

如何利用SpectraDrop超微量微孔板进行DNA定量检测

By Cathy Olsen, Ph.D., Molecular Devices, LLC, 1311 Sunnyvale, CA, 94089.

引言

Molecular Devices公司的SpectraDrop™超微量微孔板(原先称为 μ Max)让用户在SpectraMax®微孔板读板机上可一次检测多达64个样品,而上样体积仅2 μ L。SpectraDrop微孔板带有一套专门设计的适配器和玻片,此玻片在光吸收和荧光检测下的光学透性完全满足用户对应用的苛刻要求(图1)。SpectraDrop微孔板的特殊玻片设计无需校正,可保持孔间测读的一致性,孔间CV低于5%。

SpectraDrop微孔板套装包含以下部分:

- SBS-标准微孔板适配器
- 24-孔超微量样品载玻片或64-孔超微量样品载玻片
- 0.5 mm光程(透明)盖玻片,针对2- μ L上样体积
- 1.0 mm光程(蓝色)盖玻片,针对4- μ L上样体积

使用紫外光吸收来定量检测多种样品类型是一种常用的方法。获得最优检测结果的一个决定性因素就是降低样品或光学表面污染所产生的背景噪音。这篇应用文章描述了如何通过简单、常规的维护和清洁步骤即可得到高质量的结果。

Materials

- SpectraDrop超微量微孔板
- 无绒或低绒一次性吸水纸
- 空气除尘器(罐装压缩空气)
- 70%乙醇溶液(或其它有机溶剂如甲醇或丙酮)
- 双链DNA(如Sigma P/N D1501-1G)
- 去离子水或TE缓冲液
- 可移取2或4 μ L的8-通道移液器
- SpectraMax®微孔板读板机,带光吸收检测功能

SpectraDrop超微量微孔板配置(图1)



超微量样品载玻片上有专门的小孔用于24或64个样品上样。盖玻片有0.5-mm或1.0-mm两种间隔可选,分别用于2- μ L或4- μ L上样量。

Methods

清洁SpectraDrop玻片

捏住SpectraDrop玻片边缘将其拿起，在黑色背景下检查上面是否粘有污渍或灰尘。戴无粉乳胶手套有助于减少指印和皮肤油脂的污染。如果发现有污渍或灰尘，可使用一次性实验室用纸清洁玻片。要去掉顽固的污渍或指印，需要用到沾了水或乙醇的实验室用纸来清洁。不会留下擦拭痕迹的抹布等也可代替实验室用纸。

对于大多数的样品检测，用一次性实验室用纸简单的擦拭玻片就足够了。如果预计样品浓度太低或希望降低背景噪音，以下步骤会很重要。重新在黑色背景下检查玻片，确保没有灰尘微粒。使用带空气罐的除尘器将任何可见的灰尘颗粒清除以降低背景噪音。使用空气除尘器短暂、轻柔的吹气将任何粘附在玻片上的灰尘吹走。长时间或太用力的吹气会导致玻片过冷并产生冷凝作用，可能会更加难以清洁。防静电喷雾并不建议用在SpectraDrop玻片上。

缓冲液或其它用于SpectraDrop微孔板检测的溶液可以被过滤以减少溶液中的微粒，这些微粒可能会增加背景值和不同样品间的差异。

注意：强酸或强碱溶剂不可用于SpectraDrop超微量微孔板，因为会损坏玻片上的上样孔。

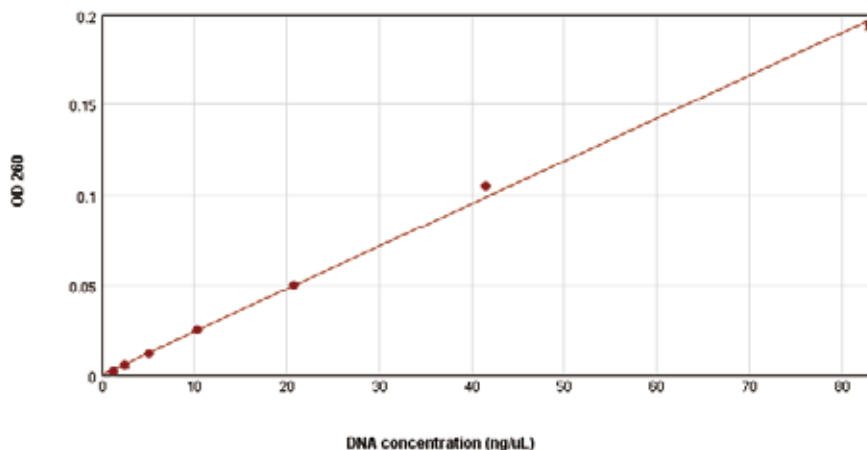
结果

DNA标准曲线

为了确定SpectraDrop超微量微孔板的DNA检测灵敏度，将溶于TE缓冲液的浓度范围为1.9到190 ng/μL的DNA标准品加入到SpectraDrop超微量微孔板的上样孔中，TE缓冲液作为空白，使用8通道移液器做3或6个重复。利用SpectraDrop 0.5-mm间隔的盖玻片，每孔的样品体积为2 μL。

SpectraDrop超微量板在SpectraMax M 5 e 微孔板读板机上进行测读，SoftMax® Pro 6软件分析数据并绘制曲线(图2)。基于背景的3次标准偏差计算的双链DNA检测限低于2 ng/μL，只需用上述指南对玻片清洁。

DNA 标准曲线(图 2)



在SpectraMax® M系列微孔板读板机上使用SpectraDrop超微量微孔板得到的DNA标准曲线。多达64孔的样品玻片让用户在一块玻片上即可完成全部标准曲线测定或更多的样品检测。

SoftMax Pro软件数据表格(图 3)

Figure 3: SoftMax Pro software data table. The table displays data for three samples (01, 02, 03) across multiple wells (E4, E5, E6, E8, E9, E10, F4, F5, F6, F8, F9, F10). The columns are Sample, Well, A260, and Concentration (ng/uL). The data is as follows:

Sample	Well	A260	Concentration (ng/uL)
01	E4	0.511	25.550
	E8	0.509	25.450
	F4	0.519	25.950
	F8	0.519	25.950
02	E5	0.103	5.150
	E9	0.087	4.350
	F5	0.079	3.950
	F9	0.105	5.250
03	E6	0.029	1.450
	E10	0.055	2.750
	F6	0.041	2.050
	F10	0.047	2.350

数据表格来自于SoftMax Pro软件的SpectraDrop超微量DNA定量模板。使用的是光程为0.5-mm间隔的玻片，浓度因子针对溶于TE缓冲液的双链DNA，通过软件自动计算出浓度。

DNA定量

DNA浓度可以通过检测260 nm光吸收直接计算出来，使用的是朗伯比尔定律， $A = xlc$ ，A为260 nm光吸收值，x为摩尔吸光度，l为光程，c为溶液浓度。对于溶于TE缓冲液的双链DNA，其浓度因子(摩尔吸光度的倒数)为4.5。SpectraDrop超微量微孔板的光程可以是0.5 mm或1.0 mm，这取决于所选用的盖玻片。

在SoftMax® Pro 6软件中，有专门简化SpectraDrop超微量微孔板进行DNA样品浓度检测和计算的预设模板。光吸收值和玻片间隔所对应的光程可以直接自动计算出样品浓度(图3)。

总结

要发挥SpectraDrop超微量微孔板最大性能的一个关键因素就是足够清洁。清除玻片上的灰尘微粒和污渍可以减小背景光吸收和样品之间的差异，从而给出最优灵敏度和可靠的结果。如果可以像上述介绍的方法一样仔细清洁玻片，那么是能够得到比2 ng/ μ L的参数更好的灵敏度的。对于许多高于2 ng/ μ L灵敏度要求的用户样品检测，只需简单的用无绒或低绒实验室用纸擦拭清洁SpectraDrop玻片便足够了。

SpectraDrop超微量微孔板可以实现少量样品的灵敏检测而不会牺牲准确性。SpectraDrop超微量微孔板易于操作，并且所有光学表面都非常易于清洁。无需孔间校准，因为间隔式玻片设计具有完美的孔间一致性。24-和64-孔样品玻片以及0.5-或1.0-mm间隔的盖玻片完全满足用户的通量和样品体积要求。SpectraDrop超微量微孔板兼容所有SpectraMax读板机包括SpectraMax Paradigm®平台以及StakMax®微孔板堆板机。