

DNA シーケンス受託解析の利用について

オープンファシリティセンター
タンパク質・遺伝子解析室
20220405v5

目次

1. 利用の手順	..2
2. サンプル調製について	..4
3. 受託解析のシーケンス作業について	..6
4. 受託解析の料金と支払方法	..8
5. 免責事項	..9
6. 再解析	..9
7. 研究相談	..9

1. 利用の手順

下記の①から⑤の手順で、受託解析が利用できます。

- ① 受託解析依頼書に必要事項を記入する*
- ② サンプルの準備
- ③ 受託解析依頼書（word ファイル）をメールで送る
- ④ サンプルを冷蔵庫内へ提出する
- ⑤ 後日、メールで結果を受け取る

* 初回利用の場合、サンプル準備の前に受託解析の担当教員との打合せが必要です。事前に打合せ日時調整の連絡をタンパク質・遺伝子解析室（E-mail: k-tsuka@fujita-hu.ac.jp、内線 9928）までお願いします。事前の打合せなくサンプルをお持ちいただいても受け取りしかねますのでご了承ください。

① 受託解析依頼書に必要事項を記入する

オープンファシリティセンターのホームページから「DNA シーケンス受託解析依頼書」をダウンロードしてください。

URL:<https://www.fujita-hu.ac.jp/~kyoriken/jyutaku/index.html>

依頼書に必要事項を記入して下さい。不明な箇所は、未記入で結構です。初回打ち合わせ時に説明します。

② サンプルの準備

Template DNA*とシーケンス用 primer をご用意ください。

* 精製済みの PCR 産物、または精製済みの plasmid が依頼可能です。

提出するサンプル

Template DNA + シーケンス用 primer + H₂O = 12 μ l となるように PCR 用 8 連チューブに分注し、ドーム型キャップでフタをして下さい。チューブ側面に算用数字でサンプル番号をご記入ください（付箋やテープなどで依頼者の名前、内線番号がわかるようにしてください）。この状態のサンプルを提出ください。これらに、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit 8 μ l を加え、最終 20 μ l として、シーケンス反応を行います。担当者がサンプルシートに「依頼者の姓 + サンプル番号」を記入します。詳しくは、「2. サンプルの調製について」、「3. 受託解析のシーケンス作業について」を参照。

③ 受託解析依頼書 (word ファイル) をメールで送る

必要事項を記入済みの「DNA シーケンス受託解析依頼書」の word ファイル (PDF 不可) を下記アドレスにメールでお送りください。

E-mail: k-tsuka@fujita-hu.ac.jp

タンパク質・遺伝子解析室 受託解析担当教員

④ 調整をしたサンプルを提出する

調整したサンプルを、依頼書に記入した「サンプル提出日時」までに下記の提出場所までお持ちください。担当者がサンプルを回収し、解析を開始します。

提出場所：大学 1 号館 3 階 317 号室 (中央研究センター) のショーケース型冷蔵庫内のサンプル入れ (青いフタのプラ容器)

担当者によるサンプル回収時間：開室日の平日 9 時から 17 時

(土日祝日、および担当教員不在時は閉室日のため、回収不可)

※ 依頼書 (word ファイル)・サンプルの 2 点が提出された時点で受付完了となり、該当日が受付日となります。

⑤ 後日、メールで結果を受け取る

受付日から原則 3 開室日以内 (土日祝日、および担当教員不在時の閉室日を除く) に、③で送られてきたメールアドレス宛に解析結果のファイルを E-mail でお送りします*。解析結果のファイルは、1 つのサンプルにつき波形ファイル (.ab1) とテキストファイル (.seq) の 2 種類です。波形ファイル (.ab1) を開くためには専用のソフトウェアが必要です。キャピラリー-DNA シーケンサーの制御 PC にインストールされている Sequencing Analysis Software で波形ファイルを見ることができます。解析結果のファイルは約 30 日間、当解析室で保持しますが、バックアップを保証するものではありません。各自でバックアップ作業をお願いいたします。

* シーケンサーは、一般利用者と共用で使用しているため、予約状況により解析が遅れる場合があります。また、シーケンサーの混雑状況により、受託解析の受付を一時中断する場合があります。

2. サンプルの調製について

DNA シーケンス解析では、template DNA の量・精製度、primer の品質などが解析結果に大きく影響します。本受託解析サービスの利用に際して、下記の①から⑥の事項を検討し、サンプルをご用意ください。

① Template DNA、primer の必要量の確認する

下表に示された DNA 量に従って調製ください。Template DNA、primer の量が少なすぎても多すぎてもシーケンス反応の障害になる場合があります。Template DNA 量は、1) 分光光度計（中央研究センターにある NanoDrop など）による吸光度測定、2) アガロースゲル電気泳動で、既知量の DNA サイズマーカーの輝度からサンプルバンドの量を推定、などにより求めることができます。

Template DNA、primer の必要量の目安（ABI プロトコルより転載）

Template	Quantity
PCR product	
100-200 bp	1-3 ng
200-500 bp	3-10 ng
500-1000 bp	5-20 ng
1000-2000 bp	10-40 ng
>2000 bp	20-50 ng
Single-stranded	25-50 ng
Double-stranded	150-300 ng
Cosmid, BAC	0.5-1.0 μ g
Bacterial genomic DNA	2-3 μ g
Primer	3.2 pmol

※Plasmid DNA は、Double-stranded を参考にしてください。

② Template DNA の精製度の確認する

分光光度計(中央研究センターにある NanoDrop など)による吸光度測定により、230nm, 260nm, 280nm の吸光度を測定し、DNA 溶液の精製度を測定してください。260nm/280nm = 1.8 以上、260nm/230nm = 2.0 以上を推奨します。満たない場合はカラムなどで再精製することをお勧めします。

③ なるべく高濃度の Template DNA を使用する

特に plasmid を template DNA とした場合、サンプル調製に使う DNA 溶液量が多くなると、そこに含まれる夾雑物によりシーケンス反応が阻害される場合があります。したがって、サンプル調製に使う Template DNA の濃度をなるべく濃くし、加える DNA 溶液量を少なくすることをお勧めします。DNA 精製を行う際に、最終的に溶解する水の量を減らすことで、最終濃度を高くすることができます。すでに DNA が溶解された状態であれば、エタノール沈殿で濃縮できる場合があります。

④ 溶媒を水にする

DNA 精製の際に、最終的な DNA の溶解にはバッファー類ではなく、水を使用してください。水に溶解することで、シーケンス反応へ余分な試薬の持ち込みを防ぐことができます。また、EDTA が含まれるとシーケンス反応が著しく阻害されるので EDTA を含む溶液（TE など）は使用しないでください。

⑤ PCR 産物を精製する

PCR 産物を template としてシーケンスする場合、サンプル中の未反応の dNTPs、PCR primers を除去する必要があります。1) アガロース電気泳動で目的バンドを切り出す方法、2) 市販の酵素（ExoSAP-IT など）により、未反応の dNTPs、PCR primers を分解する方法、などがあります。1)の方法は、目的のバンド以外にも複数のバンドが見られた場合に、目的バンドの精製にも有効です。2)の方法は、PCR で目的のバンドのみが増幅されている場合に有効で、短時間（20~30分）で処理ができます。しかし、該当するバンドに多種類の PCR 産物が含まれている場合は、クローニングする必要があります。

⑥ シーケンス用 primer を新しくする

Primer を冷凍庫で長期間保存している場合でも primer が劣化することがあります。当然、primer が劣化していると、シーケンス反応が進みません。Primer を長期間保存していて、劣化が考えられ場合は、新しくすることをお勧めします。

また、PCR で用いた primer をシーケンス反応に利用してもうまく読めない場合があります。その場合は、新たにシーケンス用 primer を設計することをお勧めします。

3. 受託解析のシーケンス作業について

① シーケンス反応試薬

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied biosystems 社)を使用し、 $20\mu\ell$ 系で BigDye Terminator Ready Reaction mix を 1/8 に希釈して使用します。

基本的に、pGEM3Z(+)と M13 primer をコントロールサンプルとして使用します。

※ 他の BigDye 試薬での反応は行いません。

② サイクル条件

シーケンス反応は、下記のサイクル条件で行います。

Hold	96°C	1 min	
Cycle	96°C	10 sec	} 25 cycles
	50°C	5 sec	
	60°C	4 min	
Hold	4°C	保存	

③ シーケンス反応後のサンプル精製

エタノール沈殿法 (エタノール/EDTA 精製) により、シーケンス反応後にサンプル精製を行います。精製後、サンプルを dry up (50°Cで2分間) し、最終的に $15\mu\ell$ の Hi-Di Formamide (Applied biosystems 社) に溶かします。シーケンサーにセットする直前に、サンプルをヒートショック (95°Cで2分間) し、on ice (5分以上)を行います。

④ キャピラリーDNA シーケンサー

下記のシーケンサー (Applied biosystems 社) のいずれかを使用します。

- ・ SeqStudio Genetic Analyzer (4本キャピラリー、28cm キャピラリー、POP1 ポリマー)
- ・ 3500 Genetic Analyzer (8本キャピラリー、50cm キャピラリー、POP7 ポリマー)

⑤ 泳動条件

SeqStudio Genetic Analyzer (4本キャピラリー)

※ 8サンプル以上の依頼の場合、原則8サンプル単位分は3500で行います。

ランモジュール	泳動時間	解読塩基数
Short**	30分	最大約300bp
Medium**	45分	最大約500bp
Long*	120分	最大約700bp

Longで行う場合があります。

*機器の使用状況により、3500のFastまたはStandardで行う場合があります。

3500 Genetic Analyzer (8本キャピラリー)

ランモジュール	泳動時間	解読塩基数
Short**	30分	最大約300bp
Rapid**	40分	最大約500bp
Fast**	65分	最大約700bp
Standard	125分	最大約850bp

※ Standardで行う場合があります。

* 機器の使用状況により、SeqStudioのLongで行う場合があります。

4. 受託解析の利用料金と支払方法

① 受託解析の利用料金

4本キャピラリー搭載機または8本キャピラリー搭載機を使用するため、4サンプル単位で依頼した場合、サンプルあたりの料金は480円です。この料金には測定試薬費150円が含まれています。測定時にサンプルがないキャピラリーについても測定試薬費が発生するため、4サンプル未満の場合は、サンプルあたりの料金は以下になります。

4サンプルの場合、 $480 \text{円} \times 4 = 1920 \text{円}$ 、**480円/サンプル**

3サンプルの場合、 $480 \text{円} \times 3 + 150 \text{円} \times 1 = 1590 \text{円}$ 、**530円/サンプル**

2サンプルの場合、 $480 \text{円} \times 2 + 150 \text{円} \times 2 = 1260 \text{円}$ 、**630円/サンプル**

1サンプルの場合、 $480 \text{円} \times 1 + 150 \text{円} \times 3 = 930 \text{円}$ 、**930円/サンプル**

(例) 14サンプルで依頼した場合の料金計算

12サンプル分： $4 \text{ サンプル単位} (480 \text{円} \times 4) 1920 \text{円} \times 3 = 5760 \text{円}$

2サンプル分： $480 \text{円} \times 2 + 150 \text{円} \times 2 = 1260 \text{円}$

合計 7020円

※ サンプル数による割引はありません。

② 支払方法

月ごとに利用料金の請求を行います。受付日の翌月上旬ごろに、研究支援推進本部事務部の研究支援課から所属室へ請求依頼をお送りします。本学研究費、公的研究費などで支払いが可能です。お問い合わせは、研究支援課までお願いいたします。

5. 免責事項

本受託解析は、解析結果を保証するものではありません。提出したサンプルの品質などにより、解析結果が得られないことがあった場合、当解析室は一切の責任を負いません。その場合、利用料金は請求いたします。

6. 再解析

本受託解析が、解析室側のミスや機械トラブルにより失敗した場合は、無料で再解析を行います。失敗した際の template DNA とプライマーの費用については補償いたしかねますのでご了承ください。

7. 研究相談

シーケンスの結果について、ご不明な点がございましたらお気軽にご相談ください。また、PCR、plasmid 作製などのサンプル調製、プライマー設計、良好なシーケンス結果が得られないなどの技術的なお困りごとに対して研究相談窓口をご用意していますので、是非ご利用ください。

連絡先：オープンファシリティセンター タンパク質・遺伝子解析室

E mail: k-tsuka@fujita-hu.ac.jp、内線 9928