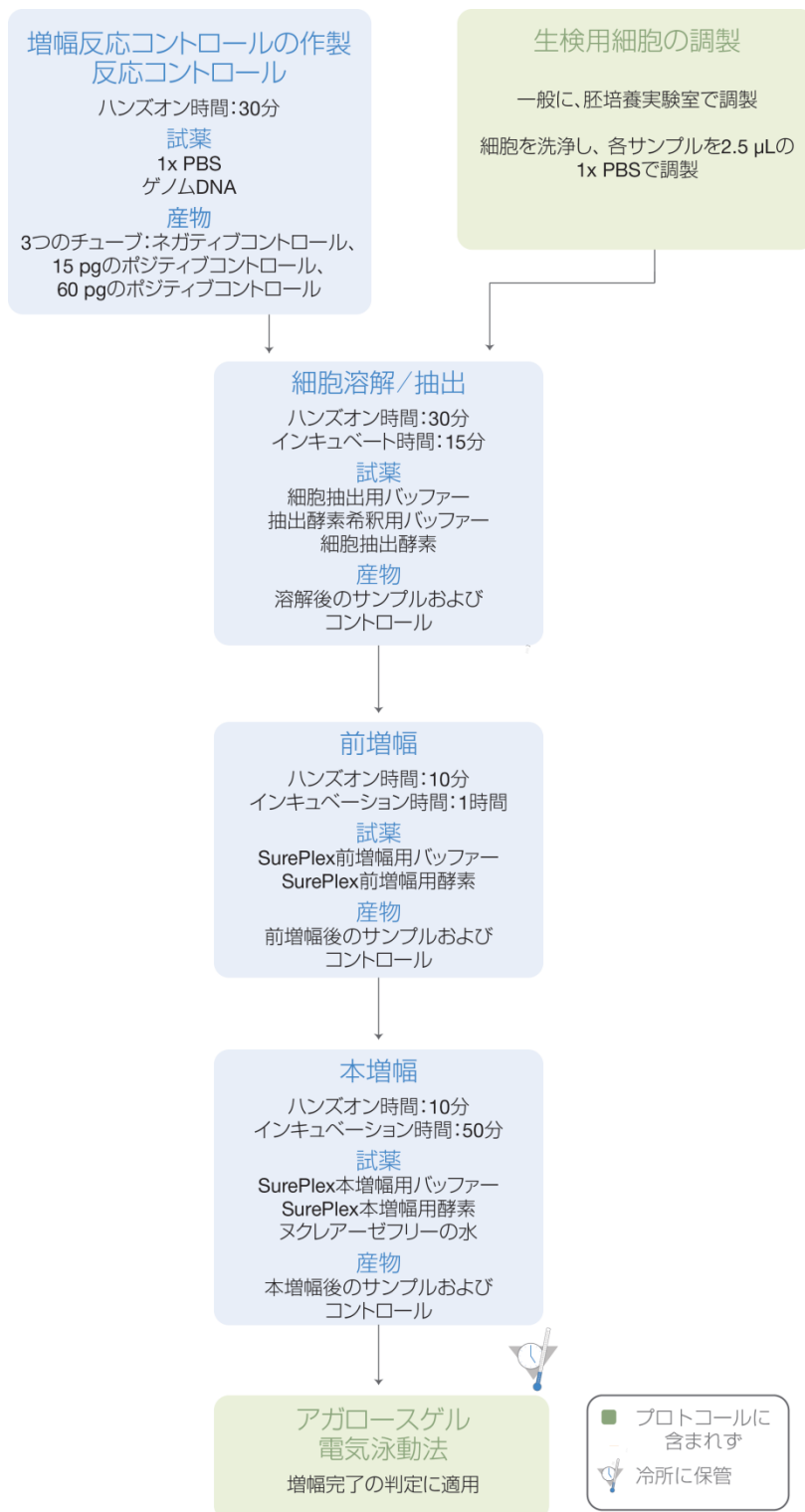


SurePlex Summary Protocol

Experienced User Card

研究目的での使用に限定



はじめに

SurePlex DNA 増幅システムは、単一細胞からの DNA 鋳型の形成に使用します。代表的な増幅法を行うことにより、24sure 異数性スクリーニング用アレイや VeriSeq PGS アプリケーションの使用に理想的な産物が生成されます。

SurePlex では、使いやすいシングルチューブプロトコルを採用しているため、SurePlex の全プロトコルを 2 時間半以内に完了させることができます。

サンプル調製および材料

表 1 サンプル調製に必要な材料

必要な材料	製品情報
SurePlex DNA 増幅システム	Illumina PR-40-415101-00
20x PBS (ヌクレアーゼフリーの水で 1x に希釈)	Cell Signaling Technologies 9808
ゲノムコントロール DNA	Promega G1521
PCR チューブ (0.2 mL、薄壁、フリップキャップ) または 96 ウェル PCR プレートおよび粘着プレート シール	Thermo Scientific AB-0620 Thermo Scientific AB-0600 (プレート) AB-0558 (シール)
微量遠心チューブ (1.5 mL、フリップキャップ)	Sarstedt 72.690.001

表 2 サンプル調製の出発材料

出発材料

0.2 mL チューブ内または PCR プレート内の 2.5 μ L 1x PBS の単一細胞

ポジティブコントロール 1 : 2.5 μ L 1x PBS のゲノム DNA 15 pg

ポジティブコントロール 2 : 2.5 μ L 1x PBS のゲノム DNA 60 pg

ネガティブコントロール : 2.5 μ L 1x PBS (0.2 mL チューブ/PCR プレート)

ネガティブコントロール : 2.5 μ L の回収用バッファークонтроール (0.2 mL チューブ/PCR プレート)

SurePlex DNA 増幅システム (50 反応) – キットコンポーネント

表 3 SurePlex DNA 増幅システム用キットのコンポーネント

コンポーネントの名称	キャップの色	分量	準備
細胞抽出用バッファーク	緑	300 μ L	氷上で融解する
抽出酵素希釈用バッファーク	紫	300 μ L	氷上で融解する
細胞抽出用酵素	黄	15 μ L	使用前に氷上へ移す
SurePlex 前増幅用バッファーク	赤	275 μ L	氷上で融解する
SurePlex 前増幅用酵素		15 μ L	使用前に氷上へ移す
SurePlex 増幅用バッファーク	橙	1.4 mL	氷上で融解する
SurePlex 増幅用酵素	青	50 μ L	使用前に氷上へ移す
ヌクレアーゼフリーの水	無色	1.8 mL	氷上で融解する

増幅反応コントロールの調製

推定所要時間

ハンズオン時間：30分

消耗品

品名	分量
1x PBS	805 μ L
ゲノム DNA (100 ng/ μ L)	5 μ L

手順

- [] 1 無菌操作用の格納キャビネット（垂直層流キャビネット）で、滅菌処理した 1.5 mL 微量遠心チューブを 4 本に分類し、表 4 の要領で内容物をそれぞれ調製します。

表 4 サンプル調製用コントロールチューブ

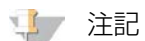
コントロールチューブ	内容	1x PBS の分量	雌ゲノム DNA 量/原液
1	1x PBS（ネガティブ）	100 μ L	-
2	2.5 ng/ μ L（ポジティブ）	195 μ L	5 μ L の 100 ng/ μ L 原液
3	25 pg/ μ L（ポジティブ）	495 μ L	5 μ L の 2.5 ng/ μ L 原液（チューブ 2 を使用）
4	6.25 pg/ μ L（ポジティブ）	15 μ L	5 μ L の 25 pg/ μ L 原液（チューブ 3 を使用）

- [] 2 各チューブに、表 4 に記載された分量の 1x PBS を加えます。
- [] 3 雌ゲノム DNA 5 μ L をチューブ 2 に加え、混合します。
- [] 4 5 μ L のチューブ 2 をチューブ 3 で希釈し、混合します。
- [] 5 5 μ L のチューブ 3 をチューブ 4 で希釈し、混合します。
- [] 6 無菌操作用の格納キャビネット（垂直層流キャビネット）で、表 5 の記載に従って、滅菌処理したフラットキャップの 0.2 mL PCR チューブを 3 本に分類します。

表 5 サンプル調製用 PCR チューブ

PCR チューブ	チューブキャップの表示	内容
1	15.6 ポジティブ	2.5 μ L の Control チューブ 4（6.25 pg/ μ L ポジティブ）
2	62.5 ポジティブ	2.5 μ L の Control チューブ 3（25 pg/ μ L ポジティブ）
3	ネガティブ	2.5 μ L の Control チューブ 1（1x PBS）

- 7 表 5 に示す内容に従い、ピペットを用いてコントロールチューブの内容物 2.5 μ L を PCR チューブに移します。



各チューブには清潔なチップを使い、移し終えたらただちに栓をします。

- 8 使用前のコントロール PCR チューブは、氷上に敷いた 96 ウェルラックに保存します。

細胞溶解/抽出

推定所要時間

ハンズオン時間：30分

インキュベート時間：15分

消耗品

品名	サンプルあたりの使用量
1x PBS	2.5 μ L
細胞抽出用バッファー（緑のキャップ）	2.5 μ L
抽出酵素希釈用バッファー（紫のキャップ）	4.8 μ L
細胞抽出用酵素（黄のキャップ）	0.2 μ L

手順

- 1 1x PBS 2.5 μ L 中および回収バッファーコントロール 2.5 μ L のサンプルを回収します。使用前のサンプルチューブおよびコントロールチューブを、氷上に敷いた 96 ウェルラックに並べます。
- 2 チューブ/プレート を 200 \times g で 3 分間（可能であれば 4°C で）遠心します。
- 3 各サンプル（コントロールを含む）に細胞抽出用バッファー（緑のキャップ）2.5 μ L を加え、2°C から 8°C で保存します。
- 4 表 6 の仕様に従って、Extraction Cocktail マスターミックスを氷上で調製し、よく混合します。

表 6 Extraction Cocktail マスターミックス

Extraction Cocktail	キャップの色	サンプルあたりの分量	5 サンプルあたりの分量
抽出酵素希釈用バッファー		4.8 μ L	24 μ L
細胞抽出用酵素		0.2 μ L	1 μ L
総量		5 μ L	25 μ L

- 5 すべてのサンプルまたはコントロールに、調製後すぐの Extraction Cocktail 5 μ L を加えます。
- 6 サンプルを軽く遠心して、チューブの内容物をすべて沈殿させます。

□7 表 7 の PCR サーマルサイクラープログラムに従って、サンプルをインキュベートします。

表 7 細胞溶解/抽出のサーマルサイクラープログラム

サイクル数	サイクル温度	インキュベート時間
1	75°C	10 分
1	95°C	4 分
1	室温	保持



注記

PCR 装置には必ずヒートリッドを使用してください。油気のある場所で、PCR 反応を行わないでください。

前増幅

推定所要時間

ハンズオン時間：10分

インキュベート時間：1時間

消耗品

品名	サンプルあたりの使用量
SurePlex 前増幅用バッファー（赤のキャップ）	4.8 μ L
SurePlex 前増幅用酵素（白のキャップ）	0.2 μ L

手順

- [] 1 表 8 の記載に従って前増幅用カクテルのコンポーネントを結合し、よく混合します。

表 8 前増幅用カクテル

前増幅用カクテル	キャップの色	サンプルあたりの分量	5 サンプルあたりの分量
SurePlex 前増幅用バッファー		4.8 μ L	24 μ L
SurePlex 前増幅用酵素		0.2 μ L	1 μ L
総量		5 μ L	25 μ L

- [] 2 細胞溶解/抽出の章で調製した各サンプル 10 μ L に、SurePlex 前増幅用カクテル 5 μ L を加え、軽く遠心します。
- [] 3 表 9 のサーマルサイクラープログラムに従って、サンプルをインキュベートします。

表 9 前増幅反応産物のサーマルサイクラープログラム

サイクル数	サイクル温度	インキュベート時間
1	95°C	2分
12	95°C	15秒
	15°C	50秒
	25°C	40秒
	35°C	30秒
	65°C	40秒
	75°C	40秒
1	4°C	保持

- [] 4 前増幅で得られた反応産物を氷上に置きます。

本増幅

推定所要時間

ハンズオン時間：10分

インキュベート時間：50分

消耗品

品名	サンプルあたりの使用量
SurePlex 増幅用バッファー（オレンジのキャップ）	1 サンプルあたり 25 μ L
SurePlex 増幅用酵素（青のキャップ）	1 サンプルあたり 0.8 μ L
ヌクレアーゼフリーの水（無色）	1 サンプルあたり 34.2 μ L

手順

- 1 表 10 の記載に従って増幅用カクテルのコンポーネントを結合し、混合します。

表 10 増幅用カクテルのコンポーネント

増幅用カクテル	キャップの色	サンプルあたりの分量	5 サンプルあたりの分量
SurePlex 増幅用バッファー	オレンジ	25 μ L	125 μ L
SurePlex 増幅用酵素	青	0.8 μ L	4 μ L
ヌクレアーゼフリーの水	無色	34.2 μ L	171 μ L
総量		60 μ L	300 μ L



注記

サンプル増幅の効率解析を行うには、リアルタイムサーマルサイクラーを用い、増幅用カクテルの SYBR Green I 色素（Invitrogen、カタログ番号 S7563）を最終濃度 0.125x で加えます。

- 2 調製後すぐの増幅用カクテル 60 μ L を前増幅反応産物 15 μ L に加え、チューブに栓をしたら、反転させて混合します。軽く遠心します。
- 3 表 11 のサーマルサイクラープログラムに従って、サンプルを増幅します。

表 11 サンプル増幅のサーマルサイクラープログラム

サイクル数	サイクル温度	インキュベート時間
1	95°C	2分
14	95°C	15秒
	65°C	1分
	75°C	1分

- 4 1.5% アガロース 1x TBE ゲルに増幅した各サンプル 5 μ L およびゲルローディングバッファー（2X）5 μ L を溶解するまでロードして、増幅が問題なく完了したことを確認します。

[] 5 増幅後の SurePlex 産物を、下流のプロトコールを実施するまで冷凍保存します。



安全なストップポイント

ただちに標識に進む予定がなければ、PCR プレートに密封し、
-25°C~-15°C で最長 1 か月間保存することができます。

商標

本製品は研究目的での使用に限定されます。

©2013 Illumina, Inc. All Rights Reserved. (不許複製・禁無断転載)

Illumina, IlluminaDx, BaseSpace, BeadArray, BeadXpresS, cBot, CSPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAllx, Genetic Energy, GenomeAnalyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode、パンプキンオレンジ色および遺伝子エネルギーの流れをベースとしたデザインは、Illumina, Inc.の商標または登録商標です。本文書に含まれるその他すべてのブランドおよび名称は、それら個別の所有者に帰属する所有物です。ラベルライセンスによる使用制限：本製品およびその使用は、Max Planck Gesellschaft が所有し、New England Biolabs, Inc. に独占的にライセンス許諾され、Illumina, Inc.にサブライセンスされた米国および海外における 1 つもしくは複数の発行済みまたは出願中の特許出願の対象です。Illumina, Inc.、その関連会社またはその認定再販業者および指定販売店から本製品を購入することにより、購入者（購入者が研究団体であるか、営利団体であるかは問わない）は、自らが購入した量の製品およびそのコンポーネントを使用するための譲渡不能な権利を譲渡されます。本製品を購入した場合でも、製品を製造することを目的とした、上記の特許または特許出願における請求権に基づくライセンスは譲渡されないものとします。購入者は、以下の商業目的、すなわち (1) 製品もしくはそのコンポーネントを製造に使用する目的、または (2) 製品もしくはそのコンポーネントを人体もしくは動物に治療目的もしくは予防目的で使用する目的のために、本製品またはそのコンポーネントを第三者に販売もしくはその他の方法で譲渡することはできず、またはその他で使用することはできないものとします。



パーツ番号：15053626 Rev. C JPN



イルミナ株式会社
東京都港区芝 5-36-7
三田ベルジュビル 22 階
サポート専用フリーダイヤル
0800-111-5011
+1.858.202.4566 (北米以外)
techsupport@illumina.com jp.illumina.com



パーツ番号：15053626 Rev. C JPN