Purificación de ADN

de geles de agarosa

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Elaboró: | Revisó: | Autorizó: |
| Nombre: | Dr. Oscar Medina Contreras | Dr. Oscar Medina Contreras | Dra. Jenny Vilchis Gil |
| Firma: |  |  |  |
| Fecha: | 2020-04-08 | 2020-04-08 | 2020-05-01 |

1. **Propósito**

Extraer fragmentos de ADN de interés de geles de agarosa con el kit GeneJet gel extraction and DNA Cleanup micro kit.

1. **Alcance**

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que deseen extraer fragmentos de ADN de geles de agarosa en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Instituto Nacional de Salud Hospital Infantil de México Federico Gómez.

1. **Políticas de operación, normas y lineamientos**

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Instituto Nacional de Salud Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento.

Los residuos de tipo CRETI (Corrosivas, Reactivas, Explosivas, Toxicas e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052-SEMARNAT- 2005.

1. **Descripción del Protocolo**

* Corroborar la presencia del fragmento de ADN de interés.
* Con una navaja de bisturi limpia, cortar la agarosa lo más cercano a la banda de ADN, tratar de adquirir el menor volumen de gel. Se recomienda tener un volumen 200mg. Colocar en tubo centrifuga de 1.5 ml. (**1**)
* Adicionar 200µl de Buffer de extracción y mezclar.
* Incubar la mezcla a 50-58°C por 10 minutos o hasta que el gel se encuentre completamente disuelto. Invertir el tubo por unos minutos para facilitar el proceso de fundición (**2**).
* Adicionar 200µl de etanol (96-100%) y mezclar.
* Transferir la muestra a la micro-columna de purificación de ADN prensamblado con el tubo de colección. Centrifugar la columna de 30-60 segundos a 14,000 x g, descartar sobrenadante y colocar la micro-columna de purificación de ADN en el tubo de colección (**3**).
* Adicionar 200µl de Buffer de prelavado (suplementado con etanol) a la micro-columna de purificación de ADN y centrifugar por 30-60 segundos a 14,000 x g. Descartar el sobrenadante y colocar la columna de purificación nuevamente en el tubo de colección (**4**).
* Adicionar 700µl de Buffer de lavado (suplementado con etanol) a la micro-columna de purificación de ADN y centrifugar de 30-60 segundos a 14,000 x g. Este paso repetir por duplicado.
* Descartar el sobrenadante y colocar la columna de purificación nuevamente en el tubo de colección (**5**).
* Centrifugar la micro-columna de purificación de ADN 1 minuto a 14,000 x g al vacío para remover por completo el buffer de lavado. Este paso es esencial para remover el etanol en la solución purificada de ADN. La presencia de etanol puede inhibir las reacciones enzimáticas.
* Transfiera la micro-columna de purificación de ADN a un tubo de micro centrifuga 1.5ml limpio.
* Adicionar 10µl de Buffer de elución a la micro-columna de purificación de ADN, centrifugar por 1 minuto a 14,000 x g, para eluir el ADN (**6**).
* Descartar la columna de purificación y guardar el ADN purificado a -20°C.

Notas:

(1). Si el fragmento de ADN extraído se utilizara en experimentos de clonación exponer pocos segundos a luz UV o colocar una placa de plástico o vidrio sobre el gel agarosa durante la iluminación con UV.

(2). Para geles de agarosa ≥1% prolongar el tiempo de incubación 15 minutos.

(3). Si el fragmento de ADN es ≥10kb centrifugar la columna por 2 minutos a 14,000 x g. Cerrar el empaque de la micro-columna de purificación de ADN fuertemente después del uso.

(4). Si el fragmento de ADN es ≥10kb centrifugar la columna por 1-2 minutos a 14,000 x g.

(5). Si el fragmento de ADN es ≥10kb centrifugar la columna por 1-2 minutos a 14,000 x g. Repita el paso anterior.

(6). El volumen recomendado de buffer de elución es 6-10µl, si es ≤10µl baja el rendimiento de ADN. Si el fragmento de ADN es ≥10kb el volumen de elución debe incrementar entre 15-20µl para obtener un óptimo rendimiento. No es recomendado un volumen de elución menor 10µl.

1. **Diagrama de Flujo**

**Contar con en el gel de agarosa y el ADN interés.**

1. **Documentos de Referencia**

Manual de “GeneJet gel extraction and DNA Cleanup micro kit”. Thermo Scientific

Current Protocols in Molecular Biology, Section 2.6.1, Supplement 59. **Frederick M. Ausubel et al. 2003.**