

Il grado di accuratezza del risultato grezzo è da considerarsi come segue:

Le sequenze ottenute sono generalmente attendibili nelle prime 600 basi circa.

La lettura utile si ottiene a circa 50 basi dal primer.

Viene utilizzato il metodo di marcatura Big Dye terminator versione 3.1 della ABI (Life Technologies) mediante cycle sequencing.

Si ottiene generalmente il 98,5% di accuratezza. La quantità di ambiguità, spesso interpretabile dall'analisi dell'elettroferogramma, è generalmente imputabile alla preparazione del template, che è a cura del richiedente; dalla complessità della sequenza, ad esempio alto contenuto di G e C, sequenze ripetute ecc., e dalla scelta dell'oligo.

La richiesta di sequenziamento si intende per un solo filamento.

Nel caso di frammenti di DNA che richiedano più reazioni per essere sequenziati completamente, la scelta dei nuovi primers per procedere nella sequenza spetta al richiedente.

L'invio dei risultati viene garantito entro e non oltre le quattro giornate lavorative successive al ricevimento dei campioni. I risultati, formato .ab1, verranno inviati all'indirizzo di posta elettronica indicato dal committente.

Si precisa che la sequenza "failed" verrà considerata in ogni caso realizzata.

Per Bac ends, lambda-phage ed altri casi particolari si prega di chiedere consulenza contattando il personale del Servizio, telefonicamente al 0815833269 o via e-mail: sbmseq@szn.it

PURIFICAZIONE E CONSEGNA DEL TEMPLATO:

DNA PLASMIDICO

La qualità del DNA plasmidico ottenuto da colture batteriche che hanno raggiunto la fase stazionaria non è ottimale. Per le colture cresciute a 37°C è consigliabile bloccare la crescita batterica ad una O.D.600 non maggiore di 1,5. Una semplice alternativa è quella di incubare gli inoculi O.N. a 30°C.

La preparazione del DNA plasmidico deve essere effettuata mediante l'uso di colonne a scambio ionico che forniscono il miglior grado di purificazione.

Si consiglia l'uso di Kit dalle ditte:

Qiagen, Sigma, Roche, Macherey Nagel, etc.

Si raccomanda di utilizzare non più della metà del volume dell'inoculo consigliato dal manuale d'uso delle colonne.

Il campione deve essere quantizzato spettrofotometricamente ed il rapporto 260/280 deve essere maggiore od uguale a 1.8.

È necessaria la documentazione fotografica del campione consegnato con marker quantitativo (si consiglia 1 µl di lambda HindIII [500 ng/ml]).

Si richiede una mix: DNA plasmidico [25 fmol/µl] in H₂O + primer [1,25 pmol/µl] in H₂O, in un volume totale di 10 µl per sequenza in Eppendorf tube da 1.5 ml. Si consiglia di partire da una concentrazione del campione e del primer rispettivamente di [100-500 ng/µl] e [5 pmol/µl].

Si prega di etichettare chiaramente sulla provetta il nome del campione e del primer per un max sette caratteri).

P.S.: per calcolare il volume in µl di DNA plasmidico da utilizzare nella mix (10 µl) per comodità si può usare la seguente formula:

$$\mu\text{l} = 0,165 \times (\text{bp}) / [\text{ng}/\mu\text{l}]$$

PRODOTTI DI PCR

La purificazione dei prodotti di PCR deve essere effettuata mediante l'uso di colonnine o da gel.

Si consiglia l'uso di Kit dalle ditte:

Qiagen, Sigma, Roche, Macherey Nagel, etc.

Il campione deve essere quantizzato spettrofotometricamente ed il rapporto 260/280 deve essere maggiore od uguale a 1.8.

È necessaria la documentazione fotografica del campione consegnato con marker quantitativo (si consiglia 1 µl di ladder HindIII [500 ng/µl]).

Per frammenti di PCR di lunghezza superiore alle 1'500 bp, si prega di contattare il Servizio.

Si richiede una mix: frammento di DNA [15 fmol/µl] in H₂O + primer [4,5 pmol/µl] in H₂O, in un volume totale di 10 µl per sequenza, in eppendorf tube da 1.5 ml. Si consiglia di partire da una concentrazione del campione e del primer di rispettivamente [10-25 ng/µl] e [20 pmol/µl].

Per i prodotti di PCR è preferibile l'uso di primers interni.

Si prega di etichettare chiaramente sulla provetta il nome del campione e del primer (max sette caratteri).

P.S.: per calcolare il volume in µl di frammento di DNA da utilizzare nella mix (10 µl) per comodità si può usare la seguente formula:

$$\mu\text{l} = 0,1 \times (\text{bp}) / [\text{ng}/\mu\text{l}]$$

PRIMERS

È preferibile che:

la TM dell'oligo sia maggiore di 50°C; la sequenza non contenga più di quattro basi uguali successive, specialmente se G o C; che il 3' sia stabile e non possieda zone di complementarità; che il contenuto di G/C sia di circa il 50% e che la lunghezza sia compresa tra 19 e 26 basi.

Presso il Servizio sono disponibili i seguenti primers:

T3 (19 mer):

5'- ATT AAC CCT CAC TAA AGG G -3'

T7 (19 mer):

5'- AAT ACG ACT CAC TAT AGG G -3'

Sp6 (19mer):

5'- GAT TTA GGT GAC ACT ATA G -3'

M13 fw(21 mer):

5'- CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3'

M13 rv (24 mer):

5'- TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC -3'

Si prega di controllare che la sequenza dell'oligo coincida perfettamente con quella del plasmide

1. Moduli di richiesta per sequenziamento Sanger.

Scaricare, compilare ed inviare a:

Sequencing: sbmseq@szn.it



Multiple sample (30) sequencing/genotyping request form

[SBM_seq_genotype_request_form_multiple_sampl\[...\]](#)

Foglio Microsoft Excel [20.6 KB]

2. [Richiesta \(sequencing\)](#)

3. [Utenti interni](#)

[Modulo di richiesta Online](#)