

安捷伦 Cary 60 紫外-可见分光光度计配置微光纤探头测定 4 °C 下微量 DNA 的纯度

应用摘要

医药/生物技术

作者

*Fyfe, DJ 和 Comerford, JC**

*Fyfe 科技公司, West Lakes
Shore, SA 5020, 澳大利亚

**安捷伦科技公司,
679 Springvale Road,
Mulgrave 3179, 澳大利亚

总结

安捷伦 Cary 60 紫外-可见分光光度计是在储存环境（如冰箱）下直接测定微量生物样品的理想仪器。本应用报告展示了如何使用 Cary 60 及其微光纤探头附件测定 4 °C 下的 DNA 纯度——结果表明，使用该仪器能够大幅节省时间和成本，同时数据精确度和重现性毫无损失。

- 不再需要比色皿
- 直接测定 4 °C 冰箱中的样品
- 节省每次分析的时间与成本

前言

多年以来，紫外-可见分光光度计一直是生物技术领域中测定 DNA 纯度和浓度的一项重要工具。该方法最早由 Warburg 和 Christian 在 1942 年开发¹，随后由 Sambrook 等人在 1989 年进行了优化，使其可用于实验室中简便、快速的测定²。分光光度法的主要优点在于测定过程：1) 简便；2) 准确；3) 不破坏样品。这一方法可以节省时间而不损失数据质量，并且在测定过程中无需使用大体积的样品或额外的耗材，从而带来经济效益。



Agilent Technologies

在之前的文章中，我们介绍了安捷伦 Cary 50 紫外-可见分光光度计配置 Hellma（德国 Hellma GmbH & Co.）的 Traycell 微量比色池紫外-可见在室温下准确、可重现地测定微量 DNA 的方法³。在本研究中，我们采用带光纤探头的 Cary 60 紫外-可见分光光度计进行了方法扩展研究，在 4 °C 以及普通实验室环境光照条件下测定了小体积样品。本方法使得用户可以将仪器靠近样品，而不是像传统光谱方法那样将样品放入仪器中，从而能够在很短的时间内完成分析。Cary 60 独有的光学设计使这一优势得以实现，它主要凭借其独特的高强度闪烁氙灯以及最新型的电子器件，使系统能够有效地监控吸光度的微小变化而不受环境背景光的任何影响。本文深入讨论了这一方法的主要优点。

仪器与材料

部件号	说明
G6860AA	Cary 60 紫外-可见分光光度计，配备 WinUV 软件和 HP 电脑（台式机）
7910035600	微光纤探头
G6866A	光纤探头耦合器
6610000800	石英比色皿（光程 1 cm；两只装）
D-4764（Sigma 化学公司）	小牛胸腺 DNA；1

方法与结果

将小牛胸腺 DNA 用纯净水（MilliQ）稀释得到不同浓度的样品，浓度范围 0–50 µg/ml。

配有光纤耦合器以及微探头的 Cary 60，如图 1 所示。在 Eppendorf 管中加入 150 µL 纯净水（MilliQ），将其读数作为空白。

由于分子生物学试剂通常保存于冷藏条件下，因此所有样品直接从 4 °C 冰箱中取出并进行分析。



图 1. 配有光纤附件的 Cary 60 测试 4 °C 下 Eppendorf 管中 150 µL DNA 的示意图。

开始时，使用 WinUV 软件“扫描”模块在 340 到 240 nm 范围进行扫描以确认最大吸收峰以及所购买的按 50:50 稀释的 DNA 样品的可靠性（图 2）。

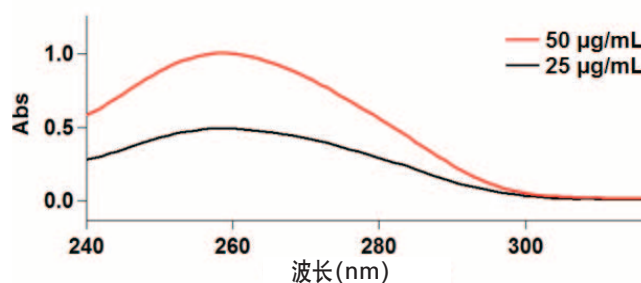


图 2. 对 4 °C 下两个浓度的 150 µL DNA 样品的扫描表明特征吸收峰出现在 260 nm 处。注意：50 µg/ml DNA 最大吸光度值 1.0Abs，25 µg/ml DNA 最大吸光度值 0.5Abs，遵守 Beer Lambert 定律 ($A = \epsilon cl$)。

为了确认 DNA 的纯度，使用 WinUV 软件专门的“RNA/DNA”模块测定 260/280 比率，该模块可自动计算 DNA 样品的纯度。如图 3 所示，这一模块使用非常简单，可以在一分钟内完成分析。

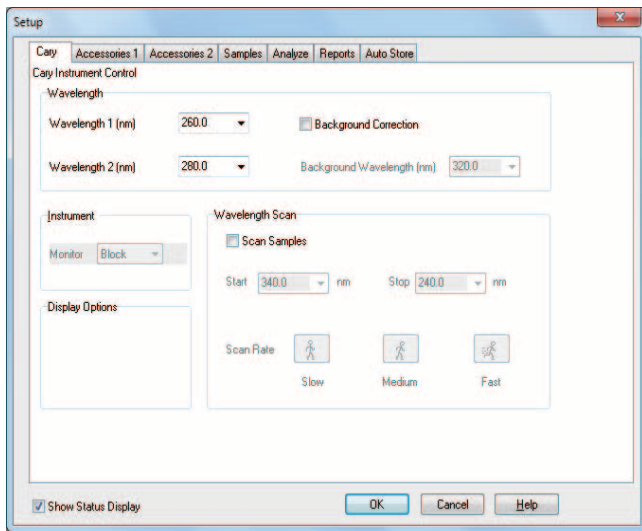


图 3. 简便、专用的 Cary WinUV 自动计算 DNA 的纯度、可靠性和浓度

最后，绘制浓度曲线以评估同一实验室条件下不同浓度 DNA 样品读数的线性和重现性(图 4)。在两个 DNA 样品读数间隙使用 MilliQ 纯净水清洗微探头。

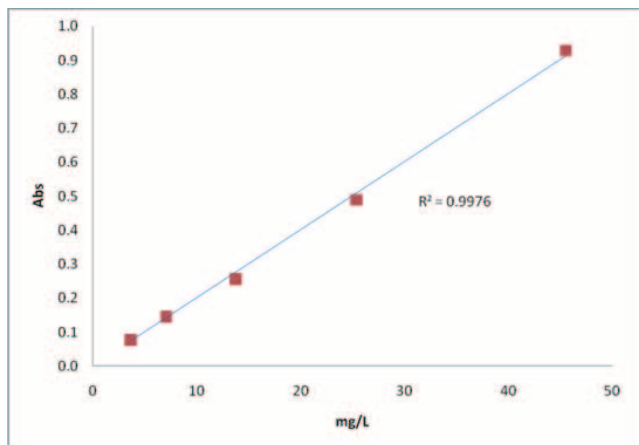


图 4. 使用微探头光纤附件在实验室常规光照条件下测定 4 °C 下 Eppendorf 管中 50 μ L DNA 样品 (0–50 μ g/mL) 得到的浓度曲线。校准方程: $Abs = 0.02393 \times \text{浓度}$; 相关系数 = 0.99126。

讨论

测定五个样品所用的时间不到两分钟。传统方法使用微量比色皿，需要等待样品加热至室温，而且在每两次测定间需要清洗微量比色皿。总之，使用 Cary 60 光纤系统可以显著降低大约 80% 的分析时间，同时采用光纤技术不易受到样品处理引起的潜在污染。使用微探头可以获得高精度的数据并大大缩短测定低温样品所需的时间，这表明 Cary 60 是一种适于测定生物样品（如 DNA）的简便、快速且高性价比的系统。本方法可以轻松直接扩展到其它样品类型，例如可在 280 nm 处测定蛋白质。

结论

Cary 60 紫外-可见分光光度计是使用光纤采样的理想仪器，它独有的高强度闪烁氙灯可以提供卓越的灵敏度和重现性。本应用报告所展示的测定 DNA 样品时的分析速度、结果重现性以及易用性证明了该仪器系统的强大优势。

使用带光纤的 Cary 60 分析生物样品还具有如下优点：

- 可以直接测定高温或低温样品（4 °C – 110 °C）而无需考虑冷凝的问题，如果使用比色皿则由于冷凝可能导致结果不正确或重现性不好
- 样品体积不受限制，可以低至 40 μ L，也可以无限大
- 无需购买昂贵的石英微量比色皿，更节省了清洗比色皿的时间
- 使用反射探头还可以分析固体、粉末或凝胶类样品

1. Warburg, O. and Christian, W. (1942)
Biochem Z., **310**; 384.
2. Sambrook, J., Fritsch, EF. and Maniatis, T.
(1989) *Molecular Cloning. A Laboratory
Manual. Second Edition*, Cold Spring Harbor
Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
3. Keighley, B. and Fyfe, D. (1995) *应用摘要*
#91. www.agilent.com

www.agilent.com/chem/cn

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011

2011年5月19日出版

出版号 5990-7863CHCN



Agilent Technologies