

## DNA 定序樣品製備與遞送注意事項

1. 標準核酸定序服務之送測樣品形式：可接受菌盤、菌液、雙股(double-strand) plasmid DNA、單股(single-strand) phage DNA、未純化或已純化之 PCR 產物、Gel 膠體、以及直接上機樣品。
2. 菌盤
  - 2.1 建議菌盤上能四區劃菌並有單一菌落，並請提供兩天內新鮮的菌盤，以免繼代培養後，純化出來的 plasmid DNA 品質不佳。
  - 2.2 請於服務委託單上註明所使用之抗生素種類與載體。
3. 菌液
  - 3.1 建議提供 2-4 c.c. 的量 (3 c.c. 尤佳)，並請提供 24 小時內新鮮的菌液，以免培養時間過長，純化出來的 plasmid DNA 品質不佳。
  - 3.2 請於服務委託單上註明所使用之抗生素種類與載體。
4. DNA 樣品
  - 4.1 雙股 DNA 已知濃度者，請提供體積至少 20  $\mu$ l 且最低濃度需求為 100 ng/ $\mu$ l；未知濃度者，因需測 OD，因此建議提供體積 30  $\mu$ l。同一 DNA 如需進行五次以上定序，請至少提供 30  $\mu$ l。
  - 4.2 單股 DNA 已知濃度者，請提供體積至少 20  $\mu$ l 且最低濃度需求為 50 ng/ $\mu$ l；未知濃度者，因需測 OD，因此建議提供體積 30  $\mu$ l。
  - 4.3 將樣品回溶於 ddH<sub>2</sub>O 中，請勿回溶於 TE Buffer，以免干擾定序反應。
  - 4.4 請於服務委託單上註明樣品濃度、所使用之載體，以及插入片段與質體長度。
5. PCR 產物
  - 5.1 必須為單一片段，以免定序結果產生雜訊。無論是否純化，建議提供體積 20-30  $\mu$ l。原則上最低濃度需求為 20 ng/ $\mu$ l，如片段長度大於 1.5 Kb 者，請提高濃度至 50 ng/ $\mu$ l。
  - 5.2 若非單一片段，建議自行跑膠並切下欲定序的 template，回收純化後，再交由本公司定序。
  - 5.3 請將純化後之產物回溶於 ddH<sub>2</sub>O，勿回溶於 TE Buffer，以免干擾定序反應。
  - 5.4 請於服務委託單上註明 PCR 產物片段長度、PCR 引子設計時之長度、T<sub>m</sub> 值，以及實際 PCR 反應時之 annealing 溫度。
  - 5.5 建議於服務委託單附上電泳膠圖，並註明電泳時 marker 與樣品之注入量。
6. 直接上機樣品

- 6.1 僅接受使用 ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (v3.1 或 v1.1) 完成反應之樣品。
- 6.2 請完成 Dye Terminator 純化步驟後，再進行送樣。
- 6.3 建議於螢光反應完成 48 小時內，以抽乾狀態遞送。
- 6.4 樣品如置於 96 孔盤，請提供樣品名稱與位置之 excel 檔。
7. 如待測樣品已知或預測為特殊結構核酸（例：GC-rich, hairpin 結構, dinucleotide repeats, siRNA constructs 等），請於服務委託單上註明。同時，亦可指定使用特殊試劑以解決上述核酸結構性問題，其服務費用請洽本公司技術人員或各區業務。
8. 多重 PCR 產物定序：請洽本公司技術人員（電話：02-26557128 ext.125）。
9. 目標基因核酸定序：請洽本公司技術人員（電話：02-26557128 ext.125）。
10. 定序用引子
  - 10.1 請於服務委託單上註明核酸定序所需之引子名稱與來源。
  - 10.2 請參考本公司免費提供定序常用引子列表。
  - 10.3 欲自行提供定序用引子者，請於送件時另行分裝，並於服務委託單上標示濃度。定序用引子建議濃度為 10  $\mu$ M (即 10 pmol/ $\mu$ l, 100 ng/ $\mu$ l)。每一個反應提供體積為 3-5  $\mu$ l。同一引子如需進行五次以上定序，請至少提供 20  $\mu$ l。
  - 10.4 設計定序用引子之注意事項：  
長度介於 18-25 bases，儘量避免重複相同的 nucleotide (特別是 G)，  
Tm 值介於 50-58 $^{\circ}$ C，避免二級結構或 dimer 之形成。
  - 10.5 本公司另提供引子設計與合成服務，以進行大片段 DNA 之步進式定序 (Primer Walking Sequencing)。
11. 單管樣品與盤式樣品分裝
  - 11.1 單管樣品請分裝於 1.5  $\mu$ l eppendorf tube 或 0.2  $\mu$ l PCR tube，定序用引子則另行分裝。
  - 11.2 盤式樣品請使用 96 孔 0.2  $\mu$ l PCR Plate，並用鋁箔膠帶密封，以免樣品揮發。
12. 定序樣品與引子名稱標示與保存
  - 12.1 樣品名稱與引子名稱皆不得超過 14 個字元。命名可使用字元包含英文字母(a-z, A-Z)、阿拉伯數字(0-9)，與符號“+, -, \_”。請勿含空白字元或其他特殊符號。請注意：樣品名稱標示必須與服務委託單提供之資料一致。
  - 12.2 定序樣品 DNA 與引子保存兩週；如需退回，請於服務委託單上註明。
13. 樣品遞送注意事項  
請將待測樣品隨同服務委託單以室溫或低溫冷藏配送至公司。