

Big Dye Terminator v3.1/1.1 反応～エタ沈精製

ABI Quick Reference Guideより

反応液調製

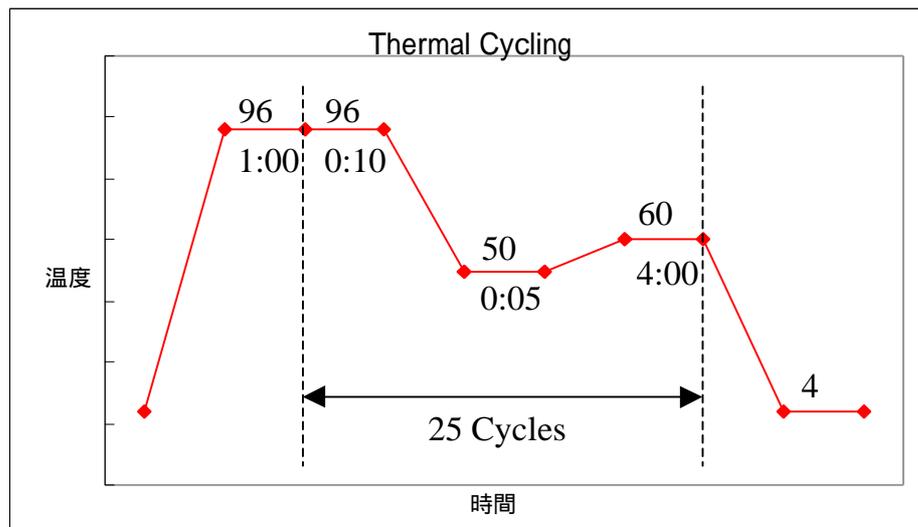
反応液

Big Dye	8ul
Template	右表参考
Primer	3.2pmol
Deionized water	up to 20ul
Total	20ul

テンプレート量

ss DNA	25-50ng
ds DNA	150-300ng
PCRProducts 100-200bp	1-3ng
PCRProducts 200-500bp	3-10ng
PCRProducts 500-1000bp	5-20ng
PCRProducts 1000-2000bp	10-40ng
PCRProducts >2000bp	20-50ng

サーマルサイクリング



エタ沈精製

(通常の場合)

【エタノール/EDTA/酢酸ナトリウム精製】

- 反応済みサンプル20ul
- 125mM EDTA 2ul
- 3M 酢酸ナトリウム 2ul
- 100% エタノール 50ul

シールして4回転倒混和

15min 室温放置

遠心 室温 2000g × 45min or 3000g × 30min

液をピペッティングで除去後、
裏返して遠心 185gでフラッシュ

- サンプル
- 70% エタノール 70ul

遠心 室温 2000g × 15min

液をピペッティングで除去後、
裏返して遠心 185g × 1min

Dry up

(未反応物が多そうな場合)

【エタノール/EDTA精製】

- 反応済みサンプル20ul
- 125mM EDTA 5ul
- 100% エタノール 60ul

シールして4回転倒混和

15min 室温放置

遠心 室温 2000g × 45min or 3000g × 30min

液をピペッティングで除去後、
裏返して遠心 185gでフラッシュ

- サンプル
- 70% エタノール 60ul

遠心 室温 2000g × 15min

液をピペッティングで除去後、
裏返して遠心 185g × 1min

Dry up

注意点

BigDyeは-20 で保存し、凍結溶解は10回までにして下さい。
(はじめに分注しておいて10回以内に使い切るようにして下さい。)

可能な場合は、5x Sequencing Bufferを使い、BigDyeを希釈して下さい。
(通常は8ulも必要ない場合が多いです。うまく希釈して節約して下さい。)

テンプレート DNAはなるべく水に溶かすようにして下さい。
TEやEDTAが多いと反応がうまくいかないことがあります。

エタ沈の時間は必ず守って下さい。
遠心は必ず室温で行って下さい。
遠心後は放置せず、すぐに液を除去して下さい。

ドライアップは乾燥しすぎないように10分以内にして下さい。