

组织印迹的 Northern 杂交

1) 硝酸纤维素膜或尼龙膜上的组织印迹

1. 在塑料板上放置两层 Whatman 1 号滤纸，在滤纸上方放上一张普通纸，然后铺上一层尼龙膜。
2. 用双面刀片从植物组织如大豆的茎上切取一块切片（厚度约为 1mm）。如果组织表面是湿的，则在 Kimwipes 纸上轻轻吸干或先用蒸馏水洗涤几秒钟然后再用 Kimwipes 纸吸干。用镊子将组织切片转移到硝酸纤维素膜上，注意一旦将切片放置在膜上就不得再移动切片。在切片上放置 4 层 Kimwipes 纸，用手指轻压 15~20 秒，用镊子小心拿开纸和组织切片。组织切片经甲苯胺蓝染色后观察其解剖结果。
3. 80℃ 真空烘烤留有组织印迹的尼龙膜 2 小时或用 UV cross-linker 在紫外光下照射尼龙膜。
4. 将留有印迹的膜面向下，放入载玻片上的一滴甲苯胺蓝溶液中，对组织切片进行染色。2~3 分钟后，吸干多余的染料，用间接照明立刻照相。将载玻片翻转，透过玻璃拍摄被染色的组织切片。在切片上粘上几张纸片以免组织切片接触显微镜。

2) 用 35S-标记的 RNA 探针检测植物印迹中的 mRNA

1. 在 Seal-A-Meal™ 塑料带中倒入 30~40ml 洗涤溶液 I，65℃ 清洗留有印迹的尼龙膜 4 小时。
2. 将膜放入 20ml 杂交溶液中，68℃ 预杂交 4 小时。
3. 将膜和用 35S-标记的 RNA 放入 10ml 杂交溶液中，68℃ 杂交 20 小时。
4. 在 100ml 洗涤溶液 II 中 42℃ 清洗尼龙膜 20 分钟，换上新鲜洗涤溶液，重复清洗 2 次。
5. 用 100ml 洗涤溶液 III 在适当的温度下（60~68℃）。用手提式微型检测器监控尼龙膜上剩余的放射性。清洗完毕后，有义 RNA 探针杂交的膜不再有放射性信号，但用反义 RNA 探针杂交的尼龙膜一般具有可检测的放射性信号。该信号的强度依赖于目的 RNA 的丰度。室温下用 0.2×SSC 对尼龙膜进行简单清洗，在空气中晾干。

洗涤缓冲液III:

0.1 mol/L Tris-HCl(pH8.0)

1 mmol/L EDTA

6. 将膜暴露在 X-射线胶卷或 Kodak T-max 400 胶卷下进行放射自显影。用水平力如一小叠书使膜和胶卷保持良好的接触。一般来说, 利用 T-max 400 胶卷比 X-射线胶卷具有更高的分辨率。放射自显影的时间依赖于放射性信号的强弱, 通常从 4 小时到 4 天。

7. 在 X-射线处理器中对 X-射线胶卷显影。把 T-max400 胶卷浸入 Kodak T-max 显影液 I 中显影 1 分钟, 将底片转移到显影终止盘中 30 秒后浸入 Kodak 快速定影液中 5 分钟, 然后用蒸馏水洗涤 5 分钟。

8. 在解剖显微镜下观察组织印迹中 mRNA 的位置。用 Kodak Technical Pan Film 2415 胶卷拍摄 mRNA 的定位模式, 然后和用苯甲酸蓝染色的组织切片解剖结果比较。