

EpiTect[®] Whole Bisulfiteome プロトコールとトラブルシューティング

PCR解析用に、Bisulfite変換したDNAの全ゲノム増幅

目次	ページ
プロトコール	
EpiTect Whole Bisulfiteome Kitを用いて Bisulfite 変換DNAの増幅	2
トラブルシューティング	4



プロトコール：EpiTect Whole Bisulfiteome Kitを用いて Bisulfite 変換 DNA の増幅

本プロトコールは、Bisulfite 変換後精製した DNA (EpiTect Bisulfite Kit などを用いて調製した DNA) の増幅を実現します。

実験を始める前の重要事項

- 本プロトコールは、EpiTect Bisulfite Kit (英語版 Handbook 14 ページ、Appendix A 参照) により Bisulfite 変換を行なった直後の 50 ng 以上の DNA、または Bisulfite 変換後 -20℃ 保存で 12 週間以内* の DNA 用に至適化されています。DNA は、TE あるいはヌクレアーゼ・フリー水で再懸濁し、増幅に使用します。DNA の品質が低い場合や Bisulfite 変換 DNA 量が少ない場合は、増幅された DNA が 1 µg 未満であったり、ゲノム配列が欠損する部分が発生することがあります。
- DNA の Bisulfite 変換に関しては、EpiTect Bisulfite Kits (英語版 Handbook 18 ページ、Ordering Information 参照) をお奨めします。
- このプロトコールは、ダウンストリームの PCR およびリアルタイム PCR アプリケーションに最適な DNA を提供するために開発されました。増幅した DNA のその他のアプリケーションでの使用に関して QIAGEN では検証していません。
- REPLI-g® Midi DNA Polymerase は必ず氷上で解凍してください (ステップ 2 参照)。EpiTect WBA Reaction Buffer は室温で解凍します。
- 使用前に EpiTect WBA Reaction Buffer を少なくとも 10 秒間ボルテックスし、均一に混和します。

操作手順

1. 1 ~ 10 µl の TE buffer あるいは Buffer EB 中の >50 ng の Bisulfite 変換したテンプレート DNA を、マイクロ遠心チューブに入れる。ヌクレアーゼ・フリー水を用いて容量を 10 µl に調節する。
EpiTect Bisulfite Kits (英語版 Handbook 18 ページ、Ordering Information 参照) で処理した DNA を用いて最適な結果が得られます。
2. REPLI-g Midi DNA Polymerase を氷上で解凍する。他のすべての試薬類は室温で解凍し、ボルテックスで混和した後軽くスピンドアウンする。
融解後 EpiTect WBA Reaction Buffer が沈殿物を形成することがあります。ボルテックスで 10 秒間混和することにより沈殿物は溶解します。

* 変換 DNA の長期保存に関しては現在研究中です。

3. 表1に従って、氷上でEpiTect Amplification Master Mixを調製する。混和後軽くスピンドアウンする。

重要：表1に記載されている順番にEpiTect Amplification Master Mix成分を添加します。EpiTect WBA Reaction Bufferは使用前に10秒間以上ボルテックスします。EpiTect Amplification Master Mixは氷上で保存し、REPLI-g Midi DNA Polymeraseを添加後、直ぐに使用します。

表1. EpiTect Amplification Master Mixの調製

成分	容量／反応
EpiTect WBA Reaction Buffer	29 μ l
REPLI-g Midi DNA Polymerase	1 μ l
トータル容量	30 μ l

4. 30 μ lのEpiTect Amplification Master Mixを10 μ lのBisulfate処理したDNA（ステップ1）に添加する。

5. 溶液を28℃で8時間インキュベートする。

反応チューブを28℃の水浴かヒートブロックに入れます。

加熱蓋付きサーマルサイクラーを使用する際には、蓋の温度を70℃にセットします。

6. サンプルを95℃で5分間加熱して、REPLI-g Midi DNA Polymeraseを不活性化する。

増幅したDNAをPicoGreen®試薬で定量する場合、この試薬は2本鎖DNAにのみ効率的に結合するために95℃でインキュベートする前にDNAを定量するか、ステップ5のインキュベートした溶液の一部を4℃に冷却して定量用に別途保存してください。

7. 増幅したDNAは短期保存には4℃、長期保存には-20℃で保存する。

PCR解析を行なう場合は、英語版Handbook 14ページ、Appendix Aをご覧ください。

注：増幅したDNAはゲノムDNAと同様に取り扱います（凍結・融解サイクル数を最小限に抑えるなど）。低濃度の核酸を長期間にわたり保存すると酸加水分解を起こします。従って増幅したDNAを希釈せずに保存することをお奨めします。

トラブルシューティングガイド

コメント

EpiTect Whole Bisulfiteome で増幅したいいくつかあるいは全てのサンプルで、アガロースゲル電気泳動において高分子の増幅産物が少ない、あるいは観察されない

- a) 反応温度が高すぎる EpiTect Whole Bisulfiteome 増幅反応においてインキュベーターが正しい反応温度 (28 °C) になっていることをチェックする。加熱蓋付きサーマルサイクラーを使用する際には、蓋の温度を 70 °C にセットする。あるいは EpiTect Whole Bisulfiteome 増幅反応を室温で行なっても適切な収量が得られる。
- b) DNA の品質が低い 変換した DNA が断片化されている。DNA の変換には DNA Protect Buffer が入った EpiTect Bisulfite Kit を使用する (英語版 Handbook 18 ページ、Ordering Information 参照)。また EpiTect Whole Bisulfiteome 増幅反応に用いる変換 DNA の量を増やす (最高 200 ng)。
- c) 変換した DNA サンプルにアルコールが混入 変換 DNA サンプル中にアルコールが残留していると、EpiTect Whole Bisulfiteome 増幅反応の収量が減少することがある。EpiTect Bisulfite Kit を DNA の変換に使用する場合、乾燥ステップの時間が十分であるか確認する。温度設定が可能な遠心機の場合には、温度を 40 °C に設定する。温度設定可能な遠心機が入手不可能な場合、EpiTect 96 Plate または EpiTect column を 65 °C で 15 分間インキュベートして、残っているエタノールを蒸発させる。

DNA 収量が約 1 ~ 3 µg あるが、ダウンストリーム・アッセイ (PCR など) でばらつくかネガティブな結果が得られる。

- a) DNA の品質が低い Bisulfite 法で変換後精製した DNA が断片化している。DNA 変換に EpiTect Bisulfite Kit を使用する。Bisulfite 変換 DNA の量を増やす (最高 200 ng)。
- b) PCR サイクリング条件が最適ではない エクステンション時間の延長は推奨しない。500 bp までの PCR 産物に関しては、エクステンション時間を 30 秒以上にしない、PCR のエクステンション時間を短縮すると特異的な PCR 産物の収量が増加することがある。

コメント

エンドポイントPCRで複数のバンドが出現

PCR中に非特異的なPCR産物が産生	エクステンション時間が長すぎる。エクステンション時間の延長は推奨しない。500 bpまでのPCR産物に関しては、エクステンション時間を30秒以上にしない。PCRのエクステンション時間を短縮すると特異的なPCR産物の収量が増加することがある。
--------------------	--

テンプレートを含まないネガティブコントロールでDNA収量が約1~3 µgあり、かつダウンストリーム・アッセイ（PCRなど）でポジティブな結果が得られる。

DNAテンプレートの混入	全ての実験器具の汚染を除去し、試薬やサンプルへの外来DNAの混入を避ける為に必要な予防策を取る。 できればドラフト内で操作する。滅菌器具とフィルター付チップのみを使用する。増幅用試薬とDNAテンプレートを別々の場所に保存する。
--------------	--

ダウンストリーム・アプリケーションの結果が最適でない

感受性の高いダウンストリーム・アプリケーションでは、EpiTect Whole Bisulfite Kitによる増幅後DNAクリーンアップが必要	お客様のアプリケーションに最適なDNAクリーンアップに関しては、弊社ウェブサイトをご覧になるか (www.qiagen.co.jp)、テクニカルサポートにお問い合わせください。
--	--

Trademarks: QIAGEN®, EpiTect®, REPLI-g® (QIAGEN Group); PicoGreen® (Molecular Probes).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

記載のQIAGEN製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。

© 2008 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

株式会社 キアゲン ■ 〒104-0054 ■ 東京都中央区勝どき3-13-1 ■ Forefront Tower II

Tel:03-6890-7300 ■ Fax:03-5547-0818 ■ E-mail:techservice-jp@qiagen.com

