

1. 反応液の調整

BigDye Terminator Ready Reaction Mix	2 μ l
サンプル DNA	
5 \times buffer	1 μ l
primer	4.8 pmol
ddH ₂ O	
<hr/>	
total volume	10 μ l

※ Ready Reaction Mix を 8 μ l 使用し、total が 20 μ l スケールのメーカー推奨プロトコールの場合シグナルが強く出過ぎることがあります。XTerminator での精製を行う場合はこの条件で行っててください。

2. 精製

反応済みサンプルに SAM 溶液、XTerminator 溶液を加え攪拌します。

96 穴プレート (シールは確実に行ってください)、0.2ml チューブのままでも 1.5ml チューブに移しても攪拌さえ出来れば大丈夫です。お持ちのボルテックスミキサーに応じて行ってください。

反応済みサンプル	10 μ l
SAM 溶液	45 μ l
XTerminator 溶液	10 μ l
<hr/>	
Total volume	65 μ l

※ SAM 溶液に白濁が生じている場合、37°C で 30min 程度保温し、析出物を溶解させてから利用してください。

※XTerminator 溶液はビーズの懸濁液です。使用前にはよく攪拌し、沈殿が無くなった事を確認してから利用してください。すぐに沈殿を始め、不均一になるため、使う直前ごとに攪拌し、ピペティングしながらのサンプリングなど工夫をされてみてください

い。

※XTerminator 溶液はビーズの懸濁液です。通常のチップでは径が細すぎるためビーズに対し水分を多く吸引することになりビーズを適正量添加できなくなります。これを防ぐため広径チップを利用する事をお薦めします。「通常のチップ先端をハサミ等で切断し使用した場合正確な量を分注できないことがありますのでお止めください」とメーカーのプロトコールにはありますが、丁寧に（正確に）行えば問題はないようです。

※SAM 溶液と XTerminator 溶液をプレミックスしてから利用する事も可能ですが、さらに沈殿が生じ易くなります。

以上を混ぜ合わせた後、2000rpm 以上、振れ幅 4mm 以上の条件で 20min 攪拌を行ってください。

※「回転数が分からない機種の場合最大速度で攪拌」とメーカーのプロトコールにはありますが、お使いのミキサーに応じてお試してください。

※長時間高回転での使用が想定されていない機種ではオーバーヒートが発生する事があるためご注意ください。

※本来のプロトコールは 30min ですが短い領域のピークが弱くなることがあります。まずは 20min でお試しください。

3. 遠心分離によるビーズの除去

ビーズがサンプルに残留した場合、キャピラリーカラム（約 12 万円）への悪影響が予想されます。ビーズの除去は完全に行ってください。

※本来、XTerminator で精製したサンプルはキャピラリーの先端がプレートの底から離れたモジュールで使用する事が推奨されています。しかし、現在遺伝子実験施設では、ウェルの底までキャピラリーが差し込まれるモジュールを使用しているため、以下のように 2 回の遠心分離を行い、ビーズ除去を確実に行ってください。

1000 x g 以上、4min 以上で遠心分離します。

→上清 45 μ l を新しいチューブに移します。

再度 1000 x g 以上、4min 以上で遠心分離します。

→上清 30 μ l を新しいチューブに移します。

-----以下未確認-----

アルミホイルで遮光し -20°Cで保存