

DS3000 Compact CE Sequencerの新機能を用いたSNaPshot[®]解析

概要

DS3000 Compact CE Sequencer(DS3000)に新機能を追加しました。新しいDS3000では、分析に用いる蛍光色素やサイズスタンダードをカスタマイズできるようになり、より多くの試薬キットをお使いいただけるようになりました。新機能の実例として、これまでのDS3000で対応していなかった蛍光色素セットを用いてSNaPshot[®] (Thermo Fisher Scientific)を実施しました。SNaPshot[®]は、一塩基伸長反応を用いてプライマーに隣接する塩基を同定する技術です。各反応産物の泳動速度を変化させることで、複数のSNPを同時に検出することが可能です。ここでは、DS3000の新機能を用いて、6か所のSNPを一度に検出しました。



DS3000
Compact CE Sequencer

実験手法

1. 装置設定

1.1. Dye Setの新規作成

新しいDS3000(Instrument Software System Version:6138300-00以降)では分析に使用する蛍光色素セット(Dye Set)を作成できます。ここではこれまでのDS3000では対応していなかったDye Set(DS-02、Applied BiosystemsTM)を使用しました。このDye Set(DS-02)はR110、R6G、TMR、ROX、LIZ[®]で構成されます。メイン画面からNew&Edit Protocols、Dye Set、Createの順に選択します(図1A-C)。New Dye Setが表示されます(図1D)。Dye Set IDに「DS-02」と入力します。ApplicationはFragmentをDye Set TemplateはCustom Dye Templateを選択してください。次にDye Conditionを設定します。Editを選択するとEdit Dye Conditionが表示されます(図1E)。はじめに、Dye ColorでSize Standardに使用する蛍光色を選択します。SNaPshot[®]ではOrangeになります。続いて分析に使用する蛍光色素を設定します。Matrix standardとテストサンプルで使用する蛍光色素をMatrix DyesとSample Dyesで選択します。最後にSpectral Calibrationの条件を設定します。Calibration Peak OrderでMatrix standardが検出される順番を指定します。SNaPshot[®]で使用するMatrix standardはDS-02(Applied BiosystemsTM)になります。Condition Number Upper LimitとQuality Value Lower Limitは変更しなくて構いません。

1.2. Size Standard Protocolの新規作成

メイン画面からNew & Edit Protocols、Size Standard Protocolsの順に選択します(図2A)。Size Standard Protocol Listが表示されたら、Createを選択します(図2B)。Size Standardに「LIZ120(50-120)」と入力します。次にDye ColorでSize standardの蛍光色を選択します。SNaPshot[®]で使用するGeneScanTM LIZ[®] 120(Applied BiosystemsTM)の場合はOrangeを選択してください。次に、Size Standard Definitionを選択し、表示されるポップアップ画面にGeneScanTM LIZ[®] 120のサイズを「,」で区切って入力します(50,62,80,110,120、図2C)。OK、Saveの順に選択して設定を保存します(図2D)。ここでは50塩基以降の数値のみ入力することをお勧めします。これは短いDNA分子は電気泳動速度が安定せず、Electrophoresis Quality(EQ)とSizing Quality(SQ)の計算に失敗することがあるためです。上記の設定により、50塩基未満のピーク波形はEQおよびSQの計算から除外されます。

1.3. Sizecalling Protocolの新規作成

メイン画面からNew&Edit Protocols、Sizecalling Protocolsの順に選択します(図3A)。Sizecalling Protocol Listが表示されたら、Createを選択します(図3B)。New Sizecalling Protocolが表示されます。以下の要領で各タブの値を入力します(図3C-G)。Protocol ID: LIZ120_sizecalling Size Standard:プルダウンメニューからLIZ120(50-120)を選択します。Analysis Range:Fullを選択します。Peak Amplitude:175 RFUと入力します。Size Quality:「Fail」に0.995、「Pass」に0.997と入力します。Electrophoresis Quality:「Fail」に40、「Pass」に100と入力します。Saveを選択し保存します。

1.4. Assayの新規作成

メイン画面からNew&Edit Protocols、Assayの順に選択します(図4A)。Assay Listが表示されたら、Createを選択します(図4B)。New Assayが表示されます。以下の要領で各項目の値を入力します(図4C)。Protocol ID: SNaPshot_Polymer4と入力します。Application: Fragmentを選択します。Polymer: Polymer4を選択します。Dye Set: DS-02を選択します。Instrument Protocol Fragment_Analysis36_Polymer4を選択します。Analysis Protocol: LIZ120_sizecallingを選択します。Saveを選択します。

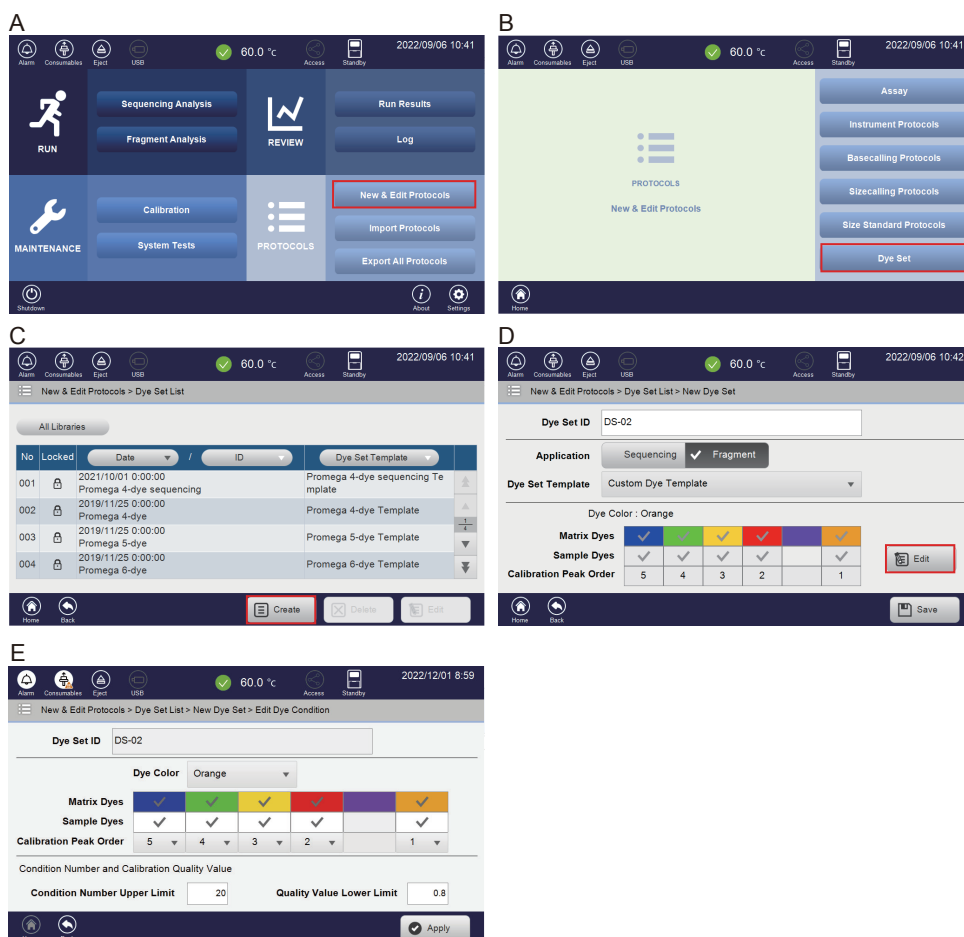


図1. Dye Setの新規作成

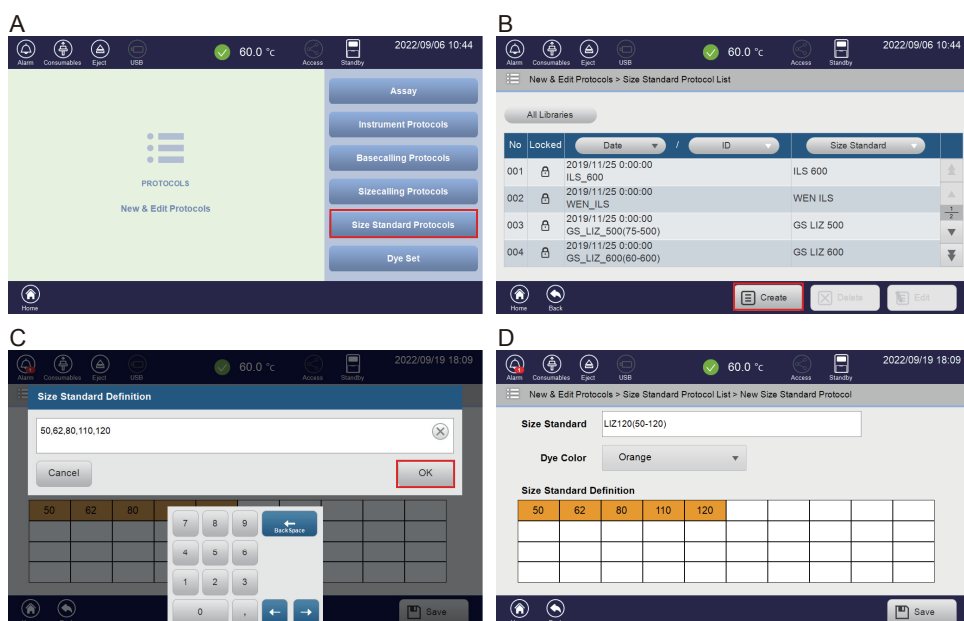


図2. Size Standard Protocolの新規作成



図3. Sizing Protocolの新規作成

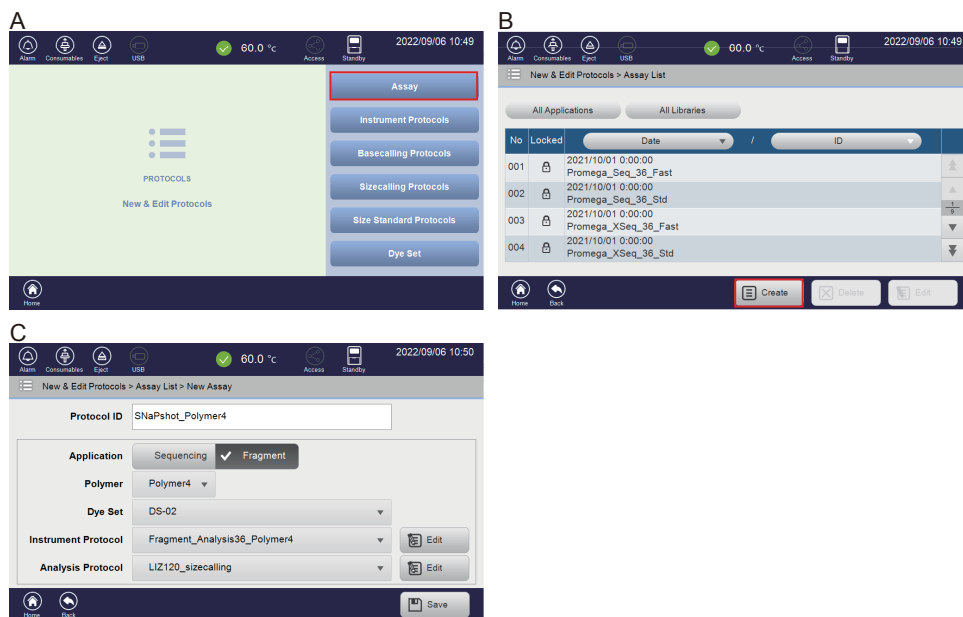


図4. Assayの新規作成

2. サンプル調製

2.1. Matrix standard

2.1.1. DS-02 Matrix Standard 1 μL をHi-Di™ formamide(Applied Biosystems™) 49 μL で希釈します。

2.1.2. 希釈した溶液を10 μL ずつ分注します。

2.1.3. 溶液を95 $^{\circ}\text{C}$ で5分間熱処理の後、氷上で急冷します。

2.2. SNaPshot® サンプル

2.2.1. SNaPshot® Multiplex Kit(Applied Biosystems™)に添付の標準DNAを用いて一塩基伸長反応を実施します(表1、2)。

2.2.2. 反応溶液にアルカリフォスファターゼ(1U)を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で1時間反応したのち、75 $^{\circ}\text{C}$ で15分処理します。

2.2.3. 溶液を95 $^{\circ}\text{C}$ で3分間熱処理の後、氷上で急冷します。

表1. 一塩基伸長反応溶液の調製

試薬	液量(μL)
SNaPshot® Multiplex Ready Reaction Mix	5
SNaPshot® Multiplex Control Primer Mix	2
SNaPshot® Multiplex Control Template	1
PCR-grade water	2

表2. 一塩基伸長反応条件

温度(℃)	時間(秒)	サイクル
96	10	×25
50	5	
60	30	
4	hold	

3. 電気泳動

3.1. Spectral Calibration

3.1.1. メイン画面からCalibration、Spectral Calibrationの順に選択します(図5A-B)。

3.1.2. Dye Set ListのCalibrated Date / Dye Setの中から、Calibrated Date / Dye SetがDS-02で、かつPolymerがPolymer4の行を選択します(図5C)。

3.1.3. 画面の指示に従ってサンプルカートリッジを取り付け、Spectral Calibrationを実施します。

3.2. サンプル泳動

3.2.1. メイン画面からFragment Analysisを選択します(図6A)。Run IDに任意の文字列を入力し、Nextを選択します。

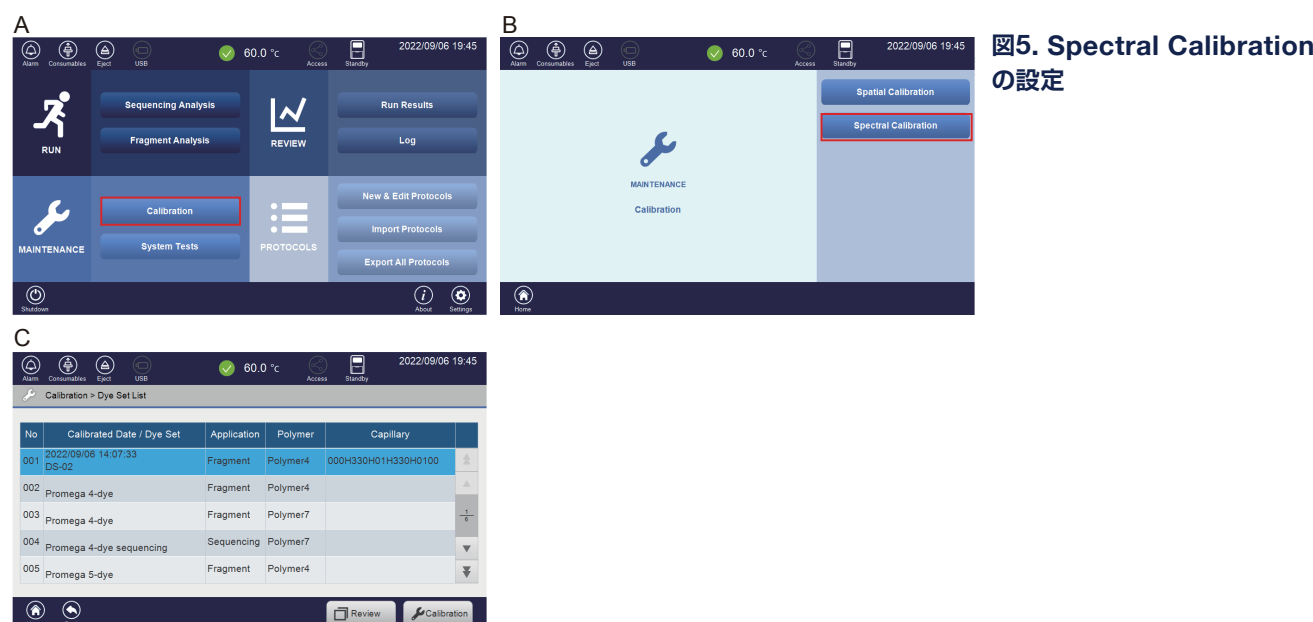
3.2.2. Setup the Stripが表示されます。Nextを選択します。

3.2.3. Setup Strip Informationが表示されます。分析したいLaneを選択します(図6B)。

3.2.4. Edit Strip Informationが表示されます。1st AssayからSNaPshot_Polymer4を選択します(図6C-D)。

3.2.5. サンプル名、サンプルタイプを登録し、Linkを選択します。

3.2.6. 画面の指示に従い電気泳動を開始します。



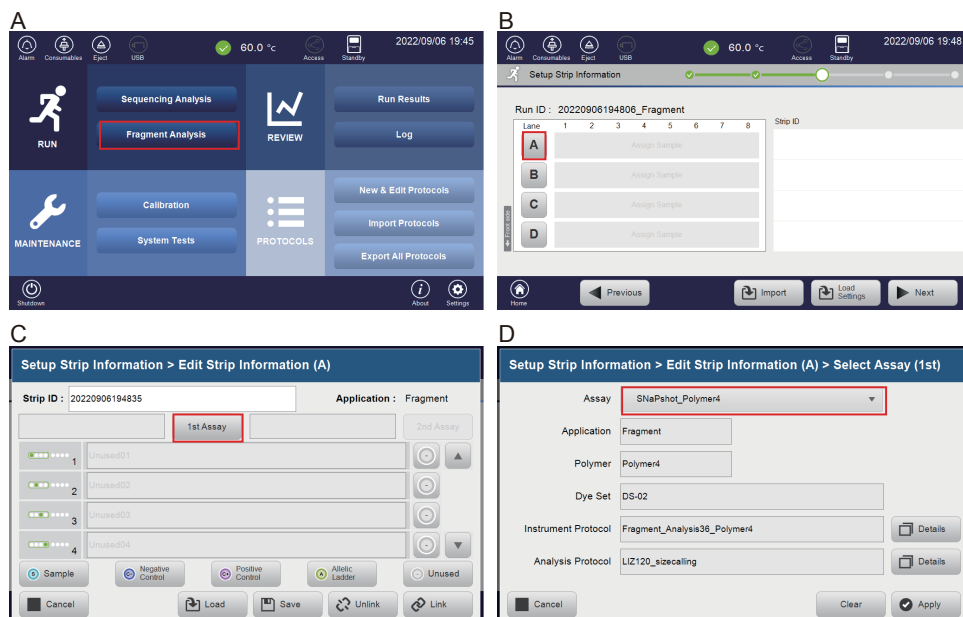


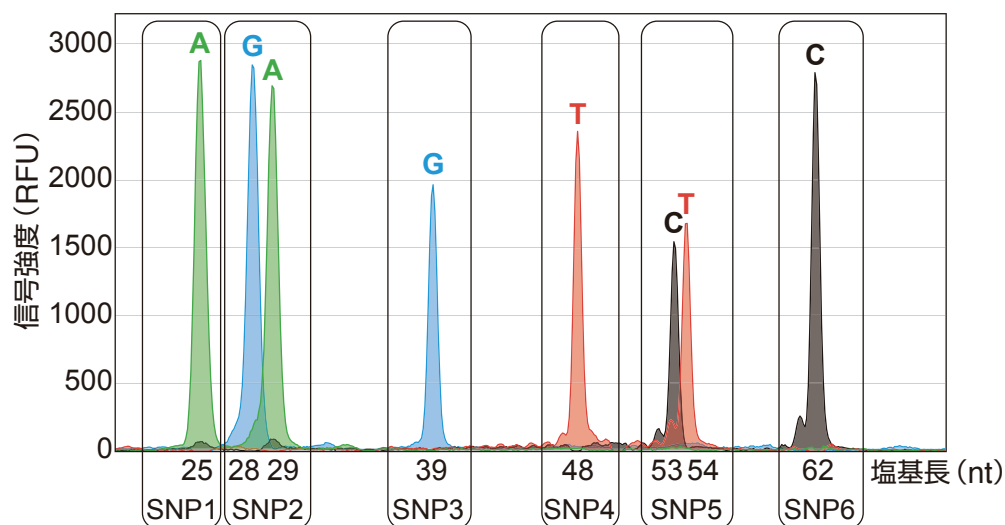
図6. サンプル泳動の設定

結果

得られた結果をGeneMarker v3.0.1(SoftGenetics)で分析し、各ピークの塩基長を算出しました。各遺伝子座で1本、もしくは2本のピーク波形が検出されました。それぞれ、ホモ接合型、ヘテロ接合型の変異を示します。ヘテロ接合型の変異は、1塩基単位で隣り合うピーク波形を形成します。二つのピーク波形を検出するには装置に高い分離性能が求められます。DS3000ではヘテロ接合を示すピーク波形が漏れなく検出されました(図7、SNP2とSNP5)。それぞれの蛍光色素に対応する塩基と反応産物の塩基長を表3にまとめました。GeneMarkerでは各ピークの検出位置をサイズスタンダードと比較することで、各ピークを構成するDNA分子の塩基長を算出します。ここで得られた塩基長を正解の塩基長と対応することで、今回解析対象とした、4つのホモ接合体と2つのヘテロ接合体のすべてを検出されたことが分かりました。

結論

DS3000に追加された新機能により、これまでよりも多くの分析試薬をお使いいただけるようになりました。ここではその実例として、SNaPshot[®]を実施しました。結果から、すべてのSNPが検出されたことが分かりました。


図7. SNaPshot® 反応産物の波形パターン

波形データは、GeneMarker v3.0.1の分析結果を元に描画しました。

表3. 反応産物の概要と結果

名称	塩基長 (base) *1		塩基		蛍光色素	色	接合型
	正解	実測	正解	実測			
SNP1	21	25	A	A	dR6G	緑	ホモ接合
SNP2	29	28, 29	A/G	A/G	dR110/dR6G	青/緑	ヘテロ接合
SNP3	37	39	G	G	dR110	青	ホモ接合
SNP4	45	48	T	T	dROX	赤	ホモ接合
SNP5	53	53, 54	C/T	C/T	dTMR/dROX	黒/赤	ヘテロ接合
SNP6	61	62	C	C	dTMR	黒	ホモ接合

*1: 蛍光色素によって電気泳動中の移動速度が異なるため、実測値は正解と一致しないことがあります。

DS3000の主な仕様

■ 本体仕様

項目	内容
キャピラリー数	4 本
キャピラリー長	36 cm
サンプルトレイ	8連チューブ×4
装置制御	タッチパネルPC
同時検出	6 色
アプリケーション	シーケンシング解析/フラグメント解析
サイズ	400 (W)×600 (D)×600 (H) mm
重量	45 kg
性能保証温度	15 – 30 °C
性能保証湿度	20 – 80% RH(結露しないこと)
電源	100 – 240 ±10% VAC, 50/60 Hz
定格電力	260 VA
対応二次解析ソフトウェア	・Mutation Surveyor (SoftGenetics社製 別売り) ・GeneMarker (SoftGenetics社製 別売り) ・GeneMarker HID (SoftGenetics社製 別売り)

■ ランモジュール仕様

ランモジュール	アプリケーション	ポリマータイプ	読取塩基長 ^{※1} (QV20 CRL)	平均ランタイム (分)
Fast_Sequence36_Polymer7	シーケンシング解析	Polymer7	≥600	≤32
Standard_Sequence36_Polymer7	シーケンシング解析	Polymer7	≥700	≤60
BDx_Fast_Sequence36_Polymer7	BDx シーケンシング解析 ^{※2}	Polymer7	≥600	≤32
BDx_Standard_Sequence36_Polymer7	BDx シーケンシング解析 ^{※2}	Polymer7	≥700	≤60
ランモジュール	アプリケーション	ポリマータイプ	平均ランタイム (分)	サイジング精度 ^{※3} (50 – 400 bp)
Fragment_Analysis36_Polymer7	フラグメント解析	Polymer7	≤35	NA
Fragment_Analysis36_Polymer4	フラグメント解析	Polymer4	≤44	<0.16

※1. 読取塩基長(QV20 CRL)はApplied Biosystems™ BigDye™ Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製・別売り)を用いて検証されています。

※2. BDxシーケンシング解析はサーモフィッシャーサイエンティフィック社のApplied Biosystems™ BigDye XTerminator™ Purification Kitを用いて精製したサンプルの解析モジュールです。

※3. サイジング精度(50 – 400 bp)はPowerPlex™ ES17 Fast Allelic Ladder MixとWEN ILS 500 ESS (Promega社製・別売り)を用いて検証されています。

■ 消耗品仕様

品名	パーツ ナンバー	内容	使用上限回数	備考
Capillary Cartridge 36 cm	613-0330	1個	300インジェクション/個	保管温度: 15 – 30 °C
Buffer	613-0252	Anode Buffer Cartridge × 2個 Cathode Buffer Cartridge × 2個	80インジェクション/個	保管温度: 2 – 10 °C
Polymer7	613-0251	Cartridge × 4個	16インジェクション/個	保管温度: 2 – 10 °C
	613-0291	Cartridge × 4個	24インジェクション/個	保管温度: 2 – 10 °C
Polymer4	613-0250	Cartridge × 4個	16インジェクション/個	保管温度: 2 – 10 °C
	613-0290	Cartridge × 4個	24インジェクション/個	保管温度: 2 – 10 °C
Septa for Cathode Buffer Cartridge	613-7231	10個	都度交換	
Retainer for Cathode Buffer Cartridge	613-7233	4個	–	
Septa for 8 well tubes	613-7230	24個	都度交換	
Base and Retainer for 8 well tubes	613-7232	4個	–	
Anode Electrode Assembly	613-7263	1個	–	

・本カタログに記載のデータは測定例を示すもので、数値の保証をするものではありません。

・本カタログの画面は、はめ込みです。

・本製品は研究用であり、薬機法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。診断目的およびその手続き上での使用はできません。

・本カタログ中の会社名、商品名は各社の商標および登録商標です。

・Applied Biosystems™、BigDye™、BigDye XTerminator™はサーモフィッシャーサイエンティフィックの商標です。

・Promega®はPromega Corporationの登録商標であり、PowerPlex™はPromega Corporationの商標です。

株式会社 日立ハイテック

本社 〒105-6409 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門ヒルズ ビジネスタワー
TEL: (03)3504-5768
E-mail: hhtgene.aj@hitachi-hightech.com

URL www.hitachi-hightech.com/jp/science/

分析機器に関する
各種お問い合わせは...

お客様サポートセンタ (03)3504-7211

受付時間 9:00 ~ 11:50 12:45 ~ 17:30 (土・日・祝日および弊社休日を除く)

株式会社 日立ハイテックサイエンス

本社 〒105-6411 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門ヒルズ ビジネスタワー
TEL: (080)1172-7021

URL www.hitachi-hightech.com/hhs/



⚠ 安全に関するご注意

●ご使用の前に「取扱説明書」をよくお読みのうえ正しくご使用ください。

お問い合わせは——

●このカタログに掲載した製品は、改善のため外観または仕様の一部を予告なく変更することがあります。
●Copyright(C) Hitachi High-Tech Corporation 2023 All rights reserved.

HTB-DS-J012P 2023.6