# DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

### • CUANTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras originales de RNA total, fueron cuantificadas con el RNA Nano 6000 Kit de la compañía Agilent en el equipo Bioanalyzer 2100 también de la compañía Agilent.

### • PREPARACIÓN DE LAS BIBLIOTECAS

Para cada RNA se realizó una remoción de RNA’s ribosomales siguiendo el procedimiento del kit RiboMinus™ Bacteria 2.0 Transcriptome Isolation de la compañía Invitrogen. Posteriormente la construcción de las bibliotecas se realizó siguiendo el protocolo del TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit de la compañía Illumina, a partir del paso de fragmentación, no se realizó captura de mRNA’s. De manera breve, se tomaron 5 uL de RNA (de la remoción previa) de cada muestra y se fragmentó durante 4 minutos a 94º C con 13 uL de la solución Fragment,Prime,FinishMix. El protocolo se continuó hasta su compleción a partir de este paso (estos pasos incluyen primera cadena de cDNA, segunda cadena de cDNA, reparación de extremos, ligación de adaptadores y finalmente una PCR de enriquecimiento) con la siguiente modificación. Después del paso de enriquecimiento por PCR, las muestras fueron purificadas con un volumen de Ampure XP Beads. Las muestras purificadas, se corrieron en un gel de agarosa Low Range al 1.5% y se cortó la banda correspondiente a la biblioteca (rango de 300 a 600 bp), las muestras se purificaron utilizando el Zymoclean Gel DNA Recovery Kit de la compañía Zymo Research.

Posteriormente, las bibliotecas fueron analizadas para determinar el tamaño promedio de cada biblioteca, a través de un ensayo de electroforesis en capilar utilizando un equipo Bioanalyzer 2100 de la compañía Agilent, utilizando un chip de DNA 1000. Las bibliotecas analizadas, fueron cuantificadas utilizando el Qubit dsDNA HS Assay Kit en un fluorómetro DeNovix DS-11 o Qubit. Ya cuantificadas por fluorescencia, las muestras se volvieron a cuantificar en esta ocasión a través de una reacción de qPCR, utilizando el 2x SYBR Green qPCR Master Mix (High ROX) de la compañía Bimake.com en un equipo Step One de la compañía Applied Biosystems.

### • SECUENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras cuantificadas por qPCR, se normalizaron a una concentración de 4 nM y se hizo la mezcla de todas las bibliotecas en una sola solución para secuenciarse. Se utilizaron 1.5 ml de la solución con las bibliotecas a una concentración de 1.8 pM para cargar en el equipo de secuenciación. La secuencia se realizó en el equipo NextSeq 500/550 utilizando un High Output Kit v2.5 de 150 cycles para una secuencia de 2x75 ciclos. La corrida fue la FIELDBDj.