

PAUTAS DE SECUENCIACIÓN

- ✓ **Calidad de DNA:** debe estar limpio. Para ello existen varios métodos que pueden servir:
 - Una mini normal bien fenolizada.
 - Columnas.
 - Para productos de PCR, *GeneClean* o alguno de los *kit* que utilizan columnas.

- ✓ **Cantidad de DNA:** es importante utilizar las siguientes cantidades, sin pasarse ni por exceso ni por defecto para que la reacción tenga lugar correctamente:
 - Plásmidos: **300-500 ng** en un volumen de 5 µl de agua.
 - DNA de cadena sencilla: **100-150 ng** en un volumen de 5 µl de agua.
 - Productos de PCR: **50-150 ng** un volumen de 5 µl de agua.

MUY IMPORTANTE: si los plásmidos están bien limpios y purificados, es preferible traer la mínima concentración del mismo (300 ng) para obtener mejores resultados.

- ✓ **Cantidad de oligonucleótido:** se necesitan **3 pmoles** en un volumen de 3 µl de agua. Al diseñar los oligos hay que tener en cuenta:
 - El primer nucleótido que se leerá con claridad estará a unos 50 nucleótidos del extremo 3' del oligo utilizado.
 - La Tm debe estar alrededor de 55°C ($T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$).

- ✓ **Volumen total:** cada *ependorf* debe contener un volumen total de **8 µl**: 5 µl de DNA + 3 µl de oligo.

REGISTRO DE USUARIOS: apuntarse en el “Cuaderno de Secuenciación” en la Unidad de Genómica (Laboratorio 16, planta -1), dejando los siguientes datos: fecha, nombre, e-mail, laboratorio al que se pertenece, número y nombre de las muestras, tipo y cantidad de DNA en ng, método empleado para la extracción y la Tm del oligo, muy importante para asegurar la unión de éste al molde durante la PCR.

Guardar las muestras en el congelador “Secuencias” (-20°C), en el segundo cajón, dentro de las cajas 1 y 2.

Las reacciones se harán por estricto orden de llegada y los resultados serán enviados por e-mail al usuario.