

# 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 OD<sub>260</sub> 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 $\mu$ g/ml 时, DNA 钠盐的 OD<sub>260</sub>=0.02 当 OD<sub>260</sub>=1 时, dsDNA 浓度约为 50 $\mu$ g/ml ssDNA 浓度约为 37 $\mu$ g/ml RNA 浓度约为 40 $\mu$ g/ml 寡核苷酸浓度约为 30 $\mu$ 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 OD<sub>260</sub>、OD<sub>280</sub> 和 OD<sub>230</sub>, 计算其比值来衡量样品的纯度。

### 经验值:

纯 DNA: OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>≈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 < OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> < 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 OD<sub>260</sub> 值相当于 40 $\mu$ g/ml RNA。样品浓度( $\mu$ g/mL)=[OD<sub>260</sub>-OD<sub>310</sub>] $\times$ 稀释倍数  
 $\times 40$  OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值用于估计核酸的纯度, OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> 估计去盐的程度。对于 RNA 纯制品, 其 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>≈2.0, OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> 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。