

# 采用 Quant-iT PicoGreen dsDNA 试剂盒对 DNA 进行灵敏的荧光定量

Joyce Itatani | Application Scientist | Molecular Devices Cathy Olsen |  
Sr. Application Scientist | Molecular Devices

## 简介

双链 DNA 通常通过测定 DNA 溶液在 260 nm 处的吸光度在酶标仪中进行定量。然而，该方法在典型的光吸收酶标仪上只能测量到约 250 ng/mL。对于涉及小样本的生物应用，如下一代测序和 DNA 扩增产物的定量，需要更敏感的方法。来自 Thermo Fisher Scientific 公司的 Quant-iT PicoGreen dsDNA 检测试剂盒对 DNA 更特异，比传统光吸收方法的灵敏度高约 1000 倍。如产品手册所述，此实验在微孔板格式中采用单一染料浓度的动态范围从 250 pg/mL 到 1000 ng/mL。在这里，我们证明了使用 Molecular Devices 公司 SpectraMax® 酶标仪和 Quant-iT PicoGreen 实验，用户可以可靠地测量低至 50 pg/mL 的双链 DNA 浓度。

为了最大化实验的灵敏度，需要使用最佳的激发和发射波长。与基于滤光片的酶标仪不同，SpectraMax iD5 多功能酶标仪和其他 SpectraMax 酶标仪中的双单色器允许在酶标仪规定的范围内选择任何波长。确定为实验提供最佳灵敏度和动态范围的激发和发射波长是很重要的，因为这些波长可能与基于滤光片的酶标仪使用的波长以及试剂盒手册中推荐的波长有所不同。

## 优势

- DNA 荧光定量灵敏度可低至 50 pg/mL
- 线性动态范围跨越四个数量级
- 预置在 SoftMax Pro 软件中的实验检测方案使结果易于分析

## 材料

- Quant-iT PicoGreen dsDNA 检测试剂盒 (Thermo Fisher Scientific cat. #P7589)
- 96-孔全黑微孔板 (Greiner Bio-One cat. #655076)
- 避光黑色微管 (Argos cat. #T7100BK)
- 酶标仪 (注: 这里没有列出的其他 SpectraMax 酶标仪对 PicoGreen 的实验具有类似的性能)
  - SpectraMax® iD5 多功能酶标仪 (Molecular Devices cat. #iD5)
  - SpectraMax® i3x 多功能酶标仪 (Molecular Devices cat. #i3x)
  - SpectraMax® M5 多功能酶标仪 (Molecular Devices cat. #M5)
  - SpectraMax® Gemini™ EM 酶标仪 (Molecular Devices cat. #EM)

## 方法

### 仪器和方案设置

- 打开酶标仪。
- 启动 SoftMax®Pro 软件, 并从实验方案下拉菜单中打开 PicoGreen 荧光方案。根据您使用的 SpectraMax 酶标仪, 您可能需要输入检测的优化设置 (见表 1)。
- 通过点击“Settings”, 在屏幕的左侧选项选择要读取的孔和检测孔板类型。

- 点击模板按钮, 打开一个窗口, 您可以将微孔板的孔分配到预先设置的模板组。使用下拉菜单选择适当的模板组。PicoGreen 荧光方案中有预先设置的模板组, 包括标准品、未知样品和未知\_NoDiln(用于未稀释的样品)。将孔分配给预设的模板组, 用读取微孔板时获得的相应数据填充方案中的组表。

### 实验准备

该方法遵循 QuantiT PicoGreen dsDNA 试剂和试剂盒产品信息表的说明, 除了实验体积从 2.0 mL 按比例减少到 200µL, 以适应 96 孔微孔板格式。

- 用无 DNA 酶的蒸馏水将试剂盒中的浓缩缓冲液稀释 20 倍, 制备成 1X TE 缓冲液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5)。
- 将浓缩 DMSO 溶液稀释 200 倍, 在 TE 缓冲液中配制 Quant-iT PicoGreen 试剂的工作水溶液 (如上所述)。建议在塑料容器中配制溶液, 而不是在玻璃容器中, 因为试剂可能会吸附在玻璃表面。用棕色或黑色的试管, 或用箔片覆盖以保护溶液不受光。该溶液应在配制后的几个小时内使用。
- DNA 标准曲线: 在 TE 中制备 2µg/mL 的 dsDNA 原液。试剂盒提供的 lambda DNA 标准品可以用 TE 稀释 50 倍, 制成 2 µg/mL 的溶液。

注: 在某些情况下, 最好使用与被测类型相似的 DNA 做标准曲线。

Parameter	SpectraMax iD5/iD3	SpectraMax i3x	SpectraMax M5/M5e/M4/M3/M2/M2e	SpectraMax Gemini EM/XPS
Read mode	Fluorescence (FL)	Fluorescence (FL)	Fluorescence (FL)	Fluorescence (FL)
Read type	Endpoint	Endpoint	Endpoint	Endpoint
Wavelengths	Excitation: 485 nm Emission: 535 nm	Excitation: 490 nm, bandwidth 9 nm Emission: 525 nm, bandwidth 15 nm	Excitation: 490 nm Emission: 525 nm Emission cutoff: 515 nm	Excitation: 490 nm Emission: 525 nm Emission cutoff: 515 nm
Plate type and Read area	Select based on microplate and wells used	Select based on microplate and wells used	Select based on microplate and wells used	Select based on microplate and wells used
PMT and Optics	PMT gain: Automatic Integration time: 200 ms Read height: Optimize for microplate used	PMT gain: N/A Flashes per read: 10 Read height: Optimize for microplate used	PMT gain: Automatic Flashes per read: 10	PMT gain: Automatic Flashes per read: 20

表 1 SpectraMax 酶标仪的仪器设置。对于 SpectraMax iD5 和 i3x 酶标仪, 读取高度设置应针对所使用的微孔板进行优化。注: 列出了其他具有类似性能的酶标仪。

- 根据需要, 可以从 1 ng/mL 到 1 µg/mL 制备高范围的标准曲线, 也可以从 25 pg/mL 到 25 ng/mL 制备低范围的标准曲线。对于高范围或低范围曲线, 可以使用 1:10 的稀释。对于低范围曲线, 将 2 µg/mL 的溶液稀释 40 倍, 得到 50 ng/mL 的起始溶液。

为满足本应用要求, 建立了 50 pg/mL 到 1 µg/mL 的一系列标准品, 稀释倍数为 1:3。

- 以每孔 100 µL 将标准品移液至 96 孔全黑微孔板中, 最好重复三次。确保包含一组只有 TE (不含 DNA) 的缓冲液空白孔。
- 每孔加入 Quant-iT PicoGreen 试剂工作水溶液 100µL (这会使标准品在孔中以 1:2 稀释)。搅拌或用振荡器混匀并在室温下避光孵育 2 - 5 分钟。

### 读板

- 如果使用的是 SpectraMax M 系列酶标仪, 请确保紫色孔板适配器在微孔板读取抽屉的托架上。把微孔板放在抽屉里。
- 点击 SoftMax Pro 软件中的 Read 按钮。

### 分析数据

- 微孔板读取后, 相对荧光单位 (RFUs) 将显示在孔板部分。数据将在设置模板时创建的组表中进行分析。关于来自分组表的代表性数据示例, 请参见表 2。

- 模板中指定的标准品 (因此显示在标准组表中) 将自动绘制在方案的标准曲线部分。
- 默认情况下应用线性曲线拟合, 但是在绘制一个很宽的动态范围内的标准曲线时, 可以使用对数曲线拟合。从图形部分的 Fit 下拉菜单中选择曲线拟合。

## 结果

使用 Quant-iT PicoGreen dsDNA 检测试剂盒和 SpectraMax 酶标仪检测 50 pg/mL 至 1 µg/mL 的 DNA 标准品 (数据来自 SpectraMax iD5 酶标仪, 但其他 SpectraMax 酶标仪给出类似的结果)。SoftMax Pro 软件自动计算每组标准品重复的平均 RFU, 标准偏差和 %CV。在 SoftMax Pro 软件中使用对数 - 对数曲线拟合绘制了一条标准曲线 (图 1)。采用 96 孔微孔板格式, 检测限为空白样品标准偏差的 3 倍, 灵敏度可低至 50 pg/mL。这远远低于 Quant-iT PicoGreen 检测产品说明书中规定的 250 pg/mL 的下限。图 2 为高范围 (A) 和低范围 (B) 的标准曲线。在标准品范围内线性良好 (图中各曲线的  $r^2 \geq 0.99$ )。

Sample	DNA conc (ng/mL)	Average RFU	StdDev	%CV
1	1000.00	54893498	611149.3	1.1
2	333.333	17114392	685401.0	4.0
3	111.111	5884808	249140.5	4.2
4	37.037	1938706	21246.0	1.1
5	12.346	667849	10336.2	1.5
6	4.115	231812	9389.3	4.1
7	1.372	74577	4324.4	5.8
8	0.457	25963	2403.5	9.3
9	0.152	8981	1422.3	15.8
10	0.051	2441	1205.6	49.4

表 2 DNA 标准品。

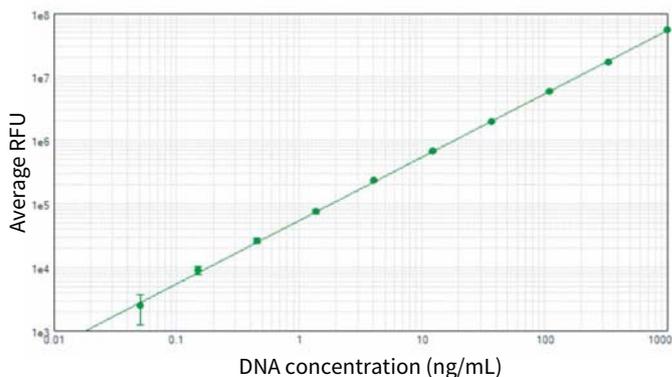


图 1 DNA 标准曲线。采用 Quant-iT PicoGreen dsDNA 检测试剂盒, 在 SpectraMax iD5 酶标仪上检测 50 pg/mL 至 1000 ng/mL 范围内的 DNA 标准品。采用 SoftMax Pro 软件中的对数 - 对数曲线拟合 ( $r^2 = 1.00$ ) 绘制标准曲线。

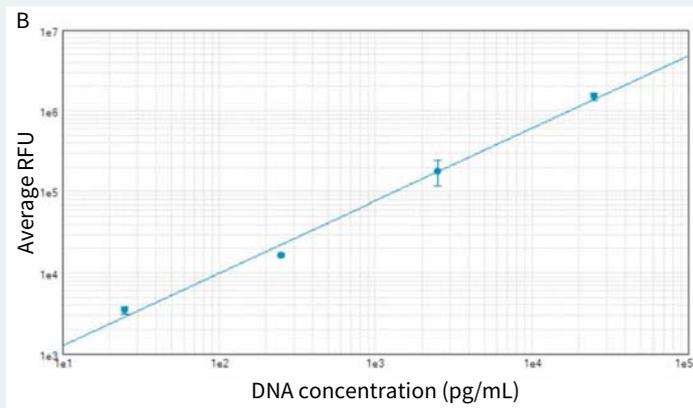
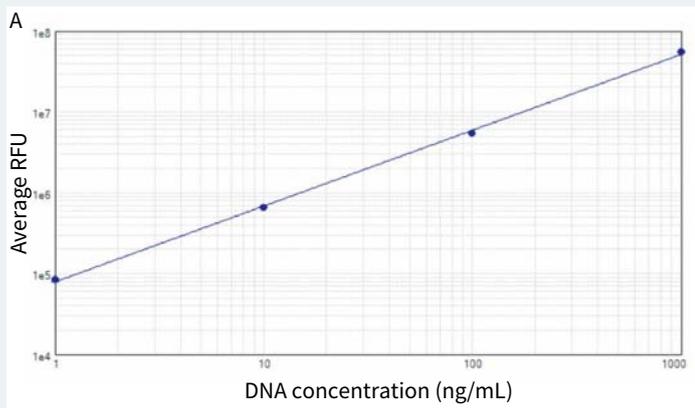


图 2 高范围 (A) 和低范围 (B) 标准曲线。使用 SoftMax Pro 软件中的对数 - 对数曲线拟合绘制曲线 (两条曲线均为  $r^2 = 0.99$ )。

## 总结

Quant-iT PicoGreen dsDNA 检测试剂盒在 SoftMax Pro 软件的 SpectraMax 酶标仪上运行时，是一种快速、灵敏的双链 DNA 检测方法。该软件的分析功能以易于阅读、用户可自定义的报告格式提供定量。一个预先配置的方案在软件中可用，以方便快速检测设置。



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

上海 电话: 86-21-3372 1088

北京 电话: 86-10-6410 8669

成都 电话: 86-28-6558 8820

台北 电话: 886-2-2656 7585

香港

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

传真: 86-21-3372 1066

传真: 86-10-6410 8601

传真: 86-28-6558 8831

传真: 886-2-2894 8267

传真: 852-2289 5385

地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335

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

地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016

地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼

地址: 香港中环皇后大道中 15 号置地广场 公署大厦 21 楼

