

## Recomendaciones para los usuarios del servicio de secuenciación

Para brindar un mejor servicio de secuenciación, sugerimos las siguientes recomendaciones:

### A. Preparación de la muestra:

1. El éxito de la reacción de secuenciación está fuertemente afectado por la calidad de la muestra. Para los plásmidos, recomendamos el uso de un kit de miniprep o un protocolo confiable para asegurar una muestra limpia y bien concentrada.
2. **Muestras de PCR:** La reacción de secuenciación está afectada por la presencia de nucleótidos libres y oligos que sobran de la PCR. El problema es más severo con reacciones de tiempo real que contienen nucleótidos fluorescentes. Se recomienda purificar la banda para aumentar la posibilidad de resultados útiles de la secuenciación. Hemos visto resultados mejores con productos de amplificación > 100 pb.
3. Favor de marcar sus muestras con nombres sencillos y distintos y oligos para evitar confusión de las reacciones o los resultados. Es importante marcar claramente los tubos con nombres legibles.
4. Los alícuotas de las muestras y los oligos para secuenciar tienen que colocarse en la gradilla amarilla marcada "secuencias" en el congelador (-20°C) de la Unidad.
5. En la Unidad medimos la concentración y la calidad de cada muestra en el Nanodrop, usando +/- 2 microlitros de la muestra. Si desean, los usuarios pueden medir sus propias muestras y entregar los resultados a la Unidad.
6. Después de la preparación de las reacciones, las muestras de ADN y oligos quedan en el congelador una semana. Los usuarios que deseen recuperar sus muestras pueden pasar a recogerlas antes.

### B. Preparación de la solicitud

1. Cada renglón de la solicitud representa una reacción con un templado y un oligonucleótido. Si quieres usar más que un oligo con una muestra de ADN, es necesario llenar un renglón para cada oligo.
2. Hay dos opciones para cada reacción, capilar corto y capilar largo. La máquina con capilar corto puede generar 450-500 bases de secuencia y el capilar largo genera 700-800 bases, dependiendo de la calidad de la muestra y la reacción. Cada reacción requiere una hora para secuenciar con capilar corto y tres para capilar largo. Considerar si es necesario pedir análisis con capilar largo; p. ej. es típico que los productos de PCR son menores de 500 pb. La solicitud de muchas reacciones con capilar largo puede causar una demora de un día o más para entregar los resultados.
3. Cuando el usuario solamente quiere confirmar que un producto de PCR es lo deseado, usualmente no es necesario secuenciar el producto de los dos extremos, que genera datos redundantes con un costo mayor.

### C. Interpretación de los resultados

1. Se recomienda a los usuarios verificar el cromatograma para revisar la calidad de la secuencia. Los programas de análisis de cromatogramas Chromas (para PC) y 4Peaks (para Mac) están disponibles sin costo a través del internet.
2. La decisión del programa a asignar un base a un pico no es perfecta. Además, a veces es posible determinar un base donde el programa ha asignado un N. El análisis de los picos con cuidado ayuda a detectar y resolver problemas posibles.
3. Cada juego de reacciones incluye una reacción de control. El control indique si hay un problema técnico con los reactivos o el secuenciador. Otras causas posibles de secuencias no claras incluyen:
  - a. Ningunos picos determinables
    - i. Ausencia de ADN
    - ii. Sitio de reconocimiento para el oligo ausente o interrumpido en el templado
  - b. Base alto de ruido
    - i. Contaminación de ADN
    - ii. Producto de PCR no limpiado
  - c. Picos múltiples en muchas posiciones
    - i. Presencia de dos templados o dos sitios de reconocimiento del oligo en la muestra

El servicio de secuenciación de la Unidad de Proteogenómica existe no solamente para llevar a cabo las secuencias de los usuarios, pero también para ofrecer análisis de los resultados. Es nuestro deseo a mejorar constantemente el servicio que brindamos. Siempre invitamos un intercambio de información con los usuarios para resolver dificultades y encontrar maneras de obtener resultados mejores.