

## ■■■ 塩基配列解析 その1 ■■■

■ 塩基配列。かつてはアイソトープを使い、ATGCそれぞれの反応産物をゲルに流し、職人的ともいえる技で薄く長いゲルをろ紙に貼り付け、X線フィルムに焼きつけたラダーを達人の技で読んでいました。その頃に比べると、信じられないほど簡単にシークエンス反応ができるようになりました。さらに、キャピラリー電気泳動の登場によってゲル作りと終わった後のゲル板洗いからも解放されました。しかし、昔とかわらず、シークエンスがうまくいかないことが今でもあります。今回は実際にこの間あった、“簡単な工程を入れるだけでシークエンスが読めるようになった話”をします。当バンクでは複数メーカーのシークエンサーを使っていますが、今回はその中のキャピラリー方式のシークエンサーを使いました。

■ 大きさ 46kb のコスミドベクターに、ある遺伝子 2kb をクローニングした後、インサート DNA の配列を確認すべくベクター側からのプライマーを用いてシークエンスをしました。前後両方向読もうとしたのですが、後ろからのシークエンスは読めたのに、前からのシークエンスがどのクローンも全く読めませんでした。Raw data を見てみると、シークエンスの反応自体がうまくいっていない様子。ベクターとプライマーの相性が悪くて反応がいかないのではないかと、はじめて使用するプライマーだったため、伸長反応に問題はないか、シークエンスに用いたコスミドを鋳型に、成功した後側からのプライマーと失敗した前側のプライマーでインサートのサイズのバンドが増幅されるか PCR をかけてみました。すると PCR 産物はきれいなシングルバンドで量も十分に増えました。プライマーの相性は問題なく、また内部に走り辛い配列もなさそうです。

■ よく行われる手法で、GC リッチの場合 DMSO を 1% 加えるのが知られていますので、読めたらと思い試し

てみました。シグナルは出るようにはなったのですが、全体にピークが乱れていて、塩基間のシグナルの分離がうまくいかず読めませんでした。

■ 次に、“Pre-heat”を試してみました。通常シークエンス反応を行う際、最初に全ての材料を加え反応液を調製しサーマルサイクラーで反応をかけますが、プレミックス（酵素、dNTPS、反応バッファーなど）とプライマーを入れる前に、template DNA と水のみで pre-heat (96 度 3 分→on ice) させるという工程です。実はこの工程はシークエンサーメーカーの添付マニュアルに書いてあったのですが、他社のシークエンス試薬の説明書にはなく、今までシークエンスを読むのに不自由を感じていなかったため、“Pre-heat”は行わず反応させていました。しかし今回は、後ろは読めたのに前が読めない、プライマーと鋳型の相性は問題なさそう、そして DMSO の効果も思わしくない。もしこれが効いたら…と、半信半疑で試してみました。

■ Template DNA と水のみで pre-heat (96 度 3 分→on ice) その後、プレミックス（酵素、dNTPS、反応バッファーなど）とプライマーを入れサーマルサイクラーで反応させました。以前と同様に反応条件は 96 度 20 秒→63.4 度 4 分×50 サイクルで行いました。

結果は…?

成功。この工程“Template DNA と水のみで pre-heat”を挟んだだけで、読めなかった前側プライマーでコスミドのシークエンスがきれいに読めるようになりました！なぜか読めないクローンをお持ちで、“Pre-heat”を行っていない場合は是非試してみてください。クローンの全長が 10kb 以下のプラスミド DNA の場合、pre-heat は 96 度 1 分程が良いようです。“Pre-heat”の教訓です。(K. I.)

(Mail News 2005. 10. 02 掲載記事)

=====  
発行

理化学研究所・バイオリソースセンター

遺伝子材料開発室

dnabank@brc.riken.jp

<http://www.brc.riken.jp/lab/dna/ja/>  
=====