

## COLONY BLOT HYBRIDIZACE

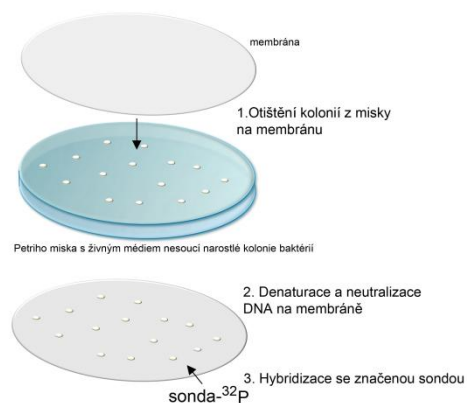
Colony blot hybridizace slouží k detekci dané sekvence DNA v jednotlivých koloniích bakterií.

Technika se sestává z těchto kroků:

- přenesení a imobilizace vzorků kolonií na membránu
- příprava vzorků na hybridizaci
- hybridizace a posthybridizační promývání
- detekce

### IMOBILIZACE VZORKŮ NA MEMBRÁNĚ

Nechejte narůst bakterie na Petriho misce s živným médiem do počtu 50-100 kolonií na misku a velikosti kolonií 0,5-1 mm v průměru. Vystříhnete nylonovou membránu do velikosti Petriho misky a opatrně ji přitlačte na misku s testovanými koloniemi. Pro určení orientace, sterilním špendlíkem propíchněte membránu a živné médium na třech místech. Sejměte membránu a vzorky nahoru ji postupně pokládejte na filtrační papíry nasáknuté v daných roztocích a nechte inkubovat dle tabulky:



Roztok	Doba inkubace
1. 10% SDS	3 min
2. 0,5N NaOH, 1,5 M NaCl	5 min
3. 0.5M Tris-Cl, 1.5M NaCl pH 7.4	5 min
4. 2X SSC	5 min

**I** S membránou manipulujeme zásadně v rukavicích. Nejlépe membránu držíme za její okraje pinzetou.

Membránu položíme na suchý filtrační papír, necháme sušit 30 minut. Poté vzorky na membráně fixujeme pomocí UV buď přímo v UV crosslinkeru, nebo 3 min na transiluminátoru, alternativně 30 - 60 min při 120 °C.

**TIP** Membrána je v tomto kroku připravena pro hybridizaci, alternativně může být zabalena do plastové fólie a uchována v +4 °C pro pozdější použití.

# PROTOKOL

## HYBRIDIZACE

- Suchou nylonovou membránu navlhčíme ponořením do dH<sub>2</sub>O. Přeneseme membránu do 0,1X SSC/0,5% SDS. Inkubujeme při 65 °C 1 hodinu.
- Membránu vložíme do prehybridizačního roztoku předehřátého na 65 °C. Na každý 1cm<sup>2</sup> membrány použijeme alespoň 100 µl prehybridizačního roztoku. Inkubujeme za stálého promíchávání při 65 °C 2 hodiny.

**TIP** Prehybridizace a hybridizace mohou být prováděny v hybridizačních válcích nebo vhodných plastových nádobách nebo také igelitových pytlících, jejichž okraje jsou utěsněny zavařením nebo zalepením (využití igelitových pytlíků je výhodné, pokud prehybridizujeme/hybridizujeme v malých objemech roztoků).

### Prehybridizační roztok\*

Komponenta	Množství na 100 ml
6X SSC	30 ml (20X SSC)
10X Denhardtův roztok	10 ml (100X)
1% SDS	10 ml (10%)
H <sub>2</sub> O	47,5 ml
250 µg/ml denaturované DNA lososích spermií**	2,5 ml (10 mg/ml)

\* skladováno v alikvotech v -20°C, před použitím přidejte denaturovanou DNA lososích spermií a temperujte na 65 °C.

\*\* do roztoku se přidává až před použitím. Před přidáním se DNA lososích spermií denaturuje zahřátím na 95 °C 5 min a poté prudkým zchlazením uložením na led na min. 1 min.

- Prehybridizační roztok vyměníme za hybridizační roztok, který jsme předem vytemperovali na 65 °C a přidali jsme denaturovanou sondu. Množství přidávané sondy se odvíjí od způsobu značení. Pokud je sonda značená <sup>32</sup>P, obvykle přidáváme tolik sondy, aby výsledná koncentrace byla 2 x 10<sup>6</sup> cpm/ml (může být v rozmezí od 0,5 x 10<sup>6</sup> až 3 x 10<sup>6</sup> cpm/ml). Pokud je sonda značena neradioaktivně, řídíme se doporučením výrobce značícího systému.

Hybridizaci provádějte 12 - 16 hod při teplotě:

- u většiny dlouhých sond (>100 bazí) 65 - 68 °C
- u krátkých/oligo sond (< 50 b) je hybridizační teplota o 5 °C nižší než je teplota T<sub>m</sub>.

Teplota T<sub>m</sub> = 4x počet GC párů + 2x počet AT párů

## PROTOKOL

Hybridizační roztok\*

Komponenta	Množství na 100 ml
6X SSC	30 ml (20X SSC)
5 % dextran sulfát	5 g
1 % SDS	10 ml (10%)
H <sub>2</sub> O	doplňte do finálního objemu 97,5 ml
250 µg/ml denaturované DNA lososích spermíí**	2,5 ml (10 mg/ml)

\* skladováno v alikvotech v -20 °C, před použitím přidejte denaturovanou DNA lososích spermíí a temperujte na 65 °C.

\*\* do roztoku se přidává až před použitím. Před přidáním se DNA lososích spermíí denaturuje zahřátím na 95 °C 5 min a poté prudkým zchlazením uložením na led na min. 1 min.

### POSTHYBRIDIZAČNÍ PROMÝVÁNÍ A DETEKCE

Membrána je promývána nízko-stringentními podmínkami, pokud očekáváme, že sonda není úplně identická s cílovou sekvencí. V opačném případě používáme vysoce-stringentní podmínky.

#### Při vysoce-stringentních podmínkách:

Promyjeme membránu v promývacím roztoku I (2X SSC/0,1% SDS), při pokojové teplotě 5 min, za konstantního promíchávání.

Promývací roztok I nahradíme promývacím roztokem II (0,1x SSC/0,1% SDS). Promýváme při 65 °C 10 min. Tento promývací krok 1-2x opakujeme.

#### Při nízko-stringentních podmínkách:

Pro promývání s nízko-stringentními podmínkami se využívá pouze 2x SSC/0,1% SDS, teplota je určena empiricky, kdy jako nejnižší je použita 37 °C.

Provedte detekci sondy buď autoradiograficky v případě radioaktivně značené sondy, nebo jiným systémem dle způsobu značení sondy.

### ODSTRANĚNÍ SONDY NAVÁZANÉ NA MEMBRÁNĚ PRO OPĚTOVNÉ POUŽITÍ MEMBRÁNY

Nylonové membrány mohou být použity 10-30x. Suchá membrána může být uskladněna při pokojové teplotě.

- Vložte membránu do roztoku 0,2 M NaOH a za konstantního promíchávání inkubujte 10 min. Použijte cca 1-2 ml NaOH na každý 1cm<sup>2</sup>. Odstraňte NaOH.

- Promyjte membránu 3x v 0,1 SSC/0,1% SDS/50 mM Tris-HCl (pH 7,5) po 5 min. Použijte cca 1-2 ml roztoku na každý 1cm<sup>2</sup>. Monitorujte pH promývacího roztoku pomocí pH papírku. Pokud roztok není neutrální, opakujte promývací kroky.

## PROTOKOL

### ALTERNATIVNÍ PREHYBRIDIZAČNÍ A HYBRIDIZAČNÍ ROZTOKY

Alternativně mohou být pro prehybridizaci a hybridizaci použity roztoky s přidavkem formamidu, který snižuje teplotu tání DNA. Tímto může být hybridizace prováděna při 42 °C.

Prehybridizační roztok s formamidem\*

Komponenta	Množství na 100 ml
<b>50% deionizovaný formamid</b>	50 ml
<b>5X SSC</b>	25 ml (20X)
<b>10X Denhardtův roztok</b>	10 ml (100X)
<b>50 mM fosfát sodný</b>	5 ml (1M, pH 6,7)
<b>2,5 % dextran sulfát</b>	5 ml (50%)
<b>0,5 mg/ml denaturované DNA lososích spermií**</b>	5 ml (10mg/ml)

\* skladováno ve 4 °C, délka skladovatelnosti max. 4 měsíce, před použitím přidejte denaturovanou DNA lososích spermií a temperujte na 65 °C.

\*\* do roztoku se přidává až před použitím. Před přidáním se DNA lososích spermií denaturuje zahřátím na 95 °C 5 min a poté prudkým zchlazením uložením na led na min. 1 min.

Hybridizační roztok s formamidem\*

Komponenta	Množství na 100 ml
<b>50% deionizovaný formamid</b>	50 ml
<b>5X SSC</b>	25 ml (20X)
<b>1X Denhardtův roztok</b>	1 ml (100X)
<b>20 mM fosfát sodný</b>	2 ml (1M, pH 6,7)
<b>10 % dextran sulfát</b>	20 ml (50 %)
<b>voda</b>	1 ml
<b>100 µg/ml denaturované DNA lososích spermií**</b>	1 ml (10 mg/ml)

\* skladováno ve 4 °C, délka skladovatelnosti max. 4 měsíce, před použitím přidejte denaturovanou DNA lososích spermií a temperujte na 65 °C.

\*\* do roztoku se přidává až před použitím. Před přidáním se DNA lososích spermií denaturuje zahřátím na 95 °C 5 min a poté prudkým zchlazením uložením na led na min. 1 min.

#### Příprava 1M fosfátu sodného (pH 6,7)

Rozpustíme 14,196 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  v 80 ml purifikované vody. Upravíme pH na 6,7 pomocí kyseliny fosforečné a doplníme do 100 ml.