



**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS
DE LA UNIDAD DE SECUENCIACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE
POLIMORFISMOS**

Marzo de 2008

INDICE

<ul style="list-style-type: none"> I. Introducción II. Objetivo General del Manual III. Marco Jurídico 1. Protocolo de Secuenciación <ul style="list-style-type: none"> 1.1 Propósito 1.2 Alcance 1.3 Responsables 1.4 Políticas de operación, normas y lineamientos 1.5 Descripción del Protocolo de Secuenciación 1.6 Diagramas 2. Protocolo para ensayo de Discriminación Alélica (taqman) ó Punto Final <ul style="list-style-type: none"> 2.1 Descripción del Protocolo para ensayo de Discriminación alélica (Taqman) ó punto final 2.2 Diagramas 3. Protocolo para ensayo PCR en Tiempo Real <ul style="list-style-type: none"> 3.1. Políticas de operación, normas y lineamientos 3.2 Recomendaciones para obtener una buena lectura de fluorescencia 3.3 Descripción del Protocolo para ensayo PCR en Tiempo Real 3.4 Diagramas IV Registros V. Glosario VI. Cambios de versión VII. Anexos 	
---	--

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD <small>SECRETARÍA DE SALUD</small>	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 3 de 38

I. Introducción

La Unidad de Secuenciación e identificación de polimorfismos, cuenta con infraestructura tecnológica de última generación producida por Applied Biosystems, una de las compañías líderes en el desarrollo y manufactura de equipos de alta tecnología para su aplicación en ciencias genómicas; y personal altamente capacitado para ofrecer a la comunidad científica de las Instituciones públicas y privadas, las técnicas de análisis de ácidos nucleicos de mayor demanda en la actualidad (Secuenciación de ADN, Análisis de fragmentos, Análisis de SNP's, Expresión Génica y PCR en Tiempo Real), dirigidas especialmente a las investigaciones en el campo de las Ciencias Biomédicas y de la salud.

La Unidad posee secuenciadores de alto rendimiento modelo 3730XL de 96 capilares, con capacidad máxima para secuenciar hasta 2,100,000 bases o de generar hasta 92,000 genotipos por día. Esta infraestructura tiene capacidad para el estudio de microsatélites (en paternidad y perfiles genéticos), polimorfismos de longitud variable, pérdida de heterocigocidad, análisis y validación de SNP's entre otros. Además cuenta con capacidad para análisis de PCR en Tiempo Real, utilizando un equipo SDS 7900HT-Fast que permite llevar a cabo experimentos de análisis de expresión génica y de genotipificación basados en la detección de moléculas fluorescentes. Esta tecnología resulta útil para estudios orientados al análisis de genotipos o expresión de un grupo pequeño de genes en un gran número de muestras, por ejemplo, en el caso de la validación de resultados obtenidos mediante microarreglos, así como en la asociación de un polimorfismo específico con alguna enfermedad.

La Unidad de Secuenciación dispone actualmente de los siguientes equipos, kits y reactivos relacionados con el análisis de ácidos nucleicos:

1. Secuenciador Automático 3730XL DNA Analyzer, con capacidad de análisis de 96 muestras simultáneas por electroforesis capilar. (Applied Biosystems).
2. Secuenciador Automático 3130XL Genetic Analyzer, con capacidad de análisis de 16 muestras simultáneas por electroforesis capilar. (Applied Biosystems).
3. Equipo de PCR en Tiempo Real SDS 7900 HT Fast, que realiza diversos ensayos principalmente expresión génica, discriminación alélica y cuantificación viral absoluta. Como estrategias de marcaje utiliza sondas TaqMan o SYBER Green. Con capacidad de análisis de hasta 384 muestras simultáneas. (Applied Biosystem).
4. Unidad automatizada de Fluídos Biomek FX Liquid Handler que realiza funciones de preparación de reacciones en placas para su lectura en los equipos, lo que potencia la capacidad de preparación y procesamiento de muestras en el laboratorio (Beckman Coulter).
5. Termocicladores de 96 y 384 pozos, Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems).
6. Química de marcaje para secuenciación: Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).
7. Química de limpieza de reacciones de PCR basada en perlas paramagnéticas (Agencourt).

El personal cuenta con el certificado por Applied Biosystems, lo cual asegura las buenas prácticas de los procedimientos y protocolos que se llevan a cabo en esta Unidad.

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD <small>SECRETARÍA DE SALUD</small>	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 4 de 38

Actualmente la Unidad de Secuenciación cuenta con 1 Responsable de la Unidad y 2 Técnicos de Laboratorio.

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD SECRETARÍA DE SALUD	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 5 de 38

II. Objetivo General del Manual

El Objetivo del manual es contar con un documento en el que se describan las técnicas para el desarrollo de los Protocolos de la Unidad de Secuenciación e Identificación de polimorfismos, 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			

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD <small>SECRETARÍA DE SALUD</small>	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 6 de 38

III. MARCO JURÍDICO

El Instituto Nacional de Medicina Genómica de la Secretaría de Salud, se encuentra sustentado en el siguiente marco jurídico – normativo:

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.

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD <small>SECRETARÍA DE SALUD</small>	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 7 de 38

Ley Federal para la Administración y Enajenación de Bienes del Sector Público.
D. O. F. 19-XII-2002.

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.

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD <small>SECRETARÍA DE SALUD</small>	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 8 de 38

Ley de los Sistemas de Ahorro para el Retiro.
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

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD <small>SECRETARÍA DE SALUD</small>	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 9 de 38

Reglamentos

Reglamento de la Ley Federal de Entidades Paraestatales.
D. O. F. 26-I-1990 y sus reformas.

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.

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD <small>SECRETARÍA DE SALUD</small>	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 10 de 38

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.
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

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD <small>SECRETARÍA DE SALUD</small>	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 11 de 38

Programa Nacional de Salud 2007-2012
 Última modificación 16-X-2007

Programa Especial de Ciencia y Tecnología 2001-2006
 D.O.F. 12-XII-2002

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

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD <small>SECRETARÍA DE SALUD</small>	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 12 de 38

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.

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

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD <small>SECRETARÍA DE SALUD</small>	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 13 de 38

peligrosos, biológicos-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo.
D. O. F. 17-II-2003.

Proyectos de disposiciones jurídicas

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.

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD SECRETARÍA DE SALUD	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 14 de 38

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

Lineamientos para la Protección y Seguridad de los Sistemas de Datos Personales del Instituto Nacional de Medicina Genómica.
 V Sesión Ordinaria de la Junta de Gobierno del Instituto Nacional de Medicina Genómica.
 16-III-2007.

ATRIBUCIONES

LEY DE LOS INSTITUTOS NACIONALES DE SALUD

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD SECRETARÍA DE SALUD	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 15 de 38

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:

1. 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;
2. 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;
3. Promover y realizar reuniones de intercambio científico, de carácter nacional e internacional, y celebrar convenios de coordinación, intercambio o cooperación con instituciones afines;
4. Formar recursos humanos en sus áreas de especialización, así como aquellas que le sean afines;
5. 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;
6. Otorgar constancias, diplomas, reconocimientos y certificados de estudios, grados y títulos, en su caso, de conformidad con las disposiciones aplicables;
7. 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			

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN		Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
		SECRETARÍA DE SALUD	Hoja: 16 de 38

1. Protocolo de Secuenciación

1.1 Propósito

1.1 Descripción de los pasos y la secuencia a seguir para el desarrollo de los Protocolos de: Secuenciación; Ensayo Taqman (Punto Final); Ensayo PCR en Tiempo Real, que sirva de guía

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD SECRETARÍA DE SALUD	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 17 de 38

para el personal que labora en la Unidad de Secuenciación e Identificación de polimorfismos, como para el conocimiento del personal del Instituto.

1.2 Alcance

2.1 Aplica al personal involucrado en la Unidad de Secuenciación e Identificación de polimorfismos

1.3 Responsabilidades

3.1 Es responsabilidad de los operadores del área el seguir los procedimientos descritos en este manual y notificar al Responsable de la Unidad de cualquier desviación que se presente durante el proceso.

3.2 El Responsable de la Unidad de Secuenciación deberá supervisar que el personal conozca entienda y aplique correctamente los procedimientos y coordine la capacitación del personal que efectúa la operación.

1.4. Políticas de operación, normas y lineamientos

1. 4.1 No se permite la entrada a personas ajenas a la Unidad, excepto para entrega de muestras y uso del robot BIOMEK

1. 4.2 Cualquier usuario que no se encuentre adscrito a la Unidad de Secuenciación tiene prohibido manipular los secuenciadores, los equipos de PCR en tiempo real y los termocicladores.

1. 4.3 Por seguridad, en caso de visitas guiadas a la Unidad de Secuenciación, no se permite que manipulen ningún equipo o reactivo sin autorización del responsable, así mismo los visitantes deben de portar gafete y bata.

1.4.4 Todo usuario debe contar con un password que le permita el acceso al folder de red, en caso de no tener contraseña acudir al departamento de Tecnologías de la información.

1. 4.5 Para el servicio de secuenciación las muestras deberán estar correctamente identificadas, cumplir con los requisitos establecidos (calidad, pureza, concentración, etc) y

1. 4.6 Todos los reactivos serán siempre alicuotados (mientras sus características lo permitan) con la finalidad de optimizar sus uso.

1. 4.7 Solamente el personal de la Unidad puede tener acceso a los reactivos y muestras dentro de los refrigeradores y en general dentro de la Unidad.

1. 4.8 No esta permitido guardar nada que no sean muestras o reactivos en los refrigeradores.

1. 4.9 El último día de cada mes, se hará un mantenimiento preventivo a todos los equipos de la Unidad para asegurar su óptimo funcionamiento.

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD SECRETARÍA DE SALUD	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 18 de 38

1. 4.10 Para asegurar la oportuna existencia de: solventes, soluciones o reactivos necesarios que estén próximos a consumirse, el personal técnico que labora en la Unidad, deberá anotarlos en la libreta correspondiente.

1. 4.11 En caso de detectar algún desperfecto o mal funcionamiento de equipo, notificar de inmediato al responsable de la Unidad.

1. 4.12 El tiempo de entrega de los análisis de secuenciación son: Sólo lectura: 24 hrs, Amplificación y lectura: 3 días; Tiempo real: variable dependiente de la complejidad del ensayo; Discriminación alélica: solo lectura: Entrega inmediata, Reacción de PCR y lectura: entrega en 12 hrs.

1. 4.13 Para ensayos de PCR Tiempo Real y Taqman, el usuario debe manipular todos los reactivos y la placa con guantes, adicionalmente se debe evitar que la placa y reactivos tengan contacto con áreas contaminadas, con polvo o talco.

1. 4.14 En caso de ensayos de PCR en Tiempo Real agendar vía correo electrónico la solicitud y el horario con un día de anticipación, el personal de la Unidad enviará un correo de respuesta.

1. 4.15 Para ensayos de discriminación alélica los usuarios deberán traer sus muestras debidamente identificadas y el formato de solicitud previamente llenado.

1. 4.15 Para los servicios de robot BIOMEK los usuarios deberán firmar una carta de corresponsabilidad y agendar vía correo electrónico con un día de anticipación.

1. 4.16 Usuarios no adscritos a la Unidad de Secuenciación e Identificación de polimorfismos no están autorizados para encender el robot, hacer cambios en los archivos de programa ni acceder a otros programas, sólo podrán utilizar el robot una vez que el personal de la Unidad haya realizado las calibraciones necesarias para el ensayo.

1.4.17 La Carta de co-responsabilidad tendrá que ser firmada por los usuarios ajenos a la Unidad de Secuenciación que manejen el equipo PCR en Tiempo Real y el Robot Biomek con el fin de asegurar el buen uso del equipo.

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD <small>SECRETARÍA DE SALUD</small>	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 19 de 38

1.5 Descripción del Protocolo de Secuenciación . A) Preparación de la Muestra (3 hrs.)

1.	Limpiar el área de trabajo
	<p>Descongelar los siguientes reactivos y mantenerlos a 4°C: Big Dye Terminator V3.1 Buffer de secuencia 5X pGEM 3Zf+ M13 (-21) PRIMER</p>
2.	Ajustar las muestras de DNA a una concentración de 10-15 ng/ μ L , en un volumen final de 4 μ L
	<p>Preparar la mezcla de reacción para secuenciación: Los volúmenes abajo indicados corresponden a una reacción por muestra. 1μ l de Big Dye Terminator V3.1 1 μ l de Buffer de Secuencia 5X 1 μ l de M13 (-21) Primer 10 uM (pGEM, o primer de la muestra) 1 μl H2O</p>
3.	Mezclar bien todos los reactivos y dar un pulso en la picofuga. Colocar 4.0 μ L de la mezcla de reacción en cada pozo de la placa.
2	Adicionar a cada pozo 2 μ L de la dilución de DNA (10-15ng/ μ L), mezclar por pipeteo.
3	Sellar la placa con una cubierta adhesiva no óptica. Colocar la placa en la centrífuga Allegra 25R y dar un pulso. Asegurarse de eliminar las burbujas en la mezcla de reacción.
4	<p>Termociclar en el equipo GeneAmp PCR System 9700 con el programa BigDye</p> <p>25 ciclos de: 96°C por 10 seg. 50°C por 5 seg. 60°C por 4 minutos.</p> <p>1 Hold de 4°C ____</p>
5	<p>B): Purificación de reacciones de PCR (30 min)</p> <p>Las muestras se limpian para eliminar todos los nucleótidos marcados con fluorescencia que no se incorporaron en la reacción de PCR. Existen varios métodos para eliminar estos nucleótidos. Pueden removerse por precipitación con Etanol, por filtración en membrana, perlas magnéticas o por columnas de Sephadex (Columnas Centrisep).</p> <p>El método mas utilizado es el de Columnas CentriSep</p> <p>a) Sacar la placa del refrigerados y ponerla a temperatura ambiente, remover la cubierta adhesiva del fondo y después la de arriba.</p> <p>b) Colocar la placa CENTR-SEP 96 sobre la placa de lavado y centrifugar a 5,700rpm durante 2 minutos, verificar la orientación de la placa. Desechar el líquido (200μl).</p> <p>c) Transferir 20μl de la reacción de secuenciación a cada pozo de la placa. Dispensar la</p>

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	SALUD	 <small>SECRETARÍA DE SALUD</small>	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS			
				Hoja: 20 de 38

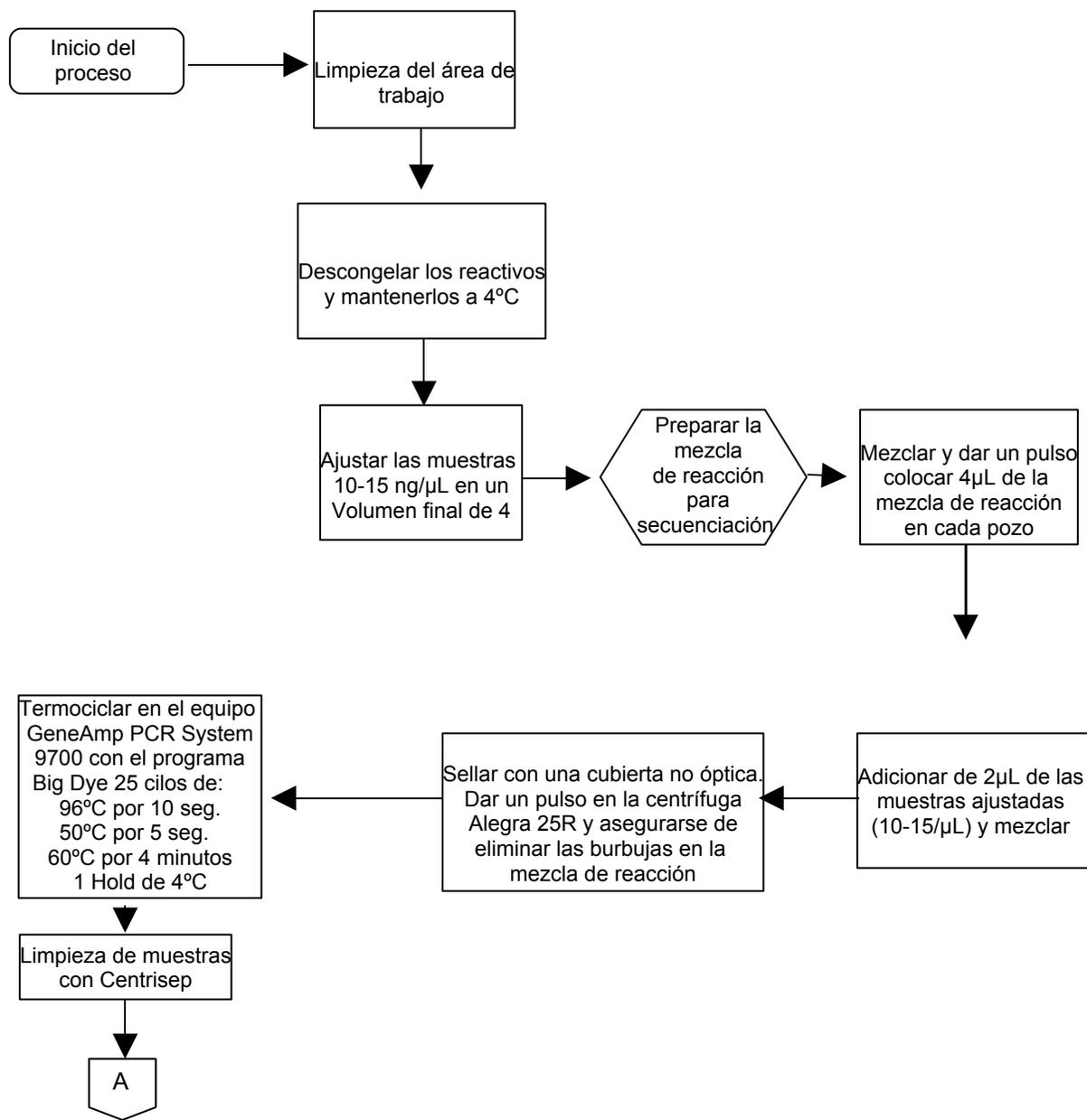
muestra en el centro de la cama del gel sin hacer contacto en la superficie del gel o en los lados.

d) Colocar la placa de colecta debajo de la placa CENTRI-SEP 96 asegurando que coincidan alfanuméricamente y centrifugar a 5,700rpm durante 2 minutos. La muestra purificada se ira al fondo de la placa de colecta y se desecha la placa CENTRI-SEP 96.

- 6 **C) : Procesamiento de las muestras en el equipo (2hrs 20 min)** Encender la computadora y posteriormente el secuenciador.
- 7 Abrir el programa Run 3730x Data Collection V3.0 (para el secuenciador 3730xl) o Run 3130xl Data Collection (para el secuenciador 3130xl).
- 8 De este paso en adelante es OBLIGATORIO usar bata y guantes para seguridad del usuario.
- 9 Colocar el polímero POP7 en el equipo y revisar que todos los conductos y la bomba de zafiro se encuentren sin burbujas, en caso de tener alguna de éstas removerlas con el *bubble remove wizard*.
- 10 Antes de realizar una corrida asegurarse de que el equipo tenga agua y buffer de corrida frescos.
- 11 Ingresar las muestras al equipo dentro del rubro *Plate Manager* y hacer una platilla nueva (*New*), indicando siempre la orientación del primer, F para Forward y R para Reverse.
- 12 Asignarle *Results Group* según sea el usuario (por ejemplo: Eros Balam), también indicar *Instrument Protocol* correspondiente (por ejemplo: Fast Sequence para el 3730xl y Rapid Sequence para el 3130x); por último asignar el *Analysis Protocol*: 3130POP7BDTV1-KB o 3730POP7BDTV3.1-De Novo
- 13 Preparar la placa para colocarla en el equipo: Poner la placa sobre la base (accesorio del equipo), sellarla con una septa y tatarla con un retainer. Es muy importante que todos los orificios de la placa y de los accesorios coincidan perfectamente para evitar daño a los capilares.
- 14 Colocar la placa en el Stacker del equipo e iniciar la corrida en el rubro *Run Scheduler*.
- 15 Al terminar la corrida abrir el programa *Sequencing Analysis V5.2*, importar las muestras y analizarlas seleccionando los parámetros BC y PP en cada muestra.
- 16 Analizar el electroferograma *Electropherogram* y los datos crudos (Raw) de cada muestra, poniendo atención en la asignación de bases, calidad de dicha asignación y fluorescencia de fondo.
- 17 Cerrar el programa y en cuanto aparezca la leyenda: Save samples? Seccionar la opción *Yes to all*.
- 18 Abrir el staker y retirar la placa. Cerrar todas las aplicaciones, y apagar el equipo, la computadora y el regulador de alto voltaje.
- 19 Retirar el POP7 y almacenarlo a 4°C, en su lugar colocar un papel parfilm.
- 20 Entrega de resultado

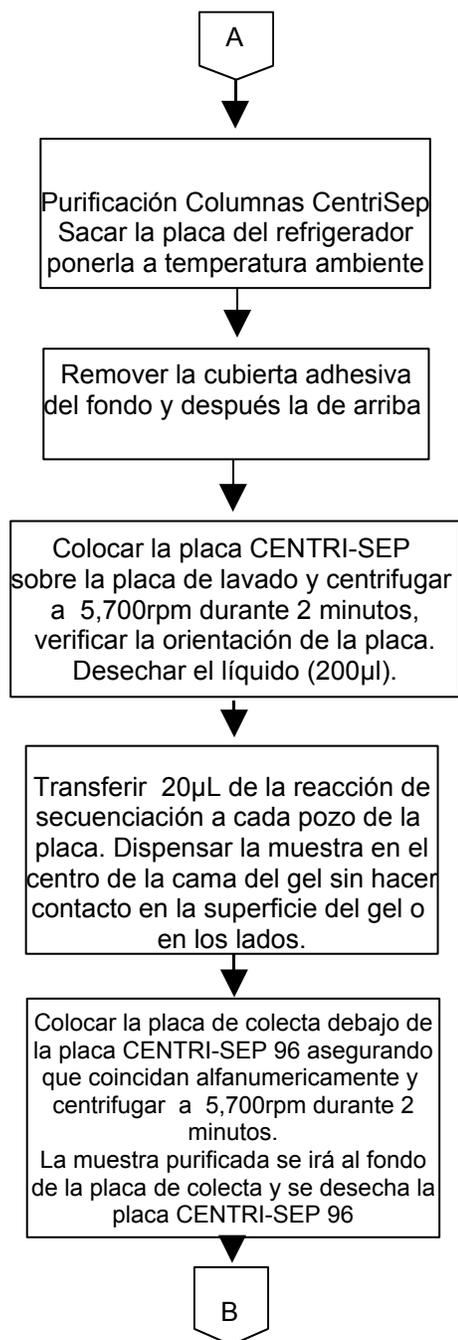
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

1.6 Protocolo de Secuenciación.
Diagrama 1. Preparación de la Muestra



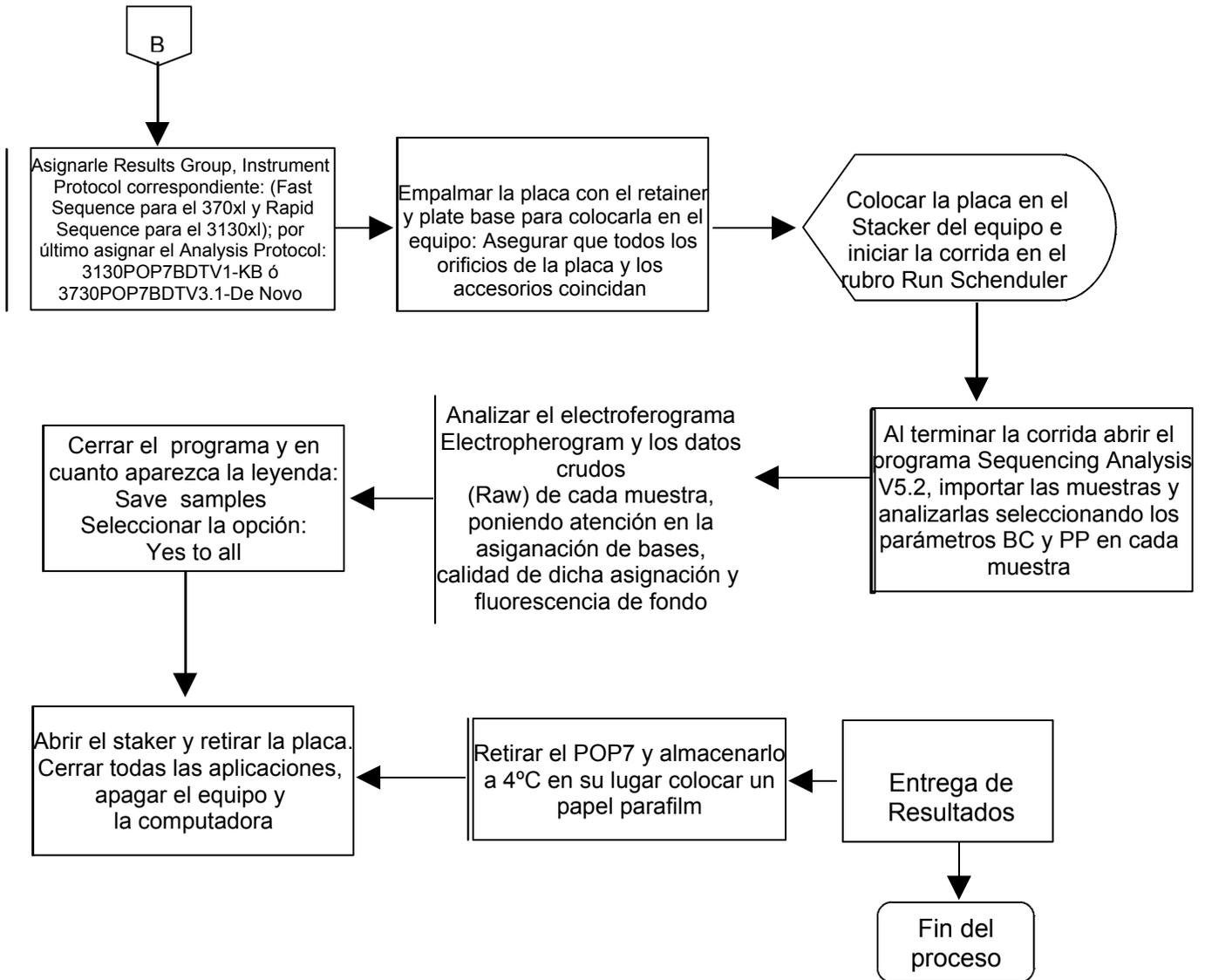
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

Diagrama 2: Purificación de reacciones de PCR (Tiempo:30 min.)



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

Diagrama 3 . Procesamiento de las muestras en el equipo (Tiempo 2 hrs. 20 min.)



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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN		Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
		SECRETARÍA DE SALUD	Hoja: 24 de 38

2. Protocolo para ensayo de Discriminación Alélica (Taqman) ó Punto Final

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD SECRETARÍA DE SALUD	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 25 de 38

2.1 Descripción del Protocolo para ensayo de Discriminación Alélica (Taqman) o Punto Final Diagrama 1. Preparación de la muestra (2 hrs. 20 min.)

2. Limpiar con etanol el área de trabajo												
3. Colocar PCR Master Mix en hielo, descongelar la sonda Taqman y colocarla en hielo (preferentemente cubierta con aluminio). Durante este lapso de tiempo rotular perfectamente la placa y encender el termociclador.												
4. Hacer la mezcla de reacción tomando en consideración la concentración de la sonda:												
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 30%;">Reactivos</td> <td style="width: 35%;">Sonda 20X</td> <td style="width: 35%;">Sonda 40X</td> </tr> <tr> <td>Universal PCR Master Mix</td> <td>225.0µL</td> <td>225.0µL</td> </tr> <tr> <td>Sonda</td> <td>11.0µL</td> <td>5.5µL</td> </tr> <tr> <td>H2O grado Biol Mol</td> <td>295.0µL</td> <td>295.5µL</td> </tr> </table>	Reactivos	Sonda 20X	Sonda 40X	Universal PCR Master Mix	225.0µL	225.0µL	Sonda	11.0µL	5.5µL	H2O grado Biol Mol	295.0µL	295.5µL
Reactivos	Sonda 20X	Sonda 40X										
Universal PCR Master Mix	225.0µL	225.0µL										
Sonda	11.0µL	5.5µL										
H2O grado Biol Mol	295.0µL	295.5µL										
5. Mezclar los reactivos 4 veces por pipeteo y dar un pulso en la picofuga												
6. Alicuotar 61 µL de la mezcla de reacción en tubos de 8 tiras												
7. Dispensar 5 µL de la mezcla de reacción a cada muestra con una pipeta multicanal y mezclar por pipeteo												
8. Sellar la placa con una cubierta óptica												
9. Colocar la placa en la centrifuga Allegra 25R y dar un pulso. Asegurarse de eliminar las burbujas en la mezcla de reacción.												
<p>1 Hold de 95°C por 10:00 min.</p> <p>40 ciclos de 92°C por 15 seg. 60°C por 1:00 min</p> <p>1 Hold de 4°C ____</p>												
10. Colocar un Pad sobre la placa y termociclar en un equipo GeneAmp PCR System 9700 siguiendo el programa para Taqman:												
<p>1 Hold de 95°C por 10:00 min.</p> <p>40 ciclos de 92°C por 15 seg. 60°C por 1:00 min</p> <p>1 Hold de 4°C ____</p>												
11. Al finalizar el termociclado retirar el pad y hacer una lectura de punto final (Allelic Discrimination) en el equipo 7900 HT Fast Real Time PCR System.												

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD SECRETARÍA DE SALUD	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 26 de 38

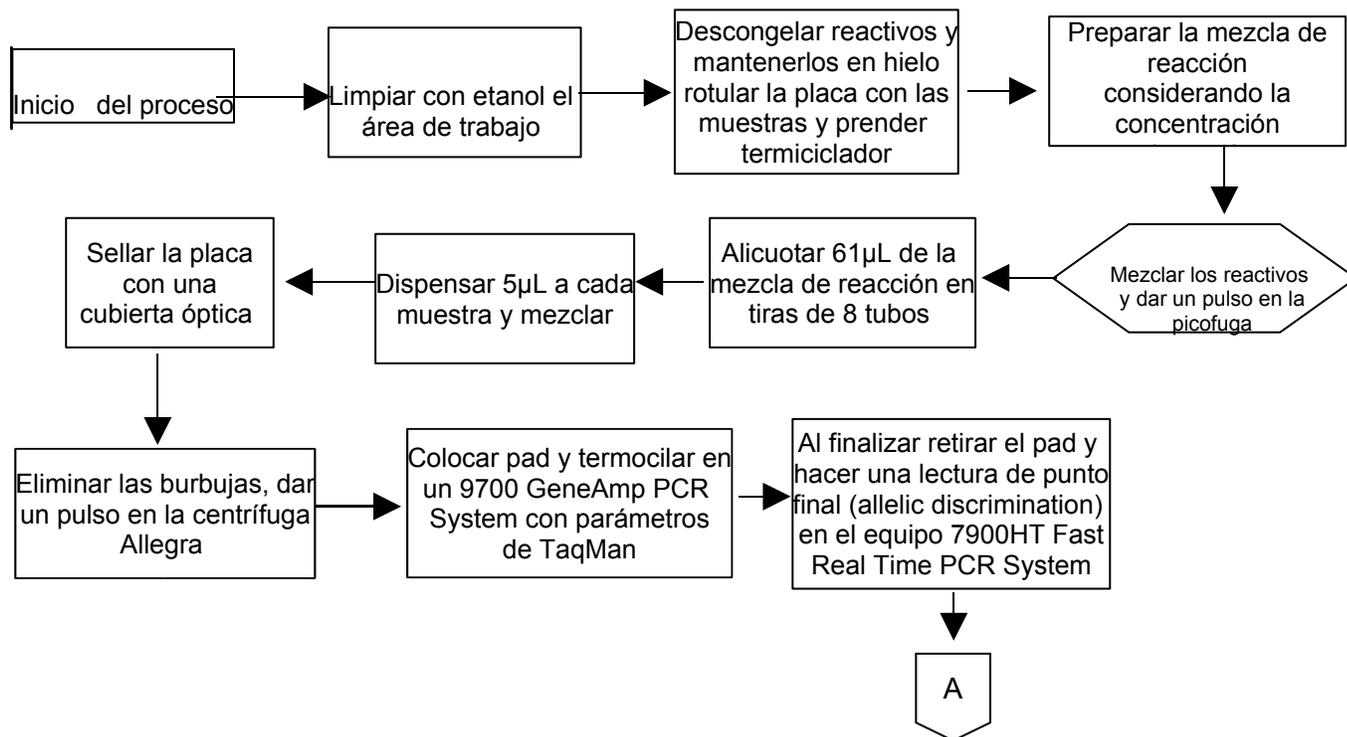
Diagrama 2. Procesamiento de la muestra dentro del equipo (10-15 min)

11. Encender la computadora y posteriormente el equipo
12. Abrir el programa SDS V2.2.2 y seleccionar la aplicación <i>Allelic Discrimination</i>
13. Seleccionar la opción <i>set up</i> ; ingresar el nombre de las muestras, seleccionar marcadores y detectores correspondientes.
14. Seleccionar la opción <i>instrument</i> y pulsar <i>connect</i> , posteriormente pulsar <i>open/close</i> y colocar la placa con las muestras en el brazo del equipo, pulsar nuevamente <i>open/close</i>
15. Pulsar la opción <i>Post Read</i> y analizar resultados
16. Seleccionar la opción <i>instrument</i> y pulsar <i>open/close</i> , retirar la placa con las muestras, pulsar nuevamente <i>open/close</i> .
17. Dentro de la opción <i>Instrument</i> pulsar <i>disconnect</i> y apagar el equipo.
18. Guardar el ensayo en la carpeta del usuario correspondiente, (disco duro), analizar los resultados y colocar los resultados en el folder de red del usuario. Apagar el equipo y guardar la placa 4°C. El término de este paso se considera el final del ensayo
19. Entrega de resultados
Termina el proceso

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

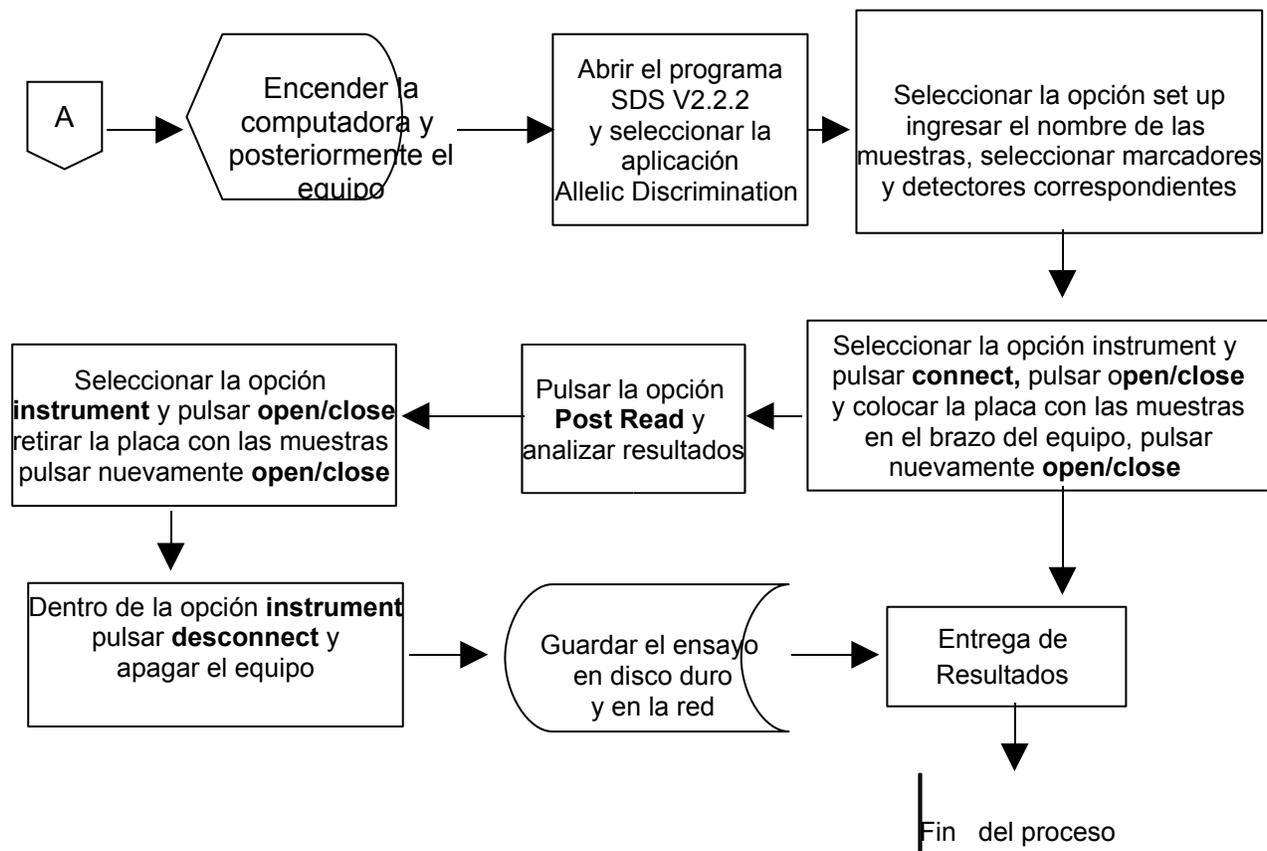
2. 2. Protocolo para ensayo de Discriminación Alélica (Taqman) ó Punto Final.

Diagrama 1. Preparación de la muestra



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

Diagrama 2. Procesamiento de la muestra dentro del equipo (10-15 min)



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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN		Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
		SECRETARÍA DE SALUD	Hoja: 29 de 38

3. Protocolo para ensayo PCR en Tiempo Real

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD <small>SECRETARÍA DE SALUD</small>	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 30 de 38

3.1. Políticas, normas y Lineamientos para uso del equipo 7900HT Fast Real -Time PCR System

3.1.1. Solo se le permitirá usar el equipo a personas que tengan la capacitación básica para el manejo del mismo * y que tengan la carta de co-responsabilidad firmada**

3.1.2 Registrarse en la bitácora al realizar la lectura de placas. En el rubro “usuario” se deberá anotar el nombre del usuario (técnicos, estancias, servicio social, etc) que realizará la lectura de los datos y además el nombre del investigador responsable, ejemplo Alfredo M / Yolanda S

3.1.3 Antes de utilizar el equipo revisar la bitácora para asegurarse de no empalmar sus corridas con las corridas en tiempo real de otros usuarios.

3.1.4 En el caso de corridas de tiempo real el usuario se anotará con 24 horas de anticipación, además anotará el horario durante el cual ocupará el equipo y no deberá exceder ese tiempo.

3.1.5 Para hacer mas eficiente el proceso, en corridas de tiempo real sólo se permite un hold de 4°C durante 10 min., si al término de este tiempo no es retirada la placa, será desechada y cualquier usuario podrá utilizar el equipo.

3.1.6 Todo usuario debe contar con un password que le permitirá el acceso al folder de red.

3.1.7 El usuario deberá hacer la lectura de tiempo real y/o punto final, guardar los archivos y subir los resultados a su folder de red sin hacer un análisis detallado de los datos obtenidos.

3.1.8 Antes de apagar el equipo verificar que NO quede abierto

3.1.9 Asegurarse de no dejar placas en el equipo

3.1.10 Apagar el equipo de Tiempo Real (sólo el instrumento, dejar encendida la computadora) al terminar lectura de las placas.

3.1.11 Si detecta cualquier anomalía en el equipo reportarlo inmediatamente.

3.1.12 Para ensayos de PCR Tiempo Real y TaqMan, el usuario debe manipular todos los reactivos y la placa con guantes, adicionalmente se debe evitar que la placa y reactivos tengan contacto con áreas contaminadas, con polvo o talco.

3.1.13 En este manual no se puede precisar los reactivos, volúmenes o número de réplicas; los parámetros de cada ensayo se especifican con el usuario antes de realizar la corrida.

3.2 Recomendaciones para obtener una buena lectura de fluorescencia

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD SECRETARÍA DE SALUD	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 31 de 38

3.2.1 Usar guantes de nitrilo al manejar las placas

3.2.2 Traer las placas cubiertas con papel aluminio

3.2.3 No colocar las placas en superficies sin protección y que se puede contaminar el bloque y obtener una mala lectura.

3.2.4 Utilizar pad en la placa si se va a correr un ensayo de Tiempo Real y retirarlo antes de hacer la lectura de Punto Final.

3.2.5 Evitar al máximo tener contacto con la película óptica que cubre a la placa

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD SECRETARÍA DE SALUD	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 32 de 38

3.3 Descripción del Protocolo para ensayo de PCR en Tiempo Real. **DIAGRAMA 1: PREPARACIÓN DE LA MUESTRA (20 – 30 min)**

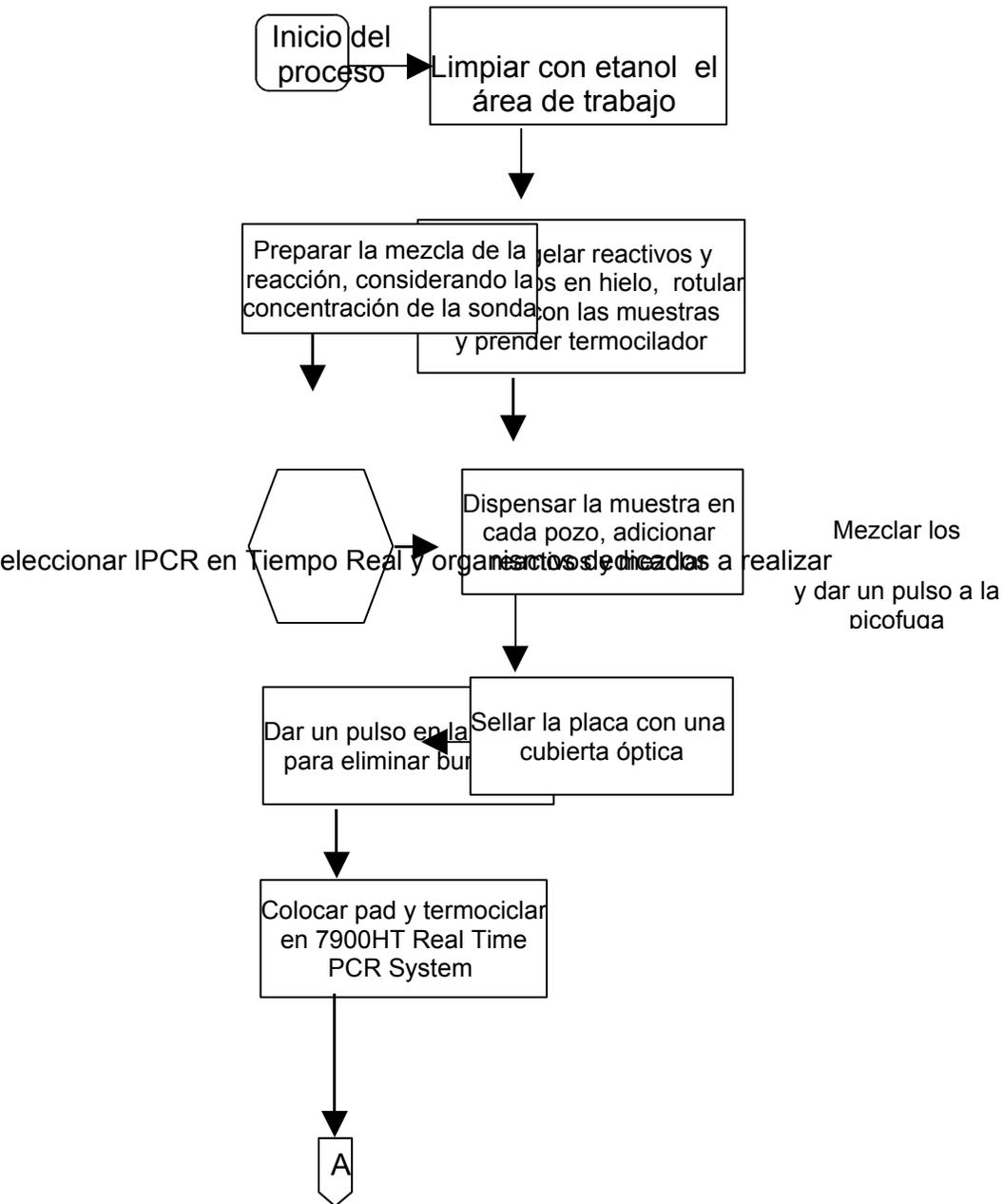
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Limpiar con etanol el área de trabajo
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Descongelar los reactivos a temperatura ambiente, durante este lapso de tiempo rotular perfectamente la placa y encender el termociclador. Cubrir con aluminio los reactivos que contengan fluorocromos y mantener todos los reactivos en hielo.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Preparar la mezcla de reacción tomando en consideración la concentración de la sonda, número de muestras y réplicas, con roles endógenos, controles negativos y positivos, etc.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Mezclar los reactivos 4 veces por pipeteo y dar un pulso en la picofuga
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Dispensar la muestra a cada pozo de la placa y adicionar la mezcla de reacción, mezclar por pipeteo.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Sellar la placa con una cubierta óptica.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Colocar la placa en la centrífuga Allegra 25R y dar un pulso. Asegurarse de eliminar las burbujas en la mezcla de reacción.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Colocar un Pad sobre la placa y termociclar en el equipo 7900HT Real Time PCR System <p style="text-align: center;">Termino del proceso</p>

Diagrama 2: Procesamiento de la muestra dentro del equipo (2 hrs 10 min.)

<ul style="list-style-type: none"> ➤ Encender el equipo 7900HT Real Time PCR System y abrir el software SDS V2.2.2, seleccionar la aplicación “Absolute Quantification” o “Relative Quantification” según sea el tipo de experimento.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Seleccionar opción set up; ingresar el nombre de muestras, seleccionar marcadores y detectores correspondientes, estándares, controles endógenos, controles positivos y negativos, etc.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ En la opción instrument seleccionar 9600 emulation, establecer parámetros de volumen y termociclado según el tipo de ensayo.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Guardar el ensayo en la carpeta del usuario (disco duro)
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Seleccionar la opción Instrument y pulsar connect, posteriormente pulsar open/close y colocar la placa con el pad en el brazo del equipo, pulsar nuevamente open/ close
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Seleccionar el ícono de corrida “start”
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Al término de la corrida sacar la placa, retirar el pad e introducir la placa nuevamente
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Pulsar la opción Post Read y analizar los resultados, guardados en la carpeta de red correspondiente.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Seleccionar la opción instrument y pulsar open/close, retirar la placa con las muestras, pulsar nuevamente open/close
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Dentro de la opción instrument pulsar disconnect y apagar el equipo. Guardar la placa 4°C
<ul style="list-style-type: none"> ➤ El término de este paso se considera el final del ensayo <p style="text-align: center;">Termino del proceso</p>

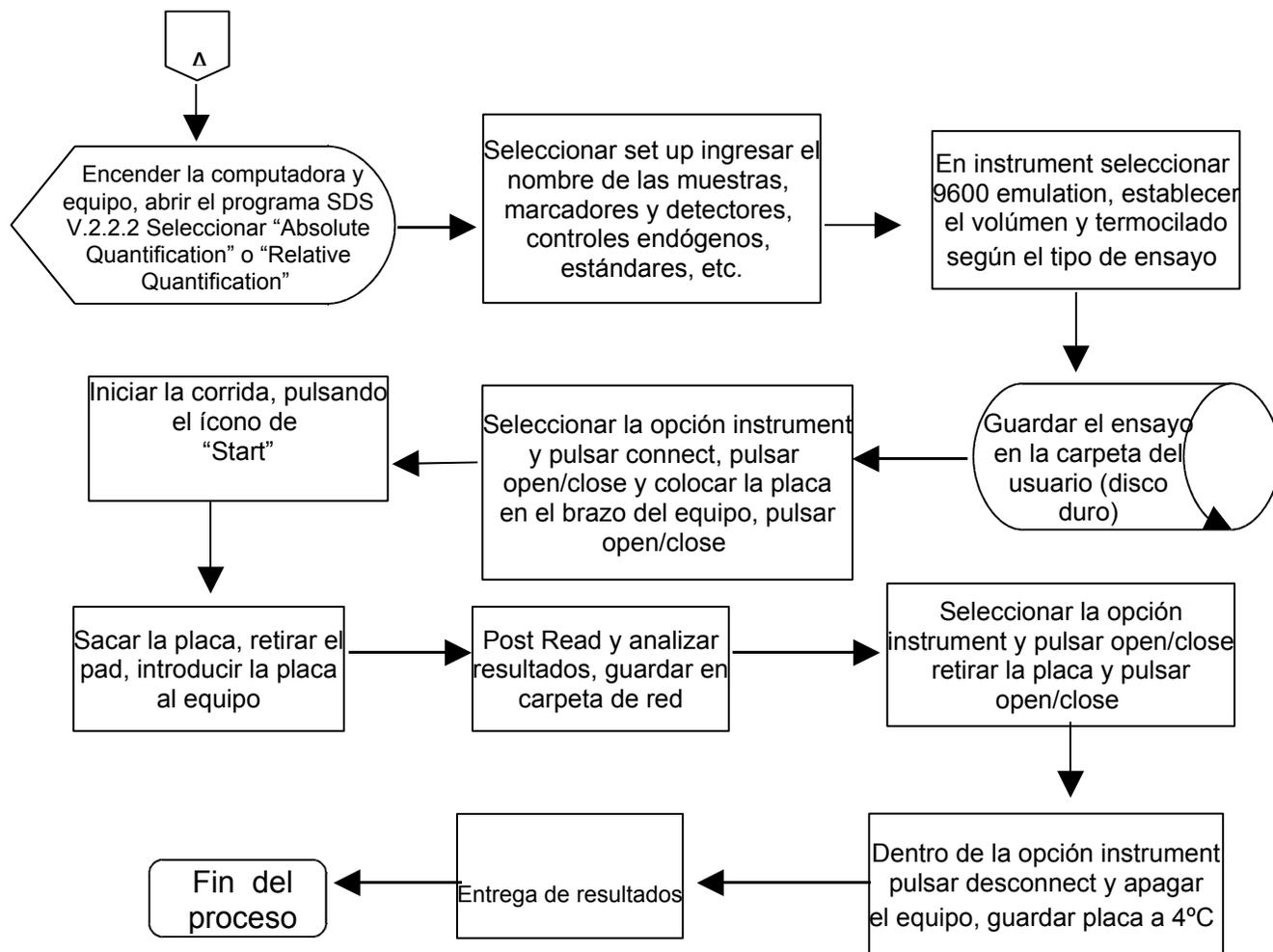
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre			
Firma			
Fecha			

3.4 Diagramas -1 Preparación de la muestra



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

Diagrama 2: Procesamiento de muestra dentro del equipo



IV. Documentos de referencia

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD <small>SECRETARÍA DE SALUD</small>	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 35 de 38

Documentos	Código (cuando aplique)
Manual de organización específico del Instituto Nacional de Medicina Genómica, autorizado por la Junta de Gobierno	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
Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System, Maintenance and Troubleshooting Guide.	Proveedor Applied Biosystems
Applied Biosystems 3730/3730xl DNA Analyzer, Maintenance and Troubleshooting Guide.	Proveedor Applied Biosystems

V. Registros

Registros	Tiempo de conservación	Responsable de conservarlo	Código de registro o identificación única
Resultados	2 meses	Unidad de Secuenciación	No aplica
Formato de solicitud para servicios de secuenciación (F-S)	5 años	Unidad de Secuenciación	No aplica
Formato de solicitud de servicio para PCR en Tiempo Real (F-TR)	5 años	Unidad de Secuenciación	No aplica
Bitácora	1 año	Unidad de Secuenciación	No aplica
Carta de co-responsabilidad	1 año	Unidad de Secuenciación	No aplica

VI. Glosario

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD SECRETARÍA DE SALUD	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 36 de 38

- VI. 1. Secuenciación: Es la asignación de bases nitrogenadas de determinada región del DNA.
- VI.2. Muestras: Material biológico proveniente de cualquier organismo extraído por métodos que permiten considerarlo representativo del mismo para efectuar un análisis
- VI.3. 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.
- VI.4. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction)
- VI.5. PCR en Tiempo Real: Es un método de análisis cuantitativo basado en la detección de fluorescencia generada en cada ciclo de amplificación de DNA/RNA
- VI.6. Robot Biomek: Manejador de líquidos automatizado con dos brazos robóticos.
- VI.7. Termocliclar: paso esencial de la PCR, en el cual la temperatura incrementa y disminuye de manera cíclica.
- VI.8. Polímero POP 7: Reactivo consumible, fase sólida empleada para el ensayo de secuenciación.
- VI.9. Placa: Consumible para 96 ó 384 muestras, compatible con los equipos de secuenciación y PCR en Tiempo Real.
- VI.10. Electroferograma: Diagrama en distintos colores donde muestra de manera muy práctica el orden de las letras del genoma.
- VI.11. Staker: Componente del equipo para realizar secuencias en donde se colocan las placas con las muestras correspondientes.
- VI.12. Buffer: Medio acuoso que permite al “secuenciador” realizar los pasos para hacer una secuenciación.
- VI.13. Centrisep: Reactivo consumible para purificar las muestras que serán sometidas a un ensayo de secuenciación.
- VI.14. Discriminación alélica: Ensayo en el cual se pueden observar y calcular las frecuencias alélicas de una población.
- VI.15. Alelo: Diferentes formas en ls que puede presentarse un gen.
- VI.16. Hold: Paso de una reacción de PCR en donde se mantienen las muestras por un tiempo definido de temperatura.

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 SALUD <small>SECRETARÍA DE SALUD</small>	Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
			Hoja: 37 de 38

VI.17. Lectura de fluorescencia: Paso crucial para los ensayos de PCR en Tiempo Real, en dónde se hace un análisis de los colores obtenidos en cada muestra durante la reacción.

VI.18. Guantes de nitrilo: Material consumible empleado para proteger al usuario y a las muestras de una posible contaminación, no tienen talco.

VI.19. Carta de co-responsabilidad: Esta carta tiene la finalidad de fomentar la responsabilidad de los usuarios, ajenos a la Unidad de Secuenciación, sobre todo, que manejen el equipo de PCR en Tiempo Real y del Robot Biomek, de esta manera se asegura que todos los usuarios harán un buen uso de los equipos para que éstos prolonguen su vida útil.

VI.20. Bitácora: Registro escrito, de uso interno para la Unidad de Secuenciación en dónde se especifican las características mas importantes de las muestras como: Identificación del Usuario y tipo de muestras solicitadas.

VII. Cambios de esta versión

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

VIII. Anexos

VIII. 1 Formato para servicio de Discriminación Alélica y PCR Tiempo Real (F-TR)

VIII. 2 Formato para servicio de Secuenciación (F-S)

VIII. 3 Instructivos para el llenado de los Formatos.

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

	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN		Código:
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		Rev.
		SECRETARÍA DE SALUD	Hoja: 38 de 38

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