

	Mode opératoire	Réf : MO_SOUTHERN Version 1 date : 04/1996
	Southern-blot Transfert Alcalin	

1. Objet et domaine d'application

2. Référent

F Cellier

3. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

4. Hygiène et sécurité

HCL



[GHS05, GHS07](#)

Hazard statements

[H290-H314-H335](#)

5. Contraintes de la méthode

6. Mode opératoire

1- Migration de l'ADN sur gel d'agarose-TAE 0.8%. Déposer entre 1-5 µg par piste. Colorer le gel au BET.

2- Dépurination: Placer le gel dans un plat "à gratin" sur un plateau agitant dans une solution d'HCl (10.4 ml HCl 37% dans 500 ml d'H₂O) pendant **10'**. Le bleu de bromophenol vire au jaune.

3- Neutralisation: Le gel est rincé dans de l'eau mq **2 x 10'**.

4- Transfert: Placer le gel sur le dispositif de transfert. Les puits sont tournés vers le bas du dispositif. Le tampon de transfert est de la soude 0.4N. La membrane de nylon chargé (ICN Biotrans chargé + ou Hybond N+) est placée sèche sur le gel en une seule fois. Le papier whatmann est pré mouillé dans de l'eau mq. Transférer 24 h.

5- Neutralisation: **Placer la membrane dans un plat "à gratin" sur un plateau agitant dans une solution de 2xSSC 2 x 15'.** "Gratter" la membrane dans du 2xSSC avec des gants bien rincés à l'eau déminéralisée. Rincer une dernière fois la membrane dans du 2xSSC. Séchage de la membrane à l'air (pas de fixation aux UV).

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	F Cellier		C Tournaire

	Mode opératoire	Réf : MO_SOUTHERN Version 1 date : 04/1996
	Southern-blot Transfert Alcalin	

Préhybridation:

- Mettre le tampon d'hybridation dans l'étuve d'hybridation à 42°C.
- Placer la membrane sèche dans tube d'hybridation. Attention que les membranes ne se chevauchent pas.
- Dénaturer l'ADN de sperme de saumon soniqué (SSS) dans un tube vissé 5' à 100°C, puis le placer rapidement dans la glace fondante. Mettre 100µg d'ADN SSS/ml de tampon d'hybridation. Mélanger l'ADN au tampon de préhybridation.
- Verser le tampon de pré-hybridation dans le tube. Compter environ 15 à 20ml de tampon d'hybridation pour un grand tube. Préhybrider une nuit à 42°C dans l'étuve d'hybridation.

Hybridation:

- Dénaturer la sonde radioactive 5' 100°C dans un tube de 1.5 ml vissé; transférer rapidement le tube dans la glace fondante. Ajouter la sonde radioactive dénaturée et mélanger. Il est recommandé de mettre 1 à 3 10⁶ cpm/ 5ml de tampon d'hybridation. Hybrider 16 à 48h à 42°C dans l'étuve d'hybridation.

Lavages:

- Vider le tube dans la poubelle radioactive « déchets liquides ³²P ». Attention au gouttes qui coulent le long du tube. Essuyer avec un sopalin.
- Faire les lavages dans le tube, dans l'étuve d'hybridation :
Rincer la membrane à 42°C 2x15 min dans SSCx2, 0.1%SDS
Rincer la membrane à 42°C 2x15 min dans SSCx0,1, 0.1%SDS

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	F Cellier		C Tournaire

	Mode opératoire	Réf : MO_SOUTHERN Version 1 date : 04/1996
	Southern-blot Transfert Alcalin	