

**BMG LABTECH**

*The Microplate Reader Company*

# 快速且準確地偵測DNA濃度

## BMG盤式螢光儀獲國際廠牌指定使用

撰文：熊泰綸

精準醫療是以個體化醫療為基本，搭配利用進步的生物科技技術所得信息與大量的資訊(大數據)所發展出的新型態醫療模式。其中包含層面相當的廣泛，從檢測、診斷、治療、到監控都包含在精準醫療之中，而在檢測層面中不論是免疫檢驗、基因體、蛋白質體以及影像分析也都囊括其中。如次世代定序透過檢測DNA評估是否有目前正處於或是潛在疾病的風險，進而提供相關資訊協助做出治療建議。

次世代定序(Next Generation Sequencing, NGS)的發展將研究與醫療層面推上更高層次的應用。在研究方面，DNA與RNA定序可以協助尋找先天基因缺陷或罕見疾病的原因；而醫療層面，也可進行癌症患者與正常人細胞間的基因差異，再配合大數據下研究及比對其基因體改變、重組、致癌基因等表現。當然，對於次世代定序相關的後續應用，DNA定量實驗就變得相當重要。傳統核酸定量方法是利用核酸鹼基中芳香環結構具有紫外光吸收的特性，而測定吸收波長為260nm的吸光值。因此，使用分光光度計偵測其樣品吸光值，利用Lambert-Beer's Law及已知的吸收光係數(例如dsDNA平均吸收光係數為 $0.02(\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$ )與偵測光徑，計算出樣品中DNA或RNA的濃度。儘管這種方法被廣泛的使用，並不意味著每次讀值都是可靠的；由於UV測定對象為帶有芳香環的鹼基，而 $A_{260}$ 對於完整成鏈的核酸或是降解成單一的核苷酸並不具有選擇性，即便可藉由 $A_{260}/A_{280}$ 及 $A_{260}/A_{230}$ 之數值來評估核酸之純度，卻無法單一測定完整結構核酸之濃度；不但如此，基於以上原理，當樣品中同時含有DNA及RNA時，UV測定法有相當大的機率因為僅偵測芳香環結構而誤判樣品濃度。

德國知名盤式分析儀大廠BMG LABTECH使用PHERAstar® FSX高通量式、CLARIOstar®全功能式及FLUOstar® Omega濾鏡式多功能盤式分析儀進行DNA螢光定量法實際測試。其中，分別對螢光定量法濃度校準與其高靈敏度能準確偵測樣品濃度提供實際的數據，針對低濃度範圍樣品(0.1~2 ng/μl)高靈敏度的偵測，其CV%低於10%；除此之外，螢光定量法能有效率應用在盤式分析儀上，不論是一般96 well或是高通量使用384 well微量盤，其檢量線線性均展現R<sup>2</sup>>0.999以上的優秀表現；因此，對於需偵測大量低濃度DNA樣品的使用者將是一大佳音。

Figure1.

使用AccuBlue™ DNA螢光定量法偵測，不論在大範圍(0~5000 pg)或低濃度範圍(0.1~100 pg)，其檢量線均R<sup>2</sup>>0.99。(B. Bruijns, 2016)

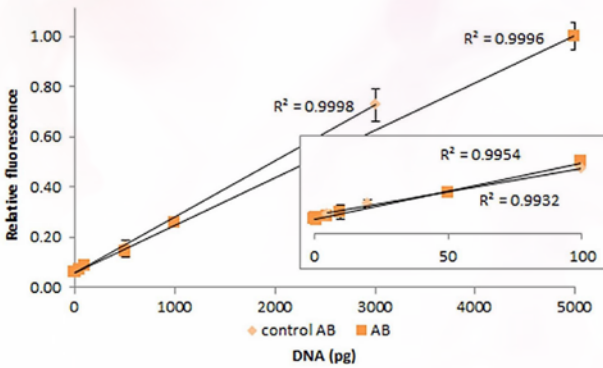


Figure3.(A)

使用96 well微量盤偵測DNA濃度1~3000 pg/μl三重複，並運算其檢量線線性R<sup>2</sup>=0.99983。

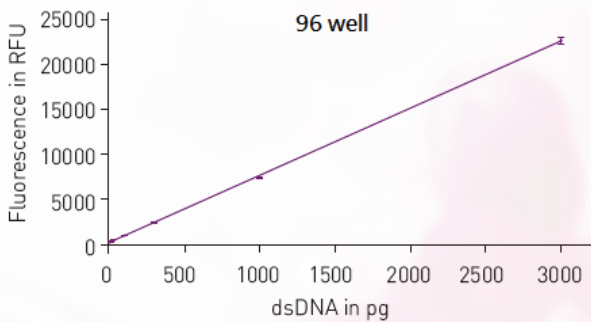


Figure3.(B)

相同使用384 well微量盤偵測DNA濃度0.25~700 pg/μl三重複，並運算其檢量線線性R<sup>2</sup>=0.99987。

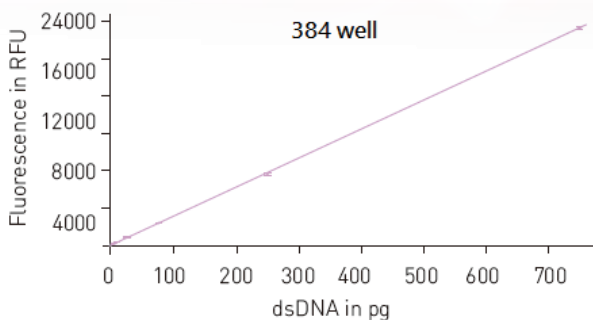
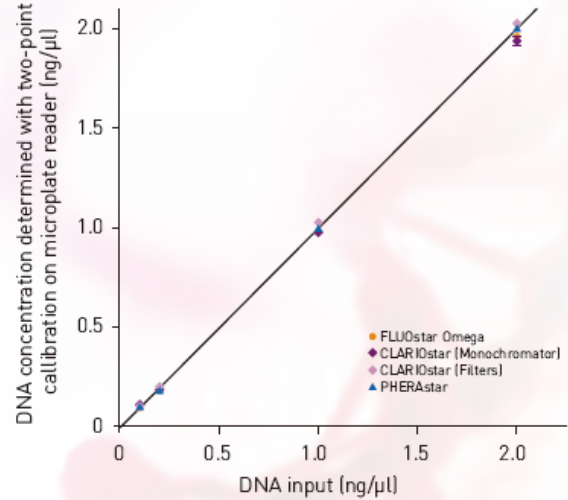


Figure2.

普遍的UV測定法靈敏度約落於2ng/μl。若分別使用PHERAstar FSX、CLARIOstar、及FLUOstar Omega盤式儀偵測0.1~2ng/μl，其結果顯示螢光測定法對於低濃度樣品偵測可提供更精準的實驗數據，其誤差低於10%。

A



B

| Input DNA concentration | DNA concentration determined on BMG LABTECH microplate readers |            |           |
|-------------------------|--|------------|-----------|
|                         | FLUOstar Omega   | CLARIOstar | PHERAstar |
| 0.1 ng/μl               | 0.109  | 0.108      | 0.101     |
| 0.2 ng/μl               | 0.196  | 0.203      | 0.195     |
| 1 ng/μl                 | 0.983  | 1.028      | 1.001     |
| 2 ng/μl                 | 1.962  | 2.025      | 2.000     |

資料來源：

1. Bruijns, B. B., Tiggelaar, R. M., & Gardeniers, J. G. E. (2016). Fluorescent cyanine dyes for the quantification of low amounts of dsDNA. *Analytical biochemistry*, 511, 74-79. DOI: 10.1016/j.ab.2016.07.022
2. BMG Labtech Technical Note 306: Fluorescent quantification of low amounts of dsDNA using AccuBlue™ NextGen from Biotium
3. BMG Labtech Technical Note 308: Quantifying double-stranded DNA with fluorescent dyes: Qubit™ on BMG LABTECH instruments
4. Invitrogen™ Technical Note: Comparison of fluorescence-based quantitation with UV absorbance measurements