

SCIENCE IMAGING SYSTEMS

# Application Note No.17

応用編：ケミフルオレッセンス法を用いた  
ノーザンハイブリダイゼーションの検出

FLA-2000 / FLA-3000G

## はじめに

ノーザンハイブリダイゼーション後のRNAの検出は、アイソトープが主に用いられてきました。アイソトープを用いると微量なRNAの検出ができる反面、実験を管理区域内で行わなければならないなどの問題があります。そのため、通常の実験室で行える手軽な検出方法が必要となってきています。その検出方法の1つである、ケミフルオレッセンス法は、酵素と基質を反応させることによって蛍光物質を生成させる方法です。FLAシリーズでは、ケミフルオレッセンス法で用いられる基質AttoPhos™の検出を感度よく行うことができます。

今回は、鹿児島大学農学部生物資源化学科の侯先生にケミフルオレッセンス法によるノーザンハイブリダイゼーションの検出をご紹介します。先生は、機能食品による遺伝子の発現制御の研究に、この手法をご活用されています。

## Contents

1. Introduction
2. 試薬の準備
3. 実験操作法
4. まとめ
5. 参考文献

## Summary

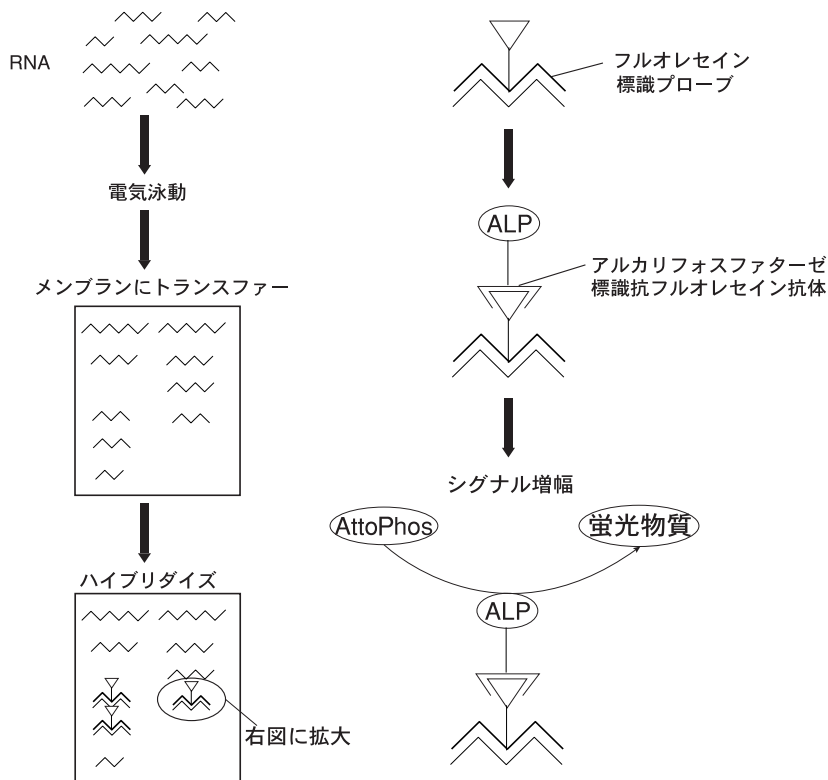
- 通常の実験室でアイソトープを使わないノーザンハイブリダイゼーションの検出が行えます。
- FLAシリーズを用いたケミフルオレッセンス法は、シグナルの検出感度が高く、再現性も優れています。

# 1 Introduction

ノーザンハイブリダイゼーション法はフィルターに固定したRNAと標識したプローブをハイブリダイズさせ、その位置と量からある遺伝子の発現がどこにどれくらいあるかを判定する技法である。この技法は分子生物学の研究者にとっては欠かせない方法の一つである。ノーザンハイブリダイゼーション法には従来アイソトープを使ってプローブを標識し、 $^{32}\text{P}$ の出す線をX線フィルムで検出する方法がとられてきた。しかし、アイソトープの人体への影響、施設の維持および廃棄物の費用を考えると、最近、非ラジオアイソトープ法である化学発光または蛍光標識プローブでのmRNAの検出が報告されている。しかし、これらの方法ではX線フィルムへの露出時間がコントロールしにくく、X線フィルムの無駄使いが多く、またプローブ標識などの問題で安定した結果が得られない場合もある。

そこでアイソトープを使用せずさらにX線フィルムも使わないノーザンハイブリダイゼーション法の開発が望まれてきた。我々は、ノーザンハイブリダイゼーション後アルカリフォスファターゼ標識抗フルオレセイン抗体とAttoPhos™(蛍光源性基質)を用いたケミフルオレッセンス法によるシグナルを増幅し、富士写真フィルム株式会社製のFLA-2000でその蛍光シグナルが安定に検出できたので、紹介させていただこうと思う。

## ケミフルオレッセンス法を用いたノーザンハイブリダイゼーション



## 2 試薬の準備

### 1. ハイブリダイゼーションバッファー

---

5 × SSC  
0.1% SDS  
5% liquid block  
5% dextran sulphate

---

-20 で3ヶ月保存可能

### 2. 洗浄バッファー

#### 洗浄バッファー-1

---

1 × SSC  
0.1% SDS

---

#### 洗浄バッファー-2

---

0.5 × SSC  
0.1% SDS

---

### 3. バッファー A

---

300 mM NaCl  
100 mM Tris-HCl, pH 7.5

---

### 4. ブロッキングバッファー

---

Blocking reagent	3 ml
バッファー A	27 ml

---

### 5. シグナル増幅液

---

Anti-fluorescein AP conjugate	4 μl
Bovine serum albumin	0.1 g
バッファー A	20 ml

---

使用時調製

### 6. 0.3% Tween 20 バッファー

---

Tween 20	0.3 ml
バッファー A	99.7 ml

---

### 3 実験操作法

#### ■ RNA サンプルの抽出およびRNA フィルターの作製

培養細胞からのRNA抽出はAGPC (Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform)法で行った。RNAフィルターは20 µgの total RNAを変性ゲルで電気泳動し、ナイロンメンブランにトランスファーして作製した。これらの方法は多くの実験書に記載されているのでご参照頂きたい。

#### ■ プローブの作製およびフルオレセイン標識

##### \*プローブDNAの精製

プローブとしての cDNAの必要部分をプラスミドベクターから制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動後、cDNAフラグメントを切り出してGENECLEAN II(BIO 101 Inc.)で精製する。

##### \*プローブDNAの変性

- (1) 150 ngのDNAを34 µlの蒸留水に溶かし、マイクロチューブに入れて密閉して96 °Cで5分間変性させる。
- (2) 氷水中で5分間急冷してスピンドウンする。

##### \*プローブDNAのフルオレセイン標識

- (1) 変性したプローブDNAのチューブに下記の試薬を加える。

Nucleotide mix	10 µl
Primers	5 µl
Enzyme solution	1 µl

- (2) スピンドウンした後、37 °Cで1時間反応させる。
- (3) 96 °Cで5分間変性させる。
- (4) 氷水中で5分間急冷してスピンドウンする。

#### ワンポイントアドバイス

用いたプローブDNA量が微量であるため、DNAの濃度測定は吸光測定値に頼らず、マーカーDNAを用いてアガロースゲル電気泳動でチェックし、定量すること。

#### ■ ノーザンハイブリダイゼーション

- (1) 容器に15 ml のハイブリダイゼーションバッファーを入れて60 °Cに温めておく。
- (2) 5 × SSCで湿らせておいたメンブランを、気泡が入らないようにハイブリダイゼーションバッファーに浸し、60 °Cで30分間ゆっくり振とうする。
- (3) フルオレセインで標識したプローブを加えてよく混和し、60 °Cで1晩ゆっくり振とうする。

## ■ 洗浄

- (1) メンブランを、あらかじめ60 ℃ に温めておいた150 mlの洗浄バッファ-1 に入れ、60 ℃ で15分間振とうする。
- (2) あらかじめ60 ℃ に温めた150 mlの洗浄バッファ-2 にメンブランを移し、60 ℃ で15分間振とうする。

## ■ シグナル増幅

- (1) 洗浄したメンブランを100 mlのバッファ-A に移し、室温で5分間振とうする。
- (2) メンブランを100 mlのプロッキングバッファ-に移し、室温で1時間振とうする。
- (3) メンブランを20 ml のシグナル増幅液に移し、室温で1時間振とうする。
- (4) メンブランを100 mlの0.3% Tween 20バッファ-に移し、室温で10 分間振とうする。(この操作を3回繰り返す)

## ■ シグナルの検出および解析

- (1) ビニールシートにメンブランを挟み、1 mlのDetection reagentを加え、5 分間反応させた後、新しいサランラップに移し、気泡が入らないように閉じる。
- (2) サランラップで包んだメンブランをFLA-2000のFLUORステージにセットする。
- (3) Image Readerを起動する。  
FLA-2000読み取り条件を次のように設定し、Read ボタンをクリックする。  
Gradation : 65536 (16 bit)  
Resolution : 50  
Sensitivity : F10 (または F1000)  
Sample Mode : Fluor. 473 nm, Y520 Filter
- (4) 読み取り終了後、Image GaugeまたはMacBAS ソフトを立ち上げる。  
"Mode - Quant"を選択し、定量解析を行う。

### ワンポイントアドバイス

シグナルの検出までの反応時間は遺伝子プローブの種類により異なる。最初は10分間おきに検出してみた方がいい。シグナルが最初から全く検出できない、あるいは極端に弱いときには一晩置いてから検出することもできる。また、基質添加後の反応時間が長過ぎる場合は、定量結果に影響を与えるので要注意。

## 4 まとめ

我々はDNAプローブをフルオレセインで標識し、ノーザンハイブリダイゼーションを行い、さらにAnti-fluorescein AP conjugate、AttoPhos™で蛍光シグナルを増幅し、FLA-2000で直接検出することができた。筆者の研究室で実験を繰り返した結果、この検出系は次の長所があることが分かった。

- 1) 検出感度がよく、アイトープと劣らない結果が得られる。
- 2) 再現性に優れ、安定したノーザンハイブリダイゼーションの結果が得られる。
- 3) アイトープを使わず、現像も要らないので、安全迅速に実験を行える。

ただし、発現量の少ない遺伝子では total RNA から mRNA を精製してからノーザンハイブリダイゼーションを行った方がよいと思われる。例えば、我々は肝臓細胞から抽出した total RNAを用いてアルブミン遺伝子の発現は容易に検出できたが、肝臓転写因子HNFの発現は total RNAでは検出できなかった。

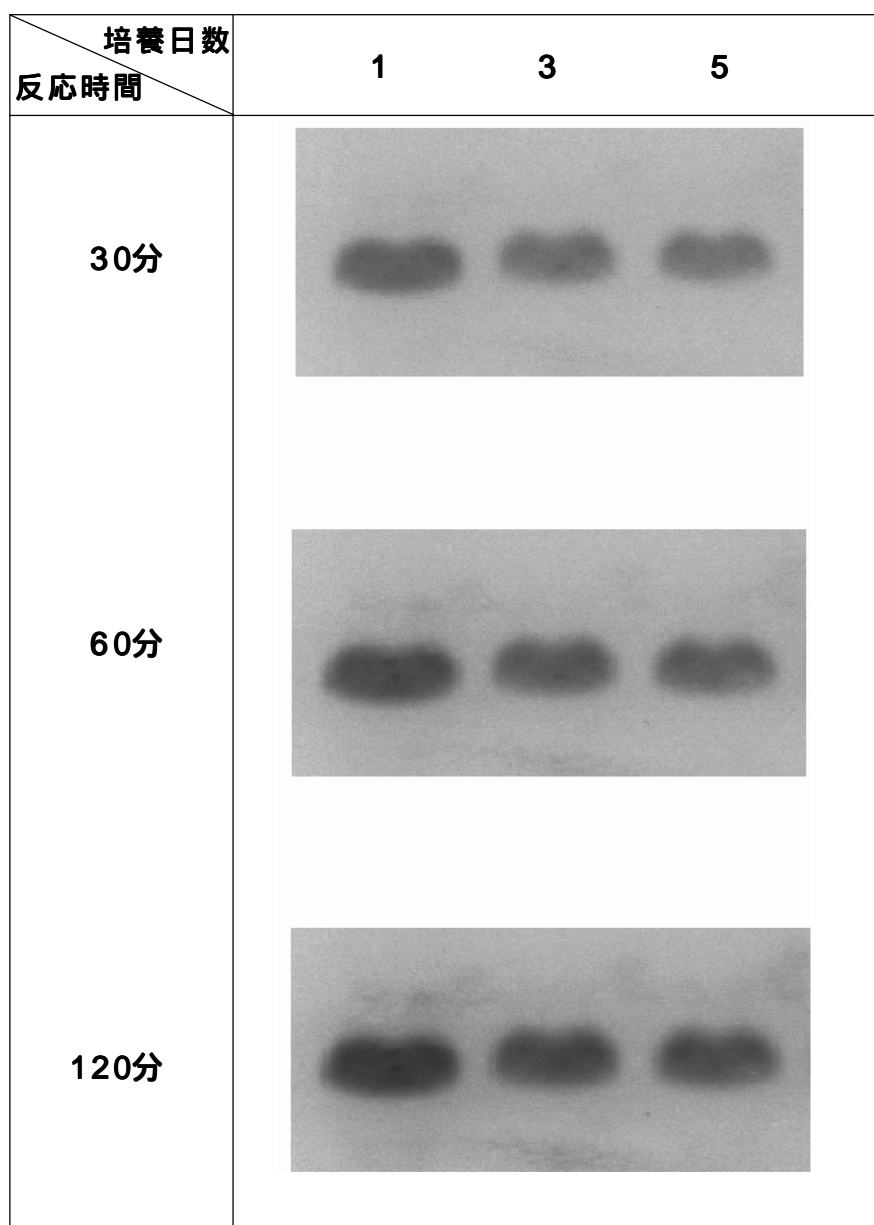


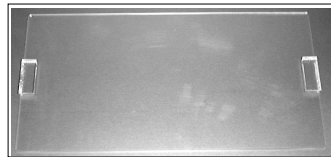
Fig.4-1

Fig.4-1 ニワトリ初代肝細胞培養におけるアルブミン遺伝子の発現  
基質添加後の反応時間と培養日数によるノーザンシグナルの変化

## FLA MEMBRANE WEIGHT のご紹介

FLA MEMBRANE WEIGHTはメンブランサンプルをFLAシリーズできれいに読み取るための板です。

フルオロステージ上においたメンブランの上から本製品を置くことによって、メンブランを平面に保つことができます。低蛍光素材を使用しておりますので、バックグラウンドの影響をおさえることができます。



### <操作方法>

1. FLUOR ステージのガラス面上にメンブランの表を下にして直接置いてください。



2. メンブランが平面になるように、メンブランの上からFLA MEMBRANE WEIGHTを載せてください。



3. FLUORステージをFLAシリーズのステージセット部にセットします。
4. Image Readerで読みとりを行います。

## 5 参考文献

---

- 1) Cano, R.J., Torres, M.J., Klem, R.E., Palomares, J.C., DNA hybridization assay using AttoPhos™, a fluorescent substrate for alkaline phosphatase, BioTechniques; 12, 264-269 (1992).
- 2) 中山広樹、西方敬人、バイオ実験 イラストレイテッド 遺伝子解析の基礎、秀潤社; 153-183 (1997).

著者

侯 徳興

(鹿兒島大学農学部生物資源化学科)

編集

三浦 研二

長島 眞喜子

大岡 留里子

(富士写真フイルム)

2000年 2月発行

---

 **FUJIFILM**

富士写真フイルム株式会社

●本書についてのお問い合わせは

東京本社 ■機器事業部 サイエンス・システム

〒106-8620 東京都港区西麻布2-26-30 TEL (03)3406-2201

FAX (03)3406-2158

E-mail : [sginfo@tokyo.fujifilm.co.jp](mailto:sginfo@tokyo.fujifilm.co.jp)

ホームページ : <http://www.fujifilm.co.jp/bio/>