

英語版 September 2009 に対応

EpiTect® Bisulfite プロトコールとトラブルシューティング

メチル化解析のための Bisulfite 法による完全な DNA 変換
およびクリーンアップ用



Sample & Assay Technologies

目次

プロトコール

DNA 中の非メチル化シトシンを Sodium Bisulfite 処理により変換	3
低濃度 DNA 溶液中の非メチル化シトシンを Sodium Bisulfite 処理により変換	8
FFPE 組織サンプルから分離した DNA 中の非メチル化シトシンを Sodium Bisulfite 処理により変換	12
少量の断片化 DNA 中の非メチル化シトシンを Sodium Bisulfite 処理により変換	17
トラブルシューティング	21

プロトコール：DNA 中の非メチル化シトシンを Sodium Bisulfite 処理により変換

このスタンダード・プロトコールにより、20 μ l 以下のスタートサンプル量で 1 ng ~ 2 μ g の DNA を処理できます。

実験を始める前の重要事項

- Bisulfite Mix チューブ 1 本で 8 回分の反応に使用できます。サンプル数が 8 サンプルより少ない場合には、残った Bisulfite Mix を -20°C で最長 4 週間保存できます。品質の劣化はありません。
- DNA Protect Buffer を DNA・Bisulfite Mix に添加混和後、溶液の色は緑色から青色に変わります（ステップ 2）。このことは溶液が Bisulfite 変換反応のために十分混和され、適切な pH 値であることを示しています。
- すべての遠心操作は室温（ $15 \sim 25^{\circ}\text{C}$ ）で行ないます。

実験開始前の準備事項

- 30 ml のエタノール（96 ~ 100%）を Buffer BW に添加し、室温（ $15 \sim 25^{\circ}\text{C}$ ）で保存します。使用前に容器を数回転倒混和します。
- 27 ml のエタノール（96 ~ 100%）を Buffer BD に添加し、 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ で保存します。使用前に容器を数回転倒混和し、使用後は容器の蓋を直ちに閉めます。Buffer BD・エタノール混和液は保存中に白色沈殿物を形成することがあります。これらの沈殿物は Buffer BD の性能に影響を与えませんが、沈殿物を EpiTect スピнкаラムにアプライすることは避けてください。
- 310 μ l の RNase フリー水を 310 μ g のキャリア RNA（凍結乾燥）に添加し、1 μ g/ μ l 溶液を調製します。ボルテックスで攪拌し、キャリア RNA を完全に溶解します。48 サンプルを同時に処理する際には、溶解したキャリア RNA 全量を Buffer BL の容器に加え、容器の蓋のラベルにチェックを入れます。サンプル数が少ない場合には、溶解済みキャリア RNA を使いやすい量（例えば 50 μ l）に分注し、 -20°C で保存します。溶液は最長 1 年間保存できます。2 週間以内に 48 未満のサンプル数を処理する際には、必要な量の Buffer BL・キャリア RNA 溶液（4 ページの表 1 参照）を調製します。キャリア RNA により EpiTect スピнкаラム・メンブレンへの DNA 結合が増加します。サンプル中に標的分子が非常に微量にしか存在しない場合は特に効果的です。100 ng 以上の DNA を使用する際にはキャリア RNA は必要ありません。
- キャリア RNA 溶液を Buffer BL に添加します。処理するサンプル数に必要なキャリア RNA 溶液と Buffer BL の量を計算します（表 1 の例を参照）。Buffer BL が沈殿物を形成している場合には、最高 70°C に温めて静かに攪拌することにより沈殿物を溶解します。

- 全てのサンプルとバッファーを室温に戻します。
- オプション：ステップ 1 で使用するサーモミキサー、ヒートブロックあるいはインキュベーターを 60°C にセットします。

表 1. キャリア RNA および Buffer BL の量

サンプル数	1	4	8	16	24	48
Buffer BL の量*	620 µl	2.5 ml	5 ml	10 ml	15 ml	31 ml
キャリア RNA 溶液の量†	6.2 µl	25 µl	50 µl	100 µl	150 µl	310 µl

* ピペティングの誤差を考慮して容量を 10% 増加してあります。

† Buffer BL 中のキャリア RNA の最終濃度は 10 µg/ml です。

操作手順

Bisulfite 反応による DNA 変換

- 1. Bisulfite 反応で用いる DNA サンプルを解凍する。必要な本数の Bisulfite Mix に、Bisulfite Mix 1 本あたり 800 µl の RNase フリー水を添加し溶解する。Bisulfite Mix が完全に溶解されるまでボルテックスする。最大 5 分間必要。**

注：必要に応じて Bisulfite Mix・RNase フリー水を 60°C に加熱してもう一度ボルテックスします。

注：溶解後、Bisulfite Mix を氷上に置かないでください。

- 2. 表 2 に従って PCR チューブ (200 µl) に Bisulfite 反応液をセットアップする。記載されている順番で各成分を添加する。**

注：DNA 溶液と RNase フリー水を合わせて 20 µl にします。

表 2. Bisulfite 反応成分

成分	容量/反応 (µl)
DNA 溶液 (1 ng ~ 2 µg)	適量‡ (最高 20 µl)
RNase フリー水	適量‡
Bisulfite Mix (溶解済み)、ステップ 1 参照	85
DNA Protect Buffer	35
トータル容量	140

‡ DNA 溶液と RNase フリー水を合わせて 20 µl にします。

3. PCR チューブの蓋を閉め、**Bisulfite** 反応液を完全に混和する。チューブを室温（15～25℃）で保存する。

注：DNA Protect Buffer を DNA・Bisulfite Mix に添加混和後、溶液の色は緑色から青色に変わります。このことは溶液が Bisulfite 変換反応のために十分混和され、適切な pH 値であることを示しています。

4. サーマルサイクラーを用いて **Bisulfite** 反応による DNA 変換を行なう。表 3 に従ってサーマルサイクラーをプログラムする。

この反応を行なうためには約 5 時間必要です。

注：反応容量 140 μ l をアプライできないサーマルサイクラーをご使用になる場合は、サーマルサイクラーの容量を最大に設定します。

表 3. Bisulfite 変換反応に用いるサーマルサイクラー条件

ステップ	時間	温度
変性	5 分	95℃
インキュベーション	25 分	60℃
変性	5 分	95℃
インキュベーション	85 分 (1 時間 25 分)	60℃
変性	5 分	95℃
インキュベーション	175 分 (2 時間 55 分)	60℃
保持	不定 [§]	20℃

[§] 変換 DNA はサーマルサイクラー中に一晩放置しても品質は変わりません。

5. **Bisulfite** 反応成分の入った PCR チューブをサーマルサイクラーにセットする。サーマルサイクラーでインキュベーションを開始する。

重要：Bisulfite 反応液にはミネラルオイルを重層しないので、この操作では加熱蓋つきのサーマルサイクラーを必ず使用してください。蓋を固く閉められる PCR チューブを使用することが重要です。

変換 DNA はサーマルサイクラー中に一晩放置しても品質は変わりません。

Bisulfite 変換した DNA のクリーンアップ

6. Bisulfite 反応による変換が完了後、Bisulfite 反応液を含む PCR チューブをスピンドウンして、新しいマイクロ遠心チューブ (1.5 ml) に Bisulfite 反応液を全て移す。

溶液中の沈殿物の混入は反応のパフォーマンスや収量には影響しません。

7. 10 µg/ml のキャリア RNA を含む新しく調製した Buffer BL 560 µl を各サンプルに加える (3 ページの“実験を始める前の準備事項”を参照)。ポルテックスで混和後スピンドウンする。

注: 100 ng より多い DNA を使用する際にはキャリア RNA は必要ありません。

8. 必要な数の EpiTect スピнкаラムとコレクションチューブをラックにセットする。ステップ 7 のチューブから全反応液を、相当する EpiTect スピнкаラムにアプライする。
9. スピнкаラムを最高速度で 1 分間遠心操作し、フロースルー液を棄て、スピнкаラムをコレクションチューブに戻す。
10. 500 µl の Buffer BW (洗浄バッファー) を各スピнкаラムに添加し、最高速度で 1 分間遠心操作する。フロースルー液を棄て、スピнкаラムをコレクションチューブに戻す。

11. 500 µl の Buffer BD (脱スルホン化バッファー) を各スピнкаラムに添加し、室温 (15 ~ 25°C) で 15 分間インキュベートする。

Buffer BD 中に沈殿物がある場合には、それらをスピнкаラムにアプライしないでください。

重要: 空気中の二酸化炭素を吸収して酸性になるのを防止するため、Buffer BD の入った容器は使用後、直ちに蓋をしてください。

注: インキュベーションの前にスピнкаラムの蓋を閉じることが重要です。

12. スピнкаラムを最高速度で 1 分間遠心操作し、フロースルー液を棄て、スピнкаラムをコレクションチューブに戻す。
13. 500 µl の Buffer BW を各スピнкаラムに添加し、最高速度で 1 分間遠心操作する。フロースルー液を棄て、スピнкаラムをコレクションチューブに戻す。
14. ステップ 13 を繰り返す。
15. スピнкаラムを新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、最高速度で 1 分間遠心操作して残存している液体を除去する。
16. 推奨: 蓋を開いたスピнкаラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブ (別途準備) に移し、ヒートブロックで 56°C、5 分間インキュベートする。

このステップにより残っている液体が蒸発します。

17. 新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）にスピнкаラムをセットする。20 μ l の Buffer EB を各メンブレンの中央にアプライする。約 15,000 \times g (12,000 rpm) で 1 分間遠心操作を行ない、精製した DNA を溶出する。

注：溶出液中の DNA 収量を増加させるために、さらに 20 μ l の Buffer EB をメンブレンの中央にアプライし、最高速度で 1 分間遠心操作します。

注：精製した DNA を 24 時間以内に使用する場合は、2 ~ 8 $^{\circ}$ C で保存することを推奨します。24 時間以上保存する場合には、-20 $^{\circ}$ C で保存することを推奨します。EpiTect Bisulfite Kit を用いて変換・精製した DNA は、品質の低下や Bisulfite 変換状態の変化なしに、-20 $^{\circ}$ C で少なくとも 3 年間 * は保存できます。

* 変換 DNA の長期保存に関しては現在研究中です。お問い合わせください。

プロトコール：低濃度 DNA 溶液中の非メチル化シトシンを Sodium Bisulfite 処理により変換

本プロトコールは大量のスタートサンプルが処理可能なため低濃度の DNA に最適です。40 μ l 以下の容量で 1 ~ 500 ng の DNA を処理できます。

実験を始める前の重要事項

- Bisulfite Mix チューブ 1 本で 8 回分の反応に使用できます。サンプル数が 8 サンプルより少ない場合には、残った Bisulfite Mix を -20°C で最長 4 週間保存できます。品質の劣化はありません。
- DNA Protect Buffer を DNA・Bisulfite Mix に添加混和後、溶液の色は緑色から青色に変わります（ステップ 2）。このことは溶液が Bisulfite 変換反応のために十分混和され、適切な pH 値であることを示しています。
- すべての遠心操作は室温（ $15 \sim 25^{\circ}\text{C}$ ）で行ないます。

実験開始前の準備事項

- 30 ml のエタノール（ $96 \sim 100\%$ ）を Buffer BW に添加し、室温（ $15 \sim 25^{\circ}\text{C}$ ）で保存します。使用前に容器を数回転倒混和します。
- 27 ml のエタノール（ $96 \sim 100\%$ ）を Buffer BD に添加し、 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ で保存します。使用前に容器を数回転倒混和し、使用後は容器の蓋を直ちに閉めます。Buffer BD・エタノール混和液の保存中に白色沈殿物を形成することがあります。これらの沈殿物は Buffer BD の性能に影響を与えませんが、沈殿物を EpiTect スピнкаラムにアプライすることは避けてください。
- 310 μ l の RNase フリー水を 310 μ g のキャリア RNA（凍結乾燥）に添加し、1 μ g/ μ l 溶液を調製します。ボルテックスで攪拌し、キャリア RNA を完全に溶解します。48 サンプルを同時に処理する際には、溶解したキャリア RNA 全量を Buffer BL の容器に加え、容器の蓋のラベルにチェックを入れます。サンプル数が少ない場合には、溶解済みキャリア RNA を使いやすい量（例えば 50 μ l）に分注し、 -20°C で保存します。溶液は最長 1 年間保存できます。2 週間以内に 48 未満のサンプル数を処理する際には、必要な量の Buffer BL・キャリア RNA 溶液（4 ページの表 1 参照）を調製します。キャリア RNA により EpiTect スピнкаラム・メンブレンへの DNA 結合が増加します。サンプル中に標的分子が非常に微量にしか存在しない場合は特に効果的です。100 ng 以上の DNA を使用する際にはキャリア RNA は必要ありません。
- キャリア RNA 溶液を Buffer BL に添加します。処理するサンプル数に必要なキャリア RNA 溶液と Buffer BL の量を計算します（表 1 の例を参照）。Buffer BL が沈殿物を形成している場合には、最高 70°C に温めて静かに攪拌することにより沈殿物を溶解します。

- 全てのサンプルとバッファーを室温に戻します。
- オプション：ステップ1で使用するサーモミキサー、ヒートブロックあるいはインキュベーターを60℃にセットします。

操作手順

Bisulfite 反応による DNA 変換

1. **Bisulfite 反応で用いる DNA サンプルを解凍する。必要な本数の Bisulfite Mix に、Bisulfite Mix 1 本あたり RNase フリー水 800 µl を添加し溶解する。Bisulfite Mix が完全に溶解されるまでボルテックスする。最大 5 分間必要。**

注：必要に応じて Bisulfite Mix・RNase フリー水を 60℃に加熱してもう一度ボルテックスします。

注：溶解後、Bisulfite Mix を氷上に置かないでください。

2. **表 4 に従って PCR チューブ (200 µl) に Bisulfite 反応液をセットアップする。記載されている順番で各成分を添加する。**

注：DNA 溶液と RNase フリー水を合わせて 40 µl にします。

表 4. Bisulfite 反応成分

成分	容量／反応 (µl)
DNA 溶液 (1 ~ 500 ng)	適量 * (最高 40 µl)
RNase フリー水	適量 *
Bisulfite Mix (溶解済み)、ステップ 1 参照	85
DNA Protect Buffer	15
トータル容量	140

* DNA 溶液と RNase フリー水を合わせて 40 µl にします。

3. **PCR チューブの蓋を開め、Bisulfite 反応液を完全に混和する。チューブを室温 (15 ~ 25℃) で保存する。**

注：DNA Protect Buffer を DNA・Bisulfite Mix に添加混和後、溶液の色は緑色から青色に変わります。このことは溶液が Bisulfite 変換反応のために十分混和され、適切な pH 値であることを示しています。

4. **サーマルサイクラーを用いて Bisulfite 反応による DNA 変換を行なう。表 5 に従ってサーマルサイクラーをプログラムする。**

この反応を行なうためには約 5 時間必要です。

注：反応容量 140 µl をアプライできないサーマルサイクラーをご使用になる場合は、サーマルサイクラーの容量を最大に設定します。

表 5. Bisulfite 変換反応に用いるサーマルサイクラー条件

ステップ	時間	温度
変性	5 分	95°C
インキュベーション	25 分	60°C
変性	5 分	95°C
インキュベーション	85 分 (1 時間 25 分)	60°C
変性	5 分	95°C
インキュベーション	175 分 (2 時間 55 分)	60°C
保持	不定 *	20°C

* 変換 DNA はサーマルサイクラー中に一晩放置しても品質は変わりません。

5. **Bisulfite** 反応成分の入った PCR チューブをサーマルサイクラーにセットする。サーマルサイクラーでインキュベーションを開始する。

重要：Bisulfite 反応液にはミネラルオイルを重層しないので、この操作では加熱蓋つきのサーマルサイクラーを必ず使用してください。

変換 DNA はサーマルサイクラー中に一晩放置しても品質は変わりません。

Bisulfite 変換した DNA のクリーンアップ

6. **Bisulfite** 反応による変換が完了後、**Bisulfite** 反応液を含む PCR チューブをスピンドウンして、新しいマイクロ遠心チューブ (1.5 ml) に **Bisulfite** 反応液を全て移す。

溶液中の沈殿物は反応のパフォーマンスや収量には影響しません。

7. 10 µg/ml のキャリア RNA を含む新しく調製した Buffer BL 560 µl を各サンプルに加える (8 ページの“実験を始める前の準備事項”を参照)。ボルテックスで混和後スピンドウンする。

注：100 ng より多い DNA を使用する際にはキャリア RNA は必要ありません。

8. 必要な数の EpiTect スピнкаラムとコレクションチューブをラックにセットする。ステップ 7 のチューブから全反応液を、相当する EpiTect スピнкаラムにアプライする。
9. スピнкаラムを最高速度で 1 分間遠心操作し、フロースルー液を棄て、スピнкаラムをコレクションチューブに戻す。

10. 500 μ l の Buffer BW (洗浄バッファー) を各スピнкаラムに添加し、最高速度で 1 分間遠心操作する。フロースルー液を棄て、スピнкаラムをコレクションチューブに戻す。

11. 500 μ l の Buffer BD (脱スルホン化バッファー) をスピнкаラムに添加し、室温 (15 ~ 25°C) で 15 分間インキュベートする。

Buffer BD 中に沈殿物がある場合には、それらをスピнкаラムにアプライしないでください。

重要：空気中の二酸化炭素を吸収して酸性になるのを防止するため、Buffer BD の入った容器は使用後、直ちに蓋をしてください。

注：インキュベーションの前にスピнкаラムの蓋を閉じることが重要です。

12. スピнкаラムを最高速度で 1 分間遠心操作し、フロースルー液を棄て、スピнкаラムをコレクションチューブに戻す。

13. 500 μ l の Buffer BW を各スピнкаラムに添加し、最高速度で 1 分間遠心操作する。フロースルー液を棄て、スピнкаラムをコレクションチューブに戻す。

14. ステップ 13 を繰り返す。

15. スピнкаラムを新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、最高速度で 1 分間遠心操作して残存している液体を除去する。

16. 推奨：蓋を開いたスピнкаラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブ (別途準備) に移し、ヒートブロックで 56°C、5 分間インキュベートする。

このステップにより残っている液体が蒸発します。

17. 新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ (別途準備) にスピнкаラムをセットする。20 μ l の Buffer EB を各メンブレンの中央にアプライする。約 15,000 x g (12,000 rpm) で 1 分間遠心操作を行ない、精製した DNA を溶出する。

注：溶出液中の DNA 収量を増加させるために、さらに 20 μ l の Buffer EB をメンブレンの中央にアプライし、最高速度で 1 分間遠心操作します。

注：精製した DNA を 24 時間以内に使用する場合は、2 ~ 8°C で保存することを推奨します。24 時間以上保存する場合には、-20°C で保存することを推奨します。EpiTect Bisulfite Kit を用いて変換・精製した DNA は、品質の低下や Bisulfite 変換状態の変化なしに、-20°C で少なくとも 3 年間 * は保存できます。

* 変換 DNA の長期保存に関しては現在研究中です。お問い合わせください。

プロトコール：FFPE 組織サンプルから分離した DNA 中の非メチル化シトシンを Sodium Bisulfite 処理により変換

ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE；formalin-fixed, paraffin-embedded）組織切片から分離した DNA（例えば QIAamp[®]、DNeasy[®]、EZ1™ Kit を使用）の Bisulfite 処理に最適なプロトコールです。クリーンアップ・ステージでの最適化された結合ステップにより、固定化組織からの DNA との結合が促進されます。本プロトコールにより、20 µl 以下のスタートサンプルから 1 ng ~ 2 µg の DNA を処理できます。

実験を始める前の重要事項

- Bisulfite Mix チューブ 1 本で 8 回分の反応に使用できます。サンプル数が 8 サンプルより少ない場合には、残った Bisulfite Mix を -20℃ で最長 4 週間保存できます。品質の劣化はありません。
- DNA Protect Buffer を DNA・Bisulfite Mix に添加混和後、溶液の色は緑色から青色に変わります（ステップ 2）。このことは溶液が Bisulfite 変換反応のために十分混和され、適切な pH 値であることを示しています。
- すべての遠心操作は室温（15 ~ 25℃）で行ないます。

実験開始前の準備事項

- 30 ml のエタノール（96 ~ 100%）を Buffer BW に添加し、室温（15 ~ 25℃）で保存します。使用前に容器を数回転倒混和します。
- 27 ml のエタノール（96 ~ 100%）を Buffer BD に添加し、2 ~ 8℃ で保存します。使用前に容器を数回転倒混和し、使用後は容器の蓋を直ちに閉めます。Buffer BD・エタノール混和液の保存中に白色沈殿物を形成することがあります。これらの沈殿物は Buffer BD の性能に影響を与えませんが、沈殿物を EpiTect スピнкаラムにアプライすることは避けてください。
- 310 µl の RNase フリー水を 310 µg のキャリア RNA（凍結乾燥）に添加し、1 µg/µl 溶液を調製します。ボルテックスで攪拌し、キャリア RNA を完全に溶解します。48 サンプルを同時に処理する際には、溶解したキャリア RNA 全量を Buffer BL の容器に加え、容器の蓋のラベルにチェックを入れます。サンプル数が少ない場合には、溶解済みキャリア RNA を使いやすい量（例えば 50 µl）に分注し、-20℃ で保存します。溶液は最長 1 年間保存できます。2 週間以内に 48 未満のサンプル数を処理する際には、必要な量の Buffer BL・キャリア RNA 溶液（4 ページの表 1 参照）を調製します。キャリア RNA により EpiTect スピнкаラム・メンブレンへの DNA 結合が増加します。サンプル中に標的分子が非常に微量にしか存在しない場合は特に効果的です。

- キャリア RNA 溶液を Buffer BL に添加します。処理するサンプル数に必要なキャリア RNA 溶液と Buffer BL の量を計算します（表 1 の例を参照）。Buffer BL が沈殿物を形成している場合には、最高 70℃ に温めて静かに攪拌することにより沈殿物を溶解します。
- 全てのサンプルとバッファーを室温に戻します。
- オプション：ステップ 1 で使用するサーモミキサー、ヒートブロックあるいはインキュベーターを 60℃ にセットします。

操作手順

Bisulfite 反応による DNA 変換

1. **Bisulfite 反応で用いる DNA サンプルを解凍する。必要な本数の Bisulfite Mix に、Bisulfite Mix 1 本あたり RNase フリー水 800 μ l を添加し溶解する。Bisulfite Mix が完全に溶解されるまでボルテックスする。最大 5 分間必要。**

注：必要に応じて Bisulfite Mix \cdot RNase フリー水を 60℃ に加熱してもう一度ボルテックスします。

注：溶解後、Bisulfite Mix を氷上に置かないでください。

2. **表 6 に従って PCR チューブ (200 μ l) に Bisulfite 反応液をセットアップする。記載されている順番で各成分を添加する。**

注：DNA 溶液と RNase フリー水を合わせて 20 μ l にします。

表 6. Bisulfite 反応成分

成分	容量／反応 (μ l)
DNA 溶液 (1 ng ~ 2 μ g)	適量 * (最高 20 μ l)
RNase フリー水	適量 *
Bisulfite Mix (溶解済み)、ステップ 1 参照	85
DNA Protect Buffer	35
トータル容量	140

* DNA 溶液と RNase フリー水を合わせて 20 μ l にします。

3. PCR チューブの蓋を閉め、Bisulfite 反応液を完全に混和する。チューブを室温 (15 ~ 25°C) で保存する。

注：DNA Protect Buffer を DNA ・ Bisulfite Mix に添加混和後、溶液の色は緑色から青色に変わります。このことは溶液が Bisulfite 変換反応のために十分混和され、適切な pH 値であることを示しています。

4. サーマルサイクラーを用いて Bisulfite 反応による DNA 変換を行なう。表 7 に従ってサーマルサイクラーをプログラムする。

この反応を行なうためには約 5 時間必要です。

注：反応容量 140 μ l をアプライできないサーマルサイクラーをご使用になる場合は、サーマルサイクラーの容量を最大に設定します。

表 7. Bisulfite 変換反応に用いるサーマルサイクラー条件

ステップ	時間	温度
変性	5 分	95°C
インキュベーション	25 分	60°C
変性	5 分	95°C
インキュベーション	85 分 (1 時間 25 分)	60°C
変性	5 分	95°C
インキュベーション	175 分 (2 時間 55 分)	60°C
保持	不定 *	20°C

* 変換 DNA はサーマルサイクラー中に一晩放置しても品質は変わりません。

5. Bisulfite 反応成分の入った PCR チューブをサーマルサイクラーにセットする。サーマルサイクラーでインキュベーションを開始する。

重要：Bisulfite 反応液にはミネラルオイルを重層しないので、この操作では加熱蓋つきのサーマルサイクラーを必ず使用してください。

変換 DNA はサーマルサイクラー中に一晩放置しても品質は変わりません。

Bisulfite 変換した DNA のクリーンアップ

6. Bisulfite 反応による変換が完了後、Bisulfite 反応液を含む PCR チューブをスピンドウンして、新しいマイクロ遠心チューブ (1.5 ml) に Bisulfite 反応液を全て移す。

溶液中の沈殿物は反応のパフォーマンスや収量には影響しません。

7. 10 µg/ml のキャリア RNA を含む新しく調製した Buffer BL 310 µl を各サンプルに加える (12 ページの“実験を始める前の準備事項”を参照)。ボルテックスで混和後スピンドウンする。
8. 250 µl のエタノール (96 ~ 100%) を各サンプルに添加する。溶液を 15 秒間ボルテックスを使ってパルスで混和後、チューブの蓋についた液滴をスピンドウンする。
9. 必要な数の EpiTect スピнкаラムとコレクションチューブをラックにセットする。ステップ 7 および 8 のチューブから全反応液を、相当する EpiTect スピнкаラムにアプライする。
10. スピнкаラムを最高速度で 1 分間遠心操作し、フロースルー液を棄て、スピнкаラムをコレクションチューブに戻す。
11. 500 µl の Buffer BW (洗浄バッファー) を各スピнкаラムに添加し、最高速度で 1 分間遠心操作する。フロースルー液を棄て、スピнкаラムをコレクションチューブに戻す。

12. 500 µl の Buffer BD (脱スルホン化バッファー) をスピнкаラムに添加し、室温 (15 ~ 25°C) で 15 分間インキュベートする。

Buffer BD 中に沈殿物がある場合には、それらをスピнкаラムにアプライしないでください。

重要：空気中の二酸化炭素を吸収して酸性になるのを防止するため、Buffer BD の入った容器は使用後、直ちに蓋をしてください。

注：インキュベーションの前にスピнкаラムの蓋を閉じることが重要です。

13. スピнкаラムを最高速度で 1 分間遠心操作し、フロースルー液を棄て、スピнкаラムをコレクションチューブに戻す。
14. 500 µl の Buffer BW を各スピнкаラムに添加し、最高速度で 1 分間遠心操作する。フロースルー液を棄て、スピнкаラムをコレクションチューブに戻す。
15. ステップ 14 を繰り返す。
16. スピнкаラムを新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、最高速度で 1 分間遠心操作して残存している液体を除去する。
17. 推奨：蓋を開いたスピнкаラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブ (別途準備) に移し、ヒートブロックで 56°C、5 分間インキュベートする。

このステップにより残っている液体が蒸発します。

18. 新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）にスピニングカラムをセットする。20 μ l の Buffer EB を各メンブレンの中央にアプライする。約 15,000 x g (12,000 rpm) で 1 分間遠心操作を行ない、精製した DNA を溶出する。

注：溶出液中の DNA 収量を増加させるために、さらに 20 μ l の Buffer EB をメンブレンの中央にアプライし、最高速度で 1 分間遠心操作します。

注：精製した DNA を 24 時間以内に使用する場合は、2 ~ 8℃で保存することを推奨します。24 時間以上保存する場合には、-20℃で保存することを推奨します。EpiTect Bisulfite Kit を用いて変換・精製した DNA は、品質の低下や Bisulfite 変換状態の変化なしに、-20℃で少なくとも 3 年間 * は保存できます。

* 変換 DNA の長期保存に関しては現在研究中です。お問い合わせください。

プロトコール：少量の断片化 DNA 中の非メチル化シトシンを Sodium Bisulfite 処理により変換

このプロトコールは少量の断片化 DNA の処理用にデザインされています。クリーンアップ・ステージでの至適化された結合ステップにより、DNA との結合が促進されます。本プロトコールにより、40 μ l 以下のスタートサンプル量で 500 pg 未満の DNA を処理できます。

実験を始める前の重要事項

- Bisulfite Mix チューブ 1 本で 8 回分の反応に使用できます。サンプル数が 8 サンプルより少ない場合には、残った Bisulfite Mix を -20°C で最長 4 週間保存できます。品質の劣化はありません。
- DNA Protect Buffer を DNA・Bisulfite Mix に添加混和後、溶液の色は緑色から青色に変わります（ステップ 2）。このことは溶液が Bisulfite 変換反応のために十分混和され、適切な pH 値であることを示しています。
- すべての遠心操作は室温（ $15 \sim 25^{\circ}\text{C}$ ）で行ないます。

実験開始前の準備事項

- 30 ml のエタノール（96 ~ 100%）を Buffer BW に添加し、室温（ $15 \sim 25^{\circ}\text{C}$ ）で保存します。使用前に容器を数回転倒混和します。
- 27 ml のエタノール（96 ~ 100%）を Buffer BD に添加し、 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ で保存します。使用前に容器を数回転倒混和し、使用後は容器の蓋を直ちに閉めます。Buffer BD・エタノール混和液の保存中に白色沈殿物を形成することがあります。これらの沈殿物は Buffer BD の性能に影響を与えませんが、沈殿物を EpiTect スピнкаラムにアプライすることは避けてください。
- 310 μ l の RNase フリー水を 310 μ g のキャリア RNA（凍結乾燥）に添加し、1 μ g/ μ l 溶液を調製します。ボルテックスで攪拌し、キャリア RNA を完全に溶解します。48 サンプルを同時に処理する際には、溶解したキャリア RNA 全量を Buffer BL の容器に加え、容器の蓋のラベルにチェックを入れます。サンプル数が少ない場合には、溶解済みキャリア RNA を使いやすい量（例えば 50 μ l）に分注し、 -20°C で保存します。溶液は最長 1 年間保存できます。2 週間以内に 48 未満のサンプル数を処理する際には、必要な量の Buffer BL・キャリア RNA 溶液（4 ページの表 1 参照）を調製します。キャリア RNA により EpiTect スピнкаラム・メンブレンへの DNA 結合が増加します。サンプル中に標的分子が非常に微量にしか存在しない場合は特に効果的です。
- キャリア RNA 溶液を Buffer BL に添加します。処理するサンプル数に必要なキャリア RNA 溶液と Buffer BL の量を計算します（表 1 の例を参照）。Buffer BL が沈殿物を形成している場合には、最高 70°C に温めて静かに攪拌することにより沈殿物を溶解します。

- 全てのサンプルとバッファーを室温に戻します。
- オプション：ステップ 1 で使用するサーモミキサー、ヒートブロックあるいはインキュベーターを 60℃ にセットします。

操作手順

Bisulfite 反応による DNA 変換

1. **Bisulfite 反応**で用いる DNA サンプルを解凍する。必要な本数の **Bisulfite Mix** に、**Bisulfite Mix 1 本あたり RNase フリー水 800 μ l** を添加し溶解する。**Bisulfite Mix** が完全に溶解されるまでボルテックスする。最大 5 分間必要。

注：必要に応じて Bisulfite Mix・RNase フリー水を 60℃ に加熱してもう一度ボルテックスします。

注：溶解後、Bisulfite Mix を氷上に置かないでください。

2. 表 8 に従って **PCR チューブ (200 μ l)** に **Bisulfite 反応液** をセットアップする。記載されている順番で各成分を添加する。

注：DNA 溶液と RNase フリー水を合わせて 40 μ l にします。

表 8. Bisulfite 反応成分

成分	容量/反応 (μ l)
DNA 溶液 (500 pg まで)	適量 * (最高 40 μ l)
RNase フリー水	適量 *
Bisulfite Mix (溶解済み)、ステップ 1 参照	85
DNA Protect Buffer	15
トータル容量	140

* DNA 溶液と RNase フリー水を合わせて 40 μ l にします。

3. **PCR チューブ**の蓋を閉め、**Bisulfite 反応液**を完全に混和する。チューブを室温 (15 ~ 25℃) で保存する。

注：DNA Protect Buffer を DNA・Bisulfite Mix に添加混和後、溶液の色は緑色から青色に変わります。このことは溶液が Bisulfite 変換反応のために十分混和され、適切な pH 値であることを示しています。

4. サーマルサイクラーを用いて **Bisulfite 反応**による DNA 変換を行なう。表 9 に従ってサーマルサイクラーをプログラムする。

この反応を行なうためには約 5 時間必要です。

注：反応容量 140 μ l をアプライできないサーマルサイクラーをご使用になる場合は、サーマルサイクラーの容量を最大に設定します。

表 9. Bisulfite 変換反応に用いるサーマルサイクラー条件

ステップ	時間	温度
変性	5 分	95°C
インキュベーション	25 分	60°C
変性	5 分	95°C
インキュベーション	85 分 (1 時間 25 分)	60°C
変性	5 分	95°C
インキュベーション	175 分 (2 時間 55 分)	60°C
保持	不定 *	20°C

* 変換 DNA はサーマルサイクラー中に一晩放置しても品質は変わりません。

5. **Bisulfite** 反応成分の入った PCR チューブをサーマルサイクラーにセットする。サーマルサイクラーでインキュベーションを開始する。

重要：Bisulfite 反応液にはミネラルオイルを重層しないので、この操作では加熱蓋つきのサーマルサイクラーを必ず使用してください。蓋を固く閉められる PCR チューブを使用することが重要です。

変換 DNA はサーマルサイクラー中に一晩放置しても品質は変わりません。

Bisulfite 変換した DNA のクリーンアップ

6. **Bisulfite** 反応による変換が完了後、**Bisulfite** 反応液を含む PCR チューブをスピンドウンして、新しいマイクロ遠心チューブ (1.5 ml) に **Bisulfite** 反応液を全て移す。

溶液中の沈殿物は反応のパフォーマンスや収量には影響しません。

7. 10 µg/ml のキャリア RNA を含む新しく調製した Buffer BL 310 µl を、各サンプルに加える (17 ページの “実験を始める前の準備事項” を参照)。ポルテックスで混和後スピンドウンする。
8. 250 µl のエタノール (96 ~ 100%) を各サンプルに添加する。溶液を 15 秒間ポルテックスを使ってパルスで混和後、チューブの蓋についた液滴をスピンドウンする。
9. 必要な数の EpiTect スピнкаラムとコレクションチューブをラックにセットする。ステップ 7 および 8 のチューブから全反応液を、相当する EpiTect スピнкаラムにアブライする。

10. スピнкаラムを最高速度で 1 分間遠心操作し、フロースルー液を棄て、スピнкаラムをコレクションチューブに戻す。
11. 500 μ l の Buffer BW を各スピнкаラムに添加し、最高速度で 1 分間遠心操作する。フロースルー液を棄て、スピнкаラムをコレクションチューブに戻す。
12. 500 μ l の Buffer BD を各スピнкаラムに添加し、室温 (15 ~ 25°C) で 15 分間インキュベートする。

Buffer BD 中に沈殿物がある場合には、それらをスピнкаラムにアプライしないでください。

重要： 空気中の二酸化炭素を吸収して酸性になるのを防止するため、Buffer BD の入った容器は使用後、直ちに蓋をしてください。

注：インキュベーションの前にスピнкаラムの蓋を閉じることが重要です。

13. スピнкаラムを最高速度で 1 分間遠心操作し、フロースルー液を棄て、スピнкаラムをコレクションチューブに戻す。
14. 500 μ l の Buffer BW を各スピнкаラムに添加し、最高速度で 1 分間遠心操作する。フロースルー液を棄て、スピнкаラムをコレクションチューブに戻す。
15. ステップ 14 を繰り返す。
16. スピнкаラムを新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、最高速度で 1 分間遠心操作して残存している液体を除去する。
17. 推奨：蓋を開いたスピнкаラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブ (別途準備) に移し、ヒートブロックで 56°C、5 分間インキュベートする。

このステップにより残っている液体が蒸発します。

18. 新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ (別途準備) にスピнкаラムをセットする。20 μ l の Buffer EB を各メンブレンの中央にアプライする。約 15,000 x g (12,000 rpm) で 1 分間遠心操作を行ない、精製した DNA を溶出する。

注：溶出液中の DNA 収量を増加させるために、さらに 20 μ l の Buffer EB をメンブレンの中央にアプライし、最高速度で 1 分間遠心操作します。

注：精製した DNA を 24 時間以内に使用する場合は、2 ~ 8°C で保存することを推奨します。24 時間以上保存する場合には、-20°C で保存することを推奨します。EpiTect Bisulfite Kit を用いて変換・精製した DNA は、品質の低下や Bisulfite 変換状態の変化なしに、-20°C で少なくとも 3 年間 * は保存できます。

* 変換 DNA の長期保存に関しては現在研究中です。お問い合わせください。

トラブルシューティング

コメント

精製ステップで DNA 収量が少ないか皆無

- | | |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) キャリア RNA を Buffer BL に添加していない | 3、8、12、17 ページの“実験開始前の準備事項”に記載されているようにキャリア RNA を調製し、Buffer BL に加える。 |
| b) Buffer BW あるいは BD の調製が不正確 | Buffer BW および BD の濃縮液が正確な量のエタノール (96 ~ 100%) で希釈されていることを確認。メタノールやメチルエチルケトンのような物質を含んだ変性アルコールは使用しない。 |
| c) 70%エタノールで Buffer BW あるいは BD を調製 | Buffer BW および BD の濃縮液が 96 ~ 100%のエタノールで希釈されていることを確認。メタノールやメチルエチルケトンのような物質を含んだ変性アルコールは使用しない。 |
| d) Buffer BW および BD を間違った順序で使用 | Buffer BW および BD がプロトコール記載の正しい順序で使用されていることを確認する。 |
| e) サンプルが完全にメンブレンを通過していない | 最高速度で 1 分間、あるいはサンプルが完璧にメンブレンを通過するまで遠心操作する。 |
| f) Buffer BL が沈殿物を形成 | Buffer BL が沈殿物を形成しているかチェックする。最高 70°C に温めて静かに攪拌することにより沈殿物を溶かす。 |

変換率が低い

- | | |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Bisulfite 反応成分が正しい順番で添加されていない | 表 2 (4 ページ)、表 4 (9 ページ)、表 6 (13 ページ)、表 8 (18 ページ) に記載されている順番に DNA、Bisulfite Mix、DNA Protect Buffer を添加したことを確認する。 |
| b) 使用しているサーマルサイクラーの条件が間違っている | 表 3 (5 ページ)、表 5 (10 ページ)、表 7 (14 ページ)、表 9 (19 ページ) に記載されているサーマルサイクラーの条件を用いる。 |
| c) DNA の品質が悪い (例; タンパク質が混入) | サンプル DNA の A_{260}/A_{280} 比が 1.7 ~ 1.9 にあることを確認する。
適切なキットでサンプル DNA を精製したことを確認する (DNA 精製に最適な QIAGEN 製品は英語版 Handbook 40 ~ 43 ページの ordering information 参照)。 |

コメント

- d) 使用した DNA 量が推奨する範囲外 スタンダードのアプリケーションでは 1 ng ~ 2 µg (3 ページ)、溶液中の DNA 濃度が低い場合は 1 ng ~ 500 ng (8 ページ)、FFPE 組織からの DNA には 1 ng ~ 2 µg (12 ページ) になるようにスタートサンプルの DNA 量を調節する。
- e) Bisulfite Mix が適切に保存されていない 溶解した Bisulfite Mix は -20°C で 4 週間保存可能。
- f) DNA Protect Buffer を添加していない DNA Protect Buffer を添加混和後、DNA・Bisulfite Mix 溶液は緑色から青色に変わる。このことは溶液が十分に混和され、DNA が EpiTect スピニングカラムに結合する適切な pH 値であることを示す。変色しない場合は、DNA Protect Buffer を添加したことを確認して、反応をもう一度行なう。
- g) CpG 配列が非常に多い特殊な CpG 領域が存在する 以下のステップを増やして、Bisulfite 変換反応に用いるサーマルサイクラー条件を延長する：95°C で 5 分間の変性と 60°C で 2 時間；その後 20°C に保つ。

ダウンストリームの MSP (methylation-specific PCR) で良い結果が得られない

- a) コントロールの反応でも PCR 産物が皆無あるいはほとんどない ホットスタート PCR を行なった場合は、最初に酵素の活性化ステップを行なったことを確認する。
PCR 反応成分をすべて添加し、最適なサイクリング条件を用いたことを確認する。
- b) Bisulfite 変換反応が失敗 スタートサンプルの DNA 純度が十分でない。変換反応には高品質の DNA のみを使用する。DNA 精製に最適な QIAGEN 製品は英語版 Handbook 40 ~ 43 ページの ordering information 参照。
変換およびクリーンアップ・プロトコルの全ステップを行なったことを確認する。
変換反応の前にサンプル DNA が分解しないように、サンプル DNA の取り扱い・保存は適切に行なう。
PCR プライマーが適切あるいは正確にデザインされていない。プライマーデザインを再考する。
PCR で用いたテンプレート DNA 量が不十分であれば、テンプレート DNA の量を増やす。

バッファーに問題

- a) DNA Protect Buffer が保存中に明るい緑色からオリーブ色に変わった
- DNA Protect Buffer は 2 ~ 8℃ で 1 年間安定で、この期間内での変色はバッファーの品質に影響しない。
- b) Buffer BD が沈殿を形成
- Buffer BD の保存中にわずかな濁りあるいは不溶性の沈殿が生じることがある。
- Buffer BD は室温 (2 ~ 8℃) で 1 年間安定で、この期間内での変色はバッファーの品質に影響しない。沈殿物をメンブレンにアプライしない。

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, DNeasy®, EpiTect®, EZ1™ (QIAGEN Group).

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。

© 2006–2010 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

