





**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DE LA  
UNIDAD DE GENOTIPIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN.  
Plataforma Affymetrix**



**Marzo de 2008**

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	 <b>SALUD</b> SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 2 de 56

## INDICE

<p>I. Introducción</p> <p>II. Objetivo General del Manual</p> <p>III. Marco Jurídico</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Propósito</li> <li>2. Alcance</li> <li>3. Políticas de operación, normas y lineamientos</li> <li>4. Descripción de los procedimientos <ul style="list-style-type: none"> <li>Genotipificación GeneChip 500K</li> <li>Genotipificación GeneChip SNP 6.0</li> <li>Análisis de Expresión Eucariotes</li> <li>Análisis de Expresión Procriotes</li> </ul> </li> <li>5. Diagrama</li> <li>6. Documentos de referencia</li> <li>7. Registros</li> <li>8. Glosario</li> <li>9. Cambios de versión</li> <li>10. Anexos</li> </ol>	
--	--

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
<b>Nombre</b>			
<b>Firma</b>			
<b>Fecha</b>			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>  SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 3 de 56



## I. Introducción

La Unidad de Genotipificación y Análisis de Expresión cuenta con la plataforma tecnológica de microarreglos de Affymetrix, compañía líder en el desarrollo de sistemas para el análisis genómico a base de microarreglos de alta densidad. La Unidad de Genotipificación y Análisis de Expresión Affymetrix del Instituto Nacional de Medicina Genómica, cuenta con la infraestructura necesaria para procesar microarreglos de genotipificación (análisis de DNA) y análisis de expresión (análisis de DNA) con los más altos estándares de calidad al contar con personal altamente calificado y la infraestructura más completa para el procesamiento de esta tecnología de punta.

La Unidad de Genotipificación y Análisis de Expresión cuenta actualmente con el siguiente equipo:

- 2 Escáners modelo 3000 7G con autoloader y estación de trabajo (Affymetrix). Este equipo está diseñado y actualizado para leer todos los tamaños de celda de los diversos microarreglos de Affymetrix El autoloader permite cargar 48 arreglos por corrida lo que permite mantener la unidad trabajando día y noche.
- 2 Hornos de hibridación modelo 640 (Affymetrix) horno con capacidad para 64 microarreglos con control de temperatura y rotación continua que permite la mezcla homogénea de la muestra durante el proceso de hibridación en el microarreglo. Estos equipos tienen capacidad para hibridar 48 microarreglos por día, es decir la Unidad tiene la capacidad de hibridar 96 microarreglos diarios.
- 6 estaciones de fluidos FS\_450 (Affymetrix). Equipo para realizar el proceso de tinción y lavado de los microarreglos. Después de la hibridación, los microarreglos se colocan en la estación de fluidos donde serán teñidos con biotina-ficoeritrina, lavados y preparados para su posterior lectura en el escaner. Cada estación de fluidos tiene capacidad para procesar 4 chips a la vez. El equipo tiene capacidad de realizar 4 ciclos de lavado en un periodo de 8 horas, lo que implica que se pueden lavar y teñir 96 microarreglos por día.
- 6 Termocicladores de 96 pozos, GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). El termociclador GeneAmp® PCR System 9700 está diseñado específicamente para la amplificación de ácidos nucleicos Esta hecho de una base modular y de bloques intercambiables que soportan tanto placas de 96 muestras como tubos para PCR de 0.2 mL.
  - 2100 Bionalayzer (Agilent): El bioanalizer de Agilent se fundamenta en la tecnología de microfluidos y se considera actualmente el método estándar para el control de calidad de las muestras de RNA. El sistema ofrece una ventaja sobre la electroforesis tradicional en términos de rapidez, automatización, cantidad de muestra utilizada y calidad de los datos obtenidos. Para la realización de experimentos de análisis de expresión, la integridad del RNA es esencial para resultados confiables. Los chips de RNA de Agilent permite caracterizar hasta 11 muestras de RNA (mensajero o total) en 30 minutos con una sensibilidad única y con un mínimo de muestra. El reporte de la calidad de la muestra

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	 <b>SALUD</b> SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 4 de 56

- 2 Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer. Espectrofotómetro basado en la tecnología de retención de muestra. Realiza análisis de absorbancia en el espectro completo de UV-Visible (220-750nm) y requiere solo 1 ml de muestra. El instrumento tiene un amplio rango dinámico ( 2-3700 ng/ul de DNA de doble cadena) y la muestra se mide directamente sin necesidad de equipo o consumibles adicionales. Tarda aproximadamente 10 segundos por medición lo que lo hace muy eficiente y preciso



1 Multiskan

Así mismo, el personal cuenta con el entrenamiento apropiado para procesar las muestras de acuerdo a los estándares de Affymetrix.

La Unidad cuenta con:

- Un responsable de la Unidad (Investigador asociado A)
- 3 técnicos de laboratorio

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
<b>Nombre</b>			
<b>Firma</b>			
<b>Fecha</b>			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>  SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 5 de 56

## II. Objetivo General del Manual

El Objetivo del manual es contar con un documento en el que se describan las actividades propias de la Unidad de Genotipificación y Análisis de Expresión Affymetrix que sirvan de guía o referencia al personal que labora en dicha área, y como inducción al personal del Instituto, estableciendo para tal efecto las políticas, mecanismos y lineamientos necesarios para que la operación se realice en estricto apego a la normatividad en la materia y coadyuvando al cumplimiento de los objetivos institucionales.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			



**III. MARCO JURÍDICO**

**Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos**

D.O.F. 05-II-1917 y sus reformas

**Leyes**

Ley Orgánica de la Administración Pública Federal.

D.O.F. 29-XII-1976 y sus reformas.

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.

D. O. F. 26-V-2000.

Últimas reformas: 20-VII-2004 y 31-V-2005.

Ley de Planeación.

D. O. F. 05-I-1983 y sus reformas.

Ley General de Salud.

D. O. F. 07-II-1984 y sus reformas.

Ley General de Bienes Nacionales.

D. O. F. 20-V-2004.

Ley General de Desarrollo Social.

D.O.F. 20-I-2004.

Ley General sobre Metrología y Normalización.

D. O. F. 01-VII-1992 y sus reformas.

Ley Federal del Derecho de Autor.

D. O. F. 24-XII-1996 y sus reformas.

Ley Federal de Entidades Paraestatales.

D.O.F. 14-V-1986 y sus reformas.

Ley Federal de Procedimiento Administrativo.



D. O. F. 04-VIII-1994 y sus reformas.

Ley Federal para la Administración y Enajenación de Bienes del Sector Público.

D. O. F. 19-XII-2002.

**CONTROL DE EMISIÓN**

	<b>Elaboró :</b>	<b>Revisó :</b>	<b>Autorizó:</b>
<b>Nombre</b>			
<b>Firma</b>			
<b>Fecha</b>			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>		<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	SECRETARÍA DE SALUD		Rev.
				Hoja: 7 de 56

Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública Gubernamental.  
D. O. F. 11-VI-2002 y sus reformas.

Ley Federal de Responsabilidades Administrativas de los Servidores Públicos.  
D. O. F. 13-III-2002 y sus reformas.

Ley Federal de los Trabajadores al Servicio del Estado, Reglamentaria del Apartado "B" del Artículo 123 Constitucional.  
D.O.F. 28-XII-1963 y sus reformas.

Ley Federal del Trabajo.  
D. O. F. 01-IV-1970 y sus reformas.

Ley Federal de Responsabilidad Patrimonial del Estado.  
D. O. F 30-XII-2005.

Ley de Ciencia y Tecnología.  
D. O. F. 5-VI-2002 y sus reformas.

Ley del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado.  
D. O. F. 27-XII-1983 y sus reformas.

Ley Reglamentaria del artículo 5º Constitucional, relativo al Ejercicio de las Profesiones en el Distrito Federal.  
D.O.F. 26-V-1945 y sus reformas.

Ley de Fiscalización Superior de la Federación.  
D. O. F. 29-XII-2000 y sus reformas.

Ley de Presupuesto, Contabilidad y Gasto Público Federal.  
D.O.F. 31-XII-1976 y sus reformas.



Ley de Ingresos de la Federación para el Ejercicio Fiscal de 2004.  
D. O. F. 31-XII-2003; 24-XI-2004.

Presupuesto de Egresos de la Federación para el Ejercicio Fiscal 2005.  
D.O.F. 20-XII-2004.

Ley de Premios, Estímulos y Recompensas Civiles.  
D.O.F. 31-XII-1975 y sus reformas.

Ley de los Sistemas de Ahorro para el Retiro.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
<b>Nombre</b>			
<b>Firma</b>			
<b>Fecha</b>			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	 <b>SALUD</b> SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 8 de 56

D. O. F. 23-V-1996 y sus reformas.

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.

D.O.F. 04-I-2000 y sus reformas.

Ley de Obras Públicas y Servicios Relacionados con las Mismas.

D.O.F. 04-I-2000 y sus reformas.

Ley del Impuesto Sobre la Renta.

D. O. F. 01-I-2002.

Ley de la Propiedad Industrial.

D.O.F. 27-VI-1991 y sus reformas.

### Códigos

Código Civil Federal.

D. O. F. 28-VIII-2005.

Código Penal Federal.

D.O.F. 14-VIII-1931 y sus reformas.

Código Federal de Procedimientos Civiles.

D.O.F. 24-II-1943 y sus reformas.

Código Federal de Procedimientos Penales.

D. O. F. 30-VIII-1934 y sus reformas.

### Estatutos

Estatuto Orgánico del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

IV Sesión Ordinaria de la Junta de Gobierno del INMEGEN 16-III-2007



### Reglamentos

Reglamento de la Ley Federal de Entidades Paraestatales.

D. O. F. 26-I-1990 y sus reformas.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			



	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>	 SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>			
				Hoja: 9 de 56

Reglamento de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública Gubernamental.  
D. O. F. 11-VI-2003.

Reglamento de la Ley Federal para la Administración y Enajenación de Bienes del Sector Público.  
D. O. F. 17-VI-2003.

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.  
D.O.F. 06-I-1987.

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Sanidad Internacional.  
D.O.F. 18-II-1985. Fe de erratas 10-VII-1985.

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Prestación de Servicios de Atención Médica.  
D.O.F. 14-V-1986.

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos.  
D.O.F. 20-II-1985 y sus reformas.

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.  
D.O.F. 18-I-1988.

Reglamento de Insumos para la Salud.  
D.O.F. 04-II-1998.  
Reformas D.O.F. 19-IX-2003.

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Protección Social en Salud.  
D.O.F. 05-IV-2004.



Reglamento Interior de la Comisión Interinstitucional para la Formación de Recursos Humanos para la Salud.  
D.O.F. 31-X-1986.  
Reformas D.O.F. 28-II-1987.

Reglamento Interior de la Comisión Interinstitucional de Investigación para la Salud.  
D.O.F. 10-VIII-1988.

Reglamento Interior de la Comisión Interinstitucional del Cuadro Básico de Insumos del Sector Salud.  
D. O. F. 27-V-2003.

Reglamento sobre Consumo de Tabaco.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
<b>Nombre</b>			
<b>Firma</b>			
<b>Fecha</b>			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>		<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	SECRETARÍA DE SALUD		Rev.
				Hoja: 10 de 56

D.O.F. 27-VII-2000..

Reglamento de la Ley de Presupuesto, Contabilidad y Gasto Público Federal.

D.O.F. 18-XI-1981 y sus reformas.

Reglamento de la Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.

D.O.F. 20-VIII-2001.

Reglamento de la Ley de Obras Públicas y Servicios Relacionados con las Mismas.

D.O.F. 20-VIII-2001.

Fe de Erratas D.O.F. 19-IX-2001.

Reglamento de la Comisión de Avalúos de Bienes Nacionales.

D.O.F. 06-XII-1999.

Reglamento del Código Fiscal de la Federación.

D.O.F. 29-II-1984 y sus reformas.

Reglamento de la Ley del Impuesto Sobre la Renta.

D.O.F. 17-X-2003.

Reglamento de la Ley de los Sistemas de Ahorro para el Retiro.

D.O.F. 30-IV-2004.

Reglamento de la Ley de Protección Civil para el Distrito Federal.

D. O. F. 21-X-1996.

Reglamento de Seguridad, Higiene y Medio Ambiente en el Trabajo del Sector Público Federal.

D.O.F. 29-IX-2006

### Planes y Programas

*Plan Nacional de Desarrollo 2007-2012.*

D.O.F. 31-V-2007

Programa Nacional de Salud 2007-2012



Ultima modificación 16-X-2007

Programa Especial de Ciencia y Tecnología 2001-2006

D.O.F. 12-XII-2002

#### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>		<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	SECRETARÍA DE SALUD		Rev.
				Hoja: 11 de 56

Programa de Investigación en Salud (PAIS) 2001-2006  
 Comisión Coordinadora de los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad de la Secretaría de Salud. Marzo 2001.

Programa de Mejora Regulatoria 2001-2006.  
 D. O. F. 17-II-2003.

**Decretos**

Decreto por el que se establece en favor de los trabajadores al servicio de la Administración Pública Federal que estén sujetos al régimen obligatorio de la Ley del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, un sistema de ahorro para el retiro.  
 D.O.F. 27-III-1992.

Decreto por el que los titulares de las dependencias y entidades de la Administración Pública hasta el nivel de Director General en sector centralizado o su equivalente en el sector paraestatal, deberán rendir al separarse de sus empleos, cargos o comisiones, un informe de los asuntos de sus competencias y entregar los recursos financieros, humanos y materiales que tengan asignados para el ejercicio de sus atribuciones legales a quienes los sustituyan en sus funciones.  
 D.O.F. 02-IX-1988.

Decreto para realizar la entrega-recepción del Informe de los Asuntos a cargo de los Servidores Públicos y de los recursos que tengan asignados al momento de separarse de su empleo, cargo o comisión.  
 D. O. F. 14-IX-2005.



**Acuerdos del Ejecutivo**

Acuerdo por el que se fijan criterios para la aplicación de la Ley Federal de Responsabilidades en lo referente a los familiares de los Servidores Públicos.  
 D.O.F. 11-II-1983

Acuerdo por el que se crea la Comisión Interinstitucional de Investigación en Salud.  
 D.O.F. 19-X-1983

Acuerdo mediante el cual se establecen las disposiciones que se aplicarán en la entrega y recepción de despacho de los asuntos a cargo de los titulares de las dependencias y entidades de la Administración Pública Federal y de los servidores públicos hasta el nivel de Director General en el sector centralizado; Gerente o sus equivalentes en el sector paraestatal.  
 D.O.F. 05-IX-1988.  
 Fe de Erratas D.O.F. 20-IX-1988.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>	 SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>			
				Hoja: 12 de 56

Acuerdo número 88 por el que se restringen áreas para consumo de tabaco en las unidades médicas de la Secretaría de Salud y en los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 17-IV-1990.

Acuerdo por el que se establecen las Reglas para la realización de proyectos para prestación de servicios.  
D.O.F. 09-IV-2004.

### Disposiciones del Consejo de Salubridad General

Acuerdo por el que se emite recomendación a fin de proteger la salud de los no fumadores por la exposición involuntaria al humo de tabaco.  
D.O.F. 28-V-2004.

### Normas Oficiales Mexicanas

Norma Oficial Mexicana NOM-168-SSA1-1998, del expediente clínico.  
D.O.F. 30-IX-1999.  
Modificaciones: D.O.F. 22-VIII-2003.

Norma Oficial Mexicana NOM-166-SSA1-19997, para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.

Norma Oficial Mexicana NOM-040-SSA2-2004, en materia de información en salud.  
D. O. F. 28-IX-2005.



Norma Oficial Mexicana NOM-003-SSA2-1993, para la disposición de sangre humana y sus componentes para fines terapéuticos.  
D. O. F. 18-VII-1994.  
Fe de Erratas: D. O. F. 23-II-1996.

Norma Oficial Mexicana NOM-010-SSA2-1993, para la prevención y control de la infección por virus de la inmunodeficiencia humana.  
D. O. F. 17-I-1995.  
Modificación D. O. F. 21-VI-2000.

Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección Ambiental–Salud Ambiental- Residuos peligrosos, biológicos-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo.  
D. O. F. 17-II-2003.

### Proyectos de disposiciones jurídicas

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
<b>Nombre</b>			
<b>Firma</b>			
<b>Fecha</b>			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>	 SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>			
				Hoja: 13 de 56

Decreto que adiciona la Ley General de Salud, referente al Genoma Humano.

**Otros ordenamientos jurídicos**

Oficio Circular por el que se da a conocer el Código de Ética de los Servidores Públicos de la Administración Pública Federal.

D. O. F. 31-VII-2002.

Códigos de Etica y de conducta del Instituto Nacional de Medicina Genómica  
 II Sesión Ordinaria de la Junta de Gobierno del Instituto Nacional de Medicina Genómica.  
 16-III-2006.

Manual de Organización Específico del Instituto Nacional de Medicina Genómica.  
 III Sesión Ordinaria de la Junta de Gobierno del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Lineamientos específicos para la aplicación y seguimiento de las medidas de austeridad y disciplina del gasto de la Administración Pública Federal.

D.O.F. 29-XII-2006.

Lineamientos generales para la Clasificación y desclasificación de la información de las Dependencias y entidades de la Administración Pública Federal.

D.O.F. 18-VIII-2003.

Lineamientos internos para la Clasificación y Desclasificación de la Información del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

III Sesión Ordinaria de la Junta de Gobierno del Instituto Nacional de Medicina Genómica.  
 16-III-2006.

Lineamientos Generales para la Organización y Conservación de los Archivos de las Dependencias y Entidades de la Administración Pública Federal.

D. O. F. 20-II-2004.

Lineamientos de Organización y Conservación de Archivos del Instituto Nacional de Medicina Genómica.



V Sesión Ordinaria de la Junta de Gobierno del Instituto Nacional de Medicina Genómica.  
 16-III-2007.

Lineamientos para la Protección de Datos Personales.

D. O. F. 30-IX-2005.

Lineamientos para la Protección y Seguridad de los Sistemas de Datos Personales del Instituto Nacional de Medicina Genómica.



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
<b>Nombre</b>			
<b>Firma</b>			
<b>Fecha</b>			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>  SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 14 de 56

V Sesión Ordinaria de la Junta de Gobierno del Instituto Nacional de Medicina Genómica.  
16-III-2007.

**ATRIBUCIONES**

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			



	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>  SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 15 de 56

### LEY DE LOS INSTITUTOS NACIONALES DE SALUD

El 20 de julio de 2004 se publica en el Diario Oficial de la Federación la adición de una fracción V bis al artículo 5, y el artículo 7 bis del capítulo I del título segundo, en este último se describe que el Instituto Nacional de Medicina Genómica tendrá las siguientes atribuciones:

- Realizar estudios e investigaciones clínicas, epidemiológicas, experimentales de desarrollo tecnológico y básicas en las áreas de su especialidad, para la comprensión, prevención, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades, rehabilitación de los afectados, así como para promover medidas de salud;
- Publicar los resultados de las investigaciones y trabajos que realice, así como difundir información técnica y científica sobre los avances que en materia de salud registre;
- Promover y realizar reuniones de intercambio científico, de carácter nacional e internacional, y celebrar convenios de coordinación, intercambio o cooperación con instituciones afines;
- Formar recursos humanos en sus áreas de especialización, así como aquellas que le sean afines;
- Formular y ejecutar programas de estudio y cursos de capacitación, enseñanza, especialización y actualización de personal profesional, técnico y auxiliar, en sus áreas de especialización y afines, así como evaluar y reconocer el aprendizaje;
- Otorgar constancias, diplomas, reconocimientos y certificados de estudios, grados y títulos, en su caso, de conformidad con las disposiciones aplicables;
- Prestar servicios de salud en aspectos preventivos, médicos, quirúrgicos y de rehabilitación en sus áreas de especialización, a través de otras instituciones de salud;

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>  SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 16 de 56



## 1. Procesamiento de muestras para Genotipificación con el Genechip 500K

### 1. Propósito

1.1 Describir los pasos y la secuencia a seguir para el procesamiento de muestras y entrega de resultados, utilizando el microarreglo de genotipificación GeneChip 500K en la Unidad de

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			



	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>		<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	SECRETARÍA DE SALUD		Rev.
				Hoja: 17 de 56

Genotipificación y Análisis de Expresión Affymetrix, del Instituto Nacional de Medicina Genómica, que sirva de guía para el personal que labora en el Instituto en dicha Unidad.

## 1. Alcance

2.1 Todo el personal del laboratorio que esté involucrado en el procesamiento de muestras en el GeneChip 500K para análisis de DNA

## 2. Políticas de operación, normas y lineamientos

3.1 Esta prohibido entrar con alimentos al laboratorio

3.2 El uso de bata es indispensable

3.3 La Unidad de Genotipificación está dividida en 2 áreas principales. El laboratorio Pre-PCR, que es un área limpia y el laboratorio principal considerado área gris. Si va a visitar el área Pre-PCR es necesario el uso de bata y guantes. No utilice los mismos guantes que se utilizaron en el laboratorio principal al ingresar al Lab Pre-PCR

3.4 Se le solicita a cualquier usuario que no esté suscrito a la Unidad de Genotipificación y Análisis de Expresión no tocar ninguno de los equipos ni materiales.

3.5 En caso de una visita a la Unidad se recomienda que los grupos no sean de más de 15 visitantes.

El trabajo en la Unidad requiere concentración por parte de los técnicos. Si va a hacer una pregunta, espere a que terminen su actividad y les contestaran con gusto.

Queda prohibido sentarse en las mesas de trabajo o en las mesas de los equipos de computo

3.6 Para procesar cualquier muestra, esta debe tener las características mínimas de calidad, estar perfectamente identificada y contar con un formato aprobado por el Responsable de la Unidad.



3.7 Queda prohibido guardar cualquier muestra o reactivo no autorizado en los refrigeradores de la Unidad de Genotipificación y Análisis de Expresión.

3.8 Cada vez que se utilice un equipo con bitácora es necesario registrarse en la misma.

3.9 En caso de detectar algún desperfecto o mal funcionamiento de cualquiera de los equipos, notificar inmediatamente al responsable de la Unidad.

3.10 Cada vez que se utiliza un microarreglo, es necesario anotar el tipo de microarreglo, el proyecto asignado, la fecha de uso, la fecha de caducidad y el operador en el formato apropiado de control de microarreglos.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>		<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	SECRETARÍA DE SALUD		Rev.
				Hoja: 18 de 56

3.11 Para los Colaboradores que están interesado en conocer como se procesan las muestras en la Unidad de Genotipificación y Análisis de Expresión es necesario que se cumplan los siguientes requisitos:

- 3.11.1 Las visitas deben ser programadas los primeros días del mes. La programación de las fechas está a cargo de la Dirección de Investigación del INMEGEN y dependerán de la carga de trabajo en la Unidad.
- 1.12.1 La Unidad solo recibirá visitantes con cita programada. La duración de la visita dependerá del tipo de microarreglo a procesar, sin embargo siempre iniciarán los Lunes a las 9:00 en punto de la mañana.
- 1.12.2 El colaborador deberá traer sus muestras como se indica en el procedimiento para entrega de muestras que le proporcionará el Responsable de la Unidad de Genotipificación. Las muestras que no cumplan con los requerimientos no podrán ser procesadas.
- 1.12.3 El personal de la Unidad le entregará un protocolo corto ( los protocolos en extenso están disponibles en la página web de Affymetrix). Deberá seguir al pie de la letra las indicaciones del personal de la Unidad y apegarse al protocolo entregado. Si tiene alguna duda, pregunte.
- 1.12.4 El colaborador podrá procesar dos muestras para conocer el procedimiento. El procesamiento de un mayor número de muestras quedará sujeto al convenio de colaboración.
- 1.12.5 El colaborador deberá estar en supervisión continua del personal de la Unidad. Todo reactivo y material deberá ser solicitado al personal de la Unidad antes de iniciar cualquier fase del experimento.
- 1.12.6 La Unidad no procesara ninguna muestra donde a lo largo del proceso el colaborador haya cometido algún error experimental.

**Políticas de Bioseguridad**

- 1.12.7 El personal generador de residuos debe identificarlos y separarlos según su tipo, clasificación según la Norma Oficial NOM- 087- ECOL-SSA1 2002
- 1.12.8 El personal generador debe depositar o verter los residuos dentro de los contenedores y bolsas que les correspondan según su tipo y características, ver la Norma Oficial Mexicana NOM-087- ECOL-SSA1 2002
- 1.12.9 Todo personal involucrado en la generación de residuos peligrosos, es responsable desde su generación hasta su disposición final.
- 1.12.10 Durante la manipulación de material químico o biológico siempre debe portar el equipo de protección adecuado (guantes, cubre bocas y lentes de seguridad)
- 1.12.11 Es obligación que cada laboratorio que genere residuos y maneje reactivos químicos tener a la mano las hojas de seguridad de los productos químicos que tiene en su área.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
<b>Nombre</b>			
<b>Firma</b>			
<b>Fecha</b>			

#### 4. Descripción del Procedimiento para procesar muestras en el Genechip 500K



##### I. Digestión

1. Mida la concentración de DNA genómico en el Nanodrop
2. Normalice las muestras de DNA a una concentración de 250 ng en un volumen de 5µl (50/µl n ) en los tubos de reacción o placa de 96 pozos.
3. Descongelar en hielo BSA y NE buffer
4. Marcar los siguientes tubos y colocar la cámara de enfriamiento:
  - Tira de 12 tubos marca Dig
  - Un tubo de 2.0 mL Eppendorf etiquetado Dig MM
5. Colocar el agua AccuGENE ® en hielo.
  - Para preparar los reactivos a excepción de la enzima:
    - A. Vortexear 3 veces x 1 seg. Cada reactivo una vez que está descongelado
    - B. Spin rápido 3 seg.
    - C. Colocar en cámara de enfriamiento.
  - Preparar la siguiente mezcla maestra (Master Mix) de Digestión EN HIELO de la siguiente forma:

Reactivo (stock)	1 Muestra	Conc. Final por muestra
H2O	11.55 ml	
NE buffer 2 (10X)	2 ml	1 X
BSA (100X 10 mg/mL)	0,2 ml	1 X
Nsp/Sty	1,0 ml	0.5 U/ ml
<b>VOLUMEN Final</b>	<b>14.75 ml</b>	
6. Divida el volumen final de la mezcla en los 8 tubos que tiene el enfriamiento para realizar las alícuotas correspondientes por muestra.
7. Agregue 14.75 ml de la Mezcla maestra de Digestión a cada tubo con DNA genómico. Mezcle y centrifugue. Se obtendrá un volumen final de 20 ml.
8. Coloque las muestras en el termociclador con el siguiente ciclo:
 

Temperatura	Tiempo
16°C	180 minutos
70°C	20 minutos
4°C	

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
<b>Nombre</b>			
<b>Firma</b>			
<b>Fecha</b>			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>  SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 20 de 56

Si no va a procesar la muestra inmediatamente guarde a -20°C

## II. Ligamiento

1. Alicuotar el buffer de T4 DNA ligasa después de descongelarlo la primera vez. **DESCONGELAR LOS REACTIVOS EN HIELO** (tardan de 20 a 30 minutos en descongelarse)

2. Prepare:

- Tira de 12 tubos marcada LIG
- Un tubo de 2.0 mL Eppendorf etiquetado Lig MM2.

3. Saque las muestras de DNA del termociclador luego del proceso de digestión, centrifúguelas.

4. Prepare la Mezcla Maestra de Ligamiento EN HIELO de acuerdo a la siguiente tabla: Vortexear los reactivos 3 veces x 1 seg. Cada vez

Reactivo (stock)	1 Muestra	Conc. Final por muestra
<b>Adaptador Nsp ó Adaptador Sty (5 µM)</b>	0,75 µl	0.25 µM
Buffer de T4 DNA Ligase (10X) *	2.5 µl	1 X
T4 DNA Ligasa (400 U/µl)	2 µl	250 U
<b>VOLUMEN Final</b>	<b>5.25 µl</b>	

5. Mezcle con vortex por 2 segundos y centrifugue antes de añadir la Mezcla maestra de Ligamiento a las muestras de DNA.

6. Alicuote 5.25 µl de la Mezcla Maestra de Ligamiento a cada una de las muestras de DNA digerido.

7. Mezcle utilizando un vortex durante 3 segundos y centrifugue a 2000 rpm. Durante 1 minuto.

8. Coloque las muestras en el termociclador con el siguiente ciclo:

Temperatura	Tiempo
16°C	180 minutos
70°C	20 minutos
4°C	∞

Si no va a procesar la muestra inmediatamente guarde a -20°C

9. Una vez terminado el ciclo Diluya cada una de las muestras con 75µl de agua grado Biología molecular antes de proceder a la PCR. **ESTE PASO ES CRUCIAL.** Debe obtener un volumen final de 100 ml.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
<b>Nombre</b>			
<b>Firma</b>			
<b>Fecha</b>			

### III. PCR

1. Saque todos los reactivos necesarios para el procedimiento y asegúrese de que estén descongelados. Mezcle y centrifugue antes de iniciar la preparación de la mezcla.
2. Alicuote 10µl de la muestra ligada diluida por triplicado. Mantenga las muestras en un bloque frío y en hielo. Coloque un film sobre la placa para protegerla de la contaminación.
3. Prepare la siguiente Mezcla Maestra (Master Mix) de PCR en hielo. (3 reacciones de PCR por muestra) Esta debe prepararse justo antes de utilizarse.

Reactivos	1 reacción (µL)	3 reacciones (µL)
Agua	39.5	118.5
Titanium Taq PCR Buffer (10X)	10	30
GC Melt (5M)	20	60
dNTP (2.5mM each)	14	42
PCR Primer 002 (100µM)	4.5	13.5
Titanium Taq DNA Polymerase (50X)	2	6
Total	90	270

Se recomienda añadir un control negativo para evaluar la presencia de contaminación



4. Añada 90µl del PCR Master Mix para obtener un volumen final de 100µl. Asegúrese de mezclar bien la mezcla maestra antes de agregarla al DNA ligado.
5. Mezcle la reacción en un vortex durante 3 segundos y luego centrifugue a 2000 rpm. Durante 1 min.
6. Programe el termociclador según la marca de la siguiente forma:  
**GeneAmp® PCR System 9700**

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	3 minutos	1X
94°C	30 segundos	30X
60°C	45 segundos	
68°C	60 segundos	
68°C	7 minutos	1X
4°C	∞	

Si no va a procesar la muestra inmediatamente guarde a -20°C

7. Al finalizar la PCR, tome una alícuota de 3µl y agregue 3µl de buffer de muestra para gel de electroforesis. Corra un gel de Agarosa/ TBE al 2% a 120V durante 50 minutos. Asegúrese que las muestras estén en el rango de tamaño requerido (1500-200pb)

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
<b>Nombre</b>			
<b>Firma</b>			
<b>Fecha</b>			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	 <b>SALUD</b> SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 22 de 56

#### IV. Purificación y Elución del Producto PCR

1. Añada al producto de PCR 8µl de EDTA 0.1M. Mezcle bien con vortex y centrifugue. Asegúrese de que el precipitado blanco de las muestras se elimine totalmente antes de proceder al siguiente paso.
2. Conecte un manifold a una bomba de vacío capaz de soportar aproximadamente 800 mbar (ej. QIAvac Multi-well Unit de QIAGEN)
3. Coloque la placa Clonotech sobre el manifold
4. Marque la placa con los productos de PCR para conocer su orientación. Corte el adhesivo de la primera fila de cada una de las placas y transfiera el volumen de las 3 primera placas a la primera fila de la placa de purificación. Tenga cuidado de no generar burbujas ni pipetear de arriba a abajo en la placa para purificación. Al añadir el último set de la placa de PCR, tener mucho cuidado pues los pozos están muy llenos.
5. Cambie de puntas y prosiga con la siguiente fila hasta tener todas las muestras en sus respectivos pozos en la placa de purificación.
6. Deje filtrar por aproximadamente 1 hr. 30 minutos.
7. Cuando la placa esté seca, lave los productos de PCR añadiendo 50µl de agua grado biología molecular y permita que los pozos se sequen antes de proceder al siguiente lavado REPITA EL LAVADO VECES. Se recomienda dejar secar el último lavado durante aproximadamente una hora y media.
8. Asegúrese de que toda el agua se elimina de la placa y realice un blotting secando el fondo con un pañuelo absorbente.
9. Coloque 5mL de buffer de recuperación (Buffer RB) en un recipiente para reactivos.
10. Con una pipeta multicanal añada 45µl de buffer a cada uno de los pozos
11. Coloque la placa en elJitterbug y de un ciclo de agitación de 10 minutos a Temperatura ambiente.
12. Una vez recuperado el producto, vuelva a repetir EL PROCESO COMPLETO UNA VEZ MAS.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

### V. Cuantificación del DNA purificado

Determine la concentración del producto PCR mediante un análisis espectrofotométrico. Esto lo puede hacer de la siguiente forma:

1. Agregue 2µl del producto de PCR purificado a 98µl de agua grado biología molecular y mezcle bien (dilución 1:50)
2. Lea la absorbancia a 260nm.. Asegúrese que la lectura está dentro del rango cuantitativo del instrumento.
3. Calcule la concentración considerando que 1 unidad de absorbancia a 260 nm es igual a 50µ g/mL de DNA.
4. Ajuste la concentración de DNA a 90µg del producto de PCR por 45 µl de solución agregando buffer RB.
5. Mezcle con un vortex durante 2 segundos y centrifugue a 2000 rpm por 1 minuto.

### VI. Fragmentación

1. Pre-caliente el termociclador a 37°C
2. Añada 5µl de buffer de Fragmentación 10X a cada muestra en hielo. A esto le denominamos la Mezcla de Fragmentación.
3. Prepare el reactivo de Fragmentación de acuerdo a la siguiente tabla. El volumen de reactivo preparado dependerá del número de muestras por procesar.  
Ejemplos de diluciones:

Reactivos	Para 20 Rx	Para 60 Rx	Para 80 Rx	
H2O grado biología molecular	106 µl	212µ	318µl	424µl
10X buffer de fragmentación	12µl	24µl	36µ	48µ
Reactivo de fragmentación	2µ	4µl	6µl	8µl

4. Añada 5µl del reactivo de fragmentación preparado como se mencionó anteriormente a los 50µl de cada una de las mezclas de fragmentación. Todo esto debe trabajarse en hielo.
5. Mezcle con un vortex durante 2 segundos y centrifugue brevemente a 2000 rpm. A 4°C.
6. Coloque inmediatamente las muestras en el termociclador y prográmelo de la siguiente forma:

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

Temperatura	Tiempo
37°C	35 minutos
95°C	15 minutos
4°C	∞

7. Centrifugue brevemente el producto de fragmentación

8. Diluya 4µl del producto de fragmentación con 4µl del buffer de muestra y corra un gel de TBE al 4% a 120V durante 20 minutos.

9. Proceda inmediatamente al paso de marcaje.

### VII Marcaje

1. Prepare la mezcla de marcaje en hielo según la siguiente tabla:

Reactivo	IX (µL)
5X Tdt Buffer	14.35
GeneChip Labeling Reagent (30mM)	2.05
Tdt	3.6
Total	20

2. Agregue 19.5µl de la mezcla de marcaje a cada una de las muestras fragmentadas de DNA

Reactivo	Volumen por Reacción
DNA fragmentado	50.5µl
Mezcla de marcaje	19.5µl

3. Mezcle con un vortex durante un par de segundos y centrifugue las muestras a 2000 rpm x 1 minuto.

4. Corra el siguiente programa en el termocilador.

Temperatura	Tiempo
37°C	4 horas
95°C	15 minutos
4°C	∞

5. Centrifugue las muestras 2000 rpm x 1 minuto. SI NO VA A PROCESAR LA MUESTRA INMEDIATAMENTE guarde a -20°C

#### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			



### VIII. Hibridación

1. Prepare el buffer MES 12X de la siguiente forma:

**MES Stock Buffer 12X**

- Volumen final: 1000mL
- 70.4 g hidrato de MES
- 193.3 g de sal sódica de MES
- 800 mL de Agua grado biología molecular
- Mezcle y ajuste el volumen a 1000mL. Mida el ph y si es necesario ajuste a 6.5-6.7
- Filtre utilizando un filtro de  $\mu\text{m}$

Reactivo (stock)	1 Muestra	Conc. Final por muestra
MES (12X, 1.22 M)	12 $\mu\text{l}$	0.056 M
DMSO (100%)	13 $\mu\text{l}$	5 %
Solución de Denhart's (50X)	13 $\mu\text{l}$	2.5 X
EDTA (0.5 M)	3 $\mu\text{l}$	5.66 mM
HSDNA (10 mg/mL)	3 $\mu\text{l}$	0.115 mg/mL
OCR,0100	2 $\mu\text{l}$	1 X
Human Cot-1 (1mg/mL)	3 $\mu\text{l}$	11.5 $\mu\text{g/mL}$
Tween-20 (3%)	1 $\mu\text{l}$	0.0115%
TMACL (5M)	140 $\mu\text{l}$	2.69 M
<b>VOLUMEN Final</b>	<b>190 <math>\mu\text{l}</math></b>	

2. Alicuote 190 $\mu\text{l}$  del cocktail de hibridación a un tubo Eppendorf de 1.5mL.

3. Agregue 70 $\mu\text{l}$  del DNA marcado al tubo anterior. Mezcle bien

4. Pre enfríe en hielo por solo 10 segundos. Centrifugue 2000 rpm x 1 minuto.

5. Coloque los tubos en el termobloque a 48°C durante 2 minutos.

6. Inyecte 200 ml. De esta solución de hibridación a los gene chips.

7. Coloque en el horno de hibridación e hibridice a 48°C de 16 a 18 horas a 60 rpm.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

## IX. Lavado, Tinción y Escaneo

1. Prepare las soluciones de lavado y tinción como se indica a continuación :

### Wash A: Buffer de lavado no astringente

- 300 mL de SSPE 20X
- 1.0 mL de Tween 20 al 10%
- 699 mL de agua

### Wash B: Buffer de lavado astringente

- a) 30 mL de SSPE 20X
- b) 1.0 mL de Tween 20 al 10%
- c) 969 mL de agua

2. Filtre las soluciones por una membrana de 0.2µm. Mantenga a Temperatura ambiente

### 0.5 mg/mL de Anticuerpo anti-streptavidina

- Resuspenda 0.5 mg del anticuerpo en 1 mL de agua.
- Mantenga a 4°C.

### 1X Array holding buffer

Para 100 mL

- 5.3mL de MES Stock buffer 12X
- 18.5 mL de NaCl 5 M
- 0.1 mL de Tween-20 al 10%
- 73.1 mL de agua

Almacene a T de 2°C a 8°C y proteja de la luz.

3. Después de 16-18 horas de hibridación quite la solución de hibridación del gene chip y deposítela en un vial para microcentrifuga. Mantenga en hielo a -80°C si va a almacenar a largo plazo.

4. Llene el gene chip hasta el tope con 250µl de Array holding buffer.

4. Prepare los siguientes reactivos:

### Buffer de tinción

Reactivo (Stock)	1 Muestra	Conc. Final por muestra
H2O	666.7µl	
SSPE(20X)	300µl	6X
Tween -20 (3%)	3.3µl	0.01%
Solución de Denharts (50X)	20µl	1X
VOLUMEN final	990µl	

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

### Solución de tinción SAPE

Reactivo (stock)	1 Muestra	Conc. Final por muestra
Buffer de Tinción	495µl	1X
1mg/mL de streptavidina ficoeritrina (SAPE)	5.0µl	10µg/mL
Volumen final	500µl	

### Solución de anticuerpo biotinilado

Reactivo (stock)	1 Muestra	2 Muestras (+10%)	5 Muestras (+10%)	Conc. Final por muestra
Buffer de tinción	495µl	1089µl	5445µl	1X
0.5 mg/mL de anticuerpo biotinilado	5.0	11µl	27.5µl	10µg/mL
Volumen final	500µl	1100µl	5500µl	

6. Corra el programa de Priming en la estación de flúidos. Espere hasta que termine el programa para colocar los tubos con los reactivos de tinción.

7. Coloque 500µl de la solución de tinción SAPE en el tubo que irá en el sample holder número 1 de la estación de flúidos.

8. Coloque 500µl de la solución de anticuerpo biotinilado en el tubo que irá en el sample holder número 2 de la estación de flúidos.

9. Coloque 800 µl de Array holding buffer 1X en el tubo que irá en el sample holder número 3 de la estación de flúidos.

10. De de alta el experimento en el software GCOS

11. De la pantalla de protocolos de la estación de flúidos seleccione el protocolo **Maping 500Kc1\_450** y dé de alta un experimento para cada módulo.

12. Seleccione Run en la caja de diálogo para iniciar el protocolo de lavado y tinción.

13. Siga las instrucciones que aparecen en el display de la estación de flúidos. Coloque los microarreglos y asegúrese de que el protocolo de lavado y tinción inicie correctamente.



14. Cuando termine el protocolo de tinción, quite los viales que contienen los reactivos de tinción y reemplácelos con microtubos vacíos.

15. Quite los Gene chips de la estación de flúidos y revise que no tengan burbujas.

16 Coloque un tough spot en las septas de los microarreglos para que no se derrame ningún líquido durante el escaneo.

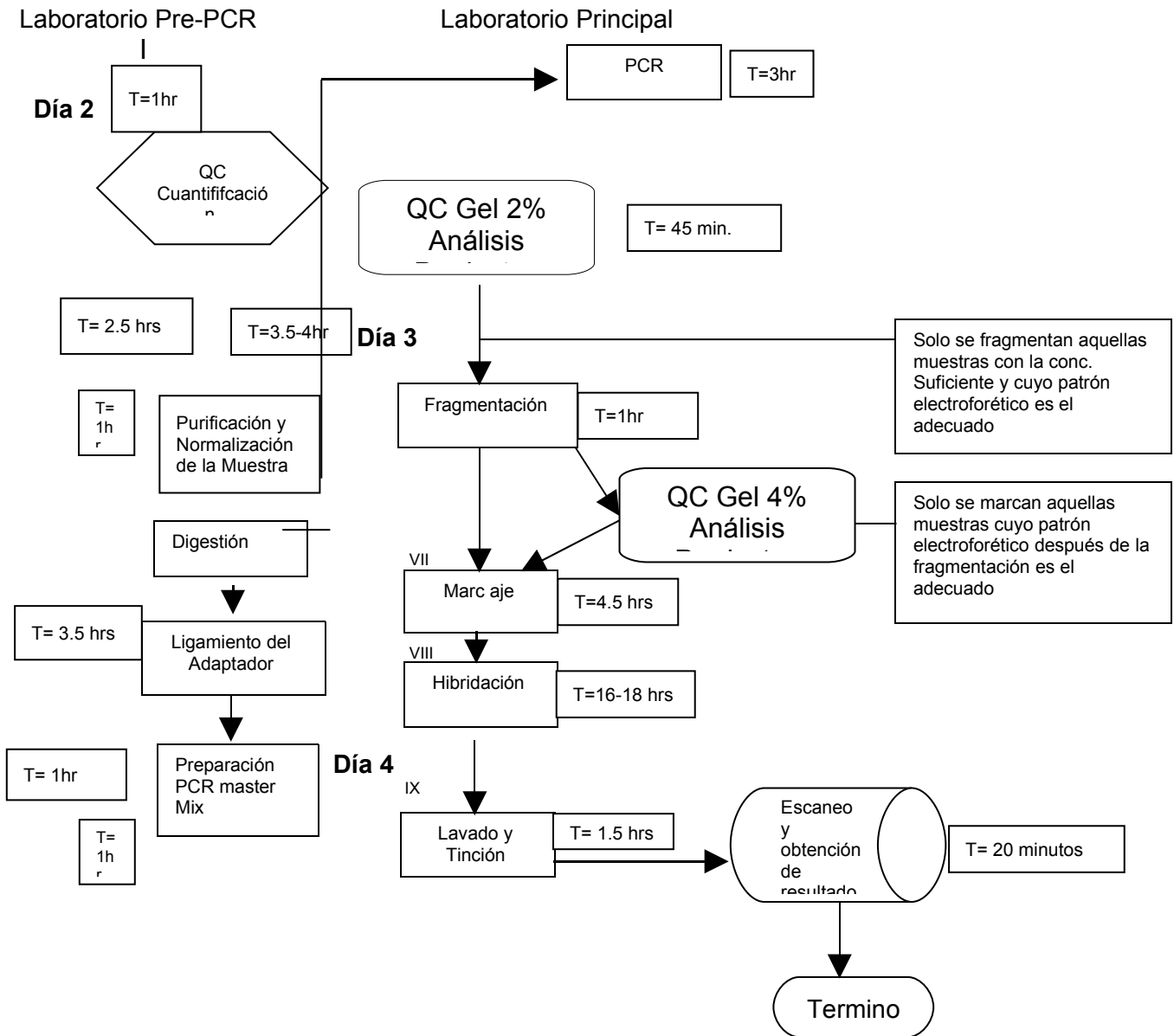
17. Asegúrese que el escáner lleva al menos 10 minutos prendiendo antes de iniciar el proceso de escaneo.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			



	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	 <b>SALUD</b> SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 28 de 56
<p>18. Si es necesario, limpie la superficie del microarreglo. No utilice alcohol para realizar este procedimiento, utilice una toallita no abrasiva o un pañuelo.</p>			
<p>19. Proceda a escanear los Genechips.</p>			
<b>Termino del Procedimiento</b>			

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
<b>Nombre</b>			
<b>Firma</b>			
<b>Fecha</b>			

**Diagrama del Proceso Genotipificación 500K**  
**Día 1**



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>  SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 30 de 56

### 3. Procedimiento para procesar muestras de RNA para microarreglos de expresión

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

### Descripción del Procedimiento para procesar muestras de RNA para microarreglos de Expresión

1. Asegurarse que la calidad del RNA que procesará es la adecuada (analice las muestras en el Bioanalizador y se debe obtener RIN mayor o igual a 8, electroferograma con 2 picos bien definidos en 18S y 28S)

2. La concentración de la muestra debe ser de preferencia de entre 5 y 10µg de RNA para asegurar una buena calidad de hibridación

#### I. Controles Poli A e incubación primer

1. Prepare la dilución de los controles de RNA Poly-A de la siguiente forma

1.1 Agregue 2µl de Poly A Control Stock en 38µl de Poly A Control Dil Buffer (Dil 1:20) Vortex y centrifugue.

1.2 Tome 2µl de la muestra anterior y agregue 98µl del Poly A Control Dil Buffer (Dil 1:50)

2. Calcule la dilución final de los controles Poli A considerando la concentración inicial de RNA inicial de acuerdo a la siguiente tabla:

Total de la muestra	3ra dilución	
1µg	1:50	2µl de la dilución 2 en 98µl de Buffer de controles.
5µg	1:10	5µl de la dilución anterior en 45 µl de Buffer de controles
10µg	1:5	5µl de la dilución anterior en 20µl de Buffer de controles

4. Programe en el termociclador el siguiente ciclo

5. Realice la mezcla para la incubación del primer de acuerdo a las siguientes tablas:

Si la concentración de RNA es de 1-8µg Si la concentración de RNA es de 1-8µg

Reactivo	Volumen
RNA	Xµl **
Controles poly A diluidos	2µl
T7-oligo (dT) primer	2µl
Agua libre RNAsa	(12-(X+4) µl**)
Vol Final	12µl

Si la concentración de RNA es de 8.1 a 15µg

Reactivo	Volumen
RNA	7µl **
Controles poly A diluidos	2µl
T7-oligo (dT) primer	2µl
Agua libre RNAsa	0 µl
Vol Final	11µl**

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
<b>Nombre</b>			
<b>Firma</b>			
<b>Fecha</b>			

5. Mezcle y centrifugue

6. Coloque la muestra en el termociclador y corra el programa de incubación

One cycle incubación    70°C 10 minutos  
                                   4°C 4 minutos

## II. Síntesis de 1ra hebra de cDNA

2.0) Prepare la mezcla de reacción para la síntesis de cDNA de acuerdo a la siguiente tabla:

Reactivo	Volumen
5X 1st Strand Reaction Mix	4µl
DTT 0.1 M	2µl
dNTP, 10mM	1µl
<b>VOL FINAL</b>	<b>7µl</b>

mezcla anterior a la muestra cuando ésta este a 4°C

3. MEZCLE UTILIZANDO EL VORTEX Y CENTRIFUGUE

4. Corra el siguiente programa del termociclador

One cycle cDNA syn    42°C 1 hr 2 minutos  
                                   4°C infinito

Ojo: Cuando el termociclador alcance 42°C coloque la muestra e incube durante 2 minutos. Tenga lista la enzima SuperScript II y al terminar los 2 minutos agregue los siguientes volúmenes:

1-8µg                            8.1-15µg  
 1µl de SuperScript II        2µl de SuperScript II

5. Continúe el programa de incubación (1 hora a 42°C) y deje a 4°C al menos 2 minutos

6. Saque la muestra y continúe al paso de síntesis de segunda hebra de cDNA

## III. SINTESIS DE SEGUNDA HEBRA cDNA

1. Prepare los siguientes programas en el termociclador



Síntesis de 2da hebra            16°C 2 hrs.  
   4°C infinito

T4 DNA polimerasa            16°C 10 minutos  
   4°C infinito

2. Prepare la siguiente mezcla de reacción por MUESTRA:

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			



	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	 <b>SALUD</b> <small>SECRETARÍA DE SALUD</small>	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 33 de 56

REACTIVO	VOLUMEN
Agua libre de RNAsa	91µl
5X 2nd Strand Reaction mix	30µl
dNTP, 10mM	3µl
E.coli DNA ligasa	1µl
E.coli DNA Polimerasa I	4µl
RNAse H	1µl
<b>Vol TOTAL</b>	<b>130µl</b>

3. Agregue la mezcla anterior a las muestras de primera hebra sintetizadas anteriormente para obtener un volumen final de 150µl

Incube la muestra durante 2 horas a 16°C

4. Cuando termine la primera incubación, saque la muestra prepare el termociclador para la incubación de 10 minutos y agregue **2µl de T4 DNA polimerasa** y proceda a la incubación de la muestra.

6. Al terminar la incubación, agregue **10µl de EDTA 0.5 M** y proceda a limpiar las muestras.

#### IV. LIMPIEZA DE LAS MUESTRAS

1. Prepare el Buffer de cDNA añadiendo 24mL de etanol a la botella de buffer según se indica.

2. Transfiera las muestras a un tubo de 1.5 mL

3. Agregue 600µl de cDNA Binding Buffer a la mezcla de cDNA, mezcle con vortex durante 3 segundos. La muestra debe ser color amarillento. Si la muestra es color naranja o violeta agregue 10µl de acetato de sodio 3M pH 5 y mezcle hasta que se torne amarilla.

4. Agregue 500µl de la mezcla a la cDNA Cleanup Spin Column que deberá estar colocada en un tubo recolector de muestra de 2 mL y centrifugue durante 1 minuto a >800 x g (10,000 RPM)

5. Agregue el resto de la muestra y centrifugue como en el paso anterior

6. DESCARTE EL LÍQUIDO FILTRADO.

7. Coloque la columna dentro de un nuevo tubo de recolección de 2 mL. Agregue 750µl de **cDNA Wash Buffer**. Centrifugue durante 1 minuto a 10,000 RPM. Descarte el líquido filtrado.



8. Abra la tapa de la columna (asegúrese que la tapa queda a contrareloj de la rotación de la centrífuga) y centrifugue durante 5 minutos a máxima velocidad. Descarte el líquido filtrado.

9. Coloque la columna en un tubo de recolección de 1.5 mL y agregue 14µl de cDNA Elution Buffer. Incube durante 1 minuto a T ambiente y centrifugue durante 1 minuto a máxima velocidad.

10. Proceda inmediatamente a la reacción de IVT.

#### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	 <b>SALUD</b> SECRETARÍA DE SALUD	Código:
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 34 de 56

## V. REACCIÓN IVT

1. Prepare el Master Mix según la concentración inicial de RNA
- 1.1 Si se partió de una conc. Inicial de 1-8µg de RNA se utilizarán los 12µl del purificado
- 1.2 Si se partió de una conc. Inicial de 8.1 a 15µg de RNA se utilizan solo 6µl del purificado.

### 1-8 µg RNA

REACTIVO	VOLUMEN
10X IVT Labeling buffer	4 µl
IVT labeling NTP mix	12µl
IVT Labeling enzyme mix	4µl
Agua Libre RNAsa	8µl
<b>Vol TOTAL</b>	<b>28µl</b>

### 8.1-15 µg RNA

REACTIVO	VOLUMEN
10X IVT Labeling buffer	4 µl
IVT labeling NTP mix	12µl
IVT Labeling enzyme mix	4µl
Agua Libre RNAsa	14µl
<b>Vol TOTAL</b>	<b>34µl</b>

2. Agregue los 28 microlitros Master mix a la muestra obtenida de la purificación (12µl)
3. Mezcle e incube la muestra a 37°C durante 16 horas.
4. Si no se va a purificar la muestra inmediatamente guarde las muestras de cRNA a -20°C o -70°C

## VI. PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL cRNA BIOTINILADO

1. Tenga listo etanol al 100% y etanol al 80% (v/v). Este paso debe trabajarse a T ambiente y sin interrupción.
2. Antes de iniciar prepare el IVT cRNA Wash Buffer agregando 20mL de etanol al buffer como lo indica la b otella.
3. Agregue 60µl de agua libre de RNAsa a la reacción de IVT y mezcle con vortex durante 3 segundos.
4. Agregue 350µl de IVT cRNA Binding Buffer a la muestra y mezcle durante 3 segundos.
5. Agregue 250µl de etanol 96-100% al lisado y mezcle bien mediante pipeteo.
6. Agregue los 700µl de la mezcla anterior a la columna de limpieza de IVT cRNA dentro de un tubo de recolección de 2 mL y centrifugue durante 15 segundos a 10,000 RPM. Descarte el líquido filtrado.
7. Transfiera la columna a un nuevo tubo de recolección y agregue 500µl de **IVT cRNA Wash Buffer**. Centrifugue durante 15 segundos a 10,000 RPM y descarte el líquido filtrado.
8. Agregue 500µl de etanol al 80% a la columna y centrifugue durante 15 segundos a 10,000 RPM.

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

9. Abra la tapa de la columna y centrifugue durante 5 minutos a máxima velocidad. Descarte el líquido filtrado.

10. Transfiera la columna a un tubo de recolección de 1.5mL y agregue 11µl de agua libre de RNAsa a la membrana de la columna. Asegúrese de que se agrega el agua directamente en la membrana. Centrifugue 1 minuto a máxima velocidad.

11. Agregue 10µl a la membrana y centrifugue 1 minuto a máxima velocidad.

12. Realice una dilución 1:100 y 1:200 y mida la absorbancia del cRNA obtenido en el Bioanalizador. Calcule la concentración de acuerdo a la siguiente fórmula:

1 absorbancia a 260 es igual a 40µg/mL

13. Calcule el rendimiento de RNA con la siguiente fórmula:  
 $cRNA = cRNA\ IVT - (Total\ RNA)$  (porcentaje usado de cDNA en la IVT)

Porcentaje de cDNA 1-8 µg RNA inicial la ecuación se multiplica por (1)

Porcentaje de cDNA 8.1-15 µg inicial la ecuación se multiplica por (0.5)

## VII. FRAGMENTACIÓN DEL RNA

1. Prepare la siguiente mezcla de fragmentación

REACTIVO	VOLUMEN
cRNA	20µg (1-21µl)
5X Fragmentation Buffer	8µl
RNAse free water	Lo necesario para completar 40µl

2. Incube a 94°C durante 35 minutos. Coloque en HIELO luego de la incubación.

3. Guarde las muestras a -20 °C y realice un análisis del producto fragmentado en el bioanalizador.

## VIII. HIBRIDACIÓN

1. Prepare 50mL de Buffer de hibridación 2X de acuerdo a lo siguiente:

8.3 mL de MES 12X

17.7 mL de NaCl 5M

4.0 mL de 0.5 M EDTA

0.1 mL de Tween 20 10%

10.9 mL de Agua

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

2. Proteja de la luz y guarde a 4°C

3. Saque los microarreglos para que se atemperen.

4. Caliente durante 5 minutos los Eukaryotic Hyb Controls a 65°C antes de preparar la mezcla de hibridación.

5. Prepare el cocktail de hibridación de la siguiente forma:

REACTIVO	CHIP HUMANO
cRNA fragmentado	15µg
Control Oligonucleotide B12	5 µl
20X Hyb Eukariotic controls	15µl
Herring Sperm DNA	3µl
BSA 50 mg/mL	3µl
2X Hyb Buffer	150µl
DMSO	30µl

6. Agregue 200µl de 1X Hyb Bufferal arreglo e incube en el horno de hibridación a 45°C durante 10 minutos.

7. Calcule el volumen correspondiente a 15 µg de RNA y coloquelo en un placa.

8. Agregue 200µl del cocktail de hibridación a la muestra.

9. Calcule el volumen de agua para llevar la reacción a 250µl

10. Mezcle el cocktail de hibridación antes de colocarlo dentro del microarreglo

11. Programe el siguiente ciclo en el termociclador:

99°C 10 minutos

45°C Infinito

12. Cuando la muestra llegue a 45, tome 2 minutos antes de iniciar la hibridación en los microarreglos

13. Agregue la muestra al microarreglo y deje hibridando durante 16-18 hrs.

## IX. LAVADO Y TINCIÓN

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

1. Prepare los buffers de lavado de la siguiente forma:

**WASH A**

Reactivo	Volumen
SSPE 20X	300mL
Tween-20 al 10%	1.0 mL
Agua	69 mL

**WASH B**

Reactivo	Volumen
MES 12X	83.3 mL
NaCl 5M	5,2 mL
Tweeb 20 al 10%	1.0 mL
Agua	910,5 mL

2. Filtre a través de un poro de 0.2  $\mu$ m

3. Prepare la solución de streptavidina ficoeritrina de la siguiente forma

**Solución SAPE**

REACTIVO	VOLUMEN
2X Stain Buffer	600 $\mu$ l
50 mg/mL BSA	48 $\mu$ l
SAPE	12.0 $\mu$ l
H2O	540 $\mu$ l
TOTAL	1200 $\mu$ l

4. Mezcle bien y divida la solución en dos viales con 600 $\mu$ l cada uno. Estos viales se colocarán en las posiciones 1 y 3 en los módulos de las estaciones de fluidos.

5. Prepare la solución de Anticuerpo de la siguiente forma:

REACTIVO	VOLUMEN
2X Stain Buffer	300 $\mu$ l
50 mg/mL BSA	24 $\mu$ l
Goat IgG	6 $\mu$ l
Ab biotinilado	3.6 $\mu$ l
H2O	540 $\mu$ l
<b>TOTAL</b>	<b>600<math>\mu</math>l</b>

6. Haga el priming de las estaciones de fluidos utilizando el Protocolo PRIME\_450

7. Cuando los equipos estén listos, coloque los tubos de anticuerpo en cada una de las posiciones indicadas.

8. Seleccione el protocolo para teñir y lavar los microarreglos de acuerdo a la siguiente tabla:

**CONTROL DE EMISIÓN**

	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

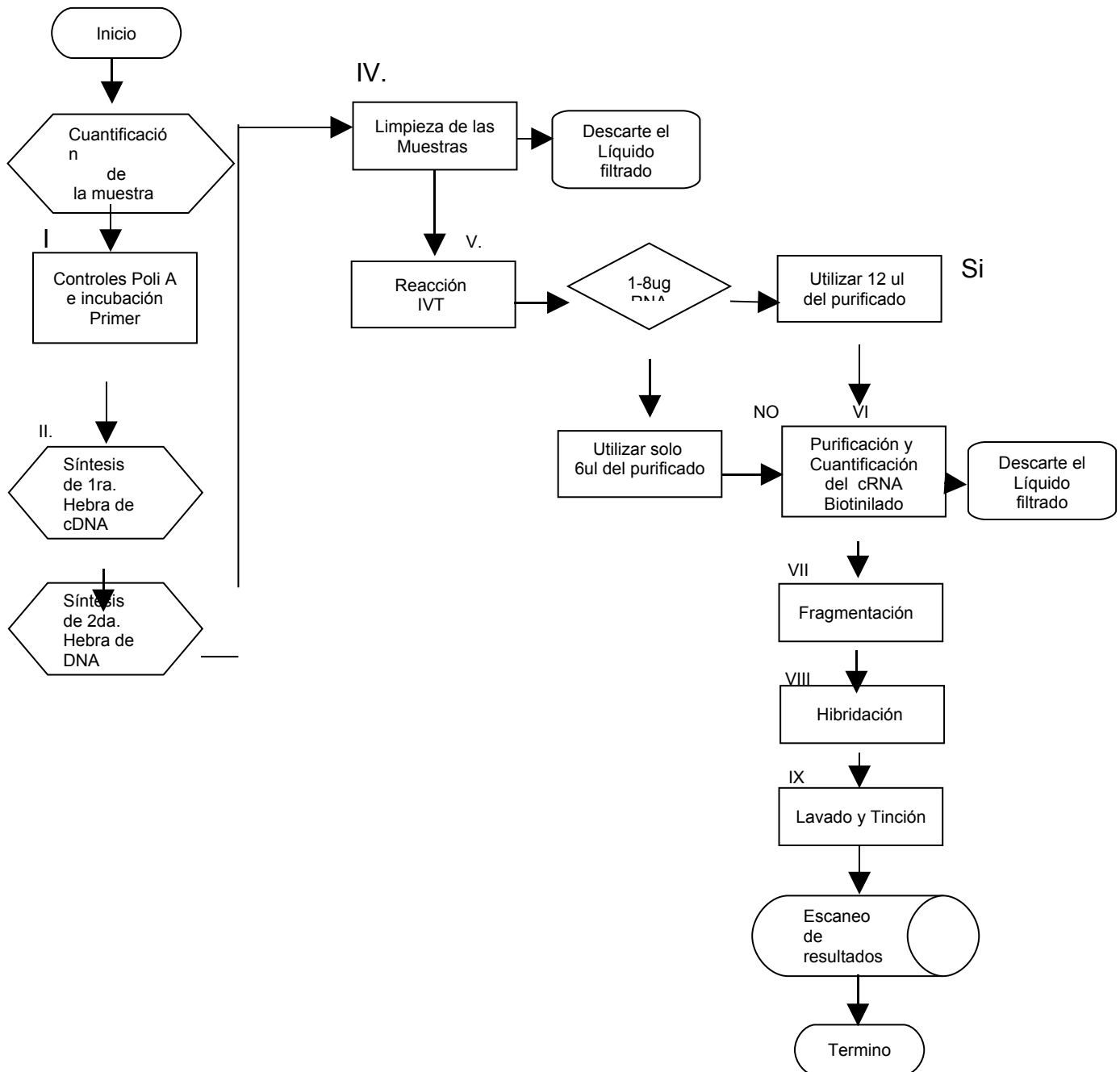
Formato Microarreglo	Ejemplo	Protocolo
49 y 64	U133 Plus 2.0 Rat Genome array 2.0	EukGE-WS2v5_450
100	Mouse 430A _2	Midi_euk2v3_450
169	Custom made arrays	Mini_euk2v3_450

9. Una vez terminado el protocolo de tinción, coloque un tough spot en los microarreglos y proceda al proceso de escaneo.



**TERMINO DEL PROCESO**

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
<b>Nombre</b>			
<b>Firma</b>			
<b>Fecha</b>			

**Diagrama del Procedimiento para procesar muestras de RNA para microarreglos de expresión**





CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>  SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 40 de 56

### 3. Procedimiento para procesar muestras SNP 5.0/6.0

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			



	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>		<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
		SECRETARÍA DE SALUD	Hoja: 41 de 56



### Descripción del Procedimiento para procesar muestras SNP 5.0/6.0

<b>I. DIGESTIÓN</b>																				
1. Mida la concentración de DNA genómico en el Nonodrop																				
2. Prepare dos sets idénticos de muestras de DNA a una concentración de 250ng en un volumen de 5µl (50/µl ng) en los tubos de reacción o placa de 96 pozos.																				
3. Se harán 2 digestiones una con la enzima Sty y otra con la enzima Nsp, se recomienda trabajar cada set en día distinto o por operadores distintos.																				
4. Descongelaar en hiel BSA y NE buffer. Para <b>Nsp</b> se utiliza el NE buffer 2 Para <b>Sty</b> se utiliza en NE buffer 3																				
5. Colocar el agua AccuGENE® en hielo																				
6. Para preparar los reactivos a excepción de la enzima:																				
A. Vortexear 3 veces x 1 seg.																				
B. Spin rápido 3 seg.																				
C. Colocar en cámara de enfriamiento.																				
Prepare la siguiente mezcla maestra (Master Mix) de Digestión EN HIELO de la siguiente forma:																				
<table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>Reactivo (stock)</th> <th>1 Muestra</th> <th>Conoc. Final por muestra</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>H2O</td> <td>11.55µl</td> <td></td> </tr> <tr> <td>NE buffer 1 (10X)</td> <td>2µl</td> <td>1X</td> </tr> <tr> <td>BSA (100X 10 mg/mL)</td> <td>0,2µl</td> <td>1X</td> </tr> <tr> <td><b>Nsp/Sty</b></td> <td>1,0µl</td> <td>0.5 U/ml</td> </tr> <tr> <td><b>VOLUMEN Final</b></td> <td>14.75 ml</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Reactivo (stock)	1 Muestra	Conoc. Final por muestra	H2O	11.55µl		NE buffer 1 (10X)	2µl	1X	BSA (100X 10 mg/mL)	0,2µl	1X	<b>Nsp/Sty</b>	1,0µl	0.5 U/ml	<b>VOLUMEN Final</b>	14.75 ml			
Reactivo (stock)	1 Muestra	Conoc. Final por muestra																		
H2O	11.55µl																			
NE buffer 1 (10X)	2µl	1X																		
BSA (100X 10 mg/mL)	0,2µl	1X																		
<b>Nsp/Sty</b>	1,0µl	0.5 U/ml																		
<b>VOLUMEN Final</b>	14.75 ml																			
“Se recomienda que la enzima se saque del refrigerador justo antes de utilizarse, se deberá alicuotar e inmediatamente regresar a su caja.																				
7. Agregue 14,75µl de la Mezcla Maestra de Digestión a cada tubo de DNA genómico. El volumen final de la mezcla de reacción es de 20µl																				
8. Mezcle con vortex durante 2 segundos y centrifugue a 2000 rpm durante 1 minuto. Coloque las muestras en el termociclador con el siguiente ciclo:																				
<table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>Temperatura</th> <th>Tiempo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>37°C</td> <td>120 minutos</td> </tr> <tr> <td>70°C</td> <td>20 minutos</td> </tr> <tr> <td>4°C</td> <td>∞</td> </tr> </tbody> </table>	Temperatura	Tiempo	37°C	120 minutos	70°C	20 minutos	4°C	∞												
Temperatura	Tiempo																			
37°C	120 minutos																			
70°C	20 minutos																			
4°C	∞																			

9. SI N O SE VA A PROCESAR LA MUESTRA INMEDIATAMENTE guarde a 20°C

**II. LIGAMIENTO**

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>    SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 42 de 56

1. Alicuotar el buffer de T4 DNA ligasa después de descongelarlo la primera vez. **DESCONGELAR LOS REACTIVOS EN HIELO** (tardan de 20 a 30 minutos en descongelarse)
2. Coloque un tubo eppendorf de 1.5 mL y una tira de 8 tubos en la cámara de enfriamiento (esta última se utilizará para colocar alícuotas de la master mix de ligamiento).
3. Saque las muestras de DNA del termociclador luego del proceso de digestión, centrifuguelas.
4. Prepare la Mezcla Maestra de Ligamiento EN HIELO de acuerdo a la siguiente tabla: Vortexear los reactivos 3 veces x 1 seg. Cada vez.

Reactivo (stock)	1 Muestra	Conc. Final por muestra
Adaptador Nsp ó Adaptador Sty (50 mM)	0,75 ml	0.25 mM
Buffer de T4 DNA Ligase (10X)*	2.5 ml	1X
T4 DNA Ligasa (400 U/ml)	2 ml	250 U
<b>VOLUMEN Final</b>	5.25 ml	

5. Mezcle con vortex por 2 segundos y centrifugue antes de añadir la Mezcla Maestra de Ligamiento a las muestras de DNA.
6. Alicuote 5,25µl de la Mezcla Maestra de Ligamiento a cada una de las muestras de DNA digerido.
7. Mezcle utilizando un vortex durante 3 segundos y centrifugue a 2000 rpm durante 1 minuto.
8. Coloque las muestras en el termociclador con el siguiente ciclo:

Temperatura	Tiempo
16°C	180 minutos
70°C	20 minutos
4°C	∞

9. SI NO SE VAN A PROCESAR LAS MUESTRAS INMEDIATAMENTE guarde a -20°C
10. Una vez terminado el ciclo Diluya cada una de las muestras con 75µl de Agua grado Biología Molecular antes de proceder a la PCR. **ESTE PASO ES CRUCIAL**  
VOLUMEN FINAL = 100µl

### III. PCR

#### 1.1 Para STY

Alicuote 10µl de la muestra ligada DILUIDA en el paso anterior por **triplicado**. Mantenga las muestras en un bloque frío y mantenga en hielo.

#### 1.2 Para NSP

Alicuote 10µl de la muestra ligada DILUIDA en el paso anterior por **cuatriplicado**. Mantenga las

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
<b>Nombre</b>			
<b>Firma</b>			
<b>Fecha</b>			

muestras en un bloque frío y mantenga en hielo.

2. Descongele los componentes del Clontech TITANIUM DNA Amplification kit a excepción de la TITANIUM Taq Polimerasa.

3. Prepare la siguiente Mezcla Maestra (Master Mix) de PCR en hielo.

Se recomienda añadir un control negativo para evaluar la presencia de contaminación

### 3.1 Para STY

3 reacciones x muestra	1 reaccion (uL)	3 reacciones(uL)	Total master mix
Agua	39,5	118,5	181,7
CT Titanium Taq PCR Buffer (10X)	10	30	46
GC Melt (5M)	20	60	92
dNTP (2.5mM each)	14	42	64,4
PCR Primer 002 (100uM)	4,5	13,5	20,7
Titanium Taq DNA Polymerase (50X)	2	6	9,2
<b>Total</b>	<b>90</b>	<b>270</b>	<b>396</b>

### 3.2 Para Nsp

4 reacciones por muestra	1 reaccion (uL)	4 reacciones(uL)	Total master mix
Agua	39,5	158	227,125
CT Titanium Taq PCR Buffer (10X)	10	40	57,5
GC Melt (5M)	20	80	115
dNTP (2.5mM each)	14	56	80,5
PCR Primer 002 (100uM)	4,5	18	25,875
Titanium Taq DNA Polymerase (50X)	2	8	11,5
<b>Total</b>	<b>90</b>	<b>270</b>	<b>668,25</b>

4. Añada 90  $\mu$ l del PCR Master Mix para obtener un volumen final de 100  $\mu$ l. Asegúrese de mezclar bien la Mezcla maestra antes de agregarla al DNA ligado.

5. Mezcle la reacción en un vortex durante 3 segundos y luego centrifugue a 2000 rpm durante 1 min.

6. Programe el termociclador de la siguiente forma:

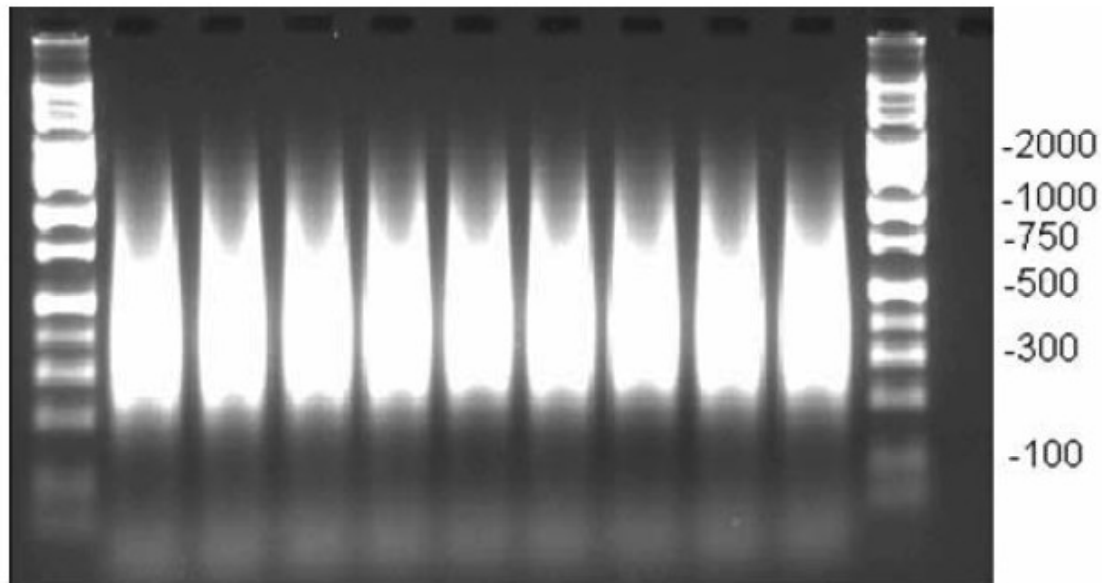
**GeneAmp® PCR System 9700**

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

Temperatura	Tiempo	CICLOS
94° C	3 minutos	1 X
94° C	30 segundos	30 X
60° C	45 segundos	
68° C	15 segundos	
68° C	7 minutos	1 X
4° C	∞	

7. Al finalizar la PCR, tome una alícuota de 3 ul y agregue 3 ul de buffer de muestra para gel de electroforesis. Corra un gel de Agarosa/TBE al 2% a 120V durante 50 minutos. Asegurese que las muestras estén en el rango de tamaño requerido (1100-200pb)

LAS MUESTRAS DEBEN OBSERVARSE COMO EL PATRÓN QUE SE MUESTRA EN LA FOTOGRAFÍA:



8. SI NO SE VA A PROCESAR LA MUESTRA INMEDIATAMENTE guarde a -20°C



## PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN

### Purificación

1. Prepare e identifique una placa EK scientific de 2.4 mL para mezclar los productos de PCR
2. Prepare Etanol al 75% utilizando agua grado biología molecular.

#### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	 <b>SALUD</b> SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 45 de 56

3. Haga un pool de 700  $\mu$ l para cada producto de PCR (3XSty y 4XNsp)
  4. Saque las perlas magnéticas de Agencourt y agite vigorosamente hasta que la solución sea homogénea y de color café oscuro.
  5. Agregue 1.0 mL de las Perlas Magnéticas de Agencourt bien mezcladas
  6. Mezcle el DNA con las perlas mediante pipeteo. Realice el pipeteo 5 veces para cada muestra.
  7. Incube 10 minutos a temperatura ambiente.
  8. DURANTE LA INCUBACION prepare el manifold de Millipore con una bomba de vacío que permita un vacío constante de 20-24 in Hg
  9. Coloque la placa para filtración de 0.45  $\mu$ m de EK Scientific y conecte a un matraz Kitasato para recibir el producto de filtración.
  10. Transfiera los productos de PCR con las perlas magnéticas a la placa de filtración. Si no va a utilizar todos los pozos de la placa selle bien antes de aplicar el vacío.
  11. Inicie la bomba de vacío y filtre hasta que los pozos se observen secos
- \*\* UTILIZE una lámpara para observar los pozos. La superficie de filtración se observa color mate cuando está completamente seca. Si la superficie brilla al observarla con la linterna, deje secar un poco más.
12. Cuando los pozos estén secos, agregue 1.8 mL de EtOH al 75% a cada uno de los pozos. Permita que los pozos sequen completamente (10-20 min)
  13. Cuando se haya filtrado todo el etanol, quite la placa del Manifold y con un Kimwipe elimine el exceso de líquido de la placa.
  14. Coloque la placa para recolección de Eluato, asegurándola a la placa de filtrado con cinta adhesiva.
  15. Agregue 55  $\mu$ l de buffer de elución (Buffer EB)
  16. Coloque el set filtro-placa de recolección en el Jitterbug y agite en el nivel 5 durante 10 minutos. Asegurese de que las perlas están resuspendidas.
  17. Coloque el filtro y la placa de recolección dentro del manifold utilizando el Deep collar específico para este paso.
  18. Quite la trampa y aplique vacío directamente al manifold. Espere hasta que la superficie de los pozos queden secas.
  19. Selle la placa con parafilm y centrifugue por 5 minutos a 2800 RPM (1400 RFC).

### Cuantificación

Determine la concentración del producto de PCR mediante un análisis espectrofotométrico.

1. Agregue 2  $\mu$ l del producto de PCR purificado a 198  $\mu$ l de agua grado biología molecular y mezcle bien. (Dilución 1:100)
2. Lea la absorbancia a 260 nm en el multiskan.

#### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

- Los valores de lectura deben estar entre 4 y 6 ug/ul
- Calcule la concentración considerando que 1 unidad de absorbancia a 260 nm es igual a 50  $\mu$ g/mL de DNA.

#### IV. FRAGMENTACIÓN

- Pre-caliente el termociclador a 37°C
- Coloque 45  $\mu$ l del producto de PCR purificado en una placa BiooRad que deberá estar en hielo.
- Añada 5  $\mu$ l de buffer de Fragmentación 10X a cada muestra en hielo. A esto le denominaremos la **Mezcla de Fragmentación**.
- REVISE el reactivo de fragmentación de acuerdo a su concentración prepare la siguiente dilución:

##### PARA 24 MUESTRAS

	2U/uL 48S	2,25U/uL 48S	2,5 U/ul 48 S	2,75 U/ul 48 S	3 U/ul 48 S
Fragmentation Reagent	9	8	7,2	6,55	6
10X Frag Buffer	18	18	18	18	18
Agua	153	154	154,8	155,45	156
<b>Total</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>180</b>

- Añada 5  $\mu$ l del reactivo de fragmentación diluido a los 50  $\mu$ l de cada una de las mezclas de fragmentación. Todo esto debe trabajarse en hielo

6. Mezcle con un vortex	Temperatura	Tiempo	rpm a 4°C.
	37° C	35 minutos	
7. Coloque inmediatamente las muestras en el termociclador con el siguiente programa:	95° C	15 minutos	
	4 °C	$\infty$	

- Centrifugue brevemente el producto de fragmentación
- Diluya 1,5  $\mu$ l del producto de fragmentación con 4  $\mu$ l del buffer de muestra y corra un gel de TBE al 4% a 120V durante 20 minutos.
- Proceda inmediatamente al paso de marcaje.

#### V. MARCAJE

- Encienda el termociclador y
- Prepare la mezcla de marcaje en hielo según la siguiente tabla:

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

Reactivo	1X (uL)
5X Tdt Buffer	14
GeneChip Labeling Reagent (30mM)	2
TdT	3,5
<b>Total</b>	<b>19,5</b>

3. Agregue 19.5  $\mu$ l de la mezcla de marcaje a cada una de las muestras fragmentadas de DNA

Reactivo	Volumen por Reacción
DNA fragmentado	53.5 $\mu$ l
Mezcla de marcaje	19.5 $\mu$ l
<b>TOTAL</b>	<b>73 <math>\mu</math>l</b>

4. Mezcle con un vortex durante un par de segundos y centrifugue las muestras a 2000 rpm x 1 minuto.

Temperatura	Tiempo
37° C	4 horas
95° C	15 minutos
4 °C	$\infty$

5. Corra el siguiente programa en el termociclador:

6. Centrifugue las muestras 2000 rpm x 1 minuto.

7. SI NO SE VA A PROCESAR LA MUESTRA INMEDIATAMENTE guarde a -20°C

## VI. HIBRIDACION

1. Prepare el buffer MES 12X de la siguiente forma

### MES Stock Buffer 12X

Volúmen final: 1000mL

70.4 g hidrato de MES

#### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

193.3 g de Sal sodica de MES  
 800 mL de Agua grado biología molecular.  
 Mezcle y ajuste el volumen a 1000 mL. Mida el pH ysi es necesario ajuste a 6.5 -6.7  
 Filtre utilizando un filtro de 2  $\mu$ m

2. Prepare el cocktail de hibridación de acuerdo a la siguiente tabla:

**Cocktail de hibridación**

Reactivo (stock)	1 Muestra	Conc. Final por muestra
MES (12X, 1.22 M)	12 $\mu$ l	0.056 M
DMSO (100%)	13 $\mu$ l	5 %
Solución de Denhart´s (50X)	13 $\mu$ l	2.5 X
EDTA (0.5 M)	3 $\mu$ l	5.66 mM
HSDNA (10 mg/mL)	3 $\mu$ l	0.115 mg/mL
OCR,0100	2 $\mu$ l	1 X
Human Cot-1 (1mg/mL)	3 $\mu$ l	11.5 $\mu$ g/mL
Tween-20 (3%)	1 $\mu$ l	0.0115%
TMACL (5M)	140 $\mu$ l	2.69 M
<b>VOLUMEN Final</b>	<b>190 <math>\mu</math>l</b>	

3. Agregue 190 $\mu$ l del cocktail de hibridación a los aprox 70 $\mu$ l del DNA marcado. Mezcle bien.

4. Programe el termociclador con el siguiente programa:

Temperatura	Tiempo
95 C	10 minutos
49C	$\alpha$

5. Inyecte 230  $\mu$ l de esta solución de hibridación a los gene chips.



6. Coloque en el horno de hibridación e hibridice a 50°C de 16 a 18 horas a 60rpm.

**VII. LAVADO, TINCION Y ESCANEAO**

1. Prepare las soluciones de lavado y tinción como se indica a continuación

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			



	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>  SECRETARÍA DE SALUD		<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>			Rev.
				Hoja: 49 de 56

<b>Wash A: Buffer de lavado no astringente</b>	<b>Wash B: Buffer de lavado astringente</b>	Filtre las soluciones por una membrana de 0.2 $\mu$ m Mantenga a T. Ambiente
300 mL de SSPE 20X	30 mL de SSPE 20X	
1.0 mL de Tween 20 al 10%	1.0 mL de Tween 20 al 10%	
699 mL de agua	969 mL de agua	

**0.5 mg/ mL de Anticuerpo anti-streptavidina**

Resuspenda 0.5 mg del anticuerpo en 1 mL de agua.  
Mantenga a 4°C

**1X Array holding buffer**

Para 100 mL  
8,3 mL de MES Stock buffer 12X  
18.5 mL de NaCl 5 M  
0.1mL de Tween-20 al 10%  
73.1 mL de agua  
Almacene a T de 2°C a 8°C y proteja de la luz.

2. Después de la 16-18 horas de hibridación quite la solución de hibridación del gene chip y deposítela en un vial para microcentrifuga. Mantenga en hielo a -80°C si va a almacenar a largo plazo.

3. Llene el gene chip hasta el tope con 250  $\mu$ l de Array holding buffer.



4. Prepare los siguientes reactivos:

**Buffer de tinción (Para aprox. 100 rxnx)**

Reactivo (stock)	1 Muestra	Conc. Final por muestra
H <sub>2</sub> O	80,04 ml	
SSPE (20X)	36 ml	6 X
Tween-20 (3%)	396 $\mu$ l	0.01%
Solución de Denharts (50X)	2.4 ml	1 X
<b>VOLUMEN Final</b>	<b>118 ml</b>	

**Solución de anticuerpo biotinilado**

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>			<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>			Rev.
			SECRETARÍA DE SALUD	Hoja: 50 de 56

Reactivo (stock)	1 Muestra	2 Muestras (+ 10%)	5 Muestras (+ 10 %)	Conc. Final por muestra
Buffer de tinción	495 $\mu$ l	1089 $\mu$ l	5445 $\mu$ l	1 X
0.5 mg/mL de anticuerpo biotinilado	5.0	11 $\mu$ l	27.5 $\mu$ l	10 $\mu$ g/mL
Volumen final	500 $\mu$ l	1100 $\mu$ l	5500 $\mu$ l	

5. Coloque 500  $\mu$ l de la Solución de tinción SAPE en el tubo que ira en el sample holder número 1 de la estación de fluidos.

6. Coloque 500  $\mu$ l de la Solución de anticuerpo biotinilado en el tubo que ira en el sample holder número 2 de la estación de fluidos.

7. Coloque 800  $\mu$ l de Array holding buffer 1X en el tubo que ira en el simple holder numero 3 de la estación de fluidos.

**No coloque estas soluciones hasta que haya corrido el Priming en la estación de fluidos**

8. Corra el programa de Priming en la estación de fluidos.

9. Una vez terminado el priming coloque los viales con las soluciones de tinción.

10. De de alta el experimento en el GCOS o en la AGCC.

11. De la pantalla de protocolos de la estación de fluidos seleccione el protocolo **GenomeWideSNP 6\_450 y** de alta un experimento para cada módulo.

12. Seleccione Run en la caja de diálogo para iniciar el protocolo de lavado y tinción.

13. Siga las instrucciones que aparecen en la el display de la estación de fluidos. Coloque los microarreglos y asegurese de que el protocolo de lavado y tinción inicia correctamente.

14. Cuando termine el protocolo de tinción, quité los viales que contienen los reactivos de tinción y reemplacelos con microtubos vacios.



15. Quite los Gene chips de la estación de fuidos y revise que no tengan burbujas.

16. Coloque un tough spot en cada una de las septas de los microarreglos para evitar que se derrame el líquido dentro del escáner.

17. Proceda a escanear los Genechips.

#### RECORDATORIOS ANTES DE ESCANEAR

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>    SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 51 de 56

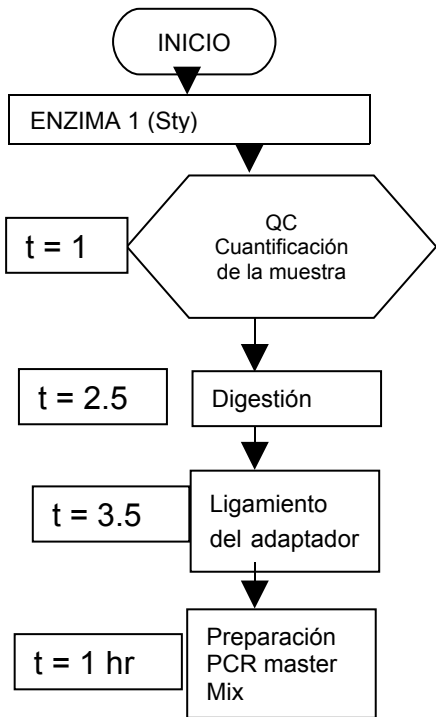
- ✓ Asegúrese que el escáner lleva al menos 10 minutos prendido antes de iniciar el proceso de escaneo.
- ✓ Si es necesario, limpie la superficie del microarreglo. No utilice alcohol para realizar este procedimiento, utilice una toallita no abrasiva o un pañuelo.
- ✓ Revise las estaciones de fluidos periódicamente para evitar errores o si hay alguna falla en el procedimiento detectarla inmediatamente y corregirla.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
<b>Nombre</b>			
<b>Firma</b>			
<b>Fecha</b>			

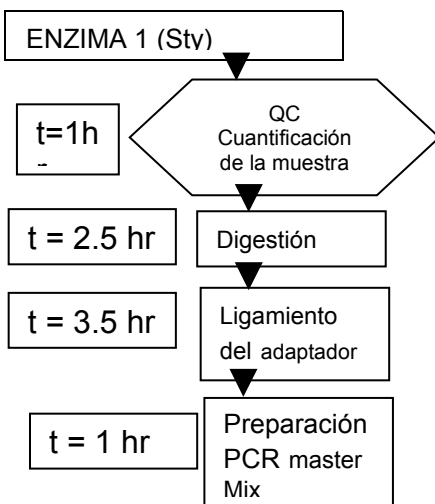
### DIAGRAMA DE PROCESO SNP 5.0/ 6.0

#### Día 1

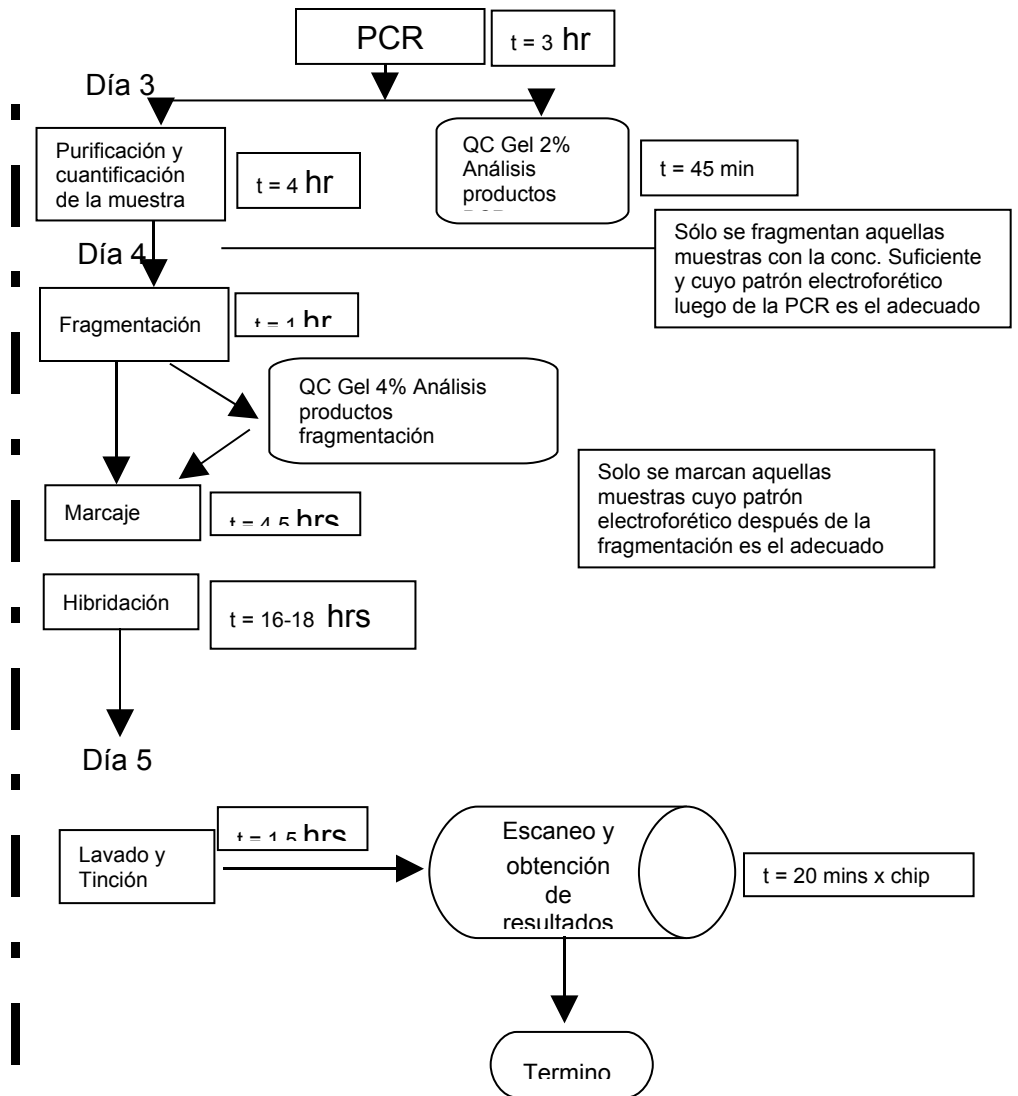
Laboratorio Pre-PCR



#### Día 2





Laboratorio Principal



#### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
<b>Nombre</b>			
<b>Firma</b>			
<b>Fecha</b>			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>  SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 53 de 56



## 6.0 Documentos de referencia

Documentos	Código (cuando aplique)
Manual de organización específico del Instituto Nacional de Medicina Genómica, autorizado por la Dirección General de Programación, Organización y Presupuesto.	Autorización 6 de marzo de 2006
Norma Oficial mexicana para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos, biológicos-infecciosos.	NOM-087-ECOL 1995 D.O.F. 17-11-2003
Norma Oficial Mexicana para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos	NOM-166-SSA1-1997 D.O.F. 13-1-2000
Norma Oficial Mexicana requisitos sanitarios del equipo de protección personal	NOM-056-SSA1-1993 D.O.F. 19-IX-1994
Manual Técnico del equipo <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Genechip® Mapping 500 Assay Manual</li> <li>➤ Affymetrix® Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty 6.0 User Guide</li> <li>➤ GeneChip Expression Analysis Technical Manual</li> <li>➤ The Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay.</li> </ul>	No aplica

## 7.0 Registros

Registros	Tiempo de conservación	Responsable de conservarlo	Código de registro o identificación única
Formato de solicitud de servicio de microarreglos	5 años	Unidad de Genotipificación y análisis de expresión Affymetrix	No aplica

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>		<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	SECRETARÍA DE SALUD		Rev.
				Hoja: 54 de 56

## 8.0 Glosario

8.1 DNA (ácido desoxirribonucleico) polinucleótido formado por la unión covalente entre unidades de desoxirribonucleótidos, compuestos de una base nitrogenada y una azúcar desoxirribosa. Contiene la información genética del organismo.

8.2 RNA ácido nucleico, formado por la unión covalente entre unidades de nucleótidos, compuestos de bases nitrogenadas y azúcares ribosa. A diferencia del DNA, el RNA tiene como base nitrogenada el uracilo que sustituye a la timina presente en el DNA

8.3 Microarreglos es una serie ordenada de sondas o pequeños fragmentos de DNA depositados en una superficie sólida que permiten hacer el análisis de ADN y ARN para conocer genotipos específicos (basado en la presencia de SNPs) o niveles de expresión genética.

8.4 Muestras: Material biológico proveniente de cualquier organismo extraído por métodos que permiten considerarlo representativo del mismo para efectuar un análisis.

8.5 Unidades de Alta Tecnología: Tecnología de punta, que proporciona servicios especializados de soporte, tanto al INMEGEN como a instituciones afiliadas, mediante la utilización de infraestructura que garantiza servicios eficientes de alta calidad y competitivos internacionalmente.

8.6 Formato de solicitud de servicio de microarreglos que contiene los datos de identificación del usuario y datos de la muestra.

8.7 Usuarios registrados: Usuarios frecuentes del servicio, a los que se les asigna un número de identificación y se les proporciona una clave de acceso al sistema para ver sus resultados en línea.

8.8 Personal técnico: Personal técnicamente capacitado que labora en la Unidad de Genotipificación

8.9 Genotipificación: Análisis de la secuencia de ADN en determinadas posiciones



8.10 Análisis de expresión: Análisis de todos los genes de un tejido bajo condiciones experimentales específicas.

8.11 Digestión: Proceso mediante el cual una cadena de ADN se fragmenta debido al rompimiento de los enlaces fosfodiéster catalizados por una enzima de restricción.

8.12 Vortexear: Acción de mezclar utilizando vortex

8.13 Ligamiento: Proceso mediante el cual un fragmento pequeño de ADN se une a otro mediante un enlace covalente entre el extremo 5' de una cadena y el extremo 3' de otra, catalizado por una enzima ADN ligasa.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	 <b>SALUD</b> SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 55 de 56

8.14 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, en la cual un fragmento de ADN se replica generando gran número de copias del mismo. Este proceso se fundamenta en la propiedad de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, bajo diversos ciclos de temperatura.

8.15 Purificación: Proceso mediante el cual se obtiene un ADN de alta calidad, homogéneo, sin nucleótidos, sencillos ni cadenas pequeñas, ni contaminación de proteínas u otros compuestos orgánicos.

8.16 Elusión: Proceso mediante el cual un compuesto específico capturado en la fase sólida pasa a la fase móvil para su recuperación.

8.17 Fragmentación: Proceso específico para el protocolo de microarreglos mediante el cual las cadenas de ADN se fragmentan a sondas con tamaño menor a 200 pb mediante la acción de una enzima DNAsa.

8.18 Hibridación: Unión de dos cadenas de ácidos nucleicos antiparalelas con secuencias de bases complementarias.

8.19 Solución de tinción SAPE: Solución streptavidina marcada con ficoeritina

8.20 Solución de anticuerpo biotinilado: Solución de anticuerpo anti streptavidina IgG de cabra marcado con biotina.

8.21 Controles Poli A.: Genes *Dap, lvs, phe, thr, ytrp de B*, subtilis modificados mediante la adición de colas poli-A clonadas a vectores pBluescript que contienen promotores de la secuencia T3.



8.22 Incubación primer: Incubación a 70 grados de la sonda de DNA con el primer para promover la separación de las hebras y la hibridación para la reacción posterior.

8.23 Termociclador: Aparato que consiste de un bloque de resistencia que distribuye a través de una placa, una temperatura homogénea durante un período de tiempo específico. Permite realizar ciclos de temperatura necesarios para una reacción en cadena de la polimerasa.

8.24 Reacción IVT: Reacción de transcripción in vitro mediante la cual se genera ARN a partir de un templado de DNA de doble cadena mediante la acción de la T7 RNA polimerasa.

8.25 SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>SALUD</b>  SECRETARÍA DE SALUD	<b>Código:</b>
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		Rev.
			Hoja: 56 de 56

## 9.0 Cambios de esta versión

Numero de Revisión	Fecha de Actualización	Descripción del cambio
No aplica	No aplica	No aplica

## 10.0 Anexos

- 10.1 Formato de solicitud de servicio de microarreglos (FA)
- 10.2 Instructivo para el llenado del Formato de Microarreglos

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			