

使用QuickDrop分光光度计进行核酸定量和分析

简介

分光光度测定法是一项定量和分析生物成分的成熟技术。其中，核酸是生物实验室最常检测的生物成分之一。确定这些样品的浓度和纯度对许多下游实验至关重要，例如PCR、qPCR测序和DNA基因芯片。

核酸主要吸收260nm下的紫外光，其浓度可以应用比尔-朗伯特定律通过它们的相关消光系数和样品光程计算出来。首先，260nm的紫外光直接照射样品，并且穿过样品，而另一边的光电检测器则测定有多少光被吸收。通过对照参比(一般是样品稀释液)，可以定量样品中的核酸浓度。

样品纯度是核苷酸定量的一个重要指标。尽管不是确定纯度最准确的方法，A260/A280和A260/A230依然可以用来粗略估计蛋白和化学成分的污染程度。

SpectraMax® QuickDrop™分光光度计是一款多用途的紫外-可见(UV-Vis)超微量分光光度计，尤其是在分析核酸样品方面。它包含一个0.5 mm超微量上样孔、比色皿插槽和内置的LCD触摸屏，使用者可以在这一个系统上进行多种实验。

在这一应用指南中，我们展示了Quick-Drop分光光度计是如何以高准确度和高一致性来定量(浓度)和定性(样品纯度)分析核酸样品的。

材料和方法

- QuickDrop 紫外-可见分光光度计 (Molecular Devices cat. #QUICKDROP)
- UltraPure™ 小牛胸腺DNA溶液 (Thermo Fisher cat. #15633019)
- RNA Control 250 (Thermo Fisher cat. #AM7155)
- 10 mm 远紫外石英比色皿 (Starna Cells cat. #9-Q-10)

样品交叉污染

样品交叉污染通过使用超微量上样孔交替检测小牛胸腺DNA和超纯水进行评价。超纯水作为参比。超微量孔在每次读数完成后用不起毛的纸擦拭干净。

标准曲线的线性

溶于超纯水中起始浓度为2500 ng/μL的双链DNA(dsDNA)经两倍系列稀释。超纯水作为空白，每个样品浓度都在0.5-mm超微量上样孔中读3次。利用预设好的DNA定量方法，从230nm到320nm波长下检测器吸光度值。DNA定量法自动计算出dsDNA浓度，基于计算方程及以下260nm和320nm分别检测出的吸光度值。

优点

- 最小样品量低至0.5 μL
- 从1.0 ng/μL到2,500 ng/μL的精确DNA定量
- LCD触摸屏可独立完成实验及数据分析
- 比色皿法可进行动力学法和波长扫描

浓度 $\mu\text{g}/\text{mL} = (A_{260} - A_{320}) \times \text{稀释因子} \times 50 \mu\text{g}/\text{mL}$

QuickDrop自动运行这些计算并报告浓度给使用者。之后，数据可以使用SoftMax[®] Pro软件和SoftMax Pro导入功能绘制图表。双对数曲线拟合用于显示标准曲线的线性。

样品体积比较

小牛胸腺DNA采用超纯水稀释，分别是0.5 μL 、1.0 μL 和2.0 μL ，在超微量上样孔中检测($n = 5$)。超纯水作为参比。参比体积与样品体积相同。

RNA 验证

ThermoFisher的RNA质控250用于比较QuickDrop分光光度计和NanoDrop[™]分光光度计的性能表现。试剂盒中提供的储存液作为参比。参比样品和RNA质控品均于超微量上样孔中检测。所得结果与RNA质控试剂盒说明书中的参数做比较。

污染物检测

样品DNA被50 μM 苯酚溶液污染。污染的样品和质控品在比色皿模块中使用“波长扫描”功能检测。这一功能在整个波长范围内递增的检测样品吸光度。结果使用Microsoft[®] Excel绘制曲线。

交叉污染实验

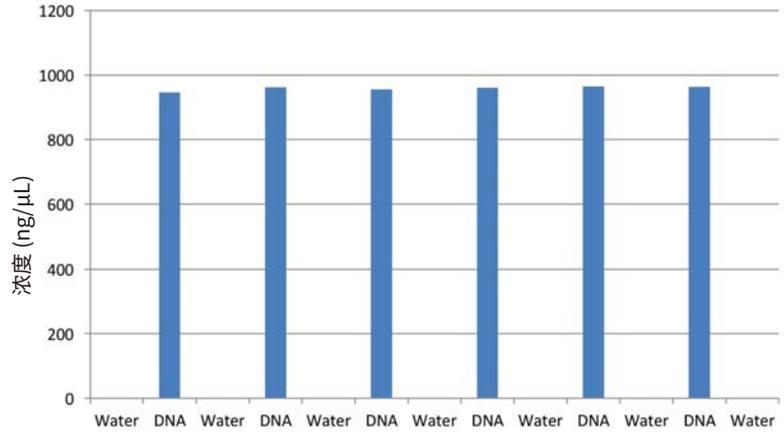


图 1. 样品交叉污染。小牛胸腺DNA和水在超微量孔中的交替测定。数据在Excel中绘制图表。图表中的数据如表1。

样品种类	浓度 (ng/ μL)	A230	A260	A280	A320	A260/A230	A260/A280
Water	0.175	-0.001	-0.001	-0.002	-0.001	1	-0.212
DNA	946.344	0.396	0.947	0.52	0.001	2.394	1.822
Water	0	-0.026	-0.015	-0.015	-0.011	0.266	1
DNA	962.532	0.394	0.958	0.524	-0.005	2.415	1.821
Water	0	-0.027	-0.016	-0.015	-0.011	0.309	1.255
DNA	955.525	0.392	0.952	0.522	-0.004	2.416	1.818
Water	0	-0.026	-0.016	-0.015	-0.011	0.322	1.267
DNA	961.479	0.396	0.958	0.525	-0.003	2.407	1.819
Water	0	-0.024	-0.013	-0.013	-0.009	0.251	1
DNA	964.822	0.393	0.96	0.525	-0.005	2.425	1.821
Water	1.565	-0.006	0.001	0.001	-0.001	-0.288	1
DNA	963.753	0.394	0.958	0.524	-0.006	2.411	1.819
Water	0	-0.016	-0.006	-0.005	-0.002	0.288	1.328

表 1:图 1 “样品交叉污染” 实验中所包含数据。

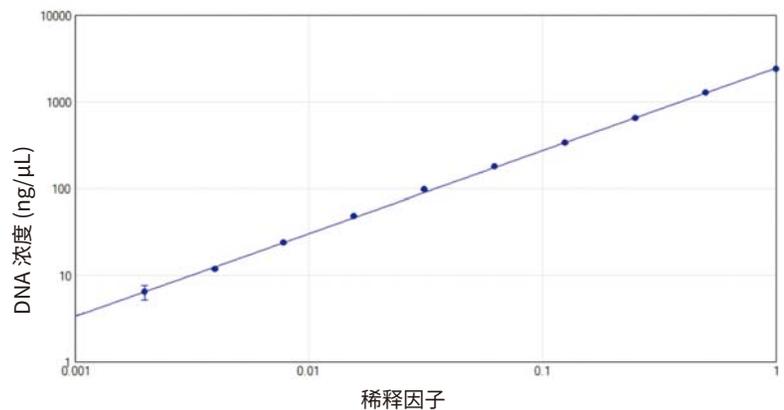


图 2. 计算的DNA浓度 vs 稀释因子。起始浓度为2500 ng/ μL 小牛胸腺DNA经2倍系列稀释所显示的稀释因子和DNA浓度之间的关系，结果来源于QuickDrop。这一曲线展示出 r^2 值为1.000的线性关系。

结果

样品交叉污染

样品交叉污染在QuickDrop超微量上样孔中检测。图1和表1中的结果显示经过不起毛的简单擦拭后，后续实验中没有明显的样品交叉污染。

标准曲线线性

在图2中，QuickDrop展示出DNA浓度和稀释因子之间的线性关系。从这个实验中，我们可以得出QuickDrop的最低检测浓度为1 ng/ μ L DNA。

样品体积比较

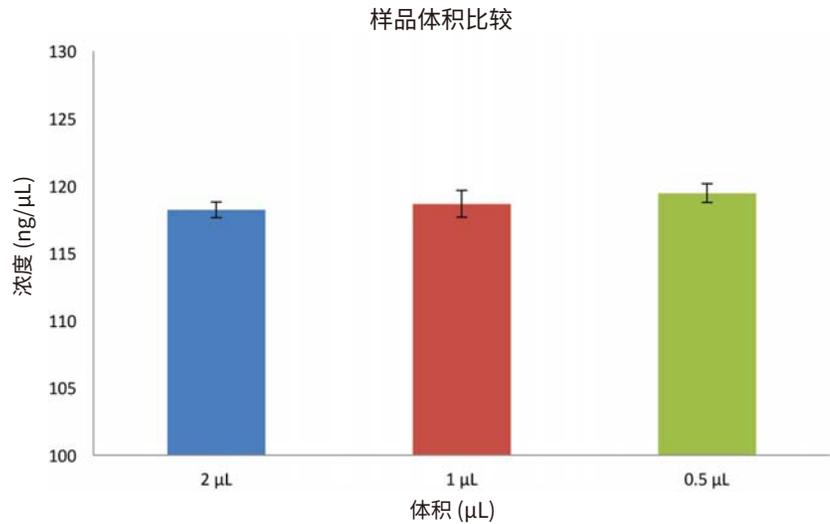
3个不同体积DNA样品在QuickDrop超微量上样孔中进行检测。计算出的样品DNA浓度在不同体积下都是一致的(图3)。为了得到更好的结果，我们建议使用2- μ L体积，因为其更易加样。

RNA验证

对RNA 250质控品的检测说明了QuickDrop完全能够用于检测RNA。所测浓度在质控品试剂盒提供的可接受范围之内(250 \pm 5 ng/ μ L)。

污染物检测

使用波长扫描功能，污染物可以从样品中识别出来，通过在230nm处与对照比较，有上升的吸光度值(图5)。这一功能可以应用于DNA纯化过程中其他类型污染物的发现，如硫氰酸胍。QuickDrop的有效波长范围可从190nm到1100nm，对全面分析各类化学品都很有帮助。



	平均	标准差	%CV
2 μ L	118.23	0.58	0.49
1 μ L	118.66	0.99	0.83
0.5 μ L	119.46	0.69	0.57

图 3. 体积再现性。2 μ L、1 μ L和0.5 μ L体积的小牛胸腺DNA在超微量孔中读数。不同体积显示出非常一致的计算浓度(n = 5)。

标准差和%CV在所有样品体积下也都非常相似。

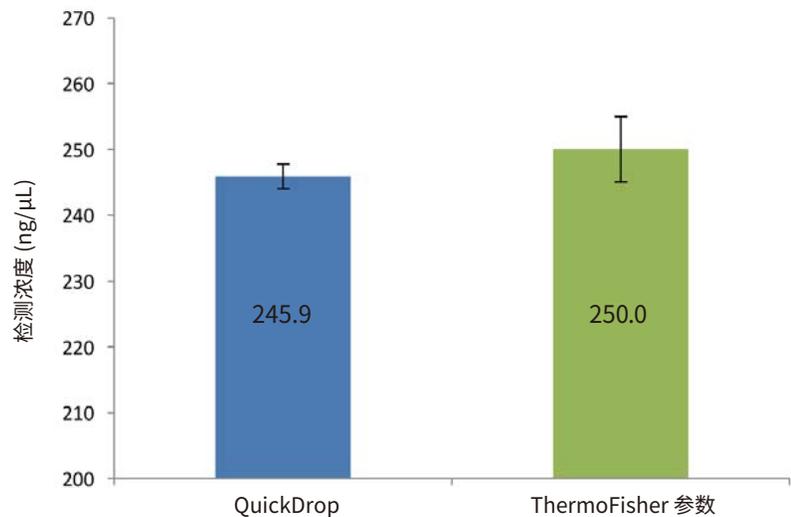


图 4. RNA验证实验。250 ng/ μ L RNA质控品在QuickDrop上检测，与ThermoFisher的NanoDrop验证结果比较(n=4)。检测出的RNA浓度(245.9 \pm 1.9 ng/ μ L)落在ThermoFisher的指定范围之内(250.0 \pm 5.0 ng/ μ L)。

总结

QuickDrop内置的比色皿模块和超微量上样孔都能够进行非常灵敏的核酸样品定量及分析。如以上所示，低至0.5 μL 的样品也能在超微量孔中得到一致性很高的读数。同时，还具有非常宽的检测范围(1 ng/ μL to 2500 ng/ μL)和非常低的样品交叉污染。

最后，内置的LCD触摸屏为研究者提供了重要信息，如样品浓度和纯度(图6)。所有这些特点，加上它小巧灵活的体积，QuickDrop分光光度计将成为在任何实验室环境下进行核酸定量和分析的理想选择。

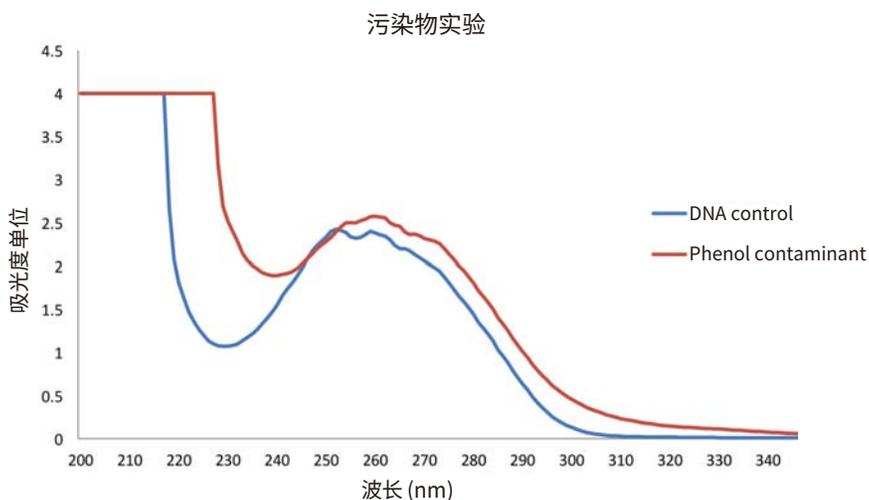


图 5. 污染物实验。苯酚污染的样品和未污染的对照利用波长扫描功能进行测定。波长扫描曲线通过Microsoft Excel绘制并叠加。在230nm处可以看到有显著的光吸收。

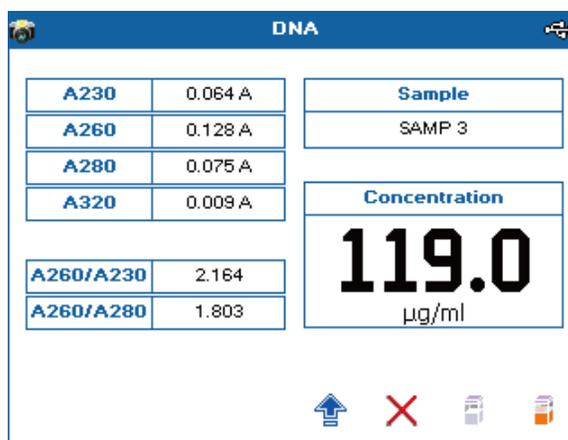


图 6. QuickDrop数据显示举例。相关参数可通过操作QuickDrop触摸屏计算并报告出来。



更多精彩内容
尽在官方微信

美谷分子仪器(上海)有限公司

全国咨询服务热线: 400-820-3586

www.MolecularDevices.com.cn Email: info.china@moldev.com

上海 电话: 86-21-3372 1088

传真: 86-21-3372 1066

地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335

北京 电话: 86-10-6410 8669

传真: 86-10-6410 8601

地址: 北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室 100124

成都 电话: 86-28-6558 8820

传真: 86-28-6558 8831

地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016

台北 电话: 886-2-2656 7585

传真: 886-2-2894 8267

地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼

香港

传真: 852-2289 5385

地址: 香港中环皇后大道中15号置地广场 公爵大厦21楼

