

## 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

Ein Versand nicht aufgereinigter PCR Fragmente per Post ist nicht empfehlenswert. Die mögliche Restaktivität der Taq DNA Polymerase beeinträchtigt die Templatequalität. 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 Ready-to-Sequence Reaktion 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

Für RtS-Reaktionen bitte das Volumen zusammen mit dem Primer (**5pmol**) auf **7µl** mit bidest. H<sub>2</sub>O auffüllen. Bitte verwenden Sie 0.2 ml Probengefäße mit **flachem** Deckel.