

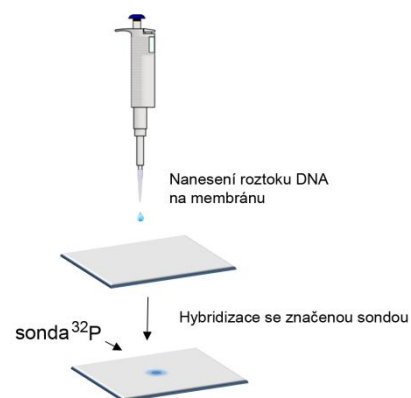
Dot Slot/Blot hybridizace

Při Dot Slot/Blot hybridizaci se DNA obvykle nakape pipetou na membránu, kde se imobilizuje UV či teplem a standardně se provádí hybridizace a detekce.

Imobilizace vzorků na membráně

Vzorky DNA jsou nejprve pro získání jednovláknových molekul denaturovány, a to zahřátím na 100 °C, po dobu 5 min a následně rychlým zchlazením přenesením na led, kde jsou vzorky inkubovány alespoň 3 min.

Denaturovaná DNA je pipetou v kapkách o 1-2 µl nanesena na membránu. Vzorky na membráně fixujeme pomocí UV buď přímo v UV crosslinkeru nebo 3 min na transiluminátoru, alternativně 30-60 min při 120°C.



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

Hybridizace

- Suchou nylonovou membránu navlhčíme ponořením do vody. 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 1cm² membrány použijeme alespoň 100 µl prehybridizačního roztoku. Inkubujeme za stálého promíchávání při 65 °C 2 hodiny.



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 ₂ O	47,5 ml
250 µg/ml denaturované DNA lososích spermíi**	2,5 ml (10 mg/ml)

PROTOKOL

* 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 ³²P, obvykle přidáváme tolik sondy, aby výsledná koncentrace byla 2×10^6 cpm/ml (může být v rozmezí od $0,5 \times 10^6$ až 3×10^6 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_m.

Teplota T_m = 4x počet GC párů + 2x počet AT párů

Hybridizační roztok*

Komponenta	Množství na 100 ml
6X SSC	30 ml (20X SSC)
5 % dextran sulfát	5 g
1 % SDS	10 ml (10%)
H ₂ O	doplňte do finálního objemu 97,5 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.

Posthybridizační promývání

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.

PROTOKOL

Detekce signálu. Detekce sondy se provádí 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 1cm². 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 1cm². Monitorujte pH promývacího roztoku pomocí pH papírku. Pokud roztok není neutrální, opakujte promývací kroky.

Alternativní prehybridizační a hybridizační roztoky

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

Prehybridizační roztok s formamidem*

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

Rozpustíme 14,196 g Na₂HPO₄ v 80 ml vody. Upravíme pH na 6,7 pomocí kyseliny fosforečné a doplníme do 100 ml.