

# 遺伝子実験施設

## DNA シーケンスサービスの手引き

令和2年8月1日

## 目次

(1) 遺伝子実験施設 DNA シーケンスサービスの内容と特徴	.....	2
(2) シーケンスサービスの手引き (解析のみ)		
(2)-1 DNA シーケンスサービス ( AB 3130xl あるいは AB 3730 使用 )	.....	3
(2)-2 大量 DNA シーケンスサービス ( AB 3730 使用)	.....	4
(2)-3 DNA フラグメントサービス ( AB 3130xl あるいは AB 3730 使用 )	.....	5
(2)-4 大量 DNA フラグメントサービス ( AB 3730 使用 )	.....	5
(3) シーケンストータルサービスの手引き (反応から解析までの一括サービス)		
(3)-1 DNA シーケンストータルサービス ( AB 3130xl あるいは AB 3730 使用 )	.....	6
(3)-2 大量 DNA シーケンストータルサービス ( AB 3730 使用 )	.....	9
図1 サンプルの提出場所	.....	12

## (1) 遺伝子実験施設 DNA シーケンスサービスの内容と特徴

当施設では、シーケンス解析のみを受託する DNA シーケンスサービス、反応から解析まで一括受託する DNA シーケンストータルサービスを提供しております。各サービスの内容は以下の通りです。

### 1) DNA シーケンス・フラグメントサービス ( AB 3130xl あるいは AB 3730 使用 )

本サービスは、サービス利用者がシーケンス反応、精製まで ( DNA フラグメントサービスでは Hi-Di ホルムアミドとサイズスタンダードの混合まで ) 行います。本サービスには、DNA シーケンスサービスに加え、フラグメントサービスがあり、それぞれ依頼書が異なりますのでご注意ください。

#### ① DNA シーケンスサービス (300 円/1 サンプル)

精製後のサンプルをお預かりし、本施設で Hi-Di ホルムアミドを添加し、シーケンス解析を行います。

#### ② DNA フラグメントサービス (300 円/1 サンプル)

サービス利用者が、PCR 反応に加え、サンプルに Hi-Di ホルムアミドとサイズスタンダードを混合します。調整後のサンプルをお預かりし、施設で泳動のみを行います。解析はサービス利用者が各自で行います。

### 2) 大量 DNA シーケンス・フラグメントサービス ( AB 3730 使用 )

本サービスは、48 サンプル単位の大量シーケンスを安価に行うサービスです。利用者がシーケンス反応、精製、Hi-Di ホルムアミドでの懸濁まで ( DNA フラグメントサービスでは Hi-Di ホルムアミドとサイズスタンダードの混合まで ) 行います。本サービスには、DNA シーケンスサービスに加え、フラグメントサービスがあり、それぞれ依頼書が異なりますのでご注意ください。

#### ③ 大量 DNA シーケンスサービス (10,000 円/48 サンプル)

サービス利用者が、シーケンス反応、精製、Hi-Di ホルムアミドでの懸濁を行い、96 穴のシーケンス解析用プレートの所定の位置に入れます。プレートをお預かりし、本施設ではシーケンス解析のみを行います。48 サンプル単位の解析サービスです。

#### ④ 大量 DNA フラグメントサービス (10,000 円/48 サンプル)

サービス利用者が、サンプルに Hi-Di ホルムアミドとサイズスタンダードを混合し、96 穴シーケンス解析用プレートの所定の位置に入れます。調整後のプレートをお預かりし、本施設で泳動のみを行います。48 サンプル単位のサービスです。解析はサービス利用者が各自で行います。

### 3) DNA シーケンストータルサービス ( AB 3130xl あるいは AB 3730 使用 )

#### ⑤ DNA シーケンストータルサービス (600 円/1 サンプル)

テンプレート DNA とプライマーを混合したサンプルをお預かりし、本施設でシーケンス反応から解析までを行うサービスです。ユニバーサルプライマーは本施設で添加することも可能です。

### 4) 大量 DNA シーケンストータルサービス ( AB 3730 使用 )

#### ⑥ 大量 DNA シーケンストータルサービス (20,000 円/48 サンプル)

テンプレート DNA とプライマーを混合したサンプルを PCR プレートまたは V 底 96 穴マイクロタイタープレートの所定の位置に入れたものをお預かりし、シーケンス反応から解析までを行うサービスです。ユニバーサルプライマーは本施設で添加することも可能です。

## (2) シーケンスサービスの手引き（解析のみ）

### (2) -1 DNA シーケンスサービス（ AB 3130xl あるいは AB 3730 使用 ）

本サービスをご利用いただく際は、以下の手順に従ってください。

㊟ 反応試薬は BigDye Ver.3.1 or BigDye Ver.1.1 をお使いください。

手順1 DNA シーケンスサービス依頼書を作成し、遺伝子実験施設サービスサポート（ [support@gene.mie-u.ac.jp](mailto:support@gene.mie-u.ac.jp) ）まで E メールでご送付ください。その際に必ずシーケンス反応に用いた試薬名（ BigDye Ver.3.1 あるいは BigDye Ver.1.1 ）と反応後の精製方法（エタノール沈殿 あるいは BigDye® XTerminator 精製キットなど）を記入してください。

手順2 BigDye® XTerminator 精製キット以外で精製したサンプルは必ず乾燥状態でお預けください。BigDye® XTerminator 精製キットで精製されたサンプルはそのままで結構です。

手順3 サンプルは **PM 3:00 までに遺伝子実験施設にお持ちいただき**、指定の冷凍庫の 96 穴ボックスに保管していただきます。その時に、冷凍庫の扉に貼ってある**サンプルシート上に、自分の所属、氏名、サンプル名**を記入してください。**PM 3:00 までにお預かりしたサンプルは翌日 PM 3:00 までに**（土日祝日を除く）結果を報告します。それ以降のご依頼は翌日受付扱いとなりますので、ご注意ください。ただし、PM 3:00 以降にサンプルを提出される場合でも、お急ぎの場合は可能な限り対応させていただきますので、スタッフにご相談ください。

#### － 結果の報告 －

解析データ（波形データ・配列テキストデータ）を**ネットワークストレージ**にて報告いたします。**PM 3:00 までにお預かりしたサンプルは原則として翌日 PM 3:00 までに**（土日祝日を除く）報告します。但し、解析不良等の理由により再解析が必要となった場合は対象外となります。諸事情により時間までに結果報告ができない場合は連絡いたします。1 解析あたり 500～700 塩基の解析を行ないますが、サンプル状態や配列により解析鎖長が短くなる事や良好なデータが得られない事がございます。波形データの印刷が必要な方はスタッフにご相談ください。

## (2) -2 大量 DNA シーケンスサービス ( AB 3730 使用 )

本サービスをご利用いただくには以下の点にご注意ください。

④1 反応試薬は BigDye Ver.3.1 or BigDye Ver.1.1 をお使いください。

④2 指定の 96 穴 PCR プレート ( AB MicroAmp® Optical 96well Reaction Plate : N8010560 ) と Hi-Di Formamide ( AB : 4311320 ) を各自でご用意いただきます。

BigDye® XTerminator 精製キット使用時には Hi-Di Formamido は必要ありません。

手順 1 大量 DNA シーケンスサービス依頼書を作成し、遺伝子実験施設サービスサポート

( [support@gene.mie-u.ac.jp](mailto:support@gene.mie-u.ac.jp) ) まで E メールでご送付ください。その際に必ずシーケンス反応に用いた試薬名 ( BigDye Ver.3.1 あるいは BigDye Ver.1.1 ) と反応後の精製方法 ( エタノール沈殿 あるいは BigDye® XTerminator 精製キットなど ) を記入してください。

手順 2 BigDye® XTerminator 精製キット以外で精製したサンプルは必ず Hi-Di ホルムアミドで懸濁し、指定の 96 穴 PCR プレートにいれてきてください。BigDye® XTerminator 精製キットで精製されたサンプルはそのままかあるいは上清 ( 45  $\mu$ l 以上 ) を指定の 96 穴 PCR プレートにいれてきてください。プレートはアルミホイルで包んでお預けください。

**重要！！ 48 サンプルの解析を希望される方は 96 穴プレートの奇数列のウェルもしくは偶数列のウェルに 1 列置きにサンプルを入れてください。96 サンプルある場合はすべてのウェルに入れていただいて結構です。依頼書作成時の well No. にご注意ください。**

手順 3 サンプルは **PM 3:00 までに遺伝子実験施設まで** お持ちいただき、指定の冷凍庫に保管していただきます。その時に、**アルミホイル上に研究室名と名前** を記載しておいてください。PM 3:00 までにお預かりしたサンプルは翌日 **PM 3:00 までに** ( 土日祝日を除く ) 結果を報告します。それ以降のご依頼は翌日受付扱いとなりますので、ご注意ください。ただし、PM 3:00 以降にサンプルを提出される場合でも、お急ぎの場合は可能な限り対応させていただきますので、スタッフにご相談ください。

### — 結果の報告 —

解析データ ( 波形データ・配列テキストデータ ) を **ネットワークストレージ** にて報告いたします。PM 3:00 までにお預かりしたサンプルは原則として翌日 **PM 3:00 までに** ( 土日祝日を除く ) 報告します。但し、解析不良等の理由により再解析が必要となった場合は対象外となります。諸事情により時間までに結果報告ができない場合は連絡いたします。1 解析あたり 500~700 塩基の解析を行ないますが、サンプル状態や配列により解析鎖長が短くなる事や良好なデータが得られない事がございます。波形データの印刷が必要な方はスタッフにご相談ください。

## (2) - 3 DNA フラグメントサービス ( AB 3130xl あるいは AB 3730 使用 )

本サービスをご利用いただく際は、以下の手順に従ってください。

**手順1** フラグメントサービス依頼書を作成し、遺伝子実験施設サービスサポート ( [support@gene.mie-u.ac.jp](mailto:support@gene.mie-u.ac.jp) ) まで E メールでご送付ください。その際に必ず使用する Dye Set を記入してください。

**手順2** PCR 反応済みサンプルに Hi-Di Formamide とサイズスタンダードを調製してお預けください。

**手順3** サンプルは **PM 3:00 までに遺伝子実験施設**にお持ちいただき、指定の冷凍庫の 96 穴ボックスに保管していただきます。その時に、冷凍庫の扉に貼ってある**サンプルシート上に、自分の所属、氏名、サンプル名**を記入してください。PM 3:00 までにお預かりしたサンプルは翌日 PM 3:00 までに (土日祝日を除く) 結果を報告します。それ以降のご依頼は翌日受付扱いとなりますので、ご注意ください。ただし、PM 3:00 以降にサンプルを提出される場合でも、お急ぎの場合は可能な限り対応させていただきますので、スタッフにご相談ください。

### ー 結果のご報告 ー

解析データを**ネットワークストレージ、フラグメント解析データフォルダ**にて報告いたします。当施設内データ解析室 (1階 113 号室、要予約) のパソコンにフラグメント解析データフォルダと解析ソフト ( Gene Mapper ) がはいています。遺伝子実験施設オンライン予約システムを使ってご利用いただけます。

**PM 3:00** までにお預かりしたサンプルは原則として翌日 **PM 3:00** までに (土日祝日を除く) 報告します。但し、解析不良等の理由により再解析が必要となった場合は対象外となります。諸事情により時間までに結果報告ができない場合は連絡いたします。

## (2) - 4 大量 DNA フラグメントサービス ( AB 3730 使用 )

本サービスをご利用いただくには以下の点にご注意ください。

**重要！！ 48 サンプルの解析を希望される方は 96 穴プレートの奇数列のウェルもしくは偶数列のウェルに 1 列置きにサンプルを入れてください。96 サンプルある場合はすべてのウェルに入れていただいて結構です。依頼書作成時の well No.にご注意ください。**

指定の 96 穴 PCR プレート ( AB MicroAmp® Optical 96well Reaction Plate : N8010560 ) をご使用ください。

### (3) シーケンストータルサービスの手引き（反応から解析までの一括サービス）

#### (3) -1 DNA シーケンストータルサービス（ AB 3130xl あるいは AB 3730 使用 ）

本サービスをご利用いただく際は、以下の手順に従ってください。

**手順1** DNA シーケンストータルサービス依頼書を作成し、遺伝子実験施設サービスサポート（ [support@gene.mie-u.ac.jp](mailto:support@gene.mie-u.ac.jp) ）まで E メールでご送付ください。

#### **手順2** サンプルの調製

- プラスミド DNA の精製には、必ずプラスミド精製キット（例えば、QIAGEN 社 QIAprep Spin Miniprep Kit や Invitrogen 社 PureLink™ HQ Mini Plasmid DNA Purification Kit など）をご使用ください。
- PCR 産物は PCR プライマーや dNTP 除去のため、必ず精製し、溶出時には **dH<sub>2</sub>O** あるいは **1/10 TE** をお使いください。
- ⑧ 精製後 PCR 産物 1 μl を電気泳動し、目的増幅産物がシングルバンドであることを確認してください。
- ⑨ 増幅鎖長が 150bp 以下のものは解析できません。
- 容量の調整には、**dH<sub>2</sub>O** を使用してください。

#### ケース1) ユニバーサルプライマーを添加希望される場合

遺伝子実験施設では以下の表のユニバーサルプライマーをご用意しました。

これらのプライマーによるシーケンスを希望される方は、ご希望のユニバーサルプライマーナンバーを依頼書に記入し、以下のとおりに調整したサンプルのみをお持ちください。

#### ☆ ユニバーサルプライマー

① M13 F ( M13 Universal Primer ( -20 ) )	GTAAAACGACGGCCAGT
② M13 R ( M13 Reverse Primer ( -24 ) )	AACAGCTATGACCATG
③ SP6 ( SP6 Sequencing Primer ( 19mer ) )	GATTTAGGTGACACTATAG
④ T3 ( T3 Sequencing Primer ( 17mer ) )	ATTAACCCTCACTAAAG
⑤ T7 ( T7 Sequencing Primer ( 17mer ) )	AATACGACTCACTATAG

⑩ 上記のプライマーの配列を必ずご確認ください、依頼書に希望されますプライマーナンバーをご指定ください。

☆テンプレートがプラスミド DNA の場合  
サンプル 1 反応あたり

Plasmid DNA	500~ 600 ng	
DW		or
総量	15 $\mu$ l	

☆テンプレートが PCR 産物の場合  
サンプル 1 反応あたり

PCR 産物		
150-200 bp		2-6 ng
200-500 bp		6-20 ng
500-1,000 bp		10-40 ng
1,000-2,000 bp		20-80 ng
>2,000 bp		40-100 ng
DW		
総量		15 $\mu$ l

ケース2) 各自で用意したプライマーを使用される場合

テンプレートとプライマーは以下に従い、計 18  $\mu$ l になるよう 1.5 ml チューブに調整してください。

☆テンプレートがプラスミド DNA の場合  
サンプル 1 反応あたり

Plasmid DNA	500~ 600 ng	
Primer	5 pmol	or
DW		
総量	18 $\mu$ l	

☆テンプレートが PCR 産物の場合  
サンプル 1 反応あたり

PCR 産物		
150-200 bp		2-6 ng
200-500 bp		6-20 ng
500-1,000 bp		10-40 ng
1,000-2,000 bp		20-80 ng
>2,000 bp		40-100 ng
Primer		5 pmol
DW		
総量		18 $\mu$ l

例えば、

Plasmid DNA	2 $\mu$ l
( Vector : pBluescript, pUC など )( 濃度 300 ng/ $\mu$ l )	
Primer(濃度 2.5pmol/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
DW	14 $\mu$ l
総量	18 $\mu$ l

**手順3** サンプル調製が完了しましたら、サンプルを**遺伝子実験施設までお持ちいただき**、指定の冷凍庫の96穴ボックスに入れて置いてください。その際に冷凍庫の扉に貼ってある**サンプルシート上**に、**自分の所属、氏名、サンプル名**を記入してください。サンプルシートはサンプルボックスと同じフォーマットになっています。サンプルボックス上の位置を確認し、シートに記入してください。



－ 結果の報告 －

解析データ(波形データ・配列テキストデータ)をネットワークストレージにて報告いたします。**AM 9:00 まで**にお預かりしたサンプルは原則として翌日 **PM 3:00 まで** (土日祝日を除く) 報告します。但し、解析不良等の理由により再解析が必要となった場合は対象外となります。諸事情により時間までに結果報告ができない場合は連絡いたします。1 解析あたり 500～700 塩基の解析を行います。サンプル状態や配列により解析鎖長が短くなる事や良好なデータが得られない事がございます。波形データの印刷が必要な方はスタッフにご相談ください。

⑨ **AM 9:00** 以降に提出されたサンプルは翌日受付扱いになります。お急ぎの方はできる限り対応させていただきますので、スタッフにご連絡ください。

⑨ 提供いただいたサンプルは解析終了後に破棄します。

### (3) -2 大量 DNA シーケンストータルサービス ( AB 3730 使用 )

本サービスをご利用いただく際は、以下の手順に従ってください。

手順1 DNA シーケンストータルサービス依頼書を作成し、遺伝子実験施設サービスサポート ( [support@gene.mie-u.ac.jp](mailto:support@gene.mie-u.ac.jp) ) まで E メールでご送付ください。

#### 手順2 サンプルの調製

- プラスミド DNA の精製には、必ずプラスミド精製キット (例えば、QIAGEN 社 QIAprep Spin Miniprep Kit や Invitrogen 社 PureLink™ HQ Mini Plasmid DNA Purification Kit など) をご使用ください。
- PCR 産物は PCR プライマーや dNTP 除去のため、必ず精製し、溶出時には **dH<sub>2</sub>O** あるいは **1/10 TE** をお使いください。
- ④ 精製後 PCR 産物 1  $\mu$ l を電気泳動し、目的増幅産物がシングルバンドであることを確認してください。
- ④ 増幅鎖長が 150 bp 以下のものは解析できません。
  - 容量の調整には、**dH<sub>2</sub>O** を使用してください。
  - サンプルは 96 穴 PCR プレートまたは V 底 96 穴マイクロタイタープレートに調整し、プレート用シール等でシーリング (密閉) してください。

#### ケース1) ユニバーサルプライマーを添加希望される場合

遺伝子実験施設では以下の表のユニバーサルプライマーをご用意しました。

これらのプライマーによるシーケンスを希望される方は、ご希望のユニバーサルプライマーナンバーを依頼書に記入し、以下のとおりに調整したサンプルのみをお持ちください。

#### ☆ ユニバーサルプライマー

① M13 F ( M13 Universal Primer ( -20 ) )	GTAAAACGACGGCCAGT
② M13 R ( M13 Reverse Primer ( -24 ) )	AACAGCTATGACCATG
③ SP6 ( SP6 Sequencing Primer ( 19mer ) )	GATTTAGGTGACACTATAG
④ T3 ( T3 Sequencing Primer ( 17mer ) )	ATTAACCCTCACTAAAG
⑤ T7 ( T7 Sequencing Primer ( 17mer ) )	AATACGACTCACTATAG

④上記のプライマーの配列を必ずご確認ください、依頼書に希望されますプライマーナンバーをご指定ください。

☆テンプレートがプラスミド DNA の場合  
サンプル 1 反応あたり

Plasmid DNA	500~ 600 ng	
DW		or
総量	15 $\mu$ l	

☆テンプレートが PCR 産物の場合  
サンプル 1 反応あたり

PCR 産物		
150-200 bp		2-6 ng
200-500 bp		6-20 ng
500-1,000 bp		10-40 ng
1,000-2,000 bp		20-80 ng
>2,000 bp		40-100 ng
DW		
総量		15 $\mu$ l

ケース2) 各自で用意したプライマーを使用される場合

テンプレートとプライマーは以下に従い、計 18  $\mu$ l になるように調整してください。

☆テンプレートがプラスミド DNA の場合  
サンプル 1 反応あたり

Plasmid DNA	500~ 600 ng	
Primer	5 pmol	or
DW		
総量	18 $\mu$ l	

☆テンプレートが PCR 産物の場合  
サンプル 1 反応あたり

PCR 産物		
150-200 bp		2-6 ng
200-500 bp		6-20 ng
500-1,000 bp		10-40 ng
1,000-2,000 bp		20-80 ng
>2,000 bp		40-100 ng
Primer		5 pmol
DW		
総量		18 $\mu$ l

例えば、

Plasmid DNA	2 $\mu$ l
( Vector: pBluescript, pUC など)(濃度 300ng/ $\mu$ l )	
Primer ( 濃度 2.5pmol/ $\mu$ l )	2 $\mu$ l
DW	14 $\mu$ l
総量	18 $\mu$ l

**手順 3** サンプル調製が完了しましたら、**サンプルをアルミホイルで包んで、アルミホイル上に、所属、氏名を明記し遺伝子実験施設まで**お持ちいただき、指定の冷凍庫に入れておいてください。

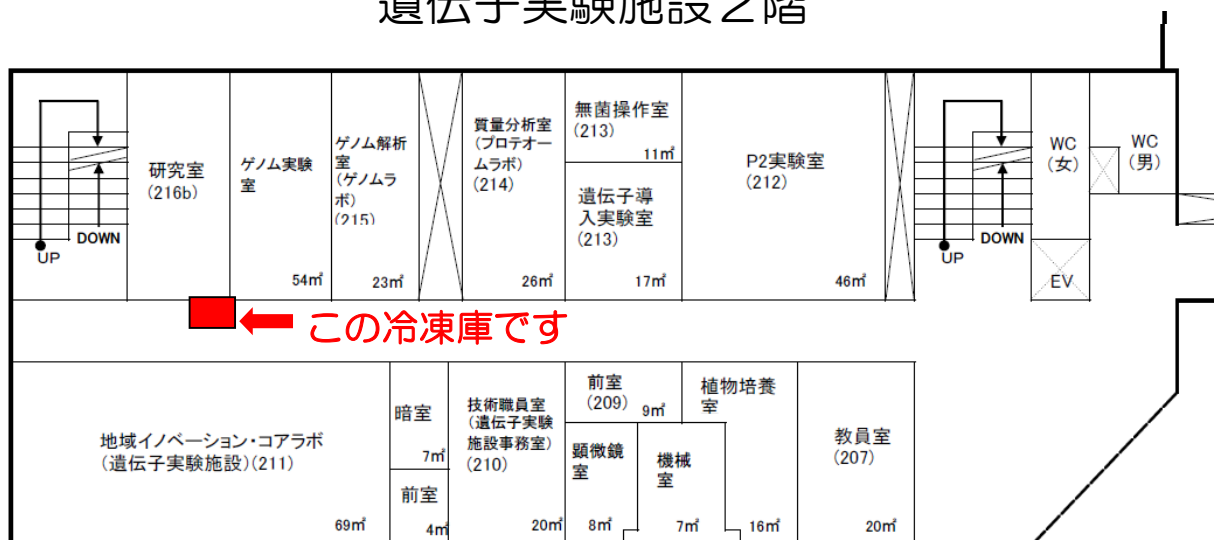
－ 結果の報告 －

解析データ(波形データ・配列テキストデータ)をネットワークストレージにて報告いたします。**AM 9:00**までにお預かりしたサンプルは原則として翌日**PM 3:00**までに(土日祝日を除く)報告します。但し、解析不良等の理由により再解析が必要となった場合は対象外となります。諸事情により時間までに結果報告ができない場合は連絡いたします。また、1解析あたり500～700塩基の解析を行ないますが、サンプル状態や配列により解析鎖長が短くなる事や良好なデータが得られない事がございます。

- ⑧ **AM 9:00**以降に提出されたサンプルは翌日受付扱いになります。お急ぎの方はできる限り対応させていただきますので、スタッフにご連絡ください。
- ⑧ 提供いただいたサンプルは解析終了後に破棄します。

図1 サンプルの提出場所

## 遺伝子実験施設2階



## 冷凍庫内

1段目
2段目 シーケンスサービス (解析のみ) の サンプルは <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> に入れてください！！
3段目 シーケンストータルサービス (反応から) の サンプルは <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> に入れてください！！
4段目
5段目