

# ● 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  $\mu$ l
  - 39  $\mu$ l DNA
  - 5  $\mu$ l 10x buffer
  - 5  $\mu$ l 10x BSA
  - 1  $\mu$ l enzyme

- 37°C、2時間

- 1  $\mu$ 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  $\mu$ l Membrane bind solutionを加え混和

- Wizardで説明書通り精製

- 15~50  $\mu$ lの純水で抽出

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

- 0.5~1  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ g DNA

- 2  $\mu$ l DIG RNA Labeling Mix

- 1  $\mu$ l RNasin

なくてもよい

- 2  $\mu$ l RNA polymerase

- 2  $\mu$ 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  $\mu$ lを泳動し反応を確認

反応は続行

- 2  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l 20mg/ml glycogen
  - 0.5 vol 7.5M NH<sub>4</sub>Ac
    - 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  $\mu$ 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ォイルをかぶせて、30分間ほど風乾
  - エアコンを切る
- 20  $\mu$ lの純水で溶かす
- 1  $\mu$ 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  $\mu$ 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