

M5 Pic5Green dsDNA Assay Kit 使用说明书

Product	Unit	Cat.#
M5 Pic5Green dsDNA Assay Kit	100 μ L	MF620-01
M5 Pic5Green dsDNA Assay Kit	5x100 μ L	MF620-05
M5 Pic5Green dsDNA Assay Kit	10x100 μ L	MF620-10

【Storage】： Shipped and stored at 4°C, Protected from light (避光) .

【产品组分】：

	MF620-01	MF620-05	MF620-10
Component A: Pic5Green dsDNA HS Reagent 200x in DMSO	100 μ l	5x100 μ l	10x100 μ l
Component B: dsDNA HS Buffer (0 ng/ul in TE Buffer)	5ml	25ml	50ml
Component C: dsDNA HS Standard#2 (10ug/ml in TE Buffer)	0.1ml	0.5ml	1ml

***备注：不同批次的试剂不可混合使用**

【产品介绍】：

在分子生物学的试验过程中，Pic5Green 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 (5 μ g/mL dsDNA 溶液 A260=0.1)。Pic5Green 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》

【基本原理】：

Pic5Green 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，Pic5Green 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)。Pic5Green (激发波长 488nm, 吸收波长 520nm)为聚合美公司精心研发出品，专门替代 PicoGreen。

【产品特点】：

- 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。

【所需仪器】：

- 微型荧光计
- 10x10mm 比色杯
- 微量检测皿适配器
- Pic5Green (激发波长 488nm) dsDNA 定量检测试剂盒，1mL 单位量的试剂浓缩液足够 2mL 体积的 200 次测定。

【操作步骤】：
A、试剂制备

Pic5Green dsDNA 定量试剂是以 100uL 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 2XPic5Green 试剂的操作溶液，用 1xTE 按 1:200 的比例稀释浓缩液（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.5）。如果要准备足够的操作溶液测定 20 个样品，可在 20mL 1x TE 中加入 100uL Pic5Green dsDNA 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。Pic5Green 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。

B、实验方法：
1). 标准品工作液的配制：

Thermo 的产品 λ DNA 货号：SD0011（1mg（Tris, Nacl 等浓度已成标准体系），加入双蒸水，配制成的标准品工作液；本试剂盒提供的是 10ug/ml in TE Buffer 标准 DNA 溶液。

2). 染料工作液的配置：

6 uLPic5Green 加入 1mL TE (注意：用 1xTE 将 Pic5Green 稀释 200 倍，现用现配，注意避光)。

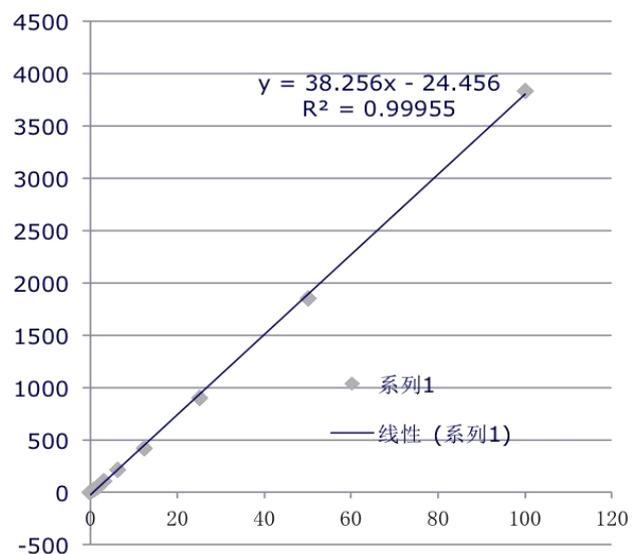
3). 标准品工作液稀释：

(1) 母液稀释：取 10ul（10ug/mL）标准品工作液加入到 990ul TE 溶液中，浓度稀释成 100ng/mL；

(2) 倍比稀释：取 800ul（100ng/mL）的标准品工作液加入到 200ul TE 溶液中，浓度达到 80ng/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 500ul（80ng/mL）的标准品工作液加入到 500ul TE 溶液中，浓度稀释到 40ng/mL；依次倍比稀释，配成 20ng/ml、10ng/ml、5.0ng/ml、2.5ng/ml、1.25ng/ml、0.625ng/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 FB-15 型便携式荧光仪（激发波长 488nm）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 1xTE 缓冲液为 blank，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)	荧光读值
100	3832
50	1848
25	901.1
12.5	423.7
6.25	216.4
3.12	108.7
1.6	43.87
0.8	28.84
0	0.637



5). 测量剩余样品的荧光值。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。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。