



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



SERVICIO DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN

SERVICIO DE SECUENCIACIÓN DE ADN

ÁREA SANGER

Codificación: **G-9.1SESAN-Ed1**

Fecha de emisión: 1/6/2021

GUÍA PARA LA OBTENCIÓN Y ENVÍO DE MUESTRAS AL SERVICIO DE SECUENCIACIÓN DE ADN (ÁREA SANGER)

CONTENIDO

1.	OBJETO Y ALCANCE	2
2.	PUREZA DE LA MUESTRA DE ADN	2
3.	CANTIDAD DE ADN REQUERIDA	2
3.1.	USUARIOS NO PRÓXIMOS AL SERVICIO	3
4.	CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS	4
5.	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ENVÍO	4
6.	HOJA DE SOLICITUD	5
7.	ENVÍO DE MUESTRAS	5
7.1.	Entrega física en el Servicio	5
7.2.	Envío por correo	5
8.	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO DE MUESTRAS	6
9.	MUESTRAS ENSAYADAS Y SUS SECUENCIAS	6
	NOTAS DE CAMBIO	6

Cualquier otra copia de este documento es una **COPIA NO CONTROLADA**

Emitido por:

Manuel Sánchez Hernández
Responsable Técnico (Área Sanger)



1. OBJETO Y ALCANCE

La muestra es un factor clave en la realización de los ensayos y en este sentido el usuario forma parte importante de la calidad de los resultados obtenidos.

Este documento es una herramienta de apoyo para los usuarios del **Servicio de Secuenciación de ADN (Área Sanger)**, que pretende facilitar la información necesaria para la correcta preparación y envío de las muestras, así como informar a dichos usuarios de las condiciones que establece el Servicio para la realización de secuenciación.

2. PUREZA DE LA MUESTRA DE ADN

El ADN ha de estar limpio y libre de contaminantes como sales, ARN o proteínas.

Para **plásmidos**, la utilización de sistemas de purificación mediante columnas suele ser adecuada para su posterior secuenciación. Si se utilizan métodos en que se precipita el ADN con etanol, es muy importante lavar el precipitado con etanol al 70%.

Para los **productos de PCR** es aconsejable separarlos en un gel de agarosa, y la banda de interés debe ser recortada y el ADN extraído (elución, GeneClean, kit con columnas etc.). Otro método sencillo es el de la Exo-SAP siempre que la banda sea única.

Es IMPORTANTE resuspender el ADN siempre en agua estéril

3. CANTIDAD DE ADN REQUERIDA

La cantidad de ADN junto con la pureza de la muestra, son los factores más importantes que afectan a la calidad de los resultados.

Si utilizamos una cantidad insuficiente de ADN, los resultados serán de mala calidad, pues la intensidad o altura de los picos del cromatograma serán muy bajos, pudiéndose enmascarar con el ruido de fondo (picos inespecíficos).

Si la cantidad es excesiva, la secuencia no alargará lo suficiente pues los oligonucleótidos cebadores se terminarán en los primeros ciclos.

Así pues, es necesario una relación equilibrada de ADN molde y cebadores.

Una vez extraído el ADN es **muy importante cuantificarlo** cargando una alícuota en un gel de agarosa junto a un control de concentración conocida. Esto nos ayudará a calcular la concentración de ADN, así como a estimar su calidad, pudiendo ver por ejemplo si está libre de ARN.

La **cantidad de ADN aconsejada** para una reacción de secuencia es la siguiente:

- plasmídico: 200-500 ng: a mayor tamaño se requiere más cantidad de ADN
- cósmidos, BAC y otros plásmidos grandes: 1-2 µg.



- productos de PCR: depende del tamaño de la banda a secuenciar. Para más información véase la tabla a continuación.

La cantidad de oligonucleótido cebador para una reacción de secuencia es de 3.2 pmol.

El volumen total de ADN mas cebador debe ser de 8 µl.

Table 8 Recommended DNA template quantities for cycle sequencing

Template	Cycle Sequencing Chemistry				
	BigDye Terminator v1.1 and v3.1	BigDye XTerminator Purification Kit	dGTP BigDye Terminator v3.0	dRhodamine Terminator	BigDye Primer
PCR product:					
100 to 200 bp	1 to 3 ng	0.5 to 3 ng	1 to 3 ng	1 to 3 ng	2 to 5 ng
200 to 500 bp	3 to 10 ng	1 to 10 ng	3 to 10 ng	3 to 10 ng	5 to 10 ng
500 to 1000 bp	5 to 20 ng	2 to 20 ng	5 to 20 ng	5 to 20 ng	10 to 20 ng
1000 to 2000 bp	10 to 40 ng	5 to 40 ng	10 to 40 ng	10 to 40 ng	20 to 50 ng
>2000 bp	40 to 100 ng	10 to 50 ng	40 to 100 ng	40 to 100 ng	50 to 150 ng
Bisulfite converted genomic DNA-PCR product	3 to 10 ng	3 to 10 ng	not recommended	not recommended	not recommended
Single-stranded DNA	50 to 100 ng	10 to 50 ng	50 to 100 ng	50 to 100 ng	150 to 400 ng
Double-stranded DNA	200 to 500 ng	50 to 300 ng	200 to 500 ng	200 to 500 ng	200 to 800 ng
Cosmid, BAC	0.5 to 1.0 µg	200 to 1,000 ng	0.5 to 1.0 µg	not recommended	0.5 to 1.0 µg
Bacterial genomic DNA	2 to 3 µg	1,000 to 3,000 ng	2 to 3 µg	not recommended	not recommended

Es el utilizado en el servicio USAL

IMPORTANTE: resuspender el ADN y el cebador siempre en agua estéril.

3.1. USUARIOS NO PRÓXIMOS AL SERVICIO

En caso de usuarios que envían muestras por correo se aconseja enviar cantidad suficiente como para realizar tres reacciones de secuenciación por si hubiese que repetir alguna. Se enviaría pues 24 µl con la cantidad de ADN y cebador necesario. También es posible enviar la muestra liofilizada.



4. CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

No se requieren condiciones específicas de conservación para las muestras.

En caso de que no sea posible la llegada de la muestra al Servicio en un plazo inferior a 48 horas tras su preparación, para conservar en las mejores condiciones el ADN, se recomienda congelar.

5. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ENVÍO

Como norma general las muestras deben llegar al Servicio de Secuenciación siguiendo las siguientes pautas:

- Se utilizarán tubos eppendorf de 1.5 ml.
- El nombre de la muestra debe rotularse en la tapa del tubo y debe ser de forma sencilla, sin muchas letras (preferiblemente no más de 6 caracteres) y evitar rotuladores que se borren fácilmente.
- En cada eppendorf con muestra debe ir el ADN molde y el cebador necesarios para una reacción de secuencia, siempre resuspendidos en agua estéril y en un volumen fijo de 8 μ l.
- El servicio dispone de algunos cebadores los cuales pueden ser añadidos por el propio Servicio a las muestras de ADN previa petición por parte del usuario sin coste alguno. Los cebadores de los que se disponen son:
 - o Universal (M13 forward): 5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3'
 - o Reverso (M13 reverse): 5' AAC AGC TAT GAC CAT G 3'
 - o Oligo T7: 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'
 - o Oligo SP6: 5' TAT TTA GGT GAC ACT ATA G 3'
 - o Oligo T3: 5' ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA 3'

Cuando sea el Servicio el que añada los cebadores, en el eppendorf de la muestra sólo se entregará el ADN molde necesario en un volumen fijo de 5 μ l en agua.

Muestras en placa: deben dejarse libre dos huecos para añadir los controles, en la primera y última posición.



6. HOJA DE SOLICITUD

Las muestras deberán llegar acompañadas de la **hoja de solicitud**.

Esta hoja está disponible en la Web y también físicamente en el propio Servicio.

La información mínima a incluir en esta hoja es:

- Datos del solicitante (nombre, apellidos y ORGANIZACIÓN con cargo a la cual solicita los trabajos)
En caso de ser nuevo cliente el Servicio solicitará datos adicionales para su registro.
- Número total de muestras entregadas.
- Identificación de las muestras (si son correlativas es suficiente indicar primera y última identificación).
- Si aplica, cebador a añadir de los que dispone el Servicio.
- Indicación sobre si la longitud de la secuencia que requiere es mayor o menor de 550nt.

7. ENVÍO DE MUESTRAS

7.1. Entrega física en el Servicio

Los nuevos usuarios deben contactar primero con el Servicio para su recepción.

En otros casos se pueden entregar directamente.

- La hoja de solicitud y las muestras se dejarán juntas (muestras sobre la hoja), en el área de recepción del laboratorio.
- El horario de recepción de muestras es de lunes a viernes de 9 a 14 horas.
- Para entrega de muestras en otros horarios, se ruega concertar cita previa mediante llamada de teléfono, al menos con 24 horas de antelación.

7.2. Envío por correo

También podrán enviarse las muestras por correo ordinario o urgente. En este caso debe tenerse en cuenta la información incluida en el apartado 2 para muestras de usuarios no próximos al Servicio.

Las secuencias se enviarán a:

SERVICIO DE SECUENCIACIÓN DE ADN

Edificio Departamental de Biología

Campus Miguel de Unamuno.

Plaza Doctores de la Reina s/n

37007 Salamanca



8. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO DE MUESTRAS

Las muestras serán inspeccionadas a su llegada para comprobar su adecuación a los requisitos especificados en este documento.

Podrán ser rechazadas cuando no se haya conservado la integridad de las mismas, cuando no estén identificadas con claridad, o cuando se dé cualquier posible circunstancia que imposibilite la correcta realización de la secuenciación.

En otros casos, ante la falta de cumplimiento de alguno de los requisitos acordados, el personal del Servicio entrará en contacto con el usuario para corregir la deficiencia.

Cuando la calidad de la muestra no sea la adecuada se comunicará al usuario y se informará de en qué medida estas incidencias han podido afectar al resultado final.

Las muestras se procesarán por orden de recepción; la planificación del trabajo se realizará una vez que las muestras se registren en el Servicio, tras su recepción.

9. MUESTRAS ENSAYADAS Y SUS SECUENCIAS

Las muestras serán eliminadas según el procedimiento de gestión de residuos de la Universidad de Salamanca. Solamente se devolverán al cliente si hay excedente y éste lo indica expresamente en la hoja de solicitud.

El Servicio se compromete a la conservación de las secuencias durante dos meses.

NOTAS DE CAMBIO

<u>Versión</u>	<u>Cambios</u>
1	Primera edición del documento