

Måling af DNA-koncentration med Qubit4-fluorimeter

Tidsforbrug

20 minutter, der kan opstå kø ved aflæsning, som dog ikke tager lang tid.
Standarderne kan evt. forberedes og maskinen kalibreres fælles for alle grupper.

Princip

DNA-koncentrationen kan måles med et Qubit4-fluorimeter. DNA farves med et fluorescerende farvestof. Fluorescensen aflæses i et fluorimeter. Indenfor et bestemt interval vil der være en lineær sammenhæng mellem den målte lysintensitet og DNA-koncentrationen. Før målingen bestemmes derfor en standardkurve ved hjælp af to DNA-standarder, dvs. DNA-prøver med en kendt koncentration. Ved hjælp af forskriften for standardkurven kan apparatet bestemme koncentrationen af prøverne. Her anvendes testkittet High sensitivity (HS dsDNA). Der kan også anvendes andre kits.

Materialer

- Qubit4 fluorimeter, se figur 1.
- 0,5 mL klare plastic-prøverør (følger med HS-dsDNA-kittet). Der anvendes 1 rør per prøve + 2 til DNA-standarder. Der kan laves fælles standarder for klassen, det er nok at nulstille apparatet én gang for hele klassen.
- DNA-standard #1 og standard #2 (Components B og C)
- Qubit™ 1X dsDNA HS Arbejdsopløsning (Working Solution, Component A), som indeholder en buffer og DNA-farvestof.
- Mikropipetter med spidser (1, 5, 10, 190, 195, 500, 1000 μ L)

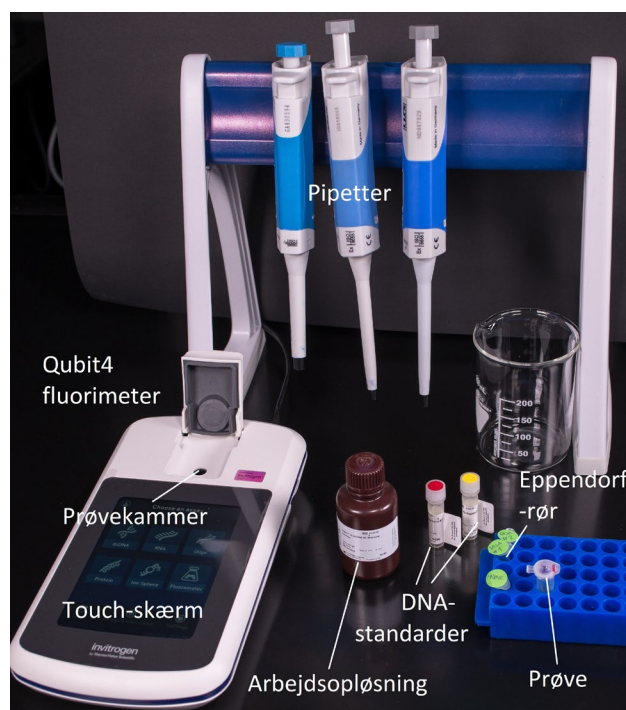


Foto: Andreas Vedel

Fremgangsmåde

Sikkerhed: Brug handsker! Reagens A bindes til DNA og kan potentielt være mutagent. Skift pipettespids mellem hver afpipettering. Hold orden og opsaml pipettespids ol. i affaldsglasset.

	Rør	Volumen	
Fælles for hele klassen	DNA-standard #1	190 μ L Arbejdsopløsning (Component A)	10 μ L DNA-standard #1
	DNA-standard #2	190 μ L Arbejdsopløsning (Component A)	10 μ L DNA-standard #2
Per gruppe	Prøve	199 μ L Arbejdsopløsning (Component A)	1 μ L Prøve

De fælles standarder for klassen:

1. Mærk to rør på låget (!) henholdsvis #1 og #2. Der må ikke skrives på rørenes sider!

Tekst: Kresten Cæsar Torp.

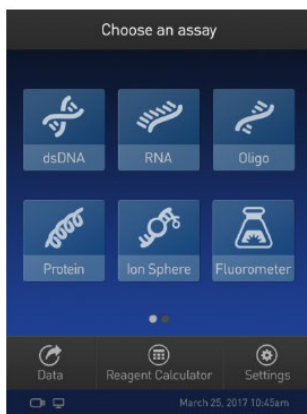
2. Afpippeter 190 μ L arbejdsopløsning til de to rør for standard #1 og standard #2, som vist i skemaet ovenfor.
3. Tilsæt 10 μ L DNA-standard #1 til rør #1 og 10 μ L DNA-standard #2 til rør #2.
4. Vortex prøverne i 2-3 sek.
5. Lad prøverne hvile i 2 min. De er nu stabile for måling i ca. 3 timer.

Gruppens prøver:

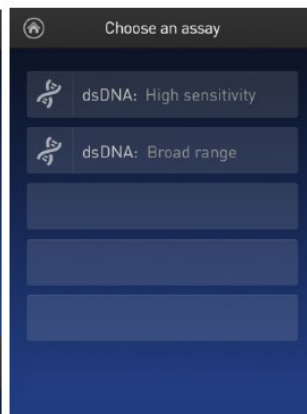
1. Mærk et rør på låget (!) til hver af gruppens prøver. Der må ikke skrives på rørens sider!
2. Tilsæt 199 μ L arbejdsopløsning til hvert rør med prøve, som vist i skemaet ovenfor.
3. Tilsæt 1 μ L prøve til hvert rør med prøve (og 10 μ L DNA-standard #1 og #2 til hvert af DNA-standardrørene).
4. Vortex prøverne 2-3 sek.
5. Lad prøverne hvile i 2 min. De er nu stabile for måling i ca. 3 timer.

Måling med Qubit:

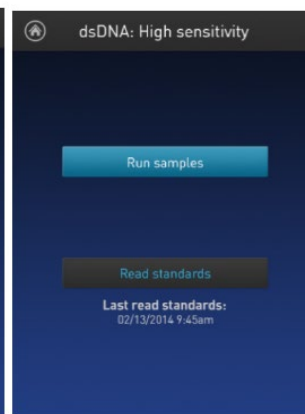
6. På skærmen vælges 'dsDNA', se figur 2.
7. Vælg '1X High Sensitivity', se figur 3.



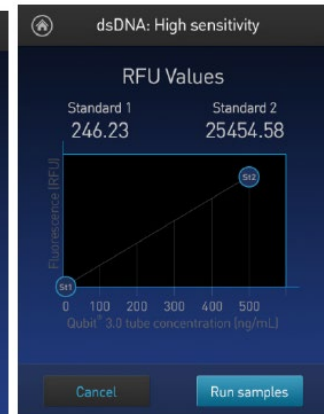
Figur 2.



Figur 3.



Figur 4.

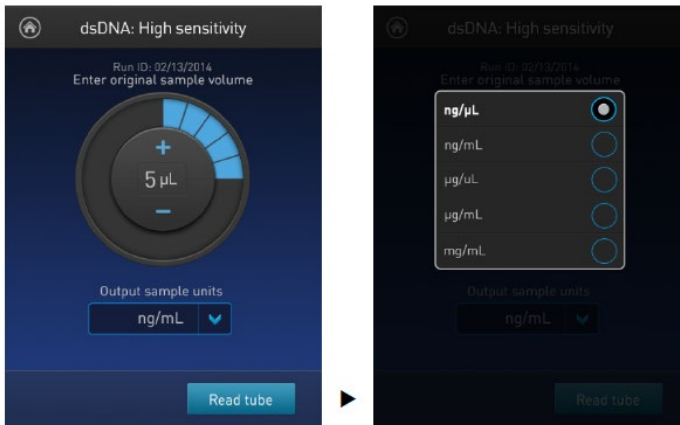


Figur 5.

Fotos fra Invitrogen Qubit 4 protokol

Hvis der skal nulstilles med DNA-standarder:

8. Vælg 'Read Standards', se figur 4. Følg instruktionen på skærmen og sæt standard #1 og #2 i prøvekommeret og luk låget. Tryk 'Read standard' På skærmen kan standardkurven ses, se figur 5.



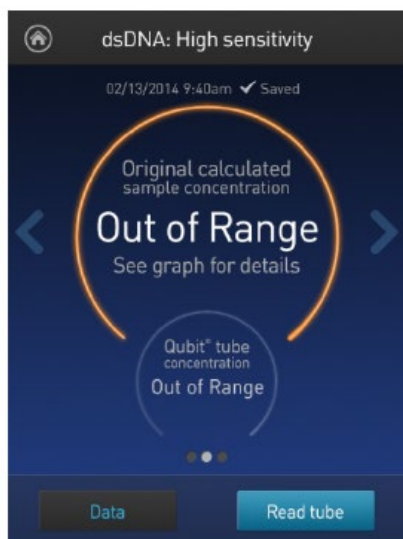
Figur 6. Fotos fra Invitrogen Qubit 4 protokol.

Måling af prøver:

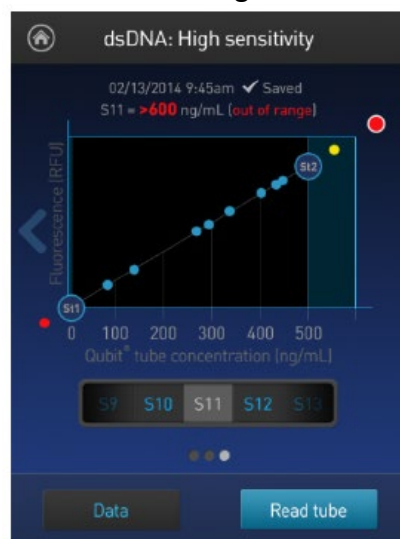
8. Vælg 'Run samples', se figur 4.
9. Indstil prøvolumen fx til 1 µL ved at skrue op eller ned for "original sample volumen" (touch).
10. Vælg output-enhed, fx ng/µL.
11. Sæt prøverøret i prøvekammeret og luk låget.
12. Tryk 'Read tube'.

'Out of range'

Prøvens DNA-koncentration kan være udenfor range. I så fald forberedes en ny prøve:



Figur 7



Figur 8

Fotos fra Invitrogen Qubit 4 protokol

13. Swipe til højre og se på næste skærmbillede, om koncentrationen er for høj eller for lav, se figur 8. Prøven ses som en rød markering. I eksemplet er den for høj.
14. Vælg et nyt volumen mellem 1 og 20 µL eller fortynd evt. prøven 1:10.
15. Mærk et nyt rør.

Tekst: Kresten Cæsar Torp.

16. Afpipetter arbejdsopløsning til røret, så arbejdsopløsning + det nye prøvevolumen giver et totalvolumen på 200 μL .
17. Tilsæt prøve
18. Vortex 2-3 sek.
19. Lad prøven hvile 2 minutter.
20. Aflæs den nye prøve.