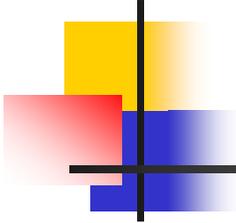


DNA的定量测定



实验目的

- 学习测定DNA含量的原理
- 掌握二苯胺法测定DNA含量的方法。



多种测定方法

- ▶ 紫外吸收法：核酸、核苷酸及其衍生物
的分子结构中的嘌呤、嘧啶碱基具有共
轭双键系统（ $-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-$ ），能够
强烈吸收250~280nm波长的紫外光。
- ▶ 定磷法
- ▶ 分别针对DNA和RNA某些特异的颜色反
应方法而建立的比色法

6.1.2 比色法和可见吸光光度法测定过程



标准曲线:

用标准溶液配制一系列浓度 c (标) 不同的有色化合物溶液, 并测定吸光度 A (标), 然后用 A (标) 对 c (标) 作图,

可得一条过原点的直线. $(A = \varepsilon b c)$

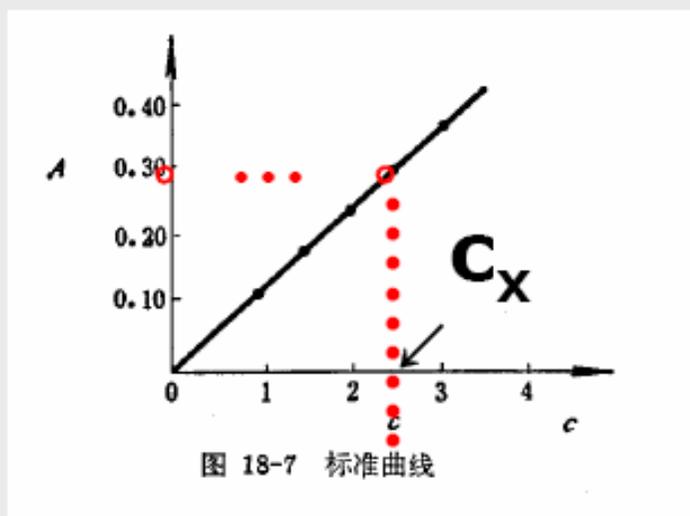
该直线称为标准曲线。

②根据上述测定值，以 **A** 为纵坐标，浓度 **c** 为横坐标，
绘制标准曲线。

③用同样方法配置
试样的有色溶液
并测定吸光度 **A_x**。



A_x



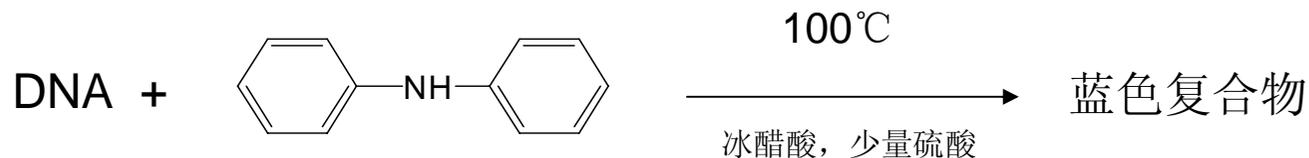
④在标准曲线上根据 **A_x** 查找对应的 **C_x**。

2、吸光度范围的选择

- 一般控制标准溶液和被测试液的吸光度在 **0.2 ~ 0.8** 范围内，才能保证测量的相对误差较小。
- **原因** 浓度测量的相对误差 E_r 与透射比 **T**（或吸光度）有关。

二苯胺法的原理

强酸、加热条件下，可以使DNA中的嘌呤碱基与脱氧核糖间的糖苷键断裂，而产生嘌呤碱基，脱氧核糖与嘧啶核苷酸。其中2'脱氧核糖在酸性环境中成为 ω -羟基- γ -酮基戊醛，此物与二苯胺反应生成蓝色化合物，在595nm处有最大吸收。DNA在40-400 μ g范围内光密度与DNA浓度成正比。





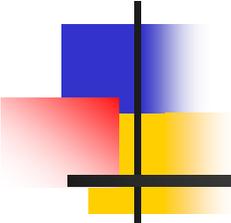
试剂和器材

■ 试剂

1mg/mL DNA标准溶液、二苯胺试剂

■ 器材

可见分光光度计、恒温水浴锅、分析天平



实验过程



标准曲线的制作

取6支试管，依次加入0、0.2、0.4、0.8、和1.0ml DNA标准溶液。添加蒸馏水，使之都成为2ml。然后各加入4ml二苯胺试剂，混匀。于90摄氏度恒温水浴10min，冷却后于595nm处进行比色测定。以DNA浓度为横坐标，光吸收值为纵坐标，绘制标准曲线。

试管	1	2	3	4	5	6
标准DNA/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水/mL	2	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0
二苯胺试剂/mL	4	4	4	4	4	4

沸水中反应**10**分钟，冷却，在595nm波长处比色

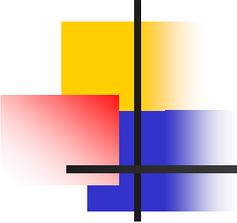
光密度值						
------	--	--	--	--	--	--



样品的测定

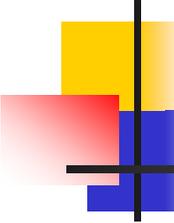
取待测样品2mL，加入二苯胺溶液4mL，摇匀，沸水中反应10分钟，冷却，然后在595nm波长出测定光密度值。根据测得的光密度值，从标准曲线上查得相应的DNA的 μg 数，按下式计算每100g兔肝组织中的DNA的含量。

$$\text{DNA含量} = \frac{\text{待测样品中测得的DNA的}\mu\text{g数}}{\text{待测样品液中样品的g数}} \times 100$$



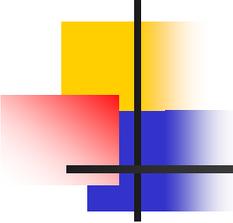
注意事项

- ✦ 糖及糖的衍生物、芳香醛、蛋白质等都对实验有干扰，测定前应尽可能除去。
- ✦ 取样准确
- ✦ 选定一台分光光度计后，所有测定工作都在同一台上完成，以避免不同仪器间的系统误差
- ✦ 二苯胺不溶于水，取用和盛放二苯胺溶液的器皿应干燥，和DNA溶液反应时迅速混合



六、思考题

- 1、DNA含量测定的方法有哪些？各有何优缺点？
- 2、简述二苯胺法测DNA的基本原理。



分光光度计

- ✦ 开启电源，指示灯亮，选择开关置于“T”，波长调至测试用波长。仪器预热20分钟。
- ✦ 预热后，打开试样室盖（光门自动关闭），调节“0”旋钮，使数字显示为“00.0”，盖上试样室盖，将盛有参比溶液的比色皿架置与校正位置，使光电管受光，调节透过率“100%”旋钮，使数字显示为“100.0”。连续几次调整“0”和“100%”，仪器即可进行测定工作。
- ✦ 将选择开关置于“A”，调节吸光度调零旋钮，使得数字显示为“.000”，然后将被测样品移入光路，显示值即为被测样品的吸光度值。

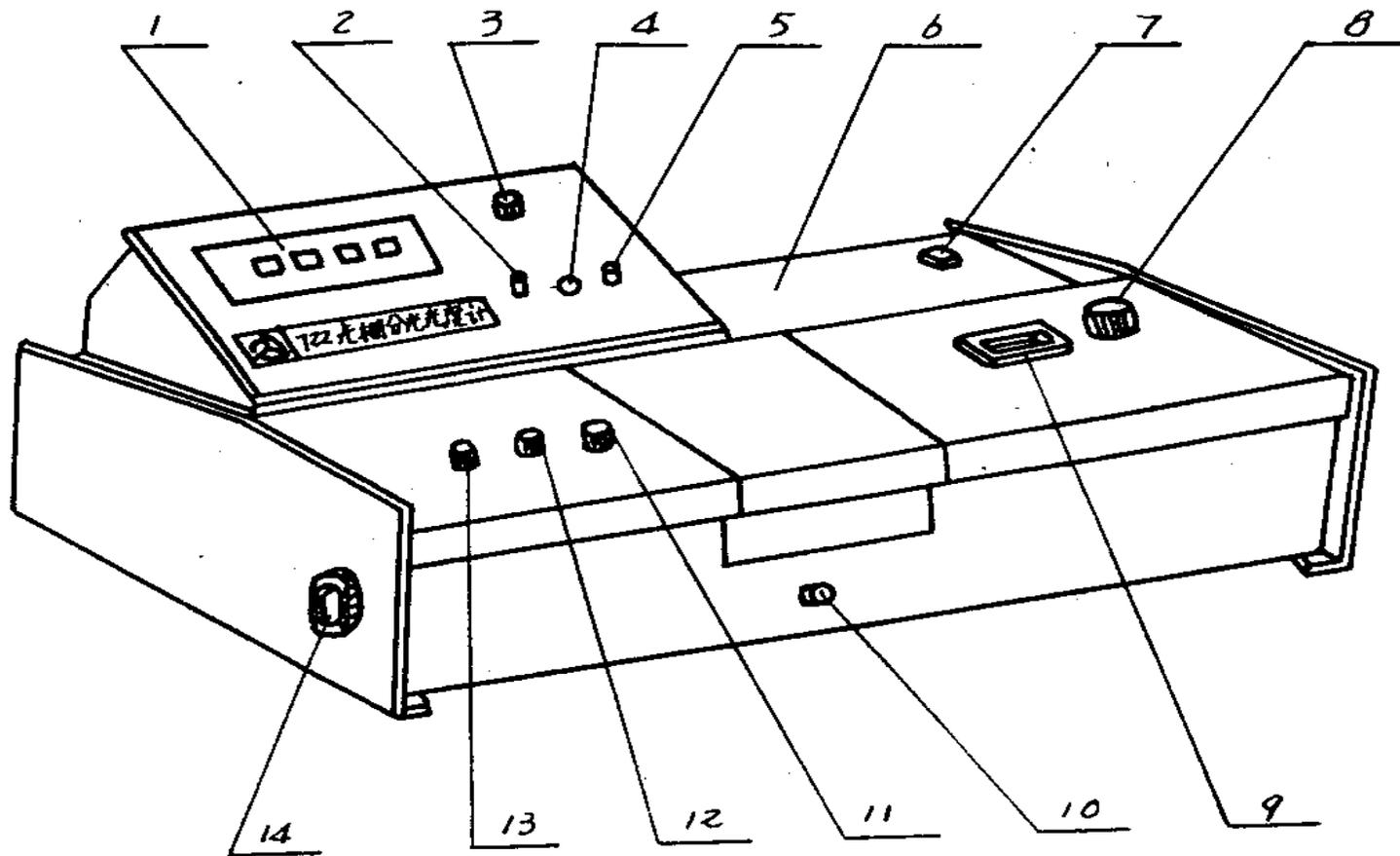


图5 仪器外形图

1. 数字显示器 2. 吸光度调零旋钮 3. 选择开关 4. 吸光度调斜率电位器 5. 浓度旋钮
 6. 光源室 7. 电源开关 8. 波长手轮 9. 波长刻度窗 10. 试样架拉手
 11. 100%T旋钮 12. 0%T旋钮 13. 灵敏度调节旋钮 14. 干燥器