

APPLICATION NOTE

如何利用 SpectraMax ABS Plus 微孔读板机进行微量 DNA 和蛋白的高通量检测

介绍

在遗传学和分子生物学中，对核酸和蛋白进行定量是许多复杂实验必要的上游检测。虽然已有多种检测方法，但是最常用的仍然是紫外分光光度法。紫外分光光度法的原理是利用分子在固定波长范围吸收光和散射光，在朗伯比尔定律（方程式 1）的基础上计算待测物质的浓度。这种方法还需要提前知道样品的摩尔消光系数和通路长度。

$$A = \epsilon cL$$

方程式1: 朗伯比尔定律是指吸光度 (A) 等于分子摩尔消光系数 (ϵ) 乘以浓度 (c) 和通路长度 (L)。变换等式后我们可以利用吸光度来计算浓度。

核酸定量已经是一门非常成熟的检测技术了，并且与最初相比其检测原理并未发生太多的改变。我们可以在 260 nm 波长下检测核酸浓度，并且可以利用 230 nm 和 280 nm 波长检测样本纯度。

我们同样可以用紫外分光光度法对蛋白质样本进行定量，然而除此之外还有更多更准确的比色测定法。紫外分光光度法利用色氨酸的芳香结构特性吸收 280 nm 波长的光，浓度的计算依赖于氨基酸序列上的不同含量的色氨酸残基。另外，二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白实验可以在不依赖于氨基酸序列和长度的情况下检测蛋白浓度。此方法是在碱性条件下利用双缩脲反应使氨基酸骨架和铜离子形成带颜色的螯合物进行测定的。

SpectraMax® ABS Plus 是一款理想的进行这些定量实验的紫外可见光谱微孔读板机。在这里，我们展示了几种不同的将 ABS Plus reader 和 SpectraDrop™ Micro-Volume Microplate and SoftMax® Pro Software 相结合用来定量检测双链 DNA 和牛血清白蛋白 (BSA) 的方法。

优势

- 更宽的波长检测范围：190 - 1000 nm
- 配合使用超微量板可大大节省样品的上样量
- SoftMax Pro 软件预置模板使得操作更加简便

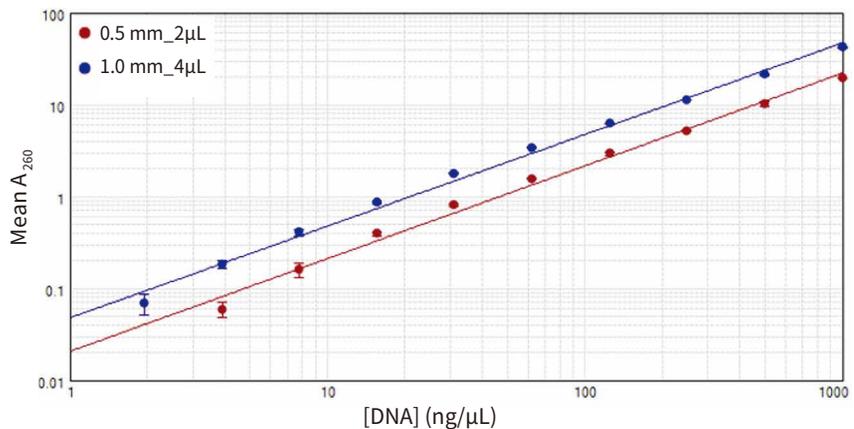


图 1 利用 SpectraDrop 超微量板进行 dsDNA 的定量 ABS Plus 读板机配置 SpectraDrop 微孔板后，对 DNA 的检测灵敏度可以降低至 2 ng/μL 和 4 ng/μL，图中所示为检测 DNA 的浓度曲线，其中蓝色为 1 mm 盖玻片，红色为 0.5 mm 盖玻片

材料

- SpectraMax ABS Plus 微孔板读板机 (Molecular Devices cat. #ABS Plus)
- SpectraDrop 超微量板 (Molecular Devices cat. #0200-6262)
- 96 孔平底透明塑料板 (Greiner Bio-One cat. #655101)
- UltraPure™ 小牛胸腺 DNA 溶液 (ThermoFisher Scientific cat. #15633019)
- Pierce BCA 蛋白质定量试剂盒 (ThermoFisher Scientific cat. #23225)
- Pierce™ 牛血清蛋白标准品 Ampules, 2 mg/mL (ThermoFisher Scientific cat. #23209)
- UV-Star® 96 孔板 (Greiner Bio-One cat. #655801)

方法

DNA 定量

1000 ng/μL 的超纯小牛胸腺双链 DNA，用 1x PBS 倍比稀释。将 2 或 4 μL 样品加入 64 孔 SpectraDrop 微量板中，并用 0.5 mm 或 1.0 mm 盖玻片盖住样品。打开 SoftMax Pro 软件中预先设置好的程序“SpectraDrop DNA Quantitation”，按照默认设置对板进行读数。数据结果用双对数曲线进行表示，SoftMax Pro 软件会进一步生成标准曲线。另外，通过范围为 220 nm 至 350 nm，步进为 4 nm 的光谱扫描可以检测样品纯度。

我们也比较了运用比色皿和微孔板进行 DNA 定量检测的优劣。待测样品按照倍比稀释为 250 ng/μL 至 0.5 ng/μL，然后加入紫外透明 96 孔微孔板中（每孔 200 μL）或者紫外可见比色皿中（1000 μL）。我们用 SpectraMax ABS Plus 微孔读板机在 260 nm 对样本进行了检测。数据结果用双对数曲线进行表示，SoftMax Pro 软件会进一步生成标准曲线。

蛋白质定量

按照 BCA 实验试剂盒提供的步骤稀释蛋白样本并做标准曲线。将 25 μL 蛋白标准品和 200 μL BCA 反应液加入 96 孔微孔板中 37°C 孵育 30 min。用 SoftMax Pro 软件打开预设程序“BCA”，在 562 nm 波长条件下读数。数据用二次方曲线拟合，进而用 SoftMax Pro 软件生成标准曲线。

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 软件生成数据表 软件预置模板可以自动计算吸光度比值和样品浓度，大大简化了 DNA 定量实验操作过程

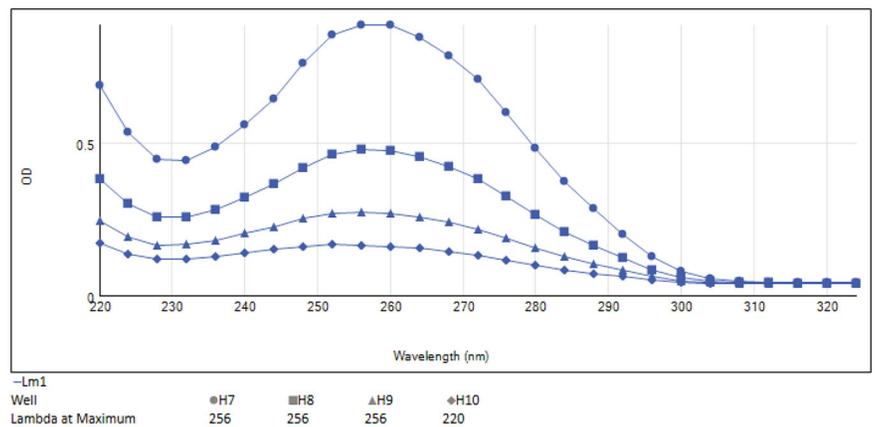


图3 SoftMax Pro 软件扫描光谱示意图 光谱扫描可以检测样品纯度，四种不同浓度的 DNA 扫描曲线如图所示，都显示只在 260 nm 有峰，说明样品纯度较高

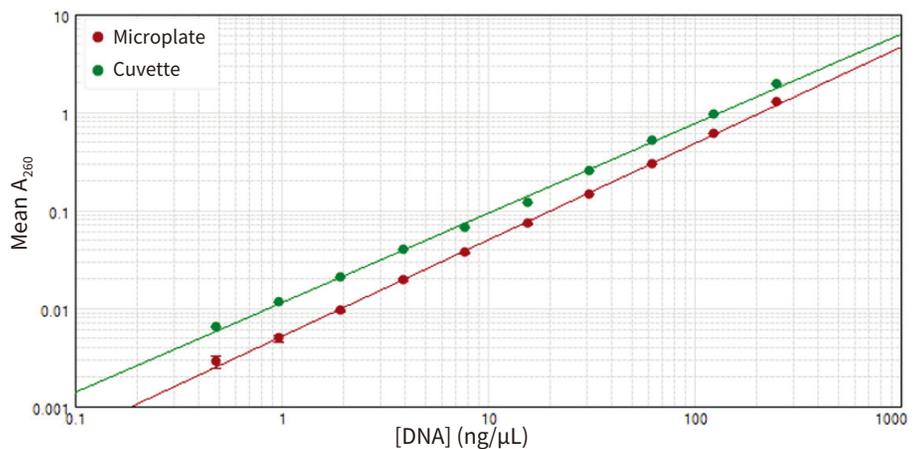


图4 用 96 孔板或比色杯进行 dsDNA 定量 dsDNA 浓度从等比稀释液 250 ng/μL 到 0.50 ng/μL，分别加入比色杯和微孔板检测，结果显示两种检测方法得到的曲线都具有良好的线性

结果

ABS Plus 微孔读板机可以在微量和标准微孔板条件下定量检测双链 DNA 浓度。利用 SpectraDrop 微量板和预设程序, ABS Plus 微孔读板机可以检测到浓度低至 2 ng/ μ L 体积为 4 μ L 的样本, 并且可以同时测量计算相关参数如 A_{260} / A_{280} 和 A_{260} / A_{230} 比例 (图 1 和 图 2)。光谱扫描可以进一步检测样本是否被污染 (图 3)。另外, ABS Plus 微孔读板机可以用微孔板方法对双链 DNA 定量。利用紫外区透光型微孔板, 读板机可以检测浓度低至 0.02 ng/ μ L 的双链 DNA (图 4)。最后, SpectraMax ABS Plus 微孔读板机可以在 BCA 浓度测定法的基础上检测蛋白浓度。按照试剂盒说明书的步骤检测 BSA 标准品浓度并绘制标准曲线 (图 5)。

结论

SpectraMax ABS Plus 微孔读板机是一款简单可靠的仪器, 支持多种检测方法, 比如比色皿和微孔板, 进行核酸和蛋白质定量的微孔板检测仪器。如果和 SpectraDrop 超微量板搭配使用, 此读板机可以一次定量 64 个体积低至 2 μ L 的样本。另外, SoftMax Pro 软件的预设模板程序可以优化实验条件并且能更快得到结果。

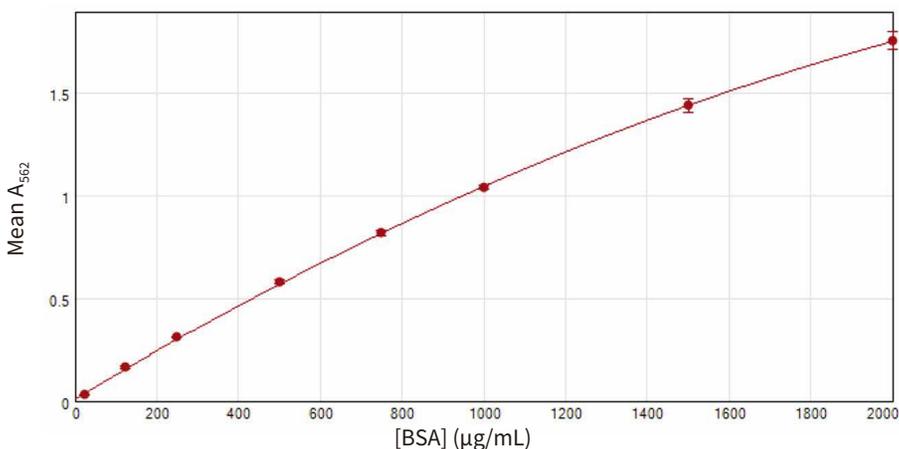


图 5 BCA 检测标准曲线 SpectraMax ABS Plus 微孔读板机可以检测 BCA, SoftMax Pro 软件可利用生成的二次方标准曲线计算出样品浓度, 标准曲线 $r^2 = 1.000$



扫一扫关注我们
的官方微信

美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询服务热线: 400-820-3586

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

上海 电话: 86-21-3372 1088

传真: 86-21-3372 1066

地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335

北京 电话: 86-10-6410 8669

传真: 86-10-6410 8601

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

成都 电话: 86-28-6558 8820

传真: 86-28-6558 8831

地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016

台北 电话: 886-2-2656 7585

传真: 886-2-2894 8267

地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼

香港

传真: 852-2289 5385

地址: 香港中环皇后大道中 15 号置地广场 公爵大厦 21 楼

