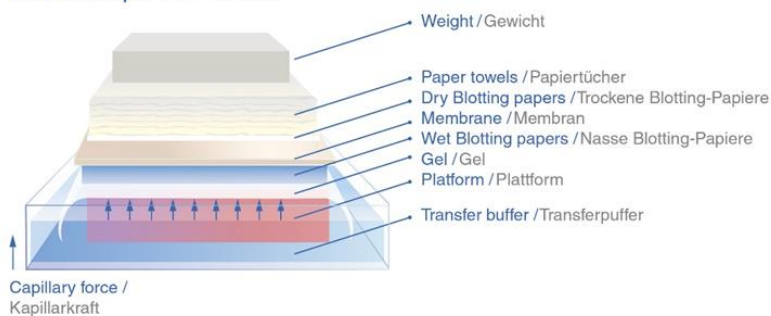


Northern & Southern Blotting

Allgemeine Informationen

Blot Set-up / Blot-Aufbau



Das Southern- und das Northern-Blotting sind molekularbiologische Techniken für den Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen. Im Anschluss erfolgt ein Hybridisierungsverfahren, das den Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen ermöglicht. **Southern-Blots** werden durchgeführt um spezifische DNA-Sequenzen zu identifizieren, z. B. um herauszufinden, wie viele Kopien eines bestimmten Gens in einem Organismus vorhanden sind.

Northern-Blots dienen dagegen dem

Nachweis von RNA, z.B. um mRNA-Pools zwischen verschiedenen Organismen zu vergleichen. Da RNAseq, Microarrays und RT-PCR heute gängige und sensitivere Methoden für die Analyse von mRNA-Pools zwischen verschiedenen Arten sind, wird das Northern-Blotting heute seltener verwendet. Das Southern-Blotting ist dagegen nach wie vor eine häufig verwendete Methode, da, im Gegensatz zur PCR, nur die Grundsequenz des Gens, aber keine spezifische Primerbindungsstelle bekannt sein muss. Dadurch kann der Southern-Blot auch für die Identifizierung orthologer oder paraloger Gene, partieller Insertionen fremder Gene oder zu Bestimmung der Anzahl der Kopien eines bestimmten Gens innerhalb eines Genoms, verwendet werden. Da der Northern-Blot heutzutage nur noch selten durchgeführt wird, wird der Hauptaugenmerk dieser Informationsbroschüre auf den Southern-Blot gelegt.

Allgemeines Vorgehen

Der erste Schritt zur Durchführung eines Southern-Blots ist die **Isolierung von genomischer DNA (gDNA)** aus einem Organismus oder aus bestimmten Zellen. Die gewonnene gDNA muss dann im nächsten Schritt fragmentiert werden. Dies geschieht in der Regel durch einen **Verdau mit ausgewählten Restriktionsenzymen**, die im besten Fall nicht innerhalb der zu untersuchenden Sequenz schneiden sollten. Zur Auftrennung der resultierenden DNA-Fragmente wird anschließend eine **Agarose-Gelelektrophorese** mit nachfolgender Qualitätskontrolle durch Gel-Dokumentation durchgeführt. Wenn das Gel das erwartete Bandenmuster aufweist kann weiterverfahren werden. Wenn große DNA-Fragmente übertragen werden sollen, kann das Gel zunächst in 0,25 M HCl-Lösung gelegt werden, da dadurch die DNA depurinieren wird und sie in kleinere Stücke zerfällt.

Zur Vorbereitung des Blottings und der Hybridisierung wird das Agarosegel in eine alkalische Lösung gelegt, um die doppelsträngige DNA in einzelsträngige DNA zu denaturieren. Diese Methode wird als **alkalischer Transfer** bezeichnet und hat den Vorteil, dass sie die Bindung der negativ geladenen DNA an die positiv geladene Membran verbessert. Anschließend wird das Gel in einem Neutralisationspuffer gewaschen und dann in Transferpuffer inkubiert. Für den Transfer der Nukleinsäuren vom Gel auf eine Membran wird häufig das **Kapillarblotting** angewendet. Das Prinzip des Kapillar-Blots besteht darin, dass die DNA durch einen Flüssigkeitsstrom auf die Membran übertragen wird. Um die Kapillarkraft aufzubauen, wird ein Pufferreservoir in eine Schale gefüllt und auf eine Plattform in der Schale wird der Blot aufgebaut. Zunächst werden ein paar Blottingpapiere auf die Plattform gelegt, deren Enden in das Pufferreservoir ragen. Auf die Blottingpapiere wird das Gel gelegt und direkt darüber eine Membran aus Nitrocellulose oder Nylon. Auf die Membran wird eine



Technische Info

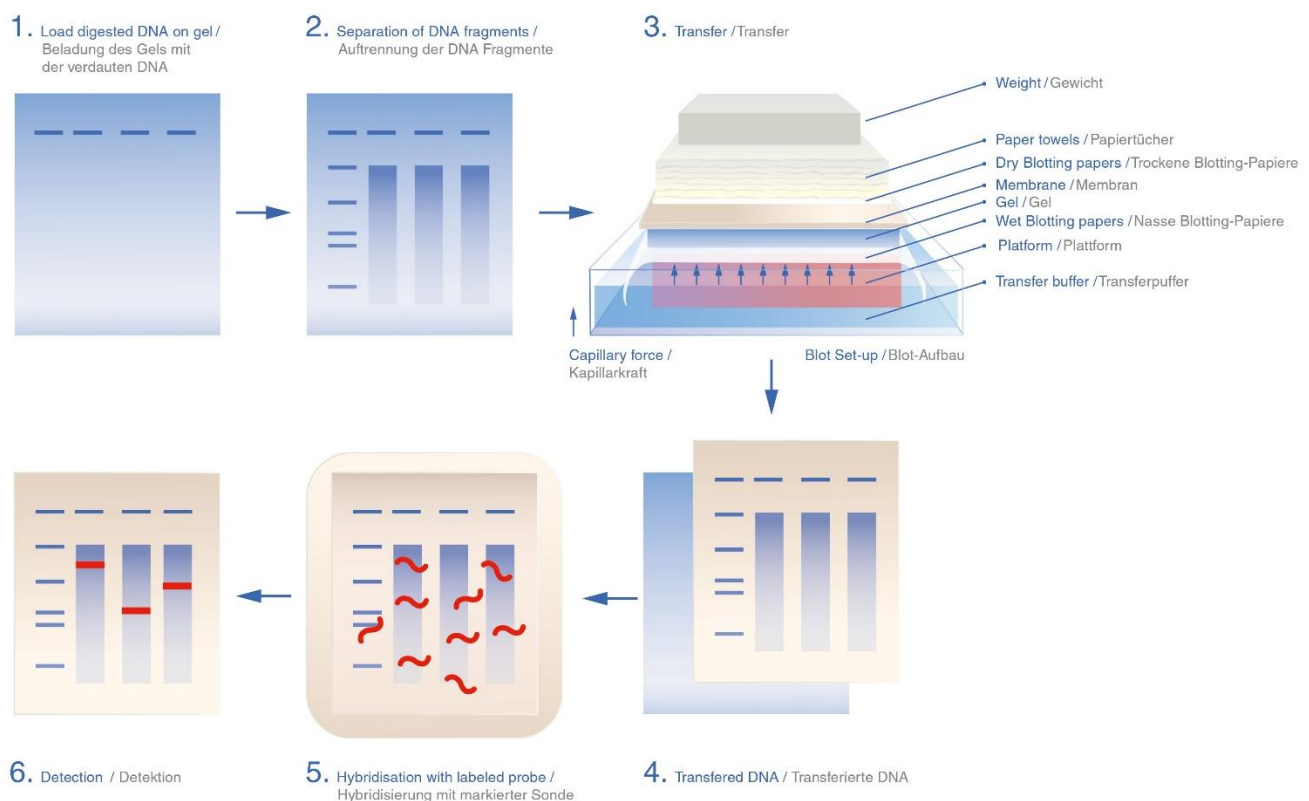
Schicht trockener Blottingpapiere platziert, darauf dann eine Schicht trockene Papiertücher. Am Ende wird der Blot mit einer Glasplatte und einem Gewicht darauf beschwert, um die für den Transfer erforderliche Kapillarkraft zu unterstützen.

Nach dem Transfer kann die DNA durch UV-Vernetzung oder alternativ durch 15-minütiges Backen bei 80 °C kovalent auf der Membran **fixiert** werden.

Zur Vorbereitung der Hybridisierung und um falsch positive Signale zu vermeiden, müssen die **freien Bindungsstellen** der Membran im nächsten Schritt **blockiert** werden. Zu diesem Zweck wird die Membran in einer Vorhybridisierungslösung inkubiert, die aus Lachssperma-DNA, BSA, Tensiden und Polymeren besteht. Die Lachssperma-DNA bindet an die unspezifischen Bindungsstellen der übertragenen DNA, während die Tenside, Proteine und Polymere die Membran sättigen und so die unspezifische Bindung der markierten Sonden-DNA an die Membran verhindern. Anschließend kann der **Hybridisierungsschritt** durchgeführt werden. Hierfür wird die Membran in einem Puffer mit der markierten Sonden-DNA, die komplementär zu Ihrer gewünschten Sequenz ist, inkubiert. Beim-Southern Blotting wird die DNA entweder radioaktiv, mit Biotin, Digoxigenin (DIG) oder einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Es ist möglich, die markierte ssDNA zu bestellen oder sie selbst zu labeln, z. B. mit einem DIG-Labeling Kit.

Im letzten Schritt wird die gesuchte Sequenz entweder durch ein Autoradiogramm oder durch einen markierten Antikörper/Streptavidin gegen DIG oder Biotin, in einem Dokumentationssystem oder ohne weitere Hilfsmittel, sichtbar gemacht.

Schematischer Ablauf





Guter Rat ist Roth.

Technische Info

Empfohlene Produkte

Blotting Schritt	Produkt	Produktname	Best. Nr.
Elektrophorese	Agarose	Agarose HR-Plus	HP30.2
		Agarose Broad Range	T846.2
		Agarose GTQ	6352.2
	Laufpuffer	ROTIPHORESE®10x TBE Puffer	3061.1
	Ladepuffer	ROTI®Load DNA tricolor	HP06.1
	DNA-Marker	DNA-Leiter kombi	CL22.1
	DNA-Farbstoff	ROTI®GelStain Red	0984.1
ROTI®Methylenblau-Färbekonzentrat		0648.1	
Transfer	SSC-Puffer	ROTI®Fair 20x SSC	1232.1
		ROTI®Stock 20x SSC	1054.1
	SSPE-Puffer	ROTI®Fair SSPE	1233.1
	Nylon-Membran	Transfermembran ROTI®Nylon plus	K058.1
		Transfermembran ROTI®Nylon 0.2	AE50.1
	NC-Membran	Transfermembran ROTI®NC 0.2	9302.1
		Transfermembran ROTI®NC 0.45	9200.1
	Blotting-Papiere	Blottingpapiere ROTILABO®, 0.75 mm	0943.1
Gel-Blottingpapiere Whatman®, 1.5 mm		A125.1	
Blotting-Geräte	Semi-Dry-Blotter ROTIPHORESE® PROfessional MAXI	KK59.1	
Fixierung	UV-Crosslinker	UV-Crosslinker, 254 nm	1782.1
Blockierung	Denhardt's Lösung	Denhardt's Pulvermischung	HP33.1
		Lachssperma-DNA Natriumsalz	5434.1
	SDS	ROTI®Stock 20 % SDS	1057.1
Inkubationsschalen	Blot-Inkubationsschalen	4811.1	
Detektion	Autoradiography	Autoradiographie Stift	CL10.1
		Röntgenkassette ROTILABO®	X265.1
	Dokumentationssysteme	Geldokumentationssystem gELLITE	1Y4N.1
Dokumentationssystem chemiLITE		1YE6.1	

Standard Protokoll

1. Verdauen Sie Ihre Probe mit geeignetem Restriktionsenzym → verwenden Sie dabei 5-10x mehr Restriktionsenzym als vom Hersteller empfohlen, Verdau bei 37 °C für 2 h (Plasmid-DNA) oder über Nacht (genomische DNA).
2. Konzentrieren Sie die DNA auf ein Volumen von 25 µl auf, z. B. durch Ethanolpräzipitation und nachfolgender Resuspension in ddH₂O, oder mithilfe von DNA-Aufreinigungssäulen.
3. Trennen Sie Ihre DNA-Fragmente in einer Agarose-Gelelektrophorese (0,7-2 % Agarosegel) für 1-16 h auf, je nach Größe der zu trennenden Fragmente. Für die Auftrennung von gDNA wird eine niedrige Spannung (5-20 V) empfohlen, für Plasmid-DNA können bis zu 100 V verwendet werden.
4. Visualisieren Sie die aufgetrennte DNA auf einem Transilluminator oder in einem Geldokumentationssystem. Plasmid-DNA sollten Sie als deutliche Banden sehen, während gDNA als ein Schmier mit helleren Banden (repetitive DNA-Elemente) erscheinen sollte. Legen Sie ein Lineal neben das Gel,





Guter Rat ist Roth.

Technische Info

um ein Foto zu machen, da dies die Zuordnung der hybridisierten Sequenz zur Position im Gel erleichtert.

5. Wenn große Fragmente übertragen werden sollen, kann die DNA depuriniert werden, indem das Gel 10 min lang in 0,25 M HCl eingelegt wird.
6. Zur Vorbereitung des Transfers denaturieren Sie die DNA, indem Sie das Gel 15-30 min lang in eine alkalische Lösung mit 1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH legen und anschließend in ddH₂O waschen.
7. Waschen Sie das Gel zweimal 15 min lang mit Neutralisationspuffer, bestehend aus 3 M NaCl und 0,5 M Tris-HCl (pH 7)
8. Äquilibrieren Sie das Gel, indem Sie es für 30 min in 20x SSC-Puffer (oder 20x SSPE-Puffer) legen.
9. Schneiden Sie ein Stück Membran (entweder Nylon oder Nitrocellulose (NC)) auf die Größe Ihres Gels zu und inkubieren Sie die Membran 5 min in 0,5x SSC-Puffer und anschließend 1 min lang in 20x SSC (alternativ 5 min in 10x SSPE).
10. Bereiten Sie die Blotting-Papiere und Papiertücher vor. Diese sollten etwas größer sein als die Membran. Eine Hälfte der Blotting-Papiere sollte in 20x SSC-Puffer (alternativ 10x SSPE) getaucht werden, bis sie gesättigt sind, die andere Hälfte sollte trocken bleiben.
11. Bauen Sie den Blot folgendermaßen auf:
 - a. Füllen Sie eine Schale mit 20x SSC-Puffer (alternativ 10x SSPE)
 - b. Legen Sie eine stabile Plattform, z. B. eine Glasplatte, in die Schale
 - c. Legen Sie einige SSC-getränkte Blotting-Papiere auf die Plattform. Achten Sie darauf, dass die Ecken der Blotting-Papiere in das SSC-Puffer-Reservoir in der Schale ragen.
 - d. Legen Sie das Gel (mit der Oberseite nach unten) auf die feuchten Blotting-Papiere.
 - e. Legen Sie die Membran auf das Gel. Achten Sie darauf, dass keine Luftblasen zwischen dem Gel und der Membran entstehen, indem Sie z. B. mit einem Glasstab vorsichtig über die Membran rollen. Bewegen Sie die Membran nach dem Auflegen nicht mehr, da der Transfer bereits begonnen haben könnte.
 - f. Legen Sie 3 Lagen trockenes Blottingpapier auf die Membran.
 - g. Legen Sie einige trockene Papiertücher auf den Blot, um die Kapillarkraft zu erhöhen.
 - h. Beschweren Sie den Blot mit einer Glasplatte und einem Gewicht.
12. Lassen Sie das Blot-Setup stehen, um die DNA zu übertragen. Der Transfer dauert mindestens 3-16 h, je nach Größe der DNA-Fragmente.
13. Fixieren Sie die DNA kovalent auf der Membran, entweder durch UV-Vernetzung (254 nm, 1 min → Nylonmembran) oder durch 15 min Backen bei 80 °C (NC-Membran).
14. Blockieren Sie die Membran durch Inkubation für 1 h bei 68 °C in Denhardts Lösung mit 100 µg/ml Lachssperma-DNA und 1 % SDS, gelöst in 6x SSC-Puffer.
15. Prehybridisieren Sie die Membran für mindestens 1 h bei 68 °C in der Blockierungslösung.
16. Denaturieren Sie Ihre markierte Sonden-DNA für 10 min bei 100 °C
17. Verdünnen Sie die markierte Sonden-DNA mit 20 ml Blockierungs-Puffer (6x SSPE, 1% SDS, alternativ: 2x SSC, 2% SDS)
18. Führen Sie den Hybridisierungsschritt durch, indem Sie die Membran über Nacht in Blockierungs-Puffer inkubieren.
19. Waschen Sie die Membran zweimal für 5 min bei Raumtemperatur in 6x Waschpuffer (6x SSPE, 0,2% SDS, alternativ 2x SSC, 0,2% SDS)



Guter Rat ist Roth.

Technische Info

20. Waschen Sie die Membran zweimal 15 min bei 68 °C in 1x Waschpuffer (1x SSPE, 0,2 % SDS, alternativ: 0,5x SSC, 0,2% SDS)
21. Inkubieren Sie die Membran für 5 min bei Raumtemperatur in Waschpuffer.
22. Für die folgenden Blockierungsschritte und den Nachweis der Sonde verfahren Sie bitte nach den Anweisungen des Sondenherstellers.

LHa 01/2023