

# Northern Blot 原理及实验方法

**原理：**在变性条件下将待检的 RNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳，继而将在凝胶中的位置转移到硝酸纤维素薄膜或尼龙膜上，固定后再与同位素或其它标记物标记的 RNA 探针进行反应。

**用途：**检测样品中是否含有基因的转录产物（mRNA）及其含量。

## 实验方法：

### [仪器、试剂、材料]

（一）仪器恒温水浴箱，电泳仪，凝胶成像系统，真空转移仪，真空泵，UV 交联仪，杂交炉，恒温摇床，脱色摇床，漩涡振荡器，分光光度计，微量移液器，电炉（或微波炉），离心管，烧杯，量筒，三角瓶等。

（二）材料总 RNA 样品或 mRNA 样品，探针模板 DNA(25 ng)，尼龙膜

（三）试剂：NorthernMax Kit (Cat. # 1940, Ambion, Inc.)，琼脂糖，DEPC, X 光底片，底片暗盒，Random Primer，dNTP Mixture，111 TBq/mmol[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP，Exo-free Klenow Fragment 和 10 X Buffer, Sephadex G-50, SDS，双氧水, 灭菌水等。

### [方法与步骤]

#### 1. 用具的准备：

180度烤器皿：三角锥瓶、量筒、镊子、刀片等4小时。电泳槽：清洗梳子和电泳槽，并用双氧水浸泡过夜，用 DEPC 水冲洗，干燥备用。处理 DEPC 水(2 L)备用。

2. 用 RNAZap 去除用具表面的 RNase 酶污染用 RNAZap 擦洗梳子，电泳槽，刀片等，然后用 DEPC 水冲洗二次，去除 RNAZap。

### 3. 制胶:

1. 称取0.36mg 琼脂糖加入三角锥瓶中, 加入32.4ml DEPC 水后, 微波炉加热至琼脂糖完全溶解。60℃空气浴平衡溶液 (需加 DEPC 水补充蒸发的水分)
2. 在通风厨中加入3.6ml 的10 \* Denaturing Gel buffer, 轻轻振荡混匀。注意尽量避免产生气泡。
3. 将熔胶倒入制胶板中, 插上梳子如果胶溶液上存在气泡, 可以用热的玻璃棒或其它方法去除, 或将气泡推到胶的边缘。注: 胶的厚度不能超过0.5cm。
4. 胶在室温下完全凝固后, 将胶转移到电泳槽中, 加入1x MOPS Gel Running buffer 盖过胶面约1cm, 小心拔出梳子。(配制250ml 1×MOPS Gel Running buffer, 在电泳过程中补充蒸发的 buffer。)
5. 检查点样孔。

### 4. RNA 样品的制备

在 RNA 样品中加入3倍体积的 formaldehyde load dye 和适当的 EB(终浓度为10ug/ml)。混匀后, 65℃空气浴15min。短暂低速离心后, 立即放置于冰上5min。

### 5.电泳:

- 1.将 RNA 样品小心加到点样孔中。
- 2.在5V/cm 下跑胶 (5 x 14cm)。在电泳过程中, 每隔30min 短暂停止电泳, 取出胶, 混匀两极的电泳液后继续电泳。当胶中的溴酚蓝 (500bp) 接近胶的边缘时终止电泳。
- 3.紫外灯下, 检验电泳情况, 并用尺子测量18S、28S、溴酚蓝到点样孔的距离。注意不要让胶在紫外灯下曝光太长时间。

## 6.转膜

1. 用3%双氧水浸泡真空转移仪后，用 DEPC 水冲洗。
2. 用 RNAZap 擦洗多孔渗水屏和塑胶屏，用 DEPC 水冲洗二次。
3. 连接真空泵和真空转移仪，剪取一块适当大小的膜（膜的四边缘应大于塑胶屏孔口的 5mm），膜在 Transfer buffer 浸湿5分钟后，放置在多孔渗水屏的适当位置。
4. 盖上塑胶屏，盖上外框，扣上锁。
5. 将胶的多余部分切除，切后的胶四边缘要能盖过塑胶屏孔，并至少盖过边缘约2mm，以防止漏气。
6. 将胶小心放置在膜的上面，膜与胶之间不能有气泡。
7. 打开真空泵，使压强维持在50~58mbar；立即将 transfer buffer 加到胶面和四周。每隔10min 在胶面加上1ml transfer buffer，真空转移2小时。
8. 转膜后，用镊子夹住膜，于1x MOPS Gel Running buffer 中轻轻泡洗10秒，去除残余的胶和盐。
9. 用吸水纸吸取膜上多余的液体后，将膜置于 UV 交联仪中自动交联。
10. 将胶和紫外交联后的膜，在紫外灯下检测转移效率。(避免太长的紫外曝光时间)
12. 将膜在-20℃保存。

## 7.探针的制备

1. 在1.5ml 离心管中配制以下反应液：模板 DNA(25 ng)                      1ul  
Random Primer 2ul 灭菌水 11ul 总体积：14ul
2. 95℃ 加热3分钟后，迅速放置于冰冷却5min。
3. 在离心管中按下列顺序加入以下溶液：

10×Buffer 2.5ul

dNTP Mixture 2.5ul

$^{111}\text{Tbq/mmol}[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  5 ul

Exo-free Klenow Fragment 1 ul

4. 混匀后 (25ul), 37°C 下反应30分钟。短暂离心, 收集溶液到管底。

5. 65°C 加热5min 使酶失活。

### **8.探针的纯化及比活性测定:**

1. 准备凝胶: 将1g 凝胶加入30ml 的 DEPC 水中, 浸泡过夜。用 DEPC 水洗涤膨胀的凝胶数次, 以除去可溶解的葡聚糖。

2. 取1ml 一次性注射器, 去除内芯推杆, 将注射器底部用硅化的玻璃纤维塞住, 在注射器中装填 Sephadex G-50凝胶。

3. 将注射器放入一支15ml 离心管中, 注射器把手架在离心管口上。1600g 离心4分钟, 凝胶压紧后, 补加 Sephadex G-50凝胶悬液, 重复此步直至凝胶柱高度达注射器0.9ml 刻度处

4. 100ul STE 缓冲液洗柱, 1600g 离心4min。重复3次。

5. 倒掉离心管中的溶液后, 将一去盖的1.5ml 离心管置于管中, 再将装填了 Sephadex G-50凝胶的注射器插入离心管中, 注射器口对准1.5ml 离心管。

6. 将标记的 DNA 样品加入25 ul STE, 取出0.5ul 点样于 DE8 paper 上, 其余上样于层析柱上。

7. 1600g 离心4min, DNA 将流出被收集在去盖的离心管中, 而未掺入 DNA 的 dNTP 则保留在层析柱中。取0.5ul 已纯化的探针点样于 DE8-paper.

8. 测比活性。

## **9. 预杂交:**

1. 将预杂交液在杂交炉中68°C预热, 并漩涡使未溶解的物质溶解。
2. 加入适当的 ULRAhyb 到杂交管中(以100cm<sup>2</sup>膜面积加入10mlULRAhyb 杂交液), 42°C 预杂交4 hr。

## **10. 探针变性:**

1. 用10 mM EDTA 将探针稀释10倍。
2. 90°C热处理稀释后探针10min 后, 立即放置于冰上5min。
3. 短暂离心, 将溶液收集到管底。

## **11. 杂交:**

1. 加入0.5ml ULTRAhyb 到变性的探针中, 混匀后, 将探针加到预杂交液中。
2. 42°C杂交过夜 (14~24hr)。杂交完后, 将杂交液收集起来于 - 20°C保存。

## **12. 洗膜:**

1. 低严紧性洗膜: 加入 Low Stringency Wash Solution#1 (100cm<sup>2</sup>膜面积加入20ml 洗膜溶液), 室温下, 摇动洗膜5min 两次。
2. 高严紧性洗膜: 加入 High Stringency Wash Solution#2 (100cm<sup>2</sup>膜面积加入20ml 洗膜溶液), 42°C 摇动洗膜20min 两次。

## **13. 曝光:**

1. 将膜从洗膜液中取出，用保鲜膜包住，以防止膜干燥。
2. 检查膜上放射性强度，估计曝光时间
3. 将 X 光底片覆盖与膜上，曝光
4. 冲洗 X 光底片，扫描记录结果。

**14. 去除膜上的探针：**将200ml 0.1%SDS（由 DEPC 水配制）煮沸后，将膜放入，室温下让 SDS 冷却到室温，取出膜，去除多余的液体，干燥后，可以保存几个月。

## **15. 杂交结果**

操作应该小心，但不必紧张。用于 RNA 电泳、转膜的所有器械、用具均须处理以除去 RNase 酶，以免样品的降解。转膜时，注意膜和多孔渗水屏之间不要有气泡