

(コロニー) / [ブランク]スクリーニング

DIG - CSPD法

ナイロンフィルターへのDNAの固定化とハイブリダイゼーション

1. 膜に印をつける。(直径 8.5 cm 円) [9.6 x 13.5 cm]

[プレートを4 にしておく]

2. プレートに膜をのせる。

(5 mm 長の「一」の字をコロニーをつついた爪楊枝でかく。)

(一晚 37 で培養。(培養後は直ちに次の操作へ進む))

3. 膜をはがし、自然乾燥。コロニー / ブランクの面を上にして、

0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl 20 sec バットに浮かべる

0.5 M Tris-HCl (pH7.5), 1.5 M NaCl 20 sec バットに浮かべる

2 x SSC 20 sec バットに浮かべる

2 x SSC ----- 浴中に浸漬する

膜が沈んでしまう場合は、それぞれの溶液をしみこませたる紙上に膜をのせる。

4. ろ紙上で自然乾燥 (完全に乾かしてはいけない)

5. プラスチックバッグにはさみ (サランラップ?) 254 (312?) nm で 2 - 5 min 照射。

要? (参考 ; 各 1 枚の 254 nm での透過率。プラスチックバッグ45%, サランラップ74%)

- - - 操 作 中 断 可 - - -

6. 2 x SSC 100 ml と膜 (10 枚) をプラスチックバッグに密封。

7. 沸騰水中で 2 min 処理。

8. 2 x SSC 400 ml で洗浄。

9. 2 x SSC 400 ml で洗浄。

10. あらかじめ 65 にした Rapid-Hyb buffer (Amersham RPN-1635) 5 ml と膜 (10 枚) をプラスチックバッグに密封し 65 で 15 min 以上ときどき攪拌しながらおく。

11. プローブを (95 -) 97 , 5 (- 10) min 処理し、直ちに氷冷。

12. プローブ濃度 5 - 10 ng/ml となるように加える。(PCR 反応物 ca. 3 μ l)

13. バッグ全体が水平となるようにして攪拌しながら 65 , 1 - 2.5 hr 。

14. 膜をバッグから出し、50 ml 2 x SSC, 0.1% SDS 20 min, 室温で洗浄。

15. 50 ml 1 (- 0.1) x SSC, 0.1% SDS 15 min, 65 で洗浄。

16. 50 ml (1 -) 0.1 x SSC, 0.1% SDS 15 min, 65 で洗浄。

17. ろ紙上で自然乾燥。

- - - 操 作 中 断 可 - - -

18. 100 ml washing buffer で膜をリンス。室温で 5 min 。

19. 100 ml blocking solution と膜を室温で 30 min 静置。

20. 1次抗体 (Anti-Digoxigenin-AP) (ストック溶液 10000 倍希釈) / 20 ml blocking solution と膜 10 枚をプラスチックバッグに密封し、室温で 30 min 静置。
21. 100 ml washing buffer で膜をリンス。室温で 15 min。
22. 100 ml washing buffer で膜をリンス。室温で 15 min。
23. 20 ml detection buffer に 5 min 膜を浸漬。
24. 20 μ l CSPD / 2 ml detection buffer と膜をプラスチックバッグに密封し、5 min 浸漬。
25. 膜を取り出し、DNA 面を上にして、ろ紙上で余分な水分を吸い取らせる。
完全に乾燥させてはならない。CSPD 溶液は回収し冷暗所に保存、2 回まで使用可。
26. 膜をプラスチックバッグに密封し、15 min, 37 $^{\circ}$ C で静置。
27. これより、作業は暗室。
室温で 5 min X-ray film に感光。
28. 現像液は 20 $^{\circ}$ C、定着液は室温で現像する。

[Maleic Acid Buffer] 0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, adjusted to pH 7.5 with NaOH

[Washing Buffer] Maleic acid buffer plus 0.3%(v/v)Tween20

[Blocking Solution] dilute the stock solution 1:10 in maleic acid buffer
([blocking stock solution] 10%(w/v) blocking reagent in maleic acid buffer)

[Detection Buffer] 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5