

## SupreDye™ Cycle Sequencing Kit

### プロトコール

製品名 : SupreDye™ Cycle Sequencing Kit (ver. 1.1, 3.1)

#### 製品概要 :

SupreDye™ Cycle Sequencing Kit は以下の性能を持ちます。

- ・ 堅牢性の向上
- ・ 均一なピーク高さ
- ・ ロングリード

サーマルサイクリングとシーケンシング反応産物のクリーンアップは最適化されていますが、個々のサンプルに合わせたプロトコールを使用できます。

SupreDye™ Cycle Sequencing Kit はシーケンス反応に必要な試薬があらかじめ混合されており、ユーザーはテンプレートとプライマーを準備するだけで反応を行うことができます。

#### キット内容

型番	反応回数	RR seq. Premix	5x Seq. Buffer	pGem control	M13(-21) primer
060001 063001	24	192 uL	0.65 mL	10 uL	10 uL
060002 060002	100	800 uL	2.0 mL (追加) 1.0mL	10 uL	10 uL
060008 063008	1000	800 uL × 10 本	2.0 mL × 8 本 (追加) 12 mL	50 uL	50 uL

#### 試薬の保存と温度管理

-20°Cで保存してください。

凍結融解の繰り返しは避け、必要に応じて試薬を小分け保存してください。

使用する試薬を融解させた後は on ice にし、室温で長時間置かないでください。

#### Dye set selection

3700/3730 Genetic Analyzer : Z BigdyeV3

3100 Genetic Analyzer, 3100-Avant Genetic Analyzer : Z Bigdye V3

## 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、Sequencing Buffer(5x)が添付されており、最適化されています。

### 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。

### テンプレートの品質確認方法:

- ・アガロースゲル電気泳動

精製した DNA サンプルがアガロースゲル上でシングルバンドとして検出されることを確認します。

Note:環状プラスミドは泳動するとその形状から 3 つのバンドとして現れます。

- ・吸光度測定

A260/A280 比は 1.7 から 2.0 の間を示します。値が小さくなる場合は、タンパク質か有機溶媒のコンタミネーションの疑いがあります。

### DNA 量の測定:

可能であれば、精製した DNA テンプレートを A260 の値から算出、またはアガロースゲル電気泳動から求めてください。

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。

Template	量
PCR 産物	
100-200 bp	1-3 ng
200-500 bp	3-10 ng
500-1000 bp	5-20 ng

1000-2000 bp	10-40 ng
>2000 bp	20-50 ng
Single-stranded	25-50 ng
Double-stranded	150-300 ng
Cosmid, BAC	0.5-1.0 $\mu$ g
Bacterial genomic DNA	2-3 $\mu$ g

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°C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。

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

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:

•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	
<hr/>	
20 uL	(VT)

例②：

- 4 uL SupreDye rr Premix (VM)
  - 2 uL 5X Sequencing Buffer (VB)
  - 1 uL Template
  - 1 uL primer (3.2 pMol)
  - 12 uL Water
- 
- 20 uL

### サーマルサイクラー設定：

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 や BrilliantDye Cycle sequencing Kit でご使用の条件をそのままお使いいただけます。実績のある設定は以下の通りです。

#### サーマルサイクリングの条件①

初期変性	96°C	1 min
28 サイクル 	96°C	10 sec
	50°C	5 sec
	60°C	2 min
	4°C	∞

#### サーマルサイクリングの条件②

初期変性	96°C	1 min
25 サイクル 	96°C	10 sec
	50°C	5 sec
	60°C	4 min
	4°C	∞

サーマルサイクリングの条件③：テンプレート濃度が低い場合、サイクル数を以下のように増やすことをお勧めします。

初期変性	96°C	1 min
40 サイクル 	96°C	10 sec
	50°C	5 sec
	60°C	2 min
	4°C	∞

### 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。

### 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。

### トラブルシューティング

症状	考えられる原因	対処法
配列が認識されない	不十分なテンプレート	<ul style="list-style-type: none"> <li>・DNA テンプレートの濃度を確認してください。</li> <li>・テンプレート濃度を増やしてください。</li> </ul>
	テンプレートにコンタミネーションがある	テンプレートを精製してください。
	不十分なプライマー	<ul style="list-style-type: none"> <li>・プライマーの濃度を確認してください。</li> <li>・プライマーの濃度を増やしてください。</li> </ul>
	プライマーがアニーリングしない	テンプレートに相補的なプライマーを使用してください。
	プライマーのデザインが不完全である、または配列が違っている	プライマーのデザインをやり直してください。
	試薬の入れ忘れ	プロトコールに従い、反応をやり直してください。
	試薬が古い、または劣化している。	フレッシュな試薬を使用してください。
	サーマルサイクラーが停止した	反応をやり直して下さい。
	誤ったサーマルサイクラー設定	反応をやり直してください。
	サーマルサイクラーの不良	<ul style="list-style-type: none"> <li>・定期的にサーマルサイクラーのキャリブレーションを行ってください。</li> <li>・サーマルサイクリングパラメーターを見直してください。</li> </ul>

配列が認識されない (続き)	精製中にシーケンシング反応物が失われた。	<ul style="list-style-type: none"> <li>・スピncラムを使用している場合は、遠心スピードが正しいかどうか確認してください。</li> <li>・エタノール沈殿を行っている場合は、エタノールの濃度が正しいか確認してください。</li> </ul>
	シーケンシング反応物が再懸濁されていない	ペレットを注意して再懸濁してください。
	Lane tracking failure (Genetic analyzer 377)	Lane tracking を確認してください。必要があれば retrack し、reextract してください。
	Electrokinetic Injection failure	インジェクションをやり直してください。
全体的にシグナルが低くノイズが多い	テンプレートが不十分	<ul style="list-style-type: none"> <li>・テンプレートの濃度を上げて下さい。</li> <li>・インジェクションするシーケンシング反応産物の量を増やしてください。</li> </ul>
	テンプレートの分解	フレッシュなテンプレートを準備し、反応をやり直してください。
	古いまたは劣化した試薬の使用	フレッシュな試薬を使用してください。
	サーマルサイクリング条件が適切でない	<ul style="list-style-type: none"> <li>・定期的にサーマルサイクラーのキャリブレーションを行ってください。</li> <li>・サーマルサイクラーのパラメーターを確認してください。</li> </ul>
	Electrokinetic Injection failure	インジェクションをやり直してください。
全体的にシグナルは十分でているが、ノイズが高い。	テンプレートにコンタミネーションがある	テンプレートを精製してください。
	反応液の中に複数のテンプレートが混入している	テンプレート DNA をアガロースゲル電気泳動にかけ、複数のテンプレートが混ざっていないことを確認してください。
	Priming site が複数存在する	<ul style="list-style-type: none"> <li>・プライマーに1つだけ priming site があることを確認してください。</li> <li>・必要があればプライマーデザインをやり直してください。</li> </ul>
	PCR 産物をシーケンシングする場合、複数の種類のプライマーが混入している	PCR テンプレートを精製し、余分なプライマーを取り除いてください。
	プライマーに N-1 コンタミネーションがある	HPLC 精製プライマーを使用してください。
	シグナルの飽和がある	・テンプレートの量を減らしてください。

		・インジェクションするシーケンシング反応液の量を減らしてください。
全体的にシグナルは十分でているが、ノイズが高い。(続き)	不適切な run module を使用	正しいものを使用してください
	不適切な instrument (matrix) file を使用	Dye terminator のケミストリーにあったファイルを使用してください。
シーケンスの特定の部位でノイズが高い	複数種類が混ざったプラスミドを使用	テンプレートが単一であることを確認してください。
	複数種類が混ざった PCR 産物を使用	テンプレートが単一であることを確認してください。
	プライマーダイマーがコンタミネーションしている	・PCR 条件を最適化してください。 ・2 つの PCR プライマーに相補的配列がないか確認してください。 ・PCR プライマーの配列がシーケンシングプライマーとオーバーラップしていないか確認してください。 ・ホットスタート PCR を検討してください。
	テンプレートのリピート部位で slippage が起こっている	・他のシーケンシングケミストリーを試してください。 ・anchored primer を使用してください。
Mobility correction が不十分	Dye set/Primer(mobility)file の選択が不適切	正しい dye set/primer file を使用してください。
	Data analysis で Peak 1 の位置が不適切	新しい Peak 1 の位置を選択してください。
	Dye set/primer(mobility)を構築するために使用されるゲルマトリックスとは全く異なるゲルを使用	Gel type に合わせた適切な dye set/primer file を使用してください。

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](mailto:technosales@technosaurus.co.jp)