

Southernův blotting

Využití a odvozené metody

Výkonným nástrojem pro rozdělování makromolekul s různou velikostí a nábojem je gelová elektroforéza. Molekuly DNA mají v podstatě stejný náboj na jednotku hmotnosti, takže se dělí na agarózových nebo polyakrylamidových gelech téměř výhradně na základě své velikosti nebo konformace. Agarózové a polyakrylamidové gely působí jako molekulární síta, která zpomalují průchod velkých molekul více než malých. Agarózové gely jsou vhodnější síta pro velké molekuly (nad několik set nukleotidů), zatímco polyakrylamidové gely jsou lepší pro rozdělování malých molekul DNA.

Analýza DNA pomocí Southernova blottingu

V roce 1975 publikoval E. M. Southern důležitý nový pracovní postup, který umožnil zjistit umístění genů a jiných sekvencí v restričních fragmentech separovaných gelovou elektroforézou. Základním rysem této metody je přenos molekul DNA separovaných gelovou elektroforézou na nitrocelulóзовou nebo nylonovou membránu. Takový přenos DNA je nazýván Southernův přenos. DNA je buď před, nebo během přenosu denaturována tím, že je gel umístěn do zásaditého roztoku. Po přenosu je DNA imobilizována na membráně vysušením nebo ozáření UV světlem a hybridizována s radioaktivní DNA-sondou obsahující studovanou sekvenci. Sonda bude hybridizovat pouze s molekulami DNA, které obsahují nukleotidovou sekvenci komplementární k sekvenci sondy.

Nehybridizované sondy jsou pak vymyty z povrchu membrány a takto upravená membrána je exponována na rentgenový film, aby mohla být detekována přítomnost radioaktivity. Po vyvolání filmu ukazují tmavé proužky pozici sekvencí DNA, které se sondou hybridizovaly. Schopnost přenosu molekul DNA separovaných gelovou elektroforézou na nylonové membrány za účelem hybridizačních studií a jiných druhů analýz se ukázala jako neobyčejně užitečná. Lze ji například využít při detekci genu cystické fibrózy atd.



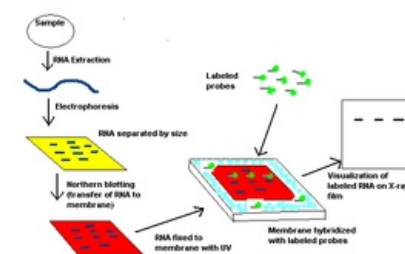
Southern blot membrána

Analýza RNA pomocí northernového blottingu

Jedná se o přenos molekul RNA po jejich separaci elektroforézou. Tento přenos se nazývá northernový přenos.

Jediný rozdíl od Southernova přenosu je, že se na membránu přenáší molekuly RNA. Molekuly RNA jsou však velmi citlivé na degradaci RNázami, a proto musí být zabráněno kontaminaci materiálu tímto extrémně stabilním enzymem. Kromě toho, většina molekul RNA obsahuje sekundární strukturu a musí proto zůstat během elektroforézy denaturována, aby byla zajištěna separace na základě velikosti. Denaturace dosáhneme přidáním formaldehydu nebo některého denaturačního činidla do pufru používaného při elektroforéze.

Po přenosu na membránu RNA hybridizuje buď s DNA, nebo RNA-sondami, stejně jako je to u Southernova přenosu. Northernová hybridizace je nesmírně užitečná při studiích genové exprese. Může se použít k určení, kdy a kde se jednotlivé geny exprimují. Nicméně northernová hybridizace stanovuje pouze míru akumulace RNA-transkriptů a neposkytuje žádnou informaci o tom, proč k akumulaci došlo. Změny akumulace transkriptů mohou být způsobeny změnami rychlosti transkripce nebo naopak rychlosti degradace transkriptů.



Detekce RNA pomocí northernového blottingu

Analýza proteinů westernovým přenosem

Někdy označován také jako *imunoblot*. Protože je mnoho funkčních proteinů složeno ze dvou nebo více podjednotek, jsou jednotlivé polypeptidy separovány v přítomnosti detergentu dodecylsulfátu sodného (SDS), který denaturuje proteiny. Po proběhnutí elektroforézy se proteiny detekují barvením Coomassie modří nebo značením stříbrem. Rozdělené polypeptidy lze ale také přenést z gelu na nitrocelulóзовou membránu a jednotlivé proteiny detekovat pomocí protilátek. Přenos se označuje jako westernový přenos a uskutečňuje se pomocí elektrického proudu

Po tomto přenosu se specifický protein identifikuje tak, že se membrána s imobilizovanými proteiny umístí do roztoku obsahujícím protilátku k tomuto proteinu. Následně se nenavázané protilátky z membrány odstraní vymytím. Přítomnost první (primární) protilátky se detekuje inkubací se sekundární protilátkou. Tato sekundární protilátka obecně reaguje s imunoglobuliny. Sekundární protilátka je spojena (konjugována) buď s radioaktivním izotopem nebo enzymem.

Odkazy

Související články

- Metody analýzy nukleových kyselin

Použitá literatura

- MURRAY, Robert K, et al. *Harperova biochemie*. 2. české (v H & H 1.) vydání. Praha : H & H, 1998. 872 s. ISBN 80-85787-38-5.
- GOETZ, Pavel, et al. *Vybrané kapitoly z lékařské biologie II*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 2002. 139 s. ISBN 80-246-0320-9.