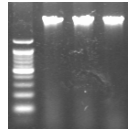


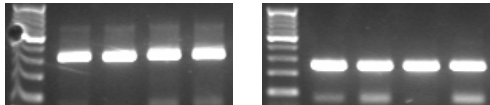
# バイサルファイトシーケンス クローニング法

## Overview of Analysis procedure

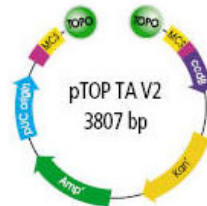
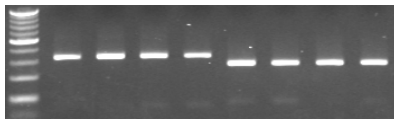
### 1. gDNA Preparation



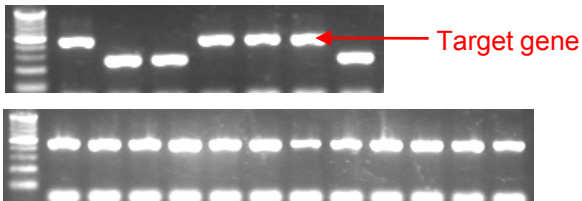
### 2. Bisulfite-treatment and PCR reaction



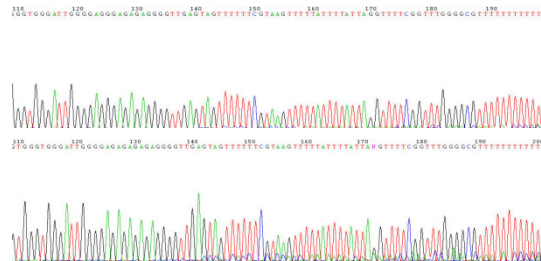
### 3. Purification of PCR product & TA-cloning



### 4. Cloning confirmation by PCR using M13 primer set



### 5. Plasmid purification and sequencing



## 1. Quality Control of Genomic DNA

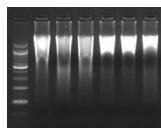
ゲノムDNAまたは細胞、組織サンプルをご提供頂き、DNA品質検査を行います。  
※細胞または組織でご提供頂いた場合、DNA抽出・精製は別途費用(オプション)

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

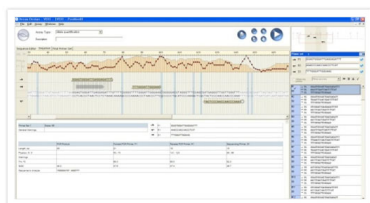


アガロールゲル電気泳動

## 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。



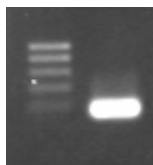
プライマーデザインプログラム

## 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

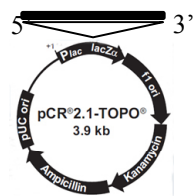


PCR産物  
アガロールゲル電気泳動

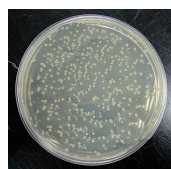
## 5. TA Cloning

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

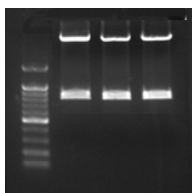
バクテリアコロニー確認後、20個のコロニーをランダムに選択してLB/ampicillin培養液に入れインキュベーター(42℃)でOD<sub>600</sub> > 0.5まで培養します。

## 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

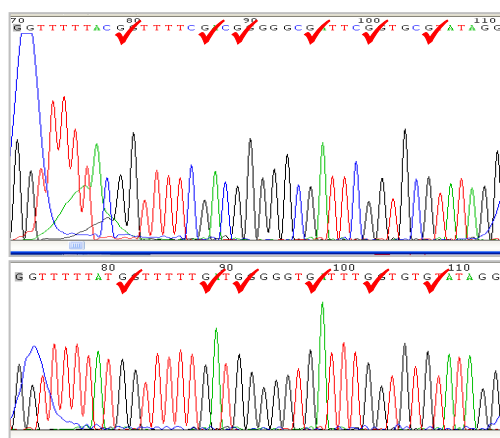
プラスミドに組み込まれたバイサルファイト後のDNA断片をEcoRI 制限酵素で処理後、アガロースゲルでバンドを確認。



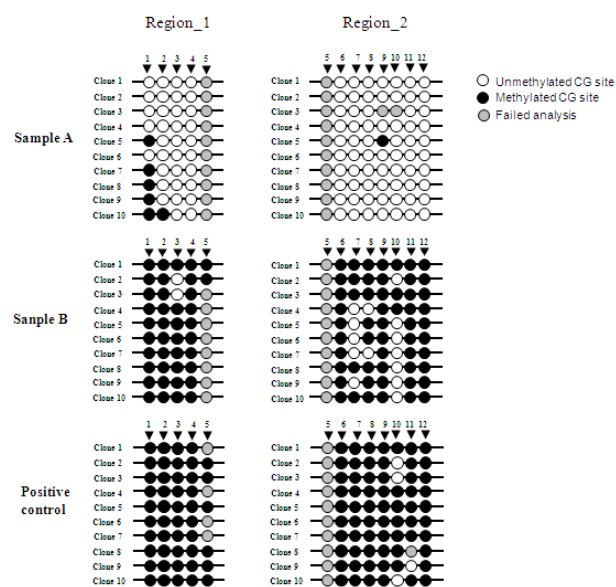
Confirmation of cloning by restriction enzyme digestion and agarose gel electrophoresis. Upper band represents the original vector and lower band are target DNA fragment.

## 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