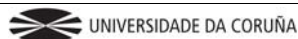




SERVIZOS DE APOIO Á INVESTIGACIÓN (SAI)
 Universidade da Coruña
 Edificio Servizos Centrais de Investigación
 Campus de Elviña, s/n - 15071 A Coruña



F-SAI-01-I-g
 Edición 2

Páxina 1 de 3

SOLICITUDE DE SECUENCIACIÓN DE ADN

UNIDADE DE BIOLOXÍA MOLECULAR (UBM)

ESPAZO RESERVADO PARA OS SAI

Data de entrada:	<input type="checkbox"/> Correo
Recibido:	<input type="checkbox"/> Achégase carta
Situación:	
Rexeitamento (motivo e sinatura):	
Informe:	Data de análise:

DATOS DA PERSOA SOLICITANTE

Nome e apelidos:	Código de usuario:
Departamento/institución/empresa:	
Teléfono:	Extensión:
Correo electrónico:	Asdo.:

FORMA DE PAGAMENTO

N.º de aplicación orzamentaria (só usuarios da UDC):	N.º de orzamento (se o tiver):		
Datos fiscais (se son distintos dos que foron indicados na alta de usuario)			
Entidade:	CIF:		
Enderezo:	Localidade:	Provincia:	C.P.:

RESULTADOS e DEVOLUCIÓN DE MOSTRAS

Forma de envío dos resultados: Correo postal Correo electrónico Ambos

Devolución das mostras (por cargo da persoa solicitante): Si Non (as mostras conservaranse 3 meses desde a entrega dos resultados)

OBSERVACIÓNS

ANÁLISES SOLICITADAS

EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO: (cubrir só no caso de solicitar a extracción de ADN)

Densidade óptica do cultivo (A_{600}): Medio de cultivo empregado:

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

Tipo de plásmido: pUC TOPO® pGEM® pBluescript® Outro:

SECUENCIACIÓN DE ADN:

Tipo de ADN: ds ADN ss ADN Produto de PCR Outro:

Características da mostra: Enxerto rico en G-C Presenta repeticións Outra:

Método de extracción: Miniprep Maxiprep Qiaprep Outro:

Método de purificación: QIAquick ExoSAP-IT High Pure Outro:

PURIFICACIÓN DO PRODUTO DE PCR

IDENTIFICACIÓN e DATOS DAS MOSTRAS

Indíquese o número total de reaccións:

N.º SAI	Nome da reacción (máx. 8 letras ou núms.)	ADN		Cebador			Observacións
		[ng/uL]	Tamaño (vector + enxerto)	Nome (máx. 4 letras ou núms.)	[uM]	Tm	
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							

Para mostrais adicionais, empregue o número de copias da páxina 2 que for preciso e indique o número de páxinas que entrega: _____ .

IDENTIFICACIÓN e DATOS DAS MOSTRAS

Indíquese o número total de reaccións:

N.º SAI	Nome da reacción (máx. 8 letras ou núms.)	ADN		Cebador			Observacións
		[ng/uL]	Tamaño (vector + enxerto)	Nome (máx. 4 letras ou núms.)	[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

Os maiores produtos de ADN plasmídico obtéñense cando se empregan condicións óptimas de crecemento. Estas condicións conséguense empregando unha única colonia illada a partir dunha transformación “fresca” ou unha placa “fresca” de bacterias de *E. coli*, inoculándoa no medio de cultivo.

- Recoméndase empregar como medio de cultivo o medio 2x Luria-Bertani (Miller) e un crecemento do cultivo cunha DO₆₀₀ de 2.0 a 3.0.
- Non se recomenda un crecemento en medios de cultivo ricos en nutrientes, tales como 2x YT e TB, xa que estes producen densidades celulares significativamente elevadas e saturan o sistema de purificación.
- O medio recomendado ten o dobre de contido de triptona e extracto de lévedo que o medio LB normal (Miller), mais mantendo a mesma cantidade de sales. A fórmula por litro deste medio é a seguinte:

Compoñente	Gramos por litro
Triptona	20 g
Extracto de lévedo	10 g
NaCl	10 g

SECUENCIACIÓN DE ADN

Existen unha serie de requisitos mínimos de calidade, esixibles para o ADN que se vai secuenciar.

Enxertos clonados:

- ADN debe estar libre de ARN, fenol, sales, etanol, EDTA, proteínas, deterxentes etc.
- ADN molde pode estar liofilizado ou en AUGA.
- Requírese unha cantidade de 500 ng por reacción, a unha concentración mínima de 100 ng/μL.
- Indíquese na solicitude de análise o tipo de vector, o tamaño do enxerto e a concentración da mostra.

Produtos de PCR:

- Os produtos de PCR deben estar libres de subprodutos, cebadores excedentes, dNTPs e sales.
- ADN pode estar liofilizado ou en AUGA.
- Requírese unha cantidade de 20 ng por cada 100 bases na lonxitude do fragmento, a unha concentración mínima de 10 ng/μL.
- Indíquese a lonxitude do fragmento e a súa concentración.

Cebadores:

- A secuenciación pódese realizar con cebadores específicos do xene ou con cebadores estándar. O servizo dispón dos iniciadores universais para vectores tales como M13FW, M13Rev, T3, T7 e SP6.
- Os cebadores específicos deben estar en auga ultrapura a unha concentración de 5 μM. Debe indicarse a temperatura de hibridación co ADN molde ($T_m = (G+C) \times 4 + (A+T) \times 2$) para que os técnicos da unidade poidan determinar a temperatura á que se realizará a marcaxe do ADN. Débese remitir un volumen de, polo menos, 10 μL.