第三章 北方雜合分析

台灣大學植物病理與微生物學系 劉瑞芬

基因表現的第一步是由RNA polymerase以轉錄反應合成出mRNA。 由於mRNA是細胞內不同基因之轉錄產物，其序列與大小不一，存在量也受嚴格調控，一般約佔細胞內全部RNA的 1~5%；其餘RNA分屬於rRNA (約佔 80~85%) 及tRNA，在真核細胞還有small nuclear RNA (snRNA)、small nucleolar RNA (snoRNA)、與small cytoplasmic RNA (scRNA) 等，它們分別以RNA的型式直接參與細胞內特定功能之執行，包括蛋白質轉譯 (rRNA與tRNA)、mRNA splicing (snRNA) 與rRNA processing (snoRNA) 等。 因為轉錄反應是基因表現的重要調控點，在分析特定基因之表現情形時，勢必得先了解其mRNA的基本性質，包括長度及表現量多寡，常見之RNA分析方法包括北方雜合分析 (Northern hybridization analysis)、RNase protection analysis (RPA) 與real-time quantitative reverse transcriptase PCR (real-time quantitative RT-PCR) 等。 本章所介紹的北方雜合分析是進行mRNA分析時最常用之基礎方法；在進行北方雜合反應時，製備好之RNA以變性洋菜膠體 (denaturing agarose gel) 進行電泳分析後，立刻以毛細管轉印法 (capillary transfer) 或其他方法轉印於尼龍膜上，再以特定核酸探針進行雜合分析，即可偵測目標mRNA的長度及存在量。 在下面實驗，我們一方面將以質體pBlueGus進行胞外轉錄反應 (*in vitro* transcription)，製備GUS基因的正意股 (sense) 與反意股 (antisense) RNA。另外，要自大腸桿菌pQG11/M15[pREP4] 純化total RNA，以便以北方雜合反應分析在IPTG誘導情況下，表現質體pQG11 所攜帶GUS基因的表現情形。實驗流程如圖 3.1 所示。

3.1 RNA 製備

自細胞抽取RNA的步驟主要包括打破細胞、以特定方法移除細胞內的蛋白質和DNA、及將RNA沉澱出來。 一般用於打破細胞的方法包括在低溫下以研缽研磨，或應用均質機將細胞打破等，將蛋白質與DNA移除的方法則包括酵解、有機溶劑萃取、酒精沉澱及氯化銫梯度離心等。 不論採用哪一種方法，最需費心者莫過於RNase的問題。 由於RNase會降解RNA，在RNA製備過程中，能否充分避開RNase的作用便成了決定RNA品質好壞的關鍵因子。 要解決這個問題，首先得注意的是存在於外在環境的RNase，務求所有實驗器皿都是RNase-free，因此電泳槽、玻璃及塑膠器皿、反應所需之溶液及二次水等，都必須依循一定步驟預先確實處理，實驗操作者也必須隨時帶上手套 (Sambrook and Russell, 2001; Ausubel et al., 2005)。 另一個問題則是細胞內原本就有的RNase活性；為解決這部份的問題，應在收集到生物材料之後立刻進行RNA的製備工作。 若須暫時儲存，則應以液態氮將生物材料急速冷凍後，儲存於 -80℃冷凍櫃；當進行RNA製備時，一旦取出儲存於冷凍櫃的材料，應立即以液態

氮研磨的方式打破細胞，並適時加入RNA萃取緩衝液，以避免RNase作用。 一般RNA萃取緩衝液都含有特定的RNase抑制劑，例如diethylpyrocarbonate (DEPC), guanidium thiocyanate (GTC) 或vanadyl-ribonucleoside complexes等，以便在細胞被打破的剎那，即時抑制細胞裏的RNase。 由於某些RNase抑制劑會抑制特定的反應，例如*in vitro* translation等，在選用RNA製備方法時，應先弄清楚所使用的RNase抑制劑會不會影響到後續反應，以免功虧一簣。

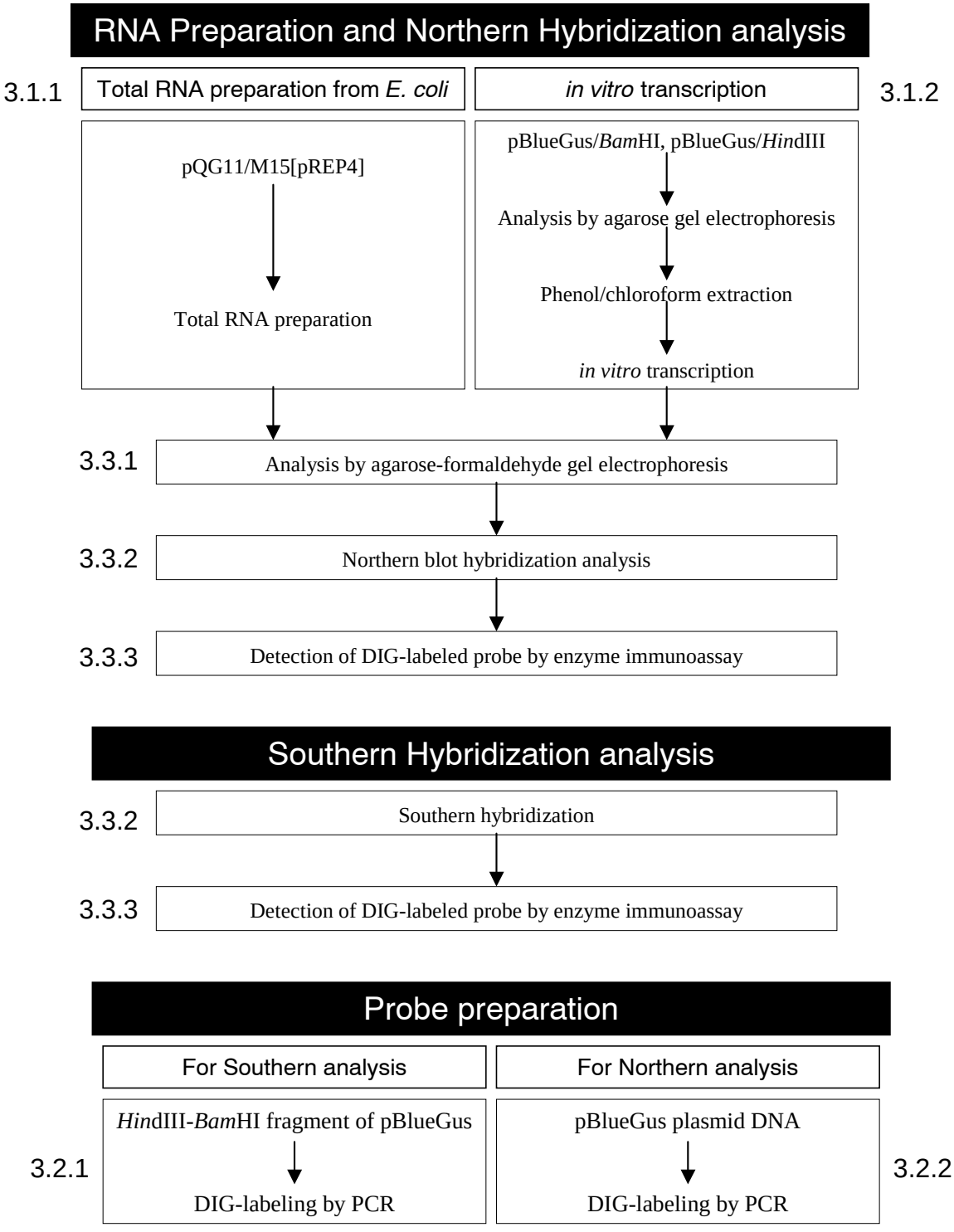

圖 3.1 北方雜合分析實驗操作流程

3.1.1 自大腸桿菌抽取 RNA

之前各組成員已分別構築出 GUS 基因之表現質體 pQG11，若要令啟動子 T5 promotor 之啟動受到更好的調控，應進一步將 pQG11 轉形至大腸桿菌 M15[pREP4]。 M15[pREP4] 可持續表現 *lac* repressor，pQG11 上用以驅動 GUS 基因表現之T5 promoter的活性將因而受到抑制，但一旦加入IPTG就能誘導GUS 基因大量表現。 在這一節的實驗裏，我們將分別自經 IPTG 誘導與未經誘導之 pQG11/M15[pREP4] 菌體抽取 total RNA，以便以北方雜合反應分析 GUS mRNA 之表現情形。 下面所採用的方法適用於大腸桿菌及其他革蘭氏陰性菌 total RNA 之抽取，實驗進行時先以 lysozyme 分解細胞壁，再以 sodium dodecyl sulfate (SDS) 裂解原生質膜 (Summers, 1970; Ausubel et al., 2005)；之後加入適量的氯化鈉溶液將 SDS、蛋白質及大腸桿菌的染色體 DNA 一併沉澱下來，並以離心法移除，存留於上清液的 RNA 則以酒精沉澱。 實驗過程所使用的 RNase 抑制劑為 DEPC。

儀器用具：

恆溫震盪培養箱 37℃

冰浴

微量離心機

分光光度計 (Hitachi U-1100 spectrophotometer)

藥品試劑：

大腸桿菌菌株 pQG11/M15[pREP4]

LB 培養液

Ampicillin (100 mg/mL)

Kanamycin (25 mg/mL)

IPTG (1 M)

Protoplasting buffer (15 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.45 M sucrose; 8 mM EDTA, stored at 4℃)

Lysozyme (50 mg/mL)

Gram-negative lysing buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM NaCl; 1 mM sodium citrate; 1.5% SDS)

Diethylpyrocarbonate (DEPC)

飽和氯化鈉溶液 (以 40 g氯化鈉溶解於 100 mL dH_2O/DEPC)

絕對酒精及 70%酒精

方法步驟：

大腸桿菌 pQG11/M15[pREP4] 之培養：

1) 將pQG11/M15[pREP4] 接種於 2 mL含ampicillin (100 μg/mL) 及kanamycin (25 μg/mL) 之LB培養液，於 37℃震盪培養過夜。

2) 隔日早晨，取 0.5 mL pQG11/M15[pREP4] 過夜培養液，加入 25 mL 含有 ampicillin (100 μg/mL) 與 kanamycin (25 μg/mL) 之 LB 培養液，於 37℃震盪培養 2 h。
3) 加入 25 μL 1 M IPTG，繼續放置於 37℃震盪培養。
4) 經過 4 h 後，取出 pQG11/M15[pREP4] 培養液，開始進行 RNA 製備工作。

製備 RNA：

◆ 注意！ 進行以下 RNA 製備實驗時，除了使用依上述步驟所準備的 pQG11/M15[pREP4] 培養液外，請記得向助教領取未經 IPTG 誘導之 pQG11/M15[pREP4] 培養液當做對照組。

1) 取出 4 支 1.5 mL 微量離心管，分別標示為 I-1, I-2, U-1 與 U-2。
2) 取 3 mL 經 IPTG 誘導之 pQG11/M15[pREP4] 培養液平均分置於微量離心管 I-1 與 I-2。
3) 取 3 mL 未經 IPTG 誘導之 pQG11/M15[pREP4] 培養液平均分置於微量離心管 U-1 與 U-2。
4) 以 8,000 rpm (4℃) 離心 5 min，小心倒掉上清液，並以微量吸管盡量吸掉殘留之液體。
5) 各加入 0.5 mL protoplasting buffer，以微量吸管將大腸桿菌充分懸浮。
6) 再加入 1 mL protoplasting buffer 與 12 μL 50 mg/mL lysozyme，混合均勻之後，移置於冰浴中作用 15 min。
7) 以 7,000 rpm 於 4℃離心 5 min。
8) 小心倒出上清液，並以微量吸管盡量吸掉殘留之液體。
9) 各加入 75 μL gram-negative lysing buffer 及 2 μL DEPC，以微量吸管小心懸浮沉澱於管底之大腸桿菌原生質體，並離心數秒。
   ◆ 在以微量吸管懸浮大腸菌原生質體時，一旦 pellet 被充分打散即應停止懸浮動作，以避免大腸菌 DNA 斷裂可能造成的問題。
   ◆ DEPC 可能是一種致癌物質，使用時請在抽氣櫥內操作。
10) 將微量離心管放入 37℃恆溫水槽作用 5 min。
11) 作用完畢之後，將離心管移到冰浴中靜置 5 min。
12) 加入 38 μL 飽和氯化鈉溶液，以手指頭輕彈管壁，充分混合均勻。
13) 靜置於冰浴中作用 10 min，此時應有白色沉澱出現。
14) 以 13,000 rpm 於 4℃離心 10 min。
15) 將上清液移至新的微量離心管，並加入 0.3 mL 絕對酒精。
16) 混合均勻後將離心管放置於 -20℃過夜，以便沉澱RNA。
   ◆ RNA 在酒精內相當穩定，若須長期保存，可停在這一步。

隔天：

17) 以 14,000 rpm 於 4℃離心 15 min。
18) 小心倒掉上清液後，加入 300 μL 70%酒精。
19) 以 14,000 rpm 於 4℃離心 5 min 之後，小心倒掉上清液。

20) 將微量離心管倒置於桌面上 30 min，以便風乾 RNA。

21) 將RNA溶解於 30 μL dH_2O/DEPC。

22) RNA定量：取 5 μL RNA，加入 995 μL dH_2O/DEPC稀釋之後，以分光光度計測其在 260 nm與 280 nm之吸光值 (記得使用石英測光管)，並計算RNA之濃度與A_{260}/A_{280}之比值。

◆ RNA溶液在 260 nm之吸光值為 1.0 時，則濃度相當於 40 μg/mL，而其A_{260}/A_{280}之比值應為 1.7~2.0 (DNA則為 1.8 左右)。

◆ 這四個 RNA 樣本將於後續實驗中，分別以甲醛洋菜膠體電泳進行分析 (3.3.1.2)。

註解討論：

a. RNA 製備過程中為何須要加入 DEPC？ DEPC 的作用方式為何？ 它會 modify RNA 嗎？

b. 在加入飽和氯化鈉溶液後，所得到的白色沉澱包含那些成份？

c. 以上述方法所得到的 RNA 沉澱除了 RNA 之外，可能還會包含小量 DNA 與蛋白質，但應不致於干擾到後續要進行的北方雜合反應。

3.1.2 胞外轉錄反應 (*in vitro* transcription)

由於RNA聚合酶一般由數個次單元組合而成，早先要在試管內應用RNA聚合酶的轉錄活性合成RNA並非易事，但這個問題在SP6, T3 及T7 等噬菌體之RNA聚合酶陸續被發現以後，情況已完全改觀。這主要是因為這類RNA聚合酶由一條多胜肽(polypeptides) 所構成，其在進行轉錄反應時所須辨認的啟動子長度僅 20 bp左右，而且轉錄起始位置非常明確，轉錄效能良好，成了目前進行胞外轉錄反應時的最佳選擇。 要進行胞外轉錄反應時，僅需將目標基因次選殖 (subclone) 至帶有SP6, T3 或T7 啟動子的轉錄載體，或者運用PCR技術在基因的一端加上 SP6, T3 或T7 啟動子的序列，即可運用對應的RNA聚合酶活性在試管內合成正意股或反意股RNA。 以質體DNA為模版進行胞外轉錄反應前，應先用限制酶自目標基因的一端切開，以免轉錄反應持續進行至載體的序列 (run-on)，但在選擇限制酶切位時應避免使用目標基因也帶有的切位；限制酶內切好之質體DNA經phenol/chloroform萃取之後，即可用來進行胞外轉錄反應。 在下列實驗裏，我們要使用的質體是pBlueGus。

3.1.2.1 質體 DNA 酵解反應與洋菜膠體電泳分析

本實驗以 *Bam*HI 與 *Hin*dIII 酵解 pBlueGus，並以洋菜電泳分析產物。

儀器用具：

微量離心機

37℃恆溫水槽

Mupid II 迷你電泳槽及鑄膠器
UV transilluminator
防護面罩
拍立得相機

藥品試劑：

質體 pBlueGus DNA (由助教提供)
限制酶 *Bam*HI 與 *Hin*dIII (Roche)
10×Reaction buffer 2 (Roche)
10×Reaction buffer 3 (Roche)
Agarose
1×TAE 電泳緩衝液
DNA分子量標記 (λ DNA/*Hin*dIII 或 100 bp ladder, 0.5 μg/mL)
10×追蹤染劑 (0.25% bromophenol blue; 0.25% xylene cyanol; 0.1 M EDTA; 50% glycerol)
Ethidium bromide (500 μg/mL)
拍立得 667 底片

方法步驟：

1) 取兩支 1.5 mL微量離心管，分別標示為 #1 與 #2 之後，依下表所列順序，逐一加入酵解反應所需各項物質 (體積單位為 μL)。
   ◆ 注意：應等所有成份都加了之後，再加入限制酶。

	#1	#2
	pBlueGus/ *Hin*dIII	pBlueGus/*Bam*HI
dH_2O	7	7
10×Reaction Buffer	Buffer 2 2	Buffer 3 2
pBlueGus DNA	10	10
Restrication enzyme	*Hin*dIII 1	*Bam*HI 1
Total volume	20	20

2) 以手指頭輕彈微量離心管，以便均勻混合管中各項物質。
3) 離心數秒後，放置於 37℃恆溫水槽作用 1~2 h。
4) 請利用這一段時間參照『基本操作技術』所描述的步驟準備一片 1.2%洋菜膠體。
   ◆ Ethidium bromide 是強力致癌物質，嚴禁戴著手套到處亂摸！
5) 自恆溫水槽取出微量離心管，離心數秒後暫存冰中備用。
6) 擬進行電泳分析時，請拿出 3 支 1.5 mL 微量離心管，分別標示為 #1, #2 與 #3，並依下表所示在各離心管逐一加入適量之 DNA 與 10×追蹤染劑 (體積單位為 μL)。

	#1	#2	#3
	pBlueGus/*Hin*dIII	pBlueGus/*Bam*HI	λ DNA/*Hin*dIII
DNA sample	2	2	1
dH_2O	7	7	8
10×追蹤染劑	1	1	1
Total volume	10	10	10

7) 把膠片移至電泳槽，注入適量電泳緩衝液，以微量吸管 P20 逐一將樣本吸入注出數次使混合均勻，並小心注入膠片的樣本槽中。
8) 接好電極線以定電壓 100 V 進行電泳，待追蹤染劑移動至膠體三分之二處時，關閉電源，將膠體移至 UV transilluminator box，以拍立得相機拍照 。

◆ DNA泳動方向為 (-) 向 (+)。 此外，在UV transilluminator box上直接觀察DNA色帶時，沒戴眼鏡的同學應戴上護目鏡或面罩，以避免UV灼傷；含有ethidium bromide之洋菜膠體請丟至專用容器中！

註解討論：

a. 請檢視 pBlueGus 的 plasid map，想想為何要選用 *Bam*HI 與 *Hin*dIII？可以選用其他切位嗎？
b. 如果酵解反應不完全，會對後續的胞外轉錄反應造成什麼影響？

3.1.2.2 以 phenol/chloroform 進行 DNA 萃取

儀器用具：

微量離心機

藥品試劑：

Plasmid DNA 酵解產物： #1 (pBlueGus/*Hin*dIII), #2 (pBlueGus/*Bam*HI)
Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) 以下簡稱為PCI
Chloroform/isoamyl alcohol (24:1) 以下簡稱為CI
3 M NaOAc (醋酸鈉 pH 5.2)
純酒精及 70%酒精

方法步驟：

◆ 注意！ 進行這一部份實驗之前，請先確定 pBlueGus/*Hin*dIII 與 pBlueGus/*Bam*HI 兩者的酵解反應都已經完全。

1) 於酵解反應 #1 與 #2 之微量離心管分別加入 182 μL 去離子水。
2) 以 200 μL PCI 萃取一次，亦即加入 PCI 後，以 Vortex 震盪混合，並在室溫離心 3 min。
3) 以微量吸管 P200 將上層液移至新的微量離心管。
4) 加入等體積之 CI，以 Vortex 充分震盪混合，並在室溫離心 3 min。
5) 以微量吸管 P200 將上層液移至新的微量離心管。
6) 加入 0.1 倍體積之 3 M NaOAc (pH 5.2) 及 2.5 倍體積絕對酒精。
7) 置於 -20℃ 過夜，或於 -80℃ 放置 30 min，以便沈澱DNA。

隔天：

1) 自冷凍櫃取出微量離心管，以 14,000 rpm 離心 10 min。
   ◆ 注意： 請利用這一段時間參照『基本操作技術』所描述的步驟準備一片 1.2%洋菜膠體。 Ethidium bromide 是一種強力致癌物質，嚴禁戴著手套到處亂摸！
2) 小心地倒出上清液。
3) 徐徐加入 0.5 mL之 70%酒精 (預先放在 -20℃ 預冷)。小心不要動到DNA沈澱。
4) 以 14,000 rpm 低溫離心 5 min 之後，倒去上清液，並將微量離心管倒置於一張乾淨的衛生紙上 30 min，以便風乾 DNA。
   ◆ 也可以用 SpeedVac 乾燥 DNA，但應小心處理，以免 DNA 沉澱不見了。
5) 以 10 μL dH_2O/DEPC溶解DNA。
6) 依照下表，自 pBlueGus/*Bam*HI 與 pBlueGus/*Hin*dIII 各取 1 μL DNA 以洋菜膠體電泳進行分析，並估算其濃度。
   ◆ DNA 濃度之估算請以 λ DNA/*Hin*dIII 量為參考值。

	#1	#2	#3	#4
	pBlueGus /*Hin*dIII	pBlueGus /*Bam*HI	λ DNA /*Hin*dIII	λ DNA /*Hin*dIII
DNA sample	1	1	1	2
dH_2O	8	8	8	7
10×追蹤染劑	1	1	1	1
Total volume	10	10	10	10

註解討論：

a. 模版 DNA 是否夠乾淨是胞外轉錄反應能否成功的重要因子。

3.1.2.3 胞外轉錄反應

儀器用具：

微量離心機

藥品試劑：

Plasmid DNA 酵解產物 pBlueGus/*Hin*dIII 及 pBlueGus/*Bam*HI

5×Transcription buffer (200 mM Tris-Cl, pH 8.0; 40 mM $MgCl_2$; 10 mM spermidine-$(HCl)_3$; 125 mM NaCl; Roche)

NTPs (含 ATP, CTP, GTP 及 UTP 各 2.5 mM)

RNase 抑制劑 RNasin (40 U/μL)

T7 與 T3 RNA polymerase (Roche)

dH_2O/DEPC

100 mM DTT (dithiothreitol)

DNase (RNase-free)
Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1), 以下簡稱 PCI
Chloroform/isoamyl alcohol (24:1), 以下簡稱 CI

方法步驟：

◆ 注意：進行下列實驗時，請務必戴手套！

1) 取 4 支 1.5 mL 微量離心管，分別標示 #1, #2, #3 與 #4，再依下表依序在 #1 與 #2 加入胞外轉錄反應所需各項試劑 (單位 μL)：

Rxs	Gus#1 (pBlueGus/*Hin*dIII)	Gus#2 (pBlueGus/*Bam*HI)
dH_2O/DEPC	25 - x	25 - x
Plasmid DNA	x (up to 2 μg)	x (up to 2 μg)
5×transcription buffer	10	10
NTP (2.5 mM each)	10	10
RNasin (40 U/μL)	1	1
DTT (100 mM)	2.5	2.5
RNA polymerase (50 U/μL)	T3 RNA polymerase 1.5	T7 RNA polymerase 1.5
Total volume	50	50

◆ 注意： 在逐一加入各項反應試劑時，微量離心管維持於室溫即可，以免在低溫時，DNA 遇到轉錄緩衝液所含 spermidine 產生沈澱。

2) 以手指頭輕彈離心管壁使混合均勻，離心數秒後放置於 37℃恆溫水槽作用 1 h。
3) 反應結束時，自 #1 與 #2 分別取出 4 μL反應物，放到微量離心管 #3 與 #4 中，將 #3 與 #4 存放於 -20℃冷凍櫃中。
4) 取 1 μL DNase 加到 #1 與 #2，混合均勻後放置於 37℃作用 15 min，以便去除 DNA 模版。
5) 反應結束後，加入 53 μL dH_2O/DEPC，以 100 μL PCI萃取一次，劇烈震盪後，離心 14,000 rpm 5 min。
6) 以微量吸管P200 將上層液移至一新的微量離心管，下層之PCI以 100 μL dH_2O/DEPC反萃取 (back-extraction) 一次。
7) 以微量吸管P200 將上層液移至步驟 6) 之新離心管。
8) 估計兩次上層液聚集之後的總體積，並以等體積之 CI 萃取一次，劇烈震盪後，離心 14,000 rpm 5 min。
9) 以微量吸管 P200 將上層液移至一支新的微量離心管，加入 0.1 倍體積之 3 M NaOAc (pH 5.2) 及 2.5 倍體積之絕對酒精。
10) 混合均勻，並置於 -20℃過夜，以便沈澱RNA。

隔天：

1) 自冷凍櫃取出微量離心管，以 14,000 rpm 於 4℃離心 10 min。
2) 仔細移去上清液之後，加入 0.5 mL 70%酒精。
3) 以 14,000 rpm 於 4℃離心 5 min。

4) 去除上清液之後，將微量離心管倒置於一張乾淨的衛生紙上大約 30 min，以便風乾 RNA。
5) 以 10 μL dH_2O/DEPC溶解RNA沈澱。

註解討論：

a. RNasin是一種RNase抑制劑，一般進行胞外轉錄或轉譯反應 (*in vitro* translation) 時，都需添加RNasin，以避免RNA降解的問題。
b. 以上述胞外轉錄反應所合成出來的 #1 與 #2 RNA 各有多長？
c. 如何得知 #1 與 #2 RNA 各為 GUS 基因的正意股或反意股 RNA？
d. 若要以上述胞外轉錄反應製造帶 cap 的 mRNA，可以怎麼進行？

3.2 以 DIG 標定核酸探針

DNA探針一般可以用^{32}P, ^{35}S或非放射性物質如biotin及digoxigenin (DIG) 加以標定；標定時利用DNA聚合酶的活性，在DNA聚合反應中，另加入 [α-^{32}P] dATP, [α-^{32}P] dCTP或DIG-11-dUTP等標定物質，所合成出來的即是被標定的核酸片段。目前常見的方法包括nick translation, random priming與polymerase chain reaction (PCR) 等。 若須對DNA進行end labeling時，可以進行kinase或filling-in reaction。 前者以 [γ-^{32}P] ATP為phosphate donor，利用T4 polynucleotide kinase的活性對帶有5'-OH的DNA進行標定。人工合成的寡核苷酸(oligonucleotides) 5'端為-OH group，可直接用於kinase reaction；一般DNA片段，若 5'端帶有phosphate group，最好先經phosphatase處理，再進行kinase reaction。 Filling-in reaction是將DNA以特定限制酶切開，露出recessed 3' termini後，利用Klenow的活性把 3'端補齊 (filling-in)；因此，只要加入適當的 [α-^{32}P] dNTP，即可在DNA的 3'端進行標定。 此外，也可以應用bacteriophage T4 DNA polymerase的 3'→5' exonuclease活性製造recessed 3' termini，再進行filling-in。 至於正意股或反意股RNA探針，則可以 [α-^{32}P] UTP或DIG-11-UTP等為標定物質，應用胞外轉錄反應加以標定。 下面要介紹的是目前最常用的方法：random priming及PCR。

3.2.1 Random priming

DNA聚合酶要進行DNA聚合反應時一定要有引子 (primer)，因為它只能以引子所提供的 3'-OH為起始點進行延伸 (extension) 的工作，而不能就地重新合成新的DNA (*de novo* synthesis)。 一般實驗常以人工合成之寡核苷酸為引子進行DNA聚合反應，這時固然可以根據已知序列設計核酸引子，但也可以採用逢機引子 (random primers)。 所謂逢機引子即其序列為逢機序列，不經特別設計，目前應用最廣者是以自動化機器所合成的、六到八個核苷酸長的寡核苷酸混合物；反應進行中若有任何一條逢機引子結合到模版DNA，即可引導DNA聚合反應之進行。 以random priming方法進行核酸標定，是以逢機引子引導Klenow fragment (large fragment of *E. coli* DNA polymerase I) 進行DNA聚合反應，並在反應過程中添加 [α-^{32}P]dNTP或DIG-11-dUTP等標定物質。 而為了避免random priming也發生於載體部份的DNA，最好不要直接以質體DNA為模版進行標定反應，而應預先將目標DNA自載體切除出來。

儀器用具：

微量離心機

沸水浴及冰浴

藥品試劑：

模版 DNA (pBlueGus 之 *Bam*HI-*Hin*dIII DNA 片段，將由助教提供)

0.2 M EDTA, pH 8.0

4 M LiCl

Random priming kit (Roche)：

Hexanucleotide mix (random primer)

dNTP mixture (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0.65 mM dTTP, 0.35 mM DIG-11-dUTP, pH 7.5)

Klenow enzyme (2 U/μL)

絕對酒精

70%酒精

TE (10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA)

方法步驟：

◆ 以下反應條件與步驟主要參照 random priming kit 製造廠商所提供之產品說明書。

1) 取 100 ng 模版 DNA，加入適量去離子水，把體積補足為 15 μL。
2) 於沸水中加熱 10 min。
   ◆ 請記得以夾子固定微量離心管之管蓋部份，以免離心管在加熱過程中蓋子爆開、進水！
3) 加熱後，迅速把微量離心管移至冰浴中，靜置數分鐘。
4) 離心數秒後，依序加入下列三種試劑：
   2 μL hexanucleotide mix
   2 μL dNTP mixture
   1 μL Klenow enzyme
5) 以指頭輕彈離心管，以便混合均勻。
6) 短暫離心後，置於 37℃恆溫水槽中作用 2 h。
   ◆ 反應時間至少須要 1 h，最長可反應過夜。
7) 作用完畢之後，加入 2 μL 之 0.2 M EDTA，以便終止 DNA 聚合反應。
8) 加入 2.5 μL 4 M LiCl及 75 μL純酒精，混合均勻，置 -20℃過夜。

隔天：

1) 於 13,000 rpm，4℃離心 15 min。
2) 倒出上清液，加入 50 μL 之 70%酒精，再離心 5 min。
3) 倒出上清液並風乾 DNA。
4) 最後以 50 μL TE 溶解 DNA。

註解討論：

a. 影響標定效率的因子主要包括模版 DNA 的純度、使用量與反應時間；在進行標定反應時，若 DNA 使用量較高 (最高 2 μg)，或反應時間較長 (最長 20

h)，可獲得的標定 DNA 量一般比較多。

b. 標定反應完成後以酒精沉澱標定 DNA，主要是為了去除 unincorporated nucleotides。 由於 unincorporated nucleotides 一般不會影響到後續的南方雜合反應，酒精沉澱這一步或可省略。但如果所製備的探針是要用於原位雜合反應 (*in situ* hybridization) 時，最好仍進行酒精沉澱。

c. 本實驗以 LiCl 取代一般常用的鹽類進行酒精沉澱，是因為 LiCl 在酒精裡的溶解度比較好，容易去除。

d. 不要對 DIG-標定之 DNA 進行 phenol/chloroform 萃取，因為 DIG 可能會存留在 organic phase。

3.2.2 PCR

PCR是極為重要的DNA增殖技術，應用層面非常廣，其中包括了核酸探針之製備。如果一段DNA已經被次選殖至載體上，要以PCR擴增這段DNA時，可根據質體multiple cloning sites兩邊的序列，選用適當的核酸引子 (universal primers) 進行擴增反應；比較常用的引子包括SP6, T3 與T7 promoter primer, M13/pUC forward與reverse primers等；若有特殊考量，也可以使用序列專一性核酸引子對。進行PCR反應時若同時添加 [α-^{32}P]dNTP或DIG-11-dUTP，所增殖的DNA即被^{32}P或DIG所標定，所以PCR是製備核酸探針非常便捷好用的方法。

儀器用具：

微量離心機

PCR 反應器

藥品試劑：

模版 DNA： pBlueGus 質體 DNA (~50 pg)

核酸引子對： T3 promoter primer 與 T7 promoter primer (各 2 μM)

礦物油 (是否需要視PCR反應器機型而定)

PCR DIG probe synthesis kit (Roche), 內含：

Taq DNA polymerase (Expand High Fidelity, 3.5 U/μL)

10×PCR DIG probe synthesis mix (2 mM dATP, dCTP, dGTP, 1.9 mM dTTP, 及 0.1 mM DIG-11-dUTP, pH 7.0)

Expand high fidelity buffer with $MgCl_2$ (10×)

方法步驟：

以下反應條件主要參照 PCR DIG probe synthesis kit 製造廠商所提供之產品說明。

1) 取一支 0.5 mL微量離心管，依下表逐一加入各項試劑 (單位 μL)：

Reagents	Volume	Final conc.
dH_2O	28.5	-
10×PCR buffer	5	1×
10×PCR DIG mix	5	200 μM dNTP
T3 promoter primer	5	0.2 μM
T7 promoter primer	5	0.2 μM
pBlusGus DNA	1	~50 pg
Taq DNA polymerase	0.5	0.5 U
Total volume	50	

2) 以手指頭輕彈管壁使各項試劑混合均勻。

3) 短暫離心後，徐徐加入 100 μL 礦物油。

◆ 有些 PCR 反應器不需使用礦物油。

4) 在 PCR 反應器上設定 PCR 反應條件：

Denaturation： 94℃/10 min

擴增反應：

30 循環之 [94℃/45 s → 55℃/1 min → 72℃/2 min]

最後之 elongation step：72℃/10 min

5) 將微量離心管移至反應器上，並開始進行 PCR 反應。

6) 反應完成後，以微量吸管吸出礦物油，並取出 5 μL PCR 反應產物，進行洋菜膠體電泳分析。

註解討論：

a. PCR 標定產物所呈現的 molecular mass 應比未標定者大。

b. 影響 PCR 反應之因子主要包括哪些？

c. 以 PCR 及 random priming 進行標定反應各有哪些優點？

3.3 變性膠體電泳與北方雜合分析

mRNA為單股,一般會捲繞成特定的三級結構,並與某些蛋白質結合,而以messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) 的型式存在於細胞內；自細胞抽取RNA時，一般會以特定步驟去除蛋白質，但仍難完全破除RNA的二/三級結構。 由於進行電泳分析時，影響核酸泳動速率的因子主要包括核酸之長度與構形 (conformation)，為了去除核酸構形所造成的影響，一般以電泳分析RNA時都採用變性膠體電泳；在進行這一類電泳分析時，由於RNA已經被變性 (denature)，影響其泳動速率的因子主要是長度。 一旦RNA以變性膠體電泳解析好,即可進一步進行北方轉印與雜合分析。

3.3.1 變性膠體電泳 (denaturing gel electrophoresis)

在進行RNA變性膠體電泳分析時，如果所要分析的RNA比較小 (<1,000 bases)，可以選用聚丙烯醯胺膠體 (polyacrylamide gel)，此時所使用之變性劑 (denaturing reagent) 主要是尿素 (urea)；這個方法一般也被用來分析核酸定序反應的產物。若所欲分析的RNA分子較大，可採用變性洋菜膠體電泳 (agarose gel electrophoresis)，所使用的變性劑為 (1) glyoxal/dimethyl sulfoxide (DMSO) 或 (2) 甲醛。 以glyoxal/DMSO系統進行電泳分析時，所使用之電泳緩衝液為 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)；為了避免電泳進行過程中，電泳槽兩邊之pH落差過大，以致影響電泳的進行，最好能在兩極之間加裝電泳緩衝液循環裝置，而且核酸泳動速率也應儘量放慢。以甲醛為變性劑時不會有這些問題，因此操作比較省事，但必須注意，甲醛氣體為有毒物質，配製甲醛洋菜膠體及進行電泳分析時應在抽氣櫥裡操作。 本實驗將採用甲醛洋菜膠體電泳法。

3.3.1.1 清理電泳槽

前面已強調過，能否將RNase去除乾淨是RNA相關實驗成功與否的主要決定因子。 在進行RNA電泳分析時，為了避免RNase可能帶來之問題，實驗室內最好能騰出一套電泳器材，專門用於RNA之分析。如果所使用的電泳槽及鑄膠器一般也用於進行DNA分析的話,在進行RNA變性膠體電泳分析前應仔細地加以清理；清理時除了以中性清潔劑徹底沖洗乾淨外，最好再用 3%過氧化氫 (H_2O_2) 浸泡 10 min。

儀器用具：

Mupid II 迷你電泳槽及鑄膠器

藥品試劑：

中性清潔劑 (abSolve, DuPont NEF971)

3% H_2O_2 (過氧化氫)

dH_2O/DEPC

方法步驟：

◆ 進行下列步驟時，請務必戴手套！

1) 以中性清潔劑仔細清洗電泳槽，再以二次水洗去清潔劑，並稍加晾乾。
2) 以 3%過氧化氫注滿電泳槽，放置於室溫 10 min。
3) 倒掉過氧化氫溶液。
4) 以dH_2O/DEPC徹底地沖洗電泳槽。

3.3.1.2 甲醛洋菜膠體電泳 (formaldehyde-agarose gel electrophoresis)

甲醛是一種常用的 RNA 變性劑。在進行甲醛洋菜膠體電泳分析時，必須先配製含有甲醛的洋菜膠體，RNA 也必須先以甲醛及 formamide 進行變性處理，以確保其二度結構充分被打開。由於甲醛可能是一種致癌物質，配製膠體及進行電泳分析時都應在抽氣櫥裡小心操作；進行電泳時所使用的緩衝液為 MOPS (3-[*N*-morpholino] propanesulfonic acid)。此外，含有甲醛的洋菜膠體比較滑溜，容易破裂，在移動膠體時應特別留神。由於 rRNA 佔細胞 RNA 總量之 80~85%，以 ethidium bromide 染色後，呈現於膠體上的兩個主要 RNA 色帶應該分別是 large 與 small rRNAs (真核生物為 28S 與 18S，原核生物為 23S 與 16S)；散佈於 small rRNA 附近，呈淡淡 smear 的就是 mRNAs，這是因為 mRNAs 存在量不多，而且長度不一的緣故。長度較短的 5S rRNA 及 tRNA 等則在膠體下方也以特定色帶呈現。

儀器用具：

65℃恆溫水槽
微量離心機
Mupid II 迷你電泳槽及鑄膠器
UV transilluminator
防護面罩
拍立得相機
抽氣櫥

藥品試劑：

自菌體抽取之 RNA (I-1, I-2, U-1, and U-2) 與胞外轉錄反應所製備之正意股及反意股 RNA (#1, #2, #3, and #4)。
5×formaldehyde gel running buffer (0.1 M MOPS, pH 7.0; 40 mM sodium acetate; 5 mM EDTA)
Formaldehyde gel loading buffer (0.25% bromophenol blue; 0.25% xylene cyanol; 50% glycerol; 1 mM EDTA)
Ethidium bromide (1 μg/μL in dH_2O/DEPC)
dH_2O/DEPC

方法步驟：

◆ 注意：

a. 下列實驗主要參照Sambrook and Russell (2001) 的方法。

b. 進行下列實驗時請務必戴手套。

c. 甲醛與 formamide 都放在抽氣櫥內。

準備一片 1.2%甲醛洋菜膠體：

1) 秤取 0.48 g agarose置 100 mL血清瓶，加入 25 mL dH_2O/DEPC。

2) 以微波爐加熱溶解之後，微微晃動血清瓶使混合均勻，再移至 60℃恆溫水槽靜置 5 min。

3) 將裝著 agarose 溶液的血清瓶移至抽氣櫥，加入 8 mL 之 5× formaldehyde gel running buffer 及 7.2 mL 之甲醛，輕輕搖晃血清瓶以便混合均勻。

◆ 膠體總體積為 40 mL，為了避免 agarose 溶液因溫度快速下降，很快便凝固，應力求動作迅速，但應避免劇烈搖晃，以免弄出一大堆氣泡，影響膠體凝結。

4) 儘速於抽氣櫥內把混合液倒入膠體鑄模，並插入樣本梳 (teeth comb)。

◆ 膠體凝固至少需時 30 min。

製備電泳分析所需之 RNA 樣本：

1) 取出 8 支 1.5 mL微量離心管，分別標示為U-1, U-2, I-1, I-2, #1, #2, #3 及 #4，並根據下表所示依序加入各項試劑 (體積單位為 μL)。

◆ U-1, U-2, I-1 及 I-2 分別為大腸桿菌所分得之 RNA (3.1.1 節)，#1, #2, #3 及 #4 分別是胞外轉錄反應所得到之 RNA (3.1.2 節)。

	I-1, I-2	U-1, U-2	#1	#2	#3	#4
Reagents	RNA from pQG11/M15[pREP4] + IPTG	RNA from pQG11/M15[pREP4] – IPTG	Tx-pBlueGus/ *Hin*dIII e/ DNase	Tx-pBlueGus/ *Bam*HI e/ DNase	Tx-pBlueGus/ *Hin*dIII e/o DNase	Tx-pBlueGus/ *Bam*HI e/o DNase
dH_2O/DEPC	4.5 - x	4.5 - x	2.5	2.5	2.5	2.5
RNA	x (6 μg)	x (6 μg)	2	2	2	2
5×formaldehyde gel-running buffer	2	2	2	2	2	2
Formaldehyde	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Formamide	10	10	10	10	10	10
Total volume	20	20	20	20	20	20

2) 混合均勻並離心數秒後，放置於 65℃恆溫水槽作用 15 min。

3) 將作用完之微量離心管移置於冰浴中。

4) 離心數秒後，再將離心管放回於冰浴中，並於各離心管分別加入 2 μL 之 formaldehyde gel loading buffer 與 1 μL ethidium bromide。

電泳：

1) 要進行電泳時，把已凝固之洋菜膠體放進電泳槽，並加入適量 1× formadehyde gel running buffer。

2) 以 50 V 定電壓預跑 5 min。

3) 依序注入上列 8 個 RNA 樣本，以 50 V 定電壓進行電泳，待追蹤染劑移動至膠體三分之二處時，關閉電源，將膠體移至 UV transilluminator box，

觀察 RNA 色帶之存在情形，並拍照存證。

◆ 注意：這一片膠體往下將用來進行北方轉印實驗，請小心處置！

註解討論：

a. 請觀察膠體上 RNA 色帶之存在情形，你知道它們各代表什麼嗎？

b. 若你必須估算特定 mRNA 分子的長度，應如何進行？

3.3.1.3 以毛細管轉移方式進行北方轉印實驗

要進行北方雜合反應前，必須先將RNA自洋菜膠體轉移至硝化纖維紙 (nitrocellulose membrane) 或尼龍膜 (nylon membrane) 上，這一個過程稱為轉印 (blotting)。 一般常用的方法包括毛細管轉移法 (capillary transfer)、真空轉移法 (vacuum transfer) 與電轉印法 (electroblotting)。 毛細管轉移法借助吸水紙吸收轉移緩衝液時所產生的牽引力量將RNA自洋菜膠體轉移至膜上；要轉印完全，起碼需要作用 6 h以上。 雖然所需花費的時間比較長，以其不須要特別的儀器設備，毛細管轉移法目前仍被普遍採用。 若分析RNA時採用變性聚丙烯醯胺膠體電泳，則必須以電轉印法進行RNA轉印。至於膜的選擇，硝基纖維素膜的優點是比較不會產生非專一性反應；不過其一旦被潤溼再烘乾之後，容易碎裂，不適用於進行多次雜合反應。 尼龍膜的優點是韌性好，與核酸結合的能力也相當強，正可以彌補硝基纖維素膜的缺點，現已成為主流。 一旦將RNA轉移至膜上後，即可以利用紫外線照射法 (*uv* irradiation) 或真空乾燥法 (在真空下 80℃加熱 2 h) 將其固定於轉印膜上。

儀器用具：

塑膠盒
玻璃板
裁紙刀

藥品試劑：

20×SSC (3 M NaCl, 300 mM sodium citrate)
尼龍膜
3MM 濾紙
吸水紙
dH_2O/DEPC

方法步驟：

1) 將甲醛洋菜膠體移放在塑膠盒內，以dH_2O/DEPC沖洗數次，以便去除甲醛。

◆ 注意：在移動膠體時請特別留心，不要把膠體弄破了！

2) 注入 100 mL 20×SSC，靜置 5 min。

3) 根據圖 3.2 所示，依序在塑膠盒上堆疊玻璃板、濾紙 (作為鹽橋)、電泳膠、

尼龍膜、三層濾紙、與吸水紙，以便以毛細管轉移方式將 RNA 轉印於尼龍膜上；塑膠盒內裝入適量 20×SSC，以便作為轉移緩衝液。

◆ 注意：

a. 濾紙與尼龍膜應先以 20×SSC 潤濕，再用於堆疊。
b. 在濾紙、尼龍膜、與電泳膠夾層間可能會有氣泡存在，因此在放好電泳膠、尼龍膜或濾紙後，應立即檢視，並以食指輕輕平移的方式小心趕走氣泡。
c. 此轉印步驟將持續至隔天才結束。

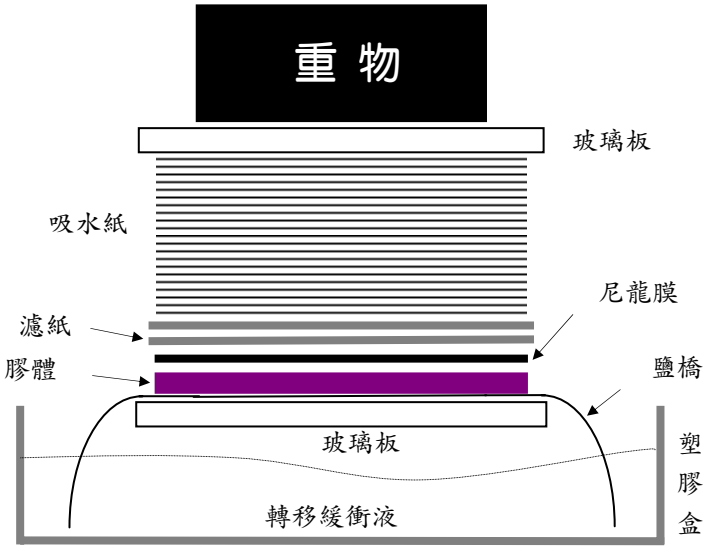

圖 3.2 以毛細管轉移法進行核酸轉印

註解討論：

a. 假使所要分析的 RNA 長度大於 2.5 kb，在進行毛細管轉移前，膠體最好先以 0.05 N NaOH 處理 20 min，再以 20×SSC 浸泡 40 min，以便局部分解 RNA，提升轉印效率。

3.3.2 北方雜合反應

北方雜合反應的步驟主要包括： (1) 加入核酸探針，使與固定於尼龍膜上的特定 RNA 進行雜合反應，及 (2) 待雜合反應結束後以含鹽緩衝液與 SDS 洗掉非專一性結合於尼龍膜上之核酸探針。 進行反應時應注意下列幾個問題： (1) 實驗操作過程仍應儘可能避免 RNase 的污染；(2) 反應前應先進行雜合前置反應 (prehybridization)，以便減少核酸探針與尼龍膜之間的非專一性結合反應；(3) 如果所使用的核酸探針是以 random priming 或 PCR 等方法所製備的雙股 DNA 探針，使用前務必先加熱變性；(4) 選用適當的嚴苛度 (stringency) 進行雜合反應及後續的轉印膜漂洗工作，以便增強雜合反應訊息，並減少雜訊，這主要可以從溫度與鹽濃度兩個方面加以考量。

儀器用具：

Crosslinker (Stratalinker 1800, Stratagene)
塑膠盒
平端鑷子
封口機
42℃恆溫槽
60℃恆溫槽

藥品試劑：

6×SSC (0.9 M NaCl, 90 mM sodium citrate)
尼龍膜
Hybridization solution [formamide, 50% (v/v); 5×SSC; blocking reagent, 2% (w/v); *N*-lauroylsarcosine, 0.1% (w/v); SDS, 0.02% (w/v)]
3MM 濾紙
2×SSC, 0.1% SDS
0.1×SSC, 0.1% SDS

方法步驟：

◆南方雜合反應請參照 6) 之後的步驟進行，惟所使用之探針為 3.2.1 節以 random priming 進行標定者。進行下列實驗時，請務必帶手套。

1) RNA 轉印步驟結束後，移除電泳膠上之吸水紙與 3M 濾紙。
2) 把尼龍膜連同電泳膠一齊移置於乾淨衛生紙上，並請小心維持電泳膠與尼龍膜的相對位置。
3) 以防水筆在尼龍膜上標出電泳膠樣本孔的位置，並以剪刀剪掉尼龍膜左上角，以便標記電泳膠的左右方位。
4) 小心地拉開尼龍膜，將之放置於 6×SSC (20 mL) 浸泡 5 min。
5) 以平端鑷子夾起尼龍膜，待 6×SSC 滴乾之後，把尼龍膜平放於衛生紙上，風乾至少 30 min。
   ◆ 與電泳膠接觸的那一面應朝上。
6) 以 Stratalinker 1800 進行 *uv* 連結反應。
7) 雜合前置反應：
   a) 將 10 mL 雜合溶液注入一個塑膠袋。
   b) 把已經風乾之尼龍膜移置於塑膠袋內，小心地把氣泡移除之後，以封口機密封好，再移至 42℃恆溫槽進行雜合前置反應 1~2 h。
8) 核酸探針變性反應：
   a) 以微量吸管小心地把 PCR 產物移至新的微量離心管。
   b) 將裝著核酸探針的微量離心管放入沸水中加熱 10 min。
      ◆ 請記得以夾子固定微量離心管之蓋子，以免加熱時蓋子爆開。

c) 把離心管移入冰浴裏靜置 3 min。
d) 瞬間離心後，取出已被變性的核酸探針，加到 5 mL 之雜合溶液。

9) 雜合反應：
a) 剪開塑膠袋一角，倒出塑膠袋內雜合前置反應所使用之溶液，並加入新配之含有核酸探針的雜合溶液 (8-d)。
b) 小心移除氣泡，並以封口機密封塑膠袋。
c) 如前節所述將塑膠袋移至 42℃恆溫槽，雜合反應將進行過夜。

10) 以含鹽緩衝液與SDS漂洗轉印膜 (Northern blot)：
a) 拿出塑膠袋，塑膠方盒以清水沖洗乾淨之後，裝入 80 mL [2×SSC, 0.1% SDS]。 剪開塑膠袋，把尼龍膜取出放進 [2×SSC, 0.1% SDS]，於室溫漂洗 2 次，每次 5 min。
b) 續以 100 mL [0.1×SSC, 0.1% SDS] 於 60℃洗 2 次，每次 15 min。
◆ 溶液需先置於 60℃恆溫水槽中預熱。

註解討論：

a. 在進行步驟 6) 之*uv*連結反應之後，若無法立即進行北方雜合反應，可將尼龍膜放入塑膠袋中，並放置於 -20℃冰箱保存。
b. 在完成步驟 10) 之轉印膜漂洗工作後，若無法立即進行 DIG 酵素連結免疫反應與鹼性去磷酸酶呈色反應，可將轉印膜放入塑膠袋中，並放置於 4℃冰箱保存。
c. 最後以 [0.1×SSC, 0.1% SDS] 漂洗轉印膜時，所用的溫度可依實際需要再調整，以便去除非專一性反應，減少雜訊。
d. 一般可以藉哪些方式控制雜合反應與轉印膜漂洗過程之嚴苛度？

3.3.3 以酵素連結免疫反應與鹼性去磷酸酶呈色反應偵測雜合訊息

進行雜合反應時所使用的探針若為放射性物質所標定者，雜合訊息可經由放射顯影術 (autoradiography) 偵測出來；若為DIG所標定者，則需借助anti-DIG抗體與鹼性去磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP) 之conjugate，並利用鹼性去磷酸酶的酵素活性轉現雜合反應訊息。 目前常用來進行鹼性去磷酸酶呈色反應的基質為 NBT (nitroblue tetrazolium) 與 BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidinium salt)； 此外，也可以選用CSPD或CDP-Star等試劑，以增加檢測敏感度。

儀器用具：

平端鑷子
旋轉搖盪器 (rotary shaker)

藥品試劑：

DIG nucleic acid detection kit (Roche)，內含：

Anti-DIG-AP conjugate
NBT/BCIP stock solution
Blocking reagent

Washing buffer (Maleic acid buffer + 3% Tween 20, v/v)

Maleic acid buffer (0.1 M maleic acid; 0.15 M NaCl; adjust to pH 7.5 with NaOH)

Blocking solution (1% blocking reagent in maleic acid buffer)

Detection buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 9.5; 0.1 M NaCl; 50 mM $MgCl_2$)

TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA)

Color-substrate solution (需要使用時取 10 mL 之 detection buffer，加入 200 μL NBT/BCIP stock solution 均勻混合)

方法步驟：

◆ 注意：

a. 以下反應條件與程序主要是參照 DIG nucleic acid detection kit 製造廠商所提供之產品說明書。
b. 北方與南方雜合之尼龍膜可同步處理，所有反應於室溫進行。
c. 以平端鑷子將尼龍膜自一種溶液移至次一種溶液時，儘可能滴乾前者之殘留部份，以免影響後續反應。
d. 浸洗過程應以搖盪器低速搖動 (50 rpm)，以便加強作用。

1) 進行 anti-DIG/AP conjugate 與 DIG-核酸探針之免疫結合反應：
   a) 以 50 mL 之 washing buffer 浸洗尼龍膜 1 min。
   b) Blocking：把尼龍膜放入 20 mL blocking solution 作用 30 min，以便填充尼龍膜上之非專一性結合部位。
   c) 取出 2 μL 之 anti-DIG-AP conjugate，並以 10 mL 之 blocking solution 稀釋。
   d) 免疫結合反應：把 anti-DIG-AP conjugate 稀釋液連同尼龍膜一起放入塑膠袋內，仔細除去氣泡並封口之後，低速搖動作用 30 min。
   e) 以 50 mL washing buffer 浸洗尼龍膜 2 次 (每次 15 min)，以便去除多餘及非專一性結合於尼龍膜的 anti-DIG-AP conjugate。
   f) 將尼龍膜放置於 20 mL 之 detection buffer 漂洗 2 min。
2) 鹼性去磷酸酵素呈色反應：
   a) 取出尼龍膜，放入 10 mL 現配之 color-substrate solution，並隨即把尼龍膜及作用溶液移至黑暗環境 (例如抽屜內) 作用。每幾分鐘檢視一次，待紫色條帶出現時即可終止反應。
   b) 欲終止反應時，請把尼龍膜移至 50 mL TE 浸漬 5 min。
   c) 拿出尼龍膜，滴乾反應液後放置於衛生紙上風乾至少 30 min，加以護貝即可保存。

註解討論：

a. 可用來定量 RNA 的方法，除了北方雜合分析之外，還有 primer extension, S1 mapping, RNase protection 及 reverse transcriptase-PCR 等；這些方法各有其特色，可依研究內容之需要選擇使用。

b. 若應實驗需要，須以不同核酸探針對同一張轉印膜進行多次雜合反應時，應注意隨時保持轉印膜溼潤，否則可能會因轉印膜乾透，無法去除膜上之雜合訊息，而影響了後續的雜合反應。

參考文獻：

Ausubel, F. M., Brent, R. Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G.., Smith, J. A., and Struhl, K. 2005. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, USA

Gesteland, R. F., Cech, T. R., and Atkins, J. F. 1999. The RNA world : the nature of modern RNA suggests a prebiotic RNA world, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA

Rapley, R., and Manning, D. L. 1998. RNA isolation and characterization protocols. Humana Press, USA

Sambrook, J., and Russell, D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA

Summers WC (1970) A simple method for extraction of RNA from *E. coli* utilizing diethylpyrocarbonate. Anal Biochem **33**: 459-463