

The *gpt* Assay of *gpt* delta Transgenic Mouse

(Ver. 2.1 / 1998.09.01)

大腸菌 *gpt* 遺伝子は guanine phosphoribosyltransferase をコードしており、野生型 *gpt* 遺伝子を持つ大腸菌は 6-thioguanine 存在下では生育できない。しかし *gpt* 遺伝子に変異を持つ大腸菌は 6-thioguanine を含む培地上でコロニーを作ることができる。したがって *gpt* 遺伝子に変異を持つ大腸菌をポジティブに選択することが可能である。

gpt 遺伝子のコード領域は 456 塩基対であり、DNA シークエンスによる迅速な変異部位の同定に適している。

gpt delta マウスでは、トランスジーンとして組み込んだ EG10 DNA 上に大腸菌 *gpt* 遺伝子が存在する。EG10 を *in vitro* パッケージングによりファージ粒子として回収した後、Cre 部位特異的組み換え酵素を発現する大腸菌 YG6020 に感染させ、ファージからプラスミドに転換させた上で、プラスミド上の *gpt* 遺伝子に変異をもつ大腸菌を 6-thioguanine を用いて選択する。YG6020 株の染色体上の *gpt* 遺伝子は欠失している。

ここでは、*in vitro* パッケージング以降に必要なプロトコルについて解説した。

| | |
|---|-------|
| The <i>gpt</i> Assay of <i>gpt</i> delta Transgenic Mouse | ... 1 |
| パッケージング効率の測定 | ... 3 |
| 6 thioguanine selection による突然変異頻度の算出 | ... 5 |
| 6TG ^r 表現型の確認と菌体の保存 | ... 7 |
| 試薬・培地の調整法 | ... 8 |
| その他の試薬・器具 | ...11 |
| シークエンス解析による <i>gpt</i> 遺伝子の変異部位の同定 | ...12 |

[The ***gpt*** Assay of *gpt* delta Transgenic Mouse]

gpt マウスの臓器から **DNA を抽出する。**

***in vitro* packaging** によりトランスジーンをファージとして回収する。

mouse DNA(1.5 µg/µl) 5 µl, FTL 15 µl, SE 30 µl を混合し 37 °C、90 min インキュベーション

FTL 15 µl, SE 30 µl をあらたに加え 37 °C、90 min インキュベーション

SM buffer 400 µl を加え、使用時まで 4 °C で保存する。(final 約 500 µl)

6-thioguanine selection (6TG selection) により *gpt* 遺伝子に変異を持つ大腸菌を選択する。

Sequencing of *gpt* gene 変異部位を同定する。

< Time table >

(パッケージング効率の測定 (省略可*))

| | |
|-------|--|
| 第 x 日 | <i>gpt</i> mouse DNA の <i>in vitro</i> packaging |
| 第 1 日 | plate の作製 前培養の開始(<i>E.coli</i> C, YG6020) |
| 第 2 日 | 本培養の開始(<i>E.coli</i> C, YG6020) 菌液の調製(<i>E.coli</i> C, YG6020) infection plating incubation at 37 |
| 第 3 日 | plate (<i>E.coli</i> C) ブラークカウント |
| 第 4 日 | +Cm plate (YG6020) コロニーカウント |

(6TG Selection)

| | |
|-------|--|
| 第 x 日 | <i>gpt</i> mouse DNA の <i>in vitro</i> packaging パッケージング効率の測定 (省略可*) |
| 第 1 日 | plate の作製 前培養の開始(YG6020) |
| 第 2 日 | 本培養の開始(YG6020) 菌液の調製(YG6020) infection plating incubation at 37 |
| 第 3 日 | |
| 第 4 日 | LB+Cm plate コロニーカウント (after 48 hrs) |
| 第 5 日 | M9+Cm plate コロニーカウント (after 66 hrs) M9+Cm+6TG plate コロニーカウント (after 72 hrs) |

* パッケージング効率の測定は、6TG Selection の Titer(Survival)測定でも代用できるので省略可。

パッケージング効率の測定

in vitro packaging した sample は、*E.coli* C と YG6020 を用いてパッケージング効率の測定を行う。

ただし、6-thioguanine selection では mutant(6TG^r, Cm^r)の選択と titer(Cm^r)の測定を同時に行うので、ここに述べるパッケージング効率の測定は、あくまでパッケージングした DNA サンプル中に含まれるファージの数を事前に推定する、いわば「めやす」をつけるための試験である。したがって、ルーチンの試験を行い、パッケージングした DNA サンプルに含まれるファージ数がおおよそ見当がつくような場合には、6TG selection に先だつて行うパッケージング効率の測定は省略しても差し支えない。

(Time table)

| | |
|-------|--|
| 第 x 日 | <i>gpt</i> mouse DNA の <i>in vitro</i> packaging |
| 第 1 日 | plate の作製 (plate, +Cm plate, soft agar) 前培養の開始(<i>E.coli</i> C, YG6020) |
| 第 2 日 | 本培養の開始(<i>E.coli</i> C, YG6020) 菌液の調製(<i>E.coli</i> C, YG6020) infection plating incubation at 37 |
| 第 3 日 | plate (<i>E.coli</i> C) ブラークカウント |
| 第 4 日 | +Cm plate (YG6020) コロニーカウント |

{ 菌液の調製 }

packaging 効率の測定 (*E.coli*C と YG6020 使用) に用いる菌液を調製する。

| | |
|--|--|
| <p>{前培養} 小試験管に分注した 2 ml LB+maltose broth に <i>E.coli</i>C (or YG6020) を植菌する。 (YG6020 の場合は培地に 25 μg/ml kanamycin を加える。)</p> <p>37 で一晩振とう培養する。</p> <p>{本培養} 必要量の LB+maltose broth に前培養液を 1/40 vol. 植菌し、OD600=1.0 になるまで 37 振とう培養する。 (YG6020 の場合は培地に 25 μg/ml kanamycin を加える。) (OD600=1.0 に達するのに 3 時間前後かかる。)</p> <p>OD600=1.0 に達した培養液は、遠心(4000 × g, 10 min at 4) した後上清を除き、菌を 1/2 vol. の LB+10 mM MgSO₄ broth に懸濁する。(計算上は OD600=2 となる。)</p> <p>氷中に保存し、その日のうちに実験に使用する。</p> | <p>LB+maltose broth は、滅菌済みの LB broth に滅菌済みの 20%(w/v)maltose 溶液を 1/100 vol. (final conc. 0.2%) 加えて調製。</p> <p>packaging 効率の測定には packaged sample 1 本あたり 2 ml の本培養液を使用する。濁度測定用に多少の余裕をみておくこと。 本培養中に soft agar (50 に保温)、試験管、plate、遠心機、吸光度計、インキュベーター等の準備をしておく。</p> <p>LB+10 mM MgSO₄ broth は、LB broth に 1 M MgSO₄ 溶液を 1/100 vol. 加えて調製。</p> |
|--|--|

{ E.coliC を用いた packaging 効率の測定 }

| | |
|--|--|
| <p>小試験管に <i>E.coli</i> C 菌液 200 μl を分注する。 (2 本)</p> <p>LB+10 mM MgSO₄ broth で 20 倍に希釈した packaged sample を 2 μl 加え、vortex で混合する。</p> <p>incubation at 37 , 20 min (静置)</p> <p>(50 の water bath で保温中の) soft agar を 2.5 ml 加えて混合し、 plate にまく。(2 枚)</p> <p>soft agar が固まったら plate を倒置し、37 で培養する。(1 day)</p> <p>プラークをカウントする。</p> | <p>分注の直前に軽く vortex をかけて菌液を均一にする。</p> <p>0.5 ml エッペンチューブに LB+10 mM MgSO₄ broth 38 μl を取り、packaged sample 2 μl を加え vortex で混合する。</p> <p>滅菌済駒込ピペット (5 ml 容) を使用する。</p> <p>一枚の plate に sample 0.1 μl が入っている計算で、一回の packaging (500 μl) での回収 phage 数を計算する。 (一枚の plate あたりのプラーク数の平均値 \times 5000)</p> |
|--|--|

{ YG6020 を用いた packaging 効率の測定 }

| | |
|--|--|
| <p>小試験管に YG6020 菌液 200 μl を分注する。 (2 本)</p> <p>LB+10 mM MgSO₄ broth で 20 倍に希釈した packaged sample を 2 μl 加え、vortex で混合する。</p> <p>incubation at 37 , 20 min (静置)</p> <p>incubation at 37 , 30 min (振とう)</p> <p>(50 の water bath で保温中の) soft agar を 2.5 ml 加えて混合し、 plate にまく。(2 枚)</p> <p>soft agar が固まったら plate を倒置し、37 で培養する。(2 days)</p> <p>Cm^r コロニーをカウントする。</p> | <p>分注の直前に軽く vortex をかけて菌液を均一にする。</p> <p>0.5 ml エッペンチューブに LB+10 mM MgSO₄ broth 38 μl を取り、packaged sample 2 μl を加え vortex で混合する。</p> <p>滅菌済駒込ピペット (5 ml 容) を使用する。</p> <p>一枚の plate に sample 0.1 μl が入っている計算で、一回の packaging (500 μl) での回収 phage(plasmid)数を計算する。 (一枚の plate あたりのコロニー数の平均値 \times 5000)</p> |
|--|--|

6 thioguanine selection による突然変異頻度の算出

6TG Selection では、Titer(Survival)の測定と 6TG Selection を同時に行う。

(Time table)

| 第 x 日 | <i>gpt</i> mouse DNA の <i>in vitro</i> packaging |
|-------|--|
| 第 1 日 | plate の作製(LB+Cm plate, M9+Cm plate, M9+Cm+6TG plate, LB soft agar, soft agar, 6TG soft agar) 前培養の開始(YG6020) |
| 第 2 日 | 本培養の開始(YG6020) 菌液の調製(YG6020) infection plating incubation at 37 |
| 第 3 日 | |
| 第 4 日 | LB+Cm plate コロニーカウント (after 48 hrs) |
| 第 5 日 | M9+Cm plate コロニーカウント (after 66 hrs) M9+Cm+6TG plate コロニーカウント (after 72 hrs) |

{ 菌液の調製 }

6TG Selection (YG6020 使用) に用いる菌液を調製する。

| | |
|--|---|
| <p>{前培養} 小試験管に分注した 2 ml LB+maltose broth に YG6020 を植 菌する。 (培地には 25 μg/ml kanamycin を添加する。)</p> <p>37 で一晩振とう培養する。</p> <p>{本培養} 必要量の LB+maltose broth に前培養液を 1/40 vol. 植菌し、 OD600=1.0 になるまで 37 振とう培養する。 (培地には 25 μg/ml kanamycin を添加する。) (OD600=1.0 に達するのに 3 時間前後かかる。)</p> <p>OD600=1.0 に達した培養液は、遠心(4000 \times g, 10 min at 4) した後上清を除き、菌を 1/2 vol. の LB+10 mM MgSO₄ broth に懸濁する。(計算上は OD600=2 となる。)</p> <p>氷中に保存し、その日のうちに実験に使用する。</p> | <p>LB+maltose broth は、滅菌済 みの LB broth に滅菌済みの 20%(w/v)maltose 溶液を 1/100 vol. (final conc. 0.2%)加 えて調製。</p> <p>6TG selection には packaged sample 1 本あたり 6 ml の本培 養液を使用する。濁度測定用に 多少の余裕をみておくこと。</p> <p>本培養中に 6TG soft agar 用の 6TG 溶液を調製する。 soft agar (50 に保温)、 試験管、plate、遠心機、吸光 光度計、インキュベーター等の 準備をする。</p> <p>LB+10 mM MgSO₄ broth は、 LB broth に 1 M MgSO₄ 溶液 を 1/100 vol. 加えて調製。</p> |
|--|---|

{ Titer(Survival)の測定 }

| | |
|---|--|
| <p>小試験管 4 本に YG6020 菌液を 200 μ l 分注する。</p> <p>20 倍希釈した packaged sample を 2 μ l 加え、vortex で混合する。</p> <p>incubation at 37 , 20 min (静置)</p> <p>incubation at 37 , 30 min (振とう)</p> <p>(50 の water bath で保温中の) LB soft agar を 2.5 ml 加えて混合し、LB+Cm plate にまく (2 枚) 。</p> <p>(50 の water bath で保温中の) soft agar を 2.5 ml 加えて混合し、M9+Cm plate にまく (2 枚) 。</p> <p>soft agar が固まったら plate を倒置し、37 で培養する。(2 and 3 days)</p> <p>Cm^r コロニーをカウントする。 (LB+Cm plate は 48 時間後、 M9+Cm plate は 66 時間後にカウントする。)</p> | <p>分注の直前に軽く vortex をかけて菌液を均一にする。</p> <p>0.5 ml エッペンチューブに LB+10 mM MgSO₄ broth 38 μ l を取り、packaged sample 2 μ l を加え vortex で混合する。</p> <p>滅菌済駒込ピペット (5 ml 容) を使用する。</p> <p>培養開始時刻を記録しておく。</p> <p>一枚の plate に sample 0.1 μ l が入っている計算で、一回の packaging (500 μ l) での回収 phage(plasmid)数を計算する。 (一枚の plate あたりのコロニー数の平均値 \times 5000)</p> |
|---|--|

{ 6TG Selection }

| | |
|--|--|
| <p>小試験管 10 本に YG6020 菌液を 200 μ l 分注する。</p> <p>packaged sample 50 μ l を加え、vortex で混合する。</p> <p>incubation at 37 , 20 min (静置)</p> <p>incubation at 37 , 30 min (振とう)</p> <p>(50 の water bath で保温中の) 6TG soft agar を 2.5 ml 加えて混合し、M9+Cm+6TG plate にまく (10 枚) 。</p> <p>soft agar が固まったら plate を倒置し、37 で培養する。(3 days)</p> <p>72 時間後に 6TG^r, Cm^r コロニーをカウントする。</p> | <p>分注の直前に軽く vortex をかけて菌液を均一にする。</p> <p>sample(約 500 μ l)を全量使用し、10 本目は残とする。直前にチューブを flash 遠心しておくロスが少ない。</p> <p><u>soft agar に 6TG を加えておくのを忘れないこと!</u></p> <p>滅菌済駒込ピペット (5 ml 容) を使用する。</p> <p>培養開始時刻を記録しておく。</p> <p>10 枚の plate のコロニー数を合計し、一回の packaging (500 μ l) での 6TG^r mutant 数とする。</p> <p>4 日以上培養すると小さいコロニーが多数現れるが、これらは <i>gpt</i> 遺伝子に変異を持たないコロニーなので数えない。</p> |
|--|--|

M9+Cm+6TG plate には 6TG の結晶が析出する上、72 時間後のコロニーはまだ小さくて見にくいので、注意してカウントする。

コロニーと思われるものを 72 時間の段階でサインペン等でマーキングしておき、4 日目まで培養してコロニーであることを確認してもよい。4 日目になってはじめて現れる微小コロニーは *gpt* 遺伝子に変異を持たないコロニーなのでカウントしない。

{ 突然変異頻度 (mutant frequency) の算出 }

[Mutant Frequency = Number of 6TG^r and Cm^r colonies / Number of Cm^r colonies]

Number of 6TG^r and Cm^r colonies : M9+Cm+6TG plate(72 時間後)のカウントより。

Number of Cm^r colonies : M9+Cm plate(66 時間後)のカウントより。

(LB+Cm plate (48 時間後)のカウントは Titer の目安になるが、計算には用いない。)

6TG^r 表現型の確認と菌体の保存

{ 表現型の確認 }

M9+Cm+6TG plate (72 時間後のカウント済み plate) から、滅菌した楊枝で 6TG^r コロニーをとり、少量 (50 μl) の 1/15 M Na-K bufer で楊枝の先を洗った後、未使用の M9+Cm+6TG plate と M9+Cm plate にストリークする。

- ・ 6TG Selection 用に作った plate の余りを 4 で保管しておいて使うとよい。
- ・ 一本の楊枝で M9+Cm+6TG plate M9+Cm plate の順にストリークする。

37 で 3 日間培養する。 M9+Cm+6TG plate に 6TG^r コロニーの生育を確認する。

{ 菌体 stock の調製 }

試験管に 2 ml LB broth(25 μg/ml Cm 含む)を分注し、M9+Cm+6TG plate から 6TG^r コロニーを植菌して、37 で一晩振とう培養する。

overnight culture をエッペンチューブに移し、遠心して上清を除き、菌体ペレットの状態 で-80 で保存する。

培養 72 時間後の M9+Cm+6TG plate 上のコロニーはまだ小さいので、カウント後、位置をマーキングしたうえで更に一日培養し、コロニーを大きくしてから採取してもよい。(4 日目以降にあらわれた他の微小コロニーはカウントしない。)

試薬・培地の調製法

Stock solution (reagents, media)

| | |
|--------------------------------------|---------------------------------|
| LB broth | |
| 20%(w/v)Maltose | |
| 10 × M9 salt | |
| 50%(w/v)Glycerol | |
| 1M MgSO ₄ | |
| 1M CaCl ₂ | |
| 1%(w/v)Thiamine | |
| 10 mg/ml Amino acids (Pro, Leu, Ile) | (ここまでの試薬は、オートクレーブまたはろ過滅菌後、室温保存) |
| 25 mg/ml Kanamycin | -20 保存 |
| 25 mg/ml Chloramphenicol | EtOH 溶液、-20 保存 |
| 25 mg/ml 6-thioguanine* | DMSO 溶液、当日調製 |

6-thioguanine[TCI (東京化成), 1 g, T0212]

Plates

| [BOTTOM](1.5% agar*) 30 ml/plate | [TOP](0.6% agar*) 2.5 ml/plate |
|----------------------------------|--------------------------------|
| plate | soft agar |
| +Cm plate | soft agar |
| LB+Cm plate | LB soft agar |
| M9+Cm plate | soft agar |
| M9+Cm+6TG plate | 6TG soft agar |

BACTO-AGAR[DIFCO, 1lb, 0140-01]

Preparation of Plates

plate

| | for 1 liter | |
|------------------|-------------|-----------|
| Agar | 15 g | |
| Bactotryptone | 10 g | |
| NaCl | 2.5 g | |
| H ₂ O | 1 l | Autoclave |

pour 30 ml/ plate(9 cm diameter).

+Cm plate (Cm=25 μg/ml)

| | for 1 liter | |
|----------------------------------|-------------|----------------------------|
| Agar | 15 g | |
| Bactotryptone | 10 g | |
| NaCl | 2.5 g | |
| H ₂ O | 1 l | Autoclave with stirrer bar |
| 25mg/ml Chloramphenicol(in EtOH) | 1 ml | |

pour 30 ml/ plate(9 cm diameter).

LB+Cm plate (Cm=25 μg/ml)

| | for 1 liter | |
|----------------------------------|-------------|----------------------------|
| Agar | 15 g | |
| LB medium | 1 l | Autoclave with stirrer bar |
| 25mg/ml Chloramphenicol(in EtOH) | 1 ml | |

pour 30 ml/ plate(9 cm diameter).

M9+Cm ± 6TG plate (Cm=25 μg/ml, 6TG=25 μg/ml)

| | for 1 liter | |
|--|-------------|----------------------------|
| Agar | 15 g | |
| H ₂ O | 900 ml | Autoclave with stirrer bar |
| 10 × M9 salt | 100 ml | |
| 50%(w/v)Glycerol | 20 ml | |
| 1M MgSO ₄ | 2 ml | |
| 1M CaCl ₂ | 100 μl | |
| 1%(w/v)Thiamine | 500 μl | |
| Amino acids (10 mg/ml Pro, Leu, Ile for YG6020) | 4 ml | |
| 25mg/ml Chloramphenicol(in EtOH) | 1 ml | |
| 25mg/ml 6-thioguanine(in DMSO) | 1 ml | 6TG 溶液は当日調製する。 |

pour 30 ml/ plate(9 cm diameter).

M9 plate は後から加える試薬が多いので、各 stock solution のコンタミに注意すること。

* [10 × M9 salt]

| | |
|--|-------|
| H ₂ O | |
| Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O | 128 g |
| KH ₂ PO ₄ | 30 g |
| NaCl | 5 g |
| NH ₄ Cl | 10 g |

fill up to 1 liter.
autoclave

soft agar

| | for 100 ml |
|------------------|------------|
| Agar | 0.6 g |
| Bactotryptone | 1 g |
| NaCl | 250 mg |
| H ₂ O | 100 ml |

autoclave keep at 50

前もってオートクレーブをかけ、室温で固まった状態で保存しておき、翌日使用前に再び短いオートクレーブ(120 , 5 min)で融かして 50 water bath に移す。

(オートクレーブから出したときよく振って混ぜておく。)

LB soft agar(0.6%(w/v)agar)

| | for 100 ml |
|-----------|------------|
| Agar | 0.6 g |
| LB medium | 100 ml |

autoclave keep at 50

前もってオートクレーブをかけ、室温で固まった状態で保存しておき、翌日使用前に再び短いオートクレーブ(120 , 5 min)で融かして 50 water bath に移す。

(オートクレーブから出したときよく振って混ぜておく。)

soft agar (0.6%(w/v)NaCl, 0.6%(w/v)agar)

| | for 100 ml |
|------------------|------------|
| Agar | 0.6 g |
| NaCl | 0.6 g |
| H ₂ O | 100 ml |

autoclave keep at 50

前もってオートクレーブをかけ、室温で固まった状態で保存しておき、翌日使用前に再び短いオートクレーブ(120 , 5 min)で融かして 50 water bath に移す。

(オートクレーブから出したときよく振って混ぜておく。)

6TG soft agar(25 μ g/ml 6TG, 0.6%(w/v)NaCl, 0.6%(w/v)agar)

融かして 50 water bath に置いた soft agar に、当日調製した 6TG 溶液(25 mg/ml in DMSO)を 0.1% vol.加えてよく混ぜる。

その他の試薬、器具

LB+Maltose broth

LB broth に 20%(w/v) Maltose 溶液を 1/100 vol.加えて調製。(final 0.2%)

LB+10 mM MgSO₄ broth

LB broth に 1 M MgSO₄ 溶液を 1/100 vol.加えて調製。(final 10 mM)

1/15 M Na-K buffer(pH 7.4)

| | |
|----------------------------------|--------|
| H ₂ O | |
| Na ₂ HPO ₄ | 7.57 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1.82 g |
| fill up to 1 liter. | |
| autoclave | |

- ・試験管 (滅菌しておく)
小試験管(12.3 × 75 mm)
- ・滅菌済シャーレ(9 cm diameter)
EIKEN KIZAI CO., LTD.
- ・5 ml 容 駒込ピペット (滅菌しておく)
- ・インキュベーター (37 °C に設定しておく)
- ・小試験管シェーカー (37 °C に設定しておく)
Environmental Incubator Shaker
New Brunswick Scientific Co., Inc.
EDISON, N. J., U.S.A.
- ・吸光光度計
- ・遠心分離機
- ・-80 °C 冷凍庫
- ・PCR 用 Thermal Cycler
DNA Engine : PTC-200, MJ Reserch
- ・自動 DNA シークエンサー
ALF DNA sequencer, Pharmacia Biotech

シーケンス解析による *gpt* 遺伝子の変異部位の同定

菌体ペレット (-80 保存)

(plasmid DNA を調製する。) 省略可

gpt gene のコード領域を含む約 740 bp を PCR で増幅する。

[TaKaRa Taq™, Code No.R001A (TAKARA) 使用]

(primer-1 and primer-2 使用)

PCR product (PCR 後の mixture. 精製不要) を template にして、オートサイクルシーケンシングラベル反応を行う。

[SequiTherm™ Long-Read™ Cycle Sequencing Kit,

Catalog No.S36100 (EPICENTRE TECHNOLOGIES) 使用]

(Cy5 標識した primer-A or primer-C 使用)

ALF DNA sequencer にアプライ、泳動する。

得られた配列から、変異部位を同定する。

< 菌体を用いた PCR の protocol >

-80 保存菌体から、*gpt* gene のコード領域を含む約 740 bp を PCR で増幅する。

使用キット：TaKaRa Taq [Code No. R001A]

| 反応液組成 | (μ l) |
|----------------------------|------------|
| DW | 39.25 |
| \times 10 buffer | 5 |
| dNTP mix(2.5 mM) | 4 |
| primer 1(10 pmol/ μ l) | 0.5 |
| primer 2(10 pmol/ μ l) | 0.5 |
| Taq pol. | 0.2 ~ 0.25 |
| total | 49.5 |

上記反応液に、菌体ペレットを極少量加える。

具体的には、

市販の楊枝を滅菌したものを用意し、菌液（凍結菌体のチューブを指で持って溶かす）に楊枝の先を浸した後、チューブの壁面でよく菌液をこすり落とし、反応液のチューブに楊枝の先をつけて数回かきまぜる。

菌を加えたチューブは軽くvortexをかけた後、flash遠心で反応液を底に落とす。

PCR [DNA Engine (oil free)]

PROGRAM

| | |
|--------|------------------------|
| step 1 | 94 , 4 min+30sec. |
| step 2 | 94 , 30 sec. |
| step 3 | 58 , 30 sec. |
| step 4 | 72 , 2 min. |
| step 5 | go to step 2, 29 times |
| step 6 | 72 , 5 min. |
| step 7 | 4 , forever |

反応の終わったPCR mixtureの一部(2 μ l)で、アガロース電気泳動によりPCR productを確認する。（この段階でバンドのみられないサンプル（全体の1 ~ 2割）を除く。）

使用時まで4 or -20 で保存する。

PCR product（未精製のmixture）をそのままtemplateに使用し、シーケンス反応を行う。

< オートサイクルシーケンシング・ラベル反応 protocol >

[SequiTherm™ Long-Read™ Cycle Sequencing Kit,
Catalog No.S36100 (EPICENTRE TECHNOLOGIES) 使用]

- 1) primer を必要量だけ H₂O で希釈する。
- 2) reaction mixture を調製する。

| | 1 sample | (× 11) |
|--------------------------------------|----------|---------|
| H ₂ O | 6.5 | 71.5 |
| × 10 buffer | 2.5 | 27.5 |
| Cy5 primer-C (or A) (2 pmol/ μ l) | 2.0 | 22 |
| DNA polymerase | 1.0 | 11 |
| | 12 μ l | 132 μ l |

DNA polymerase は上記の 7 割程度の量でも問題なく反応する。

- 3) サンプルの数だけ用意した 0.5 ml エッペンチューブに、reaction mixture を 12 μ l ずつ分注する。
- 4) reaction mixture に各サンプル (PCR product) を 5 μ l 加えて混合する。(final 17 μ l)
- 5) A, C, G, T 4 種 (色別にするとうい) の 0.2 ml エッペンチューブをサンプル数だけ用意し、それぞれに A, C, G, T termination mix を 2 μ l ずつ分注する。
- 6) 調製した reaction mixture(final 17 μ l)を A, C, G, T の各エッペンチューブに 4 μ l ずつ分注する。このとき、(泡立てないように気をつけながら) ピペッティングにより充分混合する。
- 7) オートサイクルシーケンシング反応を行う。[DNA Engine (oil free)]

PROGRAM

| | |
|--------|------------------------|
| step 1 | 95 , 5 min. |
| step 2 | 95 , 30 sec. |
| step 3 | 70 , 1 min. |
| step 4 | go to step 2, 29 times |
| step 5 | 4 , |

- 8) stop solution を 4 μ l 加えて混合する。
(stop solution は ALF に適したものを使用する。)
- 9) 使用時まで 4 or -20 で保存する。