

Hybridizace nukleových kyselin

1. Přenos DNA na hybridizační membránu (Southernův přenos)

Southernův přenos (Southern blotting) je široce užívaná analytická metoda původně vyvinutá Southernem (1975). Jednotlivé fragmenty DNA, obvykle vzniklé po štěpení restrikčními endonukleázami se rozdělí pomocí gelové elektroforézy a potom jsou přeneseny na inertní nosič (nitrocelulóзовou nebo nylonovou membránu).

A. Příprava gelu pro kapilární přenos

1. Agarozový gel obsahující rozdělené restrikční fragmenty DNA se po obarvení v ethidiumbromidu a vyfotografování ponoří do roztoku 0,25 M HCl (5 - 10 násobný objem) a inkubuje se za mírného třepání **15 minut** při pokojové teplotě. Dochází k depurinaci DNA a tím k fragmentaci restrikčních fragmentů na kratší úseky, které se snadněji přenáší. Tento krok může být vynechán, jsou-li přenášeny fragmenty menší než 5 kb.
2. Roztok HCl se nahradí stejným objemem denaturačního roztoku (0,4 N NaOH - 0,6 M NaCl) a gel se inkubuje **30 min** při pokojové teplotě za mírného třepání.
3. Denaturační roztok se nahradí neutralizačním roztokem (1,5 M NaCl - 0,5 M TRIS.Cl, pH 7,5), v němž se gel inkubuje dalších **30 min** za mírného třepání.

B. Příprava membrány pro přenos DNA z gelu (při práci s membránou papírem Whatman pracujeme v rukavicích)

1. Ustříháme membránu přesně o velikosti gelu, namočíme ji v deionizované vodě a poté přeneseme na 15 min do roztoku 10×SSC (1,5 M NaCl - 0,15 M Na₃Citrát).
2. Připravíme můstek (tj. 3 pruhy filtračního papíru Whatman 3) pro přenos pufru z rezervoáru na gel. Velikost můstku se řídí rozměrem gelu a použitého zařízení pro přenos. Můstek se poté podle nákresu přiloží na podpůrné sklo, na můstek se přiloží další 2 filtrační papíry Whatman a celé se namočí do roztoku 10×SSC. Do rezervoáru se naleje 1-2 l roztoku 10×SSC. Po namočení (1 min) se pipetou (válcovitým pohybem) odstraní vzduchové bubliny mezi jednotlivými vrstvami filtračního papíru.
3. Na můstek se položí gel po neutralizačním kroku a odstraní se vzduchové bubliny. Doporučuje se položit gel hladkou spodní stranou, která byla na podložce, nahoru, aby případné nerovnosti na horní straně nesnížily účinnost přenosu.
4. Okraje gelu se obloží parafilmem nebo potravinářskou polyetylenovou folií, aby se zamezilo falešnému nasávání pufru okolo gelu.
5. Na gel se přiloží membrána a popisovačem se označí polohy jamek a orientace membrány (membránu přiložit pokud možno napoprvé, po přiložení neodlepovat z gelu).
6. Na membránu se položí 2-3 vrstvy filtračního papíru Whatman o velikosti gelu a dále pak vrstva svého materiálu (např. 10 cm vysoká vrstva buničité vaty), zatíží se sklem a závažím o hmotnosti asi 1 kg.
7. Přenos probíhá 16-24 hodin; podle potřeby je možné doplňovat roztok 10×SSC v rezervoáru a měnit vrstvu buničité vaty.
8. Po ukončení přesávky odstraníme buničitou vatu a filtrační papír a membránu sejmem.
9. Membránu ponoříme na 30 sec do 0,4 M NaOH. Zajistí se tak kompletní denaturace imobilizované DNA.
10. Membránu přeneseme do neutralizačního roztoku (0,2 M Tris.Cl [pH 7,5] - 2×SSC).
11. Membránu mírně (nikoli úplně) osušíme na filtračním papíru a ozáříme 3 min na transiluminátoru (strana obsahující přenesenou DNA směřuje k UV lampám).
12. Membránu můžeme nechat uschnout nebo pokračujeme hybridizací.

Hybridizace DNA se značenou sondou

A. Neradioaktivní označení DNA digoxigeninem.

1. Stanoví se koncentrace templátové DNA, určené k přípravě sondy. Připraví se 15 μ l roztoku DNA o koncentraci 0,5 - 3 μ g/ml.
2. DNA se denaturuje 10 min při 100°C ve vodní lázni a rychle se zchladí na ledě (chladicí směs led/NaCl).
3. Připraví se směs pro značení DNA (v Eppendorfově zkumavce) na ledě se přidá:
 - 2 μ l směsi hexanukleotidů (směs náhodných oligonukleotidů - primerů)
 - 2 μ l směsi dNTP a Dig-dUTP
 - 1 μ l Klenowovy polymerázy
4. Obsah zkumavky se krátce zcentrifuguje a inkubuje přes noc při 37°C
5. Reakce se zastaví přidáním 2 μ l 0,2 M EDTA
6. Naznačená DNA se vystráží přidávkem 2,5 μ l 4M LiCl a 75 μ l 96% EtOH (vychlazený na -20°C). Dobře promíchat a ponechat 30 min při -70°C nebo 2 hod při -20°C.
7. Zcentrifugovat 15 min při 12 000 g, promýt 70% EtOH, osušit 96% EtOH, rozpustit v 50 μ l TE pufru.
8. Uchovávat při -20°C.

B. Hybridizace

(Uvedené objemy roztoků jsou vypočteny na 100 cm³ membrány).

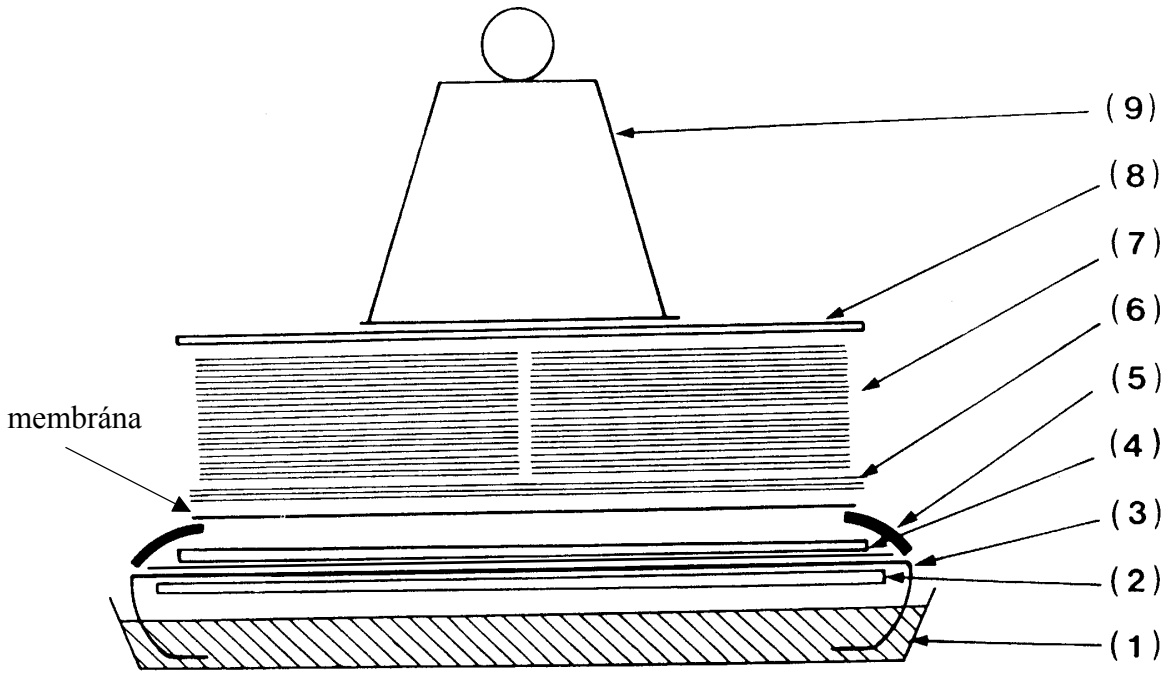
1. Membrána se prehybridizuje ve 20 ml hybridizačního roztoku při 68°C nejméně 1 hod. (vysycení míst na membráně, na něž není navázána DNA).
2. Hybridizace při 68°C v 10 ml hybridizačního roztoku s přidávkem sondy (10-100 ng DNA/ml roztoku).
3. Promytí membrány (odstranění nespecificky navázané sondy)
 - 2 x 5 minut při pokojové teplotě (asi 100 ml roztoku 2xSSC - 0,1% SDS)
 - 2 x 15 minut při 68°C (asi 100 ml roztoku 0,1xSSC - 0,1% SDS)

C. Imunologická detekce navázané sondy

(Všechny reakce se provádějí při pokojové teplotě)

1. Membrána se promyje 1 min promývacím roztokem (0,1 M Kys. maleionová - 0,15 M NaCl - 0,3% Tween 20, pH 7.5)
2. Membrána se inkubuje 30 minut v blokovacím roztoku (0,1 M Kys. maleionová - 0,15 M NaCl - 1% blokovací reagens)
3. Anti-Dig konjugát (zásobní koncentrace 750 U/ml) se rozpustí v blokovacím roztoku (objem podle velikosti membrány) do konečné koncentrace 150 mU/ml. Membrána se v tomto roztoku inkubuje 30 min.
4. Membrána se promyje promývacím roztokem 2 x 15 minut a poté se přenesení na 2 minuty do detekčního roztoku (100 mM TRIS.Cl - 100 mM NaCl - 50 mM MgCl₂).
5. Barevná reakce: Membrána se umístí do polyetylenového sáčku nebo do vhodné vany. Přidá se 5 ml detekčního roztoku obsahujícího 22,5 μ l NBT a 17,5 μ l X-fosfátu a sáček se ponechá bez třepání ve tmě. K barevné reakci dochází během 30 minut (lze ponechat 12 hod).
6. Reakce se zastaví ponořením membrány do TE pufru (membránu udržujeme vlhkou pro případnou rehybridizaci).
7. Membrána se vyfotografuje a vyhodnotí.

Aparatura pro Southernův přenos: (1) miska s 10×SSC, (2) skleněná podložka, (3) "můstek" ze 3+2 listů papíru Whatman 3 MM (3 listy jsou namočené do rezervoáru, 2 listy jsou pouze na horní ploše), (4) gel, (5) rámeček z Parafilmu, (6) 3 listy papíru Whatman 3 MM, (7) buničitá vata, (8) sklo, (9) závaží 1 kg.



Princip značení sondy digoxigeninem a kolorimetrické detekce

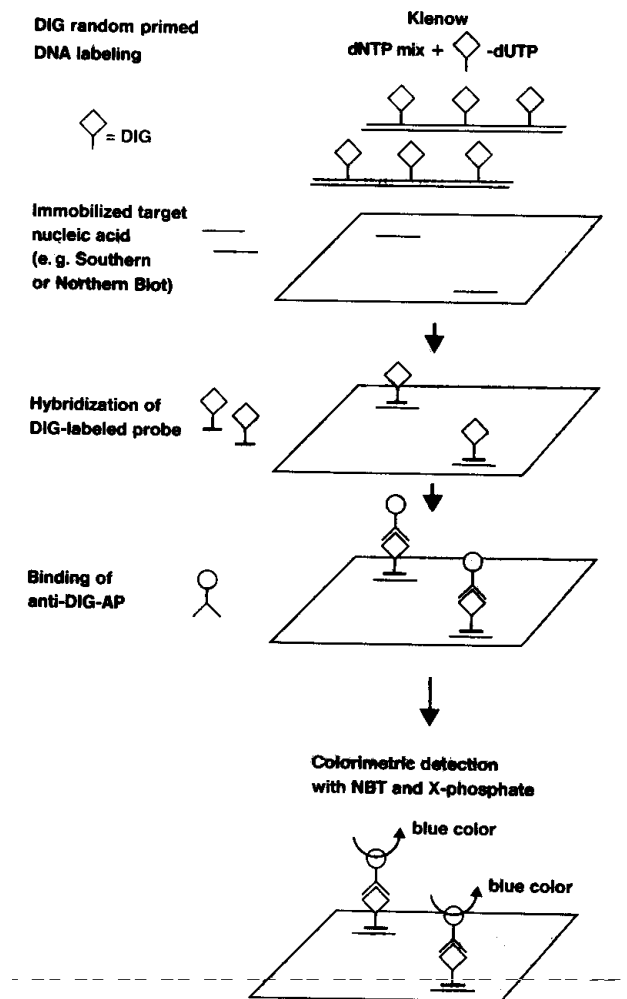
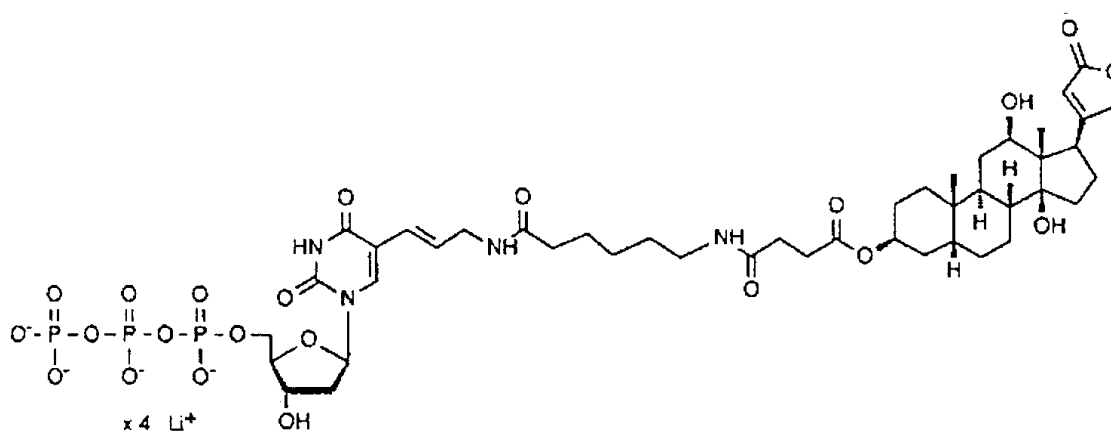


Diagram jednotlivých reakčních kroků při hybridizaci DNA se sondou značenou digoxigeninem

Reakce	Teplota	Čas	Reagent
Prehybridizace	68° C	1 - 6 hod	hybridizační pufr
Hybridizace	68° C	8 - 16 hod	hybridizační pufr + sonda
Post-hybridizační promytí	20° C	2× 5 min	2×SSC - 0,1% SDS
Post-hybridizační promytí	68° C	2× 15 min	0,1×SSC - 0,1% SDS
ekvilibrace membrány	20° C	2 min	pufr B1
blocking	20° C	30 min	pufr B2
navázání protilátky	20° C	30 min	150 mU anti-DIG AP v B2
promytí	20° C	2 × 15 min	pufr B1 + 0,3% Tween 20
ekvilibrace	20° C	2 min	pufr B3
barevná reakce	20° C	5 min - přes noc	barvicí roztok
zastavení reakce	20° C	5 min	TE pufr
fotografování			
odstranění navázané sondy a rehybridizace			
odbarvení	50 - 60° C	2× 1 - 2 hod	dimethylformamid
promytí	20° C	2 min	redes. voda
odstranění sondy (denaturace)	37° C	2× 20 min	0,2M NaOH - 0,1% SDS
neutralizace	20° C	2 min	2×SSC
prehybridizace a hybridizace s další sondou			



Molekula DIG-dUTP