

Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky (cvičení č.1)

Úvodní slovo

Rychlou a jednoduchou metodu stanovení koncentrace nukleových kyselin představuje proměření spektra v rozsahu 230 až 320 nm. Báze v nukleových kyselinách mají absorpční maximum při 260 nm. Obecně platí, že pokud je hodnota absorbance A_{260} v 1 cm kyvetě rovná 1,0, je koncentrace dvouřetězcové DNA v kyvetě 50 $\mu\text{g/ml}$. Pro jednořetězcovou DNA platí hodnota 33 $\mu\text{g/ml}$ a pro RNA 40 $\mu\text{g/mL}$. Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem 260 nm (A_{260}), zatímco bílkoviny při 280 nm (A_{280}). Čistota DNA je nejčastěji odhadována na základě poměru absorbcí při výše uvedených vlnových délkách. Pro čistou DNA platí poměr:

$$A_{260}/A_{280} = 1,80$$

Tento parametr je nejdůležitější a v běžné praxi nejčastěji používaný. Pokud je hodnota jiná než 1,80, pak je vzorek DNA kontaminován proteiny nebo RNA. Kromě absorpce biopolymery záření také rozptylují, proto je důležité změřit také hodnotu absorbance mimo absorpční oblast tj. např. při 330 nm (A_{330}). Hodnoty A_{260} a A_{280} často korigujeme právě odečtením hodnoty A_{330} . Dále se ještě stanovuje hodnota absorbance při 230 nm (A_{230}), která udává míru kontaminace izolační soupravou. Proto se stanovuje poměr A_{260}/A_{230} , u kterého ideální hodnota se nachází v rozmezí 2-3.

K měření absorbance se používá spektrofotometrů, které měří intenzitu, jak moc světla je absorbováno. Síla absorpce je dána množstvím látky, její chemickou strukturou a byla určena empiricky pro mnoho sloučenin (absorpční či extinkční koeficient). Vztah mezi koncentrací dané látky, optickou drahou a absorpčním koeficientem je dán Lambert-Beerovým zákonem.

Cíl cvičení

Stanovit koncentraci a posoudit čistotu genomové DNA z rostlin izolované ve cvičení č. 2 a plasmidové DNA izolované ve cvičení č.3.

Seznam přístrojů

- UV-VIS spektrofotometr BioSpec - nano
- sada nastavitelných pipet o objemech 0,5-10 μl , 20-200 μl a 100 -1000 μl

Vlastní pracovní postup

- 1) Zapněte spektrofotometr (BioSpec - nano).
- 2) Na přístroji nejdříve změříme samotný blank – vodu. Na plošku opatrně napipetujeme 4 μl vody, aby kapka zakryla celý otvor, a spustíme měření.
- 3) Následně se napipetují 4 μl vzorku izolované DNA v AE pufriu.
- 4) Změřené hodnoty absorbance při 230, 260, 280 a 330 nm si opište do tabulky.

vzorek	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{330}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	

1	Rostlinná DNA							
2	Plasmidová DNA							

5) Je-li naměřená hodnota A_{260} mimo hodnoty 0,1 až 0,3, opakujte ředění vzorku DNA. Jen v rozsahu hodnot 0,1 až 0,3 je závislost koncentrace na absorbanci lineární a naměřené hodnoty jsou přesné.

6) Vyhodnoťte dosažené výsledky.

Další informace k této problematice najdete v

Manchester K.L. 1995: Calue of $A_{260}/280$ ratios for measurements of purity of nucleic acids.

BioTechniques 19, 208-219.

Sambrook J. a Russell D. 2001: Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press