

Fluorescenční stanovení koncentrace DNA

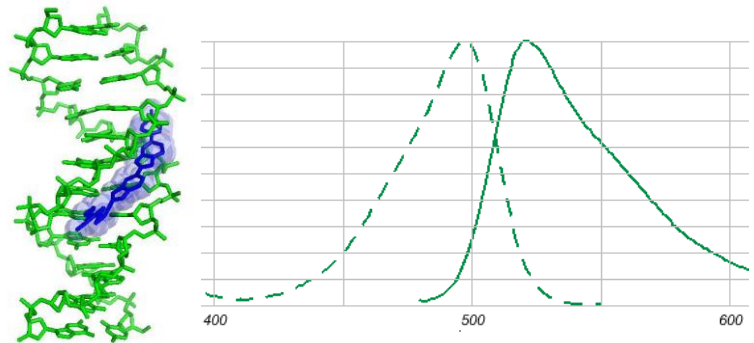
Určení koncentrace DNA je často základním krokem při analýze biologického materiálu a je součástí mnoha laboratorních protokolů. Znalost přesné koncentrace DNA je důležitá pro celou řadu technik (např. sekvenování, klonování cDNA, transkripce RNA).

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 kyvetě o optické dráze 1 cm).

Ke kvantifikaci nižších koncentrací DNA, než jsou detekovatelné za použití UV spektroskopie lze použít fluorescenční sondy, které se vážou na dvouřetězcovou DNA a vykazují několikanásobný nárůst intenzity fluorescence po navázání. K sondám, které lze použít ke stanovení koncentrace DNA patří GelStar. Tato fluorescenční sonda má excitační maximum kolem 493 nm a emituje v oblasti 530 nm.

Materiál

Spektrofluorometr
SpectroVis Plus (Vernier)
Kyveta (2 mL)
Roztok DNA (Salmon sperm)
GelStar (10000x)
1x TE pufr
Destilovaná voda



Příprava roztoků

1x TE:

10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
pH 8,0

100x GelStar

2 μl zásobního koncentrovaného roztoku GelStar nařed'te na objem 200 μl pufr
1x TE

Standardní roztok DNA

$Abs_{260} = 0,387$
koncentrace = ?

Vytvoření standardní křivky

1. Připravte vždy 1ml roztoku DNA v 1X TE postupným ředěním o koncentracích: 5 ng/μl, 2.5 ng/μl, 1.25 ng/μl, 0.625 ng/μl, 0.3125 ng/μl.
2. Připravte blank: 1 mL 1x TE pufru
3. Ke každé koncentraci 1mL standardního roztoku DNA a k blanku přidejte vždy 20 μl 100x ředěného zásobního GelStar roztoku a 980 μl 1xTE pufru. Promíchejte a postupně pipetujte do kyvety. Celková koncentrace DNA standardů v kyvetě je nyní poloviční (2.50, 1.25, . . . 0.16 ng/μl)
4. Všechny standardy a vzorky s GelStar uchovejte v temnu až do měření.
5. Zapněte spektrofluorometr podle návodu.
6. Spusťte program Logger Pro 3.8.2
7. Změřte intenzitu fluorescence
Experiment – Change units – Spectrometer – Fluorescence – excitační vlnová délka
8. Změřte nejdříve intenzitu fluorescence blanku, následně standardy: vložte kyvetu, měření spustíte tlačítkem Collect a zastavíte Stop
9. Hodnoty intenzity zapište do tabulky a vyneste do grafu hodnoty intenzity fluorescence standardů na koncentraci vzorku.

Měření neznámého vzorku

1. Nařeďte neznámý vzorek v 1x TE na celkový objem 1mL. Objem vzorku v mikrozkuhavce: 0.5 ml
2. Přidejte 20 μl 100x GelStar a 980 μl 1xTE pufru.
3. Změřte intenzitu fluorescence neznámého vzorku.
4. Určete podle standardní křivky koncentraci DNA v neznámém vzorku.

Výsledky

Stanovení koncentrace DNA v původním neředěném neznámém vzorku.