

FACS-mQ mRNA 基本プロトコール

1.細胞の固定

細胞を完全にばらばらになるまで分散

15ml チューブに移す。スイングローターで 3000rpm/5min/4C 上清をできるだけ除く。

冷やした PBS を加え、細胞を懸濁、1000 万個/1ml に PBS で調整

等量の 8%PFA-PBS を加え 4C ON

冷 PBS-T をいっぱいまで加える。1200rpm/4C/5min 上清を 100 μ l まで吸引

冷 PBS-T 10ml を加える。1200rpm/4C/5min 上清をできるだけ除く。

冷やした凍結保存液 1ml 加え細胞を懸濁、適当な量に分注して -80C で凍結保存

2. 前処理

*試薬は 4C で冷却しておく

細胞を 37C で急速融解する。

良く懸濁してスピッツに細胞を 100 μ l ずつ入れる。

冷 PBS-T 10ml 加えスイングローターで 1200rpm/4C/5min 上清を 100 μ l まで吸引

Proteinase K 液 (50 μ g/ml) 2 μ l を加えよく懸濁 (終濃度 1 μ g/ml) 室温 10 min

8%PFA-PBS を 100 μ l 加える。室温 5 min

冷 PBS-T 10ml 加え 1200rpm/4C/5min 上清を 100 μ l まで吸引

ハイブリ液 I 5ml 加え 1200rpm/4C/5min 上清を 100 μ l まで吸引(きっちり合わせる)

細胞を懸濁してハイブリ液 II を 90 μ l 加え、軽く懸濁。蓋を被せ 60C 30 min

3. ハイブリダイゼーション

1 μ l のプローブを 9 μ l のハイブリダイゼーション液 II に加える(終濃度 1ng/ μ l)

80C 5min それぞれの細胞に加える。軽く懸濁 蓋を被せ 60C 4時間

4. 洗い (遠心は常温で行う)

2xSSC-FT をあらかじめ 60C に暖めておく。

温めた 2xSSC-FT を 10ml 加える。蓋をして転倒混和

60C 10 min ゆっくり振蕩 1200rpm/室温/5min 上清を 100 μ l まで吸引

細胞を懸濁、2xSSC-T 10ml 加える。1200rpm/室温/5min 上清を 100 μ l まで吸引

5. 抗体反応 (試薬は予め冷却しておく)

Blocking 液 5ml を加える。1200rpm/4C/5min 上清を 100 μ l まで吸引

FLU 標識抗 DIG 抗体液を 1 検体あたり 100 μ l 加える。(終濃度 1 μ g/ml)

軽く懸濁 4C ON

冷 PBS-T 10ml を加える。転倒混和 1200rpm/4C/5min

上清を 100 μ l まで吸引 細胞を懸濁

冷 PBS-T 5ml を加える。FACS にかける。

試薬

*DEPC 処理

DEPC を 1/1000 容量で加え、瓶の蓋をして良く振る。蓋を軽く開けて ON 室温翌日 AC

*細胞培養用 PBS 1L

WAKO の試薬 1 袋を DWIL に溶かす。AC

*10xPBS (細胞培養以外で使用) 500ml

NaCl 40g

KCl 1g

Na₂HPO₄(12 水和物) 14.5g

KH₂PO₄ 1g

500ml の DW に溶解 DEPC 処理

*PBS-T 500ml

10 x PBS 50ml を DEPC-DW で 500ml に 500 μ l の Tween 20 を 1ml のシリンジで加えて(最終 0.1%) 良く溶解させる。

*8%PFA- PBS 50ml

(薬さじ 1 本, 漏斗 1 個, 100ml ビーカー 1 個, 回転子 1 個, 100ml フラスコ 1 個, 乾熱しておく)

40ml の DEPC-DW を 75C に加熱し, 乾熱した

薬さじで激しく攪拌しつつパラホルムアルデヒド 4g を加える。10N NaOH 20 μ l を加えて攪拌, 回転子を入れてホイルでしっかり蓋をして透明になるまで攪拌, すぐに氷冷する。冷えたら濾過して DEPC-DW で 45ml に合わせ 10xPBS 5ml 加え 4C 保存(1 週間以内に使用する)

*凍結保存液 10ml

DEPC-DW 8ml

10XPBS(DEPC 処理したもの) 1ml

DMSO 1ml

*Proteinase K 溶液(直前に調整)

PBS-T 279 μ l に Proteinase K (Roch1-194-364, PCR grade 14mg/ml) 1 μ l (終濃度 50 μ g/ml) を加える。

*20xSSC

NaCl 350.6g

クエン酸 3 ナトリウム 2 水和物 176.4g

HCl で pH7.0 に合わせる DW で 2L に

DEPC 処理

*ホルムアミドの脱イオン化

通常は不要。古いホルムアミドをハイブリ液作成に使用するときのみ行う。

乾熱したビーカーにホルムアミド（特級 WAKO 068-00426 500ml） 50ml と AG501-X8 1.0g くらい入れる。1 時間 ゆっくり攪拌、5 μ のフィルターで濾過、4 C 保存

* t RNA (50mg/ml)

酵母 t RNA 50mg を DEPC-DW 1ml に溶解、-20C 保存

*50% Dextran Sulfate 2ml

Dextran Sulfate 1g を 2ml チューブに入れ、2ml まで DEPC-DW を加える。一晩ローテーターで回転、再度 2ml の目盛りまで DEPC-DW を加え半日回転。-20C 保存

*ハイブリダイゼーション液 I 50ml

		最終濃度
ホルムアミド	25ml	50%
20xSSC	10ml	4x
Tween 20	50 μ l	0.1%
250mM EDTA(pH8.0)	200 μ l	1mM

DEPC-DW で 50ml に。50ml チューブで -20C 保存

*ハイブリダイゼーション液 II 10ml

		最終濃度
DEPC-DW		470 μ l
ホルムアミド	5ml	50%
Tween 20	10 μ l	0.1 %
20xSSC	2ml	4x
t RNA (50mg/ml)	80 μ l	400 μ g/ml
50xDenhardt's 液	400 μ l	2x
250mM EDTA(pH8.0)	40 μ l	1mM

50% Dextran Sulfate 2ml を注射器で入れて懸濁、15ml チューブで-20C 保存

*2 xSSC-FT 100ml

20xSSC 10ml
ホルムアミド 50ml

DEPC-DW で 100ml に、100 μ l の Tween 20 を 1ml のシリンジで加えて良く溶解させる。
4C 保存

*2xSSC-T 100ml

20xSSC 10ml を DEPC-DW で 100ml に 100 μ l の Tween 20 を 1ml のシリンジで加えて良く溶解させる。

*マレイン酸 Buffer 100ml

Maleic Acid (最終 100mM) 1.16g
NaCl (最終 150mM) 0.876g
DEPC-DW で 95ml として NaOH で pH を 7.5 にあわせる。

* x 20 blocking 液

Blocking Reagent 1g をマレイン酸 Buffer で 10ml とする。
加熱して溶解させる。4 C 保存。

*Blocking 液 100ml

10xPBS 10ml
20xBlocking 液 5ml
DW で 200ml に DEPC 処理後、Tween 20 100 μ l (最終 0.1%) 加え懸濁、4 C 保存

* Fluorescein (FLU) 標識抗 DIG 抗体液

Fluorescein (FLU) 標識抗 DIG 抗体 (ROCHE

11-207-741-910 200 μ g) を 1ml の DPEC-DW に懸濁する (200 μ g/ml)。100 μ l ずつ分注して遮光で-20C 保存。使用時に溶解したものは再凍結せず 4C で保存する。使用時に Blocking 液で 100 倍希釈する。