

## 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. Wir benötigen etwa **1 µg DNA** in einem Mindestvolumen von **15 µl** je Sequenzierung, da wir eine Dialyse und eine Konzentrationsbestimmung Ihrer Proben durchführen.

### 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. Benötigt werden etwa **10 - 100 ng** DNA je Sequenzierung, abhängig von der Größe des PCR-Fragments (siehe Tabelle). Gerne übernehmen wir für Sie die PCR Reaktion und die Aufreinigung des PCR Fragmentes.

Template	Größe[bp]	Menge [ng]
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

### Primer

- Falls Sie zur Sequenzierung universelle Primer benötigen, stellen wir Ihnen diese kostenlos zur Verfügung.
- Sequenzspezifische Primer sind vom Kunden zu stellen. Sind Primer nicht vorhanden, so verweisen wir auf unseren DNA-Synthese-Service

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. Je Sequenzierung werden etwa **5 pmol** Primer benötigt. Die Qualität des Primers ist entscheidend für qualitativ hochwertige Sequenzierungen.