

Southern Blot 原理及实验方法

原理：将待检测的 DNA 分子用/不用限制性内切酶消化后，通过琼脂糖凝胶电泳进行分离，继而将其变性并按其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 DNA 或 RNA 探针进行反应。如果待检物中含有与探针互补的序列，则二者通过碱基互补的原理进行结合，游离探针洗涤后用自显影或其它合适的技术进行检测，从而显示出待检的片段及其相对大小。

用途：检测样品中的 DNA 及其含量，了解基因的状态，如是否有点突变、扩增重排等。

试剂和器材

一、试剂

变性液：1.5mol/L NaCl，0.5mol/L NaOH。

中和液：0.5mol/L Tris-HCl (pH=7.0)，1.5mol/L NaCl。

20×SSC：3mol/L NaCl，0.3mol/L 柠檬酸钠。

以上溶液均在 100Kpa 灭菌 20 分钟。

2×SSC：用无菌移液管吸取 20×SSC 溶液 5mL，加无菌水 45mL。

6×SSC：用无菌移液管吸取 20×SSC 溶液 15mL，加无菌水 75mL。

二、器材

22cm×15cm 瓷盘

操作方法

1. 在琼脂糖凝胶上电泳分离 DNA。取出凝胶，切去边缘多余部分，EB 染色，在紫外灯下照相（放一标尺，可从像片中读出 DNA 迁移的距离）。
2. 将凝胶置于 200mL 变性液中，浸泡 45 分钟，并温和地不断振荡，使凝胶上的 ds-DNA 转变为 ss-DNA，然后用重蒸水冲洗凝胶几次。

3. 用中和液浸泡凝胶并不断地振荡 45 分钟，将凝胶中和至中性。防止凝胶的碱性破坏硝酸纤维膜。
4. 取一个瓷盘，在底部放一块玻璃板（或一块海绵）使盛器内的 20 倍 SSC 转移滤液低于玻板表面，在玻板表面盖一张 3mm 的二号滤纸，滤纸两边浸没于 20 倍 SSC 溶液中，在玻璃和滤纸之间，赶走所有的气泡。
5. 把凝胶底面朝上放在滤纸上，赶走两层之间出现的气泡。
6. 裁剪一张硝酸纤维膜，其长与宽大于凝胶 1—2mm，并在角上作记号，以确定滤膜方位。先把它放在去离子水中润湿后，再放在 20 倍 SSC 溶液中润湿 5 分钟，然后放在凝胶表面，两层之间不可有气泡。
7. 然后再把两张与滤膜一样大小的二号滤纸，在 2 倍 SSC 溶液中浸湿，覆盖在硝酸纤维膜上，同样要把气泡赶走。
8. 把一叠吸水纸（或卫生纸，约有 5—8cm 高，略小于滤纸），放置在滤纸上，在吸水纸上再放一块玻璃板和重约 500g 的重物，放置过夜。
9. 转移结束后，移去上面的吸水纸和滤纸，同时翻转取出凝胶与硝酸纤维膜，把凝胶的点样与硝酸纤维膜的相对应位置用铅笔或解剖针的针尖做好标记。
11. 把已转移了 DNA 的硝酸纤维膜放在 6 倍 SSC 溶液中振荡浸泡 5 分钟，然后放在滤纸上吸干溶液。再把它夹在两层滤纸之间，80℃ 真空干燥 2 小时。

注意事项

- （1）将凝胶中和至中性时，要测 pH，防止凝胶的碱性破坏硝酸纤维膜。
- （2）要注意赶走凝胶和滤纸及硝酸纤维素膜之间的气泡。

SDS-PAGE 实验原理及注意事项

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术首先在 1967 年由 Shapiro 建立, 1969 年由 Weber 和 Osborn 进一步完善。

一、原理

聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺 (简称 Acr) 和交联剂 N, N' - 亚甲基双丙烯酰胺 (简称 Bis) 在催化剂作用下, 聚合交联而成的具有网状立体结构的凝胶, 并以此为支持物进行电泳。聚丙烯酰胺凝胶电泳可根据不同蛋白质分子所带电荷的差异及分子大小的不同所产生的不同迁移率将蛋白质分离成若干条区带, 如果分离纯化的样品中只含有同一种蛋白质, 蛋白质样品电泳后, 就应只分离出一条区带。SDS 是一种阴离子表面活性剂能打断蛋白质的氢键和疏水键, 并按一定的比例和蛋白质分子结合成复合物, 使蛋白质带负电荷的量远远超过其本身原有的电荷, 掩盖了各种蛋白分子间天然的电荷差异。因此, 各种蛋白质-SDS 复合物在电泳时的迁移率, 不再受原有电荷和分子形状的影响, 而只是棒长的函数。这种电泳方法称为 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (简称 SDS-PAGE)。由于 SDS-PAGE 可设法将电泳时蛋白质电荷差异这一因素除去或减小到可以略而不计的程度, 因此常用来鉴定蛋白质分离样品的纯化程度, 如果被鉴定的蛋白质样品很纯, 只含有一种具三级结构的蛋白质或含有相同分子量亚基的具四级结构的蛋白质, 那么 SDS-PAGE 后, 就只出现一条蛋白质区带。SDS-PAGE 可分为圆盘状和垂直板状、连续系统和不连续系统。本实验采用垂直板状不连续系统。所谓“不连续”是指电泳体系由两种或两种以上的缓冲液、pH 和凝胶孔径等所组成。

1. 样品的浓缩效应

在不连续电泳系统中, 含有上、下槽缓冲液 (Tris-Gly, pH8.3)、浓缩胶缓冲液 (Tris-HCl, pH6.8)、分离胶缓冲液 (Tris-HCl, pH8.8), 两种凝胶的浓度 (即孔径) 也不相同。在这种条件下, 缓冲系统中的 HCl 几乎全部解离成 Cl⁻, 两槽中的 Gly (pI=6.0, pK_a=9.7) 只有很少部分解离成 Gly 的负离子, 而酸性蛋白质也可解离出负离子。这些离子在电泳时都向正极移动。Cl⁻ 速度最快 (先导离子), 其次为蛋白质, Gly 负离子最慢 (尾随离子)。由于 Cl⁻ 很快超过蛋白质, 因此在其后面形成一个电导较低、电位梯度较陡的区域, 该区电位梯度最高, 这是在电泳过程中形成的电位梯度的不连续性, 导致蛋白质和 Gly 离子加快移动, 结果使蛋白质在进入分离胶之前, 快、慢离子之间浓缩成一薄层, 有利于提高电泳的分辨率。

2. 分子筛效应

蛋白质离子进入分离胶后, 条件有很大变化。由于其 pH 升高 (电泳进行时常超过 9.0), 使 Gly 解离成负离子的效应增加; 同时因凝胶的浓度升高, 蛋白质的泳动受到影响, 迁移率急剧下降。此两项变化, 使 Gly 的移动超过蛋白质, 上述的高电压梯度不复存在, 蛋白质便在一个较均一的 pH 和电压梯度环境中, 按其分子的大小移动。分离胶的孔径有一定的大小, 对不同相对分子质量的蛋白质来说, 通过时受到的阻滞程度不同, 即使净电荷相等的颗粒, 也会由于这种分子筛的效应, 把不同大小的蛋白质相互分开。

二、注意事项

1. SDS 与蛋白质的结合按质量成比例（即：1.4gSDS/g 蛋白质），蛋白质含量不可以超标，否则 SDS 结合量不足。
2. 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质相对分子量时，必须同时作标准曲线。不能利用这次的标准曲线作为下次用。并且 SDS-PAGE 测定分子量有 10% 误差，不可完全信任。
3. 有些蛋白质由亚基（如血红蛋白）或两条以上肽链（ α -胰凝乳蛋白酶）组成的，它们在巯基乙醇和 SDS 的作用下解离成亚基或多条单肽链。因此，对于这一类蛋白质，SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定的只是它们的亚基或是单条肽链的相对分子量。
4. 有的蛋白质（如：电荷异常或结构异常的蛋白质；带有较大辅基的蛋白质）不能采用该法测相对分子量。
5. 如果该电泳中出现拖尾、染色带的背景不清晰等现象，可能是 SDS 不纯引起。

- 印迹法（blotting）是指将样品转移到固相载体上，而后利用相应的探测反应来检测样品的一种方法。1975 年，Southern 建立了将 DNA 转移到硝酸纤维素膜（NC 膜）上，并利用 DNA-RNA 杂交检测特定的 DNA 片段的方法，称为 Southern 印迹法。而后人们用类似的方法，对 RNA 和蛋白质进行印迹分析，对 RNA 的印迹分析称为 Northern 印迹法，对单向电泳后的蛋白质分子的印迹分析称为 Western 印迹法，对双向电泳后蛋白质分子的印迹分析称为 Eastern 印迹法

Western Blot 基本原理：在电场的作用下将电泳分离的多肽从凝胶转移至一种固相支持体，然后用这种多肽的特异抗体来检测

一般流程：

- 蛋白样品的制备
- SDS聚丙烯酰胺

- 转膜
- 封闭
- 一抗杂交
- 二抗杂交

SDS-PAGE 原理：

SDS 是一种离子性的界面活性剂，它有强离子性的硫酸根离子也带有疏水性的长碳链。当 SDS 与蛋白质混合时，它会以其碳链与蛋白质之疏水性氨基酸结合将蛋白质包起来，而以硫酸根离子外露与水分子作用。大多数蛋白质和 SDS 的平均结合量是 1:1.4（以重量为单位），而蛋白质结合固定比例之 SDS 后，由于 SDS 带强负价，使蛋白质原先的带电价微不足道，且

每单位重量之蛋白质带电价一致 (charge density),所以决定不同蛋白的泳动速率就只剩下分子大小一项因素

Western Blot 常见问题分析

***SDS-PAGE 电泳:

1、胶不平? 凝胶漏液?

- 胶板洗刷干净
- 加入 APS 和 TEMED 的量要合适
- 加入试剂后摇匀,使其充分混合,防止部分胶块聚合不均匀
- 温度合适,受热不均匀导致胶聚合不均匀
- 两块玻璃板底部要对齐

2、条带比正常的窄?“微笑”或“倒微笑”条带?

- 凝胶聚合不均匀,灌胶时候尽量混合均匀,动作轻缓
- 拔梳子要迅速,清洗加样孔要小心,以免把上样带扭曲
- 样品盐浓度过高会挤压其他条带导致宽窄不一,纯化样品,调整盐浓度
- 胶板底部有气泡会影响电泳效果,应赶走气泡。同时注意电泳槽装置是否合适

***转膜及抗体检测:

1、凝胶肿胀或卷曲? 条带歪斜或漂移? 单个或多个白点? 转膜缓冲液过热?

- 可将凝胶在转膜之前放到转膜缓冲液中浸泡 5-10min
- 电转仪长期使用导致海绵变薄,“三明治”结构不紧凑导致。可在两块海绵之间垫上少许普通的草纸
- 确保膜和胶块之间没有气泡
- 缓冲液中离子浓度太低,电流或电压太高。转膜过程注意降温

***背景太高

原因:

- | | |
|-----------|----------------|
| 1、膜没有均匀浸湿 | 2、膜或者缓冲液污染 |
| 3、封闭不充分 | 4、抗体与封闭剂出现交叉反应 |
| 5、抗体浓度过高 | |

对策:

1. 转膜前用 100% 甲醇将膜完全浸湿
2. 拿取膜与吸水纸时要戴手套,更换新鲜转膜缓冲液
3. 检测一抗、二抗与封闭剂是否有交叉反应
4. 杂交前检测一抗、二抗的工作浓度