



Protocolo do Fluorómetro Qubit

Para utilização com o Fluorómetro Qubit da Invitrogen.

Nota: O tampão Qubit é sensível à luz. Armazenar o tampão num local escuro e evitar deixá-lo exposto durante longos períodos de tempo. Quanto mais tempo o tampão estiver exposto à luz, menos precisas serão as leituras Qubit. Os ensaios Qubit também são sensíveis à temperatura, e as flutuações de temperatura podem influenciar a exatidão do ensaio. Se o tampão Qubit estiver refrigerado, deixar que o tampão atinja a temperatura ambiente antes de efetuar uma leitura.

Equipamento:

- Fluorómetro QuBit
- Centrifugadora de tubos
- Vortexer
- Pipetas P10, P20, P200

Consumíveis:

- Tubos de ensaio QuBit
- Pontas de pipeta: P20, P200

Reagentes:

- Kit Qubit para DNA de alta sensibilidade

Protocolo:

1. Numa área limpa, rotular um tubo de Ensaio Qubit por cada amostra a ser medida, mais um tubo para cada Padrão 1 ("S1") e Padrão 2 ("S2"). Evite rotular a parte lateral do tubo de ensaio (em vez disso, rotule a parte superior), uma vez que isso pode interferir com as leituras ópticas.
2. Adicionar 190µl de Tampão Qubit ao tubo identificado como "S1" e 190µL de Tampão Qubit ao tubo identificado como "S2".
3. Adicionar 199µl de tampão Qubit a cada tubo de amostra.
4. Adicionar 10µl de padrão 1 ao tubo com a designação "S1" e 10µl de padrão 2 ao tubo com a designação "S2". Colocar ambos os tubos em vortex e centrifugar.
5. Ligue o Qubit Fluorometer e seleccione dsDNA > dsDNA de alta sensibilidade > Ler padrões
6. Insira o tubo com a etiqueta "S1", feche a tampa e seleccione Ler padrão. Quando a leitura estiver concluída, substitua "S1" pelo tubo com a designação "S2", feche a tampa e seleccione Ler padrão. Quando isto estiver concluído, o fluorómetro está calibrado. Esta calibração deve ser efectuada uma vez por dia de utilização do Qubit.
7. Adicione 1µl de DNA de amostra a cada tubo correspondente.
8. Insira o primeiro tubo de amostra no Qubit Fluorometer, seleccione Executar amostras, defina o volume da amostra como 1µl e as unidades de saída como ng/µl. Seleccione *Read Tube* (Ler tubo) e registe os resultados. Repetir para todas as amostras.