

Southern blotting

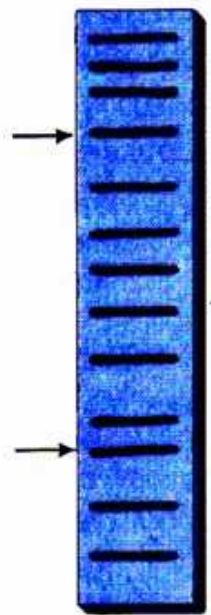
Lucie Adámková, Lucie Bauerová,
Martin Bednář

Základní informace

- Pojmenování po E. Southernovi, který tento postup zavedl r. 1975
- Metoda, která má významné uplatnění v diagnostice
- Umožňuje lépe vizualizovat výsledky elektroforézy DNA
- V doslovném překladu „pijácování“
- Elektroforetický gel není vhodným materiálem pro provádění hybridizace DNA

Samotný proces

- 1. Vycházíme ze situace, kdy proběhla elektroforéza DNA fragmentů
- 2.a) Pomocí alkalického pufru necháme vzlínat molekuly DNA z gelu na fólii (nejčastěji z nitrocelulózy), v alkalickém prostředí zároveň DNA denaturuje (vlákna se oddělí, aby mohlo v příštím kroku dojít k hybridizaci se sondou).
- 2.b) Jednořetězcová vlákna DNA, která jsou na membránu přenesena ve stejném pořadí jako byla na elfor. gelu se fixují (teplem, UV zářením)
- 3. Na fólii necháme působit další pufr s nukleotidovými sondami (v nadbytku), které hybridizují s komplementárními sekvencemi na fólii zachycených fragmentů DNA. Sondy jsou značeny radioaktivním izotopem nebo (nyní častěji) fluorescenčním barvivem
- 4. Nenavázané próby (sondy) jsou odmyty.
- 5. Nyní již můžeme vizualizovat sondou značené fragmenty (podle použitého značení sondy buď autoradiografií nebo detekcí fluorescence) v případě úspěšné hybridizace svítí na membráně v určité oblasti dvoušroubovice tvořená 1 vláknem próby a 1 vláknem studované DNA



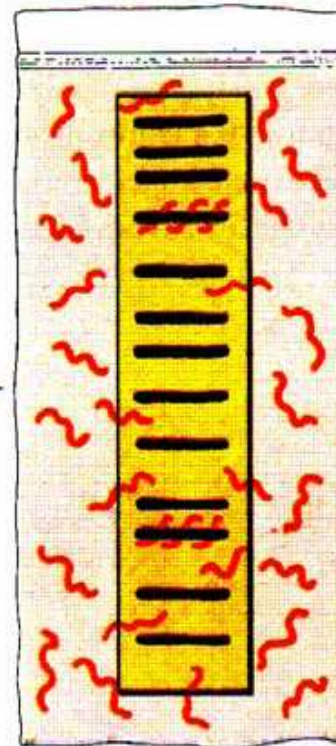
gelový elektroforeogram obsahující zkoumané sekvence DNA

denaturace NaOH a přenos na nitrocelulosu



nitrocelulosový otisk gelové elektroforezy

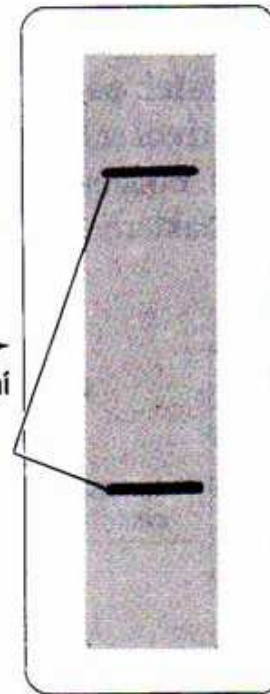
inkubace DNA vázané na celulosu se specifickou sekvencí DNA nebo RNA značenou ^{32}P



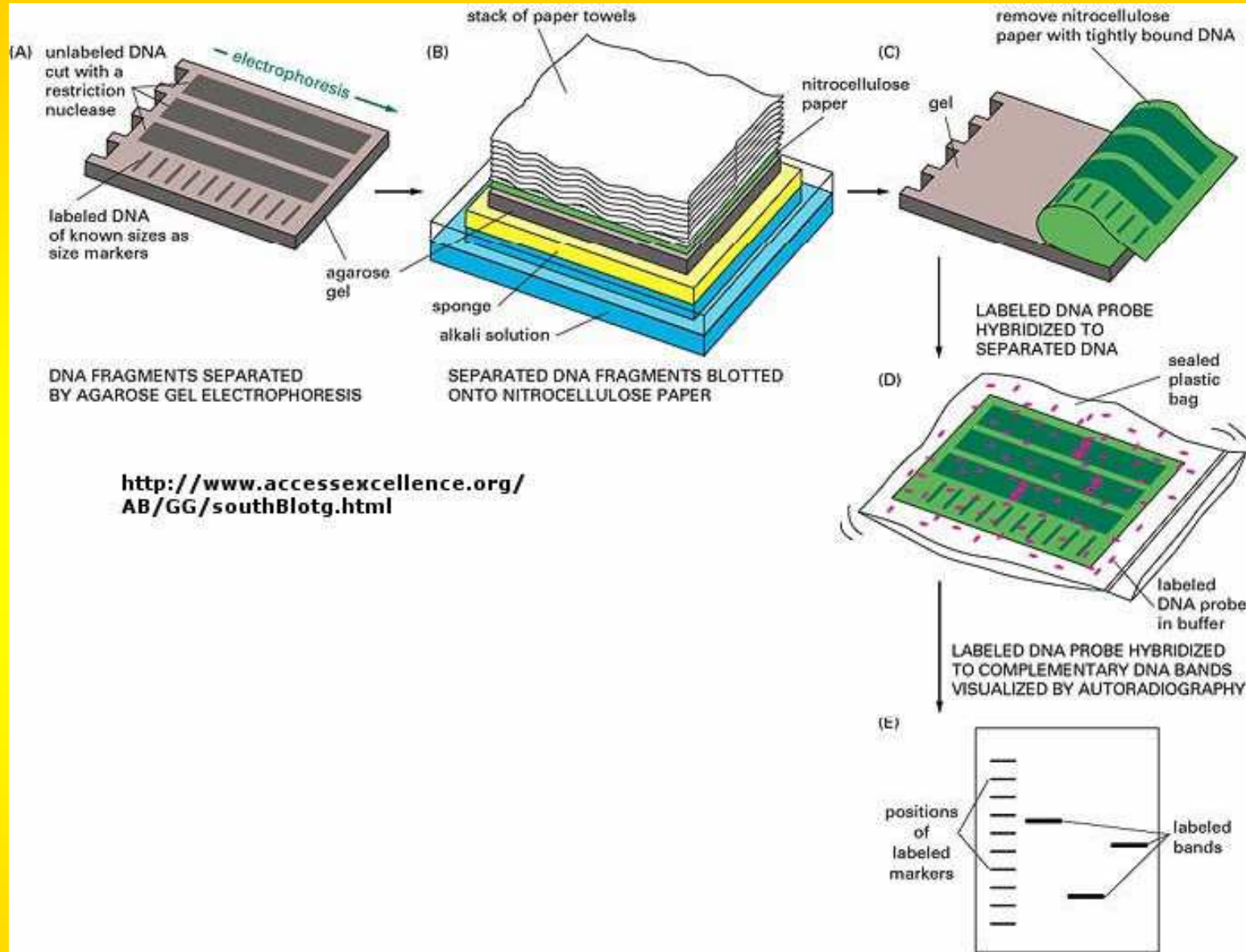
hybridizace

autoradiografie

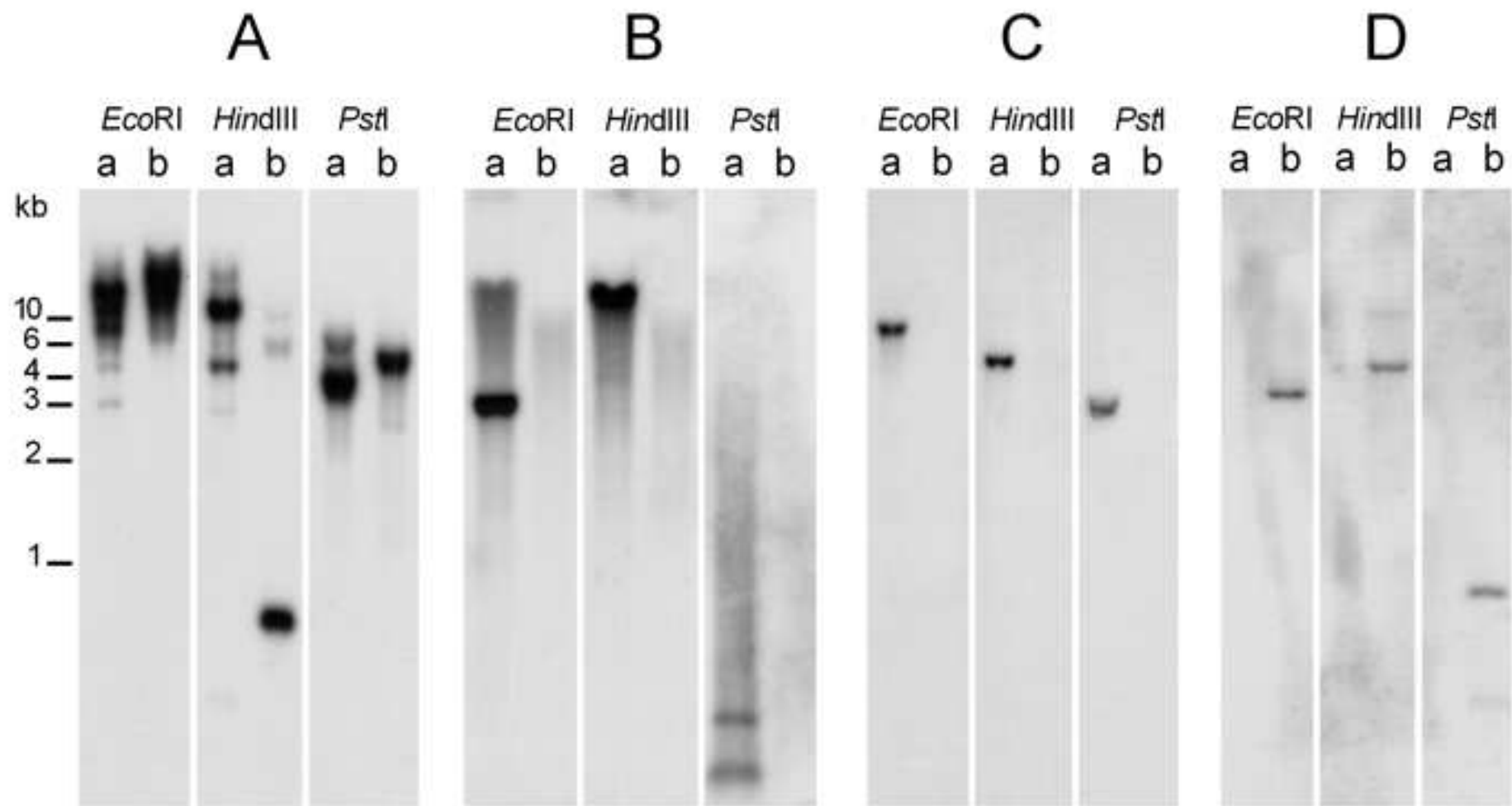
DNA komplementární ke značce s ^{32}P



autoradiogram



<http://www.accessexcellence.org/AB/GG/southBlotg.html>



Eventuality

- **Northern blotting** - označujeme tak vizualizaci elektroforézy RNA, která probíhá obdobně jako v případě Southern blottingu.
- **Western blotting** - používá se při elektroforéze bílkovin, pro jejichž značení se využívají imunochemické metody.
- **Elektroblotting** – přenos na membránu neprobíhá jen kapilárními jevy, ale za pomoci elektrického proudu

Význam

- V oblasti diagnostiky geneticky podmíněných chorob
- Je-li sonda krátká (okolo 20 nukleotidů) může se stabilně navázat při vyšší teplotě pouze pokud je s cílovou sekvencí zcela komplementární - tímto způsobem lze například odhalit bodové mutace (záměny bází) v některých genech.
- Pomocí Southern blottingu lze studovat polymorfismus DNA, tj. rozdíly v nukleotidové sekvenci různých alel
- Umožňuje z velkého množství fragmentů o podobných délkách (jež můžeme získat např. po štěpení celkové DNA pomocí restričních endonukleáz) specificky detekovat DNA fragment