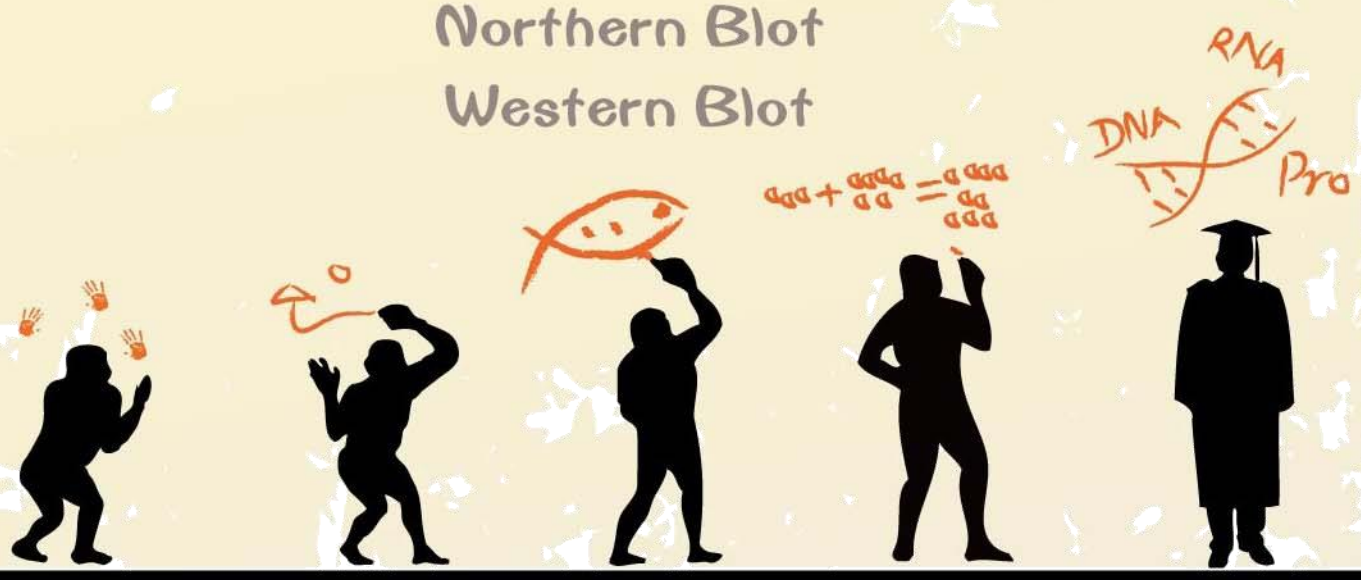
钟鼎生物
ZOONBIO BIOTECHNOLOGY

印迹杂交系列服务

Southern Blot

Northern Blot
Western Blot



公司名称：南京钟鼎生物技术有限公司
免费热线：400-025-1124
分子生物学技术服务 025-84448440-601
抗体制备技术服务 025-84448440-611
基因工程操作技术服务 025-84448440-608
蛋白表达技术服务 025-84448440-608
免疫学检测技术服务 025-84448440-602
蛋白质解析服务 025-84448440-608
项目合作 025-84448440-601
行政外联 025-84448440-606
传真：025-84448440-609
邮箱： order@zoonbio.com 公司网址： www.zoonbio.com
联系地址：江苏省南京市玄武区孝陵卫双拜巷78号紫金山创业科技园A座2楼 （ 邮编 210014 ）

技术支持：400-025-1124　　邮 箱：order@zoonbio.com

Southern Blot印迹杂交检测-DIG探针标记

Southern印迹杂交是进行基因组DNA特定序列定位的方法。其原理为利用琼脂糖凝胶电泳分离经限制性内切酶消化的DNA片段，将胶上的DNA变性并在原位将单链DNA片段转移至尼龙膜或其他固相支持物上，经干烤或者紫外线照射固定，再与相对应结构的DIG标记探针进行杂交，用放射自显影或酶反应显色，从而检测特定DNA分子的含量。

钟鼎生物自建立Southern Blot杂交服务平台以来，帮助客户完成过拟南芥、大豆、烟草、苎麻、 玉米、棉花、水稻、油菜等多物种检测，成功发表数十篇高水平论文，钟鼎生物的探针使用DIG（地高辛）标记，具有低噪、高敏、无放射性污染等优点。实验过程中保留原始数据和实验材料，数据真实可信，具有可重复性。我们使用传统的胶片曝光与最先进的自动化学发光成像检测系统相结合，确保捕获最佳信噪比的成像时间点，可以交付给客户品质最好的实验结果，客户可直接使用钟鼎生物提供的southern blot实验数据向高水平的杂志投稿。

服务名称	服务项目	服务报价
地高辛探针标记	探针标记/基因	1200元/条
Southern Blot杂交	8个样品+1个阳性对照（一张膜）	3980元

请提供高质量的DNA样品，如果需要钟鼎生物提取DNA样品，请提供新鲜的细胞、组织或菌液，我们会酌量加收部分服务费用。

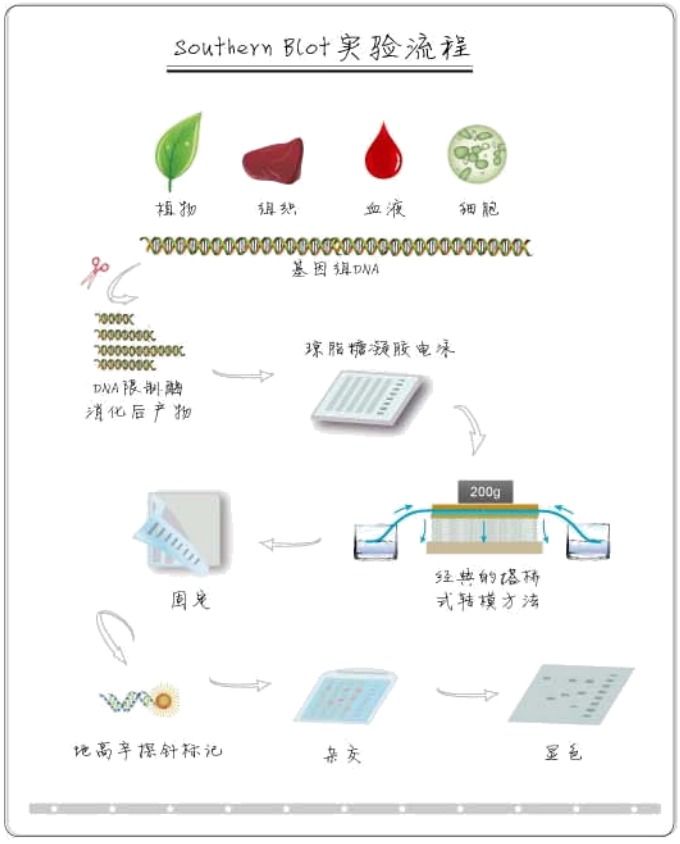
客户提供材料及信息

1、待杂交目标基因序列和含有杂交基因对应的质粒或菌株

2、待杂交的高质量DNA样品质量至关重要，决定实验的成败

- 完整的DNA，客户需提供电泳图
- 纯度：OD260/OD280=1.8-2.0
- DNA浓度不低于50ng/ul，总量>10ug，干冰或冰袋低温运输；阳性质粒至少2ug

3、下单时注明酶切方案，如果项目中需要非常规的限制性内切酶，需额外加收酶切费用或由客户提供。



Southern Blot服务发货包裹

钟鼎生物负责对客户提供样品进行DIG标记与Southern杂交检测技术服务，最终提供检测报告及原始图片

- DNA样品电泳检测报告（基因组DNA实验样品不返还，请注意保留备份）
- DNA样品酶切电泳检测报告
- PCR法制备DIG标记探针电泳检测报告
- 质粒单酶切电泳检测报告
- Southern blot标准实验流程报告
- 实验结果检测报告及原始图片

网页链接http://www.zoonbio.com/molecular-biology-service-index-Southern.html

技术支持：400-025-1124　　邮 箱：order@zoonbio.com

钟鼎生物Southern blot技术服务实验报告示例

一、 试剂、耗材

1、 PCR DIG Probe Synthesis Kit：Roche公司，货号11636090910；
2、 地高辛杂交检测试剂盒II（化学发光法）：Roche公司，货号11585614910；
3、 EcoR I：TaKaRa公司，货号D1040A；
4、 Hind III：TaKaRa公司，货号D1060A；
5、 1Kb DNA Ladder：钟鼎公司，货号DM1201；
6、 AL2000 DNA Marker：钟鼎公司，货号DM0101；
7、 HyBond N+正电荷尼龙膜：Amersham公司，货号RPN303B；
8、 引物：SNB015-F，SNB015-R，客户提供；
9、 样品：基因组DNA1、2、3、4、5、6、7、64R阴性，含目的基因的阳性质粒；
10、 DNA Molecular-Weight Marker，DIG-labeled：Roche公司，货号11218590910。

二、仪器设备

1、 梯度PCR仪：TP600型，TaKaRa公司；
2、离心机：Sigma 1-14型，Sartorius公司；
3、电泳仪：TY2795型，BIO-RAD公司；
4、电泳槽：491型，BIO-RAD公司；
5、凝胶成像分析系统：GelDocXR型，BIO-RAD公司；
6、移液器：2.5ul/100ul/200ul/1000ul，Eppendorf公司。

三、试剂及配制

1、变性液：0.5 M NaOH，1.5 M NaCl；
2、中和液：1.5 M NaCl，0.5 M Tris-HCl；
3、20×SSC：在800 ml水中溶解175.3 g NaCl和88.2 g 柠檬酸钠，加入数滴10 M NaOH调pH至7.0，加水定容至1000 ml，高压灭菌；
4、0.2 M EDTA（pH8.0）；
5、马来酸缓冲液：0.1 M 马来酸，0.15 M NaCl，用固体NaOH调至pH7.5；
6、Washing buffer：马来酸缓冲液，0.3% Tween 20；
7、Detection buffer：0.1 M Tris-HCl，0.1 M NaCl，pH9.5；
8、TE-buffer：10 mM Tris-HCl，1 mM EDTA，pH8.0；
9、Blocking solution：用马来酸缓冲液将10×blocking solution稀释10倍；
10、Antibody solution：用Blocking solution倍稀释Anti-Digoxigenin-AP。

四、探针制备

1、采用PCR制备探针模板

PCR体系（略）

PCR反应程序如下：

95℃ 预变性	2 min	
95℃ 变性	30 s	35个循环
61℃ 退火	30 s	
72℃ 延伸	35 s	
72℃ 复性	7 min	

2、琼脂糖凝胶电泳

PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，结果如右图1所示：



图1：PCR法制备DIG探针
Lane M:AL2000 DNA Marker；
Lane 1:dUTP标记的探针
Lane 2:对照的DNA片段

说明：
DIG标记的探针，电泳迁移率会增大，其表观分子量会大于未标记的PCR产物，当片段大小一致时，成功标记DIG的PCR产物如图所示

五、基因组DNA的提取和酶切

1、采用CTAB法大量植物基因组DNA快速提取试剂盒（钟鼎公司，货号DN15-10T），提取不同材料的基因组DNA，电泳检测如下组系列图所示：

玉米叶片基因组DNA



棉花基因组DNA



烟草基因组DNA



拟南芥叶片基因组DNA



苎麻叶片基因组DNA



大豆叶片基因组DNA



说明：
无论是客户提供基因组DNA或是委托钟鼎公司提取，品质需达到以下标准：纯度：OD260/OD280=1.8-2.0 浓度≥50ng/ul 质量≥10ug 电泳检测无蛋白污染和RNA污染，基因组DNA本身亦无降解，上述图片为钟鼎生物基因组提取试剂盒提取DNA，欢迎选用。

2、对基因组进行酶切，依据不同的酶，设置不同的酶切体系（详细酶切方案在具体订单中明确阐述，此处省略），电泳检测酶切产物，如下左图所示：

六、质粒酶切，根据实际情况设计酶切体系，取20 ul，进行1%琼脂糖凝胶电泳，如下右图所示：

七、电泳

将制备好的样品进行0.7%的琼脂糖凝胶电泳，25V恒压、低温、过夜。

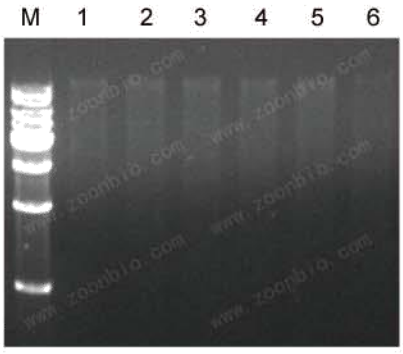
八、转膜

1、 将胶置于平皿、用蒸馏水冲洗一次后，加入数倍体积变性液室温振荡45 min。
2、 用蒸馏水冲洗2次。加入中和液室温振荡2×15 min。
3、 用蒸馏水冲洗2次。加入2×SSC以平衡凝胶和带正电荷的尼龙膜5 min。
4、 向上毛细管法进行转膜20 h。取下膜作好标记，在 2×SSC中漂洗一次，80℃烘烤固定2 h。

九、杂交

1、 预杂交：取10.0 ml Hyb-100，加入杂交管中，37℃预杂交2h。
2、 探针变性：探针在PCR仪中100℃变性10分钟，立即放冰水浴冷却5min。
3、 杂交：排尽预杂交液，在10.0ml Hyb-100）加入20ul新变性好的探针，混匀。37℃杂交过夜。

基因组DNA酶消化电泳检测图



说明：
酶切后的基因组DNA条带应该呈弥散装分布，酶切实验应先进性预实验，确保选择的内切酶不会切断待检测的基因区域。

阳性质粒酶切电泳检测图



Lane M:1Kb DNA Ladder
Lane 1:酶切前质粒
Lane 2:酶切后质粒

说明：
采用琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒（钟鼎公司，货号DR01-50T），回收片段，作为阳性对照样品使用

技术支持：400-025-1124　　邮 箱：order@zoonbio.com

十、洗膜、信号检测

1、 杂交后室温下，20 ml 2×SSC/0.1%SDS 洗膜2×5 min。

2、 65℃，20 ml 1×SSC/0.1%SDS洗涤2×15 min。

3、 再将膜置于20 ml洗涤缓冲液中平衡2-5 min。

4、 将膜在10 ml封闭液中封闭30 min（在摇床上轻轻摇动）。

5、 Anti-Dig-AP在10000 rpm下离心5 min。离心后将Anti-Dig-AP用封闭液稀释(1：5000)，2.0 ul Anti-Dig-AP加入10 ml 封闭液混匀。

6、 封闭完成后倒出封闭液，加入稀释好的10 ml抗体溶液，浸膜至少30 min。

7、 去除抗体溶液，用20 ml 洗涤缓冲液缓慢洗膜2次，每次15 min。

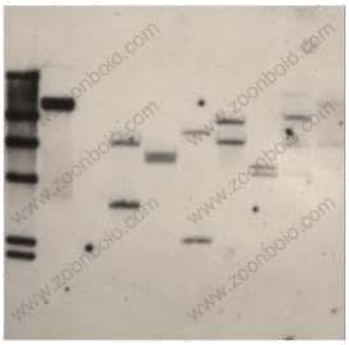
8、 在膜的正面（核酸面）滴加1 ml 的CSPD，隔绝空气15-25℃反应5 min，去除多余的液体，37℃孵育10 min。

9、 在暗房用X-ray film曝光，显影，定影，洗片，曝光记录结果。

还等什么？下一张完美胶片可能就是您的实验数据！

以下为部分案例，更多物种实验结果请咨询我们

实验材料:大豆(Glycine Max)



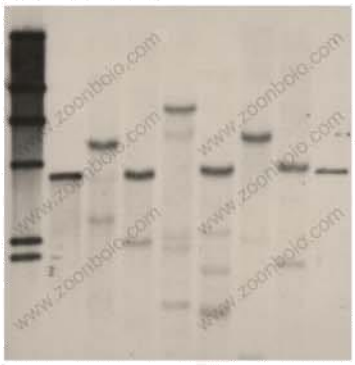
实验材料：　水稻(Oryza Sativa)



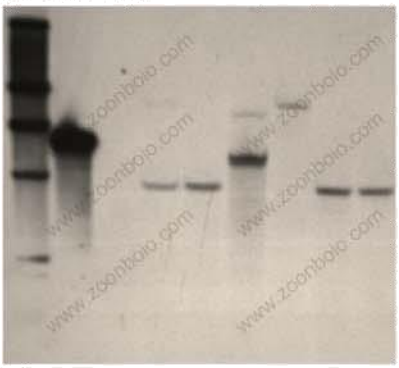
实验材料:玉米(Zea mays)



实验材料:小麦(Triticum aestivumLinn)



实验材料:烟草(Nicotiana tabacum L)



实验材料:苎麻(Boehmeria nivea)



说明：

1、上述实验图片为钟鼎生物精选的比较好的实验结果，为原始曝光胶片扫描，部分结果已见稿。

2、由于样品不同，即使是同一物种的实验材料，我们不承诺所有客户的订单都可以达到上述图片效果。

3、拒绝PS，钟鼎生物可提供曝光的原始胶片，确保实验结果真实可靠。