

Northern blot protokoll



Készítette: Miski Csaba

Northern blot

- Felhasználás: RNS/mRNS kimutatása, valamint méret és mennyiség meghatározása összetett mintából
- RNS nagyon bomlékony → RNáz mentesség

Northern blot protokoll

1., RNS izolálás:

- Módszerekkel szembeni elvárások:
 - Sejtlízis és membránroncsolás
 - Ribonukleáz aktivitás gátlása
 - Fehérjementesítés
 - Ép RNS kinyerése

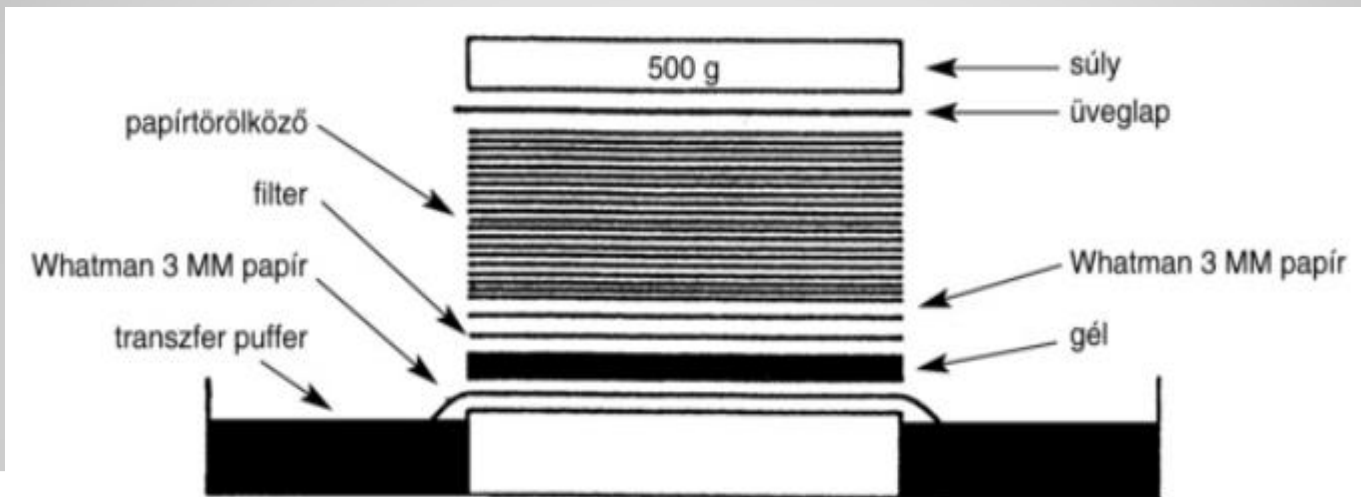
2., Izolált RNS felvitele gélre/gélen szeparálás

- Denaturáló agarózgélben választjuk el → RNS másodlagos szerkezetét bontja
- Denaturáló ágensek: formaldehid, glioxál

Northern blot protokoll

3., Blottolás

- Szűrőpapír szívja a nedvességet → RNS vele mozog → filteren megkötődik.
- Időtartam: 1 éjszaka
- Filtert szárítjuk, hő vagy UV kezeléssel rögzítjük



Northern blot protokoll

4., Előhibridizáció, hibridizáció, autoradiográfia

- A filtert egy műanyag tasakba tesszük, és hozzáadjuk az előhibridizációs oldatot (42 °C-os vízfürdőben rázatva 30 percig előhibridizálunk)
- Hozzáadjuk az elkészített próbát, és egy éjszakán át 42 °C-os termosztátban hibridizálunk
- Filtert mossuk, szárítjuk.
- Filter kazettába helyezzük(tetejére röntgen-filmet teszünk)
- A filmet 24–48 óra elteltével előhívjuk.

Blottoló készülékek

1., Száraz, puffervesztéses transzfer

- Nukleinsavak, fehérjék blottolása
- Átviteli idő: 7 perc a sajátöntésű gélek, 2 perc az E-Gel® gélek esetén



2., Félszáraz transzfer

- Több gél egyszerre
- Átviteli idő: 60 perc

3., Nedves transzfer

- Átviteli idő: 60-120 perc



● Irodalom:

- Applied Biosystems Website: The Basics: Northern Analysis. 2010.03.10.
<<http://www.ambion.com/techlib/basics/northerns/index.html>>
- Cornell University site: Northern blot. 2010. 03.10. <<http://escience.ws/b572/L13/north.html>>
- Kempelen Farkas Digitális Tankönyvtár: Northrn-hidridizáció. 2010.03.10.
<<http://www.tankonyvtar.hu/biologia/novenyvirusok-virologiai-080905-182>>
- Boros I.: Blottolási technikák. 2010.03.10. < <http://www.bio.u-szeged.hu/biokemia/hu/education/molbi/molbi-gyak/western-blot.pdf>>

Protokollok:

- Protocol online. 2010.03.10. < http://www.protocol-online.org/prot/Molecular_Biology/RNA/Northern_Blotting/index.html >

Képek:

- Csertex Kft. 2010.03.10. < <http://www.csertex.hu/muszerek/molekularis-biologiai-muszer/blottolo-keszulek.html> >
- Kempelen Farkas Digitális Tankönyvtár. 2010.03.10.
<<http://www.tankonyvtar.hu/biologia/novenyvirusok-virologiai-080905-181> >

Köszönöm a figyelmet!