

## Requisitos de las muestras para secuenciación Sanger

La calidad y concentración de la muestra está directamente relacionadas con la calidad de la secuencia obtenida. Puntos a tener en consideración son:

- **Purificación:** La purificación de la muestra es un proceso clave en la obtención de buenas secuencias. Es importante evitar el exceso de sales, normalmente es recomendable utilizar kits comerciales que tienen en cuenta los problemas en la purificación que pueden generar mala calidad en los datos de secuenciación. Asimismo la reacción de secuenciación sólo se puede llevar a cabo en condiciones satisfactorias cuando hay un único molde, en caso de no poder evitarse la aparición de más de una banda en la PCR es aconsejable cortar la banda de interés del gel de agarosa y purificarla. Dentro de lo posible solicitamos una foto del gel de agarosa en el que se ha corrido el producto de PCR, de no ser posible, solicitamos un compromiso del solicitante de que efectivamente esa PCR produce una única banda.
- **Concentración:** La concentración del molde es vital en la reacción de secuenciación. Por ello se solicita que la muestra cumpla unos estándares mínimos y que se envíe cuantificada. La cantidad mínima solicitada es de 15-20µl.

| Tipo ADN             | Concentración mínima |
|----------------------|----------------------|
| Plásmido             | 75-150 ng/µl         |
| Producto PCR (pPCR)  | 20 ng /µl            |
| pPCR mayores 1000 pb | consultar            |

- **Cebadores:** Los cebadores deberán enviarse en tubos separados a una concentración de 3-5 µM rotulados adecuadamente. La cantidad mínima de cebador es de 4 µl por reacción de secuenciación. En caso de solicitarse menos de tres secuencias, la cantidad mínima de cebador a recibir es de 10 µl. La composición del cebador afecta a la calidad de la secuenciación, normalmente los cebadores que funcionan para una PCR suelen funcionar bien en la reacción de secuenciación. Es vital evitar la formación de dímeros de cebador (cebador) ya que enturbiarán la lectura de las 100-110 cebadoras bases de la lectura. Como norma general los cebadores deben tener una Tm entre 55 y 65 °C, un tamaño mínimo de 18 pb y evitar que formen estructuras secundarias, principalmente en el extremo 3' para ello es importante evitar en lo posible repeticiones de 4 o más Gs ó Cs. La purificación del cebador también es crítica para la secuenciación, si el cebador está mal purificado o bien está ligeramente degradado va a dar lugar a picos sombra y a mucho ruido de fondo. Normalmente los cebadores comerciales están purificados por DHPLC o por otros sistemas que evitan esto, lo que unido a una correcta

conservación de los cebadores (con pocos ciclos congelación /descongelación), minimiza este tipo de problemas.

## Entrega de resultados

El plazo de entrega es de 3 a 5 días laborales para producto de PCR y Plásmido (consultar para el resto de servicios). Se entregará vía email el cromatograma y el archivo de texto de la secuencia.

El archivo del cromatograma se puede visualizar con la mayoría de programas para visualizar secuencias. Algunos ejemplos pueden ser:

- [Chromas](#)
- [Bioedit](#)
- [Sequence Scanner](#)
- [Staden Package](#)
- [Peak Scanner](#)

Consultar los precios para proyectos de gran volumen de muestras o con aplicaciones concretas.