

## シーケンス解析

Chie Mori 110830

現在はシーケンサー本体の性能が向上しているため 1/8 プロトコールを使用している。

- 1 サンプルあたりの推奨テンプレート量
  - ss DNA 25-50ng
  - ds DNA 150-300ng
  - PCR Products 100-200bp 1-3ng
  - PCR Products 200-500bp 3-10ng
  - PCR Products 500-1000bp 5-20ng
  - PCR Products 1000-2000bp 10-40ng
- 2.5xBuffer
  - 200mM Tris-HCl pH9.0
  - 5mM MgCl<sub>2</sub>

## シーケンスサンプル調整

反応液の調整

template DNA	1.0	μl
primer (5pmol)	1.0	μl
BigDye Terminator v3.1	1.0	μl
2.5xBuffer	1.0	μl
DW	1.0	μl
total	5.0	μl

反応条件

[96°C	1	minute]
↓		
96°C	10	seconds
50°C	5	seconds 25cycles
60°C	4	minutes
↓		
4°C		

## 反応液の精製

サンプルが少数の場合は CentriSep スピンカラムを使用する

1. CentriSep スピンカラムに D.W.を 800 μl 加え、カラムを膨潤させる（上下攪拌しカラムに

気泡が入らないようにする)。室温で30分以上おく。

2. 上のキャップ、下のキャップをはずして D.W.をゲル表面まで自然落下させる。この時なかなか D.W.が落ちないときがあるが、このような時は親指の腹でカラムの上をぎゅっと押さえつけて最初の1滴を出す。最初の1滴が出れば後はちゃんと出てくる。
3. ウォッシャーチューブ内の液を廃棄し、2500rpm で2分遠心する（カラムの向きを揃えること）。
4. 5  $\mu$ l の PCR 反応液に DW を 20  $\mu$ l 加える。
5. カラムを 1.5ml tube にセットし PCR 反応液をカラムに添加し（カラムの中心部に流す）、2500rpm で2分遠心する（一回目の遠心とカラムの向きを揃えること）。
6. tube に集められた溶液はそのままシーケンスのサンプルとして使える。
7. 精製したサンプルは専用の 98 穴プレートにのせる。

サンプルが多数の場合は CentriSep 8 を使用する

1. 8 連カラムの底部をハサミで切り落とし、上部のシールをはがす。
2. 2500rpm で2分間遠心する。
3. 5  $\mu$ l の PCR 反応液に DW を 20  $\mu$ l 加える。
4. 8 連カラムの下に 8 連チューブをセットし、2500rpm で2分遠心する。
5. tube に集められた溶液はそのままシーケンスのサンプルとして使える。
6. 精製したサンプルは専用の 98 穴プレートにのせる。

## ABI 3130xl の準備

1. 付属の PC を起動させてから、本体を起動させる。本体の表示ランプが緑色になったら Run 3130 Date Collection v3.1 のソフトをスタートさせる。
2. ソフトウェア画面左側カラム ga3130xl 内の plate manager を選択して以下を選択する。  
sample name : サンプルの名前  
Result Group : Seq\_Results\_Group  
Instrument Protocol : FastSeq50\_POP\_7\_BDv3.1 (Run 時間 75 分 650bp 程度)  
StdSeq50\_POP\_7\_BDv3.1 (Run 時間 150 分 900bp 程度)  
Analysis Protocol : KB\_POP7\_BDv3.1
3. 本体にプレートをセットする。
4. ソフトウェア画面左側カラム 75C7F11(PC の名前) 内の Run Schedule で使用するサンプルシートを選び、プレートとリンクさせる。
5. Instrument Status に移動し、画面左側上部、緑色の  $\Delta$  をクリックして Run をスタートさせる。