

Molecular Devices的SpectraMax系列微孔板读板机可对DNA和RNA进行快速、准确的检测



SpectraMax®微孔板读板机具有检测精度高和重复性好等特点，能够准确的检测260nm波长处光吸收值。使用Molecular Devices公司专利^[1]的PatchCheck®传感器后可将获得的结果自动转换为1cm光径下相对应的读值，使得该值与使用标准比色皿检测后获得的结果具有可比性。SoftMax®Pro软件能够自动计算出结果并以报告格式输出。

图一：SoftMax Pro软件中进行设置



SoftMax Pro软件中设置 PatchCheck功能

可见PatchCheck设置选项在SoftMax Pro 6 软件设置步骤中位置(见图一)，用户如勾选上“PatchCheck”功能后，软件会自动将光吸收结果换算为标准1cm光径下的读值。

优势：

- 可检测8, 12和96道移液器准确度和精度
- 最低检测体积4μl
- 使用水或者已知分装试剂
- 只需几分钟

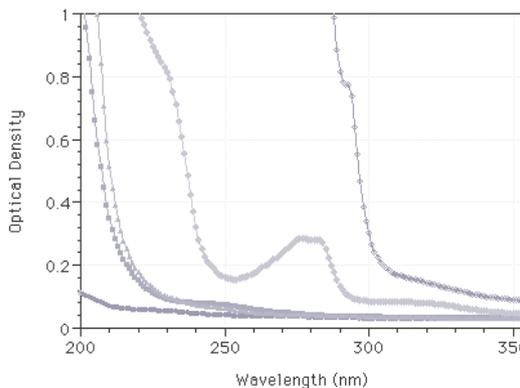
材料

- SpectraMax Plus或SpectraMax 190微孔板读板机 (Molecular Devices, LLD)
- UV-可透型微孔板 e.g. UV-Plate(Corning-Costar Cat.#3635), UV-Star(Greiner Cat.#655801, E & K Scientific Products), UVMax(Polyfiltronics, Whatman Labsales), 石英微孔板(Hellma cells, Inc.)

UV-可透型微孔板

目前石英微孔板已被广泛应用，但是价格比较贵(>\$1,000)，标准的聚苯乙烯微孔板不适于紫外光区的检测，因为低于300nm波长的光无法穿透此类材质的微孔板，除了石英微孔板外，至少还有三种UV-可透型塑料材质的微孔板可用于300nm以下波长的检测(图二)，Corning Costar UV和Greiner UV型微孔板可支持穿透光的波长下限达到215nm左右，Polyfiltronics UV型微孔板可支持穿透光的波长下限在240nm，但其在280nm波长处有一个小的吸收峰。

图二：光谱扫描结果



在SPECTRAmax plus微孔板读板机上检测，不同微孔板光谱扫描(每孔含有200μl水)结果，从左至右石英微孔板、Greiner UV微孔板，Costar UV微孔板，Polyfiltronics UV微孔板和普通聚苯乙烯微孔板。

如何获得更优检测结果^{1,2}

- 使用洁净的微孔板和澄清的溶液
- 注意如果缓冲液的光吸收值作为空白对照时，如果这些结果不能够落在期望的动态区间内，最大可能性是微孔板表面不够洁净、残次品或者孔内有颗粒物。当石英微孔板内加入水后其在260nm处的光吸收值在0.03-0.04之间，标准偏差值(SD)<0.002。Costar UV和Greiner UV的微孔板可能由于批次不同或许会略有差别，但是在260nm处光吸收的平均值在0.045-0.06之间，标准偏差均值(SD<0.002)，Polyfiltronics UV型微孔板检测背景值会更高，但是可以通过预读一下微孔板然后每孔相应的减去其背景值的方法来获得理想的检测结果(软件自动进行优化)。
- 如果你的实验过程要用大量稀释液对少量的样品(1-20μl)进行稀释时，首先吸少量样品，然后加入稀释缓冲液中，在SpectraMax微孔板读板机上自动震荡10-20S。
- 注意如果溶液中离子浓度增加会降低吸光值，将DNA直接溶解在水中其吸光值较将DNA溶解在盐离子溶液中高出30%。
- 例如光吸收值较低的样品，可同过增加样品溶液的体积(250-300μl)来获得更长的光路径，如果可能的话可做两至三个平行孔。
- 使用PathCheck传感器可将260 光吸收值自动换算为标准1cm光径下的读值。

[1] U.S. Patents 6,496,260 and 6,995,844 (实用新型专利)

DNA样品的检测

如图三所示DNA在260nm波长处的光吸收值，检测下限(即光吸收值高于空白SDs值的3倍)大约是25ng/孔，定量下限大约是75ng/孔(试剂空白SDs值的10倍)，使用微孔板检测的结果与已发表文献中使用分光光度计来检测260nm波长处DNA的光吸收的结果相吻合，对更低浓度的DNA定量检测时需要其它更加灵敏的检测技术，例如荧光染料方法。

使用DNA(or RNA)吸光率估算浓度值

DNA(或 RNA)浓度值通常用标准1cm光径下的吸光率除以260nm波长处光吸收值来进行估算(或乘以它的倒数)。使用PatchCheck后，SpectraMax读板机就能自动将光径转换为标准1cm的长度并计算浓度值。双链DNA的1/吸光率值在标准1cm光径长度下大约为50µg/ml。然而，只有当溶液中盐离子浓度较高情况下这个值是正确的(图四)。DNA在水中的吸光率较在盐离子溶液中的吸光率高出30%左右。

SoftMax Pro 软件

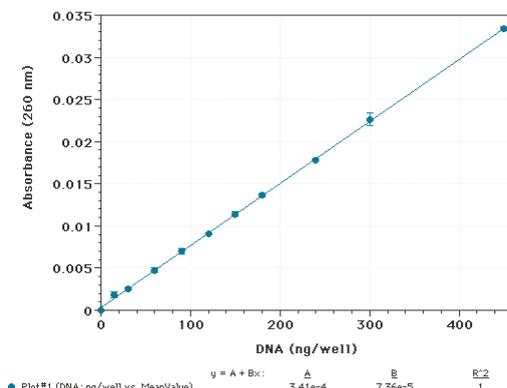
DNA(或RNA)检测试验通常需要将少量样品(2-10µl)稀释后，测量其在260nm波长处的光吸收值。SoftMax Pro软件能够自动计算其在260nm波长处的光吸收值，确定样品的原始浓度值和计算出后续试验需要的样品体积。SoftMax Pro软件同样能够兼移液系统，最小设置0.5µl步进。例如图五所示在260nm处检测5µl体积的样品，目标DNA含量需求为0.4µg。每个样品需要的体积计算后以0.5µl进行四舍五入,这些结果很容易导出到其它数据处理系统中。

总结

现在使用微孔板精确、重复的检测DNA(或RNA)的数值变得更加容易，其定量检测结果的下限可与传统的UV-Vis分光光度计相媲美，PatchCheck传感器会自动将检测结果换算成为标准1cm光径下的读值，SoftMax Pro软件不但会自动算出其浓度，还可以给出后续步骤中需要移液的体积。

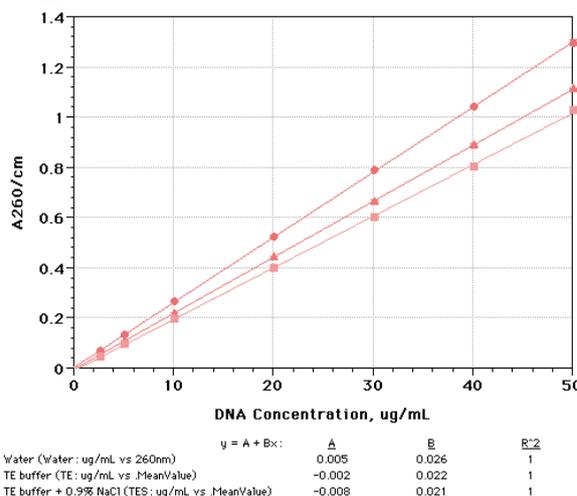
- 1 McGown, E.L. 1999. MAXline Application Note # 32
- 2 McGown, E.L. 1999. MAXline Application Note # 33
- 3 Beaven, G.H., E.R. Holiday and E.A. Johnson. 1955. The Nucleic Acids Vol. 1. p. 493 - 553; Academic Press, New York. (E. Chargaff and J.N. Davidson, Eds.)
- 4 Wilfinger, W.W., K. Mackey and P. Chomczynski. 1997. BioTechniques 22: 474 - 479.
- 5 Sambrook, J., E. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. p. E.5.
- 6 Gallagher, S.R. 1994. Current Protocols In Molecular Biology Vol. 3. John Wiley & Sons, pp. A3.D1 - A3.D3.

图三：光密度范围



使用DNA的水溶液制作标准曲线，300µl/孔。Costar UV微孔板，小牛胸腺DNA稀释于水中，稀释浓度范围从0.1-1.5µg/ml，三个复孔且每孔300µl体积，加入到Costar UV微孔板中，使用PatchCheck功能在260nm波长处进行检测。

图四：盐离子浓度对DNA在260nm波长下吸收值的影响



DNA溶于去离子水或TE缓冲液(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4)，或者TES (TE buffer + 0.9% NaCl)，(1/吸光率值)；7个浓度的平均值(2.5µg-50µg/ml)，每个样品4个重复。

图五：提取DNA

Sample	Wells	OD 260nm	ng/µL	Target Aliquot*	Aliquot**
1	D1	0.125	250.9	1.59	1.5
	D2	0.126			
2	E1	0.074	144.4	2.77	3.0
	E2	0.071			
3	F1	0.120	259.5	1.54	1.5
	F2	0.140			
4	G1	0.048	98.2	4.07	4.0
	G2	0.050			
5	H1	0.142	290.9	1.37	1.5
	H2	0.149			

*Aliquot size needed to transfer 400 ng
**Aliquot size rounded to nearest 0.5 µL

SoftMax Pro软件可列出DNA抽提的结果和计算出含有一定量DNA的溶液体积，可自动生成报告。

美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询热线: 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

