# 9. Hibridizációs technikák

A hibridizációs technikák segítségével adott nukleinsavak méretét, elhelyezkedését, mennyiségét tudjuk meghatározni. Bár a technikák jó részét már az 1970-es években ismerték, még ma is kiterjedten használják őket. A módszerek lényege az, hogy egy (többnyire radioaktívan) jelölt egyszálú, általában 200–2000 nukleotidnyi nukleinsav (**próba**) specifikusan kötődik az egyszálú nukleinsav komplementer szakaszához. A jelölés következtében tudjuk az adott nukleinsav jelenlétét, mennyiségét kimutatni.

## 9.1. Southern-blot

A technika a nevét Edwin Southernről, a módszer feltalálójáról kapta. Segítségével főleg **genomi DNS-t** tudunk vizsgálni; **deléciókat**, **inszerciókat**, **génátrendeződéseket**, bizonyos esetekben (restrikciós endonukleáz hasítóhelyek érintettsége esetén) pontmutációk jelenlétét tudjuk kimutatni. Akár genetikai „ujjlenyomatok” készítésére is használható.

A módszer lényege, hogy a genomi DNS-t valamely restrikciós endonukleázzal **megemésztjük**, majd agaróz gélen **megfuttatjuk**. A futtatás után a DNS-t **egyszálúsítani** kell; a gélt 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH oldatban inkubáljuk. A denaturáció után többnyire a gél semlegesítése következik; ennek során az egyszálú DNS-ek nem tudnak visszahibridizálni a komplementer szálhoz, mert térben messze kerültek egymástól. A gélből a DNS-t valamilyen technikával **nitrocellulóz**, vagy **nejlon membránra** transzferáljuk (9-1. ábra).

A transzfer történhet többféle módon: **vákuummal**, **elektromos áram** segítségével és a **hajszálcsövesség** jelenségét kihasználva. Az első kettőhöz speciális készülékre van szükség, ezért az utóbbi technika a legelterjedtebb.

Ha az utóbbi, kapilláristranszfer technikát használjuk, akkor a gélt valamilyen transzfer pufferrel (pl. 1,5 M NaCl, 0,15 M Na-citrát) átitatott vastag szűrőpapírra helyezzük, amelynek végei egy transzfer-puffert tartalmazó tankba lógnak. A gél tetejére helyezzük a nitrocellulóz membránt, annak a tetejére pedig egy köteg papírtörülközőt teszünk. A papírtörülközők tetejére plexi- vagy üveglap kerül, melynek súlya egymáshoz préseli a papírtörülközőket. A papírtörülköző-torony benne lévő apró kapillárisok miatt kiszívja a gélből a folyadékot, ami alulról folyamatosan pótlódik. A folyadék sodorja magával a DNS-t is, ami viszont a nitrocellulóz membránon nem jut át, ahhoz hozzáköt. Így gyakorlatilag elkészíthető a gélnek a membrán-„replikája”.

Akár két replikát is készíthetünk ugyanarról a gélről. Ha két membránt teszünk a gél két oldalára, akkor papírtörülközők segítségével mindkét oldalra ki tudjuk belőle szívatni a DNS-t. Hátránya ennek a módszernek, hogy csak a gélben eredetileg található folyadékmennyiség használható a DNS transzferéhez, nincs folyadék-utánpótlás, ezért a transzfer minősége rosszabb lesz, mint az előző esetben.

A membránra transzferált DNS-t erősen (kovalensen) rögzíteni kell a membránhoz. Ezt leggyakrabban a következő módokon oldják meg:

1. S**zárítókemencében**, 80 °C-on kb. 1-2 óra alatt „rásül” a DNS a membránra.

2. **Mikrohullámú sütőt** használva ez az idő jelentősen megrövidül, akár 2 perc is elég, hogy a nukleinsav a membránhoz kössön.

3. **Ultraibolya fény** (254 nm hullámhosszú) segítségével 1-2 perc alatt **keresztköt** egymással a membrán és a DNS. A hosszú ideig tartó besugárzást kerülni kell, mert az UV hatására törik a DNS.

A rögzítés után a membránt nejlonzacskóba vagy hibridizációs kamrába zárjuk, majd előzetesen **egyszálúsított DNS-t** (leggyakrabban lazacsperma-DNS-t vagy csirkevér-DNS-t) tartalmazó oldattal 42–68 °C-on (leggyakrabban **55 °C** közelében) 1 óráig **prehibridizáljuk** a membránt. Az egyszálú DNS **aspecifikusan** leköt minden helyet a membránon és a gélből származó, membránkötött DNS-en. A prehibridizációval párhuzamosan elkészítjük a radioaktív próbát, melynek többféle módja lehet:

- **5’ végjelölés** polinukleotid kinázzal és γ-foszfátján radioaktív ATP-vel.

- **Komplementer próba** készítése, mely részben radioaktív nukleotidokat tartalmaz. A próba elkészítéséhez a kimutatni kívánt szakasszal megegyező bázissorrendű templátot, véletlenszerű nukleotidsorrendet tartalmazó, heterogén oligonukleotidokat, ún. **random primereket** (például random hexamerek), és valamilyen polimerázt (például klenow fragmentet) használunk. Random primerek helyett használhatunk szekvenciaspecifikus primert is.

- **Nick transzlácó** E. coli DNS-polimeráz I és radioaktív nukleotidok segítségével (lásd 6. fejezet).

- Aszimmetrikus **PCR-reakció** (az egyik szálból sokkal több lesz), vagy lineáris PCR-reakció (csak az egyik, a komplementer szál szaporodik fel) radioaktív nukleotidok felhasználásával.

- ***In vitro* transzkripció** radioaktív nukleotidokkal (ilyenkor radioaktív RNS a kapott próba)

A prehibridizáció után az oldathoz hozzáadjuk a radioaktív próbát, és 3–12 órát hibridizáltatjuk a membránhoz kötött DNS-hez. A hibridizáció során a specifikus próbák a komplementer helyekről leszorítják az aspecifikusan kötődő DNS-t, és bekötnek a helyére. A hibridizáció után egyre alacsonyabb koncentrációjú sóoldatokkal mossuk a membránt, hogy az aspecifikus helyre kötődött próbák lejöjjenek róla. Mosás után a membránt szárítjuk, majd átlátszó fóliába csomagoljuk, és röntgenfilmmel exponáljuk 16–24 óra hosszat (autoradiográfia). Az előhívás után tudjuk kiértékelni a filmet (9-1. ábra).

9-1. ábra

http://www.bio.davidson.edu/people/kabernd/seminar/2002/method/lemethod/southblotle.jpg

2013.09.20.

## 9.2. Northern blot

Northern blottal adott specifikus gének működése következtében termelődött **RNS-ek szintjét** hasonlítjuk össze. A kísérlet menete nagyon hasonlít a Southern blotnál megismerttel. Az RNS-eket méret szerint elválasztjuk, majd specifikus próbákkal hasonlítjuk össze a különböző mintákban lévő, adott génről átíródott RNS-ek mennyiségét, amiből következtetni tudunk az adott gének expressziós aktivitására. Fontos különbség, hogy az elektroforézis előtt az RNS-eket nem kell restrikciós endonukleázzal emészteni, a különböző méretű RNS-ek szépen elválnak egymástól. (A nagyon sokféle mRNS olyan sűrű csíkozást alkot, hogy a gélt megfestve a csíkokat egy halvány, elmosódott oszlopnak látjuk.)

A northern blot egyik legfontosabb alapfeltétele, hogy ép RNS-t kell hozzá izolálni. Az RNS-ek épségét az izolálást követően agaróz gélelektroforézissel ellenőrizzük: a riboszómák alegységeiben található nagyobb RNS-ek (18S és 28S eukarióta sejtekben) két különálló csíkként látszanak EtBr-festés után. Ha ezek a csíkok nem, vagy nem elég élesen látszanak, akkor feltételezhető, hogy nem csak a riboszomális, de az mRNS-ek is degradálódtak. Degradálódott RNS-t nem szabad northern blot analízishez használni.

A denaturáló gélen történő elektroforézis során az összehasonlítandó mintákból származó RNS-ekből egyforma mennyiségeket (pl. 20-20 µg-ot) futtatunk 2,2 M formaldehidet tartalmazó agaróz gélen. Futtatás előtt az RNS-ek másodlagos szerkezetét nagyrészt meg kell szüntetni, hogy az ne befolyásolja a futás sebességét és ne akadályozza a későbbi hibridizációt. Az RNS-mintákat egy óra hosszat 55 ºC-on kell kezelni glioxállal vagy formaldehid/formamid keverékkel, hogy az RNS másodlagos struktúráit tönkretegyük, és egyszálú RNS-ként, csak a méretének megfelelően fusson a gélben. A mintákat jégre tesszük, glicerint és brómfenolkék festéket tartalmazó gélfelvivő pufferrel keverjük, majd a gél zsebeibe töltjük, és kezdődhet az elektroforézis. Az elektroforézist formaldehidet tartalmazó pufferben, alacsony feszültségen végezzük, hogy minél jobb elválasztást kapjunk. A hosszú (sokszor egész éjszakán át tartó) elektroforézis után a gélt DEPC-kezelt desztillált vízben mossuk, majd a későbbi transzfer puffer összetételével azonos, vagy nagyon hasonló összetételű oldattal ekvilibráljuk.

A transzfer a Southern blotnál megismerthez hasonlóan történik, gyakran más transzfer puffert használunk a nitrocellulóz, és mást a töltött nejlonmembránra történő transzferhez. A membránokra a már ismert módokon (UV, mikrohullám, hő) rögzítjük az RNS-t. A próbák előállítása, a prehibridizáció, a hibridizáció, a mosás, az expozíció és az előhívás ugyancsak a már ismertetett módon történik, néhány csekély metodikai különbséggel (9-1. ábra). A röntgenfilm feketedésének minták közötti különbözőségét az adott RNS-darabok mennyiségének különbsége okozza, ezt denzitométerrel tudjuk kvantifikálni.

## 9.3. Dot blot és slot blot

A dot blot és a slot blot technikákat kizárólag **mennyiségi összehasonlításra** alkalmazzuk. Ezeket a technikákat akkor alkalmazzuk, ha korábbi kísérletekben már meggyőződtünk arról, hogy az adott próba kizárólag az általunk kívánt nukleotidszekvenciához köt (például a korábbi Southern blot vagy northern blot hibridizáció során egyetlen csíkot kaptunk az adott mintában, nem voltak aspecifikus jelölődések). Ekkor megspórolhatjuk a nukleinsavak egymástól való elválasztását. Dot blot esetén ugyanazt a nukleinsav-mennyiséget egyforma térfogatban (pl. 20µl) kell oldanunk, majd pipettával felcsepegtetnünk egymás mellé. Slot blot esetében az azonos térfogat nem szükséges, ugyanis ilyenkor azonos felületű lyukakat tartalmazó műanyag keret és vákuum segítségével fogjuk a nukleinsavakat a membránra szívni (9-2. ábra). Száradás után a membrán sorsa ugyanaz, ami az előző két esetben. Itt is denzitometriás módszerrel próbáljuk kvantitálni a különböző mértékben feketedett pontokat.

9-2. ábra

http://www.bio-rad.com

http://imagej.nih.gov/ij/docs/examples/dot-blot/dot-blot.jpg

## 9.4. Nuclease-protection assay

Csakúgy, mint a northern blotot, ezt is elsősorban adott génekről átíródott specifikus **RNS-szintek összehasonlítására** használják. Használható még **RNS-térképezésre** (3’, 5’ végek, intronok felderítése). A technika lényege, hogy itt nem a membránon, hanem a **reakciócsőben** történik a próba **hibridizációja**. Előre gyártott, radioaktív próbákat érdemes vásárolni, melyek komplemeterek a kimutatni kívánt RNS-sel. Gazdaságossági szempontokat is figyelembe véve legtöbbször nem egyfajta, hanem többfajta RNS-hez való próbákat szoktak egy csőben árulni, így egyszerre több (akár 8-10-12, általában ugyanabban az élettani folyamatban szerepet játszó) gén expresszióját tudjuk egyidejűleg vizsgálni. A lényeg, hogy a próbák hossza megfelelően nagy mértékben különbözzön, hogy azok a gélen jól elkülöníthetőek legyenek.

A radioaktív próbákat **feleslegben** kell az RNS-mintához adni, hogy minden specifikus RNS-re jusson. A hibridizáció a hőmérséklet emelésével, majd lassú csökkentésével történik. A mintához ezután adjuk hozzá a nukleázt. DNS-próba esetén S1 nukleázt, RNS próba esetén pedig többnyire egyszálú RNS-t emésztő enzimkeveréket szoktunk használni (de az S1 nukleáz is működik). Az emésztés során elemésztődnek az egyszálú RNS-ek, az egyszálú próbák, az RNS/RNS és az RNS/DNS hibridek túlnyúló végei (RNS-térképezésnél a dupla szálból kilógó, egyszálú hurkok is leemésztődnek). A mintákat ezután poliakrilamid gélen megfuttatjuk, a gélt megszárítjuk, és röntgenfilmmel exponáljuk (9-3 ábra). Az előhívott film denzitométerrel értékelhető. A membránreplika kiiktatása miatt a nukleáz-protection assay 20–100-szor **érzékenyebb**, mint a northern blot.

9-3. ábra

http://216.74.34.73/m/37/Article/ambionf00165.jpg

http://216.74.34.73/m/37/Article/ambionf00137.jpg

## 9.5. DNS-chip (DNA-microarray)

A chiptechnológia használható **génexpresszió** (mRNS-mennyiségek) relatív mérésére, de használható genomok összehasonlítására, SNP (pontmutáció) detektálására, alternatív splicing és génfúzió kimutatására. A DNS-chip egy olyan lapocska, mely nagyon sok (akár több tízezer) piciny cellára van osztva. Mindegyik **cellában** ugyanannak az organizmusnak egy-egy génjét, vagy génvariánsát reprezentáló **oligonukleotidok** (25 vagy 60 bázis hosszúak, a fejlesztő cégtől függően) igen sok kópiája található a cella aljához rögzítve. A chipek celláiba az oligonukleotidokat mesterségesen szintetizálják ún. fotolitografikus ciklusokban: minden sötét/fény ciklusban újabb bázis szintetizálódik a lánchoz.

A vizsgálandó mintában lévő, többnyire igen heterogén nukleinsav-állományt a hibridizáció előtt valamilyen **fluoreszcens jelöléssel** kell ellátni. Többnyire cDNS, ritkábban RNS felhasználásával történik a hibridizáció. Ennek során a jelölt nukleinsavak mind-mind az őket reprezentáló cellában lévő, kötött oligonukleotidhoz hibridizálnak. A nem komplementer, aspecifikus hibridizáció megfelelő körülmények között lemosható a chipről (9-4. ábra). Alapesetben minden mintához külön chipet kell használni. Ha egy adott specifikus nukleinsavból több volt az egyik mintában, mint a másikban, akkor abból több is hibridizál a megfelelő cellába, ezáltal nagyobb fluoreszcens jelet kapunk a nukleinsavhoz kötött festék gerjesztésekor az egyik chipen, mint a másikon.

9-4. ábra

http://en.wikipedia.org/wiki/File:NA\_hybrid.svg

A chipek úgy vannak kialakítva, hogy néhány zsebben negatív és pozitív **kontroll próbák** találhatók. A hibridizáció előtt a pozitív próbákhoz kapcsolódni képes nukleinsavakat keverünk a mintánkhoz. Mivel a hozzáadott oligonukleotidok mennyisége ismert, ezekkel a kontrollokkal tudunk kalibrálni a kapott fluoreszcencia intenzitása alapján. Vannak olyan készülékek, amik **két** különböző hullámhosszú **fluoreszcens fényt** tudnak detektálni. Ezzel lehetővé válik, hogy két különböző mintát ugyanazon a chipen vizsgáljunk. A két mintát különböző színű fluoreszcens festékkel megjelölve az emittált fény intenzitásának alapján kideríthető, hogy adott specifikus nukleinsavak mely mintában voltak többségben (9-5. ábra).

A hibridizált fluoreszcens próbák fényintenzitásának összehasonlítását sohasem szemmel végezzük; a fluoreszcens detektor által mért eredményt **számítógép analizálja**, a fényerősséget a kontrollokra normalizálja. Több kísérlet statisztikai analízise után tudjuk csak egyértelműen igazolni az esetleges különbségeket. Ma már kaphatók olyan chipek, amelyek ugyan kevesebb gén analízisével (amelyek mindegyike valamilyen kapcsolatba hozható a vizsgálni kívánt élettani folyamattal), de több párhuzamos mérést tesznek lehetővé egyszerre, ezáltal gazdaságosabbá téve a technikát.

9-5. ábra

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Microarray-schema.jpg

http://csmbio.csm.jmu.edu/bioweb/Bio480/08Fallmicroarray/group4/microarray%20intro.jpg

2013.09.20.

A DNS-microarray igen hatékony technika, nagyon sok változót tud egyszerre vizsgálni. Hátránya, hogy még nagyon drága, speciális műszerezettséget kíván, és a kapott eredmények csak hozzávetőleges pontosságúak, meg kell őket erősíteni valami más technikával (real-time PCR, northern-blot stb.) is.

## 9.6. Kolónia hibridizáció

Kolónia hibridizációval azt tudjuk kideríteni, hogy a sok lehetséges közül melyik baktériumkolónia (vagy bakteriofág-mező) tartalmazza az általunk vizsgálni kívánt DNS-darabot (vagy expresszál egy specifikus RNS-t).

A baktériumkolóniákra kör alakú, a petricsésze aljának felületével megegyező méretű nitrocellulóz (vagy nejlon) membránt teszünk. A membrán és a petricsésze egyes pontjait bejelöljük, hogy a későbbiekben vissza tudjuk idézni a pontos orientációt. A membránra odatapad a kolóniákban lévő baktériumok egy része. A membránt óvatosan leszedjük a plate-ről, majd a rátapadt baktériumkolónia-maradékokkal felfelé NaOH-t és SDS-t tartalmazó pufferbe áztatott szivacsra helyezzük. A puffer átitatja a membránt, a baktériumok elpusztulnak és felnyílnak, a bennük lévő DNS denaturálódik. A membránt óvatosan egy neutralizáló oldatot tartalmazó szivacsra tesszük át, minek a hatására az egyszálú DNS hozzáköt a membránhoz. Esetleges proteázos emésztéssel eltávolíthatjuk a DNS-hez kötődő fehérjéket. A membránt többször mossuk, majd kiszárítjuk. Ezután ugyanúgy kezeljük, mint southern blot esetén. Az előhívott röntgenfilmen lévő fekete foltok megmutatják, mely baktériumkolóniákban van jelen a keresett nukleinsavdarab (9-6. ábra).

9-6. ábra

http://wiki.biomine.skelleftea.se/biomine/molecular/images/pic034.gif

2013.09.20.

## 9.7. Fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH)

A FISH-assay segítségével citogenetikai vizsgálatok során adott DNS-szakaszok **jelenlétét** és **lokalizációját** tudjuk kimutatni a **kromoszómában**. A vizsgálni kívánt szövetet vagy sejteket a tárgylemezen fixáljuk, majd permeabilizáljuk. A DNS az üveg tárgylemez felszínére tapad. Az így kapott mintát rövid, aspecifikus DNS-szakaszokkal kell prehibridizálni. A **specifikus próbát** fluoreszcensen kell jelölni (pl. fluoreszcens nukleotidok beépítésével nick-transzláció vagy PCR-reakció során), majd a prehibridizáció után 12 órán keresztül inkubálni a jelölt próbával. A mosások után a jelölés fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizualizálható (9-7. ábra).

9-7. ábra

http://1.bp.blogspot.com/-E-vetKdgrE0/Tmdu9La425I/AAAAAAAAHFQ/lKBI9Qn7ZEU/s1600/01.jpg

2013.09.26.