

# Quantificazione del **DNA** allo **spettrofotometro**

**Obiettivo** Conoscere la concentrazione di DNA di un campione ignoto e valutarne il grado di purezza per un'eventuale successiva amplificazione tramite PCR o per una corsa elettroforetica su gel di agarosio.

**Autore** Irene Martina Maina, Fondazione DiaSorin



# Materiali e reagenti

- Campioni di DNA
- Buffer in cui è eluito il DNA
- Acqua deionizzata sterile
- Cuvette di quarzo da 10 mm
- Puntali



## Strumenti

- Spettrofotometro UV/Visibile
- Micropipette



## Sicurezza

- Camice
- Guanti



## Tempo

10 minuti per la preparazione e la lettura del campione



# Procedimento

- 1.** Impostare lo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 nm per la quantificazione del DNA.
- 2.** Preparare il campione bianco. In una cuvetta di quarzo, inserire 1 ml di acqua deionizzata sterile o di buffer di eluizione del DNA. Occorre usare lo stesso solvente in cui si trova il campione di DNA estratto: se il DNA è stato eluito in acqua, utilizzare l'acqua per il campione bianco; se il DNA è stato eluito con un tampone di un kit di estrazione, usare lo specifico tampone. Azzerare lo strumento.
- 3.** Diluire il campione di DNA da analizzare, ponendo in una cuvetta di quarzo 995  $\mu$ l di solvente in cui si trova il DNA estratto e 5  $\mu$ l di DNA (diluizione 1:200). È possibile effettuare la diluizione che si ritiene più opportuna.
- 4.** Mescolare il campione con un movimento *up and down* della micropipetta, dopo l'inserimento del DNA nel solvente per favorirne la miscelazione.
- 5.** Introdurre la cuvetta di quarzo nello spettrofotometro e misurare l'assorbanza del campione a 260 nm ( $A_{260}$ ).
- 6.** Prendere nota del valore di assorbanza per il successivo calcolo della concentrazione del DNA, come riportato nelle note.
- 7.** Impostare lo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 280 nm per valutare la presenza di proteine.
- 8.** Introdurre la cuvetta del campione bianco ed azzerare lo strumento.
- 9.** Introdurre la cuvetta del campione in analisi e leggere l'assorbanza a 280 nm ( $A_{280}$ ).
- 10.** Prendere nota del valore di assorbanza per calcolare la purezza, ovvero la presenza di proteine o RNA nel campione, come mostrato nelle note.

## Note

- Lo spettrofotometro è uno strumento in grado di compiere analisi quantitative e qualitative utilizzando una sorgente luminosa monocromatica che attraversa il campione in esame con una singola lunghezza d'onda selezionata. A seconda della concentrazione delle particelle nel campione, la luce sarà più o meno assorbita dalle particelle stesse ed emessa con una intensità luminosa più bassa. Sulla base dell'intensità di luce emessa dal campione, lo spettrofotometro ne misura l'assorbanza. La legge di Lambert-Beer correla poi l'assorbanza alla concentrazione del campione, fornendoci questo dato. In particolare, secondo la legge di Lambert-Beer l'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione del campione.
- Le cuvette devono essere pulite e non presentare depositi o aloni sia sulle superfici interne sia su quelle esterne. A questo proposito, maneggiare le cuvette solo dalle pareti ruvide e mai da quelle lisce, che saranno attraversate dal raggio di luce.
- Se non si dispone di tante cuvette di quarzo quanti sono i campioni da quantificare, tra un'analisi e l'altra lavare la cuvetta con acqua deionizzata sterile e lasciare asciugare capovolta su carta assorbente.
- Calcolo della concentrazione di DNA. Utilizzando cuvette di 1 cm di cammino ottico, si è misurato che il valore di assorbanza a 260 nm, pari a 1 unità di assorbimento (u.d.A), corrisponde a una concentrazione di DNA di 50 µg/ml. Applicando una semplice proporzione, è possibile risalire alla concentrazione del DNA in analisi:

$$1 \text{ u.d. } A_{260} = 50 \text{ µg/ml} \rightarrow 1 \text{ u.d. } A_{260} : 50 \text{ µg/ml} = A_{260} \text{ misurata} : \text{concentrazione DNA ignota}$$

$$\text{Concentrazione DNA ignota (µg/ml)} = A_{260} \times 50 \text{ µg/ml} \times \text{fattore di diluizione}$$

- Calcolo della purezza del campione:

$$\text{Purezza del campione} = A_{260} / A_{280}$$

Una soluzione di DNA si considera pura quando il rapporto tra le assorbanze a 260 nm e 280 nm è compreso tra 1.8 e 2.0. Se il rapporto è < 1.8 significa che è presente una contaminazione da parte delle proteine; se il rapporto è > 2.0 è presente una contaminazione di RNA.