

# CleanSEQ<sup>®</sup>

## - For Big Dye Terminator Removal -

### ● はじめに

CleanSEQ は、ダイターミネータサイクルシーケンス反応後の未反応のダイを除去する、DNA シーケンス反応クリーンアップ用の試薬キットです。微小で形状が均一な独自のSPRI磁性ビーズ技術を用いて反応性生物を効率的に精製するため、

- シーケンス蛍光シグナルが強い
- 強い蛍光シグナル加えてノイズが低いため、S/N比 (Signal to Noise ratio) が高い
- 再現性が高い

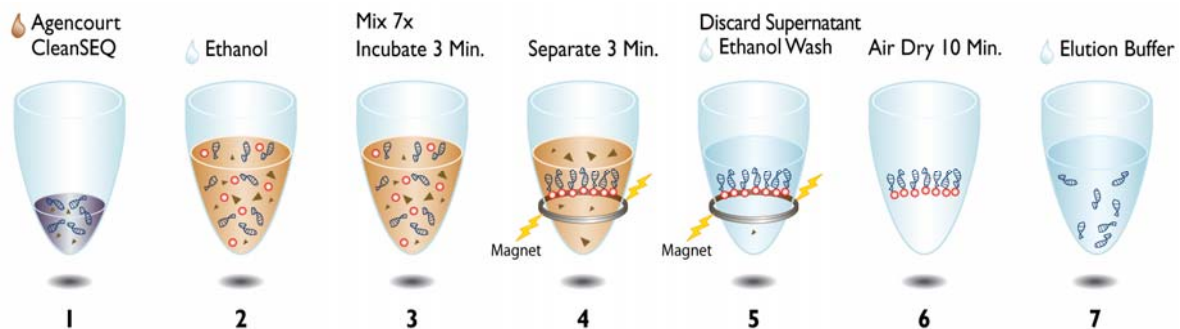
ことが特徴です。このため、

- 長いシーケンスリード
- 精度の高いDNA変異解析
- 高いシーケンス成功率

を期待できます。さらに、効率的な精製のために、サイクルシーケンス反応に使用するダイターミネータを節約できるため、結果的にDNAシーケンスコストを削減することが可能です。

CleanSEQの精製ステップはシンプルで、真空ろ過や遠心の必要も無いため、マニュアル法にも弊社ラボラトリーオートメーションシステムBiomekを用いた自動化にも対応します。

### ● 精製プロセスの概要



- 1 - 2. サイクルシーケンス反応産物に CleanSEQ とエタノールを添加し、SPRI 磁性ビーズに反応産物を結合する。続いて、磁性ビーズを専用マグネットプレートで回収する。
- 3 - 6. 磁性ビーズを洗浄し、未反応のダイ・未反応のデオキシヌクレオチド・塩などの共雑物を除去する。
7. 磁性ビーズから DNA を溶出する。

## ● キットの使用条件

CleanSEQは96ウェルフォーマットおよび384ウェルフォーマットに対応します。なお、96もしくは384ウェルプレートのウェルをすべて使用しなくても精製は可能で、サンプル数に応じた試薬量を消費します。下表の通り、ABI BigDye ターミネータを用いたサイクルシーケンスについて、容量の異なる2つのCleanSEQ 試薬キット (A29151: CleanSEQ 8 mL Kit, A29154: CleanSEQ 50 mL Kit) はそれぞれのフォーマットでの反応分に対応します。

	A29151: CleanSEQ 8 mL Kit	A29154: CleanSEQ 50 mL Kit
96ウェルフォーマット	800	5,000
384ウェルフォーマット	1,600	10,000

## ● キット内容

CleanSEQ磁性ビーズ溶液

## ● キットの保存

キットがお手元に届きましたら4℃で保存してください。  
凍結は避けてください。  
製造後、6ヶ月間使用可能です。

## ● アクセサリ

CleanSEQの使用には、下記の専用マグネットプレートが必要です。

### 96ウェルプレートフォーマットの場合

製品番号：A32782、製品名：96R Ring Super Magnet Plate

### 384ウェルプレートフォーマットの場合

製品番号：A29165、製品名：384 Magnet Plate

## ● その他必要な試薬および消耗品

### ① プレート

96ウェルプレートの場合：ABGene社AB-1000あるいはAB-1400、もしくは同等品。

384ウェルプレートの場合：ABGene社AB-1111、もしくは同等品。

### ② 85%エタノール

\*濃度により精製結果が大きく異なるため、必ず用事調整、もしくは調整後固く栓をしたうえで3日以内に使用する。

### ③ 溶出液

精製水もしくは0.1 mM EDTA (pH 8.0)をプロトコールに合わせて用意する。

## 操作法 1.

### ABI Big Dye Terminator および96ウェルフォーマットの場合

1. 磁性ビーズが均一になるまで、CleanSEQ試薬を十分に転倒混和する。  
試薬は均一に混和された状態で使用することがポイント。
2. 10  $\mu$ LのCleanSEQ試薬を各サンプルに加える。  
ダイターミネータの反応ボリュームに関わらず、10  $\mu$ LのCleanSEQ試薬を加える。
3. 下表に従い、85% エタノールを各サンプルに加える。7回のピペッティング（溶液が均一になるように）で良く混和する。  
エタノールはサンプルウェル上層に、CleanSEQ試薬はサンプルウェル下層に分離する。磁性ビーズに十分核酸を結合させるためには、エタノール添加後、十分に混和する必要がある。85%エタノールは用事調整した新鮮なものを用いる。

96ウェルフォーマット	
シーケンス反応量 (uL)	85 %エタノールの量 (uL)
5	31
10	42
15	52
20	62
25	73

{参考：85%エタノール容量= 2.077 x (10  $\mu$ L + シーケンス反応系の容量) }

4. 96ウェルプレート専用磁気プレート（製品番号A32782、96R Ring Super Magnet Plate）上に置き、3~5分（磁性ビーズが分離し、溶液が透明になるまで）静置する。  
プレートウェル内の挙動は視覚的に確認できないが、ウェル壁上で磁性ビーズがリングもしくは部分的なリングを形成する。
5. 上清を吸い上げ、取り除く。  
96ウェルプレート専用磁気プレート上に静置したまま行う。磁石で集積したビーズに触れないよう、ウェル底部からできる限り多くの上清を取り除く（上清部分には未反応のダイなどの共雑物が含まれている）。
6. 100  $\mu$ Lの85%エタノールを各ウェルに添加し、少なくとも30秒静置する。  
96ウェルプレート専用磁気プレート上に静置したまま行う。磁性ビーズをリサスペンドする必要は無い。
7. エタノールを取り除く。  
96ウェルプレート専用磁気プレート上に静置したまま行う。磁気で集積したビーズに触れないよう、ウェル底部からできる限り多くの上清を取り除く。

8. 6と7のステップをもう一度繰り返す。  
85%エタノールによる洗浄を合計2回行う。

9. 室温で10分風乾する。

96ウェルプレートは、磁気プレート上に置いたままでも、置いておかなくてもどちらでも良い。ただし、「乾き過ぎ」は蛍光の分解を促進するため注意。

10. 下表に従い、40  $\mu$ Lの溶出バッファを加え、室温で5分インキュベートする。

サイクルシーケンス反応産物は瞬時に磁性ビーズから溶出される。キャピラリーシーケンサに供する前の溶出液のデナチュレーションは行わない。

溶出バッファは0.1mM EDTA3 (pH 8.0) もしくは試薬グレードの精製水で行う(下表参照)。精製水のみで最大のシグナル強度が得られ、EDTA存在下で過度のシグナル強度が抑えられる。どちらの溶出液を使用するかは、シーケンサの感度と、シーケンス反応に使用するBigDyeの量、さらにテンプレートの種類および純度による。

	ABI3100/3130	ABI3700	ABI3730
>2 uL BigDye と PCR 反応産物	0.1mM EDTA	0.1mM EDTA	0.1mM EDTA
<2 uL BigDye と PCR 反応産物	0.1mM EDTA	Di H <sub>2</sub> O	0.1mM EDTA
>2 uL BigDye と プラスミド	0.1mM EDTA	Di H <sub>2</sub> O	0.1mM EDTA
<2 uL BigDye と プラスミド	Di H <sub>2</sub> O	Di H <sub>2</sub> O	Di H <sub>2</sub> O

ABI 3100シーケンサをご利用の場合は、

[http://www.agencourt.com/documents/products/cleanseq/Agencourt\\_CleanSEQ\\_3100\\_AppNote.pdf](http://www.agencourt.com/documents/products/cleanseq/Agencourt_CleanSEQ_3100_AppNote.pdf)

をご覧ください。

11. 96ウェルプレートを磁気プレート上に置き、3~5分(磁性ビーズが分離し、溶液が透明になるまで) 静置する。溶出液を35  $\mu$ L、別のウェルプレートに回収する。

磁性ビーズのキャリーオーバーを回避するために、5~10uLの溶出液は回収しない。

24時間以内にシーケンサに供する場合は、溶出液は4°Cで保存する。24時間以内にシーケンサに供しない場合は、-20°Cで保存し、1ヵ月以内に使用する。

## 操作法 2.

### ABI Big Dye Terminatorおよび384ウエルフォーマットの場合

1. 磁性ビーズが均一になるまで、CleanSEQ試薬を十分に転倒混和する。  
試薬は均一に混和された状態で使用することがポイント。

2. 5  $\mu$ LのCleanSEQ試薬を各サンプルに加える。  
ダイターミネータの反応ボリュームに関わらず、5  $\mu$ LのCleanSEQ試薬を加える。

3. 下表に従い、85% エタノールを各サンプルに加える。7回のピペッティング（溶液が均一になるように）で良く混和する。  
エタノールはサンプルウエル上層に、CleanSEQ試薬はサンプルウエル下層に分離する。磁性ビーズに十分核酸を結合させるためには、エタノール添加後、十分に混和する必要がある。85%エタノールは用事調整した新鮮なものを用いる。

384ウエルフォーマット	
シーケンス反応量 (uL)	85 %エタノールの量 (uL)
5	14.3
10	21.4
15	28.6

{参考 : 85%エタノール容量= 1.428 x (5  $\mu$ L + シーケンス反応系の容量) }

4. 96ウエルプレート専用磁気プレート（製品番号A29165、384 Magnet Plate）上に置き、2～3分（磁性ビーズが分離し、溶液が透明になるまで）静置する。  
ウエル壁に磁性ビーズが集積する。

5. 上清を吸い上げ、取り除く。  
384ウエルプレートを磁気プレート上に静置したまま行う。磁石で集積したビーズに触れないよう、ウエル底部からできる限り多くの上清を取り除く（上清部分には未反応のダイなどの共雑物が含まれている）。

6. 30  $\mu$ Lの85%エタノールを各ウエルに添加し、7回のピペッティングで十分リサスペンドする。その後、少なくとも30秒静置する。  
384ウエルプレートを磁気プレート上に静置したまま行う。

7. エタノールを取り除く。  
384ウエルプレートを磁気プレート上に静置したまま行う。磁気で集積したビーズに触れないよう、ウエル底部からできる限り多くの上清を取り除く。

8. 6と7のステップをもう一度繰り返す。  
85%エタノールによる洗浄を合計2回行う。

**9. 室温で10分風乾する。**

384ウェルプレートは、磁気プレート上に置いたままでも、置いておかなくてもどちらでも良い。ただし、「乾き過ぎ」は蛍光の分解を促進するため注意。

**10. 下表に従い、15～30 μLの溶出バッファを加え、室温で5分インキュベートする。**

サイクルシーケンス反応産物は瞬時に磁性ビーズから溶出される。キャピラリーシーケンサに供する前の溶出液のデナチュレーションは行わない。

溶出バッファは0.1mM EDTA3 (pH 8.0) もしくは試薬グレードの精製水で行う（下表参照）。精製水で最大のシグナル強度が得られ、EDTA存在下で過度のシグナル強度が抑えられる。どちらの溶出液を使用するかは、シーケンサの感度と、シーケンス反応に使用するBigDyeの量、さらにテンプレートの種類および純度による。

	ABI3100/3130	ABI3700	ABI3730
>2 uL BigDye と PCR 反応産物	0.1mM EDTA	0.1mM EDTA	0.1mM EDTA
<2 uL BigDye と PCR 反応産物	0.1mM EDTA	Di H <sub>2</sub> O	0.1mM EDTA
>2 uL BigDye と プラスミド	0.1mM EDTA	Di H <sub>2</sub> O	0.1mM EDTA
<2 uL BigDye と プラスミド	Di H <sub>2</sub> O	Di H <sub>2</sub> O	Di H <sub>2</sub> O

ABI 3100シーケンサをご利用の場合は、

[http://www.agencourt.com/documents/products/cleanseq/Agencourt\\_CleanSEQ\\_3100\\_AppNote.pdf](http://www.agencourt.com/documents/products/cleanseq/Agencourt_CleanSEQ_3100_AppNote.pdf)

をご覧ください。お問い合わせください。

**11. 384ウェルプレートを磁気プレート上に置き、3～5分（磁性ビーズが分離し、溶液が透明になるまで）静置する。溶出液を別のウェルプレートに回収する。**

磁性ビーズのキャリーオーバーを回避するために、2～5 uLの溶出液は回収しない。

24時間以内にシーケンサに供する場合は、溶出液は4℃で保存する。24時間以内にシーケンサに供しない場合は、-20℃で保存し、1ヵ月以内に使用する。