

## Spektrophotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

### Der LabelGuard™ ermöglicht die Quantifizierung von Probenmengen im Submikroliter-Bereich mit handelsüblichen Spektrophotometern

Chris Voolstra<sup>1</sup>, Anja Jungnickel<sup>2</sup>, Lars Borrmann<sup>3</sup>, Roland Kirchner<sup>4</sup>, Andrea Huber<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universität Köln, Institut für Genetik, <sup>2</sup>Analytik Jena AG, <sup>3</sup>Eppendorf AG, <sup>4</sup>Advantix AG, <sup>5</sup>Implen GmbH

#### Einleitung

Ein wichtiger Teil der täglichen Routine in vielen molekularbiologischen Labors ist die Analyse von Nukleinsäuren. DNA und RNA Konzentrationen, die Reinheit und, im Falle modifizierter Nukleinsäuren, die Berechnung der Modifikationseffizienz werden meist mit Hilfe der UV/Vis Spektroskopie bestimmt. Für handelsübliche UV/Vis Spektrophotometer werden üblicherweise Küvetten mit einer optischen Pfadlänge von 1 cm verwendet. Oftmals sind dadurch Probenvolumina von 50 µl bis 1.000 µl nötig. Zusätzlich müssen die Proben in der Regel verdünnt werden, um im linearen Messbereich des Photometers zu bleiben. Durch die Notwendigkeit der Verdünnung ist es in der Regel nicht möglich, das meist kostbare Probenmaterial nach der Quantifizierung für anschließende Versuche einzusetzen.

Die LabelGuard™ Mikroliter Messzelle vermeidet diese Limitierungen. Durch die Wahl einer der beiden Deckelversionen der Messzelle werden optische Schichtdicken von 1 mm bzw. 0.2 mm eingestellt. Die Probe wird dadurch virtuell um den Faktor 10 bzw. 50 verdünnt, ohne dass eine manuelle Verdünnung notwendig ist. Zusätzlich sind die Volumina mit 3 µl

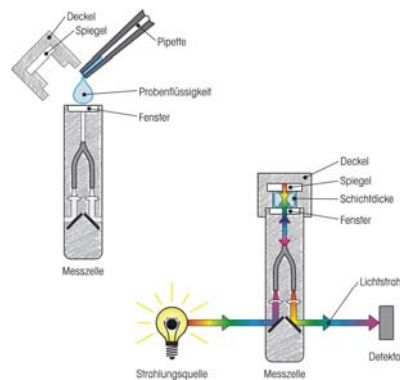


für den 1 mm Deckel und mit weniger als 1 µl für den 0.2 mm Deckel extrem gering. Die hohe Reproduzierbarkeit, die Vermeidung von Verdünnungsfehlern und die Möglichkeit, die Proben nach der Messung wieder zu verwenden sind die herausragenden Eigenschaften der LabelGuard™ Mikroliter Messzelle. Zusätzlich wird durch die LabelGuard™ Mikroliter Messzelle der Zeitaufwand im Vergleich zu Quartzküvetten für die Routinearbeit deutlich minimiert. Aus diesen Gründen ist die LabelGuard™ Mikroliter Messzelle für die Nukleinsäureanalytik im Rahmen von Technologien wie Real-Time PCR, Laser Capture Microdissection und Microarray basierende Applikationen ein sehr effizientes Hilfsmittel. Neben der Analyse von Nukleinsäuren ist die LabelGuard™ Mikroliter Messzelle natürlich auch für die Quantifizierungen von Proteinen durch die Messung der Absorption bei

280 nm oder für Methoden wie BCA, Bradford und Lowry geeignet.

#### Technische Spezifikationen

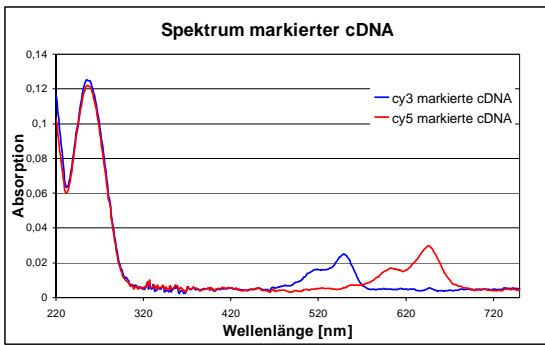
Der innovative optische Strahlengang der Messzelle wurde speziell für Messungen mit einem minimalem Probenvolumen entwickelt (Abbildung 1).



#### Abbildung 1: Messprinzip

Die Probe wird zentral auf das Messfenster pipettiert. Durch integrierte Strahlableitung und Verwendung faseroptischer Lichtleiter kann die Probe direkt auf dem Messfenster vermessen werden. Der 1 mm bzw. 0.2 mm Deckel bildet eine Messkammer mit einer definierten optischen Schichtdicke von 1 mm bzw. 0.2 mm. Im Vergleich zu einer Standard 1 cm Küvette wird dadurch eine virtuelle Verdünnung von 1:10 bzw. 1:50 erreicht. Das erforderliche Probenvolumen für den 1 mm Deckel liegt zwischen 3 µl und 5 µl und für den 0.2 mm Deckel zwischen 0.7 µl und 4 µl.

Der mittlere dynamische Bereich hängt stark von der Art des Photometers ab. Für ds-DNA wird mit der LabelGuard™ Mikroliter Messzelle ein dynamischer Bereich zwischen 2 ng/µl und 5.000 ng/µl erreicht. Die Abmessungen der Label-Guard™ Mikroliter Messzelle entsprechen mit einer Grundfläche von 12.5 mm auf 12.5 mm einer Standard Küvette. Die Zentrumshöhe des Messfensters kann mit Adaptern an die gängigen Photometer angepasst werden. Die LabelGuard™ Mikroliter Messzelle ist daher mit den meisten kommerziell verfügbaren Photometern kompatibel. Der verfügbare Wellenlängenbereich liegt zwischen 190 nm und 800 nm (Abbildung 2).



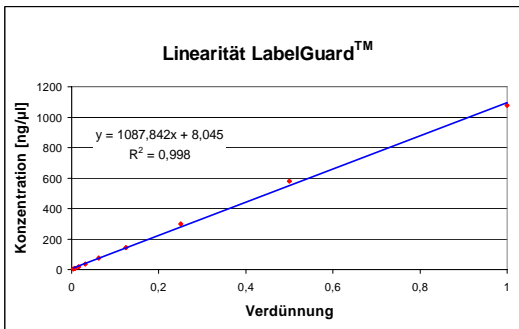
**Abbildung 2: Spektrum markierter cDNA**

Cyanine 3 und Cyanine 5 markierte cDNA wurde über einen Wellenlängenbereich von 220 nm bis 750 nm mit dem SPECORD 50 von Analytik Jena vermessen.

### Experimentelle Spezifikationen

Im folgenden Abschnitt wurden unterschiedliche experimentelle Ansätze gewählt, um die Performance der LabelGuard™ Mikroliter Messzelle zu überprüfen.

Die Messung der Absorption von ds-DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm zeigten eine sehr gute Linearität (Abbildung 3, Tabelle 1). Die Messungen wurden über einen weiten Konzentrationsbereich mit drei verschiedenen Photometern durchgeführt.



Verdünnung	Konzentration [ng/µl]
unverdünnt	1076,83
1/2	580,50
1/4	300,33
1/8	145,17
1/16	75,17
1/32	37,17
1/64	16,67
1/128	8,50
1/256	3,50

**Abbildung 3, Tabelle 1: Linearität**

Zur Bestimmung des linearen Bereichs wurden mit dem Spektrophotometer SPECORD 210 von Analytik Jena Verdünnungsreihen von ds-DNA bei 260 nm vermessen. Jede Probe wurde dreifach bestimmt. Die Ergebnisse zeigen eine gute Linearität über einen breiten Konzentrationsbereich ( $R^2=0.998$ ). Analoge Experimente, durchgeführt mit einem SPEKOL 1300 Photometer von Analytik Jena und mit einem BioPhotometer von Eppendorf, bestätigen diese Daten.

Durch die Vermessung von Plasmid DNA und Oligonukleotid Proben mit dem Eppendorf Bio-Photometer bei 260 nm konnte eine exzellente Reproduzierbarkeit gezeigt werden. Die beiden verfügbaren Deckel der Messzelle wurden mit unterschiedlichen Probenvolumina getestet (Tabelle 2, Tabelle 3). Die Variationskoeffizienten (c.v.) lagen zwischen 1,2% und 3,1%.

No.	1 mm Deckel		0.2 mm Deckel	
	A260	µg/ml	A260	µg/ml
1	0,056	28,0	0,074	185,0
2	0,056	28,0	0,075	187,5
3	0,055	27,5	0,075	187,5
4	0,055	27,5	0,077	192,5
5	0,056	28,0	0,075	187,5
6	0,053	26,5	0,074	185,0
7	0,054	27,0	0,075	187,5
8	0,053	26,5	0,076	190,0
9	0,052	26,0	0,075	187,5
10	0,055	27,5	0,075	187,5
11	0,053	26,5	0,075	187,5
12	0,055	27,5	0,076	190,0
13	0,054	27,0	0,077	192,5
14	0,054	27,0	0,076	190,0
<b>MW</b>	0,054	27,2	0,075	188,4
<b>Stabw</b>	0,001	0,6	0,001	2,3
<b>c.v. %</b>	<b>1,9</b>	<b>2,2</b>	<b>1,3</b>	<b>1,2</b>

**Tabelle 2: Reproduzierbarkeit mit Plasmid DNA**

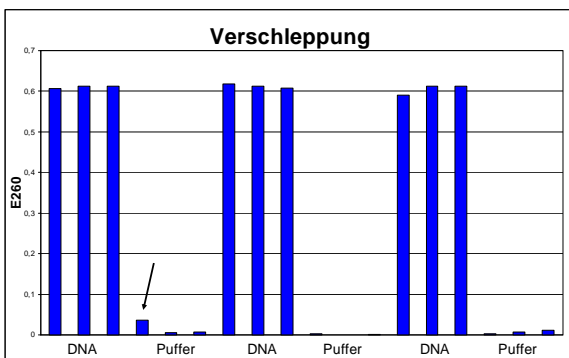
14 unabhängige Messungen wurden mit dem 1 mm Deckel und dem 0.2 mm Deckel mit 3 µl bzw. 1 µl Probenvolumen im Eppendorf BioPhotometer durchgeführt. Die gemessenen Absorptionen von 0.05 und 0.07 entsprachen Konzentrationen am unteren Detektionslimit.

No.	µg/µl oligo	A260	Volumen
1	0,570	0,380	3 µl
2	0,576	0,384	2 µl
3	0,572	0,381	1 µl
4	0,585	0,390	1 µl
5	0,567	0,378	1 µl
6	0,620	0,413	1 µl
7	0,569	0,379	700 nl
8	0,570	0,380	700 nl
<b>MW</b>	0,578	0,386	
<b>Stabw</b>	0,018	0,012	
<b>c.v. %</b>	<b>3,1</b>	<b>3,1</b>	

**Tabelle 3: Reproduzierbarkeit mit Oligonukleotid Proben**

Mit einer DNA Oligonukleotid Probe (20mer, Metabion) wurden 8 unabhängige Messungen durchgeführt. Probenvolumina zwischen 700 nl und 3 µl wurden mit dem 0.2 mm Deckel im Eppendorf BioPhotometer vermessen. Trotz dieses breiten Spektrums an eingesetzten Probenvolumina konnte ein überzeugender Variationskoeffizient von 3,1% ermittelt werden.

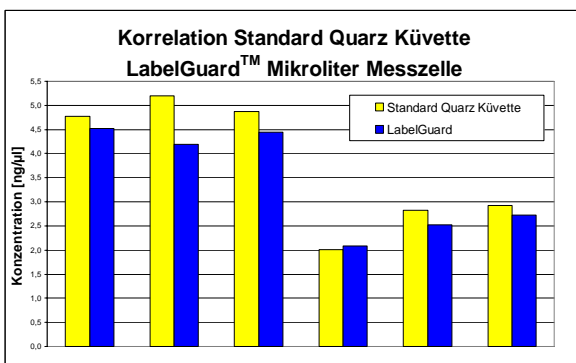
Nach einer Messung mit der LabelGuard™ Mikroliter Messzelle ist auf eine sorgfältige Reinigung der Messzelle und des Deckels zu achten. Alle Teile der Messzelle sind sehr gut zugänglich, so dass das Reinigungsprotokoll sehr einfach durchzuführen ist. Die Probe kann vor der Reinigung bei Bedarf für eine spätere Verwendung zurückgewonnen werden. Zur Reinigung verbleibt die Messzelle in der Küvettenhalterung. Das Messfenster und der Deckel werden mit einem fusselfreien Tuch oder Kimwipe gereinigt. Sollte es notwendig sein, können eventuelle restliche Fussel mit trockener Druckluft beseitigt werden, um eine optimale Leistungsfähigkeit zu garantieren. Alternierende Testmessungen von DNA und Leerpuffer bei 260 nm schließen eine mögliche systematische Verschleppung von Probenmaterial aus (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Verschleppung**

Mit dem Eppendorf BioPhotometer wurden 3 Messungen mit hoher DNA Konzentration gefolgt von 3 Messungen mit Leerpuffer durchgeführt. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass keine systematische Verschleppung von Probenmaterial vorkommt. Die minimale Verschleppung (6%) bei der vierten Messung der ersten Reihe (Pfeil) verdeutlicht die Wichtigkeit einer sorgfältigen Reinigung der Messzelle.

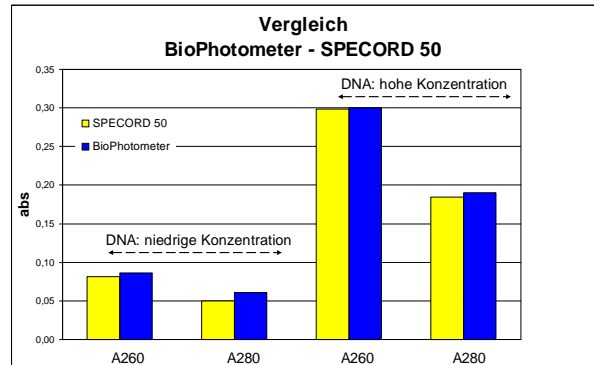
Die Ergebnisse von RNA Messungen mit einer Standard Quarz Küvette im Eppendorf BioPhotometer korrelieren mit Messungen der LabelGuard™ Mikroliter Messzelle (Abbildung 5). Obwohl die Konzentration der RNA am unteren Detektionslimit gewählt wurde, stimmen die Werte sehr gut überein.



**Abbildung 5: Quarz Küvette und LabelGuard**

6 unterschiedliche RNA Proben wurden je dreimal mit beiden Systemen bei 260 nm vermessen. Gezeigt sind die gemittelten Konzentrationswerte der drei Messungen.

Die gute Kompatibilität der LabelGuard™ Mikroliter Messzelle mit verschiedenen Spektrophotometern wurde durch die Vermessung identischer DNA Proben mit einem BioPhotometer von Eppendorf und mit einem SPECORD 50 von Analytik Jena gezeigt. Die gemessene DNA Konzentration mit beiden Photometern ist absolut vergleichbar (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Vergleichende DNA Messungen mit verschiedenen Photometern**

Niedrige DNA Konzentrationen wurden mit dem 0.2 mm Deckel, hohe Konzentrationen mit dem 1 mm Deckel jeweils dreifach bestimmt. Die Absorption der DNA hoher Konzentration und der DNA niedriger Konzentration bei 260 nm und 280 nm ist unabhängig vom verwendeten Spektrophotometer.

## Zusammenfassung

Die LabelGuard™ Mikroliter Messzelle ermöglicht absolut verlässliche spektrophotometrische Analysen von Nukleinsäuren und Proteinproben mit geringstem Volumen in den meisten handelsüblichen UV/Vis Spektrophotometern. Das minimal erforderliche Probenvolumen liegt bei weniger als einem Mikroliter. Mögliche Fehlerquellen durch die meist notwendige Verdünnung des Probenmaterials werden vermieden.

Die simple Handhabung bei gleichzeitig einfacher Reinigung der LabelGuard™ Mikroliter Messzelle verringert den Zeitaufwand und spart Materialkosten für spektrophotometrische Analysen.

Für die Nukleinsäureanalytik im Rahmen von Technologien wie Real-Time PCR, Laser Capture Microdissection und Microarray basierende Applikationen ist die LabelGuard™ Mikroliter Messzelle ein unverzichtbares Hilfsmittel in der täglichen Laborroutine.