

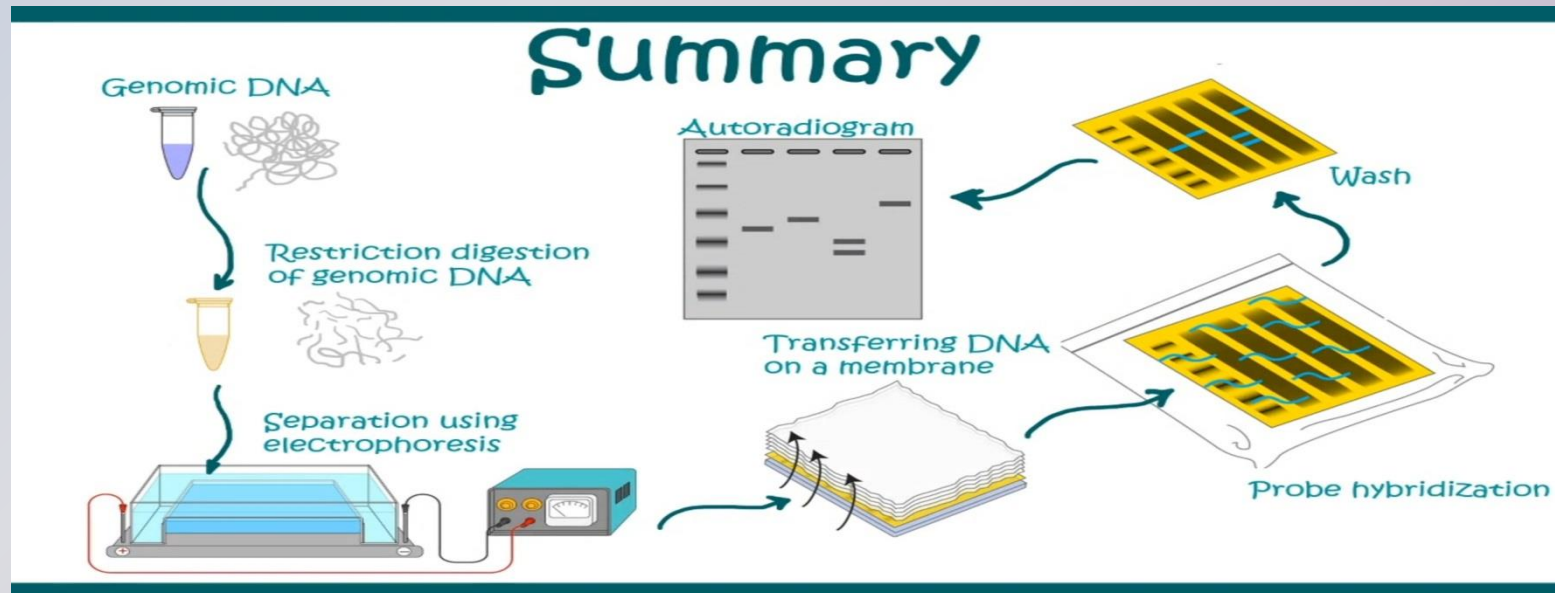


University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

عنوان

آموزش تکنیک ساترن بلات

Southern Blot

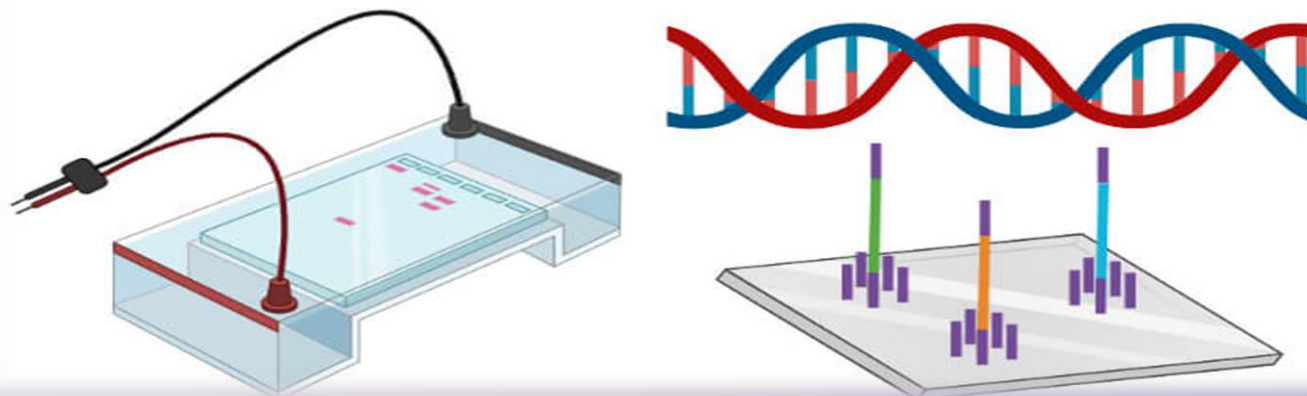


اهداف

- -آشنایی با اصول تئوری و پایه‌ای تکنیک ساترن بلات Southern blot
- -آموزش مراحل عملی شامل استخراج، برش آنزیمی، الکتروفورز، انتقال و آشکارسازی DNA
- -شناسایی توالی‌های خاص DNA با استفاده از تکنیک ساترن بلات Southern Blot
- -آشنایی با کاربردهای تحقیقاتی و بالینی این تکنیک

Southern Blot

Definition, Principle, Procedure, Results, Applications



- تکنیک ساترن بلات (Southern blot) از روش‌های کلاسیک و دقیق در زیست‌فناوری مولکولی (Molecular Biotechnology) است که برای شناسایی توالی خاص (DNA (Specific DNA Sequence در میان مخلوطی از DNA ژنومی استفاده می‌شود. این تکنیک در سال 1975 توسط ادوین ساترن (Edwin Southern) معرفی شد و تا امروز در مطالعات مولکولی، ژنتیکی و تشخیصی کاربرد گسترده‌ای دارد. تکنیک‌های بلاتینگ انواع مختلفی دارند که در این مبحث به بررسی یکی از آنها بنام ساترن بلات خواهیم پرداخت.
- در این روش، ابتدا DNA توسط آنزیم‌های محدودکننده (Restriction Enzymes) بریده می‌شود. سپس قطعات حاصل با روش الکتروفورز ژل آگارز (Agarose Gel Electrophoresis) بر اساس اندازه از هم جدا گردیده، دناتوره و خنثی‌سازی شده و به یک غشای جامد Nylon یا Nitrocellulose Membrane منتقل می‌شوند و پس از تثبیت DNA بر روی غشاء، یک پروب نشاندار (Labeled Probe) که مکمل توالی هدف است، افزوده می‌شود تا با آن هیبرید (Hybridize) شود. در پایان، با استفاده از اتورادیوگرافی (Autoradiography) یا شیمی‌لومینسانس (Chemiluminescence) محل اتصال پروب‌ها آشکار شده و وجود توالی خاص مشخص می‌گردد.

کاربردهای تکنیک ساترن بلات

- 1. تشخیص بیماری‌های ژنتیکی: (Genetic Disease Diagnosis) در برخی بیماری‌ها مانند تالاسمی یا کم‌خونی داسی‌شکل، تغییرات خاصی در توالی DNA ایجاد می‌شود. با استفاده از ساترن بلات می‌توان بررسی کرد که آیا این تغییرات جهش‌ها یا حذف‌ها در نمونه DNA بیمار وجود دارند یا خیر.
- 2. شناسایی ویروس‌های DNA دار: (Detection of DNA Viruses) اگر بدن فردی به ویروسی مانند ویروس هپاتیت B آلوده شده باشد، بخش‌هایی از DNA ویروسی ممکن است در سلول‌های او وجود داشته باشد. با این روش می‌توان آن توالی‌های ویروسی را در ژنوم سلول‌ها شناسایی کرد.
- 3. تحلیل چندشکلی‌ها یا پلی مرفیسم ژنتیکی: (RFLP Analysis) بین انسان‌ها تفاوت‌های جزئی در برخی توالی‌های DNA وجود دارد. با استفاده از ساترن بلات می‌توان این تفاوت‌ها را بررسی کرد و برای شناسایی افراد، مطالعات ژنتیکی جمعیتی یا تعیین نسبت‌های خویشاوندی استفاده نمود.
- 4. بررسی ساختار ژن‌ها: (Gene Structure Analysis) می‌توان با ساترن بلات محل قرارگیری یک توالی در ژنوم و تعداد نوکلئوتیدها آن را شناسایی کرد. این اطلاعات برای درک عملکرد ژن و بررسی جهش‌های ساختاری بسیار مفید است.

- 5. بررسی تعداد نسخه‌های یک ژن (Copy Number Variation - CNV): برخی بیماری‌ها ناشی از افزایش یا کاهش تعداد نسخه‌های یک ژن در ژنوم هستند. تکنیک ساترن بلات می‌تواند نشان دهد که آیا یک ژن خاص در تعداد بیشتر یا کمتر از حد معمول در ژنوم وجود دارد یا خیر.
- 6. مطالعات تکاملی و مقایسه‌ای (Evolutionary and Comparative Studies): دانشمندان با این روش می‌توانند ژن‌های مشابه را در گونه‌های مختلف بررسی کنند و ببینند در کدام موجودات آن ژن وجود دارد یا تغییر کرده است. این کار به درک روابط تکاملی بین موجودات زنده کمک می‌کند.



Materials and Reagents:

- Genomic DNA sample
- Restriction enzymes
- Agarose gel
- Ethidium bromide (for gel staining)
- Nitrocellulose or nylon membrane
- Denaturation solution (e.g., NaOH)
- Neutralization solution (e.g., Tris-HCl)
- DNA probe (labeled with radioactivity or fluorescence)
- Hybridization buffer
- Wash buffers
- Autoradiography film (for radioactive probes) or imaging system (for fluorescent probes)

مواد و وسایل مورد نیاز

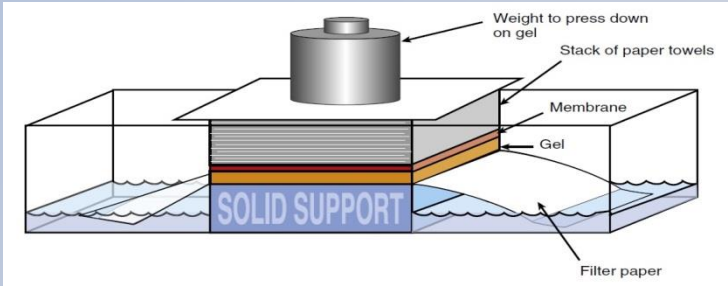
- DNA ژنومی (Genomic DNA)
- -آنزیم‌های محدودکننده (Restriction enzymes) مانند EcoRI یا HindIII
- -بافرهای آنزیمی الکتروفورز و دناتوراسیون و نوترالیزاسیون
- (Buffers: digestion, TAE/TBE, NaOH)
- -ژل آگارز (Agarose gel)
- -غشاء نایلون یا نیتروسلولز (Nylon or Nitrocellulose membrane)
- -پروب نشاندار (Labeled DNA probe)
- -سیستم بلاتینگ (Blotting setup)
- -سیستم آشکارسازی (Detection system)
- -فیلم X-ray یا سیستم فلورسانس
- - محلول‌های شست‌وشو و هیپریداسیون مانند (سالین سدیم سترات SSC) و (سدیم دودسیل سولفات SDS)
- -محلول رنگ آمیزی DNA اتیدیوم بروماید یا سیف استین

روش کار



مراحل انجام گام به گام تکنیک Southern Blotting

- 1. استخراج DNA (DNA Extraction): از نمونه‌های بیولوژیک مانند خون یا سلول‌ها ی مختلف.
- 2. هضم آنزیمی (Enzymatic digestion): برش DNA با آنزیم‌های محدودکننده مناسب .
- DNA ژنومی را با آنزیم برشگر مناسب (مثلا HINDIII یا EcoRI) در دما 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 4-6 ساعت انکوبه کنید.
- نتیجه هضم آنزیمی را روی ژل آگارز بررسی کنید تا اطمینان حاصل شود که DNA کاملاً برش خورده است.
- 3. الکتروفورز (Electrophoresis): جداسازی قطعات DNA در ژل آگارز.
- DNA هضم شده را روی ژل آگارز 1% بارگذاری کرده و در ولتاژ 80-100 ولت به مدت 1.5 تا 2 ساعت الکتروفورز را انجام دهید. ژل را زیر UV مشاهده کرده و از آن تصویر بگیرید.
- 4. دناتوراسیون (Denaturation): تبدیل DNA دورشته‌ای به تک‌ رشته‌ای با NaOH.
- ژل را به مدت 30 دقیقه در محلول NaOH 0.5 M و NaCl 1.5M قرار دهید تا DNA دناتوره شود.
- 5. خنثی‌سازی ژل (Neutralization): تنظیم pH ژل برای انتقال به غشاء.
- ژل را 30 دقیقه در بافر نوترالیزاسیون (NaCl 1.5M , Tris-HCl 1M) قرار دهید.



• 6. انتقال DNA به غشاء () (Blotting انتقال قطعات DNA به غشاء).

• غشاء نیتروسلولزی را در بافر SSC مرطوب کنید.

• انتقال DNA از ژل به غشاء را انجام دهید (12-18 ساعت).

• 7. تثبیت DNA روی غشاء () (Fixation تثبیت DNA با UV یا حرارت برای اتصال پایدار به غشاء).

• پس از انتقال، غشاء را در دمای 80 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 ساعت فیکس کنید. از گرمای خشک جهت

تثبیت DNA بر روی غشاء نیتروسلولزی و همچنین پرتو UV نیز برای تثبیت DNA بر روی غشاء استفاده می‌گردد.

8. هیبریداسیون با پروب نشاندار () (Probe hybridization افزودن پروب نشاندار مکمل توالی هدف).

غشاء را در محلول هیبریداسیون شامل (SDS و SSC) قرار داده و با پروب نشان‌دار به مدت 12-18 ساعت در 42-65 درجه سانتی‌گراد انکوبه کنید.

در این مرحله از پروب های نشاندار شده تک رشته ای جهت اتصال به قطعات DNA تک رشته ای استفاده می‌کنیم و

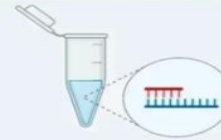
پروپ براساس رادیو اکتیویته ای که از خود نشان می‌دهد، به شناسایی کمک می‌کند.

نکته: Label دار یا نشاندار کردن فقط از طریق رادیو ایزوتوپ صورت نمی‌گیرد بلکه میتوان از مولکول های فلورسنت نیز استفاده کرد.

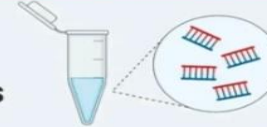
تعریف پروب (Probe): پروب یک قطعه کوتاه از اسید نوکلئیک (DNA یا RNA) است که دارای توالی مکمل با توالی هدف خاصی در نمونه مورد بررسی است. این مولکول معمولاً با یک نشانگر (مانند مواد فلورسنت، رادیواکتیو یا آنزیمی) برچسب‌گذاری شده تا پس از اتصال به توالی هدف، قابل ردیابی و شناسایی باشد.

- 9. شستشو (Washing): حذف پروب‌های غیر اختصاصی.
- غشاء را با بافر شستشو دهید تا پروب‌های غیر اختصاصی حذف شوند.
- 10. آشکارسازی (Detection): مشاهده نتایج با فیلم X-ray یا دستگاه فلورسانس.
- اگر از پروب رادیواکتیو استفاده شده، غشا را در معرض فیلم X-ray در دمای 80- درجه سانتی‌گراد قرار دهید. (چند ساعت تا یک شب) اگر از پروب فلورسانس استفاده شده، از دستگاه یو وی استفاده کنید.
- 11. تجزیه و تحلیل نتایج (Data analysis): بررسی الگوی باندها و مقایسه با مارکر مولکولی.

① Extract DNA from the sample



② Fragment DNA with restriction enzymes



③ Separate DNA by size using gel electrophoresis



④ Transfer and fix separated DNA molecules from the gel onto a nylon membrane



⑤ Probe for the DNA of interest using a nucleotide probe



⑥ Radiolabeled probes can be analyzed after they are detected using X-ray film or phosphor imaging using a laser scanner, such as the new Azure Sapphire FL Biomolecular Imager.



Azure Sapphire FL

• تفسیر نتایج

- پس از آشکارسازی، باندهایی روی غشا ظاهر می‌شوند که نشان‌دهنده توالی DNA مورد نظر هستند. بسته به تعداد و شدت وجود یا عدم وجود باندها می‌توان اطلاعات زیر را دریافت کرد:

✓ وجود یا عدم وجود توالی: اگر باندی مشاهده شود، توالی مورد نظر در نمونه وجود دارد.

✓ تعداد کپی ژن: شدت باندها نسبت به مارکر نشان‌دهنده میزان تقریبی توالی هدف بصورت نیمه‌کمی است.

✓ اندازه توالی: فاصله باندها نسبت به مارکر تعیین‌کننده اندازه قطعات است.

✓ مقایسه بین نمونه‌ها: تفاوت در تعداد یا موقعیت باندها می‌تواند بیانگر جهش‌ها یا تغییرات ساختاری در ژنوم باشد.

- تفاوت در الگوی باندی نمونه‌ها: نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی یا جهش است. مقایسه باندها در بیماران و افراد سالم میتواند به تشخیص بیماری‌های ژنتیکی کمک کند. مانند بیماری کم‌خونی داسی شکل.

عیب‌یابی و رفع عیب (Troubleshooting)

- 1. نداشتن باند:
- - علت: پروب نشاندار نشده یا هیبریداسیون ناقص بوده.
- - راه‌حل: بررسی کیفیت پروب و تکرار هیبریداسیون.
- 2. باندهای غیراختصاصی:
- - علت: دمای پایین یا شستشوی ناکافی.
- - راه‌حل: افزایش دما و شستشوی دقیق‌تر.
- 3. سیگنال ضعیف:
- - علت: کم بودن DNA یا پروب.
- - راه‌حل: افزایش مقدار DNA و زمان هیبریداسیون.

- 4. پهن شدن باندها:
- - علت: ولتاژ زیاد در الکتروفورز.
- - راه حل: کاهش ولتاژ اجرای ژل الکتروفورز.
- 5. انتقال ناقص DNA:
- - علت: دناتوراسیون ناقص یا خطای تکنیکی.
- - راه حل: بررسی محلول‌های دناتوراسیون و روش انتقال.

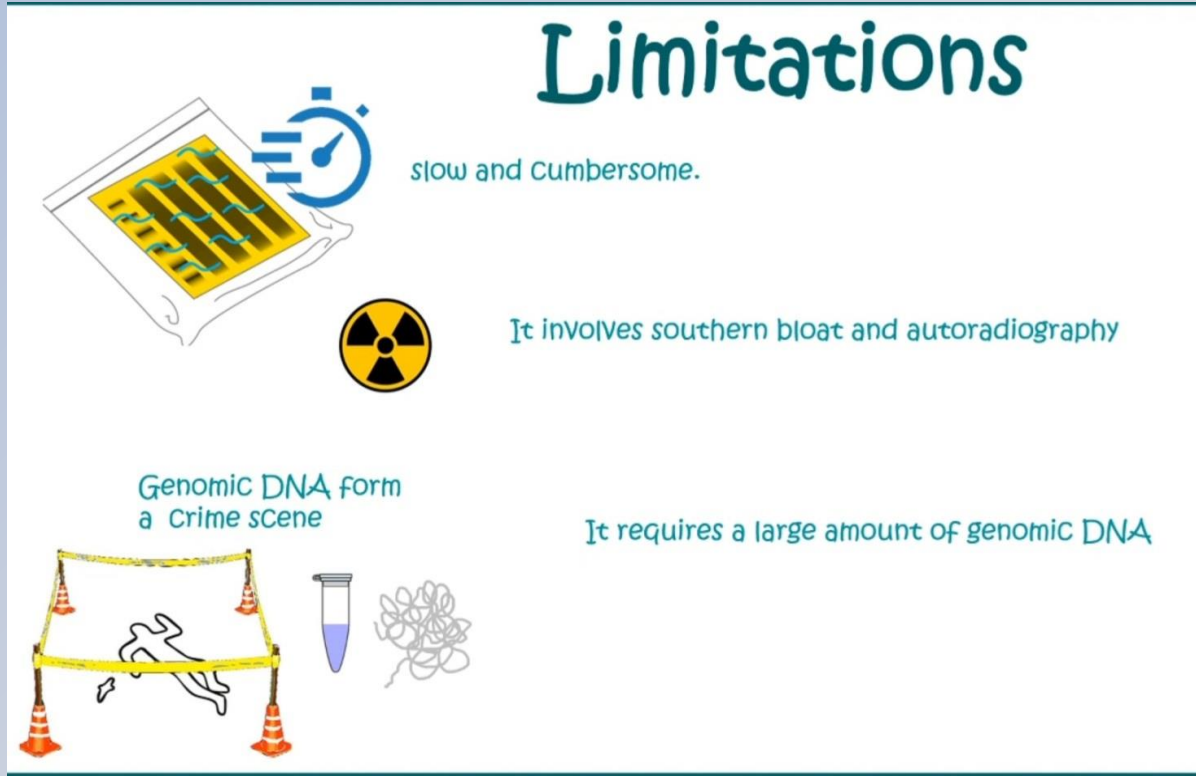
مزایا و معایب تکنیک ساترن بلات

مزایا

- تشخیص اختصاصی توالی‌های DNA
- بررسی ساختار ژن، حذف و درج
- کاربرد گسترده در پزشکی و ژنتیک قانونی

معایب

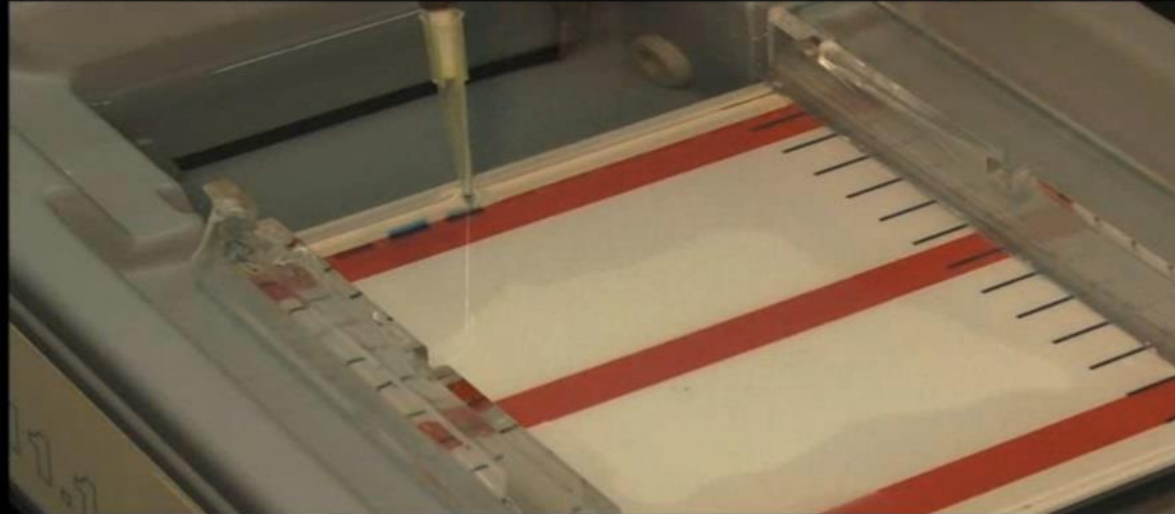
- زمان‌بر و چند مرحله‌ای
- نیاز به مقدار زیاد DNA و حساسیت کمتر نسبت به PCR
- استفاده از مواد رادیواکتیو (در صورت نیاز)
- هزینه نسبتاً بالا
- عدم توانایی تشخیص جهش‌های نقطه‌ای



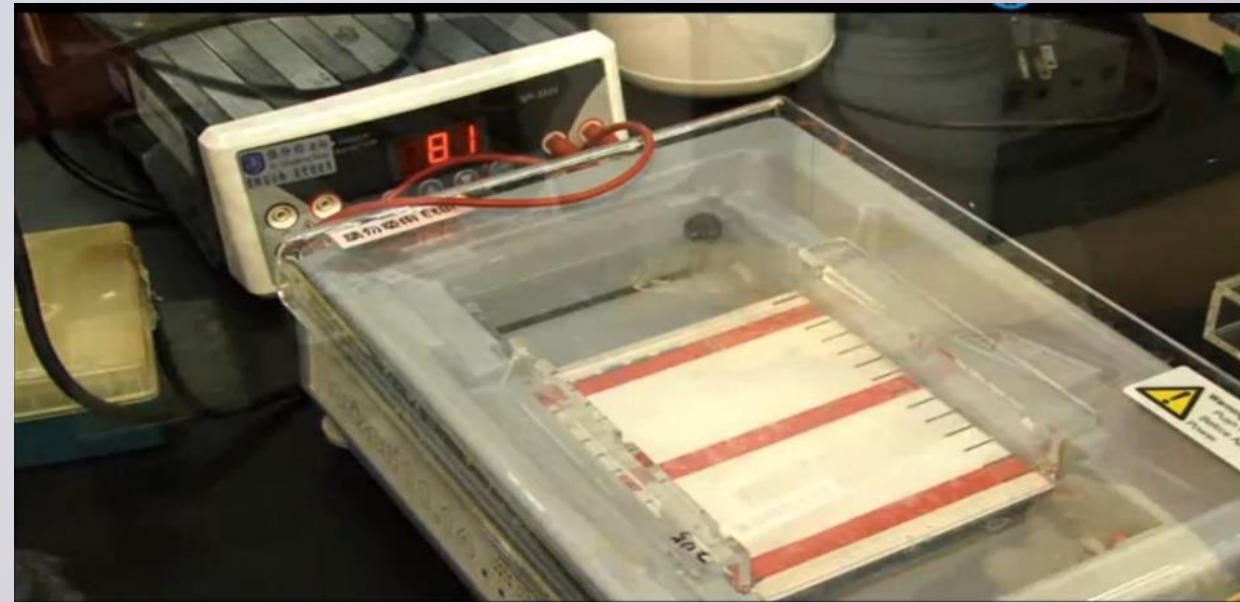
تکنیک ساترن بلات با وجود زمان‌بر بودن، همچنان یک روش دقیق برای شناسایی توالی‌های خاص DNA در مطالعات ژنتیکی، پزشکی قانونی، و تشخیص بیماری‌هاست.

با پیشرفت تکنولوژی، روش‌هایی مانند PCR، qPCR، و NGS به‌عنوان روش‌های سریع‌تر و دقیق‌تر مطرح شده‌اند، اما ساترن بلات همچنان در کاربردهای آموزشی و تحقیقاتی بنیادی جایگاه خود را حفظ کرده است.

Southern Blot



Load DNA samples (restriction enzyme treated) in 0.8% TBE gel



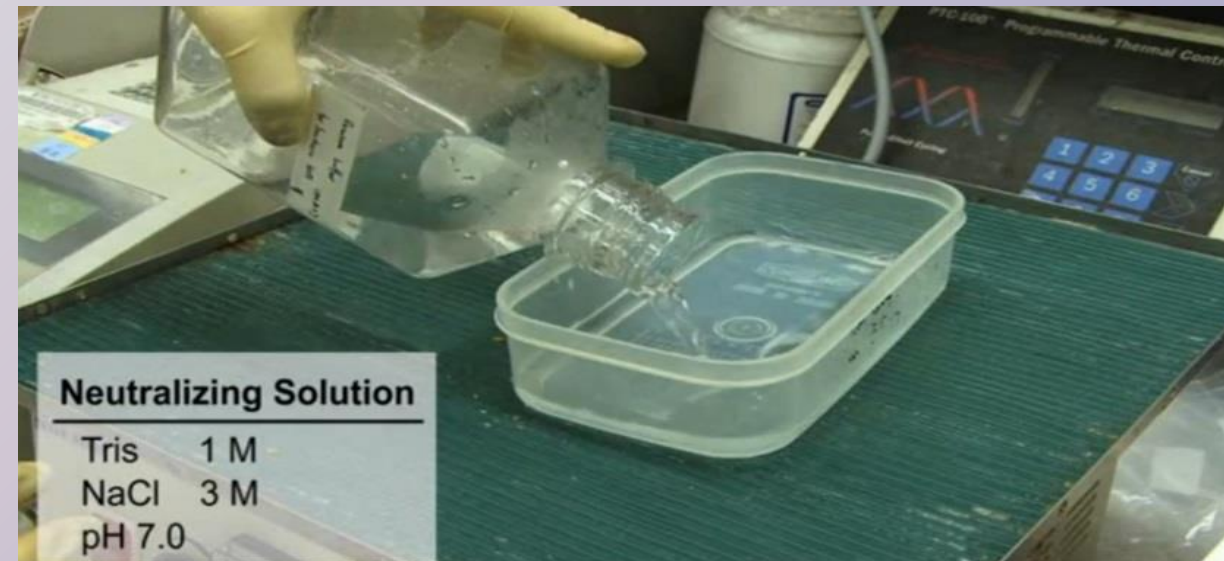
Running the gel



Denaturing Solution

NaOH	0.5 N
NaCl	1.5 M

Rock gel in Denaturing solution for 30 minutes



Neutralizing Solution

Tris	1 M
NaCl	3 M
pH	7.0

Remove denaturing buffer and rock gel in Neutralizing solution for 30 minutes

Southern Transfer



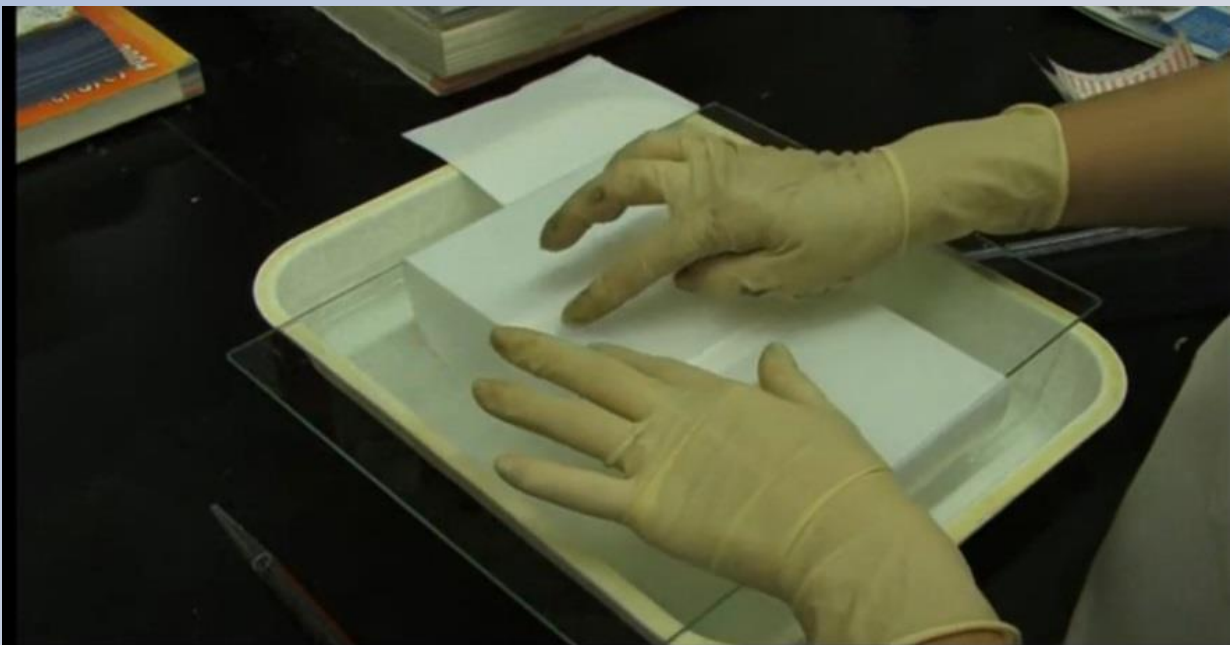
Soak filter paper in transfer buffer (10X SSC)



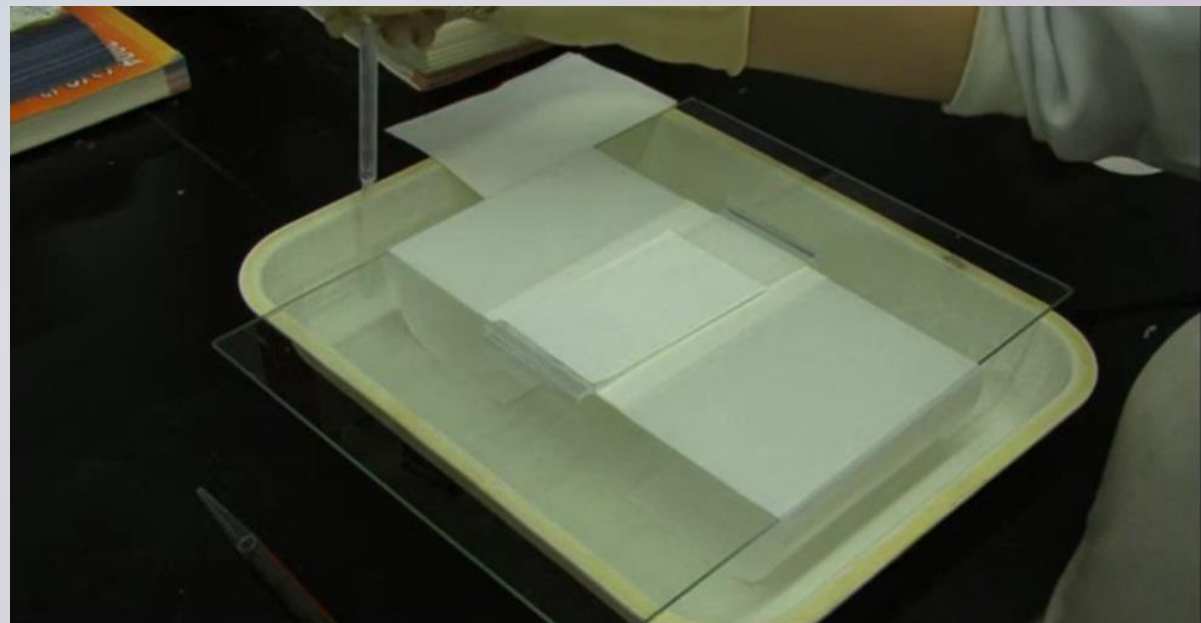
Place Whatman 3MM filter paper



Place 2 sheets of wet filter paper



Place the gel



Flood the membrane with transfer buffer



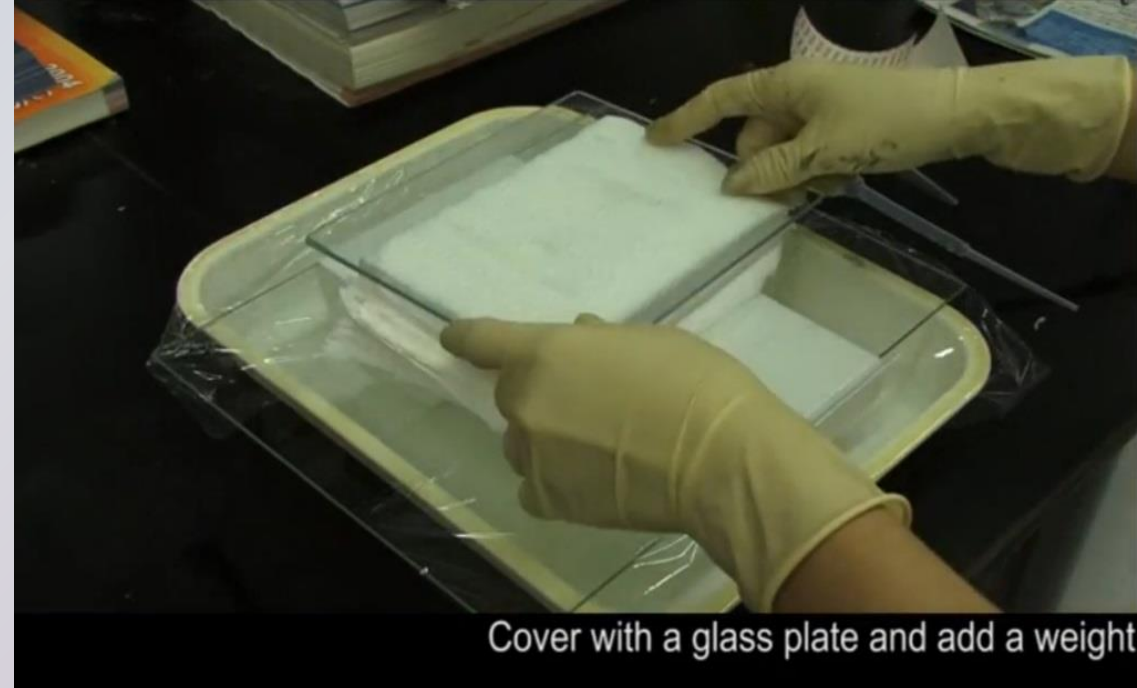
Put a nylon membrane on the gel



Cover with 2 sheets of wet Whatman 3MM filter paper



Cover with plastic wrap

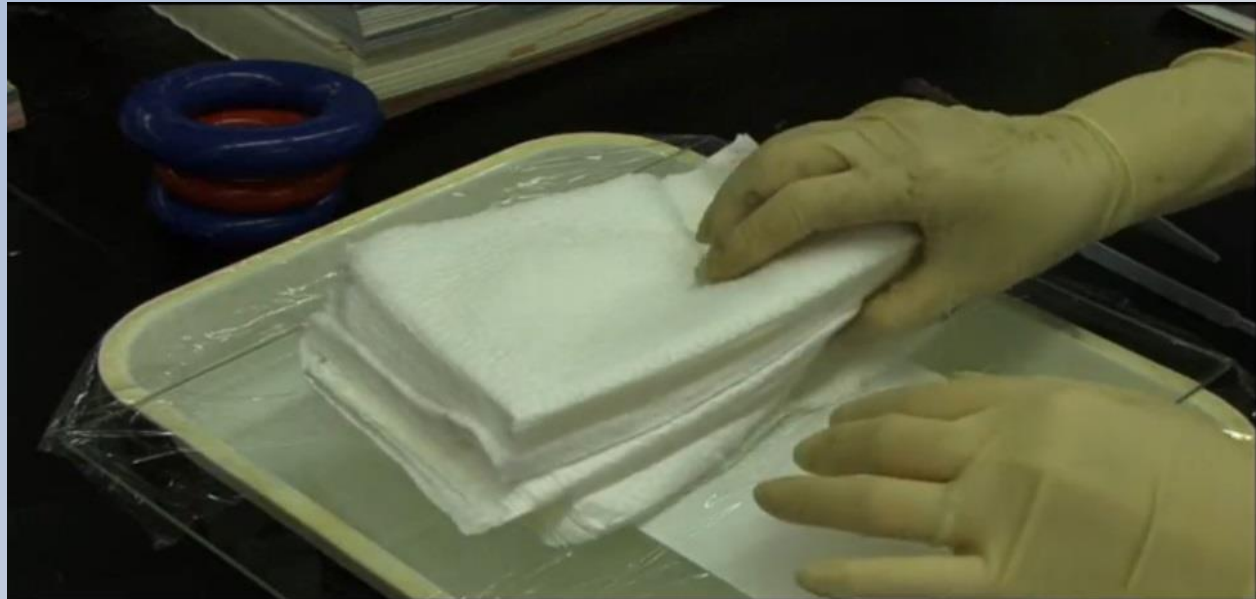


Cover with a glass plate and add a weight

Allow transfer to go overnight



Rinse nylon membrane in 6X SSC

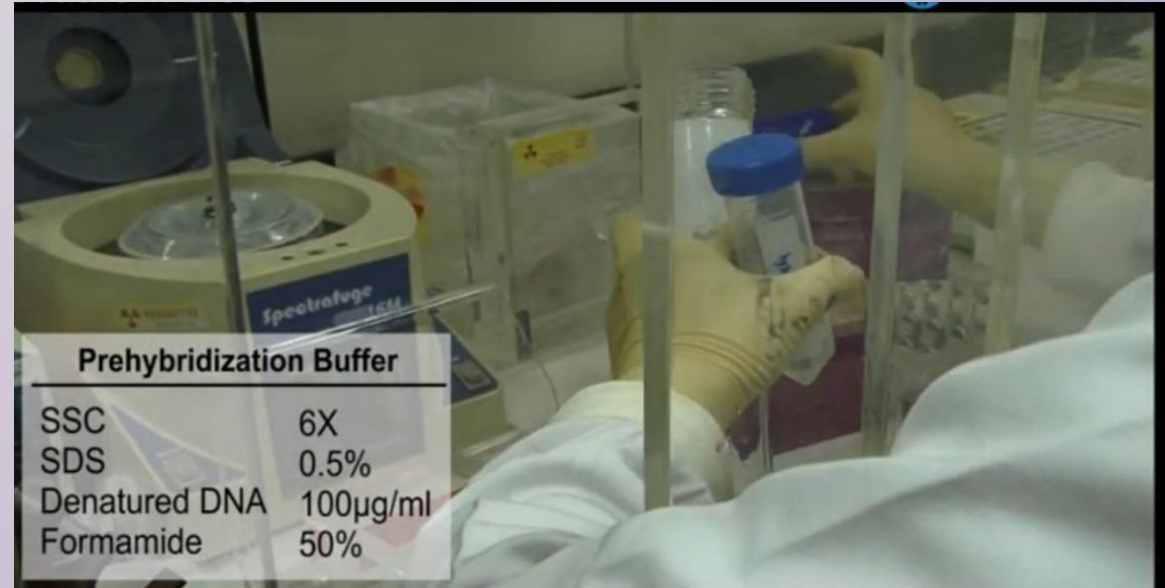


Remove paper towels and filter papers



Place membrane on a UV transilluminator to cross-link

Hybridization



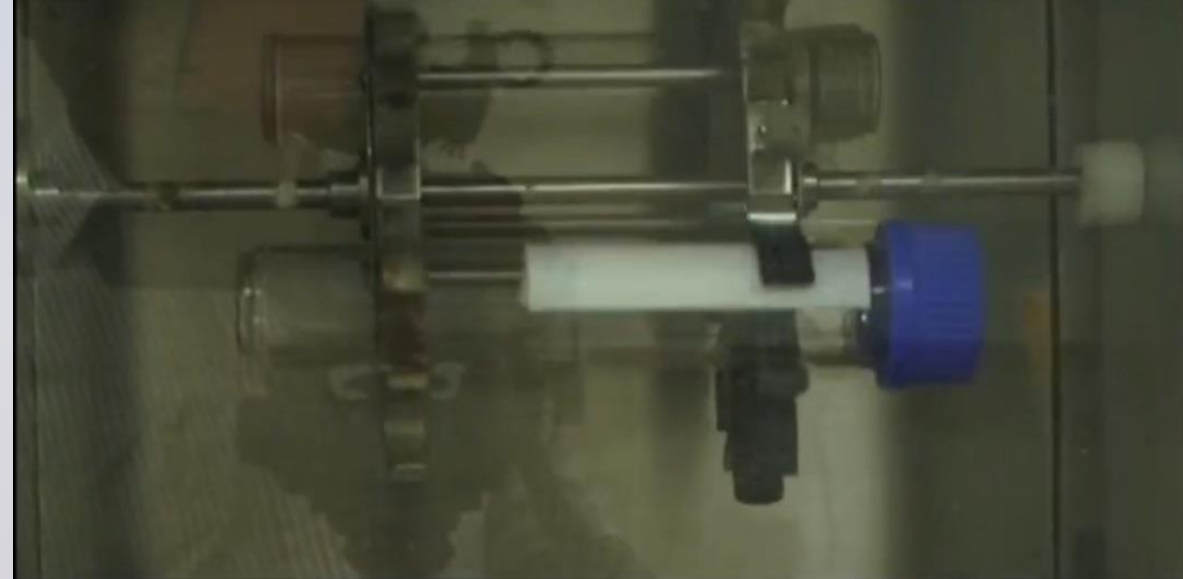
Prehybridization Buffer

SSC	6X
SDS	0.5%
Denatured DNA	100 μ g/ml
Formamide	50%

Add hybridization buffer



Add probe (isotope-labeled dCTP)



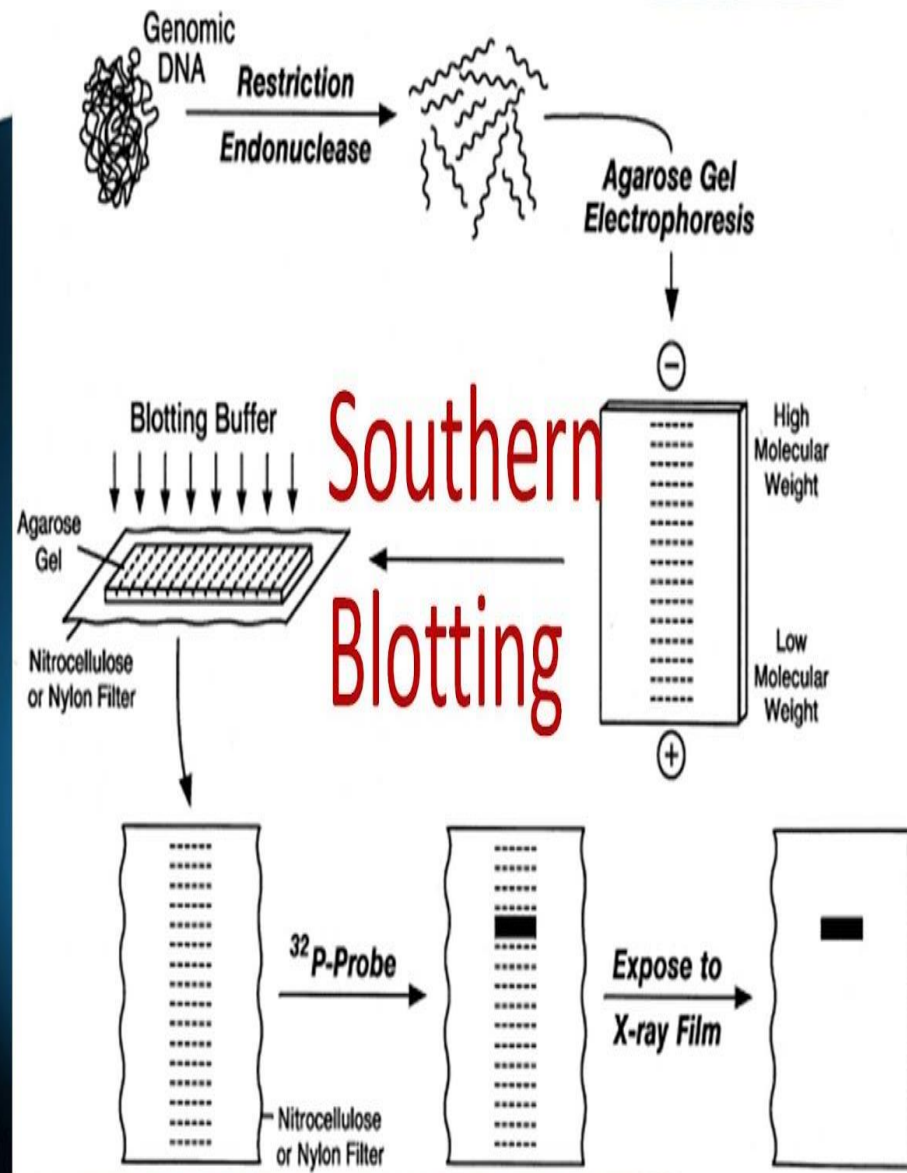
Hybridize overnight



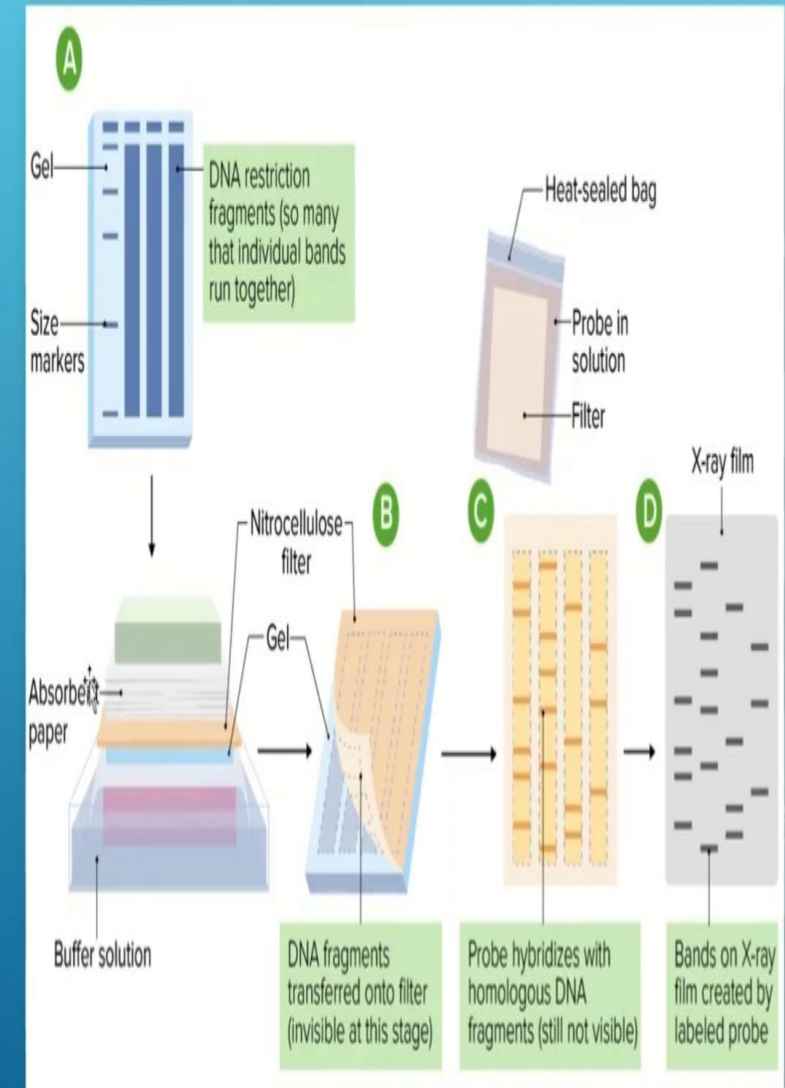
Wash the membrane by wash buffer (2x SSC, 0.1% SDS)



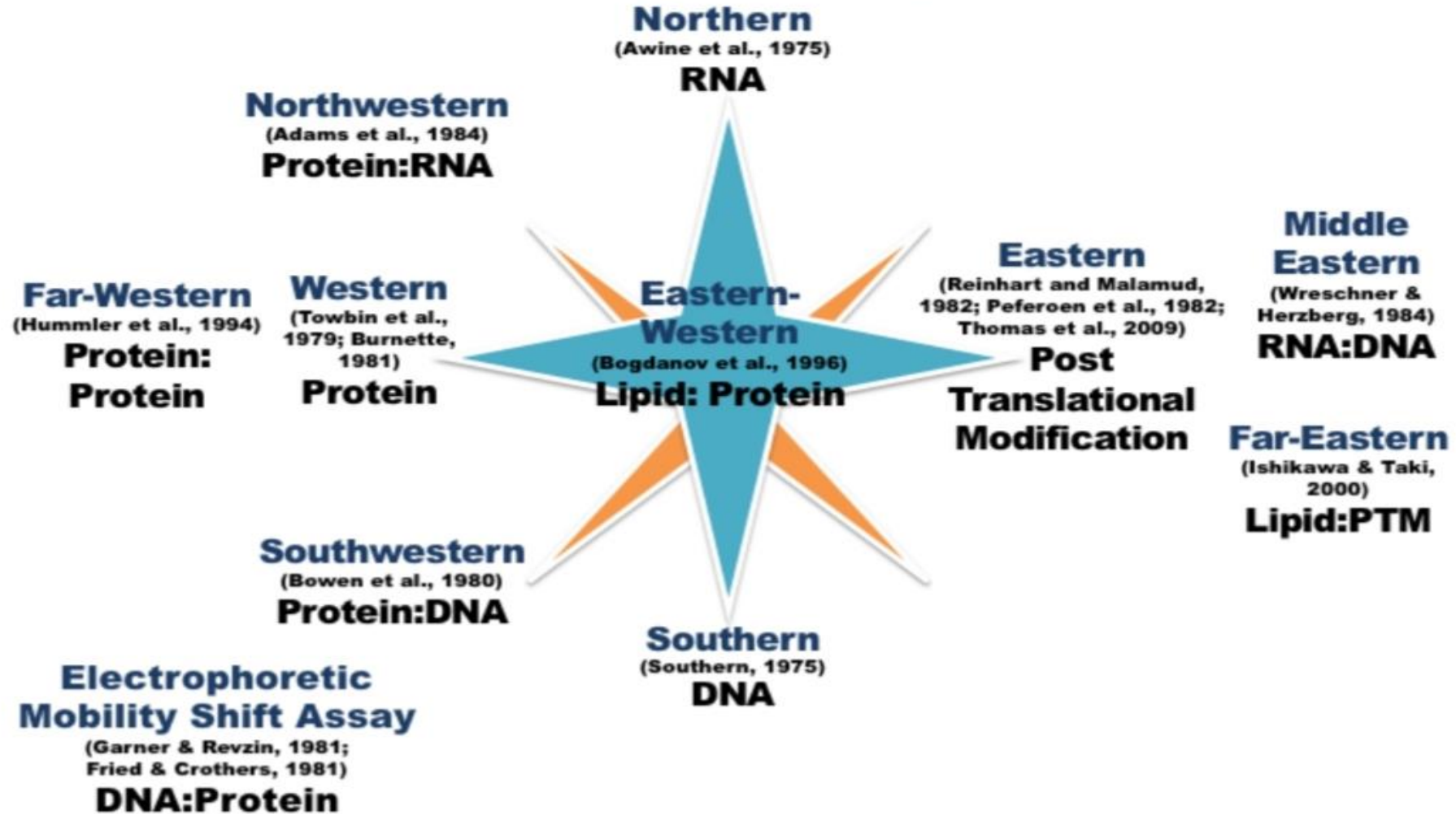
Incubate at 52°C for 30 minutes (repeat wash step for 3 times)



Southern Blotting



Blotting Compass



Parameters	Southern Blotting	Western Blotting	Northern Blotting
Target molecule	DNA	Protein	RNA
Membrane used	Nitrocellulose or Nylon membrane	Nitrocellulose or PVDF membrane	<u>diazobenzoxymethyl (DBM)</u> Or Nylon membrane
Separation Technique	Agarose or polyacrylamide gel electrophoresis	PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis)	Agarose gel electrophoresis
Probe used	A nucleic acid probe having a homologous sequence with the target molecules	Primary antibody	DNA, RNA, and oligodeoxynucleotides
Probe label used	Radiolabel enzyme	Enzyme	Radiolabel enzyme
Detection methods	Chemiluminescence, colorimetry, and X-ray film	<u>Infrared imaging</u> system, cooled CCD, or LED imaging system	Chemiluminescence, colorimetry, and X-ray film
Blotting Technique	Capillary transfer	Electroblotting	Capillary transfer
Applications	Used in forensics and study of DNA mutations	Used in identifying specific antigens or proteins from different biological samples	Used in gene expression studies and helps in disease diagnosis