

СинКвант BR РНК

Набор реагентов для измерения концентрации РНК

Краткая инструкция

1. Описание набора.

1.1. Набор реагентов «СинКвант BR РНК» предназначен для измерения концентрации РНК в диапазоне от 1 нг/мкл до 1000 нг/мкл с использованием флуориметров для определения концентрации РНК, окрашенной РНК-специфичными интеркалирующими флуоресцентными красителями ($\lambda_{ex}=635\pm 10$ нм / $\lambda_{em}=670 \pm 10$ нм).

1.2. Рекомендуемый режим хранения красителя SyDye BR РНК +2°C – +25°C в тёмном месте (фольгированном пакете). Рекомендуемый температурный режим длительного (>2 недель) хранения стандартов РНК +2°C – +8°C. Допускается заморозка всех компонентов набора. После размораживания перед использованием тщательно перемешивайте каждый компонент на вортексе в течение 5 – 10 секунд. Избегайте множественных циклов оттаивания/замораживания стандартов РНК.

1.3. Перед началом измерений необходимо привести все реактивы до достижения ими температуры в помещении. Рекомендуемая температура для проведения измерений +18°C – +25°C. Колебания температуры при измерении могут влиять на точность и воспроизводимость.

- *Перед началом работ по измерению концентрации РНК, внимательно ознакомьтесь с инструкцией к данному набору и руководством к используемым приборам.*
- *Не подвергайте образец РНК, окрашенный SyDye BR РНК воздействию яркого света перед проведением измерений. Это может негативно сказаться на точности и воспроизводимости измерений.*

Компонент	E-025-100	E-025-250
Краситель SyDye BR РНК 200-кратный в ДМСО	100 мкл	250 мкл
СинКвант BR РНК стандарт#1 0 нг/мкл	200 мкл	500 мкл
СинКвант BR РНК стандарт#2 100 нг/мкл	2X100 мкл	5X100 мкл
СинКвант BR РНК буфер 1-кратный	20 мл	50 мл

Таблица 1. Состав набора.

2. Подготовка образцов и стандартов к измерению. Общие положения.

2.1. Установите в штативе необходимое количество (по числу измеряемых образцов + пробирки для стандартов) тонкостенных прозрачных пластиковых пробирок объёмом 0.5 мл или 0.2 мл согласно и рекомендациям к использованию расходных материалов в инструкции к прибору.

2.2. Сделайте отметки маркером на крышках пробирок. Не допускается размещение надписей на боковых стенках пробирок. Пометки на пробирках, содержащих стандарты РНК, должны отличаться, т.к. для успешной калибровки важен порядок измерения стандартов.

2.3. Приготовьте рабочий раствор для измерений (далее – **PP**). Раствор пригоден для использования в течение следующих 2 часов при условии содержания его в затемнённом месте. Для приготовления **PP** в нужно растворить в отдельном флаконе (и перемешать) 200-кратный

краситель SyDye BR РНК в 1-кратном буфере СинКвант BR РНК в соотношении 1:200. При этом важно приготовить **PP** в объеме достаточном для проведения всех калибровок и измерений образцов за один подход. Для расчёта необходимого общего объема **PP** можно использовать следующую формулу:

$$V_{PP} = V_{КОН} \times (2 \times (K+1) + N_{ОБР})$$

- где V_{PP} – общий объем **PP**
 $V_{КОН}$ – конечный объем готовой смеси в пробирке при измерении/калибровке (по умолчанию $V_{КОН} = 1$)
 K – число лунок, в которых будут проводиться калибровка и измерения (например, для прибора Qubit™ Fluorimeter $K = 1$, для приборов Qubit™ Flex Fluorimeter и QUBIX – K может быть числом от 1 до 8)
 $N_{ОБР}$ – число образцов РНК к измерению

Количество измерений	Краситель SyDye BR РНК	СинКвант BR РНК буфер
1	1 мкл	199 мкл
3	3 мкл	597 мкл
10	10 мкл	1990 мкл

Таблица 2. Схема приготовления рабочего раствора «PP». Пример расчёта на 1, 3 и 10 измерений в объёме 200 мкл готового раствора.

- При проведении измерения на приборах Qubit™ Fluorimeter (и аналогичных) $V_{КОН}$ должен составлять 200 мкл. Для калибровочного измерения нужно использовать 10 мкл стандарта РНК (V_{STD}). Таким образом, для одного калибровочного измерения необходимо смешать $V_{STD} = 10$ мкл стандарта и $V_{PP} = 190$ мкл предварительно подготовленного **PP**.

Количество измерений	Стандарт Онг/мкл и 100нг/мкл	Образец
Объём PP , V_{PP}	190 мкл	180–199 мкл
Объём стандарта РНК, V_{STD}	10 мкл	–
Объём образца, V	–	1 – 20 мкл
Конечный объём, $V_{КОН}$	200 мкл	200 мкл

Таблица 3. Схема приготовления готовой смеси для калибровки и измерения.

Объём образца, V	Диапазон концентраций
1.0 мкл	20–1000 нг/мкл
2.0 мкл	10–500 нг/мкл
5.0 мкл	4–200 нг/мкл
10.0 мкл	2–100 нг/мкл
20.0 мкл	1–50 нг/мкл

Таблица 4. Рекомендованные объёмы вносимого образца для измерения.

- Калибровка производится по двум точкам (стандартам РНК с концентрациями 0 и 100 нг/мкл соответственно, приготовленным в отдельных пробирках с $V_{КОН} = 200$ мкл готовой смеси в каждой). Сначала регистрируют стандарт с концентрацией 0 нг/мкл, затем 100 нг/мкл.
- Объём измеряемого образца РНК (далее – V) может составлять от 1 мкл до 20 мкл при сохранении $V_{КОН} = 200$ мкл. Образец нужно смешать с соответствующим V_{PP} от 180 мкл до 199 мкл так, чтобы конечный объём при измерении готовой смеси составлял 200 мкл. При измерении следует учитывать рекомендованные объёмы вносимого образца, которые зависят от предполагаемой концентрации РНК (таб. 4).

- 2.4. Добавьте по 10 мкл каждого стандарта в соответствующую пробирку.
- 2.5. Добавьте нужный объём каждого образца в соответствующую пробирку (1-20 мкл).
- 2.6. Встряхните пробирки на центрифуге-вортексе в течение 2-3 секунд. Осадите капли кратким центрифугированием пробирки.
- 2.7. Проследите, чтобы в растворе на дне пробирки не оставалось воздушных пузырьков и капель жидкости на стенках пробирки. При необходимости удалите их при помощи центрифугирования.
- 2.8. Полученные растворы проинкубируйте 2–3 минуты в затемнённом месте при комнатной температуре. Образцы готовы к проведению измерений в течение следующих 2 часов при условии содержания его в затемнённом месте.

3. Калибровка и измерение образцов на Qubit™ Fluorimeter.

- 3.1. Выберите режим «**RNA**», затем «**RNA Broad Range**». Выберите команду «**Read standards**». Для использования предыдущей калибровки нужно перейти к п. 4. Для новой калибровки – п. 2.
- 3.2. Установите в камеру для измерения пробирку, содержащую предварительно подготовленный стандарт РНК с концентрацией 0 нг/мкл. Закройте крышку камеры, выберите команду «**Read standard**». По окончании измерения извлеките пробирку.
- 3.3. Установите в камеру для измерения пробирку, содержащую предварительно подготовленный стандарт РНК с концентрацией 100 нг/мкл. Закройте крышку камеры, выберите команду «**Read standard**». По окончании измерения извлеките пробирку.
- 3.4. Выберите команду «**Run samples**». При помощи интерактивного меню введите значение объёма исходного раствора РНК, использованного для измерения (допустимые значения 1 µL – 20 µL).
- 3.5. Установите в камеру для измерения пробирку, содержащую подготовленный образец. Закройте крышку камеры, выберите команду «**Read tube**». По окончании измерения извлеките пробирку. Запишите измеренное значение концентрации РНК.

4. Калибровка и измерение образцов на Qubit™ Flex Fluorimeter.

- 4.1. Выберите на дисплее режим «**RNA Broad Range (BR)**». Затем выберите команду «**Read standards & run samples**». Если вы предпочитаете использовать результаты предыдущей калибровки, то нужно выбрать режим «**Run samples**» и переходить к п. 4.2 Для новой калибровки – перейти к п. 2.
- 4.2. Установите в камеру для измерения стрипованные пробирки, содержащие подготовленный стандарт РНК с концентрацией 0 нг/мкл. Закройте крышку камеры, выберите команду «**Run standards**». По окончании измерения извлеките пробирки.
- 4.3. Установите в камеру для измерения пробирки, содержащие подготовленный стандарт РНК с концентрацией 100 нг/мкл. Закройте крышку камеры, выберите команду «**Run standards**». По окончании измерения извлеките пробирки.
- 4.4. Выберите появившуюся на экране команду «**Next**». После запроса вставьте стрипованные пробирки с вашими образцами как показано на экране. Если пробирок для измерения меньше восьми, то нужно снять выделение с позиций, не содержащих образец.
- 4.5. Выберите единицы размерности концентраций образцов.

- 4.6. При помощи интерактивного меню «**Sample volume**» введите значение объёма исходного раствора РНК, использованного для измерения (допустимые значения 1 μL – 20 μL).
- 4.7. Установите в камеру для измерения пробирки, содержащие подготовленные образцы. Закройте крышку камеры, выберите команду «**Run samples**». По окончании измерения извлеките пробирки. Для измерения следующих образцов выберите команду «**Add samples**».
- 4.8. Перейдите в режим отображения результатов измерений в виде списка, сохраните измеренные значения концентрации РНК.

ООО «НПФ Синтол»

Рекламации на набор реактивов и запросы на техническую поддержку направлять по адресу: 125499, РФ, г. Москва, Кронштадтский б-р, д. 39, корп.1, пом. 1, ком. 43/PM 12-3, email: syntol@syntol.ru, www.syntol.ru
тел. +7 (495) 984-69-93 многоканальный, +7 (499) 977-74-55, +7 (495) 506-79-97