



GENÓMICA IBM

**MANUAL DEL SERVICIO DE GENÓMICA
PARA NUEVOS USUARIOS**

SERVICIO DE GENÓMICA DEL IIBm

INTRODUCCIÓN

El Servicio de Genómica del Centro Mixto CSIC-UAM, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", fue creado en el año 1994 para apoyar con técnicas genómicas la tarea investigadora del personal del IIBm.

Además nuestro laboratorio ofrece su servicio a cuantas instituciones públicas o privadas pudieran necesitar de estas técnicas como apoyo a su investigación o al diagnóstico.

El Servicio dispone de un sistema de gestión de calidad conforme con la Norma UNE-EN ISO 9001:2000.

El Servicio pertenece a la Red de Laboratorios de la CAM. Nº de registro: 281.

<http://www.madrimasd.org/laboratorios>

UBICACIÓN

El Servicio está situado en la planta baja del IIBm-1

CONTACTO

Teléfono 91 585 44 70/ 44 74 - Fax 91 585 44 01 - Correo electrónico: genomica@iib.uam.es

HORARIO

9:00 a 17:00 h

HORARIO DE VERANO (del 15 de Junio al 15 de Septiembre)

8:00 a 15:00

FUNCIONES DEL SERVICIO DE GENÓMICA

Este manual pretende ser una ayuda para todo el personal nuevo que se incorpore al IIBm y que pretenda ser usuario del Servicio de Genómica del Centro.

En él se puede encontrar información detallada sobre los servicios que ofertamos, sus aplicaciones y algo MUY IMPORTANTE: cómo deben los usuarios traer las muestras al servicio para cada técnica.

SERVICIOS OFERTADOS

- Genotipado de ratones mediante PCR (pág. 4)
- Purificación de DNA plasmídico (QIAcube) (pág. 5)
- Extracción de DNA o RNA de células, tejidos, sangre, muestras FFPE... (QIAcube) (pág. 5)
- Cuantificación espectrofotométrica de ácidos nucleicos (Nanodrop ND-1000 y ND-8000) (pág. 6)
- Cuantificación fluorimétrica de ácidos nucleicos (Qubit) (pág. 6)
- Análisis de la integridad de RNA (2100 Bioanalyzer) (pág. 7)
- Análisis de librerías para NGS (2100 Bioanalyzer) (consultar Servicio)
- Análisis de fragmentos (ABI 3130XL) (consultar Servicio)
- Autenticación de líneas celulares humanas (ABI 3130XL) (pág. 8)
- Secuenciación Sanger de DNA para diferentes aplicaciones (ABI 3130XL) (pág. 9)
- Diseño de oligos/sondas para secuenciación Sanger, PCR y Real Time PCR (consultar Servicio)
- Retrotranscripción de RNA (pág. 11)
- Real Time PCR: expresión génica absoluta o relativa (ABI7900HT) (pág. 12)
- Real Time PCR: discriminación alélica (ABI7900HT) (pág. 15)
- Análisis de resultados de Real Time (Statminer qPCR Analysis Software) (consultar Servicio)
- Detección de *Helicobacter* en heces de ratón (ABI7900HT) (pág. 16)
- Titulación de vectores lentivirales (ABI7900HT) (pág. 17)

GENOTIPADO DE RATONES MEDIANTE PCR

El Servicio de Genómica del IIBm utiliza el kit REExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit de Sigma para la extracción de DNA de colas de ratón. Básicamente el DNA se extrae mediante una incubación de la muestra con buffer de lisis a temperatura ambiente 10 minutos. Tras la neutralización, las secuencias de interés se amplifican por PCR utilizando los reactivos del propio kit. Los productos de PCR amplificados se analizan en geles de agarosa y los resultados obtenidos se envían por correo electrónico al usuario.

Cómo traer las muestras al Servicio:

Las muestras de colas de los animales deberán traerse en hielo al Servicio y en tubos eppendorf de 1,5 ml debidamente etiquetados.

Los oligos necesarios para la(s) PCR(s) deberán traerse debidamente etiquetados al Servicio: 50 µl a 100 µM.

Los usuarios deberán proporcionar al personal del servicio información sobre las secuencias de los oligos a emplear, las condiciones de la PCR y los tamaños de los fragmentos esperados. Además se proporcionaran muestras de DNA o animales control para los diferentes genotipos esperados.

Para que el ensayo se lleve a cabo los usuarios del IIBm deberán indicar en el Servicio de Genómica el número de pedido del mismo tras solicitar el análisis a través de la web del Servicio de Compras y Almacén. No se llevarán a cabo los ensayos para los que no se haya realizado el pedido correspondiente.

Para cualquier duda consultar con: genomica@iib.uam.es

PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE CÉLULAS, TEJIDOS, MUESTRAS FFPE...

El Servicio de Genómica dispone de un equipo para extracción automatizada de DNA o RNA de muestras de diversas procedencias. El Qiacube nos ha permitido automatizar la extracción de ácidos nucleicos empleando los kits de columnas de Qiagen para diferentes aplicaciones. Hasta la fecha se han procesado en el laboratorio muestras de sangre humana, cócleas de ratón y rata, cerebro, trigéminos, saliva, páncreas, colas y heces de ratón, células en cultivo, muestras FFPE (testículo, piel, cerebro, páncreas, corazón, riñón, músculo, bazo, pulmón, próstata, estómago, hígado, intestino grueso...)...lo que nos ha permitido tener puestos a punto más de 20 protocolos de extracción diferentes. El equipo también permite la extracción de DNA plasmídico a partir de cultivos bacterianos. Las minipreps se realizarán en el Servicio todos los martes por lo que los cultivos deberán entregarse el lunes.

La cantidad de DNA o RNA obtenido puede posteriormente valorarse en el Servicio mediante cuantificación espectrofotométrica (Nanodrop) o fluorimétrica (Qubit)

Cómo traer las muestras al Servicio:

DNA de plásmidos:	1 ml de cultivo. Indicar en el Servicio las características de la muestra: nombre del vector, tamaño del inserto, medio de selección...
DNA de células:	traer lo equivalente a $3-5 \cdot 10^6$ de células en suspensión o una placa P60 de células adherentes en confluencia en 200 μ l de PBS en tubos de 2.0 ml
DNA de sangre:	200 ó 400 μ l de sangre en tubos de 2.0 ml
RNA de sangre:	600 μ l de lisado de leucocitos
RNA de cerebro/adiposo:	< 100 mg
RNA de otros tejidos:	< 30 mg
RNA de FFPE:	1-2 ó 3-4 secciones de 10 μ M

Para que el ensayo se lleve a cabo, los usuarios del IIBm deberán indicar en el Servicio de Genómica el número de pedido del mismo tras solicitar el análisis a través de la web del Servicio de Compras y Almacén. No se llevarán a cabo los ensayos para los que no se haya realizado el pedido correspondiente.

Cuando las muestras estén extraídas los usuarios recibirán un correo electrónico indicándoles que pueden pasar por el Servicio a recogerlas. Las muestras se les entregarán en tubos etiquetados con el nombre de la muestra y su concentración. Además se les enviará una hoja excel con información relativa a volumen, concentración, método de extracción empleado, RIN (en caso de solicitarlo)...

CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La espectrofotometría UV/Visible nos permite confirmar que contamos con cantidad suficiente de ácidos nucleicos (DNA/RNA) de calidad adecuada antes de llevar a cabo ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR), análisis de SNPs (Polimorfismos de nucleótido único) o la secuenciación automática de muestras de DNA de plásmidos, cósmidos, productos de PCR...

La principal ventaja de trabajar con el espectrofotómetro NanoDrop ND1000 ó ND8000 es que la medida se lleva a cabo a partir de 1 ó 1,5 µl de muestra sin ayuda de ningún tipo de cubeta ya que la muestra se pipetea directamente sobre la superficie de medida.

El rango de medida para muestras de DNA es de 2-3700 ng/µl y para RNA de 2-3000 ng/µl.

El Servicio también cuenta con un fluorímetro (Qubit) que permite, mediante la utilización de sondas fluorescentes, cuantificar de forma altamente específica muestras de DNA, RNA o proteínas. El Servicio dispone de diferentes kits en función del tipo de muestra y su concentración:

Kit	Rango
dsDNA HS assay	20 pg/µl – 100 ng/µl
dsDNA BR assay	100 pg/µl – 1000 ng/µl
dsRNA HS assay	250 pg/µl – 100 ng/µl
dsRNA BR assay	1 ng/µl – 1000 ng/µl

Cómo traer las muestras al Servicio:

Traer 3 µl de RNA ó DNA (10 -2000 ng/µl) en tubos de 1.5 ml

Para que el ensayo se lleve a cabo, los usuarios del IIBm deberán indicar en el Servicio de Genómica el número de pedido del mismo tras solicitar el análisis a través de la web del Servicio de Compras y Almacén. No se llevarán a cabo los ensayos para los que no se haya realizado el pedido correspondiente.

Cuando las muestras estén cuantificadas, se enviará al solicitante una hoja excel con información relativa a la concentración, ratios 260/280, 260/230...

ANÁLISIS DE INTEGRIDAD DE RNA

La integridad de las muestras de RNA es fundamental en el contexto de los análisis de expresión génica mediante la tecnología de microarrays o de PCR en tiempo real. El Bioanalizador 2100 permite la caracterización cualitativa y cuantitativa de muestras de RNA total o RNA mensajero (RNAm) basándose en los patrones de movilidad electroforética de las muestras en una matriz de gel que se introduce en unos chips formados por una serie de microcanales y depósitos en miniatura interconectados y a través de los cuales migran electroforéticamente los ácidos nucleicos.

El valor del número de integridad del RNA (RIN) facilita la determinación objetiva de la calidad del RNA que se utilizará en experimentos posteriores. Este valor que va desde el 1 al 10, se basa en la cuantificación de productos de degradación del RNA a lo largo de toda su migración electroforética.

ESPECIFICACIONES

El Bioanalizador Agilent 2100, puede trabajar con dos tipos de chips para RNA: Nano o Pico en función del rango de concentración de la muestras.

NANOCHIPS

Rango Cuantitativo	RNA total: 25-500 ng/μl RNAm: 25-500 ng/μl
Rango Cualitativo	RNA total: 5-500 ng/μl RNAm: 25-500 ng/μl

PICOCHIPS

Rango Cualitativo	RNA total: 50-5000 pg/μl (agua) RNAm: 250-5000 pg/μl (agua)
-------------------	--

Cómo traer las muestras al Servicio:

En general, los usuarios deberán traer al Servicio 3 μl de las muestras que deseen analizar en el equipo en tubos de 1.5 ml (1 μl se empleará para cuantificar la muestra en el Nanodrop previamente a elegir el chip a emplear; 1 μl se empleará para el análisis de integridad en el Bioanalizador). Aquellos que no dispongan de muestra suficiente que consulten en el Servicio.

Para que el ensayo se lleve a cabo, los usuarios del IIBm deberán indicar en el Servicio de Genómica el número de pedido del mismo tras solicitar el análisis a través de la web del Servicio de Compras y Almacén. No se llevarán a cabo los ensayos para los que no se haya realizado el pedido correspondiente.

Cuando las muestras estén analizadas los usuarios recibirán por correo electrónico el perfil de integridad de las mismas. Además, si la extracción se ha realizado en el Servicio se les enviará una hoja excel con información relativa a volumen, concentración, método de extracción empleado, RIN...

SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DE DNA

Volumen: 6µl
ADN: 250-300 ng
PCR: 10-20 ng/100 pb
Primer: 3,2 pmoles
Tubos: 0,2 ml

REQUISITOS DEL DNA Y PRIMERS

DNA PLASMIDICO

CALIDAD

- NO: Fenol, cloroformo, proteínas, DNA cromosómico, RNA, etanol, sales, detergentes, PEG, EDTA (TE).
- SI: DNA plasmídico purificado por columnas de adsorción.
DNA resuspendido en H₂O.
iiiiiii CUIDADO CON ESTRUCTURAS SECUNDARIAS!!!!!!!

CANTIDAD (300ng)

- SI: Cuantificado en un espectrofotómetro(NanoDrop) o en un gel de agarosa frente a un marcador de concentración.

PRODUCTO DE PCR

CALIDAD

- NO: Restos de nucleótidos, *primers*, dNTPs o enzimas de la reacción de amplificación por PCR.
- SI: DNA purificado por columnas, tratamiento con exo I y SAP o dilución del producto de PCR.

CANTIDAD 10-20ng/100pb

- SI: Cuantificado en un espectrofotómetro(NanoDrop) o en un gel de agarosa frente a un marcador de concentración.

PRIMERS

CANTIDAD 3,2 pmoles

CALIDAD Evitar en lo posible la utilización de *primers* que tengan en su secuencia más de 3 ó 4 Gs ó Cs seguidas.

Los *primers* deberán tener, al menos, 18 bases para asegurarRNAos de que hibriden con el DNA a secuenciar. Si es posible es interesante anclar los *primers* con GCs en 3´.

Utilizar *primers* con una T_m por encima de 50 °C . Para *primers* con un contenido en GCs menor del 50%, puede ser necesario extender el oligo más de 18pb para conseguir una T_m por encima de 50°C.

$$T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$$

$$T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$$

La utilización de *primers* más largos de 18 pb, minimiza la posibilidad de hibridaciones secundarias en el vector o en el inserto.

Evitar la utilización de *primers* con secuencias que formen estructuras secundarias, especialmente en el extremo 3´, o que puedan hibridar formando dímeros intercatenarios.

No emplear *primers* con *mismatches*, ni *primers* que hibriden en más de un sitio en la secuencia.

PRINCIPALES PROBLEMAS EN LA SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

1. NO SE PRODUCE REACCIÓN

- No hay DNA o hay mucho menos del necesario.
- La muestra contiene EDTA o algún otro inhibidor de la polimerasa.
- Existe una estructura secundaria fuerte próxima al *primer* empleado en la reacción.
- No hay *primer* o su concentración es inferior a 3,2 pmoles.
- El *primer* no hibrida con el DNA molde.
- La Tm del primer no es la adecuada (inferior a 50°C).

2. EL CROMATOGRAMA PRESENTA MUCHO RUIDO DE FONDO

- La señal es muy débil debido a que hay poco DNA, contaminantes, oligo inespecífico...

3. LA REACCIÓN COMIENZA PERO DECAE POCO A POCO

- Hay algún contaminante en la muestra: EDTA, sales...
- No están equilibradas las cantidades de DNA y *primer*.

4. EL CROMATOGRAMA PRESENTA DOS SECUENCIAS SUPERPUESTAS

- Hay más de un DNA molde en la muestra.
- Existe un sitio secundario de unión del *primer*. El *primer* tiene dos dianas dentro del DNA molde.
- El *primer* está mal purificado, aparece una secuencia sombra correspondiente a picos superpuestos desfasados una base.
- El producto de PCR se generó a partir de un solo *primer*.
- El producto de PCR no está bien purificado quedando restos de *primers*.

5. LA REACCIÓN COMIENZA PERO DECAE SÚBITAMENTE

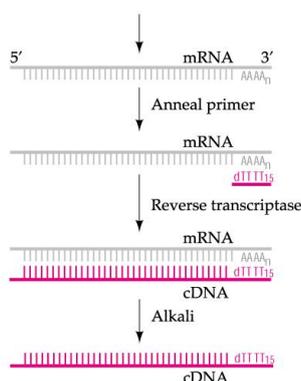
- El DNA está cortado o digerido a ese nivel.
- Existe una estructura secundaria en el DNA molde.

6. LA SECUENCIA SE LEE CORRECTAMENTE HASTA UNA SECUENCIA DE POLI-A ó POLI-T

- A partir de ese punto la polimerasa "resbala" y la secuencia aparece doble, triple...

RETROTRANSCRIPCIÓN DE RNA

La transcripción reversa (RT-PCR) es una técnica que permite sintetizar DNA complementario (cDNA) a moléculas de RNA usando para ello la enzima transcriptasa reversa. El cDNA obtenido es la cadena complementaria de la cadena molde de RNA.



El kit High Capacity cDNA Reverse Transcription de la casa comercial Applied Biosystems utiliza una mezcla de cebadores de ocho nucleótidos con secuencias generadas al azar (random primers, en lugar del oligonucleótido oligo dT que se muestra en la figura) para iniciar la síntesis de la hebra de DNA complementario. El Kit permite retrotranscribir entre 0.02 y 2 µg de RNA total en un volumen final de 20µl utilizando la enzima Multiscribe. Los random primers aseguran que la primera hebra de síntesis se produzca eficientemente a partir de todas las moléculas de RNA presentes, tanto mRNA (mensajero) como rRNA (ribosómico).

Como traer las muestras al Servicio:

Los usuarios prepararán cada muestra en un tubo eppendorf de 0.2 ml y en un volumen final de 10 µl. Las muestras de RNA deberán tener una concentración aproximada de 100 ng/µl, que será verificada por el técnico responsable.

El RNA no deberá estar degradado. Para comprobar el nivel de integridad de las muestras, éstas podrán ser analizadas empleando nano o picochips en el Bioanalizador 2100 de Agilent.

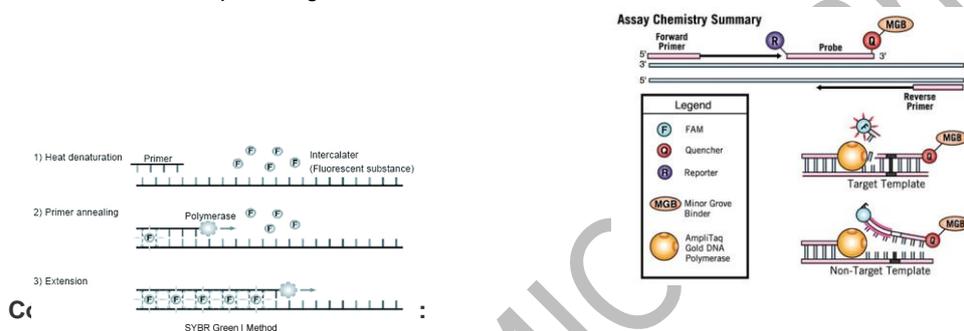
Para que el ensayo se lleve a cabo, los usuarios del IIBm deberán indicar en el Servicio de Genómica el número de pedido del mismo tras solicitar el análisis a través de la web del Servicio de Compras y Almacén. No se llevarán a cabo los ensayos para los que no se haya realizado el pedido correspondiente.

Cuando las RTs se hayan realizado se enviará un email al usuario para que pase por el Servicio a recogerlas.

PCR EN TIEMPO REAL PARA EXPRESIÓN GÉNICA

El sistema de Applied Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR para cuantificación absoluta o relativa de **expresión génica** emplea para la cuantificación una reacción de PCR acoplada a un ensayo de emisión de fluorescencia.

En el caso de la sonda fluorescente SYBR Green, ésta se incorpora a los productos de PCR de doble cadena que se van generando durante la reacción. La principal desventaja de la utilización de esta química es la posibilidad de que la sonda fluorescente se una a subproductos de la reacción de PCR como primer-dimers o productos inespecíficos que también podrían generarse. Estos productos son fácilmente visibles cuando al final del ensayo de QRT-PCR hacemos una curva de disociación del conjunto de los productos presentes en la reacción. Todas estas desventajas desaparecen cuando se emplean sondas Taqman en los ensayos de cuantificación de expresión génica.



RNA: 100ng/ μ l
Volumen: 10 μ l
Tubos: 0.2ml

Primer: 5 μ M
Volumen: 100 μ l
Tubos: 1.5ml

Los usuarios traerán las muestras al Servicio en hielo, para evitar su degradación, junto con las sondas y/o oligos que se emplearán en el ensayo. Tanto las muestras como los oligos deberán estar adecuadamente etiquetados (nombre y concentración del stock) para su correcta identificación. Los usuarios se dirigirán a la persona encargada de los ensayos de PCR en tiempo real para que haga la recepción de las muestras y anote las características del ensayo. Las muestras y los oligos se conservarán en el Servicio a -80 °C y las sondas a -20 °C en cajas propias de cada usuario.

Los usuarios prepararán cada muestra de RNA en un tubo eppendorf de 0.2 ml y en un volumen final de 10 μ l. Las muestras de RNA deberán tener una concentración aproximada de 100 ng/ μ l, que será verificada por el técnico responsable. El RNA no deberá estar degradado. Los oligos utilizados los preparará el usuario en tubos eppendorf de 1.5 ml en un volumen final de 100 μ l, y a una concentración de 5 μ M. En el caso de sondas Taqman, se traerá el tubo enviado por la casa comercial o una alícuota del mismo adecuadamente etiquetada y protegida de luz.

Los usuarios indicarán en el Registro adecuado del Servicio, los nombres de las muestras y sondas/oligos a analizar, las sondas correspondientes a los genes endógenos y la muestra calibradora a emplear en el estudio.

Para que el ensayo se lleve a cabo, los usuarios del IIBm deberán indicar en el Servicio de Genómica el número de pedido del mismo tras solicitar el análisis a través de la web del Servicio de Compras y Almacén. No se llevarán a cabo los ensayos para los que no se haya realizado el pedido correspondiente.

Los usuarios recibirán por correo electrónico una hoja excel con los resultados de la cuantificación relativa/absoluta. Una vez finalizado el ensayo los usuarios deberán recoger lo antes posible del Servicio sus muestras (RNAs, cDNAs), sondas, oligos...

El Servicio dispone además de una licencia del software Statminer qPCR Analysis para el análisis de experimentos de expresión génica. Consultar con el Servicio.

GENOMICA IIBm

ENDÓGENOS DISPONIBLES PARA PCR EN TIEMPO REAL

El Servicio pone a disposición de todos sus usuarios las siguientes sondas Taqman y los siguientes oligonucleótidos para genes endógenos humanos o de ratón.

SONDAS TAQMAN

- 18S (Hs99999901_s1)
- TBP (Hs00427621_m1)
- RPLP0 (Hs99999902_m1)
- RPLP0 (Mm01974474_gH)
- HPRT1 (Mm00446968_m1)

PRIMERS PARA SYBR GREEN

- 18S
 - Forward: 5' CCA GTA AGT GCG GGT CAT AAG C 3'
 - Reverse: 5' CCT CAC TAA ACC ATC CAA TCG G 3'

NOMENCLATURA DE LAS SONDAS TAQMAN

The first two positions designate the species

Hs = *Homo sapiens* Mm = *Mus musculus* Rn = *Rattus norvegicus*

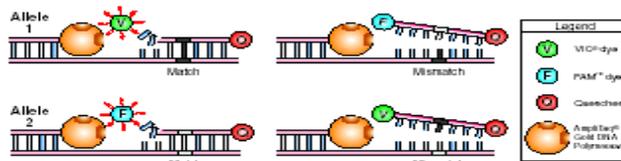
The second-to-last position contains a letter that means the following:

Assay Suffix	Assay placement
_m	Probe spans exon-exon junction and the assay will not detect genomic DNA
_s	Primer and probe are designed within a single exon and the assay will detect genomic DNA
_g	Probe spans exon-exon junction but the assay may detect genomic DNA
_mH, _sH, _gH	The assay was designed to a transcript belonging to a gene family with high sequende homology

PCR EN TIEMPO REAL PARA DISCRIMINACIÓN ALÉLICA

La discriminación alélica es el proceso por el cual se detectan en una muestra dos variantes de la secuencia de un único nucleótido. Los SNPs (Polimorfismos de Nucleótido Único) son variaciones en un punto determinado de la secuencia nucleotídica de dos individuos. Se trata de la variación genética más abundante en los genomas. Como media en el Genoma Humano hablamos de una variación en cada 500-1000 pares de bases. Esta variación se considera polimorfismo cuando la variación afecta a más del 1% de la población. Los SNPs pueden localizarse en secuencias génicas o extragénicas y en ocasiones se asocian con enfermedades, de ahí su interés.

La tecnología Taqman puede emplearse como puede verse en la figura para el estudio de SNPs. En este caso las dos sondas Taqman presentes en el ensayo son cada una de ellas complementarias para cada uno de los SNPs. Cada una posee un fluorocromo diferente en el extremo 5' y un "quencher" en el extremo 3'. Durante la fase de extensión de la reacción de PCR la DNA polimerasa rompe la sonda/as hibridadas con el DNA, separando el fluorocromo del "quencher" y detectándose emisión de fluorescencia de una de ellas o de ambas.



En las sondas Taqman para SNPs de Applied Biosystems la correlación sonda/secuencia es la siguiente:

Fluorescencia detectada	Indicativa de...
VIC	Homocigoto para el alelo X
FAM	Homocigoto para el alelo Y
Ambas	Heterocigoto

Cómo traer las muestras al Servicio:

Las muestras de DNA genómico podrán traerse ya liofilizadas en placas de 96 o 384 pocillos. La concentración por pocillo será de 5-10 ng totales. El Servicio suministrará al usuario una plantilla para completar con los nombres de las muestras.

Para que el ensayo se lleve a cabo, los usuarios del IIBm deberán indicar en el Servicio de Genómica el número de pedido del mismo tras solicitar el análisis a través de la web del Servicio de Compras y Almacén. No se llevarán a cabo los ensayos para los que no se haya realizado el pedido correspondiente.

Los usuarios recibirán una tabla excel con el genotipo correspondiente a cada muestra y una imagen (jpg) con las nubes de puntos correspondientes a los diferentes haplotipos.

DETECCIÓN DE *HELICOBACTER* EN HECES DE RATÓN MEDIANTE REAL TIME PCR

Se han identificado diferentes especies de la bacteria *Helicobacter* infectando animales de laboratorio. Las más comunes son: *H. bilis*, *H. hepaticus*, *H. muridarum*, *H. rodentium* y *H. typhlonius*. Estas bacterias pueden interferir con los resultados de laboratorio dado que se asocian a neoplasias hepáticas o intestinales y a enteritis proliferativa crónica. Además, algunas especies de *Helicobacter* pueden infectar al hombre. Por todo ello, se hace necesaria la identificación de animales de laboratorio infectados.

La detección puede llevarse a cabo mediante PCR en tiempo real amplificando una región altamente conservada entre especies del gen 16S rRNA (Ver "Relation between the severity of hepatitis C virus...". World of Gastroenterol. Vol 7; No 12 (45): 7278-7284. 2006) o mediante amplificación de secuencias específicas de especie (Ver "Differential detection of five mouse-infecting...". Clinical and diagnostic laboratory immunology. Vol 12, No 4: 531-536. 2005).

El Servicio de Genómica del IIBm lleva a cabo este ensayo utilizando primers y una sonda Taqman específicos de secuencias del gen rRNA conservadas entre diferentes especies de *Helicobacter* en el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System de Applied Biosystems.

Como traer las muestras al Servicio:

En tubos de 2.0 ml traer de 180 a 220 mg de heces de ratón

Para que el ensayo se lleve a cabo, los usuarios del IIBm deberán indicar en el Servicio de Genómica el número de pedido del mismo tras solicitar el análisis a través de la web del Servicio de Compras y Almacén. No se llevarán a cabo los ensayos para los que no se haya realizado el pedido correspondiente.

El usuario recibirá por email una tabla excel con los resultados correspondientes a sus muestras.

TITULACIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES MEDIANTE REAL TIME PCR

El uso de vectores lentivirales en investigación básica y sus potenciales aplicaciones futuras requieren una metodología que permita cuantificar con exactitud los títulos lentivirales y la expresión de los transgenes virales en las células diana.

El sistema de PCR en tiempo real de Applied Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR, emplea para la cuantificación lentiviral una reacción de PCR acoplada a un ensayo de emisión de fluorescencia. En este caso se empleará una sonda Taqman frente a las secuencias de empaquetamiento presentes en muchos genomas virales. La titulación se llevará a cabo frente a diluciones seriadas de un plásmido que contiene dichas secuencias.

Las preparaciones virales tendrán que tratarse previamente con DNasa para eliminar el DNA empleado durante la transfección.

Para más información sobre cómo traer las muestras al Servicio consultar en genomica@iib.uam.es.

GENOMICA IIBm