

Stanovení koncentrace DNA a RNA pomocí mikrofluorometru

Materiál:

- Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kit, Quant-iT™ ssDNA BR Assay Kit, Quant-iT™ RNA Assay Kit
- Standardy dsDNA, ssDNA a RNA
- Vzorek dsDNA, ssDNA a RNA o neznámé koncentraci
- Real-time PCR mikrozkušavky
- Mikrofluorometr Qubit™ (Invitrogen)

Postup:

1. Připravte si cca 1 ml Working solution smícháním Quant-iT™ reagent a Quant-iT™ buffer v poměru 1:200 zvlášť pro ssDNA, dsDNA a RNA
2. Připravte standardy smícháním 190 μ l Working solution + 10 μ l příslušného standardu #1 a #2
3. Připravte vzorek o neznámé koncentraci ve dvou mikrozkušavkách smícháním 195 μ l Working solution + 5 μ l vzorku
4. Standardy i vzorky krátce promíchat na vortexu (2-3 sec), opatrně - ve vzorku nesmí být bublinky!!
5. Inkubace 5-10 minut při laboratorní teplotě
6. Zapnout Qbit fluorometr, vybrat příslušnou metodu, nová kalibrace (standardy), poté změřit neznámý vzorek (2 x 3 měření)
7. Jaké jsou koncentrace neznámých vzorků?

Pozn.: Měření by mělo probíhat za laboratorní teploty (22- 28°C). Teplota vzorků by měla být stejná, proto nedržte zkumavku se vzorkem před měřením dlouho v ruce, po každém měření zkumavku ihned vytáhněte z přístroje a mezi jednotlivými měřeními ji ponechte inkubovat alespoň 30 sec při laboratorní teplotě.

