

京都大学大学院医学研究科 医学研究支援センター
遺伝情報解析室

DNA シークエンス受託解析利用の手引き

目次

1. はじめに	…2
2. 利用の流れ	…3
① 依頼書に必要事項を記入する	…3
② サンプルを準備する	…4
③ 依頼書(Word ファイル)をメールで送る	…6
④ 依頼書とサンプルを提出する	…6
⑤ 後日メールで結果を受け取る	…6
3. シークエンス解析の詳細	…7
① シークエンス反応試薬	…7
② シークエンス反応サイクル	…7
③ シークエンス反応後のサンプル精製	…7
④ シークエンサー	…7
⑤ 泳動条件	…7
4. DNA シークエンス受託解析利用負担金と支払方法	…8
① 利用負担金	…8
② 請求時期・徴収方法	…8
5. 再解析について	…8
6. その他	…8

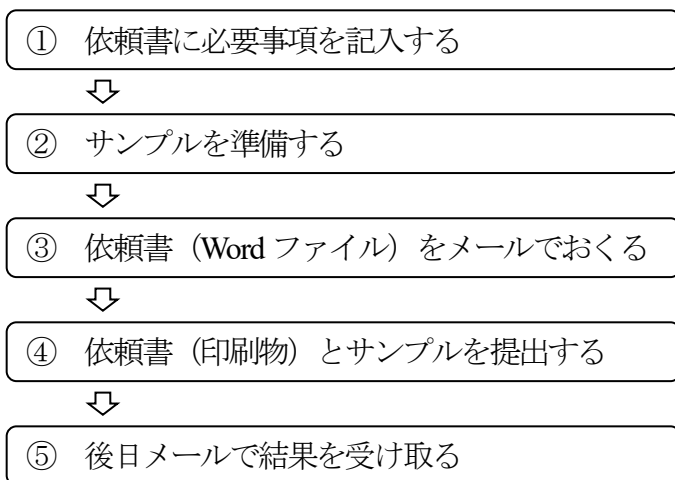
1. はじめに

- 当室の DNA シークエンス受託解析は京都大学内限定のサービスです。
学外の方は利用できません。
- 当室の DNA シークエンス受託解析は研究目的にのみ使用できます。
診断には利用できません。
- 利用にあたって事前に医学研究支援センターへ利用登録を行ってください。
登録は KUMaCo から行います。

<http://support-center.med.kyoto-u.ac.jp/SupportCenter/kumaco>

2. 利用の流れ

DNA シークエンス受託解析は以下の流れで利用できます。



① 依頼書に必要事項を記入する

「DNAシークエンス受託解析依頼書」に必要事項を記入して下さい。「DNAシークエンス受託解析依頼書」は医学研究支援センターホームページからダウンロードできます。

URL: <http://support-center.med.kyoto-u.ac.jp/SupportCenter/dna>

(表)

MRSC DNA 2014

依頼書 No. _____

医学研究支援センター
DNAシークエンス受託解析依頼書 (英文・Printout, 5頁用紙) (用)
DNA Sequencing Service Application Form (for PCR Product and Plasmid)

1. 依頼書の日付 Date	年 月 日
2. 依頼書 Request	[英名を記入] [日本語を記入: Connection]
3. 依頼サンプル名 Sample Name	英名 *サンプル名(英名)は必ず記入してください。Please use PCR product or plasmid name.
4. 依頼内容 Request	<input type="checkbox"/> 1. シークエンス反応(単独) Sequencing Reaction (Singleplex) <input type="checkbox"/> 2. 両方向のシークエンス Bidirectional Sequencing Bb. 反応試薬 Reagent Bb. サンプルの量 Sample Amount <input type="checkbox"/> Singleplex <input type="checkbox"/> Bidirectional <input type="checkbox"/> BigDye v1.1 <input type="checkbox"/> BigDye v3.1 (LITM) <input type="checkbox"/> BigDye v3.1 (LITM) <input type="checkbox"/> BigDye v3.1 (LITM) (High Resolution) <input type="checkbox"/> BigDye v3.1 (LITM) (High Resolution) (High Resolution)
	<input type="checkbox"/> 3. シークエンス反応と泳動 Sequencing Reaction and Electrophoresis Cc. シークエンス反応試薬 Sequencing Reaction Reagent <input type="checkbox"/> BigDye v1.1 <input type="checkbox"/> BigDye v3.1 (LITM) <input type="checkbox"/> BigDye v3.1 (LITM) (High Resolution) <input type="checkbox"/> BigDye v3.1 (LITM) (High Resolution) (High Resolution)
5. シークエンス反応試薬 Sequencing Reaction Reagent	<input type="checkbox"/> 泳動試薬 Buffer <input type="checkbox"/> シークエンス反応試薬 Sequencing Reaction Reagent 泳動試薬 Buffer 泳動試薬 Buffer シークエンス反応試薬 Sequencing Reaction Reagent シークエンス反応試薬 Sequencing Reaction Reagent シークエンス反応試薬 Sequencing Reaction Reagent シークエンス反応試薬 Sequencing Reaction Reagent シークエンス反応試薬 Sequencing Reaction Reagent シークエンス反応試薬 Sequencing Reaction Reagent
6. シークエンス反応試薬 Sequencing Reaction Reagent	<input type="checkbox"/> PCR product <input type="checkbox"/> Plasmid (必ず PCR 産物と Plasmid の両方を記入してください) <input type="checkbox"/> PCR product <input type="checkbox"/> Plasmid (必ず PCR 産物と Plasmid の両方を記入してください)
7. シークエンス反応試薬 Sequencing Reaction Reagent	<input type="checkbox"/> PCR product <input type="checkbox"/> Plasmid (必ず PCR 産物と Plasmid の両方を記入してください) <input type="checkbox"/> PCR product <input type="checkbox"/> Plasmid (必ず PCR 産物と Plasmid の両方を記入してください)
8. 依頼者名 Requester Name	<input type="checkbox"/> First Name (姓) First Name (Last Name) <input type="checkbox"/> Surname (姓) Surname (Last Name) <input type="checkbox"/> 氏名 (姓) Name (Last Name)

* 日本語の依頼書は必ず日本語で記入してください。Please fill in the request form in Japanese.
Please use PCR product or plasmid name.

医学研究支援センター DNAシークエンス受託解析
DNA Sequencing Service Application Form (for PCR Product and Plasmid)
E-mail: info@support-center.med.kyoto-u.ac.jp

(裏)

MRSC DNA 2014

サンプルネームシート(依頼書用紙, 48 サンプルまで)
Sample Name Sheet (for Request Form, 48 samples)

Sample Name シークエンス反応試薬(泳動試薬)の番号, サンプルの番号, 泳動試薬(泳動試薬)の番号(1-12)を記入して下さい。
Please use the number of the sequencing reaction reagent (泳動試薬) and the number of the sample name sheet (依頼書用紙) to identify the sample. The number of the sequencing reaction reagent (泳動試薬) and the number of the sample name sheet (依頼書用紙) are 1-12.

泳動試薬(泳動試薬)の番号 Sequencing Reaction Reagent (泳動試薬) No.	サンプル名 Sample Name	泳動試薬(泳動試薬)の番号 Sequencing Reaction Reagent (泳動試薬) No.	サンプル名 Sample Name
A 1		D 13	
2		14	
3		15	
4		16	
5		17	
6		18	
7		19	
8		20	
9		21	
10		22	
11		23	
12		24	
B 1		E 25	
2		26	
3		27	
4		28	
5		29	
6		30	
7		31	
8		32	
9		33	
10		34	
11		35	
12		36	
C 1		F 37	
2		38	
3		39	
4		40	
5		41	
6		42	
7		43	
8		44	
9		45	
10		46	
11		47	
12		48	

サンプルの入れ方(泳動試薬)の番号, 泳動試薬(泳動試薬)の番号, サンプルの番号, 泳動試薬(泳動試薬)の番号(1-12)を記入して下さい。Please use the number of the sequencing reaction reagent (泳動試薬) and the number of the sample name sheet (依頼書用紙) to identify the sample.

◇ 記入方法

*「2. 委託内容」は以下の2通りが選べます。

「I. シークエンス反応と泳動」 … Template と Primer を混ぜた状態でご提出下さい。

こちらでシークエンス反応から泳動まで行います。

「II. 泳動のみ」

…シークエンス反応を行い精製・乾燥したものを、または泳動の準備ができたものをご提出下さい。

*「3. シークエンス反応条件」は以下の2通りが選べます。

「通常条件」 …通常はこちらを選んで下さい。

「カスタム」 …ご希望の反応サイクルを記入して下さい。ただし、こちらを選択する場合は必ず事前にスタッフにご相談下さい。

*「6. 泳動条件」は以下の2種類があります。特に希望がないときは「どちらでも可」にチェックを入れて下さい。

「Fast」 …約1時間泳動します。最大で約700bp読めます。通常はこちらを優先して泳動します。短い配列を読むとき、お急ぎのときはこちらをお勧めします。

「Standard」 …約2時間泳動します。最大で約850bp読めます。なるべく長くよみたいときはこちらをお勧めしますが、解析結果の返送が遅くなる場合があります。

② サンプルを準備する

委託内容によってサンプルの準備方法が異なります。

(a)「シークエンス反応と泳動」の場合

Template + Primer + H₂O = 12 μ l となるよう Tube または Plate に分注して下さい。

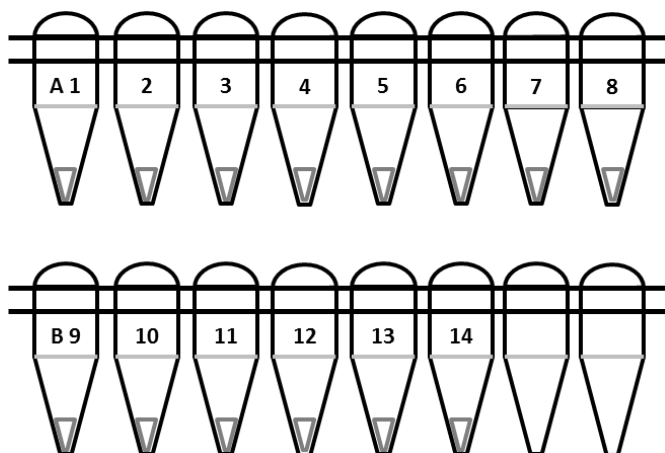
サンプル数が48以下の場合 → PCR用8連 tube

サンプル数が48より多い場合 → 96穴PCR plate (縦に8サンプルずつ、間を空けず。)
遺伝情報解析室側で、これらに反応試薬8.0 μ lを加え、Final volume 20 μ lとして、シークエンス反応を行います。その他センターでの詳しいプロトコルは2を参照ください。

Template 及び Primer 量の目安は以下の通りです。(ABIプロトコルより転載)

Template	Quantity
PCR product	
100–200 bp	1–3 ng
200–500 bp	3–10 ng
500–1000 bp	5–20 ng
1000–2000 bp	10–40 ng
>2000 bp	20–50 ng
Single-stranded	25–50 ng
Double-stranded	150–300 ng
Cosmid, BAC	0.5–1.0 μ g
Bacterial genomic DNA	2–3 μ g
Primer	3.2 pmol

◇ 8連 tube の場合のサンプルの入れ方(例:14 サンプルの場合)



サンプルの入っているチューブに通し番号をつけ、左端のチューブに8連チューブ指定アルファベット(A~F)を記入して下さい(上図参照)。間は空けないでください。

◇ 96 穴 PCR plate の場合のサンプルの入れ方(例:50 サンプルの場合)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○
B	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○
C	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○
D	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○
E	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○
F	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○
G	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○
H	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○

A1, B1, C1…の順に縦に8サンプルずつ入れてください。間は空けないでください。

(b)「泳動のみ」の場合

使用可能な試薬は Applied Biosystems 社製 BigDye v3.1 および BigDye v1.1 です。

各自でシーケンス反応を行ったサンプルを精製後、8連 tube または 96 穴 PCR plate に乾燥した状態か、または HiDi Formamide(15µl)に溶解した状態で提出して下さい。

精製に BigDye XTerminator 精製キットを使用する場合は精製後の上清(100µl 以上)を提出してください。

③ **依頼書(Word ファイル)をメールで送る**

記入済みの DNA シークエンス依頼書ファイル(Word ファイル、PDF 不可)をメールでお送り下さい。

E-mail: infoseq@support-center.med.kyoto-u.ac.jp

④ **依頼書とサンプルを提出する**

サンプルと記入済みの DNA シークエンス依頼書(印刷物)を下記提出場所までお持ち下さい。郵送・学内便では受け付けません。

提出場所：医学研究科 医学研究支援センタースタッフ室 (402 号室)
 (吉田キャンパス医学部構内 医学部総合解剖センター棟 4 階東館)
 受付時間：平日 9:30～17:00 (土日祝、および大学一斉休業日は閉室)

【重要】 依頼書(Word ファイル)・依頼書(印刷物)・サンプルの 3 点を提出した時点で受付完了となります。

⑤ **後日メールで結果を受け取る**

サンプルを受け付けてから 1～3 開室日後(閉室日は除く)に返送します。③で送ったメール宛に解析結果のファイルを E-mail で返信します。送付するファイルは、1 サンプルにつき波形ファイル(ab1 ファイル)1 個とテキストファイル(seq ファイル)1 個の 2 種類です(両方とも Windows 版)。

波形ファイル(ab1 ファイル)を見るためには専用ソフトが必要です。ソフトをお持ちでない方はフリーソフトウェアをご利用下さい。(Sequence Scanner Software, Chromas, DNA Chromatogram Explorer Lite, Finch TV, 4Peaks など。)なお遺伝情報解析室ではフリーソフトウェアの利用によるトラブルについては何ら責任を負いません。利用に際しては各自の責任において、十分確認の上お使い下さい。

3. シークエンス解析の詳細

① シークエンス反応試薬

Applied Biosystems 社製 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を 1/8 に希釈して用います (ABI 推奨).

* 試薬・手技に問題がないか確認するために、毎回 pGEM3Zf(+)(Primer:M13) を Control Sample として用いています.

* Large DNA (Cosmid, BAC 等) の場合には、BigDye v3.1 を希釈せずに用います.

② シークエンス反応サイクル

以下の ABI 推奨の反応サイクルを使用します.

96 °C	30 s	
↓		
96 °C	10 s	
50 °C	5 s	25 cycles
60 °C	4 min	
↓		
4 °C	and hold	

* Large DNA (Cosmid, BAC 等) の場合には、シークエンス反応を 60 cycles で行います.

* 二次構造をとるテンプレートなどでは、上記反応サイクルでは反応がうまく進まない場合があります. その場合は「カスタム」を選択し、シークエンス反応サイクルを適宜変更して下さい. 詳細は「DNA シークエンス受託解析を効率よく利用して頂くために」をご確認ください.

③ シークエンス反応後のサンプル精製

シークエンス反応後のサンプルの精製には、ゲル濾過法を採用しています. (エタノール沈殿法による精製に比べ、ハンドリングエラーの確率が格段に下がります.)

④ シークエンサー

Applied Biosystems® 3500xl Genetic Analyzer (24 本キャピラリーシステム, 50cm キャピラリー装着) を使用しております.

⑤ 泳動条件

ラン モジュール	解読塩基数	ランタイム	備考
Fast run	最大約 700bp	60 分	Fast run を優先して泳動します.
Standard run	最大約 850bp	120 分	Fast run 泳動の後に泳動しますので、結果が出るのが遅くなる場合があります.

4. DNA シークエンス受託解析利用負担金と支払方法

① 利用負担金

DNA シークエンス受託解析にかかる利用負担金は以下の通りです。

項目	利用負担金	
	医学研究科	それ以外学内
シークエンス反応と泳動 (Plasmid and PCR Products 等)	480 円/サンプル	660 円/サンプル
シークエンス反応と泳動 (Cosmid, BAC 等)	1,600 円/サンプル	1,780 円/サンプル
泳動のみ	220 円/サンプル	280 円/サンプル

* 医学研究支援センター解析受託利用負担金等内規別表より (2020 年 4 月 1 日改訂)

<http://support-center.med.kyoto-u.ac.jp/SupportCenter/mrscnaiki>

② 請求時期・支払方法

4-6月, 7-9月, 10-12月, 1-2月, 3月の5期に分けて精算します。詳しい精算方法は以下のページに掲載されている「[医学研究支援センター利用負担金支払いの流れ](#)」をご覧ください。

<http://support-center.med.kyoto-u.ac.jp/SupportCenter/f3#利用方法>

5. 再解析について

シークエンス解析が遺伝情報解析室スタッフの人為的なミスや機械トラブルにより失敗した場合は、無料で再解析を行います。それ以外の再解析は、すべて課金対象となります。あらかじめご了承ください。(とくに GC-rich 配列・Gateway ベクターなど解析の難しい配列を依頼される場合はご注意ください。)

結果に関してご不明な点がございましたらお気軽にご相談下さい。

6. その他

参考資料として別紙「DNA シークエンス受託解析を効率よく利用して頂くために」を HP 上に公開しております。興味のある方は御一読下さい。

<http://support-center.med.kyoto-u.ac.jp/SupportCenter/dna>

<連絡先>

京都大学大学院医学研究科 医学研究支援センター 遺伝情報解析室
京都大学吉田キャンパス 医学部構内総合解剖センター棟東館 4 階
電話: 075-753-4418 内線: (16-)4418

E-mail: infoseq@support-center.med.kyoto-u.ac.jp

URL: <http://support-center.med.kyoto-u.ac.jp/SupportCenter/dna>