

REPLI-g[®] FFPE

プロトコールとトラブルシューティング

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織からの
ゲノム DNA の全ゲノム増幅

目次	ページ
キットに含まれていない器具および試薬	2
プロトコール	
FFPE 組織切片からの全ゲノム増幅	3
トラブルシューティング	7



キットに含まれていない器具および試薬

化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着および使い捨て手袋、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。

- マイクロ遠心チューブ
- マイクロ遠心機
- サーマルサイクラー、水浴あるいはヒートブロック
- ボルテックス
- ピペットおよびフィルター付ピペットチップ
- 氷
- ヌクレアーゼ・フリー水
- ミクロトーム

プロトコール：FFPE組織切片からの全ゲノム増幅

本プロトコールを用いて、DNA精製なしにホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE； formalin-fixed、paraffin-embedded）組織から直接全ゲノム増幅（WGA； whole genome amplification）できます。FFPE組織から精製したゲノムDNAの増幅に関しては英語版 Handbook 20 ページ、Appendix B をご覧ください。

実験を始める前の重要事項

- 最適なFFPE組織切片の厚さは10～40 μmです。1回の増幅反応は切片1枚で十分です。切片中の組織の大きさにもよりますが、1組織切片にある1断片で十分です。切片の組織部分の大きさは、必ず直径1 cm以上のものを使用してください。組織部分が1 cm未満の場合は、厚い切片あるいは2枚以上の切片を使用してください。
- パラフィン包埋組織が十分にない場合、あるいは組織切片中の組織部分の直径が1 cm未満の場合は、切片をトリミングして切片内の大部分のパラフィンを除去します。ステップ3でFFPE Lysis Solution（1x）を通常より少量（<100 μl）添加します。添加したFFPE Lysis Solution（1x）で組織切片を完全に浸すことができれば十分です。
- 可能であればDNA増幅のためのスタートサンプルとして、FFPE組織から切り出した直後の切片を使用します。FFPE組織の表面が空気にさらされていた場合は、最初の2～3切片は使用しません。
- 反応セットアップ直前に、全ての酵素（例；Ligation Enzyme、FFPE Enzyme、REPLI-g Midi DNA Polymerase）を氷上で解凍してください。他の全ての試薬は室温で解凍します。

実験を始める前の準備事項

- 全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。
- 迅速かつ簡便に行なうために、本プロトコールの全てのインキュベーション・ステップはサーマルサイクラーに前もってプログラミングできます。

操作手順

1. ミクロトームで**FFPE** サンプルブロックから **1** 組織切片を切り出し、マイクロ遠心チューブに入れる。

注：組織切片が少なくとも直径 1 cm の組織を含んでいることを確認してください。最適な FFPE 組織切片の厚さは 10 ~ 40 μm です。組織部分が直径 1 cm 未満の場合、あるいは切片の厚さが 10 μm 未満の場合は、組織切片を 2 枚以上使用してください。

サンプルブロック表面が空気にさらされていた場合は、最初の 2 ~ 3 切片は使用しません。

サンプルブロックを非常にゆっくり切り出すと通常組織切片は自然に巻かれるので、反応チューブに移しやすくなります。

2. 表 2 に従って **1x FFPE Lysis Solution** を調製する。混和後スピンドウンする。

表 2. **FFPE Lysis Solution (1x)** の調製

成分	容量 / 反応
FFPE Lysis Solution (10x)	10 μl
ヌクレアーゼ・フリー水	90 μl
トータル容量	100 μl

3. **FFPE Lysis Solution (1x) 100 μl** をステップ 1 で作製した組織切片に添加する。混和後スピンドウンする。

注：トリミングした組織切片には少量の FFPE Lysis Solution (1x) (20 μl まで) を使用できます (3 ページの “ 実験を始める前の重要事項 ” を参照)。組織切片の全てが FFPE Lysis Solution (1x) 中に浸っていなければなりません。希釈されてしまうため、できるだけ少量の FFPE Lysis Solution (1x) を使用します。

4. サンプルを **95** で **10** 分間インキュベートし、パラフィンを溶解する。
5. サンプルを室温になるまで冷却する。

注：この段階でサンプルの液体部分の上層にパラフィンと組織の薄い層が形成します。

6. **Proteinase K 2 μl** を添加する。混和後スピンドウンする。
7. **60** で **60** 分間インキュベート後、**95** で **10** 分間インキュベートする。
8. 溶解した組織切片 **10 μl** を新しいマイクロ遠心チューブに入れる。

重要：パラフィンがマイクロ遠心チューブに混入しないようにしてください。

9. 表3に従ってFFPEマスターミックスを氷上で調製する。混和後スピンドウンする。

重要：表3に記載されている順番にマスターミックス成分を添加します。マスターミックスは氷上で保存し、調製後直ぐに使用します。

表3. FFPEマスターミックスの調製

成分	容量 / 反応
FFPE Buffer	8 μ l
Ligation Enzyme	1 μ l
FFPE Enzyme	1 μ l
トータル容量	10 μ l

10. FFPEマスターミックス 10 μ lをステップ8からのサンプルDNA 10 μ lに添加する。混和後スピンドウンする。

11. 反応液を 24 で30分間インキュベートする。

注：この段階で組織切片から調製された断片化したサンプルDNAはランダムにライゲートされ、長鎖DNAを形成します。

12. 95 で5分間インキュベートしてライゲーション反応を停止する。サーマルサイクラーあるいは氷上で4 まで冷却する。

13. 表4に従いREPLI-gマスターミックスを調製する。

重要：表4に記載されている順番にマスターミックス成分を添加します。マスターミックスは氷上で保存し、REPLI-g Midi DNA Polymeraseを添加後、直ぐに使用します。

表4. REPLI-gマスターミックスの調製

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

14. REPLI-g マスターミックス 30 μ l をステップ 12 で調製した変性 DNA に添加する。混和後スピンドウンする。
15. 30 で 2 時間 (標準的な反応) あるいは 8 時間 (高収量のための反応) インキュベートする。
16. 95、10 分間 インキュベートして反応を停止する。

注: 増幅反応中に溶液が白濁してきます。これは、高濃度の DNA が増幅されていることを示唆しています。

増幅した DNA を PicoGreen 試薬を用いて定量する場合、この試薬は 2 本鎖 DNA にのみ結合することにご注意ください。その場合、95 で インキュベートする前に DNA を定量するか、ステップ 15 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。95 の変性後 PicoGreen を用いて DNA を定量する場合、2 本鎖 DNA に対する補正のため収量を 2 倍にします。

17. ダウンストリーム・アプリケーションに使用するまで、増幅した DNA は -20 で保存する。

PCR 解析を行なう場合は、英語版 Handbook 18 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 50 ng/ μ l 以上の濃度で増幅した DNA を保存することをお勧めします。

トラブルシューティングガイド

コメント

増幅中に溶液が白濁する

DNA濃度が高い 白濁現象（DNA濃度が高いことに起因）はダウンストリームアッセイに影響しない。

REPLI-g FFPE Kit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

反応温度が高すぎる 増幅反応においてインキュベーターが正しい反応温度（30℃）になっていることをチェックする。

DNA収量は約**10 µg**（**2 h**プロトコール）あるいは**40 µg**（**8 h**プロトコール）があるが、ダウンストリーム・アッセイ（例；PCR）でポジティブな結果が得られない

a) DNAの品質が低い 組織切片のサンプルDNAが切断されすぎている。英語版Handbook 21ページ、Appendix Cに推奨されている方法でサンプルDNAの品質をチェックする。
より多量の組織あるいは精製したゲノムDNAを増幅反応に用いる。

FFPE組織切片から精製したDNAを増幅反応に使用する場合、DNAテンプレート量を300 ngに増やす。

b) PCR反応産物の長さが長すぎる 理想的なPCR反応産物の長さは100 bp以下である。

c) PCRサイクリング条件が最適でない エンドポイントPCRには英語版Handbook 19ページ、Table 6に記載されているサイクリング条件を推奨する。

PCRの伸長時間短縮や温度低下が特異的なPCR産物の収量増加に繋がることがある。

より大きな組織切片を増幅反応に使用する。

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**10 µg**（**2 h**プロトコール）あるいは**40 µg**（**8 h**プロトコール）あり、かつダウンストリーム・アッセイ（例；PCR）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増幅反応中にDNAを産生 すべ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の混入を避けるため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。

コメント

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が、DNA収量は約**10 µg (2 hプロトコール)**あるいは**40 µg (8 hプロトコール)**ある

ゲノムDNAテンプレートのフラグメント・サイズが500 bp未満あるいは500ゲノム当量未満のDNAテンプレートを**使用しない**。

英語版 Handbook 21 ページ、Appendix C に推奨されている方法でサンプルDNAの品質をチェックする。

増幅反応に使用する組織切片の量を増やす。あるいはトリミングした組織切片を使用する場合、FFPE Lysis Solution 量を減らす。

FFPE 組織切片から精製したDNAを増幅反応に使用する場合、DNAテンプレート量を300 ngに増やす。

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

エンドポイントPCRには英語版 Handbook 19 ページ、Table 6 に記載されているサイクリング条件を推奨する。

PCRの伸長時間短縮や温度低下が特異的なPCR産物の収量増加に繋がることもある。

リアルタイムPCRにおいて複数の融解曲線ピークが出現

PCR中に非特異的なPCR産物が産生

リアルタイムPCRにQIAGEN QuantiFast™ PCR Kitを推奨する。

PCRの伸長時間短縮や温度低下が特異的なPCR産物の収量増加に繋がることもある。

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、REPLI-g FFPE 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QIAGENテクニカルサポートにお問い合わせください。

— Memo —

Trademarks: QIAGEN®, QuantiFast™, REPLI-g® (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。

© 2007 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

