

APPLICATION NOTE

SpectraMax ABS Plus 微孔板读板机实现微量 DNA 及蛋白的高通量检测

介绍

核酸及蛋白的定量是遗传学和分子生物学中许多复杂实验上游的基本检测方法。各种方法被开发出来用于定量这些生物学成分，然而最常见的检测手段仍然是紫外分光光度法。分光光度法的基础是每个分子在一定的波长范围内吸收或透射光，在已知样本的消光系数和光径时可以通过朗伯-比尔定律 (公式 1) 计算物质的浓度。

$$A = \epsilon cL$$

公式 1: 朗伯-比尔定律指出吸光度 (A) 等于被测分子的摩尔消光系数 (ϵ) 乘以浓度 (c) 和光径 (L)。重新排列方程式使我们可以用吸光度来计算浓度。

核酸定量是一个非常稳定的技术，其基本原理自诞生以来一直没有太大的改变。为了计算核酸浓度，在 260 nm 处测量样品，并在 230 nm 和 280 nm 波长处进行辅助测量，以检查样品纯度。

蛋白样品也可以使用紫外分光光度法进行定量，然而，有更准确的比色法可用。紫外分光光度法利用色氨酸的芳香性质在 280nm 处吸收光，但是计算的蛋白浓度会受到多种多样的氨基酸序列中的色氨酸残基的影响。另外二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白实验可以不依赖氨基酸序列和长度测定蛋白浓度。该实验利用铜基双缩脲反应，其中氨基酸主干在碱性环境中与铜分子形成色螯合物。

SpectraMax® ABS Plus 是一款袖珍型 UV-Vis 光吸收微孔板读板机，非常适合于这类定量分析。在这里，我们演示了 ABS Plus 读板机与 SpectraDrop™ 超微量板和 SoftMax®Pro 软件相结合的几种不同的方法，可以定量 dsDNA 和牛血清白蛋白 (BSA) 蛋白。

材料

- SpectraMax ABS Plus 微孔板读板机 (Molecular Devices cat. #ABS Plus)
- SpectraDrop 超微量微孔板 (Molecular Devices cat. #0200-6262)
- 96 孔，透明，平底聚苯乙烯微孔板 (Greiner Bio-One cat. #655101)
- 超纯小牛胸腺 DNA (ThermoFisher Scientific cat. #15633019)
- Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific cat. #23225)
- Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard Ampules, 2 mg/mL (ThermoFisher Scientific cat. #23209)
- UV-Star® 96 孔微孔板 (Greiner Bio-One cat. #655801)

优势

- 190-1000 nm 波长覆盖范围适用于更多不同需求定量实验
- SpectraDrop 超微量检测板减少上样体积同时保证其检测灵敏度
- 通过 SoftMax Pro 软件预置模板简化实验流程提高效率

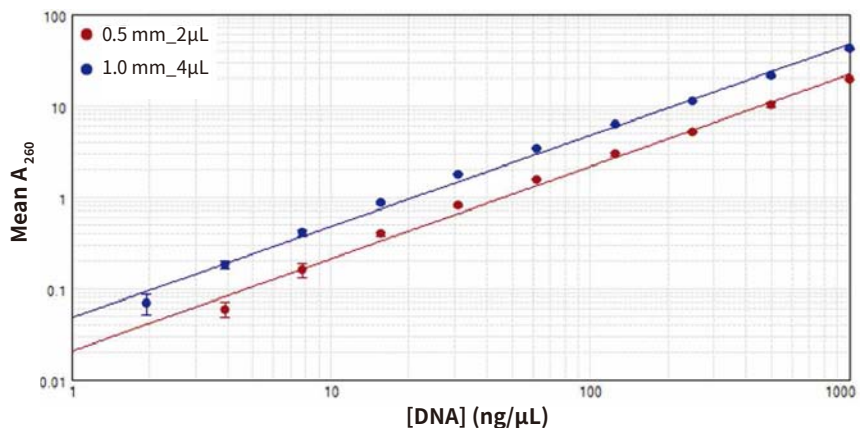


图 1 使用 SpectraDrop™ 超微量板定量 dsDNA。使用 SpectraDrop™ 超微量板在 ABS Plus 读板机上可以测量低至 2 ng/μL 和 4 ng/μL 的 DNA，分别使用 1.0 mm (蓝色) 和 0.5 mm (红色) 盖子

方法

DNA 定量

使用 1xPBS 稀释超纯的小牛胸腺 DNA，以 1000 ng/μL 为起始浓度作 2 倍梯度稀释。吸取 2 μL 和 4 μL 样本放在 64 孔超微量微孔板上，分别盖上 0.5 mm 或 1.0 mm 的盖子盖住 dsDNA 样本。在 SoftMax Pro 软件中打开预配置的模板，“SpectraDrop DNA Quantitation”，使用模板中的设置读板。在 SoftMax Pro 软件中应用 log-log 方法将数据进行拟合，并生成标准曲线。除此之外，对所有浓度进行 220 ~ 350 nm 范围的光谱扫描（4 nm 步径），以评估样品纯度。

在比色皿和微孔板内的定量也做了对比。从 250 ng/μL-0.5 ng/μL 做 2 倍梯度稀释，并取 200 μL 和 1000 μL 分别转移到紫外透明 96 孔板和 UV-Vis 比色皿。两种模式都是在 SpectraMax ABS Plus 微孔板读板机上 260 nm 处读取的，对每个数据集进行 log-log 曲线拟合，使用 SoftMax Pro 软件生成标准曲线。

蛋白定量

根据检测试剂盒说明书，采用 BSA 稀释法制备 BCA 检测标准曲线。25 μL 的蛋白标准品和 200 μL BCA 工作液被转移到一个 96 孔透明微孔板，并在 37°C 孵育 30 分钟。在 SoftMax Pro 软件中打开“BCA”预配置协议，并使用提供的设置在 562 nm 处读取车牌。对数据进行二次曲线拟合，利用 SoftMax Pro 软件生成标准曲线。

结果

ABS Plus 微孔板读板机可以利用微量体积和标准的微孔板方法定量 dsDNA。使用超微量板和预置的模板，ABS Plus 微孔板读板机可以检测 4 μL 样品低至 2 ng/μL 的浓度，并且可以自动检测和计算相对参数，如 A260/A280 和 A260/A230 的比值（图 1 和图 2）。光谱扫描是为了进一步证明样品无污染（图 3）。

1.0mm_4uL												
Sample	Well	KnownConcentration ng/μL	A260	Average A260	STDev A260	A280	A230	260:280	260:230	Co		
01	H7	1000.000	41.445	41.776	0.889	21.457	17.843	1.931	2.323			
	I7		41.351			21.470	17.785				1.926	2.325
	J7		41.207			21.322	17.663				1.933	2.333
	K7		43.101			27.930	24.539				1.543	1.756
02	H8	500.000	21.129	21.102	0.103	10.872	8.875	1.944	2.381			
	I8		21.029			10.808	8.813				1.946	2.386
	J8		21.015			10.801	8.817				1.946	2.383
	K8		21.237			11.183	9.203				1.899	2.308
03	H9	250.000	11.329	11.282	0.041	5.859	4.691	1.933	2.415			
	I9		11.257			5.808	4.641				1.938	2.426
	J9		11.259			5.816	4.639				1.936	2.427
	K9		Masked			Masked	Masked				Masked	Masked
04	H10	125.000	6.335	6.296	0.035	3.367	2.567	1.881	2.468			
	I10		6.283			3.321	2.505				1.892	2.508
	J10		6.269			3.320	2.509				1.889	2.499
	K10		Masked			Masked	Masked				Masked	Masked
05	H11	62.500	3.449	3.425	0.031	1.914	1.349	1.802	2.557			
	I11		3.395			1.868	1.291				1.818	2.630
	J11		3.401			1.884	1.311				1.806	2.594
	K11		3.453			1.909	1.331				1.808	2.594

图 2 SoftMax Pro 软件预置的数据表。该软件预置的模板可以自动计算吸光度的比值以及位置样品的浓度从而简化 DNA 定量实验

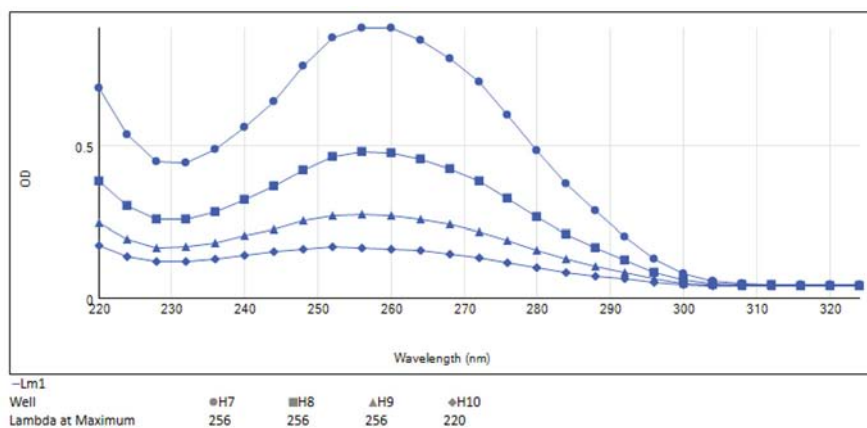


图 3 SoftMax Pro 软件预置的数据图表。通过光谱扫描确认样品纯度。四个 DNA 的相对浓度被扫描，仅在 260 nm 处发现一个峰，表明 dsDNA 为纯 DNA

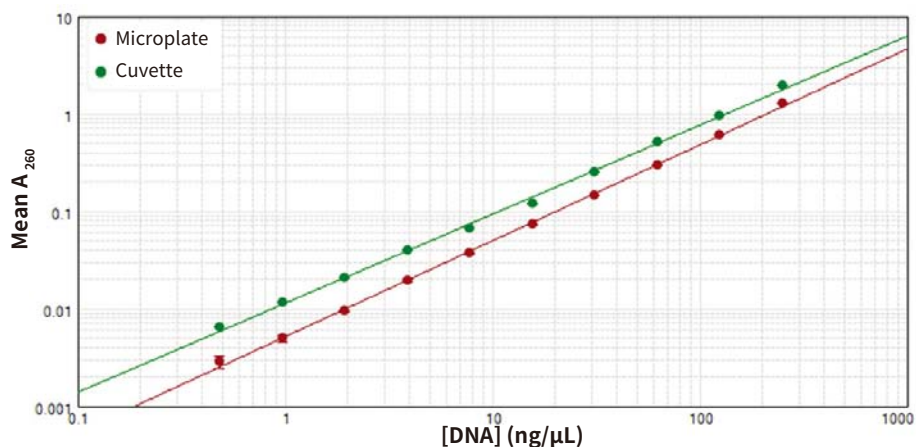


图 4 在 96 孔板和比色皿内定量 dsDNA。在 96 孔板和比色皿内分别检测在 250 ng/μL - 0.50 ng/μL 梯度稀释的 dsDNA。另外两个结果都显示出高度的线性度

另外，ABS Plus 微孔板读板机可以在微孔板模式下定量 dsDNA。使用紫外透明板，读板机可以检测低至 0.5 ng/ μ L dsDNA (图 4)。

最后，SpectraMax ABS Plus 微孔板读板机可以结合 BCA 法对蛋白质样品进行定量分析。按照提供的试验方案，检测 BSA 的标准品，并生成一条与检测试剂盒中的曲线相比较的标准曲线 (图 5)。

总结

SpectraMax ABS Plus 微孔板读板机是一款小型的，能够通过各种形式 (如比色皿或微孔板) 对核酸和蛋白质样品进行定量的微孔板读板机。当结合 SpectraDrop 超微量微孔板时，该读板机可以一次检测体积低至 2 μ L 的 64 个样品。另外，SoftMax Pro 软件预置的模板可以优化实验，加速获取结果。

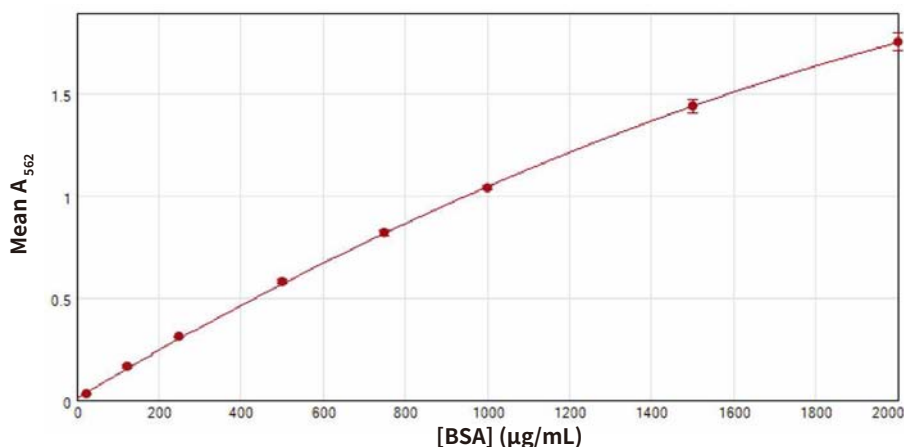


图5 BCA 试验标准曲线。ABS Plus 微孔板读板机可以检测 BCA 的标准曲线，使用 SoftMax Pro 软件对数据点进行二次曲线拟合，生成标准曲线 ($r^2 = 1.000$)



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 公爵大厦 21 楼

