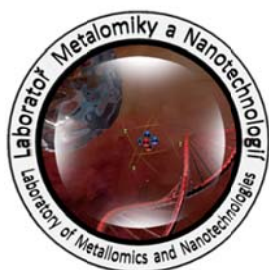


Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií

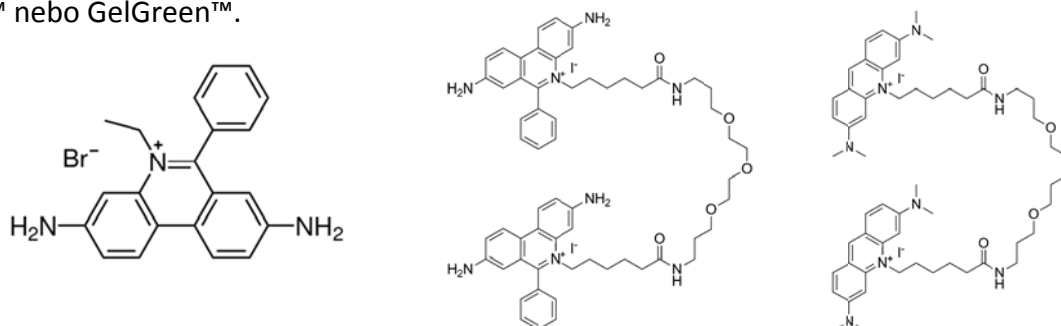


Fluorescenční barvení DNA

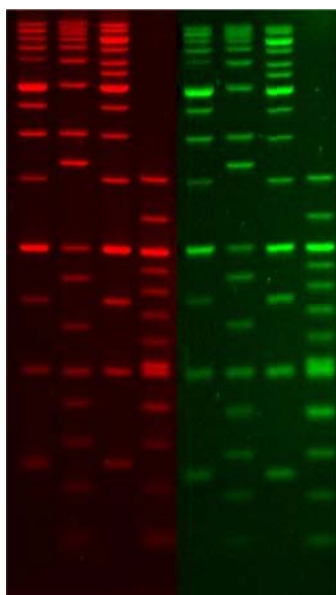
Anotace

Vizualizaci fragmentů DNA lze provést pomocí interkalačního barviva ethidium-bromid, které se včlení mezi vlákna dvouřetězcové DNA (dsDNA) a po navázání fluoreskuje po ozáření gelu na UV transluminátoru. DNA fragmenty jsou vidět jako růžovo-oranžové proužky (bandy). V čele elektroforeogramu může být patrná i RNA v podobě stejně zbarvené neohrazené skvrny.

Dále mohou být pro vizualizaci fragmentů DNA použita alternativní fluorescenční barviva, GelRed™ nebo GelGreen™.



Obr. 1.: Chemická struktura fluorescenčních barviv ethidium-bromid, GelRed™ a GelGreen™.

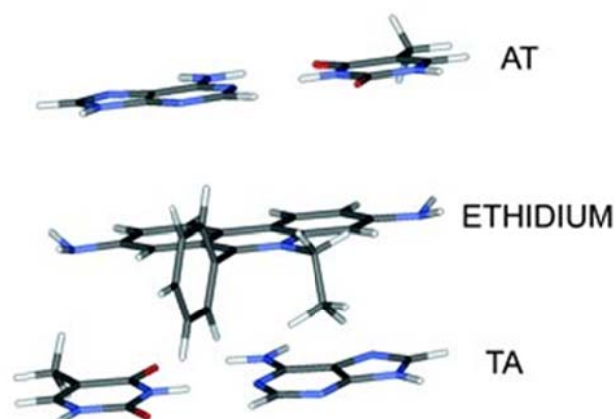


Pro detekci DNA fragmentů v podobě červených, resp. zelených proužků lze použít buď UV-transluminátor nebo fluorescenční imager. Ve srovnání s ethidium-bromidem jsou tato barviva schopna se vázat efektivněji do struktury ssDNA nebo RNA. Pokud tedy pracujeme s RNA nebo ss-DNA, přednostně použijeme tato barviva. Jejich další výhody jsou vyšší citlivost, možnost excitace viditelným zářením a vyšší kvalita snímků pořízená fluorescenčním imagerem.

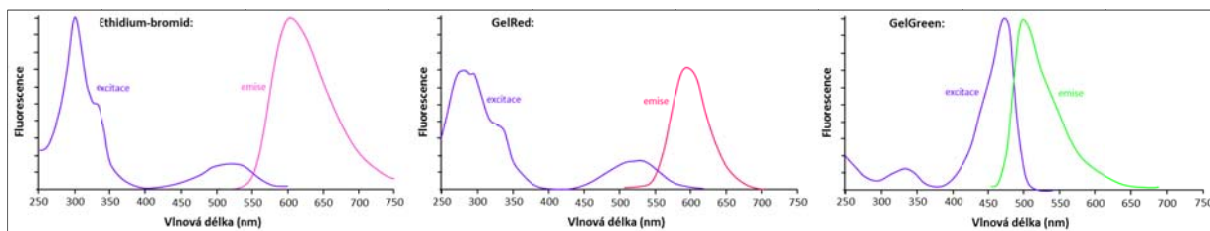
Pracovní postup

- 50 × TAE pufr (242 g Trizma báze, 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8, doplnit vodou na 1 l) Agarosa (high-melting pro běžné použití, v případě následné izolace DNA z gelu použijeme low-melting agarosu,)Ethidium-bromid, GelRed™ nebo GelGreen™.
- Do agarosového gelu o teplotě cca 55°C přidáme buď 5 µl roztoku ethidium-bromidu nebo 5 µl roztoku barviva GelGreen™ nebo GelRed™, zamícháme zakroužením a naléváme do připravené vaničky a ihned vložíme hřeben.

Pozn.: Pokud sledujeme malé změny mobility bandů nebo používáme DNA pro další práci (klonování, re-amplifikace, atd., je vhodné použít následné barvení gelu: elektroforézu provedeme na gelu bez přídavku fluorescenčního barviva. Po proběhnutí elektroforézy gel inkubujeme 30 min buď v 50 ml TAE pufru s přídavkem 5 µl ethidium-bromidu nebo v 50 ml 0.1 M NaCl s přídavkem 15 µl barviva GelRed™ nebo GelGreen™. V případě potřeby zachovat biologickou funkci DNA (klonování) je vhodné nanést na gel dva vzorky vedle sebe, po proběhnutí elektroforézy gel rozdělit, jednu polovinu nabarvit a z druhé poloviny provést excizi bandu.



- c) Gel vyfotografujeme pod UV lampou při excitační délce $\lambda_{ex} = 312 \text{ nm}$ nebo 254 nm pro GelRed™ nebo GelGreen™.
- d) Pokud byl pro detekci DNA použit GelRed, je možno detegovat fluorescenci při excitační vlnové délce $\lambda_{ex} 450 - 550 \text{ nm}$ a $\lambda_{em} 550 - 600 \text{ nm}$, pokud byl použit GelGreen, při $\lambda_{ex} 450 - 500 \text{ nm}$ a $\lambda_{em} 500 - 560 \text{ nm}$.

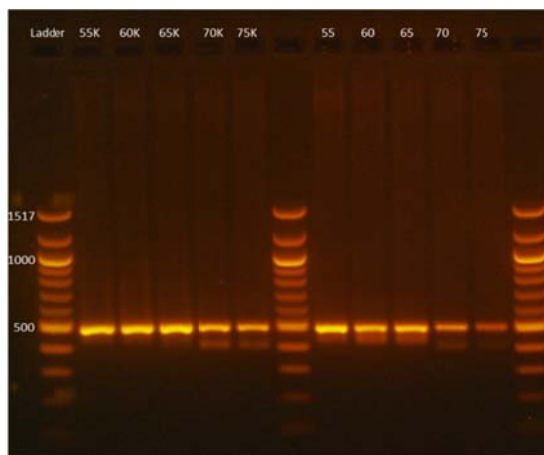


Obr. 2.: Fluorescenční spektra barviv používaných pro detekci nukleových kyselin

-Srovnáním intenzit proužků (bandů) vyizolované DNA a bandů DNA jednotlivých délek odhadneme koncentraci DNA. **Jsou k tomu zapotřebí informace z příbalového letáku DNA standardu.**

Vyhodnocení

Součástí protokolu je popsána fotografie gelu, kde jsou označeny jednotlivé dráhy vzorků a proužky (bandy) náležející DNA nebo RNA. Uvedeme rovněž koncentraci DNA, pokud ji bylo možné odhadnout.

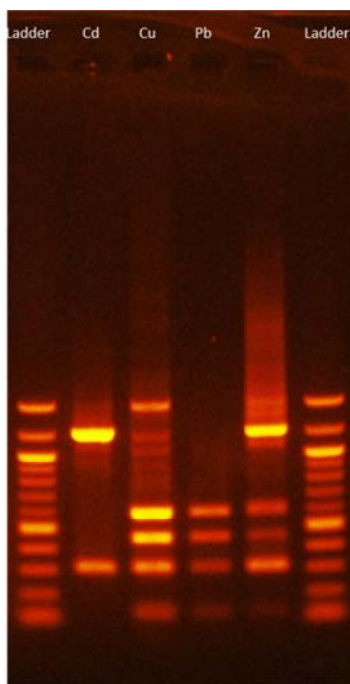


Obr. 3.: Detekce PCR produktu pomocí agarosové gelové elektroforézy. Barveno pomocí ethidium-bromidu.

CZ.1.07/2.3.00/20.0148 NANOLABSYS

Mezinárodní spolupráce v oblasti „*in vivo*“ zobrazovacích technik

http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanolabsys/



Obr. 4.: Detekce amplifikovaných fragmentů DNA pomocí agarosové gelové elektroforézy. Barveno pomocí GelRed™.

Doporučená literatura

Green M. R., Sambrook J.: Molecular cloning A laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, ISBN: 978-1-936113-42-2



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ