

UGT1A1 Pyro™ プロトコールとトラブルシューティング

ヒト UGT1A1 遺伝子のアレル変異 UGT1A1*28 および
UGT1A1*6 のジェノタイピング



目次

プロトコール

プロトコール 1 : PyroMark Q24 システムを用いたランのセットアップ	3
プロトコール 2 : UGT1A1 Pyro Kit に付属の試薬を用いた PCR	5
プロトコール 3 : Streptavidin Sepharose High Performance Beads への PCR 産物の固定	8
プロトコール 4 : PyroMark Q24 System でのパイロシーケンス解析前の サンプル調製	10
プロトコール 5 : PyroMark Q24 システムの稼動	14
プロトコール 6 : PyroMark Q24 Run の解析	17
トラブルシューティング	19

プロトコール 1 : PyroMark Q24 システムを用いたランのセットアップ

実験開始前の準備事項

- Appendix A (英語版 Handbook 31 ページ) に記載されているように Assay Setup を作製します。この操作は、初めて UGT1A1 アッセイを行なう前に 1 度だけ必要になります。

操作手順

1. ツールバーの  をクリックする。
新しいラン・ファイルを作製します。
2. ラン・パラメータを入力する (次ページの “ラン・パラメータ” 参照)。
3. 解析するサンプルに応じて、アレル変異 *28 並びにアレル変異 *6 用のアッセイをウェルに添加して、プレートセットアップする。
コントロールとしてネガティブサンプル (DNA なし) およびコントロール DNA を推奨します。
4. ランがセットアップされ PyroMark Q24 でのランの準備が整うと、酵素ミックス、基質ミックス、ヌクレオチド、プレートセットアップの一覧を印刷する。“Tools” メニューから “Pre Run Information” を選び、レポートが表示されたら  をクリックする。
5. ラン・ファイルを閉じ、Windows® Explorer を用いてラン・ファイルを USB スティック (システムに付属) に保存する。
PyroMark Q24 でプレートのランを実施するために、14 ページの “プロトコール 5 : PyroMark Q24 システムの稼動” を参照してください。

ラン・パラメータ

- Run name : 測定するランの名前を設定する。
- Instrument method : ランに使用するカートリッジに従って装置のメソッドを選択する；製品に付属の説明書を参照する。
- Plate ID : オプション：PyroMark Q24 Plate の ID を入力する。
- Bar code : オプション：プレートのバーコードナンバーを入力するか、コンピューターに接続したバーコードリーダーを所有している場合は“Barcode”のテキストボックスにマウスのカーソルを置いて（ボックスをクリックする）バーコードをスキャンする。
- Kit and Reagent ID : オプション：使用する UGT1A1 Pyro Kit のロット番号を入力する。ロット番号は製品のラベルに記載。
注：試薬 ID とキット ID の両方を入力することを推奨します。これにより、予想していなかった問題の追跡が可能です。
- Run note : オプション：ランの内容あるいは目的について注釈を入れる。

アッセイファイルを加える

ウェルにアッセイを追加するには以下のような 2 つの方法があります：

- ウェルを右クリックしてコンテキストメニューから“Load Assay”を選択する。
- ショートカットのブラウザでアッセイを選択し、クリックして、ウェルにアッセイをドラッグする。

ウェルにアプライされるアッセイによりウェルが色づけされます。

サンプル ID および注釈の入力

サンプル ID あるいは注釈の入力には、セルを選択してテキストを入力します。

サンプル ID あるいは注釈の編集には、セルを選択するか（現在の内容が選択される）セルをダブルクリックします。

プロトコール 2 : UGT1A1 Pyro Kit に付属の試薬を用いた PCR

これは、UGT1A1 Pyro Primers を用いて、UGT1A1*28 のジェノタイピング領域の PCR 増幅、また UGT1A1*6 のジェノタイピング領域の PCR 増幅のそれぞれを行なうためのプロトコールです。

実験を始める前の重要事項

- PyroMark PCR Master Mix 中の HotStarTaq® DNA Polymerase を活性化するため、PCR の最初に必ず **95°C で 15 分間**の活性化ステップを行なってください。
- 全ての反応液のセットアップは、DNA 精製 / PCR 反応液へテンプレート DNA の添加 / PCR 産物の解析 / パイロシーケンス解析に先立つサンプル調製などを行なう場所から離れたところで行なってください。
- クロスコンタミを最小限にするため疎水性フィルター付きの使い捨てチップを使用してください。

実験開始前の準備事項

- PCR プライマーが入ったチューブを開ける前に、スピンドウンしてチューブの底にプライマーを全て回収します。
- 必要に応じて DNA サンプル濃度を 0.4 ~ 2 ng/μl に調節します。

操作手順

1. **必要な全成分を解凍する。**
使用前によく混和します。
2. **次ページの表 3 に従って各 PCR プライマーセットの反応ミックスを調製する。**
反応ミックスにはサンプル以外の PCR に必要な試薬が全て含まれています。
PCR 反応に必要な反応ミックスのトータル量よりも多めに調製します。

表 3. PCR プライマーミックス用反応ミックスの調製

成分	容量／反応
PyroMark PCR Master Mix、2x	12.5 μ l
CoralLoad [®] Concentrate、10x	2.5 μ l
PCR Primer mix UGT1A1 allele variant *28 あるいは PCR Primer mix UGT1A1 allele variant *6	1.0 μ l
水（付属）	4.0 μ l
トータル容量	20.0 μl

3. 反応ミックスをよく混和し、20 μ l を各 PCR チューブに分注する。

HotStarTaq DNA Polymerase は室温で不活性なので、PCR チューブを氷上で保存する必要はありません。

4. 5 μ l のテンプレート DNA (2 ~ 10 ng のゲノム DNA) を各 PCR チューブに添加し、完全に混和する。

ネガティブコントロール（テンプレート DNA なし）は必ず同時に行ないます。

表 4. PCR の調製

成分	容量／反応
反応ミックス	20 μ l
テンプレート DNA	5 μ l
トータル容量	25 μl

5. メーカーの指示に従って、表 5 に記載されている条件を用いてサーマルサイクラーをプログラムする。

表 5. 最適な PCR サイクリング・プロトコール

			コメント
初期活性化ステップ：	15 分	95°C	HotStarTaq DNA Polymerase はこの加熱ステップにより活性化
3 ステップサイクリング：			
変性	20 秒	95°C	
アニーリング	30 秒	53°C	
エクステンション	20 秒	72°C	
サイクル数	42		
最終エクステンション：	5 分	72°C	

6. サーマルサイクラーに PCR チューブをセットし、サイクリング・プログラムをスタートする。
7. 増幅後は 8 ページの “プロトコール 3：Streptavidin Sepharose High Performance Beads への PCR 産物の固定” に進む。

プロトコール 3 : Streptavidin Sepharose® High Performance Beads への PCR 産物の固定

これは、PyroMark Q24 System での解析を行なう前に、テンプレート DNA を Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) に固定させるためのプロトコールです。

実験開始前の準備事項

- 開始前にすべての試薬と溶液を室温（15 ~ 25℃）に戻します。

操作手順

1. **Streptavidin Sepharose High Performance** ビーズの入った容器を振盪して均一な溶液にする。
2. 表 6 に従って **DNA 固定用マスターミックス** を調製する。
実施する全反応数に必要な反応ミックス量の 10% 増して反応ミックスを調製します。

表 6. DNA 固定用マスターミックスの調製

成分	容量／反応
Streptavidin Sepharose High Performance	2 µl
PyroMark Binding Buffer	40 µl
水（付属）	28 µl
トータル容量	70 µl

3. ランのセットアップ（3 ページの “プロトコール 1 : PyroMark Q24 システムを用いたランのセットアップ” を参照）に従って、24 ウェル PCR プレートの各ウェル（あるいはストリップ）に **70 µl** のマスターミックスを添加する。
4. ランのセットアップ（3 ページの “プロトコール 1 : PyroMark Q24 システムを用いたランのセットアップ” を参照）に従って、マスターミックスが入っている各ウェルに、プロトコール 2 で作製したビオチン標識 PCR 産物 **10 µl** を添加する。
マスターミックスと PCR 産物を加えた後のウェルあたりのトータル容量は 80 µl になります。
5. ストリップ・キャップで PCR プレート（あるいはストリップ）を密封する。
ウェル間で漏出がないことを確認します。

6. PCR プレートを室温（15～25℃）、1,400 rpm で 5～10 分間攪拌する。

このステップ中に、PyroMark Q24 User Manual に従ってサンプル調製のための PyroMark Q24 Vacuum Workstation を準備します。

7. すぐに 10 ページの “プロトコール 4：PyroMark Q24 System でのパイロシーケンス解析前のサンプル調製” に進む。

Sepharose ビーズはすぐに沈殿するので、攪拌後、ビーズの捕獲を迅速に行なわれなければなりません。

プレート（あるいはストリップ）の攪拌後 1 分以上経過した場合は、ビーズの捕獲前にもう一度 1 分間攪拌します。

プロトコール 4 : PyroMark Q24 System でのパイロシークエンス解析前のサンプル調製

これは、PyroMark Q24 System でのパイロシークエンス解析前に、一本鎖 DNA の調製とテンプレートへのシークエンシング・プライマーのアニーリングを行なうためのプロトコールです。

実験を始める前の重要事項

- シークエンシング・プライマーが入ったチューブを開ける前に、スピンドウンしてチューブの底にプライマーをすべて回収します。
- ラン・セットアップで前もって定義したプレートと同様のパターンで（3 ページの “プロトコール 1 : PyroMark Q24 システムを用いたランのセットアップ”）、解析領域（アレル変異 *28 あるいはアレル変異 *6）に応じて、2 種類の異なるシークエンシング・プライマーを添加します。

実験開始前の準備事項

- ステップ 17 に使用するために、80℃ に加熱したヒートブロックに PyroMark Q24 Plate Holder をセットします。
- PyroMark Wash Buffer は 10 倍濃縮液としてお届けします。初めて使用する際には、25 ml の 10x PyroMark Wash Buffer に高純度の水を添加し、最終容量を 250 ml にして、1x のワーキング溶液を調製します。

注：1x PyroMark Wash Buffer ワーキング溶液は 2 ~ 8℃ で有効期間まで安定です。

操作手順

1. 表 7 に従って各シークエンシング・プライマー、Seq Primer UGT1A1 *28 および Seq Primer UGT1A1 *6 を PyroMark Annealing Buffer で希釈する。
希釈したシークエンシング・プライマーは、シークエンスを実施するトータル数で必要な量よりも多めに準備します（サンプル数プラス 1 で必要な量を計算）。

表 7. シークエンシング・プライマーの希釈例

成分	容量／反応	(9 + 1) 反应用容量
Seq Primer UGT1A1 *28 あるいは Seq Primer UGT1A1 *6	0.8 μ l	8 μ l
PyroMark Annealing Buffer	24.2 μ l	242 μ l
トータル容量	25.0 μl	250 μl

2. ランのセットアップ (3 ページの “プロトコール 1 : PyroMark Q24 システムを用いたランのセットアップ” 参照) に従って、PyroMark Q24 Plate の各ウェルに希釈したシークエンシング・プライマーを 25 μ l 添加する。

PyroMark Q24 Plate Holder のひとつ (PyroMark Q24 Vacuum Workstation に付属) を室温 (15 ~ 25°C) に置いて、プレートの準備や移動の際に使用します。

3. プロトコール 3 で調製した PCR プレート (またはストリップ) および PyroMark Q24 Plate をワークテーブルにセットする (図 2)。

サンプルをアプライしたのと同じ方向でプレートをセットしたことを確認します。



図 2. ワークステーションに PCR プレート (またはストリップ) および PyroMark Q24 Plate をセット

4. 吸引スイッチを開いて vacuum tool を吸引する。

5. テンプレートが固定したビーズを捕獲するために、フィルター・プローブを慎重に PCR プレート（あるいはストリップ）まで下げる。プローブを 15 秒間保持する。Vacuum Tool を持ち上げる際は注意する。

Sepharose beads は非常に速く沈殿します。

プレート（あるいはストリップ）を攪拌して 1 分以上経過した場合は、ビーズの捕獲前にもう一度 1 分間攪拌します。

6. Vacuum Tool を 40 ml の 70%エタノールが入った Trough (容器) に移す (図 2)。フィルター・プローブを 5 秒間洗浄する。
7. Tool を 40 ml の Denaturation Solution が入った Trough に移す (図 2)。フィルター・プローブを 5 秒間洗浄する。
8. Vacuum Tool を 50 ml の Washing Buffer が入った Trough に移す (図 2)。フィルター・プローブを 10 秒間洗浄する。
9. Vacuum Tool を持ち上げて倒し、5 秒間垂直 (90°) 以上にして、フィルター・プローブから溶液を排出する (図 3)。



図 3. Vacuum Tool を垂直に持ち上げたところ

10. Vacuum Tool を PyroMark Q24 Plate 上に持ち上げ、Tool の吸引スイッチを閉じる (Off)。
11. Seq Primers が入ったプレートにビーズを添加し、Tool を慎重に横に攪拌する。
12. 高純度の水が入った Trough に Seq Primers を移し (図 2)、Tool を 10 秒間攪拌する。
13. フィルター・プローブの位置を高純度の水 (図 2) まで下げて吸引を行ない、プローブを洗浄する。70 ml の高純度の水をプローブに流す。
14. Vacuum Tool を持ち上げて、5 秒間垂直 (90°) 以上にして、フィルター・プローブから溶液を排出する (図 3)。
15. Tool の吸引スイッチを閉じ (Off)、tool を Parking (P) 位置に置く。

16. 真空ポンプのスイッチを切る。

最後に廃液や残った溶液を廃棄し、PyroMark Q24 Vacuum Workstation の埃や液漏れをチェックする（英語版 Handbook 32 ページ、Appendix B）。

17. 加熱していた PyroMark Q24 Plate Holder (Vacuum Workstation に添付) を用いて、PyroMark Q24 Plate とサンプルを 80℃で 2 分間加熱する。

18. プレートホルダーから PyroMark Q24 Plate を取り出し、室温（15 ~ 25℃）で 5 ~ 10 分間サンプルを静置して冷却する。

19. 次ページの “プロトコール 5 : PyroMark Q24 システムの稼動” に進む。

プロトコール 5 : PyroMark Q24 システムの稼働

本プロトコールでは、PyroMark Q24 Cartridge への試薬の充填および PyroMark Q24 の稼働の開始と停止について記述しています。ランのセットアップの詳細は PyroMark Q24 User Manual (日本語版あり) を参照してください。

実験を始める前の重要事項 :

- ランのセットアップで “Tools” メニューから “Pre Run Information” レポートを選ぶ (3 ページの “プロトコール 1 : PyroMark Q24 システムを用いたランのセットアップ”) と、特殊なランに必要なヌクレオチド、酵素、基質バッファアの容量に関する情報が得られます。

操作手順

1. 凍結乾燥された酵素と基質ミックスをそれぞれ付属の水 620 μ l で溶解する。
2. 容器を回して混和する。ボルテックスで混和しない。
ミックスを完全に溶解するために、室温 (15 ~ 25°C) で 5 ~ 10 分間インキュベートします。PyroMark Q24 Cartridge に充填する前に溶液が濁っていないことを確認します。溶液をすぐに使用しない場合は、試薬容器を氷上 * あるいは冷蔵庫で保冷します。
3. 試薬と PyroMark Q24 Cartridge を常温 (20 ~ 25°C) にする。
4. ラベル面を手前に向けて PyroMark Q24 Cartridge をセットする。
5. 図 4 に従って、PyroMark Q24 Cartridge に適切な量のヌクレオチド、酵素、基質ミックスをアプライする。
ピペットで試薬をカートリッジに移す際に気泡が入らないように気をつけます。

* 化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着と使い捨て手袋、保護用眼鏡を着用してください。詳細は製品メーカーの相当する MSDS (material safety data sheet) をご覧ください。

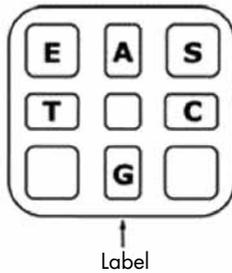


図 4. 上部から見た PyroMark Q24 Cartridge の図

記号は試薬容器のラベルに相当する。酵素ミックス (E)、基質ミックス (S)、ヌクレオチド (A、T、C、G) を、ランセットアップの “Tools” メニューにある “Pre Run information report” で示される試薬容量に従って充填する。

6. **Cartridge gate** を開き、充填済みの試薬カートリッジを挿入する（ラベル面を手前に向ける）。試薬カートリッジを完全に入れて下に押す。
7. 試薬カートリッジの手前の線が見えることを確認して、ゲートを閉める。
8. **Plate-holding frame** を開いて、プレートヒートブロックにセットする。
9. **Plate-holding frame** と装置の蓋を閉める。
10. ラン・ファイル保存した USB スティックを装置前面にある USB ポートに差し込む。
ランが完了するまで USB スティックを取り外さないでください。
11. スクリーンボタンの▲と▼を使ってメインメニューから “Run” を選択し、“OK” を押す。
12. スクリーンボタンの▲と▼を使ってラン・ファイルを選択する。
フォルダーの中を見るために、フォルダーを選択し “Select” を押します。前の画面に戻るには “Back” を押します。
13. ラン・ファイルを選び、“Select” を押してランを開始する。
14. ランが完了し、ラン・ファイルが USB スティックに保存されたことを装置が確認したら、“Close” を押す。
15. USB スティックを取り外す。
16. 装置の蓋を開く。
17. **Cartridge gate** を開き、試薬カートリッジを取り外す（上に引き上げてから外側に引く）。
18. **Cartridge gate** を閉じる。
19. **Plate-holding frame** を開いて、プレートをヒートブロックから取り出す。
20. **Plate-holding frame** と装置の蓋を閉める。

21. カートリッジに同梱のプロダクトシートに従ってプレートを廃棄しカートリッジを洗浄する。
22. 次ページの“プロトコール 6 : PyroMark Q24 Run の解析”に従ってランの解析を行なう。

プロトコール 6 : PyroMark Q24 Run の解析

このプロトコールでは、UGT1A1 ランの終了後、PyroMark Q24 Software を用いて行なうジェノタイプング解析について記述しています。

操作手順

1. 処理済みのラン・ファイルが入っている USB スティックをコンピューターの USB ポートに差し込む。
2. **Windows Explorer** を用いて USB スティック中のラン・ファイルをコンピューター上の希望の場所に移す。
3. “File” メニューの “Open” を選択するか、ショートカットブラウザのファイル () をダブルクリックして、PyroMark Q24 Software の AQ モードでラン・ファイルを開く。
4. **Analyze** ボタンをクリックして、ランを解析し結果一覧を作製する。



全ウェルを解析する。



選択したウェルを解析する。

ランの解析法に関する詳細は PyroMark Q24 User Manual (日本語版あり) をご覧ください。

5. レポートを作製するために、“Reports” メニューから “SNP Full Report” あるいは “SNP Overview Report” を選択する。

信頼性の高い結果を得るためには 30 RLU を超えるシングルピークを推奨します。アッセイセットアップの “required peak height for passed quality” で 30 RLU をセットしてください (英語版 Handbook 31 ページ、Appendix A および PyroMark Q24 User Manual 参照)。

Pyrogram® ウィンドウを右クリックするとヒストグラムが表示できるため、Pyrogram とヒストグラムを常に比較します。ピークの測定値はヒストグラムのバーの高さにマッチしなければなりません。

パイログラム結果の例

代表的なパイログラムの結果を図5～8に示します。

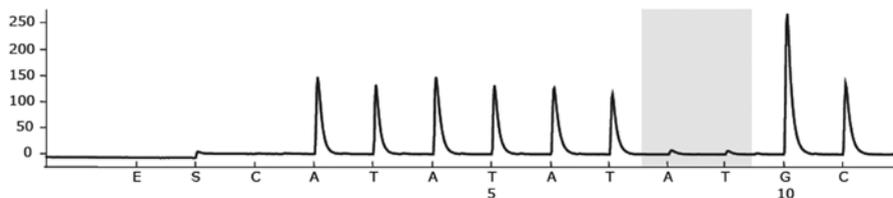


図 5. UGT1A1 *28 アレルの解析の際に、-/- (TA6/TA6) genotype をもつサンプルの解析後に得られるパイログラム

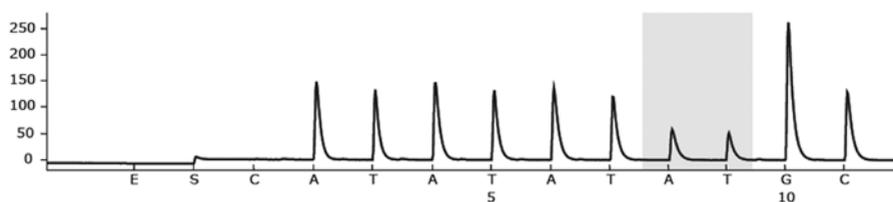


図 6. UGT1A1 *28 アレルの解析の際に、-/TA (TA6/TA7) genotype をもつサンプルの解析後に得られるパイログラム

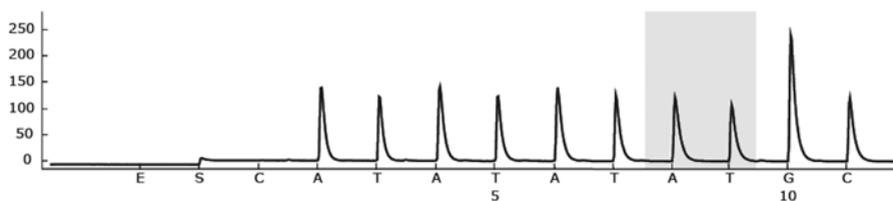


図 7. UGT1A1 *28 アレルの解析の際に、TA/TA (TA7/TA7) genotype をもつサンプルの解析後に得られるパイログラム

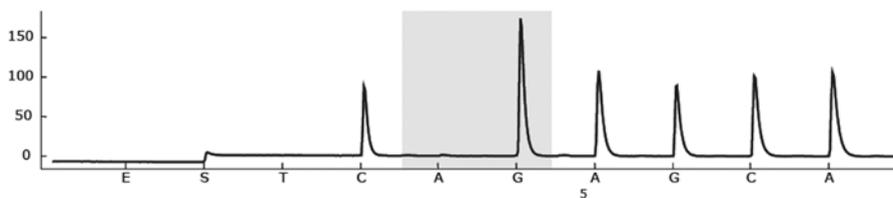


図 8. UGT1A1 *6 アレルの解析の際に、G/G genotype をもつサンプルの解析後に得られるパイログラム

トラブルシューティング

コメント

NTC : No template control (ネガティブコントロール) でシグナルがある

- a) ウェル間のクロス
トーク あるウェルからのシグナルが隣接するウェルで検出される。強いシグナルを持つサンプルをネガティブコントロール・ウェルの隣に配置しない。
- b) PCR のコンタミ フィルター付きの滅菌ピペットチップを使用する。検体、プラスミドコントロール、増幅産物などは PCR 試薬から離れた場所で保管・取り扱う。

弱いあるいは予想されていないシーケンスシグナル

ゲノム DNA の品質が低い ゲノム DNA の品質が低いと PCR が失敗することがある。QIAxcel™ System あるいはアガロースゲル電気泳動のような適切な電気泳動テクニックを用いてサンプルを解析する。

“Check” あるいは “failed” の結果

- a) アッセイセットアップ
で定義されていない
新規のアレル変異 アッセイセットアップあるいはスタンダードの “Sequence to Analyze” に網羅されていない新規のアレルで TA 反復数が少ないために、リファレンスパターンが変化したり、“Check” / “Failed” などの結果になることがある。
- b) ピークの高さが低い パイロシーケンシングを開始する前の PCR セットアップあるいはサンプル調製での取り扱いミスの結果ピークが低くなる。サンプルを再度解析することを推奨。
- c) Dispensation x で
ピークの高さの
偏差値が高い警告 パイログラムウインドウを右クリックすると表示されるヒストグラムとパイログラムを慎重に比較しなければならない。

バックグラウンドが高い

ヌクレオチドの保存が不適切 ヌクレオチドは 2 ~ 8°C で保存する。-20°C で保存するとバックグラウンドが増加することがある。

ポジティブコントロールでシグナルがない

- a) 全ウェルで酵素
あるいは基質ミックス
が不十分 “Tools” メニューの “Pre Run Information” に従って PyroMark Q24 Cartridge を充填したことを確認する。
- b) 試薬の保存あるいは
希釈が適切でない UGT1A1 Pyro Kit 試薬を同梱の説明書に従って調製する。

Trademarks: QIAGEN®, QIAxcel™, CorallLoad®, HotStarTaq®, Pyro™, Pyrogram®, PyroMark™ (QIAGEN Group); Sepharose® (GE Healthcare); Windows® (Microsoft Corporation).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

記載の QIAGEN 製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。

© 2011 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

株式会社 キアゲン ■ 〒 104-0054 ■ 東京都中央区勝どき 3-13-1 ■ Forefront Tower II

Tel: 03-6890-7300 ■ Fax: 03-5547-0818 ■ E-mail: techservice-jp@qiagen.com

