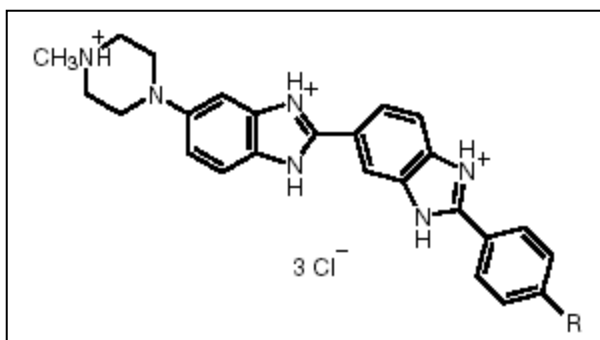


Oznaczenie ilości DNA w roztworze metodą fluorescencyjną

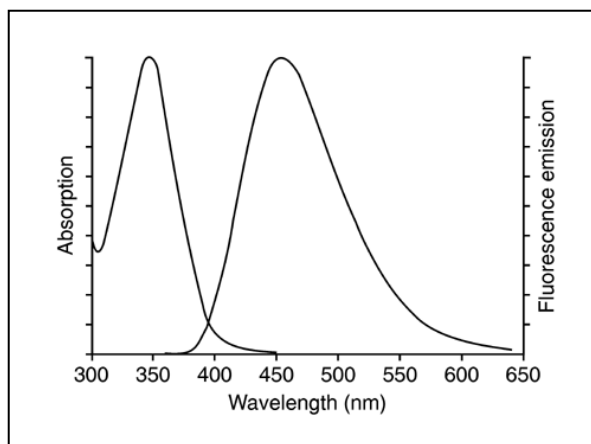
Wprowadzenie

DNA nie wykazuje mierzalnej fluorescencji wewnętrznej z wyjątkiem niskich temperatur. Mimo to, technika fluorescencyjnego oznaczania dsDNA w roztworze jest bardziej selektywna od prostego pomiaru absorbancji przy 260 nm. W metodzie absorpcyjnej nie można bowiem wykluczyć wpływu innych składników (tj. pojedyncze nukleotydy, jednoniciowy DNA) na zmierzoną wartość absorbancji (prawo addytywności absorpcji). Do pomiarów fluorescencyjnych DNA wykorzystuje się przede wszystkim barwniki, które interkalują między pary zasad. Najbardziej znanym przyładem jest bromek etydyny, stosowany szeroko do detekcji DNA zarówno w roztworze, jak i do wybarwiania żeli.

Hoechst 33258 jest pochodną bisimidazolu (Rys. 1), stosowaną do ilościowego oznaczania dsDNA (*double strand* - dwuniciowego) w roztworze, charakteryzuje się maksimum absorpcji przy 356 nm oraz maksimum emisji przy 492 nm (Rys.2).



Rys. 1 Struktura barwnika Hoechst 33258, gdzie R=OH.



Rys.2 Widmo absorpcji i fluorescencji Hoechst 33258.

Barwnik ten wiąże się specyficznie do dużego rowka DNA, co objawia się wzrostem intensywności fluorescencji dużo bardziej, niż po związaniu ssDNA lub RNA. Pozwala to na pomiar dsDNA w obecności małych ilości ssDNA, RNA lub białek. Przy pomocy tego barwnika wykrywa się dsDNA we fluorymetrze i we fluorescencyjnym czytniku płytek, co jest ponad 1000 razy czulszym pomiarem, niż pomiar absorbancji przy 260 nm. Hoechst jest używany m.in. do oceny ilości produktu PCR, DNA footprintingu,

oceny wydajności izolacji DNA i syntezy cDNA, do identyfikacji komórek apoptycznych i nekrotycznych oraz do zautomatyzowanych dużych badań.

Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest oznaczenie stężenia nieznanej próbki DNA metodą fluorescencyjną z udziałem barwnika Hoechst 33258 oraz zaznajomienie się z technikami fluorescencyjnymi do ilościowego i jakościowego oznaczania kwasów nukleinowych w roztworze.

Sprzęt i materiały:

- bufor TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5,
- roztwór Hoechst 33258 - przed pomiarami należy rozcieńczyć 0,1 ml Hoechst (1 mg/ml) w 10 ml buforu TE. **UWAGA** Roztwór należy przechowywać bez dostępu światła,
- roztwór *Calf thymus* DNA 100 µg/ml,
- spektrofлуorymetr kuwety kwarcowe d = 10 mm,
- 16 probówek typu eppendorf o pojemności 2.0 ml,
- pipety automatyczne, końcówki do pipet.

Wykonanie ćwiczenia:

1. Przygotować serię roztworów DNA w oznakowanych probówkach typu eppendorf, rozcieńczając bazowy roztwór DNA o stężeniu 100 µg/ml według instrukcji zawartej w Tabeli 1.
2. Pobrać 1800 µl z otrzymanych próbek do analizy i do każdej dodać 200 µl roztworu Hoechst.
3. Wszystkie przygotowane roztwory mieszać (około 30 sekund) w temperaturze pokojowej, najlepiej bez dostępu światła.
4. Wykonać pomiar fluorescencji wszystkich roztworów w kuwecie kwarcowej zgodnie z instrukcją obsługi aparatu, przyjmując λ wzbudzenia = 360 nm. (Do pomiaru należy pobrać 2,0 ml roztworu).

5. Odczytać maksymalną intensywność fluorescencji oraz pole powierzchni pod widmem fluorescencji. Wyniki zamieścić w Tabeli 2 (patrz wzór poniżej).

Tabela 1

Oznaczenie probówki	Objętość (μl) buforu TE	Objętość (μl) roztworu DNA 2 μg/ml	Objętość (μl) roztworu Hoechst	Otrzymane stężenie DNA w obecności barwnika Hoechst
D0	1800	0	200	ślepa próba
D1	1650	150	200	ng/ml
D2	1600	200	200	ng/ml
D3	1550	250	200	ng/ml
D4	1500	300	200	ng/ml
D5	1450	350	200	ng/ml
DX1			200	ng/ml
DX2			200	ng/ml

Tabela 2

Oznaczenie. probówki	Stężenie DNA (ng/ml)	1 seria I _F	1 seria P _F 380-650 nm	2 seria I _F	2 seria P _F 380-650 nm
D0	ślepa próba 0 ng/ml				0
D1	ng/ml				
D2	ng/ml				
D3	ng/ml				
D4	ng/ml				
D5	ng/ml				
DX1	X1 analiza 1				
DX2	X2 analiza 2				

Opracowanie wyników:

1. Wykreślić krzywą wzorcową w układzie $I_F = f(c_{DNA})$ czyli zależność maksymalnego natężenia fluorescencji od stężenia DNA wyrażonego w ng/ml.
2. Obliczyć pole powierzchni pod każdą krzywą fluorescencji i wykreślić krzywą w układzie $P_{Fst} = f(c_{DNA})$ czyli zależność całkowitej fluorescencji od stężenia DNA wyrażonego w ng/ml.
3. Odczytać z obu krzywych stężenie DNA w analizowanych próbkach. Wynik uśrednić.
4. Obliczyć zawartość DNA w badanej próbce uwzględniając rozcieńczenie oraz obliczyć procentowy błąd oznaczenia.

Literatura uzupełniająca:

1. L. Stryer *Biochemia*.
2. W. Szczepaniak *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*.
3. P. Suppan *Chemia i światło*.
4. J. R. Lakowic *Principles of fluorescence spectroscopy*.

Zagadnienia:

1. DNA – struktura, formy DNA.
2. Fluorescencja - Prawo Stokesa, schemat blokowy spektrofluorometru.
3. Znaczniki i techniki fluorescencyjne do ilościowego i jakościowego oznaczania kwasów nukleinowych w roztworze.