

Základy práce s aDNA - sekvenování

- Vizualizace produktů PCR gelovou elektroforézou 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)

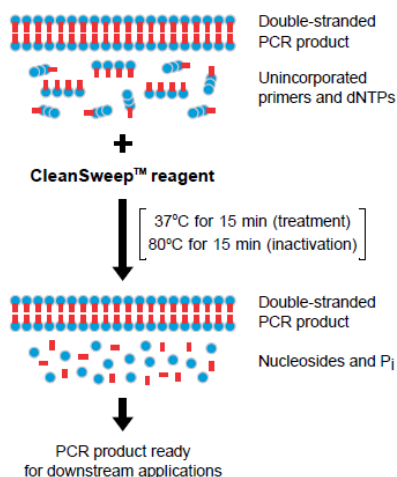
| | | | | | | |
|--------|--|--|--|--|----|----|
| ladder | | | | | PK | NK |
|--------|--|--|--|--|----|----|

- 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

Workflow



- 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 | |