

## Reinheitsbestimmung und Quantifizierung von Plasmid-DNA

### Lösung

#### 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:  $20/720$

- 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:  $10/710$

#### Aufgaben:

- Geben Sie an wie viele Maxima zu erkennen sind und interpretieren Sie den Kurvenverlauf.

*zwei, bzw. eines bei 260 nm (DNA) mit einer Schulter bei 280 nm (Protein)*

*DNA-Maximum mit höherer Extinktion als Protein*

- Bei welcher/welchen Wellenlänge/n treten die Maxima auf?

*260nm und 280 nm*

- Geben Sie die Extinktion zu folgenden Wellenlängen an:

○ 260 nm:  *z.B. E 0,155*

○ 280 nm:  *z.B. E 0,022*

○ 325 nm:  *z.B. E -0,02*

#### **Aufgaben:**

- Berechnen Sie die DNA-Konzentration der Plasmidlösung.

$$E_{260} - E_{325} = 1 \Rightarrow 50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$$

$$E_{260} - E_{325} = 0,157 \Rightarrow x \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$$

-----  
 $x \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} = 0,157 \cdot 50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} / 1 = 7,85 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  (entspricht der

Konzentration

in Küvette)

Verdünnungsfaktor:  $20/720$

$$\Rightarrow \text{Plasmid-Lösung ist } 720/20 \cdot 7,85 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} = 282,6 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$$

- Machen Sie eine Aussage über den Reinheitsgrad der Plasmidlösung.

$$(E_{260} - E_{325}) / (E_{280} - E_{325}) \Rightarrow (0,155 - (-0,02)) / (0,022 - (-0,02))$$

$$0,177 / 0,042 = 3,74$$

$\Rightarrow$  sehr reine DNA

