



CONDICIONES DE LAS MUESTRAS PARA SECUENCIAR EN LA UCTS

A la hora de secuenciar es necesario que, tanto los insertos clonados, como los productos de PCR estén libres de impurezas, tales como RNA, fenol, proteínas, sales, primers excedentes, dNTPs, etc... Para ello se deben purificar las muestras antes de entregarlas en el servicio.

La mayoría de problemas en la secuenciación son consecuencia de la baja calidad o poca concentración de DNA. Por ello, se aconseja correr un gel de agarosa antes de enviar las muestras y cuantificar, mediante absorbancia a 260/280nm, para descartar impurezas.

En la siguiente tabla se especifica la concentración requerida de DNA según el tipo de muestra:

DNA	Concentración	Cantidad total
Producto de PCR	30ng/μl	100ng
Cadena sencilla	50-100ng/μl	200ng
Cadena doble (Plásmido)	100ng/μl	500-1000ng
Cosmid, BAC	100ng/μl	500-1000ng

Las muestras deben presentarse en un tubo eppendorf de 1.5ml especificando la concentración y la cantidad total de DNA.

Al hacer la solicitud deberá especificarse el nombre de la muestra, su concentración, tipo y tamaño a secuenciar.

CONDICIONES DE LOS CEBADORES

La UCTS dispone de una batería de cinco cebadores universales para vectores que son: **M13FW, M13Rev, T3, T7 y SP6.**

En el caso de necesitar otros cebadores específicos, éstos deberán ser suministrados por el usuario que los entregará al mismo tiempo que las muestras, en un tubo eppendorf de 1.5ml debidamente rotulado, a una concentración de 5pmol/μl (5μM) en un volumen de 5μl de H₂O destilada estéril, e indicar su *Temperatura de Melting* (T_m).

Los cebadores deben cumplir las condiciones siguientes:

- Su longitud debe ser de entre 20-25 bases.
- El contenido en G-C ha de estar entre el 40-60%. Los que tengan un menor contenido, deben rediseñarse más largos para conseguir la T_m recomendada
- La T_m debe estar entre 50 y 70°C, pudiéndose utilizar la siguiente fórmula para calcularla:

$$T_m = 69.3 + 0.41 * (\%GC) - 650 / \text{long del primer}$$



SECUENCIAS FALLIDAS

Si se considera que el error es por causa ajena a la UCTS las secuencias fallidas se facturarán. Cuando el error provenga del funcionamiento interno del servicio, la secuencia se repetirá sin cargo alguno.