**Základy práce s aDNA - sekvenování**

* Vizualizace produktů PCR gelovouelektroforézou na 3% agarózovém gelu (Agarose, low gelling temperature, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA):

10 μl produktu PCR + 5 μl Gel Loading Solution (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)

Do první jamky gelu 10 μl DirectLoad™ 50 bp DNA Step Ladder (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ladder |  |  |  |  | PK | NK |

* Přečištění produktů PCR enzymem CleanSweep™ PCR Purification Reagent:

10 μl PCR produktu + 4 μl CleanSweep™ PCR Purification Reagent

Inkubace 10 minut při 37 °C, následná deaktivace enzymu při 80 °C



* Přidání sekvenačních primerů do přečištěného produktu PCR:

5 μl roztoku primerů (5 μM) + 5 μl neředěného vzorku

* Zaslání do laboratoří firmy Seqme s.r.o.

Sekvence sekvenačních primerů:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Označení primeru | | Sekvence primeru | Délka produktu |
| F15989 | 1a | CCCAAAGCTAAGATTCTAAT | 165 bp |
| R16153\* | 1b | CAGGTGGTCAAGTATTTATGG |
| F16097\* | 2a | TACATTACTGCCAGCCAC | 137 bp |
| R16233\* | 2b | TGATAGTTGAAGGTTGATTGCTGT |
| F16159 \* | 3a | CATAAAAACCCAATCCACAT | 146 bp |
| R16304 | 3b | ACTGTTAAGGGTGGGTAGGT |
| F16247\* | 4a | ACTCCAAAGCCACCCCTCA | 164 bp |
| R16410 | 4b | GAGGATGGTGGTCAAGGGAC |