

シーケンス反応

PCR 産物からポリメラーゼ連鎖反応法を利用して蛍光色素を付加した産物を得る。これを電気泳動することで塩基配列決定を行う。ここでは ABI の BigDye Terminator v3.1 キットを使った 10ul 反応系で説明する。

PreMix の希釈について

反応に使用する PreMix はバッファが 2.5x の濃度で調製されている。これに適当な量の 2.5x バッファ (付属の 5x バッファを使うか、10x シーケンスバッファを作成して使う) を加えることで希釈可能。濃度を 1/16 まで薄めて 10ul 反応系にすることで 1/32 の消費量での反応が可能。濃度 1/8 PreMix を 10ul 反応系にして消費量 1/16 にしてももちろん構わない。

必要なもの

- ・ 適当なチューブ 1 本
- ・ 600ul チューブ 1 本 or 8 連チューブ 1/8 本 /sample
- ・ Big Dye Terminator v3.1 PreMix (PreMix 0.5ul + 10x シーケンスバッファ 0.875ul + ミリ Q 2.625ul) 4ul /sample
- ・ 10uM Sequencing Primer 0.5ul (5pmol) /sample
- ・ ミリ Q 3.5ul /sample
- ・ 鋳型 DNA 水溶液 2ul (10ng/100bp になるように調整)

鋳型以外を混合後、粘性が少々高いため分注する際に若干多めに取ってしまいやすいのと、サーマルサイクラーでの反応時の蒸発を考慮して 1 サンプル当たり 0.25ul、8 サンプル当たり 2ul ミリ Q を多めに加えると、分注で液が不足するのを防ぐことができる。

手順

1. 鋳型 DNA 以外の試薬を適当なチューブで混合
2. 鋳型 DNA をサーマルサイクラーにセットするチューブに入れる
- 3.1 で混合した試薬を 2 に分注する
4. サーマルサイクラーにセットして反応

典型的な反応サイクル

- 1.96 1m
- 2.96 10s
- 3.50 5s
- 4.60 4m 2 へ 30 回
- 5.4 で hold

600ul チューブの場合は熱伝導に時間がかかるので 96 20s、50 15s、60 4.5m にする。

反応後の精製

以下は 10ul 反応系の場合である。

- 1.125mM EDTA 1ul と 3M 酢酸ナトリウム pH5.2 1ul を加える

- 2.100% エタノール 25ul を加える
3. 転倒混和して 15 分以上室温で放置
- 4.20,000 × g で 15 分以上遠心 (低温でブレーキ弱推奨)
5. プレート遠心機による排液
- 6.70% エタノール 50ul でリンス
- 7.20,000 × g で 5 分以上遠心 (常温)
8. プレート遠心機による排液

精製後の処理

1. 乾燥
- 2.Hi-Di ホルムアミド 15ul を加えてサンプルを溶解 (この状態で冷蔵なら 1 週間、冷凍なら 1ヶ月まで遮光保存可能)
3. サーマルサイクラーなどで 95 2m 加熱
4. 氷冷 (アルミ製のチューブラックを冷凍しておくとい)
5. サンプルチューブに移して専用のセプタでフタをする
6. サンプルトレイにセットしてシーケンス