

RNA 抽出 (酵母)

手順

集菌、生理食塩水で wash、eppendorf tube に集菌。

注：ストレスとしてカルシウムを使った場合、洗浄はしっかりと（生食で2回）。TE をつかうのもいいかも！？

電源入れとけ！

↓
↓
400μl AE buffer を入れて懸濁（ピペットでブリブリ懸濁が重要）
40μl の 10% SDS を入れて、ピペットでふりふり懸濁して vortex。
数が多いときは SDS+AE にしてから懸濁しても OK。
440μl のフェノールを入れて（これでもかというくらい） vortex。
ヒートブロックで 65°C、4min。

（ヒートブロックよりウォーターバスでやった方が熱が伝わる）

↓
液体窒素で急冷。

がちがちに固まったサンプルが溶けるのを待って（30min 程度!?!）、室温で遠心。

↓
（遠心している際に Phe/Chl を新しいエッペンに入れておく）

↓
上清に Phe/Chl を入れて vortex、室温で遠心。

↓
上清に 1/10 量の 3 M Na-acetate を添加、1ml の EtOH を加えて（これも予め用意しておく）、-30°C で 20min。

↓
4°C で遠心。75% EtOH でリンス。EtOH をチップで吸い取ったら一度フラッシュ。下にたまった EtOH を取り除く。キムワイプをのつけて風乾。

↓
40μl の DW(DPEC 処理済)に溶かす。

40μl から 2μl とり 278μl の DW に希釈（140 倍希釈）して定量。

20×MOPS 5μl
ホルムアミド 17.5μl
ホルムアミド 50 μl
RNA(最終濃度 20μg 分) 27.5μl

サンプルが多い時は、残りの 38μl の RNA 溶液に
20×MOPS 6.9μl
ホルムアルデヒド 24.2μl
ホルムアミド 69.1μl
を加え、先にサンプル化しても OK。

ヒートブロックで 65°C、15min、氷で急冷、サンプルバッファー添加。

↓
20μg アプライ。1×MOPS で泳動（気を使うなら MOPS は DPEC 水で希釈）。

1%アガロースゲル100ml

アガロース1g

DPEC水77ml

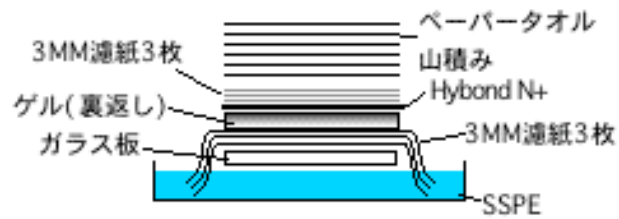
20×MOPS 5ml

↓

レンジ

↓

37%ホルムアルデヒド18ml



↓

12h 放置。

↓

メンブレンを 80°C, 2h, 3min UV クロスリンク。

冷蔵庫に保存。

↓

プレハイ

↓

メンブレンをハイブリバッグに入れて 40~65°C, 1h。

↓

プローブをぶち込むシールして 40~65°C, 12h 以上。

↓

一次(2×SSPE, 0.1% SDS)10mn×2、二次(1×SSPE, 0.1% SDS)20min×2、三次(0.1
×SSPE, 0.1% SDS)20min

ハイブリバッグをあけて一次洗浄液につける 20min。

二次洗浄(65°C)

三次洗浄(65°C)

メンブレンを風乾。

Memo