



PROTOCOLO AMPLIFICACIÓN PARCIAL DEL GEN CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD I (COI) PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE PECES

CÓDIGO: DGIA/LG/P-01.01/COI



C. AGUILAR

Rev. N°.	Fecha	Descripción de la Modificación	Edición	Aprobado por



L. CARRERA


DISTRIBUIDO A:

DEC	DGIA	AFIA	
-----	------	------	--

Copia No:

ÉSTA ES UNA COPIA CONTROLADA, SALVO SE INDIQUE DE OTRA MANERA.

Elaborado: M.Sc. Giovanna Sotil Caycho	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco	Autorizado: Ing. Lili J. Carrera Santos Directora DGIA
Fecha: Diciembre 2015	Fecha: Mayo 2016	Fecha: Junio 2016

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/LG/P-01.01/COI
	AMPLIFICACIÓN PARCIAL DEL GEN CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD I (COI) PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE PECES	Edición: 02 Revisión: 0 Fecha : 28/06/2016 Página 2 de 11

1. OBJETIVO

El presente protocolo establece las pautas a seguir para la amplificación parcial gen COI del ADN mitocondrial, mediante el uso de cebadores aplicados en el código de barras del ADN para la identificación de especies de peces a nivel molecular.

2. ALCANCE


El procedimiento es aplicable para todas las unidades de laboratorios de sedes regionales, que desarrollen una línea de investigación en el área de biología molecular, para la identificación de especies de peces marinos y continentales, mediante el análisis del gen mitocondrial COI.

3. TERMINOS Y DEFINICIONES

- **Código de barras de ADN:** herramienta desarrollada por Herbert et al. (2003) que se basa en el empleo de secuencias particulares de ADN como identificadores universales rápidos de especies, análogo al código de barras de uso comercial.
- **Primers o cebadores:** secuencia corta de oligonucleótidos de ADN que son utilizados para iniciar la síntesis de ADN mediante la técnica de la PCR, y que permite definir la región a ser amplificada.
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa, técnica mediante la cual se produce múltiples copias (2ⁿ) de un segmento corto de ADN a través de un número (n) de ciclos de temperatura y por acción de una ADN polimerasa.
- **COI:** Citocromo oxidasa subunidad I, proteína codificada en el ADN mitocondrial. El análisis de la secuencia de la región 5' de este gen viene siendo utilizado para la identificación molecular de especies de animales.



Elaborado: M.Sc. Giovanna Sotil Caycho Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Mayo 2016	Autorizado: Ing. Lili J. Carrera Santos Directora DGIA Fecha: Junio 2016
---	--	--

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/LG/P-01.01/COI
	AMPLIFICACIÓN PARCIAL DEL GEN CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD I (COI) PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE PECES	Edición: 02 Revisión: 0 Fecha : 28/06/2016 Página 3 de 11

- **Agua NFW:** Agua libre de nucleasas (*Nuclease Free Water*) como ADNasas y ARNasas, desionizada, sin aditivos químicos como DEPC, de calidad adecuada para aplicaciones en biología molecular.
- **Temperatura de annealing:** temperatura de hibridización de los cebadores o cebadores con el ADN molde, siendo aproximadamente 5°C mayor a la temperatura de melting.
- **Temperatura de melting:** temperatura en la cual el 50% de hebras se encuentran hibridizados de forma complementaria, y el otro 50% en hebra simple.

4. RESPONSABILIDADES

El Responsable o Jefe de Laboratorio:


- 4.1. Es responsable de asegurar el cumplimiento del presente protocolo.
- 4.2. Supervisa las actividades que involucran el presente ensayo.
- 4.3. Gestiona y verifica cumplimiento de plan de mantenimiento y calibración de equipos.
- 4.4. Supervisa el correcto ingreso de datos de los registros internos del trabajo.
- 4.5. Designa y autoriza al personal capacitado para ejecución de muestreo, ensayo y/o manejo de equipos según corresponda.
- 4.6. Emite informe de ensayo y asegura su confidencialidad.

El Analista (especialista, debidamente autorizado):

- 4.7. Aplica el presente protocolo y la identificación molecular de peces.
- 4.8. Verifica que la información proporcionada con la muestra sea la necesaria para realizar el ensayo.
- 4.9. Revisa el mantenimiento preventivo de los equipos y sus componentes.
- 4.10. Realiza el cálculo y emite resultados correspondientes.
- 4.11. Registra la información en el formato respectivo.



Elaborado: M.Sc. Giovanna Sotil Caycho Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Mayo 2016	Autorizado: Ing. Lili J. Carrera Santos Directora DGIA Fecha: Junio 2016
---	--	--

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/LG/P-01.01/COI
	AMPLIFICACIÓN PARCIAL DEL GEN CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD I (COI) PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE PECES	Edición: 02 Revisión: 0 Fecha : 28/06/2016 Página 4 de 11

5. EQUIPOS Y MATERIALES

5.1. EQUIPOS

- Minicentrífuga
- Agitador vortex
- Termociclador Proflex (Applied Biosystems)
- Sistema para electroforesis horizontal
- Fluorómetro o espectrofotómetro de micro volúmenes UV/VIS 190-840 nm
- Fotodocumentador

5.2. MATERIALES

- Microtubos de 1.5, 0.6 y 0.2 mL nuevos expuestos a UV (también pueden ser nuevos autoclavados y expuestos a UV).
- Micropipetas automáticas de rango variable (rango 0.5-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L).
- Tips o puntas nuevas expuestas a UV (también pueden ser autoclavadas y expuestas a UV).
- Plumón indeleble.
- Papel toalla.
- Papel de baja pelusa.


5.3. REACTIVOS

- Etanol 90° o 70°.
- Agua NFW.
- Cebadores o cebadores 10 μ M.
- Kit de PCR (dNTPs, buffer PCR 10X, TaqPol).
- Buffer TBE 1X (Trizma base –ácido bórico – EDTA) pH 8.3.
- Buffer de carga 6X.

6. CONSIDERACIONES PREVIAS

Elaborado: M.Sc. Giovanna Sotil Caycho Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Mayo 2016	Autorizado: Ing. Lili J. Carrera Santos Directora DGIA Fecha: Junio 2016
---	--	--



	PROTOCOLO -IMARPE-	DGI/LG/P-01.01/COI
	AMPLIFICACIÓN PARCIAL DEL GEN CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD I (COI) PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE PECES	Edición: 02 Revisión: 0 Fecha : 28/06/2016 Página 5 de 11

6.1. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- a. Realice todo el procedimiento utilizando guantes de nitrilo libre de polvo.
- b. Descarte todos los compuestos tóxicos en envases adecuados y destinados para este fin.
- c. Tenga cuidado al exponer los materiales con la luz UV.
- d. En caso se utilice el bromuro de etidio (tóxico) para el revelado del ADN en el gel de agarosa, se sugiere que la preparación de esta solución se realice en un ambiente aislado donde se indique el nivel de contaminación.

6.2. ÁREA DE TRABAJO Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL

- a. Limpie la cabina de flujo laminar con lejía al 10%.
- b. Utilice todos los materiales limpios (nuevos y autoclavados de ser necesario).
- c. Exponga a luz UV los tips, microtubos, agua NFW, y micropipetas a utilizar 15 min previo a la preparación de la reacción.
- d. Rotule todos los microtubos adecuadamente, y colóquelos en un rack o caja porta crioviales (según el paso durante el procedimiento).


7. PROCEDIMIENTO

7.1. FUNDAMENTO

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (**Polimerase Chain Reaction**, PCR por sus siglas en inglés) es una técnica *in vitro*, importante en procedimientos moleculares, que permite amplificar enzimáticamente (por una ADN polimerasa) muchas copias de un fragmento de interés. El análisis de secuencias amplificadas por PCR de la región COI, de aproximadamente 650 pb, es utilizada para estudios de identificación de especies a partir de pequeñas cantidades de tejido, y ha sido propuesto en particular como uno de los marcadores para la identificación de animales a través del código de



Elaborado: M.Sc. Giovanna Sotil Caycho Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Mayo 2016	Autorizado: Ing. Lili J. Carrera Santos Directora DGIA Fecha: Junio 2016
---	--	--

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/LG/P-01.01/COI
	AMPLIFICACIÓN PARCIAL DEL GEN CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD I (COI) PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE PECES	Edición: 02 Revisión: 0 Fecha : 28/06/2016 Página 6 de 11

barras de ADN (Herbert et al, 2003), registrados en una base de datos en línea BOLD Systems.

7.2. PREPARACIÓN DEL COCKTAIL DE REACCIÓN O “MASTER MIX”

- a. Utilice las extracciones de ADN genómico de peces obtenidas de acuerdo al protocolo “Extracción de ADN genómico total a partir de tejido muscular de organismos acuáticos” (DGIA/LG/P-01.01/Ext ADN).
- b. Utilice los *cebadores* o cebadores F (forward) y R (reverse) indicados en Anexo 1, descritos por Ward *et al.* (2005).
- c. Descongele las muestras de ADN molde a amplificar, así como los reactivos para la PCR.
- d. Agite las muestras en el vórtex y centrifugue los tubos por segundos.
- e. Realice los cálculos necesarios para el número de muestras a amplificar, considerando las siguientes concentraciones finales de cada uno de los reactivos y del ADN molde:


	Reactivo	Concentración final
MASTER MIX	Agua NFW	hasta volumen final de rx 12.5 a 25 μ L
	Buffer PCR	1X
	MgCl ₂	2.5 mM
	Cebadores F	0.1 μ M
	Cebadores R	0.1 μ M
	dNTPs	0.05 mM
	Taq polimerasa	0.625 U
	ADN molde	2 – 5 ng



L. CARRERA

- f. Prepare el master mix en un microtubo de 0.6 mL ó 1.5 mL (dependiendo del número de muestras a amplificar y del volumen de reacción).
- g. Agite la mezcla en un vortex y centrifugue por 5 segundos.
- h. En cada microtubo de 0.2 μ L, previamente rotulado, reparta el master mix preparado de acuerdo al volumen total de reacción elegido.

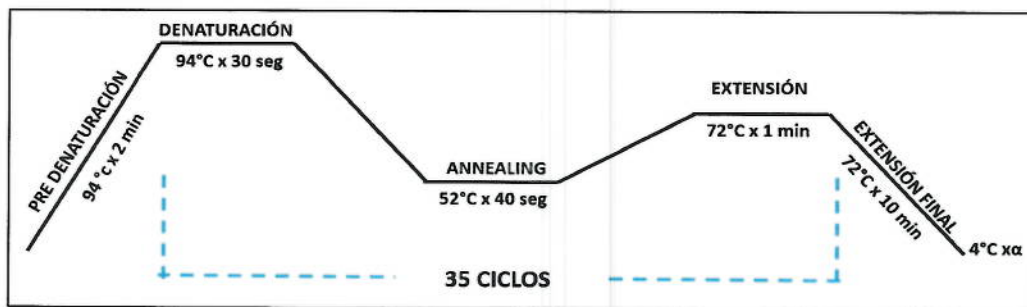
Elaborado: M.Sc. Giovanna Sotil Caycho Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Mayo 2016	Autorizado: Ing. Lili J. Carrera Santos Directora DGIA Fecha: Junio 2016
---	--	--

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/LG/P-01.01/COI
	AMPLIFICACIÓN PARCIAL DEL GEN CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD I (COI) PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE PECES	Edición: 02 Revisión: 0 Fecha : 28/06/2016 Página 7 de 11

- i. Agregue la cantidad necesaria de ADN genómico total, de acuerdo a la concentración final de reacción calculada, excepto a uno de los tubos (que será considerado como control negativo) donde se le agregará NFW en lugar de ADN.
- j. Mezcle y centrifugue por segundos, en modo táctil.

7.3. AMPLIFICACIÓN PARCIAL DEL GEN COI

- a. Coloque todos los tubos en el termociclador.
- b. Programe el equipo con las siguientes condiciones de temperatura, por 35 ciclos, según la siguiente figura:




- c. Terminada la reacción, evalúe los resultados inmediatamente, de lo contrario se pueden almacenar los amplificadores a - 20 °C hasta su análisis.
- d. Gradúe las condiciones de amplificación, las que han sido determinadas tomando en cuenta lo establecido por Ivanova et al. (2007) y Steinke y Hanner (2011), las cuales pueden ser modificadas de acuerdo al tipo de muestra a amplificar.



7.4. EVALUACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN

- a. Prepare un gel de agarosa al 1 – 1,5%, en buffer TBE (tomar como referencia el protocolo de preparación del gen indicado en el Protocolo DGIA/LG/P-01.01/Ext. ADN).

Elaborado: M.Sc. Giovanna Sotil Caycho Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Mayo 2016	Autorizado: Ing. Lili J. Carrera Santos Directora DGIA Fecha: Junio 2016
---	--	--

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/LG/P-01.01/COI
	AMPLIFICACIÓN PARCIAL DEL GEN CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD I (COI) PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE PECES	Edición: 02 Revisión: 0 Fecha : 28/06/2016 Página 8 de 11

- b. Realice una corrida electroforética en una cámara horizontal de acuerdo a las siguientes condiciones:
- Buffer de corrida: TBE 0.5-1X
 - Cantidad de amplificado: 3-4 uL
 - Buffer de carga: 1:4 con respecto al producto amplificado.
 - Voltaje: 90V.
 - Tiempo de corrida: 25 min.
- c. Coloque las muestras en cada pocillo, reservando los pocillos extremos para colocar un marcador de tamaño molecular (de 1 kb a 100 pb).
- d. Coloque el gel en transiluminador de luz UV o luz (dependiendo del agente fluorescente utilizado para el gel).
- e. Capture la imagen y transfiera en la hoja de trabajo correspondiente.
- f. Los amplificados deben tener un tamaño aproximado de 700 pb.
- g. En caso de obtener amplificaciones inexactas (más de una banda) debe volver a correr la prueba, considere modificaciones en la temperatura de annealing, la concentración de MgCl₂ y la concentración de la muestra.

8. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

HEBERT PD, CYWINSKA A, BALL SL., DEWAARD JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 270(1512): 313-21.


IVANOVA N, DEWAARD J, HAJIBABAEI M, HERBERT P. Protocols for high-volume DNA barcode analysis. DNA Working Group. Consortium for the Barcode of Life. Biodiversity Institute of Ontario. Canada.

STEINKE D. & HANNER R. 2011 The FISH-BOL collaborators' protocol. Mitochondrial DNA 22(S1): 10-14.



L. CARRERA


Elaborado: M.Sc. Giovanna Sotil Caycho Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Mayo 2016	Autorizado: Ing. Lili J. Carrera Santos Directora DGIA Fecha: Junio 2016
---	--	--

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/LG/P-01.01/COI
	AMPLIFICACIÓN PARCIAL DEL GEN CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD I (COI) PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE PECES	Edición: 02 Revisión: 0 Fecha : 28/06/2016 Página 9 de 11

WARD R, ZEMLAK TS, INNES BH, LAST PR, HEBERT PD. 2005 DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 360, 1847 – 1857.




Elaborado: M.Sc. Giovanna Sotil Caycho Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Mayo 2016	Autorizado: Ing. Lili J. Carrera Santos Directora DGIA Fecha: Junio 2016
---	--	--

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/LG/P-01.01/COI
	AMPLIFICACIÓN PARCIAL DEL GEN CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD I (COI) PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE PECES	Edición: 02 Revisión: 0 Fecha : 28/06/2016 Página 10 de 11

ANEXOS

Elaborado: M.Sc. Giovanna Sotil Caycho Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Mayo 2016	Autorizado: Ing. Lili J. Carrera Santos Directora DGIA Fecha: Junio 2016
---	--	--

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/LG/P-01.01/COI
	AMPLIFICACIÓN PARCIAL DEL GEN CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD I (COI) PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE PECES	Edición: 02 Revisión: 0 Fecha : 28/06/2016 Página 11 de 11

ANEXO 1.
**SECUENCIA DE CEBADORES UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA
 REGIÓN COI EN PECES**

CEBADORES	Secuencia (5' - 3')
VF2_t1	TGTAACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGACATTGGGCAC
FishF2_t1	TGTAACGACGGCCAGTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
FishR2_t1	CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA
FR1d_t1	CAGGAAACAGCTATGACACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA

ANEXO 2.
**RESULTADOS ESPERADOS DE LA AMPLIFICACIÓN DEL MARCADOR COI EN
 TEJIDO MUSCULAR DE PECES**

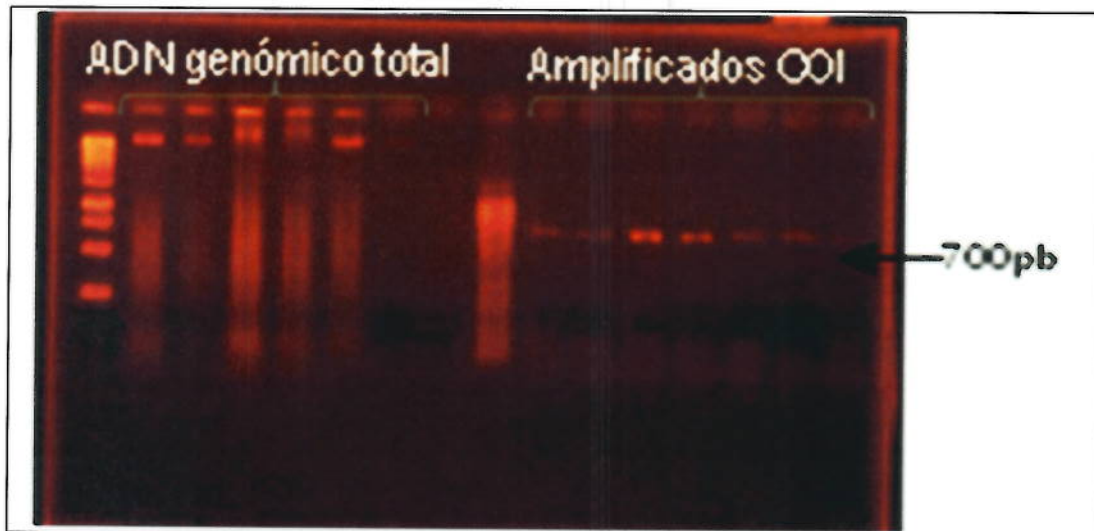


Figura 1. Gel de agarosa a 1% con muestras de amplificados del gen mitocondrial COI (aproximadamente 700 pb), comparando con muestras de ADN genómico total.


 L. CARRERA

Elaborado: M.Sc. Giovanna Sotil Caycho Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Mayo 2016	Autorizado: Ing. Lili J. Carrera Santos Directora DGIA Fecha: Junio 2016
---	--	--