

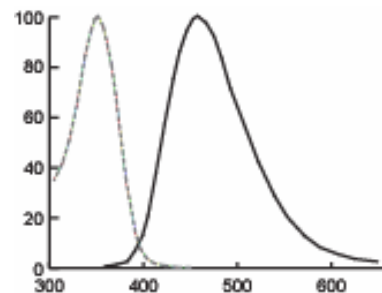
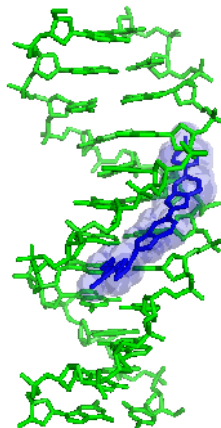
Fluorescenční stanovení koncentrace DNA

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 (např. sekvenování, klonování cDNA, transkripce RNA). Koncentrace DNA je nejčastěji měřena UV spektroskopií, určením hodnoty 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
- Mikrokyveta (1.5 mL)
- Roztok DNA (Salmon sperm)
- Hoechst 33258 10 mg/mL ve vodě
- 10X TNE pufr
- Destilovaná voda



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 5 mL 10X TNE do 45 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.
Připravovat čerstvý každý den.
Nefiltrovat.

Standardní roztok DNA

Připravit 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ roztok DNA (objem 2mL) v 1X TNE.
Jemným poklepáním promíchat roztok v mikrozkumavce.
Uchovat při 4°C až 3 měsíce.

Vytvoření standardní křivky

1. Připravit tři následná ředění roztoku DNA v 1X TNE s koncentrací od 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNA do 200 ng/mL (např. 2000, 1200, 600, 200 ng/mL po 2mL)
2. Přidat vždy 1 mL 2X Hoechst roztoku ke každé koncentraci 1mL standardního roztoku DNA. Promíchat a pipetovat do mikrokyvety. Celková koncentrace DNA standardu v kyvetě je nyní poloviční (1000, 600, 300, 100 ng/mL)
3. Připravit blank promícháním 1 mL 1X TNE pufru a 1mL 2X Hoechst roztoku. Všechny standardy a vzorky s Hoechst uchovejte v temnu až do měření.
4. Zapněte spektrofluorometr 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 štěrbin (slits) 2nm/2nm, integrační čas 1s (Fluoromax)
 - v módu **Read** při $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 442 \text{ nm}$, šířka štěrbin (slits) 10nm/10nm, integrační čas 1s (LS50)
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 1mL.
2. Přidejte 1mL 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.