

PROCOLO

Extracción de ADN para la especie Capitán de la Sabana (*eremophilus mutisii*).



AUNAP
AUTORIDAD NACIONAL
DE ACUICULTURA Y PESCA

"Acuicultura y Pesca con Responsabilidad"

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA LA ESPECIE CAPITÁN DE LA SABANA (*eremophilus mutisii*).

Equipo de autores y colaboradores

® Universidad de Ciencias Aplicadas - UDCA	® Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca
Cruz Elena Enríquez Valencia Luisa Fernanda Triana Lina Rodríguez Hernández Camilo Prieto Mojica	María Rosa Angarita Peñaranda Gustavo Salazar Ariza Javier Plata González Julia del Carmen Palacios Jairo Andrés Saganome

Esta publicación, es un producto resultado del convenio de cooperación No. 260 de 2019 cuyo objeto: "La evaluación del desempeño productivo de alevinos de capitán de la sabana (*Eremophilus mutisii*) y análisis citogenético y genético molecular de la especie en cuatro zonas del altiplano cundiboyacense (Laguna de Fúquene Suesca y embalses de Tominé y la Copa)" suscrito entre la Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca y La Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales – U.D.C.A en el año 2019.

Citación sugerida: Enríquez-Valencia, C.E., Triana, L.F., Rodríguez-Hernández, L., y Prieto-Mojica, C. (2019). Protocolo de extracción de ADN para la especie Capitán de la Sabana (*eremophilus mutisii*). Convenio 260 de 2019. AUNAP - UDCA. 3 p

®Todos los derechos reservados. Se autoriza la reproducción y difusión de material contenido en este documento para fines educativos u otros fines no comerciales, sin previa autorización del titular de los derechos de autor, sí y solo sí, se reconocen los créditos de los autores, editores e instituciones que han elaborado el presente documentos.

Las líneas de delimitación, así como los mapas que pudieran presentarse dentro de la publicación, son una representación gráfica aproximada, con fines ilustrativos y no expresan una posición de carácter oficial, por ende, ni los autores ni las instituciones vinculada, asumen la responsabilidad de las interpretaciones que surjan a partir de estas.

"Se prohíbe la reproducción de este documento para fines comerciales"

Responsabilidad: Las denominaciones empleadas y la presentación del material en esta publicación, no implican la expresión de opinión o juicio alguno por parte de las instituciones participantes. Así mismo, las opiniones expresadas no representan necesariamente las decisiones o políticas de las instituciones participantes, ni la citación de nombres, estadísticas pesqueras o procesos comerciales. Todos los aportes y opiniones expresadas son de la entera responsabilidad de los autores correspondientes. Los documentos que componen este libro han sido editados con previa aprobación de sus autores.

Protocolo de Extracción de ADN Para Capitán de la Sabana.

INTRODUCCIÓN

En la mayoría de las especies ícticas, la caracterización genética de poblaciones, la descripción de la arquitectura genética y la cuantificación de la expresión génica han sido investigadas a partir de diferentes técnicas moleculares. Algunas desventajas reportadas para estos métodos incluyen su complejidad, sensibilidad, repetibilidad y especificidad, por lo que, antes de la utilización de cualquier técnica o herramienta molecular para estudios genéticos demanda la estandarización de protocolos específicos que asegure el aislamiento del material genético en concentraciones y calidad adecuada acorde a los requerimientos y sensibilidad de la técnica a utilizar.

Bajas concentraciones del material genético y/o presencia de contaminantes, así como degradación del mismo conllevará a la no obtención de resultados ni reproducibilidad de la técnica como también a obtener resultados imprecisos. En este contexto, la estandarización de los protocolos de extracción y obtención del material genético a trabajar permite optimizar y garantizar la cantidad y calidad del ADN necesario para los respectivos estudios a realizar. Este siempre debe ser el primer paso para el desarrollo de cualquier proyecto de investigación que incluya métodos o técnicas moleculares específicas. Dicho proceso ayuda a maximizar la calidad y la confianza de los datos obtenidos y mejora la reproducibilidad de futuras investigaciones de la especie en estudio.

OBJETIVO

Extraer ADN genómico a partir de tejido muscular y sanguíneo de individuos de Capitán de la Sabana obtenidos de diferentes zonas Cundiboyacenses.

MATERIALES Y REACTIVOS NECESARIOS

a. Reactivos

PBS / Solución salina

Kit High Pure PCR Template Preparation ROCHE

Isopropanol

b. Materiales:

- Balanza analítica
- Bolsa Ziploc (tamaño pequeño)
- Micropipetas (10, 20, 100, 200 y 1000 μ L)
- Puntas para micropipetas

- Microtubos 1.5 ml
- Microcentrífuga
- Baño maría

PROCEDIMIENTO:

1. Preparación de la muestra (lavado y macerado de tejido):

Pesar 30 g de músculo y lavar con suficiente PBS, posteriormente colocar la muestra en una bolsa ziploc pequeña y añadir 300 µL del PBS. Macerar muy bien hasta volverla líquida.

2. Proceso de extracción de ADN:

- Colocar 200 µL del material macerado o triturado en un tubo de 1,5 ml y adicionar 200 µL de Binding Buffer.
- Añadir 40 µL de proteinasa K, homogeneizar e inmediatamente incubar a 70 °C por 10 minutos.
- Adicionar 100 µL de Isopropanol y mezclar bien utilizando vortex
- Colocar el material en un tubo filtro con su respectivo tubo recolector y centrifugar por 1 minuto a 8.000 rpm.
- Después de centrifugar retirar el tubo con el filtro, desechar el tubo con el líquido obtenido y colocar el filtro en un nuevo tubo colector.
- Añadir 500 µL de tampón Removal Buffer y centrifugar por 1 minuto a 8.000 rpm.
- Retirar el filtro y descartar el tubo con el líquido obtenido
- Colocar el filtro en un nuevo tubo colector, añadir 500 µL de Wash Buffer y centrifugar por 1 minuto a 8.000 rpm.
- Repetir el proceso anterior de lavado
- Insertar el filtro en un tubo de 1,5 ml estéril y limpio, añadir 50 µL de tampón Elution Buffer (previamente precalentado a 70°C) este tampón contiene 10mM Tris-Cl y pH 8.5.
- Finalmente centrifugar por 1 minuto a 8.000 rpm
- Almacenar el DNA genómico obtenido a -20°C

Cuantificación y verificación de calidad ADN genómico extraído de *Eremophilus mutisii*

La cuantificación y verificación de la calidad del ADN genómico se está realizando en Nanodrop y electroforesis de agarosa constituido por 0,6 gramos de agarosa y 50 ml de TBE 1X. Teñido con Red Ladder (10mg/mg), a 100V por 20 minutos. El ADN se visualiza en transluminador UV como se muestra en la Figura 1 y Figura 2.

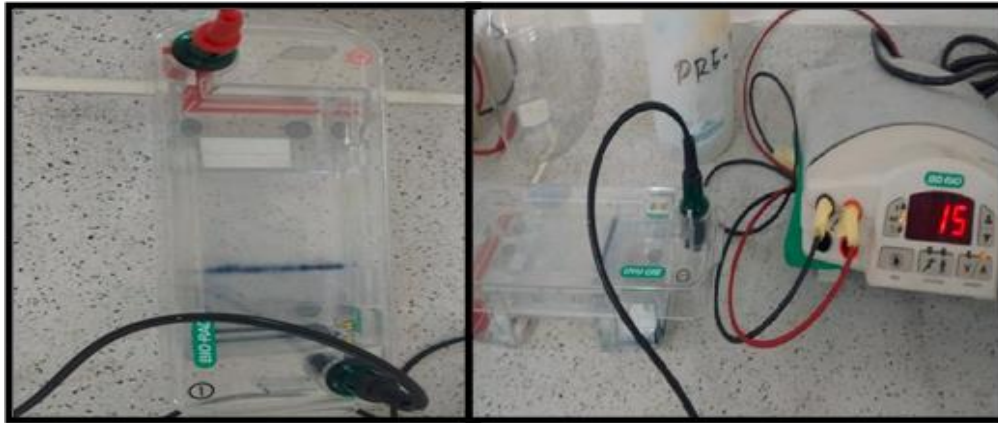


Figura 1. Electroforesis de ADN genómico del Capitán de la Sabana, realizada en el laboratorio de Genética Molecular Animal de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A

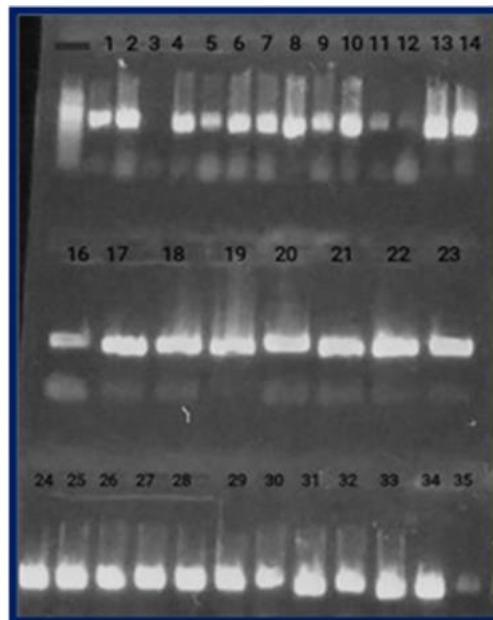


Figura 2. Visualización de ADN genómico en gels de agarosa por medio de electroforesis.