

## 1 目的

以前の実験で調整したプラスミド DNA について、溶液の pH や温度を変化させた際の紫外吸収スペクトルを測定することにより、DNA の物理化学的な性質を理解する。

## 2 原理

## 3 実験操作

### 3.1 使用器具、機器

- ・ サンプルチューブ(1.5mL)
- ・ 分光光度計
- ・ アルミブロック
- ・ グラフ用紙
- ・ ピペットマン(20  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1000  $\mu$ L)
- ・ ピペットマン用イエローチップ(20  $\mu$ L、200  $\mu$ L)、ブルーチップ(1000  $\mu$ L)
- ・ 卓上遠心分離機
- ・ 石英キュベット
- ・ pH 試験紙
- ・ ピペットマンチップ回収用ビーカー

### 3.2 試薬

- ・ NaCl-クエン酸ナトリウム水溶液  
150mM NaCl  
15mM クエン酸ナトリウム(pH7.0)
- ・ 塩酸溶液  
1M 塩酸
- ・ 水酸化ナトリウム  
1M 水酸化ナトリウム

### 3.3 DNA 紫外吸収スペクトルの pH 変化測定の実験操作

- ①DNA 溶液を  $5\mu\text{L}$  ずつサンプルチューブ 3 本に移し、NaCl-クエン酸ナトリウム溶液を  $995\mu\text{L}$  で希釈した。
- ②DNA 溶液が残り  $10\mu\text{L}$  もなかったため、DNA 溶液が入っているサンプルチューブに NaCl-クエン酸ナトリウム溶液を  $990\mu\text{L}$  加え、希釈した。
- ③3 本のサンプルチューブそれぞれに塩酸溶液、NaCl-クエン酸ナトリウム溶液、水酸化ナトリウム溶液を  $100\mu\text{L}$  ずつ入れた。
- ④各サンプルチューブから  $20\mu\text{L}$  ずつとり、pH を pH 試験紙を用いて確認した。
- ⑤各サンプルを石英キュベットに  $1\text{mL}$  入れ、紫外吸収スペクトルを  $320\text{nm}\sim 240\text{nm}$  の範囲で測定した。

### 3.4 DNA 紫外吸収スペクトルの温度依存測定の実験操作

- ⑥②で作成した DNA サンプルを石英キュベットに移して密閉し、まず室温での  $A_{260}$  を測定した。
- ⑦キュベットを  $50^\circ\text{C}$  のアルミブロックに 3 分以上置いた後、 $A_{260}$  と  $A_{320}$  を測定した。
- ⑧キュベットをアルミブロックに戻して  $60^\circ\text{C}$  になるまで加熱し、 $60^\circ\text{C}$  で 3 分置いた後、 $A_{260}$  と  $A_{320}$  を測定した。
- ⑨同様に  $70$ 、 $80$ 、 $90$ 、 $100$ 、 $110^\circ\text{C}$  でも測定を行った。
- ⑩キュベットを室温になるまで放置した後、 $A_{260}$  と  $A_{320}$  を測定した。
- ⑪熱処理前の DNA 溶液の  $(A_{260} - A_{320})$  を 1 とし、熱処理後 DNA 溶液の  $(A_{260} - A_{320})$  の変化を温度に対してプロットし、熱変性の温度  $T_m$  を求めた。

## 4 実験結果

### 4.1 DNA 紫外吸収スペクトルの pH 変化