

TempliPhi

DNA Amplification Kit

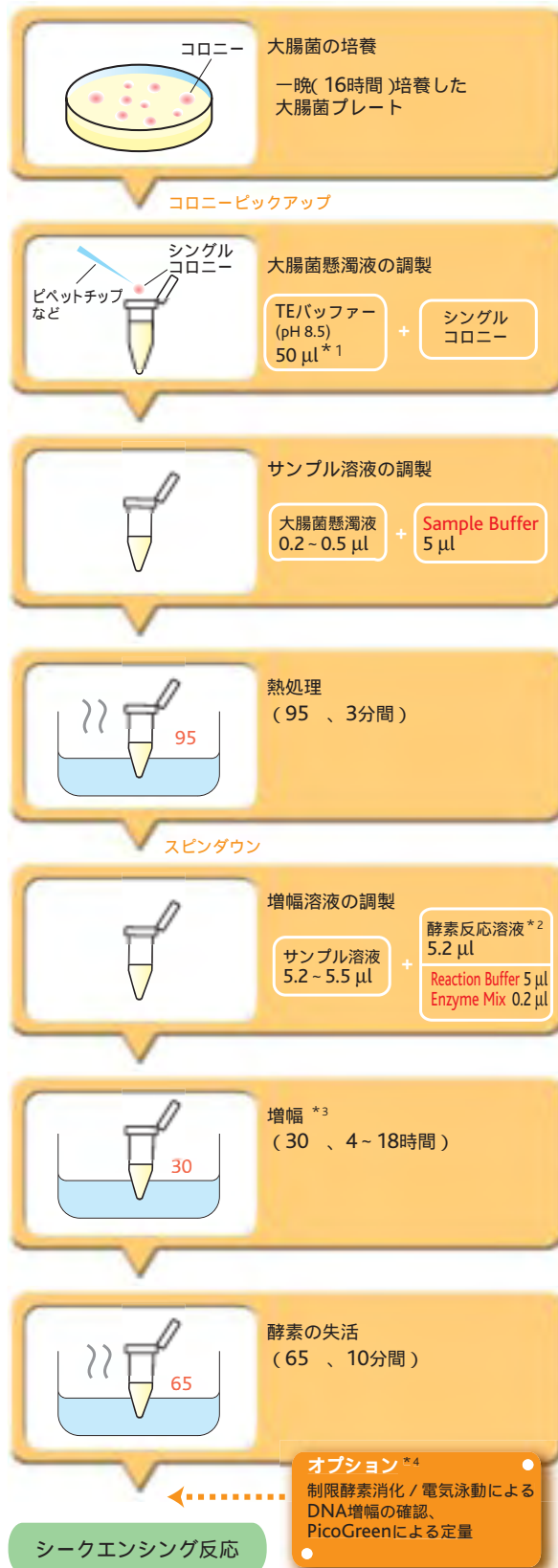
シーケンシング鋳型用
環状DNA調製試薬

完全テクニカルハンドブック ver.2



TempliPhi

Rolling Circle Amplification Kit 簡易プロトコール



キット付属の試薬を赤字で表示しました。

- *1 培養時間が16時間よりも短くコロニーが小さい場合や、低コピー数のプラスミドの場合は、TEバッファの量を適宜減らしてください。予備検討をおすすめします。
- *2 数本分まとめたマスターミックスとして調製することも可能です。用時調製してください。
- *3 通常18時間で反応が飽和に達します。
- *4 シングルカットできる制限酵素でサンプルの一部を消化し電気泳動を行います。濃度既知のサイズマーカーと同時に泳動し、増幅したDNA量を見積もってください。また、反応後にサンプルに粘性がある場合には蒸留水で1/2 ~ 1/20希釈してください。



TempliPhi DNA Amplification Kit

完全テクニカルハンドブック ver.2

TempliPhi 100 DNA Amplification Kit

TempliPhi 500 DNA Amplification Kit

TempliPhi Large Construct DNA Amplification Kit

TempliPhiユーザー登録のお願い

TempliPhiをご購入いただきましたすべてのお客様に満足して製品をご使用いただくために、皆様の実験結果をお伺いし、ご満足いただけるまでサポートを行いたいと考えております。今後、リアルタイムでの情報提供も考えておりますので、大変恐れ入りますが、弊社からコンタクトすることにご了承いただける方は、このページをコピーして各項目にご記入の上、下記番号までファクシミリにてご送付ください。

(すでにユーザー登録された方は、再度ご登録いただく必要はありません)

バイオダイレクトライン FAX 03-5331-9370		
ふりがな	姓 名	
ご氏名		
ご所属	機関(大学、会社等)	
	部門(学部・研究室等)	
	研究室(室・部署等)	
	所在地	〒(7桁) 都道府県
	ご職位	大学教授 大学助教授 大学講師・助手 大学院生・ポスドク 大学生・研究生 公的研究所研究マネージャー 公的研究所研究員 民間研究所研究マネージャー 民間研究所研究員 その他()
ご連絡先	TEL	- - (内線)
	FAX	- -
	メールアドレス*	
* 弊社では、e-mail 情報配信サービス「バイオダイレクトメール」で、最新の製品、技術情報、キャンペーン情報などをお送りしています。配信登録をご希望の方は上欄にメールアドレスをご記入ください。		
現在TempliPhiの使用について何かお困りのことがございましたら、簡単にご記入下さい。		



Contents

1. はじめに	5
1.1 TempliPhiとは.....	5
1.2 キットの構成.....	5
1.3 ホームページ上の製品情報.....	6
1.4 本書で使用する記号.....	6
2. プロトコール	7
2.1 TempliPhi 100/500 DNA Amplification Kit (TempliPhi 100/500キット).....	7
2.1.1 概要.....	7
2.1.2 TempliPhi 100/500キットによるDNA増幅反応.....	7
2.1.3 Control DNAの増幅(コントロール反応).....	9
2.2 TempliPhi Large Construct DNA Amplification Kit (TempliPhi LCキット).....	9
2.2.1 概要.....	9
2.2.2 巨大DNAの増幅反応.....	9
2.2.3 増幅DNAのシーケンシング反応.....	11
2.2.4 増幅DNAによるハイスループットシーケンシング反応(384ウェル対応).....	13
2.2.5 ダイレクトシーケンシング反応プロトコール.....	15
3. 製品Q&A	17
4. トラブルシューティング	19
5. アプリケーションノート	24
5.1 TempliPhi による実験操作のポイント.....	24
5.2 TempliPhi で増幅したプラスミドDNAによる形質転換.....	27
5.3 PicoGreen dsDNA Quantitation Kitを用いた TempliPhi増幅DNAの定量方法.....	29
6. 文献紹介	32
付録 シークエンスサークル(お客様の声・データ紹介)	33 ~ 39



注意！ TempliPhiをご使用の皆様へ

製品を安全かつ有効にご使用いただくため、あらかじめ本マニュアルをご通読ください。

本製品は試験研究用です。人、動物への医療・診断用としては使用できません。本製品を使用する際には細心の注意を払ってください。実験中は適切な保護衣を常に着用し、試薬が皮膚や眼球等に直接触れたり、体内に入ることのないよう注意深く取り扱ってください。試薬に触れた場合にはすぐに水で洗ってください。

製品内容、使用方法等につきましては、下記までご連絡ください。

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

TEL： 03-5331-9336（バイオダイレクトライン）

FAX： 03-5331-9370

e-mail: Tech-JP@ge.com

Copyright© 2004 GE Healthcare

全ての著作権は、GE Healthcareが所有します。正式に文書として発行された時GE Healthcareの許可がない場合は、いかなる意味、方法、場合においても、本取扱説明書の複製や改定、複写、配布、検索システムなどの作成や引用、転載を禁じます。

はじめに

1.1 TempliPhiとは

TempliPhi DNA Amplification Kitには、プラスミドDNAからのシーケンシング鋳型DNA調製用試薬であるTempliPhi 100/500 DNA Amplification Kit (TempliPhi 100/500キット)、BACやFosmid DNAからのシーケンシング鋳型DNA調製試薬TempliPhi Large Construct DNA Amplification Kit (TempliPhi LCキット)があります。図1に示すように、キットに含まれているPhi29 DNA polymeraseによって環状DNAが指数関数的に増幅されます(Rolling Circle Amplification法; RCA法)。30の反応でピコ~ナノグラム単位のDNAがマイクログラムの量に増幅され、従来行ってきた大腸菌の液体培養やプラスミド調製の煩雑なステップを省くことができます。また、Phi29 DNA polymeraseには校正活性があるため、Taq DNA polymeraseと比べてより正確にDNAを増幅することができます。

TempliPhiの増幅には、プラスミドDNAを含む大腸菌(TempliPhi LCキットの場合にはBAC DNAを含む大腸菌)、精製したM13ファージや他の環状DNAを用いることができます。液体培養、アガープレートのコロニー、グリセロールストックいずれの場合であっても使用可能です。増幅効率はいれるサンプルによって変わりますが、反応は一定温度(30℃)で4~18時間(TempliPhi LCキットの場合には18時間)で完了します。TempliPhiによって増幅されたDNAは、環状DNAが直鎖状にタンデムに連結した二本鎖DNAの高分子体となっています。一本鎖のM13を増幅した場合にはforwardプライマーとreverseプライマーの両方が使用できる二本鎖DNAになっているので注意してください。増幅したDNAは精製せずに直接DNAシーケンシング反応に使用することができます。

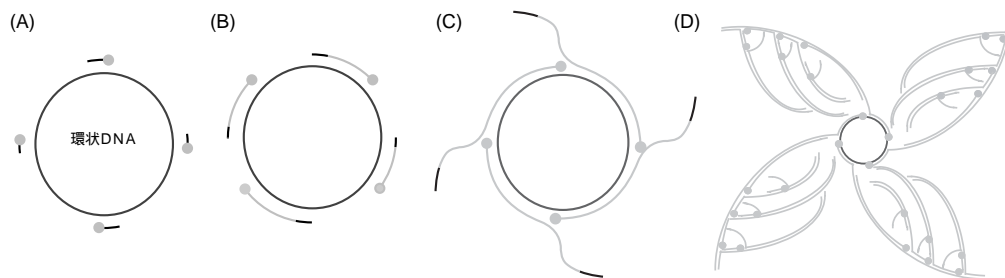


図1. RCA(Rolling Circle Amplification)法による環状DNAの増幅

(●: ランダムヘキサマー, ●: Phi29 DNA polymerase)

ランダムヘキサマーが環状DNAに結合し(A)、Phi29 DNA polymeraseによって伸長反応が行われます(B)。Phi29 DNA polymeraseの鎖置換活性により合成された鎖を置換しながら合成を進めます(C)。ランダムヘキサマーがアニールする部位が新たに露出し、branching(ブランチング)と呼ばれる現象により合成が進行します(D)。

1.2 キットの構成

TempliPhi 100/500 DNA Amplification Kit (TempliPhi 100/500キット)

コンポーネント(キャップの色)	25-6400-10 (100回分)	25-6400-50 (500回分)	保存温度
Sample buffer (白)	1 × 0.5 ml	5 × 0.5 ml	-70 または-20
Reaction buffer (青)	1 × 0.5 ml	5 × 0.5 ml	-70 または-20
Enzyme mix (黄)	1 × 20 µl	5 × 20 µl	-70
Positive control DNA (2 ng/µl pUC19)	1 × 50 µl	5 × 50 µl	-70 または-20

Note

キット添付のPositive control DNAを用いてTempliPhiによる増幅を行った場合、4時間で0.5 µg以上のDNAが増幅されます。

TempliPhi Large Construct DNA Amplification Kit (TempliPhi LCキット)

本キットはシーケンシング反応 1,000回分の鋳型DNAが増幅できます。



注意

このキットはABI 3730 / 3100でご使用いただけます。その他のシーケンサーについてはバイオダイレクトラインまでお問合せください。

コンポーネント(キャップの色)	25-6400-80 (1,000回分)	保存温度
Sample buffer (白)	1 × 9 ml	-70 または-20
Reaction buffer (青)	1 × 9 ml	-70 または-20
Enzyme mix (黄)	1 × 0.5 ml	-70

実験に必要なその他の試薬 (キットには含まれていない)

- ・ RNase A-TEG buffer (BAC DNA抽出時に使用) : 25 mM Tris-HCl (pH8.0), 10 mM EDTA, 50 mM glucose, 100 µg/ml RNaseA
- ・ Lysis solution (BAC DNA抽出時に使用) : 0.2 N NaOH, 1 % SDS
- ・ 3 M 酢酸カリウム溶液 (BAC DNA抽出時に使用) : 294 g 酢酸カリウムに114 mlの酢酸を混ぜて1Lにメスアップ
- ・ 95 % エタノール (BAC DNA抽出時に使用)
- ・ イソプロパノール (BAC DNA抽出時に使用)
- ・ TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) (サンプル希釈に使用、TempliPhi 100/500キット / TempliPhi LCキット共通)

1.3 ホームページ上の製品情報

弊社ホームページ (<http://www.gehealthcare.co.jp/lifesciences>) でTempliPhiの最新情報が入手できます。

1.4 本書で使用する記号



テンプリちゃん

TempliPhi 100/500 DNA Amplification Kit (TempliPhi 100/500キット) に関する記述



バックリちゃん

TempliPhi Large Construct DNA Amplification Kit (TempliPhi LCキット) に関する記述



2.1 TempliPhi 100/500 DNA Amplification Kit (TempliPhi 100/500キット)

2.1.1 概要

キットにはSample buffer、Reaction buffer、Enzyme mixの3種類の反応試薬とcontrol DNAが入っています。Sample bufferにはランダムヘキサマープライマー (pd(N)₆) が含まれており、大腸菌を懸濁して熱変性するステップで用いられます。精製したDNAを用いる場合にはごく少量のDNAから増幅することが可能です。Reaction bufferには塩とヌクレオチドが含まれており、Phi29 DNA polymeraseの酵素反応の緩衝の役割を果たします。Enzyme mix (50%グリセロール溶液) にはPhi29 DNA polymeraseとpd(N)₆が含まれています。

まず、Sample buffer 5 μlに1 μl以下のDNAサンプルを加えて、95 °Cで3分間熱変性します。氷中で冷却した後にEnzyme mixとReaction bufferの混合液を加えて、30 °Cで4~18時間反応させます。反応終了後は酵素を失活させるために65 °Cで10分間熱処理します (Phi29 DNA polymeraseにはエキソヌクレアーゼ活性があるため、酵素を失活させ反応産物の分解を防ぎます)。1~1.5 μgに増幅したDNAはDNA シークエンシング反応に直接使用することができます。

2.1.2 TempliPhi 100/500キットによるDNA増幅反応

ここでご紹介するのは標準的なプロトコールです。ご使用の実験系に応じてプロトコールを至適化することをおすすめします。TempliPhiの反応は少量のプラスミドDNAを効率良く増幅しますが、阻害物質による影響を受けやすいため、1~1.5 μgの増幅DNAが得られない場合は、反応に用いるサンプル量を検討してください。

Note

キットはSample buffer (白)、Reaction buffer (青)、Enzyme mix (黄)、Positive control DNAから構成されています。

() 内はキャップの色です。詳細は1.2をご参照ください。

- 1) Sample bufferとReaction bufferを氷上で溶かします。
- 2) Sample buffer 5 μlをチューブに入れます。
- 3) Sample bufferの入ったチューブにサンプル (以下を参照) を入れます。

サンプルが大腸菌の場合

プレートコロニー :

コロニーの一部 (1/100 ~ 1/10容量, 最低10² ~ 10⁴ cells) を培地の持込みがないように取り、50 μlのTE bufferで懸濁します。ボルテックスにて十分懸濁した後、0.2 ~ 0.5 μlをSample bufferに添加します。

液体培養 :

一晩振盪培養した培養液0.2 ~ 0.5 μlを直接Sample bufferに添加します。

グリセロールストック :

グリセロールストックから1 μlを取り、50 μlのTE buffer (pH7.5 ~ 8.0) で懸濁します。

ボルテックスにて十分懸濁した後、0.2 ~ 0.5 μlをSample bufferに添加します。

サンプルがM13ファージの場合

液体培養 :

ファージ上清液0.2 ~ 0.5 μlを直接Sample bufferに添加します。

ブランク：
ブランクの一部を取り直接Sample bufferに添加します。

液体培養またはグリセロールストックした大腸菌から増幅する場合のポイント

TempliPhiの反応は液体培地やグリセロールストックに含まれる一部の物質により阻害されるため、反応溶液に加えらるる培地やグリセロールストック溶液は可能な限り少なくすることが重要です。また、LB培地を用いて増殖させた大腸菌培養液を使用することをおすすめします。栄養源の豊富な培地で高密度に増殖させた場合には、大腸菌を水またはTE bufferで1/100 ~ 1/10に希釈して、そのうちの1 µlを反応に使用してください。大腸菌を希釈することで反応効率を上げることができます。

コロニーまたはブランクから増幅する場合のポイント

最初の予備実験ではコロニーの1/100 ~ 1/10の量（約 10^2 ~ 10^4 cells）を反応溶液に加えてください。もしくは、50 µlの水またはTE bufferで希釈してから0.2 ~ 0.5 µlを反応溶液に添加してください。反応溶液に大量のサンプルを添加するとTempliPhiの反応が阻害される可能性があります。 10^6 cells以上の大腸菌を使用した場合には反応効率が低下します。大腸菌を希釈することで反応効率を上げることができます。

サンプルが精製したプラスミドDNAまたはM13DNAの場合：
1 pg ~ 10 ngのDNA（0.5 µl以下）をSample bufferに添加します。

- 4) サンプルを含んだSample bufferを熱変性します。95 °Cで3分インキュベートしてください。その後4 °Cまたは氷冷します。

熱変性のポイント

熱変性のステップでは大腸菌やファージのブランクから鋳型となるDNAを溶液中に放出させますが、95 °C以上の温度や3分間以上熱変性を行うと、環状DNAと競合する大腸菌ゲノムDNAも溶液中に放出されるため、熱変性は95 °C、3分間を厳守してください。

- 5) TempliPhiのPremix溶液（Reaction buffer + Enzyme mix）を別のチューブで調製します。1反応あたり5 µlのReaction bufferと0.2 µlのEnzyme mixを混ぜて調製してください。Premix溶液はSample bufferに添加するまで氷中に置いてください。

Note

サンプル数が多い場合は、Premix溶液を数反応分まとめて1本のチューブに調製し、分注して使用することもできます。
なお、Premix溶液は保存ができません。必ず即日使用してください。

- 6) 5) で調製したPremix溶液 5 µlを4) で熱変性させたSample bufferに添加します。
- 7) 30 °Cで4 ~ 18時間インキュベートします（18時間のインキュベーション推奨）。

増幅量のポイント

反応溶液に持ち込まれる阻害物質が最少量の場合、4時間の反応で1.25 ~ 1.75 µgのDNAに増幅されます。4時間で1.25 ~ 1.75 µgまで増幅しない場合には、反応時間を4時間から18時間に延長するか、または反応系に添加する大腸菌サンプル量を減らしてください。

- 8) 反応終了後は65 °Cで10分熱失活させ、氷中に保存します。

サンプル保存のポイント

Phi29 DNA polymeraseを失活させずにサイクルシークエンシング反応を行うと、反応が阻害される可能性があります。また、増幅サンプルを保存する場合、Phi29 DNA polymeraseのエクソヌクレアーゼ校正活性によってDNAが分解されます。増幅サンプルを保存せず、すぐにサイクルシークエンシング反応に使用する場合には、シークエンシング反応の最初の熱変性のステップでPhi29 DNA polymeraseを失活させることができます。

- 9) 増幅DNAは精製せずにサイクルシークエンシング反応に使用可能です。反応に用いるサンプル量は使用するシークエンシングキットやプラスミドDNAによって変わるため、あらかじめ検討することをおすすめします。

オプションA : 増幅サンプルの1~2 µl (150~300 ng) をサイクルシーケンシング反応の20 µlの反応系に添加してください。

オプションB : 増幅サンプルに粘性がある場合には、反応系に添加する前に水またはTE bufferで2~3倍に希釈し、2~10 µlを20 µlの反応系に添加してください。

サイクルシーケンシング反応のポイント

TempliPhiの反応では10 µlの反応系で1.25~1.75 µgのDNAに増幅されます。増幅サンプルは20 で少なくとも1ヶ月は保存可能です。さらに、TempliPhi増幅DNAはサイクルシーケンシング反応後の精製ステップにも影響しません。シーケンシング反応のプロトコルを改変した場合には、添加量以外に精製ステップも含めた実験系全体を最適化する必要があります。

2.1.3 Control DNAの増幅 (コントロール反応)

キットにはコントロール反应用的DNAとしてpUC19 プラスミドDNA (2 ng/µl) が50 µl入っています。

- 1) Control DNA 0.5 µl (1 ng) をSample buffer 5 µlに加えてください。
- 2) プロトコル2.1.2の 4) へ進んでください。
- 3) コントロール反応では4時間で0.5 µg以上のDNAに増幅されます。



2.2 TempliPhi Large Construct DNA Amplification Kit (TempliPhi LCキット)

2.2.1 概要

キットにはSample buffer、Reaction buffer、Enzyme mixの3つのコンポーネントが入っています。Sample bufferにはランダムヘキサマープライマー (pd(N)₆) が含まれており、大腸菌を懸濁して熱変性するステップで用いられます。精製したDNAを用いる場合にはごく少量のDNAから増幅することが可能です。Reaction bufferには塩とヌクレオチドが含まれており、Phi29 DNA polymeraseの酵素反応の緩衝の役割を果たします。Enzyme mix (50%グリセロール溶液) にはPhi29 DNA polymeraseとpd(N)₆が含まれています。

まず、Sample buffer 9 µlに最大で4 µlのDNAサンプルを加えて、95 で3分熱変性します。氷冷した後、Reaction buffer 9 µlとEnzyme mix 0.5 µlの混合液を加えて、30 で18時間反応させます。反応終了後は酵素を失活させるために65 で10分熱処理します (Phi29 DNA polymeraseにはエキソヌクレアーゼ活性があるため、酵素を失活させ反応産物の分解を防ぎます)。5 µgに増幅したDNAはDNAシーケンシング反応に直接使用することができます。

2.2.2 巨大DNAの増幅反応

以下は標準的なプロトコルです。ご使用の実験系に応じてプロトコルを最適化することをおすすめします。TempliPhi LCキットは精製したBAC / Fosmid DNA、菌コロニー、グリセロールストックした菌体、菌体培養液から増幅することが可能です。

- 1) Sample buffer、Reaction bufferを氷上で融解します。
- 2) Sample buffer 9 µlをチューブに入れます。

- 3) Sample bufferの入ったチューブにサンプル（以下を参照）を入れます。

グリセロールストックや液体培養を用いる場合
4 μ lのサンプルをSample bufferに加えてください。

コロニーを用いる場合

アガーを持ち込まないようにコロニーのごく一部を加えてください。アガーや多くのコロニーを加えると、培地中の阻害物質によって反応効率が低下します。精製したBAC DNAやFosmid DNAを用いる場合には1 ~ 10 ng(4 μ l以下の容量)を加えてください。

液体培養またはグリセロールストックした大腸菌から増幅する場合のポイント

TempliPhiの反応はグリセロールストックや液体培地に含まれる一部の物質により阻害されるため、反応溶液に加えらる培地やグリセロールストック溶液は可能な限り少なくすることが重要です。また、LB培地を用いて増殖させた大腸菌培養液を使用することをおすすめします。栄養源の豊富な培地で高密度に増殖させた場合には、大腸菌を水またはTE bufferで1/2 ~ 1/50に希釈して、そのうちの4 μ lを反応に使用してください。希釈することで反応効率をあげることができます。

コロニーまたはプラークから増幅する場合のポイント

最初の予備実験ではコロニーの1/5 ~ 1/10の量（約 10^2 ~ 10^4 cells）を反応溶液に加えてください。もしくは、20 μ lの水またはTE bufferで希釈してから4 μ lを反応溶液に添加してください。

- 4) 大腸菌サンプルを含んだSample bufferを熱変性します。95 °Cで3分インキュベートしてください。その後4 °Cまたは氷上でインキュベートしてください。

熱変性のポイント

熱変性のステップでは大腸菌やファージのプラークから鋳型となるDNAを溶液中に放出させますが、95 °C以上の温度や3分以上の熱変性では環状DNAと競合する大腸菌ゲノムDNAも溶液中に放出されるため、熱変性は95 °C、3分間を厳守してください。

- 5) TempliPhiのPremix溶液（Reaction buffer + Enzyme mix）を別のチューブで調製します。1反応あたり9 μ lのReaction bufferと0.5 μ lのEnzyme mixを混ぜて調製してください。Premix溶液はSample bufferに添加するまで氷中に置いてください。

Note

サンプル数が多い場合は、Premix溶液を数反応分まとめて1本のチューブに調製し、分注して使用することもできます。
なお、Premix溶液は保存ができません。必ず即日使用してください。

- 6) 上記5)で調製したPremix溶液 9.5 μ lを4)で熱変性させたSampleに添加してください。

- 7) 30 °Cで18時間インキュベートしてください。

増幅量のポイント

増幅量はDNAのサイズと純度によって変わります。20 μ lの標準反応系ではDNAは最大で5 μ gまで増幅されます。

- 8) 反応終了後は65 °Cで10分熱失活させ、氷中に保存してください。

サンプル保存のポイント

Phi29 DNA polymeraseを失活させないとサイクルシーケンシング反応が阻害される可能性があります。また、増幅サンプルを保存する場合、Phi29 DNA polymeraseのエクソヌクレアーゼ活性によってDNAが分解されます。

- 9) 増幅DNAは精製せずにサイクルシーケンシング反応に使用可能です。

2.2.3 増幅DNAのシーケンシング反応

TempliPhi LCキットで増幅したDNAは、DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing KitおよびABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kitの鋳型DNAとして使用可能です。以下のサイクルシーケンシングプロトコールはABI 3730およびABI 3100での解析用に至適化されています。プラスミドやM13をシーケンシングする際の標準プロトコールとは内容が異なりますのでご注意ください。

A. 増幅DNAのエタノール沈殿

- 1) 96穴プレートのウェルに5 μ lの増幅DNAと5 μ lのミリQ水を加えます。

鋳型量のポイント

鋳型量は増幅する前のオリジナルの鋳型の大きさに依存します。巨大DNA (BACs) をシーケンスするには小さなDNA (フォスミド) よりもより多くのDNAを必要とします。増幅DNAのシーケンシング反応にはまず3~10 μ lの増幅DNAの使用を推奨しますが、お客様ご自身で必ずシーケンシングのための至適鋳型量を見つけてください。

例) 90 KbのインサートをもつBACの増幅産物をABI3730とBigDye v3.1の組合せでシーケンシングしたときの判読塩基長 (鋳型量と反応プレミックス量を変えています)

TempliPhi LCキットで増幅した反応液量				
BigDye v3.1 Premix	10 μ l	5 μ l	2 μ l	1 μ l
8 μ l	740 bp	730 bp	742 bp	729 bp
4 μ l	550 bp	743 bp	670 bp	5 bp
2 μ l	325 bp	650 bp	603 bp	503 bp
1 μ l	113 bp	230 bp	491 bp	2 bp

: この例での至適条件

- 2) Precipitation Mix (3 M 酢酸ナトリウム水溶液7 mlと95 % エタノール200 mlを混合して作成) を30 μ lずつウェルに分注しサンプルとよく混ぜます。
- 3) 5,000 rpm, 4℃で30分間遠心した後、キムワイブなどの上でプレートを逆さにし500 rpmで瞬間的にスピンドしてウェルの液を捨てます。
- 4) 70 % 氷冷エタノールを30 μ lずつウェルに分注し、5,000 rpm, 4℃で5分間遠心した後、キムワイブなどの上でプレートを逆さにし500 rpmで瞬間的にスピンドしてウェルの液を捨てます。
- 5) プレートを風乾した後、10 mM Trisバッファー, pH 8.0を10 μ lずつウェルに分注し、5~10分間激しく攪拌してペレットを完全に溶かします。プレートを軽く遠心してウェルの底にサンプル液を集めます。

B. 増幅DNAのシーケンシング反応

(1) 反応液の調製

増幅産物	10 μ l
プライマー (3.0 pmol/ μ l)	1 μ l
プレミックス	4 μ l
希釈バッファー (BigDye 5 x Dilution BufferまたはDYEnamic ET dilution buffer)	2 μ l
滅菌水	3 μ l
合計	20 μ l

反応液調製のポイント

サイクルシークエンシング反応を開始する前にプレートを1,000 rpmで1分間遠心します。ルーチンで巨大DNAのシークエンシングをする場合は1.8~3.0 pmolのプライマー使用を推奨します。サイクルシークエンシング反応時にフリーのプライマーが過剰に存在していると、非特異的な増幅の原因になります(例:>4 pmolのプライマー使用)。最も安定したシークエンシング結果を得るには、シークエンシング反応のプレミックス試薬を少なくとも4 µlから最大8 µl使用し20 µlの反応液量で反応します。ここに記載の反応条件はルーチンで使用する場合の推奨条件であり、個々の至適条件を検討する場合の目安にしてください。

(2) サイクルシークエンシングパラメータ

DYEnac ET terminators	BigDye terminators
95 , 20 s	95 , 20 s
50 , 30 s	50 , 30 s
60 , 2 min	60 , 4 min
以上 60 cycles	以上 60 cycles

パラメータ設定のポイント

PCR反応のように反応の最初に熱変性のステップをいれると酵素活性に悪影響を及ぼします。伸長反応の時間は使用するキットによって決まります。サイクル数を60~80サイクルに増加すると標準の25~30サイクルに比べてシグナル強度がより高くなります。

重要な検討項目

- ・ 増幅DNAを定量してシークエンシング反応の鋳型DNA量を至適化します。
- ・ プライマー量を1.8~3.0 pmolの範囲で至適化します。
- ・ 希釈バッファーを使用したり半量スケールで反応液を調製している場合にはプレミックス試薬の液量を増加してみます。

C. シークエンシング反応後の精製

- 1) シークエンシング反応終了後、ウェルに2 µl (1/10当量)の酢酸ナトリウム/EDTAバッファーを加えます。酢酸ナトリウム/EDTAバッファーの組成は1.5 M 酢酸ナトリウム(> pH8.0)と250 mM EDTAです。EDTAはフリーのダイターミネーターがDNAと一緒に沈殿するのを効果的に抑えるので、プライマー近傍で塩基配列判読を乱すダイターミネーター由来の非特異的なピークを劇的に減少させます。
- 2) 80 µlの95 %エタノールを加え、ボルテックスミキサーで激しく撹拌します。384穴プレートを使用している場合には10~12 µl反応液に対して30 µlの95 %エタノールを加えます。また、酢酸ナトリウム/EDTAバッファーと95 %エタノールとを前もって混合しないでください。EDTAが析出してしまう可能性があり、効果が下がります。
- 3) 96穴/384穴プレートを5,000 rpm, 4 で30分以上遠心します。
- 4) キムワイブなどの上でプレートを逆さにし、500 rpmで1分間遠心してウェルの液を捨てます。
- 5) 0.5 ml微量遠心チューブの場合250~500 µl、96穴プレートの場合100 µl、384穴プレートの場合30 µlの70 %エタノールでDNAペレットを洗浄します。
- 6) キムワイブなどの上でプレートを逆さにし、500 rpmで1分間遠心してウェルの液を捨てます。2~5分間、DNAペレットを風乾します。

- 7) 使用するDNAシーケンサーで推奨しているサンプル溶解液10 µlで乾燥サンプルを完全に溶解し、容器を軽く遠心してサンプル溶液をウェルの底に集めます。乾燥サンプルを完全に溶解するにはボルテックスミキサーで5~10分間プレートを激しく攪拌します。

2.2.4 増幅DNAによるハイスループットシーケンシング反応 (384ウェル対応)

ハイコピー数のプラスミドやM13と違い、大腸菌コロニーや大腸菌培養液からのBACやフォスミドの直接増幅は、宿主の溶菌過程でBACの他に宿主のゲノムDNAの一部も溶解させるために、比較的難しいといえます。しかも、BACやフォスミドは宿主中にシングルコピーとして存在し数が少ないのも難点です。そこで、ハイスループットDNAシーケンシング用にTempliPhi LCキットを使用した簡便なプロトコルを以下に紹介します。この方法は効果的かつ合理的であり、シーケンシングのサクセスレートを向上させるのに最も適した方法です。

以下のサイクルシーケンシングプロトコルはABI3730で巨大DNAをシーケンスするように至適化されていますのでプラスミドやM13をシーケンスする標準の推奨プロトコルとは内容が異なります。ご注意ください。

A. 増幅DNAのエタノール沈殿

- 1) 384穴プレートに5 µlのミリQ水と一緒に5 µlの増幅DNAを加えます。

ポイント

鋳型量は増幅前のDNAの大きさによって決まります。BACなど巨大DNAのシーケンシングにはサイズの小さなフォスミドよりも多くのDNAを必要とします。巨大DNAのシーケンシングには増幅DNAを3~10 µlを使用することを推奨します。シーケンシングの鋳型DNAの至適量は実験によって異なりますので必ず鋳型DNA至適量の検討をしてください。

- 2) Precipitation Mixを30 µlずつウェルに分注しサンプルとよく混ぜます。(Precipitation Mix : 3 M 酢酸ナトリウム水溶液7 mlと95 % エタノール200 mlを混合して作成)
- 3) 5,000 rpm , 4 で30分間遠心した後、キムワイブなどの上でプレートを逆さにし500 rpmで瞬間的にスピニングしてウェルの液を捨てます。
- 4) 70 % 氷冷エタノールを30 µlずつウェルに分注し、5,000 rpm , 4 で5分間遠心した後、キムワイブなどの上でプレートを逆さにし500 rpmで瞬間的にスピニングしてウェルの液を捨てます。
- 5) プレートを風乾した後、10 mM Trisバッファー , pH 8.0を8 µlずつウェルに分注し、5~10分間激しく振動攪拌してペレットを完全に溶かします。プレートを軽く遠心してウェルの底にサンプル液を集めます。

B. 増幅DNAのシーケンシング反応

(1) 反応液の調製

増幅産物	8 µl
プライマー (3.0 pmol/µl)	1 µl
プレミックス	2 µl
希釈バッファー (BigDye 5 × Dilution BufferまたはDYEnamic ET dilution buffer)	1 µl
滅菌水	0 µl
合計	12 µl

反応液調製のポイント

サイクルシークエンシング反応を開始する前にプレートを1,000 rpmで1分間遠心します。ルーチンで巨大DNAのシークエンシングをする場合は1.8~3.0 pmolのプライマー使用を推奨します。サイクルシークエンシング反応時にフリーのプライマーが過剰に存在していると、非特異的な増幅の原因になります(例:>4 pmolのプライマー使用)。最も安定したシークエンシング結果を得るには、シークエンシング反応のプレミックス試薬を少なくとも4 µlから最大8 µl使用し20 µlの反応液量で反応します。ここに記載の反応条件はルーチンで使用する場合の推奨条件であり、個々の至適条件を検討する場合の目安にしてください。

(2) サイクルシークエンシングパラメータ

DYEnaic ET terminators	BigDye terminators
95 , 20 s	95 , 20 s
50 , 30 s	50 , 30 s
60 , 2 min	60 , 4 min
以上 60 cycles	以上 60 cycles

パラメータ設定のポイント

PCR反応のように反応の最初に熱変性のステップをいれると酵素活性に悪影響を及ぼします。伸長反応の時間は使用するキットによって決まります。サイクル数を60~80サイクルに増加すると標準の25~30サイクルに比べてシグナル強度がより高くなります。

重要な検討項目

- ・ 増幅DNAを定量してシークエンシング反応の鋳型DNA量を至適化します。
- ・ プライマー量を1.8~3.0 pmolの範囲で至適化します。
- ・ 希釈バッファーを使用したり半量スケールで反応液を調製している場合にはプレミックス試薬の液量を増加してみます。

C. シークエンシング反応後の精製

- 1) シークエンシング反応終了後、ウェルに1 µl (1/10当量)の酢酸ナトリウム/EDTAバッファーを加えます。酢酸ナトリウム/EDTAバッファーの組成は1.5 M 酢酸ナトリウム(> pH8.0)と250 mM EDTAです。EDTAはフリーのダイターミネーターがDNAと一緒に沈殿するのを効果的に抑えるので、プライマー近傍で塩基配列判読を乱すダイターミネーター由来の非特異的なピークを劇的に減少させます。
- 2) 30 µlの96 %エタノールを加え、ボルテックスミキサーで激しく攪拌します。酢酸ナトリウム/EDTAバッファーと95 %エタノールとを前もって混合しないでください。EDTAが析出してしまう可能性があり効果が下がります。
- 3) 384穴プレートを5,000 rpm , 4 で30分以上遠心します。
- 4) キムワイブなどの上でプレートを逆さにし、500 rpmで1分間遠心してウェルの液を捨てます。このステップで出来るだけ沢山の液を捨てるほどフリーのダイターミネーター除去に効果があります。
- 5) 30 µlの70 %エタノールでDNAペレットを洗浄します。
- 6) キムワイブなどの上でプレートを逆さにし、500 rpmで1分間遠心してウェルの液を捨てます。2分間、DNAペレットを風乾します。

- 7) 使用するDNAシーケンサーで推奨しているサンプル溶解液10 µlで乾燥サンプルを完全に溶解し、容器を軽く遠心してサンプル溶液をウェルの底に集めます。乾燥サンプルを完全に溶解するにはボルトテックスミキサーで5~10分間プレートを一激しく攪拌します。

2.2.5 ダイレクトシーケンシング反応プロトコール

TempliPhi LCキットで増幅した増幅DNAは、DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing KitおよびABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kitの鋳型DNAとして使用することが可能です。以下のサイクルシーケンシングプロトコールはABI 3100で解析するのに至適化されています。プラスミドやM13をシーケンシングする標準プロトコールとは内容が違いますのでご注意ください。(384穴プレートを使用する場合は2.2.4をご利用ください。)

A. 増幅DNAのシーケンシング反応

(1) 反応液の調製

増幅産物	10 µl ^{注)}
プライマー (3.0 pmol/µl)	1 µl
プレミックス	4 µl
希釈バッファー (BigDye 5 × Dilution BufferまたはDYEnamic ET dilution buffer)	2 µl
滅菌水	3 µl
合計	20 µl

注) 鋳型量は増幅前のDNAの大きさによって決まります。BACなど巨大DNAのシーケンシングにはサイズの小さなフォスミドよりも多くのDNAを必要とします。巨大DNAのシーケンシングには、増幅DNAを3~10 µlを使用することを推奨します。シーケンシングの鋳型DNAの至適量は実験によって異なりますので必ず鋳型DNA至適量の検討をしてください。

反応液調製のポイント

サイクルシーケンシング反応を開始する前にプレートを1,000 rpmで1分間遠心します。ルーチンで巨大DNAのシーケンシングをする場合は1.8~3.0 pmolのプライマー使用を推奨します。サイクルシーケンシング反応時にフリーのプライマーが過剰に存在していると、非特異的な増幅の原因になります(例: > 4 pmolのプライマー使用)。最も安定したシーケンシング結果を得るには、シーケンシング反応のプレミックス試薬を少なくとも4 µlから最大8 µl使用し20 µlの反応液量で反応します。ここに記載の反応条件はルーチンで使用する場合の推奨条件であり、個々の至適条件を検討する場合の目安にしてください。

(2) サイクルシーケンシングパラメータ

DYEnaic ET terminators	BigDye terminators
95 , 20 s	95 , 20 s
50 , 30 s	50 , 30 s
60 , 2 min	60 , 4 min
以上 60 cycles	以上 60 cycles

パラメータ設定のポイント

PCR反応のように反応の最初に熱変性のステップをいれると酵素活性に悪影響を及ぼします。伸長反応の時間は使用するキットによって決まります。サイクル数を60~80サイクルに増加すると標準の25~30サイクルに比べてシグナル強度がより高くなります。

重要な検討項目

- ・ 増幅DNAを定量してシーケンシング反応の鋳型DNA量を至適化します。
- ・ プライマー量を1.8~3.0 pmolの範囲で至適化します。
- ・ 希釈バッファーを使用したり半量スケールで反応液を調製している場合にはプレミックス試薬の液量を増加してみます。

B. シーケンシング反応後の精製

- 1) シーケンシング反応終了後、ウェルに2 μ l (1/10当量)の酢酸ナトリウム / EDTAバッファーを加えます。酢酸ナトリウム / EDTAバッファーの組成は1.5 M 酢酸ナトリウム (> pH8.0)と250 mM EDTAです。EDTAはフリーのダイターミネータがDNAと一緒に沈殿するのを効果的に抑えるので、プライマー近傍で塩基配列判読を乱すダイターミネーター由来の非特異的なピークを劇的に減少させます。
- 2) 80 μ lの95 %エタノールを加え、ボルテックスミキサーで激しく攪拌します。酢酸ナトリウム / EDTAバッファーと95 %エタノールとを前もって混合しないでください。EDTAが析出してしまいう可能性があり効果が下がります。
- 3) 96穴プレート を5,000 rpm , 4 分で30分以上遠心します。
- 4) キムワイプなどの上でプレートを逆さにし、500 rpmで1分間遠心してウェルの液を捨てます。このステップで出来るだけ沢山の液を捨てるほどフリーのダイターミネータ除去に効果があります。
- 5) 0.5 ml微量遠心チューブの場合250~500 μ l、96穴プレートの場合100 μ lの70 %エタノールでDNAペレットを洗浄します。
- 7) キムワイプなどの上でプレートを逆さにし、500 rpmで1分間遠心してウェルの液を捨てます。2~5分間、DNAペレットを風乾します。
- 8) 使用するDNAシーケンサーで推奨しているサンプル溶解液10 μ lで乾燥サンプルを完全に溶解し、容器を軽く遠心してサンプル溶液をウェルの底に集めます。乾燥サンプルを完全に溶解するにはボルテックスミキサーで5~10分間プレートを激しく攪拌します。

製品Q&A



TempliPhi 100/500キット / TempliPhi LCキット共通

Q. キットの保存方法は？

A. -70℃で保存してください（-80℃、-85℃のフリーザーでも保存可能です）。あらかじめ分注して保存することをおすすめします。また、酵素活性が低下するのを防ぐため、凍結融解は5回以内にとどめてください。酵素を含まないバッファー（Sample Buffer、Reaction Buffer、Positive Control DNA）は、-20℃で保存することができます。

Q. キットを4℃で保存できますか？

A. できません。

Q. どのような増幅産物が得られますか？

A. 出発材料とした環状DNAと、同一あるいは相補的な配列が繰り返し連なった、直鎖状の一本鎖または二本鎖DNAが合成されます。

Q. Phi29 DNA polymeraseは組換え型酵素ですか？

A. Phi29 DNA polymeraseは組換え型酵素で、大腸菌から精製しています。

Q. Phi29 DNA polymeraseの忠実度（fidelity）は？

A. 校正活性を有し、複製時に起こる塩基の取込みエラー率は $1 \times 10^{-6} \sim 10^{-7}$ と極めて低くなっています。ちなみにTaq DNA polymeraseの場合、取込みエラー率は 1×10^{-4} です。

Q. Phi29 DNA polymeraseは40℃以上で酵素活性がありますか？

A. Phi29 DNA polymeraseの至適反応温度は30℃で、40℃以上ではすぐに失活します。

Q. GCリッチまたはATリッチな配列でも増幅することはできますか？

A. できます。弊社の評価実験ではGCリッチまたはATリッチサンプルでも全体の増幅効率にはほとんど差がありませんでした。増幅量が少ない場合には、増幅反応時間を18時間まで延長してください。

Q. DNAを増幅することは可能ですか？

A. DNAは環状DNAでないため、きわめて増幅効率が低く、TempliPhiでの増幅には適しません。DNAの増幅にはGenomiPhi DNA Amplification Kit（25-6600-01）をおすすめします。

Q. ゲノムDNAを増幅することは可能ですか？

A. ゲノムDNAは環状DNAでないため、きわめて増幅効率が低く、TempliPhiでの増幅には適しません。ゲノムDNAの増幅にはGenomiPhi DNA Amplification Kit（25-6600-01）をおすすめします。

Q. 熱変性ステップ（95℃，3分）を省くことはできますか？

A. 熱変性を行わないと増幅効率が著しく低下するためおすすめしません。

Q. 熱変性ステップ（95℃，3分）を延長することはできますか？

A. 95℃の熱変性ステップの時間を延長すると、DNAにニックがはいるためおすすめしません。

Q. 65℃，10分のインキュベーションを省くことはできますか？

A. Phi29 DNA polymeraseはブルーフリーディング機能としてヌクレアーゼ活性を持っており、増幅反応終了後、熱処理で酵素を失活させる必要があるため、おすすめしません。

Q. 増幅したDNA量を確認するには？

A. 反応産物を適当な制限酵素で切断した後、アガロースゲル電気泳動を行って確認してください。

または、PicoGreen dsDNA Quantitation Kitを用いて定量してください(定量方法については29~31ページを参照)。

Q. 増幅したDNA量をUV吸光度計で定量できますか？

A. 反応液に残っている過剰のランダムヘキサマーやヌクレオチド類の紫外線吸収により、UV吸光度計で測定した値から求めたDNA量は実際のDNA量よりも高い値を示し不正確です。増幅DNAの定量にはPicoGreen ds DNA Quantitation Kit (Molecular Probes) を用いて定量してください。

Q. 増幅したDNA(反応後の反応液)は保存できますか？

A. できます。保存する場合は65、10分間(酵素の不活化)のステップを必ず行ってください。この操作によりPhi29 DNA polymerase のエキソヌクレアーゼ活性を失活させます。
-20で少なくとも4ヶ月は保存できます。

Q. 増幅DNAをエタノール沈殿で精製した後に、乾燥させすぎってしまった場合はどのように溶解すればよいですか？

A. TempliPhiで増幅したDNAは branched concatemer (5ページ図1D参照)なので、乾燥させすぎると再溶解させるのが困難になります。加えるエタノールは2倍量を守り、乾燥させすぎないようにご注意ください。また、溶解にはTE bufferを用いて、少なくとも1~2時間氷上におくか、または冷蔵庫に一晩おいて溶解させてください。

Q. TempliPhi で反応した反応液をどのくらいシーケンシング反応に加えたらよいですか？

A. 使用するシーケンサー、シーケンシング試薬により異なります。アガロースゲル電気泳動またはPicoGreen dsDNA Quantitation Kitにより増幅したDNA 量を確認した後、通常シーケンシング反応に使用しているDNA 量を使用してください。

Q. TempliPhiの反応後、残存するランダムヘキサマーはシーケンシング反応を阻害しますか？

A. サイクルシーケンシング反応では高温でプライマーをアニールさせるため、ランダムヘキサマーは反応に影響しません。



TempliPhi 100/500キットのみ

Q. グリセロールストックや培養液から増幅する際の注意点は？

A. 培地成分が増幅反応を阻害することがあるため、反応に持ち込まれる培地量をできる限り少なくしてください。培養液などを用いる場合は、蒸留水で10~100倍に希釈し、その内1 µl以下を反応液に加えてください。増幅反応を最適化するには培養液の希釈系列を作製し、それぞれの系列について増幅量を確認することをおすすめします。

Q. コロニーから増幅する場合、どのくらいの量を使用すればよいですか？

A. 直径1 mm 程度のコロニーの場合、1 / 100 ~ 1 / 10 量(約 $10^2 \sim 10^4$ cells 相当)が適量になります。コロニーを10~100 µlの蒸留水に懸濁し、その内1 µl以下を反応液に加えてください。増幅反応に過剰な菌体が持ち込まれると増幅効率が低下します。

OD₆₀₀の値を測定した場合、0.1 OD / ml がおよそ 10^8 cells / ml に相当します。

Q. 植菌してから日数が経過しているコロニーから増幅できますか？

A. できるだけ新しいコロニーを使用してください。弊社の評価実験ではプレートに植菌してから2週間以内のコロニーであれば使用することが可能でした。古いコロニーを使用した場合、増幅効率が低下することがあります。

Q. 低コピー数のプラスミドでも増幅できますか？

A. できます。ただし、増幅量がプラトーに達するまで時間がかかることがあります。増幅量が少ない場合には、増幅反応時間を18時間まで延長してください。

Q. BACから増幅できますか？

A. BACの増幅には、TempliPhi LCキットをおすすめします。

Q. 使用するサンプル量（DNA量）によって増幅量に差が出ますか？

A. 4～17時間の増幅反応では増幅量に差が出る場合があります。使用するサンプル量（DNA量）にばらつきがある場合には、増幅反応時間を延長することをおすすめします。18時間の増幅反応を行った場合には、反応がプラトーに達し増幅量に大きな差は生じません。

Q. 5 µg以上に増やしたい場合にはどうすれば良いですか？

A. 反応スケールを4倍以上にしてください。



TempliPhi LCキットのみ

Q. 室温でTempliPhi LCキットの反応を行うことは可能ですか？

A. 可能です。25℃以上であれば30℃での反応とほとんど変わらずにDNA増幅が認められます。

Q. 増幅反応にかかる時間はどの位ですか？

A. 増幅反応は通常30℃で一昼夜（18時間）かかります。

Q. グリセロールストックや培養液から増幅する際の注意点は何か？

A. 培地成分が増幅反応を阻害するため、反応に持ち込む培地量をできる限り少なくしてください。特にSOC培地のような富栄養培地で培養した高濃度の菌体から反応する場合は必ず滅菌水がTEバッファーで培養液を2倍から50倍に希釈して使用してください。

Q. コロニーから増幅する場合、どのくらいの量を使用すればよいですか？

A. 1コロニーの1/5～1/10量で試してください。コロニーを針でつついて20 µlの滅菌水がTEバッファーにけん濁し、Vortexなどで攪拌した後4 µlを9 µlのSample Bufferに加えてください。反応の至適条件を検討するにはコロニーけん濁液の希釈系列を作成し、それぞれの系列について増幅量を確認することをおすすめします。

Q. 10 µg以上の増幅産物を得たいのですが？

A. 反応液量のスケールアップをすることで収量の増加が可能です。精製したBAC DNA 10 ngを鑄型として通常の20 µlの反応液量を1 mlにスケールアップすれば通常の50倍の収量の250 µgが期待できます。この場合Sample BufferとReaction Bufferをそれぞれ450 µlずつ、Enzyme Mixを25 µl使用します。

Q. ネガティブコントロール反応で増幅反応が認められるのはなぜですか？

A. TempliPhi LC反応はあらゆるDNAを鑄型にするため、規定量のBAC DNAが反応液に含まれていない場合、反応液中のプライマーが複雑なダイマーを形成し、これらを鑄型として反応が起こります。

Q. シークエンシング反応をする前に増幅DNAを精製する必要がありますか？

A. 精製する必要はありません。増幅反応した反応液の一部を直接シークエンシング反応の鑄型DNAサンプルとして使用可能です。DYEnamic ET Terminator (ABI用) キットあるいはBigDye terminator ver 3.1 (Applied Biosystems) キットでシークエンシング反応を行いApplied BiosystemsのDNA sequencerで解析可能であることが確認されています。

Q. 増幅反応した反応液をどのくらいシークエンシング反応に加えたらよいですか？

A. シークエンシング反応に加える量は増幅反応の鑄型となったDNAの大きさによって変わります。フォスミドよりもサイズが大きなBACはより多くの反応液を使用します。サンプルにより至適量が異なりますので、加える反応液量について必ず条件検討してください。シークエンシング反応の目安は、20 µlの増幅反応液から10 µlをシークエンシング反応（20 µl）の鑄型サンプルに使用します。プライマー量は3 pmolです。



ケース1. 増幅しない、または増幅量が少ない。

少量 (1 μl) のサンプルを0.6%アガロースゲル電気泳動して、増幅反応の結果を確認してください。増幅量のポイント (8ページ) にも記載したように、TempliPhi 100/500キットによる増幅DNAは約1.5 μg になります。反応を阻害する物質の混入を最小限に抑えて実験条件を至適化すれば、TempliPhi 100/500キットによる増幅反応は4時間で終了可能です (図2)。

注意

TempliPhi LCキットを使用した場合、18時間の反応で増幅DNA量は最大5 μg になります (10ページ)。

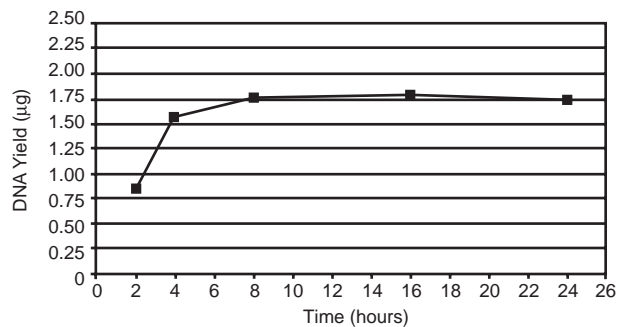


図2. TempliPhi 100 DNA Amplification Kitの反応性

1 ngのpUC19 DNAの増幅反応を24時間まで行いました。DNAの定量はPicoGreen dsDNA Quantitation reagentを用いて行いました。データはTriplicate実験の結果を示しています。



1. 過剰量のサンプルを反応溶液に加えた。

まず、増幅反応に用いるサンプル量を減らします。反応に必要なサンプル量は鑄型DNAの種類 (何からサンプルを調製したか) によって変わります。サンプル量の決定方法については2.1.2 (7ページ) をご参照ください。

増幅させるサンプルがコロニーやブランク由来の場合、コロニーを1/100 ~ 1/10に希釈した量 (最低約 10^2 ~ 10^4 個の細胞が含まれている) が必要です (図3)。

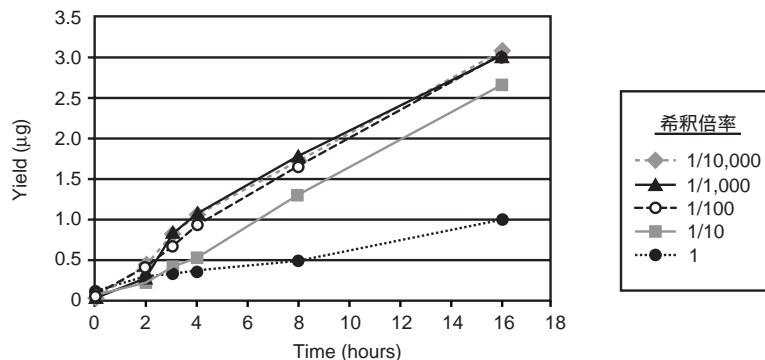


図3. 過剰量の鑄型DNAによるTempliPhi増幅反応の阻害

プラスミド (pUC19) を保持した大腸菌 (DH5) コロニー (約1.5 mm径) をピックアップし、変性バッファーで希釈しました。増幅はTempliPhi DNA Amplification Kitで行いました。

反応の至適条件は、使用するサンプルの希釈系列を作製して検討します。2倍希釈系列のサンプル 1 μl を各反応液に加えて至適反応時間で増幅させ、アガロースゲル電気泳動で反応を確認します。また、キットに添付のプラスミドDNAを用いてコントロール反応も行ってください。



2. 過剰の培養液を反応溶液に加えた。

培養液にはTempliPhiの反応を阻害する成分が含まれている場合があります。宿主細胞や使用する培地の種類によってはTempliPhiの反応が阻害されます(図4)。阻害物質の持ち込みを最小限にするため、反応液に添加する培養液量を1 μl 以下(TempliPhi LCキットの場合5 μl 以下)にしてください。添加する培養液量が少量のため操作しにくい場合は、TE bufferや滅菌水で培養液の一部を希釈して反応に用います。この場合も添加量は1 μl 以下(TempliPhi LCキットの場合5 μl 以下)にしてください。

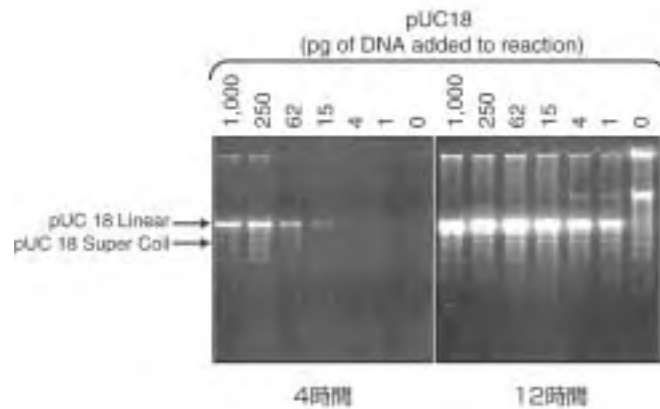


図4. TempliPhi DNA Amplification Kitによる微量DNAの増幅

TempliPhiで0~1 ngのpUC18 DNAを増幅しました。4または12時間反応後の増幅産物をEcoRIで切断しアガロースゲル電気泳動を行いました。



3. 必要以上に熱変性処理をした。

必ずしも細胞を完全に溶菌させる必要はありませんが、最初の熱変性処理はプラスミドを菌体から効率よく溶出しプライマーをアニールさせるために必要なステップです。95℃、3分間の熱処理を行ってください。95℃以上の温度や処理時間の延長は、鋳型DNAにニックが入りRCA反応の効率が悪くなるので、おすすめしません。



4. 酵素が失活している。

Phi29 DNA polymeraseは必ず-70℃(または-80℃)で保存してください。-20℃で保存する場合には試薬を2ヶ月以内で使い切ってください。霜取り機能付きのフリーザーは使用しないでください。また、TempliPhiの性能を確認する場合は、キット付属のコントロールDNAを使用してください。



5. DNA量が十分でない。

1 pgのプラスミドDNAからでも確実に増幅できることが確認されていますが(図4)、実験ごとに至適条件を検討することをおすすめします。条件検討は、幅広い希釈系列のサンプルを用いて行います。



6. DNAが環状になっていない。

Phi29 DNA polymeraseによる反応を効率よく行うために、必ず環状の鋳型DNAを使用してください。制限酵素で消化したDNAやニックが入っているDNAでは反応効率が低下します。

ケース2. シークエンシング結果が得られない、良くない。



1. DNAが増幅していない。

エチジウムブロマイドのような二本鎖DNA染色色素を用いて、少量（1 μl）の増幅産物を0.6%アガロースゲル電気泳動で解析し、増幅を確認してください。



2. 非特異的な増幅が起きている。

非特異的な増幅の原因として主に3つの理由が考えられます。

(1) 目的外のDNAの混入による非特異的増幅

Phi29 DNA polymeraseを使用した場合、環状DNAであればごく微量であっても増幅されるため、雑菌の混入のない清潔な環境下で実験を行うことが重要です。

(2) プライマーダイマーによる非特異的増幅

鋳型DNAがない場合でも増幅産物は生じます。これはプライマーダイマー由来の非特異的な増幅産物です。Phi29 DNA polymeraseによって増幅されるDNAは二本鎖DNAです。増幅したDNAを適切な制限酵素で消化してアガロースゲル電気泳動を行うと、予想されるバンドパターンが得られます。予想されるパターンが得られない場合は、鋳型DNA不足による非特異的な増幅が起こっているか、熱変性のステップに問題がある可能性があります。実験の至適条件を検討する場合には、幅広い希釈系列のサンプルを用いてください。変性処理は95℃、3分間を厳守してください。

(3) 試薬の不適切な保管による非特異的増幅

TempliPhi Premix（Reaction buffer + Enzyme mix）には反応に必要な成分がすべて含まれています。サンプルに添加する直前まで氷上に置き、非特異的な増幅産物の生成を防いでください。また、Phi29 DNA polymeraseは5℃でも活性があるので、TempliPhi Premixは用時調製してください。



3. 増幅DNAの量がサンプルによって一定していない。

一回の反応で得られる増幅DNAの量がサンプルによって一定していないと、シークエンシングの成功率にばらつきが生じます。シークエンシング前にPicoGreen dsDNA Quantitation Kitのような二本鎖DNA定量試薬を使って増幅DNAを定量してください。UV吸光度測定によるDNAの定量は、残存するランダムプライマーなどによって正確に測定できないためおすすめできません。16～18時間のTempliPhi反応では約1.5 μgの増幅DNAが得られます。増幅DNA量が一定でない場合、サイクルシークエンシング反応に加える鋳型量を適宜調整してください。また、増幅DNAが少ない場合には、最長24時間を目安に反応時間を延長してください。



4. シークエンシング反応に用いた鋳型量が適切でない。

TempliPhiによる反応終了後、増幅DNAに粘性がある場合があり、正確なピペット操作が困難になります。シークエンシング反応に進む前に希釈することをおすすめします。40 μ lの滅菌水かTE bufferを加えて数回ピペッティングしてください。必要であればボルテックスでよく混ぜてください。混和後は20 μ lのシークエンシング反応系に対して4~10 μ l (100~300 ng)の希釈サンプルを用いてください。

精製したプラスミドDNAを用いる場合とコロニーや培養液から直接増幅した場合で、シークエンシング反応に使用するための増幅DNAの至適量は異なります。幅広い希釈系列のサンプルを用いて至適条件を検討してください。



5. 反応スケールを小さくしたり Premix溶液を希釈した。

シークエンシング反応が失敗したときに共通する原因として、極端に反応スケールを小さくした場合のほか、Premix溶液を希釈した場合が考えられます。TempliPhiによる増幅産物について、これまでにさまざまなメーカーのシークエンシング試薬により条件検討を行ってきた結果、増幅後の精製は不要であることが確認されています。しかし、Premix溶液を極端に希釈すると、シークエンシング反応に必須の成分が不安定になるため、Premix溶液の希釈は行わないでください。



6. 満足するシークエンシング結果が得られない。

BAC DNAやフォスミドDNAなど巨大DNAのシークエンシングは、一般的な方法で精製したDNAを用いた場合でも多くの要因の影響を受け、いくら推奨する方法でシークエンシングしても満足のいく結果が得られない場合があります。さらに、シークエンシングするインサートDNAの塩基配列によってもその複雑性ゆえに悪影響を受ける場合があります。このような場合には一般的な方法で精製したDNAを使用した場合でもシークエンシングすることは難しく、インサートDNAを断片化してサブクローニングしてからシークエンシングすることをおすすめします。

5.1 TempliPhi DNA Amplification Kitによる実験操作のポイント

ここでは、シーケンシング用鋳型を増幅させる操作のポイントをご紹介します。TempliPhi増幅反応の至適化やTempliPhi増幅DNAを用いたシーケンシング反応を行うときには以下を参考にしてください。

キーワード： TempliPhi、DNA増幅、サイクルシーケンシング、アルカリ溶解、PicoGreen、制限酵素切断

使用する試薬

TempliPhi 100 DNA Amplification Kit
(コード番号 25-6400-10)

TempliPhi 500 DNA Amplification Kit
(コード番号 25-6400-50)

TempliPhi 10,000 DNA Amplification Kit*
(コード番号 25-6400-01)

制限酵素 *EcoRI*

PicoGreen dsDNA Quantitation Kit
(Molecular Probes)

TE buffer

* TempliPhi 10,000 DNA Amplification Kit (25-6400-01)は、TempliPhi 100 / 500 DNA Amplification Kitの倍量のスケールで反応するように至適化されたキットです。最終的に増幅DNAが倍量(約3 µg)得られます。

操作のポイント

1. 鋳型DNAが多すぎると増幅反応は阻害されます。

反応に必要な鋳型量はそのDNAを何から調製したかによって変わりますが、効率よく増幅するには1 ng程度の微量サンプルを用いることが重要です(詳細については本冊子の2~4章をご参照ください)。また、TempliPhiの反応は大腸菌の培養で生成される副産物によって阻害されることもあり(図5) 結果として収量が一定でなかったり、あるいは反応産物が得られない場合もあります。理想的にはTempliPhi反応に添加する培養液の量は、阻害物質の持込みを最小限にするために1 µl以下にしてください。添加量が少なすぎて操作しにくい場合には、TE bufferや滅菌水で培養液の一部を希釈したうえで、反応には1 µl以下を加えてください。増幅反応を至適化するためにサンプル液の希釈系列を作製して予備実験を行うことをおすすめします。

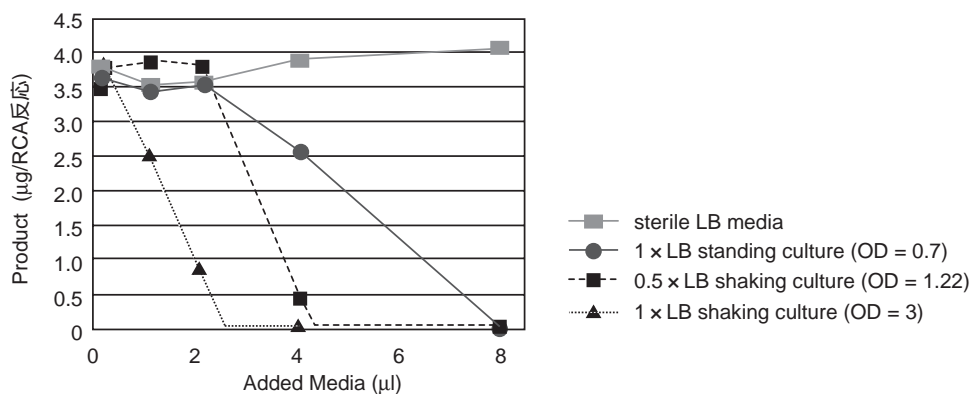


図5. 培養液中の副産物によるTempliPhi反応の阻害

フィルター濾過した培地と1 ngのpUC DNAをTempliPhi反応溶液に加え、TempliPhi 10,000 DNA Amplification Kitを用いて増幅を行いました。

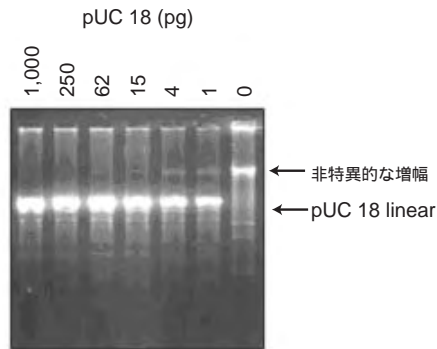


図6. DNA非存在下での非特異的な増幅

0~1 ngのpUC18 DNAを使ってTempliPhi増幅を行いました。12時間反応後、反応産物をEcoRIで消化しアガロースゲル電気泳動を行いました。

2. 鋳型DNAが入っていない場合でもDNAの増幅は起こります。

TempliPhiの反応溶液中にDNAを添加していない場合でも増幅産物は生じます。これはプライマーダイマー由来の非特異的な増幅産物です。TempliPhiによる反応のように微量DNAから指数関数的かつ高感度に増幅する方法の場合、ごくわずかのDNAが混入しているだけで増幅が生じてしまいますが、このような増幅産物からは有意義なシーケンシング結果を得ることはできません。

3. TempliPhi反応の増幅産物は二本鎖DNAです。

サンプルを適切な制限酵素で消化して電気泳動すれば、予想される電気泳動パターンが得られます。予想されるパターンが得られない場合は、鋳型DNA量の不足による非特異的な増幅が起こっている可能性が考えられます(図6)。

4. TempliPhi試薬は適切に保存する必要があります。

Phi29 DNA polymeraseの保存温度は -70 (または -80)です。試薬を2ヶ月以内に使用する場合には、-20 保存も可能です。霜取り機能付きのフリーザーは使用しないでください。TempliPhiの性能を確認するためには、キットに添付されているコントロールDNAを用いて反応を行ってください。

5. TempliPhi Premix (Reaction buffer + Enzyme mix) は用時調製してください。

TempliPhi Premixには反応に必要な成分がすべて含まれています。非特異的な増幅DNAが生じないように、使用前まで氷上に置いてください。Phi29 DNA polymeraseは

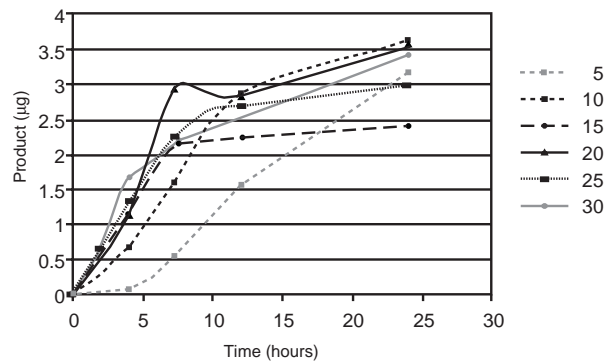


図7. さまざまな温度条件下でのTempliPhi 10,000 DNA Amplification Kit の反応性

5. 5でも活性を示すため、調製したTempliPhi Premixは即日使用してください。

6. 増幅は4時間で終了しない場合があります。

鋳型DNAとともにTempliPhiの反応に持ち込まれた阻害物質が少なければ、通常、反応は4時間で終了します。ただし、培地やアガーなどの阻害物質が反応液に混入した場合には反応が終了する(増幅量がプラトーに達する)までにより時間がかかります。また、増幅量がプラトーに達していない場合には、その収量にばらつきが起こり、サンプル量を揃えずにそのままシーケンシング反応を行うと成功率が低下する可能性があります。

7. シーケンシング反応前に増幅DNAを定量してください。

通常、TempliPhiによる増幅反応を至適条件で行っていれば増幅DNA量はほぼ一定になり、増幅後そのままシーケンシング反応に用いることができます。ただし、反応時間、大腸菌やプラスミドの種類によって増幅効率が異なるため、予備実験時は増幅DNA量を正確に定量することを強くおすすめします(29~31ページをご参照ください)。

PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes) を用いて定量することをおすすめします。分光光度計による定量を行う場合には、DNAを精製する必要があります。16~18時間のTempliPhi反応では約1.5 µgの増幅DNAが得られます。結果がばらついていた場合は、増幅反応に加える鋳型量を減らしたり、最長24時間を目安に反応時間を延長してください。



図8. TempliPhi増幅DNAの粘性

注) この写真では、反応産物の粘性がわかりやすくなるようにDNAを着色しています。

8. 増幅DNAを正確にピペット操作することが困難な場合があります。

増幅DNAに粘性がある場合、正確なピペット操作が困難です。操作する前に希釈することをおすすめします。TempliPhi増幅DNAに40 μ lの滅菌水かTE bufferを加え、数回ピペッティング操作を行うか、必要ならばボルテックスにて十分に混和します。混和後は20 μ lのシークエンシング反応系に対して4~10 μ l (100~300 ng)の希釈サンプルを添加します。

9. シークエンシング反応の鑄型として使用する増幅DNAの量を最適化する必要があります。

TempliPhi増幅DNAをシークエンシング反応に用いる場合、鑄型量は精製DNAを用いる場合とは必ずしも同じではありません。したがって、増幅DNAの希釈系列を作製してシークエンシング反応の最適条件を検討することをおすすめします。

TempliPhi反応プロトコール

- 1) Sample buffer 5 μ lをチューブに入れます。
- 2) Sample bufferの入ったチューブにサンプル(以下を参照)を入れます。

コロニーやブランクからの増幅:

コロニー全体を50 μ lのTE bufferか滅菌水の入っているチューブに入れてボルテックスにて混和し、懸濁液0.2~0.5 μ lを分注しておいたSample bufferに加えます。または、分注しておいたSample bufferに、コロニーを1/100~1/10に希釈して(最低約 10^2 ~ 10^4 個の細胞を含む)加えます。

培養液からの増幅:

分注しておいたSample bufferに、一晚振盪培養した培養液0.2~0.5 μ lを添加してください。

培養液中のM13ファージからの増幅:

分注しておいたSample bufferに、ファージを含む培養上清0.2~0.5 μ lを加えます。

グリセロールストックからの増幅:

1 μ lのグリセロールストックを50 μ lのTE bufferか滅菌水で希釈します。分注しておいたSample bufferに、希釈したグリセロールストック0.2~0.5 μ lを加えます。

サンプルが精製したプラスミドDNAまたはM13DNAの場合:

分注しておいたSample bufferに、1 pg~10 ngのDNA(0.5 μ l以下)を添加してください。

- 3) サンプルを加えたSample bufferを熱変性します。95 $^{\circ}$ Cで3分間インキュベートし、その後4 $^{\circ}$ Cまたは氷冷します。
- 4) TempliPhiのPremix溶液(Reaction buffer 5 μ l + Enzyme mix 0.2 μ l)を別のチューブで調製します。
- 5) 調製したPremix溶液5 μ lをSample bufferに添加します。
- 6) 30 $^{\circ}$ Cで4~18時間インキュベートします。
- 7) 反応終了後は65 $^{\circ}$ Cで10分間加熱して酵素を失活させ、氷中に保存します。

詳細は、本書の2章をご参照ください。

5.2 TempliPhi DNA Amplification Kitで増幅した プラスミドDNAによる形質転換

ここでは、TempliPhi DNA Amplification Kitで増幅したプラスミドDNAを直接形質転換に用いる実験例をご紹介します。この方法が使えればプラスミド調製というステップを省略できるため非常に有用です。以下に、増幅したプラスミドDNAに形質転換能力の有無を検討するプロトコールと評価結果を示します。

キーワード： TempliPhi、形質転換、制限酵素切断、ライゲーション、エレクトロポレーション、ヒートショック、コンピテントセル、PicoGreen

使用する試薬

TempliPhi 100 DNA Amplification Kit
(コード番号 25-6400-10)

TempliPhi 500 DNA Amplification Kit
(コード番号 25-6400-50)

制限酵素 *EcoRI*

T4 DNA Ligase

LB Broth

LB Agar

アンピシリン

その他の必要な試薬

ElectroMAX DH5⁺ -E Cells (Invitrogen)

Disposable Micro-Electroporation Chambers
(Invitrogen)

Cell-Porator *E. coli*
(Invitrogen)

Subcloning Efficiency DH5⁺ Competent Cells
(Invitrogen)

PicoGreen dsDNA Quantitation Kit
(Molecular Probes)

プロトコール - TempliPhiによるpUC19 DNAの増幅

A. TempliPhi反応によるサンプル調製

- 1) Sample Buffer 5 μ lに1 ngのpUC 19 DNAを混ぜます。
- 2) 95 $^{\circ}$ C で3分間熱変性を行い、氷上に置きます。
- 3) 5 μ lのReaction bufferと0.2 μ lのEnzyme mixを加えてTempliPhi反応を行います。

Note

ネガティブコントロールとして、ステップ 3) でEnzyme mix を加えないサンプルを用意します。

- 4) 30 $^{\circ}$ C で8時間反応させます。
- 5) 65 $^{\circ}$ C で10分間熱変性を行い、氷上に置きます。
- 6) 90 μ lの滅菌水を加えてよく混ぜます。
- 7) PicoGreenを用いた定量を行います。
- 8) 反応サンプルを使って10倍の希釈系列を作製します。
- 9) 形質転換実験 (次ページ、B.) を行います。

B. エレクトロポレーション法、およびヒートショック法による形質転換

- 1) TempliPhiサンプル、ネガティブコントロール、精製したpUC19 DNAの各々を用いて、DH5 コンピテントセルをエレクトロポレーション法とヒートショック法の両方で形質転換を行います。
- 2) アンピシリンを含むLB培地で37 一晩培養します。
- 3) 3種類のサンプルすべてについて形質転換効率（形質転換数 / μg DNA）を計算します。

C. 制限酵素による切断と再連結、およびそれらを用いた形質転換

- 1) TempliPhiサンプル、ネガティブコントロール、精製したpUC19 DNAの各々についてEcoRIを用いて37 、2時間の消化反応を行い(20 units EcoRI + 2 μl 10 \times buffer / 20 μl) 65 で20分間熱処理を行います。
- 2) 各々の切断サンプル5 μl に、滅菌水 3 μl 、T4 DNA Ligase buffer 1 μl 、T4 DNA Ligase 6 unitsを加えて、16 で一晩反応します。
- 3) 3種類の反応サンプルを用いて、DH5 コンピテントセルをエレクトロポレーション法とヒートショック法の両方で形質転換を行います。
- 4) アンピシリンを含むLB培地で37 で一晩培養します。
- 5) 3種類のサンプル全てについて形質転換効率（形質転換数 / μg DNA）を計算します。

結果

pUC19 DNA 1 ngをTempliPhi DNA Amplification Kitで増幅したサンプル（TempliPhiサンプル） Enzyme mixを除いてTempliPhi反応を行ったネガティブコントロール、精製済みの非増幅pUC19 DNAで*E.coli* DH5 株の形質転換を行いました。形質転換にはエレクトロポレーション法とヒートショック法を用いて検討しました。

また、上記の3種類のサンプルをEcoRIで切断後に再連結したサンプルを用いて形質転換を行いました。表1の結果は制限酵素切断後に再連結して形質転換を行うと、TempliPhiサンプルの形質転換効率が明らかに向上することを示しています。

Note

DNAなしでのコントロール実験では形質転換体は得られませんでした。

結論

- TempliPhiによりpUC19を増幅して未処理でDH5 株の形質転換を行った場合、ネガティブコントロールや精製したpUC19 DNAと比べ形質転換効率は1/1,000以下に低下します。
- TempliPhiサンプルを用いて得られた形質転換体は、これらのサンプル中に残存している鑄型として使われたpUC19 DNAによるものと考えられます。
- TempliPhiサンプルを切断部位がヶ所しかない制限酵素（例えばEcoRI）で切断してから再連結すれば、コントロールと同程度の形質転換率が得られます。

したがって、高い形質転換率を得るにはTempliPhiで増幅したプラスミドDNAをあらかじめ制限酵素で切断してから再連結して用いることをおすすめします。

表1. 未処理DNAと切断 / 再連結DNAを用いた形質転換結果

	形質転換数 / μg DNA (triplicateの平均)	
	エレクトロポレーション法	ヒートショック法
未処理DNA		
TempliPhiサンプル	1×10^4	9×10^4
ネガティブコントロール	3×10^7	1×10^8
コントロール : pUC19 DNA	6×10^7	2×10^8
切断 / 再連結DNA		
TempliPhiサンプル	2×10^7	8×10^8
ネガティブコントロール	0.0	0.0
コントロール : pUC19 DNA	5×10^7	9×10^8

5.3 PicoGreen dsDNA Quantitation Kitを用いた TempliPhi増幅DNAの定量方法

TempliPhiによる増幅反応を至適条件で行ってれば、増幅DNA量はほぼ一定になり増幅後そのままシーケンシング反応に用いることができます。ただし、反応時間、大腸菌やプラスミドの種類によって増幅効率が異なるため、予備実験時は増幅DNA量を正確に定量することを強くおすすめします。ここでは、PicoGreen dsDNA Quantitation Kitにより蛍光染色した増幅DNAをバリアブルイメージアナライザーTyphoon 9410を用いて定量した実験について紹介します。

キーワード： TempliPhi、Typhoon、PicoGreen、DNA定量

使用する試薬および機器・ソフトウェア

TempliPhi 100 DNA Amplification Kit
(コード番号：25-6400-10)

TempliPhi 500 DNA Amplification Kit
(コード番号：25-6400-50)

Typhoon 9200/9400シリーズ

ImageQuant

Microsoft Excel (Microsoft)

PicoGreen dsDNA Quantitation Kit
(Molecular Probes)

低蛍光96ウェルプレート
(推奨品：Nalge-Nunc PolySorp)

プロトコール

A. スタンダードサンプルの調製

- 1) あらかじめ、100 $\mu\text{g/ml}$ ストックの DNA溶液をTE bufferで50倍希釈しておきます (2 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 溶液)
- 2) DNAを最終濃度1 ~ 1,000 ng/ml となるように (表2を参照) 無蛍光プレートのウェルに入れ、TE bufferで100 μl にメスアップします。

B. TempliPhi増幅DNAの調製

- 1) TE bufferを99 μl 入れたウェルに、反応終了したTempliPhi溶液から1 μl を加えます。
- 2) スタンダードサンプルおよびTempliPhi増幅DNAを入れたウェルにPicoGreen溶液 (TE bufferで200倍希釈したもの) を100 μl 添加し、室温・暗所で5分間インキュベートします。

表2 スタンダードサンプルの調製例

2 $\text{ng}/\mu\text{l}$ DNA量 (μl)	TE buffer量 (μl)	PicoGreen試薬量 (μl)	DNA終濃度 (ng/ml)
100	0	100	1,000
50	50	100	500
20	80	100	200
10	90	100	100
5	95	100	50
2	98	100	20
1	99	100	10
0	100	100	0

C. Typhoonのセットアップと画像取り込み

- 1) Typhoonを起動します。
- 2) PicoGreen定量のためのセットアップを行います。

Excitation

488 nm (Typhoon 9400シリーズ) または
532 nm (Typhoon 9200シリーズ)

Emissionフィルター

520BP (Typhoon 9400シリーズ) または
526SP (Typhoon 9200シリーズ)

PMTの電圧値

必要に応じてシグナル飽和を起こさないように調節します (400 ~ 950Vの間で設定してください)

焦点深度の設定 +3mm

- 3) マイクロタイタープレートを直接スキャナーのスキャンエリアにのせ、画像を取り込みます。シグナルが弱い場合には、PMTの電圧値を上げて画像を取り直します。

D. ImageQuantを使用した定量測定

- 1) Gray/Color Adjust 機能を用いて画像の階調調整を行います。
- 2) オブジェクトツールを用いて画面上のマイクロタイタープレートの各ウェルの内側に円を描きます。
- 3) バックグラウンド削除は行わず、中央値を算出します。
- 4) Microsoft Excel内で、ネガティブコントロールとして設定したウェルの中央値を各ウェルの中央値から差し引きます。DNAスタンダードを用いて標準曲線を作成し、シグナルの強さからTempliPhi増幅DNAの濃度を求めます。

結果

図9は DNAの希釈系列を作製し、PicoGreenを用いて蛍光染色した画像データです。左側から 1,000 ng/ml、500 ng/ml、200 ng/ml、100 ng/ml、50 ng/ml、20 ng/ml、10 ng/ml、0 ng/mlの濃度となっています。図10にImageQuantおよびExcelを用いて画像を数値化し作成した標準曲線、図11に30 で6時間反応した96クローンの定量データを示しました。

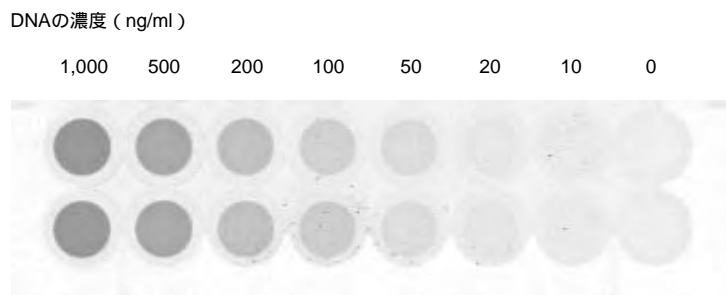


図9. マイクロタイタープレートを使用しTyphoon 9410にて取り込んだPicoGreen定量の画像

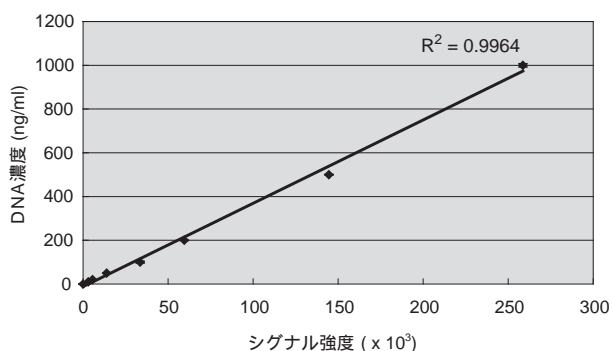


図10. 画像データからImageQuantを用いて解析した標準曲線

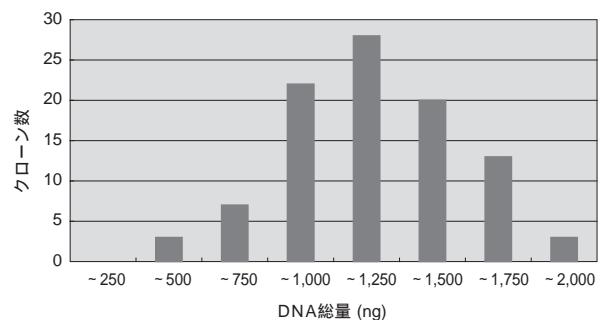


図11. TempliPhiを用いて増幅した96クローンの定量データ (30、6時間反応)

結論

- ・ PicoGreen dsDNA Quantitation Kitを用いたDNA定量は簡単に行うことができ、0 ~ 1,000 ng/mlまでの濃度において $R^2 = 0.996$ の優れた直線性を示しました。
- ・ 96 wellマイクロタイタープレートが使用できるため、ハイスループットでの解析も可能です。
- ・ シークエンシングの反応条件の最適化が容易になります。
- ・ シークエンシングに用いるTempliPhi増幅DNA量を最適化することで、安定したシークエンシング結果を得ることが可能となります。

TempliPhiの至適実験条件を検討した論文

Reagin MJ, Giesler TL, Merla AL, Resetar-Gerke JM, Kapolka KM, Mamone JA. TempliPhi: A sequencing template preparation procedure that eliminates overnight cultures and DNA purification. *J Biomol Tech.* 2003;**14**(2): 143-8

TempliPhiの原理の説明と至適実験条件を検討した論文

Nelson JR, Cai YC, Giesler TL, Farchaus JW, Sundaram ST, Ortiz-Rivera M, Hosta LP, Hewitt PL, Mamone JA, Palaniappan C, Fuller CW. TempliPhi, phi29 DNA polymerase based rolling circle amplification of templates for DNA sequencing. *Biotechniques.* 2002 Jun; *Suppl.* 44-7.

TempliPhiを用いてbegomovirusの環状ゲノムDNAをシーケンシング解析した論文

Inoue-Nagata AK, Albuquerque LC, Rocha WB, Nagata T. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. *J Virol Methods.* 2004; **116**(2): 209-11.

ゲノムDNAを増幅するアプリケーションやその利点をまとめたレビュー

Hawkins T.L. *et al.* Whole genome amplification applications and advances. *Current Opinion in Biotechnology* 2002; **13**: 65-67

シーケンシング関連試薬 ニュースレター

Sequence Circles

TempliPhi DNA Amplification Kit シーケンシング用鋳型調製試薬

ここでは、TempliPhi DNA Amplification Kitを実際に使用している先生方の実験について、実験方法ならびに結果を交えてご紹介します。いずれも、ニュースレター「Sequencing Circles」や弊社ホームページでもご覧いただけます。あわせてご利用ください。

魚介類のマイクロサテライトDNA検出のための増幅	34
關野 正志 先生 (独立行政法人 水産総合研究センター 東北区水産研究所 海区水産業研究部 資源培養研究室)	
Plasmid cDNA クローンのシーケンシング	35
小原 収 先生 (かずさDNA研究所 ヒト遺伝子第一研究室)	
アフリカトリパノソーマ原虫に対する治療薬のターゲットとなる蛋白変異体の作製	36
福間 利英 先生、井上 雅広 先生、安田 幸一 先生 (久留米大学 医学部 寄生虫学講座)	
線虫発生のゲノム生物学	37
小原 雄治 先生 (国立遺伝学研究所 生物遺伝資源情報総合センター 生物遺伝資源情報研究室)	
植物の色素合成系遺伝子の単離	38
各務 孝 先生 (青森県グリーンバイオセンター 細胞工学研究部 青い花開発プロジェクトチーム)	
ゲノム解析 ショットガン法およびnested deletion法を用いた大規模シーケンシング	39
会津 智幸 先生、清岡 美穂 先生、豊田 敦 先生 (理化学研究所 横浜研究所 ゲノム科学総合研究センター ゲノム構造情報研究グループ)	

シーケンシング関連試薬ニュースレター

Sequencing Circles

カタログ番号 : 71-2027-01

Sequencing Circles

カタログ番号 : 71-2043-01

弊社ホームページ :

<http://www.gehealthcare.co.jp/lifesciences>



魚介類のマイクロサテライトDNA検出のための増幅

ご使用のシーケンサー

ABI PRISM 373

シーケンシング反応試薬

Thermo Sequenase II Dye Terminator Cycle Sequencing Kit

TempliPhi反応装置

PCR装置
(GeneAmp 9600 もしくはコルベトリサーチ社)

TempliPhiキットの種類

TempliPhi 100 DNA Amplification Kit

本キットの良いと感じている点

- 1 シーケンシング反応のための精製が必要ない
- 2 PCRに比べて増幅効率が10%以上あがった
- 3 シーケンシング結果のシグナル強度が均一になった

実験方法

1 TempliPhi 100反応

プレートから1mm程度のコロニーをチップ先によりピックアップ

Sample Buffer 5 µlに加え、95 °Cで3分間熱変性する

Reaction Buffer 5 µlとEnzyme mix 0.2 µlを混ぜたプレミックスから5 µlを上記サンプルに加える

30 °Cで18時間反応後、65 °Cで10分間

2 シーケンシング

TempliPhi 増幅産物 2 µl
Primer 5 pmole
上記サンプルをThermo Sequenase II Dye Terminator Cycle Sequencing Kitを使用して下記のサイクル条件で反応した

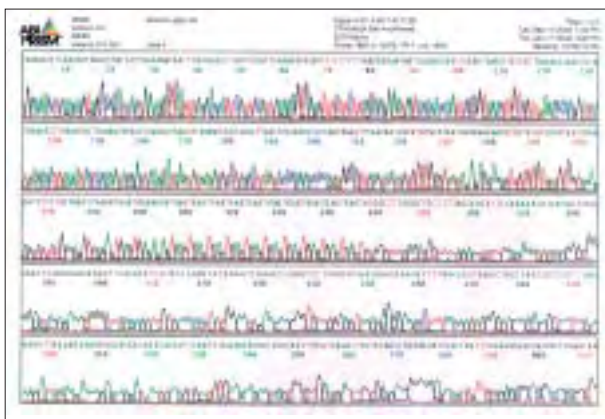
サイクル条件

95 °C	20 sec	} 30サイクル
50 °C	15 sec	
60 °C	1 min	
4 °C	soak	

3 泳動条件

シーケンシング反応後、エタノール沈殿を行い、ローディングバッファー3 µlを加えて、シーケンサーゲルに3 µlをアプライした

結果・コメント



エゾアワビの4塩基リピート配列の例

TempliPhi増幅後、アガロース電気泳動にて濃度チェックを行ったが、増幅量はそろっていた。その後シーケンシングを行ったが、Thermo Sequenase IIを使用しているため、600 bpまでシグナル強度がそろっているデータを得ることができた。ABI PRISM 373以外にも、ALF express, ALF express IIでも問題なく使用できる。



研究室紹介

ご所属：独立行政法人 水産総合研究センター 東北区水産研究所 海区水産業研究部 資源培養研究室

お名前： 関野 正志 先生

ご研究内容： 牡蠣、アワビなどの貝類、ヒラメなどの魚類のマイクロサテライト解析



Plasmid cDNA クローンのシーケンシング

ご使用のシーケンサー

RISA-384システム

シーケンシング反応試薬

DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit

TempliPhi反応装置

インキュベーター

TempliPhiキットの種類

TempliPhi 10000 DNA Amplification Kit

本キットの良いと感じている点

- 1 菌液からシーケンスの鋳型が調製できるので、手間・時間がかからない
- 2 うまく反応が進んでいると液の粘性が上がるので、分かりやすい
- 3 反応系が単純なので、特にサンプルが多いときには便利

実験方法

1 TempliPhi 10000反応

液体培地をdH₂Oで1/5倍希釈

Denature buffer 10 μlに加え、
95 °Cで3分間熱変性する

TempliPhi PreMix 10 μlを
上記サンプルに加える

30 °Cで16時間反応後、95 °Cで5分間

2 シーケンシング

TempliPhi 増幅産物を1/2倍に希釈したものを2 μlを鋳型に、Primer 3 pmoleを使用し、DYEnamic ET Terminator Sequencing Kitにて下記のサイクル条件で反応した

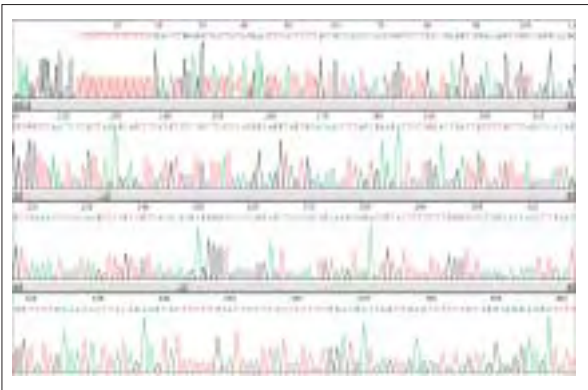
サイクル条件

95 °C	15 sec	} 60サイクル
50 °C	10 sec	
60 °C	1 min	
4 °C	soak	

3 泳動条件

シーケンシング反応後、Millipore社 Multiscreenカラムにて精製し、シーケンサーにセットした

結果・コメント



マグネティックビーズを使用したプラスミド精製ロボットで精製したプラスミドと、同等の精度でシーケンシングすることができた。



研究室紹介

ご 所 属： かずさDNA研究所 ヒト遺伝子第一研究室

お 名 前： 小原 収 先生

ご研究内容： 哺乳動物トランスクリプトーム解析、特に長鎖遺伝子の構造と機能解析





アフリカトリパノソーマ原虫に対する治療薬のターゲットとなる 蛋白変異体の作製

ご使用のシーケンサー

ABI PRISM 310

シーケンシング反応試薬

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit

TempliPhi反応装置

PCR装置 (GeneAmp 2400)

TempliPhiキットの種類

TempliPhi 100 DNA Amplification Kit

本キットの良いと感じている点

- ① プラスミドのコピーが培養でほとんど増えないものでも増やす事ができた
- ② 出発材料がバクテリアコロニーでもプラスミド溶液でも同じように使用できる

実験方法

1 TempliPhi 100反応

1 mm程度のコロニーに爪楊枝の先をつけ
1部をピックアップ

Sample Buffer 5 µlに加え、
95 °Cで3分間熱変性する

Reaction Buffer 5 µlとEnzyme mix 0.2 µl
を混ぜたプレミックスから5 µlを
上記サンプルに加える

30 °Cで4時間反応後、65 °Cで10分間

2 シーケンシング

TempliPhi 増幅産物 2 µl
Primer 3.3 pmole
上記サンプルを BigDye Terminator Cycle
Sequencing Kitを使用して下記のサイクル
条件で反応した

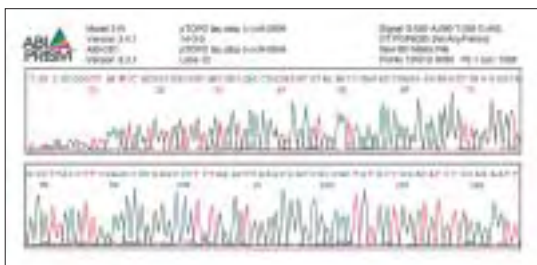
サイクル条件

96 °C	10 sec	} 25サイクル
50 °C	5 sec	
60 °C	4 min	
4 °C	soak	

3 泳動条件

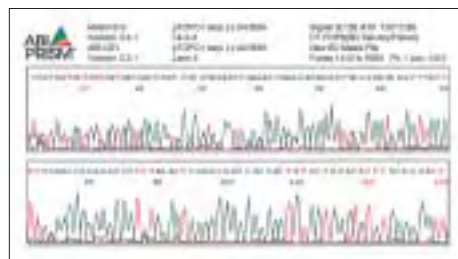
シーケンシング反応後、AutoSeq G-
50カラムにて精製し、シーケンサーに
セットした

結果・コメント



TempliPhi結果

プラスミドブレップキットを使用した場合と比較しても同等の結果が出た。シグナル強度は従来法より高くなった。また、従来法では増えなかったプラスミドについてもこれと同様の良好な結果が出ている。



プラスミドブレップ結果



研究室紹介

ご所属：久留米大学 医学部 寄生虫学講座

お名前：福間 利英 先生、井上 雅広 先生、安田 幸一 先生

ご研究内容：ももとは、久留米周辺の日本住血吸虫症撲滅のため、立ち上げられた研究室とのことでした。現在、井上先生、安田先生が研究されているアフリカトリパノソーマという原虫は、宿主から排除されるのを免れようと、ヒトの血中では、表面蛋白を次々と変えていくため、ワクチンや治療薬の作成が非常に難しいと言われています。





線虫発生のゲノム生物学

ご使用のシーケンサー

ABI PRISM 3700

シーケンシング反応試薬

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver.3

TempliPhi反応装置

GeneAmp 9700 (384ウェルブロック)

TempliPhiキットの種類

TempliPhi 10000 DNA Amplification Kit

本キットの良いと感じている点

- ① PCRと比べて、かなり長いインサートも増幅が可能
- ② PCR特有のスリッページ*が起こらない
- ③ 反応後の精製が不要

*ポリメラーゼ反応時に起きる、反復ユニットを読み飛ばしたり重複して合成する現象。この現象により反復配列後領域の解読が難しくなります。

実験方法

1 TempliPhi 10000反応

終夜培養した液体培地を1滴取り出す

Denature buffer 10 μ lに加え、
95 $^{\circ}$ Cで3分間熱変性する

TempliPhi PreMix 10 μ lを
上記サンプルに加える

30 $^{\circ}$ Cで18時間反応後、95 $^{\circ}$ Cで5分間

2 シークエンシング

TempliPhi 増幅産物 1 μ l (dH₂Oで1/2倍希釈)
Primer 3.3 pmole
上記サンプルを BigDye Terminator Cycle Sequencing Kitを使用して下記のサイクル条件で反応した

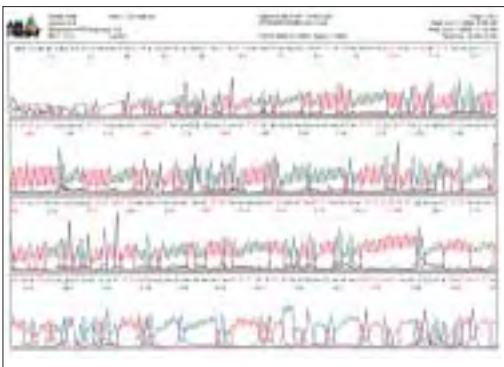
サイクル条件

96 $^{\circ}$ C	10 sec	} 25サイクル
50 $^{\circ}$ C	5 sec	
60 $^{\circ}$ C	4 min	
4 $^{\circ}$ C	soak	

3 泳動条件

シーケンシング反応後、Whatmann社
384ウェルフィルタープレートにてにて
精製し、シーケンサーにセットした

結果・コメント



TempliPhiを用いて増幅した結果



PCRを用いて増幅した結果

PCR増幅産物では、特異配列などにより、スリッページを起こし読みにくいサンプルでも、TempliPhiにより増幅させると、信頼性の高いデータを得ることができた。



研究室紹介

ご所属：国立遺伝学研究所 生物遺伝資源情報総合センター 生物遺伝資源情報研究室

お名前：小原 雄治 先生

ご研究内容：「ゲノム情報から個体がどうやってできるのか？」このメカニズムを理解するために、そして究極的にはコンピュータ上での再現をめざして、線虫 *C. elegans* を用いて研究を進めていらっしゃいます。基盤情報としてはcDNAプロジェクトを出発点として全遺伝子の半分近い約8,000遺伝子の発現パターンを明らかにされています。さらにRNAi、抗体作製などを通じ機能解析を進め、「どの遺伝子が、いつ、どの細胞で、何をしているか」というゲノムの発現・機能マップデータベースに統合化されています。そしてこれらの情報を最大限活用した個別研究が行われています。



植物の色素合成系遺伝子の単離

ご使用のシーケンサー

ABI PRISM 3100 / 373

シーケンシング反応試薬

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver.3

TempliPhi反応装置

GeneAmp 9700

TempliPhiキットの種類

TempliPhi 100 DNA Amplification Kit

本キットの良いと感じている点

- ① サンプルにチップを入れる回数が少なく、誰が利用しても事故が起こりにくい
- ② マルチピペットとPCR装置だけで、自動化ロボットなみの作業が可能
- ③ シグナル強度が均一

実験方法

1 TempliPhi 100反応

プレート上のコロニーをチップの先でピックアップし、TE (pH8.5) に懸濁

上記1 μ l を Sample buffer 5 μ l に加え、95 $^{\circ}$ C で3分間熱変性する

Reaction Buffer 5 μ l と Enzyme mix 0.2 μ l を混ぜたプレミックスから5 μ l を上記サンプルに加える

30 $^{\circ}$ C で6時間反応後、65 $^{\circ}$ C で10分間

2 シーケンシング

TempliPhi 増幅産物 3 μ l
Primer 3.2 pmole
上記サンプルを BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver.3 を使用して下記のサイクル条件で反応した

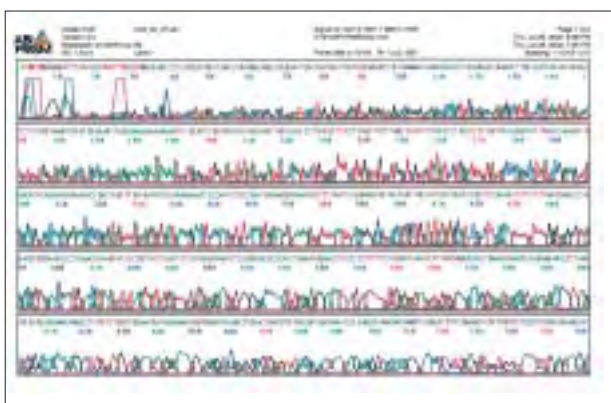
サイクル条件

96 $^{\circ}$ C	10 sec	} 25サイクル
50 $^{\circ}$ C	5 sec	
60 $^{\circ}$ C	4 min	
4 $^{\circ}$ C	soak	

3 泳動条件

シーケンシング反応後、エタノール沈殿を行い、ローディングバッファーを加えて、シーケンサーにセットした

結果・コメント



左図はABI PRISM 3100のデータだが、ABI Model 373を使用した場合も、問題なくシーケンシングデータを得ることができた。



研究室紹介

ご所属：青森県グリーンバイオセンター 細胞工学研究部 青い花開発プロジェクトチーム

お名前：各務孝先生

ご研究内容：青い花の開発。現在青色を発現する遺伝子の単離、機能解明およびそれを多品種に組換え、青いバラ等の開発をされています。

ゲノム解析 ショットガン法およびnested deletion法を用いた大規模シーケンス

ご使用のシーケンサー

MegaBACE 1000および4000

シーケンシング反応試薬

DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE

TempliPhi反応装置

インキュベーター

TempliPhiキットの種類

TempliPhi 10000 DNA Amplification Kit

本キットの良いと感じている点

- ① くり返し配列やポリA配列などPCR産物からではシーケンシングが困難な部分も、極めてきれいに解析できる
- ② 操作が簡単
- ③ ロングリードプロトコールに適している（ と関連して）

実験方法

1 TempliPhi 10000反応

終夜培養した液体培地を1滴取り出す

Denature buffer 10 μ lに加え、
95 $^{\circ}$ Cで3分間熱変性する

TempliPhi PreMix 10 μ lを
上記サンプルに加える

30 $^{\circ}$ Cで18時間反応後、95 $^{\circ}$ Cで5分間

2 シーケンシング

TempliPhi 増幅産物 1 μ l
Primer 2.5 pmole
上記サンプルをDYEnamic ET Terminator
Cycle Sequencing Kit for MegaBACEを使用
して下記のサイクル条件で反応した

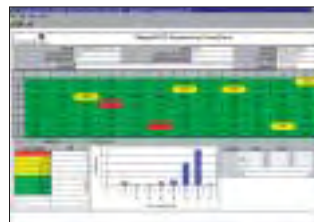
サイクル条件

95 $^{\circ}$ C	10 sec	} 30サイクル
95 $^{\circ}$ C	25 sec	
40 $^{\circ}$ C	10 sec	
60 $^{\circ}$ C	2 min	
95 $^{\circ}$ C	10 sec	} 20サイクル
60 $^{\circ}$ C	1 min	
4 $^{\circ}$ C	soak	

3 泳動条件

シーケンシング反応後、Millipore社
Multiscreenカラムにて精製し、シーケン
サーにセットした

結果・コメント



判読塩基数を表示させるスコアカード（右）、
緑色のカラムは、400 bp以上判読できたサンプル。
95 %程度のサンプルで判読することができた。

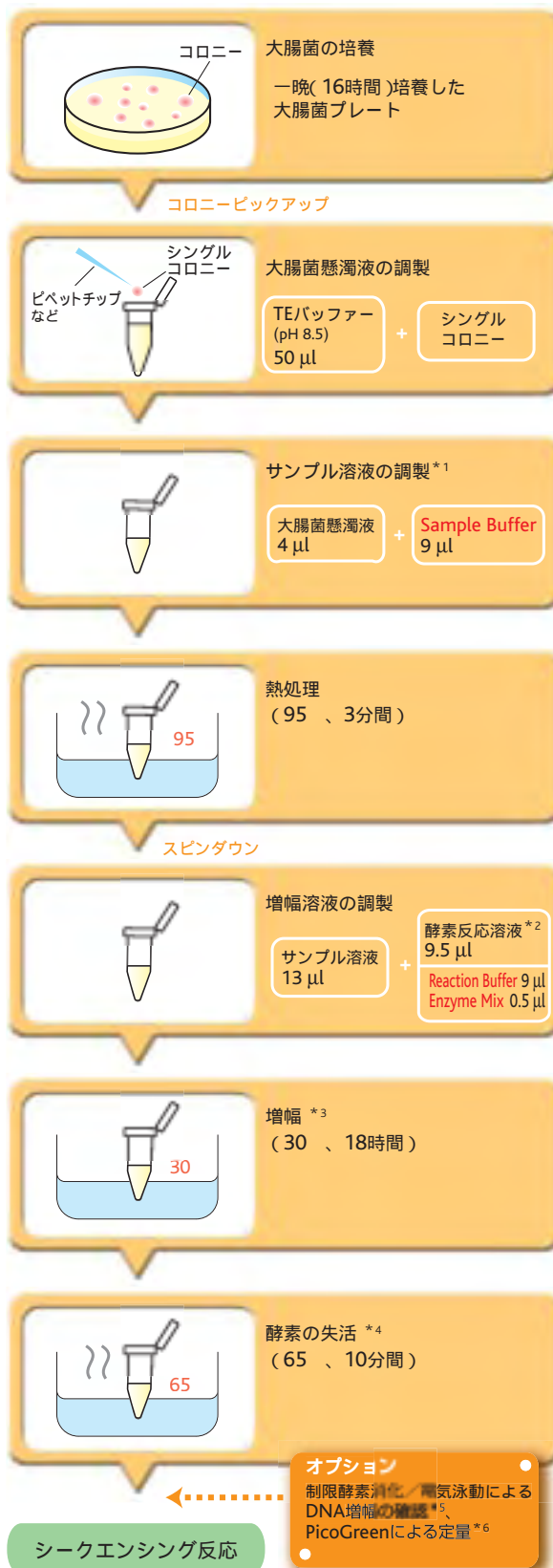
研究室紹介

ご所属：理化学研究所 横浜研究所 ゲノム科学総合研究センター ゲノム構造情報研究グループ
お名前：会津 智幸 先生、清岡 美穂 先生、豊田 敦 先生
ご研究内容：ヒトゲノムの構造・機能解析（11番、18番、21番を担当）
ヒト固有の性質を理解するために、特に霊長類との比較ゲノム構造・機能解析



TempliPhi LC

Rolling Circle Amplification Kit 簡易プロトコール



キット付属の試薬を赤字で表示しました。

- *1 予備検討することをお奨めします。グリセロールストックから出発する場合はTEで1/2~1/50希釈して4 μ l、精製DNAから出発する場合は1 ng~10 ngを使用してください。
- *2 数本分まとめたマスターミックスとして調製することも可能です。要時調製してください。
- *3 反応時間を18時間よりも短くすることはお奨めしません。コロニー/グリセロールストックから増幅する場合には大腸菌ゲノムDNAの増幅産物がコンタミする場合があります。
- *4 Phi29 DNA PolymeraseはExonuclease活性を有するため、反応後は速やかに65 10分の失活処理を行ってください。反応後の増幅DNAは4 (長期保存は-20 または-70)保存してください。
- *5 鋳型量が1 ng以下または鋳型DNAを含まないサンプルから増幅反応を行った場合には、プライマー由来の産物が非特異的に増幅されることがあります。
- *6 TempliPhi LC DNA Amplification Kitの英文マニュアルに記載の方法に従ってください。

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本社 〒169-0073

東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルヂング

お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL：03-5331-9336 FAX：03-5331-9370

e-mail：Tech-JP@ge.com



ISO 9001:2000認証取得

Home Page <http://www.gehealthcare.co.jp/lifesciences>

掲載されている製品の名称、仕様、価格などは、予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。
掲載されている社名、製品名は各社の商標または登録商標です。

この印刷物は、再生紙を使用し大豆インキにて印刷しています。

04.12.10(NS)