

Jak przygotować matrycę do sekwencjonowania

1. Przygotowanie DNA do sekwencjonowania

- DNA genomowe zawieszane w wodzie (nie mniej niż 10µl na reakcję) o stężeniu:

produkt PCR < 500 bp	50 ng
produkt PCR 500-1000 bp	100 ng
produkt PCR > 1000 bp	200 ng
DNA jednoniciowy	50 - 100 ng
DNA dwuniciowy, plazmid	200 - 500 ng
cosmid, BAC	500-1000 ng
DNA genomowy bakterii	2000-3000 ng

- Produkt reakcji PCR powinien być oczyszczony od mieszaniny reakcyjnej (dNTP, startery, bufor, polimeraza), np. za pomocą kolumnienek lub zestawem ExoSap i zawieszony w wodzie.
- Primer o stężeniu 5 pmoli/µl (5µM) w objętości nie mniej niż 10µl na reakcję.

Do zlecenia należy dostarczyć zdjęcie żelu z dokładnym opisem próbek (ile µl naniesiono na żel, wielkość produktu czy plazmidu, stężenie matrycy).

2. Opis matrycy

Każdy formularz zlecenia należy bardzo dokładnie wypełnić drukowanymi literami wraz odpowiednim opisem próbek do sekwencjonowania. Opis powinien mieć wypełnione pola dotyczące: ID matrycy (nazwa próbki klienta), rodzaj matrycy (produkt PCR, DNA genomowy, plazmid, cosmid, BAC), wielkość matrycy, nazwa primera oraz stężenie matrycy. W rubryce „uwaga” należy wpisać dodatkowe informacje dotyczące próbek: m.in. sposób czyszczenia próbek (ExoSap, kolumnienki, etanol). Można także podać temperaturę *annealingu* T_m startera.

3. Dobór odpowiedniego startera

- optymalna długość 18 - 24 nt
- zawartość par G i C 40-60%
- zrównoważony rozkład nukleotydów GC i AT
- temperatura topnienia startera powinna wynosić od 50-60 °C
- nie używać starterów tworzących struktury drugorzędowe lub dimery.

Parametry swoich starterów mogą Państwo sprawdzić na dostępnych stronach www:

- Primer-Blast http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome
- Oligo Calculator <http://trishul.sci.gu.edu.au/tools/OligoCalculator.html>
- Primer3Plus <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

lub samodzielnie:

$$T_m = (\text{ilość zasad A+T}) \times 2^\circ\text{C} + (\text{ilość zasad G+C}) \times 4^\circ\text{C}$$

Poniższa formuła pozwala wyznaczyć orientacyjne stężenie oligonukleotydu:

$$C \text{ (pmol/}\mu\text{l lub }\mu\text{M)} = (A260 \times 100) / (1.54nA + 0.75nC + 1.17nG + 0.92nT)$$

gdzie: C – stężenie, n_x - liczba zasad typu x w oligonukleotydzie

4. Odbiór wyników

Wyniki przesyłane są na adres e-mail podany w formularzu w formie graficznej (pliki z rozszerzeniem ".abi" lub ".ab1").

Do eksportowania sekwencji służą m.in. darmowe programy:

- * **FinchTV** wersja \geq 1.3.0 - Win98/NT/2000/XP, Linux, Solaris i Mac OSX
- * **Chromas** - Win95/98/NT/2000/XP

Do analizy fragmentów można wykorzystać darmowe programy: "**Peak Scanner Software v1.0**" ze strony Applied Biosystems oraz Genographer <http://hordeum.oscs.montana.edu/genographer/>

5. Czynniki zaburzające reakcję sekwencjonowania DNA

- Użycie TE/ Tris do zawieszania DNA lub startera.
- Użycie fenolu do czyszczenia DNA.
- Denaturacja chemiczna matrycy

6. Przesłanie matrycy

Próbki należy przesyłać przesyłką kurierską lub za pośrednictwem Poczty Polskiej w kopercie z wypełnieniem powietrznym. Matrycę i startery najlepiej umieścić w oddzielnych torebkach strunowych. Próbki do sekwencjonowania i startery są stabilne w temperaturze pokojowej przez kilka dni, zatem można je przesyłać bez wkładów chłodzących.

Uwaga!

Koszty przesyłki pokrywa zleceniodawca.

W przypadku większej liczby zleceń (powyżej 15 próbek do sekwencjonowania, lub całej płytki) CBDNA pokrywa koszty przesłania materiału przesyłką kurierską UPS-standard z terenu całego kraju lub przesyłką kurierską - Maraton z terenu miasta Poznania.