



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



SERVICIO DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN

SERVICIO DE SECUENCIACIÓN DE ADN
ÁREA MASIVA

Codificación: **G-9.2SEMAS-Ed1**

Fecha de emisión: 4/6/2021

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

CONTENIDO

1.	OBJETO Y ALCANCE	2
2.	CONDICIONES DE LAS MUESTRAS PARA CADA SERVICIO	2
2.1.	Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR	2
2.2.	Análisis de genotipado mediante PCR	2
2.3.	Generación de cDNA y preamplificación para ensayos de expresión génica	2
2.4.	Generación de cDNA	2
2.5.	Generación de bibliotecas para secuenciación masiva	3
2.5.1.	Bibliotecas de ADN	3
2.5.2.	Bibliotecas de ARN	3
2.6.	PCR para secuenciación Sanger	3
2.7.	Purificación de ADN a partir de muestra biológica	3
2.8.	Cuantificación de ADN mediante fluorimetría (Qubit)	3
2.9.	Aislamiento y purificación de exosomas mediante columnas de exclusión.	3
2.10.	PCR digital	4
3.	USUARIOS NO PRÓXIMOS AL SERVICIO	4
4.	IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA Y PREPARACIÓN PARA EL ENVÍO	4
5.	HOJA DE SOLICITUD	4
6.	ENVÍO DE MUESTRAS	5
6.1.	Entrega física en el Servicio	5
6.2.	Envío por correo	5
7.	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO DE MUESTRAS	5
8.	ELIMINACIÓN DE MUESTRAS ENSAYADAS	6
	NOTAS DE CAMBIO	6

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

Emitido por:

María Jara Acevedo
Responsable Técnico (Área Masiva)



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 Masiva)**, que pretende facilitar la información necesaria para la correcta preparación y envío de las muestras, así como informar a dichos usuarios de otras condiciones necesarias para los servicios prestados.

2. CONDICIONES DE LAS MUESTRAS PARA CADA SERVICIO

2.1. Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR

Se debe recibir muestra de cDNA y ha de estar limpio y libre de contaminantes como sales, ADN o proteínas. Se recomienda una síntesis de cDNA a partir de 1ug de RNA para tener una cantidad suficiente de cDNA que permita el análisis.

El cliente debe aportar un control positivo para la valoración de la realización del ensayo.

2.2. Análisis de genotipado mediante PCR

Se debe recibir muestra de DNA y ha de estar limpio y libre de contaminantes como sales, ARN o proteínas. Se recomienda una concentración superior a 100ng/uL

El cliente debe aportar un control positivo para la valoración de la realización del ensayo.

2.3. Generación de cDNA y preamplificación para ensayos de expresión génica

Se debe recibir muestra de RNA y ha de estar limpio y libre de contaminantes como sales, ARN o proteínas. La concentración de ARN requerida debe ser superior a 10ng/uL. Es obligatorio informar del origen biológico de la muestra.

2.4. Generación de cDNA

Se debe recibir muestra de RNA y ha de estar limpio y libre de contaminantes como sales, ARN o proteínas. La concentración de ARN requerida debe ser superior a 50ng/uL. Es obligatorio informar del origen biológico de la muestra.

Si no se llega a la concentración requerida de forma general se debe notificar para que se pueda evaluar la posibilidad de realizar el servicio y/o adaptar el protocolo a la muestra en cuestión.



2.5. Generación de bibliotecas para secuenciación masiva

2.5.1. Bibliotecas de ADN

Se debe recibir muestra de DNA y ha de estar limpio y libre de contaminantes como sales, ARN o proteínas. Se debe informar de la concentración del ADN recibido para poder realizar las adaptaciones necesarias en la oferta del servicio.

2.5.2. Bibliotecas de ARN

Se debe recibir muestra de RNA y ha de estar limpio y libre de contaminantes como sales, ADN o proteínas. Se debe informar de la concentración del ARN recibido para poder realizar las adaptaciones necesarias en la oferta del servicio, así como de la condición del ARN (ARN mensajero, microRNA, ARN total).

2.6. PCR para secuenciación Sanger

Se debe recibir muestra de DNA y ha de estar limpio y libre de contaminantes como sales, ARN o proteínas. Se debe informar de la concentración del ADN recibido para poder realizar las adaptaciones necesarias en la oferta del servicio.

2.7. Purificación de ADN a partir de muestra biológica

Se debe recibir la muestra debidamente preservada/conservada de acuerdo a la naturaleza de la misma (congelación, refrigeración, liofilización, etc...). Si existen dudas acerca de los métodos de conservación de las muestras contactar con el Servicio.

Se debe informar del origen biológico de la misma y de la posibilidad de ser una muestra infecciosa.

Si la purificación de la muestra requiere una inactivación previa de la misma o bien la manipulación en un laboratorio de riesgo biológico P3, se podrá solicitar el servicio del mismo al Banco Nacional de ADN, bien desde el Servicio o bien el cliente directamente.

2.8. Cuantificación de ADN mediante fluorimetría (Qubit)

Se debe recibir muestra de DNA y ha de estar limpio y libre de contaminantes como sales, ARN o proteínas.

2.9. Aislamiento y purificación de exosomas mediante columnas de exclusión.

Se debe recibir la muestra debidamente preservada/conservada de acuerdo a la naturaleza de la misma (congelación, refrigeración, liofilización, etc...). Si existen dudas acerca de los métodos de conservación de las muestras contactar con el Servicio.

Se debe informar del origen biológico de la misma y de la posibilidad de ser una muestra infecciosa.



2.10. PCR digital

Esta técnica se puede realizar tanto en ADN como en cDNA. En ambos casos se debe recibir muestra de ADN o cDNA y ha de estar limpio y libre de contaminantes como sales, ácidos nucleicos sin interés para el ensayo o proteínas.

El cliente debe aportar un control positivo para la valoración de la realización del ensayo.

En estas muestras se procederá a una cuantificación previa al análisis para establecer la cantidad necesaria para el ensayo. Si fuera necesario, se requeriría más muestra al cliente.

Es IMPORTANTE resuspender el DNA y el cDNA siempre en agua estéril o TrisHCl 10mM

3. USUARIOS NO PRÓXIMOS AL SERVICIO

En caso de usuarios que envían muestras por correo se aconseja enviar cantidad suficiente como mínimo para realizar el ensayo solicitado dos veces, por si hubiera que repetir algún estudio.

Se recomienda enviar por mensajería con un servicio máximo de 24h.

En muestras de ARN, plasma, etc... cuya conservación es la congelación, el envío debe realizarse congelado con nieve carbónica. En otros tipos de muestra cuya conservación será a temperatura ambiente o refrigerado, el envío debe realizarse en las mismas condiciones de la conservación.

4. IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA Y PREPARACIÓN 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 o bien placa de 0.2ml de 96 pocillos
- 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. Si el envío fuera en placa, debe acompañarse de una hoja (tipo Excel o similar) en el que sea fácilmente identificable y trazable la posición de cada una de las muestras en la plantilla 1-12/A-H.

5. 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)
- Tipo de estudio que se solicita
- Condiciones de las muestras enviadas (cantidad, tipo de muestra, etc...)

6. ENVÍO DE MUESTRAS

6.1. Entrega física en el Servicio

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

En otros casos se pueden entregar directamente.

6.2. 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 3 para muestras de usuarios no próximos al Servicio

Las secuencias se enviarán a:

SERVICIO DE SECUENCIACIÓN DE ADN

Edificio I+D+i
C/ Espejo, 2
37007 Salamanca

7. 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 del servicio.

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.



8. ELIMINACIÓN DE MUESTRAS ENSAYADAS

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.

NOTAS DE CAMBIO

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