HS-91-20
HS-91-100

変異検出キット

DN-Sure Mutation Discovery Kit Plus

使用説明書

株式会社ファーマフーズ
アプロサイエンスグループ

2022 年 4 月 1 日改訂

【目的・用途】

ゲノム DNA のミスマッチを PCR ベースで検出するキットです。

Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)や Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/Cas9、Zinc-finger nuclease (ZFN)などをトランスフェクションした細胞や動物の変異確認に使用できます。本キットに含まれるヌクレアーゼは 2 本鎖 DNA の 1 本鎖領域を特異的に認識・切断します。ミスマッチ部位はヌクレアーゼによって切断され、アガロースゲルやアクリルアミドゲルで検出できます。

●操作概要

A.プライマーの設計・購入 ⇨ B.組織からのDNA抽出 ⇨ C.PCR ⇨ D.変性・再アニーリング ⇨ E.ヌクレアーゼ処理・検出

【特徴】

1）短時間：4~5 時間ですべての操作が完了します

2）簡便：ゲノム抽出からヌクレアーゼ処理まで必要な試薬が全て含まれます

3）高効率・高感度：1 塩基挿入欠失も検出可能

【キット内容】

DN-Sure Mutation Discovery Kit Plus

内容	容量（20 回分） Code No. HS-91-20	容量（100 回分） Code No. HS-91-100
Lysis buffer 1	1.5 mL	7.5 mL
Lysis buffer 2	1.5 mL	7.5 mL
Excellent Taq HS Master Mix(2×)	250 uL	1250 uL
PCR grade Water	700 uL	3.5 mL
Re-annealing buffer	50 uL	250 uL
Nuclease	20 uL	100 uL

【保存方法・使用期限】

-20℃・1 年間

※ Excellent Taq HS Master Mix(2×)は 10 回分ずつに分注し、-20℃で保存してください。
凍結融解は 10 回程度まで安定です。

【本キット以外に必要な試薬・機器】

- 任意のプライマー
- 1.5mL チューブ
- ヒートブロック
- PCR チューブまたはプレート
- サーマルサイクラー
- アガロースゲルまたはポリアクリルアミドゲル
- DNA 分子量マーカー
- ローディングバッファー
- UV トランスイルミネーター

必要に応じてご用意ください。

- PCR 産物精製試薬またはキット
- ポジティブコントロール用のゲノム DNA とプライマーセット

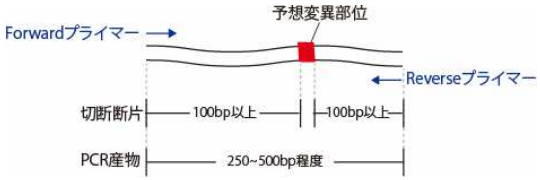
  ※適当なポジティブコントロールがない場合、ゲノム DNA とプライマーセットを別途販売しております。
  詳しくはお問い合わせください。

【プロトコール】

A. プライマー設計

プライマー設計の注意点

- T_m 値について
  プライマーの T_m 値は >60℃となるようにしてください。また、Forward プライマーと Reverse プライマーの T_m 値は大きく異ならないようにしてください。
- 長さについて
  プライマーの長さは 18-22bp となるようにしてください。
- GC 含有率について
  GC 含有率は 45-60%となるように設計してください。
- 設計する場所について
  推定される切断断片が 100bp 以上となるようにしてください。
- PCR 産物について
  PCR 産物が 250bp-500bp 程度となるようにしてください。



B. 組織サンプルからの DNA 抽出

サンプルは、組織 25mg 程度、マウス尾先端 0.2cm 程度を目安にご用意ください。組織の場合は 1-2mm 角程度にスライスしてください。

培養細胞を使用する場合は 10^3~10^4cells を直接 PCR に供します。プロトコール C に進んでください。

1）サンプルを 1.5mL チューブに加えます。

2）1)に Lysis buffer 1 を 75uL 加え、ボルテックスしスピンダウンします。

3）95℃、30min インキュベートします。

※ マウスの尾をサンプルとした場合、マウスが 6 週齢を超えているときはインキュベート時間を 2 時間にしてください。

4）インキュベート後サンプルを氷上に移し、Lysis buffer 2 を 75uL 加えます。

5）ボルテックスし、スピンダウンします。

6）上清 1-5uL を PCR のテンプレートとして使用します。

C. PCR

1）PCR 反応液の調製

PCR チューブに以下の試薬を加えます。凍結している試薬は完全に溶解後、十分混合して加えてください。

試薬	容量	終濃度
Template※	<5 uL	25-100ng
10uM　Fw プライマー	1 uL	0.4uM
10uM　Rv プライマー	1 uL	0.4uM
Excellent Taq HS Master Mix (2×)	12.5 uL	1×
PCR grade Water	up to 25 uL	
Total	25 uL	

※　培養細胞を使用する場合は 10^3~10^4cells をテンプレートとして反応系に加えてください。細胞数が多すぎると PCR 反応を阻害します。加える細胞数は 10^4cells 以下としてください。

2）　PCR 反応条件

サーマルサイクラーを設定し、以下のプログラムで PCR を行います。

	温度	時間	サイクル数
Taq の活性化	95℃	10 min	1×
熱変性	95℃	30 sec	30-40×
アニーリング	60℃※1	30 sec	
伸長反応	72℃	30 sec※2	
伸長反応	72℃	5 min	1×

※1　アニーリング温度は設計したプライマーの T_m 値を参考に決めてくだ さい。プライマーを初めて使用する場合はプライマーの T_m 値 －5℃に設定し、増幅量に応じて－5℃～＋5℃の間で検討を行います。

※2　伸長反応の時間は増幅する断片の長さによって変えてください。
Excellent Taq HS Master Mix の伸長速度は 1kb/min です。

3）電気泳動

アガロースゲルまたはポリアクリルアミドゲルを使用し、PCR 産物の電気泳動を行います。PCR 産物 1~5uL を電気泳動に供し、必ずシングルバンドであることを確認してください。また、分子量マーカーを参考に、20 ng/uL 以上の濃度があることを確認してください。

※　シングルバンドが得られなかった場合、アニーリング温度やゲノム DNA 濃度、プライマーなど PCR の条件を検討し最適化を行ってください。最適化を行ってもシングルバンドが得られなかった場合、ゲルを切り出し、精製を行ってください。

※　20ng/uL 以下の濃度である場合はカラム精製やエタノール沈殿等により濃縮を行ってください。精製時の溶出、沈殿の溶解は水で行ってください。（TE に含まれる EDTA はヌクレアーゼ処理を阻害します。）

D. 変性・再アニーリング

1）アニーリング溶液の調製

新しい PCR チューブに以下の試薬を加えます。

試薬	容量	終濃度
PCR 産物	<5 uL※1	>100ng※2
Re-annealing buffer	2 uL	
PCR grade Water	up to 18uL	
Total	18 uL	

※1　PCR 産物に含まれるバッファーの塩類等が次のヌクレアーゼ処理を阻害する場合がございますので、5uL 以下となるように反応系に加えてください。カラム精製やエタノール沈殿により PCR 産物の溶液が水に置換されている場合は 5uL 以上使用できます。

※2　カラム精製やエタノール沈殿、ゲルの切り出しによって PCR 産物を精製した場合は、DNA 量が>200ng となるように反応系に加えてください。

2）サーマルサイクラーを設定し、以下のプログラムで変性・再アニーリングを行います。

温度	時間	温度/時間
95℃	5 min	―
95-85℃	―	－2℃/sec
85-25℃	―	－0.1℃/sec
4℃	―	Hold

次の操作まで時間がかかる場合は-20℃で保存してください。

E. ヌクレアーゼ処理・検出

1）再アニーリング済みのサンプル 18uL を 9uL ずつに分け、一方に 1uL のヌクレアーゼを加え(酵素消化＋)、もう一方には 1 uL の超純水を加えて(酵素消化－)、十分混合します。

※　操作は氷上で行ってください。

2）37℃、30 分間インキュベートします。

3）穏やかに混合、スピンダウンし、直ちに氷上に移してください。

4）全量をアガロースゲル電気泳動またはポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、切断を確認します。

【トラブルシューティング】

PCR のトラブルシューティング

トラブル	原因・対策
バンドがスメアになる	ゲノム DNA 量が多すぎる。 ゲノム DNA を希釈して PCR を行ってください。
増幅量が少ない	ゲノム DNA の抽出効率が低い。 マウス尾をサンプルとする場合、6 週齢以下のマウス尾の先端を使用して下さい。先端が採取できなかった場合やマウスが 6 週齢を超えている場合は尾 0.2cm をさらに小さい断片に切断し、インキュベート時間を 2 時間にしてください。
	ゲノム DNA 量が少なすぎる。 ゲノム DNA 量を増やして PCR を行ってください。 また、RNA が大量に混入している場合は PCR 反応が阻害される可能性があります。
増幅されない	プライマー設計が不適切。 プライマー長 18-22bp、GC 含有率 45-60%、T_m 値>60℃となるように設計してください。 また、プライマーダイマーを形成しない配列にしてください。
	反応条件が不適切。 アニーリング温度を下げて PCR を行ってください。
エキストラバンドが見られる	反応条件が不適切。 アニーリング温度を上げて PCR を行ってください。サイクル数を減らしてください。 エキストラバンドが混入したまま酵素消化を行うと、バンドが消失したりスメアになり正確な消化ができません。どうしてもエキストラバンドが生じる場合はゲルを切り出し、精製を行ってください。

酵素消化のトラブルシューティング

トラブル	原因・対策
切断された断片が検出できない	切断サイトが PCR 産物の末端に近い。 切断サイトから 100bp 以上離れた位置にプライマーを設計してください。
	DNA 量が少ない。 PCR 産物は 100ng 以上、精製したサンプルは 200ng 以上を酵素消化してください。
	ゲノムに変異が入っていない。 変異が導入されていないゲノムは切断されません。
	ホモ変異体である。 ホモ変異体の場合、切断されません。ホモ変異体を検出したい場合、D.変性・アニーリングのときに wild type とサンプルの PCR 産物を 1:1 で混合して反応を行ってください。
酵素消化＋でバンドが検出できない	ヌクレアーゼ量が多すぎる。 ヌクレアーゼ量が多いと過剰な切断が起こります。
	DNA 量が少ない。 PCR 産物は 100ng 以上、精製したサンプルは 200ng 以上を酵素消化してください。
Wild Type で切断が見られる	PCR が不適切。 PCR 酵素は校正活性のある酵素を使用して下さい。 PCR によって塩基置換が起こった場合にも切断が起こります。
	DNA 量が少ない。 PCR 産物は 100ng 以上、精製したサンプルは 200ng 以上を酵素消化してください。
	ヌクレアーゼ量が多すぎる。 ヌクレアーゼ量が多いと過剰な切断が起こります。

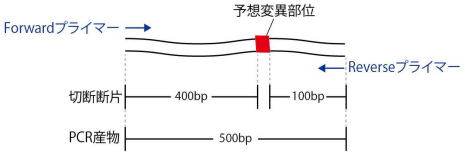
【実施例 1】

・プライマーの設計

プライマーは PCR 産物が 500bp、切断断片が 400bp と 100bp となるように設計しました。

Forward プライマー：T_m 値 60.04、鎖長 20bp、GC 含有率 55%

Reverse プライマー：T_m 値 61.20、鎖長 20bp、GC 含有率 60%



・PCR

CRISPR/Cas9 を導入したマウス 5 検体をサンプルとし、尾先端 0.2cm を切断しゲノム抽出を行いました。ゲノム抽出した溶液 5uL をテンプレートとして PCR 反応液に加え、アニーリング温度 60℃、伸長時間 40 秒で 35 サイクル PCR を行いました。PCR 反応後のサンプル 1uL に超純水 4uL、6×サンプルバッファー1uL を加え、全量をアガロースゲル電気泳動に供しました。3%アガロースゲル、TAE バッファーを用い 100V 定電圧で電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色を行いました。

その結果、得られた PCR 産物はシングルバンドで、10ng/uL 以上の濃度であることが確認できました(図 1)。

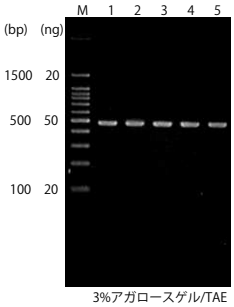
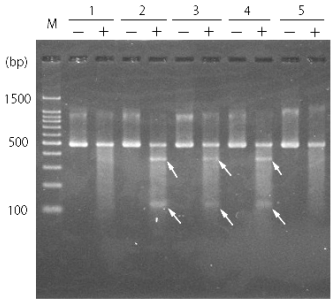


図 1． PCR 産物の電気泳動結果
M：XL-DNA Ladder100（Cat No. KE-2310）
1~5：サンプル No.

・ヌクレアーゼ処理・検出

PCR 産物 5uL に PCR grade Water 11uL、Re-annealing buffer 2uL を加え、サーマルサイクラーを用いて変性・再アニーリングを行いました。再アニーリング済みのサンプル 18uL を 9uL ずつに分け、一方に 1uL のヌクレアーゼを加え(酵素消化＋)、もう一方には 1 uL の超純水を加えて(酵素消化ー)、ピペッティングにより十分混合後、37℃、30 分間インキュベートしました。インキュベート後のサンプルに 6×サンプルバッファー2uL を加え、全量をアガロースゲル電気泳動に供しました。3%アガロースゲル、TAE バッファーを用い 100V 定電圧で電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色を行いました。その結果、サンプル 2、サンプル 3、サンプル 4 で切断が確認でき、サンプル 1、サンプル 5 では切断が確認できませんでした(図２)。

この結果、サンプル 1、5 は wild type またはホモ変異体、サンプル 2、3、4 は mutant であることが分りました。



3% アガロースゲル/TAE

図２．ヌクレアーゼ処理後の電気泳動結果
M：XL-DNA Ladder100（Cat No. KE-2310）
1~5：サンプル No.
－：酵素消化(－)
＋：酵素消化(＋)
矢印で切断された断片を示した。

【実施例 2】ホモ変異体の検出

本キットのヌクレアーゼは２本鎖 DNA のミスマッチ部位を認識し、切断します。そのため、ホモ変異体の場合は通常の方法では検出されません。ホモ変異体を検出したい場合は wild type と混合してヌクレアーゼ処理を行います。

・プライマーの設計

実施例 1 と同様です。

・PCR

wild type マウスと、CRISPR/Cas9 を導入し得られたヘテロ変異体マウスおよびホモ変異体マウスの３種類をサンプルとし、尾先端 0.2cm を切断しゲノム抽出を行いました。ゲノム抽出した溶液 5uL をテンプレートとして PCR 反応液に加え、PCR を行いました。反応条件、電気泳動は実施例 1 と同様です。電気泳動の結果、得られた PCR 産物はシングルバンドで、10ng/uL 以上の濃度であることが確認できました。

・ヌクレアーゼ処理・検出

ヘテロ変異体マウスまたはホモ変異体マウスから増幅した PCR 産物 5uL に PCR grade Water11uL、Re-annealing buffer 2uL を加えたもの（通常）と、ヘテロ変異体マウスまたはホモ変異体マウスから増幅した PCR 産物 5uL に wild type マウスから増幅した PCR 産物 5uL、PCR grade Water 11uL、Re-annealing buffer 2uL を加えたもの（WT と混合）の合計 4 種類のサンプルを調製しました（下表参照）。

試薬	通常		WT と混合	
	ヘテロ	ホモ	ヘテロ	ホモ
PCR 産物(wild type)	―	―	5 uL	5 uL
PCR 産物(ヘテロ変異体)	5 uL	―	5 uL	―
PCR 産物(ホモ変異体)	―	5 uL	―	5uL
Re-annealing buffer	2 uL	2 uL	2 uL	2 uL
PCR grade Water	11 uL	11 uL	6 uL	6 uL
Total	18 uL	18 uL	18 uL	18 uL

サーマルサイクラーを用いて変性・再アニーリングを行い、再アニーリング済みのサンプル 18uL を 9uL ずつに分け、一方に 1uL のヌクレアーゼを加え(酵素消化＋)、もう一方には 1 uL の超純水を加えて(酵素消化ー)、ピペッティングにより十分混合後、37℃、30 分間インキュベートしました。インキュベート後のサンプルに 6×サンプルバッファー2uL を加え、全量をアガロースゲル電気泳動に供しました。3%アガロースゲル、TAE バッファーを用い 100V 定電圧で電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色を行いました。

その結果、通常の方法ではヘテロ変異体のみ検出でき、WT と混合した方法ではヘテロ変異体とホモ変異体の両方検出できました(図 3)。

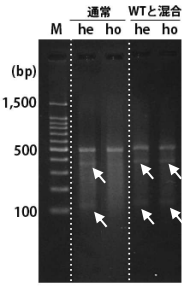


図 3. ヌクレアーゼ処理後の電気泳動結果
M：XL-DNA Ladder100（Cat No. KE-2310）
通常：通常の方法
WT と混合：WT と混合して再アニーリングした方法
he：ヘテロ変異体
ho：ホモ変異体

株式会社ファーマフーズ アプロサイエンスグループ
〒770-0865 徳島県徳島市南末広町４-53 エコービル４階
■Ｔｅｌ：088-678-6372 ■Mail：bio@apro-s.com
■Ｕｒｌ：https://apro-s.com/
本社 〒615-8245 京都府京都市西京区御陵大原1-49