



PREPARAZIONE dei CAMPIONI per il SEQUenziAMENTO

Preparazione del campione

IL sequenziamento di DNA con tecnologia capillare dà risultati migliori rispetto a quello su gel, ma richiede un campione molto più pulito.

Se non strettamente necessario si sconsiglia l'estrazione del DNA da gel agarosio.

Per purificare i prodotti di PCR ci sono vari metodi: i) la reazione enzimatica (ExoSAP), per precipitazione (SureClean, etc.); ii) i kit con legame del DNA a filtro (colonnine commerciali).

Per l'operazione di ri-sospensione o diluizione del template e dei primer, occorre utilizzare acqua rigorosamente ultrapura.

Per chi esegue in proprio la reazione di sequenza, occorre seguire attentamente le istruzioni sulla preparazione del DNA riportati nel kit utilizzato.

Preparazione per la Spedizione Postale

Nei campioni DNA e primer devono essere già mescolati nelle quantità riportate in tabella.

Non prelevare volumi inferiori a 1 µl e una volta mescolati DNA e primer, assicurarsi che la goccia sia sul fondo; lasciare evaporare a T amb. o porre il tubino sul termociclatore alla T max di 65°C per pochi min.

Non liofilizzare perchè il pellet potrebbe venire rimosso dal fondo.

Non lasciare asciugare più del necessario (potrebbero esserci problemi nella ri-sospensione in etanolo).

Non preparare più di 15 µl di campione; se in eccesso precipitare il DNA e inviare il pellet dopo un lavaggio con etanolo 70%, per evitare un eccesso di sali, poi aggiungere il primer e asciugare come sopra.

Il pellet secco può essere spedito a temperatura ambiente, con posta normale o via corriere; in ogni caso i tubini devono essere protetti da possibili schiacciamenti.

Preparazione per la sola corsa della Reazione di Sequenza

Per il servizio di "solo corsa" utilizzare kit Applied Biosystems (chimica Big Dye, V1.1 o V3.1).

La purificazione post reazione di sequenza, necessaria, può essere fatta con diverse metodiche, la più economica è la precipitazione con Etanolo-AmmonioAcetato-EDTA

Protocollo precipitazione (Ethanol/EDTA/Na-acetate):

Aggiungere al prodotto di reazione di sequenza: 2 µl di EDTA(125mM), 2 µl di Na-Acetato (3M, pH 5,6) e 50 µl di Etanolo freddo (100%), agitare bene, lasciare i campioni 10 minuti a T amb. Centrifugare a per 15 minuti. Togliere l'alcool senza rimuovere il Pellet; lavare con 70 µl di Etanolo freddo al 70%, agitare e lasciare a temperatura ambiente per 15 minuti. Centrifugare a per 10 minuti. Togliere l'alcool al 70% senza lasciare gocce. Lasciare asciugare all'aria. Spedire il tubino con il pellet senza ri-sospendere in acqua. Per altre metodiche di purificazione, con campioni finali liquidi (purificazione con colonnine) precipitare o lasciare asciugare a temperatura ambiente (non a 65°).

Specificare nella richiesta il tipo di chimica utilizzata e la metodica seguita

TABELLA DELLE QUANTITA' CONSIGLIATE DI DNA

Tipo di DNA	Quantità di DNA
DNA_ds:_plasmide+_inserto	10-15 ng/100 basi
DNA ss	50-100 ng
Cosmidi, BAC, PAC e fagi con inserti grandi	0,70-1,0 ug
Prodotti di PCR:	5-8 ng/100 basi