Purity and concentration of nucleic acid

Nucleic acid quantitation by Nanodrop

- DNA= 1.8 ~
- RNA= 2.0 ~

- **A260/A280 Ratio**
- The most common purity check for DNA and RNA is the A260/A280 ratio. Any protein contamination
- will have maximum absorption at 280 nm. Measurements are taken at both 260 nm and 280 nm
- and compared to give a ratio. For DNA the result of dividing the 260 nm absorption by the
- 280 nm needs to be greater or equal to 1.8 to indicate a good level of purity in the sample.
- For RNA samples this reading should be 2.0 or above. Results lower than this are indicative
- of impurities in the sample.

طريقة عمل الجهاز

- اختر الايقونة الخاصة بالجهاز(Nanodrope) الموجودة على سطح المكتب.
- اختر Nucleic acidمن القائمة .
- اختر نوع الحامض النووي DNA,
- اختر الوحدة القياسية الخاصة بالحامض النووي وهي ng/µL
- اختر الطول الموجي الملائم للمحلول المراد فحصه,ان الطول الموجي 280-260 هو الملائم لقياس وتقدير الحامض النووي.
- اختر الايكونه (add to the report) لاضافة جميع القياسات الخاصة بجميع عيناتك وحفظها لحين الرجوع اليها عند الحاجة.
- صفر الجهاز بواسطة (Blank المحلول المذيب للحامض النووي).يجب ان يكون هذا المحلول مذيب جيد للحامض النووي اضافة الى ان الـ Blankالمستعمل لتصفير الجهاز يجب ان يكون بنفس درجة pH ونفس الدرجة الايونية للمحلول المستعمل للمذيب للحامض النووي (DNA).
- ضع 2-1µl من محلول البلانك على عدسة الجهاز ثم انزل ذراع الجهاز.ثم اضغط على كلمة(blank)
- نظف العدسة بورق التنظيف الخاص ثم ضع العينة واضغط على كلمة (Measure) ليبدء الجهاز بالقياس.

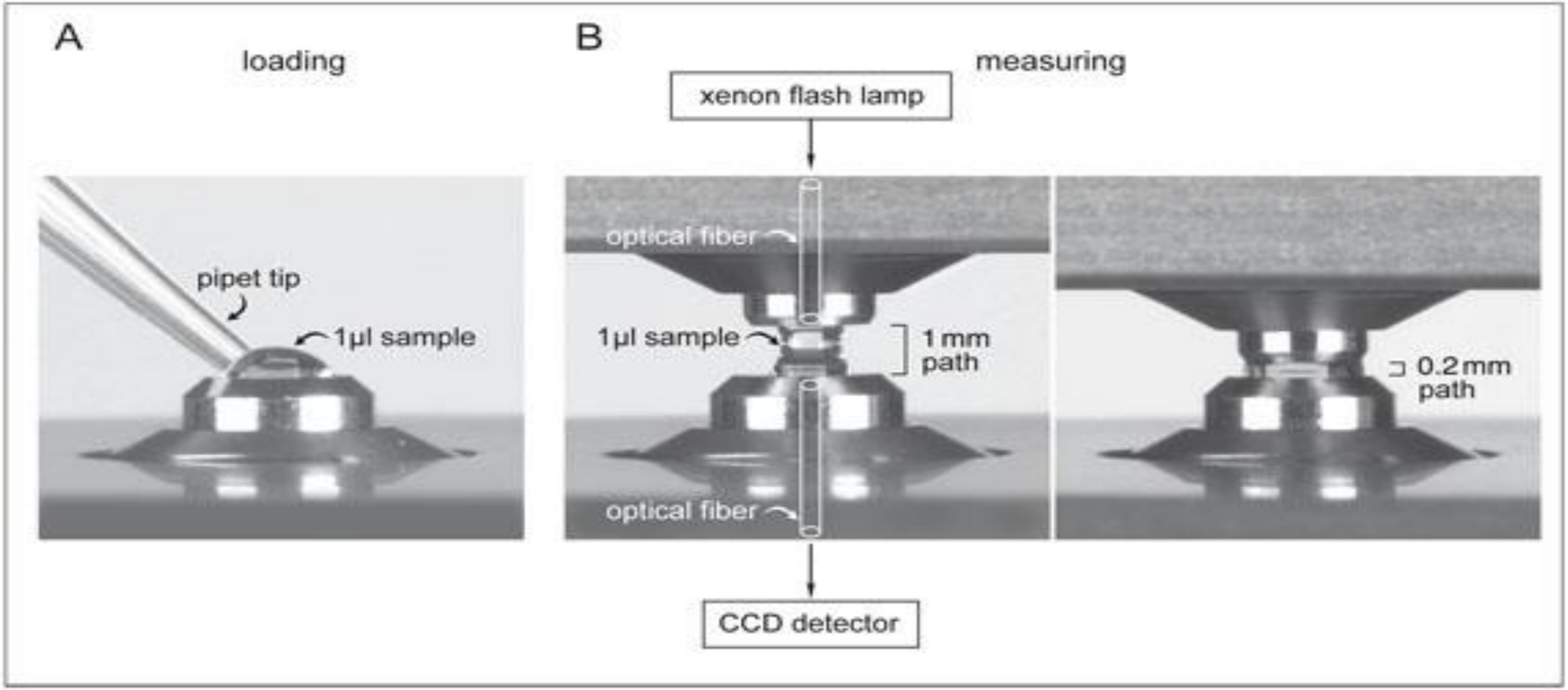
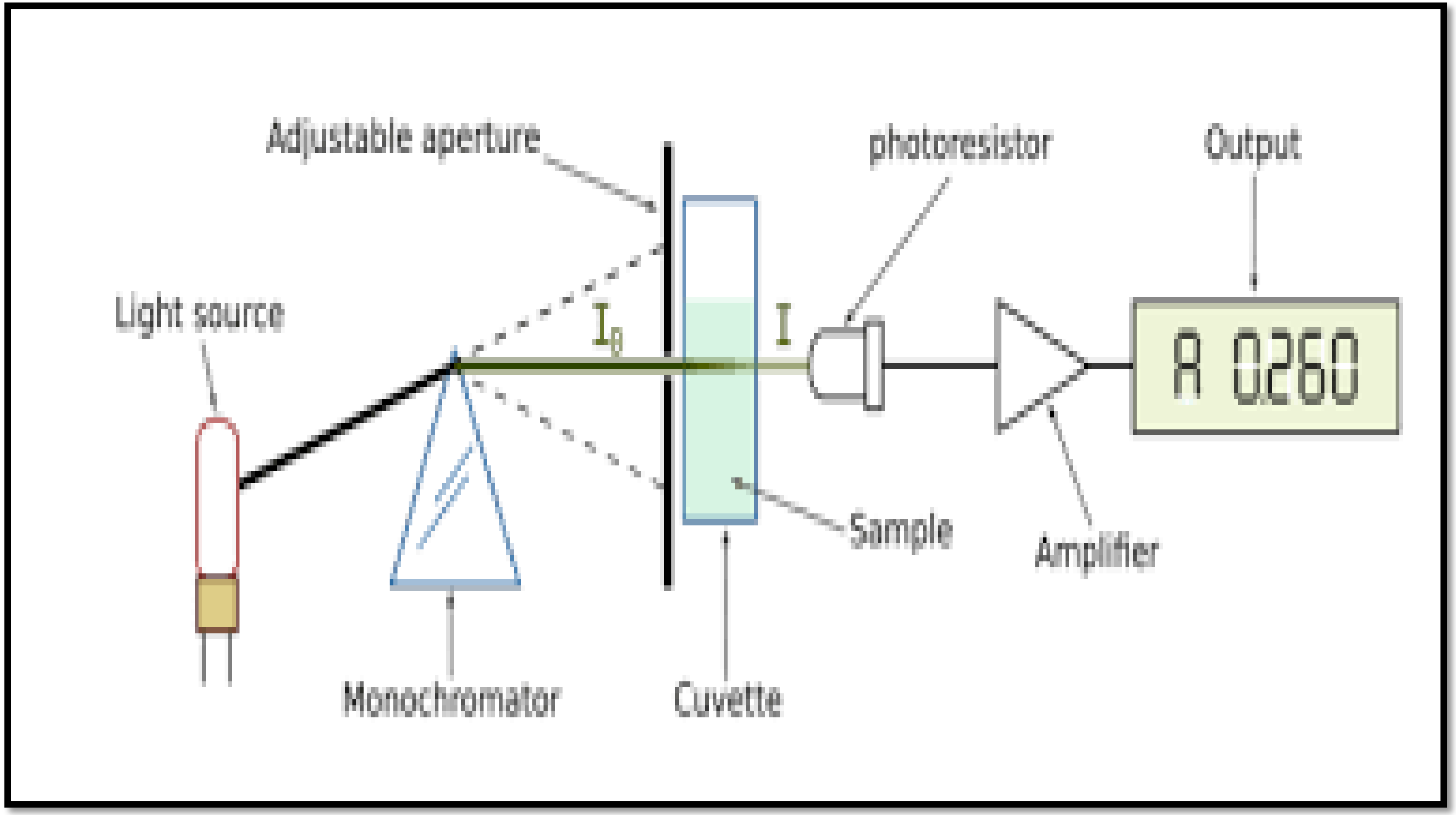
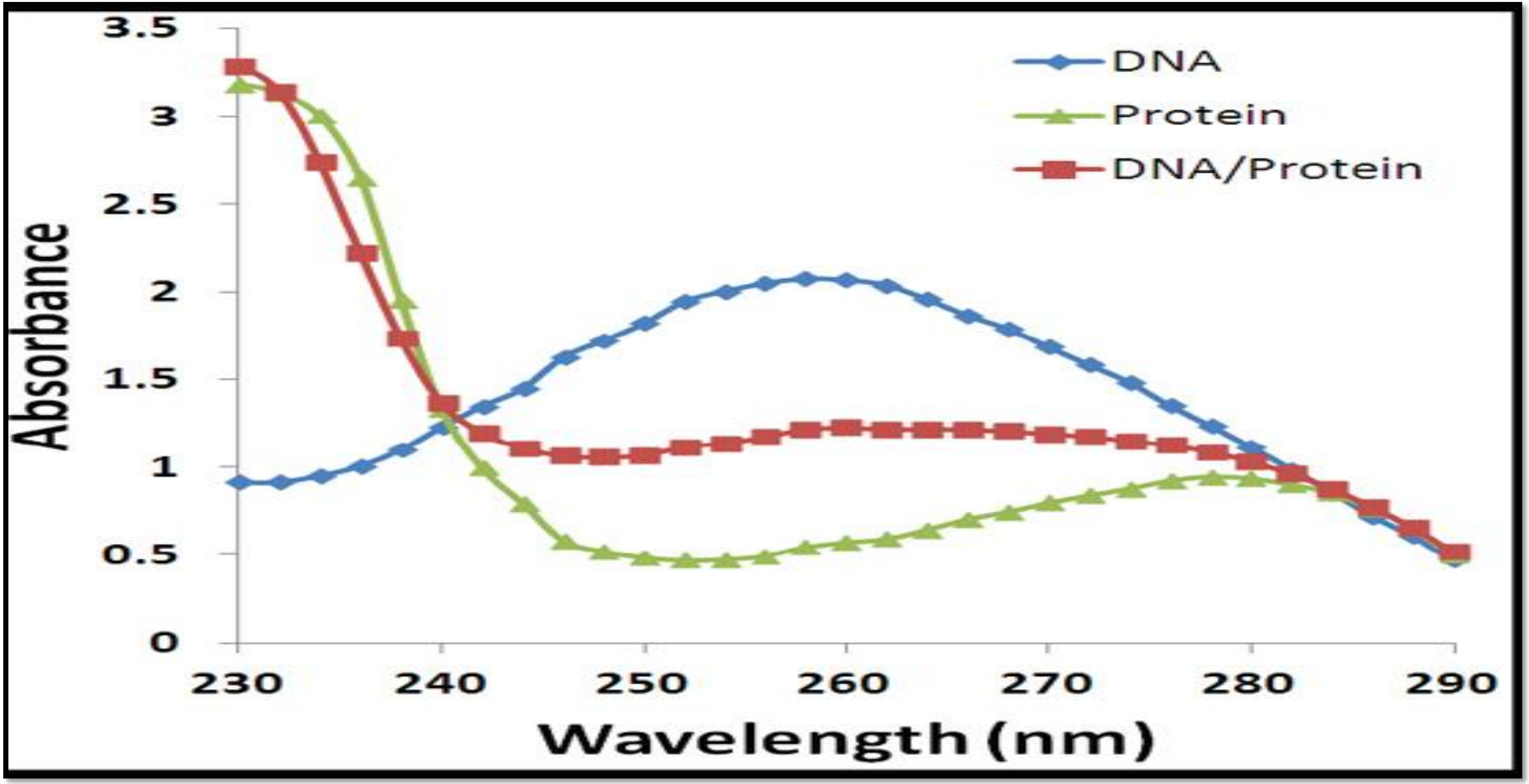


Figure A.3D.2 The NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer microvolume sample retention system. (**A**) A sample volume of 1 µl is dispensed onto the lower optical surface. (**B**) Once the instrument lever arm is lowered, the upper optical surface engages with the sample, forming a liquid column with the path length defined by the gap between the two optical surfaces. During each measurement, the sample is assessed at both a 1-mm and 0.2-mm path, providing a large dynamic range of nucleic acid detection.

Spectrophotometer work



DNA concentration curve



$$\text{Conc.(g/L)} = \frac{\text{wt.(g)}}{V_L}$$

$= 1$ g/L

$=1000$ mg/L

$=10^6$ μg /L

10^9 pg /L

10^{12} ng/L

توحيد تراكيز الحامض النووي

بعد عملية استخلاص الاحماض النووية من الخلايا المختلفة تكون تراكيزها مختلفة ما بين العينات, لذلك يجب توحيدها قبل عملية الترحيل الكهربائي بواسطة قانون معامل التخفيف باستعمال محلول متعادل خاص هو ال (DEPIC) .

- طريقة التخفيف:
- يتم قياس تركيز الحامض النووي المستخلص بواسطة جهاز المطياف الضوئي (spectrophotometer), وعمل جدول خاص بارقام العينات وتراكيزها الاولية (C1) كما موضح ادناه.
- نفرض ان التركيز الثاني (C2) الذي يتم توحيد العينات على اساسه هو (100 ng/µl), وان الحجم الثاني (V2)الكلي المطلوب هو (50µl) .
- بعد تبويب النتائج في جدول اكسل نجري عملية الطرح مابين الحجم الاول الناتج (V1) والحجم الثاني (V2) المفترض والناتج يعتبر حجم المحلول الذي يجب اضافته الى كل عينة

مثال :احسب كمية ال (DEPIC) التي نضيفها الى كل عينة DNA بالاعتماد على التراكيز الاولية المبينه ادناه ؟

samples	C1	V1	C2	V2
A1	190.88 ng/µl	X	100 ng/µl	50 µl
A2	230.76 ng/µl	X	100 ng/µl	50 µl
A3	210.36 ng/µl	X	100 ng/µl	50 µl
A4	344.87 ng/µl	X	100 ng/µl	50 µl

الحل:

باستعمال قانون معامل التخفيف المشهور

C1*V1=C2*V2

لاستخراج حجم المحلول المضاف الى كل عينة يجب

اولا استخراج قيمة (V1) وهي.. V1= C2*V2/C1

26.2 µl, 21.66 µl, 23.76 µl, 14.5 µl

الخطوة التالية هي ايجاد الفرق مابين الحجوم لاستخراج كمية المحلول المضافه.

Sample A1----- V2-V1= 23.8 µl

Sample A2----- V2-V1=28.3 µl

Sample A3----- V2-V1=26.2 µl

Sample A4----- V2-V1=35.5 µl

بعد اضافة هذه الكميات الى عينات ال DNA تصبح تراكيزة متساوية في جميع العينات

وهي 100 ng/µl يعني كل واحد مايكروليتر من العينة يحتوي ١٠٠ نانوغرام من مادة ال DNA