



Life Sciences

www.pall.com/lab

バイオダイナA&B

核酸トランスファー

取扱説明書

日本ポール株式会社
製薬フィルター部
ラボ製品グループ

目 次

	ページ
1. はじめに	
1.1 バイオダイナメンブレン	1
1.2 バイオダイナA	1
1.3 バイオダイナB	1
1.4 手法別メンブレン選定表	1
1.5 バイオダイナメンブレンの取り扱い	1
2. 核酸のトランスファー	
2.1 溶液	2
2.2 核酸のドットプロット	3
2.3 DNAのキャピラリー・トランスファー	4
2.4 DNAのバキューム・トランスファー	6
2.5 ノーザントランスファー	7
2.6 コロニーリフト、プラークリフトおよびレプリカプレーティング	8
2.7 固定化	10
3.ハイブリダイゼーション	
3.1溶液	11
3.2プレハイブリダイゼーション	11
3.3ハイブリダイゼーション	12
3.4洗浄	12
3.5リハイブリダイゼーション	12
3.6ストリッピングの別法	13
4. 参考文献	14

はじめに

1.1 バイオダイメンブレン

バイオダインは、補強材付きナイロン66製メンブレンで、DNA/RNAおよびタンパク質のトランスファー向けです。バイオダインは、トランスファー用の担体として優れた物理的特性を持っています。非常に均一で、厳重に品質管理された孔径分布を持っているため、バンド解像力が優れています。バイオダインは、特別な製膜方法(特許)により、メンブレンの材質自体が本質的に親水性となります。したがって、使用前にプレウェッティングする必要がありません。また、耐熱性、耐薬品性にも優れており、縮みやひび割れ、あるいはカール等が一切なく、1枚のメンブレンで何回もリハイブリダイゼーションが行えます。

1.2 バイオダインA

バイオダインAは両性のナイロン66製メンブレンです。メンブレンの微細孔内部表面の活性基は、アミノ基とカルボキシル基、それぞれ50%から構成されています。このためメンブレンは親水性となり、等電点はpI6.5付近になります。バイオダインAは、トランスファーのアプリケーションにおいて、生体分子に対する高い結合容量を持っています。さらに、従来から使用されているニトロセルロースと比べ、感度が高く、核酸の保持力が強い上、操作性の面でも格段に優れています。

1.3 バイオダインB

バイオダインBは、メンブレンの微細孔内部表面を強く正に荷電させる第4級アンモニウム基で高密度に修飾してあります。pH3以下~pH10以上の範囲において、微細孔内部表面が強く正に荷電しているため、負に荷電を帯びた核酸やタンパク質をイオン結合等により強く結合させます。バイオダインBは、核酸トランスファーの新手法であるいわゆる“ラビッド・トランスファー”に最適なメンブレンであり、極めて優れた感度を得ることができます。さらに、核酸の結合力が強いので、長時間のトランスファー操作も核酸がメンブレンから脱離してしまう危険性はありません。(もちろん、キヤピラリー・トランスファーでも非常に良い結果が得られます。)

1.4 手法別メンブレン選定表

	手 法	参照 ページ	メンブレン		
			バイオダインA 1.2 μm	バイオダインA 0.2 μm	バイオダインB 0.45 μm
DNA	ドットプロット	5	+	++	+++
	血清のドットプロット	5	+++	-	-
	通常のサザントランスファー (毛細管現象を用いた原法)	7	+	++	+++
	ボールで改良した サザントランスファー	7	+	++	++++
	ボールで改良した アルカリトランスファー	7	-	+	+++
	バキューム・トランスファー	10	-	++	+++
RNA	ドットプロット	6	+	++	+++
	ノーザントランスファー	12	-	++	+++
	バキューム・トランスファー	13	-	++	+++
	エレクトロトランスファー	14	-	+++	+++
コロニー/ ブランク	コロニーリフト、ブランクリフト	15	+++	+	-
	レプリカプレーティング	16	-	+++	-

*詳細については、お問い合わせください

- ++++ 特別に高い感度が得られます。
- +++ 最適なメンブレンと手法との組み合わせです。
- ++ 広範囲に使用でき、高い感度が得られます。
- + 使用できますが、感度が劣ります。
- 推奨 しません。

1.5 バイオダイメンブレンの取扱い

バイオダインは親水性のため、使用前にプレウェッティングする必要がありません。機械的強度が高く、裂けたり、ひび割れしたりすることはありません。特に、アガロースゲルからメンブレンをはがす際にも、メンブレンが破れる心配がなく、容易に操作できます。ただし、メンブレンの汚染を選けるために、ゴム手袋を着用するか、ピンセットを使用してメンブレンの端を取り扱ってください。また、メンブレンを切る際には、ハサミまたはカッターをご使用ください。

2.核酸のトランスファー

2.1 溶液

2.1.1 脱プリン化溶液

0.25M HCl

2.1.2 高塩濃度変性溶液

0.5M NaOH

1.5M NaCl

2.1.3 アルカリ変性溶液(トランスファーバッファーとして使用)

0.4M NaOH

2.1.4 中和溶液

0.5M Tris-HCl (pH 7.4)

1.5M NaCl

2.1.5 20X S S C

3M NaCl

0.3M クエン酸ナトリウム

2.1.6 20X エレクトロトランスファー・バッファー

0.06M クエン酸

0.08M Na₂HPO₄

2.1.7 タンパク質分解溶液(コロニーリフト、プラークリフト)

50mM Tris-HCl (pH7.6)

0.1%(w/v) S D S(ドデシル硫酸ナトリウム)

50mM NaCl

100 μg/mLプロテイナーゼK

2.1.8 非相同性D N A

10mg/mLサケ精子D N A

30分間超音波処理後、30分間煮沸する。-20°Cで保存する。

2.1.9 100XDenhardt 's溶液

2.0%(w/v) フィコール("Ficoll"、分子量400,000)

2.0%(w/v) ポリビニルピロリドン(PVP、分子量360,000)

2.0%(w/v) 牛血清アルブミン(B S A)

注)多くの実験系、特に³²P標識プローブを使用する場合には、非特異的吸着を小さくするために非相同性D N AおよびDenhardt 's溶液を使用しません。この場合、0.1~1% S D Sと0.1~0.5%N-ラウリルサルコシンをハイブリダイゼーション溶液およびプレハイブリダイゼーション溶液に加えることによって、ブロッキング効果を高めることができます。

2.1.10 20X S S P E

3.6M NaCl

0.2M リン酸ナトリウムバッファー(pH7.7)

0.02M EDTA

2.1.11 10% S D S

10%(w/v)SDS-蒸留水

2.1.12 ホルムアミド

混床式イオン交換樹脂で脱イオンしておく。

2.2 核酸のドットプロット

ドットプロットでは、核酸溶液を直接トランスファーマンブレン上にアプライします。バイオダインAとバイオダインBは、ともにドットプロットに使用することができます。

バイオダインAへドットプロットしたDNAおよびRNAの固定化には、ベーキングを使用することもできますが、UV照射をお勧めします。ただし、注意しなければならないのは、アルカリバッファー中のDNAをプロットした場合には、UV照射ではなく、ベーキングによって固定化すべき点です。

バイオダインBを用いた場合には、ドットプロットされたDNAがメンブレン上でアルカリ溶液にさらされている限り、あえて固定化する必要はありません。しかし、バイオダインBへのRNAのドットプロットでは、ベーキングかUV照射のどちらかで固定化してください。

A. DNAのドットプロット

1) DNAの変性には次の2つの方法がある。

- ① DNAを6X SSC中で95°Cに10分間加熱後、氷冷する。
- ② DNAをプロット5分前に高塩濃度変性溶液(2.1.2)に溶かす。

注) 6X SSCで熱変性したDNAのドットプロットには、バイオダインAおよびバイオダインBのどちらでも使用することができる。高塩濃度変性溶液でアルカリ変性したDNAのドットプロットには、バイオダインAも使用できないことはないがバイオダインBを使用することが望ましい。

2) 変性させたDNAを含む溶液(1.5 μ L以下)を適当なメンブレン上にスポットする。必要であれば、スポットを乾かした後、DNAが要求量に至るまで繰り返しスポットする。

3)

① 熱変性したDNAを使用した場合

高塩濃度変性溶液(2.1.2)に浸しておいたろ紙の上にメンブレンを載せ5分間放置する。その後、中和溶液(2.1.4)に浸しておいたろ紙の上にメンブレンを載せかえ、2分間放置して中和し、次のステップ4)に進む。

② DNAを使用した場合

バイオダインA、バイオダインBのどちらのメンブレンを用いた場合でも次のステップ4)に直接進む。

4) 2X SSCに浸しておいたろ紙の上にメンブレンを載せ、5分間放置する。

5) 固定化

バイオダインB: 風乾(4°Cで一晩放置してもよい)後、または濡れた状態のまま直接次のステップ6)に進む。

バイオダインA: 多くの実験でベーキングによっても良好な結果が得られているが、湿った状態のまま、あるいは乾燥させたメンブレン上のDNAを、UV照射により固定化することが推奨される。ただし、高塩濃度変性溶液(2.1.2)で処理したDNAをバイオダインAにスポットした場合には、ベーキングで最良の結果が得られている。(P.18の“2.7固定化”を参照)

6) P.19のハイブリダイゼーション操作に進む。

B. RNAのドットプロット

注) RNAを取り扱う場合は、器具および試薬溶液をRNA分解酵素やその他の汚染から防がなければなりません。必ず、ゴム手袋を着用してください。

1) RNAを5X SSPE(0.1mg/mLサケ精子DNA含有)で調製する。このRNA溶液を適当なメンブレン上にスポット(1.5 μ L以下)する。必要であれば、スポットを乾かした後、RNAが要求量に至るまで繰り返しスポットする。

2) ベーキングまたはUV照射により、ドットプロットされたRNAを固定化する。(P.18の“2.7固定化”を参照)

3) P.19のハイブリダイゼーション操作に進む。

2.3 D N Aのキャピラリートランスファー

1) 電気泳動条件

目的サイズのD N A断片の分離に適したアガロースゲルを用いて電気泳動を行う。試料の調製には、ブロモフェノールブルーを含むバッファーを使用する。(参考文献1)

2) 断片化処理

メンブレンへのトランスファー効率をよくするため、場合によっては電気泳動後に、ゲル中のD N Aを小さなサイズに断片化する必要がある。(参考文献2)

これには次の2つの方法がある。

- ① 0.25M HCl中にゲルを浸し、D N Aの脱プリン化を起こした後、アルカリ変性する方法
- ② エチジウムブロマイドの存在下でU V照射を行い、ゲル中でD N Aを小断片化する方法

どちらの方法も、実験条件を厳しくコントロールしないと、結果にばらつきを生じる。また、どちらの方法を選択するにしても、処理時間や次のトランスファーおよび目的とするD N A/プローブのハイブリダイゼーション効率に与える影響に関して、基礎検討を加えることが重要である。どちらかといえば、①の酸処理が推奨される。

3) トランスファーには、以下の三つの方法がある。

a) 通常のサザントランスファー(毛細管現象を用いた原法) :

本法を用いて、バイオダインAへトランスファーする場合には、ゲルを高塩濃度変性溶液(2.1.2)中でアルカリ変性後、中和溶液(2.1.4)中で中和し、20X S S C(2.1.5)を用いてトランスファーする。

b) ポールで改良したサザントランスファー:

本法を用いてバイオダインAおよびバイオダインBへトランスファーする場合には、ゲルを高塩濃度変性溶液(2.1.2)中でアルカリ変性後、中和操作を省略し、20X S S C(2.1.5)を用いてトランスファーする。

c) ポールで改良したアルカリトランスファー:

本法を用いてバイオダインBへトランスファーする場合には、ゲルのアルカリ変性および中和操作を省略し、0.4M NaOH(2.1.3)のみを用いて、直接トランスファーするだけでよい。D N Aは、トランスファー中に変性され、その後メンブレン上へ一本鎖のまま吸着する。したがって、ゲルを中和する必要はない。バイオダインAもアルカリトランスファーに使用することができるがバイオダインBを使用することが望ましい。(詳細はお問い合わせください。)

4) 目的に合ったトランスファーバッファー*を入れた容器を隣り合わせで2個置き、橋渡しするようにガラス板を架ける。

*トランスファーバッファー

- a)を用いる場合: 20X S S C(2.1.5)
- b)を用いる場合: 20X S S C(2.1.5)
- c)を用いる場合: アルカリ変性溶液(2.1.3)

5) ガラス板の上に乾いたろ紙を置き、ろ紙の両端をトランスファーバッファーの入った容器に浸す。目的に合ったトランスファーバッファーでろ紙を濡らす。小さいサイズのD N A断片(10kb以下)をトランスファーする場合には、ステップ7へ進む。

- 6) 大きいサイズ(10Kb以上)のD N A断片の場合:
電気泳動後、ゲルの2倍容の0.25M HCl中にゲルを浸し、マーカー色素のプロモフェノールブルーが黄色に変化するまで静かに振とうする。さらに、ゲルの2倍容の新しい0.25M HClに交換し、ゲルを10分間浸す。
- 7) アルカリ変性
- a) 通常のサザントランスファー(毛細管現象を用いた原法):
本法を用いる場合には、マーカー色素が元の色調に戻るまで、ゲルの2倍容の高塩濃度変性溶液(2.1.2)中にゲルを浸した後、同様にゲルの2倍容の中和溶液(2.1.4)中にゲルを10分間浸す。その後、ステップ8)に進む。
- b) ポールで改良したサザントランスファー:
本法を用いる場合には、マーカー色素が元の色調に戻るまで、ゲルの2倍容の高塩濃度変性溶液(2.1.2)中にゲルを浸した後、中和操作を省略して、ステップ8)に進む。
- c) ポールで改良したアルカリトランスファー
本法を用いる場合には、アルカリ変性は省略し、次のステップ8)に進む。
- 8) 電気泳動ゲルをガラス板上のろ紙に載せ、ゲル以外の部分を防水性のプラスチックフィルム等で覆い、トランスファーバッファーが確実にゲル内部のみを透過するようにする。
- 9) ゲル表面を完全に覆うようにメンブレンを注意深く置く。メンブレンの上できれいなピペットを転がし、ゲルとメンブレンとの間にある気泡を除く。(バイオダインメンブレンはプレウェットINGする必要がなく、ゲルに接触させるだけで瞬時に漏らすことができる。)
- 10) トランスファーバッファーでプレウェットINGしておいた2枚のろ紙(メンブレンと同じサイズ)で、メンブレン上を覆う。ろ紙の上できれいなピペットを転がし、メンブレンとろ紙との間にある気泡を取り除く。ろ紙の上に、7~8cmの厚さになるようにペーパータオルを置き、この上にガラス板を載せ、1kgの重しを載せる。ペーパータオルがゲルに接触していないことを確認する。
- 11) 一晩、あるいは最長で12時間放置して、D N Aをゲルからメンブレンにトランスファーさせる。
注) 断片化処理したD N Aは、2時間足らずでメンブレンにトランスファーされるとみてよい。トランスファー中に一度ペーパータオルを交換すると、短時間内のD N Aトランスファーが、さらに確実となる。
- 12) リンスおよび固定化(詳細は、P.18の“2.7固定化”を参照)
- a) 通常のサザントランスファー(毛細管現象を用いた原法):
本法を用いてバイオダインAにトランスファーした場合にはゲル表面からメンブレンをはがした後に、リンスしてはならない。バイオダインAにトランスファーしたDNAは、ベーキングまたはU V照射を用いて固定化することが望ましい。
- b) ポールで改良したサザントランスファー:
本法を用いてバイオダインBにトランスファーした場合には、ゲル表面からメンブレンをはがした後に、リンスしてはならない。バイオダインBにトランスファーしたD N Aは、80°Cで15分間ベーキングして固定化することが望ましい。その後、2X S S Cでリンスする。(他の固定化法を用いることもできる。)
- c) ポールで改良したアルカリトランスファー:
本法を用いてバイオダインBにトランスファーした場合には、ゲル表面からメンブレンをはがした後、2X S S Cで5分間リンスする。その後、濡れた状態のまま直接ハイブリダイゼーションを行なうか、風乾(4°Cで一晩放置してもよい。)する。
- 13) P.19のハイブリダイゼーション操作に進む。

2.4 DNAのバキューム・トランスファー

バキューム・トランスファーは、弱い吸引を利用して核酸を電気泳動ゲルからメンブレンにトランスファーする方法です。トランスファー効率が非常に高く、しかも、1時間以内にトランスファーを完了することができます。トランスファーに要する時間が短いために拡散が少なく、シャープでコントラストのよいバンドを得ることができます。バイオダインAとバイオダインBは、ともにバキューム・トランスファーに使用することができます。

以下に、ポールで改良した高塩濃度変性溶液を用いたバキューム・トランスファーをバイオダインBを用いて紹介します。

注) この方法は、使用するバキューム・トランスファー装置の取扱い説明書に従って行ってください。

- 1) 目的サイズのDNA断片の分離に適したアガロースゲルを用いて電気泳動を行う。試料の調製には、プロモフェノールブルーを含むバッファーを使用する。(参考文献1)
- 2) 吸引する開口部(ウインドー)と電気泳動したゲルとが少なくとも5mm重なるようにゲルマスクを切り抜き、バキューム・トランスファー装置を組み立てる。
- 3) バイオダインBを目的の大きさに切る。ゲルマスクの開口部の範囲内に位置するように、乾燥したバイオダインBを置く。
- 4) 脱プリン化およびアルカリ変性

方法1. バキューム・トランスファー装置の外で行う場合

酸による脱プリン化は、2.3のセクション2)および6)に、またポールで改良したサザントランスファーでの高塩濃度変性溶液(2.1.2)を用いたアルカリ変性は、2.3のセクション7)にそれぞれ概略が述べられている操作手順に従って、バキューム・トランスファー装置の外で行う。

注) ポールの社内データでは、バキューム・トランスファー装置の外で脱プリン化とアルカリ変性を行った後、バイオダインBを用いてポールで改良したバキューム・トランスファーを行った場合に、最高の感度が得られている。

高塩濃度変性溶液(2.1.2)を用いてゲルをアルカリ変性した後、中和せずに、バキューム・トランスファー装置内のバイオダインB上に注意して移す。その際、メンブレンとゲルとの間に気泡が入らないようにし、ゲルの位置が的確であることを確認する。ゲルマスクをしっかりとクランプで留め、真空ポンプのスイッチを入れ、ゲルを吸引固定する。

方法2. バキューム・トランスファー装置内で行う場合

電気泳動後、ゲルを注意深くガラス板からバキューム・トランスファー装置内のバイオダインB上に移す。その際、メンブレンとゲルとの間に気泡が入らないようにし、ゲルの位置が的確であることを確認する。ゲルマスクをしっかりとクランプで留め、真空ポンプのスイッチを入れ、ゲルを吸引固定する。

真空度が使用レベルに達する前に、十分量の脱プリン化溶液(2.1.2)をゲル中央に注ぎ、ゲル全面を完全に覆う。真空度を40cm水柱に設定し、4分間放置する。装置を傾けて、アガロースゲルの中央の凹みから過剰の脱プリン化溶液を流し集める。アスピレーターに接続したピペットを用いて、この溶液をすべて吸引除去する。

ゲル全面を完全に覆うように十分量の高塩濃度変性溶液(2.1.2)をゲル中央に注ぎ、3分間放置する。前述のようにアスピレートして、溶液をすべて吸引除去する。

5) ゲルに中和溶液を加えてはならない。真空度が使用レベルに達する前に、ゲル全面を完全に覆うように20XS S C (2.1.5)トランスファーバッファーを注ぐ。真空度を40cm水柱に安定させる。トランスファー中(40~120分)は、常にゲル全面が完全に20XSSC(2.1.5)トランスファーバッファーで覆われているようにする。

6) 前述のようにしてトランスファーバッファーを完全に除く。吸引したまま、メンブレンを残して注意深くゲルをはがし取る。吸引を止め、メンブレンをはがし取る。この際、メンブレンをリンスしてはならない。

7) 固定化

DNAの固定化は、80°Cで15分間ベーキングを行うことが望ましい。その後、2XSSCでリンスする。(P.18の“2.7固定化”を参照)

8) P.19のハイブリダイゼーション操作に進む。

2.5 ノーザントランスファー

0.2 μm のバイオダインAと0.45 μm のバイオダインBは、ともにノーザントランスファーに適しています。特にバイオダインBは、バキューム・トランスファーやエレクトロトランスファーなどのいわゆる“ラピッドトランスファー”に最適です。注)RNAを取り扱う場合は、器具や試薬溶液をRNA分解酵素やその他の汚染から防がなければなりません。常に、ゴム手袋を着用してください。20X SSC(2.1.5)トランスファーバッファーを除く全ての溶液に、0.1%SDSを加えておくことをお勧めします。

2.5.1 電気泳動条件

ホルムアミド処理した変性RNAをホルムアルデヒド、アガロースゲルを用いて電気泳動する。(参考文献4参照)

2.5.2 トランスファー操作

A. RNAのキャピラリー・トランスファー

1)トランスファーバッファーとして20X SSC(2.1.5)を入れた容器を隣り合わせで2個置き、橋渡しするようにガラス板を架ける。ガラス板の上に乾いたろ紙を置き、ろ紙の両端を20X SSC(2.1.5)の入った容器に浸す。20X SSC(2.1.5)でろ紙を濡らす。

2)通常のトランスファーの場合には、2.3の8)~11)の操作に従う。

注)ゲルから高分子量のRNAを完全に回収するためには、一晩かけて、トランスファーすることが推奨される。

3)トランスファーが終了したら、ゲル表面からメンブレンを取り除く。この際、メンブレンをリンスしてはならない。

4) 固定化

バイオダインAを用いた場合は、湿った状態のままか、あるいは乾燥させた後、UV照射によりRNAを固定化することが望ましい。バイオダインBを用いた場合は、UV照射あるいはベーキングによってRNAを固定化する。(P.18の“2.7固定化”を参照)

5) P.19のハイブリダイゼーション操作に進む。

B. RNAのバキューム・トランスファー

一般的な注意事項は、“2.4DNAのバキューム・トランスファー”をご参照ください。

1) バキューム・トランスファー装置を組み立てる。(詳細は、2.4の1)~3)を参照)

2) 電気泳動後、ゲルをガラス板からバキューム・トランスファー装置の中のメンブレン上に、注意して移す。メンブレンとゲルとの間に気泡が入らないようにし、ゲルの位置が的確であることを確認する。ゲルマスクをしっかりとクランプで留め、真空ポンプのスイッチを入れ、ゲルを吸引固定する。

3) 真空度が使用レベルに達する前に、20X SSC(2.1.5)トランスファーバッファーをゲル中央に注ぐ。この際、ゲル全面を完全に覆うことができるように十分量を加える。

4) 真空度を40cm水柱に安定させる。トランスファー中(40~120分)は、常にゲル全面が完全に20X SSC(2.1.5)トランスファーバッファーで覆われているようにしておく。

5) 装置を傾けて、アガロースゲルの中央の凹みにたまった過剰のトランスファーバッファーを流し集める。アスピレーターに接続したピペットを用いて、この溶液をすべて除去する。

6) 吸引したまま、メンブレンを残してゲルを注意深くはがし取る。吸引を止め、メンブレンをはがし取る。この際、メンブレンをリンスしてはならない。

7) 固定化

バイオダインAを用いた場合は、湿った状態のままか、あるいは乾燥させた後、UV照射によりRNAを固定化することが望ましい。バイオダインBを用いた場合は、UV照射あるいはベーキングによってRNAを固定化する。(P.18の“2.7固定化”を参照)

8) P.19のハイブリダイゼーション操作に進む。

C. RNAのエレクトロトランスファー

注) この方法は使用するエレクトロトランスファー装置の取扱い説明書に従って、操作を行ってください。

1) メンブレンをゲルと同じ大きさに切る。ゲルを1Xエレクトロトランスファー・バッファー(溶液2.1.6を希釈して調製)で予め濡らしておいた2枚のろ紙の上に置く。乾いたままのメンブレンをゲルの上に気泡が入らないように注意して重ねる。1Xエレクトロトランスファー・バッファーで予め濡らしておいた2枚のろ紙でメンブレンの上を覆う。2枚のSCOTCH-BRITE*パッドの間にこのアッセンブリー(ろ紙、ゲル、メンブレン、ろ紙)を挟む。これを2枚のプラスチック製のグリッド(格子)できちんと挟み込みモジュールを完成する。

*SCOTCH-BRITEは、3M Corporationの登録商標。

2) 1Xエレクトロトランスファー・バッファーでエレクトロトランスファー装置を満たし、ゲルと陽極との間にメンブレンが位置するようにして、ゲルとメンブレンとのモジュール完成品を装置に組み込む。熱交換器に水道水か冷却システムを接続する。

3) 定電流で3時間(例えば1アンペア/90ボルト)通電し、アガロースゲルからメンブレンにRNAをエレクトロトランスファーする。

4) トランスファー終了後、モジュールからメンブレンを取り出す。この際、メンブレンをリンスしてはならない。

5) 固定化

バイオダインAを用いた場合は、湿ったままか、あるいは乾かした後、UV照射により、RNAを固定化することが望ましい。バイオダインBを用いた場合は、UV照射あるいはベーキングによってRNAを固定化する。(P.18の“2.7固定化”を参照)

6) P.19のハイブリダイゼーション操作に進む。

2.6 コロニーリフト、プラークリフトおよびレプリカプレーティング

コロニーリフト、プラークリフトには、 $1.2\mu\text{m}$ のバイオダインAを、レプリカプレーティングには、 $0.2\mu\text{m}$ のバイオダインAをそれぞれご使用になることをお勧めします。雑菌による汚染を防ぐために、メンブレンの前処理を以下のように行ってください。

- ① 1mM EDTAで5分間煮沸する。
- ② 2段蒸留水で十分にリンスする。
- ③ クロマトグラフィー用のろ紙で挟み、アルミホイルで包む。
- ④ 20分間オートクレーブし、真空乾燥する。

A. バイオダインAを用いたコロニーリフトおよびプラークリフト

1) コロニーや、目視で確認できる程度にプラークを形成したペトリ皿を、予め 4°C の冷蔵庫内で30分間冷却しておく。

2) 無菌操作により、 $1.2\mu\text{m}$ のバイオインAを注意深く寒天培地表面に載せる。赤熱させた針でメンブレンの上から突き刺し、メンブレンと寒天培地に印を付ける。

3) メンブレンを1回の操作で注意深くはがす。

4) 高塩濃度変性溶液(2.1.2)を浸したろ紙の上に、コロニーあるいはプラークに接した面が上になるようにしてメンブレンを載せ、5分間放置する。

5) メンブレンをはがし、乾いたろ紙の上に載せ、余分な液を吸い取る。

6) 中和溶液(2.1.4)を浸したろ紙の上にメンブレンを5分間置き、中和する。

7) UV照射またはベーキングによって固定化する。(P.18の“2.7 固定化”を参照)

8) 2X SSCでリンスする。

9) P.19のハイブリダイゼーション操作に進む。

B) バイオダインAを用いたレプリカプレーティング

プラスミドやコスミドを取り込んだバクテリアのコロニーは、直接0.2 μ mのバイオダインAの上にプレーティングすることができます。雑菌による汚染を防ぐために、メンブレンには前述の前処理を行ってください。

1) 無菌操作により、ペトリ皿の寒天培地表面に0.2 μ mのバイオダインAを注意して載せる。その際、寒天培地とメンブレンとの間に気泡が入らないように注意する。

2) バクテリア懸濁液の適当な希釈溶液を調製し、メンブレン上に直接プレーティングする。(82mmディスクの場合には0.5mL、132mmディスクの場合には1.2mLの溶液を目安とする。)

3) 37°Cで適当な時間培養することにより、小さなコロニー（直径0.5mm未満）を形成させる。

4) バイオダインAをはがし、コロニーを形成している面を上にして、ガラス板上に置いた滅菌済みのろ紙の上に置く。この上に、新しい滅菌済みのバイオダインAを1回の操作でずれないように重ねる。コロニーがにじんでしまうため、重ね直したり、メンブレンを動かしたりしてはならない。

5) もう1枚の滅菌済みのろ紙とガラス板を載せる。上側のガラス板に手でカー杯圧力を加えた後、ガラス板とろ紙を取り除く。

6) 赤熱させた針で、重なっている2枚のメンブレンを突き刺し、2枚のメンブレンの同じ位置に印をつける。

7) 注意してメンブレンをはがし、2枚のメンブレンをそれぞれ別の新しい寒天培地の入ったペトリ皿の上にコロニー側が上になるようにして載せる。

8) 1枚目のメンブレン上のオリジナルのコロニーを再び培養し、このプレートマスタープレートとして冷蔵庫に保存する。

9) 2枚目のメンブレン(レプリカ)上のコロニーは、通常増殖にやや時間がかかる(4~6時間)。コロニーが小さくても明確に識別できるようになった時点で、メンブレンを寒天培地からはがす。

10) 前述の2.6のAの4)~6)に従って、レプリカメンブレンを変性し、中和する。

11) UV照射またはベーキングによって固定化する。(P.18の“2.7固定化”を参照)

注)固定化後、37°Cで6~12時間、分解溶液(2.1.7)中で処理することにより、メンブレン上のタンパク質を取り除く。黄色みがかかったコロニーのスポットはこの処理の間に消失する。その後、2X S S C中でメンブレンをリンスする。

12) P.19のハイブリダイゼーション操作に進む。

2.7 固定化

固定化の方法としては、主にオープン中での80° CのベーキングとUV照射の2つの方法があります。ただし、バイオダイナインBを用いたDNAのアルカリトランスファーの場合には、これらの固定化を必要としません。なぜなら、このようなアルカリ条件下では、正に荷電したメンブレンと負に荷電したDNAとが、非常に安定した複合体を形成するためです。同様の理由で、バイオダイナインBを用いたアルカリ・ドットプロットの場合にも固定化操作を必要としません。

A. 80°Cでのベーキング:

この方法は、バイオダイナインAおよびバイオダイナインBを用いたドットプロットを含むあらゆるDNAのトランスファーに適した固定化法です。真空オープンが必要でなく、一般的な対流式あるいは空気循環式の実験用オープンで十分です。

- 1) メンブレンへのトランスファー後、80°Cで15分間ベーキングする。
- 2) ハイブリダイゼーション操作に進む前に、2XSSCでリンスする。

B. UV照射:

この方法は、バイオダイナインAを用いたあらゆるDNA/RNAのトランスファーに適した固定化法です。また、リプロービングを目的としてバイオダイナインBにRNAを固定化する場合には、特にUV照射をお勧めします。(もちろん、80°Cでのベーキングでもよい結果は得られます。)

UV照射における最適な照射時間と照射距離を、使用する照射装置で決定しておくことは非常に重要です。(典型的な照射時間は30秒から5分で、照射距離は15cmです。)

注) 照射エネルギーは、それぞれの装置によって異なりますのでご注意ください。

1) トランスファー後、湿った状態のまま、あるいは乾燥させた状態のメンブレンを最適な条件でUV照射する>(*照射前にメンブレンを室温で60分間風乾するか、80°Cで15分間ベーキングして乾燥させる。)トランスイルミネーターを使用する場合には、湿った状態のまま、あるいは乾燥させた状態のメンブレンを、UV透過性のサランラップ**で包んでメンブレン表面を保護する。照射プレート上にメンブレンの照射側を下に向けて置き、UV照射する。

**サランラップは、旭化成工業(株)の登録商標。

2) 照射後は、ハイブリダイゼーション操作に進む前に、2XSSCで軽くリンスする。

3. ハイブリダイゼーション (参考文献5,6)

ここでは、核酸のトランスファー(ドットプロット、サザントランスファー、ノーサントランスファー、コロニーリフト、プラークリフト等)後に行うプレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーション操作について説明しております。

3.1 溶液

3.1.1 DNAストック溶液

非相同性DNA(水に溶解して10mg/mlとしたサケあるいはニジン精子DNA)を30分間超音波処理した後、30分間煮沸して変性させる。小容量に分注し、 -20°C で冷凍保存する。

3.1.2 ハイブリダイゼーション溶液(サザントランスファー用)

小容量の非相同性DNA(ストック溶液3.1.1)を 100°C で10分間煮沸した後、氷中で急冷して変性する。これを、終濃度 $100\mu\text{g/ml}$ になるように、DNAハイブリダイゼーション溶液*1に加える。

*1 DNAハイブリダイゼーション溶液

5X Denhardt's溶液(2.1.9)、5X S S C(2.1.5)、 $0.1\%(\text{w/v})$ S D S(2.1.11)

注)Denhardt's溶液を必要としない場合もある。その場合には、 $0.1\%(\text{w/v})$ S D S溶液を使用する。

3.1.3 ハイブリダイゼーション溶液(ノーザントランスファー用)

小容量の非相同性DNA(ストック溶液3.1.1)を 100°C で10分間煮沸した後、氷中で急冷して変性する。これを、終濃度 $100\mu\text{g/ml}$ になるように、RNAハイブリダイゼーション溶液*2に加える。

*2 RNAハイブリダイゼーション溶液

脱イオン化した50%ホルムアミド(2.1.12)、

5X Denhardt's溶液(2.1.9)、5X S S P E(2.1.10)、 $0.1\%(\text{w/v})$ S D S(2.1.11)

3.1.4 リンス溶液: 2 X S S C

3.1.5 洗浄バッファー: 2X S S C、 $0.1\%(\text{w/v})$ SDS

注) 使用するプローブによって、最適な洗浄バッファーを選択する必要がある。100%相同性プローブを使用する際の最も厳しい洗浄条件は、 $50^{\circ}\sim 65^{\circ}\text{C}$ で 0.1X S S C 、 $0.1\% \text{S D S}$ を使用する場合である。

3.1.6 プローブの調製

実際にはプローブの種類(性質)と、通常実験室で行っている方法とを考慮して、的確な調製を行う。

R₁標識したプローブ(参考文献5,7)の変性

①熱変性

$100\mu\text{g/ml}$ の非相同性DNAを含むプローブ溶液を 100°C で10分間煮沸した後、氷中で急冷する。

②アルカリ変性

$100\mu\text{g/ml}$ の非相同性DNAを含むプローブ溶液に、1/10容量の 1M NaOH を加え、 65°C で10分間加熱した後、1/10容量の 1M HCl を加えて中和する。

注) アルカリ条件下では、標識されたビオチンがプローブから脱離してしまうため、ビオチン化プローブを使用する場合には、アルカリ変性を行ってはならない。

3.2 プレハイブリダイゼーション

1) メンブレンをハイブリバックに入れ、メンブレン 100cm^2 当たり $2\sim 4\text{ml}$ のハイブリダイゼーション溶液を加えて密封する。(ハイブリダイゼーション溶液としてサザントランスファーの場合には3.1.2を、ノーサントランスファーの場合には3.1.3を使用する。)

2) サザントランスファーの場合には 65°C で、ノーザントランスファーの場合には 42°C で、それぞれハイブリバックを15分 \sim 1時間加温する。

3.3 ハイブリダイゼーション

- 1) メンブレンの入ったハイブリバックを開き、余分なハイブリダイゼーション溶液を廃棄する。ハイブリバックの上でピペットを転がし、中に残っている溶液をできる限り除く。
- 2) 変性処理した標識プローブを適量の新しいハイブリダイゼーション溶液(サザントランスファーの場合には3.1.2、ノーザントランスファーの場合には3.1.3)に加える。メンブレン100cm²当たり2mlのハイブリダイゼーション溶液を使用する。
- 3) この標識プローブを合む適量のハイブリダイゼーション溶液をハイブリバック中のメンブレンに加え、再び密封する。
- 4) サザントランスファーの場合には、ハイブリバックを65°Cで2時間から一晩加温して、ハイブリダイゼーションを行う。ノーザントランスファーの場合には、ハイブリバックを42°Cで4時間から一晩加温して、ハイブリダイゼーションを行う。

3.4 洗浄

- 1) ハイブリダイゼーション終了後、ハイブリバックからメンブレンを取り出し、リンス溶液(3.1.4)中に軽く浸す。
- 2) 新しいハイブリバックにメンブレンを入れ直す。
- 3) メンブレン100cm²当たり250mlの洗浄バッファー(3.1.5、室温)を加え、ハイブリバックを密封する。
- 4) ハイブリバックを室温で20分間激しく振(200 rpm)した後、洗浄バッファーを廃棄する。
- 5) 3)と4)の操作を2回繰り返す。
- 6) メンブレンをサランラップで包み、直接オートラジオグラフィーを行うか、その他のnon-RI系を用いて検出する

3.5 リハイブリダイゼーション

バイオダインAとバイオダインBは、ともに容易にリプロービングすることができます。DNAやRNAをバイオダインAへ、また、RNAをバイオダインBへ固定化し、リハイブリダイゼーションも行う場合の固定化法としては、UV照射をお勧めします。バイオダインBにDNAを固定化する場合には、80°Cでのベーキングをお勧めします。

プローブを外す(ストリッピング)には、0.1% SDS溶液中での煮沸をお勧めします。次に示した方法は、RI標識プローブ用いた場合の例です。バイオダインにビオチン化プローブ(参考文献8)を使用した場合にも、効率良くリプロービングすることができますが、別の条件が必要になります。non-RI標識プローブを使用してリプロービングを行う場合には、検出キットに添付されているメーカーのプロトコールに従ってください。

注) プローブを外すまでは、どのステップにおいてもメンブレンを乾燥させないように注意してください。

- 1) 沸騰状態の0.1% SDS溶液をメンブレンの上に注ぎ、2~3分間振盪しながら攪拌する。溶液を捨て、直ちに沸騰状態の新しい0.1% SDS溶液を加える。40°Cあるいは室温になるまで冷却する。

注) プローブを外すために、さらに厳しい処理を必要とする場合がある。その際には、0.1% SDS溶液中で、煮沸(30分間まで)を行うこともある。

- 2)十分にプローブが外れているかどうかを確認する場合には、この時点でメンブレンをサランラップで包み、オートラジオグラフィーを行う。
- 3)リプロービングする前に、メンブレンを再度プレハイブリダイゼーションする。(P20の“3.2プレハイブリダイゼーション”を参照)

3.6 ストリッピングの別法

ストリッピングの方法には、煮沸した0.1% S D S溶液を使用する他にも様々な方法があります。以下にその例を挙げます。

A. アルカリ・ストリッピング (DNAトランスファー)

注)この方法は、RN Aトランスファーの場合には行ってはなりません。

- 1)45°Cに加熱した0.4M NaOH溶液を湿ったメンブレンに注ぎ、30分間保温する。
- 2)メンブレンを0.1x S S C-0.1%(w/v)S D S中で、室温にて15分間洗浄する。
- 3)同様に、0.2M Tris-HCl(pH7.4)中で、室温にて15分間洗浄する。
- 4)十分にプローブが外れているかどうかを確認する場合には、この時点でメンブレンをサランラップで包み、オートラジオグラフィを行う。
- 5)リプロービングする前に、メンブレンを再度プレハイブリダイゼーションする。(P20の“3.2プレハイブリダイゼーション”を参照)

B. 低モル濃度のTris溶液による方法 (RN Aトランスファー)

- 1) バッファーの調製

0.5M EDTA	4mL	
50XDenhardt溶液	2mL	蒸留水で1Lにする。
1M Tris-HCl (pH7.6)	5mL	
- 2) 上記バッファー溶液を湿ったメンブレンに注ぎ、63°Cで2時間加温する。
- 3) メンブレンを0.1X S S C-0.1%(w/v)S D S中で、室温にて15分間洗浄する。
- 4) 同様に、0.2M Tris-HCl(pH7.4)中で、室温にて15分間洗浄する。
- 5)十分にプローブが外れているかどうかを確認する場合には、この時点でメンブレンをサランラップで包み、オートラジオグラフィを行う。
- 6)リプロービングする前に、メンブレンを再度プレハイブリダイゼーションする。(P.20の “3.2プレハイブリダイゼーション”を参照)

C. ホルムアミドによる方法 (RNAトランスファー)

- 1) 75%ホルムアミドー10mMリン酸ナトリウムバッファー(pH7.4)を湿ったメンブレンに注ぎ、65°Cで1時間加温する。
- 2) メンブレンを、0.1X S S C-0.1%(w/v)S D S中で、室温にて15分間洗浄する。
- 3) 同様に、0.2M Tris-HCl(pH7.4)中で、室温にて15分間洗浄する。
- 4)十分にプローブが外れているかどうかを確認する場合には、この時点でメンブレンをサランラップで包み、オートラジオグラフィを行う。
- 5)リプロービングする前に、メンブレンを再度プレハイブリダイゼーションする。(P20の“3.2プレハイブリダイゼーション”を参照)

4. 参考文献

1. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J (1982)
Molecular Cloning. A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.
2. Wahl, G. M., Stern, M. and Stark, G. R. Efficient transfer of large
DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid
hybridization by using dextran sulfate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979)
p3683-3687.
3. Reed, K. C. and Mann, D. A. Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon
membranes. Nucl. Acids Res. 13 (1985) p. 7207-7221.
4. Goldberg, D. A. Isolation and partial characterization of the *Drosophila* alcohol
dehydrogenase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) p. 5794.
5. Meinkoth, J. and Wahl, G. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid
supports. Anal. Biochem. 138 (1984) p267-284.
6. Ed. Hames, B. D. and Higgins, S. J. Nucleic acid hybridization, a practical approach, (1985) IRL Press
Ltd., Oxford, UK.
7. Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific
activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. Mol. Biol. 113 (1977) p237-251.
8. Gebeyehu, G., Rao, P. Y., Soo Chan, P., Simms, D. A. and Klevan, L. Novel biotinylated nucleotide - analogs
for labelling and colorimetric detection of DNA. Nucl. Acids Res. 15 (1987) p. 4513-4534.