

## Southern blot

用于检测重组DNA，也可分析DNA样品中是否有与探针序列同源的DNA片段。用于基因诊断，也可验证检测片段的分子量大小。将基因组DNA经限制性内切酶酶切，进行琼脂糖电泳，把分离后定位在凝胶上的不同分子量的DNA经碱变性处理，将凝胶中变性的DNA转移至一固相支持滤膜。利用标记的某一DNA、RNA或寡核苷酸与固着于滤膜上的DNA发生同源性杂交，利用放射自显影（化学发光法或显色法）检测。

（一）器材：台式离心机，恒温水浴锅，电泳仪，水平电泳槽，杂交炉，杂交袋，尼龙膜或硝酸纤维素膜，转印迹装置，滤纸，吸水纸，紫外交联仪或80℃烤箱，摇床，X线胶片。

（二）试剂：限制性内切酶，DNA加样缓冲液，DNA Ladder Marker，0.25M HCl，变性液（0.5M NaOH，1.5M NaCl），中和液（0.5M Tris-HCl PH7.5，3M NaCl），转印迹液20×SSC（3M NaCl，0.3M 柠檬酸钠，PH7.0），标记探针，2×SSC，预杂交液和杂交液，2×洗液（2×SSC，0.1%SDS），0.5×洗液（0.5×SSC，0.1%SDS），1×缓冲液（0.1M 马来酸，0.15M NaCl，PH7.5，0.3%Tween20），1×封阻液[1%（W/V）封阻剂溶于1×马来酸溶液（0.1M 马来酸，0.15M NaCl，PH7.5）]，1×检测液（0.1M Tris-HCl，0.1M NaCl，PH7.5），抗一地高辛-碱性磷酸酶。

（三）步骤：

1、酶切（以单一酶切为例），设置反应体系（反应体系30μl）

ddH<sub>2</sub>O 5μl

基因组DNA（0.5μg/μl）20μl

10×缓冲液 3μl

内切酶（10U/μl）2μl

短暂离心，消除离心管内气泡，于37℃消化过夜；

注意：若基因组DNA过低，要以较大体积进行限制酶消化，消化完毕后，可以通过乙醇沉淀、浓缩DNA片段，加少量DNA加样缓冲液点样。

2、消化好的样品点样于0.7%琼脂糖凝胶进行电泳；

注意：为保证DNA均匀分散于加样孔，应缓慢将样品加至加样孔。

3、电泳结束后，将凝胶依次用如下试剂处理进行碱变性，室温下轻轻摇动确保溶液覆盖凝胶

0.25M HCl 10-15 min

蒸馏水摇洗 5 min

变性液 40 min

蒸馏水摇洗 5 min

中和液 15 min，2次；

4、在凝胶碱变性的同时，制备转印迹装置。Southern blot转膜技术有三种：1），毛细管转移法；2），电转移法；3），真空转移法。这里介绍最经典的毛细管转移法（向上转移），在转印迹槽中，倒入20×SSC溶液，槽中置一固相支持物，在固相支持物上从下向上依次置入：两张与凝胶等宽的滤纸，将滤纸纵向自固相支持物垂于转印迹槽中（简称“桥”），底面在上的凝胶，滤膜（与凝胶等大），滤纸（与凝胶等大），吸水纸（略小于滤纸，5-8cm高），400-800g重物。凝胶四周用Parafilm膜包围防止短路。滤膜事先用2×SSC浸湿至少5 min。滤纸事先用20×SSC浸湿。转膜4-18小时；

注意：转膜装置中各层滤纸和膜之间要将气泡赶净。一旦建立转膜系统后，要防止滤膜和凝胶错位。防止吸水纸倒塌和完全湿透，要及时更换吸水纸。

5、转膜结束后，取出滤膜，边角剪一小角做标记。滤膜于2×SSC摇洗5min，用滤纸吸干；

- 6、用紫外交联照射（正面朝上）或于 80℃烤箱烘烤 0.5—2 小时；
- 7、膜可立即进行预杂交和杂交，或保存于 4℃待以后应用；
- 8、预杂交和杂交
  - 1) 将杂交膜浸湿于 6×SSC 2min，同时预热预杂交液和杂交炉至预杂交温度；
  - 2) 杂交膜封于杂交袋，按 0.2ml/cm<sup>2</sup> 膜面积加入预杂交液，预杂交至少 1 小时；
  - 3) 用于southern blot的探针可分为DNA探针、RNA探针和寡核苷酸探针。对探针的标记方法又可以分为放射性标记和非放射性标记。这里主要介绍非放射性地高辛标记探针的杂交方法。杂交时各种探针的用量：DNA探针，5—25ng/ml；RNA探针，100ng/ml；寡核苷酸探针，0.1—10pmol/ml。双链DNA探针提前 100℃变性 10min后迅速冰浴，单链探针无需变性。将处理后的探针加入杂交液温浴至杂交温度。杂交温度的选择根据杂交液的不同而不同；  
注意：应用寡核苷酸探针时，杂交温度的选择。 $T_m=4 \times (G+C)+2 \times (A+T)$ ，杂交温度比 $T_m$ 低约 10℃。
  - 4) 弃去预杂交液，将含探针的杂交液注入杂交袋，至少 3.5ml/10×1℃cm，置入杂交炉滚动；
- 9、杂交后的洗膜处理过程，顺序如下：
  - 2×洗液 2×15min
  - 0.5×洗液 2×15min
  - 1×缓冲洗液 1×3min
  - 1×封阻液 1×60min
  - 抗体液\* 1×30min
  - 1×缓冲洗液 2×15min
  - 1×检测液 1×5min\* 抗一地高辛—碱性磷酸酶用 1×封阻液稀释 10,000 倍（若用显色法稀释 5000 倍；若用 CDP-Star检测用 20,000 倍稀释）；
- 10、将膜浸于CSPD液（CSPD用 1×检测液稀释 100 倍，CDP-Star也用 1×检测液稀释 100 倍）室温避光静置 5min；回收剩余的CSPD液或CDP-Star液避光保存于 4℃可反复应用 3—5 次；
- 11、将膜上残液吸净，用保鲜膜封好于 37℃反应 15min，然后将膜固定于压片夹，进行曝光。  
注意：若用显色剂检测，新鲜配置显色剂（45 μl NBT和 35 μl BCIP溶于 10ml 1×检测液），将膜浸于显色剂中避光反应 4—16 小时，反应期间不要移动膜。

## Nothern blot

用于分析RNA样品中特定mRNA的大小和丰度。

RNA经变性琼脂糖凝胶电泳分离，转印迹至尼龙膜等固相支持膜上，再与标记的特异性探针杂交，从而分析固定于膜上的mRNA的数量和大小。常用RNA分析方法，有甲醛变性电泳、乙二醛/DMSO变性电泳和狭线印迹杂交三种方法。这里主要介绍甲醛变性电泳方法。

（一）器材：电泳仪，水平电泳槽，转印迹装置，尼龙膜或NC膜，滤纸，吸水纸，杂交炉，恒温水浴锅，摇床，X线胶片

（二）试剂：0.1%焦碳酸二乙酯（DEPC），10×MOPS电泳缓冲液[0.2M MOPS（PH7.0），0.05M 乙酸钠，0.01EDTA（PH8.0）]，37%甲醛（PH>4.0），RNA（甲醛）完全上样缓冲液，0.05M NaOH，20×SSC（3M NaCl、0.3M柠檬酸钠，PH7.0），10×SSC，标记探针，预杂交液和杂交液，2×洗液（2×SSC，0.1%SDS），0.5×洗液（0.5×SSC，0.1%SDS），1×缓冲洗液（0.1M马来酸，0.15M NaCl，PH7.5，0.3%Tween20），1×封阻液[1%（W/V）封阻剂溶于 1×马来酸溶液（0.1M马来酸，

0.15M NaCl, PH7.5)], 1×检测液 (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, PH7.5), 抗-地高辛-碱性磷酸酶

(三) 步骤:

1、制胶(50ml):

琼脂糖 0.75g

DEPC-H<sub>2</sub>O 35ml

10×MOPS 5.5 ml

甲醛 10ml

EB 2.5 μl

将制备好的胶置入电泳槽, 加电泳缓冲液 1×MOPS 450ml, 100V电压预电泳 5min;

2、取总RNA(10 μg/孔), 加RNA甲醛电泳完全加样液(按RNA: Loading Dye =1:4); 65℃变性 10min, 立即置冰上 5min; 将样本点于胶孔中, 60V电压下电泳 2-3h;

3、电泳结束后处理凝胶, DEPC. 水冲洗凝胶 3次, 0.05 NaOH 浸泡凝胶 20min, 20×SSC浸泡凝胶 40min;

4、制备转印迹装置。这里介绍最经典的毛细管转移法(向上转移), 在转印迹槽中, 倒入 20×SSC溶液, 槽中置一固相支持物, 在固相支持物上从下向上依次置入: 两张与凝胶等宽的滤纸, 将滤纸纵向自固相支持物垂于转印迹槽中(简称“桥”), 底面在上的凝胶, 滤膜(与凝胶等大), 滤纸(与凝胶等大), 吸水纸(略小于滤纸, 5-8cm高), 400-800g重物。凝胶四周用Parafilm膜包围防止短路。滤膜事先用 10×SSC浸湿至少 5 min。滤纸事先用 20×SSC浸湿。转膜 4-18 小时;

注意: 甲醛琼脂糖凝胶质地脆弱, 小心操作凝胶防止凝胶碎裂。一旦建立转膜系统后, 要防止滤膜和凝胶错位。防止吸水纸倒塌和完全湿透, 要及时更换吸水纸。

5、转膜结束后, 取出滤膜, 边角剪一小角做标记。滤膜于 2×SSC摇洗 5min, 用滤纸吸干;

6、用紫外交联照射(正面朝上)或于 80℃烤箱烘烤 0.5-2 小时;

7、膜可立即进行预杂交和杂交, 或保存于-80℃待以后应用;

8、预杂交和杂交方法同southern blot, 预杂交和杂交温度的选择: DNA探针应用 50℃, RNA探针应用 68℃, 寡核苷酸探针应用温度同southern blot方法中所述;

9、杂交后膜的处理方法同southern blot。