

第3節 ゲノムDNAのサザンブロット分析

【実習の概要】 相補的な1本鎖DNAは塩基間の水素結合により2本鎖を形成する。電気泳動で分画したDNAを、ナイロン膜などに固定し、標識したDNA断片（プローブ）と分子雑種を形成させ、特定のDNA配列を検出するのがサザンブロット法である。本節では、動物と植物に共通して存在するリボゾーマルDNAをプローブとしたゲノムDNAのサザンブロット分析による多型の検出を行う。

【器具・機器類】 冷蔵庫（4℃）、冷凍庫（-20℃）、超低温冷凍庫（-80℃）、オートクレーブ、ハイブリダイゼーションオープン、ウォーターバス、振盪器、ミューピッド、小型のバット、トランスイルミネーター、ゲル写真撮影装置、UV下で蛍光を発する定規、試薬瓶等、遠心器（マイクロチューブを回せるもの）、遠心器（卓上のマイクロチューブ専用の小型のもの）、プロットティングを行うための台等、UVクロスリンカー、アスピレーター、デシケータ、pHメーター、ピペットマン（P-20、P-200、P-1000、P-5000）、ハイブリダイゼーションバック、マイクロチューブ、イエローチップ、ブルーチップ、P-5000用のチップ、薬包紙、薬さじ等

【試薬】 *EcoRI*, *HindIII*, PCI(フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール), TE (Tris/EDTA), グリコーゲン, エタノール, Tris, SDS, EDTA, アガロース, エチジウムブロマイド, 塩酸, 酢酸, 酢酸ナトリウム, 水酸化ナトリウム, Hybond N (non-charge), NaCl, クエン酸ナトリウム, マレイン酸, ブロッキング試薬, 塩化マグネシウム, アルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体, ニトロブルーテトラゾリウム, X-リン酸 (5-ブロモ-4-クロロ-3インドリル・フォスフェート), ブロムフェノールブルー, キシレンシアノール, グリセロール, ジメチルホルムアミド, PCR DIG Probe Synthesis Kit (Rosch)

【DNAの制限酵素による消化】

- 1) 1 μg のDNAを全量100 μL 中で消化する。以下の溶液をマイクロチューブ中で混合し、37℃で一晩消化する。

{	DNA溶液 (1 μg 分)	x μL
	<i>EcoRI</i> or <i>HindIII</i> (10U/ μL)	2 μL
	10X buffer	10 μL
	滅菌水	88 - x μL
- 2) PCIを100 μL 加え、数回、チューブを反転して混ぜる。
- 3) 遠心分離する (4℃, 15000 rpm, 5分間)。
- 4) 水層 (上の層) を新しいマイクロチューブに移し、グリコーゲン溶液 (20mg/ml) 2 μL を加え、さらに3M NaOAc (pH 5.3) 10 μL と100%エタノール250 μL を加え、数回、チューブを反転させた後、-80℃で30分間インキュベートする。
- 5) 遠心分離する (4℃, 15000rpm, 20分間)。
- 6) 上清を捨て、75%エタノール200 μL を加え、チューブを数回反転させる。
- 7) 遠心分離する (4℃, 15000rpm, 5分間)。
- 8) デシケータ内で、10分間、減圧乾燥後、10 μL のTEに溶解する。

【電気泳動】

- 1) 0.8%アガロースゲルを作製する。
- 2) サンプル10 μL に色素液2 μL (TE, 0.1%ブロムフェノールブルー, 0.1%キシレンシアノール, 30%グリセロール)を加えて、電気泳動する。
- 3) エチジウムブロマイドが1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように加えたTE溶液中でゲルを10分間振盪し、染色する。
- 4) 染色後、ゲルを数回、蒸留水で濯ぐ。
- 5) トランスイルミネータ上にゲルをおきUVをあてて写真を撮る。この際、定規と一緒に撮影しておく。

【アルカリ変性】

- 1) 0.25N HClにゲルを浸し、BPBが酸性を示す黄緑色に変色後、5分間振盪する。
- 2) アルカリ変性溶液 (0.5N NaOH + 1.5M NaCl) にゲルを移し、15分間振盪する。
- 3) アルカリ変性溶液を新しいものにかえ、さらに15分間振盪する。
- 4) 中和溶液 (0.5M Tris HCl pH7.5 + 3M NaCl) にゲルを移し、15分間振盪する。
- 5) 中和溶液を新しいものにかえ、さらに15分間振盪する。
- 6) 20xSSC溶液中で5分間振盪する。

20xSSC

NaCl (3M)	175.3g
クエン酸-Na (0.3M)	88.2g

蒸留水で溶解し、塩酸でpHを7に調製し、1Lに定容したのちオートクレーブ

0.25 N HCl

濃塩酸	10 ml
滅菌水	490 ml

変性溶液

NaOH	10g
NaCl	43.8g

滅菌水で500 mlに定容する (オートクレーブ不要)

中和溶液

Tris	30.3g
NaCl	87.6g

HClでpHを7.5に調製した後、500 mlに定容し、オートクレーブ

【DNAのフィルターへのトランスファー】

- 1) ブロットするゲルと同じサイズに切ったHybond N (non charge) nylon membraneを、滅菌水で平衡化した後に、20xSSCに浸しておく。
- 2) 同様に切ったろ紙も20xSSCに浸しておく。
- 3) ブロッキング装置を作製し、20xSSC溶液を用いて一晩ブロッキングする。
- 4) トランスファー後のゲルは、エチジウムブロマイド染色して、DNAが残っていないことを確認しておく。
- 5) UVクロスリンカーにて、DNAをメンブレンにクロスリンクする。

【ハイブリダイゼーション】

- 1) ハイブリダイゼーション溶液 (5xSSC, 1%ブロッキング試薬, 0.02% SDS, 0.1% Nラウリルサルコシン) をメンブレン100 cm²当たり少なくとも40ml使用して、ハイブリダイゼーションバック中で、60°Cで3時間以上のプレハイブリダイゼーションを行う。
- 2) PCRによってDIGラベルしたプローブ液 (5 μL) を15mlのハイブリダイゼーション溶液に加え、沸騰水中で10分間インキュベートし氷冷して、変性する。
- 3) プレハイブリダイゼーション溶液を捨て、上記の変性したプローブ溶液と交換して、60°Cで一晩ハイブリダイズする。
- 4) ハイブリダイゼーション後のメンブレンを2xSSC, 0.1% SDS溶液中で、室温で5分間、2回洗浄する。
- 5) 続いて、メンブレンを0.1xSSC, 0.1% SDS溶液中で、60°Cで15分間、2回洗浄する。

【ハイブリダイズしたプローブの検出】

- 1) メンブレンをbuffer 1 (0.1 M マレイン酸, 0.15 M NaClをNaOHでpH7.5に調製しオートクレーブ滅菌) に数分間浸す.
- 2) buffer 1を捨て, buffer 2 [Buffer 1に, ブロッキング試薬を1% (w/v)の濃度に溶解したものをオートクレーブ滅菌]を加えて, 1時間インキュベートする.
- 3) buffer 2を捨て, アルカリフォスファターゼ標識の抗DIG抗体を5000倍にbuffer 2で希釈した溶液中で30分間インキュベートする.
- 4) 抗体溶液を捨て, buffer 1中で, 15分間2回の洗浄を行う.
- 5) メンブレンをbuffer 3 [0.1 M Tris-HCl (pH 9.5), 0.1 M NaCl]に数分間浸す.
- 6) 45 μ LのNBT溶液 [ニトロブルーテトラゾリウム塩を70%(v/v)のジメチルフォルムアミドに75 mg/mlの濃度で溶解]と35 μ LのX-リン酸溶液 (X-リン酸をジメチルフォルムアミドに50 mg/mlの濃度で溶解) 10 mlのバッファー3に加え暗所でバンドが現れるまでインキュベートする.