

# Genomic Southern Blot

## 準備

### 反応液類

- 脱プリン化溶液：250 mM HCl
- 変性溶液：1.5M NaCl, 0.5M NaOH
- 中和溶液：0.5M Tris-HCl (pH 7.5), 1.5M NaCl
- 10xSSC
- 5 xSSC
- 0.4M NaOH
- 低ストレンジエンシーバッファ：0.1% SDS, 2xSSC
- 高ストレンジエンシーバッファ：0.1% SDS, 0.5xSSC
- 10x マレイン酸バッファ：1.0M マレイン酸, 1.5M NaCl, pH7.5。NaOH 顆粒で調整する。
- 洗浄バッファ：1x マレイン酸バッファ + 0.3% Tween
- ブロッキング溶液：10x ブロッキング液をマレイン酸バッファで 10 倍に希釈
- DIG-抗体溶液：AP labeled anti-DIG の元チューブを遠心する。必要量を取って、ブロッキング液で 10,000 倍に希釈する (1 ul/10 ml)。
- 検出バッファ：0.1M Tris, 0.1M NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub> pH9.5

### プローブ

- DIG-DNA labeling mix で PCR 増幅 (50 ul 系)。アニーリング温度を通常より、5 C 下げる。

- 電気泳動で合成を確認する。
- PCR purification kit で精製する(100 ul で溶出)。

\*\*\*\*\*

### 制限酵素の選択

1. ゲノム DNA(1 ug)を 6 塩基認識制限酵素(EcoR1, Vho1, BamH1, Kpn1, Sac1)で 37 C、1 時間消化し、電気泳動(0.6% agarose)で消化程度を比較する。

↓

2. 未消化ゲノムバンドを残さない制限酵素を 3 種類選び、以降の実験に用いる。

### 制限酵素消化

1. 1 レーンあたり 3-5 ug のゲノム DNA が必要。プローブの数から必要なゲノム DNA を計算する。37 C、1 夜、制限酵素消化。少量泳動し、消化を確認する。

↓

2. エタ沈後、0.5 ug DNA/1 ul TE に溶解する

### 電気泳動

1. 泳動槽は、Atto AE-6111 を用いる。ゲル枠とコームを組み立てる。この時、コームの先端が底についていないことを確認する。隙間がわずかなら、スペーサーをかます。

↓

2. 1.5g agarose を 150ml TAE buffer (1.0% agarose となる) に加え、オートクレーブで完全に溶解する。約 60 C に冷めたら、ゲルを流し込む (エチブロは加えない)。十分かたまるまで、冷やす。

↓

3. サンプル (1 レーンあたり 3-5 ug DNA) に泳動バッファを 1/2 量加え、ウェルに添加する。サンプルレーンを挟むように、1 kb マーカー (5ul)、および標的遺伝子インサートの入ったプラスミド (1 ng) あるいは PCR 産物をポジコンとしてウェルに添加する。100V で泳動する。

↓

4. エチブロ (0.5 ug/ml DW) で 20 分、シェイクしながら染色。蒸留水で洗い、10 分 2 回。ゲルの写真を撮影する。

### ゲルの後処理

1. 250 mM HCl で、室温 10 分間 (正確に) シェイク。BPB の青色が黄色になればよい。蒸留水で洗い、10 分 1 回。

↓

2. 変性剤でシェイク、30 分、1 回。中和溶液でシェイク、15 分、2 回。

↓

3. ゲルを 10xSSC に 10 分間置いて、平衡化する。

## ブロットィング

1. トレイに 10xSSC を入、ブリッジをセットする。ブリッジ上に、下から次の順に積んでいく。10xSSC をしみこませた whatman 3MM 濾紙 3 枚、両端がトレイのバッファに漬かるようにセットする。

↓

2. ウェルが下を向くようにゲルを乗せる。気泡を完全に除く。ゲルが乗っていない濾紙部分をパラフィルムで被う。

↓

3. ポジティブチャージ膜をゲルと同じサイズに切って、乾いた状態で乗せる。気泡を除く。

↓

4. whatman 3MM 濾紙 3 枚をゲルと同じサイズに切って、乾いた状態で乗せる。気泡を除く。キムタオルを 20 枚程度乗せる。

↓

5. ガラス板を置き、200-500 g の重りを乗せる。ひっくり返らないように注意。一夜、放置する。途中で上のキムワイプまで完全に濡れるようだと、トランスファーが不十分になるので、1-2 時間後に様子を見て、十分量のキムタオル乗せる。

## ブロットィング後の後処理

1. ポジティブチャージ膜上のキムタオルと濾紙を取り去る。ゲルと膜が付着した状態のまま、ひっくり返し、ゲルの端とウェルの位置をボールペンで印を付ける。ゲルを取って、

UV 照射で DNA がぬけたことを確認する。

↓

2. 0.4M NaOH を染み込ませた 3 枚の whatman 3MM 濾紙の上に、ブロッキング面を上にしてポジティブチャージ膜を乗せる。5 分間静置。

↓

3. 2xSSC を染み込ませた whatman 3MM 濾紙に乗せて、中和。膜がしめった状態のまま、UV クロスリンクを行う。

### プレハイブリ

1. ブロットした膜をハイブリバッグに入れる。膜から 1cm 外側の位置で熱シールする。

↓

2. DIG Easy Hyb 溶液をハイブリバッグに入れる。必要な液量は、100 cm<sup>2</sup>あたり 10 ml で計算する。ハイブリオーブンでシェイクしながら、42 C、30 分以上プレハイブリを行う。

### ハイブリ

1. ハイブリに必要な DIG Easy Hyb 溶液量は、100 cm<sup>2</sup>あたり 3.5 ml で計算する。プローブの量については、DIG-PCR probe の場合、DIG Easy Hyb 溶液 1.0 ml に 2 ul のプローブを使う。

↓

2. プローブを沸騰水中で 5 分加温して熱変性し、即座に氷冷する。

↓

3. あらかじめ加温しておいた DIG Easy Hyb 溶液に熱変性したプローブを加える。ハイブリバッグの角を切り、プレハイブリ液を捨て、ハイブリ液を加える。切り口を熱シールして、42 C、一晩ハイブリ。

### ハイブリ後の洗浄

1. ハイブリバッグを切り、ハイブリ液を捨て、即座に、膜を 200 ml の低ストレンジエンシーバッファに移す。室温で 5 分、シェーク。

↓

2. 新しい低ストレンジエンシーバッファに交換し、室温で 5 分、シェーク。この間に、高ストレンジエンシーバッファを 65 C に加温しておく。

↓

3. 低ストレンジエンシーバッファを捨て、加温しておいた高ストレンジエンシーバッファに交換する。15 分、2 回、65 C でシェーク。

### DIG 抗体反応

1. 洗浄バッファに膜を移し、室温で 2 分シェーク。

↓

3. ブロッキング液に交換し、室温で 30 分シェーク。

↓

4. 抗体溶液に交換し、室温で 30 分シェーク。

↓

5. 洗浄バッファに交換し、室温で 15 分、2 回シェーク。

↓

6. 検出バッファで 3 分、平衡化。

### 蛍光発光と現像

1. 膜をハイブリバッグに入れ、熱シール。

↓

2. CDPstar を検出バッファで 100 倍希釈。100 cm<sup>2</sup>あたり 1ml を用意する。ハイブリバッグの角を切り、基質を入れ、切り口を熱シール。基質を膜全面に広げる。15 分、室温に放置。

↓

3. ハイブリバッグの角を切り、基質溶液を押し出す。熱シール。

↓

4. 暗室で、X-線フィルムをカセットにセットする。ハイブリバッグに入った状態のまま、膜をハイブリ面が当たるようにフィルムに乗せる。カセットのフタをする。37C で 1 時間加温。

↓

5. 現像、定着。



6. 露光の程度をみて、過不足があれば、再露光する。