

SEKVENEERIMINE APPLIED BIOSYSTEMS KAPILLAARSEKVENAATORITEL

Korduma Kippuvad Küsimused

Palju on DNAd sekveneerimiseks vaja?

DNA	ng
PCR: 100-200 bp	1-3
PCR: 200-500 bp	3-10
PCR: 500-1000 bp	5-20
PCR: >2000 bp	20-50
Plasmiid	300-500

Sekveneerimise täisteenuse tellimiseks on vaja:

- **matriits-DNA** - igas reaktsioonisegus saame kasutada kuni 5,7 µL matriits-DNA-d
- **praimer** - 10 µM (ehk 10 pmol/µL) kontsentratsiooniga praimerit kulub ühe reaktsiooni peale 0,2 µL (kuid palume saata mitte vähem kui 2-3 µL)
- **Tellimisleht** (allalaaditav leheküljelt **kapillaar.ebc.ee**) saata aadressile kapillaar@ebc.ee, samuti **trükkida välja** ning proovidega kaasa pakkida
- Pakk DNA, praimerite ning tellimislehega tuua aadressile

***EBK tuumiklabor
Riia mnt 23b-302
51010 Tartu***

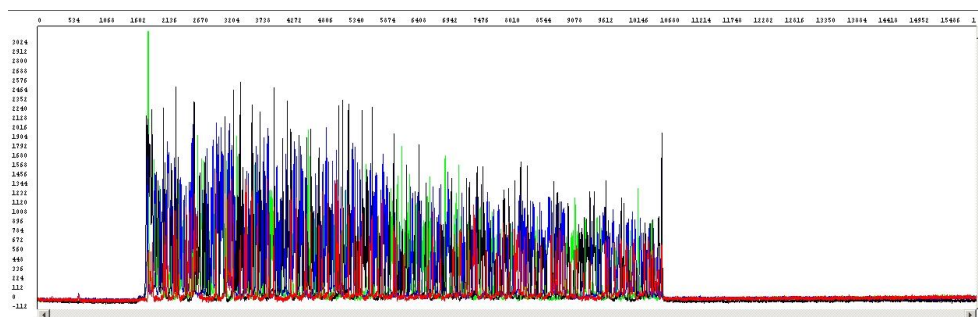
- OOTEAEK: 2-4 tööpäeva, võimalik tellida kiirteenust (24h)

Hinnakiri: www.ebc.ee/tuumiklabor

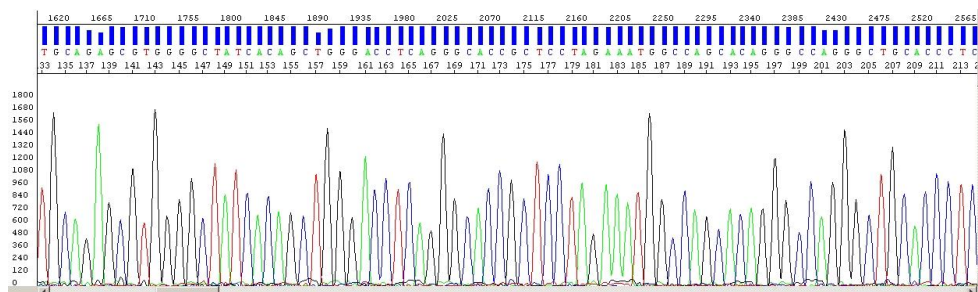
Miks mu tulemused kehavad on?

Kontrolli toorandmete signaalitugevust, selleks kasuta programmi FinchTV
Normaalne vahemik 1000-4000 RFU

Toorandmed



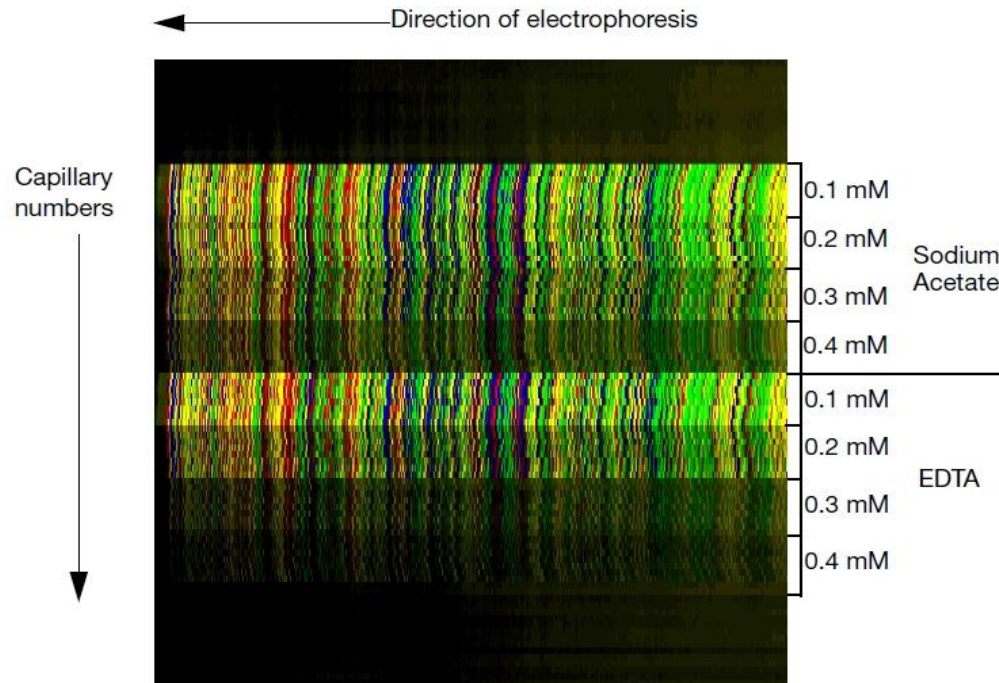
Ferogramm



Basecaller

Miks mu tulemused kehavad on?

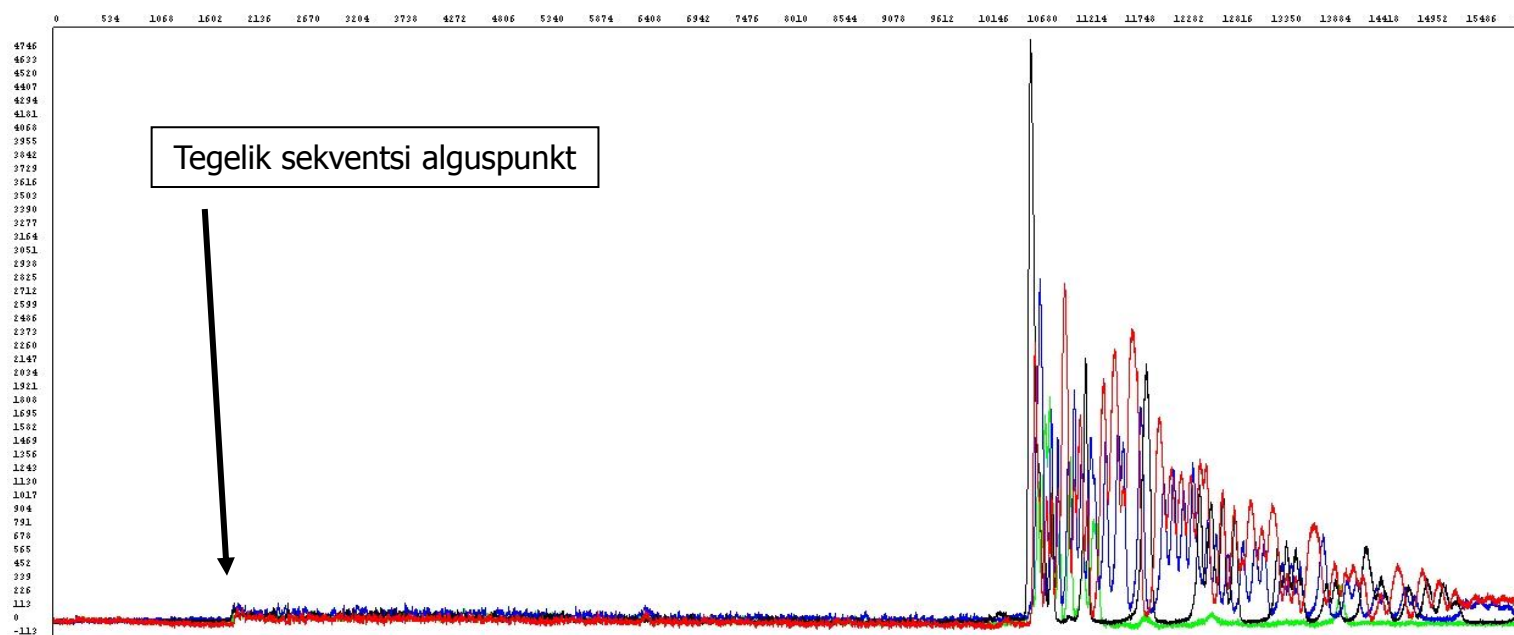
- Kui signaalitugevus on madal, siis:
 - Kas praimer seondub piisavalt efektiivselt?
 - Kas DNA on sobiva kontsentratsiooniga?
 - Soolad lahuses (väldi EDTA-d!)



The effect of salt concentration during electrokinetic injection

Miks mu tulemused kehavad on?

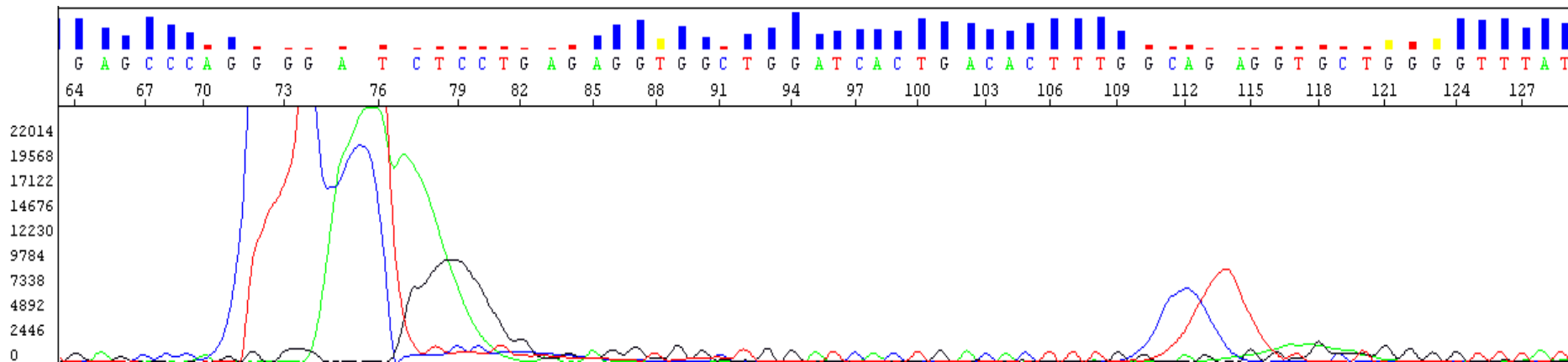
Sekventsi algus viibib



Põhjus: Liigsed soolad reaktsioonisegus

Kõrged “plekid” segavad?

“Dye Blob”: kõrged signaalid 70-80 ap ja 110-120 ap juures



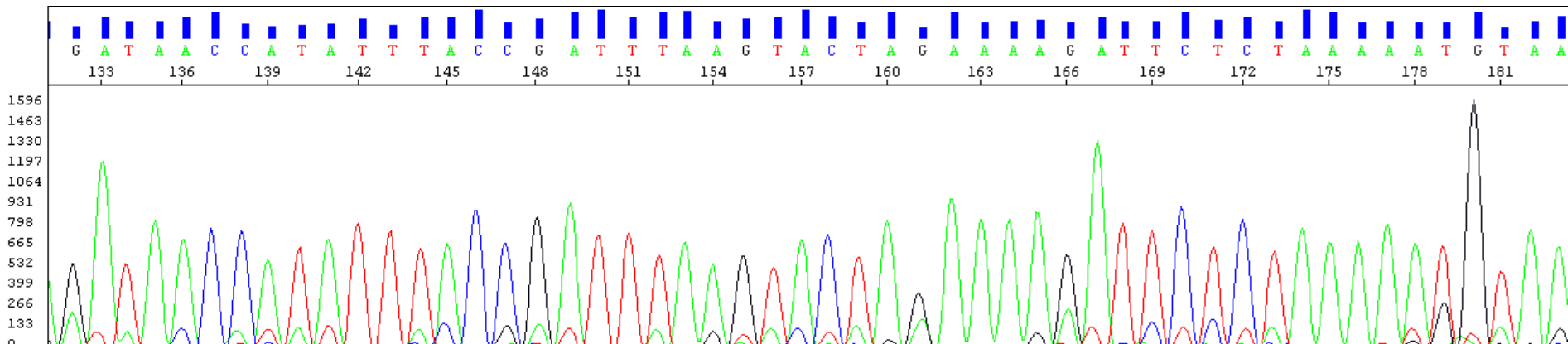
Põhjus: viga sadestamisel või liiga vähe sekveneerimisreaktsiooni produkti

Lahendus:

- kasuta sadestamisel värsket etanooli
- kontrolli, kas sekveneerimisreaktsioon on olnud efektiivne

All jookseb teine sekvents?

“Shadow sequence”



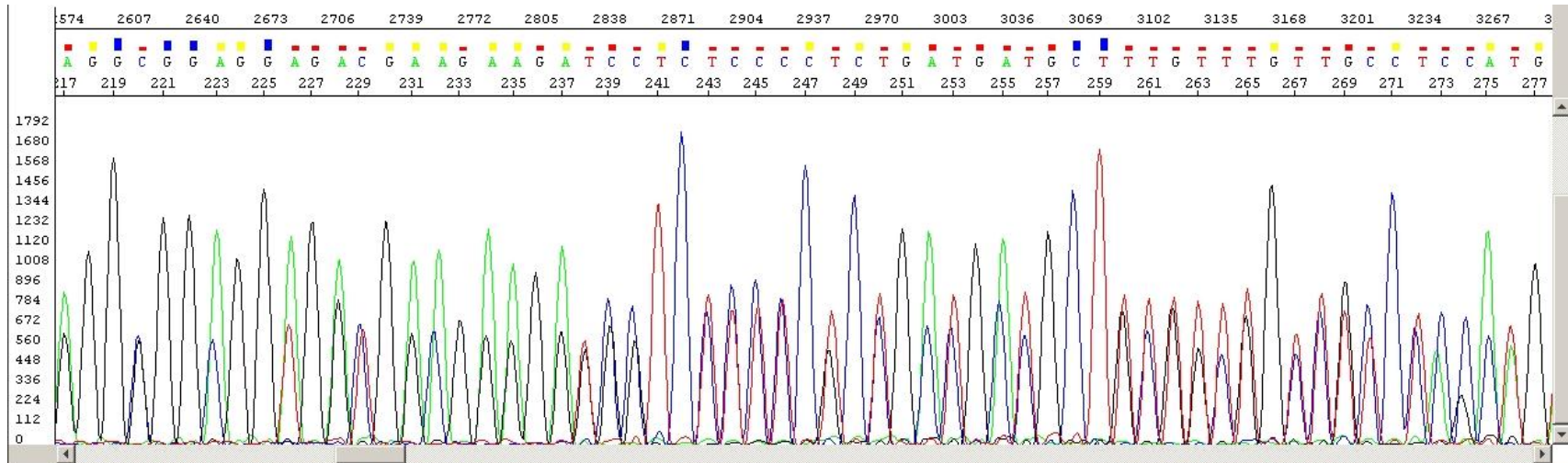
Põhjus: Praimer on lagunenud

Lahendus:

- väldi praimerite pidevat külmutamist-sulatamist
- kasuta HPLC puhastatud primereid
- kasuta teist praimerit

Erijuhtum: järjestuses on indel

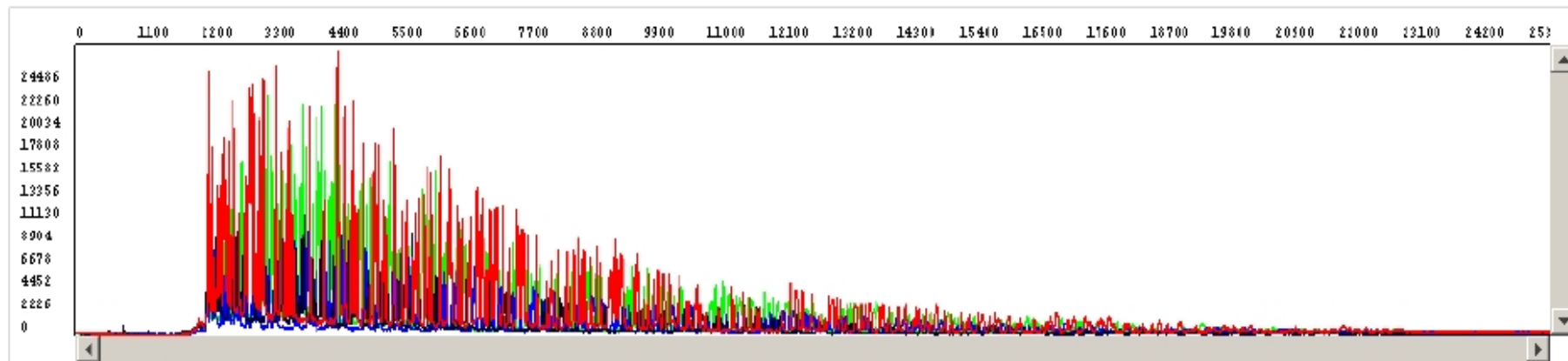
Kaks sekventsikorra?



Põhjused:

- Mitu matriits-DNAd sekveneerimisreaktsioonis
- Mitu praimerit sekveneerimisreaktsioonis
- Praimeril on mitu seondusmiskohta
- Kokku on pipeteeritud mitu sekveneerimisproovi

Sekvents “vajub ära”?



Põhjus:

- Liiga palju DNAd sekveneerimisreaktsioonis
- Soolad DNA lahuses

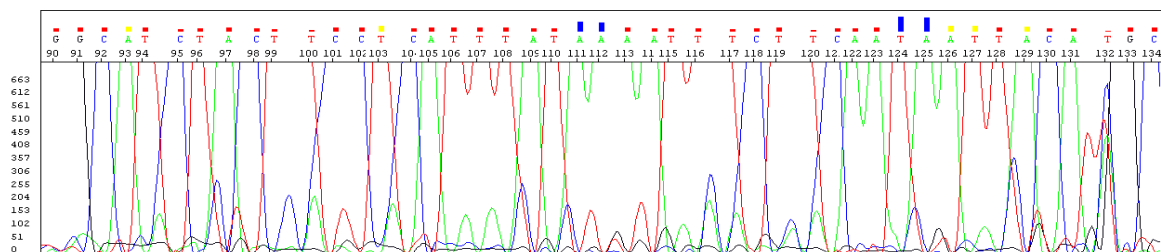
Lahendus:

- Optimeeri DNA hulka sekveneerimisreaktsioonis
- Ole kindel, et DNA lahuses pole sooli

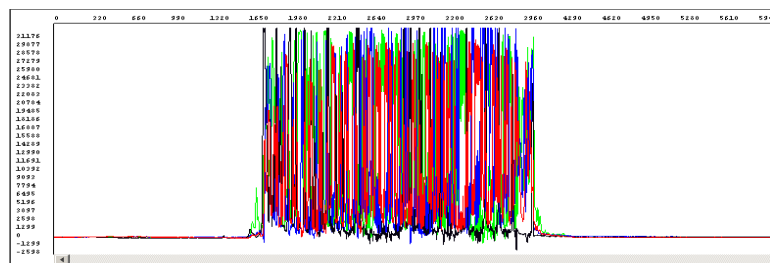
Terve aken on signaali täis?

“Bleed through/pull-up peaks”

Ferogramm:



Toorandmed:

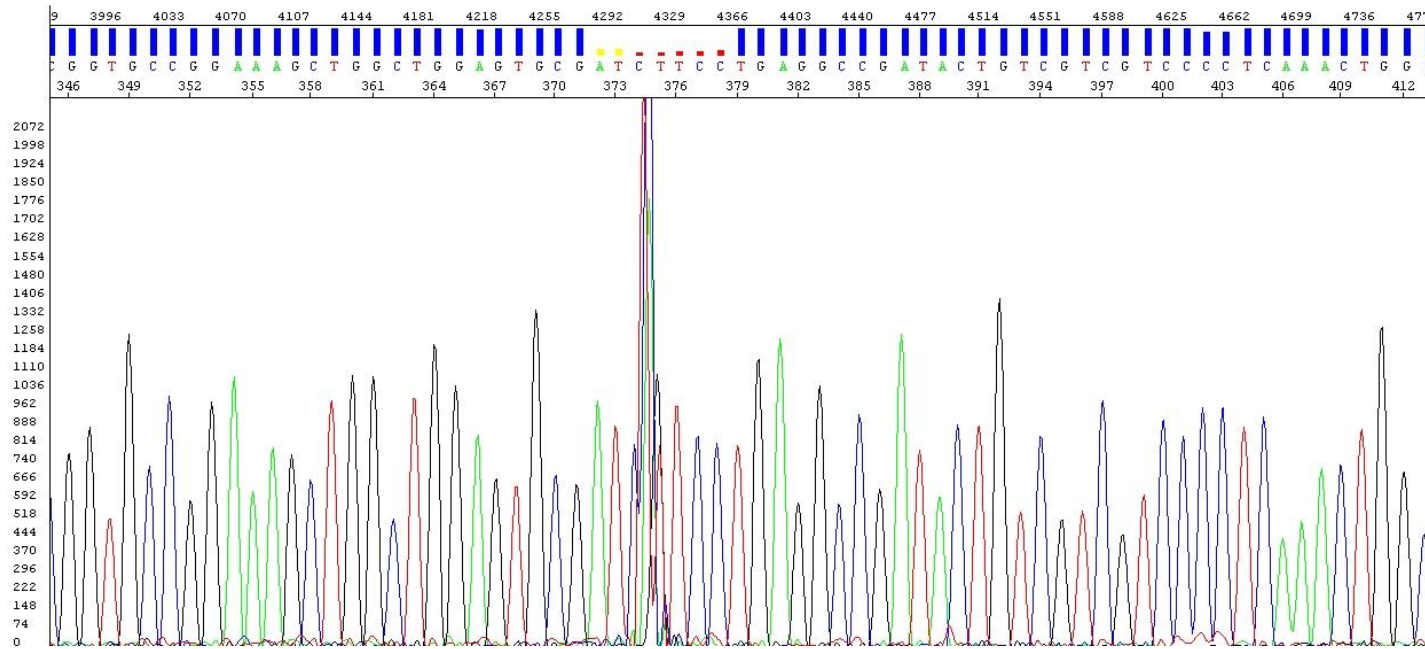


Põhjus: Liiga palju sekveneerimisprodukti

Lahendus:

- Masinast uuesti teiste seadistustega läbi lasta
- Produkti lahjendada

Üksik kõrge signaal keset sekvents?



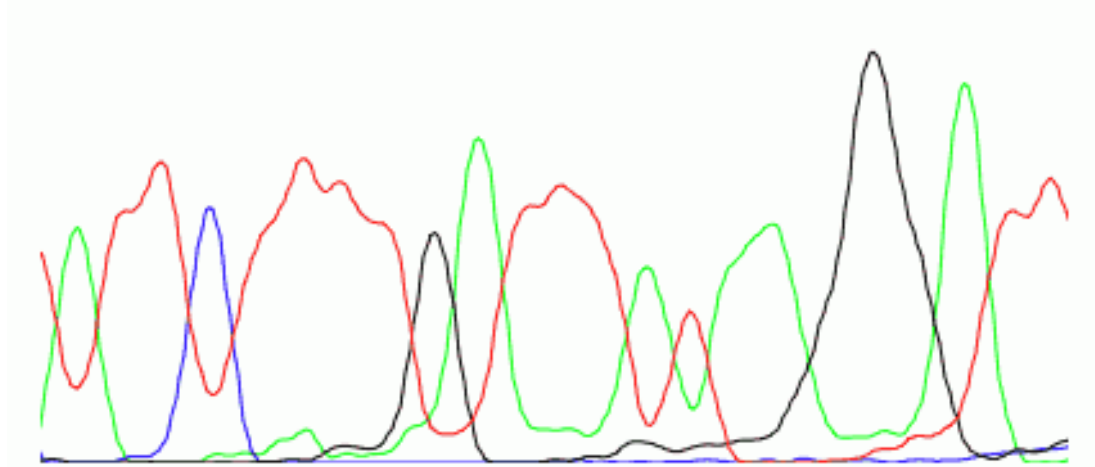
Põhjused:

- Mull elektroforeesiringis
- Kristallid polümeeris

Lahendus:

- Proovid uuesti masinast läbi lasta
- Polümeer vahetada

Resolutsioon kaob liiga vara?



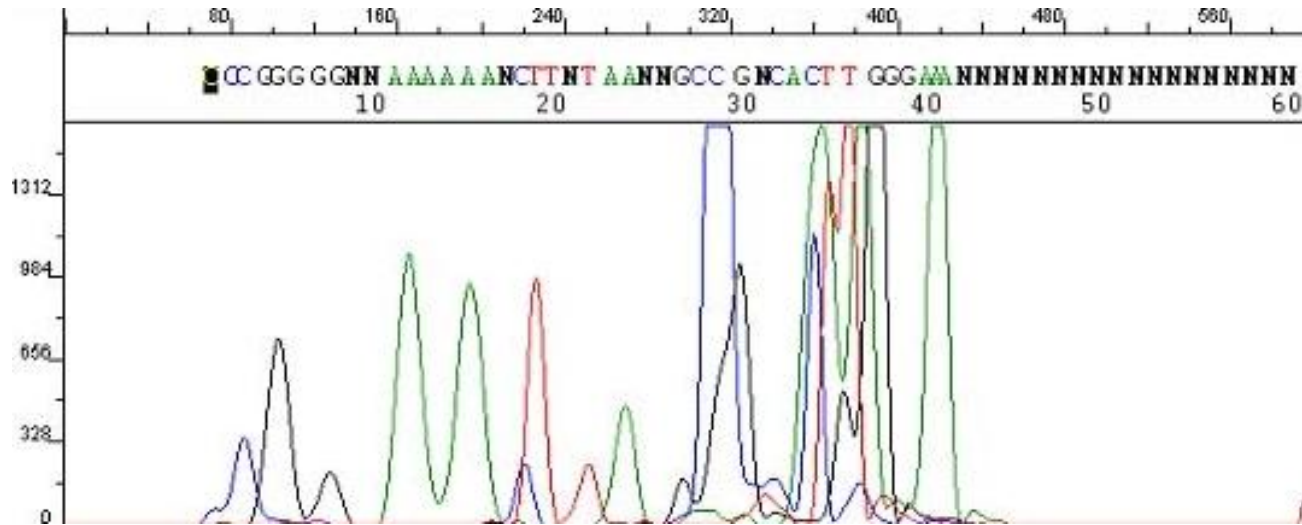
Põhjus:

- Kapillaar ummistunud või õhumull elektroforeesisüsteemis
- Plasmiidi puhul – liiga palju DNAd
- Vana polümeer

Lahendus:

- Proovid lahjendada ja siis uuesti lasta
- Polümeer vahetada

Alguses kõrge signaal, aga sekvents ei jätku



Põhjus: Praimer moodustab dimeere

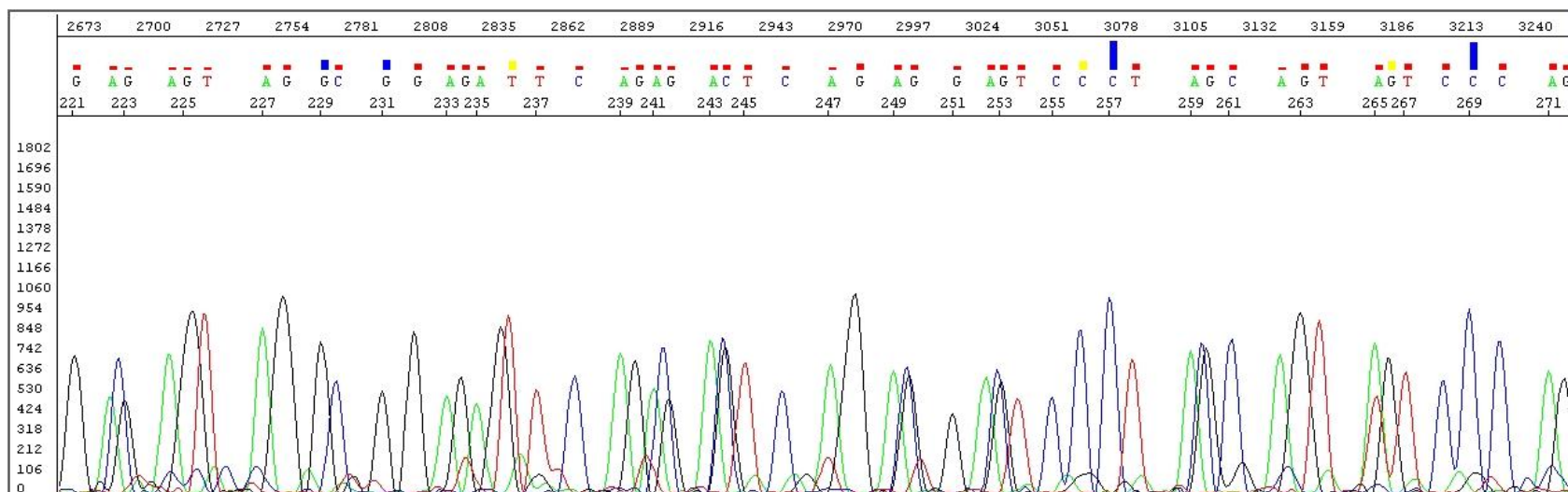
Lahendus:

- Kontrolli praimerite järjestusi
- Tõsta seondumistemperatuuri

[illegible]

Lahendus: Sekveneerida korduseni ka vastasahelalt

Signaalid on nihkes?

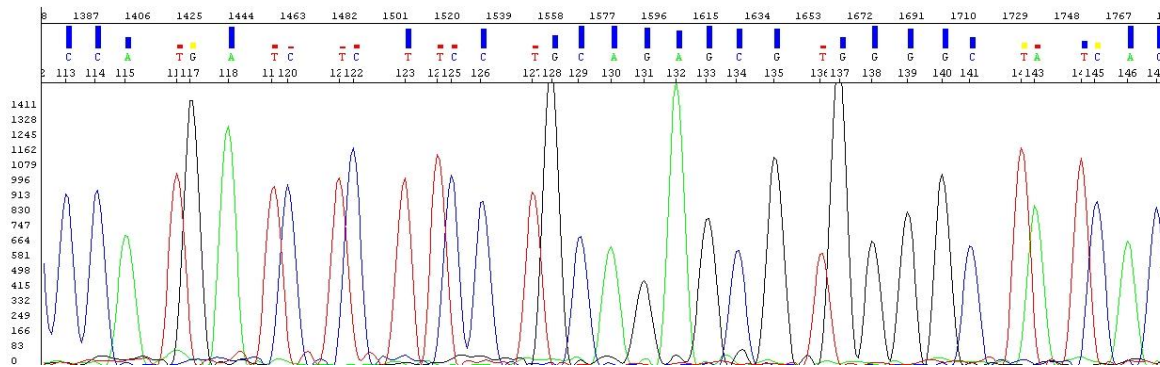


Põhjus 1: sekveneerimisreaktsioon on tehtud vale ensüümiseguga

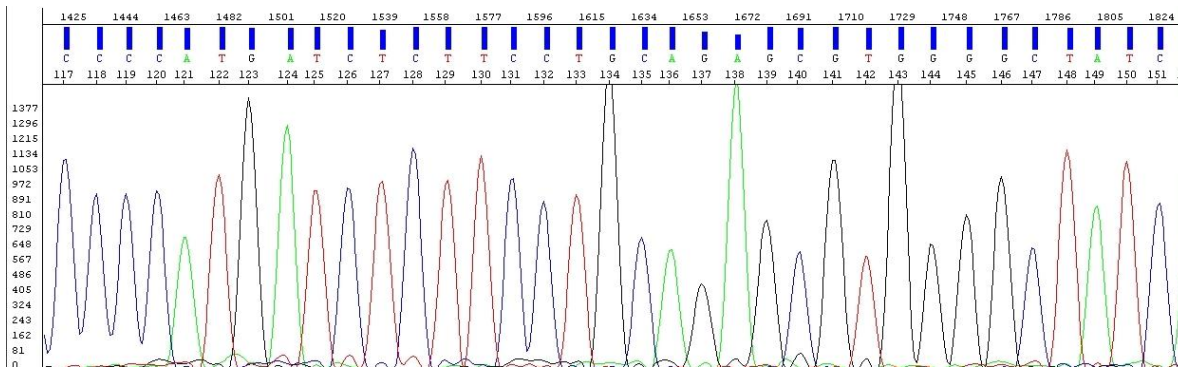
Lahendus: korrata sekveneerimisreaktsiooni õige ensüümiseguga

Signaalid on nihkes?

Põhjus 2: lõppanalüüs on tehtud valede seadistustega



Lahendus: seadistada ja analüüsida uuesti



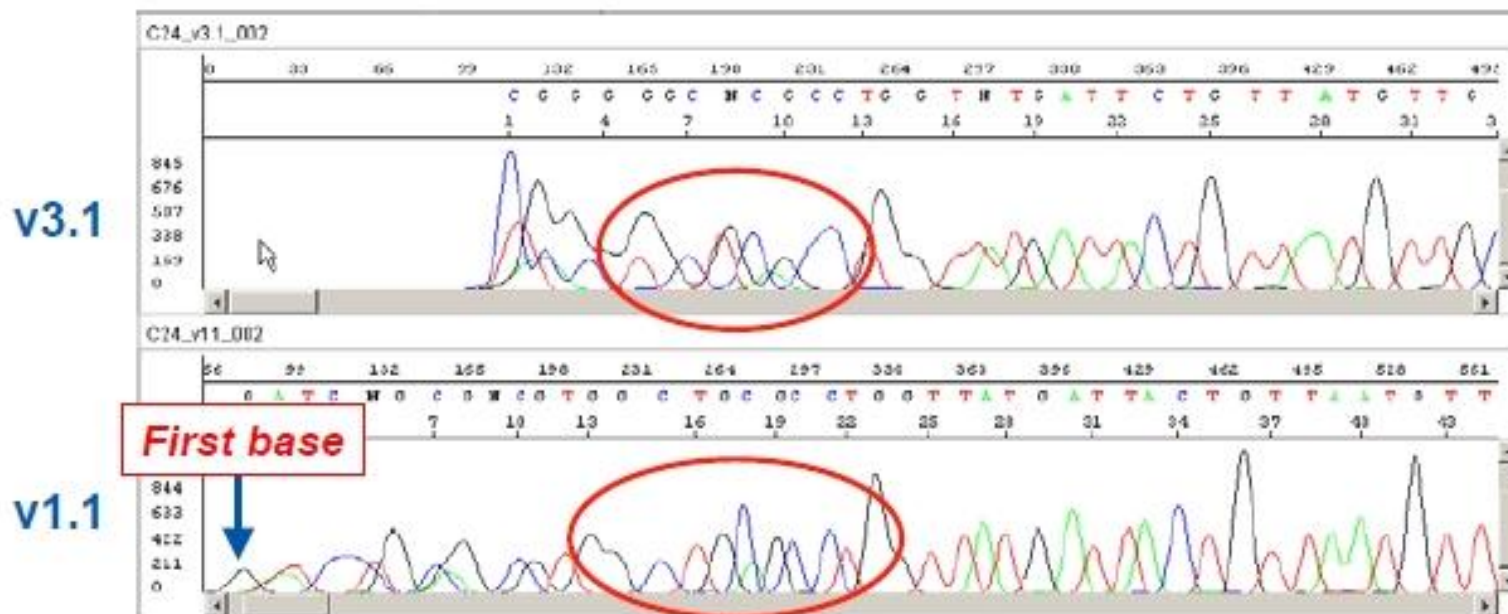
Kuidas sekveneerida keerulisi järjestusi?

Vahel ei õnnestu sekveneerimine DNA iseloomu tõttu – GC-rikas või sekundaarstruktuure moodustav materjal

- Kasutada teist ensüümisegu (dGTP Terminator v3.1 või BigDye v1.1)
- Optimeerida sekveneerimisreaktsiooni
 - inkubeerida 10 min 96°C
 - lisada 1M betaiini
 - lisada 5% DMSO
 - tõsta ensüümi hulka

BigDye v3.1 versus v1.1 ensüümisegu

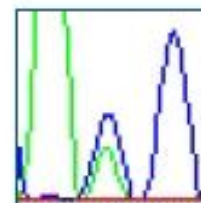
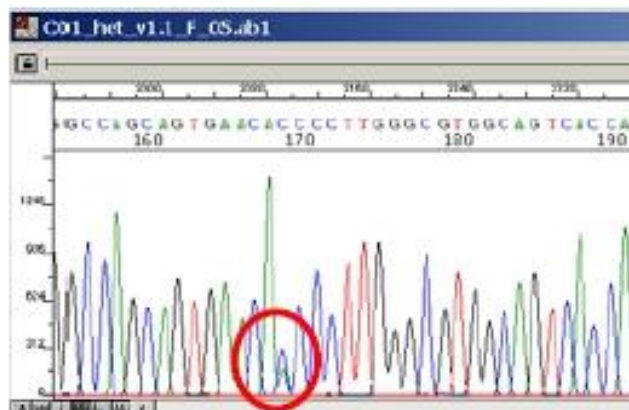
Sekventsi algus parem v1.1 ensüümisegu puhul



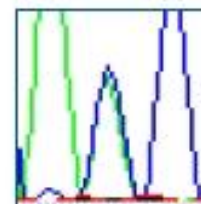
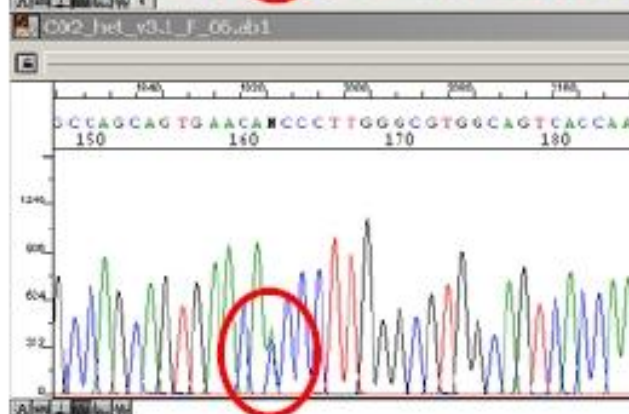
BigDYE v3.1 versus v1.1 ensüümisegu

Heterosügootsuse detekteerimine parem v3.1 ensüümisegu puhul

v1.1



v3.1



Kuidas saada kvaliteetset tulemust?

DNA kvaliteet/kvantiteet

- soolad (nt EDTA) segavad
- liiga madal/kõrge kontsentratsioon
- heterogeenne PCR-i produkt
- „keeruline“ järjestus

Praimer

- PCR-il hästi töötavad praimerid ei pruugi sekveneerimisel töötada
- pidev külmutamine-sulatamine lõhub praimereid
- ole kindel, et praimer seondub ideaalselt ja ei moodusta dimeere

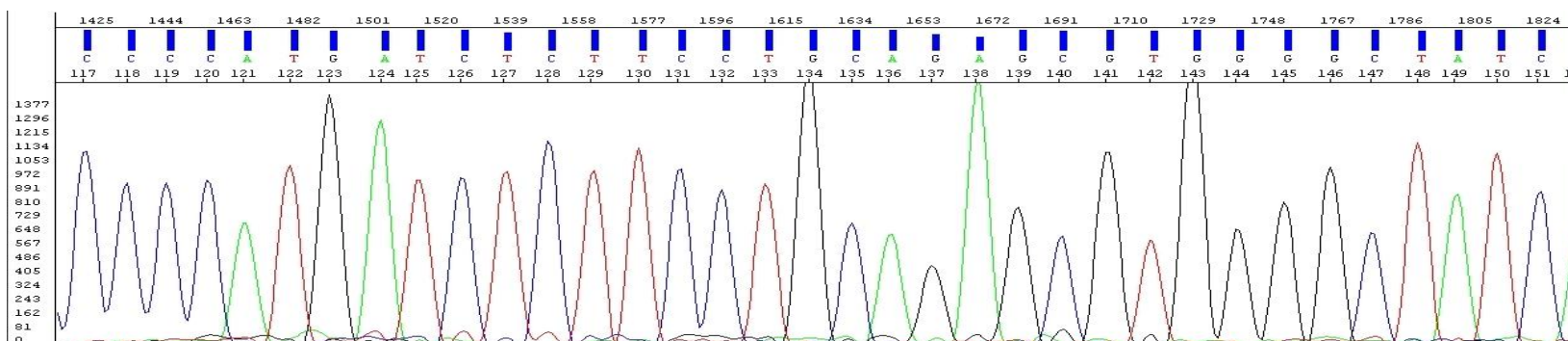
Sekveneerimisreaktsiooni viga

Sekvenaatori viga

Andmeanalüüsi viga

} meie vastutusala

Kuidas saada kvaliteetset tulemust?



- Veendu, et Sinu materjal on kvaliteetne
- Probleemide korral konsulteeri meiega

kapillaar@ebc.ee

www.ebc.ee/tuumiklabor

tel. 737 4026 (kontor), 737 4020 (labor)

Eesti Biokeskuse tuumiklabor

Riia 23b-302

51010 Tartu