

Northern杂交方法

概述

Northern杂交可以选用DIG或者BIOTIN标记的RNA探针或DNA探针,但RNA探针显示更强的杂交信号和更低的非特异性背景,因此只要可能,可尽量选用RNA探针。但由于RNA探针在操作中的严格性比使用DNA探针更高。因此大多数研究者仍使用DNA探针,在此情况下,建议使用Hyb高效杂交液以减少背景。探针的浓度因目的基因的丰度和所采用的检测方法不同而有所差异。如采用化学显色法时,探针浓度建议为30-80ng/ml,采用CSPD化学发光检测时,探针浓度建议为20-50ng/ml,如果采用CDP-Star化学发光检测,由于灵敏度很高,因此,还要适当降低探针浓度(约10-25ng/ml)。

转膜和 RNA 的固定

转膜前的RNA琼脂糖凝胶电泳采用变性电泳方法,根据需要选用适当的分子量标准。

1. 在完成电泳后,凝胶用DEPC-H₂O淋洗除去甲醛,然后置于 2 × SSC中浸泡15 ~ 30分钟。
2. 搭建转膜平台:在大口盘中放入支持物如玻璃板,玻璃板应比支持物长。剪一块滤纸,横放在玻璃板上,滤纸两端浸入盘中,用20 × SSC浸湿,并向盘中加入足量的20 × SSC。
3. 用刀将部分凝胶切去,并左下角切去一小块作为凝胶方位的记号。将凝胶置于平台中央,除去气泡。
4. 剪一张尼龙膜,大小与凝胶相当,在无RNase的水中浸泡5分钟,然后将其置于凝胶表面。膜置于凝胶表面后不易挪动,膜与凝胶之间不应留有气泡。
5. 取两张与尼龙膜同样大小的滤纸,用20 × SSC浸湿后置于膜上,用玻棒赶走气泡。将一叠略小于滤纸的吸水纸置于滤纸上,在纸上平放一玻璃板,然后在玻璃板上压一重物,室温下转膜4 ~ 6小时或过夜。

注:可以使用其它的转膜仪器进行以上过程,请遵循制造商的操作手册。

6. 转膜完成后,将膜置于一张干的滤纸上,用铅笔在膜上标记加样孔位置,用2 × SSC洗膜,再置于干滤纸上使膜晾干。

7. RNA的固定:

A) UV交联:将膜用UV照射交联。总照射剂量依膜的不同生产商而异,请按照膜的使用说明书和UV CROSSLIKER的操作手册进行。

B) 真空烘烤固定:将膜夹在两张滤纸之间,80 °C真空烘烤2小时。

杂交

1. 将膜置于装有预杂交液的杂交袋中(10ml预杂交液/100cm²膜),封好杂交袋,在设定的杂交温度下预杂交至少1小时。
2. 如果使用杂交管杂交,则根据杂交管体积,加入适量的杂交液(5-10ml)。如果膜的大小适中,也可以用无菌的50ml离心管(BD公司)进行,5ml杂交液已足够。将杂交仪设定为65 °C, 8-15转/分钟预杂交至少1小时。
3. 将标记好的探针于100 °C煮沸10 ~ 15分钟,立即放冰浴冷却10分钟。用杂交液稀释成所需浓度。

4. 将杂交袋中预杂交液倒出，加入10ml新鲜的Hyb杂交液（65℃ 预热，已加入变性的探针），小心排尽气泡，封口，放65℃ 水浴振荡杂交过夜。
5. 如果使用杂交管杂交，则倒出预杂交液，另取适量的Hyb高效杂交液(5-10ml)，加入变性过的探针(1-3 μ l/膜，或10-25ng/ml Hyb高效杂交液)，混匀。加入到杂交管中，杂交仪设定为65℃，8-15转/分钟，杂交过夜。
6. 杂交完成后，取出杂交膜，放入装有20mL的2 \times SSC/0.1% SDS溶液的平皿中，在室温下振荡洗涤两次，每次5分钟。然后放入0.1 \times SSC/0.1%SDS溶液(先放50℃ 水浴预热)中，50℃ 水浴振荡洗涤两次，每次15分钟。当探针长度小于100bp时，最后一次的洗膜温度要由预备试验确定。

杂交信号检测

除非特别说明，以下过程均在室温下进行，并轻微摇动。

化学发光法

1. 杂交洗膜后，将膜置于洗涤缓冲液中平衡1分钟。
 2. 封闭：在20ml封闭液中封闭30分钟，弃去封闭液。
 3. 抗Dig-AP于13000rpm下离心（在第一次使用时，需离心5分钟，以后使用前只需离心1分钟）。离心后将抗Dig-AP用封闭液稀释(1:15000-20000)，1 μ l Anti-Dig-AP加入20ml封闭液，混匀，与膜一起孵育30分钟。
 4. 去除抗体溶液，洗涤缓冲液洗膜2 \times 15分钟。
 5. 去除洗膜缓冲液，在检测缓冲液中平衡膜2次，每次2分钟。
- 注意：在使用化学发光底物处理之前，膜必须保持湿润，哪怕是轻微的干燥也会产生很高的背景。
6. 用检测缓冲液稀释CDP-Star底物（1:100），将膜置于干净的保鲜膜之间，用镊子抬起一角，从膜左边沿加入1ml化学发光底物，让底物溶液均匀扩散到膜的表面，然后将膜放平，排除气泡使膜四周被液体封闭，室温下放置5分钟。
 7. 排去多余的底物溶液，用保鲜膜包裹，置暗盒中对X光片曝光，曝光时间约为1-60分钟。

NBT/BCIP化学显色法

1. 杂交洗膜后，将膜转入装有20mL洗涤缓冲液的平皿中振荡洗涤5分钟。
2. 加入30mL阻断溶液孵育30分钟。
3. 再将膜转入30mL抗体溶液(1:5000, 6 μ l 抗Dig-AP加入30ml封闭液混匀)中孵育30分钟。
4. 在洗涤缓冲液中振荡洗涤两次，每次20mL，15分钟。
5. 平衡：将膜放入20mL检测缓冲液中振荡洗涤5分钟。
6. 显色：在10mL检测缓冲液中加入200 μ l的NBT/BCIP，混匀，将膜浸入显色液中，显色过夜，显色反应应在暗处完成，过程中切勿摇动。在显色反应中，可以短时暴露于光下观察，完全反应大约需要16小时。
7. 终止显色：用灭菌的双蒸水反复冲洗3~5次。在成像系统上拍照，记录结果。膜如果贮存在TE中可长期保存颜色不变。

相关服务

提供核酸的地高辛/生物素标记和检测，Southern、Northern 杂交等技术服务！质量保证，价

格合理！敬请垂询！

相关产品

核酸的地高辛/生物素标记和检测过程中相关的产品列于下表，供选择时参考。

产品名称	规格	目录号
地高辛 DNA 标记试剂盒 I	10 次标记反应	DDLK-010
生物素 DNA 标记试剂盒 I	10 次标记反应	BDLK-010
地高辛 DNA 标记试剂盒 II	10 次标记反应	RDLK-010
生物素 DNA 标记试剂盒 II	10 次标记反应	RBLK-010
地高辛 DNA 标记和检测试剂盒 I	10 次标记反应， 20 次显色检测反应	DLDS-120
生物素 DNA 标记和检测试剂盒 I	10 次标记反应， 20 次显色检测反应	RLDS-120
地高辛 DNA 标记和检测试剂盒 II	10 次标记反应， 20 次发光检测反应	DLDS-220
生物素 DNA 标记和检测试剂盒 II	10 次标记反应， 20 次显色检测反应	RLDS-220
地高辛 RNA 标记试剂盒	10 次标记反应	Coming soon
Hyb 高效杂交液	50ml, 100 ml, 200ml	Hyb-100
正电荷尼龙膜	7.5 x 10 cm 10 x 15 cm	M-1050
CPD-Star 浓缩液	0.5 ml	GR-001
NBT/BCIP 底物液	2 ml	GR-002



深圳依诺金生物科技有限公司

地址：深圳市高新区高新中一道，生物孵化器大楼1-204室

邮编：518057

电话：0755-26031015, 26031014

传真：0755-26031013

公司网页：www.innogenet-cn.com

电子邮件：info@innogenet-cn.com



北京美莱博医学科技有限公司

地址：北京市海淀区上地信息路1号国际科技创业园1号楼804室

邮编：100085

电话：010-82893546, 82894339

传真：010-82894339-806

公司网页：www.mylab.com.cn

电子邮件：mylab@mylab.com.cn