

使用 Spectrum Compact CE System 进行 Sanger 测序

使用不同循环测序方法对质粒 DNA 进行测序，并在 Spectrum Compact CE 系统上进行检测。

分析方法: 毛细管电泳

样本类型: 质粒来自国家标准与技术研究所(NIST) 和 pGEM-3Zf(+) 参比质粒，使用 BigDye™ Terminator v3.1 和 ProDye™ Terminator 进行循环测序。

仅供研究使用，用户可根据其应用进行适当调整。

了解更多详细内容，请参阅技术手册

TM672 和仪器操作手册 TMD058

网址：

www.promega.com/protocols

所需材料:

- Spectrum Compact CE System (Cat.# CE1304)
- Spectrum Compact Capillary Array, 4-Capillary, 36cm (Cat.# CE2340)
- Hi-Di™ Formamide (Thermo Fisher Scientific, Cat.# 4401457)
- Strip Septa Mat, 8-well (Cat.# CE2308)
- Spectrum Compact Buffer (Cat.# CE2300)
- Spectrum Compact Polymer7 (Cat.# CE2307)
- MicroAmp Optical 8-Tube Strip, 0.2ml (Thermo Fisher Scientific, Cat.#4316567)
- BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat.# 4337455)
- ProDye™ Terminator Sequencing System (Promega, Cat.# CR4302)
- Thermal cycler

操作流程:

1. 循环测序使用 BigDye™ Terminator v3.1 和 ProDye™ Terminator，标准体积 20µl，并按照说明书操作。
2. 按照 ProDye™ Terminator Sequencing System 说明书描述，使用 Ethanol/EDTA 沉淀来纯化测序反应。
3. 纯化的测序产物用 10µl Hi-Di™ Formamide 重悬。
4. 毛细管电泳在 Spectrum Compact CE System 上进行，使用 T_Seq_36_Std 标准测序方案和 T_Seq_36_Fast 快速测序方案。
5. 使用 ProView™ 软件分析测序结果。

实验结果:

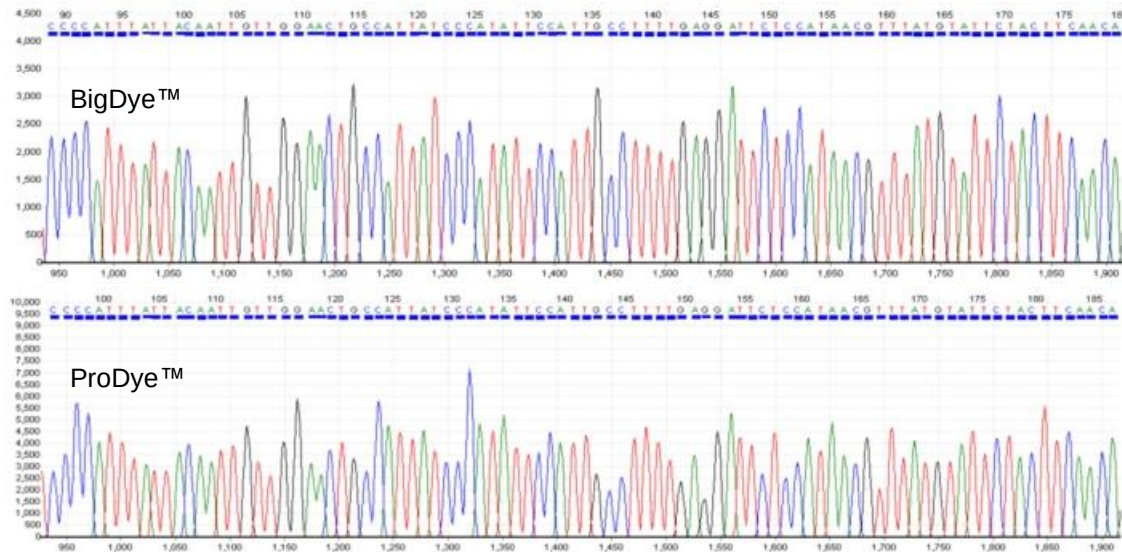


图 1. NIST ERCC-00083 质粒循环测序图谱，采用不同测序试剂盒在 Spectrum Compact CE System 系统上使用标准（Standard）测序方案测序。

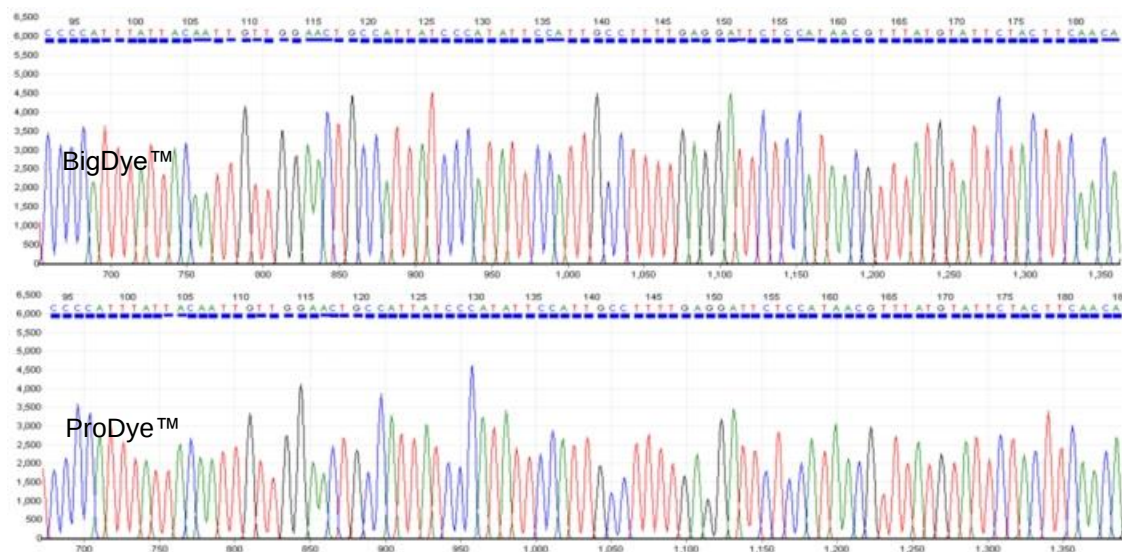


图 2. NIST ERCC-00083 质粒循环测序图谱，采用不同测序试剂盒在 Spectrum Compact CE System 系统上使用快速（Fast）测序方案测序。

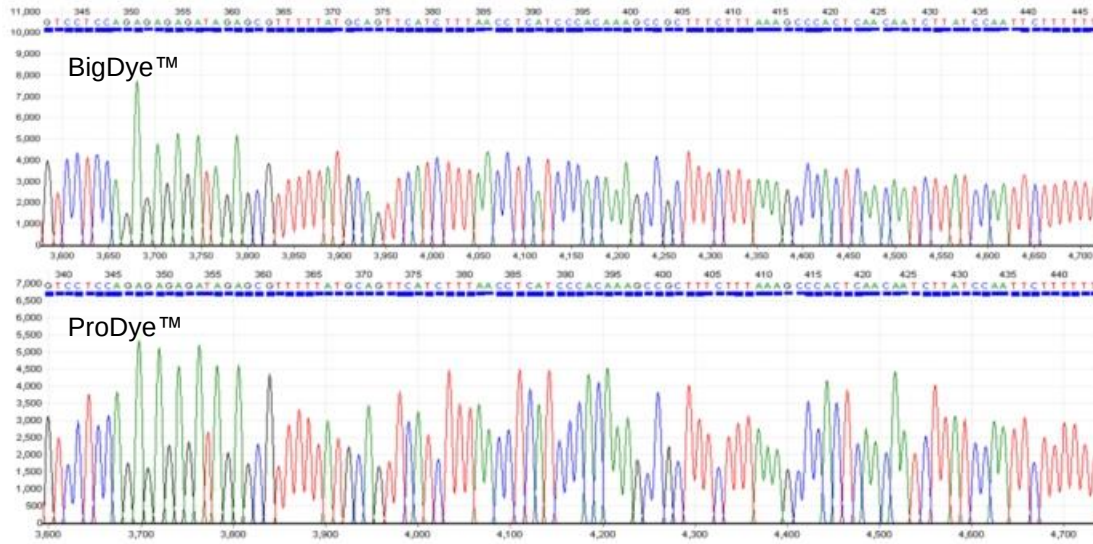


图 3. NIST ERCC-00095 质粒循环测序图谱，采用不同测序试剂盒在 Spectrum Compact CE System 系统上使用标准（Standard）测序方案测序。

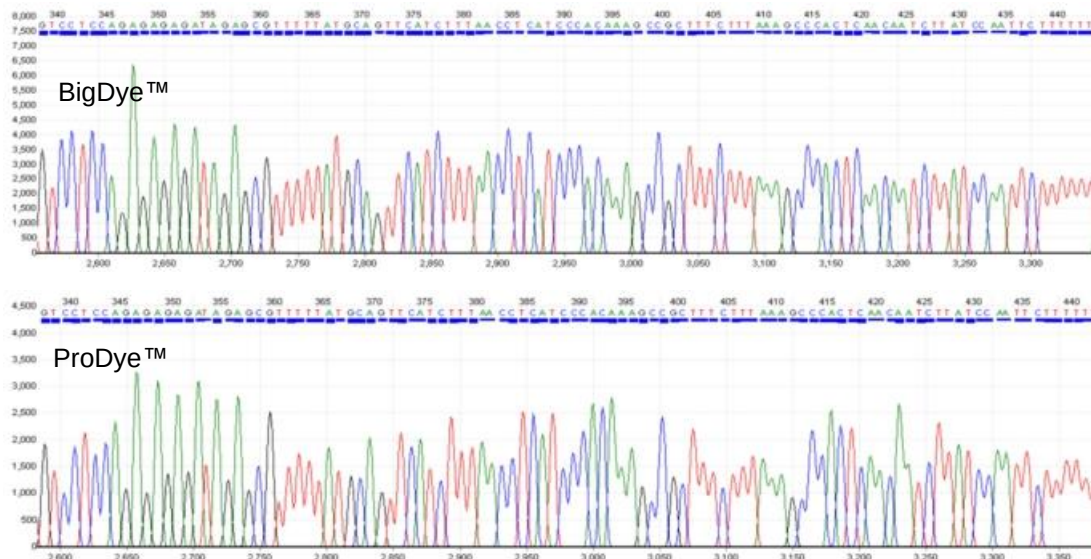


图 4. NIST ERCC-00095 质粒循环测序图谱，采用不同测序试剂盒在 Spectrum Compact CE System 系统上使用快速（Fast）测序方案测序。

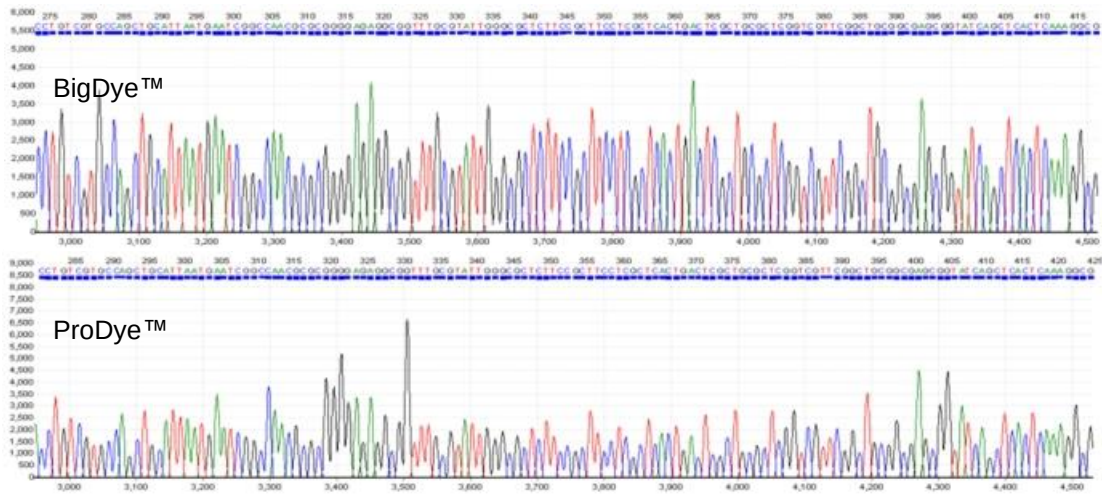


图 5. 参比质粒 pGEM-3Zf(+) 循环测序图谱，采用不同测序试剂盒在 Spectrum Compact CE System 系统上使用标准（Standard）测序方案测序。

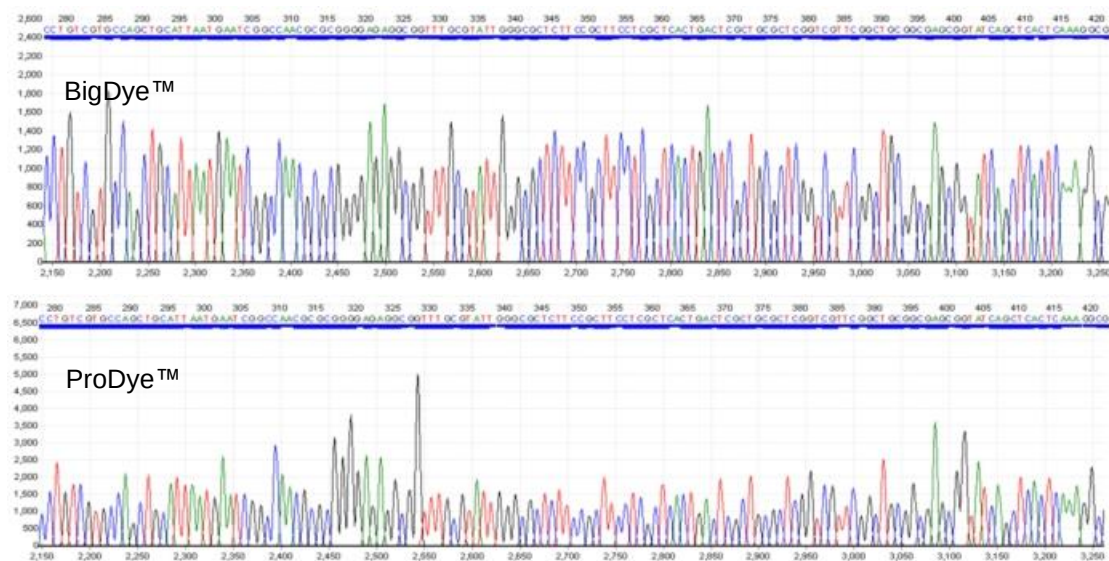


图 6. 参比质粒 pGEM-3Zf(+) 循环测序图谱，采用不同测序试剂盒在 Spectrum Compact CE System 系统上使用快速（Fast）测序方案测序。

表 1. 数据对比结果

样本	试剂盒	测序方案	CRL	QV20+	TraceScore
Plasmid 1 (ERCC #00083)	BigDye™	Standard	866	893	36
		Fast	734	720	36
	ProDye™	Standard	873	899	36
		Fast	734	714	36
Plasmid 2 (ERCC #00095)	BigDye™	Standard	919	906	36
		Fast	730	704	36
	ProDye™	Standard	911	915	36
		Fast	726	695	38
pGEM-3Zf(+)	BigDye™	Standard	876	896	36
		Fast	717	695	35
	ProDye™	Standard	883	892	36
		Fast	733	703	36

1. 连续读取长度 (CRL): 核苷酸中连续的阅读长度。
2. QV20+: 最低质量值(QV)为 20 的情况下最长核苷酸数目。
3. Trace Score: “样本分数”是一个综合质量指标，目标值为 35 或更高。