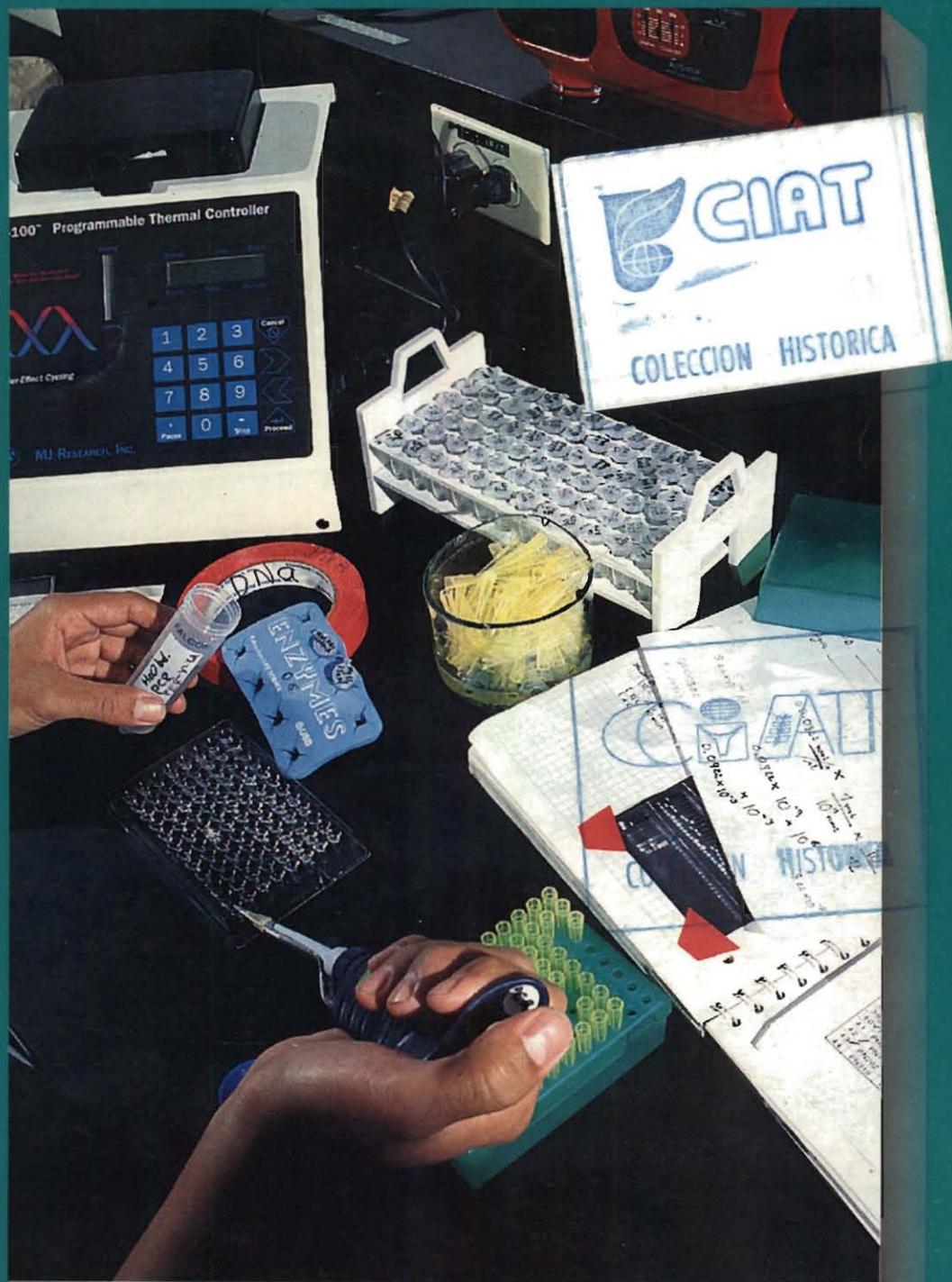


Protocolos para Marcadores Moleculares



S
494
.5
.B563
P76
c.3

Unidad de Biotecnología
CIAT

El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) se dedica al alivio del hambre y de la pobreza en los países tropicales en desarrollo, mediante la aplicación de la ciencia para el aumento de la producción agrícola, conservando, a la vez, los recursos naturales.

El CIAT es uno de los 16 centros internacionales de investigación agrícola auspiciados por el Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (GCAI).

El presupuesto básico del CIAT es financiado por 23 donantes, entre los que figuran gobiernos de países, organizaciones para el desarrollo regional e institucional y fundaciones privadas. En 1995, los siguientes países son donantes del CIAT: Alemania, Australia, Bélgica, Brasil, Canadá, China, Colombia, España, los Estados Unidos de América, Francia, Holanda, Japón, Noruega, el Reino Unido, Suecia y Suiza. Las entidades donantes son el Banco Interamericano de Desarrollo (BID), el Banco Mundial, la Fundación Ford, la Fundación Rockefeller, la Fundación Sasakawa, la Unión Europea (UE) y el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD).



Foto carátula: Mauricio Antorveza

S
494
.5
B563
P76
c-3

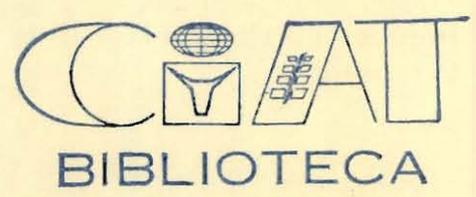


Protocolos para Marcadores Moleculares

Unidad de Investigación en Biotecnología

Compilado y editado por:

**Delkin Orlando González
Natalia Palacios
Gerardo Gallego
Joe Tohme**



021873
11 ENE 1996

CIAT **Centro Internacional de Agricultura Tropical**
International Center for Tropical Agriculture

Centro Internacional de Agricultura Tropical
Apartado Aéreo 6713
Cali, Colombia

Publicación CIAT No. 258
ISBN 958-9439-54-3
Tiraje: 400 ejemplares
Impreso en Colombia
Octubre 1995

Protocolos para Marcadores Moleculares. 1995. González, D.O.; Palacios, N.; Gallego, G. y Tohme, J. (comps. y eds.). Unidad de Investigación en Biotecnología, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 82 p.
[Publicación CIAT No. 258.]

CONTENIDO

PRÓLOGO.....	v
EXTRACCIÓN DE ADN.....	1
Extracción de ADN de Frijol.....	2
Extracción de ADN de Yuca.....	4
Extracción de ADN de Arroz.....	6
Extracción de ADN de <i>Brachiaria</i> sp.....	8
Extracción de ADN de <i>Stylosanthes</i> sp.....	10
Cuantificación del ADN.....	12
METODOLOGÍAS USADAS EN RFLP'S.....	15
Digestión de ADN Genómico.....	16
Electroforesis en Geles de Agarosa.....	17
Transformación y Minipreps.....	21
Elución de Bandas de Geles de Agarosa.....	25
Marcaje Radioactivo e Hibridización de Sondas de ADN dc.....	28
MARCADORES MOLECULARES BASADOS EN PCR.....	31
Polimorfismos de ADN Amplificados Aleatoriamente (RAPD's).....	32
Análisis de Segregantes Agrupados.....	35
Polimorfismos de Fragmentos Amplificados (AFLP's).....	36
Caracterización de Microsatélites.....	41
SECUENCIACIÓN DE ADN dc.....	47
Secuenciación de ADN dc.....	48
MARCAJE RADIOACTIVO Y NO RADIOACTIVO DE OLIGONUCLEÓTIDOS.....	51
Marcaje Radioactivo de Oligonucleótidos.....	52
Marcaje 3' Terminal de Oligos con Biotina.....	54
CONSTRUCCIÓN DE LIBRERÍAS GENÓMICAS.....	55
Librerías Genómicas en Plásmido.....	56
Librerías Genómicas en Lambda Zap II.....	61
Preparación de Células Competentes <i>E. coli</i> XL1 Blue MRF'.....	64
ANEXOS.....	65
ANEXO 1: <i>Buffer, Medios y Cocteles de Reacción</i>	66
ANEXO 2: <i>Soluciones Stock</i>	69
ANEXO 3: <i>Principio Químico de Algunos Reactivos</i>	73
ANEXO 4: <i>Abreviaturas y Símbolos</i>	76
ANEXO 5: <i>Manejo de Material Radioactivo</i>	77

PRÓLOGO

Los marcadores moleculares de ADN utilizados en estudios de mejoramiento de plantas, conservación de germoplasma y biodiversidad se han convertido en una herramienta útil y eficiente para hacer investigación avanzada en estas áreas.

El trabajo que se lleva a cabo en el CIAT, y específicamente en la Unidad de Investigación en Biotecnología, involucra el uso de técnicas como RFLP's, RAPD's, SCAR's y AFLP's, entre otras, para cumplir con los objetivos trazados en los diferentes proyectos de investigación que se adelantan en el Centro. Por ello, estas técnicas han sido ampliamente aplicadas en estudios de mapeo y localización de genes de importancia agronómica, así como en procesos de caracterización de germoplasma en yuca, frijol, arroz y pasto *Brachiaria*.

Uno de los objetivos de la Unidad de Investigación en Biotecnología es el desarrollo de un programa de capacitación de profesionales en las áreas de agronomía, biología, microbiología y ciencias afines. Es necesario, por tanto, elaborar un manual que no sólo sea útil como guía estándar para dicho programa, sino que facilite la aplicación de estas técnicas en nuestro laboratorio.

Hemos tomado como referencia bibliográfica los siguientes manuales de laboratorio: Maniatis, T., Fritsch, E.F., y Sambrook, J. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York; Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., y Struhl, K., eds. (1988), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York; Hoisington, D., Khairallah, M., y González-de-León, D. (1994), *Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*, 2a. ed., México, D.F. Nos basamos además en la experiencia de diferentes investigadores que han trabajado en la estandarización y redacción de estos protocolos en el laboratorio de esta Unidad.

Este manual se encuentra dividido en seis grandes secciones, que contienen los protocolos de rutina, acompañados de notas aclaratorias al final de cada uno. Además, hay cinco anexos que contienen la forma de preparar buffers, medios y cocteles de reacción, las soluciones stock, la acción de algunos reactivos, abreviaturas útiles y el reglamento para trabajar con radioisótopos en el laboratorio de radioactividad.

Esperamos que este manual se ajuste a los objetivos propuestos y sea una guía útil en los trabajos que requieran la aplicación de estas técnicas. Estaremos atentos a cualquier sugerencia, comentario o corrección.

D.O. González, N. Palacios, G. Gallego y J. Tohme

INVESTIGADORES PARTICIPANTES

Programa de Frijol

Janeth Patricia Gutiérrez
Eliana Gaitán
Claudia Elena Vergara
Jaime Vargas
Edgar Barrera
Delkin Orlando González

Programa de Forrajes Tropicales

Rodrigo Sarria
Natalia Palacios
Esperanza Torres

Programa de Arroz

María Victoria Montenegro
Gerardo Gallego
Jershon López

Programa de Yuca

Fernando Angel
Martín Fregene
Rocío Gómez
Fernando Rodríguez

Dirección: CIAT, Unidad de Investigación en Biotecnología
A.A. 6713, Cali, Colombia

Tel.: (57-2) 445-0000

Fax: (57-2) 445-0273

Email: CIAT-Biotechnology@Cgnet.com

J.Tohme@Cgnet.com

EXTRACCIÓN DE ADN

Extracción de ADN de Frijol

Referencias:

Dellaporta S. L., J. Wood, y J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1(14):19-21.

Vallejos, C. E., N. S. Sakiyama y C. D. Chase. 1992. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics* 131:713-720.

1. Colectar 5-10 g de tejido foliar joven, en nitrógeno líquido.
2. Macerar con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y seco, aproximadamente 5.0 g por tubo.
3. Añadir un volumen (15 ml) de buffer de extracción (Dellaporta modificado) previamente calentado a 65°C.
4. Mezclar bien con una espátula asegurándose de que todo el tejido entre en contacto con el buffer.
5. Incubar en baño de agua a 65°C, durante 30 min.
6. Añadir un volumen (15 ml) de fenol:cloroformo:octanol (25:24:1) (ver Nota 2).

PRECAUCIÓN

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.

7. Mezclar por inversión hasta que se forme una emulsión.
8. Centrifugar a 4000 rpm durante 25 min a 4°C.
9. Transferir a otro tubo la fase acuosa, teniendo cuidado de no tocar la interfase.
10. Añadir un volumen de cloroformo:octanol (24:1).
11. Mezclar por inversión.
12. Centrifugar a 4000 rpm durante 5 min a TA.
13. Transferir la fase acuosa a otro tubo.
14. Añadir 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH:5.2 y 6/10 de volumen de isopropanol a -20°C.
15. Mezclar por inversión muy suavemente.
16. Incubar a -20°C, mínimo durante 1 h, máximo toda la noche.
17. Centrifugar a 4000 rpm durante 15 min a 4°C.
18. Descartar el sobrenadante.
19. Secar el tubo colocándolo invertido sobre una toalla de papel.

20. Lavar el precipitado de ADN con 1 ml de etanol al 70% a -20°C .
21. Colocar el tubo invertido sobre una toalla de papel hasta que seque por completo (aprox. 1 h).
22. Disolver el precipitado en 500 μl de TE pH:8.0 o de agua destilada (ver Nota 3).
23. Transferir a un eppendorf nuevo.
24. Incubar a 37°C durante 20-30 min con ARNasa a una concentración final de 20 $\mu\text{g/ml}$.
25. Observar el ADN en un gel de agarosa al 0.8%.

Notas:

1. Todos los pasos que involucren el uso de mercaptoetanol, fenol y cloroformo deben realizarse con guantes y en cámara de extracción.
2. El fenol debe estar equilibrado a un pH:8.2 antes de usarlo (ver procedimiento para equilibrar fenol).
3. El volumen final en que se resuspenda el ADN depende del uso que se quiera darle. Por ejemplo, para digestiones en RFLP's se necesita mayor concentración que para PCR en RAPD's.

BUFFER DE EXTRACCIÓN: FRIJOL

Mezclar:

Tris-HCl pH: 8.0	150 mM
EDTA	15 mM
NaCl	1 M
CTAB	1.5%
β -Mercaptoetanol	1.2%
PVP	1%

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

Extracción de ADN de Yuca

Referencia:

Dellaporta S. L., J. Wood, y J. B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1(14):19-21.

1. Colectar 5-10 g de tejido foliar joven, en nitrógeno líquido.
2. Macerar con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y seco, aproximadamente 3.0 g por tubo.
3. Adicionar 15 ml de buffer de extracción Dellaporta.
4. Adicionar 1 ml de SDS 20% y mezclar bien.
5. Incubar en baño de agua a 65°C durante 10 min.
6. Adicionar 5 ml de acetato de potasio 5M y mezclar vigorosamente.
7. Incubar en baño de hielo durante 30 min.
8. Centrifugar a 15,000 rpm durante 20 min a 4°C.
9. Filtrar a través de miracloth en un tubo que contenga 10 ml de isopropanol a -20°C.
10. Mezclar suavemente.
11. Incubar a -20°C durante 2 h mínimo o toda la noche.
12. Centrifugar a 15,000 rpm durante 15 min a 4°C.
13. Eliminar el sobrenadante por decantación.
14. Secar el precipitado a TA.
15. Redissolver el ADN en 700 µl de T50E10 pH:8.0.
16. Transferir a un tubo eppendorf nuevo.
17. Centrifugar a 12,000 rpm durante 10 min a TA.
18. Transferir a un tubo eppendorf que contenga ARNasa, a una concentración final de 10 µg/ml.
19. Incubar a 37°C durante 30 min.
20. Adicionar 75 µl de acetato de sodio 3M pH:5.2 y 500 µl de isopropanol a -20°C.
21. Mezclar e incubar a -20°C mínimo 2 h, o toda la noche.
22. Centrifugar a 12000 rpm durante 15 min a 4°C.
23. Decantar el sobrenadante.
24. Añadir 1 ml de etanol al 70% a -20°C.
25. Centrifugar a 14000 rpm durante 2 min a TA.
26. Repetir desde el paso 23 al paso 25.
27. Disolver en 500 µl TE o agua estéril.
28. Observar el ADN en un gel de agarosa al 0.8%.

BUFFER DE EXTRACCIÓN: YUCA

Mezclar:

Tris-HCl 100 mM
EDTA 50 mM
NaCl 500 mM

Autoclavar**Agregar:**

β -Mercaptoetanol 0.07%
PVP 1%

Extracción de ADN de Arroz

Referencia:

McCouch, S. R., G. Kochert, Z. H. Yu, Z. Y. Wang, G. S. Khush, W. R. Coffman y S. D. Tanksley. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 76:815-829.

1. Colectar 5-10 g de tejido foliar joven en nitrógeno líquido (ver Nota 1).
2. Macerar el tejido con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y seco.
3. Agregar 16 ml de buffer de extracción Dellaporta modificado, previamente calentado a 65°C.
4. Mezclar bien agitando el tubo vigorosamente.
5. Incubar a 65°C durante 30 min, agitando los tubos cada 10 min.
6. Agregar 5 ml de acetato de potasio 5M.
7. Mezclar vigorosamente.
8. Incubar en baño de hielo durante 20 min con agitación.
9. Centrifugar a 3000 rpm durante 20 min (ver Nota 2).
10. Filtrar el sobrenadante a través de miracloth.
11. Repetir desde el paso 6 hasta el paso 10.
12. Añadir 2/3 de volumen de isopropanol -20°C.
13. Incubar a -20°C toda la noche.
14. Centrifugar a 3000 rpm, durante 30 min a 4°C.
15. Lavar el precipitado de ADN con etanol al 70% a -20°C.
16. Resuspender en 1000 µl de TE.
17. Centrifugar a 3000 rpm durante 15 min a 4°C.
18. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 15 ml.
19. Añadir ARNasa a una concentración final de 20 µg/ml.
20. Incubar a 37°C durante 10 a 15 min.
21. Adicionar 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH:5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C.
22. Incubar durante 30 min a -20°C.
23. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 a 10 min a 4°C.
24. Lavar con 1 ml de etanol al 70% a -20°C.
25. Resuspender en 300 µl de TE.
26. Centrifugar a 10,000 rpm durante 2 a 4 min a TA.
27. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.
28. Observar el ADN en un gel de agarosa al 0.8%.

Notas:

1. Para más de 5 g de tejido macerado, use 24 ml de buffer de extracción (paso 3), y en el siguiente paso, use 7.5 ml de acetato de potasio 5 M.
2. Si el sobrenadante es oscuro en el paso 9, debe repetirse desde el paso 6 hasta el paso 9, máximo 2 veces mas, hasta que se vea más claro.

BUFFER DE EXTRACCIÓN: ARROZ**Mezclar:**

Tris-HCl pH 8.0	100 mM
EDTA pH 8.0	50 mM
NaCl	500 mM
SDS (w/v)	1.25%

Autoclavar**Adicionar:**

Bisulfito de sodio (0.38 g por cada 100 ml de buffer).

Extracción de ADN de *Brachiaria* sp.

Referencia:

McCouch, S. R., G. Kochert, Z. H. Yu, Z. Y. Wang, G. S. Khush, W. R. Coffman y S. D. Tanksley. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 76:815-829.

1. Colectar de 3 a 5 g de tejido foliar joven en nitrógeno líquido.
2. Macerar el tejido con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.
3. Agregar 16 ml de buffer de extracción Dellaporta modificado, previamente calentado a 65°C.
4. Mezclar bien agitando el tubo vigorosamente.
5. Incubar a 65°C durante 30 min.
6. Agregar 5 ml de acetato de potasio 5M.
7. Mezclar vigorosamente.
8. Incubar en baño de hielo durante 20 min con agitación.
9. Centrifugar a 3000 rpm durante 20 min.
10. Filtrar el sobrenadante a través de miracloth.
11. Repetir dos veces los pasos 6 a 10.
12. Añadir 2/3 de volumen de isopropanol -20°C.
13. Incubar a -20°C toda la noche.
14. Centrifugar a 3000 rpm durante 20 min a 4°C.
15. Lavar el precipitado de ADN con etanol al 70% a -20°C.
16. Resuspender en 1000 µl de TE.
17. Centrifugar a 3000 rpm durante 15 min a 4°C.
18. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 15 ml.
19. Añadir ARNasa a una concentración final de 20 µg/ml.
20. Incubar a 37°C durante 30 min.
21. Adicionar 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH:5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C.
22. Incubar durante 30 min a -20°C.
23. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 a 10 min a 4°C.
24. Lavar con 1 ml de etanol al 70% a -20°C.
25. Resuspender en 300 µl de TE.
26. Centrifugar a 10,000 rpm durante 15 a 20 min a TA.
27. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo (ver Nota 1).
28. Observar el ADN en un gel de agarosa al 0.8%.

Notas:

1. Si en el paso 27 el ADN tiene una coloración amarilla o café, deben realizarse tres extracciones con fenol:cloroformo:octanol (25:24:1) y una extracción con cloroformo:octanol (24:1).
2. La extracción de ADN de *Brachiaria* sp. también puede hacerse por el método de extracción para frijol (pág. 2).

BUFFER DE EXTRACCIÓN: *BRACHIARIA***Mezclar:**

Tris-HCl pH:8.0	100 mM
EDTA pH:8.0	50 mM
NaCl	500 mM
SDS (w/v)	1.25%

Autoclavar**Adicionar:**

0.38 g de bisulfito de sodio por cada 100 ml de buffer.

Extracción de ADN de *Stylosanthes* sp.

Referencia:

Weeks, D. P., N. Beerman, y O. M. Griffith. 1986. A small-scale 5h-procedure for isolating multiple samples of CsCl-purified DNA: Applications to isolations from mammalian, insect, higher plant, algal, yeast, and bacterial sources. *Anal. Biochem.* 152:376-385.

1. Colectar de 3 a 5 g de tejido foliar joven en nitrógeno líquido.
2. Macerar con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y seco, aproximadamente 3.0 g por tubo.
3. Añadir 20 ml de buffer de extracción Weeks, previamente calentado a 65°C.
4. Mezclar bien e incubar a 65°C durante 30 min.
5. Añadir 20 ml de cloroformo:alcohol isoamilico (24:1).
6. Agitar suavemente.
7. Centrifugar a 15,000 rpm durante 30 min a 4°C.
8. Retirar el mucílago que puede formarse en la parte superior del tubo.
9. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo de 50 ml.
10. Añadir 2/3 de volumen de isopropanol a -20°C.
11. Mezclar suavemente.
12. Usar una asa de vidrio para pescar el ADN de la solución y transferirlo a un falcon de 15 ml.
13. Dejar secar durante 10 a 15 min a TA.
14. Añadir 4.5 ml de TE hasta que se disuelva el ADN (ver Nota 1).
15. Añadir 0.74 g de cloruro de cesio por cada ml de la solución anterior para tener una densidad de 1.4.
16. Disolver muy bien el cloruro de cesio.
17. Agregar 30 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml).

PRECAUCIÓN

El bromuro de etidio es altamente cancerígeno. Deben usarse guantes para manipularlo.

18. Agitar suavemente.
19. Transferir las soluciones a tubos de ultracentrífuga (TLA-100-3).
20. Sellar los tubos herméticamente al calor (ver Nota 2).
21. Centrifugar a 85,000 rpm durante 6 h a TA (Rotor Beckman de ángulo fijo).
22. Visualizar la banda con UV.

23. Remover la banda (aprox. 0.5 a 1.0 ml) con una jeringa de punta gruesa.
24. Agregar un volumen de alcohol isoamílico.
25. Centrifugar a 4000 rpm durante 4 seg a TA.
26. Descartar el sobrenadante de color rosado (bromuro de etidio).

PRECAUCIÓN

El bromuro de etidio es altamente cancerígeno. Deben usarse guantes para manipularlo.

27. Repetir el paso 24 al paso y el paso 25 hasta que el color rosado desaparezca.
28. Añadir 3 volúmenes de TE.
29. Añadir 2 volúmenes de etanol 100% a -20°C partiendo del volumen anterior.
30. Mezclar por inversión suavemente.
31. Incubar a -20°C toda la noche.
32. Pescar el ADN con una asa de vidrio.
33. Secar durante 10 a 15 min a TA.
34. Resuspender en 300 µl de TE.
35. Observar el ADN en un gel de agarosa al 0.8%.

Notas:

1. Para disolver el ADN, en el paso 14, incubar en baño de agua a 60°C durante 20 min.
2. En el paso 20 evite agitar el tubo para no mezclar los polisacáridos pegados a la pared del tubo.

BUFFER DE EXTRACCIÓN: *STYLOSANTHES*

Mezclar:

CTAB	2%
NaCl	1.4 M
β-Mercaptoetanol	0.2%
EDTA	20 mM
Tris-HCl pH:8.0	100 mM

Cuantificación del ADN

A. Por fluorometría

1. Encender el fluorómetro (TKO 100 Mini-Fluoromete, HOEFER Scientific Instruments), 15 min antes de usarlo.
2. Llevar el botón de escala hacia la izquierda, hasta el tope.
3. Devolverlo 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 usted (ver Nota 1).
6. Llenar la celda con 2 ml de solución TNE 1X.

PRECAUCIÓN

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

7. Ajustar el cero con el botón marcado ZERO.
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.
10. Cerrar la compuerta de la celda.
11. Con el botón de escala ajustar la lectura hasta 100.
12. Con la pipeta de bulbo sacar toda la solución.
13. Repetir desde el paso 6 hasta el paso 11.
14. Se debe ajustar el botón de escala hasta que al leer el patrón de 100 ng/ μ l la lectura sea 100. En este momento el botón de escala no debe moverse más.
15. Repetir los pasos 6 a 14, pero con el patrón de 25 ng/ μ l.
16. Cuando la lectura sea de 25 ng/ μ l no se debe mover más el botón de escala.
17. Leer nuevamente el patrón de 100 ng/ μ l. En este paso la lectura debe ser de 100 ng/ μ l, sin necesidad de mover el botón de escala.
18. Repetir los pasos 6 a 10 con cada una de las muestras (ver Notas 2 a 5).
19. Al terminar las lecturas, lavar bien la celda con alcohol.

Notas:

1. La celda debe limpiarse muy bien con un paño seco antes de usarla.
2. Entre lectura y lectura debe ajustarse el cero. En caso de que la lectura no sea cero debe sacar toda la solución, añadir solución nueva y leer el cero nuevamente.
3. Es muy importante tener cuidado de que la solución no caiga por fuera de la celda.
4. Todas las cantidades deben ser medidas cuidadosamente ya que el equipo es altamente sensible a cualquier cambio.
5. La lectura que se obtiene en el aparato tiene un comportamiento lineal con respecto a la concentración de ADN en un rango de 25 a 250 ng/ μ l; las lecturas que se obtengan por fuera de este rango no son confiables.
6. Si se necesita leer moléculas circulares, éstas deben ser previamente linealizadas mediante digestión.

B. Por comparación con patrones de ADN de Lambda

1. Preparar una solución de ADN de Lambda a una concentración final de 50 ng/ μ l.
2. Preparar una solución de Blue-Juice 1X (10 μ l BJ 10X + 90 μ l agua estéril).
3. Preparar patrones de acuerdo con la siguiente tabla:

ADN Lambda (50 ng/ μ l)	Blue Juice 1X	Volumen final	Cantidad final
1 μ l	19 μ l	20 μ l	50 ng
2 μ l	18 μ l	20 μ l	100 ng
3 μ l	17 μ l	20 μ l	150 ng
4 μ l	16 μ l	20 μ l	200 ng

4. Tomar 2 μ l de cada una de las muestras y completar a 20 μ l con Blue Juice 1X.
5. Servir en un gel de agarosa al 0.8%, con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 μ g/ml.

PRECAUCIÓN

El bromuro de etidio es altamente cancerígeno. Deben usarse guantes para manipularlo.

6. Comparar la intensidad de la banda de cada una de las muestras con los patrones de Lambda.
7. Determinar la concentración en ng/ μ l.

METODOLOGÍAS USADAS EN RFLP'S

Digestión de ADN Genómico

1. Determinar el volumen final en el cual va a realizar la digestión y la cantidad de ADN que desea digerir.
2. Determinar cuántas unidades de enzima son necesarias por μg de ADN a digerir.
3. Hacer cálculos basados en la siguiente información:

ADN:	2 a 10 μg (según la finalidad de la digestión)
Buffer 10X:	Concentración final 1X
Espermidina 40 mM:	Concentración final 4 mM
Enzima (X U/ μl):	Número de unidades necesarias para digerir X μg de ADN genómico.
Agua estéril:	Hasta completar el volumen final.

4. Diluir el ADN de cada muestra en agua estéril.
5. Preparar una mezcla maestra con el buffer, la espermidina y la enzima, en ese orden, teniendo en cuenta el número de muestras que desea digerir.

OJO

Todas las enzimas son lábiles a altas temperaturas. Manipúlelas siempre en hielo.

6. Añadir al ADN ya diluido, la cantidad de mezcla maestra necesaria.
7. Agitar muy bien cada una de las muestras pipeteando varias veces o dando golpes suaves con la yema de los dedos.
8. Incubar las digestiones a la temperatura óptima a la cual actúa cada enzima y durante el tiempo que haya sido previamente determinado, según el uso que quiera darse a la digestión.

Nota:

Las enzimas producidas en algunas casas comerciales tienen requerimientos especiales; por ejemplo, agregar Triton o BSA a determinadas concentraciones, incubar a diferentes temperaturas, etc. Estos factores deben ser tenidos en cuenta siempre que planee digerir.

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 1X.
3. Calentar el frasco, con la tapa floja, en el horno microondas o en una estufa hasta que la solución hierva durante 30 seg aproximadamente (ver Nota 1).
4. Dejar enfriar la solución hasta aprox. 50°C.
5. Si es necesario, añadir una cantidad de bromuro de etidio para que quede a una concentración final de 0.5 µg/ml; si no, continuar con el paso 6.

PRECAUCIÓN

El bromuro de etidio es altamente cancerígeno. Deben usarse guantes para manipularlo.

6. Servir la solución de agarosa en la bandeja cuando esté a más o menos 45°C.
7. Eliminar todas las burbujas.
8. Colocar los peines adecuados.
9. Dejar polimerizar la agarosa.
10. Retirar las cintas que sellan la bandeja.
11. Colocar la bandeja con el gel en la cubeta de electroforesis.
12. Cubrir el gel con Buffer TBE 1X.
13. Retirar los peines cuidadosamente para que los pozos queden bien formados.
14. Colocar la muestra en cada pozo (ver Notas 2 a 4).
15. Aplicar el voltaje o amperaje adecuado durante el tiempo establecido (ver Nota 5).
16. 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 a 1.0 µg/ml durante 10 min.

PRECAUCIÓN

El bromuro de etidio es altamente cancerígeno. Deben usarse guantes para manipularlo.

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

PRECAUCIÓN

La luz ultravioleta es un agente mutagénico peligroso para piel y ojos. Debe reducirse el tiempo de exposición al mínimo y usar máscara 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. Debe tenerse cuidado de no romper el pozo mientras se sirve la muestra.
4. Para evitar que las muestras se difundan en el gel, deben servirse rápidamente y entrarlas a un voltaje de aprox. 90-100V. Luego, colocarlas al voltaje requerido.
5. El amperaje siempre debe ser un valor que esté por debajo del voltaje o muy cercano a él. Nunca debe superarlo.

**Voltaje y Tiempo de Corrida Utilizados para
Electroforesis según su Uso.**

Uso	Voltaje (Voltios)	Tiempo (Horas)
RFLP's	22	14
Fingerprinting	22	72
RAPD's	90	1.5-3.5

B. Southern blot

1. Una vez tomada la foto, los geles se pueden cortar en una esquina; el corte es una señal de orientación del gel en el proceso de transferencia.
2. Voltrear el gel, para que el ADN quede arriba.

1. Depuración (ver Nota 4)

1. Colocar el gel en HCl 0.25N con agitación constante durante 10 a 15 min (o hasta que el azul de bromofenol del frente de corrida se torne amarillo).
2. Lavar dos veces con agua deionizada (ver Nota 4).

2. Denaturación

1. Colocar el gel en una solución de NaOH 0.5N/NaCl 0.5M con agitación constante durante 1 h (ver Nota 5).

3. Transferencia

1. Colocar en una bandeja suficiente solución de transferencia (NaOH 0.5N y NaCl 0.5M).
2. Colocar un vidrio que descance en los bordes apiestos de la bandeja.
3. Humedecer una tira (puente) de papel Whatman 3MM con solución de transferencia.
4. Colocar la tira sobre el vidrio de tal forma que quede en contacto por ambos lados, con la solución de transferencia.
5. Colocar encima del puente una tira corta de papel Whatman 3MM (previamente humedecida en solución de transferencia), que tenga el ancho del gel que se transferirá.
6. Sacar las burbujas con ayuda de una pipeta.
7. Colocar el gel con la misma orientación con que lo ha estado manejando, es decir, con el ADN hacia arriba.
8. Sacar las burbujas con ayuda de una pipeta.
9. Colocar sobre el gel una membrana de nylon (Hybond N+), del mismo tamaño del gel y previamente humedecida en solución de transferencia.
10. Sobre la membrana, colocar 2 tiras de papel Whatman 3MM previamente humedecidas en solución de transferencia.
11. Por último, colocar papel periódico sobre el montaje anterior para dar peso.
12. Dejar que se realice la transferencia toda la noche.

13. Desmontar el Southern al día siguiente.
14. Lavar la membrana en solución 2XSSC durante 5 min.
15. Colocar la membrana sobre papel Whatman para que se seque.
16. Colocar la membrana dentro del Stratalinker y operar "Autocrosslinker".
17. Una vez haya terminado la fijación del ADN a la membrana, operar "reset".
18. Guardar la membrana en papel plástico (vinilpel) a 4°C hasta la hibridización.

Notas:

1. Todo el proceso debe realizarse con guantes; la membrana, una vez transferida, se manipula con pinzas.
2. Este protocolo se conoce como Southern Alcalino o transferencia alcalina; existe otro protocolo para un southern neutro.
3. Para confirmar la eficacia de la transferencia, se debe teñir el gel con solución de bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) durante 10 min.

PRECAUCIÓN

El bromuro de etidio es altamente cancerígeno. Deben usarse guantes para manipularlo.

4. La depuración **NO** se realiza cuando se desea transferir fragmentos menores o iguales a 10Kb.
5. Las concentraciones de NaOH/NaCl pueden variar de acuerdo con las características del proceso.

Transformación y Minipreps

A. Preparación de células competentes

PRECAUCIÓN

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

1. Dejar crecer por aislamiento *E. coli* DH5 alfa en LB sólido a 37°C durante toda la noche.
2. Tomar una colonia aislada, y dejarla crecer en 2 ml de medio de cultivo a 300 rpm durante 60 a 90 min a 37°C.
3. Transferir el cultivo anterior a un erlenmeyer de 1 L que contenga 100 ml de medio de cultivo.
4. Dejar crecer a 200 rpm, durante 1 a 2 h (o hasta una $OD_{600} = 0.3-0.5$), a 37°C.
5. En tubos Falcon colocar 50 ml del cultivo anterior y centrifugar a 3000 rpm durante 5 min a 4°C.
6. Descartar el sobrenadante y secar el pellet colocando el tubo invertido sobre una toalla.
7. Resuspender el pellet de cada tubo en 20 ml de Tf1. Añadir inicialmente una pequeña cantidad de éste agitando con suavidad y luego completar la solución con el resto.
8. Unir el contenido de ambos tubos.
9. Incubar durante 5 min a 4°C.
10. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 min a 4°C.
11. Descartar el sobrenadante.
12. Resuspender rápida pero suavemente en 2 ml de Tf2.
13. Incubar a 4°C por 15 min.
14. Alicuotar 100 µl en tubos eppendorf previamente enfriados.
15. Congelar las alícuotas a -80°C.

Notas:

1. Es recomendable colocar los tubos, pipetas, tips y, en general, el material que desea usar en el cuarto frío.
2. En los pasos que requieren resuspensión es mejor no utilizar las pipetas.
3. Para congelar no es necesario utilizar nitrógeno líquido.

B. Transformación de células competentes

PRECAUCIÓN

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

1. Tomar una alícuota de 100 μ l de células competentes y descongelarla en un baño de hielo (ver Nota 2).
2. Adicionar la cantidad necesaria de ADN moviendo la pipeta suavemente a través de la suspensión celular (ver Nota 1).
3. Agitar cuidadosamente durante 5 seg.
4. Incubar las células en baño de hielo durante 30 min.
5. Realizar choque térmico a 42 °C en un baño de agua durante 45 seg.
6. Incubar en baño de hielo durante 2 min.
7. Añadir 0.9 ml de SOC a TA (ver Nota 3).
8. Incubar a 37°C durante 1 h a 225 rpm.
9. Platear 100 μ l en cajas de LB con el antibiótico y/o reactivos de selección apropiados y rastrillar.
10. Incubar a 37° C durante toda la noche.
11. Seleccionar colonias recombinantes.

Notas:

1. Para determinar la cantidad óptima de ADN debe realizarse un ensayo; se recomienda diluir las ligaciones 5 veces y añadir 1 μ l de la dilución a las células. Una ligación estándar normalmente contiene de 100 a 1000 ng de ADN en 100 μ l de reacción, lo cual nos estaría dando de 1 a 10 ng de ADN ligado por reacción de transformación.
2. Las células competentes pueden ser congeladas y descongeladas hasta 4 veces sin una alteración significativa en la eficiencia de la transformación.
3. El medio SOC puede ser remplazado por otros medios de cultivo, pero, la eficiencia de la transformación podría verse reducida.

C. Minipreps usando lisis por calentamiento

PRECAUCIÓN

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

1. Tomar una colonia aislada e incubarla en 3 ml de LB líquido (con el antibiótico apropiado) a 250 rpm, durante toda la noche a 37°C.
2. En cámara transferir 1.5 ml del cultivo anterior a un tubo eppendorf.
3. Centrifugar a 3000 rpm durante 30 seg a 4°C.
4. Descartar el sobrenadante y secar el tubo invirtiéndolo sobre una toalla de papel.
5. Resuspender el pellet en 350 µl de STET (ver Notas 2 y 3).
6. Adicionar 25 µl de solución fresca de lizozima (10 mg/ml en 10mM Tris-HCl pH:8.0).
7. Dar vórtex suave hasta que se disuelva el pellet.
8. Colocar los tubos en un baño hirviendo (100°C), durante 40 seg exactamente (ver Nota 1).
9. Sacar los tubos y centrifugar a 12,000 rpm durante 10 min a TA.
10. Remover el pellet con un palillo estéril o transferir el sobrenadante a otro eppendorf.
11. Adicionar 33 µl de acetato de sodio 3M pH:5.2 y 420 µl de isopropanol frío.
12. Mezclar con un vórtex muy suave durante 3 seg.
13. Incubar durante 5 min a TA.
14. Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 min a 4°C.
15. Descartar el sobrenadante y secar el tubo invirtiéndolo sobre una toalla de papel.
16. Asegurarse de que el tubo esté seco y añadir 1 ml de etanol al 70%.
17. Centrifugar a 12,000 rpm durante 2 min a 4°C.
18. Decantar el etanol y dejar secar completamente a TA.
19. Resuspender el pellet de ácidos nucleicos en 50 µl de TE (pH:8.0) a 4°C.
20. Remover ARN añadiendo ARNasa (10 mg/ml) (ver Nota 4).
21. Incubar durante 20 min a 37°C.
22. Ver plásmidos en gel de agarosa al 1%.

Notas:

1. Es muy importante asegurarse de que el baño de agua esté hirviendo cuando se coloquen allí los tubos y de que estos permanezcan en el baño un tiempo exacto.
2. El STET puede almacenarse hasta un mes a 4°C, pero la lisozima debe prepararse en el momento de usarla.
3. Después de agregar el STET, el trabajo puede continuar fuera de la cámara de flujo laminar.
4. El tratamiento con ARNasa, así como la visualización del plásmido total en agarosa, son opcionales y dependen del propósito.

D. Conservación de células competentes***PRECAUCIÓN***

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

1. Preparar tubos eppendorf de tapa rosca, autoclavarlos y rotularlos.
2. Mezclar el cultivo bacteriano (el mismo usado para minipreps) 1:1 con Medio de conservación.
3. Incubar toda la noche a -20°C.
4. Almacenar a -80°C.

Elución de Bandas de Geles de Agarosa

A. Wizard DNA PCR PREP System, Promega

1. Recortar bandas del gel de agarosa (LMP) y depositarlas en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Calentar las bandas durante 8 min a 65°C.
3. Adicionar 1 ml de resina previamente homogenizada.
4. Mezclar por inversión.
5. Agregar la mezcla de resina y ADN a una jeringa de 3 ml y pasarla muy suavemente a través de la columna del kit.
6. Adicionar 2 ml de isopropanol al 80% a la jeringa y pasarlos suavemente por la columna (ver Nota 1).
7. Centrifugar la columna a 12,000 rpm durante 20 seg a TA.
8. Dejar la columna 5 min a TA para evaporar el Isopropanol.
9. Lavar la columna con 40 µl de TE precalentado a 65°C.
10. Dar un golpe a la columna para que baje el TE y dejar 1 min en reposo.
11. Cambiar de eppendorf.
12. Centrifugar a 12,000 rpm durante 20 seg a TA (ver Nota 2).
13. Determinar la concentración de la sonda mediante una curva de calibración o por fluorometría.

Notas:

1. Nunca sacar el émbolo con la columna unida a la jeringa.
2. El producto de esta centrifugación es el ADN eluido.

B. Metodología usando gelasa

1. Electroforesis en gel de agarosa LMP y buffer TAE 1X.
2. Cortar las bandas de interés y colocarlas en un tubo eppendorf previamente pesado.
3. Pesar el tubo con la banda y determinar el peso de la agarosa.
4. Añadir por cada 50 mg de gel 1 µl de Gelase Buffer 50X (Epicentre Technologies, Madison, USA).
5. Calentar el tubo durante 20 min a 70°C.
6. Incubar durante 5 min a 45°C.
7. Añadir 0.3 U de gelasa (agarasa) por cada 200 mg de gel, diluida en Gelase Buffer 1X.

8. Incubar durante 1 a 2 h a 45°C.
9. Añadir un volumen de acetato de amonio 5M y dos volúmenes de etanol al 100% a TA.
10. Mezclar bien e incubar durante 30 min a TA.
11. Centrifugar a 14,000 rpm durante 30 min a TA.
12. Descartar el sobrenadante con una pipeta (ver Nota 1).
13. Lavar el pellet con etanol al 70% a TA.
14. Secar el pellet en vacío durante 15 min.
15. Resuspender el ADN en la cantidad de agua de ampollita necesaria para obtener una concentración final de 10 ng/μl (ver Nota 2).

Notas:

1. El sobrenadante no debe descartarse por decantación, ya que este pellet no se adhiere firmemente a la pared del tubo.
2. Usualmente, el rendimiento de purificación con agarosa está alrededor del 80% para fragmentos mayores de 0.5Kb; por lo tanto, si se parte de 1 μg de ADN en la banda, el rendimiento será aproximadamente de 800 ng y puede resuspenderse en 80 μl de agua de ampollita.

C. Metodología usando fenol

1. Cortar la(s) banda(s) de interés.
2. Cubrir el pedazo de gel con un volumen de fenol equilibrado en un tubo eppendorf.
3. Fundir la agarosa a 65°C.
4. Congelar a -70°C durante 20 min.
5. Centrifugar a 14,000 rpm durante 10 min a TA.
6. Separar la fase acuosa.
7. Adicionar un volumen de sec-Butanol.
8. Mezclar mediante vórtex durante 15 seg.
9. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min a TA.
10. Descartar la fase superior.
11. Repetir 3 veces desde el paso 6 hasta el 8.
12. Adicionar 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto.
13. Precipitar a -70°C durante 15 min.
14. Centrifugar a 15,000 rpm durante 15 min a 4°C.
15. Lavar con etanol al 70%.

16. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min.
17. Secar el pellet hasta que el etanol se evapore.
18. Resuspender el precipitado en 20 μ l de TE.
19. Cuantificar por fluorometría la cantidad de ADN eluido.

Marcaje Radioactivo e Hibridización de Sondas de ADN de

ADVERTENCIA

Todo trabajo que implique uso de material radioactivo debe realizarse bajo estrictas normas de seguridad establecidas en CIAT. Cualquier persona que manipule material radioactivo debe haber tomado un curso preparatorio y contar con la debida autorización.

A. Marcaje

1. Denaturar la sonda por calentamiento a 96°C durante 10 min.
2. Incubar en hielo hasta el momento del marcaje.
3. Preparar la mezcla maestra de marcaje según la siguiente información:

ADN sonda	100-200 ng
dCTP	4 µl
dTTP	4 µl
dGTP	4 µl
Buffer 10X	5 µl
Primer	5 µl
32P-ATP	5 µl
Klenow	2 µl
Agua destilada hasta un vol. final de	50 µl

4. Incubar a 37°C durante 1 h.
5. Pasar la sonda a través de una columna de Sephadex G-50 equilibrada con TE, centrifugando a 1500 rpm durante 3 min a TA.

B. Purificación de sonda en columnas de Sephadex G-50

1. Sellar con lana de vidrio la parte inferior de una jeringa de 1 ml soportada en un tubo falcon de 15 ml.
2. Llenar la jeringa con Sephadex G-50 equilibrado con TE, hasta 5 mm por debajo del tope de la jeringa.
3. Centrifugar a 1500 rpm durante 5 min a 4°C.
4. Repetir el paso anterior hasta completar el empaquetamiento de la columna.
5. Hidratar la columna con 100 µl de TE.
6. Colocar dentro del falcon un tubo de tapa rosca de 1.5 ml.

7. Adicionar la sonda marcada (aproximadamente 50 μ l) a la columna.
8. Sellar con parafilm.
9. Centrifugar a 1500 rpm durante 3 min a TA.
10. Remover el parafilm y descartar la jeringa.
11. Con ayuda de unas pinzas, sacar el tubo de 1.5 ml que contiene la sonda purificada (ver Nota 1).

C. Hibridización con sondas de ADN

1. Humedecer los filtros en 2X SSC.
2. Prehibridizar en bandejas plásticas durante 4 a 5 h (o toda la noche) a 65°C en buffer de prehibridización que contenga el esperma de salmón denaturado, con agitación constante a 50 rpm (ver Notas 2, 4 y 5).
3. Denaturar la sonda, marcada y purificada, a 96°C durante 10 min.
4. Incubar en hielo durante 5 min.
5. Agregar la sonda denaturada al buffer de prehibridización (ver Nota 3).
6. Incubar a 65°C durante toda la noche.

D. Lavados (ver Nota 6)

1. SSC 2X / SDS 0.1%, a 65°C durante 1 h.
2. SSC 1X / SDS 0.1 %, a 65°C durante 1 h.
3. SSC 0.5X / SDS 0.1 %, a 65°C durante 1 h.

E. Exposición

1. Dejar secar los filtros a TA.
2. En el casete de exposición, organizar los componentes de la siguiente forma:
 - Pantalla intensificadora
 - Filtros
 - Una lámina de acetato
 - Película
 - Pantalla intensificadora
3. Llevar el casete a -70°C durante el tiempo necesario, según la lectura de cuentas por minuto que tenga el filtro al final del proceso (ver Nota 7).

F. Revelado

1. Retirar el casete de -70°C y llevarlo inmediatamente al cuarto oscuro.
2. Colocar la película en el líquido revelador durante 5 min.
3. Lavar con abundante agua.
4. Transferir las películas al líquido fijador durante 5 min.
5. Lavar con abundante agua.
6. Dejar secar.

Notas:

1. Si por alguna razón es necesario guardar la sonda marcada, ésta debe conservarse a -20°C .
2. El volumen de solución de prehibridización depende de la cantidad de filtros que se coloquen en la bandeja. Para un filtro (7 x 20 cm) se agregan 50 ml de buffer, y para 4 filtros, 100 ml.
3. La solución de prehibridización es la misma que se utiliza en la hibridización.
4. Todas las soluciones deben ser precalentadas a las temperaturas en que ser utilizadas.
5. En general, las temperaturas deben ser controladas tan estrictamente como sea posible durante el proceso.
6. Después del segundo lavado se deben monitorear las cpm de las membranas. Los lavados se realizan según la homología de la sonda que se está hibridizando: hasta SSC 0.5X para un 80% de homología, y hasta SSC 0.02X para el 99% de homología.
7. Los filtros se consideran listos para exponer cuando las lecturas oscilan entre 400 y 1000 cpm.

MARCADORES MOLECULARES BASADOS EN PCR

Polimorfismos de ADN Amplificados Aleatoriamente (RAPD's)

Referencias:

Welsh, J. y M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18:7213-7218.

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Antoni Rafalski y S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 12:6531-6535.

A. Amplificación

1. En un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml, adicione los siguientes reactivos para el coctel de la reacción, según la siguiente tabla (ver Notas 1 y 2):

Reactivo	Conc. Stock	Arroz	Fríjol	Yuca	<i>Brachiaria</i>
Agua bd estéril					
Buffer	10X	1X	1X	1X	1X
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	2.0 mM	2.5 mM	1.8 mM
dNTP's	2.5 mM	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM
BSA	100X	1X	1X	-	1X
Primer	*	*	*	*	*
Taq polimerasa	5 U/μl	1 U	1 U	1 U	1 U
ADN	5 ng/μl	12.5 ng	50 ng	25 ng	50 ng
Vol. Final		12.5 μl	25 μl	12.5 μl	25 μl

* La concentración del *primer* puede variar en un rango de 6 a 10 μM. Se trabaja con volúmenes fijos.

2. Colocar las muestras de ADN en la caja de ELISA (ver Nota 3).
3. Agregar el coctel a cada una de las muestras.
4. Añadir a cada muestra suficiente aceite mineral que la cubra totalmente (aprox. 50-70 μl).
5. Cubrir la placa con vinilpel.

6. Colocar la placa en el termociclador (MJ. PTC-100) previamente programado según las siguientes opciones (ver Notas 4 y 5):

Programa largo

Paso 1	94°C	5 min
Paso 2	94°C	1 min
Paso 3	36°C	1 min
Paso 4	72°C	2 min
Paso 5	<i>34 veces desde el paso 2 hasta el paso 4.</i>	
Paso 6	72°C	7 min
Paso 7	4°C	5 min

Programa corto

Paso 1	94°C	5 min
Paso 2	94°C	1 min
Paso 3	36°C	30 seg
Paso 4	72°C	1 min
Paso 5	<i>34 veces desde el paso 2 hasta el paso 4.</i>	
Paso 6	72°C	7 min
Paso 7	4°C	5 min

Notas:

1. La enzima debe añadirse justo antes de mezclar el coctel con las muestras.
2. Con cada *primer* que se evalúe debe realizarse un control negativo. La cantidad de ADN se reemplaza por agua bidestilada (bd) estéril.
3. El trabajo sobre la placa de ELISA debe realizarse cuidadosamente, para evitar contaminación entre las diferentes muestras.
4. Los productos de la amplificación pueden ser almacenados a 4°C durante varios días, o a -20°C durante períodos de tiempo más largos.
5. El último paso de cada programa se hace a 4°C; a esta temperatura puede permanecer durante algunas horas.

B. Electroforesis

1. Preparar un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

PRECAUCIÓN

El bromuro de etidio es altamente cancerígeno. Deben usarse guantes para manipularlo.

2. Añadir 1/10 del volumen de Blue Juice 10X a cada una de las muestras.
3. Sembrar las muestras en el gel e incluir un marcador de tamaño molecular.
4. Correr la electroforesis a 70-90 voltios durante 3 h aproximadamente.
5. Observar en el transiluminador de UV el producto de la amplificación y tomar foto.

Notas:

1. El TBE puede reutilizarse varias veces teniendo cuidado de que esté bien mezclado en la cámara antes de reusarlo.
2. La agarosa puede reciclarse hasta cuatro veces.

Análisis de Segregantes Agrupados

Referencia:

Michelmore, R. W., I. Paran y R. V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9828-9832.

Este protocolo se denomina en inglés Bulk Segregant Analysis.

1. Seleccionar los materiales de la progenie que utilizán en el estudio.
2. Mezclar el ADN de todos ellos hasta una concentración final de 5 ng/ μ l.
3. Utilizar esta mezcla para RAPD's como si fuera una muestra corriente.

Nota:

Por lo regular, se utilizan entre 4 y 5 individuos para el análisis.

Polimorfismos de Fragmentos Amplificados (AFLP's)

Referencia:

Vos, P. R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Freijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. (in press, Nucleic Acids Res.)

A. Preparación de adaptadores

1. Mezclar 1430 pmoles de cada oligo que compone el adaptador para MseI.
2. Completar a un volumen de 28.6 μ l con agua bd estéril, para que quede a una concentración final de 50 pmoles/ μ l.
3. Mezclar en un tubo aparte 715 pmoles de cada componente para el adaptador EcoRI.
4. Completar con agua bd estéril a un volumen de 143 μ l, para que quede a una concentración final de 5 pmoles/ μ l.
5. Ambos tubos se incuban durante 10 min a 65°C.
6. Dejar enfriar y almacenar a -20°C.

B. Doble digestión y ligación de adaptadores

1. Tomar 500 ng de ADN y agregar una mezcla maestra que contenga:

EcoRI	5 unidades
MseI	5 unidades
One-Phor-All buffer 10X	1X
DTT (50 mM)	5 mM

2. Completar con agua bd estéril a un volumen final de 50 μ l.
3. Incubar durante 1 h a 37°C en baño de agua.
4. Agregar 10 μ l de una mezcla maestra que contenga:

Adaptador para EcoRI.....	5 pmoles
Adaptador para MseI	50 pmoles
ATP	1.2 mM
One-Phor All buffer 10X	1X
DTT (50 mM)	2.5 mM
T4 ADN ligasa	1 U

5. Incubar durante 3 h a 37°C en baño de agua.

C. Amplificación selectiva en cascada

1. Utilizar *primers* para cada uno de los adaptadores que contienen un nucleótido selectivo al azar (+1/+1) y tres nucleótidos selectivos al azar (+3/+3).
2. Preparar Mix 1 y Mix 2 para PCR +1/+1 (ver Anexo 1).
3. Mezclar 5 µl de ADN producto de la doble digestión y la ligación con 25 µl de Mix 1 y 20 µl de Mix 2 para PCR +1/+1
4. Colocar las muestras en MJ PTC-100 y correr PCR +1/+1 **en 35 ciclos** con las siguientes condiciones:

94°C	30 seg
55°C	30 seg
72°C	60 seg

5. Tomar 20 µl del producto del PCR y observar un barrido de bajo tamaño molecular en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

PRECAUCIÓN

El bromuro de etidio es altamente cancerígeno. Deben usarse guantes para manipularlo.

6. Diluir 1:20 con TE.
7. Marcar radioactivamente 5 ng de *primer* para EcoRI (+3), agregando una mezcla maestra que contenga lo siguiente:

³² P gamma ATP (3000 Ci/mmol)	0.2 µl
One-Phor-All buffer 10X	1 X
T4 PNK	0.1 U

ADVERTENCIA

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

8. Incubar durante 30 min a 37°C.
9. Inactivar la enzima durante 10 min a 70°C.
10. Preparar Mix 1 y Mix 2 para PCR +3/+3 (ver Anexo 1).
11. Mezclar 5 µl de la dilución obtenida en el paso 6 con 5 µl de Mix 1 y 10 µl de Mix 2, +3/+3.

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

94°C	30 seg
65°C	30 seg (-0.7°C / ciclo)
72°C	60 seg

Hacer 12 ciclos hasta alcanzar la temperatura de alineamiento del primer de 56°C

94°C	30 seg
56°C	30 seg
72°C	60 seg

Hacer 24 ciclos.

13. Almacenar a 4°C hasta el momento de correr el gel.

D. Electroforesis en gel de poliacrilamida

PRECAUCIÓN

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. Lavar muy bien con abundante agua y jabón los dos vidrios del aparato de secuenciación (ver Nota 1).
2. Limpiarlos perfectamente con etanol absoluto.
3. Aplicar una capa de sigmacote (Sigma) al vidrio que contiene la cámara de buffer de corrida.
4. Dejar evaporar el sigmacote durante 10 min.
5. Armar el aparato (ver Notas 1, 2 y 3).
6. Sellar el borde inferior y los laterales con cinta tesa impermeable.
7. Mezclar:

Acrilamida 6% (19:1)	120 ml
TEMED	120 µl
Persulfato de amonio 10%	600 µl

8. Con ayuda de una jeringa de 50 ml agitar bien la solución tomándola y dispensándola dos veces.
9. Inclinar el aparato y servir la acrilamida cuidadosamente por uno de los extremos.

10. Colocar los peines con el borde liso hacia adentro del gel.
11. Cubrir el resto del peine con acrilamida.
12. Dejar polimerizar la acrilamida por lo menos 2 h o toda la noche (ver Nota 4).
13. Colocar 300 ml de TBE 1X precalentado en la cubeta inferior.
14. Retirar la cinta del borde inferior y montar el aparato sobre la cubeta inferior, ajustando los accesorios.
15. Llenar la cubeta superior con 1500 ml de TBE 1X precalentado.
16. Retirar los peines.
17. Con ayuda de una jeringa de 50 ml, remover la urea que se acumula en el borde superior del gel.
18. Colocar los peines cuidadosamente de tal manera que los dientes sólo penetren un poco el gel.
19. Precorrer el gel a 1800-2000 V durante 30 a 60 min hasta que alcance la temperatura de 50°C (ver Nota 5).

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 haber tomado un curso preparatorio; además, debe contar con la debida autorización.

20. Tomar 3 μ l del amplificado +3/+3 y añadir un volumen de stop solution.
21. Denaturar las muestras incubando durante 3 min a 95°C.
22. Colocar las muestras en un baño de hielo hasta el momento de servir el gel.
23. Servir de 3.0 a 3.5 μ l de cada reacción.
24. Correr electroforesis a 40-50 V/cm, durante aproximadamente 2 h.
25. Descartar el buffer de la cubeta superior.
26. Retirar los brazos y la cinta de los bordes laterales.
27. Separar cuidadosamente los vidrios y dejar el gel sobre el vidrio no siliconizado.
28. Colocar cuidadosamente una hoja de Whatman 3MM sobre el gel y levantarlo.
29. Cubrir el gel en vinilpel.
30. Secar al vacío durante 1 h a 80°C
31. Exponer durante toda la noche sin pantalla intensificadora a TA.

Notas:

1. Durante la preparación y el lavado del aparato de secuencia deben usarse guantes.
2. Los brazos laterales deben quedar 1 cm por encima del borde inferior.
3. Si se deja el gel polimerizando toda la noche, colocar toallas de papel embebidas en TBE 1X en la parte superior del gel y sellarlo con vinilpel.
4. Para mejores resultados, el gel no debe calentarse por encima de 50°C.

Caracterización de Microsatélites

A. Método No Radioactivo

1. Detección de polimorfismos

1. Amplificar los microsatélites en las muestras de ADN deseadas usando el protocolo descrito en la siguiente parte "Condiciones de amplificación de material a evaluar", ajustando sólo la temperatura de alineamiento de acuerdo al T_m 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 volúmen final de 50 μ l utilizando las siguientes condiciones:

dNTPs	0.2 mM
MgCl ₂	1.5 mM
One-Phor All Buffer 10 X	1 X
Taq Pol	2.0-2.5 U
Primers	0.2 μ M

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

PRECAUCIÓN

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
H ₂ O	28.0 ml

Degasificar aplicando vacío durante 10 min.

Temed	0.04 ml
-------------	---------

Verter el gel y dejar polimerizar durante 1 h.

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 Metaphor 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.

Caracterización de Microsatélites

B. Método Radiactivo

1. Detección de polimorfismos

1. Amplificar los microsatélites en las muestras de ADN 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 10 X	1 X
[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 haber 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	1 X
MgCl ₂	1.5 mM
<i>Reverse Primer</i>	0.2 μM
dNTP's	0.2 mM
<i>Forward Primer</i> [γ ³² P]	0.1 μM
Taq polimerasa	1 U
ADN	50 ng

2. 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

Hacer 10 ciclos

94°C	10 seg
56°C	1 min
72°C	2 min

Hacer 20 ciclos

72°C	10 min
------------	--------

4. Electroforesis en gel de poliacrilamida

PRECAUCIÓN

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 AFLP's.
2. Preparar Acrilamida (19:1) 7% Urea 7.6 M.

3. Mezclar:

Acrilamida 7% (19:1)	120 ml
TEMED	120 μ l
Persulfato de amonio 10%	120 μ l

SECUENCIACIÓN DE ADN dc

Secuenciación de ADN dc

A. Preparación del plásmido

1. Tomar aproximadamente 4 μg de ADN de plásmido purificado por Wizard Clean Up System (Promega) (ver Nota 1).
2. Agregar 3 μl de solución denaturalizante.
3. Completar con agua destilada estéril hasta 20 μl .
4. Incubar durante 5 min a TA.
5. Precipitar con 4 μl de acetato de sodio 3M pH:5.2 y 80 μl de etanol absoluto.
6. Incubar durante 20 min a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
7. Centrifugar a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C .
8. Retirar cuidadosamente el sobrenadante por la pared del tubo opuesta a aquella en que se encuentra el precipitado.
9. Lavar con 100 μl de etanol al 70%.
10. Repetir los pasos 7, 8 y 9.
11. Secar al vacío durante 15 min.

B. Apareamiento

1. Resuspender el precipitado obtenido en el paso 11 en 7 μl de agua destilada estéril.
2. Agregar 2 μl de buffer de reacción 5X.
3. Agregar 1 μl de *primer* (50 ng/ μl).
4. Incubar 1 h a 37°C .
5. Incubar en hielo hasta el momento del marcaje (ver Nota 2).

C. Marcaje

ADVERTENCIA

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

1. Diluir el Gmix 1:5 con agua destilada estéril (ver Nota 3).
2. Diluir la Secuenasa 1:8 en buffer de dilución (ver Nota 3).

3. A 10 μ l de la solución de apareamiento agregar:

Gmix diluido	2 μ l
DTT(0.1M)	1 μ l
³² P-dATP (3000 Ci/mmol)	1 μ l
Secuencia diluida	2 μ l

4. Incubar durante 3 min a TA.
5. Colocar 2.5 μ l de cada dideoxinucleótido en tubos separados.
6. Precalentar durante 1 min a 37°C.
7. Agregar 3.5 μ l de reacción de marcaje a cada tubo.
8. Incubar la reacción durante 5 min a 37°C.
9. Agregar 4 μ l de solución de parada a cada tubo.
10. Almacenar a -20°C hasta el momento de correr la electroforesis.
11. Hacer gel de poliacrilamida (ver Nota 4).

Notas:

1. Durante todo el proceso deben usarse tubos taparosca de 1.5 ml.
2. En el paso 5 de la sección de apareamiento se recomienda que el tiempo de incubación no sea mayor de 1 h.
3. El Gmix diluido puede almacenarse hasta un mes a -20°C y la Secuencia diluida es estable durante 1 h a 4°C.
4. El gel de poliacrilamida se prepara según las indicaciones descritas en la sección de AFLP's, modificando las cantidades: la de TEMED es 150 μ l y la de persulfato de amonio 15% es 180 μ l, para 100 ml de acrilamida (19:1) 6%.

**MARCAJE RADIOACTIVO Y
NO RADIOACTIVO DE
OLIGONUCLEÓTIDOS**

Marcaje Radioactivo de Oligonucleótidos

Referencia:

Sambrook et al. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual.

Marcaje e Hibridización con Gamma ^{32}P -ATP

A. Marcaje

1. Mezclar en un tubo taparosca debidamente marcado:

Oligonucleótido (10 pmol/ul)	1 μl
Buffer para PNK 10X	2 μl
^{32}P -gamma ATP (10 mCi/ml)	5 μl
T4 PNK (10U/ μl)	1 μl
Agua	11 μl

ADVERTENCIA

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

2. Incubar durante 45 min a 37°C.
3. Inactivar la enzima durante 15 min a 68°C.
4. Purificar el oligonucleótido marcado mediante columnas de Sephadex G-50.
5. Colocar 2 μl en tubos de contador de centelleo y ubicarlos en la gradilla con la tarjeta #2.
6. Oprimir la orden AUTOCOUNT.

B. Hibridización

1. Calcular el T_m del oligonucleótido que se marcará para determinar la temperatura de pre & hibridización.
2. Añadir 45 ml por filtro de buffer de prehibridización en la bandeja.
3. Denaturar DNA de esperma de salmón (5 mg/ml) por calentamiento durante 10 min a 100°C.
4. Incubar en hielo durante 5 min.
5. Añadir 5 ml al buffer de prehibridización.

6. Incubar a la temperatura indicada durante toda la noche sin agitación.
7. Añadir la sonda marcada y purificada.
8. Incubar durante toda la noche a la misma temperatura de prehibridización.

C. Lavados y exposición

1. 6X SSC/0.1% SDS, 2 veces durante 15 min a TA.
2. 6X SSC/0.1% SDS, una vez durante 15 min a la temperatura de hibridización.
3. Medir con Geiger los cpm de cada filtro.
4. Exponer los filtros a -70°C con doble pantalla intensificadora el tiempo necesario según la lectura en cpm del filtro.
5. Revelar la película.

Nota:

1. Las temperaturas, los tiempos y las condiciones de astringencia en todo el proceso deben ser estandarizadas para cada oligonucleótido, teniendo en cuenta su T_m , su longitud y su secuencia.

Marcaje 3' Terminal de Oligos con Biotina

Referencia:

Korger, B. D. 1989. Preparación y uso de sondas oligonucleótidos biotinilados. Focus Vol.11 #3. (Con modificaciones).

1. Mezclar en un tubo taparosca lo siguiente:

Oligonucleótido	100 pmoles
Buffer Tailing 5X	1 X
Biotina-14- dATP (0.4 mM)	20 μ M
Terminal Transferasa	20 U
Agua hasta completar un vol. final de	50 μ l

2. Incubar durante 1 h a 37°C.
3. Detener la reacción agregando 2 μ l de EDTA 0.5M.
4. Almacenar a -20°C.
5. Usarla como sonda en procesos de hibridización no radioactivo.

CONSTRUCCIÓN DE LIBRERÍAS GENÓMICAS

Librerías Genómicas en Plásmido

Referencia:

Sambrook et al. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual.

A. Digestión del ADN genómico

1. Mezclar en un tubo eppendorf lo siguiente:

ADN nuclear	20 µg
Espermidina 40 mM	20 µl
Buffer10X	20 µl
Enzima apropiada	80 U
Agua bd estéril hasta un vol. final de	200 µl

2. Incubar durante 5 a 6 h a 37°C.
3. Preparar gel de agarosa 1% (LMP).
4. Correr la electroforesis a 30 a 40 voltios con marcadores de tamaño molecular.
5. Teñir el gel con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

PRECAUCIÓN

El bromuro de etidio es altamente cancerígeno. Deben usarse guantes para manipularlo.

6. Ubicar los fragmentos entre 0.3 y 3.0 Kb del ADN nuclear digerido y eluirlos del gel.

B. Elución de fragmentos

Se puede utilizar cualquiera de los procedimientos descritos en el protocolo Elución de Bandas de Geles de Agarosa.

C. Digestión y defosforilación del plásmido

1. Mezclar en un tubo eppendorf:

ADN plasmídico	20 µg
Espermidina 40 mM	20 µl
Buffer 10X	20 µl
Enzima apropiada	60 U
Agua bd estéril hasta un vol. final de	200 µl

2. Incubar a 37°C durante 5 h.

3. Verificar la digestión con 200 ng de ADN mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.
4. Usar como control en la misma electroforesis:
 - Plásmido sin digerir
 - Marcador de tamaño molecular
5. Si la digestión es incompleta, agregar 60 U más de enzima e incubar durante 4 h más; si no, continuar con el paso 6.
6. Extraer la muestra con fenol:cloroformo (1:1).
7. Precipitar el ADN añadiendo 2 volúmenes de etanol a -20°C durante 2 h.
8. Recuperar el ADN por centrifugación a 14,000 rpm durante 15 min a 4 °C.
9. Resuspender el precipitado seco en 90 µl de 10 mM Tris-HCl pH:9.3.
10. Tomar 200 ng y guardarlos a -20 °C, para usarlos en la ligación C.
11. Agregar al resto del plásmido digerido:

Buffer de defosforilación 10X 10 µl
 CIP (ver Nota 1) 1 U/100 pmoles

12. Incubar durante 30 min a 37°C.
13. Agregar SDS a una concentración final de 0.5%.
14. Agregar EDTA (pH:8.0) a una concentración final de 5 mM.
15. Inactivar la enzima por calentamiento a 65°C durante 1 h o a 75°C durante 10 min.
16. Enfriar la reacción a TA.
17. Purificar el ADN mediante 2 extracciones con fenol-cloroformo (1:1).
18. Agregar 0.1 volumen de acetato de sodio 3M (pH:7.0) y 2 volúmenes de etanol 100%.
19. Mezclar bien por inversión.
20. Incubar durante 1 h a -20°C.
21. Recuperar el ADN por centrifugación a 14,000 rpm durante 20 min a 4°C.
22. Lavar el precipitado con etanol al 70% a 4°C.
23. Disolver el ADN precipitado en TE (pH:7.6) hasta una concentración final de 100 µg/ml.
24. Almacenar en alícuotas de 50 µl a -20°C.

Notas:

1. 2 μg de un plásmido linealizado de 5 Kb de longitud contiene aproximadamente 1.4 pmoles de residuos terminales 5'-fosfato.
2. Este sistema funciona para aquellos plásmidos que tienen el gen de la β -Galactoisidasa, por ejemplo: serie pUC, pBluescript, etc.

D. Verificación de la defosforilación

1. Realizar las siguientes ligaciones:

Ligación A: 200 ng de plásmido defosforilado.

Ligación B: 200 ng de plásmido defosforilado 200 ng de ADN lambda digerido con la respectiva enzima de restricción.

Ligación C: 200 ng de plásmido linealizado sin defosforilar (*Ver sección C. Digestión y defosforilación del plásmido*).

2. Para cada ligación, agregar:

Buffer de ligación 10X	1 μl
ATP 10 mM	1 μl
ADN ligasa del fago T4	1.5 U Weiss
Agua bd estéril hasta un vol. final de	10 μl

3. Incubar toda la noche a 16°C.
4. Transformar células competentes *E. coli* DH5 alfa con 0.1 y 1 μl de cada ligación (ver Nota 1).

PRECAUCIÓN

Cualquier trabajo que involucre cultivo de bacterias debe realizarse en cámara de flujo laminar y siguiendo todas las normas de bioseguridad establecidas.

5. Como control positivo, transformar con 10 pg de plásmido sin digerir (ver Nota 2).
6. Plaquear 1, 10 y 50 μl de cada transformación en placas LB suplementadas con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), X-gal (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), IPTG (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).
7. Incubar durante 16 h a 37°C.
8. Contar el número de colonias presentes en cada placa.

Notas:

1. La defosforilación debe reducir la eficiencia de la transformación con respecto al plásmido linearizado por un factor de 50 o más (la ligación B debe ser, con respecto a la C, por lo menos cinco veces mayor).
2. El control positivo del plásmido sin digerir da el título de células transformadas por μg de ADN.
3. Realizar un control negativo, transformando células sin ADN.

E. Ligación del ADN nuclear

1. Realizar las siguientes dos reacciones:

Ligación 1: 200 ng de plásmido digerido defosforilado
 + 200 ng de ADN nuclear digerido por la
 enzima apropiada y eluido.

Ligación 2: 130 ng de plásmido digerido defosforilado
 + 270 ng de ADN nuclear digerido por la
 enzima apropiada y eluido.

Por cada ligación, agregar:

Buffer de ligación 10X	1 μl
ATP 10 mM	1 μl
ADN ligasa del fago T4	1.5 U Weiss
Agua bd estéril hasta un vol. final de	10 μl

2. Incubar a 16 °C durante toda la noche.
3. Transformar con 1 y 2 μl de cada ligación.
4. Incubar a 37°C durante 16 h.
5. Contar las colonias recombinantes (blancas) (ver Nota 1).
6. Calcular título y eficiencia.
7. Escoger el mejor título para realizar más transformaciones.

Notas:

1. Después de la transformación, dos tipos de colonias serán evidentes:
 - Colonias azules: son las colonias que poseen plásmidos no recombinantes.
 - Colonias blancas: son las colonias que poseen plásmidos recombinantes.

F. Selección de sondas de baja copia

1. Seleccionar y resembrar las colonias blancas (recombinantes) en medio LB líquido con ampicilina (100 µg/ml).
2. Hacer miniprep de cada colonia.
3. Colocar 10 ng de cada plásmido recombinante en un filtro de nylon.
4. Dejar secar la muestra a TA durante 5 min.
5. Denaturar el ADN sumergiendo el filtro durante 1 min en la solución:
0.5 M NaOH
1.5 M NaCl
6. Neutralizar durante 1 min en:
1.5 M NaCl
0.5 M Tris-HCl, pH:7.2
1.0 mM EDTA
7. Secar el filtro a TA.
8. Fijar en un transiluminador UV durante 3 min, colocando el ADN en contacto directo con el transiluminador.
9. Hibridizar el filtro con ADN nuclear marcado.
10. Seleccionar los plásmidos que dieron una señal positiva tenue después de la hibridización.

Notas:

1. Según la intensidad de la señal de hibridización, se pueden clasificar 3 tipos de sondas:
Sondas de baja copia: señal tenue o negativa
Sondas medianamente repetitivas: señal intermedia
Sondas altamente repetitivas: señal fuerte

Librerías Genómicas en Lambda Zap II

Referencia:

Undigested Lambda Zap II Cloning Kit, Stratagene.

A. Ligación de sitios COS

1. Mezclar en un tubo de 0.5 ml lo siguiente:

DNA Lambda ZAP II	10 µg
Buffer de ligación 10X	2 µl
rATP (pH:7.5) 10 mM	2 µl
T4 DNA ligasa (4 U/µl)	2 µl

2. Completar con agua destilada a un volumen final de 20 µl.
3. Incubar toda la noche a 4°C.
4. Calentar durante 15 min a 68°C (para inactivar la enzima).
5. Enfriar durante 15 min a TA.

Nota:

La ligación de sitios COS sólo es necesaria cuando se va a realizar el llenado parcial de brazos cortados.

B. Digestión del ADN de Lambda

1. Mezclar en un tubo eppendorf:

DNA Lambda ZAP II ligado en COS	5 µg
Enzima XhoI	25 U
Buffer 10X	5 µl
BSA	0.5 µl
Espermidina (40 mM)	5.0 µl
Completar con agua destilada a un vol. final de	50 µl

2. Incubar durante 2 h 30 min a 37°C.
3. Extraer una vez con fenol:cloroformo (1:1).
4. Extraer una vez con cloroformo.
5. Agregar acetato de sodio a la fase acuosa, para que quede a una concentración final de 0.3M.
6. Agregar 2.5 volúmenes de etanol al 100% frío.
7. Incubar a -70°C durante 15 min.
8. Centrifugar a 14000 rpm durante 10 min a 4°C.
9. Lavar el precipitado con etanol al 70%.
10. Dejar secar el precipitado a TA.
11. Resuspender en 10 µl de TE.

C. Digestión de ADN total para clonar

1. Mezclar en un tubo eppendorf lo siguiente:

ADN	100 µg
Buffer 10X	80 µl
Espermidina (40 mM)	80 µl
Enzima Sau 3AI (5 U/µl)	120 µl (6 U/µg)
Completar con agua bd un vol. final de	800 µl

2. Incubar a 37°C toda la noche.
3. Realizar electroforesis en gel de agarosa LMP al 0.6% a 22 V durante toda la noche, con marcador de tamaño molecular del ADN de Lambda digerido con Hind III.
4. El ADN que se encuentra por debajo de la banda de 0.5 Kb del marcador se corta, se extrae y se purifica con fenol-cloroformo.

D. Llenado parcial de brazos cortados

1. Después de purificar con Fenol-Cloroformo, resuspender en 5 µl (5 µg) de ADN de lambda y en 100 µl (800 ng) de ADN de fríjol.
2. Para llenar 5µg de ADN de Lambda ZAP II, mezclar:

dTTP 10 mM	0.5 µl
dCTP 10 mM.....	0.5 µl
Buffer 10X Parcial Fill-in.....	1.0 µl
Klenow (5 U/µl).....	0.3 µl
Agua bd.....	7.7 µl

3. Incubar durante 30 min a TA.
4. Inactivar la enzima durante 15 min a 65°C.
5. Hacer una limpieza con fenol-cloroformo.

E. Ligación

1. Determinar la relación [ADN foráneo:brazos de Lambda] ideal para la ligación.
2. Mezclar en varios tubos de 0.5 ml lo siguiente:

ADN Lambda Zap II digerido	1 µg
Buffer 10X	0.5 µl
T4 DNA ligasa (4 U/µl)	0.5 µl
rATP (10 mM)	0.5 µl

3. A cada tubo añadir diferentes cantidades de ADN foráneo que estén por encima y por debajo de la cantidad ideal predeterminada.

4. Completar con agua destilada a un volumen final no superior a 5 μ l.
5. Incubar durante 2 días a 4°C.

F. Empaquetamiento in vitro (Gigapack II Packaging Extract, Stratagene)

PRECAUCIÓN

Todo trabajo que involucre el uso del bacteriófago Lambda debe realizarse en cámara de flujo laminar, observando todas las normas de bioseguridad necesarias.

1. Retirar del congelador de -80°C los extractos que se utilizarán y colocarlos en baño de hielo.
2. Descongelar entre los dedos el extracto "Freeze/Thaw".
3. Añadir el ADN inmediatamente (ver Nota 1).
4. Agregar 15 μ l de extracto "Sonic".
5. Agitar suavemente con los dedos, teniendo cuidado de no producir burbujas.
6. Dar un spin 3 a 5 seg.
7. Incubar durante 2 h a TA (ver Nota 2).
8. Añadir 500 μ l de TMG y 20 μ l de cloroformo.
9. Mezclar fuertemente.
10. Dar un spin de 5 seg.
11. Almacenar a 4°C.

Notas:

1. En el paso 3 se deben añadir de 1 a 4 μ l del producto de la ligación, que deben contener entre 0.1 y 5.0 μ g de ADN.
2. En el paso 7 es muy importante observar el tiempo de empaquetamiento, ya que períodos largos de incubación pueden reducir dramáticamente la eficiencia de empaquetamiento.

Preparación de Células Competentes *E. coli* XL1 Blue MRF'

PRECAUCIÓN

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

1. Obtener colonias aisladas de la cepa mediante siembra por aislamiento en medio sólido.
2. Tomar una colonia aislada e incubarla a 37°C durante toda la noche en 50 ml de LB suplementado con maltosa al 0.2% y sulfato de magnesio 10 mM.
3. Centrifugar a 3000 rpm durante 10 min a 4°C.
4. Descartar el sobrenadante.
5. Resuspender en 10 ml de sulfato de magnesio 10 mM.
6. Almacenar a 4°C.

ANEXOS

ANEXO 1: Buffer, Medios y Cocteles de Reacción

BUFFER 10X PARA T4-PNK

Tris-HCl pH 7.6	0.5 M
MgCl ₂	0.1 M
DTT	50 mM
Espermidina	1 mM
EDTA pH 8.0	1 mM

Almacenar a -20°C.

BUFFER PARA PCR 10X

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

BUFFER DE PRE & HIBRIDIZACION MARCAJE DC

Na ₂ HPO ₄ pH: 7.2	0.5 M
SDS	7 %
BSA	1 %
ADN esperma de salmón	100 µg/ml

(Previamente denaturado durante 10 min a 100°C y colocado luego en baño de hielo)

BUFFER DE PRE & HIBRIDIZACIÓN MARCAJE OLIGOS

SSC	6X
NaH ₂ PO ₄	20 mM
SDS	0.4%
Denhardt's	5X
ADN esperma de salmón	500 µg/ml

(Previamente denaturado durante 10 min a 100°C y colocado luego en baño de hielo)

BUFFER TNE 10X

En 800 ml de agua destilada, disolver:

Tris Base	12.1 g
EDTA-Na ₂	3.7 g
NaCl	58.4 g

Ajustar el pH a 7.4 con HCl.

Completar con agua destilada hasta 1000 ml.

Filtrar y almacenar a 4°C.

BUFFER PARA FLUOROMETRÍA

Para 100ml de buffer, medir muestras de ADN que estén entre 100 y 200 ng/µl

Solución stock Hoechst	10 µl
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	40 ml

Ajustar volumen con agua destilada.

BUFFER STET

NaCl	0.1 M
Tris-HCl pH 8.0	10 mM
EDTA pH 8.0	1 mM
Tritón X-100	5%

BUFFER DE EXTRACCIÓN ARROZ & BRACHIARIA

Tris-HCl pH 8.0	100 mM
EDTA pH 8.0	50 mM
NaCl	500 mM
SDS (w/v).....	1.25%

Autoclavar.

Adicionar 0.38 g de bisulfito de sodio por cada 100 ml de Buffer.

BUFFER DE EXTRACCIÓN FRIJOL

Tris-HCl pH 8.0	150mM
EDTA	15mM
NaCl	1M
CTAB	1.5%
β -Mercaptoetanol.....	1.2%
PVP	1%

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

BUFFER DE EXTRACCIÓN STYLOSANTHES

CTAB	2%
NaCl	1.4 M
β -Mercaptoetanol.....	0.2%
EDTA	20 mM
Tris-HCl pH 8.0	100 mM

BUFFER DE EXTRACCIÓN YUCA

Tris-HCl.....	100mM
EDTA	50mM
NaCl	500mM

Autoclavar.

Agregar:

β -Mercaptoetanol.....	0.07%
PVP	1%

MEDIO LB LÍQUIDO

A 950 ml de agua desionizada 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.

Autoclavar.

MEDIO LB SÓLIDO

A 900 ml de agua desionizada agregar:

Bacto triptona.....	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Agar.....	15 g

Disolver.

Ajustar pH a 7.0 con NaOH.

Completar volumen a 1000 ml.

Autoclavar.

MEDIO SOC

Bacto triptona.....	2%
Extracto de levadura	0.5%
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

Autoclavar.

Adicionar glucosa esterilizada por filtración. para una concentración final de 20 mM.

Ajustar pH a 7.0.

MEDIO DE CONSERVACIÓN

MgSO ₄	10 mM
Tris-HCl pH 7.5	10 mM
Glicerol	30%

MIX 1 PARA PCR +1/+1

Primer para Eco RI (+1).....	75 ng
Primer para Mse I (+1).....	75 ng
dNTP's	200 µM

Agua bidestilada estéril hasta un volumen de 25 µl.

MIX 2 PARA PCR +1/+1

Taq polimerasa	1 U
Buffer para PCR	1X

Agua bidestilada estéril hasta un volumen de 20 µl.

MIX 1 PARA PCR +3/+3

Primer para Eco RI (+3) marcado	5 ng
Primer para Mse I	30 ng
dNTP's	200 µM

Agua bidestilada estéril hasta un volumen de 5 µl.

MIX 2 PARA PCR +3/+3

Taq Polimerasa	0.4 U
Buffer para PCR	1X

Agua bidestilada estéril hasta un volumen de 10 µl.

T10E1

Para 500 ml, mezclar:

Tris-HCl 1M pH 8.0	5 ml
EDTA 0.5M	1 ml

Completar el volumen con agua destilada. Autoclavar y guardar a 4°C.

T50E10

Para 500 ml mezclar:

Tris-HCl 1M pH 8.0	25 ml
EDTA 0.5M	10 ml

Completar el volumen con agua destilada. Autoclavar y guardar a 4°C.

TOP AGAROSA

Para 100 ml, pesar:

Caseína enzimática hidrolizada.....	1 g
Extracto de levadura	0.5 g
Cloruro de sodio	0.3 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Agarosa	0.7 g

Autoclavar.

Enfriar hasta 60°C.

Adicionar 1ml de MgSO₄ 1M y 2.5 ml de Tris-HCl 1M pH 7.5.

ANEXO 2: Soluciones Stock

ACRILAMIDA 30% (Acrilamida:bis-Acrilamida 19:1)

PRECAUCIÓN

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 28.5 g
Bis-acrilamida 1.5 g

Llevar a 100 ml con agua destilada.

ACRILAMIDA 6% 7.5M UREA

Acrilamida 30% 20 ml
Urea 42 g
TBE 10X 10 ml

Completar con agua destilada a 100 ml.
Filtrar la solución por 0.22 μ m y almacenar en oscuridad a 4°C.

ADN ESPERMA DE SALMÓN 5 mg/ml

Pesar 1 g de ADN esperma de salmón y disolverlo en 200 ml de agua. Agitar hasta que el ADN se humedezca y luego autoclavar durante 30 min.

Almacenar a -20°C.

Antes de usar ésta solución se debe calentar a 100°C durante 10 min y luego pasarla a un baño de hielo.

ACETATO DE AMONIO 2M

En 350 ml de agua destilada disolver 77.08 g de acetato de amonio

Completar el volumen a 500 ml
Autoclavar.

ACETATO DE POTASIO 5M

En 900 ml de agua destilada disolver 490.75 g de acetato de potasio.

Ajustar el volumen a 1000 ml.
Autoclavar.

ACETATO DE SODIO 3M

En 900 ml de agua destilada disolver 408.1 g de acetato de sodio.

Ajustar el pH a 5.2 con ácido acético glacial.
Completar el volumen a 1000 ml.
Autoclavar.

AMPICILINA 100 mg/ml

Para preparar 10 ml, pesar 1 g de ampicilina y disolver en agua destilada estéril.
Filtrar por 0.22 μ m
Alicuotar y almacenar a -20°C.

BLUE JUICE

Preparar una solución con azul de bromofenol al 0.25% y Glicerol en agua al 30%.

Almacenar a 4°C.

BROMURO DE ETIDIO 10 mg/ml**PRECAUCIÓN!**

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.

En 100 ml de agua disolver 1 g de bromuro de etidio.

Almacene en botella oscura y a 4°C.

CLOROFORMO-OCTANOL 24:1**PRECAUCIÓN**

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

Para 500 ml, mezcle:

Octanol 20 ml
Cloroformo 480 ml

CLORURO DE CESIO 2:1.9

Cloruro de Cesio 100 g
Completar con agua hasta 60 ml

CTAB 10%

Para preparar 1000 ml pesar 100 g de CTAB.

DENHARDT'S

Para preparar 500 ml, mezclar:

BSA 5g
Ficoll 5g
Polyvinil pirrolidona 5g

Alicuotar y almacenar a -20°C.

EQUILIBRAR FENOL**PRECAUCIÓN!**

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.

1. Hidratar el fenol a 68°C en baño maría.
2. Agregar hidroxiquinolina a una concentración final de 0.1%.
3. Agregar un vol de Tris-HCl 0,5 M pH 8.0.
4. Agitar con magneto durante 30 min.
5. Dejar sin agitación durante 15 min.
6. Descartar la fase acuosa.
7. Añadir de 200 a 300 ml de Tris-HCl 0.1 M pH 8.0.
8. Repetir 3 ó 4 veces desde el paso 7 hasta que el pH del fenol esté entre 8.0 y 8.2.
9. Almacenar a 4°C con una capa de Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 (aproximadamente 200 ml).

ESPERMIDINA 40mM

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

EDTA 0.5M pH 8.0

Para preparar 1 litro de EDTA (0.5M)

EDTA 186.1 g
NaOH 18 g

Ajustar pH a 8.2.
Autoclavar.

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

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.

Para preparar un litro, mezcle:

Cloroformo 480 ml
Octanol 20 ml
Fenol equilibrado 500 ml

HCl 2.5N**PRECAUCIÓN**

El HCl es un ácido fuerte. Debe trabajarse en cámara de extracción, con guantes; evite respirar los vapores.

Para 500 ml, tomar 104.2 ml de HCl al 37%.

IPTG (Isopropil tio-β-D-galactoside)

Disolver 2 g de IPTG en 8 ml de agua bidestilada estéril.

Completar volumen a 10 ml.
Esterilizar usando filtro milipore de 0.22 μm.
Guardar a -20°C.

LISOZIMA 50 mg/ml

En 1 ml de agua destilada, disolver 50 mg de lisozima

Almacenar a -20°C.
Descartar cada alícuota que use.

NaCl 5M

Para 1000 ml disolver 292.2 g de NaCl (PM 58.44)

Autoclavar.

NaOH 10N

Para preparar 1 litro, pesar 400 g de NaOH y disolverlos en 800 ml de agua.
Cuando estén completamente disueltos, completar el volumen a 1 litro.

Na₂HPO₄ 1M pH 7.2

Na₂HPO₄ anhidro 142 g
Agua 700 ml

Ajustar a pH 7.2 con 200 ml de NaH₂PO₄ 1M.

NaH₂PO₄ 1M

NaH₂PO₄ 120 g
Agua Completar a 1 litro

RNAasa 10mg/ml

Disolver RNAasa pancreática (ARNasa A) a una concentración de 10 mg/ml en 10 mM de Tris-HCl pH 7.5 y 15 mM de NaCl.

Calentar a 100°C durante 15 min.
Enfriar a temperatura ambiente.
Dispensar en alícuotas y almacenar a -20°C.

SSC 20X

Para 1 litro, mezclar:

NaCl 175.3 g
 Acido cítrico trisódico 88.2 g

Llevar a pH 7.0 con HCl 1M.
 Autoclavar.

SEPHADEX G-50

Pesar 10 g de Sephadex G-50.
 Adicionarle 300 ml de agua.
 Dejar sedimentar.
 Sacar el agua.
 Repetir este procedimiento 3 veces.
 Lavar con TE 2 veces y dejar toda la noche a 4°C en TE.
 Autoclavar 20 min y almacenar a 4°C.

SDS 20%

Para preparar 2 litros de SDS al 20% disuelva:
 400 g de SDS en 1600 ml de agua destilada.
 Cuando esté completamente disuelto lleve a volumen de 2 litros.

TF-1 (SOLUCIÓN PARA CÉLULAS COMPETENTES)

Mezclar:

MES 10 mM pH 5.9
 RbCl 100 mM
 MnCl₂ 50 mM
 CaCl₂ 10 mM

Ajustar pH a 5.8 con KOH 1N.
 Esterilizar en milipore 0.2 µm.
 Almacenar a 4°C.

TF-2 (SOLUCIÓN PARA CÉLULAS COMPETENTES)

Mezclar:

PIPES 10 mM pH 6.5
 RbCl 10 mM
 CaCl₂ 75 mM
 Glicerol 15%

Esterilizar en milipore 0.2 µm.

Almacenar a 4°C.

Tris-HCl 1 M**PRECAUCIÓN**

El HCl es un ácido fuerte. Debe trabajarse en cámara de extracción, con guantes; evite respirar los vapores.

En 800 ml de agua destilada estéril disolver 121.1 g de Tris-base.

Ajustar al pH deseado adicionando HCl concentrado:

pH	HCl
7.4	70 ml
7.6	60 ml
8.0	42 ml

Ajustar volumen a 1000 ml.
 Autoclavar.

X-GAL

Disolver 20 mg de X-Gal en 1 ml de Dimetilformamida.
 Proteger la solución de la luz.
 Almacenar a -20°C.

ANEXO 3: Principio Químico de Algunos Reactivos

ACIDOS

HCl (Acido clorhídrico)

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

EDTA (Acido etilendiamino-tetra-acético)

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

ALCOHOLES

Etanol

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

Isopropanol

Ayuda o reemplaza el etanol en su función de precipitar el ADN.

Alcohol isoamílico

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

Mercaptoetanol

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

ACRILAMIDA

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

Un 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.

AGAROSA

Es un polímero lineal. El gel de agarosa es una matriz cuya densidad está determinada por la concentración de la agarosa. La electroforesis en geles de agarosa se utiliza para separar fragmentos de ADN; así, al aplicar un campo eléctrico a través del gel, el ADN cargado negativamente, a un pH neutro, migra hacia el ánodo. La tasa 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 254 nm es absorbida por el ADN y transmitida al colorante; la radiación a 302 nm y 366 nm es absorbida por la unión del colorante y, en ambos casos, la energía se re-emite a 590 nm en la región visible del espectro rojo-naranja.

BLUE JUICE

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

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.

DITIOREITOL (DTT)

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

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

DETERGENTES

SDS (dodecil sulfato de sodio)

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

CTAB (bromuro de cetil- trimetil- amonio)

Detergente catiónico fácilmente removible por dilución, que permite la solubilización de compuestos de 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 las hexoquinasas.

FENOL

Es tóxico por inhalación y por contacto con la piel. Debe usarse en cámara de extracción y evitar su contacto con piel, ojos y ropa. Debe lavarse muy bien el material contaminado con él.

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.

SALES

Acetato de potasio, acetato de sodio, cloruro de sodio

Aumentan el poder iónico de la solución y ocasionan por ello la precipitación del ADN.

ANEXO 4: Abreviaturas y Símbolos

ADN	Acido desoxirribonucleico
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (polimorfismos longitudinales de fragmentos amplificados)
bd	Bidestilada
bj	Blue Juice
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
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 (polimorfismo en el ADN amplificado aleatoriamente).
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (polimorfismo 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
V	Voltios
Vol.	Volumen
°C	Grado centígrado
µg	microgramo
µl	microlitro
µM	micromolar

ANEXO 5: Manejo de Material Radioactivo

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL Unidad de Investigación en Biotecnología

REGLAMENTO

I. NORMAS GENERALES

1. Queda terminantemente prohibido comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos durante el trabajo con material radioactivo; de este modo se evita la incorporación de radionúclidos.
2. Queda terminantemente prohibido utilizar pipetas con la boca dentro del área restringida; para esta labor se utilizarán pipetas de punta desechable o las ayudas correspondientes.

II. PERSONAL

1. Sólo el personal técnico del CIAT debidamente autorizado por el Instituto de Asuntos Nucleares podrá laborar en este laboratorio. Quedan excluidas de él las mujeres embarazadas.
2. Personas no autorizadas no tendrán acceso a este laboratorio.
3. El personal autorizado deberá someterse a un examen médico anual para establecer su aptitud para seguir trabajando con radionúclidos.
4. Se dará un entrenamiento teórico semestral al personal autorizado, en el cual se repasarán los peligros del trabajo con radionúclidos y las técnicas de manejo prudente, así como el comportamiento en caso de emergencia. El personal presente ratificará con su firma la asistencia, la cual será de carácter obligatorio para poder seguir trabajando con radionúclidos. El personal nuevo recibirá una introducción equivalente para adquirir el permiso interno.
5. La persona responsable se encargará de que se cumpla el reglamento y de que los libros estén al día; además, será la persona de referencia para cualquier caso de contaminación y se encargará de organizar los cursos de entrenamiento.

III. PROTECCION PERSONAL

1. Evitar toda exposición innecesaria; y evitarla sobre todo a terceras personas.
2. El personal autorizado deberá tomar máximas precauciones en el manejo de radionúclidos; debe utilizar las batas de laboratorio de manga larga y los guantes. El trabajo se deberá realizar en lo posible detrás de las pantallas protectoras.
3. Queda terminantemente prohibido salir del área de control con la bata o los guantes puestos. Los guantes serán desechados después de cada trabajo. Una vez realizada la tarea, el operario se lavará las manos con agua tibia y jabón. Si todavía halla contaminación, continuará el aseo hasta alcanzar el nivel de contaminación aceptable.
4. Las contaminaciones del personal deberán ser notificadas al responsable del laboratorio de radioisótopos quien tomará las precauciones necesarias.

IV. AREA DE TRABAJO

1. El área de trabajo deberá identificarse como tal; además, llevará el símbolo internacional de radiación.
2. Un control de contaminación deberá llevarse a cabo antes y después de efectuar un trabajo en un área designada.
3. Todas las operaciones con material radioactivo se realizarán sobre superficies lisas, dentro de tinajas provistas de papel absorbente por un lado y repelente por el otro.
4. No deberán ponerse libros, cuadernos, etc. sobre las superficies en que se trabaje con material radioactivo en el cuarto de isótopos.
5. Cualquier contaminación que no pueda eliminarse del área de trabajo será notificada al responsable para que éste tome las medidas necesarias.

V. MATERIAL RADIOACTIVO

1. El almacenamiento de material radioactivo se hará en el refrigerador del cuarto de isótopos; el material estará debidamente identificado. No deberá presentarse radiación a través de las paredes del refrigerador.
2. El material radioactivo que esté en uso deberá permanecer en el laboratorio en todo momento.

VI. DESECHOS

1. El equipo de laboratorio usado en el cuarto de isótopos no se mezclará con el resto del equipo sin antes pasar por el control de contaminación; si es necesario, pasará por un proceso de descontaminación o período de enfriamiento.
2. Los desechos radioactivos líquidos se recogerán en las botellas plásticas adquiridas especialmente para este propósito y éstas deberán permanecer siempre dentro de sus contenedores acrílicos.
3. Tanto las botellas de desechos líquidos como las canecas especiales para el almacenamiento de desechos radioactivos sólidos deberán llevar la siguiente información:
 - Radioisótopos
 - Fecha en que terminó de llenarse el recipiente
 - Fecha en que se cumplirán 10 vidas medias (^{32}P , ^{35}S)
4. Los desechos que contengan ^{32}P y ^{35}S se almacenarán durante 10 vidas medias, o sea, 5 meses para ^{32}P y 30 meses para ^{35}S ; al cabo de ese tiempo, los materiales serán desechados después de un control de actividad. Los materiales líquidos se verterán en la alcantarilla con suficiente agua para que sea mayor su dilución; los desechos sólidos se echarán a la basura despojados de su identificación como material radioactivo. El material combustible será incinerado.

Laboratorio de Radioisótopos del CIAT (Cali, Colombia)

El laboratorio en que se manejan materiales radioactivos en el CIAT fue construido y equipado específicamente para este propósito. Entró en funcionamiento a fines de 1991.

Este laboratorio tiene todas las especificaciones recomendadas para el manejo de ^{32}P , ^{35}S y ^{14}C ; son las siguientes:

1. Superficies de trabajo lisas. Suelos y paredes en material polimérico industrial lavable y sin rendijas. Tomas eléctricas colgantes para evitar contaminación no lavable.
2. Sistema de aire acondicionado aislado.
3. Pantallas escudo acrílicas de media pulgada para protección personal. Materiales absorbentes para cubrir el área de trabajo.
4. Recipientes plásticos para desechos radioactivos líquidos y sólidos con contenedores individuales acrílicos de 1 cm de espesor. Bolsas plásticas para desechos radioactivos.
5. Contenedores acrílicos para el manejo de materiales biológicos radioactivos.
6. Sondas para detección de contaminación.
7. Batas, máscaras, guantes y cobertores de antebrazos para los operarios.
8. Avisos, símbolos de radioactividad en cinta y placas fijadas tanto en los lugares de acceso como en los sitios o implementos de trabajo con material radioactivo.

9. Kit de descontaminación de material radioactivo que contiene:
 - Tambor de almacenamiento y tambor de transferencia
 - Tambor de fibra recubierto de plástico (30 gal)
 - Cubierta para zapatos
 - Guantes, respiradores
 - Un galón líquido para descontaminar
 - Toallas para descontaminar
 - Bolsas plásticas, escobas, esponjas, cable, cepillos
 - Señales de advertencia

10. El almacenaje de desechos en proceso de enfriamiento se hace en un almacén de campo debidamente rotulado y aislado en tambores plásticos con sus respectivas fechas de sellado y con la identificación de los isótopos en ellos contenido.

Introducción Corta al Uso de Radioisótopos y Comportamiento en el Hot Lab del CIAT

Existen reglas de comportamiento y precauciones especiales para laboratorios donde se efectúan trabajos con radioisótopos. La exposición a la radiación debe reducirse al mínimo y la incorporación de ésta debe evitarse a toda costa. Los siguientes puntos deben ser observados:

1. Queda terminantemente prohibido fumar, comer, beber o maquillarse dentro del área restringida.
2. El ingreso al área restringida queda terminantemente prohibido a personas que no tengan el permiso respectivo. Deberá hacerse sólo con ropa protectora (bata). No usar ropa contaminada.
3. No pipetear reactivos con la boca.
4. Usar guantes durante el trabajo con sustancias radiactivas. Desecharlos o sacárselos antes de abandonar el laboratorio. No tocar nada fuera del área de trabajo con los guantes.
5. Lavarse las manos después de manipular sustancias radiactivas y comprobar si hay contaminación de cuerpo o de ropa.
6. Mantener el área de trabajo limpia. Hacerle chequeo antes y después de realizar algún trabajo. Cubrir el área con papel absorbente, el cual deberá ser cambiado si se contamina. Usar bandejas para atrapar líquidos en caso de accidente. No colocar ni cuadernos ni libros sobre el área de trabajo.
7. Marcar los objetos contaminados; mientras tanto, protegerlos con una pantalla. Objetos que salgan del área restringida deberán ser bien chequeados con el Gaiger.
8. Limpieza de utensilios; informarse sobre la mejor manera de efectuarla.
9. Los desechos radioactivos se colocarán en los contenedores designados para ello. Durante el trabajo se deben utilizar basureros temporales con bolsas de plástico para facilitar el manejo de los desechos.
10. El trabajo en el área restringida queda absolutamente prohibido a mujeres embarazadas.
11. Avisar a los responsables sobre cualquier tipo de accidente o contaminación personal y acatar en todo momento las normas y consejos de los responsables del laboratorio.

Nombre:
Fecha:
Firma:
Carnet:

Lab:

Responsable:

