

サザンブロット解析の流れ

①ゲノムDNAの調製

- ・組織・細胞から、サザンブロット解析用ゲノムDNAを調製します。
- (注意点)
- ・ヒトや野生動物の組織・細胞、およびウイルス感染細胞等はお引き受けできない可能性があります。**必ずご相談ください。**

②ゲノムDNAの制限酵素処理

- ・ゲノムDNAを制限酵素で消化し、アガロース電気泳動の前処理を行います。
- (注意点)
- ・ゲノムDNAをお持ち込みの場合は、サザンブロット解析用の調製キットで精製し、濃度が50 ng/ μ L以上となるようにTE bufferで溶解し、4°Cで保存してください。
- ・DNAの濃度・純度が十分でない場合は、お持ち込みのサンプルを再精製させていただく場合があります。(DNA調製料金がかかります)
- ・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。

③サザンブロット解析 (Cold)・メンブレン作製

＜メンブレン作製＞

- ・制限酵素処理したゲノムDNAをアガロース電気泳動し、ゲル内でDNA変性後、ナイロンメンブレンに転写します。

(注意点)

- ・使用する制限酵素はDNAメチル化の影響を受けない酵素を選択し(ゲノムメチル化解析は除く)、完全消化してください。ゲノム解析グレードの酵素を推奨します。

＜プローブ作製＞

- ・RI標識プローブ作製の鋳型DNAを調製します。

(注意点)

- ・プローブ領域の設定は結果を左右する最も重要なステップです。設定配列中にAluなどの反復配列が含まれていないか、偽遺伝子の有無、GC含量など、十分に吟味してください。
- ・プローブ領域をベクターにクローニングし、シーケンスにより配列確認済みのものをご用意ください。また、プローブ領域のみを増幅するプライマーペアも併せてご提供ください。

④プローブ作製

⑤サザンブロット解析 (Hot)・ハイブリダイゼーション及び検出

＜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、メンブレン上のDNAとハイブリダイズさせることで、目的のDNAを検出します。

(注意点)

- ・プローブ(Cold)をお持ち込みの場合は、約25 ng/ μ Lの濃度に調製してください。
- ・DNAを転写したメンブレンをお持ち込みの場合、表裏(DNAが転写されている面が表)と上下(ゲルのウェルがあった位置が上)を明示し、ウェルの位置をメンブレン上にマーキングしてください。また、電気泳動後のゲルの撮影データをご提供ください。

※現在、①または②のステップからのみ受託可能です。これ以外のステップからをご希望の場合はご相談ください。