

## Product Information

GenomePlex® Whole Genome Amplification (WGA)  
Kit

製品番号 WGA1

保存温度 -20 °C

## TECHNICAL BULLETIN(使用説明書)

## 製品概要

GenomePlex® は全ゲノム増幅(WGA)法により、ゲノム DNA をおよそ 500 倍に増幅するキットです。増幅後の収量は出発原料の純度および量によって変動します。本キットは、ゲノム DNA をランダムに断片化して生じた短い断片を、ユニバーサルプライマー結合部位に挟まれた PCR 増幅可能な OmniPlex® Library 分子に変換するという、独自の増幅技術を利用しています。この OmniPlex ライブラリーを、ユニバーサルなオリゴヌクレオチドプライマーを用いて少サイクル数で PCR 増幅します。

WGA はさまざまな用途に用いられており<sup>1,2</sup>、全血、植物、土壌、口腔粘膜細胞、ホルマリン固定組織、培養細胞といったさまざまなサンプルに由来する精製ゲノム DNA に使用できます。GenomePlex WGA が要するサンプル DNA 量は最小 10 ng で、PCR 後には >10 µg 以上の WGA 産物を得ることができます。精製した WGA 産物は、ゲノム DNA や染色体 DNA と同様の方法で分析できます。TaqMan® アッセイ、マイクロサテライト解析、SNP 解析、シーケンシングなど、多くの実験に使用できます。

## キット内容

| 製品概要                           | 製品番号  | 数量              |
|--------------------------------|-------|-----------------|
| 10 × Fragmentation Buffer      | F4304 | 55 µL           |
| 1 × Library Preparation Buffer | L7167 | 110 µL          |
| Library Stabilization Solution | L7292 | 55 µL           |
| Library Preparation Enzyme     | E0531 | 55 µL           |
| 10 × Amplification Master Mix  | A5604 | 410 µL          |
| Nuclease-Free Water            | W4765 | 2 × 1.5 mL      |
| Control Human Genomic DNA      | D7192 | 10 µL (5 ng/µL) |

## キット以外にご用意いただく材料および試薬

- WGA DNA Polymerase (GenomePlex WGA Reamplification Kit(製品番号 WGA3)に含まれます)
- サーマルサイクラー
- サンプル DNA
- 分光光度計
- 0.2~0.5 mL の PCR 用チューブ、または PCR 用マルチウェルプレート
- PCR 用に割り当てたピペット
- PCR 用ピペットチップ

## 注意事項と免責事項

GenomePlex WGA Kit は試験研究用のみを目的として販売されています。医薬品、家庭用その他試験研究以外の用途には使用できません。危険性や安全な取り扱いに関しては化学物質安全データシート(MSDS)をご覧ください。

GenomePlexおよびOmniPlexはRubicon Genomicsの登録商標です。本製品は研究用です。本製品をヒトまたは動物の治療用または診断用として使用するにはRubicon Genomics Inc.の使用許諾が必要です。許可なくこれらの用途に使用することはRubicon Genomics Inc. ([www.rubicongenomics.com](http://www.rubicongenomics.com))の特許権を侵害します。

## 保存安定性

キット内容はすべて-20 °C で保存してください。解凍して使用する際は氷上に置いてください。Library Preparation Enzyme は、-20 °C より高い温度での保存や 4 °C に長時間おくと安定性に悪影響が生じます。

## 手順

WGAのプロセスは、断片化、OmniPlex ライブラリー作製、PCR 増幅に分けられます。初めの2ステップ(断片化および OmniPlex ライブラリー作製)は続けて実施する必要がありますが、これはライブラリーDNAの末端が分解して後のステップに悪影響を及ぼす恐れがあるためです。段階的な等温反応で生じた OmniPlex ライブラリーDNAは、 $-20^{\circ}\text{C}$  で最大3日間は後のステップに影響することなく保存することができます。最終的に得られた WGA DNA 産物は  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存してください(安定性は同条件で保存したゲノム DNA サンプルと同等です)。

使用するサンプル DNA 量は重要です。ヒトのゲノム DNA のように複雑なサンプルを使用する場合は、使用 DNA 量が少ないと、得られる GenomePlex 産物における遺伝子の偏りが大きく変化します。ヒトゲノム DNA を 1 ng 使用した場合、得られる産物の遺伝子量はオリジナルの 2~10 倍の範囲で変動しますが、一方、収率は約 50% 低くなるだけです。細菌の DNA のように複雑度が低いゲノムの場合、1 ng という少ない DNA から始めても良好な結果が得られます。

GenomePlex は、抽出された DNA の長さが 200 bp 以上であれば、保存されている固定組織 DNA や分解された DNA サンプルにも使用できます。しかし、そうした損傷 DNA から満足できる量の最終産物を得るには、通常よりも多いサンプル量が必要です。固定組織 DNA の場合は最大 100 ng を使用して以下のプロトコール(断片化ステップを含む)を実施することを推奨します。

キット付属の Control Human Genomic DNA のようなポジティブコントロール DNA サンプルも同時に使用して実験を進めてください。

## 断片化

1. DNA サンプルを抽出し、UV 吸光度 (260 nm) を測定して濃度を測ります。1 ng/ $\mu\text{L}$  の DNA 溶液を調製します。
2. 10  $\mu\text{L}$  の DNA サンプル (1 ng/ $\mu\text{L}$ ) を PCR 用チューブまたはマルチウェルストリップ/プレートにとり、1  $\mu\text{L}$  の 10 × Fragmentation Buffer を加えます。
3. チューブまたはプレートをサーマルブロック(サーマルサイクラー)にセットして、 $95^{\circ}\text{C}$  で正確に4分間加熱します。このインキュベーションは時間の影響を強く受けるため注意してください。多少のずれも結果に影響します。
4. サンプルを取り出してただちに氷冷し、短時間遠心分離して内容物をチューブ/プレートの底に集めます。

## ライブラリー作製

5. 各サンプルに 2  $\mu\text{L}$  の 1 × Library Preparation Buffer を加えます。
6. 1  $\mu\text{L}$  の Library Stabilization Solution を加えます。
7. よくボルテックスし、遠心して底に集め、 $95^{\circ}\text{C}$  のサーマルサイクラーで2分間加熱します。
8. サンプルを氷冷し、遠心してサンプルを底に集め、氷上に置きます。
9. 1  $\mu\text{L}$  の Library Preparation Enzyme を加えてボルテックスし、短時間遠心分離します。
10. サーマルサイクラーにセットして、以下のプログラムでインキュベーションします。
 

|                             |
|-----------------------------|
| 16 $^{\circ}\text{C}$ 、20 分 |
| 24 $^{\circ}\text{C}$ 、20 分 |
| 37 $^{\circ}\text{C}$ 、20 分 |
| 75 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分  |
| 4 $^{\circ}\text{C}$ で保持    |
11. サーマルサイクラーからサンプルを取り出し、短時間遠心分離します。ただちに増幅ステップに進むか、または  $-20^{\circ}\text{C}$  で3日間まではサンプルを保存できます。

## 増幅

12. ステップ 11 で得られた 15  $\mu\text{L}$  の反応液に対し、以下の試薬を加えます。

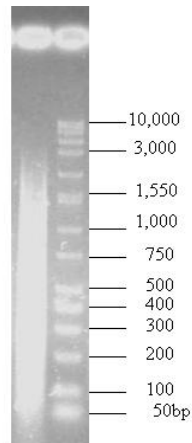
|                               |                    |
|-------------------------------|--------------------|
| 10 × Amplification Master Mix | 7.5 $\mu\text{L}$  |
| Nuclease-Free Water           | 47.5 $\mu\text{L}$ |
| WGA DNA Polymerase            | 5 $\mu\text{L}$    |

13. よくボルテックスしてから短時間遠心分離し、サーマルサイクル反応を開始します。以下のプログラムは PE 9700 型サーマルサイクラーまたはその同等品に最適化されています。

|                        |                            |
|------------------------|----------------------------|
| 最初の変性                  | $95^{\circ}\text{C}$ 、3 分  |
| 以下のステップを 14 サイクル実施します。 |                            |
| 変性                     | $94^{\circ}\text{C}$ 、15 秒 |
| アニーリング/伸長              | $65^{\circ}\text{C}$ 、5 分  |

サイクル終了後、反応液は  $4^{\circ}\text{C}$  で保持するか、または  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存しておき、あとで分析・精製します。WGA DNA の安定性は同条件で保存したゲノム DNA と同等です。

WGA DNA の品質を定性的に確認するには、5~10% (4~8  $\mu$ L) の最終反応液を 1.5%アガロースゲルで泳動します。DNA の長さは 75~1500 bp の範囲にあり、平均は約 400 bp となります。



最終産物は他の実験に使用する前に精製することを推奨します。GenomePlex WGA で増幅した DNA は、PCR Cleanup Kit (製品番号 NA1020) や、一本鎖/二本鎖 DNA の一般的な精製方法で精製できます。精製した DNA は吸光度を測定することで定量できます ( $A_{260} = 1$  が 50 ng/ $\mu$ L DNA に相当します)。増幅中には一本鎖 DNA が生じるため、PicoGreen<sup>®</sup>などの色素を用いた定量法では、WGA DNA の収量が実際よりも低く見積もられることがあります。

#### 製品性能

すべてのロットについて標準的なヒトゲノム DNA サンプル 10 ng で増幅試験が行われ、3~7  $\mu$ g のサンプルが得られることを確認しています。品質および増幅の偏りについては、8 個の別々の遺伝子座に対するプライマーセットを用いたりアルタイム PCR で測定されています。

#### 参考文献

1. Barker, D. L., *et al.*, Two methods of whole-genome amplification enable accurate genotyping across a 2320-SNP linkage panel. *Genome Res.*, **14**, 901–907 (2004).
2. Gribble, S., *et al.*, Chromosome paints from single copies of chromosomes. *Chromosome Res.*, **12**, 143–151 (2004).
3. Thorstenson, Y. R., *et al.*, An Automated Hydrodynamic Process for Controlled, Unbiased DNA Shearing. *Genome Res.*, **8**, 848–855 (1998).

GenomePlex WGA テクノロジーは特許出願中です。  
GenomePlex および OmniPlex は Rubicon Genomics Inc. の登録商標です。  
TaqMan は Roche Molecular Systems の登録商標です。  
PicoGreen は Molecular Probes, Inc. の登録商標です。  
SD, TR, KTA, MAM 06/07-1

#### よくある質問

1. **GenomePlex はどのように作用するのですか？**  
ゲノム DNA をランダムに断片化して得られた各断片の末端に、共通の配列を付加します。この断片ライブラリーを 14 サイクルの PCR で増幅します。
2. **断片化ステップを 4 分間より短く(または長く)するとどうなりますか？**  
4 分間という断片化時間は、さまざまな DNA サンプルについて最適な結果を与えることがわかっています。断片化時間が短すぎたり、断片化を行わなかったりすると、WGA 産物の収率が低下し、遺伝子の偏りが大きくなります。断片化時間を 10 分間とした場合も、大抵は WGA 産物の収率が低下しますが、これはかなりの量の DNA が短くなりすぎて、ライブラリーがうまく作製されなくなるためです。
3. **断片化された DNA の平均サイズはどれぐらいですか？**  
断片化後の平均サイズは約 0.4 kb です。
4. **GenomePlex は保存固定組織の DNA や分解された DNA といったサンプルにも使用できますか？**  
はい、抽出後の DNA の長さが 200 bp 以上であれば使用できます。しかし、そのような損傷 DNA の場合、満足できる量の最終産物を得るには多量のサンプルが必要です。固定組織 DNA の場合は最大 100 ng を使用してプロトコール(断片化ステップを含む)を実施することを推奨します。トラブルシューティングガイドの「収量が少ない—使用した DNA が分解されている」の項を参照してください。
5. **GenomePlex のプロトコールに示されているよりも少ない量の DNA で使用することはできますか？**  
ヒトのゲノム DNA のように複雑なサンプルを使用する場合は、使用 DNA 量が少ないと、得られる GenomePlex 産物における遺伝子の偏りが大きく変化します。ヒトゲノム DNA を 1 ng 使用した場合、得られる産物の遺伝子量はオリジナルの 2~10 倍の範囲で変動しますが、一方、収率は約 50% 低くなるだけです。しかし、細菌の DNA のように複雑度が低いゲノムの場合は、わずか 1 ng という DNA から始めても良好な結果が得られます。

6. **WGA DNA はどのようにして精製すべきですか？  
GenomePlex DNA を定量するのによい方法はありますか？**

GenomePlex DNA は、他の実験に使用する前に Sigma の PCR cleanup kit (製品番号 NA1020) を用いて精製することをお勧めします。精製した DNA は吸光度を測定することで定量できます ( $A_{260}=1$  が 50 ng/ $\mu$ L DNA に相当します)。増幅中には一本鎖 DNA が生じるため、PicoGreen などの定量法では、WGA DNA の収量が実際よりも低く見積もられることがあります。

7. **GenomePlex DNA はどうすれば保存できますか？  
GenomePlex のプロセスはどこで中断できますか？**

WGA のプロセスは、断片化、OmniPlex ライブラリー作製、PCR 増幅に分けることができます。断片化された DNA の末端が分解されると後のステップに悪影響を及ぼすため、ただちに次のステップに進んでください。段階的な等温反応で生じた OmniPlex ライブラリー DNA は、 $-20^{\circ}\text{C}$  で最大 3 日間は後のステップに影響することなく保存することができます。最終的に得られた WGA DNA は  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存してください (安定性は同条件で保存したゲノム DNA サンプルと同等です)。

8. **ネガティブコントロールを使用した (DNA を加えない)  
GenomePlex プロセスでは産物は得られますか？**

鋳型 DNA の含まれないコントロールからは産物は得られません。鋳型を使用しなかった場合の産物には、PCR やハイブリダイゼーション法で探索しても、対象遺伝子は含まれていません。

9. **この全ゲノム増幅法の配列フィデリティーを決定するために  
行われた実験とはどのようなものですか？**

製品開発中、107 種類のヒトプライマーセットを用いた PCR および定量的 PCR により、GenomePlex 法における増幅遺伝子量に関するテストが行われました。プライマーセットはすべて、National Center for Biotechnology の UniSTS データベース\*に由来しています。この 107 種類の DNA 配列は、ヒト遺伝子のうち 20~30,000 種というわずかな部分を代表するものですが、統計的にはヒトゲノムをよく代表しています。

\*<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unists>

また、共同研究者らは、GenomePlex を用いた増幅産物量に関する論文を発表しています<sup>1,2</sup>。

弊社の品質管理プログラムの一環として、全ゲノム増幅 (WGA) キットのすべてのロットはヒトゲノム DNA を用いて増幅試験を実施しており、さらに定量的 PCR および 8 種の UniSTS プライマーセットを用いた試験も実施しています。得られた結果を、等量の未増幅 DNA と比較します。その結果、複数の領域で遺伝子量が同一であることが示されています。

GenomePlex WGA 製品のアプリケーションデータや最新のプロトコールについては、WGA のホームページ [http://www.sigmaaldrich.com/Life\\_Science/Molecular\\_Biology/PCR/Product\\_Lines/Whole\\_Genome\\_Amplification.html](http://www.sigmaaldrich.com/Life_Science/Molecular_Biology/PCR/Product_Lines/Whole_Genome_Amplification.html) をご覧ください。

## トラブルシューティングガイド

| 問題                                     | 原因                                    | 推奨される対策   |
|--|---------------------------------------|---|
| サイクル反応後の収量が少ない                         | サンプルに PCR 阻害物質が含まれている、またはバッファの塩濃度が高い  | 適切なマイクロ透析装置を用いて透析することで、阻害成分を希釈することができます。このプロセスで DNA が失われる場合があるため、透析後のサンプルを定量することを強く推奨します。   |
|  | 使用した DNA が分解されている、または使用量が 10 ng 未満だった | 不十分な量の DNA を増幅すると、多くの場合、得られる産物の収率は低くなり、遺伝子量の偏りが大きくなります。鑄型によっては、使用量を多くすることで増幅可能となることがあります。分解されたサンプルの場合、使用する鑄型の量を 25~100 ng に増やすことで WGA 増幅が成功した例があります。  |
|  | より多くの酵素が必要である                         | 使用する DNA ポリメラーゼの量が少ないと WGA の収率は低下します。反応混合物 75 $\mu$ L あたり 12 unit 以上のホットスタート DNA ポリメラーゼを使用することを推奨します。サイクル数を増やすと DNA 産物に増幅の偏りが生じるため、DNA ポリメラーゼの追加の方が好ましい対策です。  |
|  | 反応後の精製が不適切であった                        | PCR Cleanup Kit (製品番号 NA1020) での精製をお勧めします。この方法では一本鎖と二本鎖の両方の DNA が保たれます。   |
|  | 断片化反応が長すぎた(または短すぎた)                   | 4 分間という断片化時間は、さまざまな DNA サンプルについて最適な結果を与えることがわかっています。断片化時間が短すぎたり、断片化を行わなかったりすると、WGA 産物の収率が低下し、遺伝子量の偏りが大きくなります。断片化時間を 10 分間とした場合も、大抵は WGA 産物の収率が低下しますが、これはかなりの量の DNA が短くなりすぎて、ライブラリーがうまく作製されなくなるためです。 |
| WGA 産物中の対象遺伝子に著しい偏りがあることが定量的 PCR で示された | コントロールが不適切である                         | ゲノム DNA を GenomePlex WGA と比較する際は、コントロールのゲノム DNA を切断してからにしてください。断片化プロトコール(ステップ 1~4)を実施した複数のサンプルをプールしたもの、またはハイドロシアー処理 (hydroshearing) で断片化した DNA をコントロールとして比較することを推奨します <sup>3</sup> 。                |
|  | DNA サンプルが少ない、または分解されている               | 上記「収率が低い」の項の対策を参照してください。  |

Sigma ブランド製品は Sigma-Aldrich, Inc.を通じて販売されています。

Sigma-Aldrich, Inc.は同社製品がこの文書およびその他の Sigma-Aldrich 発行文書に含まれる情報に合致していることを保証します。お客様の個別の用途と製品の適合性についてはお客様にてご判断ください。掲載の品目、製品情報、価格などは予告なく変更される場合がございます。納品伝票または同梱の内容明細書の裏面をご覧ください。