

DNA シーケンス受託解析について 生化学解析センター

ABI 3130 Genetic Analyzer を利用した場合: 4 サンプルを 1 セットとして解析しますので、4 サンプルに充たない場合には他の依頼者のサンプルと併せて解析を行う場合があります。ご理解いただけますようお願いいたします。

ABI 3500 Genetic Analyzer を利用した場合: 24 サンプルを 1 セットとして解析しますので、24 サンプルに充たない場合には他の依頼者のサンプルと併せて解析を行う場合があります。

テンプレート DNA PCR からの依頼に関しまして、GC または GT リッチなテンプレートのシーケンス用に ご利用頂ける dGTP v3.1 Cycle Sequencing Kit を用意しました。

依頼者が鋳型 DNA とプライマーの混合物を作成して依頼する場合

1. 試料を入れる容器

試料は BigDye 試薬添加後、TaKaRa PCR Thermal Cycler TP-600 装置で反応させますので、0.2 ml 8 連 PCR チューブまたは、96 穴 PCR プレートを用意して下さい。

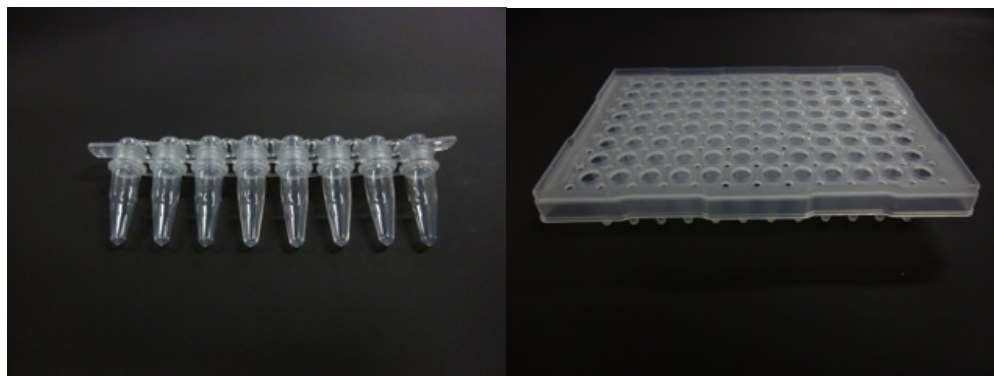
未反応 Dye を除くために磁気ビーズ法を添加後、混合のため vortex mixer を使用しておりますので、単独チューブや切り離したチューブでは跳ね飛んでしまうため 8 連チューブをそのまま切り離さずに提出願います。

8 連チューブ側面には、依頼書の No.(番号)をご記入下さい。

8 連 PCR チューブ

96 穴プレート

(キャップはドーム型でもフラット型でも可)



2. 鋳型 DNA とプライマー混合物作成手順 (依頼者が準備するもの)

2-1. プラスミド DNA の場合: シリカ系プラスミド DNA 精製キットで精製した DNA を推奨。

PCR 産物の場合: シリカ系 PCR 産物精製キット等を利用して精製した DNA を推奨。

2-3. 鋳型 DNA の量: プラスミド DNA の場合には、塩基長 $\times 0.1\text{ng}$ (例 5 kb のプラスミド DNA の場合、 $5,000 \times 0.1 = 500\text{ng}$) を計算式として使用する。

2-4. プライマーの量: 2.5 pmol 使用する。

2-5. 最終的に水を加え、6 μL にする。

鋳型 DNA	xx μl
primer	xx μl
dd H ₂ O	xx μl

total 6 μL

(センターでは、4 μL の反応 mixture を加えて PCR を行う)

3. 解析依頼書類関係

3-1. 試料は解析依頼書の書式に従って記入してください。

3-2. 解析依頼書を生化学解析センター生化学宛メール (seika-kaiseki@mail1.id.yamagata-u.ac.jp) にお送り下さい。講座名、依頼者名を記載したボックス(下記、写真 1 参照)に試料を入れ、がん研究センター4階オープンレンタルラボの指定冷蔵庫に入れてください(右写真参照)。解析依頼書のコピーをあわせてご提出ください。

医学部外の方は学内メール便等を利用して生化学解析センター宛送付願います。



試料入れボックス(各自でご用意下さい) 講座名、依頼者名、内線番号をご記入下さい(下写真参照)。ボックスは終了後解析依頼書を入れた箱の横に置いておきますので、お持ち帰りをお願いします。

3-3. データの返還: データは解析終了後、メール添付書類(zip 圧縮ファイル)としてメールで送付します。



4. センターで使用する基本反応条件

プラスミドおよび PCR 産物の配列解析反応試薬として、BigDye 3.1 を使用しています。

ご要望に応じて、GC または GT リッチなテンプレートのシーケンス用試薬 dGTP v3.1 Cycle Sequencing Kit での反応、解析も承ります。

4-1. プラスミドおよび PCR 産物で 400-850 塩基程度解析する場合の基本反応 mixture の組成 (1/8 希釈) Pre-Mix 1.0 μ L + 2.5 x dilution buffer 3.0 μ L

4-3. 状況によっては上記反応条件を変更する場合があります。

4-4. dilution buffer (5 x) 組成

350 mM Tris HCl (pH 9)、2.5 mM MgCl₂

下記、市販試薬を混合したものを使用する。(反応確認済み)

(1) Trizma Pre-set crystals (pH 9.0) Sigma T9693-100G

(2) Magnesium chloride 1.0M solution Sigma M1028-100ML

4-5. サイクルシーケンス反応 (Thermocycling steps、ABI Veriti)

96°C 1 min → (96°C 10 sec, 50°C → 5 sec 60°C → 4 min) x 25 times → 25°C forever

4-6. 未反応 DyeTerminate 除去

Agencourt 社、CleanSEQ(磁気ビーズ精製法)を使用する。

5. 受託解析料金(解析費用は使用する試薬・器材価格の変動、手法の変更など必要に応じて見直しを行い変更する場合があります。)

個別料金についてはお問い合わせ下さい (山形大学内限定)。