



PROTOCOLO EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL DE CULTIVOS PUROS BACTERIANOS

CÓDIGO: DGIA/LG/P-01.01/Ext.ADNBac

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




DISTRIBUIDO A:

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

Copia No:
ÉSTA ES UNA COPIA CONTROLADA, SALVO SE INDIQUE DE OTRA MANERA.

Elaborado: M Sc. Giovanna Sotil M Sc. Yerisf Torres Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera santos Directora DGIA Fecha: Julio 2016
---	--	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/LG/P-01.01/Ext.ADNBac
	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL DE CULTIVOS PUROS BACTERIANOS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha :21/07/2016 Página 2 de 13

1. OBJETIVO

El presente protocolo establece las pautas a seguir para la obtención del ADN genómico total de alta pureza y bajo nivel de degradación, a partir de cultivos puros de cepas bacterianas mantenidas en medio líquido, de diferentes especies acuáticas para ser utilizado en posteriores análisis de marcadores moleculares.

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, orientada a la identificación o caracterización molecular de una cepa bacteriana aislada de ambientes marinos o continentales.

3. TERMINOS Y DEFINICIONES

- **ADN genómico:** ADN del genoma completo de un organismo, conteniendo tanto las regiones codificantes como no codificantes.
- **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.
- **Buffer TE:** Solución tampón Trizma base – EDTA, solución comúnmente utilizada en biología molecular especialmente en procedimientos donde se involucra la presencia de ADN, ADNc o ARN.
- **CTAB:** Bromuro de hexadeciltrimetilamonio $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{Br})(\text{CH}_3)_3$. Detergente, sal de amonio surfactante cuaternario catiónico, comúnmente empleado como detergente en la extracción de ácidos nucleicos de alto peso molecular, también utilizado para la precipitación de ácidos nucleicos.
- **SDS:** Detergente aniónico (**S**odium **D**odecyl **S**ulfate) que puede formar complejos con proteínas a través de interacciones hidrofóbicas. Adicionalmente puede solubilizar proteínas y lípidos de membranas celulares, ayudando a la separación de proteínas del ADN.



Elaborado: M.Sc. Giovanna Sotil M.Sc. Yerisf Torres Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera santos Directora DGIA Fecha: Julio 2016
---	--	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/LG/P-01.01/Ext.ADNBac
	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL DE CULTIVOS PUROS BACTERIANOS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha :21/07/2016 Página 3 de 13

- **NaCl:** Cloruro de sodio, sal que se utiliza para mantener en solución el complejo ADN - CTAB.
- **Lisis celular:** Ruptura de membrana celular.
- **Marcador molecular:** Fragmento de ADN asociado a una cierta ubicación dentro del genoma. Es utilizado como una herramienta de selección molecular que permite identificar y caracterizar diferencias en individuos.
- **Pellet:** En los procesos de centrifugado se refiere al material sedimentado.

4. RESPONSABILIDADES

El Responsable o Jefe de Laboratorio:


- 4.1. Es responsable de asegurar el cumplimiento del presente protocolo.
- 4.2. Supervisa los procesos que involucran la extracción del ADN conforme al protocolo establecido.
- 4.3. Supervisa los controles de calidad que se realizan, conforme al protocolo.
- 4.4. Supervisa el correcto ingreso de datos de los registros internos del trabajo.
- 4.5. Designa y autoriza al personal capacitado para realizar este procedimiento.

El Analista:

- 4.6. Aplica el presente protocolo para realizar extracción del ADN genómico total.
- 4.7. Verifica que la información proporcionada con la muestra sea la necesaria para realizar el ensayo.
- 4.8. Realiza el mantenimiento preventivo del equipo y sus componentes.
- 4.9. Realiza y emite el cálculo de los resultados.
- 4.10. Registra información en formato correspondiente.



Elaborado: M Sc. Giovanna Sotil M Sc. Yerisf Torres Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera santos Directora DGIA Fecha: Julio 2016
---	--	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/LG/P-01.01/Ext.ADNBac
	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL DE CULTIVOS PUROS BACTERIANOS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha :21/07/2016 Página 4 de 13

5. EQUIPOS Y MATERIALES

5.1. EQUIPOS

- Agitador magnético.
- Agitador vórtex.
- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Baño maría seco o incubadora (a 60 °C).
- Cabina de esterilización con UV.
- Centrifuga refrigerada.
- Congeladora.
- Equipo para electroforesis horizontal.
- Espectrofotómetro UV o Fluorómetro.
- Estufa.
- Fotodocumentador de luz UV.
- Microcentrífuga para tubos de 1.5 mL.
- Potenciómetro.


5.2. MATERIALES

- Hoja de bisturí.
- Micropipetas automáticas de rangos variables (0.5-10 µL, 10-200 µL, 100-1000 µL).
- Microtubos de 1.5 mL nuevos y expuestos a UV (también pueden ser autoclavados).
- Tips o puntas nuevas expuestas a UV (también pueden ser autoclavadas)
- Papel de baja pelusa.
- Papel toalla.
- Pinzas punta fina.
- Plumón indeleble.



5.3. REACTIVOS

Elaborado: M.Sc. Giovanna Sotil M.Sc. Yerisf Torres Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera santos Directora DGIA Fecha: Julio 2016
---	--	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/LG/P-01.01/Ext.ADNBac
	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL DE CULTIVOS PUROS BACTERIANOS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha :21/07/2016 Página 5 de 13

- Agarosa (para electroforesis de ácidos nucleicos).
- Agua NFW.
- Buffer de carga 6X.
- Buffer TE (Tris-HCl, EDTA) pH 8.0.
- Buffer TBE 10X (Trizma base – ácido bórico – EDTA) pH 8.3.
- Etanol 70% (preparado a partir de etanol absoluto).
- GelRed, u otro agente intercalante para el revelado del ADN.
- Isopropanol.
- Marcador de tamaño molecular (250 – 10000 pb aprox.).
- NaCl 5M.
- Proteinasa K (20 mg/mL).
- SDS 10%.
- Solución CTAB-NaCl.
- Solución de cloroformo-álcohol isoamílico (en proporción 24:1, respectivamente).
- Soluciones de limpieza (etanol 80%, lejía 10%).

6. PROCEDIMIENTO


6.1. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- a. Realizar todo el procedimiento utilizando guantes de nitrilo libre de polvo.
- b. Manipule los solventes orgánicos, en una campana extractora de gases o utilice una mascarilla con filtro para gases, guarde las soluciones preparadas en frascos de vidrio color ámbar y rotularle adecuadamente.
- c. Descarte todos los compuestos tóxicos en envases adecuados y destinados para este fin.
- d. Tenga cuidado al exponer los materiales con la luz UV.
- e. En caso se utilice el bromuro de etidio para el revelado del ADN en el gel de agarosa, dado el nivel tóxico de este compuesto, se sugiere que



L. CARRERA

Elaborado: M Sc. Giovanna Sotil M Sc. Yerisf Torres Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera santos Directora DGIA Fecha: Julio 2016
---	--	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/LG/P-01.01/Ext.ADNBac
	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL DE CULTIVOS PUROS BACTERIANOS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha :21/07/2016 Página 6 de 13

la preparación de esta solución se realice en un ambiente aislado donde se indique el nivel de contaminación.

6.2. PREPARACIÓN DEL MATERIAL Y ÁREA DE TRABAJO

- a. Prepare las soluciones necesarias previamente, teniendo en cuenta las concentraciones y pH indicados en Anexo 1. Las soluciones buffer se deben de guardar en refrigeración (aproximadamente a 4 °C).
- b. Limpie el área de trabajo con etanol 80%, secarlo con papel toalla, y luego limpie con lejía 10%.
- c. Utilice todos los materiales limpios (y autoclavados de ser necesario).
- d. Rotule todos los microtubos adecuadamente, y colóquelos en un rack o caja porta crioviales.
- e. Incube la solución CTAB - NaCl a 50 °C aprox. 20 min previo a su uso.
- f. Coloque el isopropanol y etanol 70% a – 20 °C, aproximadamente 40 min antes de su uso.

7. PROCEDIMIENTO


Fundamento: La extracción y purificación de ácidos nucleicos constituye la primera etapa de la mayoría de los estudios de biología molecular. Aquí se busca romper la membrana celular mediante una solución tampón de extracción (conteniendo EDTA, Tris-HCl, SDS, CTAB y proteinasa K. Esta técnica propone el uso de solventes orgánicos, digestión enzimática, lisis con detergentes, uso de solventes orgánicos y precipitación del ADN por sales (*Salting out*).

7.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

- a. Rotule 2 microtubos de 1.5 mL con el código de identificación del tubo de ensayo de cual se va a extraer el cultivo bacteriano y transfiera con cuidado 1.5 mL del cultivo a cada microtubo.
- b. Centrifugue los microtubos a 14000 rpm por 20 min.



Elaborado: M Sc. Giovanna Sotil M Sc. Yerisf Torres Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera santos Directora DGIA Fecha: Julio 2016
---	--	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/LG/P-01.01/Ext.ADNBac
	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL DE CULTIVOS PUROS BACTERIANOS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha :21/07/2016 Página 7 de 13

- c. Elimine el sobrenadante y deje únicamente el precipitado o pellet, seguido procese o almacene a -20 °C, hasta su uso.

7.2. LISIS CELULAR


- a. Agregue al pellet, 567 µL de buffer TE y homogenice por pipeteo repetitivos.
- b. Agregue 30 µL de SDS 10% y 3 µL de Proteinasa K.
- c. Mezcle el preparado en vórtex e incube a 37 °C durante 1 hora.

7.3. PRECIPITACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

- a. Agregue 100 µL de NaCl 5M y mezcle con vórtex (este paso es importante ya que el complejo CTAB – ADN precipitará si la concentración de NaCl es menor a 0.5 M)
- b. Agregue 80 µL de la Solución CTAB/NaCl (lo que en conjunto con la solución anterior, permitirán remover residuos como pared celular, proteínas y polisacáridos unidos al CTAB y mantener los ácidos nucleicos en solución).
- c. Agite la muestra e incube a 65 °C durante 15 min.
- d. Agregue un volumen igual (aproximadamente 700 a 800 µL) de cloroformo-alcohol isoamílico.
- e. Agite la muestra o en un agitador de tubos durante 5 minutos y centrifugue a 14000 rpm por 5 min.
- f. Extraiga la fase acuosa (fase superior) y transfiera a un tubo nuevo (evitar tocar o transferir la interfase).
- g. Elimine los residuos de cloroformo-alcohol isoamílico adecuadamente (en un frasco de residuos de solventes orgánicos).
- h. Realice un segundo lavado, repitiendo los pasos desde el punto d.
- i. A la fase acuosa obtenida luego del segundo lavado, agréguele 0.6 volúmenes de isopropanol, respecto al volumen recuperado de la fase acuosa (aprox 600 – 700 µL).
- j. Agite la muestra (observar el inicio de la precipitación del ADN) e incube a -20°C por 30 min.



Elaborado: M Sc. Giovanna Sotil M Sc. Yerisf Torres Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera santos Directora DGIA Fecha: Julio 2016
---	--	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/LG/P-01.01/Ext.ADNBac
	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL DE CULTIVOS PUROS BACTERIANOS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha :21/07/2016 Página 8 de 13

- k. Centrifugue a 14000 rpm por 10 min y eliminar el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet de ADN.
- l. Agregue 1 mL de etanol 70% y agite manualmente de modo que el pellet y las paredes del tubo se laven, seguido centrifugue a 14000 rpm por 3 min y elimine el sobrenadante y quédese con el pellet.
- m. Repita el lavado, una vez más como mínimo.
- n. Agregue entre 20 a 100 μ L de agua NFW o buffer TE (dependiendo de la cantidad de ADN precipitado) para disolver el pellet y almacenar las extracciones a - 20 °C.

7.4. EVALUACIÓN DE LA CANTIDAD Y CALIDAD DEL ADN EXTRAÍDO

- a. Determine la concentración de ADN (ng/ μ L) y la pureza de la extracción, colocando una alícuota de la muestra (ADN extraído) en un fluorómetro y/o en un espectrofotómetro UV/VIS (de utilizar un espectrofotómetro realice lecturas a absorbancias de 230nm, 260nm y 280nm).
- b. Registre los datos y considere como extracciones de buena calidad a aquellas muestras que den por resultado índices de: A260/A230 y A260/A280 con valores entre 1.8 - 2.
- c. Para evaluar la integridad del ADN extraído: prepare un gel de agarosa entre 0.8 a 1%, disuelta en buffer TBE 0.5X ó 1X. Antes de que gelifique agregue el agente fluorescente intercalante entre nucleótidos, para la tinción de ácidos nucleicos (ejm GelRed, runSafe, Sybr Safe, etc.).
- d. Con la ayuda de una micropipeta automática, mezcle 2 μ L de ADN con 0.5 μ L de buffer de carga 6X.
- e. Coloque la mezcla en un pocillo del gel, además seleccionar uno de los pocillos para colocar un marcador de tamaño molecular de fragmentos grandes (ejemplo de 0.25 – 10 kb).
- f. Realice la corrida electroforética horizontal a 90V, por 30 a 40 min.



Elaborado: M Sc. Giovanna Sotil M Sc. Yerisf Torres Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera santos Directora DGIA Fecha: Julio 2016
---	--	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/LG/P-01.01/Ext.ADNBac
	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL DE CULTIVOS PUROS BACTERIANOS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha :21/07/2016 Página 9 de 13

- g. Retire el gel de la cámara electroforética y colóquelo sobre la pantalla del transiluminador de luz UV o luz azul (dependiendo del agente fluorescente utilizado para el gel).
- h. Capture la imagen y colóquelo en la hoja de trabajo correspondiente.

8. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

WILSON, K. (1987). Preparation of genomic DNA from bacteria. Current protocols in molecular biology, 2-4.



Elaborado: M Sc. Giovanna Sotil M Sc. Yerisf Torres Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera santos Directora DGIA Fecha: Julio 2016
---	--	---



**PROTOCOLO
-IMARPE-**

DGIA/LG/P-01.01/Ext.ADNBac

**EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL DE CULTIVOS
PUROS BACTERIANOS**

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha :21/07/2016
Página 10 de 13

ANEXOS

Elaborado: M Sc. Giovanna Sotil
M Sc. Yerisf Torres
Fecha: Diciembre 2015

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Julio 2016

Autorizado: Ing. Lili Carrera santos
Directora DGIA
Fecha: Julio 2016

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/LG/P-01.01/Ext.ADNBac
	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL DE CULTIVOS PUROS BACTERIANOS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha :21/07/2016 Página 11 de 13

Anexo 1.

Preparación de soluciones

1. Buffer TE

10 mM	Tris HCl, pH 7.4, 7.5, o 8.0
1 mM	EDTA, pH 8.0

2. Buffer TBE 10X

108 g	Tris base (890 mM)
55 g	Ácido bórico (890 mM)
40 ml	0.5 M EDTA, pH 8

3. Solución CTAB – NaCl

- a. Disuelva 4.1 g NaCl en 80 mL de agua ultra pura.
- b. Agregue lentamente los 10 g de CTAB y agitar constantemente.
- c. Caliente a 65°C para disolver y enrace a 100 mL.

4. NaCl 5 M


292	NaCl
100 mL	Agua ultrapura

5. SDS 10%

0.10 g	SDS
1 mL	Agua ultrapura



Elaborado: M Sc. Giovanna Sotil M Sc. Yerisf Torres Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera santos Directora DGIA Fecha: Julio 2016
---	--	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/LG/P-01.01/Ext.ADNBac
	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL DE CULTIVOS PUROS BACTERIANOS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha :21/07/2016 Página 12 de 13

Anexo 2.

Formatos de muestras procesadas

LG/F-RM/01.01 C

RECEPCIÓN DE MUESTRA			
Registro de recepción (Laboratorio, fecha, etc.)			
Tipo de muestra	Cantidad recibida	Cantidad procesada	Código de muestra

LG/F-CM/01.01 B

RESULTADOS				
Cuantificación				
Código de muestra	Espectrofotómetro			Fluorómetro
	Concentración	A260/A280	A260/A230	Concentración
Electroforesis				
Pocillo	Código	Gel de agarosa		
1				
2				
3				
4				
5				
...				
Condiciones de corrida:				
Observaciones:				


DGIA
L. CARRERA

Elaborado: M Sc. Giovanna Sotil M Sc. Yerisf Torres Fecha: Diciembre 2015	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera santos Directora DGIA Fecha: Julio 2016
---	--	---



PROTOKOLO
-IMARPE-

DGIA/LG/P-01.01/Ext.ADNBac

EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL DE CULTIVOS
PUROS BACTERIANOS

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha :21/07/2016
Página 13 de 13

Anexo 3.

Gel de agarosa mostrando la integridad del ADN extraído

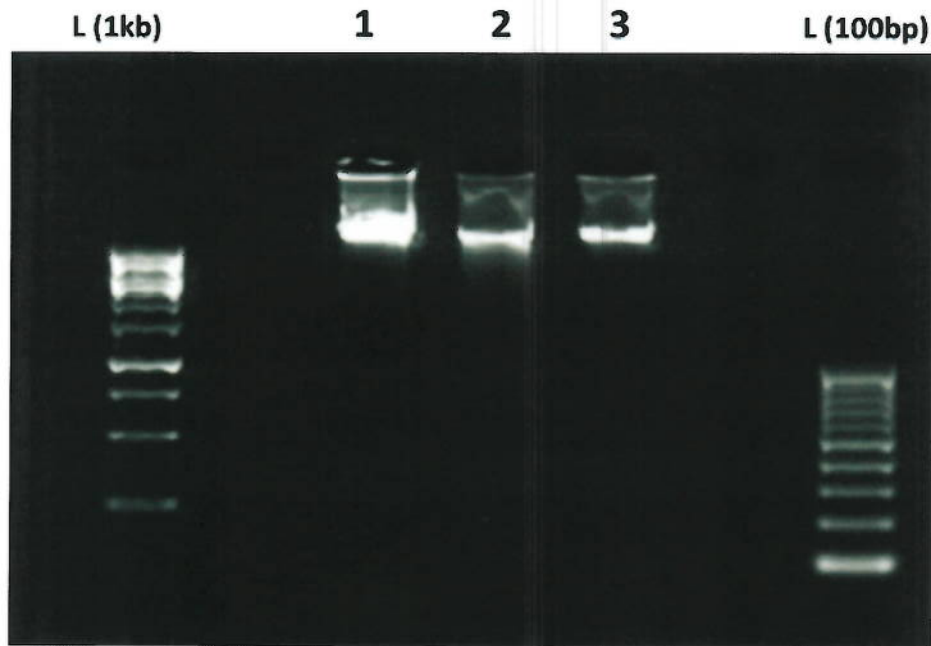


Figura 1. Gel de agarosa a 1% con muestras de extracción de ADN a partir de un cultivo bacteriano, revelado con GelRed (Biotium), condiciones de corrida: 90V por 30 min. Concentración de stock de ADN obtenidos entre 80 a 1700 ng/uL. 1, 2, 3 = cepas bacterianas; L(100pb) = marcador de tamaño molecular de 100 a 1000 pb; L(1kb) = marcador de tamaño molecular de 250 a 10000 pb

