

## NORTHERNOVA HYBRIDIZACE

Vzhledem k tomu, že se při Northern hybridizaci pracuje s RNA a RNA je extrémně citlivá na působení RNáz, je zapotřebí se vyvarovat jakékoliv kontaminace RNázami. Pro snížení rizika kontaminace RNázami všechny roztoky, které jsou použity pro Northernovu hybridizaci, musí být ošetřeny dietylpyrokarbonátem (DEPC), který RNázy inaktivuje. Pokud se vyskytne kontaminace RNázami v průběhu experimentu, buď ve formě používaných roztoků, či přítomnosti RNáz přímo ve vzorku, zvyšuje se nebezpečí degradace vzorku RNA.

!

---

### INAKTIVACE RIBONUKLEÁZ POMOCÍ DEPC

DEPC (dietylpyrokarbonát) je používán k inaktivaci RNáz, a to prostřednictvím modifikací, které se u těchto enzymů vytváří působením DEPC na histidinu, lysinu, cysteinu a tyrosinu. Pro inaktivaci RNáz se využívá 0,1% DEPC (v/v).

Ve vodných roztocích DEPC rychle hydrolyzuje na CO<sub>2</sub> a etanol. Poločas rozpadu DEPC je ve fosfátovém pufru při pH 6 asi 20 min. Tato hydrolyza je zesilovaná roztokem Tris a dalších aminů, proto působení DEPC není doporučované za přítomnosti těchto látek. DEPC, který je uchovávan bez přítomnosti nukleofilních látek (např. H<sub>2</sub>O nebo etanol), je perfektně stabilní, nicméně přítomnost i malého množství těchto látek vede k rychlému rozpadu DEPC. Proto je třeba DEPC chránit před vlhkostí. Uchovávejte DEPC v malých alikvotech a suchu. Před otevřením nechte vždy nádobu s DEPC vytemperovat na teplotu prostředí.

!

### Ošetření roztoků 0,1% DEPC:

1 ml DEPC přidejte k 1 litru roztoku, nechte působit alespoň 1 hodinu při 37 °C a poté DEPC inaktivujte autoklávováním. Při autoklávování se DEPC rozkládá na etanol a CO<sub>2</sub>. Pokud v roztoku zůstanou zbytky DEPC, může dojít k některým modifikacím RNA a inaktivaci některých biochemických reakcí.

---

### PŘÍPRAVA ELEKTROFRETICKÉ SEPARACE VZORKŮ RNA

Prvním krokem je elektroforetická separace vzorků v agarosovém gelu. Co se týče rizika degradace vzorků přítomnými ribonukleázami, je to nejkritičtější fáze celé metody. RNázy mohou být přítomné nejen v používaných roztocích, ale také elektroforetické aparatuře. Z tohoto důvodu je velmi doporučované používání jen elektroforetické aparatury s „RNA statusem“, tj. aparatury, která slouží výhradně jen pro separaci vzorků RNA, stejně tak používání roztoků vyhrazených jen k tomuto účelu.

## PROTOKOL

**Příprava elektroforetické aparatury:** Umyjte elektroforetickou vanu, vaničku a hřeben roztokem saponátu, opláchněte vodou, poté etanolem a vysušte. Poté ponořte do roztoku 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a nechte působit 10 min. Důkladně opláchněte v DEPC-H<sub>2</sub>O.

### **Příprava denaturačního gelu s 2,2 M formaldehydem:**

RNA je ve formě jednořetězcových molekul, které tak hybridizují samy se sebou a vytváří tak více či méně složité sekundární struktury. Vzhledem k tomu, že tyto struktury mohou ovlivnit elektroforetickou separaci, je třeba molekuly RNA denaturovat. Denaturace se provádí v průběhu elektroforézy, a to prostřednictvím dodaného formaldehydu.

### Příprava 100 ml agarosového gelu s 2,2 M formaldehydem:

- přidejte 1,5 g agarosu do 72 ml sterilní DEPC-vody a rozpustíte v mikrovlnné troubě,
- nechejte ochladit na 55 °C,
- v digestoři přidejte 10 ml 10X MOPS elektroforetického pufru a 18 ml formaldehydu. Promíchejte a nalijte do připravené elektroforetické vaničky.

1,5% agarosový gel je vhodný pro separaci RNA o velikosti 0,5 - 8 kb. Větší RNA by měla být separovaná v agarosovém gelu o koncentraci 1 - 1,2%.

### Příprava 10X MOPS elektroforetického pufru:

- rozpustíte 41,8 g MOPS v 700 ml sterilní DEPC vody,
- upravte pH na 7,0 pomocí 2 M NaOH,
- přidejte 50 ml 1 M octanu sodného (s působením DEPC) a 40 ml 0,5 M EDTA (s působením DEPC).
- doplňte objem roztoku na 1 litr pomocí DEPC-H<sub>2</sub>O. Sterilizujte roztok pomocí filtrace přes 0,45 µm Milipore filtry a uchovávejte při pokojové teplotě chráněné před světlem. Pokud roztok časem změní barvu na tmavší než je slámově žlutá, nelze použít.

---

## **VZORKY RNA A RNA VELIKOSTNÍ MARKER**

Množství celkové RNA, které je nanášeno na jednu jamku by obvykle mělo být do 20 µg v objemu 1 - 2 µl. Nanesení většího množství RNA do jamky vede k vytvoření šmouhy na gelu místo ostrého proužku, stejně tak jako v přítomnosti soli či SDS. Pro správné odhadnutí velikosti separované RNA, je třeba nanést i RNA velikostní marker. Molekuly DNA a RNA, ač stejné velikosti, neběží při ELFO stejně. Vzorky RNA jsou smíchány s denaturační směsí. S denaturační směsí je smíchán i velikostní marker.

## PROTOKOL

Denaturační směs	
RNA (do 20 µg)	2 µl
10x MOPS elektroforetický pufr	2 µl
Formaldehyd	4 µl
Formamid	10 µl
Voda	Doplňte do 20 µl

Inkubujte vzorky 60 min při 55 °C. Zchladte vzorky 10 min na ledu a krátce zcentrifugujte.

Ke každému vzorku přidejte 2 µl 10X nanášecího pufru a uložte na led.

10X nanášecí pufr (10ml)	
50 % glycerol	5 ml
10 mM EDTA	200 µl 0,5 M EDTA , pH 8, připravená z DEPC-H <sub>2</sub> O
0,25% (w/v) bromfenolová modř	0,025 g
DEPC-H <sub>2</sub> O	doplňte na finální objem 10 ml

---

### ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE RNA

Připravte elektroforézu, vložte připravený gel a zalijte dostatečným množstvím 1X MOPS elektroforetickým pufr. Nechte elektroforézu běžet nejprve bez vzorků na prázdko, a to 5 min při 5 V/cm. Poté naneste vzorky a zapněte elektroforézu. V průběhu elektroforézy několikrát (např. každou hodinu) promíchejte elektroforetický pufr, eventuálně pro promíchávání pufru použijte elektroforetickou vanu s peristaltickou pumpou.

Po ukončení elektroforézy promývejte gel nejprve ve vodě po dobu 15 min, poté 2x 15 min v 10X SSC.

---

### PŘENOS RNA NA MEMBRÁNU

Přenos RNA z gelu na hybridizační membránu je v podstatě identický tomu, jakým je přenos DNA na membránu při Southernově hybridizaci. Existují dva hlavní způsoby přenosu nukleových kyselin z gelu na membránu, je to jednak pomocí osmózy a jednak elektropřenos. My uvádíme ten klasičtější, což je přenos osmózou.

- Připravíme si přenosový můstek. Jako můstek nám může posloužit elektroforetická vanička otočená dnem vzhůru nebo krabička od špiček otočená dnem vzhůru. Můstek položíme na dno vaničky. Velikost vaničky, tj. její plocha, by měla být alespoň o 1/3 větší než je plocha gelu.

## PROTOKOL

- Na můstek položíme předvlhčený (20x SSC) filtrační papír tak, aby jeho okraje dosahovaly na dno vaničky. Dbáme, aby pod filtračním papírem nebyly bubliny, pokud tam bubliny jsou, tak je vytlačíme. (např. vyhlazením skleněnou tyčinkou).
- Na můstek s filtračním papírem položíme gel, a to jeho spodní stranou nahoru (jamky dnem nahoru). Opět odstraníme veškeré bubliny, které se pod gelem případně vytvořily. Pro budoucí orientaci, jeden roh gelu odřízneme. Povrch gelu lehce zalijeme 20x SSC.
- Připravíme si nylonovou membránu tak, aby měla velikost gelu a jeden z jejích rohů byl ustřižen. Membránu předvlhčíme a položíme na gel tak, aby se ustřižený roh membrány překrýval s uříznutým rohem gelu. Opět odstraníme bubliny.



Případné bublinky by vadily vzorkům v přenosu na membránu.

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

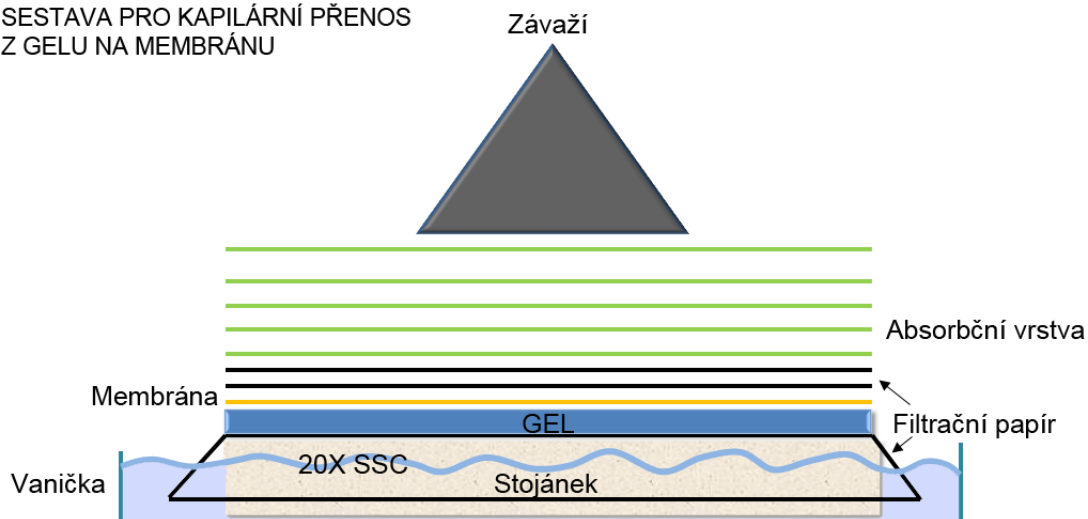
- Na membránu položíme dva kusy filtračního papíru o stejném rozměru, jako má gel. Filtrační papír předem předvlhčíme v 20x SSC. Odstraníme veškeré bubliny.
- Poté položíme absorbentní vrstvu, např. 6 – 10 cm vrstvu buničiny o rozměrech gelu.
- Absorbentní vrstvu zatížíme deskou (z libovolného materiálu) a závažím o cca 0,5 kg (může posloužit 0,5 l lahev se šroubovacím víčkem, která je naplněná 0,5 l vody).
- Do spodní misky nalijeme 20x SSC tak, aby hladina byla pod horním okrajem můstku. Necháme vzlínat 6-12 hodin.



Proti případnému vzlínání pufry okolo gelu izolujeme vrchní stranu přesahů filtračního papíru, který leží na můstku, pomocí pásků alobalu.

## PROTOKOL

SESTAVA PRO KAPILÁRNÍ PŘENOS  
Z GELU NA MEMBRÁNU



### PROMYTÍ MEMBRÁNY A IREVERZIBILNÍ IMOBILIZACE RNA NA MEMBRÁNĚ

V této fázi máme membránu s navázanými vzorky RNA. Vazba RNA na membránu je pouze na základě slabých iontových interakcí. Proto membránu s RNA exponujeme UV záření, které mezi RNA a membránou vytvoří pevné kovalentní vazby. Postupujeme takto:

- Rozebereme přenosovou sestavu
- Překlopíme membránu s gelem na suchý filtrační papír (gelem nahoru). Abychom získali orientaci o horní/spodní straně membrány a poloze vzorků, měkkou tužkou propíšeme jamky v gelu na membránu.
- Membránu proplachujeme 5 min v 6x SSC.
- Membránu položíme na suchý filtrační papír, necháme osušit a 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 ve +4 °C pro pozdější použití.

### PREHYBRIDIZACE A HYBRIDIZACE

V tomto kroku je membrána s testovanými vzorky nejprve inkubována v prehybridizačním roztoku, čímž se sníží pozdější nespecifické nasedání sondy, a poté se membrána inkubuje v hybridizačním roztoku obsahujícím značenou sondu. V průběhu hybridizace se sonda naváže na komplementární sekvenci vzorku. Postupujeme takto:

- Inkubujte membránu 2 hod při 68 °C v 10 - 20 ml prehybridizačního roztoku.

## PROTOKOL

- Inkubujte membránu v hybridizačním roztoku s přidanou sondou. Pokud je sonda dvouřetězcová, je třeba ji předem denaturovat, a to zahřátím na 100 °C po dobu 5 min a následným rychlým zchlazením, a to uložením na led minimálně na 3 min.

Prehybridizační/hybridizační roztok	
0,5 M pufru fosfátu sodného (pH 7,2)*	134 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 4 ml 85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
7 % SDS (w/v)	70 g
1 mM EDTA (pH 7)	200 µl 0,5 M EDTA (pH 7), v DEPC
DEPC-H <sub>2</sub> O	doplnit do 1 litru

Příprava 0,5 M pufru fosfátu sodného: 134 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O rozmícháme v DEPC-dH<sub>2</sub>O. Objem vody by měl být takový, aby po přidání dalších komponent vznikl roztok o 1l. Přidáme 4 ml 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

- 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>. Přičemž  
$$T_m = 4x \text{ počet GC párů} + 2x \text{ počet AT párů}$$

Pro detekování malého množství mRNA použijte alespoň 0,1 µg sondy, jejíž aktivita přesahuje 2 x 10<sup>8</sup> cpm/µg.

Pro detekování sondy, která není plně homologní s cílovým úsekem, používáme nízko-stringentní podmínky, tj. hybridizace je prováděna při 37 - 42 °C v hybridizačním pufru obsahujícím 50% deionizovaný formamid, 0,25 M fosfát sodný (pH 7,2), 0,25 M NaCl a 7% SDS.

---

### POSTHYBRIDIZAČNÍ PROMÝVÁNÍ

Z membrány se při tomto promývání odmyvá nespecificky navázaná sonda (tzn. molekuly sondy navázané jinde než k cílové sekvenci).

Membránu promývejte v:

- 100 - 200 ml 1X SSC, 0,1% SDS při pokojové teplotě 10 min
- 100 - 200 ml roztoku 0,5x SSC, 0,1% SDS, předehřátého na 68 °C. Promývejte při 68 °C po dobu 10 min. Tento promývací krok opakujte 2x.

## PROTOKOL

**DETEKCE SONDY.** Způsob detekce sondy se provádí v závislosti na typu značení sondy, a to buď autoradiograficky v případě radioaktivně značené sondy, nebo jiným systémem dle způsobu značení sondy.

---

### **ODSTRANĚNÍ SONDY Z MEMBRÁNY**

Odstranění sondy z membrány se provádí pro opětovné použití membrány pro hybridizaci. Nylonové membrány mohou být použity 10 - 30x. Suchá membrána může být uskladněna při pokojové teplotě.

Pro odstranění navázané sondy z membrány pro opětovné použití membrány lze využít inkubaci membrány po 1 - 2 hod ve velkém objemu buď roztoku 10 mM Tris-Cl (pH 7,4) a 0,2% SDS předeřátého na 70 – 75 °C, nebo roztoku 50% deionizovaného formamidu, 0,1x SSC, 0,1% SDS předeřátého na 68 °C.