

Southern 印记杂交

Southern Blot

吴昊，陈太钰，林拥军，陈浩*

作物遗传改良国家重点实验室，华中农业大学，武汉

*通讯作者邮箱: hchen@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 吴昊, 陈太钰, 林拥军, 陈浩. (2018). Southern Blot. *Bio-101* e1010104. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010104.

How to cite: Wu, H., Chen, T. Y., Lin, Y. J. and Chen, H. (2018). Southern Blot. *Bio-101* e1010104. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010104. (in Chinese)

实验原理: Southern 印记杂交 (Southern Blotting) 是将植物基因组总 DNA 酶切, 通过琼脂糖凝胶电泳分离, 变性之后利用虹吸原理印记到固相支持物上 (如尼龙膜), 然后与变性的同位素标记探针特异性地在一定温度下退火, 最后根据同位素标记情况分析杂交结果的分子生物学技术。

实验目的: Southern Blotting 可用于多种实验目的, 比如检测目的片段拷贝数, 限制性片断长度多态性分析、外源基因的整合模式等等, 该操作说明适用于水稻的目的片段拷贝数检测。

关键词: Southern blotting, RFLP, 拷贝数检测

材料与试剂

1. 两个玻璃盘 (强烈建议用两个玻璃盘, 而不要用搪瓷盘来洗胶, 搪瓷盘较小且边沿不圆滑, 操作时容易弄破凝胶)
2. 一个搪瓷盘 (用来放一些杂物, 如垫片等)
3. 玻璃棒, 玻璃板
4. 铲胶板, 吸水纸, 尺子, 铅笔, 小刀, 一个 300 g 的重物 (最好重量比较分散)
5. 两张用作盐桥的滤纸 (如果是 19.5 cm x 10 cm 的标准尼龙膜, 建议滤纸尺寸为 35 cm x 14.5 cm) 以及两张覆盖膜的滤纸, 比膜的长、宽各略大 0.5 cm 即可
6. Klenow 酶(1 U/μl) (试剂盒)
7. Tris (Sigma, catalog number: T-1378, FW 121.1)

8. 硼酸
9. EDTA
10. NaAC·3H₂O
11. 冰醋酸
12. Agarose (Biowest, Lot: 122000)
13. *Hind* III (Takara)
14. Agarose (Invitrogen, catalog number: 75510-019)
15. λDNA Marker (λ-*Eco*R14 I digest) (Takara, catalog number: CK1801E)
16. 浓 HCl (中平能化集团开封东大化工有限公司试剂厂)
17. 溴酚蓝
18. NaCl (国药)
19. NaOH (国药)
20. Tris (Trizone base)
21. Tris-sodian citrate (柠檬酸钠) (国药)
22. SDS (Bio Basic Inc., LJ0303B7011J)
23. Southern Blot Hybridization Buffer
24. Random Primer DNA Labeling Kit Ver 2.0 (Takara, Lot BK3201)
25. TE buffer
26. 10x TAE buffer (见溶液配方)
27. TBE buffer (见溶液配方)
28. Depurination Solution (见溶液配方)
29. Denaturation buffer (见溶液配方)
30. Neutralization buffer(见溶液配方)
31. Nucleic acid transfer buffer (20x SSC) (见溶液配方)
32. Southern Blot Hybridization Buffer (见溶液配方)
33. 洗膜液 (2x SSC + 0.1% SDS) (见溶液配方)

仪器设备

1. NanoDrop 2000 (Thermo)
2. 电泳槽

3. 水浴锅和干浴锅
4. 扫磷屏的机器为 FUJIFILM 的 FLA-5100 多功能影像分析仪，磷屏为该仪器配件

实验步骤

1. 总 DNA 大样的检测

在总 DNA 大样抽提之后 (见水稻叶片高质量 DNA 抽提 [吴昊等, 2018]), 加入 TE Buffer (pH 8.0), 常温溶解至少 7 d (最好半个月以上), 每天上下颠倒几次, 利于其快速溶解。溶解好之后, 需进行质量检测。

1.1 DNA 大样的凝胶电泳:

用 0.5x TBE 制一块长约 12 cm 的 0.8%琼脂糖 (Agarose, Biowest) 凝胶, 每个 DNA 样品取 1 μ l 上样, 90 V 电泳 (电泳槽长度约 33 cm, 下同) 2.5 h。若电泳的结果显示主带清晰无明显拖带, 点样孔比较干净, 表明 DNA 质量合格; 如果有很明显的拖带, 则表明 DNA 有明显降解, 不宜继续后面的实验。

1.2 浓度测定: 使用 Thermo 公司的 NanoDrop 2000 测定 DNA 浓度。

1.3 跑胶检测: 根据所测浓度, 取相同质量的样, 跑胶看亮度是否一致, 检验浓度测定是否准确。

用 0.5x TBE 制一块 20 cm x 12 cm 的 0.8%琼脂糖 (Agarose, Biowest) 凝胶, 每个 DNA 样品取 1 μ g 上样, 90 V 电泳 2.5 h (由于上样量较多, EB 染色时间不易过长, UVP 检测时紫外灯亮度也不应太高)。如果浓度均一则进行后续实验, 否则重新测浓度、跑胶检测直至均一。

注意: 若连续检测几次的结果差别很大, 则表明 DNA 溶解可能不完全。

2. 大样酶切、转膜胶电泳

2.1 大样酶切

取 8 μ g 大样 DNA, 配成 25 μ l 的酶切体系, 每个反应加入相应限制性内切酶 (一般浓度为 15 U/ μ l) 1 μ l, 酶切 20-22 h。从每个酶切反应中取 1 μ l, 0.8% TBE 凝胶 (胶长度约 14 cm) 80 V 电泳 2.5 h 以检测是否酶切完全。电泳检测的同时, 建议将酶切的样品暂时放入 4 $^{\circ}$ C 冰柜以降低其酶活。如果酶切样品电泳结果显示, 泳道内 DNA 亮度从上至下均匀, 没有明显的主带 (如图 1), 说明酶切完全可以进行转膜; 若存在明显的主条说明酶切不完全。

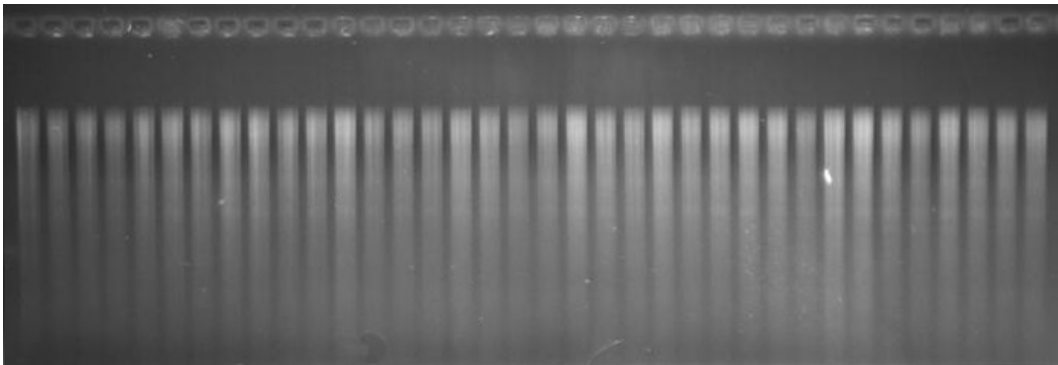


图 1. 大样酶切电泳检测

2.2 如果电泳检测结果显示酶切不完全，可再补加一次酶（一般为 5 U），继续酶切 5-6 h，同样取 1 μ l 电泳检测。一般补一次酶即可。

2.3 转膜胶的制备、电泳

注：此步为 Southern blot 起始第一步，非常重要！

1) 制胶：用 1x TAE 配制 1%的琼脂糖 (Invitrogen, Agarose) 凝胶。制备整板 (20 cm x 24 cm) 的凝胶大约需要 350 ml TAE。将电泳槽清洗干净，换上干净的 TAE 缓冲液。

注意：使用 TAE 配制凝胶，并作为电泳缓冲液是因为其在长时间电泳后发热较小；而 TBE 中含有硼酸，电泳时间过长发热严重。

2) 点样：每个酶切样品加入 2 μ l 10x Loading Buffer (含有浓的溴酚蓝染料，保证电泳完毕后，凝胶上可见溴酚蓝)，然后全部上样。在凝胶最边上的点样孔点约 3 ng 的 14 Kb λ DNA Marker (Takara, λ EcoR14 I digest, CK1801E)。

注意：该 Marker 浓度为 50 ng/ μ l，可稀释 10 倍后使用。

3) 电泳：30 V，24-26 h

3. 转膜前的准备 (可在转膜胶电泳期间完成)

3.1 两个玻璃盘 (强烈建议用两个玻璃盘，而不要用搪瓷盘来洗胶，搪瓷盘小，边沿不圆滑，容易弄破胶)

3.2 一个搪瓷盘 (用来放一些杂物，如垫片等)

3.3 玻璃棒，玻璃板

3.4 铲胶板，吸水纸，尺子，铅笔，小刀，一个重物 (300 g，最好重量比较分散)

以上物品使用前均用蒸馏水洗净。

3.5 两张用作盐桥的滤纸 (如果转膜用 19.5 cm x 10 cm 的标准尺寸尼龙膜, 建议盐桥的尺寸为 35 cm x 14.5 cm), 外加两张比膜的尺寸略大 (0.5 cm) 的滤纸。

3.6 转膜用的一系列试剂的准备 (见溶液配方)。

4. 转膜前对凝胶的处理

电泳结束之后, 将凝胶连同制胶板取出, 用蒸馏水轻柔地冲洗一下。取一块洗涤用的玻璃板, 可在其下垫一张白纸 (起衬托背景的作用)。在玻璃板上洒一些蒸馏水, 用手轻轻地将凝胶从制胶板上推到玻璃板上。凝胶强度不高, 一定要小心操作避免凝胶破碎。

4.1 切胶

一般先从点样孔向下 (即电泳的方向) 1 cm 处切掉点样孔, 然后根据尼龙膜的宽度切掉凝胶下面部分, 保证切割后的凝胶大小略小于膜的大小。此外, 胶左右两侧边缘也要切掉一点, 原因是制胶时胶与制胶板接触的地方因为毛细现象会相对高一点点, 如果不切掉在转膜过程中无法与膜平整接触。切两边时注意不要切到样品。

待胶的大小确定之后, 一般在右下角 (最后一个样品) 切个小角作为标记, 以便胶翻面之后确定点样顺序。

4.2 切胶完毕之后, 用铲胶板压住胶, 然后将玻璃板快速翻面。注意小心操作, 避免将胶摔破。

4.3 在一玻璃盘中放入灭菌的蒸馏水, 将 (已翻面) 胶放进去, 用手轻柔晃动玻璃盘, 漂洗 3 min。

4.4 脱嘌呤处理

将胶用铲胶板移至 Depurination Solution 的玻璃盘中, 脱嘌呤 13 分钟左右 (此时凝胶上溴酚蓝染料会变黄色), 期间经常注意摇晃。凝胶上小片段 (0.5-1.5 kb) 的 DNA 在几个小时之后便可以顺利地转到膜上, 而较大 (比如大于 10 kb) 的 DNA 片段不易转移, 脱嘌呤后可以大大地提高其转移效率。

4.5 变性

将玻璃盘中的 Depurination Solution 倒掉, 换上灭菌蒸馏水, 漂洗 3 min, 倒掉。加入 Denaturation Buffer 直至浸没凝胶, 室温处理 30 min, 期间注意经常

摇晃 (此时凝胶上溴酚蓝应该由黄色变回蓝色)。

4.6 中和

将玻璃盘中的 Denaturation buffer 倒掉，换上灭菌蒸馏水，漂洗 3 min，倒掉。加入 Neutralization buffer 直至浸没凝胶，室温处理 30 min，期间注意经常摇晃，然后在转膜前再用水漂洗一下凝胶。

5. 转膜

5.1 搭盐桥 (可以在变性和中和缓冲液处理的同时进行)

- 1) 在一个干净的玻璃盘里倒入 700-800 ml 20x SSC，将洗干净的胶板放在其上，用移液器吸转膜液将其表面湿润。
- 2) 将用作盐桥的滤纸先在转膜液 (20x SSC) 中润湿一下，然后轻轻放置在胶板上，缓慢放下尽量不要留下气泡。用玻璃棒赶走气泡，使滤纸平整。
- 3) 用移液器吸转膜液湿润第一张盐桥，然后按同样的方法在第一张盐桥上铺第二层滤纸。用玻璃棒赶气泡，平整滤纸。

5.2 将凝胶小心地推到盐桥上，玻璃棒赶走盐桥与凝胶之间的气泡，用移液器吸转膜液滴在胶面上及其四周，整个过程要保持胶和盐桥湿润。

5.3 用小塑料片垫在胶的四周边缘，防止“短路”，注意胶片不要插得太深，以免妨碍泳道上的 DNA 样品转移。用移液器吸转膜液滴在胶面上。

5.4 先对尼龙膜作记号，记录转膜时间、膜的正反面、点样顺序等信息，将尼龙膜在转膜液中湿润后轻轻放在胶上，最好一次性成功，避免再次移动尼龙膜。用玻璃棒赶气泡，用移液器吸转膜液滴于胶面。

5.5 将一张比膜略大的滤纸，先用转膜液湿润，然后置于胶上，用玻璃棒赶气泡，加转膜液湿润，依同样的方法放上两张同样大小滤纸。

5.6 在滤纸之上放一沓吸水纸 (高度约 8 cm，不宜太高)，在吸水纸上放一小块玻璃板，压一重物 (20 x 20 cm 的胶，重物不超过 750 g，建议一张标准膜上用装蔗糖的试剂瓶装 300 ml 水即可)，期间注意换吸水纸，不要让吸水纸歪掉 (否则凝胶受力不均)，转膜 24 h。

6. 转膜后处理

6.1 转膜完毕之后，小心取下盐桥上的所有装置，用镊子夹起膜，用两张比膜略大的滤纸包住，放入开口塑料袋中，置于 80 °C 真空烘膜 2 h。不建议烘膜前对

膜进行漂洗,因为此时膜上的 DNA 并未固定,漂洗过程中可能会使膜上的 DNA 发生移动。

6.2 将转完膜的胶置于 EB 盘中染胶,观察转膜效果。

注意:即使转膜效果不好,此时也已经无法挽回,所以前面的每一步操作都要仔细。

6.3 待烘膜完成后可以用保鲜膜包好置于 4 °C 冰箱中保存或进行直接进行后续 Southern 杂交。

7. 预杂交 (试剂见溶液配方)

7.1 将 Southern 杂交液提前在 65 °C 温浴,等到没有明显的沉淀即可使用。

7.2 将膜放入一端封口的杂交袋 (长约 30 cm) 中,膜靠近封口的一端。

7.3 加入 65 °C 预热的杂交液,杂交液用量一般为 125 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 。一张标准膜通常加入 25-30 ml 杂交液,赶出气泡,用封口机封口,再将杂交袋装入一个完好的塑料自封袋中。然后置于杂交室的摇床内 65 °C、120 rpm 预杂交 6-12 h。新转膜预杂交时间要长一点,而旧膜可以稍短。

8. 制备探针、加探针

使用 Random Primer DNA Labeling Kit Ver 2.0 (Takara, Lot BK3201) 试剂盒标记探针。提前将同位素操作室里的水浴锅和干浴锅打开并分别调至 37 °C 和 95 °C。根据同位素室使用手册的要求检测同位素室内相关区域的放射性信号,确定未污染后进行后续步骤。

8.1 配制以下反应体系:

DNA 模板 (100 ng) + λ DNA (Takara, 10 ng) + ddH ₂ O	12 μl
随机引物 (试剂盒内含)	2 μl

8.2 95 °C 干浴变性 5 min,立即放置于冰上 5 min。

8.3 继续向体系中加入:

10x Buffer (试剂盒内含)	2.5 μl
dHTP (试剂盒内含,缺 dCTP)	2.5 μl
Klenow 酶 (1 U/ μl) (试剂盒内含)	1 μl

放置于冰上,带到同位素操作室。

8.4 加入 5 μl 同位素标记的 dCTP,小心吸打混匀,盖上离心管盖后置于 37 °C 水

浴锅温浴 30 min。

- 8.5 将离心管取出，加入 300-400 μ l 杂交液，开盖放置于干浴锅中 95 °C 加热 10 min。

注意：加热时切勿盖上离心管盖，防止温度过高将管盖冲开。

- 8.6 待干浴到第 6 min 时可拿出预杂交袋放入有机玻璃橱中，从自封袋中取出杂交袋，将杂交袋垂直拎起，此时膜应处于杂交袋的底端。用剪刀将杂交袋右上方剪出一个外弧形的小口，通过此小口赶出大气泡。在弧形剪口处搓开一个约 3 cm 的小口，将杂交袋放置于倾斜的有机玻璃板上，拿出用于干浴锅中的探针液，用 1 ml 的移液器满量程吸取，保证枪头不再下滴之后加入到杂交袋中。

注意：枪头伸入杂交袋弧形小口 2-3 cm，切勿将探针溶液直接加到在膜上。所有操作都要十分小心，避免同位素污染杂交膜的外部。

- 8.7 在弧形剪口处封口两次，封口线高于枪头伸入加探针的位置，用事先准备好的小滤纸片拭去袋口的残余液体，小心检查封口是否完好。
- 8.8 将杂交液从下往上赶两三次，让杂交液与刚加入的探针液混合，再次赶气泡至上方，将气泡封于膜上方约 4 cm 处。
- 8.9 将杂交袋再次放入自封袋中，放入摇床中 65 °C、120 rpm 杂交 12 h 以上。

9. 洗膜

- 9.1 配制洗膜液 (2x SSC + 0.1% SDS) (见溶液配方)。

- 9.2 将洗膜液倒入洗膜盒中，深度约 2 cm，置于台面中央。

- 9.3 从摇床中取出自封袋，仔细检查是否有杂交液漏出，若完好继续后续操作。取出杂交袋，膜位于杂交袋底部，沿垂直中线对折一次，将杂交液尽量赶至杂交袋下方。

- 9.4 右手拿起剪刀，左手拇指、无名指和小指紧紧捏住杂交袋对折中线一端，食指和中指夹住杂交袋顶端，用剪刀小心于膜上方 1-2 cm 水平剪口，剪刀与杂交袋需成一定角度且尽可能地使用剪刀的最前端以减小污染区域。全程需要防止杂交液溅出，尤其是在最后剪开的时候。剪开之后左手的食指与中指夹住剪掉的杂交袋顶端并放入垃圾桶中。

- 9.5 将杂交袋内的杂交液全部倒在烧杯中，用小纸片拭干倾倒尖端的杂交液，烧杯里的杂交液倒入指定容器中。

- 9.6 用镊子将膜夹出，直接放入冷洗液中，杂交袋丢入垃圾桶内。
- 9.7 室温冷洗约 5 min，期间小心晃动洗膜盒。冷洗的同时用微波炉加热洗膜液至约 70 °C。将冷洗液倒入烧杯中，注意让膜粘在洗膜盒底部，随后将冷洗液倒入指定容器中。
- 9.8 将洗膜盒及镊子剪刀转移至热洗区，待洗膜液温度降到 65 °C 时倒入洗膜盒中，注意不要直接倒在膜上。
- 9.9 先热洗 30 s，然后每 10 s 用镊子夹起膜，用 Counter 进行放射性信号检测。探头距离膜约 2 cm，当信号的最高值在 500 左右即可结束热洗。膜在洗膜盒内壁上靠几次以蘸去部分洗膜液，随后直接放在事先准备好的多层滤纸上。
- 9.10 翻转膜让滤纸吸走残留的洗膜液，用保鲜膜包住膜放入磷屏中压好，3 h 之后扫磷屏。扫磷屏的机器为 FLA-5100 多功能影像分析仪 (FUJIFILM)，磷屏为该仪器配件，具体操作方法见产品说明书。

溶液配方

1. 5x TBE
54 g Tris
27.5 g 硼酸
20 ml 0.5M EDTA, pH 8.0
加水至 1 L，搅拌溶解
2. 10x TAE
484.5 g Tris
80 ml 0.5M EDTA, pH 8.0
68 g NaAC·3H₂O
用大约 120 ml 冰醋酸调 pH 至 8.1 加水至 4,000 ml
3. Depurination Solution (脱嘌呤溶液)
11 ml HCl (浓 HCl)
989 ml 灭菌蒸馏水
终浓度为 0.125 M HCl (保质期 1 个月)
4. Denaturation Buffer (变性液)
87.66 g NaCl (国药)

20 g NaOH (国药)

依次溶解，定容至 1 L (保质期 3 个月)

5. Neutralization Buffer (中和缓冲液)

87.66 g NaCl

60.5 g Tris (Trizona base)

先大概加 700 ml 灭菌水使溶解，用稍微浓一些的 HCl 调 pH 至 7.5，定容至 1 L (保质期 3 个月)

6. Nucleic acid transfer buffer (转膜液 20x SSC)

88.23 g Tris-sodian citrate (柠檬酸钠) (国药)

175.32 g NaCl

先加大约 800 ml H₂O 使其溶解，此时 pH 应在 7-8 之间，定容至 1 L (高盐溶液，可用搅拌子充分搅动，保质期 3 个月)

7. Southern Blot Hybridization Buffer (Saghai's Lab)

Final conc.	Stock	Vol.
5x SSC	20x	250 ml
50 mM PB (pH 6.8)	0.5 M	100 ml
5x Denhardt's	50x	100 ml
2.5 mM EDTA (pH 8.0)	0.5 M	5 ml
100 µg/ml ssDNA	5 mg/ml	20 ml
0.4% SDS	20%	20 ml
Dextran sulfate		50 g
ddH ₂ O to		1,000 ml

(以上成分依次添加，待前一成分充分溶解后再加入其它成分，SDS 需最后添加)

8. 洗膜液 (2x SSC + 0.1% SDS)

20x SSC 100 ml

20% SDS 5 ml

加水至 1,000 ml

参考文献

1. 吴昊, 陈太钰, 林拥军, 陈浩. (2018). [水稻叶片高质量 DNA 抽提](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1010102). *Bio-101* e1010102. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010102.