

商品名： DynaMarker[®] DIG Labeled Blue Color Marker for Small RNA
(旧名称: DynaMarker[®] Colored DIG Marker for Small RNA)

商品コード： DM270

分子量範囲： 20 – 100 bases

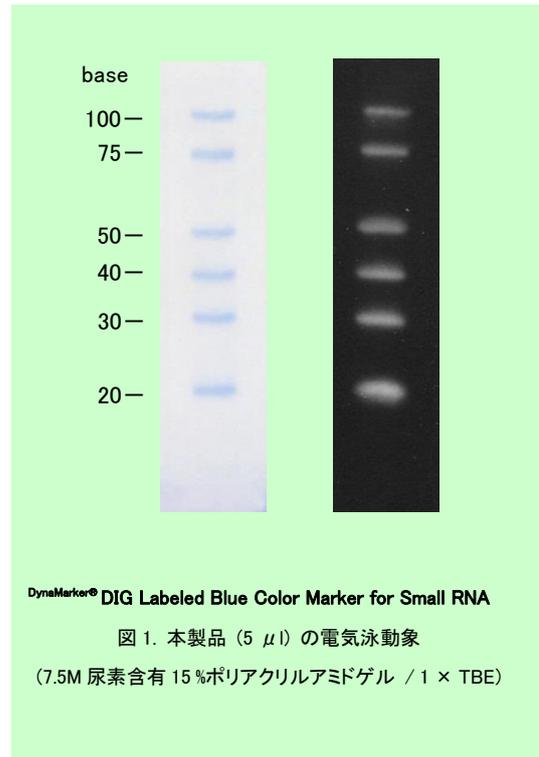
容量： 125 μ l (5 μ l \times 25 loadings)

保存温度： -20 $^{\circ}$ C

特徴：

本製品は 20~100 bases の分子量範囲の 6 本の色素修飾された DIG 標識核酸バンド(青色)で構成されています。変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動における泳動のモニタリングやノーザンブロットングにおける抗 DIG 抗体を用いた検出にご使用いただけます。

各バンドの見かけ分子量は天然 RNA と 95% の精度で一致します(表 1)。本マーカーは変性剤の添加や加熱処理は必要なく、そのまますぐにお使いいただけます。



保存バッファー組成：

2 mM Tris-HCl (pH8.0), 8mM EDTA, 78 % Formamide

品質検定：

本マーカーを 37 $^{\circ}$ C、24 時間インキュベートし、7.5M 尿素含有 10%アクリルアミドゲル電気泳動にて分解が見られないことを確認しております。

推奨使用量： 5 – 10 μ l

電気泳動条件：

本製品は 10~15%尿素変性アクリルアミドゲル(1 \times TBE)にてご使用ください。この条件以外では正確な見かけ分子量で各バンドが分離されない可能性があります。

注意：

電気泳動による、より正確な分子量の決定には天然 RNA で構成される以下の分子量マーカーをご使用ください。

DynaMarker[®] Small RNA II (code# DM192)

DynaMarker[®] Small RNA II Easy Load (code# DM197)

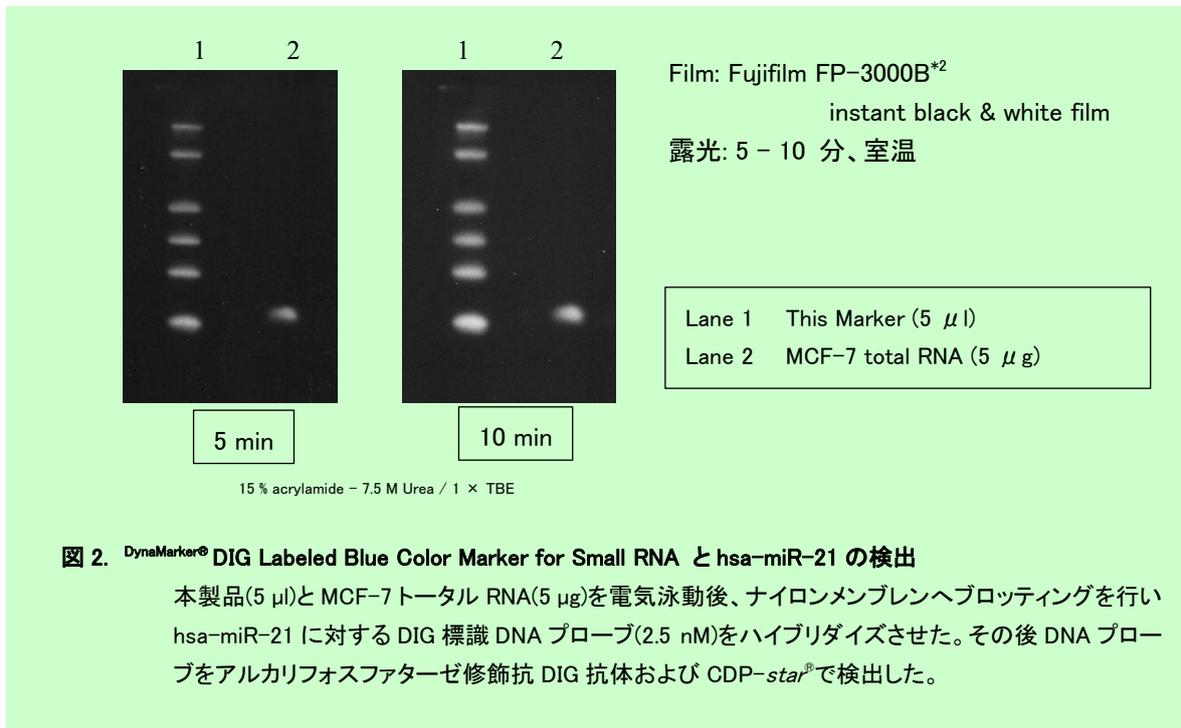
アクリルアミド濃度

		10 %	15 %
DynaMarker® Small RNA II + 75 base RNA	100 base	103.9 %	101.3
	75*	104.8	100.6
	50	102.5	101.6
	40	103.0	100.5
	30	99.6	104.5
	20	100.0	102.8

表 1. DynaMarker® Small RNA II との移動度一致率
(*75 base RNA は DynaMarker® Small RNA II に後から添加。DynaMarker® Small RNA II には含まれておりません。)

検出感度 :

本製品は抗 DIG 抗体を用いた化学発光検出(例えば CDP-*star*[®]*1 などの発光基質を用いた)にご使用いただけます。検出感度はハイスピードインスタントフィルム、X 線フィルム、化学発光検出器などの検出装置に依存します。次に一例を示します。



*1: CDP-*star*[®] is a trademark of Tropix, Inc.

*2: FP-3000B is a product of Fujifilm Corp.

推奨使用方法：

本製品は電気泳動のモニタリングおよびメンブレンへのトランスファー効率の確認に適しています。
以下は実験の一例です。

・電気泳動およびメンブレンへのトランスファー

1) 7.5M 尿素含有 12.5%ポリアクリルアミドゲルの調製

40 % acrylamide : bis solution	6.25 ml
Urea	9.0 g
10 × TBE	2.0 ml
H2O	to 20 ml

尿素が完全に溶解したら、TEMED を 20 μ l および 10%過硫酸アンモニウム(10% APS)を 160 μ l 添加し速やかに混合します。その溶液をスラブゲルガラスプレート間に流し込み、コームをセットします。

2) 電気泳動

ご使用前に本製品が完全に融解していることを確認してください。

変性処理したお手持ちの RNA サンプルおよび本製品を 5 μ l アプライします。そして 1 × TBE を電気泳動バッファーとし、200V で電気泳動を行います。

3) メンブレンへの転写

- 3-1) ポジティブチャージナイロンメンブレンおよび複数枚のプロットングペーパーをアクリルアミドゲルよりも少し大きめに用意し、0.5 × TBE に浸します。
- 3-2) プロットングペーパー2 枚をプロットング装置の陽極側に置きます。
- 3-3) プロットングペーパーの上にナイロンメンブレンを重ねます。
- 3-4) メンブレンの上に泳動したアクリルアミドゲルを載せます。その際、メンブレンとゲルの間の気泡を上から押さえつけるようにして押し出します。
- 3-5) プロットングペーパー2 枚をゲルの上に載せ、プロットング装置の陰極をセットします。
- 3-6) 2 mA/cm² で 30～60 分通電します。
- 3-7) マーカーがメンブレンへ転写されていることを確認したのち、メンブレンを 2 × SSC バッファーで洗浄します。
- 3-8) UV クロスリンカーで RNA をメンブレンに固定します。
- 3-9) ノーザンハイブリダイゼーション実験を行います。

参考文献:

- Joseph Sambrook, and David W. Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J. G. Seidman, John A. Smith, and Kevin Struhl (1994-) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.
- Sang Woo Kim, Zhihua Li, Patrick S. Moore, A. Paula Monaghan, Yuan Chang, Mark Nichols and Bino John (2010) A sensitive non-radioactive northern blot method to detect small RNAs. Nucleic Acids Research. **38**(7): e98

