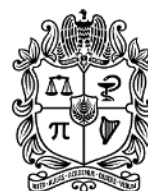


INSTRUCTIVO PARA LA PREPARACIÓN Y ENVÍO DE MUESTRAS SERVICIO DE SECUENCIACIÓN Y ANALISIS MOLECULAR





1. Información General del Documento	
Objetivo:	Proveer a los usuarios del servicio las instrucciones necesarias para que las muestras a procesar cumplan con las condiciones adecuadas para lograr resultados de alta calidad.
Alcance:	Usuarios internos y externos que envíen muestras biológicas para su procesamiento.
Justificación (Opcional):	
Definiciones:	ADN (Ácido desoxirribonucleico): material que contiene la información hereditaria en los humanos y casi todos los demás organismos, que determinan la forma y características de un organismo y sus funciones. En 1953 los investigadores James Watson y Francis Crick propusieron la estructura de doble hélice del ADN. Todas las células, procariotas y eucariotas, contienen ADN en sus células. La información en el ADN se almacena como un código compuesto por cuatro bases químicas, adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). Las bases de ADN se emparejan entre sí para formar unidades llamadas pares de bases (pb). Plásmidos: son fragmentos extracromosómicos de ácidos nucleicos (ADN o ARN) que aparecen en el citoplasma de algunos procariotas. Varían en su tamaño, aunque menor que el cromosoma principal. Cada bacteria puede tener uno o varios a la vez. Los plásmidos tienen una conformación variable su estructura puede ser lineal, circular o superenrollada. Contienen mecanismos para su replicación y control del número de copias. Secuenciación de Sanger o secuenciación de didesoxinucleótidos: método que determina una secuencia de ADN de forma relativamente sencilla. En general, utiliza varios elementos; ADN a secuenciar, ADN polimerasa, primer o cebador, nucleótidos (A, T, C y G) y didesoxinucleótidos (ddA, ddT, ddG y ddC). Con estos componentes se realiza la amplificación de ADN mediante una PCR, para obtener muchas copias. Como resultado se obtienen fragmentos de diferentes tamaños, acabados en el didesoxinucleótido. Posteriormente, los fragmentos de diferentes tamaños migran por electroforesis capilar (diferente carga eléctrica) hasta obtener el orden de nucleótidos en forma de secuencia de la cadena complementaria que se esté estudiando. Purificación: eliminación de residuos del producto de PCR que puedan interferir con la secuencia (tales como sales, EDTA, entre otros).
Documentos de Referencia (Opcional):	
Condiciones Generales:	Para garantizar que tanto usuarios internos y externos envíen muestras biológicas para su procesamiento de manera adecuada, el Servicio de Secuenciación y Análisis



	Molecular se compromete a divulgar en la página web, a socializar con cada uno de los usuarios, a cumplir con el envío de las muestras en el tiempo estipulado y como usuario de SSiGMol y/o responsable de la entrega de muestras usted acepta haber leído la presente información y realizar los diferentes procesos del servicio como aquí se encuentran establecidos. Para el registro, seguimiento y control del proceso desde la recepción hasta el envío de las muestras el personal del laboratorio deberá diligenciar en cada muestra el formato B.IG.FT.10.004.009, B.IG.FT.10.004.051, y B.IG.FT.10.004.010, y la verificación del diligenciamiento del proceso debe hacerse como mínimo una vez se envíen las muestras. A partir del día de entrega de resultados, mantenemos las muestras almacenadas por un periodo de 30 días (un mes calendario). Luego de este periodo todas las muestras son desechadas. A partir del día de entrega de resultados, mantenemos una copia digital de los archivos de resultados enviados por un periodo de seis meses. SSiGMol NO se responsabiliza por demoras en los procesos debido al NO cumplimiento de nuestros Usuarios de los requisitos descritos en la presente guía.
--	---

Desarrollo del contenido
2. PURIFICACIÓN/SECUENCIACIÓN 2.1. Productos de PCR para purificación/secuenciación. El éxito de la purificación de productos depende críticamente de la calidad de la amplificación. Ofrecemos el servicio de purificación a partir de productos de PCR. Si el producto amplificado presenta una alta cantidad de dímeros de primers o amplificaciones inespecíficas no garantizamos los resultados. 2.2. Solicitud de servicio e información asociada. Para acceder al servicio de purificación/secuenciación a partir de productos de PCR es necesario que junto con la solicitud del servicio envíe la siguiente información: • Imagen clara del gel de agarosa en el que se comprobó la amplificación de las muestras. • Nombre de cada una de las muestras en cada carril de la imagen. • Porcentaje de preparación del gel, tiempo de corrido y voltaje. • Volumen de la muestra cargado en el gel y tamaño esperado del fragmento amplificado. • Volumen del marcador de peso molecular (MPM) utilizado. Recomendamos el uso de MPM diseñados para la cuantificación de ADN.



SSiGMol realiza la purificación de todas las muestras, y define cuales de estas muestras son adecuadas para secuenciación. Sin embargo, esto no garantiza la calidad de los resultados de la secuenciación.

2.3. Preparación de las muestras para purificación/secuenciación.

En un tubo eppendorf de 1.5 mL, envíe 45µL de producto de PCR. En tubo(s) independiente(s) envíe el volumen de primer(s) que se requiere considerando que por muestra debe entregar 1 µL. Sin embargo, el mínimo volumen de primer que debe entregar es 5,0µL (Tenga en cuenta que en los casos en que se requiera repetir el procesamiento de alguna(s) muestras, es necesario contar con suficiente cantidad de primers). La concentración del primer debe ser 10µM. Recuerde que, si usted no envía sus muestras y sus primers al volumen y concentración adecuados, no podremos garantizar la calidad de sus resultados.

Si usted requiere secuenciar una muestra con dos primers (forward y reverse) envíe solo una muestra para purificar, a partir de esta realizamos la secuenciación con ambos primers. Recuerde que en este caso el cobro se hace por una purificación y dos secuencias.

3. SECUENCIACIÓN

El éxito de la reacción de secuenciación de ADN depende críticamente de la pureza y la concentración adecuada de las muestras, entre otros factores.

Para purificar sus Plásmidos, utilice un kit comercial que garantice la pureza del ADN del plásmido para secuenciación.

Tenga en cuenta que sus productos de PCR deben estar libres de posibles inhibidores, primers o dNTPs no incorporados. Productos no purificados, o purificados de manera inadecuada no son apropiados para ser secuenciados. Le recomendamos visualizar su producto purificado en un gel de agarosa para confirmar la ausencia de productos inespecíficos.

Envíe sus muestras de ADN re-suspendidas en AGUA ULTRAPURA. Recomendamos NO utilizar TE para diluir o re-suspender las muestras ya que el EDTA inhibe la reacción de secuencia. Recuerde que los buffers de elución de los kits de purificación generalmente contienen EDTA.

3.1. Preparación de las muestras.

En tubos de 1.5mL o de 0.6mL, o en placas de 96 pozos de 0.2 mL, prepare 10µl de muestra purificada de acuerdo a las concentraciones especificadas en la tabla 1. Adicione 1.2 µL del primer respectivo, cuya concentración inicial debe ser 10µM. El volumen final (muestra + primer) será de 11.2 µL siendo la concentración final del primer de 1.07 µM. Recuerde que si usted no envía sus muestras y sus primers a la concentración adecuada la calidad de sus resultados puede verse comprometida.

El laboratorio recomienda tener en cuenta las concentraciones que aparecen en la tabla 1, de acuerdo con los tamaños de los amplificadores. Las concentraciones de la tabla corresponden a los valores mínimos en que debe estar su muestra para ser viable para secuenciar, usted puede entregar sus muestras hasta al doble de la



concentración descrita sin afectar la secuenciación. Recuerde que, si la cantidad de ADN presente en la muestra es inferior a la necesaria, probablemente, la reacción de secuenciación fallará produciendo datos con baja señal, ruido de fondo, errores y ambigüedades. Demasiado DNA molde puede producir efectos similares.

Calculo concentración: Longitud producto PCR (en pb)/50: Cantidad ng/μl

Tipo de muestra	Concentración ng/μl
Plásmidos 3 a 20 kb	35
Plásmidos > 20 kb y cósmidos	70
Productos de PCR de 100 a 200 pb	0.5 - 3
Productos de PCR de 200 a 500 pb	1 - 10
Productos de PCR de 500 a 1000 pb	2 - 20

3.2. Primers de secuenciación.

Los primers que usted agregue a la muestra deben estar re-suspendidos en AGUA ULTRA PURA, libres de sales, EDTA, o de otros posibles inhibidores. Es importante que tenga en cuenta que sus primers cumplan con las siguientes características ya que de esto dependerá la calidad de sus secuencias:

- Longitud de 17-25 bases.
- Contenido del GC % entre el 40% y el 60%.
- Tm (temperatura de anillamiento) entre 53°C y 58°C.

No siempre los primers que usted emplea para amplificar sirven también para secuenciar. En especial, primers con posiciones degeneradas ocasionan inconvenientes en la secuenciación.

SSiGMol ofrece sin costo adicional los siguientes primers universales para secuenciar. En caso de que usted solicite que SSiGMol suministre los primers, envíe sus muestras al volumen y concentración recomendadas.

Primer	Secuencia (5'-3')
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAA
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
M13F(-47)	CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC
M13F(-20)	GTA AACGACG GCCAGT
M13R(-26)	CAGGAAACAGCTATGAC
M13R(-40)	GCGGATAACAATTCACACAGG

Tabla 2. Primers universales que ofrece SSiGMol



4. FRAGMENTOS (AFLPS, MICROSATÉLITES, SNPS)

El éxito del análisis de fragmentos depende críticamente de tener concentraciones correctas y condiciones óptimas del producto en el caso de amplificaciones en multiplex.

4.1. Preparación de las muestras.

Preparare 10µL de muestra debidamente diluida re-suspendida en AGUA ULTRA PURA.

Existe una alta probabilidad de que usted tenga que realizar diluciones de sus productos de amplificación antes de enviarlos al servicio. La dilución requerida depende del tamaño del (los) fragmento(s) y su intensidad.

4.2. Fluorocromos.

Para la realización de análisis de fragmentos fluoromarcados es importante tener en cuenta la compatibilidad de diferentes fluorocromos. La única combinación de fluorocromos que permite el marcaje y detección de cuatro (4) fluorocromos (sin contar el LIZ® Size Standard) es PET, 6FAM, NED y VIC.

SSiGMol tiene disponible los siguientes filtros:

- DS-33 (Dye Set G5): fluorocromos [6-FAM™, VIC®, NED™, PET®, LIZ®]
- DS-02 (Dye Set E5): fluorocromos [dR110, dR6G, dTAMRA™, dROX™, LIZ®]
- DS-32 (Dye Set F): fluorocromos [5-FAM™, JOE™, NED™, ROX™]
- DS-36 (Dye Set J6): fluorocromos [6-FAM™, LIZ®, NED™, SID, TAZ, VIC®]

SSiGMol ofrece tres estándares de peso molecular (Size Standards) disponibles de acuerdo al tipo de marcador y las necesidades de sus usuarios:

- GeneScan LIZ-120 Size Standard
- GeneScan LIZ-600 Size Standard
- GeneScan LIZ-1200 Size Standard

Nota importante:

Le recomendamos realizar la optimización de la migración de sus fragmentos en nuestro equipo con pocas muestras (múltiplos de 8), antes del envío masivo de muestras.

5. ENVÍO DE MUESTRAS

Si usted entrega sus muestras a SSiGMol o las envía por correo, por favor tenga en cuenta lo siguiente: SSiGMol recibe muestras en tubo o placa.

Tubos:

- Utilice micro-tubos de 1.5mL, ó de 0.6 mL. (No recibimos ni muestras ni primers en tubos de PCR de 0.2mL). Marque sus tubos de forma clara y legible en la tapa y el costado.



Placas:

- Utilice placas de 96 pozos de 0.2mL. Llene la placa por columnas. No deje pozos vacíos. La placa debe cubrirse adecuadamente (con mantas adhesivas o tiras de tapas). SSiGMol no se responsabiliza por la contaminación cruzada que pudiera ser ocasionada en el transporte, si las placas no se cubren de manera adecuada.
- Solo se reciben muestras en los horarios establecidos (lunes a viernes de 8 am a 12m y lunes a jueves 2 pm a 4 pm). En caso de muestras enviadas por correo, organice su envío para que las muestras lleguen al Instituto de Genética preferiblemente en los horarios establecidos.
- Solo se reciben muestras que cumplan con las condiciones de preparación indicadas en éste instructivo. Para el caso de fragmentos, solo se reciben muestras en múltiplos de 8. Si envía sus muestras por correo, y no cumplen con las condiciones de preparación NO se procesarán. Nos pondremos en contacto para definir el procedimiento a seguir.
- Las muestras se reciben con los formatos B.IG.FT.10.004.009 y B.IG.FT.10.004.010 debida y totalmente diligenciado. Es necesario traer una copia del formato, que se firmara como recibido. (Este formato se encuentra disponible en PDF en la página web: https://genetica.unal.edu.co/integra_web_servicios.php?id_servicio=14). Si usted envía sus muestras por correo, envíelas junto con los formatos necesarios. Le recomendamos quedarse con una copia del formato diligenciado, para que usted realice el seguimiento del saldo.
- Para el envío de muestras en tubo, verifique que han sido tapados adecuadamente. Recomendamos colocar los tubos en una sola bolsa con cerrado hermético.
- Para el envío de muestras en placa, por favor verifique que hayan sido cubiertas adecuadamente y que el sistema que usted utiliza para cubrirlas evita los derrames. Le recomendamos colocarlas en una bolsa con cierre hermético.
- Sus muestras pueden permanecer a temperatura ambiente por un tiempo de 24 horas, sin embargo, si usted considera que son muestras especialmente susceptibles a la degradación, por favor utilice geles refrigerantes al interior de las bolsas de cierre hermético. Por favor evite el uso de hielo corriente y de neveras de icopor.

6. ENTREGA DE RESULTADOS

Los resultados del procesamiento de sus muestras se entregarán vía correo electrónico de 4 a 7 días hábiles contados a partir del siguiente día hábil de la recepción de las muestras en el laboratorio. Este tiempo depende fundamentalmente de la cantidad de muestras recibidas. Siempre procesamos las muestras en orden de llegada.

6.1.Secuenciación.

Los resultados en SSiGMol se disponen como cromatogramas (.ab1), archivos que se pueden leer con programas como BioEdit Sequence Alignment Editor y Chromas (para Windows), Geospiza FinchTV (para MAC o Windows), estos programas corresponden a software libre.

El resultado de la secuenciación es el cromatograma. También enviamos un archivo correspondiente al control positivo que se corre junto con las muestras en la reacción de secuenciación, en la purificación y en la



electroforesis capilar.

Como parte de nuestra política, realizamos la revisión de todas las secuencias obtenidas. En caso de que sus muestras generen secuencias con problemas que sugieran un tipo claro de causa (secuencia mezclada, exceso de DNA, poco DNA, etc.) se lo haremos saber junto con sus resultados.

6.2. Análisis de fragmentos.

Los resultados en SSiGMol se disponen como cromatogramas (*.fsa), archivos que se pueden leer solamente con el programa GeneMapper ver. 4.1. Dada la complejidad de asignar genotipos, SSiGMol no realiza análisis de los datos automáticos. En cambio, ofrecemos acceso al programa de manera presencial o por acceso remoto para los usuarios que se encuentren fuera de la ciudad, el horario se acordará con el personal de soporte técnico.

Applied Biosystems dispone del software libre Peak Scanner Software que es de fácil uso y permite leer, editar, analizar, imprimir y exportar datos de análisis de fragmentos generados por los equipos de Applied Biosystems.

Los archivos.fsa de análisis de fragmentos consisten en el cromatograma de sus muestras y del LIZ® Size Standard adicionado por nosotros. El LIZ se considera el control positivo de la electroforesis capilar y como parte de nuestro servicio, este control positivo, se revisa en cada uno de los archivos de análisis de fragmentos que generamos.

7. GARANTÍAS

De acuerdo con nuestra política de Gestión de Calidad basada en la norma ISO 9001:2015, para el proceso de gestión de laboratorios y extensión de la Universidad Nacional de Colombia, en SSiGMol garantizamos:

- La seguridad y confidencialidad de toda la información compartida entre el Usuario y SSiGMol.
- La seguridad y confidencialidad de las muestras físicas recibidas por SSiGMol de acuerdo a los procedimientos establecidos.
- La seguridad y confidencialidad de los resultados obtenidos.
- La calidad de los resultados de todas las muestras que cumplan con las condiciones de preparación que se establecen en este instructivo.
- En caso de reprocesamiento, solo se realizará el 5% de la cantidad de muestras enviadas en esta solicitud. Si desea reprocesar más muestras cada una tendrá un costo del 50% del valor total de una secuencia.
- SSiGMol no utilizará ni la información, ni las muestras físicas, ni los resultados obtenidos para ningún fin diferente al establecido con el Usuario.

Elaboró:	Andrea del Pilar Hurtado Cruz	Revisó:	Yohanna Maya González	Aprobó:	Humberto Arboleda Granados
Cargo:	Coordinadora Técnica	Cargo:	Coordinadora de Calidad	Cargo:	Coordinador Laboratorio
Fecha:	20-02-2024	Fecha:	28-02-2024	Fecha:	28-02-2024