

# Wizard® MagneSil™ Sequencing Reaction Clean-Up System を使用した BigDye™ Terminator シークエンシング反応の自動 精製



By Paul Otto, M.S., and Michael Bjerke, M.S.  
Promega Corporation

## 要約

Wizard® MagneSil™ Sequencing Reaction Clean-Up System は、ABI PRISM® BigDye™ターミネーターでのシークエンシング反応より得られた伸長産物を、MagneSil™ Paramagnetic Particles (PMPs)を用いて精製するシステムで、完全に自動化したプロトコルを使用することができます。この手順を用いれば、700塩基以上のシークエンシングデータを、98%を上回る精度で得ることが可能です。プロメガは、複数の自動化ワークステーション向けに、標準的な 96 ウェル増幅プレートを用いた自動化プロトコルを開発しました。

## はじめに

ABI PRISM® BigDye™ターミネーターは、ハイスループットの自動化 DNA シークエンシング法として現在よく用いられています。シークエン斯拉ダーの作成は、蛍光標識した BigDye™鎖ターミネーターヌクレオチド(2)を用いてサンガー(Sanger)法(1)により行ないます。BigDye™ターミネーターは、フルオレセインドナーと 4 種類の d-ローダミンベースのアクセプターのいずれか 1 種類で構成されるエネルギー転移ダイを、ジデオキシヌクレオチド三リン酸(ddNTPs)に結合したものです(3)。自動化シークエンサーは、標識されたシークエンシング伸長産物を分子ふるいマトリクスで分離し、特異的な検出波長を用いてターミナルヌクレオチドを同定します。

シークエンシング反応液には、解析前に除去しておかないとデータ収集の妨げとなる成分が含まれています。塩類は異常な泳動パターンの原因となり、取り込まれていないダイ標識ターミネーターや類似分子種は、シークエンシング伸長産物本来のシグナルを干渉する可能性があります(図 1)。ゲルろ過やエタノール沈殿に基づく従来の精製方法では、遠心分離や吸引乾燥を繰り返す必要があるため、ハイスループットの自動化アプリケーション用としては問題があります。

表1. Wizard® MagneSil™ Sequencing Reaction Clean-Up System の特長および利点

- 複数の自動化ワークステーション向けに、標準的な 96 ウェル増幅プレートを用いた自動化プロトコルを開発しています。
- マニュアルや半自動で精製した場合と同等のシークエンシング精度が得られます。
- マニュアル操作 (遠心分離機や吸引装置への移動など) を行なう必要がありません。
- 精製したシークエンシング伸長産物はゲルローディング溶液に溶出するため、ゲルへのアプライが容易です。

シークエンシング精度はマニュアル操作の場合と同等で、  
しかも自動化プロトコルの方が  
明らかに優れている点があります。

プロメガは、プラスミド DNA の精製に最適な、磁気を利用した核酸精製法を開発しました(4)。Wizard® MagneSil™ Sequencing Reaction Clean-Up System は、MagneSil™ Paramagnetic Particles (PMPs)を主成分とする MagneSil™ GREEN を用いて、BigDye™ターミネーターによる DNA シークエンシング反応からの多検体DNA精製を行ないます。このシステムでは自動化したプロトコルを使用しますが、マニュアル操作の場合と同等のシークエンシング精度を得ることができます。96 ウェル増幅プレートを自動化デッキに一旦設置してしまえば、DNA シークエンサーにサンプルがロードされるまでマニュアル操作は一切必要ありません。

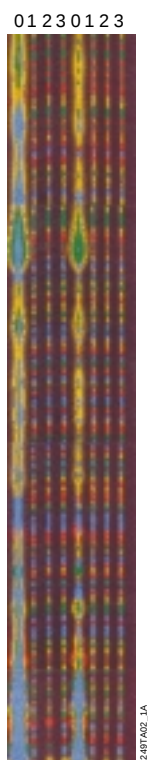


図1. ABI PRISM® 377 DNA シークエンサーにおける精製および未精製の BigDye™ターミネーターシークエンシング反応のゲル画像

pGEM®-3Zf(+) Vector テンプレートと pUC/M13 (-21) オリゴヌクレオチドプライマーを使用した反応。レーン 0、未精製。レーン 1、ゲルろ過スピンカラムによる精製。レーン 2、エタノール沈殿による精製。レーン 3、Wizard® MagneSil™ Sequencing Reaction Clean-Up System による精製。

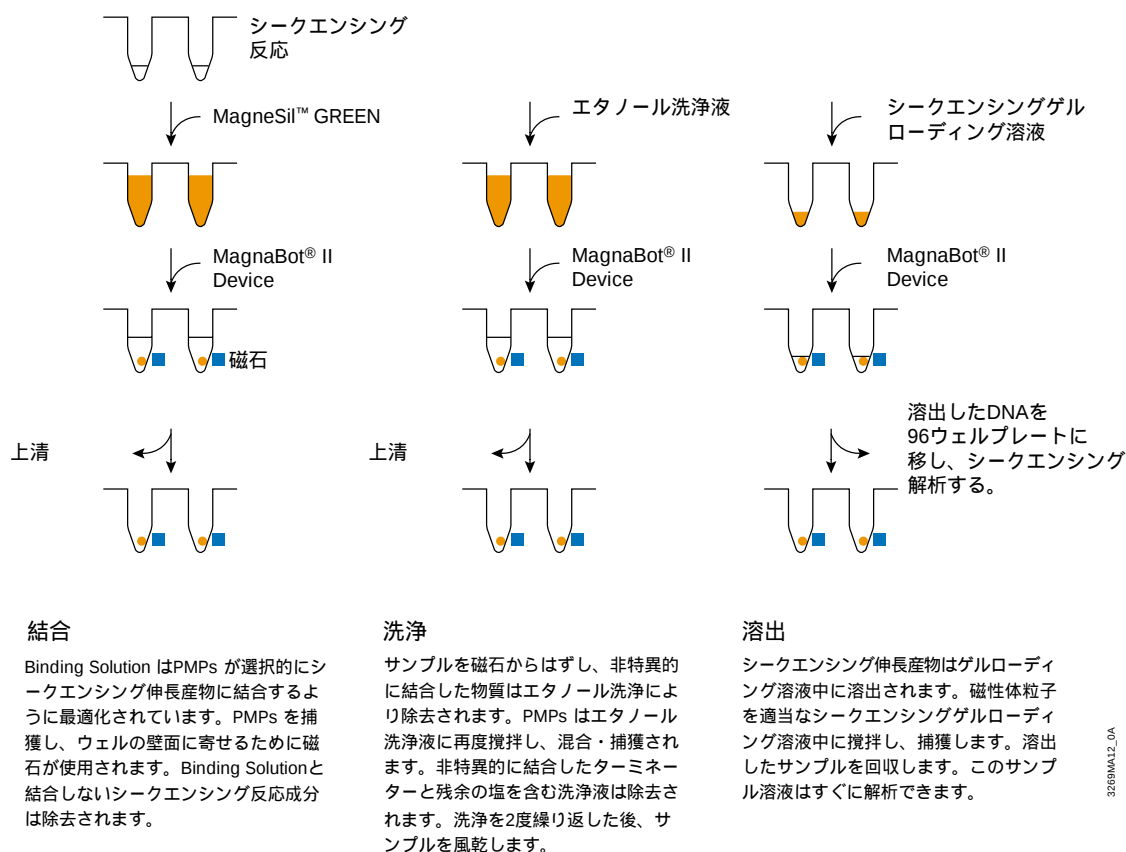


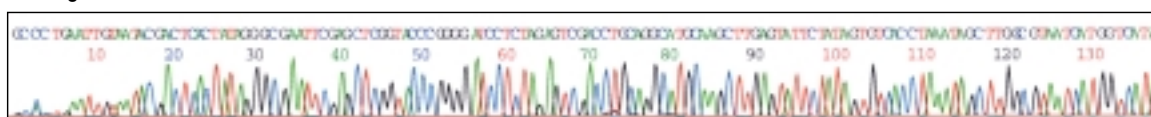
図2. Wizard® MagneSil™ Sequencing Reaction Clean-Up System のプロトコール概略図

## 手順

Wizard® MagneSil™ Sequencing Reaction Clean-Up System は、BigDye™ ターミネーターのサイクルシーケンシング反応からの伸長産物精製を、標準的な 96 ウェル PCR プレートを使用して自動化ワークステーションで行えるように設計されています。図 2 は、3 段階から成る手順を図式化したものです。MagneSil™ PMPs はシーケンシング伸長産物に選択的に結合し、非特異的に吸着した物質はエタノール洗浄で除去されます。また、精製した伸長産物はローディング溶液に溶出されるため、解析が容易です(図 1 および 3)。プロトコールの詳細は、Wizard® MagneSil™ Sequencing Reaction Clean-Up System の Technical Bulletin #TB287 をご覧ください。オンラインで [www.promega.com](http://www.promega.com) からご入手いただけます。

プロメガは、MagneSil™ Sequencing Reaction Clean-Up System を自動化プラットフォームで最適に使用できるようにするため、3 種類の付属品を設計しました。図 4 に、これらの付属品、Plate Stand (カタログ番号 V8261)、Plate Clamp 96 (カタログ番号 V8251)、MagnaBot® II Magnetic Separation Device (カタログ番号 V8351)を示します。マニュアル操作法については本誌13ページをご覧ください。

### A. MagneSil™ PMPs



### B. Ethanol Precipitation

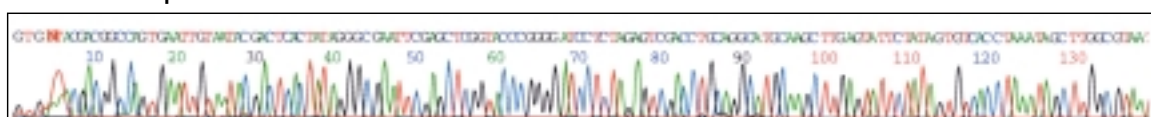


図3. ABI PRISM® 3700 DNA Sequencer で解析した精製後のシーケンシング反応のエレクトロフェログラム

パネル A : Wizard® MagneSil™ Sequencing Reaction Clean-Up System で精製した反応。パネル B :エタノール沈殿で精製した反応。

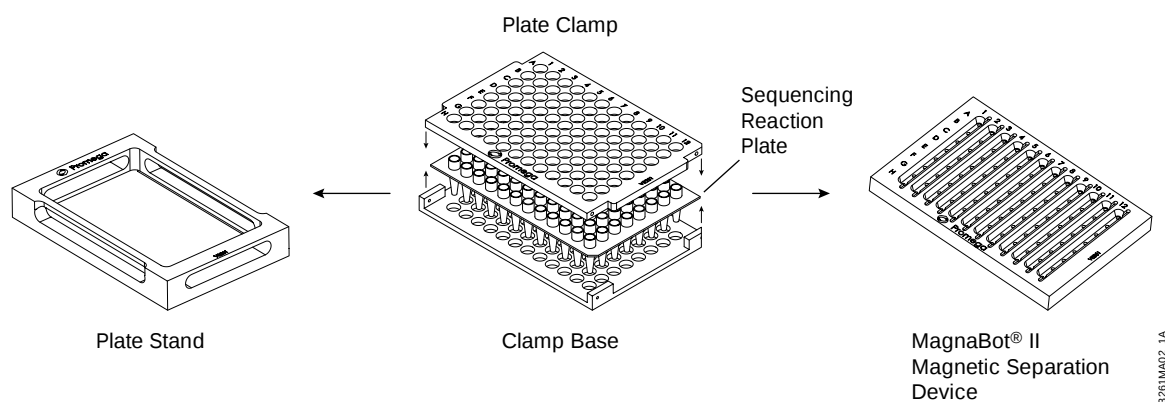


図4. Wizard® MagneSil™ Sequencing Reaction Clean-Up System 用付属品

96 ウェルプレートは、プレートがずれないように Plate Clamp 96 に設置する。組み立てたPlate Clamp をClean-Up 操作中は Plate Stand で固定し、MagneSil™ PMPs を磁氣的に分離する際は MagnaBot® II Device 上に設置する。

## シーケンス精度

MagneSil™ Sequencing Reaction Clean-Up System での精製後に得られるシーケンスデータ精度を、パーセント精度、PHRED 20 解析長および開始位置で評価しました。PHRED は、各塩基に対するエラー率を示す Base Calling プログラムです(5,6)。任意の塩基の PHRED 値が 20 となった場合、その塩基のエラー率が 100 分の 1 であることを表わします。

プロメガは、MagneSil™ Clean-Up System を使用することにより、600 塩基のシーケンスを 98%の精度で解析できることを確認しています。図 5 に示すとおり、本システムで精製したシーケンスでは通常 700 塩基を 98%の精度で解析可能です。

図 6 に、PHRED 値が 20 を上回るシーケンスの長さを示しました。MagneSil™ Clean-Up System で精製したシーケンシング反応の場合、PHRED が 20 となる解析長は通常 600 塩基以上です。

Lock-on ポジションについても評価しました。Lock-on ポジションとは、プライマー 3' 末端から解析可能なシーケンスが得られるまでの塩基数を指します。そのオリゴヌクレオチドプライマーでは、96 ウェルプレート 1 枚で 19.6 (+/-1.8 S.D.)という平均値が得られています。Wizard® MagneSil™ Sequencing Reaction Clean-Up System では、Lock-on ポジションが 25 塩基のシーケンスを得ることが可能となっており、通常はこの値は 20 塩基以下です。つまり、目的シーケンスの開始点から約 20 塩基手前で終了するプライマーを使用すれば最適な性能を得ることができます。

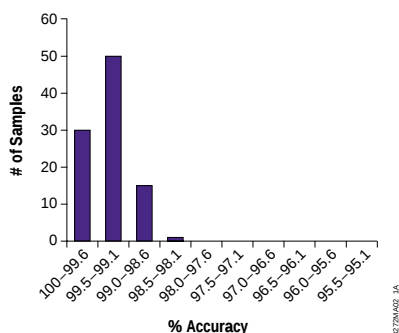


図5. MagneSil™ Sequencing Reaction Clean-Up System で精製した 96 サンプルのシーケンシングデータのパーセント精度

サンプルは、96 ウェルプレートを用いて ABI PRISM® 3700 DNA Sequencer で解析した。精製には Wizard® MagneSil™ Sequencing Reaction Clean-Up System を使用した。

## 結論

Wizard® MagneSil™ Sequencing Reaction Clean-Up System は、真にハイスループット向けのサンプル精製法です。本システムを使用して、さまざまな自動化プラットフォームに応用可能な自動化プロトコールを用いて精製したシーケンシング反応からは、安定した正確なデータを得ることができます。

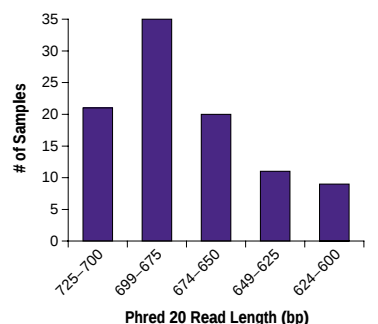


図6. MagneSil™ Sequencing Reaction Clean-Up System 実施後のシーケンシングデータの解析

本システムを用いて精製した 96 サンプルのシーケンシングデータの PHRED 20 値。

## 参考文献

1. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.(1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
2. Prober, J.M. *et al.* (1987) *Science* **238**, 336-341.
3. Rosenblum, B.B.*et al.* (1997) *Nucl. Acids Res.* **25**, 4500-4504.
4. White, D. *et al.* (1998) *Promega Notes* **69**, 12-14.
5. Ewing, B. *et al.* (1998) *Genome Res.* **8**, 175-185.
6. Ewing, B. and Green, P. (1998) *Genome Res.* **8**, 186-194.

## 製品案内

| 製品名                                                   | サイズ      | カタログ番号 | 価格 ( ¥ ) |
|-------------------------------------------------------|----------|--------|----------|
| Wizard® MagneSil™ Sequencing Reaction Clean-Up System | 1 × 96回分 | A1830  | 20,000   |
|                                                       | 4 × 96回分 | A1831  | 35,000   |
|                                                       | 8 × 96回分 | A1832  | 60,000   |
| MagnaBot® II Magnetic Separation Device               | 1セット     | V8351  | 96,000   |
| Plate Clamp 96                                        | 1セット     | V8251  | 50,000   |
| Plate Stand                                           | 1セット     | V8261  | 50,000   |