

实验十五 DNA的定量测定



一、实验目的



学习和掌握二苯胺法测定DNA含量的方法。

二、原理

核酸含量的测定方法包括紫外吸收法、定磷法和分别针对DNA和RNA的颜色反应方法。本实验采用针对DNA的二苯胺法测DNA的含量。在酸性溶液中，DNA与二苯胺共热生成蓝色化合物，该物质在595nm有最大吸收，在40~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内其峰值与DNA含量成正比。

冰醋酸，少量硫酸

蓝色物

DNA +

三、试剂和器材



1. 试剂

200 μ g/mL DNA标准溶液、二苯胺试剂

2. 器材

可见分光光度计、恒温水浴锅、分析天平

四、操作步骤

1. 标准曲线的制作

取12只试管分成6组，按下表操作。取2管的平均值，以DNA浓度为横坐标，光密度为纵坐标，绘制标准曲线。



试管	0	1	2	3	4	5
标准DNA/mL	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
蒸馏水/mL	2	1.6	1.2	0.8	0.4	0
二苯胺试剂/mL	4	4	4	4	4	4

60℃恒温水浴中保温1h，冷却，在595nm波长处比色

光密度值						
------	--	--	--	--	--	--

2. 样品的测定



取待测样品2mL，加入二苯胺溶液4mL，摇匀，60℃保温1h，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，按下式计算待测样品的DNA的含量。

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

五、注意事项

其他糖及糖的衍生物、芳香醛、蛋白质等都对实验有干扰，测定前应尽可能除去。



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。