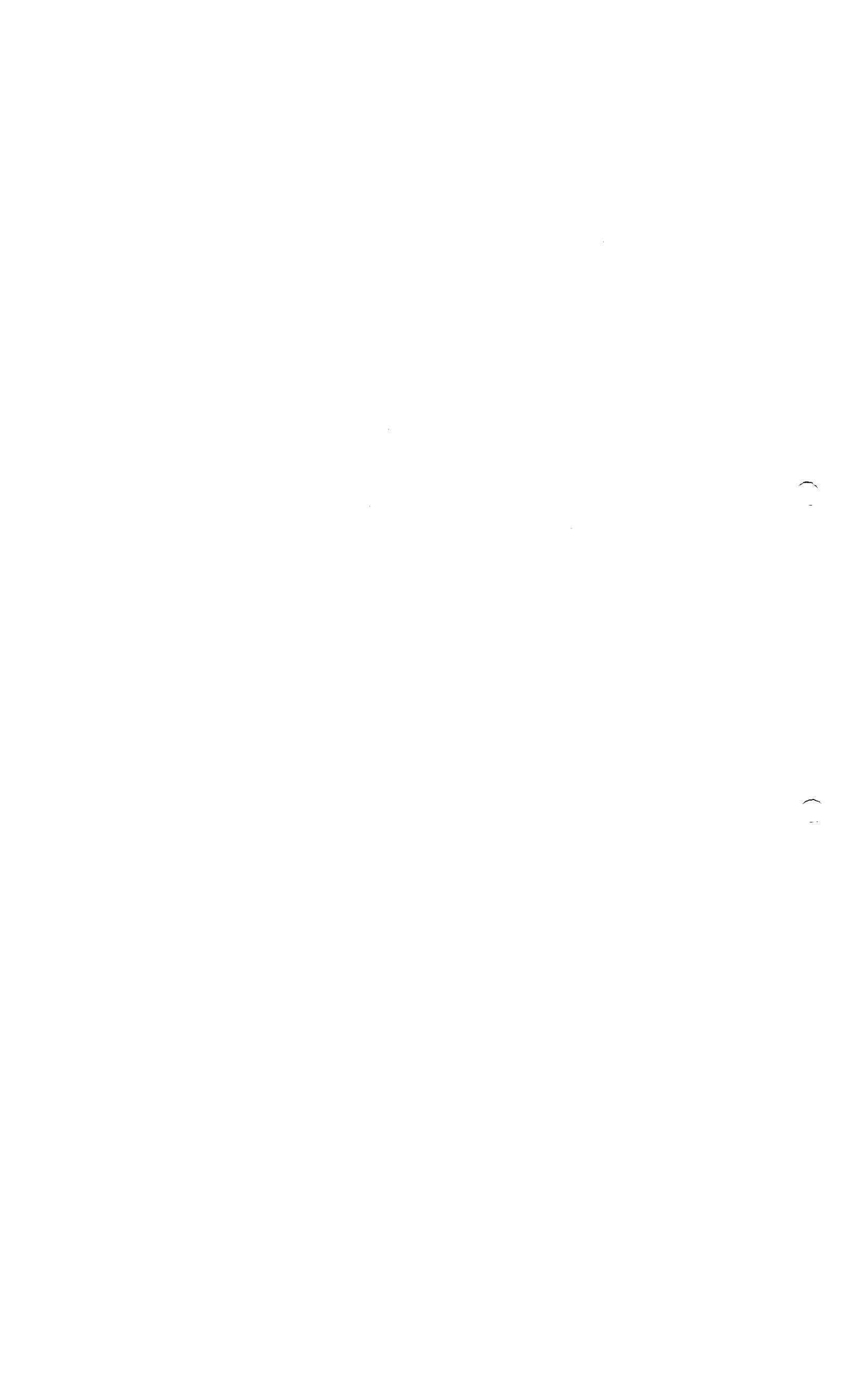




Tabla 3: Perfil de control de calidad del banco de células Vero de trabajo LS-10, pruebas realizadas sobre el sobrenadante en el pasaje 137^o

Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Prueba de detección de <i>Mycoplasma</i> mediante el método de cultivo	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 745	Ph. Eur. 2.6.7, edición actual Inoculación en dos medios (líquido y sólido). Incubación en condiciones aerobias y anaerobias.	Sin crecimiento de <i>Mycoplasma</i> .
Prueba de detección de <i>Mycoplasma</i> mediante epifluorescencia en cultivo celular	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 745	Según la Ph. Eur. 2.6.7, edición actual Epifluorescencia.	No se detectó <i>Mycoplasma</i> mediante epifluorescencia en cultivo celular.
Prueba de detección de agentes extraños con células: - células continuas Vero - células diploides humanas MRC-5 - células primarias de riñón de mono	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 745	Según la Ph. Eur. 2.6.16, edición actual Inoculación del sobrenadante en las monocapas de cada tipo de célula. Detección de efecto citopático. Prueba de hemadsorción.	Ausencia de efecto citopático para cada tipo de célula. Ausencia de hemadsorción para cada tipo de célula.
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 745	Ph. Eur. 2.6.1, edición actual Filtración por membrana. Cultivo en condiciones aerobias y anaerobias.	Sin crecimiento microbiano



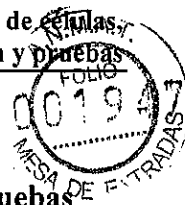
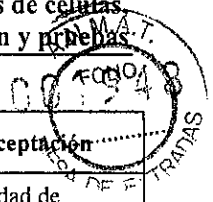



Tabla 4: Perfil de control de calidad del banco de células Vero de trabajo LS-10, pruebas realizadas en el pasaje 147^o (después de un mínimo de 10 PDL)


Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Observación al microscopio electrónico (después de la inducción)	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 745	Microscopía electrónica de transmisión en cultivos celulares inducidos (por yodouracilo desoxirribosa; IUDR) y no inducidos.	No se observan virus, partículas parecidas a virus, <i>Mycoplasma</i> , hongos, levaduras ni bacterias antes y después de la inducción por IUDR.
Prueba de detección de agentes extraños en animales; por vía intramuscular: - ratones lactantes - ratones - cobayos - conejos por vía intracerebral: - ratones	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 745	Inoculación de cada tipo de animal	Sin evidencia de agentes extraños
Prueba de agentes extraños en huevos de gallina embrionados: - cavidad alantoidea - saco vitelino - membrana corioalantoidea	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 745	Inoculación de cada tipo Prueba para detectar la presencia de hemaglutininas.	Sin evidencia de agentes extraños
Cocultivo de células intactas con: - células diploides humanas MRC-5 - células primarias de riñón de mono	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 745	Subcultivo en monocapas de cada célula. Detección de efecto citopático. Prueba de detección de hemadsorción.	Ausencia de efecto citopático para cada tipo de célula. Ausencia de hemadsorción para cada tipo de célula.
Cocultivo de células fragmentadas con: - células diploides humanas MRC-5 - células primarias de riñón de mono	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 745	Subcultivo en monocapas de cada célula. Detección de efecto citopático. Prueba de detección de hemadsorción.	Ausencia de efecto citopático para cada tipo de célula. Ausencia de hemadsorción para cada tipo de célula.
Prueba de tumorigenicidad en ratas recién nacidas	TRS 745	Inoculación en ratas recién nacidas	Ausencia de tumorigenicidad
Prueba de tumorigenicidad en células 3T3	TRS 745	Inoculación en células 3T3 NIH.	≤ 0,005 focos/μg





Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Prueba de detección de transcriptasa inversa	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 745	Método de Rey (método bioquímico)	Ausencia de actividad de transcriptasa inversa


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUI
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A.





4.2.2 Especificaciones de los bancos de células de trabajo subsiguientes (a partir del LS-11)

El perfil de control de calidad que se aplica para los bancos de células Vero de trabajo producidos (a partir del LS-11) y los posteriores como LS-12 cumple los requisitos de la Ph. Eur. § 5.2.3 “*Cell substrates for the production of vaccines for human use*” (sustratos celulares para elaborar vacunas de aplicación en seres humanos) y las recomendaciones del TRS de la OMS n° 878 (1998) Anexo 1 “*Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals*” (requisitos para el uso de células animales como sustrato in vitro para la elaboración de productos biológicos) actualmente vigente, así como la política interna.

Estas especificaciones se presentan a continuación en las siguientes tablas:

- tabla 5: pruebas de control de calidad realizadas en el pasaje 137° en las células.
- tabla 6: pruebas de control de calidad realizadas en el pasaje 137° en los sobrenadantes.
- tabla 7: pruebas de control de calidad realizadas en el pasaje 147° (después de un mínimo de 10 PDL más allá del nivel máximo utilizado para la producción) en las células.
- tabla 8: pruebas de control de calidad realizadas en el pasaje 147° (después de un mínimo de 10 PDL más allá del nivel máximo utilizado para la producción) en los sobrenadantes.

Las especificaciones se presentan en cuatro tablas para mostrar mejor en qué sustrato (células o sobrenadantes) se lleva a cabo realmente cada prueba.

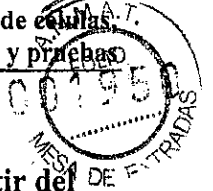


Tabla 5: Perfil de control de calidad de los bancos de células Vero de trabajo (a partir del LS-11), pruebas realizadas sobre células en el pasaje 137^o

Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Observación al microscopio óptico tras la fijación y la tinción	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual	Microscopía óptica	Morfología celular y características de multiplicación de las células Vero* Ausencia de alteraciones citológicas atribuibles a contaminantes microbianos
Observación al microscopio electrónico	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual	Microscopía electrónica de transmisión	No se observan virus, partículas parecidas a virus, <i>Mycoplasma</i> , hongos, levaduras ni bacterias.
Observación en el día 14	/	Según la Ph. Eur. 2.6.16, edición actual Microscopía óptica	Ausencia de efecto citopático
Hemadsorción en el día 14	/	Según la Ph. Eur. 2.6.16, edición actual Contacto con eritrocitos procedentes de diferentes especies (cobayo, gallina, mono y ser humano).	Ausencia de hemadsorción
Identificación de células de simio	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual, TRS 878	Según la Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Análisis de isoenzimas (lactato deshidrogenasa, fosfogluconato deshidrogenasa, glucosa fosfato isomerasa) mediante enfoque isoeléctrico (IEF).	Identificación positiva
Identificación de la línea celular continua Vero	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual, TRS 878	Huella genética	Coincide con las células de referencia

* Documento de referencia: "Terasima T. y Yasukawa M.: Biological properties of Vero cells derived from the present stock, *Vero Cells: Origin Properties and Biomedical Applications*, Department of Microbiology, School of Medicine Chiba University. 1988, 32-5 "(1)



Tabla 6: Perfil de control de calidad de los bancos de células Vero de trabajo (a partir del LS-11), pruebas realizadas en el sobrenadante en el pasaje 137^o

Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Prueba de detección de <i>Mycoplasma</i> por el método de cultivo	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 878	Según la Ph. Eur. 2.6.7, edición actual Inoculación en dos medios (líquido y sólido). Incubación en condiciones aerobias y anaerobias.	Sin crecimiento de <i>Mycoplasma</i> .
Prueba de detección de <i>Mycoplasma</i> mediante epifluorescencia en cultivo celular	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 878	Según la Ph. Eur. 2.6.7, edición actual Epifluorescencia.	No se detectó <i>Mycoplasma</i> mediante epifluorescencia en cultivo celular.
Prueba de detección de agentes extraños con células: - células continuas Vero - células diploides humanas MRC-5 - células primarias de riñón de mono	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 878	Según la Ph. Eur. 2.6.16 Inoculación de los sobrenadantes en las monocapas de cada tipo de célula. Detección de efecto citopático. Prueba de hemadsorción.	Ausencia de efecto citopático para cada tipo de célula. Ausencia de hemadsorción para cada tipo de célula.
Prueba de detección de <i>Mycobacteria in vitro</i>	/	Según la Ph. Eur. 2.6.2, edición actual Inoculación a medios sólidos y líquidos adecuados.	Sin crecimiento de <i>Mycobacteria</i>
Prueba de detección de <i>Mycobacteria in vivo</i>	/	Inoculación en cobayos	Ausencia de muertes debidas a <i>Mycobacteria</i>
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 878	Ph. Eur. 2.6.1, edición actual Filtración por membrana. Cultivo en condiciones aerobias y anaerobias.	Sin crecimiento microbiano

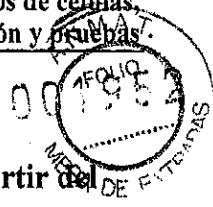


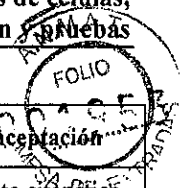


Tabla 7: Perfil de control de calidad de los bancos de células Vero de trabajo (a partir de LS-11), pruebas realizadas sobre células en el pasaje 147^o

Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Identificación de células de simio	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 878	Según la Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Análisis de isoenzimas (lactato deshidrogenasa, fosfogluconato deshidrogenasa, glucosa fosfato isomerasa) mediante enfoque isoeléctrico (IEF).	Identificación positiva
Identificación de la línea celular continua Vero	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 878	Huella genética	Coincide con las células de referencia
Observación al microscopio óptico tras la fijación y la tinción	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual	Microscopía óptica	Morfología celular y características de multiplicación de las células Vero*. Ausencia de alteraciones citológicas atribuibles a contaminantes microbianos
Observación al microscopio electrónico (después de la inducción)	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 878	Microscopía electrónica de transmisión en cultivos celulares inducidos (por yodouracilo desoxirribosa; IUDR) y no inducidos.	No se observan virus, partículas parecidas a virus, <i>Mycoplasma</i> , hongos, levaduras ni bacterias antes y después de la inducción por IUDR.
Prueba de detección de agentes extraños en animales: por vía intramuscular: - ratones lactantes - ratones - cobayos - conejos por vía intracerebral: - ratones	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 878	Inoculación de cada tipo de animal	Sin evidencia de agentes extraños
Prueba de agentes extraños en huevos de gallina embrionados: - cavidad alantoidea - saco vitelino - membrana corioalantoidea	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 878	Inoculación de cada tipo Prueba para detectar la presencia de hemaglutininas.	Sin evidencia de agentes extraños
Cocultivo de células intactas con: - células continuas Vero - células diploides humanas MRC-5 - células primarias de riñón de mono	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 878	Subcultivo en monocapas de cada célula. Detección de efecto citopático. Prueba de detección de hemadsorción.	Ausencia de efecto citopático para cada tipo de célula. Ausencia de hemadsorción para cada tipo de célula.


 ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.


 CHRISTIAN DOMINGUEZ
 MODERADO
 SANOFI PASTEUR S.A.



Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Cocultivo de células fragmentadas con: - células continuas Vero - células diploides humanas MRC-5 - células primarias de riñón de mono	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 878	Subcultivo en monocapas de cada célula. Detección de efecto citopático. Prueba de detección de hemadsorción.	Ausencia de efecto citopático para cada tipo de célula. Ausencia de hemadsorción para cada tipo de célula.

* Documento de referencia: "Terasima T. y Yasukawa M.: Biological properties of Vero cells derived from the present stock, *Vero Cells: Origin Properties and Biomedical Applications*, Department of Microbiology, School of Medicine Chiba University. 1988, 32-5 "(1)



Tabla 8: Perfil de control de calidad de los bancos de células Vero de trabajo (a partir del LS-11), pruebas realizadas en el sobrenadante en el pasaje 147^o

Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Prueba de detección de transcriptasa inversa	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 878	Método de Rey (método bioquímico)	Ausencia de actividad de transcriptasa inversa
Prueba de detección de transcriptasa inversa	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 878	PERT (PCR cuantitativa).	Ausencia de actividad de transcriptasa inversa

5 Métodos de control

A continuación se presenta la descripción de los métodos analíticos y biológicos utilizados para controlar los bancos de células de trabajo (a partir del LS-11).

5.1 Métodos analíticos realizados en el pasaje 137^o con células

5.1.1 Observación al microscopio óptico tras la fijación y la tinción

- Principio

La prueba consiste en comprobar:

- Las características morfológicas de las células Vero (morfología poligonal, presencia de 2 nucleolos, ocasionalmente 3, aspecto del citoplasma...).
- El aspecto típico de los cultivos de células Vero: propiedades de crecimiento, tiempo para obtener una densidad celular de saturación...,
- La ausencia de anomalías citológicas que demuestren la presencia de contaminación microbiológica o viral.

- Equipo

Equipo estándar utilizado en un laboratorio de cultivo celular y viral.

- Reactivos

- Medios de crecimiento, medios de mantenimiento suministrados por producción: medio Iscove con 5 % de suero fetal y de ternero, almacenado a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.
- Etanol absoluto, almacenado a entre $+20\text{ °C}$ y $+25\text{ °C}$.
- Hemalun [1 x C], almacenado a entre $+20\text{ °C}$ y $+25\text{ °C}$.
- Floxina al 1 % en agua ultrafiltrada, almacenada a entre $+20\text{ °C}$ y $+25\text{ °C}$.

- Procedimiento operativo



- Siembre las células en cubreobjetos en placas de Petri y cultive a $+37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (al menos 5 placas de Petri, 2 cubreobjetos por placa de Petri, alrededor de 6×10^6 células por placa).
- Fije las células al menos en 5 momentos: el día 1, 2 ó 3, 3 ó 4, 7 y 14.
- Cambie el medio el día 7.
- Tiña las células fijadas en cada momento con hemalun y después con floxina.

- Lectura, cálculo, resultados

La lectura se lleva a cabo por examen microscópico óptico desde baja (x 4) hasta alta ampliación (x 100).

- Criterios de validez

La prueba es válida si al menos el 80 % de las células de control son observables y si el 20 % restante se rechaza por motivos no específicos (contaminación bacteriana y fúngica, matraz abierto, matraz roto...).

5.1.2 Observación al microscopio electrónico

- Principio

La prueba consiste en comprobar las características morfológicas de las células y la ausencia de agentes extraños contaminantes durante el período de observación del cultivo celular de control por microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM).

- Equipo

Equipo estándar utilizado en un laboratorio de cultivo celular y virología.

- Reactivos

- Suspensión celular de control almacenada a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.
- Medio de crecimiento suministrado por el laboratorio de producción.
- Tampón de cacodilato sódico 0,15 M (pH = 7,4) almacenado a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.
- Solución de glutaraldehído al 3 % en tampón de cacodilato sódico 0,15 M almacenada a $+5 \pm 3\text{ °C}$.

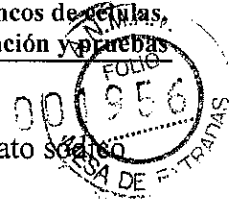
- Procedimiento operativo

Siembre las células en matraces desechables (25 cm^2) y cultive a temperatura adecuada.

Fije el cultivo celular al menos en 3 momentos de medición (generalmente a las 24, 48 y 72 horas). En cada momento:

- Coseche el líquido sobrenadante celular de 2 matraces.
- Mezcle el líquido sobrenadante celular con solución de glutaraldehído al 3 % (v/v) e incube durante 30 minutos a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.
- Deseche el líquido sobrenadante celular e incube con solución de glutaraldehído al 1,5 % durante 30 minutos a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.





- Deseche la solución de glutaraldehído y lave una vez con tampón de cacodilato sódico almacenado a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Llene los matraces con tampón de cacodilato sódico y conserve a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la preparación de los cultivos celulares para los estudios por SEM y TEM.
- Lectura, cálculo, resultados

La lectura se lleva a cabo por SEM y TEM.

- Criterios de validez

La prueba es válida si al menos el 80 % de las células de control son observables y si el 20 % restante se rechaza sólo por motivos no específicos.

5.1.3 Observación en el día 14

El método se describe con el método para hemadsorción en el día 14.

5.1.4 Hemadsorción en el día 14

- Referencia

Esta prueba se basa en la Ph. Eur. 2.6.16 "Tests for extraneous agents in viral vaccines for human use" (pruebas para agentes extraños en vacunas virales para uso en seres humanos).

- Principio

La prueba consiste en comprobar la ausencia de contaminantes virales extraños en un cultivo celular de control durante el período de observación.

Los agentes contaminantes se detectan por examen microscópico de un efecto citopático (CPE) inducido y/o por hemadsorción.

- Equipo

Equipo estándar utilizado en un laboratorio de cultivo celular y virología.

- Reactivos

- Medio suministrado por el laboratorio de producción (medio 199 con 1 % de suero de ternero recién nacido), almacenado a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS) [1 x C] sin calcio ni magnesio, almacenada a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Suspensiones de eritrocitos de cobayo, gallina, mono y ser humano al 0,4 % en tampón PBS [1 x C], almacenadas a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Tampón fisiológico almacenado a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Procedimiento operativo

Todas las operaciones se llevan a cabo en condiciones estériles.





La prueba consta de las siguientes etapas:

- Siembra de las células de control (al menos el 5 % del volumen total de las suspensiones celulares preparadas o 500 mL de la suspensión celular a la concentración de siembra celular para producción viral) en medio de crecimiento, a $+36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ y a una concentración de $\approx 4,5 \cdot 10^4$ células/cm² (= 32 matraces, 220 cm²).
- Mantenimiento del cultivo celular a $+36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante al menos 14 días.
- Cambios de medio al menos en el séptimo día del cultivo celular de control.
- Cosecha, distribución del líquido sobrenadante al final del período de observación y almacenamiento a -70 °C .
- Lavado de las monocapas celulares con PBS [1 x C].
- Incubación de suspensiones al 0,4 % de eritrocitos de cobayo, gallina, mono y ser humano (O⁺) en el 25 % de la superficie de la capa celular para cada tipo de eritrocito, a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$, $+20\text{ °C} - +25\text{ °C}$ y $+36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, durante 30 min (2 matraces por tipo de eritrocito y por temperatura).

Para la prueba de identidad celular, lave la superficie de la monocapa celular necesaria con medio libre de suero e incube con este medio durante al menos un día a $+36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (2 ó 3 matraces).

Tras el período de incubación, lave otra vez (x 3) las monocapas celulares con PBS [1 x C], antes de la tripsinización y prepare al menos 2 mL de suspensión celular en tampón fisiológico a una concentración de $5 \cdot 10^7$ células/mL, almacenar a -70 °C antes de enviarlo al departamento de bioquímica, responsable de la prueba de identidad.

- Lectura, cálculo, resultados

Los cultivos se comprueban por microscopía óptica invertida (objetivos x 4 – x 10), al menos antes de cada cambio de medio, al final del período de observación y después de la prueba de hemadsorción.

Los resultados se expresan como ausencia (0) o presencia (+) de efecto citopático (CPE) y/o hemadsorción.

- Criterios de validez

La prueba se considera válida si se cumplen los siguientes requisitos:

- Se puede observar al menos el 80 % de la superficie celular al final de la prueba.
- El 20 % restante se rechaza por motivos no específicos (contaminación bacteriana, matraz abierto, matraz roto...).





5.1.5 Identificación de células de simio

El método analítico se describe en la sección 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios.

5.1.6 Identificación de la línea celular continua Vero (huella genética)

- Principio

Se extrae y cuantifica el ADN de las células Vero. Se trata con enzimas de restricción que cortan el ADN en fragmentos de diferentes tamaños. Estos fragmentos se separan por electroforesis y se transfieren a una membrana de nailon. Para la detección, una sonda radiactiva o una sonda marcada con DIG se hibrida con los fragmentos de ADN.

Se utilizan las siguientes enzimas de restricción:

- *Taq I*
- *Pvu II*
- *Hind III*

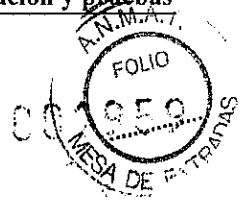
La sonda utilizada es un ADNc cuya secuencia de nucleótidos corresponde al gen HLA de clase I. Esta sonda celular humana muestra un polimorfismo discriminante, lo que permite la caracterización de la línea celular Vero y su distinción de otras células de primates y humanas. Las diferencias observadas también pueden discriminar células Vero de diferentes orígenes.

- Equipo

Equipo habitual de laboratorio de biología molecular.

- Reactivos

- Solución de NaCl 10 mM - EDTA 10 mM.
- Clorhidrato de guanidina 6 M
- Acetato amónico 7,5 M
- Proteínasa K a razón de 10 mg/mL
- Etanol
- N-lauroilsarcosina al 20 %
- Tris-EDTA [1 x C] pH = 8,0 (TE)
- Tampón TAE (Tris, acetato, EDTA) [10 x C]
- Tampón TBE (Tris, borato, EDTA) [5 x C]
- Tampón SSPE [20 x C]
- Agarosa SeaKem (p. ej.: TEBU)
- Bromuro de etidio
- SDS al 20 %
- ADN desnaturalizado de esperma de salmón (10 mg/mL)
- Formamida desionizada



- Columns NICK™
- Kit de marcado de ADN cebado al azar (p. ej.: ROCHE).
- Enzimas de restricción: *Hind III*, *Pvu II*, *Taq I* (p. ej.: ROCHE).
- Sonda de HLA de clase I (HLA B7) aislada por SOOD et al., (1981).
- Nucleótido dGTP marcado con ³²P (p. ej.: Amersham)
- AP antidigoxigenina (150 U/200 µL).
- Reactivo CDP-star, listo para usar
- DIG Easy Hyb
- Conjunto de tampón de lavado y bloqueo DIG
- Agua sin nucleasas.
- Muestras utilizadas:
 - Células Vero correspondientes a los lotes de producción
 - Células Vero de ATCC (referencia)
 - Se pueden incluir en la prueba otras células de primates, células humanas y células de otras especies como controles (p. ej.: células MRC-5, PER-C6, CHO como control negativo).
 - Las células se suspendieron en NaCl al 0,9 % a una concentración de 5×10^7 células/mL.
- Procedimiento operativo
 - 1) Extracción del ADN genómico

Lave las células descongeladas dos veces con solución de NaCl 10 mM - EDTA 10 mM en tubos de 50 mL (centrifugación 10 min - 1000 rpm +4 °C).

Homogeneice el microgránulo en:

- 14 mL de clorhidrato de guanidina 6 M
- 1 mL de acetato amónico 7,5 M
- 1 mL de N-lauroilsarcosina al 20 %
- 200 µL de proteinasa K (10 mg/mL)

Incube en baño de agua durante 1 hora a $+55 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$

Enfríe los tubos a temperatura ambiente y agregue 30 mL de etanol: se forma la esfera de ADN.

Lavar el ADN dos veces con etanol al 70 %.

Vuelva a suspender el ADN en TE [1 x C] pH = 8,0 o en agua libre de nucleasas hasta obtener un gel homogéneo.





2) Cuantificación del ADN

Determine la absorbancia de las soluciones de ADN a 280 nm y 260 nm.

- Análisis de proteínas a 280 nm
- Análisis de ADN de doble cadena a 260 nm

La proporción DO 260 nm/DO 280 nm debe ser mayor o igual que 1,6.

La unidad de DO a 260 nm corresponde a una concentración de ADN de 50 µg/mL.

3) Digestión de ADN genómico por enzimas de restricción

Es necesario observar las siguientes reglas:

- El volumen mínimo de mezcla de reacción para 8 µg (con sonda radiactiva) o para 20 µg (con sonda marcada con DIG) de ADN son 40 µL de ADN.
- Lleve a cabo la digestión con 32 U (para radiomarcación) o con 40 U (para marcación con DIG).
- El volumen de enzima no debe superar 1:10 del volumen total de reacción.
- Utilice tampones específicos para cada enzima.

Pipetee en el orden siguiente: agua, tampón enzimático, ADN y enzima de restricción.

Incube en baño de agua durante 5 horas a +37 °C ± 1 °C para *Hind III* y *Pvu II* y a +65 °C ± 1 °C para *Taq I*.

4) Separación de fragmentos de ADN por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %.

Inocule muestras de 40 µL en cada pocillo.

No olvide el marcador de tamaño (p. ej.: ADN de fago lambda digerido por *Hind III*).

Procese durante 40 horas a alrededor de 32 V.

Después de la electroforesis, tñe el gel con solución de bromuro de etidio.

5) Transferencia al vacío de los fragmentos de ADN del gel de agarosa a una membrana de nailon

1ª etapa: despurinización con HCl 0,25 N, 1 h.

2ª etapa: desnaturalización con NaOH 0,4 N, 4 h.

Al final de la transferencia, marque los pocillos.

Enjuague la membrana dos veces durante 10 minutos en SPPE [2 x C] y seque en el horno a +80 °C.

