

应用指南

# 基于SpectraDrop微量检测板的 低体积荧光核酸定量

## 简介

紫外吸收法是常见的DNA分析方法之一，可用于多种样本的定量分析。但是，在一些应用中，由于制备方法和原材料的稀缺我们需要对极低体积或浓度的样本进行定量。此时就需要更为灵敏的荧光核酸定量法。

来自于Molecular Devices的SpectraDrop™微量检测板提供了比其他任何微量检测板更高的检测通量，其兼容SpectraMax®系列酶标仪并支持多达64样本每次的通量。检测体积少至2 μL。SpectraDrop微量检测板采用专门设计的适配器和滑块组合。滑块具有出色的光学透明度，支持光吸收和荧光分析，从而满足相应的应用需求（图1）。

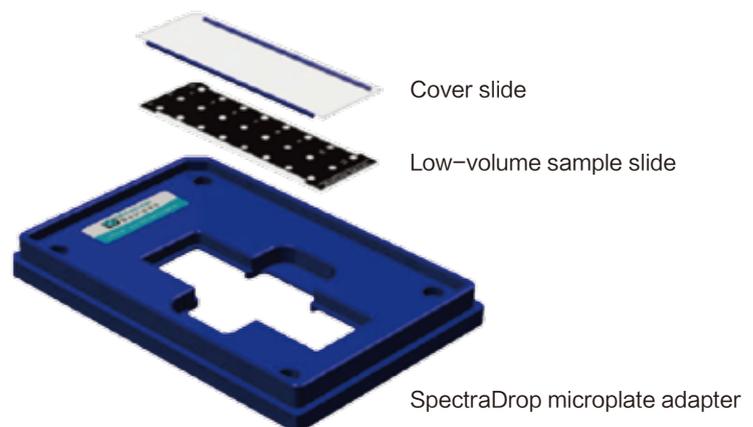
在此，我们展示如何利用Promgea的QuantiFluor dsDNA系统并结合微量检测板进行对低至2 μL的微量样本的浓度检测。该方法检测下限低达每样本5 pg，或2.5 pg/μL，其比微量光吸收法（检测下限约为2000 pg/μL）灵敏约一千倍。因此，我们在此提供的检测方法非常适合超越光吸收法灵敏度的应用，如第二代测序技术。

## 微量法操作步骤

我们在原始步骤参数上针对微量体积检测稍作改进，如下。标准品准备于TE缓冲液中，浓度为1至1000 pg/μL。2 μL标准品以三复孔形式用八通道排枪加入SpectraDrop底部滑块的孔中。然后每孔加入2 μL QuantiFluor dsDNA Dye，混匀。此时样本总体积应为4 μL。空白复孔则只含有缓冲液和染料，用于确定背景荧光值。最后盖上顶部滑块，在黑暗中孵育5分钟后进行读板分析。

## 优势

- DNA浓度检测下限低达2.5 pg/μL
- 优越的通量性
- 无需桥正
- 容易清洗



**图1 SpectraDrop 微量检测板构成** 检测板的微量样品滑块上支持24或64个样品孔。顶部滑块可配备厚度0.5和1 mm的垫片，分别用于2和4 μL样本的检测。

## 仪器设置

SpectraDrop 微量检测板支持 SpectraMax® Paradigm® 多功能酶标仪和相应的荧光强度检测(FI-FLRH)卡盒和优化了信号/背景波长的TUNE卡盒。同时微量检测板也支持基于光栅的 SpectraMax® M5e 多功能酶标仪。各仪器相应的参数见表1。

数据的获取和分析均用SoftMax® Pro 软件完成。用户可使用预设的QuantiFluor 模板结合软件中设定的SpectraDrop规格参数进行快捷的模板设置并确保数据的准确性。除此之外，通过对四角的样本的扫描，Paradigm多功能酶标仪支持针对微量检测板的参数优化，获得更加精确的结果。最后，Paradigm多功能酶标仪还支持读板高度的优化，以获得最大的信号强度。

## 检测线性和灵敏度

QuantiFluor系统结合SpectraDrop微量检测板的线性范围超越了标准品浓度范围(1-1000 pg/μL)。所得的标准曲线R方值高达0.999(图2)，检测下限，即空白孔数值标准偏差的三倍为每孔5pg或2.5 pg/μL。

## 结论

处理微量DNA样本的研究人员经常需要一种方法能精确定量微量DNA。而SpectraDrop微量检测板能做到对浓度低达2.5 pg/μL的DNA样本的测量，比其比微量光吸收法灵敏一千倍。利用QuantiFluor dsDNA定量系统加上SpectraDrop微量检测板可允许用户在不牺牲结果准确性的前提下将样本损失降到最低。同时该方法无需不同孔之间的校正，因为垫片和滑块的设计保证了孔与孔之间的高度均一性。滑块可配0.5或1mm厚度的垫片，满足用户对通量和检测体积的需求。兼容性上SpectraDrop微量检测板可在所有SpectraMax系列酶标仪，包括SpectraMax Paradigm酶标仪上使用，也兼容StakMax®微孔板处理系统。

	SpectraMax Paradigm reader (FI-FLRH)	SpectraMax Paradigm reader (TUNE)	SpectraMax M5e reader
Ex wavelength (nm/bandwidth)	485/20	508/20	485
Em wavelength (nm/bandwidth)	535/25	560/20	525
Cutoff filter (nm)	N/A	N/A	515
PMT and optics	Integration time 140 ms	Integration time 140 ms	Auto PMT 10 flashes/read

Table 1: Instrument settings for QuantiFluor assay.

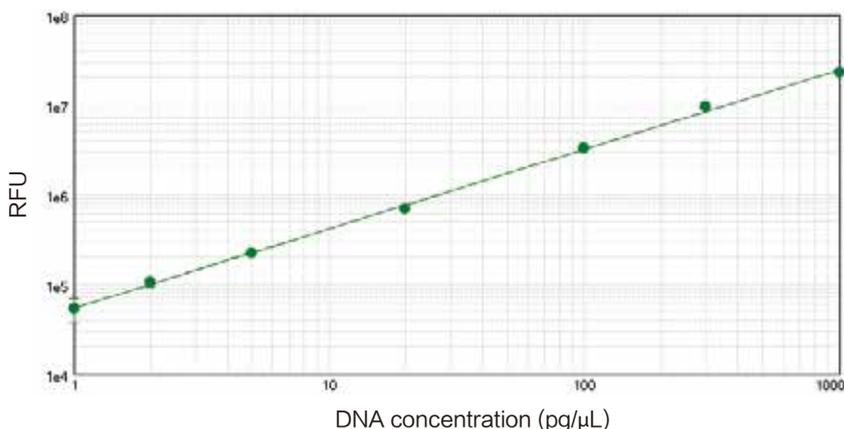


图2 dsDNA 标准曲线 基于SpectraDrop微量检测板检测的dsDNA 标准曲线图。荧光值由 SpectraMax® Paradigm® 多功能酶标仪检测分析。dsDNA的检测下限为每孔5pg或2.5 pg/μL。R方值大于0.999。类似结果可由SpectraMax® M5e多功能酶标仪分析获得。