

## SOUTHERNOVA HYBRIDIZACE

Existuje celá řada protokolů pro Southernovu hybridizaci. Tyto protokoly se do značné míry totožné co se týče úvodních fází, jako je příprava vzorků elektroforetickou separací, jejich denaturace, přenos a imobilizace na membránu. Protokoly se rozcházejí až co se týče konkrétních podmínek hybridizace, jako je složení hybridizačního roztoku či podmínek posthybridizačního promývání. Tyto rozdíly v protokolech nejsou ve výsledném efektu obvykle nijak dramatické, nehledě na to, že to zásadní ve všech protokolech zůstává vždy stejné. Samozřejmě existují odlišnosti, které bychom ve vlastních experimentech měli respektovat, jako je např. teplota hybridizace v závislosti na délce použité sondy či je způsob značení sondy, který vede k odlišnému postupu při závěrečné detekci sondy.

---

### ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE VZORKŮ A JEJICH PŘÍPRAVA

- **ELFO:** DNA testovaných vzorků společně se značeným velikostním markerem je separovaná standardně použitím agarosové elektroforézy.

- **Depurinace DNA pro fragmentaci příliš dlouhých fragmentů:** gel je ponořen do 0,25 M HCl na 10 min. Pokud je v nanášecím roztoku při ELFO použita bromfenolová modř, při depurinačním kroku by se měla modrá barva bromfenolové modři změnit na žluto-zelenou. Gel je poté opláchnut v destilované vodě.

Krok depurinace umožní fragmentaci dlouhých úseků DNA na menší a usnadní tak lepší přenos fragmentů na membránu.

- **Denaturace:** Gel je ponořen do denaturačního roztoku (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) na 2x 15 min, poté je gel opláchnut v destilované vodě.

Při denaturačním kroku dochází k rozpadu dvouřetězcových molekul DNA na jednořetězcové.

- **Neutralizace:** Gel je ponořen do neutralizačního roztoku (0,5 M Tris-HCl, 3 M NaCl, pH 7,5) na 2x 15 min.

---

### PŘENOS DNA NA MEMBRÁNU

Existují dva hlavní způsoby přenosu DNA 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.

- 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).

## PROTOKOL

- 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.

**I** 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.

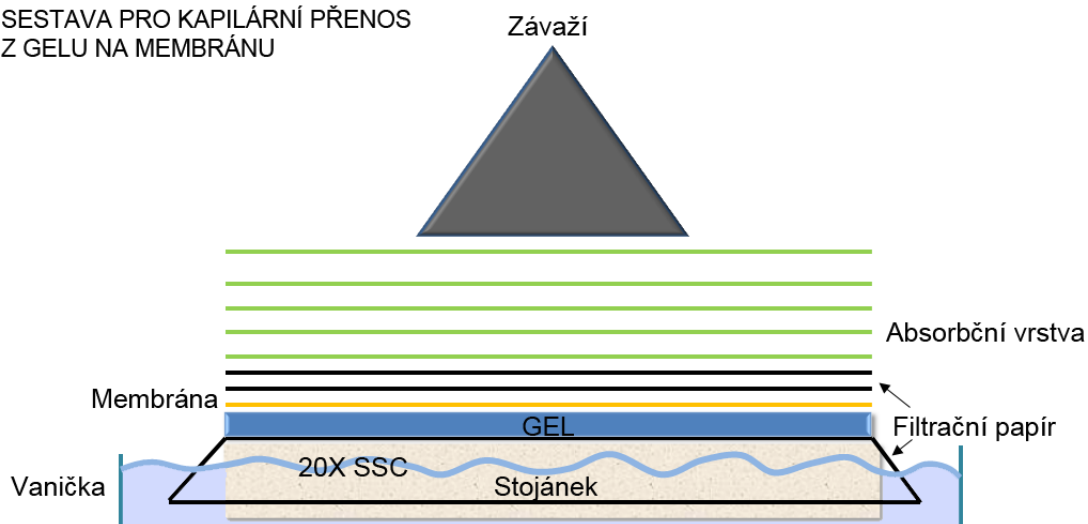
- Poté položíme absorbentní vrstvu, např. 6 – 10 cm vrstvu buničiny o rozměrech gelu.

- 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.

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

### SESTAVA PRO KAPILÁRNÍ PŘENOS Z GELU NA MEMBRÁNU



### PROMYTÍ MEMBRÁNY A IREVERZIBILNÍ IMOBILIZACE DNA NA MEMBRÁNĚ

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

- Rozebereme přenosovou sestavu

## PROTOKOL

- 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.

### 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:

- Suchou nylonovou membránu navlhčíme ponořením do vody. Přeneseme membránu do 0,1X SSC/0,5% SDS. Inkubujeme při 65 °C 1 hod.
- 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
<b>6X SSC</b>	30 ml (20X SSC)
<b>10X Denhardtův roztok</b>	10 ml (100X)
<b>1% SDS</b>	10 ml (10%)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	47,5 ml
<b>250 µg/ml denaturované DNA lososích spermií**</b>	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.

## PROTOKOL

- Prehybridizační roztok vyměníme za hybridizační roztok, který jsme předem vytemperovali na 65 °C a přidali jsme denaturovanou sonda. 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 tání (T<sub>m</sub>). Přičemž

$$T_m = 4x \text{ počet GC párů} + 2x \text{ počet AT párů}$$

Hybridizační roztok\*

Komponenta	Množství na 100 ml
6X SSC	30 ml (20X SSC)
5 % dextran sulfát	5 g
1 % SDS	10 ml (10%)
H <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

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

- 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.

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

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 (1 M, pH 6,7)
10 % dextran sulfát	20 ml (50 %)
voda	1 ml
100 µg/ml denaturované DNA lososích spermií**	1 ml (10 mg/ml)

## PROTOKOL

\* skladováno ve 4 °C, délka skladovatelnosti je 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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  v 80 ml vody. Upravíme pH na 6,7 pomocí kyseliny fosforečné a doplníme do 100 ml.