



PROTOSCOLOS DE TRABAJO EN EL LABORATORIO MOLECULAR DE BIODIVERSIDAD

Autor: Sergio Pérez
Edición: Rosa Roldán
2020



CONTENIDO	PÁG.
INTRODUCCIÓN	1
1.CONDICIONES DE BIOSEGURIDAD	2-3
1.1 Orden y Limpieza	2
1.2 Protección personal	3
1.3 Normas	
2. PROTOCOLO PARA EXTRACCIÓN DE ADN KIT PROMEGA RELIAPREP - TEJIDOS	4-6
2.1 Equipo y materiales	4
2.2 Procedimiento	5-6
3. PROTOCOLO PARA AMPLIFICACIÓN DE ADN REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA -PCR-	7-10
3.1 Preparación de cebadores (primers)	
3. PROTOCOLO PARA ELECTROFORESIS	11-13
3.1 Equipo y materiales	11
3.2 Preparación de Buffer TBE	11
3.3 Procedimiento	12-13
3.4 Protocolo de uso de GelRed	13



INTRODUCCIÓN

El Laboratorio Molecular de Biodiversidad de la Escuela de Biología de la Universidad de San Carlos de Guatemala -USAC- está ubicado en el campus central de la USAC, en el segundo nivel del Edificio T10, Ciudad Universitaria Zona 12, Ciudad de Guatemala. En este laboratorio se desarrollan técnicas moleculares para estudios genéticos con aplicaciones en taxonomía, filogeografía y resolución de preguntas ecológicas y evolutivas.

Este laboratorio presta un servicio a varias unidades de la Escuela de Biología. Además, apoya en la realización de proyectos como tesis, investigaciones de estudiantes del Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad -EDC- y del Ejercicio Profesional Supervisado -EPS-, investigaciones de la Dirección General de Investigación -DIGI-, entre otros.

En este documento se presentan las condiciones de bioseguridad y los protocolos de trabajo para el laboratorio. De manera que sirva como un documento de apoyo para el personal que utilice las instalaciones. Específicamente, se detallan los protocolos de trabajo para extracción y amplificación de ADN, y electroforesis.



1. CONDICIONES DE BIOSEGURIDAD

1.1 Orden y limpieza

- 1.El laboratorio se mantendrá ordenado, limpio y libre de materiales no relacionados con el trabajo.
- 2.Guardar los frascos de reactivos, materiales y útiles de trabajo al acabar de utilizarlos, en donde corresponda.
- 3.Las superficies de trabajo se descontaminarán después de todo derrame de material potencialmente peligroso y al final de cada jornada de trabajo.
- 4.Colocar siempre los residuos y la basura en contenedores y recipientes adecuados.
- 5.En el caso de que se averíe un equipo, informar inmediatamente al encargado, evitando utilizarlo hasta su completa reparación.

1.2 Protección personal

- 1.Se usarán en todo momento batas en el laboratorio.
- 2.Se debe usar guantes protectores apropiados para todos los procedimientos que puedan entrar en contacto directo o accidental con sangre, líquidos corporales, reactivos o tejidos. Una vez utilizados, los guantes se retirarán de forma aséptica y a continuación se lavarán las manos.
- 3.El personal deberá lavarse las manos al entrar al laboratorio y antes de abandonar la zona de trabajo.
- 4.Se debe usar gafas de seguridad, viseras u otros dispositivos de protección cuando sea necesario proteger los ojos y el rostro de salpicaduras, impactos y fuentes de radiación ultravioleta artificial.



1.3 Normas

1. En las zonas de trabajo estará prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.
 2. Está prohibido almacenar alimentos o bebidas para consumo humano en las zonas de trabajo del laboratorio.
 3. No se debe pipetear con la boca ninguna clase de sustancia.
 4. Se recomienda ubicar todo el material a utilizar en el interior de la Cabina de Seguridad Biológica antes de empezar a trabajar. De esta forma se evita que nada pase hacia dentro o hacia fuera de la misma hasta que el trabajo haya terminado.
 5. Todas las sustancias, equipos, materiales, etc., deberán ser manejados con el máximo cuidado, atendiendo a las indicaciones de los manuales o fichas de uso o de seguridad según sea el caso.
 6. Al conectar o desconectar cualquier equipo eléctrico las manos deben estar completamente secas, los cables de los equipos deben estar en optimas condiciones de no ser así no lo use, infórmelo al encargado del laboratorio.
- Nota: El extintor contra incendios se encuentra ubicado en el primer nivel de este edificio (T-10).



2. PROTOCOLO PARA EXTRACCIÓN DE ADN KIT PROMEGA RELIAPREP TEJIDOS

- Limpiar y ordenar todo antes de iniciar

2.1 Equipo y materiales

1. Micropipetas de 10 μ l, 200 μ l y 1000 μ l. La micropipeta de 10 μ l se presta del área de PCR, con su soporte, limpiarla.
2. Asegurar suficiente disponibilidad de micropipetas puntas (10 μ l, 200 μ l y 1000 μ l), tubos (1.5ml y 2ml).
3. Traer el KIT PROMEGA RELIAPREP, con reactivos y columnas
 - **Reactivos del kit:** Proteinasa K, Cell Lysis Buffer (CLD), RNase A, agua ultrapura (libre de nucleasas), Binding Buffer (BBA) y Column Wash Solution (CWD).
4. Solución PBS separada en tubos Eppendorf 1.5ml
5. Gradillas
6. Vortex
7. Microcentrífuga 14,000rpm y microcentrífuga pequeña
8. Plataforma de incubación
9. Papel de aluminio
10. Equipo de disección (tijeras y pinzas)
11. Mechero
12. Alcohol etílico al 95% en pisetas y mechero
13. Caja para muestras
14. Marcadores Sharpie
15. Guantes de látex o nitrilo
16. Cuaderno



2.2 Procedimiento:

1. Preparar una gradilla con una serie de 2 tubos Eppendorf de 1.5ml por cada muestra (previamente esterilizados), una columna y dos tubos recolectores.
2. Preparar el vortex, mechero y microcentrífuga (para 14,000 rpm), y varios tubos (1.5 o 2ml) con solución PBS.
3. Preparar la plataforma de incubación a 56°C.
4. Macerar, en un pedacito de papel de aluminio limpio, ca. 25mg de tejido, y cortar en pedacitos más pequeños. Utilizar tijeras y pinzas limpias, esterilizadas con alcohol etílico 95% y con la llama de un mechero.
5. Añadir 160 µl de solución fosfatada PBS y agitar en vortex.
6. Homogenizar la muestra.
7. Añadir 20µl de **Proteinasa K**.
8. Añadir 200 µl de **Cell Lysis Buffer (CLD)** y mezclar en vortex por 10 segundos.
9. **Incubar a 56°C, por 30 minutos a 2 horas**, o más si la muestra es difícil de homogenizar. Mezclar regularmente con vortex por 10 segundos, aproximadamente cada media hora.
10. Añadir a cada muestra 20µl de solución **RNase A**, mezclar con vortex por 10 segundos.
11. **Incubar a 56°C por 10 minutos**.
12. Retirar la muestra de la incubadora y añadir 250µl de **Binding Buffer (BBA)**, mezclar en vortex por 10 segundos.
NOTA: Si todavía se observa gran cantidad de restos de tejido en la muestra, centrifugar la muestra, en una microcentrífuga, por un minuto (para posteriormente descartar el precipitado).
13. Colocar una columna **ReliaPrep Binding Column** en un tubo colector y transferir la muestra líquida al interior de la(s) columna(s).



14. Colocar las columnas y tubos colectores en una microcentrífuga y centrifugar a máxima velocidad (14,000rpm) por un minuto. Revisar las columnas para verificar si toda la solución ha pasado por el filtro, de lo contrario centrifugar por un minuto adicional.

5. Descartar los tubos colectores y la solución como desechos tóxicos.

16. Colocar las columnas en un nuevo tubo colector. Añadir 500µl de Column Wash Solution (CWD) a la columna y centrifugar por 2 minutos. Revisar las columnas para verificar si toda la solución ha pasado por el filtro, de lo contrario centrifugar por un minuto adicional.

17. Repetir dos veces adicionales el lavado con 500µl de Column Wash Solution (paso 15), para un total de tres lavados. En cada paso descartar la solución y seguir utilizando el mismo tubo colector.

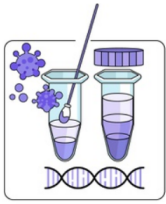
18. Colocar la columna en un nuevo tubo de 1.5ml.

19. Añadir 50-200µl de **Nuclease-Free Water** y centrifugar por un minuto a máxima velocidad.

NOTA: a menor solución, más concentrado el ADN, aunque se perderá un pequeño porcentaje.

20. Descartar la columna y almacenar la solución con aDN. La muestra puede almacenarse a 4°C por períodos cortos de tiempo y a -20°C a largo plazo.

- Limpiar y ordenar todo al terminar



3. PROTOCOLO PARA AMPLIFICACIÓN DE ADN REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA -PCR-

3.1 Preparación de cebadores (primers)

Los cebadores generalmente se adquieren liofilizados, sin congelación durante el transporte, y se les debe añadir agua “ultrapura” después de recibirlos y almacenarlos a -20°C para extender su vida útil. La cantidad de agua ultrapura que hay que añadir a cada primer depende de la cantidad de micromoles que se hayan solicitado a los fabricantes. Generalmente se indica en el tubo la cantidad de microlitros de agua que se deben añadir para obtener una concentración de almacenamiento de 100uMoles. El cebador se almacena en un lugar y recipiente separado y solo se saca del congelador cuando se requiere diluir más cebador de trabajo. En el laboratorio se hacen diluciones de trabajo menos concentradas (10uMoles) añadiendo nueve partes de agua ultrapura a una parte de cebador (de 100uMoles). Por ejemplo, se pueden preparar 100 uL de “primer” de trabajo añadiendo 90uL de agua + 10 uL de primer. El cebador de trabajo se almacena en una caja separada (personal e identificada) junto a otros cebadores diluidos y los otros componentes utilizados para la preparación del Master Mix.

- Concentraciones de trabajo para Master Mix:

MgCl₂ 25 o 50mM

Buffer 5 o 10X

dNTPs 2mM

PF 10μM

PR 10μM

Taq Polimerasa 2.5U



- GoTaq Master Mix:
 1. En área de PCR pre-seleccionar las muestras (extracciones) que se van a trabajar con PCR.
 2. Hacer cálculo para Master Mix de una muestra.
 3. Generalmente se calculan las cantidades necesarias para obtener muestras de PCR en 25µL. En ese caso se utilizan las siguientes concentraciones (para una muestra de 25µL):

Cuadro 1. Concentraciones sugeridas para 25µl: 3.5mM MgCl₂ (cuarta columna)

	2.0mM	2.5mM	3.0mM	3.5mM
H ₂ O	9.3	8.8	8.3	7.8
MgCl ₂ 25mM	2	2.5	3	3.5
Buffer 5X	5	5	5	5
dNTP's Mix 2mM	2.5	2.5	2.5	2.5
PF 10uM	2.5	2.5	2.5	2.5
PR 10uM	2.5	2.5	2.5	2.5
Taq Polimerasa 2.5U	0.2	0.2	0.2	0.2
SUB-TOTAL	24	24	24	24
ADN de muestra	1	1	1	1
TOTAL	25	25	25	25



Cuadro 2. Concentraciones sugeridas para 50 μ l: 3.5mM MgCl₂ (cuarta columna)

	2.0mM	2.5mM	3.0mM	3.5mM
H₂O	19.6	18.6	17.6	16.6
MgCl₂ 25mM	4	5	6	7
Buffer 5X	10	10	10	10
dNTP's Mix 2mM	5	5	5	5
PF 10uM	5	5	5	5
PR 10uM	5	5	5	5
Taq Polimerasa 2.5U	0.4	0.4	0.4	0.4
SUB-TOTAL	49	49	49	49
ADN de muestra	1	1	1	1
TOTAL	50	50	50	50

Cuadro 3. Concentraciones sugeridas con GoTaq pre Master Mix para 25 μ l

	2.0mM
H₂O	6.5
GoTaq pre-Mix	12.5
PF 10uM	2.5
PR 10uM	2.5
SUB-TOTAL	24
ADN de muestra	1
TOTAL	25

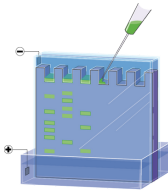


Cuadro 4. Concentraciones sugeridas con GoTaq pre Master Mix para 50 μ l

	2.0mM
H₂O	14
GoTaq pre-Mix	25
PF 10μM	5
PR 10μM	5
SUB-TOTAL	49
ADN de muestra	1
TOTAL	25

NOTA:

- Hacer cálculos para Master Mix (MM) para el número de muestras que se quieren trabajar, más una muestra control negativo, otra como control positivo, y la cantidad de una adicional para evitar que al final haga falta un poco de MM. Anotarlo todo en la bitácora de trabajo.
- Lo último que se vierte en el Master Mix es la muestra, pero esto se realiza en otra mesa, no en la de PCR.



4. PROTOCOLO PARA ELECTROFORESIS

- Limpiar y ordenar todo antes de iniciar

4.1 Equipo y materiales

1. Agarosa en polvo
2. Buffer TDE
3. Cámara de electroforesis
4. Microondas
5. Guantes de nitrilo
6. Peines para electroforesis
7. Balanza
8. Matraz 250ml
9. Espátula de laboratorio
10. Microtubos de 0.2ml
11. Micropipetas de 10 μ l
12. Puntas de micropipetas 10 μ l
13. Servilletas para limpiar
14. Alcohol etílico para limpiar
15. Agua destilada (dH₂O)
16. Limpiar y ordenar todo antes de iniciar

4.2 Preparación de Buffer Tris/Borato/EDTA (TBE)

- TBE viene en concentración 10X
- La concentración de uso es : TBE 0.5X
- Para preparar un litro de TBE 0.5X: colocar 950 ml de dH₂O y añadir 50 ml de TBE10X.



4.3 Procedimiento

1. Armar y balancear la cámara de electroforesis.
2. En un matraz pequeño colocar 0.45 g de agarosa.
3. Para una cámara de electroforesis se utilizan 45ml de TBE 0.5X, vertidos en el matraz con agarosa.
4. Calentar con pausas la muestra en el microondas, en total es 1 minuto, en períodos de 15 segundos, más pausas. Durante las pausas agitar ligeramente hasta que se disuelvan todos los grumos. **No permitir que la muestra hierva y se rebalse.**
5. Añadir colorante sensible a luz UV.
6. Dejar enfriar unos minutos la muestra hasta que pueda tocarse el matraz con la mano (con guantes).
7. Verter la solución en la cámara de electroforesis (con los peines) y dejar enfriar y cuajar (aprox. 20 minutos).
8. Retirar los peines, cambiar la posición del gel dentro de la cámara (con los pozos del lado negativo) y añadir TBE 0.5X hasta el nivel indicado en la cámara.
9. Preparar muestras en microtubos (0.2ml) con 3 microlitros de solución de azul de bromofenol IF + 2 microlitros de solución con ADN. Una muestra control negativo adicional contendrá agua pura y otra muestra contendrá la escalera de referencia.
10. Cargar los 5 microlitros de la muestra teñida en los pozos de la cámara.
11. Conectar y calibrar la fuente de poder a 100 voltios y 35 minutos (opcional: 120V x 30min). La electroforesis termina automáticamente.
12. Retirar el gel de la cámara de electroforesis con la ayuda de una espátula y una servilleta. Escurrirla antes de transferir a la cámara de UV.
13. Colocar el gel dentro de la cámara oscura y encender la luz UV.



14. Revisar la posición del gel y la visualización de las bandas de ADN a través de la ventana de vidrio “polarizado” de protección a luz UV. Las visualizaciones deben ser breves, de pocos segundos.
15. Revisar la imagen en la cámara fotográfica y/o la computadora y grabarla o imprimirla.
16. Apagar todo el sistema.
17. Depositar el gel en recipiente de desechos tóxicos.
18. Limpiar todo, con uso de servilletas y alcohol etílico. La cámara de electroforesis se lava suavemente solo con agua destilada. Dejar secar en el mismo sitio de uso.

4.4 Protocolo de uso de GelRed

El GelRed es una tinción utilizada para la visualización de ácidos nucleicos en geles de agarosa para electroforesis.

- GelRed viene en concentración de 10,000X, en cantidad de 500µl.
- **Para la solución de trabajo:** disolver 100µl de GelRed (10,000X) en 900µl de agua destilada (ultrapura).
- **Forma de uso:** para 50ml de gel de agarosa, añadir 5µl de solución de trabajo GelRed.