

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

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 μ l (節約法)

↓ + 1 μ l Sodium Acetate/ EDTA Buffer を加える

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

vortex

↓ + 40 μ 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 μ 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。