

CUGA[®]

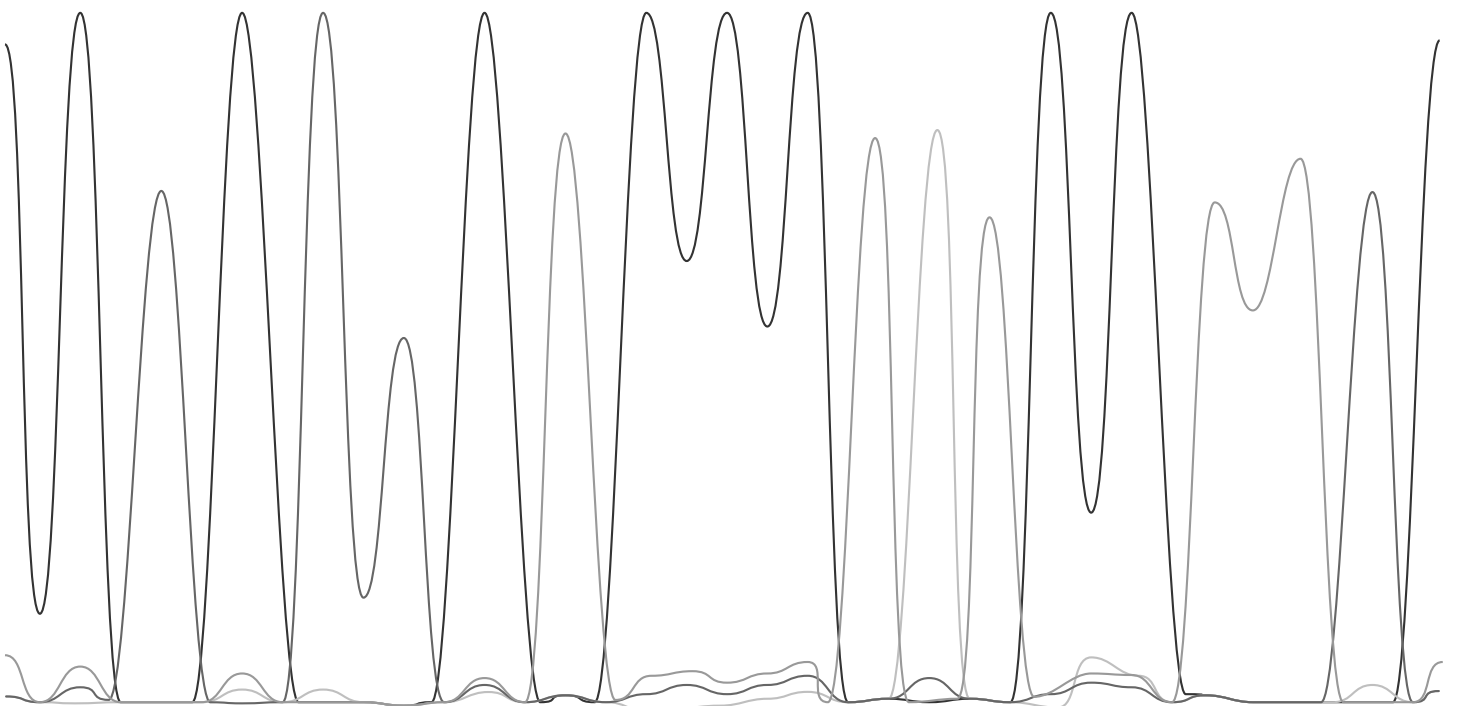
Sequencing Kit

for ABI PRISM[®] 377XL DNA Sequencer

ユーザーズマニュアル

Ver. 2.2

- CUGA[®]3 Sequencing Kit
- CUGA[®]7 Sequencing Kit



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® 377XL DNA Sequencer、ソフトウェアは Sequencing Analysis version 3.0 以上です。
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。
 - 本製品には、ホルムアミドが含まれています。使用方法および廃棄には十分にご注意ください。
 - 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。
 - 本製品の操作ではアクリルアミドを使用します。アクリルアミドは劇物に指定されており、中枢および末梢神経障害を生じることが報告されています。また、動物実験においては、変異原性も報告されておりますので、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 6 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、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2004年7月現在のものです。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

* 弊社製品に関しては、(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
(シーケンスゲルの準備)	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	10
<i>CUGA</i> [®] シークエンシングプロトコル	11
(シーケンスゲルの準備)	11
(鋳型 DNA の準備)	12
鋳型 DNA の調製方法	12
プラスミド DNA を鋳型にする場合	12
PCR 産物を鋳型にする場合	13
コントロール DNA (pTS1) について	13
(シーケンス反応)	14
(反応後の精製(エタノール沈殿))	15
マイクロチューブによる方法	15
96well PCR プレートによる方法	16
(シーケンス・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	18
参考文献	20
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	21
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	22

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® 377XL DNA Sequencer)

製品構成	製品名	CUGA®3 Sequencing Kit		CUGA®7 Sequencing Kit	
		100 反応	24 反応	100 反応	24 反応
ユーザーズマニュアル		1 冊	1 冊	1 冊	1 冊
簡易マニュアル		1 枚	1 枚	1 枚	1 枚
5 × Reaction Buffer		400 µL × 1 本	100 µL × 1 本	400 µL × 1 本	100 µL × 1 本
MnCl ₂ Solution		100 µL × 1 本	25 µL × 1 本	100 µL × 1 本	25 µL × 1 本
NTP/Terminator Mixture		200 µL × 1 本	50 µL × 1 本	200 µL × 1 本	50 µL × 1 本
CUGA®3 Enzyme Solution		10 µL × 1 本	3 µL × 1 本	-	-
CUGA®7 Enzyme Solution		-	-	10 µL × 1 本	3 µL × 1 本
Enzyme Dilution Buffer		108 µL × 1 本	26 µL × 1 本	108 µL × 1 本	26 µL × 1 本
Loading Dye Solution		400 µL × 1 本	75 µL × 1 本	400 µL × 1 本	75 µL × 1 本
Control DNA (50ng/ µL)		40 µL × 1 本	16 µL × 1 本	40 µL × 1 本	16 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6ヶ月以内に使用するようにしてください。

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® 377XL DNA Sequencer で解析する際、最初に Matrix Standard Set Up Kit (ABI PRISM® 377XL DNA Sequencer) 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。本製品には 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® 377XL DNA Sequencer)

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®シーケンシングの概要】

CUGA®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®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、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社製のBODIPY® Dyeを採用しています。

【CUGA®RNAポリメラーゼとは】

CUGA®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との親和性を低く押さ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®3、CUGA®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.12(鋳型DNAの準備)をご覧ください)。

CUGA®RNAポリメラーゼは、本製品中のCUGA®3 (CUGA®7) Enzyme Solutionに含まれています。CUGA®3 (CUGA®7) Enzyme Solutionとは、CUGA®3 (CUGA®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 (ddH₂O)

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附着し、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): マイクロチューブ使用時 / 0.5M EDTA・2Na (pH8.0): 96well プレート使用時

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。

【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® 377XL DNA Sequencer、ソフトウェアは Sequencing Analysis version 3.0 以上です。

ゲル試薬

シーケンス用のゲルは、ABI PRISM® 377XL DNA Sequencer で推奨されている試薬、方法にしたがって作製してください。試薬は全て電気泳動グレードのものをご使用ください。

ゲル作製に使用する 40%ゲルストック溶液に関しては、PAGE PLUS™ Concentrate, 40% (AMRESCO®社)、またはそれと同等の性能を有するものを推奨しています。それ以外の 40%ゲルストック溶液を使用した場合、良好な結果が得られない場合もありますので、ご注意ください。

10 × TBE ストック溶液 (1L)

電気泳動の際には、このストック溶液を 10 倍に希釈して使用します。ストック溶液を調製する際、EDTA・2Na の量を通常よりも多くする必要があります。通常の組成でストック溶液を調製したものを使用すると、精度に影響が出る恐れがありますので、ご注意ください。

CUGA®シーケンシング用 10 × TBE ストック溶液 1L の組成

Tris	108.0g
ホウ酸	55.0g
EDTA・2Na	20.5g
ddH ₂ O	up to 1L

10%過硫酸アンモニウム、TEMED (N,N,N,N -テトラメチルエチレンジアミン)

シーケンス用ゲルを重合させる際に使用します。

10%過硫酸アンモニウム溶液は、必ず使用直前に調製してください。古い溶液を使用すると、ゲルの重合に時間がかかることがあります。

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された方は、p.11 以降の「CUGA® シークエンシングプロトコル」をお読みください。

CUGA® 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® 377XL DNA Sequencer、ソフトウェアは Sequencing Analysis version 3.0 以上で、Matrix Standard Set Up Kit (for ABI PRISM® 377XL DNA Sequencer) 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でおこないます。

(シークエンスゲルの準備)

本製品を使用する際、ゲル濃度は 6%のものを使用します。また、試薬に関しては、40%ゲルストック溶液^{注1}、10×TBE ストック溶液^{注2}が通常のサイクルシークエンスと異なりますのでご注意ください。その他は通常と同じです。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。

重要 ゲル濃度は必ず 6%のものをご使用ください。ゲル濃度が異なると、泳動後の解析トラブルの原因となります。

注 1: CUGA® Sequencing Kit によるシークエンス作業をおこなう際に使用する 40%ゲルストック溶液は、PAGE PLUS™ Concentrate, 40% Solution (AMRESCO®社)、またはそれと同等の性能を有するものを推奨しています。それ以外の 40%ゲルストック溶液を使用した場合、良好な結果が得られない場合もありますので、ご注意ください。

注 2: CUGA®シークエンシング用に EDTA・2Na の量が通常よりも多く調製した 10×TBE ストック溶液をご使用ください(p.6 参照)。

[6%ゲル溶液の調製量]

試薬	36cm ガラス板	48cm ガラス板
40%ゲルストック溶液 ^{注1}	4.5 mL	7.5 mL
10×TBE ストック溶液 ^{注2}	3 mL	5 mL
Urea	10.8 g	18.0 g
ddH ₂ O	up to 30 mL	up to 50 mL
10%過硫酸アンモニウム溶液	150 μL	250 μL
TEMED(N, N,N ,N テトラメチルエチレンジアミン)	15 μL	25 μL

* 作製手順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。

(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® 377XL DNA Sequencer)」をご用意ください。本製品には 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® 377XL DNA Sequencer 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® 377XL collection” を起動させ、「Sample Sheet」を開きます。
- (2) [DyeSet/Primer] の項目は [DT6%Ac{A set Any-Primer}]^{注1} を選択、[Instrument File] の項目は [<none>] を選択します。

CUGA® Sequencing Kit でシーケンス反応を行ったサンプル (p.11 以降参照) を同時に泳動することも可能です^{注2}。サンプルがある場合にも、同様の設定を行います。

Sequencing Sample Sheet					
#	Sample Name	DyeSet/Primer	Instrument File	Project Name	Comments
1	Matrix-C	DT6%Ac{A set Any-Primer}	<none>		
2	Matrix-U	DT6%Ac{A set Any-Primer}	<none>		
3	Matrix-g	DT6%Ac{A set Any-Primer}	<none>		
4	Matrix-A	DT6%Ac{A set Any-Primer}	<none>		
5	Sample-1	DT6%Ac{A set Any-Primer}	<none>		
6	Sample-2	DT6%Ac{A set Any-Primer}	<none>		
7	Sample-3	DT6%Ac{A set Any-Primer}	<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」と、「Loading Dye Solution」^{注3}を加え、ボルテックスにより十分に溶解させます。

Matrix Standard (each)	1.0 μL
Loading Dye Solution ^{注3}	1.0 μL
Total	2.0 μL

Run File の設定

- (4) 「Run File」を立ち上げ、各項目は以下のように設定します。

設定項目	36cm ガラス板	48cm ガラス板
Run Module	Seq Run 36A-1200 ^{注4}	Seq Run 48A-1200 ^{注4}
Sample Sheet	上記で設定した「Sample Sheet」ファイル	
Instrument File	<none> ^{注5}	
Collect time	9.0 hours	12.0 hours
Well-to-Read distance	36cm	48cm

シーケンス・ラン

- (5) 作製したゲル、1×TBE バッファー溶液^{注6}をDNAシーケンサーにセットします。
- (6) (4) で調製した各マトリックススタンダードを1.0 μL ずつアプライします。シーケンス反応を行ったサンプルも同時に泳動する場合は、同様に1.0 μL ずつアプライします。
- (7) **Run** ボタンをクリックして、シーケンス・ランを開始します。

注1: “DT6%Ac{A set Any-Primer}”が見つからない場合、コンピューター上の別のフォルダ内に保存されていないか検索で調べてください。見つかった“DT6%Ac{A set Any-Primer}”は、ハードディスク System folder ABI folder 内へ移してください。コンピューター上で見つからない場合には、ABI PRISM® 377XL DNA Sequencer 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。

注2: マトリックスファイル作成後、「Sample Manager」上でこのマトリックスファイルを用いて再解析することでシーケンスサンプルの波形データが得られます (p.9 参照)

注3: Loading Dye Solution は、Matrix Standard Set Up Kit には含まれておりません。CUGA® Sequencing Kit に添付のものをご使用ください。また、Loading Dye Solution に溶解後、熱変性は不要です。

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。

注5: CUGA® Sequencing Kit でシーケンス反応を行ったサンプルを同時に泳動する場合も<none>を選択してください。

注6: CUGA®シーケンシング用に調製した10×TBEストック溶液 (p.6 参照) を10倍希釈したもの (1×TBE バッファー溶液) をご使用ください。

マトリックススタンダード泳動後の操作

- (8) 「Sample Manager ^{注7}」または「Run Folder」内にある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開きます。
- (9) **Raw Data** ボタンをクリックして、それぞれピーク^{注8}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) [Make Matrix]ダイアログボックスの C、T ^{注9}、G、A それぞれの[Matrix Standard]ファイルを選択します。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。
- (13) **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]に保存されません。[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。
- (14) [Taq Terminator Matrix]を選択し、**OK** ボタンをクリックします。
- (15) 確認のメッセージ“Make Matrix successfully completed”が表示された後、**OK** ボタンをクリックすると、CUGA[®] 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 7: 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 8: [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 9: 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[®]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。

同時にシークエンス反応を行ったサンプルを泳動した場合の操作

同時にシークエンス反応を行ったサンプルを泳動した場合は、引き続き以下の再解析操作を行ってください。

- (16) メニューバーのアプリケーションメニューから“Sequencing Analysis”を選択し、「Sample Manager ^{注4}」を開きます。
- (17) 各項目が以下のように設定されているならばそのまま、“A”チェックボックスにチェックを入れ、**Start** ボタンをクリックして再解析を行ってください。それ以外の場合には以下のように設定し直して、“A”チェックボックスにチェックを入れ、**Start** ボタンをクリックして再解析を行ってください。

注 4: 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。

設定項目	選択項目
Basecaller	[ABI-100]または[SemiAdaptive]
Spacing	15.0
DyeSet/Primer file	DT6%Ac{A set Any-primer}
Instrument file	CUGA Matrix

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	
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)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。
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)からやり直してください。

CUGA® シークエンシングプロトコル

ここでは、鋳型 DNA の調製から DNA シークエンサーの稼働まで、一連の CUGA® シークエンシングの手順を説明します。鋳型 DNA の調製、DNA シークエンサーの設定等、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。

(シーケンスゲルの準備)

本製品を使用する際、ゲル濃度は6%のものを使用します。また、試薬に関しては、40%ゲルストック溶液、10×TBEストック溶液が通常のサイクルシーケンスと異なりますのでご注意ください。その他は通常と同じです (p.7 参照)。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。

(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[®]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[®]3 (CUGA[®]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[®]3、CUGA[®]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す。

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。

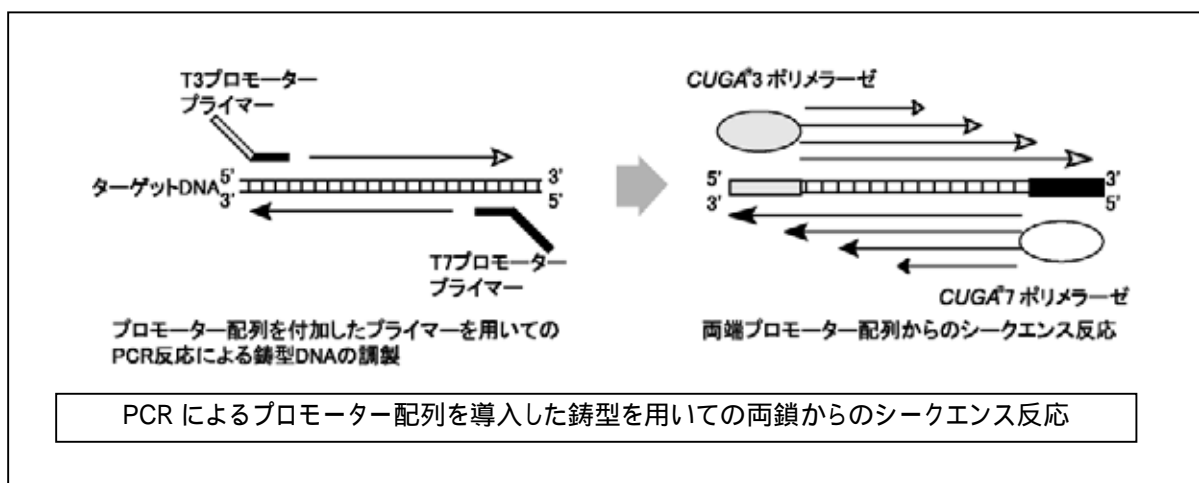
() PCR 産物を鑄型にする場合

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鑄型 DNA ができます。これにより、シーケンス反応の際、CUGA[®]3、CUGA[®]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鑄型として、「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。

- ・5x Reaction Buffer
- ・MnCl₂ Solution
- ・NTP/Terminator Mixture

酵素の準備

- (2) 以下の容量で CUGA[®]3 (CUGA[®]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 [®] 3 (CUGA [®] 7) Enzyme Solution	N μL (=0.12 μL × n)
Enzyme Dilution Buffer	9 × N μL
Total	(10 × N) μL

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 ₂ O	y μL
	5x Reaction Buffer	4.0 μL
	MnCl ₂ Solution	1.0 μL
	NTP/Terminator Mixture	2.0 μL
	Enzyme Mixture	1.0 μL
	DNA (0.1 ~ 0.2pmol) ^{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[®]3 (CUGA[®]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。

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。

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

$$\text{pmol DNA} = \frac{(\mu\text{g}) \times 1,515}{(\text{bp})}$$

[: dsDNA 鋳型の質量数(μg)]

[: dsDNA 鋳型の塩基数(bp)]

〈反応後の精製(エタノール沈殿)〉

シークエンス反応後、シークエ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®シークエンシングでは、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クエンス反応産物を精製する方法です。

マイクロチューブによる方法

- (1) 反応後の溶液に0.1M EDTA・2Na^{注1}を25 µL 加え、十分にボルテックスします。
- (2) 100%エタノールを55 µL 加え^{注2}、十分にボルテックスした後、遮光下、室温にて15分間静置^{注3}します。
- (3) 室温、16,000 × g 以上、15分間遠心します。
- (4) 遠心後、上清をできる限り取り除きます。
- (5) 70%エタノールを250 µL 加えて、室温、16,000 × g 以上、5分間遠心します。
- (6) 遠心後、上清をできる限り取り除きます。
- (7) ペレットを乾燥させます^{注4}。
- (8) ペレットに2 µL の Loading Dye Solution を加え、ボルテックスで十分に溶解させます^{注5}。

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、シークエ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、Loading Dye Solution 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: Loading Dye Solution に溶解後、熱変性は不要です。

96well PCR プレートによる方法

- (1) 反応後の溶液に 0.5M EDTA·2Na^{注1} を 5 μL 加え、十分に混合します。
- (2) 100%エタノールを 55 μL 加え^{注2}、十分に混合した後、シールをして遮光下、室温にて 15 分間静置^{注3}します。
- (3) 室温、700 × g、60 分間遠心します。
- (4) 遠心後、シールを取り、プレートを反転させて上清を捨てます。
- (5) ペーパータオル上にプレートを逆さに置いたまま遠心機にセットし、スピンドウンして、ウェルに付着した溶液を除去します。
- (6) 70%エタノールを 210 μL 加えて、室温、700 × g、5 分間遠心します。
- (7) 遠心後、シールを取り、プレートを反転させて上清を捨てます。
- (8) ペーパータオル上にプレートを逆さに置いたまま遠心機にセットし、スピンドウンして、ウェルに付着した溶液を除去します。
- (9) ペレットを乾燥させます^{注4}。
- (10) ペレットに 2 μL の Loading Dye Solution を加え、十分に溶解させます^{注5}。

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、シークエ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、Loading Dye Solution 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: Loading Dye Solution に溶解後、熱変性は不要です。

(シーケンス・ランの手順)

ABI PRISM® 377XL DNA Sequencer 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® 377XL collection” を起動させ、「Sample Sheet」を開きます。
- (2) [DyeSet/Primer]の項目は[DT6%Ac {Aset Any-Primer}]^{注1}を選択、[Instrument File]の項目は[CUGA Matrix]を選択します。

Sequencing Sample Sheet					
#	Sample Name	DyeSet/Primer	Instrument File	Project Name	Comments
1	Sample-1	DT6%Ac{A set Any-Primer}	CUGA Matrix		
2	Sample-2	DT6%Ac{A set Any-Primer}	CUGA Matrix		
3	Sample-3	DT6%Ac{A set Any-Primer}	CUGA Matrix		
4	Sample-4	DT6%Ac{A set Any-Primer}	CUGA Matrix		

注1: “DT6%Ac {Aset Any-Primer}”が見つからない場合、コンピューター上の別のフォルダ内に保存されていないか検索で調べてください。見つかった“DT6%Ac {Aset Any-Primer}”は、ハードディスク System folder ABI folder 内へ移してください。コンピューター上で見つからない場合には、ABI PRISM® 377XL DNA Sequencer 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。

Run File の設定

- (3) 「Run File」を立ち上げ、各項目は以下のように設定します。

設定項目	36cm ガラス板	48cm ガラス板
Run Module	Seq Run 36A-1200 ^{注2}	Seq Run 48A-1200 ^{注2}
Sample Sheet	上記で設定した「Sample Sheet」ファイル	
Instrument File	CUGA Matrix	
Collect time	9.0 hours	12.0 hours
Well-to-Read distance	36cm	48cm

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。

シーケンス・ラン

- (4) 作製したゲル、1×TBE バッファー溶液^{注3}を DNA シークエンサーにセットします。
- (5) Loading Dye に溶解したサンプルを 1µL アプライします。
- (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。

注3: CUGA®シーケンシング用に調製した 10×TBE ストック溶液(p.6 参照)を 10 倍希釈してご使用ください。

シーケンス・ラン終了後の操作

- (7) メニューバーのアプリケーションメニューから“Sequencing Analysis”を選択し、「Sample Manager」^{注4}を開きます。
- (8) 各項目が以下のように設定されているならば、解析は終了です。それ以外の場合には、以下のように設定し直して、“A”チェックボックスにチェックを入れ、[Start] ボタンをクリックして再解析を行ってください。

注4: 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。

設定項目	選択項目
Basecaller	[ABI-100]または[SemiAdaptive]
Spacing	15.0
DyeSet/Primer file	DT6%Ac{A set Any-primer}
Instrument file	CUGA Matrix

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 によりシークエ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。
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。
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。
非特異的な PCR 産物	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。

要因	対処法
<p>“Tag was not found”というエラーメッセージが出て、電気泳動が開始されない</p>	
<p>指定外の文字入力</p>	<p>サンプルシートに入力した文字が装置付属の操作ガイドで指定していない文字を入力した可能性があります。サンプルシートに入力した文字を再度確認してください。</p>
<p>その他</p>	<p>上記の対処法を試みて改善されない場合は、下記の手順でマトリックスファイルのアップデートを行ってください。</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) ハードディスクの「System Folder」内にある「ABI Folder」を開きます。 (2) 「ABI Folder」の中にある既存の Matrix File をクリックしアイコンをグレーの状態にします。メニューバーの[File]から<Duplicate>を選択して、既存の Matrix File の複製ファイルを作成します。 (3) ファイル名が「(既存のマトリックスファイル名)copy」となっている複製ファイルを「CUGA Matrix Update」に変更します。 (4) 「Sample Manager」または「Run」フォルダから泳動した 4 種類の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開きます。 (5) Raw Data ボタンをクリックしてそれぞれピークが出ていることを確認してください。 (6) 「Sequencing Analysis」フォルダ内の“Data Utility”を起動します。 (7) メニューバーの「Utility」から[Make Matrix]を選択します。 (8) [Make Matrix]ダイアログボックスの C、T、G、A それぞれの [Matrix Standard]ファイルを選択します。 CUGA®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。 (9) Update File ボタンをクリックします。 (10) 「System Folder」内にある「ABI Folder」の中から「CUGA Matrix Update」を選択します。 (11) 「Taq Terminator Matrix」を選択し、OK ボタンをクリックします。 (12) 確認のメッセージ“Matrix already exists! Do you want to write over existing matrix?”が表示された後、Yes ボタンをクリックします。 (13) 確認のメッセージ“Make Matrix successfully completed”が表示された後、OK ボタンをクリックすると、CUGA シークエンシング用マトリックスファイルのアップデートが完了します。

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	TTTGTTTTATT	TTTCTAAATA	CATTCAAATA	TGTATCCGCT	700
CATGAGACAA	TAACCCTGAT	AAATGCTTCA	ATAATATTGA	AAAAGGAAGA	750
GTATGAGTAT	TCAACATTTT	CGTGTCGCC	TTATTCCCTT	TTTTGCGGCA	800
TTTTGCCTTC	CTGTTTTTGC	TCACCCAGAA	ACGCTGGTGA	AAGTAAAAGA	850
TGCTGAAGAT	CAGTTGGGTG	CACGAGTGGG	TTACATCGAA	CTGGATCTCA	900
ACAGCGGTAA	GATCCTTGAG	AGTTTTCGCC	CCGAAGAACG	TTTTCCAATG	950
ATGAGCACTT	TAAAGTTCT	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 -	<u>TAATACGACT</u>	<u>CACTATAGGG</u>	<u>AGAATGCATG</u>	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
	AGGTCGTTCC	CTCCAAGCTG	GGCTGTGTGC	ACGAACCCCC	CGTTCAGCCC	850
	GACCGCTGCG	CCTTATCCGG	TAATATCGT	CTTGAGTCCA	ACCCGGTAAG	900
	ACACGACTTA	TCGCCACTGG	CAGCAGCCAC	TGGTAACAGG	ATTAGCAGAG	950
	CGAGGTATGT	AGGCGGTGCT	ACAGAGTTCT	TGAAGTGGTG	GCCTAACTAC	1000

- 3'

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。
- ・ PAGE PLUS™は、AMRESCO®社の登録商標です。
- ・ AMRESCO®は、AMRESCO®社の登録商標です。
- ・ 「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

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。