

- Das NanoPhotometer™ -

Ein Synonym für spektrophotometrische Quantifizierung von Proben im Nano- und Standard-Volumen-Bereich, für hohe Reproduzierbarkeit und für Linearität über einen weiten Bereich

¹Reena Kartha PhD, ²Fabienne Trotier, ³Dr. Andrea Kreuz, ³Dr. Andrea Huber

¹Department of Pathology, Stanford University, ²Institut für Medizinische Genetik, Charité Universitätsmedizin Berlin, ³Implen GmbH

Einleitung

Die spektrophotometrische Analyse von Nukleinsäuren, Proteinen und Bakterienkulturen ist ein wesentlicher Teil der täglichen Laborroutine. Mit dem universellen NanoPhotometer™ von Implen können sowohl geringste Probenvolumina im submikroliter Bereich (ab 0,7 µl), als auch Proben im Standard-Volumen Bereich analysiert werden. Die Vermessung der geringen Probenvolumina erfolgt küvettenlos mit der integrierten LabelGuard™ Mikroliter Messzelle (Abbildung 1 und 2). Größere Volumina können mit handelsüblichen Küvetten vermessen werden.



Abbildung 1: NanoPhotometer™ mit integrierter LabelGuard™ Mikroliter Messzelle.

Insert: Aufpipettieren eines Probentropfens auf das Messfenster.

Das NanoPhotometer™ erfüllt alle erdenklichen Anforderungen des Laboralltags. Es können Einzel- und Mehrfachwellenlängenmessungen, Konzentrationsbestimmungen, Standardkurvenmessungen und Verhältnisberechnungen durchgeführt werden. Die vollständige Kinetikfunktionalität und die Möglichkeit eines Spektrum Scans runden das Repertoire des NanoPhotometers™ ab. Voreingestellte Methoden zur Nukleinsäureanalytik (dsDNA, ssDNA, RNA, Oligos), zur Bestimmung der Labelingeffizienz (Farbstoffeinbauten z.B. für Microarray Experimente), zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford, Lowry, BCA, Biuret, Protein nach Christian-Warburg (A280)) und zur Bestimmung der Zelldichte (OD600) erleichtern die spektrophotometrische Probenanalytik.

Das Photometer verfügt über eine Komplettssoftware auf einem integrierten Computer. Der Datentransfer auf einen PC ist über USB oder Bluetooth möglich. Durch seine Vielseitigkeit ist das robuste Allroundtalent NanoPhotometer™ für alle erdenklichen Anwendungen geeignet. Vor allem durch die Möglichkeit auch geringste Probenvolumen zu analysieren ist das

NanoPhotometer™ im Rahmen von Technologien wie Real-Time PCR, Laser Capture Microdissection und Microarray basierende Applikationen ein sehr effizientes Hilfsmittel.

Technische Spezifikationen

Mit dem NanoPhotometer™ ist ein kompletter Spektrumschscan von 200 nm bis 950 nm möglich. Der Wellenlängenbereich für Einzel- oder Mehrfachwellenlängenmessungen liegt zwischen 190 nm und 1100 nm. Der mittlere dynamische Bereich für dsDNA liegt zwischen 15 ng/µl und 4000 ng/µl (optional erweiterbar auf 7 ng/µl bis 8000 ng/µl), der für Proteine liegt zwischen 0,2 mg/ml und 100 mg/ml (z.B. BSA-Lösung) und ist ebenfalls erweiterbar.

Tabelle 1: Spezifikationen

	Lid 5	Lid 10	Lid 50	Lid 100
optische Schichtdicke [mm]	2	1	0,2	0,1
virtuelle Verdünnung	1:5	1:10	1:50	1:100
Probenvolumen [µl]	6 - 10	3 - 5	0,7 - 4	0,7 - 3
dynamischer Bereich dsDNA [ng/µl]	7 - 350	15 - 700	250 - 4000	500 - 8000
Rückgewinnung der Probe	ja (keine Verdunstung)			
Zeit für Reinigung	5 Sekunden			
Probendurchsatz	160/h			
kompatibel mit flüchtigen Lösungsmitteln (z.B. Acetonitril/Toluol)	ja			

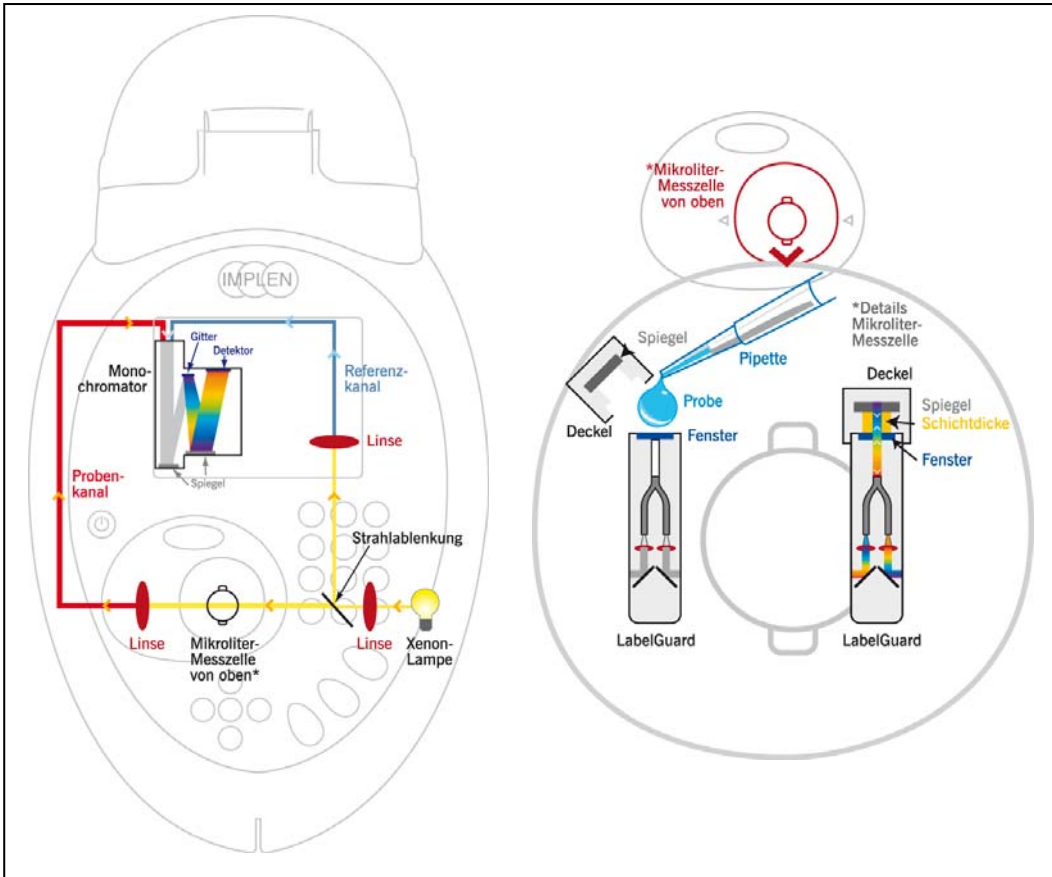


Abbildung 2: Optischer Strahlengang des NanoPhotometers™

Durch integrierte Strahlableitung und Verwendung faseroptischer Lichtleiter kann die Probe direkt auf dem Messfenster vermesen werden. Die vier verfügbaren Deckelversionen (Lid 5, 10, 50 und 100) der Mikroliter Messzelle stellen unterschiedliche optische Schichtdicken ein (Tabelle 1). Im Vergleich zu einer Standard 1 cm Küvette wird dadurch eine virtuelle Verdünnung von bis zu 1:100 erreicht, ohne dass eine manuelle Verdünnung notwendig ist. Verdünnungsfehler werden somit ausgeschlossen und die Proben können nach der Messung wieder verwendet werden.

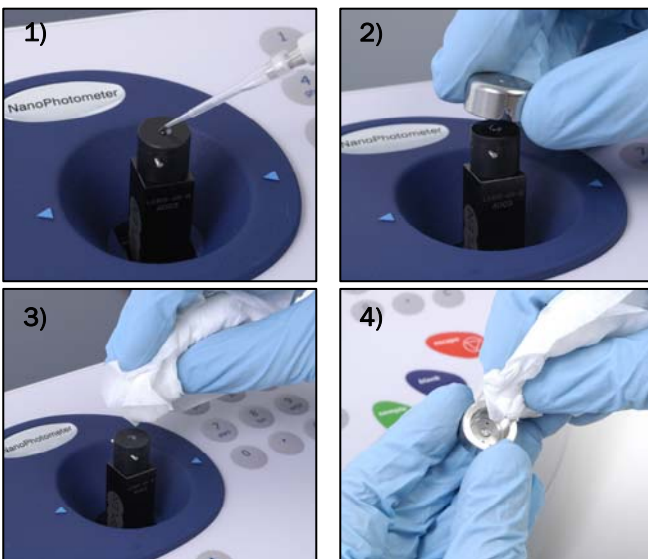


Abbildung 3: Küvettenlose Messung

1) Pipettieren der Probe auf das Messfenster. 2) Aufsetzen des Lids auf die Zelle. 3) Reinigung des Messfensters mit einem fusselfreien Tuch oder Kimwipe. 4) Reinigung des Spiegels im Lid mit einem fusselfreien Tuch oder Kimwipe.

Experimentelle Spezifikationen

Hohe Reproduzierbarkeit und Linearität über einen weiten Konzentrationsbereich sind wesentliche Qualitätskriterien eines Spektrophotometers. In dieser Application note wird die Performance des NanoPhotometers™ bezüglich dieser beiden Parameter sowohl für die Nukleinsäure- und Proteinanalytik, als auch für die Bestimmung der optischen Dichte von Bakterien-suspensionen dargestellt.

Der Linearitätsnachweis des Photometers erfolgte mit unterschiedlichem Probenmaterial, um den mannigfaltigen Einsatzbereich des Photometers hervorzuheben. So wurde neben einer ATP-Lösung auch Plasmid DNA, genomische DNA, eine *Escherichia coli* Kultur und Immunglobulin G (IgG) als Proteinprobe vermesen. Von jeder Probe wurden Verdünnungsstufen hergestellt und die optische Dichte der Verdünnungen in unabhängigen Einzelmessungen mehrfach bestimmt. Nach jeder Messung wurde das Messfenster mit einem trockenen Kimwipe gereinigt (Abbildung 3) bzw. die Küvette gewechselt und ein neues Aliquot der Probe pipettiert. Die Vermessung der Nukleinsäuren und der Proteine erfolgte mit eingeschalteter „Background Correction-Funktion“.

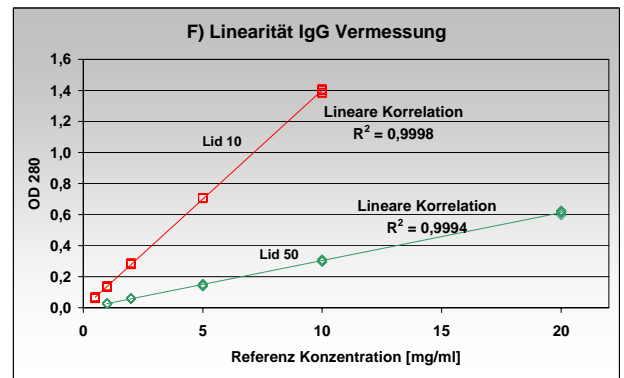
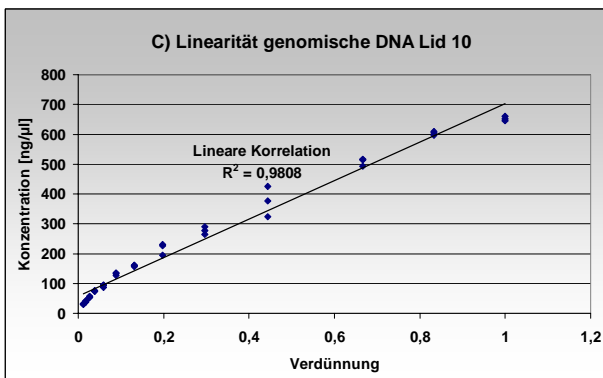
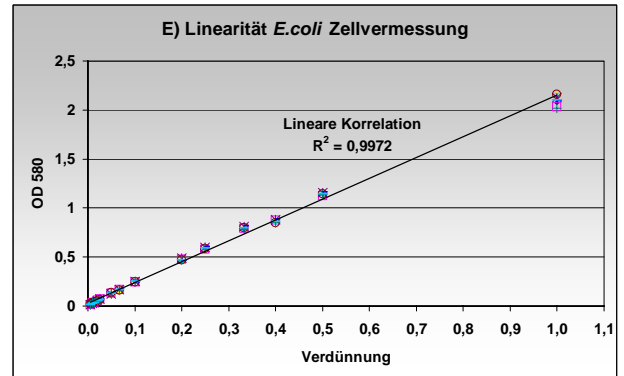
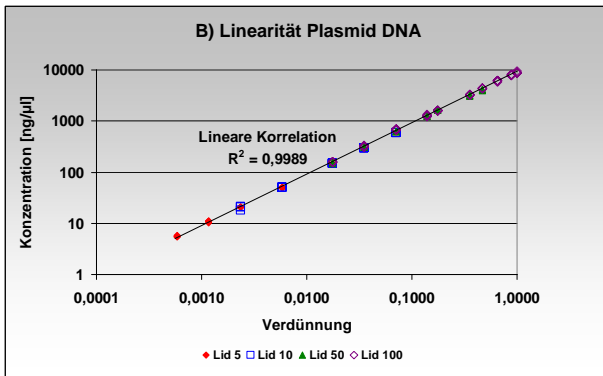
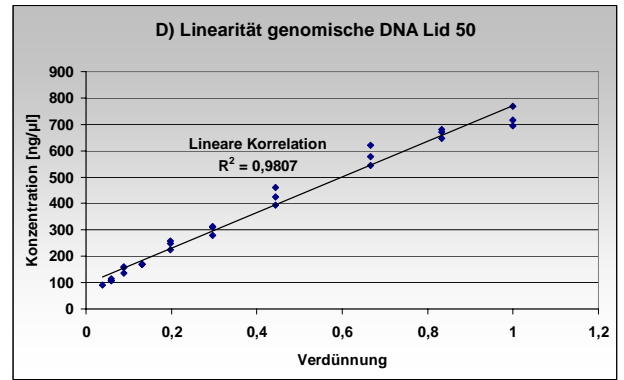
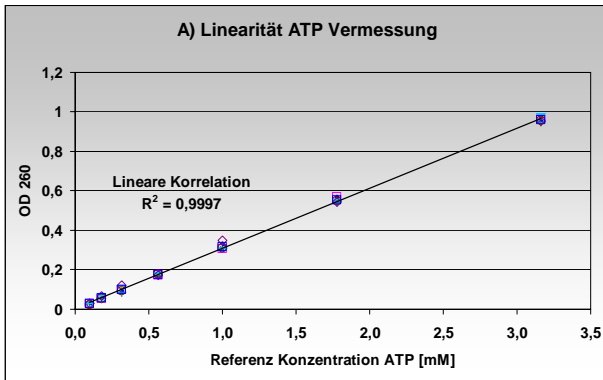


Abbildung 4: Bestimmung der Linearität

Zur Bestimmung des linearen Bereichs des NanoPhotometers™ wurden eine ATP-Lösung, Plasmid DNA, genomische DNA, eine *E. coli* Kultur und als Proteinprobe Immunglobulin G (IgG) in verschiedenen Verdünnungsstufen vermessen. **A)** ATP wurde in 7 Verdünnungen küvettenlos (Lid 50) bei 260 nm vermessen. Pro Verdünnungsstufe wurden 10 Wiederholungen durchgeführt. **B)** Von der Plasmid DNA wurden 14 Verdünnungen in Triplikaten bei 260 nm vermessen. Die Messungen erfolgte küvettenlos. Die jeweilige Lid Version wurde gemäß des dynamischen Bereiches gewählt. **C) und D)** Die genomische DNA wurde in 13 Verdünnungen küvettenlos (Lid 10 bzw. 50) bei 260 nm vermessen. Jede Verdünnung wurde 3-fach bestimmt. **E)** Von der *E. coli* Kultur wurden 14 Verdünnungen je achtfach bei 580 nm mit 1 ml Semi-micro Plastikkuvetten vermessen. **F)** Die IgG-Lösung wurde in fünf Verdünnungsstufen küvettenlos (Lid 10 und Lid 50) bei 280 nm vermessen. Pro Verdünnung wurden 5 unabhängige Messungen durchgeführt.

Für die Vermessung der ATP-Lösung wurden aus einer Ausgangslösung (100 mM) 7 Verdünnungen hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 10 unabhängige Messungen mit Lid 50 bei 260 nm durchgeführt. Das Probenvolumen betrug hier 2 µl. Der ermittelte Determinationskoeffizient (R^2) von 0,9997 spricht für die sehr guten Linearitätseigenschaften des Photometers (Abbildung 4A). Berechnet man nach dem Lambert-Beerschen Gesetz aus Absorption, Konzentration und Schichtdicke den molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = E/c \cdot d$), ergibt sich ein Koeffizient von $15,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Dieser stimmt hervorragend mit

dem aus der Literatur bekannten Extinktionskoeffizienten von ATP überein ($15,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Bock et al., 1956).

Die Plasmid DNA (5100 bp) wurde in 14 Verdünnungsstufen über einen Konzentrationsbereich von 5 ng/µl bis 8500 ng/µl bei 260 nm vermessen. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 3 unabhängige Messungen mit dem entsprechenden Lid der LabelGuard™ Mikroliter Messzelle gemäß den Spezifikationen (Tabelle 1) durchgeführt. Bei einer Überlappung des dynamischen Bereiches wurde die entsprechende Verdünnungsstufe mit mehreren Lids vermessen. Mit

allen vier verfügbaren Lids konnten hervorragende Determinationskoeffizienten (R^2) von nahezu 1 ermittelt werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Determinationskoeffizienten für die Plasmid DNA

Lid 5	Lid 10	Lid 50	Lid 100
$R^2 = 1$	$R^2 = 0,999$	$R^2 = 0,998$	$R^2 = 0,998$

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die gemessenen Konzentrationen von der jeweiligen Lidversion unabhängig sind, und dass auch über diesen extremen Konzentrationsbereich ein linearer Zusammenhang besteht (Abbildung 4B).

Von der genomischen DNA wurden 13 Verdünnungsstufen bei 260 nm mit Lid 10 und Lid 50 in Triplikaten vermessen. Der Konzentrationsbereich reichte von 30 ng/ μ l bis 700 ng/ μ l. Das Probevolumen betrug für beide Lids je 3 μ l. Genomische DNA ist auf Grund der hohen Viskosität und der Tendenz an Materialien zu haften schwieriger zu vermessen. Trotz dieser Schwierigkeiten, konnte mit einem Determinationskoeffizienten von $R^2=0,9807$ auch für die genomische DNA ein sehr guter linearer Zusammenhang dargestellt werden (Abbildung 4C und 4D).

Für die Bestimmung der Linearität mit einer Bakterienkultur wurden von einer *E. coli* Übernachtskultur 14 Verdünnungen hergestellt. Jede Verdünnung wurde achtfach bei 580 nm mit Semi-micro Plastikkuvetten vermessen (Probevolumen 1 ml). Der Determinationskoeffizient (R^2) betrug hier 0,9972 und bestätigt die hohe Linearität des Photometers (Abbildung 4E). Analoge Experimente, durchgeführt mit dem Bakterienstamm *Rhodobacter capsulatus* unterstreichen diese Ergebnisse (Daten sind auf Nachfrage erhältlich).

Die Bestimmung der Linearität mittels einer Proteinprobe erfolgte durch die Vermessung einer IgG-Verdünnungsreihe. Aus einer Stammlösung wurden 5 Verdünnungsstufen hergestellt, die küvettenlos bei 280 nm (nach Christian-Warburg) je fünffach mit Lid 10 und Lid 50 vermessen wurden. Das Probevolumen betrug 3,5 μ l. Die hervorragenden Determinationskoeffizienten (R^2) von 0,9998 und 0,9994 sprechen für sich (Abbildung 4F). Zusätzliche Experimente zeigten, dass auch hohe Proteinkonzentrationen mit dem NanoPhotometer™ problemlos vermessen werden können, da die Funktionalität des Messfensters von der Oberflächenspannung unabhängig ist. (Daten sind auf Nachfrage erhältlich).

Durch Wiederholungsmessungen von Plasmid DNA, genomischer DNA, der *E. coli* Suspension und der IgG-Lösung konnte die exzellente Reproduzierbarkeit des NanoPhotometers™ gezeigt werden. Für die Plasmid DNA waren die ermittelten Variationskoeffizienten (c.v.) extrem niedrig und lagen zwischen 0,5 % und 2,8 % (Tabelle 3). Bei der genomischen DNA lagen die Variationskoeffizienten (c.v.) für beide Lids mit 3,6 % und 4,0 % geringfügig höher (Tabelle 4). Berücksichtigt man, dass genomische DNA auf Grund der hohen Viskosität in einem Probenvolumen von wenigen Mikrolitern schwieriger zu vermessen ist, liegen auch

diese Variationskoeffizienten in einem sehr guten Bereich.

Die 14 Verdünnungsstufen der *E. coli* Kultur wurden je achtfach vermessen. Die Standardabweichungen der acht unabhängigen Messungen vom Mittelwert sind minimal und sprechen ebenfalls für die gute Reproduzierbarkeit des Photometers (Abbildung 5A, Fehlerbalken).

Bei der Vermessung der IgG's kann neben der Reproduzierbarkeit auch die Abweichung von der eingewogenen Sollkonzentration aufgezeigt werden (Abbildung 5B). Für die beiden eingesetzten Lids (10 und 50) sind diese Abweichungen, wie auch die Standardabweichungen der Einzelmessungen vom Mittelwert der Wiederholungsmessungen minimal (Fehlerbalken).

Tabelle 3: Reproduzierbarkeit Plasmid DNA

No.	niedrige	mittlere	hohe
Konzentration [ng/ μ l]			
1	50	294	1620
2	52	294	1723
3	50	295	1635
4	49	294	1592
5	50	291	1630
6	51	295	1598
7	51	292	1580
8	52	294	1575
9	52	292	1562
10	51	291	1598
MW	51	293	1611
Stabw	1,0	1,5	45,8
c.v. %	1,9	0,5	2,8

Tabelle 4: Reproduzierbarkeit genomische DNA

No.	lid 10	lid 50
Konzentration [ng/ μ l]		
1	593	682
2	583	642
3	574	638
4	578	648
5	606	668
6	619	638
7	622	708
8	629	690
MW	601	664
Stabw	21,4	26,8
c.v. %	3,6	4,0

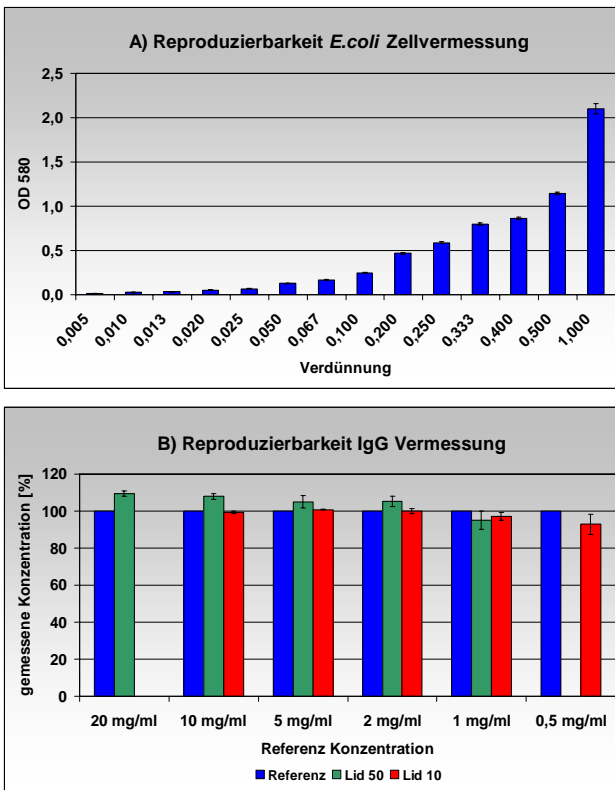


Abbildung 5: Bestimmung der Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit des NanoPhotometers™ wurde zusätzlich durch die Vermessung einer *E. coli* Kultur und einer IgG-Verdünnungsreihe bestimmt. **A)** Von der *E. coli* Kultur wurden 14 verschiedene Verdünnungen je achtfach bei 580 nm mit 1 ml Semi-micro Plastikküvetten vermessen. Die Vermessung erfolgte über den gesamten Absorptionsbereich mit optischen Dichten zwischen 0,015 und 2,1. Dargestellt sind die Mittelwerte der acht Wiederholungsmessungen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der acht unabhängigen Messungen. **B)** Von der IgG-Lösung wurden sechs Verdünnungsstufen küvettenlos (Lid 10 und Lid 50) bei 280 nm vermessen. Pro Verdünnung wurden 5 unabhängige Messungen durchgeführt. Die Referenzwerte (blau) entsprechen 100 %. Die gemessenen Werte für Lid 50 (grün) und für Lid 10 (rot) sind prozentual zum Referenzwert angegeben. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der fünf unabhängigen Messungen.

Neben der Konzentrations- und Qualitätsanalyse von Nukleinsäuren und Proteinen können mit dem NanoPhotometer™ auch markierte Proben vermessen, und die Qualität sowie die Quantität des Farbstoffeinbaus analysiert werden. Zusätzlich zu den Cyanine-Farbstoffen (Cy3, Cy3,5, Cy5 und Cy5,5) können z.B. verschiedene AlexaFluorophore, Oyster-Dyes und Texas Red vermessen werden.

Die Performance des Photometers bezüglich der Bestimmung des Einbaus von Cy3 und Cy5 wurde mit genomischer DNA analysiert. Hierzu wurden je 10 Aliquots mit dem Agilent Labeling Protokoll für Array CGH markiert und bei den entsprechenden Wellenlängen vermessen (Abbildung 6). Die Vermessung mit dem NanoPhotometer™ gibt Aufschluss über Menge und Qualität der DNA Probe, wie auch über die Effizienz des Farbstoffeinbaus (Tabelle 5).

Bei dieser Versuchsreihe wurde auch die Schnelligkeit des NanoPhotometers™ aufgezeichnet und es konnte gezeigt werden, dass das Ergebnis einer Einzelmessung (Pipettieren, Vermessen, Reinigen) in ca. 20 Sekunden vorliegt. Die reine Messzeit beträgt weniger als 4 Sekunden.

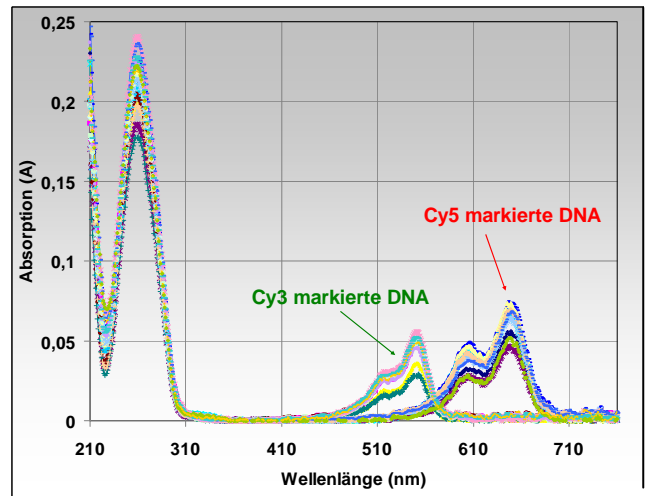


Abbildung 6: Spektrum markierter dsDNA

Mit Cyanine 3 (grün) oder Cyanine 5 (rot) markierte genomische DNA wurde über einen Wellenlängenbereich von 210 nm bis 760 nm mit dem NanoPhotometer™ vermessen.

Tabelle 5: Einbau von Cy3- und Cy5-Farbstoffen in genomische DNA

No.	dsDNA [ng/ul]	dsDNA [µg]	Cy3 [pmol/ul]	Cy5 [pmol/ul]	Cy dye Einbau-rate [pmol/ug]
1	107	5350	-	2,2	20,9
2	105	5250	-	2,6	24,8
3	92	4600	-	1,8	19,6
4	113	5650	-	2,9	25,7
5	105	5250	-	2,7	25,7
6	110	5500	-	2,9	26,4
7	107	5350	-	2,5	23,4
8	98	4900	-	2,7	27,6
9	118	5900	-	2,7	22,9
10	111	5550	-	2,0	18,0
11	110	5500	3,2	-	29,1
12	99	4950	2,4	-	24,2
13	102	5100	3,2	-	31,4
14	88	4400	1,9	-	21,6
15	108	5400	3,3	-	30,6
16	108	5400	3,2	-	29,6
17	120	6000	3,7	-	30,8
18	112	5600	3,0	-	26,8
19	114	5700	3,4	-	29,8
20	110	5500	3,2	-	29,1

Zusammenfassung

Das NanoPhotometer™ von Implen liefert für Applikationen mit einem Probenvolumen im submikroliter Bereich (ab 0,7 µl), als auch für Proben im Standard-Volumen Bereich (bis 3500 µl) mit einer hohen Präzision absolut verlässliche Messergebnisse.

Einfachste Bedienung und hoher Probendurchsatz durch extrem kurze Messzeiten sind die herausragenden Eigenschaften des Systems. Daneben stellen der extrem weite dynamische Bereich und die hohe Reproduzierbarkeit des NanoPhotometers™ weitere besondere Vorteile dar. Mit seinem wartungsfreien Setup trägt das NanoPhotometer™ dazu bei, Kosten zu minimieren und Ausfallzeiten zu verhindern.

Für Labore, deren Forschungsschwerpunkt im Bereich Genomik und/oder Proteomik liegt, ist das NanoPhotometer™ sowohl für die Nukleinsäure- und Proteinanalytik, als auch für die Analyse von Bakterienkulturen ein unverzichtbares Basisinstrument.

Literatur

Bock et al., (1956), Arch. Biochem. Biophys. 62: 253–264

Danksagung

Die Daten der ATP-Verdünnungsreihe wurden freundlicherweise von Herrn Ulrich F. Müller PhD, Department of Chemistry and Biochemistry, University of California San Diego zur Verfügung gestellt.

Die IgG-Daten wurden freundlicherweise von Dr. Alfons Nichtl, Penzberg zur Verfügung gestellt.

Kontakt

Dr. Andrea Kreuz

Dr. Andrea Huber

info@implen.de

Implen GmbH
Am Schatzbogen 52
81829 München
Deutschland

Telefon: 0049-(0)-89-7263718-0

Fax: 0049-(0)-89-7263718-54