2020/04/10

SupreDye™ v1.1 Cycle Sequencing Kit

ユーザーマニュアル

製品名： SupreDye™ Cycle Sequencing Kit v1.1

（旧製品名）BrilliantDye Terminator Cycle Sequencing Kit

製品概要:

本製品は、実績の高いサンガーチェーンターミネーション法を基にしたコンプリートキットです。このキットは 2.5x 濃度のプレミックスとして梱包され、非常に柔軟性の高いケミストリーとして最適化されています。また、de novo シーケンシングなどを含む多くのシーケンシングアプリケーションのために設計されております。このキットは高品質でロングリードを可能にする均一なピーク高さと最適なシグナルバランスをもたらします。

キット内容

型番	反応回数	RR seq. Premix	5x Seq. Buffer	pGem control	M13(-21) primer
060001	24	192 uL	0.65 mL	10 uL	10 uL
060002	100	800 uL	2.0 mL （追加）1.0mL	10 uL	10 uL
060008	1000	800 uL×10 本	2.0 mL×8 本 （追加）12 mL	50 uL	50 uL

保存温度

-20℃

プロトコール

SupreDye Cycle Sequencing Kit はすぐに使用できるプレミックスのフォーマットですべての必要な構成試薬が梱包されています。これらの試薬は、PCR 産物やプラスミドなどの1本鎖または2重鎖の DNA テンプレート蛍光のサイクルシーケンシング反応に最適です。

希釈:

キットには、SupreDye Sequencing Buffer(5x)が添付されており、最適化されております。

PCR テンプレートの精製:

最適な結果のために、シーケンスの前に、dNTP やプライマーを取り除くことで PCR 産物を精製する必要があります。カラムタイプの精製では、QuickStep 2 PCR Purification Kit 108 本入り（#92159）、酵素反応による精製では、EnzSAP PCR Clean-Up Reagent （500 反応）(#EnzSAP-500)をお勧めします。

テンプレートの品質と量:

シーケンス品質が良くない場合のよくあるケースに、テンプレートの品質と量の問題があります。テンプレートは、タンパク質、RNA、染色体 DNA、PCR プライマー、dNTP、酵素、塩、有機溶媒、残留界面活性剤が出来る限り含まれないように調製する必要があります。

サイクルシーケンシングのために、以下のテンプレート量をガイドラインとしてお使い下さい。

PCR 100-200 bp	2-4 ng
PCR 200-500 bp	5-10 ng
PCR 500-1000 bp	5-20 ng
PCR 1000-2000 bp	10-40 ng
>2000 bp	20-50 ng
Plasmid DNA	150-300ng

テンプレート量が不足すると、弱いシグナルとシグナルノイズ比の上昇をもたらします。過剰なテンプレートはオーバーロードシグナルによってリード長が短くなります。

プライマーの品質と量:

サイクルシーケンシングの際には、必ず高品質なプライマーを使用してください。プライマーによって発生する問題の多くは、不完全な長さのプロダクトを含むことで、”n-1 stutter peaks” を生じることで起こる、いわゆる N-1 アーチファクトです。シーケンシングプライマーを 5 uM(=5 pMol/uL) 濃度、-20℃で保存し、凍結融解を避けることをお勧めします。使用濃度は 3-5 pMol のプライマーを1反応でお使い下さい。

反応溶液:

2.5 x 濃度の SupreDye ready-reaction premix は希釈することが可能です、添付の 5 x Sequencing Buffer をお使い下さい。終濃度が 1 x となっているかどうか確認してください。プレミックスに含まれるバッファー濃度も x 2.5 となっております。標準的な反応は最終ボリューム 20 uL で、プレミックス 8 uL を加えます。しかしながら、過剰なシグナルを回避するためや試薬の節約のために、標準量のプレミックスを加えることはお勧めしません。5 x Sequencing Buffer と 2.5 x rr premix の組み合わせについて、一般的なルールは以下の通りです。

$$\mathrm{VB} = \left(\frac{\frac{VT}{2.5} - VM}{2}\right)$$

VB=反応液中の 5 x Sequencing Buffer 量

VT=トータルのシーケンシング反応液量

VM＝反応液中の SupreDye シーケンシングミックスの量

例:

・1 uL SupreDye rr Premix (VM)

・3.5 uL 5X Sequencing Buffer (VB)

・1 uL Template

・1 uL primer (5 pMol)

・13.5 uL Water

20 uL (VT)

サーマルサイクラー設定:

サイクルシーケンシング反応のために、以下のような仕様のサーマルサイクラーが必要です。

- 96 well (0.2 mL スタンダードフォーマット)
- リッドヒーター（105℃）
- Thermal ramp 1℃/sec
- フルプログラムが可能
- プログラム終了後4℃まで冷却可能

サーマルシーケンシング反応の設定については、BigDye™ Terminator cycle sequencing kit でご使用の条件をそのままお使いいただけます。

その他、実績のある設定は以下の 2 通りです。

サーマルサイクリングのプロトコール①

初期変性	96℃	45 sec
28 サイクル	96℃	10 sec
	50℃	5 sec
	60℃	2 min
	4℃	∞

サーマルサイクリングのプロトコール②

初期変性	96℃	45 sec
25 サイクル	96℃	10 sec
	50℃	5 sec
	60℃	4 min
	4℃	∞

反応後の精製について:

キャピラリーシーケンサーにサンプルを導入する前に、サイクルシーケンシング反応産物はddNTP や塩といった不要物を取り除く必要があります。精製方法は、エタノール沈殿法、セファデックスビーズフィルトレーションや磁気ビーズによる精製法があります。EdgeBio Systems の#42453 Gel filtration Cartridge は膨潤済みのビーズ製品でスピーディーに精製が可能で、シーケンス品質も良く、お勧めです。シングルチューブタイプの#42453 の他、96well タイプ、8-strip タイプもございます。

対応機器:

精製後の反応物は、以下のキャピラリーシーケンサーで解析することができます。

- Applied Biosystems 310 DNA sequencer
- Applied Biosystems 3100 (Avant) Genetic Analyzer
- Applied Biosystems 3100 (XL) Genetic Analyzer
- Applied Biosystems 3500 (xL) Genetic Analyzer
- Applied Biosystems 3730 (XL) DNA Analyzer
- Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer
- Promega Spectrum Compact CE system

DyeSet / Matrix File / Spectral Calibration:

このキットは Filterset E (Dye Set E for BigDye Terminator v1.1)設定に最適化されています。お手持ちのアナライザーのマニュアルをご参照の上、Dye Set のキャリブレーションを行ってください。このキットに含まれている pGEM コントロールを使いキャリブレーションを行うことができます。

Data Analysis:

ベースコーリングに関しては、シーケンサーに付属のシーケンシングアナリシスソフトウェアに従う方法が簡便です。BigDye v1.1 に適した DyeSet / Primer ファイルと組み合わせた KB Base Caller の使用をお勧めします。読み取る配列の長さを改善するためには、PeakTrace (https://www.nucleis.com/peaktrace/) をお勧めします。

キットに含まれるコントロール:

24 回分を除き、すべての SupreDye キットにはコントロール DNA テンプレート(pGEM plasmid DNA)とコントロールプライマー(-21M13)が添付されています。テンプレート 1uL、プライマー 1 uL をシーケンシング反応に利用し、実験のバリデーションとトラブルシューティングのためにお使いいただけます。

ご不明の点は下記までお問合せ下さい。

株式会社エムエステクノシステムズ

●東日本 TEL (03)3235-0673 FAX (03)3235-0669

●西日本 TEL (06)6396-6616 FAX (06)6396-6644

e-mail: technosales@technosaurus.co.jp