

# Applications

Note 228 | September 2010

## Reproduzierbare photometrische Bestimmungen von DNA-Konzentrationen mit der Eppendorf® UVette® im BioPhotometer plus™

Martin Armbrecht, Eppendorf AG, Hamburg • Jennifer Oduro, Charité, Berlin

### Zusammenfassung

In der Regel werden DNA-Konzentrationen photometrisch in mehrfach verwendbaren Küvetten aus Quarzglas bestimmt. In Einweg-UV-Küvetten, wie der Eppendorf UVette, können solche Messungen ebenfalls mit vergleichbar guten Ergebnissen durchgeführt werden, wie wir anhand dieses Artikels zeigen können. Dazu wurden Messungen mit unterschiedlichen DNA-Konzentrationen in der UVette mit dem Eppendorf BioPhotometer plus durchgeführt und die Reproduzierbarkeit dieses Messsystems anhand des berechneten Variationskoeffizienten einer Messreihe aufgezeigt. Messreihen wurden sowohl mit dem 2 mm als auch mit dem 10 mm Lichtweg der Eppendorf UVette erstellt und mit Messergebnissen einer Quarzglasküvette verglichen.

### Einleitung

In der Regel werden photometrische Nukleinsäurebestimmungen in Küvetten aus Quarzglas durchgeführt, da allgemein angenommen wird, dass Plastikmaterial für UV-Licht undurchlässig und somit für Nukleinsäuremessungen ungeeignet ist. Wir zeigen in diesem Artikel, dass mit der Eppendorf UVette photometrische Messungen im UV-Bereich reproduzierbar durchgeführt werden können, da der spezielle Kunststoff für UV-Licht durchlässig ist. Die Eppendorf UVette ist damit eine der wenigen Einmalküvetten aus Plastik auf dem Markt, welche auch für Messungen im UV-Bereich verwendet werden kann. Einmalküvetten wie die Eppendorf UVetten haben im Gegensatz zu mehrfach verwendbaren Quarzglasküvetten den Vorteil, dass die zu messende Probe nicht mit Material aus vorangegangenen Messungen kontaminiert werden kann. Zudem reichen im Fall der UVette bereits 50 µL Probenvolumen für reproduzierbare Messungen aus.

Gemessen wird in der UVette standardmäßig mit einem 10 mm Lichtweg. Es ist aber möglich, bei stark konzentrierten Lösungen einen zusätzlichen Lichtweg von 2 mm zu verwenden (s. Abbildung 1). Hierfür wird die UVette einfach um 90° gedreht. Somit bietet die UVette die Flexibilität, mit zwei verschiedenen Lichtwegen zu messen, wofür ansonsten zwei verschiedene Küvetten benötigt würden. Der mögliche Messbereich hinsichtlich der Probenkonzentration wird dadurch deutlich erweitert.

In diesem Artikel wird gezeigt, dass mit beiden Lichtwegen reproduzierbare Messungen im UV-Bereich durchgeführt werden können.

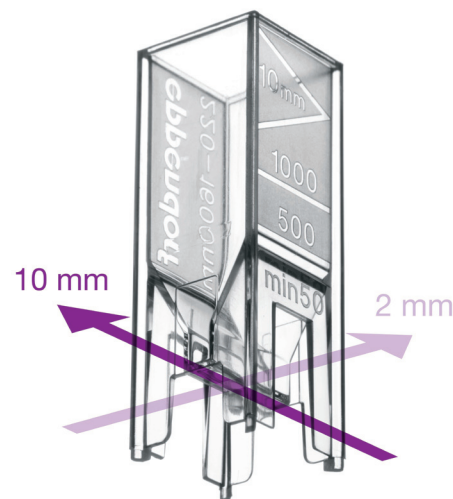


Abbildung 1: Eppendorf UVette

Zwei Lichtwege stehen für photometrische Messungen kombiniert in einer Küvette zur Verfügung: Der Standard 10 mm-Lichtweg (violett) und für höhere Konzentrationen ein 2 mm-Lichtweg (Hellviolett).

### Material und Methoden

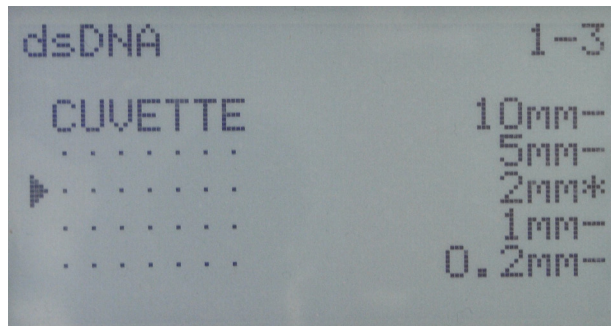
1) Überprüfung der Reproduzierbarkeit durch Messungen im UV-Bereich unter Verwendung der Eppendorf UVette und ihren beiden möglichen optischen Lichtwegen von 2 und 10 mm.

#### Material

Eppendorf BioPhotometer plus  
 UVetten  
 BioPhotometer Data Transfer Software  
 Humane Genomische DNA (Promega, ca. 200 ng/μL (Herstellerangabe), gemessen ca. 238 ng/μL)  
 Wasser (molecular biology grade), pH 7,0  
 Eppendorf Research Pipetten  
 epT.I.P.S.  
 Thermodrucker DPU 414  
 Hellma Ultra-Mikroküvette aus Quarzglas (Schichtdicke 10 mm, QS105.202)

#### Methode

Es wurden jeweils 2 Verdünnungsreihen mit der Human Genomischen DNA angelegt, wobei die Ausgangslösung in jeder Verdünnungsreihe DNA 1:2, 1:4 und 1:8 verdünnt wurde. In jeder Verdünnungsreihe wurde jede Verdünnungsstufe jeweils 10-fach gemessen. Die unverdünnte Lösung und 1:2 Verdünnungsstufe wurden mit dem 2 mm- bzw. die 1:4 und 1:8 verdünnten DNA Lösungen mit dem 10 mm-Lichtweg gemessen. Letztere Verdünnungen wurden zum Vergleich der Reproduzierbarkeit auch in Küvetten aus Quarzglas gemessen.  
 Die Verwendung der beiden Lichtwege wurde bei den Einstellungen der Parameter am BioPhotometer plus entsprechend berücksichtigt (Abb. 2). Die 10 Messungen pro Messreihe erfolgten nacheinander. Aus jeder Messreihe wurden der Mittelwert, die maximale Abweichung vom Mittelwert bei jeder Messung und der Variationskoeffizient bestimmt.



**Abb. 2:** Einstellung des 2 mm Lichtweges in den Parametern für die Methode dsDNA

### Ergebnisse und Diskussion

1) Reproduzierbarkeit von photometrischen DNA-Bestimmungen unter Verwendung von Eppendorf UVetten und dem BioPhotometer plus

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit von photometrischen DNA-Messungen in Eppendorf UVetten wurde in zwei Konzentrationsbereichen gemessen. Dabei wurden mit DNA-Proben jeweils 10 Messungen in verschiedenen Küvetten durchgeführt. Für Proben mit einer DNA-Konzentration über 100 ng/μL wurde der 2 mm Messweg verwendet. Geringer konzentrierte Proben wurden mit dem 10 mm Messweg der UVette sowie in einer Quarzglasküvette zum Vergleich gemessen.  
 Für jede Messreihe wird das Ergebnis der Absorption bei 230, 260, 280 nm und außerdem die angezeigte DNA-Konzentration angegeben. Die Ergebnisse bei 340 nm sind nicht aufgeführt, da hier mit hochreiner DNA gearbeitet wurde und mit einer Verunreinigung somit nicht zu rechnen war.

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurden aus den Ergebnissen der Mittelwert, die durchschnittliche Abweichung der einzelnen Messergebnisse vom Mittelwert und der gemessene Variationskoeffizient errechnet. Die Messreihen wurden mit der Methode dsDNA am BioPhotometer plus ermittelt, da hier alle für die DNA-Messungen relevanten Parameter in einem Display übersichtlich angezeigt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1A bis 1D zu sehen.



Tabelle 1D: Ergebnis der Messungen mit 1:8 verdünnter DNA-Lösung (10 mm Messweg) - UVette

Wellenlänge [nm]	1. UVette 10 mm Messweg			Konzentration [ng/μL]	2. UVette 10 mm Messweg			Konzentration [ng/μL]
	230	260	280		230	260	280	
Probe 1	0,344	0,594	0,322	29,7	0,345	0,593	0,321	29,7
Probe 2	0,345	0,595	0,322	29,7	0,344	0,594	0,32	29,7
Probe 3	0,345	0,596	0,322	29,8	0,344	0,594	0,321	29,8
Probe 4	0,345	0,596	0,322	29,8	0,344	0,595	0,321	29,8
Probe 5	0,345	0,594	0,322	29,7	0,344	0,595	0,322	29,8
Probe 6	0,344	0,595	0,322	29,8	0,343	0,595	0,322	29,8
Probe 7	0,346	0,597	0,324	29,8	0,344	0,595	0,322	29,8
Probe 8	0,346	0,597	0,323	29,8	0,345	0,597	0,322	29,8
Probe 9	0,346	0,598	0,325	29,9	0,344	0,597	0,322	29,8
Probe 10	0,346	0,597	0,323	29,9	0,344	0,596	0,322	29,8
Mittelwert	0,345	0,596	0,323	29,790	0,344	0,595	0,322	29,780
Durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert	0,0006	0,0011	0,0008	0,0540	0,0004	0,0009	0,0006	0,0320
Variationskoeffizient (VK)	0,2 %	0,2 %	0,3 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,1 %

Tabelle 1E: Ergebnis der Messungen Quarzglas mit 1:4 bzw 1:8 verdünnter DNA Lösung - Quarzglasküvette

Wellenlänge [nm]	1. Quarzglasküvette 10 mm Messweg (1:4 verdünnte DNA-Lösung)			Konzentration [ng/μL]	2. Quarzglasküvette 10 mm Messweg (1:8 verdünnte DNA-Lösung)			Konzentration [ng/μL]
	230	260	280		230	260	280	
Probe 1	0,677	1,156	0,642	57,8	0,341	0,584	0,327	29,2
Probe 2	0,678	1,156	0,642	57,8	0,341	0,583	0,326	29,15
Probe 3	0,677	1,156	0,643	57,8	0,341	0,584	0,327	29,2
Probe 4	0,675	1,155	0,641	57,75	0,341	0,585	0,328	29,25
Probe 5	0,677	1,155	0,641	57,75	0,341	0,584	0,327	29,2
Probe 6	0,677	1,157	0,642	57,85	0,342	0,585	0,327	29,25
Probe 7	0,678	1,156	0,642	57,8	0,343	0,585	0,328	29,25
Probe 8	0,677	1,157	0,643	57,85	0,341	0,584	0,328	29,2
Probe 9	0,678	1,156	0,643	57,8	0,343	0,586	0,33	29,3
Probe 10	0,678	1,156	0,643	57,8	0,344	0,586	0,329	29,3
Mittelwert	0,677	1,156	0,632	57,800	0,342	0,585	0,328	29,23
Durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert	0,0006	0,0004	0,0006	0,0200	0,0010	0,0008	0,0009	0,0400
Variationskoeffizient (VK)	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,3 %	0,2 %	0,4 %	0,2 %

Die Messreihen mit den hohen DNA-Konzentrationen (unverdünnt und 1:2 verdünnt) weisen bei allen Wellenlängen mit dem 2 mm Lichtweg einen VK von 0,3 % bis 0,5 % auf. Die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert liegt dabei zwischen 0,001 und 0,002 E.

Bei der 1:4 bzw. 1:8 verdünnten DNA-Lösung liegt der VK der jeweiligen Messreihen bei allen gemessenen Wellenlängen zwischen 0,1 % und 0,3 % und die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert beträgt 0,001 E.

Wie aus Tabelle 1E ersichtlich, liegen die Messabweichungen mit Küvetten aus Quarzglas in einem ähnlich niedrigen Bereich.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass reproduzierbare Messungen im UV-Bereich mit den Eppendorf UVetten aus Kunststoff genau wie in Quarzglasküvetten möglich sind. Dieses gilt sowohl für den 2 mm als auch den 10 mm Lichtweg.

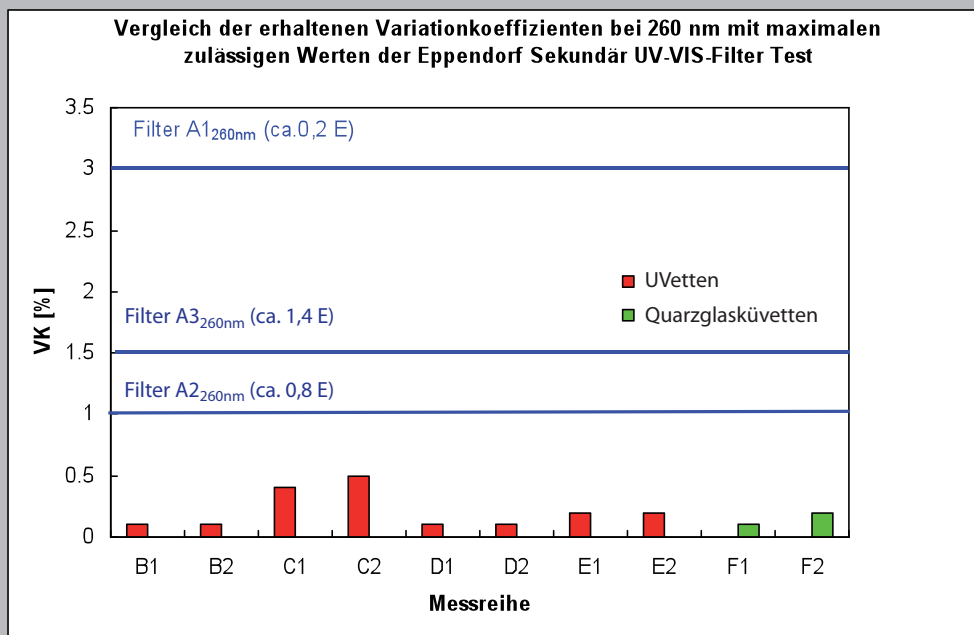
Bezüglich der Reproduzierbarkeit von Messergebnissen kann die photometrische Richtigkeit der Messergebnisse beim BioPhotometer plus mit einem Kalibrationsfiltersatz, dem Sekundären UV-VIS-Filtersatz, überprüft werden [1]. Hierfür werden 3 sogenannte Breitbandfilter verwendet, die eine Absorption bei 260 nm von ca. 0,2 (Filter A1), 0,8 (Filter A2) und 1,4 (Filter A3) aufweisen. Bei Kalibrationsmessungen darf für den Filter A1 ein maximaler VK von 3 %, für den Filter A2 ein VK von 1 % und für den Filter A3 ein VK von 1,5 % erzielt werden. In Abbildung 3 sind diese Werte mit den VK's aus den Messreihen mit der UVette und den Quarzglasküvetten zusammenfassend dargestellt. Wie aus Abbildung 3 ersichtlich, liegen die gemessenen Variationskoeffizienten der UVette und der Quarzglasküvetten deutlich unter denen der maximal erlaubten VK's aus dem UV-VIS-Filtersatz.

Dadurch wird die hohe Reproduzierbarkeit der Messungen in der UVette zusätzlich belegt.

#### Fazit

In diesem Artikel wurde gezeigt, dass mit Einmal-UV-Küvetten aus Plastik, wie den Eppendorf UVetten, reproduzierbar im UV-Bereich Messungen durchgeführt werden können. Wie die Messreihen mit dsDNA belegen, lagen die Abweichungen sowohl beim 10 mm als auch beim 2 mm Lichtweg im Rahmen der technischen Spezifikationen des für die Messung verwendeten BioPhotometer plus. Dass beide Lichtwege eine hohe Reproduzierbarkeit bei den Messungen zeigten, unterstreicht die flexiblen Einsatzmöglichkeiten der UVetten bei UV-Messungen.

Die Möglichkeit, mit einem kürzeren optischen Lichtweg in derselben Küvette auch höhere Konzentrationen zu messen, ist darüber hinaus bisher einmalig bei Plastik-Küvetten.



**Abb. 3:** Gemessene VKs aus den Messreihen UVette und Quarzglasküvetten im Vergleich zu den maximal erlaubten VK's der Kalibrationsfilter aus dem Sekundären UV-VIS-Filtersatz.

Blaue Linien: erlaubte Variationskoeffizienten der Kalibrationsfilter A1, A2, A3 bei 260 nm

B1-E2: VKs der Messreihen aus den Messungen mit der UVette bei 260 nm

F1-F2: VK's der Messungen mit Quarzglasküvette bei 260 nm.

## Literatur

- [1] Eppendorf UserGuide No. 10, Evaluating the functionality of the Eppendorf BioPhotometer plus using the Secondary UV-VIS Filter Set. [www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)

## Bestellinformationen

Bezeichnung	Beschreibung	Bestell-Nr.
Eppendorf BioPhotometer plus™	230 V / 50 - 60 H	6132 000.008
Thermodrucker DPU 414	Inkl. Netzteil und Druckerkabel 230 V	6131 011.006
Thermopapier	5 Rollen	0013 021.566
UVette®	Original Eppendorf Kunststoffküvette, einzeln verpackt, direkt im BioPhotometer verwendbar, zertifiziert RNase-, DNA und proteinfrei, 80 Stück	0030 106.300
UVette® routine pack	Eppendorf Quality Reinheitsgrad, wiederverschließbare Box 200 Stück	0030 106.318
Kuvettenständer	Für 16 Küvetten	4308 078.006
Sekundär UV-VIS-Filter	Testfiltersatz zur Überprüfung der photometrischen- und Wellenlängenrichtigkeit (gemäß NIST)	6131 928.007

**eppendorf**  
*In touch with life*

Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH · Peter-Henlein Str. 2 · 50389 Wesseling-Berzdorf · Deutschland  
 Tel: +49 2232 418-0 · Fax: +49 2232 418-155 · E-mail: [vertrieb@eppendorf.de](mailto:vertrieb@eppendorf.de) · [www.eppendorf.de](http://www.eppendorf.de)  
 Eppendorf Austria · Ignaz Köck Straße 10/2. OG · 1210 Wien · Österreich  
 Tel: +43 1 890 13 64-0 · Fax: +43 (0)1 890 13 64-20 · E-mail: [office@eppendorf.at](mailto:office@eppendorf.at) · [www.eppendorf.at](http://www.eppendorf.at)  
 Vaudaux-Eppendorf AG · Im Kirschgarten 30 · 4124 Schönenbuch · Schweiz  
 Tel: +41 61 482 1414 · Fax: +41 61 482 1419 · E-mail: [vaudaux@vaudaux.ch](mailto:vaudaux@vaudaux.ch) · [www.eppendorf.ch](http://www.eppendorf.ch)

Application Support Tel: +49 1803 666 789 · E-mail: [support@eppendorf.com](mailto:support@eppendorf.com)