

● in situハイブリダイゼーション用DIGプローブの合成

● 注意

- RNaseのコンタミに注意
 - チップ、エッペンドルフチューブなどはオートクレーブ滅菌したてのものを使う
マイクロピペットもときどき滅菌
 - 新しい手袋を装着
 - 作業場所を掃除する
 - 手早く操作
 - 操作中はエアコンを切る
- RNAの泳動
 - 反応の確認だけなので、以下の点に注意すれば十分
 - 泳動槽、ゲルトレーなどは、洗剤で洗う
 - 滅菌したバッファ、新鮮なゲルを使う
 - RNase-freeのloading bufferを使う
 - ゲルにロードするときに、サンプルが周りのバッファとなるべく混じらないようにする
 - 泳動時間を30分間で切り上げ、すぐに撮影する

● 材料

- DNase-RNase-free water
Wizardキット付属のを利用できる
- Promega Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification Kit
他社のキットに比べRNaseの混入が少ない。Sigma GenElutePlasmid Miniprep KitはRNaseの混入が多く不適。ゲル精製やWizard Clean-up Systemでは除ききれない
- インサートの5'側で切るための制限酵素
5'オーバーハングが望ましい
- Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System
カラムは小袋に分け密封。キット開封後は室温保存。冷蔵保存では湿気て変質すること
も。収量が低下してきたら新品に交換
- Ambion SP6/T7/T3 RNA Polymerase-Plus
SP6/T7/T3のうちインサートの3'側から転写するものを選択。"Plus"はRNase阻害剤入。
分注しておく
- Promega RNasin Plus
なくてもよい
- Roche DIG RNA Labeling Mix
10x
- Promega RQ1 DNase
分注しておく
- 7.5 M ammonium acetate
オートクレーブ
- 99.5% ethanol
- 75% ethanol
滅菌水で希釈

● 材料について

● 方法

● テンプレートの準備

- 大腸菌からプラスミドを用時精製
新鮮なほうがよい

● インサートの間近の5'側を制限酵素で切断

- 反応 50 μ l
 - 39 μ l DNA
 - 5 μ l 10x buffer
 - 5 μ l 10x BSA
 - 1 μ l enzyme

- 37°C、2時間

- 1 μ lを泳動し、切断を確認

● DNAの精製

バンドが1本ならゲル精製は不要

● Wizardで精製

- 50 μ l Membrane bind solutionを加え混和

- Wizardで説明書通り精製

- 15~50 μ lの純水で抽出

DNAの収量により水の量を加減する。1 μ g/ μ l前後に調整できると結果がよい

- 0.5~1 μ lを泳動し、濃度判定

● DNAのフェノール抽出は不要

フェノール抽出を繰り返すとボーテックスによりDNAが痛むことがある

● RNAの合成

- 反応 20 μ l

DNAと spermidineとの共沈を避けるため室温で混和する

- 純水

- 1~2 μ g DNA

- 2 μ l DIG RNA Labeling Mix

- 1 μ l RNasin

なくてもよい

- 2 μ l RNA polymerase

- 2 μ l 10x buffer

融解後 spermidineが析出しているので、よく溶かしてから使用。spermidineがDNAと共沈することがあるので、最後に加え、すぐ攪拌

- 37°Cで2時間

温水槽ではチューブのフタに水が凝結して反応液の濃度が変わってしまうので、エアインキュベータを使う

- 1 μ lを泳動し反応を確認

反応は続行

- 2 μ l RQ1 DNaseを加え、37°Cで15分間

DNAがだいたいなくなれば十分

- 1 μ l Stop solution
- RNA精製
 - 余剰なDIG-NTPがあるとバックグラウンドが上がるので、それを除く
- 次を加え、-40~-20°C、一晩
 - 1 μ l 20mg/ml glycogen
 - 0.5 vol 7.5M NH₄Ac
 - NaCl、LiClでは収率が下がる
 - 2.5 vol EtOH
- 30分間遠心、上澄みを捨てる
 - アスピレータにマイクロピペットチップをつけて吸い取る
- 100 μ l 70% EtOHを加えてポーテックス、10分間遠心、上澄みを捨てる。繰り返し
- フタを開けたままフویلをかぶせて、30分間ほど風乾
 - エアコンを切る
- 20 μ lの純水で溶かす
- 1 μ lを泳動し、生成物を確認
 - 待つ間は-20°Cに置く
- HYBを加えて、500~1000 μ lにする
- -40~-20°Cで保存
 - 半年は使える
- DIG-RNAにフェノール抽出をしてはいけない
 - 有機層にRNAがいく

● 05/04/03 21:09:06