

Abteilung Funktionale und Angewandte Genomik

DNA Sequenzierung

Der 48-Kapillar-DNA-Analyzer 3730 ist der Goldstandard in der genetischen Analyse für den mittleren bis hohen Durchsatz. Die Anwendungen reichen von der Standard-Sanger-DNA-Sequenzierung bis hin zur DNA-Fragmentanalyse wie Mikrosatelliten, AFLP, SNP-Analyse sowie Mutationsnachweis.

Für diese Anwendungen kontaktieren Sie bitte Dr. Jost Muth (0241 6085-12050).

Bei der Kapillarelektrophorese (CE) erreichen Sequenzen guter Qualität unter optimalen Bedingungen in der Regel eine Länge von bis zu 800 eindeutigen Basen, während die ersten 50 Basen aufgrund der Einschränkungen der CE nicht lesbar sind. Die Sequenzierprimer sollten so gewählt werden, dass sie den gesamten Bereich von Interesse abdecken, insbesondere bei der Sequenzierung von langen und kurzen DNA-Fragmenten. Routine-DNA-Sequenzierungen werden dienstags und donnerstags durchgeführt. Die Preise pro Probe betragen 4,50 € für weniger als 24 Proben und 3,00 € für mehr als 24 Proben, wenn diese auf einer PCR-Platte abgegeben werden.

Die Sequenzierergebnisse werden in den Standardformaten .abi und .seq ausgegeben und werden auf einem passwortgeschützten ftp-Server zur Verfügung gestellt.

Proben-Handling für die DNA-Sequenzierung

Template

Die Qualität der Sequenzierergebnisse hängt von der Qualität und Quantität des Templates ab. Template-DNA sollte gründlich aufgereinigt und Kontaminationen (z. B. mit Ethanol) sowie die Verwendung von EDTA-haltigen Elutionspuffern vermieden werden. Der verwendete *E. coli*-Stamm kann einen erheblichen Einfluss auf die Qualität der Template-DNA für Plasmide, Cosmide und BACs haben. Stämme, die für die Proteinexpression optimiert sind, sollten nicht eingesetzt werden.

Die optimale Konzentration der Template-DNA finden Sie in Tabelle 1.

Tabelle 1 Optimale Konzentration der Template-DNA.

Plasmid	Quantität (≥100 ng/μL)	PCR Produkt	Quantität
"standard" plasmid	400-600 ng (140-160 ng/kb)	100 - 200 bp	6-15 ng
"gateway" plasmid	600-900 ng (210-240 ng/kb)	200 - 500 bp	15-30 ng
siRNA plasmid	600-900 ng (210-240 ng/kb)	500 - 1000 bp	25-50 ng
Cosmid, λDNA	2-5 μg	1000 - 2000 bp	40-100 ng
BAC, YAC, PAC	2-5 μg	> 2000 bp	80-200 ng

Primer

Primer, die für die Sequenzierung verwendet werden, sollten eine spezifische Bindungsstelle im Template besitzen und keine Sekundärstrukturen bilden oder zu Dimeren oder Oligomeren hybridisieren. Bei der Sequenzierung von PCR-Templates kann die Verwendung von nested Primern für die Sequenzierung die Qualität des Sequenzierungsergebnisses verbessern.

Vorbereitung der Proben

Sequenzierproben sollten 14 µl in **10 mM Tris-Puffer** (pH 8,0, **kein EDTA**) verdünnte Template-DNA und 2 µL Sequenzierprimer (10 µM, Standardplasmid und PCR-Produkt) für ein Gesamtvolumen von 16 µL enthalten. Für andere Plasmide kann die Primerkonzentration angepasst werden (2-5 µL, 10 µM). Die Proben sollten in **0,5 mL Reaktionsgefäßen** (< 24 Proben) oder in verschlossenen Standard **96-Well PCR-Platten** (> 24 Proben) abgegeben werden. Auf PCR-Platten werden die Proben horizontal angeordnet (Probe 1 in Well A1, Probe 2 in Well A2, etc.). Die Proben sollten mit einem eindeutigen »Sample Initial« versehen werden, das aus den Initialen des Kunden (bis zu 4 Buchstaben) und einer **fortlaufenden** Nummer besteht, die ohne Lücken zwischen den Proben mit einer beliebigen Zahl beginnen kann. Bei Reaktionsgefäßen sollte **jeder Deckel** mit dem »Sample Initial« beschriftet werden, während PCR-Platten mit Namen und Datum **gekennzeichnet** werden.

Sequenzierauftragsformular

Mit jeder Probenlieferung sollte ein Sequenzierauftragsformular ausgefüllt werden, das alle notwendigen Informationen für eine erfolgreiche und qualitativ hochwertige Sequenzierung enthält.

Kennzeichnung der Proben - »Sample Initial«

Die Probenkennzeichnung sollte aus den Initialen des Kunden (bis zu 4 Buchstaben) und einer fortlaufenden Nummerierung ohne Sonderzeichen bestehen. Das »Sample Initial« (erste Spalte auf dem Auftragsformular) entspricht nicht dem individuellen Probennamen (Spalte »Template«) und sollte einfach gehalten werden, um die Bearbeitung der Proben zu vereinfachen und eine korrekte Zuordnung der Sequenzen zu den Proben zu gewährleisten.

Template (14 µL)

In dieser Spalte sollte die Bezeichnungen der zu sequenzierenden Proben eingetragen werden, um eine Zuordnung zum »Sample Initial« zu ermöglichen.

Primer (2 µL, 10 µM)

Diese Spalte sollte die Bezeichnung der verwendeten Primer enthalten.

Produktlänge

Die erwartete Produktlänge jedes Templates sollte, insbesondere bei großen Probenmengen, eingetragen werden.

Kundeninformation

Kundeninformationen müssen vollständig und digital ausgefüllt werden, um die Kommunikation und Abrechnung zu gewährleisten.

Übermittlung der Sequenzierproben

Die Proben können entweder vor Ort abgegeben oder per Post versendet werden.

Für die Vor-Ort-Abgabe sollten die Proben in einem Plastikbeutel, beschriftet mit Namen und Datum zusammen mit dem ausgedruckten und vollständig ausgefüllten Sequenzierauftragsformular abgegeben werden. Die Proben können zwischen 8:00 und 16:15 Uhr am Empfang abgegeben oder außerhalb dieser Zeiten im Briefkasten vor dem Eingang eingeworfen werden. An den Sequenziertagen (Dienstag und Donnerstag) können die Proben bis 10:30 Uhr für die Sequenzierung am selben Tag abgegeben werden. Später abgegebene Proben können möglicherweise erst am nächsten Sequenziertag analysiert werden.

Für den Versand der Proben per Post, sollten die Probenröhrchen mit einer Schnur aneinander gekettet werden, PCR-Platten sorgfältig mit einer geeigneten Verschlussfolie verschlossen, in einen gepolsterten Umschlag zusammen mit dem Sequenzierauftragsformular gelegt und an diese Adresse geschickt werden:

Kontakt

Sequencing Service
Fraunhofer-Institut für
Molekularbiologie und
Angewandte Oekologie IME
Forckenbeckstr. 6
52074 Aachen
sequencing@ime.
fraunhofer.de

Dr. Jost Muth
Telefon 0241 6085-12050
Lena J. Freund
Telefon 0241 6085-35045
www.fraunhofer.de/fag