

PowerPlex® 16 System

日本語 プロトコル No. TMD012J 2001年 11月

カタログ番号 DC6530, DC6531, および DG2850

目次

| | |
|--|-----------|
| I. はじめに | 1 |
| II. STR タイピング | 1 |
| A. STR タイピングの利点 | 1 |
| B. PowerPlex® 16 System のローカスを用いる利点 | 2 |
| C. 識別能力 | 5 |
| D. Internal Lane Standard 600 | 6 |
| E. 警告および使用上の注意 | 6 |
| III. キットの構成 | 7 |
| IV. DNA 抽出法 | 7 |
| V. PowerPlex® 16 System を用いた DNA 増幅のプロトコル | 8 |
| A. 増幅反応の準備 | 8 |
| B. サーマルサイクラーによる増幅 | 10 |
| C. 増幅産物のアガロースゲル電気泳動 (オプション) | 11 |
| VI. ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer を用いた増幅断片の検出 | 12 |
| A. マトリックスの標準化 | 12 |
| B. 装置の準備 | 12 |
| C. サンプルの調製 | 13 |
| D. キャピラリー電気泳動および検出 | 14 |
| VII. ABI PRISM® 377 DNA Sequencer を用いた増幅断片の検出 | 15 |
| A. ポリアクリルアミドゲルの準備 | 15 |
| B. マトリックスの標準化 | 16 |
| C. 装置の準備 | 17 |
| D. ゲルのプレ・ラン | 17 |
| E. サンプルの調製とロード | 18 |
| F. ゲル電気泳動および検出 | 18 |
| G. ガラスプレートの再使用 | 19 |
| VIII. データの分析 | 20 |
| A. PowerTyper™ 16 Macro | 20 |
| B. 分析 | 20 |
| C. コントロール | 22 |
| D. 結果 | 23 |
| IX. 困ったときには・・・ | 25 |
| A. 増幅 | 25 |
| B. PowerTyper™ 16 Macro | 28 |
| X. 参考文献 | 30 |
| XI. 付録 | 32 |
| A. バッファーと溶液の組成 | 32 |
| B. 関連製品の紹介 | 33 |

I. はじめに

STR^(a) (short tandem repeat) ローカスは、3 ~ 7 塩基長の短い反復配列エレメントからなります (1-4)。このような反復配列はあらゆるヒト・ゲノムに存在しており、その多くは高度に多型性を示すマーカーとして利用でき、ポリメラーゼ連鎖反応により検出することが可能です (5-8)。STR ローカスのアレルは、増幅した領域に含まれる反復配列のコピー数によって識別され、電気泳動で分離したのち RI、銀染色、または蛍光検出により同定されます。

PowerPlex[®] 16 System^(a,b) を使用すれば、16 のローカス (15 の STR ローカスと Amelogenin) を一度に増幅し、3 色検出を行なうことができます。PowerPlex[®] 16 System には、Penta E、D18S51、D21S11、TH01、D3S1358、FGA、TPOX、D8S1179、vWA、Amelogenin、Penta D、CSF1PO、D16S539、D7S820、D13S317、D5S818 の 16 ローカスが含まれます。Penta E、D18S51、D21S11、TH01、D3S1358 に特異的なプライマーはフルオレセイン (FL) 標識してあり、FGA、TPOX、D8S1179、vWA、Amelogenin に特異的なプライマーはカルボキシ - テトラメチルローダミン (TMR) 標識、Penta D、CSF1PO、D16S539、D7S820、D13S317、D5S818 に特異的なプライマーは 6'-カルボキシ -4', 5'-ジクロロ -2', 7'-ジメトキシ -フルオレセイン (JOE) 標識されています。16 のローカスのすべてを 1 本のチューブ内で一度に増幅し、1 回の注入または 1 本のゲルレーンで分析することができます。

PowerPlex[®] 16 System は、ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer 用が開発されていますが、ABI PRISM[®] 377 DNA Sequencer でもご利用いただけます。

PowerPlex[®] 16 System には、AmpliAq Gold[®] DNA ポリメラーゼを除く、精製ゲノム DNA の STR 領域の増幅に必要なすべての試薬が含まれます。本マニュアルでは、増幅産物の分離および分離した物質の検出に関するプロトコルに加えて、PowerPlex[®] 16 System を Perkin-Elmer Model 480 および GeneAmp[®] PCR System 9600、9700、2400 サーマルサイクラーで使用する場合について、個別のプロトコルを掲載しています。蛍光検出装置の操作プロトコルについては、装置の製造業者から入手していただく必要があります。

プロメガの他の蛍光 STR システムや銀染色を用いた増幅 STR 断片の検出法の詳細は、インターネットで www.promega.com からご入手いただけます。また、ご請求に応じてプロメガよりご送付いたします。

II. STR タイピング

A. STR タイピングの利点

STR タイピングは、使用する増幅産物が AMP-FLP (9) や VNTR (10) で検出するものよりかなり小さく 500bp 未満であるため、分解を受けた DNA テンプレートの利用に関して他のタイピング法よりも柔軟に対応することができます。また、PCR を行なうことはできてもサザンプロット法による分析に適した品質の DNA を十分に供給できない種々の DNA 迅速精製法でも、STR タイピングになら適用することができます。

プロメガの STR 産物は一般に長さが異なり、識別可能です。そのため、各ローカスについて、既知アレルの一部またはすべてと同じ長さのフラグメントを含むアレリックラダーを作成することができます。同じローカスのアレリックラダーと増幅サンプルを視覚的に、あるいは機器により比較することで、迅速かつ正確なアレルの割り当てを行なうことができます。PowerPlex[®] 16 System を使用して得られた結果は、デジタル化して記録することができ、保存されているデータベースと直接比較することができます。人口分析では、人口データに関する任意定義の固定バイナリ (arbitrarily defined fixed bins) を使用する必要はありません (11)。

注：このマニュアルで紹介しているプロトコルはプロメガで試験されています。増幅、検出用装置には様々な種類があります。プロトコルは、サイクル数やインジェクション時間 (またはロードする容量) も含め、各研究室の装置毎に最適化する必要があります。

研究室内でバリデーションを実施してください。

B. PowerPlex® 16 System のローカスを用いる利点

PowerPlex® 16 System に含まれるローカス（表 1 および 2）は、世界の複数の主要規格化団体の要求を満たすものが選択されています。例えば、米連邦捜査局（Federal Bureau of Investigation; FBI）は、有罪判決を受けた犯罪者のプロファイルに関する米国内データベースである CODIS (COmbined DNA Index System) に、サンプルを検索または収載（登録）する前にタイピングすべき 13 の STR コアローカスを選択しました。PowerPlex® 16 System は、1 回の反応ですべての CODIS コアローカスを増幅することができます。

PowerPlex® 16 System には、ヌクレオチド 5 個が反復している 2 つの新たな低スタッター・高多型性のローカス Penta E と Penta D も含まれています。これらのローカスを追加したことにより、本システムの識別力は著しく向上し、PowerPlex® 16 System は父性係争の決定的な解決に足る排反検定力を持つ単独の増幅システムとなっています。また、Penta E および Penta D は、スタッターがきわめて低いことから、法医学的ケースワークで直面することの多い DNA 混合物の評価用として理想的なローカスです。

最後になりましたが、各サンプルの性別判定を可能とするため、PowerPlex® 16 System には Amelogenin ローカスが加えられています。表 3 は、一般的に入手可能な標準的な DNA テンプレートで明らかになった PowerPlex® 16 System のアレルを示したものです。

Taq DNA ポリメラーゼの使用に起因するものを含む反復数のずれ（repeat slippage）やターミナルヌクレオチドの付加といったアーティファクトを回避あるいは最小限に抑えるため、プロメガでは STR ローカスおよびプライマーを慎重に選択しました。反復のずれ(12,13) は、“n - 4 バンド”、“スタッター”、あるいは“シャドーバンド（shadow bands）”などとも呼ばれ、DNA 増幅中の反復単位の損失や、サンプル材料における体細胞性の DNA のぼらつき、もしくはその両方に起因して生じます。このようなアーティファクトの量は、主としてローカスや複製された DNA シークエンスによって異なります。

ターミナルヌクレオチドの付加(14,15) は、増幅した DNA フラグメントの 3' 末端に Taq DNA ポリメラーゼがヌクレオチド（通常はアデニン）をテンプレート非依存的に付加することによって起こります。このようなターミナルヌクレオチド付加の発生効率率は、プライマーの配列によって異なります。そのため、予想されたものより 1 塩基短いアーティファクトのバンド（すなわちターミナル付加の欠如）が見られることがあります。プロメガではプライマー配列を改変し、60 で 30 分間の最終伸長ステップを増幅プロトコールに追加することにより(16)、推奨量の DNA テンプレートが使用されていれば実質的に完全なターミナルヌクレオチド付加が得られるようにしました。

マイクロバリエーションアレル（反復長以外の長さで相互に区別されるアレル）の存在は、アレルの解釈や割り当てを複雑にしています。高度の多型性、マイクロバリエーションの傾向、および突然変異率の上昇の間には、相関関係が存在するように見えます(17,18)。そのため、FGA および D21S11 は多数の比較的共通したマイクロバリエーションを示します。理由はまだわかりませんが、高度な多型性を示す Penta E ローカスでは、高頻度のマイクロバリエーションは認められません（表 2）。

表 1. PowerPlex® 16 System のローカス特異的な知見

| STR ローカス | 標識 | 染色体位置 | GenBank® のローカス およびローカス定義 | 反復配列 ¹ 5' 3' |
|-------------|-----|----------------------|--|----------------------------|
| Penta E | FL | 15q | NA | AAAGA |
| D18S51 | FL | 18q21.3 | HUMUT574 | AGAA (19) |
| D21S11 | FL | 21q11-21q21 | HUMD21LOC | TCTA Complex (19) |
| TH01 | FL | 11p15.5 | HUMTH01, Human tyrosine hydroxylase gene | AATG (19) |
| D3S1358 | FL | 3p | NA | TCTA Complex |
| FGA | TMR | 4q28 | HUMFIBRA, Human fibrinogen alpha chain gene | TTTC Complex (19) |
| TPOX | TMR | 2p23-2pter | HUMTPOX, Human thyroid peroxidase gene | AATG |
| D8S1179 | TMR | 8q | NA | TCTA Complex (19) |
| vWA | TMR | 12p12-pter | HUMVWFA31, Human von Willebrand factor gene | TCTA Complex (19) |
| Amelogenin | TMR | Xp22.1-22.3 and Y | HUMAMEL, Human Y chromosomal gene for Amelogenin-like protein | NA |
| Penta D | JOE | 21q | NA | AAAGA |
| CSF1PO | JOE | 5q33.3-34 | HUMCSF1PO, Human c- fms proto-oncogene for CSF-1 receptor gene | AGAT |
| D16S539 | JOE | 16q24-qter | NA | GATA |
| D7S820 | JOE | 7q11.21-22 | NA | GATA |
| D13S317 | JOE | 13q22-q31 | NA | TATC |
| D5S818 | JOE | 5q23.3-32 | NA | AGAT |

amelogenin は STR
ではありませんが、
106 塩基の X 特異的
バンドと 112 塩基の
Y 特異的バンドを示
します。9947A DNA
(女性) は、106 塩
基の X 特異的バンド
のみを示します。

¹ International Society for Forensic Haemogenetics (ISFH) の DNA Commission の 1997 年 8 月の報告書(20,21) には、次のように明記されています。『1) コード遺伝子中の STR ローカスに関しては、コード鎖を使用し、反復モチーフの最初の可能な 5' ヌクレオチド配列を用いて反復配列モチーフを定義すること。2) コード遺伝子と関係のない STR ローカスに関しては、最初のデータベース収載または原著論文の記載を使用すること。』

TMR = carboxy-tetramethylrhodamine

FL = fluorescein

JOE = 6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein

NA = 該当しない

表 2. PowerPlex® 16 System のアレリックラダーの知見

| STR | ローカス | 標識 | Allelic Ladder 1,2 サイズの 範囲 (塩基) | Allelic Ladder の反復数 | Allelic Ladder ³ 中にあるアレリック 反復数の反復数 |
|------------|------|-----|---------------------------------------|---|---|
| Penta E | FL | FL | 379-474 | 5-24 | 20.3 |
| D18S51 | FL | FL | 290-366 | 8-10, 10.2, 11-13, 13.2, 14-27 | |
| D21S11 | FL | FL | 203-259 | 24, 24.2, 25, 25.2, 26-28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36-38 | |
| TH01 | FL | FL | 156-195 | 4-9, 9.3, 10-11, 13.3 | |
| D3S1358 | FL | FL | 115-147 | 12-20 | |
| FGA | TMR | TMR | 322-444 | 16-18, 18.2, 19, 19.2, 20, 20.2 21, 21.2, 22, 22.2, 23, 23.2, 24, 24.2, 25, 25.2, 26-30, 31.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2 | |
| TPOX | TMR | TMR | 262-290 | 6-13 | |
| D8S1179 | TMR | TMR | 203-247 | 7-18 | |
| vWA | TMR | TMR | 123-171 | 10-22 | |
| Amelogenin | TMR | TMR | 106, 112 | X, Y | |
| Penta D | JOE | JOE | 376-449 | 2.2, 3.2, 5, 7-17 | |
| CSF1PO | JOE | JOE | 321-357 | 6-15 | |
| D16S539 | JOE | JOE | 264-304 | 5, 8-15 | |
| D7S820 | JOE | JOE | 215-247 | 6-14 | |
| D13S317 | JOE | JOE | 169-201 | 7-15 | |
| D5S818 | JOE | JOE | 119-155 | 7-16 | |

¹ アレリックラダー中の各アレリックの長さは、シーケンス解析により確認しています。

² Internal Lane Standard 600 などのレーン内部標準を使用した場合、アレリックラダー成分の算出されたサイズは、記載されているサイズと異なることがあります。このような相違が生じるのは、アレリックラダーとILS 成分ではシーケンスが異なるため、泳動速度に差が生じるからです。色素標識もアレリックの泳動に影響を及ぼします。

³ 記載されているアレリックは、頻度が 1/1000 を上回るものです。

表 3. 一般的な入手できる標準的鋳型 DNA における PowerPlex® 16 System によるアレリックの決定

| STR | ローカス | 標準鋳型 DNA | | |
|------------|------|------------|--------|------------|
| | | K562 | 9947A | 9948 |
| Penta E | | 14, 5 | 13, 12 | 11, 11 |
| D18S51 | | 16, 15 | 19, 15 | 18, 15 |
| D21S11 | | 31, 30, 29 | 30, 30 | 30, 29 |
| TH01 | | 9.3, 9.3 | 9.3, 8 | 9.3, 6 |
| D3S1358 | | 16, 16 | 15, 14 | 17, 15 |
| FGA | | 24, 21 | 24, 23 | 26, 24 |
| TPOX | | 9, 8 | 8, 8 | 9, 8 |
| D8S1179 | | 12, 12 | 13, 13 | 13, 12 |
| vWA | | 16, 16 | 18, 17 | 17, 17 |
| Amelogenin | | X, X | X, X | X, Y |
| Penta D | | 13, 9 | 12, 12 | 12, 8 |
| CSF1PO | | 10, 9 | 12, 10 | 12, 11, 10 |
| D16S539 | | 12, 11 | 12, 11 | 11, 11 |
| D7S820 | | 11, 9 | 11, 10 | 11, 11 |
| D13S317 | | 8, 8 | 11, 11 | 11, 11 |
| D5S818 | | 12, 11 | 11, 11 | 13, 11 |

Amelogenin は STR ではありませんが、106 塩基の X 特異的なバンドと、112 塩基の Y 特異的なバンドを示します。

細胞株 9947A、9948、および K562 に関する情報は、locus.umdj.edu/nigms でご覧いただけます。K562 細胞株は、American Type Culture Collection、www.atcc.org (バージニア州マナッサス) から入手できます。

C. 識別力

PowerPlex® 16 System で増幅される 15 の STR ローカスにより、強力な識別力が得られます。これらのローカスおよびその多様なマルチプレックスの組み合わせに対する人口統計を表 4 ~ 6 に示します。これらのデータは、Bode Technology Group (バージニア州スプリングフィールド) North Carolina Bureau of Investigation (ノースカロライナ州ローリー) Palm Beach County Sheriff's Office (フロリダ州ウェストパームビーチ) Virginia Division of Forensic Science (バージニア州リッチモンド) および Charlotte/Mecklenburg Police Department Laboratory (ノースカロライナ州) との共同研究の一環として作成されました。これらのデータの生成には、アフリカ系アメリカ人、カフカス系アメリカ人、ヒスパニック系アメリカ人の人口集団から 200 人以上の個人に対する分析を行いました。アジア系アメリカ人のデータでは、150 名を超える個人の分析を行いました。STR ローカスに関するより詳細な人口データについては、参考文献 23 ~ 28 をご覧ください。

表 4 は、さまざまな人口集団における PowerPlex® 1.2^{a,b} および 16 System の適合率 (29) を示したものです。PowerPlex® 16 System を使った適合率は、白人系アメリカ人の 1.83×10^{17} 分の 1 から、アフリカ系アメリカ人の 1.42×10^{18} 分の 1 までです。

父性評価分析によく用いられる判定基準は父性指数 (PI) で、これは母親、子供、および擬父の遺伝子型に基づいて、父性を有する遺伝的確率を表わす方法です (30)。PowerPlex® 1.2 および 16 System の代表的な父性指数を表 5 に示します。PowerPlex® 16 System では、いずれの集団でも通常 500,000 を上回る父性指数が得られます。父性評価分析に用いる計算値には、このほかに排反検定力があります (30)。排反検定力は、PowerPlex® 16 System で算出した場合、いずれの被験人口集団でも 0.999998 を上回る値となります (表 6)。

表 4. さまざまな集団における PowerPlex® 1.2 および 16 System の適合率

| STR システム | 適合率 | | | |
|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | アフリカ系 アメリカ人 | カフカス系 アメリカ人 | ヒスパニック系 アメリカ人 | アジア系 アメリカ人 |
| PowerPlex® 1.2 System (8 STR loci) | 1 in 2.77×10^8 | 1 in 1.15×10^8 | 1 in 1.45×10^8 | 1 in 1.32×10^8 |
| PowerPlex® 16 System (15 STR loci) | 1 in 1.41×10^{18} | 1 in 1.83×10^{17} | 1 in 2.93×10^{17} | 1 in 3.74×10^{17} |

表 5. さまざまな集団における PowerPlex® 1.2 および 16 System の代表的な父性指数

| STR システム | 代表的な父性指数 | | | |
|-----------------------|----------------|----------------|------------------|---------------|
| | アフリカ系 アメリカ人 | カフカス系 アメリカ人 | ヒスパニック系 アメリカ人 | アジア系 アメリカ人 |
| PowerPlex® 1.2 System | 497 | 262 | 318 | 471 |
| PowerPlex® 16 System | 2,510,000 | 1,520,000 | 5,220,000 | 4,110,000 |

表 6. さまざまな集団における PowerPlex® 1.2 および 16 System の排反検定力

| STR システム | 排反検定力 | | | |
|-----------------------|----------------|----------------|------------------|---------------|
| | アフリカ系 アメリカ人 | カフカス系 アメリカ人 | ヒスパニック系 アメリカ人 | アジア系 アメリカ人 |
| PowerPlex® 1.2 System | 0.9982042 | 0.9968863 | 0.9973367 | 0.9981793 |
| PowerPlex® 16 System | 0.9999996 | 0.9999994 | 0.9999983 | 0.9999998 |

D. Internal Lane Standard 600

Internal Lane Standard (ILS) 600 には、60、80、100、120、140、160、180、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、550、600 塩基長の 22 の DNA フラグメントが含まれています。各フラグメントはカルボキシ-X-ロードミン (CXR) で標識されており、PowerPlex® 16 で増幅した産物の存在下に、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer または ABI PRISM® 377 DNA シークエンサーを用いて別に (4 色で) 検出することができます。ILS 600 は、PowerPlex® 16 System を使用する際の解析精度を向上させるために、ゲルレーンまたはキャピラリー電気泳動 (CE) 注入の都度使用するようデザインされています。このレーン内部標準の調製および使用に関するプロトコールは、セクション VI. C. および VII. E. をご参照ください。

E. 警告および使用上の注意

PCR によるタイピングを法医学または父性に関するケースワークに用いる場合には、バリデーション試験および品質管理法が必要となりますが、これらについては本マニュアルには記載されていません (31,32)。精製した DNA サンプルの品質のわずかな変化や、バッファー、イオン強度、プライマー濃度、使用するサーマルサイクラー、サーマルサイクリングの条件のわずかな変化が、PCR 反応の成否に影響することがあります。変性ゲル電気泳動や蛍光検出に関する推奨手順と同様に、増幅に関する推奨手順についても遵守されるよう強くお勧めいたします。

PCR による STR 解析には、きわめて微量の非テンプレート領域のヒト DNA が混入することがあります。サンプル DNA の調製、プライマーペアの取り扱い、増幅反応の準備、および増幅産物の解析の際には、交差汚染を生じないように、厳重に注意する必要があります。増幅前に使用する試薬 (Gold STR 10 × Buffer および PowerPlex® 16 10 × Primer Pair Mix) は、増幅後に使用する試薬および材料 (PowerPlex® 16 Allelic Ladder Mix、Internal Lane Standard 600、および Blue Dextran Loading Solution) とは別の箱で提供されます。これらは別々に保存してください。かならず陰性コントロール反応 (テンプレートなし) を試験に加え、試薬の純度を確認してください。手袋およびエアロゾルバリアーピペットチップのご使用を強く推奨いたします (ART® チップなど、セクション XI. B)。

STR 産物の解析に使用する試薬のなかには有害性が疑われるものも含まれており、それぞれ適切に取り扱う必要があります。表 7 に、このような試薬により引き起こされる可能性のある有害作用について記載しました。

表 7. 有害試薬

| Reagents for ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer | 有害性 |
|---|--------------|
| ホルムアミド | 刺激物、催奇物質 |
| Reagents for ABI PRISM® 377 DNA Sequencer | 有害性 |
| アクリルアミド (Long Ranger® Gel Solution) | 発癌物質の疑い有り、有毒 |
| 過硫酸アンモニウム | 酸化剤、腐食性有り |
| ホルムアミド (Blue Dextran Loading Solution に含有) | 刺激物、催奇物質 |
| TEMED | 腐食性、可燃性有り |
| 尿素 | 刺激物 |

III. キットの構成品

| 製品名 | サイズ | カタログ番号 |
|----------------------|--------|--------|
| PowerPlex® 16 System | 100 回分 | DC6531 |
| | 400 回分 | DC6530 |

DC6531 には 25µl の反応を 100 回行うのに十分な試薬が含まれます。

Preamplification Components Box (Yellow Label)

- 1 × 300µl Gold ST R 10 × Buffer
- 1 × 250µl PowerPlex® 16 10 × Primer Pair Mix
- 25µl 9947A DNA (10ng/µl)

Postamplification Components Box (Magenta Label)

- 1 × 25µl PowerPlex® 16 Allelic Ladder Mix
- 1 × 150µl Internal Lane Standard (ILS) 600
- 1 × 1ml Blue Dextran Loading Solution

保存条件：すべての構成品は - 20 で保存してください。PowerPlex® 16 10 × Primer Pair Mix、PowerPlex® 16 Allelic Ladder Mix、および Internal Lane Standard 600 は光感受性ですので、暗所で保存してください。増幅前用の試薬と増幅後用の試薬は、別々のピペット、チューブラックなどを使用して別々に保存・使用されるよう強く推奨します。

| 製品名 | カタログ番号 |
|----------------------|--------|
| PowerTyper™ 16 Macro | DG2850 |

Genotyper® 2.0 または 2.5 に使用する PowerTyper™ 16 Macro はご希望に応じて Promega から入手いただけます (無料)。

色分離マトリックスの初期セットアップには標準マトリックスが必要です。Matrix FL-JOE-TMR-CXR は別売りです (セクション XI.B を参照)。

IV. DNA 抽出法

プロメガでは、増幅に用いる DNA の調製用としてさまざまな DNA 抽出法を評価してきました。SV Total RNA Isolation System[®] (カタログ番号 Z3100) を使用すれば、標準的なプロトコールの変法を用いて、15 ~ 30 分という短時間でゲノム DNA の単離を行なうことができます。この改変プロトコールの詳細については、参考文献 33 をご覧ください。プロメガの ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System (カタログ番号 A7710) を使用すれば、全血または血痕から増幅解析用のゲノム DNA を簡単、効果的、かつ安全に単離することができます。また、Wizard® Genomic DNA Purification Kit (カタログ番号 A1120) を使用すれば、有機溶媒を用いることなく全血から迅速・簡単に二本鎖 DNA を単離することができます。Wizard® キットを用いて単離した DNA は、PCR 用およびサザンハイブリダイゼーション実験用として最適です。詳細な方法については、GenePrint® Fluorescent STR Systems Technical Manual #TMD006 をご参照ください。Technical Manual は、インターネットにて www.promega.com からご入手いただけます。また、ご請求に応じてプロメガよりご送付いたします。

Allelic Ladder Mix は、輸送の際、別の密封された包装で届けられます。このチューブは、開封後、増幅後用の箱に入れてください。

Matrix FL-JOE-TMR-CXR (カタログ番号 DG2860) および Internal Lane Standard 600 (カタログ番号 DG2611) の情報については、関連製品 (セクション XI.B) をご覧ください。

V. PowerPlex® 16 System を用いた DNA 増幅のプロトコール

準備するもの

- Thermal Cycler Model 480 あるいは GeneAmp® System 9600, 9700 または 2400 (PE Biosystems)
- 微量高速遠心機
- 0.5ml または 0.2ml (薄壁) 微量遠心チューブ (PE Biosystems)
- 1.5ml 褐色微量遠心チューブ (Fisher、カタログ番号 05-402-26)
- エアロゾールバリアーピペットチップ (セクション XI.B を参照)
- AmpliTaq Gold® DNA polymerase (PE Biosystems)
- Nuclease-Free Water (カタログ番号 P1193)
- mineral oil (カタログ番号 DY1151、Thermal Cycler Model 480 用)

下記のプロトコールにより、通常は 25µl の反応液で 0.5 ~ 1ng のテンプレート DNA を増幅します。この量より多いテンプレートを使用すると、小さなローカスで高いピークが、大きなローカスで比較的低いピークが見られます。PowerPlex® 16 System は GeneAmp® PCR System 9600 サーマルサイクラー用に最適化されています。GeneAmp® PCR Systems 9700 サーマルサイクラー、GeneAmp® PCR Systems 2400 サーマルサイクラー、Perkin-Elmer Model 480 サーマルサイクラー用の増幅プロトコールについても用意しております。

A. 増幅反応の準備

注： 交差汚染を防止するため、手袋とエアロゾールバリアーピペットチップの使用を強く推奨します。増幅前用の試薬と増幅後用の試薬は、完全に別々の部屋に分けて保管してください。増幅反応液は、反応準備専用の実験室で調製してください。装置や備品は、増幅準備専用のものを使用してください。

1. Gold ST R 10 × Buffer と PowerPlex® 16 10 × Primer Pair Mix を融かす。

注： これらの試薬は、使用の都度、5 ~ 10 秒間ボルテックスして混和することが非常に重要です。Gold ST R Buffer は沈殿を生じることがあります。沈殿が生じた場合には、溶液を 37 °C で短時間温め、沈殿が溶解するまでボルテックスしてください。

2. 準備すべき反応の数を決める。この反応の数には、陽性コントロールおよび陰性コントロールも含まれます。ピペティングのエラーを加味して、この数字に 1 ~ 2 反応分を加えます。こうすることで各試薬に微量の無駄は生じますが、全サンプルに対して十分な量の PCR マスターミックスを確保することができます。また、これにより、各反応液には必ず同じマスターミックスが含まれるようになります。
3. ラックに、1 反応当たり 1 本の清浄な 0.2ml または 0.5ml 微量遠心チューブを準備し、適宜ラベルする。

増幅を成功させるためには細心の注意が必要です。増幅のトラブルシューティングのためのガイドをセクション IX.A に示します。

GeneAmp® PCR システム 9600、9700、2400 サーマルサイクラーをお使いの場合は、0.2ml 薄壁 MicroAmp® 反応チューブを使用してください。Perkin-Elmer model 480 用には、標準の 0.5ml GeneAmp® 反応チューブを推奨します。

4. 表 8 に、2.5 μ l の DNA テンプレートを 25 μ l の反応液で使用する場合の 1 サンプル当たりの各試薬の量を示します。これより多いテンプレートが必要な場合は、水量を適宜増減してください。

表 8 .PowerPlex® 16 System 用の増幅反応液

| PCR マスターミックスの構成 | サンプルあたりの液量 |
|--|------------------|
| Nuclease-Free Water | 16.7 μ l |
| Gold ST R 10 \times Buffer | 2.5 μ l |
| PowerPlex™ 16 10 \times Primer Pair Mix | 2.5 μ l |
| AmpliTaq Gold® DNA polymerase ¹ | 0.8 μ l (4u) |
| マスターミックスの液量 | 22.5 μ l |
| 鋳型 DNA (あとから添加) | 2.5 μ l |
| 合計反応液量 | 25 μ l |

¹ AmpliTaq Gold® DNA ポリメラーゼが 5u/ μ l であると仮定した。酵素濃度が異なる場合は、使用する酵素の量を適宜増減してください。

5. 表 9 を用いて、PCR マスターミックスの各成分の必要量を算出する。1 サンプル当たりの量 (μ l) に総反応数 (手順 2 で算出) を乗じ、最終的なマスターミックス量 (μ l) を算出する。

表 9 .PowerPlex® 16 System 用のマスターミックス

| PCR マスターミックスの構成 | サンプルあたりの液量 | \times 反応数 | 最終液量 (μ l) |
|--|------------------|--------------|-----------------|
| Nuclease-Free Water | μ l | | |
| Gold ST R 10 \times Buffer | 2.5 μ l | | |
| PowerPlex® 16 10 \times Primer Pair Mix | 2.5 μ l | | |
| AmpliTaq Gold® DNA polymerase ¹ | 0.8 μ l (4u) | | |
| マスターミックスの量 ² | μ l | | |
| チューブあたり | | | |
| 鋳型 DNA (あとから添加) | μ l | | |
| 合計反応液量 | 25 μ l | | |

¹ AmpliTaq Gold® DNA ポリメラーゼが 5u/ μ l であると仮定した。酵素濃度が異なる場合は、使用する酵素の量を適宜増減してください。

² テンプレート DNA とマスターミックスを加えた液量が 25 μ l となるようにしてください。

注： テンプレート DNA を TE バッファー中で保存する場合には、添加する DNA サンプル量が最終反応液量の 20% を上回らないようにしてください。PCR の増幅効率や増幅の質は、pH の変化 (Tris-HCl が添加されることに起因) 利用可能なマグネシウム濃度 (EDTA によるキレート作用に起因)、あるいはテンプレート DNA の由来や使用した抽出手順に依存して低濃度で存在する可能性のある他の PCR 阻害物質に大きな影響を受けます。

6. 表 9 の順番どおりに各試薬の最終量を 1.5ml の滅菌褐色チューブに添加する。穏やかに混和する。
7. 各反応チューブに、PCR マスターミックスをピペットで分注する (表 9)。
8. PCR マスターミックスを添加したそれぞれのチューブに、ピペットで各サンプルのテンプレート DNA (0.5 ~ 1ng) を分注する。
9. 陽性増幅コントロール用として、9947A DNA サンプルを、テンプレート DNA の容量に 0.5ng となるよう希釈する。希釈した DNA 1ng を、PCR マスターミックスを添加した微量遠心チューブにピペットで分注する。

2ng を越える鋳型 DNA を増幅に用いるとローカス間のピーク高の不均衡が引き起こされます。小さなローカスのほうが大きなローカスと比べてより多くの増幅産物量を示します。増幅プログラムのサイクル数を 2 ~ 4 減らすと (10/20 または 10/18 サイクル) ローカス間のバランスが安定します。

10. 陰性増幅コントロール用として、Nuclease-Free Water（テンプレート DNA の代わり）を、PCR マスターミックスを添加した微量遠心反応チューブにピペットで分注する。
11. GeneAmp® PCR System 9600、9700、または 2400 サーマルサイクラーと MicroAmp® 反応チューブを使用する場合は、反応チューブへのミネラルオイルの添加は不要です。しかし、Model 480 サーマルサイクラーと GeneAmp® 反応チューブを使用する場合は、各チューブにミネラルオイルを 1 滴添加してからふたをしてください。

注：ミネラルオイルはチューブの側壁をつたわせてオーバーレイすることにより、飛散によるサンプルのロスや交差汚染を防止します。

B. サーマルサイクラーによる増幅

1. チューブをサーマルサイクラーにセットする。
2. 推奨プロトコールを選択して実施する。下記に、GeneAmp® PCR system 9600、GeneAmp® PCR system 9700、GeneAmp® PCR system 2400、および Perkin-Elmer model 480 サーマルサイクラーでの実施に適したプロトコールをご紹介します。
3. サーマルサイクリングのプロトコールが完了したら、サンプルを - 20 で暗箱中に保存する。

注：増幅サンプルを 4 以上で保存すると、分解産物を生じる恐れがあります。

| Perkin-Elmer GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler 用プロトコール | Perkin-Elmer GeneAmp® PCR System 2400 Thermal Cycler 用プロトコール |
|--|--|
| サイクルの設定： 95°C で 11 分、続いて 96°C で 1 分、続いて 100% の速度で 94 に下げ、30 秒 29% の速度で 60°C に下げ、30 秒 23% の速度で 70°C に上げ、45 秒 10 サイクル繰り返す、続いて 100% の速度で 90°C に上げ、30 秒 29% の速度で 60°C に下げ、30 秒 23% の速度で 70°C に上げ、45 秒 18 22 サイクル繰り返す、続いて 60°C で 30 分 4°C で置く | サイクルの設定： 95°C で 11 分、続いて 96°C で 1 分、続いて 100% の速度で 94°C に下げ、30 秒 100% の速度で 60°C に下げ、30 秒 23% の速度で 70°C に上げ、45 秒 10 サイクル繰り返す、続いて 100% の速度で 90°C に上げ、30 秒 100% の速度で 60°C に下げ、30 秒 23% の速度で 70°C に上げ、45 秒 18 22 サイクル繰り返す、続いて 60°C で 30 分 4°C で置く |
| Perkin-Elmer GeneAmp® PCR System 9600 Thermal Cycler 用プロトコール | Perkin-Elmer Thermal Cycler Model 480 用プロトコール |
| サイクルの設定： 95°C で 11 分間、続いて 96°C で 1 分間、続いて 94°C で 30 秒間 68 秒間で 60°C に下げ、60 で 30 秒 50 秒間で 70°C に上げ、70 で 45 秒 10 サイクル繰り返す、続いて 90°C で 30 秒 60 秒間で 60°C に下げ、60 で 30 秒 50 秒間で 70°C に上げ、70 で 45 秒 18 22 サイクル繰り返す、続いて 60°C で 30 分 4°C で置く | サイクルの設定： 95°C で 11 分、続いて 96°C で 2 分、続いて 94°C で 1 分 60°C で 1 分 70°C で 1.5 分 10 サイクル繰り返す、続いて 90°C で 1 分 60°C で 1 分 70°C で 1.5 分 18 22 サイクル繰り返す、続いて 60°C で 30 分 4°C で置く |

注：増幅および検出用装置には様々な種類があります。プロトコールは、サイクル数、インジェクション時間（またはロードする容量）を含めて、各研究室の装置毎に最適化する必要があります。

注：プロメガの試験では、0.5 ~ 1ng の精製した鋳型 DNA について 10/20 および 10/22 サイクルでうまくいくことが示されました。DNA 量が多い場合（FTA® 紙）は、少ないサイクル数、例えば 10/18 でお試しください。

各研究室でバリデーションを実施してください。

C. 増幅産物のアガロースゲル電気泳動 (オプション)

アガロースゲル電気泳動を行なうことにより、ポリアクリルアミドゲル電気泳動やキャピラリー電気泳動を行なう前に増幅反応の成否を迅速に確認することができます。

準備するもの

(溶液の組成はセクション XI.A をご覧ください)

- TAE 1 × バッファー
 - アガロース
 - 5 × ローディングバッファー
 - エチジウムブロマイド溶液、0.5µg/ml
1. アガロース 2.0g を TAE 1 × バッファー 100ml に添加して、2% アガロースゲル (約 150cm²) を調製する。液面の位置を容器にマークし、煮沸または電子レンジ加熱によりアガロースを溶解する。蒸発により失われた液量は、予熱 (60) した脱イオン水を添加して補充する。
 2. ゲルトレイに流し込む前に、アガロースを 55 まで冷却する。ゲルトレイが水平に設置されていることを確認してください。アガロースをトレイに流し入れたら、ゲルコームを挿入し、20 ~ 30 分固まるのを待つ。
 3. 各増幅サンプル 10µl を 5 × ローディング溶液 2.5µl と混和して、サンプルを調製する。
 4. 泳動バッファー用として、1 リットルの TAE 1 × バッファーを調製する。
 5. ゲルとトレイを泳動ゲルボックスに設置する。ゲルが少なくとも液面下 0.65cm となるまで、タンクに十分量の泳動バッファーを注入する。コームを静かに抜き去る。
 6. 各サンプルと 5 × ローディング溶液を混合したサンプルをそれぞれアプライする (上記の手順 3 を参照)。
 7. 電圧を 5 volts/cm に設定する (2 電極間の距離として測定)。ゲルを 2 時間泳動する。
 8. 泳動後、0.5µg/ml エチジウムブロマイド含有 TAE 1 × バッファーでゲルを染色する。室温で、穏やかに 20 分間振とうする。エチジウムブロマイド溶液を除去して、脱イオン水で置換する。ゲルを 20 分間脱色する。
 9. ゲルを UV トランスイルミネーターで撮影する (302nm)。

注： データを解析する際に、アレル以外の余分なバンドが認められても心配する必要はありません。非変性アガロースゲル電気泳動を実施した場合には、DNA ヘテロ二本鎖が生成されることが予想されます。アガロースゲル電気泳動を行なう目的は、PCR 反応の成否の確認だけです。

VI. ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer を用いた増幅断片の検出

準備するもの

(溶液の組成はセクション XI.A をご覧ください。)

- ヒーティングブロック、恒温槽、またはサーマルサイクラー
- 310 キャピラリー、47cm × 50µm (PE Biosystems)
- Performance Optimized Polymer 4 (POP-4; PE Biosystems)
- ガラスシリンジ (1ml)
- 10 × Genetic Analyzer Buffer with EDTA (PE Biosystems)
- サンプルチューブとセプタム (中ブタ) (PE Biosystems)
- エアロゾールバリアーピペットチップ (セクション XI.B)
- 電導度が 100µS/cm 未満の脱イオン化ホルムアミド (Amresco, Ultra Pure Grade, カタログ番号 0606)
- Matrix FL-JOE-TMR-CXR (カタログ番号 DG2860)
- 氷

ホルムアミドの品質は、検出結果に非常に大きな影響を及ぼします。伝導率が 100µS/cm 未満の脱イオン化ホルムアミドを使用してください。ホルムアミドは、小分けにして -20°C で凍結保存しておくことができます。凍結融解を繰り返したり、4°C で長期間保存すると、ホルムアミドが分解する恐れがあります。伝導率が 100µS/cm を上回るホルムアミドはイオン化している可能性があり、注入時に DNA と競合します。このような競合が起こると、ピーク高が低くなり、感度も低下します。注入時間を延長しても、シグナルは上がりません。

A. マトリックスの標準化

マトリックスの標準化には、Matrix FL-JOE-TMR-CXR (カタログ番号 DG2860) が必要です。マトリックスの標準化に関するプロトコールおよび追加情報については、Matrix FL-JOE-TMR-CXR Technical Bulletin #TBD015 (カタログ番号 DG2860 で提供) をご覧ください。ご請求に応じてプロメガよりご送付いたします。また、www.promega.com からオンラインでご入手いただけます。マトリックスファイルを適切に作成することは、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer を使用したマルチカラーシステムを評価する上できわめて重要です。マトリックスは、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer ごとに作成する必要があります。

B. 装置の準備

1. ポンプブロックの洗浄、キャピラリーの取り付け、オートサンプラーのキャリブレーション、およびシリンジのポリマー充填に関する説明は、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer User's Manual をご参照ください。
2. ABI PRISM® 310 collection ソフトウェアを開く。
3. ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer User's Manual にしたがって、GeneScan® サンプルシートを作成する。“sample info” の列に適切なサンプル情報を入力する。

PowerPlex® 16 Allelic Ladder Mix を含む行については、青色素、黄色素、緑色素の色に対して、“sample info” の列に “Ladder” と挿入する。PowerTyper™ 16 Macro を使用して良好なデータ解析結果を得るには、この情報が入力されていなければなりません。

新たな GeneScan® 注入リストを作成する。プルダウンメニューから、適切なサンプルシートを選択する。

手順 4 の注入時間は、装置ごとに最適化する必要があります。1ng の増幅サンプルには、2 ~ 5 秒の注入時間をお薦めします。

- プルダウンメニューから “GS STR POP4 (1ml) A” モジュールを選択する。注入時間を 3 秒、泳動時間を 30 分に変更し、その他のパラメーターについては下記の設定をそのまま使用する。

| | |
|------------|------|
| Inj. Secs: | 3 |
| Inj. kV: | 15.0 |
| Run kV: | 15.0 |
| Run : | 60 |
| Run Time: | 30 |

注：ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer を長時間運転すると、泳動中にフラグメントの移動がわずかに変動することがあります。このような変動は、温度変化またはカラムの変化に起因すると考えられます。多数のサンプルを解析する場合、泳動時間全体を通して異なる時間にアレリックラダーの注入を行なうことにより、サンプルの遺伝子型決定をより正確に行なうことができます。

- 適切なマトリックスファイルを選択する (セクション VI. A)
- データを自動的に解析するには、auto analyze チェックボックスを選択し、適切な解析パラメーターとサイズ標準を選ぶ。これらの選択肢に関する具体的な情報については、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer User’s Manual をご参照ください。

C. サンプルの調製

PowerPlex® 16 System には、増幅サンプルの 4 色検出・分析用のレーン内部標準 (ILS) として、Internal Lane Standard 600 が添付されています。この方法では、PowerPlex® 16 Allelic Ladder Mix の注入は、96 サンプルの泳動当たり 3 ~ 4 回しか必要ありません。

- Internal Lane Standard 600 (ILS 600) と脱イオン化ホルムアミドを下記にしたがって混合して混和し、ローディングカクテルを調製する。

$$[(1.0\mu\text{l ILS 600}) \times (\text{注入数})] + [(24.0\mu\text{l 脱イオン化ホルムアミド}) \times (\text{注入数})]$$

- 調製したローディングカクテル 25.0μl と増幅サンプル 1.0μl を混合する。

注：検出限界は装置ごとに異なります。したがって、注入時間や、ローディングカクテルと混和するサンプル量は、適宜増減する必要があります。ピーク高が高すぎる場合 (2,000rfu を上回る場合)、ローディングカクテルと混和する前にサンプルを Gold ST R 1 × Buffer で希釈しておく方法もあります。この場合、ローカス間でアレルのピーク高が不均質となることがあります。最適な結果を得るには、増幅反応液中の DNA テンプレート量を減らすか、増幅プログラムのサイクル数を 2 ~ 4 サイクル減らしてください (すなわち、10/18 または 10/20 サイクリング)、ILS 600 の量も調節することができます。

- 調製したローディングカクテル 25.0μl と PowerPlex® 16 Allelic Ladder Mix 1.0μl を混合する。
- サンプルおよびラダーを 95 °C で 3 分間加熱して変性させ、直ちに氷上に移して 3 分間冷却する。サンプルの変性は、ローディングの直前に行なうこと。
- 適切なオートサンプラートレイ (48 または 96 チューブ用) にチューブを設置する。
- オートサンプラートレイを装置内に設置し、装置の扉を閉じる。

D. キャピラリー電気泳動および検出

1. サンプルトレイをロードして扉を閉じたら、“Run” を選択してキャピラリー電気泳動システムを作動させる。
2. Raw Data と Status ウィンドウの確認により、電気泳動をモニターする。
3. シリンジのポンピング、サンプル注入、およびサンプルの電気泳動には、1 サンプル当たり約 40 分を要します。
4. GeneScan® Analysis ソフトウェアを用いてデータを解析する。GeneScan® プロジェクトを開く。
5. 1 つ以上のサンプルを対象として、Raw Data を検討する。サンプルファイル名を反転表示させ、“sample” メニューの下から “raw data” を選択する。カーソルを移動させ、大きなプライマピークの右側のベースライン上に十字線を合わせる（最初のレーン内部標準のピーク [赤色] より前）。ウィンドウの左下に表示される X 値を、解析パラメーターにおける開始位置として使用する。
6. 解析パラメーターは次のとおりとする。

| | |
|-----------------------|--|
| Analysis Range | Start: defined in step 5 Stop: 10000 |
| Data Processing | Baseline: Checked Multi Component: Checked Smooth Options: Light* |
| Peak Detection | Peak Amplitude Thresholds**: B: Y: G: R: Min. Peak Half Width: 3pts |
| Size Call Range | Min: 60 Max: 600 |
| Size Calling Method | Local Southern Method |
| Split Peak Correction | None |

* 平滑化オプション (Smoothing Options) は、研究施設ごとに決定する必要があります。強度に平滑化すると、ときに TH01 アレル 9.3 と 10 を区別できないことがあります。

** ピーク振幅閾値は、ソフトウェアがピークとみなすことのできる最低のピーク高です。ピーク振幅閾値は通常 50 ~ 200rfu で、研究施設ごとに決定する必要があります。

7. 解析パラメーターは、GeneScan® Analysis フォルダ内の Analysis Parameters フォルダに保存してください。
8. 保存した解析パラメーターファイルを、サンプルに適用する。
9. 新しいサイズ標準を割り当てる。サンプルファイルを選択して、サイズ標準の隣りの矢印を反転表示させ、次いで “define new” を選択する。セクション VIII. D、図 1 のパネル D に示すように、サイズ標準ピークを割り当てる。サイズ標準は、GeneScan® Analysis フォルダ中の Size Standards フォルダに保存する。

注： CXR (赤色) チャンネルで TMR (黄色) からのプルアップ (嵩上げ) またはブリードスルー (にじみ) が見られる場合は、解析パラメーターの赤色チャンネルのピーク振幅閾値を高く変更することができます (100 ~ 200rfu)。CXR (ILS) フラグメントは 300rfu 以上のはずなので、これが解釈の妨げとなることはありません。

10. サイズ標準ファイルをサンプルに適用したのち、サンプルファイルを解析する。

注：

増幅サンプルのピーク高は、2,000rfu 未満が理想的です。

2,000rfu を上回るピーク高は、装置の飽和状態に起因するアーティファクトのピークである可能性があります（すなわち、サンプルのオーバーロード）。サンプルのピーク高が装置の直線的な検出範囲から外れている場合には、実際のアレルピークに対するスタッターピークの比率が高くなり、アレル位置の特定が困難となります。ピーク高のバランスも、均質性が低下する可能性があります。

同一サンプルを使って検出した相対的な蛍光ユニット数には、装置ごとにばらつきが見られることがあります。また、色素間のバランスに影響を与えるような相対的な色の検出効率にも、装置間にはばらつきが見られます。

11. データの解析についてはセクション VIII を参照してください。

VII. ABI PRISM® 377 DNA Sequencer を用いた増幅断片の検出

準備するもの

（溶液の組成はセクション XI.A をご覧ください。）

- ヒーティングブロック、恒温槽、またはサーマルサイクラー
- Long Ranger® gel solution（BMA、カタログ番号 50611）または Long Ranger Singel™ pack for ABI sequencers 377-36cm（BMA、カタログ番号 50691）
- 10% ammonium persulfate（カタログ番号 V3131）
- TEMED（カタログ番号 V3161）
- Urea（カタログ番号 V3171）
- TBE 10 × バッファー
- Nalgene® 組織培養用フィルター（0.2 ミクロン）
- エアロゾールバリアーピペットチップ（セクション XI.B.）
- ゲルローディングピペットチップ
- 36cm ゲル板（前後）
- 36cm ゲルスパーサー（厚さ 0.2mm）
- 36- ウェルシャーケティースコームまたは 34- ウェルスクエアティースコーム（厚さ 0.2mm）
- ダブルクリップ（事務用大型ダブルクリップなど）
- Liqui-Nox® または他の洗剤
- Matrix FL-JOE-TMR-CXR（カタログ番号 DG2860）
- 氷

A. ポリアクリルアミドゲルの準備

アクリルアミド（Long Ranger® ゲル溶液）は神経毒であり、発癌性を持つ疑いもあるため、吸入したり皮膚に触れたりしないように十分注意してください。本物質を取り扱う際は、警告表示をよく読み、必要な予防措置を講じてください。アクリルアミド溶液を使用する際には、かならず手袋を 2 重に装着し、安全メガネをかけてください。

下記は、ABI PRISM® 377 DNA Sequencer での使用を目的とした 36cm 変性ポリアクリルアミドゲルの調製プロトコルです。低蛍光ガラスプレートのご使用をお薦めします。このようなガラスプレートは、機器の製造業者から入手することができます。

1. 温水と 1% Liqui-Nox® 溶液を使用してガラスプレートをよく洗浄する。脱イオン水で十分にすすぐ。無塵の環境でガラスプレートを風乾する。

- 2枚のガラスプレート間に0.2mmのサイドゲルスパーサーを挟んでガラスプレートを組み立てる。バインダーダブルクリップを使用して、プレートを固定する（片側当たり4個のダブルクリップ）。このようにして組み立てたガラスプレートを、試験管ラックなどの支持物に水平に置く。
3. 表10にリストした成分を混和して、5% Long Ranger® アクリルアミドゲル溶液（総量50ml）を調製する。この溶液を、尿素が溶解するまで攪拌する。

表10. 5% Long Ranger® Polyacrylamide Gelの組成

| 構成品 | 5% Gel | 最終濃度 |
|-----------------------|--------|------|
| 尿素 | 18g | 6M |
| 脱イオン水 | 26ml | - |
| 10× TBE | 5ml | 1× |
| 50% Long Ranger® ゲル溶液 | 5ml | 5% |
| 合計液量 | 50ml | |

注：Long Ranger Single™ Packs を使用してもよい。

4. アクリルアミド溶液を、0.2µm フィルター（Nalgene® 組織培養用フィルターなど）でろ過し、さらに5分間脱気する。
5. 50mlのアクリルアミド溶液に35µlのTEMEDと250µlの10% 過硫酸アンモニウム（用時調製）を添加し、穏やかに混和する。
6. 使い捨ての30cc シリンジを用いてゲルを注入する。その際、プレートのウェル側端から注入を開始し、2枚の水平ガラスプレート間にアクリルアミドを慎重に注入していく。溶液は、プレート上端の幅まで充填する。一定の流速で注入しながらガラスプレートを軽くたたき、プレート底部への溶液の移動を助けるとともに気泡の形成を防ぐ。
7. ガラスプレート間に36ウェルのシャークティースコームまたは34ウェルのスクエアティースコームを挿入する。64または96ウェルのシャークティースコームを使用してもよい。
8. ダブルクリップ3個を一定間隔で使ってコームを固定する。
9. 残りのアクリルアミド溶液は、重合コントロール用として保持する。
10. 少なくとも2時間は静置し、重合させる。重合コントロールを調べ、重合が完了していることを確認する。

B. マトリックスの標準化

マトリックスの標準化には、Matrix FL-JOE-TMR-CXR（カタログ番号DG2860）が必要です。マトリックスの標準化に関するプロトコールおよび追加情報については、Matrix FL-JOE-TMR-CXR Technical Bulletin #TBD015（カタログ番号DG2860に添付）をご覧ください。本Technical Bulletinは、ご請求に応じてプロメガよりご送付いたします。また、www.promega.comからご入手いただくこともできます。マトリックスファイルを適切に作成することは、ABI PRISM® 377 DNA Sequencerを使用してマルチカラーシステムを評価するためにきわめて重要です。マトリックスは、ABI PRISM® 377 DNA Sequencer ごとに作成する必要があります。

注：ゲルは、一晩保存することができます。ただし、その場合は脱イオン水で湿らせたペーパータオルとプラスチックフィルムラップでプレート上部および下部を覆い、ゲルが乾燥するのを防いでください（尿素が析出してゲルが破損するため）。

C. 装置の準備

1. ABI PRISM® 377 Collection ソフトウェアを開く。
2. GeneScan® Analysis Software User's Manual にしたがって、サンプルシートを作成する。“sample info” の列に適切なサンプル情報を入力する。

PowerPlex® 16 Allelic Ladder Mix を含む行については、青色素、黄色素、緑色素の色に対して、“sample info” の列に “Ladder” と挿入する。PowerTyper™ 16 Macro (カタログ番号 DG2850) を使用して良好なデータ解析結果を得るには、この情報が入力されている必要があります。

3. 新たな GeneScan® ランを作成し、下記の設定を使用する。

| | |
|------------------------|----------------|
| Plate Check Module: | Plate Check A |
| PreRun Module: | PR GS 36A-2400 |
| Run Module: | GS36A-2400 |
| Collect time: | 3 hours |
| Well-to-Read distance: | 36cm |

4. プルダウンメニューから適切なサンプルシートと選択コームを選択する。
5. 適切なゲルマトリックスファイルを選択する (セクション VII.B)。

D. ゲルのプレ・ラン

1. 重合が完了したアクリルアミドゲルからダブルクリップを取り外す。必要に応じて、脱イオン水で湿らせたペーパータオルでガラスプレートの過剰なアクリルアミドを拭き取る。
2. コームから余分なポリアクリルアミドをそぎ落とし、コームを抜き取る。シャークティースコームを使用した場合は、シャークティースコームの歯をゲルに約 1 ~ 2mm 慎重に挿入する。
3. ゲル / ガラスプレートユニットを、377 カセットにセットする。
4. カセットを装置に固定し、ABI PRISM® 377 DNA Sequencer User's Manual の推奨にしたがってプレートをチェックする。水平部の折れ線グラフが平坦でない場合は、カセットを取り外してプレート表面の汚れを落とし、再度プレートのチェックを行なう。
5. 装置の上部および下部バッファー槽に TBE 1 × バッファーを添加する。
6. バッファーを満した 30cc シリンジを用いてゲルのウェル部分から気泡を完全に追い出し、上部バッファー槽にふたをする。19 ゲージの曲針を取り付けたシリンジを用い、ゲル底部の気泡を完全に除去する。
7. 加熱プレートを取り付け、給水チューブを接続する。すべての電極を取り付け、装置の扉を閉じ、“PreRun” ボタンを選択する。15 ~ 20 分間、またはゲル温度が 40 以上となるまで、ゲルをプレ・ランする。ステータスウィンドウを開いてゲルの温度をモニターする。
8. ゲルのプレ・ラン中に、サンプルおよびアレリックラダーサンプルを調製する。

E. サンプルの調製とロード

PowerPlex® 16 System には、増幅サンプルの 4 色検出・解析用として、Internal Lane Standard 600 (ILS 600) が添付されています。この方法では、ゲル当たり 2 ~ 3 レーンの PowerPlex® 16 Allelic Ladder Mix しか必要ありません。

1. ILS 600 と Blue Dextran Loading Solution を下記にしたがって混合して混和し、ローディングカクテルを調製する。

$[(0.5\mu\text{l ILS 600}) \times (\text{レーン数})] + [(1.5\mu\text{l Blue Dextran Loading Solution}) \times (\text{レーン数})]$

2. 調製したローディングカクテル 2.0 μl と増幅サンプル 1.0 μl を混合する。

注： 検出限界は装置ごとに異なります。したがって、ローディングカクテルと混和するサンプル量は、適宜増減する必要があります。ピーク高が高すぎる場合 (2,000rfu を上回る場合)、ローディングカクテルと混和する前にサンプルを Gold ST R 1 x Buffer で希釈しておく方法もあります。この場合、ローカス間でアレルのピーク高が不均質となることがあります。最良の結果を得るには、増幅反応液中の DNA テンプレート量を減らすか、増幅プログラムのサイクル数を 2 ~ 4 サイクル減らしてください (すなわち、10/18 または 10/20 サイクリング)、ILS 600 の量も調節することができます。

3. 調製したローディングカクテル 2.0 μl と PowerPlex® 16 Allelic Ladder Mix 1.0 μl を混合する。
4. サンプルを短時間微少遠心し、液をチューブの底に集める。
5. サンプルを 95 °C で 2 分間加熱して変性し、氷上に移して急冷する。サンプルの変性は、ゲルにロードする直前に行なってください。ローディングの数時間前に変性を行なった場合、サンプル DNA が部分的にリアニールしてしまいます。
6. プレ・ランを 15 ~ 20 分間行なったのち、“pause” ボタンをクリックして装置を一時停止する。プレ・ランを一時停止とすることにより、サンプルローディング中も水の循環を継続することができ、ゲルの保温が可能となります。
7. バッファを充填した 30cc シリンジを用いて、ウェル部分の尿素をフラッシュする。
8. 各ウェルに変性したサンプルを 1.5 μl ずつロードする。
9. 上部バッファ槽にふたをし、装置の扉を閉じる。

F. ゲル電気泳動および検出

1. ローディング後、“Cancel” を選択してプレ・ランを終了させる。泳動時間の設定が 3 時間となっていることを確認し、“Run” を選択して電気泳動を開始する。
2. ゲルイメージとステータスウィンドウの確認により、電気泳動をモニターする。
3. そのまま 3 時間電気泳動する。600 塩基対の ILS フラグメントがレーザーを通過するはずです。
4. ゲルレーンをトラッキングして抽出する。
5. ゲルイメージを検討する。ゲル上の、プライマー領域を除外できるような位置に、カーソルを置く。解析パラメーターの “Start” 値として、ウィンドウ上部のスキャン値を使用する。
6. GeneScan® プロジェクトを開く。

手順 8 は、装置ごとに最適化する必要があります。ローディング量は 1.0 ~ 2.0 μl とするようお勧めします。

7. 下記の解析パラメーターの使用を推奨します。

| | |
|-----------------------|--|
| Analysis Range | Start: ステップ 5 を参照 Stop: 10000 |
| Data Processing | Baseline: Checked Multi-Component: Checked Smooth Options: Light* |
| Peak Detection | Peak Amplitude Thresholds**: B: Y: G: R: Min. Peak Half Width: 3pts |
| Size Call Range | Min: 60 Max: 600 |
| Size Calling Method | Local Southern Method |
| Split Peak Correction | None |

* 平滑化オプションは、研究施設ごとに決定する必要があります。強度に平滑化すると、ときに TH01 アレル 9.3 と 10 を区別できないことがあります。

** ピーク振幅閾値は、ソフトウェアがピークとみなすことのできる最低のピーク高です。ピーク振幅閾値は通常 50 ~ 200rfu で、研究施設ごとに決定する必要があります。

8. 解析パラメーターは、GeneScan® Analysis フォルダ内の Analysis Parameters フォルダに保存すること。
9. 保存した解析パラメーターファイルを、サンプルに適用する。
10. サイズ標準を割り当てる。サンプルファイルを選択して、サイズ標準の隣りの矢印を反転表示させ、次いで “define new” を選択する。セクション VIII. D の図 1 のパネル D に示すように、サイズ標準ピークを割り当てる。サイズ標準は、GeneScan® Analysis フォルダ中の Size Standards フォルダに保存する。
11. 保存したサイズ標準をサンプルに適用したのち、サンプルファイルを解析する。

注：

増幅サンプルのピーク高は、2,000rfu 未満が理想的です。

2,000rfu を上回るピーク高は、装置の飽和状態に起因するアーティファクトのピークを生成する可能性があります（すなわち、サンプルのオーバーロード）。サンプルのピーク高が装置の直線的な検出範囲から外れている場合には、実際のアレルピークに対するスタッターピークの比率が高くなり、アレルの同定が困難となります。ピーク高のバランスも、均質性が低下する可能性があります。

同一サンプルを使って検出した相対的な蛍光ユニットには、装置ごとにばらつきが見られることがあります。また、色素間のバランスに影響を与えるような相対的な色の検出効率にも、装置間にばらつきが見られます。

G. ガラスプレートの再使用

2 枚のガラスプレートを分離してゲルを廃棄します。温水と 1% Liqui-Nox® などの洗剤を用いてガラスプレートを洗淨します。脱イオン水で十分にすすいだのち、プレートを風乾します。プレートの洗淨に研磨性のある素材を使わないようにしてください。

洗剤や油はプレート上に被膜を形成することがあり、ゲルのエクストルージョン（膨潤）や濁りを帯びたバックグラウンドの原因となります。プレートを 2N HCl 中に 15 分間浸漬したのち十分にすすぐという方法をとることもできます。

VIII. データの分析

A. PowerTyper™ 16 Macro

PowerPlex® 16 System で生成したデータの解析を容易にするため、プロメガでは、ABI Genotyper® ソフトウェアで遺伝子型の自動割り当てを可能とするファイルを作成しました。サンプルを PowerPlex® 16 System で増幅し、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer または 377 DNA Sequencer で検出し、GeneScan® Analysis ソフトウェアで解析したのち、サンプルファイルを Genotyper® プログラムにインポートして PowerTyper™ 16 Macro (カタログ番号 DG2850) を使って解析します。

PowerTyper™ 16 Macro は、Genotyper® 2.0 または 2.5 ソフトウェアと組み合わせて使用します。したがって、Genotyper® 2.0 または 2.5 ソフトウェアがお客様の Macintosh® コンピューターにインストールされていなければなりません。

PowerPlex® 16 Allelic Ladder Mix を含む各レーンの “sample info” 列に、“ladder” という単語が記載されていることを確認してください。このマクロは、アレリックラダーを含むサンプルファイルを、“ladder” という単語を利用して検出しています。

下記の説明にしたがい、PowerPlex® 16 System に含まれる 16 のローカス(Penta E、D18S51、D21S11、TH01、D3S1358、FGA、TPOX、D8S1179、vWA、Amelogenin、Penta D、CSF1PO、D16S539、D7S820、D13S317、および D5S818) のアレルを同定してください。増幅サンプルのピーク高は、2,000rfu 未満が理想的です。

B. 分析

1. PowerTyper™ 16 Macro (カタログ番号 DG2850) を、ディスクからお使いのコンピューターのハードドライブ内の指定の場所に移す。
2. Genotyper® ソフトウェアを開き、次に PowerTyper™ 16 Macro を開く。Genotyper® ソフトウェアに関するご不明点は、Genotyper® User's Manual をご参照ください。
3. ファイルの下で、“import” を選択して、GeneScan® Project または解析しようとしているサンプルファイルをインポートする。青色素、黄色素、緑色素、および赤色素の色をインポートする。(Genotyper® 2.5 では、色の選択は preferences で行ないます。)
4. “Check ILS” マクロをダブルクリックする(マクロは、アクティブウィンドウの左下の隅にリストされています)。プロットウィンドウが開いてレーン内部標準(ILS 600)が赤色で表示されます。下にスクロールして、レーン内部標準のフラグメントサイズが正確であることを確認する。必要に応じ、GeneScan® ソフトウェアを用いてサンプルを再度解析し、レーン内部標準フラグメントを定義しなおす。

注：ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer では、黄色の色素(TMR 標識ローカスである FGA、TPOX、D8S1179、vWA、および Amelogenin) が 1,000rfu を上回るピーク高を含む場合、赤色の色素にブリードスルー(にじみ)(通常、150rfu 未満)が観察されることがあります。青色、緑色、および黄色の色素では、このようなブリードスルーがローカスの解釈やアレルの同定に影響を及ぼすことはありません。このようなピークが検出されるのを防ぐため、必要に応じて解析パラメーターの赤色(ILS 600)チャンネルのピーク振幅閾値を高く(150 ~ 200rfu)することもできます。

注：“sample info” は、PowerTyper™ へのインポート後にも追加・修正することができます。サンプルを反転表示させ、“views” の下の “show dye/lanes window” を選択してください。

注：このソフトウェアは、1 つのラダーサンプルを使用してアレルサイズを決定します。このマクロは、アレル位置の特定用としてインポートされた最初のラダーサンプルを使用します。

注：“POWER”マクロの実行には数分を要することがあります。

5. “POWER”マクロをダブルクリックする（マクロは、アクティブウィンドウの左下の隅にリストされています）。 “POWER”マクロは、ラダーサンプル中のアレルを識別し、すべてのローカスについてオフセット（差引き）を算出します。このプロセスは、数分を要することがあります。マクロが完了したら、プロットウィンドウが開いてアレリックラダーが表示されます（すなわち、Penta E、D18S51、D21S11、TH01、および D3S1358）。

通常、アレリックラダーは、ローカスの既知のアレルの全てといわないまでもほとんど同じ長さのフラグメントを含んでいます。アレリックラダーのサイズとリピートユニットを、本マニュアルの表2（セクション II.B）にリストします。GeneScan® Analysis ソフトウェアおよび Genotyper® ソフトウェアを使用した解析により、増幅サンプルフラグメントとアレリックラダーおよびレーン内部標準との比較から、アレル決定を行なうことができます。レーン内部標準を使用する場合、算出されたアレリックラダー成分の長さは、表に記載された値とは異なることがあります。これは、アレリックラダーフラグメントとサイズ内部標準のフラグメントとの配列の相違による泳動度の差に起因するものであり、重要ではありません。

6. “Allelic Ladders”マクロをダブルクリックする。プロットウィンドウが開き、青色（フルオレセイン）のアレリックラダー（Penta E、D18S51、D21S11、TH01、および D3S1358）、緑色（JOE）のアレリックラダー（Penta E、CSF1PO、D16S539、D7S820、D13S317、および D5S818）、および黄色（TMR）のアレリックラダー（FGA、TPOX、D8S1179、vWA、および Amelogenin）が表示されます。アレリックラダーに正しいアレル位置が割り当てられていることを確認してください（図 2）。

注：このソフトウェアは、1つのラダーサンプルを使用してアレルサイズを決定します。マクロは、アレルの同定用としてインポートされた最初のラダーサンプルを使用します。サンプル中にラダー以外のアレルが多数見つかった場合は、別のラダーを注入またはレーンをマクロにインポートして、先のラダーは消去することができます。この場合、新たなラダーサンプルを使用してマクロを再実行する必要があります。

7. “Display Fluorescein Data”マクロをダブルクリックして、すべてのサンプル注入/レーンの青色の色素を表示させる。必要に応じ、下にスクロールして確認や編集を行なう。
8. “Display TMR Data”マクロをダブルクリックして、すべてのサンプル注入/レーンの黄色の色素を表示させる。必要に応じ、下にスクロールして確認や編集を行なう。
9. “Display JOE Data”マクロをダブルクリックして、すべてのサンプル注入/レーンの緑色の色素を表示させる。必要に応じ、下にスクロールして確認や編集を行なう。

10. “PowerTable”、“Make Allele Table”、または “Make CODIS Table” マクロを選択して、適切なテーブル（表）を作成する。3 種類の表形式をマクロとして利用することができます（下記を参照）。PowerTable を選択した場合、1 サンプルファイル当たり最大 4 アレルまで扱うことが可能です。低いピークシグナルや高いピークシグナルといった追加情報も含まれます。Allele Table や CODIS Table を選択した場合は、1 ローカス当たり 2 アレルしか扱うことができません。1 ローカスに 3 アレル以上が存在する場合は、検出されたアレルのうちもっとも小さい 2 つが利用されます。Allele Table 形式では、カテゴリー（ローカス）を列に表示しますが、CODIS Table 形式ではカテゴリーを行に表示します。これらの表は、必要に応じてカスタマイズすることができます。表内のデータを保存するには、“table” ドロップダウンメニューの “export” と “table” を反転表示させます。保存したファイルは、Microsoft® Excel で表示、分析することができます。

PowerTable 形式

| Sample Info | Sample Comment | Category | Peak 1 | Peak 2 | Peak 3 | Peak 4 | Over-flow | Low Signal | Saturation | Edited Label | Edited Row |
|-------------|----------------|----------|--------|--------|--------|--------|-----------|------------|------------|--------------|------------|
| | | | | | | | | | | | |

Allele Table 形式

| Sample Info | Category Allele 1 | Category Allele 2 |
|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | | | | | | | |

CODIS Table 形式

| Sample Info | Category | Peak 1 | Peak 2 |
|-------------|----------|--------|--------|
| | | | |

11. “file” メニューの下から “save as” を選択して、解析データを保存する。

注意： PowerTyper™ Macro は Genotyper® ファイルの 1 つのファイルなので、“save as” の代わりに “save” を選択すると上書きされてしまいます。

PowerTyper™ Macro は Genotyper® の 1 つのファイルなので、“save as” の代わりに “save” を選択すると上書きされてしまいます。

C. コントロール

1. 陰性コントロールの結果を確認する。陰性コントロールには、増幅産物は存在しないはずで。
2. 9947A DNA を使用した陽性コントロール結果を確認する。増幅サンプルのピーク高は、2,000rfu 未満が理想的です。コントロール DNA アレルの反復サイズを、ローカス特異的なアレリックラダーと比較する。9947A DNA を使用した場合に予想される各ローカスのアレル位置を表 3 に示します（セクション II. B）。

D. 結果

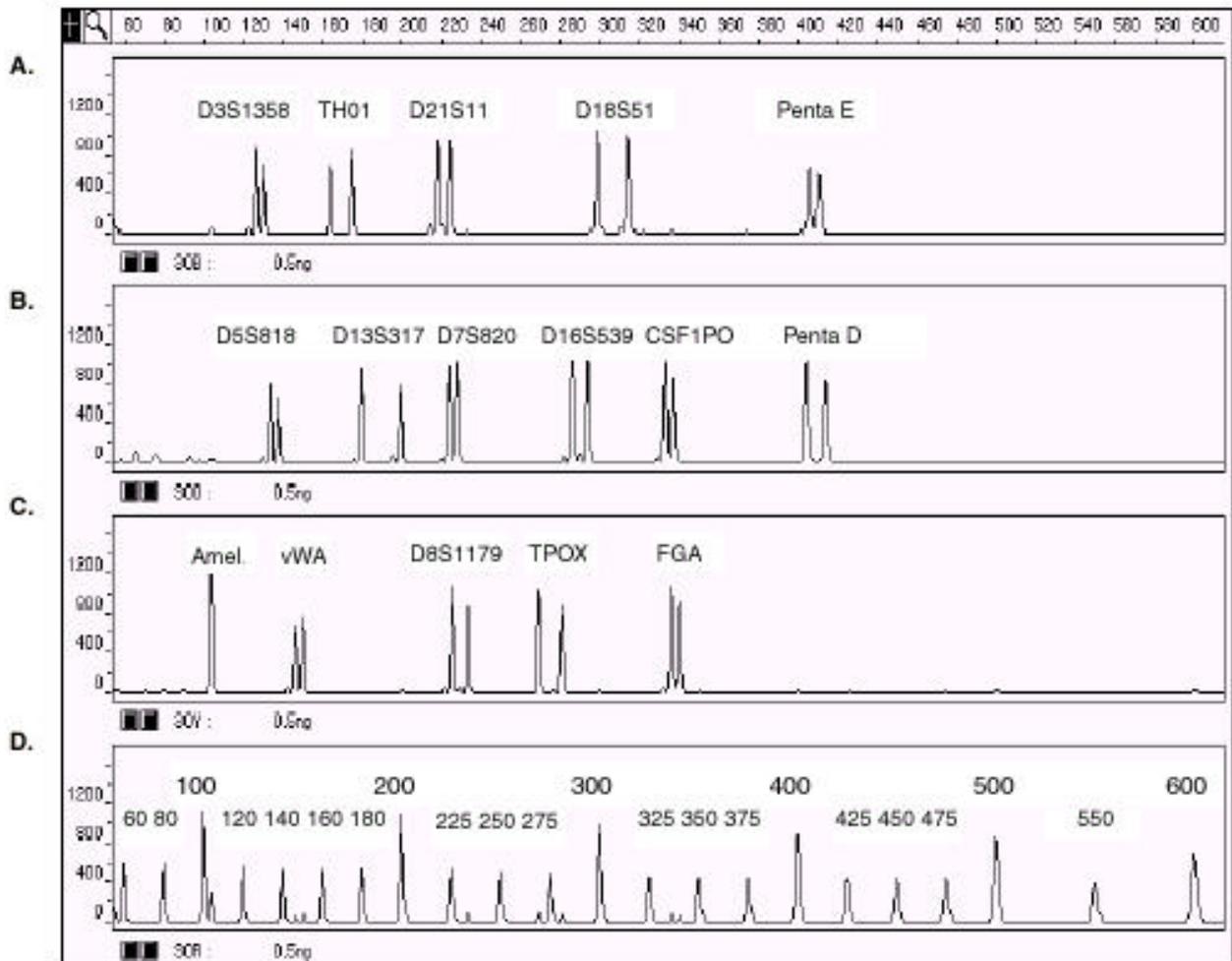


図 1. PowerPlex® 16 System

1 種類の DNA テンプレート (0.5ng) を、PowerPlex® 16 10 × Primer Pair Mix を使用して増幅した。増幅産物を Internal Lane Standard 600 と混和し、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer を使って注入時間 3 秒で泳動した。結果を GeneScan® 解析ソフトウェアで解析した。

パネル A: フルオレセイン標識ローカスである D3S1358、TH01、D21S11、D18S51、および Penta E のピークを示す電気泳動図。

パネル B: JOE 標識ローカスである D5S818、D13S317、D7S820、D16S539、CSF1PO、および Penta D のピークを示す電気泳動図。

パネル C: TMR 標識ローカスである Amelogenin、vWA、D8S1179、TPOX および FGA のピークを示す電気泳動図。

パネル D: Internal Lane Standard 600 のフラグメントを示す電気泳動図。

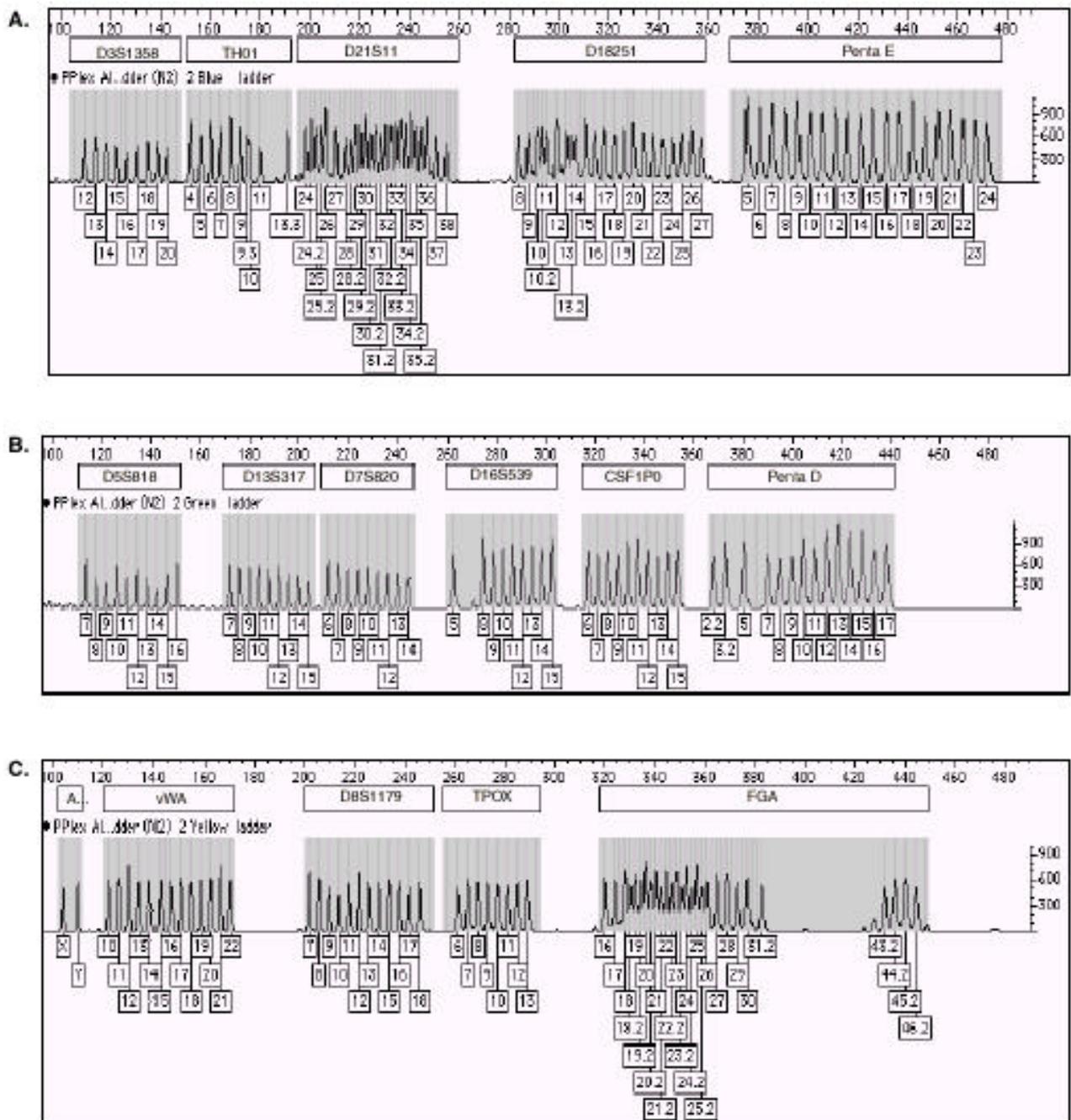


図 2. PowerPlex® 16 Allelic Ladder Mix

PowerPlex® 16 Allelic Ladder Mix を、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer を使用して注入時間 3 秒で泳動した。GeneScan® サンプル ファイルを、Genotyper® 2.0 ソフトウェアと PowerTyper™ 16 Macro で解析した。

パネル A: フルオレセイン標識アレルラダー成分と、そのアレル位置。

パネル B: JOE 標識アレルラダー成分と、そのアレル位置。

パネル C: TMR 標識アレルラダー成分と、そのアレル位置。

ここに記載のない疑問点については、プロメガテクニカルサービスまでお問い合わせください。
E-Mail: prometec@jp.promega.com

IX. 困ったときには・・・

A. 増幅

| トラブルの症状 | 可能性のある原因 | コメント |
|------------------------------------|---|--|
| アレルピークが微弱、またはまったく認められない | テンプレート DNA が不純物を含有する | 使用するテンプレートはごく微量なので、このような不純物が問題となることは非常にまれです。用いる DNA 抽出法によっては、DNA サンプル中に阻害物質が混入することがあります。 |
| | テンプレート DNA 量が不十分 | 推奨量のテンプレート DNA を使用してください。 |
| | 酵素活性が不十分 | 推奨量の AmpliTaq Gold® DNA ポリメラーゼを使用してください。チューブのラベルに記載されている使用期限をご確認ください。 |
| | 増幅プログラムが不適切 | 増幅プログラムを確認してください。 |
| | 塩濃度が高い、または pH が変化している | DNA 量は、反応液の総体積の 20% 以下とする必要があります。DNA サンプルからの K ⁺ 、Na ⁺ 、Mg ²⁺ 、または EDTA のキャリーオーバーは、PCR に悪影響を及ぼす可能性があります。pH の変化も PCR に影響することがあります。 |
| | サーマルサイクラーまたはチューブの問題 | セクション V.B のサーマルサイクリングプロトコルを再度ご確認ください。プロトコルに記載されていない反応チューブやサーマルサイクラーについては、プロメガでは試験を行っておりません。サーマルサイクラーのヒーティングブロックのキャリブレーションが必要となる場合があります。 |
| | プライマー濃度が低すぎる | 推奨するプライマー濃度を使用してください。使用前によく混和してください。 |
| | ゲルへのローディング前にサンプルが変性されていない | ゲルまたはキャピラリーにロードする直前にサンプルが熱変性されていることを確認してください。 |
| | キャピラリー電気泳動の注入が不良 (ILS 600 のピークにも影響が及んでいる) | サンプルを再注入してください。シリンジの O リングに液漏れがないか確認してください。レーザーの出力を確認してください。 |
| | 品質の低いホルムアミドを使用した | サンプルを ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer で泳動する場合は、かならず高品質のホルムアミドを使用してください。脱イオン化ホルムアミドの伝導率は 100µS/cm 未満でなければなりません。 |
| 1 つまたはすべてのカラーチャンネルにおいて余計なピークが検出される | 他のテンプレート DNA や過去に増幅した DNA がコンタミしている。 | クロスコンタミネーションが問題となる場合があります。エアロゾルバリアーピペットチップを使用し、手袋は頻繁に交換してください。 |

IX. 困ったときには・・・(続き)

A. 増幅(続き)

| トラブルの症状 | 可能性のある原因 | コメント |
|--|------------------------------------|---|
| 1 つまたはすべてのカラーチャンネルにおいて余計なピークが検出される(続き) | STR 増幅のアーティファクト | STR システムの PCR 増幅は、ときにアーティファクトを生成することがあります。このようなアーティファクトは、アレルの 1 塩基または 4 塩基下に微弱なピークとして現われます。サンプルがオーバーロードされている場合(>2000rfu)は、スタッターバンドのピーク高が上昇します。 |
| | サンプルの変性が完全でない | サンプルは、ゲルまたはキャピラリーへのローディング直前に、推奨時間どおりに熱変性処理を行なってください。 |
| | バックグラウンド | ロードする増幅産物量を減らすか、注入時間を短縮してください。マトリックスの最適化について、Matrix-FL-JOE-TMR-CXR Technical Bulletin #TBD015 もご覧ください。 |
| | キャピラリー電気泳動(CE)に関するアーティファクト(“スパイク”) | 電圧がわずかに変化したり、尿素の結晶がレーザーを通過すると、“スパイク”や予期せぬピークが現われることがあります。スパイクは 1 つの色素で現われることもありますが、多くの場合は 2 つ以上の色素で現われるので、容易に検出することができます。サンプルを再注入して確認してください。 |
| | CE に関するアーティファクト(コンタミ) | ABI PRISM [®] 310 Genetic Analyzer や 10× Genetic Analyzer バッファの希釈に使用する水がコンタミしていると、青色および緑色の色素にピークが出現することがあります。オートクレーブした滅菌水を使用し、バイアルを交換して、バッファリーザーバーを洗浄してください。 |
| | DNA 量が多すぎる | DNA テンプレートの推奨量は 1~2ng です。2ng を上回る量の DNA テンプレートを増幅すると、多数のスタッターバンドが現われることがあります。DNA テンプレート量を減らすか、増幅プログラムのサイクル数を 2~4 サイクル減らしてください(10/20 または 10/18 サイクルパターン)。 |
| | プルアップ(嵩上げ)またはブリードスルー(にじみ) | ピーク高が 2,000rfu を上回る場合や、サンプルに不正確または不適切なマトリックスを適用した場合にはプルアップが生じます。解析パラメーターのピーク振幅閾値を高く変更し(150~200rfu)、GeneScan [®] ソフトウェアで再度解析してください。新しいマトリックスを作成し、サンプルに適用してください。 |

IX. 困ったときには・・・（続き）

A. 増幅（続き）

| トラブルの症状 | 可能性がある原因 | コメント |
|--------------------------|---|--|
| アレリックラダーが、サンプルと同様に泳動されない | アレリックラダーと Primer Pair Mix が不適合 | アレリックラダーが Primer Pair Mix と同じキットに添付されていたものであることを確認してください。 |
| | 品質の低いホルムアミドを使用した | サンプルを ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer で分析する場合は、かならず高品質のホルムアミドを使用してください。脱イオン化ホルムアミドの伝導率は 100µS/cm 未満でなければなりません。 |
| | バッファーが不適合 | サンプルが、不適切なバッファーで希釈されている可能性があります。サンプルの希釈には、1× Gold ST R Buffer を使用してください。 |
| | 多数のサンプルを泳動すると、キャピラリー電気泳動（CE）中にサンプルの移動がわずかに変動することがあります。このような変動は、時間経過に伴う温度の変化または CE カラムの変化に起因すると考えられます。 | 別途注入したアレリックラダーを使用して、PowerTyper™ 16 Macro でサイズを決定してください。 |
| ピーク高が不均衡 | DNA 量が多すぎる | DNA テンプレートの推奨量は 1~2ng です。2ng を上回る DNA テンプレート量を増幅すると、収量の不均衡が起こり、小さなローカスの増幅産物の収量の方が、大きなローカスの収量より多くなります。ローカス間のバランスを改善するには、DNA テンプレート量を減らすか、増幅プログラムのサイクル数を 2~4 サイクル減らしてください（10/20 または 10/18 サイクル）。 |
| | FTA® ペーパーの使用 | 過剰量の DNA テンプレートを使用した場合と同様の問題を生じることがあります。ローカス間のバランスを改善するには、増幅プログラムのサイクル数を 2~4 サイクル減らしてください（10/20 または 10/18 サイクル）。 |
| | DNA サンプルが分解している | DNA テンプレートが小さいフラグメントに分解され、大きなローカスで収量の低下が見られる。 |
| | テンプレート DNA 量が不十分 | 推奨量のテンプレート DNA を使用してください。 |
| | 品質の低いホルムアミドを使用した | サンプルを ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer で分析する場合は、かならず高品質のホルムアミドを使用してください。脱イオン化ホルムアミドの伝導率は 100µS/cm 未満でなければなりません。 |

注：増幅しすぎたサンプルを希釈すると大きなローカスでシグナルの減少が見られます。

IX. 困ったときには・・・(続き)

A. 増幅(続き)

| トラブルの症状 | 可能性のある原因 | コメント |
|----------------|-------------|--|
| ピークの高さの不均衡(続き) | 何らかのバランスの問題 | 使用前に 10× Primer Pair Mix および Gold ST R 10× Buffer を完全に融かし、ボルテックスする。サーマルサイクラーとピペットのキャリブレーションを定期的に行う。例えば、アニーリングの温度を 60 から 59 に変えたことでバランスの改良が見られたことがあります。 |

B. PowerTyper™16Macro

| トラブルの症状 | 可能性のある原因 | コメント |
|---|--|--|
| ファイルコンピューター上で開くことができない | Genotyper® ソフトウェアがインストールされていない | Genotyper® 2.0 または 2.5 ソフトウェアがインストールされていることを確認してください。 |
| | Genotyper® ソフトウェアのバージョンが不適切 | PowerTyper™ 16 Macro は、Genotyper® バージョン 2.0 以降のバージョンでないと作動しません。 |
| | ディスクが破損している | 搬送中にディスクが破損した可能性があります。プロメガテクニカルサービス(電話番号 03-3669-7980)までご連絡ください。 |
| エラーメッセージ: “Could not complete the ‘Run Macro’ command because no dye/lanes are selected” | アレリックラダーサンプルファイルが検出されない | PowerPlex® 16 Allelic Ladder Mix を含む各レーンの “sample info” 列に、“ladder” という単語が記載されていることを確認してください。このマクロは、アレリックラダーを含むサンプルファイルを、“ladder” という単語を利用して検出しています。 |
| | 4 つの色素がいずれもインポートされない | Genotyper® ソフトウェア、バージョン 2.0 では、サンプルファイルをインポートする際に 4 つの色素をチェックする必要があります。Genotyper® 2.5 では “edit” の下で preferences を設定し、青色素、緑色素、黄色素、および赤色素をインポートします。 |
| エラーメッセージ: “Could not complete the ‘Run Macro’ command because the labeled peak could not be found” | アレリックラダーサンプルファイルにおいて、1 つ以上のアレルのピーク高が 150rfu 未満 | アレリックラダーのカテゴリーは、最小ピーク高が 150rfu と定義されています。ラダーのアレルが 150rfu 未満の場合、ソフトウェアはアレルのピーク位置を判定することができません。ピーク高が確実に 150rfu 以上となるように、サンプル量を増やすか注入時間を延長し、再度アレリックラダーの泳動を行なってください。 |
| | マクロが、アレリックラダーサンプルの CE スパイクを、アレルと認識する | 別途注入したアレリックラダーを使用してください。 |

ここに記載のない疑問点については、プロメガテクニカルサービスまでお問い合わせください。
E-Mail: prometec@jp.promega.com

IX. 困ったときには・・・(続き)

B. PowerTyper™ 16 Macro(続き)

| トラブルの症状 | 可能性のある原因 | コメント |
|---|---|--|
| エラーメッセージ: “Could not complete the ‘Run Macro’ command because the labeled peak could not be found” (続き) | アレリックラダーのアレルの塩基数が、定義した範囲内に入っていない | 内部レーン標準が正しいことを確認してください。内部レーン標準を定義し直し、GeneScan® ソフトウェアを用いてサンプルを再度分析してください。 |
| | | アレリックラダー中の最小アレルのサイズを同じアレルについて記載されている塩基数と比較してください。必要に応じ、カテゴリーの開始範囲を(カテゴリーウィンドウ内で) ±6bp 以上に上げ、マクロを別名で保存してください。 |
| | GeneScan® の解析パラメーターで強度の平滑化を選択すると、ときに TH01 アレル 9.3 と 10 を分離できないことがある | GeneScan® の解析パラメーターで、軽度の平滑化を選択してください。 |
| | アレリックラダーのピークが高すぎるため、スタッターピークがアレルピークと判断される | 注入時間を短縮するか、アレリックラダーの使用量を減らしてください。もしくは、GeneScan® 解析パラメーターのピーク振幅閾値を高く変更してアレリックラダーサンプルを再解析してください。 |
| プロットウィンドウまたはアレルテーブルで全データを表示することができない | マクロが適切な順番で実行されていない | 最初に “POWER” マクロを実行したのち、その他のマクロを実行してください。 |
| ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer を使用した場合に、サンプルにラダー以外のピークが多数認められる | 多数のサンプルを泳動すると、CE 中にサンプルの移動がわずかにずれることがあります。このような変動は、時間経過に伴う温度の変化または CE カラムの変化に起因すると考えられます。 | 別途注入したアレリックラダーを使用して、PowerTyper™ 16 Macro でサイズを決定してください。ラダーサンプルに関しては、新しいカラムでの最初の注入は使用しないでください。 |
| | レーン内部標準に割り当てられたフラグメントが不正確であったため、アレルの塩基対サイズが不正確となった | レーン内部標準のフラグメントが正しく割り当てられていることを確認してください。GeneScan® ソフトウェアを使ってサンプルを再解析し、レーン内部標準フラグメントを定義しなおしてください。 |

X. 参考文献

1. Edwards, A. *et al.* (1991) DNA typing with trimeric and tetrameric tandem repeats: polymorphic loci, detection systems, and population genetics. In: *The Second International Symposium on Human Identification 1991*, Promega Corporation, 31.
2. Edwards, A. *et al.* (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* **49**, 746.
3. Edwards, A. *et al.* (1992) Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* **12**, 241.
4. Warne, D. *et al.* (1991) Tetranucleotide repeat polymorphism at the human b - actin related pseudogene 2 (actbp2) detected using the polymerase chain reaction. *Nucl. Acids Res.* **19**, 6980.
5. Ausubel, F.M. *et al.* (1993) Unit 15: The polymerase chain reaction. In: *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Greene Publishing Associates Inc., and John Wiley and Sons, NY.
6. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Chapter 14: In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
7. *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification* (1989) Erlich, H.A., ed., Stockton Press, New York, NY.
8. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (1990) Innis, M.A. *et al.*, eds., Academic Press, San Diego, CA.
9. Budowle, B. *et al.* (1991) Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am. J. Hum. Genet.* **48**, 137.
10. Nakamura, Y. *et al.* (1987) Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* **235**, 1616.
11. Budowle, B. and Monson, K.L. (1989) In: *Proceedings of an International Symposium on the Forensic Aspects of DNA Analysis*, Government Printing Office, Washington, DC.
12. Levinson, G. and Gutman, G.A. (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 203.
13. Schlotterer, C. and Tautz, D. (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucl. Acids Res.* **20**, 211.
14. Smith, J.R. *et al.* (1995) Approach to genotyping errors caused by nontemplated nucleotide addition by Taq DNA polymerase. *PCR Methods and Applications* **5**, 312.
15. Magnuson, V.L. *et al.* (1996) Substrate nucleotide-determined non-templated addition of adenine by Taq DNA polymerase: Implications for PCR-based genotyping. *BioTechniques* **21**, 700.
16. Walsh, P.S., Fildes, N.J. and Reynolds, R. (1996) Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucl. Acids Res.* **24**, 2807.
17. Moller, A., Meyer, E. and Brinkmann, B. (1994) Different types of structural variation in STRs: HumFES/FPS, HumVWA and HumD21S11. *Int. J. Leg. Med.* **106**, 319.

18. Brinkmann, B., Moller A. and Wiegand, P. (1995) Structure of new mutations in 2 STR systems. *Int. J. Leg. Med.* **107**, 201.
19. Griffiths, R. *et al.* (1998) New reference allelic ladders to improve allelic designation in a multiplex STR system. *Int. J. Legal Med.* **111**, 267.
20. Bar W. *et al.* (1997) DNA recommendations: further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Int. J. Legal Med.* **110**, 175.
21. Gill, P. *et al.* (1997) Considerations from the European DNA Profiling Group (EDNAP) concerning STR nomenclature. *Forensic Science International* **87**, 185.
22. Levedakou, E. *et al.* (2001) Allele frequencies for fourteen STR loci of the PowerPlex™ 1.1 and 2.1 Multiplex Systems and Penta D locus in Caucasians, African-Americans, Hispanics and other populations of the United States of America and Brazil. *Journal of Forensic Sciences*, in press.
23. Lins, A.M. *et al.* (1998) Development and population study of an eight-locus short tandem repeat (STR) multiplex system. *J. Forensic Sci.* **43**, 1168.
24. Puers, C. *et al.* (1993) Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic STR locus HUMTH01[AATG]_n and reassignment of alleles in population analysis using a locus-specific allelic ladder. *Amer. J. Human Genet.* **53**, 953.
25. Hammond, H. *et al.* (1994) Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. *Am. J. Hum. Genet.* **55**, 175.
26. Bever, R.A. and Creacy, S. (1995) Validation and utilization of commercially available STR multiplexes for parentage analysis. In: *Proceedings from the Fifth International Symposium on Human Identification 1994*. Promega Corporation, 61.
27. Sprecher, C.J. *et al.* (1996) A general approach to analysis of polymorphic short tandem repeat loci. *BioTechniques* **20**, 266.
28. Lins, A.M. *et al.* (1996) Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci-silver stain and fluorescent detection. *BioTechniques* **20**, 882.
29. Jones, D.A. (1972) Blood samples: probability of discrimination. *J. Forensic Sci. Soc.* **12**, 355.
30. Brenner, C. and Morris, J.W. (1990) In: *Proceedings from the International Symposium on Human Identification 1989*, Promega Corporation, 21.
31. Presley, L.A. *et al.* (1992) The implementation of the polymerase chain reaction (PCR) HLA DQ alpha typing by the FBI Laboratory. In: *The Third International Symposium on Human Identification 1992*, Promega Corporation, 245.
32. Hartmann, J.M. *et al.* (1991) Guidelines for a quality assurance program for DNA analysis. *Crime Laboratory Digest* **18**, 44.
33. Kephart, D. (1999) Rapid isolation of genomic DNA from small quantities of human tissue. *Profiles in DNA* **2**(3), 7.

弊社ホームページのサイト www.promega.com/geneticidentity で STR 参照文献に関する追加情報をご覧いただけます。

XI. 付録

A. バッファーと溶液の組成

10% 過硫酸アンモニウム

過硫酸アンモニウム 0.05g を脱イオン水 500 μ l に添加する。アクリルアミドゲル溶液 50ml 当たりに 250 μ l の 10% 過硫酸アンモニウムを使用する。

Blue Dextran ローディング溶液

88.25% ホルムアミド
15mg/ml blue dextran
4.1mM EDTA (pH 8.0)

脱イオン化ホルムアミド

Amresco の Ultra Pure Grade を使用してください (カタログ番号 0606)。導電率計を使用して導電率を調べてください。脱イオン化ホルムアミドの導電率は 100 μ S/cm 未満である必要があります。脱イオン化ホルムアミドは、分注して凍結しておくことができます。凍結融解の繰り返しは避けてください。

エチジウムブロマイド溶液 (10mg/ml)

1.0g エチジウムブロマイド

エチジウムブロマイドを 100ml の脱イオン水に溶解する。アルミホイルで覆うか、溶液を褐色ピンに移し、室温で保存してください。注意：エチジウムブロマイドは、強力な突然変異誘発物質です。この色素を取り扱う際は手袋を着用し、計り分けの際はマスクを着用してください。

Gold ST R 10 x Buffer

500mM KCl
100mM Tris-HCl (25 で pH 8.3)
15mM MgCl₂
1% Triton[®] X-100
2mM ずつ dNTP
1.6mg/ml BSA

TAE 50x バッファー (pH 7.2)

242g Tris base
57.1ml 氷酢酸
100ml 0.5M EDTA ストック

Tris base と EDTA ストックを 500ml の脱イオン水に添加する。氷酢酸を添加する。脱イオン水で 1 リットルにメスアップする。

TBE 10x バッファー

107.8g Tris base
7.44g EDTA
(Na₂EDTA · 2H₂O)
~ 55.0g ホウ酸

Tris base と EDTA を 800ml の脱イオン水に溶解する。pH をモニターしながら、目的 pH である 8.3 に達するまでホウ酸を徐々に添加する。脱イオン水で 1 リットルにメスアップする。

TE⁻⁴ [10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA (pH 7.5)]

2.21g Tris base
0.037g EDTA
(Na₂EDTA · 2H₂O)

Tris base と EDTA を 900ml の脱イオン水に溶解する。HCl で pH を 7.5 に調節する。脱イオン水で 1 リットルにメスアップする。

B. 関連製品の紹介

Fluorescent STR Multiplex System

| 製品 | サイズ | カタログ番号 |
|--|--------|--------|
| PowerPlex® 1.2 System ^(a,b) | 100 回分 | DC6101 |
| | 400 回分 | DC6100 |

臨床検査用ではありません。

付属品

| 製品 | サイズ | カタログ番号 |
|---------------------------------------|--------------------|--------|
| Internal lane Standard 600* | 150µl | DG2611 |
| Fluorescent Ladder CXR, 60-400 Bases* | 65µl | DG6221 |
| Matrix FL-JOE-TMR-CXR** | 各 20µl | DG2860 |
| Gold ST R 10× Buffer* | 1.2ml | DM2411 |
| Mineral Oil* | 12ml | DY1151 |
| Nuclease-Free Water* | 50ml (2 × 25ml) | P1193 |

* 研究用。

** 臨床検査用ではありません。

DNA精製システム

| 製品 | サイズ | カタログ番号 |
|---|--------|--------|
| ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System | 100 回分 | A7710 |
| Wizard® Genomic DNA Purification Kit | 100 回分 | A1120 |
| | 500 回分 | A1125 |
| SV Total RNA Isolation System | 50 回分 | Z3100 |

研究用。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動試薬

| 製品 | サイズ | カタログ番号 |
|---------------------|------|--------|
| Ammonium Persulfate | 25g | V3131 |
| TBE Buffer 10× | 1L | V4251 |
| TEMED | 50ml | V3161 |
| Urea | 1kg | V3171 |

研究用。

ART® Aerosol-Resistant Tips (表 11を参照)

| 製品 | 容量 | サイズ (チップ数/キット) | カタログ番号 |
|--------------------------------|----------|-------------------|--------|
| ART® 10 Ultramicro Pipet Tip | 0.5–10µl | 960 | DY1051 |
| ART® 20E Ultramicro Pipet Tip | 0.5–20µl | 1,000 | DY1061 |
| ART® 20P Pipet Tip | 20µl | 960 | DY1071 |
| ART® GEL Gel Loading Pipet Tip | 100µl | 1,000 | DY1081 |
| ART® 100 Pipet Tip | 100µl | 960 | DY1101 |
| ART® 100E Pipet Tip | 100µl | 960 | DY1111 |
| ART® 200 Pipet Tip | 200µl | 960 | DY1121 |
| ART® 1000 Pipet Tip | 1,000µl | 768 | DY1131 |

表 11. ART® Aerosol-Resistant Tips と互換性のあるピペットの相互参照表

| | ART® 10 DY1051 | ART® 20E DY1061 | ART® 20P DY1071 | ART® GEL DY1081 | ART® 100 DY1101 | ART® 100E DY1111 | ART® 200 DY1121 | ART® 1000 DY1131 |
|--|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| Pipettors | | | | | | | | |
| Eppendorf® Digital, 0.5–10µl | | • | | | | | | |
| Eppendorf® Digital, 2–10µl, 2–20µl | | | • | | | • | | |
| Eppendorf® Digital, 10–100µl | | | | • | | | | |
| Eppendorf® Digital, 100–1,000µl | | | | | | | | • |
| Finnpipette® Digital, 5–40µl | | | • | • | • | • | | |
| Finnpipette® Digital, 40–200µl | | | | • | | | • | |
| Finnpipette® Digital, 200–1,000µl | | | | | | | | • |
| Oxford Benchmate® 0.5–10µl | • | • | | | | | | |
| Oxford Benchmate® 10–50µl | | | | | • | | | |
| Oxford Benchmate® 40–200µl | | | | • | | • | • | |
| Oxford Benchmate® 200–1,000µl | | | | | | | | • |
| Oxford Benchmate® Multichannel, 5–50µl | | | | | • | | | |
| Oxford Benchmate® Multichannel, 40–200µl | | | | | | | • | |
| Pipetman® P-2, 0–2µl | • | | | | | | | |
| Pipetman® P-10, 0.5–10µl | • | | | | | | | |
| Pipetman® P-20, 0–20µl | | | • | | | | | |
| Pipetman® P-100, 0–100µl | | | | • | | • | | |
| Pipetman® P-200, 0–200µl | | | | | | | • | |
| Pipetman® P-1000, 0–1,000µl | | | | | | | | • |
| Titertek®/Labsystems Multichannel, 5–50µl | | | | | • | | | |
| Titertek®/Labsystems Multichannel, 50–300µl | | | | | | | • | |
| Ulster V-3 Series, 2–20µl | | | • | | | | | |
| Ulster V-3 Series, 20–200µl | | | | | | | • | |
| Ulster V-3 Series, 200–1,000µl | | | | | | | | • |

a)STR loci are the subject of U.S. Pat. No. 5,766,847 and German Pat. No. DE 38 34 636 C2, issued to the Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften, eV, Germany. Exclusive rights have been licensed to Promega Corporation for uses in human clinical research and diagnostics applications and all forms of human genetic identity. The development and use of STR loci is covered by U.S. Pat. No. 5,364,759 assigned to Baylor College of Medicine, Houston, Texas. Rights have been licensed to Promega Corporation for all applications.

U.S. Pat. No. 5,599,666 has been issued to Promega Corporation for allelic ladders for the loci CSF1PO, F13A01, FESFPS, LPL and vWA. U.S. Pat. No. 5,674,686 has been issued to Promega Corporation for allelic ladders for the locus CSF1PO and the combination of allelic ladders for the loci CSF1PO, FESFPS and TH01. U.S. Pat. No. 5,783,406 has been issued to Promega Corporation for allelic ladders for the locus CSF1PO. U.S. Pat. No. 6,156,512 has been issued to Promega Corporation for allelic ladders for the loci D16S539, D7S820, D13S317 and D5S818.

Use of Promega's STR Systems requires performance of the polymerase chain reaction (PCR), which is the subject of European Pat. Nos. 201,184 and 200,362, and U.S. Pat. Nos. 4,683,195, 4,965,188 and 4,683,202 owned by Hoffmann-La Roche. Purchase of Promega's STR Systems does not include or provide a license with respect to these patents or any other PCR-related patent owned by Hoffmann-La Roche or others. Users of Promega's STR Systems may, therefore, be required to obtain a patent license, depending on the country in which the system is used. For more specific information on obtaining a PCR license, please contact Hoffmann-La Roche.

(b)U.S. Pat. No. 5,843,660 has been issued to Promega Corporation for multiplex amplification of STR loci. Other patents are pending.

© 2000, 2001 Promega Corporation. All Rights Reserved.

GenePrint, *PowerPlex* and *Wizard* are trademarks of Promega Corporation and are registered with the U.S. Patent and Trademark Office.

PowerTyper and *ReadyAmp* are trademarks of Promega Corporation.

ABI PRISM, *GeneScan*, *Genotyper* and *MicroAmp* are registered trademarks of The Perkin-Elmer Corporation. *AmpliTaq Gold* and *GeneAmp* are registered trademarks of Roche Molecular Systems, Inc. *ART* is a registered trademark of Molecular Bio-Products. *Eppendorf* is a registered trademark of Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH. *Finnpipette* is a registered trademark of LabSystems Oy. *FTA* is a registered trademark of Flinders Technologies, Pty, Ltd., and is licensed to FITZCO, Inc. *GenBank* is a registered trademark of the U.S. Dept. of Health and Human Services.

Liqui-Nox is a registered trademark of Alconox. *Long Ranger* is a registered trademark of FMC Corporation. *Macintosh* is a registered trademark of Apple Computer, Inc. *Microsoft* is a registered trademark of Microsoft Corporation. *Nalgene* is a registered trademark of Nalge Nunc International. *Oxford Benchmate* is a registered trademark of Sherwood Medical Industries. *Pipetman* is a registered trademark of Gilson Medical Electronics. *Titertek* is a registered trademark of Flow Laboratories. *Triton* is a registered trademark of Union Carbide Chemicals and Plastics Co., Inc.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.