Ampdirect を用いて得られた PCR 産物のダイレクトシークエンス

【用意するもの】

機器・機材

- サーマルサイクラー（ASTEC 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クエンス

【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	3μl
ExoSAP-IT	1μl
H_2O	2μl

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℃ for 15 min

   80℃ for 15 min

③サイクルシークエンス

1. 以下の組成表をもとにサイクルシークエンス反応溶液(10μl)を調整する。

試薬	濃度	容量
Big Dye Terminator V1.1/V3.1	2.5×	0.25μl
Big Dye Sequencing Buffer	5×	1.875μl
primer	-	3.2pmol
PCR 産物	-	20-50ng
H_2O	-	to 10μl
Total		10μl

2. 以下の条件設定でサイクル反応させる。

   Cycling conditions:

   40cycle

   95℃ for 10sec

   50℃ for 5sec

   60℃ for 2min.30sec

Ampdirect を用いて得られた PCR 産物のダイレクトシークエンス

④Dye-Terminator の除去

1. サイクルシークエンス産物の入ったプレートに Clean SEQ 10μl 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(μl)	85%エタノール容量(μl)
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 100μl 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 40μl 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 35μl を新しいシークエ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クエンシング解析する
    (参照: 3100/3100-Avant ジェネティック アナライザユーザーガイド)