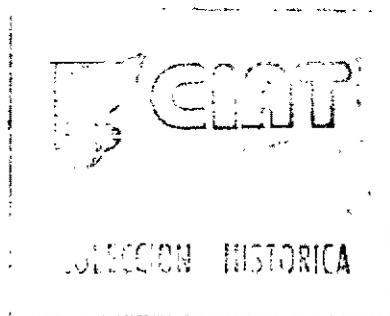


SB  
211  
.C3  
P768

# PROTOCOLOS GENETICA MOLECULAR DE YUCA



Compilado y editado por:

Fregene Martin A., Ph.D.  
Gutierrez A Janneth Patricia.  
Buitrago R Charles.

100001

CIAT Centro Internacional de Agricultura Tropical  
International Center for Tropical Agriculture

[2661]

## CONTENIDO

<b>Extracción, Purificación y Determinación de la Concentración del ADN</b>	1
Extracción de ADN total. Método de Dellaporta	2
Extracción de ADN Minipreparación. Modificado de Dellaporta	3
Extracción de ADN total. Método de Gilbertson - Dellaporta	5
<b>Cuantificación y Calidad del ADN</b>	7
Cuantificación por fluorometría	7
Calidad del ADN	8
Cuantificación por comparación con patrones de ADN de Lambda	8
<b>Electroforesis</b>	9
Electroforesis en gel de agarosa	9
Electroforesis en geles denaturantes de poliacrilamida	10
Tinción con nitrato de plata	12
<b>Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLPs)</b>	13
Digestión del ADN genómico	13
Digestión de ADN del bacteriófago lambda ( $\lambda$ )	14
Transferencia o southern blot	14
Hibridización	16
<b>Transformación y Minipreps</b>	19
Células competentes	19
Electroporación	19
Minipreps por lisis por calentamiento	20
Purificación de sondas	21
- Elusión de bandas	21
- Digestión de plásmido	21
- Amplificación de insertos de plásmidos	22
<b>Polimorfismos de ADN Amplificados Aleatoriamente (RAPDs)</b>	23
Dilución del ADN	23
Amplificación	23
- Electroforesis	24
<b>Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLPs)</b>	25
Digestión del ADN genómico con enzimas de restricción	25
Ligación de adaptadores	25
Reacciones de preamplificación (PCR +1/+1)	26
Amplificación AFLP selectiva (PCR +3/+3)	27
<b>Microsatélites o Repeticiones de Secuencias Cortas (SSRs)</b>	29
Marcaje de oligos	29
Pre-hibridización, Hibridización y Lavados de los oligos	29
Protocolo sencillo para desarrollar microsatélites en yuca	30

Selección de librerías BAC por hibridización	32
Detección de microsatélites por PCR	33
<b>Secuenciación</b>	35
- Preparación de la muestra	35
- Preparación de primer	35
- Montaje del gel	36
- Manejo del Abi Prism 377-96	37
<b>RNA</b>	40
Extracción de RNA por el método de la proteinasa K (Hall et al 1978) con algunas modificaciones	40
Síntesis de cADN	41
- Elusión y amplificación de bandas polimórficas	42
Clonación de fragmentos polimórficos eluidos y reamplificados (TDFs)	43
- Transformación	44
<b>Secuenciación de los marcadores de secuencias expresadas (ESTs)</b>	45
<b>Anexos</b>	47
ANEXO 1: Preraración de soluciones	47
ANEXO 2: Soluciones para tinción con plata	54
ANEXO 3: Abreviatura y símbolos	55

## Extracción, Purificación y Determinación de la Concentración del ADN

### Extracción De ADN Total

Basado en el método de Dellaporta 1983

1. Colectar 3-4 g de tejido foliar joven, en nitrógeno líquido.
2. Macerar con nitrógeno líquido en un mortero hasta obtener un polvo fino y seco.
3. Transferir a un tubo Falcon de 50 ml frío, use una espátula fría.
4. Adicionar 16 ml de buffer de extracción, previamente calentado a 65°C, y 1ml de SDS 20% (no manipular más de 16 tubos falcon).
5. Agitar vigorosamente hasta que el tejido se mezcle bien con el buffer, continuar mezclando durante 2 min.
6. Incubar en baño maria a 65°C, y mezclar por inversión 5-6 veces, cada 5 min, durante 15 min.
7. Retirar del baño los tubos y dejar enfriar a temperatura ambiente, durante 10 min.
8. Adicionar 5 ml de Acetato de Potasio 5M frío, mezclar por suave inversión 5-6 veces.
9. Incubar en baño de hielo durante 20 min.
10. Centrifugar a 3000 rpm durante 20 min a 4°C.
11. Filtrar el sobrenadante a través de dos capas de miracloth en un tubo falcon nuevo de 50 ml.
12. Adicionar un volumen de isopropanol frío (aproximadamente 18 ml), y mezclar por inversión de 8-10 veces.
13. Incubar a -20°C durante 2 h, y centrifugar a 3000 rpm durante 20min.
14. Eliminar el sobrenadante, y remover el exceso de isopropanol invirtiendo los tubos sobre una toalla de papel.
15. Resuspender el precipitado en 5 ml de T50E10 (50mM Tris-HCl/10mM EDTA), incubando a 65°C, preferiblemente durante 10 a 15 min con agitación suave y constante.
16. Adicionar un volumen de isopropanol frío y mezclar por inversión suavemente 8-10 veces.
17. Incubar a -20°C durante 2 h, y centrifugar a 3000 rpm durante 20min.
18. Eliminar el sobrenadante, y remover el exceso de isopropanol colocándolo invertido sobre una toalla de papel. Dejar los tubos sobre la toalla de papel durante 1 h, para que el precipitado quede bien seco.

19. Adicionar 200-500  $\mu$ l de T10E1 (10mM Tris-HCl/1Mm EDTA, que contiene 10 mg/ml ARNasa, dependiendo del tamaño del precipitado). Guardar los tubos a 4°C toda la noche, o incubar a 65°C, para disolver el precipitado.
20. Transferir a tubos eppendorf y correr 2  $\mu$ l de muestra en un gel de agarosa para ver la calidad. Medir la concentración en el Fluorometro. Guardar el ADN a -20°C para almacenar a largo plazo ó a 4°C si se va a almacenar durante 1 o 2 días.

**Buffer de Extracción (Para 1 litro de solución)**

Reactivo	Volumen
100mM Tris-HCL	100 ml de 1M Tris-HCl
50mM EDTA	100 ml de 0.5M EDTA
500mM NaCl	100 ml de 5M NaCl

Completar el volumen con agua deionizada.

Autoclavar durante 15 min.

Adicionar 1% (w/v) de PVP (40000MW); disolver.

Adicionar 700  $\mu$ l de 2 $\beta$ -Mercaptoetanol.

**Precaución:** El 2 $\beta$ -Mercaptoetanol es altamente tóxico, debe usarse guantes y mascarilla para manipularlo.

## Extracción De ADN Minipreparación

Modificado de Dellaporta

1. Colectar, 1 hoja o cogollo ó la mitad de una hoja madura; aproximadamente 0.15-0.2 g de tejido.
2. Macerar en un mortero con nitrógeno líquido.
3. Transferir a un tubo eppendorf, de 1.5 ml frío, use una espátula fría.
4. Adicionar 800  $\mu$ l de buffer de extracción, precalentado a 65°C, y 50  $\mu$ l de SDS 20% (no manipular más de 36 tubos eppendorf).
5. Agitar vigorosamente el tejido hasta que se mezcle bien con el buffer, continuar mezclando durante 1 min.
6. Incubar en baño maria a 65°C, y mezclar por inversión 5-6 veces, durante 15 min.
7. Retirar los tubos del baño y dejar enfriar a temperatura ambiente, aproximadamente 2min.
8. Adicionar 250  $\mu$ l de Acetato de Potasio 5M frío, mezclar por inversión suave 5-6 veces.
9. Incubar en hielo durante 20 min.
10. Centrifugar a 12000 rpm en una centrifuga eppendorf durante 10 min.
11. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml.
12. Adicionar un volumen de isopropanol frío (aprox. 700  $\mu$ l), y mezclar por inversión suave 8-10 veces.
13. Incubar a -80°C durante 1 h, y centrifugar a 12000 rpm durante 10 min.
14. Eliminar el sobrenadante y remover el exceso de isopropanol invirtiendo los tubos sobre una toalla de papel.
15. Resuspender el precipitado en 500  $\mu$ l de T<sub>50</sub>E<sub>10</sub> (50mM Tris-HCl/10Mm EDTA), incubar a 65°C preferiblemente durante 10 a 15 min con agitación suave y constante.
16. Adicionar un volumen de isopropanol frío (500  $\mu$ l) y mezclar por inversión suave 8-10 veces.
17. Incubar a -80°C durante 1 h, y centrifugar a 12000 rpm durante 10min.
18. Eliminar el sobrenadante, y remover el exceso de isopropanol invirtiendo los tubos sobre una toalla de papel. Dejar los tubos sobre la toalla de papel durante 1 h, para que el precipitado quede bien seco.
19. Adicionar 100-200  $\mu$ l de T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (10mM Tris-HCl/1Mm EDTA, que contiene 10 mg/ml RNAsa, dependiendo del tamaño del precipitado). Guardar los tubos a 4°C toda la noche, o incubar a 65°C para disolver el precipitado.
20. Transferir a tubos eppendorf y correr 2  $\mu$ l de muestra en un gel de agarosa para ver la calidad.

21. Medir la concentración en el fluorómetro. Guardar el ADN a  $-20^{\circ}\text{C}$  para almacenar a largo plazo ó a  $4^{\circ}\text{C}$  si se va a almacenar durante 1 o 2 días.

**Buffer de Extracción (Para 1 litro de solución)**

Reactivo	Volumen
100mM Tris-HCL	100 ml de 1M Tris-HCl
50mM EDTA	100 ml de 0.5M EDTA
500mM NaCl	100 ml de 5M NaCl

Completar el volumen con agua deionizada.

Autoclavar durante 15 min.

Adicionar 1% (w/v) de PVP (40,000MW); disolver.

Adicionar 700  $\mu\text{l}$  de 2 $\beta$ -Mercaptoetanol.

**Precaución:** El 2 $\beta$ -Mercaptoetanol es altamente tóxico, debe usarse guantes y mascarilla para manipularlo.

## Extracción De ADN Total

Basado en el Método Gilbertson-Dellaporta

1. Recolectar hojas frescas en Nitrógeno líquido y almacenar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
2. Macerar con nitrógeno líquido.
3. Colocar 3 g del material macerado en un tubo falcon de 50 ml.
4. Adicionar 16 ml del buffer de extracción, precalentado a  $65^{\circ}\text{C}$ .
5. Agregar 1 ml de SDS 20 % y mezclar vigorosamente.
6. Incubar los tubos en baño Maria a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 20 min. Mezclando por inversión del tubo cada 5 min.
7. Añadir 5 ml de acetato de potasio 5M frío. Invertir muy bien los tubos para mezclar (equilibrar los tubos).
8. Centrifugar a 3000 rpm durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
9. En otro tubo falcon de 50 ml estéril, agregar 10 ml de isopropanol frío.
10. Filtrar el sobrenadante con papel Miracloth en el tubo donde está el isopropanol.
11. Mezclar por inversión suavemente hasta que se formen hilos de color blanco en el tubo (equilibrar los tubos).
12. Centrifugar a 3000 rpm por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
13. Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con 1 ml de etanol al 70%.
14. Centrifugar por 5 min a 3000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ .
15. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet.
16. Resuspender en  $500\ \mu\text{l}$  de T50E10 agua estéril. Si es difícil resuspender caliente a  $65^{\circ}\text{C}$  por 10 min.
17. Transferir el ADN a un tubo eppendorf de 1.5 ml.
18. Añadir  $20\ \mu\text{l}$  de RNAsa (10 mg/ml) e incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 20 min.
19. Centrifugar por 2 min a 8000 rpm a temperatura ambiente.
20. Transferir el sobrenadante a otro tubo eppendorf.
21. Sembrar  $2\ \mu\text{l}$  de este ADN en un gel de agarosa al 0.8 %.
22. Leer concentración en el fluorometro.

**Buffer de Extracción**

Reactivo	Concentración	Para 100 ml	[ ] Final
Tris-HCl pH: 8.0	1 M	10 ml	100 mM
EDTA pH: 8.0	0.5 M	10 ml	50 mM
NaCl	5 M	10 ml	500 mM
PVP1	----	1 g	1%
2 $\beta$ -Mercaptoetanol	----	1 ml	10 mM

**Nota:**

1. El PVP y el 2 $\beta$ -Mercaptoetanol se agregan al buffer solo antes de usar

**Precaución:** El 2 $\beta$ -Mercaptoetanol es altamente tóxico, debe usarse guantes y mascarilla para manipularlo.

## Cuantificación y Calidad del ADN

### Cuantificación por Fluorometría

#### Para tener en cuenta:

1. Utilizar siempre su propio patrón de calibración (dilución 1:10 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) de ADN estándar 1 mg/ml ), colorante (10 ml, 1mg/ml de Hoechst 3258\*) y TNE 10X (Tris-HCl 100mM, EDTA 10mM, NaCl 2M).
2. Traer todos los implementos de trabajo como: Puntas p-20, guantes respectivos, servilletas, agua destilada y la pipeta de 20 debidamente forrada con papel plástico.
3. Siempre usar guantes exclusivos para este trabajo (**GUANTES DE NITRILO**) y por favor no contaminar ningún equipo u otro instrumento con los guantes.
4. Limpiar muy bien el sitio de trabajo antes y después de su empleo.
5. Evitar derramar solución de trabajo al interior del fluorómetro.
6. Lavar muy bien la celda después de su uso y limpie - Seque con KIMWPES, debido a que estos no sueltan lanas ni rayan la celda.
7. Eliminar los desechos adecuadamente al terminar el trabajo

#### Pasos:

1. Encender el equipo 15 min antes de su empleo.
2. Preparar la solución de trabajo (siempre fresca) tomando en cuenta el número de muestras a evaluar: TNE 1X (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, NaCl 0.2M, pH 7.4) (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hoechst 3258 en TNE 1X).
3. Llenar la celda con 2 ml de solución TNE 1X y calibrar con 2  $\mu\text{l}$  de patrón a 100 ng/ $\mu\text{l}$ . Mezclar suavemente con pipeta pasteur.
4. Leer de nuevo el patrón, en este momento la lectura debe dar 100 ng/ $\mu\text{l}$ .
5. Iniciar la lectura de cada muestra, empleando 2 ml de buffer y mezclando muy bien después de adicionar los 2  $\mu\text{l}$  de cada muestra.
6. Verificar la lectura del patrón en cualquier momento para estar seguros que el equipo esta funcionando bien.

**Importante:** \*El Hoechst 3258, es un colorante altamente tóxico, mutágeno: Usar siempre guantes al manipularlo y careta cuando se vaya a pesar y evite el contacto con la piel.

## Calidad del ADN

1. Tomar 2  $\mu\text{l}$  de ADN (de cada una de las muestras), adicionarle 2  $\mu\text{l}$  de buffer carga (azul de bromofenol 0.25% y glicerol 30%) y 7  $\mu\text{l}$  de agua estéril.
2. Servir cada muestra en un gel de agarosa al 1.0%, con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .
3. Observar el gel en un transiluminador de luz UV y tomar foto.

## Cuantificación por Comparación con Patrones de ADN de Lambda

Preparar una solución de ADN de Lambda (comercial) a una concentración final de 100  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , el cual puede usarse como una secuencia ascendente de concentraciones de solución-patrón de ADN (comercial) con el que se comparan diferentes muestras de ADN de concentraciones desconocidas, así: 1  $\mu\text{l}$  de ADN de Lambda = 100 ng , 2  $\mu\text{l}$  = 200 ng , 3  $\mu\text{l}$  = 300 ng , etc.

Sembrar en un gel de agarosa al 1.0 % con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

El cálculo aproximado de las concentraciones de las bandas se realiza mediante la observación de la fotografía del gel, en presencia de luz ultravioleta. En donde al comparar la intensidad de la banda de cada una de las muestras con los patrones de lambda, se puede determinar la concentración en  $\text{ng}/\mu\text{l}$  de la muestra.

## Electroforesis

### Electroforesis en Gel de Agarosa

Usar la bandeja (pequeña, mediana o grande, esta última para 2, 3 y 4 peines) y peines (delgados, medianos o gruesos de 20 ó 30 pozos) adecuados, dependiendo de las necesidades del ensayo.

1. Pesar la cantidad de agarosa requerida (dependiendo del tamaño de la bandeja del gel) y diluirla en el buffer TBE 1X ó 0.5X.
2. Calentar en microondas o en agitador magnético con calor, hasta disolver bien.
3. Dejar enfriar, adicionar bromuro de etidio<sup>1</sup> (10mg/ml) para que quede a una concentración final de 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , sólo si es necesario (no siempre se requiere el uso de este reactivo en los geles de agarosa, lo cual depende de la técnica a evaluar).
4. Servir la solución de agarosa en la bandeja (previamente lavada y sellada con cinta en los bordes abiertos).
5. Eliminar las burbujas con la ayuda de una punta de micropipeta, colocar los peines adecuados y dejar polimerizar durante 20 min.
6. Retirar la cinta de los bordes de la bandeja, y colocarla dentro de la cámara de electroforesis.
7. Adicionar el buffer TBE, hasta cubrir el gel, retirar cuidadosamente los peines para evitar romper los pozos.
8. Servir las muestras en los pozos (adicionando previamente el buffer carga tanto para darle peso a la muestra y así evitar que se salga del pozo como para conocer la posición de la muestra durante la electroforesis).
9. Conectar los electrodos y programar el voltaje adecuado para cada proceso.
10. Una vez terminada la electroforesis retirar el gel de la cámara y si no se ha llevado a cabo el paso 5, el gel se debe teñir en una solución con bromuro de etidio a 1.0  $\mu\text{g/ml}$  durante 5 a 10 min.
11. Observar el gel en un transiluminador de luz UV<sup>2</sup> y tomar foto.

#### **Precaución:**

<sup>1</sup> El bromuro de etidio es altamente cancerígeno. Usar *guantes de nitrilo* o doble guante de látex para su manejo.

<sup>2</sup> La luz ultravioleta es un agente mutagénico peligroso para piel y ojos. Siempre usar máscara para protección de la cara y ojos.

## Electroforesis en Geles Denaturantes de Poliacrilamida

### Reactivos:

6% acrilamida: bisacrilamida (19:1)

0.5% Ácido acético en 95% Etanol

10% Persulfato de Amonio

TEMED

Bind-Silane

Repel silane

buffer carga denaturante

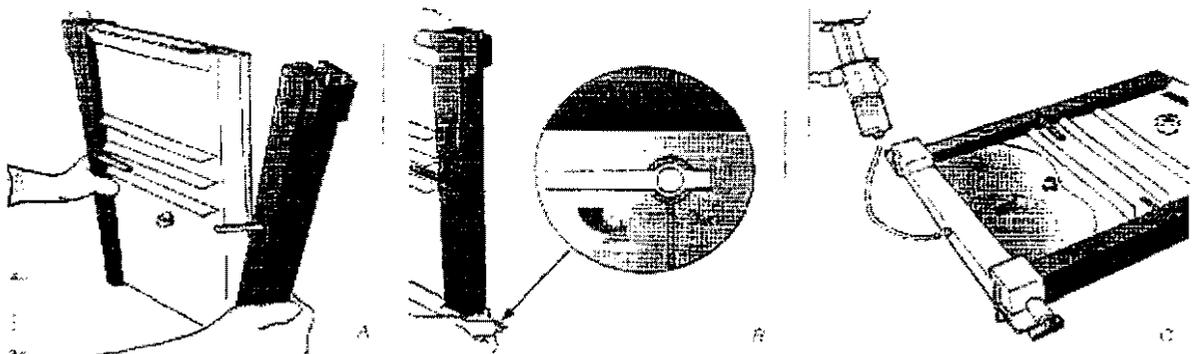
Agua

**Precaución:** La acrilamida es un agente neurotóxico. Use guantes, tapabocas, prepare la solución en cámara de extracción.

### Preparación del gel de poliacrilamida

Gel de poliacrilamida denaturante con las siguientes dimensiones: 38cmx50cmx0.4mm

1. Lavar dos veces cada vidrio con jabón usando una esponja diferente para cada uno (vidrio de la cámara y vidrio), enjuagar bien.
2. Secar los vidrios con papel toalla, limpiar 2-3 veces con ETOH al 95%, usando Kimwipe.
3. Aplicar Repel silane (300-400  $\mu$ l) sobre el vidrio de la cámara con Kimwipe, dejar evaporar durante 10 min.
4. Preparar la solución de adhesión adicionando 3  $\mu$ l de Bind-Silane a 1 ml de ácido acético al 5% en ETOH al 95%, aplicar sobre el vidrio con movimientos circulares. Dejar evaporar.
5. Colocar entre el vidrio y el vidrio de la cámara dos separadores, (de 0.4mm). Ensamblar los brazos (figura a y b).
6. Colocar el gel (aparato de secuencia) horizontalmente sobre una superficie plana. Adicionar TEMED y APS a la solución de acrilamida, mezclar y servir lentamente evitando la formación de burbujas (figura c).
7. Formar frente de corrida insertando el borde liso del peine (5-6mm). Deje polimerizar mínimo 1 h, o durante toda la noche.



### Montaje gel de poliacrilamida

1. Lavar los restos de acrilamida de la cámara, montar el gel sobre la base y adicionar TBE 1X precalentado 50-55°C.
2. Limpiar el exceso de urea y acrilamida de los pozos con una jeringa.
3. Introducir el peine con el borde dentado (1mm) en el gel teniendo cuidado de no deformar el frente de corrida.
4. Precorrer el gel a 100 W hasta que la temperatura de los vidrios sea de 50°C.
5. Lavar los pozos con jeringa para remover urea (hacerlo cada vez que se requiera sembrar más muestras.).
6. Sembrar las muestras previamente denaturadas (3 min a 96°C).
7. Correr el gel a 100 W y 1800 V aproximadamente, manteniendo la temperatura a 50°C.

**Nota:**

\* En un gel al 6%: el azul de bromofenol migra con bandas de aproximadamente 25 bases y el cilen xianol migra con bandas de aproximadamente 105 bases

## Tinción Con Nitrato De Plata

Soluciones requeridas:

1. Fijadora.
2. Tinción: Nitrato de plata.
3. Reveladora.
4. Parada.

(Ver anexo preparación de soluciones)

### Procedimiento

1. Luego de la electroforesis, quitar brazos y colocar la cámara sobre una superficie plana.
2. Separar los vidrios ejerciendo presión sobre uno de ellos.
3. Tiña el gel (colocándolo siempre hacia arriba) siguiendo los siguientes pasos:

Paso	Solución	Tiempo
A	Fijador	20 min
B	H <sub>2</sub> O deionizada	3 veces x 2min
C	Tinción	30 min
D	H <sub>2</sub> O deionizada	10 seg. (Paso crítico, ver nota 4)
E	Revelador	2-5min
F	Parada	5 minu
G	H <sub>2</sub> O deionizada	3 minu

4. Nunca adicionar solución directamente sobre el gel.
5. Colocar el gel sobre soporte, dejar secar toda la noche. Luego podrá ser fotografiado o analizado en escaner.

### Notas

- 1-La calidad del agua es muy importante. Usar agua deionizada (18 mili-ohmios) para los lavados y agua bidestilada para la preparación de todas las soluciones.
- 2-Los pasos que involucren uso de Formaldehído y ácido acético deben hacerse en cámara de extracción
- 3-La solución de revelado debe estar entre 8-10°C. (Paso crítico para un buen revelado)
- 4-El tiempo del lavado después de la tinción no debe exceder los 10 seg. Si esto ocurre repetir el paso de tinción de 30 min.
- 5-Nunca arrojar la solución de AgNO<sub>3</sub> al desagüe. Después de usar la solución de tinción (10 veces) adicionar 5 g de NaCl por Litro/Sln, dejar decantar, filtrar con Whatman 3M y descartar el AgCl en desechos orgánicos.

## Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLPs)

### Digestión de ADN genómico

1. Diluir el ADN de cada muestra en agua estéril, para tener una concentración final de 10  $\mu$ g.
2. Para cada muestra se requiere:

Reactivo	Concentración Final
ADN	10 $\mu$ g
Buffer 10X	1X
Espermidina 40mM	4Mm
Enzima	50U

3. Preparar un cóctel general (con el buffer, la espermidina, y la enzima, en el mismo orden), dependiendo del número de muestras a digerir con cada enzima<sup>1</sup>. Debe mezclarse muy bien al adicionar la enzima.
4. Adicionar el cóctel a cada muestra de ADN diluido, mezclar muy bien.
5. Incubar a 37°C durante toda la noche.
6. Revisar la digestión del ADN en un gel de agarosa al 1% (TBE 1X), correr la electroforesis a 80V durante 2 h.
7. Observar el gel en un transiluminador de luz UV y tomar foto.
8. Correr una electroforesis definitiva en un gel al 0.8% -1% x 300 ml empleando un peine de 30 pozos x 1mm sin Bromuro de etidio.
9. Puede usarse TBE 1X o TBE 0.5X, si es 1X, correr el gel a 22V durante la noche, si es de 0.5X, correr el gel durante el día, a 33 V.
10. Teñir el gel en una solución de bromuro de etidio (1.0  $\mu$ g/ml) durante 5-10 min y tomar foto.

#### Nota:

1. No todas las enzimas trabajan bajo las mismas condiciones por lo cual deben tenerse en cuenta algunos factores antes de planear una digestión, ya que dependiendo de la casa comercial tienen requerimientos especiales como el uso adicional de BSA, o incubar a diferentes temperaturas.  
Todas las enzimas son lábiles a altas temperaturas, deben ser manipuladas siempre en hielo.

### Digestión de ADN del Bacteriófago Lambda ( $\lambda$ )\*

(Usar como patrón en geles de agarosa)

Enzima = Pst I

	[Inicial]	[final]	Vf = 1 ml
$\lambda$ ADN	500 ng/ $\mu$ l	50 $\mu$ g	10 $\mu$ l
Pst I	20U/ $\mu$ l	2U/ $\mu$ g	5 $\mu$ l
Buffer	10X	1X	100 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O			795 $\mu$ l

\*Verificar la concentración del  $\lambda$  comercial y ajustar las cantidades según corresponda.

Incubar a 37°C durante 3 h. Tomar una alícuota de 5  $\mu$ l. Visualizar en un gel de agarosa al 1%. Parar la digestión con buffer de carga (10% del volumen final). Guardar a -20 °C.

Nota:

\*Los marcadores Lambda/HindIII o Lambda/PstI constituyen una referencia útil para calcular los pesos moleculares de fragmentos de ADN después de la separación electroforética.

### Transferencia o Southern Blot

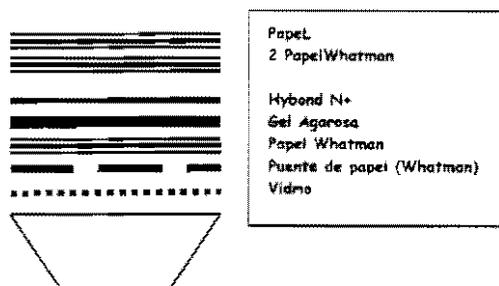
Depuración:

1. Colocar el gel en 500 ml de HCl 0.25N con agitación constante durante 15 min (o hasta que el azul de bromofenol del frente de corrida del gel se torne amarillo).
2. Descartar el HCl y lavar el gel dos veces con agua deionizada.

Denaturar:

1. Adicionar 500 ml de NaOH 0.5N / NaCl 0.5M, agitar durante 30 min.

Transferencia:



1. Preparar la solución de transferencia en NaOH 0.5N /NaCl 0.5M (1 L por gel)
2. Hacer un corte en la esquina superior izquierda tanto del gel como de la membrana para la identificación posterior.
3. Cortar la membrana de nylon con las mismas dimensiones del gel y marcar con lápiz en uno de los extremos la identificación del gel que se va a transferir.
4. Colocar en una bandeja plástica solución de transferencia (suficiente).
5. Colocar un vidrio que haga puente sobre la bandeja.
6. Humedecer una tira de papel whatman 3MM con solución de transferencia y colocarla en posición contraria al vidrio de tal manera que los extremos del papel se humedezcan en la solución.
7. Sobre el papel colocar una tira de papel corta (papel whatman 3MM), del ancho del gel que se va a transferir, previamente humedecida en solución de transferencia, retirar las burbujas<sup>1</sup>.
8. Colocar el gel sobre la tira de papel con los pozos hacia abajo<sup>1</sup>
9. Colocar sobre el gel la membrana de nylon (Hybond N+), previamente humedecida en solución de transferencia y del mismo tamaño del gel<sup>1</sup>.
10. Sobre la membrana colocar 2 tiras adicionales de papel, previamente humedecida en solución de transferencia<sup>1</sup>.
11. Colocar papel periódico sobre todo el montaje para proporcionar peso. Si se emplea una superficie plana, se puede colocar sobre el papel periódico un peso adicional para obtener una presión pareja en la superficie de secado.
12. Dejar la transferencia durante toda la noche<sup>2</sup>.
13. Desmontar la transferencia al día siguiente.
14. Lavar el filtro en una solución 2XSSC x Tris HCl 40mM a pH7.5 (200ml) durante 5 min.
15. Secar los filtros sobre papel toalla durante 3 min.
16. Fijar el ADN a la membrana en un stratalinker.
17. Guardar el filtro en una bolsa plástica o, papel plástico a 4°C hasta su uso.

**Nota:**

1. Asegurarse que no hay burbujas de aire sobre cada capa (papel) que se va incorporando al sistema (ó entre la tira de papel, el gel y la membrana), para lo cual se debe rodar una pipeta de vidrio sobre la superficie expuesta
2. Si se va a dejar la transferencia por más de un día se deben cubrir los extremos libres de la bandeja con papel plástico para evitar que se evapore el buffer de transferencia.

## Hibridización

### Buffer de pre-hibridización

Para preparar 2 litros de buffer de hibridización (Churchill y Gilbert)

1. Adicionar 500 ml de agua deionizada (a 70°C) en una botella de 2 litros.
2. Pesar 72 g de fosfato de sodio (monobásico), y gradualmente adicionarlo al agua, revolver en un agitador magnético
3. Pesar 268 g de fosfato de sodio (dibásico heptahidratado, o 142 g de fosfato de sodio (dibásico) anhidro; una vez que la sal monobásico se ha disuelto, adicionar la dibásica.
4. Mantener en agitación hasta que toda la sal se halla disuelto. Adicionar 700ml de SDS al 20%, Mantener en agitación.
5. En un erlenmeyer de 500 ml, adicionar 300 ml de agua deionizada a temperatura ambiente; pesar 20 g de sero albúmina bovina (BSA), y adicionar agua mientras mezcla en un agitador magnético. Mantener en agitación hasta que el BSA este completamente disuelto quedando una solución amarilla verdosa.
6. Adicionar la solución de BSA a la botella de 2 litros y continuar agitando hasta que el buffer este completamente homogéneo, alrededor de unos 5 min
7. El buffer de hibridización esta listo para usar (no calentar el buffer por encima de 70°C después de adicionar el BSA).

### Pre-hibridización

1. Poner a hervir agua en un vaso de precipitado. Denaturar en un tubo, falcon suficiente ADN esperma de Salmón, incubar en agua hirviendo durante 5 min. Usar 1 ml de ADN esperma de Salmón (10 mg/ml) para cada 100 ml de buffer de hibridización.
2. Transferir rápidamente a hielo y dejar durante 5 min.
3. Distribuir los filtros que se van hibridizar, de manera que se puedan colocar dos juegos de filtros simultáneamente en las cajas.
4. A dos cajas de hibridización plásticas, vacías y limpias, adicionar 30 ml de buffer de hibridización (a aprox. 65°C), usando un tubo falcon. Inmediatamente colocar boca arriba un filtro de cada juego en cada caja.
5. Adicionar 30 ml de buffer hasta cubrir completamente los filtros en las cajas.
6. Colocar otro filtro, boca arriba, en cada caja.
7. Repetir los pasos 4 y 5 hasta que todos los filtros hallan sido colocados en las cajas.

8. Adicionar 1 ml de ADN espermatozoide de Salmón denaturado para 100 ml de buffer y agitar suavemente las cajas para mezclar.
9. Cubrir las cajas con una caja vacía, y transferir a una incubadora a 65°C, con agitación. Continuar la incubación mínimo 3 h, o hasta que la sonda marcada sea liberada en las cajas. No es necesario pre-hibridizar los filtros toda la noche.

### Marcaje de sondas

(Para 3-6 filtros en 90-150 ml de buffer de hibridización).

1. Transferir a un tubo eppendorf 200 ng (1-21  $\mu$ l) de ADN para ser marcado. Denaturar el ADN incubándolo en una plancha caliente a 100°C durante 5 min.
2. Incubar rápidamente en hielo durante 5 min.
3. Adicionar 29  $\mu$ l de cóctel, (4  $\mu$ l de cada dNTP, excluyendo DAP, 5  $\mu$ l de mezcla de primer/BSA, 5  $\mu$ l de buffer, 2  $\mu$ l de enzima Klenow, 3-5  $\mu$ l de  $^{32}$ P DAP,) y transferir a un baño de agua a 37°C durante 2-3 h.
4. Purificar la sonda pasándola a través de una columna de sephadex (G-50), centrifugar durante 3min.
5. Denaturar la sonda marcada calentándola a 100°C durante 5 min.
6. Poner inmediatamente en hielo durante 5 min.
7. Adicionar la sonda marcada a los filtros en el buffer de hibridización.

### Hibridización y lavados

(Un máximo de 12 cajas deben ser manipuladas a la vez, por ejemplo para cada 4 litros deben prepararse 2 buffers de lavado)

1. Hibridizar los filtros mínimo 16 h.
2. Descartar el buffer de hibridización caliente en un contenedor apropiado para estos desechos.
3. Adicionar a cada caja 300 ml del 1<sup>er</sup> buffer de lavado (2XSSC/0.1SDS) a 65°C.
4. Incubar a 65°C durante 20 min (No más de 20 min).
5. Descartar el buffer de lavado caliente en un contenedor de desechos apropiado; medir la actividad en los filtros. Si las cuentas por minuto (cpm) para cada filtro es > 1500 cpm ir a al paso 6, si no ir al paso 9.
6. Adicionar 300 ml del 2<sup>o</sup> buffer de lavado (0.5XSSC/0.1SDS) a 65°C.
7. Incubar a 65°C durante 10 min (No más de 10 min).

8. Descartar el buffer de lavado, y medir la actividad de los filtros. Si cada filtro tiene más de 1500 cpm, repita los pasos 6-7.
9. Colocar los filtros boca arriba sobre una toalla de papel durante 30-60 min.
10. Colocar una pantalla intensificadora dentro de cada cassette, organizar los filtros medio secos boca arriba dentro de los cassettes, colocar una hoja de acetato para proteger la película de los filtros, seguido por una hoja de película, finalmente colocar otra pantalla. Meter los cassettes en una bolsa negra y llevar a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 3-5 días, dependiendo de la actividad de los filtros. Una buena regla para la exposición es:  $< 500$ : 5-7 días;  $> 500 < 1000$ : 4 días;  $> 1000 < 1,500$ : 3 días.
11. Remover los cassettes del congelador de  $-80^{\circ}\text{C}$ , y dejar que se calienten a temperatura ambiente antes de abrir, 1-2 h. Remover la película y revelarla, encubando en la solución de revelado durante 2-5 min, en agua corriente 2 min, en el fijador 2-5 min, y en agua corriente 5 min. (No exceder más de 5 min en el revelador).

## Transformación y Minipreps

### Células Competentes

1. Inocular 50 ml de medio SOB con una colonia fresca, en un frasco de 500 ml.
2. Incubar a 37°C con agitación constante durante toda la noche.
3. Diluir 0.5 ml de células en 500 ml de medio SOB, en un frasco de 2 L.
4. Incubar a 37°C con agitación constante por 4-5 h, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8.
5. Centrifugar a 5000 r.p.m. por 10 min. {centrifuga Beckman, rotor JA10 (2600 g)}.
6. Resuspender el pellet en 500 ml de glicerol al 10% (v/v) estéril y frío.
7. Centrifugar a 5000 rpm por 15 min. Descartar cuidadosamente el sobrenadante cuando este traslucido, sino centrifugar por más tiempo.
8. Repetir los pasos 6 y 7.
9. Resuspender el pellet en 2 ml de glicerol nuevamente al 10% (v/v), puede ser utilizado el que queda en las paredes del tubo.
10. Dispensar alícuotas de 20  $\mu$ l en tubos colocados en baño de etanol-hielo.
11. Almacenar a -70 °C.

### Electroporación

1. Enfriar en hielo las celdas estériles.
2. Servir en celdas, los 20  $\mu$ l de células competentes y entre 1-1,5  $\mu$ l de plásmido.
3. Ubicar las celdas en la cámara del electroporador con agua hielo.
4. Estar pendiente de que el interruptor este en el punto donde está la celda blanco, teniendo en cuenta que siempre debe estar el juego completo de 4 celdas.
5. Para iniciar cada choque, el regulador de pulsos debe estar en posición de carga (Charge).
6. Se presiona el botón UP, hasta alcanzar un voltaje de aproximadamente 415.
7. Una vez alcanzado este nivel, se cambia el interruptor a la posición de armado (Arm).
8. Se espera a que el voltaje llegue a 405 exactamente y se oprime el botón TRIGGER.
9. Se mueve el interruptor a la celda siguiente y así sucesivamente.
10. Una vez electroporado, se cultivan las células en medio SOC (1ml), para recuperarlas, durante 2 h a 28°C y 250 rpm.

11. Plaquear en medio LB con los antibióticos de selección del plásmido que se insertó.
12. Se selecciona una sola colonia para hacer el miniprep y el resto para stock.

### Minipreps por Lisis por Calentamiento

1. Tomar una colonia e incubarla en 3 ml de LBroth líquido + Ampicilina [100 $\mu$ g/ml], a 37°C x 160 rpm durante toda la noche.
2. Transferir 1.5 ml del cultivo a un tubo eppendorf de 1.5 ml.
3. Centrifugar 12000 rpm durante 2 min a 4°C.
4. Descartar el sobrenadante.
5. Repetir los pasos 2, 3, y 4 y secar el tubo invirtiéndolo sobre una toalla de papel.
6. Adicionar 520  $\mu$ l de STET (NaCl 0.1M, TrisHCl pH: 8.0 10 mM, EDTA pH: 8.0 1mM, Tritón X-100 al 5%). Resuspender fuertemente.
7. Adicionar 32  $\mu$ l de lisozima fresca (solución de 10 mg/ml en 10mM Tris-HCl pH: 8.0). Mezclar suavemente hasta que se disuelva el precipitado.
8. Incubar en un baño maria a 100°C durante 60 seg.
9. Retirar los tubos del baño y centrifugar a 14000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.
10. Remover el precipitado con un palillo estéril.
11. Adicionar 52  $\mu$ l de acetato de sodio 3M pH: 5.2 y 600  $\mu$ l de Isopropanol frío.
12. Mezclar suavemente, invirtiendo el tubo.
13. Incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
14. Centrifugar a 14000 rpm durante 10 min a 4°C.
15. Descartar el sobrenadante y dejar secar invirtiendo los tubos sobre una toalla de papel.
16. Lavar el botón celular adicionando 1000  $\mu$ l de etanol frío al 70%.
17. Centrifugar a 12000 rpm durante 2 min a 4°C.
18. Descartar el sobrenadante y dejar secar completamente a temperatura ambiente.
19. Resuspender el botón de ácidos nucleicos en 50  $\mu$ l de TE (TrisHCl 1M; EDTA 0.5M, pH: 8.0).
20. Adicionar ARNasa (10 mg/ml) para remover el RNA.
21. Incubar durante 20 min a 37°C.
22. Hacer un gel de agarosa al 1%, para visualizar los plásmidos.

## Purificación De Sondas

### Elusión de Bandas

1. Desde un gel de agarosa LMP.
2. Cortar el pedazo de agar que contiene la banda
3. Colocarla dentro de un tubo eppendorf de 1.5 ml.
4. Incubar en un baño maria a 75°C durante 20 min.
5. Adicionar 1 volumen de fenol.
6. Mezclar e incubar a -80°C durante 30 min.
7. Dejar a temperatura ambiente durante 10 min.
8. Centrifugar a 12000 rpm durante 10 min a 4°C.
9. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.
10. Adicionar 1 volumen de butanol.
11. Centrifugar a 12000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
12. Descartar el sobrenadante (fase de butanol).
13. Adicionar 1 volumen de isopropanol a la fase inferior, mezclar por inversión.
14. Centrifugar a 12000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
15. Descartar el sobrenadante, y precipitar la fase inferior con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH: 5.2 y 2.5 volúmen de etanol al 96%.
16. Incubar a -80°C durante 30 min ó -20°C durante 2 h.
17. Centrifugar a 12000 rpm durante 20 min a 4°C.
18. Lavar con etanol al 70%.
19. Secar el botón celular y disolverlo en 30  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.
20. Ver el producto (3  $\mu$ l) en un gel de agarosa al 1%.

### Digestión De Plásmidos\*

Reactivo	Concentración Final
ADN de plásmido	10-20 $\mu$ l
Buffer 10X	1X
Espermidina 40mM	4mM
Enzima (PstI)	5U
H <sub>2</sub> O	

\*Ver la digestión en un gel de agarosa al 1%.

### Amplificación de Insertos de Plásmidos

1. Preparar en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml el cóctel de la reacción que contenga todos los reactivos enumerados a continuación, excepto el ADN del plásmido.

Reactivo	Concentración Stock	Concentración final
Agua bidestilada estéril		Ajustar a 25 $\mu$ l
Buffer	10X	1X (2,5 $\mu$ l)
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.5 mM
DNTPs	2.5 mM	0.2 mM
BSA (opcional)	100X	1X
Cebador1	10 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M
Cebador 2	10 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M
Taq polimerasa	5 U/ $\mu$ l	0.5 U
ADN plásmido	1 ng/ $\mu$ l	5.0 ng
Volumen Total		25 $\mu$ l

2. Adicionar a cada tubo el cóctel.
3. Adicionar 5  $\mu$ l de plásmido a cada tubo, mezclar suavemente.
4. Amplificar usando programa abajo descrito.
5. Cuantificar la concentración de inserto (por fluorometría).
6. Verificar la amplificación cargando 5  $\mu$ l de cada muestra (1  $\mu$ l de ADN + 5  $\mu$ l de buffer carga (azul de bromofenol 0.25% y glicerol 30%) + 3  $\mu$ l de agua estéril) en un gel de agarosa al 1%, con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml), e incluir un marcador de tamaño.

#### Programa:

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94°C	1 min
2	94°C	1 min
3	55°C	2 min
4	72°C	3 min
5	29 ciclos desde el paso 2	
6	72°C	15 min
7	14°C	Indefinido

## Polimorfismos de ADN Amplificados Aleatoriamente (RAPDs)

### Dilución del ADN

Con la concentración del ADN obtenida en el fluorómetro preparar las diluciones a 10 ng/ $\mu$ l necesarias para su posterior amplificación (RAPDs, o microsatélites), como sigue:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

### Amplificación

1. Preparar en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml el cóctel de la reacción (dependiendo del número total de muestras) que contenga todos los reactivos enumerados a continuación, excepto el ADN.

Reactivo	Concentración Stock	Concentración final
Agua bidestilada estéril		Para completar volumen
Buffer	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.5 mM
DNTPs	2.5 mM	0.2 mM
BSA (opcional)	100X	1X
Primer (OPERON)*	6-10 $\mu$ M	4.0 $\mu$ M
Taq polimerasa	5 U/ $\mu$ l	1U
ADN	10 ng/ $\mu$ l	25 ng
Volumen Total		12.5 $\mu$ l

\*La concentración del primer varía entre 6 a 10  $\mu$ M, pero la concentración final debe quedar aproximadamente a 4  $\mu$ M, en general se trabaja con un volumen fijo = 2  $\mu$ l de cada primer independiente de la concentración de cada primer.

### Notas:

- 1 El agua empleada tanto para las diluciones del ADN, como para la amplificación de las mismas debe ser tipo HPLC ó agua bidestilada estéril (autoclavada y filtrada).
- 2 Es importante estandarizar las concentraciones óptimas de MgCl<sub>2</sub> y Taq-polimerasa con cada nuevo lote de enzima, buffer y MgCl<sub>2</sub>.
- 3 El ADN debe ser diluido a 10 ng/ $\mu$ l. Es importante la cuantificación precisa de la concentración del ADN, para asegurar la calidad de la amplificación.
- 4 La enzima debe añadirse siempre al final.

2. Colocar el ADN en la caja de ELISA.
3. Agregar el cóctel a cada una de las muestras.
4. Si es necesario (si el termociclador lo requiere) se debe adicionar a cada muestra 50  $\mu$ l de aceite mineral.
5. Cubrir la caja con papel plástico o con su respectiva tapa (esto depende del tipo de termociclador que se emplee).
6. Colocar la placa en el termociclador (MJ Research, PTC-100 o PTC-200), previamente programado.

**Programa:**

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94°C	1 min
2	42°C	15 seg
3	72°C	1 h 10 min
4	91°C	15 seg
5	42°C	15 seg
6	72°C	1 h 10 min
7	36 ciclos desde el paso 4	
8	14°C	Indefinido

**Electroforesis**

1. Servir el producto de PCR en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 0.5X, con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml), e incluir un marcador de tamaño. Después de la amplificación adicionar a cada muestra 1/10 del volumen de buffer carga (azul de bromofenol 0.25% y glicerol 30%).
2. Correr la electroforesis a 280-300V durante 1 h aproximadamente.
3. Observar al UV y tomar foto.
4. Hacer la lectura directamente de la foto, armar una matriz (Excel) con los datos.
5. Analizar los resultados (NTSYS).

## Polimorfismo de los Fragmentos Amplificados (AFLP's)

### Digestión del ADN Genómico con Enzimas de Restricción

Tomado de Gibco (cat. No. 10978-021), Adaptado en CIAT, para yuca.

Es esencial evitar digestiones parciales del ADN genómico, lo cual puede originar reconocimientos incorrectos de los polimorfismos.

#### Preparación del cóctel:

1. Adicionar a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml lo siguiente:

Reactivo	[final]	Volumen
ADN	250 ng	2.5 $\mu$ l
Eco RI/MseI	5U	1.0 $\mu$ l
Buffer 5X	1X	2.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O bidestilada		6.5 $\mu$ l
		Vf = 12.5 $\mu$ l

2. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente para recolectar la reacción en el fondo del tubo.
3. Incubar 37°C durante 2 h a 37°C.
4. Incubar la mezcla durante 15 min a 70°C para inactivar las enzimas de restricción.
5. Incubar el tubo en hielo 5 min y recolectar por centrifugación.

### Ligación de Adaptadores

1. Adicionar al ADN digerido del paso anterior:

Reactivo	Volumen
Solución de ligación-adaptador	12 $\mu$ l
T4 ADN ligasa (1 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l

2. Mezclar suavemente a temperatura ambiente, y centrifugar brevemente para recolectar el contenido.
3. Incubar a 20°C  $\pm$  2°C durante 2 h.
4. Hacer una dilución 1:10 de la ligación, como sigue:

5. Tomar 10  $\mu$ l de la muestra y transferir a un tubo de microcentrífuga de 1.5ml.
6. Adicionar 90  $\mu$ l de Te buffer y mezclar bien.
7. La solución restante de la reacción puede ser almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Reacciones de Preamplificación (PCR +1/+1)

1. Preparar un cóctel de amplificación como sigue:

Reactivo	Volumen
ADN diluido 1:10 (ADN de la ligación paso 4)	2.5 $\mu$ l
Pre-amp primer mix	20 $\mu$ l
Buffer PCR 10X + Mg	2.5 $\mu$ l
Taq-ADN polimerasa (1 unidad/ $\mu$ l)	0.3 $\mu$ l
Agua destilada	0.7 $\mu$ l
Volumen total	25 $\mu$ l

2. Mezclar suavemente, centrifugar brevemente para recolectar el contenido para amplificar durante 20 ciclos (programa AFLP+1), guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Programa:

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94°C	30 seg
2	56°C	1 min
3	72°C	1 min
4	19 ciclos desde el paso 4	
5	14°C	Indefinido

3. Hacer dilución 1:50 de la siguiente manera: transferir 3  $\mu$ l a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, que contiene 147  $\mu$ l de buffer TE. Almacenar el resto de PCR + 1 sin diluir a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Amplificación AFLP Selectiva (PCR +3/+3)

1. Por cada par de primer, adicionar el siguiente cóctel a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, marcado como mix 1.

Reactivo	Volumen
Primer EcorI	0.5 $\mu$ l
Primer MseI (+ dNTPs)	4.5 $\mu$ l
Total	5.0 $\mu$ l

2. En otro tubo marcado como mix 2:

Reactivo	Volumen
Agua bidestilada	7.9 $\mu$ l
Buffer de PCR 10X + Mg	2.0 $\mu$ l
Taq-ADN polimerasa (5 unidades / $\mu$ l)	0.1 $\mu$ l
Volumen total (para una reacción)	10 $\mu$ l

3. Adicionar mix 1 y mix 2 a un tubo de PCR de 0.2  $\mu$ l con 5  $\mu$ l de PCR+1 diluido:

Reactivo	Volumen
ADN (diluido 1:50)	5 $\mu$ l
Mix 1 (primers/dNTPs)	5 $\mu$ l
Mix 2 (Taq-polimerasa/buffer)	10 $\mu$ l
Volumen total	20 $\mu$ l

4. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente para coleccionar la reacción.
5. Amplificar con el programa AFLP+3.
6. Almacenar las muestras a -20°C.
7. Adicionar a cada muestra 4  $\mu$ l de buffer de corrida.
8. Denaturar las muestras a 94°C durante 3 min.
9. Servir 4  $\mu$ l de cada muestra en un gel de poliacrilamida al 6% en condiciones denaturantes.
10. Correr a 100 Vativos durante aproximadamente 2 h a 50°C.
11. Desmontar y teñir con nitrato de plata.

## Programa (AFLP + 3):

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94°C	30 seg
2	65°C	30 seg
3	72°C	1 min
4	94°C	30 seg
5	65°C	30 seg -0.7/cyc
6	72°C	1 min
7	11 ciclos desde el paso 4	
8	94°C	30 seg
9	56°C	30 seg
10	72°C	1 min
11	22 ciclos desde el paso 8	
12	14°C	Indefinido

Tiempo aproximado de duración de la amplificación, 2 h 10 min.

## Microsatélites o Repeticiones de Secuencias Cortas (SSRs)

### Marcaje de Oligos

Reactivo	Volumen
Oligo (10 pmol/ul)	2 $\mu$ l
BufferI	2 $\mu$ l
T4 ADN Kinasa	1 $\mu$ l
Gamma <sup>32</sup> P	5 $\mu$ l
H2O	10 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

Incubar a 37°C durante 1h 20 min, y parar la reacción incubando a 65°C durante 20 min. El oligo marcado es adicionado directamente a la caja de pre-hibridización (después de cambiar el buffer).

### Pre-hibridización, Hibridización y Lavados de los Oligos

Prepare como mínimo 2 litros de buffer de pre-hibridización.

#### Buffer De Pre-Hibridización

Reactivo	Volumen
10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH6.8)	200 ml de 0.1M
0.5% SDS	50 ml de 20%SDS
6XSSC	600 ml de 20XSSC
0.1% leche deshidratada (descremada)	2 g
1mM EDTA	4 ml de 05M

1. Pre-hibridizar los filtros en cajas grandes a 68°C durante 2-7h con 400ml (o más si se hibridizan más de 4 filtros) de buffer; cambiar el buffer con buffer fresco, pre-calentado a temperatura apropiada (-5°C de el T<sub>m</sub> (temperatura de anillamiento) para cada Oligo), justo antes de adicionar el oligo marcado.
2. Lavar con 6XSSC y 0.1SDS durante 5 min 2 veces; si la señal es aún muy caliente (>100000 cpm) pueden prolongarse los lavados.

## Protocolo Sencillo para Desarrollar Microsatélites en Yuca

### Importante:

\*Se asume que la librería enriquecida está hecha con anterioridad, y clonada en el sitio del polyenker de PUC18, y los clones positivos identificados y aislados con anterioridad por selección de microsatélite de las librerías y miniprepss de plásmidos, usando el kit de extracción de minipreps QIAprep (QIAGEN GMBH).

1. Chequear la calidad del plásmido corriendo 0.5  $\mu$ l del mismo en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Estimar la concentración incluyendo el ADN de lambda (sin digerir) de 100 ng, 250 ng, 500 ng, y 1000ng (en este caso la concentración se ha estimado con anterioridad en 500 ng/ $\mu$ l para casi todos los clones, de aproximadamente 25  $\mu$ l en 10mM Tris-HCL pH 7.5).
2. Montar 2 PCRs de secuenciación, con los primers M13 universal y M13 reverse, Para cada clone como sigue:
  - 4  $\mu$ l colorante reactivo, mezclar
  - 2  $\mu$ l relevant primer (concentración 0.8  $\mu$ M/ $\mu$ l)
  - 500 ng ADN plasmídico (en este caso 1  $\mu$ l)
  - Llevar a 10  $\mu$ l con agua deionizada estéril (en este caso 3  $\mu$ l).
3. Hacer el PCR de secuenciación: para un volumen de 10  $\mu$ l

Colocar los tubos en la máquina de PCR.

### Programa:

Paso	Temperatura	Tiempo
1	96°C	30 seg
2	50°C	15 seg
3	60°C	4 min
4	25 ciclos desde el paso 1	
5	4°C	Indefinido

Guardar hasta que este listo para precipitar.

4. Los productos de PCR se deben limpiar antes de ser cargados en el gel de secuencia, para remover nucleótidos no-incorporados al colorante-marcado. La reacción de PCR se puede limpiar usando columnas de sephadex (CIAT), lo cual es de hecho preferible para rescatar fragmentos pequeños, o por precipitación con alcohol donde la resina de sephadex y las jeringas no son necesarias.

#### Protocolo de limpieza por precipitación

- Transferir la reacción de PCR a microtubos de 1.5 ml.
  - Para esto, adicionar 1µl de acetato de sodio 3M (pH 5.2, muy importante)
  - Adicionar 22 µl etanol absoluto frío (grado analítico).
  - Dejar a temperatura ambiente durante 1 h.
  - Precipitar el producto de PCR centrifugando a 4°C durante 30 min, observar la orientación del tubo.
  - Con mucho cuidado remueva el etanol del sobrenadante aspirando o usando la punta de una pipeta. Tenga cuidado de no alterar el precipitado visible.
  - Adicionar 250 µl de etanol 70% (grado analítico), centrifugar durante 10min a 4°C, colocando antes un tubo en la misma orientación.
  - Secar durante 1 min al vacío.
5. Hacer el gel de secuencia, (ver secuenciación) y dejarlo durante 2 h. Adicionar 3 µl de buffer de carga de secuencia (5:1 formamida deionizada: azul dextran). Denaturar a 90-100°C durante 2 min y cargar 1.5 µl de cada muestra.
  6. Una vez hecha la secuenciación, extraer el gel y rastrear las líneas apropiadamente, asegurándose que las líneas correspondan con las muestras como se disponen en la hoja de muestras. Copiar el archivo de texto de cada muestra en un diskette y abrir en microsoft Word. Los primers sentido y antisentido (primers Universales) pueden ser alineados usando el programa "BLAST dos secuencias" opción de BLAST que se encuentra en la siguiente dirección de Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/wblast2.cgi>. Simplemente cargar en las ventanas dadas las secuencias sentido y antisentido y usar el botón de alinear para alinear las secuencias. Una vez esto este hecho, regresar a los datos crudos para aclarar cualquier duda acerca de la fidelidad de los datos de la secuencia, tal como donde las dos líneas no se alinean apropiadamente.

7. Limpiar la secuencia del vector; usar también el algoritmo de BLAST con la opción "BASIC BLAST", el banco de datos para buscar es "vector". Usar solamente la secuencia antisentido durante esta búsqueda. Una vez esto este hecho, limpiar las partes de la secuencia que correspondan a la secuencia del vector. También buscar la siguiente secuencia antisentido "AGTTCCAGACC", y "GGAGTGGAAAG" estas son las secuencias de los adaptadores, las que se encuentran al comienzo del inserto, justo después de la secuencia del vector.
8. Diseñar los primers para la secuencia antisentido. Hay muchos paquetes para diseño de primers, pero el mejor puede ser primer3 encontrado en <http://www-genome.wi.mit.edu/cai-ban/primer/primer3.cai>. Sólo hay que seguir las instrucciones dadas en el botón de la primera página. Notar que la longitud del primer óptima para microsatélites es de 20 bp, y el contenido de GC óptimo es de 40%, el tm (temperatura de anillamiento) óptimo es 56°C, y para hacer los primers que rodean el microsatélite usar el "target box", entrar a la posición de comenzar el microsatélite, seguido por una coma, y luego la longitud del microsatélite.

**Notas:**

Al encontrar un clon (plásmido) que parece ser una mezcla, hacer un PCR con éste y separarlo usando agarosa de bajo punto de fusión y re-amplificación. Para secuenciar esto, usar los protocolos CIAT.

**Selección de librerías BAC por hibridización**

1. Inocular membranas Hybond N+ (Amersham, UK) con un High Density Replicateng Tool (HDRT) de 384 puntas, de micro-placas.
2. Colocar las membranas en cajas de petri con LB agar que contengan 12.5 µg/ml de clorafenicol e incubar a 37 °C durante 12 a 36 h hasta que se obtengan colonias de 1 a 2 mm de diámetro.
3. Remover las membranas y colocarlas con las colonias hacia arriba, sobre un bloque de papel filtro absorbente (Whatman Ca. No. 3030 700) remojado en las siguientes soluciones y por un tiempo específico:
  - Solución 1 (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl) durante 7 min.
  - Solución 2 (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 8.0), durante 7 min.
  - Dejar secar al aire algo más de 1 h.
  - Solución 3 (0.4 N NaOH), durante 20 min.
  - Solución 4 (5X SSPE), durante 7 min.
  - Dejar secar durante la noche.

4. Prehibridizar los filtros a 65°C mínimo durante 4 h con buffer de hibridización.
5. Intercambiar el buffer de prehibridización con buffer fresco y continuar la prehibridización durante 2-4 h a 65°C.
6. Adicionar las sondas e hibridizar durante 18 a 36 h a 65°C.
7. Lavar los filtros con 2X-0.1X SSC y 0.1% SDS 2-3 veces durante 20 min a 65°C.
8. Secar con toallas de papel, envolver en papel plástico, y exponer durante 24 a 72 h usando pantalla.

**Notas:**

- Usar placas Q-bot (Genetix, Enc., UK), de 384-pozos que contienen los clones BACS los cuales son distribuidos sobre membranas de hybond N+ de 22 cm. x 22 cm.
- Las bacterias de 72 placas son localizadas dos veces sobre una membrana, resultando en 27648 únicos clones sobre cada membrana. Alternativamente, los filtros de nylon (12 X 8 cm.) pueden ser inoculados con un HDRT 384 desde las microplacas usando el robot Biomek 2000 (Beckman).
- Las membranas pueden ser almacenadas a temperatura ambiente por meses.

### DetECCIÓN de Microsatélites por PCR

1. Preparar en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml el cóctel de la reacción que contenga todos los Reactivos enumerados a continuación, excepto el ADN.

Reactivo	Stock	[Final]	Vol. por muestra
Buffer PCR	10X	1X	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM	1.5 µl
dNTP's	5.0 mM	0.2 mM	1.0 µl
Primer antisentido	10 µM	0.125µM	0.25 µl
Primer sentido	10 µM	0.125 µM	0.25 µl
Taq Polimerasa	5 U/µl	U	0.3 µl
ADN	10 ng/µl	50 ng	5.0 µl
H2O deionizada estéril		20 µl	10 µl

2. Colocar el ADN en la placa de PCR (de 96 o 384 pozos) o en tubos de 0.2 µl.
3. Agregar el cóctel a cada una de las muestras.
4. Cubrir la caja con su respectiva tapa.
5. Colocar la placa en el termociclador (MJ Research PTC-200), previamente programado.

**Programa:**

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94°C	3 min
2	94°C	30 seg
3	55°C	1 min
4	72°C	1 min
5	29 ciclos desde el paso 2	
6	72°C	5 min
7	14°C	Indefinido

6. Al finalizar la amplificación guardar a -20°C, hasta el momento de hacer la electroforesis.

**Notas:**

1. El agua empleada tanto para las diluciones del ADN, como para la amplificación de las mismas debe ser tipo HPLC ó agua bidestilada estéril (autoclavada y filtrada).
2. Es importante estandarizar las concentraciones óptimas de MgCl<sub>2</sub> y Taq-polimerasa con cada nuevo lote de enzima, buffer y MgCl<sub>2</sub>.
3. El ADN debe ser diluido a 10 ng/μl.
4. La Enzima debe añadirse siempre al final.

**Limpieza de Placas de PCR (que se van a reutilizar):**

- Con el chorro de agua sacar el contenido de los pozos (colorante y ADN y demás componentes de la reacción de amplificación).
- Después dejar en alcohol al 50% durante algunas horas o de un día para otro.
- Secar sobre toallas de papel.
- Autoclavar.
- Secar en el horno y guardar.

**Electroforesis en Gel de poliacrilamida**

1. Después de la amplificación adicionar a cada muestra 10 μl de buffer carga denaturante (azul de bromofenol 0.05%, cilen xianol 0.05% y formamida 95%). Servir el producto de PCR en un gel poliacrilamida al 6%, e incluir un marcador de tamaño (10 o 25 pb).
2. Correr la electroforesis a 1800V durante 2 h aproximadamente.
3. Revelar la información mediante el empleo de tinción con plata.
4. Hacer la lectura directamente del vidrio, Scanner.
5. Armar una matriz (Excel) con los datos. Análisis de datos.

## Secuenciación\*

### Preparación de la Muestra:

En tubos de PCR	1Rx
Agua	3 $\mu$ l
Primer (3.2pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
ADN (Plasmido)	2 $\mu$ l
MIX (Big Dye)	<u>4 <math>\mu</math>l</u>
	Vf = 10 $\mu$ l

### Preparacion del Primer:

Sp6 3.2 pmol/ $\mu$ l	20 $\mu$ l >	6.4 $\mu$ l de primer a 10 $\mu$ M + 13.6 $\mu$ l de H <sub>2</sub> O
	100 $\mu$ l >	32 $\mu$ l de primer a 10 $\mu$ M + 68 $\mu$ l de H <sub>2</sub> O

### Programa de EXTENSION: Folder SQ > EXT (MJ#1)

Paso	Temperatura	Tiempo
1	96°C	30 seg
2	55°C	15 seg
3	60°C	4 min
4	Por 25 ciclos	
5	4°C	Indefinido
6	Guardar a	-20°C

### Limpeza: En tubos de 1.5 ml agregar lo siguiente:

- 4  $\mu$ l acetato de amonio 7M.
- Luego 50  $\mu$ l de etanol absoluto analitico.
- Poner en el Vortex suavemente.
- Seguidamente colocarlo en hielo durante 30min.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 30min a 4°C.
- Sacar el sobrenadante.
- Adicionar 200  $\mu$ l de etanol 70%.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 10min a 4°C.
- Sacar el sobrenadante.
- Secar en Speed Vac por 5min a 60°C.

\*Basado en modificaciones de Giraldo M.C. 2001

Montaje del Gel:

1. Se deben lavar muy bien los vidrios con Alconox diluido y agua deionizada
2. Revisar que el cassette y todo este limpio y a la mano {Beaker, magneto, filtro, pipetas de 5ml y de 1000  $\mu$ l, puntas, Acrilamida al 40%, agua bidestilada, urea, amberlita o resina para deionizar, TBE 10X, bomba de vacio, plancha de agitacion, persulfato fresco (mantener 1ml congelado) - 0.1g x 1ml, Temed}.

**Preparacion De Acrilamida Stock al 40% - 29:1 (Vf = 100 ml)**

- Pesar en Beaker:  
Acrilamida 38.67 g  
Bis-Acrilamida 1.33 g
- Disolver en H<sub>2</sub>O
- Adicionar 10 g de Amberlita o Resina y agitar por 10 min.
- Se filtra con 0.2  $\mu$ m

**Preparacion De Acrilamida al 4% (Vf = 50 ml)\***

## Se Mezclan:

- 5.625 ml de Acrilamida al 40%
- 25 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada.
- 18 g urea.
- 0.5 g de amberlita o resina.
- Agitar durante 10 a 15 min (hasta que disuelva bien y actue la resina).
- Filtrar: Pasar primero 5 ml de TBE 10X y luego lo que se tiene de acrilamida al 4%.
- Desgasificar por 5 min y trasvasar a un frasco con tapa.

Preparacion del Gel:

1. Se monta la camara.
2. Adicionar a los 50 ml de acrilamida al 4%: 250  $\mu$ l de persulfato fresco y 35  $\mu$ l de Temed.
3. Servir el Gel.
4. Polimerizar por 2 h.

**Nota:**

Si se desea almacenar por unas horas guardar a 4°C, es preferible usar fresca.

### Manejo Del Abi Prism 377-96

IR A > ABI PRISM 377-96 COLLECTION

IR A > FILE > NEW > SQ Sample (donde se llena la hoja de trabajo)

Se llena solo la columna > SAMPLE NAME

**ASEGURARSE QUE LAS CONDICIONES ESTEN DADAS PARA EL FILTRO USADO**

**E ES PARA BIG DYE**

IR A > FILE > SAVE AS > SAMPLE SHEETS > S SHEET FECHA

(Por seguridad se guarda con la fecha y hora en que fue corrido)

Se salva y se cierra la hoja.

IR A > NEW > SQ RUN

Modificar LANES ....Dependiendo del numero de muestras

IR A > SAMPLE SHEET y BUSCAR el archivo de la hoja de trabajo que ya se habia salvado

TENIENDO LA HOJA DE TRABAJO LLENA

### PRECORRIDA

- Prender el equipo con la puerta cerrada.
- Instalar el tanque de buffer<sup>1</sup> de la parte inferior y conectar (rojo).
- Instalar el cassette y ajustar los cuatro tornillos.
- Cerrar la puerta.
- Revisar si los vidrios estan limpios con **PLATE CHECK**.
- Ajustar con la placa de enfriamiento y conectarla.
- Montar el tanque de arriba teniendo cuidado de que selle y no tenga derrame - probar antes de llenar completamente el tanque superior.
- Sacar la Urea sin salpicar.

#### **Nota:**

1. Se debe tener cuidado de no salpicar al servir el buffer y al limpiar la urea

PARA PRECORRER:

IR A > WINDOW > STATUS - 1 hora hasta que alcance 51°C.

**PREPARAR LA MUESTRA**

- Formamida 4  $\mu$ l (4:1).
- Blue dextran 1  $\mu$ l >>>> Para 1ml.
- 3.5  $\mu$ l por muestra.
- Darle VORTEX.
- Se denatura 2 min a 96°C.
- Se dejan en hielo hasta la siembra.
- Se le da > PAUSE (asi la temperatura se sostiene).

**Nota:**

Tenga cuidado de no apoyarse en la camara

**PARA SEMBRAR LAS MUESTRAS**

- Limpiar la urea.
- Adicionar un poco de colorante en cada extremo (para ver el frente de corrida).
- Se coloca el peine entrandolo bien en el gel.
- Adicionar mas buffer.
- Sembrar las muestras impares - 2  $\mu$ l (los tubos deben tener una numeracion adicional de acuerdo con el numero de pozos).
- IR A > RESUME y asi se reinicia la precorrida durante 5 min.
- VER > STATUS (00:26:40)
- Pasados 5 min > Darle PAUSE > sembrar las muestras pares > CANCELE > RUN.
- En RUN esta el Folder del dia SE BUSCA y SE SALVA Con la FECHA.  
(GEL 27-02-2001)

## LECTURA DEL GEL

Todo queda en el disco duro GENOME

IR A > ABI PRISM 377-96 > RUNS Buscar el folder

IR A SECUENCHER 3 > FILE > SAVE AS se salva como un proyecto en el folder que destine el usuario.

Se da doble click en los archivos sin extensión:

- Se le da en **SHOW CHROMATOGRAM**.
- Agrandar la ventana.
- Ubicarse en el numero 1 y le da en **SELECT>>> FIND BASES**.
- Borrar las bases anteriores al inserto.
- Cerrar la ventana.
- Copiar la secuencia en word (si quiere).
- Y se salva .

### NOTA:

1. El protocolo de Secuenciación fue tomado de modificaciones realizadas por la experiencia de Martha Cecilia Giraldo (Laboratorio Caracterización Germoplasma de Frijol-CIAT).
2. Todos los pasos del proceso de Secuenciación en yuca deben ser confirmados con Edgar Barrera (Genética de Yuca-CIAT).

## RNA

### Extracción de RNA por el Método de la Proteinasa K (Hall et al 1978) con algunas modificaciones

1. Tomar 3 g de tejido pulverizado en nitrógeno líquido.
2. Agregar 7.8 ml de buffer de extracción que contiene:  
Borato de sodio 0.2 M, pH 9 (380,4 g/mol)  
EGTA 30mM  
DTT 5mM  
SDS 1%  
Previamente precalentado de 70 a 100°C.
3. Homogenizar el extracto e incubar durante 3 min a 70°C.
4. Adicionar 3,9 mg de proteinasa K e incubar a 37°C durante 1 h 30 min.
5. Adicionar 600  $\mu$ l de KCl 2M para parar la reacción.
6. Incubar en hielo durante 5 min y centrifugar a 8500 rpm durante 30 min a 4°C.
7. Tomar el sobrenadante y adicionar 1 volumen de fenol equilibrado con agua a pH6.0.
8. Centrifugar a 4000 rpm durante 15 min a 4°C.
9. Adicionar al sobrenadante 1 volumen de cloroformo, mezclar y centrifugar como en el paso anterior.
10. Precipitar el RNA en la solución acuosa durante toda la noche a 4°C con LiCl a una concentración final 2M.
11. Centrifugar a 10000 rpm durante 30 min a 4°C y descartar el sobrenadante.
12. Lavar el pellet dos veces con LiCl 2M (adicionar 1ml de LiCl, centrifugar a 10000 rpm durante 20 min a 4°C.) y dejar secar un poco.
13. Resuspender el pellet en agua tratada con DEPC.
14. Medir la pureza y la concentración en el espectrofotómetro a 260 y 280 nm.
15. Almacenar a -80°C.

-El aislamiento del mRNA con partículas magnéticas unidas a oligos poli dT, se realiza según el protocolo de DYNAL.

## Síntesis de cADN

1. Después de varios lavados con el "Washig buffer" de DYNAL realizar la síntesis de la primera cadena con la SuperScript II y su buffer respectivo, según el protocolo para esta Transcriptasa Reversa a 42°C con agitación constante durante 2 h.
2. Sintetizar la segunda cadena según el protocolo de Bachem con el buffer 10x cADN (2) a 16°C agitando durante dos horas.
3. Hacer dos lavados con "Washig buffer" de los Dynabeads, resuspender en agua con DEPC.
4. La digestión y ligación se realizan según el protocolo standard para AFLPs. Con modificaciones según la combinación de enzimas empleada.
5. En la digestión separar los dynabeads del cADN y continuar la ligación con el sobrenadante o la fase líquida.
6. Hacer la preamplificación según Bachem con el profile: (94°C por 30 seg., 52°C por 30 seg., 72°C por 60 seg.)15 ciclos.
7. Ver en gel, estimar la concentración y diluir a 1 ng/ $\mu$ l.
8. Continuar en el AFLP normal pero con primers +2 y el profile es el mismo que se utiliza para el PCR+3.
9. Hacer la lectura de los polimorfismos y cortar algunas bandas para elusión.

**Elusión y Amplificación de Bandas Polimórficas**

Protocolo para RNAmapping (Differential Display system) de GenHunter (1994) modificado por G. Gallego (1996)

1. Una vez ubicada la banda polimórfica tomar la banda en el gel (es importante tener bien identificada la combinación de cebadores a la que corresponde cada polimorfismo).
2. Guardar a 4°C cada banda en un tubo eppendorf marcado.
3. Resuspender en 150  $\mu$ l de TE pH8.0 y dejar hidratar durante 10 min a 4°C.
4. Calentar en un baño a 100°C durante 15 min para que el ADNc se separe de la matriz de poliacrilamida. (Es importante deshacer completamente el gel en esta solución).
5. Centrifugar a 12000 rpm durante 5 min.
6. Llevar el sobrenadante a otro tubo adicionarle 5  $\mu$ l de glicógeno (10 mg/ml), 10  $\mu$ l de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 450  $\mu$ l de etanol al 100%. Mezclar cuidadosamente y precipitar a -80°C durante 30 min o toda la noche a -20°C
7. Centrifugar a 12000 rpm durante 15 min a 4°C y descartar el sobrenadante.
8. Lavar el precipitado con 200  $\mu$ l de etanol al 85%, y centrifugar brevemente.
9. Dejar secar y resuspender en 10  $\mu$ l de agua bidestilada estéril precalentada a 65°C.

Reamplificación del ADN complementario eluído

ADNc molde	5 $\mu$ l
DnTPs	250 $\mu$ M,
Buffer 10X	1X,
Cebador de 50ng/ $\mu$ l (correspondiente a cada banda)	0.3 $\mu$ l
Taq polimerasa(CIAT)	0.2 $\mu$ l
Agua bidestilada estéril	Completar volumen
Volúmen final	40 $\mu$ l.

- El programa de el termociclador corresponde a la preamplificación para AFLPs, con 5 min más de extensión a 72°C.
- Confirmar la amplificación en gel de agarosa al 1%.

## Clonación de Fragmentos polimórficos eluidos y reamplificados (TDFs)

Partir de TDFs reamplificados, utilizando el Kit de clonación pGEM-T Easy Vector Systems de Promega que es eficiente en la ligación de productos de PCR. Este vector tiene en el sitio de inserción unos extremos cohesivos 3' con deoxitimas que incrementan en gran medida la eficiencia de ligación de productos de PCR por la adición de deoxiadenosinas que realizan algunas Taq polimerasas termoestables.

Visualizar los TDFs a insertar, en un gel de agarosa al 1% para comprobar la integridad del amplificado y la concentración, este kit requiere de una cierta cantidad de molde en nanogramos, dado por la ecuación:

$X(\text{ng de producto de PCR}) =$

$\frac{Y(\text{pares de bases del producto de PCR}) \times 60 \text{ ng (cantidad de vector)} \times \text{razón inserto:vector}}{3003 \text{ pb (tamaño del vector)}}$

Después de calcular la cantidad de molde necesaria, preparar la siguiente reacción:

TDF (20ng/ $\mu$ ml) a clonar	1 $\mu$ l
Vector	1 $\mu$ l
Buffer del Kit	1 $\mu$ l
T4 ligasa	1 $\mu$ l
Agua bidestilada estéril	Completar volumen
Volumen final	10 $\mu$ l

Dejar toda la noche a 15°C.

**Transformación**

Electroporación, según el manual del Cell-Porator Electroporation System I (Gibco BRL).

1. Colocar en cada celda la mezcla de 1 ó 0.5  $\mu$ l de reacción de ligación con 20  $\mu$ l de células competentes.
2. Pasar la reacción de la celda a un tubo falcon que contiene 900  $\mu$ l de medio SOC.
3. Incubar una hora a 37°C con agitación para la expresión de resistencia a antibiótico y pasar 200  $\mu$ l de esta reacción a LB Agar en caja de petri.
4. Incubar a 37°C de 14-16 h para observar colonias blancas (con plásmidos recombianantes) y colonias azules (con plásmidos no recombianantes).
5. De las colonias transformadas, tomar cinco procedentes de cada inserto y poner a crecer en medio LB líquido agitando a 37°C durante 16 h para obtener suficiente cantidad de plásmido con inserto.
6. Para hacer los minipreps usar lisis por calentamiento (Sambrook et al., 1989). (ver capítulo de transformación).
7. Reamplificar de nuevo usando de 10 a 100 ng de plásmido con los cebadores correspondientes para comprobar la identidad, el tamaño y la integridad del inserto.
8. Ver en geles de agarosa al 1%.

## Secuenciación de los marcadores de secuencias expresadas (ESTs)

Secuenciador automático ABI PRISM™ 377 ADN Sequencer (PERKIN ELMER)  
programa ABI PRISM™ 377 ADN Sequencing Analysis.

### Reacción de secuenciación:

2 $\mu$ l (0.3-1 $\mu$ g)	Miniprep del clon correspondiente
1 $\mu$ l	Cebador de una de las cadenas proveniente de EcoRI o MseI de dos bases selectivas de concentración 4 pm/ $\mu$ l
4 $\mu$ l	Mezcla de terminadores con los colorantes fluorescentes,buffer
1U	AmpliTaq ADN polimerasa FS de Perkin Elmer

Secuenciar ambas cadenas.

### Programa de PCR

Paso	Temperatura	Tiempo
Denaturación	94°C	30 seg
Alineamiento de cebador	55°C	5 seg
Extensión	60°C	4 min
Conservación	4°C	Indefinido

1. Armar el gel de poliacrilamida al 4.5% en el secuenciador.
2. Configurar la ubicación de las muestras, el tiempo de corrida de 4 h, la matriz que se va a utilizar para la lectura: 377.
3. Precorrer con solución fijadora hasta que alcance los 51°C.

### Preparación de muestras

1. Resuspender el PCR purificado (columna de Sephadex) y seco, con solución fijadora.
2. Denaturar durante 2 min a 100°C y conservar en hielo al sembrar en el gel.
3. Correr la electroforesis durante 4 h.
4. Trabajar el archivo de corrida, seleccionando los mejores sectores de lectura de secuencia 'tracking' y presentarlos en forma de electroforegramas.
5. Editar la lectura de los picos de 4 colores que indican la presencia de cada base.
6. Ubicar las secuencias correspondientes a los cebadores y el inserto de interés, eliminar la secuencia del vector.

7. Alinear ambas cadenas con el programa Sequencher 3.0 para Macintosh que permite corregir también las bases dudosas o mal leídas proporcionando una buena secuencia.

## ANEXO 1: Preparación de soluciones

### ADN esperma de salmón 5 mg/ml

Esperma 1 g

Disolver el esperma en 200 ml de agua destilada y luego autoclavar durante 30 min. Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Antes de usar esta solución se debe calentar en agua a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 10 min y luego ponerlo en baño de hielo.

### Acetato de Potasio 5M

KOAc Vf = 1L  
490.75 g

Calibrar a pH 7.5 con ácido acético 2M. Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Acetato de Sodio 3M pH 5.2

Acetato de sodio Vf = 1000 ml  
408.1 g

Adicionar 700ml de agua destilada, agitar hasta disolver, llevar a volumen.  
Calibrar pH hasta 5.2 con ácido acético glacial. Autoclavar. Guardar a temperatura ambiente.

### Acrilamida al 40% (29:1)

Acrilamida Vf = 100 ml  
38 g  
Bis-acrilamida 2 g

Disolver en 50ml de agua destilada, agitar hasta disolver y llevar a volumen.  
Guardar en botella oscura a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### Acrilamida al 30% (19:1)

Acrilamida Vf = 1000 ml  
285 g  
Bis-acrilamida 15 g

Disolver en 200ml de agua destilada, agitar hasta disolver y llevar a volumen.  
Guardar en botella oscura a  $4^{\circ}\text{C}$ .

## ANEXO 1: Preparación de soluciones

### ADN esperma de salmón 5 mg/ml

Esperma 1 g

Disolver el esperma en 200 ml de agua destilada y luego autoclavar durante 30 min. Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Antes de usar esta solución se debe calentar en agua a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 10 min y luego ponerlo en baño de hielo.

### Acetato de Potasio 5M

KOAc Vf = 1L  
490.75 g

Calibrar a pH 7.5 con ácido acético 2M. Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Acetato de Sodio 3M pH 5.2

Acetato de sodio Vf = 1000 ml  
408.1 g

Adicionar 700ml de agua destilada, agitar hasta disolver, llevar a volumen. Calibrar pH hasta 5.2 con ácido acético glacial. Autoclavar. Guardar a temperatura ambiente.

### Acrilamida al 40% (29:1)

Acrilamida Vf = 100 ml  
38 g  
Bis-acrilamida 2 g

Disolver en 50ml de agua destilada, agitar hasta disolver y llevar a volumen. Guardar en botella oscura a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### Acrilamida al 30% (19:1)

Acrilamida Vf = 1000 ml  
285 g  
Bis-acrilamida 15 g

Disolver en 200ml de agua destilada, agitar hasta disolver y llevar a volumen. Guardar en botella oscura a  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Acrilamida al 6%**

	[Inicial]	Vf = 1000 ml
Acrilamida	30%	200 ml
TBE	5X	200 ml
Urea	5M	300.3 g
Urea	7M	420.4 g

Disolver en 200ml de agua destilada, agitar hasta disolver y llevar a volumen. Esterilizar empleando un filtro de 0.22  $\mu$ m. Guardar en botella oscura a 4°C.

**Buffer carga**

	[Final]	Vf = 100ml
Azul de bromofenol	0.25%	0.25 g
Glicerol	30%	30 ml

Guardar a temperatura ambiente.

**Buffer para geles denaturantes**

Formamida	95%
Azul de bromofenol	0.05%
Xylene cyanol	0.05%
NaOH	10 mM
Ó EDTA	20 mM

Se puede usar NaOH ó EDTA. Guardar a 4°C.

**Buffer hibridización**

Fosfato de sodio 0.5 M  
 SDS 7%  
 EDTA 1 mM 10 ug/ml  
 pH 7.2

**Buffer de PCR 10X**

Triton X100	1%
KCl	500 mM
Tris HCl pH9.0	100 mM
H <sub>2</sub> O bidestilada	

Mezclar KCl, Tris HCl y agua bidestilada y esterilizar empleando un filtro de 0.22  $\mu$ m. Adicionar Triton X100 en la cámara y llevar a volumen. Alicuotar en tubos Eppendorf. Guardar a -20°C.

Se pueden preparar soluciones stock de KCl y Tris HCl pH9.0 (esteriles) ó bien emplear directamente la cantidad de reactivo requerida, tomando en cuenta el peso molecular de cada uno.

**Buffer STET**

	[Inicial]	[Final]	Vf = 35ml
NaCl	5M	0.1M	0.7 ml
Tris HCl pH8.0	1M	10mM	0.35 ml
EDTA pH 8.0	0.5M	1mM	0.07 ml
Triton X100		5%	0.7 ml

**Buffer TBE 10X**

	Vf = 1L
Trizma base	108 g
Acido borico	55 g
EDTA pH8.0 0.5M	40 ml

Ajustar el volumen con agua deionizada. Autoclavar. Guardar a temperatura ambiente.

**Buffer TBE 5X**

	Vf = 1000 ml
Trizma base	54 g
Acido borico	27.5 g
EDTA (0.5M) pH8.0	20.0 ml

Ajustar el volumen con agua deionizada. Guardar a temperatura ambiente.

**Buffer TE pH 8.0**

		Vf = 100 ml
Tris HCl pH 8.0 1M	10 mM	1 ml
EDTA pH8.0 0.5M	1 mM	0.2 ml

Autoclavar. Guardar a temperatura ambiente o a 4°C

**Buffer TNE 10X**

	Vf = 250 ml
Trizma base	3.025 g
EDTA- Na <sub>2</sub>	0.925 g
NaCl	14.6 g

Calibrar pH hasta 7.4 con HCl y llevar a volumen. Autoclavar. Guardar en botella oscura a 4°C.

**Bromuro de etidio 10mg/ml**

	Vf=100ml
Bromuro de etidio	1 g

Disolver en 100 ml de agua bidestilada. Guardar en una botella oscura a 4°C. Usar mascara y guantes apropiados al manipular este reactivo.

**Cloroformo: Isoamil alcohol (24:1)**

	Vf = 25 ml
Chloroformo	24 ml
Alcohol isoamil	1 ml

Guardar en una botella oscura a temperatura ambiente, por corto periodo de tiempo.

**EDTA 0.5M pH 8.0**

	Vf=1L
EDTA	168.1 g
ó EDTA.2H <sub>2</sub> O	186.1g

Calibrar pH hasta 8.0 con NaOH, (12g). Autoclavar. Guardar a temperatura ambiente ó a 4°C

**Espermidina 40mM**

Espermidina	58.2mg
-------------	--------

Llevar a 10 ml con agua destilada.

**HCl 2.5N**

	[inicial]	Vf = 500 ml
HCl	37%	104.2 ml

Trabajar en camara extractora, manipular con guantes. Guardar a temperatura ambiente .

**HCl 0.25N**

	[inicial]	Vf = 1L
HCl	32%	24.55 ml
ó HCl	37%	20.83 ml

Trabajar en camara extractora, manipular con guantes. Guardar a temperatura ambiente

**Isopropil tio-β-D-galactoside (IPTG) 200mg/ml**

	Vf =10 ml
IPTG	2 g

Disolver en 8 ml H<sub>2</sub>O bidestilada esteril y agitar hasta disolver y llevar a volumen.  
Esterilizar empleando un filtro de 0.22 μm. Guardar a -20°C

**LB broth (Luria-Bertani Medium)**

	Vf = 1L
Bacto Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Adicionar agua bidestilada hasta 800 ml. Calibrar pH=7.0 con 10N NaOH (0.2 ml). Llevar a volumen. Autoclavar. Guardar a 4°C

**LB-agar**

	Vf= 1L
Bacto Triptona	10g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g

Adicionar menos agua. Calibrar pH=7.0 con 10N NaOH (2 ml). Adicionar el agar. Autoclavar. Guardar a 4°C ó servir en cajas de petri. Dejar enfriar el medio hasta 50°C antes de adicionarle el antibiotico (termolabil). Dejar que se solidifique a temperatura ambiente. Guardar a 4°C, y 2 h antes de usarlas incubarla invertidas a 37°C.

**Lisozima 10mg/ml**

	[inicial]	Vf= 1ml
Lisozima	10mg	10 mg
Tris HCl pH8,0	1M	10 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O		990 $\mu$ l

Preparar fresca, en H<sub>2</sub>O bidestilada o en 10mM TrisHCl pH 8,0

**Medio de conservación de celulas E. coli a -20°C**

Extracto de levadura	5 g
Bacto Triptona	10 g
NaCl	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.27 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.79 g
Citrato de sodio	0.49 g
*MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 1M	0.4 ml
Glicerol	44 ml

\* Despues de autoclavar y dejar enfriar el medio a temperatura ambiente, se le agrega el MgSO<sub>4</sub>.

**Medio SOC**

Bacto Triptona	2 g
Extracto de levadura	0.55 g
H <sub>2</sub> O bidestilada	97 ml
NaCl 1M	1 ml
KCl 1M	1 ml
Disolver todo lo anterior y autoclavar. Luego agregar:	
MgCl <sub>2</sub> 1M, MgSO <sub>4</sub> 1M	1 ml
Glucosa 2M	1 ml
Filtar, ajustar pH7.0 $\pm$ 0.1	

**MgSO<sub>4</sub> 10mM**

MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O  
Autoclavar.

Vf = 100 ml  
214 mg

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5M**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0M  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0M

0.5M  
0.5M

Vf = 100ml  
72 ml  
28 ml

Al mezclarse bien alcanza un pH 7.2. Guardar a temperatura ambiente

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5M**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M

Vf = 1L  
142 g  
Approx 200 ml

Disolver Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 800 ml de H<sub>2</sub>O, calibrar a pH 7.2 con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M. Completar a volumen. Autoclavar. Guardar a temperatura ambiente.

NaOH 10N  
NaOH

*Revisar concentración al 10% el NaOH.*

*OJO Esta solución es para*

Reacción exotérmica (adicionar lentamente el NaOH mientras se agita). Autoclavar. Guardar a temperatura ambiente.

*hacer con plata.*

**NaCl 5M**

NaCl

Vf=1L  
292.2 g

Disolver en 700 ml de agua destilada, agitar y llevar a volumen. Autoclavar. Guardar a temperatura ambiente.

**Persulfato de amonio al 10%**

Persulfato de amonio

Vf = 1 ml  
100 mg

*Ojo 0.1g/ml*

Mezclar. Guardar a 4°C hasta por un mes.

**RNasa 10mg/ml**

Rnasa A

Vf = 1ml  
10 mg

Puede ser disuelta en agua bidestilada o en Tris HCl 10mM pH 7.5 y NaCl 15mM. Guardar a -20°C

**SDS 20%**

SDS

Vf = 1L

200g

Disolver en agua bidestilada pre-calentada. Guardar a temperatura ambiente.

**SSC 20X**

Cloruro de Sodio

Vf = 1000 ml

175.3g

Citrato de Sodio

88.2g

Calibrar a pH7.0 con NaOH 10N. Autoclavar. Guardar a temperatura ambiente.

**T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>**

Tris HCl pH 8.0

1M

Vf = 500 ml

5 ml

EDTA pH 8.0

0.5M

1 ml

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

**T<sub>50</sub>E<sub>10</sub>**

Tris HCl pH 8.0

1M

Vf = 500 ml

25 ml

EDTA pH 8.0

0.5M

10 ml

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

**Tris HCl 1M**

Trizma base

Vf = 1L

121.12 g

Disolver en 700 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada. Calibrar el pH7.5- 8.0 con HCl concentrado. Autoclavar. Guardar a temperatura ambiente.

**X-Gal 20mg/ml**

X-Gal

Vf = 10 ml

200 mg

Disolver en Dimethyl formamide. Guardar a -20°C en una botella oscura.

**5X SSPE**

NaCl

0.9 M

Fosfato de sodio

50 mM

EDTA

5 mM

pH7.7

## ANEXO 2: Soluciones para tinción con plata

**NOTA:**

Las cantidades a continuación son para tanques de 17.5 L, a excepción del revelador cuyo volumen es de 3.5 L.

**REVELADOR**

	Vf = 3.5 L
Carbonato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	105 g
Formaldehido 37% ( $\text{H}_2\text{CO}$ )	4.5 ml
Tiosulfato de Sodio (10mg/ml) ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	650 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}$ bidestilada	

Prepara la solución adicionando el  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada y llevar a volumen. Enfríe la solución a 10°C antes de usarla. La solución se usa máximo 4 veces.

**TINCION**

Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ )
Formaldehido 37%
$\text{H}_2\text{O}$ bidestilada

Vf = 17.5 L (Tanque)  
61.25 g  
78.75 ml  
17 L

*Ojo*  
17.5 g plata  
22.5 ml de Formaldehido

Prepara la solución en agua bidestilada y luego llevar a volumen. La solución se usa máximo 40 veces

**FIJADOR/PARADA (Acido Acetico 10%)**

Acido acetico glacial
$\text{H}_2\text{O}$ bidestilada

Vf = 17.5 L (Tanque)  
6125 ml  
11375 ml

La solución se usa máximo 40 veces

*Ojo*  
1,750 ml de acido acetico.  
15,750 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .

### ANEXO 3: Abreviaturas y Símbolos

ADN	Acido desorribonucleico
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (polimorfismos longitudinales de fragmentos amplificados)
cpm	Cuentas por minuto
g	Gramo
h	Hora (s)
L	Litro (s)
M	Molar
mA	Miliamperios
mg	Miligramos
min	Minuto (s)
ml	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normal
ng	Nanogramos
PCR	Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
RAPD	Random Amplified Polimorphic ADN (polimorfismo en el ADN amplificado aleatoriamente)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción)
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundo (s)
Sln	Solución
U	Unidades
UV	Ultravioleta
Vf	Volumen final
W	Vatias
°C	Grado centigrado
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar

