

## Protocolo para southern (sistema alkphos direct)

### Dot Blot

- 1) Equilibrar la membrana de nitrocelulosa durante 20 minutos en SCC 10 X (NaCl 173 gr, Nacitrato 88,2 gr, en 1 litro de H<sub>2</sub>O pH 7 para el SCC 20X). Hacer lo mismo con un papel de filtro Whatman N° 1.
- 2) Colocar en el equipo de Dot Blot, primero el papel de filtro y luego la membrana. Sacar las burbujas con una varilla de vidrio perfectamente limpia.
- 3) Cerrar el aparato. Y sembrar las muestras en cada well.
- 4) Incubar a temperatura ambiente durante 25 minutos para facilitar la absorción.
- 5) Hacer vacío para mejorar el punto anterior.
- 6) Realizar un lavado con NaOH 100 mM.
- 7) Dejar secar la membrana.
- 8) Fijar mediante luz UV durante 5 minutos.
- 9) La membrana queda lista para realizar la prehibridación.

### Generacion de la sonda

1. Calentar 5-10 minutos a 100 °C solución de 10 ul de DNA (100-150 ng)
2. Colocar rapidamente en hielo durante 5 minutos. Spin.
3. Agregar 10 ul de buffer de reacción
4. Agregar 2ul de reactivo para marcar
5. Agregar 10 ul de solución cross linker (diluida previamente, 2ul de sc crosslinker en 8 ul de agua que viene con el kit)
6. Incubar 30 minutos a 37 °C
7. La sonda puede ser utilizada inmediatamente o mantenerse durante 2 horas en hielo. Se puede conservar con un volumen de glicerol a -20 °C por 6 meses

### Prehibridación e hibridación

1. Para una membrana de aproximadamente 100 cm<sup>2</sup> preparar 6 ml de solución de hibridación (NaCl 0,5 M; blocking 4% p/v; sc de hibridación que viene con el kit). La relación es 0,125-0,25 ml de buffer/cm<sup>2</sup> de membrana
2. Las membranas se prehibridan a 50-75 °C durante un mínimo de 15 minutos
3. Se agregan 30 ul de la sonda preparada según lo anterior (5-10ng/ml) y se incuba mínimo ON.

### Revelado

1. Precalentar el buffer de lavado primario ( urea 2M; SDS 0,1%; Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH7 50 mM; NaCl 150 mM; MgCl<sub>2</sub> 1mM; reactivo de bloqueo 0,2%) a la temperatura de hibridación. Se utilizan 2-5 ml/cm<sub>2</sub> de membrana. Este buffer puede ser conservado hasta 1 semana en la heladera
2. Labvar la membrana con la solución anterior durante 10 minutos a la temperatura de hibridación con agitación suave . repetir 3 veces este paso
3. Agregar un exceso de buffer de lavado secundario ( stock 20X; tris base 1M; NaCl 2M ajustada a pH 10. Esto puede almacenarse hasta cuatro meses en heladera. En el momento de usar agregar 2ml/L de MgCl<sub>2</sub> 1M a una solución 1X). Lavar con agitación suave 10 minutos a temperatura ambiente. Repetir este paso 3 veces
4. Secar el exceso de líquido de las membranas y colocarlas sobre una superficie seca
5. Colocar sobre las membranas el reactivo de detección (CDP-Sta) a razón de 30-40 ul/cm<sup>2</sup> de membrana e incubar 2-5 minutos
6. Secar la membrana escurriendola en papel absorbente
7. Colocar la membrana en Saran Wrap dentro del film cassette
8. En oscuridad (luz roja) colocar una placa de autorradiografía sobre la membrana
9. Cerrar el film cassette y exponer durante 1 hora mínimo a temperatura ambiente
10. Remover el film
11. Incubar el film en solución de revelado 5 minutos
12. Incubar unos minutos en agua corriente
13. Incubar el film en sc de fijación
14. Secar