

RT-PCR for detection astroviruses

<Reverse Transcription>	<PCR>
buffer 1 μ l 1 \times	buffer 4 μ l 1 \times
MgCl ₂ 2 5mM	MgCl ₂ 1 1.5mM
dNTPs 4 each 1mM	HAstV com+ 0.5 0.5 μ M
HAstV com- 0.5 2.5 μ l	Taq 0.5 2.5U/100 μ l
RNase inhibitor 0.5 1U/ μ l	Water 34
RTase(MuLV) 0.5 2.5U/ μ l	40 μ l
Water 1	94 $^{\circ}$ C 1min (pre heat)
RNA 0.5	↓
10 μ l	94 $^{\circ}$ C 30sec
42 $^{\circ}$ C 30min	55 $^{\circ}$ C 30sec 30cycles
↓	72 $^{\circ}$ C 1min
99 $^{\circ}$ C 5min	↓
↓	72 $^{\circ}$ C 7min
5 $^{\circ}$ C 5min	↓
	store at 4 $^{\circ}$ C

図2に示すと通りの反応液を作製し、RT-PCRを行う。

これにSRSV検出用のNV81/82SM82 primerを加え（加えた分だけのwaterを減らすこと）、SRSVとastrovirusの同時検出を行うことも可能であった（この時の反応時間はNV81/82 primerに合わせた）。今までのところ同時検出での問題はないが、試験数が少ないため、サンプルを増やす必要がある。yuri primerでの同時検出は未だ試みていない。

目的のサイズに1本だけ鮮明にバンドが得られる場合は間違いなく目的の遺伝子が増幅できたと考えてよいが、サンプルに含まれる多くの遺伝子（細胞由来、ウイルス由来）または蛋白による遺伝子増幅の不完全阻害、完全阻害を考慮すると、目的のバンド以外に数本のバンドが検出されたとしても問題とせず、サザンハイブリによる確認試験を行うようにする。

ウイルス性食中毒検査法のプロトコール

分担研究者 山崎謙治
大阪府立公衆衛生研究所

糞便からのSRSV検出法

【RNA抽出法】

1. 1.5 ml遠心チューブに1 mlのH₂Oを入れ10~20%の糞便乳剤を作成する。
15,000 rpm 10 min遠心
2. 上清250 μ lにISOGEN-LS (ニッポンジーン) 750 μ l加える
Vortex, Store for 5 min at Room Temp.
Spin down
3. クロロホルム200 μ l加える
Vortex 15 sec, Store for 3 min at Room Temp.
15,000 rpm 15 min at 4 $^{\circ}$ C
4. 上清を450 μ l取り、イソプロピルアルコール450 μ l加える
Vortex, Store for 10 min at Room Temp.
15,000 rpm 15 min at 4 $^{\circ}$ C
5. 上清を捨て80%エタノール750 μ l加える
15,000 rpm 5 min at 4 $^{\circ}$ C
6. 上清を捨て約5分間真空乾燥する
7. DEPC処理H₂O 15~20 μ lに再浮遊する
RT-PCRに使用 保存する場合は-70 $^{\circ}$ Cに保存する

【RT-PCR法】

1. Primer (NV81/NV82/SM82)を用いたRT-PCR

A. Reverse transcription (RT)

RT反応液

Reagent	Volume	Final conc.
H ₂ O	8 μ l	
5 mM dNTP mix (TaKaRa)	4 μ l	1 mM
10X PCR Buffer (TaKaRa)	2 μ l	1 x
50 μ M NV81	1 μ l	2.5 μ M
MuLV RTase (PERKIN ELMER)	0.5 μ l	10 u
RNasin (TaKaRa)	0.5 μ l	40 u
	16 μ l d)	d); 半量で使用

RT反応液8 μ lにRNA 2 μ l加え、ピペッティング
ミネラルオイル(SIGMA; heavy white oil) 1滴入れる
42 $^{\circ}$ C 30 min 99 $^{\circ}$ C 5 min 4 $^{\circ}$ C 3 min

B. PCR

B. PCR

PCR反応液

Reagent	Volume	Final conc.
H ₂ O	69.5 μ l	
10X PCR Buffer (TaKaRa)	8 μ l	1 x
50 μ M NV82	1 μ l	0.5 μ M
50 μ M SM82	1 μ l	0.5 μ M
rTaq DNA Polymerase (TaKaRa)	0.5 μ l	2.5 u

80 μ l e)

e); 半量で使用

反応液40 μ lをcDNA tubeに加える

フタをしてSpin down

PCR反応 (PERKIN ELMER; DNA Thermal Cycler)

94°C 1 min 49°C 1 min 20 sec 72°C 1 min

40 cycles 72°C 15 min store at 4°C

3. Primer (Yuri 22R/Yuri 22F)を用いたRT-PCR

A. Reverse transcription (RT)

RT反応液

Reagent	Volume	Final conc.
H ₂ O	8 μ l	
5 mM dNTP mix (TaKaRa)	4 μ l	1 mM
10X PCR Buffer (TaKaRa)	2 μ l	1 x
50 μ M Yuri22R	1 μ l	2.5 μ M
MuLV RTase (PERKIN ELMER)	0.5 μ l	10 u
RNasin (TaKaRa)	0.5 μ l	40 u

16 μ l f)

f); 半量で使用

RT反応液8 μ lにRNA 2 μ l加え、ピペッティング

ミネラルオイル(SIGUMA; heavy white oil) 1滴入れる

42°C 30 min 99°C 5 min 4°C 3 min

B. PCR

PCR反応液

Reagent	Volume	Final conc.
---------	--------	-------------

(TaKaRa)		
50 μ M Yuri22 F'	1 μ l	0.5 μ M
rTaq DNA Polymerase (TaKaRa)	0.5 μ l	2.5 u

80 μ l g) g); 半量で使用

反応液40 μ lをcDNA tubeに加える

フタをしてSpin down

PCR反応 (PERKIN ELMER; DNA Thermal Cycler)

94°C 30 sec 51°C 1 min 72°C 1 min

35 cycles 72°C 7 min store at 4°C

【PCR産物の確認】

0.5 μ g/mlのエチジウムブロミドを含む2%アガロースゲル
(SIGMA type ii; Medium EEO)にPCR産物8 μ lをアプライして
Mupid-3で電気泳動する

【プライマーの塩基配列】

NV35 (-) 5' CTT GTT GGT TTG AGG CCA TAT 3' (21 mer Tm = 60)
NV36 (+) 5' ATA AAA GTT GGC ATG AAC A 3' (19 mer Tm = 50)

NV81 (-) 5' ACA ATC TCA TCA TCA CCA TA 3' (20 mer Tm = 54)
NV82 (+) 5' TCA TTT TGA TGC AGA TTA 3' (18 mer Tm = 46)
SM82 (+) 5' CCA CTA TGA TGC AGA TTA 3' (18 mer Tm = 50)

Yuri22R (-) 5' CAT CAT CCC CGT AGA AAG AG 3' (20 mer Tm = 60)
Yuri22F (+) 5' ATG AAT GAG GAT GGA CCC AT 3' (20 mer Tm = 58)

カキからの検出法

【RNA抽出法】

1. Weigh digestive diverticulum 0.5 g/1.5 ml eppendorf tube (/sample). Store them at -80 °C
2. Add 0.5 ml warm distilled water (ca.37°C), mix with toothpicks (vortex for 10 sec.), cent at 15krpm. for 5 min. at 4 °C. Take sup. (0.25ml) to a new 1.5 ml tube.
3. Add 0.75 ml of ISOGEN-LS, lysis or homogenization, keep for 5 min. at RT, then add 0.2 ml of Chloroform, shake vigorously for 15 sec. keep for 2-3 min. at RT. Cent. at 12 krpm. for 15 min. at 4 °C, take aqueous phase (max 400 ul) to a new tube, add 0.5 ml of isopropanol, then mix well, keep for 5-10 min. at RT.
4. Cent. at 12 krpm. for 10 min. at 4 °C, discard sup. Wash the precipitate at least 1 ml of 75% Etoh (12 krpm for 5 min. at 4 °C)

5. Dry briefly, dissolve the precipitate with 25 ul of DEPC-treated H₂O.

【RT-PCR 法】

1. RT reagent mixture

2x Bca 1st Buffer, 25 mM MgSO₄, dNTP Mixture, RNase Inhibitor (40 U/ul)

BcaBEST Revers transcriptase (22U/ul, TaKaRa), Primer (25uM), RNase free H₂O

After preparation of the mixture aliquot 17.5 ul into 0.5 ml tube, then add 2.5 ul of sample.

2. Set up thermo cycler (PERKIN ELMER) as followed, 65°C 1 min/ 30°C 1min./65°C 30 min./ 80°C 2 min./ 5°C 5 min.

3. PCR reagent mixture

25 mM MgSO₄, 5x Bca 2nd Buffer, Bca-Optimized Taq (TaKaRa), up stream primer, down stream primer, dH₂O

Take 10 ul of each RT-product into a new tube. Add 40 ul of prepared reaction mix into a RT-reacted tube containing 10 ul of the product with mineral oil. Then start PCR reaction as follows; 94°C 1 min, 56°C 1 min 20 sec, 72°C 1 min, 30 cycles.

4. Nested PCR reagent mixture

10x PCR buffer, dNTP 1mM, 25 uM up stream primer, 25 uM down stream primer, Taq Polymerase,

Aliquot 49 ul into 0.5 ml tube, then add 1 ul of PCR product.

Set up thermo cycler as followed, 94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 30 sec, 30 cycles.

5. Take 7 ul of above product and mix with 2 ul of sample buffer, apply 7 ul of mixed sample on the gel, check the product.

【Hybridization】

1. load samples on 1.2 % Agarose gel/TAE and electrophoresis.

2. soak gel in 0.25N HCl for 10 min.

3. rinse gel 3 times with DW.

4. soak gel in denaturation soln. for 15 min x 2.

5. soak gel in neutralization soln. for 30 min.

6. set up transfer pyramid as below & aspirate 2 h at 7 cm/Hg.

7. take out membrane and rinse in 2 x SSC for 5 min & UV Fix.

8. prehybri with ExpressHyb soln. at 65°C for 30 min.

9. hybri with denatured Dig-labeled probe 10 ng/ml at 65°C for 1 hr.

10. 2x SSC/0.1% SDS, at RT for 5 min x 2.

11. 0.2x SSC/0.1% SDS, at 65°C for 15 min x 2.

12. Dig-buffer 1, 1 ml.

13. Dig buffer 2, 30 min.

14. Dig-buffer 1 1 ml x 2.

15. 1/5000 x AP- α -Dig Ab/Dig-buffer 2, 30 min.

16. Dig-buffer 1, 1 ml.

17. 0.2 % Tween20/Dig-buffer 1, 20 min x 2.

18. Dig-buffer 3, at RT for 3 min

誌上発表 山崎謙治他；ウイルス性胃腸炎、薬局、49, 22~29 (1998)

- 学会発表 山崎謙治他；迅速、高感度なRT-PCR法によるSRSVの検出、
第39回日本臨床ウイルス学会（1998年、札幌）
- 山崎謙治他；SRSVの迅速診断と遺伝子解析からみた流行の特徴、
第46回日本ウイルス学会総会（1998年、東京）
- 依田知子他；市販生食用カキからのSRSV検出法の簡便化、
第46回日本ウイルス学会総会（1998年、東京）

RT-PCR による SRSV 検査法

10%糞便乳剤

Ultraspec3'RNA でウイルス RNA を抽出

G 1 ・ G 2 primer を用いて RT-PCR

電気泳動

ナイロンメンブランにトランスファー

プローブハイブリダイゼーション

判定

RT-PCR for SRSV detection from fecal specimen

STOOL HOMOGENATE:

put 1-2 g of stool into 15 ml centrifuge tube
containing 10 ml of MEM* and 1 ml of glass beads
make small aliquot of stool into 2ml screw cap tube and store at -80C

↓
vortex, 1 min

↓
centrifuge at 3,000 rpm, 10 min

↓
collect supernatant

↓
centrifuge at 10,000 rpm, 10 min

↓
collect supernatant

↓
filter through 0.45 um filter*

↓
make aliquots, and use for RNA extraction, cultivation, EM diagnosis and -80C store

MEM: or PBS,H₂O

glass beads: appx. 3mm diameter

*:ダイフロン抽出の代わりとして行っている。0.45 um filter: 25mm disposable, Cellulose Acetate, ADVANTEC DISMIC 25CS #25CS045AS

2ml screw cap tube: SARSTEDT#72.694.006S

1.5 ml micro test tube: Eppen dorf Safe Lock #0030 120.086

PCR の検査のみの場合、2.0ml のマイクロチューブに-0.5ml 容のガラスビーズと 1.5ml の PBS を入れ、糞便 0.2-0.3 g を加え便乳剤を作製する。

2.0 ml micro test tube: Eppen dorf Safe Lock #0030 120.094

RNA EXTRACTION:

pipette 100 or 200 ul of stool homogenate into 1 ml of Ultraspec-3'RNA*,
mix by pipetting
↓
add 200 ul of chloroform
↓
vortex vigorously, 15 sec
↓
stand on ice, 5 min
↓
centrifuge 12,000 rpm for 15 min at 4 C
↓
transfer supernatant (400 or 500 ul) to new 1.5 ml tube* 無理して多くとらない
↓
add equal volume (400 or 500 ul) of 2-propanol at RT, and mix well
↓
stand for 10 min at RT (or keep -20 C for >30 min)
↓
centrifuge 15,000 rpm for 15 min at 4 C
↓
remove supernatant
↓
add 1 ml of cool 70% Ethanol
↓
mix gentle
↓
centrifuge 15,000 rpm for 5 min at 4 C
↓
remove supernatant
↓
spin down
↓
remove supernatant completely
↓
dry up pellet, stand at RT for 10 min
↓
resuspend in 30 ul of DEPC water*
↓
use for RT-PCR or store at -80 C

Ultraspec-3'RNA:BIOTEX LABORATORIES, INC #BL27200

1.5 ml tube:RNase, Dnase free, Ambion #12450

DEPC water: Diethylpirocarbonate treated H2O, Ambion #9920

Ultraspec-3'RNA:同等品 : ISOGEN-LS 、ニッポンジーン#311-0261

Ultraspec は 37 °C で溶解、よく攪拌後 1ml づつ 1.5ml tube 分注し 4 °C で保存

RT-PCR mixture

DEPC water	32,225	Ambion
5x Ampdirect	10.0	Shimadzu
2.5mM dNTPs	4.0	Takara
0.1M Dithiothreitol	1.0	BM
10uM G1 or G2 primer mix	1.0	Pre-mix
100units/ul RNase inhibitor	0.2	Takara
5 units/ul Takara Taq	0.5	Takara
40units/ulAMV RT XL	0.075	Takara

10uM G1 primer mix
SR33(-), SR48(+), SR50(+), SR52(+)

10uM G2 primer mix
SR33(-), SR46(+)

Procedure:

thaw reagent mix and spin down, and stand on ice

↓

pipette reagent as above and keep ice cold

↓

pipette 49 ul of RT-PCR mixture into 0.2 ml PCR tube on ice

↓

↓ Viral RNA

↓ heat at 65 C, 5 min or 94 C, 3 min

↓ stand on ice, for >1 min

↓ spin down

↓

add 1 ul of viral RNA

↓

mix gentle and spin down

↓

set thermalcycler at 4 C*

Program:	PE9700	Takara MP
(1)	4 C, hold	(1) 4 C, hold
(1)	50 C, 30 min for RT	(1) 50 C, 30 min for RT
(1)	94 C, 3 min	(1) 94 C, 3 min
(40)	94 C, 0.5 min	(40) 94 C, 1 min
	50 C, 0.5 min	50 C, 1 min
	60 C, 0.5 min	60 C, 1 min
(1)	72 C, 7 min	(1) 72 C, 7 min
(1)	4 C, hold	(1) 4 C, hold

Ampdirect(Shimazu)は Inhibitor に対して有効である。

RT-PCR 用緩衝液と酵素は Titan One Tube RT-PCR system, BM#1 888 382,でもほぼ同等の結果が得られる。

G1 primer と G2primer を別々に行うため tube は2本必要となる。G1 primer と G2primer を混合して1本で行うことができるが若干感度が低下する。

キーポイント：

RT-PCR mixture は各試薬を融解後、攪拌・遠心し、氷上で十分に冷却してから master mix を作製する。master mix は氷上で30分ぐらいは安定である。

viral RNA は必ず heat denature し、その後氷上で1分以上冷却すること。

*hot start に対して cool start と呼ばれる方法で non-specific なバンドが減る。

Gel analysis:

apply 10 ul of PCR product and 2 ul of 6x Dye on 3 % agarose gel
Electrophoresis using Mupid-II, 100V for 50 min

Staining gel, 0.5 ug/ml of Ethidium bromide for 30-60 min with rocking
rinse in DDW
take pictures

3% Agrose/TAE

1x TAE	100ml
Nu Seive agarose 3:1	3g

Nu Seive agaros は短鎖 DNA の解析用に調整された寒天で、2種類の寒天が混ざっている。
このため寒天の溶解にはいかなの注意が必要である。

1x TAE にアガロースを加え、スターラーで 10-15 分間攪拌後、オートクレーブあるいは
電子レンジで寒天を溶解する。寒天を溶解後、再びスターラーで攪拌する。
寒天が 50-60 °C に冷えてから、ゲルトレーに注ぎ、コームをセットする。アガロースが固
まったら 5-10 分間冷蔵庫で冷却後、ゲル上に 1x TAE を適量注ぎ、コームを抜き取る。
ゲルはトレーごとサランラップで包み、4 °C で保存する事ができる。

Molecular Marker

123 bp ladder, GibcoBRL#15612-011
Dig labeled bio marker low, Bio Ventures, INC

10x TAE: 0.4M Tris, 0.4 M 酢酸, 0.01M EDTA

Nu Seive3:1 :Takara・FMC#50090
EtBr solution: ニッポンジーン# 315-90051

Southern hybridization を行うので泳動バッファーは毎回交換する、EtBr 入りの泳動バッ
ファーで電気泳動すると DNA の量で泳動度が変わる。

SOUTHERN BLOT AND PROBING

Blotting:

by vacuum blotter

stained gel



50 ml of Denaturation solution, 30-60 min, gentle shake (rocking)



50 ml of Neutralization solution, 30-60 min, gentle shake



transfer to nylon membrane* using vacuum blotter* under 7.5 cmHg for 60 min



Rinse membrane in 5 x SSC



UV crosslinking (1200x100 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$, 3 times)



Dry and store at 4 C

nylon membrane: Mupid gel の大きさにカット (big size gel: 7x11 cm)
Hybond-N+ (22x22 cm), Amersham #RPN2020B

vacuum blotter: Toyobo, VB-30

vacuum blotter を用いると 1 時間でトランスファーが完了する。

vacuum blotter が無い場合、通常の capillary transfer でもよい。

P-16 に簡便な capillary transfer を示してある。この方法で 3 時間で十分トランスファー
できることが確認済みである。

UV crosslinker が無い場合、UV トランスイルミネーター上で 2~3 分間 UV を照射するこ
とでも可能。(短波長 254nm)

Hybridization:

Rinse membrane in 5x SSC



transfer membrane into Hybri-bag*



add 10 ml of Prehybridization solution with shaking for 58 C for >3 hours (1 hr)*



↓ discard Prehybridization solution



add 5 ml of Hybridization solution with shaking for 58 C for >6 hours - overnight



↓ recover Hybridization solution, and store at -20 C*



transfer to a clean dish



1st wash,

50 ml of 2x Wash solution* with shaking RT for 5 min



transfer to a clean dish



2nd wash ↓

50 ml of 2x Wash solution with shaking RT for 5 min



transfer to a clean dish



1st wash ↓

50 ml of 0.5x Wash solution* with shaking RT for 5 min



transfer to a clean dish



2nd wash ↓

50 ml of 0.5x Wash solution with shaking RT for 5 min



transfer to a clean dish

Hybri-bag: コスモ・バイオ#S-1001

Hybri-bag の代わりにタッパー（深型、シールパッキン付）を使っている、この時は 25ml 溶液を入れる。

*: プレハイブリの時間は 1 時間でも可能

*: 各ハイブリ（プローブ）溶液は回収し再利用している。1 シーズンは使える。

Detection:

50 ml of G-buffer-1*, shake RT for 1 min



transfer to a clean dish



50 ml of G-buffer-2, shake RT for 30 min



transfer to a clean dish
↓
20 ml of Anti Dig-AP* 1:10000 in G-buffer-2, shake RT for 30 min
↓
transfer to a clean dish
↓
1st wash ↓
50 ml of G-buffer-1, shake RT for 15 min
↓
transfer to a clean dish
↓
2nd wash ↓
50 ml of G-buffer-1, shake RT for 15 min
↓
transfer to a clean dish
↓
50 ml of G-buffer-3, shake RT for 2 min,
↓
↓ 1 ml of CSPD* 1:100 in G-buffer-3 on Parafilm*
lay membrane (DNA side down) on CSPD, 5 min
↓
drip off excess liquid (not dry up)
↓
Seal membrane between OHP film or Saran rap
↓
↓ incubate 37 C, 5 min
↓
Exposure for 60 min to X-ray film*

Anti Dig-AP, CSPD, Blocking reagent: DIG Luminescent Detection Kit,
Boehringer Mannheim, 1 363 514
単品でも購入することができるがキットの方が割安である。
X-ray film: Hyper film MP, Amersham #RPN1677H
2日間ぐらいは発光している。

Stripping and reprobing:

Rinse membrane in H₂O



transfer to a clean dish



1st wash ↓

50 ml of Stripping solution (at 37 C), shake at 37C for 15 min



transfer to a clean dish



2nd wash ↓

50 ml of Stripping solution (at 37 C), shake at 37C for 15 min, shake



rinse in 2x SSC



Prehybridization and next probe or store in 2xSSC

Liquid hybridization:

プローブタイピングは現在5種類のタイプがあるため、Hybridization and probingの実施前にLiquid hybridizationを実施することによって、PCRで検出したSRSV遺伝子のプローブタイプを簡便に調べることができる。しかしながら、1サンプルにつき各タイプを処理するため多くのサンプルをこの方法でタイピングするには手間を必要とする。

mix 9 ul of PCR product and 1 ul of 1.0 uM Dig-labeled probe in 0.2 ml PCR tube

↓

incubate the mixture using Thermal cycler as following condition

94 C, 3 min

50 C, 3 min

4 C, hold

↓

add 2 ul of 6x Dye

↓

load on 3% Nusieve3:1 agarose/TAE

↓

electrophoresis 100V for 50 min

↓

stain gel in 0.5 ug/ml of EtBr

↓

take picture

Detection:

transfer to nylon membrane* using vacuum blotter* under 7.5 cmHg for 60 min

↓

Rinse membrane in 5 x SSC

↓

UV crosslinking (1200x100 ㉵ J/cm², 3 times)

↓

50 ml of G-buffer-1*

↓

↓ shake, 1 min

↓

transfer to a clean dish

↓

50 ml of G-buffer-2

↓

↓ 30 min, rock

↓

transfer to a clean dish

↓

20 ml of Anti Dig-AP* 1:10000 in G-buffer-2

↓

↓ 30 min, rock

↓

transfer to a clean dish

↓

1st wash ↓
50 ml of G-buffer-1
↓
↓ 15 min, shake
↓
transfer to a clean dish
↓
50 ml of G-buffer-1
↓
↓ 15 min, shake
↓
transfer to a clean dish
↓
50 ml of G-buffer-3
↓
↓ 2 min, shake
↓
1 ml of CSPD* 1:100 in G-buffer-3 on Parafilm*
lay membrane (DNA side down) on CSPD, 5 min
↓
drip off excess liquid
↓
Seal membrane between OHP film or Saran rap
↓
↓ incubate 37 C, 5 min
↓
Exposure for 60 min to X-ray film*

BUFFERS

Denaturation Solution (0.5N NaOH, 1.5 M NaCl)

NaOH(Mwt=40.0)	20 g	
NaCl(Mwt=58.44)	87.7 g	
H2O		up to 1 liter

Neutralization Solution (1.0 M Tris-HCl,ph7.5, 1.5 M NaCl)

2.0 M Tris-HCl,ph7.5	500 ml	
5 M NaCl		300 ml
H2O		up to 1 liter

5 M NaCl

2.0M Tris-HCl(pH7.5)

20x SSC (3 M NaCl, 0.3 M Sodium citrate)

NaCl(Mwt=58.44)	175.3 g	
Trisodium Citrate Dihydrate(Mwt=294.1)		88.23g
H2O		up to 1 liter

Prehybridization solution

(5xSSC, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 1%(w/v) Blocking reagent*)

20x SSC	250 ml	
N-lauroylsarcosine	1 g	
10 % SDS		2 ml
H2O		approx 700 ml

↓

stir

↓

add Blocking reagent 10 g

↓

stir and heat at 50 C

↓

adjust volume to 1 liter

↓

aliquot and store at -20 C

Hybridization solution

(10 pmol/ml Digoxigenin labeled probe, prehybridization solution)

DIG probe set P1A

Prehybridization solution 25ml

50 nmol/ml SR63d 5 ul

50 nmol/ml SR65d 5 u l

50 nmol/ml SR69d 5 u l

DIG probe set P1B
Prehybridization solution 25ml
50 nmol/ml SR67d 5 u l

DIG probe set P2A
Prehybridization solution 25ml
50 nmol/ml SR61d 5 u l

DIG probe set P2B
Prehybridization solution 25ml
50 nmol/ml SR47d 5 u l

DIG probe set new type
Prehybridization solution 25ml
50 nmol/ml 96065d 5 u l

2x Wash solution (0.3xSSC, 0.1% SDS)

20x SSC	15 ml
10% SDS	1 ml
H2O	up to 1 liter

0.5x Wash solution (0.075x SSC, 0.1% SDS)

20x SSC	3.75 ml
10% SDS	1 ml
H2O	up to 1 liter

G-buffer-1 (100 mM Tris-HCl,ph7.5, 150 mM NaCl)

2 M Tris-HCl,ph7.5	50 ml	
5 M NaCl		30 ml
H2O	up to 1 liter	

G-buffer-2 (100 mM Tris-HCl,ph7.5, 150 mM NaCl, 2% Blocking reagent)

G-buffer-1		1 liter
blocking reagent	20 g	
↓		
stir and heat at 60 C		
↓		
adjust volume to 1 liter		
↓		
aliquot and store at -20 C		

G-buffer-3 (100mM Tris-HCl,ph9.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl)