

Pyrosequencing 樣品製備注意事項

1. 樣品若為 PCR 產物，請附電泳膠圖。一次 pyrosequencing 分析所需體積 25 μ l；若一個 PCR 產物，需分析多個 sequencing primers，請提供足夠的 PCR 產物。例如：一個 PCR 產物，需分析 2 個 sequencing primers，請提供 PCR 體積 50 μ l (25 μ l * 2 = 50 μ l)。Sequencing primer 請提供 10 μ M，體積 10 μ l (1-5 個反應)；20 μ l (5-10 個反應)，以此類推。
2. 樣品若為 Bisulfite-converted DNA，請提供體積至少 20 μ l，且最低濃度需求為 50 ng/ μ l。
3. 若需由公司代為進行 Bisulfite conversion 處理之樣品，請提供至少 2 μ g 的 gDNA 量，且最低濃度需求為 50 ng/ μ l。
4. Assay 設計所需資訊，除提供欲分析之序列，尚需提供此段 DNA 序列的前後序列各 500 bp，並請用 Word 檔，清楚標示欲分析之區域或位點。
 - 4.1 SNP 位點請以 / 或 IUPAC 碼 標示，範例：T/C or Y；A/C/G or V。
 - 4.2 InDels 請以 [] 標示，範例：A[C]G 代表 ACG 或 AG。詳細資訊，歡迎來電洽詢。
5. 若是自行提供已設計的 primer，亦同時需提供相對應的 Sequence to Analyze，並且請注意 PCR primer pair 其中的 5'端需有 Biotin 修飾，且必須與 sequencing primer 序列呈反向。如有疑問，歡迎來電洽詢。
6. 此實驗所使用機型為 QIAGEN PyroMark Q24。