

Southern blotting

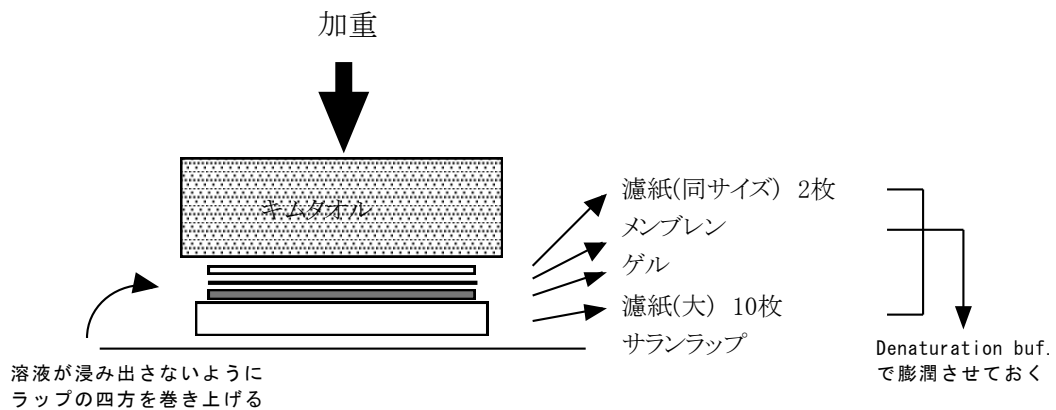
Sakurai (2002.6.6)

● DNA の用意 (酵母 total DNA)

- 10ml の YES ヘコロニーを植菌し、33°Cで培養 (20-24h)。
- 集菌した菌を 1ml の YES で懸濁。1.5ml のエッペンチューブへ移す。
- 遠心後、上清を除く。
- 以下、Takara Gen とるくん™ (酵母用) code No.9084 のキットを用いて DNA の回収をする。
- Sol1 を 540 μ l 加え vortex し完全溶解する。
- Sol2 を 60 μ l 加え vortex。
- 70°C 10 分。
- Sol3 を 300 μ l 加え穏やかに inversion。
- On ice で 2 分後、さらに inversion。
- 4°C、12000rpm、5 分。
- 上清にイソプロパノール 600 μ l 加え vortex。
- 4°C、12000rpm、5 分。
- 70% EtOH で洗浄、遠心。
- ペレットを乾燥後、50ul TE (in 1/100-1/50 RNaseA) に溶解。
- 37°C で 1 時間程度 RNase 処理をする。
うち 1 μ l くらいで泳動チェック
- 必要量 (2-10 μ g)* の total DNA を適当な制限酵素で酵素処理をする。Overnight。* 通常、25-50 μ l の DNA を用いる。
- 翌朝、切れ残りが無いよう、さらに酵素を加え処理。3 時間程度。
- EtOH 沈殿。
- ペレットを TE 10 μ l 程度に溶解。

● blotting (ここでは alkali transfer/capillary blotting を記す)

- 0.8% アガロース TBE ゲルでサンプルを泳動。
一番大きなゲルの場合、120ml ゲル
- 泳動終了後、定規と一緒に写真を撮っておく。
- ゲルをトリミングし、大きさを測っておく。
- ゲルをトレイに移し、Denaturation solution で 10 分間振とう。
この間に濾紙とメンブレンの用意
(濾紙はゲルより 1cm ずつ大きめのもの 10 枚。同サイズ 2 枚。
Whatman No.1 を使用)
(メンブレンはゲルと同サイズ。APB 社の Hybond-N+ を使用)
- transfer のセッティング。



- 5-10 分後、下から数枚のキムタオル (浸みてるもの) を除く。

- ・キムタオルを補充し、overnight で transfer。
15 分おきくらいにキムタオルの交換を行えば、数時間で完了する

● hybridization & wash

- ・メンブレンにコーム穴の位置を鉛筆で印し付ける。
- ・メンブレンを 2x SSC で洗う。2 回。(中和)
- ・メンブレンをハイブリボトルへセット。
プロット面を内側になるべく重ならないように丸める
- ・予め 42°C で温めた 10-20ml のハイブリ液 (no probe) を加え、42°C で 30 分間プレハイブリ。タイトテックのハイブリオープンで回転振とうさせる。
- ・プレハイブリ中に、プローブのラベリングを行う (APB ECL direct nucleic acid labeling and detection system を用いる)。
 - ・100ng/10 μ l の DNA を 5-10 分間ボイル。
PCR probe の場合、50ul PCR reaction (ゲル抽出精製品) の 1/10 量で充分
 - ・On ice で 5 分間。
 - ・等量 (10 μ l) の labelling reagent を加え混和。
 - ・等量 (10 μ l) の glutaraldehyde を加え混和。
 - ・37°C で 10 分間 labelling。
- ・プレハイブリ終了後、メンブレンに直接付かないようにプローブ溶液をハイブリ液に混合。
- ・42°C でハイブリ、5 時間～overnight で回転振とうさせる。
- ・ハイブリ終了後、ハイブリ液を捨て、予め 42°C で温めておいた少量の primary wash buf. ですすぐ。
- ・primary wash buf. (42°C) をハイブリボトルに 8 分目まで満たし、20 分間回転振とうさせる。2 回。
- ・メンブレンをトレーに移し、secondary wash buf. で室温 5 分間振とうさせる。2 回。

● detection

- ・ECL detection reagent の 1 と 2 を等量ずつ混合する。
大ゲルの場合、合わせて 14ml 程度
- ・ラップの上にメンブレンを広げ、混合した detection reagent をまんべんなくかける。
- ・1 分間浸した後、メンブレン上を軽く風乾させる。
- ・メンブレンをなるべくしわができないようにラップに包む。
- ・カセットにメンブレンとフィルムをセットする (暗室)。
- ・適時、フィルムを現像する。以下の順にフィルムの具合を見ながら浸す時間を調整する。
レンドール (現像) → 水 (停止) → レンフィクス (固定) → 水洗

○ Denaturation solution (1L stock)

NaCl 1.5M
NaOH 0.5M

○ 20x SSC (500 ml stock)

Na₃ citrate 0.3M
NaCl 3M (～pH7.0 になるはず)

○ hybridization buf. (frozen stock)

ECL Gold hybridization buffer
NaCl 0.5M 室温で混合
Blocking agent 5%(w/v) 42°C で 1 時間、完全に溶解させる
さらに 0.5-1 時間熱処理し、10ml ずつ分注し -30°C 保存

○ primary wash buf. (小ハイブリボトルの場合、200-300 ml 必要)

Urea 6M
SDS 0.4%
20x SSC 0.5x SSC

○ secondary wash buf.

2x SSC

◆参考資料

Takara Gen とるくん™ (酵母用) 説明書

APB ECL direct nucleic acid labelling and detection system 説明書

APB Hybond-N+ 説明書