



**Набор реагентов для измерения
концентрации ДНК на флуориметре Qubit
«Spectra Q BR»**

#spectrabr-100

#spectrabr-500

#spectrabr-1000

Инструкция по применению

1. Назначение

1.1. Полное название

Набор реагентов для измерения концентрации ДНК на флуориметре Qubit (ThermoFisher, США), с использованием программы «dsDNA» → «Broad Range» - Spectra Q BR.

1.2. Назначение

Набор реагентов «Spectra Q BR» Raissol[™] предназначен для измерения концентрации двухцепочечной ДНК в растворах в интервале 2 – 1000 нг/мкл.

1.3. Область применения

Набор для измерения концентрации ДНК «Spectra Q BR» может быть использован в научных лабораторных центрах и институтах, исследовательских лабораториях, для точного измерения концентрации двухцепочечной ДНК в растворах с помощью флуориметра Qubit с целью последующих исследований с применением разных техник ПЦР, ферментативной подготовки геномных библиотек и секвенирования. Только для научных исследований.

1.4. Принцип действия

Краситель Spectra Q BR, являясь интеркалятором, связывается с двухцепочечной ДНК. Интеркалятор возбуждается лазером, детектируется флуоресценция прибором Qubit, после чего прибор автоматически рассчитывает концентрацию относительно стандартов и выводит значение на экран.

2. Характеристика набора

Компоненты набора являются одноразовыми. Набор реагентов «Spectra Q BR» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1. Состав набора

Набор реагентов «Spectra Q BR» рассчитан на 100, 500 или 1000 измерений, включая стандартные контроли для калибровки прибора Qubit.

№	Реагент/вспомогательный материал	Описание	#spectrabr-100		#spectrabr-500		#spectrabr-1000	
			Объем, мл	Кол-во, шт.	Объем, мл	Кол-во, шт.	Объем, мл	Кол-во, шт.
1	Spectra Q BR dye	Жидкость без посторонних примесей и включений, красного цвета, с невыраженным сероподобным запахом	0,1	1	0,5	1	1	1
2	Spectra Q BR buffer	Бесцветная прозрачная жидкость без посторонних примесей и включений, без запаха	20	1	100	1	200	1
3	Standard 1	Бесцветная прозрачная жидкость без посторонних примесей и включений, без запаха	0,1	1	0,5	1	1	1
4	Standard 2	Бесцветная прозрачная жидкость без посторонних примесей и включений, без запаха	0,1	1	0,5	1	1	1

Концентрация нуклеиновой кислоты Standard 1 и Standard 2 – 0 нг/мкл и 100 нг/мкл, соответственно.

3. Меры предосторожности при работе с набором

Работу проводят в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Потенциальный риск применения набора – класс 2а. Необходимо одновременное обеспечение и соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами исследуемых проб, помещений и оборудования.

3.1. Необходимость обучения персонала

Для работы с данным набором реагентов необходимо участие специалиста с высшим/средним медицинским или биологическим образованием. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

3.2. Меры безопасности

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают при должном использовании.

При работе с набором следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

Избегать контакта компонентов набора с кожей, глазами, слизистыми оболочками и одеждой. При попадании промыть большим количеством воды в течение нескольких минут. При приеме внутрь немедленно обратиться за медицинской помощью.

4. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

Работу с набором следует проводить в боксе для стерильных работ с ДНК-пробами (например, бокс абактериальной воздушной среды БАВнп-01 – «Ламинар-С» – 1,8, ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 2 (МУ 1.3.2569-09).

4.1. Дозирующие устройства

Набор автоматических дозаторов переменного объема на 2-20 мкл, 20-200 мкл и 100-1000 мкл.

4.2. Другое используемое оборудование

- Вортекс (например, Biosan Microspin FV-2400);
- флуориметр Qubit (ThermoFisher Scientific, США);
- штатив для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5-2 мл;
- штатив для пробирок объемом 0,5 мл;
- штатив для дозаторов переменного объема;
- холодильник от +2 до +8°C (для хранения стандартов).

4.3. Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и пробирок.

4.4. Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

- микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 или 2 мл;
- прозрачные тонкостенные пробирки объемом 0,5 мл без градуировки (например, Qubit[™] Assay Tubes, Invitrogen);

- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 20 мкл;
- одноразовые медицинские халаты и одноразовые медицинские перчатки;
- комплект средств для обработки рабочего места.

5. Анализируемые пробы

5.1. Предварительная подготовка биологического материала

Замороженные образцы необходимо разморозить и перемешать на вортексе. Проба должна быть прозрачная, без видимых примесей. При наличии твердых примесей, необходимо центрифугировать образец на скоростной центрифуге и использовать прозрачный супернатант. В случае предполагаемых высоких концентраций образца необходимо развести образец в 2-10 раз, с последующим перерасчетом полученных концентраций на параметр разведения.

5.2. Условия транспортировки и возможного хранения анализируемых проб

Хранение образцов ДНК в стандартном буфере TE:

- при комнатной температуре – в течение суток;
- при температуре от +2 до +8 °С – в течение 4 суток;
- при температуре от -24 до -16 °С – в течение 1 года;
- при температуре не выше -68 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

6. Проведение процедуры измерения концентрации двухцепочечной ДНК

1. Приготовить мастер-микс на необходимое количество реакций из расчета:

Название реагента	мкл на 1 реакцию
Spectra Q BR dye	1
Spectra Q BR buffer	199

2. Приготовить стандарты в тонкостенных прозрачных пробирках: Standard 1 – 10 мкл первого стандарта разводятся в 190 мкл мастер-микса; Standard 2 – 10 мкл второго стандарта разводятся в 190 мкл мастер-микса.
3. Подготовить образцы: в отдельную тонкостенную прозрачную пробирку вносится 200- $V_{обр}$ мкл мастер-микса и $V_{обр}$ мкл анализируемого образца (варьируется от 1 до 10 мкл). Например, при измерении пробы $V_{обр}=2$ мкл в пробирку вносится $200-2=198$ мкл мастер-микса и 2 мкл измеряемой пробы.
4. Все образцы и стандарты перемешать на вортексе. Сбросить капли со стенок с помощью кратковременного центрифугирования.
5. На флуориметре Qubit выбрать методы «dsDNA».
6. В открывшемся меню выбрать программу «Broad Range».
7. Пред измерением откалибровать прибор, нажав кнопку «Read standards». Поочередно измерить сначала 1-й стандарт, затем 2-й.
8. После замера обоих стандартов нажать кнопку «Run samples». Установить объем образца, в зависимости от того, какой объем образца вносился в пробирку.
9. Последовательно измерить концентрации образцов.

Важно! Интеркалятор Spectra Q BR dye имеет средство к РНК в 10 раз ниже, чем к ДНК.

6.1. Возможные трудности при измерении концентрации двухцепочечной ДНК

Проблема	Возможная причина	Описание решения
Калибровка по имеющимся стандартам проходит с выведением сообщения об ошибке	Было взято несоответствующее количество стандарта	Приготовить и замерить стандарты повторно

7. Условия хранения, транспортировки и эксплуатации

7.1. Условия хранения

Spectra Q BR buffer может храниться при температуре от +4°C до +25°C в течение 12 месяцев с даты выпуска изготовителя.

Интеркалятор **Spectra Q BR dye** можно хранить при комнатной температуре в недоступном для света месте в течение 12 месяцев. При долгосрочном хранении интеркалятор должен храниться при температуре от -20°C до +4°C в недоступном для света месте в течение 12 месяцев и более. Интеркалятор **Spectra Q BR dye** может замерзнуть при хранении от +2°C до +8°C.

Standard 1 и **Standard 2** необходимо хранить при температуре от +2°C до +8°C в течение 12 месяцев, не допуская замораживания.

7.2. Условия транспортировки

Транспортировка интеркалятора **Spectra Q BR dye** и буфера **Spectra Q BR buffer** может производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от +4°C до +25°C.

Транспортировка **Standard 1** и **Standard 2** должна производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от +4°C до +8°C. Допускается кратковременное повышение температуры хранения (транспортировки) от +4°C до +25°C не более 5 суток.

7.3. Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ШББ собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в специально предназначенное вспомогательное помещение (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей инактивации согласно требованиям СанПиН 2.1.7.2790-10. Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу Г, как токсикологически опасные отходы 1-4 классов опасности (СанПиН 2.1.7.2790-10).

7.4. Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортировки, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов направлять на предприятие-изготовитель ООО «Сесана» (107014, г. Москва, ул. Короленко, 8, email: sales@sesana.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и лабораторных работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ООО «Сесана» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию в соответствии с действующим законодательством.