超微量螢光偵測
讓您無痛升級盤式螢光儀

游季禹　撰

以超微量的方式定量核酸或是蛋白質已經不是新鮮的事情了，市面上琳瑯滿目的超微量分光光度計，代表著超微量的時代早已來臨。下一個未來，即是超微量螢光偵測世界。

什麼是超微量？以往都是利用石英比色管，以1-3 ml的體積定量核酸或是蛋白質。直到10多年前，微量盤式分光光度計(microplate spectrophotometer)被延伸使用在定量上，但一般而言仍需要約100 µl的樣品體積。當遇到珍貴樣品時，並沒有那麼多的樣品量可以進行定量，所以需要將每一個待測樣品稀釋再測量，如此一來，不僅費時費工，又會造成更大的實驗誤差。而超微量即代表只要2 µl以下的樣品量，依然可以完成定量的步驟，不僅快速方便，更增加了準確度。

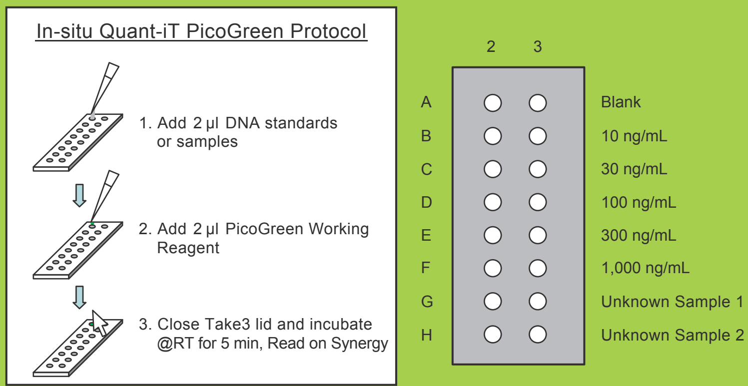
美國BioTek公司，早在多年前已經推出超微量升級模組—TAKE3(如圖一)，可以利用microplate spectrophotometer進行超微量判讀核酸或是蛋白質。microplate spectrophotometer除了具有穩定光源外，其偵測器為光電二極管(photodiode)，在最小偵測極限及再現性上，都較市面上的CCD偵測器來的優越。此外更值得一提的是，一次最多可同時判讀16個樣品，效能等同於市面上16台超微量分光光度計。

圖一、TAKE3尺寸及使用如同一般96孔微量盤，但只需2 µl樣品量。

如今，TAKE3已經進化為超微量螢光偵測模組，除了吸收光的判讀方法，再加上螢光的實驗，讓microplate spectrophotometer無痛升級為超微量吸光螢光判讀儀(如圖二)。以下實驗利用Quant-iT PicoGreen dsDNA試劑測量DNA濃度，佐證TAKE3在超微量螢光測量的便利性及準確度。

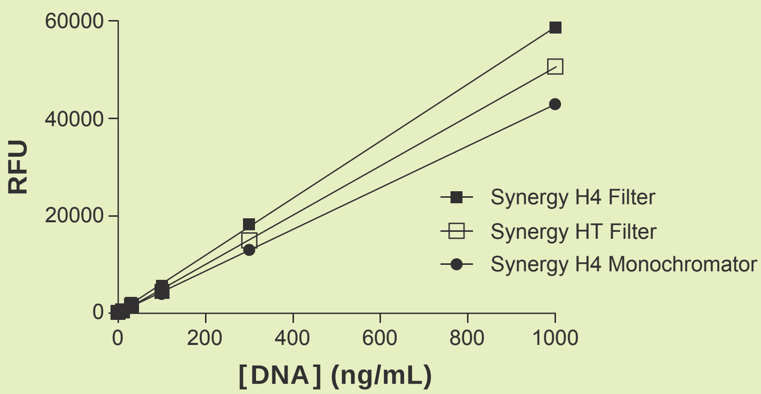
將Lambda dsDNA稀釋成不同濃度的標準品，分別取2 µl於樣品槽內。另外配製25 ng / mL及500 ng / mL的Lambda dsDNA當作樣品，以驗證實驗準確度。再依序加入PicoGreen試劑2 µl，蓋上TAKE3的上蓋，即完成取樣步驟(如圖三)。為了同時觀察以全波長和濾鏡式的螢光偵測結果，利用BioTek Synergy H4儀器的全波長和濾鏡式模組及Synergy HT儀器的濾鏡式功能，分別進行判讀。Synergy H4全波長模式判讀時，以495 nm作為激發波長，而526 nm為散射波長，頻寬調整為9 nm。另外以Synergy H4及Synergy HT的濾鏡模式判讀時，則選擇485 nm濾鏡(頻寬20 nm)為激發波長，而528 nm濾鏡(頻寬20 nm)為散射波長。

圖二、將TAKE3置入microplate spectrophotometer
即可升級為超微量吸光螢光偵測儀。



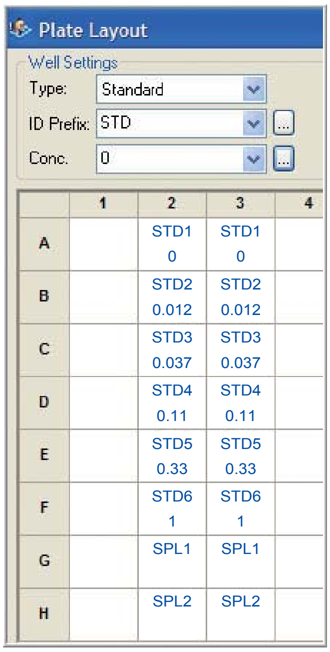
圖三、A列為Blank，B至F列為標準品，作為繪製標準曲線用，而G和H則為已知濃度的樣品，以驗證準確度。

將Blank及5個標準品(濃度由10~1000 ng / mL)的判讀結果，以線性方程式繪製標準曲線。分別得到三條不同斜率的標準曲線(如圖四)，R^2值均大於0.999(三重複實驗)，代表再現性很高。另外以已知濃度樣品的RFU值，帶入標準曲線所得到的濃度計算值分別為25.4 ng / mL(精確度為+ 1.6%)及485 ng / mL(精確度為- 3.0%)，在超微量螢光的世界裡，屬於非常突出的表現。

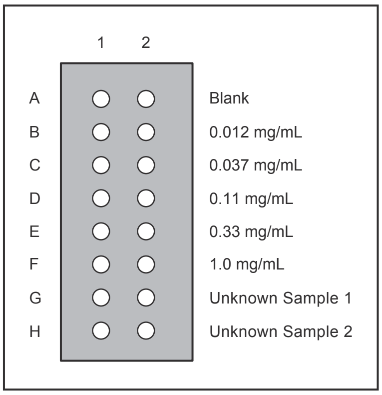


圖四、以三種方式判讀TAKE3螢光實驗，可得到三條不同斜率的標準曲線，R^2值均大於0.999(三重複實驗)，代表再現性很高。

由以上簡單明確的實驗，可以確定TAKE3在超微量螢光實驗有令人滿意的表現，即使DNA濃度降到ng / mL等級，仍然有高再現性及高精準度的結果。再者，TAKE3還可以判讀3 mL及1 mL的石英管，等於將microplate spectrophotometer的判讀方式從微量盤擴充至2 µl超微量及石英管，不需要再另外採購儀器，即可進行所有的判讀方式。除了在價位上等於節省了66%的實驗室經費，另外更不需要擔心實驗室空間不足的窘境。最後附帶一提，由圖四可發現，若以濾鏡模式判讀，得到的RFU值較高，因為濾鏡的頻寬較大，激發光的能量較多，所以散射光的訊號也較強。所以全波長雖有較大的波長選擇彈性，但濾鏡也有螢光高訊號的優點，BioTek Synergy H4及Synergy H1擁有全波長及濾鏡雙系統，讓您自由選擇最有利的實驗方式。



	1	2	3	4
A		STD1 0	STD1 0	
B		STD2 0.012	STD2 0.012	
C		STD3 0.037	STD3 0.037	
D		STD4 0.11	STD4 0.11	
E		STD5 0.33	STD5 0.33	
F		STD6 1	STD6 1	
G		SPL1	SPL1	
H		SPL2	SPL2	

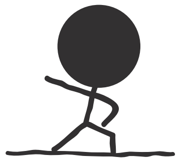


超微量世界地圖

為自己選一條最適合的路

測量樣品：

dsDNA	ssDNA	RNA
Protein	Bacteria	Cell



已購買全波長
ELISA reader

BioTek® Get a Better Reaction. Take3

- 1~16個樣品
- 吸收光及螢光實驗
- 適用3 ml / 1 ml石英管

Picodrop™ μl spectrophotometry made simple Pico100

- 非接觸式，不怕污染
- 珍貴樣品可回收
- 可進行蛋白質呈色定量

樣品珍貴
需回收使用

CapitalBio NanoQ

- 雙光路徑選擇1 mm / 0.2 mm
- 大範圍濃度偵測2~3700 ng / ul (dsDNA)
- 具內部校正，不怕測不準