



SERVICIOS DE APOYO Á INVESTIGACIÓN (SAI)
 Universidade da Coruña
 Edificio Servizos Centrais de Investigación
 Campus de Elviña, s/n - 15071 A Coruña

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
 F-SAI-01-I-c
 Edición 2
 Página 1 de 3

SOLICITUD DE SECUENCIACIÓN DE ADN
 UNIDAD DE BIOLÓGÍA MOLECULAR (UBM)

ESPACIO RESERVADO PARA LOS SAI

Fecha de entrada:	<input type="checkbox"/> Correo
Recibido:	<input type="checkbox"/> Se adjunta carta
Situación:	
Rechazo (motivo y firma):	
Informe:	Fecha de análisis:

DATOS DE LA PERSONA SOLICITANTE

Nombre y apellidos:	Código de usuario:
Departamento/institución/empresa:	
Teléfono:	Extensión:
Correo electrónico:	Fdo.:

FORMA DE PAGO

N.º aplicación presupuestaria (sólo usuarios de la UDC):	N.º de presupuesto (si lo tiene):		
Datos fiscales (si son distintos de los indicados en el alta de usuario)			
Entidad:	CIF:		
Dirección:	Localidad:	Provincia:	C.P.:

RESULTADOS y DEVOLUCIÓN DE MUESTRAS

Forma de envío de los resultados: Correo postal Correo electrónico Ambos

Devolución de las muestras (por cargo de la persona solicitante): Sí No (las muestras se conservarán 3 meses desde la entrega de los resultados)

OBSERVACIONES

ANÁLISIS SOLICITADOS

EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO: (cubrir sólo en caso de solicitar la extracción de ADN)

Densidad óptica del cultivo (A_{600}): _____ Medio de cultivo empleado: _____

Tipo de cepa bacteriana: JM109 XL1-blue DH1 DH5 α Otra: _____

Tipo de plásmido: pUC TOPO® pGEM® pBluescript® Otro: _____

SECUENCIACIÓN DE ADN:

Tipo de ADN: ds ADN ss ADN Producto de PCR Otro: _____

Características de la muestra: Inserto rico en G-C Presenta repeticiones Otra: _____

Método de extracción: Miniprep Maxiprep Qiaprep Otro: _____

Método de purificación: QIAquick ExoSAP-IT High Pure Otro: _____

PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

IDENTIFICACIÓN y DATOS DE LAS MUESTRAS

Indíquese el número total de reacciones:

N.º SAI	Nombre de la reacción (máx. 8 letras o núms.)	ADN		Cebador			Observaciones
		[ng/uL]	Tamaño (vector + inserto)	Nombre (máx. 4 letras o núms.)	[uM]	Tm	
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							

IDENTIFICACIÓN y DATOS DE LAS MUESTRAS

Indíquese el número total de reacciones:

N.º SAI	Nombre de la reacción <small>(máx. 8 letras o núms.)</small>	ADN		Cebador			Observaciones
		[ng/uL]	Tamaño <small>(vector + inserto)</small>	Nombre <small>(máx. 4 letras o núms.)</small>	[uM]	Tm	
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							
30							
31							
32							
33							
34							
35							
36							
37							
38							
39							
40							
41							
42							
43							
44							
45							
46							
47							
48							
49							
50							
51							
52							
53							
54							

Extracción de ADN plasmídico

Los mayores productos de ADN plasmídico se obtienen cuando se emplean condiciones óptimas de crecimiento. Estas condiciones se consiguen empleando una única colonia aislada a partir de una transformación “fresca” o una placa “fresca” de bacterias de *E. coli*, inoculándola en el medio de cultivo.

- Se recomienda emplear como medio de cultivo el medio 2x Luria-Bertani (Miller) y un crecimiento del cultivo con una DO₆₀₀ de 2.0 a 3.0.
- No se recomienda un crecimiento en medios de cultivo ricos en nutrientes, tales como 2x YT y TB, ya que estos producen densidades celulares significativamente elevadas y saturan el sistema de purificación.
- El medio recomendado tiene el doble de contenido de triptona y extracto de levadura que el medio LB normal (Miller), pero manteniendo la misma cantidad de sales. La fórmula por litro de este medio es la siguiente:

Componente	Gramos por litro
Triptona	20 g
Extracto de levadura	10 g
NaCl	10 g

Secuenciación de ADN

Existen una serie de requisitos mínimos de calidad, exigibles para el ADN que se va a secuenciar.

Insertos clonados:

- ADN debe estar libre de ARN, fenol, sales, etanol, EDTA, proteínas, detergentes etc.
- ADN molde puede estar liofilizado o en AGUA.
- Se requiere una cantidad de 500 ng por reacción, a una concentración mínima de 100 ng/μL.
- Indíquese en la solicitud de análisis el tipo de vector, el tamaño del inserto y la concentración de la muestra.

Productos de PCR:

- Los productos de PCR deben estar libres de subproductos, cebadores excedentes, dNTPs y sales.
- ADN puede estar liofilizado o en AGUA.
- Se requiere una cantidad de 20 ng por cada 100 bases en la longitud del fragmento, a una concentración mínima de 10 ng/μL.
- Indíquese la longitud del fragmento y su concentración.

Cebadores:

- La secuenciación se puede realizar con cebadores específicos del gen o con cebadores estándar. El servicio dispone de los iniciadores universales para vectores tales como M13FW, M13Rev, T3, T7 y SP6.
- Los cebadores específicos deben estar en agua ultrapura a una concentración de 5 μM. Debe indicarse la temperatura de hibridación con el ADN molde ($T_m = (G+C) \times 4 + (A+T) \times 2$) para que los técnicos de la unidad puedan determinar la temperatura a la que se realizará el marcaje del ADN. Se debe remitir un volumen de, por lo menos, 10 μL.