

Doseamento de RNA por espectrofotometria

Os ácidos nucleicos (DNA, RNA) são detetados por análise do seu espectro de absorção. As bases púricas e pirimídicas dos nucleótidos absorvem luz ultravioleta (UV) apresentando um pico de absorção máxima a cerca de 260 nm. Assim, quanto mais elevada for a absorção de luz pela amostra de ácido nucleico, maior será a sua concentração. Com base nestas propriedades, a quantificação de ácidos nucleicos pode ser feita num espectrofotómetro (*'Nanodrop'*) expondo a amostra a luz UV a 260 nm, em que um fotodetector mede a luz que atravessa a amostra e mede a densidade ótica (*optical density* – OD).

Para estimar a concentração de RNA utiliza-se a seguinte relação: $1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$ RNA:

$$[\text{RNA } \mu\text{g/ml}] = \text{OD} \times 40 \text{ } \mu\text{g/ml} \times \text{fator de diluição}$$

Para calcular a quantidade de DNA total obtido:

$$\text{RNA } (\mu\text{g}) = \text{concentração de RNA} \times \text{volume total da amostra (ml)}$$

As proteínas (sobretudo devido aos aminoácidos aromáticos e nomeadamente aos resíduos de triptofano) absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm. Sendo assim, a relação A_{260}/A_{280} fornece um parâmetro de avaliação da qualidade (contaminação com proteínas) das preparações de ácidos nucleicos.

1. A avaliação da concentração de RNA será feita recorrendo ao Genova Nano (sala 2.4.40 – *'Nanodrop'*), utilizando o mesmo princípio da espectrofotometria mede a concentração de DNA, com a grande vantagem de necessitar apenas de volumes muito pequenos de amostra (1 – 2 μl).
2. Utilizar o modo *'Multi-wavelength'* e fazer o branco com a solução de ressuspensão do DNA plasmídico (i.e., ddH₂O).
3. Avaliar a concentração e pureza das amostras através das leituras a 260 nm e das razões 260/280 nm e 269/230 nm, respetivamente.