

Northern Blot试剂盒

Northern Blot Kit

注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及-20°C,保质期12个月。

货号规格/Catalog Number and Size

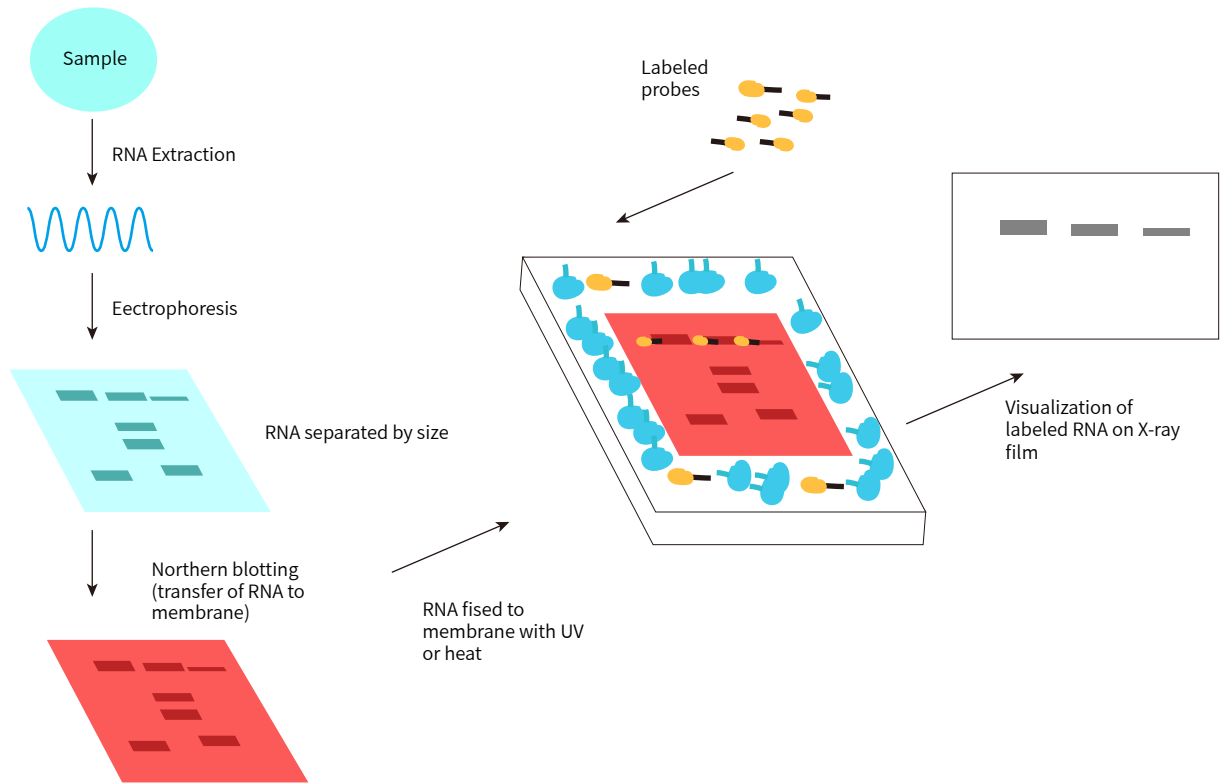
序号	试剂	货号及规格			储存
		IEP009 (12T)	IEP009M (24T)	IEP009L (96T)	
01	25×PBS	3 mL	6 mL	24 mL	4°C
02	Cell lysis buffer	10 mL	20 mL	80 mL	4°C
03	6×RNA loading buffer	40 mL	80 mL	320 mL	4°C
04	Wash Buffer I	40 mL	80 mL	320 mL	4°C
05	Wash Buffer II	40 mL	80 mL	320 mL	4°C
06	Wash Buffer III	60 mL	120 mL	480 mL	4°C
07	Pre-hybridization solution	30 mL	60 mL	240 mL	4°C
08	anti-DIG	10 μL	20 μL	80 μL	4°C
09	Developer solution	10 μL	20 μL	80 μL	4°C
10	Blocking buffer	30 mL	60 mL	240 μL	-20°C

产品简介/Product Description

RNA 印迹杂交 (Northern blot) 是一种将 RNA 从凝胶中转移至尼龙膜上, 通过检测 RNA 表达水平来检测基因表达的方法。其原理是在变性条件下将待检样品进行凝胶电泳, 继而将 RNA 在凝胶中的位置转移到尼

龙膜上，定后再与同位素或其它标记物标记的 RNA 探针进行反应，如果待测样品中含有与探针互补的序列，则两者通过碱基互补的原理进行结合，游离的探针洗涤后再用显影技术进行检测。

技术路线/Technology mapping



使用流程/Procedure

1. RNA 提取 (~1.2h)

- ①洗涤：用预冷的 1 mL 1×PBS 洗涤洗涤样品（如细胞、胚胎、组织）两次，最后一次吸干 PBS；
- ②裂解：根据细胞量或样品量加入适量体积 Cell lysis buffer, 将 1.5 mL EP 管剧烈振 10 次, 室温孵育 3~5 min；
- ③氯仿抽提：按 0.2 mL 氯仿 / 1 mL Cell lysis buffer 的比例加入氯仿并充分振荡 20 s, 冰上静置至分层, 12,000g、4°C 离心 10 min；
- ④沉淀：吸取上清 (0.5 mL 上清 / 1 mL Cell lysis buffer) 转移至新的 2 mL EP 管中, 切勿吸到中间层, 按 1.5 倍上清液体积加入异丙醇, 充分混匀, -20°C 冷冻 30 min, 12,000 g、4°C 离心 10 min, 小心弃去上清；
- ⑤乙醇脱盐：按 1 mL 75% 乙醇 / 1 mL Cell lysis buffer 的比例, 加入预冷的 75% 乙醇, 7500 g、4°C 离心 5 min, 小心弃去上清；
- ⑥溶解：打开 EP 管盖, 室温自然挥发乙醇 10 min (乙醇需挥发干净), 加入 30 μL RNase-free ddH₂O 室温溶解 RNA 沉淀 10 min。

注意：

1. 先用 DEPC 水, 将 25×PBS 稀释成 1×PBS；
2. 1 mL Cell lysis buffer/10⁷ 个细胞；
3. 枪头、离心管无酶处理；
4. 75% 乙醇使用无酶水配制；
5. 样本处理需要及时开展。

2. RNA 检测 (~0.5h)

- ①取 5 μ L RNA 样品检测 RNA OD260、OD280，根据 OD260/OD280 计算总 RNA 浓度及杂质污染程度；
- ②取 5 μ L RNA 样品，1% 琼脂糖凝胶电泳（120 V，10 min）检测 RNA 完整性；
- ③剩余样品样品可直接用于后续实验或置于 -80 $^{\circ}$ C 保存；

注意：标准情况下，RNA 电泳后 3 条带，条带亮度分别为 2:1:1。

2. 电泳 (~2h)

- ①配制 15% 尿素变性胶；

试剂	质量/体积 (8 mL)
尿素	3.84 g
10 \times TBE	0.8 mL
40%聚丙烯酰胺	3.04 mL
10%过硫酸铵	40 μ L
TEMED	8 μ L
无酶水	补至8 mL

- ②向电泳槽中加入 0.5 \times TBE 缓冲液后，整个电泳槽置于冰上，60 V 预电泳 30 min；
- ③将 20 μ g RNA 样品与 1/5 体积 6 \times RNA Loading Buffer 混合，75 $^{\circ}$ C 预热 5 min，快速置于冰上静置 10 min 后上样；
- ④80 V 稳压电泳至溴酚蓝指示带跑至距底部约 1/3 处，结束电泳（整个电泳过程需在冰上进行）。

注意：

1. 配制 15% 尿素变性胶时，先加入 10 \times TBE 和 40% 聚丙烯酰胺使尿素完全溶解后，再加入 10% AP（过硫酸铵）和 TEMED，并充分混匀；
2. RNA 变性后要立即置于冰上。

4. 转膜 (~0.5h)

- ①剪取尼龙膜（凝胶大小），置于 0.5 \times TBE 缓冲液中室温浸泡 10 min；
- ②按照自下而上 3mm 滤纸、尼龙膜、凝胶、3mm 滤纸顺序放置，用玻璃棒赶出所有气泡；
- ③转膜：390 mA 恒流半干转膜仪转膜约 30 min；

注意：3mm 滤纸和凝胶之间不能滞留气泡。

5. 交联 (~0.1h)

- ①转膜结束后，揭去凝胶上方的 3mm 滤纸，翻转凝胶，用铅笔在膜上标注点样孔的位置；
- ②将膜置于紫外交联仪中（有 RNA 的一面朝上），交联 RNA 2~10 min；
- ③膜烤干后铅笔标注 Marker 的位置，塑料袋密封，4 $^{\circ}$ C 保存备用；

6. 杂交 (~21h)

- ①预杂交：将膜反面朝向杂交瓶（有 RNA 的一面朝里，与液体接触），加入 10 mL Pre-hybridization solution，排尽气泡，42 $^{\circ}$ C 预杂交 2 h，回收 Pre-hybridization solution；
- ②杂交：取 10 μ L 探针（10 μ M），100 $^{\circ}$ C 沸水中变性 10min 后，立即冰浴冷却 10min，然后加至 10 mL Pre-hybridization solution 中，37~42 $^{\circ}$ C 杂交 18h，回收含探针的 Pre-hybridization solution。
- ③洗涤 1：加入 10mL Wash Buffer I，室温洗涤 5min，重复一次；

④洗涤 2：加入 10mL Wash Buffer II，42°C洗涤 10min，重复一次；

⑤洗涤 3：加入 10mL Wash Buffer III，室温洗涤 5min。

注意：

1. Pre-hybridization solution 和含探针的 Pre-hybridization solution 保存于 -20°C，可重复使用 2~3 次；

2. 探针变性后要立即置于冰上；

3. 本步骤在杂交炉中完成。

7. 抗体孵育 (~3h)

①封阻：加入 10 mL Blocking bufferr，室温封闭 30min，回收 Blocking buffer；

②孵育抗体：向回收的 Blocking 中加入 2 μL anti-DIG，室温孵育 2 h，回收含 anti-DIG 的 Blocking buffer；

③洗涤：加入 10 mL Wash Buffer III，室温洗涤 15min，重复一次；

④平衡：加入 20 mL 1×PBS，室温平衡 5min。

注意：Blocking buffer 和含 anti-DIG 的 Blockingbuffer 均可重复使用 2~3 次。

8. 显影 (~0.5h)

①将膜正面（有 RNA 的一面）朝上，加入适量显影液（Developer solution :1×PBS=1:100，体积约为 0.02 mL/cm²），15~25°C避光孵育 5min；

②将膜置于化学发光成像仪中曝光 5~20 min 显影。

注意事项/Notes

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内；

2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

