

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

メチル化解析のコントロール実験用ヒトコントロールDNA
(100反応分)

目次	ページ
プロトコール	
EpiTect PCR Control DNA Setを使用	2
トラブルシューティング	6



プロトコール：EpiTect PCR Control DNA Setを使用

実験を始める前の重要事項

- DNAを調製あるいはPCR産物を解析する場所から離れたところで反応液のセットアップを行なってください。
- クロスコンタミを最小限に抑えるために、疎水性フィルターを装着したチップを使用してください。
- 各PCRで10 ngのテンプレートDNAを使用することを推奨します。
- Control DNAを適切なバッファー（TEあるいは水）で希釈します。
注：これは保存中にDNAの安定性に影響します。

操作手順

1. PCR Control Reactionのセットアップ。

PCR反応ごとに1 μ l（10 ng）の各control DNAを使用します。

特異的で信頼できるメチル化特異的PCR結果を得るために、EpiTect MSP Kit（表1、2参照）、あるいはリアルタイムPCRを利用したMethylLight法キット、EpiTect MethylLight PCR Kit（表3、4参照）を使用することを推奨します。

表1. EpiTect MSP Master Mixを用いた反応セットアップの例

成分	容量／反応	最終濃度
EpiTect Master Mix、2x	25 μ l	1x
希釈したプライマーミックス		
プライマーA*	適量	0.3～0.4 μ M
プライマーB*	適量	0.3～0.4 μ M
テンプレートDNA		
テンプレートDNA	1 μ l	10 ng
RNase フリー水	適量	
トータル容量	50 μ l	

注：反応容量を変更する場合は、各成分量を適宜調節します。

* 最終プライマー濃度0.3～0.4 μ Mはほとんどのアプリケーションに最適です。しかし、個々に最適濃度を決定する際は、0.2～0.5 μ Mのプライマー濃度で行ないます。

表2. EpiTect MSP Master Mixを用いたサイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
初期活性化ステップ：	10分	95℃	HotStarTaq® d-Tect Polymeraseはこの加熱ステップにより活性化
3ステップサイクリング			
変性：	15秒	94℃	
アニーリング：	30秒	50～55℃	プライマーの T_m より約8℃低い温度
エクステンション：	30秒	72℃	500 bp以上のPCR産物では500 bpのDNA当たり約1分間のエクステンション時間を使用
サイクル数：	30～40		
最終エクステンション：	10分	72℃	

表3. EpiTect MethyLight PCR Kitを用いた反応セットアップ

成分	容量/反応	最終濃度
EpiTect MethyLight Master Mix、2x	25 μ l	1x
希釈したプライマーミックス		
プライマーA*	適量	0.4 μ M
プライマーB*	適量	0.4 μ M
プローブ1 (メチル化)	適量	0.2 μ M
プローブ2 (非メチル化)	適量	0.2 μ M
テンプレートDNA		
テンプレートDNA	1 μ l	10 ng
RNaseフリー水	適量	
トータル容量	50 μl	

注：反応容量を変更する場合は、各成分量を適宜調節します。

* 最終プライマー濃度0.4 μ Mはほとんどのアプリケーションに最適です。しかし、個々に最適濃度を決定する際は、0.4～0.6 μ Mのプライマー濃度で行ないます。

表4. TaqMan®プローブを用いたメチル化PCR解析のサイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
PCR初期活性化ステップ：	5分	95℃	HotStarTaq Plus DNA Polymeraseはこの加熱ステップで活性化される
2ステップサイクリング			重要：以下のサイクリング条件を用いた場合のみ最適な結果が得られる
変性：	15秒	95℃	
アニーリング/ エクステンション：	60秒	60℃	アニーリング/エクステンションステップと蛍光データ収集の組み合わせ
サイクル数：	40～45		サイクル数はテンプレートDNA量に依存

2. プライマーおよびPCR条件の特異性をチェックする。

Control DNAと特異的なプライマーペアを用いた際に予想される結果を表5に示します。

表5. 予想されるPCR結果

DNAのタイプ	非メチル化 ターゲット 遺伝子用 プライマー	非メチル化 ターゲット 遺伝子用 プライマー (Bisulfite変換済み)	メチル化 ターゲット 遺伝子用 プライマー (Bisulfite変換済み)
	PCR 1	PCR 2	PCR 3
Unmethylated control DNA	PCR増幅	PCR増幅なし	PCR増幅なし
Unmethylated control DNA (Bisulfite変換)	PCR増幅なし	PCR増幅	PCR増幅なし
Methylated control DNA (Bisulfite変換)	PCR増幅なし	PCR増幅なし	PCR増幅
テンプレートを含まない コントロール	PCR増幅なし	PCR増幅なし	PCR増幅なし

3. プライマーおよびPCR条件の感度をチェックする。

検出法によってはプライマーに対応するPCR産物を他のものと容易に判別（例；サイズの違い）できるようにプライマーを選択しなければなりません。

メチル化DNAに特異的なプライマーと非メチル化DNAに特異的なプライマー、そして、Bisulfite変換済みメチル化DNAと非メチル化DNAの様々な量を組み合わせた control DNA 溶液を用いた実験を行なうことにより、MSPアッセイの感度を評価できます（表6）。必要に応じて control DNA をTEバッファーで希釈します。

表6. MSP感度の定量

DNAのタイプ	control DNA量							
	PCR 1	PCR 2	PCR 3	PCR 4	PCR 5	PCR 6	PCR 7	PCR 8
Unmethylated control DNA (Bisulfite変換済み)	10 ng	9.9 ng	9 ng	5 ng	1 ng	0.1 ng	0 ng	0 ng
Methylated control DNA (Bisulfite変換済み)	0 ng	0.1 ng	1 ng	5 ng	9 ng	9.9 ng	10 ng	0 ng

トラブルシューティングガイド

コメント

PCR産物なし

- | | | |
|----|---------------------------|---|
| a) | ピペッティングエラー、または試薬の入れ忘れ | PCRをもう一度行なう。プライマーなどの試薬の濃度および保存条件をチェックする。 |
| b) | プライマー濃度が最適でない、またはプライマーが分解 | 0.2～0.5 μM の各プライマー濃度で0.1 μM ずつ増やしてPCRを再度行なう。
特に高感度なPCRを行なう際は、変性ポリアクリルアミドゲル*でプライマーが分解していないかをチェックする。 |
| c) | スタートテンプレートに問題 | スタートテンプレートの濃度、保存条件、品質についてチェックする。ストック溶液からテンプレート核酸の連続希釈溶液を調製する。これを用いてPCRを再度行なう。 |
| d) | PCR産物が皆無 | 4ページの表5“予想されるPCR結果”を参照。 |

* 化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着と使い捨て手袋、保護用眼鏡を着用してください。詳細は製品メーカーの相当するMSDS (material safety data sheet) をご覧ください。

Trademarks: QIAGEN®, EpiTect®, HotStarTaq® (QIAGEN Group); TaqMan® (Roche 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。

© 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

