

■ DNA シーケンス反応・精製プロトコール

(Big Dye Terminator サイクルシーケンシングプロトコール)

使用キット: Applied Biosystems Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

シーケンスを行いたいサンプルとプライマー及びプレミックスを以下の組成で調製します。

・バッファー (Big Dye Sequencing Buffer)	3.5µl
・プライマー	3.2 pmol
・テンプレート DNA (dsDNA or PCR 産物)	X ng*1
・プレミックス (BigDye Terminator v3.1Cycle Sequencing Kit Code No. 4303152)	1.0µl
滅菌水にて 計 20µl にメスアップ	

サンプルを泡立てないようにゆっくりと混和させ、以下の条件でサーマルサイクラーにセットし、PCR 反応(*2、*3)を行います。

96°C 1分*4

↓

96°C 10秒
50°C 10秒
60°C 4分

— 25 サイクル

↓

4°C

シーケンス反応後、サンプルの精製を行い、反応で取り込まれなかった色素を取り除く必要があります。(下記参照)

「注意点」

*1 サンプルのサイズに応じて使用量を決めます。プラスミド DNA6,000bp で 100ng (アガロース電気泳動の濃度で) 使用します。

*2 この PCR 温度条件は、ABI GeneAmp PCR システム モデル 9600,9700,2400,2700 を用いた場合の設定値です。各社サーマルサイクラーがありますが、各社でスロープの違いがありますので温度条件、反応時間等をご検討ください。またアニーリング温度は 50°C となっていますが、シーケンスがうまく読めない時や二重構造があつて途中でシーケンス反応がガクッと止まってしまう時は、Tm 値から判断して変更してみてください。

*3 ミネラルオイルを使用する機種はサイクルが終了したらミネラルオイルをパラフィルムなどで除いてください。

*4 ヒートブロックが 90°C 以上になってからチューブを差し込みます。

[サンプルの精製方法]

以下に挙げるいずれかの方法でサンプルを精製してください。エタノール沈殿を用いた方法では一部フリーの蛍光 Terminator が残ることがあります。

(I) スピンカラム(Centri-Sep: ABI P/N 401762, 401763) を利用した方法

- 1) カラム内へ滅菌水 800 μ l を加える。
- 2) 2 時間以上静置し、乾燥したゲルを十分に水和させる。その後、ボルテックスで攪拌する。
- 3) カラムに気泡がないことを確認する。(気泡がある場合は、カラムを軽くたたくことにより除去する)。
- 4) 上のキャップ、下のストッパーの順に外す。(キャップは必ず上から外します。下を先に外してしまうとゲル内に気泡が入ってしまいます。)
- 5) ウォッシャーチューブをセットする。
- 6) カラム内の滅菌水をゲル表面まで自然落下させる。
- 7) 捕集した滅菌水を捨てる。
- 8) 再びウォッシャーチューブをセットする。
- 9) 730 x g (2,500 rpm) で、2 分間遠心する。(遠心機にセットする方向はいつも同じにし、325 x g ~ 730 x g で遠心します。2 分間以上遠心しないようにします。また、735 x g 以上で遠心しないようにします。)
- 10) サンプルチューブをセットする。
- 11) 反応液 20 μ l をカラムの中央にアプライする。(チューブの壁などに触れないように注意します。反応液が壁に付いた場合、フリーの蛍光 Terminator が残る原因になります)。
- 12) 730 x g (2,500 rpm)、2 分間遠心する。
- 13) サンプルチューブに回収されたサンプルを Speed vac などを用いて乾燥させる。

(II) エタノール沈殿を利用した方法

- 1) 20 μ l 反応液に 2 μ l の 125mM EDTA を各ウェルに添加する。(加える時には、サンプルに直接混ざるように入れること)
- 2) 2 μ l の 3M の酢酸ナトリウムを各サンプルに添加する。(加える時には、サンプルに直接混ざるように入れること)
- 3) 50 μ l ~ 60 μ l の 100% のエタノール(室温*1)を添加する(2.5vol)。
- 4) 5 ~ 6 回転倒混和して十分に攪拌する。
- 5) 室温で 15 分間インキュベートする。
- 6) 15,000rpm で 20 分室温*1 で遠心する。
 - ・沈殿は見えないので、キャップの根元に沈殿がくるように遠心を行う。
 - ・p200 のピペットマンで、根元とは逆の方から上清をすばやく取り除く。
- 7) その沈殿に 70 μ l のフレッシュな 70% エタノール(室温*1)を加える。
- 8) 15,000rpm で 5 分室温*1 で遠心する。
- 9) p200 のピペットマンで、根元とは逆の方から上清を丁寧に取り除く。*2
- 10) 上清を取り除いた後、37 $^{\circ}$ C で 2 分乾燥する。(アルコールのにおいがしない事を確認する*3)
- 11) シーケンサーにかける時まで遮光して -20 $^{\circ}$ C で保存。

「注意点」

*1 エタノールと遠心機は室温で使用してください。冷えているとフリーの蛍光 Terminator が落ちてきて、塩基配列の特定の箇所が読みにくくなります。

*2 上清を残さないように注意深く吸い取って下さい。

*3 アルコールはシーケンサーの電気泳動を阻害します。タッピングして少しも水分がないこと(アルコールのにおいがしないこと)を確認して下さい。