

PicoGreen dsDNA 定量检测试剂盒说明书

货号: AC13850

规格: 2000T

保存: 4℃避光保存, 有效期 1 年。

产品内容:

名称	规格	保存
PicoGreen component-A(200×in DMSO)	1mL	4℃避光保存
PicoGreen component-B(TE buffer)	200mL	4℃避光保存
PicoGreen component-C(Calf ThymusDNA)	1mL	4℃避光保存

产品说明:

在分子生物学的试验过程中, PicoGreen dsDNA 定量试剂盒是荧光检测双链 DNA 并进行定量的一种产品, 这种方法非常灵敏。常用于分子生物学技术中的: cDNA 文库的构建; 用于亚克隆的 DNA 片段纯化及应用, 比如进行 DNA 定量、产物扩增和引物的进一步检测。疫苗是现代疾病预防中常用的控制方式。如今许多疫苗是细胞培养疫苗, 比如重组乙肝疫苗、狂犬病疫苗等大多数疫苗都采用细胞培养的方法生产。其中, 疫苗的纯化是关键问题, 我们需要尽可能的去除宿主细胞 DNA 和宿主蛋白。假若宿主细胞的 DNA 和蛋白同疫苗一起注入人体将会产生不可预料的后果。

常规的 DNA 含量的检测方法是在 260nm (A₂₆₀) 处测其吸光值。这种方法的主要缺点是核苷酸、单链核酸和蛋白质对信号的影响很大, 并且还会受到核酸制备过程中污染物的干扰, 无法区分 DNA 和 RNA, 而且这种方法不灵敏 (5μg/mL dsDNA 溶液 A₂₆₀=0.1)。PicoGreen 定量检测方法简单、方便, 被多家生物制品厂所选择, 成为生物制品残留 DNA 检测的标准。

PicoGreen 与 DNA 双链结合后才发出的荧光, 无 DNA 不发荧光; 所发荧光与 DNA 浓度成正比。在 2010 年《中国药典》中提出, PicoGreen 定量 DNA 的方法检出限约 0.3ng/mL, DNA 含量在 1.25-80ng/mL 范围时线性较好(R²>0.99)。

优点:

- 1、该方法可以测定来源于任何表达宿主样品中的双链 DNA。
- 2、可以直接定量 PCR 扩增产物而无需从反应混合物中纯化 DNA。
- 3、远远超出传统紫外 A₂₆₀ 的检测方法和 Hoechst33258 的灵敏度。
- 4、较高浓度的盐, 尿素, 乙醇, 氯仿, 去垢剂, 蛋白或琼脂糖对测定无影响。
- 5、在等摩尔浓度 ssDNA 和 RNA 存在的条件下测定 dsDNA, 其影响很小。

所需器材:

微型荧光计; 微量检测皿适配器; 1cm 石英比色皿

试剂制备:

PicoGreen dsDNA 定量试剂是以 1mL 的浓缩液形式保存在无水的 DMSO (二甲基亚砷) 中。实验当天, 配制 1X PicoGreen 试剂的工作溶液, 用 TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.5) 按 1:200 的比例稀释 PicoGreen component-A 浓缩液。由于试剂容易吸附到玻璃表面, 要在塑料容器中

配制。PicoGreen 试剂见光易降解，所以应将配好的溶液用箔包住或放置暗处避光保存。溶液最好在配制好数小时内使用，以保证最佳结果。注意：TE buffer 是 1×TE buffer。

实验方法：

1)、标准品工作液的配制：

Sigma 小牛胸腺嘧啶 DNA 干粉 1mg (Tris, Nacl 等浓度已成标准体系)，加入 1 mL 双蒸水，配制成 1 mg/mL 的标准品工作液；

2)、染料工作液的配置：

5 μ L PicoGreen 加入 1 mL TE buffer(注意：用 TE buffer 将 PicoGreen 稀释 200 倍，现用现配，注意避光)。

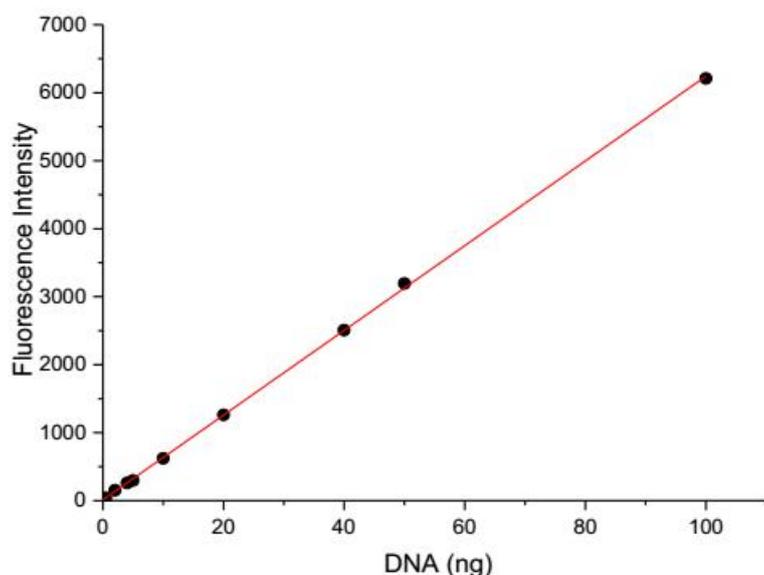
3)、标准品工作液稀释：

1、母液稀释：取 10 μ L (1 mg/mL)标准品工作液加入到 990 μ L TE buffer 溶液中，浓度稀释成 10 μ g/mL，取 10 μ L (10 μ g/mL) 标准品工作液加入到 990 μ L TE buffer 溶液中，浓度稀释成 100 ng/mL；

2、倍比稀释：取 800 μ L (100 ng/mL) 的标准品工作液加入到 200 μ L TE buffer 溶液中，浓度达到 80 ng/mL (药典规定：荧光染色方法 DNA 含量在 1.25-80 ng/mL 范围线性较好，该法 DNA 检出限为 0.3 ng/mL)，取 500 μ L (80 ng/mL) 的标准品工作液加入到 500 μ L TE buffer 溶液中，浓度稀释到 40 ng/mL；依次倍比稀释，配成 20 ng/mL、10 ng/mL、5.0 ng/mL、2.5 ng/mL、1.25 ng/mL、0.625 ng/mL 的标准品溶液；

4)、标准曲线的制备：倍比稀释后的各梯度标准品溶液和染料工作液各取 100uL 混匀，避光室温放置 5min。使用荧光仪检测样品的荧光值：将混合后的溶液加入微量比色皿，确信不要在样品中引入气泡，轻轻地弹微量检测皿的外部，可以驱散气泡。以 TE buffer 缓冲液为 blank，激发波长 488nm，发射波长 520nm，测定样品和空白对照的荧光值；用标准品溶液的浓度 (ng/mL) 对应的荧光强度作直线回归，制备标准曲线。

待测 DNA 最终浓度(ng/mL)	100	50	40	20	10	5	4	2	0.5	0
荧光读值	6210	3195	2507	1261	620.8	298	258.8	152	43.8	0.72



5)、测量样品的荧光值。荧光计将给出一个直接的浓度读数，数据可以用来产生 DNA 浓度的标准曲线。