サザンブロット解析の流れ

受託範囲と各工程の全体像

① ゲノムDNAの調製

組織・細胞からサザンブロット解析用の高分子ゲノムDNAを精製します。

② 制限酵素処理

ゲノムDNAを制限酵素で消化し、電気泳動の前処理を行います。

③ 電気泳動・メンブレン作製

アガロース電気泳動後、ゲル内でDNAを変性し、ナイロンメンブレンへ転写します。

④ プローブ作製

RI標識用のプローブ鋳型DNAを調製します。

⑤ ハイブリダイゼーション・検出

非標識プローブ鋳型からランダムプライマー法でRI標識プローブを作製し、膜上DNAとハイブリダイズして検出します。

現在の受託開始点　① DNA調製から　② 制限酵素処理から

- 上記以外の段階からの依頼は、試料状態と実施可能性を事前にご相談ください。

事前相談

ヒト・野生動物由来の組織／細胞、ウイルス感染細胞などは、受入できない可能性があります。必ず事前にご相談ください。

解析設計・実施上の重要事項

- 制限酵素は、予測断片長・認識部位・メチル化感受性を考慮して選択し、完全消化を確認します。
- プローブ領域は結果を左右する重要工程です。反復配列（Alu等）、相同配列・偽遺伝子、GC含量を確認します。
- ハイブリダイゼーションでは、プローブ量、温度、洗浄ストリンジェンシーを最適化します。
- RI標識プローブにより、膜上の目的DNA断片を検出します。

用語：Cold＝非標識のプローブ鋳型DNA ／ Hot＝RI標識後のプローブ。工程名ではなく試料状態として明示します。

試料準備とメンブレン作製

①ゲノムDNA調製　②制限酵素処理　③電気泳動・膜転写

① ゲノムDNAの調製

組織・細胞から解析用ゲノムDNAを調製します。

持ち込み条件

- サザンブロット解析に適した方法で精製
- 50 ng/μL以上
- TE bufferに溶解
- 4℃で保存

注意

- 濃度・純度が不足する場合は再精製することがあります（DNA調製料金が発生）
- PCR用に調製したゲノムDNAは使用できない場合があります

② 制限酵素処理

ゲノムDNAを制限酵素で消化し、アガロース電気泳動に供します。

消化済みDNAの持ち込み条件

- 全容量30 μL以下
- 0.5 μg/μL以上
- TE bufferに溶解

注意

- 解析設計に適した制限酵素を選択します
- 完全消化を確認してください
- 高品質な酵素（ゲノム解析用途）を推奨します

③ メンブレン作製

制限酵素処理DNAをアガロース電気泳動し、ゲル内でDNAを変性後、ナイロンメンブレンへ転写します。

メンブレン持ち込み時

- DNA転写面（表）を明示
- ゲルのウェル側（上）を明示
- ウェル位置を膜上にマーキング
- 電気泳動後のゲル撮影データを提出

膜の乾燥・折れ・汚染を避けてください。

補足　50 ng/μL、30 μL、0.5 μg/μLなどは本部門の受入条件です。一般的なサザンブロット法の普遍的要件ではないため、試料量・DNA品質・解析設計に応じて事前確認します。

プローブ作製、ハイブリダイゼーションおよび検出

④プローブ作製　⑤RI標識・ハイブリダイゼーション・検出

④ プローブ作製

RI標識プローブ作製用の鋳型DNAを調製します。

設計上の確認

- プローブ領域は解析結果を左右する重要ステップ
- Alu等の反復配列を避ける
- 相同配列・偽遺伝子の有無を確認
- GC含量、標的座位への特異性を確認

提出物

- プローブ鋳型DNA
- プローブ領域を増幅するプライマーペア
- 可能であればクローニング後、シーケンスで配列確認した鋳型
- 配列情報のみの場合は事前相談

持ち込み濃度：約25 ng/μL

⑤ ハイブリダイゼーションと検出

非標識プローブ（Cold）を鋳型として、ランダムプライマー法によりRI標識プローブを作製します。

作製したRI標識プローブを、ナイロンメンブレン上のDNAとハイブリダイズさせ、目的DNA断片を検出します。

検出品質を左右する要因

- プローブの特異性と比活性
- プローブ濃度
- ハイブリダイゼーション温度・時間
- 洗浄条件（ストリンジェンシー）
- メンブレンの取扱いと非特異的結合

RIを使用するため、作業は施設の放射線安全管理手順に従って実施します。

依頼前の確認　プローブ設計、予測バンドサイズ、制限酵素、野生型・改変型アレルの想定パターンを事前に共有してください。