



Sequenziamento Sanger

- Estrazione DNA da pellet cellulari con kit Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Tissue (Mini kit for DNA from cells and tissue code 740952.250)
- PCR Mix (kit GoTaq® G2 DNA polimerasi, Promega catalog number M7848):
 - DNA (20ng)
 - Primer Forward (10μM) = 0,5 μl
 - Primer Reverse (10μM) = 0,5 μl
 - Buffer Go Taq = 5 μl
 - dNTPs (10mM) = 0.5 μl
 - GoTaq DNA Polymerase = 0,125 μl
 - H2O = a volume finale (25 μl)

- PCR reaction conditions:

	95°C	3 m		
Denaturing	95°C	30 s	}	35 Cycles
Annealing	?	30 s		
Extension	72°C	30 s		
	72°C	7 m		
	4°C	∞		

- Visualizzazione prodotti di PCR (gel di agarosio o QIAxcel)
- Purifica dei prodotti di PCR con ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (ThermoFisher catalog number 78201.1.ML) seguendo il protocollo del prodotto.

Codice Documento	revisione	data	emesso	Pagina
RC27	01	10-10-2025	Gruppo Riprogrammazione Cellulare	1 di 2

- Sequenziamento Mix (kit BigDye™ Terminator v3.1, ThermoFisher catalog number 4337455):

- BigDye Buffer 5X = 1 µl
- Primer Forward (10µM) = 1 µl
- BigDye Terminato v3.1 = 0,7 µl
- PCR amplification Product = 1 µl
- H2O = a volume finale (10 µl)

- Sequencing reaction conditions:

	95°C	3 m		
Denaturing	95°C	10 s	}	30 Cycles
Annealing	56 °C	5 s		
Extension	60°C	4 m		

- Purifica dei prodotti di sequencing in due possibili modi:

- 1) QIAGEN DyeEx 2.0 Spin Kit (250) 63206
- 2) QIAGEN DyeEx 96 Kit (4) 63183

- Caricamento del purificato finale nelle piastre per sequenziatore contenenti formammide (piastre differenti a secondi del sequenziatore; 20 µl di formammide + 4 µl di campione per il vecchio a 4 capillari/ 10 µl di formammide + 2 µl di campione per il nuovo a 8 capillari). Centrifugare brevemente la piastre. Denaturare la piastra a 95°C per 5 minuti. Caricare la piastra nel sequenziatore.

Dott.ssa Jessica Roselli
CM 87341
Istituto CSS Mendel
Jessica Roselli

[Signature]
OSPEDALE
CASA SORELLO DELLA SOFFERENZA
Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico
Opera di San Pio da Pietrelcina -
SAN GIOVANNI ROTONDO (FG)
Il Vicedirettore Scientifico
Dott. Massimo Carella

Codice Documento	revisione	data	emesso	Pagina
RC27	01	10-10-2025	Gruppo Riprogrammazione Cellulare	2 di 2