

Southern blot

Matériel et Solution :

Stop buffer (volume total de 15 mL) :

- 600 µL EDTA 0,5M pH8
- 900 µL NaCl 5M
- compléter avec de l'eau stérile à 15 mL

HCl 0,25 N (volume total de 500 mL) :

- 12,5 mL de HCl à 37%
- compléter avec de l'eau stérile à 500 mL

NaCl 1,5 M / NaOH 0,5M (volume total de 500mL)

- 150mL NaCl 5M
- 10g de NaOH (dans les poudre Base parterre sous l'espace de travail à côté de Mustafa)

NaOH 0,4 M (volume total de 2L) – solution de transfert

- 32g de NaOH

Papier Watman

Membrane Hybond N+

SSC 5X, 0,01% SDS (volume total de 100 mL)

- 25 mL SSC 20X
- 100µL SDS 10%
- compléter à 100 mL avec de l'eau stérile

Solution d'hybridation (volume total de 500 mL) :

- chauffer 250 mL de sodium phosphate 0,5 M (Na_2HPO_4) pendant 1 à 2 minutes au micro-ondes.
- ajouter 35 g de SDS. Mélanger et chauffer jusqu'à dissolution.

- Attendre que la solution de se refroidisse.
- Ajouter 150 mL de sodium phosphate 0,5 M.
- ajouter 5 g de BSA, fraction V. Mélanger jusqu'à dissolution complète.
- Ajouter 1 mL EDTA 0,5 M et 50 μ L de yeast tRNA 10 mg/mL
- Compléter le volume à 500 mL avec du sodium phosphate 0,5 M.

Faire des aliquots de 20 mL dans des Falcon de 50 mL.

Conserver à -20°C.

SSC 2X (volume total de 200 mL) :

- 20 mL SSC 20X
- compléter avec de l'eau stérile à 200 mL.

SSC 0,1 X SDS 0,1% (volume total de 100 mL) :

- 0,5 mL SSC 20X
- 1 mL SDS 10%
- compléter avec de l'eau stérile jusqu'à 100 mL.

SSC 0,1X (volume total de 50 mL) :

- 0,25 mL SSC 20X
- compléter avec de l'eau stérile à 50 mL.

Méthode :

Digestion

- 1) Procéder à la digestion des échantillons pendant nuit à la température adéquate selon l'enzyme de restriction. (recette pour une digestion)
 - a. Digérer 1 à 2 μ g d'ADN extrait par phénol/chloroforme. (minimum de 1 μ g quand sonde unique pendant hybridation)
 - b. Mettre 10 μ L du tampon 10X adéquat
 - c. Ajouter 1 μ L BSA si nécessaire
 - d. Ajouter 1 μ L de RNAse A (5mg/mL)
 - e. 15 Unités d'enzyme

- f. Compléter avec de l'eau achetée (l'eau nano a tendance à inhiber les réactions enzymatiques) pour un volume de 100 μ L.
- 2) Après une nuit de digestion, arrêter la réaction avec 100 μ L (1 volume) de «stop buffer».
 - 3) Faire une extraction phénol/chloroforme :(100 μ L de chaque – 1 volume de chaque). Vortexer 30 secondes et centrifuger 3 minutes à 13 000 rpm. Récupérer le surnageant.
 - 4) Faire une extraction chloroforme : ajouter 1 volume de chlorofome (200 μ L – 1 volume), Vortexer 30 secondes et centrifuger 3 minutes à 13 000 rpm. Récupérer le surnageant.
 - 5) Procéder ensuite à la précipitation en mettant 1 μ L de glycogen 20mg/mL (optionnel mais permet de mieux voir le culot) et 500 μ L d'éthanol 100% dans le tube. Placer le tube à -20°C pendant au moins 30 minutes ou à -80°C pendant 10 minutes.
 - a. Note : les étapes peuvent s'arrêter ici si nécessaire. Il suffit de garder les échantillons à -20°C.
 - 6) Dès que les échantillons sont sortis du congélateur, centrifuger 15 à 30 minutes à 13 000 rpm.
 - 7) Jeter le surnageant et ajouter 1 mL d'éthanol 70% pour laver. Mélanger par inversion.
 - 8) Centrifuger 3 minutes à 13 000 rpm.
 - 9) Décantier.
 - 10) Sécher le culot (à l'aide du speed vac)
 - 11) Resuspendre le culot dans 9 μ L de TE pH 8 acheté et 1 μ L de tampon de chargement 10X (contenant le bleu de bromophénol et xylène cyanol)

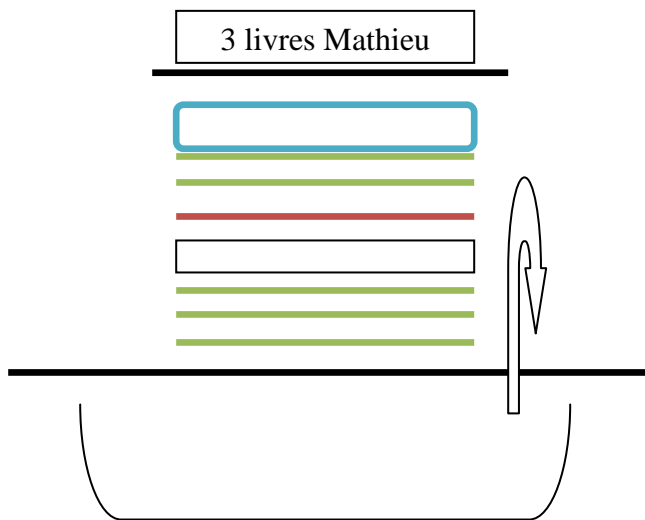
Migration du gel

- 12) Charger ces échantillons dans un gel TBE pour une migration toute la nuit (70V permet une bonne séparation pour les fragments de l'ordre de 20 000 pb)
 - a. Les marqueurs de tailles qui sont chargés dans le gel doivent être marqués radioactivement.
 - b.

Transfert du gel sur la membrane

- 13) Après avoir fait migrer les échantillons sur gel, couper le long des puits avec un scalpel et couper le coin en bas à gauche du gel.

- a. Placer le gel dans un plat en verre plus grand que le gel.
 - b. Conseil, retourner déjà le gel afin que les puits soient contre le verre. Une fois la dépurination réalisée, le gel sera très mou et il sera difficile de le tourner par la suite pour le mettre sur le montage.
- 14) Dépurer le gel pendant 10 minutes avec HCl 0,25N avec une agitation constante.
 - 15) Rincer 1 fois avec de l'eau distillée.
 - 16) Dénaturer l'ADN du gel avec la solution NaCl 1,5 M / NaOH 0,5M pendant 45 minutes avec une agitation constante.
 - 17) Enlever la solution de NaCl 1,5 M / NaOH 0,5M et en mettre de la nouvelle pour 15 minutes.
 - 18) Préparer la solution de transfert NaOH 0,4 M.
 - 19) Découper 2 morceaux de papier Watman 3MM (aussi long que le gel et à 4 fois la largeur du gel).
 - 20) Découper 5 morceaux de papier Watman 3MM (de la taille exacte du gel)
 - 21) Préparer le montage suivant.



- a. Mettre une grande vitre par-dessus le plat en pyrex. Mette 2 grandes feuilles de Watman comme la flèche l'indique, donc par-dessus la vitre et les extrémités trempent dans le plat en pyrex. Ajouter la solution de transfert dans le plat en pyrex. Les bords de Watman sont mouillés et le liquide monte par capillarité. Avec une pipette, prendre un peu de solution de transfert du plat en pyrex et mettre au milieu du papier Watman pour que ce soit bien inondé. Ensuite,

rouler la pipette sur le papier pour enlever les bulles. Faire très doucement au début et faire de plus en plus fort.

- i. CONSEIL POUR ENLEVER LES BULLES : par exemple, pour un gel de 23 cm de long et 15 cm de large, il faut rouler de manière verticale (ne pas rouler de manière horizontale car des plis vont apparaître et il n'en faut surtout pas !)
- ii. Aussi, il est important de rouler à partir du Centre vers les côtés.
- b. Par la suite, préparer un autre plat en pyrex avec un peu de solution de transfert afin de tremper les divers éléments avant de les mettre sur le montage.
- c. Prendre 3 papiers Watman 3MM de la taille du gel et les tremper dans la solution de transfert dans le plat préparé en (b). Rouler la pipette dessus pour enlever les bulles entre chaque papier.
- d. Lorsque les 15 minutes de dénaturation du gel sont terminées, le rincer avec de l'eau distillée 1 fois. Il faut retourner le gel de manière à ce que les puits soient face au Watman (dans le sens inverse d'une migration). Passer la pipette dessus pour éliminer les bulles.
 - i. Il est inutile de retourner le gel si cela a déjà été fait à l'étape 13.
- e. Découper une membrane Hybond N+ – ne pas toucher à la membrane, seulement au papier rouge) – de la taille du gel. Mouiller la membrane (pas le papier rouge) avec de l'eau distillée des deux côtés et tremper la 5 minutes dans la solution de transfert.
- f. Placer la membrane sur le gel. Rouler avec la pipette.
- g. Placer 1 papier Watman taille de gel dans la solution de transfert et le mettre sur la membrane hybond. Rouler avec la pipette.
- h. Mouiller le dernier papier Watman taille de gel dans la solution de transfert et le placer sur le montage. Rouler pour enlever les bulles.
- i. Placer une pile de papier (qui sert à s'essuyer les mains).
- j. Placer une vitre de verre et 3 livres par-dessus.
- k. Ajouter en haut du montage un niveau pour voir si c'est droit et ajuster pour que le montage soit droit.
- l. Laisser pendant 1 nuit transférer. (monte par capillarité)

22) Préparer les solutions pour le lendemain faire l'hybridation :

- a. SSC 5X, 0,01% SDS

b. Solution d'hybridation

Hybridation

- 23) Après la nuit à transférer, défaire le montage.
- 24) Mettre la membrane dans un plat pyrex avec 100 mL de solution SSC 5X, 0,01% SDS pendant 1 minute.
- 25) Mettre la membrane sur un papier Watman large pour la laisser sécher 30 minutes.
- 26) Placer la membrane dans un tube (la rouler ADN à l'intérieur de haut en bas) et mettre 20 mL de solution d'hybridation dans le tube. Mettre dans le four à la température d'hybridation (65°C) pendant au moins 2 heures.
- 27) Décongeler la solution d'hybridation dans un bain marie à 55°C.
- 28) Préparer la sonde;
 - a. Dans un Eppendorf, mélanger :
 - i. 75ng D'ADN,
 - ii. 1µL d'hexamère 0,5µg/µL
 - iii. compléter avec de l'eau achetée pour un volume de 17µL.
 - b. Chauffer 2 minutes à 95°C.
 - c. Refroidir 5 minutes à température pièce et ajouter :
 - i. 2,5µL de tampon klenow 10X (500µL Tris 1M pH 7,5, 100 µL MgCl₂ 1M, 50µL DTT 200 mM, 50 µL BSA 10mg/mL, 300µL eau)
 - ii. 2,5 µL dNTPmix (sauf dATP) 0,5mM
 - iii. 2,5 µL αdATP radioactif
 - iv. 0,5µL klenomw 2,5 U
 - d. Laisser 1 heure à 37°C.
 - e. Arrêter la réaction avec 1µL EDTA 0,5M et 100 µL TE pH 8
 - f. Prélever 1 µL et mettre sur papier Watman pour faire une chromatographie (avant purification)
 - g. Passer le mélange sur colonne G50
 - i. Remplir la colonne avec 700 à 1000 µL de Sephadex G50
 - ii. Centrifuger 30 secondes à 5000 rpm
 - iii. Ajouter 150 µL SDS 1%
 - iv. Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm
 - v. Passer la sonde sur la colonne

- vi. Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm
- vii. Récolter 150 μL (sonde à 10 000 – 20 000 cpm/ μL)
- viii. Prélever 1 μL sur Papier watman.
- ix. Prendre 50 μL et diluer à 20 000 cpm/ μL .
- x. Conserver à 4°C.
- xi. Mettre le papier Watman dans un bécher avec de l'eau et laisser migrer.
Exposer ensuite sur phosphorimager.

29) Ajouter l'équivalent de 6×10^6 cpm de sonde au tube contenant la solution d'hybridation.

30) Incuber à température d'hybridation (65°C) toute une nuit.

31) Préparer les solutions de lavage pour le lendemain.

- a. SSC 2X
- b. SSC 0,1 X SDS 0,1%
- c. SSC 0,1X

Lavages

32) Après que l'hybridation toute la nuit ait été faite, il faut procéder aux lavages.

33) Enlever la solution d'hybridation.

34) Ajouter 15 mL de SSC 2X et agiter 1 minute.

35) Enlever la solution et en remettre 15 mL de SSC 2X. Incuber 20 minutes dans un four à température pièce.

36) Enlever la solution de lavage et mettre 50 mL de solution SSC 0,1X/SDS 0,1%.
Incuber à 55°C pendant 1 heure.

37) Enlever la solution de lavage et ajouter 50 mL de SSC 0,1X (optionnel).

38) Vérifier la radioactivité avec le Geiger.

39) S'il y a trop de radioactivité, recommencer les étapes de lavages avec 50 mL de solution SSC 0,1X/SDS 0,1%.

40) Envelopper la membrane dans un papier plastique et le fermer hermétiquement.
Attention qu'elle ne sèche pas.

41) Exposer dans le phosphorimager pour la nuit. Vérifier le résultat plus tard (minimum de 24 heures d'exposition) !

Stripping

42) S'il y a besoin de faire une seconde hybridation, il faut «stripper» la membrane :

- a. Placer la membrane dans un plat en plastique et incuber la membrane 30 minutes à 45°C dans la solution de transfert.
- b. Enlever la solution de transfert et ajouter un solution contenant SSC 0,1X / SDS 0,1% / Tris-HCl 0,2M pH 7,5 et incuber 15 minutes à 45°C.
- c. Vérifier la radioactivité avec le Geiger.
- d. Conserver la membrane dans un papier plastique et s'assurer qu'elle ne sèche pas.