

DIG or FITC 標識-RNA probe の合成

プローブ合成用テンプレートの調製

1. プラスミドをテンプレートに使う場合

プラスミドの制限酵素消化

- 1) センス配列下流側のマルチクローニングサイトから、コード領域を切断しない制限酵素を選ぶ
↓
- 2) 10 ug 程度のプラスミドを制限酵素消化
↓
- 3) Phenol/chloroform 処理
↓
- 4) エタ沈
↓
- 5) 1ug DNA/ul TE に可溶化

2. プラスミドから PCR 増幅して、PCR 産物をテンプレートに使う場合

- 1) M13Fw+M13Rev primers, or SP6+T7 primers でインサートを増幅 (100ul PCR)
↓
- 2) PCR Purification Kit で精製
↓
- 3) DNA 量を定量 (普通、数 ug が合成される)
↓
- 4) 200ng/ul (1/10 TE) に溶解

Probe 合成

1) 次の反応液を混合

DDW	12 ul
10×transcription buffer	2 ul
DIG or FITC-NTP labeling mix	2 ul
RNase inhibitor (20 U)	1 ul
(T7, T3, SP6) RNA polymerase (20 U)	2 ul
<u>DNA template (vector=1ug/ul, PCR product=200ng/ul)</u>	<u>1 ul</u>
Total	20 ul

↓

2) 37C, 2h

加温開始 45min で 0.5ul を電気泳動し、合成量を確認

不十分な場合、RNA polymerase を追加

↓

3) DNase I (20 U) 2 ul

RNase inhibitor 1 ul

を加え、37C, 15min

↓

4) 0.2M EDTA 2ul を加える

0.5ul を電気泳動し、DNA 消化と RNA のバンドを確認

↓

5) エタ沈

glycogen 1 ul

3M NaAc 3 ul

EtOH 75 ul

-80C 30min or -20C 2h

↓

6) 15,000rpm, 10min

↓

7) 70% EtOH/DEPC DW, 500ul で洗浄

↓

8) 5 min, 風乾

↓

9) DEPC H₂O 23ul

RNase inhibitor 2ul

に RNA を溶解

75ul HB4 buffer を加え、80C 5min、激しく攪拌、氷冷

↓

10) -80C 保存