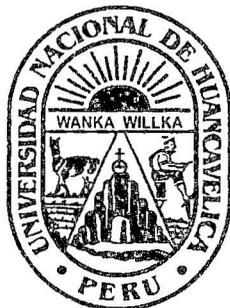


# UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCABELICA

(CREADA POR LEY N° 25265)

FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍA  
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE ZOOTÉCNIA



EVALUACIÓN DE 3 MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN  
DE ADN GENÓMICO A PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE  
DE VICUÑA (*Vicugna vicugna mensalis*)

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

**INGENIERO ZOOTECNISTA**

PRESENTADO POR:

Bach/Ing. Tantahuilca Landeo, Folke Claudio

Bach/Ing. Trucios Crispin, Haymé

ASESOR

*M.Sc. Elmer René Chavez Araujo*

CO-ASESOR:

*M.Sc. Rufino Paucar Chanca*

HUANCAVELICA - PERÚ

2011



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCAMELICA FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍA



63

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En el Auditorium de la Facultad de Ciencias de Ingeniería, a los 17 días del mes de octubre del año 2011, a horas 4:00. p.m., se reunieron los miembros del Jurado Calificador conformado por los siguientes: **Dr. Jaime Antonio RUIZ BEJAR (PRESIDENTE)**, **Ph. D. Edgar Carlos QUISPE PEÑA (SECRETARIO)** y **Blgo Mblgo Víctor Guillermo SÁNCHEZ ARAUJO (VOCAL)**, designados con la resolución N° 069-2010-FCI-UNH, de fecha 22-02-2010, ratificados con Resolución de Decano N° 009-2011-FCI-CGT-UNH de fecha 13-10-2011, a fin de proceder con la evaluación y calificación de la sustentación del informe final de tesis titulado: "EVALUACIÓN DE 3 MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO A PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE DE VICUÑA (*Vicugna vicugna mensalis*)", presentado por los Bachilleres: **Haymé TRUCIOS CRISPÍN y Folke Claudio TANTAHUILLCA LANDEO**, para optar el **Título Profesional de Ingeniero Zootecnista**, Finalizado la evaluación a horas 17:00.; se invitó al público presente y a los sustentantes abandonar el recinto. Luego de una amplia deliberación por parte de los Jurados, se llegó al siguiente resultado:

### HAYME TRUCIOS CRISPÍN

APROBADO  POR...*Mayoría*.....

DESAPROBADO

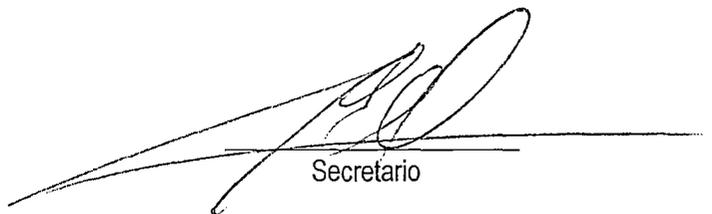
### FOLKE CLAUDIO TANTAHUILLCA LANDEO

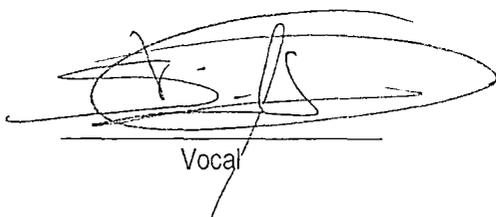
APROBADO  POR...*Mayoría*.....

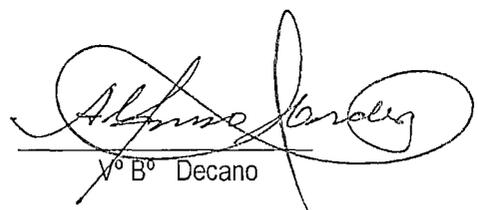
DESAPROBADO

En conformidad a lo actuado firmamos a continuación:

  
Presidente

  
Secretario

  
Vocal

  
Vº Bº Decano

## DEDICATORIA

A mis Padres: Claudio y Teresa.

Por depositar en mi toda su confianza y esperanza,  
gracias por su cariño y comprensión y a mis hermanos  
por su apoyo.

FOLKE.

A mi madre; por su paciencia, amor y  
comprensión el cual hizo posible la  
culminación de la tesis.

A Dios; por ser la luz que guía mi  
camino, brindarme amor, fortaleza,  
sabiduría y permanecer siempre a mi  
lado.

HAYMÉ.

---

## AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional de Huancavelica por permitir la utilización de las instalaciones en el laboratorio.
  - Al proyecto “Fortalecimiento de capacidades logísticas y humanas en Biotecnología Molecular a fin de desarrollar estudios sobre la conservación de poblaciones animales en estado crítico o en peligro de extinción en Huancavelica-Perú”, financiado por AECID (Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo) a través de la Universidad Nacional de Huancavelica (UNH) y la Universidad Pública de Navarra (UPNA), la cual hizo posible la ejecución del presente trabajo de investigación.
  - Al Lic. Francisco Triviño Barrientos por su apoyo desinteresado en la ejecución de la presente investigación.
  - Al M.Sc Elmer René Chávez Araujo, por su orientación para la planificación, ejecución y culminación del presente trabajo de investigación.
  - Al M.Sc Rufino Paucar Chanca, por guiarnos en la ejecución y orientarnos en la culminación del presente trabajo de investigación.
  - A toda nuestra familia, quienes durante nuestra permanencia en la universidad supieron comprendernos y apoyarnos en todo momento.
-

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
RESUMEN	
<b>CAPITULO I</b>	
INTRODUCCIÓN	01
<b>CAPITULO II</b>	
MARCO TEORICO Y CONCEPTUAL	03
2.1 Antecedentes	03
2.2 Bases teóricas	06
2.2.1 La Vicuña.	06
2.2.2 Sangre de vicuña	07
2.2.3 ADN	08
2.2.4 Extracción de ADN genómico	08
2.2.5 Evaluación de ADN mediante espectrofotometría	10
2.2.6. Evaluación de ADN mediante electroforesis	11
<b>CAPITULO III</b>	
MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. Lugar de ejecución del estudio	12
3.2. Materiales y equipos	12

---

3.2.1	Material biológico	12
3.2.2	Material de laboratorio	12
3.2.3	Reactivos	13
3.2.4	Material de campo	15
3.2.5	Materiales y equipos de escritorio	15
3.2.6	Equipo de laboratorio	16
3.3.	Metodología y procedimiento	17
a.	Recolección de las muestras	17
b.	Métodos de extracción de ADN genómico	17
b.1	Método de Fenol- Cloroformo- Isoamílico	17
b.2	Método de Cloruro de sodio	19
b.3	Método de Acetato de amonio	20
c.	Evaluación de ADN por espectrofotometría	21
d.	Evaluación de ADN por electroforesis	22
3.4.	Población de estudio y diseño estadístico	23
A.	Población	23
B.	Análisis estadístico	24

**CAPITULO IV**

RESULTADOS		25
4.1	Cantidad de ADN	25
4.2	Calidad de ADN	27



<b>CAPITULO V</b>	
DISCUSIÓN	30
<b>CAPITULO VI</b>	
CONCLUSIÓN	33
<b>CAPITULO VII</b>	
RECOMENDACIONES	34
<b>CAPITULO VIII</b>	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
<b>ANEXO</b>	

---

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro N° 01:</b> Comparación del índice $A_{260}/A_{280}$ y la cantidad de ADN obtenida a partir de los métodos de extracción ensayados.	6
<b>Cuadro N° 02:</b> Comparación del índice $A_{260}/A_{280}$ y la cantidad de ADN obtenida a partir de tres métodos de extracción evaluados.	25
<b>Cuadro N°03:</b> Estadística Descriptiva de los 3 métodos de extracción de ADN.	25
<b>Cuadro N° 04:</b> Prueba de Normalidad	26
<b>Cuadro N° 05:</b> Prueba de Levene	26
<b>Cuadro N° 06:</b> Medias de la Concentración de ADN de tres métodos de Extracción de ADN.	27
<b>Cuadro N° 07:</b> Dodecil sulfato de sodio (SDS)	39
<b>Cuadro N° 08:</b> Buffer de lisis	39
<b>Cuadro N° 09:</b> Buffer de lisis TKM1+triton	39
<b>Cuadro N° 10:</b> Buffer T10E1 (Tris, EDTA)	39
<b>Cuadro N° 11:</b> Absorbancia de ADN con el método Fenol-Cloroformo-Isoamílico	40
<b>Cuadro N° 12:</b> Absorbancia de ADN con el método cloruro de sodio	40
<b>Cuadro N° 13:</b> Absorbancia de ADN con el método de acetato de amonio	41
<b>Cuadro N° 14:</b> Resultados en Programa R	41

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura N° 01:</b> Electroforesis en gel de agarosa donde se observa las bandas de ADN por los dos métodos.	5
<b>Figura N° 02:</b> Cálculo del tamaño muestral de la población total a un grado de confiabilidad al 95%	24
<b>Figura N° 03:</b> Electroforesis del ADN extraído de una muestra de sangre con los 3 métodos.	27
<b>Figura N° 04:</b> Electroforesis del ADN extraído de una muestra de sangre con los 3 métodos.	28
<b>Figura N° 05:</b> Electroforesis del ADN extraído de una misma muestra de sangre con los 3 métodos.	28

---

## RESUMEN

El presente Trabajo de Investigación, se realizó en el laboratorio de Biotecnología Molecular de la Universidad Nacional de Huancavelica, ubicado a 3680 msnm. dentro del proyecto “Fortalecimiento de capacidades logísticas y humanas en biotecnología molecular a fin de desarrollar estudios sobre la conservación de poblaciones animales en estado crítico o en peligro de extinción en Huancavelica-Perú”, financiado por AECID. El objetivo fue determinar que método de extracción nos permite obtener ADN genómico de alta calidad y cantidad, para ello se tomaron muestras de sangre de vicuñas capturadas en el chaccu 2009 del Centro de investigación de camélidos sudamericanos Lachocc en el paraje denominado Saccsalla, a una altura de 4450 msnm, el mencionado centro cuenta con una población aproximada de 205 vicuñas entre machos y hembras, entre adultos y crías.

Se trabajó con 36 muestras de sangre de vicuña que fueron transportadas al laboratorio en tubos vacutainer de 5ml, la extracción de ADN se realizó utilizando tres métodos diferentes: fenol-cloroformo-isoamílico; cloruro de sodio y acetato de amonio. La calidad y cantidad de ADN se evidenció mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y lecturas de las absorbancias de  $A_{260/280}$  para determinar el grado de pureza de ADN, como también la concentración de ADN mediante espectrofotometría.

Se obtuvieron índices de absorbancia a  $A_{260/280}$  de 1.81, 1.67 y 1.17 que corresponden a concentraciones de ADN genómico de 138.30, 60.98 y 54.73 ug/ml para los

---

métodos de Cloruro de Sodio (NaCl), Fenol Cloroformo isoamilico (FCI) y Acetato de Amonio (AA) respectivamente, la cual se verifico mediante electroforesis observándose bandas de ADN que demuestran la calidad de ADN, concluyéndose la efectividad de extracción de ADN con el método de Cloruro de Sodio. Asimismo, indicamos que los resultados obtenidos son fundamentales para iniciar los estudios de variabilidad genética a nivel molecular en vicuñas.

**Palabras claves:** Métodos de extracción de ADN, sangre, vicuña

---

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas la reducción de la biodiversidad del planeta se ha convertido en un tema de vital importancia a solucionar. La extinción de una especie animal representa la pérdida de un recurso que se ha desarrollado a través de millones de años de selección natural (FAO, 2007; Hoces, 2008). Un ejemplo de la pérdida de especies animales de la región de los andes del Perú es la caza indiscriminada de vicuñas la cual llegó a estar catalogada en peligro de extinción, pasando inclusive por un “cuello de botella” genético (Wheeler, 1995).

Esta especie es la más pequeña de los camélidos sudamericanos y tiene la fibra más fina, que es solo comparable con la fibra del gusano de seda (Quispe, 2010). En el año 2006 Huancavelica contaba con 20,762 números de vicuñas y en el año 2009 contaba una población de 13,785 vicuñas la cual constituye una disminución del número de vicuñas (DRAH, 2009), como consecuencia probable del inadecuado manejo en silvestría, mediante cercos comunales, que podrían conllevar a una disminución de la heterocigocidad (Quispe, 2009b).

Por lo cual una forma de gestionar políticas de conservación de estos animales es mediante la evaluación genética de variabilidad utilizando marcadores moleculares que requieren métodos de extracción de ADN de células del animal, donde se debe aislar ADN puro para la prueba en estudio. Existen varios métodos

de extracción del ADN genómico, como el método de fenol- cloroformo-isoamílico, cloruro de sodio, acetato de potasio, acetato de amonio, método de bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB), etc., para diversas muestras de tejidos del animal como la sangre, la saliva, el pelo, las heces y los músculos. El método de fenol-cloroformo-isoamílico es el método más usado para obtener ADN genómico, pero este es un método lento y laborioso, por el cual necesitamos establecer un método de extracción de ADN genómico que sea una alternativa simple, fácil, rápida y no contaminante que permite obtener ADN genómico de buena calidad y en cantidades suficientes que pueda ser utilizado para posteriores estudios.

El método fenol- cloroformo- isoamílico se comparó con otros dos métodos (cloruro de sodio y el acetato de amonio) para evaluar la calidad y cantidad de extracción de ADN genómico, en ese sentido el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar que método de los tres mencionados nos permite obtener ADN genómico de alta calidad y cantidad para así contribuir en el desarrollo de la conservación de especies mediante las técnicas de biotecnología molecular que permiten realizar bancos genómicos de especies que se encuentran en peligro de extinción, para lo cual es necesario tener optimizado una técnica de extracción de ADN.

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

#### 2.1. ANTECEDENTES

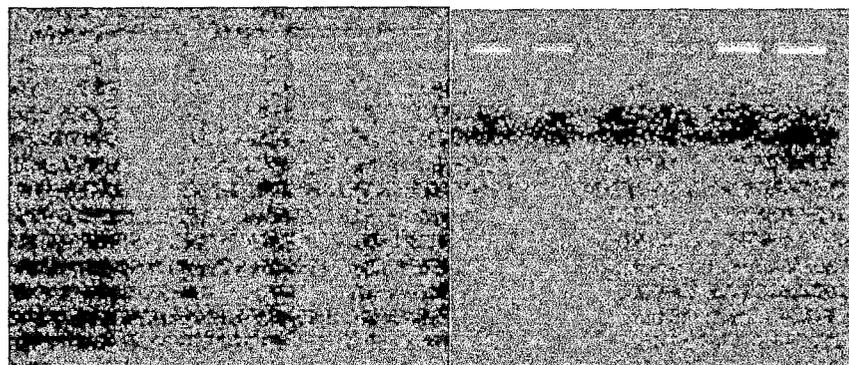
**Fraga *et al.* (2004)**, evaluó la aplicabilidad de 5 protocolos en la extracción del ADN genómico de Triatomíneos (mosquito causante de transmisión de la enfermedad de Chagas), y describió el método del acetato de potasio modificado, como un método con el que se obtiene un alto rendimiento y pureza del ADN en un tiempo de 4 horas con una pureza de 1.94 de absorbancia, con el método de calentamiento se trabajó por un tiempo de 30 minutos y se obtuvo una pureza de 0.79 de absorbancia, con el método fenol-cloroformo se trabajó en un tiempo de 19 horas con una pureza de 1.69 de absorbancia, con el método de acetato de potasio en un lapso de 4 horas se obtuvo ADN con una pureza de 1.93 de absorbancia y con el método bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) con un tiempo de 4 horas se obtuvo ADN con una pureza de 1.90 de absorbancia, la calidad del ADN constituye un elemento crucial para los estudios de biología molecular, por ello se necesita un método de extracción de ADN lo más estandarizado posible con el que se obtenga un ADN puro, no degradado, libre de ARN y

de inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa, porque cambios en la pureza afectan los perfiles de amplificación y esto se manifiesta en la presencia de bandas falsas y en la poca reproducibilidad del ensayo.

**Lopera *et al.* (2008)**, logro extraer ADN a partir de muestras de aletas y larva de peces, en donde comparó un protocolo modificado de extracción de ADN con sal común (NaCl) con un protocolo modificado de extracción con fenol-cloroformo. Las muestras aisladas de diferentes especies de peces usando la extracción con sal común permitieron obtener ADN de buena calidad con un grado de pureza de 1.9 de absorvancia y fue usado con éxito en la amplificación de los marcadores moleculares RAPD y microsatélite. Esto demostró la efectividad de la extracción de ADN con sal común en comparación con el protocolo modificado de extracción con fenol-cloroformo con el cual se obtuvo 1.5 de grado de pureza y es un método lento, laborioso, contaminante. La extracción de ADN usando el protocolo con sal común (NaCl) es una alternativa simple, fácil, rápida y no contaminante que permite obtener ADN de buena calidad y en cantidades suficientes.

En el mencionado estudio la integridad del ADN se verificó por electroforesis horizontal utilizando un gel de agarosa al 1%, 70 V por 60 min, en tampón 1x TBE (500 mM de Tris-HCl, 60 mM de ácido bórico y 83 mM de EDTA), la cual se muestra en la siguiente figura:

**Figura N° 01:** Electroforesis en gel de agarosa donde se observa las bandas de ADN por los dos métodos.



Método Fenol-cloroformo

Método sal común (NaCl)

De igual manera **De Jesus *et al.* (2005)**, ensayó dos métodos de extracción de ADN, uno de ellos a partir de tejido de oreja mediante la técnica hotshot y el otro utilizando muestras sanguíneas basado en una precipitación salina (cloruro de sodio), se determinó la calidad y la cantidad de ADN obtenido por ambos métodos, mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría de luz ultravioleta respectivamente; observándose que con el método de hotshot se obtuvo ADN con un índice de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  de 1.2 y con el método de precipitación salina (cloruro de sodio) se obtuvieron ADN con un índice de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  de 1.7, en cuanto a la concentración de ADN, expresada en  $\mu\text{g/ml}$  se obtuvo al multiplicar el valor de  $A_{260}$  nm  $\times$  50  $\times$  dilución de la muestra (33,33 veces), la cual se muestra en el siguiente cuadro:

**Cuadro N° 01:** Comparación del índice A260/A280 y la cantidad de ADN obtenida a partir de los métodos de extracción ensayados.

Métodos de extracción	A260/A280	Concentración de ADN (ug/ml)
Hotshot (tejido)	1.2	45.00
Precipitación Salina (sangre)	1.7	368.30

FUENTE: De Jesus *et al.* (2005)

**Maturrano *et al.* (2009)**, realizó la extracción de ADN con tres métodos diferentes: fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (PCI), un kit comercial (QIAamp DNA Stool Mini Kit, QIAGEN) y el mismo kit modificado (QIAamp DNA Stool Mini Kit, QIAGEN, buffer ASL). La cantidad y calidad de ADN se evidenció mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, observándose mediante el método de PCI y el método del kit comercial el ADN obtenido en la mayoría de las muestras presentaba gran cantidad de contaminantes que inhibían la PCR, la utilización del kit comercial modificado permitieron la extracción de ADN de buena calidad capaz de ser utilizado en pruebas moleculares.

## 2.2. BASES TEÓRICAS.

### 2.2.1. La Vicuña

La vicuña es la especie más pequeña de los cuatro camélidos sudamericanos, apenas alcanza un metro de altura, habita en las

llanuras de los altos andes, a una altura entre 3000 a 4000 m.s.n.m, es una especie en peligro de extinción, debido a la caza sistemática y a un elevado índice de mortalidad infantil e incluso prenatal, lo que impide que las poblaciones se regeneren, su fibra es muy suave de color beige o vicuña (marrón claro rojizo) en el lomo y blanco en la zona ventral y las patas con variaciones, dependiendo de las zonas geográficas donde habitan, es la más cotizada del mundo (Bustinza, 2001).

Por ello la vicuña es una de las alternativas para superar la pobreza de estas comunidades ya que el potencial de la vicuña está en la fibra muy fina de alto precio, en consecuencia es necesario cuidar este recurso. (Bustinza, 2001).

### **2.2.2. Sangre de Vicuña**

La sangre se compone de un líquido llamado plasma y de diversos elementos celulares los cuales son los glóbulos rojos, los glóbulos blancos y las plaquetas; como adaptación al menor contenido de oxígeno en el aire (hipoxia) por la altura, la sangre de la vicuña posee cerca de 14 millones de glóbulos rojos o hematocitos por  $\text{mm}^3$ , que permite tener un mayor contenido de hemoglobina para una mayor eficiencia de captación y transporte de oxígeno. (Bas y Bonacic- 2003).

La sangre es una fuente excelente de ADN, está presente en los glóbulos blancos (o leucocitos) por ser células nucleadas (Bas y Bonacic- 2003).

### 2.2.3. ADN

La biología molecular ha avanzado mucho en los cuarenta años siguientes al descubrimiento de la estructura del ADN ya que es la que contiene la información genética. El primer paso para realizar estudios es disponer de muestras de ADN con calidad y cantidad que permita su análisis molecular. (De Jesus *et al.* 2005).

El ácido desoxirribonucleico (ADN) constituye el material genético de los organismos vivos, la estructura del ADN es una pareja de largas cadenas de nucleótidos; cada nucleótido está formado por un grupo fosfato, una desoxirribosa y una base nitrogenada. Existen cuatro bases: dos purínicas (o púricas) denominadas adenina (A) y guanina (G) y dos pirimidínicas (o pirimídicas) denominadas citosina (C) y timina (T) (Lodish *et al.* 2004).

### 2.2.4. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN constituye la primera etapa de los estudios de biología molecular, la cual requiere una serie de etapas básicas, en primer lugar tienen que romperse la pared celular y la membrana plasmática para poder acceder al núcleo de la célula. A continuación debe romperse también la membrana nuclear para dejar libre el ADN. Por último hay que proteger el ADN de enzimas que puedan degradarlo y para aislarlo hay que hacer que precipite en alcohol, el procedimiento de lisis idóneo suele consistir en un equilibrio de

técnicas y ha de ser suficientemente fuerte para romper el material inicial, pero suficientemente suave para preservar el ácido nucleico (Somma M. 2001)

### **Etapas de la extracción de ADN**

1. Lisis de las células; las sales ayudan a romper la estructura de macromoléculas como las proteínas o los ácidos nucleicos consiguiendo su desnaturalización, la adición de un detergente como el SDS es necesaria para desnaturalizar las membrana plasmática y nuclear.
2. Degradación de la fracción proteica asociada al ADN; se consigue mediante la adición de una proteasa, la fracción proteica puede precipitarse mejor con la ayuda de sales como el acetato de amonio o el acetato sódico.
3. Purificación; consta de 3 fases:
  - Precipitación del ADN; el ADN es insoluble en alcohol, por lo que se puede precipitar con etanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y recuperar mediante una centrifugación. El alcohol del sobrenadante se llevará las sales añadidas previamente.
  - Lavado del pellet; Se realiza con etanol frío volviendo a centrifugarse.
  - Recuperación; el sedimento se puede suspender en agua o buffer Tris tras ser secado completamente (Lodish *et al.* 2004)

Los métodos de extracción permiten obtener ADN purificado a partir de diversas fuentes para después realizar análisis específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La pureza del ADN es un elemento importante en ese tipo de análisis. Si se desea obtener ADN muy purificados, que no contengan contaminantes inhibidores, es preciso aplicar métodos de extracción adecuados (Somma M. 2001). El uso del protocolo de extracción con fenol-cloroforno ha sido el método más usado para obtener ADN genómico. Estos protocolos tienen buenos resultados para muestras de diversos orígenes, sin embargo es un método lento, laborioso y contaminante. La extracción de ADN usando el protocolo con sal común (NaCl) es una alternativa simple, fácil, rápida y no contaminante que permite obtener ADN de buena calidad y cantidad (Lopera *et al.* 2008)

#### **2.2.5. Evaluación de ADN mediante espectrofotometría**

El ADN, puede cuantificarse en soluciones acuosas, midiendo la absorbancia ( $A$ ) de luz ultravioleta. Si la muestra es pura, es decir, no contiene cantidades significativas de contaminantes como proteínas, fenol, etc, la medición espectrofotométrica de la irradiación ultravioleta absorbida por las bases es sencilla y exacta, se emplea el cociente  $A_{260}/A_{280}$  para calcular la pureza del ADN, en cuanto a la concentración de ADN, expresada en  $\mu\text{g/ml}$  se obtiene al multiplicar el valor de  $A_{260}$  nm x 50 x Dilución de la muestra. El

número 50 es una constante relacionada con una solución de ADN de doble hebra cuya concentración es de 50 µg/ml (Somma M. 2001).

#### **2.2.6. Evaluación de ADN mediante electroforesis**

La electroforesis consiste en la separación de moléculas (proteínas, ácidos nucleicos) a través de una matriz tamponada (agarosa, acrilamida). La matriz funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico, de acuerdo al tamaño y la carga neta que poseen, en el que los fragmentos de ADN de menor tamaño migran más rápidamente hacia el ánodo que aquellos de mayor tamaño. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable por la fuerte carga negativa en condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis (Yabar. 2003). La resolución y velocidad de separación de fragmentos de ADN por electroforesis son reguladas a través de la concentración de agarosa (o acrilamida) en el gel y el voltaje aplicado durante la electroforesis. Al aumentar la concentración de agarosa se dificulta el movimiento de los fragmentos a lo largo del gel, el incremento del voltaje aumenta proporcionalmente la velocidad de migración de los fragmentos en el gel (Yabar. 2003). Mediante el transiluminador se observa las bandas de ADN en el gel, el cual debe observarse bandas intensamente brillosas íntegras y claras, eso nos va a indicar una banda de ADN libre de contaminantes como proteínas y fenol (Yabar. 2003).

## **CAPITULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de ejecución del estudio**

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Molecular de la Universidad Nacional de Huancavelica, ubicado en el distrito, provincia y departamento de Huancavelica, a una altitud aproximada de 3680 msnm a 74° 98' longitud oeste y 12° 78' latitud sur.

El clima es frío, siendo la temperatura media anual que varía entre 5 a 8 °C y una precipitación pluvial anual de 829.6 mm.

#### **3.2. Materiales y equipos**

##### **3.2.1. Material biológico**

- Sangre de vicuña tomada en tubos vacutainer de 5 ml, estas muestras fueron recolectadas en el Chaccu realizado por la Universidad Nacional de Huancavelica el año 2009.

##### **3.2.2. Material de laboratorio**

- Micropipeta 0.5 - 10 µl

- Micropipeta 20 - 100  $\mu$ l
- Micropipeta 100 - 1000  $\mu$ l
- Tubos Eppendorf de 2 ml
- Tubos Eppendorf de 1 ml
- Tubos vacutainer de 5 ml
- Puntillas para micropipeta
- Guantes quirúrgico
- Tubos falcón graduado 50 ml
- Gradillas
- Papel toalla
- Lámina extensible de parafina

### **3.2.3 Reactivos y buffers**

- Proteinasa K
- Fenol – cloroformo – isoamílico (25-24-1)
- Cloroformo- isoamílico (24-1)
- Cloruro de sodio (NaCl)

- Etanol absoluto
- Etanol al 70%
- RNAsa
- Buffer de lisis
- Buffer de carga (blue-orange)
- Agua ultrapura miliQ
- Agua bidestilada
- Acetato de amonio
- Dodecil sulfato de sodio (SDS)
- Buffer Tris-HCL
- Tritón al 1%
- Agarosa
- Bromuro de etidio
- Etilen diamino tetra acético (EDTA)
- Buffer Tris, Borato, EDTA (TBE)
- Buffer T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (Tris, EDTA)

### **3.2.4 Material de campo**

- Guardapolvo
- Cámara fotográfica
- Jeringas
- Algodón
- Alcohol
- Plumón indeleble

### **3.2.5 Materiales y equipos de escritorio**

- Computadora
- Impresora
- Folder manila
- Memoria flash – USB
- Papel bond A4 de 80 gr
- Lapiceros
- Cuadernos de apuntes
- Libros

### 3.2.6 Equipo de laboratorio

- Microcentrífuga (14000 r.p.m.)
- Probeta graduada
- Vórtex
- Micropipetas P1000, P100, P20 y P10
- Balanza de precisión
- Espectrofotómetro de luz ultravioleta (UV)
- Transiluminador de luz ultravioleta (UV)
- Cubetas de cuarzo
- Cámara de flujo laminar
- Congeladora a  $-80^{\circ}\text{C}$
- Congeladora a  $-20^{\circ}\text{C}$
- Congeladora a  $4^{\circ}\text{C}$
- Fuente de poder
- Cámara de electroforesis

### 3.3. METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTO

#### a) **Recolección de las muestras:**

Para la toma de muestras de sangre de las 36 vicuñas entre machos y hembras se procedió a escoger aleatoriamente, las muestras de sangre fueron tomadas por punción en la vena yugular, usando tubos vacutainer de 5ml conteniendo EDTA debidamente rotulados (número de arete, fecha).

#### b) **Métodos de extracción de ADN genómico**

Se trabajó con 36 muestras de sangre las cuales se sometieron a distintos procesos para llegar a extraer ADN genómico, se utilizó 3 métodos de extracción los cuales fueron:

##### **b.1) Método de Fenol-cloroformo-isoamílico (Maturrano *et al.*)**

- Se tomó 500 ul de sangre en un eppendorf de 2 ml, seguidamente se añadió 1 ml de buffer de lisis TKM1+tritón al 1%, se agitó en vortex y luego se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos.
- Se eliminó el sobrenadante.
- Luego se añadió al precipitado 1 ml de buffer de lisis TKM1+tritón al 1%, luego se agitó en vortex hasta disgregar el precipitado, seguidamente se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos.

- Se eliminó el sobrenadante, para luego repetir el paso anterior.
- Se suspendió en 1 ml de buffer de lisis, se agitó en vortex, se añadió 30  $\mu$ l de proteinasa K y 2.5 $\mu$ l de RNAsa, luego se agitó.
- Se incubó toda la noche a 37°C con 800 rpm.
- Tras la incubación se añadió 600  $\mu$ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1, se agitó invirtiendo el tubo y se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Luego se traspasó la fase superior acuosa a un eppendorf y se añadió 600  $\mu$ l de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se desechó la fase inferior.
- Se agitó por inversión y se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, se vuelve a repetir el paso anterior.
- Se añadió al sobrenadante 1.5 ml de etanol a -20°C, y se invirtió el tubo hasta que aparezca la “medusa” de ADN.
- Se dejó a -80°C durante 20 minutos para que precipite el ADN.
- Se centrifugó a 10000 rpm durante 7 minutos a 4°C.
- Se eliminó el sobrenadante, y se añadió 2 ml de etanol al 70% a -20°C, y se pasó a un eppendorf de 2 mL.
- Se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
- Se eliminó el sobrenadante, luego se secó el precipitado a 37°C durante 15-30 minutos.

- Se añadió 500  $\mu$ l de buffer T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>.
- Se disolvió el precipitado a 37 °C durante 30 minutos.
- Luego se midió la absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  para determinar la pureza del ADN extraído.

#### **b.2) Método de cloruro de sodio (Lopera *et al.*)**

- Se tomó 500  $\mu$ l de sangre en un eppendorf de 2ml luego se añadió 1 ml de NaCl 0.9%, se agitó en vortex y seguidamente se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos.
- Se eliminó el sobrenadante, quedando solo el pellet.
- Luego se añadió al precipitado 1 ml de buffer lisante 1 (5ml de Tris 2M pH 7.5, 2.5 ml de MgCl<sub>2</sub> 1M, y agua hasta 500 ml), se agitó en vortex hasta disgregar el precipitado y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos, luego se eliminó el sobrenadante.
- Se volvió a repetir el paso anterior una vez más.
- Se colocó en la nevera por ½ hora agitando de vez en cuando.
- Se resuspendió en 1ml de buffer lisante 2 (2 ml de NaCl 5M, 10 ml de EDTA 0.25M pH 8 y 5 ml de SDS 1%), luego se agitó en vortex, y se añadió 30  $\mu$ l de proteinasa K, se agitó y se añadió 2.5 $\mu$ L de RNAsa.
- Luego se incubó toda la noche a 56°C con 800 rpm.

- Se añadió 600  $\mu$ l de cloroformo-álcohol isoamílico 24:1 y se eliminó la fase inferior.
- Se añadió al sobrenadante 1.5 ml de etanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$ , luego se invirtió el tubo hasta que aparezca la “medusa” de ADN.
- Se dejó a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos para que precipite el ADN.
- Se centrifugó a 10000 rpm durante 7 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Se eliminó el sobrenadante, y se añadió 2 ml de etanol al 70% a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y se traspasó a un eppendorf de 2 ml.
- Se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Se eliminó el sobrenadante, luego se secó el precipitado a  $37^{\circ}\text{C}$  o a temperatura ambiente durante 15-30 minutos.
- Se añadió 500  $\mu$ l de buffer  $T_{10}E_1$ .
- Se disolvió el precipitado a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos hasta que esté completamente disuelto.
- Se midió la absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  para determinar la pureza del ADN extraído.

### **b.3) Método acetato de amonio (Arroyo *et al*).**

- Se tomó una muestra de 500  $\mu$ l de sangre de vicuña, luego se añadió buffer de lisis, se centrifugó a 14000 r.p.m. por 10 minutos y el sobrenadante se descartó; el pellet fue suspendido con 1 ml de buffer de lisis y se centrifugó a 14000 rpm por 10

minutos luego se descartó el sobrenadante dejando sólo lo suficiente para cubrir el pellet. Posteriormente se suspendió en 300 µl de TE (Tris EDTA) 20:5; se agregaron 20 µl de dodecil sulfato de sodio 10% (SDS), se agitó suavemente, se colocaron 20 µl de proteinasa K y 2.5 µl de RNAsa.

- Se incubó toda la noche a 41°C con agitación de 800 rpm, una vez transcurrido el tiempo, se retiraron las muestras de la incubadora, se enfriaron a temperatura ambiente y se le agregaron 500 µl de acetato de amonio 8M luego se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos.
- Luego se adicionó 750 µl de etanol absoluto se agitó por inversión hasta lograr precipitar el ADN, luego se centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado dos veces con etanol al 70%, luego de retirar el alcohol, el ADN se disolvió en 30 µl de buffer T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>.

**c) Evaluación de ADN por espectrofotometría**

Una vez extraído el ADN genómico se verificó la cantidad del ADN, mediante espectrofotometría para lo cual se realizaron las medidas de Absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro UV, se calculó la relación  $A_{260}/A_{280}$  que nos indica el grado de pureza de ADN que debe tener un valor que oscile entre 1.8 a 2.0 (Arana *et al.* 2009); de esta forma se garantiza una desproteinización aceptable de la muestra.

Se tomó unas cubetas de cuarzo en la cual se añadió 250  $\mu$ l de agua bidestilada y se hace el blanco, para medir las muestras se procedió a diluir 25  $\mu$ l de ADN, el espectrofotómetro indica las medidas de Absorbancia a 260 nm y 280 nm, luego se calculó la relación  $A_{260}/A_{280}$  de todas las muestras de ADN genómico extraído para determinar la pureza de ADN, en cuanto a la concentración de ADN expresada en  $\mu$ g/ml se obtuvo al multiplicar el valor de  $A_{260}$  nm X 50 X Dilución de la muestra que es 25.

**d) Evaluación de ADN por electroforesis**

- La calidad del ADN fue verificada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 1 hora con 30 min a 75 voltios; seguidamente el gel se llevó al transluminador UV para observar las bandas de ADN.
- Se pesó 1gr de agarosa para preparar gel, luego se añadió 90 ml de buffer TBE, se calentó hasta ebullición en el agitador magnético, removiendo el erlenmeyer durante el calentamiento para disolver bien la agarosa después se añadió 2.5  $\mu$ l de bromuro de etidio y se mezcló bien, luego se echó sobre el molde y se colocó el peine. Una vez solidificado, se sumergió el gel en buffer TBE contenida en la cámara de electroforesis, luego se quitó el peine para proceder al cargado de las muestras.

- Para cargar las muestras se pipetearon gotas de 2 ul de muestra de ADN y 8 ul de buffer de carga sobre un trozo de lámina de parafina, se mezcló bien y luego se pipetearon dentro de los espacios libres que dejó el peine (pocillo).
- Se encendió la fuente de poder a 75 voltios durante 1 hora con 30 min, pasado el tiempo se evidenció las bandas de ADN en el transiluminador de luz UV para determinar la integridad de las bandas de ADN con ello verificar la calidad de ADN.

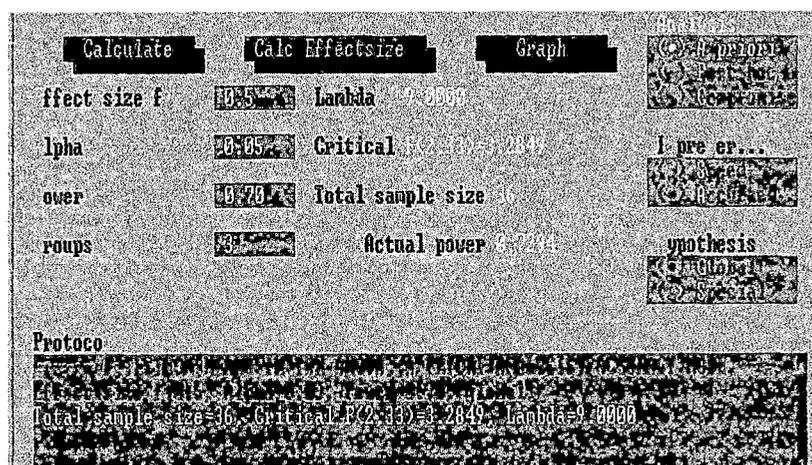
### **3.4. Población de estudio, diseños estadísticos.**

#### **A. Población**

La población objeto de estudio lo constituyeron 205 vicuñas criadas en semicautiverio, de los cuales se trabajó con muestras de sangre de 36 vicuñas del Centro de Investigación y desarrollo de Camélidos Sudamericanos Lachocc - Huancavelica, se utilizó el software G-POWER, para determinar el grado de confiabilidad de las muestras en relación a la población total.

Para el cálculo del tamaño muestral se usó G-Power para lo cual se consideró 0.5 para el tamaño del efecto (grado de desviación de la  $h_0$ ), un nivel de significancia de 0.05 y una potencia de 0.70 tal como se observa en la siguiente figura.

**Figura N° 02:** Cálculo del tamaño muestral de la población total a un grado de confiabilidad al 95%



## B. Análisis estadístico

Para la evaluación de los métodos de extracción del ADN genómico de sangre de vicuña, se aplicó un DCA no balanceado cuyo modelo matemático es:

$$Y_{ij} = u + T_i + E_{ij}$$

**Donde:**

$Y_{ij}$  = Calidad del ADN genómico del  $i$ -ésimo método de extracción.

$u$  = Media general del método de extracción de ADN genómico.

$T_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo método de extracción del ADN genómico.

$E_{ij}$  = Error residual.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS

#### 4.1. CANTIDAD DE ADN

**Cuadro N° 02:** Comparación del índice  $A_{260}/A_{280}$  y la cantidad de ADN obtenida a partir de tres métodos de extracción evaluados.

Método de Extracción	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{260}/A_{280}$	Concentración de ADN (ug/ml)
Método de Fenol- cloroformo-isoamilico	0.049	0.029	1.67	60.98
Método de Cloruro de sodio	0.111	0.061	1.81	138.30
Método de Acetato de amonio	0.044	0.038	1.17	54.73

FUENTE: Elaboración propia-2010

Según los resultados mostrados en el cuadro N° 02 se puede observar el grado de pureza y concentración de ADN; con el método de fenol cloroformo isoamilico se obtuvo 1.67 de pureza con una concentración de 60.98 ug/ml, con el método cloruro de sodio se obtuvo 1.81 de pureza y una concentración de 138.30 ug/ml de ADN y por ultimo con el método de acetato de amonio se obtuvo 1.17 de pureza y una concentración de 54.73ug/ml de ADN.

#### Cuadro N° 03: Prueba de Normalidad

Prueba	Estadística		Valor p	
Shapiro-Wilk	W	0.9816	P	0.725

Para ver la distribución normal de los datos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk lo cual nos indica que los datos del presente estudio cumplen con el supuesto de normalidad.

**Cuadro N° 04: Prueba de Levene**

Grados de Libertad	F Calculada	Pr(>F)
2	1.9189	0.1604
39		

Al evaluar la homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene, se demuestra que se cumple con este supuesto de homogeneidad de varianzas ya que el valor P es 0.1604 mayor que 0.05.

**Cuadro N° 05: Medias de la Calidad de ADN de tres métodos de Extracción de ADN.**

	Método Fenol- Cloroformo- Isoamílico	Método Cloruro de Sodio	Método Acetato de Amonio
Media	1.67a	1.81b	1.17c
Desviación estándar	0.12	0.12	0.07

\*a, b y c, medias con letras muestran que hay diferencias estadísticas significativas

(Prueba Tukey  $p < 0,05$ )

Según el cuadro N° 05, nos indica que existen evidencias estadísticas significativas, lo cual demuestra que los tres métodos de extracción de ADN genómico producen diferentes calidades de ADN a partir de muestras de sangre de vicuña.

**Cuadro N° 06:** Medias de la Concentración de ADN de tres métodos de Extracción de ADN.

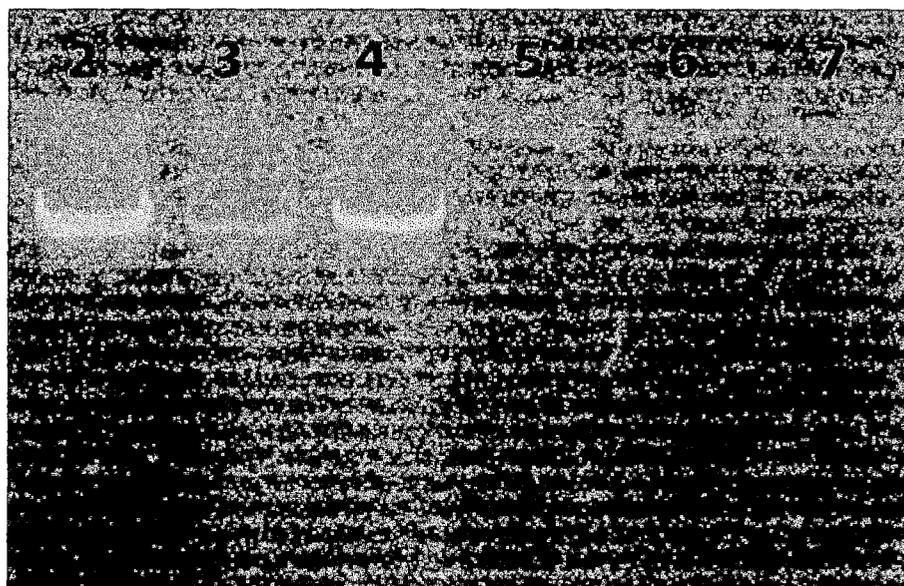
	<b>Método Fenol- Cloroformo- Isoamílico</b>	<b>Método Cloruro de Sodio</b>	<b>Método Acetato de Amonio</b>
Media	60.98a	138.30b	54.73c
Desviación estándar	0.35	0.12	0.08

\*a, b y c, medias con letras muestran que hay diferencias estadísticas significativas (Prueba Tukey  $p < 0,05$ )

Según el cuadro N° 06, nos indica que existen evidencias estadísticas significativas. Lo cual demuestra que los tres métodos de extracción de ADN genómico producen diferentes concentraciones de ADN a partir de muestras de sangre de vicuña.

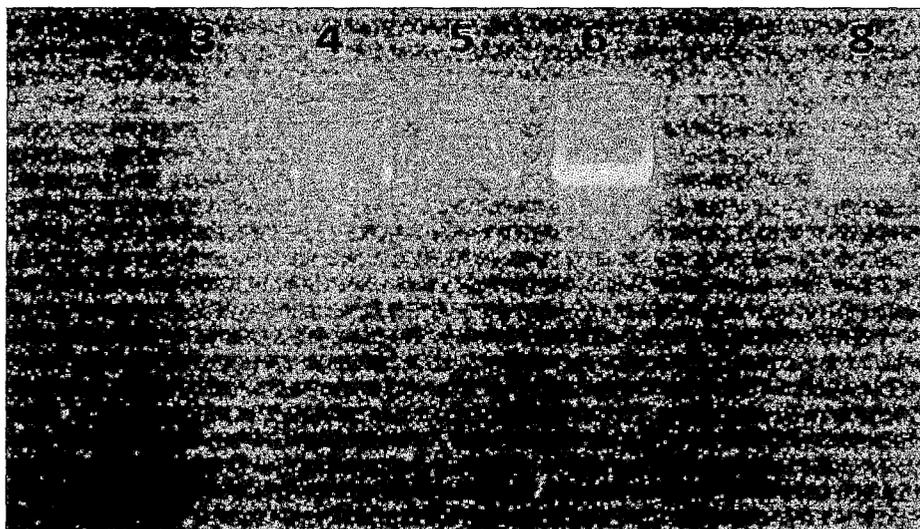
#### 4.2. CALIDAD DE ADN

**Figura N° 03:** Electroforesis del ADN extraído de una muestra de sangre con los 3 métodos.



Se observa en la figura N° 03 las bandas de ADN las cuales corresponden: carriles 2 y 4 extracción método NaCl, carril 3 extracción método Fenol cloroformo, carriles 5, 6 y 7 método acetato de amonio, se puede observar que se obtienen mejores resultados con el método NaCl ya que se observa mejor calidad de ADN.

**Figura N° 04:** Electroforesis del ADN extraído de una muestra de sangre con los 3 métodos.



Según la figura se observa; el carril 6 extracción método NaCl, carriles 4, 5 y 8 extracción método Fenol-Cloroformo-Isoamílico, carriles 2,3 y 7 método acetato de amonio.

**Figura N° 05:** Electroforesis del ADN extraído de una misma muestra de sangre con los 3 métodos.



El carril 3 y 4 son con método fenol-Cloroformo-Isoamílico, carriles 2 y 7 método acetato de amonio carril 5 y 6 extracción método NaCl.

## CAPITULO V

### DISCUSIÓN

- Fraga *et al.* (2004), con el método de acetato de potasio modificado obtuvo un alto rendimiento y pureza (1.94) de ADN en un tiempo de 4 horas, con el método de fenol-cloroformo obtuvo ADN con una pureza de 1.69 en un tiempo de 19 horas, por otro lado el ADN extraído con el método de fenol-cloroformo presentaban inhibidores de PCR (fenol, proteínas, etanol), por todo ello se puede decir que este método de extracción es un método lento, contaminante y laborioso. En el presente estudio (Cuadro N°02) utilizando el método de fenol-cloroformo-isoamilico se obtuvo ADN con una pureza de 1.67 que nos confirma que es un método que presenta contaminantes que inhiben la PCR.
- Lopera *et al.* (2008), comparó un protocolo modificado de extracción de ADN con sal común (NaCl) con un protocolo modificado de extracción con fenol-cloroformo. Las muestras aisladas de diferentes especies de peces usando la extracción con sal común permitieron obtener ADN de buena calidad (1.9), estos resultados se asemeja a los resultados obtenidos en el presente trabajo

utilizando el método cloruro de sodio donde se obtuvo ADN con una pureza de 1.81.

- En los resultados que se muestran en el cuadro N° 02, se observa una calidad de ADN de 1.81 con una concentración de 138.30 ug/ml esto con el método de cloruro de sodio la cual se asemeja con los resultados obtenidos por (De Jesus *et al.* 2005) con el método de precipitación salina (cloruro de sodio), que obtuvo ADN con un grado de pureza de 1.7, con una concentración de 368.30 ug/ml tal como se observa en el cuadro N° 01, que es mayor en comparación al método de hotshot que obtuvo 1.2 de grado de pureza y 45.00 ug/ml de concentración de ADN.
- En cuanto a la calidad de ADN, las bandas observadas en la figura N° 03 en los carriles 2 y 4 muestran una intensa luminosidad que demuestra la calidad de ADN con el método cloruro de sodio el cual confirma los resultados observados por Lopera *et al.* (2008) según la figura N° 01 que se muestra mejor calidad de ADN con el método de cloruro de sodio.
- Según Maturrano *et al.* (2009), la utilización del kit comercial modificado (QIAamp DNA Stool Mini Kit, QIAGEN, buffer ASL) permitieron la extracción de ADN de buena calidad capaz de ser utilizado en pruebas moleculares, con el método fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (PCI) y con el kit comercial (QIAamp DNA Stool

Mini Kit, QIAGEN) obtuvo ADN de baja calidad con gran cantidad de contaminantes que inhiben la PCR, lo cual se comprueba con los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación ya que se obtuvo una baja calidad de ADN con una pureza de 1.67 con el método fenol-cloroformo-isoamilico.

## CAPITULO VI

### CONCLUSIÓN

- Este estudio demostró la efectividad del método de extracción con cloruro de sodio (NaCl), el cual es un método simple, reproducible, económico y no contaminante, la calidad de ADN se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en donde se observó ADN libre de contaminación con ARN y otras sustancias, correspondiéndose la intensidad de la banda de ADN con la pureza de las muestras medidas en espectrofotómetro que es de 1.81 con una concentración de 138.30 ug/ml. Este método de extracción puede substituir otros métodos que utilizan elementos químicos contaminantes y peligrosos, como es el caso de protocolos con fenol-cloroformo.
- El método Fenol - Cloroformo permite obtener ADN genómico contaminado, si bien los resultados obtenidos en el presente estudio se encuentra en el rango permitido de pureza, el problema es que presenta inhibidores (como fenol, etanol) de PCR que no permiten realizar análisis moleculares posteriores.
- Con el método acetato de amonio se logró extraer ADN genómico de baja calidad (1.17 de absorbancia) y cantidad (54.73 ug/ml).

## **CAPITULO VII**

### **RECOMENDACIONES**

- Se recomienda extraer ADN genómico a partir de muestras de sangre con el método de cloruro de sodio ya que es un método económico y se obtiene ADN libre de contaminantes la cual son óptimas para posteriores usos en biología molecular.
- Evaluar la extracción de ADN a partir de diferentes muestras biológicas con el método cloruro de sodio.

## CAPITULO VIII

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arana A, Soret B, Quispe E, Paucar R. 2009. Manual de biología molecular, Huancavelica-Perú.
- Arroyo E, Chamorro L, Martínez J, Caraballo L, 2005. Extracción de ADN en sangre y en mosquito y electroforesis, Universidad de Sucre, Facultad de Educación y Ciencias, Departamento de Biología, Programa de Biología, Laboratorio de parasitología molecular.
- Bas F, Bonacic C. 2003. Adaptative strategies of South American camelids. Proceedings of the VI International Symposium on the Nutrition of Herbivores Merida, Yucatan, Mexico.
- Bustinza A. 2001. La Alpaca, conocimiento del gran potencial andino Edit. Universidad Nacional del Altiplano, Puno-Perú.
- Brack A. 2008. Los camélidos sudamericanos. <http://www.infoandina.org/> . Accesado el 8 de Abril de 2009.
- DRAH. 2009. Compendio Regional Agrario, Gobierno Regional de Huancavelica. Perú. 384 pág.
- De Jesus R, Moreno N, Martínez, J.A, 2005. Ensayo de dos métodos de extracción de ADN de ratón para ser usado en el control genético de ratones Consanguíneos mediante la reacción en cadena de la polimerasa

(PCR), revista Científica, vol. XV- N° 002 , Universidad del Zulia Maracaibo, Venezuela, 134-140 pag.

- Fraga J, Rodríguez J, Fuentes O, Castex M. y Fernández A.,(2004). Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).
- FAO. 2007. The State of the world's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Edited by Barbara Rischkowsky & Dafydd Pilling. Rome. Page 511.
- Hoces D. 2008. Conservation and current use of the vicuña (*Vicugna vicugna mensalis*) in Perú.  
[http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion\\_internacional/tallerNDF/Linksdocumentos/WG-CS/WG5-Mammals/WG5-CS8%20Vicugna/WG5-CS8-S.pdf](http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion_internacional/tallerNDF/Linksdocumentos/WG-CS/WG5-Mammals/WG5-CS8%20Vicugna/WG5-CS8-S.pdf). Accesado el 14 de Abril de 2010.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M, Zipursky S, Darnell J, 2004. Biología celular y molecular, edit. Panamericana, Buenos Aires-Argentina, 973 pág.
- Lopera N, Jayme A, Povh R, Ribeiro P, Patricia C, Gomes, Carolina B. Jacometo y Lopes T, 2008. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. Ciencia e Investigación Agraria, Brazil, vol.35- N°1, pág. 77-86.

- Maturrano L, Aguilar J.M, Krüger P, Chávez J, Wheeler J.C, 2009. Evaluación de tres Técnicas de Extracción de ADN a partir de Muestras de Heces de Vicuña Peruana (*Vicugna vicugna mensalis*), Instituto de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos - Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor San Marcos, Lima-Perú.
- Quispe E., Rodríguez T., Iñiguez L. y Mueller J. 2009b. Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. *Animal Genetic Resources Information*, 45: 1–14.
- Quispe E., Ramos H., Mayhua P. y Alfonso L. 2010. Fibre characteristics of vicuña (*Vicugna vicugna mensalis*). *Small Rumin. Res.*93(1): 64-66.
- Somma M. (2001). Extraction y Purification de ADN, European Commission, Institute for Health and Consumer Protection.
- PROCASUD, 2009. Programa de Mejora de Camélidos Sudamericanos, Universidad Nacional de Huancavelica.
- Vila B. 2006. Investigación, conservación y manejo de vicuñas, Proyecto financiado por el Programa INCO-DEV Unión Europea-Buenos Aires – Argentina. 206 pág.
- Wheeler J. 1995. Evolution and present situation of the South American Camelidae. *Biological journal of the Linnean Society* 54: 271-295
- Yabar C. 2003. Manual de Procedimientos de Electroforesis para Proteínas y ADN, Instituto Nacional de Salud, Lima-Perú.

# ANEXO

**Cuadro N° 07: Dodecil sulfato de sodio (SDS)**

Cantidad final / Reactivos	25 mL	50 mL	100 mL
Lauryl Sulfato	2.5 gr.	5 gr.	10 gr.
H <sub>2</sub> O dd	25 mL	50 mL	100 mL

**Cuadro N° 08: Buffer de lisis**

Cantidad final / Reactivos	500 mL	250 mL	100 mL
NaCl 5M	40 ml	20 ml	8 ml
Tris-HCl 1M	50 ml	25 ml	10 ml
EDTA 0.5M	5 ml	2.5 ml	1 ml
SDS 10%	10 ml	5 ml	2 ml
dd H <sub>2</sub> O	395 mL	197.5 mL	79 mL

**Cuadro N° 09: Buffer de lisis TKM1+triton**

Cantidad final / Reactivos	250 mL	500 mL	1000mL
Tris HCl	2.5 mL	5 mL	10 mL
KCl 1M	2.5 mL	5 mL	10 mL
MgCl <sub>2</sub>	1.25 mL	2.5 mL	5 mL
EDTA 0.5M	1 mL	2 mL	4 mL
dd H <sub>2</sub> O	X mL	X mL	X mL
Tritón x-100	5 mL	10 mL	20 mL

**Cuadro N° 10: Buffer T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (Tris, EDTA)**

Cantidad final / Reactivos	200 mL	100 mL	50 mL
Tris HCl 1M (pH=8)	2 ml	1 ml	0.5 ml
EDTA 0.5M (pH=8)	0.4 ml	0.2 ml	0.1 ml
dd H <sub>2</sub> O	X ml	X mL	X mL

**Cuadro N° 11: ABSORBANCIA DE ADN CON EL MÉTODO FENOL-CLOROFORMO**

N° de muestra	A260/A280
1	1.64
2	1.45
3	1.75
4	1.75
5	1.83
6	1.64
7	1.59
8	1.76
9	1.69
10	1.40
11	1.45
12	1.76
13	1.68
14	1.45

**Cuadro N° 12: ABSORBANCIA DE ADN CON EL METODO CLORURO DE SODIO**

N° de muestra	A260/A280
1	1.71
2	1.77
3	1.77
19	1.68
20	1.66
26	1.94
14	1.88
21	1.72
17	2.06
22	1.68
16	1.71
19	2.00
10	1.77
28	1.87

**Cuadro N° 13: ABSORBANCIA DE ADN CON EL METODO DE ACETATO DE AMONIO**

N° de Muestra	A260/A280
1	1.20
2	1.29
33	1.10
4	1.16
5	1.09
25	1.12
35	1.22
8	1.29
9	1.15
16	1.11
18	1.31
21	1.21
22	1.13
23	1.13

**Cuadro N° 14: RESULTADOS EN PROGRAMA R**

- **Homogeneidad de varianzas**

```
> levene.test(concentracion-metodos_extrac)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
      Df F value Pr(>F)
group  2  1.9189 0.1604
      39
```

- **Normalidad**

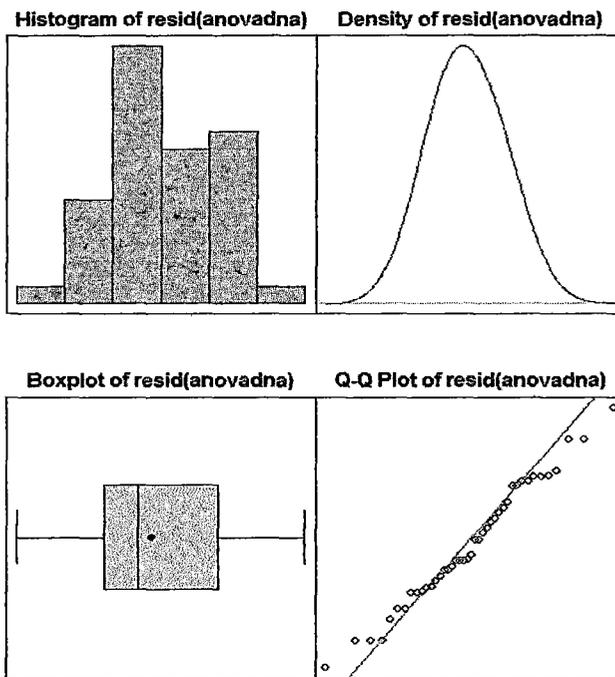
```
> shapiro.test(res.std)

      Shapiro-Wilk normality test

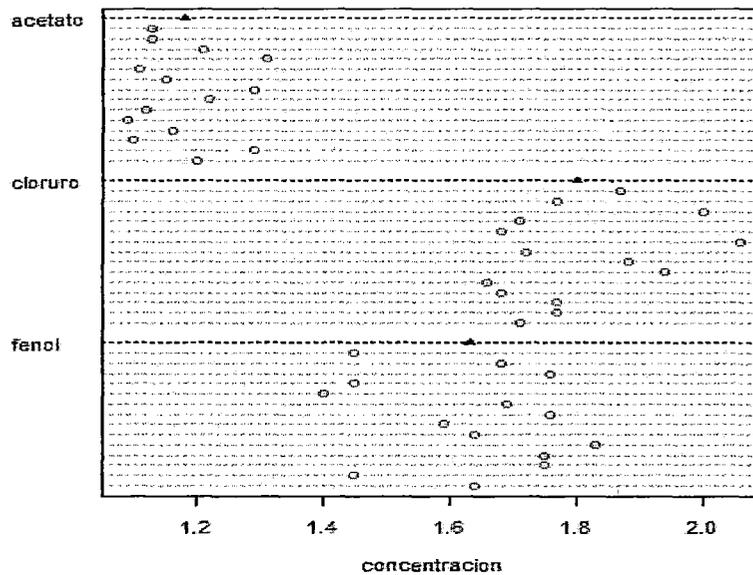
data:  res.std
W = 0.9816, p-value = 0.725
```

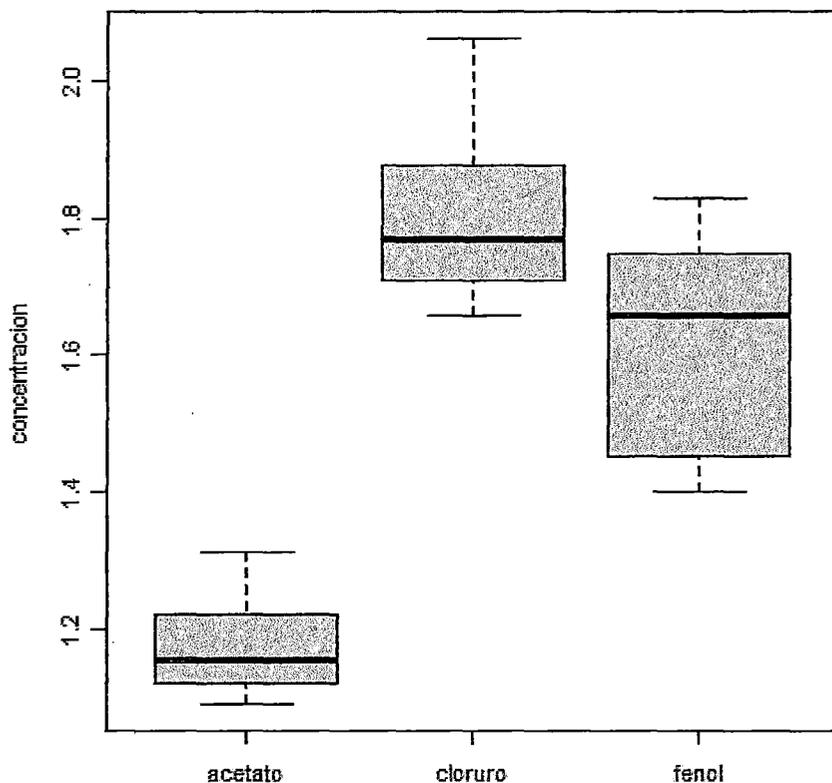
### Gráfico de Normalidad:

#### EXPLORATORY DATA ANALYSIS



### Gráficos de Exploración





- **Análisis de Varianza**

```
> summary(anovadna)
              Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
metodos_extrac  2  2.89518   1.4476  103.39 2.57e-16 ***
Residuals      39  0.54604   0.0140
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

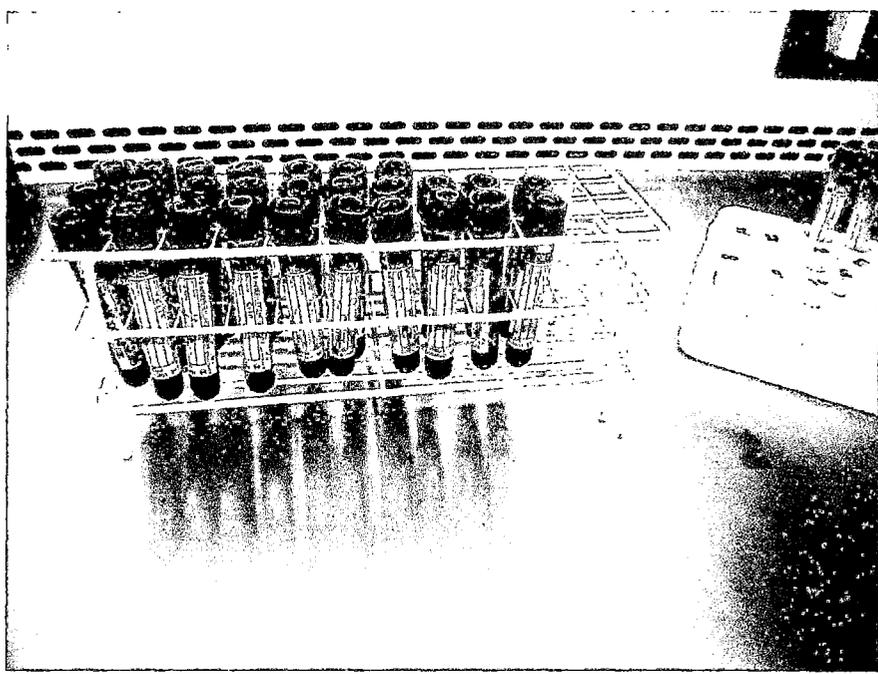
- **Prueba de Tukey**

```
> tukeydna
Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

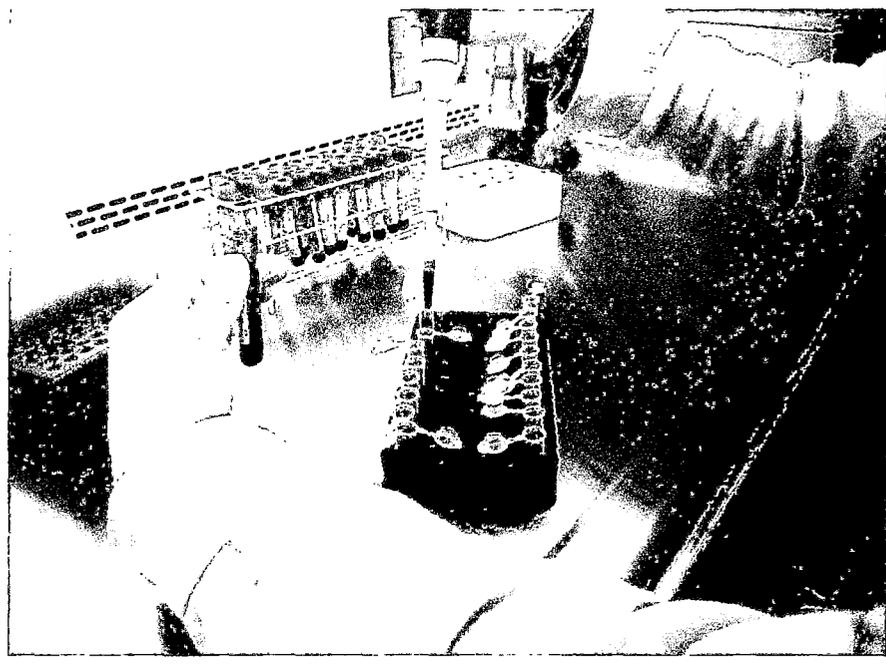
Fit: aov(formula = concentracion ~ metodos_extrac, data = dna)

$metodos_extrac
              diff            lwr            upr            p adj
cloruro-acetato  0.6221429  0.5131843  0.73110142  0.0000000
fenol-acetato    0.4521429  0.3431843  0.56110142  0.0000000
fenol-cloruro   -0.1700000 -0.2789586 -0.06104144  0.0014041
```

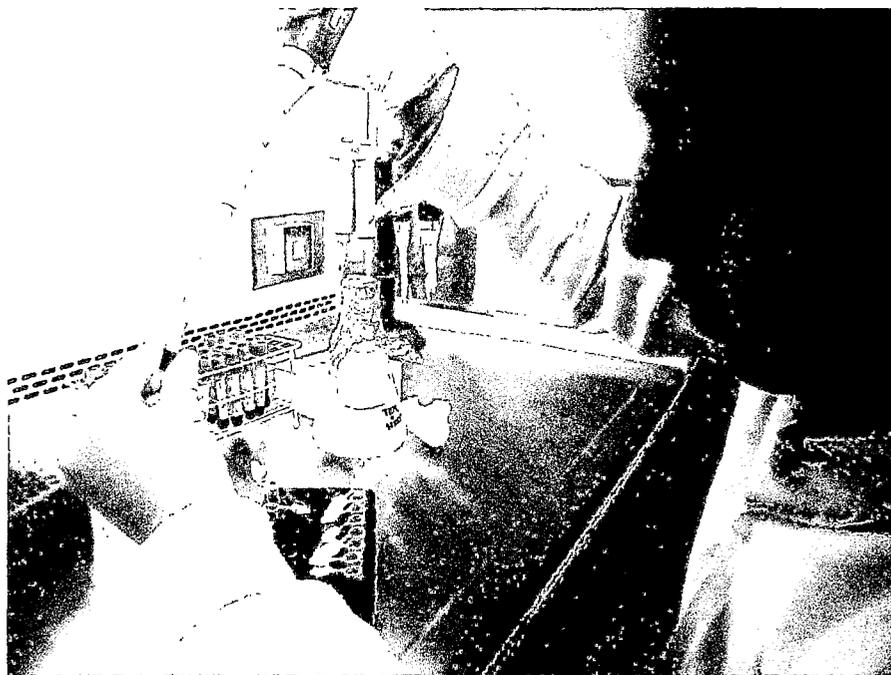
- **FOTO N° 1: MUESTRAS DE SANGRE DE VICUÑAS ROTULADAS.**



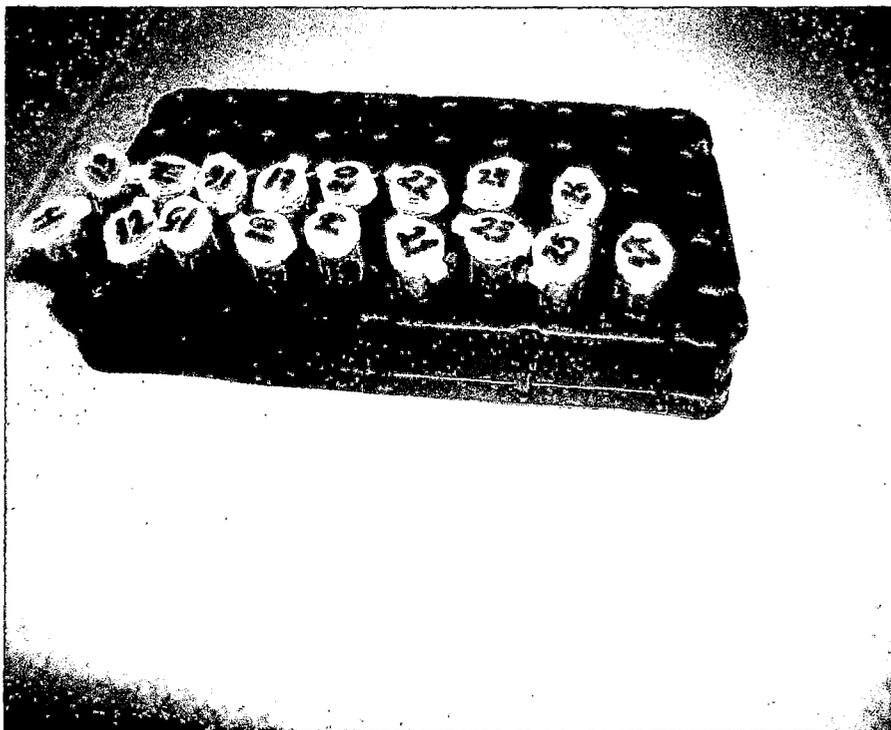
- **FOTO N° 2: TRASLADO DE LA SANGRE DE VICUÑA A UN TUBO EPPENDORF.**



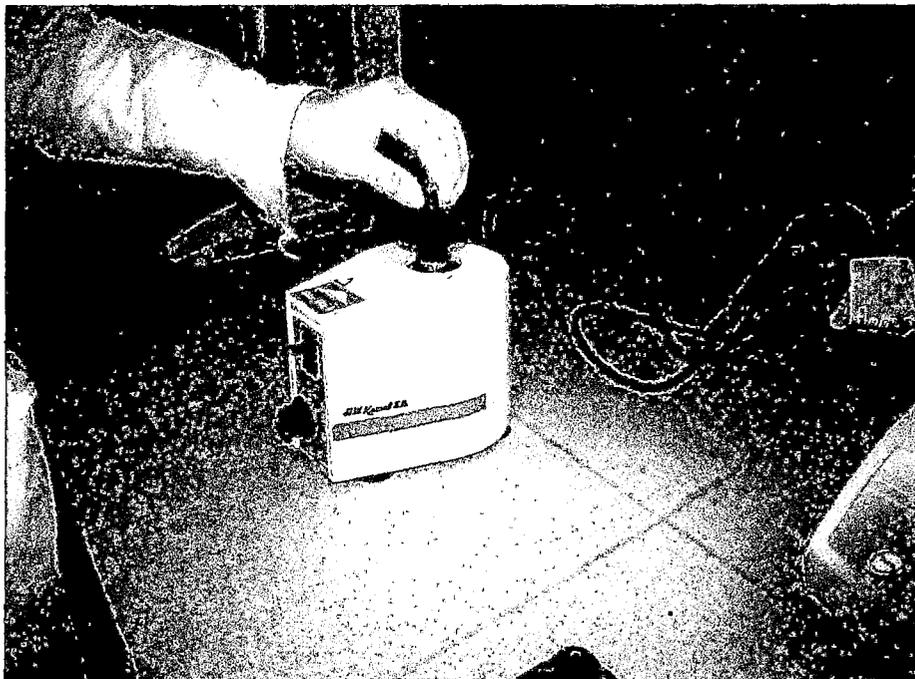
- **FOTO N° 3: AGREGANDO LA SOLUCIÓN TKM1 AL TUBO EPPENDORF CON LA MUESTRA DE SANGRE.**



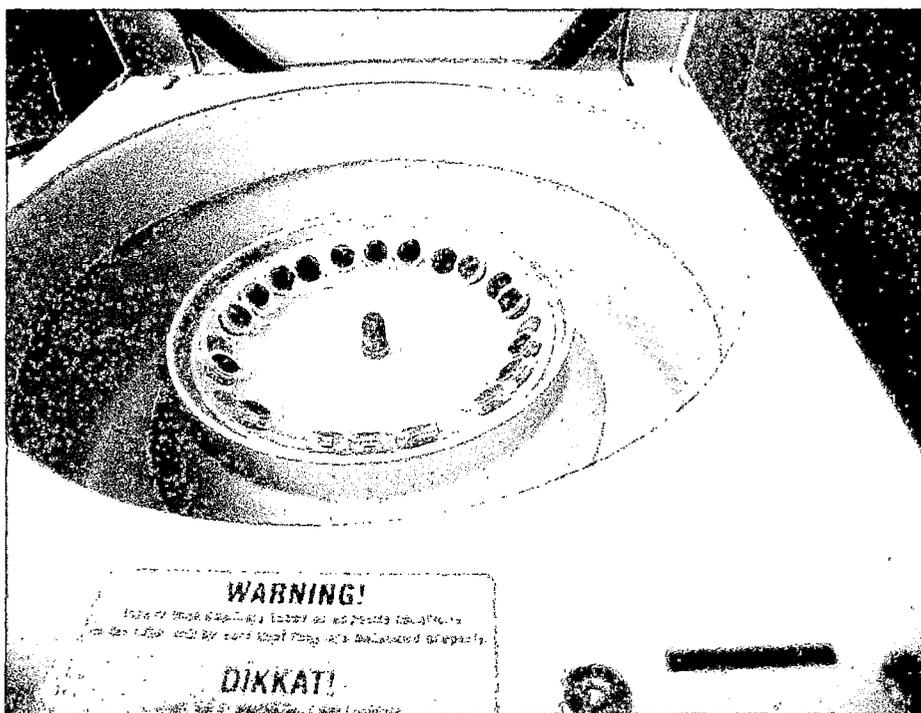
- **FOTO N° 4: TUBOS EPPENDORF CON MUESTRAS DE SANGRE Y CON LA SOLUCION TKM1 ROTULADAS**



- **FOTO N° 5: AGITANDO TUBO EPPENDORF PARA MEZCLAR LA MUESTRA DE SANGRE Y LA SOLUCIÓN TKM1.**



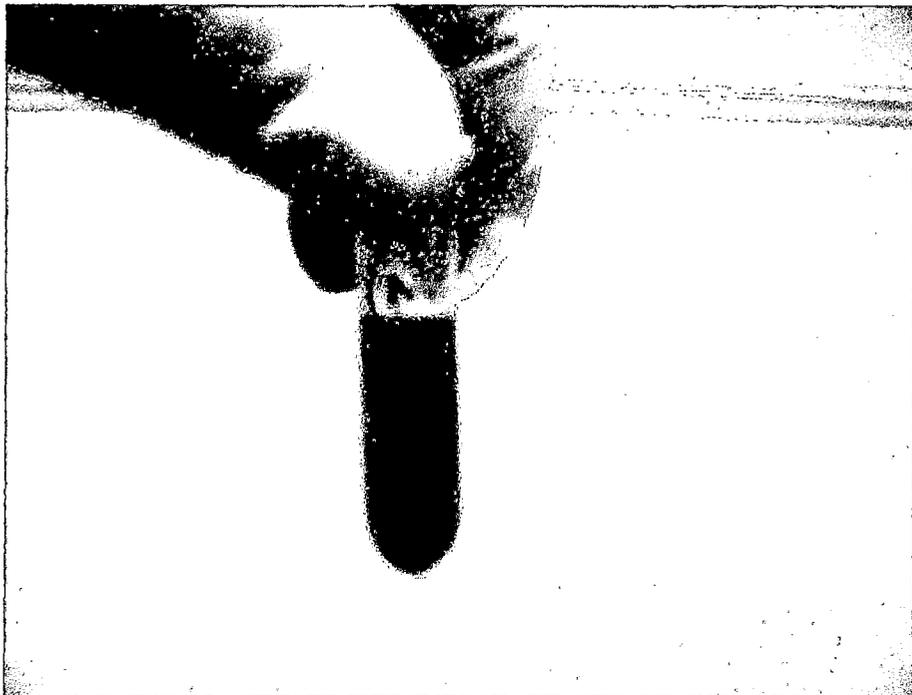
- **FOTO N° 6: TUBOS EPPENDORF CON MUESTRAS DE SANGRE DE VICUÑA COLOCADAS EN LA CENTRIFUGA.**



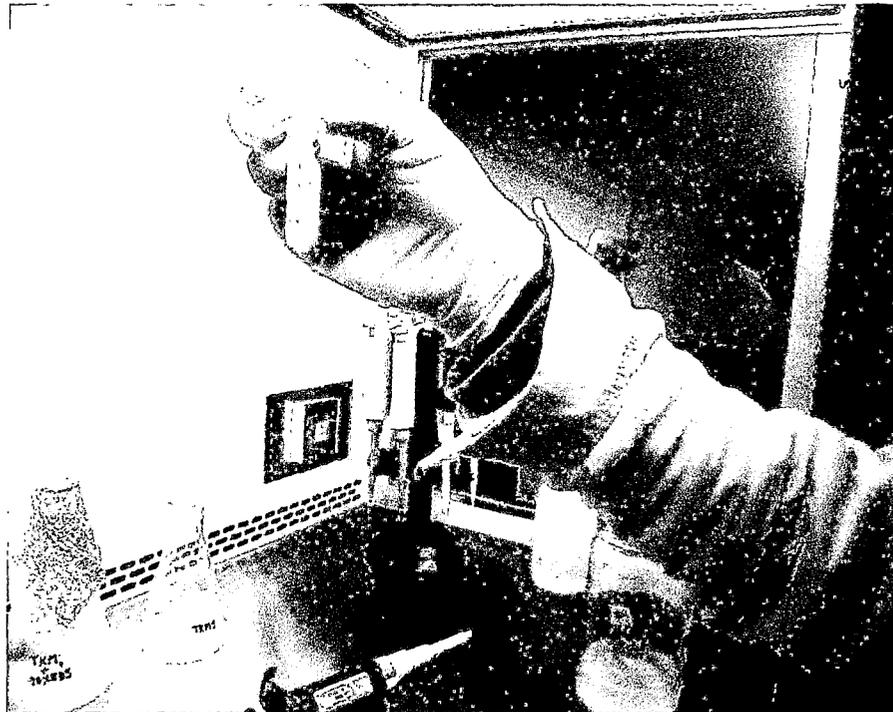
- FOTO N° 7: PROGRAMANDO LA CENTRIFUGA A 14000 RPM DURANTE 10 MINUTOS.



- FOTO N° 8: TUBO EPPENDORF DESPUÉS DE UNA CENTRIFUGACIÓN



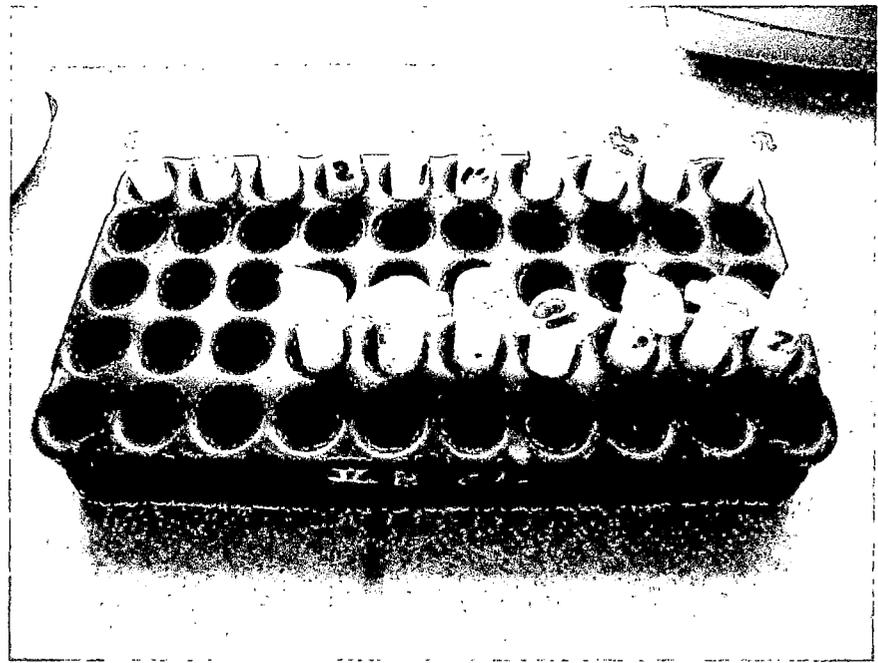
- **FOTO N° 9: TUBO EPPENDORF SOLO CON EL PELLET.**



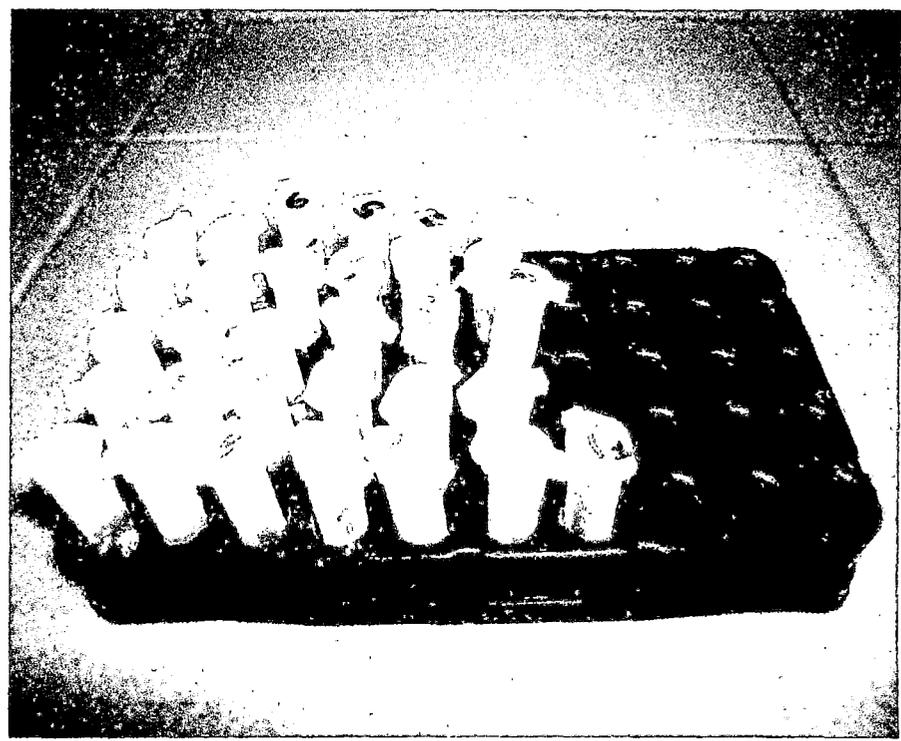
- **FOTO N° 10: INCUBANDO MUESTRAS DE SANGRE CON TAMPON DE LISIS DURANTE TODA LA NOCHE A UNA TEMPERATURA DE 37° C.**



- **FOTO N° 11: MUESTRAS DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN DE TODA LA NOCHE.**



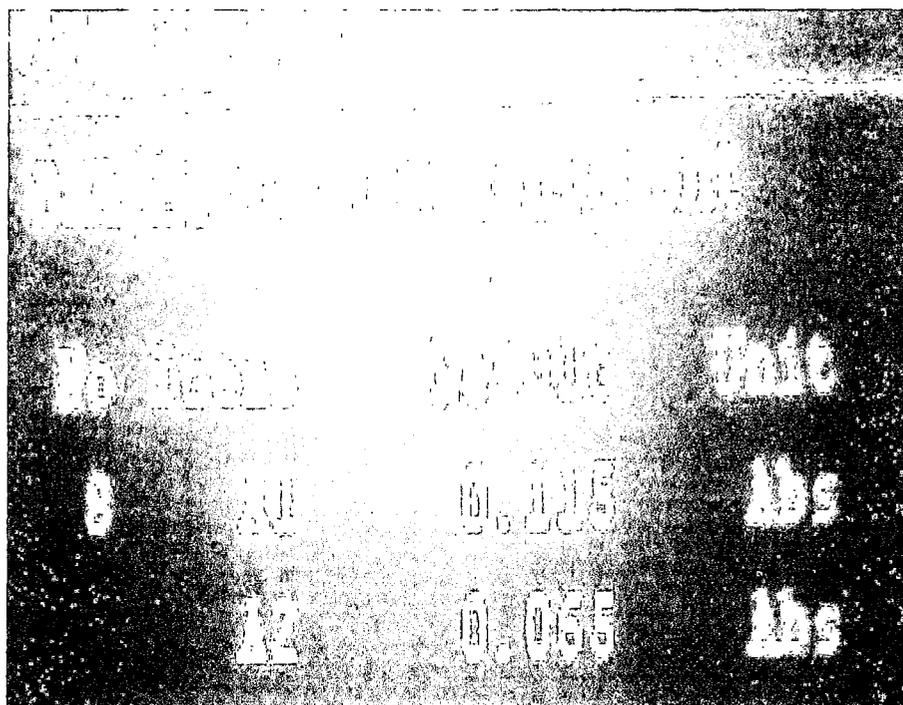
- **FOTO N° 12: MUESTRAS CONGELADAS A -80°C PARA CUANTIFICAR EL ADN.**



- **FOTO N° 13: ESPECTOFOTOMETRO CALIBRADO A 0.00 PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE ADN.**



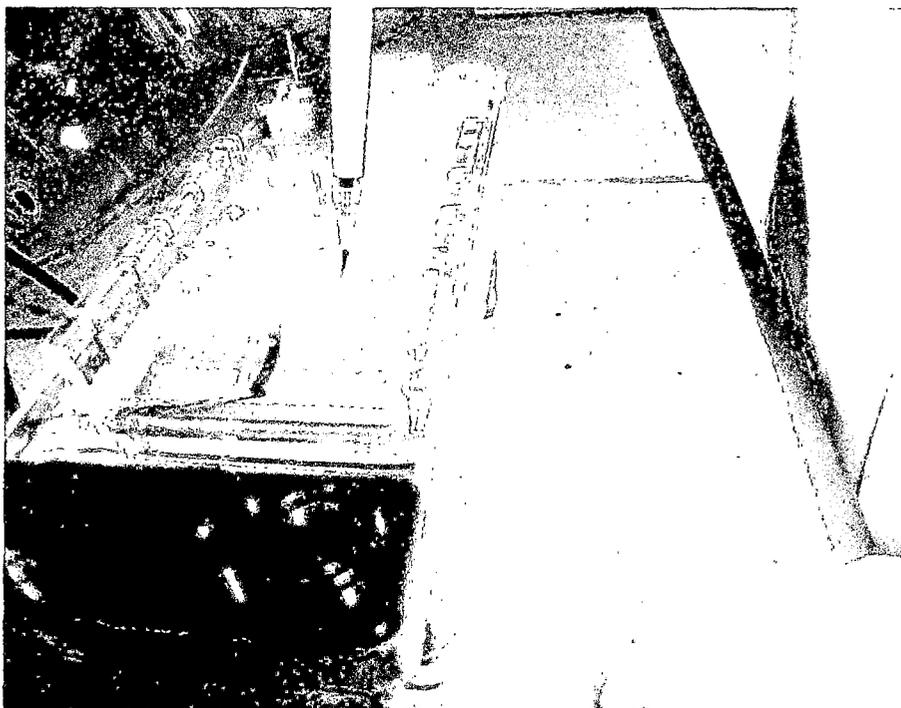
- **FOTO N° 14: RESULTADO OBTENIDO DESPUÉS DE CUANTIFICAR LA MUESTRA DE ADN EXTRAÍDO.**



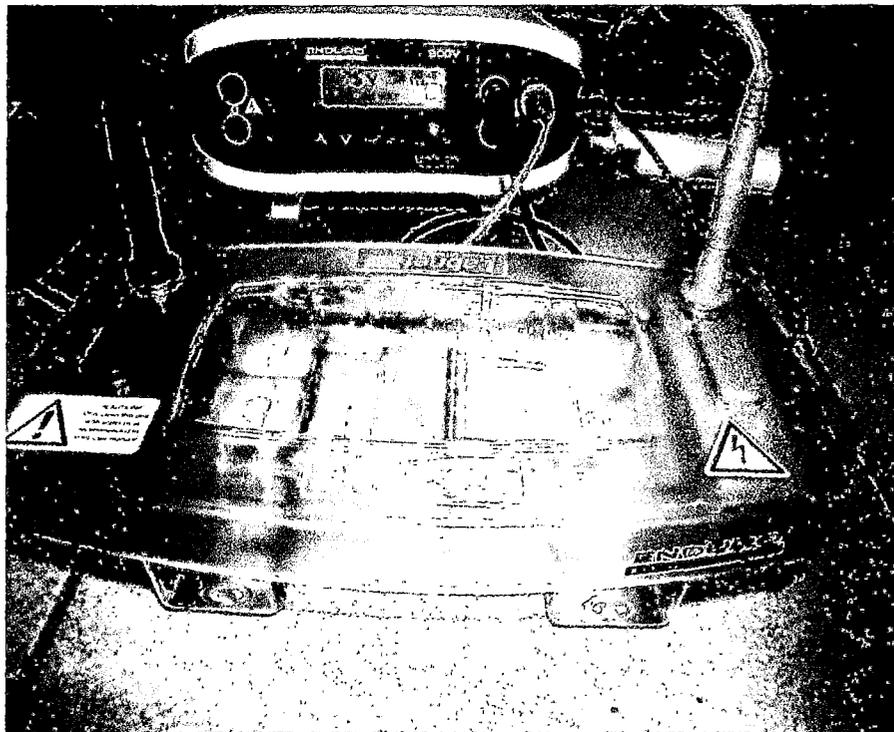
- **FOTO N° 15: PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE ADN PARA EL CORRIDO EN GEL AGAROSA AL 1%.**



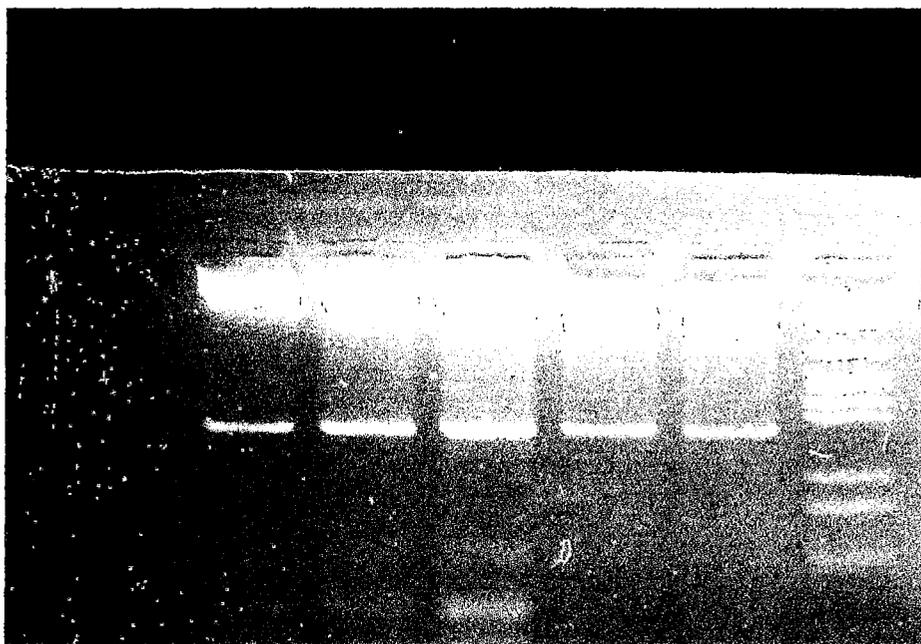
- **FOTO N° 16: CARGANDO LAS MUESTRAS DE ADN MAS BUFFER DE CARGA EN LOS POCILLOS DEL GEL**



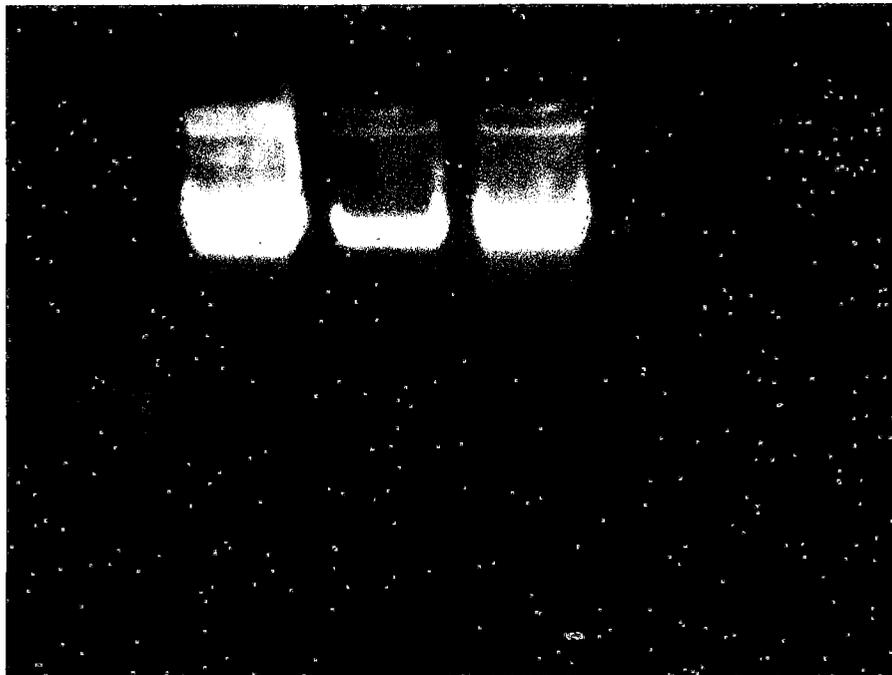
- **FOTO N° 17: CORRIDO DE LAS MUESTRAS DE ADN A 75 V POR 1 HORA CON 30 MINUTOS.**



- **FOTO N° 18: BANDAS DE ADN OBSERVADAS EN EL TRANSILUMINADOR**



- **FOTO N° 19: BANDAS DE ADN OBSERVADAS EN CÁMARA DE TRANSILUMINADOR UV.**



- **FOTO N° 20: ELECTROFORESIS DEL ADN EXTRAÍDO DE MUESTRA DE SANGRE.**

