



ROTI®Hybriquick

I. Einleitung

Bei ROTI®Hybriquick handelt es sich um einen Natriumphosphat-gepufferten Hybridisierungspuffer. Der Puffer wird direkt als 1x Hybridisierungspuffer eingesetzt und ist für alle Southern- und Northern-Blot Hybridisierungen ab 50°C geeignet. Je nach Hybridisierungsansatz sollte ROTI®Hybriquick auch für die vorhergehende Prähybridisierung verwendet werden. In vielen Fällen kann die Hybridisierung erfolgen, indem dem heißen Prähybridisierungspuffer die denaturierte Sonde zugesetzt wird und der fertige Hybridisierungspuffer wieder zu den Membranfiltern gegeben wird. In Verdünnungen von 1:2 bis 1:10 eignet sich ROTI®Hybriquick auch für die anschließenden Waschschriffe mit zunehmender Stringenz. Geeignet für alle Membrantypen und Nachweisarten. Für Northern-Blot-Hybridisierungen empfehlen wir zur Reduktion des Hintergrundes eine nicht-geladene Nylon-Membran (AE50.1).

II. Technische Hinweise

Um eine möglichst große Flexibilität und Stabilität zu gewährleisten, enthält der Puffer keine zusätzlichen Blockierungssubstanzen wie Lachs- oder Heringssperma DNA. Bitte setzen Sie diese nach Denaturieren selbst zu, übliche Konzentrationen sind etwa 100 – 500 µg/ml. Da der Puffer SDS enthält, können sich bei tieferen Temperaturen SDS-Flocken bilden. Diese sind für die Qualität des Puffers nicht von Bedeutung und können durch Erwärmen leicht wieder in Lösung gebracht werden.

III. Protokoll einer typischen Southern-Blot Hybridisierung mit ROTI®Hybriquick

III.I Prähybridisierung

- Die Filtermembranen in 50 mM Natriumphosphat / 1 mM EDTA (pH 8,0) anfeuchten und in warmem ROTI®Hybriquick äquilibrieren (etwa 40-50°C).

- Prähybridisieren in ca. 10 ml ROTI®Hybriquick pro 500 cm² Filterfläche. Wir empfehlen die Zugabe von 100 µg/ml gescherter, denaturierter Heringssperma DNA. Prähybridisierung für mindestens 2 Stunden bei 65 °C.

III.II Hybridisierung

- Optional: Konkurrenz der repetitiven DNA Fragmente durch Zugabe von 100 µg gescherter und denaturierter genomischer DNA derselben Spezies.

- Hitzedenaturierung der Sonden-DNA durch Kochen für 5 bis 10 Minuten und sofortigen Transfer auf Eis.

- Abgießen des Prähybridisierungspuffers von den Filtern. Die Sonde kann direkt zum Prähybridisierungspuffer oder zu vorgewärmtem, frischem ROTI®Hybriquick zugegeben werden.

- Sofort Zugabe der Hybridisierungslösung zu den Filtern. Die Hybridisierung erfolgt i.d.R. über Nacht bei 65 °C unter leichtem Schütteln oder im Rotationsofen.

III.III Waschen der Membranen

- Waschen der Filtermembranen in vorgewärmtem ROTI®Hybriquick bei 65 °C unter kräftigem Schütteln:
A) in Verdünnung 1:2 für 10 min
B) in Verdünnung 1:5 für 10 min
C) in Verdünnung 1:10 für 10 min
(Schritt C kann wiederholt werden bis der Hintergrund reduziert ist.)

- Anschließend erfolgt die Detektion der Signale durch direkte Röntgenfilmmexposition oder Chemolumineszenznachweis.

IV. Protokoll einer typischen Northern-Blot Hybridisierung mit ROTI®Hybriquick

Alle Lösungen sollten durch Behandlung mit 0,1% DEPC (Best. Nr. K028.1) von RNAsen befreit worden sein. Weiterhin RNase-frei arbeiten. Wir empfehlen die Verwendung nicht-geladener Nylon-Membranen.

IV.I Prähybridisierung

- Die Filtermembranen in 50 mM Natriumphosphat / 1 mM EDTA (pH 8,0) anfeuchten und in warmem ROTI®Hybriquick äquilibrieren (etwa 40-50°C).

- Prähybridisieren in ca. 10 ml ROTI®Hybriquick pro 500 cm² Filterfläche. Wir empfehlen die Zugabe von 100 µg/ml gescherter, denaturierter Heringssperma DNA. Prähybridisierung für mindestens 2 Stunden bei 65 °C.

IV.II Hybridisierung

- Optional: Konkurrenz repetitiver RNAs durch Zugabe von 100 µg gescherter und denaturierter genomischer DNA oder denaturierter RNA derselben Spezies.

- Bei **ds-Sonden**: Hitzedenaturierung der Sonde durch Kochen für 5 bis 10 Minuten und sofortigen Transfer auf Eis. Alternativ: Denaturierung durch Addition von 0,1 Vol. 3 M NaOH, Inkubation für 5 min. bei RT. Neutralisation durch Transfer auf Eiswasser und Zugabe von 0,05 Vol. 1 M Tris-Cl (pH 7,2) und 0,1 Vol. 3 M HCl. **ss-Sonden** müssen nicht denaturiert werden, allerdings kann bei Sonden, die eine starke Sekundärstruktur bilden, eine Denaturierung die Hybridisierung verbessern.

Für die nachfolgende Hybridisierung gilt:
Hochstringente Hybridisierungen (hohe Homologie Sonde/Target) bei ca. 65-68 °C über Nacht in 1 x ROTI®Hybriquick
Bei niederstringenten Hybridisierungen (schwache Homologie Sonde/Target) empfehlen wir die Verwendung folgenden Hybridisierungspuffers:
3 ml ROTI®Hybriquick
+ 5 ml Formamid
+ 1 ml SDS (20 %)
+ 1 ml NaCl (2 M)

- Abgießen des Prähybridisierungspuffers von den Filtern. Die Sonde kann direkt zum Prähybridisierungspuffer ROTI®Hybriquick oder zu vorgewärmtem, frischem Formamid-Hybridisierungspuffer zugegeben werden.

- Sofort Zugabe der Hybridisierungslösung zu den Filtern. Die Hybridisierung erfolgt i.d.R. über Nacht bei 65-68 °C (hochstringente Hybridisierung) oder bei 37-42 °C (niederstringente Hybridisierung) unter leichtem Schütteln oder im Rotationsofen.

IV.III Waschen der Membranen

- Waschen der Filtermembranen in vorgewärmtem Waschpuffer bei 65-68 °C (hochstringente H.) / 23 °C (niederstringente H.) unter kräftigem Schütteln:

A) 2 x SSC / 0,1 % SDS für 15 min

B) 1 x SSC / 0,1 % SDS für 15 min

C) 0,5 x SSC / 0,1 % SDS für 15 min

Schritt C kann wiederholt werden bis der Hintergrund reduziert ist. Eine Erhöhung der SDS-Konzentration auf 1 % kann den Hintergrund weiter reduzieren.

- Anschließend erfolgt die Detektion der Signale durch direkte Röntgenfilmexposition oder Chemolumineszenznachweis.

ROTI®Hybriquick A981.1 1 |



Gefahr H290-H318

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe

Postfach 100121 • 76231 Karlsruhe

Telefon: +49 (0) 721/ 5606-0

Fax: +49 (0) 721/ 5606-149

info@carlroth.de • www.carlroth.de

ip 07/2021

Die Firma ist eine Kommanditgesellschaft mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRA 100055. Persönlich haftende Gesellschafterin ist die Roth Chemie GmbH mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRB 100428. Geschäftsführer: André Houdelet

Instructions for use



ROTI®Hybriquick

I. Introduction

ROTI®Hybriquick is a sodium phosphate buffered hybridisation buffer. The buffer is to be used directly as a 1 x hybridisation buffer and is suitable for all Southern- and Northern-Blot hybridisation processes from 50 °C onwards. Depending on specific assay, ROTI®Hybriquick should also be used for the preceding prehybridisation. In many cases hybridisation can be carried out by adding the denatured probe directly to the hot prehybridisation buffer and then returning the hybridisation buffer to the membrane filters. Diluted at 1:2 to 1:10 ROTI®Hybriquick is also suitable, with increasing stringency, for subsequent wash steps. Suitable for all membrane types and detection methods. We recommend using an uncharged nylon membrane (AE50.1) for Northern-Blot hybridisation in order to reduce the background.

II. Technical Information

In order to ensure highest possible flexibility and stability, the buffer contains no additional blocking substances such as salmon or herring sperm DNA. Please add these yourself after denaturing. Standard concentrations are app. 100-500 µg/ml. As the buffer contains SDS, SDS flakes may form at lower temperatures. These are of no consequence with regard to the quality of the buffer and can be dissolved easily by heating.

III. Protocol of a typical Southern-Blot hybridisation with ROTI®Hybriquick

III.I Prehybridisation

- Wet the filter membranes in 50 mM sodium phosphate / 1 mM EDTA (pH 8.0) and equilibrate in warm ROTI®Hybriquick (app. 40-50 °C).

- Prehybridization in app. 10 ml ROTI®Hybriquick per 500 cm² filter surface. We recommend adding 100 µg/ml sheared and denatured herring sperm DNA. Prehybridize for at least 2 hours at 65 °C.

III.II Hybridisation

- Optional: Competition of repetitive DNA fragments by adding 100 µg sheared and denatured genomic DNA of the same species.

- Heat-denaturize probe-DNA by boiling for 5 to 10 minutes and transferring immediately onto ice.

- Cast the prehybridisation buffer from the filters. The probe can be added directly to the prehybridisation buffer or to preheated, fresh ROTI®Hybriquick.

- Immediately add the hybridisation solution to the filters. As a rule, hybridisation should be carried out overnight at 65 °C under gentle shaking or in the rotation oven.

III.III Washing the membranes

- Wash the filter membranes in preheated ROTI®Hybriquick at 65 °C under vigorous shaking:

A) at a dilution of 1:2 for 10 mins

B) at a dilution of 1:5 for 10 mins

C) at a dilution of 1:10 for 10 mins

(Step C can be repeated until the background is reduced).

- Detection of signals can then be carried out via direct X-ray film exposition or chemoluminescence detection.

IV. Protocol of a typical Northern-Blot hybridisation with ROTI®Hybriquick

All solutions should have been freed from RNAses by treating them with 0.1 % DEPC (Art. No. K028.1). Work process should also be RNase-free. We recommend using uncharged nylon membranes.

IV.I Prehybridisation

- Wet the filter membranes in 50 mM sodium phosphate / 1 mM EDTA (pH 8.0) and equilibrate in warm ROTI®Hybriquick (app. 40-50 °C).

- Prehybridisation in app. 10 ml ROTI®Hybriquick per 500 cm² filter surface. We recommend adding 100 µg/ml chopped and denatured herring sperm DNA. Prehybridize for at least 2 hours at 65 °C.

IV. II Hybridisation

- Optional: Competition of repetitive RNAs by adding 100 µg sheared and denatured genomic DNA or denatured RNA of the same species.

- **ds-probes:** heat-denaturize the probe by boiling for 5 to 10 minutes and immediately transferring onto ice. Alternatively: denaturize by adding 0.1 volume 3 M NaOH, incubate for 5 minutes at room temperature. Neutralize by transferring onto icy water and adding 0.05 volume 1 M Tris-Cl (pH 7.2) and 0.1 volume 3 M HCl.

- **ss-probes:** do not have to be denaturized. However, in the event of probes which form a strong secondary structure, denaturation may improve hybridisation.

Following is applicable for subsequent hybridisation: Highly stringent hybridisation (high homology of probe target) at 65-68 °C overnight in 1 x ROTI®Hybriquick. For low-stringent hybridisation (weak homology of probe target), we recommend using following hybridisation buffers:

3 ml ROTI®Hybriquick
+ 5 ml formamide
+ 1 ml SDS (20 %)
+ 1 ml NaCl (2 M)

- Casting the prehybridisation buffer from the filters. The probe can be added directly to the prehybridisation buffer ROTI®Hybriquick or to preheated, fresh formamide hybridisation buffer.

- Add the hybridisation solution to the filters immediately. As a rule, hybridisation should be carried out overnight at 65 -68 °C (highly stringent hybridisation) or 37-42 °C (low-stringent hybridisation) under gentle shaking or in the rotation oven.

IV. III Washing the membranes

- Wash the filter membranes in preheated washing buffer at 65-68 °C (highly stringent hybridisation) / 23 °C (low-stringent hybridisation) under vigorous shaking:

A) 2 x SSC / 0.1 % SDS for 15 mins

B) 1 x SSC / 0.1 % SDS for 15 mins

C) 0.5 x SSC / 0.1 % SDS for 15 mins

Step C can be repeated until the background is reduced. Increasing the SDS-concentration to 1 % can further reduce the background.

- Detection of signals can then be carried out via direct X-ray film exposition or chemoluminescence detection.

ROTI®Hybriquick A981.1 1 |

 Danger H290-H318

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe

P.O. Box 100121 • 76231 Karlsruhe

Phone: +49 (0) 721/ 5606-0

Fax: +49 (0) 721/ 5606-149

info@carlroth.com • www.carlroth.com

ip 07/2021

The company is a limited partnership with headquarters in Karlsruhe, reg. court Mannheim HRA 100055. Roth Chemie GmbH, with headquarters in Karlsruhe, reg. court Mannheim HRB 100428, is the personally liable partner. Managing Director: André Houdelet. Sales tax identification number: DE 143621073.