

4. QUANTIFICAÇÃO EM ESPECTROFOTÔMETRO:

Luciana Correia de Almeida Regitano

Os ácidos nucléicos absorvem luz no comprimento de onda de 260 nm. Para fazer a leitura no espectrofotômetro, normalmente se utiliza uma diluição em água. Para estimar a concentração de DNA utiliza-se a seguinte relação: $1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ }\mu\text{g DNA dupla-hélice}$ (Regitano, 2001; Sambrook, 2002).

Dessa forma, a concentração de DNA na amostra é obtida pelo seguinte cálculo:

[DNA] = Valor da leitura em O.D. X 50 X Fator de diluição

As proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm. Sendo assim, a relação A_{260}/A_{280} fornece um parâmetro de avaliação da qualidade das preparações de ácidos nucléicos. Valores inferiores a 1,8 resultam de contaminação com proteína.

Utilize o espaço abaixo para anotar o resultado da quantificação:

A concentração de RNA nas amostras também será avaliada por espectrofotometria, tendo uma alíquota de amostra de RNA dissolvida em água deionizada, na proporção de 1:100 (5 μ L de DNA: 495 μ L de água deionizada).

autoclavada). O grau de pureza do RNA será estimado pela razão entre as absorbâncias medidas a 260 e 280 nm, que deve ser igual ou superior a 1,75 (Sambrook, 2002). Para uma amostra de RNA pura tem-se que: $OD_{260}/OD_{280} = 1,8$ a 2,0. Uma densidade óptica igual à 1,0 corresponde a 40 µg de RNA (fita simples) por mL. Desta forma a concentração de RNA na amostra pode ser calculada através da seguinte relação:

Concentração de RNA ($\mu\text{g/mL}$) = $\text{OD}_{260} \times \text{Fator de diluição (100)} \times 40$

Utilize o espaço abaixo para anotar o resultado da quantificação: