

---

**MANUAL OPERATIVO DE FUNCIONAMIENTO  
DE LA UNIDAD DE SINTESIS Y SECUENCIACION DE ADN  
DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LA UNAM**

**DE LA USSADN**

- [Misión](#)
- [Objetivos y Justificación](#)
- [Personal Adscrito](#)
- [Comité Técnico](#)
- [Infraestructura](#)
- [Servicios](#)
- [Precios](#)
- [Formas de Pago](#)
- [Horario de Atención](#)

**De Los Oligos**

- [Escalas De Síntesis](#)
- [Instrucciones Para Solicitar Oligos](#)

**De La Secuenciación**

- [Instrucciones Para Solicitar Secuenciación](#)

---

**Misión**

El Instituto de Biotecnología, consciente de la importancia de los oligonucleótidos sintéticos y la secuenciación de DNA para el desarrollo de la Biotecnología moderna y el estudio de la Biología molecular, creó la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA), un laboratorio especializado en la síntesis química de oligonucleótidos y la secuenciación automatizada de DNA. Actualmente, los 45 grupos de investigación del IBt utilizan ambos servicios.

La optimización de tiempos de uso de sintetizadores y secuenciadores, así como el mejoramiento en la infraestructura de la USSDNA, permitió ir extendiendo de manera gradual ambos servicios a un gran número de instituciones académicas y privadas de la República Mexicana, manteniendo la prioridad de los usuarios del IBt sobre los usuarios externos.

La síntesis química de oligonucleótidos se lleva a cabo en sintetizadores automatizados de DNA, mediante el método de fosfitotriéster en fase sólida, usando  $\beta$ -cianoetil fosforamiditos de dA, dT, dG y dC como materia prima y otros químicos adicionales para completar cada acoplamiento nucleotídico.

La secuenciación de DNA se realiza por el método de Sanger, usando didesoxiterminadores fluorescentes y un secuenciador automatizado de DNA que funciona a base de capilares, en los cuales se realizan las separaciones electroforéticas.

**Objetivos y Justificación**

Hace 21 años, la importación de reactivos a nuestro país, incluyendo los oligonucleótidos sintéticos, era un proceso lento que podía demorar hasta tres meses y afectaba de manera directa el rápido desarrollo de los proyectos de investigación. Actualmente, estos períodos se han reducido a 30-45 días, pero aún así continúan siendo prolongados para realizar investigación de alto rendimiento. Para tratar de ofrecer el mejor servicio tanto a usuarios del IBt, como a usuarios de otras dependencias e instituciones, en la USSDNA nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Sintetizar oligonucleótidos y secuenciar las muestras de DNA con estándares de calidad iguales o superiores a los ofrecidos en el extranjero.
2. Entregar los oligonucleótidos en un período máximo de 5 días hábiles a partir de la recepción de la solicitud.
3. Entregar los resultados de secuenciación en un período máximo de 3 días hábiles a partir de la recepción de la muestra.
4. Repetir las secuencias fallidas una sola vez, sin costo adicional.
5. Ofrecer los servicios de síntesis y secuenciación a precios internacionalmente competitivos.
6. Mantener una retroalimentación constante con los usuarios para mejorar ambos servicios.
7. Realizar investigación metodológica e innovación tecnológica para mejorar ambos servicios.
8. Ofrecer asesoría en cualquier tema relacionado con oligonucleótidos sintéticos y secuenciación de DNA.

## Personal Adscrito a la USSDNA

- [Dr. Rubén Paul Gaytán Colín](#) (Responsable Operativo)
- [M en C Eugenio López Bustos](#) (Síntesis de Oligos)
- [QI Santiago Becerra Ramírez](#) (Síntesis de Oligos)
- [M en C Jorge Arturo Yáñez Ponce de León](#) (Secuenciación de ADN)
- [QI Abigail Roldán Salgado](#) (Síntesis de Oligos, por honorarios)
- [Biol. Ana Yanci Alarcón González](#) (Secuenciación de ADN, por honorarios)

## Comité Técnico de la USSDNA

- [Dr. Rubén Paul Gaytán Colín](#) (Responsable Operativo)
- [Dra. Clarita Olvera Carranza](#)
- [Dr. Jose Luis Puente García](#)
- [Dra. Gloria Saab Rincón](#)

## Infraestructura

La USSDNA está dividida en dos laboratorios localizados en el segundo piso del edificio sur del IBt. El primero de ellos, ubicado entre el laboratorio 6 y la unidad de computo, ocupa un área de 49 m<sup>2</sup> y alberga la parte de síntesis de oligonucleótidos. El otro laboratorio, con aire acondicionado obligatorio permanente, está ubicado entre los laboratorios 8 y 9. Ocupa un área de 15 m<sup>2</sup> y alberga la parte de secuenciación de DNA.

La USSDNA cuenta con dos sintetizadores automáticos de DNA (Applied Biosystems, modelos 391 y 394) capaces de ensamblar oligonucleótidos de 2 hasta 100 nucleótidos de longitud. En conjunto, estos instrumentos pueden sintetizar aproximadamente 32 oligonucleótidos en 20 horas de funcionamiento continuo.

Adicionalmente, se cuenta con un sintetizador de alta productividad (BioAutomation, modelo MerMade 192) capaz de ensamblar de manera simultánea 192 oligonucleótidos de tamaños similares en un solo día.

En cuanto a secuenciación, se cuenta con un secuenciador automático de DNA de 16 capilares (Applied Biosystems, modelo 3130xl), capaz de dar lecturas promedio de 900 bases y analizar 192 muestras por día.

## Servicios

- Venta de oligonucleótidos sintéticos desalados a personal del IBt y toda la comunidad académica de México. Todos los oligonucleótidos de 30 bases o menos son sintetizados en escala de 50 nmol, salvo que se solicite de manera explícita la escala de 200 nmol. Todos los oligonucleótidos de 31 bases o más y aquellos degenerados de cualquier tamaño, sólo se sintetizan en escala de 200 nmol debido a limitaciones en la infraestructura. En escala de 50 nmol se garantizan al menos 120  $\mu$ g de oligonucleótido, mientras que en la escala de 200 nmolas se garantizan 500  $\mu$ g.
- Síntesis de oligonucleótidos antisentido de tipo "oligofosforotioatos".
- Purificación de oligonucleótidos por PAGE (por solicitud explícita).
- Asesoría en purificación de oligonucleótidos a personal del IBt.
- Secuenciación de muestras de ADN (productos de PCR) a personal del IBt y toda la comunidad académica de México.

## Precios De Los Servicios

<b>Clientes</b>	<b>Oligonucleótidos (100nmol)</b>	<b>Secuenciación</b>
<b>IBT</b>	0.60 USDIs/base	8.00 USDIs/muestra (en un solo sentido)
<b>Dependencias UNAM</b>	0.70 USDIs/base	10.00 USDIs/muestra (en un solo sentido)
<b>Otras Instituciones y Empresas Privadas</b>	0.70 USDIs/base más IVA	10.00 USDIs/muestra (en un solo sentido)

## Pago De Los Servicios

Para facilitar los trámites de administración, todos los grupos de investigación del IBt gozan de un año de crédito. Los oligonucleótidos y las secuencias del año de servicio deben pagarse al inicio del siguiente año. Los pagos se pueden hacer por transferencia de presupuesto UNAM de cada laboratorio al presupuesto de la USSDNA, inicialmente en cero al inicio de cada año. También es posible realizar los pagos de proyectos de CONACyT u otras fuentes a través de pedidos de materiales o reactivos para la USSDNA o bien a través de la generación de recibos oficiales de la UNAM. Sin embargo, en este último caso, el adeudo se incrementa 30% a fin de cubrir el porcentaje retenido por la administración de la UNAM y por el IBt.

Todos los usuarios externos deben pagar a través de depósitos mediante "fichas de depósito referenciadas" emitidas por la USSADN vía el Mtro. Jorge Yáñez Ponce de León (jay@ibt.unam.mx) al momento de cotizar su solicitud.

## Horario de Atención

- Los oligonucleótidos pueden ser solicitados vía electrónica (como se describe más adelante) los 365 días del año, a cualquier hora y pueden ser recogidos directamente en la USSDNA, de 9:00 a 15:00 hrs y de 16:00 a 21:00 hrs de Lunes a Viernes. Esto es conveniente para los clientes de Cuernavaca porque pueden tener sus productos más rápido que los clientes de otras ciudades.

- A los clientes del Distrito Federal y área conurbada, los oligonucleótidos se envían a Ciudad Universitaria a través de la valija IBt-CU, entre las 9:00 hrs y 13:00 hrs. Sin embargo, este servicio no está disponible todos los días y depende exclusivamente de la administración del IBt.
- Los envíos a otras ciudades se realizan a las 13:00 hrs por DHL, llegando los oligonucleótidos al siguiente día.
- Para el IBt y Cuernavaca, las muestras de DNA para secuencia solo se reciben de 9:00 a 12:00 hrs, por las razones que se describen mas adelante.
- Los clientes del Distrito Federal y área conurbada pueden enviar sus muestras de DNA para secuencia a través de la valija localizada en la coordinación de la investigación científica en CU, entre las 9:00 y las 13:00 hrs
- Los clientes de cualquier otra ciudad pueden enviar sus muestras de DNA para secuencia, a través de DHL preferentemente. Esta compañía garantiza las entregas de material al día siguiente.
- Las muestras deben ser enviadas a la siguiente dirección: Mtro. Jorge Yáñez Ponce de León Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA Instituto de Biotecnología - UNAM Av. Universidad #2001 Col. Chamilpa Cuernavaca, Morelos 62210 Tel: (777) 3 29 77 12

## Escalas De Síntesis

Todos los oligonucleótidos de 30 bases o menos serán sintetizados en escala de 50 nmol, salvo que se solicite de manera explícita la escala de 200 nmol. Todos los oligonucleótidos de 31 bases o más y aquellos degenerados de cualquier tamaño, sólo se sintetizarán en escala de 200 nmol debido a limitaciones en la infraestructura. En escala de 50 nmol se garantizan al menos 120  $\mu$ g de oligonucleótido, mientras que en la escala de 200 nmolas se garantizan 500  $\mu$ g.

## Instrucciones Para Solicitar Oligos

1. Las solicitudes para el servicio de síntesis de oligonucleótidos sólo se reciben vía electrónica, llenando una "Solicitud de Oligos". El personal del IBt puede acceder a esta solicitud siguiendo la ruta: [www.ibt.unam.mx](http://www.ibt.unam.mx) 'uso interno 'oligos y secuenciación. Las personas externas al IBt deben acceder a la solicitud a través del mismo portal, pero siguiendo la ruta: [www.ibt.unam.mx/sintesis](http://www.ibt.unam.mx/sintesis) 'servicios 'oligos y secuenciación de DNA 'solicitud de oligos.
2. Llenar cada uno de los campos de la solicitud con la información requerida.
3. Para moverse entre campo y campo, SOLO debe hacerse a través del "mouse". No usar la opción ENTER durante el llenado de esta solicitud porque esta acción ejecuta el envío y al final parecería que los oligonucleótidos se solicitaron dos veces.
4. Asignar a cada oligonucleótido una clave que el cliente pueda identificar. Esta clave está restringida a 10 caracteres.
5. Capturar las secuencias en dirección 5'->3', separándolas por tripletes con un espacio o guión (p.ej. ATG-ATT-AGC-TCA).
6. En caso de requerir bases degeneradas, utilice el siguiente código de una letra :

<b>M=A/C</b>	<b>R=A/G</b>	<b>W=A/T</b>	<b>S=C/G</b>	<b>Y=C/T</b>	<b>K=G/T</b>
<b>V=A/C/G</b>	<b>D=A/G/T</b>	<b>H=A/T/C</b>	<b>B=C/G/T</b>		

7. Cada solicitud sólo sirve para ordenar hasta un máximo de 10 oligonucleótidos. Si desea solicitar más oligonucleótidos debe llenar otra solicitud.
8. Tras enviar la solicitud (botón inferior de la solicitud de oligonucleótidos), de manera automática se emitirá una respuesta electrónica anunciando la recepción de la solicitud y, asimismo, indicará una fecha máxima de 5 días hábiles en la que su solicitud estará lista (NOTA: En la Unidad de Síntesis). Por favor anote su número de solicitud para poder monitorear su pedido.
9. Una vez recibida su solicitud, ésta sólo podrá ser cancelada antes de la síntesis de los oligonucleótidos. Llamar a la USSDNA lo más pronto posible.
10. En el caso de las solicitudes externas, el Maestro Jorge Yáñez Ponce de León les enviará una cotización en menos de 24h para confirmar el pedido.

### **Control de calidad de oligonucleótidos**

-La USSDNA se compromete a entregar oligonucleótidos desalados de alta calidad, en los que se observe una sola banda por UV shadowing al ser analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida.

-La cuantificación se realiza por espectrofotometría de absorción de luz ultravioleta a 260nm.

### **Entrega de oligonucleótidos.**

Los oligonucleótidos se entregan desalados, disueltos en agua estéril, junto con un reporte de síntesis que incluye la clave del oligonucleótido asignada por el solicitante, la secuencia, la concentración, el volumen total, la temperatura de fusión ( $T_m$ ) y la cantidad de agua y "stock" para preparar 100  $\mu$ l de una solución 10  $\mu$ M (pmol/ $\mu$ l) del oligo en cuestión.

Los oligonucleótidos pueden ser recogidos directamente en la USSDNA, de 9:00 a 14:00 hrs y de 16:00 a 21:00 hrs de Lunes a Viernes. Esto es muy conveniente para los clientes de Cuernavaca porque normalmente tienen sus productos más rápido que los clientes de otras ciudades. Los oligonucleótidos pueden ser enviados a través de valija a la Coordinación de la Investigación Científica, en CU, sin costo de envío para los clientes del Distrito Federal y área conurbada. Pueden ser enviados a cualquier parte del país, cobrando el costo de envío por algún servicio de mensajería. Se recomienda guardar el oligonucleótido stock a  $-20^{\circ}\text{C}$  para alargar su vida media y a  $4^{\circ}\text{C}$  la solución diluida que se estará usando en los experimentos.

**Purificación de oligonucleótidos.** La purificación de oligonucleótidos, laboralmente demandante, no es necesaria para la mayoría de aplicaciones biológicas y en cambio, hace que se descuide el proceso de producción. Por ello, la USSDNA se reserva el derecho de "aceptar o negarse" a purificar oligonucleótidos, dependiendo de la carga de trabajo que se tenga en ese momento. El personal de la USSDNA puede asesorar a los clientes en esta labor de purificación.

### **Instrucciones Para Solicitar Secuenciación**

1. HORARIO DE ENTREGA DE MUESTRAS. Las muestras a analizar y la solicitud de secuencia se deben entregar en el laboratorio de secuenciación, en un horario de 9 a 12 hrs en días hábiles. Esto con el fin de programar su procesamiento y aprovechar al máximo las posiciones disponibles en el

secuenciador. Evitar llevarlas en horarios distintos al estipulado porque pueden provocar la desconcentración del operador y se podría equivocar en el procesamiento. Una vez recibidas las muestras, le será asignado un número de solicitud y secuencia, con los que podrá verificar el estado de su solicitud.

2. Los usuarios externos pueden enviar sus muestras a temperatura ambiente, siempre que se garantice la entrega en la USSDNA en menos de 2 días. La dirección de envío es:

Attn.  
Mtro. Jorge Yáñez Ponce de León  
Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA  
Instituto de Biotecnología -UNAM  
Av. Universidad #2001  
Col. Chamilpa  
Cuernavaca, Morelos 62210  
Tel: (777) 3 29 77 12

3. PREPARACION DE TEMPLADOS. La calidad de los resultados de secuencia está directamente relacionada con la calidad y cantidad del templado. Por tanto, las muestras deben ser purificadas por "kits" de purificación de plásmidos o productos de PCR (p.ej. minipreps de Qiagen, Roche, Fermentas, etc). Además deben ser analizadas por gel de agarosa y cuantificadas por lectura de absorbancia a 260 nm.
4. Las muestras deben ser preparadas en agua grado biología molecular y no en TE u otro buffer.
5. Las cantidades totales de muestra para el análisis de secuencia son las siguientes  
Plásmido de 3 a 6 Kb: 500 - 750 ng Plásmido de 7-20 Kb): 750 - 1000 ng Producto de PCR : 120 ng
6. Para cada reacción de secuencia se requieren 10 pmolas totales de "primer". Considerar que la reacción de secuencia se realiza con un solo oligonucleótido.
7. La mezcla DNA / oligonucleótido se debe entregar en un tubo Eppendorf de 200  $\mu$ l de tapa plana en un volumen final de 16  $\mu$ l. Si se desea utilizar un oligonucleótido de la USSDNA, el volumen final debera ser de 15  $\mu$ l.
8. La USSDNA cuenta con los siguientes "primers":
  - o m13/pUC -40 Fw 5'-GTT TTC CCA GTC ACG TTG TA-3'
  - o m13/pUC Rv 5'-TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC-3'
  - o T7 PRIMER 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
  - o T3 PRIMER 5'-CGC ATT TAA CCC TCA CTA AAG-3'
  - o SK PRIMER 5'-CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC-3'
  - o KS PRIMER 5'-TCG AGG TCG ACG GTA TCG-3'
9. Las muestras que no cumplan con las especificaciones requeridas no serán recibidas.

### **Resultados de secuencia.**

Los resultados de secuencia se podrán descargar del servidor de secuencia al 3er día hábil de haber recibido la muestra, utilizando la clave y contraseña del servidor pbr de cada usuario. En el caso de usuarios externos, los resultados serán enviados por correo electrónico.

---

Para mayor información sobre Síntesis de Oligonucleótidos ó Secuenciación de DNA,  
favor de contactar a:

M. en C. Jorge Arturo Yáñez Ponce de León  
email: [jay@ibt.unam.mx](mailto:jay@ibt.unam.mx)  
Red UNAM: 27604 ó 27712  
Cuernavaca: 777 329 1604 ó 777 329 1712  
CDMX: 56 22 76 04 ó 56 22 77 12

---