

PROTOCOS DE LABORATORIO



Laboratorio de Genética
Molecular Aplicada

TERCERA EDICIÓN

PROTOSCOLOS DE LABORATORIO

Laboratorio de Genética
Molecular Aplicada
del CIMMYT

Tercera edición

El Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT®) (www.cimmyt.org) es un organismo internacional, sin fines de lucro, que se dedica a la investigación científica y la capacitación relacionadas con el maíz y el trigo en los países en desarrollo. Basados en la solidez de nuestra ciencia y en nuestras asociaciones colaborativas, generamos, compartimos y aplicamos conocimientos y tecnologías con el objeto de incrementar la seguridad alimentaria, mejorar la productividad y la rentabilidad de los sistemas de producción agrícola, y conservar los recursos naturales. El CIMMYT recibe fondos para su agenda de investigación de varias fuentes, entre ellas, del Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (CGIAR) (www.cgiar.org), gobiernos nacionales, fundaciones, bancos de desarrollo e instituciones públicas y privadas.

© Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) 2004. Derechos reservados. Las designaciones empleadas en la presentación de los materiales incluidos en esta publicación de ninguna manera expresan la opinión del CIMMYT o de sus patrocinadores respecto al estado legal de cualquier país, territorio, ciudad o zona, o de las autoridades de éstos, o respecto a la delimitación de sus fronteras. El CIMMYT autoriza el uso razonable de este material, siempre y cuando se cite la fuente.

Cita correcta: CIMMYT. 2006. Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. Tercera edición. México, D.F.: CIMMYT.

ISBN: 968-6923-43-8

Descriptores AGROVOC: inmunoensayos de quimioluminiscencia;
ADN; hibridación del ADN

Otros descriptores: marcadores moleculares; PCR; RAPD; RFLP

Códigos de categorías AGRIS: F30 (fitogenética y mejoramiento)

Clasificación decimal Dewey: 631.523.

Índice

Prólogo	v
Abreviaturas y siglas	vii
Extracción en gran escala de ADN	1
Extracción de ADN utilizando un extractor de savia	5
Extracción en pequeña escala de ADN de muy alta calidad	7
Cuantificación y control de la calidad del ADN	11
Marcadores del peso molecular para la electroforesis en gel	13
Electroforesis en gel de agarosa neutral	18
Geles de doble espesor	19
Diagrama de producción de los RFLP	20
Digestión del ADN genómico con enzimas de restricción	21
Transferencia de Southern a la membrana MSI	24
Amplificación de insertos de plásmidos con la PCR	26
Amplificación de insertos de cultivos bacterianos con la PCR	27
Incorporación de digoxigenina-dUTP en insertos de plásmidos con la PCR	28
Cuantificación relativa de los insertos amplificados en gel	30
Verificación de la actividad de la digoxigenina-dUTP incorporada	32
Hibridación y detección de sondas marcadas con digoxigenina	33
Eliminar la sonda para reutilizar las membranas	37
Protocolos para STS y SSR	38
<i>Fingerprinting</i> del ADN de maíz y de trigo con un secuenciador automático de ADN	48
Protocolo para la quimioluminiscencia de los AFLP	53
Detección de secuencias de ADN transgénico en el maíz	60
Minipreparaciones de plásmidos	67
Aislamiento de insertos de plásmidos	69
Preparación de células competentes congeladas	70
Preparación de células competentes frescas	71
Transformaciones bacterianas	72
Soluciones concentradas de uso general	73
Programa de cuantificación del ADN con el espectrofotómetro DU-65 de Beckmann	77
Hojas de datos	80

Prólogo

El principal motivo de compilar y publicar este manual es proveer a los científicos, investigadores y estudiantes en los sistemas nacionales de investigación agrícola, las universidades y pequeñas empresas privadas en los países en desarrollo, así como también a las instituciones de investigación avanzada en el mundo industrializado, con una guía útil sobre los protocolos que actualmente se aplican en el Laboratorio de Genética Molecular Aplicada (AMG, por su nombre en inglés: Applied Molecular Genetics) que forma parte del Centro de Biotecnología Aplicada del CIMMYT, el cual, a su vez, ahora pertenece al Programa de Recursos Genéticos. En esta tercera edición del manual se incorporan la realimentación y sugerencias enviadas por personas que lo han utilizado en el pasado. Desde que se publicó la primera edición, se han distribuido más de 1000 ejemplares (de las versiones en español y en inglés).

Algunas de las tecnologías aquí descritas son muy actuales; otras son un poco anticuadas, pero las hemos incluido porque siguen siendo útiles (aunque en el futuro es posible que sean eliminadas). No obstante, las personas que tienen las versiones anteriores del manual notarán que hemos desechado secciones sobre protocolos obsoletos, al mismo tiempo que hemos agregado otras nuevas.

Los protocolos que más se emplean en el Laboratorio AMG del CIMMYT tienen que ver con la tecnología de los marcadores moleculares y pueden aplicarse para realizar mapeos, selección con la ayuda de marcadores moleculares y estudios sobre la diversidad genética. Muchos de ellos se pueden utilizar en otros cultivos además del maíz y el trigo, las especies primordiales con las que trabaja el CIMMYT.

Los protocolos descritos en este manual se aplican en el Laboratorio AMG del CIMMYT; sin embargo, cabe subrayar que las condiciones en cada laboratorio son distintas y que, por tanto, los protocolos deben ajustarse de acuerdo con los requerimientos de cada plantel.

Deseamos dar las gracias a los miembros del personal del Laboratorio AMG, la Unidad de Inspección y Distribución de Semillas y la Unidad de Comunicaciones Corporativas del CIMMYT por haber aportado su tiempo y conocimientos a la producción de esta versión actualizada del manual. Ellos son Pablo Alva Galindo, Claudia Bedoya Salazar, Elsa Margarita Crosby, Jonathan Crouch, Leticia Díaz Huerta, Susanne Dreisigacker, Virginia García Reyes, Ana Lidia Gómez Martínez, Marta Hernández Rodríguez, Eva Huerta Miranda, Hugo López Galicia, Carlos Martínez Flores, Monica Mezzalama, Ma. Asunción Moreno Ortega, Silverio Muñoz Zavala, Griselda Palacios Bahena, Enrico Perotti, Pingzhi Zhang, Jean Marcel Ribaut, Mark Sawkins, Alberto Vergara Vergara, Marilyn Warburton, Manilal William, Xia Xianchun y Alma McNab (consultora). Asimismo, reconocemos las valiosas aportaciones de personas que alguna vez trabajaron en el CIMMYT y que participaron en la producción de las versiones anteriores del manual: Diego González-de-Léon, David Hoisington, Mireille Khairallah, Scott McLean y Michel Ragot.

Rogamos a nuestros lectores, en especial aquellos a quienes les parece útil este manual, que nos envíen sus comentarios. Asimismo, agradeceríamos cualquier corrección o sugerencia que pudiera contribuir a mejorar las futuras ediciones de este manual.

Por favor dirija sus comentarios a:

Laboratorio de Genética Molecular Aplicada
CIMMYT, Apdo. Postal 6-641
06600 México, D.F., México
Teléfono: (52) (55) 5804-2004
Fax: (52) (55) 5804-7558
Email: mwarburton@cgiar.org, mwilliam@cgiar.org,
svelazquez@cgiar.org

Abreviaturas y siglas

ADN	ácido desoxirribonucleico
AMP	ampicilina
ARN	ácido ribonucleico
BME	β-mercaptoetanol
BPB	azul de bromofenol
BPF	bajo punto de fusión
BSA	albúmina de suero bovino
CSPD	Disodio 3-(4-metoxispiro{1,2-dioxetano-3,2'(5'-cloro)tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)fenil fosfato
CTAB	bromuro de alquiltrimetilo mixto-amonio
dATP	5'-trifosfato de deoxiadenosina
dCTP	5'-trifosfato de deoxicitidina
H ₂ O _{dd}	agua bidestilada
dGTP	5'-trifosfato de deoxiguanosina
dH ₂ O	agua destilada
Dig	digoxigenina
Dig-dUTP	digoxigenina-11-dUTP
dNTP	5'-trifosfatos de deoxinucleósidos
DO	densidad óptica
DO _x	densidad óptica a x nm
DTT	ditiotreitól
dUTP	5'-trifosfato de deoxiuridina
EDTA	tetracetato de etilendiamina
EtBr	bromuro de etidio
EtOH	etanol
g	gramo (-s)
h	hora (-s)
HYB	hibridación
kb	kilobases
KOAc	acetato de potasio
mA	miliamperes
min	minuto (-s)
ml	mililitros

MSI	Micron Separations Inc.
NaOAc	acetato de sodio
ng	nanogramo (-s) = 10 ⁻⁹ gramos
nm	nanómetro (-s) = 10 ⁻⁶ metros
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PM	peso molecular
RFLP	polimorfismos por segmentos de longitud restringida
RXN	reacción (-es)
S&S	Schleicher & Schuell
SDS	dodecilsulfato sódico
seg	segundo (-s)
SGB	amortiguador para gel con muestras
SS ADN	ADN de esperma de salmón
SSC	citrato sódico salino
STE	tris-EDTA sódico (también TEN)
TA	temperatura ambiente
TAE	tris-acetato EDTA (amortiguador)
TBE	tris-borato EDTA
TE	tris-EDTA (amortiguador)
TNE	tris-EDTA sódico (Na) (amortiguador)
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
TTE	tris-EDTA Tritón (amortiguador)
TTP	5'-trifosfato de timidina
U	unidad (-es) de enzima
UV	ultravioleta
V	voltios
CX	cianol de xileno
[FINAL]	concentración FINAL
[Sol. concentrada]	concentración inicial
°C	grado Celsius
μg	microgramo (-s) = 10 ⁻⁶ gramos
μl	microlitro (-s) = 10 ⁻⁶ litros

Extracción en gran escala de ADN

Liofilización

1. Coseche las hojas de plantas cultivadas en el invernadero o el campo. Es preferible utilizar hojas jóvenes sin zonas necróticas ni lesiones, aunque también se pueden utilizar hojas maduras que aún no llegan a la senescencia.
2. Si la nervadura central es gruesa y dura, deséchela. Corte o doble las hojas en secciones de 10 a 15 cm y colóquelas en una bolsa de malla de fibra de vidrio junto con la etiqueta que identifica la muestra (se pueden utilizar papel aluminio o bolsas de papel si se perforan para permitir el flujo de aire). Coloque las bolsas en una hielera u otro recipiente con hielo para mantener frías las muestras (pero no permita que se congelen). Asegúrese que no se mojen las muestras.
3. Coloque las muestras en un recipiente de espuma de poliestireno o algún otro tipo de recipiente que pueda contener nitrógeno líquido. Agregue nitrógeno líquido para congelar rápidamente las muestras. *No permita que se descongelen las muestras hasta que estén liofilizadas.*

NOTA: Las muestras pueden congelarse y conservarse a -80°C hasta el momento de liofilizarlas.

4. Transfiera las muestras congeladas al liofilizador. Asegúrese de que el liofilizador esté a una temperatura baja (la cámara debe estar a $\leq -50^{\circ}\text{C}$) y produzca un vacío adecuado (≤ 10 micrones Hg) antes de cargar las muestras. No sobrecargue el liofilizador; asegúrese de que el carío siempre sea de ≤ 100 micrones y de que la temperatura de condensador sea de $\leq -50^{\circ}\text{C}$. Las muestras deben secarse en 72 horas. Por lo general, el peso de las hojas frescas equivale a ≈ 10 veces el peso seco.
5. Las muestras secas pueden conservarse en bolsas de plástico herméticamente cerradas a temperatura ambiente por unos días o a -20°C , si se desea almacenarlas varios años.
6. Llene una hoja de registro de la cosecha.

Molienda

1. Muela las hojas con un molino mecánico (Tecator Cyclotec Sample Mill, Model 1093) hasta obtener un polvo fino, en un frasco de plástico que se pueda cerrar herméticamente.

NOTA: Si el material vegetal pesara menos de 4 g (peso fresco), muela hasta pulverizar en un molino de café con tapa al raz o en un mortero con nitrógeno líquido. Cuanto más fino se muela, mayor será la cantidad de ADN obtenida de una determinada cantidad de material.

2. Almacene las muestras molidas en frascos herméticamente cerrados, a -20°C . Así se mantienen estables durante varios años.

Aislamiento del ADN genómico

(basado en el método de Saghai-Marroof *et al.*, 1984¹)

1. Coloque entre 300 y 400 mg de tejido liofilizado y molido en un tubo de polipropileno de 15 ml para centrifugación. Se obtienen de 50 a más de 100 µg de ADN/100 mg de tejido seco. Si se requieren cantidades mayores, comience con 1 g de tejido liofilizado en un tubo de polipropileno de 50 ml para centrifugación y triplique todas las cantidades dadas anteriormente. Si se requieren cantidades menores, ponga entre 100 y 150 mg de tejido liofilizado en un tubo de centrifugación de 5 ml y utilice un tercio de las cantidades dadas anteriormente.
2. Agregue 9.0 ml de solución amortiguadora CTAB para extracción, calentada (65°C), a los 300-400 mg de tejido liofilizado y molido. Es mejor distribuir el tejido sobre las paredes laterales del tubo antes de agregar la solución amortiguadora, con el fin de evitar que se apelmace el tejido seco en el fondo. Mezcle invirtiendo el tubo varias veces con suavidad.
3. Incube durante 60 a 90 min en un horno a 65°C, agitando los tubos continuamente con suavidad.
4. Retire los tubos del horno. Espere de 4 a 5 min para que se enfríen los tubos y agregue 4.5 ml de cloroformo/octanol (24:1). Mezcle agitando suavemente los tubos durante 5 a 10 min.
5. Centrifugue en una centrifugadora de mesa durante 10 min a 1300-1500 x g² a TA.

NOTA: A menos de 15°C, el complejo de CTAB/ácido nucleico puede llegar a precipitarse, lo cual podría arruinar la preparación y dañar la centrifugadora.

6. Vierta la capa acuosa superior en otros tubos de 15 ml. Agregue 4.5 ml de cloroformo/octanol y agite suavemente durante 5 a 10 min.
7. Centrifugue en una centrifugadora de mesa durante 10 min a 1300-1500 x g² a TA.
8. Con una pipeta, transfiera la capa acuosa superior a otros tubos de 15 ml que contengan 30 µl de 10 mg/ml de ARNasa A (previamente hervida). Mezcle invirtiendo con suavidad los tubos e incube durante 30 min a TA.
9. Agregue 6.0 ml de isopropanol (2-propanol). Mezcle invirtiendo con suavidad los tubos.
10. Retire el ADN precipitado con un gancho de vidrio.³ Continúe con las OPCIONES A, B o C.

OPCIÓN A: Extracción con fenol para obtener ADN de mayor pureza

Por lo general no es necesaria esta opción para los análisis de RFLP, a menos que el ADN no se digiera adecuadamente. De hecho, es mejor realizar una extracción con fenol sólo después de la digestión con enzimas de restricción; esto mejora la separación en bandas y la resolución de éstas después de la electroforesis del ADN (véanse más detalles en secciones posteriores).

¹ Saghai-Marroof, M.A., K. Soliman, R.A. Jorgensen y R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. PNAS 81:8014-8018.

² 3000-3200 rpm en una centrifugadora Beckman GP o GPR, con rotor oscilatorio (que puede contener 56 x tubos de 15 ml).

³ Prepare el gancho de vidrio sellando primero el extremo de una pipeta de vidrio para transferencia de 23 cm, calentando el extremo en una llama durante unos segundos. Caliente luego 1 cm de la punta mientras hace rotar la pipeta. Cuando se ablande, deje que la punta se doble para formar un gancho. Enfríe antes de usarlo. Los ganchos usados se pueden limpiar lavándolos con dH₂O y EtOH.

11. Coloque el gancho con ADN en un tubo de plástico de 5 ml que contenga 1 ml de TE; haga girar con suavidad el gancho hasta que el ADN se deslice de él. Tape los tubos y agítelos suavemente a TA hasta el día siguiente, para disolver el ADN.
12. Extraiga cada muestra con 1 ml (1 x el volumen original de TE) de fenol equilibrado o 1:1 de fenol: cloroformo. Centrifugue la muestra durante 10 min a $1300 \times g^1$ en un rotor de cubeta oscilatoria.
13. Transfiera la capa (acuosa) superior a otro tubo. Extraiga el ADN con 1 ml (1 x el volumen original de TE) de cloroformo/octanol. Centrifugue la muestra 10 min a $1300 \times g^1$ en un rotor con cubeta oscilante. Transfiera la capa (acuosa) superior a un tubo nuevo. Continúe con el paso 15 de la OPCIÓN B.

OPCIÓN B: Precipitación con etanol

14. Coloque el gancho con ADN en un tubo de plástico de 5 ml que contenga 1 ml de TE; rote con suavidad el gancho hasta que el ADN se deslice del mismo. Tape los tubos y agite suavemente durante toda la noche a temperatura ambiente para disolver el ADN.
15. Precipite el ADN agregando 50 μ l de 5 M NaCl y luego 2.5 ml de EtOH absoluto (2.5 el volumen original de TE); mezcle invirtiendo con suavidad el tubo.
16. Retire el ADN precipitado con el gancho de vidrio. Continúe con el paso 17 de la OPCIÓN C.

OPCIÓN C: Lavados del ADN

17. Coloque el gancho con ADN en un tubo de plástico de 5 ml que contenga 3 a 4 ml de LAVADO 1. Deje el ADN en el gancho dentro del tubo durante unos 20 min.
18. Enjuague brevemente el ADN del gancho en 1 a 2 ml del LAVADO 2 y transfíralo a un tubo de plástico de 5 ml (preferiblemente un tubo Sarsted con tapas giratorias para evitar que se evapore el TE) que contenga 0.5 a 1.0 ml de TE (nosotros utilizamos 0.3-0.5 ml. para maíz y 0.5-1.0 ml. para trigo); haga girar con suavidad el gancho hasta que el ADN se deslice del gancho. Tape el tubo y agítelo con suavidad a la temperatura ambiente hasta el día siguiente, para disolver el ADN. Almacene las muestras a 4°C.

Solución amortiguadora con CTAB para extracción¹

SOL. CONC.	[FINAL]	1 RXN	5 RXN	10 RXN	20 RXN	50 RXN	60 RXN
		10 ml	50 ml	100 ml	200 ml	500 ml	600 ml
dH ₂ O		6.5 ml	32.5 ml	65.0 ml	130.0 ml	325.0 ml	390.0 ml
1 M Tris-7.5	100 mM	1.0 ml	5.0 ml	10.0 ml	20.0 ml	50.0 ml	60.0 ml
5 M NaCl	700 mM	1.4 ml	7.0 ml	14.0 ml	28.0 ml	70.0 ml	84.0 ml
0.5 M EDTA-8.0	50 mM	1.0 ml	5.0 ml	10.0 ml	20.0 ml	50.0 ml	60.0 ml
CTAB ²	1 %	0.1 g	0.5 g	1.0 g	2.0 g	5.0 g	6.0 g
14 M BME ³	140 mM	0.1 ml	0.5 ml	1.0 ml	2.0 ml	5.0 ml	6.0 ml

¹ Utilice la solución recién hecha; calentar a 60-65°C antes de agregar CTAB y BME.

² CTAB = bromuro mixto de alquiltrimetil-amonio (Sigma M-7635).

³ Agregar BME (β -mercaptoetanol) bajo una campana extractora, justo antes de usarse.

LAVADO 1: 76% de EtOH, 0.2 M NaOAc

SOL. CONC.	100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	500 ml
EtOH absoluto	76 ml	152 ml	228 ml	304 ml	380 ml
2.5 M NaOAc	8 ml	16 ml	24 ml	32 ml	40 ml
dH ₂ O	16 ml	32 ml	48 ml	64 ml	80 ml

LAVADO 2: 76% EtOH, 10 mM NH₄OAc

SOL. CONC.	100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	500 ml
EtOH absoluto	76 ml	152 ml	228 ml	304 ml	380 ml
1 M NH ₄ OAc	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml
dH ₂ O	23 ml	46 ml	69 ml	92 ml	115 ml

CLOROFORMO:OCTANOL: 24:1

SOL. CONC.	100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	500 ml
Cloroformo	96 ml	192 ml	288 ml	384 ml	480 ml
Octanol	4 ml	8 ml	12 ml	16 ml	20 ml

Extracción de ADN de pequeñas cantidades de tejido liofilizado

Para extraer ADN de pequeñas cantidades de tejido liofilizado (~ 50 mg), utilice tubos de 2 ml y proceda como sigue:

1. Agregue 1 ml de solución amortiguadora CTAB.
2. Incube durante 60 min agitando continuamente con suavidad.
3. Retire los tubos de la incubadora; déjelos enfriar y agregue 1 ml de cloroformo:etanol. Mezcle durante 10 min.
4. Centrifugue durante 10 min.
5. Retire 700 µl de la capa acuosa superior.
6. Agregue 10 µl de 10 mg/ml ARNasa A. Mezcle e incube durante 30 min.
7. Agregue 1 ml de isopropanol y mezcle.
8. Centrifugue los tubos durante 15 min a 12000 rpm para precipitar el ADN.
9. Retire la capa supernadante y seque el ADN a TA.
10. Vuelva a suspender en 200 µl de TE.

Extracción de ADN utilizando un extractor de savia

(basado en el método de Clarke *et al.*, 1989¹)

1. Preparación y uso del extractor de savia:²

Asegurar que los rodillos del extractor estén completamente limpios y que el sistema de enjuague que lava los rodillos entre una muestra y otra esté conectado a una fuente de alta presión de agua de-ionizada. Si solo cuenta con agua de la llave para lavar los rodillos, asegúrese de que al final éstos se enjuaguen muy bien con agua de-ionizada o con dH₂O entre una muestra y otra. Siempre seque los rodillos minuciosamente con toallas de papel suaves y limpias antes de iniciar la siguiente extracción.

Coloque la punta del alimentador de la solución amortiguadora sobre la mitad superior de los rodillos para asegurar que la solución se mezcle bien con la muestra de tejido prensada. Introduzca la muestra de tejido entre los rodillos en rotación a un ángulo pequeño a fin de lograr aplicar una presión estable a una sola capa de tejido (éste se enrollará en el rodillo en espiral).

- Use 150 a 250 mg de tejido foliar recién cosechado que ha sido mantenido sobre hielo (dentro de un tubo) o congelado a -80°C (dentro de un tubo). Es fundamental que al introducir el tejido entre los rodillos del extractor, la solución amortiguadora se encuentre ya en esa parte de los rodillos. Es necesario sincronizar esta operación muy bien con el bombeado del amortiguador; de otra manera, el ADN se degradará.
Bombee 1.0 ml de la solución amortiguadora y recoja el extracto en tubos de 2 ml en la punta de los rodillos.
- Incube los extractos en un baño de maría o en un horno a 65°C durante 20 a 40 min; mezcle suavemente dos veces o continuamente durante la incubación. Retire los tubos del calor y déjelos enfriar durante 5 a 10 min.
- Extraiga las muestras con 1 ml de octanol-cloroformo (1:24). Mezcle por inversión durante 5 min; a continuación, centrifugue en una centrifugadora de mesa a 3200 rpm durante 10 min.
- Transfiera la capa superior acuosa que contiene el ADN a tubos Eppendorf de 2.0 ml. Si el ADN tiene que ser cuantificado con precisión al final de la extracción, agregue 10 a 20 µl de ARNasa A + T1 (ver los otros protocolos) en el tubo e incube durante 30 min a 37 °C, o una hora a TA.
- Agregue 75 µl de 5M NaCl y precipite el ADN con 1 ml de etanol absoluto bien frío.
- Centrifugue rápidamente (*spin down*) el ADN, decante el etanol y seque en un vacío ligero durante 30 min.
- Vuelva a suspender durante toda la noche en la cámara fría en 200 a 500 µl de TE, pH8.0.
- Cuantifique utilizando el método del gel o con un fluorómetro TKO. Con este método se puede obtener un mínimo de 15 µg de ADN.

¹ Clarke, B.C., L.B. Moran y R. Appels. 1989. DNA analyses in wheat breeding. *Genome* 32:334-339.

² Extractor de savia: MEKU Erich Pollähne G.m.b.H. – 3015 Wennigsen, Am Weingarten 14, Alemania.

Solución amortiguadora de extracción¹

SOL. CONC.	[FINAL]	10 ml	50 ml	100 ml	200 ml
dH ₂ O		1.7 ml	8.5 ml	17.0 ml	34.0 ml
1 M Tris-8.0	100 mM	1.0 ml	5.0 ml	10.0 ml	20.0 ml
5 M NaCl	2100 mM	4.2 ml	21.0 ml	42.0 ml	84.0 ml
0.5 M EDTA-8.0	150 mM	3.0 ml	15.0 ml	30.0 ml	60.0 ml
PVP ²	0.5%	0.05 g	0.25 g	0.5 g	1.0 g
CTAB ³	2%	0.2 g	1.0 g	2.0 g	4.0 g
14 M BME ⁴	140 mM	0.1 ml	0.5 ml	1.0 ml	2.0 ml

¹ Usar solución recién hecha; calentar a 60-65° C antes de agregar CTAB y BME.

² Recomendamos usar Sigma PVP, catálogo PVP-40 (polivinilo pirrolidone con un peso molecular medio de 40,000).

³ CTAB = Bromuro mixto de alquiltrimetil-amonio (Sigma M-7635).

⁴ Agregar BME (β -mercaptoetanol) justo antes de usarse, bajo una campana extractora.

Extracción en pequeña escala de ADN de muy alta calidad

Si se muele el tejido foliar completamente liofilizado antes de efectuar la extracción, esto da como resultado ADN de muy alta calidad en cantidades que dependerán del método utilizado. El proceso de molienda y extracción en gran escala, descrito en la página 1 para los RFLPs, se puede reducir y ajustar a fin de poder utilizar un molino de café o pequeños balines de metal en un tubo de 1.5 ml. Estos dos métodos constituyen una manera poco costosa, rápida y fácil de obtener cantidades pequeñas o medianas de ADN de muy alta calidad.

Liofilización

1. Coseche la hoja madura más joven de plantas cultivadas en el invernadero o el campo. Lo mejor es escoger hojas jóvenes sin áreas necróticas ni lesiones, pero también pueden servir hojas maduras que no estén en senescencia.
2. La cantidad final de ADN que se requiere es lo que determina cuál de los dos procedimientos que aparecen enseguida (balines de acero inoxidable o molino de café) se utilizará. Estos procedimientos requieren de distintas cantidades de tejido foliar. Cuando hay poco material foliar o solo se requieren pequeñas cantidades de ADN de cada planta, se recomienda usar el método de los balines, ya que se puede procesar un número mayor de muestras al mismo tiempo. Sin embargo, si se necesitan mayores cantidades de ADN o si se extraerá ADN de muchas plantas en mezclas para análisis poblacionales, es mejor emplear el molino de café.

Balines

1. Cortar la hoja de cada planta en pedazos pequeños (0.5 a 1.5 cm) y colocarlos en un tubo de 1.5 ó 2.0 ml. Se pueden colocar en el tubo hojas procedentes de más de una planta, hasta un máximo de 6 hojas.
2. Mantenga los tubos frescos hasta congelarlos y trate de congelarlos cuanto antes. Congelar toda la noche en un congelador a -80°C o utilizar nitrógeno líquido. No permitir que las muestras se descongelen antes de la liofilización.
3. Coloque las bandejas (charolas) con los tubos que contienen el material congelado en el liofilizador. Dejar las tapas de los tubos **ABIERTAS**.
4. Asegúrese que la cámara del liofilizador se mantenga en todo momento a una temperatura de -60°C . Verifique que el liofilizador produzca vacío antes de cargar las muestras y cerciórese que el vacío esté siempre a menos de 100 micrones. No sobrecargue el liofilizador; afortunadamente, es difícil sobrecargarlo debido al pequeño tamaño del material foliar en cada tubo. Las muestras generalmente se secan en 72 horas, pero con este método pueden tardar menos.
5. El tejido ya seco puede almacenarse durante unos días en los mismos tubos, con las tapas **CERRADAS**, a temperatura ambiente. Si desea guardarlo más tiempo, utilice una temperatura de -20°C . Puede iniciar el proceso de extracción utilizando los mismos tubos.

Molino de café

6. Corte una hoja por planta en secciones de 8 a 10 cm y colóquelas en una bolsa de papel encerado impermeable al agua. Se pueden colocar entre 15 y 20 hojas en una misma bolsa. Mantener las muestras frescas hasta congelarlas y tratar de congelarlas cuanto antes. Congelar toda la noche en un congelador a -80°C o utilizar nitrógeno líquido.
7. Para analizar poblaciones utilizando mezclas, se recomienda utilizar 15 plantas de la misma edad. De cada planta, corte la hoja madura más joven de 10 cm de largo. El tamaño y la madurez de las todas hojas deben ser exactamente iguales, ya que la cantidad de ADN que se extraerá dependerá de ambos factores y es preciso extraer la misma cantidad de cada planta.
8. Las bolsas con las muestras se pueden guardar en una bolsa de plástico herméticamente cerrada a -80°C hasta el momento de la liofilización. Mantener las muestras durante por lo menos 12 horas en el congelador, a menos que se utilice nitrógeno líquido para acelerar el procedimiento, en cuyo caso las muestras se pueden transferir al liofilizador directamente del nitrógeno. No permita que las muestras se descongelen antes de la liofilización.
9. Transferir las muestras al liofilizador. Asegúrese que la cámara en todo momento esté a -60°C . Cerciórese que el liofilizador produzca vacío antes de cargar las muestras, y que el vacío esté siempre a menos de 100 micrones. No se debe sobrecargar la cámara. Las muestras generalmente se secan en un mínimo de 72 horas, pero pueden tardar más si se colocan muchas cámaras en el liofilizador.
10. Las muestras ya secas se pueden guardar unos días a temperatura ambiente en una bolsa de plástico herméticamente cerrada. Si desea guardarlas más tiempo, es necesario almacenarlas a -20°C .

La molienda

Balines

1. Los balines de acero inoxidable que se emplean en este procedimiento son de $5/32''$ (4 mm). Se pueden comprar por millar en Baleros y Bandas Sánchez, Juárez Sur No. 340, Texcoco, Edo. de Méx., tel. 9540687.
2. Si las hojas enteras se secaron en bolsas de papel encerado impermeables antes de molerlas, aún se pueden cortar en pedazos para colocarlas en los tubos de 1.5 ml; no obstante, una vez secas, las hojas son difíciles de cortar porque tienden a desintegrarse.
3. Coloque de dos a tres balines (de 4 mm de diámetro) en cada tubo y ciérrelo bien. Coloque los tubos en un recipiente de espuma de poliestireno (Unicel) y asegure la tapa de éste con varias ligas de hule resistente.
4. Coloque el recipiente de Unicel en un agitador orbital y sujételo a éste con ligas de hule o con cinta adhesiva. Mantener los tubos en vibración constante a una velocidad de 400 rpm durante 2 horas o hasta obtener un polvo fino.
5. También se puede colocar el recipiente de Unicel en un vórtice que debe hacerse funcionar durante 1 ó 2 horas o hasta que las muestras estén finamente molidas.
6. Utilice un imán para retirar los balines del polvo antes de comenzar la extracción.
7. El polvo de las hojas se puede guardar en los tubos sellados o se puede iniciar de inmediato la extracción de ADN en esos mismos tubos.
8. Si las muestras no están totalmente secas antes de la molienda, ésta será deficiente y se obtendrá un rendimiento escaso de ADN. Cuanto más fino el polvo, mayor será el rendimiento de ADN.

Molino de café

9. Se puede emplear un molino de cualquier marca, pero nosotros utilizamos molinos marca Braun que compramos en Carrillo Alonzo, Art. 123 No. 7, Col. Centro, Texcoco, tel. 55123046. A estos molinos les colocamos plástico transparente sobre las tapas para evitar que las hojas se adhieran a éstas durante la molienda.
10. Colocar el material foliar seco en el molino y moler hasta obtener un polvo fino (entre 30 sec y 2 min). Cuanto más fino el polvo, mayor será el rendimiento de ADN.
11. Con una brocha y un embudo de papel, vacíe el polvo en un tubo de 15 ml.
12. Póngale la tapa al tubo y manténgalo cerrado hasta que esté listo para hacer la extracción. Puede iniciar este procedimiento en los mismos tubos.
13. Para evitar la contaminación, utilice un trapo húmedo, una brocha fina o aire comprimido para limpiar el molino después de moler cada muestra.

Aislamiento de ADN genómico

Con este método se obtienen de 50 a 100 µg de ADN por cada 100 mg de tejido liofilizado y molido. Si se requiere utilizar una mayor cantidad de tejido (hasta 1.0 g), escale directamente las cantidades dadas a continuación.

1. Caliente la solución amortiguadora de extracción (CTAB) a 65 °C.
2. Coloque 50 mg de tejido liofilizado y molido en un tubo de 2 ml (si utiliza un tubo de 1.5 ml, reduzca todos los volúmenes en un 25%).
3. Agregue 1 ml de solución amortiguadora CTAB. Mezcle por inversión, para homogenizar el tejido con la solución amortiguadora.
4. Incube y mueva los tubos con suavidad en un agitador de balance en un horno a 65 °C durante 90 min.
5. Retire los tubos del horno y deje enfriar durante 5 a 10 min.
6. Agregue 500 µl de cloroformo:octanol (24:1). Agite los tubos por inversión durante 10 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugue a 3500 rpm a temperatura ambiente durante 10 min para formar la fase acuosa (líquido claro de color amarillo) y la fase orgánica (de color verde oscuro).
8. Recupere aproximadamente 750 µl de la fase superior acuosa y vacíela en un tubo nuevo de 1.5 ó 2.0 ml con 5 µl de ARNasa. *Paso opcional: Repita el tratamiento con cloroformo en la fase acuosa para obtener ADN más puro, pero en menor cantidad.*
9. Mezcle por inversión e incube durante 30 min en un horno a 37°C.
10. Agregue 1/2 volumen de isopropanol (2-propanol) al 100% previamente enfriado en un refrigerador a -20°C. Mezcle por inversión para favorecer la precipitación del ADN. *Paso opcional: Incube las muestras toda la noche a -20 °C, sobre todo si no es visible el ADN precipitado.*
11. Centrifugue a 3500 rpm a temperatura ambiente durante 30 min para precipitar y formar la pastilla de ADN en el fondo del tubo. Deseche el isopropanol por decantación. *Paso opcional: Extraiga el fenol de cada muestra con 0.5 ml de 1:1 fenol:cloroformo, siguiendo el procedimiento de extracción de fenol que aparece en la p. 3. Cabe señalar que normalmente no es necesario este paso cuando se utiliza tejido liofilizado.*

12. Agregue 1 ml de alcohol al 75%. Lave suavemente la pastilla de ADN. Deseche el alcohol por decantación y repita el lavado. Deje que el alcohol se evapore a temperatura ambiente hasta que la pastilla seque. Si todavía siente olor a alcohol, esto indica que la pastilla no está completamente seca.
13. Vuelva a suspender la pastilla en 1 ml de TE o agua doble destilada. Guarde las muestras a 4°C hasta utilizarlas; si no las va a utilizar en mucho tiempo, almacénelas a -20°C. *Nota: Cuando el ADN congelado es descongelado, empieza a quebrarse. Por eso, solo debe congelarse si se va a almacenar a largo plazo y, de preferencia, una vez terminados todos los análisis. Si el ADN va a utilizarse en varios proyectos con largos intervalos entre uno y otro, conviene hacer porciones alícuotas y colocarlas en tubos para su congelación. De esta manera, cada porción alícuota de ADN es descongelada una sola vez, al comienzo de cada proyecto.*

Cuantificación y control de la calidad del ADN

Cuantificación del ADN con UV

Agregue 15 µl de cada muestra a 735 µl de TE, mezcle bien y lea la DO260 y la DO280 para determinar la pureza. Vea en la página 77 las instrucciones para usar el espectrofotómetro DU-65 de Beckman y el listado del programa para la lectura automática de muestras.

Después de la cuantificación con UV, diluya la muestra a 0.3 µg/µl (u otra concentración) con TE y almacene a 4 °C. La muestra se mantendrá utilizable hasta seis meses. Si desea conservarla más tiempo, manténgala en congelación.

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{\text{DO260} \times 50 \text{ (factor de dilución)} \times 50 \mu\text{g/ml}}{1000}$$

Es preciso determinar la relación DO260/DO280 para evaluar la pureza de la muestra. Si esa relación es de 1.8-2.0, es probable que la absorción sea causada por los ácidos nucleicos. Una relación inferior a 1.8 indica que pueden existir proteínas y/u otros elementos absorbentes de UV en la muestra; en ese caso, es conveniente volver a precipitar el ADN. Una relación superior a 2.0 indica que las muestras pueden estar contaminadas con cloroformo o fenol y se debe volver a efectuar la precipitación con etanol (OPCION B).

En la página 77 se incluye un programa para espectrofotómetro DU-65 de Beckman, el cual efectúa la entrada automática de las muestras (con dispositivo absorbedor) y calcula todos los valores apropiados para cada muestra.

Control de la calidad del ADN

Este paso es esencial para verificar que el ADN aislado es de alto peso molecular. Para una resolución adecuada de los RFLP, el ADN original debe emigrar como una banda apretada de peso molecular ≥ 40 kb. No obstante, es inevitable la degradación de una parte del ADN aislado y el protocolo presentado a continuación está diseñado para correr el ADN en condiciones óptimas con el fin de asegurar las cantidades relativas de ADN degradado y de ADN de alto peso molecular. El procedimiento también permite verificar la cuantificación con UV antes señalada.

Si tiene pocas muestras de ADN (digamos, menos de 25), verifíquelas todas. En caso contrario, verifique sólo el 10 al 20% de las muestras asegurándose de que la selección es totalmente aleatoria.

1. Prepare una dilución de 10 ng/µl de las muestras seleccionadas (por ejemplo, 4 µl de ADN a 0.3 µg/µl + 116 µl de TE).
2. Cargue 100 ng de cada muestra diluida (10 µl de ADN + 2 µl de 5X SGB) en un gel de agarosa al 0.7%. Incluya por lo menos un carril por peine de ADN Lambda (λ) no cortado, como marcador del peso molecular. Cargue 100 ng (de una dilución de 10 ng/µl) de este marcador para verificar tanto la calidad como la cantidad de los ADN de las muestras.
3. Corra el gel a 50 mA por unos 90 minutos. Vea en la sección sobre electroforesis en gel los detalles de la preparación del gel, las condiciones de corrida y la visualización del ADN.

Prueba de la digestibilidad del ADN

Es esencial realizar esta prueba antes de organizar experimentos de digestión en gran escala. Se digiere una pequeña cantidad de ADN con las endonucleasas de restricción en las condiciones descritas en la siguiente sección, con el fin de verificar la calidad del producto digerido.

Si usted tiene pocas muestras de ADN (digamos, menos de 25), verifíquelas todas. Si no es así, verifique sólo 10 a 20% de las muestras, asegurándose de que la selección es totalmente aleatoria.

1. Ponga 2 µg de cada muestra de ADN en un tubo de 0.5 ml para microcentrifugadora.
2. Prepare una mezcla a granel para digestión basada en la fórmula que se indica a continuación, y manténgala sobre hielo húmedo. Agregue 8 µl de esa mezcla a cada uno de los tubos que contienen ADN. Mezcle bien pero con suavidad y centrifugue para que se deslice hasta el fondo el contenido de los tubos.

SOL. CONC.	[FINAL] o cantidad	Por cada 15 µl de RXN	Ejemplo de la mezcla para digerir 20 muestras*
ADN (0.3 µg/µl)	2 µg	7.0 µl	—
H ₂ Odd	—	5.6 µl	112 µl
Amortiguador 10X	1X	1.5 µl	30 µl
Espermidina 0.1 M	2.5 mM	0.4 µl	8 µl
Enzima (10 U/µl)	2.5 U/µg ADN	0.5 µl	10 µl

* Siempre prepare mezclas de reacción para la cantidad total de reacciones + 1, en caso de que haya errores al pipetear.

3. Incube a 37 °C durante 1.5 a 3 h. Detenga las reacciones con 3 µl de 5X SGB.
4. Cargue las muestras en un gel de agarosa al 0.7% y corra el gel a 40 mA durante 2 a 3 h. Use ADN Lambda digerido con *Hin*dIII como marcador del peso molecular. Vea en la sección sobre electroforesis en gel los detalles acerca de la preparación del gel, las condiciones de corrida y la visualización del ADN.

Marcadores del peso molecular para la electroforesis en gel

Dos tipos de patrones del peso molecular (PM) se usan ordinariamente. Los patrones Lambda/*Hind*III y PhiX174/*Hae*III del PM constituyen una referencia útil para calcular los pesos moleculares de fragmentos de ADN grandes y pequeños, respectivamente, después de la separación electroforética; los “patrones internos del PM” proporcionan un instrumento para normalizar las distancias de migración de los fragmentos dentro de cada carril con el fin de facilitar las comparaciones entre los carriles en las mismas o distintas luminografías en los estudios de *fingerprinting*.

ADN Lambda (λ) marcado en los extremos como patrón del peso molecular para luminografías

Digestión del ADN λ con *Hind*III

SOL. CONC.	[FINAL] o cantidad	50 μ l de RXN
H ₂ Odd	–	31.8 μ l
Amortiguador 10X	1X	5.0 μ l
Espermidina 0.1 M	2.5 mM	1.2 μ l
ADN λ (0.45 μ g/ μ l)*	5 μ l	11.0 μ l
<i>Hind</i> III (10 U/ μ l)	2 U/ μ g ADN	1.0 μ l

* Verifique la concentración del λ comercial y ajuste las cantidades según corresponda.

1. Deje digerir a 37 °C durante 2 a 3 h.
2. Asegurar que la digestión esté completa corriendo cerca de 50 ng en un gel de agarosa al 0.7%. Cuando esté completa, siga al paso 3 ó 4.
3. Si se va a utilizar el ADN λ como marcador PM sin marcar los extremos, inactivar la enzima incubándola a 65°C durante 10 min. Luego agregue 110 μ l de TE y 40 μ l de 5X SGB para lograr una concentración de 25 ng/ μ l. Haga porciones alícuotas y consérvelas a 4°C o en el congelador.
4. Para marcar los extremos, precipite agregando 5 μ l de 2.5 M NaOAc y 125 μ l de EtOH absoluto, mezcle bien invirtiendo los tubos y coloque a -80 °C durante 30 min.
5. Centrifugue en una microcentrifugadora durante 10 a 15 min a velocidad máxima. Vierta la capa sobrenadante e invierta los tubos para que se escurran. Es muy importante dejar que se seque el precipitado.
6. Vuelva a suspender el precipitado en 15 μ l de H₂Odd. Suponiendo que hay poca o ninguna pérdida de ADN durante la precipitación, la concentración debe ser de unos 5 μ g/15 μ l o de 0.33 μ g/ μ l.

Marcado en los extremos del ADN λ /HindIII con digoxigenina-dUTP (dig-dUTP)

SOL. CONC.	[FINAL] o cantidad	50 μl de RXN
H ₂ Odd	—	25.0 μ l
10X amortiguador Klenow	1X	5.0 μ l
10 mM dATP	100 μ M	0.5 μ l
10 mM dCTP	100 μ M	0.5 μ l
10 mM dGTP	100 μ M	0.5 μ l
1 mM dig-dUTP	40 μ M	2.0 μ l
ADN λ /HindIII*	5 μ g	15.0 μ l
2U/ μ l Klenow**	3 U	1.5 μ l

* Verifique la concentración del λ comercial y haga los ajustes necesarios.

** Adquiérala en Fisher Scientific (cat. # PR-M2201 Promega-Biotec) o BRL (cat. # 80125B).

7. Incube a 37 °C durante 1.5 h.
8. Detenga la reacción colocando los tubos a 65 °C durante 15 min.
9. Precipite con EtOH como en el paso 4 anterior.
10. Vuelva a efectuar la suspensión en 250 μ l de TE para llegar a una concentración final de 20 ng/ μ l. Esta solución puede entonces diluirse a 10 ó 1 ng/ μ l con TE.
11. Verifique la incorporación de la dig-dUTP siguiendo el protocolo “Verificación de la actividad de la digoxigenina-dUTP incorporada” (p. 32).

Use 5 ng/carril de ADN λ digerido con HindIII y marcado en los extremos con digoxigenina-dUTP.

12. Prepare soluciones de trabajo a partir de las soluciones concentradas de acuerdo con las siguientes proporciones:

SOL. CONC.	1 ng/μl SOL. CONC.	10 ng/μl SOL. CONC.	20 ng/μl SOL. CONC.
ADN λ marcado en los extremos	5 μ l	0.50 μ l	0.25 μ l
TE	11 μ l	15.50 μ l	15.75 μ l
5X SGB	4 μ l	4.00 μ l	4.00 μ l

Digestión de ADN ϕ X174 con HaeIII

SOL. CONC.	[FINAL] o cantidad	150 μl de RXN
H ₂ Odd	—	68.25 μ l
Amortiguador 10X	1X	15.00 μ l
Espermidina 0.1 M	2.5 mM	3.75 μ l
ADN ϕ X174 (0.25 μ g/ μ l)*	15 μ g	60.00 μ l
HaeIII (10 U/ μ l)	2 U/ μ g ADN	3.00 μ l

* Verifique la concentración del ADN de plásmidos ϕ X174RF y haga los ajustes necesarios.

1. Deje digerir a 37°C durante 2 a 3 h.
2. Verifique la digestión corriendo cerca de 50 ng en un gel de agarosa al 0.7%.
3. Inactivar la enzima incubando a 65°C durante 10 min. Agregue 300 µl de TE y 150 µl de 5X SGB para lograr una concentración de 25 ng/µl. Haga porciones alícuotas (200 µl en tubos de 0.5 ml) y mantenga a 4°C o en el congelador.

Marcadores internos del peso molecular para estudios de *fingerprinting* con RFLP

Dos marcadores, un fragmento “máximo” y otro “mínimo” de ADN λ , se usan ordinariamente como patrones internos del PM en todos y cada uno de los carriles de un gel para *fingerprinting*, incluido el carril (o carriles) de los marcadores del PM. Se escogieron por su fácil preparación y detección y por su tamaño conveniente para propósitos de normalización en la mayoría de los experimentos de *fingerprinting* en que se usan RFLP.

Preparación de un patrón “máximo” del PM

1. Digerir el ADN λ con *Xba*I para generar dos fragmentos grandes (de 24.5 y 24 kb) que coemigrarán después de las cortas migraciones usadas en estos protocolos (véase, por ejemplo, el protocolo siguiente).

SOL. CONC.	[FINAL]	
	o cantidad	50 µl de RXN
H ₂ Odd		30.3 µl
Amortiguador 10X	1X	5.0 µl
Espemidina 0.1 M	2.5 mM	1.2 µl
ADN λ (0.4 µg/µl)*	5 µg	12.5 µl
<i>Xba</i> I (10 U/µl)	2 U/µg ADN	1.0 µl

* Verifique la concentración del λ comercial y haga los ajustes necesarios.

2. Deje digerir a 37 °C durante 1 a 2 h. Verifique la digestión corriendo una muestra pequeña (digamos, de 0.5 µl) en un microgel de agarosa al 0.7%. Agregue más enzima a la reacción de digestión e incube durante otra hora si es necesario.
3. Precipite agregando 5 µl de 2.5 M NaOAc y 125 µl de EtOH, mezcle bien invirtiendo los tubos y coloque a -80 °C durante 30 min.
4. Centrifugue en una microcentrifugadora durante 10 a 15 min a velocidad máxima. Vierta la capa sobrenadante e invierta los tubos para que se escurran. Es muy importante dejar que se seque el precipitado.
5. Vuelva a efectuar la suspensión del precipitado en 500 µl de H₂Odd. Suponiendo que hay poca o ninguna pérdida de ADN durante la precipitación, la concentración debe ser de unos 10 ng/µl. Esta cantidad será suficiente para por lo menos 150 geles de 120 pozos cada uno.

Aislamiento y preparación de un “patrón mínimo del peso molecular”

Se puede solicitar un fragmento de λ -*Eco*RI/*Kpn*I de 1.5 kb, que fue clonado en pUC18 (2686 pb). Originalmente fue aislado digiriendo λ con *Eco*RI y *Bam*HI.

Se pueden obtener grandes cantidades de este fragmento a partir de minipreparaciones de plásmidos, como se describe más adelante (p. 67). Como es importante obtener un fragmento muy limpio, trate el ADN resultante con proteinasa K a 37 °C durante 30 min; luego efectúe una

extracción con fenol/cloroformo seguida de una extracción inversa para minimizar las pérdidas de ADN y, finalmente, precipite con EtOH antes de efectuar nuevamente la suspensión en TE.

6. Digiera 10 µg del ADN que contiene el plásmido en una reacción de 30 µl con dos unidades de *EcoRI* y *BamHI* (la misma solución amortiguadora).
7. Verifique la digestión cargando 1 µl (es decir, unos 300 ng) en un minigel.
8. Si la digestión es completa, agregue 6 µl de 5X SGB y cargue en un gel de agarosa al 1.2% de bajo punto de fusión (BPF). Puede cargar hasta 5 µg/carril (cargue en 2 a 4 pozos). Incluya EtBr en el gel y el amortiguador de corrida.
9. Corra el gel en el cuarto frío a 40 mA. Verifique la separación con una lámpara portátil de UV después de 30 min (si hace la corrida en un minigel).
10. Cuando el plásmido y el inserto estén bien separados, saque el inserto ya sea cortándolo o mediante electroelución del fragmento λ en la membrana de celulosa DEAE (por ejemplo, NA-45 de S&S).
11. Ajuste para obtener una concentración final de 10 ng/µl. Si ha cortado el fragmento para sacarlo, derrita el gel a 65 °C antes de agregar TE para ajustar la concentración.
Recuerde que con 10 µg de ADN de plásmido obtendrá 3.5 µg de ADN del inserto.
12. Verifique en un minigel (de 50 a 100 ng son suficientes para este propósito).

Use 0.25 ng/carril del fragmento lambda de 24.5 kb y 0.5 ng/carril del de 1.5 kb y detecte empleando 500 ng de ADN λ marcado, por cada botella grande de hibridación. Marque el λ mediante la iniciación aleatoria incluyendo digoxigenina-dUTP al 1%.

Adición de marcadores internos del PM al ADN genómico de la planta

Se deben agregar a cada ADN genómico las cantidades apropiadas de marcadores internos para el análisis de *fingerprinting*. El procedimiento más sencillo consiste en agregar esos marcadores al efectuar nuevamente la suspensión del ADN después de la digestión con enzimas de restricción.

13. Prepare una cantidad de trabajo de los fragmentos de la siguiente manera:

Fragmento	[Sol. conc.]	Cantidad a agregar por c/carril del gel	
		ng/carril	µl de material/carril
24.5 kb	10 ng/µl	0.25 ng	0.025 µl
1.5 kb	10 ng/µl	0.50 ng	0.050 µl

No olvide agregar la cantidad adecuada de 5X SGB para completar la mezcla de carga de ADN, TE y patrones internos del PM.

Marcadores internos del peso molecular para *fingerprinting* con SSR

Un patrón "máximo" del peso molecular se usa ordinariamente en cada carril de los geles para *fingerprinting* SSR, tanto de agarosa como poliacrilamida. Consiste en PCR amplificado a partir del plásmido Phi (φX174RF) y es fácil de preparar. No es posible usar un fragmento "mínimo", ya que los fragmentos más pequeños que 80 pares base se ven (si es que aparecen) en los geles de agarosa y poliacrilamida como una mancha. Patrones "mínimos" más grandes obstruirían los alelos SSR, los cuales suelen ser muy pequeños, entre 80 y 100 pares base.

1. Obtener los siguientes iniciadores de un fabricante de oligonucleótidos (solemos obtenerlos de Operon):

Iniciador *forward* (5'-3'): CGCCAAATGACGACTTCTAC

Iniciador *reverse* (5'-3'): GCGCATAACGATAACCACTGA

Estos iniciadores corresponden a la posición 1547 and 2050, respectivamente, del plásmido Phi y amplifican un fragmento con 523 pares base de largo.

2. Corra la siguiente reacción PCR utilizando ADN de plásmido Phi (ϕ X174RF) sin cortar. Recomendamos que se efectúen varias reacciones, porque se necesitará bastante producto.

SOL. CONC.	[FINAL]	25 μ l de RXN	100 μ l de RXN
	o cantidad		
H ₂ Odd	—	10.3 μ l	41.2 μ l
Amortiguador 10X <i>Taq</i>	1X	2.5 μ l	10.0 μ l
dNTP (2.5mM cada uno)	50 mM cada uno	0.5 μ l	2.0 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	1.2 mM	0.6 μ l	2.4 μ l
Polimerasa <i>Taq</i> (5U/ μ l)	0.5 U	0.1 μ l	0.4 μ l
ADN Phi (5 ng/ μ l)	25 ng	5.0 μ l	20.0 μ l
Iniciador <i>forward</i> (2.0 μ M)	0.24 μ M	3.0 μ l	12.0 μ l
Iniciador <i>reverse</i> (2.0 μ M)	0.24 μ M	3.0 μ l	12.0 μ l

3. Amplifique utilizando el siguiente programa:

1 ciclo de:	30 ciclos de:	1 ciclo de:
93°C por 1 min	93°C por 30 seg	72°C por 5 min
62°C por 1 min		
72°C por 1 min		

4. Corra un minigel para verificar la amplificación y el tamaño correcto en algunas reacciones. Si se ha amplificado un solo fragmento de 523 bp, combine todas las reacciones en un solo tubo para almacenarlas.
5. Utilice aproximadamente 200 ng del estándar de peso molecular en cada carril de un gel para *fingerprinting* con poliacrilamida; puede agregarse directamente a la mezcla de reacción con el amortiguador de carga.

Electroforesis en gel de agarosa neutral

(basado en el método de T. Helentjaris, NPI)

1. Agregue agarosa a la cantidad apropiada de solución amortiguadora 1X TAE para gel. La cantidad que prepare dependerá del molde que se usará. Enseguida aparece un ejemplo del tamaño de un gel:

Tamaño del gel	Agarosa (0.7%) ¹	Amortiguador de gel 1X	Vol. de la muestra/pozo
20 x 25 cm	2.10 g	300 ml	20 µl

2. Derrita la agarosa en horno de microondas, mezclando varias veces durante el calentamiento. Enfríela a 55°C (si desea, puede colocar el recipiente en agua fría para acelerar el enfriamiento) manteniéndola cubierta para evitar la evaporación.
3. Tape con cinta adhesiva los extremos de la charola (bandeja) para gel, vierta la agarosa en la charola e inserte los peines. Deje solidificar (20 a 30 min).
4. Retire la cinta y coloque la charola en el dispositivo con amortiguador 1X TAE para gel. Vierta solución amortiguadora en el dispositivo en cantidad suficiente para cubrir el gel con al menos 0.5 cm. Retire los peines sólo cuando esté listo para cargar las muestras.
5. Corra las muestras en el gel a 100 mA durante 5 a 10 min; luego córralas a 15 ó 20 mA, corriente constante, hasta que el colorante azul de bromofenol haya emigrado hasta justo encima del siguiente conjunto de pozos. En general, esto tomará de 14 a 16 horas para un gel grande con cuatro peines y una migración del colorante de unos 6 cm. Puede correr el gel con un amperaje mayor, pero esto puede afectar la resolución de las muestras. Se puede mejorar la resolución recirculando el amortiguador.
6. Retire la charola del dispositivo y tiña en 1 µg/ml de bromuro de etidio (100 µl de 10 mg/ml de bromuro de etidio en 1000 ml de dH₂O) durante 20 min agitando con suavidad.

ADVERTENCIA: El bromuro de etidio es en extremo mutagénico; use guantes al manipularlo y tome las máximas precauciones.

7. Enjuague el gel en dH₂O durante 20 min; deslice el gel en un transiluminador UV y fotografíe.

Para una cámara Fotodyne PCM-10 con visera de 20 x 26 cm y película Polaroid Tipo 667, use una exposición f8 o f5.6, de 1 segundo.

Amortiguador 10X TAE para gel: 400 mM Tris, 50 mM NaOAc, 7.7 mM EDTA

SOL. CONC.	1 litro	2 litros	3 litros	4 litros	5 litros
Tris Base (PM=121.10)	48.40 g	96.80 g	145.20 g	193.60 g	242.0 g
NaOAc (PM=82.03)	4.10 g	8.20 g	12.30 g	16.40 g	20.5 g
Na ₄ EDTA (PM=380.20)	2.92 g	5.84 g	8.76 g	11.68 g	14.6 g

Ajuste el pH a 8.0 con ácido acético glacial.

¹ Use concentraciones más altas de gel para la separación de fragmentos pequeños como plásmidos e insertos de sondas.

Geles de doble espesor

Un gel de “doble espesor” está constituido por dos capas de agarosa vertida en forma consecutiva en el mismo molde con los peines en posición. Después de la electroforesis, las dos capas se separan y se obtienen así dos sistemas duplicados, separados, de membranas. En consecuencia, las muestras deben tener el volumen exacto de las resultantes pozos de “doble altura”; esto asegurará que cada capa de gel contenga aproximadamente la misma cantidad de ADN por carril.

Hay por lo menos dos buenas razones para correr geles de doble espesor: el procedimiento reduce a la mitad el número de posibles errores de carga y duplica la producción de membranas dada una cantidad fija de geles de doble espesor. En nuestro laboratorio, una persona puede cargar, correr y transferir un máximo de cuatro geles de doble espesor en una jornada y media de trabajo normal. Esto representa una producción total de $4 \times 2 \times 120 = 960$ carriles para el análisis.

1. Agregue agarosa a la cantidad total de amortiguador 1X TAE para gel.

Tamaño del gel	Agarosa (0.7%)	Total de amortiguador 1X	Primera capa	Segunda capa	Volumen de la muestra
20 x 25 cm	4.62 g	660 ml	280 ml	380 ml	50 μ l

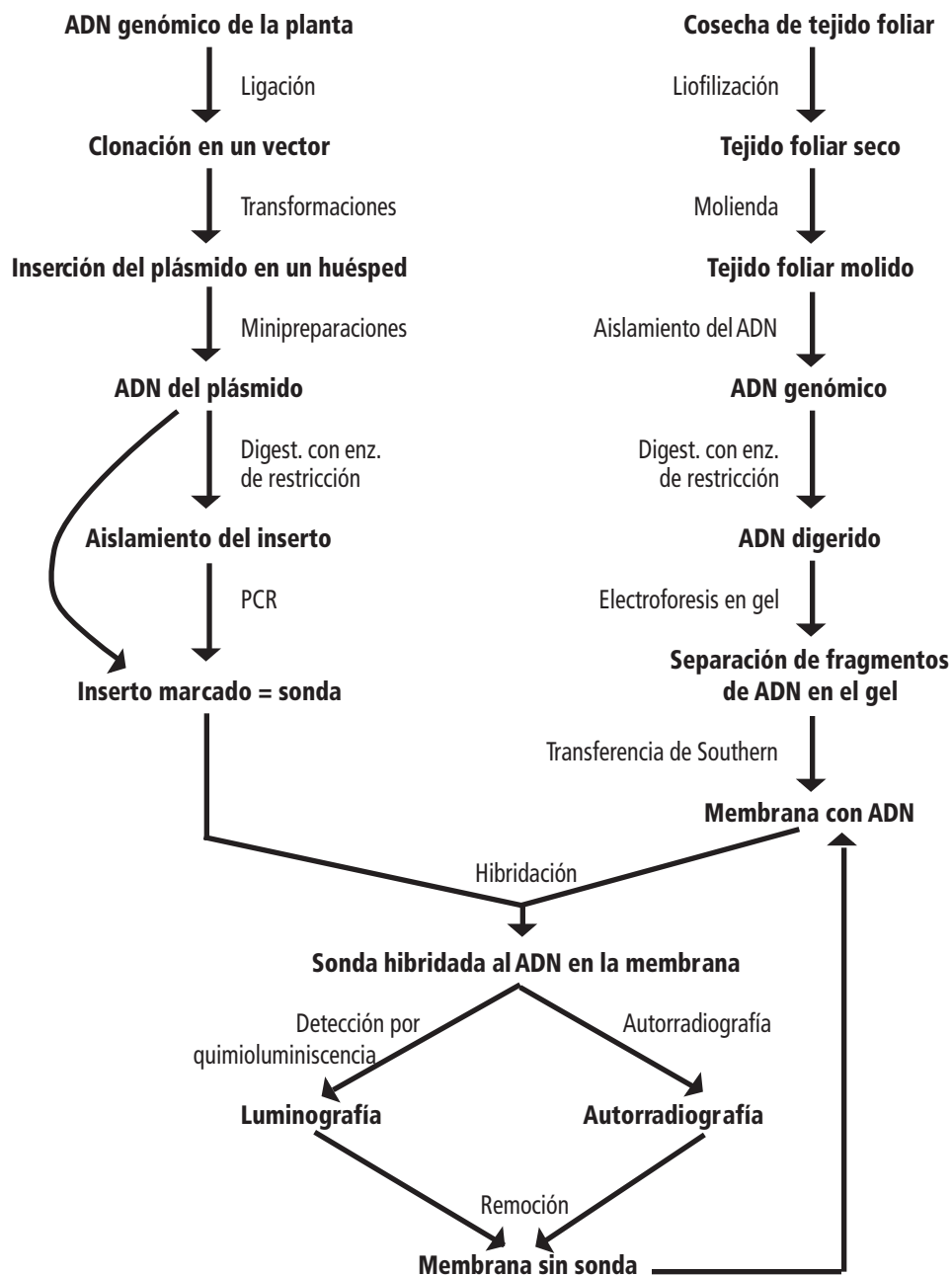
2. Derrita en horno de microondas, mezclando varias veces durante el calentamiento. Enfríe a 55 °C (si lo desea, puede colocar el recipiente en agua fría para acelerar el enfriamiento) manteniéndola cubierta para evitar la evaporación.
3. Tape con cinta adhesiva los extremos de la charola (bandeja) para gel de tal modo que la charola pueda contener dos capas. Vierta en la charola la cantidad de agarosa indicada para la primera capa, medida en un cilindro graduado, limpio y calentado, y luego inserte los peines. Deje solidificar durante 20 a 30 minutos.
4. Deje enfriar la segunda capa de solución de gel a 55 °C y viértala sobre la primera capa. Vierta la solución con lentitud moviéndola gradualmente hacia adelante y hacia atrás sobre el extremo inferior del dispositivo para evitar que se produzca un agujero al derretirse la capa inferior. Deje solidificar durante 20 a 30 minutos.
5. Retire la cinta y coloque la charola en el dispositivo. Vierta amortiguador 1X para gel en el dispositivo en cantidad suficiente para cubrir el gel; luego retire los peines y cargue las muestras en los pozos. Cargue los pozos del gel hasta la parte superior de la segunda capa. Por lo general se requieren 50 a 60 μ l para llenar cada pozo.
6. Corra las muestras en el gel a 100 mA durante 5 a 10 min; luego córralas a 25 mA, corriente constante, hasta que el colorante azul de bromofenol haya emigrado hasta justo encima del siguiente conjunto de pozos. En general el gel estará hecho después de 14 a 16 horas. Se puede mejorar la resolución recirculando el amortiguador.
7. Retire la charola del dispositivo. Coloque el gel de doble espesor en una charola grande con amortiguador 1X para gel proveniente de la corrida, hasta casi cubrir el gel. Separe las capas del gel en la esquina del gel de doble espesor usando una espátula delgada. Luego, comenzando desde esta separación, con lentitud y manteniendo una ligera inclinación deslice una pipeta de vidrio de 1 ml entre las dos capas. Sostenga con firmeza los extremos de la pipeta con las dos manos y deslícela hasta que se separen las dos capas del gel. Tenga cuidado de no romper el gel paralelamente a los pozos.
8. Tiña cada gel en 1 μ g/ml de bromuro de etidio (100 μ l de 10 mg/ml de bromuro de etidio en 1000 ml de dH₂O) durante 20 minutos meneándolo con suavidad.

ADVERTENCIA: El bromuro de etidio es en extremo mutagénico; use guantes al manipularlo y tome las máximas precauciones.

9. Enjuague el gel en dH₂O durante 20 min, deslice el gel en un transiluminador UV y fotografíe.
 Para una cámara Fotodyne PCM-10 con visera de 20 x 26 cm y película Polaroid Tipo 667, use una exposición f8 o f6, de 1 segundo.

Amortiguador 10X TAE para gel (vea el protocolo anterior)

Diagrama de flujo del procedimiento de los RFLP



Digestión del ADN genómico con enzimas de restricción

(basada en el método de T. Helentjaris, NPI)

Se suelen presentar dos situaciones al organizar experimentos de digestión en gran escala: puede haber unas pocas (≤ 10) muestras de ADN que serán digeridas en grandes cantidades con propósitos de selección (digamos, de 24 a 48 repeticiones) o, por el contrario, una gran cantidad de muestras (por ejemplo, una población de mapeo) que digerir para usarlas en un número específico de separaciones en gel (digamos 4 a 10 repeticiones). En ambos casos, la gran cantidad de ADN en cada muestra es digerida toda de una vez con cada enzima, y en un volumen superior al volumen de carga del gel. En consecuencia, una vez completada la digestión, se precipita el ADN con etanol y se vuelve a efectuar la suspensión del ADN en un volumen de carga apropiado. Por consiguiente, en los protocolos presentados a continuación se consideran los volúmenes de las reacciones y los tamaños correspondientes de tubos que se requieren.

La extracción con fenol después de la digestión sólo es necesaria cuando se requiere una calidad muy alta de migración y separación del ADN en los geles como, por ejemplo, en el caso de las comparaciones de la diversidad molecular o la investigación de *fingerprinting*.

Los cuadros presentados en este protocolo suponen una concentración del ADN de $0.3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y una concentración enzimática de $10 \text{ U}/\mu\text{l}$. Contienen datos acerca de las cantidades máximas que pueden ser procesadas con cada tamaño de tubo de reacción.

Digestión de numerosas muestras de ADN

Cálculos

NOTA: Ordinariamente efectuamos la digestión de $10 \mu\text{g}$ de ADN de maíz o de $15 \mu\text{g}$ de ADN de trigo en cada carril de un gel de una sola capa.

1. Determine el total de μg y el volumen de cada muestra de ADN que se va a digerir con una enzima en un solo tubo, de la siguiente manera:

$$\text{Total de } \mu\text{g de ADN} = (\text{cantidad de ADN por carril}) \times (\text{número de carriles de la muestra})$$

$$\text{Total de } \mu\text{l de ADN} = (\text{total de } \mu\text{g de ADN}) / (\text{concentración de ADN, } \mu\text{g}/\mu\text{l})$$

2. Determine las unidades (U) y el volumen de la enzima necesarios para digerir cada muestra de ADN. En general, es mejor usar $2.5 \text{ U}/\mu\text{g}$ de ADN para evitar digestiones parciales.

$$\text{Total de U de enzima} = (\text{total de } \mu\text{g de ADN}) \times 2.5$$

$$\text{Total de } \mu\text{l de enzima} = (\text{total de U de enzima}) / (\text{concentración de la enzima, U}/\mu\text{l})$$

3. Sobre la base de los volúmenes del ADN y de la enzima, determine el volumen total de la reacción y, por lo tanto, el tamaño de tubo que usará. A continuación se indican los volúmenes máximos de reacción y los correspondientes volúmenes máximos de ADN posibles para los distintos tamaños de tubos.

μg de ADN (a $0.3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Vol. de ADN	Tamaño del tubo	Vol. de RXN	Amortig. 10X	0.1 M espermidina
10 - 90 μg	35 - 300 μl	1.5 ml	400 μl	40 μl	10 μl
90 - 120 μg	300 - 400 μl	2.0 ml	550 μl	55 μl	14 μl
120 - 300 μg	400 - 1000 μl	5.0 ml	1300 μl	130 μl	33 μl
300 - 900 μg	1000 - 3000 μl	15.0 ml	4000 μl	400 μl	100 μl

- Determine el volumen de H₂O_{dd} por tubo de la siguiente manera¹:

$$\mu\text{l de H}_2\text{O}_{dd} = (\text{vol. total de RXN}) - (\mu\text{l de sol. amortiguadora} + \mu\text{l de espermidina} + \mu\text{l de ADN} + \mu\text{l de enzima})$$
- Calcule una mezcla para digestión que contenga el volumen total de H₂O_{dd}, solución amortiguadora, espermidina y enzima necesario para la cantidad total de las distintas muestras de ADN que van a ser digeridas por la misma enzima. Por si acaso hubiera algún error al pipetear, prepare una cantidad adicional de la mezcla de reacción de la siguiente manera:
 Para tubos de 1.5 ó 2.0 ml, prepare suficiente mezcla de reacción para uno o dos tubos adicionales de RXN;
 Para tubos de 5 ml, prepare 1/4 más de la mezcla de reacción;
 Para tubos de 15 ml, prepare 1/10 más de la mezcla de reacción.

Reacciones de digestión

- Rotule los tubos para las reacciones y agregue la cantidad apropiada de muestra de ADN que se va a digerir.
- Prepare la mezcla de reacción sobre hielo, agregando la enzima al final; mezcle bien.
- Ponga partes iguales de la mezcla de reacción en los tubos de reacción. Mezcle bien (no revuelva en un Vortex).

$$\mu\text{l de mezcla de reacción/tubo} = (\mu\text{l de vol. de RXN/tubo}) - (\mu\text{l de ADN/tubo})$$
- Incube a 37 °C durante 3 a 5 h.

Precipitación del ADN digerido

- Detenga la reacción agregando 5 M NaCl hasta llegar a una concentración final de 0.25 M NaCl.
- Agregue 2.5 volúmenes de EtOH, mezcle bien, ponga a -80 °C durante 30 min o a -20 °C hasta el día siguiente. El ADN precipitado se puede conservar en EtOH a -20 °C por tiempo indefinido.

Tamaño del tubo	Volumen de RXN	μl 5M NaCl	μl EtOH	Volumen total después de EtOH
1.5 ml	400 μl	20 μl	1000 μl	1420 μl
2.0 ml	550 μl	28 μl	1375 μl	1953 μl
5.0 ml	1300 μl	65 μl	3250 μl	4615 μl
15.0 ml	4000 μl	200 μl	10000 μl	14200 μl

¹Cálculos para las digestiones máximas de ADN por cada tamaño de tubo:

SOL.CONC.	[FINAL] o cantidad	$\mu\text{g de ADN/tamaño de tubo/vol. de RXN/}$			
		90 $\mu\text{g / 1.5 ml / 400 } \mu\text{l}$	120 $\mu\text{g / 2.0 ml/ 550 } \mu\text{l}$	300 $\mu\text{g / 5.0 ml/ 1300 } \mu\text{l}$	900 $\mu\text{g / 15.0 ml/ 4000 } \mu\text{l}$
H ₂ O _{dd}	—	27.5 μl	51 μl	62.5 μl	275 μl
Amortiguador 10X	1X	40.0 μl	55 μl	130.0 μl	400 μl
Espermidina 0.1 M	2.5 mM	10.0 μl	14 μl	32.5 μl	100 μl
10 U/ μl de enzima	2.5 U/ μg	22.5 μl	30 μl	75.0 μl	225 μl
0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN	—	300.0 μl	400 μl	1000.0 μl	3000 μl

Haga estos cálculos con enzimas marca Roche, que vienen con el amortiguador incluido.

12. Centrifugue en una microcentrifugadora a velocidad máxima (~12,000 rpm) durante 10 a 15 min.
13. Descarte la capa sobrenadante e invierta los tubos para que se escurran. Evapore el EtOH de las muestras colocando los tubos boca arriba en un desecador al vacío durante 10 a 15 min a vacío ligero, o déjelos hasta el día siguiente sobre la mesa de trabajo. Tenga cuidado de eliminar todo el EtOH, pues de quedar algún residuo será imposible cargar las muestras en los geles. No obstante, evite el secado excesivo pues eso dificultará volver a suspender las muestras.
14. Disuelva el precipitado en el volumen adecuado de TE para cargarlo en los pozos de un gel de agarosa. Generalmente es suficiente usar 16 μ l de TE y 4 μ l de 5X SGB por cada pozo de una sola capa, pero se necesitan 40 μ l de TE y 10 μ l de 5X SGB para un pozo de doble capa. Disuelva primero el ADN en TE y luego agregue 5X SGB. Por lo general los precipitados se disuelven en 2 a 3 horas.

Transferencia de Southern a la membrana MSI

(basado en el método de T. Helentjaris, NPI)

La matriz que usamos es la membrana de nylon MSI Magnagraph, no cargada, con poros de 0.45 μm , disponible en rollos de 20 cm x 3 m en Fisher Scientific o MSI (cat. # NJ4-HY000-10) y, más recientemente, membrana de nylon Biotodyne A, no cargada, disponible en rollos de 20 cm x 10 m de Gibco BRL (Cat. # 10134-013).

1. La mejor superficie de un gel para que haya un contacto parejo con un filtro de membrana es la que se forma en el fondo del molde del gel. Por consiguiente, es conveniente voltear el gel antes de construir un sistema de papel secante y, preferiblemente, antes de la desnaturalización. Prese el gel entre dos placas delgadas de acrílico, sujete con firmeza las esquinas y dele vuelta con un solo movimiento rápido. Deje una de las placas debajo del gel para facilitar la manipulación de éste en operaciones posteriores.
2. Desnaturalice el gel durante 30 min en 0.4 de N NaOH, 0.6 M NaCl; trate cada gel en aproximadamente tres veces su volumen de solución.
3. Transfiera el gel a otra charola (bandeja) y neutralícelo durante 30 min en 0.5 M Tris-7.5, 1.5 M NaCl; trate cada gel en aproximadamente tres veces su volumen de solución.

Construcción del sistema de transferencia con secante húmedo

4. Corte la membrana de nylon para que tenga las mismas dimensiones del gel. Rotule (con pluma marcadora S&S) o haga una muesca en la esquina superior izquierda de la membrana para su identificación posterior. Coloque en el amortiguador para transferencia.
5. Ponga una rejilla de plástico en una charola poco profunda para permitir que la solución amortiguadora para transferencia (25 mM NaPO_4 , pH de 6.5) llegue al centro de la esponja.
6. Coloque una esponja limpia con un grosor de 6 a 8 cm en el centro de la rejilla de plástico; la superficie de la esponja debe ser igual a la del gel que se va a secar o más grande. Empape bien la esponja en la solución amortiguadora para transferencia.
7. Sumerja brevemente una hoja de papel secante (extra grueso) en la solución para transferencia y colóquela encima de la esponja.

NOTA: Asegúrese de que no haya **NINGUNA** burbuja de aire entre la hoja de papel secante, el gel y la membrana. Use solución amortiguadora para transferencia entre las capas y haga rodar una pipeta de vidrio sobre la superficie expuesta con el fin de evitar la formación de burbujas.

8. Coloque el gel sobre papel secante encima de la esponja, con el lado abierto de los pozos hacia abajo.
9. Ponga la pieza cortada de matriz sobre el gel, con el lado rotulado hacia abajo, para identificar el lado de transferencia de la matriz. Use una varilla de vidrio para alisar la matriz sobre la superficie del gel.
10. Coloque una hoja de papel secante humedecido sobre la matriz.
11. Con cuidado, ponga una pila de toallas de papel de 10 cm de alto encima del papel secante. Si se emplea una superficie plana, se puede colocar arriba de la pila un peso liviano adicional para obtener una presión pareja en la superficie de secado.

NOTAS: No es necesario que las toallas de papel cubran toda la superficie del gel. No obstante, si se extienden más allá de los bordes del papel secante, se debe colocar un trozo de material plástico (son muy adecuadas para esto las películas radiográficas usadas) o material de envoltura de tipo Saran Wrap entre las dos capas de papel secante, para aislar las

toallas de papel del secante de abajo y de la solución amortiguadora. Esto evitará que se produzca un cortocircuito en la transferencia.

En lugar de toallas de papel, se puede usar una esponja de 6 a 8 cm de espesor. Humedezca la esponja con la solución amortiguadora para transferencia y exprima la mayor cantidad posible de la solución. Ponga la esponja encima del papel secante y coloque un peso ligero sobre ella.

12. Agregue solución amortiguadora de transferencia a la charola para que el nivel de la solución permanezca alto durante el proceso de transferencia.
13. Deje que se efectúe la transferencia hasta el día siguiente (16 a 18 horas). Se debe retirar con cuidado la capa húmeda inferior de toallas de papel una vez que la pila ha absorbido 5 a 8 cm de solución amortiguadora para transferencia.

NOTA: Si usa una esponja, retírela y exprima la solución después de 4 a 5 horas de transferencia.

14. Retire la matriz y colóquela inmediatamente en 2X SSC. Usando guantes, frotar con suavidad para retirar cualquier partícula de agar. Lave la membrana durante 15 min, agitándola, en 2X SSC.
15. Deje secar la membrana al aire o escurrir hasta que esté *húmeda* pero no mojada (por lo general 2 a 5 min); no permita que se seque.
16. Coloque la membrana sobre un papel de filtro húmedo y reticule con UV en el reticulador de UV Stratagene usando la calibración automática (120,000 μ joules/cm²).
17. Caliente en el horno a 95 °C sobre o entre papel de filtro limpio durante 1.5 a 2 h.
18. Verifique brevemente la transferencia bajo luz UV. Si no rotuló previamente la membrana, hágalo ahora con una pluma o lápiz de marcado permanente en el lado unido al ADN.
19. Si la membrana no va a ser usada durante una semana o más, consérvela entre hojas de papel de filtro limpio en una bolsa de plástico cerrada herméticamente, en un lugar fresco y seco (se la puede almacenar a 4 °C).

Solución desnaturalizadora: 0.4 N NaOH, 0.6 M NaCl (1 litro/gel)

SOL. CONC.	1 litro	5 litros	10 litros	20 litros	40 litros
NaOH (PM=40.00)	16.0 g	80.0 g	160.0 g	320.0 g	640.0 g
NaCl (PM=58.44)	35.0 g	175.3 g	350.6 g	701.3 g	1402.6 g

Disuelva el NaCl primero y luego el NaOH para evitar que se forme un precipitado.

Solución neutralizadora: 0.5 M Tris-7.5, 1.5 M NaCl (1 litro/gel)

SOL. CONC.	1 litro	5 litros	10 litros	20 litros	40 litros
Tris-HCl (PM=156.60)	63.5 g	317.5 g	630.5 g	1270.0 g	2540.0 g
Tris-base (PM=121.10)	11.8 g	59.0 g	118.0 g	236.0 g	472.0 g
NaCl (PM=58.44)	87.6 g	438.0 g	876.0 g	1752.0 g	3504.0 g
O					
Tris-base (PM=121.10)	60.6 g	302.8 g	605.5 g	1211.0 g	2422.0 g
NaCl (PM=58.44)	87.7 g	438.3 g	876.6 g	1753.2 g	3506.4 g
HCl concentrado	25.0 ml	125.0 ml	250.0 ml	500.0 ml	1000.0 ml

Solución amortiguadora para transferencia: 25 mM NaPO₄, pH de 6.5 (5 litros/gel)

SOL. CONC.	1 litro	5 litros	10 litros	20 litros	40 litros
1 M NaPO ₄ -6.5	25 ml	125 ml	250 ml	500 ml	1000 ml

2X SSC

SOL. CONC.	250 ml	500 ml	750 ml	1000 ml	2000 ml
25X SSC	20 ml	40 ml	60 ml	80 ml	160 ml

Amplificación de insertos de plásmidos con la PCR

1. Prepare una mezcla de reacción que contenga todos los componentes enumerados a continuación, excepto el plásmido.

SOL. CONC.	[FINAL]	Patrón 25 µl de RXN	Ejemplo de mezcla de reacción para 40 RXN
H ₂ O ^{dd}	—	ajustar a 25.0 µl	variable
Amortiguador <i>Taq</i> (10X; sin Mg)	1X	2.5 µl	100 µl
MgCl ₂ (50 mM) ¹	2 mM	1.0 µl	40 µl
Glicerol ²	15 %	3.75 µl	150 µl
Mezcla de dNTP (10 mM de cada uno)	50 µM de cada uno	0.5 µl (0.125 de cada uno)	20 µl
Enzima <i>Taq</i> (5 U/µl) ¹	0.5 U	0.1 µl	4 µl
Iniciador 1 (2 µM) ^{10,3,4}	0.2 µM	2.5 µl	100 µl
Iniciador 2 (2 µM) ^{3,4}	0.2 µM	2.5 µl	100 µl
Plásmido (5 ng/µl) ³	5 ng	1.0 µl	—

2. Transfiera con una pipeta la cantidad correspondiente de la mezcla dentro de cada tubo.
3. Agregue 1 µl de plásmido a cada tubo. Mezcle brevemente y centrifugue.
4. Cubra cada muestra con 25 µl de aceite mineral ultrapuro.
5. Coloque en la máquina de PCR y asegúrese de que haya suficiente aceite en cada pozo para que exista un contacto apropiado con el tubo.
6. Amplifique usando el siguiente programa:⁵

1 ciclo de:	25 ciclos de:	1 ciclo de:
94 °C por 1 min	94 °C por 1 min	72 °C por 1 min
	55 °C por 2 min	
	72 °C por 2 min*	

* **Nota:** Puede ser necesario duplicar el tiempo de extensión para insertos que miden más de 1.5 Kb.

7. Retire el aceite agregando 25 µl de TE + 25 µl de cloroformo. Mezcle y centrifugue. Pase la capa acuosa superior a un tubo nuevo usando una pipeta.
8. Verifique la amplificación cargando 5 µl de cada muestra (1 µl de ADN + 1 µl de 5X SGB + 3 µl de dH₂O) en un gel al 1.0%.

¹ Puede ser necesario determinar las concentraciones óptimas de MgCl₂ y *Taq* con cada lote nuevo de enzima.

² Se ha encontrado que este ingrediente optativo ayuda a amplificar inserciones grandes o “difíciles”.

³ Diluido en “solución amortiguadora para dilución de ADN” (10 nM Tris, pH de 8.0, 1 mM EDTA, 10 nM NaCl).

⁴ Ejemplos de secuencias del iniciador:

pUC y M13	CV72	5' - ACGACGTTGTAACACGACGGCCAGT - 3'
vectores derivados	CV76	5' - AAACAGCTATGACCATGATTACGCC - 3'
pBR322 <i>Pst</i> I	CV236	5' - GCGCAACGTTGTTGCCAT - 3'
insertos	CV237	5' - CGAGCGTGACACCACGAT - 3'

⁵ Condiciones óptimas para el termociclador de sistema TwinBlock™ de ERICOMP.

Amplificación de insertos de cultivos bacterianos con la PCR

1. Raspe una sola colonia fresca de una placa de cultivo usando un mondadientes o use 2 μ l de un cultivo de la noche anterior, o 2 μ l de un "stab" de glicerol.
2. Suspenda en 50 μ l de amortiguador TTE en un tubo de 0.5 ml para microcentrifugadora.
3. Incube a 95 °C durante 10 min para producir un lisado bacteriano.
4. Centrifugue durante 5 min para que se depositen los detritos bacterianos y use 2.5 μ l de la capa sobrenadante para efectuar la reacción de amplificación con la PCR como se indicó en el protocolo anterior.

Puede conservar este lisado a 4 °C para usos posteriores.

Amortiguador TTE

STOCK	[FINAL]	25 ml	100 ml
H ₂ Odd		24.15 ml	96.6 ml
Tritón X - 100	1%	0.25 ml	1.0 ml
1 M Tris HCl - 8.5	20 mM	0.50 ml	2.0 ml
0.5 M EDTA - 8.0	2 mM	0.10 ml	0.4 ml

Esterilice y distribuya en partes iguales en tubos de 1.5 ml o en tubos Starsted de 2 ml. Almacene a 4°C.

Incorporación de digoxigenina-dUTP en insertos de plásmidos con la PCR

1. Prepare una mezcla de reacción que contenga todos los componentes enumerados a continuación excepto el plásmido.

SOL. CONC.	[FINAL] o cantidad	RXN de 100 µl 2.5% Dig	RXN de 100 µl 5.0% Dig
dH ₂ O	—	46.5 µl	46.4 µl
Amortiguador <i>Taq</i> (10X; sin Mg)	1X	10.0 µl	10.0 µl
MgCl ₂ (50 mM) ¹	2 mM	4.0 µl	4.0 µl
Glicerol ²	15 %	15.0 µl	15.0 µl
Mezcla-dTTP dNTP (10 mM de cada uno)	50 µM de cada uno	1.5 (0.5 µl de cada uno)	1.5 (0.5 µl de cada uno)
dTTP (10 mM)	48.75 or 47.5 µM	0.4875 µl	0.475 µl
Dig-dUTP (1 mM) ³	1.25 or 2.5 µM	0.125 µl	0.250 µl
Enzima <i>Taq</i> (5U/µl) ¹	2.0 U	0.4 µl	0.4 µl
Iniciador 1 (2 µM) ^{4,5}	0.2 µM	10.0 µl	10.0 µl
Iniciador 2 (2 µM) ^{4,5}	0.2 µM	10.0 µl	10.0 µl
Plásmido (5 ng/µl) ⁴	10 ng	2.0 µl	2.0 µl

2. Ponga 98 µl de la mezcla en cada tubo.
3. Agregue 10 µl de plásmido a cada tubo. Mezcle brevemente y centrifugue.
4. Cubra cada muestra con 50 µl de aceite mineral ultrapuro.
5. Coloque en la máquina para PCR y asegúrese de que haya suficiente aceite en cada pozo para que exista un contacto apropiado con el tubo.
6. Amplifique usando el programa siguiente:⁶

1 ciclo de:	25 ciclos de:	1 ciclo de:
94 °C por 1 min	94 °C por 1 min	72 °C por 4 min
	55 °C por 2 min	
	72 °C por 2 min*	

* Puede ser necesario duplicar el tiempo de extensión para insertos que miden más de 1.5 Kb.

¹ Puede ser necesario determinar las concentraciones óptimas de MgCl₂ y *Taq* con cada lote nuevo de enzima.

² Se ha encontrado que este ingrediente optativo ayuda a amplificar insertos grandes o “difíciles”.

³ Digoxigenina-11dUTP, Boehringer Mannheim, cat. # 1093088 (25 nmol/25 µl).

⁴ Diluido en solución amortiguadora para dilución de ADN (10 mM Tris, pH de 8.0, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl).

⁵ Ejemplos de secuencias del iniciador:

pUC y M13	CV72	5' - ACGACGTTGAAAACGACGGCCAGT - 3'
vectores derivados	CV76	5' - AAACAGCTATGACCATGATTACGCC - 3'
pBR322 <i>Pst</i> I	CV236	5' - GCGCAACGTTGTTGCCAT - 3'
insertos	CV237	5' - CGAGCGTGACACCACGAT - 3'

⁶ Condiciones óptimas para el termociclador de sistema TwinBlock™ de ERICOMP.

7. Retire el aceite agregando 25 μl de TE + 50 μl de cloroformo. Mezcle y centrifugue. Con una pipeta, transfiera la capa acuosa superior a otro tubo.
8. Cuantifique la producción de inserto usando el método descrito en la sección sobre la cuantificación en gel.
9. La cuantificación en gel es una buena opción, ya que también permite verificar el producto de la amplificación y la incorporación de Dig-dUTP en ese producto. Los detalles sobre estos protocolos se presentan en la sección sobre la cuantificación en gel.

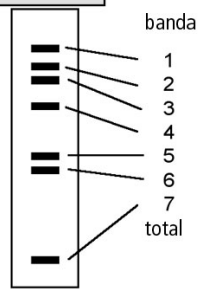
Cuantificación relativa de los insertos amplificados en gel

Después de la amplificación con la PCR es esencial verificar si tuvieron éxito las reacciones, cuál ha sido su rendimiento y, también, cuando se ha efectuado el marcado con digoxigenina, si la marca incorporada tiene la actividad prevista.

1. Prepare una dilución al 1:5 de cada inserto amplificado (por lo menos 2 μ l de inserto en 8 μ l de TE); esto hará que la concentración del inserto esté dentro del rango de los marcadores moleculares usados, como se explica más adelante.
2. Cargue 2 μ l de estas diluciones con 4 μ l de SGB diluido (3:1, TE: 5X SGB) en un gel de agarosa al 1% de tamaño mediano. Cargue uno o dos pozos por peine con una mezcla de marcadores de peso molecular que cubran el rango previsto de tamaños y concentraciones de los insertos (véase más adelante). Se puede hacer una buena mezcla con Lambda / *Hind*III y PhiX174 / *Hae*III. Use exactamente 60 ng de cada uno de estos marcadores.
3. Corra el gel a 40 mA durante 2 a 3 h o hasta que el azul de bromofenol haya emigrado unos 4 cm. Tiña el pozo con bromuro de etidio y decolore en agua.
4. Tome una fotografía del gel con los pozos y los fragmentos paralelos a las lámparas UV del transiluminador. La exposición tiene que ser calibrada de acuerdo con las condiciones de que usted dispone, de tal modo que la banda más intensa de los patrones moleculares casi sature la película, pero no por completo.
5. Estime la cantidad de inserto en cada carril comparando su intensidad con dos o tres bandas de los patrones que tengan pesos moleculares similares. Consulte la tabla presentada a continuación para estas comparaciones. Recuerde que la concentración del inserto equivale a cinco veces esta estimación.
6. Calcule el tamaño de los insertos amplificados sobre la base de los patrones de peso molecular y compare esos tamaños con los previstos según trabajos anteriores.

Marcadores del peso molecular

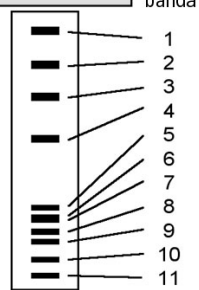
λ / Hind III



Lambda/ HindIII	% del total	ng de banda en 60 ng del total	ng de banda en 100 ng del total	ng de banda en 200 ng del total
23130	48	29	48	96
9416	19	12	19	39
6557	14	8	14	27
4361	9	5	9	18
2322	5	3	5	10
2027	4	3	4	8
560	1	1	1	2
48373 pb		60	100	200

(tamaño real: 48502 pb)

ϕ X174/ HaeIII



(como se ve en el gel al 2%) total

PhiX/ HaeIII	% del total	ng de banda en 60 ng del total	ng de banda en 100 ng del total	ng de banda en 200 ng del total
1353	25	15	25	50
1078	20	12	20	40
872	16	10	16	32
603	11	7	11	22
310	6	3	6	12
281	5	3	5	10
271	5	3	5	10
234	4	3	4	9
194	4	2	4	7
118	2	1	2	4
72	1	1	1	3
5386 pb		60	100	200

Verificación de la actividad de la digoxigenina-dUTP incorporada

Se puede hacer esta verificación usando el gel de cuantificación para insertos marcados con la PCR; en este caso, empiece con el paso 2. Si ha usado otros procedimientos de marcado, comience con el paso 1.

1. Cargue de 1 a 5 μ l de cada reacción marcada en un gel de agarosa al 1% de tamaño mediano. Corra el gel a 40 mA durante 2 a 3 h, luego tiña y decolore.

NOTA: No es necesario desnaturalizar y neutralizar el gel puesto que no hay ningún paso de hibridación en este procedimiento.

2. Construya un sistema para transferencia en seco de la siguiente manera:

Ponga un trozo de material para envoltura de tipo Saran Wrap sobre una superficie plana y limpia que sea más grande que el tamaño del gel.

Coloque dos capas de papel secante (extragrueso) empapado en solución amortiguadora para transferencia, un poco más grandes que el tamaño del gel.

Ponga el gel boca abajo sobre el papel filtro y coloque un trozo de membrana de transferencia sobre él, asegurándose de que no haya burbujas entre las capas.

Ponga un papel de filtro delgado y seco del mismo tamaño que la matriz y, por último, una pequeña pila de toallas de papel secas cortadas al tamaño del gel. Coloque un peso sobre esta construcción y deje que se efectúe la transferencia por un período de 4 horas o hasta el día siguiente.

3. Desmantele la construcción y lave la membrana en 2X SSC durante 5 min. Deje que se escurra y reticule con UV en el reticulador de UV Stratagene usando la calibración automática (120,000 μ joules/cm²), o caliente en el horno durante 1 h a 90 °C.
4. Detecte la digoxigenina incorporada siguiendo los protocolos de "Hibridación y detección de sondas marcadas con digoxigenina" (p. 33), pero los tiempos de cada paso se pueden abreviar como se indica a continuación:

Solución	Operación
Amortiguador 1	enjuague
Amortiguador 2	lave 5 min
Antidig	incube 10 min
Amortiguador 1	lave 5 min
Amortiguador 3	enjuague
AMPPD	incube 5-10 min

5. Exponga las membranas a una película de rayos X durante 45 a 60 min a 37 °C.

Hibridación y detección de sondas marcadas con digoxigenina

Se han optimado estos protocolos para hibridaciones en botellas de vidrio **siliconizado** (por ejemplo, las de Robbins Scientific Corp. o similares) y en tubos de polipropileno marca Corning; maneje las membranas con extremo cuidado tomándolas por los extremos superiores o inferiores usando pinzas limpias para filtros (Nalgene) y asegúrese que nunca se sequen.

1. Prehibride las membranas durante 1 a 3 h (y por lo menos 2 h la primera vez) en un horno a 65 °C, en una charola (bandeja) con suficiente solución HYB para cubrir bien todas las membranas. La solución HYB usada para la prehibridación puede conservarse congelada a 4 °C y usarse nuevamente tres o cuatro veces, o hasta que el material precipitado no se incorpore a la solución al calentarla.
2. Enrolle las membranas húmedas sobre una pipeta de vidrio grueso encima de una superficie plana y limpia humedecida con un poco de la solución HYB de la charola, e insértelas en botellas limpias de hibridación. Asegúrese de que no se enrosquen al rotar en el horno (síndrome del “taco”; verifique la dirección de rotación del mecanismo giratorio) y evite que se formen burbujas o que se sequen las membranas. Puede colocar hasta cinco membranas de 500 cm² en una sola botella. Las membranas más pequeñas se pueden poner en tubos de polipropileno marca Corning de 15 ó 50 ml, que se puedan colocar en secciones de tubo PVC que tengan el diámetro correcto y sean suficientemente largas para poner dos tubos en cada una.
3. Agregue suficiente solución para cubrir la membrana (15 ml); ajuste el volumen para acomodar las membranas pequeñas en los tubos. La solución HYB debe contener al menos 100 ng/ml de 2.5-5% de sonda marcada con digoxigenina (desnaturalice la sonda calentándola a 95 °C durante 10 min y enfriándola sobre hielo). Si la sonda que contiene solución HYB ya ha sido usada y congelada, descongélela y desnaturalícela durante 20 min a 95 °C en agua hirviendo.

NOTA: Después de la primera utilización, la intensidad de la señal de la membrana comenzará a disminuir; entonces será necesario aumentar gradualmente la concentración de la sonda en la solución HYB y/o elevar la concentración de CSPD (véase más adelante) cada vez que se utilice.

4. Hibride durante 15 a 18 h (hasta el día siguiente) a 65 °C en botellas en el horno para hibridación.
5. Retire las membranas de la botella (o botellas) y lávelas juntas agitándolas en charolas de tamaño adecuado, de la siguiente manera:

2 x 5 min	0.15X SSC, 0.1% SDS	TA
3 x 15 min	0.15X SSC, 0.1% SDS	60°C

O, para un lavado menos riguroso

3 x 15 min	0.15X SSC, 0.1% SDS	TA
1 x 15 min	0.15X SSC, 0.1% SDS	50°C

Es esencial vigilar las temperaturas de lavado para asegurarse que se respeten sistemáticamente los tratamientos anteriores; la reducción indebida de la temperatura o un menor tiempo de tratamiento pueden provocar un mayor ruido de fondo y resultados menos predecibles.

NOTAS: La sonda que contiene solución HYB puede ser conservada a -20 °C para su reutilización. Limpie de inmediato las botellas de hibridación para evitar la formación de residuos de HYB.

6. Enjuague las membranas en Amortiguador 1 a TA (si fuera necesario, se pueden dejar las membranas en esta solución por períodos más prolongados).
7. Incube las membranas en el Amortiguador 2 durante 30 min a TA, agitándolas (5 ml/100 cm²).
8. Incube las membranas en solución antidig fresca (5 ml/100 cm²) durante 30 min a TA agitándolas; se puede volver a usar esta solución el mismo día de la primera utilización o en los dos días siguientes al primer uso. (Centrifugue la antidig inmediatamente antes de usarla y pipetee con cuidado la cantidad deseada.)
9. Lave las membranas agitándolas, de la siguiente manera:

3 x 10 min	Amortiguador 2 TA	0.5 ml/cm ²
3 x 10 min	Amortiguador 1 TA	0.5 ml/cm ²
1 x 5 min	Amortiguador 3 TA	0.5 ml/cm ² ¹
10. Incube las membranas en solución AMPPD (5 ml/100 cm²) durante 20 min a TA agitándolas, preferiblemente en la oscuridad.
(Después de cada utilización, guarde la solución AMPPD en el refrigerador, en una botella envuelta en papel aluminio.)
11. Retire con lentitud cada membrana de la charola con AMPPD, dejando que la solución se escurra de la membrana; luego colóquela, con el lado del ADN hacia abajo, sobre una película de material plástico para envoltura como GladWrap. Puede poner varias membranas en fila sobre una tira larga de película asegurada a la mesa con cinta adhesiva. Coloque otra hoja de GladWrap encima (el lado de atrás de las membranas) y agregue un acetato fino para facilitar su manipulación. Corte el GladWrap entre las membranas y cierre los bordes sobre el lado de atrás de cada membrana.
12. Coloque las membranas en carpetas de exposición y expóngalas a películas radiográficas XAR-5 hasta el día siguiente (15 a 18 h).
NOTA: Observe que en este protocolo se ha buscado esta larga exposición para facilitar el manejo simultáneo de varias docenas de membranas grandes; además, así se dispone de un intervalo natural de descanso para la persona a cargo.
13. Revele la película radiográfica durante 6 min en revelador GBX (Kodak), enjuague en agua durante 30 seg, fije en fijador GBX durante 3 min y enjuague durante 3 min en agua que corre.
NOTA: Si la señal es débil (se pueden ver al menos algunas bandas tenues), las membranas se pueden incubar en AMPPD más fuerte y reexpuestas comenzando con el Amortiguador 3 (paso 9).
14. Para asegurar una duración más prolongada de las membranas y la remoción adecuada de la sonda, proceda de inmediato a retirarlas de su envoltura de material plástico y sumérgalas en 0.1X SSC, 0.1% SDS (“lavado de máxima rigurosidad”) o en 2X SSC en una charola a TA. **NO PERMITA QUE SE SEQUEN LAS MEMBRANAS.** Puede mantenerlas por unos días en esta solución a 4 °C o, mejor, removerlas de inmediato (véase el protocolo siguiente, p. 37).

Solución HYB

SOL. CONC.	[FINAL]	25 ml	50 ml	75 ml	100 ml	150 ml
25X SSC	5X SSC	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	30 ml
Laurilsarcosina al 10%	0.01%	25 µl	50 µl	75 µl	100 µl	150 µl
20% SDS (bueno)	0.02%	25 µl	50 µl	75 µl	100 µl	150 µl
Reactivo bloqueador* (Roche)	0.2% 0.3%	50 mg 75 mg	100 mg 150 mg	150 mg 225 mg	200 mg 300 mg	300 mg 450 mg

* Agréguelo después de calentar la solución a 65 °C y verifique que el pH es de 7.4. Nosotros utilizamos 0.2% para el maíz y 0.3% para el trigo.

¹ Si es necesario, puede dejar las membranas en esta solución por períodos más prolongados.

0.10X SSC, 0.1% SDS: lavado de máxima rigurosidad

SOL. CONC.	1000 ml	2000 ml	3000 ml	4000 ml	5000 ml	6000 ml
25X SSC	4.0 ml	8.0 ml	12.0 ml	16.0 ml	20.0 ml	24.0 ml
20% SDS	5.0 ml	10.0 ml	15.0 ml	20.0 ml	25.0 ml	30.0 ml

0.15X SSC, 0.1% SDS: lavado muy riguroso

SOL. CONC.	1000 ml	2000 ml	3000 ml	4000 ml	5000 ml	6000 ml
25X SSC	6.0 ml	12.0 ml	18.0 ml	24.0 ml	30.0 ml	36.0 ml
20% SDS	5.0 ml	10.0 ml	15.0 ml	20.0 ml	25.0 ml	30.0 ml

0.20X SSC, 0.1% SDS: lavado riguroso

SOL. CONC.	1000 ml	2000 ml	3000 ml	4000 ml	5000 ml	6000 ml
25X SSC	8.0 ml	16.0 ml	24.0 ml	32.0 ml	40.0 ml	48.0 ml
20% SDS	5.0 ml	10.0 ml	15.0 ml	20.0 ml	25.0 ml	30.0 ml

Amortiguador 1

SOL. CONC.	[FINAL]	500 ml	1000 ml	2000 ml	4000 ml
1 M Tris-HCl, pH de 7.5	0.01 M	5.0 ml	10.0 ml	20.0 ml	40.0 ml
5 M NaCl	0.15 M	15.0 ml	30.0 ml	60.0 ml	120.0 ml

Amortiguador 2

SOL. CONC.	[FINAL]	500 ml	1000 ml	2000 ml	4000 ml
1 M Tris-HCl, pH de 7.5	0.01 M	5.0 ml	10.0 ml	20.0 ml	40.0 ml
5 M NaCl	0.15 M	15.0 ml	30.0 ml	60.0 ml	120.0 ml
Reactivo bloqueador maíz	0.1%	500.0 mg	1000.0 mg	2000.0 mg	4000.0 mg
(Roche # 1096176) trigo	0.2%	1000.0 mg	2000.0 mg	4000.0 mg	8000.0 mg

Para disolver el agente reactivo, caliente la solución a 65 °C **antes** de agregarlo. (**Nunca** caliente en el horno de microondas una solución que ya contiene el reactivo bloqueador.) Puede prepararse esta solución hasta un día antes de usarse, pero asegúrese de usarla a la temperatura ambiente.

Amortiguador 3

SOL. CONC.	[FINAL]	100 ml	200 ml	400 ml	500 ml
1 M Tris-HCl, pH de 9.5	0.10 M	10.0 ml	20.0 ml	40.0 ml	50.0 ml
5 M NaCl	0.10 M	2.0 ml	4.0 ml	8.0 ml	10.0 ml

Someta la solución al autoclave antes de usarla o utilice soluciones ya pasadas por el autoclave y H₂Odd.

Antidig (1:15000)

Amortiguador 2 + 1 µl/15 ml de antidig (antidigoxigenina-AP, Boehringer Mannheim, cat. # 1093274, 150 unidades/200 µl).

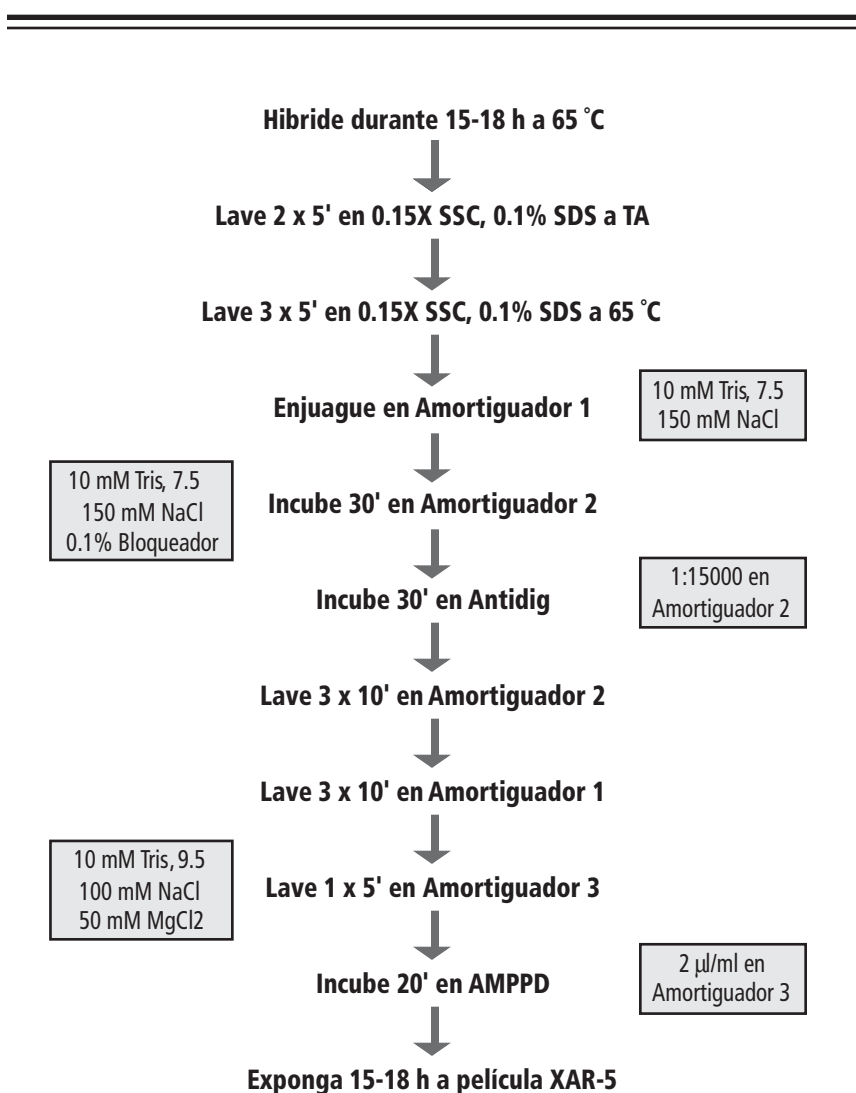
Solución AMPPD (2 µl/ml)

Amortiguador 3 + 2 µl/ml de AMPPD (Tropix, cat. # PD250-B, 10 mg/ml)

NOTAS: La concentración de AMPPD puede incrementarse después de varios usos; la señal disminuye cada vez que se utiliza la membrana.

La solución AMPPD diluida debe conservarse a 4 °C en una botella envuelta en papel de aluminio. La solución puede volverse a usar varias (de 5 a 10) veces si se esteriliza con filtro después de unas cuantas utilizaciones para evitar la contaminación.

PROTOCOLO PARA QUIMIOLUMINISCENCIA



Eliminar la sonda para reutilizar las membranas

Un problema con los métodos sensibles de detección mediante la quimioluminiscencia es que se puede detectar aun una cantidad muy pequeña de sonda marcada que quede en la membrana después de la remoción. En muchos casos, esta señal “de arrastre” aumentará la complejidad de los patrones de bandas resultantes después de resonar con una sonda diferente y, por lo tanto, puede obstaculizar la captura e interpretación de datos.

Otro problema es que, al intentar evitar “el arrastre”, tal vez se remueva excesivamente la membrana, de tal modo que se elimina la señal de arrastre pero, por desgracia, se reducen tanto la relación entre la señal global y el ruido como la vida útil de la membrana.

El procedimiento indicado a continuación, que sólo podemos recomendar si usted ha seguido exactamente los protocolos anteriores para la transferencia a la membrana, la fijación del ADN, la hibridación y la detección, nos ha dado buenos resultados para al menos siete reutilizaciones de las membranas con un ruido de fondo insignificante y ninguna señal de arrastre o una muy tenue. Maneje las membranas con extremo cuidado tomándolas por los bordes superiores o inferiores con una pinza (Nalgene) limpia para filtros y nunca las deje secar. La duración y la temperatura del lavado son los factores esenciales para una remoción adecuada, que se pueda repetir.

Lavados de remoción usando un tanque para lavado de fabricación casera

Con el fin de ampliar la capacidad de esta delicada operación, construimos un tanque de lavado al que se acopló en una esquina un calentador de agua/ unidad de circulación (el circulador de inmersión Polystat de Cole Parmer). Cabe holgadamente una pila plana de membranas grandes (digamos, 50) en el espacio que deja la unidad de calentamiento. El tanque tiene un desagüe para facilitar los cambios de soluciones y la limpieza.

1. Inmediatamente después de exponer las membranas a la película, transfíralas a 2X SSC o TE para evitar que se sequen demasiado o que crezca moho si se dejan en los cartuchos de exposición.
2. Caliente previamente la solución removedora (0.1X SSC, 0.1% SDS) a 93 °C en baño de María.
3. Lave las membranas en el tanque durante 4 a 6 min a un máximo de 90-93 °C.

NOTA: Para introducir con rapidez las membranas en la solución calentada, primero las colocamos como pila plana en una cesta de malla de plástico (con agujeros de 1 cm²). La cesta tiene asas fuertes y largas que facilitan introducir la cesta en la solución. Una vez introducidas las membranas en la solución, use pinzas para reducir la posibilidad de que se peguen entre sí o se enrosquen, y establezca una buena circulación de la solución en la cesta.

4. Transfiera las membranas rápidamente a un recipiente que contenga TE o 2X SSC a TA. Proceda de inmediato con su próxima rehibridación (vea el paso 1 del protocolo anterior), almacene a 4 °C, o deje secar bien al aire sobre papel de filtro limpio y guarde en bolsas de plástico cerradas herméticamente a TA o en el refrigerador.

0.1X SSC, 0.1% SDS: lavado de remoción (también lavado de máxima rigurosidad)

SOL. CONC.	1000 ml	2000 ml	3000 ml	4000 ml	5000 ml	6000 ml
25X SSC	4.0 ml	8.0 ml	12.0 ml	16.0 ml	20.0 ml	24.0 ml
20% SDS	5.0 ml	10.0 ml	15.0 ml	20.0 ml	25.0 ml	30.0 ml

Protocolos para STS y SSR

(Modificado de varias fuentes)

Los sitios de secuencia blanco (STS) generalmente se basan en información de secuencias derivada de sondas RFLP. Las secuencias terminales de una sonda dada pueden estar disponibles y es posible que haya que elaborar iniciadores para amplificación de la secuencia intermedia (existen varios programas de computadora para hacer esto, tanto comerciales como del dominio público). A veces existen secuencias publicadas de pares de iniciadores utilizables. Los STS también pueden elaborarse a partir de fragmentos de RAPD y AFLP clonados.

Las secuencias simples repetidas (SSR o microsatélites) son fáciles de encontrar desde hace algunos años. Se ha publicado o se ha puesto a disposición por otros medios un número cada vez mayor de pares de iniciadores para detectar loci de SSR en una gran variedad de cultivos.

Es posible acceder información de secuencias para ambos sistemas de marcadores de fuentes confiables en el Internet. Para información acerca del maíz, consulte MaizeDB en <http://www.agron.missouri.edu/query.html>. Para trigo, consulte GrainGenes en <http://wheat.pw.usda.gov>.

A diferencia de los RFLP o los AFLP, la calidad del ADN molde es menos importante para los STS y SSR. Hemos obtenido buenos resultados utilizando ADN de grandes volúmenes de tejido liofilizado y molido, al igual que de ADN extraído de un pequeño pedazo de hoja congelada con el método del extractor de savia.

Amplificación

1. Prepare una mezcla de reacción que contenga todos los componentes anotados a continuación, excepto el ADN o los iniciadores, dependiendo de si se están preparando varias reacciones utilizando los mismos iniciadores para distintas muestras de ADN o diferentes pares de iniciadores para las mismas muestras de ADN.

NOTA: Son un poco diferentes las concentraciones óptimas de varios de los componentes para el maíz y el trigo. Si necesita preparar una mezcla de reacción con anterioridad, le sugerimos que incluya todos los componentes salvo la polimerasa *Taq* y que mantenga la mezcla a 4°C o a -20°C hasta que vaya a utilizarla. La enzima *Taq* se agrega justo antes de hacer partes alícuotas de la mezcla de reacción.

Maíz

SOL. CONC.	[FINAL] o cantidad	15 µl de RXN	20 µl de RXN
H ₂ O ¹	—	1.40 µl	3.6 µl
Amortiguador <i>Taq</i> (10X; sin Mg)	1X	1.50 µl	2.0 µl
MgCl ₂ (50 mM) ²	2.5 mM	0.75 µl	1.0 µl
Mezcla dNTP (2.5 mM de cada uno)	150 µM de cada uno	0.90 µl	1.2 µl
Enzima <i>Taq</i> (5 U/µl)	1 U	0.20 µl	0.2 µl
Glicerol (100%) (optativo) ³	10%	1.50 µl	2.0 µl
Iniciadores, F+R (1.0 µM de cada uno) ⁴	0.25 µM de cada uno	3.75 µl	5.0 µl
ADN (10 ng/µl)	50 ng	5.00 µl	5.0 µl

¹ Sigma Cell Culture Water, Cat. # W-3500.

² Es esencial determinar las concentraciones óptimas de MgCl₂ y *Taq* para cada lote nuevo de enzima y ADN de las especies que se analizarán.

³ Se puede agregar glicerol a la reacción si se quiere. En general favorece la amplificación de productos grandes. Para facilitar el pipeteado del volumen requerido, antes caliente el tubo.

⁴ Ambos iniciadores *forward* y *reverse* están presentes en el mismo tubo.

Trigo

SOL. CONC.	[FINAL]	15 µl de RXN	20 µl de RXN
	o cantidad		
H ₂ O ¹	—	2.22 µl	4.7 µl
Amortiguador <i>Taq</i> (10X; sin Mg)	1X	1.50 µl	2.0 µl
MgCl ₂ (50 mM) ²	2.5 mM	0.75 µl	1.0 µl
Mezcla dNTP (2.5 mM de cada uno)	200 µM de cada uno	1.20 µl	1.6 µl
Enzima <i>Taq</i> (5 U/µl)	1 U	0.20 µl	0.2 µl
Glicerol (100%) (optativo) ³	2.5 %	0.38 µl	0.5 µl
Iniciadores F + R (1.0 µM de cada uno) ⁴	0.25 µM de cada uno	3.75 µl	5.0 µl
ADN (10 ng/µl)	50 ng	5.00 µl	5.0 µl

- Agregue los iniciadores o la muestra de ADN a cada tubo o pozo rotulado de la placa de microtitulación.
- Ponga partes alícuotas de la mezcla de reacción en cada tubo rotulado o en la placa de microtitulación.
- Cubra cada muestra con una gota o 20 a 30 µl de aceite mineral ultrapuro, si es necesario (es decir, si no va a utilizar una tapa de calentamiento).
- Coloque en la máquina de PCR, asegurándose de que haya suficiente aceite en cada pozo (cuando sea necesario) para que haya un contacto adecuado con el tubo.
- Amplifique utilizando cualquiera de los dos programas siguientes:⁵

Programa PCR estándar

1 ciclo de:	30 ciclos de:	1 ciclo de:
93°C por 1 min	93°C por 30 seg	72°C por 5 min
	X°C por 1 min (X está entre 50 y 68°C)	
	72°C por 1 min	

Programa PCR "touchdown"

1 ciclo de:	7 ciclos de:	35 ciclos de :	1 ciclo de:
94°C por 2 min	94°C por 1 min	94°C por 1 min	72°C por 5 min
	Y°C por 1 min	Z°C por 1 min	
	(reduciendo 1°C por ciclo)	72°C por 1 min	
	72°C por 1 min		
	Y=69, 59 ó 54°C	Z=62, 57, 52 ó 47°C	

NOTA: Cada par de iniciadores tiene una temperatura de alineamiento óptima que tiene que ser definida con base en sus secuencias. Para los SSR, hemos podido amplificar la mayoría a una temperatura de alineamiento de Z=60°C con el programa estándar y de Z=57°C con el programa "touchdown". Por tanto, comenzamos a ensayar nuevos iniciadores a esas temperaturas. Si no se da una amplificación satisfactoria, reducimos o incrementamos la temperatura 4 ó 5°C. Comparado con el programa estándar, el programa "touchdown" puede eliminar algunas bandas no específicas.

- Agregue 3 a 4 µl de 5X SGB a cada tubo y cargue en el sistema de geles que prefiera.

¹ Cell Culture Water de Sigma, cat. # W-3500.

² Es esencial determinar las concentraciones óptimas de MgCl₂ y *Taq* para cada lote nuevo de enzima y ADN de las especies que se analizarán.

³ Se puede agregar glicerol a la reacción si se quiere. En general favorece la amplificación de productos grandes. Para facilitar el pipeteado del volumen requerido, antes caliente el tubo.

⁴ Ambos iniciadores *forward* y *reverse* están presentes en el mismo tubo.

⁵ Condiciones optimadas para ERICOMP TwinBlockTM / MJ Research DNA Engine Tetrad TM System Thermocyclers.

Electroforesis en gel

El sistema de electroforesis en gel que seleccione, así como sus varios componentes, dependerá del tamaño anticipado del producto (o productos) y, en menor grado, de la intensidad de éste (o éstos). En nuestro laboratorio, hemos ensayado geles de agarosa horizontales a diferentes concentraciones y diversas mezclas de distintas proporciones de agarosa de buena calidad y de calidad normal; geles de poliacrilamida pequeños con distintas concentraciones y proporciones de acrilamida y bisacrilamida teñida con bromuro de etidio y nitrato de plata; geles secuenciadores de poliacrilamida para desnaturalización con tinte de plata; y separación de productos marcados con fluorescencia mediante un secuenciador automático. Estos dos últimos sistemas aún no han sido optimizados en nuestras condiciones. Enseguida se anotan las condiciones que hemos estado utilizando tanto para la electroforesis en gel de agarosa como la electroforesis pequeña en gel de poliacrilamida no-desnaturalizante/desnaturalizante (PAGE).

Enseguida presentamos algunas de nuestras **normas generales**:

- Utilizar geles de agarosa para los STS debido a los fragmentos de gran tamaño.
- En el caso de los SSR utilizados en estudios de diversidad genética o *fingerprinting*, siempre usar PAGE debido a que se requiere una mayor resolución.
- En el caso de los SSR utilizados en estudios de mapeo, buscar polimorfismos en líneas progenitoras en geles de agarosa y volver a correr en poliacrilamida sólo los SSR con diferencias tan pequeñas o de intensidad tan baja que no se observan claramente en los geles de agarosa.

Electroforesis en gel de agarosa

Hay que considerar estos factores al decidir el tipo y tamaño de geles de agarosa que se deben utilizar:

- **La concentración de agarosa**, dependiendo del tamaño de los productos amplificados; generalmente utilizamos 1.5% para fragmentos más grandes (200 a 3500 pb), como los STS, y 4% para fragmentos más chicos (menos de 400 pb), como los SSR.
- **La distancia de migración y la proporción de agarosa de buena calidad a una de calidad normal** son factores que influyen en la resolución de las diferencias en los tamaños de los productos amplificados. A mayor distancia, mejor resolución (véase el inciso sobre cómo elegir los tanques para la electroforesis). Para lograr la resolución óptima, utilizamos en primer lugar geles de agarosa de Metaphor⁶ al 4% y luego geles de agarosa 2:1 Metaphor:SeaKem. Cabe señalar que se obtienen resoluciones un poco más bajas con estos últimos.
- Utilizamos **amortiguador 1X TBE** (para preparar el gel y correrlo), en vez de 1X TAE, para lograr una mejor resolución. Este amortiguador puede volverse a utilizar una o dos veces sin problema ya que el tiempo de corrida suele ser breve. Otra opción que se puede ensayar en vez de volver a usar el amortiguador es utilizar 0.5X TBE.
- Hemos estado usando los mismos **tanques para electroforesis** que usábamos para los RFLP, es decir, charolas (bandejas) para gel de 20x25 cm en las que insertamos 2, 4 o hasta 8 peines de 30 dientes, dependiendo de la diferencia en tamaño de los productos de amplificación.

⁶ Existen varias marcas de agarosa para aplicaciones de alta resolución. La agarosa Metaphor es un producto excelente, pero costoso (FMC, Rockland, NY, Cat. # 50184). Sin embargo, puede usarse por lo menos cuatro veces después de correr las muestras de ADN, como sigue: continuar la corrida electroforética, volver a derretirla y luego agregar agua caliente para asegurarse de regresar al volumen inicial. Seakem LE (Karlson, Cat. # 50004).

En caso de diferencias muy pequeñas, es necesario usar dos peines (distancia de migración: 12.5 cm), pero si la diferencia es grande, ocho peines (o 3 cm de distancia de migración) son suficientes.

- En la actualidad utilizamos tanques para electroforesis modelo Sunrise™ 96 y Sunrise™ 192 fabricados por Life Technologies (cat. #11068-111 y 21069-133, respectivamente), cuyas charolas de 12x24 y 24x24 cm contienen cuatro peines con 26 ó 52 dientes. Esto nos permite someter a la electroforesis muestras de una o dos placas de microtitulación, respectivamente, y cargar las muestras con una pipeta multicanal.

En el caso de los STS, cargue 12 µl de cada muestra en un gel de agarosa al 1.5% preparado con el amortiguador de gel 1X TBE. Realice la electroforesis en 1X TBE a 100 V, corriente constante, hasta que el colorante azul haya emigrado lo necesario.

Para los SSR:

1. Agregue agarosa a una cantidad adecuada del amortiguador de gel 1X TBE y registre el peso tanto de la agarosa como del amortiguador.
2. Derrita la agarosa en el horno de microondas mezclando vigorosamente varias veces durante el calentamiento. Asegúrese que toda se disuelva (tarda más en disolverse que a concentraciones más bajas). Pésela otra vez y agregue H₂O hasta lograr el peso original (para reponer lo que se perdió por evaporación); vuélva a calentarlo una vez más.
3. Para eliminar las burbujas muy pequeñas formadas por el mezclado, aplique el vacío al matraz (puede colocarlo en un desecador que esté conectado al vacío).
4. Vierta la agarosa de inmediato en la charola del gel con los extremos tapados con cinta adhesiva e inserte los peines. Deje que solidifique (20 a 30 min). Puede enfriarlo a 4 °C durante 15 min antes de cargar las muestras. A menudo preparamos estos geles el día anterior y los mantenemos cubiertos con Saran Wrap en el refrigerador.
5. Remueva la cinta adhesiva y cargue las muestras en el gel "seco" con una jeringa Hamilton o coloque la charola en el dispositivo con amortiguador 1X TBE. Saque los peines sólo cuando esté listo para cargar las muestras. Vierta suficiente amortiguador 1X TBE en el dispositivo del gel hasta cubrir el gel con al menos 0.5 cm.
6. Corra las muestras en el gel a 100 voltios, corriente constante, durante 2 a 3 h, hasta que el colorante azul de bromofenol haya emigrado hasta justo arriba del siguiente juego de pozos.
7. Saque la charola del dispositivo y tiña en 1 µg/ml de bromuro de etidio (100 µl de 10 mg/ml de bromuro de etidio en 1000 ml de dH₂O) durante 20 min agitando suavemente.

ADVERTENCIA: El bromuro de etidio es en extremo mutagénico; use guantes al manipularlo y tome las máximas precauciones.

8. Enjuague el gel en dH₂O durante 20 min; deslice el gel en un transiluminador UV y fotografíe.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis en gel de poliacrilamida se usa cuando se requiere una mayor resolución en las bandas. Hemos estado utilizando dos sistemas en el laboratorio. Aunque el sistema Bio-Rad PROTEAN® II da mejor resolución debido a que es más larga la distancia de migración posible,

nosotros utilizamos más el sistema Atto AE-6220 porque es más sencillo de usar. También utilizamos geles desnaturalizantes y no desnaturalizantes. Aunque el primer sistema es un poco más laborioso, da como resultado patrones más simples de fragmentos amplificados.

Sistema de electroforesis PROTEAN® II xi (16x20 cm, 1 mm de grosor)–Laboratorios Bio-Rad

Cada tanque puede contener hasta cuatro geles. Cada gel requiere 40 ml de solución de poliacrilamida (6 a 12% de 29:1 acrilamida, dependiendo de la resolución requerida). El gel se corre a una corriente constante de 100 a 120 V durante 3 a 5 h.

Sistema de electroforesis ATTO⁷ AE-6220 (13x14 cm, 1 mm de grosor)

1. Cómo se montan las placas de vidrio

Ensamblar las placas de vidrio y los selladores con unas pinzas. Asegurar que los selladores estén en posición correcta entre las dos placas de vidrio para evitar fugas. Se pueden montar dos geles en un solo aparato. Existen tres tipos de peines (con 14, 20 y 28 pozos). Nosotros usamos peines con 28 pozos para que las pipetas de muchos canales entren en cada tercer pozo. Esto es muy conveniente cuando hay que cargar un gran número de muestras.

2. Preparación de los geles

Geles no desnaturalizantes: Como el tamaño de los fragmentos con la mayoría de los iniciadores SSR es de 80 a 300 pb, nosotros recomendamos usar 12% de 29:2 acrilamida para empezar. La concentración se puede reducir (por ejemplo, al 8%) o incrementar (por ejemplo, al 16%) para fragmentos grandes y chicos, respectivamente.

Geles desnaturalizantes: Utilizamos 6% de 19:1 acrilamida con 42% de urea (al igual que en los geles de secuenciación).

Un gel requiere 20 ml de solución de acrilamida. Prepare una cantidad suficiente de esta solución, según el número de geles que se correrán. Inserte los peines entre las placas inmediatamente después de vaciar la solución de acrilamida en las placas ensambladas. A temperatura ambiente, la solución de acrilamida se polimeriza en 20 min.

ADVERTENCIA: La acrilamida es neurotóxica and debe manejarse bajo una campana de extracción –póngase una bata de laboratorio, protección para los ojos y guantes, y tome las máximas precauciones.

Un tanque de electroforesis requiere alrededor de 1 litro de 1X TBE. Coloque las placas con los geles en el aparato. Remueva los peines y enjuague los pozos con una jeringa. Es esencial este paso, en especial con las bandas polimórficas que se encuentran muy cerca unas de otras. Si se omite este paso, la solución de acrilamida no polimerizada se polimerizará en el fondo de los pozos y afectará la migración de los fragmentos.

NOTAS: Con los geles no desnaturalizantes, se puede usar amortiguador Tris-glicina (25 mM de trizma-base, 192 mM de glicina). Este amortiguador requiere más tiempo para correr, pero da por resultado una mejor separación de las bandas.

El pH del amortiguador TBE debe ajustarse con ácido acético a fin de que el fondo de los geles se reduzca después de la tinción con plata.

⁷ Dirección: ATTO Corporation, Hongo 1-25-23, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8425, Japan. Tel: +81-3-5684-6643; Fax: +81-3-3814-4868; email: eig@atto.co.jp; <http://www.atto.co.jp>.

3. Cargado de las muestras

Para los geles **no desnaturalizantes**, agregue 2 a 4 μl de 5X SGB con BPB y CX a cada muestra y cargue 6 a 10 μl de cada una con una micropipeta. Use un marcador de PM adecuado en uno o dos pozos; nosotros utilizamos alrededor de 100 ng del marcador de peso molecular de 100 pb o el plásmido Phi (X174RF) digerido con *Hae*III. Para estudios de diversidad genética, utilizamos un marcador de peso interno en cada carril (vea el protocolo de los marcadores de peso molecular).

Para los **geles desnaturalizantes**, agregue 5 a 7 μl de solución interruptora (*stop solution*) a cada muestra de 15 μl y desnaturalice a 95°C durante 5 min. También debe desnaturalizar un marcador de peso molecular de 100 pb. La muestra debe cargarse después de pre-correr los geles.

4. Electroforesis

Geles no desnaturalizantes: Corra los geles a corriente constante de 250V durante 2 a 5 h, dependiendo de la concentración de la acrilamida. En general, la corrida tarda 2 h para geles de 8% y 5 h para geles de 16%. El BPB normalmente se ha salido del gel y el CX o se ha salido también o se encuentra al fondo del gel (dependiendo de la concentración de acrilamida).

Geles desnaturalizantes: Haga una pre-corrida de los geles a una corriente constante de 400V durante 30 min para que la temperatura del amortiguador llegue a 60 ó 65°C. Antes de cargar las muestras, enjuague los pozos otra vez para eliminar la urea. Cargue 4 μl de las muestras desnaturalizadas. Corra a 350V durante 60 a 70 min hasta que el CX llegue a 2 ó 3 cm del fondo de los geles. Verifique la temperatura del amortiguador de vez en cuando y mantenga a 60 ó 70°C reduciendo o incrementando el voltaje.

Saque los geles de las placas; corte una o dos esquinas de los geles para que la dirección del gel y el número del mismo se puedan identificar después de la tinción con plata.

5. Tinción con plata (modificado de Sanguinetti *et al.*, 1994. *Biotechniques* 17:915-919)

Se agitan con suavidad las charolas (bandejas) durante la realización de todos los pasos. Use guantes en todo momento y manipule los geles con suavidad ya que la presión y las huellas digitales producen manchas. Asimismo, es importante utilizar recipientes de vidrio limpios así como agua destilada y deionizada porque los contaminantes reducen grandemente la sensibilidad de la tinción.

a) Coloque los geles en 100 ml de etanol al 10% con 0.5 ml/100 ml de ácido acético y agite durante 3 a 5 min.

b) Reponga la solución con 0.2% de nitrato de plata en solución acuosa y agite durante 5 a 10 min. Esta solución se puede volver a utilizar muchas veces si se le agrega 20 ml de nitrato de plata al 2% a cada litro después de cada uso.

c) Enjuague los geles brevemente con H_2O y transfiera a 100 ml de la solución reveladora.

d) Cuando obtenga un revelado adecuado (en 5 a 15 min), deseche la solución reveladora y enjuague los geles con H_2O . Detenga la reacción agregando cerca de 100 ml de la solución interruptora (*stop solution*) (o también puede usar ácido acético al 10%).

NOTA: Se recomienda el agua destilada y deionizada para todas las soluciones que se utilizan en la tinción. Las charolas deberán limpiarse con toallas de papel suaves y mojadas para quitar el residuo de plata. Cuanto más débil la intensidad de la banda, más largo el tiempo de revelado, lo cual da por resultado un fondo más oscuro. En ese caso, cargue más muestra u optimice las condiciones de PCR para lograr una mejor amplificación.

6. Evaluación/fotografiado/secado

Coloque el gel en una cámara de luz con lámparas fluorescentes. Evalúe los resultados y fotografíe a f22-32 y una exposición de 1/125 segundos con película de Tipo 667. Los polimorfismos se deben evaluar en los geles y no en las fotos. Si fuera necesario, seque los geles como sigue: ponga los geles entre dos capas de celofán, estírelos y fíjelos con pinzas a placas de vidrio; seque a temperatura ambiente. También se puede utilizar un secador de geles.

Multiplexing de pares de iniciadores

En el caso de pares de iniciadores que resultan en productos de amplificación de distintos tamaños, existe un procedimiento denominado *multiplexing* que permite la amplificación simultánea de dos o más microsátélites, siempre y cuando tengan temperaturas de alineamiento similares. Nosotros hemos utilizado este procedimiento mayormente al efectuar el *duplexing* (dos pares de iniciadores a la vez). Para el *multiplexing*, siga el mismo procedimiento pero utilice la siguiente fórmula:

SOL. CONC.	[FINAL] o cantidad	25 µl de RXN
H ₂ O ^{dd} ⁸	—	0.0 µl
Amortiguador <i>Taq</i> (10X; sin Mg)	1X	2.5 µl
MgCl ₂ (50 mM) ⁹	2.5 mM	1.3 µl
Glicerol (100%) (optativo) ¹⁰	10%	2.1 µl
Mezcla de dNTP (2.5 mM de cada uno)	200 µM de cada uno	2.0 µl
Enzima <i>Taq</i> (5 U/µl)	1 U	0.2 µl
Iniciador 1 F+R (1.0 µM de cada uno)	0.3 µM de cada uno	6.0 µl
Iniciador 2 F+R (1.0 µM de cada uno)	0.3 µM de cada uno	6.0 µl
ADN (10 ng/µl)	50 ng	5.0 µl

NOTA: En algunos casos, combinar dos juegos de pares de iniciadores da por resultado la amplificación preferencial de uno de los dos productos. Para mejorar la amplificación del producto mal amplificado, sugerimos que se incremente la cantidad de iniciadores del SSR o STS mal amplificado y/o reducir la cantidad de iniciadores de los otros SSR o STS, reducir la temperatura de alineamiento, y/o utilizar polimerasa *Taq* de mejor calidad.

⁸ Cell Culture Water de Sigma, cat. # W-3500.

⁹ Es esencial determinar las concentraciones óptimas de MgCl₂ y *Taq* para cada lote nuevo de enzima y ADN de las especies que se analizarán.

¹⁰ Se puede agregar glicerol a la reacción si se quiere. En general favorece la amplificación de productos grandes. Para facilitar el pipeteado del volumen requerido, antes caliente el tubo.

Amortiguador para gel 5X TBE: 0.45 M Tris-borate, 10 mM EDTA

SOL. CONC.	1 litro	2 litros	3 litros	4 litros	5 litros
Tris Base (PM=121.10)	54.0 g	108.0 g	162.0 g	216.0 g	270.0 g
Ácido bórico (PM=61.83)	27.5 g	55.0 g	82.5 g	110.0 g	137.5 g
0.5 M EDTA pH 8.0	20.0 ml	40.0 ml	60.0 ml	80.0 ml	100.0 ml

Ajuste el pH a 8.0 con ácido acético glacial o HCl (ácido acético para PAGE).

Un precipitado se puede formar si se almacena durante largos períodos de tiempo.

Amortiguador para gel 10X TBE: 0.9 M Tris-borate, 20 mM EDTA

SOL. CONC.	1 litro	2 litros	3 litros	4 litros	5 litros
Tris Base (PM=121.10)	108.0 g	216.0 g	324.0 g	432.0 g	540.0 g
Ácido bórico (PM=61.83)	55.0 g	110.0 g	165.0 g	220.0 g	275.0 g
0.5 M EDTA pH 8.0	40.0 ml	80.0 ml	120.0 ml	160.0 ml	200.0 ml

Ajuste el pH a 8.0 con ácido acético glacial o HCl (ácido acético para PAGE).

Es posible que se forme un precipitado si se almacena durante largos períodos de tiempo.

Amortiguador para gel 10X TG para una mejor resolución

SOL. CONC.	2 litros
Tris Base (PM=121.10)	60.0 g
Glicina (PM=75.07)	288.0 g
H ₂ Odd	hasta 200.0 ml

Amortiguador para muestras a cargar en gel 5X SGB

SOL. CONC.	[FINAL]	50 ml	100 ml
1 M Tris-8.0	50 mM	2.5 ml	5.0 ml
0.5 M EDTA-8.0	5 mM	0.5 ml	1.0 ml
Sucrosa	25%	12.5 g	25.0 g
Azul de bromofenol	2 mg/ml	100.0 mg	200.0 mg
Cianol de xileno	2 mg/ml	100.0 mg	200.0 mg
H ₂ Odd		hasta 50.0 ml	hasta 100.0 ml

Solución interruptora (stop solution)

SOL. CONC.	[FINAL]	1500 µl
5M NaOH	10 mM	3.0 µl
99% de formamida	95%	1439.0 µl
Azul de bromofenol	0.05%	1.5 mg
Cianol de xileno	0.05%	1.5 mg
H ₂ Odd		61.0 µl

Haga porciones alícuotas y mantenga a 4°C.

Solución concentrada de acrilamida al 40%: 29acrilamida:1bisacrilamida

SOL. CONC.	500 ml	1000 ml	2000 ml
Acrilamida	193.3 g	386.7 g	773.3 g
Bisacrilamida	6.7 g	13.4 g	26.8 g
Disuelta en H ₂ Odd para llegar al volumen final.			

Otra opción es comprar una mezcla de acrilamida/bisacrilamida de Sigma (cat. #2792) y preparar la solución concentrada al 40% “en botella” a fin de evitar pesar las dos sustancias. Filtre la solución a través de un filtro de poro de 0.45 µm y guarde la solución en botellas oscuras. La solución se puede almacenar a 4°C por unos cuantos meses.

ADVERTENCIA: La acrilamida, una neurotoxina potente, se absorbe a través de la piel. Por tanto, hay que manipularla bajo una campana de extracción. Póngase una bata, protectores oculares, una máscara y guantes cuando trabaje con acrilamida o bisacrilamida en polvo, y tome las máximas precauciones. Póngase una bata y guantes siempre que manipule soluciones que contengan estos elementos químicos.

Persulfato de amonio al 25% (APS)

SOL. CONC.	10 ml	20 ml	30 ml
Persulfato de amonio	2.5 g	5.0 g	7.5 g

Disuelva en H₂O hasta lograr el volumen final. La solución se puede guardar a 4°C hasta un mes.

ADVERTENCIA: El APS es peligroso –póngase una bata, protectores oculares y guantes al manipularlo.

Solución de acrilamida al 6% (para geles no desnaturalizantes)

SOL. CONC.	1 gel	2 geles	4 geles	6 geles	8 geles
Acrilamida al 40%	3 ml	6 ml	12 ml	18 ml	24 ml
Amortiguador 5X TBE o 5XTG	4 ml	8 ml	16 ml	24 ml	32 ml
H ₂ O	13 ml	26 ml	52 ml	78 ml	104 ml
APS al 25%	70 µl	140 µl	280 µl	420 µl	560 µl
TEMED	10 µl	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl

Solución de acrilamida al 8% (para geles no desnaturalizantes)

SOL. CONC.	1 gel	2 geles	4 geles	6 geles	8 geles
Acrilamida al 40%	4 ml	8 ml	16 ml	24 ml	32 ml
5X TBE	4 ml	8 ml	16 ml	24 ml	32 ml
H ₂ O	12 ml	24 ml	48 ml	72 ml	96 ml
APS al 25%	70 µl	140 µl	280 µl	420 µl	560 µl
TEMED	10 µl	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl

Solución de acrilamida al 12% (para geles no desnaturalizantes)

SOL. CONC.	1 gel	2 geles	4 geles	6 geles	8 geles
Acrilamida al 40%	6 ml	12 ml	24 ml	36 ml	48 ml
5X TBE	4 ml	8 ml	16 ml	24 ml	32 ml
H ₂ O	10 ml	20 ml	40 ml	60 ml	80 ml
APS al 25%	70 µl	140 µl	280 µl	420 µl	560 µl
TEMED	10 µl	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl

NOTA: La misma solución de TBE debe usarse para preparar tanto el gel como el amortiguador para la corrida. La polimerización es causada tanto por APS como TEMED. Una vez agregados esos componentes, se debe verter el gel rápidamente. La cantidad de APS que se agregue puede cambiar según la temperatura ambiente y el tiempo requerido para la polimerización.

ADVERTENCIA: TEMED es inflamable y muy corrosivo –póngase una bata, protectores oculares y guantes cuando lo manipule.

Solución de acrilamida al 6% (para geles desnaturalizantes)

SOL. CONC.	[FINAL]	200 ml	300 ml	600 ml	1000 ml
Urea	42%	84.0 g	126.0 g	252.0 g	420.0 g
10X TBE	1X	20.0 ml	30.0 ml	60.0 ml	100.0 ml
Acrilamida al 40%	6%	30.0 ml	45.0 ml	90.0 ml	150.0 ml
H ₂ O		hasta 200.0 ml	hasta 300.0 ml	hasta 600.0 ml	hasta 1500.0 ml

Filtre con un filtro desechable. Puede conservarse a 4°C en la oscuridad para usarse después (en 1 a 2 meses).

Nosotros compramos 19:1 acrilamida:bisacrilamida de Sigma (cat. # A-2917) y preparamos la solución de acrilamida al 40% "en botella" para no tener que pesar la acrilamida y bisacrilamida por separado. Esta es una manera segura de preparar la solución.

Etanol al 10% con 0.5 ml/100 ml de ácido acético

SOL. CONC.	200 ml	400 ml	800 ml
Etanol	20 ml	40 ml	80 ml
Ácido acético	1 ml	2 ml	4 ml

Disuelva en H₂O hasta lograr el volumen final.

Solución de tinción: nitrato de plata al 0.2%

SOL. CONC.	1 litro	2 litros
AgNO ₃ (PM = 169.9)	2 g	4 g

Disuelva en H₂O hasta lograr el volumen final.

ADVERTENCIA: El nitrato de plata es un agente corrosivo oxidante –póngase una bata, protectores oculares y guantes cuando lo manipule.

Solución reveladora: hidróxido de sodio al 3% + 0.5ml/100ml formaldehído

SOL. CONC.	100 ml	200 ml	400 ml	800 ml	1000 ml
NaOH	3 g	6 g	12 g	24 g	30 g
Formaldehído al 36-38%	0.5 ml	1 ml	2 ml	4 ml	5 ml

La concentración del formaldehído puede variar dependiendo de la empresa de la cual se compra. Este componente debe agregarse justo antes de usarse.

ADVERTENCIA: El formaldehído es cancerígeno; además causa lagrimeo y es inflamable. Debe manipularse bajo una campana de extracción –póngase una bata, protectores oculares y guantes cuando lo manipule, y tome las máximas precauciones.

Solución de detención: 1.5% Na₂EDTA2H₂O

SOL. CONC.	1 litro	2 litros	4 litros
Na ₂ EDTA2H ₂ O (PM = 372.2)	15 g	30 g	60 g

Fingerprinting del ADN de maíz y de trigo con un secuenciador automático de ADN

Para el estudio de la diversidad genética en poblaciones de maíz y trigo usando marcadores SSR con un secuenciador automático de ADN, se requiere el uso de iniciadores marcados con fluorescencia. Las marcas que usamos son TET (verde), HEX (amarillo) y FAM (azul) para marcar los iniciadores que se utilizan en el Secuenciador de ADN ABI PRISM 377™, y HEX (verde), FAM (azul) y NED (amarillo) para marcar los que usan con el Analizador Genético ABI PRISM 3100®. Se pueden utilizar otros colores, pero resultan más costosos. El ABI 377, que emplea gel de poliacrilamida, ya no se consigue en el mercado. El ABI 3100 es un sistema automático de electroforesis capilar que separa, detecta y analiza varios fragmentos de ADN marcados con fluorescencia en una sola corrida. En el Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT usamos el 3100 para hacer *fingerprinting* de líneas y poblaciones de maíz y de trigo. Comparado con correr geles de poliacrilamida manualmente, es mucho más eficiente y se ahorra tiempo y dinero al correr los mismos 20 a 120 marcadores SSR en maíz y en trigo en condiciones en que se amplifican muchos iniciadores al mismo tiempo (*multiplexing*). Esta mayor eficiencia compensa el costo más alto de los reactivos (ver la descripción del *multiplexing* a continuación).

Además hemos desarrollado un método (para el maíz) en el que se amplifica más de un iniciador en la misma reacción (*multiplex*) de PCR. Esto nos permite analizar un gran número de SSR en cada carril del gel de secuenciación (*multiload*). La gran ventaja que ofrece el secuenciador son su gran sensibilidad y su alta resolución (en geles de poliacrilamida) para separar fragmentos de 50 a 500 pb. Si desea ver cuadros de estos iniciadores, visite los siguientes sitios de la web: Cuadro 1 (para maíz): <http://www.cimmyt.org/ambionet/85%20coremarkersfordiversitystudy.PDF> y Cuadro 2 (para trigo): http://www.cimmyt.org/english/webp/support/publications/support_materials/pdf/SSRs_pedigree.pdf.

Reacciones de polimerización en cadena (PCR)

Las PCR que se usan para amplificar los SSR utilizados en los estudios de diversidad son fundamentalmente las mismas que las PCR descritas en otras secciones de este manual, con la excepción de las modificaciones de los iniciadores fluorescentes. Estos son algunos ejemplos:

Maíz

Reactivo	10 µl de 1RXN
Amortig. <i>Taq</i> (10X)	1.0
dNTP (2.5 mM)	1.2
MgCl ₂ (50 mM)	0.4
Iniciadores (2 µM)	X
H ₂ O dd	Y
Enzima <i>Taq</i>	0.15
ADN (5ng/µl)	1.5

X = La cantidad varía según el iniciador.

Y = Se ajusta para llevar a un volumen total de 10 µl.

NOTA: Para el caso de maíz, es posible amplificar hasta tres iniciadores en la misma reacción (*multiplex*) y se pueden combinar dos *multiplex* para poder correr el mayor número posible de iniciadores por carril en el gel.

Trigo

Reactivo	20 µl de 1RXN
Amortig. <i>Taq</i> (10X)	2.0
dNTP (2.5 mM)	2.0
MgCl ₂ (50 mM)	1.2
Iniciador (1-3 µm)	X
H ₂ O dd	Y
Enzima <i>Taq</i>	0.6
ADN (5 ng/µl)	5

X = La cantidad varía según el iniciador.

Y = Se ajusta para lograr un volumen total de 10 µl.

Consideraciones generales al utilizar *multiplexing* y *multiloading* con los iniciadores SSR

Los iniciadores SSR se pueden combinar antes o después de hacer la amplificación del ADN con PCR. Si se hace antes, el procedimiento se denomina *multiplexing*; si se hace después, se denomina *multiloading*. Ambos procedimientos se pueden usar para aumentar la eficiencia del *fingerprinting*. Nosotros realizamos tanto el *multiplexing* como el *multiloading* con el maíz, pero con el trigo sólo utilizamos el *multiloading*. En el maíz, existe un número mucho mayor de marcadores SSR disponibles al público, así que fue más fácil encontrar combinaciones para el *multiplexing*, en tanto que con el trigo no hemos encontrado un número suficiente de opciones.

En el *multiplexing*, se usan de forma mucho más eficiente los reactivos tanto de la electroforesis como de la PCR. Las mismas cantidades de reactivos de PCR se agregan al tubo, pero se agregan a la mezcla dos pares, o más, de iniciadores SSR, en vez de sólo uno. Los iniciadores SSR que se amplificarán de forma simultánea deben ser ensayados primero para asegurar que tienen la misma temperatura de alineamiento y que no interfieren en la amplificación uno del otro (porque se alinea con el otro iniciador) y que no competirán uno con el otro, con el resultado de que sólo uno amplifica un producto, o que amplifique un producto a expensas del otro par.

Los productos amplificados de cada par no deben ser del mismo tamaño. Si lo son, deben ser marcados con colores diferentes. Sin embargo, aun cuando dos productos sean marcados con distintos colores, recomendamos que nunca se pongan dos de exactamente el mismo tamaño uno junto a otro ya que los picos pueden encimarse y hacer que la cámara no distinga el verdadero color del pico. Si desea una descripción de los picos encimados o los espectros del tinte fluorescente, consulte el manual del Analizador Genético ABI PRISM® 3100 o del Secuenciador de ADN ABI PRISM™ 377. Recomendamos, como regla general, que no haya contacto entre fragmentos de distintos colores y que se mantengan al menos 10 pares base de “amortiguación” entre el alelo más pequeño del SSR más grande y el alelo más grande del SSR más pequeño. En caso de fragmentos de distintos SSR marcados con el mismo color, recomendamos mantener 50 pares base de “amortiguación” entre los productos amplificados para que no haya confusión acerca de cuál fragmento pertenece a cuál SSR.

Cuando efectúe el *multiloading*, puede agregar productos de PCR sencillos o producidos por *multiplexing* (o una combinación de ambos) al mismo tubo al preparar las muestras antes de cargar el gel. Las mismas consideraciones en cuanto al tamaño se aplican a los fragmentos producidos por *multiloading* como a los fragmentos producidos por *multiplexing* (ver arriba). Además, como todos los fragmentos deben tener aproximadamente la misma potencia de señal, en las reacciones de *multiplexing* y *multiloading* es necesario correr un gel de prueba de los productos con el fin de diluir o concentrarlos, según se requiera, hasta que todos los fragmentos tengan la concentración óptima. Si están muy diluidos, no se podrán leer ni analizar con facilidad

después de la electroforesis; si están muy concentrados, sus picos excederán lo que la cámara puede leer. Esto causará un pico indefinido y ancho y el tamaño será inexacto; también causará más picos encimados de otros colores. Una vez corrido el gel de prueba, las potencias aproximadas de ese juego de iniciadores SSR probablemente se conservarán constantes durante por lo menos seis meses. Después las potencias pueden disminuir y habrá que incrementarlas. Las potencias relativas de los colorantes fluorescentes que comúnmente utilizamos en nuestros laboratorios son 6-FAM>HEX>TET. Esto se refleja en las cantidades de iniciadores que solemos utilizar en cada reacción (ver los Cuadros 1 y 2 en el sitio web del CIMMYT).

Preparación de las muestras

Para la preparación de las muestras se necesitan los siguientes reactivos:

- Formamida desionizada
- Amortiguador de carga (25mM EDTA, 50 mg/mL azul dextrano) (incluido en el kit de tamaño estándar)
- Estándar de tamaño GS 350 o GS 500 TAMRA (para el ABI 377) o ROX (para el ABI 3100)
- ADN muestra, proveniente de la reacción de PCR

Para preparar las muestras:

- a. Se prepara una mezcla de amortiguador de carga y formamida en proporción de 5:1.
- b. Se prepara el estándar de tamaño (FLS): 0.3 µl GS 350 o GS 500 (TAMRA o ROX) y 1.1 µl de amortiguador de carga-formamida.
- c. Las muestras se preparan mezclando 1.0 µl de la muestra (producto de PCR) y 1.3 µl de FLS.
- d. Desnaturalizar la mezcla resultante a 95°C durante 5 min; inmediatamente después se coloca y se mantiene sobre hielo hasta que se carga en el gel.

NOTA: Si la concentración de la muestra es muy alta (lo cual causará fragmentos muy intensos cuyos tamaños no podrán ser determinados por el secuenciador), ésta se puede diluir con H₂Odd estéril; o bien, cuando la concentración es muy baja, se pueden concentrar algunos microlitos a 65°C. No obstante, siempre se toma 1 µl de la muestra para mezclarlo con el FLS.

Electroforesis

Electroforesis en gel (Analizador Genético ABI PRISM™ 377)

Preparación del gel

Para preparar 50 ml de solución para la elaboración del gel de poliacrilamida al 4.5%, se usan los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad
Urea	18.0 g
Acrilamida al 40% (29:1) ^a	5.625 ml
H ₂ Odd	28.5 ml
Resina ^b	0.5 g
TBE 10X ^c	5.0 ml
APS al 10%	250 µl
TEMED	30.0 µl

^a Se usa acrilamida-bisacrilamida (29:1) Bio-Rad. Preparar la solución al 40% como se indica en el Manual de Usuario (sección 2.9).

^b Utilizar resina AG 501-X8 20-50 mesh de Bio-Rad.

^c Preparar el amortiguador 10X TBE según el Manual de Usuario (sección 2.9).

La solución de urea-acrilamida se prepara de acuerdo con el manual del secuenciador de ADN ABI PRISM™ 377 (sección 2.22). La modificación que hemos hecho aquí consiste en desgasificar la solución durante 5 min después de agregar el amortiguador TBE 10X. Es muy importante que el amortiguador no entre en contacto con la resina, ya que ésta destruye la efectividad del mismo.

NOTAS: La solución resultante es suficiente para preparar dos geles de 36 cm. Los agentes polimerizantes (APS y TEMED) se agregan justo antes de llenar el sistema "gel cassette". Es importante que todos los reactivos utilizados para elaborar el gel sean ultrapuros.

Preparación del sistema "gel cassette"

El montaje del sistema gel-cassette consta de cuatro etapas anotadas a continuación. Para instrucciones más detalladas, consulte la sección 2.13 del manual del usuario.

1. Limpieza de las placas de vidrio.
2. Montaje de las placas en el cassette.
3. Unión del dispositivo de inyección del gel al cassette.
4. Vaciado de la solución de acrilamida en la jeringa; permita que fluya hacia el gel y evite la formación de burbujas golpeando suavemente las placas de vidrio a medida que fluya el gel.

NOTA: Normalmente usamos peines de dientes cuadrados de 50 ó 66 pozos

Uso del Secuenciador de ADN ABI PRISM™ 377

Para correr el gel en el secuenciador es importante referirse a la sección 3 del manual del usuario para ver de forma detallada los pasos a seguir en la ejecución de la electroforesis.

- a. Preparar el gel cassette para la corrida (sección 3.5).
- b. Montar el gel cassette en la cámara de electroforesis (sección 3.8).
- c. Ejecutar el software ABI PRISM™ y crear una nueva corrida haciendo clic en NEW/GEN SCAN RUN.
- d. Checar las placas de vidrio y el gel con el fin de asegurar que no se produzcan picos por fluorescencia de partículas en las placas de vidrio o en el gel (usar la opción PLATE CHECK, sección 3.11).
- e. Llenar la cámara de electroforesis con amortiguador 1X TBE (sección 3.15).
- f. Conectar la placa de transferencia de calor (sección 3.15).
- g. Ejecutar la opción PRE-RUN; ésta tiene como finalidad equilibrar la temperatura del gel (sección 3.25). Durante esta etapa, la temperatura del gel aumenta hasta alcanzar 51 °C. La temperatura mínima a la cual se pueden cargar las muestras en el gel es de 38 °C.
- h. Cargar las muestras e iniciar la corrida (sección 3.26): Generalmente se cargan de 1 a 1.5 µl de cada muestra. Una vez que se han cargado las muestras, se deja pre-correr 2 min con el fin de que las muestras penetren en el gel. Finalmente, se ejecuta la opción RUN y empieza la recolección de datos.

NOTAS: Es importante mencionar que la duración de la corrida varía entre 1 y 2.5 horas dependiendo del tamaño de los fragmentos.

El gel se puede usar nuevamente para correr una prueba.

Se recomienda reiniciar la computadora y desconectarla de la red durante la corrida.

Es necesario que se llene una hoja de datos (sección 3.20 ó 4.16) antes de iniciar la corrida.

Limpeza del sistema después de cada corrida

Para limpiar el sistema después de cada corrida, ver la sección 3.32 del manual del usuario.

Análisis del gel

Una vez que la electroforesis ha concluido, es necesario preparar el gel para el análisis, como sigue. Se abre el gel y se le aplican las opciones "TRACK LANES" y "EXTRACT LANES". La opción "TRACK LANES" tiene como finalidad alinear cada carril y se puede hacer manual o automáticamente. La opción "EXTRACT LANES" tiene como finalidad extraer los valores de la intensidad de fluorescencia en cada carril, para que posteriormente al definir el estándar de tamaño, el programa asigne los valores de los tamaños de los fragmentos obtenidos (ver el manual del usuario para más información).

Sistema automatizado de electroforesis capilar (Analizador Genético ABI PRISM® 3100)

Cómo realizar una corrida de análisis de fragmentos

1. Montar el sistema de instrumentos como se describe en las secciones 3.11 y 3.19 del Manual del Usuario del Analizador Genético ABI PRISM® 3100, 2001.
2. Verificar y llenar las soluciones según se requiera. Antes de cada corrida, determine si tiene que agregar o cambiar el polímero y el amortiguador en el instrumento, como se describe en las secciones 2.13 a 2.16 de la Guía Quick Start del Analizador Genético ABI PRISM® 3100, 2001, o las secciones 3.20 a 3.23 del Manual del Usuario.

NOTAS: Como se indica en el manual, no deje burbujas en el bloque superior del polímero. Asimismo, asegúrese de eliminar todas las burbujas del bloque inferior, ya que podrían interrumpir el circuito eléctrico, calentando y destruyendo los bloques.

En el 3100 se recomienda reponer a diario el amortiguador de la corrida, pero nosotros lo reponemos cada segundo o tercer día sin afectar la resolución ni la calidad de los datos.

Sólo agregamos la cantidad de polímero que se requiere para una semana. Hay que planear muy bien las corridas. El polímero es el componente más costoso de toda la reacción.

3. Preparar las muestras como se describe en la Guía Quick Start (secciones 2.4 a 2.6) y el Manual del Usuario (secciones 3.8 a 3.10).

NOTAS: Para preparar la mezcla de formamida y estándar de tamaño usamos 1000 µl de formamida Hi-Di™ y 30 µl (en vez de 50) GS 350 o GS 500 ROX.

Para cargar mezclamos de 0.5 a 1.0 µl de los productos PCR combinados con 8 µl (en vez de 10) de la mezcla de formamida y estándar de tamaño.

4. Inicie y supervise la corrida como se describe en la Guía Quick Start (secciones 2.18 a 2.32) y el Manual del Usuario (secciones 3.27 a 3.60).

NOTA: Nosotros usamos un módulo de corrida con un tiempo más corto de corrida que lo especificado en el módulo *default* a fin de mejorar la eficiencia.

5. Para conservar el Analizador en buenas condiciones, seguimos las sugerencias dadas en el capítulo 5 de la Guía Quick Start o en el capítulo 8 del Manual del Usuario.

NOTA GENERAL: Ninguno de los dos manuales del Analizador Genético ABI PRISM® 3100 está completo. Algunos procedimientos se describen con mayor detalle en la Guía Quick Start y otros en el Manual del Usuario. Por eso, es buena idea siempre consultar los dos.

Protocolo para la quimioluminiscencia de los AFLP

(basado en los protocolos de Vos *et al.*, 1995. *Nuc. Acid Res.* 23:4407-4414, Greg Penner, AAFC, Winnipeg, y el sistema Digoxigenina de Enrico Perotti, CIMMYT)

Este protocolo para AFLP ha sido optimado para trigo hexaploide (harinero), pero también ha funcionado muy bien con el maíz, centeno, trigo tetraploide (duro) y *Tripsacum*. El uso de *PstI* en vez de *EcoRI* es de especial utilidad en el trigo hexaploide debido a su enorme genoma y el altísimo número de secuencias repetidas. Debido a que el *PstI* es sensible a la metilación, produce un menor número de bandas que un enzima como el *EcoRI*.

El sistema quimioluminiscente descrito aquí consiste en utilizar uno de los dos iniciadores selectivos marcados con digoxigenina. Después de efectuar la amplificación y la electroforesis en geles de secuenciación, los productos de la amplificación se transfieren a una membrana de nylon, y la mezcla de anti-Dig y fosfatasa alcalina y el sistema CSPD se usan para detectar los productos de amplificación en película de rayos X. Estos son los pasos a seguir:

1. Digestión del ADN con dos enzimas.
2. Ligazón de los adaptadores a los fragmentos de restricción.
3. Preamplificación utilizando iniciadores con una base selectiva para cada enzima de restricción.
4. Amplificación selectiva utilizando iniciadores con tres bases selectivas para cada enzima de restricción, una de ellas marcada con dig.
5. Electroforesis en geles de secuenciación.
6. Transferencia de los fragmentos amplificados.
7. Detección, exposición de la membrana a película de rayos X y revelado de la película.

Digestión del ADN

1. Obtener los siguientes componentes para la digestión **secuenciada** de ADN genómico con dos enzimas:

SOL. CONC.	[FINAL] o cantidad	50µl de RXN
H ₂ Odd	hasta 50 µl	hasta 50 µl
Amortiguador 10X para <i>MseI</i>	1X	5.0 µl
<i>MseI</i> (5 U/µl)	2.5 U/µg de ADN	0.5 µl
ADN genómico (0.3 µg/µl)	1 µg	15.0 or 4.5 µl
<i>PstI</i> (10 U/µl)	2.5 U/µg de ADN	0.25 µl
NaCl (2.5 M)	50 µM	1 µl

NOTA: Ajustar la cantidad de ADN dependiendo del tipo de extracción que se realizó: 15 µl para la extracción de savia y 4.5 µl para extracción de tejido liofilizado.

SOL. CONC.	[FINAL] o cantidad	50µl de RXN
H ₂ Odd	hasta 50 µl	39.9 µl
Amortiguador 10X para <i>MseI</i>	1X	5.0 µl
<i>MseI</i> (5 U/µl)	2.5 U/µg ADN	0.5 µl
ADN genómico (0.3µg/µl)	1 µg	3.35 µl
<i>EcoRI</i> (10 U/µl)	2.5 U/µg de ADN	0.25 µl
NaCl (5 M)	100 mM	1 µl

- Digerir el ADN con *MseI* y el amortiguador apropiado e incubar durante 3.5 a 4.0 h a 37°C.
- Agregar NaCl hasta llegar a 50 mM para *PstI* o 100 mM para *EcoRI*.
- Digerir el ADN con *PstI* o *EcoRI* a 37°C durante 2 h más (o toda la noche, si se trata de trigo) (si se digieren muchas muestras, preparar una mezcla de reacción con NaCl y la enzima).
- Inactive las enzimas a 70°C durante 15 min.

Verifique la calidad de la digestión cargando 5µl de cada ADN digerido + 2µl de 5XSGB en gel de agarosa al 0.7% e incluya un carril con 100 ng de φX174/*HaeIII* como marcador del peso molecular.

Ligazón de los adaptadores

- Si los adaptadores aún no se han alineado (es decir, dos oligos de un solo filamento que necesitan alinearse para formar un adaptador), hay que alinearlos siguiendo los pasos anotados a continuación. Este procedimiento debe realizarse una sola vez.

Prepare 50 µM de una solución concentrada de cada adaptador de *MseI forward* y *reverse*.

Prepare 5 µM de una solución concentrada de cada adaptador *PstI* o *EcoRI forward* y *reverse*.

Alínee los adaptadores para hacerlos de doble filamento, como sigue:

95°C durante 5 min
65°C durante 10 min
37°C durante 10 min

Saque las muestras, déjelas que lleguen a la temperatura ambiente y guárdelas a -20°C.

- Prepare la mezcla de ligazón, como sigue:

SOL. CONC.	[FINAL] o cantidad	10 µl de RXN volúmenes
H ₂ Odd	—	5 µl
Amortiguador de ligazón (5X)	1X	2 µl
Adaptor <i>MseI</i> (50 µM)	50 pmoles	1 µl
Adaptor <i>PstI</i> (o <i>EcoRI</i>) (5 µM)	5 pmoles	1 µl
Ligasa ADN T4 (1 U/µl)	1 U	1 µl

NOTA: El amortiguador de ligazón contiene 10 mM de ATP. Mantenga la ligasa **sobre hielo en todo momento**.

- Agregue 10 µl de la mezcla de ligazón a 50 µl (o 45 µl si corrió un gel de alta calidad) de ADN digerido. Incube a temperatura ambiente durante 2 h. Ahora puede proceder al paso de la preamplificación. Si no va a realizar la preamplificación de inmediato, mantenga la ligazón en el refrigerador hasta su utilización. Después de la preamplificación, mantenga la ligazón a -20°C.

Preamplificación del ADN

9. Prepare 21 μl de la siguiente mezcla de reacción para la preamplificación (las concentraciones se basan en una reacción de 25 μl después de agregar el ADN ligado):

SOL. CONC.	[FINAL] o cantidad	21 μl de RXN
H ₂ Odd	hasta 21 μl	12.75 μl
Amortiguador de polimerasa <i>Taq</i> (10X)	1X	2.50 μl
Iniciador pre-amp <i>MseI</i> (10 μM)	0.56 μM	1.40 μl
Iniciador pre-amp <i>PstI</i> (10 μM)*	0.56 μM	1.40 μl
Mezcla de dNTP (2.5 mM de cada uno)	0.2 mM de cada uno	2.00 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 mM	0.75 μl
Polimerasa <i>Taq</i> (5 U/ μl)	1 U	0.20 μl

* Igual para el iniciador pre-amp *EcoRI*.

10. Agregue 4 μl (66.67 ng) de ADN ligado a 21 μl de la mezcla de reacción para la reacción de preamplificación y, si fuera necesario, cubra cada muestra con 25 μl de aceite mineral.
11. Amplifique con el siguiente programa:

25 ciclos de: 94°C durante 30 seg
56°C durante 1 min
72°C durante 1 min

Verifique la ligazón y la preamplificación cargando 5 μl de cada ADN preamplificado + 2 μl de 5XSGB en un gel de agarosa al 1.0%, utilizando 100 ng de $\phi\text{X174}/\text{HaeIII}$ como marcador del peso molecular.

12. Agregue 80 a 100 μl de H₂Odd estéril a cada reacción después de completada la amplificación.

Amplificación selectiva de ADN

13. Prepare la siguiente mezcla de reacción de 18 μl (las concentraciones se basan en una reacción de 20 μl después de agregar 2 μl de ADN preamplificado):

SOL. CONC.	[FINAL] o cantidad	18 μl de RXN
H ₂ Odd	hasta 18 μl	11.65 μl
Amortiguador de polimerasa <i>Taq</i> (10X)	1X	2.00 μl
Iniciador de amp selec. <i>MseI</i> (5 μM)	0.25 μM	1.00 μl
Iniciador de amp selec. Dig- <i>PstI</i> (2 μM)*	0.1 μM	1.00 μl
Mezcla de dNTP (2.5 mM de cada uno)	0.2 mM de cada uno	1.60 μl
MgCl ₂ (50 mM)	1.5 mM	0.60 μl
Polimerasa <i>Taq</i> (5 U/ μl)	0.75 U	0.15 μl

* Los iniciadores selectivos *PstI* y *EcoRI* que se obtienen en el mercado están marcados con digoxigenina. Nosotros compramos iniciadores purificados con HPLC (HPLC-purified primers) (escala de 0.2 μmoles) de Operon.

14. Agregue 18 μl de la mezcla de reacción y 3 μl del producto preamplificado según el paso 12 y, si fuera necesario, cubra cada muestra con 25 μl de aceite mineral.

15. Amplifique con el siguiente programa:

10 ciclos de:	23 ciclos de:
94°C durante 60 seg	94°C durante 30 seg
65°C a 56°C durante 60 seg (reduciendo 1°C cada ciclo)	56°C durante 30 seg
72°C durante 90 seg	72°C durante 60 seg

Verifique la amplificación cargando 5 µl de cada ADN amplificado + 2 µl de 5XSGB en un gel de agarosa al 1.0%, utilizando 100 ng de ϕ X174/ *Hae*III como marcador del peso molecular.

Electrophoresis en gel

Nosotros usamos un aparato de secuenciación en gel de Bio-Rad. Es fácil vaciar los geles mediante una jeringa unida a un tubo conectado al fondo del gel.

- Limpiar las placas efectuando tres lavados con H₂Odd y dos con etanol al 70%. En cada lavado bañar la placa con un chorro de la solución y secar muy bien con toallas grandes de papel marca Kimwipes. Deje secar 5 min.
Póngase guantes y con una toalla grande Kimwipes bajo una campana extractora, aplique 1 ml de solución Bind-Silane recién preparada a la placa de vidrio. Póngase otro par de guantes y aplique 1 ml de Sigmacote (Sigma, cat. # SL-2) a la placa de plástico. Deje secar de 10 a 15 min. Limpie las placas otra vez lavando con EtOH al 70%. Deje secar de 3 a 5 min.
- Monte el molde. Selle el fondo con 5 ml de solución de acrilamida, más 7.5 µl de APS al 25% y 7.5 µl de TEMED. Deje que se polimerice durante 20 min.
- Prepare (o utilice una solución ya preparada) una solución de acrilamida al 6% y prepare una solución fresca de persulfato de amonio al 25% (APS).
- Agregue 80 µl de TEMED y 80 µl de APS al 25% a 80 ml de solución de acrilamida al 6%, y mezcle suavemente. No permita que se formen burbujas.
Coloque el peine en la tapa en posición invertida (es decir, con los dientes viendo hacia fuera), alrededor de 5 mm en el sandwich de vidrio. Tenga mucho cuidado de no dejar que se formen burbujas.
Una vez que el sandwich de vidrio está lleno de la solución de gel, coloque pinzas grandes a través de la parte superior del gel para lograr un sellado hermético.
- Permita que el gel se polimerice durante al menos una hora.
- Saque el peine y lave la parte superior del gel de forma secuencial con H₂Odd.
- Haga una precorrida del gel a 100 W durante alrededor de 1 h hasta que las placas lleguen a 50°C.
- Mientras tanto, prepare las muestras que se cargarán agregando 2 µl de solución interruptora (*DNA sequencing stop solution*) a 5 µl de la reacción de amplificación; luego desnaturalice a 95°C durante 5 min, y colóquelos sobre hielo de inmediato.
- Reinserte el peine de manera que los dientes de tiburón toquen apenas el gel en su parte superior. Ensamble el aparato de corrida y agregue 1X TBE a la cámara amortiguadora.
- Cargue muestras de 2.5 µl a 3.5 µl si utiliza un peine de 72 dientes o de 5 µl si utiliza uno de 49 dientes. Corra el gel a 120 W y saque el peine cuando las muestras hayan emigrado 3 cm. Mantenga la temperatura a 50°C durante al menos 3 h. Cuando la corrida haya concluido, deje que las placas se enfríen antes de separarlas.

Transferencia del gel (en seco)

26. Corte una membrana de nylon sin carga que mida 30 x 43 cm (nosotros utilizamos membranas de bajo costo como las *MSI Magna*) y deje remojar en 0.5X TBE.
27. Separe las placas de plástico de las de vidrio. El gel se pega a la placa de vidrio. Colóquelo en posición horizontal, con el lado del gel hacia arriba. Coloque la membrana remojada sobre el gel, preferiblemente con la ayuda de otra persona para poder colocarla de una vez en el lugar indicado y evitar moverla para ajustar su posición.
28. Elimine las burbujas de aire pasando con suavidad una pipeta de vidrio sobre la membrana. Coloque 3 filtros de papel grueso encima, luego una placa de plástico y luego un peso (no muy pesado porque podría deformar el gel).
29. Deje que se transfiera durante 4 h.
30. Desmonte el sistema de transferencia y enjuague la membrana con 0.5X TBE (optativo).
31. Seque la membrana durante 15 min a 65°C; enseguida reticule (*crosslink*) con UV en el reticulador de UV Stratagene a 120,000 μ joules o caliente a 95°C durante media hora.
32. Después de la transferencia, limpie las placas con NaOH (0.1 M) para eliminar el gel adherido a las placas.

Detección con CSPD de productos marcados con dig

33. Incube la membrana en 1 L del amortiguador 1 durante 5 min a temperatura ambiente agitando con suavidad.
34. Incube la membrana en 1 L del amortiguador 2 durante 30 min a temperatura ambiente agitando con suavidad.
35. Incube la membrana en 500 ml de solución anti-Dig durante 30 min a temperatura ambiente agitando con suavidad. Se puede utilizar una solución anti-Dig que haya sido usada dos o tres veces si se ha mantenido a 4°C.
36. Lávela dos veces en 1 L del amortiguador 1 durante 15 min a temperatura ambiente agitando con suavidad.
37. Equilibre la membrana en 1 L del amortiguador 3 durante 5 min a temperatura ambiente agitando con suavidad.
38. Incube la membrana en 500 ml de solución CSPD durante 25 min at RT agitándola de preferencia en la oscuridad.

NOTA: Se pueden incubar varias membranas al mismo tiempo para propósitos de detección.

39. Remueva la membrana de la charola (bandeja) del CSPD lentamente, dejando que la solución se escurra; luego colóquela, con el lado del ADN hacia abajo, sobre un pedazo de plástico GladWrap. Ponga otro pedazo de GladWrap encima como soporte; coloque una película de rayos X transparente del mismo tamaño de la membrana (nosotros utilizamos la incubación en cloro para quitarle la emulsión de plata a película de rayos X no útil) y selle las orillas en la parte trasera de la membrana.
40. Coloque la membrana en el cassette y expóngala a película de rayos X XAR-5 durante 4 a 8 h.
41. Revele la película durante 6 min en revelador GBX; enjuague con H₂O durante 30 seg, fíjela con un fijador GBX durante 3 min y enjuague durante 3 min bajo el chorro del agua.

Recomendaciones para los AFLP:

1. Mantenga los nucleótidos separados y en porciones alícuotas de 50 µl.
2. Haga pequeñas porciones alícuotas de todos los reactivos, suficientes para sólo tres experimentos.

MgCl ₂	100 µl
Amortiguador 10X	250 µl
Polimerasa <i>Taq</i>	25 µl
Amortig. de ligazón	100 µl
Adaptadores	50 µl
Iniciadores pre-amp	75 µl
Iniciadores de amplificación	100 µl

3. Mantenga las ligazones y preamplificaciones en el congelador a -20°C.

Secuencias de los adaptadores

*Mse*I-1 5' GACGATGAGTCCTGAG 3'

*Mse*I-2 5' TACTCAGGACTCAT 3'

*Eco*RI-1 5' CTCGTAGACTGCGTACC 3'

*Eco*RI-2 5' AATTGGTACGCAGTC 3'

*Pst*I-1 5' GACTGCGTAGGTGCA 3'

*Pst*I-2 5' CCTACGCAGTCTACGAG 3'

Secuencias de los iniciadores

Iniciadores de preamplificación

*Mse*I+N 5' GATGAGTCCTGAGTAAN 3'

*Eco*RI+N 5' GACTGCGTACCAATTCN 3'

*Pst*I+N 5' GACTGCGTAGGTGCAGN 3'

Iniciadores selectivos (nosotros usamos +3/+3, pero se puede usar +2/+3 or +2/+2)

*Mse*I+NNN 5' GATGAGTCCTGAGTAANNN 3'

*Eco*RI+NNN 5' GACTGCGTACCAATTCNNN 3'

*Pst*I+NNN 5' GACTGCGTAGGTGCAGNNN 3'

Solución de acrilamida al 6%

SOL. CONC.	[FINAL]	200 ml	300 ml	600 ml	1000 ml
Urea	42%	84.0 g	126.0 g	252.0 g	420.0 g
10X TBE	1X	20.0 ml	30.0 ml	60.0 ml	100.0 ml
Acrilamida al 40%	6%	30.0 ml	45.0 ml	90.0 ml	150.0 ml
H ₂ O		hasta 200.0 ml	hasta 300.0 ml	hasta 600.0 ml	hasta 1500 ml

Filtre con un filtro desechable. Esta solución puede mantenerse (de 1 a 2 meses) a 4°C en la oscuridad.

Nosotros compramos acrilamida:bisacrilamida 19:1 de Sigma (cat. # A-2917) para preparar solución de acrilamida al 40% "en la botella". De esta manera evitamos tener que pesar la acrilamida y la bisacrilamida por separado. Esta es una forma muy segura de preparar la solución.

Solución Bind-Silane

SOL. CONC.	[FINAL]	1.0 ml	2.0 ml	5.0 ml
H ₂ Odd		45 µl	90 µl	225 µl
Ácido acético glacial		5 µl	10 µl	25 µl
Alcohol absoluto		950 µl	1900 µl	4750 µl
Bind-silane*		5 µl	10 µl	25 µl

* 3-(Trimetoxisililo) propilmetacrilato, de Fluka.

Solución de persulfato de amonio al 25% (APS)

SOL. CONC.	[FINAL]	100 µl	200 µl	300 µl	400 µl
H ₂ Odd Sigma		100 µl	200 µl	300 µl	400 µl
APS	25%	25 mg	50 mg	75 mg	100 mg

Solución interruptora (stop solution)

SOL. CONC.	[FINAL]	1500 µl
5M NaOH	10 mM	3.0 µl
Formamida al 99%	95%	1439.0 µl
Azul de bromofenol	0.05%	1.5 mg
Cianol de xileno	0.05%	1.5 mg
H ₂ Odd		61.0 µl

NOTA: Haga porciones alícuotas y mantenga a 4°C.

Amortiguador 1

SOL. CONC.	[FINAL]	500 ml	1000 ml	2000 ml	4000 ml
1 M Tris-HCl, pH 7.5	0.01 M	5.0 ml	10.0 ml	20.0 ml	40.0 ml
5 M NaCl	0.15 M	15.0 ml	30.0 ml	60.0 ml	120.0 ml

Amortiguador 2

SOL. CONC.	[FINAL]	500 ml	1000 ml	2000 ml	4000 ml
1 M Tris-HCl, pH 7.5	0.01 M	5.0 ml	10.0 ml	20.0 ml	40.0 ml
5 M NaCl	0.15 M	15.0 ml	30.0 ml	60.0 ml	120.0 ml
Leche sin grasa en polvo*	1-2%	5-10 g	10-20 g	20-40g	40-80 g

* Nosotros usamos leche desgrasada en polvo marca Carnation (Clavel) (baja en colesterol, natural) por ser menos costosa que el reactivo bloqueador de Boehringer.

Amortiguador 3

SOL. CONC.	[FINAL]	100 ml	200 ml	500 ml	1000 ml
1 M Tris-HCl, pH 9.5	0.10 M	10.0 ml	20.0 ml	50.0 ml	100 ml
5 M NaCl	0.10 M	2.0 ml	4.0 ml	10.0 ml	20 ml

Someta la solución al autoclave antes de usarla o use soluciones y H₂Odd ya esterilizadas en el autoclave.

Anti-Dig (1:15000)

Amortiguador 2 + 1 µl/15 ml anti-Dig (Anti-digoxigenina-AP, Boehringer Mannheim, cat. # 1093274, 150 Unidades/200 µl). Esta solución puede volverse a usar hasta tres veces dentro de pocos días si se mantiene a 4°C.

Solución CSPD (2 µl/ml)

Amortiguador 3 + 2 µl/ml CSPD (Tropix, cat. # CD100R, 10 mg/ml)

NOTA: La solución CSPD ya diluida debe almacenarse a 4°C en una botella envuelta en papel aluminio. Puede volverse a usar de 5 a 10 veces si se filtra a través de un filtro esterilizado después de cada uso para evitar la contaminación.

Detección de secuencias de ADN transgénico en el maíz

Las secuencias de ADN transgénico pueden ser detectadas mediante la reacción de polimerización en cadena (PCR) o, si son expresadas, por medio del ensayo de inmunosorbencia ligada a la enzima (ELISA). La PCR se corre usando iniciadores específicos para eventos transgénicos, como los enumerados en el cuadro que sigue. Todo el maíz transgénico que ha sido lanzado al comercio o sembrado en una superficie considerable en algún momento desde la primera vez que fueron liberados los transgénicos comerciales (en 1996) contiene el gene Bar (PAT), el promotor CaMV 35S o la secuencia de terminación NOS y, por tanto, todos los eventos pueden ser detectados utilizando estos tres promotores. Todos los eventos salvo uno (el GA21) pueden ser identificados mediante el Bar o el 35S. Sin embargo, algunas de las líneas más recientes que serán lanzadas al mercado en un futuro muy cercano no contienen ninguna de estas dos secuencias. En consecuencia, será necesario ensayar más iniciadores para poder detectar también la presencia de esas secuencias de ADN. Se puede correr la PCR normal en ADN de la muestra para detectar la presencia o ausencia de las secuencias transgénicas; la RealTime PCR puede correrse para cuantificar la cantidad de ADN transgénico presente en una muestra dada. Ahora bien, la RealTime PCR debe correrse sólo después de realizar la PCR normal o ELISA para verificar que la muestra es, en realidad, transgénica, ya que resulta muy costoso correr esa prueba.

Resumen de todos los eventos transgénicos presentes en el maíz que han sido aprobados para ser ensayados en campo, y si alguno se fabrica para el mercado en algún país (a 29 de noviembre de 2002).

Evento	Empresa	Gene(s)	Promotor (es)	Secuencia(s) de terminación	¿Se comercializa?
176	Syngenta	cry1Ab bar bl	35S 35S bp	35S 35S (ninguno)	No
676, 678, 680	Pioneer	pat DAM	35S 512del	(ninguno) ppII	No
B16 (DLL25)	DeKalb	pat bla	35S bp	tDNA-Tr7 (ninguno)	No
BT11 (X4334CBR, X4734CBR)	Syngenta	pat cry1Ab	35S 35S	NOS NOS	Sí
CBH-351	Aventis	bar cry9c bla	35S 35S bp	NOS 35S (ninguno)	No
DBT418	DeKalb	bar cry1Ac pinII bla	35S 35S 35S bp	tDNA-Tr7 ppII ppII (ninguno)	No
GA21	Monsanto	EPSP	Actin	NOS	No
MON80100	Monsanto	GOXv247 cry1Ab EPSPS neo	35S 35S 35S bp	NOS NOS NOS (ninguno)	No
MON802	Monsanto	GOXv247 cry1Ab EPSPS neo	35S 35S 35S bp	NOS NOS NOS (ninguno)	No

Evento	Empresa	Gene(s)	Promotor (es)	Secuencia(s) de terminación	¿Se comercializa?
MON809	Pioneer	GOXv247	35S	NOS	No
		cry1Ab	35S	NOS	
		EPSPS	35S	NOS	
		neo	bp	(ninguno)	
MON810	Monsanto	cry1Ab	35S	(ninguno)	Sí
MON832	Monsanto	GOXv247	35S	NOS	No
		EPSPS	35S	NOS	
		neo	bp	(ninguno)	
MON863	Monsanto	cry3Bb1	35S	Ahsp17	No
		neo	35S	NOS	
MS3	Aventis	bar	35S	NOS	No
		barnase	pTa29	(ninguno)	
MS6	Aventis	bar	35S	NOS	No
		barnase	pTa29	(ninguno)	
		bla	pb	(ninguno)	
NK603	Monsanto	EPSPS	Actin	NOS	No
		EPSPS	35S	NOS	
T14, T25	Aventis	pat	35S	35S	Sí
		bla	bp	(ninguno)	
TC1507	Dow/Pioneer	pat	35S	35S	No
		cry1Fa2	Ubiquitin	ORF25	

Protocolos para detectar secuencias de ADN transgénico mediante la PCR

Las poblaciones que se someterán a prueba se examinan para detectar la presencia del promotor CaMV 35S y la secuencia codificadora bar, que son fragmentos de ADN encontrados en la mayoría de los maíces transgénicos comerciales, pero que no ocurren en forma natural en el genoma del maíz. Se cosechan hojas individuales de cada planta de cada población y se extrae el ADN siguiendo el protocolo de la extracción de savia descrito en este manual (vea la p. 5). Cuantifique y mezcle el ADN en el mismo tubo para formar mezclas de 10 a 15 plantas cada una. Amplifique las mezclas utilizando la PCR (el método más sensible para detectar fragmentos de ADN) y un iniciador específico para el promotor CaMV 35S o la región codificadora bar. Use las siguientes secuencias iniciadoras:

35S	GCTCCTACAAATGCCATCA	GATAGTGGGATGTGCGTCA
bar	GTCTGCACCA TCGTCAACC	GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC

Para medir la sensibilidad del análisis, debe extraerse también el ADN aislado de una planta que se sabe es transgénica y que contiene el promotor CaMV 35S. Mezcle el ADN de la planta transformada con el ADN de una planta no transformada en una proporción de 1:14 (ADN transformado a ADN no transformado). Someta el ADN amplificado a la electroforesis y obsérvelo en geles de agarosa, de acuerdo con los procedimientos anotados en este manual (vea la p. 18). Con esta mezcla de ADN es posible detectar la presencia del promotor CaMV 35S. Es más, se puede detectar, en las muestras que componen una mezcla, la presencia hasta de una sola planta transformada entre las 15 que conforman la mezcla.

Para asegurar que las reacciones están operando de manera correcta, amplifique todas las muestras de ADN usando un iniciador correspondiente a un fragmento de ADN que se sabe ocurre naturalmente en el genoma del maíz (por ejemplo, uno de tres marcadores SSR: phi96100, phi056 o ssr64). Por último, para comprobar si la secuencia iniciadora CaMV en realidad amplifica

un fragmento de ADN específico en el maíz transgénico, amplifique el ADN de un control positivo que se sabe contiene el promotor CaMV 35S y córralo en todos los geles en los que se ensayan materiales nuevos.

Extracción de ADN

Para extraer ADN de plantas individuales, corte pedazos de hoja de plántulas de 3 semanas de edad. Extraiga el ADN utilizando el método del extractor de savia descrito en la p. 5 de este manual. Corra el ADN de 65 plantas escogidas al azar en un gel y examine la calidad y cantidad del ADN, comparándolas con una cantidad estándar de ADN (del plásmido Lambda cortado con *HindIII*). Use ADN solo en la cantidad y calidad adecuadas para la amplificación con PCR.

Condiciones para la PCR

Amplifique el ADN en reacciones de 20 microlitros (μl) que contengan los siguientes componentes:

H ₂ O	5.6 μl
Amortiguador 10X <i>Taq</i> , sin Mg	2.0 μl
MgCl ₂ (50 mM)	1.0 μl
Mezcla de dNTP (2.5 mM de cada uno)	1.2 μl
Enzima <i>Taq</i> (5 U/ μl)	0.2 μl
Iniciadores, F+R (1.0 μM de cada uno)	5.0 μl
ADN (10 ng/ μl)	5.0 μl

Amplifique el ADN con un DNA Engine Tetrad System Thermocycler de MJ Research de acuerdo con los siguientes parámetros:

1 ciclo de:	30 ciclos de:	1 ciclo de:
93°C durante 1 min	93°C durante 30 seg	72°C durante 5 min
	62°C* durante 1 min	
	72°C durante 1 min	

* Temperatura de alineamiento para los iniciadores de promotores 35S. Amplifique el iniciador de control, Phi96100, a una temperatura de alineamiento de 56°C.

Condiciones para la electroforesis

Someta el ADN amplificado a la electroforesis en un gel de agarosa al 2% y tíñalo con bromuro de etidio para observarlo, de acuerdo con los protocolos normales de nuestro laboratorio (vea los Protocolos para STS y SSR en la p. 38).

El ADN de control

Debe usarse un control positivo (por ejemplo, el ADN de una planta transgénica). En el CIMMYT utilizamos Event 5601, que se sabe que contiene el promotor CaMV 35S como parte del *construct* transgénico. Cuando se le amplifica con este promotor, se puede observar un fragmento con 195 pares base.

Protocolos para detectar secuencias de ADN transgénico con ELISA

Materiales requeridos

- Un kit¹ de ELISA para detectar el evento de interés
- Materiales que serán sometidos a prueba (semilla o tejido foliar)
- Equipo de molienda y extracción
- Un recipiente de plástico con sello hermético (cámara húmeda)
- Toallas de papel
- Agua destilada
- Micropipetas y una pipeta multicanal que mida 50 y 100 ml
- Puntas de micropipeta estériles
- Un cilindro con graduaciones
- Una báscula de 1 a 500 g
- Una rejilla para los tubos con muestras
- Tubos de centrifugación
- Bolsas de extracción para las muestras
- Centrífuga con 5000 g de capacidad
- Lector de placas de microtitulación
- Botella de lavado
- Agitador orbital de placas
- Una muestra de un diagrama de carga

Procedimiento de muestreo

Realizar correctamente un muestreo es el primer paso –y el más importante– para hacer un uso apropiado de los kits comerciales y obtener resultados confiables. Los kits cuantitativos permiten hacer una mezcla de un número definido de granos o de porciones de tejido foliar. El muestro debe realizarse dependiendo de la cantidad de material, el nivel de detección requerido y el nivel de detección del kit.

La Administración de Inspección de Granos, Empacadoras y Corrales (Grain Inspection, Packers, Stockyards Administration, GIPSA) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) proporciona información científica completa sobre el muestreo de semilla para la detección de organismos modificados genéticamente (OMG) en el siguiente sitio de la web: http://151.121.3.117/biotech/sampling_grains_for_biotechnolog.htm.

Extracción de tejido foliar

Las hojas se recolectan del campo o el invernadero. En ambos casos deben mantenerse en frío en un contenedor térmico durante su transporte al laboratorio.

Muestras de hojas individuales

Pese cada muestra foliar y colóquela en una bolsa de extracción con la cantidad apropiada del amortiguador de extracción correcto, como se indica en el protocolo del kit. Asegúrese de rotular cada bolsa claramente. Muela cada muestra con la ayuda de un homogenizador de tejido o con la mano de un mortero hasta extraer toda la savia. Esta savia puede usarse de inmediato, conservarse durante unas horas a 4°C o congelarse a -20°C durante unos cuantos días.

¹ Los kits se pueden comprar en AGDIA (<http://www.agdia.com/>), ENVIROLOGIX (http://www.envirologix.com/artman/publish/cat_index_2.shtml) o NEOGEN (<http://www.neogeneurope.com/>).

Muestras de muchas hojas

Se recomienda utilizar un disco foliar o una perforación foliar representativa para tomar muestras foliares compuestas (incluir hasta el número de hojas indicado en el protocolo del kit, no más). Apile las hojas sobre una superficie limpia y con un taladro de corchos (de 5 mm de diámetro) perforo las hojas hasta producir el número requerido de discos. Saque los discos del taladro de corchos con un alambre limpio, pese los discos y transfíeralos a una bolsa de extracción. Agregue el amortiguador de extracción de acuerdo con la proporción recomendada. El peso de los discos varía según las condiciones de crecimiento, edad, variedad y origen (invernadero o el campo) de la planta.

Extracción de semilla

Extracción de una sola semilla

Triture la semilla con un triturador o un martillo. Pésela y colóquela en una bolsa de extracción con la cantidad recomendada del amortiguador de extracción. Deje reposar el extracto durante al menos 30 seg antes de iniciar la prueba.

Extracción de muchas semillas

Para moler muestras mezcladas de semilla, se recomienda usar una licuadora (marca Osterizer® o un molino de café, de bolita, etc.) que tenga un recipiente adecuado. Ponga el número de semillas indicado en el protocolo del kit en el aparato de molienda, pulverice la semilla, agite el recipiente para mezclarla y verifique que no queden semillas sin moler. Transfiera el polvo a otro recipiente y pese la cantidad especificada (la submuestra); agregue la proporción recomendada del amortiguador de extracción, cierre el recipiente y agítelo durante 10 a 15 seg. Deje reposar al menos 30 seg antes de realizar la prueba. Use sólo la capa sobrenadante (la capa superior del líquido). Para lograr un mejor resultado, centrifugue la muestra extraída a 5000 g durante 5 min para obtener una capa sobrenadante más limpia.

Protocolo de ensayo

Siga el protocolo indicado en el kit. Lea bien las instrucciones antes de comenzar y asegúrese de tener todo lo necesario a la mano: amortiguadores, controles, diagrama de carga, micropipetas, etc.

Ejemplo de un diagrama de carga

Diagrama de carga para ELISA

Fecha:

Experimento:

ID de la placa:

Operador:

Evento:

Kit:

Dilución muestra:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Identificación de la muestra

1A	_____	5A	_____	9A	_____
1B	_____	5B	_____	9B	_____
1C	_____	5C	_____	9C	_____
1D	_____	5D	_____	9D	_____
1E	_____	5E	_____	9E	_____
1F	_____	5F	_____	9F	_____
1G	_____	5G	_____	9G	_____
1H	_____	5H	_____	9H	_____
2A	_____	6A	_____	10A	_____
2B	_____	6B	_____	10B	_____
2C	_____	6C	_____	10C	_____
2D	_____	6D	_____	10D	_____
2E	_____	6E	_____	10E	_____
2F	_____	6F	_____	10F	_____

2G _____	6G _____	10G _____
2H _____	6H _____	10H _____
3A _____	7A _____	11A _____
3B _____	7B _____	11B _____
3C _____	7C _____	11C _____
3D _____	7D _____	11D _____
3E _____	7E _____	11E _____
3F _____	7F _____	11F _____
3G _____	7G _____	11G _____
3H _____	7H _____	11H _____
4A _____	8A _____	12A _____
4B _____	8B _____	12B _____
4C _____	8C _____	12C _____
4D _____	8D _____	12D _____
4E _____	8E _____	12E _____
4F _____	8F _____	12F _____
4G _____	8G _____	12G _____
4H _____	8H _____	12H _____

Minipreparaciones de plásmidos

(basado en el método de Birnboim y Doly, 1979¹)

1. Incube un cultivo bacteriano en 10 ml de medio LB y un antibiótico apropiado hasta el día siguiente.
2. Coseche las células centrifugando todo el cultivo en un tubo de 15 ml para centrifugadora durante 5 min a velocidad máxima en una centrifugadora de mesa (1300-1500 x g). Deseche la capa sobrenadante.
3. Vuelva a suspender el precipitado de células revolviendo en el Vortex y agregue 200 µl de la solución I que contenga 5 mg/ml de lisozima (agregue la lisozima una hora, o menos, antes de la utilización). Revuelva y deje a la temperatura ambiente durante 5 min. Es más fácil volver a suspender las células si se las revuelve en el Vortex antes de agregar la mezcla de lisozima.
4. Agregue 400 µl de la solución II, mezcle suavemente (no en el Vortex) e incube 15 min sobre hielo.
5. Agregue 300 µl de la solución III, mezcle suavemente (no en el Vortex) e incube 15 min sobre hielo.
6. Centrifugue 15 min a velocidad máxima en la centrifugadora de mesa; vierta la capa sobrenadante en un tubo de 1.5 ml para microcentrifugadora.
7. Agregue 600 µl de isopropanol muy frío; mezcle y deje reposar a -20°C durante 1 h o a -80°C durante 30 min. Centrifugue 5 min a velocidad máxima en la microcentrifugadora (~12,000 rpm), vierta la solución y seque el tubo.
8. Vuelva a disolver el precipitado en 190 µl de dH₂O. Esto puede colocarse en un Vortex, mezclando suavemente durante 45 min.
9. Agregue 5 µl de 1 mg/ml de ARNasa A y 5 µl de 500 U/ml de ARNasa T1. Incube a 37 °C (o a la TA) durante 15 min.
10. Agregue 10 µl de 5 mg/ml de Proteinasa K. Incube a 37 °C (o a la TA) durante 20 min.
11. Extraiga con 200 µl de fenol [o 200 µl de fenol/cloroformo (1:1)].
12. Centrifugue durante 4 min a velocidad máxima en la microcentrifugadora (~12,000 rpm). Transfiera la capa (superior) acuosa a otro tubo para microcentrifugadora.
13. Agregue 100 µl de 7.5 M NH₄OAc para precipitar el ADN.
14. Agregue 800 µl de EtOH absoluto muy frío; mezcle suavemente e incube a -80 °C durante 30 min. Centrifugue 5 min a velocidad máxima en la microcentrifugadora y deseche la capa sobrenadante.
15. Lave el precipitado con 1 ml de 75% EtOH; centrifugue 4 min en la microcentrifugadora. Deseche la capa sobrenadante y seque el tubo en el desecador de vacío (durante 20 a 30 min).
16. Disuelva el precipitado en 50 µl de TE-8.0.

¹ Birnboim, H.C. y J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research* 7:1513-1518.

Cuantificación del ADN con UV

Los plásmidos generalmente se cuantifican utilizando un mini-fluorómetro, pero un espectrofotómetro también se puede emplear, como sigue.

Agregue 5 µl de cada muestra a 745 µl de TE; lea la DO260 y la DO280 para determinar la pureza. Diluya la muestra con TE a 1 µg/µl o 100 ng/µl. Conserve a -20 °C. Se podrá usar la muestra durante un período de hasta 6 meses. (Vea el programa del espectrofotómetro de Beckman en la p. 77.)

Solución I: 25 mM Tris-8.0, 10 mM EDTA, 50 mM glucosa

SOL. CONC.	10 ml	20 ml	30 ml	40 ml	50 ml
1.0 M Tris-8.0	250 µl	500 µl	750 µl	1000 µl	1250 µl
0.5 M EDTA-8.0	200 µl	400 µl	600 µl	800 µl	1000 µl
Glucosa	90 mg	180 mg	270 mg	360 mg	450 mg

NOTA: La solución I se puede preparar como una solución concentrada 10X y conservarse distribuida en pequeñas partes alícuotas a -20 °C, para su uso posterior. Cuando la vaya a usar, descongélela, dilúyala y agregue la lisozima.

Solución II: 0.2 M NaOH, 1.0% SDS

SOL. CONC.	100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	500 ml
1.0 M NaOH	20 ml	40 ml	60 ml	80 ml	100 ml
20% SDS	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml

Solución III: 3 M KOAc, pH de 5.5

Disuelva 29.5 g de acetato de potasio en 60 ml de dH₂O. Agregue suficiente ácido acético glacial para llevar el pH a 5.5 (aproximadamente 11 ml). Complete el volumen final hasta tener 100 ml.

Aislamiento de insertos de plásmidos

1. Prepare la mezcla de reacción para digestión usando la enzima apropiada (*Pst*I, *Sal*I, etc.) y corrija el amortiguador para enzima.

SOL. CONC.	[FINAL]	Por cada 30 μ l de RXN
H ₂ O	—	1.75 μ l
Amortiguador 10X	1X	3.00 μ l
0.1 M espermidina	2.5 mM	0.75 μ l
Enzima (10 U/ μ l)	25 U	2.50 μ l
Plásmido (1 μ g/ μ l)	22 μ g	22.00 μ l

2. Agregue la mezcla de reacción a un tubo de 500 μ l para microcentrifugadora, que contenga plásmidos, e incube a 37 °C durante 2 a 3 horas. Da mejor resultado un horno a 37 °C porque es mínima la condensación en las paredes del tubo.
3. Interrumpa la reacción agregando 6 μ l de 5X SGB que contenga sólo el colorante cianol de xileno.
4. Retire 1 μ l (650 ng de plásmido) que se usará para determinar el PM del inserto. Efectúe la electroforesis en gel de agarosa normal al 1% con digesto *Hae*III de ϕ X174 como patrón del PM (vea la p. 14).
5. Prepare un gel de agarosa al 1.1% de BPF. Caliente la agarosa más lentamente que lo normal para reducir la formación de espuma. Una vez establecido el gel, ponga a 4 °C para enfriar. El gel, la solución amortiguadora para la corrida, y las soluciones para coloración y decoloración deben conservarse a 4 °C antes de la corrida y durante ésta. Incluya EtBr en el gel y la solución amortiguadora.
6. Retire el gel del refrigerador y cargue las muestras (esto puede hacerse a la TA). Colóquelo en un aparato pre-enfriado para gel y corra en frío a 40 mA hasta que el colorante haya emigrado unos 2 cm (en un gel a 1.1%, el pUC18, 2700 pb, correrá justo hasta abajo del cianol de xileno). Verifique la separación con una lámpara portátil de UV después de 30 min (si efectúa la corrida en un minigel).
7. Cuando se visualicen las bandas, es mejor minimizar la exposición a la UV ya sea con una lámpara de mano de UV de onda larga o dejando el gel en una charola (bandeja) transparente a la UV que se coloca sobre un transiluminador.
8. Marque rápidamente las bandas de los insertos introduciendo en el gel una porción de 1.5 pulgadas de un popote (una pajilla) de plástico alrededor de cada inserto.
9. Una vez marcados todos los insertos, apague la luz UV. Retire cada popote del gel e introduzca la parte de agarosa contenida en el popote en un tubo con tapa de rosca, usando una pipeta P-200 (coloque el cilindro en el extremo del popote y presione el émbolo para empujar el contenido del popote dentro del tubo). Los tubos Sarstedt (# 72.694/006) se cierran herméticamente y tienen una superficie conveniente para escribir.
10. Suponiendo que usted conoce el PM del inserto y ha obtenido una digestión del 100%, diluya cada muestra en dH₂O hasta llegar a la concentración deseada (10 ng/ μ l). Estime el volumen final usando las marcas en los tubos Sarstedt.
11. Fusione la mezcla de agua y agarosa mediante el calentamiento a 65-70 °C durante 5 a 10 min. Revuelva en el Vortex y almacene a 4 °C en tubos cerrados herméticamente. En estas condiciones, los insertos son estables para el oligomarcado durante varios años.

Preparación de células competentes congeladas

Se recomienda este protocolo para la producción de grandes cantidades de células competentes de eficiencia mediana para la subclonación rápida de insertos individuales.

1. Cultive hasta el día siguiente la cepa deseada en 5 ml de medio LB (sin antibiótico).
2. Diluya el cultivo obtenido en medio LB (sin antibiótico) en una proporción de 1:100 y agítelo a 37 °C hasta que la DO600 llegue a 0.3-0.4.
3. Transfiera las células a botellas de 250 ml para centrifugadora y enfríe sobre hielo durante 10 min.
4. Centrifugue las células durante 7 min a 3500 rpm a 4 °C.
5. Elimine con cuidado la capa sobrenadante y vuelva a suspender el precipitado pipeteando con suavidad 5 ml de 10 mM MgCl₂ estéril y muy frío. Una vez que las células están nuevamente en suspensión, agregue otros 120 ml de 10 mM MgCl₂.
6. Centrifugue las células durante 7 min a 3500 rpm a 4 °C.
7. Elimine con cuidado la capa sobrenadante y vuelva a suspender el precipitado pipeteando con suavidad 5 ml de 50 mM CaCl₂, 20% de glicerol, estériles y muy fríos. Una vez que las células están nuevamente en suspensión, agregue otros 5 ml de 50 mM CaCl₂, 20% de glicerol.
8. Coloque sobre el hielo durante al menos 1 h.
9. Transfiera porciones iguales de 400 µl de células a tubos individuales de 500 µl para microcentrifugadora, esterilizados.
10. Congele rápidamente las células en hielo seco/baño de etanol (o en etanol a -80 °C) y conserve a -80 °C hasta que vayan a usarse.

10 mM MgCl₂

SOL. CONC.	100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	500 ml
1.0 M MgCl ₂	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml
H ₂ Odd	99 ml	198 ml	297 ml	396 ml	495 ml

50 mM CaCl₂, 20% de glicerol

SOL. CONC.	100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	500 ml
1.0 M CaCl ₂	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml
Glicerol	20 ml	40 ml	60 ml	80 ml	100 ml
H ₂ Odd	75 ml	150 ml	225 ml	300 ml	375 ml

Preparación de células competentes frescas

Se recomienda este protocolo para la producción de células competentes de eficiencia bastante alta, para la clonación confiable de insertos individuales de ADN genómico digerido en experimentos de construcción de genotecas. Cuando es posible obtenerlas, también recomendamos el empleo de las células competentes disponibles en el comercio para la construcción de genotecas. Estas células son excelentes para los experimentos de subclonación.

1. Cultive hasta el día siguiente la cepa deseada en 10 ml de medio LB (sin antibiótico), dos días antes del empleo previsto de las células.
2. Diluya 1.5 ml del cultivo obtenido al día siguiente en 40 ml de medio LB precalentado a 37 °C.
3. Agite a 37 °C hasta que la DO600 llegue a 0.4-0.6 (unas 2.5 a 3 h).
4. Transfiera las células a un tubo de 50 ml para centrifugadora (por ejemplo, marca Corning) y enfríe sobre hielo por 20 min.
5. Centrifugue la suspensión de células durante 15 min a 3000 rpm a 4 °C.
6. Elimine con cuidado la capa sobrenadante y vuelva a suspender el precipitado pipeteando con suavidad 20 ml de 50 mM CaCl₂ esterilizado y muy frío. Use la punta de la pipeta para volver a suspender con suavidad las células.
7. Enfríe sobre hielo durante 20 min.
8. Centrifugue la suspensión de células durante 15 min a 3000 rpm a 4 °C.
9. Elimine con cuidado la capa sobrenadante y vuelva a suspender el precipitado pipeteando con suavidad 4 ml de 100 mM CaCl₂ esterilizado y muy frío. Use la punta de la pipeta para volver a suspender con suavidad las células.
10. Coloque sobre hielo y mantenga en el refrigerador hasta usarla la mañana siguiente.

50 mM CaCl₂

SOL. CONC.	100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	500 ml
1.0 M CaCl ₂	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml
H ₂ O _{dd}	95 ml	190 ml	285 ml	380 ml	475 ml

100 mM CaCl₂

SOL. CONC.	100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	500 ml
1.0 M CaCl ₂	10 ml	20 ml	30 ml	40 ml	50 ml
H ₂ O _{dd}	90 ml	180 ml	270 ml	360 ml	450 ml

Transformaciones bacterianas

1. Agregue 40 ng de ADN de plásmido a 20 μ l de células competentes descongeladas.
2. Mezcle muy suavemente.
3. Coloque sobre hielo durante 20 a 30 min.
4. Provoque un choque de calor a 42 °C durante 40 segundos en baño de María.
5. Coloque sobre hielo durante 10 min.
6. Agregue 80 μ l de medio LB (sin antibióticos).
7. Agite durante 2 a 4 h a 225 rpm a 37 °C.
8. Disemine en forma pareja las células sobre LB + el antibiótico adecuado en una charola (bandeja).
9. Cultive hasta el día siguiente a 37 °C (o hasta que se vean con nitidez las colonias).

NOTA: Una vez que se descongelan las células competentes deben descartarse si no se utilizan. No vuelva a congelarlas.

Soluciones concentradas de uso general

1 M NH₄OAc: 1 M acetato de amonio

Disuelva 7.71 g de acetato de amonio (PM = 77.08) en dH₂O para obtener un volumen final de 100 ml. Esterilice mediante filtración.

7.5 M NH₄OAc: 7.5 M acetato de amonio

Disuelva 57.83 g de acetato de amonio (PM = 77.08) en dH₂O para obtener un volumen final de 100 ml. Esterilice mediante filtración.

1 M CaCl₂: 1 M cloruro de calcio

Disuelva 11.0 g de CaCl₂ (PM anhidro = 110.0) en dH₂O para obtener un volumen final de 100 ml. Esterilice en autoclave.

Mezcla de DNTP (2.5 mM cada uno de dCTP, dGTP, dATP y dTTP)

Recomendamos utilizar un juego de trifosfato de deoxynucleosida, grado PCR (Roche, cat. 1969064). Cada juego trae cuatro tubos individuales que contienen dCTP, dGTP, dATP y dTTP a una concentración de 100 mM. Para hacer la mezcla, colocar 250 µl de cada nucleótido en un tubo de 10 ml y agregar 9000 µl de H₂Odd estéril (Sigma, cat. W3500) para obtener una concentración de 2.5 mM de cada uno.

Hacer alícuotas de 1 ml y marcar cada tubo con un punto de distinto color (rojo, dTTP; azul, dCTP; negro, dATP y verde, dGTP) para indicar el contenido. Almacenar a -20°C.

Para hacer soluciones (10 mM) de un solo nucleótido, mezclar 250 µl de cada uno (100 mM) por separado con 2,250 µl de H₂Odd estéril. Hacer alícuotas y rotular. Almacenar a -20°C.

0.1 M DTT: 0.1 M ditioneitol en acetato de sodio

Disuelva 1.55 g de ditioneitol en 10 ml de 0.01 M NaOAc-5.2. Diluya 1:10 con 0.01 M NaOAc-5.2. Esterilice mediante la filtración. Almacene en alícuotas de 100 µl a -20 °C.

0.5 M EDTA-8.0

Disuelva 186.12 g de Na₂EDTA·2H₂O (PM = 372.24) en aprox. 750 ml de dH₂O. Agregue precipitados de NaOH para llevar el pH a 8.0. Una vez que el EDTA está en solución, complete hasta 1000 ml con dH₂O. Esterilice en autoclave.

10 mg/ml bromuro de etidio

Disuelva 100 mg de bromuro de etidio en 10 ml de dH₂O. Envuelva el tubo en papel de aluminio y almacene a 4 °C.

ADVERTENCIA: El bromuro de etidio es en extremo mutagénico

20% laurilsarcosina

Disuelva 200 g de N-laurilsarcosina (sal sódica, PM = 293.4, Sigma #L5125) en dH₂O para obtener un volumen final de 1000 ml. Revuelva durante varias horas para disolver por completo. Esterilice mediante filtración y ponga alícuotas en tubos de 15 ml (por ejemplo, marca Corning).

Medios LB

Por litro: 10 g de Bacto-triptona
5 g de extracto Bacto-levadura
10 g de NaCl

Ajuste el pH a 7.5 con 1 M NaOH.

LB + Amp

Esterilice en autoclave y deje enfriar a 50 °C. Agregue 100-250 mg de ampicilina (sal sódica, Sigma #A9518) por litro de LB estéril. No esterilice en autoclave una solución que contenga antibióticos.

LB + Amp para placas

Agregue 15 g de Bacto-agar por litro de LB. Disuelva el agar en el horno de microondas y esterilice en autoclave. Agregue Amp, 25 ml por placa.

LB + Amp para "stabs"

Agregue 7 g de Bacto-agar por litro de LB. Esterilice en autoclave. Agregue Amp y vierta los "stabs".

1 M MgCl₂: 1 M cloruro de magnesio

Disuelva 20.33 g de MgCl₂·6H₂O (PM = 203.30) en dH₂O para obtener un volumen final de 100 ml. Esterilice en autoclave.

OLB TE-7: 3 mM Tris-HCl, 0.2 mM EDTA, pH de 7.0

Agregue 300 µl de 1 M Tris-HCl, pH de 7.5, y 40 µl de 0.5 M EDTA-8.0 a 90 ml de H₂Odd (la más pura que pueda obtener; nosotros usamos el agua para cultivos celulares de Sigma, cat. #W-3500). Verifique el pH poniendo unos µl en un papel para pH. **No contamine esta solución ya que se usa para las reacciones de PCR.** Si es necesario, lleve el pH a 7.0 con HCl y complete el volumen hasta llegar a 100 ml.

1 M NaPO₄ - 6.5: amortiguador con fosfato para la transferencia de Southern

Para aproximadamente 1 litro, comience con 660 ml de 1 M NaH₂PO₄ y agregue 1 M Na₂HPO₄ para llevar el pH a 6.5 (aprox. 330 ml).

- o -

SOL. CONC.	500 ml	1000 ml	2000 ml	5000 ml
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (PM=137.99)	46 g	92 g	184 g	460 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O (PM=268.07)	45 g	90 g	180 g	450 g

Ajuste el pH a 6.5 con precipitados de NaOH. Esterilice en autoclave.

Fenol (equilibrado)

Equilibre fenol de grado para biología molecular ultrapuro, derretido (a 65 °C), agregando un volumen igual de Tris-9.5. Agite bien y deje separar; retire aspirando al vacío la capa acuosa (superior). Repita la equilibración dos veces más con Tris-9.5 y otras dos veces con TE-8.0. Usando papel para pH, verifique que el pH del fenol es superior a 7.0. Deje una pequeña capa de TE sobre el fenol. Distribuya el fenol equilibrado en partes iguales en tubos de 50 ml con tapas; envuelva cada uno de los tubos en papel de aluminio y almacene a 4 °C.

10 mg/ml proteinasa K

Disuelva 100 mg de Proteinasa K (BRL #5530UA) en H₂Odd hasta obtener un volumen final de 10 ml. Distribuya partes alícuotas de 200 µl en tubos de 0.5 ml y almacene a -20 °C.

10 mg/ml ARNasa A

Disuelva 100 mg de ARNasa (Sigma # R4875) en 10 ml de 10 mM Tris-7.5, 15 mM NaCl. Caliente en agua hirviendo durante 15 min y deje enfriar lentamente a la temperatura ambiente. Distribuya partes alícuotas de 1 ml y almacene a -20 °C. La solución de trabajo se puede almacenar a 4 °C.

500 U/ml ARNasa T1

Diluya ARNasa T1 (Sigma #R8251) con 10 mM Tris-7.5, 15 mM NaCl, a 500 U/ml. Caliente en agua hirviendo durante 15 min y deje enfriar lentamente a la temperatura ambiente. Distribuya en partes alícuotas de 1 ml y almacene a -20 °C.

SS ADN: 10 mg/ml de ADN de esperma de salmón

Disuelva 100 mg de ADN de esperma de salmón (Sigma # D1626) en TE-8.0, hasta obtener un volumen final de 10 ml, girando hasta el día siguiente a 4 °C. Corte el ADN haciéndolo pasar 3-4 veces a través de una aguja de calibre 22. Desnaturalice colocándolo en agua caliente durante 10 min y enfriándolo luego sobre hielo. Distribuya en partes alícuotas y almacene a 4 °C.

20% SDS: 20% dodecilsulfato sódico

Disuelva 200 g de laurildodecilsulfato, sal sódica (PM = 288.40) agregándolo poco a poco a 800 ml de dH₂O. Después de la disolución completa, ajuste para tener un volumen final de 1000 ml. Puede usar uno de bajo grado (Sigma # L5750) para los lavados HYB, etc., y uno de mejor grado (Sigma # L4390) para la solución HYB, las preparaciones de plásmidos, las soluciones de interrupción, etc.

Prepare la solución bajo una campana de extracción, y utilice guantes y anteojos de protección.

5X SGB: Amortiguador para gel con muestras

SOL. CONC.	[FINAL]	50 ml	100 ml
1 M Tris-8.0	50 mM	2.5 ml	5.0 ml
0.5 M EDTA-8.0	5 mM	0.5 ml	1.0 ml
Sucrosa	25%	12.5 g	25.0 g
BPB	2 mg/ml	100.0 mg	200.0 mg
Cianol de xileno (optativo)	2 mg/ml	100.0 mg	200.0 mg
H ₂ Odd		up to 50.0 ml	up to 100.0 ml

BPB = azul de bromofenol, sal sódica

2.5 M NaOAc: 2.5 M acetato de sodio

Disuelva 20.5 g de acetato de sodio (anhidro, PM = 82.03) en dH₂O hasta obtener un volumen final de 100 ml. Esterilice en autoclave.

5 M NaCl: 5 M cloruro de sodio

Disuelva 292.2 g de NaCl (PM = 58.44) en dH₂O hasta obtener un volumen final de 1000 ml. Esterilice en autoclave.

1 M NaOH: 5 M hidróxido de sodio

Disuelva 40 g de NaOH (PM = 40.00) en dH₂O hasta obtener un volumen final de 1000 ml. Esterilice en autoclave. (Es mejor pesar aprox. 40 g de precipitados y determinar luego el volumen final correcto para una solución 1 N)

1 M Na₂HPO₄: 1 M fosfato sódico dibásico

Disuelva 268 g de fosfato sódico, dibásico, heptahidrato (PM = 268.07), en dH₂O hasta obtener un volumen final de 1000 ml. Esterilice en autoclave.

1 M NaH₂PO₄: 1 M fosfato sódico monobásico

Disuelva 138 g de fosfato sódico, monobásico, monohidrato (PM = 137.99), en dH₂O hasta obtener un volumen final de 1000 ml. Esterilice en autoclave.

0.1 M espermidina

Disuelva 1 g de espermidina (PM = 145.2, Sigma # S2626) en H₂O hasta obtener un volumen final de 69 ml. Esterilice mediante filtración y distribuya en partes alícuotas en tubos de 5 ml. Almacene a -20 °C; la solución de trabajo se puede conservar a 4 °C.

2X SSC: 3.7 M NaCl, 0.375 M Na-citrato, pH de 7.4

SOL. CONC.	10 litros	20 litros
NaCl (PM=58.44)	175.2 g	350.4 g
Na-citrato•2H ₂ O (PM=294.10)	88.0 g	176.0

Ajuste el pH a 7.4. Esterilice en autoclave.

25X SSC: 3.7 M NaCl, 0.375 M Na-citrato, pH de 7.4

SOL. CONC.	1 litro	2 litros	3 litros	4 litros	5 litros
NaCl (PM=58.44)	219 g	438 g	657 g	876 g	1095 g
Na-citrato•2H ₂ O (PM=294.10)	110 g	220 g	330 g	440 g	550 g

Ajuste el pH a 7.4. Esterilice en autoclave.

STE: Amortiguador Tris-EDTA sódico, pH de 8.0

SOL. CONC.	[FINAL]	100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	500 ml
1 M Tris-8.0	10 mM	1.0 ml	2.0 ml	3.0 ml	4.0 ml	5.0 ml
0.5 M EDTA-8.0	1 mM	0.4 ml	0.8 ml	1.2 ml	1.6 ml	2.0 ml
5 M NaCl	100 mM	2.0 ml	4.0 ml	6.0 ml	8.0 ml	10.0 ml

1 M Tris - pH de 7.5, 8.0 ó 9.5

Disuelva 121 g de Tris-Base en aprox. 750 ml de dH₂O. Agregue HCl conc. hasta que se llega al pH deseado (75 ml de HCl = pH 7.5, 49 ml de HCl = pH 8.0). Lleve el volumen de la solución a 1000 ml con dH₂O. Esterilice en autoclave.

TE-8: 10 mM Tris - 8.0, 1 mM EDTA - pH 8.0

SOL. CONC.	50 ml	100 ml	500 ml	1000 ml
1 M Tris - 8.0	0.5 ml	1.0 ml	5.0 ml	10.0 ml
0.5 M EDTA - 8.0	0.1	0.2	1.0	2.0
H ₂ O	hasta el volumen	hasta el volumen	hasta el volumen	hasta el volumen

10 mM TTT (Boehringer Mannheim 104 264) PM = 570.2

Disuelva 10 mg en 1753 µl de OLBTE-7 (disuelva directamente en la botella original). Almacene en partes alícuotas de 50 µl a -20 °C. Marque los tubos con tapas rojas.

Programa de cuantificación del ADN con el espectrofotómetro DU-65 de Beckmann

Las siguientes son instrucciones para un programa preparado para el espectrofotómetro DU-65 de Beckmann. El programa tiene el propósito de permitir al usuario efectuar lecturas rápidas de A260 y A280 de muchas muestras y, a partir de ellas, calcular las relaciones A260/A280, las concentraciones de ADN, el ADN total y la cantidad de TE necesaria para llevar las muestras a la concentración especificada.

1. Encienda la fuente de luz UV para el espectrofotómetro. Toma alrededor de 1 minuto para que haya luz UV; sin embargo, es mejor esperar 15 minutos para que la lámpara se estabilice. Cuando está encendida la luz, se indicará esto con las letras UV en la pantalla LCD, las cuales cambian de minúsculas a mayúsculas. Asegúrese de que también la impresora está encendida y en línea.
2. Oprima el botón **PROG**. Aparecerán en la pantalla los programas disponibles para el usuario. Seleccione Programa 0: DNA oprimiendo ya sea **STEP** o **BSTP**.
3. Cuando aparece Programa 0: DNA en la pantalla LCD, oprima **R/S**.
4. Se le pedirá la siguiente información:

STORED INFO Y:1 N:0 [INFORMACIÓN ALMACENADA SI = 1 NO = 0]

¿Está usted calculando nuevamente valores correspondientes a información previamente almacenada? Si la respuesta es afirmativa, oprima **1** y **ENTER**; si es negativa, **0** y **ENTER**.

DILUTION? [¿DILUCIÓN?]

¿Cuál es el factor de dilución para las muestras que va usted a leer? El valor sobreentendido es 1:50. Si sus muestras están diluidas con otro valor diferente de 1:50, oprima las teclas de los números que corresponden y luego oprima **ENTER**. Para entrar el valor sobreentendido, sencillamente oprima **ENTER**.

RNA FACTOR? [¿FACTOR ARN?]

La concentración final de ADN se divide por este factor ARN para tener en cuenta el ARN en la muestra. El factor ARN sobreentendido es 1, lo que indica que se ha usado RNasa en la muestra y que ésta no contiene ARN. En general, con el maíz se usa un factor de 5. Entre el número deseado y oprima **ENTER**. Si va a entrar el factor sobreentendido, simplemente oprima **ENTER**.

RESUS. VOLUME? [¿VOLUMEN DE RESUSPENSIÓN?]

¿Cuál es el volumen de la muestra final de la cual ha tomado usted las partes alícuotas? El valor sobreentendido es 1500 µl. Entre el valor deseado y oprima **ENTER**. Para entrar el valor sobreentendido, simplemente oprima **ENTER**.

FINAL $\mu\text{g}/\mu\text{l}$? [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$ FINALES?]

¿En qué concentración querría usted que se diluyera la muestra de la cual ha tomado esta parte alícuota? El valor sobreentendido es $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Entre el valor deseado y oprima **ENTER**. Para entrar el valor sobreentendido, simplemente oprima **ENTER**.

- Se le pedirá que inserte un "blank" [blanco]. El blanco corresponde al líquido que usted ha usado para diluir la muestra en partes iguales. Esto se usará para calibrar el instrumento. Oprima **R/S**. Es muy importante ya que todos los cálculos futuros dependen de esto.
- Luego se le pedirá que inserte cada muestra. Oprima **R/S** y el espectrofotómetro absorberá la muestra, calculará las concentraciones y pedirá la muestra siguiente. Esto continúa indefinidamente hasta que se oprima **PROG**.
- Una vez que han sido verificadas todas sus muestras, se pueden volver a calcular los valores para la resuspensión y demás. Esto se hace volviendo a correr el PROG 0: DNA. Al comenzar el programa, cuando se le pregunte por STORED INFO Y:1 N:0, oprima 1 para indicar que sí. Se le pedirá entonces información como se señaló anteriormente; no obstante, en lugar de preguntar por las muestras, el espectrofotómetro volverá a calcular los valores a partir de las cifras almacenadas en la última corrida de las muestras.

Listado del programa

PROG 0: ADN	031: CALL ENTR	063: CALL CRLF	006: 8.
000: Strt	032: STO 001	064: CALL CRLF	007: CALL BLNK
001: disp 5	033: 5.	065: 1.	008: MSG cTE
002: ABS	034: CALL BLNK	066: RCL 008	009: CALL COUT
003: 1.	035: RCL 001	067: x=y	010: CALL CRLF
004: STO 006	036: CALL FOUT	068: GOTO READ	011: 35.
005: MSG cSTO	037: CALL CRLF	069: 1.	012: CALL ASCI
006: MSG RED	038: 1500.	070: CALL CHAN	013: 5.
007: MSG INFO	039: STO 002	071: lbi READ	014: CALL BLNK
008: MSG Y:1	040: MSG RESU	072: MSG cINS	015: MSG cSAM
009: MSG N:0	041: MSG SVO	073: MSG ERT	016: MSG PLE
010: CALL ENTR	042: MSG L?	074: MSG BLAN	017: CALL COUT
011: STO 008	043: CALL COUT	075: MSG K	018: 1.
012: 50.	044: CALL ENTR	076: R/S	019: CALL BLNK
013: STO 000	045: STO 002	077: CALL FILL	020: 4.
014: MSG DILU	046: 2.	078: 280.	021: CALL BLNK
015: MSG TION	047: CALL BLNK	079: LMDA	022: MSG cA26
016: MSG ?	048: RCL 002	080: CALB	023: MSG 0
017: CALL COUT	049: CALL FOUT	081: 260.	024: CALL COUT
018: CALL ENTR	050: CALL CRLF	082: LMDA	025: 5.
019: STO 000	051: 0.2	083: CALB	026: CALL BLNK
020: 4.	052: STO 003	084: 1.	027: MSG cA28
021: CALL BLNK	053: MSG FINA	085: CALL CHAN	028: MSG 0
022: RCL 000	054: MSG L uG	086: rtn	029: CALL COUT
023: CALL FOUT	055: MSG :uL?		030: 5.
024: CALL CRLF	056: CALL COUT	PROG 1:HEADER	031: CALL BLNK
025: 1.	057: CALL ENTR	000: Strt	032: MSG c260
026: STO 001	058: STO 003	001: 57.	033: CALL COUT
027: MSG RNA	059: 8.	002: CALL BLNK	034: 47.
028: MSG FACT	060: CALL BLNK	003: MSG cTOT	035: CALL ASCI
029: MSG OR?	061: RCL 003	004: MSG AL	036: MSG c280
030: CALL COUT	062: CALL FOUT	005: CALL COUT	037: CALL COUT

038:	5.	026:	CALL STOR	082:	RCL 002	036:	RCL 009
039:	CALL BLNK	027:	280.	083:	RCL 007	037:	1.
040:	MSG cuG	028:	LMDA	084:	*	038:	+
041:	CALL COUT	029:	READ	085:	RCL 003	039:	CALL LOAD
042:	47.	030:	STO 005	086:	/	040:	STO 005
043:	CALL ASCI	031:	RCL 009	087:	RCL 002	041:	CALL FOUT
044:	MSG cuL	032:	1.	088:	-	042:	3.
045:	CALL COUT	033:	+	089:	CALL FOUT	043:	CALL BLNK
046:	5.	034:	RCL 005	090:	2.	044:	RCL 004
047:	CALL BLNK	035:	CALL STOR	091:	CALL BLNK	045:	RCL 005
048:	MSG cuG	036:	RCL 006	092:	disp 3	046:	/
049:	MSG DNA	037:	CALL FOUT	093:	RCL 006	047:	CALL FOUT
050:	CALL COUT	038:	disp 6	094:	CALL FOUT	048:	5.
051:	5.	039:	2.	095:	1.	049:	CALL BLNK
052:	CALL BLNK	040:	CALL BLNK	096:	+	050:	0.05
053:	MSG cTO	041:	10.	097:	STO 006	051:	RCL 001
054:	MSG ADD	042:	STO 010	098:	CALL CRLF	052:	/
055:	CALL COUT	043:	lbl LINE	099:	GOTO LOOP	053:	RCL 004
056:	5.	044:	95.			054:	*
057:	CALL BLNK	045:	CALL ASCI		PROG 3: REPEAT	055:	RCL 000
058:	35.	046:	dec 010	000:	Strt	056:	*
059:	CALL ASCI	047:	GOTO LINE	001:	lbl READ	057:	STO 007
060:	CALL CRLF	048:	2.	002:	disp 3	058:	CALL FOUT
061:	CALL LINE	049:	CALL BLNK	003:	RCL 006	059:	5.
062:	CALL CRLF	050:	RCL 004	004:	CALL FOUT	060:	CALL BLNK
063:	2.	051:	CALL FOUT	005:	disp 6	061:	disp 6
064:	CALL CHAN	052:	3.	006:	2.	062:	RCL 007
065:	rtn	053:	CALL BLNK	007:	CALL BLNK	063:	RCL 002
		054:	RCL 005	008:	10.	064:	*
		055:	CALL FOUT	009:	STO 010	065:	CALL FOUT
		056:	3.	010:	lbl LINE	066:	5.
		057:	CALL BLNK	011:	95.	067:	CALL BLNK
		058:	RCL 004	012:	CALL ASCI	068:	RCL 002
		059:	RCL 005	013:	dec 010	069:	RCL 007
		060:	/	014:	GOTO LINE	070:	*
		061:	CALL FOUT	015:	2.	071:	RCL 003
		062:	5.	016:	CALL BLNK	072:	/
		063:	CALL BLNK	017:	RCL 006	073:	RCL 002
		064:	0.05	018:	2.	074:	-
		065:	RCL 001	019:	*	075:	CALL FOUT
		066:	/	020:	STO 009	076:	2.
		067:	RCL 004	021:	CALL LOAD	077:	CALL BLNK
		068:	*	022:	STO 004	078:	disp 3
		069:	RCL 000	023:	0.01	079:	RCL 006
		070:	*	024:	x>y	080:	CALL FOUT
		071:	STO 007	025:	GOTO OK	081:	lbl LOOP
		072:	CALL FOUT	026:	60.	082:	RCL 006
		073:	5.	027:	CALL ASCI	083:	1.
		074:	CALL BLNK	028:	0.01	084:	+
		075:	disp 6	029:	CALL FOUT	085:	STO 006
		076:	RCL 007	030:	GOTO LOOP	086:	CALL CRLF
		077:	RCL 002	031:	lbl OK	087:	RCL 006
		078:	*	032:	RCL 004	088:	RCL 012
		079:	CALL FOUT	033:	CALL FOUT	089:	x<=y
		080:	5.	034:	3.	090:	GOTO READ
		081:	CALL BLNK	035:	CALL BLNK	091:	rtn

Hojas de datos

En las páginas siguientes se reproducen las hojas de datos que han resultado muy útiles en el Laboratorio de GMA del CIMMYT. Esas hojas permiten registrar los diversos tipos de información necesaria para calcular las soluciones y los materiales requeridos, así como los resultados obtenidos en varios de los pasos importantes del análisis de los RFLP. Como este análisis en general implica el procesamiento de muchas muestras y sondas, aconsejamos que cada investigador elabore un conjunto de hojas para registrar toda la información durante el análisis. Puede usted copiar las hojas aquí presentadas o simplemente usarlas como ejemplos.

Project:

Project ID:

Name(s):

Date: | |

Harvesting and Grinding Records Germplasm Surveys

Summary of Plant/Fungus/Insect Material Available

Germplasm Description (full information please)

Project:

Project ID:

Name(s):

Date: | |

Germplasm Description (continued)

page _____

Project: Project ID:

Name(s): Date: |

Full History of Harvested Material (one list per harvest)

Location planted: Place planted:

Date planted: | Cycle:

Trial/plot no.: Date harvested: |

Who harvested:

Material:

How many leaves/plant Plants/accession Mesh bags/accession

NOTES on harvesting method:

Date frozen: | Into lyophilizer: |

Out of lyophilizer: |

Date ground: | Samples: to

| Samples: to

| Samples: to

| Samples: to

| Samples: to

| Samples: to

| Samples: to

NOTES

Project:

Project ID:

Name(s):

Date: | |

Harvesting and Grinding Records Mapping Populations

Summary Of Plant / Fungus / Insect Material Available

Parental Genotype Descriptions (full information please)

Scheme of Population Development

Project:

Project ID:

Name(s):

Date:

Additional Notes on Parental Accessions and Population Development....

page _____

DNA Extraction Record

Name:

Date:

Project:

Color code:

Materials:

Tube #	Sample I.D.		Tube #	Sample I.D.		Tube #	Sample I.D.		Tube #	Sample I.D.
1	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	29	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	57	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	85	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
2	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	30	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	58	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	86	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
3	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	31	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	59	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	87	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
4	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	32	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	60	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	88	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
5	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	33	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	61	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	89	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
6	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	34	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	62	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	90	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
7	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	35	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	63	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	91	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
8	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	36	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	64	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	92	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
9	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	37	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	65	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	93	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
10	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	38	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	66	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	94	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
11	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	39	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	67	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	95	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
12	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	40	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	68	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	96	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
13	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	41	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	69	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	97	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
14	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	42	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	70	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	98	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
15	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	43	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	71	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	99	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
16	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	44	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	72	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	100	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
17	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	45	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	73	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	101	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
18	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	46	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	74	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	102	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
19	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	47	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	75	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	103	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
20	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	48	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	76	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	104	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
21	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	49	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	77	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	105	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
22	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	50	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	78	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	106	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
23	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	51	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	79	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	107	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
24	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	52	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	80	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	108	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
25	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	53	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	81	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	109	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
26	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	54	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	82	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	110	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
27	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	55	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	83	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	111	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>
28	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	56	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	84	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	<input style="width: 15px; height: 15px;" type="text"/>	112	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>

Gel Format

Name:

% Agarose:

Membrane Type:

Transfer Quality:

Date:

Power Supply #:

Roll #:

Comments:

Project:

Volts & mAmps/Time:

Blot Labels:

of Layers/# of Gels:

Entered in Computer

Row #1																														
Lane #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Sample																														

Row #2																														
Lane #	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Sample																														

Row #3																														
Lane #	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
Sample																														

Row #4																														
Lane #	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
Sample																														

PCR amplification/labeling of probes

Name:

Date:

Bulk mix calculations for PCR amplification (15 μ l)

STOCK	[Final] or amount	15 μ l rxn	Bulk mix X samples
ddH ₂ O	–	6.3 μ l	
10X Taq buffer, Mg-free	1X	1.5 μ l	
50 mM MgCl ₂	2 mM	0.6 μ l	
Glycerol	15%	2.25 μ l	
dNTP mix (10 mM ea)	50 μ M each	0.3 μ l (0.075 ea)	
5 U/ μ l Taq enzyme	0.3 U	0.06 μ l	
2 μ M primer 1	0.2 μ M	1.5 μ l	
2 μ M primer 2	0.2 μ M	1.5 μ l	
5 ng/ μ l plasmid	5 ng	1.0 μ l	

Bulk mix calculations for PCR amplification (25 μ l)

STOCK	[Final] or amount	25 μ l rxn	Bulk mix X samples
ddH ₂ O	–	11.15 μ l	
10X Taq buffer, Mg-free	1X	2.5 μ l	
50 mM MgCl ₂	2 mM	1.0 μ l	
Glycerol	15%	3.75 μ l	
dNTP mix (10 mM ea)	50 μ M each	0.5 μ l (0.125 ea)	
5 U/ μ l Taq enzyme	0.5 U	0.1 μ l	
2 μ M primer 1	0.2 μ M	2.5 μ l	
2 μ M primer 2	0.2 μ M	2.5 μ l	
5 ng/ μ l plasmid	5 ng	1.0 μ l	

Bulk mix calculations for PCR amplification & labeling (5%)

STOCK	[Final] or amount	5.0% Dig 100 μ l rxn	Bulk mix X samples
ddH ₂ O	–	46.38 μ l	
10X Taq buffer, Mg-free	1X	10.0 μ l	
50 mM MgCl ₂	2 mM	4.0 μ l	
Glycerol	15%	15.0 μ l	
dNTP mix - dTTP (10 mM ea)	50 μ M each	1.5 μ l (0.5 ea)	
10mM dTTP	47.5 μ M	0.475 μ l	
1 mM Dig-dUTP	2.5 μ M	0.250 μ l	
5 U/ μ l Taq enzyme	2.0 U	0.4 μ l	
2 μ M primer 1	0.2 μ M	10.0 μ l	
2 μ M primer 2	0.2 μ M	10.0 μ l	
5 ng/ μ l plasmid	10 ng	2.0 μ l	

Hybridization Data Sheet

Name: _____	Date: _____
Hybridization soln: 5 ml per 50 ml centrif tube -or- 10 ml per glass bottle + 1 ml per membrane	Comments: _____ _____
Stringency washes: 5 volumes*, place 3 volumes at 65°C Buffer 1: 8 volumes, place 4 volumes at 65°C (for Buffer 2) Buffer 3: 1 volume	Need: _____ Need: _____ Need: _____ Need: _____
*volume needed in each tray for washing, detection, etc.	
Entered Into Computer	

Tube #	BLOT		PROBE				PreHYB		HYB		Str. Washes		AMPPD		Exps. Hrs.	Folder #	SCORE		COMMENTS		
	ID	Use	Locus	% Dig	Labeling	Lbl Date	ng/μl	μl	Time	Time	HVB	mils	?X	T °C			ul/ml	Use		Bnds	Lane

Data Sheet for Fluorometer Readings

Name:

Date: | |

Project:

Color code:

Materials:

Sample #	DNA ID	Reading ng/ μ l	μ l to add	Total ng DNA		Sample #	DNA ID	Reading ng/ μ l	μ l to add	Total ng DNA
1						41				
2						42				
3						43				
4						44				
5						45				
6						46				
7						47				
8						48				
9						49				
10						50				
11						51				
12						52				
13						53				
14						54				
15						55				
16						56				
17						57				
18						58				
19						59				
20						60				
21						61				
22						62				
23						63				
24						64				
25						65				
26						66				
27						67				
28						68				
29						69				
30						70				
31						71				
32						72				
33						73				
34						74				
35						75				
36						76				
37						77				
38						78				
39						79				
40						80				

Notas



CIMMYT^{MR}

Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo
Apartado Postal 6-641, 06600 México, D.F., México
www.cimmyt.org