

Técnicas Moleculares Aplicadas a la Identificación de la Resistencia a Enfermedades en Diferentes Cultivos

9 - 18 diciembre de 1999



República de Colombia

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural

SB
599
.2
T4

CIAT
Internacional de Agricultura Tropical
International Center for Tropical Agriculture

SB
599
.2
T4

CURSO TALLER

**TECNICAS MOLECULARES APLICADAS A LA
IDENTIFICACIÓN DE LA RESISTENCIA A
ENFERMEDADES EN DIFERENTES CULTIVOS**



FITOPATOLOGÍA DE YUCA

**Compilado y Editado por:
Mary Isabel Barragán
José Luis Claroz
Elizabeth Alvarez**

17 JUN. 2003

UNIDAD DE INFORMACION Y
DOCUMENTACION
105918

**Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural
MADR
Centro Internacional de Agricultura Tropical
CIAT**

Diciembre 9-18, 1999

CURSO TALLER

TECNICAS MOLECULARES APLICADAS A LA IDENTIFICACIÓN DE LA RESISTENCIA A ENFERMEDADES EN DIFERENTES CULTIVOS

Director del curso: Elizabeth Alvarez C.
Fitopatóloga Ph.D.

Investigadores Participantes: José Luis Claroz
Mary Isabel Barragán A.
Sandra Lorena Reyes
Juan Fernando Mejía
Germán Alberto Llano
Faustina Giraldo
Edgar Barrera
Fabio Escobar
María Cristina Suárez
Fernando Angel

Conferencistas: Elizabeth Alvarez, Fitopatóloga Ph.D.
Fernando Correa, Fitopatólogo Ph.D.
George Majuku, Fitopatólogo Ph.D.
Mathew Blair, Genetista Ph.D.
Fernando Angel, Biólogo Molecular Ph.D.
Miriam Cristina Duque, Estadística MSci.
Paul Chavarriaga, Biólogo Molecular MSci.
José Luis Claroz, Biólogo Genetista
María Cristina Suárez, Bióloga Genetista
Edgar Barrera, Biólogo Genetista

TABLA DE CONTENIDO

1. Extracción de ADN

- Extracción de ADN de *Phytophthora vignae* y *Phytophthora citricola*
- Extracción de ADN de *Sphaceloma manihoticola*
- Extracción de ADN de *Sphaerotheca pannosa*
- Extracción de ADN de hojas de yuca
- Electroforesis en gel de Agarosa para el control de calidad del ADN
- Cuantificación del ADN en Fluorómetro (TK0-100)

Figura 1. (ADN total en gel de Agarosa 1%)

2. Amplificación de ADN utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

- Amplificación de ADN utilizando la región del espacio interno transcrito (ITS) 1, 2, 4, 5 del gen 5.8S
- Digestión del producto Amplificado con enzimas de restricción
- Amplificación aleatoria de fragmentos de ADN (RAPDs) utilizando 4 primers

Figura 2. Diagrama de la metodología utilizada para PCR y Digestión.

Figura 3. Amplificación de ADN de aislamientos de *Phytophthora* con el primer OPH-02 a partir de la técnica RAPD.

3. Polimorfismos de fragmentos amplificados (AFLPs)

- Restricción de ADN genómico
- Ligación de adaptadores
- Reacción de preamplificación
- Amplificación selectiva
- Electroforesis
- Tinción con plata
- Análisis de geles

Figura 4. Diagrama de la metodología utilizada para AFLP

Figura 5. AFLP de ADN de yuca

4. Estudio de Secuencias Microsatélites

- Amplificación de ADN de yuca con PCR
- Electroforesis en Agarosa o poliacrilamida
- Tinción con bromuro o con plata
- Análisis de datos o geles

Figura 6. Microsatélites en yuca

5. Clonación del gen Mat 2 de *Ceratocystis paradoxa*

- Extracción de ADN
- Amplificación (PCR) usando Mat 2 primers Hmg 1 – Hmg 2
- Comparación del producto amplificado: Mat 1/Mat 2 en gel de Agarosa.
- Concentración del producto amplificado
Electroforésis en gel de Agarosa de bajo punto de fusión
Corte de banda de tamaño específico
- Purificación del gen utilizando el Kit (Gene Clean II)
- Cuantificación del ADN
- Clonación del ADN (fragmento Mat 2) en PG en T-Easy vector
- Sembrar E-coli en medio LB ampicilina incubar durante la noche
- Extraer ADN del plásmido de las células de E-coli usando el Kit Qiagen
- Corte del fragmento Mat 2 del vector usando la enzima de restricción Eco RI
- Electroforésis en gel de agarosa aplicando bajo voltaje ubicación de la banda de interes.

Figura 7. Identificación de la banda a Clonar en un PCR con primers Degenerados HMG 1 y HMG 2

ANEXOS

- 1) Soluciones stock, medios de cultivo, buffers
- 2) Abreviaturas y símbolos
- 3) Precauciones generales para bioseguridad y manejo de reactivos en el laboratorio

EXTRACCIÓN DE ADN DE HOJAS DE YUCA Método De Extracción Modificado (Dellaporta, 1983)

1. Tomar tubos falcon de 50ml.
2. Adicionar 15 ml de buffer Dellaporta (ver Anexo).
3. Adicionar 3.5g de tejido macerado y mezclar suavemente.
4. Incubar durante 10 minutos a 60°C en agitación.
5. Adicionar 5 ml de acetato de potasio 5M, a 4°C
6. Incubar en hielo durante 1 hora.
7. Equilibrar los tubos con buffer Dellaporta.
8. Centrifugar durante 1h. a 3000rpm y 4°C.
9. Filtrar el sobrenadante en tubos falcon 50ml que contengan 10ml de isopropanol frío (-20), usando gasa , papel filtro o fibra miracloth
10. Mezclar suavemente.
11. Incubar a -20°C por 1 hora o durante toda la noche.
12. Equilibrar los tubos con isopropanol.
13. Centrifugar 1 hora a 3000 r.p.m. a 4°C.
14. Eliminar el sobrenadante, escurriendo sobre papel absorbente seco.
15. Resuspender el pellet con 750µl de TE.
16. Transferir con micropipeta a tubo eppendorf.
17. Centrifugar 8-10 minutos a 12000 rpm.
18. Transferir el sobrenadante a tubos eppendorf nuevos.
19. Agregar 15-30µl de RNAsa, incubar 30 minutos a 37°C.
20. Adicionar 75µl de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 500 µl de isopropanol, mezclar suavemente y dejar precipitar.
21. Incubar 30 minutos a -20°C.
22. Centrifugar 10 minutos a 10000 rpm y 4°C.
23. Descartar el sobrenadante (escurrir en papel absorbente).
24. Adicionar 500µl de etanol frío al 70% y agitar suavemente desprendiendo el pellet sin resuspender (estos 500µl dependen de la cantidad de pellet, puede ser hasta 1000µl).
25. Centrifugar 5 minutos a 12000rpm y 4°C.
26. Descartar el sobrenadante.
27. Lavar con 500 µl de etanol centrifugando 5 minutos a 12000 r.p.m. y 4°C, despegar el pellet sin resuspender.
28. Secar en papel absorbente.
29. Resuspender en agua destilada estéril (200µl- 400µl) dependiendo de la cantidad del pellet.

ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

A. Preparación del gel de Agarosa:

1. Sellar con cinta de enmascarar los bordes abiertos de las bandejas de electroforesis.
2. Diluir la agarosa en Buffer TBE 0.5X.
3. Calentar el frasco, con la tapa floja, en un horno microondas o en una estufa hasta que la solución hierva durante 30 seg. dejar enfriar la solución hasta aproximadamente 50°C. Añadir Bromuro de Etidio a una concentración final de 0.5µg/ml, si no, continúe con el numeral 6.

PRECAUCION: El bromuro de Etidio es altamente cancerígeno.
debe usarse guantes para manipularlo.

4. Servir la solución de agarosa en la bandeja.
5. Eliminar todas las burbujas con la ayuda de un gotero o una punta plástica.
6. Colocar los peines adecuados (20 o 30 posos)
7. Dejar la agarosa en reposo hasta que polimerise completamente 15 minutos aproximadamente.
8. Retirar las cintas que sellan la bandeja.
9. Colocar la bandeja con el gel en la cubeta de electroforesis.
10. Cubrir el gel con Buffer TBE 0.5X.
11. Colocar las muestras mezcladas con buffer de carga dentro de cada poso y correr el gel al voltaje, amperaje y por el tiempo, previamente establecido de acuerdo a las necesidades.
12. En caso de que no se haya agregado Bromuro de Etidio en el paso 5, el gel debe teñirse en una solución de bromuro de Etidio al 1.0µg/µl por 10 min.

PRECAUCION: El bromuro de Etidio es altamente cancerígeno.
Debe usarse guantes para manipularlo.

13. Observar el gel en transiluminador de luz UV y tomar foto.

PRECAUCION: La luz ultravioleta es un agente mutagénico y peligroso para la piel y los ojos. Debe reducirse el tiempo de exposición al mínimo y usar máscaras para proteger cara y ojos.

Notas:

- 1) La agarosa debe diluirse completamente en el buffer mientras se calienta.
- 2) Al servir las muestras debe evitarse que se salgan del pozo.
- 3) Para evitar que las muestras se difundan en el gel, deben servirse rápidamente y entran en el gel con 200V aprox. Una vez dentro se utiliza 80 voltios constante hasta el final de la electroforésis.

El amperaje siempre debe ser un valor que este por debajo o muy cercano al del voltaje. Nunca debe superarlo.

CUANTIFICACION DE ADN POR FLUOROMETRIA

1. Encender el Fluorómetro 15 minutos antes de usarlo.
2. Llevar el botón de escala hacia la izquierda hasta el tope.
3. Devolver cinco vueltas hacia la derecha.
4. Con el botón del cero ajustar el cero.
5. Colocar la celda de modo que la G quede frente a Ud.
6. Llenar la celda con 2 ml de solución de trabajo.

PRECAUCION: El colorante que se utiliza es altamente tóxico. Trabaje siempre con guantes y evite el contacto con la piel.

7. Con el botón del cero ajustar el cero.
8. Añadir 2 μ l del patrón de ADN concentración 100 ng/ μ l.
9. Con pipeta de bulbo pipetear arriba y abajo hasta mezclar bien. cerrar la compuerta de la celda.
con el botón de escala ajustar la lectura hasta 100.
con la pipeta de bulbo sacar toda la solución.
10. Repetir desde el paso 6 hasta el paso 11.
11. Se debe ajustar el botón de escala hasta que al leer el patrón de 100ng/ μ l la lectura sea 100. En este momento el botón de escala no debe moverse más.
12. Repetir los pasos 6 hasta el 14 pero con el patrón de 25ng/ μ l.
13. Cuando la lectura sea de 25ng/ μ l no se debe mover más el botón de escala.
14. Leer nuevamente el patrón de 100ng/ μ l. En este paso la lectura debe ser de 100 ng/ μ l sin necesidad de mover el botón de escala.
15. Repetir los pasos del 6 al 10 con cada una de sus muestras.
16. Al terminar su lectura, lave bien la celda con alcohol.

Notas:

- 1) La celda debe limpiarse muy bien con un paño seco, antes de usarse.
- 2) Entre lectura y lectura debe ajustarse el cero en caso de que la lectura no sea cero debe sacar la solución, añadir solución nueva y leer el cero nuevamente.
- 3) Es muy importante tener cuidado de que la solución no caiga dentro del aparato.

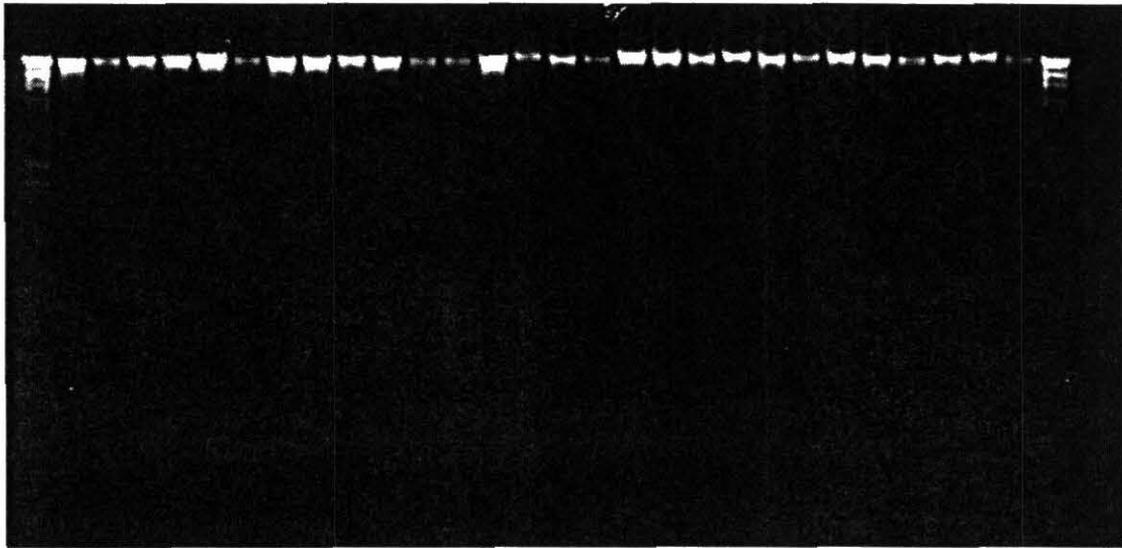


Figura 1. DNA total en gel de Agarosa al 1%

METODOLOGÍAS USADAS EN LA AMPLIFICACIÓN DE ADN

AMPLIFICACIÓN DE ADN UTILIZANDO LA TECNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

1. El procedimiento de PCR se debe hacer en la Cámara de Flujo Laminar y los reactivos deben estar en hielo.
2. Preparación del coctel de reacción, volumen usado por cada muestra

	Volumen (μ l)	[] inicial	[] final
Agua destilada estéril	15.375		
Buffer Taq Polimerasa	2.5	10X	1X
dNTPs	2.5	2mM	0.2mM
Primer 1	0.25	50 μ M	0.5 μ M
Primer 2	0.25	50 μ M	0.5 μ M
MgCl ₂	3.0	25mM	3.0mM
ADN	1.0	5ng/ μ l	5.0ng
Taq Polimerasa	0.125	5 U/ μ l	0.625 U

Volumen final 25 μ l

Buffer de la enzima Taq Polimerasa 10X (KCl 50mM, Tris-HCl 10mM [pH 8.3], Triton 0.1%.)

dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dTTP)

Primers (ITS-1, ITS-2, ITS-4, ITS-5)

3. Coloque la cantidad correspondiente de cada reactivo dentro de un tubo de Eppendorf que contenga la mezcla.
4. A partir del coctel de reacción coloque en tubos de PCR 20 μ l de la mezcla
5. Adicione a cada tubo 5 μ l de ADN cada muestra.
6. Amplifique en un Termociclador usando el programa correspondiente a cada organismo que se este analizando, ejemplo para el hongo *Phytophthora*
 1. 95°C durante 3 minutos
 2. 57°C durante 30 segundos
 3. 72°C durante 2 minutos
 4. 95°C durante 30 segundos
 5. 24 ciclos desde el paso número 2

6. 50°C durante 30 segundos
 7. 72°C durante 10 minutos
 8. 4°C indefinido
-
7. El producto amplificado se analiza en un gel de agarosa de 1.5% en tampón TBE 0.5X (Trizma-base, ácido bórico, EDTA [pH 8.0] y bromuro de Etidio 10mg/ml), se corre en voltaje constante 100V durante 2 horas.
 8. En cada gel se coloca un control de peso molecular, 100pb o 1kb.
 9. Se coloca el gel en un transiluminador con luz ultravioleta y se toma una fotografía.

DIGESTIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

1. Determinar el volumen final en el cual se va a realizar la digestión y la cantidad de ADN que se desea digerir
2. Determinar cuantas unidades de enzima son necesarias por mg de ADN a digerir.
3. Para hacer el análisis de restricción, se toman 5 μ l del producto amplificado de PCR y se le adicionan 2 μ l de Buffer de la enzima 10X y 1 μ l de la enzima de restricción
4. Se incuba durante 16 horas a 37°C
5. Se adiciona 3 μ l de Buffer de Carga
6. Se corre un gel de agarosa 1.5% con tampón TBE 1X y Bomuro de Etidio 10mg/ml
7. La electroforesis se corre durante 4 horas a 80V constante.
Para cada gel se incluye un marcador de peso molecular conocido (100pb y 1Kb)

AMPLIFICACION ALEATORIA DE FRAGMENTOS DE ADN (RAPD)

1. Preparación del coctel de reacción, volumen usado por cada muestra

	Volumen (μ l)	[] inicial	[] final
Agua destilada estéril	12.0		
Buffer Taq Polimerasa	2.5	10X	1X
dNTPs	2.5	2mM	0.2mM
Primer	1.25	10 μ M	0.5 μ M
MgCl ₂	2.5	25mM	2.5mM
ADN	4.0	5ng/ μ l	20.0ng
Taq Polimerasa	0.3	5 U/ μ l	1.5 U

Volumen final 25 μ l

Buffer de la enzima Taq Polimerasa 10X (KCl 50mM, Tris-HCl 10mM [pH 8.3], Triton 0.1%.)

dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dTTP)

Primers específicos

- Coloque la cantidad correspondiente de cada reactivo dentro de un tubo de Eppendorf que contenga la mezcla.
- A partir del coctel de reacción coloque en tubos de PCR 20 μ l de la mezcla
- Adicione a cada tubo 4 μ l de ADN cada muestra.
- Amplifique en un Termociclador usando el programa correspondiente a cada organismo que se este analizando, ejemplo para el hongo *Phytophthora*
 - 94°C durante 55 segundos
 - 94°C durante 35 segundos
 - 36°C durante 1 minutos
 - 72°C durante 2 minutos
 - 40 ciclos desde el paso número 2
 - 72°C durante 8 minutos
 - 4°C indefinido

6. El producto amplificado se analiza en un gel de agarosa de 1.4% en tampón TBE 0.5X (Trizma-base, ácido bórico, EDTA [pH 8.0] y bromuro de Etidio 10mg/ml), se corre en voltaje constante 70V durante 4 horas.
7. En cada gel se coloca un control de peso molecular 1Kb.
8. Se coloca el gel en un transiluminador con luz ultravioleta y se toma una fotografía.

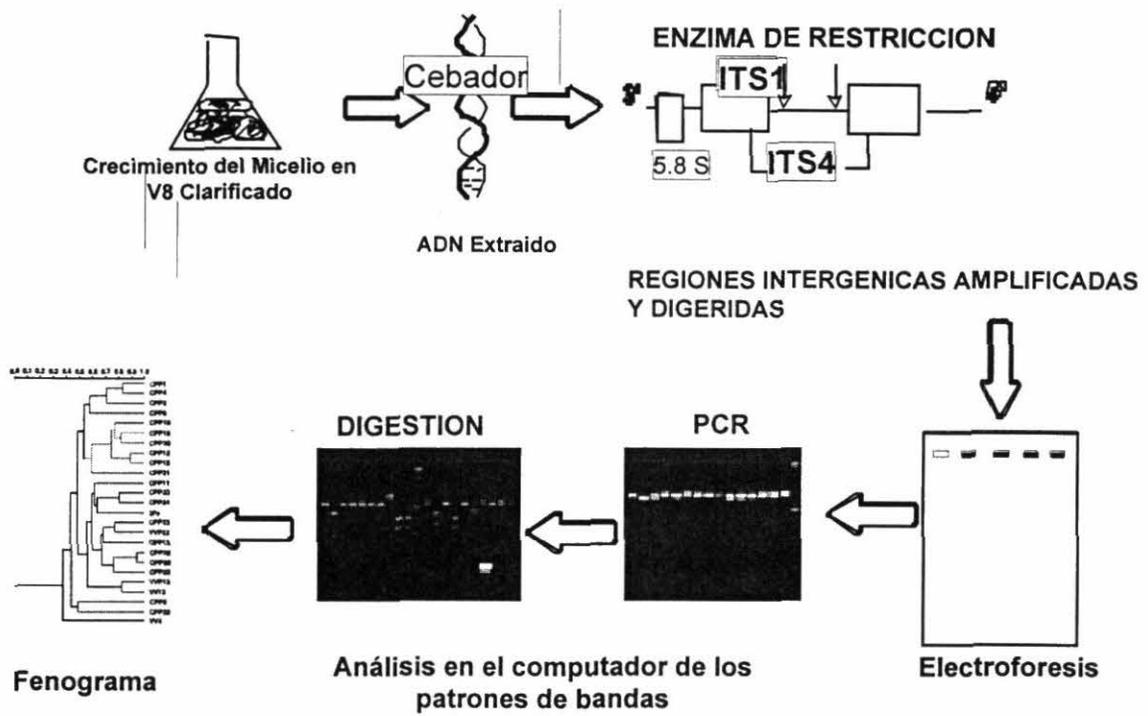


Figura 2. Diagrama de la metodología utilizada para PCR y Digestión

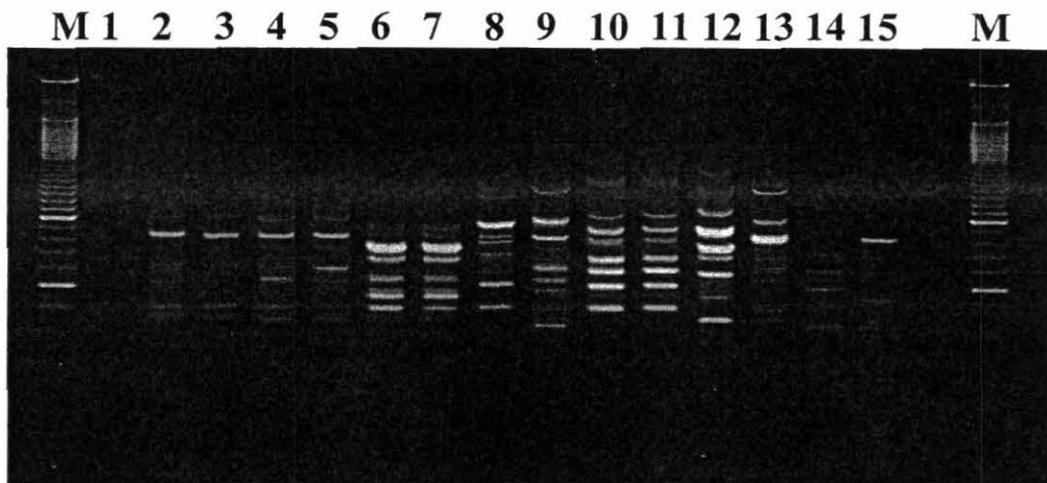


Figura 3. Amplificación de ADN de aislamientos de *Phytophthora* con el primer OPH-02 a utilizando RAPD

**MARCADORES MOLECULARES BASADOS
EN PCR**

POLIMORFISMOS DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLPs)

Para la técnica de AFLP (Polimorfismos de Fragmentos amplificados) se utiliza un Kit de reactivos específicos diseñado para microorganismos por Gibco BRL

1. Adicionar en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml.

	Control (μ l)	Muestra (μ l)
Buffer de Reacción 5X	5.0	5.0
ADN control (<i>E. coli</i>)	2.5	----
ADN de la muestra	----	<18
<i>Eco</i> RI/ <i>Mse</i> I	2.0	2.0
Agua Destilada Estéril	15.5	
Volumen Total	25.0	25.0

2. Las muestras se mezcla durante 3 segundos en la centrifuga
3. Incubar la mezcla por dos horas a 37°C
4. Incubar la mezcla durante 15 minutos a 70°C para inactivar la restricción de endonucleasas
5. Coloque los tubos en hielo durante un minuto y centrifugue por 3 segundos

Ligación de Adaptadores

1. Adicionar al producto de la digestión 24 μ l de solución de ligación de adaptadores y 1 μ l de T4 DNA ligasa
2. Mezclar despacio a temperatura ambiente e incubar a 20°C durante 2 horas
3. Llevar a una dilución de 1:10 de la mezcla de ligación y buffer TE
Tomar 10 μ l de mezcla de ligación y colocarlo en un tubo de microcentrifuga, adicionar 90 μ l de Buffer TE.
4. La mezcla sobrante de cada muestra guardarla a -20°C

Preamplificación

1. En un tubo de 0.2 a 0.5ml colocar los siguientes componentes

Producto de Digestión Ligación	5 μ l
Primer E-0	2.7 μ l
Primer M-0	12.0 μ l
Buffer 10X para PCR más Mg	5.0 μ l
Enzima Taq Polimerasa (1U/ μ l)	1.0 μ l
Agua Destilada Estéril	25.3 μ l
Volumen Total	51.0 μ l
2. Mezcle suavemente y centrifugue por 3 segundos
3. Amplifique en un Termociclador repitiendo 20 ciclos del siguiente programa
 1. 94°C durante 30 segundos
 2. 56°C durante 60 segundos
 3. 72°C durante 60 segundos
 4. 4°C indefinido
4. Hacer una dilución 1:50 a partir del producto amplificado de la siguiente manera: transferir a un tubo de PCR 3 μ l de producto y 147 μ l de Buffer TE
5. Este producto alcanza para 30 amplificaciones, el sobrante se guarda a -20°C

Amplificación Selectiva para AFLP

1. En un tubo de 1.5 ml preparar el **Mix 1** (para 10 muestras)

Primer <i>Eco</i> RI	5 μ l
Primer <i>Mse</i> I con dNTPs	45 μ l
Volumen Total	50 μ l
2. En otro tubo preparar el **Mix 2** (para 10 muestras)

Agua destilada Estéril	79 μ l
Buffer 10X para PCR más Mg	20 μ l
Enzima Taq Polimerasa (5U/ μ l)	1 μ l
Volumen Total	100 μ l
3. En un tubo de PCR se coloca 5 μ l del producto amplificado en los procesos anteriores, adicionando 5 μ l del **Mix 1** y 10 μ l del **Mix 2**
4. Mezclar suavemente y centrifugar por 3 segundos
5. Amplifique en un Termociclador el siguiente programa

1. Un ciclo de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos.
2. Bajar la temperatura 0.7°C para cada paso durante 12 ciclos
3. 23 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos.
4. Tiempo total de amplificación 2 horas 2 minutos
6. El producto del proceso total se denatura a 98°C durante y se coloca en hielo durante 5 minutos antes de sembrarlo en el gel de poliacrilamida.

ELECTROFORESIS Y TINCIÓN CON PLATA

1. Preparación del gel de poliacrilamida.

- 1.1 Lavar bien el vidrio donde va pegado el gel con alconox y una esponja exclusiva para esto. Limpiar 3 veces con etanol al 95% para remover los restos de alconox. Todo se realiza con Kimwipes. Tenga la precaución de usar guantes diferentes para este paso y el 1.4.
- 1.2 Preparar la solución de pegado así: 3 μ l de Bind Silane, 1 ml de ácido acético al 0.5% en etanol al 95%. Esparza bien el Bind por todo el vidrio con un kimwipe.
- 1.3 Esperar 5 minutos para que el Bind Silane se seque. Limpie suavemente 3 veces con etanol al 95% para remover el exceso de Bind Silane.
- 1.4 Lavar bien la cámara tres veces con etanol al 95%, aplicar con Kimwipes el Sigmacote. Esperar 5 minutos que el Sigmacote se seque.
- 1.5 Coloque los espaciadores y arme la cámara.
- 1.6 Sirva la acrilamida al 6% (120 ml). Adicione 199 μ l de TEMED y 500 μ l de Persulfato de Amonio al 10%.
- 1.7 Sirva el gel cuidadosamente, tratando de no formar burbujas. Coloque el gel horizontalmente y coloque con cuidado el peine de dientes de tiburón.
- 1.8 Deje polimerizar al menos una hora. Si lo deja más tiempo cubra con papel toalla húmeda y papel plástico.

2. Electroforesis del Gel de Poliacrilamida.

- 2.1 Adicione 2 litros de TBE 0.5X calentado previamente en microondas por 10 minutos a la cubeta de electroforesis y a la cámara que contiene el gel.
- 2.2 Limpie los residuos de acrilamida del peine con una jeringa. Remueva el peine y con la jeringa y el TBE limpie la línea donde van los pozos. Vuelva a colocar el peine pero ahora con los dientes hacia abajo.
- 2.3 Precorra el gel a 100 W, hasta que la temperatura llegue a 50° C. Deposite 2 μ l de solución stop en cada pozo para que las muestras no se pasen de un pozo al otro.
- 2.4 Prepare las muestras en una relación 4:1 (muestra: solución stop).
- 2.5 Denature las muestras a 94° C por 3 minutos e inmediatamente ponerlos en hielo.

- 2.6 Cuando se vayan a servir las muestras, con una jeringa remueva el exceso de urea en los pozos. Colocar de 3-4 μ l de las muestras de cada pozo, evitando demorarse mucho en este paso, debido a que el gel se puede enfriar mucho.
- 2.7 Corra el gel usando las mismas condiciones del precorrido, durante 1:45 minutos.

3. Tinción con plata.

- 3.1 Después de la electroforesis, se descarta el buffer con cuidado. Remueva el peine y desbarate la cámara. Separe la cámara del vidrio con cuidado. La cámara debe despegar fácilmente. El gel debe estar firmemente pegado al vidrio.
- 3.2 Coloque el gel en una cubeta y realice los siguientes pasos:

Paso	Solución	Tiempo (min.)
1	Solución de fijación	20
2	3 veces lavar con dH ₂ O	2-6
3	Solución de Tinción	30
4	Lavar con dH ₂ O	5 seg.
5	Solución Reveladora	2-10
6	Solución de Parada	5
7	Lavar con dH ₂ O	5

Los anteriores pasos deben realizarse en shaker.

- 3.3 Deje secar el gel toda la noche.

Composición de las soluciones:

- A.1 Solución de Acrilamida al 6% (2000 ml)

Reactivo	Cantidad
Acrilamida	114 gr
bis-Acrilamida	6 gr
TBE 10X	100 ml
UREA	900,9 gr
dH ₂ O	Complete a 2 lt

A.2 Acido Acético 0.5% - ácido en etanol al 95%.

Adicionar 1 ml de ácido acético glacial a 199 ml de etanol al 95%.

A.3 Persulfato de Amonio al 10%

Adicionar 1,0 gr de Persulfato de Amonio a 10 ml de dH₂O.

A.4 Solución de Revelado. 3.5 l.

Reactivo	Cantidad
Carbonato de Sodio	105 gr
Formaldehído 37%	4.5 ml
Tiosulfato de Sodio	650 µl
dH ₂ O	Complete a 3.5 lt

Preparar esta solución 1 hora antes de usar. Úsese bien frío.

A.5 Solución de Teñido. 3.5 lt.

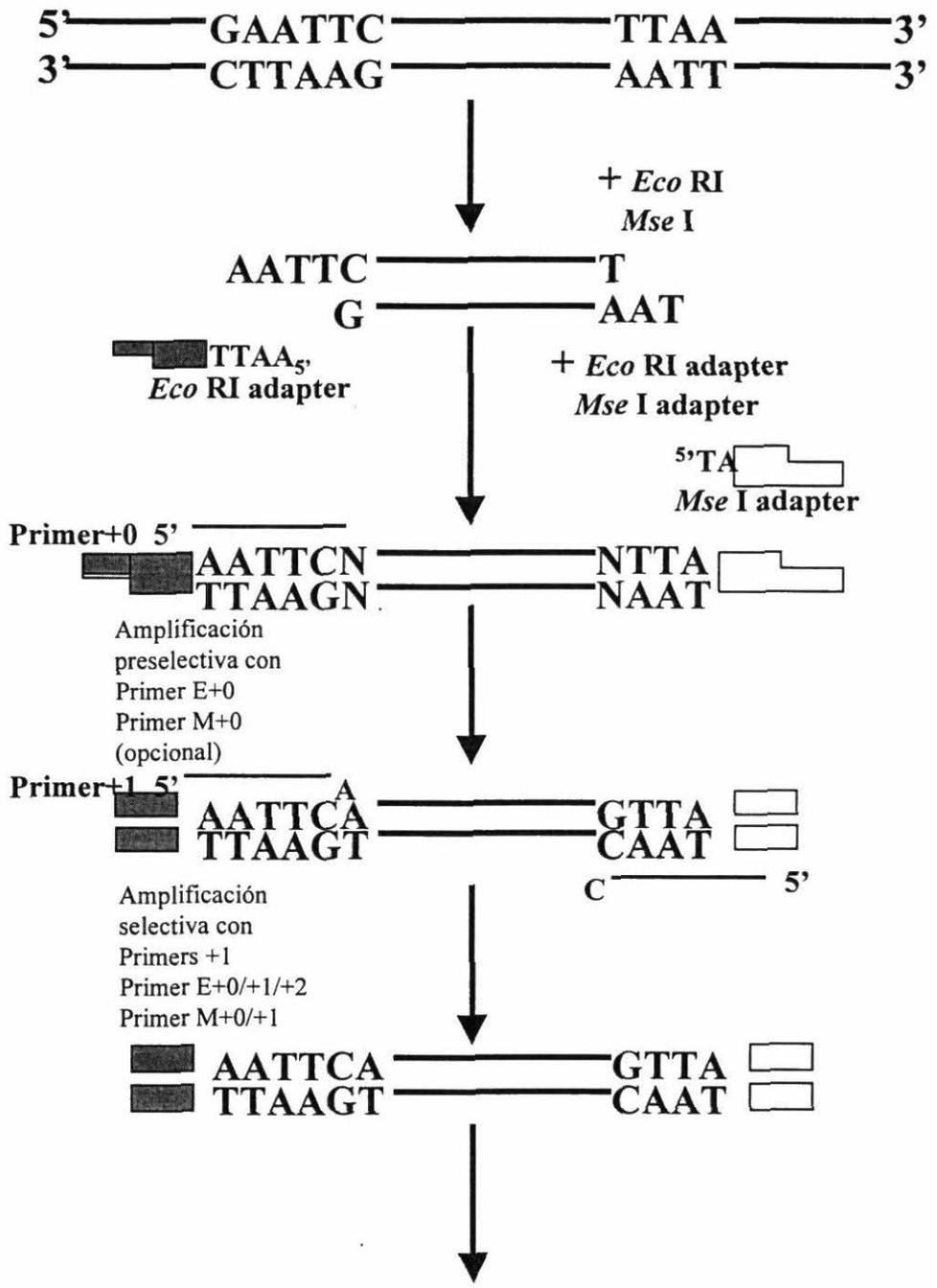
Reactivo	Cantidad
Nitrato de Plata (AgNO ₃)	3.5 gr
Formaldehído al 37%	4,5 ml
dH ₂ O	Complete a 3.5 lt.

A.6 Solución Fijadora y de Parada. 3.5 lt. Es mejor hacerlas separadas.

Acido Acético Glacial al 10%. 350 ml de AA + dH₂O

Tinción con Plata

- 1) 20 min. en solución fijadora (Acido Acético al 10%).
- 2) 2 min. lavado en agua. Tres veces.
- 3) 30 min. en la solución para teñir plata. 100 RPM tapar con cartones.
- 4) 10 seg. un lavado con agua
- 5) 5-10 min. en solución de revelado.
- 6) 5 min. en solución de parada. (Acido Acético al 10%).
- 7) 3-5 min. un lavado con agua.
- 8) Se deja secar.



Denaturación para Electroforésis en gel de Poliacrilamida

Figura 4. Diagrama de la metodología utilizada para AFLP

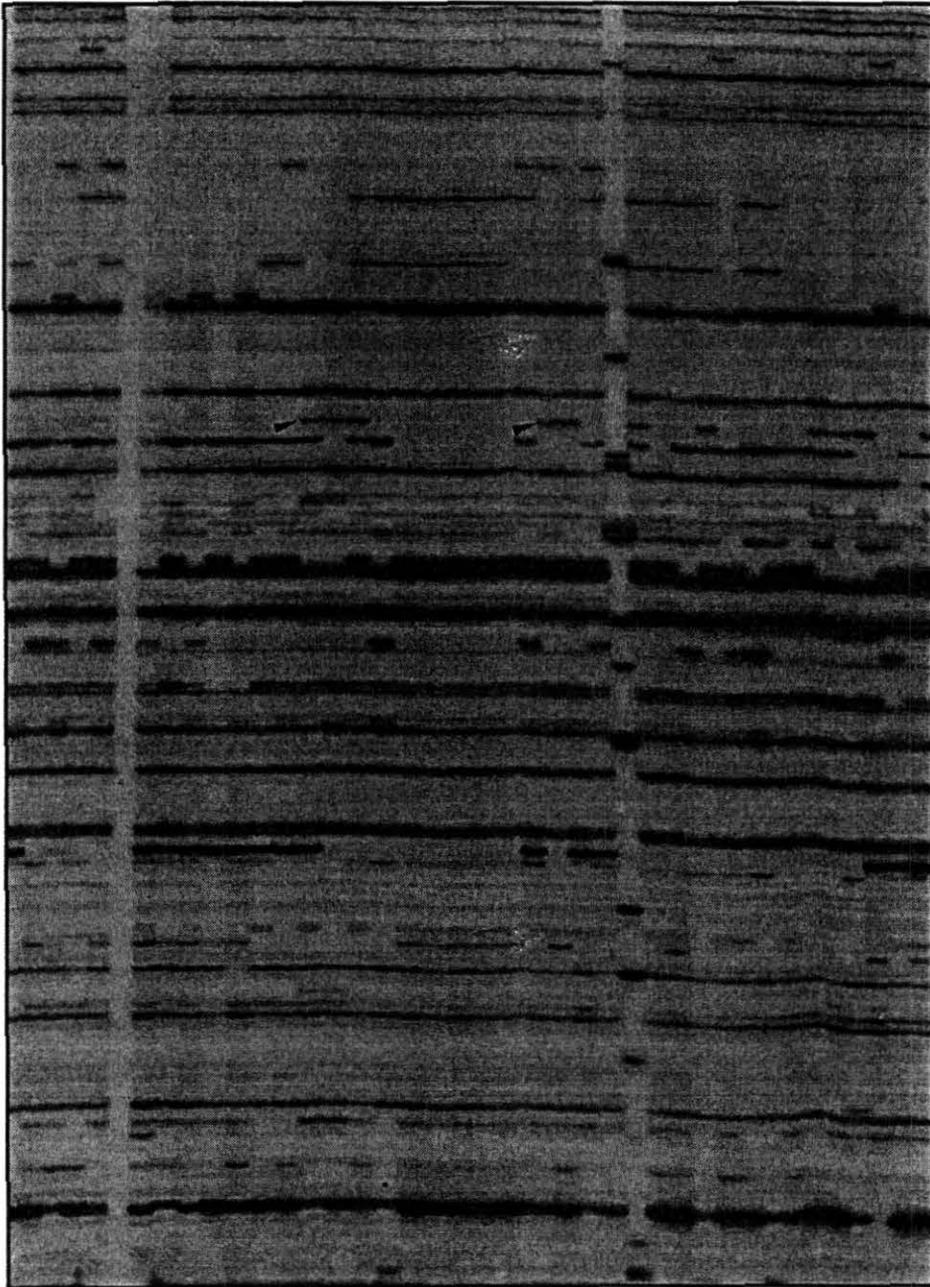


Figura 5. AFLP de ADN de yuca

CARACTERIZACION DE MICROSATELITES

A. Método No Radioactivo

1. Detección de Polimorfismos

1. Amplificar los microsátélites en las muestras de AND deseadas usando el protocolo descrito en la siguiente parte “ Condiciones de amplificación de material a evaluar ”, ajustando solamente la temperatura de alineamiento de acuerdo al Tm de los oligonucleótidos.
2. Usar geles de poliacrilamida al 10% para visualizar los productos de amplificación.

2. Condiciones de amplificación del material para evaluar

1. Amplificar 100 ng de DNA en un volumen final de 50 µl utilizando las siguientes condiciones:

dNTPs	0.2 mM
MgCl ₂	1.5 mM
One-Phor All Buffer 10 X	1 X
Taq Polimerasa	2.0-2.5 U
Primers	0.2 µU

2. Hacer el PCR en “touchdown, teniendo en cuenta la temperatura de alineamiento de cada primer. Iniciar con un annealing 10°C por encima de la temperatura de cada primer e ir disminuyendo 1°C por ciclo hasta llegar a la temperatura propia del *primer*.

94°C	3 min.
94°C	10 seg.
66°C (-1°C/ciclo)	1 min.
72°C	2 min.

Hacer 10 ciclos

94°C	10 seg.
56°C	1 min.
72°C	2 min.

Hacer 20 ciclos

72°C	10 min.
------	---------

3. Servir de 15 a 20 μ l del producto del PCR en el gel.

3. Electroforesis en gel de poliacrilamida

PRECAUCION

La acrilamida es un agente altamente neurotóxico. Por favor, use guantes y tapabocas. Además, trabaje en cámara de extracción cuando manipule el reactivo puro. Las soluciones deben manipularse con guantes.

Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1) 30%	16.6 ml
10X TBE	5.0 ml
Persulfato de Amonio 10% (recién preparado)	0.35 ml
H2O	28.0 ml
<i>Degasificar aplicando vacío durante 10 min.</i>	
Temed	0.04 ml
<i>Verter el gel y dejar polimerizar durante 1 h.</i>	

1. Cargar 15-20 μ l de muestra de ADN (PCR). Correr el gel en TBE 1X a 300 V por el tiempo requerido (aproximadamente, 2 h).
2. Teñir con bromuro de Etidio a una concentración de 1 μ g/ml durante 3 min.
3. Tomar foto.

Nota: Si no desea utilizar geles de poliacrilamida debido a su toxicidad, puede utilizar como alternativa (un poco más costosa) geles de Metaphor.

1. Adicionar el agarosa Metaphor al buffer TAE.
2. Llevar al autoclave durante 1 min. Usar las condiciones de esterilización para medios líquidos; esto ayuda a disolver el agarosa Mataphor sin producir burbujas.
3. Verter el gel y mantenerlo a 4°C durante 1 h, como mínimo.
4. Cargar 20 μ l de muestra en el gel y correrlo a 100 V durante el tiempo requerido.
5. Teñir el gel con bromuro de Etidio.
6. Tomar foto.

CARACTERIZACION DE MICROSATELITES

B. Método Radioactivo

1. Detección de Polimorfismos

1. Amplificar los microsátélites en las muestras de AND deseadas usando el siguiente protocolo, y ajustando únicamente la temperatura de alineamiento en el PCR, de acuerdo al T_m de los oligonucleótidos.

2. Marcaje del *Primer*

1. Hacer marcación del forward primer según las siguientes condiciones:

Forward primer	4 μ M
One-Phor-All buffer 10X	1X
[γ^{32} P] dATP (3000 Ci/mmol)	0.1 μ l
T4 PNK	2 U

ADVERTENCIA

Todo trabajo que implique uso de material radioactivo debe realizarse bajo las estrictas normas de seguridad establecidas. Cualquier persona que manipule material radioactivo debe hacer tomado un curso preparatorio; además, debe contar con la debida autorización.

2. Incubar durante 30 min. a 37°C.
3. Inactivar la enzima durante 10 min. a 70°C.

3. Amplificación

1. Hacer el PCR en “touchdown”, teniendo en cuenta la temperatura de alineamiento de cada primer. Iniciar con un annealing 10°C por encima de la temperatura de cada *primer* e ir disminuyendo 1°C por ciclo hasta llegar a la temperatura propia del *primer*.
2. Preparar coctel de reacción:

Buffer PCR 10X	1X
----------------	----

MgCl ₂	1.5 mM
<i>Reverse Primer</i>	0.2 μM
dNTP's	0.2 mM
<i>Forward Primer</i> [γ32P]	0.1 μM
Taq polimerasa	1 U
AND	50 ng

3. Colocar las muestras en un PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) y correr PCR con las siguientes condiciones:

94°C		3 min.
94°C		10 seg.
66°C (-1°C/ciclo)		1 min.
72°C		2 min.
	<i>Hacer 10 ciclos</i>	
94°C		10 seg.
56°C		1 min.
72°C		2 min.
	<i>Hacer 20 ciclos</i>	
72°C		10 min.

4. Electroforesis en gel de poliacrilamida

PRECAUCION

La acrilamida es un agente altamente neurotóxico. Por favor, use guantes y tapabocas. Además, trabaje en cámara de extracción cuando manipule el reactivo puro. Las soluciones deben manipularse con guantes.

1. Para montaje y corrida de los geles ver indicaciones descritas en la sección de AFLPs.
2. Preparar Acrilamida (19:1) 7% Urea 7.6 M
3. Mezclar

Acrilamida 7% (19:1)	120 ml
TEMED	120 μl
Persulfato de Amonio 10%	120 μl

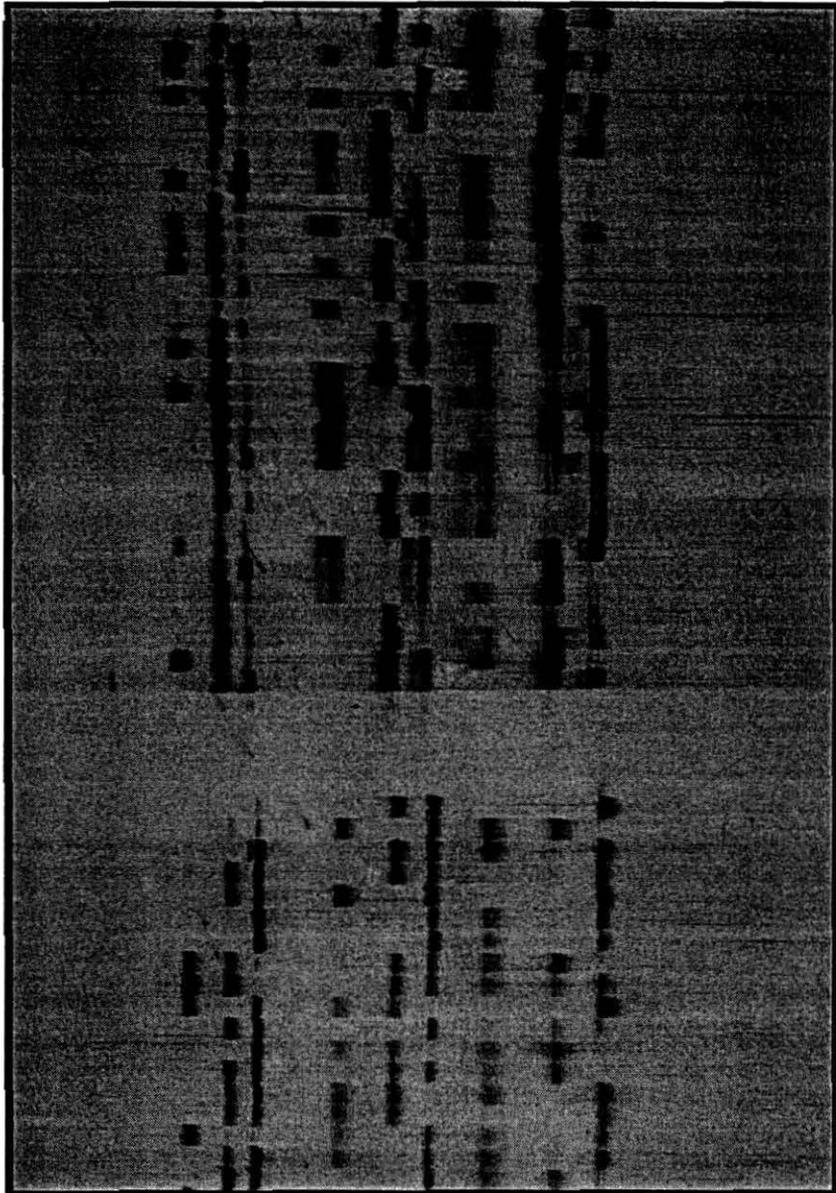


Figura 6. Microsatélites en yuca

CLONAJE DE GENES

Clonación del gen Mat 2 de *Ceratocystis paradoxa*

Extracción de ADN

1. Tomar crecimiento micelial de los aislamientos (medio líquido con 2% de Extracto de Malta y 1% de Extracto de Levadura).
2. Filtrar a través de papel Wathman No. 1 con la ayuda de una bomba de vacío
3. Macerar el micelio en Nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y seco
4. Tomar el micelio macerado y adicionar 10ml del Buffer de Extracción. (Calentado previamente a 65°C).
5. Se Mezcla por inversión y se lleva a -2°C
6. Incubar a 65°C durante 30-60 minutos
7. Colocar 500µl del sobrenadante en un tubo Eppendorf
8. Adicionar 0.4 Volúmenes de Acetato de Potasio 5M (a 4°C) mezclando bien.
9. Coloque en hielo por 20 minutos
10. Centrifugar por 15 minutos a 13.200 r.p.m.
11. Recuperar el sobrenadante cuidando de no tocar la interfase y descartar el pellet.
12. Precipitar con 0.58 volúmenes de Isopropanol frío.
13. Mezclar por inversión y dejar precipitando por 30 minutos a -2°C
14. Centrifugar durante 10 minutos a 13.200 r.p.m. descartando posteriormente el sobrenadante
15. Adicionar al pellet 1.5ml de etanol al 70% y colocarlo a -20°C.
16. Almacenar durante 30 a 60 minutos o dejar durante la noche a -20°C
17. Centrifugar durante 10 minutos a 13.200r.p.m. descartar el sobrenadante
18. Centrifugar rápidamente y extraer el exceso de alcohol
19. Se seca el pellet por 10 minutos en una campana de vacío o por una hora a temperatura ambiente
20. Resuspender el pellet en 100µl de 10mM TE pH 8.0
21. Se deja durante 30 minutos y se mezcla suavemente
22. Se deja en reposo durante otros 30 minutos antes de Utilizar el ADN.

PCR Mix

1. Preparación del Coctel de reacción, volumen usado por cada muestra

	Volumen (μ l)
Agua destilada estéril	62.5
MgCl ₂	16.0
Buffer Taq Polimerasa	10.0
dNTPs	10.0
Hmg1 (50 μ M)	0.5
Hmg2 (50 μ M)	0.5
Taq polimerasa (5 U/ml)	0.5

Volumen final del coctel 100 μ l

Buffer de la Enzima Taq polimerasa 10X (KCl 50mM, Tris-HCl 10mM [pH 8.3], Tritón 0.1%)

dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)

2. Coloque la cantidad correspondiente de cada reactivo dentro de un tubo Eppendorf.
3. A partir del coctel de reacción coloque en tubos de PCR 100 μ l de la mezcla.
4. Adicione a cada tubo 5 μ l de ADN de cada muestra
5. Amplifique en un Termociclador usando el programa correspondiente a cada organismo que se este analizando. Ejemplo para el Hongo *Ceratocystis paradoxa* con primers Degenerados.
 1. 95°C durante 1 minuto 35 segundos
 2. 95°C durante 35 segundos
 3. 52°C durante 30 segundos
 4. 72°C durante 1 minuto
 5. 35 ciclos del paso 2 al 4
 6. 72°C durante 20 minutos
6. El producto amplificado se analiza en un gel de Agarosa de 1.5%, en tampón TBE 0.5X (Trizma-base, ácido bórico, EDTA [pH 8.0] y Bromuro de Etidio 10mg/ml), se corre en voltaje constante 100V durante 2 horas.
7. En cada gel se coloca un control de peso molecular, 1kb

8. Se coloca el gel en un transiluminador con luz Ultravioleta y se toma una fotografía.

PURIFICACION DE PCR (Kit PCR purification System. Gibco Cat 11458-015)

Antes de iniciar, precalentar una alícuota de Buffer TE a 65 - 70°C. Verificar que al Buffer de lavado (H2), se le adicionó alcohol.

1. Se toman 100 µl de producto PCR en un tubo de 1.5 ml
2. Agregar 4 volúmenes de solución de ligamiento (H1) y mezclar suavemente. Si se ha usado aceite no es necesario removerlo.
3. Se toma toda la mezcla y se pasa a los tubos spin column, que se ha colocado previamente dentro del tubo colector de 2 ml.
4. Centrifugar a 13200 r.p.m. durante 60 seg.
5. Se elimina la solución del tubo colector y se coloca de nuevo el spin column dentro del mismo tubo colector.
6. Lavar el filtro del spin column con 700 µl de buffer de lavado (H2), al cual previamente se le ha agregado alcohol, centrifugando a 13200 r.p.m. por 1 minuto.
7. Se elimina la solución del tubo colector y centrifugar de nuevo por 1 min, para eliminar el buffer residual.
8. Se pasa el spin column a un tubo eppendorf de 1.5 ml, que se le ha cortado previamente la tapa.
9. Agregar 50 µl de buffer TE previamente calentado a 65 - 70°C, sobre el centro del filtro sin tocarlo con la punta de la pipeta. Dejar en reposo durante 1 minuto y centrifugar a 13200 r.p.m. durante 2 min. (En caso de requerir alta concentración de ADN se utilizan 30 µl de buffer TE).
10. Tapar los tubos eppendorf y eliminar los spin column.
11. Ver el producto amplificado en un gel de Agarosa al 1.5%. Voltaje 80V.
12. Se identifica la banda de 300pb, comparando con el control de 1kb (banda diferencial entre el Mat 1 y el Mat 2).

Aislamiento de las Bandas (Kit: Gel Extraction Cat. 28704 Qiagen)

Este protocolo esta diseñado para extraer y purificar DNA de 70pb a 10kb.

Nota: Agregar Etanol del 96 al 100%, al Buffer PE antes de usarlo. Se requiere Isopropanol (100%) y baño de María a 50°C.

1. Extraer el fragmento de DNA mediante un bisturí limpio y nuevo
2. Pesar el fragmento de gel que se ha colocado en un tubo Eppendorf de 1.5ml. Adicionar 3.0 volúmenes de Buffer QG a un volumen del gel (100mg = 100 μ l). Por ejemplo adicionar 300 μ l de Buffer QG a cada 100mg de gel
3. Incubar a 50°C durante 10 minutos, o hasta que el gel se haya disuelto completamente. Para ayudar a disolver el gel, mezclar con vórtex cada 2 a 3 minutos durante la incubación. La Agarosa se debe solubilizar completamente.
4. Chequear que el color de la mezcla sea amarillo (similar al Buffer QG). Si el color de la mezcla es naranja o violeta, agregar 10 μ l de Acetato de Sodio 3M pH 5.0 y mezclar. El color de la mezcla debe tornarse amarillo.
La adsorción de DNA a la membrana del spin column es eficiente sólo a pH menor o igual a 7.5.
5. Adicionar Isopropanol en cantidad igual a un volumen de la muestra del gel cortado. Por ejemplo si la banda de Agarosa es de 100mg adicionar 100 μ l de Isopropanol
6. Colocar los tubos spin column en tubos de 2ml
7. Para ligar el DNA aplicar la muestra al spin column y centrifugar a 13.200 r.p.m. durante 1 minuto.
8. Descartar el líquido que pasa a través de la membrana y colocar el spin column de nuevo en el mismo tubo.
9. Para lavar, agregar 750 μ l de Buffer PE al spin column y centrifugar a 13.200 r.p.m. durante 1 minuto.
10. Descartar el líquido que pasa a través de la membrana y centrifugar nuevamente el spin column durante un minuto a 13.200 r.p.m. con el fin de eliminar el etanol residual.
11. Colocar el spin column en un tubo de 1.5ml al que se le ha cortado previamente la tapa
12. Para eluir el DNA agregar 50 μ l de Buffer EB (10mM de Tris-HCl pH 8.5) o agua, al centro de la membrana del spin column sin tocarla. Centrifugar a 13.200 r.p.m. durante un minuto.
Alternativamente para incrementar la concentración del DNA, agregar 30 μ l de Buffer de elución al centro de la membrana, dejando reposar por un minuto y centrifugar durante un minuto a 13.200 r.p.m.
13. Conservar a -20°C hasta el momento de la ligación.

Ligación (pGEM -T and pGEM -T Easy Vector Systems Promega)

1. Se adiciona en un tubo de PCR los siguientes reactivos en su orden correspondiente, manteniendo en hielo mientras se pipetea.
2. Buffer de ligación: 5 μ l. Mezclar vigorosamente en un vórtex antes de colocarlo en el tubo
3. 1 μ l de Vector (pGEM-T easy Vector), previamente centrifugado por 5 seg a 5000 rpm.
4. Después se adiciona en orden 3 μ l del Producto del PCR previamente purificado y 1 μ l T4 DNA ligasa
5. Se mezcla todo con la pipeta y se conserva a 4°C durante toda la noche. Alternativamente se pueden incubar las reacciones por una hora a temperatura ambiente, pero se disminuye el número de transformantes.

Transformación (pGEM -T and pGEM -T Easy Vector Systems Promega)

1. Las muestras a las que se les realizó la ligación se les da un spin por 10 segundos. Mantener en hielo.
2. Se coloca 4 μ l de cada muestra en el fondo de un tubo Falcon de polipropileno de 15 ml
3. Las Células competentes (JM109 High Efficiency competent Cell de Promega) conservadas en el ultrafreezer a -80°C, se sacan en hielo por cinco minutos previamente, para descongelar un poco, antes de colocarla con la muestra respectiva.
4. Colocar 50 μ l de las células competentes en el fondo del tubo y mezclar suavemente con la pipeta
5. Las muestras se dejan por 18 minutos en hielo, teniendo la precaución de mezclarlas con toques suaves cada 2 minutos, sin dejar que se adhieran gotas de la suspensión, a las paredes del tubo.
6. Se colocan todas las muestras en una gradilla de icopor para realizar un choque de temperatura. Se colocan en un baño de María a 42°C durante 50 segundos (exactamente).
7. Se saca inmediatamente la gradilla y se coloca por 2 minutos en hielo
8. Adicionar a cada muestra 950 μ l de medio SOC líquido. Hacer un tubo control.
9. Los tubos se colocan en un Shaker a 150 r.p.m. durante 1 hora y media, con temperatura constante de 37°C

10. Mientras se incuban las bacterias, media hora antes de terminar, se alistan los platos de cultivo. En platos de medio LB sólido se adiciona 4µl de IPTG (200mg/ml) y 20µl de XGAL, frotando los reactivos de manera uniforme sobre el medio, con una L de vidrio, sin romper el medio. Los platos de medio se dejan secar a temperatura ambiente en la cámara de flujo laminar.
11. De cada tubo de muestra se siembra en dos platos con LB preparados en el paso anterior, colocando 100µl de cada muestra por plato y se raya uniformemente sobre la superficie, mediante una L de vidrio.
12. Las cajas se incuban a 37°C por 16 a 24 horas
13. La bacteria sobrante de los tubos Falcon se puede almacenar a 4°C.
14. Después de las 24 horas se selecciona en cada plato de cultivo las colonias blancas, marcándolas y numerándolas. Las colonias blancas son las que tienen los insertos, las azules no. Las cajas se pueden almacenar a 4°C hasta su uso.

Aislamiento del Plásmido (Concert Rapid Plasmid Purification Systems, Gibco Cat. 11453-024)

PRECAUCION: Todo el trabajo que involucre cultivo de bacterias, debe realizarse en cámara de flujo laminar y siguiendo todas las normas de bioseguridad establecidas.

Precalentar una alícuota de Buffer TE a 65-70°C. Verificar que la RNAsa A se ha agregado al buffer de suspensión de celular (G1) y que no se haya formado precipitado en la solución de lisis de células (G2). Verificar que el Etanol se ha agregado al Buffer de Lavado (G4).

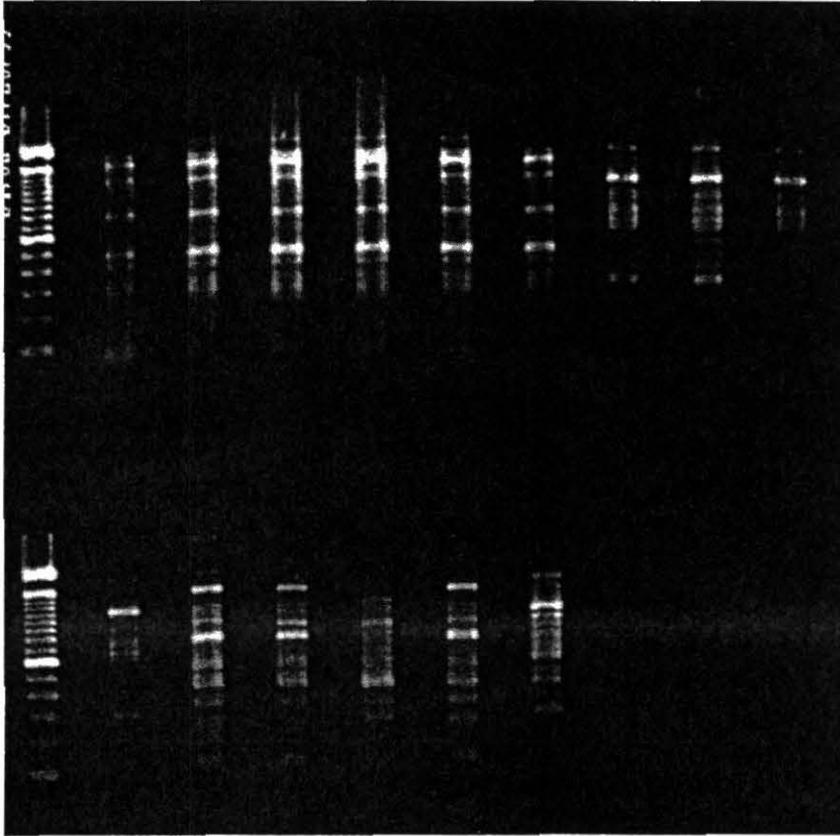
1. Cada colonia seleccionada es llevada a un tubo con 5ml con medio LB líquido con ampicilina (1ml por litro del medio; Ampicilina stock de 100mg/ml). Con la punta de la pipeta se toma la colonia transformada y se deposita suavemente en el medio, mezclando con la misma punta de la pipeta.
2. Se incuba a 37°C en el Shaker durante 15 horas.
3. Recuperación de células: Centrifugar a 3.100 r.p.m. durante 5 minutos. Remover el sobrenadante.
4. Suspensión de células: Agregar al pellet 210µl de Buffer para suspensión de células (G1), el cual contiene la RNAsa A. Suspender las células hasta obtener una solución homogénea.

5. Lisis de células: Agregar 210 μ l de solución de lisis de células (G2). Mezclar suavemente mediante inversión 5 veces. No dar vórtex. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
6. Neutralización: Agregar 280 μ l de Buffer de neutralización (G3) y mezclar inmediatamente mediante inversión por 5 veces. No dar vórtex. Centrifugar la mezcla a 13.200 r.p.m. durante 10 minutos.
7. Colocar un spin column en un tubo de 2ml. Cargar el sobrenadante del paso anterior en el spin column. Centrifugar a 13.200 r.p.m. durante un 1 minuto. Descartar el líquido que pasa a través del filtro.
8. Lavado: Colocar de nuevo en el tubo de 2 ml y agregar 700 μ l al spin column de Buffer de lavado (G4), al cual se le ha agregado previamente alcohol. Centrifugar a 13.200 r.p.m. durante 1 minuto. Descartar el líquido que pasa a través del filtro. Centrifugar nuevamente a 13.200 r.p.m. por 1 min, para remover el Buffer de lavado residual.
9. Elución del plásmido: Colocar el spin column en un tubo de 1.5ml al que se le ha cortado previamente la tapa. Agregar 75 μ l de Buffer TE previamente calentado a 65-70°C, directamente al centro del spin column sin tocar el filtro con la punta de la pipeta. Incubar a temperatura ambiente por un minuto y centrifugar a 13.200 durante 2 minutos.

Restricción con Eco RI

1. Se prepara un coctel por muestra de 14 μ l de agua, 2 μ l del Buffer de la Enzima 10X y 1 μ l de la enzima de restricción.
2. Se adiciona 3 μ l del producto del Miniprep del plásmido
3. Se incuba durante 1 hora a 37°C en el Termociclador
4. Se corre en un gel de Agarosa 1.5% con tampón TBE 1X y Bromuro de Etidio 10mg/ml
5. La electroforesis se corre durante 2 horas a 80V constante.

1.



2.

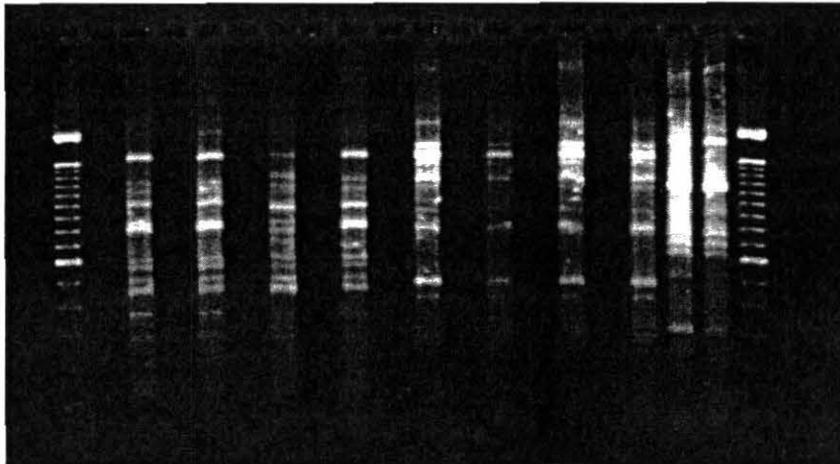


Figura 7. Identificación de la banda a Clonar en un PCR con Primers degenerados HMG 1 y HMG2

ANEXOS

ANEXO, BUFFERS Y MEDIOS

BUFFER PARA PCR 10X

KCl	500 mM
Tris-HCl pH 8.8	100 mM
Tritón X-100	1 %

BUFFER TNE 10X

En 800 ml de agua destilada disolver:

Tris Base 12.1 gr

EDTA-Na₂ 3.7 gr

NaCl 58.4 gr

Ajustar el pH a 7.4 con HCl

Completar con agua destilada hasta 1000 ml

Filtrar y almacenar a 4°C.

BUFFER PARA FLUOROMETRIA

Para medir muestras de DNA entre 100ng/ml y 2000ng/ml

Solución stock Hoechst: 1mg/ml:10µl

10X TNE 10 ml

Agua destilada estéril 90 ml

BUFFER TBE 10X

Para 1000 ml:

Tris Base 108 g

Acido Bórico 55 g

EDTA 0.5M pH 8.0 40 ml

Completar el volumen con agua destilada

TE

Para 500 ml mezclar:

Tris-HCl 1M pH 8.0 5 ml

EDTA 0.5M pH 8.0 1 ml

Completar el volumen con agua destilada.

Autoclavar y guardar a 4°C.

T50 - E10

Para 500 ml mezclar:

Tris-HCl 1M pH 8.0 25 ml

EDTA 0.5M pH 8.0 10 ml

Completar el volumen con agua destilada

Autoclavar y guardar a 4°C

MEDIO LIQUIDO LB

A 950 ml de agua deionizada agregar:

Bacto triptona 10 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl 10 g

Disolver

Ajustar pH a 7.0 con NaOH

Completar volumen a 1000 ml con agua destilada

Autoclavar

STET BUFFER

NaCl 0.1 M

Tris-HCl pH 8.0 10 mM

EDTA pH 8.0 1 mM

Tritón X-100 5 %

BUFFER DE EXTRACCION

Tris-HCl pH 8.0 150 mM

EDTA 15 mM

NaCl 1 M

CTAB 1.5%

B-Mercaptoetanol 1.2%

PVP 1 %

El B-Mercaptoetanol y el PVP se agregan justo antes de usar el buffer.

**BUFFER DE EXTRACCION
(YUCA)**

Tris-HCl pH 8.0	100 Mm
EDTA pH 8.0	50 mM
NaCl	500 mM

Autoclavar
Agregar:

B-Mercaptoetanol	10 mM
PVP	1 %

HCl 2.5N

Para 500 ml tomar 104.2 ml de HCl al 37%
Completar el volumen con agua destilada.

PRECAUCION: El HCl es un ácido fuerte. Debe trabajarse en cámara de extracción, con guantes y evitar respirar los vapores.

NaCl 5M

Para 1000 ml disolver 292.2 g NaCl (PM 58.44)
Autoclavar.

BLUE JUICE

Preparar una solución con Azul de Bromofenol 0.25% y
Glicerol en Agua 30%.
Almacenar a 4°C.

EDTA 05M pH 8.0

Para preparar 1 litro de EDTA (0.5M)
EDTA 186.1 g
NaOH 18 g

Medir pH 8.2, autoclavar.

NaOH 10N

Para preparar 1 litro pesar 400gr de NaOH y disolverlo en 800ml de agua.

Cuando esté completamente disuelto, completar el volumen a 1 litro.

20X SSC

Para 1 litro mezclar:

NaCl: 175.3 g

Acido Cítrico 88.2 g

Trisódico:

Llevar a pH 7.0 con HCl. (1M)

Autoclavar.

SDS 20%

Para preparar 2 litros de SDS al 20% disuelva:

400 gr de SDS en 1600 ml de Agua destilada. Cuando esté completamente disuelto lleve a volumen de 2 litros.

Tris-HCl 1 M

En 800ml de Agua destilada estéril disolver 121.1 gr de Tris-base

Ajustar el pH deseado adicionando HCl concentrado:

PH	HCl
7.4	70ml
7.6	60ml
8.0	42ml

Ajustar volumen a 1000ml.

Autoclavar.

PRECAUCION: El HCl es un ácido fuerte. Debe trabajarse en cámara de extracción, con guantes y evitar respirar los vapores.

ACETATO DE AMONIO 2M

En 350ml de Agua destilada-disolver 77.08gr de Acetato de Amonio

Completar el volumen a 500ml

Autoclavar

ACETATO DE POTASIO 5M

En 900ml de Agua destilada disolver 490.75gr de Acetato de Potasio.
Ajustar volumen a 1000ml
Autoclavar

RNAsa 10mg/ml

Disolver RNAsa pancreática (RNAsa A) a una concentración de 10mg/ml en 10mM de Tris-HCl pH 7.5 y 15mM de NaCl.
Calentar a 100° C por 15 minutos.
Enfriar a temperatura ambiente
Dispensar en alícuotas y almacenar a -20°C.

ACETATO DE SODIO 3M

En 900ml de Agua destilada disolver 408.1 gr de Acetato de Sodio
Ajustar el pH a 5.2 con Acido Acético Glacial
Completar volumen a 1000ml
Autoclavar

BROMURO DE ETIDIO 10mg/ml

En 100ml de Agua disolver 1 gr de Bromuro de Etidio.
Almacene en botella oscura y a 4°C.
PRECAUCION: El bromuro de Etidio es altamente mutagénico y moderadamente tóxico. Use guantes cuando trabaje con soluciones que contienen este colorante y use máscara cuando trabaje con el reactivo puro.

LISOZIMA 50mg/ml

En 1ml de Agua destilada disolver 50mg de lisozima.
Almacenar a -20°C.
Descartar cada alícuota que use.

FENOL: CLOROFORMO: OCTANOL (25:24:1)

Para preparar un litro mezcla:

Cloroformo 480ml

Octano 20ml

Fenol Equilibrado 500ml

PRECAUCION: El fenol es altamente tóxico. Causa quemaduras severas e intoxicación por inhalación. Siempre que lo use trabaje en cámara de extracción, use guantes y evite cualquier contacto con la piel.

CLOROFORMO-OCTANOL 24:1

Para 500ml mezcla:

Octanol 20ml

Cloroformo 480ml

PRECAUCION: El cloroformo debe manipularse en cámara de extracción, con guantes.

EXPERMIDINA 40mM

Pesar 58.2 mg y llevar a 10 ml con Agua destilada.

CTAB 10%

Para 1000 ml pesar 100 g de CTAB.

AMPICILINA 10 mg/ml

Para 10 ml pesar 100 mg de Ampicilina.

EQUILIBRAR FENOL

500 gr Fenol sólido

300 ml 30 mM NaCl hirviendo

10 gr Trizma base

0.5 gr Hidroxiquinolina

Limpiar con 300 ml de Tris-HCl 0.5M pH:8.0

PRINCIPIO QUIMICO DE ALGUNOS REACTIVOS

FENOL

Tóxico por inhalación y contacto con la piel. Debe usarse en cámara de extracción, evitarse el contacto con piel, ojos y ropa y debe lavarse muy bien el material.

El fenol, hidroliza las uniones polipeptídicas de las proteínas, denaturándolas; se usa en la purificación de ácidos nucleicos puesto que las proteínas tienen mayor afinidad por la fase fenólica que por la fase acuosa.

CLOROFORMO

Solvente que evita la precipitación de proteínas denaturadas de naturaleza hidrofóbica. Remueve residuos de fenol presentes en la muestra y disuelve componentes orgánicos como clorofila e hidroxifenoles.

ACRILAMIDA

La acrilamida y la bis-acrilamida son altamente tóxicos. Debe evitarse el contacto con ojos, piel y ropa; usarse en áreas ventiladas y lavar con abundante agua el material contaminado.

El gel de poliacrilamida resulta de la polimerización de monómeros de acrilamida en cadenas largas, intercalados con bis-acrilamida; la reacción es iniciada por Persulfato de Amonio y acelerada por TEMED.

DTT (DITIOREITOL)

Es una sustancia altamente tóxica. Debe evitarse el contacto con ojos, piel y ropa y debe usarse en áreas ventiladas.

Reduce disulfuros en sus correspondientes tioles; a bajas concentraciones se puede usar en buffers de reacción para mantener la actividad enzimática y a altas concentraciones disocia disulfuros en polipéptidos, lo cual facilita la denaturación por detergentes.

AGAROSA

Es un polímero lineal. El gel de agarosa es una matriz cuya densidad es determinada por la concentración de la agarosa; la electroforesis en geles de agarosa se utiliza para separar fragmentos de ADN, así al aplicarse un campo eléctrico a través del gel, el ADN cargado negativamente a un pH neutro, migra hacia el ánodo. La rata de migración está dada por parámetros como tamaño molecular del ADN, concentración de agarosa, conformación del ADN, voltaje, buffer de corrida, etc.

BROMURO DE ETIDIO

Colorante fluorescente que contiene un grupo planar que se intercala entre las bases del ADN. La radiación ultravioleta a 254nm es absorbida por el ADN y transmitido al colorante; la radiación a 302nm y 366nm es absorbida por la unión del colorante y en ambos casos la energía se remite a 590nm en la región visible del espectro rojo-naranja.

BLUE JUICE

Buffer de carga que incrementa la densidad de la muestra, da color a la misma y además en un campo eléctrico el colorante se mueve hacia el ánodo a ratas predecibles.

DETERGENTES

SDS (Dodecil sulfato de sodio)

Detergente aniónico. Actúa como agente solubilizante de proteínas y componentes de tejidos y membranas.

CTAB (Bromuro de cetil trietil amonio)

Detergente catiónico fácilmente removible por dilución que permite la solubilización de compuestos tipo polisacárido.

Tritón X-100

Detergente no iónico, polar, específico para disolver componentes de membranas y tejidos de difícil disolución en SDS.

Lauril-sarcosine

Detergente aniónico semejante al SDS, pero que inhibe hexoquinasas.

ALCOHOLES

Etanol

Utilizado en la precipitación del ADN, ya que reduce la constante dieléctrica del solvente.

Isopropanol

Ayuda y/o reemplaza el etano en su función de precipitar el ADN.

Alcohol isoamílico

Actúa como un agente antioxidante; impide o disminuye la formación de interfaces durante la extracción de ADN.

Mercaptoetanol

Escinde enlaces disulfuro de modo reversible y forma disulfuros mixtos con las cadenas laterales de las proteínas.

SALES

Acetato de potasio, Acetato de sodio, Cloruro de sodio

Salas que al aumentar el poder iónico de la solución ocasionan la precipitación del ADN.

ACIDOS

HCl (Acido clorhídrico)

Actúa como agente reductor de cadenas largas de ADN para favorecer la transferencia del ADN a membrana.

EDTA (Acido etilendiaminotetra-acético)

Agente quelante de iones metálicos como Ca^{++} y Mg^{++} . Inhibe la acción de nucleasas al no haber cofactores libres para su actividad.

ABREVIATURAS

AND	Acido Desoxirribonucleico
AFLP	Amplified Fragment Length Polimorphism (Polimorfismos longitudinales de fragmentos amplificados).
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
Cpm	Cuentas por minuto
DC	Doble Cadena
G	gramo
H	hora (s)
Kb	Kilobases
L	Litros
LMP	Low melting point (Bajo punto de fusión)
M	Molar
mA	miliamperios
mg	miligramos
min.	minuto (s)
ml	mililitro
mM	Milimolar
MPC	Magnetic Particle Concentrator
N	Normal
ng	Nanogramos
O.D	Densidad óptica
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la Polimerasa).
pg	picogramos
pmoles	picomoles
RAPD	Random Amplified Polimorphic DNA (ADN polimórfico amplificado aleatoriamente)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphisms (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción).
rpm	revoluciones por minuto
SCAR	Sequence characterization Amplified Regions (Caracterización de secuencia de regiones amplificadas).
seg.	segundo (s)
TA	Temperatura Ambiente
T4 PNK	T4 Polinucleótido Kinasa
U	Unidades
U.weiss	Unidades weiss
UV	Ultravioleta
Vol.	Volumen
V	Voltios
°C	Grado Centígrado
µg	microgramo
µl	microlitro
µM	micromolar



Técnicas Moleculares Aplicadas a la Identificación de la Resistencia a Enfermedades en Diferentes Cultivos

CIAT 9-18 Diciembre 1999

De Izquierda a Derecha

Victoria Eugenia Villegas Cenipalma, John Loke CIAT, Janneth Gutiérrez CIAT, Rodrigo Hoyos U. Nal. Colombia, Jairo Osorio Corpoica, Matthew Blair CIAT, Juan Carlos Angel Cenicaña, Mary Isabel Barragán CIAT, Lucia Afanador U. Nal. Colombia, Alvaro Echeverri U. Nal. Colombia, Anibal Montoya ICA, Alvaro Salive Fedearroz, José Luis Claroz CIAT, Leticia Serna U Caldas, Aliceth Ayala Cenipalma, Mónica Márquez Asocolflores, Darío Castañeda Centro Fruticola Andino, Francia Varón ICA, Hernando Ranjel Cenicaña, María Luisa Guzmán Cenicaña, Elizabeth Alvarez CIAT, Armando Muñoz Corp. BIOTEC, Sandra Reyes CIAT, Jackeline Sánchez Cenipalma, Ruben Darío Zarate U. Nal Colombia, Carlos Huertas ICA, Edgar Barrera CIAT, Luis Fernando Patiño Augura, Juan Fernando Mejía CIAT, Lina María Tabarez CIAT, Luis Fernando Gil Cenicafe, Adriana Ruíz CIAT, Jorge Evelio Angel ICA, Jaime Eduardo Muñoz U. Nal Colombia



Fotos: Juan Carlos Quintana
Diseño : Julio César Martínez
Camilo Oliveros