**Southern Blot DNA印迹杂交 实验全流程**

一、DNA 的提取
人和哺乳动物细胞基因组DNA的分离通常是在有**[EDTA](http://www.ebioe.com/yp/product-list-700.html%22%20%5Ct%20%22_blank)、Sarkosye**等一类**去污剂**存在下，用**[蛋白酶](http://www.ebioe.com/yp/product-list-470.html%22%20%5Ct%20%22_blank)K**消化细胞，随后用**酚、氯仿**抽提，经**RNase 处理和纯化**来提取DNA。
(1)取单层细胞，经无钙、镁PBS洗一次，用0.25%胰[蛋白酶](http://www.ebioe.com/yp/product-list-470.html%22%20%5Ct%20%22_blank)消化，细胞悬液经PBS洗2次,弃上清，取细胞沉淀。
(2)加入2ml细胞裂解液(10mM [Tris](http://www.ebioe.com/yp/product-list-702.html%22%20%5Ct%20%22_blank) HCL，pH8.0，0.1mol/L [EDTA](http://www.ebioe.com/yp/product-list-700.html%22%20%5Ct%20%22_blank)，10mmol/L NaCL，1%[SDS](http://www.ebioe.com/yp/product-list-703.html%22%20%5Ct%20%22_blank))充分混匀，加入蛋白酶K 至终浓度为0.5～1g/L、Sarkosye终浓度为0.5%，混匀**裂解**蛋白呈糊状。
(3)50℃[水浴](http://www.ebioe.com/yp/product-list-56.html%22%20%5Ct%20%22_blank)2h，转入37℃[水浴](http://www.ebioe.com/yp/product-list-56.html%22%20%5Ct%20%22_blank)过夜，次日加入等体积饱和酚，轻轻颠倒混匀，以**防止DNA断裂**，约3min。

12000r/min 离心15分钟（室温）
(4)取水相，再加入等体积酚/氯仿(1:1),同样颠倒混匀，**去除蛋白质**12000 r/min 离心15分钟（室温）
(5)再重复步骤(4)，再用等体积酚/氯仿(1:1)抽提一次
(6)取水相，再加入等体积氯仿，去除酚及蛋白质，颠倒混匀
12000 r/min 离心15分钟（室温）
(7)取水相，加入2倍体积的预冷无水乙醇，**沉淀DNA**，混匀-20℃放置1小时
12000 r/min 离心15分钟（室温）
(8)用70%乙醇洗涤一次，按上法离心将沉淀真空干燥10分钟。
(9)加入RNase A至终浓度100mg/L，37℃水浴消化1小时，**消化污染的RNA**。
(10)加入蛋白酶K 至终浓度0.4g/L、Sarkosye至终浓度0.5%，混匀，50℃水浴2小时，加入NaAC至终浓度10mmol/L。
(11)用等体积饱和酚各抽提一次，步骤同前。
(12)吸上清，加入氯仿/异戊醇(24:1)，按上法再抽一次。
(13)取水相，加入2倍体积预冷无水乙醇，-20℃ 1小时。
(14)取沉淀用70%乙醇洗一次，真空干燥10分钟后溶于少量TE中，4℃贮存。

Southern对DNA的质量要求比较高，一般来说，**高质量DNA** 样品需具备以下几点：
① DNA 完整性好；
② DNA 纯度高；
③ 勿用TE 溶解DNA；
④ DNA 浓度不低于**0.7ug/ul**，杂交需模板DNA 约20ug/泳道/次
**二、引物设计
三、DNA 检测**

**1、DNA浓度的测定**
DNA浓度用紫外[分光光度计](http://www.ebioe.com/yp/product-list-230.html%22%20%5Ct%20%22_blank)测定，核酸的光吸收值位于波长260nm处，蛋白质则位于280nm，分别测定后，其OD260/OD280的比值应大于 1.8.低于此值，说明DNA中仍残留较多的蛋白质，此时可用酚、氯仿继续抽提纯化。若比值大于1.9表明DNA链破坏，断裂严重，已成为小分子，因此操作应轻柔。
取少许DNA溶液，经紫外线扫描，吸收峰值位于波长260nm处，其纯度应为OD260/OD280=1.8,
OD260值为1的溶液大约含50μg/mL DNA，故**DNA的浓度 (μg/mL)=OD260值×50μg/mL×稀释倍数。DNA总量(μg)=DNA浓度(μg/mL)×总体积 (mL)**
**2、DNA分子量的测定**
DNA分子量大小测定，可用含溴化乙锭的1%[琼脂](http://www.ebioe.com/yp/product-list-642.html%22%20%5Ct%20%22_blank)凝胶电泳法测定，根据加入标准品片断的电泳迁移距离计算样品片断分子量大小，此技术还可用作分离基因组 DNA，进一步进行Southern吸印分析。
**四、探针制备（以PCR 标记方法为例）
1、标记原理**
Dig-dUTP 在Taq DNA [聚合酶](http://www.ebioe.com/yp/product-list-473.html%22%20%5Ct%20%22_blank)的作用下，经基因特异的引物PCR 指数扩增，可掺入到新合成的DNA 分子中，从而完成DNA 探针的标记。在延伸反应中，每20~25 个核苷可有一个Dig-dUTP 分子掺入到新合成的DNA 链中。
**2、操作步骤
1）探针标记
注意：在探针标记前，必须用普通PCR 优化反应条件（试剂盒中提供了过量的Taq DNA [聚合酶](http://www.ebioe.com/yp/product-list-473.html%22%20%5Ct%20%22_blank)及其Buffer，建议用于条件优化），包括引物、退火温度、延伸时间、模板量等，设定好最佳反应条件。任何非特异扩增可能导致高的杂交背景甚至假阳性。**
**在标记反应的同时，用普通dNTP 做一个相同体系的非标记PCR 扩增。**扩增体系：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组份 | D标加量 | Control加量 |
| 10×buffer (plus Mg2+)  | 2μl  | 2μl |
|  | 1μl | 0 |
|  | 0 | 0.4μl |
| 引物F/R | 1μl  | 1μl |
| 模板  | 1μl  | 1μl |
|  | 1μl | 1μl |
|  | 14μl | 14.6μl |

**PCR扩增：**
95℃ 5min;[ 95℃ 30sec,60℃ 35sec, 72℃ 30sec;] 72℃ 5min;
30 cycles

**2）标记探针检测**
取标记产物和普通PCR扩增产物各1μl，1.0%的[琼脂](http://www.ebioe.com/yp/product-list-642.html%22%20%5Ct%20%22_blank)糖凝胶电泳。由于大分子量的DIG掺入，**标记产物泳动速度比普通PCR产物要慢**。所以根据电泳图就可以判断是否标记上和有没有非特异标记！其余标记产物-20℃保存。

如果要准确检测标记效率（一般不必），取标记产物1μl和Dig标记的对照DNA，用DNA稀释液按 10倍系列稀释后点样于带正电荷[尼龙膜](http://www.ebioe.com/yp/product-list-989.html%22%20%5Ct%20%22_blank)上。用紫外交联仪或真空烘烤固定DNA探针，按杂交检测方法进行信号检测，然后与膜条上的Dig标记的对照DNA信号强度对比，推算出标记的探针浓度。如初始模板量较大，可取1μl标记产物稀释10~100倍后定量。
**五、基因组DNA 酶切**[限制性内切酶](http://www.ebioe.com/yp/product-list-469.html%22%20%5Ct%20%22_blank)(RE)可裂解双链DNA，每种酶的特点是具有高度特异性的DNA裂解点和不同电离子强度的特殊反应条件。不同产品其反应条件不同，应根据说明书操作。单位(U)RE活性是在37℃ 1小时内能将1μg DNA所有特异性位点切断的酶用量。若用两种以上不同的内切酶，要注意RE的最适盐浓度，要由低向高逐级添加适量盐逐个进行DNA切割。
通常，10个单位的内切酶可以切割1μg不同来源和纯度的DNA。
在正式酶切之前先用20μl小体系预酶切看是否切得动，然后用大体系37℃酶切过夜。
**1、酶切体系：**

|  |  |
| --- | --- |
| 组份 | 加量 |
| 10×buffer | 4.5μl |
| HindШ 内切酶 | 6.5μl |
| 样品DNA  | 25μg |
| ddH2O  | 补足水至45μl，于37℃水浴中酶切20h |

每一种酶都有其相应的最佳缓冲液，以保证最佳酶活性，使用时的缓冲液浓度应为1×。有的酶要求100μg/ml的BSA以实现最佳活性。不需要BSA的酶如果加了BSA也不会受太大影响。
酶切完后，取5μl 酶切DNA样品于1%的琼脂糖凝胶上检测酶切是否充分。如果酶切充分，灌制1%的agrose胶，加入上样buffer后，在25-30V稳压电泳 12-24hrs（包括DNA Marker）。
**2、电泳**
1%浓度琼脂糖凝胶、TBE buffer（EB 染料电泳后染）
100ml TBE buffer中加入10μl 10mg/ml溴化乙锭（EB）,将凝胶放置其中染色30分钟, 照相。
**六、转膜**1、将胶裁成9.8cm×8.0cm 大小，于平皿中用[蒸馏](http://www.ebioe.com/yp/product-list-67.html%22%20%5Ct%20%22_blank)水冲洗一次；（此步一定记好胶的大小，后面裁纸/膜以及杂交液体积的选择都要用到）
2、加入100ml 0.25 mol/L 的**盐酸**脱嘌呤，室温振荡15~30 min，至溴酚蓝完全变成黄色。（如果限制性片段＞10kb，酸处理时间可适当延长；若限制性片段很小，此步可省略）
3、用[蒸馏](http://www.ebioe.com/yp/product-list-67.html%22%20%5Ct%20%22_blank)水冲洗2 次。加入**变性液**（1.5mol/L NaCl、0.5mol/L NaOH）室温振荡20~30min；至溴酚蓝完全恢复到原来的蓝色。
4、用蒸馏水冲洗2 次。加入**中和液**（1.5mol/L NaCl、1.0mol/L [Tris](http://www.ebioe.com/yp/product-list-702.html%22%20%5Ct%20%22_blank)-Cl ， pH7.4）室温振荡2×15min；
5、用蒸馏水冲洗2 次。加入2×SSC 平衡凝胶和[尼龙膜](http://www.ebioe.com/yp/product-list-989.html%22%20%5Ct%20%22_blank) 5min；
6、虹吸印记法转膜26 小时
1) 在方盘上放置一平板，其上放置一[滤纸](http://www.ebioe.com/yp/product-list-976.html%22%20%5Ct%20%22_blank)，[滤纸](http://www.ebioe.com/yp/product-list-976.html%22%20%5Ct%20%22_blank)两端搭入盘内浸入2×SSC中，用玻璃棒赶走滤纸和平板之间的气泡。
2) 将凝胶倒置于平台上, **正面朝下**，切掉右下角，并用**保鲜膜**封闭四周以**防止**吸水纸接触凝胶的边缘从而接触平板造成液流的**短路**。
3) 将尼龙膜放于胶上，赶走气泡。
4) 膜上放两张滤纸，其上再放20层吸水纸。
5) 吸水纸上放一平板，其上放500g左右的重物，目的是**建立**液体从液池经凝胶向尼龙膜的**上行通路**，以洗脱凝胶中的DNA 并使其聚集到尼龙膜上。
6) 室温下过夜转膜，持续16小时以上，期间换纸2-3次。
7）完成转膜后，胶染色，观察转膜效果。并标记好序号、加样孔位置和对应分子量标准的位置，**尼龙膜和凝胶直接接触的一面为正面**。
8）用2×SSC漂洗尼龙膜一次，滤纸吸干，紫外交联仪下照射**固定DNA**(5000μJ /cm2)5min。
**七、杂交**1）预杂交：取8.0ml 65℃预热的Hyb 高效杂交液（Hyb-100），加入杂交管中，排尽气泡，65℃[杂交炉](http://www.ebioe.com/yp/product-list-132.html%22%20%5Ct%20%22_blank)中预杂交2h（8-15转/分）。（此步中高效杂交液的用量根据 9.8cm×8.0cm计算所得，1ml高效杂交液/10cm2胶，9.8×8.0=78.4 ）
2）探针变性：将已标记好的探针沸水浴中变性10 分钟，立即放冰水浴冷却10min(探针一经变性，立即使用)，。

3）杂交：排尽预杂交液，在8.0ml 新Hyb 高效杂交液（Hyb-100）加入4.0μl 新变性好的探针(1-3ul/膜，5-20ng/ml杂交液)，混匀。65℃杂交仪中杂交过夜（8-15转/分）。

4）杂交完成后，将杂交液回收置于一可耐低温又可耐沸水浴的管中，贮存于-70℃以备重复使用。重复使用时，解冻并在65℃下变性10min.。

**八、洗膜、信号检测（化学显色法）**1）杂交后室温下，20 ml 2×SSC/0.1%[SDS](http://www.ebioe.com/yp/product-list-703.html%22%20%5Ct%20%22_blank) 洗膜2×5min。
2）50℃，20 ml 0.1×SSC/0.1%SDS 洗涤2×15min。（洗液需要先预热到50℃）
3）再将膜置于20ml 洗涤缓冲液中平衡2-5min。
4）将膜在10 ml 阻断液中阻断30min（在[摇床](http://www.ebioe.com/yp/product-list-339.html%22%20%5Ct%20%22_blank)上轻轻摇动）。
5）封闭完成后倒出阻断液，加入稀释好的10ml [抗体](http://www.ebioe.com/yp/product-list-383.html%22%20%5Ct%20%22_blank)溶液，浸膜至少30min。(Anti-Dig-AP 在10000rpm 离心5min。离心后将Anti-Dig-AP 用阻断液稀释(1:5000)，2.0μl Anti-Dig-AP 加入10ml 封闭液混匀)
6）去除[抗体](http://www.ebioe.com/yp/product-list-383.html%22%20%5Ct%20%22_blank)溶液，用20 ml 洗涤缓冲液缓慢洗膜2 次，每次15min。
7）去除洗涤缓冲液，在20 ml 检测液中平衡膜2 次，每次2min。
8）用检测缓冲液稀释300μl NBT/BCIP 化学显色底物，在约15ml 新鲜制备的显色液中反应显色，在显色过程中勿摇动。

**注意：在几分钟内即有颜色开始沉淀，并在16h后完成反应。为检测显色程度，膜可以短时碱暴露于光线下。**9）当达到所需的点或带强度后，用50ml双蒸水或TE 缓冲液洗涤5 min 终止反应，照相记录结果。

**若是杂交结果不满意，尼龙膜可经过处理进行重杂交。膜重杂交前的处理如下：**

**a. NBT/BCIP化学显色法**

1. [烧杯](http://www.ebioe.com/yp/product-list-912.html%22%20%5Ct%20%22_blank)中盛装适量的DMF(Dimethylformamid,二甲基甲酰胺)，通风橱内50-60℃水浴。

**注：DMF是挥发性的，且大约67℃时能够燃烧。**

2. 将膜置于[烧杯](http://www.ebioe.com/yp/product-list-912.html%22%20%5Ct%20%22_blank)内，温育至褪色。

3. 用双蒸水彻底淋洗膜。

4. 用20-30ml 0.2N NaOH，0.1%SDS(w/v)37℃震荡洗涤2×20min。

5. 2×SSC平衡数分钟。

6. 空气干燥或立即用于杂交。

**b. CDP-Star化学发光法**

**膜的存放**

**a. 若欲再杂交**

在塑料袋中密封保存，任何时候膜都不能干。**注：欲保持颜色，可用TE缓冲液保存。**

**b. 不再杂交**

15-25℃干膜，存放。**注：干膜过程中颜色会减淡，为再生颜色，可在TE缓冲液中湿润。**

**Southern溶液的配制**1、洗液Ⅰ的配制：250ml (2×SSC，0.1%SDS)
20×SSC 25ml 10%SDS 2.5ml ddH2O 至250ml
2、洗液Ⅱ的配制：100ml (0.1×SSC，0.1%SDS)
20×SSC 0.5ml 10%SDS 1ml ddH2O 至100ml
3、洗涤液：250ml (马来酸缓冲液：Tween-20=1：0.3%)
马来酸缓冲液 250ml Tween-20 750ul

4、马来酸缓冲液：(1×) 1L
马来酸 11.607g NaOH 7.88g NaCl 8.77g
定容至1L，用固体调至PH7.5，高压灭菌。
5、阻断液(10×) 500ml
Blocking Solution 50g 马来酸缓冲液 定容至500ml
70℃水浴溶化混匀，然后121℃高压灭菌(高压时盖子要松)

6、20×SSC 1L
在800ml水中溶解，NaCl 175.3g 柠檬酸钠 88.2g

10mol/L NaOH调节pH值至7.0.加水定容至1L，分装后高压灭菌
7、10%SDS 1L
在900ml水中溶解100g电泳级SDS，加热至68℃助溶，加入几滴浓HCl调节pH值至7.2，加水定容至1L，分装备用。

**注意：SDS的微细晶粒易扩散，因此称量时要戴面罩，称量完毕后要清除残留在称量工作区和天平的SDS，10%SDS溶液无须灭菌，过滤。**8、TE pH 8.0 1L
10mmol/L Tris•HCl(pH 8.0) 1 mmol/LEDTA(pH 8.0)
9、检测缓冲液(5×) 1L
0.5mTris•HCl 60.57g 0.5m NaCl 29.25g 调pH值至9.5
10、PBS缓冲液
NaCl 8g KCl 0.2g Na2HPO4 1.44g KH2PO4 0.24g
浓HCl调pH至7.4
11、变性缓冲液 1L
1.5M NaCl 87.66g 0.5M NaOH 20g
12、0.25M HCl(脱嘌呤液) 250ml
2.5M HCl 25ml ddH2O至250ml
13、2.5M HCl 100ml
浓HCl 21.55ml ddH2O至100ml
14、中和缓冲液 1L
1.5M NaCl 87.66g 1MTris•HCl 121.14gTris,HCl调pH7.4 加水至1L。

1. 用双蒸水彻底淋洗膜。

2. 用20-30ml 0.2N NaOH，0.1%SDS(w/v)37℃震荡洗涤2×20min。

3. 2×SSC平衡数分钟。

4. 空气干燥或立即用于杂交。