

サザンブロット解析の流れ

①ゲノムDNAの調製

・組織・細胞より、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、及びウイルスを感染させた細胞等はお引き受け出来ない可能性があります。**必ずご相談下さい。**

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を持ち込む場合は、DNAは濃度が50ng/ul以上となるようにTE bufferで溶解し、4℃で保存して下さい。

・DNAの濃度・純度が十分でない場合は、持ち込んだサンプルを再精製させて頂きます。(DNA調製料金が掛かります)

・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)

・制限酵素処理したDNAを持ち込む場合は、全容量30ul以下、濃度0.5ug/ul以上でTE bufferに溶解して下さい。

・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)、完全消化して下さい。ゲノム解析グレードの酵素を推奨します。

<プローブ作製>

・放射能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などの反復配列を含まないか？偽遺伝子の存在、GC含量など、十分吟味して下さい。

・PCRでプローブを増幅しますので、鋳型をお持ち下さい。配列のみの場合は、ご相談下さい。

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>

・プローブ(Cold)を鋳型に、ランダムプライマーによる放射能標識プローブを作製し、メンブレン上のDNAとハイブリダイズすることで、目的のDNAを検出します。

(注意点)

・プローブ(Cold)を持ち込む場合は、25ng/ul前後の濃度に調製して下さい。

・DNAを転写したメンブレンを持ち込む場合、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下さい。また、電気泳動後のゲルの撮影データを提供して下さい。

※①～⑤、いずれのステップからでも受託可能です