

SCIENCE IMAGING SYSTEMS

Application Note

No.18

応用編：化学発光試薬 CSPD[®]による
ノーザンブロットティングの検出

LAS-1000 / LAS-1000plus / LAS-1000C

はじめに

LASシリーズの発売によって、微弱な化学発光を感度よく検出できるようになりました。また、化学発光試薬も種々の改良により、発光強度の増加、発光の長寿命化、試薬のキット化など、より使いやすいものになってきています。これらの組み合わせにより、微量なDNA、RNA、タンパク質などの検出ができます。

化学発光法は、通常の実験室で行える非常に魅力のある手法です。その為、今までのRIを使った実験系を化学発光法へ移行しようと多くの人が試みています。

今回は、ノーザンブロットティングを化学発光で検出されている女子栄養大学・佐久間研究室の福島先生にご執筆頂きました。先生は、小腸で発現している遺伝子の検出にこの方法を適用されており、今回のApplication Noteでは、実験条件、手順を詳細に記述して頂いています。

Contents

1. 実験手順
2. 実験結果
3. 参考文献

Summary

- 化学発光試薬CSPD[®]を使用してノーザンブロットティングの検出ができます。
- RIを使わないので通常の実験室で作業が行えます。
- RI法と同等の感度を得ることができました。

1 実験手順

■ 準備試薬

- ISOGEN(株式会社ニッポンジーン)
- Oligotex™-dT30<Super>(宝酒造株式会社)
- アガロースME(岩井化学薬品株式会社)
- Nylon membranes, positively charged(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)
- DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)
- DIG Luminescent Detection Kit(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)

■ 実験プロトコール

RNAの調整

小腸より粘膜をスライドガラスにてかき取り、ISOGENを用いて総RNA^{*1}を調製する。

^{*1} 総RNAを用いてバンドが検出できない場合は、Oligotex™-dT30<Super>等でpoly(A)⁺RNAに精製する。

メンブレンの作製

- (1) 電気泳動装置はコスモ・バイオ社製のMupid-3を用い、ホルムアルデヒドを含む0.8%アガロースゲル^{*2}で電気泳動する。
- (2) RNA溶液2.4μl^{*3}に5×MOPS緩衝液4.0μl、ホルムアルデヒド3.6μl、ホルムアミド10μlを加え、60℃で15分間反応させる。
- (3) 反応後色素液2.0μlを加え、50Vで電気泳動する。
- (4) 電気泳動により分離したRNAはNylon membranes, positively chargedに20×SSCにてプロットング法により転写する。
- (5) メンブレン上のRNAは120℃で30分間加熱し固定化する。

^{*2} アガロース0.8gと蒸留水50mlをまずオートクレーブにて溶解後、蒸留水12ml、5×MOPS緩衝液20ml、ホルムアルデヒド18mlを加えゲルトレイに流し込みゲルを作製する。

^{*3} 総RNAであれば20μg、poly(A)⁺RNAであれば2.0μg程度

ハイブリダイゼーション

- (1) RNAプローブは、DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)を用いて試薬に添付のプロトコールに従って作製する。
- (2) メンブレン(11×6cm)に、ハイブリダイゼーション液^{*4}5.0mlを加え、65℃で3時間以上プレハイブリダイゼーションを行う。
- (3) DIG標識RNAプローブを含むハイブリダイゼーション液1.0ml^{*5}に交換し、65℃で一晩反応(15時間程度)させる。
- (4) 反応したメンブレンは、2×SSC、0.1% SDSで室温10分間洗浄する。さらに、0.2×SSC、0.1% SDSで65℃20分間2回洗浄する。

^{*4} 5×SSC、10×Denhardt's液、10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 pH6.5、0.5% SDS、50%ホルムアミド、0.1mg/ml サケ精巢由来DNA

^{*5} ハイブリダイゼーション液の量はメンブレンの大きさによって異なる。

ワンポイントアドバイス

プローブの濃度は、キット添付のDIG-labeled RNAコントロールの5分の1程度にラベルされたものを400倍希釈で用いている。ハイブリダイゼーション液1.0mlに対し、プローブ2.5 μ l。

検 出

- (1) DIG Luminescent Detection Kitを用い、試薬に添付のプロトコールに従って検出を行う。
- (2) CSPD[®]は検出バッファー^{*6}で100倍に希釈する。
- (3) メンブレン(11×6cm)と上記のCSPD[®]溶液0.5ml^{*7}をハイブリダイゼーションバックの中に入れシールする。
- (4) シールしたメンブレンは37℃で15分間インキュベートし定常状態に到達させる。
- (5) 富士写真フイルム株式会社製のLAS-1000plusを用いて化学発光強度を測定する。

^{*6} 10mM Tris-HCl, pH9.5,
0.1M NaCl

^{*7} CSPD[®]溶液の量はメンブレンの大きさによって異なる。

ワンポイントアドバイス

この方法は、DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)を用い、RNAプローブを作製しノーザンハイブリダイゼーションを行っている。DNAフラグメントをDIG DNA Labeling Kit(ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)でラベルし、ハイブリダイゼーションの温度を50℃で行い、洗浄温度を55℃で行った場合、若干感度が低下するがほぼ同様の結果が得られた。

ワンポイントアドバイス

我々は、小腸で発現している数種の遺伝子(カルシウム結合タンパク質(カルビンディンD9k)、ラクターゼ、スクラーゼ、ビタミンDレセプター、 α -アクチン)についてDIGシステムによるノーザンハイブリダイゼーションを行っているが、発現量やRNAの性質により遺伝子間に感度の差は有るが、全てRI法と同等の感度を得ている。RI法でpoly(A)⁺RNAにまで精製しないと検出できない遺伝子は、DIGシステムにおいてもpoly(A)⁺RNAにまで精製しないと検出できない。

2 実験結果

ラット小腸のカルシウム結合タンパク質をFig.2-1のように、CSPD®にて検出することができた。この検出した結果を、total RNAを横軸、LAS-1000plusの定量値を縦軸にプロットしたところ、Fig.2-2のように直線性のある結果を得ることができた。

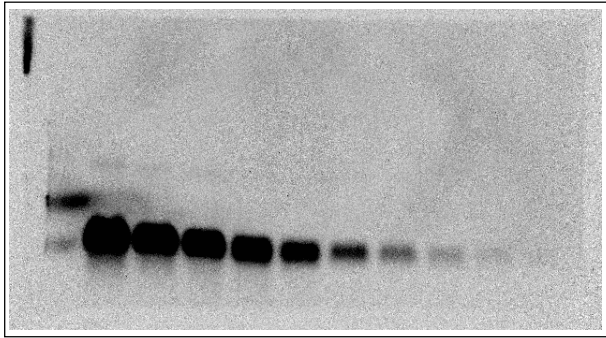


Fig.2-1

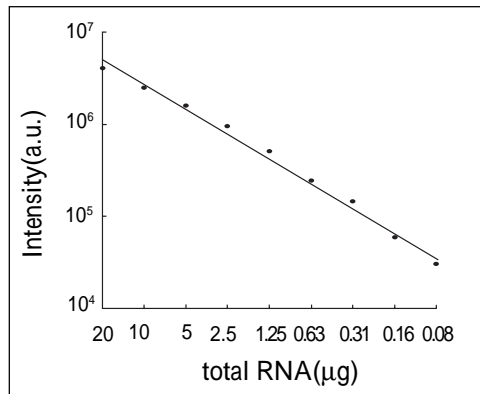


Fig.2-2

Fig.2-1 ラット小腸のカルシウムの結合タンパク質(カルビンディンD9k)のノーザンブロットニング

アプライ量:左から 20μg, 10μg, 5μg, 2.5μg, 1.25μg, 625ng, 312ng, 156ng, 78ng, 39ng

基質: CSPD®

<読み取り条件>

Binning: NO

Exposure Time: 1min

Position: 1

Fig.2-2 アプライ量と定量値

3 参考文献

- 1) 野村慎太郎、稲澤譲治著、細胞工学別冊9 脱アイントープ実験プロトコル DIGハイブリダイゼーション、秀潤社(1994)。
- 2) DIGシステムを用いてハイブリダイゼーションを行うためのユーザーガイド、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社。

著者

佐久間 慶子

福島 亜紀子

(女子栄養大学分子栄養学研究室)

編集

三浦 研二

長島 真喜子

大岡 留里子

(富士写真フィルム)

CSPD は、Tropix社の登録商標です。

2000年 3月発行

 **FUJIFILM**

富士写真フィルム株式会社

●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

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