

(コロニー) / [ブランク]スクリーニング

D I G - A B C 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 / プ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. 10 % スキムミルク水溶液 50 ml を膜 10 枚とプラスチックバッグに密封し、室温で 1 hr (以上) 静置。

19. PBS でリンス。10 % スキムミルク水溶液は回収して、-20 で保存。
20. 1 次抗体 (Anti-Digoxigenin) (ストック溶液 100 - 400 倍希釈) PBSA (3 % BSA / PBS) 10 ml と膜 10 枚をプラスチックバッグに密封し、室温で 1 hr (以上) 静置。
- - - 操 作 中 断 可 - - -
21. 300 ml PBS で 5 min 膜を洗浄。スキムミルク溶液を解凍。
22. 500 ml PBS で 15 min 膜を洗浄。
23. 1 l PBS で 15 min 膜を洗浄。
24. 膜をスキムミルク溶液に 5 min 浸漬。
25. PBS で膜をリンス。(直ちに次の操作へ進む。中断不可)
Vectastain ABC kit
26. ビオチン化抗体 1 drop + ブロッキング用血清 3 drops / 10 ml PBS を調製。
27. アピジン DH 2 drops + ビオチン化 HRP-H 2 drops / 5 ml PBS を調製、室温で 30 min 以上静置。
28. 膜 10 枚と抗体溶液 5 ml をプラスチックバッグに密封し、室温で、30 min 静置。
29. 抗体溶液回収。(4 保存、10 日位使用可)
30. PBS で膜を 5 min 洗浄。
31. 10 ml ビオチン化 HRP - H 溶液と膜をプラスチックバッグに密封し、室温で 30 min 以上静置。
32. 300 ml PBS で 5 min 膜を洗浄。
33. 500 ml PBS で 15 min 膜を洗浄。
34. 1 l PBS で 15 min 膜を洗浄。
35. 基質溶液に膜を 1 枚ずつ 5 - 10 min 室温で浸漬。
36. 水道水で洗浄。
37. ろ紙上で自然乾燥。

基質溶液 [4 C N]		基質溶液 [D A B]	
	ca. 250 ml		50 ml
0.3 % クロロナフトール / MeOH	40 ml	50 mg/ml DAB	0.50 ml
0.3 % H ₂ O ₂	8 ml	30 % H ₂ O ₂	0.017 ml
27 mg / ml dH ₂ O イミダゾール	5 ml	dH ₂ O	48.2 ml
1 x PBS	200 ml	2 M Tris-Cl (pH 7.2)	1.25 ml