

如何使用 QE65000 科研级光谱仪测定核酸和蛋白质

QE65000 科研级光谱仪采用薄型背照式探测器 (Back-thinned)，二维像素阵列 (1044*64pi)，可高效收集狭缝整个高度的光信号，对波长范围 200-1100nm 的信号进行响应，内置热电制冷器，积分时间最长可达 15 分钟，尤其适用于低亮度级别测试。下面以实例说明如何使用 QE65000 测定核酸和蛋白质的含量。

1) 光度法测定蛋白质含量

该方法操作简便快捷，测试成本低。

a. 实验原理

溴麝香草酚蓝 (BTB) 染料在 pH=8.0 时为蓝色 ($\lambda_{\max}=615 \text{ nm}$)，加入蛋白质后发生明显减色反应，并且在一定范围内吸光度下降值与蛋白质含量成正比

b. 实验试剂及测试仪器

人血清蛋白 (HSA) 质量浓度 5.69 mg/L，其他浓度取此溶液稀释；

溴麝香草酚蓝溶液 $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$

Tris-HCl 缓冲溶液 (pH=8.0)；

1cm 比色皿；

卤钨灯光源；

QE65000 光谱仪。

c. 实验方法

以水为参比，分别测定溴麝香草酚蓝，以及溴麝香草酚蓝-HAS 混合液的吸光度。可以看到加入蛋白质 HAS 后，溴麝香草酚蓝的吸收峰下降，在 615 nm 处表现为明显的减色效应。

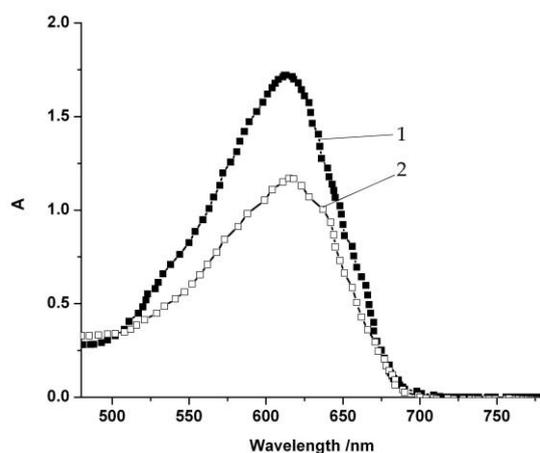


图 1 吸收光谱: 1 溴麝香草酚蓝; 2 溴麝香草酚蓝-HAS

然后以空白试剂（溴麝香草酚蓝）为参比，测试含不同浓度 HAS 的溴麝香草酚蓝溶液在 615nm 处吸光度。得到蛋白质 HAS 与吸光度在 11.3~800 $\mu\text{g/ml}$ 范围内具有线性关系，见图 1，线性回归方程为 $A=0.0009C+0.0341$ ($R=0.9980$)。由此可根据吸光度测定该范围内蛋白质含量。

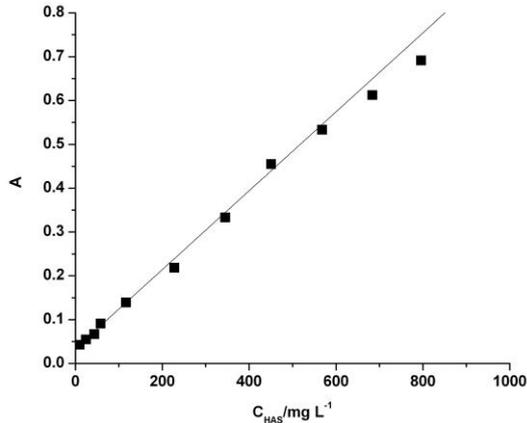


图 2 吸光度与蛋白质含量的线性关系

2) 荧光法测核酸

a. 实验原理

溶液的荧光强度与该溶液的吸光程度及溶液中荧光物质的荧光量子产率有关。根据比尔定律，通过液池的透射光强度 $I_t=AI_0e^{-abc}$ 。其中 c 为溶液中荧光物质的浓度， b 为液池厚度， a 为吸光系数。对于很稀的溶液在一定频率和强度的激发光照射下，如果光被吸收得分数不太大，而且溶液的浓度很小时，溶液所产生的荧光强度与溶液中该荧光物质的浓度成正比。该方法利用核酸与荧光染料作用发生荧光猝灭效应，在一定范围内荧光强度衰减与核酸浓度呈线性关系求算核酸含量。

b. 实验试剂及测试仪器

缓冲剂：六次甲基四胺-盐酸缓冲溶液 ($\text{pH}=7$)；

显色剂：天青 I 溶液；

不同浓度的 ct DNA 溶液（小牛胸腺 DNA）；

625nm 激发光源；

QE65000 光谱仪。

c. 实验方法

取 5 支 1 cm 比色皿依次加入样品 1#-4#, 如表 1 所示。

表 1 测定样品编号

	1#	2#	3#	4#
ct DNA ($\mu\text{g/mL}$)	0	10	25	50
天青 I (mol/L)	3×10^{-6}	3×10^{-6}	3×10^{-6}	3×10^{-6}

各管混匀后, 在激发光 $\lambda_{\text{ex}}=625 \text{ nm}$ 下, 首先测定 $\lambda=654 \text{ nm}$ 处的发射光空白溶液(2#)的荧光值 I_1 ; 而后测定加入核酸后体系 (2#, 3#, 4#样品) 的荧光强度为 $I_n(n=2,3,4)$, 体系荧光强度的降低值表示为 $\Delta I_f=I_1-I_n$ 。

d. 测试结果及讨论

图 3 为天青 I 与不同浓度 ct DNA 体系的荧光激发、发射光谱, 在 623 nm 可见光激发下, 天青 I 在 654 nm 出产生很强的荧光, 这是其荧光特征, 在天青 I 中加入 ct DNA 后, 体系的荧光激发及发射峰峰型和位置不变, 但强度降低, 发生了荧光猝灭。

天青 I 的荧光猝灭程度在一定范围内与加入的 ct DNA 的浓度成线性关系, 据此可以建立核酸定量测定的方法。得到线性回归方程 $\Delta I_f=18.35+64.56\rho$, 相关系数 $r=0.9964$, 线性范围 (0-60 $\mu\text{g/mL}$)。

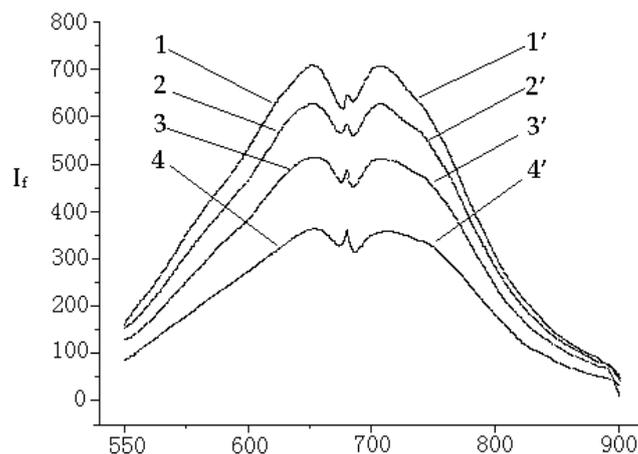


图 3 天青 I 与 ct DNA 作用的荧光激发 (1-4) 和发射光谱 (1'-4')