

SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DE DNA

Volumen:	6µl
ADN:	250-300 ng
PCR:	10-20 ng/100 pb
Primer:	3,2 pmoles
Tubos:	0,2 ml

REQUISITOS DEL DNA Y PRIMERS

DNA PLASMIDICO

CALIDAD

- NO: Fenol, cloroformo, proteínas, DNA cromosómico, RNA, etanol, sales, detergentes, PEG, EDTA (TE).
SI: DNA plasmídico purificado por columnas de adsorción.
DNA resuspendido en H₂O.
iiiiiii CUIDADO CON ESTRUCTURAS SECUNDARIAS !!!!!!!!

CANTIDAD (300ng)

- SI: Cuantificado en un espectrofotómetro(NanoDrop) o en un gel de agarosa frente a un marcador de concentración.

PRODUCTO DE PCR

CALIDAD

- NO: Restos de nucleótidos, *primers*, dNTPs o enzimas de la reacción de amplificación por PCR.
SI: DNA purificado por columnas, tratamiento con exo I y SAP o dilución del producto de PCR.

CANTIDAD 10-20ng/100pb

- SI: Cuantificado en un espectrofotómetro(NanoDrop) o en un gel de agarosa frente a un marcador de concentración.

PRIMERS

CANTIDAD 3,2 pmoles

CALIDAD

Evitar en lo posible la utilización de *primers* que tengan en su secuencia más de 3 ó 4 Gs ó Cs seguidas.
Los *primers* deberán tener, al menos, 18 bases para asegurarRNAos de que hibriden con el DNA a secuenciar. Si es posible es interesante anclar los *primers* con GCs en 3´.
Utilizar *primers* con una T_m por encima de 50°C . Para *primers* con un contenido en GCs menor del 50%, puede ser necesario extender el oligo más de 18pb para conseguir una T_m por encima de 50°C.

$$T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$$

$$T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$$

La utilización de *primers* más largos de 18 pb, minimiza la posibilidad de hibridaciones secundarias en el vector o en el inserto.

Evitar la utilización de *primers* con secuencias que formen estructuras secundarias, especialmente en el extremo 3´, o que puedan hibridar formando dímeros intercatenarios.

No emplear *primers* con *mismatches*, ni *primers* que hibriden en más de un sitio en la secuencia.

PRINCIPALES PROBLEMAS EN LA SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

1. NO SE PRODUCE REACCIÓN

- No hay DNA o hay mucho menos del necesario.
- La muestra contiene EDTA o algún otro inhibidor de la polimerasa.
- Existe una estructura secundaria fuerte próxima al *primer* empleado en la reacción.
- No hay *primer* o su concentración es inferior a 3,2 pmoles.
- El *primer* no hibrida con el DNA molde.
- La Tm del primer no es la adecuada (inferior a 50°C).

2. EL CROMATOGRAMA PRESENTA MUCHO RUIDO DE FONDO

- La señal es muy débil debido a que hay poco DNA, contaminantes, oligo inespecífico...

3. LA REACCIÓN COMIENZA PERO DECAE POCO A POCO

- Hay algún contaminante en la muestra: EDTA, sales...
- No están equilibradas las cantidades de DNA y *primer*.

4. EL CROMATOGRAMA PRESENTA DOS SECUENCIAS SUPERPUESTAS

- Hay más de un DNA molde en la muestra.
- Existe un sitio secundario de unión del *primer*. El *primer* tiene dos dianas dentro del DNA molde.
- El *primer* está mal purificado, aparece una secuencia sombra correspondiente a picos superpuestos desfasados una base.
- El producto de PCR se generó a partir de un solo *primer*.
- El producto de PCR no está bien purificado quedando restos de *primers*.

5. LA REACCIÓN COMIENZA PERO DECAE SÚBITAMENTE

- El DNA está cortado o digerido a ese nivel.
- Existe una estructura secundaria en el DNA molde.

6. LA SECUENCIA SE LEE CORRECTAMENTE HASTA UNA SECUENCIA DE POLI-A ó POLI-T

- A partir de ese punto la polimerasa "resbala" y la secuencia aparece doble, triple...