

Stanovení DNA za použití Hoechst 33258

Určení koncentrace DNA je často základním krokem při analýze biologického materiálu a je součástí mnoha laboratorních protokolů. Znalost přesné koncentrace DNA je důležitá pro celou řadu technik (sekvenování, syntéza a klonování cDNA, transkripce RNA atd.) Koncentrace DNA je nejčastěji měřena UV spektroskopií, odčítáním absorbance při 260 nm ($Abs_{260} = 1$ pro dvouřetězcovou DNA o koncentraci 50 $\mu\text{g/mL}$; v 1 cm kyvetě). Ke kvantifikaci nižších koncentrací DNA, než jsou detekovatelné za použití UV spektroskopie lze použít bisbenzen imidový interkalátor **Hoechst 33258**, který se váže na AT bohaté oblasti dvouřetězcové DNA a vykazuje zvýšenou fluorescenci za podmínek vysoké iontové síly. Hoechst má excitační maximum kolem 350 nm a emituje v oblasti 450 nm. Citlivost Hoechst interkalátoru je přibližně 10ng/mL. Dynamický rozsah použitelnosti Hoechst pro stanovení koncentrace DNA přesahuje 3 řády od 10ng/mL do 1 $\mu\text{g/mL}$ DNA.

Materiál

- Spektrofluorometr
- Mirokyveta (100 μL)
- Roztok DNA (Salmon sperm)
- Hoechst 33258 10 mg/mL ve vodě
- 10X TNE pufr
- Destilovaná voda
- 1X TE pufr, 10 mL

Příprava roztoků

Varování: Hoechst 33258 je možný karcinogen a mutagen. Při přípravě roztoku pracujte v rukavicích, s respirátorem a v digestoři.

Hoechst 33258 roztok

Naředit 1ml zásobního roztoku Hoechst 33258(10 mg/mL) 9 mL destilované vody.
Uchovat v tmavé láhvi při 4°C až 6 měsíců

10 X TNE pufr

Rozpustit v 800 mL dest. vody:
12.11 g Tris Base, MW = 121.14
3.72 g EDTA, disodná sůl dihydrát, MW = 372.20
116.89 g NaCl, MW = 58.44
Nastavit pH na 7.4 koncentrovanou HCl
Doplnit dest. vodou do 1000 mL
Filtrovat (0.45 μm)
Lze uchovat při 4°C až po dobu 3 měsíců

Pozn. Koncentrace NaCl a pH jsou důležité pro správnou vazbu Hoechst na DNA.

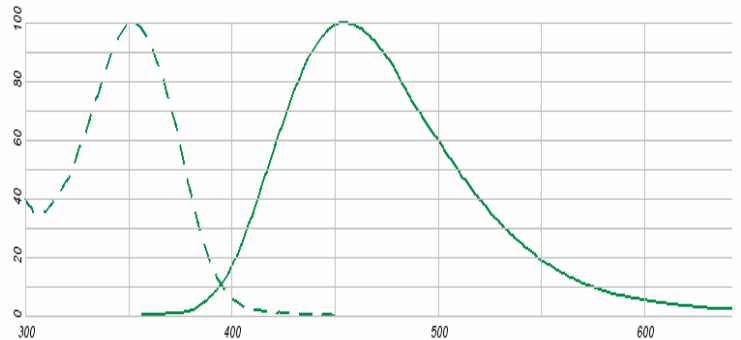
1 X TNE: Naředit 1 mL 10X TNE do 9 mL destilované vody.

2X Hoechst roztok na stanovení

Naředit 5 μL Hoechst 33258 roztoku (1mg/mL) do 25 mL 1X TNE. Uchovat za pokojové teploty. Chránit před světlem. Přípravovat čerstvý každý den. Nefiltrovat.

Standardní roztok DNA

Přípravit 1mg/mL roztok DNA v 1X TNE. Jemným poklepáním promíchat roztok v mikrozkuhavce. Uchovat při 4°C až 3 měsíce.



Vytvoření standardní křivky

1. Přípravit tři následná ředění roztoku DNA v 1X TNE s koncentrací od 2 $\mu\text{g/mL}$ DNA do 200 ng/mL (např. 2000, 1200, 600, 200 ng/mL po 2mL)
2. Přidat vždy 100 μL 2X Hoechst roztoku ke každé koncentraci 100 μL standardního roztoku DNA. Promíchat a pipetovat do mikrokvetvy. Celková koncentrace DNA standardu v kvetě je nyní poloviční (1000, 600, 300, 100 ng/mL)
3. Přípravit blank promícháním 100 μL 1X TNE pufru a 100 μL 2X Hoechst roztoku.
Všechny standardy a vzorky s Hoechst uchovejte v temnu až do měření.
4. Zapněte Fluoromax-4 podle návodu.
5. Změřte intenzitu fluorescence v módu **single point** při $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$, šířka šterbin (slits) 2nm/2nm, integrační čas 1s
6. Změřte nejdříve intenzitu fluorescence blanku, následně standardy.
7. Hodnoty intenzity zapište do tabulky a vynesete do grafu hodnoty intenzity fluorescence standardů po odečtení hodnoty blanku.

Měření neznámého vzorku

1. Nařed'te neznámý vzorek v 1X TNE na celkový objem 100 μL .
2. Přidejte 100 μL 2X Hoechst roztoku.
3. Připravte 2 různá ředění neznámého vzorku.
4. Změřte intenzitu fluorescence neznámých vzorků.
5. Po odečtení intenzity blanku určete podle standardní křivky koncentraci DNA v neznámém vzorku.

Výsledky

Stanovení koncentrace DNA v neznámém vzorku.