

Reinheitsbestimmung und Quantifizierung von Plasmid-DNA

Aufgabenstellung

Über eine fotometrische Messung sollen der Reinheitsgrad und die Menge an Plasmid-DNA in einer Plasmidlösung bestimmt werden.

Allgemein

Reinheitsbestimmung:

Plasmid-DNA kann mit Proteinen verunreinigt sein. Da DNA und Proteine Absorptionsmaxima bei verschiedenen Wellenlängen aufweisen, können sie fotometrisch unterschieden werden. Dazu eignet sich ein Wellenlängen-Scan von 230 bis 325 nm. DNA weist ein Absorptionsmaximum bei 260 nm und Proteine bei 280 nm auf. Bei 325 nm absorbieren weder DNA noch Proteine. Bei dieser Wellenlänge gemessene Absorptionen sind auf Verunreinigungen der Küvetten zurückzuführen.

Quantifizierung:

Die DNA-Konzentration einer Lösung kann näherungsweise wie folgt bestimmt werden:

$50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ weisen bei einer Wellenlänge von 260 nm eine Extinktion von 1 auf.

Eine genaue Bestimmung ist mit folgender Formel möglich:

$$c \left[\text{pmol} / \text{ml} \right] = \frac{E_{260}}{13,2 \cdot S}$$

$S = \text{DNA-Länge in kb}$

Versuchsdurchführung

Material

- Fotometer
- UV-Halbmikroküvetten
- Küvettenständer
- Mikropipetten und Spitzen

Chemikalien pro Zweiergruppe

- λ -DNA ($0,3 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)
- Plasmid-DNA z. B. Plasmidisolation
- demin. Wasser

Arbeitsschritte

Vorbereitung der Probe

- Nach der Plasmidpräparation werden in einer Halbmikroliter-Küvette 700 μl demin. Wasser vorgelegt. Dazu werden 20 μl Plasmidlösung gegeben.

Bestimmen Sie den Verdünnungsfaktor:.....

- Durch Invertieren (Parafilm verwenden) wird die Probe gemischt und anschließend im Fotometer vermessen.
- Als Kontrolle werden 10 μl λ -DNA ($0,3 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) mit 700 μl demin. Wasser verdünnt und fotometrisch vermessen.

Bestimmen Sie den Verdünnungsfaktor:.....



Fotometrische Messung (Genesis 6-Fotometer)

1. Wählen Sie als Messmethode den Wellenlängen-Scan (Test-Taste → Scan) aus. Es soll die Absorption im Spektrum von 230 bis 325 nm bestimmt werden.

Test-Bezeichnung	DNA-Scan
Messmodus	Absorption
Startwellenlänge	230 nm
Stoppwellenlänge	325 nm
Probenposition	Manuell 6
Scangeschwindigkeit	schnell
Intervall	0,5 nm
ID#	1
Auto drucken	Ein
Auto speichern	Ein
Datendateiname	DNA-Scan

Aufgaben:

1. Geben Sie an wie viele Maxima zu erkennen sind und interpretieren Sie den Kurvenverlauf.
2. Bei welcher/welchen Wellenlänge/n treten die Maxima auf?
3. Geben Sie die Extinktion zu folgenden Wellenlängen an:
 - 260 nm:
 - 280 nm:
 - 325 nm:

Auswertung:

Das Verhältnis E_{260}/E_{280} ist ein Maß für die Reinheit der DNA-Lösung. Um E_{260}/E_{280} bestimmen zu können, muss von den Extinktionen noch der Nullwert E_{325} subtrahiert werden.

Es gilt:

- $(E_{260}-E_{325})/(E_{280}-E_{325}) < 1,8$ □ DNA ist mit Proteinen kontaminiert
- $(E_{260}-E_{325})/(E_{280}-E_{325}) \geq 1,8$ □ DNA ist „rein“

Aufgaben:

1. Berechnen Sie die DNA-Konzentration der Plasmidlösung.
2. Machen Sie eine Aussage über den Reinheitsgrad der Plasmidlösung.

Literatur:

- Short Protocols in Molecular Biology. Vol. 2, Fifth Edition von Wiley, ISBN 0-471-25092-9
- Monika Jansohn (Hrsg.): Gentechnische Methoden – Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 640 Seiten. Spektrum Akademischer Verlag 2007. 4. Aufl. ISBN 978-3-8274-1537-0

