

Ampdirect を用いて得られた PCR 産物のダイレクトシーケンス

【用意するもの】

機器・機材

- サーマルサイクラー (ASTECC PC-808)
- Thermo-Fast 96,Low Profile (ABgene AB-0700)
- Domed Cap Strip(ABgene AB-0602)
- シークエンス用 ultraAmp Semi-Skirted PCR Plate 96-well(日本ジェネティクス 35841)
- SPRIPlate 96R マグネットプレート(日本ジェネティクス, AG000219)
- ABI Prism 3100 ジェネティックアナライザ(日本ジェネティクス ABI3100)

試薬

- ExoSAP-IT(amersham pharmacia biotech, US78202)
- Clean SEQ(日本ジェネティクス, AG000121)
- Big Dye Terminator v1.1 (Applied Biosystems, 4337450)
- Big Dye Terminator v3.1(Applied Biosystems, 4337455)
- Big Dye Terminator v1.1/v3.1 Sequencing Buffer(5×) (Applied Biosystems, 4336697)
- Genetic Analyzer Buffer with EDTA(Applied Biosystems, 402824)
- 100%エタノール(ナカライテスク, 14713-95)
- プライマー
- テンプレートDNA(PCR 産物)

【参考文献】

- (1) 細胞工学 別冊 バイオ実験イラストレイテッド(秀潤社)
- (2) 細胞工学 別冊 PCR Tips(秀潤社)
- (3) 3100/3100-Avant ジェネティック アナライザユーザーガイド(Applied Biosystems)
- (4) ナカライテスク 総合カタログ(ナカライテスク)

【更新履歴】

2006/8/9 Nakanishi

Ampdirect を用いて得られた PCR 産物のダイレクトシーケンス

【プロトコール】

①PCR

FTA カードと Ampdirect を用いたジェノタイピング方法プロトコール参照

http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/serikawas%20Lab/Protocols/Genotyping%20with%20FTA%20and%20Ampdirect_050516.pdf

②ExoSAP-IT による過剰プライマーの除去

1. PCR 産物をサイズマーカーと共に電気泳動して大まかな DNA 含量を調べる。

2. 以下の組成表をもとに PCR 産物に ExoSAP-IT を加える。

1 sample あたり

PCR 産物	3 μ l
ExoSAP-IT	1 μ l
H ₂ O	2 μ l

3. サーマルサイクラーにて以下の条件設定でインキュベートする。

Cycling conditions:

37°C for 15 min

80°C for 15 min

③サイクルシーケンス

1. 以下の組成表をもとにサイクルシーケンス反応溶液 (10 μ l) を調整する。

試薬	濃度	容量
Big Dye Terminator V1.1/V3.1	2.5×	0.25 μ l
Big Dye Sequencing Buffer	5×	1.875 μ l
primer	-	3.2 pmol
PCR 産物	-	20-50 ng
H ₂ O	-	to 10 μ l
Total		10 μ l

2. 以下の条件設定でサイクル反応させる。

Cycling conditions:

40 cycle

95°C for 10 sec

50°C for 5 sec

60°C for 2 min.30 sec

Ampdirect を用いて得られた PCR 産物のダイレクトシーケンス

④Dye-Terminator の除去

1. サイクルシーケンス産物が入ったプレートに Clean SEQ 10 μ l を添加する。
(注1: Clean SEQ のボトルを振り、ビーズを懸濁させる。)

2. 以下の表を参照の上、85%エタノールを添加する。

反応産物の容量 (μ l)	85%エタノール容量 (μ l)
5	31
10	42
15	52
20	62

3. ピペッティングを 7~10 回行う。
(注 2: 溶液が均一に薄茶色になるように混合する。)
4. SPRIPlate 96R マグネットプレート上に3分間置き、ビーズを分離させる。
5. 上清を反応プレートから吸引し、廃棄する。
(注 3: ウェルの底から吸引し、ビーズを吸い込まないように気をつける。)
6. 85%エタノール 100 μ l を添加し、30 秒静置する。
(注 4: 洗浄は 30 秒以上静置しても構わない。)
7. すべての溶液を吸引し、廃棄する。
8. 室温で 10 分間、乾燥させる。
(注 5: 過度の乾燥は反応産物の分解を生じる恐れがある。)
9. プレートを SPRIPlate 96R マグネットプレートから取り外し、滅菌水を 40 μ l 添加する。
10. 室温で 5 分間静置し、完全に溶出する。
11. 再びプレートを SPRIPlate 96R マグネットプレート上に 1 分間置き、ビーズを分離させる。
12. ローディング用に、上清のサンプル 35 μ l を新しいシーケンサー用プレートへ移す。
13. ABI Prism 3100 ジェネティックアナライザにてシーケンシング解析する
(参照: 3100/3100-Avant ジェネティック アナライザユーザーガイド)