

ノザンブロットィング <Non-RI (DIG-Labeling による)>

山根美穂

*分裂酵母の RNA の分離、精製については RNA preparation の項目を参照

このプロトコルは DIG Northern Starter Kit (Roche) の添付説明書および Roche DIG 説明書集 (日本語版) 8th を参考にしています。

過程が多く、複雑なので、一度よく読んで一通り頭に入れてからとりかかってください。

◆ 必要なもの

● 試薬類

10 X MOPS buffer (ナカライテスク : 23442-81)

37% formaldehyde (Wako : 064-00406)

ホルムアミド (Wako : 066-02301)

20 X SSC (ナカライテスク : 32146-91) → オートクレーブ滅菌が必要

10% SDS (Invitrogen : 15553)

DynaMarkerRNA High (フナコシ: BDL code : DM160)

DIG Northern Starter Kit (Roche : 12 039 672 910)

RNase free の滅菌水 (大量に必要)

HybondN-plus

3MM paper

● RNA 試料

1 レーン辺り 2 μg の total RNA が必要となる。

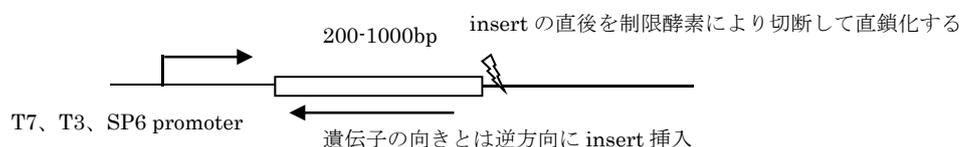
10 μg ほどを分離精製するつもりで試料を作成するとよい (分裂酵母の場合、経験的には log phase の細胞で 5×10^6 細胞を処理すれば 10 μg の RNA が得られるはずであるが、細胞の状態にもよるのであらかじめ検討が必要)

● プローブ作製のための DNA テンプレート

この kit には T7、T3、SP6 の 3 種の RNA polymerase がついているので、いずれかのプロモーター下流に目的とする遺伝子配列を挿入し、転写が行われるようにデザインする (経験的には SP6 プロモーターからの転写が一番効率良く行われたが、lot によるものかもしれません)。転写されるプローブの長さは 200-1000bp になるようにする。また、挿入した遺伝子の下流の制限酵素部位で切断し、linearize しておく (転写がそこで終わるように)。

このとき用いる制限酵素はなるべく 5'突出か平滑末端となるものを選ぶ。

制限酵素処理をして linearize したプラスミドは phenol / chloroform 処理、エタノール沈殿を行い、10mM Tris-HCl (pH 8.5)に溶解しておく（プローブの作製の項目で詳述する）。



1. プローブの作製

1-1 template の直鎖化

- ・ エッペンチューブに以下の溶液を混合する

plasmid DNA	5 μ g 相当量
10 x buffer	10 μ l
Restriction Enzyme	3 μ l
H ₂ O	to 100 μ l
- ・ 制限酵素の反応温度にて完全に消化する（37°Cで2時間程度）
- ・ 100 μ lのフェノール / クロロホルムを加えて混合し、15000回転、4°C、5分間遠心し、水層を新しいチューブへうつす
- ・ 10 μ lの3M酢酸ナトリウム、250 μ lのエタノールを加えて混合する
- ・ 15000回転、4°C、15分間遠心し、沈殿を氷冷した70%エタノールで洗浄する（15000回転、4°C、5分）
- ・ 沈殿を15 μ lのEB（10mM Tris pH8.5）に溶解し、1 μ lを用いて濃度を測定する（およそ0.3 μ g / μ lになっているはず）

1-2 ラベリング

- ・ エッペンチューブに以下の溶液を混合する

Linearized plasmid DNA	1 μ g 相当量
RNase inhibitor	0.2 μ l
H ₂ O	to 10 μ l
- ・ さらに以下試薬を加える（DIG Northern Starter Kit の添付試薬）

5 x Labeling mix (vial 1a)	4 μ l
5 x transcription buffer (vial 1b)	4 μ l
RNA polymerase (T7, T3 or SP6)	2 μ l
- ・ 42°Cで1時間インキュベート
- ・ 2 μ lのDNaseIを加え、37°C15分間インキュベート
- ・ 2 μ lの0.2M EDTA (pH8.0)を加えて反応を止める

1-3 プローブの検定

➤ 必要なもの (全て用事調整)

✓ RNA dilution buffer

20 x SSC 300 μ l

37 % Formaldehyd 200 μ l

RNase free water 500 μ l

✓ Washing buffer

10 x Washing buffer 6ml

RNase free water 54ml

✓ Blocking solution

10 x Maleic acid buffer 2.5ml

10 x Blocking solution 2.5ml

RNase free water 20ml

✓ Antibody solution

Blocking solution (上記) 10ml

Anti-DIG-AP 1 μ l

Anti-DIG-AP は混合する前にチューブを 4°C で 10000rpm 、5 分間遠心する

✓ Detection buffer

10 x Detection buffer 1ml

RNase free water 9ml

✓ Hybond-N+ : 3 x 6 cm くらいに切って、滅菌シャーレなどに入れておく

➤ プローブ検定

- 以下の表のように希釈液を作製する

Tube	RNA(μ l)	From tube #	RNA dilution buffer (μ l)	Dilution	Final concentration
1	RNA 原液を水で 10 ng / μ l になるように希釈する				10 ng / μ l
2	2	1	18	1 : 10	1 ng / μ l
3	2	3	198	1 : 100	10 pg / μ l
4	15	3	35	1 : 3.3	3 pg / μ l
5	5	3	45	1 : 10	1 pg / μ l
6	5	4	45	1 : 10	0.3 pg / μ l
7	5	5	45	1 : 10	0.1 pg / μ l
8	5	6	45	1 : 10	0.03 pg / μ l
9	5	7	45	1 : 10	0.01 pg / μ l
10	0	-	50	-	0

- 作製した希釈液の tube 3~10 の各 1 μ l を滅菌シャーレ等に入れたメンブレン上にスポットしていく
 - UV-cross linker にて 0.12 J オートクロスリンク
 - Washing buffer をシャーレに注ぎ、2 分間インキュベートする
 - 液を捨て、新たに 10 ml の Blocking solution を入れて、30 分間インキュベートする
 - 液を捨て、10 ml の antibody solution を入れて、30 分間インキュベート
 - 20ml の Washing buffer にて 15 分間 x 2 回洗浄する
 - 10 ml の Detection buffer にて 2~5 分間インキュベート
 - 3 方を切り開いたハイブリバッグ等の上にメンブレンを置き、CDP-Star を 4 滴ほど滴下する
 - すぐに上のフィルムでカバーをして、液を行きわたらせる
 - 室温で 5 分間インキュベートしたら、メンブレンの周りをシーラーにてシールする
 - Image Lab 等を用いてシグナルを検出する
- Tube7 の spot (0.1pg / μ l) くらいまでシグナルが検出されるようであれば、このプローブを用いて本実験を行うことができる

2. 電気泳動とトランスファー

2-1 電気泳動

➤ 必要なもの

- ✓ 1.2%ホルムアルデヒドゲル (150mL) ←Mupid の 13x12cm ゲル (13 コーム穴用)

RNase free のフラスコに以下を入れる

Agarose 1.8g

H₂O(RNase free) 126.9ml

レンジで Agarose を溶解し、適当に冷えたら以下を加える

10 X MOPS buffer 15ml

37% formaldehyde 8.1ml (できればドラフト内で)

よく混合し、ゲル型に流し入れて固まるまで待つ (2時間くらい)

- ✓ 1 x MOPS buffer

滅菌水 450ml

10 x MOPS buffer 50ml

- ✓ RNA loading buffer

まず、以下の組成で作製する (RNA loading buffer Mix. 1)

Glycerol 2.5ml

H₂O 2.5ml

BPB 適当に色づくほど

200 μ l くらいずつに分注して-30 度にストックしておく

電気泳動する前に、以下のように混合する (サンプル量に応じて作製するが、少なすぎると作りにくいので、最低以下の量を作製する。ちなみに、*25 μ l / sample 見ておけば足りる (実際は 21.5 μ l を使用))

10 x MOPS 50 μ l

フォルムアミド 250 μ l

37% formaldehyde 80 μ l

RNA loading buffer Mix. 1 50 μ l

Filtrate する

➤ 電気泳動試料の作製

RNA は電気泳動直前にエタノール沈殿を行い精製する。

実際には $10 \mu\text{g}$ 相当量が得られる量を沈殿させ、 $20 \mu\text{l}$ の H_2O に溶解したものを OD 測定し、うち $3 \mu\text{g}$ を用いて電気泳動試料の作製を行う。

- ・ エッペンチューブに以下を入れて混合する

Total RNA $3 \mu\text{g}$ 相当

H_2O RNA と合わせて $6 \mu\text{l}$ にする

RNA loading buffer $21.5 \mu\text{l}$

- ・ 65 度で 10 分間インキュベートし、その後 1 分間氷上におく
- ・ $18 \mu\text{l}$ ずつ (RNA $2 \mu\text{g}$ 相当) を 1.2% ホルムアルデヒドゲルに load する
- ・ $1 \times$ MOPS buffer にて、 50V で 2 時間半くらい電気泳動を行う (できればドラフト内で)

◇ マーカーについて

RNA マーカーを用いる場合は、マーカーの説明書に従い調整する。以下に、BioDynamics Laboratory 社の DynaMarker RNA High を用いる場合について記す。

- ・ エッペンチューブに以下を混合する

RNA High $2 \mu\text{l}$

RNA loading buffer $16 \mu\text{l}$

EtBr ($200 \mu\text{g} / \text{ml}$) $1 \mu\text{l}$

- ・ 75 度 3 分間インキュベートし、その後急冷する
- ・ 全量をゲルに load する

Total RNA 中のリボソーマル RNA をマーカーとして用いる場合

- ・ エッペンチューブに以下を混合する

Total RNA ($1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$) $2 \mu\text{l}$

RNA loading buffer $16 \mu\text{l}$

EtBr ($200 \mu\text{g} / \text{ml}$) $1 \mu\text{l}$

- ・ 75 度 3 分間インキュベートし、その後急冷する
- ・ 全量をゲルに load する

2-2 トランスファー

- ・ 電気泳動が終了したら、マーカーレーンを切り離し、撮影しておく（必要であれば、定規などを添える）
- ・ マーカー以外の部分は、不必要な部位を切り取った後、15 cm滅菌シャーレ等に入れる
- ・ 滅菌水（RNase free）を注ぎ、15 分間インキュベートする
- ・ 液を 20 x SSC に変えて 15 分間インキュベートする
- ・ 新しい 20 x SSC に変えて、さらに 15 分間インキュベートする
- ・ サザンブロッティングと同じ要領でメンブレンへのトランスファーを行う（サザンブロッティングの項を参照）～16 時間
- ・ トランスファーが完了したら、コーム穴に鉛筆で印をつけておく
- ・ 3MM ペーパーに 2 x SSC をしみこませ、その上に転写された面を上にしてメンブレンを置く
- ・ UV-cross linker にて 0.12 J オートクロスリンク
- ・ 滅菌水（RNase free）にて軽くリンスし、3MM ペーパー上に置いて風乾させる（乾いたら、ハイブリバック等に入れて 4℃ でしばらく保管できる）

3 ハイブリダイゼーション

- ・ DIG Easy Hyb を 68℃ に温めておく（10 x 10 cm のメンブレン辺り 12ml 必要）12ml のうち 1ml はエッペンチューブにとりわけておく
- ・ ハイブリバッグにメンブレンと温めた DIG Easy Hyb を 11ml 入れて、68℃ で 30 分間インキュベートする（プレハイブリダイゼーション）
- ・ 1-2 で作製した DIG ラベルしたプローブ 1.2 μg 相当を氷上で溶かす
- ・ RNase free H₂O を加えて total の液量を 50 μl になるようにする
- ・ 100℃ で 5 分間 boil した後、急冷する
- ・ プレハイブリダイゼーションが終了したら、先程のプローブを加える
（直接濃い液がメンブレンにかからないように、いったん残しておいた 1ml の DIG Easy Hyb にプローブを加え、その後ハイブリバッグにうつすとよい）
68℃ で O/N インキュベートする

4 洗浄と検出

➤ 必要なもの (全て用事調整)

- ✓ Stringency wash buffer I (200ml)
 - 20 x SSC 20ml
 - 10% SDS 2ml
 - RNase free water 178ml

- ✓ Stringency wash buffer II (200ml)
 - 20 x SSC 1ml
 - 10% SDS 2ml
 - RNase free water 197ml

68°Cであらかじめ温めておく

- ✓ Washing buffer (250ml)
 - 10 x Washing buffer 25ml
 - RNase free water 225ml

- ✓ Blocking solution (100ml)
 - 10 x Blocking solution 10ml
 - 10 x Maleic acid buffer 10ml
 - RNase free water 80ml

- ✓ Detection buffer (100ml)
 - 10 x Detection buffer 10ml
 - RNase free water 90ml

- ・ Stringency wash buffer I をハイブリオープン (68°C) に入れて、あらかじめ温めておく
 - ・ Stringency wash buffer II が十分に温まってきたらハイブリダイゼーションを終了し、メンブレンをハイブリバッグから取り出す
 - ・ 100ml の Stringency wash buffer I を 15cm 滅菌シャーレ等、メンブレンが入るサイズの容器に入れ、そこに取り出したメンブレンを入れる
 - ・ 室温で 5 分間洗浄する。2 回繰り返す
 - ・ 液を捨て、新たに Stringency wash buffer II を注ぎ、68°C で 15 分間の洗浄を 2 回繰り返す (各 100ml を使用)
 - ・ 新しい 15cm 滅菌シャーレに 50ml の Washing buffer を入れ、そこにメンブレンをうつして室温で 2 分間インキュベート
 - ・ Blocking solution 50ml を別の容器 (50ml チューブ等) にとりわけておく
 - ・ シャーレの Washing buffer を捨て、残りの Blocking solution をそそぐ
 - ・ 室温で 30 分間インキュベートする (ブロッキング)
 - ・ DIG-antibody のチューブを 4°C で 10,000 回転、5 分間遠心し、5 μ l をチューブに取り分けておいた 50ml の Blocking solution に加える (10,000 倍希釈の抗体希釈液)
 - ・ ブロッキングが終了したら、液を捨て、上記の抗体希釈液を注ぐ
 - ・ 室温で 30 分間インキュベート
 - ・ 液を捨て、100ml の Washing buffer を注ぎ室温で 15 分間洗浄する。2 回繰り返す
 - ・ 液を捨て、Detection buffer を注ぎ、3 分から 5 分間インキュベート
 - ・ 3 方を切り開いたハイブリバッグにメンブレンをのせる
 - ・ CDP-star を滴下し 5 分間インキュベート
 - ・ 余分な液を捨て、メンブレンの周囲をシールする
 - ・ Image Lab 等を用いてシグナルを検出する
- 10 分から 30 分ほどの露光で十分なシグナルが得られるはずである