

## Southern blotting

Hybridization solution を作製する。(例：200 mL)

1. 50% de ionized formamide 88 mL
2. 5×denhardtts solution 20 mL
3. 10% Dextran sulphate Na salt 20 g(溶けにくい!)
4. 5×SSPE 50 mL
5. 1% SDS 20 mL

始めに 1-4 まで液を作ってから最後に 5 を行うのが好ましい。(泡立つため)

1-4 の作製の際には 3 の粉が溶けにくいいため 42 °C で温めながら行うとよい。

1-5 まで完了したら混合

salmon sperm DNA(ss DNA)2 mL を 95 °C , 5 min 後 on ice 5 min

42 °C に保温

Pre hybridization

トランスファー済の乾燥 membrane を RO 水に浸す。(500 mL ほど) 5 min

5×SSC に浸す、5 min

ガラス筒の中に membrane を入れ、30 mL ずつ Hybridization solution を入れる。

混合。(membrane がガラス面によく引っつくようにする)

42 °C 、2 時間ハイブリダイゼーションオープンで攪拌。

probe 作製

1.5 mL チューブに DNA 12.5 ng を 1 μL、primer 1 μL、MilliQ 5 μL 入れる。

95 °C 、3 min 後 on ice (氷水) 5 min

×10 Buffer 1.25 μL dNTP 1.25 μL 入れる。

標識 dNTP 2.5 μL 加える。(ここからは RI 室で行う)

Exo free klenow Fragment 0.5 μL 入れる。

37 °C 、10 min

ペーパークロマトグラフィーによる probe チェック

ペーパークロマト試験紙に赤い点で印を付ける。

その点に 1 μL probe をつける

赤点につかないようにギ酸アンモニウムをつけ 1 分間静置。

サランラップにはさみ、現像する。

95 °C 、3 min

氷水で急冷

Hybridization

氷上で急冷した後、100 μL の TE を作製した probe の中に入れて溶かす。

あらかじめ 30 mL Hybridization solution を入れておいた 50 mL チューブの中に 50  $\mu$ L ずつ先ほどの probe 入りの TE を入れる。

ふたを閉めて、思い切りふり membrane に染込ませる。

オーバーナイト 42<sup>o</sup>、Rotation (ハイブリオープンで)

0.3% SSC、0.1% SDS を適当量入れ、タッパに membrane をつける。それを 50 に保ったインキュベーターに 5 min 程入れる。この操作を 3 回行う。

membrane をタンパク面を上にしてフィルターの上に乗せ、サランラップで巻き、カセットに入れる。

暗室でフィルムを切ってカセットの中にしっかり入れる。

-80 で数時間保存

現像する。