

DNA 浓度和纯度的测定

可以有两种方法：分光光度法 溴化乙锭法分光光度法

一、目的

熟练掌握分光光度法检测 DNA 纯度和浓度的方法。

二、原理

DNA 或 RNA 链上碱基的苯环结构在紫光区具有较强吸收,其吸收峰在 260nm 处。波长为 260nm 时, DNA 或 RNA 的光密度 OD₂₆₀ 不仅与总含量有关, 也随构型而有差异。对标准样品来说, 浓度为 1 μ g/ml 时, DNA 钠盐的 OD₂₆₀=0.02 当 OD₂₆₀=1 时, dsDNA 浓度约为 50 μ g/ml ssDNA 浓度约为 37 μ g/ml RNA 浓度约为 40 μ g/ml 寡核苷酸浓度约为 30 μ g/ml(由于底物不同有差异)当 DNA 样品中含有蛋白质、酚或其他小分子污染物时, 会影响 DNA 吸光度的准确测定。一般情况下同时检测同一样品的 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 和 OD₂₃₀, 计算其比值来衡量样品的纯度。

经验值:

纯 DNA: OD₂₆₀/OD₂₈₀≈1.8 (> 1.9, 表明有 RNA 污染; < 1.6, 表明有蛋白质、酚等污染)

纯 RNA: 1.7 < OD₂₆₀/OD₂₈₀ < 2.0 (< 1.7 时表明有蛋白质或酚污染; > 2.0 时表明可能有异硫氰酸残存) 若样品不纯, 则比值发生变化, 此时无法用分光光度法对核酸进行定量, 可使用方案二的方法或其他方法进行估算。

DNA 纯度及浓度检测分光光度法

定量测定 DNA 或 RNA, 应选 260nm、230nm、280nm 和 310nm 波长读数。其中 260nm 读数用来估算样品中核酸浓度, 310nm 为背景吸收值。1 个 OD₂₆₀ 值相当于 40 μ g/ml RNA。样品浓度(μ g/mL)=[OD₂₆₀-OD₃₁₀] \times 稀释倍数
 $\times 40$ OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值用于估计核酸的纯度, OD₂₆₀/OD₂₃₀ 估计去盐的程度。对于 RNA 纯制品, 其 OD₂₆₀/OD₂₈₀≈2.0, OD₂₆₀/OD₂₃₀ 应大于 2。

OD260/OD280<2.0 可能是蛋白污染所致，可以增加酚抽提；OD260/OD230<2 说明去盐不充分，可能是 GIT 污染所致，可以再次沉淀和 70%乙醇洗涤。