

Usporedba metoda za obilježavanje i detekciju pri hibridizaciji DNA po Southern-u

Lač, Maša

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:161534>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Maša Lač

7571/BT

USPOREDBA METODA ZA OBILJEŽAVANJE I DETEKCIJU
PRI HIBRIDIZACIJI DNA PO SOUTHERN-U

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Genetičko inženjerstvo

Mentor: Doc.dr.sc. Anamarija Štafa

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

USPOREDBA METODA ZA OBILJEŽAVANJE I DETEKCIJU PRI HIBRIDIZACIJI DNA PO SOUTHERN-U

Maša Lač, 0058212402

Sažetak: Hibridizacija po Southern-u koristi se za detekciju sekvencija DNA, a temelji se na komplementarnom sparivanju (hibridizaciji) jednolančane obilježene DNA sonde s jednolančanom ciljnom sekvencijom DNA na membrani. Hibridizacija se odvija pri uvjetima koji omogućuju komplementarno sparivanje DNA sonde s ciljnom regijom, uz minimalnu količinu nespecifičnog vezanja sonde na membranu. DNA sonde mogu se obilježavati radioaktivno, koristeći radioizotope (^{32}P , ^{35}S , ^{125}I or ^3H) ili neradioaktivno, koristeći specifične molekule poput biotina ili digoksigenina (DIG). Najčešće korištena metoda za detekciju radioaktivno obilježenih sonda je autoradiografija, dok se detekcija neradioaktivno obilježenih sonda temelji na kemiluminiscencijskim i kromogenim reakcijama. U ovom radu uspoređene su različite metode obilježavanja i detekcije pri hibridizaciji po Southern-u te su navedene njihove prednosti i mane.

Ključne riječi: detekcija DNA, hibridizacija po Southern-u, obilježavanje DNA

Rad sadrži: 26 stranica, 10 slika, 3 tablice, 46 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Doc.dr.sc. Anamarija Štafa

Pomoć pri izradi: Doc.dr.sc. Anamarija Štafa

Datum obrane: 10. srpnja 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

COMPARISON OF METHODS FOR DNA LABELING AND DETECTION USED IN SOUTHERN BLOT HYBRIDIZATION

Maša Lač, 0058212402

Abstract: Southern blot is a method used for detection of specific DNA sequences and it is based on the complementary pairing of a labelled single-stranded DNA probe with target single-stranded DNA bound to the membrane. Hybridization occurs under stringent conditions which allow specific binding of a probe with a target sequence with the minimal nonspecific binding of DNA probe to the membrane. Probes can be labelled radioactively, using radioisotopes (^{32}P , ^{35}S , ^{125}I or ^3H) or non-radioactively, using specific biotin or digoxigenin (DIG) molecules. Most commonly used detection method for radiolabeled probes is autoradiography, while detection of non-radioactive methods is based on chemiluminescence and chromogenic reactions. In this thesis different methods for labeling and detection during Southern blot hybridization were compared and their advantages and disadvantages are indicated.

Keywords: detection of DNA, labeling DNA, Southern blot

Thesis contains: 26 pages, 10 figures, 3 tables, 46 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Assist. Prof. Anamarija Štafa PhD

Technical support and assistance: Assist. Prof. Anamarija Štafa PhD

Defence date: July 10th 2020

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Lančana reakcija polimerazom.....	3
2.2. Hibridizacija DNA po Southern-u	4
2.2.1. Radioaktivno obilježavanje DNA	5
2.2.2. Neradioaktivno obilježavanje DNA	6
2.2.2.1. Neradioaktivno obilježavanje DNA digoksigeninom.....	7
2.2.2.2. Neradioaktivno obilježavanje DNA biotinom.....	8
2.2.3. Metode za pripremu obilježene DNA	9
2.2.3.1. Obilježavanje krajeva DNA sonde	9
2.2.3.2. Jednoliko obilježavanje sonde	10
2.2.4. Metode za detekciju	13
2.2.4.1. Metode za detekciju radioaktivno obilježene nukleinske kiseline	13
2.2.4.2. Metode za detekciju neradioaktivno obilježene nukleinske kiseline	15
2.2.5. Usporedba osjetljivosti radioaktivno i neradioaktivno obilježenih sondi.....	17
2.2.6. Uklanjanje signala i ponovna detekcija.....	20
3. ZAKLJUČAK	22
4. POPIS LITERATURE	23

1. UVOD

Hibridizacija DNA po Southern-u molekularno je genetička metoda koja omogućuje detekciju specifičnih regija koje su komplementarne s jednolančanom obilježenu DNA sondom (Southern, 1975).

Ova metoda temelji se na denaturaciji izolirane DNA, prijenosu jednolančane DNA na membranu te fiksaciji DNA pri povišenoj temperaturi ili pomoću UV zračenja. Membrana se potom prvo inkubira u predhibridizacijskoj otopini pri čemu se zasićuje različitim kemijskim spojevima, kao što su na primjer obrano mlijeko ili nespecifična DNA, kako bi se smanjila vjerojatnost nespecifičnog vezanja DNA sonde. Nakon predhibridizacijske otopine dodaje se hibridizacijska otopina koja sadrži jednolančanu obilježenu DNA (DNA sondu), koja je komplementarna specifičnoj regiji koju želimo detektirati, a hibridizacija se provodi pri točno određenim uvjetima koji omogućuju upravo komplementarno sparivanje obilježene DNA s ciljnom sekvencijom DNA. DNA sonde mogu sadržavati radioaktivno ili neradioaktivno obilježene deoksiribonukleotide, a za njihovu pripremu postoji nekoliko metoda. Naime, DNA sonde, neovisno o tome sadrže li radioaktivno ili neradioaktivno modificirane deoksiribonukleotide, mogu biti obilježene jednoliko, pri čemu su obilježeni deoksiribonukleotidi inkorporirani u molekulu, ili mogu biti obilježeni sami krajevi molekule. Izbor tipa modifikacije deoksiribonukleotida i metode za pripremu DNA sonde ovisi i o karakteristikama ciljne sekvencije za detekciju. Na kraju, za detekciju sekvencija (regija) s kojima se sonda komplementarno sparuje također postoji nekoliko metoda koje primarno ovise o tipu obilježavanja deoksiribonukleotida.

U ovome radu opisat će se obilježavanje DNA sondi pomoću radioaktivno i neradioaktivno modificiranih deoksiribonukleotida, kao i različite metode koje se koriste za obilježavanje krajeva ili jednoliko obilježavanje DNA sonde. Dodatno, usporedit će se metode koje se koriste za detekciju hibridiziranih (ciljnih sekvencija) i objasniti će se upotreba, prednosti i mane svake pojedine metode.

2. TEORIJSKI DIO

Molekularno-genetičke metode koriste se za detekciju, izolaciju, kvantifikaciju i analizu sekvencija nukleinskih kiselina, a postoje različite metode detekcije sekvencija čiji je redosljed nukleotida djelomično ili u potpunosti poznat. Ukoliko analizirana sekvencija kodira za protein, metode detekcije temelje se na komplementaciji mutacije, specifičnim antigen-antitijelo interakcijama (ELISA metoda) i protein-protein interakcijama (metoda komplementacije). ELISA metoda (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) imunološka je metoda koja se temelji na detekciji imobiliziranog antigena pomoću odgovarajuće molekule antitijela na koju je vezan enzim (Engvall i Perlmann, 1971). Metoda za identifikaciju i kvantifikaciju protein-protein interakcija naziva se metodom komplementacije proteinskih fragmenata (engl. Protein fragment Complementation Assay, PCA). Pri provođenju ove metode, svaki ispitivani protein fuzioniran je sa jednim fragmentom "reporter" proteina. Ukoliko dođe do interakcije između dvaju ispitivanih proteina, dva fragmenta "reporter" proteina formiraju funkcionalni protein čija je prisutnost mjerljiva (Viola i Gonzalez, 2015). Metoda „dva hibrida“ je metoda koja detektira protein-protein interakcije aktivacijom transkripcije zbog specifičnih reakcija domena proteina koji su vezani na ispitivane proteine (Michnick i sur., 2000).

Ukoliko regija koja se analizira ne kodira za protein ili je poznata njena sekvencija, detekcija se može provesti metodama hibridizacije i lančanom reakcijom polimerazom (engl. polymerase chain reaction, PCR). Hibridizacijske metode temelje se na komplementarnom sparivanju jednolančanih lanaca DNA ili RNA pri čemu nastaje hibridna molekula DNA/DNA, DNA/RNA ili RNA/RNA. Kako bi detekcija hibridiziranih molekula bila moguća, jedan komplementaran lanac sadrži modificirane nukleotide koji omogućuju vizualizaciju. Hibridizacijske metode koriste se za detekciju specifičnih sekvencija, a primjenjuju se za izolaciju i kvantifikaciju DNA, pretraživanje genomskih banaka te proučavanje organizacije, regulacije i ekspresije gena. Uvjeti hibridizacije podešavaju se kako bi se postigao visok stupanj komplementarnog sparivanja s ciljnom sekvencom, a na specifičnost sparivanja utječu različiti faktori poput temperature pri kojoj se provodi hibridizacija, koncentracije soli u hibridizacijskom puferu, pH vrijednosti pufera i koncentracije denaturirajućih agenasa u puferu (Netzer, 1999). Neke od metoda koje se temelje na hibridizaciji nukleinskih kiselina su metoda hibridizacije po Southern-u (za detekciju DNA) i metoda hibridizacije po Northern-u (za detekciju RNA).

2.1. Lančana reakcija polimerazom

Metoda lančane reakcije polimerazom (engl. polymerase chain reaction, PCR) koristi se za *in vitro* umnažanje točno određene regije DNA iz male količine genetičkog materijala. Osim toga, modifikacije ove metode omogućuju i kvantifikaciju broja kopija specifične (ciljne) sekvencije DNA. Reakcijska smjesa sastoji se od DNA kalupa, termostabilne DNA polimeraze, smjese četiriju deoksiribonukleotid-trifosfata (dNTP) te dvije kemijski sintetizirane oligonukleotidne početnice, pufera i vode. Svaka se početnica sparuje s komplementarnom sekvencom na jednom lancu DNA, koji omeđuje regiju koja se želi umnožiti, a 3'- krajevi početnica okrenuti su jedan prema drugom i služe kao supstrati za sintezu DNA termostabilnom DNA polimerazom. Tijekom lančane reakcije polimerazom ponavljaju se ciklusi denaturacije, hibridizacije i sinteze novih kopija ciljne sekvencije DNA (Broomfield i Bourn, 1998).

Za određivanje udjela pojedinih molekula DNA u nekom uzorku koristi se metoda kvantitativne lančane reakcije polimerazom (engl. „quantitative PCR“, qPCR). Metoda qPCR temelji se na istovremenom umnažanju ciljne sekvencije DNA i kvantifikaciji umnožene sekvence koja je moguća zbog korištenja fluorescentnih boja. U početku, fluorescentne boje interkalirale su u dvolančanu DNA te se povećanjem količine DNA produkta povećavao intenzitet fluorescencije. Ipak, interkaliranje fluorescentnih boja u nespecifične sekvencije DNA i dimere početnica dovelo je do pogrešne kvantifikacije PCR produkata ciljne sekvencije DNA (Higuchi i sur., 1992). Zbog toga, razvijena je metoda TaqMan koja se temelji na korištenju jednolančanih oligonukleotida komplementarnih regiji nizvodno od jednog mjesta vezanja početnica. Sintetizirani oligonukleotid sadrži dvije molekule koje fluoresciraju i vezane su na 5'- i 3'-krajeve. Dok je sintetizirani oligonukleotid intaktan, jedna fluorescentna molekula vezana za 3'-kraj (najčešće rodamin) reducira emitiranu fluorescenciju fluorescentne molekule vezane za 5'-kraj (najčešće fluorescein). Taq polimeraza svojom egzonukleaznom aktivnošću razgrađuje oligonukleotid koji sadrži vezane fluorescentne molekule i komplementarno je sparen s ciljanom sekvencijom, te time omogućava daljnju sintezu nove kopije DNA produkta. Razgradnjom oligonukleotida povećava se intenzitet emitirane fluorescencije fluoresceina zbog povećanja udaljenosti dviju fluorescentnih boja. Povećanje intenziteta fluorescencije ukazuje na povećanje broja produkta PCR (Livak i sur., 1995). Metode „molecular beacon“ i „scorpion probes“ alternative su metodi TaqMan, pri čemu je jedina razlika u porastu intenziteta fluorescencije hibridizacijom sonde, a ne degradacijom sonde tijekom amplifikacije (Tyagi i Kramer, 1996, Thelwell i sur., 2000).

2.2. Hibridizacija DNA po Southern-u

Hibridizacija DNA po Southern-u je molekularno-genetička metoda koja se koristi za detekciju sekvencija DNA čiji je nukleotidni slijed komplementaran s obilježenom DNA sondom (DNA probom). Ova metoda omogućuje detekciju fragmenata komplementarnih sa sondom i primjenjuje se u raznim molekularnim analizama zbog mogućnosti identifikacije odgovarajućih fragmenata DNA unutar genomske DNA. Na temelju hibridizacije po Southern-u razvile su se metode hibridizacije po Northern-u i po Western-u. Hibridizacija po Northern-u koristi se za detekciju specifičnih fragmenata mRNA, a hibridizacija po Western-u koristi se za analizu proteina (Mahmood i Yang, 2012).

Ukratko, ova metoda uključuje gel-elektroforezu native ili restrikcijskim endonukleazama pocijepane DNA i prijenos DNA na membranu na kojoj se ciljna sekvencija hibridizira s obilježenom sondom nakon čega slijedi detekcija. Nakon provedene elektroforeze gel se boja etidij-bromidom, koji interkalira u DNA i apsorbira UV zračenje čime omogućuje vizualizaciju fragmenata DNA, te se fotografira na UV-transiluminatoru. Razdvojene fragmente DNA potrebno je prenijeti na membranu, a kako bi se prijenos DNA s gela na membranu olakšao, gel se podvrgava predtretmanu. Predtretman uključuje depurinaciju pomoću kloridne kiseline te denaturaciju fragmenata inkubacijom u otopini amonijevog acetata i natrijeve lužine. Predtretman omogućuje uniforman prijenos većih fragmenata DNA (>10 kb) jer se sekvencije DNA fragmentiraju na mjestima depurinacije. DNA se u alkalnim uvjetima denaturira što je neophodno kako bi moglo doći do hibridizacije DNA sa jednolančanom obilježenom sondom. Prije samog prijenosa gel se ispire u vodi ili ekvilibrira u neutralizirajućoj otopini (Primrose i Twyman, 2006).

Prijenos DNA sa elektroforetskog gela na membranu moguć je pomoću više metoda. Southern (1975) opisao je kapilarni prijenos DNA sa gela na nitroceluloznu membranu, a od tada se primjenjuju elektrotransfer i metode prijenosa pod sniženim ili povećanim tlakom, kojima se ostvaruje efikasniji prijenos DNA iz gela na membranu. Danas se najčešće koriste pozitivno nabijene membrane od najlona koje imaju veći kapacitet za vezanje nukleinskih kiselina te veću mehaničku snagu od nitroceluloznih membrana. Novije metode omogućuju efikasniji prijenos DNA iz gela na membranu, no zahtijevaju specijaliziranu opremu što ih čini mnogo skupljim od kapilarnog prijenosa. Fragmente je prije hibridizacije potrebno fiksirati na membranu najčešće zagrijavanjem ili pomoću UV zračenja. Fiksacija pomoću UV zračenja temelji se na stvaranju kovalentnih veza između timidina u lancu DNA i pozitivno nabijenih amino skupina na membrani od najlona (Primrose i Twyman, 2006).

Membrana na koju je fiksirana DNA podvrgava se predhibridizaciji i hibridizaciji. Sastav (pred)hibridizacijske otopine uvelike može utjecati na stabilnost hibrida i osjetljivost sonde, a osnovna mu je uloga zasićivanje membrane i smanjenje vjerojatnosti nespecifičnog vezanja sonde na membranu. Najčešće se dodaju kemijski obrađeno obrano mlijeko i DNA nosač (engl. carrier DNA) to jest nespecifična denaturirana DNA jer ove obje komponente zasićuju vezna mjesta na membrani. Osim toga, dodatak formamida hibridizacijskom puferu omogućuje provođenje hibridizacije pri nižim temperaturama (Cseke i sur., 2003), što rezultira boljom kontrolom reakcije hibridizacije i s manje nespecifičnog vezanja sonde. Kako bi se smanjila temperatura provođenja hibridizacije, umjesto formamida može se dodati urea. Denhardtova otopina, koju čine goveđi serumski albumin (BSA, bovine serum albumin), polivinilpirolidon i fikol također se može koristiti kako bi se reduciralo nespecifično vezanje za membranu (Denhardt, 1966). Dodatak dekstran sulfata u hibridizacijsku otopinu povećava viskoznost čime se omogućava efikasniji kontakt označene sonde s ciljanom sekvencijom i ubrzava hibridizacija (Farrell, 2017).

Sondu je moguće označiti radioaktivno ili neradioaktivno zbog čega se priprema obilježene sonde može provoditi na nekoliko različitih načina. Reakcija hibridizacije započinje dodatkom označenih, denaturiranih molekula sondi u predhibridizacijsku otopinu. Hibridizacija se provodi pri točno određenim uvjetima koji omogućuju specifično vezanje obilježene DNA sa komplementarnom sekvencijom DNA. Hibridizirana se sonda detektira različitim metodama, čiji izbor ovisi o načinu obilježavanja sondi.

2.2.1. Radioaktivno obilježavanje DNA

Radioaktivni izotopi koji se raspadaju beta raspadom, poput ^3H , ^{32}P i ^{35}S , našli su primjenu u hibridizacijskim metodama pri obilježavanju nukleinskih kiselina. Osim navedenih izotopa, za obilježavanje nukleinskih kiselina može se koristiti radioaktivni izotop joda, ^{125}I , koji emitira beta i gama ionizirajuće zračenje (Tijssen, 1993). Radioaktivnim obilježavanjem DNA nastaju sonde koje prilikom detekcije emitiraju vrlo jak signal na autoradiografskom filmu.

Radioaktivno označene sonde razlikuju se u specifičnoj radioaktivnosti što ovisi o načinu obilježavanja. Naime, ukoliko se pri obilježavanju DNA sonde radioaktivni izotopi dodaju kao prekursori za sintezu komplementarnog lanca sonda se jednoliko obilježava, no moguće je i obilježavanje samo krajeva DNA, najčešće zamjenom fosfatne skupine prilikom fosforilacije. Jednolikim obilježavanjem molekula nukleinskih kiselina sintetiziraju se sonde visoke specifične radioaktivnosti, dok se obilježavanjem krajeva nukleinskih kiselina

sintetiziraju sonde niske specifične radioaktivnosti. Nedostatak jednolikog obilježavanja je smještaj radioaktivnog izotopa ^{32}P u okosnici DNA, što uslijed radioaktivnog raspada dovodi do loma u DNA zbog čega je poželjnije koristiti radioaktivni izotop ^{35}S koji zamjenjuje kisikov atom fosfatne grupe (Tijssen, 1993). Obilježavanjem krajeva DNA veća se specifična aktivnost po masi DNA dobivene sonde postiže korištenjem kratkih jednolančanih oligonukleotida (do 20 nukleotida) kao sonda (Maitland i sur., 1987).

Vremenom poluraspada opisuje se vrijeme potrebno za raspad polovine broja jezgri. Radioaktivni izotopi visoke aktivnosti (^{32}P , ^{125}I) našli su primjenu u membranskim hibridizacijama, dok se radioaktivni izotopi niže aktivnosti (^{35}S , ^3H) koriste za obilježavanje DNA u *in situ* hibridizaciji. Nedostatak pri korištenju radioaktivnog izotopa fosfora je kratko vrijeme poluraspada zbog čega je korištenje obilježenih sonda vremenski vrlo limitirano (tablica 1).

Tablica 1. Najčešća primjena odgovarajućih radioizotopa u hibridizacijskim tehnikama (Maitland i sur., 1987)

Radioaktivni izotop	Vrijeme poluraspada	Sugerirana metoda hibridizacije (membranska ili <i>in situ</i>)
^{32}P	14.3 dana	membranska
^{125}I	60 dana	membranska, <i>in situ</i>
^{35}S	87.4 dana	membranska, <i>in situ</i>
^3H	12.43 godina	<i>in situ</i>

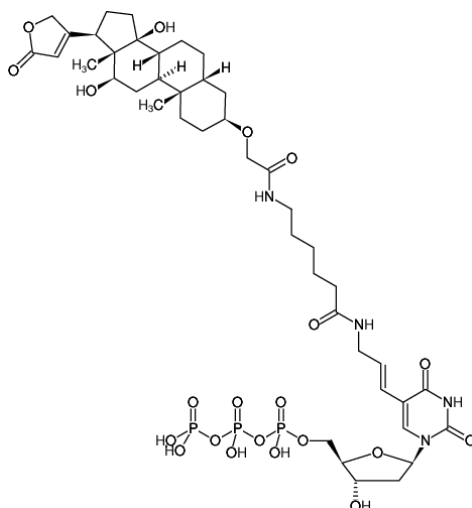
Osim kratkog vremena poluraspada, problem kod korištenja radioaktivnih izotopa predstavlja neophodno provođenje mjera zaštite zdravlja tijekom rada sa radioizotopima te pravilno zbrinjavanje radioaktivnog otpada (Tijssen, 1993).

2.2.2. Neradioaktivno obilježavanje DNA

Neradioaktivno obilježavanje DNA počelo se upotrebljavati zbog prednosti nad radioaktivnim obilježavanjem DNA poput sigurnosti pri radu, nižih cijena pripreme obilježene DNA, brže detekcije te stabilnosti sonde (Dale i sur., 2012). Sustavi neradioaktivnog obilježavanja uključuju enzimsku, kemijsku ili fotokemijsku modifikaciju molekule nukleinske kiseline, koju je moguće detektirati specifičnim vezanjem antitijela ili specifičnih molekula. Pri neradioaktivnom obilježavanju DNA najčešće se koriste sonde u kojima su na nukleotide vezane molekule biotina ili digoksigenina.

2.2.2.1. Neradioaktivno obilježavanje DNA digoksinom

Digoksin je steroidna molekula izolirana iz cvjetova i listova biljaka *Digitalis purpurea* i *Digitalis lanata* (Farrell, 2017). Primjenjuje se kao haptent u metodama obilježavanja DNA u genetičkom inženjerstvu, a digoksin je vezan za deoksiuridin-trifosfat kovalentnom vezom (DIG-dUTP). Nukleotid DIG-dUTP ugrađuje se u DNA kao analog dTTP nasuprot deoksiadenozina, a ugradnja digoksigenina ne ometa mogućnost komplementarnog sparivanja označene DNA (slika 1).



Slika 1. Molekula digoksin-11-deoksiuridin-trifosfat (DIG-11-dUTP). Molekula digoksigenina vezana je pomoću razmaknice duljine 11 C atoma na 5C atom uridina deoksiuridin-trifosfata (dUTP) (Strachan i Read, 2018) (slika preuzeta iz Jenna Bioscience).

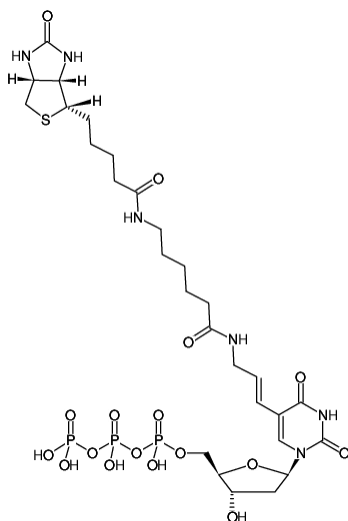
Označavanje pomoću digoksigenina provodi se enzimskom ugradnjom DIG-dUTP-a u molekulu DNA pomoću Klenowog enzima metodom pomaka zareza (engl. nick translation, poglavlje 2.2.3.2.) prilikom pripreme sonde. Dodatno povećanje osjetljivosti sonde obilježene digoksinom moguće je sintezom sonde metodom nasumičnog započinjanja (engl. random priming, poglavlje 2.2.3.2.) (Seibl i sur., 1990). Osim navedenim metodama, obilježavanje DNA digoksinom moguće je pripremom sonde označavanjem krajeva ugradnjom DIG-dUTP te pripremom sonde jednolikim obilježavanjem metodom lančane reakcije polimerazom, a označavanje RNA sonde metodom transkripcije *in vitro* (McCreery, 1997).

Zbog vrlo visoke specifičnosti i osjetljivosti hibridizacije, označavanje DNA digoksinom pogodno je za detekciju jedinstvenih regija kod hibridizacije čitavog genoma. Dodatna pogodnost korištenja sonde obilježene digoksinom je mogućnost skladištenja sintetiziranih sonde minimalno godinu dana pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bez gubitka aktivnosti (Lion i Haas, 1990).

Detekcija sondi označenih digoksigeninom provodi se metodama kemiluminiscencije i kromogenom reakcijom (Farrell, 2017).

2.2.2.2. Neradioaktivno obilježavanje DNA biotinom

Biotin je molekula vitamina topljivog u vodi koji se često koristi u molekularnim metodama zbog vrlo visokog afiniteta za vezanje specifičnih molekula streptavidina i avidina, a najčešće dolazi konjugiran s dUTP-om (Gebeyehu i sur., 1987). Neradioaktivno obilježavanje sonde biotinom temelji se na ugradnji modificiranih nukleotida biotin-dUTP kao analoga dTTP u DNA. Najčešće korišteni modificirani nukleotid je biotin-11-dUTP koji u svojoj strukturi sadrži razmaknicu duljine 11 atoma između biotina i nukleotida (slika 2). Što je veća duljina razmaknice, detekcija ima veći stupanj osjetljivosti zbog olakšane interakcije između biotina i specifične molekule. S druge strane, što je duljina razmaknice manja, postupak označavanja pomakom zareza, nasumičnim započinjanjem i PCR-om je efikasniji. Ugradnjom modificiranih nukleotida ne smanjuje se efikasnost hibridizacije te ne dolazi do ometanja biološke aktivnosti označene DNA (Farrell, 2017).



Slika 2. Molekula biotin-11-deoksiuridin-trifosfat (biotin-11-dUTP) (slika preuzeta iz Jenna Bioscience).

Za detekciju DNA sondi obilježenih biotinom koriste se specifična antitijela ili specifične molekule. Avidin je protein izoliran iz bjelanjka jajeta i specifično se veže za biotin zbog čega je pogodan za detekciju biotinom obilježene sonde i pridonosi osjetljivosti detekcije (Wilchek i Bayer, 1990). Osim avidina, za detekciju biotinom označene sonde koristi se i specifična molekula streptavidina, izolirana iz bakterije *Streptomyces avidinii*. Streptavidin je tetramerni protein koji ima četiri vezna mjesta za biotin. Dodatno, fizikalna svojstva i struktura streptavidina pogoduju smanjenju nespecifičnih reakcija (Farrell, 2017).

2.2.3. Metode za pripremu obilježene DNA

Postoje različite metode za pripremu obilježene DNA sonde, pri čemu se nukleinska kiselina može obilježiti jednoliko ili se mogu obilježiti njeni krajevi. Prilikom obilježavanja krajeva nukleinskih kiselina najčešće se dodaje samo jedna molekula modificiranog deoksiribonukleotida ili fosfatna skupina. Jednolikim obilježavanjem nukleinskih kiselina ugrađuju se više molekula modificiranih deoksiribonukleotida, pri čemu nastaje sonda s obilježenim nukleotidima unutar nukleinske kiseline.

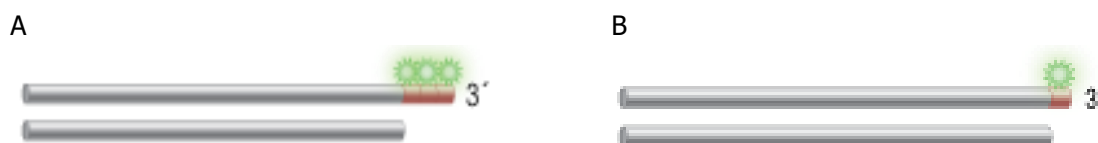
2.2.3.1. Obilježavanje krajeva DNA sonde

Za obilježavanje 3'-krajeva DNA koristi se: i) polimerazna aktivnost na 3'-uvučenim krajevima DNA; ii) deoksiribonukleotidil transferazna aktivnost na 3'-krajevima jednolančanih i dvolančanih DNA; te iii) aktivnost Taq polimeraze na ravnim krajevima DNA.

Za obilježavanje dvolančanih molekula DNA sa 3'-uvučenim krajevima, koji nastaju djelovanjem odgovarajućih restrikcijskih endonukleaza, najčešće se koristi 5'-3' polimerazna aktivnost Klenow enzima koja produljuje uvučeni 3' kraj.

Obilježavanje 3'-kraja DNA sonde moguće je i terminalnom deoksiribonukleotidil transferazom (terminalnom transferazom), a kako terminalnoj transferazi nije potreban kalup, moguće je dodavanje modificiranih nukleotida i na jednolančane molekule DNA. Ovom metodom sintetizira se sonda sa obilježenim jednolančanim 3'-krajem (slika 3A).

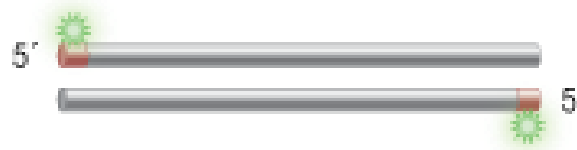
Taq DNA polimeraza također ima terminalnu transferaznu aktivnost koja omogućuje dodavanje dodatnog nukleotida (najčešće dATP) na 3'-kraj svakog sintetiziranog lanca (Hilario, 2004, slika 3B).



Slika 3. Obilježavanje 3'-krajeva molekule DNA pomoću A) terminalne deoksiribonukleotidil transferaze i B) Taq polimerazom. Na slici je prikazan produkt DNA nakon obilježavanja ugradnjom označenih nukleotida (prikazano crvenom bojom sa zelenim signalom) (slika preuzeta sa web stranice New England Biolabs).

Obilježavanje 5'-kraja DNA provodi se zamjenom neradioaktivne fosfatne skupine radioaktivnom fosfatnom skupinom pomoću enzima polinukleotid fosfataze i polinukleotid kinaze. Ova reakcija prvo uključuje uklanjanje postojeće fosfatne skupine s 5'-kraja DNA pomoću enzima polinukleotid fosfataze te dodavanje radioaktivno obilježene fosfatne skupine

katalizirano enzimom polinukleotid kinazom, a kao donor obilježene fosfatne skupine koristi se [γ - 32 P]ATP (Hilario, 2004, slika 4).



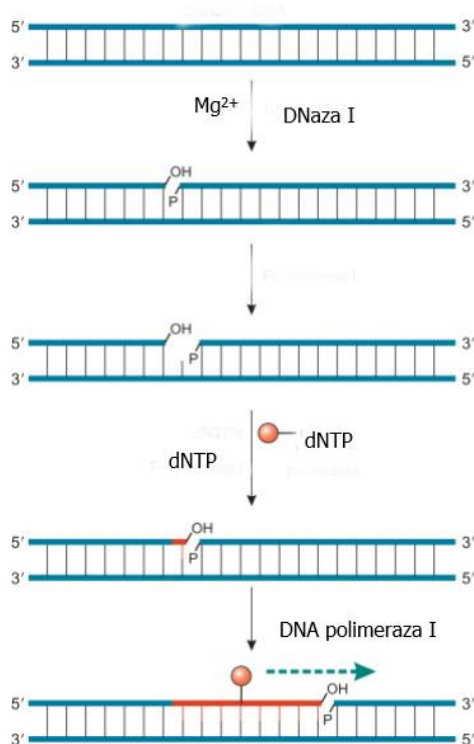
Slika 4. Produkt obilježavanja 5'-kraja DNA enzimima polinukleotid kinaza i polinukleotid fosfataza. Crvenom bojom sa zelenim signalom prikazani su označeni nukleotidi ugrađeni u produkt obilježavanja DNA (slika preuzeta sa web stranice New England Biolabs).

2.2.3.2. Jednoliko obilježavanje sonde

Metode koje se koriste za jednoliko obilježavanje sonde su: metoda pomaka zareza (engl. "nick translation"); metoda nasumičnog započinjanja (engl. "random priming"); lančana reakcija polimerazom (engl. "polymerase chain reaction, PCR"); i transkripcija *in vitro*.

Metoda pomaka zareza provodi se pomoću enzima DNaza I i DNA polimeraze I. Ova se metoda temelji na istovremenoj degradaciji i sintezi DNA u smjeru 5'-3' pri čemu dolazi do ugradnje modificiranih nukleotida. Enzim DNaza I, ovisno o reakcijskim uvjetima, može uvoditi dvolančane ili jednolančane lomove (engl. "nick"). U prisustvu Mg^{2+} enzim DNaza I uvodi nasumične jednolančane lomove u linearnim ili kružnim dvolančanim DNA (Campbell i Jackson, 1980). 3'-OH kraj jednolančanog loma DNA polimeraza I zatim koristi kao početnicu za sintezu komplementarnog lanca. DNA polimeraza I u metodi pomaka zareza koristi 5'-3' polimeraznu aktivnost i 5'-3' egzonukleaznu aktivnost. DNA polimeraza I ugrađuje deoksiribonukleotide na 3'-OH slobodne krajeve jednolančanih lomova dok simultano nukleaznom aktivnošću degradira nukleotide s 5' krajeva jednolančanog loma pomičući tako jednolančani lom duž DNA u smjeru sinteze (Rigby, 1977). Kada su u reakcijskoj smjesi prisutni označeni deoksiribonukleotidi, konačni sintetizirani produkt je dvolančana DNA s dugačkom obilježenom regijom (slika 5). U ovoj se metodi kao prekursori za sintezu polinukleotidnog lanca mogu koristiti deoksiribonukleotidi s radioaktivnim α -fosfatom ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$) ili neradioaktivno modificirani nukleotidi.

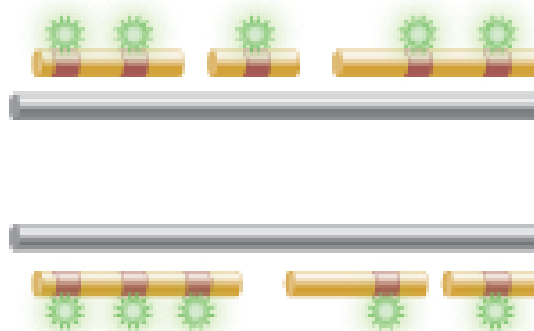
Provjera uspješnosti pripreme obilježenih sonde metodom pomaka zareza moguća je direktnom detekcijom. Direktna detekcija provodi se pripremom serije decimalnih razrjeđenja otopina označenih sonda i njihovim vezanjem za membranu. Nakon vezanja označenih sonde na membranu provodi se hibridizacija i vizualizacija označenih sonde. Rezultati vizualizacije uspoređuju se sa rezultatima vizualizacije standardnih otopina poznatih koncentracija obilježene DNA na istoj membrani (Roche, 2008).



Slika 5. Postupak obilježavanja DNA metodom pomaka zareza. U prisutnosti Mg^{2+} DNaza I uvodi jednolančani lom. U reakcijsku smjesu dodaje se smjesa neobilježenih i obilježenih dNTP-ova. DNA polimeraza I koristi 3'-OH kraj jednolančanog loma kao početnicu te simultanom razgradnjom i ugradnjom nukleotida obilježava DNA (slika preuzeta i modificirana iz Hermanson, 2013).

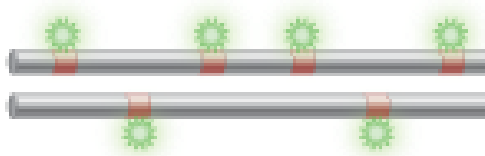
Metoda nasumičnog započinjanja temelji se na korištenju kratkih oligonukleotidnih početnica, najčešće heksanukleotida ili heptanukleotida. Prvo se denaturira dvolančana DNA, koja služi kao kalup za sintezu, a kratke oligonukleotidne početnice komplementarno se sparuju s regijama denaturiranog kalupa. Na hibridiziranim početnicama počinje sinteza DNA pomoću Klenow enzima koji ima 5'-3' polimeraznu i 3'-5' egzonukleaznu aktivnost, no nema 5'-3' egzonukleaznu aktivnost. Zbog nedostatka 5'-3' aktivnosti sinteza komplementarnog lanca započinje samo od 3'-OH kraja hibridiziranih početnica te prilikom provođenja metode ne dolazi do degradacije početnica (Karcher, 1995). U reakcijsku se otopinu dodaju obilježeni i neobilježeni deoksiribonukleotidi te se oni ugrađuju u nosintetizirani lanac DNA, a ovom metodom nastaje dvolančana DNA u kojoj je jedan lanac obilježen (Slika 6).

Duljina sintetiziranih obilježenih sondi obrnuto je proporcionalna koncentraciji kratkih početnica te ovisi o duljini kalupa (Karcher, 1995). Provjera uspješnosti pripreme obilježenih sondi metodom nasumičnog započinjanja također se provodi direktnom detekcijom (Roche, 2008).



Slika 6. Produkt obilježavanja DNA metodom nasumičnog započinjanja. Na slici su prikazani kalup DNA za sintezu (sivo), kratke oligonukleotidne početnice (žuto) i ugrađeni obilježeni nukleotidi (crveno sa zelenim signalom) (slika preuzeta sa web stranice New England Biolabs).

Obilježavanje sonde lančanom reakcijom polimeraze omogućuje istovremeno umnažanje i obilježavanje sonde (Farrell, 2010). Za pripremu obilježenih sonda lančanom reakcijom polimeraze potrebna je najmanja količina kalupa. Obilježavanjem lančanom reakcijom polimeraze nastaju dvolančane molekule DNA u kojima su oba lanca obilježena (slika 7).



Slika 7. Produkt obilježavanja DNA metodom lančane reakcije polimerazom. Ugrađeni obilježeni nukleotidi prikazani su crvenom bojom sa zelenim signalom (slika preuzeta sa web stranice New England Biolabs).

Provjera uspješnosti pripreme obilježene sonde lančanom reakcijom polimeraze moguća je provođenjem gel elektroforeze. U usporedbi s provjerom uspješnosti obilježavanja detekcijom na membrani, ovaj način provjere zahtjeva manje vremena. Naime, usporedno s pripremom obilježenog PCR produkta (sonde), potrebno je napraviti i umnožavanje kalupa bez dodatka obilježenih (modificiranih) nukleotida pri čemu nastaje obični PCR produkt. Zbog prisustva modificiranih nukleotida u obilježenoj sondi, molekule migriraju sporije nego neobilježeni produkti jednake veličine. Nakon vizualizacije DNA, najčešće bojanjem etidij bromidom, intenzitet obilježenih produkata PCR reakcije treba biti jednak ili nešto manji od intenziteta neobilježenih PCR produkata. Ako su, kao uzorci, na gel za elektroforezu dodane i standardne otopine poznatih koncentracija, moguće je otprilike odrediti masu obilježene sonde u uzorcima. Masa obilježene sonde određuje se usporedbom relativnog intenziteta obilježene sonde u uzorku i relativnog intenziteta uzorka standardne otopine podjednake veličine (Roche, 2008).

In vitro transkripcija jedina je metoda za obilježavanje kojom se obilježavaju RNA sonde. Za provođenje *in vitro* transkripcije koriste se RNA polimeraze virusa T7, T3 i SP6, ovisno o korištenom promotoru. Jedan od načina pripreme kalupa za transkripciju je pomoću vektora sa promotorom smještenim uzvodno od višestrukog mjesta za kloniranje (engl. MCS, multiple cloning site), a kalup za transkripciju klonira se u jedno od restrikcijskih mjesta. Plazmidnu DNA potrebno je prije transkripcije pocijepati restrikcijskom endonukleazom koja prepoznaje restrikcijsko mjesto nizvodno od kalupa DNA kako bi se označio kraj transkripcije za određenu RNA polimerazu. Ligiranjem DNA kalupa između dvaju promotora omogućuje se transkripcija jednog ili drugog lanca, odnosno sinteza kodirajuće ili nekodirajuće RNA, ovisno o izboru odgovarajuće RNA polimeraze. Ako kalup DNA ne sadrži promotorsku sekvenciju određenog virusa, ona se može dodati lančanom reakcijom polimeraze (PCR). Početnica za lančanu reakciju polimerazom je u tom slučaju oligonukleotid komplementaran promotorskoj sekvenciji na 5'-kraju kalupa. DNA kalup može se pripremiti i komplementarnim sparivanjem oligodeoksiribonukleotida. Ovakav način pripreme uključuje pripremu dva oligonukleotida: jedan kraći oligonukleotid sastoji se samo od promotorske sekvencije te drugi, dulji, nekodirajući oligonukleotid sastoji se od sekvencije komplementarne DNA kalupu na 5' kraju te sekvencije komplementarne promotorskoj sekvenciji na 3' kraju. Nakon komplementarnog sparivanja, promotorska regija postaje dvolančana, a sekvencija kalupa jednolančana nekodirajuća sekvencija, no ovaj način pripreme može se koristiti jedino ako je transkribirana sekvencija RNA kraća od 100 pb (Huang i Yu, 2013). Duljina sintetizirane obilježene sonde ovisi o položaju promotora i terminatora, a provjera uspješnosti pripreme sonde provodi se direktnom detekcijom (Roche, 2008).

2.2.4. Metode za detekciju

Tijekom metode hibridizacije po Southern-u nastaju hibridizirane molekule koje je moguće detektirati pomoću više metoda. Ukoliko su se za obilježavanje sonde upotrijebili radioaktivni izotopi, detekcija hibridiziranih sonde najčešće se provodi autoradiografijom. Neradioaktivno obilježene sonde mogu se detektirati na nekoliko načina, ovisno o načinu modifikacije nukleinske kiseline (nukleotida).

2.2.4.1. Metode za detekciju radioaktivno obilježene nukleinske kiseline

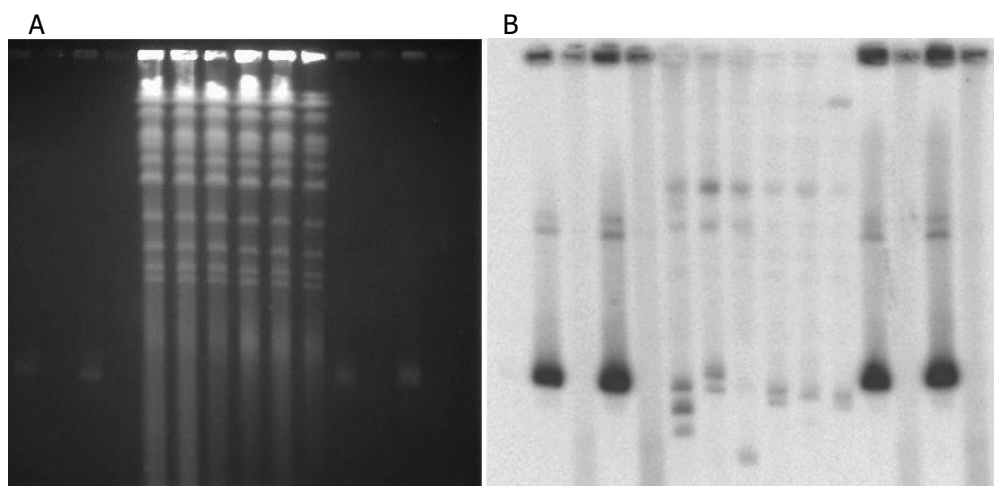
Za detekciju radioaktivno obilježenih nukleinskih kiselina koriste se direktne i indirektne (neizravne) metode. Proces razvijanja slike direktnim kontaktom radioaktivnog uzorka s filmom primjer je izravne autoradiografije, koja je najbolja metoda za detekciju radioizotopa niže energije (^3H , ^{35}S), no nije pogodna detekciju visoko energetskih β -čestica ili γ zračenja

emitiranih iz radioizotopa ^{32}P i ^{125}I . Takve emitirane čestice zbog velikog dometa prođu kroz rendgenski film bez redukcije srebrovih iona, zbog čega je za detekciju radioaktivnog raspada visoko energetskih izotopa bolje koristiti neizravne metode detekcije (Tijssen, 1993).

Autoradiografija je najčešće korištena metoda za detekciju radioaktiviteta temeljena na stvaranju kontakta radioaktivnih sondi s rendgenskim filmom. Naime, rendgenski film prekriven je fotografskom emulzijom koja sadrži kristale srebrovih halogenida (klorid, bromid, jodid, fluorid) inkapsulirane u emulziji želatine. Radioaktivni uzorak u kontaktu s prekrivenim rendgenskim filmom generira latentnu (nevidljivu) sliku koja odgovara radioaktivitetu u uzorku. Kada β -čestice ili γ -zrake emitirane iz radioizotopa pogode emulziju želatine, srebrovi ioni iz emulzije reduciraju se u srebrove atome, a svaka molekula srebrovog halogenida neovisan je detektor radioaktivnog raspada jer je svaka molekula zasebno inkapsulirana u želatini. Izlaganje uzorka odvija se isključivo u mraku, pri čemu dolazi do redukcije srebra isključivo emisijom radioaktivnog zračenja uzorka, što je izrazito bitno jer su molekule srebrovih halogenida iznimno osjetljive na svjetlost i radijaciju. Rezolucija nastale slike proporcionalna je ionizacijskom kapacitetu radioizotopa, a vrijeme izlaganja uzorka ovisi o energiji korištenog radioizotopa. Radioizotopi relativno niske energije (^3H) reduciraju samo susjedne molekule srebrovih halogenida zbog malog dometa zračenja te time stvaraju sliku vrlo oštrem rezolucije. Izotopi visoke energije (^{125}I , ^{32}P) reduciraju značajno veći broj molekula halogenida pa stvaraju tamnije slike s manjom specifičnošću. Nakon izlaganja membrane rendgenskom filmu, vizualizacija slike provodi se uranjanjem autoradiografskog filma u otopinu s razvijajućim reagensom. Razvijajući reagens (često srebrov nitrat, AgNO_3) generira vidljivu sliku potamnjujući emulziju želatine reduciranih srebrovih atoma. Reakcija razvijanja slike zaustavlja se fiksirajućim reagensom koji uklanja višak srebrovih halogenida s fotografskog filma. Visoko radioaktivna područja reduciraju više molekula srebrovih halogenida te time stvaraju regije filma s većom optičkom gustoćom, odnosno tamnija područja (Tijssen, 1993).

Neizravne metode autoradiografije tehnike su u kojima se emitirana energija iz radioaktivnog izvora pretvara u svjetlosnu pomoću scintilatora, koristeći fluorografiju ili pojačavajuće zaslone. Pri fluorografiji, uzorak se impregnira tekućim scintilatorom, koji fluorescira kad je pogođen s nabijenom česticom ili visoko energetskim fotonom. Radioaktivna emisija prebacuje energiju u molekule scintilatora koje zatim emitiraju fotone koji izlažu fotografsku emulziju, a fluorografija se većinom koristi za poboljšanje osjetljivosti detekcije slabih emitera β -čestica. Pojačavajući zaslone su ploče od čvrstog anorganskog scintilatora koje se tijekom detekcije smješta iza rendgenskog filma. Emisija visoko energetskih

radioizotopa koja prolazi kroz film apsorbira se u zaslon i konvertira se u svjetlo te tako stvara sliku (slika 8).



Slika 8. Primjer detekcije korištenjem radioaktivno obilježene sonde (^3H) i neizravne detekcije pomoću pojačavajućeg zaslona A) elektroforeza kromosomskih fragmenata u pulsirajućem gelu (PFGE) i B) hibridizacija DNA po Southern-u koristeći radioaktivno obilježenu repetitivnu δ sekvencu iz genoma kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Štafa, usmeno priopćenje).

Premale količine radioaktiviteta ipak nisu pogodne za detekciju neizravnim metodama zbog relativno visoke nestabilnosti srebrinih atoma nastalih pogotkom fotona svjetlosti. Jedan je atom srebra vrlo nestabilan te se njegova stabilnost može povećati ako u razdoblju dok ne konvertira natrag u srebrov ion, drugi foton svjetlosti proizvede drugi srebrov atom koji će stabilizirati isti.

2.2.4.2. Metode za detekciju neradioaktivno obilježene nukleinske kiseline

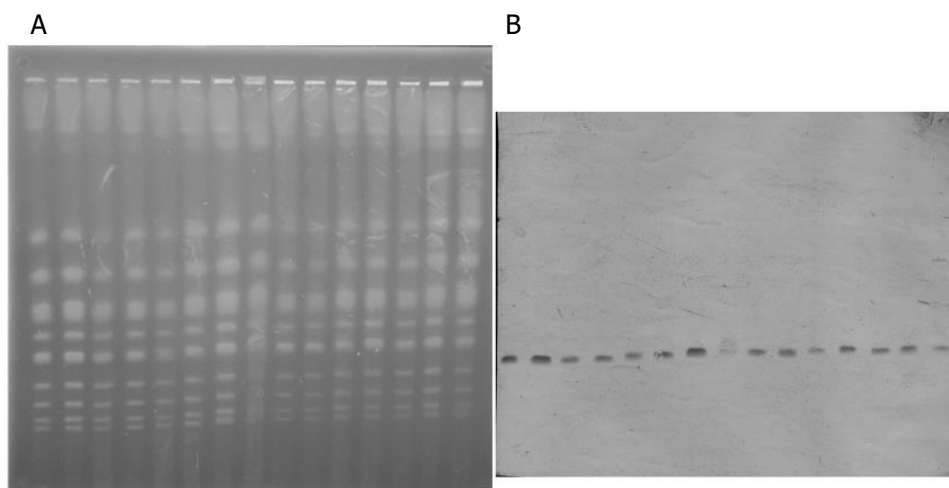
Metode za detekciju neradioaktivno obilježenih nukleinskih kiselina mogu se podijeliti na izravne (fluorescencija) i neizravne (kemiluminiscencija i kromogena metoda).

Izravna detekcija hibridiziranih molekula temelji se na obilježavanju sonde fluorescentnim bojama. Fluorescentno obilježavanje sonde moguće je provesti na 5'- i 3'-krajevima DNA te duž sekvencije DNA sonde jednolikim obilježavanjem (Proudnikov i Mirzabekov, 1996). Obilježavanje se provodi ugradnjom nukleotida na kojima je vezana molekula fluorescentne boje pomoću razmaknice određene duljine. Duljina razmaknice utječe na uspješnost obilježavanja i intenzitet signala tijekom detekcije. Povećanjem duljine razmaknice povećava se uspješnost hibridizacije i detektabilnost (Zhao i sur., 1994). Izravna detekcija fluorescentno obilježenih sonde manje je osjetljiva metoda od detekcije autoradiografijom, no takva sonda ne predstavlja zdravstveni rizik tijekom rada te ima

moćnost dugotrajnog skladištenja bez značajnog gubitka aktivnosti (Proudnikov i Mirzabekov, 1996).

Neizravna detekcija neradioaktivno obilježenih sonda temelji se na kolorimetrijskim (kromogenim) ili kemiluminiscencijskim reakcijama. Detekcija se najčešće provodi specifičnim antitijelima ili molekulama koje se specifično vežu na molekule kojima je nukleinska kiselina obilježena. Na antitijela ili specifične molekule (streptavidin, avidin) vezan je enzim koji se može detektirati pomoću kromogenih supstrata, koji u reakciji s enzimom stvaraju obojeni produkt, ili kemiluminiscencijskih supstrata koji u reakciji s enzimom stvaraju nestabilni produkt koji svojim raspadom emitira svjetlost. Enzimi koji se koriste za detekciju najčešće su alkalna fosfataza ili peroksidaza hrena. Do nastajanja vidljivog produkta tijekom kromogene detekcije dolazi isključivo u regijama na membrani gdje je došlo do hibridizacije sonde, odnosno homologije ciljne sekvencije i obilježene sonde (Farrell, 2010). Glavni nedostatak takvih metoda je veliki broj koraka prilikom detekcije.

Kromogena metoda detekcije temelji se na enzimski kataliziranoj reakciji s odgovarajućim supstratima, koja rezultira stvaranjem obojanog produkta koji se taloži izravno na membrani, a reakcija se odvija isključivo na mjestima na kojima je došlo do komplementarnog sparivanja digoksigeninom ili biotinom obilježenih sonda s jednolančanim molekulama na membrani. Detekcija alkalnom fosfatazom uključuje vezanje antitijela (ili streptavidina/avidina) na specifičnu molekulu biotina ili digoksigenina te enzimski kataliziranu redoks reakciju sa kolornim supstratom 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfatom (BCIP) i nitroblue tetrazolium soli (NBT) tijekom koje se razvija ljubičasto obojen produkt netopljiv u vodi (Kessler, 1990). Ukoliko se za detekciju koristi peroksidaza hrena, ona je vezana na antitijelo ili specifičnu molekulu i detektira se s kloronaftolom pri čemu nastaje tamno ljubičasti lako vidljiv talog (Karcher, 1995). Nedostatak kromogene detekcije može biti inhibicija aktivnosti alkalne fosfataze do koje dolazi tijekom stvaranja taloga pa se dobivaju nepouzdana i netočni rezultati. Kromogeni supstrati imaju najmanju osjetljivost pri detekciji obilježenih nukleinskih kiselina, a za sam razvoj boje tijekom detekcije kolornom reakcijom često je potrebno i do nekoliko sati (slika 9) (Farrell, 2017).



Slika 9. Primjer detekcije korištenjem DIG-obilježene sonde i neizravne detekcije pomoću kromogene reakcije alkalne fosfataze sa supstratom 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfatom (BCIP) i nitroblue tetrazolium soli (NBT). A) elektroforeza kromosoma u pulsirajućem gelu (PFGE) i B) hibridizacija DNA po Southern-u koristeći neradioaktivno obilježenu jedinstvenu sekvencu, gen *URA3* iz genoma kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Štafa, usmeno priopćenje).

Kemiluminiscencijska metoda temelji se na generiranju svjetlosti enzimskom modifikacijom odgovarajućih supstrata, a emitirana svjetlost očitava se na rendgenskom filmu. Mehanizam mjerenja kemiluminiscencije sličan je autoradiografiji, no vrijeme izlaganja rendgenskom filmu mnogo je kraće nego kod detekcije autoradiografijom. Konverzija kemijske energije u emisiju vidljivog svjetla rezultat je reakcije oksidacije ili hidrolize supstrata. Ovakvu detekciju moguće je provesti sustavom s alkalnom fosfatazom ili sustavom s peroksidazom hrena. Sustav s alkalnom fosfatazom uključuje 1,2-dioksetan kao supstrat. Njegovom defosforilacijom nastaje metastabilni fenoladni ion koji svojim raspadom emitira plavo svjetlo valne duljine oko 480 nm, a količina svjetlosti je izravno proporcionalna s količinom prisutne fosfataze, pa samim time i ciljnih molekula DNA hibridiziranih sa sondom. Sustav s peroksidazom hrena uključuje kao supstrat vodikov peroksid (H_2O_2) koji je reduciran u kisikov radikal (O_2^-) i molekulu vodika H_2 . Ova reakcija potiče luminiscencijsku oksidaciju cikličkog hidrazid luminola i drugih odgovarajućih supstrata te kao produkti oksidacije nastaju 3-aminoftalat i N_2 s pratećom emisijom svjetla (Farrell, 2010).

2.2.5. Usporedba osjetljivosti radioaktivno i neradioaktivno obilježenih sondi

Ovisno o korištenoj metodi obilježavanja i načinu pripreme obilježenih sondi sintetiziraju se sonde različite osjetljivosti. Tijekom hibridizacije potrebno je optimizirati uvjete predhibridizacije, hibridizacije i detekcije. Podešavanjem uvjeta tijekom provođenja hibridizacije po Southern-u kao rezultat dobivaju se intenzivni signali sa minimiziranim nespecifičnim vezanjem DNA sondi za membranu.

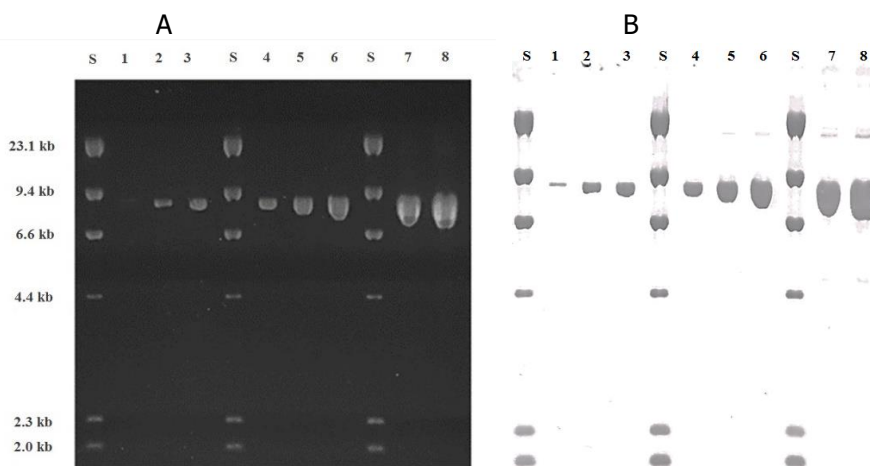
Osjetljivost hibridizacije određena je količinom hibridiziranih molekula to jest minimalnom masom odgovarajuće sekvencije DNA na membrani koja se može detektirati. Što je tijekom hibridizacije više označenih molekula sonde hibridiziralo s ciljnom sekvencijom, intenzitet signala je jači. Specifična aktivnost sonde određena je omjerom označenih nukleotida i ukupnog broja nukleotida u sondi. Metode koje omogućuju ugradnju obilježenih deoksiribonukleotida, poput pomaka zareza, nasumičnog započinjanja, *in vitro* transkripcije te metode lančane polimeraze, rezultiraju pripremom sondi visoke specifične aktivnosti te se zbog toga i najčešće primjenjuju.

Radioaktivno obilježavanje sondi smatra se metodom kojom se sintetiziraju najosjetljivije DNA sonde, a osjetljivost ovisi i o odabiru odgovarajućeg radioizotopa (Mifflin i sur., 1987, tablica 2).

Tablica 2. Usporedba minimalne mase ciljne sekvence DNA i radioaktivnog izotopa korištenog pri obilježavanju DNA.

Radioaktivni izotop	Masa ciljne DNA / broj kopija	Referenca
³² P	1 pg / 1 kopija gena	Mifflin i sur., 1987, Maitland i sur., 1987
³⁵ S	1 pg / 2-5 kopija gena	Mifflin i sur., 1987, Maitland i sur., 1987

Kod hibridizacije s neradioaktivno obilježenim sondama potrebno je koristiti veću masu obilježenih sondi nego kod radioaktivno obilježenih sondi (Mifflin i sur., 1987; slika 10, tablica 3).



Slika 10. Analiza osjetljivosti DIG-obilježene sonde koja sadrži gen URA3 iz kvasca *D. bruxellensis* (DbURA3), a sintetizirana je lančanom reakcijom polimerazom. A) gel različitih masa plazmida pBOCALDU porezanog restrikcijom endonukleazom SmaI, B) hibridizacija po Southern-u neizravnom detekcijom pomoću kromogene reakcije alkalne fosfataze sa supstratom 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfatom (BCIP) i nitroblue tetrazolium soli (NBT). S– DNA bakteriofaga λ pocijepana s restrikcijom SmaI (200 ng); 1–8–različite mase plazmida pBOCALDU pocijepanog s restrikcijom SmaI; 1– 1 ng, 2– 5 ng, 3– 10 ng, 4– 10 ng, 5– 25 ng, 6– 50 ng, 7– 100 ng, 8– 200 ng (preuzeto i modificirano iz Bertoša, 2014).

Tablica 3. Usporedba minimalne mase ciljne sekvence DNA pri radioaktivnom i neradioaktivnom obilježavanju DNA.

Metoda obilježavanja	Masa ciljne DNA	Referenca
Radioaktivno obilježavanje	1 pg	Mifflin i sur., 1987
Neradioaktivno obilježavanje digoksigeninom	< 1 ng	Bertoša, 2014.
Neradioaktivno obilježavanje biotinom	5 pg	Mifflin i sur., 1987

Pri eksperimentalnom radu uspoređivanja osjetljivosti sonde označenih radioaktivnim izotopom ^{32}P , ^{35}S i biotinom, rezultati su pokazali da je radioaktivnim obilježavanjem fosforom i sumporom detektirano 1 pg DNA, dok je za pozitivnu reakciju sustava detekcije biotinom obilježenih sonde bilo potrebno 5 pg DNA. Rezultati ukazuju na veću osjetljivost radioaktivno obilježenih sonde od neradioaktivno obilježene sonde biotinom. Vrijeme detekcije radioaktivno obilježene sonde ^{32}P iznosilo je 4 h, a ^{35}S 96 h. Sonde obilježene biotinom detektirale su se pomoću fosfataza i peroksidaza hrena, a najmanja masa ciljne DNA postignuta je metodom detekcije sa fosfatazom. Vrijeme detekcije neradioaktivno obilježene sonde peroksidazom manje je od vremena detekcije pomoću fosfataze (Mifflin i sur., 1987). Eksperimentalnim radom ustanovljeno je da je efikasnost obilježavanja i intenzitet signala prilikom korištenja sonde obilježenih radioaktivnim sumporom i biotinom vrlo slična (Maitland i sur., 1987).

Veliku prednost neradioaktivnog obilježavanja sondi nad radioaktivnim predstavlja i mogućnost skladištenja neradioaktivno obilježenih sondi minimalno godinu dana te njihova višekratna upotreba. Zbog kratkog vremena poluživota radioizotopa (posebice najčešće korištenog izotopa ^{32}P) i/ili njihovog štetnog utjecaja na zdravlje i okoliš, skladištenje nije moguće. Alternativna mogućnost višekratnog korištenja radioaktivnih sondi je korištenje radioaktivnog izotopa ^{33}P umjesto ^{32}P . Radioizotop ^{33}P niže je energije od izotopa ^{32}P , emitira beta čestice znatno niže energije te ima dulje vrijeme poluživota (25.3 dana). Zbog niže energije radioizotopa, vrijeme izlaganja tijekom autoradiografije je dulje. Nadalje, ^{33}P predstavlja manji rizik pri rukovanju i omogućuje bolju rezoluciju autoradiografske slike (Lichtenstein i Moiseev, 1992).

Iako je osjetljivost sonde određena tipom i metodom obilježavanja sondi, kako bi se pri hibridizaciji po Southern-u dobili hibridizacijski signali bez nespecifičnog vezanja DNA sondi, potrebno je optimizirati i uvjete za prijenos DNA iz gela na membranu, fiksiranje DNA na membranu, optimizirati uvjete predhibridizacije i hibridizacije, ispiranja membrane i detekcije hibridiziranih molekula.

2.2.6. Uklanjanje signala i ponovna detekcija

Nakon hibridizacije i odgovarajuće metode detekcije moguće je ukloniti signal i obilježenu sondu te provesti hibridizaciju s drugom obilježenom sondom i detekciju. Ukoliko se rehibridizacija provodi sa istom ciljnom sekvencijom potrebno je ukloniti signal i sondu, no ako se provodi detekcija različitih sekvencija uklanjanje signala i sonde nije nužno. Prilikom uklanjanja sondi postoji mogućnost gubitka molekula DNA s membrane te redukcije signala tijekom rehibridizacije. Također, tijekom sljedeće detekcije može doći do povećanja nespecifičnog vezanja obilježene sonde i pozadinskog obojenja cijele membrane. Korištenje najlonskih membrana omogućuje višestruko provođenje metoda hibridizacije s istom membranom koje nije moguće s membranom od nitroceluloze.

Radioaktivne sonde mogu se ukloniti s membrane različitim reagensima (natrijev hidroksid, SDS, formamid ili vrijuća voda, Herzer i Englert, 2001), no jednostavnije je membranu s radioaktivno obilježenim sondama ostaviti nekoliko vremena poluraspada radioaktivnog izotopa korištenog za obilježavanje DNA sonde, kako bi došlo do raspada gotovo svih radioaktivnih jezgri. Reagens koji se upotrebljava za uklanjanje sondi treba biti što manje invazivan kako bi se minimizirao gubitak ciljnih sekvencija DNA s membrane. Procedura koja koristi najinvazivniji reagens za uklanjanje sondi je procedura s natrijevim hidroksidom, a manje invazivne procedure koriste SDS ili vrijuću vodu. Najmanje invazivna procedura koja

rezultira najmanjim gubitcima DNA je pomoću formamida (Herzer i Englert, 2001), i u tom slučaju prilikom rehibridizacije neće doći do pojave signala dobivenih hibridizacijom s prvom DNA sondom.

Umjesto uklanjanja neradioaktivno obilježenih sondi, moguća je inaktivacija signala pa se tako peroksidaza hrena inaktivira inkubacijom membrane u 15% H₂O₂ pri sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta. Osim inaktivacijom enzima, izbjegavanje uklanjanja sonde moguće je korištenjem drugačijih haptena ili različite metode detekcije pri rehibridizaciji (Herzer i Englert, 2001).

Za uklanjanje kemiluminiscencijskih i kolornih produkata te sondi koriste se isti reagensi kao za uklanjanje radioaktivnih sondi, no prilikom uklanjanja kolornih produkata potrebno je prije uklanjanja sondi ukloniti obojeni talog. Uklanjanje taloga provodi se inkubacijom membrane u dimetilformamidu pri povišenoj temperaturi (50-60 °C) u digestoru (Cseke i sur., 2003). Nakon uklanjanja taloga moguće je ukloniti sondu, no potrebno je paziti da se membrana ne osuši jer u tom slučaju neće biti moguće uklanjanje sonde. Kako bi se minimizirao gubitak ciljnih sekvencija DNA s membrane, koriste se što manje invazivni spojevi za uklanjanje sondi (Herzer i Englert, 2001).

3. ZAKLJUČAK

Na temelju provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. DNA sonde u metodi hibridizacije po Southern-u mogu se obilježiti radioaktivno, koristeći radioaktivne izotope ili neradioaktivno, koristeći molekule biotina i digoksigenina.
2. Radioaktivnim obilježavanjem sintetiziraju se DNA sonde najveće osjetljivosti, no zbog kratkog vremena poluživota i zdravstvenih rizika pri radu sve se češće upotrebljavaju neradioaktivno obilježene sonde.
3. Neradioaktivno obilježene DNA sonde karakterizira sigurnost pri radu i veća stabilnost zbog čega se mogu dugotrajno skladištiti i višestruko upotrebljavati.
4. Detekcija radioaktivno obilježenih sonda provodi se autoradiografijom, dok se detekcija neradioaktivno obilježenih sonda provodi kromogenim i kemiluminiscencijskim metodama. Kemiluminiscencijska detekcija osjetljivija je od kromogene metode i sigurnija od autoradiografije.

4. POPIS LITERATURE

Bertoša R. (2014) Sinteza i određivanje osjetljivosti digoksinom obilježene probe za hibridizaciju DNA metodom po Southern-u. Završni rad, Sveučilište u Zagrebu.

Broomfield A., Bourn D. (1998) Basic techniques in molecular genetics. *The Journal of Laryngology and Otology* **112**: 230–234.

Campbell V. W., Jackson D. A. (1980) The Effect of Divalent Cations on the Mode of Action of DNase I. The Initial Reaction Products Produced From Covalently Closed Circular DNA. *The Journal of Biological Chemistry* **255** (8): 3726-3735.

Challberg M. D., Englund P. T. (1980) Specific Labeling of 3' Termini with T4 DNA Polymerase. *Methods in Enzymology* **65** (1): 39–43.

Dale J. W., von Schantz M., Plant N. (2012) From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology, 3.izd., Wiley & Sons. str. 98-99.

Deng G.-R., Wu R. (1983) Terminal transferase: Use of the Tailing of DNA and for *in Vitro* Mutagenesis. *Methods in Enzymology* **100**: 96–115.

Denhardt D. T. (1966) A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **23**: 641-646.

Engvall E., Perlmann P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**: 871-874.

Evans M. R., Read C. A. (1992) 32P, 33P and 35S: Selecting a Label for Nucleic Acid Analysis. *Nature* **358**: 520–521.

Farrell R. E. (2010) RNA Methodologies: Laboratory Guide for Isolation and Characterization, 4.izd., Academic Press. str. 261-282.

Farrell R. E. (2017) RNA Methodologies: Laboratory Guide for Isolation and Characterization, 5.izd., Academic Press. str. 469-526.

Gebeyehu G., Rao P. Y., SooChan P., Simms D. A., Klevan L. (1987) Novel biotinylated nucleotide - analogs for labeling and colorimetric detection of DNA. *Nucleic Acids Research* **15** (11): 4513–4534.

Hermanson G. T. (2013) Bioconjugate Techniques, 3.izd., Academic Press. str. 962.

- Herzer S., Englert D. F. (2001) Nucleic acid hybridization. U: Molecular biology problem solver: a laboratory guide, Gerstein A.S., ur., Wiley Liss Inc. str. 432-434.
- Higuchi R., Dollinger G., Walsh P. S., Griffith R. (1992) Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Biotechnology* **10**: 413–417.
- Hilario E. (2004) End labeling procedures: an overview. *Molecular Biotechnology* **28** (1): 77-80.
- Huang C., Yu Y.-T. (2013) Synthesis and labeling of RNA in vitro. *Current Protocols in Molecular Biology* 4. poglavlje, str. 1-14.
- Jenna Bioscience, <<https://www.jenabioscience.com/>> Pristupljeno 22. lipnja 2020.
- Karcher S. J. (1995) Molecular Biology, A Project Approach, 1.izd., Academic Press. str. 135-192.
- Kessler C., Höltke H. J., Seibl R., Burg J., Mühlegger K. (1990) Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids. I. A novel DNA labeling and detection system based on digoxigenin: anti-digoxigenin ELISA principle (digoxigenin system). *Biological Chemistry Hoppe Seyler* **371** (10): 917-927.
- Lichtenstein A. V., Moiseev V. L. (1992) A Procedure for Repeated Usage of ³³P-Labeled DNA Probes in Hybridization Experiments. *Analytical Biochemistry* **207**: 280-284.
- Lion T., Haas O. A. (1990) Nonradioactive Labeling of Probe with Digoxigenin by Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* **188**: 335-337.
- Livak K. J., Flood S. J. A., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications* **4**: 357-362.
- Mahmood T., Yang P.-C. (2012) Western blot: technique, theory and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences* **4** (9): 429–434.
- Maitland N. J., Cox M. F., Lynas C., Prime S., Crane I., Scully I. (1987) Nucleic acid probes in the study of latent viral disease. *Journal of Oral Pathology* **16**: 199-211.
- McCreery T. (1997) Digoxigenin labeling. *Molecular Biotechnology* **7**: 121–124.
- Michnick S. W., Remy I., Campbell-Valois F.-X., Valée-Bélisle A., Pelletier J. N. (2000) Detection of Protein-Protein Interactions by Protein Fragment Complementation Strategies. *Methods in Enzymology* **328**: 208-230.

Mifflin T. E., Bowden J., Lovell M. A., Bruns D. E., Hayden F. G., Gröschel D. H. M., Savory J. (1987) Comparison of Radioactive (^{32}P and ^{35}S) and Biotinylated Probes for Detection of Cytomegalovirus. *DNA Clinical Biochemistry* **20**: 231-235.

Netzer K.-O. (1999) Hybridization Methods (Southern and Northern Blotting). U: Techniques in Molecular Medicine, Hildebrandt F., Igarashi P., ur., Springer Lab Manual. str. 127-128.

New England Biolabs, < <https://international.neb.com/>> Pristupljeno 22. lipnja 2020.

Primrose S. B., Twyman R. M. (2006) Principles of Gene Manipulation and Genomics. 7.izd., Blackwell. str. 18-23.

Proudnikov D., Mirzabekov A. (1996) Chemical methods of DNA and RNA fluorescent labeling. *Nucleic Acids Research* **24** (22): 4535-4542.

Rigby P. W. J., Dieckmann M., Rhodes C., Berg P. (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *Journal of Molecular Biology* **113**: 237-251.

Roche (2008) DIG application manual for filter hybridization

Seibl R., Höltke H. J., Rüter R., Meindl A., Zachau H. G., Raßhofer R., Roggendorf M., Wolf H., Arnold N., Wienberg J., Kessler C. (1990) Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids. III. Applications of the digoxigenin system. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **371**: 939-951.

Southern E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**(3): 503-517.

Strachan T., Read A. (2018) Human molecular genetics, 4.izd., Garland Science. str. 202.

Štafa A., usmeno priopćenje

Thelwell N., Millington S., Solinas A., Booth J., Brown T. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Research* **28**(19): 3752-3761.

Tijssen P. (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers B.V. str. 272-287.

Tsai C.-J., Cseke L. J. (2003) Southern Blot Hybridization. U: Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, 2.izd., Cseke L. J., Kaufman P. B., Podila G. K., Tsai C.-J., ur., CRC Press. str. 99.

Tyagi S., Kramer F. (1996) Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. *Nature Biotechnology* **14**: 303–308.

Viola I. L., Gonzalez D. H. (2015) Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects, Academic Press. str. 28.

Wilchek M., Bayer E. A. (1990) Introduction to avidin-biotin technology. *Methods in Enzymology* **184**: 5-13.

Zeph L. R., Lin X., Stotzky G. (1991) Comparison of three nonradioactive and a radioactive DNA probe for the detection of target DNA by DNA hybridization. *Current Microbiology* **22**: 79–84.

Zhu Z., Chao J., Yu H., Waggoner A. S. (1994) Directly labeled DNA probes using fluorescent nucleotides with different length linkers. *Nucleic Acids Research* **22** (16): 3418–3422.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

ime i prezime studenta