بسمه تعالی

دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

گروه بیوتکنولوژی

تهیه کننده دکتر بهرام کاظمی

۲۶- نشان دار کردن اسيد هاي نوكلئيك

مقدمه: نشاندار كردن اسيد هاي نوكلئيك تحول بزرگي در بيولوژي مولكولي ايجاد نمود. اين تكنيك براي تاييد كارهاي مولكولي و همچنين غربالگري كلني هاي باكتري حاوي پلاسميد نوتركيب (هيبريداسيون) استفاده مشود. انشاا.... در اين كارگاه با روشهاي نشاندار كردن اسيد هاي نوكلئيك بصورت عملي آشنا خواهيم شد و روش هيبريديزاسيون را عملا" انجام ميدهيم. دراينجا مختصري از كارهايي كه انجام خواهد شد توضيح داده ميشود.

رو شهاي نشاندار كردن آنزيماتيك DNA :

Random - Primed Labeling

Nick Translation

سنتز پروب بكمك PCR.

در روش Nick translation نوكلئوئيدهاي نشاندار نشده با نوكلئوئيدهاي نشاندار شده تعويض ميشوند (سنتزجابجايي). در دو رو ش ديگر به سنتز DNA جديد منجر ميشود (Net synthesis).

۲۷- RANDOM - PRIMED LABELING

در هيبريديزاسيون علاوه بر استفاده از پروب هاي نشاندار شده با راديوايزوتوپها ازگروههاي تغيير يافته غير راديواكتييو مانند بيوتين ياديگوكسي ژنين نيز استفاده ميشود. اين رو ش در سال ۱۹۸٤ و ۱۹۸۳توسط Feinberg و Vogelstein ابداع گرديد. نشاندارکردن توسط آنزيم klenow انجام ميشود كه قطعه بزرگ DNA پلميراز I اشرشياكلي ميباشد. Klenow فاقد فعاليت اگزونوكلئازي `3 ® `5 ميباشد ولي برعكس داراي فعاليت اگزونوكلئازي `5 ® `3 ميباشد.

براي نشاندار كردن با روش Random - Priming اول DNA دو رشتهاي)خطي(توسط حرارت دناتوره شده و سپس روي يخ سرد ميشود تامانع رناتوراسيون DNA شده ويصورت زنجيره ها ي تك رشته اي باقي بماند. Supercoiled DNA مقدار كمتري نشاندار ميشود چون Reannealing رشته هاسريعتر انجام ميشود.بنا براين مولكولهاي DNA جلقوي بايد قبل از نشاندار شدن بصورت خطي درآمده باشند تا عمل Labeling به مقدار زياد انجام گيرد.

از قطعات كوچك DNA هگزا نوكلئوتيدي با تواليهايمتفاوت به عنوان پرايمر(آغازگر) براي سنتز DNA بكمك يك آنزيم DNA پليمراز استفادهميشود. مخلوط هگزانوكلئوتيدهابه روش تصادفي – اتفاقي به DNAدناتوره شده هدف Anneal ميشوند. اين اليگونوكلئوتيدهادر واكنش پليمرازبعدي به عنوان primer عمل ميكنند. سنتز پروب با اضافه كردن آنزيم پليمراز klenow و چهاردزوكسي نوكلئوتيد تري فسفات(كه حداقل يكي ازآنها [dUTP] باهاپتن نشاندارشده است) شروع ميشود. چون پرايمرها خاصيت تصادفي - اتفاقي دارند ميتوانند به همه ترادف هاي هدف ا تصال يابند. در اثناي سنتزبه روش Random - primed هر دو

زنجيره DNA (رشته‌هاي مكمل DNA هدف) بعد از دناتوراسيون به عنوان الگو عمل ميكنند. غلظت زياد پرايمر مانع Reanealing دورشته الگو با يكديگر ميشود.

در اين روش به علت عمل پرايمرهاي كوتاه معمولا" رشته DNA نشاندار كوتاهتر از DNA الگو مي باشد .چون هر دو رشته DNA اصلي به عنوان Template عمل ميكنند رشته هاي پروب نشاندار نيز تا اندازه‌اي مكمل يكديگر هستند، بطوري كه قبل از هيبريديزاسيون لازم است دناتوره شوند.

از روش Random - primed براي نشاندار كردن قطعات DNA به مقدار چند نانوگرم تا چندين ميكروگرم استفاده ميشود. نشاندار شدن بعداز ۳۰-۶۰ دقيقه به حداكثر ميرسد و هنگام انكوباسيون طولاني ورود ماده نشاندار به رشته ثابت است . حساسيت ها،پتن‌هايي مانند بيوتين و Digoxigenin از طريق Random priming تا ۱۰۰ فمتوگرم DNA ميباشد.

۲۸- Nick translation

اين روش اولين با ربراي نشاندار كردن پروب با را ديوايزوتوپ توسط Rigny در سال ۱۹۷۷ ابداع گرديد. در اين روش عمل دو آنزيم DNase I و DNA polymerase I اشرشياكلي روي DNA دو رشته‌اي همزمان‌انجام ميگيرد. DNase I يك اندونوكلئاز اختصاصي هيدروليز كننده باند هاي فسفودي استر رشته هاي DNA ميباشد. اين عمل منجربه ايجاد اليگونوكلئوتيدهاي كوتاه حاوي ۵` فسفات ميشود. عمل آنزيم روي هر رشته DNA مستقيما و در حضور يون Mg^{2+} انجام ميگيرد و شكافهايي در DNA يك رشته‌اي بوجود مي آورد كه تعداد آنها به غلظت Dnase I در مخلوط انكوباسيو ن بستگي دارد.

اين عمل با غلظت پايين Dnase I هم انجام ميشود . در اين شرايط فقط تعداد كمي Nick در هر زنجير DNAبه وجود ميآيد. آنزيم Polymerase I DNA داراي سه فعاليت كاتاليتيك مستقل يعني پليمرازي ٥`٣® `, اگزونوكلئازي ٥`٣® ` واگزونوكلئازي ٣®` ٥` ميباشد.

فعاليت نوكلئاز ي ٥ `٣®` آنزيم باعث حذف دزوكسي نوكلئوتيدها از انتهاي `5 فسفات ميشود، با فعاليت پليمرازي ٥` ٣® ` آن ، آنزيم مذكوربطور همزمان نوكلئوتيدتري فسفاتها را به انتهاي ٣`- OHآزاد شكاف (Nick) اضافه ميكند. اگر دزكسي نوكلئوتيد تري فسفات هاي همراه دزوكسي نوكلئوتيدتري فسفاتهايتغيير يافته با هاپتن در مخلوط واكنش با شند در اثناي واكنش پليمريزاسيون هاپتن وارد زنجيره ميشود. چون عملDNA Polymerase I وابسته به DNA الگو است ترادف نوكلئوتيدي هنگام Nick translation بدون تغييربا قي ميماند.

٢٩- نشاندار كردن DNA توسط PCR

PCR يك روش توانمند براي سنتز پروبهايDNA (DNA بدون وكتور) مي‌باشد اين روش در سال١٩٨٤توسط موليس ابداع گرديد وبراي كارهايي مانند تكثير, Cloning , Sequencing و سنتز پروب بكار گرفته شد. در اين روش دو پرايمرحاوي دزوكسي نوكلئوتيدتري فسفاتهاي نشاندار شده درپليمريزاسيونDNA شركت ميكنند. PCR توسط يك DNA پليمراز گرمادوست مانند Taq انجام ميشود واكنش Amplification در ٣٠ سيكل حرارتي در سه مرحله دناتوراسيون، Annealing وExtenssion انجام ميگيرد.

۳۰- هيبريديزاسيونHybridization

DNA دو رشته‌اي محلول تحت تاثير حرار ت دناتوره ميشود. اگر حرار ت در حد Tm مولكول DNA باشد دناتوراسيون برگشت ناپذير است يعني رشته‌هاي DNA در محيط سرما جدا از يكديگر باقي ميمانند. Tm يك مولكول DNA دو رشته‌اي ايستايي DNA در حرارت مي‌باشد(Function of. the Thermal Stability) در يك DNAهومولوگ اين پديده انعكاس نسبت با ز ها يعني محتواي G+C موجود در DNA ميباشد. C وG با سه اتصال هيدروژني بهم متصل ميشوند در حاليكهT وA با دو اتصال بهم مربوط ميشوند. Tm مولكول DNA تحت تاثير قدرت يوني محيط (با افزايش يونها Tm بالا ميرود)، حضور يونها(Mg^+) ، پلي ساكاريدها, پرتئين و حلال‌هاي آلي(Formamide)) قرار ميگيرد.

رشته‌هاي DNA دو رشته‌اي دناتوره شده در حرار ت كمتر از Tm خودبخودبهم چسبيده و نهايتاباDNA مكمل خود يك هيبريد پايدارتشكيل ميدهند بنا بر اين واكنش از كينتيك ثانوي(Second- Order Kinetics) تبعيت ميكند. هيبريديزاسيون نيز شبيه Tm تحت تاثير فاكتورهايي مانند قدرت يوني و حلال‌هاي آلي قرار ميگيرد. اصطلاح Stringency در اين مورد مفهوم مهمي است اما همه اين فاكتورها (حرارت ، غلظت نمك، وجود حلالهاي آلي) را دربرنميگيرد. در شرايط Stringency پايين (نمك زياد و حرارت كم) DNA هاي با شباهت كمتر با همديگر هيبريد ميشوند. در صورتيكه درStringency بالا (غلظت كم نمك و حرارت بالا در حضور فرماميدHybridization) فقط بين دو DNA باهومولوژي با لا اتفاق ميافتد. در اين شرايط حرارت Hybridization ۳۰-۲۰ درجه پايين تر از(melting tm) (temprature)است .براي انجام Hybridization بايد DNAهدف را روي يك پشتيان جامد منتقل نمود تا DNA نشاندار (بصورت محلول) با DNA هدف هيبريد تشكيل دهند. در ساترن بلات DNA يا RNA روي ژل آگارز الكتروفورز ميشوند و سپس روي غشاي

نيتروسلولزيا نايلوني منتقل ميگردند. از مواد پشتيان كننده ديگر مانند سلولز فعال، سفاكريل، پلي استيرن يا بيدهاي مگنيتك نيز ميتوان استفاده نمود.

پارامترهايHybridization

پايداري هيبريد:

تشكيل هيبريدهاي اسيدنوكلئيك يك پروسه برگشت پذير است . Tm عبارت است از حرارتي كه نصف مولكولهاي DNA دوپلكس‌به تك رشته تبديل ميشوند و تحت تاثيرغلظت نمك كاتيونهاي يك ظرفيتي (مول بر ليتر) تعداد نوكلئوتيدهاي زنجيره، تركيب‌بازها (كه با G+C بيان ميشود) و غلظت عوامل ناپايدار كننده هليكس مانند Formamide قرار ميگيرد.

كينتيك هيبريديزاسيون پروبهاي تك رشته‌اي (Riboprobe) :

ميزان تشكيل هيبريد براي پروبهاي تك رشته‌اي از كينتيك اوليه (First - Order Kinetics) تبعيت ميكند زيرا تقريبا هميشه غلظت پروب بيشتر از Target DNA است ، بالاترين ميزان هيبريديزاسيون در محلول بصورت تجربي مشخص ميشود. درجه Tm در دو پلكسDNA- DNA ۱۵ درجه كمتر از دوپلكس-RNA DNA است.

غلظت كاتيون (M) تاثير كمتري روي ميزانConstant) (rateثابت هيبريديزاسيون DNA-DNA دارد .ميزان هيبريديزاسيون تحت ثير قدر ت يوني پايين قرار ميگيرد. هيبريديزاسيون در M۱ NaClهفت برابربيشتر از M NaCl ۰,۱۸ انجام ميگيرد. كاهش غلظت نمك در حد M NaCl۰,۰۹ تا ۵ برابر ميزان

هيبريديزاسيون را كاهش ميدهد. تا ثير نمك روي تشكيل دوپلكس RNA - DNAتا اندازه‌اي با آنچه ذكر شد اختلاف دارد. در M۰,۱ NaC تشكيل DNA-RNA همسنگDNA-DNA ((Equivalentاست ولي در M ۱ NaClميزان تشكيل دوبلكس RNA-DNA دوبرابر M ۰,۱۸ است.

كينيك هيبريديزاسيون در پروبهاي دو رشته‌اي (DNA)

در پروبهاي دو رشته‌اي هيبريديزاسيون از كينتيك ثانويه ((Second - Order Kinetics)تبعيت ميكند. اين پروبهامي توانند بااسيدهاي نوكلئيك ثابت شده روي فيلتر هيبريد شوند و يادر محلول دوباره Renature گردند. در نتيجه هيبريديزاسيون ۵ برابر آهسته تر از پروبهاي تك رشته‌اي انجام ميگيرد.

پليمرهاي دكستران آنيوني (دكستران سولفات ۵۰۰) ياپلي اتيلن گليكول ۶۰۰۰ اتصال دو رشته پرو ب را در محلول به همديگرتشديد ميكنند. دكستران سولفات محلول را از DNA خارج ميكند بنا براين غلظت موثر DNA افزايش ميابد. اثر دكستران سولفات براي پلي نوكلئوئيدهاي بيشتر از 250bp مشهودتر است و روي اليگونوكلئوئيدها تاثيري ندارد.

وقتي از پروبهاي تك رشته اي استفاده ميشودهيبريديزاسيون تا سه برابر افزايش ميابدو وقتي از Nick translated probe استفاده شود تا ۱۰۰برابر ميشود. مولكول‌هايي كه از طريق Nick translation نشاندار شده‌اند دكستران سولفات تشكيل شبكه پروب (probe network)يا hyper polymer هاراتسريع نميكند وتاكيد ميشود كه تشكيل چنين شبكه‌هايي به اندازه پرو ب بستگي دارد. خاطر نشان ميسازد كه اگر دكستران سولفات در محيط نباشد backgroundهاي غيراختصاصي زياد ميشوند.

روش کار:

Labeling (نشاندار کردن DNA و RNA)

براي نشاندار کردن قطعه DNA (پروب) از کيت Random Primed DNA Labeling شرکت Roch Molecular Biochemicals که با سيستم Digoxigenin (غير راديواکتيو) کار ميکند استفاده ميشود. ديگوکسي ژنين يك هاپتن استروئيدي است کهDNA ، RNA و اليگونوکلئوئيدها را جهتHybridization نشاندار ميکند. و ظهور(Detection) آن بصورت کالريمتري انجام ميشود. براي نشاندار کردنDNA ، ديگوکسي ژنين از طريق اتصال استري وارد dUTP ميشود،

اتصال فوق دربرابر قليا (alkali) ناپايداربوده و اين يك امتيازي است که DIG - ۱۱ - dUTP به آساني توسط قلياز رشته مکمل روي Filter (کاغذ نيتروسلولز يا غشا' نايلون) شسته شده و ميتوان دوباره از فيلتربراي هيبريديزاسيون با پرو ب ديگر استفاده نمود.

- DNA را مد ت ۱۰ دقيقه در آ بجو ش قرار داده دهيد تا به strand DNA Single تبديل شودوبلافاصلهان را روي يخ حاوي نمك منتقل کنيد و مواد زيررا به آن اضافه نماييد.

۱. - ۲ ميکروليتر ازمخلوط هگزانوکلئوئيدها

a. ۲ ميکروليتر مخلوط.dNTP

b. آب مقطر تا حجم ۱۹ ميکروليتر

c. ۱ ميکروليتر آنزيم klenow

۲. با دست به ته لوله ضربه بزنيدتا مواد داخل لوله مخلوط شوندو مختصري سانتريفوژكنيد (quick spin)

۳. - مد ت ٢٤ ساعت (O/N) در ۳۷ درجه قراردهيد.

٤. - واكنش رابا EDTA متوقف كرده وبراي پرسيپيتاسيون Licl با غلظت نهائي M۰,۵ به آن اضافه كنيد

a. رسوب حاصل را در ۵۰ ميكروليتر بافرTE حل كنيد.

۵. - براي كنترل Labeling يك واكنش نيزبا DNA كنترل موجود در كيت انجام دهيد.

بررسي كمي و كيفي پروب نشاندار شده:

از پروب نشاندار شده رقت سريال(۱/۱۰, ۱/۱۰۰, ۱/۱۰۰۰) تهيه كنيد (به هر يك از ويال‌ها ۹ ميكروليتر آب اضافه كرده سپس يك ميكروليتر از پروب به لوله اول اضافه كرده و خوب مخلوط كنيد و همينطور يك ميكروليتر از لوله اول به لوله دوم منتقل كنيدو.....)

با انجام Dot blot روي نايلون يا نيتروسلولز آنهارا ظاهر (detect) كنيد.

۱. پس از انجام (dot) لكه‌گذاري قبل از اينكه لكه‌ها'كاملا خشك شوند توسط UV Crosslinker (مقدار ۱۲۰۰۰ ژول انرژي) آنها را روي غشا ثابت كنيد (وقتي DNA در معرض UV قرار گيرد تيمين موجود در آن با گروههاي آمين روي سطح نايلون cross-link ميشوند .

۲. نايلون را مدت ۱۰ دقيقه دربا فر I قرار دهيد.

۳. غشا را مدت ۱ ساعت دربا فر II قرار دهيد تا فيلتر block شود(جاهائيكه DNA وجود ندارد توسط BSA پوشيده block)) ميشود تا آنتي بادي نتواند روي غشا بچسبد)

٤. غشا را مدت ٢٠ دقيقه در Dig Anti بارقت ١/٥٠٠٠ قرار دهيد.

٥. غشا را چند دفعه با بافر I شستشو داده تا آنتي با دي‌هاي متصل نشده از روي فيلتر حذف شوند.

٦. غشا را بابافر III شستشو دهيد

٧. - لكه‌هاي روي غشا را با (Tetrazolium (NBT Nitro Blue و (Bromo Chloro Indolyl Phosphate BCIP) ظاهر كنيد

٨. با مقايسه رنگ لكه‌ها بارنگ لكه DNA كنترل نشاندار شده موجود در كيت مقدار پروب نشاندار شده را محاسبه كنيد). هر ميكروگرم DNA كنترل حاوي ... نانوگرم DNA نشاندار شده ميباشد.

تهيه Riboprobe

ريبوپروب هااز رونويسي اختصاصي يكي از پروموتورهايT7 ، T3 يا SP6 كه در نزديك DNA كلون شده در يك Vector مناسب قرار دارند تهيه ميشوند .معمولا از پلاسميد Bluescript كه پروموتورهاي T3 و T7 در دو طرف MCS آن قرار دارند استفاده ميشود(قطعه پروب بايد در پلاسميد Bluescript.sk كلون شده باشد).

براي‌تهيه Riboprobe پلاسميد نوتركيب را توسط يك Restriction.Enzyme مناسب برش داده تا بصورت خطي دربيآيد وبرحسب اينكه قطعه كلون شده درDown stream كداميك از پروموتورها قرار گرفته باشد پروموتوررا توسط polymerase RNA اختصاصي آن فعال كنيد تا از قطعه DNA كلون شده در پلاسميد از طريق RUN off Synthesis در لوله آزمايش RNA سنتز شود.

براي تهيه ريبوپروب از كيت (RNA Labeling and Detection Kit)شركت Roch Molecular Biochemicals استفاده ميشود. اين كيت از طريق Run Off Synthesis از DNA معيني كه در پلاسميد مخصوصي كلون شده است (الگو) RNA سنتز ميكند. به ازاي هر۲۵- ۲۰ نوكلئوتيد يك مولكول Digoxigenin–11–UTP وارد رشته ميشود .چون براي سنتز محدوديتي وجود ندارد مقدار زيادي RNA ساخته ميشود .در شرايط استاندارد از هر يك ميكروگرم DNA در حدود ۱۰ ميكروگرم RNA رونويسي ميشود.Riboprobe هايي كه با اين روش سنتز ميشوند داراي خواص زير هستند:

۱. ـ داراي طول معيني بوده و اختصاصي وتك رشته‌اي مي با شند.
۲. شبيه probe DNA ها به يكديگر متصل نميشوند.
۳. ـ اتصال Dig به UTP نسبت به NaOH مقاوم ميباشد.

رو ش كار:

۱. مقدار ۲-۱ ميكروگرم DNA راتوسط Enzyne Resteriction مناسب هضم (digest) كنيد.
۲. بعد از اتمام واكنش آن را extroction P.C.I كرده سپس با الكل رسوب دهيد.(هرگزازRNase استفاده نكنيد).
۳. مقدار۲ ميكروليتر NTP به واكنش اضافه كنيد.
٤. ۲ ميكروليتر Transcription Buffer X۱۰ به آنا ضافه كنيد.
٥. ـ ۱ ميكروليتر ((T3, T7) RNA ploymerase به آن اضافه كنيد.
٦. حجم واكنش را با آب مقطربه ۲۰ ميكروليتر برسانيد.

۷. مقدار ۱ میکرولیتر RNasin (مهار کننده RNase) به واکنش اضافه کنید تااز فعالیت RNase احتمالي درواکنش جلوگیري کند.

۸. لوله را مختصري سانتریفیوژ (spin quick) نموده و ۲-۱ ساعت در ۳۷ درجه قرار دهید.

۹. واکنش رابا EDTA متوقف نموده وبراي رسوب دادن RNA ازLiCl باغلظت نهائي M۰,۵ استفاده کنید.

۱۰. بعد از شستشو با الکل ۷۰، رسوب را در ۱۰۰ میکرولیتر DEPC treated water حل کنید.

۱۱. مقدار ۱ میکرولیتر RNasin به آن اضافه کرده و ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه کنید.

۱۲. کمیت پروب تولید شده شبیه DNA probe تعیین میشود فقط براي تهیه بافر II ازDEPC treated water استفاده شود

۱۳. از RNA نشاندار شده موجود در کیت براي مقایسه پروبها استفاده کنید.

Hybridization

دراین کارگاه براي هیبرید یزاسیون از دو روش Dot blot hybridization وSouthern blot hybridization استفاده میکنیم.

روش دات بلات

۱. از DNA (قطعات DNA کلون شده) رقت سریال تهیه کنید و روي Nylon membrane لکه‌گذاري انجام دهید(Dot bloting).

۲. مدت ٥ دقيقه غشانايلوني را در محلول Denaturing قرار دهيد تا DNA دناتوره شود (لازم به ذكر است كه نايلون نبايد در محلول شناور شود بلكه بايد ته ظرف يا سيني يك لايه كاغذ خشك كن قرار داده شود سپس محلول را روي كاغذ ريخته بطوري كه فقط كاغذ خيس شود وسپس نايلون را روي آن قرار دهيد).

۳. مدت ٥ دقيقه غشارا مانند مرحله قبل در محلول Neutralizing قرار دهيد تا.غشا خنثي شده و از شكنندگي آن جلوگيري شود.

٤. غشا را روي كاغذ خشك كن قرار داده و هنگا ميكه هنوز مرطوب است DNA را باUV Cross Linker روي أن ثابت كنيد.

٥. غشا در اين مرحله آماده است هم ميتوان براي مدتي آن را نگهداري نمود و هم ميتوان پروسه Hybridization را دنبال نمود.

روش ساترن بلات

DNA را با آنزيم‌هاي Restriction مناسب هضم كنيد و سپس آن راالكتروفورز نماييد. ظرفيت اتصال اسيدهاي نوكلئيك به غشا نايلوني ٥٠٠ ميكروگرم در هر سانتيمترمربع ميباشد وبراي فيلتر نيتروسلولوز صد ميكرو گرم در هر سانتيمتر مربع است .

۱. وقتي الكتروفورز انجام شد ژل رابا UV مشاهده كرده وبراي جلوگيري از اصراف مواد قسمتهائي از ژل را كه مورد استفاده نيست حذف كند(ژل را Trim كنيد) .

۲. گوشه (يكي از گوشه‌ها) ژل را علامت گذاري كرده و سپس ۹۰ دقيقه در حرارت اتاق آن را داخل محلول Denaturing دوران دهيد تا DNA دناتوره شود (N NaOH٠,٤) البته DNA هاي

سنگين تراز۱۵kb را بايد با محلول۰,۲۵M اسيد كلريدريك Depurinate نمود تا بتوانند از ژل روي غشا منتقل شوند (اين كار همراه باshaking انجام شود).

۳. واكنش را ۲۰ دقيقه در حرارت اتاق در محلول Neutratizing قرار دهيد (همراه باshakingانجام گيرد).

٤. غشا (membrane Nylon) رابه اندازه ژل بريده و گوشه آن را مانند ژل علامت گذاري كرده و سپس در آب ديونيزه آن را خيس كنيد.

٥. بعد از آماده كردن تا نك انتقال (Transfer Tank) يك قطعه كاغذ صافي روي سيني تا نك قرار دهيد.

٦. كاغذ صافي را حتما" بابافرتا نك خيس كنيد كه حباب هوا در آن قرار نگيرد .

۷. يك لايه كاغذ واتمن۳MM روي آن قرار دهيد بطوري كه دو سر كاغذ دربا فرتا نك قرار گيرد.

۸. ژل رابصورت وارونه(نسبت به موقعي كه الكتروفورز ميشود) روي كاغذ واتمن قرار داده بطوري كه زير ژل حباب هوا قرار نگيرد.

۹. نايلون آماده شده را روي ژل قرار دهيد بطوريكه هوا زير آن نفوذ نكند.

۱۰. يك لايه كاغذ واتمن روي فيلتر قرار دهيد.

۱۱. اطراف آن را با پارافيلم خوب بپوشانيد.

۱۲. يك لايه كاغذ صافي و سپس چندين لايه كاغذ خشك كن روي آن قرار دهيد بطوري كه مايع را جذب كند.

۱۳. يك صفحه شيشه اي روي آن قرار دهيدويك وزنه ۵۰۰ گرمي روي شيشه مستقركنيد.

۱٤. اطراف تا نك را با نايلون بپوشانيد كه تبا دل هوا با خارج انجام نگيرد واز تبخيربافرتا نك ممانعت نمايد.

١٥. براي بافرتا نك از محلول NaOH N٠,٤ استفاده كنيد زيرا براي Nylon بهتر از كاغذ نيتروسلولز ميباشدو موجب دناتوره شدن و ثابت شدن DNA روي نايلون ميشود.

١٦. مدت ٢٤ ـ٤ ساعت در هواي اتاق قرار دهيد.

١٧. نايلون را خارج كرده و با SSC X٢ بشوئيد تا ذرات ژل ازروي آن حذف شوند.

١٨. وقتي نايلون هنوز نمدار است DNA را با دستگاه crosslinker UV روي آن ثابت كنيد.

hybridization Pre (دات بلات يا'ساترن بلات)

١. غشارا داخل كيسه پلاستيكي (bag Hybridization) قرارداده ومقدار ٢٠ml/100cm^{٢} محلول Prehybridization داخل كيسه ريخته و سپس آن را خوب درز گيري كنيد بطوريكه مايع از آن نفوذ نكند(seal شود).

٢. مدت ٢ـ ١/٥ ساعت در ٤٢ درجه قراردهيد(براي ريبوپروب حرارت ٥٠ درجه درنظرگرفته شود)

٣. پروب را مدت ٥ دقيقه درآب جوش قرار داده تا دناتوره شود

٤. بلافاصله روي يخ حاوي نمك قرار دهيد.

٥. يكي از گوشه هاي كيسه پلاستيكي حاوي nylon را بريده و آن را روي كاغذ خشككن قرار داده و با چرخانيدن يك مداد يا ميله شيشهاي گرد روي آن , محلول Prehyridization را از آن خارج كنيد.

٦. مقدار ٢,٥ml/100cm^{٢} پروب مخلوط شده با محلول Hybridization وارد كيسه كنيد.

٧. هواي آن را خارج كرده دوباره آن را seal كنيد.

۸. مدت يك شب آن را در ٤٢ درجه قرار دهيد. (براي ريبوپروب ٥٠.درجه).

Post hybridization

۱. نايلون را از كيسه خارج كنيد.

۲. مدت ٥ دقيقه بامحلول۲ XSSC , 1% SDS همراه shaking در حرارت اطاق نايلون را بشوئيد.

۳. مدت ١٥ دقيقه بامحلول ۲ XSSC , 1% SDSآن را يشوئيد (RT)

٤. مدت ۳۰ دقيقه بامحلول ۲ XSSC , 1% SDSدر٦٥ درجه شستشو دهيد.

٥. Detection آن شبيه پروب انجام ميگيرد.

هيبريديزاسيون با Riboprobe

۱. مراحل blot Dot يا blot Southern شبيه DNA پروب انجام ميگيرد.

۲. دماي Hybridization را ٥٠ درجه درنظربگيريد.

۳. بهتر است پروب (RNA) را هنگام استفاده مدت ٥ دقيقه در آب جوش قرار دهيد تا چنانچه RNA دايره (Loop) تشكيل داده است باز شود.

٤. مراحل شستشو و Detection نيز شبيه DNA انجام ميگيرد.

٥. بايد دقت نمود كه حين پروسه كار Rnase وارد محيط نشود وازتماس دست يا با وسايل كار و نمونه خودداري شود.

٦. حتما" از دستكش استفاده كنيد

۷. وسایل شیشه‌اي، تیپها و محلول‌هارا با ید از آلوده شدن با RNase محافظت نمود.

۸. موادووسایل کاربا RNA باید از وسایل و مواد دیگر جداباشند. وسایل شیشه‌اي بعد از شستشوبا ید در محلول ۰/۱درصدDEPC شناور شوند و سپس اتوکلاو گردند وبعد از آن‌بمدت ۳ ساعت در ۲۵۰ درجه قرار گیرند.

۹. تیپها ، لوله‌هاي سانتریفیوژ و لوله‌هاي فالکن فاقد RNase میباشند ولي با یداتوکلاو شوند.

۱۰. DEPCماده مهار کننده غیر اختصاصي ریبونوکلئاز میباشد که با آدنین موجود درRNA واکنش میدهد.

تهیه Deionized formamide

یکي از مشکلات در hybridization Riboprobe تجزیه شدن RNA توسط آلوده کننده‌ها ي موجود در Formamide میباشد براي جلوگیري از این عمل با ید فرمامید دیونیزه شود.

روش کار:

۱. براي دیونیزه کردن فرمامید احتیاج به رزین (lonexchanger) میباشد .از کاتیون (Carboxymethyl) و آنیون (DEAE (Diethylaminoethyl استفاده میشود.

۲. کاتیون و آنیون (از هر کدام ۵ گرم) جداگا نه بایك لیترآب Equilibrate میشوند. بعد از مخلوط شدن محلول ابري مانند تشکیل میگردد .این محلول را با دستگاه فیلتراسیون در خلا فیلتر(کاغذ صافي واتمن) کرده تا آب رزین خارج شده و رزین روي فیلتربا قي بماند و خشك شود سپس با یك لیتر فرمامید ۳۰ دقیقه روي همزن میچرخد تا خوب مخلوط شود .محلول دو باره با

دستگاه فيلتراسيون درخلا با كاغذ صافي واتمن فيلتر ميشود بطوري كه يك محلول صاف تشكيل ميگردد.اين محلول Formamide Deionizedدر يخچال نگهداري ميشود.

طرزتهيه بافرها:

الف) بافرهاي Detection (ظهور) :

۱- بافرI:

Tris (PH:7.5) 100mM NaCl 500mM

۲- بافرII :

(BSA (blocking reagent 1-3% كه در بافر I ٦٥درجه حرارت داه ميشود تا حل شود

۳- بافر III:

Tris (pH:9.5) 100mM

NaCl 100mM

MgCl2 50mM

ب) بافرهاي Hybridization :

۱- بافرPre hybridization :

Deionized formamide 50%

SSC	5X
Denhardts	5X
hosphate buffer	50mM
SS DNA	125mg/ml

٢- بافر Hybridization :

Deionized formamide	50%
SSC	5X
Denhardts	1X
Phosphat buffer	20mM
SS DNA	25mg/ml
Dextran sulfate	10%

٣- محلول Denhardts :

BSA	1%
Ficoll	1%

Polyvinyl pyrolidone 1%

٤- با فر 20X SSC :

NaCl 3M

Na Citrate 3M

pH: 7