

UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica

Informe de Laboratorio

- PROYECTO:** Diversidad filogenética de *Macrobrachium* spp. (Decapoda: Palaemonidae) en la cuenca alta del río Napo, Ecuador
- INFORMACIÓN DEL PERSONAL CIENTÍFICO:**

Investigador: PhD. [Rodrigo Eduardo Espinosa Barrera](#)

Técnico: Ing. [Walter Armando Quilumbaquin Alba](#)

Estudiantes: Lizbeth Paillacho

3. PROCEDIMIENTOS:

3.1. EXTRACCIÓN DE ADN

3.1.2. Nombre del Protocolo

EZNA Insect DNA Kit

3.1.3. Preparación de muestras

Antes de empezar con la extracción es necesario separar a partir del tercer pleopodo, ya que de esa parte se tomará el tejido para la extracción. Posteriormente, con la ayuda de pinzas se retira la quitina y se toma el tejido para almacenarlo en tubos de 1.5 mL. El otro extremo del espécimen será almacenado en tubos falcon de 15 mL con alcohol y su respectiva etiqueta de codificación. De los tubos de 1.5 mL se pesará aproximadamente 20 mg de tejido en tubos de 1.5 mL y llevados al ultracongelador -80°C por 30 min para triturar hasta conseguir un polvo homogéneo.

3.1.4 Materiales, reactivos, equipos y software

Materiales	Reactivos	Equipos	Software
-Pinzas -Puntas (blancas, amarillas y azules) -Tubos -Gradilla -Fosforera -Tijeras -Mechero -Cajas petri -Vaso de precipitación -Tubos falcon (15 ml) -Marcador indeleble	-Kit extracción -Etanol 100% -Isopropanol 100% -Cloroformo -ARNasa -Alcohol Isoamilico -Agua desionizada -Alcohol 96%	-Balanza analítica -Vortex -Baño maría -Microcentrífuga -Ultracongelador -Nanodrop	-Ninguno

--	--	--	--

3.1.5. Procedimiento

Para la extracción, se añaden 350 µL de tampón CTL y 25 µL de proteinasa K a la muestra, seguido de una breve vortexación. Luego, se incuba a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, se agregan 350 µL de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se mezcla por inversión. La muestra se centrifuga a 10.000 g durante 2 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se recuperan 300 µL de la fase acuosa superior y se transfieren a un nuevo tubo de 1,5 mL debidamente etiquetado. Se añaden 300 µL de BL Buffer y 2 µL de ARNasa, mezclando nuevamente por inversión, y se incuba a 70°C durante 10 minutos. Posteriormente, se incorporan 300 µL de etanol al 100% y se mezcla por inversión.

La solución obtenida se transfiere a una minicolumna previamente colocada en un tubo de recogida de 2 mL, aplicando 750 µL de la mezcla y centrifugando a 10.000 g durante 1 minuto. Se desecha el filtrado y se reutiliza la minicolumna hasta filtrar toda la solución. Luego, se añaden 500 µL de tampón HBC y se centrifuga a 10.000 g por 30 segundos. Tras descartar el filtrado, se agregan 700 µL de tampón de lavado de ADN y se centrifuga a 10.000 g durante 1 minuto, repitiendo este paso una segunda vez. Posteriormente, la minicolumna vacía se centrifuga durante 2 minutos a 10.000 g para eliminar restos de solución.

Finalmente, la minicolumna se transfiere a un nuevo tubo de 1,5 mL y se añaden 100 µL de tampón de elución previamente calentado a 70°C. Se deja reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos y se centrifuga a 10.000 g por 1 minuto. La minicolumna se descarta y el ADN obtenido se almacena a 4°C.

3.1.6. Resultados

Tabla 1. Concentración y pureza de las muestras de *Macrobrachium spp.*

Nombre del frasco/ muestra	Código	Ácido nucleico(ng/µL)	A260/A28 0	A260/A23 0
VP3194	M03J	78,639	1,927	2,299
SMON142	M04J	61,552	1,939	2,277
FTIO1606	M05J	139,143	1,944	2,478
FTIO1145	M06J	19,775	1,855	1,994
CPBLO1609	M08J	26,354	1,882	2,043
C6ANT1494	M11J	129,97	1,958	2,407
PATC1341	M13J	44,721	2,034	2,369

<i>PATC1175</i>	<i>M16J</i>	<i>99,924</i>	<i>1,927</i>	<i>2,523</i>
<i>AHNO41555</i>	<i>M20J</i>	<i>200,728</i>	<i>1,921</i>	<i>2,6</i>
<i>AHNO41235</i>	<i>M21J</i>	<i>135,504</i>	<i>1,97</i>	<i>2,524</i>
<i>CPBTO164</i>	<i>M22J</i>	<i>38,84</i>	<i>2,024</i>	<i>2,406</i>
<i>CPBTO1395</i>	<i>M23J</i>	<i>25,707</i>	<i>2,067</i>	<i>2,206</i>
<i>CPBTO1105</i>	<i>M24J</i>	<i>47,335</i>	<i>1,938</i>	<i>2,539</i>
<i>VCHP11295</i>	<i>M25J</i>	<i>4,161</i>	<i>1,808</i>	<i>1,069</i>
<i>RTYCU1135</i>	<i>M26J</i>	<i>100,105</i>	<i>1,98</i>	<i>2,623</i>
<i>BZYCU1675</i>	<i>M27J</i>	<i>193,066</i>	<i>2,001</i>	<i>2,615</i>
<i>BZYCU15</i>	<i>M28J</i>	<i>149,835</i>	<i>2,054</i>	<i>2,733</i>
<i>BZYCU1515</i>	<i>M29J</i>	<i>88,619</i>	<i>2,113</i>	<i>2,855</i>
<i>CHP21445</i>	<i>M32J</i>	<i>17,589</i>	<i>2,07</i>	<i>2,177</i>
<i>SJNTO175</i>	<i>M33J</i>	<i>99,07</i>	<i>2,03</i>	<i>2,575</i>
<i>RCYCU1825</i>	<i>M34J</i>	<i>16,487</i>	<i>2,095</i>	<i>2,249</i>
<i>RCYCU1825</i>	<i>M35J</i>	<i>20,66</i>	<i>2,075</i>	<i>2,474</i>
<i>RCYCU119</i>	<i>M36J</i>	<i>42,2</i>	<i>1,969</i>	<i>2,43</i>

3.1.7. Conclusiones:

- Las muestras que presentaron una concentración menor a 50 gu/uL no se realizaron diluciones.

3.1.8. Recomendaciones

- Realizar diluciones a 50 ng/uL.
- Dejar evaporar el alcohol de las muestras y congelar a -80°C antes de empezar con la extracción de ADN.
- Extraer 300 uL en la fase acuosa de extracción.