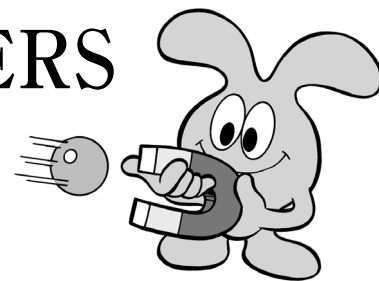


# DYNABEADS LETTERS



## テクニカルヒント --- DYNABEADS® M-280 STREPTAVIDINを用いた PCR増幅産物のDIRECT GENOMIC SEQUENCING

Dynabeads® M-280 Streptavidin は、PCR 増幅されたゲノムDNA (1)のDirect sequencingに用いるユニークな固体担体です。この固相アプローチにより、高収率で再現性のあるDNA 塩基配列決定結果が得られます。また、DNAテンプレートを固定化する磁気ビーズ (Dynabeads® M-280 Streptavidin) の使用により、subcloning、析出、抽出、および遠心操作などの時間のかかる操作が不用です。

### 1. 使用法

#### 1. Dynabeads® M-280 Streptavidinの調製

a. 毎回、5 ~ 20 µlのDynabeads M-280 Streptavidin<sup>注1)</sup> を20 µlの2 x Binding and Washing (B&W) bufferで洗う。

注1) ・T7 DNA ポリメラーゼ (Sequenase®)法を用いる場合: DNAテンプレートにつき20 µl (200 µg)  
 ・Taq cycle sequencing 法を用いる場合: 250 bp 以上のDNAテンプレートの場合、10 µl (100 µg)  
 250 bp 以下のDNAテンプレートの場合、5 µl (50 µg)

・B&W buffer の組成については5 ページ参照。  
 ・Dynabeads®は、1 回にまとめて洗ってもかまいません。  
 その場合はシークエンス反応数に応じて単にDynabeads の使用量を増やしてください。

b. 2 x B&W buffer 40 µl 中にビーズを再懸濁する。

#### 2. PCR増幅ガイドライン

a. PCR反応あたり、ゲノム DNA 0.5 µgまでと 各5 ~ 10 pmole の特異的な flanking プライマー  
 一方はビオチン化、他方はビオチン化していない ( non-biotinylated ) プライマーを使用してPCRを行う<sup>注2)</sup>。

注2) ・PCR 増幅においては高度に精製されたビオチン化プライマーを使用することが重要です。  
 これにより、高いビオチン化比率を持つPCR産物が得られます。すべてのビオチン化試薬は、立体障害を減らすために、少なくとも炭素6 原子分の長さのスペーサーを含むようにしてください。DYNAL は、HPLC 精製されたビオチン化プライマーを使用することをお勧めします。

・ビオチン化プライマーの完全な伸長を促すために、3倍過剰の non-biotinylated プライマーを使うことも可能です。  
 これにより、シークエンス(2)を妨げる可能性のある、結合せずに残ったビオチン化プライマーを最少限度に抑えることができます。

・DYNAL は、一本鎖 DNA (3)を切ってプライマーから5' biotinを外すような、Taq DNA ポリメラーゼによる structure-specific エンドヌクレアーゼ活性を防ぐため、72 °Cで5分間の伸長を行ってPCR増幅を終えることを薦めています。このステップは前サイクル中で伸長が不完全だったものを、完全な長さにして産物の量を増やす効果もあります。

・実際の標的核酸の量が、その他の含有物に比べ、非常に希薄である、ある種の臨床応用において、あるいは始めの材料の純度に制限がある場合(4)、( これらの問題の両方は、同時に起こる可能性があります、(5) ) nested PCR方法( まず、外側のプライマーセットによるPCRを行い続いて、片方をビオチン化してある内側のプライマーセットで、PCRをかける2段階PCR反応 )を使用することによってより特異的な産物を得ることができます。

・標的DNAの二次構造はときにより、DNA ポリメラーゼ によるプライマーの伸長を妨げることがありますが、反応液中にdimethyl sulfoxide( DMSO )を用いることにより、複雑な二次構造 (6)をもつDNA の増幅を可能にできる場合があります。DMSOは、5 - 10 % の最終濃度になるように反応液に加えてもTaq-mediated PCR 増幅の状態を変えません。二次構造の危険性を最小にするための他の方法としては、PCR条件中のアニーリング温度を上げるか、あるいはnested PCR法を行うことも効果的な場合があります。

### 3. PCR産物の固定化

- 増幅されたPCR産物40 µlに、1.で調製した40 µlのDynabeads<sup>®</sup>を加えます。
- チューブまたはプレートを穏やかにたいたいて懸濁させ続けながらDynabeads<sup>®</sup>を室温で15分間インキュベート<sup>注3)</sup>します。

注3) ・DNAテンプレート> 1Kbの場合:48 で30分間インキュベートすると、より結合が容易です。  
あるいは、長いPCR産物(>800 bp)を固定化するときは、立体障害の効果を減らすようにより多くのDynabeads<sup>®</sup>を加えて下さい。

### 4. DNA duplex のMelting

- 適当な磁石(Dynal MPC<sup>®</sup>)に固定化された産物を含んでいるチューブ/プレートを置き上清をピペットで除きます。
- 40 µlの、2 x B&Wを加えてDynabeads<sup>®</sup>を洗います<sup>4)</sup>。

注4) ・固定化した産物は、数週間、4 で保管できます。

- 再度、チューブをDynal MPCに置いて、上清を除去します。
- Dynabeads<sup>®</sup>を新たに調製した0.1MのNaOH<sup>注5)</sup>、8 µlに再懸濁させます。

注5) ・新たに調製した0.1 M NaOHを使用して下さい。NaOHは、適当な容量に分注して、3~5カ月間凍結保存できます。

- 室温で5分間インキュベートします。

### 5. DNA 鎖の分離

- Dynal MPCを使用して、チューブ/well中Dynabeads<sup>®</sup>を壁に集め、きれいなチューブ/wellにNaOH上清を移します。上清は、complementary non-biotinylated ssDNAを含み、これを、さらにシーケンシング(7.参照)することも可能です。
- Dynabeads(ピオチン化ストランドが固定化しているもの)を0.1M NaOH、50 µlで1回、1 x B&W緩衝液40 µlで1回、さらにTE緩衝液、50 µlで1回洗います。すべての場合、ピペットによるスムーズなストロークで再懸濁させます。
- 上清を除去して、使用するシーケンシング・プロトコルのテンプレート容量に応じて水を加え、容量を調節します。

### 6. シークエンス反応

Taq DNA PolymeraseあるいはT7 DNA Polymerase(Sequenase)を用いる手動あるいは自動のdideoxy シークエンシング法用の、すべての一般のシーケンス用キットを利用できます。

<各シーケンス方法の利点>

T7 DNA ポリメラーゼ(Sequenase): ・高率のポリメリゼーション  
・均一のシグナル強度(突然変異あるいはheterogeneityの検出によい。)  
・読める長さが長い

Taq DNA Polymerase: ・より高い温度の、二次構造を減らす(すなわち、GCの豊富な領域などによい。)  
・少ないDNAテンプレートでよい。  
・少ないDynabeads<sup>®</sup>M-280 Streptavidinでよい。

- 該当するシーケンス用プライマー注6)を含むアニーリング混合液に、single-stranded テンプレートを固定化したDynabeads<sup>®</sup>を加えます。

注6) ・固定化されたsingle-stranded テンプレートは純粋のDNA テンプレートと同様に取り扱って下さい。  
・genomic sequencingにDynabeads<sup>®</sup>M-280 Streptavidinを用いるときは、PCR産物の作製に利用したものと同一プライマーをシーケンシング反応に用いず、内側のシーケンスプライマーを使用することが重要です。それをしないと、PCRアーティファクト(truncated PCR産物による"false"run offなど)のため好ましくないシーケンス結果となることが考えられます。nested PCRを用いた最適の条件の場合、二番目のPCR反応の中で使うnon-biotinylatedプライマーを、シーケンス用プライマー(7)として使ってもかまいません。

- 使用するキットのシーケンスプロトコルに従ってシーケンス反応を続けます(annealing、そしてラベル化反応)。
- 伸長完了後、過剰のシーケンス用プライマーおよび取り込まれなかったヌクレオチドを含む上清を除去します<sup>注7)</sup>。

注7) ・cycle sequencing法を用いるとき、このステップを省略してください。  
鋳型DNA他の反応成分の存在によって、配列データ(すなわちバンド強度、解像力、そして塩基対応精度)の品質が悪くなることが、報告されています(8)。

d. ホルムアミド溶液<sup>注8)</sup>を加え、72-95 °Cで5分間加熱することによって、新しく合成されたストランド(終結産物)を溶出させます。

注8) ・フレッシュなホルムアミド溶液を使用下さい。古いホルムアミド溶液を使用する場合、95 °C、5分間熱してから使用して下さい。この厳しい条件により、streptavidin、ピオチン間の相互作用を破壊しdideoxyフラグメントと共にDNAテンプレートを解離させます。ビーズ表面からの解離の結果、DNAテンプレートは再シーケンスすることはできません。

< 手動シーケンスの場合 >

・Sequenase : ホルムアミド停止溶液を加えゲルへのloadingに先立ち、洗いは不用です。

< 自動化されたシーケンスの場合 >

・Sequenase Dye Primer 法: 反応を止め、過剰のプライマーを除くためにTE緩衝液で1回Dynabeads®を洗い、loading bufferに再懸濁させます。

・Sequenase Dye Terminator 法: 取り込まれなかった色素を除くために、0.01M Tris-HCl pH 8.0、0.1% Tween-20®の中で2~4回、Dynabeads®を洗い、loading bufferに再懸濁させます。

・Taq Dye Primer法: 反応物を集め、エタノール沈澱させて、loading bufferに再懸濁させます。

・Taq Dye Terminator 法: Taq Dye Primer法と同様ですが、フェノール/クロロホルム抽出法(フェノール:水:クロロホルム(68:18:14)、2回)あるいはスピン・カラム分離(9)を用いて、過剰のDye Terminatorを伸長産物から除去します。

e. Dynal MPC を用いてチューブの壁に Dynabeads®を集め、dideoxyフラグメントを含んでいる上清を除去する<sup>注9)</sup>。

注9) ・このステップは、省略してもよい。伸長シーケンス混合液とホルムアミド溶液中のDynabeadsはdideoxyフラグメントの移動を阻害しないので、シーケンス用ゲルに直接ロードしても構いません。

f. シーケンスゲルへ各反応の2分の1を直接ロードして下さい。<sup>注10)</sup>

注10) ・固定化したDNAテンプレートは、わずかなシグナルの減少はありますが、2~6回、再シーケンスすることができます(2)。固定化されたテンプレートを0.10~0.15 M NaOHで2回、10 mMのTris-HCl pH 8.0(0.1% Tween-20)で2回洗う。テンプレートは4 °Cで保管して下さい。

## 7. non-biotinylatedストランドのシーケンス用調製

固相DNA塩基配列決定後に溶液中に残っているピオチン化されていないssDNAの調製法がいくつか報告されています(10-14)。これらの報告の一つでは、固定化されたストランドはSequenaseによってシーケンスされ、溶出された固定されていないストランドは、Taq DNAポリメラーゼ(14)によってうまくシーケンスされています。

アルカリ上清中の相補DNAテンプレートのヌクレオチド配列を決定するためには、以下のオプションがあります。

a. アルカリ上清を0.2 M HCl、4 µlと1.0 M Tris-HCl、1 µl(シーケンス用酵素の最適pHに調節済)(10)でアルカリ上清を中和します<sup>注11)</sup>。

直ちにピペットで混ぜ、使用のシーケンス・プロトコルに従って、水で容量を調節します。

注11) ・異なるピペット間の較正における小さい相違が中和で問題になる可能性があるため、必ずNaOHとHClには、同じピペットを使用します。

b. 0.15 M NaOH、300 µlを添加し5分間置くことによって、ペレットにしたビーズからピオチン化されていないssDNAを溶出させます。磁気分離をもちいて、新しいチューブにその上清を移します。

5 Mアンモニウム酢酸塩(pH 6.6) 150 µlを添加し中和して、さら補助沈澱剤(11)として核酸を含まないグリコーゲンの2 µgを用いた、イソプロパノール沈澱法により沈澱させます。

c. NaOH洗い溶液に、1/10用量の3 Mナトリウム酢酸塩(pH 5.2)と2.5倍量のエタノールを加えてピオチン化されていないストランドを回収します。2時間-20 °Cでインキュベートします。12,000 gで10分間サンプルを遠心し70%エタノールで2度ペレットを洗い、真空乾燥し、水、5 µl(12)に再度溶解させます。

d. LeeとVacquier(13)による方式では、Centricon®-30 microconcentratorを使用することにより、アルカリ上清の正確な中和と沈澱操作を必要としません。

## 試薬

DNAテンプレートの最適の結合のために少なくとも最終濃度1.0M以上の塩濃度のbufferを薦める。示唆された緩衝液は、次のとおりです。:

Binding & Washing buffer(2 x 濃度)

10 mM Tris-HCl pH 7.5

1.0 mM EDTA

2.0M NaCl<sup>注12)</sup>

注12) ・大きいDNAテンプレート用(>1Kb)には、DYNALは最終濃度3.0 MのLiClを含むBinding & Washing bufferの使用を薦めます。NaClは高い濃度で沈澱する傾向があるのでLiClを使用して下さい。(LiClはNaClより高い溶解性を持つ)。

## 文献 :

1. Hultman T, Stahl S, Hornes E, Uhlen M  
Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using magnetic beads as solid support  
Nucleic Acids Research 1989;17(13):4937-4946
2. Applied Biosystems, Inc., DNA sequencing, User Bulletin No.21, April 1992,  
Magnetic beads (Dynabeads®) used as solid phase support in purification and cycle sequencing of PCR products
3. Lyamichev V, Brow MAD, Dahlberg JE  
Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by bacterial DNA polymerases  
Science 1993; 260: 778-783
4. Dieffenbach CW, Lowe TMJ, Dveksler GS  
General concepts for PCR primer design  
PCR Methods and Applications 1993;3(3):S30-S37
5. Albert J, Fenyo EM  
Simple, sensitive and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reactions with nested primers  
J Clin Microbiol 1990;28:1560-1564
6. Shen W-H, Hohn B  
DMSO improves PCR amplification of DNA with complex secondary structure  
Trends in Genetics 1992;8(7):227
7. Chu C-S, Trapnell BC, Murtagh Jr.JJ, Moss J, Dalemans W, Jallat S, Mercenier A, Pavirani A, Lecocq J-P, Cutting GR, Guggino WB, Crystal RG  
Variable deletion of exon 9 coding sequences in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mRNA transcripts in normal bronchial epithelium  
The EMBO Journal 1991;10(6):1355-1363 ( Ref No. 528 )
8. Tong X, Smith LM  
Solid phase purification in automated DNA sequencing  
DNA sequence 1993;4:151-162
9. Applied Biosystems, Inc., DNA sequencing, User Bulletin No. 20, December 1991,  
Removal of Excess Taq DyeDeoxy Terminators
10. Hultman T, Bergh S, Moks T, Uhlen M  
Bidirectional solid-phase sequencing of in vitro-amplified plasmid DNA  
Bio Techniques 1991;10(1):84-93 ( Ref No.425 )
11. Mitchell LG, Vaghmar R, Murtagh Jr.JJ  
Biotin-enhanced sequencing of PCR products and generation of single stranded DNA probes  
In: Uhlen M, Hornes E, Osvik O (Eds.), Advances in biomagnetic separation. Eaton publishing Co., Natick, MA, USA.  
1994: 31-48 ( Ref No.1133 )
12. Thomas MG, Hesse SA, Makie AT, Farzaneh F  
Sequencing of cDNA using anchored oligo dT primers  
Nucleic Acids Research 1993;21(16):3915-3916 ( Ref No. 1106 )
13. Lee Y-H, Vacquier VD  
A method for obtaining high-quality sequences from the non-biotinylated, free ssDNA remaining after solid-phase sequencing  
Bio Techniques 1993;14(2):191-192 ( Ref No. 905 )
14. Rolfs A, Scheller I, Finckh U, Weber-Rolfs I  
Non-Radioactive, Direct, Solid-phase Sequencing of Genomic DNA Obtained from Polymerase Chain Reaction  
In: Rolfs A, Scheller I, Finckh U, Weber-Rolfs I ( Eds. ), PCR: Clinical Diagnostics and Research. Berlin, Heidelberg:  
Springer Verlag, 1992: 168-183 A73-75 ( Ref No.886 )

Sequenase® is a registered trademark of United States Biochemical Corporation, USA.

Centricon® is a registered trademark of Amicon, Inc., USA.

Tween-20® is a registered trademark of ICI Americas, Inc., USA.

GeneAmp® is a registered trademark of Hoffmann-La Roche, Inc., USA.

The GeneAmp PCR process is covered by U.S. patents owned by Hoffmann-La Roche, Inc., USA.

Dynal®, Dynabeads®, and Dynal MPC® are registered trademarks of Dynal AS, Oslo, Norway and the products are covered by several international patents.

お問合せは 日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル  
TEL 03 3593-3211 [代] FAX 03 3593-3216