

# DNAシーケンス業務

## サンプル調製方法

2008.06.05

- 業務内容: 4色蛍光ダイターミネーター法を用いたサイクルシーケンス法による解析を行います。
- 使用機種: ABI PRISM 310
- 納品: 解析結果のデータをメールで納品します。また、ご希望に応じて結果のプリントアウトを納品することも可能です。

### 価格・納期

- ・ 1サンプル 2,500 円/解析 納期: 約 2 週間
- ・ 20解析セット 40,000 円 (1 解析当り 2,000円) 納期: 約 1 ヶ月
- ・ 泳動のみ 800 円/解析

### 注意

20解析セット価格の適用は、すでに数サンプルについて良好な結果が得られており、20サンプルまとまった状態で一度に提出できる場合に限りま。

Forward、Reverse両方向の解析については、2解析分の料金となりますのでご注意ください。解析可能な鎖長は約600bpを目安としてください。納品するデータは、結果のいかににかかわらず料金を徴集させていただきます。できるだけ良好な結果を納品するため、下記の条件を満たしたサンプルとなるようお願い致します。ご不明な点については多少にかかわらずセンターまでお問い合わせください。

### 精製

精製度が低い場合は、cccDNAにocDNAやlinearDNAが加わります。PCR産物の場合、未反応プライマーを除去するためにDNAを精製してください。いずれの場合も精製方法についての情報を依頼書に記載して下さい。尚、PCR産物のダイレクトシーケンスの場合は、フィルター、ゲルからの切り出し等による精製を行ったものをご提出ください。クローニングサンプルの場合は通常のミニプレ法による調製後ご提出ください。フィルター等を用いた場合はその旨を記載してください。市販の精製キットを使った場合はメーカーと品名だけの記載でも結構です。

### 泳動のみ

依頼者がシーケンス反応と精製を行い、センターでは文字通り泳動のみ行うオプションです。シーケンス反応はABIのBigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kitを使用して下さい。他の試薬を使用する場合はシーケンサに対応する特性データの供給が必要になりますので、事前にご相談ください。

サンプルの電気泳動写真からは、以下のことを確認させていただきます。

#### 1) 純度

クローニングサンプルの場合、サンプル中にRNAや目的以外のDNA断片が含まれていないことを確認します。また、プラスミドにニック（切れ目）が入っていると反応

が阻害されるので解析不能の原因となります。ニックが入っていないcccDNAが、最もシーケンスに適しています。提出して頂いたサンプルがどれくらいcccDNAを含んでいるかを確認します。

## 2) サンプル量

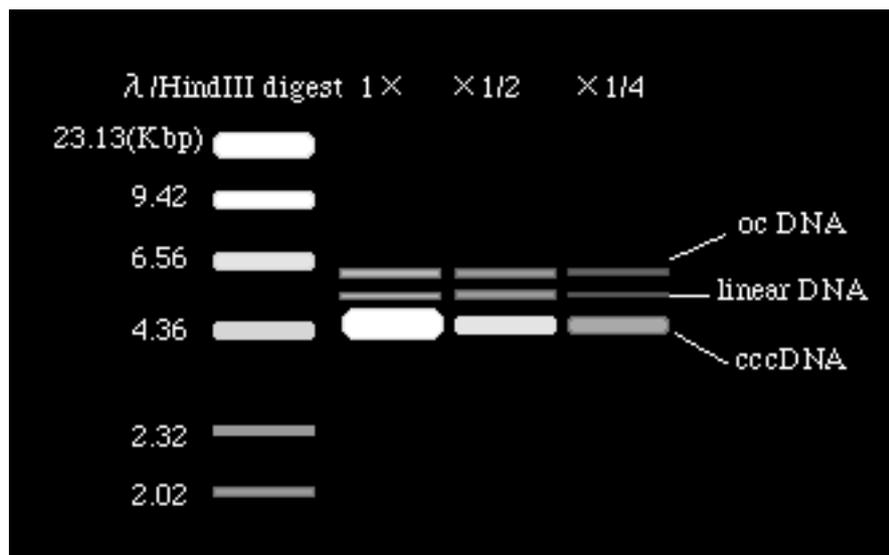
一般に、分光光度計で測定されたDNA濃度は機種や計算式などの違いによって誤差を生じる場合が多いため、サンプルの濃度はバンドの濃淡によって判断することが必要となります。サンプル濃度は以下の手順を参考に調製してください。

サンプルを適量のバッファーに溶解し、1倍、2倍、4倍希釈したものを濃度の分かっているマーカーとともに下図のように電気泳動してください（制限酵素処理は必要ありません）。目的バンド（cccDNA）に最も近い分子量マーカーのバンドの比から目的バンドのDNA量を推定します。マーカーはなるべくサンプルと同じ位置に来るサイズのDNA断片を含むマーカーを使ってください（クローニングサンプルの場合は量が正確に分かっているプラスミドを用いても結構です）。

目的のバンドに最も近い分子量マーカーのバンド（例えば4.36Kbp）のDNA量( $\mu\text{g}$ )を計算します。800ng/ $\mu\text{l}$ のマーカーを10 $\mu\text{l}$ アプライした場合、マーカー全体のDNA量は8 $\mu\text{g}$ となります。これに4.36Kbp/47.81Kbp（目的バンド付近のバンド/ $\lambda$ DNA全長）を掛けると約0.7 $\mu\text{g}$ となります。この値を基準にして見た目の濃さからサンプルの濃度を推定します。数種類の希釈系列の中で、下記の濃度範囲にあるものをサンプルとして以下の電気泳動写真と共にご提出ください。

### サンプルの濃度範囲

- ・クローニングされている場合 1.5 $\mu\text{g}$  (溶液の場合、濃度範囲：100～1000ng/ $\mu\text{l}$ )
- ・PCR産物の場合（鎖長に合わせ、以下を目安にしてください）
  - 100bpの場合 30ng（溶液の場合、濃度範囲：1～10ng/ $\mu\text{l}$ ）
  - 500bpの場合 150ng（溶液の場合、濃度範囲：10～100ng/ $\mu\text{l}$ ）



$\lambda$ DNA全長：23.13+9.42+6.56+4.36+2.32+2.02=47.81(Kbp)

アプライ量：800ng/ $\mu\text{l}$ ×10 $\mu\text{l}$ =8 $\mu\text{g}$

4.36KbpバンドのDNA量：8 $\mu\text{g}$ ×4.36/47.81=0.7 $\mu\text{g}$

### シーケンスプライマー

1pmol/ $\mu$ lで約50 $\mu$ lご用意ください。また、塩基配列を依頼用紙備考欄にご記入ください。プライマーが残った場合は返却可能です。尚、pUC系ベクター、Bluescript系ベクターなどを用いてクローニングされたサンプルの場合は、以下のシーケンスプライマーをセンターで用意します。

#### pUC系：

RV-M	5' GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG 3'
M4	5' CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC 3'

#### Bluescript系：

T3	5' ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA 3'
T7	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'

#### pGEM系：

-21M13	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3'
sp6	5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG 3'

### 5) DNAシーケンスデータ表示用ソフトについて

センターがお送りしたデータファイルは、ABIの純正表示ソフトEdit view もしくは互換の各種Viewerで見ることができます。医学部キャンパスではファイル共有サーバBISONの「\shisetsu\総合分析実験センター\機能解析分野\センターアプリ\DNAシーケンスデータ表示用ソフト\」に代表的なものを置いてありますので、手元にコピーしてお使いください。各ソフトのインストール条件や使用方法については、それぞれの作者に直接問い合わせをお願いします。