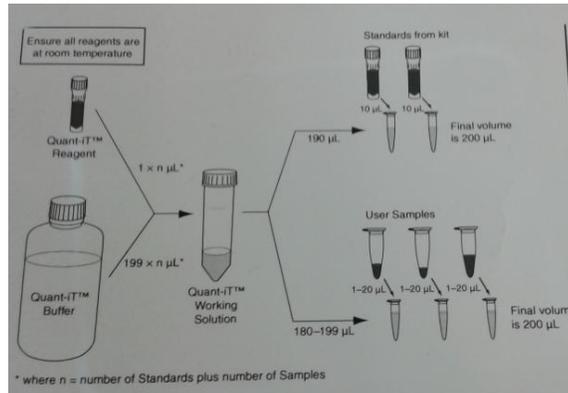


Manual de uso del fluorómetro Qubit 3.0 Life Technologies Agosto 2016



1. Conectar el regulador al tomacorriente por la parte de atrás del equipo, no tiene botón de encendido, el aparato arranca unos segundos después de que comienza a para energía.

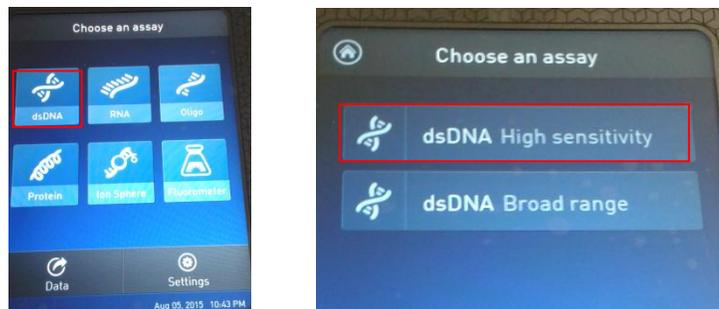


2. Se prepara previamente una solución stock de trabajo para el conjunto de muestras y los estándares calculando 199 µL de buffer Qubit dsDNA HS + 1 µL de colorante (tubo azul, dye) (volumen total es de 200 µL) en tubos Qubit o Axigen por cada una de las muestras, adicionales se preparan otros 200 µL de solución de trabajo para cada estándar y otros 400 µL extras de acuerdo a la siguiente ecuación:
 $(\text{Número de muestras} \times 199 \mu\text{L buffer} + 1 \mu\text{L dye}) + 2 \text{ estándares} (199 \mu\text{L buffer} + 1 \mu\text{L dye}) + 2 \text{ volúmenes extras de } 199 \mu\text{L} + 1 \mu\text{L dye} = \text{volumen total}$; calcular el volumen total en función del número de muestras y los dos estándares, prepararlo junto para evitar sesgos en la medición, agregar la solución de colorante al final y protegerla de la luz siempre.

Homogeneizar el dye en vortex y darle un espín corto en centrifuga, homogeneizar también la solución final en vortex.



3. Etiquetar un tubo para cada muestra y uno para cada estándar, tomar 199 μL del stock para cada muestra en un tubo nuevo y agregarle 1 μL de muestra, homogeneizar en vortex.
4. El primer menú de opciones que el equipo muestra es el menú de ensayos, si se trata de cuantificar ADN para librerías presionar sobre la pantalla ADN de doble cadena (dsDNA, double strand DNA) y luego High sensitivity y después read standards.

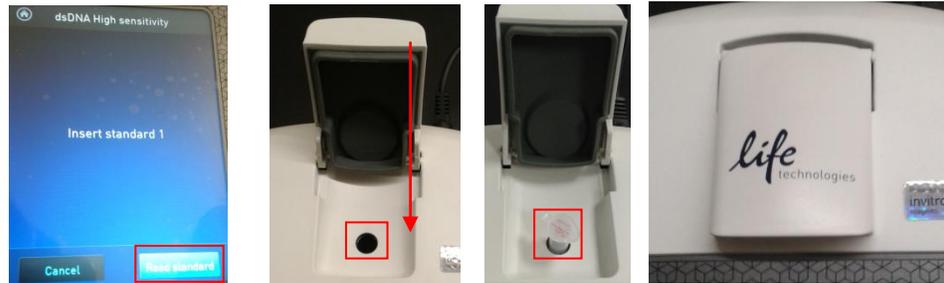


5. Antes de leer las muestras se debe calibrar el equipo para ello se lee la mezcla de los estándares (tubo rojo estándar 1, tubo amarillo estándar 2) con la solución de trabajo, estos se preparan mezclando 190 μL del stock con 10 μL de cada estándar (homogeneizar cada estándar en vortex y darle un espín ligero antes de hacer la mezcla), homogeneizar e incubar dos minutos antes de leer.

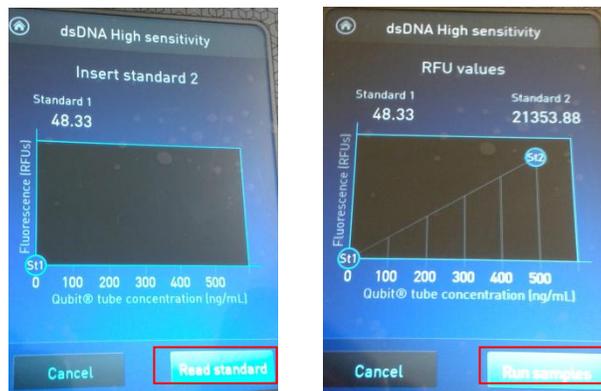


6. El equipo pide leer primero el estándar 1 de este solo graficará los dos primeros valores de la curva, después se lee el 2 del cual grafica los últimos tres puntos, los valores de las muestras deben estar en el rango de los valores de la curva de calibración; se coloca el

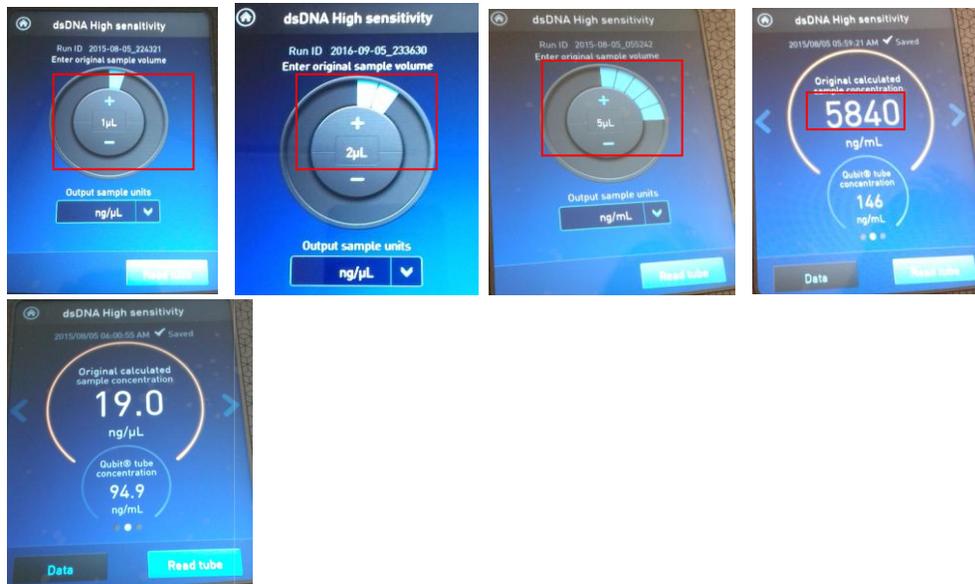
tubo del estándar la cavidad de la parte superior, se cierra la cubierta y se presiona en leer estándar.



7. El equipo considera los dos primeros valores leídos del estándar 1 para la curva de calibración y los últimos 3 del estándar 2, una vez leídos los estándares el equipo mostrará una gráfica con los valores obtenidos y dará la opción de leer las muestras.



8. Al terminar de leer los estándares se prepara la mezcla de solución de trabajo (stock) con la muestra agregando **2 µL** de esta a 198 µL de solución del stock se incuba 2 minutos después de la homogenización en vortex y se debe leer inmediatamente, si pasa mucho tiempo habrá un sesgo en los valores leídos, usualmente de usa **1 µL** pero se recomiendan **2 µL**, en este caso ajustar el Qubit para que lea las muestras a **2 µL**, se puede ajustar a **5 µL** o mas dependiendo del experimento, para ADN suelen ser suficientes 2.

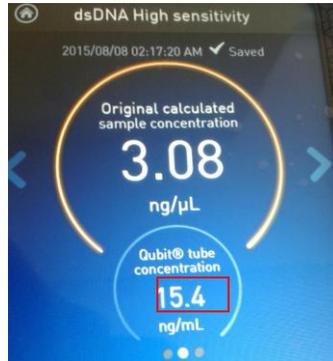


9. El valor final se aparece dentro del círculo al terminar la lectura de la muestra, estos datos pueden exportarse desde un puerto USB en la parte trasera del equipo, o bien el equipo puede conectarse a una computadora para exportar los datos presionando en la opción Data.
10. Se recomienda dar un vortex a los tubos antes de leerlos e incubarlos dos minutos, también es importante leer los tubos dos veces, primero todos una vez y luego todos de nuevo, mas no leer un mismo tubo dos veces seguidas.



11. El equipo muestra dos valores uno en un círculo grande que considera el factor de dilución y el del círculo pequeño indica la concentración sin considerar el factor de dilución, para reportar el valor si se siguió el protocolo el valor del círculo grande es el real, si se hizo

algún ajuste de volumen de muestra (el equipo permite un rango de 1 – 10 μL de muestra) en el ejemplo de abajo el valor de 15.4 se multiplica por el volumen total (200 μL) y se divide entre 1000 esto da como resultado el valor del círculo grande, si hubo algún ajuste de volumen se deben hacer los cálculos de factor de dilución para corregir los valores. Se recomienda leer los tubos inmediatamente ya que el colorante tiende a degradarse con la luz y después de un tiempo si la muestra se vuelve a leer el equipo arroja resultados distintos y sesgados, a veces arriba del valor original leído y a veces debajo.



12. Al terminar de leer desconectar el equipo.