

1. 反応液調製 (0.2ml tube)	節約法	ABI 推奨法
• BigDye Terminator Ready Reaction Mix	2 $\mu$ l	4 $\mu$ l
• 5 X Sequencing Buffer	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l
• Primer(3.2~5 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
• Template DNA (~ __ng = __bp $\times$ 0.1)	__ $\mu$ l	__ $\mu$ l
• ミリ Q 水	__ $\mu$ l	__ $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>1 0 <math>\mu</math>l</b>	<b>2 0 <math>\mu</math>l</b>

## 2. Thermal cycling

1. Hold	96°C	1min	
2. Cycle	96°C	10 sec	—
	50°C	5 sec	25~35 cycles
	60°C	2~4 min	—
3. Hold	4~12°C	store	

## 3. サンプルの精製 (エタノール沈澱はすべて室温 20°Cで)

反応済みサンプル 10  $\mu$ l (節約法)

↓ + 1  $\mu$ l Sodium Acetate/ EDTA Buffer を加える

(\*組成 : 1.5M Sodium Acetate、250mM EDTA、pH8.0)

vortex

↓ + 40  $\mu$ l 100%エタノール (室温保存) を加える

vortex

↓

1 5 分間室温放置

↓

遠心 2 0 °C、15000rpm 1 5 分

↓

マイクロピペットで上清を完全に除く

↓ + 80~100  $\mu$ l 70%エタノール (室温保存) をチューブの壁を洗うように加える

遠心 2 0 °C、15000rpm 5 分

↓

マイクロピペットで上清を完全に除く

↓

アルミホイルでチューブスタンドを覆って、真空乾燥 4 分

↓

泳動直前まで-2 0 °Cで保存

\*Sodium Acetate/EDTA Buffer(pH.8.0)の作り方

3M Sodium Acetate(pH.8.0) と 500mM EDTA Buffer(pH.8.0)を 1 : 1 の割合で混ぜる。