

DyeEx[®] Handbook

プロトコールとトラブルシューティング

DyeEx 2.0 Spin Kit

DyeEx 96 Kit

この日本語版は英語版 Handbook、
May 2002 に対応します。



2301171_02/07

目次

ダイターミネーター除去用プロトコール

DyeEx 2.0 Spin プロトコール	3
DyeEx 96 プロトコール	5
ABI PRISM [®] 310、373、3100、377、MegaBACE [™] 1000 用 スタンダードプロトコール	7
ABI PRISM 3700 および Beckman CEQ 2000 用 改良プロトコール	9
トラブルシューティングガイド	12

ダイターミネーター除去用 DyeEx 2.0 Spin プロトコール

実験を始める前の重要事項

- ABI PRISM 310、3100、370、377、3700、Beckman CEO 2000 シークエンサーを用いたシークエンス解析には次のプロトコールを推薦します。
- すべての遠心操作は通常のマイクロ遠心機で $750 \times g$ で行います。個々の遠心機に最適な速度は次のように計算します。 $\text{rpm} = 1000 \times \sqrt{750/1.12 r}$ (r = ローター半径、mm)

表 2. このプロトコールに適したマイクロ遠心機と相当する速度の例

マイクロ遠心機	速度
Eppendorf Centrifuge 5415C	3000 rpm
Eppendorf Centrifuge 5417C	2700 rpm
Heraeus Biofuge 15	2800 rpm
Hettich Mikro 24-48	2630 rpm
Beckman GS15R	2100 rpm
Hettich Mikro EBA12	2700 rpm

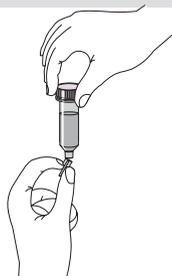


図 1. 末端に折り易いストッパーがついた DyeEx 2.0 (ねじる必要なし)

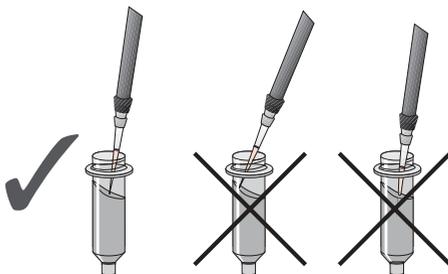


図 2. DyeEx 2.0 スピニングカラムへのサンプルアプライ

1. スピнкаラムを静かにボルテックスしてレジンを再懸濁させる。
2. カラムのふたを 1 / 4 開ける。
これはスピнкаラム内部が真空状態になることを避けるために行います。
3. スピнкаラム末端のストッパーを折って (図 1)、スピнкаラムを 2 ml カラムチューブ (添付) にセットする。
4. 計算した速度で 3 分間遠心操作を行う。
5. スピнкаラムを新しい遠心チューブに静かに移す。シ - クエンシング反応液 (10 ~ 20 μ l) をゲルベッドにゆっくりとアプライする (図 2)。
注:
 - シ - クエンシング反応液を直接、傾斜したゲルベッド表面の中央にアプライします (図 2)。反応液やピペットチップがカラムの側面に触らないようにします。サンプルがゲルに吸引されるようにゆっくりアプライし、ゲルベッドの側面に落ちないようにします。ピペットチップでゲルベッド表面を触らないようにします。
 - このプロトコールは、10 ~ 20 μ l のシ - クエンシング反応液に適しています。より簡単な操作、再現性のあるピペッティング、誤差を抑えるために、10 μ l 以下のサンプル量ではゲルベッドにアプライする前に、蒸留水で 20 μ l に調整することをお勧めします。
 - シークエンシング反応液からダイターミネーターをクリーンアップする前に、ミネラルオイルや鉱油を除去する必要はありません。
 - カラムのふたを再びする必要はありません。
6. 計算した速度で 3 分間遠心操作する。
7. マイクロ遠心チューブからスピнкаラムを取り除く。
溶出液は精製 DNA を含んでいます。
オプション：ABI PRISM 3700 で water loading protocol を用いる場合には、サンプルを乾燥させずに直接シークエンサーに溶出液をアプライできます。
8. 吸引遠心機でサンプルを乾燥し、DNA シークエンサーに添付の解説書に従って、操作する。

ダイタ - ミネ - タ - 除去用 DyeEx 96 プロトコール

実験を始める前の重要事項

- 使用する DNA シークエンサーに最適なプロトコールを選んでください。

スタンダードプロトコール (7 ページ参照)

このプロトコールは ABI PRISM 310、3100、373、377、MegaBACE 1000 シークエンサーで最高のシグナル強度と長い読み取りが得られるように至適化されています。(ABI PRISM 3700、CEQ 2000 でも使用可能ですが、読み取りの長さが同じでもシグナル強度の低下が観察されることがあります。)

改良プロトコール (9 ページ参照)

このプロトコールは ABI PRISM 3700 あるいは Beckman CEQ 2000 で最高のシグナル強度が得られるように至適化されています。

表 3. これらのプロトコールに適した遠心機、ローター、アダプターと相当する速度の例

Centrifuge	Rotor	Adapter	Speed
QIAGEN Centrifuge 4-15C or 4K-15C*	Plate Rotor 2 x 96	含む	2500 rpm
Beckman Allegra 6†	PTS-2000	含む	2300 rpm
Eppendorf 5810†	MTP Rotor A-4-62	4 MTP adapters	2400 rpm
Heraeus Megafuge 1.0†	Cat. No. 75002704	Microplate carrier (Cat. No. 75007586)	2500 rpm
Heraeus Megafuge 2.0†	Cat. No. 75008155	Microplate carrier (Cat. No. 75008083)	2400 rpm
Hettich ROTANTA 96 or 46†	Cat. No. 4444	4 MTP adapters	2300 rpm
Hettich ROTIXA 120 or 150S†	Cat. No. 4294	4 MTP adapters	2300 rpm
Sorvall T-6000†	H-1000B	Microplate Carrier	2450 rpm
Sorvall RT7†	RTH-250	Microplate Carrier	2450 rpm
Centra CL3/CLR†	Rotor 244	含む	4000 rpm
Multi/Multi RF†	Rotor 8244	含む	4000 rpm

* QIAGEN で販売しています。詳細は弊社テクニカルサポート部にお問い合わせ下さい。この遠心機は DyeEx 96 Kit に最適ですので、この使用を推奨します。

† 遠心速度は遠心機のサプライヤーから得られた情報をもとに計算しています。これらの遠心機、ローター、アダプターに関しては QIAGEN ではテストを行っていません。QIAGEN はこれらのデータの精度には責任を負いません。

- マルチチャンネル・ピペットによりシークエンシング・サンプルの取り扱いが容易になります。
- DyeEx 96 プレートを用いる際は、適切な遠心機、ローター、アダプターを使用してください。ローターとアダプターは高さ 4.5 cm のマイクロプレートの遠心操作が可能でなければなりません。適切な遠心機、ローター、アダプターの例を表 3 に載せています。QIAGEN では Centrifuge 4-15C あるいは 4K15C を販売しています。詳細は弊社にお問い合わせ下さい。
- DyeEx 96 プレートは $1000 \times g$ での遠心操作が必要です。適切な速度は次式から換算できます。 $\text{rpm} = 1000 \times \sqrt{1000/1.12 r}$ (r = ローターの半径、mm)
- 遠心操作後、遠心力の差によって DyeEx 96 プレートのゲルベッド表面はそれぞれのウェルで異なることがあります (図 3 参照)。これは正常で、DyeEx 96 操作のパフォーマンスには影響しません。
- 常に DyeEx 96 Kit に添付されている廃液収集プレートを用いてください。これらのプレートは別途購入可能です (Collection Plates, 48-well; Cat. No. 19584)。これ以外の廃液収集プレートを使用することはお薦めしません。

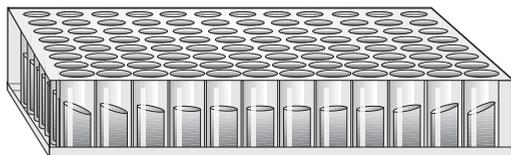


図 3. 遠心操作後の DyeEx 96 プレートの状態。外側のウェルのゲルベッド表面は遠心力の方向によって傾斜する。

スタンダードプロトコール

ABI PRISM 310、3100、373、377、MegaBACE 1000 用操作手順

1. DyeEx 96 プレートを手袋から取り出し、DyeEx 96 プレートの上部と底からテープを取り除く。

DyeEx 96 プレートを取り扱う際には、このプレートを必ず水平に保つようにします。最初に底からテープを除去する方が簡単です。

2. DyeEx 96 プレートを収集プレート（添付）の上部に置き、計算した速度で3分間遠心操作する。

収集プレートは再使用できます。フロースルーを捨てます。

注：DyeEx 96 Kit に添付されている廃液収集プレートを常に使用してください。これらのプレートは別途購入可能です。（Handbook 21 ページのオーダーインフォメーション参照）

添付されている収集プレート以外の収集プレートを DyeEx Kit と使用することはお薦めしません。

3. DyeEx 96 プレートを適切なアダプターを用いて溶出プレートに注意深く載せる。

注：溶出後のサンプル乾燥法により、最適な溶出プレートのタイプは異なります（図4参照）。

精製サンプルをサーマルサイクラ - 上で乾燥させる場合には、アダプターを用いて、サーマルサイクラ - および遠心機に適切な 96 ウェルプレート上あるいは 12 x 8 連ウェル上に、DyeEx 96 プレートをセットします（図4a参照）。適切な 96 ウェル PCR プレートは Corning/Costar (Cat. No. 6513)、適切なアダプターは PE Biosystems (MicroAmp® Base, Cat. No. N801-0531) で購入可能です。

精製サンプルを吸引遠心機上で乾燥させる場合には DyeEx 96 プレートを 96 ウェルマイクロプレート上にセットします（図4b参照）。最適な 96 ウェルマイクロプレートは QIAGEN で購入可能です（Cat. No. 19581、Handbook 21 ページのオーダーインフォメーション参照）。

注：DyeEx 96 プレートを遠心ローターの中に確実にセットするために、溶出プレートのウェル上部が DyeEx 96 プレートの底と直接接触していることを確認します（10 ページ、図5参照）。

4. 各ウェルのゲルベッドに 10 ~ 20 μ l のシークエンシングサンプルをアプライする。

注：シ - クエンシング反応液をゲルベッド表面の中央にピペットでアプライします（11 ページ、図6参照）。反応液あるいはピペットチップがウェルの側面に触らないようにします。サンプルがゲルに吸収されるようにサンプルをゆっくりアプライし、ゲルベッドの端に落ちないように注意します。ピペットチップでゲルベッド表面を触らないでください。

5. 計算した速度で3分間遠心操作する。

溶出液には精製ずみシークエンシング反応液が含まれています。

オプション：water loading protocolを用いてMegaBACE 1000あるいはABI PRISM 3700でシークエンシングを行う際には、サンプルを乾燥させずに溶出液を直接シークエンサーにアプライできます。formamide loading bufferを用いる際にはステップ6を行います。

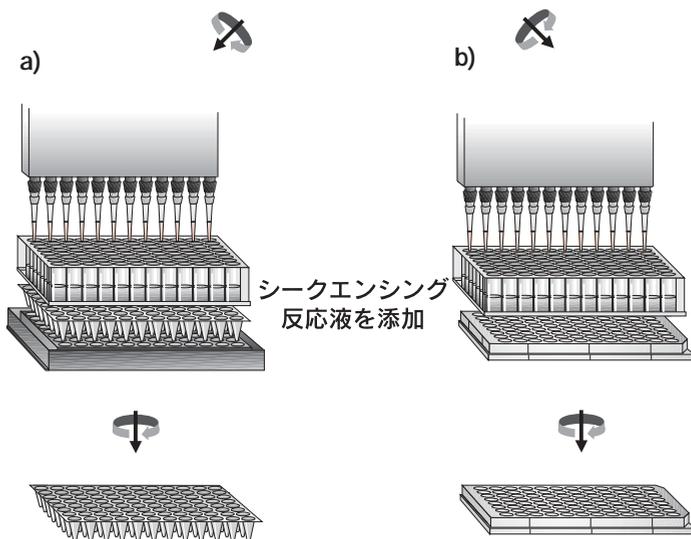
6. サンプルを乾燥させ、DNA シークエンサーに添付された説明書に従って操作する。

サンプルを真空遠心機あるいはサーマルサイクラーで70℃でふたをせずに乾燥する。

DyeEx 96 Kit操作手順



廃液収集プレート上に
DyeExプレートをセット



精製されたシークエンシング反応液

図4. サーマルサイクラー (a) あるいは吸引遠心機 (b) での乾燥に適切なプレートへの溶出の際のDyeEx 96 操作手順

改良プロトコール

ABI PRISM 3700、Beckman CEQ 2000 を用いて最高のシグナル強度を得るためのプロトコール

注：最高のシグナル強度が必要でなければ、スタンダードプロトコールを使用できます。どのプロトコールを選択するかは、5 ページの“ 実験を始める前の重要事項 ” を参照してください。

1. DyeEx 96 プレートを袋から取り出し、DyeEx 96 プレートの上部と底からテープを除く。

DyeEx 96 プレートを取り扱う際には、このプレートを水平に保つようにします。最初に底からテープを除去する方が簡単です。

2. DyeEx 96 プレートを収集プレート（添付）の上部にセットし、計算した速度で1分間遠心操作する。

収集プレートは再使用できます。フロースルーを捨てます。

注：DyeEx 96 Kit に添付されている廃液収集プレートを常に使用してください。これらのプレートは別途購入可能です（Handbook 21 ページのオーダーインフォメーション参照）。添付されている収集プレート以外の収集プレートをDyeEx Kit と使用することはお薦めしません。

3. DyeEx 96 プレートを収集プレートの上部に置き、各ウェルに 300 μ l の水を添加し、計算した速度で3分間遠心操作する。

脱イオン水の使用をお薦めします。

4. DyeEx 96 プレートを適切なアダプターを用いて溶出プレート上に注意深く載せる。

注：溶出後のサンプル乾燥法により、最適な溶出プレートのタイプは異なります（図4参照）。

精製サンプルをサーマルサイクラ - 上で乾燥させる場合には、アダプターを用いて、サーマルサイクラ - および遠心機に適切な 96 ウェルプレート上あるいは 12 x 8 連ウェル上に、DyeEx 96 プレートをセットします（図4a参照）。適切な 96 ウェルPCR プレートは Corning/Costar (Cat. No. 6513)、適切なアダプターは PE Biosystems (MicroAmp® Base, Cat. No. N801-0531) で購入可能です。

精製サンプルを吸引遠心機上で乾燥させる場合にはDyeEx 96 プレートを 96 ウェルマイクロプレート上にセットします（図4b参照）。最適な 96 ウェルマイクロプレートは QIAGEN で購入可能です（Cat. No. 19581、Handbook 21 ページのオーダーインフォメーション参照）。

注：DyeEx 96 プレートを遠心ローターの中に確実にセットするために、溶出プレートのウェル上部がDyeEx 96 プレートの底と直接接触していることを確認します（10 ページ、図5参照）。

5. 各ウェルのゲルベッドに 10 ~ 20 μl のシークエンシングサンプルをゆっくりアプライする。

注： シークエンシング反応液をゲルベッド表面の中央にピペットでアプライします（11 ページ、図 6 参照）。反応液あるいはピペットチップがウェルの側面に触れないようにします。サンプルがゲルに吸収されるようにサンプルをゆっくりアプライし、ゲルベッドの端に落ちないように注意します。ピペットチップでゲルベッド表面を触らないでください。

6. 計算した速度で 3 分間遠心操作する。

溶出液には精製済みシークエンシング反応液が含まれています。

オプション： water loading protocol を用いて ABI PRISM 3700 でシークエンシングを行う際には、サンプルを乾燥させずに溶出液を直接シークエンサーにアプライできます。ホルムアルデヒド・ロ・ディング・バッファーを用いる際にはステップ 7 を行います。

7. サンプルを乾燥させ、DNA シークエンサーに添付された説明書に従って操作する。

サンプルを吸引遠心機あるいはサーマルサイクラーで 70 °C でふたをせずに乾燥させます。

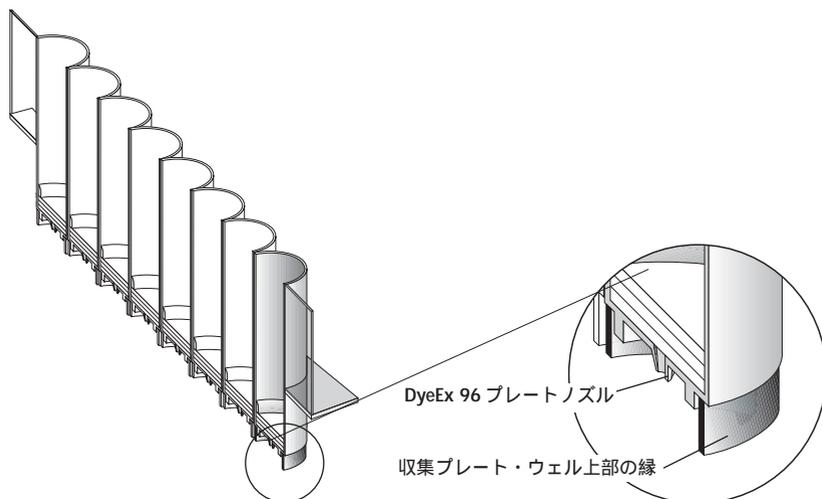


図 5. DyeEx 96 プレートを確実に遠心ローターに挿入するために、DyeEx 96 プレートをしっかりと収集プレートに固定する。適切な収集プレートを用いると、DyeEx 96 プレートの底にあるノズルは、収集プレート上部の縁にはまり込む（上図参照）。いくつかのタイプの収集プレートは DyeEx 96 との使用に適していない。

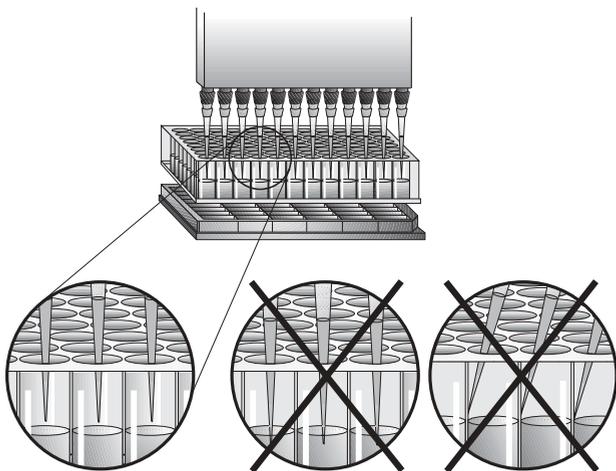


図 6. 左の拡大図にあるように、サンプルをゲルベッドのまん中にピペットでアブライする。

トラブルシューティング

コメントと提案

ダイターミネーター・プロップがシークエンシングプロファイルの始めに存在する (例 ; 未反応のダイターミネーターのシグナルが高い)。

- | | |
|--------------------|--|
| a) サンプル量が多すぎる | サンプル量が 20 μ l であることを確認する。20 μ l 以上のサンプル量ではダイターミネーターのキャリーオーバーが生じ、この結果プロップが生じる。 |
| b) サンプルのアプライが適切でない | サンプルをゲルベッド表面の中心に直接ピペットでアプライする (3 ページ図 2、11 ページ図 6 を参照)。反応液あるいはピペットチップがゲルベッドの端、DyeEx 2.0 スピнкаラムの壁、DyeEx プレートのウェルに接触しないようにする。 |
| c) サンプルのアプライが速すぎる | サンプルがゲルに吸収されるようにゆっくりアプライし、ゲルベッドの端に流れないようにする。 |

シグナル強度が低い

- | | |
|----------------|--|
| a) サンプル量が少なすぎる | <p>DyeEx 2.0 Spin Kit
アプライしたサンプルが 10 μl 以上であることを確認する。必要なら DyeEx 2.0 スピнкаラムにアプライする前に蒸留水で 20 μl に調整する。この操作により、取り扱いが容易になり、再現性が高く、エラーを最小限に抑えられる。</p> <p>DyeEx 96 Kit
アプライしたサンプルが 10 μl 以上であることを確認する。必要な場合、DyeEx プレートにアプライする前に蒸留水で 20 μl に調整する。サンプル量を 20 μl に調整することで、シグナル強度は最大 30 % まで増加する。</p> |
|----------------|--|

遠心操作後、DyeEx 96 プレートのゲルベッドの高さが違う

a) ゲルベッド表面が異なる

遠心操作後の DyeEx 96 プレート・ウェル中のゲルベッド表面の状態は、ウェルにかかる遠心力の差により異なる（図 3）。これは正常であり、DyeEx 96 操作のパフォーマンスには影響しない。

DyeEx 96 Kit に添付されている廃液収集プレートを必ず使用する。これらのプレートは別途注文も可能（Collection Plates, 48-well; Cat. No. 19584）。これ以外の収集プレートを DyeEx 96 Kit と使用しないことを推奨する。

株式会社 **キアゲン**

〒104-0054 東京都中央区勝どき 3-13-1 Forefront Tower II

Tel: 03-6890-7300

Fax: 03-5547-0818

E-mail: techservice-jp@qiagen.com

www.qiagen.co.jp

