

LB 培地及びアガロースのダイ・ターミネーター法による DNA シークエンシングに及ぼす影響

山口幸洋,^{*,a} 任張幸子,^b 小幡博子,^c 大河原知水,^a
江口裕伸,^a 黒津敏嗣,^a 鈴木敬一郎^a

Effects of Agarose and LB Medium on Dye-terminator DNA Sequencing

Yukihiro YAMAGUCHI,^{*,a} Sachiko NIMBARI,^b Hiroko OBATA,^c Tomomi OOKAWARA,^a
Hironobu EGUCHI,^a Toshitsugu KUROTSU,^a and Keiichiro SUZUKI^a

Department of Biochemistry, Hyogo College of Medicine,^a 1-1 Mukogawa-cho, Nishinomiya, Hyogo
663-8501, Japan, Osaka Minami National Hospital School of Nursing,^b 2-1 Kidohigashimachi,
Kawachinagano, Osaka 586-8521, Japan and AV OVO Inc.,^c 1-13-11
Higashishinsaibashi, Chuo-ku, Osaka 542-0083, Japan

(Received January 15, 2002; Accepted March 27, 2002)

The direct sequencing of PCR products, a bacterial colony (plasmid DNA), or a phage plaque (λ DNA) is a very powerful technique in several molecular biological applications. Recently, we reported the successful application of this direct sequencing methodology, called recyclesequencing. Occasionally, however, our sequencing efforts failed due to the presence of agarose gel containing Luria-Bertani (LB) medium. Consequently, we pursued a semiquantitative investigation of the inhibitory effects of agarose and LB medium on the direct sequencing reaction. We found that LB medium concentrations greater than 26.7% inhibited the sequencing reaction. Furthermore, agarose concentrations greater than 0.20% in a reaction mixture also inhibited the sequencing reaction.

Key words—DNA sequencing; agarose; Luria-Bertani (LB) medium

緒 言

ゲノム DNA や cDNA のライブラリーからクローニングした遺伝子のスクリーニングの際、クローニングしたファージを精製し、制限酵素で切断して断片をサブクローニングし、そのプラスミドを形質転換したコロニーが多数ある場合、それらのコロニーからプラスミドを調製、シーケンスを行うことは非常に多くの労力を要する。そこで我々はダイ・ターミネーター法によるファージ DNA のダイレクトシーケンス¹⁾やプラスミドのコロニーダイレクトシーケンス²⁾について検討を行い、ゲノムライブラリーや cDNA ライブラリーからのターゲットとなるクローンのハイスループットなスクリーニング方法を確立してきた。²⁾ その過程で、ファージプラークのダイレクトシーケンス

(リサイクルシーケンス)を行う際にピックアップするトップアガーやコロニーダイレクトシーケンスを行う際にコロニーと一緒にピックアップしてしまう LB アガーがシーケンス反応に阻害の影響を及ぼすことを実感してきた。そこでファージプラークのダイレクトシーケンス及びコロニーダイレクトシーケンスのシーケンス反応の至適条件を探る目的で LB 及びアガロースゲル各々のシーケンス反応に及ぼす影響について半定量的な検討を行った。

実 験 の 部

方法

LB 培地の影響についての検討 BigDye™ terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) の反応液 (pUC 系のプラスミド DNA pGEM-3Zf(+) 2 μ l (0.4 μ g), BigDye™ terminator cycle sequencing premix: 8 μ l, -21 M13 プライマー: 4 μ l (3.2 pmol), LB 液体培地を (Table 1)

^{a)}兵庫医科大学学生化学講座, ^{b)}国立大阪南病院付属看護学校, ^{c)}榊アヴ・オヴォ
e-mail: yyama@hyo-med.ac.jp

Table 1. Effect of LB Medium and Agarose on DNA Sequencing

Sample No.	Volume of LB (μ l)	Final concentration of LB (%)	Reading length (bases)	Sample No.	Amount of agarose (μ l)	Final concentration of agarose (%)	Reading length (bases)
1	0.0	0.0	650	1	0.0	0.00	650
2	0.1	0.7	650	9	0.5	0.05	550
3	0.2	1.3	650	10	1.0	0.04	465
4	0.4	2.7	650	11	2.0	0.08	500
5	1.0	6.4	640	12	4.0	0.15	(460)
6	2.0	13.3	610	13	6.0	0.20	0
7	4.0	26.7	0	14	8.0	0.24	0
8	6.0	40.0	0	15	10.0	0.28	0

加え、最終的に ddH₂O で 15 μ l にメスアップ) を調整し、サーマルサイクラーでサイクルシーケンシングの反応を行った。96°C/10 sec, 50°C/5 sec, 60°C/2.5 min を 25 サイクル反応させ、反応終了後の反応液を Sephadex G50 (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, England) のスピナラムにかけて未反応の蛍光物質を除去した後、エタノール沈澱を行い、これを試料とした。試料をインストラクションマニュアルに記載してあるホルムアミドの溶液 Template Suppression Reagent (TSR) に溶かして ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer を用いてシーケンシング解析を行った。

アガロースの影響についての検討 あらかじめ 200 μ l の PCR チューブに 0.7% アガロース溶液を適量 (Table 1) 入れ、氷上で固めておいた。それらのチューブに BigDye™ terminator の反応液 (pUC 系のプラスミド DNA pGEM-3Zf(+)) 2 μ l (0.4 μ g), BigDye™ terminator cycle sequencing premix: 8 μ l, -21 M13 プライマー: 4 μ l (3.2 pmol), ddH₂O: 10 μ l) を加え、サーマルサイクラーでサイクルシーケンシングの反応を行った。96°C/10 sec, 50°C/5 sec, 60°C/2.5 min を 25 サイクル反応させ、反応終了後の反応液を Sephadex G50 のスピナラムにかけて未反応の蛍光物質を除去した後エタノール沈澱を行い、これを試料とした。試料をインストラクションマニュアルに記載してあるホルムアミドの溶液 Template Suppression Reagent (TSR) に溶かして ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer を用いてシーケンシング解析を行った。

なお、Reading Length については DNA pGEM-3Zf(+) の配列は既知であるので、データベース

上のその配列と今回の実験で得られた各々の配列を比較して、5 塩基以上合わなくなる手前までを読めたとし、Reading Length とした。

結果と考察

コロニーダイレクトシーケンシング並びにファージプラークダイレクトシーケンシングの至適条件の確立のために LB 培地及びアガロースのシーケンシング反応に及ぼす影響について半定量的な検討を行った。その結果、LB 培地については反応液中の最終濃度が 26.7% 以上でシーケンシング反応を阻害することが分かった (Fig. 1, Table 1)。

アガロースについては反応液中の最終濃度が 0.08% まではシーケンシング反応は阻害されなかった (Fig. 1, Table 1)。Gibb と Wong は β -グロブリンの PCR でアガロースの濃度が 0.033% 以上になると反応が阻害されると報告している。³⁾ 一方、Setterquist と Smith は反応液を 0.05% のアガロースゲルの中に封入する encapsulated PCR で HIV-1 gag 遺伝子の PCR を行っている。⁴⁾ これらの PCR の結果と我々のシーケンシング反応の結果を単純に比較することは難しいが、少なくとも DNA ポリメラーゼの反応は 0.2% 以上の濃度のアガロースによって阻害されると言えるだろう。その理由の 1 つとして、アガロースの濃度がある程度高くなってくると反応液の一部がゲル化ないしは全体的に半ゲル状になり、反応混合液の濃度が至適条件からずれるのではないかと考える。

LB 培地及びアガロースについてそれぞれのシーケンシング反応に及ぼす影響について検討を行ってきたが、実際にはコロニーダイレクトシーケンシングの場合でもファージのプラークダイレクトシーケン

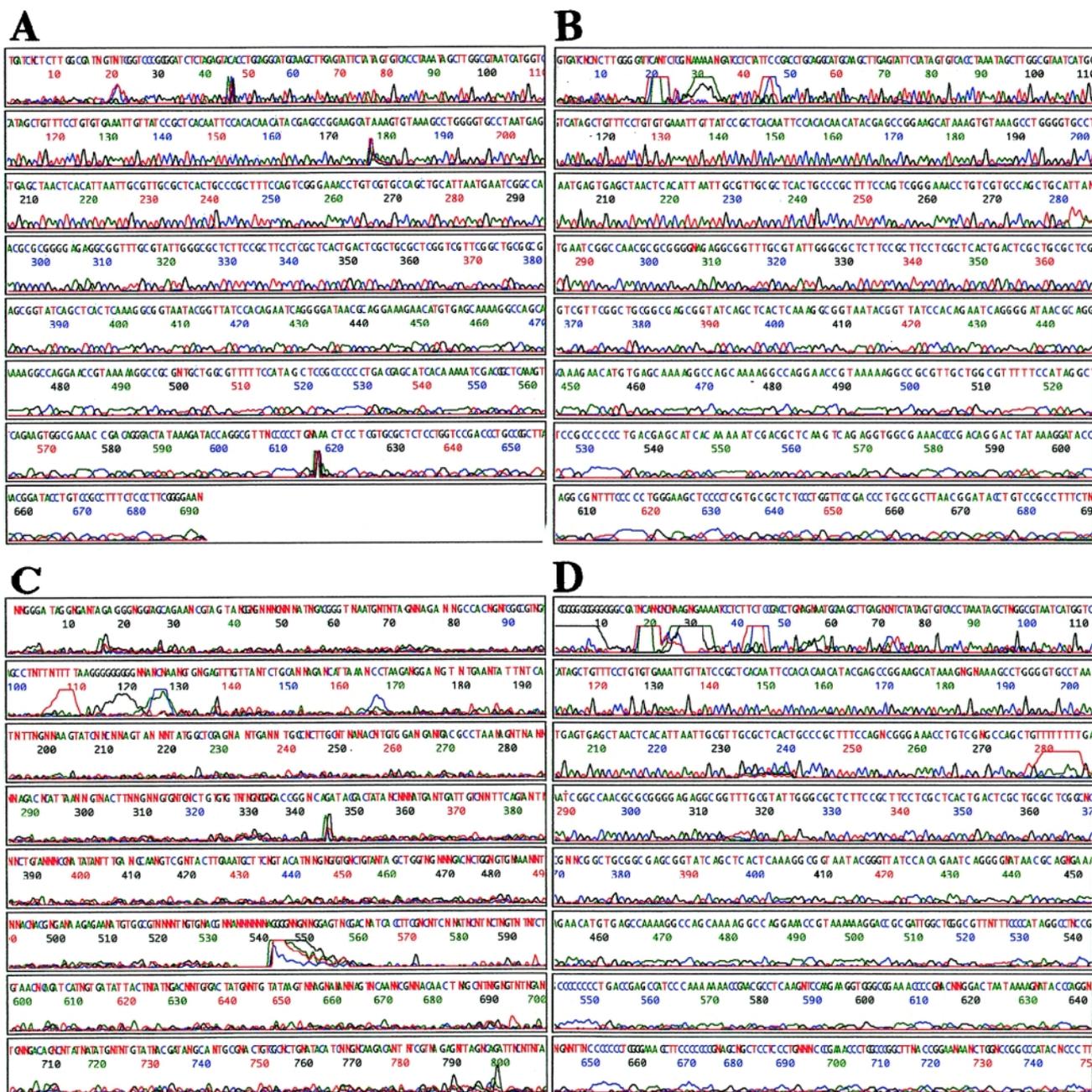


Fig. 1. An Electropherogram of Sequencing Using BigDye Terminator
 (A) Sample No. 1, (B) Sample No. 6, (C) Sample No. 7, (D) Sample No. 12.

シングの場合でもアガロースを含んだ LB 培地に影響してくる。そこで、1.5%アガロースを含んだ LB 培地について検討したところ、6 μ l (最終濃度：21.1% LB 培地, 0.17%アガロース) 以上でシーケンズ反応が阻害された (未発表データ)。LB 培地, アガロースそれぞれ単独での阻害の濃度とほぼ同程度であり, 相加的な阻害効果は見られなかった。

おわりに

プラスミド DNA のコロニーダイレクトシーケンシングやファージプラークのダイレクトシーケンシング (リサイクルシーケンシング) は LB 培地やアガロースなどの阻害により時として上手く行かない場合があるが, 今回検討した条件を踏まえて LB 培地やアガロースの混入を極力抑えればクローニン

グした遺伝子の確認に大変有効な方法である。我々は日常取り扱っている試料を精製などの前処理なしで迅速かつ簡便にシークエンシング反応できる方法を検討している。PCR についての阻害物質の検討はいくつか報告^{3,5)}があるもののシークエンシング反応については現在までのところ本報以外にほとんどない。

謝辞 本研究の実施に当たりシークエンス解析をサポートして下さいました兵庫医科大学共同研究室の狩野直子技術員に深謝します。

REFERENCES

- 1) Obata H., Tanaka T., Fujii T., Sasho C., Yamaguchi Y., Suzuki K., *Anal. Biochem.*, **297**, 102-105 (2001).
- 2) Sasho C., Obata H., Tanaka T., Okuto K., Yamaguchi Y., Suzuki K., *Yakugaku Zasshi*, **121**, 701-705 (2001).
- 3) Gibb A. P., Wong S., *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 275-276 (1998).
- 4) Setterquist R. A., Smith G. K., *Nucleic Acids Res.*, **24**, 1580-1581 (1996).
- 5) Al-Soud W. A., Radstrom P., *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 485-493 (2001).