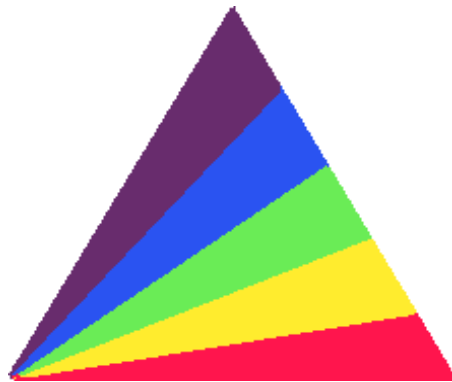


PRISM™-Tips 5

**Informationen
zur automatischen DNA-Sequenzierung und Fragmentanalyse
mit den
ABI PRISM™-Systemen 310, 373 und 377**



Fluorophore

Protokolle

Trennsysteme

Datenanalyse

April '99

PE Biosystems

Inhalt

1

	Seite
1. Einleitung	2
2. Fluoreszenz-Farbstoffe	3
2.1 Überblick Fluoreszenz-Farbstoffe	3
2.2 Auswahl von Farbstoffen für die Fragmentanalyse	4
2.3 Tips zur Fragmentanalyse	4
2.4 Matrixerstellung	5
3. Probenvorbereitung für die Sequenzanalyse	6
3.1 Plasmid-DNA Präparation	6
3.2 PCR-Produkte als Template	6
3.3 Primer-Design und Qualität	6
4. Sequenzierungsreaktionen	7
4.1 Protokolle für BigDye Terminator Reaktionen	7
4.2 Tips zur Sequenzierung	11
5. Elektrophorese 310	12
5.1 Zusätzlich benötigte Reagenzien und Materialien	12
5.2 310 Elektrophorese Tips	12
5.3 310 Standard Trennsysteme	13
5.4 310 Spezial Trennsysteme	14
6. Elektrophorese 377 / 373	15
6.1 Zusätzlich benötigte Reagenzien und Materialien	15
6.2 Stammlösungen	15
6.3 Gel-Vorbereitung	15
6.4 Wasserlade-Protokoll	15
6.5 377 / 373 Elektrophorese Tips	16
SEQ Trennsysteme	17
SEQ Gel- und Ladeprotokolle	18
SEQ Moduleinstellungen	19
GS Trennsysteme	20
GS Gelprotokolle	20
GS Moduleinstellungen	21
373 Gelsysteme	22
7. Datenauswertung	23
7.1 GS-Standards im Überblick	23
7.2 Tips zum Sequence Navigator™	24

1. Einleitung

Diese Broschüre enthält aktuelle Hinweise zur DNA-Sequenzierung und Fragmentanalyse mit den ABI PRISM™-Systemen 310, 373 und 377. Ziel dieser Broschüre ist es, Anwendern den Einstieg in die neue Technologie zu erleichtern und erfahrene Anwender über neue Entwicklungen zu informieren.

PE Biosystems als innovative Firma bietet kontinuierlich neue Produkte, Systemerweiterungen und Protokolloptimierungen an. Deshalb können Informationen, welche in dieser Broschüre enthalten sind, schon nach kurzer Zeit wieder überholt sein! Aktuelle Informationen erhalten Sie unter:

Preise, Produktunterlagen, Angebote	Verkauf	06150 101 165
Bestellungen, Reklamationen	Auftragsbearbeitung	06150 101 114
Technische Fragen, Ersatzteile	Service Hotline	01805 310 377
PCR-spezifische Fragen	PCR Support Hotline	06150 101 153
Anwendungsspezifische Fragen	GA Support Hotline	01805 001 463
Trainingskurse	Anmeldung	06150 101 113
Oligosynthese	Custom Synthesis	06150 101 140
PE Biosystems Österreich	Support	++43 1 6023 101 33

Homepage (<http://www2.perkin-elmer.com/ab/pebio/>)

Literatur (GS+Seq Guide) <http://www2.perkin-elmer.com/ab/techsupp/doclib.html>

2. Fluoreszenz-Farbstoffe

2.1 Überblick Fluoreszenz-Farbstoffe

„Für jedes Farbstoff-Set muß eine spezifische *Matrix* erstellt werden!“

Sequenzanalyse

Filterset A

Wellenlänge	535 nm	559 nm	586 nm	615 nm
DyePrimer	5-FAM (C)	JOE (A)	TAMRA (G)	ROX (T)
DyeTerminator	R110 (G)	R6G (A)	TAMRA (T)	ROX (C)

Filterset E

Wellenlänge	540 nm	570 nm	595 nm	625 nm
BigDye Primer	dR110 BD (C)	dR6G BD (A)	dTAMRA BD (G)	dROX BD (T)
dRhodamin Terminator	dR110 (G)	dR6G (A)	dTAMRA (C)	dROX (T)
BigDye Terminator	dR110 BD (G)	dR6G BD (A)	dTAMRA BD (T)	dROX BD (C)

Fragmentanalyse (GeneScan)

Filterset A

Wellenlänge	535 nm	559 nm	586 nm	615 nm
STR-Primer, Stockmarks Pferd	5-FAM	JOE	TAMRA	ROX
AFLP	6-FAM	HEX	TAMRA	ROX

FilterSet B/C

Wellenlänge	532 nm	543 nm	557 nm	584 nm
OLA	6-FAM	TET	HEX	TAMRA

Filterset D

Wellenlänge	532 nm	559 nm	580 nm	615 nm
Linkage Mapping Set 2	6-FAM	HEX	NED	ROX

Filterset F

Wellenlänge	535 nm	559 nm	580 nm	615 nm
Profiler, AFLP Microbial, Stockmarks Rind II	5-FAM	JOE	NED	ROX

2.2 Auswahl von Farbstoffen für die Fragmentanalyse

4

Bei der Auswahl von Primermarkierungen für Multiplex-Analysen sollte die unterschiedliche Sensitivität und das unterschiedliche Laufverhalten der einzelnen Dyes berücksichtigt werden. Allgemein gilt:

- PCR-Reaktionen, die hohe Ausbeuten liefern, sind mit einem Farbstoff geringer Empfindlichkeit zu markieren.
- PCR-Reaktionen, die niedrige Ausbeuten liefern, sind mit einem Farbstoff hoher Empfindlichkeit zu markieren.
- Sollen DNA-Fragmente gleicher Sequenz miteinander verglichen werden, müssen diese mit dem gleichen Farbstoff markiert werden, da die Farbstoffe wegen ihrer unterschiedlichen Größe ein voneinander abweichendes Laufverhalten zeigen.

	Abnehmende Empfindlichkeit					
	→					
Farbstoff	FAM	JOE / TET	HEX	NED	TAMRA	ROX
Sensitivität	100%	100%	50%	50%	25%	12%
Faktor	8	8	4	4	2	1

	Abnehmende Laufgeschwindigkeit					
	→					
Farbstoff	FAM	HEX	JOE / TET	NED	TAMRA	ROX

2.3 Tips zur Fragmentanalyse

Tips zur PCR

- PCR-Produkte mit +A
Eine nachträgliche Behandlung des PCR-Ansatzes mit T4-Polymerase führt zur Entfernung überhängender ssDNA und somit des zusätzlichen A's. Protokoll :
0,5 Units T4-Polymerase + 10 µl PCR-Ansatz 30 min bei 37°C inkubieren.
- Erzeugung von +A
Für eine einfachere Interpretation von Mikrosatelliten-Daten empfiehlt es sich, die PCR-Bedingungen so zu wählen, daß die +A-Produkte mit Präferenz gebildet werden. Um das zu erreichen, muß der reverse PCR-Primer am 5'-Ende um die Sequenz $5' \text{GTTTCTT} 3'$ verlängert werden ("Pigtailling"). Außerdem sollte noch ein Zyklus von 60°C über 45 min an das Cycle-Protokoll angehängt werden.
- Poolen von PCR-Ansätzen
Zur multifluorophoren Fragmentlängenbestimmung können auch mehrere verschiedene PCR-Ansätze nach der Reaktion vereinigt werden. Der Pool muß dann jedoch bei RT mit 100% EtOH gefällt und anschließend bei RT mit 70% EtOH gut gewaschen werden. Nach dem Trocknen kann die Probe wieder in Wasser gelöst und zur Denaturierung in Formamid oder TSR eingesetzt werden.

Tips zur Auswertung

- Signale brechen in anderen Farben durch
Wenn zuviel DNA geladen wird, kann die systemeigene Matrix nicht mehr arbeiten (Überladen des Systems!). Eine überladene Probe zeigt an der Stelle der Hauptsignale an gleicher Position auch in anderen Farben Signale.

1. Matrix Standard Läufe

Matrix Standards getrennt voneinander auftrennen und individuelle Sample Files anlegen.

2. Rohdaten Analyse

Matrix Standard Files öffnen und Rohdaten begutachten. Sind Signale vorhanden, gibt es unspezifische Peaks oder Fluoreszenzverunreinigungen, ist die Basislinie gerade?

3. Gute Peaks finden

Je File einen Scanbereich (X-Achsenwert) definieren, der mindestens 5 eindeutig voneinander getrennte Peaks enthält, die von den Matrix Standard-Fragmenten stammen. Diese Peaks müssen mindestens 150 Fluoreszenzeinheiten (Y-Achsenwert) und nicht mehr als 4.000 Fluoreszenzeinheiten hoch sein (von Basislinie bis Peakspitze).

4. Bereiche festlegen

Scannummern der Anfangs- und Endpunkte (X-Achsenwerte) der Scanbereiche notieren.

5. Differenzen bilden

Je Matrix-Standardfile die Differenz aus ermitteltem Anfangs- und Endpunkt bestimmen. Der kleinste Differenzwert wird bei der Erstellung der Matrix als Gesamtpunktzahl eingegeben.

6. Matrix erstellen

Sequenz Matrix:

- DataUtility Programm öffnen —> **UTILITIES** —> **MAKE MATRIX** auswählen.
- Matrix-Standard Sample Files für **C** (blaue Farbe), **A** (grüne Farbe), **G** (gelbe Farbe), **T** (rote Farbe) importieren, bzw. **Kitprotokoll beachten!**
- Werte der jeweiligen Anfangspunkte bei **Start At** eingeben.
- Kleinsten Differenzwert oder 1.500 bei **Points** eintragen.
- Matrix** Art (Dye Primer oder Terminator) wählen.
- Matrix unter **New File** benennen und mit **OK** abspeichern.

GeneScan Matrix:

- GS Analyse Programm öffnen —> **FILE** —> **NEW** —> **MATRIX** auswählen.
- Matrix Standard Sample Files für **B** (blaue Farbe), **G** (grüne Farbe), **Y** (gelbe Farbe), **R** (rote Farbe) importieren.
- Werte der jeweiligen Anfangspunkte bei **Start At** eingeben.
- Kleinsten Differenzwert oder 1500 bei **Points** eintragen.
- Mit **OK** bestätigen und Matrix abspeichern.

7. Matrix überprüfen

Sequenz Matrix:

- Im DataUtility Programm unter —> **FILE** —> **Open** Matrix Standard Files nacheinander auswählen und Datenfenster **Analyzed** betrachten.
- Bei einer guten Matrix sieht man nur Peaks in einer Farbe, während die Basislinien der anderen Farben gerade sind. Eine schlechte Matrix zeigt ebenfalls Peaks in anderen Farben an selber Stelle wie die Standardfragmente.

GeneScan Matrix:

- Im GS Analyse Programm unter —> **FILE** —> **NEW** —> **PROJECT** auswählen.
- Unter —> **PROJECT** —> **ADD SAMPLE FILES** Matrix Standard Files einladen.
- Spalte **SAMPLE FILE** markieren und Matrix unter —> **SAMPLE** —> **INSTALL NEW MATRIX** anhängen.
- Unter —> **SETTINGS** —> **ANALYSIS PARAMETERS** bei **Analysis Range** zuvor ermittelten Anfangspunkt bei **Start** und 10.000 bei **Stop** eingeben.
- Spalten der Farben **B**, **G**, **Y** und **R** alle markieren und **Analyze** anklicken.
- Chromatogramme unter —> **WINDOWS** —> **RESULTS CONTROL** durch gleichzeitiges Aktivieren aller Farben pro Sample File betrachten.
- Bei einer guten Matrix sieht man nur Peaks in einer Farbe, während die Basislinien der anderen Farben gerade sind. Eine schlechte Matrix zeigt ebenfalls Peaks in anderen Farben an selber Stelle wie die Standardfragmente.

3. Probenvorbereitung für Sequenzanalysen

6

3.1 Plasmid-DNA Präparation

Alle Plasmid-Präparationsmethoden sind für eine anschließende DNA-Sequenzierung mit den ABI PRISM™-Systemen geeignet. Beste Ergebnisse erhält man bei Beachtung folgender Punkte:

- **RNAse-Behandlung**
- **Phenolextraktion**
- **Fällung, Zentrifugation, Waschen der DNA bei Raumtemperatur !**
- **Gründlich waschen bei Raumtemperatur !**
- **Fällung mit:**
 - 4 M Ammonium-Acetat**
 - Protokoll : 1 Vol DNA-Lösung + 1 Vol 4 M NH₄OAc + 6 Vol 100% EtOH
- **Lösen von DNA ausschließlich in Wasser**
- **Quantifizierung durch Aufnahme eines Spektrums 200 - 300 nm**

3.2 PCR-Produkte als Template

Zwingende Voraussetzung für eine direkte Sequenzierung von PCR-Produkten ist ein **einheitliches PCR-Produkt!** Das beste PCR-Template erhält man aus einer optimierten PCR.

Optimierungsschritte für PCR-Templates

- **Primermenge 3 - 5 pmol, nicht mehr als 10 pmol einsetzen !**
- **Reaktionsvolumen ≤ 25 µl**
- **Hot Start mit AmpliTaq™ Gold**
- **Verschiebung der Primersequenzen um 2-3 Basen in 5'-Richtung**

Bevor PCR-Produkte direkt sequenziert werden können, müssen **unerwünschte Nebenprodukte** (überschüssige Primer, nichteingebaute Nukleotide und Puffer-Salze) durch eine Ammonium-Acetat-Fällung (s.o.) oder Centricon 100 Säulenreinigung abgetrennt werden.

Sind bei der PCR **mehrere Produkte** entstanden und möchte man eine Gelaufreinigung vermeiden

- **“Nested”-Primer für die Sequenzierung verwenden.**

3.3 Primer-Design und Qualität

Ein PCR- oder Sequenzierprimer sollte möglichst nach folgenden Kriterien ausgewählt werden:

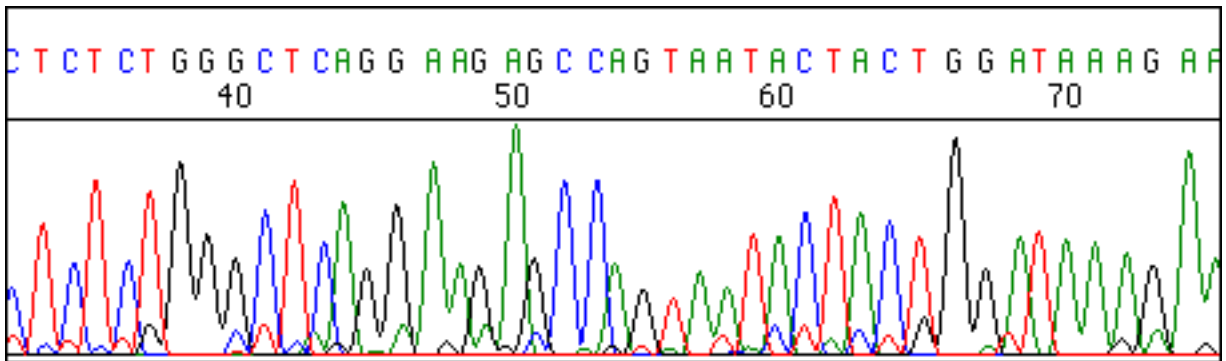
- **22 - 24 Nukleotide lang**
- **Gleichmäßige Verteilung der Nukleotide (1:1:1:1)**
- **Base G oder C am 3'-Ende**
- **Keine Hairpin-loops (Komplementäre Rückfaltungen)**
- **Primer-Dimer Bildung sollte ausgeschlossen sein**

Die Annealingtemperatur T_a des Primers kann nach folgender Näherungsformel abgeschätzt werden:

$$T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})$$

$$T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$$

Der Primer sollte in Wasser gelöst sein und darf **keine Nebenprodukte** („n-x Primer“) enthalten. Diese führen bei einer Sequenzierung mit DyeTerminatoren zu Sequenzüberlagerungen.



Sequenzüberlagerungen durch „n-1 Primer“

Empfohlene Primersequenzen:

Universal Primer -21M13: 5' ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG 3'

Reverse Primer M13RP1: 5' TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3'

4. Sequenzierungsreaktionen

4.1 Protokolle für BigDyeTerminator Reaktionen

Auf den folgenden Seiten sind die wichtigsten Protokolle für eine Sequenzierung mit BigDyeTerminatoren auf je einer Seite zusammengefaßt. Angaben in diesen Protokollen können von Angaben in den mitgeschickten Kitprotokollen (englische Version) abweichen.

Bitte führen Sie die Reaktionen unter den hier angegebenen Bedingungen durch!!

Folgende Protokolle finden Sie in diesem Kapitel:

- **Standard Protokoll**
- **Fast Protokoll**
- **Large Template Protokoll**

Die Volumina des Reaktionsansatzes im Standardprotokoll können bei optimaler Templatequalität um den Faktor 4 reduziert werden, wobei es empfehlenswert ist, das Gesamtreaktionsvolumen nicht kleiner als 10 µl zu machen.

ABI PRISM™ Protokoll

8

AmpliTaQ® FS BigDyeTerminator

Reaktionsansatz:

Premix	8,0	µl
DNA-Template		
ssDNA	0,1	µg
dsDNA	0,2 - 0,5	µg
PCR-Produkte (0,2 - 5 kb)	10 - 100	ng
Primer	10	pmol
H₂O	ad 20	µl

Nur bei TC 1 / 480 mit zwei Tropfen leichtem Mineralöl überschichten !

Thermocycler Protokoll (25 Zyklen): Für Perkin Elmer Thermocycler !

TC 1 / 480

96°C	30 sec
45° - 60°C	15 sec
60°C	4 min

TC 2400 / 9600 / 9700

96°C	10 sec
45° - 60°C	5 sec
60°C	4 min

Aufreinigung Reaktionsansatz:

(Centri Sep)

- Säule mit 750 µl H₂O 30 min vorquellen
- Flüssigkeit ablaufen lassen
- 2 min 3.000 rpm zentrifugieren
- Reaktionsansatz (20 µl) zentral aufgeben
- 2 min 3.000 rpm zentrifugieren
- bei Bedarf :
- Eluat 10 min in Speed-Vac trocknen

(Ethanol Fällung)

- 80 µl H₂O, 10 µl 3 M NaAc pH 4,6 und 250 µl 100% EtOH (RT) zugeben
- 15 min 15.000 rpm zentrifugieren
- EtOH entfernen
- mit 250 µl 70% EtOH (RT) waschen
- 5min 15.000 rpm zentrifugieren
- EtOH entfernen
- Pellet 5 min in Speed-Vac trocknen

Probenvorlage:

310

- 4 µl Centri Sep Eluat + 20 µl TSR *oder getrockneten Ansatz in 20 µl TSR aufnehmen*
- 2 min bei 90°C denaturieren

377

- Getrockneten Ansatz in 4 µl Formamid / 25 mM EDTA pH 8,0 (5:1) aufnehmen
- 2 min bei 90°C denaturieren und 1 µl auftragen

ABI PRISM™ Fast Protokoll

9

AmpliTaQ® FS BigDyeTerminator

Reaktionsansatz:

Premix	8,0 µl	4,0 µl
Plasmid-DNA	1,5 µg	-
PCR-Produkte (0,2 - 5 kb)	-	200 ng
Primer (mind. 20mer)		10 pmol
H₂O		ad 20 µl

Thermocycler Protokoll (15 Zyklen): Für Perkin Elmer Thermocycler !

TC 2400 / 9600 / 9700

96°C	10 sec
60°C	90 sec

Aufreinigung Reaktionsansatz:

(Centri Sep)

- Säule mit 750 µl H₂O 30 min vorquellen
- Flüssigkeit ablaufen lassen
- 2 min 3.000 rpm zentrifugieren
- Reaktionsansatz (20 µl) zentral aufgeben
- 2 min 3.000 rpm zentrifugieren

bei Bedarf :

- Eluat 10 min in Speed-Vac trocknen

(Ethanol Fällung)

- 80 µl H₂O, 10 µl 3 M NaAc pH 4,6 und 250 µl 100% EtOH (RT) zugeben
- 15 min 15.000 rpm zentrifugieren
- EtOH entfernen
- mit 250 µl 70% EtOH (RT) waschen
- 5min 15.000 rpm zentrifugieren
- EtOH entfernen
- Pellet 5 min in Speed-Vac trocknen

Probenvorlage:

310

- 4 µl Centri Sep Eluat + 20 µl TSR *oder getrockneten Ansatz in 20 µl TSR aufnehmen*
- 2 min bei 90°C denaturieren

377

- Getrockneten Ansatz in 4 µl Formamid / 25 mM EDTA pH 8,0 (5:1) aufnehmen
- 2 min bei 90°C denaturieren und 1 µl auftragen

ABI PRISM™ Large Template Protokoll

10

AmpliTaQ® FS BigDyeTerminator

Reaktionsansatz :

Premix	8,0	µl
DNA-Template		
Cosmide (bis 100 kb)	1,5	µg
PACs (100 -150 kb)	3	µg
BACs (bis 300 kb)	4 - 5	µg
Primer	10	pmol
DMSO	1	µl
H₂O	ad 20	µl

Thermocycler Protokoll (30 Zyklen): Für Perkin Elmer Thermocycler !

Vorinkubation 5 min 96°C, dann Premix zugeben !

TC 2400 / 9600 / 9700

96°C	10 sec
50°C	5 sec
60°C	4 min

Aufreinigung Reaktionsansatz :

(Centri Sep)

- Säule mit 750 µl H₂O 30 min vorquellen
- Flüssigkeit ablaufen lassen
- 2 min 3.000 rpm zentrifugieren
- Reaktionsansatz (20 µl) zentral aufgeben
- 2 min 3.000 rpm zentrifugieren

- Eluat 10 min in Speed-Vac trocknen

(Ethanol Fällung)

- 80 µl H₂O, 10 µl 3 M NaAc pH 4,6 und 250 µl 100% EtOH (RT) zugeben
- 15 min 15.000 rpm zentrifugieren
- EtOH entfernen
- mit 250 µl 70% EtOH (RT) waschen
- 5min 15.000 rpm zentrifugieren
- EtOH entfernen
- Pellet 5 min in Speed-Vac trocknen

Probenauftrag :

310

- Getrockneten Ansatz in 20 µl TSR aufnehmen
- 2 min bei 90°C denaturieren

377

- Getrockneten Ansatz in 4 µl Formamid / 25 mM EDTA pH 8,0 (5:1) aufnehmen
- 2 min bei 90°C denaturieren und 1 µl auftragen

4.2 Tips zur Sequenzierung

11

- Reaktionsgefäße
Sequenzierungsreaktionen **nicht** in **farbigen Reaktionsgefäßen (Tubes)** durchführen !

BigDyeTerminator Sequenzierungs Tips

- GC-reiche DNA
Zugabe von **1 µl DMSO** zum 20 µl Reaktionsansatz (Endkonzentration 5%) oder **Vorinkubation über 5 min bei 98°C** vor Zugabe des Premixes und Cyclen.
- AT-reiche DNA
Temperaturprofil **30 x (96°C 5 s, 50°C 4 min)** oder
Temperaturprofil **25 x (96°C 5 s, 60°C 90 s, 50°C 90 s)**
4 µl Premix im 20 µl Ansatz
- Sekundärstrukturen
16 µl Premix und Temperaturprofil **25 x (98°C 20 s, 55°C 15 s, 60°C 4 min)** oder
Linearisierung des Templates oder die Generierung von ssDNA z.B. über Magnetic Beads.
- Homopolymere Bereiche
Temperaturprofil **30 x (96°C 5 s, 50°C 4 min)**
Neuer Sequenzierprimer, der 25 Basen aus dem Polymerbereich besitzt und am 3'-Ende die Base mit der die Sequenz weitergeht.
- Repeat-Strukturen
Temperaturprofil **25 x (98°C 5 s, 60°C 90 s, 50°C 90 s)**
- Niedrige Signalstärken trotz genügend DNA
16 µl Premix und **1 µl DMSO**
- Primerannealing
Primerbedingte Probleme, lassen sich in einigen Fällen lösen, indem man die Kettenverlängerung bei **55°C** statt bei 60°C und **30 Zyklen** anstelle von 25 durchführt.
- PCR-Produkte
Sollen PCR-Produkte mit einer Länge bis zu 700 bp sequenziert werden, wird ein Ansatz mit **halbem Premix = 4 µl** im 20 µl Reaktionsansatz empfohlen.
- Fällung im 96er GeneAmp Format
Folgendes Protokoll ermöglicht eine direkte Fällung nach der Sequenzierungsreaktion im Mikrotiterplatten-Format:
 1. Zugabe von 74 µl 70% EtOH mit 0,5 mM MgCl₂ bei Raumtemperatur und gut mischen.
 2. 15 min bei Raumtemperatur stehen lassen.
 3. 15 min bei 3.000 g zentrifugieren.
 4. Mehrfach gefaltetes Papiertuch über Mikrotiterplatte legen und Platte umdrehen.
 5. Umgekehrt 1 min bei 500 g zentrifugieren.
 6. Papiertuch entfernen. Proben sind bereit und müssen nicht weiter getrocknet werden.

Primer Tips

- (Dye)Primer Länge
Für Primer mit niedrigen Schmelztemperaturen, wie z.B. die 17mere T3 / T7 und SP6, ist im Temperaturprofil eine Annealing-Temperatur von **45°C** anstelle von 55°C auszuwählen.

Probedenaturierung

- Denaturierungsbedingungen von markierter DNA: **2 min 90°C**, **nicht mehr !!!!**

5. Elektrophorese 310

12

5.1 Zusätzlich benötigte Reagenzien und Materialien

Name	Menge	Anbieter	Best.-Nr.
Borsäure	1 kg	Merck	165.1000
EDTA	100 g	Sigma	ED2SS
Ethanol p.a.	2,5 l	Merck	983.2500
Formamid Ultra	100 ml	Sigma	F5786
Glycerin p.a.	1l	Merck	1.04092.1000
Isopropanol, p.a.	2,5 l	Merck	9634.2500
Kimwipes Lite 200	200 Stck	Kimberly-Clark	7101
NaOH Plätzchen p.a.	1 kg	Merck	1.06469.1000
Tris	1 kg	BIO-RAD	161-0719
Wasser (HPLC)	2,5 l	Merck	1.15333.2500

Zubehör für 96 Proben im Autosampler

Genetic Analyzer Septa Strips	PE Biosystems	402059
Genetic Analyzer Retainer Clips	PE Biosystems	402866
0.2 ml MicroAmp Reaction Tubes	PE Biosystems	N801-0580
MicroAmp Tray und Retainer	PE Biosystems	N801-0530
MicroAmp Base	PE Biosystems	N801-0531

5.2 310 Elektrophorese Tips

- Probeninjektion (Wasserladeprotokoll)

Statt in TSR oder Formamid kann die DNA-Probe auch in **Wasser** vorgelegt und denaturiert werden. In diesem Fall muß die Injektionszeit verkürzt werden und zwar auf: 5 - 10 sec für Sequenzanalysen und auf 3 - 5 sec für Fragmentanalysen.

- Haltbarkeit von Elektrophorese-Reagenzien

Geöffnete Reagenzien sollten spätestens nach **4 Wochen** aufgebraucht sein. Ist Polymer auskristallisiert, kann es durch Erwärmen auf 37°C und gutes Mischen wieder in Lösung gebracht werden.

- Breite Peaks

können entstehen, wenn **Salze** oder organische Verbindungen die Oberfläche der Kapillare besetzen. Reaktions-Ansätze bei RT fällen und gut waschen. **Öl- und Ethanol-Reste** führen ebenfalls zu Peakverbreiterungen.

- Probenladen

Zur Denaturierung der PCR-Produkte, diese ausschließlich in **hochreinem Formamid (Ultrapur)** aufnehmen. Altes oder unreines Formamid führt zu einem abnormalen Laufverhalten der Fragmente. Außerdem wird damit weniger DNA geladen.

- Spannungsüberschläge

Zur Vermeidung von Spannungsüberschlägen im Bereich des Autosamplers ist darauf zu achten, daß erstens die Puffergefäße nicht höher als bis zur Markierung gefüllt sind und zweitens keine Feuchtigkeit im Bereich des Septums oder an den Gefäßwänden kondensiert ist.

Sequenzanalyse

Anwendung: Ca. 450 Basen in 55 min

<u>Modul: Seq POP6 RAPID (1 ml)</u>	
<u>Kapillare:</u>	47 cm / 50 µm (grün)
<u>Polymer:</u>	POP-6
<u>Puffer:</u>	1 x GA-Puffer mit EDTA
<u>Vorlage:</u>	Probe in 20 µl TSR lösen.
<u>Denaturierung:</u>	2 min bei 90°C und auf Eis abkühlen.

Anwendung: Ca. 650 Basen in 2,5 h

<u>Modul: Seq POP6 (1 ml)</u>	
<u>Kapillare:</u>	61 cm / 50 µm (rot)
<u>Polymer:</u>	POP-6
<u>Puffer:</u>	1 x GA-Puffer mit EDTA
<u>Vorlage:</u>	Probe in 20 µl TSR lösen.
<u>Denaturierung:</u>	2 min bei 90°C und auf Eis abkühlen.

Denaturierende Fragmentanalyse

Anwendung: 1 Basen-Auflösung bis 250 bp in 25 min

<u>Modul: GS STR POP4 (1 ml)</u>	
<u>Kapillare:</u>	47 cm / 50 µm (grün)
<u>Polymer:</u>	POP-4
<u>Puffer:</u>	1 x GA mit EDTA
<u>Vorlage:</u>	1 µl PCR-Ansatz / 0,5 µl Standard / 12 µl Formamid
<u>Denaturierung:</u>	2 min bei 90°C und auf Eis abkühlen.

Anwendung: 1 Basen-Auflösung bis 350 bp in 55 min

<u>Modul: Seq POP6 RAPID (1 ml)</u>	
<u>Kapillare:</u>	47 cm / 50 µm (grün)
<u>Polymer:</u>	POP-6
<u>Puffer:</u>	1 x GA mit EDTA
<u>Vorlage:</u>	1 µl PCR-Ansatz / 0,5 µl Standard / 12 µl Formamid
<u>Denaturierung:</u>	2 min bei 90°C und auf Eis abkühlen.

Native Fragmentanalyse

Kapillare	Polymer
I.D. 50 µm 47 cm (grün)	GS Polymer (7%ig)

Anwendung: **SSCP Analyse**

<u>Modul: GS Template (1 ml)</u>	
<u>Kapillare:</u>	47 cm / 50 µm (grün)
<u>Polymer:</u>	5% GS Polymer, 10% Glycerin, 1 x TBE
<u>Puffer:</u>	10% Glycerin, 1 x TBE
<u>Vorlage:</u>	1 µl PCR-Ansatz / 0,5 µl Standard / 0,5 µl 0,3 N NaOH / 10,5 µl Formamid
<u>Denaturierung:</u>	2 min bei 90°C und auf Eis abkühlen.

Einstellungen GS Template:	Injection Time = 10 sec	Syringe Pump Time = 180 sec
	Injection Voltage = 15 kV	Pre-Injection EP = 0 sec
	Collection Time = 24 min	EP Voltage 13 kV
	Heatplate Temperature = 30°C	

Anwendung: **„Fast Native“ mit 1% Basen-Auflösung bis 14 kb**

<u>Modul: GS Template (1 ml)</u>	
<u>Kapillare:</u>	47 cm / 50 µm (grün)
<u>Polymer:</u>	2,5% GS Polymer, 1 x GA-Puffer mit EDTA
<u>Puffer:</u>	1 x GA mit EDTA
<u>Vorlage:</u>	1 µl PCR-Ansatz / 0,5 µl Standard / 12 µl Formamid
<u>Denaturierung:</u>	2 min bei 90°C und auf Eis abkühlen.

Einstellungen GS Template:	Injection Time = 1 sec	Syringe Pump Time = 30 sec
	Injection Voltage = 15 kV	Pre-Injection EP = 0 sec
	Collection Time = 13 min	EP Voltage 15 kV
	Heatplate Temperature = 60°C	

6.1 Zusätzlich benötigte Reagenzien und Materialien

Name	Menge	Anbieter	Best.-Nr.
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	30 g	BIO-RAD	1610121
Ammoniumperoxodisulfat	100 g	Aldrich	24,861-4
Borsäure	1 kg	Merck	165.1000
EDTA	100 g	Sigma	ED2SS
Filtratflasche (250 ml)	1	Nalgene	300-4000
Formamid Ultra	100 ml	Sigma	F5786
Harnstoff	1 kg	BIO-RAD	161-0731
Isopropanol p.a.	2,5 l	Merck	9634.2500
Kimwipes (Rolle)	1 Stck	Kimberly-Clark	7201
Membranfilter RC58; 0.2 µm	1 Pckg	Schleicher&Schuell	410312
NaOH Plätzchen p.a.	1 kg	Merck	1.06469.1000
PAGE-PLUS*	100 ml	Biometra	211-562
TAPS	1 kg	Sigma	T5130
TEMED	5 ml	BIO-RAD	161-0800
Tris	1 kg	BIO-RAD	161-0719
Wasser (HPLC)	2,5 l	Merck	1.15333.2500

6.2 Stammlösungen

30% PAA-Lösung*	10 x TBE-Puffer	10 x TTE-Puffer*	10% APS
58 g Acrylamid	108 g Tris	60.55 g Tris	1 g APS
2 g Bisacrylamid	55 g Borsäure	121.65 g TAPS	
	7.4 g Na ₂ EDTA	3.72 g Na ₂ EDTA	
146 ml HPLC-H ₂ O	ad 1 l mit HPLC-H ₂ O	ad 1 l mit HPLC-H ₂ O	10 ml HPLC-H ₂ O

*** Diese Lösungen sind nach Öffnung nicht länger als 4 Wochen haltbar!**

6.3 Gel-Vorbereitung

Glasplatten mit 6 N NaOH behandeln, mit dest. Wasser spülen und mit Isopropanol p.a. / Wasser (9:1) nachbehandeln. Trocknen, Spacer auflegen und die Glasplatten zusammensetzen.

- Gellösung filtrieren
- APS und TEMED addieren
- Lösung zwischen die vorbereiteten Platten gießen und 1 h polymerisieren lassen

6.4 Wasserlade-Protokoll

- Obere Pufferkammer (max. 600 ml) mit deionisiertem Wasser füllen und Taschen spülen
- DNA in Formamid / EDTA (10:1) aufnehmen und 2 min bei 90°C denaturieren, abkühlen
- Ungerade Spuren beladen und DNA 2 min mit Pre-Run Modul einlaufen lassen
- Gerade Spuren beladen und erneut 1-2 min einlaufen lassen
- 10 x Puffer in obere Pufferkammer geben und mit dem Wasser gut mischen
- Elektrophorese mit entsprechendem Runmodul starten

- Haifischkamm einsetzen
Setzen Sie den Kamm außerhalb des Gerätes ein, da dort die Lichtverhältnisse günstiger sind.
- Probenladen
kann durch Zugabe von 1 µl einer konz. Dextran-Blau-Lösung zum Denaturierungs-Mix erleichtert werden. Für Fragmentanalysen (Square tooth comb) hilft eine Vorbeladung aller Taschen mit Dextranblau / Formamid, um die Taschen sichtbar zu machen. Nach Beladung 2 Minuten einwandern lassen und dann die Taschen spülen!
- Abnormales Laufverhalten
Schlechte Resultate erhält man, wenn das Gel zu schnell läuft. Dies spiegelt sich in einem niedrigen Spacing-Wert, einer engen Peakfolge am Anfang und breiten Peaks ab Base 250 wieder. **In diesem Fall bitte Wasser und Chemikalien überprüfen !!**
- Schlechte Auflösung
Zeigen insbesondere Sequenzierungsreaktionen einen plötzlichen Auflösungsverlust im Mittelteil der Sequenz, wobei die Signale immer breiter werden, befinden sich organische, nichtfluoreszierende Verbindungen auf den Glasplatten. Diese Verbindungen können durch Einlegen der Platten in 2 N NaOH über Nacht wieder entfernt werden. Auslöser können sein: Filtratflaschen, Handschuhe, Trockentücher, Spülmittel, Alkohol oder Detergenzien.
- Spuren verlassen den Fensterbereich
Dieses Phänomen tritt auf, wenn entweder eine Verbindung zwischen oberer und unterer Pufferkammer besteht, indem Puffer in dem Spalt zwischen Spacer und Gel nach unten läuft, oder wenn die Taschen nach dem ersten Auftrag nicht gespült wurden.
Da Formamid ein Isolator ist, ist es wichtig nach dem Laden und Einwandern der ersten Proben, alle Taschen nochmals gründlich zu spülen. Ansonsten fließt der Hauptstrom am linken und rechten Rand des Gels, was dazu führt, daß die Randspuren nach außen gezogen werden und eventuell das Gelfile-Fenster verlassen.
- Haltbarkeit von Elektrophorese-Lösungen
Geöffnete Acrylamidlösungen sollten spätestens nach 4 Wochen aufgebraucht sein. TBE-Puffer sind zu verwerfen, wenn sich eine Trübung bzw. ein weißer Niederschlag zeigt.
- Taschen kollabieren (Bindesilanrezept)
Bei Verwendung von Square-Tooth Kämmen entstehen Taschen aus Acrylamid, die beim Entfernen des Kammes leicht deformiert werden können. Um das zu verhindern, wird im Bereich dieser Taschen eine Glasplatte vor dem Gießen des Geles mit einer Bindesilan-Lösung behandelt.
Bindesilan-Lösung: 1 ml EtOH + 250 µl 10%ige Essigsäure + 3 µl Bindesilan
- Reinigung von fluoreszierenden oder verunreinigten Glasplatten
 1. Platten unter fließendem, warmen Wasser von Gel und Harnstoffresten befreien.
 2. Platten über Nacht in **2 N NaOH p.a.** einlegen. 2 N NaOH mit fluoreszenzfreiem, deionisiertem Wasser ansetzen!!
 3. Platten mit deionisiertem Wasser gut abspülen.
 4. Platten trocknen.
 5. Platten zusammensetzen und Gel gießen.

- Ladeschema für 96 Lane Gele

	rot 1	blau 2	schw 3	rot 4	blau 5	schw 6	rot 7	blau 8	schw 9	rot 10	blau 11	schw 12
A	1	3	5	49	51	53	2	4	6	50	52	54
B	7	9	11	55	57	59	8	10	12	56	58	60
C	13	15	17	61	63	65	14	16	18	62	64	66
D	19	21	23	67	69	71	20	22	24	68	70	72
E	25	27	29	73	75	77	26	28	30	74	76	78
F	31	33	35	79	81	83	32	34	36	80	82	84
G	37	39	41	85	87	89	38	40	42	86	88	90
H	43	45	47	91	93	95	44	46	48	92	94	96

SEQ Trennsysteme

550	650	700	750	800	1000	Leseweite (Basen)
4 h	8 h	9 h	10 h	12 h	18 h	Daten- aufnahme
36 cm			48 cm			Glas- Platten
36-2400 200 B/h	36-1200 100 B/h		48-1200 90 B/h			Module*
4.5 % PAA (29:1) TBE-Puffer	5 % PAA (29:1) TBE-Puffer	4.8 % PAGE- PLUS TBE-Puffer	4.25 % PAA (29:1) TBE-Puffer	5.25 % PAGE- PLUS TBE-Puffer	4.25 % PAGE- PLUS TTE-Puffer	Gel- lösung & Puffer

* Veränderte Elektrophoreseparameter siehe **Moduleinstellungen**

SEQ Gel- und Ladeprotokolle

Für PAA-Gele (29:1)

Lese- weite (Basen)	End- konz.	30% PAA	Harnstoff	10 x TBE	10x TTE	HPLC- Wasser	TEMED	10% APS	Laufpuffer oben / unten
550	4.5 %	7.5 ml	18 g	6 ml	-	23 ml	20 µl	300 µl	1 x TBE
650	5 %	8.4 ml	21 g	6 ml	-	20 ml	20 µl	300 µl	1 x TBE
750	4.25 %	7.1 ml	21 g	6 ml	-	21 ml	20 µl	300 µl	1 x TBE

Für PAGE-PLUS-Gele

Lese- weite (Basen)	End- konz.	40% PAGE- Plus	Harnstoff	10 x TBE	10x TTE	HPLC- Wasser	TEMED	10% APS	Laufpuffer oben / unten
700	4.8 %	6 ml	18 g	5 ml	-	23 ml	20 µl	300 µl	1 x TBE
800	5.25 %	6.6 ml	18 g	5 ml	-	23 ml	20 µl	300 µl	1 x TBE
1000	4.25 %	5.3 ml	18 g	-	6 ml	21.5 ml	20 µl	300 µl	2 x TTE / 1 x TTE

Ladeprotokolle

Für alle Gelsysteme **Wasserlade-Protokoll** verwenden !

Kamm	36 Lanes	48 Lanes	64 Lanes	96 Lanes
max. Volumen	1 - 3 µl	1 - 1.5 µl	0.8 - 1 µl	0.5 µl

SEQ Moduleinstellungen

Für PAA-Gele (29:1)

Modul (Filterset A oder E)	Seq Run 36-2400	Für 550 Basen		
Electrophoresis Voltage	2700 V konstant	Collection Time	4	Hours
Electrophoresis Current	60 mA	Gel Temperature	51	°C
Electrophoresis Power	200 W	Laser Power	40	mW
CCD Offset*	250	CCD Gain*	2	
Modul (Filterset A oder E)	Seq Run 36-1200	Für 650 Basen		
Electrophoresis Voltage	2500 V	Collection Time	8	Hours
Electrophoresis Current	50 mA	Gel Temperature	51	°C
Electrophoresis Power	40 W konstant	Laser Power	40	mW
CCD Offset*	250	CCD Gain*	2	
Modul (Filterset A oder E)	Seq Run 48-1200	Für 750 Basen		
Electrophoresis Voltage	2400 V konstant	Collection Time	10	Hours
Electrophoresis Current	50 mA	Gel Temperature	51	°C
Electrophoresis Power	200 W	Laser Power	40	mW
CCD Offset*	250	CCD Gain*	2	

Für PAGE-PLUS-Gele

Modul (Filterset A oder E)	Seq Run 36-1200	Für 700 Basen		
Electrophoresis Voltage	1680 V konstant	Collection Time	9	Hours
Electrophoresis Current	50 mA	Gel Temperature	51	°C
Electrophoresis Power	150 W	Laser Power	40	mW
CCD Offset*	250	CCD Gain*	2	
Modul (Filterset A oder E)	Seq Run 48-1200	Für 800 Basen		
Electrophoresis Voltage	2400 V konstant	Collection Time	12	Hours
Electrophoresis Current	50 mA	Gel Temperature	51	°C
Electrophoresis Power	200 W	Laser Power	40	mW
CCD Offset*	250	CCD Gain*	2	
Modul (Filterset A oder E)	Seq Run 48-1200	Für 1000 Basen		
Electrophoresis Voltage	3000 V	Collection Time	18	Hours
Electrophoresis Current	60 mA	Gel Temperature	45	°C
Electrophoresis Power	40 W konstant	Laser Power	40	mW
CCD Offset*	250	CCD Gain*	2	

* Bei 96 Lanes:

CCD Offset = 0

CCD Gain = 4

GS Trennsysteme

500 bp	800 bp	2500 bp	Fragment-Länge
1 - 2	1 - 3	4 - 10	Auflösung (Basen)
3 h	5 h	9 h	Datenaufnahme
36 cm		12 cm	
36-2400	36-1200	12-1200 / 2400	Glasplatten
4.5 % PAA (29:1) TBE-Puffer	5.0 % PAA (29:1) TBE-Puffer	4.0 % PAA (29:1) TBE-Puffer	Module*
			Gel- lösung & Puffer

* Veränderte Elektrophoreseparameter siehe **Moduleinstellungen**

GS Gelprotokolle

Für PAA-Gele (29:1)

Fragmentlänge	Endkonz.	30% PAA	Harnstoff	10 x TBE	HPLC-Wasser	TEMED	10% APS	Laufpuffer oben / unten
500 bp	4.5 %	7.5 ml	18 g	6 ml	23 ml	20 µl	300 µl	1 x TBE
800 bp	5.0 %	8.4 ml	21 g	6 ml	20 ml	20 µl	300 µl	1 x TBE
2500 bp	4.0 %	6.7 ml	21 g	5 ml	21.3 ml	20 µl	300 µl	1 x TBE

Ladeprotokolle

Für alle Gelsysteme **Wasserlade-Protokoll** verwenden !

Kamm max. Volumen	36 Lanes 1 - 3 µl	48 Lanes 1 - 1.5 µl	64 Lanes 0.8 - 1 µl	96 Lanes 0.5 µl
-------------------	-----------------------------	-------------------------------	-------------------------------	---------------------------

GS Moduleinstellungen

Für PAA-Gele (29:1)

Modul (Filterset A oder E)	GS Run 36-2400			Für 500 Basen		
Electrophoresis Voltage	3000	V	konstant	Collection Time	3	Hours
Electrophoresis Current	60	mA		Gel Temperature	51	°C
Electrophoresis Power	200	W		Laser Power	40	mW
CCD Offset*	250			CCD Gain*	2	

Modul (Filterset A oder E)	GS Run 36-1200			Für 800 Basen		
Electrophoresis Voltage	2500	V		Collection Time	5	Hours
Electrophoresis Current	50	mA		Gel Temperature	51	°C
Electrophoresis Power	50	W	konstant	Laser Power	40	mW
CCD Offset*	250			CCD Gain*	2	

Modul (Filterset A oder E)	GS Run 12-1200/2400			Für 2500 Basen		
Electrophoresis Voltage	750	V	konstant	Collection Time	9	Hours
Electrophoresis Current	60	mA		Gel Temperature	51	°C
Electrophoresis Power	200	W		Laser Power	40	mW
CCD Offset*	250			CCD Gain*	2	

* Bei 96 Lanes:

CCD Offset = 0

CCD Gain = 4

24/12cm WTR

6 %iges Polyacrylamidgel (60 ml):

30,0	g	Harnstoff
12,0	ml	30 %ige Acrylamidlösung
6,0	ml	10 x TBE-Puffer
20,0	ml	bidest. Wasser

Laufbedingungen : **27 Watt, 14 h**

34cm WTR

5 %iges Polyacrylamidgel (60 ml):

30,0	g	Harnstoff
10,0	ml	30 %ige Acrylamidlösung
6,0	ml	10 x TBE-Puffer
22,0	ml	bidest. Wasser

Laufbedingungen : **27 Watt, 15 h**

48cm WTR

5 %iges Polyacrylamidgel (60 ml):

30,0	g	Harnstoff
10,0	ml	30 %ige Acrylamidlösung
6,0	ml	10 x TBE-Puffer
22,0	ml	bidest. Wasser

Laufbedingungen : **37 Watt, 18 h**

24cm WTR (Basesprinter)

6 %iges Polyacrylamidgel (50 ml):

21,0	g	Harnstoff
10,0	ml	30 %ige Acrylamidlösung
6,0	ml	10 x TBE-Puffer
mit bidest. Wasser auf 50 ml auffüllen		

Laufbedingungen : **45 Watt, 8 h**

34cm WTR (Basesprinter)

5 %iges Polyacrylamidgel (50 ml):

21,0	g	Harnstoff
8,4	ml	30 %ige Acrylamidlösung
6,0	ml	10 x TBE-Puffer
mit bidest. Wasser auf 50 ml auffüllen		

Laufbedingungen : **48 Watt, 10 h**

48cm WTR (Basesprinter)

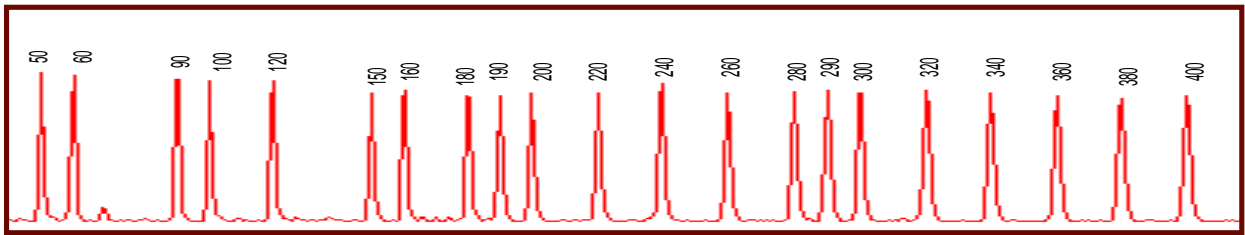
5,5 %iges Polyacrylamidgel (50 ml):

18,0	g	Harnstoff
9,2	ml	30 %ige Acrylamidlösung
5,0	ml	10 x TBE-Puffer
mit bidest. Wasser auf 50 ml auffüllen		

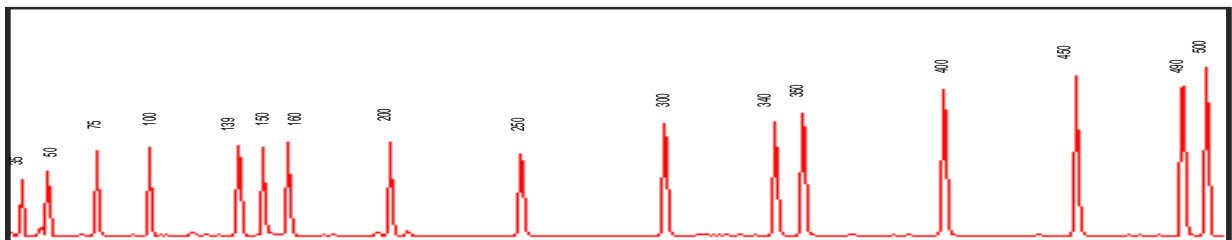
Laufbedingungen : **60 Watt, 15 h**

7.1 GS-Standards im Überblick

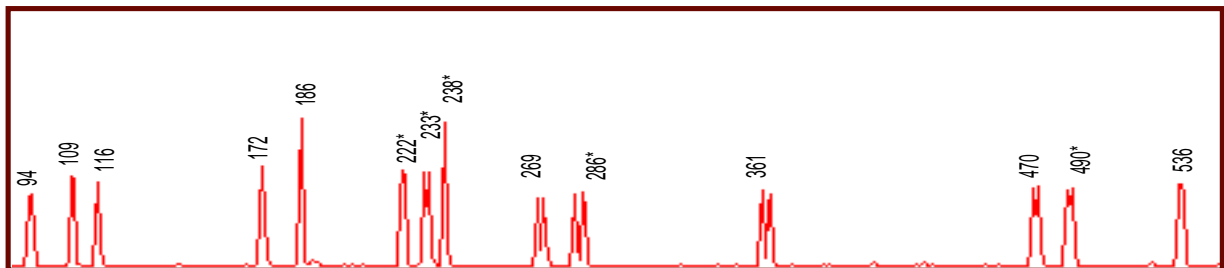
HD 400



GS 350 / 500



GS 2500



Fragmente: 37, 94, 109, 116, 172, 186, 222*, 233*, 238*, 269, 286*, 361, 470, 490*, 536, 827, 1115, 1181, 1722, 2008, 2162, 2465, 2481, 2860, 4529, 4771, 5099, 14079

* Rechten Peak definieren

Interne Standards für 310 geeignet: GS 350, HD 400, GS 500

Interne Standards für 37X geeignet: GS 350, HD 400, GS 500, GS 1000, GS 2500

Fragmentlängenbestimmung 310

• Zuordnung GS 350 und GS 500

Die Fragmente mit den Längen 250 und 340 dürfen bei der Definition des Längenstandards nicht miteinbezogen werden, da sie unter den gegebenen Bedingungen ein abnormales Laufverhalten zeigen. Diese Fragmente erhalten die Größe = 0.

• GS 1000 und GS 2500

Diese Standards sind nicht zur Längenberechnung mit denaturierenden Polymerlösungen geeignet, weil die komplementären, markierten Stränge unter diesen Bedingungen ein unterschiedliches Laufverhalten zeigen.

Der Sequence Navigator™ ist ein Sequenzvergleichsprogramm für kleinere Sequenzierungsprojekte bis ca. 5 kb. Mit dem Programm kann man Sequenzvergleiche aber keine automatischen Alignments durchführen, d.h. die Sequenzen müssen in der richtigen Reihenfolge und auch in der richtigen Orientierung für das Alignment vorgelegt werden.

Beim Arbeiten mit dem Navigator sollte man nach folgendem Schema vorgehen:

1. **Sequence Navigator™** öffnen.
2. Gegebenenfalls neues **Layout** öffnen (**File -> New Layout**).
3. **Sequenz Files** laden (**Sequences -> Import Sequence**).
4. **Alignment** durchführen
 - Sollen 2 Sequenzen miteinander verglichen werden (**Align -> Comparative**)
 - Sollen mehr Sequenzen gleichzeitig miteinander verglichen werden, was einem Multiple-Alignment entspricht (**Align -> Clustal**). **Nicht Multiple** auswählen, diese Option ist ausschließlich für Aminosäure-Sequenzvergleiche gedacht!
 - Sollen überlappende Sequenzen verglichen werden, müssen zunächst die Sequenzen in der richtigen Reihenfolge vorgegeben werden, 1te Sequenz mit 2ter und nicht 2te mit 1ter (**Align -> Overlap**).
Funktioniert diese Option nicht, weil der Überlappungsbereich zu groß ist, empfiehlt es sich, die **Comparative** Option auszuprobieren.
5. **Unterschiede** zwischen angepaßten Sequenzen anzeigen lassen (**Sequences -> Create Shadow(s) -> Compare Two Sequences**).
6. **Chromatogramme** vergleichen und **Peakmuster** beachten.
Zu vergleichende Sequenzfiles durch Anklicken bei gehaltener **Shift-Taste** im linken Layout-Fenster markieren, und interessanten Sequenzbereich im Hauptlayout-Fenster markieren.
Unter (**Sequences -> Display Electropherograms**) Chromatogramme anzeigen lassen.

Sollen mehr als 3 Sequenzchromatogramme gleichzeitig angezeigt werden, kann der Bildausschnitt verkleinert werden, indem man die **Alt-** oder **Option-Taste** drückt bevor man Display Electropherograms unter Sequences auswählt. Wenn dann im folgenden Fenster unter **Tile: half width** ausgewählt wird, kann man bis zu 9 Chromatogramme gleichzeitig betrachten.

Weitere Tips:

- Sequenzen Exportieren
Sollen abgeleitete Proteinsequenzen (**Sequences -> Create Shadow(s) -> Translate Codons to Amino Acids**) oder Consensussequenzen (**Sequences -> Create Shadow(s) -> Compute Consensus Sequence**) bearbeitet oder exportiert werden, müssen diese Files zunächst aktiviert werden. Dazu wird das File im linken Layout-Fenster markiert und anschließend unter (**Sequences -> Freeze Shadows**) aktiviert.