

Northern Blotting – Gel preparation and treatment

- 1) Preparar el gel MOPS/formaldehido de la siguiente manera:
Precalentar 17,5 de formaldehido y 30 ml de buffer MOPS 10X a 55 °C.
Disolver 3-4,5 gr de agarosa en 250 ml de H₂O. Llevar a 55 °C. Agregar el buffer MOPS 10X y el formaldehido. poner el gel en el compartimento adecuado y dejar que se haga.
Notas: El gel de agarosa es 0.7M con respecto al formaldehido y 1X con respecto al buffer MOPS. Esta formula se puede escalar para el tamaño de gel requerido. Se puede incluir en el gen BrET (0.01 ug/ml) pero no en exceso porque inhibe la transferencia.
- 2) Preparar las muestras de RNA, usando la siguiente tabla

	Volumen (ul)	[final]
RNA		
Formaldehido	5.5	2.2M
Formamida	15	50%
buffer MOPS 10X	1.5	0.5X
Agua	8-V	
TOTAL	30	

Poner las muestras a 55 °C por 15 minutos para desnaturalizar. Después de la desnaturalización, agregar 3ul del loading buffer 10X (Rnasa free). Mezclar y sembrar.

Notas: Las muestras deben estar desproteinizadas. No se deben guardar a -20 °C por largos períodos.

- 3) Separar las muestras de RNA usando MOPS 1X como buffer de electroforesis. Visualizar y fotografiar.
- 4) Poner el gel en un tachito y cubrirlo con agua destilada. Incubar por 15 minutos y con agitación.
- 5) Descartar el agua y agregar SSC 10X. Agitar 15 minutos y repetir este paso una vez más.
- 6) Preparar el aparato de transferencia, usando un buffer de transferencia neutral. Se puede usar SSC 10X o 20X.