

## 5. BIRULENTZIA-GENEEN DETEKZIOA DNA-ZUNDA HIBRIAZIOAREN BIDEZ

### Materialak

- 1,5 ml-ko eppendorf hodi esterilak
- Horma meheko eppendorfak (PCR)
- Pipetak eta erabili eta botatzeko punta esterilak
- Eskularruak
- Fluxu laminarreko kabina
- Termozikladorea
- Transiluminadore ultramorea
- Paper xurgatzailea
- Nylon iragazkiak
- Transferentzia burutzeko kubeta (gela kokatzeko euskarria sartu behar da).
- Gela kokatzeko euskarria (gela baino zabalagoa eta luzeagoa izan behar da).
- Whattman 3MM papera
- Aluminio-papera
- Agarosa
- Elektroforesia burutzeko kubeta
- Cutter
- Hibridazio labea
- Parafilm (parafinazko papera)
- Hibridazio poltsa
- Poltsak ixteko makina
- Plataforma birakaria
- Izokin espermaren DNA

### Disoluzioak

- Ur molekularra autoklabatuta
- 10X *Taq polimerasa* tanpoia
- 50 mM magnesio kloruroa
- Abiarazleak
- dATP, dGTP, eta dCTP: 0.2 mmol/l bakoitzeko

- DIG-11-dUTP: 0.07 mmol/l
- dTTP: 0.13 mmol/l
- ur bidestilatua
- *Taq polimerasa* 5 U/  $\mu$ l (INVITROGEN)
- Pisu molekularreko markatzailea digoxigeninarekin markatuta
- 1X TBE: 10X TBE soluziotik prestatzen da
- Laginak
- 3M Azetato sodikoa (p.H 5.2): Disolbatu 40.8 g de azetato sodiko ur distilatuan. pH 5.2 doitu azido azetiko glazialaren bidez. bete 100 ml bolumen bat izan arte eta autoklabatu.
- Etanol izoztua.
- TE (pH 8.0): 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA. Autoklabatu eta giro-tenperaturan gorde.
- 20X SSC: Disolbatu 175.3 g NaCl eta 88.2 g zitrato sodiko ur distilatuan. Bolumena litro batera doitu eta autoklabatu.
- 0.25 M HCl: 21.5 ml HCl 11.6 M (d. 1.18) eta 978.5 ml ur distilatua giro tenperaturan gorde.
- Soluzio desnaturatzailea: 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH
- Soluzio neutralizatzailea: 0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl
- Formamida desionizatua: Nahastu 10 ml formamida 5-10 g ioi-trukatzeke erretxinarekin. Nahastu 30 minututan, Whatman 3MM paperareki irazi eta - 20 °Ctan gorde.
- Hibridizatzeko soluzioa: %50: 5  $\times$  SSC, %2 blokeatzeko soluzioa (p/b), N-lauroylsarcosina, %0.1 gatz sodikoa (p/b) , % 0.02 SDS (p/b); %50: Formamida desionizatua. Erabiliko den soluzio honen bolumenari, erabiltzeko unean gehitu behar zaizkio 100  $\mu$ g izokin espermaren DNA desnaturalizatu berria (100 °Ctara berotuz 10 minutu).
- 10 X Blokeatzeko soluzioa: 10 g blokeatzeko errektiboa, 100 ml azido maleikoaren tanpoia. Agitazioarekin prestatzen da mikrouhin labean berotuz. -20 °Ctan gorde. Erabiltzeko orduan diluitu lortzeko 1 X diluzioa.
- Antidigoxigenina antigorputza (Roche diagnostics)
- Azido maleikoaren tanpoia: 11.6 g azido maleiko, 30 ml 5M NaCl, ur distilatua 1000 ml osatu arte. pH 7,5 doitu

- TBS: 0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl; pH 7.5
- Soluzio kromatikoa: 0.1 M Tris-HCl pH 9.5; 0.1 M NaCl. Erabiltzeko momentuan aluminio-paperarekin estalitako ontzi bat prestatu (ezin zaio argia eman), eta gehitu 10 ml soluzio hau, 50  $\mu$ l NBT eta 37.5  $\mu$ l BCIP (Roche diagnostics).

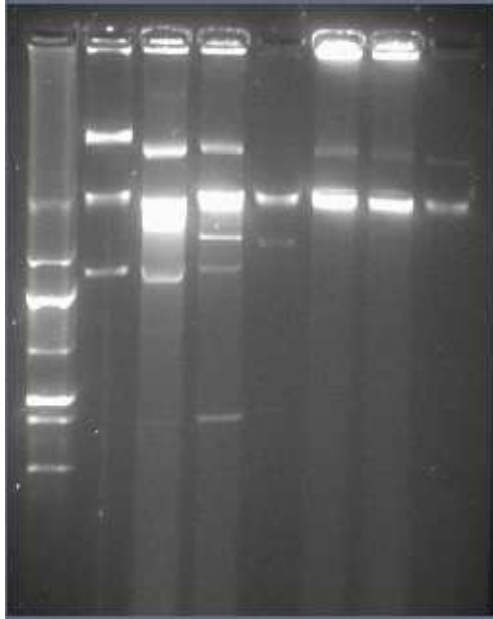


## Protokoloa

### 5.A: DNAREN TRANSFERENTZIA *SOUTHERN TRANSFER* METODOAREN BIDEZ

Teknika honen bidez elektroforesian tamainaren arabera banandu diren DNA zatiak desnaturalizatuak izaten dira, nylon iragazki batera transferituta eta ibilgetuta. DNAREN posizioa agarosa-gelan mantenduko da iragazkira transferitzerakoan.

1. Gelari iragazki bat atera elektroforesia egin eta gero, DNAREN tamaina eta posizioa kalkulatu ahal izateko.



2. Gela gainazal batean kokatu eta behar ez diren guneak moztu.
3. Murgildu gela 0.25 M HCl soluzio batean 15 minututan.
4. Desnaturalizatu DNA gela soluzio desnaturalizatzailean murgilduz  $2 \times 15$  min giro tenperaturan eta agitazioarekin.
5. Neutralizatu gela soluzio neutralizantean murgilduz  $2 \times 15$  min giro tenperaturan agitazioarekin.
6. Estali gela kokatzeko euskarria 3 MM Whatman paperarekin. euskarri hau gela baino zabalagoa eta luzeagoa izan behar da. Kokatu euskarri hau ontzi baten barruan.  $10 \times$  SSC gehitu 3 MM Whatman bustiz. Ontziaren beheko aldean soluzio bolumen bat geratu behar da eta 3 MM Whatman paperaren ertzak bolumen horretan murgilduta egon behar dira. Ziurtatu ez direla burbuilarik gelditzen euskarria eta 3 MM Whatman paperaren artean.
7. Parafilmararekin euskarriaren ertzak estali (erdian gela kokatzeko gune bat gelditu behar da, eta gelaren ertzak parafilmararen gainera gelditu behar dira). Kokatu gela 3 MM Whatman paperaren gainean. Ziurtatu burbuilarik ez direla gelditzen 3 MM Whatman papera eta gelaren artean.
8. Nylon iragazki zati bat moztu; gela baino 1-2 mm luzeago eta zabalagoa izan behar da. Eskularruak erabili filtroa hartzeko, eta ez inoiz eskuekin ikutu.
9. Murgildu gela  $2 \times$  SSC soluzioan 2- 3 min

10. Kokatu umelduta dagoen nylon iragazkia gelaren gainean; iragazkiaren ertza gelaren putzuaren marra estali behar du. Ziurtatu ez direla burbuilarik gelditzen gela eta iragazkiaren artean.

11. 3 MM Whatman 3 zati  $2 \times$  SSC soluzian umeldu (gelaren tamaina berdinekoak) eta nylon iragazkiaren gainean kokatu. Ziurtatu ez direla burbuilarik gelditzen.

12. Paper xurgatzailearekin 5-8 cm-ko dorre bat egin (paperak bata bestearen gainean ipiniz) eta gainetik kristalesko euskarri bat ipini. Honen helburua zera da: ontzian ipini dugun likidoa 3 MM. Whatman paperetik gora joango da, gela zeharkatuko du, eta horrekin batera DNA zatiak nylon iragazkira pasatuko dira kapilaritatez. Gela parafilmarekin inguratzen da soluzioa gelaren azpiko whatman paperetik paper xurgatzaileara derrigorrez gelaren erditik pasatzeko.

13. Transferentzia 12 -24 orduetan burutzen da. Paper xurgatzailea umeltzen den heinean ordezkatzeko joan behar da. Transferentziaren denbora DNAREN zatien tamaina eta gelaren kontzentrazioaren menpean dago; neurri txikiko zatiak (< 1 kb) % 0.8 agarosa gel batetik 1-2 orduetan transferitzen eta > 5 kb-zatiak 15 ordu edo gehiagotan.

14. Denbora pasa eta gero, paper xurgatzailea kendu eta iragazkia hartu.

15. Murgildu iragazkia  $6 \times$  SSC soluzioan giro-tenperaturan 5 minututan eta 3 MM Whatman paper baten gainean lehortzen utzi.

16. Iragazkia DNA aldetik argi ultramorean ipini 2 minututan

Hibridazioa ez bada segituan egiten iragazkia 3 MM Whatman papera artean gorde giro-tenperaturan

## 5.B:HIBRIDAZIOA DIGOXIGENINAREKIN MARKATUTAKO DNA-ZUNDA BATEN BIDEZ

### digoxigenina-dUTPrekin markatutako zundaren lorpena

1. “ master mix” bat prestatzen da nukleotidoen hurrengo kontzentrazioekin:

- dATP, dGTP, y dCTP: 0.2 mmol/l bakoitzeko
- DIG-11-dUTP: 0.07 mmol/l
- dTTP: 0.13 mmol/l
- ur bidistilatua esterila

2. PCRaren beste osagiak beti bezala gehitzen dira. DNA molde bezala, ekoiztu nahi den zundaren andui kontrolaren DNA erabiltzen da, eta dagozkion abiarazleak eta amplifikazioaren baldintzak erabiltzen dira.

3. Anplifikatua purifikatzen da DNA hauspeatuz, horretarako 0.1 bolumen 3M azetato sodiko eta 2 bolumen etanol izoztua gehituko ditugu. Gau osoa - 20 °Ctan hauspeatzen utzi behar da. Zentrifugatu (12000 rpm, 20 min) eta TEn birsuspenditu.

Ziurtatzeko zunda dagoela eta zein kontzentrazioan DNA kunatifikatzen da espektrofotometro baten bidez. Ondoren zunda markatuta dagoen edo ez ikusi behar da, eta zein kantitatean. Horretarako nylon iragazki zati bat hartzen da,  $2 \times \text{SSC}$ -n umeltzen da eta zundaren elkarren segidako diluzioen  $\mu\text{l}$  bat ezartzen dira. Iragazkia errebelatzen da hibridazio atalean agertzen den protokoloa jarraituz eta puntu urdinen agerpena ikusten da intentsitate handitik txikira, zundaren kontzentrazio handiak edo txikiak erabiltzen ezarri diren arabera. Gehitu behar den zundaren kantitatea jakiteko, lortu diren laginak kontzentrazio ezaguna daukan patroï batekin konparatu behar da.

### Hibridazioa

Hibridazio prozesua 3 ataletan banatzen da: prehibridazioa, hibridazioa eta garbiketak.

1. Prehibridazioa: iragazkia hibridazio poltsa batean kokatzen da, 20 ml (gutxienez) hibridazio-soluzioa gehitu  $100 \text{ cm}^2$  iragazki baterako, eta poltsa ixten da burbuilarik utzi barik. Ordu bat (gutxienez) inkubatzen da  $42 \text{ }^\circ\text{C}$ tan homogeneousatzen noizean behin.

2. Hibridazioa. Hibridazio-soluzioa ordezkatu 2.5ml hibridazio-soluzio/ $100 \text{ cm}^2$  iragazki eta soluzio horri gehitu behar zaio izokin espermaren DNA desnaturalizatu berria eta DNA zunda desnaturalizatu berria ( $100 \text{ }^\circ\text{C}$ tan berotuz 10 min). Markatutako DNAREN kontzentrazio egokia iragazkian detektatzeko dagoen DNAREN araberakoa da. Orokorrean 10 -15 ng markatutako zunda/ 1 ml hibridazio soluzio jartzen da. Inkubatu gutxienez 6 ordu  $42 \text{ }^\circ\text{C}$ tan, noizbehika homogeneousatzen.

3. Garbiketak. Behin inkubazio denbora igarota, iragazkia ateratzen da eta giro-temperaturan garbitzen da soluzioaren 50 ml-ekin (gutxienez). Hasteko  $2 \times \text{SSC}$ , %0.1 SDS (p/b) soluzioarekin 15 minutuko 2 garbiketa egiten dira giro-temperaturan eta agitazioarekin, eta ondoren  $0.1 \times \text{SSC}$ , %0.1 SDS (p/b) soluzioarekin 30 minutuko 2 garbiketa  $68 \text{ }^\circ\text{C}$ tan agitazioarekin.

### Hibridoen detekzioa

1. Inkubatu iragazkia 30 min (gutxienez) 20 ml 1 X blokeatzeko soluzioa.

2. Garbitu iragazkia 3 aldiz, (10 minututan) 50 ml TBS tanpoiarekin.

3. Antidigoxigenina antigorputza zentrifugatu 5 minutu erabili baino lehen. Antigorputza diluitu blokeatzeko soluzioan 1: 5000 proportzian. Inkubatu iragazkia ordu bat soluzio honen 20 ml-tan/ 100 cm<sup>2</sup> iragazki .

4. Garbitu 3 aldiz (10 minututakoak) TBS 50 ml-ekin

5. Murgildu iragazkia soluzio kromatikoan eta inkubatzen utzi kolorea agertu arte (minutu gutxitan hazten da kolorea sortzen eta erreakzio osoa egun batean betetzen da). Erabiltzen den ontzia edo poltsa aluminio-paperarekin estali behar da argitik babesteko. Ez da irabiatu behar.

6. Erreakzioa betetzen denean iragazkia urarekin garbitzen da 5 minututan. Iragazkia hezea dagoen bitartean argazki bat atera; ondoren 3 MM. Whatman paperaren gainean lehortzen lagatzen da. (Koloreak pixka bat argitzen dira lehortzerakoan).

