

Fluorescenční stanovení koncentrace DNA

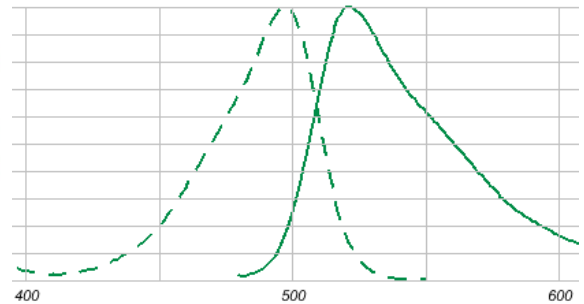
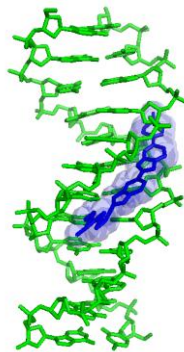
Určení koncentrace DNA je často základním krokem při analýze biologického materiálu a je součástí mnoha laboratorních protokolů. Znalost přesné koncentrace DNA je důležitá pro celou řadu technik (např. sekvenování, klonování cDNA, transkripce RNA).

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 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 10000x koncentrovaného roztoku GelStar nařed'te na objem 200 μl 1x TE pufr

Standardní roztok DNA

$Abs_{260} = 0,308$
koncentrace = ?

Vytvoření standardní křivky

1. Připravte následná ředění roztoku DNA v 1X TE s koncentrací:
5 ng/μl, 2,5 ng/μl, 1,25 ng/μl, 0,625 ng/μl, 0,3125 ng/μl po 1mL)
2. Připravte blank: 1 mL 1x TE pufru
3. Ke každé koncentraci 1mL standardního roztoku DNA a k blanku přidejte vždy 20 μl 100x 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, . . . 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 запиšte do tabulky a vynesete do grafu hodnoty intenzity fluorescence standardů na koncentraci vzorku.

Měření neznámého vzorku

1. Nařed'te neznámý vzorek v 1x TE na celkový objem 1mL. Objem v eppendorfci: 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.