

# CUGA<sup>®</sup> Sequencing Kit

---

for ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer

## ユーザーズマニュアル

Ver. 2.3

- CUGA<sup>®</sup>3 Sequencing Kit
- CUGA<sup>®</sup>7 Sequencing Kit
- CUGA<sup>®</sup>7 Sequencing Set Up Kit
- CUGA<sup>®</sup>7 and 3 Sequencing Pack



# はじめにお読みください

---

このたびは、弊社製品をお買いあげいただき、誠にありがとうございます。  
本製品をお使いいただく前に、以下の事項にご注意ください。

## 【使用上の注意】

1. 本製品は、試験研究用です。医療行為および臨床診断薬としては使用できません。
2. 本製品で指定している DNA シークエンサーは、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer です。
3. 本製品は、日本国内のみ有効です。日本国内で購入した本製品を海外で使用する場合は、使用許諾を与えるものではありません。
4. 本製品のお取扱いは、本ユーザーズマニュアルの記載内容通りにおこなってください。マニュアルの記載内容と異なったお取り扱いによるトラブルにつきましては、弊社では責任を負いかねますのでご注意ください。
5. 本製品に含まれている化合物、および本製品に含まれていない試薬、化合物を併用しての使用は、化合物の危険性に関して、十分な知識が必要です。十分な知識がない場合は、ご使用になれません。
  - 実験中は、白衣、保護メガネ、手袋等で体を試薬から保護し、皮膚等に直接触れないようにご注意ください。万一皮膚等に触れた場合、直ちに 15 分間以上流水で洗い流してください。
  - 本製品の操作ではエタノールを使用します。エタノールは引火性ですので、取扱いには十分にご注意ください。
6. 本製品は、-20 で保存してください。過冷却は避けてください。
7. 本製品の有効期限は、受取日から 3 ヶ月です。

本製品の安全な取扱いおよび使用方法については、(株)ニッポンジーンテック ホームページに Material Safety Data Sheet を公開していますので、ご参照ください(URL: <http://www.nippongenetech.com/MSDS.htm>)。

本製品は、理化学研究所の「マウスエンサイクロペディア計画」プロジェクトの推進の過程で開発されたものです。

このユーザーズマニュアルの記載内容は2005年5月現在のもので、記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なしに変更する場合があります。最新のユーザーズマニュアルは(株)ニッポンジーンテック ホームページ(URL: <http://www.nippongenetech.com/cuga/file.htm>)から入手してください。

---

## 本製品に関するお問い合わせ先

---

### 株式会社ニッポンジーン学術営業部

Tel 076 (451) 6548  
Fax 076 (451) 6547  
E-mail [info@nippongene.com](mailto:info@nippongene.com)

---

\* (株)ニッポンジーンテック製品に関しては、(株)ニッポンジーンで取り扱っておりますので、上記(株)ニッポンジーン学術営業部へお問い合わせください。

# 目次

---

---

はじめにお読みください	1
製品内容	3
品質管理	4
内容説明	5
製品以外に必要な試薬、機器	6
マトリックスファイルの作成	7
(ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer のセットアップ)	7
(マトリックススタンダードの準備)	7
(マトリックスファイルの作成手順)	8
マトリックスファイル作成のトラブルシューティング	11
<i>CUGA</i> ® シークエンシングプロトコル	12
(ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer のセットアップ)	12
(鋳型 DNA の準備)	13
鋳型 DNA の調製方法	13
プラスミド DNA を鋳型にする場合	13
PCR 産物を鋳型にする場合	14
コントロール DNA (pTS1) について	14
(シークエンス反応)	15
(反応後の精製(エタノール沈殿))	16
(シークエンス・ランの手順)	17
<i>CUGA</i> ® シークエンシングのトラブルシューティング	19
参考文献	21
<b>付録 1</b> コントロール DNA (pTS1) の塩基配列 / T3 プロモーター配列側	22
<b>付録 2</b> コントロール DNA (pTS1) の塩基配列 / T7 プロモーター配列側	23

## 製品内容

本製品を使用される際には、必ず製品内の試薬の有無をご確認後、本ユーザーズマニュアルにしたがってご使用ください。欠品等がある場合には、お手数ですが、代理店または和光純薬工業(株)までお問い合わせください。

### 【製品内容】(for ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer)

製品構成	CUGA®3 Sequencing Kit		CUGA®7 Sequencing Kit		CUGA®7 Sequencing Set Up Kit	CUGA®7 and 3 Sequencing Pack
	24 反応	5 反応	24 反応	5 反応	5 反応	各 5 反応
ユーザーズマニュアル	1 冊	1 冊	1 冊	1 冊	1 冊	1 冊
簡易マニュアル	1 枚	1 枚	1 枚	1 枚	1 枚	1 枚
5 × Reaction Buffer	100 μL × 1 本	20 μL × 1 本	100 μL × 1 本	20 μL × 1 本	20 μL × 1 本	20 μL × 2 本
MnCl <sub>2</sub> Solution	25 μL × 1 本	5 μL × 1 本	25 μL × 1 本	5 μL × 1 本	5 μL × 1 本	5 μL × 2 本
NTP/Terminator Mixture	50 μL × 1 本	10 μL × 1 本	50 μL × 1 本	10 μL × 1 本	10 μL × 1 本	10 μL × 2 本
CUGA®3 Enzyme Solution	3 μL × 1 本	2 μL × 1 本	-	-	-	2 μL × 1 本
CUGA®7 Enzyme Solution	-	-	3 μL × 1 本	2 μL × 1 本	2 μL × 1 本	2 μL × 1 本
Enzyme Dilution Buffer	26 μL × 1 本	6 μL × 1 本	26 μL × 1 本	6 μL × 1 本	6 μL × 1 本	6 μL × 2 本
Control DNA (50ng/ μL)	16 μL × 1 本	5 μL × 1 本	16 μL × 1 本	5 μL × 1 本	5 μL × 1 本	5 μL × 2 本
Matrix Standard (C)	-	-	-	-	4 μL × 1 本	-
Matrix Standard (U)	-	-	-	-	4 μL × 1 本	-
Matrix Standard (g)	-	-	-	-	4 μL × 1 本	-
Matrix Standard (A)	-	-	-	-	4 μL × 1 本	-

本製品内の試薬は、全て-20 で保存してください。過冷却は避けてください。

本製品は、受取日から3ヶ月以内に使用するようになっています。

本製品に含まれている試薬は必ず氷上で取り扱ってください。失活するおそれがあります。

**重要** 本製品を用いて ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer で解析する際、最初に Matrix Standard Set Up Kit (for ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer) を使用してマトリックスファイルを作成する必要があります。CUGA®3 (CUGA®7) Sequencing Kit、CUGA®7 and 3 Sequencing Pack には Matrix Standard Set Up Kit は含まれておりませんので、お求めの際は、以下の製品を販売元の和光純薬工業(株)までお問い合わせください。

### 【関連製品】Matrix Standard Set Up Kit (for ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer)

製品構成	内量
Matrix Standard (C)	1 × 4 μL
Matrix Standard (U)	1 × 4 μL
Matrix Standard (g)	1 × 4 μL
Matrix Standard (A)	1 × 4 μL

## 品質管理

---

検定用鑄型として T3、T7 プロモーターを含むプラスミド DNA pTS1 を用いて本製品の検定をおこない、下記の基準以上の性能を持つことを確認しています。

読み取り精度: 99.5% / 400base

巻末付録「Control DNA (pTS1) の塩基配列」参照

# 内容説明

## 【CUGA<sup>®</sup>シーケンシングの概要】

CUGA<sup>®</sup>シーケンシングとは、*in vitro*転写反応を利用した塩基配列決定法である「転写シーケンス法」を(株)ニッポンジーンテックが独自に改良、製品化した、画期的なシーケンシングシステムです。

### CUGA<sup>®</sup>シーケンシングの主な特長

#### 1. PCR産物を精製することなく、そのままシーケンス反応への持ち込みが可能

PCR反応後の未反応分のdNTPを取り込まないので、PCR後の精製は不要です。

#### 2. 従来法では解析困難であった塩基配列に対して、比類無いパフォーマンスを発揮

鋳型DNAの一本鎖への熱変性が不要なので、シーケンス反応の障害となる高次構造を形成することなく、シーケンス反応をスムーズにおこなうことができます。

#### 3. 等温(37℃)、短時間(1時間)での反応可能

サーマルサイクラーは不要で、さらに短時間で反応を行えるため、経費と時間が節約できます。

原理的には、Sanger, F.らのジデオキシターミネーター法を基礎にしており、ターミネーターが蛍光色素で標識されているため、現在、塩基配列決定のために使用されているDNAシーケンサーに簡単なセットアップ後、解析作業をおこなうことができます。なお、ターミネーターにラベルされた蛍光色素には、Molecular Probes<sup>™</sup>社製のBODIPY<sup>®</sup> Dyeを採用しています。

## 【CUGA<sup>®</sup>RNAポリメラーゼとは】

CUGA<sup>®</sup>RNAポリメラーゼとは、*in vitro*転写反応を利用して塩基配列を決定する「転写シーケンス法」に用いるために開発されたRNAポリメラーゼで、プロモーター特異性が高く、且つポリメラーゼ活性の高い、大腸菌ファージT3またはT7 RNAポリメラーゼをもとに、*in vitro* mutagenesisを用いて変異導入された独自の酵素です(特許出願中)。

この酵素は、3'-デオキシヌクレオチドの取り込み効率が改善されており、更に新生RNAとの親和性を低く抑えるような変異を導入したことにより、ノイズの少ない、非常に鮮明な解析結果を得ることに成功しました。これにより、現在普及している蛍光色素で標識されたターミネーターを用いたDNAシーケンサーによる解析に適応できるようになりました。

さらにCUGA<sup>®</sup>3、CUGA<sup>®</sup>7 Sequencing Kitの併用により、ターゲットDNAの両側にT3、T7プロモーターが付加した構造の鋳型DNAの両鎖からのシーケンシングが可能となりました(詳しくは、p.13(鋳型DNAの準備)をご覧ください)。

CUGA<sup>®</sup>RNAポリメラーゼは、本製品中のCUGA<sup>®</sup>3 (CUGA<sup>®</sup>7) Enzyme Solutionに含まれています。CUGA<sup>®</sup>3 (CUGA<sup>®</sup>7) Enzyme Solutionとは、CUGA<sup>®</sup>3 (CUGA<sup>®</sup>7) RNAポリメラーゼを転写シーケンス法用に独自に最適化した酵素溶液です。

## 製品以外に必要な試薬、機器

---

### 【シーケンス反応】

水 (ddH<sub>2</sub>O)

蒸留した脱イオン水をオートクレーブで 121、40 分の滅菌処理したものをご使用ください。

インキュベーター

37 を一定時間(1 時間)保つことのできるものがが必要です。本製品では、気相式インキュベーターのご使用をお勧めします。液相式やヒートブロック式インキュベーターの場合、加温時にチューブの上方部分が均等に加温されないために水滴が付着し、反応液の濃度が変化することがありますのでご注意ください。

### 【エタノール沈殿】

0.1M EDTA・2Na (pH8.0)

シーケンス反応後、シーケンス反応産物を精製する際のエタノール沈殿操作時に使用します。pH 調整後、オートクレーブで 121、40 分間の滅菌処理したものをご使用ください。

エタノール

シーケンス反応後、シーケンス反応産物を精製する際のエタノール沈殿操作時に使用します。エタノールは、必ず JIS 試薬特級のものをご使用ください。また、変性アルコールは絶対に使用しないでください。

遠心機

エタノール沈殿操作時に使用します。

TSR または、Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems 社製)

泳動サンプルの溶解に使用します。

### 【電気泳動】

DNA シークエンサー

本製品で指定している DNA シークエンサーは、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer です。

ポリマー

ポリマーは、必ず Applied Biosystems 社製 POP-6™ をご使用ください。POP-4™ には対応していませんのでご注意ください。

バッファー

泳動バッファーは、Applied Biosystems 社製 10 × Genetic Analyzer Buffer with EDTA をイオン交換水で 10 倍に希釈したものをご使用ください。

### 【DyeSet/Primer ファイル】

DT POP6

「Sample Sheet」の設定の際に必要なファイルです。お使いの ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer の“DT POP6”がインストールされていない場合、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer 付属の Collection Software インストール用 CD で再インストールしてください。インストール CD に含まれていない場合は、DT POP6 Module File を、Applied Biosystems 社から入手してください。

# マトリックスファイルの作成

---

既にマトリックスファイルを作成した方は、11 ページ以降の「*CUGA*<sup>®</sup> シークエンシングプロトコル」をお読みください。

*CUGA*<sup>®</sup> Sequencing を初めておこなわれる前に、マトリックスファイルを作成する必要があります。マトリックスファイルの作成は、それぞれの DNA シークエンサーに蛍光色素の特性、補正値を設定するものです。

ご使用の ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer およびソフトウェアで、Matrix Standard Set Up Kit (for ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer) に含まれている 4 種類の「Matrix Standard」をそれぞれ電気泳動し、ファイルに読み込むことおこないます。

## (ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer のセットアップ)

本製品は、Applied Biosystems 社製 POP-6<sup>™</sup> を使用します。ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer への POP-6<sup>™</sup>、泳動バッファー、キャピラリー等の装填および機器調整については、ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer 付属の操作ガイドをご参照ください。

**重要**ポリマーは、必ず Applied Biosystems 社製 POP-6<sup>™</sup> をご使用ください。POP-4<sup>™</sup> には対応していませんのでご注意ください。

## (マトリックススタンダードの準備)

マトリックスファイルを作成する前に、弊社製品の「Matrix Standard Set Up Kit (for ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer)」をご用意ください。*CUGA*<sup>®</sup>3 (*CUGA*<sup>®</sup>7) Sequencing Kit、*CUGA*<sup>®</sup>7 and 3 Sequencing Pack には Matrix Standard Set Up Kit は含まれておりませんので、お求めの際は、販売元の和光純薬工業(株)までお問い合わせください。



## 〈マトリックスファイルの作成手順〉

ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer の操作やソフトウェアの詳細については、装置付属の操作ガイドにしたがってください。

### Sample Sheet の設定

- (1) “ABI PRISM® 310 collection” を起動させ、「Sample Sheet」を開きます。
- (2) [Dye Set/Primer]の項目は[DT POP6 <sup>注1</sup>]を選択、[Matrix]の項目は[<none>]を選択します。

Sequence Analysis Sample Sheet				
#	Sample Name	Dye Set/Primer	Matrix	Comment
A1	Matrix-C	DT POP6	<none>	
A3	Matrix-U	DT POP6	<none>	
A5	Matrix-g	DT POP6	<none>	
A7	Matrix-A	DT POP6	<none>	

### マトリックススタンダードサンプルの準備

- (3) Matrix Standard Set Up Kit に含まれている4種類の各「Matrix Standard」の試薬チューブに、直接以下の容量の TSR <sup>注2</sup>または、Hi-Di™ Formamide <sup>注3</sup>を加え、ボルテックスにより十分に溶解させます。その後、全量をサンプルチューブに移し替えて、サンプルトレイにセットします。

#### 【TSR に溶解する場合】

Matrix Standard (each)	4.0 μL
TSR <sup>注2</sup>	20.0 μL
Total	24.0 μL

#### 【Hi-Di™ Formamide に溶解する場合】

Matrix Standard (each)	4.0 μL
Hi-Di™ Formamide <sup>注3</sup>	30.0 μL
Total	34.0 μL

### Injection List の設定

- (4) 「Injection List」を立ち上げ、(2)で作成した「Sample Sheet」を選択します。
- (5) [Module]の項目は、47cm キャピラリーの場合には[Seq POP6 Rapid (1mL) A <sup>注4</sup>]、61cm キャピラリーの場合には[Seq POP6 (1mL) A <sup>注4</sup>]を選択します。インジェクション時間・電圧、シークエンス・ラン等の条件はTSRに溶解したシークエンス反応産物の場合は、[Module]の設定値のままでおこないます。Hi-Di™ Formamide に溶解したシークエンス反応産物の場合は、インジェクション時間を 15 秒にして、そのほかの条件は、設定値のままでおこないます。

注 1 : お使いの ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer に“DT POP6”がインストールされていない場合、装置付属の Collection Software インストール用 CD で再インストールしてください。インストールCDに含まれていない場合は、DT POP6 Module File を、Applied Biosystems 社から入手してください。

注 2,3 : TSR、Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems 社製) は、Matrix Standard Set Up Kit には含まれておりませんので別途、ご用意ください。  
Hi-Di™ Formamide は劣化するとシークエンス精度に影響を与えるおそれがありますので、なるべく新しいものをお使いください。  
TSR または、Hi-Di™ Formamide に溶解したサンプルを保存する場合は、冷凍で数週間、室温で48時間安定です。

注 4 : 本製品はフィルターセット A のみ対応しています。フィルターセット E は使用できません。

**【TSR に溶解したシーケンス反応産物を解析する場合】**

\* 47cm キャピラリーの場合

Inj.#	Tube & Sample Name	Module	Inj. Secs	Inj. kV	Run kV	Run	Run Time	Auto Anlz.	Auto Prt.	Finish Time
1	A1-Matrix-C	Seq POP6 Rapid (1mL) A	30	2.0	15.0	50	36			
2	A3-Matrix-U	Seq POP6 Rapid (1mL) A	30	2.0	15.0	50	36			
3	A5-Matrix-g	Seq POP6 Rapid (1mL) A	30	2.0	15.0	50	36			
4	A7-Matrix-A	Seq POP6 Rapid (1mL) A	30	2.0	15.0	50	36			

\* 61cm キャピラリーの場合

Inj.#	Tube & Sample Name	Module	Inj. Secs	Inj. kV	Run kV	Run	Run Time	Auto Anlz.	Auto Prt.	Finish Time
1	A1-Matrix-C	Seq POP6 (1mL) A	30	2.5	12.2	50	120			
2	A3-Matrix-U	Seq POP6 (1mL) A	30	2.5	12.2	50	120			
3	A5-Matrix-g	Seq POP6 (1mL) A	30	2.5	12.2	50	120			
4	A7-Matrix-A	Seq POP6 (1mL) A	30	2.5	12.2	50	120			

**【Hi-Di™ Formamide に溶解したシーケンス反応産物を解析する場合】**

\* 47cm キャピラリーの場合

Inj.#	Tube & Sample Name	Module	Inj. Secs	Inj. kV	Run kV	Run	Run Time	Auto Anlz.	Auto Prt.	Finish Time
1	A1-Matrix-C	Seq POP6 Rapid (1mL) A	15	2.0	15.0	50	36			
2	A3-Matrix-U	Seq POP6 Rapid (1mL) A	15	2.0	15.0	50	36			
3	A5-Matrix-g	Seq POP6 Rapid (1mL) A	15	2.0	15.0	50	36			
4	A7-Matrix-A	Seq POP6 Rapid (1mL) A	15	2.0	15.0	50	36			

\* 61cm キャピラリーの場合

Inj.#	Tube & Sample Name	Module	Inj. Secs	Inj. kV	Run kV	Run	Run Time	Auto Anlz.	Auto Prt.	Finish Time
1	A1-Matrix-C	Seq POP6 (1mL) A	15	2.5	12.2	50	120			
2	A3-Matrix-U	Seq POP6 (1mL) A	15	2.5	12.2	50	120			
3	A5-Matrix-g	Seq POP6 (1mL) A	15	2.5	12.2	50	120			
4	A7-Matrix-A	Seq POP6 (1mL) A	15	2.5	12.2	50	120			

**シーケンス・ラン**

(6) **Run** ボタンをクリックして、シーケンス・ランを開始します。

**重要**ラン終了後のマトリックススタンダードサンプルは、9 ページの方法により作成した CUGA Matrix ファイルを使用して、ベースコールが可能なことを確認するまで、廃棄せずに -20 で保管してください。

### シーケンス・ラン終了後の操作

- (7) “Sequencing Analysis”を起動させます。「Sample Manager <sup>注5</sup>」を選択後、[Base Caller]の設定を[ABI-CE1]または[ABI-CE2]に選択します。
- (8) 4 種の各マトリックススタンダードサンプルのデータファイルをそれぞれダブルクリックします。
- (9) [Raw Data] ボタンをクリックして、それぞれピーク<sup>注6</sup>が出ていることを確認してください。
- (10) 「Sequencing Analysis」フォルダ内の“Data Utility”を起動します。
- (11) メニューバーの「Utility」から[Make Matrix]を選択します。
- (12) 以下、[Make Matrix]ダイアログボックス内の設定をおこないます。
- (12-1) [Make Matrix]ダイアログボックスの C、T <sup>注7</sup>、g、A それぞれの [Matrix Standard]を選択します。選択が正しくない場合には、マトリックスファイルは作成できませんのでご注意ください。
- (12-2) [New File] ボタンをクリックし、ファイル名を「CUGA Matrix」と入力して、[Save] ボタンをクリックして保存してください。[ABI Folder]に保存されず、[ABI Folder]に保存されなかった場合、CUGA Matrix ファイルを[ABI Folder]内に移してください。
- (12-3) [Taq Terminator Matrix]を選択し、[OK] ボタンをクリックします。
- (12-4) [OK] を選択後、約 20 秒後に「Make Matrix successfully completed」という確認の表示がされますので、[OK] ボタンをクリックすると、CUGA<sup>®</sup> シークエンシング用マトリックスファイルのセットアップが完了します。

注 5: スクリーン上に「Sample Manager」が現れない場合、メニューバーより、「Show Sample Manager」を選択してください。

注 6: [Raw Data]での各ターミネーターを示す色は、C(青色)、U(赤色)、g(黒色)、A(緑色)を示します。

注 7: 各ターミネーターに対するサンプルファイルを選択する際に CUGA<sup>®</sup>シークエンシング用マトリックスファイルの場合は、T のダイアログボックスに、U のサンプルファイルを選択します。

## マトリックスファイル作成のトラブルシューティング

マトリックスファイル作成時にエラーメッセージが現れ、ファイルが作成できない等のトラブルが生じた場合、下記の該当する項目の解決法にしたがって対処してください。

要因	対処法
マトリックスファイルが作成できない	
インジェクションエラー	キャピラリーが正しくセッティングされているかどうか確認してください。キャピラリーのセッティング、キャリブレーションについては装置付属の操作ガイドにしたがってください。
液量不足	サンプルチューブに移し替えた「Matrix Standard」のTSR 溶液の液量が 20 $\mu$ L 以上になっていることを確認してください。
シグナルが弱い	「Probably signal too weak」というエラーメッセージが出たマトリックススタンダードデータファイルの[Raw Data]を表示します。十分なシグナル強度のピークが検出されている 2,000 スキャン程度の領域で、はじめのスキャン数の数値を、Make Matrix ダイアログボックスの対応する塩基の[Start at]の欄に入力します。以下、p.9 の(12-1)から再度やり直してください。 やり直しても、同様のエラーメッセージが出る場合は再度泳動からやり直してください
インジェクション時間が短い	インジェクション時間を 35～50sec まで延長して再度泳動してください。
各マトリックススタンダードのデータファイルの選択間違い	保存されている 4 種類の各マトリックススタンダードサンプルのデータファイル名と[Raw Data]のピークの色 (Matrix-C: 青色、Matrix-U: 赤色、Matrix-g: 黒色、Matrix-A: 緑色) が一致しているか確認します。通常、他 3 色のシグナルのピークも同時に検出されますが、他 3 色よりもシグナル強度が優位に強くなっていることを確認してください。 再度、4 種類の各マトリックススタンダードサンプルのデータファイルと塩基ボタンの組み合わせを確認後、p.9 の(12-1)からやり直してください。

# CUGA® シーケンシングプロトコル

---

ここでは、鋳型 DNA の調製から DNA シーケンサーの稼働まで、一連の CUGA® シーケンシングの手順を説明します。鋳型 DNA の調製、DNA シーケンサーの設定等、サイクルシーケンス法とは若干異なるところがありますのでご注意ください。

## (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer のセットアップ)

本製品は、Applied Biosystems 社製 POP-6™を使用します。ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer への POP-6™、泳動バッファー、キャピラリー等の装填および機器調整については、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer 付属の操作ガイドをご参照ください。

**重要**ポリマーは、必ず Applied Biosystems 社製 POP-6™をご使用ください。POP-4™には対応していませんのでご注意ください。

## (鑄型 DNA の準備)

### 【鑄型 DNA の調製方法】

シーケンス反応前の準備として、鑄型となるサンプル DNA の調製をおこないます。サンプル DNA の調製方法は、( ) プラスミド DNA を鑄型にする方場合、( ) PCR 産物を鑄型にする場合があります。

#### ( ) プラスミド DNA を鑄型にする場合

##### ( - 1) プラスミドの種類

CUGA<sup>®</sup>シーケンシングは、T3 または T7 RNA ポリメラーゼによる転写反応を利用していますので、シーケンス反応をおこなう際は、必ず T3 または T7 プロモーター配列が必要です。したがって、プラスミド DNA の種類によっては本製品では使用できないものもあります。

また、本製品で使用している CUGA<sup>®</sup>3 (CUGA<sup>®</sup>7) RNA ポリメラーゼは、T3 (T7) プロモーター配列から約 50 base までの部分は解析できないという性質を持っています。したがって、T3 または T7 プロモーター配列を有するプラスミドでも、クロニングサイトによっては 5 側の配列が解析できない可能性がありますので、ご注意ください。

#### Cloning Vector pTS1 について

弊社で転写シーケンス法用に開発したクローニングベクター pTS1 は、クローニング部位として *Hinc* を用いると、転写開始点からの距離が約 50 base になるよう設計されています。

さらにマルチクローニングサイトをはさんだ両側に T3、T7 プロモーターを配しているため、CUGA<sup>®</sup>3、CUGA<sup>®</sup>7 Sequencing Kit を併用することで、両鎖からのシーケンシングが可能となりました。

また本クローニングベクターは、従来のサイクルシーケンス法にも使用できますので、あらかじめ本クローニングベクターをご利用になると便利です。

pTS1 をご購入の際は、代理店または和光純薬工業(株)へお問い合わせください。

コード No.	品名	容量
300-10123	Cloning Vector pTS1 DNA	10 µg
301-10131	Cloning Vector pTS1, <i>Hinc</i> Treated	2 µg

pTS1 は、制限酵素未消化のもの、*Hinc* により消化済みのものの 2 種類があります。詳しくは、ニッポンジーンテック ホームページ (<http://www.nippongenetech.com>) をご覧ください。

Cloning Vector pTS1 *Hinc* Treated は、あらかじめ制限酵素 *Hinc* で処理、5 末端を脱リン酸化してあります。したがって、直ちにクローニング実験に使用できます。

##### ( - 2) プラスミド DNA の調製方法

プラスミド DNA の調製方法はいくつかありますが、一般におこなわれている調製方法、または市販のキットを用いた調製方法で結構です。

**重要** プラスミド DNA を調製する際、RNA の混入を防ぐため、RNase 処理を必ずおこなうようにしてください。RNase 処理をおこなった後は、フェノール処理を必ずおこない、RNase を完全に失活させてください。  
また、抽出溶液には EDTA を含む Buffer は使用しないでください。

[参考] 50 ~ 400 µL の容量で RNase 反応をおこない、同量の PCI (フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール = 25:24:1) で RNase を除去後、エタノール沈殿をおこないます。  
精製後は、滅菌水または 10mM Tris-HCl (pH8.0) に溶解してください。

現在市販されているプラスミド DNA 調製用キットには、シリカゲルカラムを用いた精製法があり、RNase 処理、フェノール処理をおこなわずに本製品の使用が可能なものがあります。詳しくは、株式会社ニッポンジーン 学術営業部 (p.1 参照) までお問い合わせください。

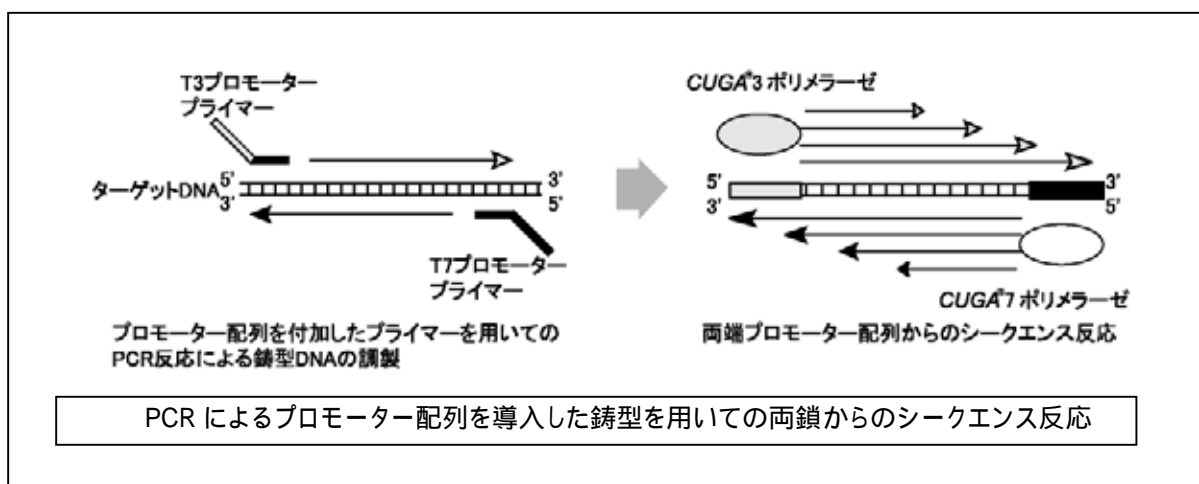
〔 PCR 産物を鋳型にする場合 〕

必ず本製品に対応するプロモーター配列を導入できるように、PCR をおこなってください。  
 ターゲット DNA を増幅する一方のプライマーの 5' 末端に以下に記載されている T3 または T7 プロモーター配列を付加してください。

また、プライマーの 5' 末端に、それぞれ以下に記載されているプロモーター配列を付加して、共に PCR をおこなうと、ターゲット DNA の両側に T3、T7 プロモーターが付加した構造の鋳型 DNA ができます。これにより、シーケンス反応の際、CUGA<sup>®</sup>3、CUGA<sup>®</sup>7 Sequencing Kit を使い分けることで、両鎖からのシーケンシングが可能となります。

5 - CTAATTAACCCCTCACTAAAGGG + NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN -3  
 (T3 プロモーター配列) (設計したプライマー配列)

5 - CTAATACGACTCACTATAGGG + NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN -3  
 (T7 プロモーター配列) (設計したプライマー配列)



サイクル数が過剰である場合には、非特異的な PCR 産物が増幅する場合がありますので、PCR 反応に使用する酵素やサイクル等は、非特異的な PCR 産物が増幅されず、目的の PCR 産物が増幅される反応条件の設定にしてください。また、プライマーダイマー等もシーケンス反応の効率低下を引き起こすことがありますので、プライマーの配列をご確認ください。

PCR 産物を用いて本製品によるシーケンスをおこなう場合は、できる限り用時調製してください。長期間保存、あるいは凍結融解を繰り返しておこなった PCR 産物はシーケンス反応の効率低下の原因となります。

〔コントロール DNA について〕

本製品には、製品の性能を確認するための鋳型として、「Control DNA」が含まれています。万一、シーケンス反応結果が芳しくなかった場合の原因究明の指標となりますので、シーケンス反応をおこなう際、同時に「Control DNA」も使用することをお勧めします。

本製品に含まれている「Control DNA」は、pTS1 を使用しています。pTS1 の塩基配列については、巻末の〔付録〕をご覧ください。

## (シーケンス反応)

### 試薬の準備

- (1) 本製品から凍結している以下の試薬を取り出し、氷上で完全に溶解させます。ピペティング操作等で溶液の濃度を均一にした後、卓上遠心機等でスピンドウンしてください。

- ・5 × Reaction Buffer
- ・MnCl<sub>2</sub> Solution
- ・NTP/Terminator Mixture

### 酵素の準備

- (2) 以下の容量で CUGA<sup>®</sup>3 (CUGA<sup>®</sup>7) Enzyme Solution を希釈します。この希釈溶液を、「Enzyme Mixture」と称します。「Enzyme Mixture」は、均一な溶液になるように混合してください。ただし、ボルテックスでの過剰な混合は避けてください。使用容量は、シーケンス反応数(n)に応じて決定します。

[ Enzyme Mixture ]

CUGA <sup>®</sup> 3 (CUGA <sup>®</sup> 7) Enzyme Solution	N	μL (=0.12 μL × n)
Enzyme Dilution Buffer	9N	μL
Total		

### 反応液の調製

- (3) それぞれの試薬を以下の容量で、 ~ の順に加えてよく混合します。この混合溶液を「Reaction Mixture」と称します。最後に「Reaction Mixture」と 鋳型 DNA をよく混合して、氷上に置きます。

Reaction Mixture	{	ddH <sub>2</sub> O	y μL
		5 × Reaction Buffer	4.0 μL
		MnCl <sub>2</sub> Solution	1.0 μL
		NTP/Terminator Mixture	2.0 μL
		Enzyme Mixture	1.0 μL
		DNA (0.1 ~ 0.2 pmol) 注1	x μL
Total		20.0 μL	

### シーケンス反応

- (4) 気相式インキュベーターを用いて、37、60 分間、反応をおこないます。

**重要** CUGA<sup>®</sup>3 (CUGA<sup>®</sup>7) Enzyme Solution は使用直前に Enzyme Dilution Buffer で希釈してください。一度希釈した酵素は保存できません。

注 1: 使用する鋳型 DNA 量は、一反応あたりおよそ 0.1 ~ 0.2 pmol が最適な鋳型量です。  

$$\text{pmol DNA} = (\mu\text{g}) \times 1,515 / (\text{bp})$$
 [ : dsDNA 鋳型の質量数(μg)]  
 [ : dsDNA 鋳型の塩基数(bp)]

**重要** 「Reaction Mixture」は調製後、できる限り遮光してください。ターミネーターに標識されている蛍光色素が分解するおそれがあります。

**重要** 鋳型 DNA は必ず最後に加えてください。混合する順序を変更するとシグナルが低下する場合があります。



## 〈反応後の精製(エタノール沈殿)〉

シーケンス反応後、シーケンス反応産物を精製するため、エタノール沈殿をおこないます。

CUGA®シーケンシングでは、以下の操作によるエタノール沈殿法が最も効率よくシーケンス反応産物を精製する方法です。

(1) 反応後の溶液に 0.1M EDTA·2Na<sup>注1</sup> を 25  $\mu$ L 加え、十分にボルテックスした後、エタノールを 55  $\mu$ L 加え<sup>注2</sup>、十分にボルテックスした後、遮光下、室温にて 15 分間放置<sup>注3</sup>します。

(2) 室温、16,000  $\times$ g 以上、15 分間遠心します。

(3) 遠心後、上清をできる限り取り除きます。

(4) 70%エタノールを 250  $\mu$ L 加えて、室温、16,000  $\times$ g 以上、5 分間遠心します。

(5) 遠心後、上清をできる限り取り除きます。

(6) ペレットを乾燥させます<sup>注4</sup>。

(7) ペレットを 20 ~ 25  $\mu$ L の TSR<sup>注5</sup>または、30  $\mu$ L の Hi-Di™ Formamide<sup>注6</sup>にてボルテックスで十分に溶解します。

他の精製方法および精製キットで反応後の精製をおこなうと、波形データに乱れが生じる場合がありますのでご注意ください。

注 1: 0.1M EDTA·2Na 溶液の添加量が不十分な場合、波形データのシグナルが著しく低下するおそれがありますのでご注意ください。

注 2: エタノールの最終濃度が 50 ~ 60%となるようにしてください。

注 3: 室温での静置時間が不十分な場合、シーケンス反応産物の沈殿量が不足し、波形データのシグナルが低下するおそれがありますのでご注意ください。

注 4: ペレットを乾燥させすぎると、TSR に溶解しにくくなりますのでご注意ください。またペレットの乾燥が不十分な場合は、バックグラウンドシグナルの上昇や波形データが乱れる等の原因となりますのでご注意ください。

注 5,6 : TSR、Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems 社製)は、本製品には含まれておりませんので別途、ご用意ください。Hi-Di™ Formamide は劣化するとシーケンス精度に影響を与えるおそれがありますので、なるべく新しいものをお使いください。TSRまたは、Hi-Di™ Formamide に溶解したサンプルを保存する場合は、冷凍で数週間、室温で 48 時間安定です。

## (シーケンス・ランの手順)

ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer の操作やソフトウェアの詳細については、装置付属の操作ガイドにしてください。

### Sample Sheet の設定

- (1) “ABI PRISM® 310 collection” を起動させ、「Sample Sheet」を開きます。
- (2) Dye Set/Primer]の項目は[DT POP6 注1]を選択、[Matrix]の項目は[CUGA Matrix]を選択します。

Sequence Analysis Sample Sheet				
#	Sample Name	Dye Set/Primer	Matrix	Comment
A1	Sample-1	DT POP6	CUGA Matrix	
A3	Sample-2	DT POP6	CUGA Matrix	
A5	Sample-3	DT POP6	CUGA Matrix	
A7	Sample-4	DT POP6	CUGA Matrix	

### サンプルの準備

- (3) TSR または、Hi-Di™ Formamide に溶解したシーケンス反応産物を全量サンプルチューブに移し替えて、サンプルトレイにセットします。

### Injection List の設定

- (4) 「Injection List」を立ち上げ、(2)で作成した「Sample Sheet」を選択します。
- (5) [Module]の項目は、47cm キャピラリーの場合には[Seq POP6 Rapid (1mL) A 注2]、61cm キャピラリーの場合には[Seq POP6 (1mL) A 注2]を選択します。

TSR に溶解したシーケンス反応産物の場合は、インジェクション時間・電圧、シーケンス・ラン等の条件を[Module]の設定値のままでおこないます。

Hi-Di™ Formamide に溶解したシーケンス反応産物の場合は、インジェクション時間を変更する必要があります。CUGA®3 シーケンス反応産物で解析する場合は 30 秒、CUGA®7 シーケンス反応産物を解析する場合は 15 秒に設定してください。そのほかの条件は、設定値のままでおこないます。

シグナル強度や解析したいサイズによっては条件を変更することが可能です。詳細は装置付属の操作ガイドにしてください。

### 【TSR に溶解したシーケンス反応産物を解析する場合】

\* 47cm キャピラリーの場合

Inj.#	Tube & Sample Name	Module	Inj. Secs	Inj. kV	Run kV	Run	Run Time	Auto Anlz.	Auto Prt.	Finish Time
1	A1-Sample-1	Seq POP6 Rapid (1mL) A	30	2.0	15.0	50	36			
2	A3-Sample-2	Seq POP6 Rapid (1mL) A	30	2.0	15.0	50	36			
3	A5-Sample-3	Seq POP6 Rapid (1mL) A	30	2.0	15.0	50	36			
4	A7-Sample-4	Seq POP6 Rapid (1mL) A	30	2.0	15.0	50	36			

\* 61cm キャピラリーの場合

Inj.#	Tube & Sample Name	Module	Inj. Secs	Inj. kV	Run kV	Run	Run Time	Auto Anlz.	Auto Prt.	Finish Time
1	A1-Sample-1	Seq POP6 (1mL) A	30	2.5	12.2	50	120			
2	A3-Sample-2	Seq POP6 (1mL) A	30	2.5	12.2	50	120			
3	A5-Sample-3	Seq POP6 (1mL) A	30	2.5	12.2	50	120			
4	A7-Sample-4	Seq POP6 (1mL) A	30	2.5	12.2	50	120			

注 1: お使いの ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer に “DT POP6” がインストールされていない場合、装置付属の Collection Software インストール用 CD で再インストールしてください。インストール CD に含まれていない場合は、DT POP6 Module File を、Applied Biosystems 社から入手してください。

注 2: 本製品はフィルターセット A のみ対応しています。フィルターセット E は使用できません。

**【Hi-Di™ Formamide に溶解した CUGA®3 シークエンス反応産物を解析する場合】**

\* 47cm キャピラリーの場合

Inj.#	Tube & Sample Name	Module	Inj. Secs	Inj. kV	Run kV	Run	Run Time	Auto Anlz.	Auto Prt.	Finish Time
1	A1-Sample-1	Seq POP6 (1mL) A	30	2.0	15.0	50	36			
2	A3-Sample-2	Seq POP6 (1mL) A	30	2.0	15.0	50	36			
3	A5-Sample-3	Seq POP6 (1mL) A	30	2.0	15.0	50	36			
4	A7-Sample-4	Seq POP6 (1mL) A	30	2.0	15.0	50	36			

\* 61cm キャピラリーの場合

Inj.#	Tube & Sample Name	Module	Inj. Secs	Inj. kV	Run kV	Run	Run Time	Auto Anlz.	Auto Prt.	Finish Time
1	A1-Sample-1	Seq POP6 (1mL) A	30	2.5	12.2	50	120			
2	A3-Sample-2	Seq POP6 (1mL) A	30	2.5	12.2	50	120			
3	A5-Sample-3	Seq POP6 (1mL) A	30	2.5	12.2	50	120			
4	A7-Sample-4	Seq POP6 (1mL) A	30	2.5	12.2	50	120			

**【Hi-Di™ Formamide に溶解した CUGA®7 シークエンス反応産物を解析する場合】**

\* 47cm キャピラリーの場合

Inj.#	Tube & Sample Name	Module	Inj. Secs	Inj. kV	Run kV	Run	Run Time	Auto Anlz.	Auto Prt.	Finish Time
1	A1-Sample-1	Seq POP6 (1mL) A	15	2.0	15.0	50	36			
2	A3-Sample-2	Seq POP6 (1mL) A	15	2.0	15.0	50	36			
3	A5-Sample-3	Seq POP6 (1mL) A	15	2.0	15.0	50	36			
4	A7-Sample-4	Seq POP6 (1mL) A	15	2.0	15.0	50	36			

\* 61cm キャピラリーの場合

Inj.#	Tube & Sample Name	Module	Inj. Secs	Inj. kV	Run kV	Run	Run Time	Auto Anlz.	Auto Prt.	Finish Time
1	A1-Sample-1	Seq POP6 (1mL) A	15	2.5	12.2	50	120			
2	A3-Sample-2	Seq POP6 (1mL) A	15	2.5	12.2	50	120			
3	A5-Sample-3	Seq POP6 (1mL) A	15	2.5	12.2	50	120			
4	A7-Sample-4	Seq POP6 (1mL) A	15	2.5	12.2	50	120			

**シーケンス・ラン**

(6) **Run** ボタンをクリックして、シーケンス・ランを開始します。

**シーケンス・ラン終了後のデータ解析**

(7) “Sequencing Analysis”を起動させます。「Sample Manager <sup>注3</sup>」を選択後、[Base Caller]の設定を[ABI-CE1]または[ABI-CE2]に選択します。「Spacing」は自動設定でピークの重なり等がある場合は、スペース値を変えて、再解析することで改善することがあります。

注 3 : スクリーン上に「Sample Manager」が現れない場合、メニューバーより、「Show Sample Manager」を選択してください。

## CUGA® シークエンシングのトラブルシューティング

本製品をご使用の際にトラブルが生じた場合、下記の該当する項目の解決法にしたがって対処してください。

要因	対処法
シグナルが出ない	
インジェクションエラー	キャピラリーが正しくセッティングされているかどうか確認してください。キャピラリーのセッティング、キャリブレーションについては装置付属の操作ガイドにしたがってください。
液量不足	サンプルチューブに移し替えたシーケンス反応産物の TSR 溶液の液量が、20 $\mu$ L 以上になっていることを確認してください。
シグナルが弱い	
TE buffer の影響	TE buffer に溶解した鋳型 DNA を用いた場合、TE buffer に含まれる EDTA によりシーケンス反応が阻害されるため波形データのシグナルが弱くなります。鋳型 DNA は滅菌水、または 10mM Tris-HCl (pH8.0) に溶解してください。
エタノール沈殿時のエタノール添加量不足	エタノール沈殿時のエタノールの終濃度が 50 ~ 60%であることを確認してください。
遠心が不十分	遠心時間を延長、または回転数を上げて遠心してください。
鋳型 DNA 量不足	鋳型 DNA 量が 0.1 ~ 0.2pmol であるかどうか確認してください。
鋳型 DNA の精製法及び純度	プラスミド DNA 調製時に、RNase を使用した場合必ずフェノール処理をおこなってください。 その後、アガロースゲル電気泳動、分光光度計等により純度を確認してください。
インジェクション時間が短い	インジェクション時間を 35 ~ 50sec 程度まで延長して再度泳動してください。
その他	上記の対処法を試みて、改善されない場合は反応時間を 1 時間程度延長することで結果が改善される場合があります。

要因	対処法
読取り鎖長が短い、ノイズが多い	
エタノール沈殿時の上清除去が不十分	エタノール沈殿後、及び 70%エタノール洗浄後の上清除去が不十分な場合、塩や未反応のターミネーター等が残存するため、シグナルの減衰、ノイズの増加、シグナル出現時間が遅れる等の原因となります。できる限り上清は取り除いてください。
鋳型 DNA 量が過剰	過剰な鋳型 DNA 量でシークエンス反応を行うと低分子側のシグナルが極端に強く、高分子側へ進むにしたがってシグナル強度が減衰することがあります。鋳型 DNA 量が 0.1 ~ 0.2pmol であるかどうか確認してください。
鋳型 DNA(PCR 産物)の純度	鋳型 DNA として PCR 産物を用いた場合、プライマーダイマーや副産物等が多く含まれていると、シークエンス反応の効率が低下し、シグナル減衰の原因となることがあります。アガロース電気泳動等で純度を確認してください。
スリップページ現象 がみられる	
特異的な塩基配列	シークエンス反応時に NTP/Terminator Mixture と CUGA® Enzyme Solution を 2 倍量加え、反応温度を約 7 付近まで下げること、結果が改善される場合があります。(反応時間:1~2 時間程度)

poly A または poly T のような homopolymer の直後から、シグナルが重なって解析困難となる現象。

## 参考文献

---

- 1) Izawa, M., et al. *J. Biol. Chem.*, 273(23): 14242-14246 (1998)
- 2) Sasaki, N., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(7): 3455-3460 (1998)

# 付録 1

## コントロール DNA (pTS1) の塩基配列 / T3 プロモーター配列側

本製品は、コントロール DNA に pTS1 を使用しています。以下、T3 プロモーター配列を含む 1000 base の塩基配列を記します。

### pTS1 の T3 プロモーター配列を含む塩基配列 (下線部は T3 プロモーター配列)

					塩基数 (bp)
AATTAACCCT	CACTAAAGGG	<u>AGAGAGCTCC</u>	TGCAGGCTAG	CTTGCGCAAG	50
GATCCTAGGC	CTGAAGCTTG	TCGACGAATT	CACCCGGGAA	GATCTTGCTT	100
ACGTACGCGT	GGTACCATGC	ATTCTCCCTA	TAGTGAGTCG	TATTATGCGC	150
GCAATTCACT	GGCCGTCGTT	TTACAACGTC	GTGACTGGGA	AAACCCTGGC	200
GTTACCCAAC	TTAATCGCCT	TGCAGCACAT	CCCCCTTTCG	CCAGCTGGCG	250
TAATAGCGAA	GAGGCCCGCA	CCGATCGCCC	TTCCCAACAG	TTGCGCAGCC	300
TGAATGGCGA	ATGGCGCCTG	ATGCGGTATT	TTCTCCTTAC	GCATCTGTGC	350
GGTATTTTAC	ACCGCATATG	GTGCACTCTC	AGTACAATCT	GCTCTGATGC	400
CGCATAGTTA	AGCCAGCCCC	GACACCCGCC	AACACCCGCT	GACGCGCCCT	450
GACGGGCTTG	TCTGCTCCCG	GCATCCGCTT	ACAGACAAGC	TGTGACCGTC	500
TCCGGGAGCT	GCATGTGTCA	GAGGTTTTCA	CCGTCATCAC	CGAAACGCGC	550
GAGACGAAAG	GGCCTCGTGA	TACGCCTATT	TTTATAGGTT	AATGTCATGA	600
TAATAATGGT	TTCTTAGACG	TCAGGTGGCA	CTTTTCGGGG	AAATGTGCGC	650
GGAACCCCTA	TTTGTTTATT	TTTCTAAATA	CATTCAAATA	TGTATCCGCT	700
CATGAGACAA	TAACCCTGAT	AAATGCTTCA	ATAATATTGA	AAAAGGAAGA	750
GTATGAGTAT	TCAACATTTT	CGTGTGCCCC	TTATTCCCTT	TTTTGCGGCA	800
TTTTGCCTTC	CTGTTTTTGC	TCACCCAGAA	ACGCTGGTGA	AAGTAAAAGA	850
TGCTGAAGAT	CAGTTGGGTG	CACGAGTGGG	TTACATCGAA	CTGGATCTCA	900
ACAGCGGTAA	GATCCTTGAG	AGTTTTCGCC	CCGAAGAACG	TTTTCCAATG	950
ATGAGCACTT	TTAAAGTTCT	GCTATGTGGC	GCGGTATTAT	CCCGTATTGA	1000

## 付録 2

### コントロール DNA (pTS1) の塩基配列 / T7 プロモーター配列側

本製品は、コントロール DNA に pTS1 を使用しています。以下、T7 プロモーター配列を含む 1000 base の塩基配列を記します。

#### pTS1 の T7 プロモーター配列を含む塩基配列 (下線部は T7 プロモーター配列)

					塩基数 (bp)	
5 -	TAATACGACT	<u>CACTATAGGG</u>	AGAATGCATG	GTACCACGCG	TACGTAAGCA	50
	AGATCTTCCC	GGGTGAATTC	GTCGACAAGC	TTCAGGCCTA	GGATCCTTGC	100
	GCAAGCTAGC	CTGCAGGAGC	TCTCTCCCTT	TAGTGAGGGT	TAATTTGCGC	150
	GCACAGCTTG	GCGTAATCAT	GGTCATAGCT	GTTTCCTGTG	TGAAATTGTT	200
	ATCCGCTCAC	AATTCACAC	AACATACGAG	CCGGAAGCAT	AAAGTGTAAG	250
	GCCTGGGGTG	CCTAATGAGT	GAGCTAACTC	ACATTAATTG	CGTTGCGCTC	300
	ACTGCCCGCT	TTCCAGTCGG	GAAACCTGTC	GTGCCAGCTG	CATTAATGAA	350
	TCGGCCAACG	CGCGGGGAGA	GGCGGTTTGC	GTATTGGGCG	CTCTTCCGCT	400
	TCCTCGCTCA	CTGACTCGCT	GCGCTCGGTC	GTTTCGGCTG	GGCGAGCGGT	450
	ATCAGCTCAC	TCAAAGGCGG	TAATACGGTT	ATCCACAGAA	TCAGGGGATA	500
	ACGCAGGAAA	GAACATGTGA	GCAAAAGGCC	AGCAAAAGGC	CAGGAACCGT	550
	AAAAAGGCCG	CGTTGCTGGC	GTTTTTCCAT	AGGCTCCGCC	CCCCTGACGA	600
	GCATCACAAA	AATCGACGCT	CAAGTCAGAG	GTGGCGAAAC	CCGACAGGAC	650
	TATAAAGATA	CCAGGCGTTT	CCCCCTGGAA	GCTCCCTCGT	GCGCTCTCCT	700
	GTTCCGACCC	TGCCGCTTAC	CGGATACCTG	TCCGCCTTTC	TCCCTTCGGG	750
	AAGCGTGGCG	CTTTCTCAAT	GCTCAGCTG	TAGGTATCTC	AGTTCGGTGT	800
	AGGTCGTTTC	CTCCAAGCTG	GGCTGTGTGC	ACGAACCCCC	CGTTCAGCCC	850
	GACCGCTGCG	CCTTATCCGG	TAATATCGT	CTTGAGTCCA	ACCCGGTAAG	900
	ACACGACTTA	TCGCCACTGG	CAGCAGCCAC	TGGTAACAGG	ATTAGCAGAG	950
	CGAGGTATGT	AGGCGGTGCT	ACAGAGTTCT	TGAAGTGGTG	GCCTAACTAC	1000



Copyright © 2002-2005 NIPPON GENETECH CO.,LTD. All Rights Reserved.

---

記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なしに変更する場合があります。

- ・ ABI PRISM®は、米国Perkin Elmer社の米国およびその他の国々における登録商標です。
- ・ BODIPY®は、米国Molecular Probes社の米国およびその他の国々における登録商標です。
- ・ CUGA®は、株式会社ニッポン ジーンテックの日本における登録商標です。
- ・ 「ニッポンジーン」および「NIPPON GENE」は、株式会社ニッポンジーンの日本における登録商標です。
- ・ その他、製品名等の固有名詞は各社の商標、または登録商標です。



お問い合わせ先

株式会社ニッポンジーン 学術営業部

TEL 076 (451) 6548

FAX 076 (451) 6547

E-mail [info@nippongene.com](mailto:info@nippongene.com)

弊社製品は、(株)ニッポンジーンで取り扱っておりますので、弊社製品に関しては上記へお問い合わせください。