

## 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
<b>Volumen total por reacción</b>	<b>15 µl</b>

- Protocolo del termociclador para TP-PCR:

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

- Preparación de muestras EC:

		Cantidades
<b>Reactivos</b>	Formamida Hi-Di™	11 µl
	Marcador ROX 1000	2 µl
<b>Volumen total/pocillo</b>		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
<b>Volumen total/Pocillo</b>	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
<b>Volumen total</b>	22 µl	22 µl

- Protocolo del termociclador para mPCR:

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

- Master mix PCR polimorfismo C667T :

<b>Mix</b>	10 µl
<b>Agua</b>	5 µl
<b>Muestra DNA</b>	2,5 µl

**Anexo III:**

-Protocolo termociclador PCR C667T:

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

-Preparación para electroforesis capilar C667T: (16 MUESTRAS)

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