



生物化学实验

生物大分子定量测定技术

3.4 核酸定量测定：紫外吸收法

北京大学 王青松 胡晓倩

概述

- 紫外吸收法测定核酸含量操作简便、快速、灵敏、用量少、不消耗样品，常应用于核酸的分离纯化过程中的检测。
- 该方法对核酸纯品测定准确度高，若核酸样品中混有较大量的蛋白质或核苷酸等具有紫外吸收特性的物质时对测定干扰较大，应设法除去干扰物质的影响。

实验原理

- DNA和RNA中嘌呤环和嘧啶环的共轭双键($\text{—C}=\text{C—C}=\text{C—}$)具有吸收紫外线的性质, 因此核酸也表现出强烈的紫外吸收特性, 最大吸收峰在波长260 nm处。
- 蛋白质分子中的芳香族氨基酸也具有紫外吸收的特性, 通常最大吸收峰在波长280 nm处, 在260nm处的吸光值仅是核酸的1/10或更低, 所以核酸样品中蛋白质含量较低时对紫外法测定核酸含量影响不大。
- 当样品中含有蛋白质的杂质时, A_{260}/A_{280} 比值小于1.8, 利用 $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ 的比值可鉴别核酸的纯度, 但此方法无法判定RNA和DNA相互污染的情况。

DNA: A_{260}/A_{280} 比值 ≥ 1.8

RNA: A_{260}/A_{280} 比值 ≥ 2.0

实验试剂器材

猪脾DNA钠盐制品

2.5 g/L钼酸铵-2.5%高氯酸溶液 (沉淀剂)

0.01 mol/L NaOH溶液

0.1 mol/L NaOH溶液

DNA样品溶液
(1 mg /mL)

双光束紫外-可见分光光度计及石英比色皿

10 mL及25 mL
容量瓶

可调式移液器

台式离心机

漩涡混合器

试剂和器材

实验内容

1. DNA紫外吸收峰扫描图谱的绘制



2. 核酸含量和纯度测定



3. 消除DNA样品溶液中核苷酸对吸光值的干扰

实验步骤

- **1. DNA紫外吸收峰扫描图谱的绘制**

准确吸取0.5 mL DNA样品溶液置于25 mL容量瓶内，用去离子水定容至25 mL，此时DNA浓度为20 $\mu\text{g/mL}$ 。取3 mL稀释的DNA溶液用双光束紫外-可见分光光度计在波长200 nm~300 nm范围内进行扫描。

- **2. 核酸含量和纯度测定**

配制核酸样品（浓度5~50 $\mu\text{g/mL}$ ）。用去离子水作为空白，将上述稀释的DNA溶液在紫外-可见分光光度计上260 nm和280 nm波长处分别测定吸光值。

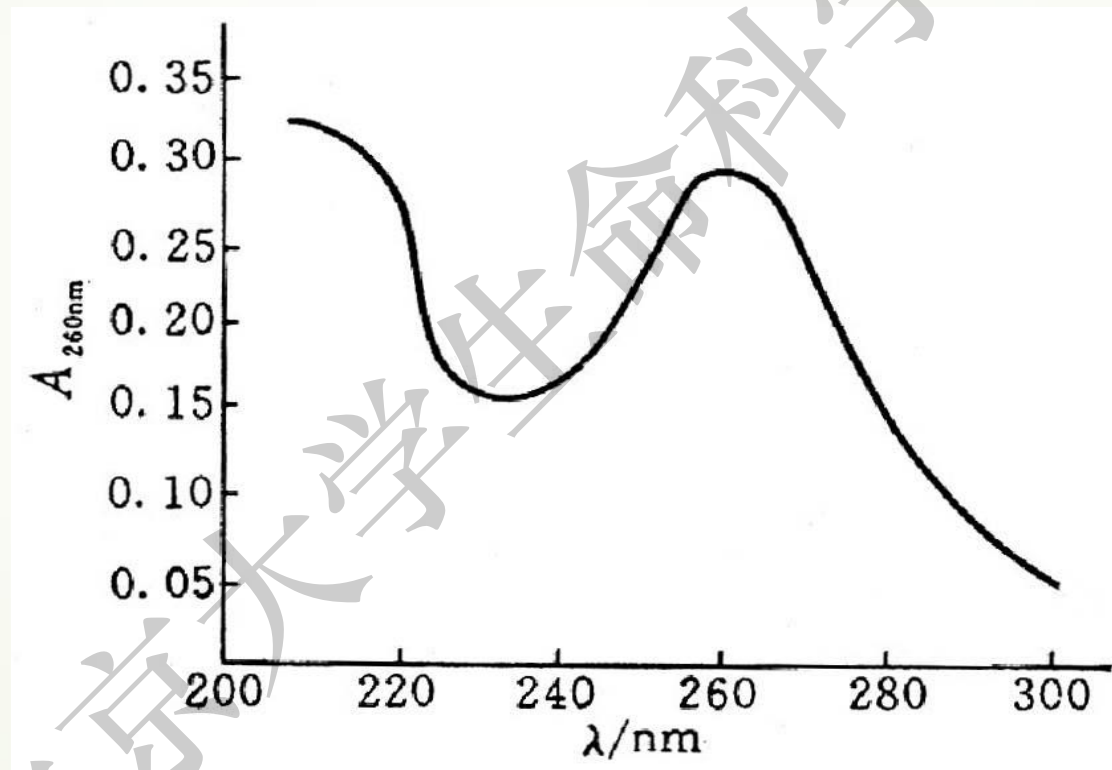
实验步骤

- 3. 消除DNA样品溶液中核苷酸对吸光值的干扰

如果待测样品中含有核苷酸和寡核苷酸，测定前可用钼酸铵-高氯酸沉淀剂除去大分子核酸，以此溶液作为对照测定样品溶液的吸光值。取2个1.5 mL塑料小离心管，按照下表加样。

编号	对照管	样品管
试剂处理		
DNA样品溶液/mL	0.5	0.5
沉淀剂/mL	0.5	-
H ₂ O/mL	-	0.5
混匀，放置冰浴中30 min，离心（3 000 r/min，10 min），从两管中分别吸取0.5 mL上清液到2个10 mL容量瓶内，用去离子水（pH7.0）定容。用去离子水为空白，在波长260 nm处测定吸光值。		
A _{260 nm}		

1. DNA紫外吸收峰扫描图谱



2. 核酸含量和纯度测定

- 根据以下公式计算核酸的质量浓度和 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 的比值，并判断DNA样品的纯度。

$$\text{RNA质量浓度}(\mu\text{g} / \text{mL}) = \frac{A_{260\text{ nm}}}{0.024 \times L} \times N$$
$$\text{DNA质量浓度}(\mu\text{g} / \text{mL}) = \frac{A_{260\text{ nm}}}{0.020 \times L} \times N$$

式中 $A_{260\text{ nm}}$ 为波长260 nm处的吸光值；
 L 为比色皿的厚度（一般为1 cm）；
 N 为样品溶液稀释倍数；
0.024为1 mL溶液含**1 μg RNA**的吸光值；
0.020为1 mL溶液含**1 μg DNA**的吸光值。

3. 消除DNA样品中核苷酸对吸光值的干扰

- 对照管是将大分子核酸沉淀后测定留在溶液中核苷酸等小分子的吸光值，用样品管的吸光值减去对照管的吸光值，即得到DNA大分子在260 nm的吸光值，按照上面的公式计算DNA的质量浓度。

4. 计算DNA样品的质量分数

- 根据以下公式计算DNA样品的质量分数

$$\text{样品DNA质量分数 (\%)} = \frac{\text{测定的样品DNA质量浓度}}{\text{配制的样品DNA质量浓度}} \times 100\%$$

注意事项

- 样品DNA溶解时，先用少量 0.01 mol/L NaOH溶液浸润，逐步加入NaOH溶液使其充分溶解。**这一步至关重要**，DNA溶解不好会出现团状，影响测定结果。
- 溶液的pH值对核酸的紫外吸收有很大影响，要预先将样品溶液及作为空白的去离子水pH值调到7.0。