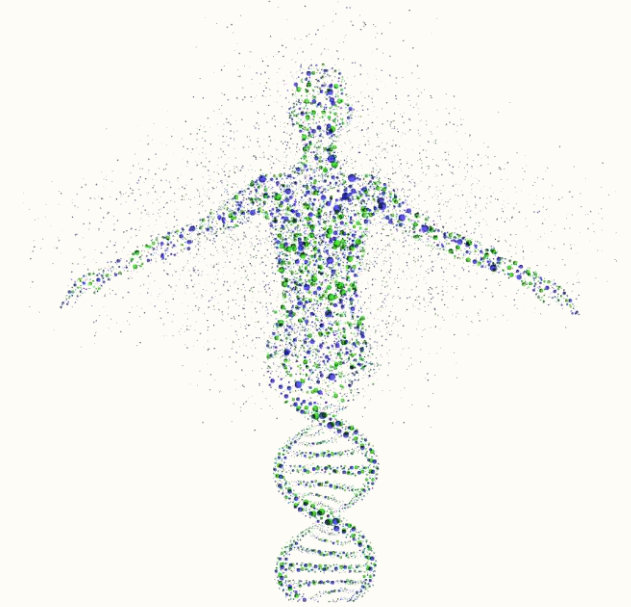


DNA Quantification





The little things are infinitely the most important...



Sherlock Holmes, *A Case of Identity*

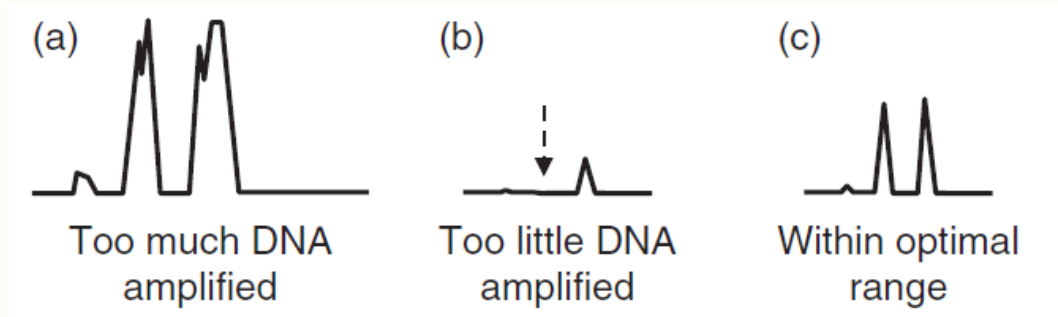
Quantification? Why?

FAKTA:

Hasil Ekstraksi: Human DNA + non human DNA

GUNA:

DNA Template optimal ? →



Hasil STR Typing yang dipengaruhi oleh produk amplifikasi

D.N.A. Box 6.2 Calculation of DNA Quantities in Genomic DNA

1. Molecular weight of a DNA base pair = 618 g/mol
 A = 313 g/mol; T = 304 g/mol; A-T base pairs = 617 g/mol;
 G = 329 g/mol; C = 289 g/mol; G-C base pairs = 618 g/mol
 2. Molecular weight of DNA = 1.98×10^{12} g/mol
 There are 3.2 billion base pairs in a haploid cell $\sim 3.2 \times 10^9$ bp
 $(\sim 3.2 \times 10^9 \text{ bp}) \times (618 \text{ g/mol/bp}) = 1.98 \times 10^{12} \text{ g/mol}$
 3. Quantity of DNA in a haploid cell = 3 picograms
 1 mole = 6.02×10^{23} molecules
- $(1.98 \times 10^{12} \text{ g/mol}) \times (1 \text{ mole} / 6.02 \times 10^{23} \text{ molecules})$
 $= 3.3 \times 10^{-12} \text{ g} = 3.3 \text{ picograms (pg)}$
 A diploid human cell contains $\sim 6.6 \text{ pg}$ genomic DNA

4. One nanogram of human DNA comes from ~ 152 diploid cells
 $1 \text{ ng genomic DNA (1000 pg)} / 6.6 \text{ pg/cell} = \sim 303 \text{ copies of each locus}$
 (2 per 152 diploid genomes)

METODE KUANTIFIKASI DNA

1. UV absorbance and yields
2. Slot Blot
3. Picogreen microtiter plate assay
4. AluQuant human DNA quantitation system
5. End-point PCR
6. Real-time quantitative PCR

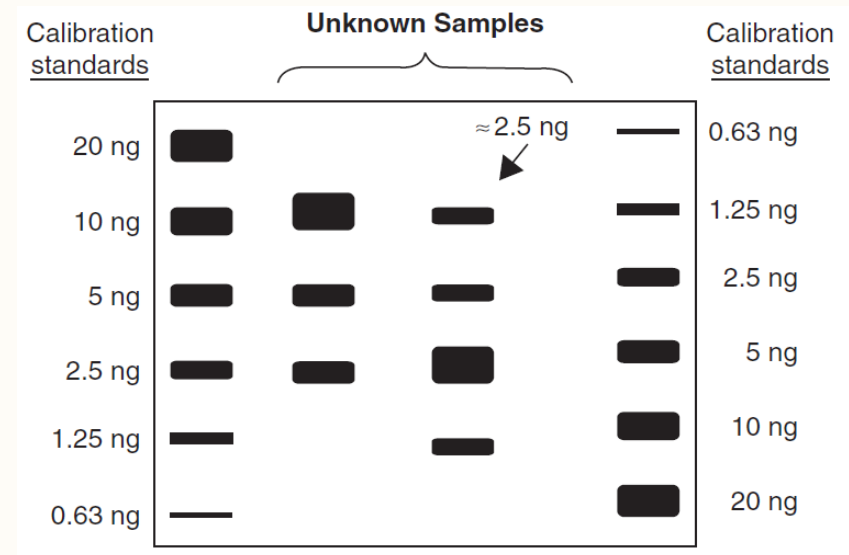
METODE KUANTIFIKASI DNA

1. UV absorbance and yields

- Absorbance λ 260 nm / pendar warna pewarnaan EtBr
- (+) mudah, cepat
- (-) tidak sensitif, perlu spesimen >>, tidak sensitif

2. Slot Blot

- Spesifik manusia dan primata
- Gunakan probe radioaktif, modifikasi deteksi kolorimetrik
- Tidak dijual sejak 2006



METODE KUANTIFIKASI DNA

3. PicoGreen microtiter plate assay

- **PicoGreen** adalah pewarna yang berpendar saat berikatan dengan **double-stranded DNA**
- **Dapat deteksi 250pg double-stranded DNA dalam 96-well microtiter plate**
- **(+) mudah, otomatis**
- **(-) mengkuantifikasi DNA total, tidak sensitif**

4. AluQuant human DNA quantitation system

- **Memanfaatkan *Alu* repeats pada genom manusia**
- **DNA terdeteksi memanfaatkan pendaran cahaya hasil oksidasi luciferin**
- **(+) dapat deteksi 0,1 sd 50ng human DNA, sensitif, robotic**
- **(-) teknologi tertinggal**

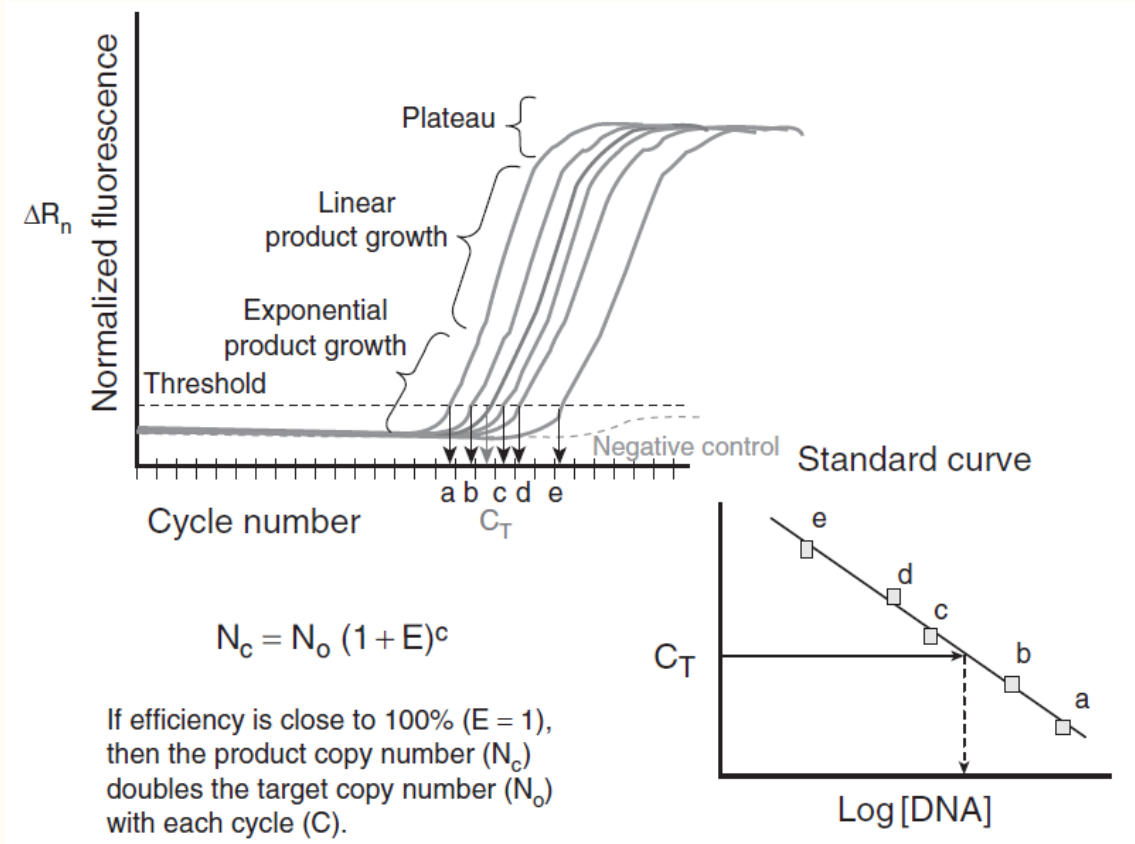
METODE KUANTIFIKASI DNA

5. End-point PCR

- **Digunakan untuk menilai seberapa potensial sampel DNA dapat teramplifikasi**
- **Metode fungsional karena dapat memonitor level inhibitor PCR**

6. Real-time quantitative PCR

- **Di ciptakan oleh Higuchi dan rekan sekira tahun 1990an**
- **Dapat mengukur kualitas dan kuantitas jumlah DNA yang dapat diamplifikasi secara Bersama tanpa buka tube PCR**
- **Menganalisa perubahan per siklus dari sinyal yang terfluoresensi dari amplifikasi sekuens target**
- **Populer menggunakan The 5' Nuclease Assay (TaqMan) atau SYBR Green**



Analisa qPCR

RT-PCR



Thank you and
have a nice weekend