

dsDNA HS Assay Kit for Qubit 操作说明书

货号: PC-90036

保存: 2-8°C保存, 一年有效期

产品简介:

常规 DNA 含量的检测方法是在 260nm (A260) 处测其吸光值。这种方法的主要缺点是核苷酸、单链核酸和蛋白质对信号的影响很大, 并且还会受到核酸制备过程中污染物的干扰, 无法区分 DNA 和 RNA, 而且这种方法不灵敏 (5µg/mL dsDNA 溶液 A260=0.1)。本试剂盒定量检测方法简单、方便, 被多家生物制品厂所选择, 成为生物制品残留 DNA 检测的标准。目前该方法已纳入 2010 年版《中国药典》

例如: Nanodrop 系列微量分光光度计是目前最常见的紫外吸光法检测样品的浓度及纯度, 由于它会检测吸光度在 260nm 处所有物质的吸光值 (如 DNA/RNA 以及降解核酸和游离核苷酸等其他杂质), 因此读数并不是十分准确。而荧光计通过荧光染料与特定目标分子结合后, 检测其荧光强度来测目标分子的浓度, 因此其定量结果一般低于 A260nm 处的读数, 但是更为准确。

重要的是准确的 DNA 定量对于后续应用至关重要。Nanodrop 系列全波长微量分光光度计无法精确测定 5ng/µL 以下的 DNA 浓度, 然而, 许多 DNA 样品又恰在这个范围之内, 在检测双链 DNA 时, 荧光计的检测极限可达 0.5pg/µL。此时, 更灵敏的荧光计似乎是个更好的选择。荧光计和相应的定量试剂盒, 能快速灵敏、精确测定 DNA 的浓度。

本试剂将被用于成本昂贵的下游实验: qPCR、PCR 克隆、转染和新一代测序等精密测定的实验, 精准定量范围 10pg/µL 至 10ng/µL。

检测原理:

绿色荧光染料与 DNA 双链结合后才会发出荧光, 无 DNA 不发荧光; 所发荧光与 DNA 浓度成正比。在 2010 年《中国药典》中提出, 本试剂盒定量 DNA 的方法检出下限约 10pg/µL, DNA 含量在 10pg/µL~10ng/µL 范围时线性较好 ($R^2 > 0.99$)。本试剂盒利用绿色 DNA 染料能够特异性结合双链 DNA, 而不与蛋白质、RNA、盐离子结合的原理, 通过激发光照射, Qubit 检测仪收集发射光, 特异的分析样品中双链 DNA 的实际含量, 能够排除样品中蛋白质、RNA、盐离子等物质的干扰, 从而对双链 DNA 进行精准的定量。

优点:

- 1) 该方法可以测定来源于任何表达宿主样品中的双链 DNA。
- 2) 可以直接定量 PCR 扩增产物而无需从反应混合物中纯化 DNA。
- 3) 远远超出传统紫外 A260 的检测方法和 Hoechst33258 的灵敏度。
- 4) 特异性检测与 Mg^{2+} 、氯化钠、醋酸钠、醋酸铵、乙醇、苯酚、氯仿、SDS、RNA、蛋白质、Triton-X100、dNTPS、BSA 等干扰物没有交叉反应。
- 5) 在等摩尔浓度 ssDNA 和 RNA 存在的条件下测定 dsDNA, 其影响很小。

所需器材:

一次性无尘手套、Qubit assay tubes (500 tubes, Life Technologies, Cat. no. Q32856) 或者 Axygen PCR-05-C tubes (VWR, part no. 10011-830); 荧光仪 (Qubit 2.0, Qubit 3.0 等荧光仪)

注意事项:

1. 检测温度: 所有检测必须在室温操作 (22-28°C);
2. 孵育时间: DNA 与工作液混合后, 反应 3min, 荧光信号在 3 个小时内都是稳定的。
3. 荧光校准: 每次使用前, 请按照批次使用校准, 以确保实时检测数据的一致性。



使用方法（仅供参考）：

一、实验准备

- 1、在使用前，将试剂盒中的各组分恢复至室温。
- 2、准备足够量 0.5 mL PCR 薄壁管并标注。请勿在 PCR 管侧壁标注，以免影响荧光信号采集。推荐使用 Qubit assay tubes (Cat. No. Q32856) 或 Axygen PCR-05-C tubes (Cat. No. 10011-830)。

二、配制检测工作液

在塑料容器中，使用 dsDNA Buffer 按比例将适量 dsDNA Reagent 稀释至 1×（例：取 1 μ L dsDNA Reagent，加入 199 μ L dsDNA Buffer），现用现配。工作液配制好后，3 小时内使用。

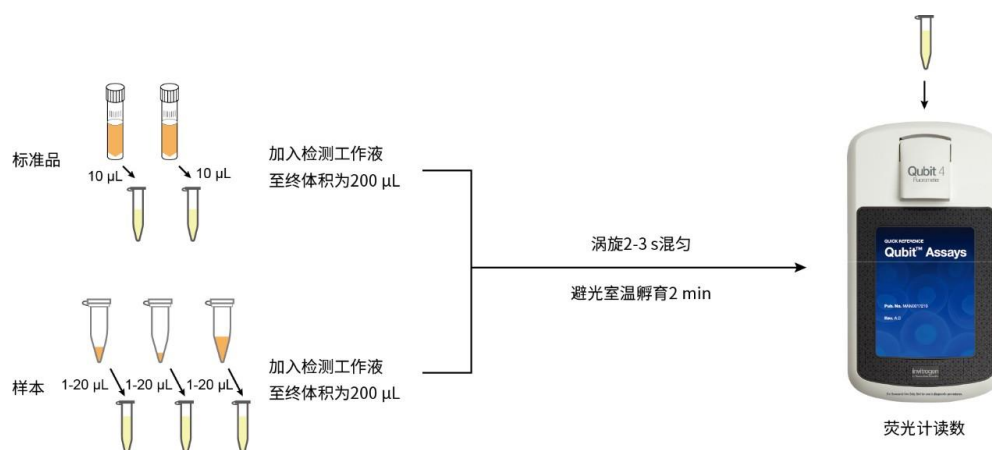
三、配制待检样品

- 1、配制待检标准品。取 190 μ L 检测工作液至标准品 PCR 管中，加入 10 μ L dsDNA Buffer（可选择不加），作为 Standard #1 空白组；再取 190 μ L 检测工作液至标准品 PCR 管中，加入 10 μ L dsDNA Standard #2（DNA 标准品），轻轻涡旋振荡 2-3 sec，尽量避免气泡产生。
- 2、配制待检样品。取 180-199 μ L 检测工作液至样本 PCR 管中，分别加入 1-20 μ L 待检样本，使 PCR 管中每个样本终体积为 200 μ L，轻轻涡旋振荡 2-3 sec，尽量避免气泡产生。

四、检测

- 1、将所有待检 PCR 管置于室温避光孵育 2 min。
- 2、按照 Qubit® 荧光仪的操作说明，选择 dsDNA High Sensitivity 检测程序测定荧光信号值。

操作流程图例：



2. Qubit® 3.0 操作步骤

- 2.1 在 Qubit® 3.0 主屏幕操作页面，选择 DNA，然后选择检测类型 dsDNA High Sensitivity。显示“Read standards”，选择 Read Standards 进行检测。
- 2.2 将装有 Standard #1 管子插入样品槽中，关闭上盖，按键 Read standard. 读取完成后(~3 seconds)，移走 Standard #1。
- 2.3 将装有 Standard #2 管子插入样品槽中，关闭上盖，按键 Read standard. 读取完成后(~3 seconds)，移走 Standard #2。
- 2.4 按键 Run samples。
- 2.5 在读取页面，选择相应的单位和体积；
 - 2.5.1 从旋转轮面板上选择+或-按钮来选择添加到试管中的样品体积（从 1 - 20 μ L）；
 - 2.5.2 从下拉菜单中选择测量样品浓度的浓度单位。
- 2.6 将装有待测样品的管子插入样品槽中，关闭上盖，按键 Read，读取完成后(~3 seconds)，移走样品，直至样品测完。

3. Qubit® 2.0 操作步骤

3.1 在 Qubit® 2.0 主屏幕操作页面，选择 DNA，然后选择检测类型 dsDNA High Sensitivity。显示“Read standards”，选择 Read Standards 进行检测。

3.2 将装有 Standard #1 的管子插入样品槽中，关闭上盖，按键 Read standard. 读取完成后(~3 seconds)，移走 Standard #1。

3.3 将装有 Standard #2 管子插入样品槽中，关闭上盖，按键 Read standard. 读取完成后(~3 seconds)，移走 Standard #2。

3.4 按键 Run samples。

3.5 将装有待测样品的管子插入样品槽中，关闭上盖，按键 Read，读取完成后(~3 seconds),移走样品，直至样品测完。

3.6 按照 200/X 公式计算管中 DNA 浓度。

样品浓度 = QF value × (QF Value :Qubit® 2.0 直接测量得到样品的结果； X:加入的样品体积)

污染物对 dsDNA 定量检测试剂盒检测结果的影响

Effect of contaminants in the Qubit ® dsDNA HS Assay, tested over a range of 1–500 ng/mL

污染物 Contaminant	10 µL 样品中的浓度 Concentration in 10 µL Sample	样品检测时浓度 Final Concentration in the assay	检测结果 Result
Salts			
Ammonium acetate	200 mM	10 mM	OK
Sodium acetate	200 mM	10 mM	OK
Sodium chloride	200 mM	10 mM	OK
Magnesium chloride	40 mM	2 mM	OK
Organic Solvents			
Phenol	2%	0.1%	OK
Ethanol	20%	1%	OK
Chloroform	4%	0.2%	OK
Detergents			
Sodium dodecyl sulfate	0.2%	0.01%	OK
Triton X-100	0.02%	0.001%	OK
Other Compounds			
Bovine serum albumin	400 µg/mL	20 µg/mL	OK
RNA	1×*	1×*	OK
dNTPs	2 mM	100 µM	OK
Polyethylene glycol	20%	1%	OK
Agarose	2%	0.1%	OK

*1×：表示含有与 dsDNA 相同浓度的 RNA。

