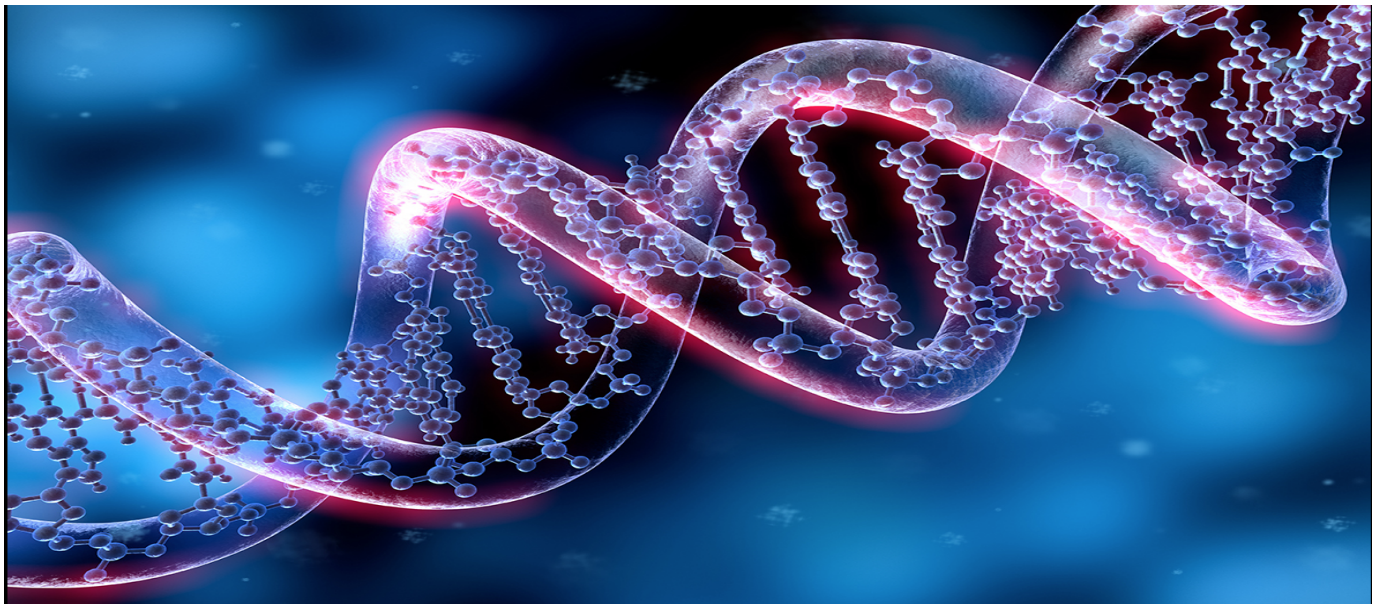
M&M BIOTECH
attitude to innovation

DNA LAB FACILITY

REGOLAMENTO

SERVIZIO DI SEQUENZIAMENTO ACIDI NUCLEICI



www.mmbiotech.it
info@mmbiotech.it
Via Camillo Tutini, 13
80136 Napoli
T +39 081 3656790
F +39 081 19285837

MODALITA' DI PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DA INVIARE AL SEQUENZIAMENTO DI ACIDI NUCLEICI DEL CEINGE

I campioni da sequenziare vanno organizzati in piastre utilizzando 95 posti o *strip* da 8 posti, ordinati per colonne.
Per sequenze singole è possibile utilizzare tubi Eppendorf del volume di 1,5 ml.

- ***Per prodotti di PCR da purificare,*** bisogna allegare alla mail di richiesta una fotografia della loro analisi mediante elettroforesi su gel di agarosio o una stampa nel caso in cui l'analisi sia stata fatta mediante QIAxcel, utilizzando comunque un idoneo *marker* **DI PESO MOLECOLARE E DI CONCENTRAZIONE**.
- La fotografia del gel deve essere realizzata in maniera tale da essere verosimile, senza cioè integrazioni del segnale o cambi di contrasto e deve riportare la data inserita di default dalla strumentazione.
  L'immagine prodotta dal QIAxcel, di contro, deve contenere un massimo di **tredici campioni**, così da permetterne chiara interpretazione e deve riportare la data inserita di default dalla strumentazione
- ***Per prodotti di PCR già purificati,*** i campioni devono essere accompagnati da loro quantizzazione al NanoDrop.

- ***Per DNA plasmidico,*** infine, il campione deve essere accompagnato da sua quantizzazione al NanoDrop.

Al fine di ottenere risultati finali soddisfacenti è necessario che il campione da sequenziare abbia comunque i seguenti requisiti:

-sia omogeneo in termini di specie molecolare, privo cioè di contaminanti come potrebbero essere, ad esempio, i *primers* utilizzati nel corso della reazione di amplificazione;

-sia correttamente quantizzato;

-sia privo di eventuali tracce di reattivi usati nel corso della sua purificazione come ad esempio etanolo.

Modalita' di preparazione del DNA plasmidico da sequenziare con "custom primers"

Plasmidi clonati di dimensioni totali < 10 kb, **debitamente mescolati allo specifico *primer* di sequenza** (in un unico tubo) secondo le condizioni di seguito riportate:

DNA		PRIMER		VOLUME TOTALE
CONCENTRAZIONE	VOLUME	CONCENTRAZIONE	VOLUME	
100 ng/µl	4 µl	2 µM	4 µl	8 µl

Plasmidi clonati di dimensioni totali > 10 kb , **debitamente mescolati allo specifico *primer* di sequenza** (in un unico tubo) secondo le condizioni di seguito riportate:

DNA		PRIMER		VOLUME TOTALE
CONCENTRAZIONE	VOLUME	CONCENTRAZIONE	VOLUME	
100 ng/µl	8 µl	2 µM	4 µl	12 µl

Modalita' di preparazione del DNA plasmidico da sequenziare con "standard primers"

Plasmidi clonati di dimensioni totali sia < 10 Kb che > 10 kb da sequenziare utilizzando *primers* standard secondo le condizioni di seguito riportate:

DNA	
CONCENTRAZIONE	VOLUME TOTALE
100 ng/µl	20 µl

Modalita' di preparazione dei prodotti di PCR gia' purificati

La quantità di campione da consegnare è di **3 ng di DNA ogni 100 basi** debitamente mescolati allo specifico *primer* di sequenza (in un unico tubo) secondo le condizioni di seguito riportate per ciascuna reazione in un volume finale di **ALMENO 14 µl**.

DNA		PRIMER		VOLUME TOTALE
CONCENTRAZIONE	VOLUME	CONCENTRAZIONE	VOLUME	
3 ng/100 basi	10 µl	2 µM	4 µl	14 µl

Modalita' di preparazione dei prodotti di PCR da purificare

Per la purificazione degli amplificati dai *primers* e dai dNTPs il campione deve essere inviato nella quantità riportata nella tabella in basso, insieme ad una foto della PCR corsa sul gel di agarosio dove siano indicate le dimensioni della banda e la quantità caricata sul gel. La concentrazione del templato si riferisce a prodotti di PCR non purificati e la quantità richiesta è di **ALMENO 20 µl** per ciascuna reazione di sequenza.

DIMENSIONI	100-200 bp	300-400 bp	500-600 bp	700-800 bp	900-1000 bp
CONCENTRAZIONE	5 ng/µl	10 ng/µl	16 ng/µl	20 ng/µl	20 ng/µl

PRIMERS STANDARD

E' possibile utilizzare i *primers* più comuni per i vettori più frequenti. L'elenco completo è indicato nella tabella in basso.

M13	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
M13 Rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG
T7 Term.	GCT AGT TAT TGC TCA GCG
BGH REV	TAG AAG GCA CAG TCG AGG

SEQUENZE CON PRIMERS CUSTOM

E' possibile utilizzare i *primers* propri, seguendo strettamente le indicazioni seguenti:

-la concentrazione del *primer* deve essere 2 µM;
-la quantità del *primer* deve essere di 30 µl per la prima reazione e 4 µl per ogni reazione ulteriore;
-la lunghezza del *primer* deve essere compresa tra i 18 ed i 25 nucleotidi;
-il contenuto in "GC" del *primer* deve essere uguale o maggiore al 50%;
-la temperatura di *melting* del *primer* deve essere compresa tra i 50 °C ed i 60 °C.