

HS-92-20  
HS-92-100

変異検出キット

# DN-Sure Mutation Discovery Kit

## 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



※ 本キットにはゲノム抽出試薬、DNA ポリメラーゼは含まれておりません。

## 【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：検出はアガロースゲルまたはアクリルアミドゲルで可能
- 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

内容	容量 (20 回分) Code No. HS-92-20	容量 (100 回分) Code No. HS-92-100
Re-annealing buffer	50 uL	250 uL
Nuclease	20 uL	100 uL

## 【保存方法・使用期限】

-20℃・1 年間

### 【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
- ゲノム DNA 抽出試薬またはキット
- DNA ポリメラーゼ（正確性の高い酵素を使用して下さい。）
  - ※ ポリメラーゼによっては、バッファーに含まれる塩類等が後のヌクレアーゼ処理を阻害する場合がございます。  
詳しくはトラブルシューティングをご覧ください。(P.5)

必要に応じてご用意ください。

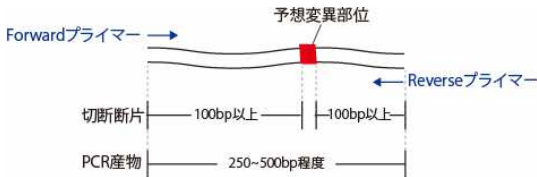
- PCR 産物精製試薬またはキット
- ポジティブコントロール用のゲノム DNA とプライマーセット
  - ※ 適当なポジティブコントロールがない場合、ゲノム DNA とプライマーセットを別途販売しております。  
詳しくはお問い合わせください。

## 【プロトコール】

### A. プライマー設計の注意点



- $T_m$  値について  
プライマーの  $T_m$  値は  $>60^\circ\text{C}$  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。



### C. PCR の注意点



- DNA ポリメラーゼについて  
ポリメラーゼによっては、バッファーに含まれる塩類等が後のヌクレアーゼ処理を阻害する場合がございます。詳しくはトラブルシューティングをご覧ください。(P.5)
- PCR 産物について  
PCR 産物がシングルバンドで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。
- DNA 濃度について  
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。  
※ 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 <sup>※1</sup>	>100ng <sup>※2</sup>
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°C	5 min	—
95-85°C	—	-2°C/sec
85-25°C	—	-0.1°C/sec
4°C	—	Hold

次の操作まで時間がかかる場合は-20°C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°C、30 分間インキュベートします。

3) 穏やかに混合、スピンドウンし、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】

### 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。
	ポリメラーゼによる、切断ができなかった場合、下記をお試しください。 ・アニーリング溶液を調製する際に、反応系に加える PCR 産物量を 2uL 以下としてください。 ・PCR 産物の精製を行ってください。エタノール沈殿を行う場合はエタノールが混入しないように気を付けてください。
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。

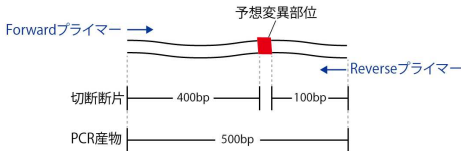
## 【実施例 1】

### ・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 5 $\mu$ L 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 $^{\circ}$ C、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 1 $\mu$ L に超純水 4 $\mu$ L、6 $\times$ サンプルバッファー 1 $\mu$ L 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/ $\mu$ L 以上の濃度であることが確認できました(図 1)。

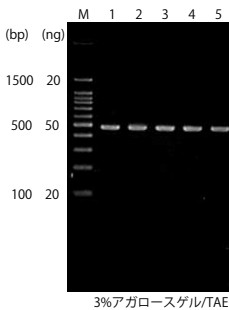


図 1 . PCR 産物の電気泳動結果  
M : XL-DNA Ladder100 (Cat No. KE-2310)  
1~5 : サンプル No.

・ヌクレアーゼ処理・検出

PCR産物 5 $\mu$ L に PCR grade Water 11 $\mu$ L、Re-annealing buffer 2 $\mu$ L 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 18 $\mu$ L を 9 $\mu$ L ずつに分け、一方に 1 $\mu$ L のヌクレアーゼを加え(酵素消化+)、もう一方には 1  $\mu$ L の超純水を加えて(酵素消化-)、ピペッティングにより十分混合後、37 $^{\circ}$ C、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 $\times$ サンプルバッファー2 $\mu$ L 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。

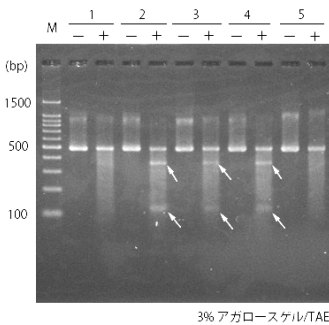


図 2. ヌクレアーゼ処理後の電気泳動結果  
M : XL-DNA Ladder100 (Cat No. KE-2310)  
1~5 : サンプル No.  
- : 酵素消化(-)  
+ : 酵素消化(+)  
矢印で切断された断片を示した。



## 【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 Water 11uL、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-)、ピペ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)。

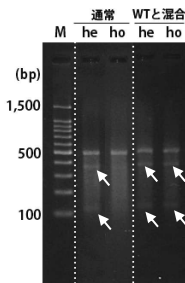


図 3. ヌクレアーゼ処理後の電気泳動結果  
M : XL-DNA Ladder100 (Cat No. KE-2310)  
通常：通常の方法  
WT と混合：WT と混合して再アニーリングした方法  
he：ヘテロ変異体  
ho：ホモ変異体





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