

Protocolos de preparación de muestras

Contenido

1. TIPOS DE MUESTRA

2. PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE MUESTRA

- 2.1 Producto de PCR crudo (sin purificar).
- 2.2 Producto de PCR crudo en gel (sin purificar).
- 2.3 Producto de PCR purificado.
 - 2.3.1 Características de las muestras purificadas.
- 2.4 Muestras de ADN genómico
- 2.5 Muestra de ADN de plásmidos purificados.
- 2.6 Muestras listas para cargar
- 2.7 Etiquetado de la muestra

3. PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE PRIMERS

- 3.1 Concentración y volúmenes necesarios
- 3.2 Etiquetado de primers

4. PROTOCOLO DE PREPARACIÓN PARA EL ENVÍO

- 4.1 Llenado de solicitud en línea
- 4.2 Información solicitada

5. RESULTADOS INSATISFACTORIOS

6. FORMATOS ANEXOS



1. TIPOS DE MUESTRA

- Productos de amplificación por PCR purificados o sin purificación en líquido o en gel.
- ADN de plásmido.
- ADN genómico.
- Productos ya preparados con reacción de secuenciación con kit BigDye Terminator v3.1 y purificado

La calidad de la reacción de secuenciación depende de la calidad, pureza y características intrínsecas del ADN utilizado como templado y de la especificidad de los primers de secuenciación utilizados.

La mayoría de los kits de purificación de ADN comercialmente disponibles proporcionan material de calidad suficiente para secuenciar, sólo se debe verificar que el amortiguador de elución que contienen no interfiera con la posterior reacción de secuenciación empleada. En caso de duda sobre la formulación de la solución de elución comercial se recomienda resuspender el ADN purificado en agua libre de nucleasas no tratada con DPEC.

En cuanto a los primers, el usuario es responsable de asegurar que son adecuados y confiables para la secuenciación por electroforesis capilar. Todos los primers enviados deben también venir en la concentración indicada en agua libre de nucleasas no tratada con DPEC.

Por favor considere que la reacción de secuenciación y el secuenciador automatizado empleados permiten leer correctamente un promedio de 500 pb, a partir de las bases 50-80 en ambos extremos. Productos menores a 200 pb no permiten obtener secuencias confiables mayores a 100 bp.

2. PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE MUESTRA



Producto de PCR crudo (sin purificar)

2.1

Para muestras enviadas como productos de PCR crudo, ofrecemos el servicio de purificación, siempre y cuando el producto amplificado NO presente una alta cantidad de dímeros de primers o amplificaciones inespecíficas.

Las muestras de amplicones únicos se purifican por columna previamente a la reacción de secuenciación, para lo cual es necesario:

1. Confirmar que la reacción de PCR sólo tiene un producto de amplificación. Se debe proporcionar la fotografía de gel de agarosa que demuestre la presencia de una sola banda. Indicar en la fotografía los tamaños de referencia del marcador de peso molecular y el volumen de reacción cargado en el gel tanto de la muestra como del marcador.
2. Para evitar cualquier degradación es importante que los templados obtenidos por PCR se conelen inmediatamente después de la amplificación.
3. Enviar el amplicón en una concentración de 40-50 ng/ μ l en un volumen total mínimo de 10 μ l.
4. Posterior a la purificación se determina la concentración y pureza del producto por espectrometría a 260/280 nm.

2.2

Producto de PCR crudo en gel (sin purificar)

Para productos de PCR que rinden varias bandas de amplificación, ofrecemos el servicio de purificación de bandas individuales a partir de gel de agarosa LMP, siempre y cuando el producto amplificado esté presente en una cantidad que asegure la recuperación adecuada de producto.

Las muestras de amplicones en gel se purifican por columna previamente a la reacción de secuenciación, para lo cual es necesario:

1. Enviar la pieza de gel de agarosa LMP que contiene la banda única deseada en un microtubo de 1.5/2 ml.
2. Proporcionar la fotografía de gel de agarosa que demuestre la presencia de la banda de interés a fin de estimar si existe suficiente cantidad para su purificación. Indicar en la fotografía los tamaños de referencia del marcador de peso molecular y el volumen de reacción utilizado.

Pág. 3



3. La reacción de secuenciación se realizará únicamente si posterior a la purificación se verifica la presencia de una sola banda por gel de agarosa y si se obtiene una concentración adecuada del producto, determinada por espectrofotometría.

2.3 *Producto de PCR purificado*

La calidad de la reacción de secuenciación depende de la pureza del producto de PCR utilizado como templado. Los productos de PCR deben estar libres de posibles inhibidores, primers o dNTPs no incorporados. Los amplicones no purificados o purificados parcialmente generan secuencias no confiables o incluso ausencia de éstas por inhibición de la reacción.

El envío de muestra de PCR purificadas por el usuario requiere:

1. Determinar la concentración de la muestra purificada por espectrofotometría.
2. Enviar un volumen de 5 μ l de amplicón por reacción de secuenciación individual a la concentración solicitada (Tabla 1) dependiendo del tipo de producto y tamaño del amplicón.
3. Proporcionar la fotografía de gel de agarosa que demuestre la presencia del producto purificado. Indicar en la fotografía los tamaños de referencia del marcador de peso molecular y el volumen de reacción utilizado.
4. Verificar que la solución de elución o resuspensión no contenga inhibidores de la reacción de secuenciación como EDTA. Se recomienda el uso de agua libre de nucleasas no tratada con DPEC.

2.3.1 *Características de la muestra purificada*

La Tabla 1 indica las concentraciones mínimas del templado purificado recomendadas para la reacción de secuenciación de ADN por electroforesis capilar, de acuerdo al tipo de muestra.

Tabla 1. Concentración de templado recomendados para secuenciación por electroforesis capilar.

Templado	Concentración en μl/reacción
Producto de PCR:	1-3 ng
100 - 200 pb	3-10 ng
200 - 500 pb	5-20 ng
500 - 1000 pb	10-40 ng
1000 - 2000 pb	20-50 ng
>2000 pb	
Cadena sencilla	25-50 ng
Doble cadena	150-300 ng
Cósmido, BAC	0.5-1.0 μ g
DNA genómico bacteriano	2-3 μ g

- Las muestras deben enviarse disueltas en agua desionizada libre de nucleasas y no tartada con DPCE, o en forma liofilizada. No utilice TE para diluir o para resuspender las muestras ya que el EDTA inhibe la reacción de secuencia.

- Si se desea secuenciar un templado con dos primers (forward y reverse), envíar sólo una muestra para purificar, a partir de ésta se realiza la secuenciación con ambos primers. Tenga en cuenta que en este caso el cobro se hace por una purificación y dos secuencias

NOTA IMPORTANTE: Recuerde que la calidad de los resultados puede verse comprometida si las muestras y los primers no se envían a las concentraciones adecuadas o en soluciones que interfieran con la reacción de secuenciación.

Muestra de ADN genómico

2.4

Para el ADN genómico se prefiere que la concentración es de alrededor de 20 ng/ul en un volumen total de 10 ul por reacción de secuencia. Los primers deben ser proporcionados en 10uM y necesitamos un volumen mínimo de 225ul para cada uno.

Muestra de ADN de plásmidos purificados

2.5

La calidad de la reacción de secuenciación del ADN depende de la pureza del ADN. El ADN debe ser enviado a una concentración de 100ng/ul en un volumen de 10ul.

Muestras listas electroforesis capilar

2.6

Remitiendo la muestra preparada para ser inyectada directamente en el secuenciador automático, por lo que ya se ha realizado la reacción de secuenciación y la eliminación del colorante y todo lo que nos solicita es hacer la electroforesis capilar en el instrumento AB. Los protocolos recomendados para la purificación es el de purificación con BigDye® Terminator v3.1, precipitación con etanol y con columnas CENTRI-SEP.

Las placas ya cargadas para la electroforesis capilar deben enviarse totalmente cubiertas con papel aluminio y en un tiempo no mayor a 24 horas posteriores a la preparación (siempre y cuando no se encuentran resuspendidas en formamida).Incluir junto con las muestras el control de reacción de secuenciación.

Etiquetado de la muestra

2.7

Para asegurar la correcta identificación de las muestras se solicita:

1. Asignar un nombre de identificación no mayor a 10 caracteres.
2. Etiquetar cada microtubo con letra legible y marcador permanente.
3. Indicar la concentración del amplicón.
4. Indicar la fecha de obtención.



5. Indicar las iniciales oficiales de la Institución de origen.
6. El nombre de la muestra en el microtubo deberá coincidir con el nombre indicado en la solicitud de servicio.

3. PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE LOS PRIMERS

3.1 *Requisitos del primer*

Es responsabilidad del usuario asegurar que los primers proporcionados son adecuados y confiables para la secuenciación por electroforesis capilar, que se unen específicamente la región y/o templado proporcionado y que no generan secuencias inespecíficas. De estas características dependerá la calidad y longitud de las secuencias obtenidas.

1. Los primers de secuenciación se deben entregar a una concentración de 3.2 pmol/ μ l en agua ultra pura libre de nucleasas, EDT, DPCE y cualquier otro posible inhibidor.
2. Por cada muestras solicitud se debe proporcionar cada primer en un volúmen mínimo es de 5 μ l a la concentración indicada.
3. Los oligonucleótidos deben cumplir con las siguientes características:
 - Ser específico a la región y/o templado de interés.
 - Longitud de 17-25 bases.
 - Contenido de GC entre el 40% y el 60%.
 - Tm (temperatura de alineamiento) entre 53°C y 58°C.

3.2 *Etiquetado de primers*

Para asegurar la correcta identificación de los primers se solicita:

1. Asignar un nombre de identificación no mayor a 5 caracteres.
2. Etiquetar cada microtubo con letra legible y marcador permanente.
3. Indicar la concentración del primer.
4. Para secuencias bidireccionales indicar la dirección de cada primer como FW para forward y RV para reverse.
5. Indicar la fecha de preparación de la dilución.
6. El nombre del primer en el microtubo deberá coincidir con el nombre indicado en la solicitud de servicio.

4. PROTOCOLO DE PREPARACIÓN PARA EL ENVÍO DE MUESTRAS



1. Llenado de solicitud en línea
2. Información solicitada

Para acceder al servicio de purificación a partir de productos de PCR purificado o no es necesario que junto con la solicitud del servicio envíe la siguiente información:

1. Fotografía clara del gel de agarosa en el que se comprueba la amplificación de las muestras.
 - a. Para productos de PCR purificados o para purificar a partir de reacción la reacción de amplificación debe ser una sola banda,
 - b. Para producto de PCR para purificación a partir de gel se debe indicar cuál es la banda deseada que se aislo.
2. Sobre la fotografía se debe indicar:
 - a. El nombre de cada una de las muestras sobre cada carril. El nombre debe corresponder al asignado en la etiqueta del microtubo y en la solicitud.
 - b. El volumen de cada muestra cargado en el gel.
 - c. Tamaño esperado del fragmento amplificado.
 - d. La concentración del marcador de peso molecular utilizado (nombre comercial) y los tamaños de cada banda.
 - e. Porcentaje de preparación del gel, tiempo de corrida y voltaje.

5. RESULTADOS INSATISFACTORIOS

Debe tomar en cuenta que pueden producirse fallos en la secuenciación, los cuales pueden ser debidos a:

- 1) Las características de las muestras (concentración, pureza, integridad) o de los primers (diseño, concentración, etc.) y purificación correcta de la reacción de secuenciación.
- 2) Información insuficiente o errónea por parte del usuario al momento del llenado del formato en línea.
- 3) Error durante la realización del análisis por funcionamiento interno del servicio.

El cobro y facturación de las secuencias fallidas se realiza cuando se estima que las causas de error son del tipo 1 y 2. Nos comunicaremos con el usuario para confirmar si desea que se repita la reacción y en caso afirmativo se facturará cada reacción repetida. Aquéllas producidas por errores del tipo 3 se repiten automáticamente sin facturar la repetición.



6. FORMATOS ANEXOS

6.1

Formato para envío de muestras



FORMATO PARA ENVÍOS DE MUESTRAS

Nombre(s):	
Apellidos:	
Profesión:	
Estado:	
Dirección:	
E-mail para envío de resultados:	
Teléfono:	Celular:
Institución o empresa:	

DATOS RELATIVOS A LAS MUESTRAS

Tipo de molde de ADN: Producto de PCR Plásmido Otros Especificar:

Observaciones del solicitante:

ID muestra (asignado por el sistema)	Nombre de muestra	Nombre primer	Tamaño del Templado
USO INTERNO			
# Muestras totales:			

Formato para registro de primers

REGISTRO DE PRIMERS

Secuencia:

5' _____

_____ 3'

Nombre del primer:

Tamaño del primer:

Persona que diseñó:

Lugar de síntesis:

Tm: _____ °C

GC: _____ %

AT: _____ %

Descripción del ensayo:

Observaciones: