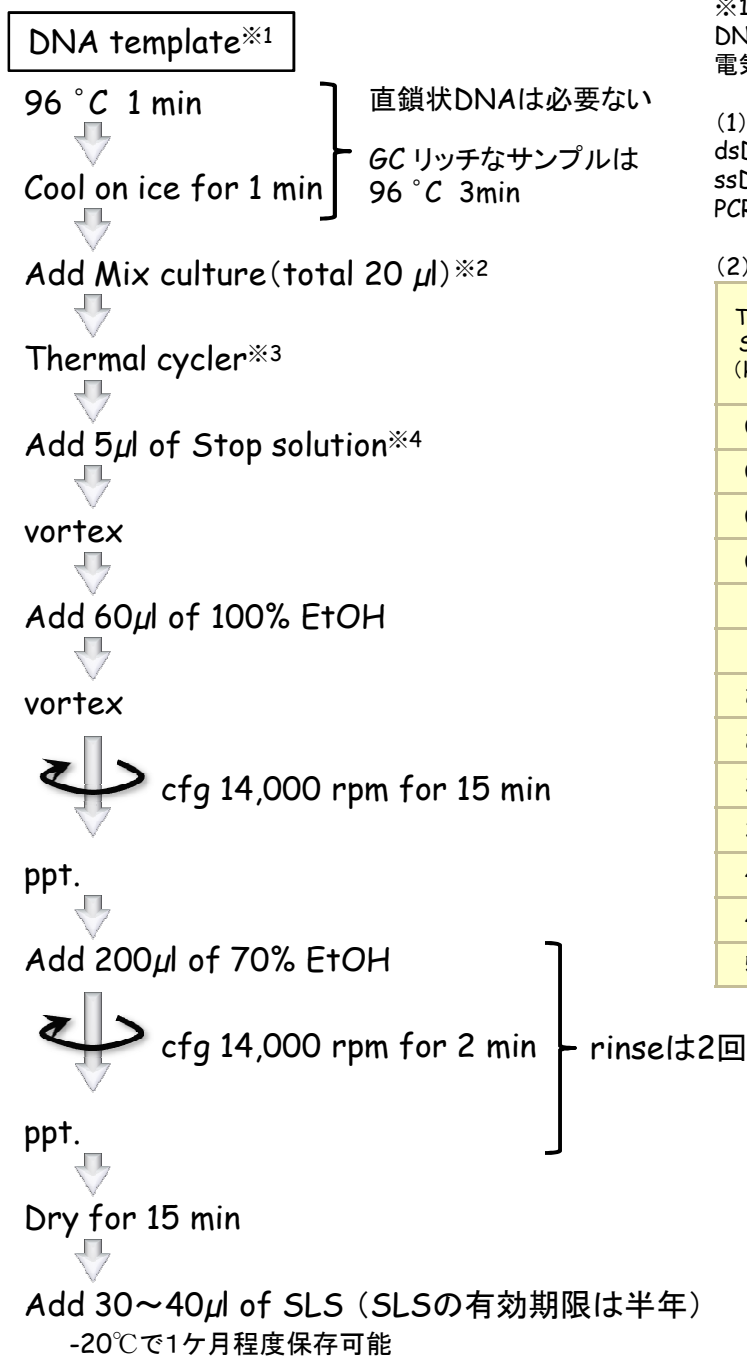


Beckman Sequencer使用のための Sample調整



※1 シークエンス反応に使用するテンプレートDNA の最適量は、DNA のタイプにより異なるため、シークエンス反応前にアガロース電気泳動またはOD 値を測定し、濃度を確認する。

(1) テンプレート量(プライマーとの比を考慮するためmol 数で表示)
dsDNA.....100fmol (50~100fmol)
ssDNA.....50fmol (25~50fmol)
PCR product50fmol (25~100fmol)

(2) DNA サイズによるテンプレート量 (ng) の換算表

Total Size (kbp)	ng for 25 fmol	ng for 50 fmol	ng for 100 fmol	Total Size (kbp)	ng for 25 fmol	ng for 50 fmol	ng for 100 fmol
0.2	3.3	6.5	13	6.0	100	195	390
0.3	4.9	9.8	20	7.0	115	230	455
0.4	6.5	13	26	8.0	130	260	520
0.5	8.1	16	33	9.0	145	300	580
1.0	16	33	65	10.0	165	325	650
1.5	24	50	100	12.0	195	390	780
2.0	33	65	130	14.0	230	455	910
2.5	41	82	165	16.0	260	520	1040
3.0	49	100	195	18.0	295	585	1170
3.5	57	115	230	20.0	325	650	1300
4.0	65	130	260	25.0	410	820	1650
4.5	72	145	290	30.0	490	1000	1500~2000*1
5.0	80	165	325	40.0	650	1300	

★1 テンプレートDNA 使用量は、2μg が最大値

※2 Mix culture

Master Mix	2 μl ~ 8 μl
Primer	1 μl (3.2 pmol)
DNA template	25~100 fmol
dH ₂ O	Up to 20 μl

※3 Thermal cycler

96 °C	20 sec	} 25~35 cycle
50 °C ^{♡1}	20 sec	
60 °C	3 min ^{♡2}	
4 °C		

♡1 T3, T7, M13-F, M13-Rなどでは45 °C 程度が望ましい。

♡2 伸長しにくい場合は長めに設定する。

※4 Stop solution (用時調整)

3M NaAce	2 μl
100mM EDTA	2 μl
Glycogen	1 μl
total	5 μl

Beckman sequencerの基本的な操作方法

分析時間の目安：1レーン(8samples) / 2h

Sequenceに必要なもの

- アクリルアミドゲル
- dH₂O
- Sample Plate ※¹(先がとがっている方のPlate)
- ペーパータオル等
- Buffer Plate ※²

※¹ SampleをPlateに全量(30~40μl)入れ、mineral oilを1滴入れておく

※² Buffer PlateのSampleと対応するレーンに8滴程度のBufferを入れておく

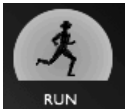
(1レーンに8 Sample未満の場合も、Sampleを入れたレーンにBufferを入れる)

シーケンサーの立ち上げ
Sample・Buffer・ウェットングトレイセット
ゲルセット


CEQ8000とパソコンの電源を入れる(どちらが先でもOK)

ログイン(パスワードを聞いてくるが、Enterをクリック)

CEQ system  を開く

Run  をクリック(→次のOKをクリック)

Direct control  のタブをクリック

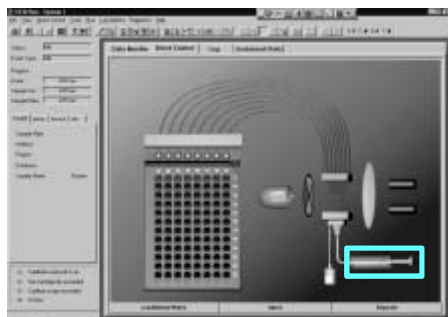
画面中央下の  をクリック(→Start をクリック)

GOの表示が出る

Sample Access Coverを開けてウェットングトレイ(手前からBuffer Plate、ウェットングトレイ、Sample Plate)の水を捨て、ウェットングトレイとフタをdH₂Oですすぎ、Fill LineまでdH₂Oを入れる
※水にはアクリルアミドが含まれるため、ペーパータオル等に吸わせる

手前にBuffer Plate (切れ込みのある方を右奥)、奥にSample Plateをセットする。Buffer Plateには、白いふたをかぶせる

Sample Access Coverを閉めて、Loadをクリック



左図青枠のゲルの部分をクリック
(→次のOKをクリック)

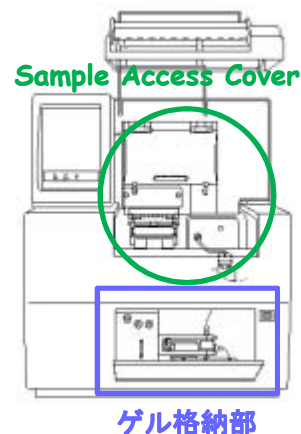
GOの表示が出る

ゲル格納部のふたを開けてゲルの筒を起し、黄色のダミーカートリッジを取って、ゲルをセットする(ゲルカートリッジに付いていたゴムキャップはダミーカートリッジに付ける)

ゲルの筒を倒して、ゲル格納部のふたをする。

instol cartridgeをクリック

Doneをクリック



サ
ン
プ
ル
の
測
定
開
始

SET UP



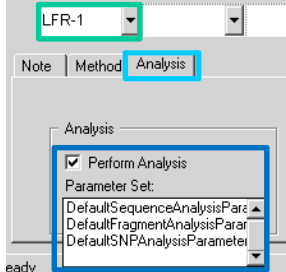
をクリック(→次のOKをクリック)

	1	2
A	pUC18.A01	A2
B	pUC18.B01	B2
C	pUC18.C01	C2
D	pUC18.D01	D2
E	pUC18.E01	E2
F	pUC18.F01	F2
G	pUC18.G01	G2
H	pUC18.H01	H2

Sampleを入れたレーンの部分にSample名を入れていく。

Sample名を入れたレーンの下の ▼ をクリックして、LFR-1にする

左下の Analysis タブをクリック



解析するすべてのレーンを指定して Perform analysis にチェックを入れ、Default Sequence Analysis Parameter にする

メニューバーより File → Save As... を選択

シーケンス名を記入(→次のOKをクリック)

右上の Run Sample Plates  をクリック

Start をクリックし、サンプルの位置を確認(名前を入力した場所の色が変わる)

Display は消しておく

解

Analysis Module  をクリック

メニューバーより File→Open を選択

ダイアログボックスから **Sample Plate Results** のタブをクリック

サンプルプレートの名前を選択

OK をクリック

Sample Plate のダイアログボックスが表示され、**目的のデータ(位置)**をクリック

Open をクリック

析

解析前 **Default Sequence Analysis Parameter** にチェックし忘れていたら、**Analysis**→**Analyze**→**OK**

見たいデータ(画面左)をクリック

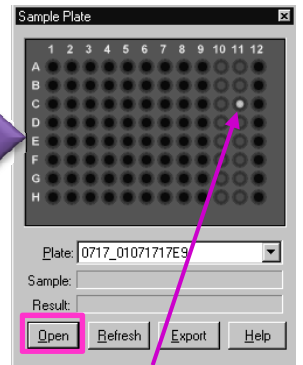
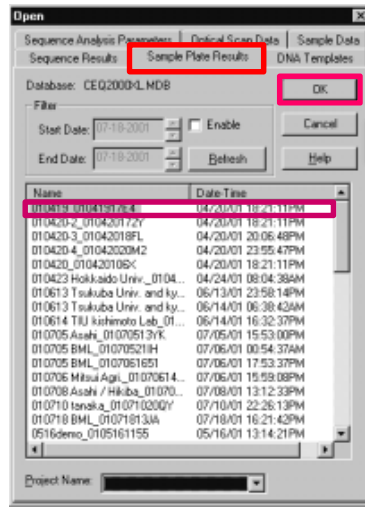
結

果

の

表

示



開きたいデータをクリック

Analyzed Data

解析結果を波形で表示

Base Sequence

解析結果をテキスト形式にて表示

Raw Data

生データの表示

Current

電流値の表示

Voltage

電圧値の表示

Compare Tab

データの並び合わせ

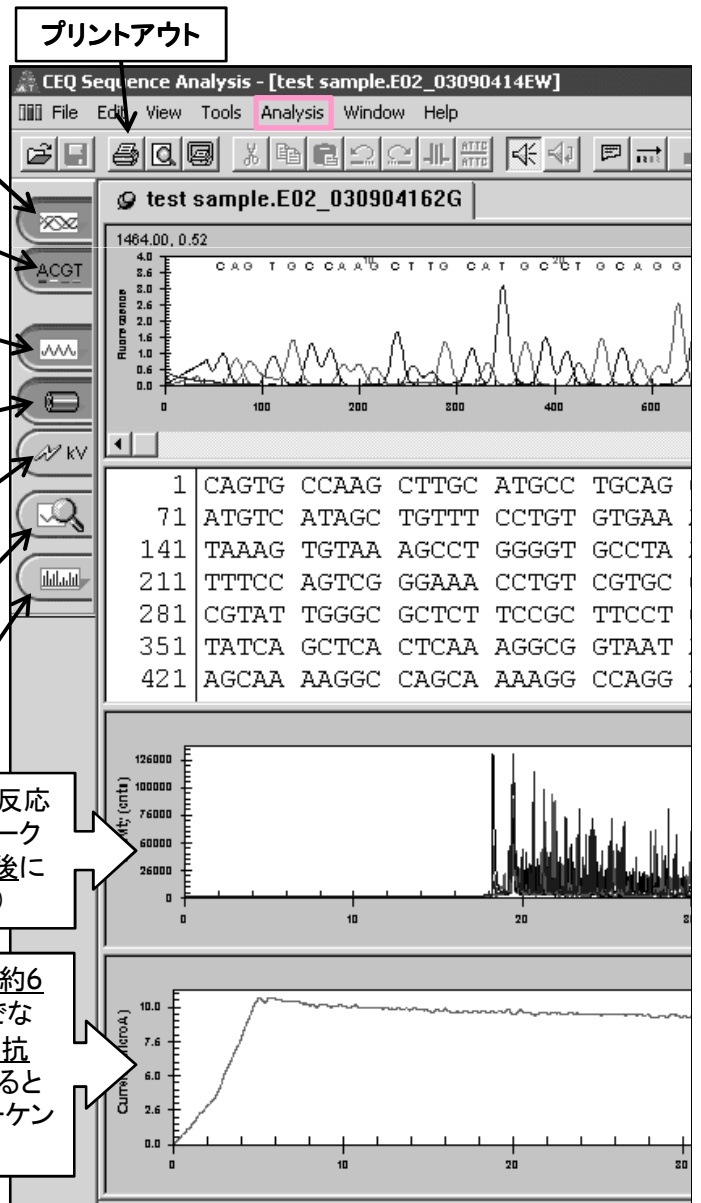
Quality Parameters

ベースコールのクオリティーの表示

最低これらを見ておくと、トラブルシューティング(流しの横の棚のファイル又は、http://www.beckmancoulter.co.jp/anote_dload/index_pro1_CEQ.html)で判断しやすい。

Raw Data は通常20分前後に未反応 Dye のピークが検出され、そのピークのY軸のスケールが100000万前後になります。(エタノール沈殿の場合)

電流値は泳動開始後5分で最大まで上がり、約6~9 μ A程流れます。サンプルの濃度が適正でない場合や何らかの不純物が含まれていると抵抗が変わり、電流値が乱れます。電流値が乱れると未反応Dyeのピークの検出時間が遅れ、シーケンスが長く読めません。



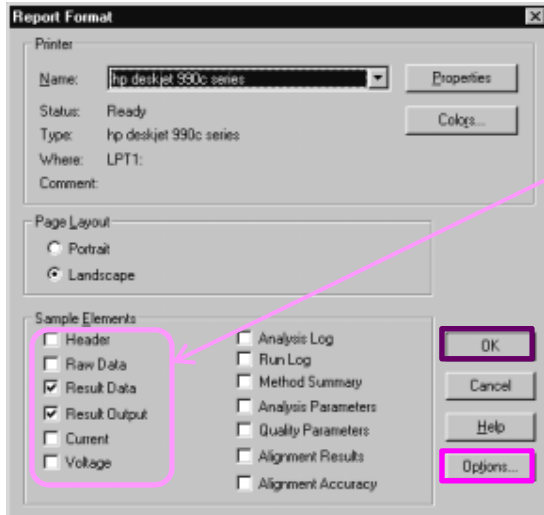
プリントアウト（必要であれば）データの保存

メニューバーよりFile→Report Format...を選択

表示されたダイアログボックスReport Formatよりプリントアウトする項目やプリント用紙の選択

各項目の詳細なパラメータはOptions...のボタンをクリックし、表示されたダイアログボックスOptionで設定

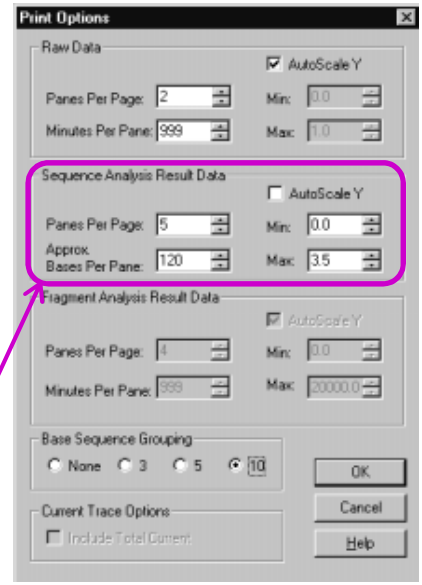
すべての設定が終了したらOKをクリック



Sample Elements
Result Data
 波形データ
Result Output
 シーケンスのテキストデータ

Sequence Analysis Result Data
Panes Per Page
 波形データを表示する際の1ページの段落
Approx Bases Per Pane
 1段に表示させる塩基配列(波形)の数

Auto Scale のチェックを外してMinを0、maxを3.5~4.0ぐらいにすると綺麗にprint out する。

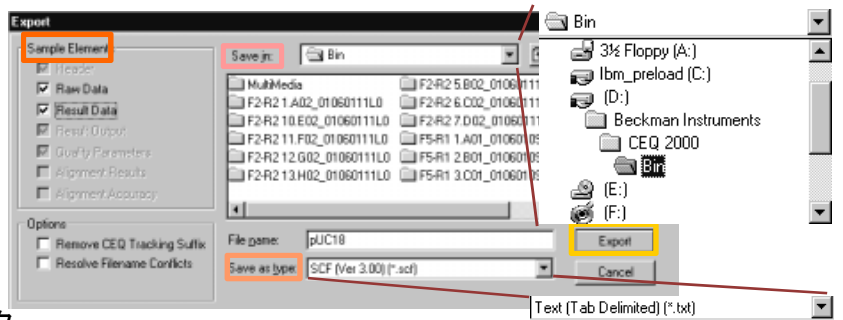


メニューバーよりFile→Exportを選択

「Save in」より転送先を、「Save as types※1」からファイル形式を選択

「Sample Elements※2」より転送するデータタイプを選択

ダイアログボックス上のExportをクリック



※1 Save as type について

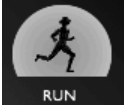
SCF	波形データを含む形式	SCF形式で保存したファイルを開く場合、解析ソフトを入れておく。解析ソフトは、インターネットでフリーソフトがダウンロードできる。
Text	すべてのデータをテキスト形式で表示	BioEdit (メーカーさんイチャオシ!)、Trace Viewer、4peaks、Finch TV、Sequence Scanner Software v1.0、など
SEQ	塩基配列をテキスト形式で表示	

※2 データのタイプ(Sample Elements)


ファイル形式によって転送できるデータのタイプには制限があるため、クリアになっている項目より選択しチェックを入れる。CEQ8000 解析ソフトはscf 形式で転送したAnalyzed Data を開くことができる(この場合に表示されるデータは波形のデータとテキストデータ)。なおプリントアウトも同じデータのタイプを使用。

Raw Data	Raw Data やCurrent など
Result Data	波形データ
Result Output	テキスト形式のデータ

S
a
m
p
l
e
.
B
u
f
f
e
r
.
G
e
l
を
取
り
出
し
、
終
了

Run  をクリック(→次のOKをクリック)

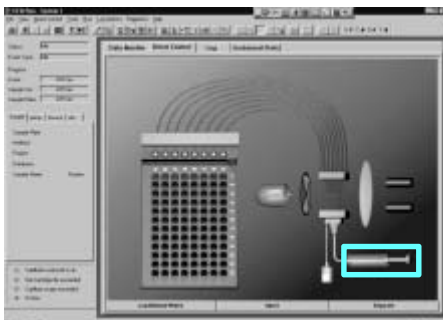
Direct control  のタブをクリック

画面中央下の  をクリック(→Start をクリック)

GOの表示が出る

Sample Access Coverを開けてBuffer PlateとSample Plateを取り出す。白いふたはsequencerに入れておく

Sample Access Coverを閉めて、Loadをクリック



左図青枠のゲルの部分をクリック(→次のOKをクリック)

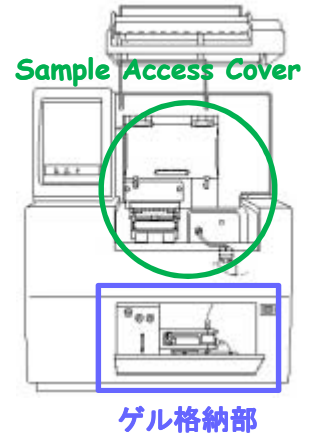
GOの表示が出る

ゲル格納部のふたを開けてゲルの筒を起し、ゲルを取って、黄色のダミーカートリッジをセットする

ゲルの筒を倒して、ゲル格納部のふたをする。

Installed Plugをクリック

パソコン→CEQ8000の順に電源を切る



この他にもCEQ8000には様々な機能があります。
流しの横の棚のプロトコールを参照するか、
http://www.beckmancoulter.co.jp/anote_dload/index_pro1_CEQ.html
からダウンロードしてください。