

ICON プローブを用いたメチル化 DNA の配列選択的定量実験
(リアルタイム PCR 使用)

※注意

ここに記載してあるプロトコールは初期段階のモデルケースとしてのものです。
各種溶液の濃度などは今後の検討により、さらに良い条件が出てくることが
考えられます。あくまで参考としてご覧ください。

反応

- ・ 標的 DNA 溶液 (100nM) 5 μ L
- ・ ICON プローブミックス (センス鎖用・アンチセンス鎖用 各 100nM) 5 μ L
- ・ ヘキサシアノ鉄 (III) 酸カリウム水溶液 (1M) 5 μ L
- ・ バッファーミックス (Tris-HCl (pH=7.7 100mM)、EDTA (1mM)、NaCl (2M)) 25 μ L

これらを反応チューブ内で混合、95°C で 5 分加熱後、0°C に急冷

↓

オスミウム酸カリウム水溶液 (25mM) 10 μ L

を加え、55°C 1 時間加熱

↓

脱塩処理を行い、そのろ液を後の実験に用いる

定量

脱塩したろ液をプライマー、dNTP、DNA ポリメラーゼ、SYBR Green I
を含む PCR 反応液に分注

↓

リアルタイム PCR にて反応を行う

(反応条件: 95°C 5 秒 → 60°C 10 秒 → 72°C 15 秒) × 50 サイクル

↓

リアルタイム追跡（470nm 励起/510nm 検出）によって得られたデータを解析する

検量線

以上の反応を標準サンプル（メチル化 0%、メチル化 100%等）に対しても行い、それらの増幅曲線立ち上がり点から検量線を作成する。

参考

◆検量線用サンプルの作成方法

1. 目的配列を含む 300base 程度を PCR にて増幅し、精製を行う
（PCR によりメチル化部分が非メチル化状態になったサンプルが増幅される）

→メチル化 0 %サンプル
2. 1 で得られたサンプルに対して、市販のメチル化キットを用いてメチル化処理を行う

→メチル化 1 0 0 %サンプル
3. 1 と 2 を比率を変えて混合し、中間濃度サンプルとする。