

シーケンス

・シーケンス反応

2.5x Seq Mix (Big Dye Terminator) 0.25 μ l

5x Seq Buffer 1.875 μ l

1 mM Primer (プライマーの希釈は TE ではなく MiliQ) 3.2 μ l

DW 3.675 μ l

Plasmid 1 μ l (DW とプラスミドの量は調整可)

計 10 μ l

↓

サーマルサイクラーで以下の条件で反応させる

96°C 1 min

(96°C 10 sec, 50°C 5 sec, 60°C 4 min) \times 35 cycle

4°C ∞

・エタ沈

0.6 ml チューブに

3 M NaOAc pH 5.2 1 μ l

125 mM EDTA 1 μ l

100%エタノール 25 μ l を別々に加える (Mix を作ると沈殿を生じてしまう)

↓

チビタンで遠心し、液を底に落とす

↓

ボルテックス

↓

サンプルを加える

↓

ピペッティング

↓

10~15 min 室温静置

↓

4°C 14,000 rpm 20 min で遠心

↓

上清を捨てる (絶対に沈殿を吸わないように)

↓

70%エタノールを 100 μ l 加える

↓

転倒混合

↓

4°C 14,000 rpm 20 min で遠心

↓

上清を捨てる

↓

乾燥させる

・シークエンス直前

HIDI ホルムアミド 20 μ l 加える

↓

チビタンで遠心し、液を落とす

↓

しっかりとボルテックス

↓

100°C 30 sec

↓

氷上で急冷

↓

ボルテックス

↓

チビタンで遠心

↓

96 穴プレートに移す

※蓋に触らない、触るときは手袋着用

※4 の倍数に満たない際は、HIDI ホルムアミドを入れ、合わせる

↓

シークエンサーへ