



PREPARAZIONE dei CAMPIONI per il SEQUenziAMENTO

OPZIONE BASE: Reazione di sequenziamento e purificazione / Elettroforesi capillare

Preparazione del campione

Il risultato del sequenziamento è principalmente determinato dalla qualità del DNA; per questo è necessario che il prodotto di PCR consista in una singola banda netta e specifica. Si sconsiglia l'estrazione del DNA da gel agarosio, se non strettamente necessario. In caso di necessità utilizzare agarosio ultra puro, ridurre al minimo le dimensioni della banda tagliata e aumentare il numero di lavaggi in etanolo.

Per purificare i prodotti di PCR si possono utilizzare vari metodi: dalla reazione enzimatica (ExoSAP), alla precipitazione (SureClean, etc.) oppure i kit con legame del DNA a filtro (colonnine commerciali). Il template e i primers devono essere risospesi in acqua deionizzata, e mai in EDTA (infatti il sequenziamento capillare è molto sensibile alla presenza di sali).

Preparazione per la Spedizione Postale

DNA e primer devono rispettare le quantità che trovate anche sul modulo di richiesta e possono essere spediti sia separati che già mescolati nello stesso tubino/eppendorf.

Predisporre 15µl di template purificato con le seguenti concentrazioni:

DNA Plasmidico: 50-100 ng/µl

Prodotto PCR: 150-300pb: 1ng/µl; 300-1000pb: 5ng/µl; >1000pb: 10ng/µl

Aggiungere 2µl di primer a concentrazione 10pmol/µl (10µM) e assicurarsi che il volume totale (campione DNA + primer) sia almeno 17µl

Qualora la quantità necessaria di Dna risultasse in un volume maggiore rispetto a quello richiesto potete lasciare evaporare a Tamb. o porre il tubino sul termociclature alla Tmax di 60°C per pochi min. Non liofilizzare e non lasciare seccare più del necessario (campioni seccati eccessivamente possono avere problemi nella risospensione e portare a risultati non soddisfacenti).

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

I campioni devono essere siglati a partire dalla 1° riga sul modulo. Si raccomanda di apporre su ogni tubino il numero progressivo e non il codice identificativo assegnato al campione (evitando così di scrivere sigle illeggibili sul tubino).

I campioni inviati devono sempre essere accompagnati dal corrispondente modulo (scaricabile), compilato in ogni sua parte. In particolare è necessario specificare sempre la data d'invio e un recapito a cui verrà inviata via mail la notifica dell'arrivo dei campioni, e successivamente sarà spedito l'etroferogramma delle sequenze.

2° OPZIONE: Purificazione prodotto di PCR / Reazione di sequenziamento e purificazione / Elettroforesi capillare.

La corretta quantità del DNA è fondamentale nel determinare l'esito della reazione di sequenza. La quantizzazione del template può essere fatta mediante spettrofotometro o corsa comparativa su gel d'agarosio. Si consiglia il secondo metodo in quanto la misurazione tramite spettrofotometro potrebbe non essere affidabile se il campione fosse contaminato da altri acidi nucleici (DNA genomico o RNA). E' necessario che al campione amplificato, venga così allegata la foto del template stesso caricato su gel d'agarosio, indicando le dimensioni della banda, il tipo e la quantità del marker corso insieme al prodotto di PCR. Questo ci consentirà di valutare meglio le varie fasi successive.

I campioni dovranno essere spediti insieme anche ai primers (a parte) e alla foto del gel, con posta normale o via corriere; in ogni caso tutti i tubini devono essere protetti da possibili schiacciamenti meccanici. I prodotti da purificare devono essere siglati a partire dalla 1° riga sul modulo. Si raccomanda di apporre su ogni tubino il numero progressivo e non il codice identificativo assegnato al campione (evitando così di scrivere sigle illeggibili sul tubino) che deve essere riportato anche sulla foto del gel allegata. I campioni inviati devono sempre essere accompagnati dal corrispondente modulo (scaricabile), compilato in ogni sua parte. In particolare è necessario specificare sempre la data d'invio e un recapito a cui verrà inviata via mail la notifica dell'arrivo dei campioni, e successivamente sarà spedito l'ettroferogramma delle sequenze.

4° OPZIONE: Solo Elettroforesi capillare (solo frammenti fino a 500pb)

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

Per questo 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) da noi consigliato:

Aggiungere al prodotto di reazione di sequenza: 2,25 µl di EDTA(125mM), 2,25 µl di Na-Acetato (3M, pH 5,6) e 50 µl di Etanolo freddo (95%); agitare bene, lasciare i campioni 15 minuti a T amb. Centrifugare per 15 minuti alla massima velocità. Togliere l'alcool senza rimuovere il Pellet; lavare con 100 µl di Etanolo freddo al 70%, agitare e lasciate a temperatura ambiente per 10 minuti. Centrifugare alla massima velocità 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°).

Il pellet secco o risospeso in acqua può essere spedito a temperatura ambiente, con posta normale o via corriere; in ogni caso i tubini devono essere protetti il più possibile da possibili schiacciamenti meccanici. I campioni devono essere siglati a partire dalla 1° riga sul modulo. Si raccomanda di apporre su ogni tubino il numero progressivo e non il codice identificativo assegnato al campione (evitando così di scrivere sigle illeggibili sul tubino). I campioni inviati devono sempre essere accompagnati dal corrispondente modulo (scaricabile), compilato in ogni sua parte. In particolare è necessario specificare sempre la data d'invio e un recapito a cui verrà inviata via mail la notifica dell'arrivo dei campioni, e successivamente sarà spedito l'ettroferogramma delle sequenze.