

ANEXOS

Anexo I:

- Mix TP-PCR:

Componente	PCR con cebadores repetidos (RP) CGG
Tampón amplificación	11,45 µl
Cebadores F,R FAM del FMR1	0,5 µl
Cebador del CGG del FMR1	0,5 µl
Diluyente	0,5 µl
Mezcla de polimerasa	0,05 µl
Muestra DNA	2 µl
Volumen total por reacción	15 µl

- Protocolo del termociclador para TP-PCR:

PCR con cebadores repetidos	
Descripción	Duración
Desnaturalización	95°C 5'
10 Ciclos	97°C 35''
	62°C 35''
	68°C 4'
20 ciclos	97°C 35''
	62°C 35''
	68°C 4'+20''/ciclo
Extensión	97°C 35''
Pausa	4°C ∞

- Preparación de muestras EC:

		Cantidades
Reactivos	Formamida Hi-Di™	11 µl
	Marcador ROX 1000	2 µl
Volumen total/pocillo		13 µl + 2 µl Producto PCR

Desnaturalización en termociclador 2' a 95°C seguido de 4' hasta que se inyecte en el instrumento EC.

Anexo II:

- Digestiones enzimáticas:

Componente	Control FAM	Digestion HEX
Buffer de digestión	3,7 µl	3,7 µl
Enzima control FAM	0,3 µl	-
Enzima de restricción HEX	-	0,3 µl
Volumen total/Pocillo	4 µl	4 µl

Termociclador para digestión 2h a 37°C

- Master mix de mPCR:

Componente	FAM-PCR Master Mix	HEX-PCR Master Mix
mPCR GC-Rich Amp Buffer	20 µl	20 µl
Mix Polimerasa GC-Rich	0,1 µl	0,1 µl
Primers mPCR FAM	1,9 µl	-
Primers mPCR HEX	-	1,9 µl
Volumen total	22 µl	22 µl

- Protocolo del termociclador para mPCR:

mPCR	
Descripción	Duración
Desnaturalización	98°C 5'
27 Ciclos	97°C 35''
	62°C 35'
	72°C 4'
Extensión	72°C 10'
Pausa	4°C ∞

- Master mix PCR polimorfismo C667T :

Mix	10 µl
Agua	5 µl
Muestra DNA	2,5 µl

Anexo III:

-Protocolo termociclador PCR C667T:

Polimorfismo C667T	
Descripción	Duración
Desnaturalización	94°C 20'
30 Ciclos	94°C 1''
	58°C 2'
	72°C 1'
Extensión	72°C 20'
Pausa	4°C ∞

-Preparación para electroforesis capilar C667T: (16 MUESTRAS)

		Cantidades
Reactivos	Formamida Hi-Di™	250 µl
	GeneScan® 500 LIZ™ size	6,8 µl
Volumen total/pocillo		15 µl +3 µl Producto PCR