

## SERVICIO BÁSICO DE SECUENCIACIÓN MULTICAPILAR

La secuenciación Sanger, también conocida como capilar, es una técnica para la secuenciación de ADN basada en la incorporación selectiva de dideoxynucleótidos (ddNTPs) por la ADN polimerasa durante la replicación in vitro del ADN. Fue desarrollado por Frederick Sanger y sus colegas en 1977. Fue el método de secuenciación más utilizado durante aproximadamente 25 años antes de ser reemplazado por métodos de secuenciación de nueva generación (NGS).

El [Analizador genético 3130 HID, Applied Biosystem by Life Technologies](#), es la herramienta perfecta para el análisis de fragmentos de ADN, genotipado de SNPs y secuenciación de ADN.

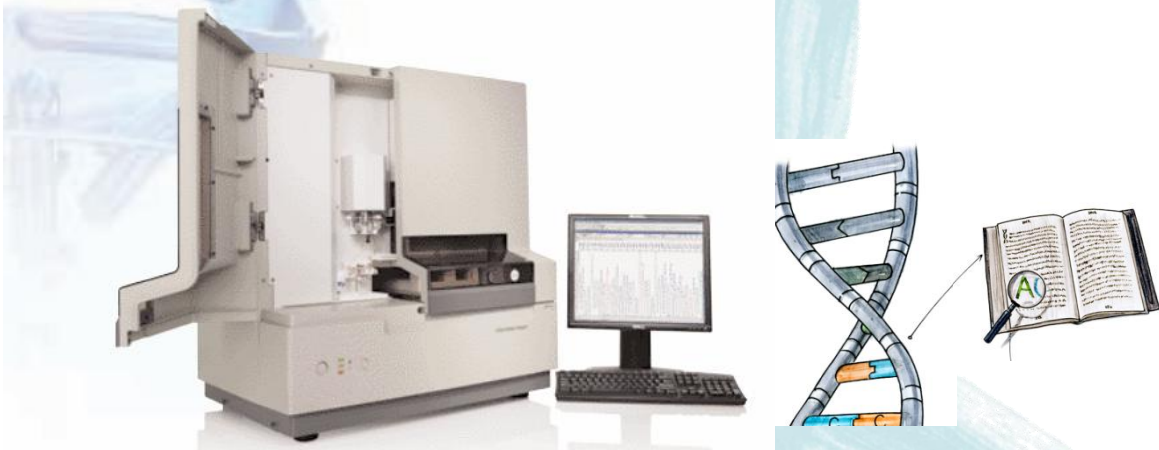


En la Unidad de Genómica de GENYO el servicio de Secuenciación Multicapilar se realiza los **lunes a las 9:30h**, siendo necesario enviar las muestras y la hoja de muestras con anterioridad.

El Servicio de Genómica realizará:

- Reacción de secuenciación.
- Envío de los resultados por correo electrónico.

Si la secuenciación fallara o los resultados no fueran los deseados, el coste de la repetición será a cargo del usuario ya que es el responsable de la calidad/condiciones de las muestras y primers; por ello se requiere que sea el usuario el que presente las muestras/primers en los parámetros que indicamos a continuación:



1. Las muestras deberán haber sido purificadas previamente por el usuario así como cuantificadas y ajustadas a la concentración adecuada:

- Plásmidos: 100-500ng/μl.
- Productos de PCR: 15-20ng/μl.

Los productos de PCR deberán haber sido analizados en un gel de agarosa previamente para verificar que el tamaño de éste es el esperado por el usuario.

2. Por reacción de secuenciación el Servicio de Genómica necesitará un volumen de:
  - Plásmidos: 6µl.
  - Productos de PCR: 2µl.
3. Los primers deberán tener:
  - Una longitud de 18-24 pb, un contenido en GC 50-55% y una Tm 55 (-60)°C
  - Una concentración de 3µM.
  - Menos de 4 repeticiones de cualquiera base.
  - Evitar posibles dímeros de primer.
  - Intentar empezar y terminar el primer con C o G.

Si el usuario prefiriera mandar las muestras con el primer ya incluido las condiciones serían:

- Volumen final de 6µl.
  - 500 ng totales de plásmido.
  - 20 ng totales de producto de PCR.
  - Una concentración final 1µM de primer.
4. Las muestras deberán estar en la Unidad de Genómica antes de las **9.00 h.** de cada lunes, así como la solicitud digital (plantilla de Excel) para dicho Servicio. Los formularios a completar se encuentran en la página web de la Unidad de apoyo de Genómica y Genotipado, siendo necesarios tanto el "Formulario de envío de muestras" como la "plantilla del formato" (<http://www.genyo.es/content/informacion-general>). (Si en dichas solicitudes faltara algún dato se intentaría contactar con el usuario y así poder procesar las muestras el día previsto, si no fuera posible se dejarían para el siguiente).
  5. Los resultados serán enviados en 3 días laborables desde su procesamiento. De no ser así por algún problema técnico se informaría al usuario.
  6. Si hubiera necesidad de repetir la reacción de secuenciación su cargo sería por parte del usuario.

## SERVICIO COMPLETO SECUENCIACIÓN MULTICAPILAR

El Servicio de Secuenciación Multicapilar se encargará de toda la puesta a punto de las muestras para su posterior secuenciación, esto incluye:

- Verificación de la calidad y concentración de las muestras: columnas de purificación, gel de agarosa para productos de PCR y cuantificación por electrofotómetro Nanodrop.
- Ajuste de la concentración apropiada para la secuenciación.
- Secuenciación, visualización, edición y valoración de los resultados.
- Envío de resultados por correo electrónico en un plazo de 5 días laborables desde la entrega de muestras.
- Repetición de la secuenciación de la muestra si esta fallara o su calidad fuera baja.

Los únicos requisitos exigidos comprenden al volumen de muestra necesario:

- Productos de PCR al menos 10µl.
- Plásmidos al menos 30µl.

(Si se tuviera que hacer más de una reacción de secuenciación por muestra, p.ej. forward y reverse, el volumen necesario sería proporcional al número de reacciones)

- Para proyectos específicos con la necesidad del diseño del plan de actuación (diseño de primers, determinación de número de secuencias, etc.) y con un gran número de muestras deberán ponerse en contacto directo con la Unidad en el correo [unidad.genomica@genyo.es](mailto:unidad.genomica@genyo.es).

