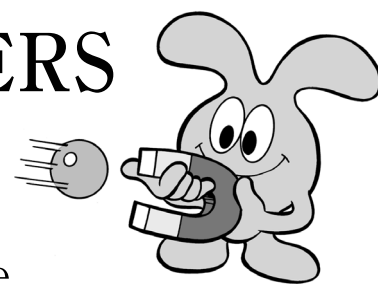


DYNABEADS LETTERS



P53 PCR - Direct Sequence

1. 国立小児病院小児医療研究センター ウイルス研究室
 2. 兵庫医科大学 第二内科学教室
- 浅田 穰¹、水谷 修紀¹、和田 浩²

Direct Sequence

5'末端がbiotinラベルされているantisense primerを用いてPCRを行う。

genomic DNA	0.1 μ g
10 x reaction buffer	5 μ l
dNTP's mix	2 μ l
5'-primer	5 pmol
3'-primer	5 pmol
DDW	
Taq polymerase (Ampli Taq)	1 unit
<hr/>	
total	50 μ l

PCR program	97°C	7 min
	72°C	6 min
	94°C	30 sec
	63°C	30 sec
	72°C	1 min以上 30 cycles
	72°C	10 min

PCR産物はその一部を泳動し、シングルバンドであることを確認し、以下のステップへ進む。

- (1) PCR産物の40 μ lを取り、新しいチューブに移す。この時、mineral oilをなるべく入れないようにする。
- (2) Dynabeads M-280 streptavidin の20 μ lを取り、B&W buffer (1~2M NaCl/TE) 100 μ l で2回洗い、B&W buffer 40 μ l にresuspendする。
- (3) (1)に(2)を加え、室温で15 min, rotateしながらincubateする。
- (4) 上清を除去し、B&W buffer 40 μ lで2回洗う。
- (5) 0.1N NaOH 10 μ lを加え、室温で10 min, rotateしながらincubateする。
- (6) 上清は別のチューブへ回収し、Dynabeadsに0.1N NaOH 50 μ lを加え、1回洗う。***
- (7) B&W buffer 40 μ lで3回洗い、TE 50 μ lで1回洗う。
- (8) TE 50 μ lにresuspendする。

以上の操作で、Dynabeads 上に1本鎖のPCR産物がついている状態となる。
続いて、sequence反応へ進む。SEQUENASE kitを用いる。

(9) TEを除き、DDW 7 μ lにresuspendし、以下を混合し、annealingを行う。

5'-primer	1 μ l(0.5 pmol/ μ l)
sequencing buffer	2 μ l
beads in DDW	7 μ l
<hr/>	
total	10 μ l

(10)ドライブロックで65 $^{\circ}$ C、15 min heatした後、ブロックのスイッチを切り、60 min 放置する。

これを annealing mixとする。

(11)以下の mixを作る。***

annealing mix	10 μ l
0.1M DDT	1 μ l
1/5 labelling mix(DDWで希釈)	2 μ l
α -32P-dCTP	1 μ l
1/8 sequenase(dilution bufferで希釈)	2 μ l
<hr/>	
total	16 μ l

室温で 5 min 放置する。

(12) GATC 各々の termination mix 2.5 μ l に(11)の mix を3.5 μ lずつ分注し、37 $^{\circ}$ C、10 min incubate する。

(13) stop solution 4 μ lを加える。

(14) 80 $^{\circ}$ C、2 min heatし、上清を約10 μ l 回収する。****

ゲル電気泳動は従来と同様に行う。ゲルは6 % polyacrylamide gel で 0.5 x TBEとする。

また、泳動前のサンプルは heat はしなくてよい。

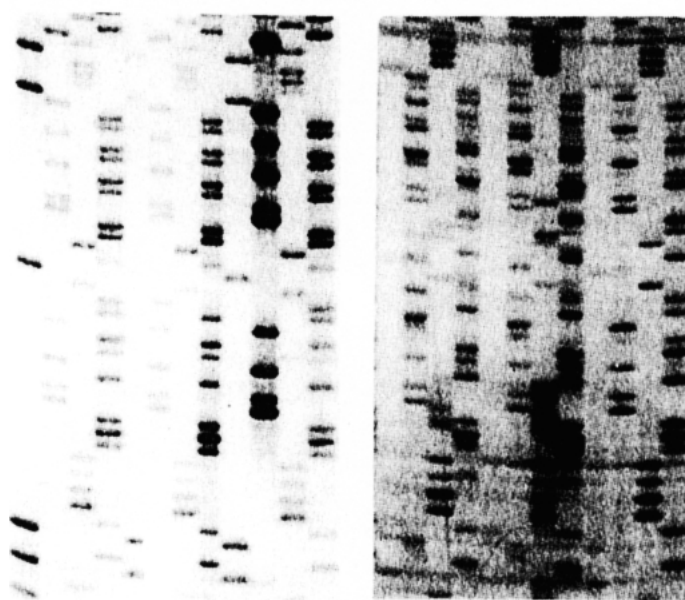
** 上記(6)のステップで回収した上清から逆向きのdirect sequenceが可能である。

HClで中和し、70 % EtOHで塩を洗ってtemplateとする。

*** P53に関しては上記の条件で sequence 反応はほぼ先端まで達している。

より5'側を読みたいときは labelling mix をさらに希釈して使う。

**** 残った Dynabeads M280 streptavidin は適当量のTEを加え、4 $^{\circ}$ Cで保存できる。



Solid phase

Asymmetric PCR

お問合せは 日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL (03)3593-3211〔代〕 FAX (03)3593-3216