

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 KUMaCo から依頼する	…3
	② サンプルを準備する	…4
	③ 依頼書とサンプルを提出する	…6
	④ 後日メールで結果を受け取る	…6
3.	シーケンス解析の詳細	…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	…8
4.	DNA シークエンス受託解析利用負担金と支払方法	…9
	① 利用負担金	…9
	② 請求時期・徴収方法	…9
5.	再解析について	…10
6.	その他	…10
7.	連絡先	…10

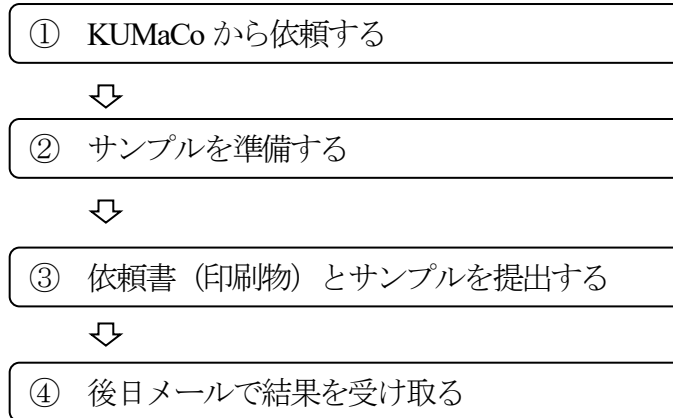
1. はじめに

- 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・生命科学研究支援機構 (iSAL) の利用登録を行ってください。
登録は iSAL ウェブサイト内、KUMaCo のページから行います。

<https://support-center.med.kyoto-u.ac.jp/isal/project/>

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 KUMaCo から依頼する

KUMaCo マイポータルにログインして依頼してください。詳細は遺伝情報解析室のページ掲載の『依頼方法 (KUMaCo マニュアル「6.DNA シークエンス受託解析」)』をご確認ください。

◇ KUMaCo マイポータル依頼画面入力時の注意

* 「2. 委託内容」は以下の3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. シークエンス反応と泳動 (COSMID, BAC)」 …事前にご相談ください。

「III. 泳動のみ」 …シークエンス反応を行い精製・乾燥したもの、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初回に必ず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) 「シーケンス反応と泳動」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。

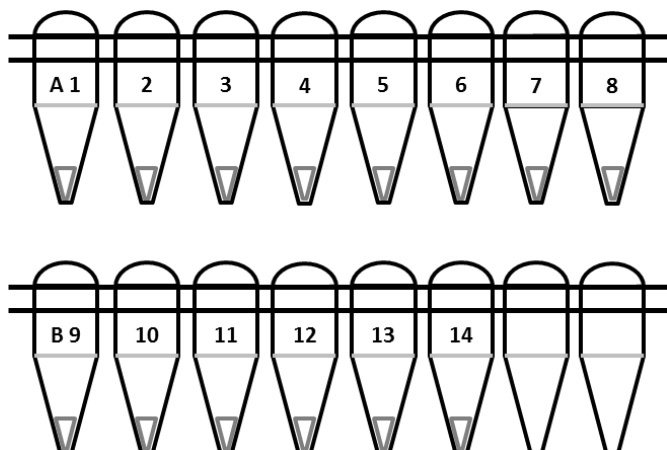
- サンプル数が48以下の場合 → PCR用8連 tube
- サンプル数が48より多い場合 → 96穴PCR plate

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、シーケンス反応を行います。その他当室での詳しいプロトコルは「3. シーケンス解析の詳細」を参照ください。

◇ Template 及び Primer 量の目安 (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) を提出して下さい。

③ 依頼書とサンプルを提出する

サンプルと KUMaCo からダウンロードした 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：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 401a
受付時間：平日 8:00～20:00（土日祝、および大学一斉休業日は閉室）
（8:00-9:30、17:00-20:00 に提出する際には認証 IC カードで扉をあけておはいりください）

④ 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、以下のメールアドレスから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）。

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

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

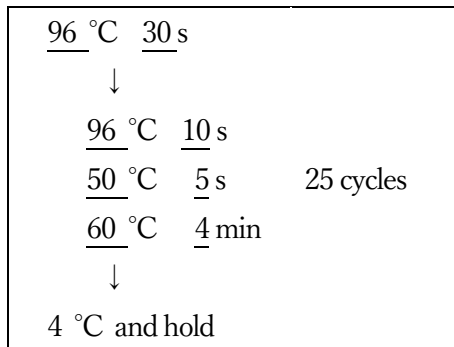
Applied Biosystems 社製 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を 1/8 に希釈して用います (ABI 推奨).

* 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.



* 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	480 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	1,600 円/サンプル
泳動のみ	220 円/サンプル	220 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 (2023 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「iSAL 利用負担金支払いの流れ」をご覧ください。

<https://support-center.med.kyoto-u.ac.jp/isal/organization/#payment>

5. 再解析について

シーケ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 シーケ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>

7. 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>