

DS3000 Compact CE Sequencerを用いた、短いDNAの読取精度向上

概要

サンガーシーケンスでは、読み始めの領域でピーク波形が得られなかったり、読取エラーが発生したりすることがあります。これは、キャピラリーに充填された電気泳動媒体(ポリマ)が、短いDNAを適切に検出、分離できないことがあるためです。ここでは、DS3000 Compact CE Sequencerを用いて、読み始めの領域のデータ品質を改善した例を示します¹。改善に当たって、テイルを付加したプライマを用いました。テイルはシーケンスプライマの5'末端に付加する任意の塩基配列です。テイルにより反応産物が長くなるため、電気泳動で分離できるようになります。40塩基のテイルを付加すると、シーケンスプライマの3'末端下流1塩基目のDNAからエラー無く読み取ることができました。一方、テイルの分だけ読取塩基長が短くなること が示されました。テイルを付加する際は、このレポートをご参照の上、事前に必要な解析区間をご確認ください。



DS3000
Compact CE Sequencer

結果と考察

T3プライマを用いてプラスミドDNA(pTS1、ニッポンジーン™)をシーケンスしました。テイルの長さは40塩基です。初めにテイルの効果をピーク波形で確認しました(図1、図中の塩基長はプライマの3'末端を0としてカウントしている点にご注意ください)。テイルが無いプライマではプライマの3'末端から17塩基分のピーク波形が認められません。20塩基目以降には明確なピーク波形が確認できるものの、読取エラーが発生しています(図1A赤枠部分)。対照的に、テイルを付加したプライマではプライマ3'末端から1塩基目のピーク波形が確認できます。また図の範囲で読取エラーは発生していません。次にベースコールの開始位置を比較しました(図2)。DS3000は2種類のシーケンス用アッセイを実装しています。一般的にFast sequencing(Fast-seq)は短時間でできるだけ長い読取長を得たい場合に使用し、Standard sequencing(Std-seq)はFast-seqよりも長い読取長を得たい場合に適しています。ここではそれぞれのアッセイを用いて検証しました。どちらのアッセイを用いても、テイルを付加することで、プライマに近い領域からベースコールが得られることが分かりました。特にStd-seqを用いたケースでは16回の試行すべてで1塩基目からベースコールが得られました。最後に読取終了位置を比較しました。図3における読取終了位置は、同定した塩基の信頼性が99%以上を維持する最後の塩基の位置を示します。どちらのアッセイでもテイルを付加すると読取終了位置が短くなっています(図3)。電気泳動の特性としてDNAが長くなるほど分離性能が低下し、塩基を正しく同定することが難しくなります。テイルを付加した反応産物では、テイルの分だけ塩基長が長くなり、長塩基側の分離性能が低下します。その結果として読取終了位置が短くなったと考えられます。

結論

シーケンスプライマに40塩基のテイルを付加することで、読み始めの領域の読取エラーとベースコール開始位置を改善しました。特にStd-seqを用いた検証では、全ての試行でプライマの3'末端下流の1塩基目から波形データとベースコールが得られました。一方で、テイルを付加するとその分だけ読取塩基長が小さくなりました。テイルを付加する際は、このレポートをご参照の上、事前に必要な解析区間をご確認ください。

トラブルシューティング

- ・シーケンスプライマのテイル部分が鋳型DNAとアニールするとシーケンスデータにノイズが生じて信頼性が低下します。テイルの塩基配列は、鋳型DNAとできるだけ対合しないように設計してください。特にテイルが鋳型DNAとアニールする領域のTm値が、プライマのTm値を超えないようにご注意ください。
- ・テイルがプライマやテイル自身とアニールしたり、高次構造を形成したりするとシーケンスデータの信頼性が低下します。テイル付きプライマを設計する際はテイルとプライマの塩基配列を慎重に検討してください。プライマ設計ソフトウェアの中には自己対合や高次構造を排除する機能が備わっているものがあります²。これらのご利用をご検討ください。
- ・テイルを長くしすぎると高次構造を形成しやすくなります。テイルは一般的に40塩基程度以下の長さにするをお勧めします。

実験手法

サイクルシーケンス反応はpTS1(ニッポンジーン™)を鋳型として実施しました(表1~3)。反応産物をエタノール沈殿で精製し、10 μ LのHiDi™ formamide(Thermo Fisher Scientific)に溶解しました。シーケンス解析はDS3000で実施しました(表4)。ピーク波形はsangerseqR³を元に描画しました。

表1. シーケンスプライマ

プライマ	塩基配列
T3プライマ	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
テイル付きT3プライマ	CAAAACGTCGTGAGACAGTTTGTAGGGATAACAGGGTAATATTAACCCTCACTAAAGGGA

表2. サイクルシーケンス反応条件

温度(℃)	時間(秒)	サイクル
96	60	×1
96	10	×25
54	5	
60	240	
4	hold	

表3. サイクルシーケンス反応系

試薬	液量(μ L)
鋳型DNA(100 ng/ μ L)	2
BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	4
10 μ M Primer	0.64
BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5×Sequencing Buffer	2
PCR grade water	11.36

表4. 電気泳動条件

アッセイ	電気泳動モジュール	電気泳動		サンプル注入	
		時間	電圧	時間	電圧
Fast-seq	AB_Seq_36_Fast	約30分	14 kV	4秒	1.2 kV
Std-seq	AB_Seq_36_Std	約60分	7.5 kV	4秒	1.2 kV

参考文献

- (1) Binladen, J., et al. 5'-Tailed sequencing primers improve sequencing quality of PCR products. *BioTechniques*. 42 (2), 174-176 (2007)
- (2) Untergasser, A., et al. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 40 (15), e115 (2012)
<https://www.primer3plus.com/>
- (3) Hill, J., T., et al. Poly peak parser: Method and software for identification of unknown indels using sanger sequencing of polymerase chain reaction products. *Developmental Dynamics*. 243, 1632-1636 (2014)

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™ ES117 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-J015

2023.7