

Northern Blot

成洪涛, 张海涛, 袁猛*

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: myuan@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 成洪涛, 张海涛, 袁猛. (2018). Northern Blot. *Bio-101* e1010116. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010116.

How to cite: Cheng, H. T., Zhang, H. T. and Yuan, M. (2018). Northern Blot. *Bio-101* e1010116. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010116. (in Chinese)

实验原理: 在变性条件下将待检 RNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳, 使其按照分子量大小分离。按照同 Southern Blot 相同的原理进行转膜, 并使用探针进行杂交检测。相比 RT-PCR 等技术, Northern blot 具有稳定、可靠、假阳性少等优点。

实验目的: 检测样品中某一特定基因 mRNA 的转录与否, 以及转录的水平。比较两个或两个以上的不同样品中某一基因的转录差异。

关键词: RNA, Northern Blot, 同位素, 紫外交联

材料与试剂

1. 进口 RNAase free 1.5 ml 和 0.5 ml 管子*
2. 进口 RNAase free 20 μ l、200 μ l 枪头*
3. 转膜盘子
4. 玻璃棒
5. 玻璃板
6. 胶片
7. 滤纸
8. 洗膜盒
9. DEPC 水*

*注: 需经高温高压灭菌处理。

10. Random Primer DNA Labeling Kit Ver 2.0 (TAKARA, catalog number: D6045)
11. 琼脂糖

12. NaAc
13. NaOH (国药试剂)
14. EDTA (国药试剂)
15. MOPS (上海生工)
16. NaH₂PO₄ (国药试剂)
17. H₃PO₄ (85%, 国药试剂)
18. NaCl (国药试剂)
19. Na₃Citrate (柠檬酸三钠, 国药试剂)
20. SDS (国药试剂)
21. Deionized formamide (上海生工)
22. 37% formaldehyde (甲醛, 国产)
23. Glycerol (国产)
24. Bromphenol Blue (溴酚蓝, Sigma)
25. Xylene Cyanol (二甲苯氰, Sigma)
26. 1 M NaAc (pH 7.0) (见溶液配方)
27. 4 N NaOH (见溶液配方)
28. 0.5 M EDTA (pH 8.0) (见溶液配方)
29. 10x MOPS buffer (见溶液配方)
30. 1 M NaH₂PO₄ buffer (pH 7.2) (见溶液配方)
31. 20x SSC (见溶液配方)
32. 10% SDS (见溶液配方)
33. Sample buffer (见溶液配方)
34. 转膜缓冲液 (见溶液配方)
35. Blue juice (loading buffer) (见溶液配方)
36. Hibridization buffer (见溶液配方)
37. 洗膜液 (见溶液配方)
38. 4x SSC (见溶液配方)

仪器设备

1. 烧杯
2. 量筒
3. 梳子
4. 烧瓶
5. 灭菌锅
6. 电泳槽
7. 电泳仪
8. 离心机
9. 水浴锅
10. 通风橱
11. 超净工作台
12. 摇床
13. -20 °C 冰箱
14. 紫外交联仪
15. FLA-5100 型荧光/化学发光及同位素影像扫描分析仪

实验步骤

一、转膜前预处理

先用稀释好的 0.4 N NaOH 将转膜需要用到的器皿浸泡过夜 (盘子、玻璃棒、玻璃板、烧杯、量筒、胶片、跑胶用的梳子、挡板、胶槽和制胶用的烧瓶), 然后用 DEPC 水清洗 2~3 遍, 晾干待用。

二、跑胶及转膜

1. 先将 100 ml 10x MOPS 用灭菌的 DEPC 水稀释至 1x MOPS (1 L), 取 75 ml 1x MOPS (中号电泳槽半板) 制备 1%~1.2% 浓度琼脂糖胶。琼脂糖加热融化后, 冷却至 70 °C 加 37% 甲醛, 使终浓度为 2% (75 ml 中加 4.3 ml 甲醛), 通风橱中放 1 h。剩余的 1x MOPS buffer 倒入中号槽, 用作电泳缓冲液。
2. 抽提质量完好的样品 RNA 测好浓度后按以下体系加样:

15 μg RNA+灭菌的 DEPC 水 10 μl

Sample buffer 8 μl

loading buffer 2 μl

EB (10 mg/ml) 0.03 μl

加样时候, 先加好 RNA 和 DEPC 水, 离心机短暂离心。将 Sample buffer、loading buffer 和 EB 按照比例配成 mixture, 然后向每个样品中各加 10 μl 。加好后, 离心, 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴变性 10 min, 立即放冰上, 点样前再用离心机甩一下。

3. 将胶放入加好电泳缓冲液的中号槽中, 预电泳 5 min。按顺序点样, 不要漏出, 记好样品顺序。
4. 在中号槽中, 用 100 V 电压电泳 1 h, 直至最前方的蓝色染料距离点样孔约 3.5~4 cm。将电泳好的凝胶在凝胶成像系统中照相, 观察 RNA 质量及凝胶电泳情况, 此时应该在成像中看到 RNA 无降解, 并且 28S 和 18S 刚好分开。这一步拍摄的图像用于结果分析中对于样品 RNA 上样量和完整性进行描述。
5. 在 500 ml 4x SSC 中加 27 ml 37% 甲醛(终浓度为 2%)溶液, 混匀用作转膜缓冲液(转膜缓冲液见溶液配方)。转膜具体步骤同 Southern (参见“Southern Blot”吴昊等, 2018), 不同的是所用的转膜盘子, 玻璃板, 玻璃棒等都是要用预先 DEPC 水处理好的。一切操作要在通风橱内进行, 以避免甲醛对人体的伤害。

三、杂交

1. 将凝胶及膜取下, 分别在凝胶成像系统中观察凝胶上是否有 RNA 残留, 膜上 RNA 效果是否完好。(可选内容: 用紫外凝胶成像系统将膜中 RNA 拍摄下来, 用作内参对照。也可以在杂交后, 将探针洗去, 用 18S RNA 探针再杂交一次, 结果作为内参对照)。
2. 将膜放在稀释好的 2x SSC 中稍漂洗, 然后放在干净的滤纸上, 在超净工作台上将水分吹干。
3. 于紫外交联仪内以 1200 ENERGY 照一次 30 sec, 重复一次。在超净工作台上吹 5-10 分钟。
4. 在杂交管内加入约 20~50 ml 杂交液(依膜的数量及膜大小而定), 将膜卷起放入, 注意有 RNA 的一面朝内, 于 64 $^{\circ}\text{C}$ 杂交炉中预杂交 1~4 h, 注意杂交管要平衡好。

(也可以用杂交袋，加入杂交液后，注意**不能有**气泡。后面步骤中加完探针后也要消除气泡)。

5. 使用“Random Primer DNA Labeling Kit”进行同位素标记探针。将探针模版(PCR扩增的基因特异片段或基因的酶切片段，经回收)测好浓度后，按以下体系加入：

DNA 3 μ l (10 ng~1 μ g)

Random primer 2 μ l

ddH₂O up to 14 μ l

dNTP Mixture (不含 dCTP) 2.5 μ l

10x Buffer 2.5 μ l

Klenow Fragment 1 μ l

α -dCTP*(同位素室中加) 5 μ l

先加入 DNA、random primer 和 ddH₂O，95 °C 变性 3~5 min，冰上放 5 min。短暂离心后，继续加入 dNTP 和 10x Buffer，离心后再加 Klenow Fragment 酶，加酶时注意低温操作，先加在管壁上。立即到同位素室加入同位素，混匀离心，于 37 °C 反应 30 min。

6. 向探针标记的离心管中加入 500 μ l 杂交液，不盖盖子，放于干浴上，95 °C 加热 10 min。迅速放于冰中，冷却 5 min。取出杂交管，将标记产物加入杂交管，盖紧管盖，于 64 °C 杂交过夜。

注：所有废物等需按照同位素室的相关规定放入指定容器！

四、洗膜，压片

将杂交管中杂交液倒出，放入指定回收器皿中。取出杂交膜，放入洗膜盒，先用少量洗膜液，冷洗 10 min。将膜取出测信号，根据信号大小决定是否热洗。若信号高，换新的洗膜液，放至 64 °C 摇床上摇(注意转速要调低，盒子要加盖)。中间取出膜检测信号，直到信号值达到适宜为止。当膜上某一区域信号强，而其他区域信号弱代表杂交上了。然后包膜压片，压磷屏，依信号强弱决定时间。也可以压 X 光片，放于 -20 °C 3 天左右即可冲洗。

五、结果扫描

在 FLA-5100 扫描仪中，扫描磷屏。结果扫描完后，将磷屏消磁，杂交膜保存于暗夹

中。如果是压 X 光片，在暗室进行显影和定影。X 光片晾干后，用扫描仪将结果保存下来。

六、结果整理

将 FLA-5100 扫描的结果或 X 光片扫描结果整理，作成图片，和电泳后的 RNA 检测结果整合在一起，分析各样品中基因的表达情况。

溶液配方

1. 1 M NaAc (pH 7.0)

82 g NaAc 先加一定量灭菌的 ddH₂O

NaOH 调 pH 值至 7.0

灭菌的 ddH₂O 定容至 1 L

2. 4 N NaOH

160 g NaOH (国药试剂)

加水至 1 L 溶解

3. 0.5 M EDTA (pH 8.0)

186.1 g EDTA (国药试剂) 先加一定量灭菌的 ddH₂O

NaOH 调 pH 值至 8.0

灭菌的 ddH₂O 定容至 1 L

4. 10x MOPS buffer

MOPS (上海生工) 41.85 g

1 M NaAc (pH 7.0) 50 ml

0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml

加一定量未灭菌的 DEPC 水

4 N NaOH 调 pH 至 7.0 (约加 7 ml)

未灭菌的 DEPC 水定容至 1 L，灭菌

5. 1 M NaH₂PO₄ buffer (pH 7.2)

NaH₂PO₄ (国药试剂) 71 g

H₃PO₄ (85%) (国药试剂) 4 ml

用灭菌的 DEPC 水定容至 1 L

6. 20x SSC
 - NaCl (国药试剂) 175.3 g
 - Na₃Citrate (柠檬酸三钠 国药试剂) 88.2 g
 - 用灭菌的 ddH₂O 定容至 1 L
7. 10% SDS
 - SDS (国药试剂) 100.0 g
 - 灭菌的 ddH₂O 定容至 1 L (将水加热到 68 °C 有助于溶解)
8. Sample buffer
 - Deionized formamide (上海生工) 1,000 μl
 - 10x MOPS buffer 200 μl
 - 37% formaldehyde(甲醛) (国产) 320 μl
9. 转膜缓冲液
 - 500 ml 4x SSC 和 27 ml 37%甲醛(终浓度为 2%)溶液，混匀
10. Blue juice (loading buffer)
 - Glycerol (国产) 70 ml
 - 5x TBE 10 ml
 - 10% SDS 2 ml
 - 0.5 M EDTA (pH 8.0) 4 ml
 - Bromphenol Blue (溴酚蓝, Sigma) 0.5 g
 - Xylene Cyanol (二甲苯氰, Sigma) 0.5 g
 - 加灭菌的 ddH₂O 定容至 100 ml
 - 37 °C 摇动混匀过夜
11. Hibridization buffer
 - 1 M NaH₂PO₄ buffer 500 ml
 - 0.5 M EDTA (pH 8.0) 2 ml
 - 10% SDS 700 ml
 - BSA10 g
 - 用灭菌的 DEPC 水定容至 1 L
12. 洗膜液
 - 20x SSC 100 ml
 - 10% SDS 10 ml

用灭菌的 DEPC 水定容至 1 L

13. 4x SSC

20x SSC 200 ml

灭菌的 DEPC 水定容至 1 L

注意事项

1. Northern blot 一个主要的问题是存在 RNA 酶的污染，所以 Northern blot 中所有的实验用品都需要经过除去 RNA 酶的过程，如 NaOH 浸泡处理、DEPC 处理等。
2. 抽提的 RNA 质量一定要好，这是实验结果好坏的关键，最好浓度比较一致，杂质较少。有条件的话可以先电泳检测。
3. Northern blot 中很多实验用品如甲醛、EB、DEPC、紫外灯等对人体都有一定的伤害，要注意保护。
4. 实验所用的标记试剂盒为 TAKARA 公司的 Random Primer Labeling Kit, 模板 DNA 的长度一般不要低于 300 bp。

参考文献

1. 吴昊 等 . (2018). [Southern Blot](#). *Bio-101* e1010104. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010104.