

## 分光光度计 260/280 260/230 比值所代表意义

核酸在波长 260 nm 处有最高吸收峰。吸收紫外光的性质是嘌呤环和嘧啶环的共轭双键系统所具有的，所以嘌呤和嘧啶以及一切含有它们的物质，不论是核苷、核苷酸或核酸都有吸收紫外光的特性。但紫外法不能区分 DNA 和 RNA，只能用来鉴定核酸的纯度和含量。

蛋白质由于含有芳香氨基酸，因此也能吸收紫外光。通常蛋白质的吸收高峰在 280nm 波长处，在 260nm 处的吸收值公为核酸的十分之一或更低，故核酸样品中蛋白质含量较低时对核酸的紫外测定影响不大。

RNA 的 260nm 与 280nm 吸收的比值在 2.0 以上；DNA 的 260nm 与 280nm 吸收的比值则在 1.9 左右。当样品中蛋白质含量较高时比值即下降。

### 如何避免吸光值漂移

读数不稳定可能是实验者最头痛的问题。灵敏度越高的仪器，表现出的吸光值漂移越大。事实上，分光光度计的设计原理和工作原理，允许吸光值在一定范围内变化，即仪器有一定的准确度和精确度。

#### 1. 核酸本身物化性质

溶解核酸的缓冲液的 pH 值、离子浓度等

在测试时，离子浓度太高也会导致读数漂移，因此建议使用 pH 值一定、离子浓度较低的缓冲液（如 TE）可大大稳定读数。核酸的吸光值受 pH 值和缓冲液离子浓度影响。只有在一定的 pH 值和低离子浓度的条件下（如 10 mM Tris-HCl pH 8.0），才能得到精确的检测结果。水的 pH 值不稳定，可能导致检测误差。一些缓冲液在紫外范围内存在自身吸收，为了确保准确测量，请使用与悬浮或洗脱样品时相同的缓冲液。

#### 2. 样品的稀释浓度

同样是不可忽视的因素，由于样品中不可避免存在一些细小的颗粒，尤其是核酸样品。这些小颗粒的存在干扰测试效果。为了最大程度减少颗粒对测试结果的影响，要求核酸吸光值至少大于 0.1A，吸光值最好在 0.1-1.5 A。在此范围内，颗粒的干扰相对较小，结果稳定。从而意味着样品的浓度不能过低，或者过高（超过光度计的测试范围）。

#### 3. 操作因素

如混合要充分，否则吸光值太低，甚至出现负值；混合液不能存在气泡，空白液无悬浮物，否则读数漂移剧烈；必须使用相同的比色杯测试空白液和样品，否则浓度差异太大；换算系数和样品浓度单位选择一致；不能采用窗口磨损的比色杯；样品的体积必须达到比色杯要求的最小体积等多个操作事项。

### 各波长具体含义及相关问题

#### 1. A260nm

是核酸最高吸收峰的吸收波长，最佳测量值的范围为 0.1 至 1.0。如果不在此范围，稀释或浓缩样品，使之在此范围内；如果吸光度小于 0.05，检查是否存在操作因素（如移液不准确，样品内有悬浮物等）影响。DNA 样品的 A260 吸光度值是否 >0.1。（请注意，这个值跟仪器无关，核酸的吸光度必需大于 0.1，其值才有效和可靠，因为样品中的杂质和颗粒这些不纯物的干扰通常会对光有一定吸收，其值 <0.1）；

#### 2. A280nm, A270nm

是蛋白最高吸收峰的吸收波长，比值可进行核酸样品纯度评估：纯 DNA 的 A260/A280 比值为 1.8，纯 RNA 为 2.0。如果比值低，表示受到蛋白（芳香族）或酚类物质的污染，需要纯化样品。比值=1.5 相当于 50% 蛋白质/DNA 溶液。酚的最大吸收峰在 270nm。

#### 3. A230nm

是碳水化合物最高吸收峰的吸收波长，比值可进行核酸样品纯度评估：纯 DNA 和 RNA 的 A260/A230 比值为 2.5。若比值小于 2.0 表明样品被碳水化合物（糖类）、盐类或有机溶剂污染，需要纯化样品。A230 产生负值主要是由于在很低 DNA 浓度的溶液中的一些其他成分的干扰所导致的。在下一个测定中，需要降低样品的稀释度，A230 的负值会被校正。

#### 4. A320nm 或 A340nm

为检测溶液样品的浊度和其他干扰因子。该值应该接近 0.0。如果不是，标明溶液中有悬浮物，需要纯化样品。纯样品的 A320 一般是 0。

#### 5. A260/A280 和 A260/A230

是核酸纯度的指示值。纯度好的 DNA 或 RNA，在 pH7-8.5 下 A260 / A280 的比值应该在 2.0 或 2.5。纯净的样品比值大于 1.8 (DNA) 或者 2.0 (RNA)。如果比值低于 1.8 或者 2.0，表示存在蛋白质或者酚类物质的影响。A230 表示样品中存在一些污染物，如碳水化合物、盐（胍盐）等，较纯净的核酸 A260/A230 的比值大于 2.0。

当 0.5%BSA 蛋白质污染时，蛋白污染会导致 260 和 280 的数值都下降，其净结果是 260/280 比值下降，但 260/280 的比值变化并不显著，正如分子克隆 3 所说。但蛋白残留会导致 230 的数值显著上升，显著影响 260/230 的比值。也就是说，如果 RNA 样品的 260/280=1.7，260 /230=0.5，那么就应该考虑污染原因不是胍盐残留，而是蛋白残留。

其他：

用分光光度计测量 RNA 时，用水而不是用 TE 缓冲液稀释 RNA 样品会造成 A260/A280 比值下降。原因是低离子强度和低 pH 溶液会增加 280 nm 处的光吸收值。

加氯仿离心后取上清的时候千万不要贪多，那样就很容易被蛋白污染，所以现在一般取 400ul 左右。

当 260/230<1 时，只有两种情况。一是胍盐污染，二是蛋白污染。