

Southern blot protokoll

Készítette:

Sarkadi-Nagy István Botond

Southern blot

Edwin Southern fejlesztette ki 1975-ben

Felhasználás: - specifikus DNS
szegmensek kimutatása és lokalizálása
egy összetett DNS mintából

A módszer lépései

1. Előkészítés és elektroforézis
2. Denaturáció és blotting
3. Hibridizációs próba
4. Előhívás

1. Előkészítés és elektroforézis

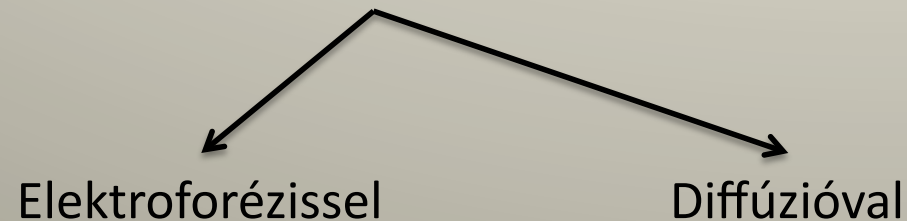
- A vizsgált genomikus DNS emésztése restrikciós endonuklázzal
Elvárások: A DNS mintát kis méretű darabokra hasítjuk (4000kb)
Leggyakrabban alkalmazott endonukleázok: EcoRI, HindIII
- Agaróz gélelektroforézis
6-16 óra
A DNS fragmentumok méret szerinti elválasztása standard DNS létra mellett

Szükség esetén (15 kb fölött) kezelés HCl-al, vagy hosszabb UV besugárzással a DNS fragmentumok jobb tapadásáért a membrán felületén.

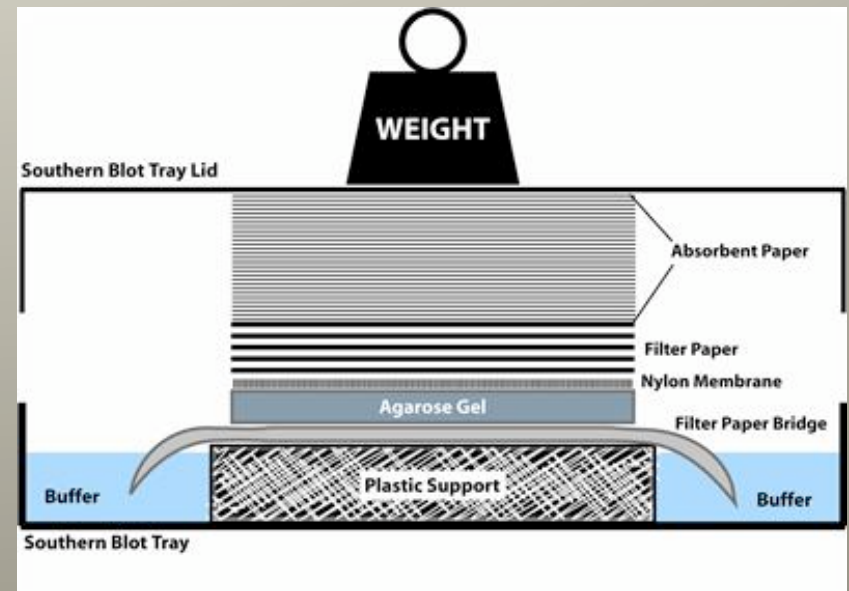
2. Denaturáció és Blotting

- NaOH-os kezelés, a DNS denaturációja
Maradvány RNS nyomok eltávolítása

- Átvitel a membránra (blotting)



A puffer diffúziójával együtt a mintánk átkerül a mebránra ahová ionos kötésekkel kapcsolódnak a DNS fragmentumok



Membránok

Kétféle membránt használnak a protokollokban:

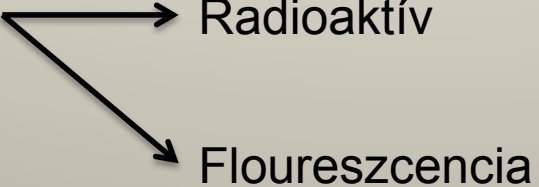
- nitrocellulóz

- nylon

A mebránhoz termosztálással (80°C, 2 óra), vagy UV fény segítségével rögzítjük a DNS-t

3. Hibridizációs próba

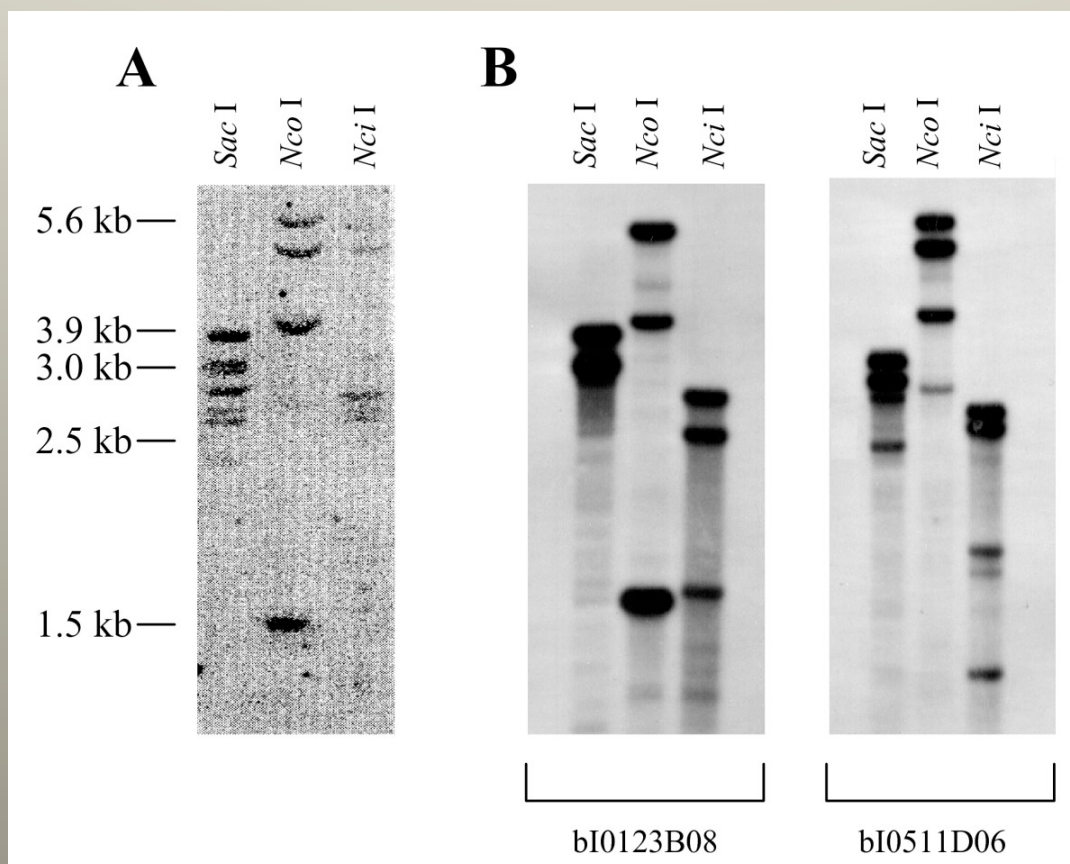
- A vizsgált cDns szegmensről komplementer próbát készítünk ezt a próbát jelöljük

- Jelölések: 
 - Radioaktív
 - Floureszcencia

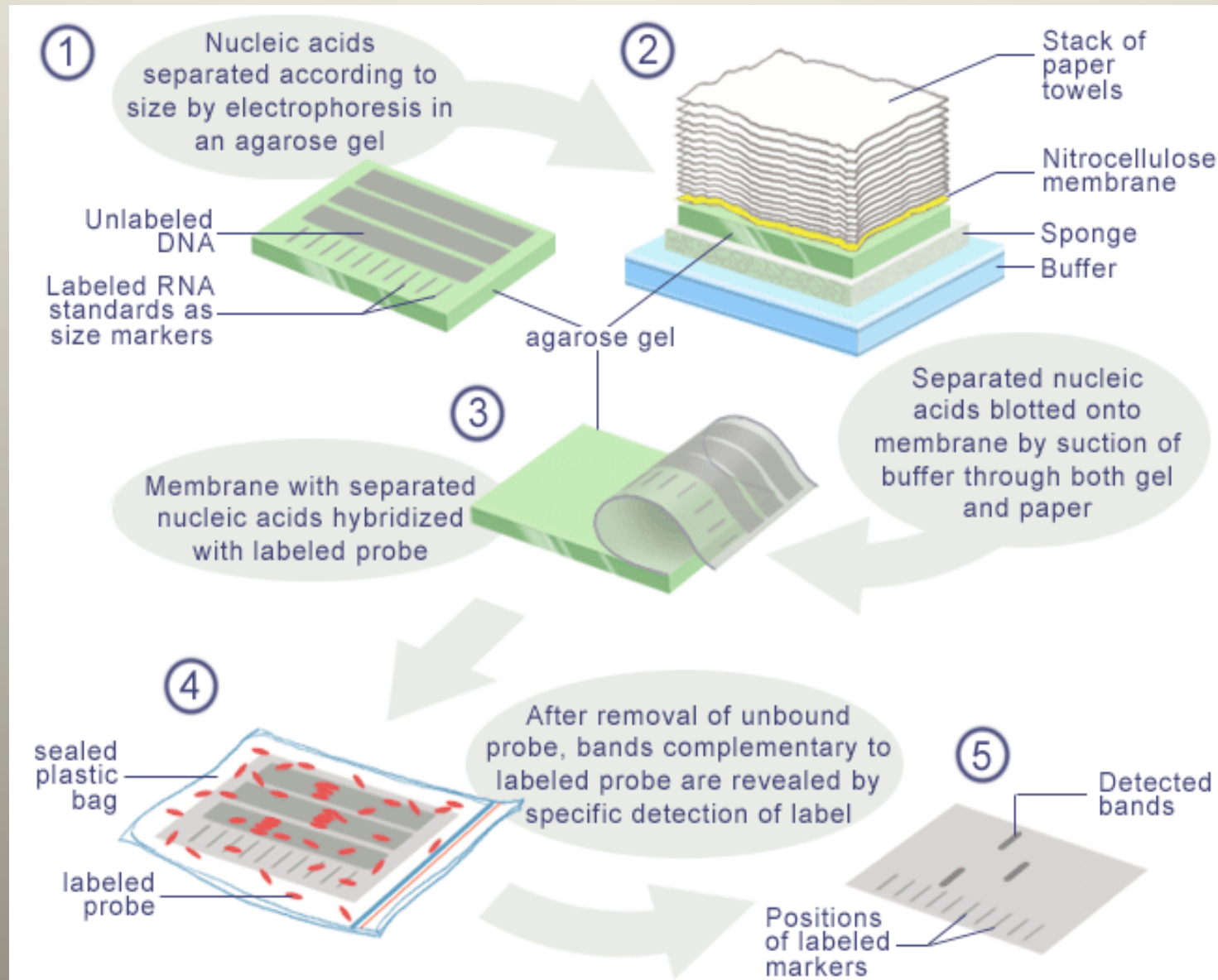
A membránról a meg nem kötött DNS próbákat lemossuk

4. Előhívás, értékelés

A radioaktív vagy fluoreszcens jelölt próbát Röntgen előhívásával (autoradiográfiával) tesszük láthatóvá



Összegzés 1.



Irodalom jegyzék:

- Robert F. Weaver, Philip W. Hedrick : Genetika (Panem kiadó, 2000)
- Protocol-online.org :Analys of Genomic DNA by Southern Hybridization (Southern Blot)
http://www.protocol-online.org/cgi-bin/prot/view_cache.cgi?ID=2746
- Cornell University – Southern Blot technology:
<http://escience.ws/b572/L22/south.html>
- Statemaster.com : Encyclopedia, Southern Blot
• <http://www.statemaster.com/encyclopedia/Southern-blot>
- Képek: <http://www.gbiosciences.com/EducationalUploads/EducationalProductsImages/mediumimages/Southern%20Blot.jpg>
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/151/figure/F1?highres=y>
<http://www.mmi.mcgill.ca/mmimediasampler2002/>