

DIG 標識 RNA probe の作製(1/8/04 Y. Yagi)

準備

プローブに用いる配列の DNA 断片を pBluescript、pGEM 等の T7, T3, SP6 プロモーターを持つベクターにサブクローニングする。この時、DNA 断片を切断しない制限酵素サイトが挿入する DNA 断片の両側にあるようにしておく。また、クローニングした向きを確かめておく。プローブは anti-sense 鎖を検出に、sense 鎖をネガティブコントロールに用いる。Work することが確認されていない断片を使うときは sense 鎖のコントロールを取る。

サブクローンした DNA を QIAprep Miniprep, QIAGEN Plasmid Midi Kit 等で精製し、テンプレートとして用いる。

OD を計り DNA 量を定量しておく。

・テンプレート DNA の直鎖化

RNA の合成がベクター部分まで進まないようにするために、MCS 内で転写に用いるプロモーターから遠い側のユニークなサイトで制限酵素処理をする。

切断が完全であることを反応液を一部取って確認しておく。

必要なら加熱して失活処理をする

エタ沈して適当量の RNase free water に溶かす。0.5-1 μ g/ μ l

1 回のラベリング反応に 1 μ g のテンプレート DNA を用いる。10 μ g 以上を制限酵素処理しておくとも毎回制限酵素処理をしなくても良い。

私は Glycogen をキャリアに用いてエタ沈し、制限酵素処理後は DNA を定量していない。不安なら、計り直しても良い。

制限酵素や制限酵素とともにコンタミしてくるものを失活させ完全に除くために ProteinaseK 処理してフェノール・クロロホルム処理するプロトコルもあるが、しなくても今のところ問題は発生していない。

ブロットイング用

・in vitro transcription

H2O	12 μ l	
10x transcription buffer	2 μ l	
10x Labeling Mix	2 μ l	
DNA (0.5 μ g/ μ l)	2 μ l	
RNaseIn (RNase inhibitor)	1 μ l	
RNA polymerase	1 μ l	total 20 μ l

37°C 1-2 時間

反応を初めて約 1 時間のころに反応のチェックをする。2 μ l の反応液を取り、DNA 用の 0.7%アガロースゲルで電気泳動する。マーカーは DNA のものでよい。テンプレートのバンドと合成された RNA が観察されるはずである。予想されるサイズの辺りに RNA のシグナルがあれば OK。長い断片で途中で RNA ポリメラーゼの止まりやすい配列がある場合何種類かの長さの RNA が観察されることがある。また、直鎖化したときの切れのこりが多いと、RNA のシグナルはスミアに予想より長いものが出てくるようになる。

正しく RNA が合成されていたら次の段階に。

・ テンプレート DNA の分解。(in situ 用の場合必ずしも必要ではない)

add

RNaseIn	1 μ l
tRNA	2 μ l
RNase free DNase	1 μ l

37°C 10min

TE	76μl
3M NaoAc	10μl
Et-OH	250μl
Glycogen	1μl

Centrifuge (Et-OH ppt)
Rinse 70% Et-OH

50μl の DEPC 処理水に溶かす。
(ラベリングの効率をチェックする。)

in situ 用

2x carbonate buffer: 120mM Na₂CO₃, 80mM NaHCO₃ 分注し-20°C保存
stop solution: 0.2M NaoAc (エタ沈用のものを薄める)

H ₂ O	12μl	
10x transcription buffer	2μl	
10x Labeling Mix	2μl	
DNA (0.5μg/μl)	2μl	
RNaseIn (RNase inhibitor)	1μl	
RNA polymerase	1μl	total 20μl

37°C 2時間

2μl をチェック用にとって置く

H ₂ O	30μl
2x carbonate buffer	50μl

mix incubate 65°C 10min

stop solution 100μl

10μl をチェック用にとる。

→反応後のサンプルとともにアガロースゲルで電気泳動しチェック。転写反応の効率とアルカリ反応でプローブ断片が数百 bp になっていることを確認。

4M LiCl	20μl
tRNA (20mg/ml)	5μl
Et-OH	300μl

Mix, -20°C >15min

Spin 20min. 4°C

Wash pellet in 70%Et-OH

dry

20μl の DEPC 処理水に溶かす。