



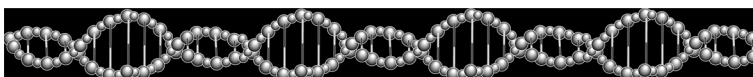
Instituto de Investigaciones
Biomédicas "Alberto Sols"

**SERVICIO DE
SECUENCIACIÓN
AUTOMÁTICA**

Índice

Introducción	1
1. Modalidades de secuenciación	2
a. Secuenciación de una sola cadena	2
b. Secuenciación analítica	3
c. Secuenciación diagnóstica	3
2. Oligonucleótidos disponibles	5
3. Protocolo de preparación de las muestras	6
a. ADN clonado	6
a.1 Extracción de ADN	6
a.2 Cuantificación	6
a.3 Envío de las muestras al Servicio de Secuenciación	6
b. Productos de PCR	7
b.1 Amplificación	7
b.2 Purificación	7
b.2.1 Dilución directa del producto de PCR	7
b.2.2 Tratamiento del producto de PCR con exonucleasa I y SAP	7
b.2.3 Purificación del producto de PCR de un gel de agarosa	7
b.2.4 Purificación mediante columnas del producto de PCR	8
b.3 Cuantificación	8
b.4 Envío de muestras al Servicio de Secuenciación	8
4. Protocolo de envío de muestras	9
5. Problemas más frecuentes durante la secuenciación	10
6. Algunos datos y formulas de utilidad	17

INTRODUCCIÓN



El Servicio de Secuenciación Automática de ADN del Centro Mixto CSIC-UAM, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, fué creado en el año 1994 y presta su servicio en este centro. Además ofrece su servicio a cuantas instituciones públicas o privadas pudieran necesitar de esta técnica como apoyo a su investigación o al diagnóstico.

Nuestro servicio abarca:

- La secuenciación de ADN para distintas aplicaciones
 - Secuenciación de una sola cadena,
 - Secuenciación analítica
 - Secuenciación diagnóstica).
- El diseño de oligonucleótidos para secuenciación o PCR.
- La purificación de ADNs plasmídicos o productos de PCR.

1

MODALIDADES DE SECUENCIACIÓN

A.- Secuenciación de una sola cadena

B.- Secuenciación Analítica

C.- Secuenciación Diagnóstica

A. SECUENCIACIÓN DE UNA SOLA CADENA

Consiste en la secuenciación de un fragmento de ADN, mediante una única reacción. El fragmento a secuenciar puede corresponder a:

- ADN clonado en un vector plasmídico, un cósmido u otro vector.
- Producto de PCR.

La fiabilidad de esta modalidad de secuenciación resulta superior al 98%. El tamaño medio de las lecturas oscila entre 650-700 pares de bases, siempre condicionado por la calidad del ADN.

Los oligonucleótidos o *primers* empleados en la reacción de secuenciación pueden ser de dos tipos:

- *Primers* universales (consultar tabla de *primers* disponibles).
- *Primers* específicos: pueden ser los mismos que los empleados en la amplificación por PCR.

Este servicio INCLUYE:

- Comprobación de la cantidad y calidad del ADN de la muestra recibida mediante electroforesis en gel de agarosa, siempre que se solicite o si se detectan problemas en la reacción de secuencia.
- *Primers* universales gratuitos (consultar tabla de *primers* disponibles).
- Secuenciación automática de la muestra.
- Comprobación de la secuencia obtenida y resolución de indeterminaciones.
- Envío por e-mail de la secuencia en formato de texto, así como del cromatograma correspondiente a la reacción.
- Envío de los cromatogramas originales impresos por correo ordinario.

Plazo de entrega: dos días laborales a partir de la recepción de la muestra en nuestro laboratorio (para muestras recibidas antes de las 16 horas).

B. SECUENCIACIÓN ANALÍTICA

Esta modalidad de servicio consiste en la secuenciación completa de un producto de PCR o de un ADN clonado cuando el tamaño del amplificado o del inserto sea superior a 1 kilobase.

Este servicio INCLUYE:

- Extracción del ADN plasmídico a partir de la bacteria.
- Secuenciación en cadena simple de ambos extremos del inserto con *primers* universales. En el caso de productos de PCR, las dos primeras reacciones de secuenciación se efectuarán con los *primers* empleados durante la amplificación del producto de PCR.
- Diseño de *primers* específicos sobre las lecturas obtenidas en la fase de secuenciación anterior (*primer walking*). Este paso se repetirá hasta la obtención de un solo *contig*.
- Alineamiento y ensamblaje de todas las lecturas obtenidas durante la fase de secuenciación.
- Edición del *contig*, eliminación de las secuencias del vector de clonaje y resolución de las posibles indeterminaciones.
- Envío por correo electrónico de la secuencia en formato texto.
- Envío por correo ordinario de un informe de resultados que contiene la secuencia consenso

Plazo de entrega: 10 días laborables por cada kilobase de inserto.

C. SECUENCIACIÓN DIAGNÓSTICA

Esta modalidad consiste en la secuenciación completa de ambas cadenas del ADN de la muestra con una redundancia mínima de cuatro lecturas por cada posición nucleotídica, proporcionando una fiabilidad superior al 99%.

Este servicio INCLUYE:

- Comprobación de la cantidad y calidad del ADN de la muestra recibida, mediante electroforesis en gel de agarosa.
- Control de calidad y de la identidad de la muestra mediante secuenciación parcial.
- Inicio de un proyecto de secuenciación siguiendo la estrategia de *primer walking*.
- Edición del contig, eliminación de la secuencia del vector de clonación y resolución de las posibles indeterminaciones.
- Establecimiento de una secuencia consenso.
- Edición final de la secuencia con una redundancia mínima de cuatro lecturas por cada posición nucleotídica.
- Envío por correo electrónico de la secuencia en formato de texto.
- Envío por correo ordinario de un informe de resultados que contiene la secuencia.

Plazo de entrega: 12 días laborables por cada kilobase de inserto.

2

OLIGONUCLEÓTIDOS DISPONIBLES

Estos *primers* podrán solicitarse de forma gratuita para la secuenciación de sus muestras.

OLIGO	SECUENCIA	Nº NUCLEOT
T3	5' AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG 3'	20
T7	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'	20
Sp6	5' GAT TTA GGT GAC ACT ATA G 3'	19
M13/pUC Reverse primer	5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'	17
M13 (-20) Forward primer	5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'	17
Reverse (-48)	5' AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA 3'	24
M13 / pUC Forward (-40)	5' GTT TTC CCA GTC ACG AC 3'	17
SK (17 mer)	5' TCT AGA ACT AGT GGA TC 3'	17
KS (17 mer)	5' CGA GGT CGA CGG TAT CG 3'	17
Lambda gt 11 Forward	5' GGT GGC GAC GAC TCC TGG AGC CCG 3'	24
Lambda gt 11 Reverse	5' TTG ACA CCA GAC CAA CTG GTA ATG 3'	24
Lambda gt 10 Forward	5' AGC AAG TTC AGC CTG GTT AAG 3'	21
Lambda gt 10 Reverse	5' CTT ATG AGT ATT TCT TCC AGG GTA 3'	24
pGEX 5'	5' GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG 3'	23
PGEX 3'	5' CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG 3'	23
pMal E	5' GGT CGT CAG ACT GTC GAT GAA GCC 3'	24
GL primer 2	5' CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA 3'	23
EGFP-N	5' CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G 3'	22
EGFP-C	5' ATG GTC CTG CTG GAG TTC GT 3'	20
GFP-N	5' CAT CAC CAT CTA ATT CAA CAA G 3'	22
GFP-C	5' GGT CCT TCT TGA GTT TGT AAC AG 3'	22

3

PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

El éxito de cada reacción de secuencia es directamente proporcional a la calidad y pureza de la muestra. Factores como la cepa bacteriana o el vector de clonaje utilizados puede además influir en la calidad de los resultados. A continuación les detallamos los pasos que deben realizarse previamente a la secuenciación de sus muestras:

A. ADN CLONADO

A.1 EXTRACCIÓN DE ADN

La muestra de estar libre de contaminantes, por ello es importante el método de extracción empleado. Impurezas como proteínas, ARN, ADN cromosómico, fenol, cloroformo, etanol, sales, detergentes, PEG, EDTA, etc., suelen producir ruido de fondo y, en general, dan lugar a una baja calidad de los resultados de secuenciación.

El método de extracción que recomendamos es el de lisis alcalina (Miniprep Kit, PE Applied Biosystems, Part Number 402790). Tras la extracción recomendamos resuspender el ADN en 25 μ l de agua destilada estéril y proceder a su cuantificación en un gel de agarosa.

A.2 CUANTIFICACIÓN

Puede realizarse mediante medición de absorbancia de la muestra a 260nm en un espectrofotómetro. Sin embargo, dado que la concentración obtenida por espectrofotometría puede diferir mucho de la real, recomendamos verificar el estado del ADN y cuantificar la muestra mediante electroforesis en gel de agarosa y comparación frente a un marcador de pesos moleculares.

La principal causa de que una reacción de secuenciación falle es que la cantidad de ADN presente en la muestra sea inferior a la necesaria.

A.3 ENVÍO DE LAS MUESTRAS AL SERVICIO DE SECUENCIACION

Seguir el Protocolo de envío de muestras que se indica más adelante (página 9).

B. PRODUCTOS DE PCR

B.1 AMPLIFICACIÓN

Los productos de PCR contienen restos de nucleótidos, *primers*, dNTPs y enzimas que, suelen producir ruido de fondo impidiendo su secuenciación de forma directa. Por este motivo, es necesario incorporar un paso de purificación previo a la secuenciación. Para ello podrán emplearse cualquiera de los métodos siguientes:

B.2 PURIFICACIÓN

B.2.1 DILUCIÓN DIRECTA DEL PRODUCTO DE PCR

Este método implica diluir una alícuota del producto de PCR entre 5 y 10 veces en agua y emplearlo directamente en la secuenciación automática. Para ello, es necesario emplear bajas concentraciones de dNTPs y *primers* en la reacción de PCR, de tal manera que, las concentraciones finales de los *primers* sean de 0,2 μM o menos y las concentraciones de dNTPs sean de 100 μM o menos.

La principal desventaja de este método es que se requiere una optimización individual de las condiciones para cada producto de PCR.

B.2.2 TRATAMIENTO DEL PRODUCTO DE PCR CON EXONUCLEASA I Y SAP

El tratamiento con Exonucleasa I degrada los *primers* de PCR residuales mientras que, la fosfatasa alcalina (Shrimp Alkaline Phosphatase) defosforila los dNTPs sobrantes. Tras la inactivación por calor de ambas enzimas puede emplearse el producto de PCR en la secuenciación automática.

Este método no puede aplicarse en el caso de productos de PCR contaminados con subproductos secundarios.

B.2.3 PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR DE UN GEL DE AGAROSA

Este método permite separar el producto de PCR de interés de subproductos contaminantes, *primers* y dNTPs. La cantidad de ADN recuperada variará en función del tamaño de la banda. La luz UV empleada para visualizar los productos puede romper el ADN produciendo paradas y ruidos durante la secuenciación.

Se trata de un método fácil y barato que está dando muy buenos resultados en el secuenciador automático. Basta con correr un gel de agarosa de bajo punto de fusión, cortar la banda correspondiente al producto que nos interesa (procurar no contaminar la banda con oligos y

cortar la menor cantidad de agarosa posible), fundir la agarosa y extraer el ADN con varias extracciones de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) hasta eliminar totalmente la agarosa. Precipitar la banda con etanol y sal, resuspenderla en dH₂O estéril. Cuantificar la cantidad en un gel de agarosa.

Alternativamente pueden emplearse kits como QIAquick Gel Extraction Kit. Cat. No. 28704. Qiagen

B.2.4 PURIFICACIÓN MEDIANTE COLUMNAS DEL PRODUCTO DE PCR

Este método puede emplearse cuando el resultado de la amplificación por PCR sea una sola banda. QIAquick PCR Purification Kit. Cat. No. 28104. Qiagen

B.3 CUANTIFICACIÓN

Puede realizarse mediante medición de absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro, sin embargo, recomendamos verificar el estado del ADN y cuantificar la muestra mediante electroforesis en gel de agarosa y comparación frente a un marcador de pesos moleculares.

La principal causa de que una reacción de secuencia falle es que la cantidad de ADN presente en la muestra sea inferior a la necesaria. Para descartar esta posibilidad, hay que comprobar el ADN como paso previo a la secuenciación. Las estimas de concentración obtenidas por espectrofotometría pueden diferir mucho de las reales, por ello, nosotros siempre cuantificamos mediante electroforesis en gel de agarosa y comparación frente a marcadores de pesos moleculares de concentración conocida. Esto nos permite además, detectar algunos de los problemas más frecuentes de las muestras, como por ejemplo, la presencia de más de un amplificado o la detección de dímeros de los oligos utilizados durante la amplificación.

B.4 ENVÍO DE MUESTRAS AL SERVICIO DE SECUENCIACIÓN

Una vez cuantificado el ADN, se ruega seguir el protocolo de envío de muestras al servicio (página 9).

4

PROTOCOLO DE ENVÍO DE MUESTRAS

Nuestro servicio ofrece actualmente la posibilidad de secuenciar aproximadamente 700pb de ADN subclonados o productos de PCR como tales, así como la opción de preparar adecuadamente estos ADN subclonados o purificar los productos de PCR de los oligonucleótidos empleados en la reacción.

En tubos de 0.2 ml (tubos de PCR):	
DNA	
Doble cadena	200-500 ng
Cadena sencilla	50-100 ng
Cósmidos	0,5 - 1 µg
ADN genómico bacteriano	2,0 - 3,0 µg
Fragmento de PCR	10-20 ng /100 pb
Primer	3,2 pmoles
Completar con H ₂ O hasta 6 µl (No utilizar NUNCA TE)	

Esta tabla os ayudará a encontrar la equivalencia entre ng y pmoles para oligos de distintas longitudes:

Longitud del primer	ng de primer equiv a 10 pmol
16 mer	53 ng
17 mer	57 ng
18 mer	60 ng
19 mer	63 ng
20 mer	67 ng
24 mer	80 ng
27 mer	90 ng
31 mer	103 ng

5

PROBLEMAS MÁS FRECUENTES DURANTE LA SECUENCIACIÓN

A continuación describimos los problemas más frecuentes que se detectan durante las reacciones de secuencia, las causas que han podido originarlos, así como los factores que podrían ayudar a resolverlos:

NO SE PRODUCE REACCIÓN O ESTA DECAE POCO DESPUÉS DE COMENZAR

Esto puede deberse a:

- No hay ADN o hay mucho menos del necesario.
- No hay *primer* o su concentración es inferior a la necesaria (3.2 pmoles).
- El *primer* no se une al ADN molde.
- El sitio de unión del *primer* en el vector de clonación, se ha perdido o dañado accidentalmente. Al clonar pueden crearse artefactos con una deleción cerca del sitio de inserción, o deleciones que eliminan el sitio de apareamiento.
- Si se trata de productos de PCR, puede que los amplificados no sean el producto de la amplificación con los dos *primers*. En algunos casos, el amplificado se genera a partir de uno de los *primers* por lo que sólo obtendremos reacción de secuenciación con ese *primer*.

UNIÓN DÉBIL DEL PRIMER AL ADN MOLDE. SEÑAL DE DÉBIL INTENSIDAD

Esto puede deberse a:

- Calidad y cantidad del ADN empleado en la reacción de secuencia.
- Composición de bases del fragmento que se desea secuenciar.
- Primer empleado. A continuación se detallan unas normas útiles a la hora de diseñar *primers* para la secuenciación
 1. Evitar en lo posible la utilización de *primers* que tengan en su secuencia más de 3 ó 4 Gs ó Cs seguidas.

2. Los *primers* deberán tener, al menos, 18 bases para asegurarnos de que hibriden con el ADN a secuenciar.
3. Para la secuenciación por PCR los *primers* con una T_m por encima de 450 C producen mejores resultados que aquellos con menor T_m
4. 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 450 C.
5. La utilización de *primers* más largos de 18 pb, minimiza, así mismo, la posibilidad de hibridaciones secundarias en el vector o en el inserto.
6. Debe evitarse la utilización de *primers* con secuencias que formen estructuras secundarias, especialmente en el extremo 3', o puedan hibridar formando dímeros intercatenarios.
7. No deben emplearse *primers* con *mismatches*, ni *primers* que hibriden en más de un sitio en la secuencia.

Recordar que la forma de conseguir la T_m de un oligo es aplicar la fórmula:

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

$$T_a = T_m - 50 \text{ C (Temperatura de anillamiento)}$$

EL CROMATOGRAMA PRESENTA MUCHO RUIDO DE FONDO

Esto puede deberse a:

- Existe un sitio secundario de unión del *primer* que da lugar a picos extra.
- El *primer* está mal purificado, puede observarse una “secuencia sombra”, correspondiente a picos superpuestos desfasados una base.
- La PCR no fue específica y la muestra contiene más de un amplificado.
- El fragmento de PCR no ha sido purificado y los *primers* de amplificación que quedan en el medio pueden interferir generando productos de expresión a partir de más de un *primer*.

EL CROMATOGRAMA PRESENTA DOS SECUENCIAS SUPERPUESTAS

Esto puede deberse a:

- El *primer* tiene varias dianas dentro del ADN molde.
- Hay más de un ADN molde distinto en la muestra.
- La muestra es un ADN subclonado pudiendo arrastrarse un fragmento del *polilinker*, como resultado de lo cual, la muestra tiene dos dianas para el *primer* universal que hemos empleado.
- El producto de PCR no está purificado o la purificación no ha eliminado totalmente los restos de *primer* que no se gastado durante la amplificación.
- El producto de PCR está generado por un único primer (diana del primer presente en ambos extremos).

LA REACCIÓN COMIENZA DE FORMA INTENSA PERO DECAE RAPIDAMENTE

Esto puede deberse a:

- Hay algún compuesto contaminante en la muestra. Se sospecha que el EDTA puede causar este efecto. Por tanto, no recomendamos que se resuspenda el ADN en TE.
- No están equilibradas las cantidades de ADN molde y *primer*.

LA REACCIÓN FUNCIONA NORMALMENTE PERO DECAE SUBITAMENTE

Esto puede deberse a:

- El ADN está cortado o digerido a ese nivel y la reacción finaliza.
- La secuencia de ADN produce determinados motivos que provocan este efecto en la reacción: estructura secundaria en el ADN molde (por ejemplo, por la presencia de repeticiones invertidas o palíndromos) que no puede ser recuperada por la polimerasa.

Las posibles soluciones a este problema son:

- Secuenciar la cadena complementaria.
- Fragmentar el molde, subclonarlo y secuenciar los fragmentos.
- Utilizar un kit alternativo (dGTP *Big Dye*) que generalmente resuelve estas estructuras.

LA RESOLUCIÓN DISMINUYE ANTES DE LO ESPERADO

Esto puede deberse a:

- La muestra puede contener demasiadas sales o contaminantes arrastrados durante la extracción, purificación, amplificación, etc,

LA PARTE INICIAL DEL CROMATOGRAMA ESTÁ OSCURECIDA POR PICOS QUE ENMASCARAN LA SECUENCIA

Esto puede deberse a:

- Los *primers* empleados forman dímeros que también son un molde sobre el que se producirá reacción de secuencia. Cuando termina la secuencia de los dímeros (después de 25-30 bases) la lectura es correcta.
- La cantidad de ADN y oligo no era suficiente y no se han consumido todos los dNTPs

LA SECUENCIA COMIENZA A LEERSE CORRECTAMENTE PERO A PARTIR DE UN CIERTO PUNTO EL CROMATOGRAMA PRESENTA MEZCLAS DE PICOS

Esto puede deberse a:

- El molde realmente es una mezcla de más de un clon. La secuencia del vector se lee perfectamente hasta el sitio de clonaje, pero luego se observa una mezcla de picos.

LA SECUENCIA SE LEE CORRECTAMENTE HASTA UNA ZONA DE POLIA O UN POLIT

Esto puede deberse a:

- Esto se debe a que la polimerasa "patina" deslizándose sobre el ADN molde. Los productos del deslizamiento no son aparentes cuando el fragmento se observa en un gel de agarosa, en la secuenciación se observa un patrón tipo "olas" ilegible después de la región homopolimérica.

Para solucionar este problema:

- Puede secuenciarse la cadena complementaria o
- Utilizar *primers* específicos también llamados " *primers* anclados" que se unan al homopolímero.

LA SECUENCIA EMPEORA SUSTANCIALMENTE DESPUÉS DE UNA ZONA RICA DE GT, GA U HOMOPOLÍMEROS DE G

Esto se debe a:

- Se trata de zonas difíciles de secuenciar debido a su composición nucleotídica.

Para superarlas es posible:

- Secuenciar la cadena complementaria.
- En algunos de estos casos los resultados mejoran repitiendo la reacción con el kit alternativo (dGTP *Big Dye*).

DIFICULTAD PARA SECUENCIAR REGIONES RICAS EN GCs

En todos los organismos, el contenido de GC varía entre el 25-75%. En el genoma de mamíferos, en concreto, esta variación oscila entre el 45 y el 50%, aunque existen secuencias especialmente ricas en GCs. Aquellas zonas con un porcentaje superior al 62%, pueden ser difíciles de secuenciar con tag polimerasa.

Para superar estas zonas:

- Una de las modificaciones más útiles que permite mejorar los resultados, es añadir a la reacción standard 5% de DMSO.
- Otras modificaciones posibles serían añadir a la reacción de PCR 5-10% de formamida o 5-10% de glicerol.
- Aumentar la temperatura de desnaturalización a 98° C.
- Aumentar el número de ciclos de la PCR de 25 a 30
- Linearizar el ADN con un enzima de restricción

DIFICULTAD PARA SECUENCIAR REGIONES RICAS EN A Ts

En general no resulta complicado secuenciar regiones ricas en AT, aunque el análisis de los datos empleando el protocolo de secuenciación por PCR con terminadores marcados fluorescentemente, puede plantear algunas dificultades.

Por ello, es necesario tener en cuenta:

- En series de Ts o Aes consecutivas: el *primer* pico de la secuencia es grande, mientras los demás son de menor intensidad y algunas veces resultan enmascarados por el ruido de fondo.
- En series de Ts consecutivas seguidas por una G: el pico de G suele ser grande y a menudo viene precedido de un hombro.

DIFICULTAD PARA SECUENCIAR REGIONES CON ESTRUCTURA SECUNDARIA

Los moldes con estructuras secundarias del tipo, repeticiones invertidas o palíndromes, pueden causar problemas a la hora de secuenciar. Se observa entonces una reducción rápida de la intensidad de la señal, que indica que la enzima no ha sido capaz de continuar más allá de ese punto. Este tipo de problemas aumenta a zonas que además son ricas en GCs.

- En tal caso, podrán aplicarse algunas de las modificaciones descritas para las zonas ricas en GCs (5% DMSO...).

DIFICULTAD PARA SECUENCIAR REGIONES DE LARGAS REPETICIONES

Las regiones repetidas en el DNA pueden ser desde 2 ó 3 bases hasta cientos de ellas. En general, las repeticiones cortas no suelen dar problemas.

- En caso de largas repeticiones, ricas en GCs, se puede aplicar algunas de las sugerencias ya indicadas.
- La generación de deleciones en estas zonas, puede romper la repetición y facilitar a secuenciación.

DIFICULTAD PARA SECUENCIAR REGIONES DE LARGOS HOMOPOLÍMEROS

Cuando una base se repite más de 10 veces en una región del ADN, se pueden producir problemas a la hora de secuenciar esta región. En concreto, con Gs ó Cs, los problemas se observan ya con menos de 10 bases consecutivas, mientras que la Tag polimerasa puede leer sin problemas regiones de As ó Ts de 25 ó 30 bases.

- En este caso se pueden obtener buenos resultados empleando primer del tipo T25 (A, G ó C) (oligo degenerado) o los *primers* individuales T₂₅A, T₂₅G ó T₂₅C específicamente. La base 3' del *primer* permite anclar este a la secuencia al final del homopolímero, mejorando los resultados obtenidos.

DIFICULTAD PARA SECUENCIAR REGIONES CON COMPRESIONES

Las compresiones en la secuencia se producen como consecuencia de una movilidad no-uniforme de los fragmentos en geles de poliacrilamida, debido a la formación de zonas de estructura secundaria en el ADN monocatenario en regiones que presentan complementaridad intracatenaria. Estas zonas aparecen en la secuencia como 2 o más fragmentos de distinta longitud, migrando con movilidades semejantes (picos superpuestos y espaciado no-uniforme).

- Estos problemas se solucionan empleando dITP en lugar de dGTP en la secuenciación por PCR, ya que el dITP no aparea tan fuertemente con residuos de citosina como el dGTP.

6

ALGUNOS DATOS Y FORMULAS DE UTILIDAD

Datos biofísicos de los dNTPs

Nucleótido	Peso Molecular (Daltons)
dATP	491
dCTP	467
dGTP	507
dTTP	482

Conversiones:

ds ADN (ADN de doble cadena)	A (260nm) = OD (260nm) = 1 para una solución de 50 µg/ml
ss ADN (ADN de simple cadena)	A (260nm) = OD (260nm) = 1 para una solución de 33 µg/ml
ARN	A (260nm) = OD (260nm) = 1 para una solución de 40 µg/ml

Ecuaciones y pesos moleculares:

Absorbancia = coeficiente de extinción molar x concentración x paso de onda

$$[\text{Concentración de oligo}] (\mu\text{g/ml}) = 10^3 \times P_m \times OD \times F / E \times d$$

P_m = peso molecular

OD = Absorción a 260 nm

F = Factor de dilución

E = coeficiente de extinción molar

d = paso de onda

P_m de ds ADN de 500 pb = 325000 Daltons

P_m de ss ADN de 500 nt = 162500 Daltons

P_m medio de un dNTP = 325 Daltons

Conversión de pmoles a µgr de primer

$$\mu\text{g} = (\text{n}^\circ \text{ de pmoles} \times \text{longitud} \times 325) / 10^6$$

Ejemplo: 10 pmoles de un oligo de 25 mer

$$\mu\text{g} = (10 \text{ pmoles} \times 25 \times 325) / 10^6 = 0.081 \mu\text{g de primer}$$

Conversión de µg a pmoles de primer

$$\text{pmoles} = \mu\text{grs} \times 10^6 / (\text{longitud} \times 325)$$

Ejemplo: 0.1 µg de un oligo de 20 mer

$$\text{pmoles} = 0.1 \times 10^6 / (20 \times 325) = 15.4 \text{ pmoles de primer}$$

Calculo de la concentración de primer para amplificación por PCR

$$\text{Concentración } \mu\text{M de primer} = \text{pmoles}/\mu\text{l}$$