

用于 dsDNA 定量检测的 PicoGreen® 荧光染料

在 Modulus™ 单管型多功能检测仪上的应用



1. 应用说明

在分子生物学的试验过程中，PicoGreen® dsDNA 定量试剂盒是荧光检测双链 DNA 并进行定量的一种产品，这种方法非常灵敏。常用于分子生物学技术中的：cDNA 文库的构建；用于亚克隆的 DNA 片段纯化及应用，比如进行 DNA 定量、产物扩增 1, 2 和引物的进一步检测 3, 4。

应用 PicoGreen® dsDNA 定量试剂盒能对至少 100 μ l 样品的 dsDNA 直接定量。Modulus 多功能检测仪的检测灵敏度为 100 μ l 样品中 45 pg 的 DNA。PicoGreen® 检测线性范围 4 个数量级（图 1）。即使在核酸制备过程中引入了盐、尿素、乙醇、氯仿、去污剂、蛋白或琼脂等常见的几种污染物，这种检测结果的线性仍能获得。实验检测中的 RNA 和单链 DNA 产生的荧光量极小，当用 PicoGreen® dsDNA 定量试剂盒和 Modulus™ 多功能检测仪进行实验时发现：相同克分子数的单链 DNA 和 RNA 对定量结果几乎没有什么影响。

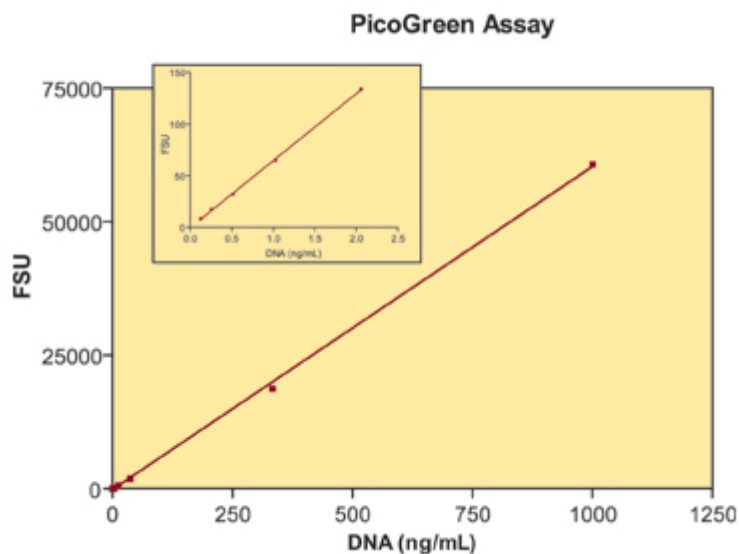


图 1 用 Modulus™ 多功能检测仪和蓝色荧光模块对 dsDNA 定量分析，加 PicoGreen 工作液之前，用 1 倍的 TE 对 2000 ng /ml 的 λ dsDNA 做倍比稀释，平衡 5min 后，将样品转移到 100ul 微量比色杯中读数。

2. 所需材料

- [Modulus™ 单管型多功能检测仪](#)
- Blue 荧光模块（货号：9200-040）
- PicoGreen® dsDNA 定量试剂盒（分子探针，P-7581）
- 微量比色杯（货号：7000-950）和微量适配器（货号：9200-928）或 10×10mm 比色杯（货号：7000-959）

3. 试剂制备

注：试剂的处理、应用和保存应根据 Molecular Probes, Inc 提供的信息资料操作。

1 倍的 TE 使用量应根据检测的需要来定，把 20 倍 TE 稀释成 1 倍的。PicoGreen® dsDNA 定量试剂盒提供了 1ml 无水二甲亚砜的浓缩染料溶液。实验时，需使用 2 倍的工作液，可用 1 倍的 TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) 按 1:200 的比例稀释浓缩染料液。溶液制备需用塑料器皿不能用玻璃器皿，因为试剂中某些成分会吸附到玻璃器皿表面。用箔金纸包裹或放置黑暗处避光保存。

注：溶液在制备后数小时内使用检测结果会比较好。

4. 仪器安装

4.1 关掉 Modulus™ 多功能检测仪电源开关，根据操作手册插入 Blue 荧光模块。

4.2 打开电源开关，校准前先预热 1min。

5. 校准

5.1 制备浓度为 2 µg/ml，溶解在 1 倍 TE 中的 dsDNA 溶液。小牛胸腺 DNA 常用来做标准曲线，尽管其他的纯化 dsDNA 也可以。作标准曲线时常会选择与检测样品相似的类型；长片段或短片段会用来定量相应大小的限制性片段；质粒会被用来定量质粒 DNA。不过，大部分双链线性 DNA 会产生相等强度的信号，与片段长度无关。尽管信号强度可能会受到核酸制备过程中污染物的影响，但 PicoGreen 检测结果的线性是不会变的。因此，采用这种检测方式，双链 DNA 制备产生的标准曲线和检测样品所产生的曲线是非常相近的，完全能根据标准曲线来估测样品的结果。

5.2 标准溶液的制备。将等体积的 DNA 储存液加入到 2 倍的 PicoGreen 工作液中，充分混合，标准液最终浓度 1000 ng/ml。

注：可以但没必要用 5 个标准样来校准 Modulus™ 多功能检测仪。

5.3 空白对照液的准备。加入相同体积的样品缓冲液（通常是 1 倍 TE，无 DNA）到 2 倍的 PicoGreen 工作液中，充分混合。

5.4 加入相同体积的样品到 2 倍的 PicoGreen 工作液中，充分混合。

注：不要混合微量比色杯中的标准液和加有 PicoGreen 工作液的样品，可以单独在小离心管中将染料和样品混合。

5.5 将混合好的染料和样品混合液转到 100ul 微量比色杯中，避光室温孵育 2-5min。

注：转移过程中不要引入气泡。

5.6 校准 Modulus™ 多功能检测仪用 1000 ng/ml。

注：单点校准精确度会更高，用一个和检测样品浓度相同或相近的标准样优化系统，例如，若检测样品浓度在 300 ng/ml，要用一个 500 ng/ml 标准 DNA 样。保存这次校准以供将来使用（可选）。

6. 样品分析

6.1.1 样品加入 100ul 微量比色杯中，点击“Measure Fluorescence”。

注：校准后就没必要再运行标准曲线。

6.1.2 样品最终结果会显示在功能机显示屏上。

注：由于 PicoGreen 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，举例见表 1。

样品(μ l)	稀释液(μ l)	样品稀释倍数	2X PicoGreen染料 (μ l)	染料稀释倍数	读数结果 (ng/mL)	实际样品浓度 (ng/ml)
2	48	1:25	50	1:2	60	3,000
5	95	1:20	100	1:2	290	11,600
10	90	1:10	100	1:2	852	17,040

表 1 不同稀释倍数对荧光读数结果的影响，仅仅是举例。

7. 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。

8 参考文献

1. Nucleic Acids Res. 24, 2623 (1996)
2. BioTechniques 21, 372 (1996)
3. BioTechniques 21, 664 (1996)
4. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 6091 (1996)
5. Anal. Biochem. 102, 344 (1980)
6. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).