

Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen mittels Fluoreszenz-Farbstoffen im Eppendorf BioSpectrometer® fluorescence

Martin Armbrecht¹, Jasper Gloe², Wolfgang Goemann²

¹Eppendorf AG, Hamburg, Germany

²Eppendorf Instrumente GmbH, Hamburg, Germany

Zusammenfassung

Mittels Fluoreszenz lassen sich Nukleinsäuren sensitiver und spezifischer bestimmen, als dies mit der herkömmlichen Methode über UV-VIS Spektroskopie möglich ist. Im vorliegenden Artikel wird beschrieben, wie dsDNA unter Verwendung des Fluoreszenz-Farbstoffes PicoGreen® bestimmt wird. Dabei wird insbesondere darauf eingegangen, wie die Proben für die Messungen am

Eppendorf BioSpectrometer vorbereitet werden und wie die Programmierung erfolgt. Experimentell werden dabei die Methoden PicoGreen und PicoGreen - „short“ miteinander verglichen. Obwohl bei der Methode PicoGreen - „short“ nur mit 2 Standards gemessen wurde, konnte eine hohe Genauigkeit in der Auswertung festgestellt werden.

Einleitung

Probleme bei Bestimmung von Nukleinsäuren über UV-VIS Spektroskopie

Nukleinsäure-Konzentrationen werden in der Regel über Messungen der Lichtabsorption in UV-VIS Spektrometern bestimmt. Dabei wird die Absorption bei 260 nm gemessen und mit einem spezifischen Faktor die Konzentration errechnet. Durch zusätzliche Messungen bei 230 nm, 280, 320 (oder 340) nm können Verunreinigungen durch Proteine oder anderes organisches Material sowie störende Partikel festgestellt werden. Leider ist die photometrische Bestimmung nicht sehr empfindlich. Wird eine gewisse Menge unterschritten, lässt sich die Menge an Nukleinsäure in der Regel nicht mehr von Artefakten unterscheiden. Bei hohen sowie auch bei niedrigen Konzentrationen ist eine spezifische Konzentrationsbestimmung problematisch, wenn die Proben durch andere Nukleinsäuren verunreinigt sind. So weisen alle Nukleinsäuren bei 260 nm ein Absorptionsmaximum auf und können somit photometrisch kaum unterschieden werden. Der einzige Unterschied ist, dass einzelsträngige Nukleinsäuren eine höhere Absorption aufweisen als doppelsträngige (s. Abbildung 1). Dieser Effekt wird auch als Hyperchromie bezeichnet [1], ermöglicht aber natürlich keine Unterscheidung der Moleküle voneinander. Im Gegenteil, die eigentliche Konzentrationsbestimmung einer Nukleinsäure wird durch die Anwesenheit einer weiteren Nukleinsäure verfälscht.

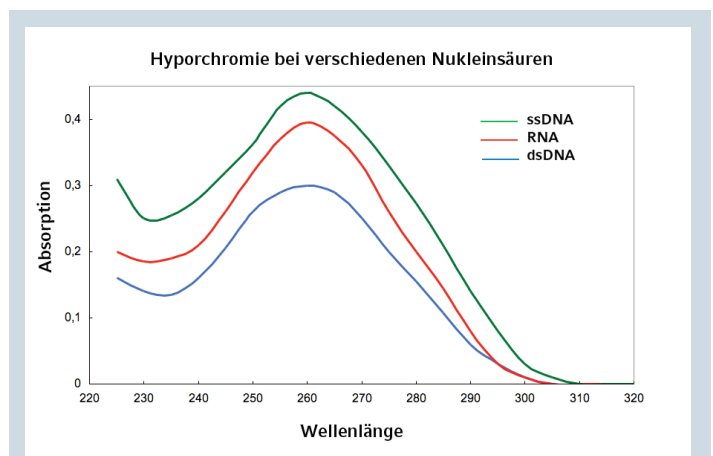


Abbildung 1: Hyperchromie bei verschiedenen Nukleinsäuren

Überlappende Absorptionsmaxima machen sich auch bei der Isolierung von Plasmid-DNA ohne durchgeführten RNA-Verdau bemerkbar. Der Anteil an verbleibender RNA im Eluat liegt bspw. bei einer klassischen Plasmid-Gewinnung bei 90% [2]. Hinzu kommen bei dieser Form der Plasmid-Isolierung weitere mögliche Störungen bspw. durch Kontaminationen mit Phenol oder Proteinen. Dadurch kann eine genaue photometrische Bestimmung der Plasmid-Konzentration nicht durchgeführt werden.

Fluoreszenz-Messungen als Alternative

Eine weitere Möglichkeit, Nucleinsäuren zu bestimmen, besteht darin, die Moleküle indirekt über einen Fluoreszenz-Farbstoff nachzuweisen. Diese Methode eignet sich hervorragend, um dsDNA, ssDNA und Oligo-Nukleotide, RNA und auch Proteine spezifisch zu bestimmen. Neben der höheren Spezifität ist diese Art der Quantifizierung zudem um den Faktor 1000-10000 sensitiver als die herkömmliche Methode der Lichtabsorptionsmessung. In Tabelle 1 ist eine Übersicht über einige bekannte Fluoreszenz-Farbstoffe und deren Nachweisgrenze dargestellt.

Der Vorteil ist, dass die Farbstoffe spezifisch an die jeweilige zu bestimmende Nucleinsäure binden, d.h. dsDNA kann spezifisch und in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Ein sehr hohes Maß an Spezifität weist der für die Bestimmung von dsDNA häufig verwendete Farbstoff PicoGreen der Firma life technologies™ auf. Dieser Farbstoff kann geringe Mengen an gelöster dsDNA nachweisen. Selbst in Anwesenheit von gleicher Menge RNA oder einzelsträngiger DNA wird nahezu ausschließlich dsDNA mit PicoGreen detektiert. Andere Fluoreszenz-Farbstoffe wie Ethidiumbromid interagieren dagegen auch mit RNA. Auch ist hier die Nachweisgrenze nicht so niedrig wie mit PicoGreen. Der Farbstoff Hoechst H33258 ist noch spezifischer für dsDNA als PicoGreen, aber dafür nicht so sensitiv. In Tabelle 2 ist eine Übersicht über die genannten Methoden zur Bestimmung von dsDNA dargestellt.

Wie unterscheiden sich Fluoreszenz- von Absorptionsmessungen?

Grundsätzlich gehen beide Messmethoden davon aus, dass gelöste Moleküle mit dem Licht einer bestimmten Wellenlänge interagieren. Bei der Absorption werden mittels Lichtenergie Elektronen des bestrahlten Moleküls auf ein höheres Energieniveau gebracht. Das Licht wird dabei absorbiert. Nach dieser Absorption fallen die angeregten Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. In einem Photometer kann über einen Detektor die verbleibende Lichtmenge mit der Ausgangslichtmenge ins Verhältnis gesetzt und somit die Absorption bestimmt werden. Über eine stoffspezifische Konstante, den so genannten Absorptionskoeffizienten, und die optische Schichtdicke (in der Küvette) kann mittels des Lambert-Beer'schen bzw. Bouguer-Lambert-Beer'schen Gesetzes $A = E \cdot C \cdot L$ die Konzentration der Moleküle in einer Lösung bestimmt werden (wobei E = Absorptionskoeffizient, C = Konzentration, L = optische Schichtdicke).

Soll eine Probenkonzentration über Fluoreszenz nachgewiesen werden, wird die Probe ebenfalls mit einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt. Das Licht wird zunächst wiederum absorbiert. Wird ein Fluorophor angeregt, fällt dieser bzw. dessen angeregte Elektronen nicht direkt auf sein ursprüngliches Energieniveau. Es fällt zunächst auf einen etwas niedrigeren Energielevel und gelangt erst von dort auf den ursprünglichen Zustand.

Tabelle 1: Beispiel einiger Fluoreszenz-Farbstoffe zur Bestimmung von Biomolekülen. Die Daten beziehen sich auf die Angaben der Reagenzhersteller.

Farbstoff	Zielmolekül	Messbereich
PicoGreen	dsDNA	0,025 – 1000 ng/mL
Hoechst H33258	dsDNA	0,1 – 10 µg/mL (dsDNA)
Ethidiumbromid	dsDNA, RNA	0,1 – 10 µg/mL (dsDNA)
RiboGreen®	RNA	1 – 1000 ng/mL
Oligreen®	ssDNA, Oligo-DNA	0,1 - 1000 ng/mL
NanoOrange®	Protein	10 ng/mL-10 µg/mL

Tabelle 2: Sensitivität bekannter Detektionsmethoden für dsDNA bzw. RNA [3]

Bestimmungsmethode	Absorption	Fluoreszenz		
	A260	Hoechst H33258	Ethidiumbromid	PicoGreen
DNA-Messbereich	1–50 µg/mL	0,01–15 µg/mL	0,1–10 µg/mL	0,025–1000 ng/mL
RNA-Messbereich	1–40 µg/mL	NA	1–40 µg/mL	Minimal sensitivity
Verhältnis (DNA/RNA)	0.8	400	2.2	>100

Ist das der Fall, wird Fluoreszenz-Strahlung emittiert (s. Abbildung 2). Die emittierte Strahlung hat dabei immer eine höhere Wellenlänge als die Anregungswellenlänge (Abbildung 3).



Ein wesentlicher Unterschied zur Konzentrationsbestimmung über Absorptionsmessungen ist, dass der oben genannte Fluorophor wie PicoGreen nicht direkt bestimmt wird, sondern dafür genutzt wird, indirekt Moleküle wie dsDNA nachzuweisen. Die Berechnung der Konzentration erfolgt über eine vorher erstellte Standardkurve. Dabei werden bekannte Nukleinsäure-Konzentrationen (Standards) mit dem Fluoreszenz-Farbstoff versetzt und die relative Fluoreszenz (RFU) nach Interaktion mit den Standards in einem Fluorimeter gemessen.

In dem vorliegenden Artikel soll gezeigt werden, wie mittels eines PicoGreen -Assays der Firma life technologies (Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Reagent and Kits) dsDNA unter Verwendung des Eppendorf BioSpectrometer fluorescence nachgewiesen werden kann. Neben der herkömmlichen Bestimmung über 5 Standards, die laut Hersteller vorgegeben sind, zeigen wir, dass eine zuverlässige Bestimmung bei Verwendung von nur 2 Standards möglich ist. Auch bei den anderen Nukleinsäure-Methoden (RiboGreen, OliGreen), die im Eppendorf BioSpectrometer über Fluoreszenz ausgewertet werden, werden neben den herkömmlichen Methoden diese sogenannten „Short protocols“ angeboten (Auswertung über 2 Standards: 0 und X ng/mL). Ein wichtiger Vorteil des BioSpectrometer fluorescence

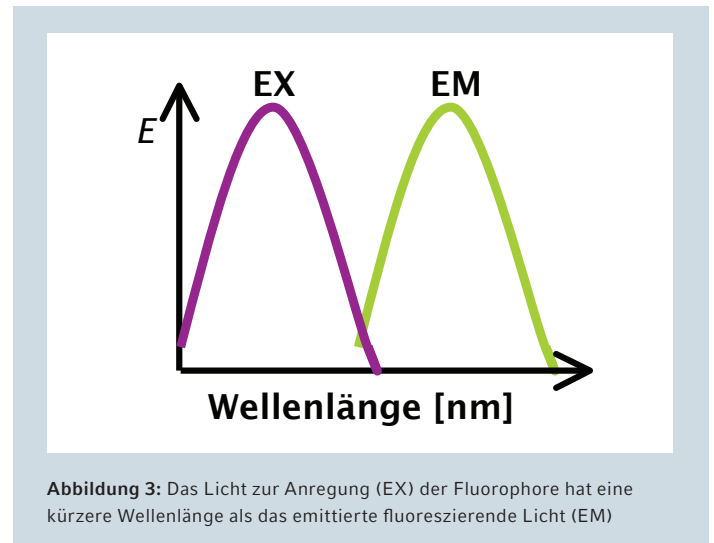


Abbildung 3: Das Licht zur Anregung (EX) der Fluorophore hat eine kürzere Wellenlänge als das emittierte fluoreszierende Licht (EM)

ist, dass hier nicht nur ein Fluorimeter vorliegt, sondern auch ein vollwertiges Spektrometer. Das erweist sich schon bei Erstellung der Standardlösungen als Vorteil, da die Standard-Ausgangslösung spektrometrisch überprüft werden muss. Somit können alle notwendigen Messungen für die Auswertung mit dem oben genannten Kit an einem Gerät durchgeführt werden.

Material und Durchführung

Material: BioSpectrometer fluorescence, Quant-iT PicoGreen dsDNA Kit, VIS-Makroküvetten, Wasser (Molecular Grade), 2 x 50 mL Reagenzgefäße, 1,5/2 mL Eppendorf Safe Lock Tubes, Eppendorf MixMate®, Eppendorf UVette®, dsDNA-Stammlösung (AppliChem®: A5187,1000), Eppendorf Research® Pipetten

Erstellung der Standardkurve mit dsDNA-Standards

Für die Erstellung der Messlösung wurde die Bedienungsanleitung des Quant-iT PicoGreen dsDNA-Kit zugrunde gelegt. Anstelle von 2 mL wurden nur 1 mL Messvolumen verwendet. Dies ist möglich, da aufgrund der niedrigen Lichtstrahlhöhe von nur 8,5 mm im Eppendorf BioSpectrometer fluorescence, 1 mL für die Messung in Makroküvetten ausreicht. Bei Erstellung der Standardkurve ist darauf zu achten, dass die entsprechende Standardkonzentration sich auf das Volumen des gesamten Messansatzes bezieht. Dies muss auch bei der Ermittlung der Probenkonzentration berücksichtigt werden. So müssen natürlich Proben und Standards gleichermaßen hergestellt werden. Da die Messungen, wie zuvor beschrieben, deutlicher empfindlicher sind als Absorptionsmessungen, müssen alle verwendeten Geräte, insbesondere die Pipetten, sich in einem technisch einwandfreien Zustand befinden. Darüber hinaus ist es zu empfehlen, alle verwendeten Kit-Komponenten vor Verwendung zunächst 2h bei RT stehen zu lassen. Zunächst wird der Assay-Puffer erstellt. Hierfür werden 1 mL des im Kit mitgelieferten 20xTE Puffer mit 19 mL Wasser (Molecular Grade) in einem 50 mL Reagenzgefäßen verdünnt. Die Reagenzlösung liegt in konzentrierter Form in 100 µL Portionen vor. Daraus werden 50 µL entnommen und ebenfalls in einem Reagenzgefäß 200fach mit dem frisch hergestellten

Assay-Puffer auf 10 mL verdünnt (0,05 mL Reagenzlösung + 9,95 mL Assay-Puffer). Diese Menge reicht für ca. 20 Messungen inkl. Proben und Standards.

Die im Kit mitgelieferte DNA-Stammlösung liegt in einer Konzentration von 100 ng/µL vor. Diese wird mit dem Assay-Puffer zunächst 1:50 verdünnt. Die finale Konzentration dieser dsDNA Ausgangslösung für die Standards sollte dann 2 ng/µL bzw. 2000 ng/mL betragen. Die so hergestellte Ausgangslösung sollte darüber hinaus photometrisch überprüft werden. Eine dsDNA Lösung von 2 ng/µL entspricht einer optischen Dichte bei 260 nm von 0,04, gemessen in einer Küvette mit 10 mm Lichtweg. Da es sich bei dem Eppendorf BioSpectrometer fluorescence um ein vollwertiges UV-VIS Spektrometer handelt, können in diesem Gerät sowohl die photometrische Überprüfung der Ausgangslösung als auch die folgenden fluorimetrischen Messungen durchgeführt werden.

Für die photometrischen Messungen können Eppendorf UVetten verwendet werden. Als Blanklösung dient der frisch hergestellte 1 x TE Puffer. Für die photometrische Vorabmessung wird die Methode dsDNA gewählt. Um zu überprüfen, ob die Ausgangslösung frei von Kontaminationen ist, sollten der „Scan“, das Verhältnis 260/230 und die Hintergrundkorrektur bei 320 bzw. 340 nm vor der Messung im Bereich „check parameters“ aktiviert werden (Abbildung 4A und 4B).

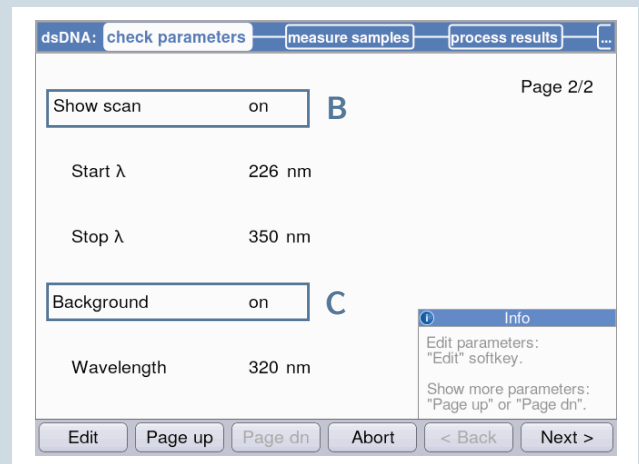
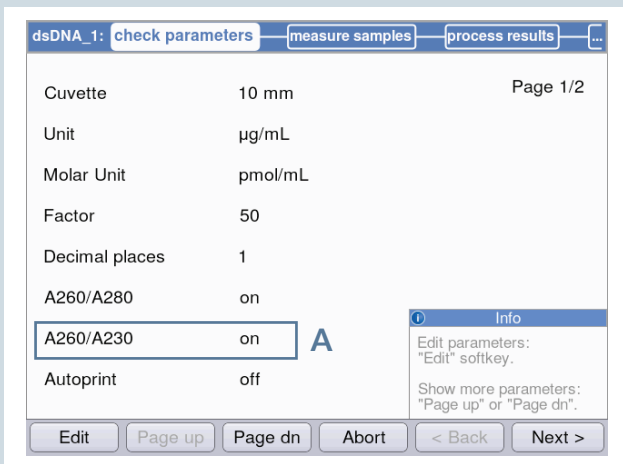


Abbildung 4: Einstellung für die Messung der Ausgangslösung am Eppendorf BioSpectrometer® fluorescence

A: A260/A230

B: Aktivierung des Scans

C: Aktivierung des Backgrounds

In Abbildung 5 ist gezeigt, dass die Ausgangslösung für die Standardkurve die vom Hersteller empfohlene Ausgangskonzentration aufweist. Falls sich die zu erwartende Konzentration nicht wiederfinden lässt, können die Werte für die Standardkurve entsprechend angepasst werden. Wird zum Beispiel nur

eine dsDNA-Konzentration von 1,6 µg/mL gemessen, können die Standardkonzentrationen auch folgendermaßen erstellt und programmiert werden (s.a. Tabelle 3): 800 ng/mL, 80 ng/mL, 8 ng/mL, 0,8 ng/mL und 0 ng/mL.

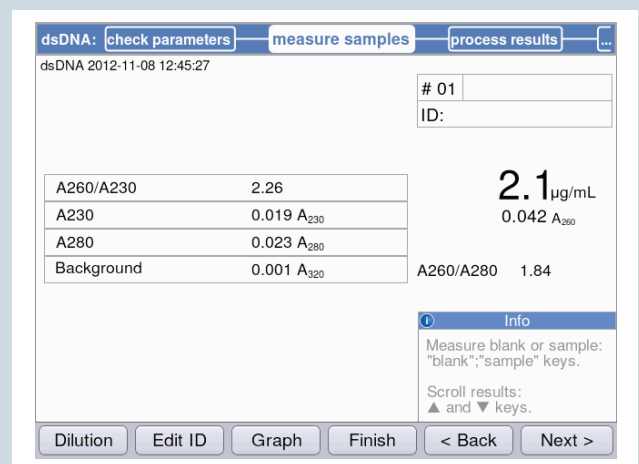
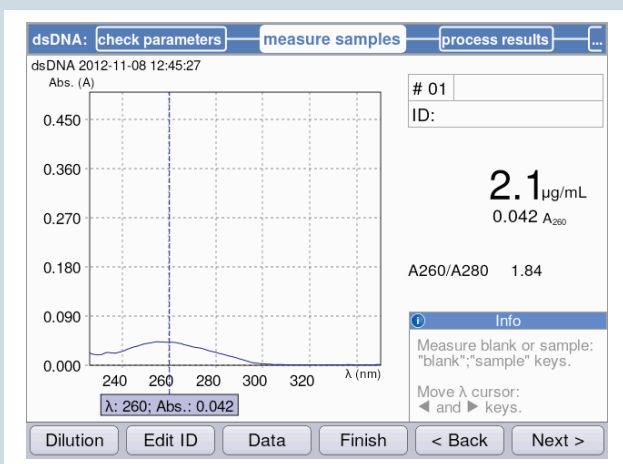


Abbildung 5: Überprüfung der Konzentration der Ausgangslösung für die Standardkonzentrationen.

Nachdem die Konzentration der dsDNA-Ausgangslösung überprüft wurde, können die Lösungen für die Standardmessungen erstellt werden. Wie oben beschrieben beträgt das Messvolumen nur 1 mL statt 2 mL, wie vom Kit Hersteller angegeben, was auch eine erhebliche Einsparung an Reagenz-Lösung

bedeutet. Idealerweise werden für jede Verdünnungsstufe 2-3 identische Standards (Replikate) hergestellt. In Tabelle 3 ist das entsprechende Pipettierschema für die jeweiligen Verdünnung dargestellt.

Tabelle 3: Pipettierschema für die jeweiligen Standardkonzentrationen

Verdünnungsstufe	Volumen des Assay-Puffers [µL]	Volumen der dsDNA Ausgangslösung [µL]	Volumen der verdünnten Reagenzlösung [µL]	Endkonzentration dsDNA im Gesamtansatz [ng/mL]	Standardnummer
1	0	500	500	1000	5
2	450	50	500	100	4
3	495	5	500	10	3
4	499,5* (495)	0,5 (5 µL 1:10)	500	1	2
5	500	0	500	0	1

*Die Ausgangslösung sollte zunächst 1:10 verdünnt werden (z.B. 5 µL DNA-Lösung plus 45 µL Assay-Puffer). Von dieser verdünnten Lösung werden dann 5 µL entnommen und mit 495 µL Assay-Puffer vermischt.

Es ist wichtig, dass die Messproben genauso behandelt werden wie die Standards. In diesem Fall bedeutet das, es müssen 500 µL der Proben (möglichst in 1 X TE Puffer) mit 500 µL Reagenzlösung versetzt werden. Müssen die Proben aufgrund eines zu hohen Signals verdünnt werden, sollte eine entsprechende Verdünnung immer mit dem frisch hergestellten 1x TE-Puffer erfolgen. Wenn im Gerät die entsprechend ver-

wendete Verdünnung programmiert ist, wird automatisch die Ausgangskonzentration berechnet und angezeigt. Weiterhin ist zu beachten, dass der Standard mit der Konzentration 0 ng/mL gleichzeitig als Blank dient. Zudem sollten die Ansätze zunächst in einem Eppendorf Safe-Lock Gefäß vorpräpariert und unmittelbar vor der Messung gründlich zum Beispiel mit einem Eppendorf MixMate® durchmischt werden.

Programmierung und Messung der Standardkurve:

Für die Bestimmung von dsDNA wird die Methode PicoGreen verwendet.

Die Anzahl der Standards und die Standardkonzentration lassen sich im Bereich "check parameters" programmieren.

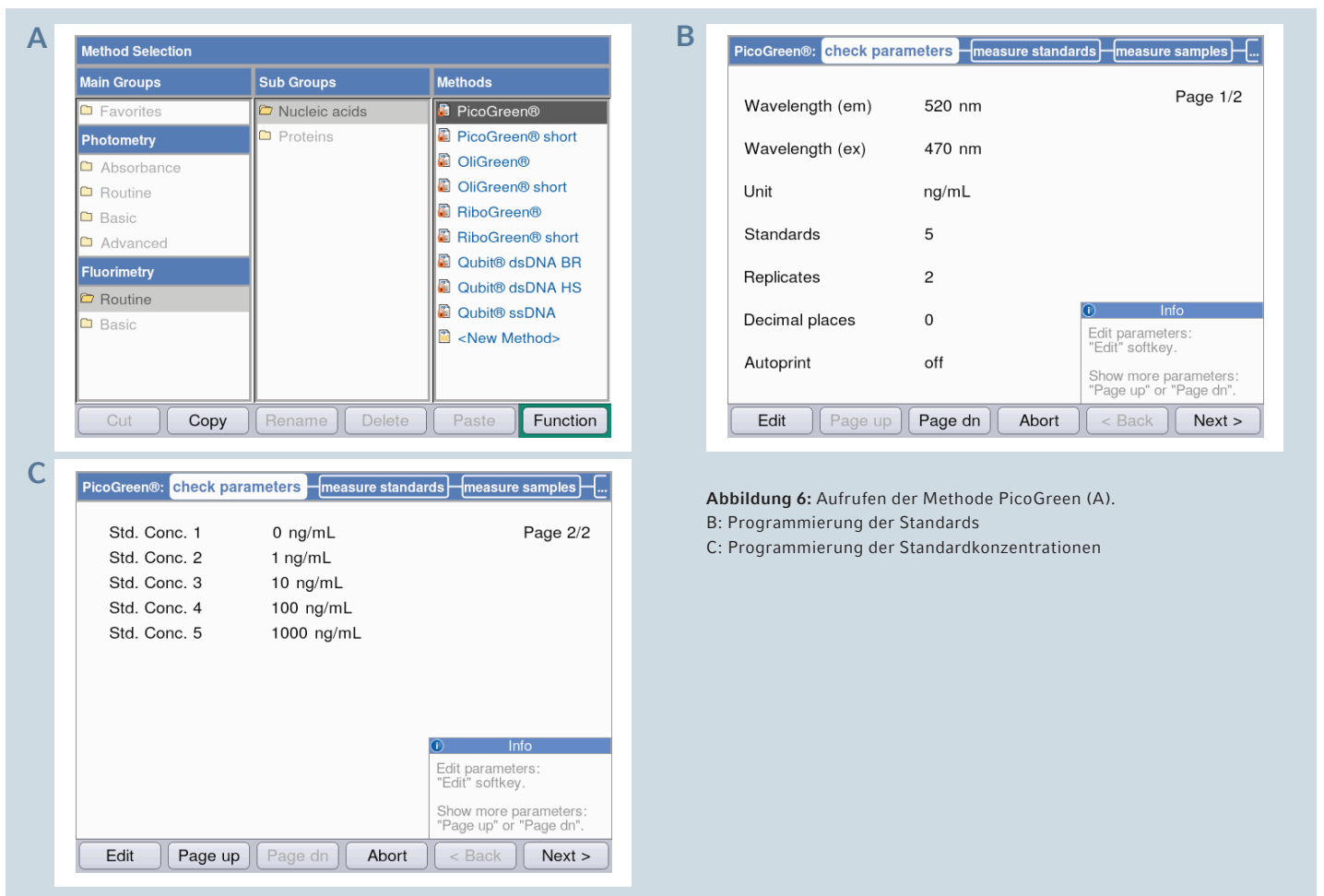


Abbildung 6: Aufrufen der Methode PicoGreen (A).
 B: Programmierung der Standards
 C: Programmierung der Standardkonzentrationen

Alle Parameter sind entsprechend der Vorgaben im Protokoll des Quant-iT PicoGreen dsDNA Kit von life technologies programmiert.

Über den Softkey „Next“ gelangt man in den Bereich „measure standards“. Alle Standards und auch die Proben sollten möglichst schnell hintereinander weg gemessen werden, da das Fluoreszenzsignal innerhalb der Ansätze mit der Zeit abnimmt

(Photobleaching). Während der Messung kann zwischen einer tabellarischen bzw. graphischen Darstellung gewechselt werden (Abbildung 7). Entscheidend für die Auswertung ist, dass die Kurve einen linearen Verlauf zeigt und das Bestimmtheitsmaß R^2 0,95 nicht unterschreitet. Bei Unterschreitung gibt das Gerät einen entsprechenden Warnhinweis.

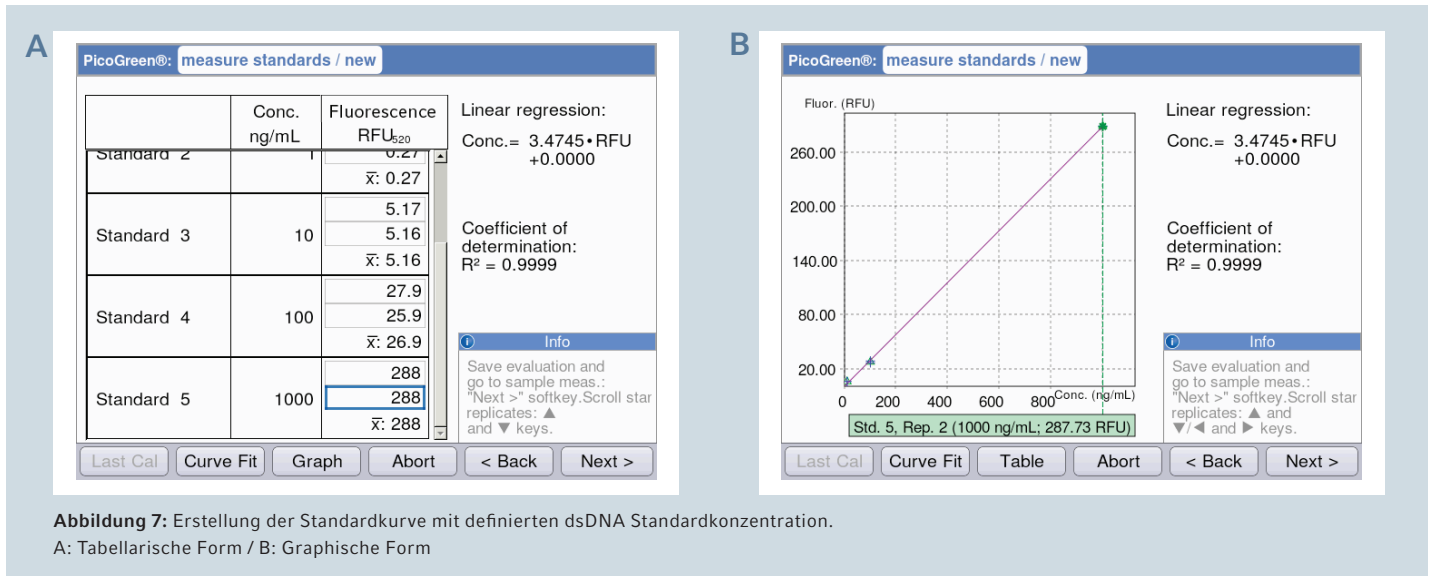


Abbildung 7: Erstellung der Standardkurve mit definierten dsDNA Standardkonzentration.

A: Tabellarische Form / B: Graphische Form

Verwendung der PicoGreen -„short“ Methode:

Bei Messung mit Standardkurven, die streng linear verlaufen, wie bei der Bestimmung von dsDNA mit PicoGreen, ist es auch möglich, die Anzahl der Standards zu reduzieren. Hierfür werden im Eppendorf BioSpectrometer fluorescence die sogenannten „Short methods“ angeboten. Dabei werden nur ein „Null“-Standard und ein weiterer Standard mit einer definierten Konzentration gemessen. Der zweite Standard muss innerhalb des linearen Bereichs liegen. Die Auswertung erfolgt in dem Fall über lineare Interpolation, da eine lineare

Regression mit nur 2 Standards nicht möglich ist. Im Eppendorf BioSpectrometer fluorescence sind in der PicoGreen -„short“ Methode 0 und 500 ng/mL vorprogrammiert (Abbildung 8).

Die Programmierung der Short-Methode lässt sich einfach und schnell durchführen. Im Ergebnisteil wird gezeigt, dass Probenbestimmungen, die mit einer solchen 2-Punkt-Kalibrierung durchgeführt werden, ähnlich genaue Ergebnisse liefern wie bei herkömmlicher Auswertung mit 5 Standards.

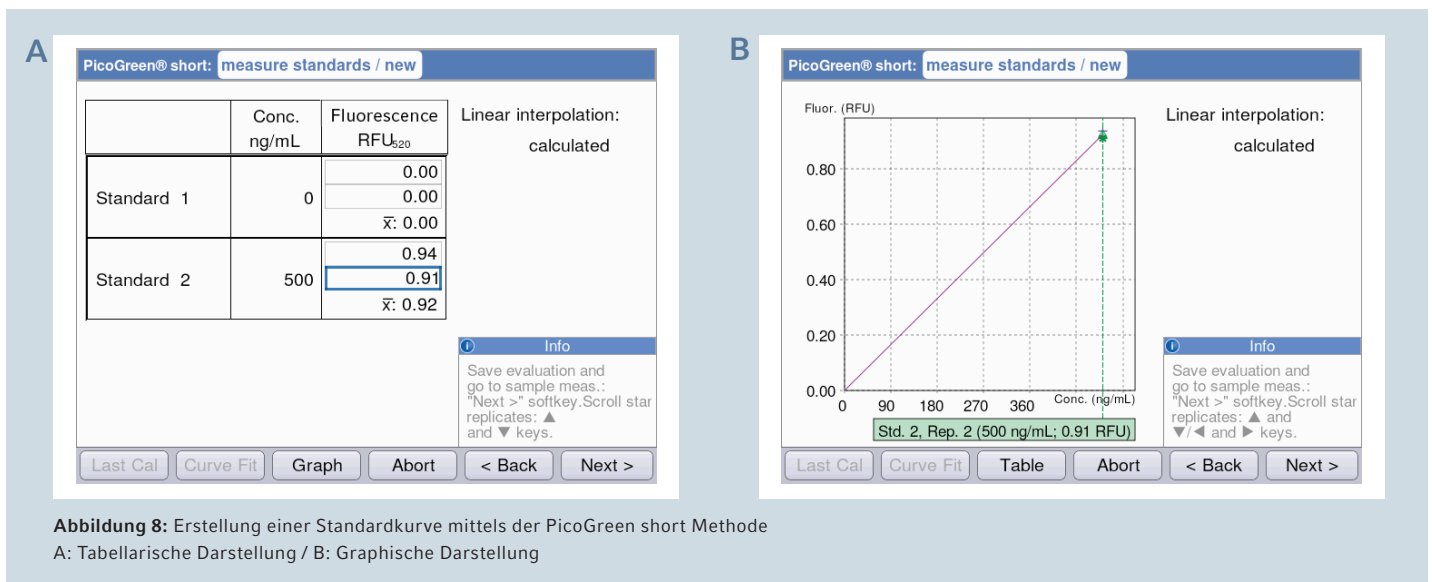


Abbildung 8: Erstellung einer Standardkurve mittels der PicoGreen short Methode

A: Tabellarische Darstellung / B: Graphische Darstellung

Bestimmung von RNA, ssDNA und Oligo-DNA

Im Eppendorf BioSpectrometer sind neben der PicoGreen-Methode auch Methoden für die Bestimmung von RNA über RiboGreen und ssDNA bzw. Oligo-DNA mittels OliGreen vorprogrammiert. Die Methoden orientieren sich dabei an den Kits von Life Technologies Quant-iT „RiboGreen RNA Reagent and Kit (RNA)“ bzw. Quant-iT „OliGreen ssDNA Reagent and Kit“. Die Bearbeitung dieser Methoden erfolgt analog der Auswertung über PicoGreen. Das gilt auch für die Short-Methoden, die für diese Kits ebenfalls vorprogrammiert sind. Bei dem RiboGreen-Kit ist es eventuell besser, wenn man für die Standardkurve statt einer linearen Regression (wie in der Kit-Beschreibung angegeben) eine nicht-lineare Regression anwendet. Während der Erstellung der Standardkurve lässt sich die Regression im Eppendorf BioSpectrometer fluorescence auch während der Messung der Standards beliebig anpassen. In jedem Fall sollte die Regression verwendet werden, die optimal zum Verlauf der Standardkurve passt. Dieses wird durch die Determinationskonstante R^2 dargestellt (Min.: 0,95/ Max.: 1).

Durchführung von fluorimetrischen Messungen mit dem Eppendorf BioSpectrometer fluorescence

Fluorophoren wie die oben genannten Farbstoffe sind sehr lichtempfindlich. Die Eigenschaft der Fluoreszenz wird mit zunehmender Zeit durch Lichteinfluss abnehmen („Photobleaching“). Aus diesem Grund sollten die entsprechenden Reagenzien möglichst dunkel und kühl gelagert werden. Auch während der Messungen macht sich der Effekt des „Photobleaching“ bemerkbar. Daher sollten die Standardkurve und die Proben möglichst schnell hintereinander weg gemessen werden.

Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Methoden „PicoGreen“ und „PicoGreen - „short““ gegenüber gestellt. Die vorprogrammierten „short“-Methoden zeichnen sich dadurch aus, dass zum einen die Standards wesentlich schneller gemessen werden können, zum anderen eine erhebliche Menge an Reagenzien gespart werden kann. Es werden nur zwei Standards gemessen. Im BioSpectrometer fluorescence sind das für PicoGreen - „short“ 0 ng/mL und 500 ng/mL. Auch hier wird der Nullstandard gleichzeitig für die Blank-Messung verwendet. Da die Standard-Reihe für die Auswertung mit PicoGreen, wie in Abbildung 7b gezeigt, mit 5 Standards linear verläuft, ist davon auszugehen, dass eine Auswertung mit nur 2 Standards möglich sein muss.

Die Stabilität der Fluorophoren ist sehr unterschiedlich: PicoGreen ist relativ stabil, wohingegen RiboGreen seine Eigenschaft zur Fluoreszenz unter Lichteinfluss recht schnell verliert. Eine Standardkurve sollte für jede Bestimmung neu erstellt werden, da sich aufgrund der Empfindlichkeit der Messungen durch leichte Änderungen in der Lichtintensität oder Temperatur keine 100%ig reproduzierbaren Messbedingungen erzeugen lassen. Daher sollten Messungen einer Messreihe immer unter gleichbleibenden Lichtverhältnissen durchgeführt werden.

Da die Vorbereitungen für die Messungen somit recht aufwendig sind im Vergleich zu Bestimmungen über UV-VIS Spektroskopie, empfiehlt es sich, die Proben zu sammeln, bevor eine Messreihe gestartet wird. Dadurch lassen sich auch Reagenzien sparen.

Bei allen Messungen ist der verwendete Null-Standard auch immer gleichzeitig die Blank-Lösung. Wie oben erwähnt, sollte immer überprüft werden, ob die Standardkurve zu der voreingestellten Regressionsauswertung („curve fit“) passt. Eine nachträgliche Anpassung ist während der Erstellung der Standardkurve jederzeit möglich. Die Auswertemethode kann durch die Funktion „Curve Fit“ jederzeit während der Messungen geändert werden.

Genauer wäre es, die Standardkurve immer mit Doppel- oder Dreifachbestimmungen pro Standard zu erstellen. Dadurch ist es eher möglich zu sehen, ob ein Standard aus der Messreihe herausfällt. Während der Messung der Standards kann jeder einzelne Standard neu gemessen werden.

Während der Messungen sollte auf die Höhe der RFU geachtet werden. Werte unter 1 sollten nicht verwendet werden.

Beim Vorbereiten der Messlösung muss insbesondere bei den Standards darauf geachtet werden, diese vor der Messung ausreichend zu mischen.

Für die Gegenüberstellung beider Methoden wurden jeweils eine Standardkurve mit 2 Standards (0 und 500 ng/mL) und eine Standardkurve mit 5 Standards erstellt (0, 1, 10, 100 und 1000 ng/mL). Anschließend wurden Konzentrationen von Proben mit 10, 100 und 1000 ng/mL mit beiden Standardkurven bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 9 gezeigt. Die Screenshots 9 A-C basieren auf einer Auswertung mit 5 Standards. 9 D-F zeigen die Ergebnisse basierend auf einer Auswertung mit 2 Standards.

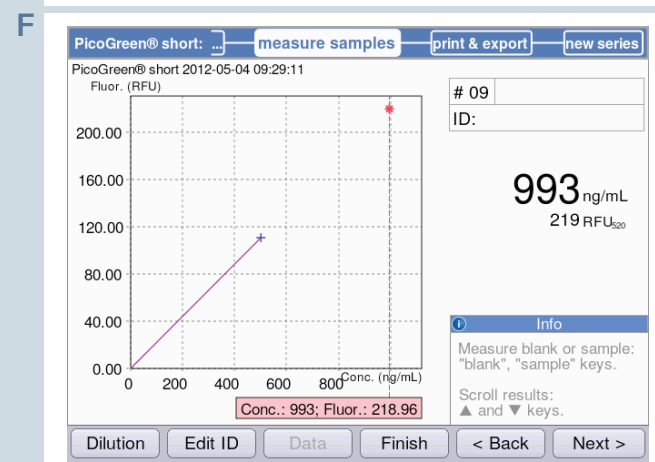
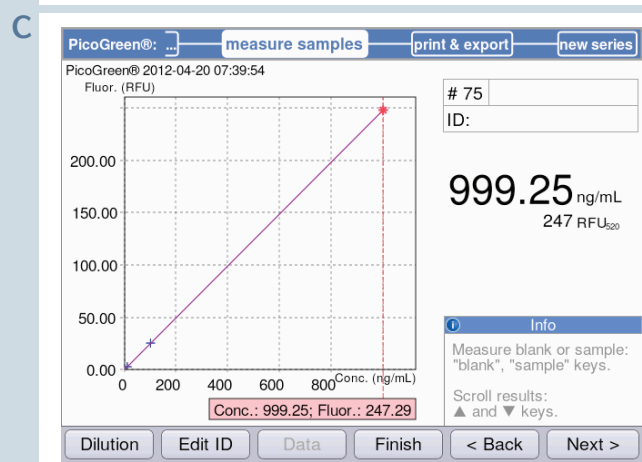
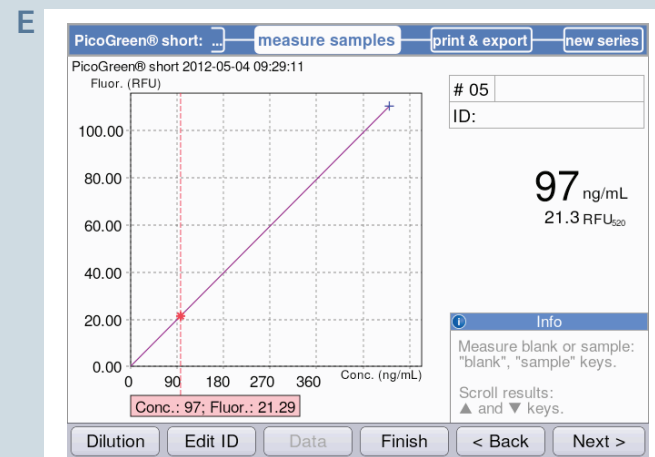
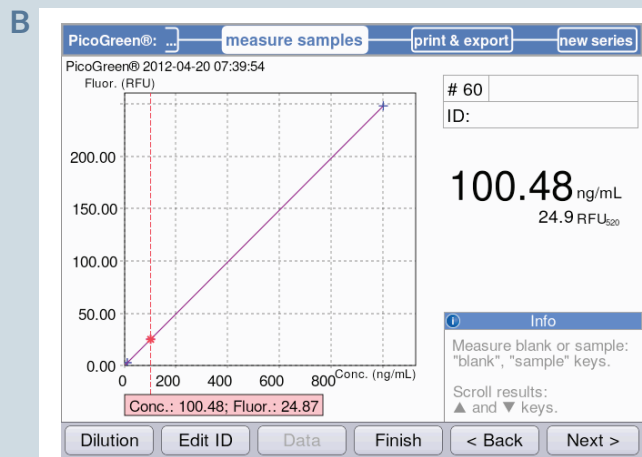
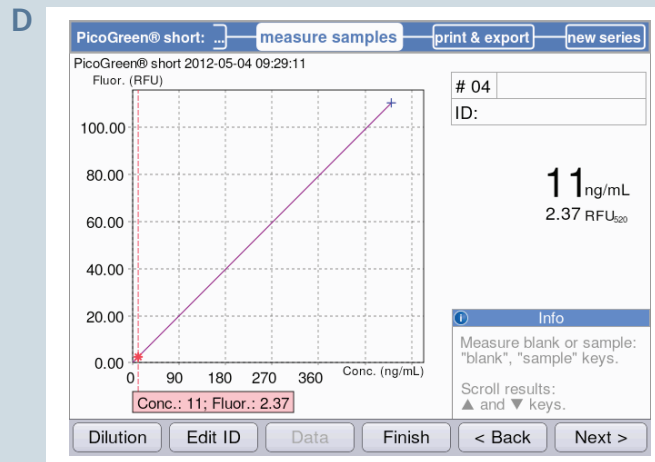
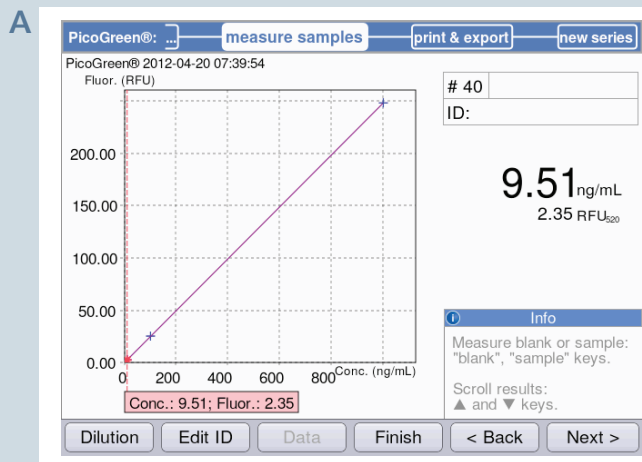


Abbildung 9: Bestimmung von dsDNA Proben (10, 100 und 1000 ng/mL) mit der Methode PicoGreen und PicoGreen - „short“

A-C: Methode PicoGreen

D-F: Methode PicoGreen - „short“

Wie aus Abbildung 9 zu entnehmen ist, sind die Ergebnisse beider Methoden vergleichbar. Eine Auswertung über 5 Standards ist in diesem Beispiel etwas genauer. Für eine schnelle Überprüfung von einzelnen Proben ist die „short“-Methode aber ausreichend.

Dies zeigt sich auch, wenn man die Ergebnisse basierend auf der Methode PicoGreen -„short“ und einer 2-Punktkalibration auf einem Vergleichsgerät misst (Tabelle 4). Die Ergebnisse liegen in dem zu erwartenden Bereich und weichen nur minimal voneinander ab.

Tabelle 4: Vergleich von dsDNA Bestimmungen mittels der „PicoGreen short“ am BioSpectrometer fluorescence und einem Vergleichsgerät

Standards - Sollkonzentration	Ergebnis im Vergleichsgerät (2 Standards)	Abweichung vom Sollwert	Ergebnis im BioSpectrometer mit PicoGreen -„short“ (2 Standards)	Abweichung vom Sollwert	Abweichung zwischen BioSpectrometer und Vergleichsgerät
[ng/mL]	[ng/mL]	[ng/mL] / [%]	[ng/mL]	[ng/mL] / [%]	[%]
10	11,2	1,2 / 12	11	1 / 10	2,4
100	97,2	-2,8 / 2,8	97	-3 / 3	0,8
1000	993,1	-7 / 0,7	993	-7 / 0,7	0,0

Wie aus Tabelle 4 als auch aus Abbildung 9 ersichtlich, lassen sich mittels der PicoGreen -„short“ Methode ausreichend genaue DNA-Konzentrationen ermitteln. Die Ergebnisse weichen nur geringfügig vom Sollwert ab und auch die Abweichungen zum Referenzgerät sind minimal.

Ein großer Vorteil beim Eppendorf BioSpectrometer ist, dass bei Messungen mit einer Standardkurve die Ergebnisse in einem Graphen immer direkt in Relation zu der Standardkurve abgebildet werden. Dadurch lässt sich genau abschätzen, ob die Probenkonzentration mit dem gemessenen Bereich der Kurve übereinstimmt. Fehleinschätzungen von Ergebnissen können dadurch leicht eliminiert werden.

Die oben dargestellten Messungen sind alle in Makroküvetten aus PMMA (Polymethylmethacrylat) mit 1 mL Messvolumen durchgeführt worden. Das BioSpectrometer fluorescence kann aber mit allen gängigen Küvetten betrieben werden. Für Fluoreszenz-Messungen können Makroküvetten aus Quarzglas, Halbmikroküvetten aus PMMA, Ultramikroküvetten aus Quarzglas oder auch die Eppendorf UVette eingesetzt werden. Durch die Verwendung der Eppendorf UVette könnte das

Messvolumen nochmals deutlich reduziert werden, da hier für die Messung 60 µL ausreichend sind. Zu beachten ist dabei, dass bei einem geringen Einsatz von Reagenz auch das Fluoreszenz-Signal reduziert wird. Dies kann bei Messungen an der Untergrenze des Messbereichs zu größeren Ungenauigkeiten bei der Probenbestimmung führen.

Mittels Nukleinsäure-Bestimmung über Fluoreszenz lassen sich, wie gezeigt, deutlich geringere Konzentrationen an dsDNA messen als über die Standardbestimmung mittels UV-VIS Spektroskopie. Da das Eppendorf BioSpectrometer fluorescence in der Lage ist, dsDNA sowohl über Fluoreszenz als auch über Absorptionsmessungen zu bestimmen, ergibt sich hier ein bisher von anderen Geräten im Markt nicht erreichter Messbereich. Dieser wird sogar noch erweitert, wenn das Messsystem mit einer Mikrovolumenküvette, wie der Eppendorf µCuvette G1.0 erweitert wird (4). Dadurch ergibt sich ein theoretischer Messbereich für dsDNA von 1 ng/ml bis zu 1500000 ng/mL (=1,5 mg/mL).

Fazit

Das Eppendorf BioSpectrometer fluorescence ist ein vollwertiges UV-VIS Spectrometer mit integriertem Fluorimeter. Alle Methoden, die im Eppendorf BioSpectrometer basic implementiert sind, stehen auch hier zur Verfügung. Durch das integrierte Fluorimeter können zusätzlich Standard-Methoden zur Nukleinsäuren- und Proteinbestimmung über Fluoreszenz durchgeführt werden. Die vorprogrammierten Methoden orientieren sich an den Quant-iT Kits der Firma life technologies. Neben den in den Kits empfohlenen Auswertungen über 5 Standards, werden darüber hinaus auch für alle Nukleinsäure-Methoden „Short methods“ angeboten, die eine Auswertung

mittels 2 statt 5 Standards ermöglichen. Mit PicoGreen als Beispiel konnte gezeigt werden, dass eine Auswertung ohne Verlust der Genauigkeit möglich ist. Dieses wurde auch bei Messungen in einem Vergleichsgerät bestätigt. Durch „Short-Methods“ und Reduzierung des Messvolumens unter Verwendung der Eppendorf UVette lässt sich zudem eine erhebliche Menge an Reagenzien sparen.

In Kombination mit der Eppendorf µCuvette G1.0 und dem Eppendorf BioSpectrometer fluorescence ist es weiterhin möglich, dsDNA in einem Bereich von 1 – 1.500 000 ng/mL (= 1,5 mg/mL) zu bestimmen.

Literatur

- [1] F. Lottspeich, J. W. Engels, Bioanalytik, 3.Auflage (2012), Spektrum Verlag
- [2] Mülhardt, C., Der Experimentator, Spektrum Verlag
- [3] Gallager, R.S, Current protocols in molecular biology, Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy, Appendix 3D
- [4] Armbrecht, M., Karow, K.: Eppendorf μ Cuvette™ G1.0 - A new micro-volume system for highly precise photometric determination of nucleic acids or proteins in the Eppendorf BioPhotometer® and Eppendorf BioSpectrometer

Bestellinformationen		
Bezeichnung	Best.-Nr. International	Best.-Nr. Nordamerika
Eppendorf BioSpectrometer® fluorescence 230 V/50-60 Hz, Netzstecker Europa, weitere Netzanschlussvarianten erhältlich 120 V/50-60 Hz, Netzstecker Nordamerika	6137 000.006	
Eppendorf BioSpectrometer® fluorescence Referenzfiltersatz Filtersatz zur Überprüfung der photometrischen Richtigkeit und Wellenlängenrichtigkeit (gemäß NIST) sowie zur Überprüfung der fluorimetrischen Präzision (zufällige Messabweichung) und Linearität.	6137 928.009	6137000014 6137928009
Eppendorf μCuvette™ G1.0 – Eppendorf Mikrovolumen-Messzelle für Eppendorf BioPhotometer und BioSpectrometer	6138 000.018	6138000018
Thermodrucker DPU 414 inkl. Netzteil und Druckerkabel 230 V, EU 115 V/100 V, USA JP 230 V	6131 011.006 6131 010.000 6131 012.002	952010140
Thermopapier 5 Rollen	0013 021.566	952010409
UVette® 220 nm – 1 600 nm Original Eppendorf Kunststoffküvette, einzeln verpackt, zertifiziert RNase-, DNA- und proteinfrei 80 Stück	0030 106.300	952010051
UVette® routine pack 220 nm – 1 600 nm Eppendorf Quality Reinheitsgrad, wiederverschließbare Box 200 Stück	0030 106.318	952010069
Küvettenständer für 16 Küvetten	4308 078.006	940001102

Your local distributor: www.eppendorf.com/contact

Eppendorf AG · 22331 Hamburg · Germany
eppendorf@eppendorf.com · www.eppendorf.com

www.eppendorf.com

AppliChem ist eine eingetragene Marke der AppliChem GmbH, Darmstadt.

PicoGreen®, OliiGreen®, RiboGreen®, Nanoorange® und Qubit® sind eingetragene Marken der Molecular Probes, Inc. Corporation, Eugene, OR, USA.

Quant-iT™ ist eine Handelsmarke der Life technologies Corporation, Carlsbad, CA 92008 USA. Eppendorf®, das Eppendorf Logo, Eppendorf BioSpectrometer®, UVette®, MixMate®, Eppendorf Research® sind eingetragene Marken der Eppendorf AG, Hamburg, Germany. Eppendorf μ Cuvette™ ist eine Handelsmarke der Eppendorf AG, Hamburg, Germany. Alle Rechte vorbehalten, einschließlich Grafiken und Bilder. Copyright © 2013 by Eppendorf AG.