

# PicoGreen 荧光法定量生物制品 DNA 残留 在 Modulus™ 单管型多功能检测仪上的应用



## 1. 应用说明

疫苗是现代疾病预防中常用的控制方式。如今许多疫苗是细胞培养疫苗，比如重组乙型肝炎疫苗、狂犬病疫苗等大多数疫苗都采用细胞培养的方法生产。其中，疫苗的纯化是关键问题，我们需要尽可能的去除宿主细胞 DNA 和宿主蛋白。假若宿主细胞的 DNA 和蛋白同疫苗一起注入人体将会产生不可预料的后果。

常规的 DNA 含量的检测方法是在 260nm (A260) 处测其吸光值。这种方法的主要缺点是核苷酸、单链核酸和蛋白质对信号的影响很大，并且还会受到核酸制备过程中污染物的干扰，无法区分 DNA 和 RNA，而且这种方法不灵敏（5 $\mu$ g/mL dsDNA 溶液 A260=0.1）。

在 2010 年版《中国药典》的征求意见稿中，针对生物制品的 DNA 残留检测，药典提供了两种检测方法。其中的 PicoGreen 定量检测方法简单、方便，被多家生物制品厂所选择，成为生物制品残留 DNA 检测的标准。

Modulus™ 单管型多功能检测仪是 Turner Biosystems 公司的一款产品，具有发光、荧光和吸收光检测功能。使用 Modulus™ 单管型多功能检测仪，可以通过 PicoGreen 来精确定量 dsDNA。如果使用微量适配器，可以将检测体积减少到 100 $\mu$ l 以下，节约样品的同时也节约了染料的成本。

## 2. 所需器材

- Modulus™ 单管型多功能检测仪 (9200-003)
- 微量适配器 (9200-928)
- 微量比色皿
- PicoGreen 试剂

## 3. 试验方案

### 3.1 试剂准备

PicoGreen 是以 1mL 的浓缩液形式保存在无水的 DMSO (二甲基亚砜) 中。实验当天，配制 2  $\times$  PicoGreen 试剂的工作溶液，用 1 $\times$  TE 按 1:200 的比例稀释浓缩液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.5)。如果要准备足够的工作溶液测定 20 个样品，可在 20mL 1 $\times$  TE 中加入 100 $\mu$ L PicoGreen dsDNA 定量试剂。由于试剂容易吸附到玻璃表面，要在塑料容器中配制。PicoGreen 试剂见光易降解，所以应将配好的溶液用箔包住或放置暗处避光保存。

溶液最好在配制好数小时内使用，以保证最佳结果。

### 3.2 DNA 标准曲线

3.2.1 标准品工作液的配制: Sigama 小牛胸腺嘧啶 DNA 干粉 (货号: D4522-1MG) 1mg (Tris,

NaCl 等浓度已成标准体系），加入 1mL 双蒸水，配制成 1mg / mL 的标准品工作液；

### 3.2.2 标准品工作液稀释：

(1) 母液稀释：取 10ul (1mg / mL) 标准品工作液加入到 990ul TE 溶液中，浓度稀释成 10ug / mL，取 10ul (10ug / mL) 标准品工作液加入到 990ul TE 溶液中，浓度稀释成 100ng / mL；

(2) 倍比稀释：取 800ul (100ng / mL) 的标准品工作液加入到 200ul TE 溶液中，浓度达到 80ng / mL (药典规定：荧光染色方法 DNA 含量在 1.25-80 ng/mL 范围线性较好，该法 DNA 检出限为 0.3 ng/ml)，取 500ul (80ng / mL) 的标准品工作液加入到 500ul TE 溶液中，浓度稀释到 40ng / mL；依次倍比稀释，配成 20ng/ml、10ng/ml、5.0ng/ml、2.5ng/ml、1.25ng/ml、0.625ng/ml 的标准品溶液；

3.2.3 标准曲线的制备：倍比稀释后的各梯度标准品溶液和染料工作液各取 100ul 混匀，避光室温放置 5min。

2×DNA 溶液浓度 (ng/mL)	2×DNA溶液的体积 (mL)	2×PicoGreen 溶液的体积 (mL)	PicoGreen 试剂测定中 DNA 的终浓度 (ng/mL)
80	0.5	0.5	40
40	0.5	0.5	20
20	0.5	0.5	10
10	0.5	0.5	5
5	0.5	0.5	2.5
2.5	0.5	0.5	1.25
1.25	0.5	0.5	0.625
0.625	0.5	0.5	0.3125
0	0.5	0.5	空白

表 1：标准曲线的溶液制备

3.2.4 使用 Modulus™ 单管型多功能检测仪的 Blue 荧光模块检测样品的荧光值：将混合后的溶液加入微量比色皿，确信不要在样品中引入气泡，轻轻地弹微量检测皿的外部，可以驱散气泡。以 1×TE 缓冲液为 blank，测定样品和空白对照的荧光值；用标准品溶液的浓度 (ng/ml) 对应的荧光强度作直线回归，制备标准曲线 (图 1、图 2)；

2×DNA 溶液浓度 (ng/mL)	PicoGreen 试剂测定中 DNA 的终浓度 (ng/mL)	荧光值
80	40	3260.19
40	20	1774.12
20	10	911.85
10	5	537.89
5	2.5	331.99
2.5	1.25	219.69
1.25	0.625	179.06
0.625	0.3125	156.82
空白	空白	115.51

表 2：标准曲线样品检测值

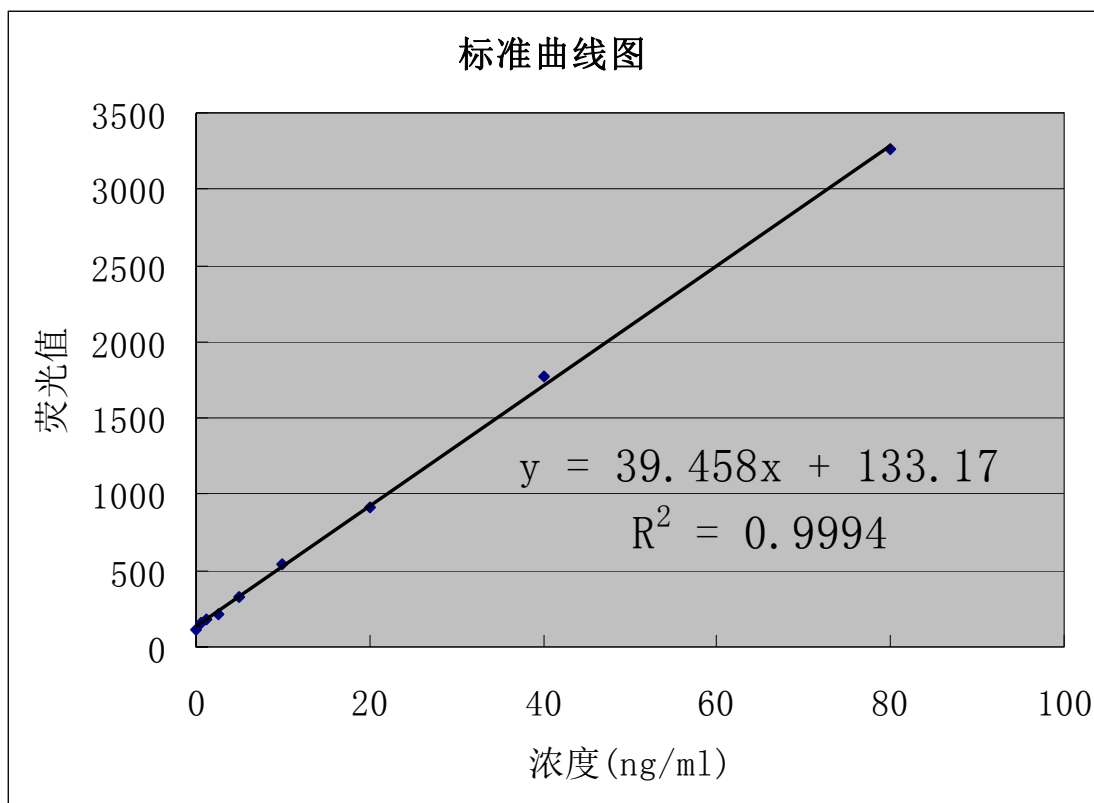


图 1: 标准曲线

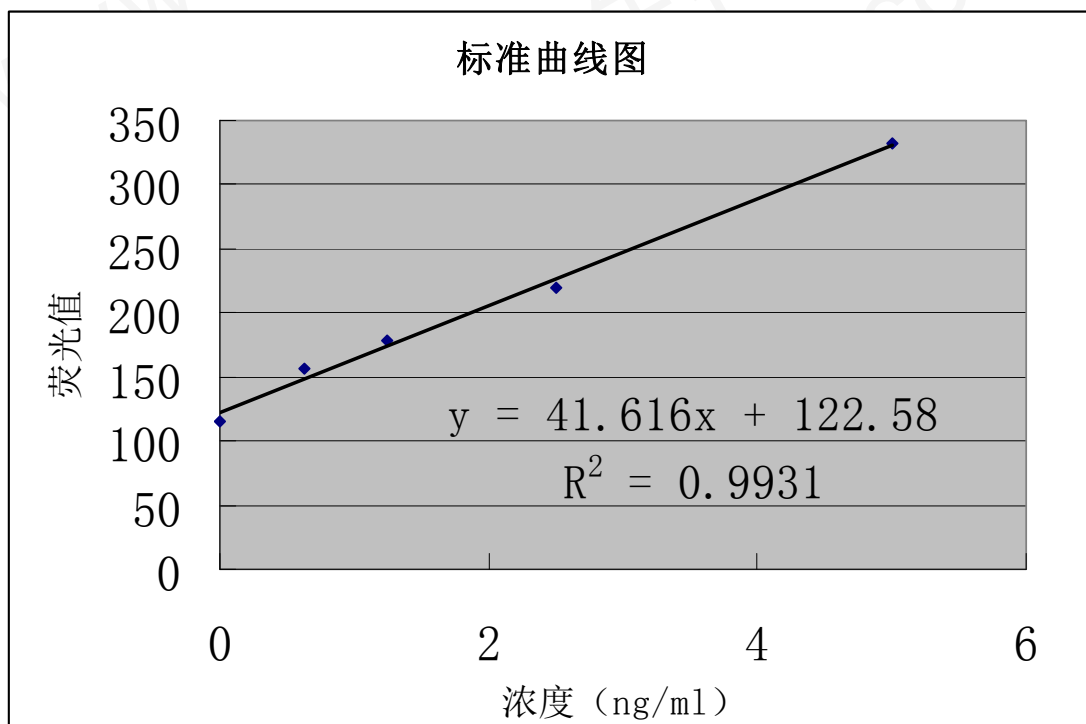


图 2: 图 1 左下角低浓度部分的标准曲线放大

#### 4 样品分析

在每个样品中加入等体积的 2×PicoGreen 工作溶液（3.1 节准备），充分混匀，避光于室温下孵育 5 分钟。将孵育好的溶液加入微量比色皿，使用 Modulus™ 单管型多功能检测仪检测其荧光值。将样品溶液的荧光强度代入回归方程，求出样品的残余 DNA 含量 (ng/ml)。

## 5 结果分析

在 2010 年《中国药典》(征求意见稿)中提出, PicoGreen 定量 DNA 的方法检出限约 0.3ng/ml, DNA 含量在 1.25-80 ng/mL 范围时线性较好。

在此次制备的标准曲线中, 在 0.625-80ng/ml 保持了极好的线形 ( $R^2=0.9994$ ), 最低标准曲线点达到了 0.3125ng/ml, 并且有进一步稀释检测的可能。这表明 Modulus™ 单管型多功能检测仪可以完全满足药典规定的 PicoGreen 检测试验, 并且可以进一步实现更高的灵敏度需求。

## 6 关于 Modulus™ 单管型多功能检测仪

Modulus™ 单管型多功能检测仪是 Turner Biosystems 公司生产的一款单管型多功能检测仪, 它具有生物与化学发光检测、荧光检测和光吸收检测三个功能。Modulus™ 单管型多功能检测仪采用模块化设计, 可根据实验的需求, 选用相应的检测模块, 来完成生物与化学发光、荧光或光吸收检测。