

Probenvorbereitung

Plasmide

Wir empfehlen, Plasmide im Escherichia coli Stamm DH5a zu vermehren. Anschließend sollte die DNA mit Säulen (z.B. QiaTip Mini, Qiagen) aufgereinigt werden.

PCR Fragmente

Wir empfehlen eine Aufreinigung der PCR Fragmente mit handelsüblichen Säulen. Wichtig ist eine effiziente Abtrennung der PCR Primer, da diese das Sequenzierergebnis beeinträchtigen. Störend wirken sich auch Primerdimere aus.

Primer

Ihr Primer sollte etwa 18 - 20 Nukleotide lang sein. Optimal sind Primer, die eine gleichmäßige Verteilung von G, A, T, und C aufweisen. Längere Wiederholungen von Nukleotiden sollten vermieden werden. Palindrome sollten sich, wenn überhaupt, nicht im 3' Bereich des Primers befinden. Wegen der stabileren Paarung des terminalen Nukleotids kann die DNA Polymerase eine Sequenzierreaktion effizienter starten, wenn ein Primer am 3' Ende ein G oder C trägt. Die Qualität des Primers ist entscheidend für qualitativ hochwertige Sequenzierungen.

Welche DNA-Menge setze ich für eine Sequenzierung ein?

Template	Große[bp]	Menge [ng]
Plasmid-DNA	<8000	150-300
PCR-Produkte	100-200	1-3
PCR-Produkte	200-500	3-10
PCR-Produkte	500-1000	5-20
PCR-Produkte	1000-2000	10-40
PCR-Produkte	>2000	20-50

- Es sollten für die Sequenzierreaktion 5 pmol Primer eingesetzt werden
- Wir sequenzieren auf einem ABI 3130xl-Sequencer unter Verwendung des ABI BigDye®Terminator v.3.1 Ready Reaction Sequenziermix. Bitte stimmen Sie Ihre RtL - Sequenzierungen auf diese Vorgabe ab

Wir empfehlen folgenden Reaktionsansatz für eine Sequenzierungsreaktion

X µl Template (einzusetzende Menge entnehmen Sie bitte obiger Tabelle)
0,5 µl Primer (Stocklösung: 10 µM)
1 µl BigDye®Terminator v.3.1 Ready Reaction Sequenziermix
1,5 µl BigDye®Terminator v1.1, v.3.1 5x Sequencing Buffer
Ad 10 µl mit HPLC-Wasser

Cycling Protokoll

25 Zyklen à
96°C 10 sec
50°C 5 sec
60°C 4 min

Nach dem Ende der Cycle Sequencing Reaktion sollten die Proben bei 4°C gelagert werden, sofern sie nicht sofort weiterverarbeitet (gefällt) werden.

Wir empfehlen folgendes Protokoll zur Fällung der Sequenzierprobe:

- 10µl Sequenzierprobe
- 10µl HPLC-Wasser
- 2µl 3M NaAc (pH 4,6)
- 50µl EtOH p.a. (96%)
- vortexen, für 15 min bei Zimmertemperatur inkubieren
- bei 13 000 rpm für 11 min bei Zimmertemperatur zentrifugieren
- Überstand komplett abnehmen und verwerfen
- mit 250µl EtOH (70%) waschen
- bei 13 000 rpm für 5 min bei Zimmertemperatur zentrifugieren
- Überstand komplett abnehmen und verwerfen
- Sediment trocknen

Wichtig: Es darf sich kein Ethanol mehr im Reaktionsgefäß befinden!

RtL-Proben nicht Freitags versenden!
