

PicaGreen dsDNA 定量检测试剂盒

PicaGreen dsDNA Assay Kit

货号: C6030

规格: 10×100ul (2000T)

试剂组成:

试剂	组分	含量	保存条件	保存期
试剂 A	PicaGreen 试剂	1ml solution in DMSO (200×)	2-8℃避光	半年
试剂 B	TE buffer	50ml	室温保存	
试剂 C	小牛胸腺 DNA	1ml, 1ug/ml in TE buffer	2-8℃保存	

简介: 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。 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。

目前该方法已纳入 2010 年版《中国药典》

原理: 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($R^2 > 0.99$).

操作步骤:

1、试剂制备

PicaGreen dsDNA (Component A)(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 2XPicoGreen 试剂的操作溶液, 用 1xTE (Component B) 按 1:200 的比例稀释浓缩液。如果要准备足够的操作溶液测定 20 个样品, 可在 20mL1x TE (Component B) 中加入 100μLPicaGreen dsDNA (Component A) 定量试剂。由于试剂容易吸附到玻璃表面, 要在塑料容器中配制。PicaGreen 试剂 (Component A) 见光易降解, 所以应将配好的溶液用锡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。

2、DNA 标准曲线

2.1 预备 1μg/mLdsDNA (Component c) 或贮存液于 1x TE 中。根据在 1cm 光程长度的比

色杯中 A260nm 时的吸光度确定 DNA 浓度；相应于 $\mu\text{g/mL}$ dsDNA 溶液 $A_{260}=0.02$ 。尽管任何纯化的 dsDNA 制剂都可用来做标准曲线，但常用的是小牛胸腺 DNA。最好用跟被检测的样品相似的 DNA 做标准曲线，用或长或短的线型 DNA 片段测定相近大小的酶切片段；质粒用于测定质粒 DNA。然而大部分线状 dsDNA 分子，不管其片段长度大小，都会产生大致相等的信号。PicaGreen 试剂测定法在通常污染核酸试剂的几种复合物存在的条件下仍能保持线状，尽管信号强度可能受到影响。因此，为了得到有效的对照处理，被用来做标准曲线的 dsDNA 溶液要用和实验样品相同的方式来处理，并且应该包含相同的可能存在的污染物。

2.2 要产生从 0.5ng/mL 到 500ng/mL（见表 1）单重复 8 个点的标准曲线，在 2X 终浓度下配制一系列的 DNA 溶液，混合相同体积的 2XDNA 和 2XPicaGreen 操作溶液，放入 10×10mm 比色杯中。混合相同体积的 1XTE 和 2XPicaGreen 操作溶液以备空白对照。避光于室温下放置 2-5 分钟。

2×DNA 溶液浓度 (ng/ml)	2×DNA 溶液的体积 (ml)	2×PicaGreen 溶液的体积 (ml)	PicaGreen 试剂测定中 DNA 的终浓度 (ng/ml)
1000	1	1	500
200	1	1	100
50	1	1	25
20	1	1	10
5	1	1	2.5
2	1	1	1
1	1	1	0.5
0	1	1	空白

表 1: 用 10×10mm 比色杯时 DNA 标准曲线

2.4 孵育后用合适的荧光计测量样品荧光值。选择蓝色激发光，用荧光值最大的样品校正仪器。

2.5 测量剩余样品的荧光值。不同的微型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，下面以 TBS-380 微型荧光计为例。

3、样品分析

3.1 用 1X TE 稀释未知 DNA 样品至需要的体积（10×10mm 比色杯需 1.0mL，微量检测皿需 25-100 μL ）。对样品高度稀释可以确保任何污染物都被最大限度地冲淡。然而也要避免取样体积太小而无法精确吸取的情况。去除样品中 RNA 和 ssDNA 参照 4 部分。

3.2 在每个样品中加入 2XPicaGreen 试剂的操作溶液（3.1 节准备），混合好，将混合物移入合适的比色杯，避光于室温下放置 2-5 分钟。

3.3 可以对样品进行不同的稀释处理重复测定以确保结果的准确性。

4、去除样品中单链核苷酸

当 ssDNA 与 dsDNA 等摩尔浓度时，后者的测定受前者的干扰很小。前者浓度 10 倍于后者时，对荧光信号的干扰也不过 10%。但当 DNA 浓度低时，ssDNA 能产生较大干扰在高浓度时，由 RNA 结合 PicaGreen 试剂产生的荧光值用 RNA 酶处理样品可消除。RNA 酶 A、酶 T1 结合核酸酶 S1 能除去所有单链核酸，从而保证样品荧光值是由 dsDNA 产生。(具体做法请查阅相关的参考文献)

参考文献：

- [1] Nucleic Acids Res. 24, 2623 (1996)
- [2] BioTechniques 21, 372 (1996)
- [3] BioTechniques 21, 664 (1996)
- [4] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 6091 (1996)
- [5] Anal. Biochem. 102, 344 (1980)
- [6] Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, J. Sambrook, E.F.Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)