



MACBIOBLUE
Nuevos Productos y Procesos en el Ámbito
de la Biotecnología Azul de la Macaronesia




MAC 2014-2020
Cooperación Territorial

Interreg
Fondo Europeo de Desarrollo Regional



Curso: Diversidad genética en salinas tradicionales

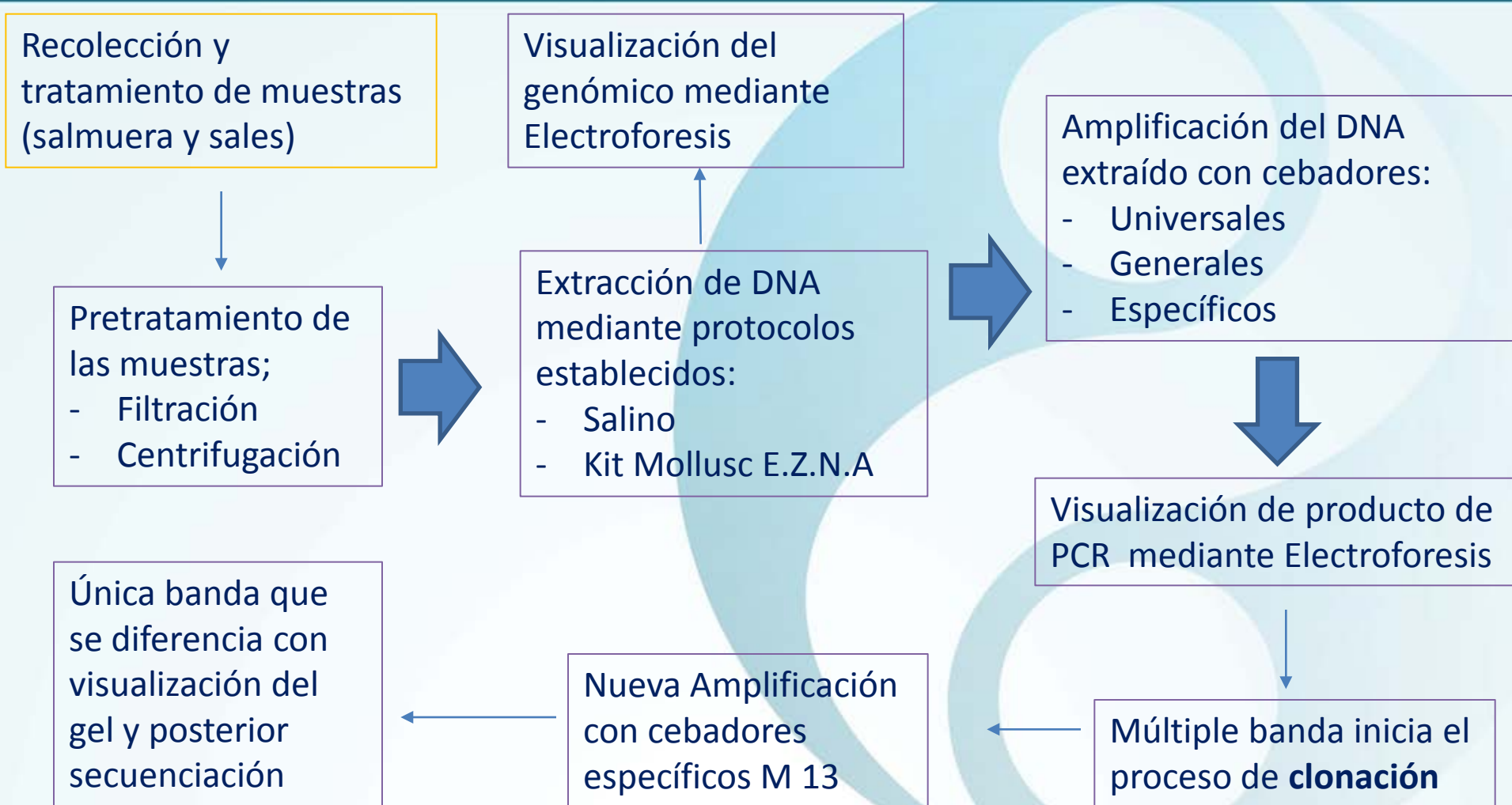
MACBIOBLUE

MAC/1.1b/086

São Vicente, Cabo Verde
12 al 17 noviembre de 2018
Universidade de Cabo Verde.
Faculdade de Engenharia e Ciências do Mar.
Departamento de Engenharias e Ciências Marinhas (DECM)



- ◈ Se aplicarán técnicas moleculares para el análisis de la diversidad genética en las salinas tradicionales de Cabo Verde.
- ◈ El curso está enfocado a la utilización de las herramientas moleculares para el estudio de la diversidad en los ecosistemas singulares de las salinas y el seguimiento del equilibrio necesario para la producción de la sal
- ◈ Se trabajará con muestras de diferente naturaleza (salmuera y sales) provenientes de las salinas de origen marino.
- ◈ Se realizará la selección de métodos de extracción y tipos de cebadores más indicados para la amplificación del DNA.
- ◈ La amplificación para detectar la presencia de los grupos y especies objetivo, principalmente cianobacterias, microalgas e invertebrados, se realizará con varios marcadores mitocondriales y nucleares.
- ◈ Se aplicará la técnica de clonación para amplificar el ADN cuando se presenten multibandas en la PCRs.



Filtración:

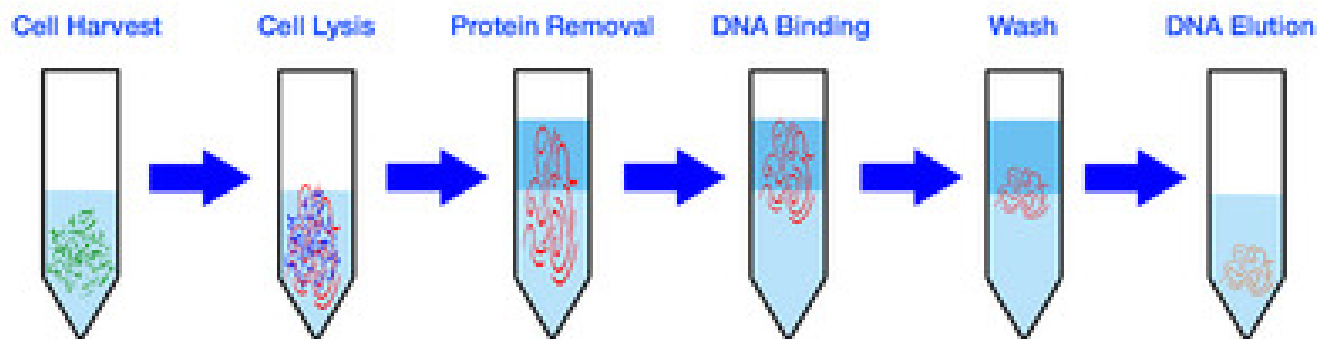
- **Fundamento:** la fuerza impulsora para que el líquido atraviese el filtro es la que ejerce la presión atmosférica cuando aplicamos el vacío al sistema.
- **Utilidad:** separar un sólido de un líquido, cuando lo que se quiere recuperar es el sólido.
- **Material:** soporte, pinza metálica, embudo de Büchner, filtro de 0,2 o 0,45 micras circular (de un tamaño que cubra la base del embudo sin sobrepasarla), matraz de Kitasato, adaptador de goma o de caucho, varilla de vidrio, conexión a un sistema de vacío (bomba de succión, trompa de agua).



Centrifugación:

- La centrifugación es una técnica de sedimentación, acelerada gracias al uso de fuerza centrífuga. Se aplica al análisis o a la separación de mezclas de partículas, células, orgánulos o moléculas.
- Para la formación de pellets centrifugamos a una velocidad superior a 15,000 g durante 15-20 min

1. Pesar aproximadamente 30 mg de filtro/pellet.
2. Adicionar 350 µL de ML1 + 25 µL de Proteinasa K.
3. Vortex 15 s y dejar 3 h a 60°C , luego ON toda la noche a 37°C.
4. Añadir 350µL de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)
5. Vortex y centrifugar a 10.000 xg durante 2 minutos a temperatura ambiente.
6. Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo de microcentrífuga de 1.5mL.
7. Añadir 350µL de MBL Buffer y 10µL de RNase A. Vortexear a máxima velocidad durante 15 segundos.
8. Incubar a 70°C durante 10 minutos y enfriar a temperatura ambiente.
9. Añadir 350µL de etanol absoluto. Vortexear a máxima velocidad durante 15 segundos.
10. Insertar una columna HiBind DNA Mini Column en un tubo de colección de 2mL.
11. Transferir 750µL de muestra a la columna, incluyendo cualquier precipitado que se haya formado.
12. Centrifugar a 10.000 xg durante 1 minuto, desechar el filtrado y reutilizar el tubo de colección. Repetir los dos últimos pasos hasta que toda la muestra haya pasado por la columna.
13. Desechar el filtrado y el tubo de colección.
14. Insertar la columna dentro de un tubo de colección de 2mL nuevo.
15. Añadir 500µL de HBC Buffer y centrifugar a 10.000 xg durante 30 segundos. Desechar el filtrado y reutilizar el tubo de colección.
16. Añadir 700µL de DNA Wash Buffer y centrifugar a 10.000 xg durante 1 minuto. Desechar el filtrado y reutilizar el tubo de colección. Repetir el paso anterior para una segunda etapa de lavado.
17. Centrifugar la columna vacía a máxima velocidad durante 2 minutos para secar la membrana, de lo contrario, los restos de etanol podrían interferir en las aplicaciones posteriores.
18. Transferir la columna a un tubo de microcentrífuga de 1.5mL libre de nucleasa.
19. Añadir 75µL de Elution Buffer precalentado a 70°C
20. Dejar enfriar a temperatura ambiente durante 2 minutos. Centrifugar a 10.000 xg durante 1 minuto.
21. Almacenar a -20 °C.



1. Pesar aproximadamente 30mg de filtro/pellet.
2. Añadir 600µL de tampón de extracción (0.05M Tris – 0.1M EDTA), 70µL de SDS al 10% y 20µL de proteinasa K (20mg/mL).
3. Incubar la solución durante una noche (mínimo 4 horas) a 55°C en un tubo de microcentrífuga de 1.5mL codificado. Luego ON 37°C
4. Añadir 200µL de NaCl 5M y mezclar durante 20 minutos.
5. Centrifugar la muestra a velocidad máxima a 4°C durante 20 minutos.
6. Transferir 800µL de sobrenadante (ADN extraído) a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5mL.
7. Añadir 700µL de alcohol absoluto e incubar un mínimo de 2 horas a -20°C.
8. Centrifugar la muestra durante 15 minutos a máxima velocidad a 4°. Descartar el sobrenadante.
9. Lavar el pellet de ADN añadiendo 800µL de etanol frío al 70% y centrifugar durante 15 minutos a máxima velocidad a 4°C. Descartar el sobrenadante.
10. Secar el pellet a temperatura ambiente durante un mínimo de 4 horas. Evitar secar durante más tiempo ya que el ADN podría degradarse.
11. Resuspender el pellet en 150µL de H₂O doblemente destilada.
12. El extracto de ADN puede ser guardado a 4°C durante un día. Para un almacenamiento prolongado guardar a -20°C.



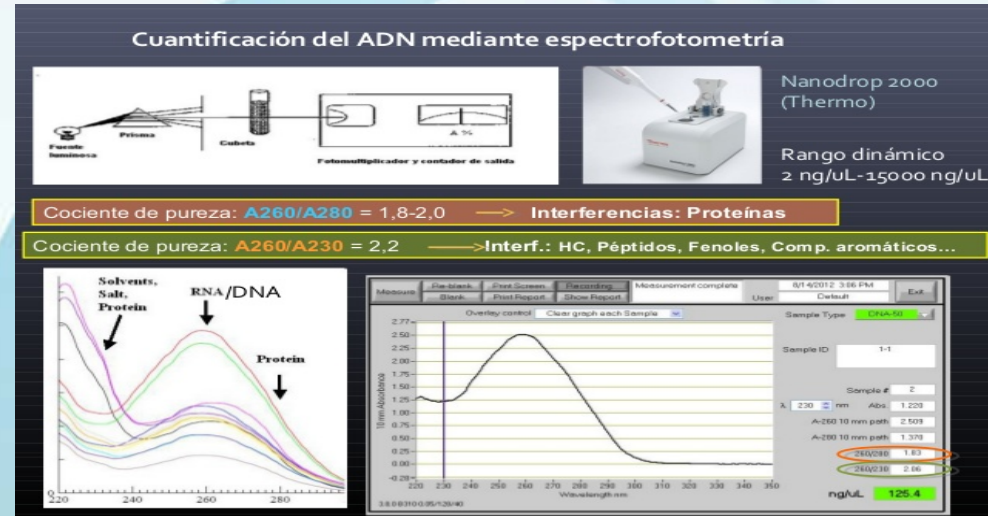
Cuantificación mediante espectrofotometría:

Medición mediante espectrofotometría de la luz UV absorbida por las bases nitrogenadas.

Se tomarán lecturas de la Densidad Óptica (D.O.) a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. La lectura a 260 nm permite calcular la concentración del ADN en la muestra. Una D.O.260 de 1.0, corresponde aproximadamente a 50 µg.mL⁻¹ de ADN doble cadena, a 33 µg.mL⁻¹ de ADN cadena sencilla, a 20-30 µg.mL⁻¹ de oligonucleótidos entre 20 a 40 bases y a 40 µg.mL⁻¹ de RNA. La relación entre las medidas a 260 y 280 (D.O.260:D.O.280) proporciona un estimado de la pureza de la muestra. Las preparaciones puras de ADN deben tener un valor D.O.260:D.O.280 de 1,8 a 2.

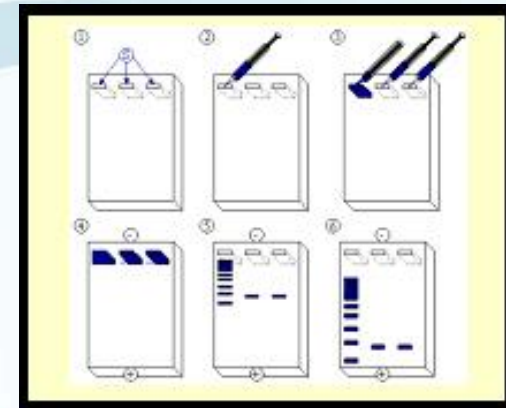
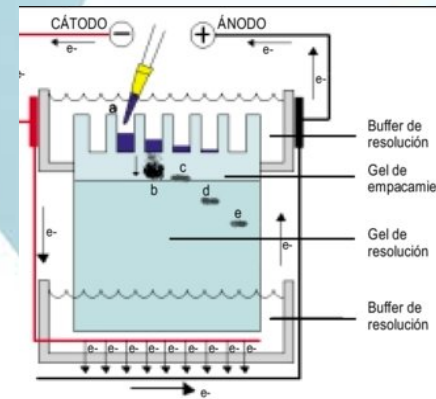
1. Realizar una dilución 1:10 (5 µL en 45 µL de TE/agua destilada) de la muestra de ADN utilizando tampón TE o agua destilada, en un volumen final de 50 µL.
2. Calibrar a cero el espectrofotómetro con tampón TE/agua. Colocar el volumen total de la dilución de la muestra en una cubeta de cuarzo de 1 mL. Medir y registrar el valor de la D.O. a 260 y 280 nm
3. Estimar la concentración de ADN en la muestra utilizando la siguiente relación:

$$[\text{ADN}] = 50\mu\text{g.mL}^{-1} \times \text{D.O.260nm} \times \text{factor de dilución}$$

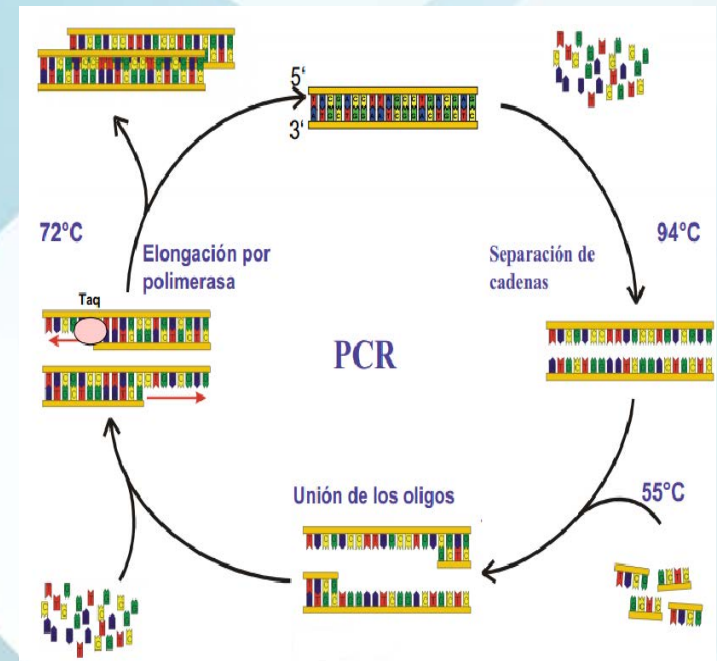
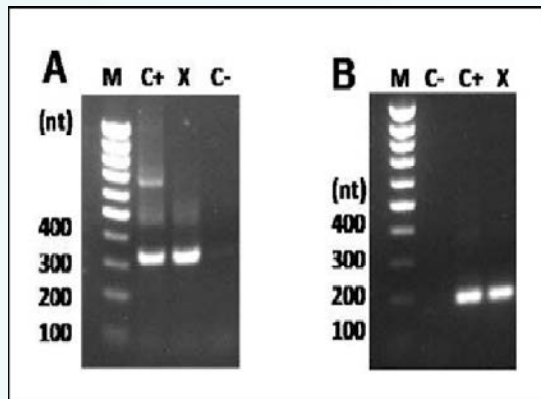


Visualización:

- Mediante Electroforesis al 1% de agarosa



1. Técnica que consiste en la amplificación *in vitro* de un fragmento de ADN.
2. Es necesario conocer, al menos parcialmente, la secuencia del fragmento a amplificar (un gen, una parte de un gen, una región no codificadora,...).
3. Para que tenga lugar la reacción se requiere de unos componentes:
4. En tubos de PCR se añade 1 μ L de ADN genómico. Rotulados e identificados.
5. Se prepara el Mix de Reacción (el que contienen todos los componentes) a un volumen que corresponda por el total de muestra.
6. Se añade 14 μ L de mix a cada tubo que contenga el ADN genómico y uno sin ADN que nos sirva de Control negativo.
7. Poner el termociclador con el programa seleccionado para el primer que se emplea.
8. Visualizar los resultados en un gel al 2% de agarosa y 4 μ L de leader.



REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE ADN - PCR

Componente	Con. Stock	Con. Final	V/ muestra	V/ x muestras
Taq Go Buffer	5x	1x		
MgCl ₂	25 mM	(1,5mM- 2,5mM)		
dNTPs	10 mM	0,8 mM		
Primer FW	100 µM	20µM		
Primer RV	100 µM	20µM		
Taq Polimerasa	5 U	0,015 U		

CLONACION: consiste en unir in vivo fragmentos de ADN de procedencia muy diversa con secuencias de ADN capaces de replicarse de manera autónoma. En esta técnica de la clonación molecular o génica no se clonan células, pero sí se utilizan para clonar fragmentos de ADN, se las llama células competentes.

Filtración:

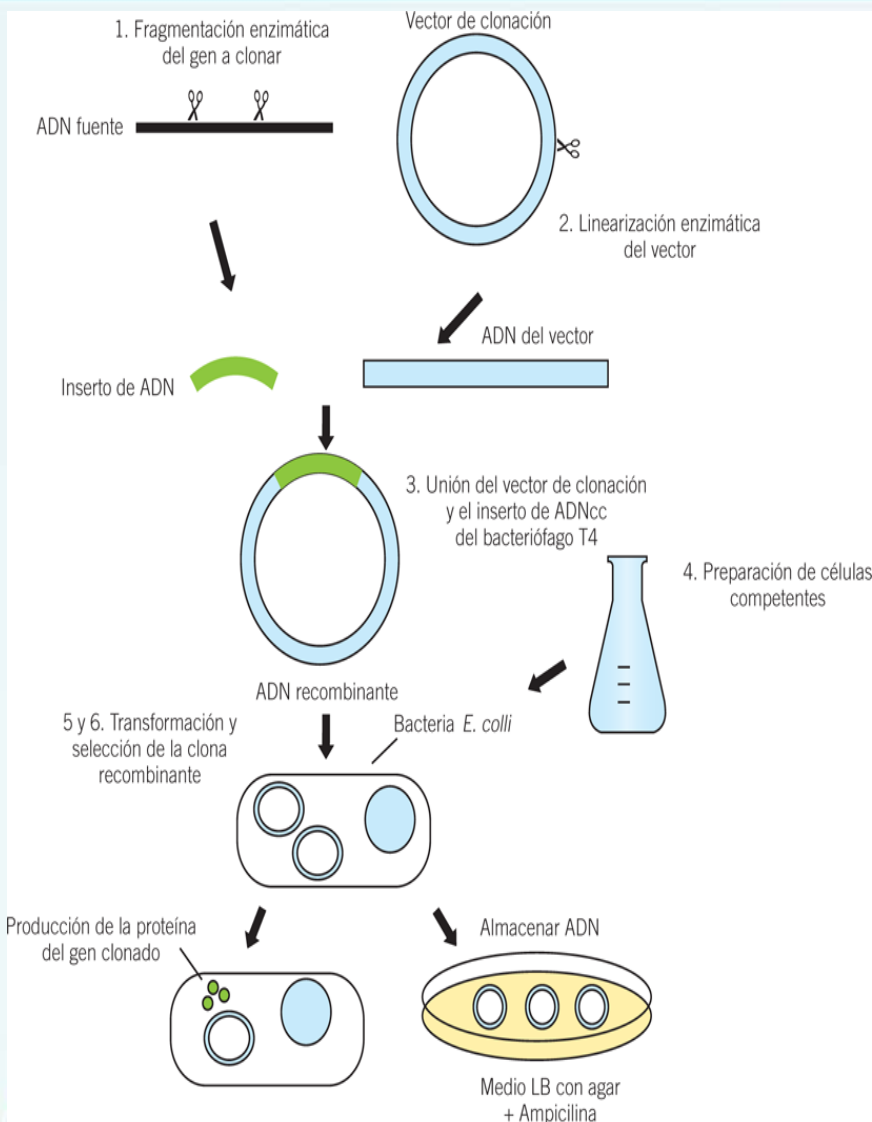
1. Insertar el Amicon Ultra-0.5 ml en el tubo colector.
2. Adicionar las muestras y completar el volumen hasta 500 microlitros con agua dd.
3. Centrifugar a 14.000 g entre 10-30 min.
4. Colocar el Amicon en un nuevo tubo colector en posición invertida.
5. Centrifugar 2 min a 1000 g y recoger el filtrado.
6. Cuantificamos la cantidad de producto de PCR.
7. Una vez filtrado podemos seguir con el proceso de ligación o almacenar a – 20º C.

Ligación:

8. Se toman tubos de 0.5 ml rotulados para cada filtración realizada.
9. Preparar alícuotas para un único uso de 2x Rapid Ligation Buffer. Vortex vigorosamente 2x Rapid Ligation Buffer antes de usar.
10. Centrifugar brevemente el pGEM-T Easy Vector 11. Preparar una reacción de 10 µl como se indica: Tablas 2 y 3 (Dosier)

Transformación:

11. Preparar placas para cada reacción de ligación.
12. Se centrifugan las reacciones de ligación para colectarlas en el fondo del tubo.
13. Adicionar 2µL de cada reacción de ligación a un tubo estéril de 17x100 mm tipo Falcon sobre hielo.
14. Tomar alícuotas congeladas de JM109 HECC y colocarlas sobre hielo has descongelación
15. Pipetear suavemente 25 µL de células a cada tubo de ligación.
16. Oscilar los tubos para mezclar y colocarlos sobre hielo 20 min.
17. Incubar las células durante 45-50 s en baño a exactamente 42°C sin agitar y pasarlas a hielo durante dos minutos.
18. Adicionar 500 µl de medio SOC atemperado a los tubos con las reacciones y las células.
19. Incubar durante 3-5 horas a 37°C con agitación (150-250 rpm).
20. Una vez acabado el periodo de transformación se produce la siembra en las placas. Para ello se platean 12-150 µL de cada una de las transformaciones en condiciones de esterilidad (bajo llama).
21. Se deja absorber sobre los medios unos 30 min para posteriormente incubarlo a 37°C ON.



Transformación (CONTINUACIÓN):

22. Pasada la noche ha de observar que han crecido colonias y se pasa a nevera a 4°C para apreciar los cambios de coloración en las células (las blancas son las que han tenido éxito en la transformación mientras que las azules no).

23. Screening de colonias para la PCR Colony: - Seleccionamos la colonia con la punta de la pipeta y se transfiere a un tubo con 50 µL de agua MiliQ.

24. Se pone a 96°C durante 10 min. En bloque térmico.

25. Centrifugar a 16000 g durante 5 -10 min.

26. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo y se conserva a -20°C hasta su uso para la PCR.



Las colonias seleccionadas son amplificadas mediante una PCR, según la reacción con los primers M13

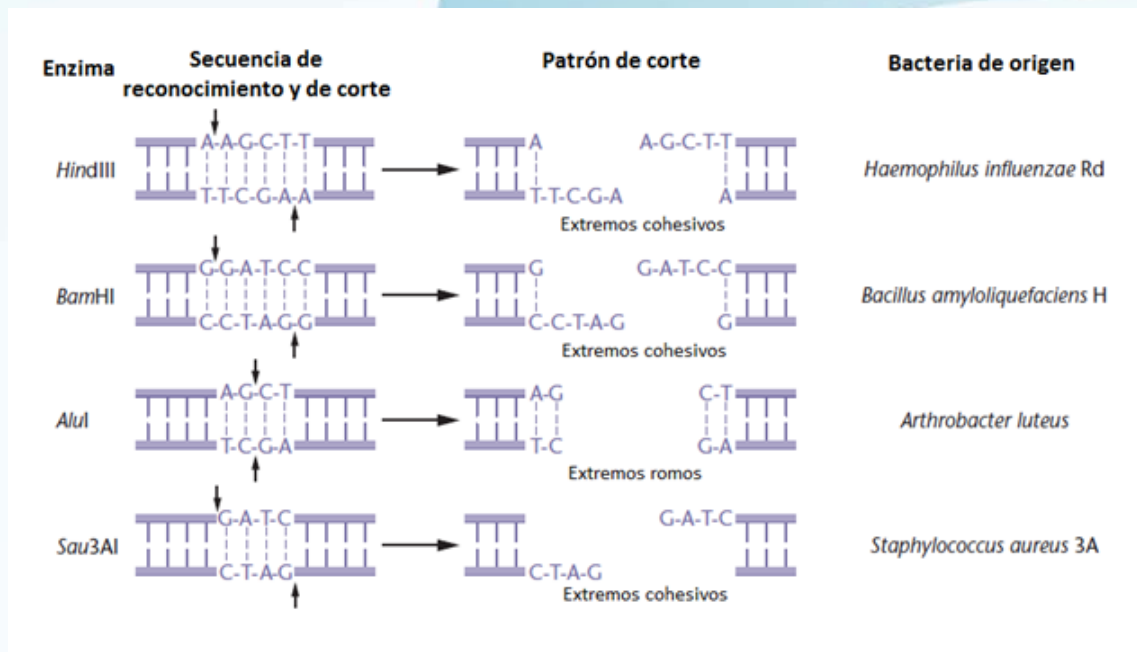
Reactivos	V/ muestras	V/ X muestras
Go Taq Buffer 5x	3	
25mM MgCl ₂	1,5	
DNTP(s) (10mM)	0,12	
Go Taq DNA Polymerase	0,075	
M13 F	0,12	
M13R	0,12	
Agua (MiliQ)	Ajustamos la cantidad en base a la cantidad de DNA a usar	
DNA	(depende de la calidad del ADN, entre 2-5 µL del producto clonado)	

El volumen total en la reacción de PCR es de 15 µL

El programa usado es el siguiente: 94°C, 3'/40 x (94°C, 30''/55°C, 30''/72°C, 1'30'')/72°C, 10'/4°C, 5'

RFLP: polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

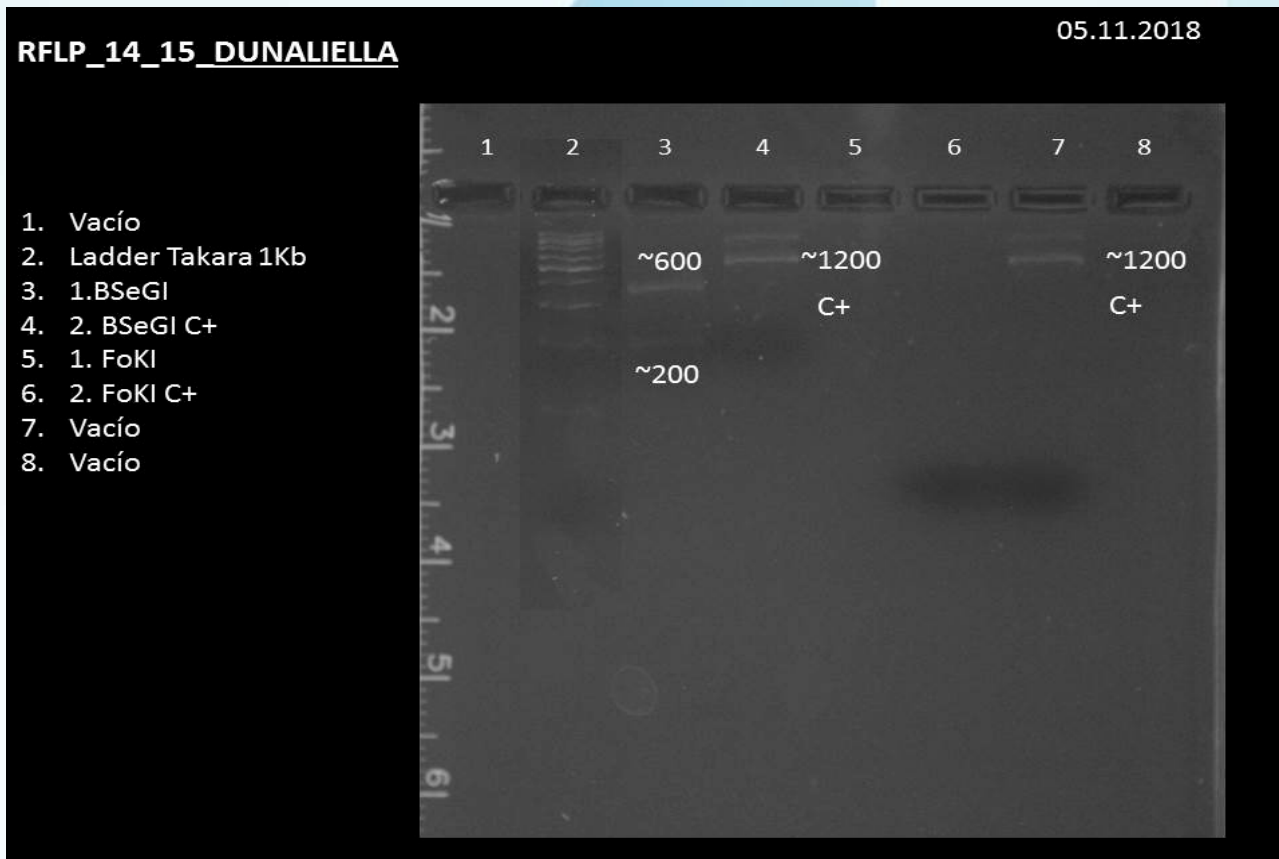
Una **enzima de restricción** (o endonucleasa de restricción) es aquella que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortar el ADN en ese punto en concreto, llamado sitio o diana de restricción. Los sitios de restricción presentan entre cuatro y seis pares de bases, con las que son reconocidos.



PCR-RFLP con la enzima de restricción BseGI para identificar *Dunaliella salina*

Componente	Con. Stock	V/ muestra	V/ x muestras
Enzima BseGI	10 U	0,5µl	
FD Green Buffer	10x	1µl	
Agua		8,5µl	
Producto PCR 1ng		5µl	
Volumen total		15µl	

Visualización de ADN digerido con 2 enzimas: BseGI y FokI



Investigadores: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Laboratorio BioMol
Carolina Medina Alcaraz
Dailos Hernández Reyes
Nieves González Henríquez

Contactos:

nieves.gonzalez@ulpgc.es

daiherey@gmail.com

carolina.medina106@alu.ulpgc.es

MACBIOBLUE

MAC/1.1b/086

Entidades participantes beneficiarias y de Terceros Países:



Participantes asociados:

