**SEKVENACE**

**Dodáte Naše práce**

*Po kliknutí na ikonku se objeví*

 *upřesnění našich požadavků*

Mini-izolace templátové DNA (plazmidy, kosmidy)

1. Bakteriální kolonie

Kontrola templátu (elektroforéza v agarosovém gelu)

2. Templátová DNA

Sekvenační reakce

Přečištění sekvenační reakce

3. Hotové sekvenační reakce

Analýza sekvenační reakce pomocí kapilárního sekvenátoru

Vyhodnocení sekvenačních dat a rozeslání výsledků emailem

Pro úspěšné sekvenování vašeho vzorku je velmi žádoucí poskytnout všechny námi požadované údaje uvedené u jednotlivých kapitol.

1. **Bakteriální kolonie s templátovou DNA**

Mini Prep DNA pro sekvenační reakci bude připravena z kultur *E. coli* kultivovaných v naší laboratoři. Součástí standardní isolace je stanovení koncentrace, velikosti a kvality templátové DNA pomocí elektroforézy v agarózovém gelu. Po dohodě jsou však možné i další úkony či kontroly, jako např. proměření vzorku na spektrofotometru v UV oblasti, restrikční analýza, kontrola insertu pomocí jeho reamplifikace, atd.

Dáváme přednost kultuře rozočkované na jednotlivé kolonie nebo klonu v tekutém mediu

Před vlastní isolací je nutné, abychom znali následující údaje:

* jméno vektoru a jeho rezistenci k antibiotiku
* velikost celého konstruktu (vektor + insert)
* pokud se jedná o nízkokopiový plasmid (apendix), prosíme o zvláštní upozornění
* jméno hostitelského kmene *E. coli*

Pro úspěšnou isolaci a sekvenaci templátové DNA má volba správného hostitelského kmene velký význam. Více informací najdete zde.

**2**. **Templátová DNA**

Vlastnosti isolované templátové DNA podstatným způsobem ovlivňují výsledky sekvenování. Obecně platí, čím čistší DNA tím lepší výsledek sekvenování. DNA by měla být rozpuštěna ve vodě nebo v 10 mM Tris-HCl, pH 8,0. Pro získání dobrých výsledků by DNA neměla obsahovat zbytky proteinů, solí, RNA, fenolu či další organickou kontaminaci. Každopádně doporučujeme kontrolovat kvalitu a množství dodávané templátové DNA na agarosovém gelu. Pouhé měření koncentrace DNA ve spektrofotometru není vždy dostačující.

Nejčastější rozdělení templátové DNA je na plazmidovou DNA, PCR produkt, kosmidovou DNA, BAC DNA a jinou nízkokopiovou DNA:

1. **Plazmidová DNA**

Templátová DNA připravená klasickou miniprepovou metodou (Birnboim a Doly, 1979) ve většině případů neposkytuje vyhovující sekvenační výsledky. Proto důrazně doporučujeme použití minikolonek pro čištění plazmidové DNA , které fungují na bázi afinitní chromatografie nebo na bázi iontoměniče. Použití takovýchto kolonek zaručuje ve většině případů přípravu DNA o požadované čistotě, koncentraci a množství.

**b) PCR produkt**

PCR produkt lze sekvenovat, ale je třeba ho předem zbavit neinkorporovaných dNTP a primerů. Přítomnost primerů by způsobila nečitelnou směs sekvencí a dNTP by změnily poměr koncentrace dNTP/ddNTP. Pro purifikaci doporučujeme použít komerční PCR spin column kity.
Pokud PCR produkt tvoří pouze jeden proužek na agarosovém gelu, lze ho pouze přečistit a následně použít pro sekvenační reakci. Pokud na agarosovém gelu detekujeme více než jeden PCR produkt, máme několik možností. Jednak můžeme ten o požadované velikosti vyříznout z gelu, přečistit a provést sekvenaci. Pokud známe sekvenci PCR produktu je další možností použítí specifického vnitřního primeru buď pro reamplifikaci nebo přímo pro sekvenaci (nested primer).

1. **BAC, kosmidy, fosmidy a jiné nízkokopiové konstrukty**

Sekvenování takovýchto konstruktů je mimořádně náročné a vyžaduje extrémní podmínky sekvenační reakce. Naprosto nezbytná je nejvyšší kvalita dodané DNA. Doporučujeme použití speciálních kitů pro isolaci těchto nízkokopiových konstruktů, které pracují většinou na bázi křemičitých iontoměničů

**Doporučené minimální množství a koncentrace dodané templátové DNA**

Firemní materiály uvádějí minimální množství templátové DNA pro úspěšné sekvenování (<http://www.appliedbiosystems.com> –BigDye terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Manual, kat č.: 4337035).

V naší laboratoři se nám osvědčilo pro plazmidy a lineární fragmenty včetně PCR produktů dodržovat následující jednoduché pravidlo: Na 100 bp templátové DNA je třeba dodat 10 ng vzorku pro jednu sekvenační reakci. Např. do jedné sekvenační reakce plazmidu o velikosti 6,5 kb dáme cca 650 ng templátové DNA. Toto pravidlo nelze uplatnit při sekvenování BAC, kosmidů a fosmidů. Zde požadujeme koncentraci templátové DNA minimálně 0,2 µg/µl a nejméně 10 µl pro jednu reakci.

Doporučujeme dodat větší než minimální množství templátové DNA pro případné opakování sekvenace.

**Primery**

Středisko sekvenování nabízí celou řadu standardních primerů, které jsou vhodné pro sekvenování insertů naklonovaných do často používaných vektorů. Jejich seznam a sekvence lze najít zde. Prosíme dodržení našeho názvosloví pro eliminaci nedorozumění.

Pokud máte svůj vlastní primer pro sekvenační reakci, dodejte ho, prosíme, rozpuštěný ve vodě v koncentraci 10 pmol/µl (10 µM roztok) v minimálním množství o 5 µl větším než je požadovaný počet reakcí s tímto primerem.

**3. Hotová sekvenační reakce**

Příprava hotových sekvenačních reakcí vyžaduje již značnou zkušenost nejenom při přípravě templátu (viz bod 1. a 2.), ale také při provádění vlastních sekvenačních reakcí a jejich finálním zpracování. Úspěšné provedení sekvenační reakce ovlivňuje řada faktorů jako např.:

* poměr templát/sekvenační mix
* annealingová teplota použitého sekvenačního primeru
* doba jednotlivých kroků sekvenační reakce (denaturace, annealing, elongace)
* počet cyklů sekvenační reakce
* způsob čištění hotové sekvenační reakce a jiné

Optimalizace všech těchto parametrů je poměrně náročná a často je třeba provést řadu seriových pokusů.

Pokud dodáváte hotovou sekvenační reakci, je nezbytné splnit následující požadavky:

sekvenační reakce musí být - provedena kitem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit firmy Applied Biosystems

 - přečištěna (pomocí např. precipitace, magnetických kuliček, affinitní chromatografie, gelové filtrace, atd.)

 - dodána buď ve formě vysušeného peletu nebo rozpuštěna v 15 – 20 µl HiDi formamidu (Applied Biosystems\* kat č.:)

\* - výhradní dodavatel chemikálií firmy Applied Biosystems pro Českou republiku je firma Applera Česká republika, s.r.o. Použití reagencií pro fluorescenční sekvenování od jiného výrobce se nedoporučuje z důvodu odlišnosti použitých fluorochromů.

**4. Dodací lhůta a doručení výsledků sekvenační analýzy**

Vždy se snažíme zpracovat vaše vzorky v nejkratší možné lhůtě.

 Výsledky sekvenační analýzy standardně posíláme e-mailem ve dvou formátech .ab1 a .txt. Pro prohlížení a editaci doporučujeme použít data ve formátu .ab1.Tento formát lze otevřít v různých programech pro analýzu a zpracování sekvenačních dat jako je Chromas, ChromasPro, DNA Star – Lasergene, SeqScape, CLC Workbanch, Sequence Scanner (volně stažitelný). Všechna data jsou u nás uložena na CD, což nám umožňuje i po delší době provést reanalýzu (posun začátku čtení, výběr jiných analytických algoritmů, atd.). Lze je také přímo stáhnout u nás na váš flash disk.