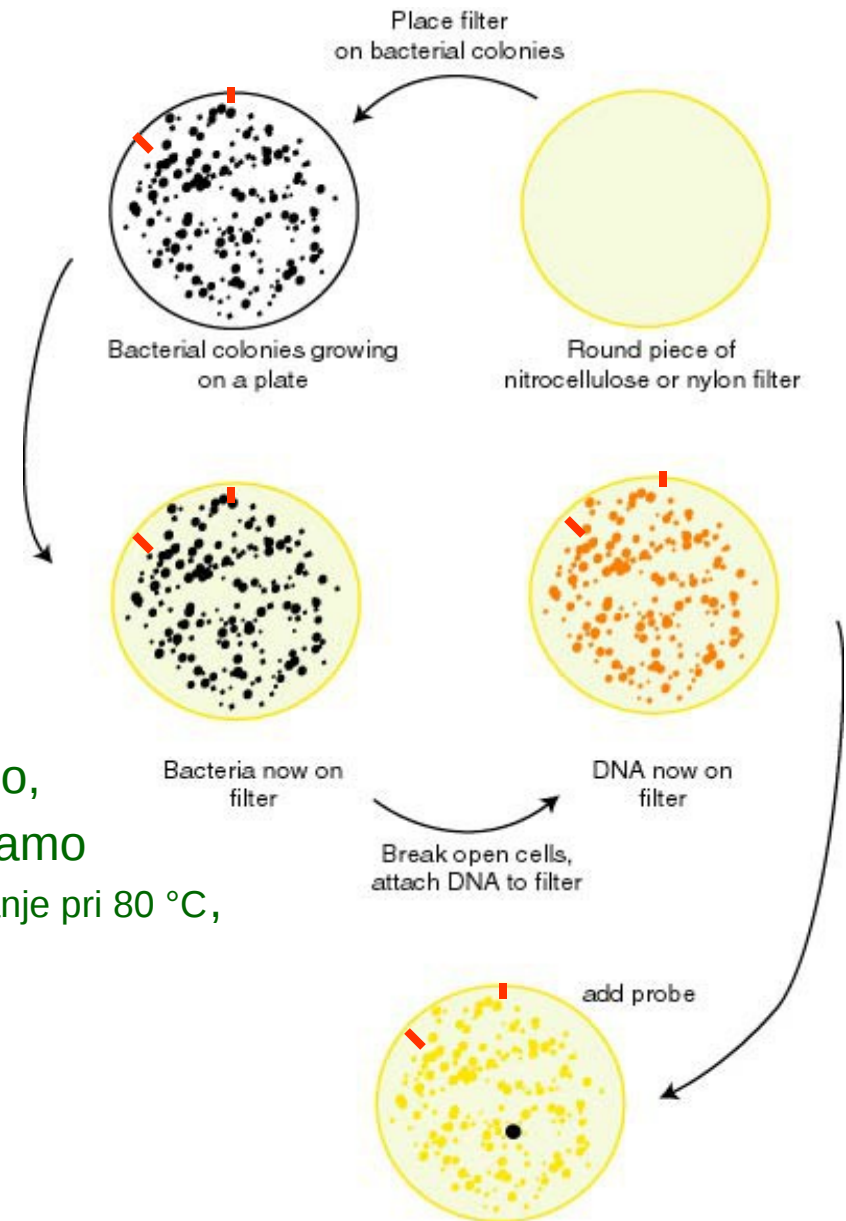


Preiskovanje knjižnic

- bakterijske kolonije prepivnemo na membrano,
- bakterije liziramo, DNA denaturiramo in fiksiramo
0,5 M NaOH/nevtralizacija/proteinaza K, spiranje; zapekanje pri 80 °C,
- hibridiziramo z označeno sondo
[metoda po Grunsteinu in Hognessu (1975)]



Hibridizacija

Prileganje identičnih ali podobnih zaporedij nukleinskih kislin preko nastanka stabilnih baznih parov. [Stabilni bazni pari: >80 % identičnost na odseku ~50 bp.]

sonda reagira s tarčnim zaporedjem v obliki ssDNA

(dsDNA + NaOH → ssDNA)

- denaturirano tarčno DNA vežemo na membrano
- inkubiramo z označeno sondo
- spiramo pri pogojih, ki onemogočajo nespecifične interakcije

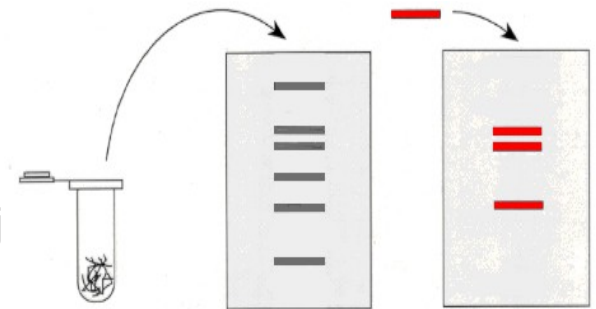
Sonde so večinoma dolge 100 - 1000 b (! izjeme)

Značilnosti hibridizacijske reakcije:

- specifičen proces (do vezave pride samo na mestu ujemanja baz)
- prisotnost nespecifičnih tarč ne vpliva na interakcijo med sondo in specifično tarčo

Uporaba:

- detektiranje specifične DNA v knjižnicah
- detektiranje specifičnega fragmenta po elektroforezi
- določanje relativne količine specifične mRNA v vzorcih
- hibridizacija *in situ*



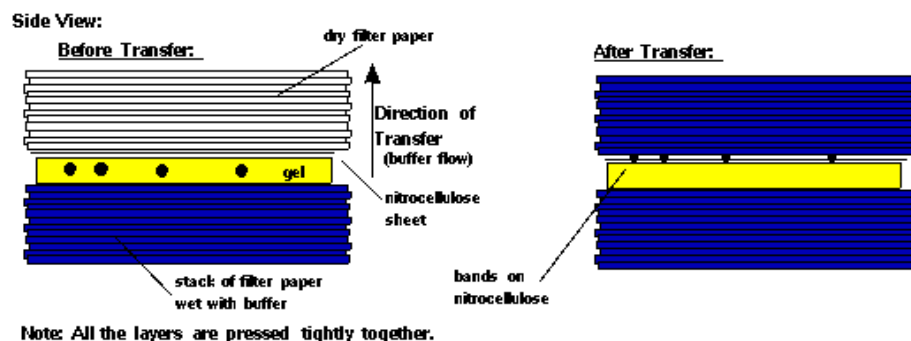
Načini prenašanja na membrano

Nukleinske kisline običajno prenašamo na membrano z elektroforeznega gela, na katerem smo opravili ločevanje po velikosti.

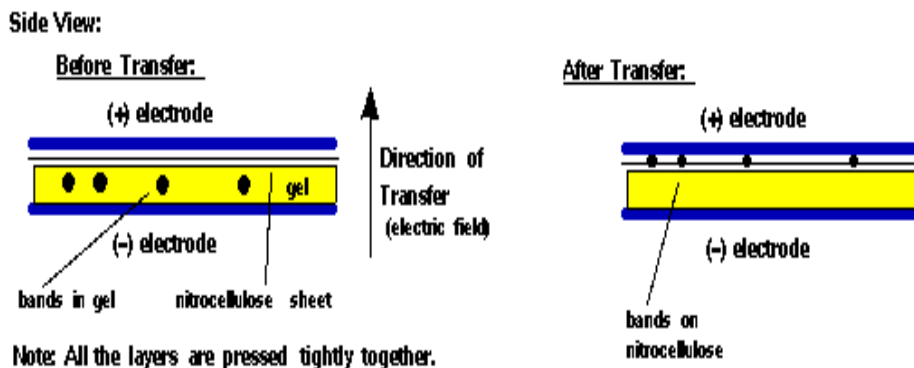
☒ Hibridizacija v raztopini je z eksperimentalnega stališča nesmiselna (izjeme: PCR, mol. svetila).

Prenos lahko dosežemo na več načinov:

kapilarni prenos:



elektro-prenos:



Načini prenašanja /2

suhi prenos - gel namočimo v pufru, odcedimo in nanj pritismo membrano

kontaktni prenos - enako, brez predhodnega namakanja gela

vakuumski prenos - prenos pospešimo z vakuumom (zadošča 1 h)

- *hibridiziranje v gelu je možno, a je precej neučinkovito*

mokri prenos



ni prenos



polsuhi prenos



nski prenos



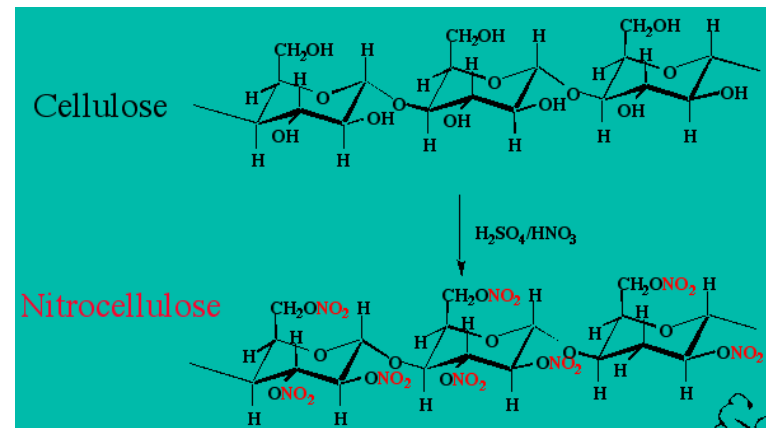
Prenašalne membrane

vrste membran:

- nitrocelulozne membrane (samo za kolorimetrično ali radioaktivno detekcijo) - manjša občutljivost kot najlonske membrane, DNA na NC ne moremo pritrditi z UV-svetlobo
- pozitivno nabite najlonske membrane (tudi za kemiluminiscenco*) – bolj obstojne membrane, večja občutljivost
- nenabite najlonske membrane (manjša kapaciteta vezave kot nabite membrane)

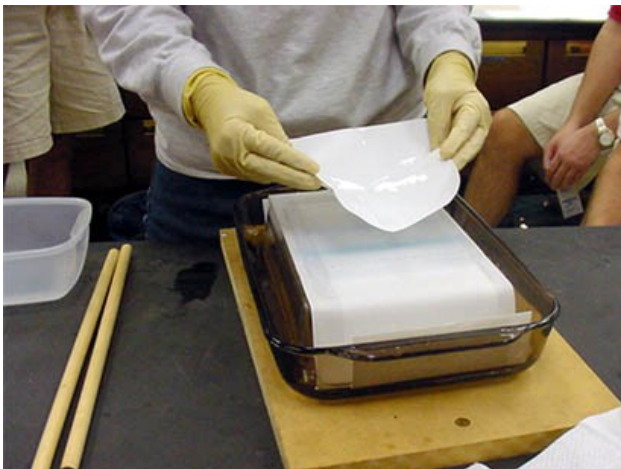
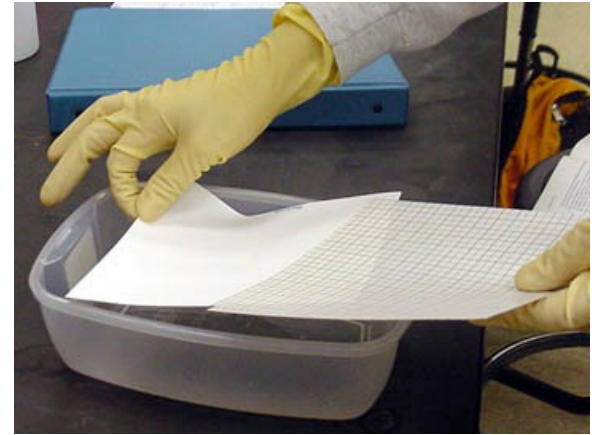
* za kemiluminiscenčno detekcijo je potrebna hidrofobna membrana, zato NC membrane niso primerne

Lastnosti membran so lahko odvisne od proizvajalca in šarže (npr. gostota naboja - previsoka povzroča visoka ozadja).



Delo s prenašalnimi membranami /1

- DNA in RNA imata veliko afiniteto do nitroceluloznih in nabitih najlonskih membran
- pred prenosom DNA z agaroze je treba DNA denaturirati (močne alkalne raztopine: npr. 0,5 M NaOH), tako da se na membrano veže kot ssDNA



weight
support
filter paper and
paper towels
nylon membrane
(hidden)
filter paper
wicks



Delo s prenašalnimi membranami /2

- nezasedena mesta na membrani je treba blokirati, da se tja ne veže sonda; blokiramo z nespecifično DNA (npr. telečja, lososova)
- dodamo sondo v molarnem prebitku in inkubiramo več ur, da se ustvarijo hibridne molekule
- proces hibridizacije je dvostopenjski:
 - a) nukleacija - tvorba kratkega niza sparjenih baz (vsaj 3) - počasi
 - b) zapiranje - podaljševanje sparjene regije - hitro
- speremo nevezano sondo, da zmanjšamo ozadje; postopek večkrat ponovimo



Delo s prenašalnimi membranami /3

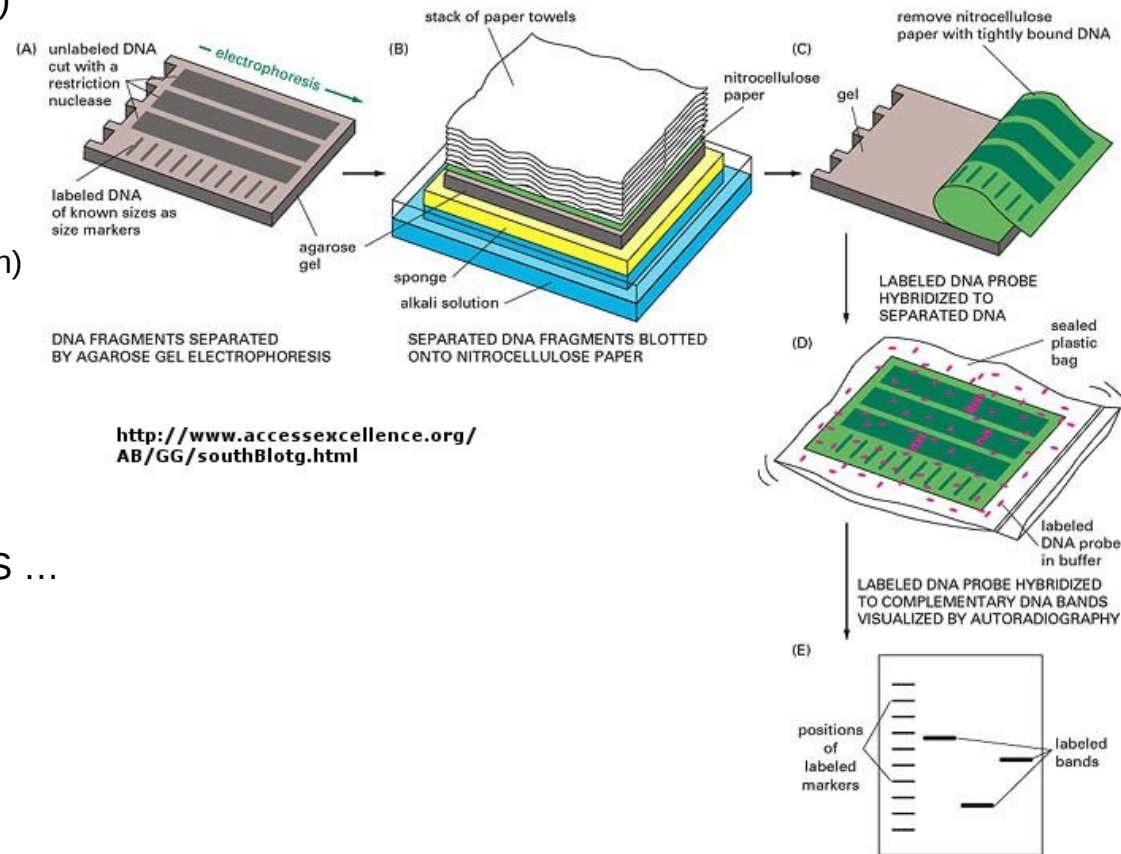
- s spreminjanjem pogojev spiranja lahko detektiramo bolj ali manj podobne molekule (spiranje pri višji temperaturi → večja specifičnost signala)
- detektiranje signala: avtoradiografija ali neradioaktivni načini (kemične ali encimske kromogene reakcije)

tipične razmere med hibridizacijo:

6x SSC, 0,2 % SDS,
1x Denhardtova raztopina
(0,02 % BSA, 0,02 % fikor, 0,02 % polivinilpirolidon)
ali 1 % mleko
sonda: 10-50 ng/ml
65 °C, 18-24 h

tipična raztopina za spiranje:

3x SSC, 0,2 % SDS → 1x SSC, 0,2 % SDS ...
(SSC = 150 mM NaCl, 15 mM Na-citrat pH 7)



Fiksiranje DNA na membrane

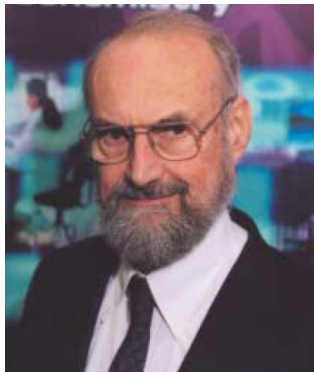
- UV-crosslinker (30-60 s, RT)
- zapiranje v vakuumu (80 °C 2 h) - NC/nekoč
- inkubiranje v alkalnem: samo za poz. nabite membrane (4-6 h, RT)

Fiksiranje z UV: vezava je preko T, ki se kovalentno vežejo na membrano. Najti je treba optimalne pogoje vezave (dovolj čvrsto, a ne preko vseh T, da so ti še na voljo za parjenje s sondo).



Tipi prenosov

- northern: analiziramo RNA (10-20 µg/nanos), ki jo ločimo na denaturirajočih agaroznih gelih (v prisotnosti glioksala ali formaldehida)
- Southern (1975): detektiramo specifična zaporedja DNA. Genomske fragmente ločujemo po velikosti na agaroznih gelih - osnova RFLP in podobnih metod.



TIBS 25, 585-588 (2000)

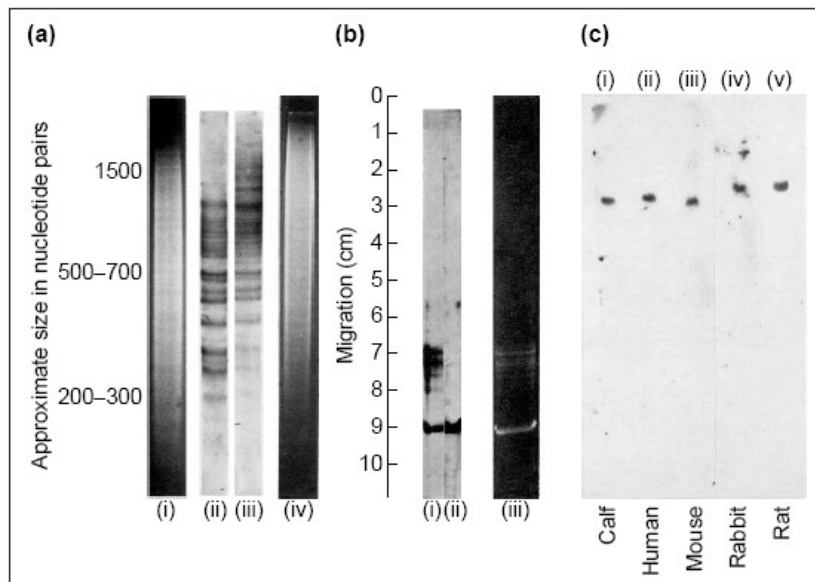
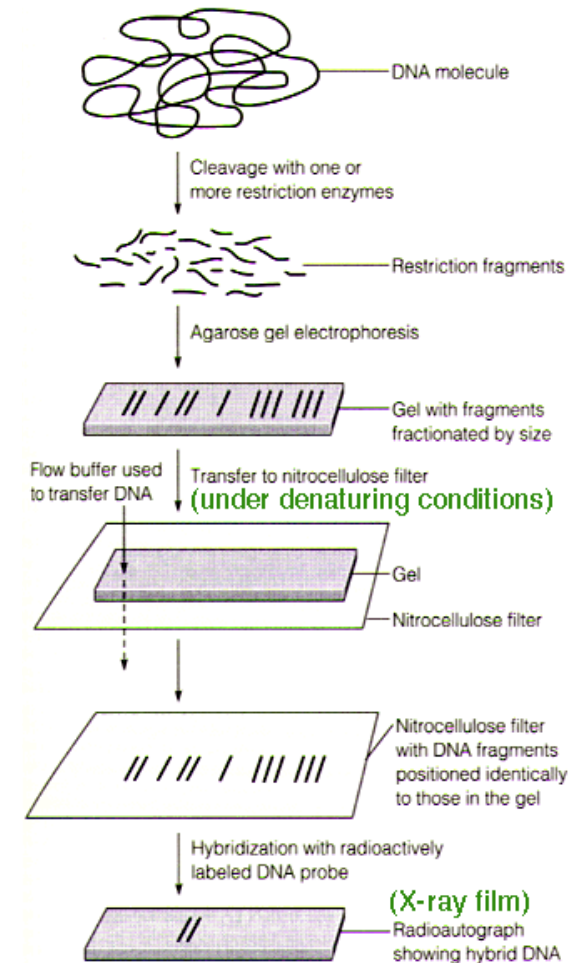
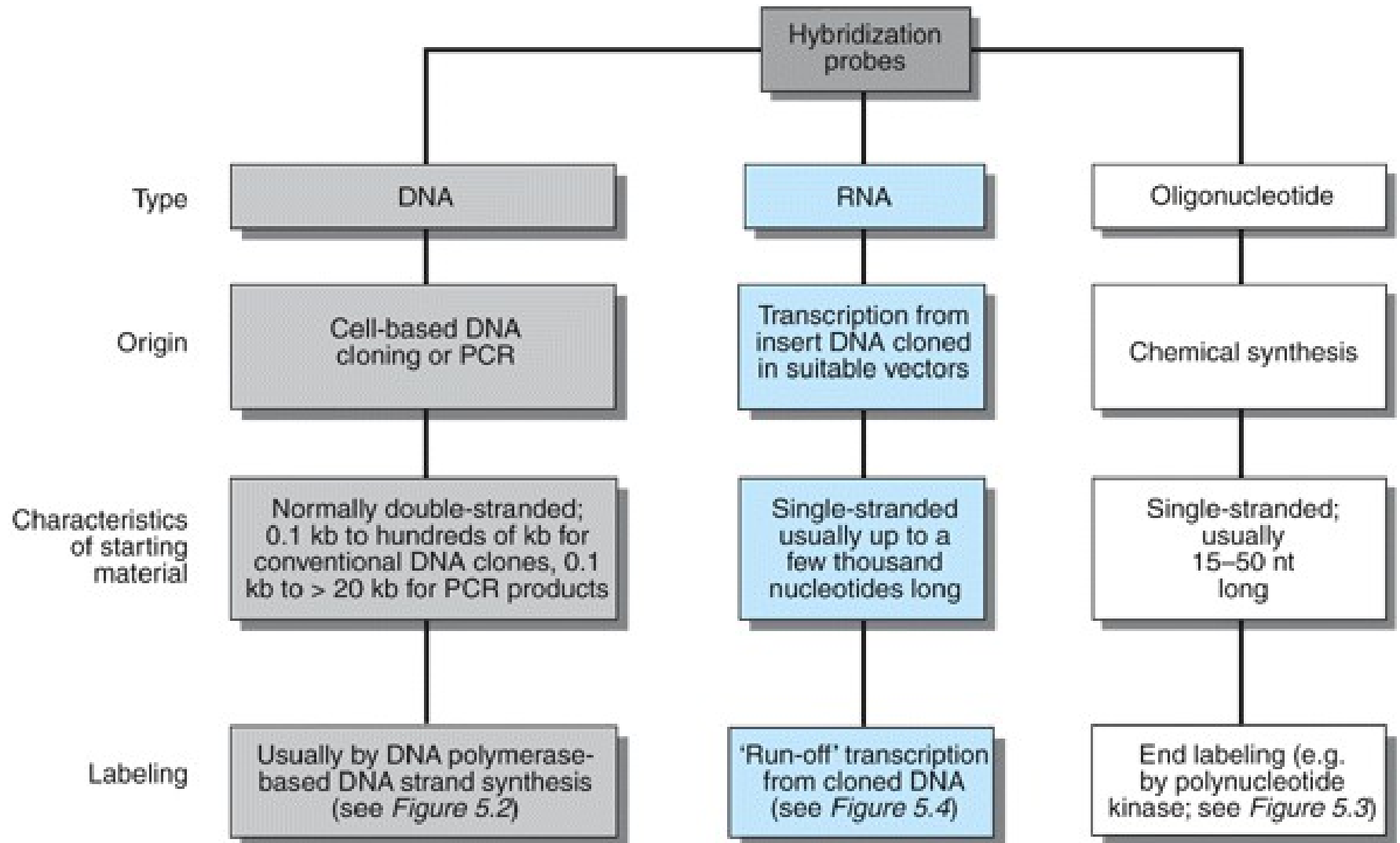


Figure 3

Examples of 'gel transfers' from the original publication²¹. (a) HaellI digests of *E. coli* DNA probed with 5S ribosomal RNA; (b) EcoRI digest of purified ribosomal RNA genes probed with 18S and 28S ribosomal RNAs; (c) EcoRI digests of various mammalian DNAs probed with ribosomal RNA.





Sonde

Sonde so označene ssDNA ali RNA, ki so vsaj delno komplementarne zaporedju, ki ga iščemo. Uporabljamo jih pri tehnikah prenosa (blotting) in pri študijah celic *in situ*.

vrste označevanja:

radioaktivno (32P, 35S, 125I, 3H)

biotin

encimi (alk.fosfataza, hrenova peroksidaza)

kemoluminiscenca

fluorescenca

antigeni

detekcija:

avtoradiografija, števci

preko avidina/streptavidina

test aktivnosti

luminometer, film

fluorimetri, mikroskopija

protitelesa

Sonde /2

Načini pritrjevanja oznak na DNA (RNA):

- pomikanje zareze (*nick translation*)
- podaljševanje začetnega oligonukleotida (*primer extension*)
- RNA-polimeraza
- označevanje koncev
- direktno označevanje
- označevanje s PCR

Sondo lahko pripravimo na osnovi zaporedja iz sorodnega organizma (heterologne sonde) ali pa jih sintetiziramo na osnovi znanega aminokislinskega zaporedja proteina, za katerega iščemo zapis.

Sonde /3

Priprava označene sonde **s pomikom zareze** (Rigby et al., 1977)

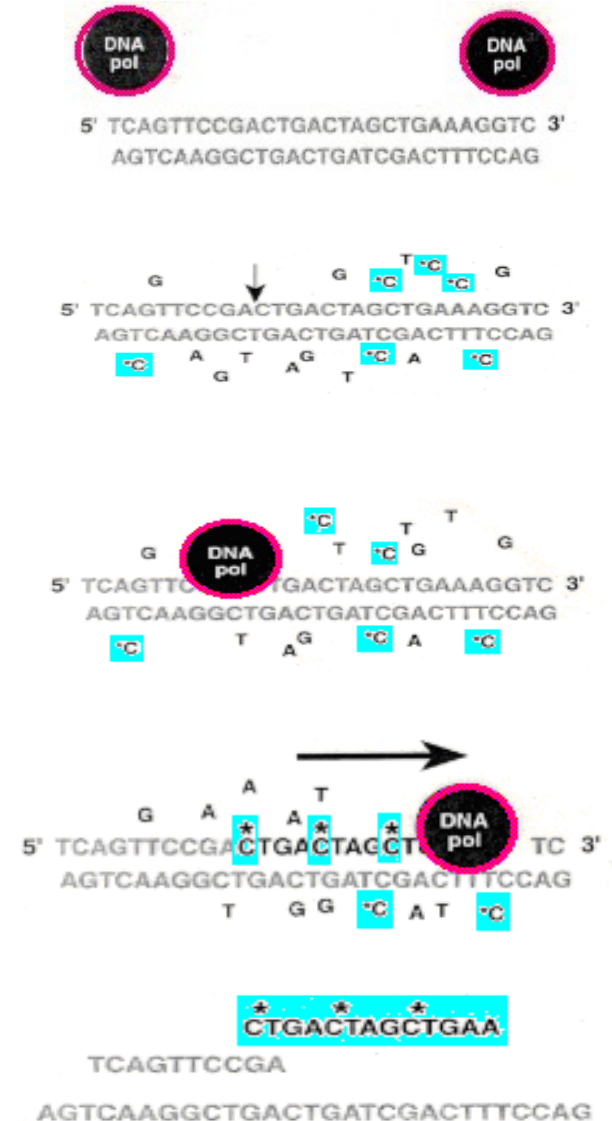
1.) osnova reakcije sta DNA, ki jo želiš označiti, in DNA-polimeraza

2.) v reakcijo dodaj dNTP (1 **označen**) in vnesi zareze v DNA [DNaza I]

3.) dodaj polimerazo, ki bo zareze zapolnjevala z dNTP (5'→3')

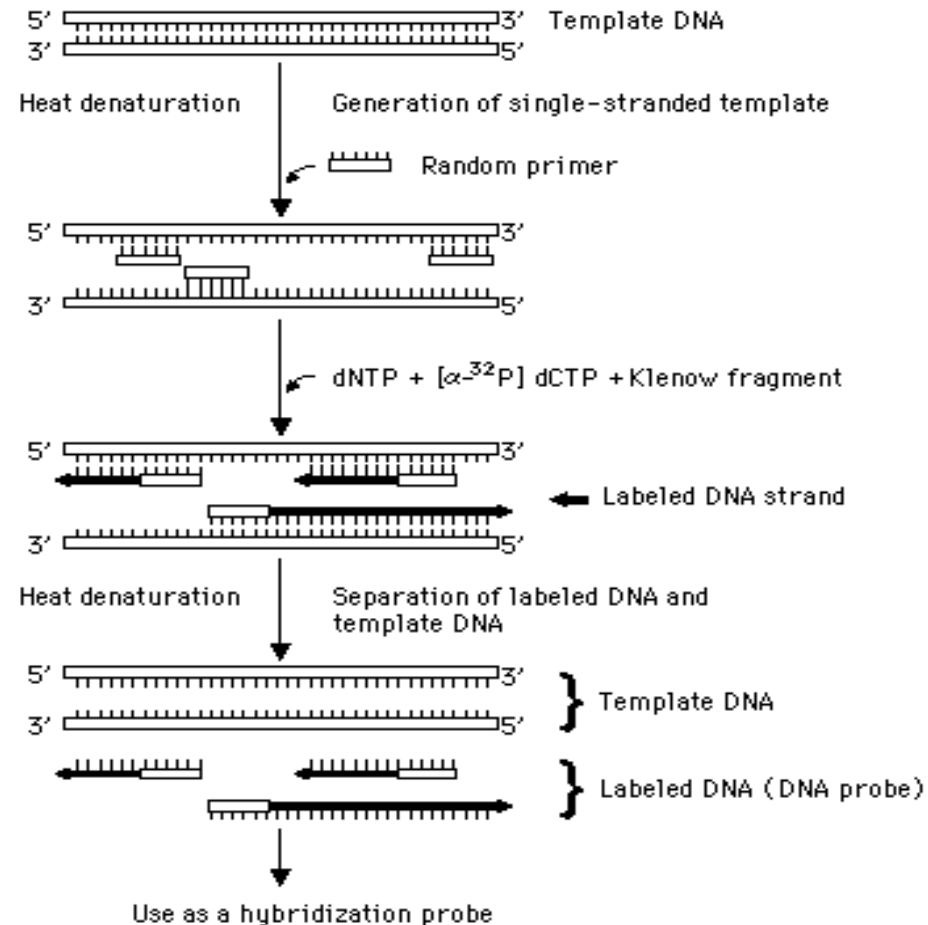
4.) polimeraza cepi vezi pred sabo [eksonukleazna aktivnost 5'→3'] in vgrajuje nove nukleotide vključno z označenim dNTP

5.) DNA denaturiramo in ločimo označeno sondo od preostanka DNA

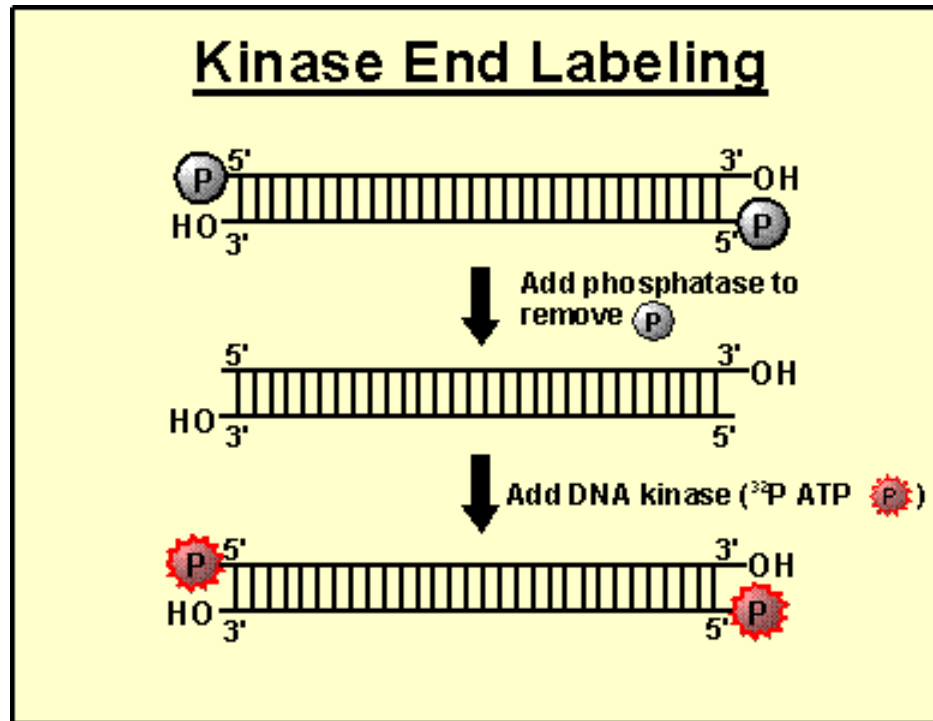


Sonde /4

Priprava sonde po metodi z naključnimi začetnimi oligonukleotidi (*random primer*) oz. metodi s podaljševanjem oligonukleotidov (Feinberg & Vogelstein, 1983).
Začetni oligonukl.: 6-10 b.



Sonde /5



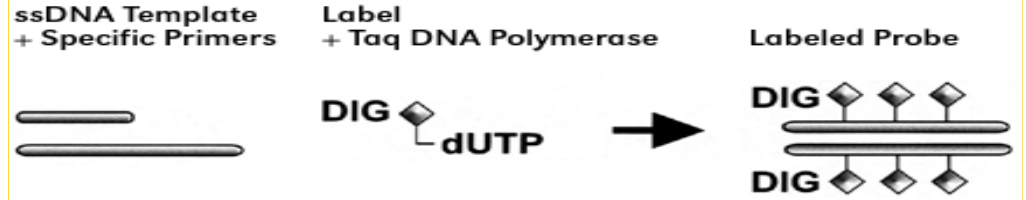
Priprava sonde po metodi z **označevanjem koncev** (*end labelling*):

Običajno označimo 5'-konec DNA/RNA tako, da dodamo označevalno skupino s pomočjo delovanja polinukleotid kinaze (PNK).

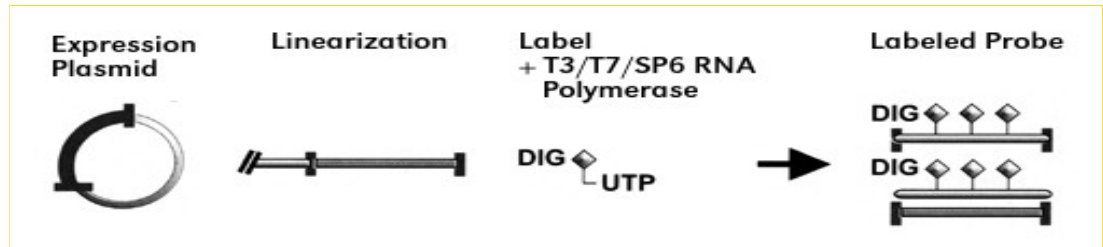
Vendar tako lahko vgradimo samo 1 označevalno skupino, kar pomeni manjšo specifično aktivnost pri detekciji. Najprej s CIP odstranimo fosfatne skupine, nato s T4-PNK dodamo na 5'-konec označen fosfat ³²P.

Sonde /6

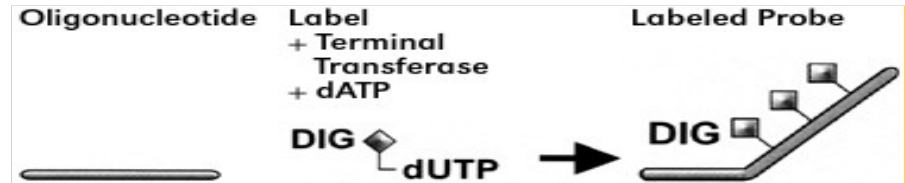
Priprava sonde s PCR:



Priprava z RNA-polimerazo:



Vgradnja označevalca v repe s terminalno transferazo:

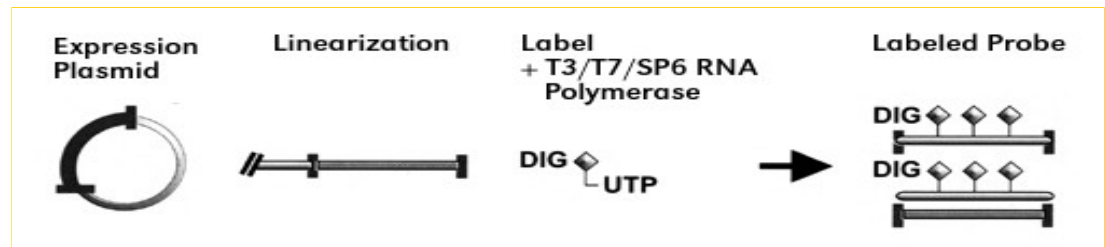


Sonde /6

Priprava sonde s PCR:



Priprava z RNA-polimerazo:



Vgradnja označevalca v repe s terminalno transferazo:

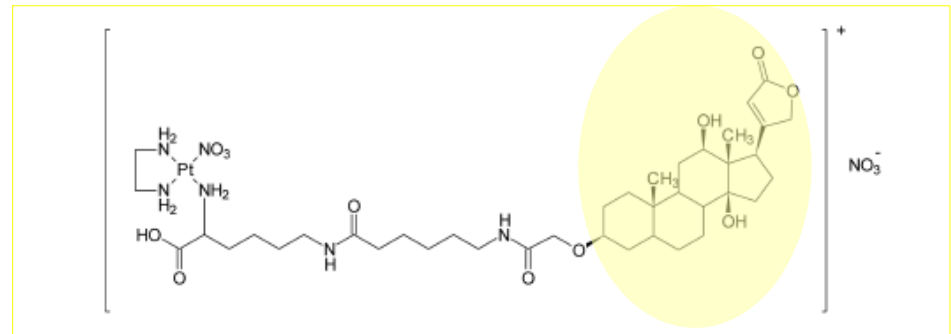


Direktno označevanje:

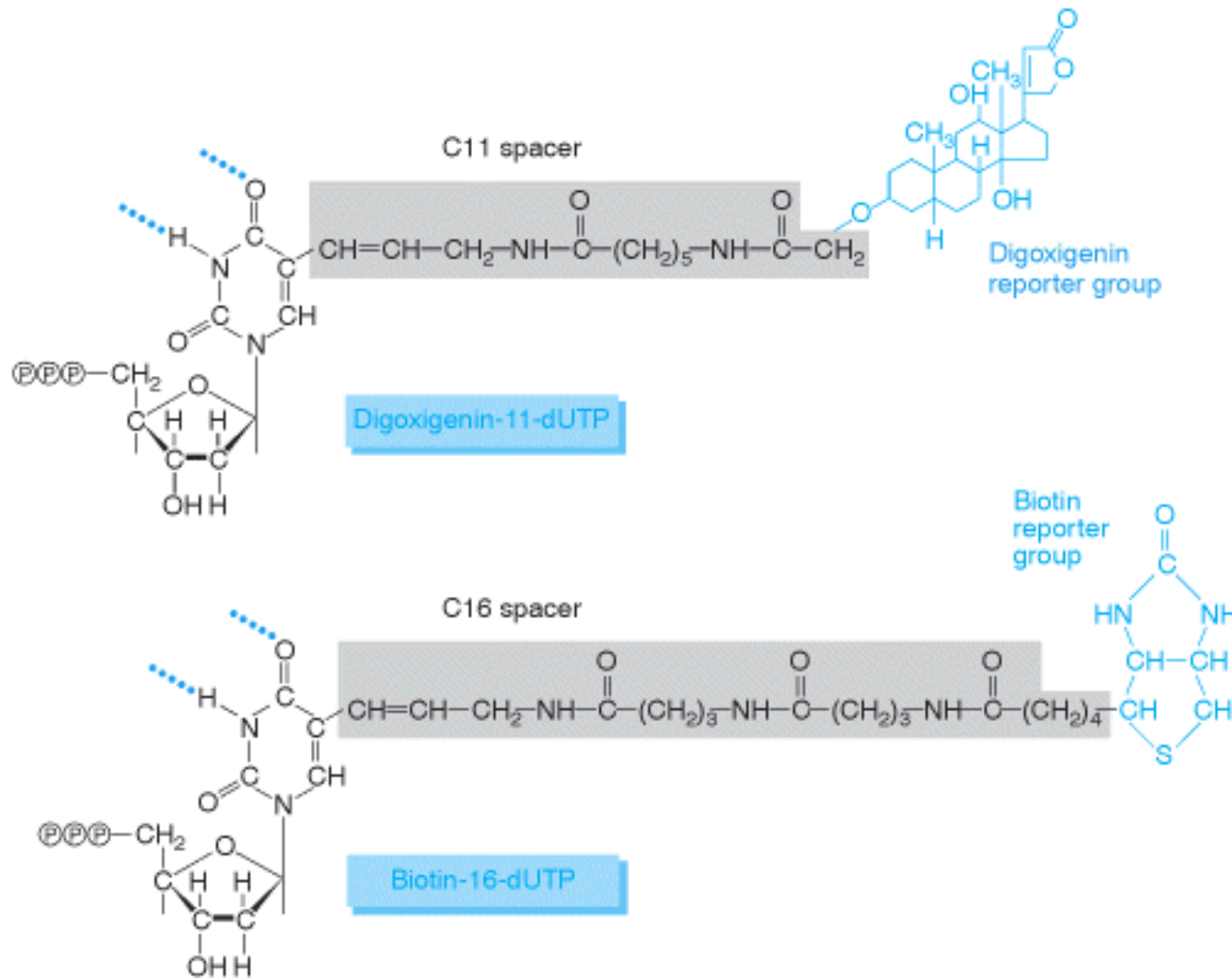
DNA pri 85 °C inkubiramo 30 minut s cisplatinovo linkersko molekulo, na katero je že vezana oznaka. Vezava poteče na N7

gvanozina in citozina.

DIG Chem-Link, Roche



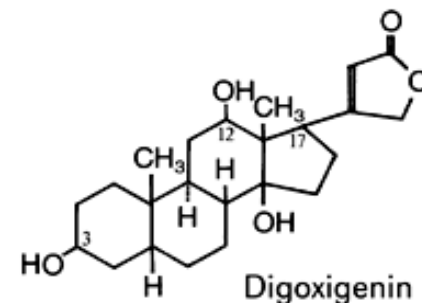
Sonde: neradioaktivno označevanje



Key:
.....
Potential hydrogen bond in base pairing when incorporated in double helix

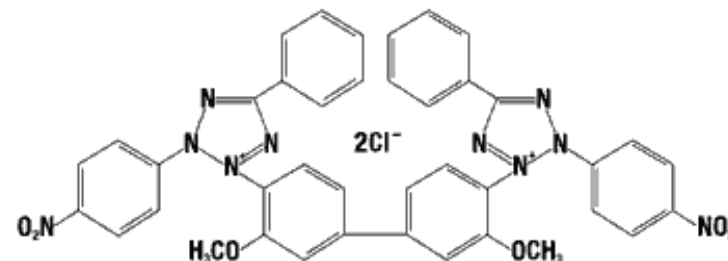
Označevanje in detekcija /1

- kemično označena sonda: po prenosu membrano inkubiramo s protitelesi proti digoksigenu, ta pa so konjugirana z reporterskim encimom (npr. alkalno fosfatazo)



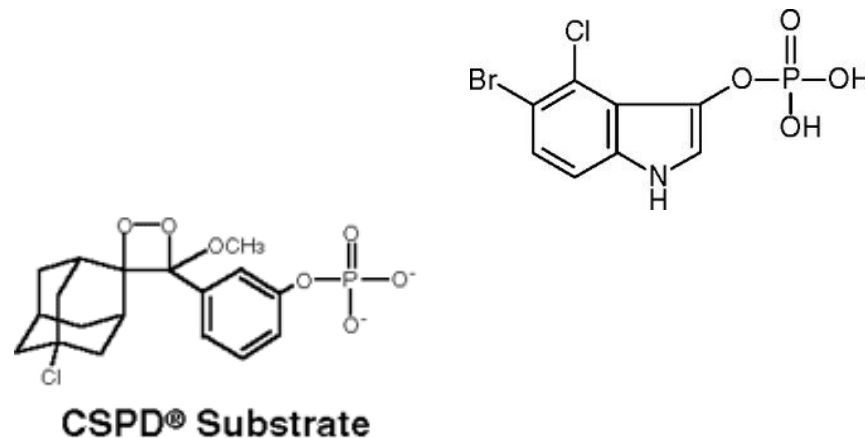
DETEKCIJA 1:

- dodamo substrata NTB (nitro blue tetrazolium) in BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indolilfosfat), ki ju fosfataza razgradi in nastane netopno modro barvilo na mestu vezanih protiteles



DETEKCIJA 2:

- dodamo kemoluminiscenčni substrat za alkalno fosfatazo (CSPD) in detektiramo sproščeno svetlobo (luminometer ali film)

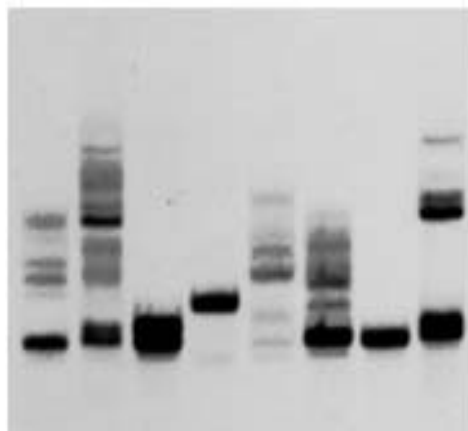


Označevanje in detekcija /2

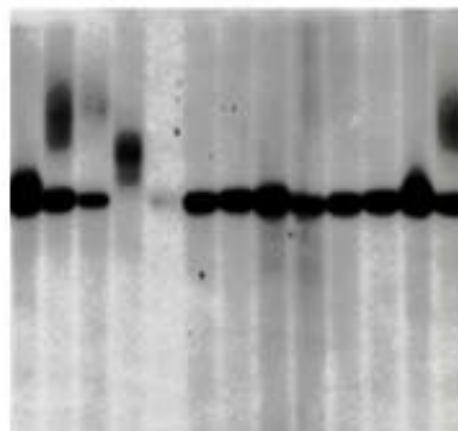
Iste membrane z vzorci lahko zapored uporabimo z dvema različno označenima sondama (npr. digoksinin in fluorescein).

Iste membrane lahko uporabimo večkrat tudi v primeru, da po končani detekciji sondo speremo z imobilizirane tarčne DNA. Metode spiranja so odvisne od vrste označevanja, v osnovi pa gre za inkubiranje v 0,2 M NaOH, 0,1 % SDS (2 x 15 min).

DIG-labeled probe



P32-labeled probe



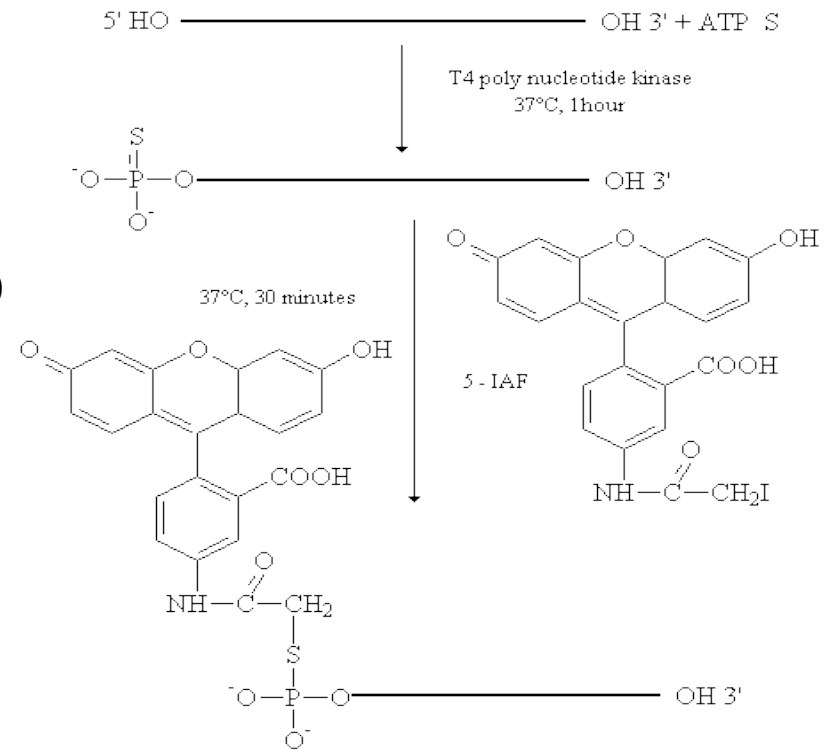
Označevanje in detekcija /3

Označevanje s fluoresceinom:

- označimo lahko katerikoli oligonukleotid - naročimo markiranje ob sintezi ali oznako vnesemo v laboratoriju:
 - 1.) s T4-PNK na 5'-konec DNA uvedemo fosfortioatno skupino (uporabimo reagent adenozin-5'-O-3-tiotrifosfat)
 - 2.) fosfortioat reagira z 5-jodoacetamid-fluoresceinom (5-IAF), kar povzroči vezavo fluoresceina na žveplov atom
- tako označen oligonukleotid uporabimo za označevanje sond, npr. s PCR

DETEKCIJA:

- detektiramo s posebno aparaturo (npr. Flourolmager)



Označevanje in detekcija /4

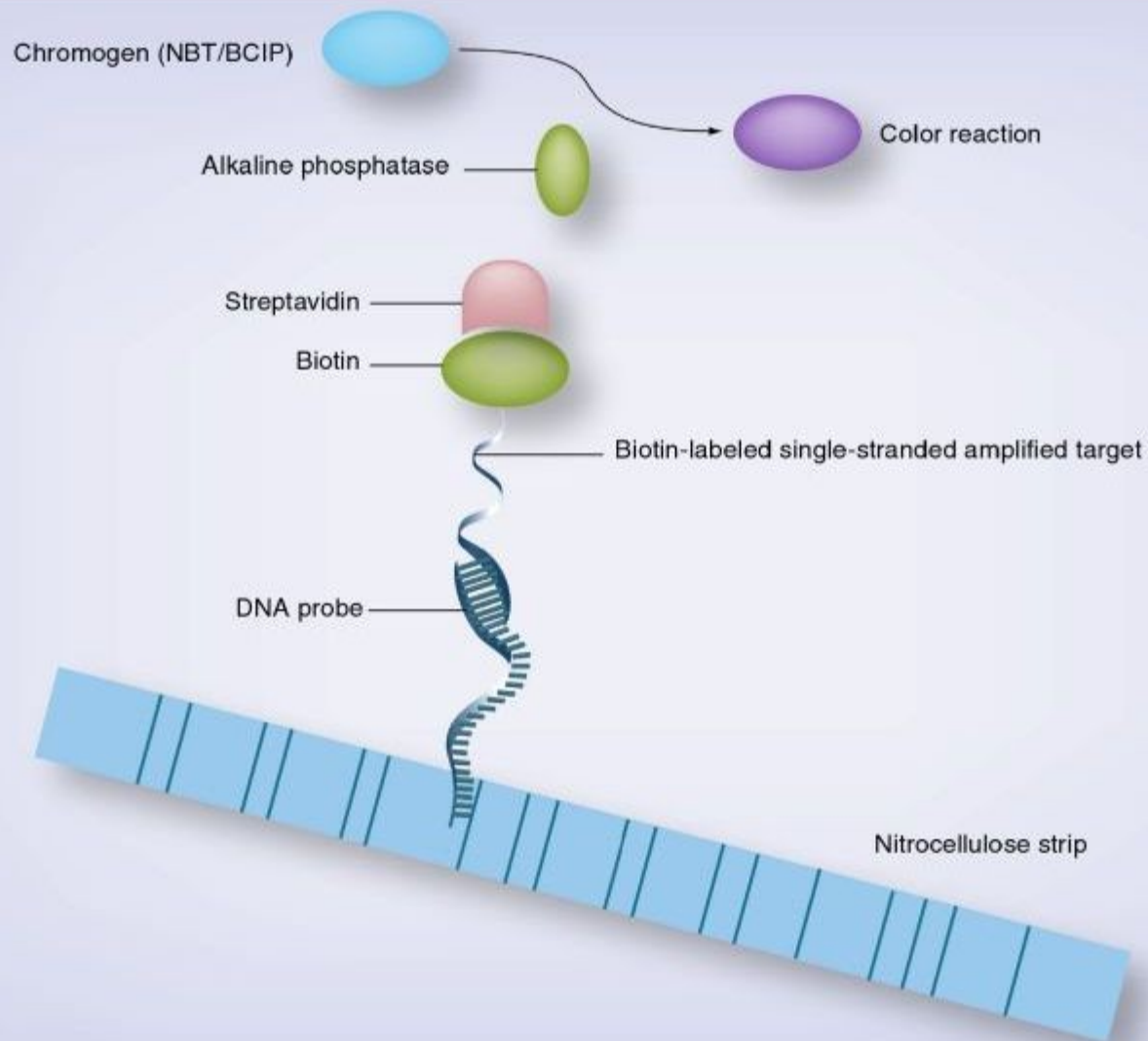
Označevanje preko **biotina** omogoča podobne načine detekcije kot so bili opisani pri digoksinu (kemiluminiscenca ali kolorimetrično detektiranje preko kompleksa streptavidin - alkalna fosfataza). Biotin smo vezali na sondo kemično preko psoralena ali že v postopku sinteze.

Primerjava radioaktivnih in neradioaktivnih označevalcev:

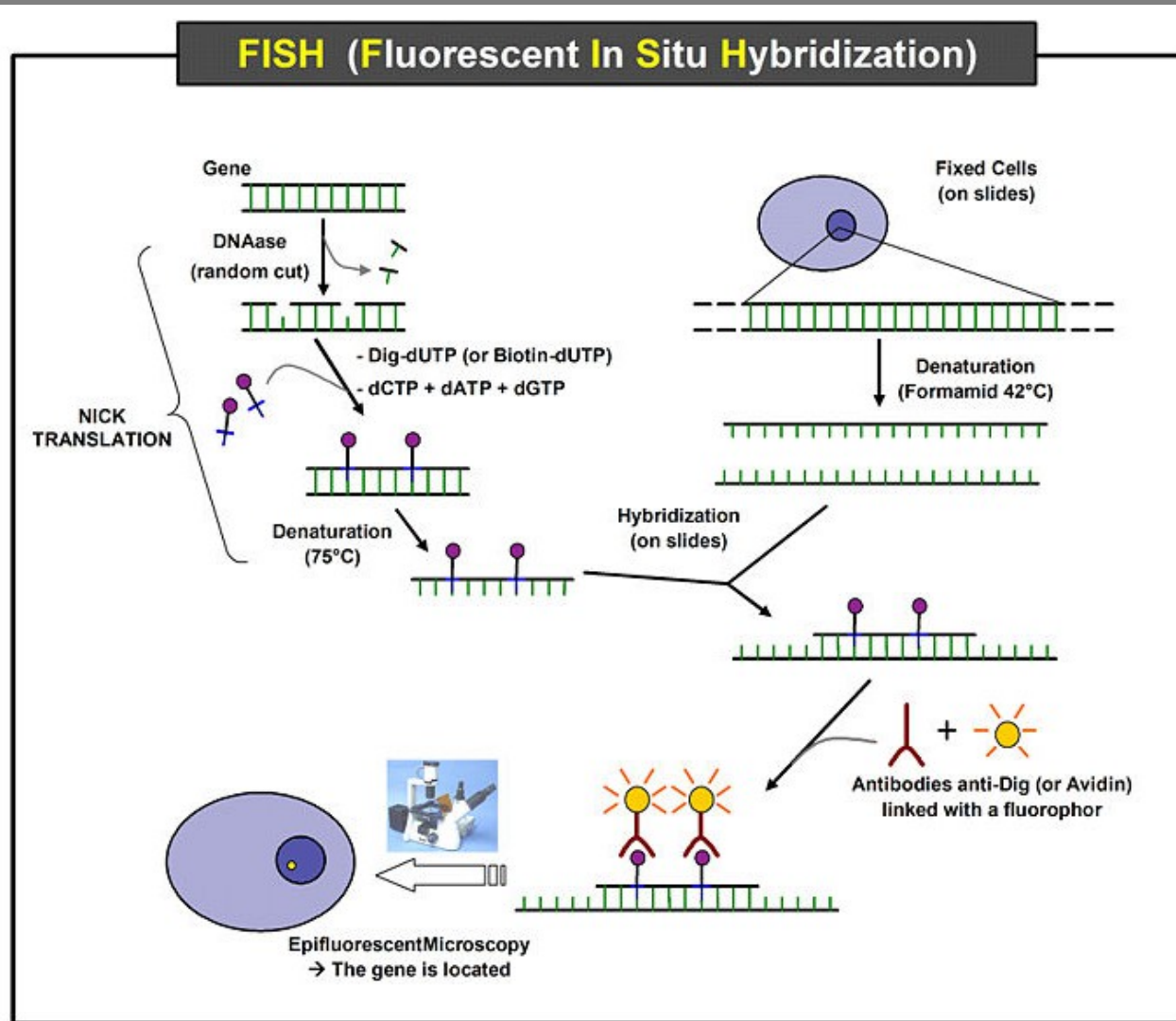
- radioaktivnost – manj reagentov, standardizirani postopki, podaljševanje ekspozicije - močnejši signali
- alternativni postopki: trajnost reagentov (ni upada aktivnosti izvora), ni nevarnosti za okolje in delavce, kratki časi eksponiranja, možnost barvnih reakcij

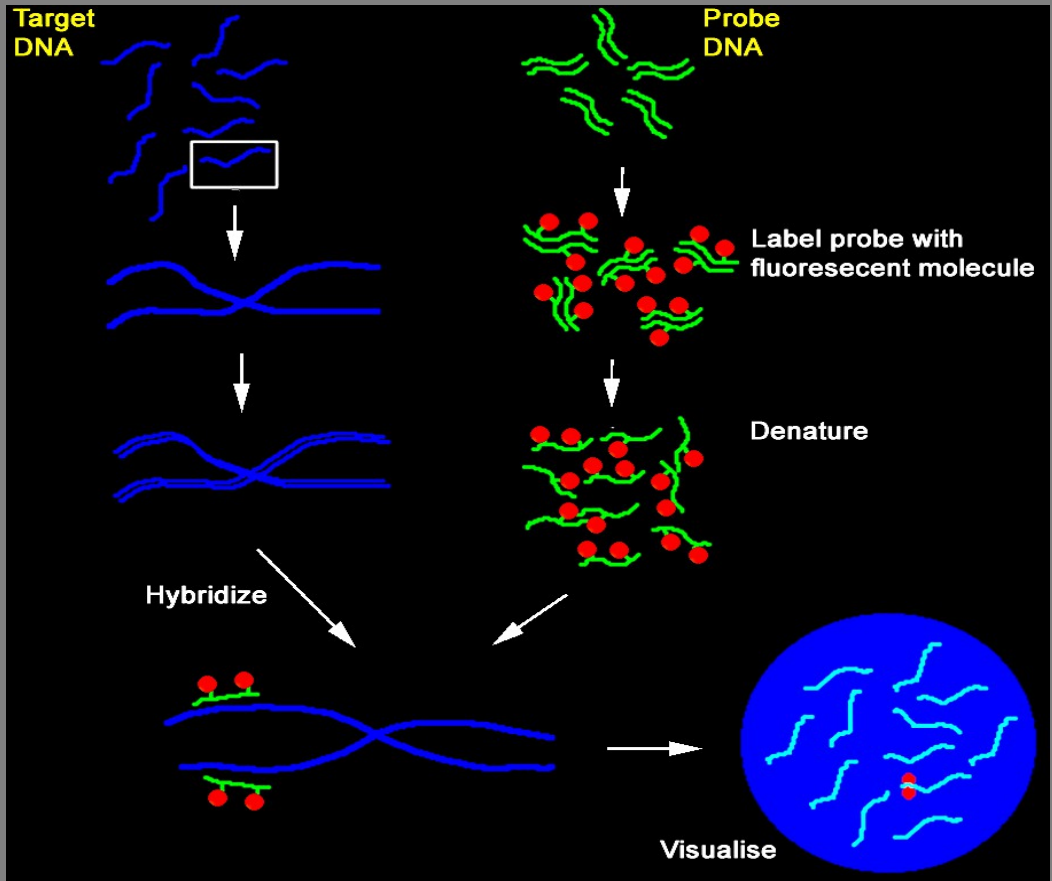
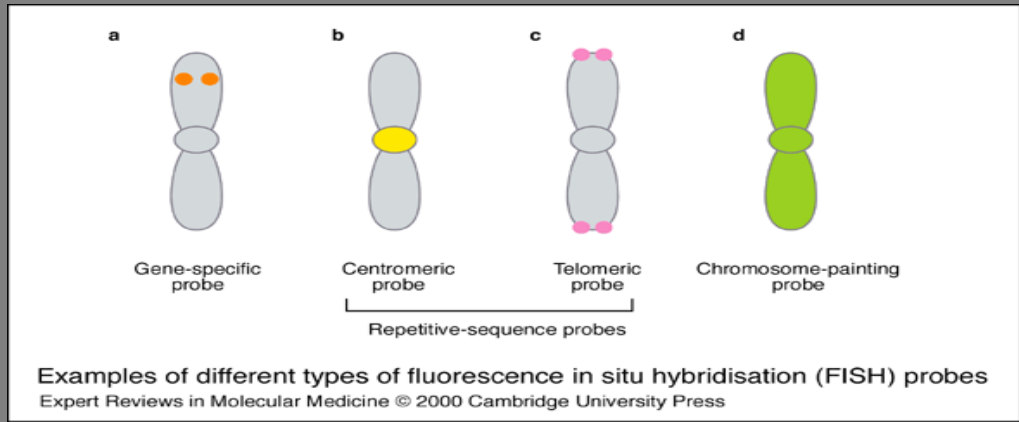
Na tržišču je več deset kompletov reagentov za različne načine označevanja in detekcije. Najprej se moramo odločiti, ali bomo označevali radioaktivno ali ne, nato pa po katerem postopku bomo označevali sondo.

Kupiti je mogoče tudi membrane za prenos northern z že ločenimi vzorci mRNA iz posameznih normalnih in patoloških tkiv.



Označevanje in detekcija: FISH





Določanje nukleotidnega zaporedja DNA

Osnovni metodi:

1) Maxam & Gilbert (1977): kemična cepitev dsDNA

2) Sanger (1977): zaključevanje verige pri sintezi s ssDNA

- Pri obeh osnovnih metodah uporabljamo radioaktivno označevanje (pri novejših izvedbah Sangerjeve metode v avtomatskih postopkih so oznake fluorescenčne).
- Pri obeh pristopih analiziramo fragmente DNA.
- Prekinitve vnesemo kemično.
- Prekinitve vnašamo na specifičnih mestih, ki omogočajo ločevanje med 4 bazami.
- V začetni stopnji moramo izolirati DNA, ki jo želimo analizirati, v čisti obliki, nato pa izvedemo reakcije, ki vodijo do vnosa markerja in vnosa prekinitvev. Sledi ločevanje fragmentov po velikosti (PAGE; avtomatizirani postopki: kapilarna elektroforeza - CE)

Pri fluorescenčnem označevanju ločimo:

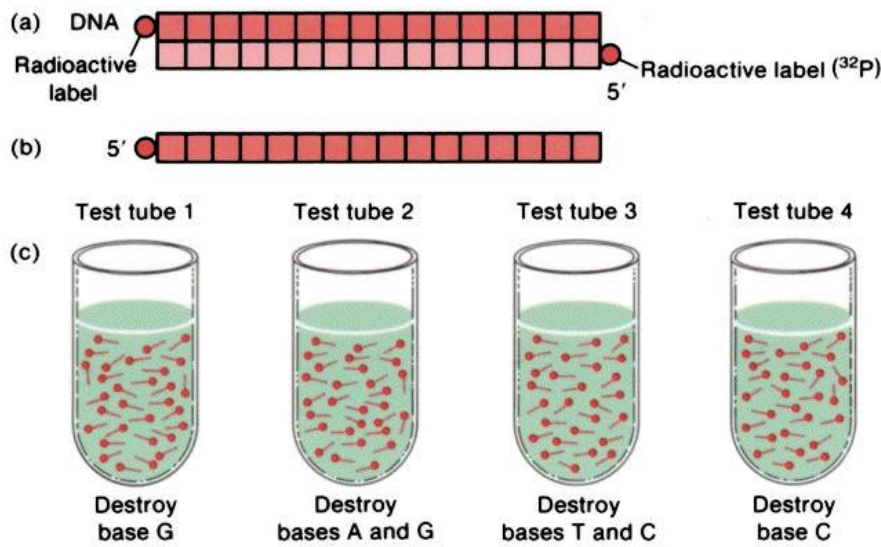
- označevanje preko začetnega oligonukleotida (*dye primer chemistry*)
- označevanje preko terminatorja (*dye terminator chemistry*)

Metoda po Maxamu in Gilbertu

Postopek:

- * dsDNA označimo na 5'-koncu s ^{32}P -ATP
- * 2 verigi ločimo pri 90°C v DMSO, naneseemo na PAGE in nato izoliramo posamezni verigi
- * ssDNA razdelimo na 4 alikvote in obdelamo ločeno (modifikacija baz):
 - G** z dimetilsulfatom **A+G** z mravlj. kislino
 - C+T** s hidrazinom **C** s hidrazinom v alkalnem

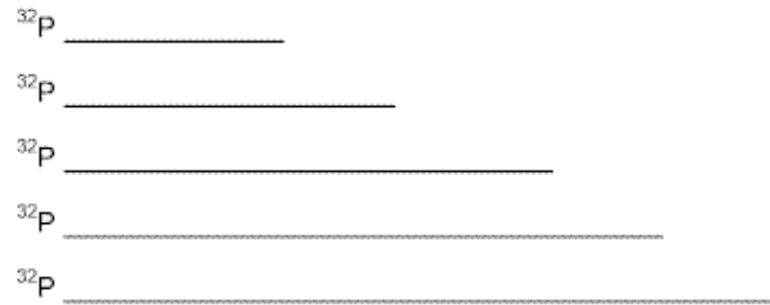
Na mestu modificiranih baz s piperidinom v kislem prekinemo verigo → fragmente ločimo s PAGE. Razcep ni kvantitativen, zato dobimo veliko število radioaktivno označenih produktov.



CHEMICAL CLEAVAGE OF A DNA SAMPLE AT C BASES

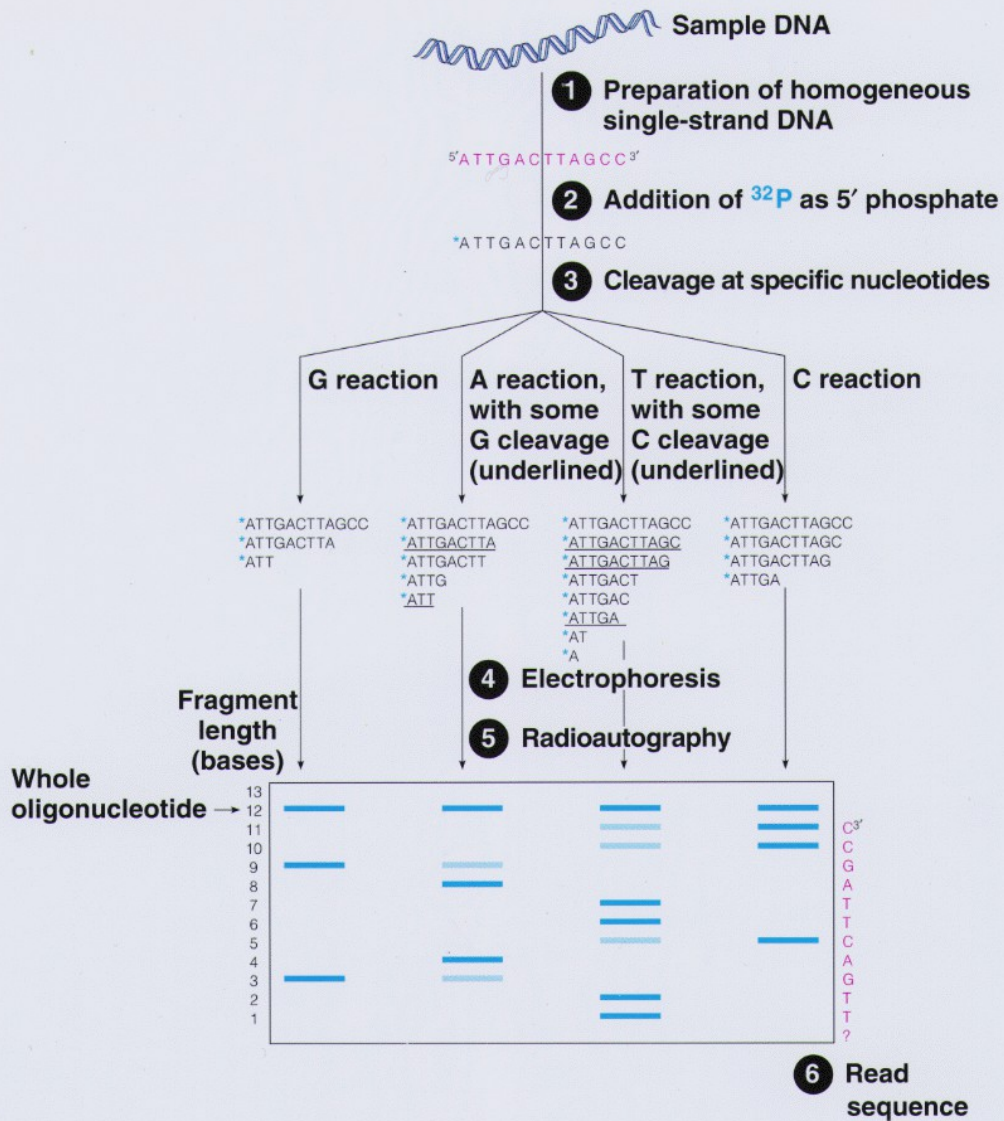
End-labelled DNA sample

^{32}P -A-p-T-p-T-p-G-p-C-p-G-p-C-p-T-p-G-p-C-p-A-p-C-p-G-p-C-p-T



End-labelled DNA fragments

Figure 4A.4 Sequencing an oligonucleotide by the Maxam-Gilbert method

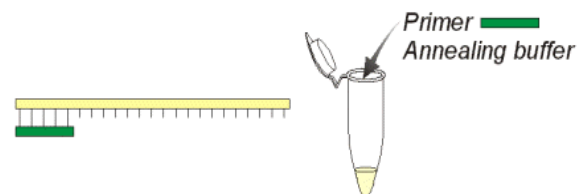


Določanje zaporedja po dideoksi-metodi (1)

izoliramo dsDNA in jo pretvorimo v ssDNA obliko (denaturacija)



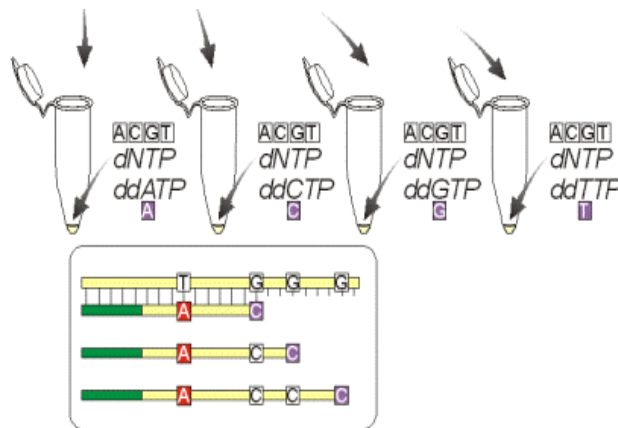
vežemo začetne oligonukleotide (15-20 b)



dodamo encim, dNTP in označeni nukleotid (označevalna reakcija)

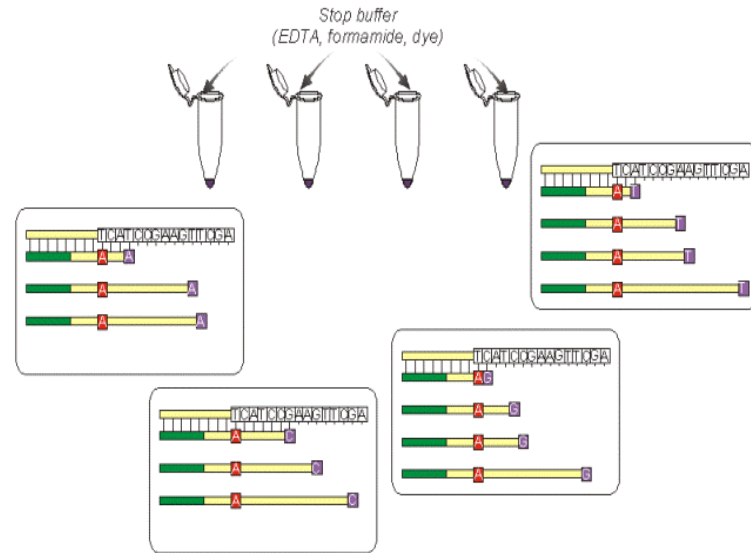


dodamo terminatorje (ddNTP)

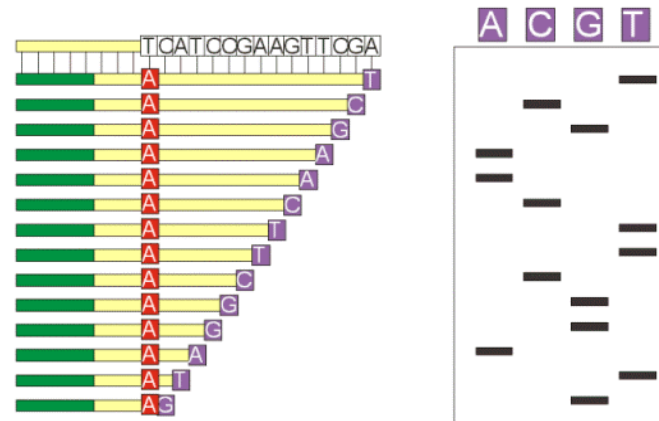


Določanje zaporedja po dideoksi-metodi (2)

zaustavimo reakcijo

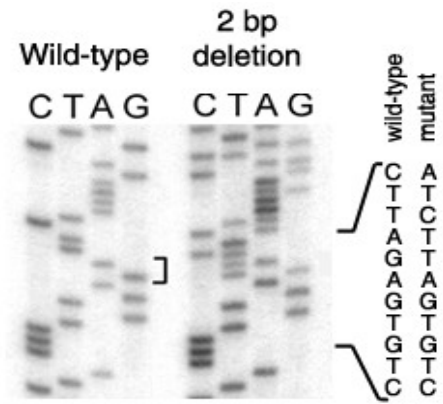
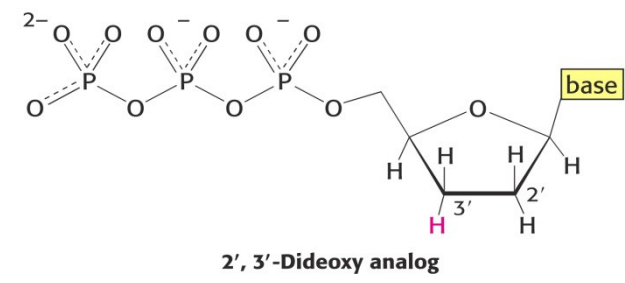
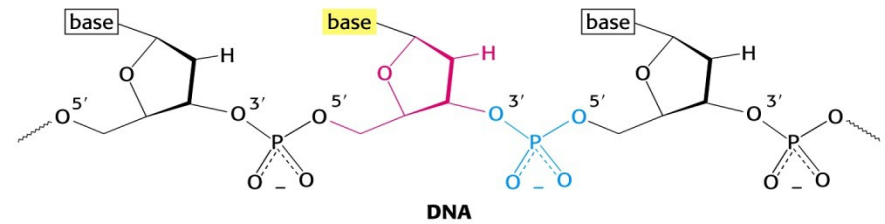
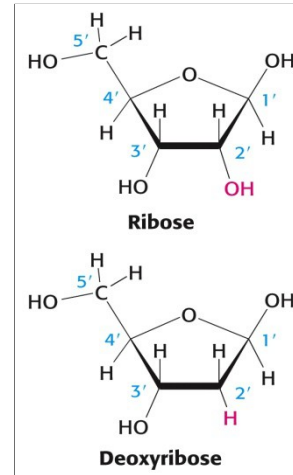
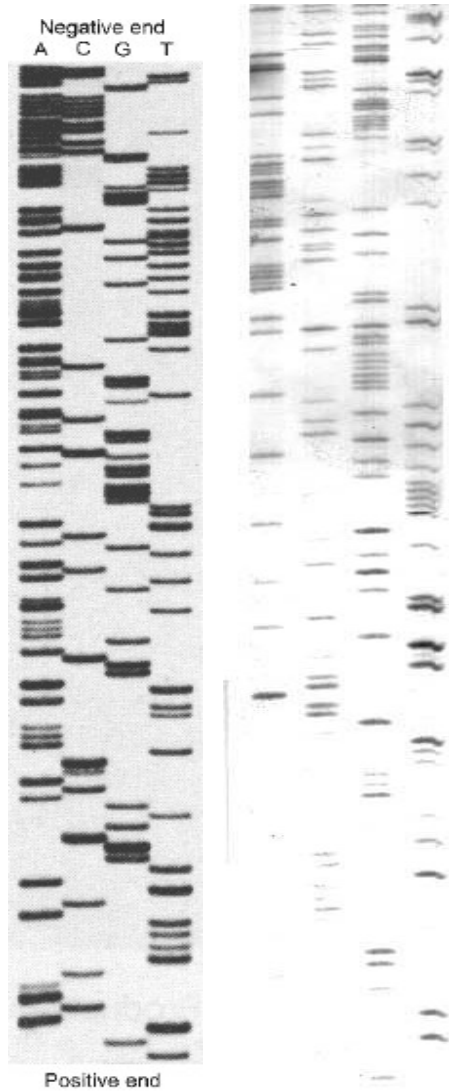


ločimo nastale fragmente po velikosti
(elektroforeza na 7 % PAG + 7 M urea)



Določanje zaporedja po dideoksi-metodi (3)

dideoksinukleotidi kot terminatorji v polimerazni reakciji:



Avtomatski sekvenatorji

Dva različna pristopa:

- vsako bazo označimo s svojim barvilom in analiziramo v 1 nanosu (4 reakcije = 1 zaporedje hkrati); detektor ločeno zazna posamezne signale in program generira izpis
- uporabljamo samo 1 barvilo in vsako bazo nanese ločeno (4 nanosi za 1 zaporedje); detektor prebere vsakega od 4 signalov ločeno, program integrira signale in generira izpis

Barvila so fluorescenčna (emisija v vidnem ali IR delu spektra) ali radioaktivna.

Fragmente ločujemo s klasično PAGE ali s kapilarno elektroforezo.

Aparatura ima ločevalni del, detektorski del in kontrolni/integracijski del.

Problemi: prekrivajoči spektri barvil, sekundarne strukture in kompresije

Postopek:

priprava matrične DNA (plazmid, fag,...)

sekvenčna reakcija (vgradnja barvila med polimerazno reakcijo)

čiščenje označene DNA

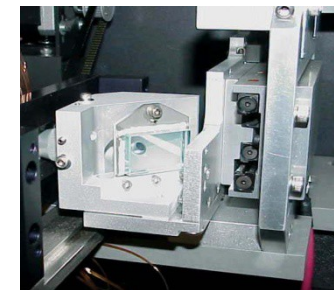
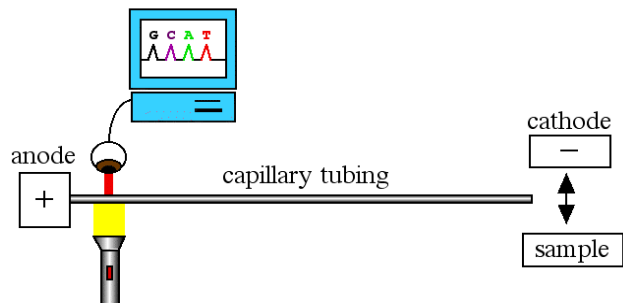
nanos na elektroforezni nosilec

ločevanje na nosilcu

detekcija in interpretacija signalov (surovi signal → odštevanje ozadja, mapiranje signalov, oblikovanje izpisa)

Naprave na osnovi kapilarne elektroforeze

Proizvajalec ABI (Applied Biosystems)



Kapilare so običajno iz silikata, dolge 30-50 cm in imajo notranji premer ~50 μm ; nanos 10-100 nl.

Za delo z velikim številom vzorcev so na voljo večkapilarni sistemi z vzporedno detekcijo.

Uporabljamo komercialna barvila (Big-Dye; ABI)

Ločevanje pri 10-30 kV.

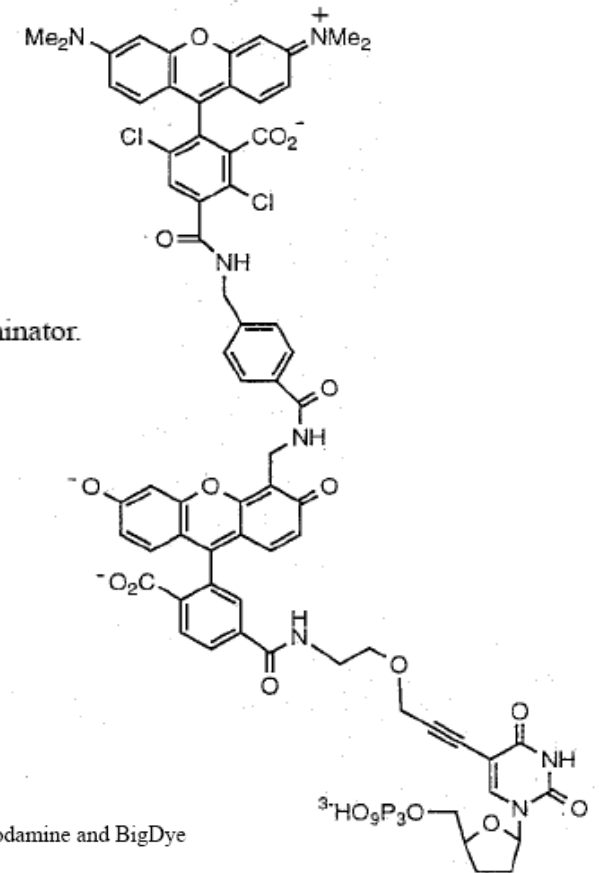
Prednosti sistema: ni potrebno pripravljati PA-gelov, ni gibljivih delov.

Slabosti: potrošni material je sorazmerno drag (kapilare, reagenti), zanesljivost določenega zaporedja je ~98,5 %.

Kemizem "Big-Dye"

Označeni so terminatorji (→ vedno lahko uporabimo enake)

Structure of the ddT-BigDye terminator.



ddT-EO-6CFB-dTMR

Table 1. Linkers, fluorophores and final terminator concentration for each nucleotide of the three terminator sets: rhodamine, d-rhodamine and BigDye

Terminators	Rhodamine			d-Rhodamine			BigDye			
	Nucleotide	Linker ^a	Dye	Final conc. (μM)	Linker	Dye	Final conc. (μM)	Linker	Donor dye	Acceptor dye
ddATP	PA	5-R6G	0.02	PA	dR6G-2	0.02	PA	6-FAM	dR6G-2	0.11
ddCTP	PA	6-ROX	0.13	EO	dTAMRA-2	0.12	EO	6-FAM	dROX-2	0.16
ddGTP	PA	5-R110	0.01	EO	dR110-2	0.01	EO	5-FAM	dR110-2	0.10
ddTTP	PA	6-TAMRA	0.23	EO	dROX-1	0.18	EO	6-FAM	dTAMRA-2	1.12

^aThe linkers are PA, propargylamino and EO, propargyl ethoxyamino.

Sekvenatorji na osnovi CE (3)

Izpis:

