

用于 DNA 定量检测的 Hoechst 33258 荧光染料

在 Modulus™ 单管型多功能检测仪上的应用



1. 应用说明

在分子生物学的许多试验中，DNA 定量都是一个很重要的步骤。用到 DNA 的常用技术有序列分析、cDNA 合成和克隆、RNA 转录、转染、核酸标记（比如，随机引物标记）等等，这些试验的好坏取决于所使用模板浓度，对所用 DNA 模板浓度错误估计往往是导致这些实验失败的最直接原因。

核酸的浓度通常用紫外，在 260nm 波长处，测吸光值获得，检测中的灵敏性会受到很高的背景干扰。Hoechst 33258，一种二苯甲亚胺 DNA 结合物，在检测时会有比紫外激发更强的荧光产生，检测更灵敏。它在紫外区(350 nm)附近被激发，发射波在蓝光区(450 nm)，检测 dsDNA 的灵敏度是 10 ng/ml（见图 1）。

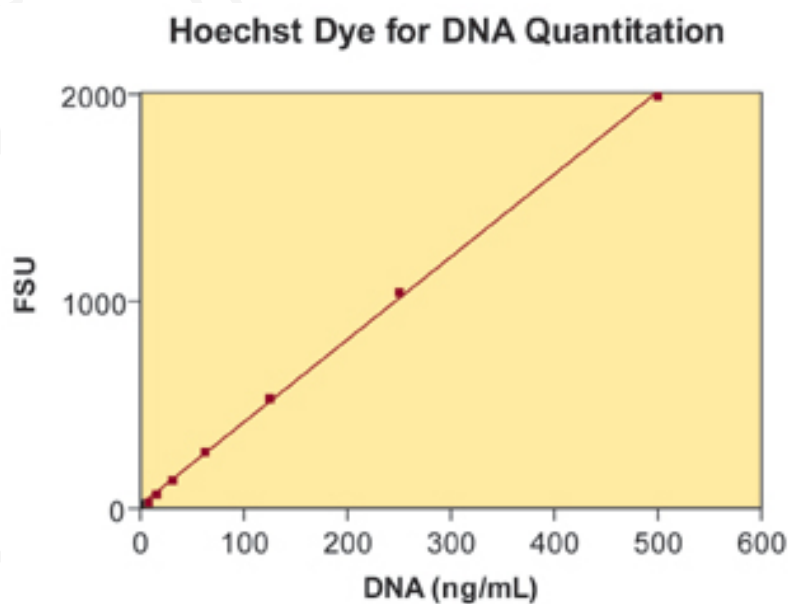


图 1 用 Hoechst 染料和紫外激发光对 dsDNA 定量分析，加 2 倍 Hoechst 染料工作液之前，用 1 倍的 TNE 对 1 μ g/ml 的 DNA 做倍比稀释，平衡 5min 后，将 100 μ l 样品转移到微量检测检测皿中读数。

2. 所需材料

- [Modulus™ 单管型多功能检测仪](#)
- 紫外荧光模块（货号：9200-041）
- 微量比色杯（货号：7000-950）和微量适配器（货号：9200-928）或比色杯（货号：7000-959）
- Hoechst 33258 10 mg/ml（分子探针 H3569）
- 10XTNE 储存缓冲液
- 0.45 μ m 的过滤水

3. 考虑因素

3.1 DNA 样品中的 AT 含量会影响到 Hoechst 33258-DNA 荧光，因此，检测样品时设一对照是非常重要的，小牛胸腺 DNA 由于是双链、高度聚合并含有大约 58% 的 AT (42% GC) 而经常被用作动植物 DNA 的对照。对于细菌 DNA 来说，它会有不同的对照，因为不同菌种的 AT 含量变化较大。

3.2 不同构造的质粒 DNA (超螺旋型、螺旋型、环形和、线型) 会有不同的 Hoechst 33258 结合效果。因此，选择一种与样品特征相似的标准品对照也是很重要的。

3.3 在单链基因组 DNA 上的 Hoechst 33258 荧光只有在双链基因组 DNA 上的一半，单链 DAN 片段的荧光量并不会与单链 DAN 的浓度成比例地引发荧光。

3.4 用于全细胞 DNA 抽提的缓冲液对后期的检测没有什么影响。

3.5 少量的去污剂 (<0.01% SDS) 对检测也没有什么影响。

3.6 含盐浓度为 3M NaCl 的 DNA 抽提样对检测没有影响。为获得较强的荧光，纯化的 DNA 样品中至少要含有 200mM 的 NaCl，未纯化样品中需含 2.0-3.0M 的 NaCl。对于未纯化样品来讲，较高的盐浓度会将结合在 DNA 上的蛋白裂解下来，便于染料分子的结合。

3.7 RNA 对检测没有影响，因为 Hoechst 33258 通常并不与 RNA 结合。来之于 RNA 的荧光信号通常会低于相同 DNA 浓度的 1%。

4. 试剂制备

4.1 Hoechst 33258 储存液

1 mg/ml Hoechst 33258: 1ml 的 Hoechst 33258 (10 mg/ml) 加 9ml 的用 0.45 μ m 滤膜过滤的蒸馏水稀释而成。

注: Hoechst 33258 可能会致癌和导致基因突变，操作时须带手套、面罩，并且在通风橱内操作。

4.2 10XTNE 储存缓冲液

溶解于 800ml 蒸馏水中: 12.11g Tris 碱[Tris (羟甲基) 氨基甲烷], 分子量=121.14; 3.72g EDTA 乙二胺四乙酸, 二钠盐, 二水合物, 分子量=372.20; 116.89g 氯化钠, 分子量=58.44。用浓盐酸调节溶液 PH 至 7.4, 补加蒸馏水定容至 1000ml, 使用前用 0.45 μ m 滤膜过滤, 4 $^{\circ}$ C 可保存 3 个月。

注: PH 和氯化钠浓度对于 Hoechst 试剂和 DNA 的结合至关重要。

1 倍的 TNE: 用 90ml 蒸馏水 (0.45 μ m 滤膜过滤) 稀释 10ml 10 倍的 TNE。

4.3 准配 2 倍的染料液用于 10-1000 ng/ml 的 DNA: 用 100ml 的 1 倍的 TNE 稀释 20 μ l Hoechst 33258 储存液 (1 mg/ml), 室温放置, 现用现配, 一旦染料加入千万别再过滤!

4.4 小牛胸腺 DNA 标准液：准备溶解在 1 倍 TE 浓度为 1 mg/ml 的小牛胸腺 DNA 储存液，轻击小管充分混匀，4℃可保存 3 个月。

5. 样品检测

5.1 荧光模块的安装

5.1.1 关掉多功能机电源开关，根据操作手册插入紫外荧光模块

5.1.2 打开电源开关，校准前先预热 1min。

5.1.3 用于 10X10mm 比色杯的实验方案

5.1.3.1 准备 1ml 2000 ng/ml dsDNA 标准液校准比色杯。

5.1.3.2 以 1:1 的比例加 2 倍的染料工作液到 2000 ng/ml dsDNA 标准液中，终浓度为 1000 ng/ml。

5.1.3.3 在另外的小管中加入空白对照液：2 倍的染料工作液以 1:1 的比例加入 1X TNE 缓冲液，最少 2ml。

5.1.3.4 校准多功能机用 1000 ng/ml。

注：用一个和检测样品浓度相同或相近的标准样优化系统，使检测更精确。例如，若检测样品浓度在 300 ng/ml，要用一个 500 ng/ml 标准 DNA 样。标准样浓度应该是与检测样浓度相同或超出 100 ng/ml。

5.1.3.5 保存这次校准以供将来使用（可选）

5.1.3.6 向 1ml 样品的小管中加 1ml 2 倍的染料液，需要的话，可以用 1 倍 TNE 稀释样品。

注：小管中溶液体积最少需 2ml。

5.1.3.7 放入多功能机读数前平衡样品和染料混合液 5min。

5.1.3.8 样品和染料浓度会在多功能机显示屏上显示。

注：由于染料的加入，最终浓度要小于起始浓度的 1/2。另外也要考虑到起始样品的稀释。

5.1.4 使用微量比色杯的实验方案

5.1.4.1 标准液制备。将 1mg/ml 的 DNA 储存液用 1 倍 TNE 稀释到 2 μg/ml，加相等体积的 2 倍的染料工作液，而后重复步骤 4.4，充分混合。

注：用一个和检测样品浓度相同或相近的标准样优化系统，使检测更精确。例如，若检测样品浓度在 300 ng/ml，要用一个 500 ng/ml 标准 DNA 样。标准样浓度应该是与检测样浓度相同或超出 100 ng/ml。

5.1.4.2 空白对照液制备。在另一只小离心管中加入相同体积的样品缓冲液（通常是 1 倍 TNE）和 2 倍的染料工作液。

5.1.4.3 混合小离心管中加有 2 倍染料工作液的样品。

注：在微量比色杯中不要混合检测样、标准样或有染料液的空白对照液。

5.1.4.4 取 100 μl 检测样、标准样和空白对照液分别加到微量比色杯中，室温避光静置 2-5min。

注：不要在微量比色杯中引入气泡，它会导致读数错误。

5.1.4.5 校准多功能机用 1000 ng/ml。

5.1.4.6 保存这次校准以供将来使用（可选）

5.1.4.7 微量比色杯中样品所测浓度会在多功能机显示屏上显示。

注：由于染料的加入，最终浓度要小于起始浓度的 1/2。另外也要考虑到起始样品的稀释。

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。