"2026, Año de Margarita Maza Parada"

COMENTARIOS

Con fundamento en el numeral 6.3.3.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-2020, se publica el presente proyecto a efecto de que los interesados, a partir del 1º de noviembre hasta el 31 de diciembre de 2026, lo analicen, evalúen y envíen sus observaciones o comentarios en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante la CPFEUM, sita en Río Rhin número 57, colonia Cuauhtémoc, código postal 06500, Ciudad de México, o al correo electrónico: consultas@farmacopea.org.mx.

DATOS DEL PROMOVENTE

Nombre:		**Cargo:**	
Institución o empresa:		**Dirección:**	
Teléfono:		**Correo electrónico:**	

MONOGRAFÍA NUEVA

Dice	Debe decir	Justificación*
MGA-FH 0280 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA PARA LA DETECCIÓN DE AMPLICONES DE ADN VEGETAL		
INTRODUCCIÓN		
La electroforesis en gel de agarosa es una técnica de separación de moléculas de ácidos nucleicos en función de su tamaño, mediante la aplicación de un campo eléctrico sobre una matriz porosa. Debido a que el esqueleto azúcar-fosfato del ácido desoxirribonucleico (ADN) presenta carga neta negativa a pH neutro o ligeramente alcalino, los fragmentos de ADN migran hacia el ánodo (+) y, dentro del gel, los fragmentos de menor tamaño se desplazan con mayor velocidad que los de mayor tamaño.		
Esta técnica complementa a los métodos de amplificación de marcadores moleculares vegetales, ya que permite verificar la integridad del		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
ADN extraído, confirmar el éxito de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y estimar el tamaño de los productos amplificados (amplicones) antes de su secuenciación, tal como se indica en el MGA-FH 0260.		
ALCANCE		
Este apartado establece los requisitos de equipo, reactivos y procedimiento para la separación, detección y caracterización por tamaño de amplicones de ADN vegetal (de aproximadamente 400 – 1 200 pb) y para la verificación de la integridad del ADN genómico extraído, mediante electroforesis en gel de agarosa.		
1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO		
La agarosa es un polisacárido lineal que, al disolverse por calentamiento en una solución amortiguadora y enfriarse, forma un gel con una red de poros cuyo diámetro depende de su concentración. Al aplicar una diferencia de potencial constante, las moléculas de ADN migran a través de esta red con una velocidad inversamente proporcional al logaritmo de su tamaño en pares de bases (pb). La migración depende además de la concentración de agarosa, la intensidad del campo eléctrico, la composición y fuerza iónica de la solución amortiguadora y la conformación del ADN.		
El tamaño de los fragmentos se estima por comparación con un marcador de peso molecular (escalera de ADN) de tamaños conocidos que se corre en el mismo gel. Los fragmentos separados se visualizan mediante un colorante fluorescente para		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
ADN, que emite fluorescencia al ser excitado con luz ultravioleta (UV) o luz azul, según el colorante empleado.		
Para amplicones de hasta 1 200 pb, como los generados con los códigos de barras de ADN descritos en el MGA-FH 0260, se emplea un gel de agarosa al 1 % (p/v), el cual ofrece una resolución adecuada para este intervalo de tamaños.		
2. METODOLOGÍA		
2.1. Material y equipo		
• Cámara de electroforesis horizontal, con charola para gel, peines de formación de pocillos y compuertas o cinta para sellar los extremos de la charola. • Fuente de poder con salida de corriente directa y control de voltaje constante. • Horno de microondas o placa de calentamiento con agitación. • Balanza analítica. • Micropipetas calibradas y puntas con filtro. • Sistema de visualización y documentación de geles (transiluminador UV o de luz azul con cámara o fotodocumentador). • Equipo de protección personal: bata, guantes de nitrilo y protección ocular (pantalla o lentes con filtro UV al usar transiluminador UV).		
2.2. Soluciones y reactivos		
Todas las soluciones deben prepararse con agua de grado biología molecular o agua desionizada, y con reactivos de grado biología molecular. A excepción		

CONSULTA

<table>
<tr><th>Dice</th><th>Debe decir</th><th>Justificación*</th></tr>
<tr><td>de las soluciones amortiguadoras que deben prepararse con agua desionizada.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>2.2.1. Solución amortiguadora de corrida. Se utiliza como solución amortiguadora por defecto Tris-borato-EDTA (TBE) a concentración 1X. De manera alternativa puede emplearse Tris-acetato-EDTA (TAE) a concentración 1X, siempre que se indique y valide. La misma solución debe utilizarse para preparar el gel y para llenar la cámara de electroforesis. Las soluciones concentradas se preparan como se indica en la tabla 1 y se diluyen a su concentración de trabajo antes de su uso.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="3">Tabla 1. Preparación de las soluciones amortiguadoras de corrida.
<table>
<tr><th>Componente</th><th>TBE 50X (1 L) – por defecto</th><th>TAE 50X (1 L) – alternativa</th></tr>
<tr><td>Tris base</td><td>540 g</td><td>242 g</td></tr>
<tr><td>Ácido bórico</td><td>275 g</td><td>—</td></tr>
<tr><td>Ácido acético glacial</td><td>—</td><td>57.1 mL</td></tr>
<tr><td>EDTA 0.5 M, pH 8.0</td><td>200 mL</td><td>100 mL</td></tr>
<tr><td>Ajuste de pH</td><td>pH 8.3 – 8.6</td><td>No requiere ajuste (pH ≈ 8.5)</td></tr>
<tr><td>Concentración de trabajo</td><td>1X (dilución 1:50 de la solución 50X): 45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA</td><td>1X (dilución 1:50 de la solución 50X): 40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>La solución de EDTA 0.5 M pH 8.0 y la solución de TBE se preparan como se describe en el MGA 0311. Las soluciones se almacenan a temperatura ambiente y se descartan si se observa la formación de precipitado.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>2.2.2. Agarosa. Agarosa de grado biología molecular, con punto de fusión estándar y baja</td><td></td><td></td></tr>
</table>

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
electroendósmosis (EEO). El gel se prepara a una concentración de 1 % (p/v), es decir, 1 g de agarosa por cada 100 mL de solución amortiguadora de corrida.		
2.2.3. Solución amortiguadora de carga 6X. Solución de glicerol al 30 % (v/v) con azul de bromofenol al 0.25 % (p/v) y, opcionalmente, xilencianol FF al 0.25 % (p/v), en agua. El glicerol aumenta la densidad de la muestra para que se deposite en el fondo del pocillo y los colorantes permiten seguir el avance de la corrida. Puede sustituirse por solución de carga comercial. **2.2.4. Marcador de peso molecular.** Escalera de ADN comercial de 1 kb, con fragmentos de tamaño conocido que incluyan el intervalo esperado de los amplicones. Se utiliza en la concentración y volumen indicados por el fabricante.		
2.2.5. Colorante de visualización. Puede emplearse cualquier colorante fluorescente diseñado para la visualización segura de ADN, utilizado a la concentración y bajo las instrucciones del fabricante. **No debe emplearse bromuro de etidio** debido a su toxicidad y potencial mutagénico. El colorante puede incorporarse al gel antes de su gelificación o utilizarse para teñir el gel después de la corrida.		
2.3. Preparación del gel		
Pesar la cantidad de agarosa necesaria y suspenderla en el volumen correspondiente de solución amortiguadora de corrida en un matraz con capacidad de al menos el doble del volumen de la		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
solución. Calentar en horno de microondas o en placa de calentamiento, agitando ocasionalmente, hasta la disolución completa de la agarosa (solución transparente, sin partículas visibles). Compensar con agua desionizada la pérdida de volumen por evaporación, si fuera necesario.		
Enfriar la solución hasta aproximadamente 50 – 60 °C. Si el colorante se incorpora al gel, adicionarlo en este punto y mezclar suavemente por rotación para evitar la formación de burbujas. Verter la solución en la charola, previamente nivelada y con los extremos sellados, colocar el peine y retirar las burbujas con una punta de pipeta. Dejar gelificar a temperatura ambiente durante al menos 30 min.		
Retirar cuidadosamente el peine y los sellos de la charola, colocar el gel en la cámara y cubrirlo con solución amortiguadora de corrida hasta una altura de aproximadamente 3 – 5 mm por encima de su superficie.		
2.4. Preparación y aplicación de las muestras		
Mezclar cada producto de PCR (amplicón) con la solución amortiguadora de carga 6X de modo que la concentración final de ésta sea 1X. El volumen total aplicado por carril es de 5 µL, incluida la solución de carga; normalmente 1 µL de solución de carga 6X y 4 µL de producto de PCR. Aplicar la mezcla en el fondo del pocillo correspondiente, evitando perforar el gel o desbordar el pocillo.		
En cada gel deben incluirse, como mínimo: • Un carril con marcador de peso molecular.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
• Un carril con el control positivo de la PCR. • Un carril con el control negativo de la PCR (reacción con agua grado biología molecular en lugar de ADN). • Un carril por cada muestra analizada.		
Para verificar la integridad del ADN genómico extraído, aplicar entre 100 – 200 ng de ADN con solución de carga en un gel de agarosa al 0.8% (p/v).		
2.5. Corrida electroforética		
Cerrar la cámara, conectar los electrodos a la fuente de poder respetando la polaridad (las muestras se aplican del lado del cátodo, −, y migran hacia el ánodo, +) y aplicar un voltaje constante de 110 V durante 60 min para un gel de 10 – 12 cm de longitud. Detener la corrida cuando el frente del colorante azul de bromofenol haya recorrido aproximadamente dos tercios a tres cuartas partes de la longitud del gel.		
Debe evitarse aplicar voltajes excesivos, ya que producen sobrecalentamiento del gel, bandas difusas o distorsionadas y fusión parcial de la agarosa.		
2.6. Visualización y documentación		
Desconectar la fuente de poder, retirar el gel de la cámara y, si el colorante no fue incorporado previamente, teñirlo de acuerdo con las instrucciones del fabricante del colorante y enjuagar		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
con agua si es necesario. Colocar el gel en el transiluminador y visualizar las bandas con luz UV o luz azul, según lo indicado para el colorante empleado. Registrar el electroforetograma mediante fotografía o con el sistema de documentación de geles, indicando la identificación de cada carril.		
2.7. Precauciones de seguridad		
• Utilizar guantes en todo momento. Aun cuando los colorantes de visualización segura presentan menor toxicidad, los geles, soluciones de tinción y materiales contaminados deben desecharse conforme a las indicaciones del fabricante y a la normatividad vigente. Está prohibido el uso de bromuro de etidio. • La luz UV daña la piel y los ojos; emplear protección ocular y facial y no exponerse directamente al transiluminador. • No manipular la cámara ni los electrodos mientras la fuente de poder esté conectada. • Manejar con precaución la solución de agarosa caliente para evitar quemaduras y salpicaduras.		
3. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS		
La corrida electroforética es válida únicamente si el marcador de peso molecular presenta bandas nítidas y bien resueltas, el control positivo muestra una banda única del tamaño esperado y el carril del		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
control negativo no presenta bandas de amplificación.		
El tamaño del amplicón se estima por comparación de su posición con la de las bandas del marcador de peso molecular y debe corresponder, dentro de la tolerancia de la técnica, con el tamaño aproximado especificado en la monografía correspondiente. Se considera que la amplificación fue exitosa cuando se observa una banda única, definida y de tamaño consistente con el esperado. Una banda de intensidad adecuada indica que la cantidad de producto es suficiente para su secuenciación.		
Las situaciones más frecuentes y su interpretación se resumen en la tabla 2.		

CONSULTA

<table>
<tr><th>Dice</th><th>Debe decir</th><th>Justificación*</th></tr>
<tr><td>

Tabla 2. Interpretación de resultados y acciones sugeridas.

Observación	Posible causa	Acción sugerida
Banda en el control negativo	Contaminación de reactivos o de la mezcla de reacción	Invalidar la prueba; descontaminar áreas y repetir con reactivos nuevos
Ausencia de banda en el control positivo	Falla en la PCR o degradación de reactivos	Invalidar la prueba; revisar reactivos y programa del termociclador
Ausencia de banda en la muestra con control positivo válido	ADN degradado, escaso o con inhibidores	Verificar la integridad y pureza del ADN; repetir con dilución del ADN o nueva extracción
Más de una banda	Amplificación inespecífica	Optimizar la temperatura de alineamiento o la concentración de ADN
Banda difusa o de baja masa (< 100 pb)	Dímeros de cebadores o exceso de cebadores	Reducir la concentración de cebadores
Bandas distorsionadas o con forma de sonrisa	Sobrecalentamiento o gel no nivelado	Reducir el voltaje; nivelar la charola
Barrido continuo en el ADN genómico	Degradación del ADN	Repetir la extracción con material vegetal adecuadamente desecado

</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>La electroforesis confirma la presencia y el tamaño del producto de PCR, pero no su identidad. Los amplicones que cumplan con los criterios anteriores deben someterse a secuenciación, como se describe en el MGA-FH 0260.</td><td></td><td></td></tr>
</table>

*Para una mejor comprensión de su solicitud adjunte bibliografía u otros documentos que sustenten sus comentarios.

Formato EP-PO-214/05-2

CONSULTA