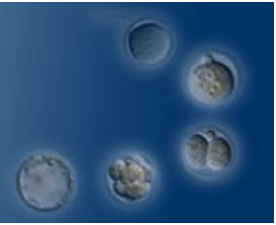


LARGE

Laboratory for
Animal Resources and
Genetic Engineering
RIKEN, Center for Developmental Biology



06. ゲノム抽出からサザン解析

1. ゲノム抽出

1)ES細胞から

- (1) lysis buffer(注1)を667.5ul加える
- (2)P1000でピペッティング
- (3)10%SDSを7.5ul加える
- (4)10mg/ml ProKを75ul加える
- (5)55°C 8hr~Overnight 緩やかにシェイキング
- (6)100ug/mlのRNase A を10ul加える
- (7)37°C 1hr
- (8)フェノールを750ul(RT)加えて、ローテート(TAITEC RT-5)15min(注2)
- (9)cfg at 12,000rpm for 5min RT
- (10)同様にフェノール/クロロホルム処理 2回
- (11)クロロフォルム処理1回
- (12)イソプロパノールを750ul加えて、ゲノムが析出するまでinvert
- (13)cfg at 3,000rpm for 15min RT (3,000rpmでやるとゲノムが解けやすい)
- (14)70%エタノールを1ml加える
- (15)cfg at 3,000rpm for 15min RT
- (16)もう一度(14)~(15)
- (17)風乾
- (18)200ulのTE(pH8.0)に溶解する(解けにくい場合は50°Cで暖めたり、P200のピペットでピペティングするスムーズに通るようになれば解けた状態)。
- (19)吸光度測定、電気泳動で濃度を確認する

2) tailから

- (1)1~2cmのtailを細かく切る
 - (2)lysis buffer(注1)を675ul加える
 - (3)10mg/ml ProKを75ul加える
 - (4)55°C 8hr~overnight 緩やかにシェイキング
 - (5)100ug/mlのRNase A を10ul加える
 - (6)37°C 1hr
 - (7)フェノールを750ul(RT)加えて、ローテート(TAITEC RT-5)15min(注2)
 - (8)cfg at 12,000rpm for 5min RT
 - (9)同様にフェノール/クロロホルム処理1回、クロロフォルム処理1回
 - (10)イソプロパノールを750ul加えて、ゲノムが析出するまでinvert
 - (11)cfg at 3,000rpm for 15min RT
 - (12)70%エタノールを1ml加える
 - (13)cfg at 3,000rpm for 15min RT
 - (14)もう一度(12)~(13)
 - (15)風乾
 - (15)200ulのTE(pH8.0)に溶解(解けにくい場合は50°Cで暖める)
 - (16)同様にフェノール/クロロホルム1回した後、エタノール沈殿(cfg at 3,000rpm for 15min RT)
 - (17)70%エタノールを1ml加える
 - (18)cfg at 3,000rpm for 15min RT
 - (19)もう一度(17)~(18)
 - (20)風乾
 - (21)200ulのTE(pH8.0)に溶解(解けにくい場合は50°Cで暖めたり、P200のピペットでピペティングするスムーズに通るようになれば解けた状態。tailの場合はやりすぎると壊れるので程々にする。)
 - (22)吸光度測定、電気泳動で濃度を確認
- Tail 1cmあたり100ng/ul~500ng/ul回収可能

3) フェイズロックゲルを用いた場合

(1)~(7)まで同じ

(8) フェイズロックゲル(QIAGEN MaXtract Low Density Cat. No. 129016)のチューブにデカントで移す

(9) フェノール750ul(RT)加えて、ローテート15min

(10)cfg at 12,000rpm for 5min 4°C

(11)同様にフェノクロ2回

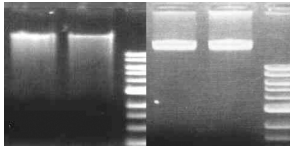
以下同様

4)泳動写真

左:tail由来、右:ES由来

各2レーンずつ泳動(200ng/lane)

35V 60min、0.7%agarose gel、marker : 1kbp ladder(最高段10kbp)



Tailは壊れ易いので破壊されたGenomeでスメアを引く

注1)lysis bufferの組成 (ES細胞からの場合はSDSを含まない)

10mM Tris-HCl(pH8.0)

150mM NaCl

10mM EDTA

0.5% SDS

注2) ゲノムはドロドロしているので1000ul用チップの先をはさみで数ミリカットして使用するとよい

2. 制限酵素処理

注) 一回で消化できない場合は2~3回行う(08.サザンに使う制限酵素を参照)。酵素処理後はボルテックスしても構わない。

- (1) 反応体積200ul(酵素20~40U)で10ugのゲノムを消化する
- (2) Overnight
- (3) フェノール/クロロホルム処理(cfg at 1,2000rpm)
- (4) エタノール沈殿 (cfg at 1,2000rpm)
- (5) 70% EtOHでWash
- (6) 15ulのTE(pH8.0)で溶解

3. トランスファー

- (1) 泳動サンプルをボルテックスして完全に溶かし、20~50mAでBPBがゲルの中央から末端までOvernight(午後7時頃から翌朝9時頃)で泳動する
- (2) 翌朝、10X loading dyeを5ul加える(以降の目印となる)
- (3) EtBr染色 (定規を添えて写真をとる)
- (4) 50mM HCl (D.W 480ml+HCl 2ml)でBPBが黄色になるまでシェイク (約15分)
- (5) Sol A 45min シェイク(BPBが黄色から青色に戻り、XCが緑色に変わる)
- (6) Sol B 45min シェイク

注1) コームは7.5mm以上の広めのものを必ず使用する

注2) loading dyeはXylen cyanol FF(XC)+ Bromophenole blue(BPB)を使用する

注3) ゲノムはコームは7.5mmで5ug程度ローディングする

組成

Sol A : 500ml

5M NaCl 150ml

5N NaOH 50ml +D.W

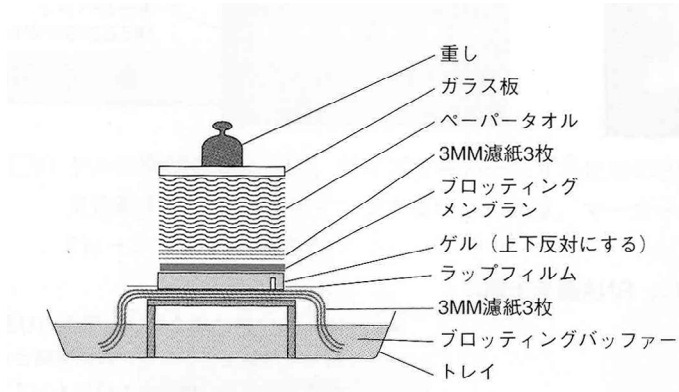
Sol B : 500ml

5M NaCl 300ml

2M Tris-HCl(pH7.5) 125ml +D.W

(7)キャピラリートランスファー

トランスファーに関しては20xSSCを用いた一般的な方法で行っております(下図参照)。



注1)メンブランはAnersham Biosciences社製の Hybond-N+を使用しています。

注2)ゲルより上に載せる3MMろ紙はD.Wで濡らしたものを2枚、乾いたものを3枚の計5枚を使用。

注3)ペーパータオルはクレシア社製のコンフォートサービスタオル200を200枚使用しています。

(8)ハイブリダイゼーションバッファーの作製

Hybridization buffer 100mlの組成

- 1)2M NaH_2PO_4 (MW 156.01) 7.9ml
- 2)1M Na_2HPO_4 (MW 358.14) 34.2ml
- 3)70mlぐらいまでD.Wを加える
- 4)BSA(Fraction V、pH5.2)を1g加えて完全に溶かす
- 5)0.5M EDTAを0.2ml加える
- 6)65°Cに暖める
- 7)SDSを7g加えて完全に溶かす
- 8)100mlにメスアップ

注)TOYOBOのPerfect Hyb(Code No.HYB-101)で代用可能

(9)プレハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションバッグを用いて13.5cm X 13.5cmのメンブランに対して約15mlのハイブリダイゼーションバッファーを加え、65°Cで2hr~8hrシェイキング

(10)プローブの標識

TAKARA社製の Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2を使用して、 α ^{32}P -dCTPで標識する

(プローブはBACを鋳型としたPCRにて増幅し、そのPCR産物をゲルから切り出して25ng/reaction使用、 α 32 P-dCTPは1.25ul加える。)

(11)ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションバッグを用いて13.5cm X 13.5cmのメンブレンに対して15mlのハイブリダイゼーションバッファーを加え、プローブを13.5cm X 13.5cmのメンブレンに対して鋳型25ng分のプローブを加え、65°Cで12hr~17hrシェイキングする

(14)Washing

Washing 条件はプローブに依存しますので下記に示す方法はあくまでも目安として下さい

1)0.1XSSC+0.1%SDS (室温)で15minシェイキング

2)ガイガーカウンターを1cm離して測定した場合に、バックグラウンドが100~200cpm、目的の位置のシグナルが200~1kcpmであればWashingを止めオートラジオグラフィーを行う

もしそうでなければ以下の行程へ進む

3)0.1XSSC+0.1%SDS(65°C)で30min~シェイキング

4)0.1XSSC+0.1%SDS(65°C) 30min~

5)0.1XSSC+0.1%SDS(65°C) 30min~

注1)Tail由来のGenome DNAは不純物が多くバックグラウンドが高くなる傾向があるので0.1XSSC+0.1%SDSでのWashingを75°Cで行うこともある。

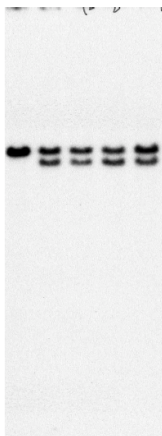
注2)ES細胞で上手くいって、マウスtailでは上手くいかない場合は、ゲノムが壊れている可能性が高いので、ゲノムを泳動して、先の写真と比較する。スメアがひどい場合は壊れているので、精製し直す必要がある。また検出するバンドのサイズが10kb以上はかなり難しく、短い制限酵素にかえるか、5'側か3'側の短い方へ変えてみるのがよい。

参考

1)プローブ配列の選び方

<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>のWebでプローブの候補配列500~1kbpをBlastにかける。このBlastで全く他に相同領域が無ければプローブとしてはほぼ優良な配列である。Neo probeはNeoのORFをPCRで増幅してProbeとする。

2)例



注)

シグナル強度はこのぐらいは必要で、バックグラウンドも低く抑える。またNeoプローブはランダムインテグレーションを検出するため、露光を長めに行ったものも必要である。