



Protocolo de extracción de ADN en invertebrados: E.Z.N.A. Mollusc Kit

Comprobar que disponemos de todo el material y equipos necesarios para la extracción.

EQUIPOS	MATERIALES Y REACTIVOS
Bloque térmico	Bata
Microcentrífuga de sobremesa	Guantes de nitrilo
Vórtex	Tubos de microcentrífuga de 1.5mL
Micropipetas de 20, 200 y 1000µL	Puntas para micropipetas
	Rotulador indeleble azul o negro
	Etanol absoluto
	Isopropanol
	Cloroformo
	Alcohol isoamílico
	Kit E.Z.N.A. para extracción de moluscos

***Nota:** Puntas para pipetas y tubos de microcentrífuga autoclavados.*

- Preparar DNA Wash Buffer y HBC buffer (ANEXO III).
- Conectar el bloque térmico para que alcance una temperatura de 70°C. Posteriormente poner a calentar el tampón de elución Elution Buffer.
- Homogeneizar la muestra de tejido. Para ello el primer paso consiste en quitar la humedad de la muestra, previamente conservada genéticamente, sobre un trozo de papel absorbente. Con la ayuda de unas pinzas y un bisturí esterilizado, trocear finamente el tejido para aumentar la superficie de contacto entre la muestra y las soluciones que posteriormente se utilizarán durante la extracción. Finalmente pesar unos 30mg del tejido sobre papel de aluminio previamente tarado e introducir en un tubo de microcentrífuga de 1.5mL autoclavado y codificado.

Nota: La cantidad de material de partida depende de la muestra y se puede aumentar si los resultados que se obtienen con los 30mg de tejido son aceptables. Para las muestras de procesamiento fácil, el procedimiento puede ser ampliado y los volúmenes de tampón utilizados aumentar en proporción. En cualquier caso no usar más de 50mg de tejido ya que la capacidad de unión con la columna podría sobrepasarse. Los tejidos difíciles pueden requerir menos de 30mg de muestra y además doblar todos los volúmenes para asegurar la lisis adecuada.

- Añadir 350µL de *ML1 Buffer* y 25µL de *Proteinase K Solution*. Mezclar completamente con vortex.
- Incubar a 60°C un mínimo de 30 minutos o hasta que la muestra se haya solubilizado.



Nota: El tiempo real de incubación varía y depende de la elasticidad del tejido. La mayoría de las muestras no requieren más de cuatro horas. Alternativamente una incubación a 37°C durante toda la noche produce buenos resultados.

- Añadir 350µL de una solución de *cloroformo:alcohol isoamílico* (24:1). Vortex y centrifugar a 10.000 xg durante 2 minutos a temperatura ambiente.
- Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo de microcentrífuga de 1.5mL. Evitar pipetear la interfase lechosa, ya que contiene contaminantes e inhibidores.

Nota: Este paso elimina gran parte de los polisacáridos y proteínas de la solución y mejora el rendimiento de la filtración. Si después de la centrifugación sólo aparece una pequeña fase acuosa, añadir 200µL más de *ML1 Buffer* y vortexear. Repetir pasos 8 y 9.

- Añadir 350µL de *MBL Buffer* y 10µL de *RNase A*. Vortexear a máxima velocidad durante 15 segundos.
- Incubar a 70°C durante 10 minutos y enfriar a temperatura ambiente.
- Añadir 350µL de etanol absoluto. Vortexear a máxima velocidad durante 15 segundos.
- Insertar una columna *HiBind DNA Mini Column* en un tubo de colección de 2mL.

Nota: Si se desea equilibrar la columna, se deben llevar a cabo los siguientes pasos:

- Añadir 100µL de *NaOH 3M* a la columna *HiBind DNA Mini Column*.
- Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos.
- Desechar el filtrado y reutilizar el tubo de colección.
- Transferir 750µL de muestra a la columna, incluyendo cualquier precipitado que se haya formado.
- 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.
- Desechar el filtrado y el tubo de colección.
- Insertar la columna dentro de un tubo de colección de 2mL nuevo.
- Añadir 500µL de *HBC Buffer* y centrifugar a 10.000 xg durante 30 segundos. Desechar el filtrado y reutilizar el tubo de colección.
- 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.
- 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.

- Transferir la columna a un tubo de microcentrífuga de 1.5mL libre de nucleasa.
- Añadir 75µL de Elution Buffer precalentado a 70°C.



Nota: Los volúmenes pequeños de tampón de elución incrementan la concentración de ADN pero disminuyen el rendimiento. No se recomienda utilizar volúmenes mayores de 200µL.

- Dejar enfriar a temperatura ambiente durante 2 minutos. Centrifugar a 10.000 xg durante 1 minuto.

Nota: Cualquier combinación de los siguientes pasos se puede utilizar para ayudar a aumentar el rendimiento de ADN.

- Después de añadir el tampón de elución, incubar la columna durante 5 minutos.
 - Aumentar el volumen de elución.
 - Repetir la etapa de elución con tampón de elución sin calentar (esto puede aumentar el rendimiento, pero disminuir la concentración).
 - Repetir la etapa de elución usando el eluato de la primera elución (esto puede aumentar el rendimiento mientras se mantiene el volumen de elución).
- Almacenar el ADN a -20°C.



Protocolo de extracción de ADN: Método NaCl

Comprobar que disponemos de todo el material y equipos necesarios para la extracción.

EQUIPOS	MATERIALES Y REACTIVOS
Bloque térmico	Bata
Microcentrífuga de sobremesa	Guantes de nitrilo
Micropipetas de 20, 100, 200 y 1000µL	Tubos de microcentrífuga de 1.5mL
	Puntas para micropipetas
	Rotulador indeleble azul o negro
	Tris
	EDTA
	SDS al 10%
	Proteinasa K
	NaCl 5M
	Etanol absoluto
	Etanol al 70%
	Agua MiliQ

***Nota:** Puntas para pipetas y tubos de microcentrífuga autoclavados.*

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



PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN DE ADN

Comprobar que disponemos de todo el material y equipos necesarios para la amplificación.

EQUIPOS	MATERIALES Y REACTIVOS
Micropipetas de 2, 10, 20 y 100µL	Bata
Vortex	Guantes de nitrilo
Microcentrífuga de sobremesa	Planilla de amplificación
Termociclador	Rotulador indeleble azul o negro
	Placa de PCR
	Rack para placa de PCR
	Tubos de microcentrífuga de 1,5mL
	Puntas para micropipetas
	Gradilla tubos de 1,5mL
	Hielo picado
	Cubeta para hielo picado
	Tampón de reacción
	Agua MiliQ autoclavada
	Disolución de MgCl ₂
	dNTPs
	Cebadores (forward – reverse)
	Polimerasa

***Nota:** Puntas para pipetas y tubos de microcentrífuga autoclavados.*

- Calcular las concentraciones del cóctel de PCR y anotarlas en la Planilla de Amplificación (ANEXO IV). Anotar también la distribución de las muestras en la placa.
- Poner un rack con una placa de PCR sobre hielo y pipetear el volumen de ADN que corresponda en cada uno de los pocillos de la placa. Tapar y mantener refrigerado.
- Preparar el "MIX" de PCR; para ello sacar del congelador los reactivos de la reacción de PCR a usar menos la Polimerasa.
- Tomar un tubo de centrífuga de 1.5mL, poner sobre hielo y añadir los reactivos procurando guardar el siguiente orden: Agua - tampón de reacción - MgCl₂ - dinucleótidos - cebadores. Se prepara el volumen de MIX necesario en función del número de muestras de ADN, más un control de ADN y un volumen extra para cubrir los errores de pipeteo.

Nota: Homogeneizar mediante agitación manual el tubo de MgCl₂ y el de dNTPs antes de pipetear. Además procurar meter la punta de la pipeta lo menos posible en los tubos que contienen los reactivos.

- Sacar la polimerasa del congelador y añadir el volumen necesario en la mezcla anterior. Puesto que la polimerasa se degrada con facilidad, se debe tomar una serie de precauciones:
 - Sacar del congelador justo en el momento de su utilización y una vez utilizada, guardarla con la misma rapidez.
 - Mantenerla en hielo durante su uso.
- Agitar el MIX con un vortex.
- Sacar la placa de PCR reservada en el congelador, darle un spin en la centrífuga y añadir el volumen correspondiente del MIX en cada uno de los pocillos que contenga ADN y en un pocillo sin ADN (control negativo).
- Meter la placa en la centrífuga y darle un spin. La placa queda lista para introducir en el termociclador (ANEXO V) y amplificar.



VERIFICACIÓN PCR

El producto de PCR es verificado mediante la carga de una alícuota de la reacción en un gel de agarosa al 2-2,5 % y observado posteriormente con un transiluminador UV. Se comprueba el tamaño esperado, su intensidad, la ausencia de amplificaciones inespecíficas, la ausencia de dímeros de cebadores y la ausencia de señal en las reacciones utilizadas como control negativo (sin ADN molde). Posteriormente se guarda una imagen del gel y se edita con los códigos de individuo correspondientes a cada una de las bandas (Figura 8).



Figura 8: Ejemplo de visualización de productos de PCR en forma de bandas, de un fragmento del gen CO1 en varias especies de teleósteos.

CLONACIÓN

Este protocolo 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. Las células que se suelen utilizar son bacterias, es decir, el ADN deseado se introduce en el ADN bacteriano, de forma que cuando la bacteria se reproduzca hará múltiples copias de ese ADN.

FILTRACIÓN

La concentración y purificación física que se realiza sobre las muestras seleccionadas para clonar se lleva a cabo con tubos Amicon Ultra -0.5 ml (Ultracel-100K).

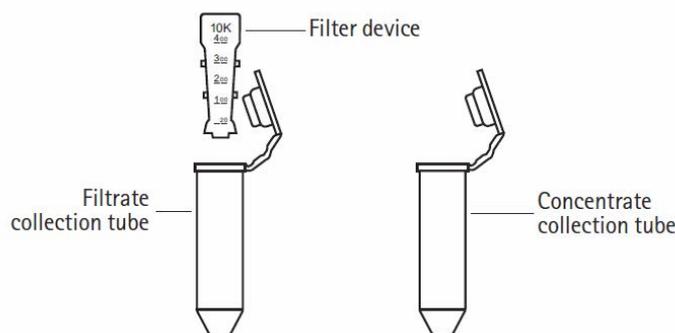


Figura 3. Amicon Ultra-0.5 ml y tubo colector.

- Insertar el Amicon Ultra-0.5 ml en el tubo colector (Figura 3).
- Adicionar las muestras (en nuestro caso decidimos aunar todas las muestras con tamaño de fragmentos similares) y completar el volumen hasta 500 microlitros con agua MiliQ.
- Colocar los tubo en centrifuga (balanceada) y centrifugar a 14.000 g entre 10-30 min. (Figura 4).

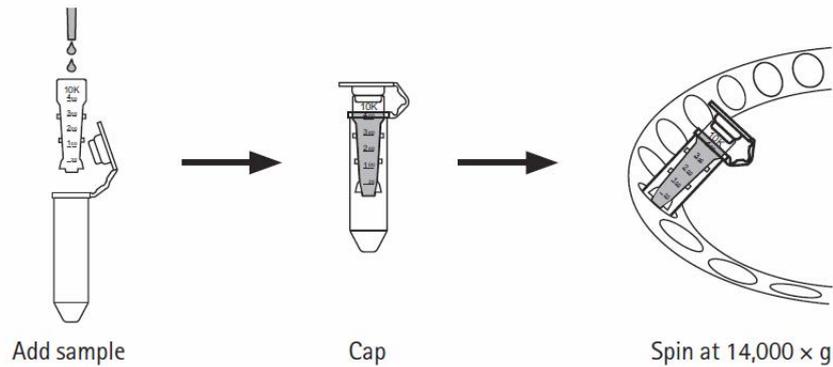


Figura 4. Amicon en el tubo colector y centrifuga.

- Retirar de la centrifuga y colocar el Amicon en un nuevo tubo colector en posición invertida (Figura 5).
- Centrifugar 2 min a 1000 g y recoger el filtrado. (Normalmente se espera que lo eluviado tenga un volumen final entre 20 y 30 microlitros)

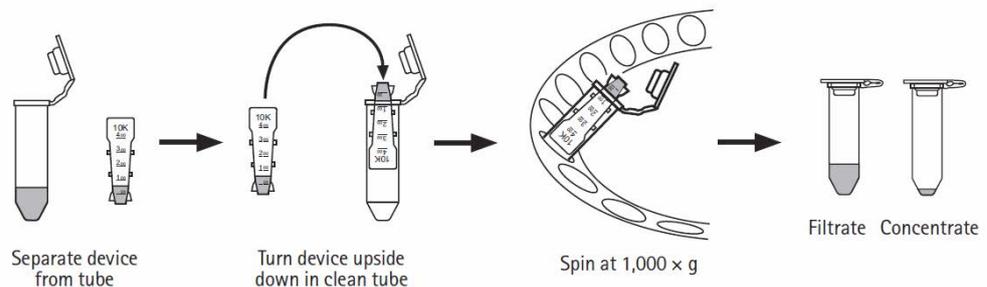


Figura 5. Colocar Amicon en nuevo tubo colector invertido y centrifugar 2 min.

- Cuantificamos la cantidad de producto de PCR.
- Una vez filtrado podemos seguir con el proceso de ligación o almacenar a -20°C .

LIGACIÓN

En esta parte del proceso de clonado lo que se pretende es que los fragmentos se inserten a un plásmido que será el que se replique en la posterior fase de transformación.

La ligación se lleva a cabo usando pGEM-T Easy Vector y 2x Rapid Ligation Buffer (Promega). El pGEM es un plásmido de 3 Kb y concentración 50 ng/ μl .

Se toman tubos de 0.5 ml rotulados para cada filtración realizada.

- Preparar alícuotas para un único uso de 2x Rapid Ligation Buffer.

- Centrifugar brevemente el pGEM-T Easy Vector
- Vortex vigorosamente 2x Rapid Ligation Buffer antes de usar.
- Preparar una reacción de 10 µl como se indica: Tablas 2 y 3



Tabla 2. Reactivos y volumen usados en el estándar, control positivo y control negativo.

REACTIVOS	ESTANDAR	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
2X Rapid Ligation Buffer	5 µL	5 µL	5 µL
pGEM T Easy Vector	1 µL	1 µL	1 µL
Producto de PCR	(cantidad en base al tamaño) 1	----	----
Control de inserto de ADN	----	2 µL	----
T4 DNA Ligasa	1 µL	1 µL	1 µL
Agua Mili Q	(completar el volumen hasta 10 µL)	(completar el volumen hasta 10 µL)	(completar el volumen hasta 10 µL)

Tabla 3. Cálculo de la cantidad del producto de PCR:

CANTIDAD DE PRODUCTO DE PCR	
ng del vector (pGEM)	50
Kb del vector	3
Kb del inserto	(reflejado en el marcador de peso molecular de peso específico durante la electroforesis del producto del PCR)
Ratio molar	Inserto 1
	Vector 1
ng de inserto	-----

NOTA: la relación molar óptima es 1:1 pero si los resultados de la cuantificación del producto de PCR no son óptimos probar con ratios molares de 1:3; 3:1; 1:8; 8:1. Lo recomendado para un mayor número de ligaciones es una cantidad entre 1-10 ng por microlitro en un volumen final de reacción de 10- 20 microlitros (10- 200 ng de DNA).



Para cambiar los ratios se emplea la siguiente fórmula:

$(\text{ng del vector} \times \text{tamaño del inserto en Kb} / \text{tamaño del vector in kb}) \times (\text{ratio molar de inserto: vector})$

Por ejemplo: para el caso de las salinas tenemos unas muestras con un tamaño de 700 pb o lo que es lo mismo 0.7 kb aplicándola para el ratio óptimo 1:1 y el ratio 3:1 obtenemos:

- Ratio 1:1
 $\text{ng del inserto} = ((50 \times 0.7)/3) \times (1/1) = 11.6 \text{ ng}$
- Ratio 3:1
 $\text{ng del inserto} = ((50 \times 0.7)/3) \times (3/1) = 35 \text{ ng}$

El proceso de clonado requiere de cultivo de las células competentes, estos medios de cultivo son específicos ya que contienen componentes que marcan las células no ligadas o inhiben el exceso de crecimiento bacteriano.

- El medio empleado es el LB agar/ampicilina/IPTG/X-Gal.
- La preparación del medio requiere de pasos previos:
- Se pesan 37 g de agar LB para un 1 litro de agua destilada.
- Vertemos la mitad del agua junto el agar en un vaso de precipitado de capacidad 1L (para humectar) y ponemos en la hornilla.
- Cuando este disuelto el agar adicionamos el resto del agua y esperamos a ebullición hasta que quede totalmente claro.
- Ponemos el contenido en una botella de vidrio y llevamos a autoclavar durante 150 min a 121°C.
- La ampicilina requiere de una concentración final de 100 µg/ml por lo que disolvemos 0.1g de ampicilina en 1ml de agua Mili Q.
- El IPTG se precisa en un concentración de 0.1 M o 100mM para ello disolvemos 0.6 g en 25 ml de agua MiliQ y es disolución de tiene que filtrar y almacenar a 4° C.
- X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-galactoside) necesita una concentración de 50 mg/ml por lo que disolvemos 5.0mg de X-Gal en un 1 ml de N-N-Dimetilformamida. Donde se realice la disolución se debe de conservar en un bote oscuro recubierto de papel de aluminio y conservado a -20°C.



- Una vez el medio este autoclavado y haya alcanzado una temperatura aproximada de 50°C se le adiciona el ml de ampicilina, 100µl de IPTG y las 20 µl de X-Gal, se homogeniza con cuidado de no formar burbujas y se reparte en placas de 85 mm y esperamos a que solidifiquen.
- Las placas se pueden conservar una semana a temperatura ambiente o bien guardar durante un mes a 4°C.



TRANSFORMACION USANDO pGEM T-Easy Vector Ligation Reactions (Promega):

En esta fase se requieren los siguientes elementos:

- Celulas altamente competentes ($\geq 1 \times 10^8$ cfu/ μ g DNA): JM109 Higt Efficiency Comptent Cells (Promega).
- Tubos de polipropileno 17 x 100 mm Falcon.
- Incubador con agitación a 37°C
- Bañó a 42°C
- Medio SOC a temperatura ambiente
- Placas con medio de cultivo
- Reacciones de ligación.

Procedemos como sigue:

- Preparar placas para cada reacción de ligación. Requieren de atemperarse antes de la siembra.
- Se centrifugan las reacciones de ligación para colectarlas en el fondo del tubo.
- Adicionar 2µL de cada reacción de ligación a un tubo estéril de 17x100 mm tipo Falcon sobre hielo.
- Tomar alícuotas congeladas de JM109 HECC y colocarlas sobre hielo has descongelación (5 min) (las células competentes están alicuotadas en 25 µL para cada reacción y se conservan a -80°C). Mezclar las células suavemente oscilando el tubo.
- Pipetear suavemente 25 µL de células a cada tubo de ligación.
- Oscilar los tubos para mezclar y colocarlos sobre hielo 20 min



- Incubar las células durante 45-50 s en baño a exactamente 42°C sin agitar y pasarlas a hielo durante dos minutos.
- Adicionar 500 µl de medio SOC atemperado a los tubos con las reacciones y las células.
- Incubar durante 3-5 horas a 37°C con agitación (150-250 rpm).
- 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).
- Se deja absorber sobre los medios unos 30 min para posteriormente incubarlo a 37°C ON.
- 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).
- 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.
- Se pone a 96°C durante 10 min. En bloque térmico.
- Centrifugar a 16000 g durante 5 -10 min
- Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo y se conserva a -20°C hasta su uso para la PCR.

PCR DE LAS COLONIAS

Las colonias seleccionadas son amplificadas mediante una PCR, según la reacción de la Tabla 4 con los primers M13.

Tabla 4. Colony PCR usando primer M13.

Reactivos	Volumen/ reacción	X reacciones
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'