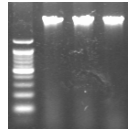


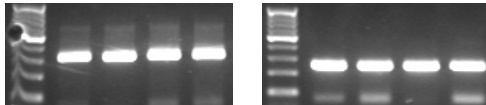
バイサルファイトシーケンス クローニング法

Overview of Analysis procedure

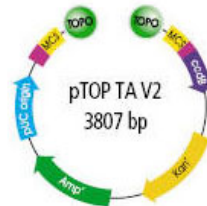
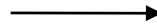
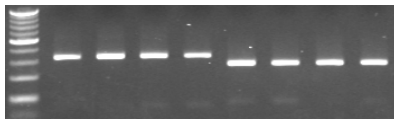
1. gDNA Preparation



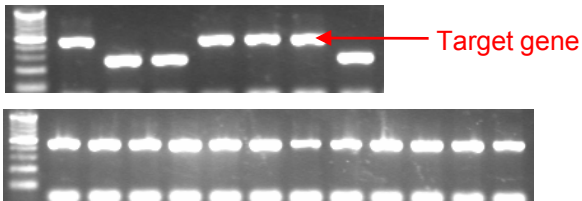
2. Bisulfite-treatment and PCR reaction



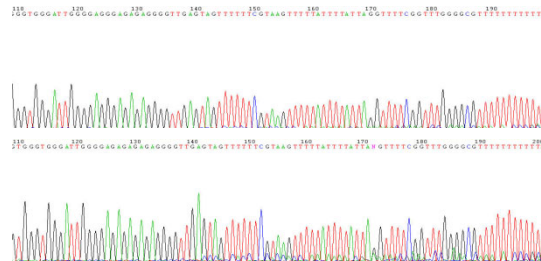
3. Purification of PCR product & TA-cloning



4. Cloning confirmation by PCR using M13 primer set



5. Plasmid purification and sequencing



1. Quality Control of Genomic DNA

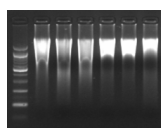
ゲノムDNAまたは細胞、組織サンプルをご提供頂き、DNA品質検査を行います。
※細胞または組織でご提供頂いた場合、DNA抽出・精製は別途費用(オプション)

NanoDrop 分光光度計とアガロースゲル電気泳動により、DNAの品質検査を行います。

→ $OD_{260}/OD_{230} > 2.0$, $OD_{260}/OD_{280} > 1.8$



分光光度計



アガロールゲル電気泳動

2. Primer Design and PCR Condition Set-up

ターゲット遺伝子解析領域の検索を行いPCRプライマーを設計
※お客様より解析領域をご指定頂いた場合、指定領域に対してPCRプライマーを設計致します。
PCRプライマーを合成して、PCRコンディションのセットアップを行います。



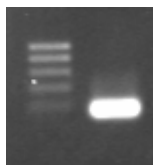
プライマーデザインプログラム

3. Bisulfite Treatment

DNAサンプルをバイサルファイトにより C→T 変換

4. PCR Amplification and Confirmation with Agarose Gel Electrophoresis

バイサルファイト処理後、ターゲット領域をPCR増幅を行いアガロースゲルにてシングルバンドを
PCR産物の精製を行います

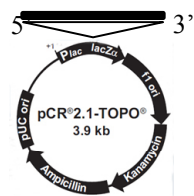


PCR産物
アガロールゲル電気泳動

5. TA Cloning

精製したDNAをpCR2.1ベクターTOPO TA cloning kit (Invitrogen) に混合してインキュベーションします。
ライゲーションDNAはヒートショック法によりTOP10 competent cellsに形質転換されLB/ampicillinディッシュで16時間42°Cでインキュベーションします。

Target DNA fragment



TA cloning with pCR2.1
TOPO vector



Typical result of transformation
onto LB/ampicillin dish

6. Colony Peaking & Single Cell Culture

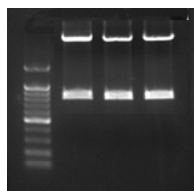
バクテリアコロニー確認後、20個のコロニーをランダムに選択してLB/ampicillin培養液に入れインキュベーター(42℃)でOD₆₀₀ > 0.5まで培養します。

7. Plasmid Purification

バクテリアをスピンドウンしてペレットにします。
プラスミドを抽出します。

8. Confirmation of Cloning

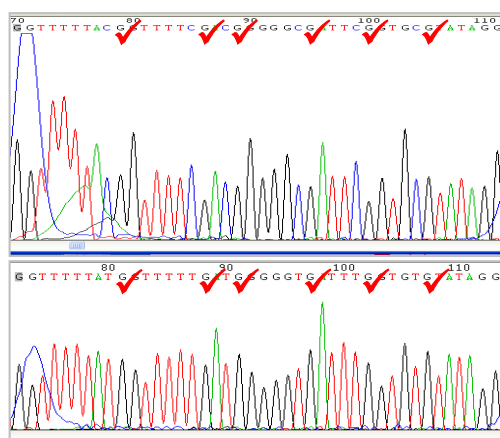
プラスミドに組み込まれたバイサルファイト後のDNA断片をEcoRI 制限酵素で処理後、アガロースゲルでバンドを確認。



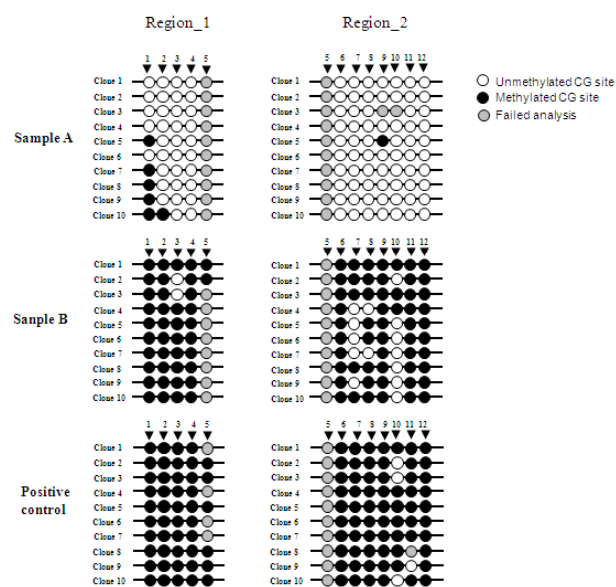
Confirmation of cloning by restriction enzyme digestion and agarose gel electrophoresis. Upper band represents the original vector and lower band are target DNA fragment.

9. Sequencing & Result Report

最少 15の プラスミドをシーケンス解析を行います。
解析は10プラスミド/サンプルのシーケンス結果を報告致します。



The representative results of bisulfite clonal Sequencing with methylated target sequence (upper) and unmethylated target sequence (lower). Check mark(red) indicates Cytosine residue of CpG site.



バイサルファイトシーケンス(クローニング法)受託解析

価格;

¥220,000 1サンプル/1ターゲット遺伝子(200-300 bp領域)

¥150,000 追加サンプル

¥15,000 DNA抽出・精製(細胞または組織):オプション

価格例;

1ターゲット遺伝子、3サンプル

¥220,000(1サンプル分含む) + ¥300,000(¥150,000 x 2) = ¥520,000

ALLIANCE Biosystems

〒533-0033大阪市東淀川区東中島1-20-12 722
株式会社アライアンスバイオシステムズ
TEL 06-6324-8817 Fax 06-6324-8818

info@alliance-bio.com
www.alliance-bio.com