

シーケンス

準備するもの

【器具】

- ・ PCR 機 (Takara PCR Thermal Cycler など)
- ・ PCR 用チューブ
- ・ ヒートブロック
- ・ オートシーケンサー (ABI 310 など)

【試薬】

- ・ BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems)
- ・ 任意のプライマー (1.6 μ M)
- ・ Hi-Di (ホルムアミド溶液)
- ・ 100% EtOH, 70% EtOH
- ・ milliQ

プロトコール

<シーケンス反応>

目的の遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を調製する。DNA は 1 サンプルにつき ~500ng 必要。

下の様に反応液を混合する。

プラスミド DNA	~500ng
プライマー (1.6 μ M)	1 μ l
Big Dye premix	2 μ l
Buffer	1 μ l
MQ	5 μ l
Total	10 μ l

下のサイクルで PCR 反応を行う。

Takara PCR Thermal Cycler の場合

96	1 分	1 サイクル
96	30 秒	
50	15 秒	
60	2 分	25 サイクル

PCR が終了したら、反応液に 100% EtOH 64 μ l、MQ 26 μ l を加えよく攪拌し、室温で 15 分静置する。

15,000 rpm、15 分間、室温で遠心分離し、上清を捨てる。

70% EtOH 100 μ l を加え、15,000 rpm、10 分間、4 で遠心し、上清を捨てる。

沈殿を乾燥させ、Hi-Di 20 μ l を加え、ピペッティングにより沈殿を溶解させる。

95、2 分間加熱し、すぐに氷中に戻す。

オートシーケンサー (ABI 310) にかける。