

# Northern Blot

## 反応液類

- 10 x MOPS, pH7.0

200mM MOPS, 50mM sodium acetate, 20mM EDTA

NaOH で、pH7.0 に調整。オートクレーブ

- 泳動バッファ：1 x MOPS

- ローディングバッファ：サンプルと混合する直前に調製する

250ul フォルムアミド

83ul フォルムアルデヒド

50ul 10 x MOPS

50ul グリセロール

10ul 2.5% ブロモフェノールブルー

57ul DEPC-DW

- 0.25-0.5ug/ml エチブロ

- 10xSSC

- 5 xSSC
- 低ストレンジェンシーバッファ：0.1% SDS, 2xSSC
- 高ストレンジェンシーバッファ：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

\*\*\*\*\*

## ゲルの作製

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。  
サンプル量が多いので、厚い方のコームを使う。

↓

2. 3g アガロースを 141.9ml の 1 x MOPS (最終 2% アガロース)に加え、オートクレーブ

↓

3. 60Cに冷めたら、8.1ml フォルムアルデヒドを加え、よく混和し、ゲルプレートに流す。十分に硬化する。

### 電気泳動

1. レーンあたり 1ug Total RNA を準備する  
↓
2. RNA/ローディングバッファ混合液を調製し、65 C、10 分間熱変性し、氷上で急冷  
↓
3. 泳動槽に 1 x MOPS を入れ、サンプルをロードする  
↓
4. 100V で、泳動。BPB が 2/3 移動したら終了  
↓
5. エチブロで、20 分染色。  
↓
6. リボゾーム RNA のバンドを確認し、ゲルを撮影。ビニール袋を乗せて、ゲルの形とウェルの位置、18S, 28S リボゾームのバンドの位置をマジックでビニール上に記す

### ブロッティング

**以下の操作は、手袋を着用し、メンブレンはピンセットで持つように**

1. ゲルを 10xSSC で、15 分、2 回洗浄

↓

2. 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。

↓

3. 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。

↓

4. 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。

↓

5. 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。

↓

7. 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を乗せる。

↓

8. 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。

### UV クロスリンク

1. メンブレンを 2xSSC を染み込ませた whatman 3MM 濾紙に乗せる

↓

2. 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。ハイブリオープンでシェイクしながら、68C、30 分以上プレハイブリを行う。

### ハイブリ

1. プローブには、ish用の DIG-RNA プローブを利用する。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。DIG Easy Hyb 溶液 1.0 ml に 5 ul のプローブを使う。チューブ中でプローブを混ぜ、68 C に加温しておく。

↓

2. 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、68 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 の低ストレンジェ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ェンシーバッファに交換し、室温で 5 分、シェーク。この間に、高ストレンジェンシーバッファを 68 C に加温しておく。

↓

3. 低ストレンジェンシーバッファを捨て、加温しておいた高ストレンジェンシーバッファに交換する。68 C で 15 分、2 回シェーク。

### 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。

↓

1. ブロッキング液に交換し、室温で 30 分シェーク。

↓

2. 抗体溶液に交換し、室温で 30 分シェーク。

↓

3. 洗浄バッファに交換し、室温で 15 分、2 回シェーク。

↓

4. 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。