

Product Information

GenomePlex® Single Cell
Whole Genome Amplification Kit

製品番号 WGA4

保存温度 -20 °C

TECHNICAL BULLETIN (使用説明書)

製品概要

GenomePlex® は Whole Genome Amplification (WGA) 法を利用し、ゲノム DNA の増幅ができます。本キットでは、ゲノム DNA をランダムに断片化し、その小断片をユニバーサルプライマー結合サイトの隣接する PCR 増幅可能な OmniPlex® ライブラリに変換する、独自の増幅技術を用いています。OmniPlex ライブラリをユニバーサルオリゴヌクレオチドプライマーを用いて一定回数 PCR 増幅します。

本キットは単一の細胞からゲノム DNA を増幅するために設計されています。単一の細胞からの WGA では通常、数百万倍の増幅によって、gDNA はマイクログラム量となります。単一の細胞からの WGA 増幅産物を精製し、ゲノムあるいは染色体 DNA サンプルに用いられる様々な解析に供することができます。TaqMan® アッセイ、マイクロサテライト解析、SNP 解析、シーケンス、比較ゲノムハイブリダイゼーションなどの数多くのその後のアプリケーションに用いることができます^{1,2}。

付属する試薬

製品概要	製品番号	10 Rxn	50 Rxn
10 × Single Cell Lysis & Fragmentation Buffer	L1043	350 µL	1.8 mL
Proteinase K Solution	P4850	25 µL	110 µL
1 × Single Cell Library Preparation Buffer	L0918	25 µL	110 µL
Library Stabilization Solution	L7292	12 µL	55 µL
Library Preparation Enzyme	E0531	12 µL	55 µL
10 × Amplification Master Mix	A5604	85 µL	410 µL
WGA DNA polymerase	W3891	55 µL	275 µL
Control DNA (5 ng/µL)	D7192	10 µL	10 µL
Nuclease-Free Water	W4765	1.5 mL	2 × 1.5 mL

キットの他にご用意いただく試薬および材料

- サーマルサイクラー
- 単離した単一の細胞
- 分光光度計
- 0.2 mL もしくは 0.5 mL の薄壁 PCR チューブまたは PCR 用マルチウェルプレート
- 専用ピペット
- PCR 用ピペットチップ

注意事項と免責事項

Single Cell GenomePlex WGA Kit は試験研究用製品です。医薬品、家庭での使用など試験研究用以外の用途には使用できません。危険性と安全な取り扱いについては安全性データシート (MSDS) をご覧ください。

GenomePlex と OmniPlex は Rubicon Genomics 社の登録商標です。本製品は研究用です。本製品を人または動物に対して治療または診断目的に使用する場合には、Rubicon Genomics 社のライセンスが必要です。許可なき使用は Rubicon Genomics 社の所有権の侵害にあたります。(www.rubicongenomics.com)

保存安定性

すべてのコンポーネントは -20 °C で保存してください。使用のために解凍する際は、氷上で行ってください。ライブラリ調製用酵素の安定性は -20 °C 以上で保存した場合や 4 °C 以上で長期置いた場合、影響を受けます。

手順

Single cell WGA 手順は溶解および断片化、OmniPlex ライブラリ作成、PCR 増幅に分けられます。これらのステップは途中で中断すると、ライブラリ DNA の末端が分解する場合があるので、中断せず連続して行ってください。このような分解は次のステップに影響します。最終的な WGA DNA は -20 °C で保存してください。このとき、同様に保存したゲノム DNA サンプルと同等の安定性です。

すべての実験は本キットに付属の Control Human Genomic DNA (D7192)のようなポジティブコントロール DNA サンプルと同時に測定することを推奨します。

単一細胞の溶解および断片化

1. レーザーキャプチャーマイクロダイセクション、セルソーティング法やその他の方法で単一の細胞を PCR 用容器に分離します。セルソーティングを行う場合は、Tris EDTA (TE) バッファーのような低イオン強度のバッファーを用い、体積は最小限にします。
2. 単一細胞サンプルに十分量の水を加え最終体積を 9 μ L にします。
3. 2 μ L の Proteinase K 溶液を 32 μ L の 10 \times Single Cell Lysis & Fragmentation Buffer に加え、使用する Lysis and Fragmentation Buffer Solution (溶解および断片化用バッファー)を調製します。よくボルテックスします。
4. 新たに調製した Proteinase K 溶液-10 \times Single Cell Lysis & Fragmentation Buffer の混合液 1 μ L を単一細胞サンプルに加えます。よく撹拌します。
5. DNA 混合物を 50 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートし正確に 4 分間だけ 99 $^{\circ}$ C に加熱します。インキュベーションは時間に非常に敏感であることに注意してください。時間の過不足は結果に影響します。氷冷します。ライブラリ作成前にサンプルをスピンドウンします。

ライブラリ作成

6. 各サンプルに 2 μ L の 1 \times Single Cell Library Preparation Buffer を加えます。
7. 1 μ L の Library Stabilization Solution を加えます。
8. よく混合し、95 $^{\circ}$ C で 2 分間サーマルサイクラーに置きます。
9. サンプルを氷冷し、遠心して集め、再び氷冷します。
10. 1 μ L の Library Preparation Enzyme を加え、よく混合し、短時間遠心します。
11. サンプルをサーマルサイクラーに置き、次のようにインキュベートします。
 - 16 $^{\circ}$ C で 20 分間
 - 24 $^{\circ}$ C で 20 分間
 - 37 $^{\circ}$ C で 20 分間
 - 75 $^{\circ}$ C で 5 分間
 - 4 $^{\circ}$ C で維持
12. サーマルサイクラーからサンプルを外し短時間遠心します。サンプルを直ちに増幅するかまたは-20 $^{\circ}$ C で 3 日間保存します。

増幅

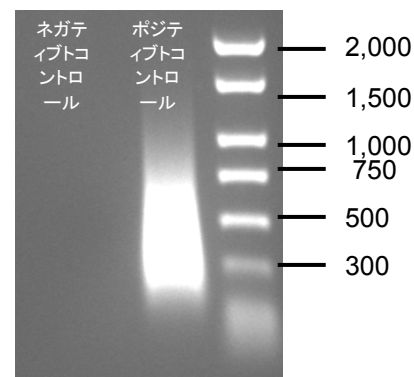
13. 以下の試薬を合計 14 μ L の反応溶液に加えます。
 - 7.5 μ L の 10 \times Amplification Master Mix
 - 48.5 μ L の Nuclease-Free Water
 - 5.0 μ L の WGA DNA Polymerase
14. よく撹拌し、短時間遠心し、サーモサイクルを開始します。次のやり方は PE 9700 またはその同等のサーマルサイクラーに最適化されています。
 - 初期変性 95 $^{\circ}$ C 3 分間

以下を 25 サイクル行います

変性	94 $^{\circ}$ C 30 秒間
アニール/伸長	65 $^{\circ}$ C 5 分間
維持	4 $^{\circ}$ C

サイクル完了後、4 $^{\circ}$ C で反応を維持するかまたは -20 $^{\circ}$ C で解析または精製の準備ができるまで保存します。WGA DNA の安定性は同一条件で保存したゲノム DNA と同等です。

WGA DNA の品質の定量評価は、最終反応液の 5~10% (4~8 μ L) を 1.5% アガロースゲルにロードすることによって行えます。DNA サイズの範囲は 100~1000 bp になり、平均サイズは約 400 bp です。



次のアプリケーションに使用する前に最終産物を精製することを推奨します。GenomePlex WGA で増幅した DNA は、Sigma PCR Cleanup Kit (製品番号 NA1020) または一本鎖と二本鎖 DNA を分離する標準的な精製法で精製できます。精製したら吸光度測定により DNA を定量し、その際 1 A₂₆₀ unit が 50 ng/ μ L の DNA に相当すると推定します。PicoGreen[®] 色素などによる測定方法によって実際の WGA DNA 収量よりも少なく計測されることがありますが、これは増幅時に一本鎖 DNA が生じる可能性があるためです。

製品概要

すべてのロットは、標準的なヒトゲノム DNA サンプル 100 pg の増幅による機能的なテストが行われ、4 µg の収量が得られています。増幅の品質と性能は 8 つの異なる遺伝子座に対するプライマーセットを用いたリアルタイム PCR により評価されています。ネガティブ (鋳型を含まない) コントロールからは検出可能な産物は生じません。

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. *Genomic Research*, **14**, 901-7 (2004).

2. Gribble, S., *et al.* Chromosome paints from single copies of chromosomes. *Chromosome Research*, **12**, 143-51 (2004).
3. Thorstenson, Y. R., *et al.* An Automated Hydrodynamic Process for Controlled, Unbiased DNA Shearing. *Genome Research*, **8**, 848-855 (1998).

GenomePlex WGA 技術は特許出願中です。

GenomePlex と OmniPlex は Rubicon Genomics 社の登録商標です。

TaqMan は Roche Molecular Systems 社の登録商標です。

PicoGreen は Molecular Probes 社の登録商標です。

SD,CB,TR,KTA,MAM 06/07-1

トラブルシューティングガイド

問題	原因	推奨される解決法
サイクル後の収量が低い。	サンプルが塩あるいは阻害剤を含有している。	ソーティング過程でプロセスの障害となる阻害剤や塩が残る可能性があります。
	鋳型が低品質。	単一細胞の DNA が単離プロセス中に分解した。単一細胞の保存が不適切であった。1 つ以上のサンプルについて WGA を行うことにより、自然に起こるランダムな品質上の問題は解消できますが、ソーティングプロセスでサンプルがダメージを受けた場合には効果はありません。
	反応後の精製が不適切であった。	Sigma 社の PCR Cleanup Kit (NA1020) を推奨します。この方法では一本鎖および二本鎖の DNA を維持する必要があります。
	単一細胞が捕捉できなかった。	PCR 用チューブに単一細胞が入っていることを確認してください。また single cell lysis/fragmentation buffer に加えた後に完全にボルテックスすることを確認してください。
qPCR で対象とする遺伝子に対する WGA 性能に大きな偏りがある。	DNA サンプルが少ないかまたは分解している。	低収量についてのコメントを参照ください。
	コントロールが不適切。	コントロール用の DNA が切断されている場合、ゲノム DNA と GenomePlex WGA の比較が可能です。前述の方法 (ステップ 1~5) で断片化した幾つかのサンプルを集めたものを用いるか、または hydroshearing した DNA と比較することを推奨します ³ 。
ネガティブ (鋳型を含まない) コントロールで産物が生じる。	試薬に外部からの混入物がある。	1 つ以上の試薬に DNA が混入している。結果に影響しない場合には、影響を受けているコンポーネントを交換して鋳型を含まないクリーンなコントロールで再実験を行うことができます。

よくある質問

- 1. GenomePlex はどのように機能するのですか？**
ゲノム DNA をランダムに断片化し、その各産物 DNA の末端に共通の配列が結合されます。この断片のライブラリを 25 サイクルの PCR で増幅します。
- 2. 断片化 (99 °C のステップ) が正確に 4 分間でない場合はどうなりますか？**
様々な DNA サンプルによる検証によって、4 分間の断片化時間は最適な結果を与えることがわかっています。断片化が不足するかまたは全くないと、WGA 産物の収量が低下し、遺伝子の再構成も良くありません(遺伝子に偏りが生じます)。断片化ステップを 10 分間にしてもほとんどの場合に WGA 収量は低下しますが、その理由は DNA のかなりの部分が小さくなりすぎるかあるいは分解しすぎて効率的なライブラリ生成ができないためです。
- 3. 断片化 DNA の平均サイズは？**
断片化ステップ後の平均サイズは約 0.4 kb です。
- 4. GenomePlex ではネガティブコントロール (DNA 投入なし) で産物が生成されますか？**
正しい手順で行えば DNA 投入のない場合に産物は生成されません。
- 5. WGA DNA の精製はどのようにすべきですか？ GenomePlex DNA を定量するための好ましい方法はありますか？**
GenomePlex DNA の精製は、Sigma 社の PCR cleanup kit (製品番号 NA1020) を使用して、WGA 後の実験プロセスに用いる前に行うことを推奨します。精製したら吸光度測定により DNA を定量し、その際 1 A₂₆₀ unit が 50 ng/μL の DNA に相当すると推定します。PicoGreen 色素などによる測定方法によって実際の WGA DNA 収量よりも少なく計測されることがありますが、これは増幅時に一本鎖 DNA が生じる可能性があるためです。
- 6. GenomePlex DNA はどのように保存すべきですか？ GenomePlex のプロセスはどこで中断できますか？**
WGA プロセスは単一細胞の溶解/断片化、OmniPlex ライブラリ作成、PCR 増幅のステップに分けられます。DNA 末端が分解すると後のステップに影響を及ぼしうするため、断片化 DNA の処理は直ちに行うべきです。段階的等温反応で生成する OmniPlex ライブラリ DNA は、-20 °C で 3 日間まで保存でき、その際プロセスにおいて検出可能な差はみられません。最終的な WGA DNA は -20 °C で保存してください。このとき同様に保存したゲノム DNA サンプルと同等の安定性です。
- 7. サンプルの遺伝子構成を解析したところアレルドロップアウトがみられました。**
研究により、アレルドロップアウトは単一細胞の増幅に固有のものであることが示されています。Sigma 社の Single Cell WGA Kit アレルドロップアウトを最小限に抑えます。WGA の方法論は多くの単一細胞 WGA サンプルを定量的 PCR で調べることにより評価され、アレルドロップアウト発生率は 30%でした。