



CARTERA DE SERVICIOS LABORATORIO DE SECUENCIACIÓN

1. Reacción de secuenciación:

Las muestras pueden proceder de ADN plasmídico purificado con columnas de adsorción y resuspendido en H₂O, o de productos de PCR que hayan sido purificados mediante columnas, tratamiento enzimático o dilución del producto de PCR.

En ambos casos, se debe tener en cuenta las impurezas que puedan influir en la reacción de secuenciación (inhibidores de la reacción como nucleasas, contaminación con RNA, etanol, fenol, presencia de sales...).

En la siguiente tabla se indica las cantidades de muestra a entregar en el servicio dependiendo del origen de la misma.

	Productos PCR	Plásmidos	Cósmidos y BAC
Cantidad total de ADN	15-20 ng/100pb	300-500 ng	1000-1500 ng
Concentración Oligo	3,2 pmol	3,2 pmol	10-15 pmol

2. Migración de reacciones de secuenciación:

El usuario tiene la opción de realizar la reacción de secuenciación y purificar los productos. En el servicio se recogen las muestras purificadas por el usuario a partir de la reacción de secuenciación tanto de producto de PCR como de origen plasmídico. En estos casos, es importante tener en cuenta que pueden existir tanto inhibidores de la PCR como impurezas que afectan al correcto procesado de las muestras por el sistema de electroinyección en el capilar y posterior electroforesis (sales, EDTA, restos de dideoxinucleótidos marcados, enzimas de la reacción,...) por lo que se recomienda una correcta purificación de los productos.

3. Genotipado:

Mediante las técnicas de genotipado, se pueden visualizar uno o múltiples fragmentos de ADN amplificados simultáneamente, obteniéndose de este modo patrones de bandas. El producto de la reacción de PCR con oligos marcados es separado en el autoanalizador y, mediante los estándares introducidos en cada muestra, se infiere el tamaño de los fragmentos amplificados.



Relación de Fluoróforos a utilizar por el usuario para el marcaje:

	Max A (nm)	Max E (nm)
6-FAM™	494	517
5-FAM™	493	522

dRI10	501	525
dR6G	529	549
JOE™	528	554
HEX™	535	553
VIC®	538	554
NED™	546	575
Cy3C	550	550
PET®	558	595
ROX™	587	607
LIZ®	638	655

El laboratorio usa ROX y LIZ como fluoróforos para marcar la curva patrón.

Tabla esquemática de matrices a utilizar en el laboratorio según combinación de fluoróforos a detectar:

Matriz	Dye Set	Utilidad
D 6-FAM™ HEX™ VIC®	NED™ ROX	Microsatélites, MLPAs y TP-PCR
F 5-FAM™ JOE™	NED™ ROX	MSI,
G5 6-FAM™ VIC®	NED™ PET™ LIZ®	QF-PCR, microsatelites
E5 dRI10 dr6G	dTAMARA™ dROX™	SNaPShot