

Sequencer 373A (2階)

(by R.Kawai-Hirai)

1. 専用のピーカーに urea 40.0 g, dW 20 ml, 10xTBE 8 ml, 40% AA 12 ml を取り、穏やかに加熱しながら30分攪拌。(heat 目盛り 3, stir 目盛り 4)
2. ガラス板を専用洗剤(バイオノックス)でよく洗い、dWを流した後、iso-PrOHで磨く。スパーサーも洗浄し、ガラス板の表裏に気をつけて組み立てる。
3. ゲル溶液が室温であることを確認し、メスシリンダーにて 80 ml にメスアップ。0.2 μ m ディスポフィルターで濾過および脱気(約15分)。(ディスポフィルターは使用后すぐにdWで洗浄、5回まで使用可)
4. 濾液に、400 μ l 10% APS(直前に調製: APS 50 mg / 500 μ l dW)、45 μ l TEMEDを静かに加え、組み立てたガラス板に流し込む。
5. キャスト後、2時間以上経ったら、Sequencer本体のスイッチを入れる。
6. ゲル板からキャストイングコーム、テープをはずし、ガラス板表面をバイオノックスで洗浄、dWを流し、iso-PrOHで磨く(下部1/3を念入りに)
7. Macを立ち上げる。
プレートチェックを行う。("Main Menu" "Start Pre-run" "Plate Check")
4色のベースラインのうち、赤色にポインタの先端を合わせ、Y軸の値が1000となるように、電圧を調節。("Main Menu" "Calibration" "Configure" "more" "more" "more" "oo" "change" "Main Menu" "Monitor Run") (プレートチェック終了時 "Abort Run")
8. ヒートブロックを90°Cにしておく。
1xTBEを1.5l 調整。
9. ゲルにシャークコームを差し込み、バッファークャンバーをセット。ウエルをリンス後、プレランを行う。("Main Menu" "Start Pre-run" "Pre-Run Gel" "Start Scan") 開始直後の電圧値が1100 - 1400 V、電流値が21 - 25 mAであることを確認。5 - 10分電気泳動する。
10. 1サンプル当たり4 μ l のローディングバッファ(50 mM EDTA 1: 脱イオン化ホルムアミド 5)でサンプルをピペティングにより溶解させる。
11. サンプルを 90°C, 2分加熱後、氷で急冷する。ウエルを洗浄後、サンプルをロードして、泳動を開始。("Start Run")

- 11'. サンプル数が12より多い場合は、まず12以下のサンプルをロード、泳動開始後、残りのサンプルをヒート・ショック処理する。
初めのサンプル泳動開始10分後に、泳動を中断させ("Interrupt Run")、ウエルを再度洗浄後、サンプルをロードし、泳動再開("Resume Run")。
12. MacのFinderを開き、"Gel File"とフォルダー"Results of ooo"を削除。
"Data Collection"に戻り、"Edit"メニューの"Settings"を選択して設定。
次に、"File"メニューから"New Sample Sheet"を選択し、サンプル名、プライマー等を入力。
サンプルシート入力後、ウィンドウを閉じ、コントローラーの"Collect"をクリックする。
"Scan #"がカウントすることを確認したら、モニターを一番暗くし、Sequencerから離れてよい。
- 13 データ・コレクション、自動解析が終了したら、プリンターのスイッチを入れてから、Macを再起動させる。
- 14 データをFD(12サンプルで2HD1枚)に写し、研究室のMac("Manhattan" "sequence data")に入れる。