

产品说明书

产品名称: WonderBlue® High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit

产品货号: BN12011

产品规格: 200T, 1000T

储存条件

4°C 避光保存, 推荐条件下可储存 6 个月。

产品内容

组分	200T	1000T
A (WonderBlue® High Sensitivity dsDNA Quantitation Solution)	50 mL	250 mL
B (WonderBlue® High Sensitivity dsDNA Enhancer, 100×)	0.5 mL	2.5 mL
C (dsDNA Standards in 10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 2 mM sodium azide, 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 and 10 ng/μL dsDNA from calf thymus)	每组 0.1 mL (8 组)	每组 0.5 mL (8 组)

产品参数

Ex/Em: 485/530 nm (结合 dsDNA), 图 1 是 WonderBlue® 的光谱图。

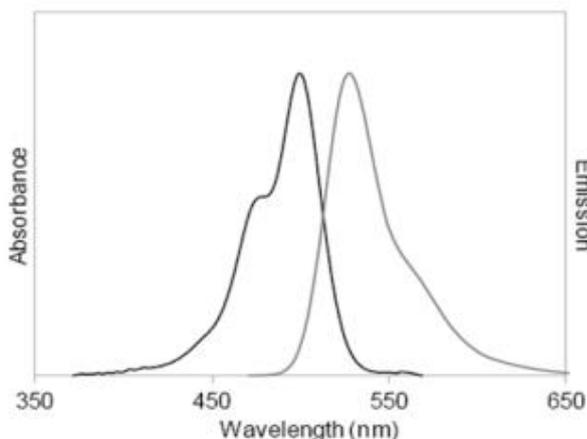


图 1. 在 dsDNA 过饱和的条件下, WonderBlue® 的激发与发射光谱图。

产品介绍

WonderBlue® dsDNA 定量试剂盒 (WonderBlue® High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit) 不同于常规的基于吸光度的测量, 这款试剂盒可以区分 dsDNA、ssDNA 或 RNA, 有选择性地检测 dsDNA (见图 2)。与传统 DNA 定量方法相比, 该产品具有检测范围广、高灵敏度、高特异性等优点。试剂盒主要包含 WonderBlue® High Sensitivity dsDNA Quantitation Buffer, Enhancer solution 以及 pre-diluted dsDNA Standards 三个组分, 可以在 200 μL 体系内定量 0.2-100 ng 的 dsDNA (见图 3)。此外, 试剂盒还可以将其他污染物的影响降低至最低, 可以耐受常规污染物例如蛋白质, 盐, 有机溶剂和洗涤剂 (见表 1), 该试剂盒不具有细胞膜通透性, 没有细胞毒性和诱发突变性, 对人体安全无害。

使用方法

1. 为了得到最佳结果, 请使用精确校准的移液器和去 RNA 酶的枪头、试管以及检测板。建议检测时每个 DNA 标样和未知样品都设定 3 个复孔。如果检测时不只一块 96 孔板, 建议每块 96 孔板都设定一条标准曲线, 尽量减少检测板之间的误差。
2. 使用前, 将产品从储存条件下取出恢复至室温。如果 100× Enhancer 储存液出现沉淀, 可以 37°C 水浴溶解。每个组分应充分震荡或涡旋混匀、离心, 以免造成不必要的试剂的损耗。
3. 每个待测样品对应 200 μL 的 WonderBlue 工作液。对于一个 96 孔板, 吸取 200 μL 100× Enhancer, 加入到 20 mL Quantitation Solution 中, 涡旋混匀, 配置成 WonderBlue® 工作液, 为得到最佳结果, 工作液应在一小时内使用完毕。如果将工作液重新储存并在 24 h 内使用, 结果的准确性会

有轻微损失。储存过程中，增强液可能会出现沉淀现象，可以通过涡旋震荡使其重悬。

4. 对于每个样品，吸取 200 μL 的工作液至黑色的 96 孔板微孔中。为确保结果精确可靠，建议每个测试样品和 DNA 标样分别做平行的 3 个复孔，此过程也可以使用有精确量程的移液排枪进行。黑色的检测板可以减少各测试样品间的荧光干扰。

5. 在 96 孔板微孔中，每孔加入 10 μL 的 dsDNA 标样或 1-20 μl 未知样品，并用移液器轻轻混匀。

6. 将微孔板室温避光孵育 5-10 min，为得到最佳结果，孵育结束后，应立即读取检测板。也可以在 6 h 内读取数据，但结果的精确性会有轻微损失。

7. 使用激发波长和发射波长在 485 nm 和 530 nm 处的酶标仪测量荧光值。

8. 制作一条标准曲线，计算检测样品的 DNA 浓度(见图 2)。

注：图 3 标准曲线仅供参考，您可以根据实际测得的数据自制标准曲线，从而求算样品的浓度。

实验参考因素

1. 对于要检测的植物或动物来源的 DNA 样本，小牛胸腺 DNA (Calf thymus DNA) 常常作为制作 DNA 标样的参照物。因为 Calf thymus DNA 具有双链结构、高度聚合，碱基分配均匀 (AT 含量 58%，GC 42%)。如果检测样品的荧光值超过了标准曲线，那么需要将样品做进一步稀释处理。为了保持结果的一致性，务必使每孔上样量均等，且不含有其他高浓度的污染物。

2. WonderBlue® High Sensitivity dsDNA 定量试剂盒可以测量范围在 0.2-100 ng 的 dsDNA。对于一些不需要线性检测的样品，试剂盒检测范围可以扩展至 200 ng。如需检测更低含量的样品，您可以将 DNA 标样用 1 \times TE 缓冲液作进一步的稀释，浓度可以稀释到 0.02 ng/ μL ，然后按照常规程序每

孔 10 μL 上样。

3. 对于不同种类的检测仪器，您可以优化仪器设置，以获取最佳线性度。一些可能会影响最终线性度和相对荧光强度的因素有：(1) 激发和发射波长与带宽；(2) 截止型滤波器；(3) 灵敏度设置；(4) 移液的准确性；(5) 微孔板制造商。

4. 表 1 详细列出了几种常见的 DNA 污染物，如盐、溶剂、洗涤剂和蛋白质等 (见第 3 页)。

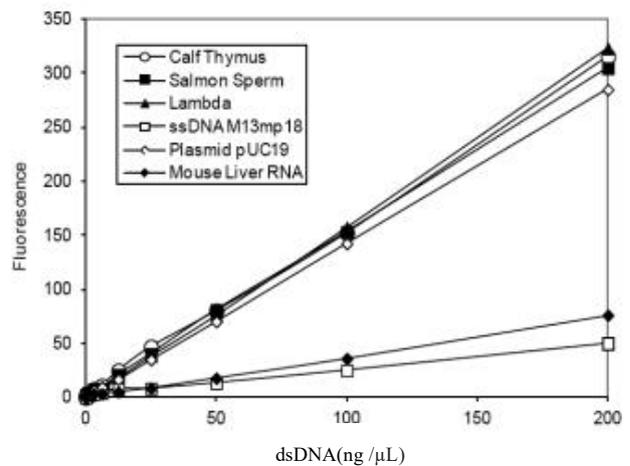


图 2. 使用 WonderBlue® High Sensitivity dsDNA 定量试剂盒检测不同类型核酸得到的相对荧光强度。

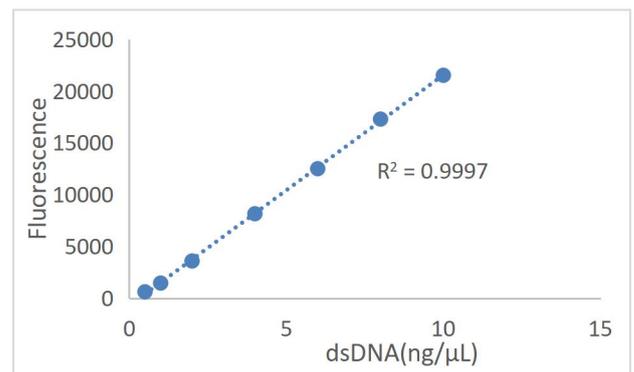


图 3. 使用 WonderBlue® Hig Sensitivity dsDNA 定量试剂盒制作的 calf thymus DNA 标准曲线 (Ex/Em 485/530)，左上角插图显示了低浓度 DNA 样本测定的曲线图。

表 1. 常见的 DNA 污染物对 WonderBlue® High Sensitivity dsDNA 定量试剂盒的影响

复合物	初始浓度	终浓度(200µL)	结果
醋酸铵	100 mM	5 mM	Pass
醋酸钠	600 mM	30 mM	Pass
氯化钠	200 mM	10 mM	Pass
氯化镁	25 mM	1.25 mM	Pass
苯酚	2 %	0.10 %	Pass
乙醇	10 %	0.5 %	Pass
氯仿	2 %	0.1 %	Pass
十二烷基硫酸钠 (SDS)	0.2 %	0.01 %	Pass
Triton X-100	0.2 %	0.01 %	Pass
牛血清白蛋白 (BSA)	200 mg/mL	10 mg/mL	Pass*
dNTPs**	2 mM	100 µM	Pass
聚乙二醇	40 %	2 %	
琼脂糖	2 %	0.1 %	

三份 dsDNA 平行样品的标准曲线，分别在上述含有指定浓度污染物的条件下（初始浓度进行检测，“Pass”指与没有污染物的体系相比较，实验结果变化范围<20%。所有样品用 Molecular Devices Gemini XS 酶标仪在 485 nm 处激发，在 530 nm 处测荧光强度。“Pass*”指由此条件测得的标准曲线有少许变动。“dNTPs**”指 dATP, dCTP, dGTP, dTTP 的混合物。