

## **Guía para la presentación de muestras para secuenciación de genomas a través del servicio de secuenciación de genomas individuales de Macrogen.**

Macrogen ha dedicado más de diez años a la secuenciación del genoma utilizando nuevas técnicas que emplean tecnología avanzada, y a proporcionar resultados de forma rápida y satisfactoria a nuestros clientes. En Macrogen utilizamos la secuenciación a gran escala desarrollada por “Applied Biosystems”, concretamente el modelo “3730XL”. No solo secuenciamos todo tipo de ADNs (plásmido, cosmido, vector fágico, Bacterias), también secuenciamos productos de PCR. Macrogen proporciona un servicio de secuenciación de ADN de alta calidad para académicos, gobiernos, institutos de investigación y empresas privadas, a un precio realmente competitivo. Por favor, pongase en contacto con nosotros para cualquier proyecto o investigación.

Para solicitar un servicio de secuenciación, por favor, entre en nuestra página web, acceda a nuestro sistema y cree su cuenta de usuario a través del siguiente link:

<http://dna.macrogen.com/eng>

### **Contactos Útiles**

**Información sobre la secuenciación de sus muestras:** [info@macrogen.com](mailto:info@macrogen.com)

**Información sobre el pago:** [payment@macrogen.com](mailto:payment@macrogen.com)

### **Technical support**

**Macrogen-Korea :** [support@macrogen.com](mailto:support@macrogen.com)

**Macrogen-Europe :** [support-europe@macrogen.com](mailto:support-europe@macrogen.com)

Ayuda y consejos técnicos

Dirección de envío (para los servicios realizados en Macrogen Inc.)

**Macrogen Inc.**

**908 World Meridian Venture Center,**

**#60-24, Gasan-dong, Geumchun-gu,**

**Seoul 153-781, Korea**

**Tel: +82-(0)2-2113-7790**

**Fax: +82-(0)2-2113-7919**

E-mail: [info@macrogen.com](mailto:info@macrogen.com)

Dirección de envío (para el Servicio “Express” realizado en Macrogen Europe, exclusivo para clientes Europeos)

**Macrogen Europa**

**Meibergdreef 31**

**1105 AZ Amsterdam**

**the Netherlands**

**Tel: +31-20-333-7563**

E-mail: [europe@macrogen.com](mailto:europe@macrogen.com)

Formato de la muestra	Requisitos de la muestra	Observaciones
Plásmido	* 100 ng/μl	
	* Volumen mínimo: 20μl	Para la resecuenciación se requiere un mínimo de 5 μl
16S	* Placa de Agarosa/Stock en Glicerol	N/A
	* ADNg: 30-50ng * Volumen mínimo: 20μl	
Producto PCR(purificado)	* 50 ng/μl	
	* Volumen mínimo: 20μl	Para la resecuenciación se requiere un mínimo de 5 μl
Producto PCR(No purificado)	* 100 ng/μl	N/A
	* Volumen mínimo: 20μl	
Secuenciación complicada	* 100 ng/μl	N/A
	* Volumen mínimo: 40μl	
Primer Walking	* El tamaño de Inserto, su tamaño al máximo 4kb	Secuenciación de cadena simple: 1μg/1kb de inserto -Si el tamaño del inserto es mayor a 4kb, es necesario enviar el clon en un cultivo estable en Agarosa

Es posible enviarnos cultivos del clon seleccionado de E.Coli en placa o glycerol, Plásmidos de ADN purificado o sin purificar, y productos de PCR purificados o sin purificar. Molde y primers deben ser proporcionados en agua DI o en Tampón Tris 18mM, no en Tampón TE.

**a) Muestras para tubo individual:**

- Stock General glycerol/Agar-stab/Cultivo en Placa de Agar culture a temperatura ambiente.
- Se recomienda utilizar tubos para microcentrifuga de 1.5μl en forma seca (liofilizada) o en solución (TE libre de nucleasas o en Agua destilada) a temperatura ambiente.
- Resecuenciación gratuita incluida

**b) Placa de 96 pocillos:**

- Recomendamos tapas en tiras de 8 pocillos en forma seca o en solución (TE libre de nucleasas o en Agua de stilada) a temperatura ambiente.

**Por favor, envíe sus muestras de forma correcta y segura, cerrando correctamente las tiras de tapas, como puede observar en la siguiente imagen.**



**¡La tira de tapa está bien sellada!**

**Para prevenir cualquier daño físico, por favor, rotule en los laterales de la placa.**



**¡Rotule en los laterales!**

**Por favor, cierre firmemente para prevenir cualquier daño durante el envío, como la evaporación o contaminación de sus muestras durante.**



**¡Sus muestras están bien preparadas y llegarán perfectamente a su destino!**



Cerrar incorrectamente puede causar contaminación entre pocillos, y con ello, resultados insatisfactorios.

- La resecuenciación no está incluida, y se cobrará a parte.

-Por favor, prepare las muestras para prevenir cualquier diferencia de la concentración entre pocillos o diferencias de tamaño para garantizar resultados de calidad.

## Guía de preparación del ADN Molde

### 1) Preparación del molde

Para el éxito de la secuenciación automática es necesario contar con un molde purificado correctamente y a una concentración adecuada.

#### i) Plásmido de ADN.

Preparación:

Existen diversas herramientas comerciales. Por favor, suministre el ADN en agua desionizada. No utilice TE para diluir o resuspender el ADN, porque el EDTA impide el ciclo de secuenciación. Les recomendamos que usen el kit “Qiagen miniprep/midiprep” porque con ambos se obtiene el plásmido en condiciones idóneas para la realización de la secuenciación. Por favor proporcione ADN en una concentración aproximada a los 100ng/μ, y una cantidad de al menos de 2 μg. Una cantidad extra de ADN garantiza que tendremos suficiente cantidad de las muestras para una posible resecuenciación, en caso de que fuese necesaria. Si la concentración de las muestras no se encuentra dentro del rango o si no se nos proporciona suficiente molde para hacer sus reacciones, los experimentos se verán retrasados.

## ii) Productos de PCR

### Preparación

El ADN tiene que encontrarse libre de factores que lo contaminen como los primers no utilizados o dNTPs. El molde de PCR que no se somete a algún tipo de purificación post PCR no es adecuado para hacer la secuenciación, por lo que nos proporcionarán resultados incorrectos o poco precisos.

Es altamente recomendable que su producto de PCR sea sometido previamente al envío a una electroforesis en gel, para confirmar que se encuentra el producto específico con el tamaño correcto. Puede utilizarse el kit de extracción “Qiagen Gel” o otra herramienta de limpieza del producto de PCR para eliminar todos los elementos perjudiciales presentes en su ADN molde.

## 2) Cepas de acogidas

Las cepas de acogidas pueden afectar a la calidad del ADN molde, incluso utilizando los mejores métodos. La cepa de acogida DH5-  $\alpha$  suele garantizar resultados buenos. HB101, XL-1 Blue, JM109 y MV1190 usualmente dan buenos resultados, pero JM101 suele dar problemas.

El medio de cultivo para el crecimiento, también puede afectar al rendimiento de los resultados, aunque LB suele proporcionar resultados satisfactorios.

## 3) Determinación de la concentración de ADN

El/La investigador/a puede trabajar con concentraciones de ADN muy distintas, pero si la cantidad de ADN es muy baja, la calidad de los resultados puede verse afectada de forma significativa. Usar la absorbancia UV para determinar la concentración del ADN suele proporcionar resultados imprecisos. La mejor forma de alícuotar ADN, es correr una alícuota de la muestra en un “minigel”, y comparar la intensidad de banda con el patrón de tamaño conocido. También existen patrones de tamaño comerciales para este propósito.

Para cada reacción, por favor proporcione 10ng/100 bases, y al menos de 20 ng/ $\mu$ l de solución en agua desionizada. Por favor, envíenos por lo menos 10ul para cualquier resecuenciación necesaria.

**El control del tamaño de banda mediante electroforesis es preferible a las medidas proporcionadas con un espectrofotómetro..**

## 4) Preparación de los primers

### Consideraciones para los Primers:

-Los primers deben ser proporcionados en agua DI a la concentración requerida(vea los fotos de arriba)

- purificación alta

- concentración adecuada

- No existencia de sitios de unión secundarios primer-molde.

- No desiguales

- .- Longitud de 18-25 bases

- Proporción GC% entre 40% y 60%.

- Una Tm(temperature de punto de fusion) entre 55°Cy 60°C

- No curva significativa(>3bp)

- Libre de sal, EDTA, u otros causantes de contaminación

Por favor proporcione los primers a una concentración de (10 pmole/ $\mu$ l =60 ng/ $\mu$ l)en agua desionizada, a un volumen superior a 20  $\mu$ l..

Los Primers proporcionados por los clientes deben estar desaladoso purificados. Los Primers crudos generalmente no funciona bien para la secuenciación. Tenemos en nuestro laboratorio una colección de primers universales disponibles que enumeramos a continuación y que pueden solicitar a Macrogen sin coste adicional.

Primer Name	Sequence(5'->3')	Base
Bluescript SK	CGCTCTAGAACTAGTGGATC	20
EBV-RP	GTGGTTTGTCCAAACTCATC	20
KAN2-FP	ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC	25
KAN2-RP	GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG	25
M13-FP	TGTA AAAACGACGGCCAGT	18
pBacPAC-RP	GTCTGTAAATCAACAACGC	19
pBAD-FP	ATGCCATAGCATTTTTATCC	20
pDONOR-FP	TAACGCTAGCATGGATCTC	19
pEGFP_N	CCGTCCAGCTCGACCAG	17
pEGFP-FP	TTAGTGAACCGTCAGATC	19
pEGFP-RP	AACAGCTCCTCGCCCTTG	18
pESP-RP	TCCAAAAGAAGTCGAGTGG	19
pET-24a	GGGTTATGCTAGTTATTGCTCAG	23
pET-RP	CTAGTTATTGCTCAGCGG	18
pMalE	TCAGACTGTTCGATGAAGC	18
pREP-fwd	GCTCGATAACAATAAACGCC	19
35S-A	AAGGGTCTTGCGAAGGATAG	20
35S-B	AGTGGAAAAGGAAGGTGGCT	20
AD Reverse	AGATGGTGCACGATGCACAG	20
CYC1 Reverse	GCGTGAATGTAAGCGTGAC	19
DsRed1-C	AGCTGGACATCACCTCCCACAACG	24
DsRed1-N	GTA CTGGA ACTGGGGGACAG	21
EGFP-C	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG	22
EGFP-N	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG	22
GAL1 Forward	AATATACCTCTATACTTTAACGTC	24
U-19mer Primer	GTTTTCCAGTCACGACGT	19
T7EEV	ATGTCGTAATAACCCCGCCCCG	22

Bluescript KS	TCGAGGTCGACGGTATC	17
pFastBac Forward	GGATTATTCATACCGTCCCA	20
pFastBac Reverse	CAAATGTGGTATGGCTGATT	20
AOX1 Forward	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	21
AOX1 Reverse	GCAAATGGCATTCTGACATCC	21
a-Factor	TACTATTGCCAGCATTGCTGC	21
STag 18mer Primer	GAACGCCAGCACATGGAC	18
MT Forward	CATCTCAGTGCAACTAAA	18
QE Promoter	CCGAAAAGTGCCACCTG	17
pRH Forward	CTGTCTCTATACTCCCCTATAG	22
pRH Reverse	CAAAATTCAATAGTTACTATCGC	23
SV40-pArev	CCTCTACAAATGTGGTATGG	20
SV40-Promoter	GCCCCTAACTCCGCCCATCC	20
pTrcHis Forward	GAGGTATATATTAATGTATCG	21
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	20
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	20
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20
pJET1.2R	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	24
T7	AATACGACTCACTATAG	17
T7terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	19
T7promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	20
T3	ATTAACCCTCACTAAAG	17
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	18
M13F-pUC(-40)	GTTTTCCCAGTCACGAC	17
M13R-pUC(-40)	CAGGAAACAGCTATGAC	17
M13F(-20)	GTA AACGACGGCCAGT	17
M13R(-20)	GCGGATAACAATTCACACAGG	22
pGEX5	GGCAAGCCACGTTTGGTG	18
pGEX3	GGAGCTGCATGTGTCAGAGG	20
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	20
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	22
518F	CCAGCAGCCGCGTAATACG	20
800R	TACCAGGTATCTAATCC	18
BGH-R	TAGAAGGCACAGTCGAGG	18
CMV-F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	21
RVprimer3	CTAGCAAATAGGCTGTCCC	20
RVprimer4	GACGATAGTCATGCCCCGCG	20

GLprimer1	TGTATCTTATGGTACTGTA ACTG	23
GLprimer2	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA	23
pQE-F	CCCGAAAAGTGCCACCTG	18
pQE-R	GTTCTGAGGTCATTACTGG	19
Gal4AD	TACCACTACAATGGATG	17
pBAD-F	ATGCCATAGCATTTTTATCCA	21
pBAD-R	GATTTAATCTGTATCAGG	18
EGFP-CF	AGCACCCAGTCCGCCCTGAGC	21
EGFP-CR	CGTCCATGCCGAGAGTG	17
EGFP-NR	CGTCGCCGTCCAGCTC	16