

## IV. 各解析に共通の試薬・キット

### A. DNA 抽出

- ◆簡便な操作で高純度ゲノム DNA を抽出
- ◆各種 DNA メチル化解析に

#### • NucleoSpin® Tissue

##### **【1】製品説明**

NucleoSpin® Tissue は、培養細胞（ $10^2 \sim 10^7$  個）や動物組織（1~25 mg）、バクテリア、酵母などから、遠心操作により簡便かつ迅速に高純度のゲノム DNA を調製するためのスピニングタイプのキットです。

35  $\mu$ g までの高純度ゲノム DNA を調製可能です（組織、細胞からの一般的収量：15~25  $\mu$ g）。

サンプルの溶解は SDS と Proteinase K を含む溶液中で 56°C で行います。溶解液にカオトロピック塩 (Binding Buffer B3) とエタノールを加え、NucleoSpin® Tissue Column のシリカ膜への DNA の結合を最適化します。シリカ膜への結合は可逆的で核酸に特異的であるため、不純物は洗浄バッファーにより効果的に除くことができます。高純度のゲノム DNA は最終的に低イオン、弱アルカリ性の Elution Buffer により溶出され、PCR やサザンブロット、酵素反応など次の実験に直接使用することができます。

##### **【2】プロトコール**

ゲノム DNA の必要量は、解析手法によって異なります。例えば、EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit による 1 回の濃縮には、約 1  $\mu$ g のゲノム DNA を使用します。また、MethylEasy™ Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit による 1 回の処理には、50 pg~5  $\mu$ g のゲノム DNA を用います。なお、抽出したゲノム DNA は、4°C にて冷蔵保存し、後の解析に用いることも可能です。DNA 抽出法の詳細は、NucleoSpin® Tissue の製品説明書をご参照ください。

##### **【3】製品リスト**

NucleoSpin® Tissue (製品コード 740952.10/50/250)

## B. RNA 抽出

- ◆簡便な操作で高純度 total RNA を抽出
- ◆遺伝子発現解析に

### ・ [NucleoSpin® RNA](#)

#### 【1】製品説明

NucleoSpin® RNA は、培養細胞（ $\sim 5 \times 10^6$  個）や動物組織（ $\sim 30$  mg）、バクテリア、酵母などから、遠心操作により簡便かつ迅速に高純度 total RNA を調製するためのスピнкаラムタイプのキットです。付属の NucleoSpin® Filter により、サンプル溶解液の清澄化と粘度の低減が可能です。また、添付の DNase I を用いてオンカラム処理を行うことにより、効果的にゲノム DNA の除去を行うことができます。

$10^6$  個の HeLa 細胞から約  $14 \mu\text{g}$  の total RNA を調製できます。

#### 【2】プロトコール

total RNA の必要量は、解析手法によって異なります。例えば、リアルタイム RT-PCR には、1 反応当たり  $10 \sim 50$  ng (total RNA 相当量) の cDNA を使用します。また、マイクロアレイ解析には、約  $2 \mu\text{g}$  の total RNA を用います。なお、抽出した total RNA は、 $-80^\circ\text{C}$  にて凍結保存し、後の解析に用いることも可能です。RNA 抽出法の詳細は、NucleoSpin® RNA の製品説明書をご参照ください。

#### 【3】製品リスト

[NucleoSpin® RNA \(製品コード 740955.20/50/250\)](#)

## C. コントロールメチル化 DNA

- ◆すぐに使えるメチル化された Human genomic DNA
- ◆各種 DNA メチル化解析のコントロールに

### ・ [EpiScope® Methylated HeLa gDNA](#)

#### 【1】製品説明

本製品は、CpG methylase を用いて高度にメチル化した HeLa 細胞由来ゲノム DNA です。さまざまな DNA メチル化解析において、ポジティブコントロールとして使用することができます。

#### 【2】実験例

HeLa S3 細胞から調製したゲノム DNA  $500$  ng を MethylEasy™ Xceed を用いてバイサルファイト処理し、処理後のゲノム DNA 溶液  $20 \mu\text{l}$  を得た。また、メチル化 DNA のポジティブコントロールとして EpiScope® Methylated HeLa gDNA  $500$  ng も同様にバイサルファイト処理した。処理後のゲノム DNA 各  $1 \mu\text{l}$  を鋳型として、CDH1、CDKN2A および MLH1 の CpG アイランド領域の一部を TaKaRa Taq™ Hot Start Version を用いて PCR で増幅し、クローニング後にそれぞれ 24 クローンについてシーケンス解析を行った。結果の解析には、理化学研究所から提供されている QUMA (Quantification tool for Methylation Analysis、<http://quma.cdb.riken.jp/>) を利用した。

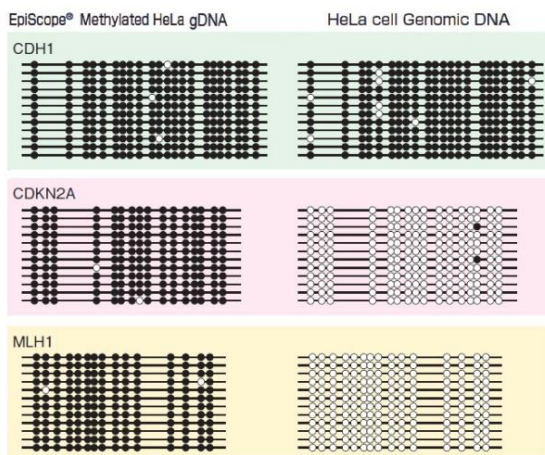


図1. バイサルファイトシーケンス解析結果

バイサルファイトシーケンス解析の結果、実験に使用した HeLa S3 細胞の CDH1 の CpG アイランドはメチル化状態であり、CDKN2A と MLH1 の CpG アイランドは非メチル化状態であることが分かった。一方、コントロールに使用した EpiScope® Methylated HeLa gDNA の CpG 配列のシトシンメチル化率は 98.9%となり、ほぼ完全にメチル化されていることが確認された。

### 【3】製品リスト

[EpiScope® Methylated HeLa gDNA \(製品コード 3520\)](#)