



5hmC Profiling Kit

Catalog No. 55023

(日本語マニュアル Version A1, 2024年2月29日版)

* 必ず最新の英文マニュアルをご確認ください。

Copyright 2023 Active Motif, Inc.

Information in this manual is subject to change without notice and does not constitute a commitment on the part of Active Motif, Inc. It is supplied on an “as is” basis without any warranty of any kind, either explicit or implied. Information may be changed or updated in this manual at any time.

This documentation may not be copied, transferred, reproduced, disclosed, or duplicated, in whole or in part, without the prior written consent of Active Motif, Inc. This documentation is proprietary information and protected by the copyright laws of the United States and international treaties.

The manufacturer of this documentation is Active Motif, Inc.

© 2023 Active Motif, Inc., 1914 Palomar Oaks Way, Suite 150; Carlsbad, CA 92008. All rights reserved.

All trademarks, trade names, service marks or logos referenced herein belong to their respective companies.

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

Contents

概要	1
アッセイのフローチャート	2
Kitの構成成分と保管温度	3
Kit以外に追加で必要なもの	4
プロトコール	5
Bufferの調製	5
解析サンプルの調製	5
5hmC Profiling プロトコール.....	8
Appendix.....	13
Section A. コントロールSpike-In DNAの使用法.....	13
Section B. Spike-In DNAのqPCR推奨条件	15
Section C. % Inputの計算法.....	16
トラブルシューティング	17
テクニカルサポート	18

概要

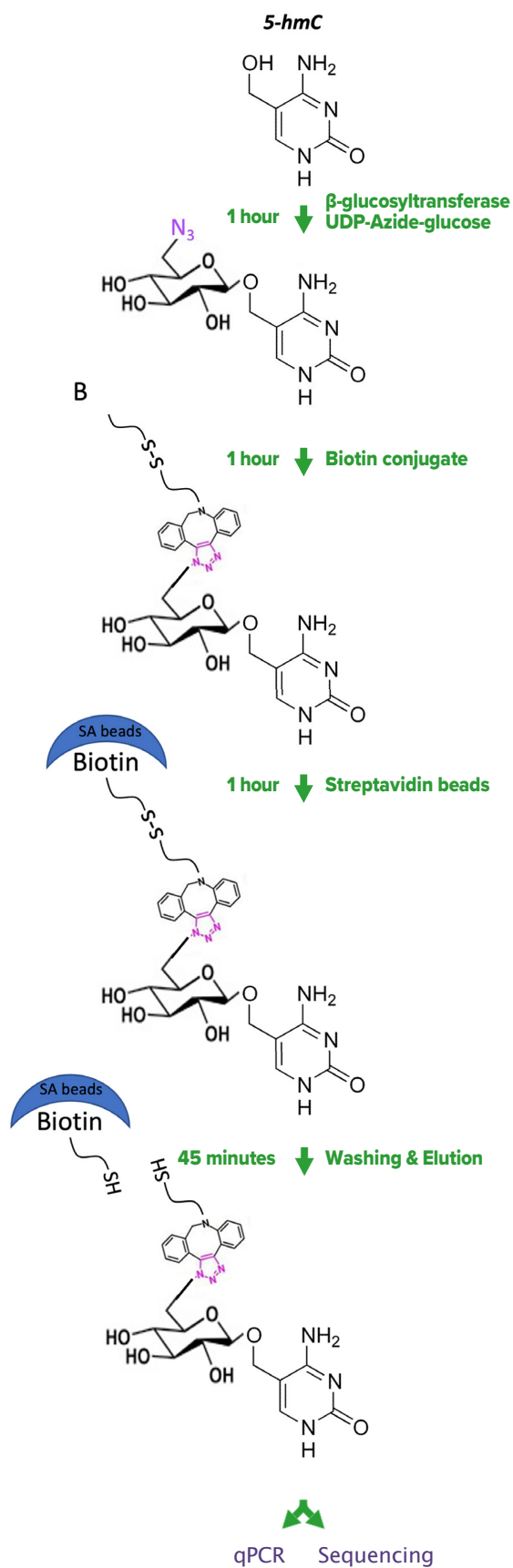
5hmC Profiling Kit は、5-hydroxymethylcytosine (5hmC)を含むDNA断片を検出・捕捉し、ゲノムワイド解析に使用するように設計されています。このキットは、100-500塩基対のサイズに断片化された二本鎖DNAに用いることができます。このDNAを β -glucosyltransferase酵素と修飾されたUDP-グルコースドナーの存在下でインキュベートします。この酵素は、グルコースを5hmCに転移し、グルコシル-ヒドロキシメチルシトシンを生成します。次にビオチン結合体が修飾グルコースに化学的に結合されます。さらに、ストレプトアビジン磁気ビーズを用いて、ビオチン化5hmCを含むDNA断片を捕捉します。ビオチンとグルコース部分の間のスペーサーはジスルフィド結合を含むため、断片は還元剤(溶出バッファー)で溶出することができ、5hmCを含む断片が濃縮されます。SPRIビーズによる精製後、濃縮されたDNAはqPCRおよび/または次世代シーケンサーで、それぞれターゲット解析またはゲノムワイドな5-ヒドロキシメチルシトシン解析に使用できます。

5hmC Profiling Kitは、5hmCの化学標識を利用することによりヒドロキシメチル化DNA断片を極めて特異的かつ高感度に捕捉することができます。また、ビオチン-ストレプトアビジン結合反応により、より厳密に結合および洗浄条件を設定することができ、免疫沈降法では検出できない感度と特異性を得ることができます。Active Motifの磁気を利用した高速なプロトコルは、洗浄とインキュベーションのステップ数を最小限にするために効率化されており、濃縮された5hmC DNAを5時間以内に得られます。さらに利便性を高めるため、キットにはオプションとして、5-ヒドロキシメチルシトシンまたは5-メチルシトシンをわずかな割合で含む2つのDNA断片の等モル混合物を含むSpike-In DNAも含まれています。これらの断片をターゲットとするPCRプライマーは、濃縮の効率と特異性の両方を確認するために使用できます。

Product	Format	Catalog No.
5hmC Profiling Kit	24 rxns	55023



アッセイのフローチャート



Kit の構成品と保管温度

受領後は速やかに開封し、各構成品は、以下の表にある温度で保管してください。キットおよび構成品は、適切に保管されている場合、6ヶ月安定であることを保証いたします。

Kit Component	Quantity	Storage
Beta-glucosyltransferase	55 µL	-20°C
UDP-Azide-Glucose	65 µL	-20°C
Biotin Conjugate Solution	500 µL	-20°C
Spike-In DNA (10 ng/µL)	55 µL	-20°C
5hmC Spike-In Primer	160 µL	-20°C
5mC Spike-In Primer	160 µL	-20°C
10X Reaction Buffer	140 µL	4°C
Streptavidin Beads*	620 µL	4°C
Binding Buffer AM13	28 mL	4°C
10X Elution Buffer AM2	140 µL	4°C
SPRI Beads*	4.5 mL	4°C
TT Buffer	3.6 mL	RT
10 mM Tris-HCl, pH 8	11 mL	RT

* Streptavidin Beads と SPRI Beadsは、再凍結しないでください。これらのビーズは、受領後に4°Cで保管してください。

キット以外に追加で必要なもの

- 100-500 bpに断片化したサンプルDNA
- 回転式チューブミキサー
- 80% エタノール (用時調製)
- 0.2 mL PCRチューブまたは0.2 mLの8連チューブ
- 0.2 mL PCRチューブ用磁気スタンド
- PCRチューブ用遠心機
- 核酸低吸着性チューブ (1.5-2 mL: (例) Corning社のProduct Number 3207)
- 37°Cに設定可能なウォーターバスまたはヒートブロック
- DNaseフリー精製水

プロトコール

Bufferの調製

10X Elution Buffer AM2

10X Elution Buffer AM2にBinding Buffer AM13を加えて1X Elution Bufferを調製する。

(例) 50 μ Lの溶出反応あたり、5 μ Lの10X Elution Buffer AM2にBinding Buffer AM13を45 μ L加える。

SPRI Beads

使用する30分前には、室温に戻しておく。使用時には10秒ほどボルテックスで攪拌する。

解析サンプルの調製

解析サンプルの量

ライブラリー調製に十分な濃縮DNAを取得するために、80 ng~2.5 μ gの断片化ゲノムDNAから実験を開始することを推奨します。サンプルの種類により、それより少ない量でも解析できる場合もありますが、80 ng未満の場合、ライブラリー調製中にPCRの重複が大量発生し、シーケンスデータの正確な解釈が困難になることがあります。また、ユニーク分子インデックス(UMI)を使用すれば、ライブラリー増幅前に各分子にユニークな分子タグを付加することにより、PCR duplicateの問題を軽減できる可能性があります。

がん細胞のように5hmCレベルが非常に低い細胞の割合が高い組織では、2.5 μ g以上のDNAが必要になります。このような場合2.5 μ g以下になるようサンプルを分けて濃縮反応を行い、精製時にDNAをプールすることをお勧めします。

サンプルのDNA断片サイズは、100-500 bpの範囲にあることが必要ですので、5hmC Profiling Kitを使用する前に、制限酵素処理や超音波破碎法など、推奨するDNAの断片化方法を用いて調製してください。

ゲノムDNAの断片化

5hmC Profiling Kit のアッセイを開始する前に、機械的断片化(ソニケーターなど)、またはメチル化非感受性制限酵素による制限消化のいずれかを用いて100 から 500 塩基対の断片となったゲノム DNAを得る必要があります。その際、市販のキットや確立された標準的プロトコールを用いて高品質のゲノムDNAを調製することを推奨します。ゲノムDNAの品質評価にはアガロースゲル電気泳動を実施し、DNA濃度はUV分光光度計で確認してください。

制限酵素による断片化

メチル化非感受性制限酵素で切断することにより、ゲノムDNAを適当な長さに断片化することができます。この断片はPCR解析に十分な長さ(75 bp以上)でなければなりません。制限酵素処理は、小さな反応系で実施できるため、限られたサンプル量で作業する場合に推奨されます。また、制限酵素処理では、より再現性の高い断片化パターンを得られます。いくつかの有用なメチル化非感受性制限酵素を以下の表に示します。予想されるように、認識配列にグアニン(G)とシトシン(C)を含む酵素は、アデニン(A)とチミン(T)のみで構成される酵素に比べて、より頻繁にCpGアイランドを切断します。

Restriction Enzyme	Recognition Sequence	No. of fragments (per kb) in CpG Islands	No. of fragments (per kb) in non-CpG Islands
<i>Mse I</i>	TTAA	0.8	2.88
<i>Bfa I</i>	CTAG	1.56	1.55
<i>Tas I</i>	AATT	0.8	2.88
<i>Csp6 I</i>	GTAC	2.23	1.41

酵素メーカーの推奨法に従って制限酵素処理を行います。以下はプロトコルの例です。このプロトコルは、単離したゲノムDNAの量や、使用する制限酵素によって変更することができます。以下の例は、*Mse I* (New England Biolabs (NEB))を用いた1 µg DNAの制限消化を示しています。DNA量が多い場合は、必要に応じて反応をスケールアップしてください。

Genomic DNA	1 µg
10X rCutSmart Buffer	5 µL
<i>Mse I</i> (10 U/µL)	1 µL
dH ₂ O	to 50 µL final volume
Total volume	50 µL

1. ピペティングにより溶液をよく混ぜ、37°Cで1時間から一晩反応させる。
2. 反応後、65°Cで20分間インキュベートし、*Mse I*を不活性化する。
3. 酵素処理したDNAを、フェノール/クロロホルム抽出法や、市販のDNA精製キット(例えばQIAGEN MinElute Reaction Cleanup Kit (Cat No. 28204))を用いて、精製する。

機械的断片化(ソニケーション)

大量のゲノムDNAを処理する場合は、機械的断片化が理想的です。一般的に、DNAは平均500 bp以下の断片サイズにせん断する必要があります。Active MotifのPIXUL[®]のようなマルチサンプルソニケーター(Cat. No. 53130)やEpiShear[™]のようなプローブ型ソニケーター(Cat. No. 53051)がその目的に使用できます。

EpiShear[™] を使用する場合のプロトコール

1. ゲノムDNAを1.5 mL のマイクロチューブに入れ、10 mM Tris-HCl, pH 8を加えて、全量を300 µL にする。一回の処理では、20 µg以上のDNAを使用することを推奨。
2. EpiShear[™]のようなプローブ型ソニケーターでは、氷上で30秒間のパルス『on』を6回行う (EpiShear[™]では、amplitude (出力強度): 45%)。パルス照射間に30秒ずつ休止して氷冷する。断片化したDNAは、2% アガロース電気泳動を行い、サイズを確認する。

Spike-In DNA (10 ng/μL)

オプションのポジティブコントロールSpike-In DNA(10 ng/ μL)は、グルコース化反応に添加する前に断片化したサンプル DNA に添加してください。これにより、5hmCの効率的かつ選択的な回収を確認することが可能になります。Spike-In DNA と断片化したサンプルDNAの比率は、1:10,000 を維持することを推奨します。例えば、25 μg の断片化ゲノム DNA に対して2.5 ngのSpike-In DNA (10 ng/ μL)を利用します。より詳細な手順については[Section A. コントロールSpike-In DNAの使用法](#)(13ページ)をご参照ください。

Spike-In DNA (10 ng/μL)には、5-メチルシトシン (5mC)または5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)を少量混和して増幅した2種類のdsDNA断片が等モル混合されています。

これらの断片は、ウサギIgH遺伝子座から別々に増幅して等モル濃度でプールし、10 ng/μLとして調製したものです。使用直前に希釈し、ストック溶液は凍結して保存してください。

2種類のSpike-In DNA断片の配列は以下のとおりです。

5mC DNA fragment 266 bp sequence:

```
5'TTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAAGTTTAAACTCTAGGAAGGAGGGCCACCAT-  
GACCGAGTGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTACGAATTCGCAGTCG-  
GTGGAGGAGTCCGAGGGAGGCCTGATCAGGCCTGGAGGAACCCTGACACTCACCTGCACAG-  
CCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGGTATGGAGTGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAACGGGCT-  
GGAATGGATCGGATTC3'
```

5hmC DNA fragment 207 bp sequence:

```
5'TTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAAGTTTAAACTCTAGGAAGGAGGGC-  
CACCATGACCGAGTGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTACGAATTCG-  
GCCCTTGTGATGACCCAGACTCCACATTCCACGTCTGCGGCCCGTGGGAGGCACAGTCACCAT-  
CAACTGCCAGTCCAGTCAGA3'
```

5hmC Profilingプロトコール

グルコース化反応(60分)

1. グルコース化反応に必要な試薬の量を以下の表を参考にして、準備する。
2. 各サンプルに、200 μ Lの PCR チューブを用意する。

Sample: 反応液には、DNA断片内の5hmCを β -glucosyltransferaseにより選択的にグルコース化するのに必要な試薬が十分量含まれます。

Negative Control: UDP-Azide-Glucoseドナーを含まないネガティブコントロール反応をサンプルと一緒にを行うことを推奨します。ネガティブコントロールでは5hmCが濃縮されることはありません。

断片化サンプルDNA + Spike-In DNA*: 断片化サンプル DNAの推奨範囲は0.08 μ g から 2.5 μ g です。1サンプルあたり2.5 μ gから開始することをお勧めします。オプションのSpike-In DNAを加える場合は、13ページの[Section A. コントロールSpike-In DNAの使用法](#)を参照してください。

注意: Spike-In DNAと断片化したDNAの合計の総液量は、40 μ Lを超えないようにしてください。

Sterile water: 総液量が50 μ Lになるように滅菌水を加えてください。

3. 各PCRチューブに以下の順序で試薬を加える。

Reagents	Sample	Negative Control
Sterile water	___ μ L	___ μ L
10X Reaction Buffer AM1	5 μ L	5 μ L
UDP-Azide-Glucose	2.5 μ L	—
Fragmented sample DNA + Spike-In DNA*	___ μ L	___ μ L
Beta-glucosyltransferase	2 μ L	2 μ L
Total Volume	50 μL	50 μL

*Spike-In DNAの添加は、オプションです。

4. ピペティングして、溶液をよく混ぜる。PCRチューブのキャップをしっかりと締めて遠心し、液体をチューブの底に集める。
5. 37°Cで1時間反応する。

ビオチン化反応(60分)

6. PCRチューブを軽く遠心して、液体をチューブの底に集める。
7. 20 μ L Biotin Conjugation Solutionを各チューブに加える。

8. PCRのチューブを締め、ボルテックスで溶液をよく混ぜます。再度軽く遠心して、液体をチューブの底に集める。
9. 37°Cで1時間反応する。

ビオチン化DNAの精製(30分)

ビオチン化DNAをSPRIビーズで精製する。サンプル容量(70 μ L) に対して1.5倍のSPRI bead solution (105 μ L)を使用する。

注意: SPRI beads は、使用する30分前には、室温に戻して、使用前には10秒ボルテックスを行い、よく混ぜてから使用してください。

10. 室温に戻し、よく攪拌された105 μ LのSPRI beadsをビオチン化DNAを含む各チューブに加える。
 11. 5-10回程度、ピペティングして混ぜる。
 12. 5分間反応する。
 13. 磁気スタンドに10分間静置する。
 14. 上清を吸って捨てる。
 15. 次の洗浄ステップを2回繰り返す。
 - a. ビーズを側面に残したまま、新しく調製した80%エタノールを200 μ L加える。
 - b. 室温で30秒静置する。
 - c. 上清を捨てる。
 16. チューブの蓋を開けたまま室温に静置し、エタノールを蒸発させる。ビーズが濡れて輝いた状態から、やや乾燥してくすんだ状態になったら(約2-5分)、次のステップに進む。
 17. チューブを磁気スタンドから外し、55 μ L の10 mM Tris HCl, pH 8.0を加えて混合し、2分間静置する。
 18. 磁気スタンドにチューブに2分間静置する。
 19. シーケンスやqPCR用に上清の一部を採取し、inputとして、-20°Cで保存する。
 - a. 5 μ Lの上清を新しいPCRチューブに移す。
 - b. 15 μ LのTT Bufferを加えて、総量20 μ Lにする。
- 注意:** TT Bufferは0.05% Tween-20を含み、DNAのロスを防ぎます。
- c. このDNAを-20°Cで保管する。
20. 残った上清(~50 μ L)を別の新しいPCRチューブに移す。
 21. このDNAは、Capture反応に使うまで-20°Cで保管する。

Capture反応(60分)

Capture反応に使用するStreptavidin Beadsは、必ずボルテックスなどを使ってよく混ぜて使用してください。複数のサンプルを処理する場合には、適宜攪拌しながら使用してください(少なくとも1回は途中で混ぜてください)。

22. サンプルごとに0.2 mLのPCRチューブを用意し、以下の試薬を加える。

Reagents	Sample	Negative Control
Streptavidin Beads	25 μ L	25 μ L
Binding Buffer AM13	25 μ L	25 μ L
Purified Biotinylation Reaction	50 μ L	50 μ L
Total Volume	100 μL	100 μL

23. 室温で1時間、回転式ミキサーを使用して混ぜる。

洗浄と溶出(60分)

洗浄と溶出ステップへ進む前に、10X Elution Buffer AM2にBinding Buffer AM13を加えて1X Elution Bufferを調製しておきます。50 μ L溶出スケールの場合、5 μ L 10X Elution Buffer AM2を45 μ L、Binding Buffer AM13に加えます。

24. Capture 反応が完了後、PCRチューブを軽く遠心してチューブを磁気スタンドに置き、ビーズをチューブ側面に回収する。未結合の画分をさらに解析する場合は、上清を微量遠心チューブに入れ、-20°Cで保管する。そうでない場合は、上清を注意深く取り除く。
25. 次の洗浄ステップ(a-c)を5回繰り返す。
- 200 μ LのBinding Bufferを加える。ビーズがピペットに付着しないように注意しながら、静かに2-3回ピペッティングして再懸濁する(使用するスタンドの磁力によっては、ビーズを完全に再懸濁させるために磁気スタンドからチューブを外す必要があるかもしれません)。
 - チューブを磁気スタンドに置き、チューブ側面に集まるのを待つ。
 - 上清や、残った泡を注意深く取り除く。
26. 5回の洗浄後、ビーズに50 μ Lの1X Elution Bufferを加えて、2-3回ピペッティングして再懸濁する。
27. 液体が混ざるように、回転式チューブミキサーなどを使って、室温で、30分間インキュベーションする。
28. チューブを軽く遠心して、キャップに残った液体をチューブに回収する。
29. チューブを磁気スタンドに置き、ビーズをチューブ側面に回収する。
30. 濃縮されたDNAを含む上清を新しいチューブに移す。
31. 回収した濃縮DNAを精製する(次のステップ)。

濃縮DNAの精製(30分)

濃縮DNAに1.5倍相当の75 μ L SPRI bead solutionを加えて、SPRI beads精製を行う。

注意: SPRI beadsは、使用する30分前には室温に戻し、使用前には10秒ボルテックスを行い、よく混ぜてから使用してください。

32. ビオチン化したDNAを含むチューブに、よく懸濁した室温のSPRI beads を75 μ L加える。
33. ピペティングを5-10回行い、よく混ぜる。
34. 5分間室温でインキュベーションする(訳注:攪拌は不要)。
35. 磁気スタンドにチューブを10分間静置し、チューブ側面にビーズを回収する。
36. 上清を除く。
37. 以下の洗浄ステップを2回繰り返す。
 - a. ビーズをチューブ側面に残したまま、200 μ Lの新しく調製した80%エタノールを加える。
 - b. 室温で30 秒間静置する。
 - c. 上清を捨てます。
38. チューブの蓋を開けたまま室温に静置し、エタノールを蒸発させる。ビーズが濡れて輝いた状態から、やや乾燥してくすんだ状態になったら(約2-5分)、次のステップに進む。
39. チューブを磁気スタンドから外し、20 μ LのTT Bufferを加えて混合し、2分間静置する。
40. 磁気スタンドにチューブを2分間静置する。
41. 上清を新しいPCRチューブに移す。
42. 長期保管する場合には、核酸低吸着性チューブに入れ、-20°Cで保管します。

解析

1. Qubitなどの蛍光定量システムを用いて5hmC 濃縮 DNA を定量します。サンプル中の5hmCの含量によっては、Nanodropなどの測定法ではDNAを正確に定量できない場合があるので、サンプルが選択した測定法の検出可能範囲内にあることを確認してください。
2. 必要であれば、ライブラリー調製前に濃縮のチェックとしてリアルタイムPCR解析を行います。qPCRには2 μ LのプルダウンDNAを、NGSライブラリー調製には18 μ LのプルダウンDNAの使用をお勧めします。オプションのSpike-In DNAを使用した場合は、付属のプライマーミックスを使用し、[Appendix, Section A. コントロールSpike-In DNAの使用法](#) (13 ページ)の内容に従ってqPCRを行い、濃縮が成功したかどうかを判定します。あるいは、DNAサンプル中の目的のターゲットを増幅することもできます。ただし、増幅条件は、各標的遺伝子座、マスターミックス、装置に合わせて最適化する必要があります。

- ライブラリー調製は、使用するシーケンサーのプラットフォームに対応した推奨される方法で実施してください。この工程では、dsDNA断片の末端にアダプターが付加されます。その後、ライブラリーをPCRにより増幅し、シーケンス前に検証するステップを含みます。ライブラリー調製には市販の各種キットを使用できますので、各メーカーの推奨に従ってください。Active Motifの5hmC Profiling Kitから得られた濃縮DNAは、Illumina[®]シーケンシングプラットフォームで解析できることを検証しています。各サンプルのベースラインピークを決定するために、Input DNAをシーケンスすることもできます。

Appendix

Section A. コントロールSpike-In DNAの使用法

本キットには、濃縮効率と特異性を確認するためのオプションとして、5-メチル化(5mC)および5-ヒドロキシメチル化(5hmC) DNAを含むコントロールが同梱されています。このSpike-In DNAは10 ng/ μ Lで提供されます。Spike-In DNAをサンプルDNAに添加すると、5hmCを含む断片はグルコース化反応とビオチン化反応を受け、ストレプトアビジンビーズに捕捉されます。対照的に、5mCを含む断片はこれらの反応を受けず、バックグラウンドシグナルを与えるのみです。溶出・精製後、付属のプライマーミックスを用いてリアルタイムPCR法でDNAを解析することにより、捕捉効率を確認することができます。Spike-In DNAの断片配列はウサギのゲノムDNAに由来するため、ヒトおよびマウスゲノムDNAのcapture反応には干渉しません。

各グルコース化反応では、断片化したサンプルDNA (ng)に対してSpike-In DNA (ng)を1:10,000の割合で使用することを推奨します。断片化したサンプルDNAに加える前に、まずSpike-In DNAを希釈する必要があります。以下に、サンプル濃度範囲別のSpike-In DNAの希釈に関する推奨事項を示します。

Inputが20 – 200 ngの断片化DNAの場合:

1. Spike-In DNAの1:10,000希釈液を調製する。
 - a. 0.2 mLのPCRチューブを3本用意し、それぞれの希釈率(1:100、1:1,000、1:10,000)がわかるように書き込む。
 - b. 1:100のチューブに198 μ Lの10mM Tris HCl, pH 8、および2 μ LのSpike-In DNA (10 ng/ μ L)を加える。
 - c. ボルテックスで3秒攪拌し、軽く遠心する。
 - d. 1:1000のチューブに90 μ Lの10mM Tris HCl, pH 8および10 μ Lの1:100に希釈したSpike-In DNAを加える。
 - e. ボルテックスで3秒攪拌し、軽く遠心する。
 - f. 1:10,000 のチューブに 90 μ L 10mM Tris HCl, pH 8 および 10 μ L の1:1000に希釈したSpike-In DNAを加える。
 - g. ボルテックスで3秒攪拌し、軽く遠心する。
 - h. この1:10,000のチューブは、Spike-In DNAの濃度が 0.001 ng/ μ Lとなる。

2. 以下の式を用いて、希釈したSpike-In DNA (0.001 ng/μL)をサンプル DNA (S)に加え、Spike-In DNAとサンプルDNAの比率を1:10,000にする量(V)を算出できる:

$$V [\mu\text{L}] = \frac{\left(\frac{S}{10,000} [\text{ng}]\right)}{0.001 [\text{ng}/\mu\text{L}]} = \frac{S \times 10^{-4}}{10^{-3}} = 0.1 \times S [\mu\text{L}]$$

例えば、25 ngの断片化したサンプルDNA (S)をグルコース化反応に使用する場合には、1:10,000に希釈したSpike-In DNA (0.001 ng/μL)を2.5 μL (つまり2.5 pg)添加します。

注意: Spike-In DNAと断片化したDNAの合計量は、1サンプルあたり40 μLを超えないようにしてください。

Inputが200 – 2000 ngの断片化DNAの場合:

1. Spike-In DNAの1:1000希釈液を調製する。
 - a. 0.2 mLのPCRチューブを2本用意し、それぞれの希釈率(1:100、1:1,000)がわかるように書き込む。
 - b. 1:100のチューブに198 μLの10mM Tris HCl, pH 8、および2 μLのSpike-In DNA (10 ng/μL)を加える。
 - c. ボルテックスで3秒撹拌する。
 - d. 卓上遠心機で軽く遠心する。これで、チューブ内のSpike-In DNAの濃度は0.1 ng/μLとなる。
 - e. 1:1000のチューブに90 μLの10mM Tris HCl, pH 8および10 μLの1:100に希釈したSpike-In DNAを加える。
 - f. ボルテックスで3秒撹拌する。
 - g. 卓上遠心機で軽く遠心する。これで、チューブ内のSpike-In DNAの濃度は0.01 ng/μLとなる。
2. 以下の式を用いて、希釈したSpike-In DNA (0.01 ng/μL)をサンプル DNA (S)に加え、Spike-In DNAとサンプルDNAの比率を1:10,000にする量(V)を算出できる:

$$V [\mu\text{L}] = \frac{\left(\frac{S}{10,000} [\text{ng}]\right)}{0.01 [\text{ng}/\mu\text{L}]} = \frac{S \times 10^{-4}}{10^{-2}} = 0.01 \times S [\mu\text{L}]$$

例えば、250 ngの断片化したサンプルDNA (S)をグルコース化反応に使用する場合には、1:1,000で希釈したSpike-In DNA (0.01 ng/μL)を2.5 μL (つまり25 pg)添加します。

注意: Spike-In DNAと断片化したDNAの合計量は、1サンプルあたり40 μLを超えないようにしてください。

Section B. Spike-In DNAのqPCR推奨条件

Spike-In DNA (10 ng/ μ L)には、5-メチルシトシン(5mC)または5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)を少量混合して増幅した2種類のdsDNA断片が等モル混合されています。ライブラリー調製とシーケンスに進む前の濃縮効率の確認は、これらのSpike-In DNAを標的としたqPCRにより決定することができます。

Spike-In QCをシーケンス用に作製したライブラリーと組み合わせて使用するには、以下のプロトコールに従ってください。Inputおよびブルダウンして濃縮したサンプルDNAの10%(容量)をqPCR解析に使用します。残りのサンプルはライブラリー調製に使用してください。

注意: サンプルおよびInputのqPCRは、triplicatesで実施することを推奨します。

1. PCRチューブに48 μ LのTT Buffer を入れ、そこに2 μ LのInput DNAを加える(Step 19でInput用に保存したDNA)。
2. ボルテックスで攪拌し、軽く遠心する。
3. 別のPCRチューブに48 μ LのTT Bufferを入れ、そこに2 μ Lの濃縮DNAを加える(Step 42で保存した濃縮DNA)。
4. ボルテックスで攪拌し、軽く遠心する。
5. サンプルと同数の以下の試薬類を、それぞれ5mC用と5hmC用として準備する。

Reagent	20 μ L PCR reactions
Fast SYBR Green master mix	10 μ L
5mC or 5hmC Primer Mix*	2 μ L
Sterile water	3 μ L
DNA sample (eluted or Input)	5 μ L
Total Volume	20 μL

*PCR Primer Mixには、コントロールDNAの増幅のためのForwardとReverse両方のプライマーが含まれています。上記のPCRプロトコールの20 μ Lの反応スケールに対し適切なPCR Primer Mix(5mCまたは5hmC)を2 μ L使用します。

6. リアルタイムPCR装置にチューブをセットし、以下のようにプログラムする。増幅条件は各ターゲットの遺伝子座、マスターミックス試薬、PCR装置に合わせて最適化する。初期の推奨条件は以下の通り:

Step	Protocol
1	95 °C for 2 minutes
2	95 °C for 10 seconds
3	65 °C for 30 seconds

Repeat 40x

Section C. % Inputの計算法

% Inputの計算法:

各サンプルについてtriplicate (n=3)で実施したPCRのCT値の平均を取ります。InputのCT値の平均から-3.32を引き、プルダウンに対するInput量を補正します。ターゲットあたりの% Inputは以下の計算を使用します:

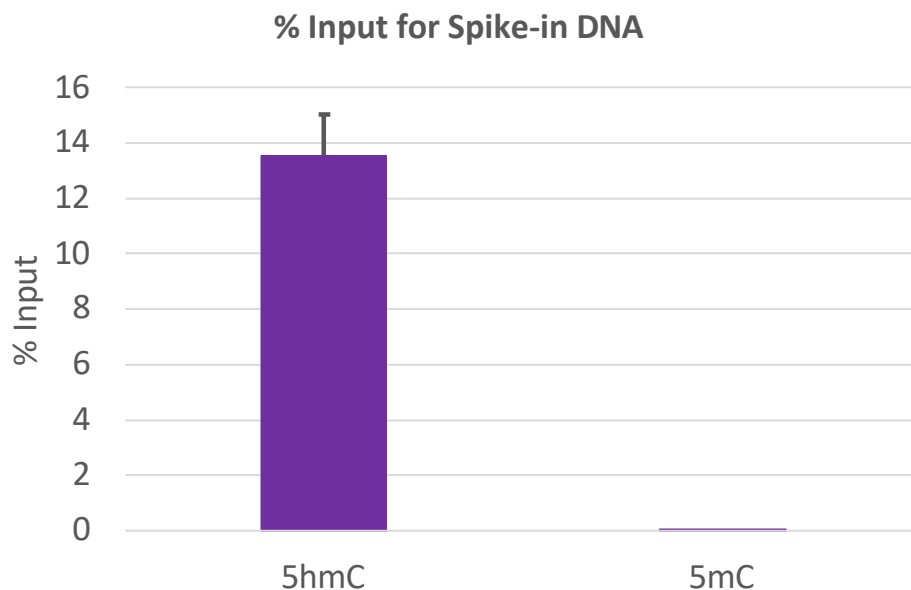
$$\% \text{ Input} = \left(2^{-(\text{Avg Pulldown Ct} - \text{Avg Input Ct})} \right) \times 100$$

Spike-In DNAを使ったQCにおける、弊社の推奨する成否の基準は、以下のとおりです:

% Input 5hmC > 9.5% (5hmCが濃縮できている)

% Input 5mC < 1%

以下は、Spike-In DNA濃縮のデータ例です。この実験では、310 ngのマウス脳gDNAに31 pgのSpike-In DNAを添加し(1:10,000)、triplicateで5hmC Profiling Kitのプロトコールを実施しました。Input DNA と濃縮後DNAの両方に5mCまたは5hmC プライマーミックスを使用してRT-PCRを行っています。グラフは、各反応の平均CT値を用いて%Inputを計算し、棒グラフで示しています。5hmCと5mCの濃縮度は、それぞれ13.52%と0.02%でした。



トラブルシューティング

Problem/Question	Recommendation
メチル化DNAの濃縮ができな い、もしくはほとんどできていな い。	5hmC Profiling Kitは、1反応あたり0.08~2.5 µgの断片化DNA (<500 bp)での使用に最適化されています。5hmCが少ないサンプルの場合、1反応あたり、より多くのサンプルが必要な場合があります。2.5 µg以上を使用する場合は、複数に分けて実施し、濃縮DNAの精製時にサンプルをプールしてください。
	実験を開始する前に、それぞれの試薬が「Bufferの調製」欄の手順に従って調製されていることを確認してください。試薬は記載された順序で加えてください。
DNAの断片化には、制限酵素と ソニケーションのどちらを使うべ きか？	制限酵素による消化は非常に正確で再現性が高いという利点があります。しかし、DNAは高度に精製されている必要があり、複数の遺伝子座を解析するには異なる酵素の使用が必要なこともあります。また、目的の領域が使用する制限酵素の認識配列で挟まれていない可能性がある他、一塩基多型(SNPs)によりタイプの異なる細胞では切断部位が異なる可能性があるため、混乱した結果を生じる可能性があります。対照的に、ソニケーションはDNAをランダムに断片化するため、多くの遺伝子座を同時に解析することが可能です。
DNAを断片化するために使用 した制限酵素を除去するため に、熱不活性化を行うべき か？	制限消化後は、サンプルを65°Cで20分間処理することを推奨します。一部の酵素(Mse Iなど)はこの処理で不活性化されませんが、不活性化しない酵素もDNAから強制的に排除されます。ほとんどの場合(熱不活性化されていない酵素を使用する場合でも)、このように処理したDNAは5hmC Profiling Kitのプロトコールに使用するのに適していると考えられます。ただし、状況によっては(例えば、断片化するDNAに細胞由来のタンパク質が混入している場合や、消化に大量の制限酵素が必要な場合)、精製カラムやフェノール抽出/エタノール沈殿により断片化DNAを精製することが望ましい場合があります。

テクニカルサポート

ご不明な点などありましたら、以下のテクニカルサポートまでご連絡ください。

アクティブ・モティフ株式会社
テクニカルサポート

E-mail: japantech@activemotif.com
Tell: 03-5225-3638
Fax: 03-5261-8733