

Hybrydyzacja typu northern

Piotr Koźbiał

Październik 1999

Streszczenie

Hybrydyzacja northern jest standardową techniką stosowaną do identyfikacji oraz określania wielkości analizowanych transkryptów RNA. Najistotniejsze różnice odróżniające northern od Southern to elektroforeza w warunkach denaturujących strukturę drugorzędową RNA, brak etapu denaturacji RNA za pomocą NaOH¹ oraz powszechne stosowanie formamidu w buforach do hybrydyzacji.

Część I

Teoria

Metody takie jak Southern i northern oparte są na zdolności sondy do wybiórczego wiązania się z sekwencjami do niej komplementarnymi. Hybrydyzacja pozwala specyficznie wykrywać interesujące nas sekwencje mimo obecności dużej ilości innych (nie komplementarnych) molekuł. Komplementarność w tym przypadku rozumiemy jako zależne od sekwencji rozpoznawanie się molekuł (ang. "molecular recognition") i ich wzajemne wiązanie. Na przykład dwie nici dwuniciowego DNA wiążą się ze sobą ponieważ mają komplementarne sekwencje. Dzięki wiązaniu sondy z komplementarną do niej sekwencją powstają kompleksy "sonda-sekwencja komplementarna". Te kompleksy można wykrywać dzięki temu, że sonda jest wyznakowana (radioaktywnie lub chemicznie).

W roztworze występują następujące kompleksy różnych molekuł zwane dalej hybrydami:

1. DNA-DNA. Jednociowe DNA (ssDNA) może dzięki parowaniu zasad tworzyć dwuniciowe hybrydy w których ssDNA sondy wiąże się

do komplementarnego ssDNA analizowanej sekwencji.

2. DNA-RNA. Sonda którą jest ssDNA może tworzyć dwuniciowe hybrydy z komplementarną cząsteczką RNA (RNA jest z reguły jednociowe).
3. RNA-RNA

Dwie ważne właściwości hybrydyzacji to:

1. Reakcja hybrydyzacji jest specyficzna - sonda wiąże się tylko do sekwencji komplementarnej.
2. Hybrydyzacja jest wybiórcza - czyli zachodzi pomiędzy komplementarnymi molekułami RNA mimo obecności dużej ilości niekomplementarnych molekuł. Tak więc sonda może wiązać się wybiórczo do obiektu docelowego w roztworze bilionów spokrewnionych lecz nie identycznych molekuł.

Techniki hybrydyzacji są nieocenione ponieważ w komórce znajduje się tysiące genów i tysiące różnych mRNA. Po uwolnieniu zawartości komórki podczas ekstrakcji DNA, RNA lub białka ostatecznie izolujemy mieszaninę genomowego DNA lub całkowite RNA. Analiza specyficznego genu lub jego produktu (mRNA) w takiej mieszaninie nie byłaby możliwa jeśli techniki których używamy nie pozwalałyby na specyficzne wykrywanie konkretnej molekuły RNA lub DNA.

1 Podstawowe definicje

Southern blot

- analizowany obiekt: DNA (np. genomowy DNA) po pocięciu enzymem restrykcyjnym
- sonda: radioaktywnie wyznakowane DNA o sekwencji komplementarnej do analizowanego DNA.

¹NaOH hydrolizuje RNA

Northern blot:

- analizowany obiekt: RNA (np. całkowite RNA z liści *Arabidopsis thaliana*)
- sonda: wyznakowany radioaktywnie DNA lub RNA o sekwencji komplementarnej do analizowanego RNA

2 Opis hybrydyzacji

Tworzenie hybryd w roztworze nie ma większego sensu - ponieważ po zmieszaniu roztworu RNA z roztworem radioaktywnej sondy uzyskamy radioaktywny roztwór w którym nie będzie można określić które transkrypty tworzą hybrydy z sondą. Dlatego przed hybrydyzacją RNA rozdziela się na żelu a następnie unieruchamia na podłożu stałym (immobilizacja) dzięki czemu pozostaje ono na swoim miejscu podczas hybrydyzacji i odpłukiwania niezwiązanej sondy. Ostatnim etapem northerna jest detekcja miejsc wiążących sondę odpowiadających położeniu sekwencji RNA komplementarnych do sondy.

3 Etapy hybrydyzacji

1. Elektroforeza w żelu.
2. Transfer na membranę nylonową (która pełni rolę "solid support").
3. Blokowanie miejsc niespecyficznie wiążących sondę.
4. Przygotowanie sondy.
5. Hybrydyzacja.
6. Odpłukanie niespecyficznie związanej sondy.
7. Detekcja hybryd sondy z molekułą docelową.

3.1 Elektroforeza w żelu

Technika ta służy do rozdzielenia molekuł na podstawie ich wielkości. Właściwości użytego do elektroforezy buforu i jego pH są dobrane, tak że rozdzielane molekuły mają ujemny wypadkowy ładunek elektryczny. RNA przemieszcza się w polu elektrycznym od negatywnej elektrody (-) do dodatniej elektrody (+) i przeciskając się przez pory

żelu rozdziela się pod względem wielkości. Aby zapobiec różnicy wielkości struktur drugorzędowych tworzonych przez RNA należy go zdenaturować. Różne techniki są stosowane przy usuwaniu struktur drugorzędowych i trzeciorzędowych RNA i DNA (np. podczas przygotowywania DNA do Southerna tnie się go enzymem restrykcyjnym na fragmenty restrykcyjne mające tylko strukturę pierwszorzędową). RNA do Northerna mimo, że RNA jest jednoniciowe to poprzez parowanie komplementarnych zasad tworzy struktury drugorzędowe (zwykle mniej niż 50% cząsteczki RNA pozostaje jednoniciowa). Aby temu zapobiec denaturujemy RNA w obecności formaldehydu.

Pozbawione struktur drugorzędowych próbki rozdzielają się pod względem masy cząsteczkowej, ponieważ bez struktur drugorzędowych i trzeciorzędowych ich jest proporcjonalna do masy cząsteczkowej. Odległość na jaką się przemieszcza jest proporcjonalna w przybliżeniu do log odwrotności masy cząsteczkowej (logarytm 1/MW).

Masa molekularna rozdzielanych cząsteczek mierzona jest w:

DNA: bp (parach zasad) i kbp (1kbp=1000bp)

RNA: nt (nucleotydach) i knt

W większości elektroforez do jednej studzienki dodaje się mieszaninę DNA lub RNA lub białka o znanej masie cząsteczkowej. Tego rodzaju standardy wielkości (masy cząsteczkowej) używane są do kalibracji danej elektroforezy (umożliwiają określenie wielkości naszych molekuł poprzez porównanie ze standardami, bo "masa naszej molekuły" = "masa molekuły standardu który przemieścił się o ten sam dystans w trakcie elektroforezy"). Próbki na żelu wybarwia się bromkiem etydyny który wiąże się w sposób niespecyficzny (niezależny od sekwencji) z naszymi RNA (zauważ, że sonda wiąże się ale w sposób zależny od sekwencji). Kompleks DNA-EtBr fluoryzuje w świetle ultrafioletowym.

3.2 Transfer na membranę

Po rozdzielaniu RNA lub DNA na podstawie różnic w masie cząsteczkowej, musimy je unieruchomić przenosząc na membranę. Robimy to dlatego, że hybrydyzacja w żelu nie zachodzi zbyt dobrze. Ta procedura nazywana jest blotowaniem (dlatego mówimy northern blot lub Southern blot). Zwykle jako "solid support" wykorzystuje się membrany nylonowe

lub filtry nitrocelulozowe (nazywane filtrami ponieważ pierwotnie były one używane jako papier filtrujący). DNA i RNA bardzo dobrze wiąże się do powierzchni membrany w sposób niezależny od sekwencji.

DNA i RNA przenosi się na membranę najczęściej poprzez transfer kapilarny, w którym molekuly przemieszczają się wraz z strumieniem buforu przepływającego przez żel.

Zauważ, że w Southernie, DNA w żelu jest dwuniciowe, tak więc trzeba go zdenaturować, bo sonda może wiązać się tylko do jednoniciowego DNA.

RNA już podczas elektroforezy znajduje się w postaci jednoniciowej umożliwiającej wiązanie się sondy.

3.3 Blokowanie (niespecyficznie wiążących miejsc)

Na tym etapie, na powierzchni filtra znajdują się molekuly rozdzielonego pod względem wielkości RNA oraz miejsca które jeszcze nie związały (niespecyficznie) żadnych molekuł. Gdybyśmy dodali sondę do takiego filtra, to związała by się ona niespecyficznie do wolnych miejsc na filtrze, tak jak to zrobiły molekuly transferowane z żelu na filtr. Otrzymalibyśmy filtr całkowicie pokryty sondą tak, że detekcja hybryd sonda-RNA nie byłaby możliwa. Z tego powodu filtry przed hybrydyzacją inkubuje się w roztworze zawierającym stężony DNA lub RNA blokujący niespecyficznie wiążące miejsca. Takie traktowanie opłaszca filtr i zapobiega niespecyficznemu wiązaniu się sondy z powierzchnią filtra.

3.4 Przygotowanie sondy

Radioaktywne sondy DNA dla hybrydyzacji Southern i Northern

Naszym celem jest w tym wypadku stworzenie radioaktywnej kopii dwuniciowego fragmentu DNA. Do tej procedury używa się wycięty z plazmidu fragment restrykcyjny zawierający nasz gen.

Tak więc, trawimy plazmid odpowiednim enzymem restrykcyjnym, a produkty trawienia rozdzielamy na żelu. Ponieważ plazmid ma zwykle mniej niż 20 kbp i znamy jego mapę restrykcyjną, więc jesteśmy w stanie zidentyfikować prążek na żelu zawierający interesującą nas sekwencję. Ten prążek wycinamy z żelu i ekstrahujemy z niego DNA. Ponieważ prążki są dobrze od siebie oddzielone na żelu DNA jakie

z nich wyizolowaliśmy zawiera identyczne fragmenty dwuniciowego DNA.

Fragmenty restrykcyjne (matryca) są następnie znakowane z użyciem losowych heksamerów ("random hexamer"):

1. Denaturujemy matrycowe DNA - helisy rozdzielamy przez gotowanie.
2. Dodajemy mieszaninę losowych heksamerów (6-cio nukleotydomowe fragmenty ssDNA) o sekwencjach zawierających wszystkie kombinacje 6 nukleotydów. Te heksamery parują ze wszystkimi komplementarnymi miejscami na matrycy.
3. Dodajemy: DNA polimerazę, dATP, dGTP, dTTP i radioaktywne dCTP. Zazwyczaj, fosforan związany z cukrem (fosforan a jest włączany do nici DNA) jest radioaktywnym izotopem (fosfor-32).
4. Mieszaninę reakcyjną gotujemy przed hybrydyzacją aby zdenaturować zsyntetyzowaną sondę.
5. W ten sposób otrzymujemy radioaktywny jednoniciowy DNA, który jest kopią obydwu nici matrycy i nadaje się do użycia jako sonda

Ta procedura jest przedstawiona na schemacie poniżej (wyznakowane DNA jest narysowane grubszą linią).

3.5 Hybrydyzacja

We wszystkich rodzajach blotów, wyznakowana sonda jest dodawana z buforem do wyblokowanego filtra (membrany) i jest inkubowana przez kilka godzin aby sonda odnalazła swoją molekułę docelową

3.6 Odplukiwanie

Po utworzeniu hybryd pomiędzy sondą a molekułą docelową musimy usunąć niezwiązaną (z molekułą docelową) sondę która jest w roztworze którym nasiąknięty jest filtr. Jeśli nie usuniemy niezwiązanej sondy to cały filtr będzie radioaktywny i specyficzne hybrydy będą niewykrywalne (na tak dużym sygnale tła).

Niezwiązaną sondę odplukujemy przemywając filtr kilkakrotnie buforami.

Uwaga: W Southernie i Northernie hybrydy mogą się tworzyć pomiędzy RNAmi o zbliżonej lecz nie identycznej sekwencji (np.: z tym samym genem z dwóch różnych gatunków). Ta właściwość jest wykorzystywana w badaniu genów z innych (niż sonda) organizmów lub do badania mutacji. Dlatego stosujemy odpłukowanie w warunkach o różnej ostrości ("stringency") tak aby w zależności od potrzeb odpłukać mniej lub silniej związaną sondę (o różnym stopniu homologii). Kontrolując w ten sposób ostrość płukania (Piotr : dla mnie słowo "stringency" jest OK) poprzez na przykład zwiększanie temperatury zwiększamy ostrość płukania tak, że po płukaniu zostają hybrydy o mniejszej ilości mismaczy (mismacz to miejsce niekomplementarne).

3.7 Detekcja hybryd sonda-RNA

Na tym etapie mamy filtr nylonowy z miejscami w których sonda związała się z komplementarnymi sekwencjami RNA. Taki filtr wygląda jak czysta kartka papieru i trzeba w jakiś sposób określić miejsca wiązania sondy.

Autoradiografia Jeśli sonda jest radioaktywna to można wykryć promieniowanie radioaktywne ponieważ naświetla ono kliszę rentgenowską (tak jak film czarno-biały w aparacie fotograficznym tylko, że większy, grubszy i czulszy). Taki film naświetlamy przykładając do niego (w ciemności) filtr po hybrydyzacji. Najczęściej naświetla się go od kilku minut do kilku tygodni. Po wywołaniu miejsca nie naświetlone są przezroczyste a w miejscach w których promieniowanie z radioaktywnych punktów na filtrze naświetliło film zaobserwujemy ciemne plamy, których intensywność będzie proporcjonalna do ilości wiążącego sondę RNA.

Detekcja enzymatyczna Jest stosowane jeśli sonde wyznakowaliśmy chemicznie dioksygeniną (DIG). Taką sondę wykrywa się za pomocą koniugatu przeciwciała-enzym który rozkłada substrat na nierozpuszczalny barwny produkt (chromogeniczny substrat) lub produkt którego rozkład wywołuje fluorescencję.

Część II

Część praktyczna

Aby zapobiec degradacji RNA stosujemy w northernie naczynia i roztwory wolne od RNaz. Szczególnie należy unikać rzeczy używanych do miniprepów (w których stosuje się RNaze). Do przygotowania roztworów do northerna stosujemy sterylną dejonizowaną wodę (świeża MiliQ jest wolna od RNaz). Do dezaktywacji RNaz używamy DEPC² (nie stosujemy do roztworów zawierających tris, bo DEPC reaguje z grupami aminowymi).

UWAGA!

Techniki dezaktywacji RNaz są szczegółowo omówione w rozdziale poświęconym izolacji RNA.

Ewentualne problemy: Jednociowe RNA może tworzyć struktury drugorzędowe zakłócające rozdział na żelu. Aby temu zapobiec elektroforezę próbek RNA przeprowadzamy w warunkach denaturujących. Do denaturacji RNA powszechnie stosuje się formaldehyd, glyoxal/DMSO lub (silnie trujący) methylmercuric chloride.

Często na autoradiogramie³ pojawia się słaby sygnał hybrydyzacji leżący na wysokości rybosomalnego RNA. W takiej sytuacji, aby mieć pewność, że nie jest to niespecyficzna hybrydyzacja do rRNA należy zamiast całkowitego RNA użyć mRNA.

Granicą czułości northerna jest detekcja około 5 pg analizowanego transkryptu. W przypadku transkryptów genów o wysokim poziomie ekspresji 5 pg znajduje się w mniej więcej 100ng całkowitego RNA. Do hybrydyzacji używa się zwykle 10ug RNA, tak aby możliwe było wykrycie rzadkich transkryptów (stanowiących nie mniej niż 0,01% mRNA). Do analizy bardzo rzadkich transkryptów używa się frakcji poli(A)+. 3ug poli(A)+ powinno pozwolić na detekcję transkryptu mRNA stanowiącego powyżej 0,0002% frakcji poli(A)+ RNA.

Do badania poziomu ekspresji genów⁴ niezbędne jest dodawanie równej ilości RNA do każdej próbki. Określenie stężenia całkowitego RNA

²DEPC (ang. "diethylpyrocarbonate") - dwuetylopirowęglan jest kancerogenem.

³Autoradiogram pokazuje rozmieszczenie prążków RNA hybrydujących do radioaktywnie wyznakowanej sondy.

⁴Northern pozwala na określenie poziomu danego transkryptu, który jest wypadkową szybkości jego transkrypcji i degradacji.

nie jest proste ponieważ zwykle zawiera ono zanieczyszczenia utrudniające precyzyjny pomiar spektrofotometryczny⁵. Aby potwierdzić, że do nakładanych na żel próbek dodaliśmy identyczną ilość RNA puszczamy dodatkową elektroforezę z taką samą ilością RNA jaką planujemy do właściwej elektroforezy. Jeśli na tym testowym żelu ilości RNA w poszczególnych próbkach nie są równe to przy korygowaniu ilości nakładanego na żel RNA należy:

- Dostosowywać ilość odpipetowanego do próbki RNA w mniejszym stopniu niż wynikałoby to z zaobserwowanych na żelu różnic (zaobserwowanych "na oko" lub analizując komputerowo fotografię takiego żelu). Np. zamiast dodać 40% więcej RNA należy dodać tylko 20% więcej.
- Jeśli różnice w stężeniu RNA są ogromne, tak że do jednych próbek dodajemy ułamek ul RNA a do innych kilkadziesiąt ul RNA, to należy: odpipetować po równej ilości RNA do każdej próbki (np. po 200 ug), strącić RNA i zawiesić w identycznej objętości (wody lub formamidu).

4 Szczegółowy opis hybrydyzacji northern

Odczynniki i aparatura

agarozą, wodą, 10xMOPS-EDTA (0.2M MOPS, 50mM octan sodu, 10mM EDTA pH7.0) formaldehyd, formamid, glicerol, barwnik bromophenol blue, bromek etydyny, 1M NaOH, 10xSSC, zasilacz, aparat do elektroforezy (najlepiej z chłodzeniem), łaźnia wodna lub termoblok, końcówki do pipet, próbówki Eppendorfa.

4.1 Przygotowanie żelu (1,3%, 30ml)

1. Rozpuść 0,39g świeżej agarozy w wodzie wolnej od RNaz. Wsyp agarozę do 26,1 ml wody i rozpuść w kuchenie mikrofalowej mieszając co kilkadziesiąt sekund. Po rozpuszczeniu agarozy pozostaw ją na 5 minut w temp. 90-100oC (można w kuchenie nastawionej na najmniejszą moc lub wstawiając do zlewki ze świeżo zagotowaną wodą).

⁵Absorpcję RNA badamy przy długości fali równej 254 lub 260nm.

2. Dodaj 3ml buforu 10xMOPS-EDTA[3] (trzeba mieszać i/lub dodawać lekko ogrzany bufor aby uniknąć krzepnięcia żelu).
3. Schłódź żel do temp. ok. 50oC (nie jest zbyt gorąca aby przyłożyć do policzka). Najlepiej schładzać w wodzie w styropianowym pudełku (dodaj do pudełka tyle wody ile w zlewce jest żelu).
4. Pod wyciągiem dodaj dwa razy 0,76ml 37% formaldehydu⁶(w tym stężeniu zwany jest formaliną).
5. Wylej żel do dokładnie wypoziomowanej wanienki. (Żele do northern'a nie powinny być grubsze niż 3mm, dlatego ważne jest dokładne wypoziomowanie wanienki na żel).
6. Żel powinien powoli zastygać więc trzeba wylewać go w ciepłym miejscu (ale nie cieplej niż 37oC).

Uwaga!

4.2 Przygotowanie próbek RNA

Przygotuj świeży bufor dodając:

- 0,75 ml zdejonizowanego formamidu (niezdejonizowany pachnie amoniakiem i/lub jest żółty).
- 0,15 ml buforu 10xMOPS-EDTA
- 0,24 ml formaldehydu
- 0,1 ml wody wolnej od RNaz
- 0,1 ml 80% glicerolu
- 0,08 ml 10% lub 2% w/v Bromophenol blue.

Taki bufor niektórzy przechowują w -20oC w eppendorfówkach, ale tak przechowywany bufor nie zawsze działa.

Denaturacja próbek RNA.

- Dodać 15ul buforu do 5ul próbki RNA (nie mniej niż 10 ug RNA)
- Inkubować 15 minut w 65oC.
- Przenieść do lodu.

Tak zdenaturowane RNA można przechowywać przez kilka miesięcy w -80oC.

⁶Opary formaldehydu są toksyczne.

4.3 Elektroforeza

Próbki na żel można nanieść w sposób standardowy (1ul bromku etydyny dodajemy bezpośrednio do każdej próbki) lub jeśli mamy bardzo dużo próbek to:

1. Pod wyciągiem, gdzie krzepnie żel, do każdej kieszonki dodajemy 10ul dziesięciokrotnie rozcieńczonego bromku etydyny.
2. Żel z bromkiem wkładamy ostrożnie do buforu (1xMOPS-EDTA) do aparatu do elektroforezy i taki pusty żel puszczamy w odwrotną stronę (+ od strony studzienek), czekamy 2-5 minut aż bromek przejdzie ze studzienek w żel poniżej.
3. Zamieniamy elektrody (- od strony studzienek).
4. Nanosimy próbki (bez bromku) i włączamy elektroforezę (bromek idzie w przeciwną stronę niż RNA i DNA, więc bromek idąc do (-) wymiesza się z RNA idącym do (+)).

Elektroforezę prowadzimy przy niskim napięciu (np. 18 godzin 5-20V, czyli najmniejsze napięcie jakie daje zasilacz do elektroforezy), mieszając bufor co kilka godzin i najlepiej z chłodzeniem od dołu (puszczanie elektroforezy w chłodni nie ma sensu bo bufor będzie bardzo intensywnie parował). Aby uzyskać chłodzenie aparatu od dołu można włożyć aparat z buforem do kuwety i wsypać do kuwety pod aparat, lód z wodą. Można też po włożeniu aparatu z buforem do kuwety zamiast wysypywania lodu z wodą można umieścić tę kuwetę na zlewie i doprowadzić do niej rurką zimną wodę (zimna woda z kranu wpływa do kuwety obmywa aparat i wylewa się z drugiej strony kuwety do zlewu)

Jeśli nie zależy nam na jakości rozdzielania to można puszczać elektroforezę przy napięciu 5V/cm odległości między elektrodami. Należy pamiętać, aby aparat do elektroforezy był bardzo dobrze wypoziomowany, ponieważ optymalnie powinno być około 1mm buforu nad żelem.

Elektroforezę prowadzimy, aż barwnik (bromophenol blue) przemieści się do 1/2-2/3 !!! długości żelu. Żel z rozdzielonym RNA można oglądać na transiluminatorze UV (oczywiście jeśli wcześniej dodaliśmy do RNA bromku etydyny). Nie zaleca się barwienia żelu po elektroforezie bromkiem etydyny. Formaldehyd powoduje bardzo wysokie tło jeśli dodamy bromek etydyny do żelu i utrudnia odbarwienie (odbarwienie żelu ułatwiają substancje zawierające grupę aminowe, np. triss, mocznik, itp).

4.4 Transfer RNA z żelu na membranę

Po elektroforezie żel płuczemy 2 razy po 20 min w 10xSSC (aby usunąć formaldehyd). Jeśli żel był barwiony bromkiem inaczej niż to opisano powyżej, to zapewne przed transferem należy go też inaczej traktować.

Transfer downwoard ("w dół") układa się w wysokiej wanience plastikowej i składa się z następujących warstw:

1. Wanienka z 10xSSC
2. Whatman 3M⁷ po którym spływa 10xSSC.
3. Kilka warstw Whatman 3M, tak aby roztwór SSC spływający z wanienki równomiernie zwilżał żel leżący poniżej.
4. Żel obłożony dookoła parafilmem. Parafilm uniemożliwia przepływ roztworu poza żelem.
5. Filtr nylonowy (na nim zatrzymuje się RNA przemieszczające się z buforem przepływającym przez żel).
6. Kilka warstw Whatman 3M (umożliwia równomierny odpływ buforu 10xSSC, który przesącza się z membrany powyżej).
7. Szeroki pasek Whatmana 3M umożliwiający spływanie buforu na dno wanienki.
8. Stolik (np. plastikowe pudełko lub warstwa celulozowych gąbek) dostatecznie wysoki, aby spływający z góry bufor nie zatopił nam transferu.

4.4.1 Etapy układania transferu (downword).

1. Na dnie plastikowej wanienki (najlepiej o stromych brzegach) połóż prostokątną pieluchę lub kilkucentymetrową warstwę bibuły lub plastikowe pudełko.
2. Na pieluchę (lub pudełko) połóż 2-3 dosyć duże (znacznie większe od żelu) kawałki zwilżonego (10x SSC) papieru Whatman 3M.
3. Połóż namoczony przez 5 minut (w wodzie) filtr nylonowy z obciętym rogim, filtr powinien być większy od żelu o około 1mm.

Pomiędzy warstwami nie może być ani jednego pęcherzyka powietrza.

⁷Whatman 3M jest wysokiej jakości papierem filtracyjnym

4. Na filtr nylonowy połóż żel, w tej samej orientacji co w aparacie do elektroforezy. Na zdjęciu żelu które uprzednio zrobiłeś zaznacz położenie obciętego rogu filtra. Żel lepiej się układa jeśli polejemy filtr nylonowy odrobiną buforu 10x SSC.
5. Przebijając studzienki żelu, zaznacz ołówkiem (najlepiej o długim cienkim rysiku) położenie studzienek (jest to bardzo ważne, jeśli o tym zapomniełeś to dalsze etapy nie mają sensu).
6. Na żel połóż kilka warstw zwilżonego (w 10x SSC) papieru Whatman 3M (dokładnie tej samej wielkości co żel).
7. Wytnij kilka pasków papieru Whatman 3M o szerokości równej długości żelu. Pasek papieru musi być na tyle długi, aby położony na żelu sięgał obydwojma końcami do stojącego nad wanienką pojemnika z buforem (10x SSC).
8. Zwilż te długie paski Whatman'a 3M w buforze (10x SSC) i połóż je na żelu. Połóż tak aby żel leżał w połowie ich długości.
9. Na wanience z transferem postaw mniejszą wanienkę na bufor (10x SSC).
10. Włóż końce długich pasków Whatman'a do wanienki na bufor i nalej do niej 10xSSC.

Tak ustawiony transfer idzie przez 1-3 godziny w chłodni. Czas zależy od grubości i stężenia żelu oraz od wielkości analizowanych transkryptów (im większe !!! transkrypty tym dłuższy czas transferu). Pamiętaj, aby w czasie trwania transferu nie zabrakło buforu 10x SSC!

4.5 Zapiekanie (immobilizacja)

1. Filtr po transferze (jeszcze wilgotny) połóż na czystej powierzchni transiluminatora UV (można na przezroczystej folii typu Saran) stroną z RNA do góry i włącz UV na 5 min. Uwaga na UV, trzeba przestrzegać zasad pracy z transiluminatorem!
2. Po zapiekanu na UV filtr połóż filtr na papierze Whatman 3M i pozwól mu wyschnąć na powietrzu.
3. Suchy filtr z RNA zawiń w papier Whatman 3M i zapiecz w 80°C przez około 45 minut (min. 30 min, max. 2 godz.).

Taki filtr gotowy jest do prehybrydyzacji. Można go przechowywać ale nie jest to wskazane.

4.6 Prehybrydyzacja

1. Przygotuj bufor do prehybrydyzacji[1], dodając świeżo zdenaturowane DNA ze spermy łososia (lub jakiegokolwiek pofragmentowane genomowe DNA, np. Ze spermy śledzia, z grasicy cielęcej, itp.)
2. Do suchej, czystej butelki do hybrydyzacji włóż filtr z zapieczonym RNA. Strona z RNA jest skierowana do wnętrza butelki. Końce filtra mogą się minimalnie ząbiać. Jeśli filtr jest zbyt duży, to należy położyć go na siateczce nylonowej (nylon mesh) która umożliwi dostęp buforów do wszystkich miejsc filtra.
3. Następnie ostrożnie (aby się nie pieniał) wlewamy bufor do prehybrydyzacji. Zwijamy pęsetą filtr i przechylając butelkę pozwalamy filtrowi nasiąknąć buforem. Nasiąkanie rozpoczynamy od krawędzi leżącej od strony butelki i powoli przekręcając butelkę i odwijając filtr dochodzimy z nasączaniem do krawędzi leżącej od wewnątrz butelki.
4. Butelkę wkładamy do pieca na hybrydyzacji nastawionego na 42°C (uwaga jeśli po kilkudziesięciu minutach filtr się zwinie w rulonik, to trzeba wyjąć butelkę i włożyć ją odwrotnie).

Prehybrydyzację prowadzimy nie krócej niż 2 godziny i nie dłużej niż przez noc (optymalnie 4-6 godzin). Dobrze jest wstawić do tego samego pieca bufor do hybrydyzacji - tak aby w chwili, gdy będzie on potrzebny miał już odpowiednią temperaturę.

4.7 Znakowanie sondy

Uwaga. Wszystkie czynności z izotopem przeprowadzamy w pokoju izotopowym. Eppendorfówki z izotopem trzymamy w statywach z pleksi, cały czas nosimy fartuch i dwie pary rękawiczek gumowych (zewnątrzną parę jeśli się zabrudzi izotopem zastępujemy nowymi rękawiczkami, eppendorfówki przenosimy pęsetą (nie ręką), wszystko robimy za ekranami z pleksi). Przestrzegamy wszystkich zasad pracy z izotopem w pracowni izotopowej klasy III.

Zmodyfikowana metoda z kitu Fermentasa

Zmieszaj:

- 5ul DNA (150ng - taki prążek już wyraźnie widać na żelu)
- 5ul primerów (hexanukleotydów)
- 10ul H₂O

Zwiruj przez kilka sekund, Denaturuj (gotowanie) przez 5-10 min, gwałtownie schłódź na lodzie i zwiruj przez kilka sekund.

Dodaj:

- 1,5 ul MixA (bez dATP)
- 1,5ul H₂O
- 1,5ul polimerazy Klenowa
- Na końcu tuż po dodaniu Klenowa dodaj przestrzegając BHP izotop ³²P[dATP]

!!!

Wymieszaj i zwiruj przez kilka sekund, inkubacja przez 10 minut w 37oC (w ogrzonym wcześniej statywie z pleksi).

Dodaj:

- 3ul dNTP i inkubuj przez 5 min. w 37oC

Zatrzymaj reakcję przez dodanie 1ul 0,5M EDTA (pH 8). Tak wyznakowaną sondę oczyszcza się na kolumnie z Sephadex G-50

4.7.1 Oczyszczanie wyznakowanej sondy

Sondę oczyszczamy, aby pozbyć się niewłazonego do DNA izotopu i zbyt krótkich radioaktywnych fragmentów, które mogłyby wiązać się niespecyficznie do membrany. Wszystkie rzeczy niezbędne podczas oczyszczania sondy muszą zostać przygotowane i poustawiane wcześniej.

1. Do strzykawki (mała cieniutka strzykawka "insulinówka") wkładamy na dno (przy wylocie do igły) kawałek waty szklanej. Tłoczek odkładamy na bok (będzie potrzebny później).
2. Tak zatkaną strzykawkę po umocowaniu w statywie, napełniamy małymi kroplami zawiesiną Sephadex'u G-50 w buforze TE. Sephadex powinien osiąść w strzykawce tak, aby pozostało około 1-2 cm pustego miejsca od góry strzykawki.

3. Pod strzykawkę wstawiamy statyw litego pleksi a w nim kilka eppendorfówek. Całość stawiamy za ekranem ochronnym z pleksi.

4. Obok strzykawki stawiamy małą płytkę z pleksi ze szczeliną. Płytkę ta posłuży nam do sprawdzania radioaktywności na różnych poziomach strzykawki (promieniowanie przechodzi tylko przez szczelinę (najlepiej ustawić płytkę tak, aby do licznika docierało tylko promieniowanie z dolnego końca strzykawki).

Uwaga!

5. Nanosimy radioaktywną sondę (z dodatkiem kilkunastu ul blue dextran'u) na sephadex w strzykawce i po wsiąknięciu tego roztworu w sephadex, dodajemy małymi porcjami roztwór TE. Po dodaniu pierwszej porcji TE powinniśmy poczekać aż wsiąknie ona całkowicie w sephadex.

6. Przepływ dodawanego TE przez sephadex powoduje, że duże cząsteczki DNA szybko się przemieszczają wraz z jego strumieniem a małe wolniej. Powoduje to rozdzielenie dużych cząsteczek DNA od małych i od niewłazonego do DNA izotopu. Z chwilą, gdy duże cząsteczki wyznakowanego DNA znajdują się u wylotu strzykawki, licznik G-M zarejestruje zwiększoną liczbę rozpadów radioaktywnych. W tym momencie trzeba przesunąć statyw z eppendorfówkami tak aby wypływający ze strzykawki roztwór zbierał się do nowej probówki. W zależności od wielkości wyznakowanych fragmentów kolokalizują się one w roztworze zabarwionym blue dextranem.

7. Z chwilą gdy zaczyna spadać ilość zliczeń na liczniku G-M, przesuujemy statyw i wypływający roztwór zbieramy do nowej probówki aż do momentu w którym ilość zliczeń znacznie rośnie (jeśli w ogóle taki moment nastąpi).

8. Następnie tłoczkiem od strzykawki zatykamy ją od góry (uwaga na wypływające ze strzykawki krople) i wyrzucamy ją do kosza na odpadki radioaktywne.

Nasza wyznakowana sonda znajduje się w pierwszej (a czasami także w drugiej) najbardziej radioaktywnej probówce. Radioaktywność probówek sprawdzamy wyciągając je pęsetą na chwile ze statywu. Należy to robić w tej samej odległości od licznika (np. 30cm). Zawsze najlepiej osłonięta od promieniowania powinna być osoba pracująca z izotopem.

4.8 Denaturacja sondy i hybrydyzacja.

Sondę oczyszczoną na Sephadex'ie denaturujemy gotując ją przez około 7 minut. UWAGA Należy zabezpieczyć eppendorfówkę przed samoczynnym otwarciem (np. robiąc dziurkę w wieczku, lub wzmacniając zamknięcie eppendorfówki przez właściwe i bardzo mocne owinięcie folią aluminiową - owijamy folią aluminiową i ubijamy tę folię przez wciśnięcie do statywu).

!!!

UWAGA! Otwarcie eppendorfówki podczas denaturacji spowoduje rozprysnięcie izotopu po całym pomieszczeniu - zabezpiecz się przed taką ewentualnością!

1. Eppendorfówkę zawierającą zdenaturowaną sondę dopełniamy buforem do hybrydyzacji.
2. Wylewamy bufor do prehybrydyzacji i zastępujemy go minimalną ilością buforu do hybrydyzacji. Im mniej buforu tym lepiej, ale musi być go dostatecznie dużo żeby filtr nylonowy był nim cały czas na całej długości obmywany. Musimy pamiętać też aby ilość dodanego z buforem TE izotopu nie rozcieńczyła w sposób istotny buforu do hybrydyzacji.
3. Do butelki wlewamy naszą sondę (wlewamy na samo dno butelki, gdzie zebrał się nasz bufor). Nie wolno wlewać sondy bezpośrednio na membranę.

Hybrydyzację w buforach zawierających formamid prowadzimy nie krócej niż 24 godziny (najlepiej przez 36 godzin). Temperatura hybrydyzacji zależy od stopnia homologii i długości sondy. Zwykle wynosi ona 42oC.

4.9 Płukanie filtru po hybrydyzacji

Po hybrydyzacji sondę zlewamy do 15 ml plastikowej butelki i przechowujemy w -20oC w lodówce zamrażarce w pracowni izotopowej (pamiętaj o BHP). Taką sondę można używać jeszcze przez kilkanaście dni, ale nie więcej niż 3 razy. Przed każdym użyciem pamiętaj o jej denaturacji (65oC, 10min).

Płuczemy w dużej ilości (około 25-50ml) roztworów o różnej stringencji (ostrości). Roztwory muszą mieć właściwą temperaturę już w chwili wlewania.

- 25oC - 2x SSC; 0,1%SDS -30 sekund (odpłukuje resztki roztworu do hybrydyzacji)

- 25oC - 2x SSC; 0,1%SDS -dwa razy po 15 minut (pierwszym i ostatnim stężeniem SSC płuczemy dwukrotnie)
- 25oC - 1x SSC; 0,1%SDS -20 minut
- 25oC - 0,1x SSC; 0,1%SDS - 20 minut.
- 42oC - 0,1x SSC; 0,1%SDS - 20 minut (na tym płukaniu kończymy dla sond dosyć dobrze homologicznych).
- 65oC - 0,1x SSC; 0,1%SDS - 20 minut - dwa razy po 15 minut (dla sond o 100% homologii).

Po ostatnim płukaniu szybko zawijamy filtr w cienką plastikową folię (nie wolno dopuścić do jego wyschnięcia) i ewentualnie przyklejamy dobrze (taśmą klejącą) do zafoliowanej tekturki z zaznaczonymi radioaktywnym atramentem punktami odniesienia.

Tak przygotowany filtr sprawdzamy wstępnie licznikiem G-M. Następnie w ciemni fotograficznej kładziemy go na kliszy rentgenowskiej, tak aby strona filtru z RNA stykała się z kliszą. Po drugiej stronie kliszy kładziemy ekran świecący pod wpływem promieniowania, które przeleciało przez kliszę i wzbudza na ekranie fluorescencję która także zaczernia kliszę. Wzbudzona na ekranie fluorescencja trwa dłużej w -80oC, dlatego całość umieszczamy w specjalnej kasecie i eksponujemy w REVCO.

Kliszę rentgenowską wywołujemy według dołączonego do niej opisu.

Bibliografia

- [1] Buffer do prehybrydyzacji (5x Denhardt's, 50% formamid, 5x SSC, 0.1% SDS, 100 ug/ml zdenaturowanego DNA ze spermy łososia, 100 ug/ml polyA). Sambrook and Manniatis "Laboratory Manual".
- [2] Buffer do hybrydyzacji (2x Denhardt's, 50% formamid, 5x SSC, 0.1% SDS, 100 ug/ml zdenaturowanego DNA ze spermy łososia, 100 ug/ml polyA). Sambrook and Manniatis "Laboratory Manual".
- [3] 10x MOPS-EDTA (0.2M MOPS, 50mM octan sodu, 10mM EDTA pH 7.0). Current Protocols in Molecular Biology.