

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DEL SECUENCIADOR
GENETICO:**

3500 xL GENETIC ANALIZER de Applied Biosystems

INDICE

- I. **Introducción**
- II. **Objetivo General del Manual**
- A. **Protocolo de Secuenciación**
 - A.1 **Propósito**
 - A.2 **Alcance**
 - A.3 **Responsables**
 - A.4 **Políticas de operación, normas y lineamientos**
 - A.5 **Descripción del Protocolo de Secuenciación**
- III. **Documentos de Referencia**
- IV. **Registros**

I. **Introducción**

El laboratorio de Biología Molecular, cuenta con infraestructura tecnológica de última generación producida por Applied Biosystems, una de las compañías líderes en el desarrollo y manufactura de equipos de alta tecnología para su aplicación en genética y biología molecular; y personal altamente capacitado para ofrecer a la comunidad científica de las Instituciones públicas y privadas, las técnicas de análisis de ácidos nucleicos de mayor demanda en la actualidad (Secuenciación de ADN, Análisis de fragmentos, Análisis de SNP's, etc.), dirigidas especialmente a las investigaciones en el campo de las ciencias biomédicas y de la salud.

El laboratorio cuenta con un secuenciador de alto rendimiento modelo 3500 xL de 24 capilares, con capacidad máxima para secuenciar hasta 500,000 bases o de generar hasta 24,000 genotipos por día. Esta infraestructura tiene capacidad para el estudio de microsatélites en perfiles genéticos, polimorfismos de longitud variable, análisis y validación de SNP's entre otros.

El Laboratorio de Biología Molecular dispone actualmente de los siguientes equipos, kits y reactivos relacionados con el análisis de ácidos nucleicos:

1. Secuenciador Automático 3500 xL ADN Genetic Analyzer, con capacidad de análisis de 24 muestras simultáneas por electroforesis capilar. (Applied Biosystems).
2. Unidad automatizada de Fluídos Biomek Liquid Handler que realiza funciones de preparación de reacciones en placas para su lectura en los equipos, lo que potencia la capacidad de preparación y procesamiento de muestras en el laboratorio (Beckman Coulter).
3. Tres termocicladores de 96 pozos, Veriti 96-Well Thermal Cyclers (Applied Biosystems).
4. Química de marcaje para secuenciación: Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).
5. Química de limpieza de reacciones de PCR basada en columnas cromatográficas (Qiagen).

Actualmente, el Laboratorio de Biología Molecular cuenta con un Responsable y un Técnico de laboratorio.

II. Objetivo General del Manual

El objetivo del manual es contar con un documento en el que se describan las técnicas para el desarrollo de los protocolos del Laboratorio de Biología Molecular, que sirvan de guía o referencia al personal que labora en esta área, así como de los usuarios del servicio de las instituciones que conforman el Consorcio o de otras instituciones públicas o privadas y sirvan también para establecer los mecanismos y lineamientos necesarios para que la operación se realice en estricto apego a la normatividad en la materia, coadyuvando al cumplimiento de los objetivos institucionales.

A. Protocolo de Secuenciación

A.1 Propósito

1.1 Descripción de los pasos y la secuencia a seguir para el desarrollo de los Protocolos de Secuenciación que sirva de guía para el personal que labora en el Laboratorio de Biología Molecular, así como para el conocimiento de los usuarios de los Institutos del consorcio.

A.2 Alcance

2.1 Aplica al personal que labora en el Laboratorio de Biología Molecular de la Red de Apoyo a la Investigación (RAI).

A.3 Responsabilidades

3.1 Es responsabilidad de los operadores del área el seguir los procedimientos descritos en este manual y notificar al Responsable de la Unidad de cualquier desviación que se presente durante el proceso.

3.2 El Responsable del Laboratorio deberá supervisar que el personal conozca entienda y aplique correctamente los procedimientos y coordine la capacitación del personal que efectúa la operación.

A.4. Políticas de operación, normas y lineamientos

A.4.1 No se permite la entrada a personas ajenas a la Unidad, excepto para entrega de muestras.

A.4.2 Cualquier usuario que no se encuentre adscrito al Laboratorio de Biología Molecular tiene prohibido manipular el secuenciador.

A.4.3 Para el servicio de secuenciación, las muestras deberán estar correctamente identificadas, cumplir con los requisitos establecidos (calidad, pureza, concentración, etc) y todos los reactivos serán siempre alicuotados (mientras sus características lo permitan) con la finalidad de optimizar su uso.

A.4.4 Solamente el personal de la Unidad puede tener acceso a los reactivos y muestras dentro de los refrigeradores y en general dentro de la Unidad.

A.4.5 No está permitido guardar nada que no sean muestras o reactivos en los refrigeradores.

A.4.6 El último día de cada mes, se hará un mantenimiento preventivo a todos los equipos de la Unidad para asegurar su óptimo funcionamiento.

A.4.7 Para asegurar la oportuna existencia de: solventes, soluciones o reactivos necesarios que estén próximos a consumirse, el personal técnico del Laboratorio de Biología Molecular, deberá anotarlo en la libreta correspondiente.

A.4.8 En caso de detectar algún desperfecto o mal funcionamiento de equipo, notificar de inmediato al responsable del Laboratorio.

A.4.9 El tiempo de entrega de los análisis de secuenciación son: Sólo lectura: 72 hrs, Amplificación y lectura: 5 días.

A.5. Descripción del Protocolo de Secuenciación

a) Preparación de la Muestra (3 hrs.)

1. Limpiar el área de trabajo
2. Descongelar los siguientes reactivos y mantenerlos a 4°C: Big Dye Terminator V3.1 Buffer de secuencia 5X pGEM 3Zf+ M13 (-21) PRIMER
3. Ajustar las muestras de ADN a una concentración de 10-15 ng/ μ L, en un volumen final de 4 μ L
4. Preparar la mezcla de reacción para secuenciación: Los volúmenes abajo indicados corresponden a una reacción por muestra. 1 μ l de Big Dye Terminator V3.1 1 μ l de Buffer de Secuencia 5X 1 μ l de M13 (-21) Primer 10 μ M (pGEM, o primer de la muestra) 1 μ l H ₂ O
5. Mezclar bien todos los reactivos y dar un pulso en la microfuga. Colocar 4 μ L de la mezcla de reacción en cada pozo de la placa.
6. Adicionar a cada pozo 2 μ L de la dilución de DNA (10-15ng/ μ L), mezclar por pipeteo.
7. Sellar la placa con una cubierta adhesiva no óptica. Colocar la placa en la centrífuga HERMLE Z326K y dar un pulso. Asegurarse de eliminar las burbujas en la mezcla de reacción.
8. Termociclar en el equipo Veriti 96-Well Thermal Cycler con el programa BigDye 25 ciclos de: 96°C por 10 seg. 50°C por 5 seg. 60°C por 4 minutos. Mantener a 4°C
9. b): Purificación de reacciones de PCR (30 min) Las muestras se limpian para eliminar todos los nucleótidos marcados con fluorescencia que no se incorporaron en la reacción de PCR. Existen varios métodos para eliminar estos nucleótidos. Pueden removerse por precipitación con Etanol, por filtración en membrana, perlas magnéticas o por columnas de Sephadex (Columnas Centri-Sep). El método más utilizado es el de Columnas Centri-Sep a) Sacar la placa del refrigerador y ponerla a temperatura ambiente, remover la cubierta adhesiva del fondo y después la de arriba. b) Colocar la placa CENTRI-SEP 96 sobre la placa de lavado y centrifugar a 5,700 rpm durante 2 minutos, verificar la orientación de la placa. Desechar el líquido (200 μ l). c) Transferir 20 μ l de la reacción de secuenciación a cada pozo de la placa. Dispensar la

muestra en el centro de la cama del gel sin hacer contacto en la superficie del gel o en los lados.

d) Colocar la placa de colecta debajo de la placa CENTRI-SEP 96 asegurando que coincidan alfanuméricamente y centrifugar a 5,700 rpm durante 2 minutos. La muestra purificada se irá al fondo de la placa de colecta y se desecha la placa CENTRI-SEP 96.

10. **c): Procesamiento de las muestras en el equipo (2hrs 20 min)** Encender la computadora y posteriormente el secuenciador.
11. Abrir el programa Run 3500 xL Data Collection V3.0.
12. De este paso en adelante es OBLIGATORIO usar bata y guantes para seguridad del usuario.
13. Colocar el polímero POP7 en el equipo y revisar que todos los conductos y la bomba de zafiro se encuentren sin burbujas, en caso de tener alguna de éstas removerlas con el *bubble remove wizard*.
14. Antes de realizar una corrida asegurarse de que el equipo tenga agua y buffer de corrida frescos.
15. Ingresar las muestras al equipo dentro del rubro *Plate Manager* y hacer una platilla nueva (*New*), indicando siempre la orientación del primer, F para Forward y R para Reverse.
16. Asignarle *Results Group* según sea el usuario, también indicar *Instrument Protocol* correspondiente (por ejemplo: Fast Sequence or Standard Sequence); por último asignar el *Analysis Protocol*: 3500POP7BDTV1-KB
17. Preparar la placa para colocarla en el equipo: Poner la placa sobre la base (accesorio del equipo), sellarla con una septa y taparla con un retainer. Es muy importante que todos los orificios de la placa y de los accesorios coincidan perfectamente para evitar daño a los capilares.
18. Colocar la placa en el Stacker del equipo e iniciar la corrida en el rubro *Run Scheduler*.
19. Al terminar la corrida abrir el programa *Sequencing Analysis V5.2*, importar las muestras y analizarlas seleccionando los parámetros BC y PP en cada muestra.
20. Analizar el electroferograma *Electropherogram* y los datos crudos (Raw) de cada muestra, poniendo atención en la asignación de bases, calidad de dicha asignación y fluorescencia de fondo.
21. Cerrar el programa y en cuanto aparezca la leyenda: Save samples? Seleccionar la opción *Yes to all*.
22. Abrir el staker y retirar la placa. Cerrar todas las aplicaciones, y apagar el equipo, la computadora y el regulador de alto voltaje.
23. Retirar el POP7 y almacenarlo a 4°C, en su lugar colocar el *conditioning reagent*.
24. Entrega de resultado a través de correo electrónico conteniendo los archivos con extensión .ab1

III. Documentos de referencia

Documentos	Código (cuando aplique)
Applied Biosystems 3500 xL DNA Genetic Analyzer, Maintenance and Troubleshooting Guide.	Proveedor Applied Biosystems

IV. Registros

Registros	Tiempo de conservación	Responsable de conservarlo	Código de registro o identificación única
Resultados	2 meses	Laboratorio de Biología Molecular	No aplica
Bitácora	1 año	Laboratorio de Biología Molecular	No aplica