

# REPLI-g® UltraFast Mini

## プロトコールとトラブルシューティング

精製したゲノムDNA、血液、細胞からの迅速な  
全ゲノム増幅

目次	ページ
プロトコール	
精製したゲノムDNAの増幅	2
血液あるいは細胞からのゲノムDNA増幅	5
トラブルシューティング	8



# プロトコール：精製したゲノムDNAの増幅

## 実験を始める前の重要事項

- 本プロトコールは10 ng以上のゲノムDNAテンプレートからの全ゲノム増幅に最適化されています。DNAテンプレートはTEバッファーで懸濁します。DNAの品質が高い場合には、スタートサンプル量を減らすことができます（1～10 ng）。
- REPLI-g UltraFast Mini Kitを用いた反応で通常7～10 µgのDNAが得られます。低品質のDNAを用いるとDNA収量は低くなる場合があります。
- 少なくともフラグメントの一部が10 kb以上ある2 kb以上のDNAテンプレートを用いることにより最高の結果が得られます。
- REPLI-g UltraFast DNA Polymeraseは必ず氷上で解凍してください（ステップ6参照）。他のすべての試薬は室温（15～25℃）で解凍します。
- Buffer D1およびBuffer N1は調製後3ヶ月以上保存しないでください。

## 実験を始める前の準備事項

- キット中のBuffer DLBチューブにヌクレアーゼ・フリー水500 µlを添加、撹拌して手短に遠心操作する。  
注意：調製したBuffer DLBは-20℃で6ヶ月間保存可能です。Buffer DLBはpHに不安定です。大気中の二酸化炭素による中和は避けてください。
- すべてのバッファーと試薬は使用前にボルテックスを用いて完全に混和してください。
- ステップ9で使用するヒートブロックあるいはウォーターバスを予め30℃にセットします。

## 操作手順

1. 全ゲノム増幅反応のトータル数に十分なBuffer D1（変性試薬）とBuffer N1（中和試薬）を調製する（3ページ、表1および2参照）。

注意：表1および2に記載したBuffer D1およびBuffer N1のトータル容量は最高40回分の反応に最適です。Buffer D1およびBuffer N1は調製後3ヶ月以上保存しないでください。

表 1. Buffer D1 の調製

成分	容量*
調製した Buffer DLB†	5 µl
ヌクレアーゼ・フリー水	35 µl
トータル容量	40 µl

\* トータル容量は最高 40 回分の反応に最適です。余った Buffer D1 は -20 で最高 3 ヶ月まで保存できます。

† Buffer DLB の調製法は「実験を始める前の準備事項」(2 ページ)に記載されています。

表 2. Buffer N1 の調製

成分	容量†
Stop Solution	8 µl
ヌクレアーゼ・フリー水	72 µl
トータル容量	80 µl

† トータル容量は最高 40 回分の反応に最適です。

2. DNA テンプレート 1 µl をマイクロ遠心チューブに入れる。  
DNA テンプレートの量は 10 ng 以上になるようにします。  
DNA コントロール反応にはコントロールゲノム DNA (例; REPLI-g Human Control Kit, cat.no.150090) 10 ng (1 µl) を使いセットアップします。
3. 1 µl の Buffer D1 を DNA に添加する。手短にボルテックスで混和してスピンドウンする。
4. サンプルを室温 (15 ~ 25 ) で 3 分間インキュベートする。
5. 2 µl の Buffer N1 をサンプルに添加する。手短にボルテックスで混和してスピンドウンする。
6. REPLI-g UltraFast 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手短にスピンドウンする。  
解凍後 REPLI-g UltraFast Reaction Buffer は沈殿物を形成することがあります。10 秒間、ボルテックスで混和することにより沈殿物は溶解します。

7. 表3に従ってマスターミックスを氷上で調製する。混和後手短にスピンドウンする。

重要：マスターミックスは氷上で保存し、REPLI-g UltraFast DNA Polymeraseを添加後、直ぐに使用します。

表3. マスターミックスの調製

成分	容量 / 反応
REPLI-g UltraFast Reaction Buffer	15 $\mu$ l
REPLI-g UltraFast DNA Polymerase	1 $\mu$ l
トータル容量	16 $\mu$ l

8. マスターミックス 16  $\mu$ l を変性した DNA (ステップ5) 4  $\mu$ l に添加する。
9. 30 で 1.5 時間インキュベートする。  
30 でのインキュベーション後、ステップ10で同じウォーターバスあるいはヒートブロックを使用する際は、これらを 65 にセットし加熱します。
10. 反応液を 65 で 3 分間加熱して、REPLI-g UltraFast DNA Polymerase を不活性化する。  
注意：増幅した DNA を PCR で解析する場合には、酵素の不活性化後に DNA を水あるいは TE バッファーで 1:25 に希釈してください (例； 2  $\mu$ l DNA + 48  $\mu$ l 水 / TE バッファー)。希釈した DNA 2 ~ 3  $\mu$ l を各 PCR 反応に使用します。
11. 増幅した DNA は使用するまで -20 で保存する。  
REPLI-g UltraFast Mini Kit を用いて増幅した DNA は、ゲノム DNA と同様に凍結・融解をできるだけ避けてください。

# プロトコール：血液あるいは細胞からのゲノムDNA増幅

## 実験を始める前の重要事項

- 本プロトコールは全血あるいは細胞サンプル（例；ソーティングした細胞や組織培養細胞など）0.5  $\mu$ lに最適化されています。細胞の濃度は600細胞/ $\mu$ l以上で使用してください。
- REPLI-g UltraFast Mini Kitを用いた反応で通常7～10  $\mu$ gのDNAが得られます。低品質のDNAを用いるとDNA収量は低くなる可能性があります。
- 血液サンプル中のヘパリン濃度が高い場合、REPLI-g反応を妨害することがあります。EDTAあるいはクエン酸で処理した血液はより良い結果が得られます。
- REPLI-g UltraFast DNA Polymeraseは必ず氷上で解凍してください（ステップ7参照）。他のすべての試薬は室温（15～25℃）で解凍します。
- Buffer D2は調製後3ヶ月以上保存しないでください。

## 実験を始める前の準備事項

- キット中のBuffer DLBチューブにヌクレアーゼ・フリー水500  $\mu$ lを添加、撹拌して手短に遠心操作する。  
注意：調製したBuffer DLBは-20℃で6ヶ月間保存可能です。Buffer DLBはpHに不安定です。大気中の二酸化炭素による中和は避けてください。
- すべてのバッファーと試薬は使用前にボルテックスを用いて完全に混和してください。
- ステップ10で使用するヒートブロックあるいはウォーターバスを予め30℃にセットします。

## 操作手順

1. 全ゲノム増幅反応のトータル数に十分なBuffer D2（変性試薬）を調製する（表4を参照）。

注意：表4に記載したBuffer D2のトータル容量は最高40回分の反応に最適です。Buffer D2は調製後3ヶ月以上保存しないでください。

表 4. Buffer D2 の調製

成分	容量*
DTT, 1 M	5 $\mu$ l
調製した Buffer DLB†	55 $\mu$ l
トータル容量	60 $\mu$ l

\* トータル容量は最高 40 回分の反応に最適です。余った Buffer D2 は -20 °C で最高 3 ヶ月まで保存できます。

† Buffer DLB の調製法は「実験を始める前の準備事項」(5 ページ)に記載されています。

2. PBS 1  $\mu$ l をマイクロ遠心チューブに入れる。
3. 細胞サンプル 0.5  $\mu$ l (>600 細胞/ $\mu$ l) あるいは血液 0.5  $\mu$ l を PBS に添加する。  
あるいは、サンプルが REPLI-g 反応を阻害する場合には、PBS で希釈した血液あるいは細胞サンプル (最高 1:10) を使用できません (例; 2  $\mu$ l の血液あるいは細胞サンプル + 18  $\mu$ l の PBS)。  
DNA コントロール反応にはコントロールゲノム DNA (例; REPLI-g Human Control Kit, cat.no.150090) 10 ng (1  $\mu$ l) を使いセットアップします (操作手順は「精製したゲノム DNA の増幅」を参照)。
4. 1.5  $\mu$ l の Buffer D2 をサンプルに添加する。手短にボルテックスで混和してスピンドウンする。
5. 氷上で 10 分間インキュベートする。
6. 1.5  $\mu$ l の Stop Solution をサンプルに添加する。手短にボルテックスで混和してスピンドウンする。
7. REPLI-g UltraFast 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手短にスピンドウンする。  
解凍後 REPLI-g UltraFast Reaction Buffer が沈殿物を形成することがあります。10 秒間、ボルテックスで混和することにより沈殿物は溶解します。
8. 表 5 に従ってマスターミックスを氷上で調製する。混和後手短にスピンドウンする。  
重要: マスターミックスは氷上で保存し、REPLI-g UltraFast DNA Polymerase を添加後、直ぐに使用します。

表 5. マスターミックスの調製

成分	容量 / 反応
REPLI-g UltraFast Reaction Buffer	15 $\mu$ l
REPLI-g UltraFast DNA Polymerase	1 $\mu$ l
トータル容量	16 $\mu$ l

9. マスターミックス 16  $\mu$ l を変性した DNA (ステップ 6) 4.5  $\mu$ l に添加する。
10. 30 °C で 1.5 時間インキュベートする。  
30 °C でのインキュベーション後、ステップ 11 で同じウォーターバスあるいはヒートブロックを使用する際は、これらを 65 °C にセットし加熱します。
11. 反応液を 65 °C で 3 分間加熱して、REPLI-g UltraFast DNA Polymerase を不活性化する。  
注意：増幅した DNA を PCR で解析する場合には、酵素の不活性化後に DNA を水あるいは TE バッファーで 1:25 に希釈してください (例； 2  $\mu$ l DNA + 48  $\mu$ l 水 / TE バッファー)。希釈した DNA 2 ~ 3  $\mu$ l を各 PCR 反応に使用します。
12. 増幅した DNA は使用するまで -20 °C で保存する。  
REPLI-g UltraFast Mini Kit を用いて増幅した DNA は、ゲノム DNA と同様に凍結・融解をできるだけ避けてください。

# トラブルシューティングガイド

## コメント

---

ある反応液（例；ポジティブコントロール）のDNA収量は約7 µg あるが、いくつかの反応液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。

反応が失敗。ゲノムDNA テンプレートに阻害物質が存在する  
ゲノムDNAをクリーンアップするか、ゲノムDNAを希釈してもう一度増幅を行なう。

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7 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。

混入したDNAテンプレートによりREPLI-g反応中でDNAが増幅  
全ての実験機具の汚染を除去し、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。

できれば層流フードで操作する。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  
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、QIAGENテクニカルサポートには、REPLI-g反応後DNAクリーンアップが必要  
お問い合わせください。

精製したゲノムDNAの増幅用プロトコール

リアルタイムPCR解析で遺伝子座のコピー数が減少またはない

ゲノムDNAテンプレートが分解  
インタクトなゲノムDNAテンプレートを使用する。  
高濃度のゲノムDNAを使用する。

ジェノタイピングアッセイで対立遺伝子の脱落が観察された

ゲノムDNAテンプレートが分解  
インタクトなゲノムDNAテンプレートを使用して再実験する。  
高濃度のゲノムDNAで実験を繰り返す。

## コメント

---

血液あるいは細胞からのゲノムDNA増幅用プロトコール

リアルタイムPCR解析で遺伝子座のコピー数が減少またはない

血液抗凝固剤として使用したヘパリンの濃度が通常より高い

1x PBSを用いてヘパリン処理した血液を5倍まで希釈する。

サンプル中のDNAがすでに分解

インタクトなスタートサンプルを用いて実験を繰り返す。

サンプルからゲノムDNAを分離し、精製したゲノムDNAの増幅用プロトコールを使用しスタートDNA量を増やす(2ページ)。

サンプルが反応を阻害

サンプルからゲノムDNAを分離し、精製したゲノムDNAの増幅用プロトコールを使用する(2ページ)。

ジェノタイピングアッセイで対立遺伝子の脱落が観察された

血液抗凝固剤として使用したヘパリンの濃度が通常より高い

1 x PBSを用いてヘパリン処理した血液を5倍まで希釈する。





---

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



---

W W W . Q I A G E N . C O . J P

2301081 09/2006