

PROTOCOLO EXPERIMENTAL SOUTHERN BLOT

MÉTODOS

➤ DÍA 1

a. Amplificación mediante PCR de una secuencia específica de DNA empleando *Phusion High-Fidelity* DNA polimerasa (F-530 Thermo Fischer)

1. Mezcla de PCR (en hielo):

Component	20 μ L rxn	50 μ L rxn	Final conc.
H ₂ O	add to 20 μ L	add to 50 μ L	
5X Phusion HF Buffer*	4 μ L	10 μ L	1X
10 mM dNTPs	0.4 μ L	1 μ L	200 μ M each
Forward primer**	X μ L	X μ L	0.5 μ M
Reverse primer **	X μ L	X μ L	0.5 μ M
Template DNA	X μ L	X μ L	
(DMSO***, optional)	(0.6 μ L)	(1.5 μ L)	(3%)
Phusion DNA Polymerase	0.2 μ L	0.5 μ L	0.02 U/ μ L

La **Phusion DNA polimerasa** debe de ser el **último componente añadido** en la mezcla de PCR para evitar que su actividad exonucleasa pueda degradar los *primers* en ausencia de dNTPs.

Para DNA de baja complejidad (ej. plásmido) **1 pg-10 ng/50 μ l** de volumen de reacción (además, el volumen de DNA no debe superar el 10% del volumen total de mezcla de PCR).

2. Condiciones termociclador:

Cycle step	2-step protocol		3-step protocol		Cycles
	Temp.	Time	Temp.	Time	
Initial Denaturation	98 °C	30 s	98 °C	30 s	1
Denaturation	98 °C	5–10 s	98 °C	5–10 s	25–35
Annealing (see 5.3)	–	–	X °C	10–30 s	
Extension (see 5.4)	72 °C	15–30 s/kb	72 °C	15–30 s/kb	
Final extension	72 °C 4 °C	5-10 min hold	72 °C 4 °C	5-10 min hold	1

Para el cálculo de la temperatura de *annealing* de los *primers* específicos se recomienda emplear la aplicación **Tm CALCULATOR** de *Thermo Scientific Web Tools*.

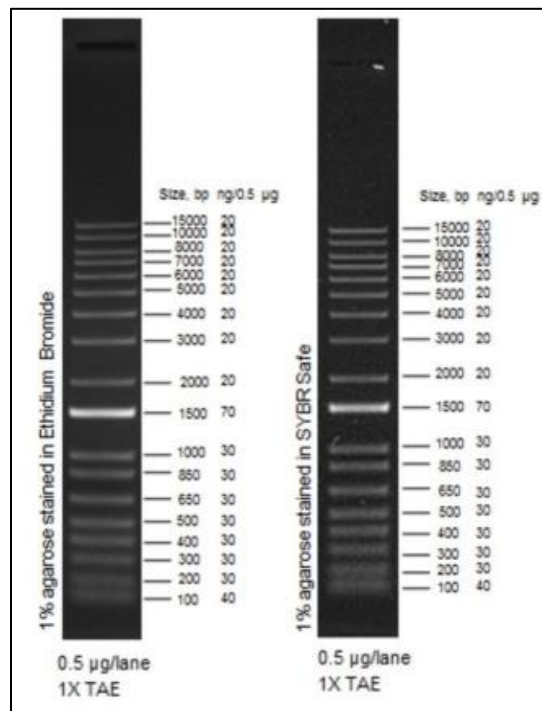
Para DNA de baja complejidad (ej. plásmido) usar **tiempos de extensión de 15 segundos/ kb**.

b. Análisis mediante electroforesis en gel de AGAROSA 1%

1. Separar una alícuota de 20 μ l de la mezcla de PCR.
2. Añadir 4 μ l de tampón de carga de DNA 6X (0.03% azul de bromofenol + 0.03% xileno cianol +60 mM EDTA pH 7.6 y 60% glicerol en agua destilada).
3. Cargar en un gel 1% agarosa (ej. 150 ml tampón TBE 1X* + 1.5 gr de agarosa A9539 SIGMA+ 7.5 μ l de **Red Safe Nucleic Acid Staining Solution 20000X 21141 INtRON**) con marcadores de peso molecular (**1 kb Plus DNA Ladder 10787018 Thermo Fischer**).
4. Correr a 90 V constantes durante 50 min-1 hora.
5. Visualizar en un transiluminador UV.

*TBE 1X: 89mM Tris, 89mM ácido bórico, 2mM EDTA.

1 kb Plus DNA Ladder



c. **Síntesis de una sonda DNA marcada con biotina a partir de la secuencia de DNA amplificada por PCR empleando el Biotin Decalabel DNA Labeling Kit (K0651 Thermo Scientific).**

1. Añadir los siguientes componentes en un vial de 1.5 ml:

DNA template (100 ng - 1 µg)	10 µl
Decanucleotide in 5X Reaction Buffer	10 µl
Water, nuclease-free	to 44 µl

2. Vortex y microfugación durante 3-5 segundos.

3. Incubar el vial a 100°C durante 5-10 min y enfriar en hielo seguidamente. Microfugar de inmediato.

4. Añadir los siguientes componentes en el mismo vial:

Biotin Labeling Mix	5 µl
Klenow fragment, exo- (5 u)	1 µl

5. Agitar el vial y microfugar durante 3-5 segundos.

6. Incubar 1 hora a 37 °C (incubar durante más de 20 horas incrementa el rendimiento de la reacción).

7. Parar la reacción con la adición de **1 µl de 0.5 M EDTA pH8.**

El DNA sintetizado (sonda biotilada) puede usarse directamente para hibridación o almacenarse a -20°C (no es necesaria la purificación para la mayoría de las aplicaciones posteriores). Cuantificación en Nanodrop.

➤ **DÍA 2**

d. **Southern blot de una muestra de DNA: electroforesis en gel de agarosa y transferencia a membrana de nitrocelulosa (LC2001 Invitrogen).**

1. Cargar las **muestras de DNA** con el volumen de **tampón de carga 6X** (0.03% azul de bromofenol + 0.03% xileno cianol +60 mM EDTA pH 7.6 y 60% glicerol en agua destilada) adecuado (concentración final 1X) en un gel de **agarosa 1%** (para DNA genómico 0.7%) en **TBE 1X**.

2. Correr el gel a **90 V constantes durante 1-2 horas** (para DNA genómico 3V/cm durante 18 horas).
3. Lavar el gel en agua destilada, añadir **Denaturation solution (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)** y agitar 30 min a temperatura ambiente.
4. Lavar el gel en agua destilada y añadir **Neutralization solution (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH7.2, 1 mM EDTA)**. Agitar 15 minutos a temperatura ambiente. Repetir este paso.
5. Llenar una cubeta con **Blotting buffer (SSC 20X pH 7: 3 M NaCl, 0.3 M citrato sódico)**. Realizar el montaje de transferencia por capilaridad empleando membrana de nitrocelulosa 0.45 μm (LC2001 Invitrogen) y evitando la formación de burbujas.



6. Transferir el DNA por capilaridad durante 18 horas a temperatura ambiente.

➤ **DÍA 3**

e. Hibridación con la sonda biotinilada

7. Lavar la membrana en buffer 2X SSC para eliminar los residuos de agarosa, secar a temperatura ambiente y fijar durante 2 minutos con luz UV.

8. Preparar la solución de hibridación:

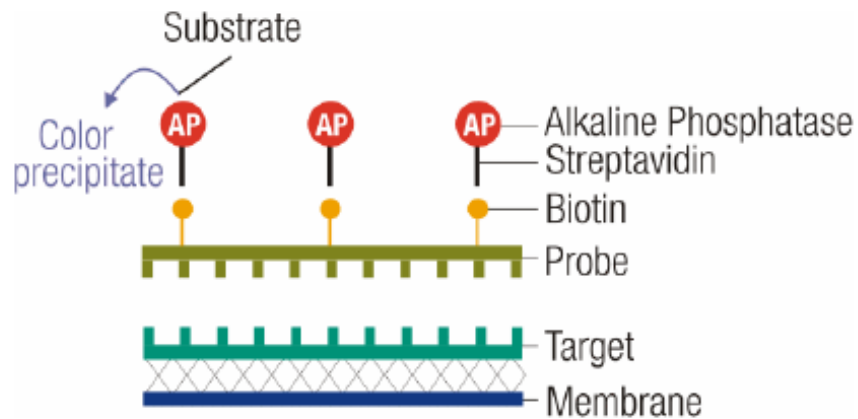
- Desnaturalizar la sonda biotinilada a 100 °C durante 5 min y colocar en hielo.
- Añadir la sonda desnaturalizada a la **solución de hibridación (6X SSC, 5X Denhardt's solution, 0.5% SDS y 50 % v/v formamida)** a una concentración final de 25-100 ng/ml (concentración usual para sondas no marcadas radioactivamente).

9. Añadir la solución de hibridación a la membrana (60 µl/cm²) e incubar toda la noche (>12 h) a 42°C en agitación.

➤ **DÍA 4**

f. **Detección cromogénica de la sonda biotinilada hibridada empleando el Biotin Chromogenic Detection Kit (K0661 Thermo Scientific).**

La sonda biotinilada hibridada con la secuencia específica de DNA transferida a la membrana de nitrocelulosa es detectada mediante la **unión de estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina**; esta última enzima degrada el sustrato BCIP-T produciendo un precipitado insoluble azul bien definido en los sitios de reacción en la membrana.



Componentes del kit:

Component	#K0661 for 10 rxns
Streptavidin-AP Conjugate	40 µL
50X BCIP/NBT Solution	4 mL (2 × 2 mL)
Blocking Reagent (powder)	5 g
10X Blocking/Washing Buffer	200 mL
10X Detection Buffer	30 mL

Preparación de las soluciones de ensayo (en agua miliQ):

-**Blocking/Washing buffer**. Diluir 1 volumen del concentrado 10X en 9 volúmenes de agua (puede almacenarse a 4°C durante 1 semana).

-**Blocking solution**. 1% w/v Blocking reagent en 1X *Blocking/Washing buffer* (puede almacenarse en alícuotas a -20°C).

-**Estreptavidina-AP conjugada**. Diluir 5000 veces en *Blocking solution* (preparar en fresco justo antes de su uso).

-**Detection buffer**. Diluir 1 volumen del concentrado 10X en 9 volúmenes de agua (puede almacenarse a 4°C durante 1 semana).

-**Sustrato**. Diluir 1 volumen de BCIP/NBT 50X en 49 volúmenes de *Detection Buffer* 1X (preparar en fresco justo antes de su uso).

Durante todos los pasos del procedimiento, la membrana debe flotar libremente en la cubeta/recipiente y estar siempre cubierta por la solución correspondiente.

10. Lavar la membrana 2 veces en **buffer 2X SSC 0.1% SDS** a temperatura ambiente 10 minutos.

11. Lavar la membrana 2 veces en **buffer 0.1X SSC 0.1% SDS** a 65°C durante 20 minutos.

12. Lavar la membrana en **Blocking/Washing buffer 1X** durante 5 minutos a temperatura ambiente con agitación suave.

13. Bloquear la membrana en **Blocking solution** durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave.

14. Preparar la **Estreptavidina-AP conjugada** (dilución **1:5000 en Blocking solution**)

15. Incubar la membrana en Estreptavidina-AP conjugada durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave.

16. **Lavar** la membrana a temperatura ambiente con agitación suave:

-Incubar en **Blocking/Washing** buffer durante 15 min y descartar la solución. Repetir el lavado y descartar.

-Incubar en **Detection buffer 1X** durante 10 minutos y descartar la solución.

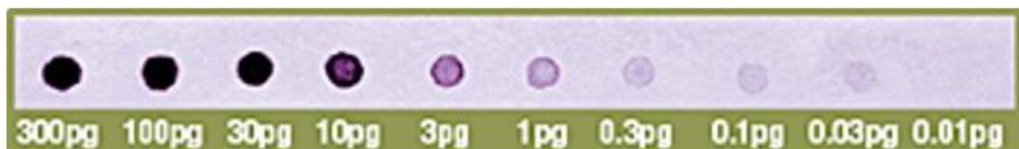
17. Realizar la **reacción enzimática**. Incubar la membrana con el **sustrato preparado en fresco** a temperatura ambiente en oscuridad (el precipitado se vuelve visible después de 15-30 min de incubación).

18. Parar la reacción descartando el sustrato y lavando la membrana con **agua miliQ** durante unos segundos.

19. Eliminar el agua y **secar la membrana al aire** (no debe secarse si van a realizarse *strippings* y re-hibridaciones! adicionales).

***DOT BLOTTING (día 2) ≈eficacia de la biotilación de la sonda de DNA**

- i. Preparar varias **diluciones de la sonda biotilada** (ej. 1 ng/ μ l-10 fg/ μ l) y transfiera una gota de cada dilución a la **membrana de nitrocelulosa** (LC2001 *Invitrogen*).
- ii. **Secar al aire la membrana** a temperatura ambiente durante 30-45 minutos (o 10 min a 80°C).
- iii. Colocar la membrana en un **transiluminador UV** (las gotas de muestra hacia abajo) y enlazar la sonda a la membrana durante **1-5 minutos**. (La membrana puede ser almacenada a 4°C o a temperatura ambiente hasta que sea necesaria).
- iv. Colocar la membrana en un recipiente/cubeta adecuado y realizar el **procedimiento de detección** como se indica en el punto f del protocolo de Southern Blot (mejora el rendimiento incubar **toda la noche con el sustrato!**). Ajustar los volúmenes de soluciones al tamaño de membrana y al recipiente/cubeta.



Dot-blot hybridization with a biotin-labeled probe

Lambda DNA/HindIII was biotin-labeled with the Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit and used as a hybridization probe in a dot-blot of the homologous DNA on SensiBlot Plus Nylon Membrane. The blot was developed with the Biotin Chromogenic Detection Kit.

