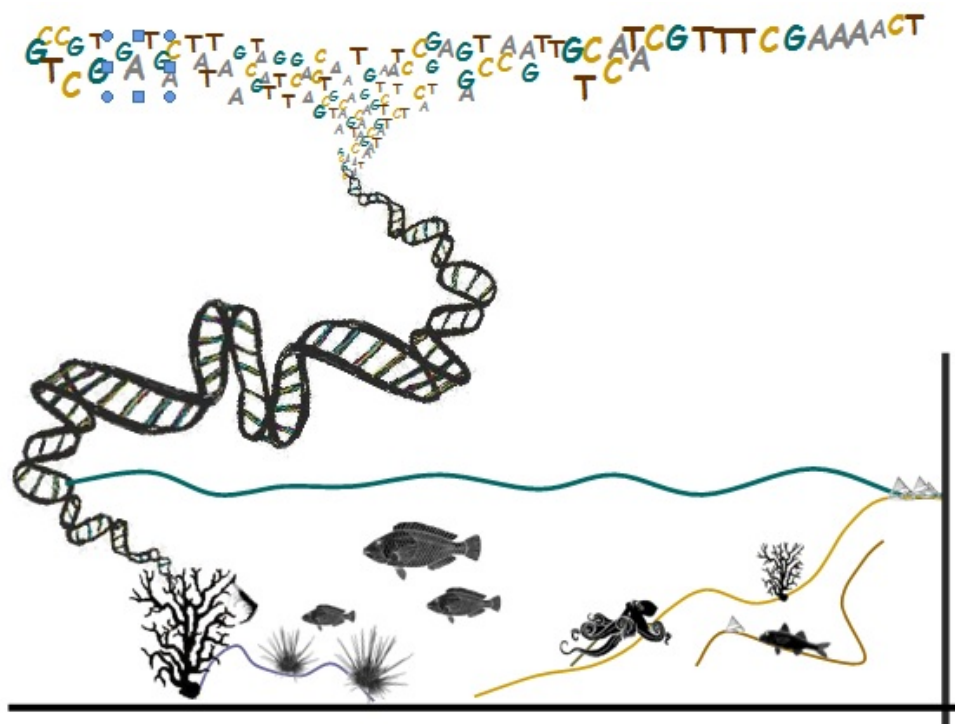


GUÍA DE PROCEDIMIENTOS Y PROTOCOLOS GENÉTICOS DE ESPECIES MARINAS



Autores: Javier Quinteiro, Pablo Manent, Patricia Assunção, Carolina Medina, Ruth Sarmiento
Coordinación: Nieves González-Henríquez, Manuel Rey-Méndez

**1ª REVISIÓN
MARZO 2015**

ISBN 978-84-608-6634-3
Depósito legal C 364-2016

ÍNDICE

1. INVESTIGADORES/LABORATORIOS	4
2. OBJETIVO DE LA GUÍA	4
3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO	7
3.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	7
3.2. FUENTES DE RECOLECCIÓN	7
3.3. PLANIFICACIÓN DEL MUESTREO	8
4. PROCESADO DE LAS MUESTRAS	10
4.1. ACONDICIONAMIENTO DEL TEJIDO	10
4.2. PROCEDIMIENTO PARA EL ACONDICIONAMIENTO DE TEJIDO	10
4.3. ALMACENAJE Y BASE DE DATOS	11
4.3.1. Vínculos a la base de datos	15
5. AISLAMIENTO DEL ADN	16
5.1. ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN	16
5.2. PROTOCOLOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN	17
5.2.1. Protocolo de extracción de ADN en peces: E.Z.N.A. tissue Kit	17
5.2.2. Protocolo de extracción de ADN en peces: Método NaCl	19
5.2.3. Protocolo de extracción de ADN en invertebrados: E.Z.N.A. Mollusc Kit	20
5.2.4. Protocolo de extracción de ADN en microalgas: Método CHELEX	22
5.2.5. Protocolo de extracción de ADN en fanerógamas marinas: Método modificado de CTAB	23
5.2.6. Protocolo de extracción de ADN con <i>SPEEDTOOLS FOOD DNA EXTRACTION KIT</i> (BIOTOOLS B&M Labs, S.A.)	25
6. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DEL ADN AISLADO. ELECTROFORESIS	27
6.1. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE UN GEL DE AGAROSA	27
6.2. PROCEDIMIENTO PARA LA CARGA DE MUESTRAS EN EL GEL Y VISUALIZACIÓN DE ADN	29
7. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DEL ADN AISLADO	32
7.1. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ADN MEDIANTE ESPECTROFOTÓMETRO	32
8. AMPLIFICACIÓN DE ADN: PCR	33
8.1. GENES MITOCONDRIALES SELECCIONADOS PARA ESPECIES DE ANIMALES MARINOS	34

8.2.	CEBADORES DE UTILIDAD EN ANIMALES MARINOS.....	35
8.3.	CEBADORES DE UTILIDAD EN VEGETALES MARINOS	36
8.4.	REACTIVOS DE PCR	37
8.5.	CONDICIONES DE PCR.....	37
8.6.	PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN DE ADN	37
8.7.	VERIFICACIÓN PCR.....	39
9.	SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR.....	40
9.1.	PURIFICACIÓN	40
9.1.1.	Protocolo de purificación enzimática de los productos de PCR.....	40
9.2.	REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN.....	41
9.2.1.	Protocolo Reacción de Secuenciación.....	41
9.3.	PURIFICACIÓN DE LA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN	43
9.3.1.	Protocolo Purificación de la Reacción de Secuenciación	43
9.4.	SECUENCIACIÓN	45
10.	ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS	61
	(PCR – RFLP)	61
11.	BIBLIOGRAFÍA	62
12.	ANEXOS	64
	ANEXO I: PLANILLA DE MUESTREO	64
	ANEXO II: ELABORACIÓN DE ETIQUETAS	65
	ANEXO III: PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES	66
	ANEXO IV: PLANILLAS PCR Y SECUENCIACIÓN	70
	ANEXO V: MANEJO DE EQUIPOS PRINCIPALES	73

1. INVESTIGADORES/LABORATORIOS

❖ COORDINADORES:

Nieves Elvira González Henríquez

Laboratorio BIOMOL. Departamento de Biología. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria; Campus de Tafira 35017; Las Palmas de Gran Canaria, España.

Manuel Rey Méndez

Laboratorio SISMOL. Departamento de Bioquímica e Biología Molecular; Universidad de Santiago de Compostela (USC); CIBUS Planta 3. Lab. 4. Avda. Lope Gomez de Marzoa s/n. 15782 - Santiago de Compostela, A Coruña. Galicia, España.

❖ PARTICIPANTES:

Carolina Medina Alcaraz

Laboratorio BIOMOL. Departamento de Biología. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria; Campus de Tafira 35017; Las Palmas de Gran Canaria, España.

Javier Quinteiro

Laboratorio SISMOL. Departamento de Bioquímica e Biología Molecular; Universidad de Santiago de Compostela (USC); CIBUS Planta 3. Lab. 4. Avda. Lope Gomez de Marzoa s/n. 15782 - Santiago de Compostela, A Coruña. Galicia, España.

Pablo Manent

Laboratorio BIOMOL. Departamento de Biología. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria; Campus de Tafira 35017; Las Palmas de Gran Canaria, España.

Patrícia Assunção

Dpto. de Biotecnología; División de Investigación y Desarrollo Tecnológico; Instituto Tecnológico de Canarias (ITC); Playa de Pozo Izquierdo, s/n. 35119 - Santa Lucía - Gran Canaria, España.

Ruth Sarmiento Herrero

Laboratorio BIOMOL. Departamento de Biología. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria; Campus de Tafira 35017; Las Palmas de Gran Canaria, España.

2. OBJETIVO DE LA GUÍA

La finalidad del proyecto BANGEN es promover el desarrollo y uso de las Metodologías de Biología Molecular, basadas en el análisis de ADN, con la finalidad de establecer estrategias de rápida respuesta en la investigación de organismos marinos y gestión de la biodiversidad, así como establecer la red de colaboración y transferencia científico-tecnológica BANGEMAC entre el espacio macaronésico. BANGEMAC pretende articular una red de sinergias que permita maximizar los recursos regionales destinados a la preservación de la biodiversidad y la planificación común de los recursos naturales.

Actualmente, la red de socios que desde el año 2009 están interesados en desarrollar un sistema integrado de transferencia de información transnacional, a través de la red BANGEMAC, está formada por diversas instituciones como son el Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM) y el Instituto Tecnológico de Canarias (ITC) en las Islas Canarias, la Universidade dos Açores en Azores (UA) y la Câmara Municipal do Funchal (CMF), el Museu Municipal de História Natural do Funchal (MMF) y la Estação de Biologia Marinha do Funchal (EBMF) en Madeira.

Uno de los fundamentos esenciales que alimentan a la red es la obtención de datos genéticos. Así, una optimización continuada de las metodologías de trabajo de laboratorio que permitan eliminar errores y agilizar la generación de datos genéticos es un hito importante. Por lo tanto, en el marco de la red BANGEMAC, compartir las experiencias prácticas de los laboratorios vinculados a la red permitirá mejorar y actualizar los trabajos técnicos de un modo continuado por un lado; y por otro, acelerar la estandarización de métodos de trabajo ya optimizados, facilitando las condiciones de trabajo práctico. Así, el presente manuscrito pretende servir como una guía de trabajo técnico en el que se detallan las diversas metodologías utilizadas en los laboratorios vinculados a BANGEMAC.

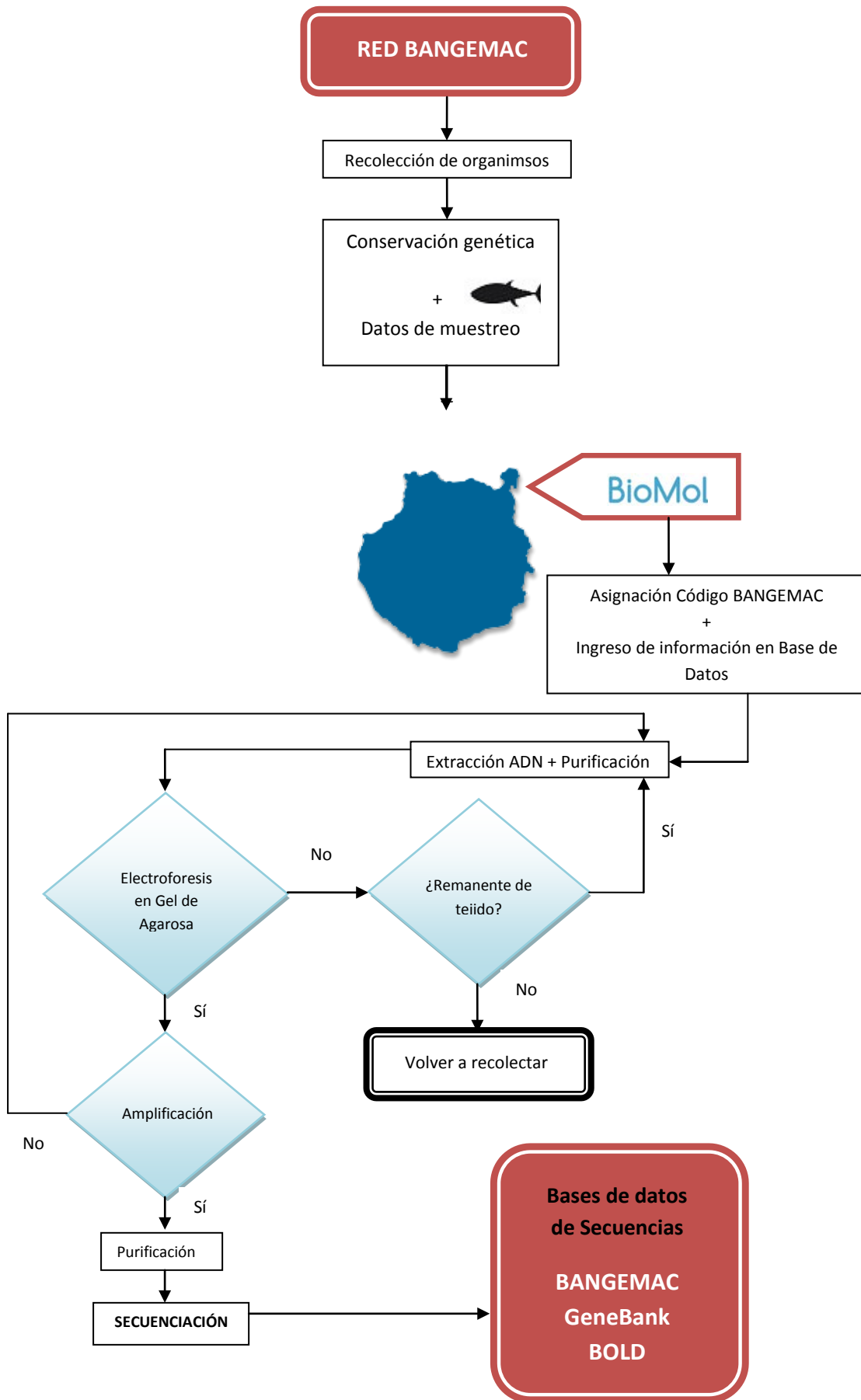


Diagrama de flujo del funcionamiento general de la RED BANGEMAC

3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO

3.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

El primer paso en la mayoría de los trabajos de investigación en biología es la recolección de los especímenes del medio físico en el que viven y que forman parte de una muestra de una especie concreta. Un espécimen es un organismo individual examinado por un taxónomo el cual, a través de caracteres merísticos observados, consigue llegar al reconocimiento de una especie. Una muestra o unidad muestral, en general se refiere a una cantidad limitada de especímenes agrupados por una variable biológica o geográfica que pretende representar el universo muestral de dicha variable. De este modo, estas unidades muestrales pueden usarse para explicar parones o relaciones biológicas, interacciones ecológicas, inferir determinados procesos o clasificar u ordenar colecciones biológicas a través de procedimientos estadísticos apropiados a cada campo de estudio. En genética de poblaciones por ejemplo, una muestra estará representada por un conjunto de alelos o haplotipos que normalmente pretenden representar la variación genética en un área geográfica concreta. A efectos prácticos, a lo largo de la guía se entenderá el espécimen como el organismo entero recolectado en el medio natural. Una muestra corresponderá a la porción de tejido de cada uno de los especímenes, de la que se utilizará un fragmento para la extracción de su ADN.

3.2. FUENTES DE RECOLECCIÓN

Las fuentes que suministran especímenes y muestras al banco pueden ser diversas y, en todo momento, deberán intentar aprovechar especímenes ya recolectados por varios motivos: logística aparatosa, riesgos condicionados por el medio marino y sacrificios innecesarios en las poblaciones naturales. Así, siempre que sea posible, se priorizará la obtención de muestras capturadas en campañas de muestreo de especies marinas de entidades colaboradoras, colecciones de museos, mercados locales, etc. No obstante, las muestras suministradas a la red BANGEMAC deben corresponder a especímenes que, por definición, deben estar correctamente identificados por taxónomos especializados.

El conjunto datos de secuencias nucleotídicas del Banco Genético Marino de la Macaronesia (BANGEMAC) pretende obtener la representación de la biodiversidad genética de las especies marinas de los archipiélagos macaronésicos. En este sentido, BANGEMAC es multidisciplinar en el sentido de ser una base de datos genéticos de diversos marcadores genéticos, aunque principalmente haya sido ideado para datos de secuencias nucleotídicas homólogas de una porción del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I (COI). La COI ha sido internacionalmente utilizada con éxito para la discriminación entre especies de numerosos taxones marinos, por lo que actualmente está considerada (con excepción de algunos taxones concretos) como una herramienta genética con valor taxonómico. Esto quiere decir que la variación genética de dicha porción homóloga de la COI tiene la capacidad de mostrar diversas agrupaciones o **clusters** derivados de análisis filogenéticos que representan la diversidad genética intraespecífica de ese gen que coincide con la variación genética y por

otro, para realizar análisis posteriores que conformarán un mínimo de diez especímenes. Por otro lado, las secuencias nucleotídicas de otros genes nucleares y mitocondriales también formarán parte del Banco; para las cuales se adecuarán los tamaños muestrales en función del tipo de estudio que se lleve a cabo. Por ejemplo, para los estudios filogeográficos en la región macaronésica sobre las cinco especies objetivo (*Sparisoma cretense*, *Octopus vulgaris*, *Megabalanus azoricus*, *Grapsus adensionis* y *Plesionika edwardsii*). Durante el proyecto BANGEN se decidió recolectar 50 individuos de cada archipiélago, tratando de cubrir el máximo número de islas para intentar capturar la máxima variación genética inducida por la insularidad.

3.3. PLANIFICACIÓN DEL MUESTREO

En primer lugar se deben ajustar las condiciones de muestreo dependiendo de la especie objetivo de estudio. Tales condiciones incluyen la elección del arte de pesca, localización geográfica, época de muestreo y materiales de almacenamiento y preservación.

Una vez organizada la salida de campo, se procede a la preparación del material que debe incluir necesariamente:

- Planillas impresas en papel con los datos que se deben anotar durante la recolección (ANEXO I), entre los que se incluye "Medio de conservación de origen" que hace referencia al modo en que se conservará inicialmente tras la captura (refrigerado o congelado), "Fecha de recolección", "Recolector", etc.
- Bolsas para muestreo (ANEXOII).
- Papel.
- Lápiz.
- Nevera portátil con placas de hielo.
- GPS portátil.

Durante la recolección/pesca, se introducirá cada espécimen en el interior de una bolsa plástica habilitada para tal fin con etiquetas que contengan las siguientes anotaciones (ANEXO II):

- Número de **Hoja de muestreo** en la que se recogen los datos sobre dicho espécimen.
- **Nº de muestra** (debe coincidir con el número de muestra que aparece en la hoja de muestreo). En caso de recolectar varios individuos de la misma especie, se podrán introducir dentro de la misma bolsa, sin olvidar anotar los nº de muestra correspondientes (una vez en el laboratorio, se reasignará a cada muestra un código de acuerdo a la base de datos).

Cada uno de los especímenes, a partir de cuyas muestras de tejido se aislará el ADN total, será caracterizado morfológicamente, fotografiado y serán recogidos todos los datos de interés que no pudieron ser anotados durante la recolección (posición geográfica de captura, caracteres merísticos de valor

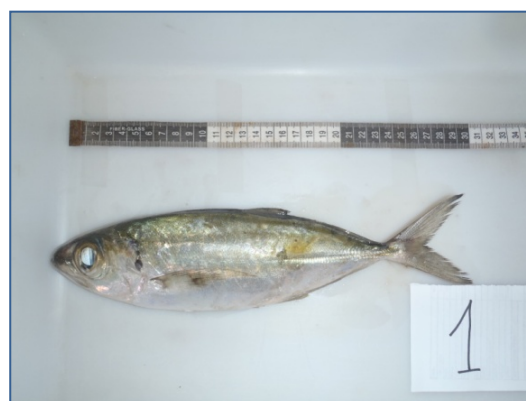


Figura 1: El espécimen se fotografía junto al número de muestra y una escala paralelamente.

taxonómico, lugar de procedencia, etc.). El registro fotográfico es importante debido a que el medio de conservación puede hacer que se pierdan caracteres taxonómicos importantes como la coloración, que podrían ser esenciales para una posible confirmación taxonómica posterior (Figura 1).

4. PROCESADO DE LAS MUESTRAS

4.1. ACONDICIONAMIENTO DEL TEJIDO

En función del medio de conservación de origen, es decir, del método de conservación que se lleve a cabo tras la captura del espécimen, se procederá de un modo u otro:

- **Muestras frescas:** Cuando el tiempo transcurrido entre el muestreo y la conservación genética no es superior a veinticuatro horas, los especímenes deben mantenerse refrigerados desde el momento en el que son tomados del medio marino.
- **Muestras congeladas:** Antes de proceder a la conservación genética, se introducen las muestras congeladas en el refrigerador para que el proceso de descongelación sea lento y así minimizar la degradación del tejido.
- **Muestras conservadas en disolventes orgánicos (etanol, formol):** Cuando el medio de conservación de origen coincide con el medio de conservación genética, el tratamiento de las muestras no requiere tanta inmediatez como en los casos anteriores, aunque resulta conveniente mantenerlas en frío.

En el contexto del trabajo de muestreo y teniendo en cuenta las difíciles condiciones del medio marino, se ha mostrado que la preservación de cada muestra de tejido en etanol 96° y en frío supone una eficiente metodología de conservación genética. A continuación se detalla el protocolo para llevar a cabo dicho proceso correctamente.

4.2. PROCEDIMIENTO PARA EL ACONDICIONAMIENTO DE TEJIDO

- Comprobar que disponemos de todo el material necesario para el proceso.

MATERIAL	REACTIVOS
Bata	Etanol 96°
Guantes de nitrilo	Alcohol para limpieza
Mechero de alcohol o Bunsen	
Bisturí	
Pinzas	
Tijeras de acero	
Vaso de precipitado	
Criotubos de rosca de 2mL	
Pipeta Pasteur	
Rotulador indeleble de color azul o negro	

Nota: La preparación de tejidos para su posterior uso en investigación molecular debe ser estandarizada, ya que una mala manipulación de los mismos, implicaría riesgos de contaminación humana o cruzada entre especímenes. Por ello, el uso de guantes y el orden dentro del puesto de trabajo, resultan de gran importancia para evitar riesgos potenciales.

- En una mesa de trabajo sin corrientes de aire cercanas, encender un mechero de alcohol (o Bunsen).
- Verter alcohol para limpieza en un vaso de precipitado.
- Agitar unas pinzas y un bisturí en el interior del vaso con alcohol. Sacarlos y pasarlos por la llama del mechero unos segundos extremando la precaución. Dejar enfriar.
- Tomar las pinzas y el bisturí y cortar una porción de tejido, a ser posible muscular, e introducir en un criotubo de rosca de 2mL. Rellenar con etanol a 96°.
- Codificar el tubo tal como se indica en el apartado 4.3. (Catalogación) y conservar congelado a -20° hasta el momento de su análisis.

Nota: SIEMPRE se deben esterilizar los utensilios metálicos con alcohol y mechero antes de continuar con el siguiente espécimen. En caso de que hayan quedado restos del espécimen anterior adheridos a los utensilios, limpiar con papel antes de la esterilización.

4.3. ALMACENAJE Y BASE DE DATOS

Durante el proceso de conservación de las muestras de cualquier colección biológica, se deben tener en cuenta una serie de etapas que garanticen su adecuada preservación y su fácil manejo. Entre estas etapas se encuentran el ingreso de los ejemplares, etiquetado, catalogación, sistematización y almacenamiento.

- Ingreso de los ejemplares: Los métodos y técnicas de preservación dependen del uso posterior al que se destine el ejemplar, al grupo al que pertenezca y al estado en el que lleguen al laboratorio.
- Catalogación: Asignación de un nuevo código único y consecutivo a cada muestra que entre a formar parte de la colección de acuerdo a los registros existentes. El fin de la codificación de cada tubo es facilitar su posterior reconocimiento en el laboratorio y en la base de datos.

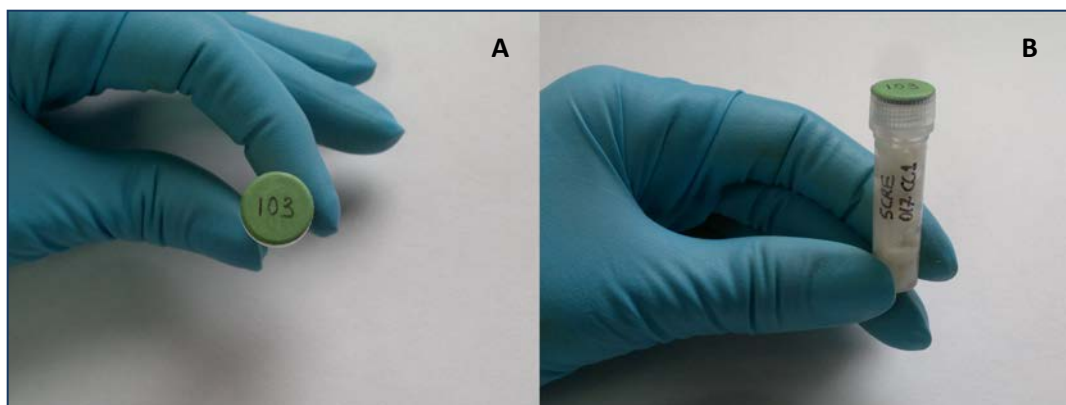


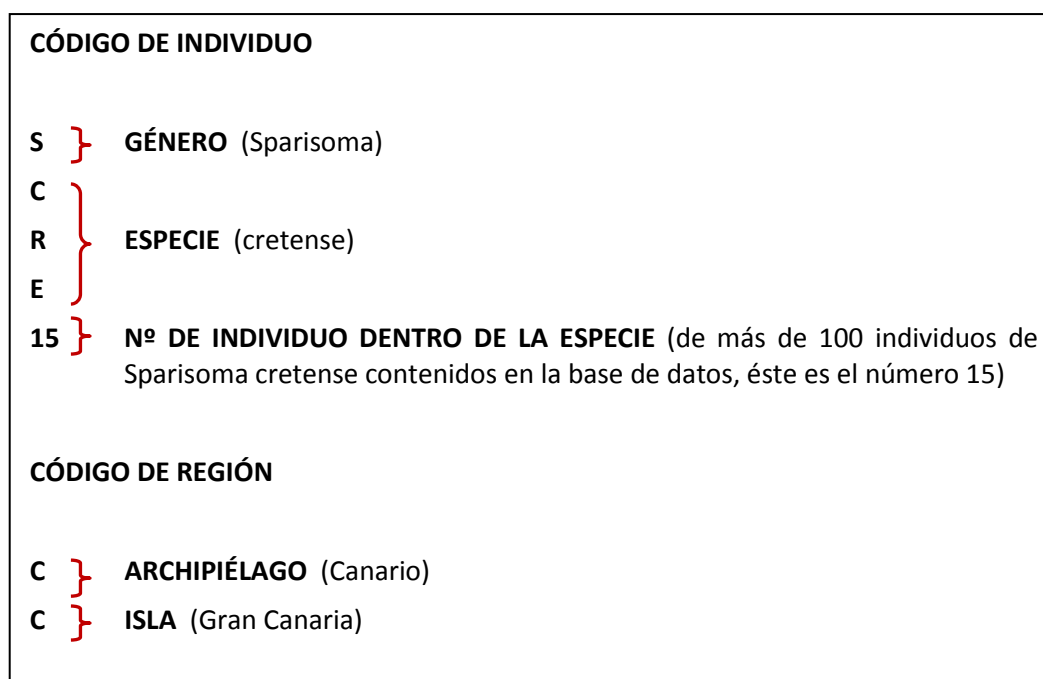
Figura 2: A) Código de almacenaje. B) Código de individuo más código de región de un individuo de *Sparisoma cretense*.

El primer paso de la codificación consiste en asignar a la muestra un **Código de Almacenaje**. Éstos son códigos numéricos que van en orden consecutivo del "1" en adelante.

Por tanto, para ingresar un nuevo individuo, se debe entrar en la base de datos y comprobar que ningún campo tenga filtros puestos, avanzar hasta el final de la tabla y asignar a la nueva muestra un código de almacenaje consecutivo al último que incluya la base de datos. La forma de etiquetar el tubo consiste en poner una pegatina circular en la tapa del vial con el código de almacenaje escrito con lápiz, para así evitar que se borren los números en caso de fugas de etanol (Figura 2A).

El siguiente paso consiste en asignar a la muestra un **Código de Individuo**, el cual está formado por cuatro letras. La primera letra hace referencia a la primera letra del Género y las tres siguientes a las tres primeras de la Especie. Además, el código de individuo lleva asociado un **Código de Región** conformado por dos letras. La primera hace referencia al Archipiélago y la segunda a la Isla donde ha sido muestreado el individuo (Esquema 2).

Así por ejemplo, el código **SCRE015 CC** perteneciente a la especie *Sparisoma cretense* se interpreta según el *Esquema 2*.



Esquema 2: Interpretación del Código de Individuo y del Código de Región.

Nota: En el caso de que varias especies coincidan con el mismo código de individuo, a una de ellas se le asigna un código de cinco letras. La primera correspondiente al Género y las otras cuatro a la Especie. Un ejemplo de ello es lo que ocurre con las especies *Decapterus macarellus* y *Dentex macrophtalmus*:

- Decapterus macarellus: DMAC
- Dentex macrophtalmus: DMACR

Para asignar un Código de Individuo, primero se busca en la base de datos el código de almacenaje que se ha asignado a la muestra. Luego se completan los campos "GRUPO",

"FAMILIA" Y "ESPECIE". Se aplica un filtro para que sólo aparezcan los individuos de dicha especie y se asigna un Código de Individuo consecutivo al último de la lista. Por último se anota dicho código en el lateral del vial con un rotulador indeleble de punta fina de color azul o negro (Figura 2B). En caso de que la muestra sea un extracto de ADN, además del código lateral, se anota la fecha de extracción.

Tanto la muestra de tejido como su extracto de ADN respectivo llevan asociados el mismo código de almacenaje y de individuo. La diferencia radica en que a los viales con tejido se les asignan etiquetas de color **VERDE** y a los viales con ADN etiquetas de color **ROJO**.

- C. **Almacenamiento:** Las muestras se almacenarán en cajas congelables para criotubos, en orden consecutivo según código de almacenaje. En el lateral de cada caja se pega un trozo de cinta adhesiva rotulable (verde en las cajas de tejidos y roja en las cajas de extractos de ADN) y se anota el rango de códigos que abarca cada una de ellas, el número de la caja y el contenido de la misma, "Tejido" o "ADN" (Figura 3). El stock de tejido se almacena en un compartimento del congelador distinto al del stock de ADN y a -20°C.

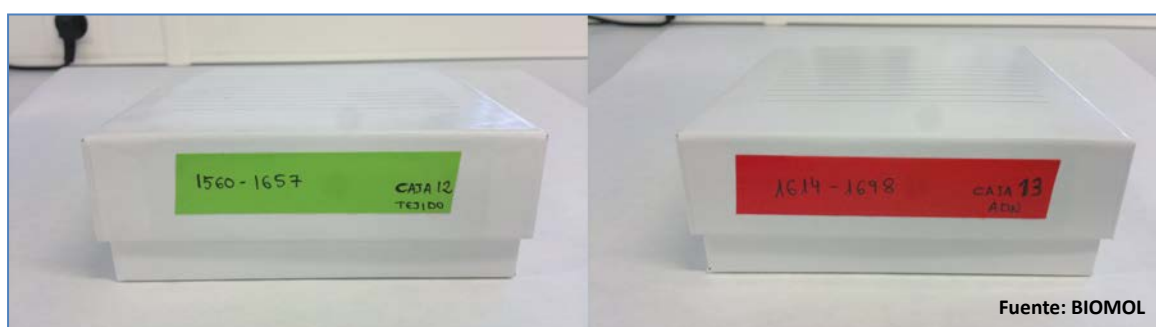


Figura 3: Cajas congelables con muestras de tejido con cinta verde y muestras de ADN con cinta roja.

- D. **Sistematización:** Consiste en anexar toda la información de cada ejemplar además de la contenida en la planilla de muestreo, en la base de datos Excel con el fin de agilizar la consulta de información. Cada uno de los siguientes campos, forma parte del conjunto de variables de la base de datos BANGEMAC y deben ser completados para cada espécimen:

- **Código de Almacenaje:** Código numérico con el que están almacenadas las muestras.
- **Phylum** al que pertenece el espécimen. Ejemplo: *Arthropoda*.
- **Clase** a la que pertenece el espécimen. Ejemplo: *Maxillopoda*.
- **Orden** al que pertenece el espécimen. Ejemplo: *Sessilia*.
- **Familia** a la que pertenece el espécimen. Ejemplo: *Balanidae*.
- **Género** al que pertenece el espécimen. Ejemplo: *Megabalanus*.
- **Especie** a la que pertenece el espécimen. Ejemplo: *Megabalanus azoricus*.
- **Imagen del espécimen:** Siempre que se disponga de ella, se asignará a este campo un código de fotografía, que debe coincidir con el mismo código del archivo en formato jpg.

- **Tejido remanente:** Mediante sistema binario de unos y ceros se puede saber si existe tejido almacenado.
- **Extracto de ADN:** Mediante sistema binario de unos y ceros se puede saber si existe extracto de ADN almacenado.
- **Fecha de extracción:** Fecha en la que se realizó la extracción de ADN.
- **Nº de placa de PCR:** Mediante este campo se puede saber en qué placa de PCR se encuentra una muestra concreta y de ese modo poder localizar fácilmente la información almacenada de la misma.
- **Nº de placa de secuenciación:** Mediante este campo se puede saber en qué placa de Reacción de secuenciación se encuentra una muestra concreta y de ese modo poder localizar fácilmente la información almacenada de la misma.
- **COI, RC y CytB Geneious o Bioedit:** Mediante sistema binario de unos y ceros se puede saber si hay secuencia depositada en la base de datos GENEIOUS.
- **COI, RC y CytB Genebank:** Las secuencias que estén publicadas en la base de datos Genebank, serán vinculadas con el Código asociado de Genebank.
- **Código de Individuo:** Código de cuatro letras. La primera hace referencia al Género y las otras tres a la Especie.
- **Código de región:** Incluye archipiélago e Isla.
- **Código antiguo:** Código que tienen las muestras que proceden de laboratorios externos o bien códigos que han sido cambiados por diversos motivos.
- **Identificación BOLD:** Únicamente para secuencias COI. Nombre de la especie identificada tras el análisis de similitud de secuencias COI entre la secuencia problema, objeto de comparación y la base de datos de secuencias BOLD.
- **Porcentaje de similitud BOLD (análisis BOLD):** Valor de porcentaje obtenido en el análisis BOLD para la especie con mayor porcentaje de similitud con la secuencia problema de la base de datos de secuencias BANGEMAC.
- **Identificación BLAST:** Únicamente para secuencias COI. Nombre de la especie identificada tras el análisis de similitud de secuencias COI entre la secuencia problema, objeto de comparación y la base de datos de secuencias BLAST.
- **Porcentaje de similitud BLAST (análisis BLAST):** Únicamente para secuencias COI. Valor de porcentaje obtenido en el análisis BLAST para la especie con mayor porcentaje de similitud con la secuencia problema de la base de datos de secuencias BANGEMAC.
- **Observaciones con MATCH.**
- **Localización:** Ubicación exacta dentro de la región.
- **Latitud y Longitud:** En grados, minutos y segundos.
- **Recolector:** Nombre de la persona o entidad que se ha encargado del muestreo del espécimen.
- **Identificador taxonómico:** Nombre de la persona que ha identificado morfológicamente a cada espécimen. Esta identificación puede consistir simplemente en su reconocimiento visual o basada en caracteres diagnóstico tras una necesaria consulta de bibliografía específica del taxa en cuestión.
- **Fecha de recolección** del espécimen del medio natural.
- **Medio de conservación de origen:** Medio en el que se conserva el espécimen tras la captura hasta la conservación definitiva de la muestra de tejido.

- **Fecha de conservación genética:** Fecha en la que la muestra de tejido es conservada en etanol al 96°.
- **Proyecto/Encargo:** Nombre del Proyecto a través del cual se ha procesado una muestra o Nombre de la entidad que solicita un encargo con determinadas muestras.
- **Observaciones:**

4.3.1. Vínculos a la base de datos

Una vez obtenida la secuencia de cada espécimen, se debe reflejar esta información en la base de datos.

Cada vez que se confirme que un individuo tiene secuencia, se anotará en la columna "Nombre del gen GENEIOUS/BIOEDIT" (COI, D-loop o Cytb) de la base de datos mediante un uno. Además, en la columna "Nombre del gen GENE BANK" se vinculará la secuencia publicada previamente en Genbank del siguiente modo:

- Abrir base de datos **Genebank** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y buscar la secuencia que se desea vincular al excel. Una vez se localice, copiar la dirección de la web.
- Abrir la base de datos *Excel*.
- Apretar el botón derecho sobre la casilla donde se desea generar el vínculo y seleccionar **Hipervínculo**.
- Luego **Vincular a: Archivo o página existente**.
- En el recuadro **Dirección**, añadir la dirección copiada anteriormente.
- Una vez hecho esto, en el recuadro **Texto** se anota el código con el que aparece la secuencia en Genebank.
- Clickear en **Aceptar**.

Nota: Tanto las imágenes de los especímenes como las secuencias brutas y las editadas, deben ser guardadas en sus respectivas carpetas dentro del Servidor de BioMol.

5. AISLAMIENTO DEL ADN

El aislamiento consiste en la extracción del ADN genómico total disuelto, a partir de tejido animal a través de dos pasos clave. El primero, es la rotura de las membranas nuclear y mitocondrial, consiguiendo liberar el ADN, y el segundo la precipitación del mismo. Una vez finalizada la extracción, la electroforesis en gel de agarosa permite visualizar las bandas de ADN genómico y cuantificar aproximadamente el tamaño del ADN obtenido, por comparación directa con un marcador cuyo tamaño de bandas es previamente conocido, y la cantidad en base a la intensidad de la banda en el gel. La visualización es posible gracias al uso de marcadores como el SYBR Safe, capaces de emitir fluorescencia bajo luz UV.

Hay diversas formas de extraer ADN, con recetas particulares y protocolos caseros de laboratorios. Además, en el mercado se pueden encontrar diversos kits de extracción de ADN, normalmente más rápidos y menos agresivos que los protocolos tradicionales, y que suelen ofrecer un óptimo rendimiento. El método "casero" es más laborioso y lento, aunque más económico. Sin embargo, ambos ofrecen un rendimiento de trabajo parecido. Por lo tanto, dependiendo de la naturaleza de la especie, se selecciona el protocolo de aislamiento de ADN total más adecuado.

5.1. ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN

Antes de proceder a la extracción de ADN, se debe tomar la muestra de tejido conservada en etanol, para acondicionarla y lograr así la máxima eficacia durante los procesos analíticos posteriores. El protocolo a seguir es el siguiente:

- Comprobar que disponemos de todo el material necesario para el proceso.

MATERIAL	REACTIVOS
Bata	Alcohol para limpieza
Guantes de nitrilo	
Mechero de alcohol o Bunsen	
Bisturí	
Pinzas	
Vaso de precipitado	
Papel de aluminio	
Papel absorbente	
Tubos de microcentrífuga de 1.5mL	
Rotulador indeleble azul o negro	

- Quitar la humedad de la muestra 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.
- Pesar aproximadamente 30mg del tejido sobre papel de aluminio previamente tarado e introducir en un tubo de microcentrífuga de 1.5mL autoclavado y codificado con rotulador indeleble.

Nota: Antes de pasar a la siguiente muestra, introducir las pinzas y el bisturí en un vaso con etanol de lavado y pasar por la llama de un mechero para esterilizar.

5.2. PROTOCOLOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN

5.2.1. Protocolo de extracción de ADN en peces: E.Z.N.A. tissue 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
	Kit E.Z.N.A. para extracción de tejidos
	Opcional: Solución de RNasa (100mg/mL)

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 55°C.

Nota: Aunque no sea necesaria la homogeneización mecánica de los tejidos, la pulverización en nitrógeno líquido mejora la lisis y reduce el tiempo de incubación.

- Añadir 200µL de *TL Buffer* y 25µL de *OB Protease Solution*. Aplicar vortex hasta que se mezcle completamente e incubar a 55°C en el bloque térmico con agitación durante 3 horas o si se prefiere toda la noche. Al mismo tiempo, rotular todos los tubos de microcentrífuga y las columnas que se vayan a utilizar durante la extracción con el código correspondiente.

- Centrifugar a velocidad máxima (13.000 xg) durante 5 minutos y transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga estéril de 1.5mL con cuidado de no transferir el pellet.
- Añadir 220µL de *BL Buffer*. Vortex hasta mezclar completamente e incubar a 70°C durante 10 minutos.

Nota: Si se forma un tenue precipitado tras la adición del tampón, no preocuparse puesto que no va a interferir en la recuperación del ADN.

- Añadir 220µL de *etanol absoluto*. Vortex.
- Insertar una columna HiBind DNA Mini Column dentro de un tubo de colección de 2mL y transferir la muestra completa de la etapa 8 a la columna incluyendo cualquier precipitado que se hubiera formado.
- Centrifugar a velocidad máxima durante 1 minuto, desechar el filtrado y reutilizar el tubo de colección.
- Añadir 500µL de HBC Buffer. Centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos y desechar el filtrado y el tubo de colección.
- Insertar la columna en un tubo de colección nuevo.
- Añadir 700µL de DNA Wash Buffer. Centrifugar a velocidad máxima durante 30 segundos.
- Desechar el filtrado y reutilizar el tubo de colección.
- Repetir los dos últimos pasos.
- Centrifugar la columna vacía a máxima velocidad durante 2 minutos para secar la columna, de lo contrario, los restos de etanol podrían inhibir la PCR.
- Transferir la columna a un tubo de microcentrifuga de 1.5mL libre de nucleasa.
- Añadir 75µL de Elution Buffer precalentado a 70°C.
- Dejar reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos. Centrifugar a velocidad máxima durante un minuto.

Nota: Cada elución de 200 µl tiene un rendimiento del 60-70% del ADN unido a la columna. Así, dos eluciones por lo general, dan resultados de 90%. Sin embargo, aumentar el volumen de elución reducirá la concentración del producto final. Para obtener ADN a concentraciones más altas, la elución se puede llevar a cabo utilizando 50-100 µl del tampón de elución (que reduce ligeramente el rendimiento de ADN total). Los volúmenes más bajos de 50 µl reducen considerablemente los rendimientos. En algunos casos, los rendimientos pueden incrementarse mediante la incubación de la columna a 70 ° C (en lugar de a temperatura ambiente) después de la adición de tampón de elución.

- Conservar el ADN a -20 °C.

5.2.2. Protocolo de extracción de ADN en peces: 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°. 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.

5.2.3. 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 procesado 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.

5.2.4. Protocolo de extracción de ADN en microalgas: Método CHELEX

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

EQUIPOS	MATERIALES Y REACTIVOS
Bloque térmico	Bata
Vórtex	Guantes de nitrilo
Microcentrífuga de sobremesa	Tubos de microcentrífuga de 1.5mL
Micropipetas de 100, 1000µL	Puntas micropipetas
	Rotulador indeleble azul o negro
	Vaso pequeño de precipitado de vidrio
	Varilla de vidrio
	Resina CHELEX
	Agua desionizada autoclavada

Nota: Puntas para pipetas y tubos de microcentrífuga autoclavados.

- Preparar solución CHELEX 10% (ANEXO III).
- Sacar del congelador una alícuota de 300µL de CHELEX 10% por cada muestra.
- Añadir 50 µL de cultivo (o un poco de cultivo en agar) a su respectiva alícuota.
- Agitar en el vórtex durante 10-15 seg.

- Encender el bloque térmico e incubar los tubos a 95°C durante 30 minutos con agitación.
- Agitar en el vórtex durante 10-15 segundos con cuidado para evitar que se abran las tapas de los viales.
- Centrifugar 5 minutos a alta velocidad (>10.000 rpm).
- Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 mL con cuidado de no arrastrar Chelex, ya que es inhibidor de la PCR.
- Purificar el sobrenadante. El Real Clean Spin kit (REAL, Durviz S.L.U., Valencia, Spain) da resultados satisfactorios aunque puede servir otro método o kit de purificación.
- Almacenar a -20°C.

5.2.5. Protocolo de extracción de ADN en fanerógamas marinas: Método modificado de CTAB

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

EQUIPOS	MATERIALES Y REACTIVOS
Homogeneizador automático ¹	Bata
Bloque térmico	Guantes de nitrilo
Baño de agua	Rotulador indeleble azul o negro
Microcentrífuga de sobremesa	Tubos microcentrífuga 1.5mL
Pipeta automática 20-200µL	Rack para tubos de microcentrífuga de 1.5mL con tapa
Vórtex	Puntas micropipetas
	CTAB 2%
	PVP 1%
	EDTA 0,02M pH=8
	NaCl 1,4M
	Tris-HCl 0,1M pH=8
	2-Mercaptoetanol
	Cloroformo
	Alcohol isoamílico
	Isopropanol
	TE

Nota: Puntas para pipetas y tubos de microcentrífuga autoclavados.

Nota: Previamente a la extracción, el material vegetal a usar deberá limpiarse y estar totalmente seco. Para la obtención de un mejor rendimiento en la extracción de ADN, la parte basal (zona blanquecina) de las hojas será el material idóneo por no presentar epífitos y ser la zona donde las hojas producen tejido nuevo y crecen, por lo que es rica en ADN. Conviene que el tejido a secar sea suficiente como para un mínimo de dos

¹ En su defecto, utilizar nitrógeno líquido.

extracciones. Una vez la muestra se ha limpiado, deberá secarse al tacto y luego ser introducida en una bolsita codificada de cierre hermético con gel de sílice, manteniéndola el tiempo necesario hasta su total secado. Si el gel de sílice estuviera saturado de humedad, debe reponerse por otro nuevo. Una manera fácil para confirmar el secado de la muestra se basa en que la misma esté “crujiente”.

- Preparar la disolución *CTAB* (ANEXO III).
- Colocar cada muestra en un tubo de microcentrífuga de 1.5-2mL y rotular con su código respectivo (Apartado 4.3. Catalogación).
- Pulverizar las muestras con un homogeneizador automático o con nitrógeno líquido.
- Encender baño de agua y calentar el tampón *CTAB* a 60°C.
- Añadir 400µL del tampón calentado a la muestra e incubar en un bloque térmico a 60°C durante aproximadamente 2 horas (tiempo estimado para que los tejidos se digieran totalmente). Homogeneizar invirtiendo los tubos cada 30 minutos.
- Añadir 800µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y homogeneizar. Para ello se colocan los viales en un rack con tapa y se invierte suavemente durante 10 minutos.
- Centrifugar 10 minutos a 8.000 xg.
- Pipetear con mucho cuidado el sobrenadante (fase acuosa) e introducir en un tubo de 1,5mL nuevo. Se recomienda pipetear el sobrenadante con sumo cuidado y en volúmenes de 200µL ya que el cloroformo es muy escurridizo y puede contaminar fácilmente la muestra.
- Para precipitar el ADN, añadir 200µL de isopropanol frío (conservado a -20°C). Aunque un tiempo 30 minutos es suficiente para que precipite suficiente cantidad de ADN, éste es el único paso en el que se puede parar, por lo que se recomienda dejar las muestras toda la noche a -20°C.
- Centrifugar 10 minutos a 4°C y 16.000 xg. Descartar el sobrenadante y conservar únicamente el pellet de ADN.
- Añadir 500µL de etanol 70% frío y agitar ligeramente.
- Centrifugar 2 minutos a 8.000 xg y pipetear con cuidado el etanol.
- Dejar evaporar el etanol a temperatura ambiente o introducir en estufa a 37-40°C durante una hora.
- Añadir 50-100µL de TE y resuspender el ADN con ayuda de una pipeta.
- Nota: En caso de que la resuspensión no tenga que ser inmediata, conviene dejar el tubo con ADN y TE cerrado, en un bloque térmico a 36-40°C con agitación mínima o en estufa a la misma temperatura agitando con suavidad de vez en cuando.
- Conservar a -20°C

5.2.6. Protocolo de extracción de ADN con *SPEEDTOOLS FOOD DNA EXTRACTION KIT* (BIOTOOLS B&M Labs, S.A.)

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

EQUIPOS	MATERIALES Y REACTIVOS
Homogeneizador	Bata
Bloque térmico	Guantes de nitrilo
Vórtex	Rotulador indeleble azul o negro
Centrífuga de sobremesa	Tubos de centrifuga de 2mL
Pipeta automática de 10, 200 y 1.000µL	Tubos de centrifuga de 1.5mL
	Puntas para pipetas

Nota: Puntas para pipetas y tubos de microcentrifuga autoclavados.

- Homogeneizar aproximadamente 200mg de la muestra en polvo para que la lisis sea efectiva.
- Transferir el homogeneizado a un tubo de centrifuga de 2mL.
- Para realizar la lisis celular, añadir 550µL de Buffer BCF precalentado a 65°C y agitar 15 segundos mediante Vórtex.
- Añadir 10µL de *Proteinase K* y mezclar 3 segundos con Vórtex.

Nota: Si la muestra no se disuelve con dicha cantidad de Buffer BCF, añadir más cantidad del mismo y de Proteinasas K de forma proporcional hasta que la muestra se resuspenda totalmente.

- Incubar a 65°C durante 30 minutos y posteriormente centrifugar 10 minutos a una velocidad superior a 10.000 xg para que los contaminantes y desechos celulares sedimenten.
- Transferir el sobrenadante a un tubo de centrifuga de 2mL y añadir un volumen de Buffer BC4 y un volumen de etanol absoluto. Mezclar mediante vortex 15 segundos.
- Para cada preparación utilizar una columna con su tubo de centrifuga. Cargar unos 600µL mezcla en la columna y centrifugar 1 minuto a 11.000 xg.
- Descartar el filtrado y repetir el paso 8 hasta que haya pasado toda la mezcla por la columna.
- Colocar la columna en un nuevo tubo de centrifuga y añadir 400µL de Buffer BCQO a la columna. Centrifugar 1 minuto a 11.000 xg. Descartar el filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo de centrifuga.
- Añadir 700µL de Buffer BC5 a la columna. Centrifugar 1 minuto a 11.000 xg. Descartar el filtrado. Colocar la columna en un nuevo tubo de centrifuga.
- Para un tercer lavado, añadir 200µL de Buffer BC5 a la columna. Par eliminar totalmente el buffer, centrifugar 2 minutos a 11.000 xg y descartar el filtrado. La columna debe estar completamente libre de etanol para evitar la inhibición de procesos posteriores.

- Colocar la columna en un nuevo tubo de centrifuga de 1.5mL. Añadir 100µL de Buffer BCE precalentado a 70°C directamente en la membrana.
- Incubar a temperatura ambiente 5 minutos y centrifugar 5 minutos a 11.000 xg. El filtrado contiene el ADN purificado de la muestra.
- Almacenar a -20°C.

6. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DEL ADN AISLADO. ELECTROFORESIS

La electroforesis a través de un gel de agarosa, es uno de los métodos estándares más usados para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. La técnica es simple, rápida de realizar y además es capaz de separar fragmentos de ADN que no pueden ser separados correctamente por otros procedimientos.

6.1. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE UN GEL DE AGAROSA

- Comprobar que disponemos de todo el material y equipos necesarios para preparar gel de agarosa.

EQUIPOS	MATERIALES Y REACTIVOS
Fuente de alimentación electroforesis	Bata
Cubeta de electroforesis	Guantes de nitrilo
Molde para geles de agarosa	Manopla
Peines para la cubeta de electroforesis	Puntas micropipetas
Microondas	Erlenmeyer de vidrio de 250mL
Balanza analítica	Probeta de vidrio de 500mL
Micropipeta 0.5-10 μ L	Nivel de burbuja
	Termómetro
	Cinta adhesiva de laboratorio
	Agarosa en polvo
	TAE 1X
	SYBR® Safe
	Agua MiliQ

Nota: Puntas para pipetas y tubos de microcentrifuga autoclavados.

- Tomar un molde para geles, comprobando que esté limpio y seco. Si el soporte está abierto por los laterales y no poseemos un molde para el mismo, sellar los bordes con cinta adhesiva de laboratorio.
- Colocar los peines en el interior del molde para geles y con la ayuda de un nivel de burbuja, buscar la zona de la poyata más horizontal posible (Figura 4).

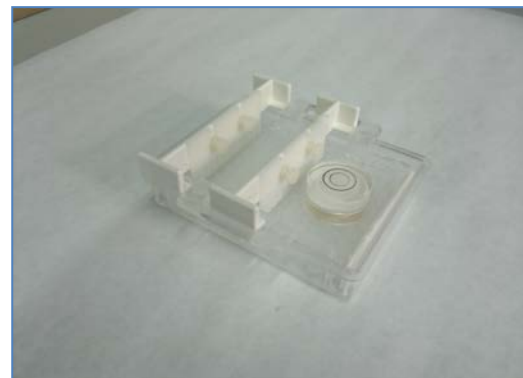


Figura 4: Soporte para geles, peines y nivel de burbuja.

- Diluir el tampón TAE 10X con agua MiliQ hasta alcanzar una concentración de TAE 1X (ANEXO III). La cantidad de TAE 1X a preparar, va a depender del tamaño de la cubeta de electroforesis y del gel de agarosa (Tabla 1).

	GEL 1%			GEL 2%		
	Cubeta pequeña	Cubeta grande		Cubeta pequeña	Cubeta grande	
		Molde mediano	Molde grande		Molde mediano	Molde grande
Volumen TAE 1X Cubeta (mL)	250	1500		250	1500	
Masa de agarosa (g)	0.40	1	2	0.72	2	4
Volumen TAE1X Gel (mL)	40	100	200	40	100	200
Volumen SybrSafe (μL)	0.80	0.80	1.60	1.40	1.60	3.20
Volumen Escalera 1000pb (μL)	3	3		-	-	
Volumen Escalera 100pb (μL)	-	-		3	3	3
Volumen Tampón de carga (μL)	3	3		3	3	
Volumen ADN genómico (μL)	5	5		-	-	
Volumen Producto PCR (μL)	-	-		5	5	

Tabla 1: Cantidad de reactivos a utilizar en función del tamaño de la cubeta de electroforesis y porcentaje de agarosa del gel.

- Llenar la cubeta de electroforesis con TAE 1X (Tabla 1).
- Pesar la agarosa que sea necesaria en función del tamaño y concentración del gel que se desee preparar. Ponerla en un matraz erlenmeyer y añadir TAE 1X (Tabla 1).

Tener en cuenta:

- Gel de agarosa al 1%: Visualización de ADN genómico.
- Gel de agarosa al 2%: Visualización de ADN amplificado.
- Introducir el matraz erlenmeyer en el microondas y calentar durante medio minuto. Sacar del microondas con la ayuda de una manopla y extremando la precaución para evitar daños causados por los vapores calientes o roturas. Agitar el erlenmeyer para ayudar a que se disuelva la agarosa. Volver a introducir en el microondas y repetir el proceso hasta que la agarosa esté completamente disuelta, es decir, sin restos de cristales en la disolución.

Nota: Evitar que la agarosa llegue a ebullición; por ello es importante que la solución se caliente a intervalos cortos de tiempo.

- Sacar el matraz del microondas y poner sobre una poyata. Introducir un termómetro y esperar a que la solución disminuya su temperatura hasta alcanzar los 60°C aproximadamente. Si se desea acelerar el proceso de enfriamiento, se puede introducir el matraz en el interior de un vaso de precipitado con agua fría. Tener cuidado para que no entre agua en el matraz.
- Pipetear un volumen adecuado de *SybrSafe* (calcular volumen siguiendo las instrucciones del reactivo). Introducir la punta en la solución de agarosa y verter el colorante. Agitar el matraz hasta la homogeneización del color.

Nota: Resulta de gran importancia mantener el *SybrSafe* en oscuridad tanto durante el almacenaje como durante la tinción del gel, ya que se degrada con la luz solar.



Figura 5: Gel de agarosa solidificado y retirada de peines.

- Verter el contenido del matraz sobre el molde para geles con mucho cuidado. En caso de formarse burbujas sobre el gel, eliminarlas con la ayuda de una punta de pipeta lo más rápido posible antes de que se solidifique.
- Dejar enfriar el gel (proceso que durará una media de 20 minutos) e introducir el molde en el interior de la cubeta de electroforesis con TAE1X. Agarrar el peine con ambas mano y moverlo poco a poco a la vez que se tira hacia arriba hasta sacarlo completamente (Figura 5).

Nota: Después de cada uso, se deben enjuagar los peines con agua destilada.

- Retirar la cinta e introducir el soporte en la cubeta de electroforesis, cuidando que el tampón cubra el gel totalmente.

6.2. PROCEDIMIENTO PARA LA CARGA DE MUESTRAS EN EL GEL Y VISUALIZACIÓN DE ADN

MÉTODO 1

- Introducir el molde con el gel en el interior de la cubeta de electroforesis lleno de TAE1X y verificar que los pocillos están más cercanos al polo negativo (electrodo de color negro), ya que el ADN está cargado negativamente y migra hacia el polo positivo (electrodo de color rojo).

- Cortar un trozo de PARAFILM de unos 6cm de ancho y colocar sobre un rack de PCR sobre frío.
- Pipetear 2 μ L de tampón de carga y colocar sobre el PARAFILM. Formar una hilera de tantas gotas de tampón como muestras se vayan a cargar en el gel.
- Pipetear 5 μ L de muestra de ADN y depositar sobre los 2 μ L de tampón, aspirando y soltando unas 3 veces hasta que se haya homogeneizado y con cuidado de no aspirar aire para que no se formen burbujas (Figura 6A).

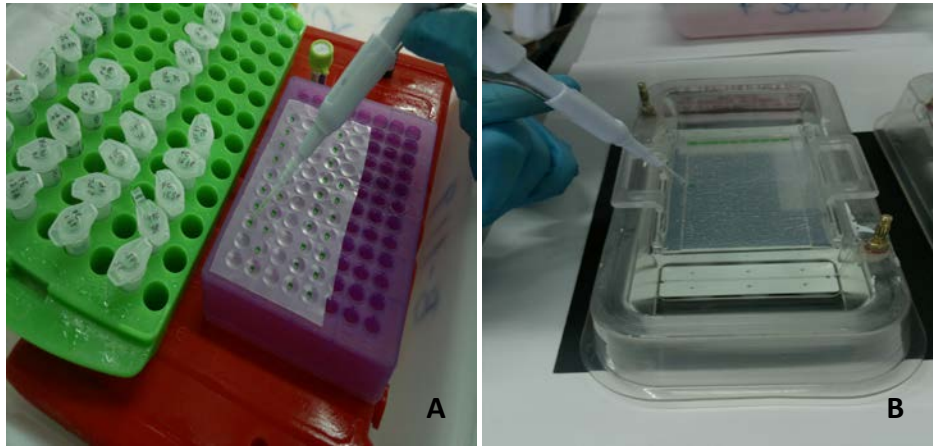


Figura 6: **A)** Homogeneización de muestra + tampón de carga; **B)** Carga del gel de agarosa con la muestra.

- Tras la homogeneización, pipetear los 7 μ L de muestra más tampón y colocar en uno de los pocillos del gel de agarosa, dejando siempre libre el primero. Se debe evitar meter mucho la punta en el pocillo ya que podría romperse el gel (Figura 6B).
- Repetir los pasos 2-4 hasta completar la carga del gel con todas las muestras.
- Pipetear 3 μ L de marcador de peso molecular y depositar en el primer pocillo del gel.
- Una vez cerrada la cubeta, se conectan los electrodos y se enciende la fuente de alimentación, ajustándola a una potencia adecuada. La electroforesis se debe llevar a cabo en condiciones de oscuridad, por lo que se recomienda apagar la luz más cercana, cerrar persianas e incluso cubrir la cubeta con una caja de cartón.
- Dejar que corra el ADN en el gel el tiempo que se estime necesario en función de las características del mismo.
- Apagar la fuente de alimentación y desconectar los electrodos antes de sacar el gel de agarosa.
- Tras la electroforesis, el gel se visualiza sobre un transiluminador de UV. El ADN se presenta en forma de bandas cuyo tamaño se estima comparando la posición alcanzada tras la migración respecto a la posición de la banda del marcador de peso molecular.

MÉTODO 2

- Poner una placa para PCR sobre hielo.

- Pipetear 2 μ L de tampón de carga en tantos pocillos como muestras se vayan a cagar.
- Pipetear 5 μ L de muestra de ADN y depositarla sobre los 2 μ L de tampón de carga, aspirando y soltando unas tres veces cuidando de no aspirar aire.
- Repetir los pasos de 4 a 10 del MÉTODO 1.

7. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DEL ADN AISLADO

El ADN presenta un máximo de absorbancia a 260nm, mientras que las proteínas lo tienen a 280nm. De tal modo que calculando la relación A_{260}/A_{280} , se puede determinar la pureza del ADN, siendo más puro cuando dicho cociente es aproximadamente igual a 1.9. El ADN puede cuantificarse directamente en soluciones acuosas, diluidas o sin diluir, midiendo la absorbancia de luz ultravioleta.

7.1. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ADN MEDIANTE ESPECTROFOTÓMETRO

- Comprobar que disponemos de todo el material y equipos necesarios.

EQUIPOS	MATERIALES Y REACTIVOS
Espectrofotómetro 260/280 nm	Bata
Cubeta espectrofotómetro	Guantes de nitrilo
Micropipeta 20-200µL	Cubetas de espectrofotómetro
	Papel de aluminio
	Tubos de centrifuga de 1.5mL
	Puntas micropipetas
	Buffer EB

Nota: Puntas para pipetas y tubos de microcentrifuga autoclavados.

- Para cuantificar el ADN se prepara una dilución del mismo con un factor de dilución igual a dos. Por ejemplo, para 25µL de ADN, se añaden 25 µL de agua MiliQ.
- Introducir la dilución en la cubeta del espectrofotómetro, previamente puesto el blanco (25 µL de buffer EB+ 25 µL agua MiliQ).
- Determinación de la concentración de ADN en la muestra (2 µL ADN en 48 µL de H₂O).

8. AMPLIFICACIÓN DE ADN: PCR

El proceso de amplificación se lleva a cabo a través de la reacción en cadena de la polimerasa. Esta técnica se basa en el fenómeno de replicación del ADN llevada a cabo por la enzima "ADN polimerasa". Esta enzima realiza la síntesis de una cadena complementaria de ADN en sentido 5'→3' usando un molde de cadena sencilla a partir de una región de doble cadena. La ADN polimerasa necesita además, un cebador (primer) para poder comenzar la síntesis. Los primers son una pareja de oligonucleótidos de cadena sencilla diseñados para que sean complementarios a cada uno de los extremos del fragmento de ADN que se quiere amplificar.

La enzima polimerasa es la responsable de realizar multitud de copias de secuencias de ADN, específicas del genoma nuclear y/o mitocondrial, a partir de un cebador. Para llevar a cabo esta reacción, primero se prepara un "mix" o "cóctel" de amplificación en el que se añaden todos los ingredientes necesarios para que la PCR pueda desarrollarse correctamente.

La técnica de la PCR incluye tres pasos:

- A) **Desnaturalización** de la doble cadena de ADN, en la que las dos hebras se separan completamente tras la replicación.
- B) **Hibridación** del cebador a las zonas flanqueantes de las regiones a ser amplificadas. El cebador "reconoce" zonas específicas del ADN extraído con una secuencia nucleotídica complementaria a la suya, permitiendo la ligación entre ambas secuencias: la del cebador y la de la secuencia objetivo del ADN extraído.
- C) **Extensión** del cebador en sentido 5'→3', en la que la polimerasa va adicionando bases nucleotídicas a la cadena del cebador en el extremo 3', hasta completar la cadena complementaria de la región objetivo del ADN.

Estos tres pasos constituyen un ciclo completo de amplificación, en el que se obtiene como producto el doble de copias de ADN de doble cadena de la secuencia objetivo, que servirán nuevamente de molde para el siguiente ciclo. Así, se repite este ciclo desnaturalización-hibridación-extensión un número determinado de veces (normalmente entre 30 y 40 ciclos) y consecuentemente, el número de copias aumenta exponencialmente a medida que avanzan los ciclos. El número total de ciclos determinará la producción total de copias de la secuencia objetivo amplificada.

Además de los ciclos anteriormente explicados, para completar un patrón de PCR se añade un paso previo de desnaturalización a aproximadamente 94°C durante 3-5 minutos, y otro posterior de extensión final, a 72°C durante 7-10 minutos:

94°C	→ Desnaturalización previa → 3 - 5 minutos
95°C	→ Desnaturalización
50 - 70°C	→ Hibridación primers
72°C	→ Extensión
72°C	→ Extensión final → 7 - 10 minutos

Los cebadores empleados en la PCR son secuencias cortas de nucleótidos (20-30 pares de bases), caracterizadas por poseer una elevada afinidad por la zona flanqueante a la región que se quiere amplificar. Así, la selección de los cebadores dependerá principalmente de la/s especie/s objeto de estudio, del tipo de marcador (secuenciación de ADN nuclear o mitocondrial, microsátélites, AFLPs, RAPDs, etc....) que pretende ser utilizado en el estudio, y del gen analizado. Una vez realizada la PCR, el producto obtenido puede ser visualizado en una electroforesis, con gel de agarosa 2–2,5 %, para verificar el correcto funcionamiento de la PCR y confirmar que el tamaño de los productos amplificados corresponde con los tamaños esperados.

Para la amplificación se seleccionan fragmentos de diversos genes mitocondriales, con distintas características y sometidos a distintas presiones evolutivas, con el fin de maximizar su capacidad de resolución, necesaria para capturar variación en la región geográfica que comprende BANGEMAC. Para cada grupo de organismos se selecciona preferentemente un marcador, en función de su utilidad e información disponible.

8.1. GENES MITOCONDRIALES SELECCIONADOS PARA ESPECIES DE ANIMALES MARINOS

A. ARNr 16S: Gen con un elevado grado de conservación a lo largo de la escala evolutiva. Su uso es adecuado para la resolución de relaciones filogenéticas. De aplicación generalmente para moluscos y crustáceos.

B. COX1: El gen citocromo oxidasa I representa un gen de uso generalizado dentro de la iniciativa BOL (Barcoding Of Life), mostrando una gran capacidad taxonómica a nivel de especie y con una evolución más rápida que el gen anterior. En consecuencia, se aplica a la mayoría de las especies consideradas, tanto en estudios a nivel microevolutivo como macroevolutivo.

C. Cyt-B: El Citocromo b es un gen mitocondrial muy utilizado en estudios de sistemática molecular debido a la alta disponibilidad de secuencias de este gen útiles para fines comparativos. Numerosos estudios utilizan este gen para estudiar relaciones filogenéticas en diversos grupos taxonómicos de peces.

D. Región Control (D-LOOP): La región control es la zona no codificante más amplia del ADN mitocondrial y se encuentra implicada en la replicación y transcripción del ADN mitocondrial. Presenta una elevada tasa de mutación con un sesgo hacia la presencia de A+T. La elevada tasa de mutación la hace adecuada como marcador en estudios de estructuras poblacionales o en filogenia entre especies íntimamente relacionadas.

8.2. CEBADORES DE UTILIDAD EN ANIMALES MARINOS

El proceso de amplificación se ha optimizado mediante la utilización de cebadores específicos para cada una de las especies marinas, pero cuanto más universal sea el cebador a utilizar para amplificar la región de un determinado gen, mayor número de taxas abarcará. No obstante, la elevada variabilidad nucleotídica en la Región Control y las diversas posiciones de esta secuencia dentro del ADN mitocondrial en los diferentes rangos taxonómicos, dificulta la existencia de cebadores "universales" para su amplificación. Una primera estrategia es la utilización de cebadores que hayan mostrado su eficiencia en taxas relacionados. La segunda aproximación es la definición del orden génico del taxón implicado y el diseño de cebadores en las zonas flanqueantes de la región control (Figura 7).

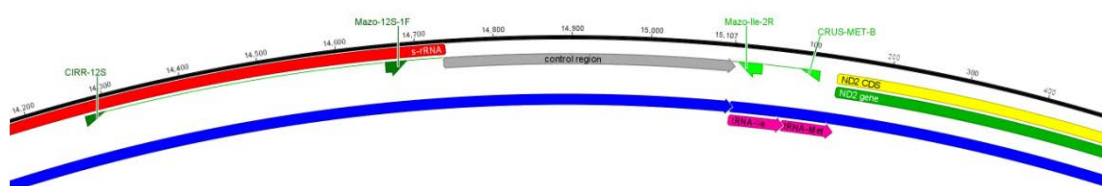


Figura7: Estrategia de amplificación para la caracterización de la región control en *Megabalanus azoricus*, de acuerdo a la secuencia del genoma mitocondrial de *Megabalanus volcano* (NC 006293).

La Tabla 2 recoge algunos de los pares de primers más utilizados para amplificar las distintas regiones de ADN en los distintos organismos marinos del proyecto que nos ocupa.

Región Amplificada	Secuencia 5' – 3' (Cebadores)	Organismo marino	Referencia
ARNr 16S	16Sa-5' (CGCCTGTTTATCAAAAACAT) 16Sb-3' (CCGGTCTGAACTCAGATCACGT)	<i>Moluscos y Crustáceos</i>	Palumbi, 1998
	Cirr-16S-5F (CAACCTGGCTYACGCCGGTCT) Cirr-Val-3R (GCTGTTAAGCATTTCATTACTGAAAAGG)	<i>Cirrípedos</i>	Quinteiro et al., 2007
COXI	LCO1490 (GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G) HCO2198 (TAA ACT TCA GGGTGA CCA AAA ATC A)	<i>Invertebrados y algunas especies de peces</i>	Folmer et al., 1994
	COL6 (TYT CHA CAA AYC ATA AAG AYA TYG G') COH6 (TAD ACT TCD GGR TGD CCA AAR AAY CA)	<i>Crustáceos decápodos</i>	Shubart., 2009
	FishF2 (TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC) FishR2 (ACT TCA GGG TGA CCG AAG AAT CAG AA)	<i>Peces, tiburones y rayas</i>	Ward et al., 2005
	PATCOX1F1 (CCTAGGRATATGRGCAGGTTTAGTAGG) PATCOX1R1 (TCAGTTAATARTATAGTAATTGCYCCRGCTA)	<i>Especies macaronésicas de lapas del Género Patellas</i>	SISMOL (USC), 2014
CytB	L14725 (CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG) H15149 (CCCTCAGAATGATATTTGCCTCA)	<i>Peces</i>	Pääbo., 1990
			Kocher et al., 1989
	L15424 (ATCCATTCCACCCATACTACTC) L15573 (AATAGGAAGTATCATTGGGTTTGATG)	<i>Peces</i>	Edwards et al., 1992
			Taberlet et al., 1992

	CB2-H (CCCTCAGAATGATATTTGCTCTCA) CB1-L (ATCCAACATCTCAGCATGATGAAA)	<i>Peces</i>	Palumbi et al., 1991
	CB6F (CTCCCTGCACCTTCAAACAT) CB6R (GGAAGG TTAAAGCCCGTTGT)	<i>Peces</i>	Gaither et al., 2011
	Dmac-CB-1F (TCCCCGCTCCCTCGAACATCT) Dmac-CB-2R (CGCCGTTGGCGTGCATGTTTC)	<i>Decapterus macarellus</i>	<i>Bras., 2014</i>
	Dmac-CB-3F (CCTGCACGAAACGGGCTCGAA) Dmac-CB-4R (GGCGGGGGTGAAGTTGTCGG)	<i>Decapterus macarellus</i>	<i>Bras., 2014</i>
Región Control	L15998 (TACCCCAAACCTCCCAAAGCTA) CSBDH (TGAATTAGGAACCAGATGCCAG)	<i>Peces</i>	Alvarado., 1994 Alvarado., 1995
	Gra-12S-1F (TCGGTAACTCCTTTCATGCAACT) Gra-Gin-2R (AGAAATGGTGCATTCCATTACG)	<i>Grapsus adscensionis</i>	SISMOL (USC)
	ples-12S1F (GCGAAGGATTAAGCAAGGATCAAAC) ples-Ile-3R (AGGCTTCTCTCATAATTCGCCCTA)	<i>Plesionika edwardsii</i>	SISMOL (USC)
	Scre F1 Pro (TCCACCTCTAGCTCCCAAAGCTA) Scre 3R CSB (CCCTGAAGTAGGAACCAAATGTCAGTA)	<i>Sparisoma cretense</i>	SISMOL (USC)
	Scre 4F CSB (GACATTTGGTTCCTACTTCAGGGACA) Scre R2 Phe (TCGGGACTTTTAAAGGTCCATCTTAAC)	<i>Sparisoma cretense</i>	SISMOL (USC)
	Mazo-12S-1F (CTATCAAAGTAATCCTTTTGTGAGGCA) Mazo-Ile-2R (GATAACAACACGGACCTCAACGAT)	<i>Megabalanus azoricus</i>	SISMOL (USC)
	PCOR-1F (ATCTTTACTGAGCATAACCATGA) PCOR-3R (CTAGTGAGTGGTGTAAAGGCAC)	<i>Pollicipes darwini</i>	Quinteiro et al., 2007
	PCOR-1F (ATCTTTACTGAGCATAACCATGA) PCOR-2R (GGCAACGGTACCACCTTAGT)	<i>Pollicipes pollicipes</i>	Quinteiro et al., 2007
	L-Pro-1 (ACTCTACCCCTAGCTCCCAAAG) H-DL-C-1 (CCTGAAGTAGGAACCAGATGCCAG)	<i>Helicolenus dactylopterus</i>	Ostellari et al., 1996 (In Aboim et al., 2005)
	Dmac-CR-1F (GGTGCAGTAACCATCRCTCAGCAC) Dmac-CR-2R (CCCCCAGATTTTTGCTCCCTACC)	<i>Decapterus macarellus</i>	<i>Bras., 2014</i>

Tabla 2: Cebadores utilizados según regiones amplificadas en animales marinos.

8.3. CEBADORES DE UTILIDAD EN VEGETALES MARINOS

Algunos de los cebadores utilizados en vegetales marinos están recogidos en la Tabla 3.

Región amplificada	Secuencia 5'-3' (Cebadores)	Organismos marinos	Referencia
ITS	AB28 (GGGATCCGTTTCCGTAGGTGAACCTGC) TW81 (GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT)	<i>Microalgas</i>	Goff et al., 1994
ADNr18S	18Seuk-F (GTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTA) 18Seuk-R (AGGGCAGGGACGTAATCAACG)	<i>Microalgas</i>	Ferris et al., 2005

Tabla 3: Cebadores utilizados según regiones amplificadas en microalgas.

8.4. REACTIVOS DE PCR

Existe una amplia disponibilidad comercial de reactivos de PCR, incluyendo enzimas y tampones de reacción y numerosos servicios de síntesis de cebadores. En cualquier caso, el cóctel de una reacción de amplificación siempre debe contener los siguientes componentes:

- Tampón de amplificación
- Solución de $MgCl_2$
- Mezcla de dinucleótidos (dNTPs)
- Cebador “forward”
- Cebador “reverse”
- Agua MiliQ autoclavada
- Enzima termoestable ADN Polimerasa (Taq)

El volumen total de reacción por muestra (cóctel + ADN), puede oscilar entre los 15 y los 25 μL y varía en función de la secuencia objeto de análisis.

8.5. CONDICIONES DE PCR

Para un juego de cebadores, se definen las condiciones ideales de amplificación que permite obtener un producto de PCR adecuado para la secuenciación. Se definen tanto las condiciones de reacción como el perfil térmico de la PCR.

Como ejemplo, en muestras de ADN de *Megabalanus azoricus*, la amplificación se realizó en un volumen de 12,5 μL de una mezcla constituida por 1,25 μL de Bufferx10 Promega, 2.5 mM de $MgCl_2$, 200 μM de cada uno de los dNTPs, 0,2 μM de cada cebador, 0.025 unidades de AmpliTaq Gold DNA polimerasa (Applied Biosystems) y 20-75ng de ADN aislado. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación consistieron en una etapa inicial de desnaturalización/activación enzimática a 94°C durante 12 minutos seguida de 35 ciclos, cada uno de los cuales consistió en una desnaturalización a 94°C durante 20 segundos, fusión a 50°C durante 20 segundos y extensión a 60°C durante 60 segundos y una etapa final de extensión a 60°C en 5 minutos. En todas las ocasiones fue llevada a cabo simultáneamente una reacción de control negativo conteniendo sólo los reactivos, para verificar la ausencia de contaminación por ADN extraño.

8.6. 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 100 μL	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.
-

8.7. 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.

9. SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

9.1. PURIFICACIÓN

Una vez verificada la obtención del producto de PCR, cualquier resto de nucleótidos no consumidos y/o cebadores remanentes en el producto de PCR debe ser eliminado, ya que pueden interferir en la posterior reacción de secuenciación.

9.1.1. Protocolo de purificación enzimática de los productos de PCR

ExoSAP-IT (Amersham-Biosciences) es un producto que utiliza dos enzimas hidrolíticas, Exonucleasa I y Fosfatasa Alcalina para eliminar esos restos no deseados y preparar el producto de PCR para el siguiente paso. A pesar de que el protocolo comercial indica volúmenes mayores, las siguientes indicaciones han dado resultados satisfactorios reduciéndolos en gran medida. Se procede del siguiente modo:

- Comprobar que disponemos de todo el material y equipos necesarios.

EQUIPOS	MATERIALES Y REACTIVOS
Termociclador	Bata
Micropipetas de 10 y 2 μ L	Guantes de nitrilo
	Planilla de purificación de PCR
	Hielo picado o placas de hielo
	Puntas para micropipeta
	Gradillas para placas de PCR
	Placa de PCR
	Rack para placa de PCR
	USB® ExoSAP-IT® PCR Product cleanup (Affymetrix)

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

- Anotar los datos requeridos en la planilla de Purificación de PCR (ANEXO IV).
- Rotular una placa nueva de PCR con la fecha, el tipo de organismos, el gen a amplificar y la palabra EXOSAP. Poner la placa en frío y dispensar 5 μ L de producto de PCR en cada pocillo.
- Sacar una alícuota de ExoSAP-IT del congelador y añadir 1 μ L a cada muestra. Mantener el ExoSAP-IT en hielo durante todo el proceso.
- Poner en marcha el termociclador e incubar la placa a 37°C durante 30 minutos, seguido de un paso final de 15 minutos a 80°C.
- Conservar en frío a -20°C.

9.2. REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN

Una vez purificado el producto de PCR, se lleva a cabo la reacción de secuenciación en la que las bases nucleotídicas de las secuencias amplificadas, quedan marcadas con fluorescencia para poder ser detectadas en el secuenciador. Para ello el kit comercial *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) ofrece resultados satisfactorios. A pesar de que el fabricante indica un protocolo a seguir con unos volúmenes específicos que aseguran el correcto funcionamiento de los reactivos, la modificación de los protocolos del fabricante ha ofrecido resultados satisfactorios, consiguiendo reducir drásticamente el volumen del Big Dye.

9.2.1. Protocolo Reacción de Secuenciación

- Comprobar que disponemos de todo el material y equipos necesarios.

EQUIPOS	MATERIALES Y REACTIVOS
Micropipetas de 2 y 10 μ L	Bata
Vórtex	Guantes de nitrilo
Microcentrífuga de sobremesa	Planilla de Reacción de Secuenciación
Termociclador	Hielo picado o placas de hielo
	Tubos de microcentrífuga de 1.5mL
	Puntas para micropipetas
	Placa de PCR
	Rack para placa de PCR
	Tapa de silicona para placa de PCR
	BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
	Agua MiliQ autoclavada

Nota: Puntas para pipetas y tubos de microcentrífuga autoclavados.

- Anotar todos los datos requeridos en la Planilla de Reacción de Secuenciación (ANEXO IV).
- Rotular una placa nueva de PCR con la fecha, el tipo de organismos, el gen amplificado previamente y las palabras "Reacción de Secuenciación".
- En un tubo de microcentrífuga de 1.5mL mezclar los componentes necesarios para cada reacción de secuenciación (Tabla 4). Preparar el mix con un volumen de más para compensar las pérdidas durante el pipeteo.

REACTIVO		VOLUMEN (μL)
Mix de reacción	Big DyeMix	0,5
	Buffer de Secuenciación	1,75
ADN molde		2
Primer (3,2 μM)		1
Agua MiliQ autoclavada		4,75
Volumen Total de Reacción		10

Tabla 4: Mix de reacción de secuenciación.

Nota: En función del tamaño esperado de la secuencia problema, la casa comercial recomienda una cantidad determinada de ADN molde a usar de un producto de PCR (Tabla 5).

Producto de PCR molde (pb)	Cantidad (ng)
100-200	1-3
200-500	3-10
500-1000	5-20
1000-2000	10-40
>2000	40-100

Tabla 5: Cantidad de ADN molde a usar en función del tamaño esperado de la secuencia problema.

- Darle un Vórtex al Mix preparado anteriormente, seguido de un pulso en la centrifuga.
- Poner la placa previamente rotulada sobre frío y añadir 8 μL de Mix a cada uno de los pocillos.
- Dispensar 2 μL de ADN purificado con ExoSap-IT en cada pocillo que contenga el mix. Cubrir con una tapa de silicona para placas y llevar al termociclador.
- Programar el ciclo de secuenciación en el termociclador tal como sigue:

96°C →	1 minuto	} x 35 ciclos	} 3 horas 5 minutos
96°C →	15 segundos		
50°C →	15 segundos		
60°C →	4 segundos		

Nota: Lo más recomendable es crear un programa específico con el perfil térmico de la reacción de secuenciación y guardarlo con el nombre de "Reacción de Secuenciación", de tal modo que se pueda acceder directamente a este programa cada vez que se siga este protocolo.

- Almacenar la placa con la reacción de secuenciación a -20°C.

9.3. PURIFICACIÓN DE LA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN

La purificación del producto obtenido en la reacción de secuenciación, puede realizarse utilizando el kit comercial *BigDye XTerminator Purification Kit* (Applied Biosystems) el cual es simple, rápido y con un óptimo rendimiento. El protocolo de la casa comercial consiste en mezclar los reactivos *XTerminator* y *SAM* suministrados por el kit, guardando unas proporciones adecuadas entre sí, proporcionadas también por la casa comercial en función del volumen total cargado en la placa que va a ser usado posteriormente en la secuenciación. secuenciador automático **ABI3500** (Applied Biosystems), en el que sólo pueden cargarse placas de 96 muestras y el volumen total de producto de la reacción de secuenciación usado hasta el momento de 10 µL (tabla 6).

Tipo de placa y volumen de reacción/pocillo	Volumen XTerminator™/pocillo (µL)	Volumen SAM™/pocillo (µL)
384 pocillos/5µL	5	22.5
96 pocillos/10µL	10	45
96 pocillos/20µL	20	90

Tabla 6: Volúmenes de reactivos a utilizar según tamaño de placa y volumen de ADN.

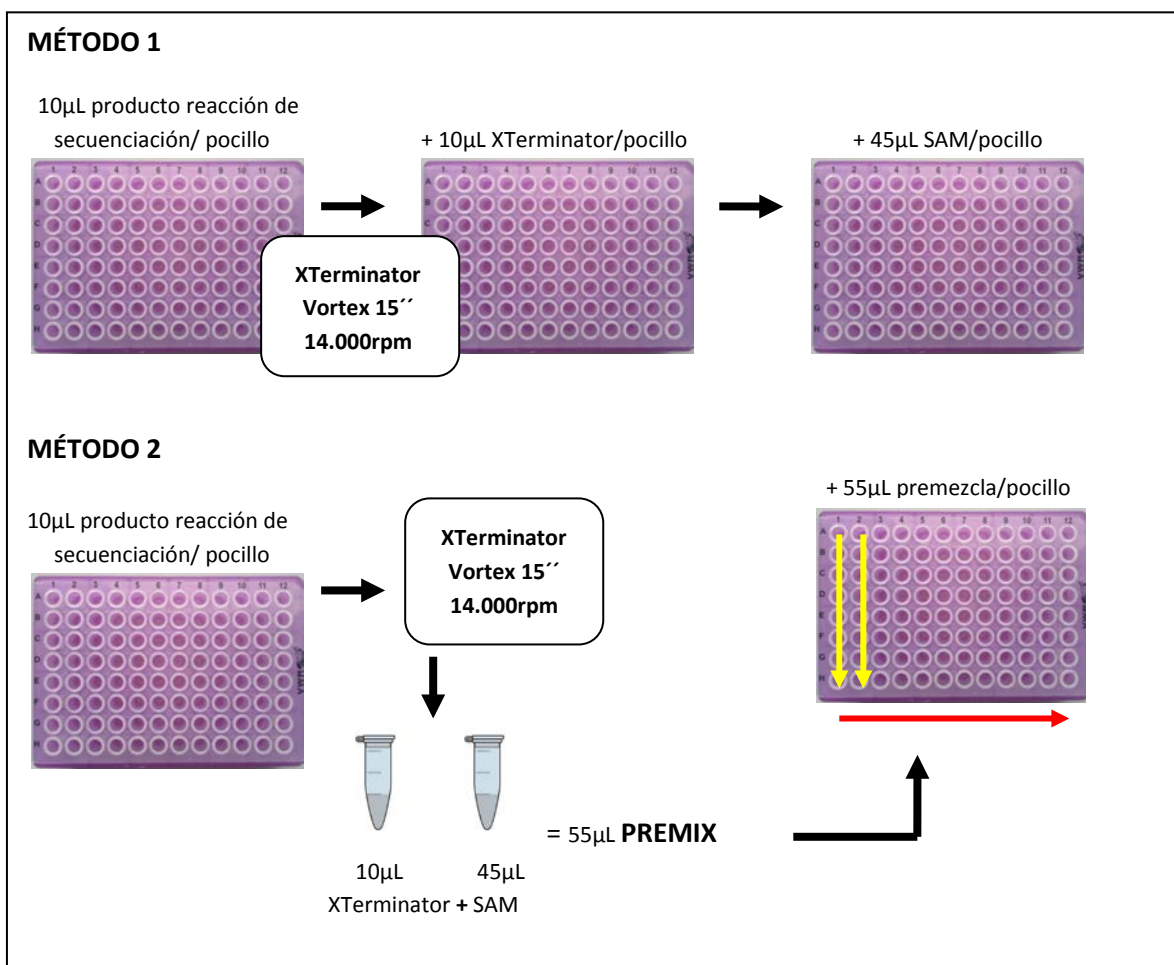
9.3.1. Protocolo Purificación de la Reacción de Secuenciación

- Comprobar que disponemos de todo el material y equipos necesarios.

EQUIPOS	MATERIALES Y REACTIVOS
Micropipetas de 10 y 100µL	Bata
Microcentrífuga de sobremesa	Guantes de nitrilo
Bloque térmico	Puntas para micropipetas
	Hielo picado o placas de hielo
	Rack para placa de PCR
	BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems)

Nota: Puntas para pipetas y tubos de microcentrífuga autoclavados.

- Poner la placa de reacción de secuenciación en frío y añadir 10µL de XTerminator y 45µL de SAM siguiendo el Método 1 o el Método 2 (Esquema 3). La mezcla de estos dos reactivos puede realizarse previamente (PREMIX), o directamente en la placa de purificación de la reacción de secuenciación. En caso de hacer una premezcla, se multiplican los volúmenes de cada reactivo por el número de muestras a secuenciar, más algunas extra debido al error de pipeteo. Tanto si se sigue el Método 1 como el Método 2, se deben pipetear los reactivos de arriba hacia abajo en el sentido de las flechas amarillas y de izquierda a derecha en el sentido de la flecha roja (Esquema 3). Tener la precaución de no dejar libre ningún pocillo en una misma columna.



Esquema 3: Protocolo para la purificación de la reacción de secuenciación. Aunque la placa conste de 96 pocillos, las premezclas se hacen en función de la capacidad del microtubo en el que se vaya a preparar el PREMIX. De este modo, para un tubo de 1.5mL se preparará una premezcla para aproximadamente 24 muestras.

Nota: La solución XTerminator necesita estar muy bien mezclada, ya sea cuando se hace la premezcla, como cuando se pipetea ambos directamente en cada muestra. Además para un correcto funcionamiento, la casa comercial indica el uso de puntas con boca más ancha debido

al tamaño de las partículas de esta solución. No obstante, la experiencia con puntas de pipetas de 1.000µL ha sido buena hasta la fecha.

- Una vez la placa esté completa con los reactivos y el producto de la reacción de secuenciación en cada pocillo, sellar la placa y colocarla en el bloque térmico a velocidad elevada (usamos la Thermo finemixer, FinrPCRSh 2000-DX en la posición 7), a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Centrifugar a 2.000 xg durante 2 minutos.
- Conservar a -20°C.

9.4. SECUENCIACIÓN

Actualmente, el laboratorio BioMol realiza el proceso de secuenciación en el Analizador Genético ABI3500 (Applied Biosystems), entendiéndose como tal al proceso de lectura de bases de nucleótidos de una molécula de ADN. Este Instrumento es un sistema de análisis de ADN basado en fluorescencia, que utiliza la tecnología de electroforesis capilar (Figura 9). Este proceso consiste en la inyección electrocinética de las moléculas de ADN en capilares llenos de polímero usando un bajo voltaje durante unos pocos segundos. Luego, la aplicación de un campo eléctrico de alta tensión tirará del ADN a través del polímero e irá migrando a lo largo del capilar y haciendo que los nucleótidos de las secuencias de ADN se ordenen y se detectan por fluorescencia mediante un sistema de láser. No obstante, antes de inyectar las muestras, el instrumento prepara los capilares bombeando solución del polímero por alta presión a través de la bomba de suministro de polímero hasta la cubeta de agua destilada del Contenedor de Tampón Catiónico (CTC). Este procedimiento también elimina posibles restos remanentes de la carrera anterior y establece las condiciones físico-químicas del medio electroforético para su correcto funcionamiento.

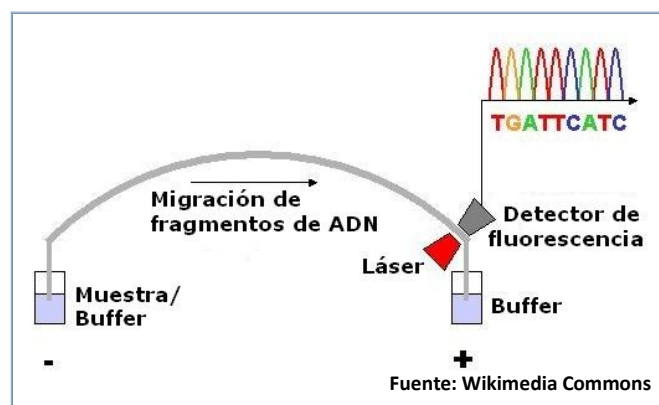


Figura 9: Esquema de electroforesis capilar.

La discriminación de cada nucleótido de la secuencia de ADN (A, T, G, C) se consigue debido a que cada uno de ellos está marcado con un fluorocromo particular (FAM: azul, HEX: verde, NED: amarillo, ROX: rojo), cuya fluorescencia es detectada por la célula de detección del secuenciador. Luego, esta señal cromatográfica será analizada, en base a una matriz interna del sistema, por el paquete informático que monitorea el proceso de secuenciación y que va realizando una transducción a tiempo real de cada base nucleotídica y que, al finalizar el

proceso resulta en la secuencia completa de ADN. Además de los procesos que se producen en una secuenciación capilar, los aparatos necesarios para llevar a cabo una secuenciación completa son: un Analizador Genético o secuenciador donde llevar a cabo la parte química y física del proceso (Figura 10) y un ordenador conectado al secuenciador que funciona a modo de transductor, capaz de transformar la información lumínica suministrada por el secuenciador en información nucleotídica. Así, en la Tabla 7 se detallan las partes fundamentales y el funcionamiento del Analizador Genético ABI3500 y del DATA COLLECTION software (Applied Biosystems) usados en el laboratorio BIOMOL.

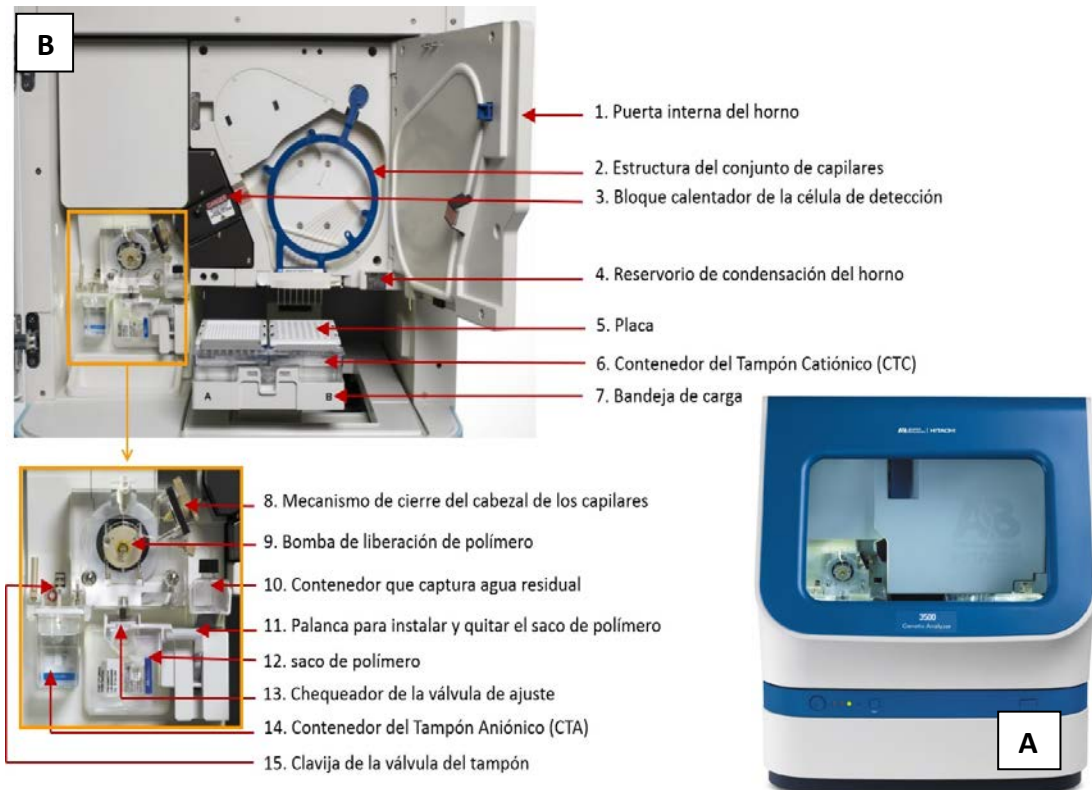


Figura 10: A) Vista frontal del secuenciador ABI3500 B) Componentes internos del Instrumento

Parte del Instrumento	Función
1. Puerta del horno	Protege las partes más importantes del instrumento: el conjunto de capilares y el bloque calentador de la célula de detección.
2. Conjunto de capilares	Permite la separación de los fragmentos de ADN marcados con fluorescencia mediante electroforesis. Es una unidad reemplazable compuesta por 8 capilares de 50 cm.
3. Bloque calentador de la célula de detección	Mantiene la célula de detección en su lugar para la detección de láser y mantiene la temperatura de la célula de detección a 50 ° C.
4. Reservorio de condensación del horno	Recolecta la condensación del horno.
5. Placa	La placa que contiene las muestras a analizar durante 1 carrera. Esta placa debe introducirse en una estructura formada por dos partes (superior e inferior) que se ensamblan para retenerla y que no se mueva en su interior durante la carrera.

6. Contenedor de Tampón Catiónico (CTC)



El CTC contiene el tampón para llevar a cabo las electroforesis en el instrumento. El CTC está formado por dos cubetas, una de ellas con 24 agujeros que contiene el tampón de electroforesis. La otra, con 48 agujeros más pequeños, suministra el líquido que mantiene la función de lavado de residuos, enjuagando las puntas de los capilares y recogiendo los residuos entre las inyecciones después de cargar las muestras de la placa. Contiene etiqueta de identificación por radiofrecuencia, por lo que lleva un control de caducidad automático. A pesar de que la casa comercial aconseja su uso con un rendimiento óptimo hasta 120 inyecciones, en el laboratorio BIOMOL se han superado este número de inyecciones manteniendo la calidad de los resultados. Almacenar entre 2°C y 8°C.

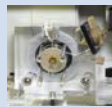
7. Bandeja de carga

Sustenta las placas de muestra y el CTC y se mueve para alinear las placas y el CTC con los capilares.

8. Horno

Mantiene una temperatura uniforme de 60°C en el conjunto de capilares.

9. Bloque de la bomba



Incluye: 8. Mecanismo de cierre del cabezal de los capilares, 9. Bomba de liberación de polímeros, 10. Contenedor de agua residual, 11. Palanca para instalar y quitar el saco del polímero, 12. Saco de polímero, 13. Chequeador de la válvula de ajuste, 15. Clavija de la válvula del tampón.

10. Saco de polímero



El polímero es el medio a través del cual migran los fragmentos de ADN en el interior del capilar. El ABI3500 está preparado para utilizar varios tipos de polímero, no obstante, en el laboratorio BIOMOL se ha utilizado siempre el POP7™ (Applied Biosystems) por su óptimo rendimiento. Contiene etiqueta de identificación por radiofrecuencia, por lo que lleva un control de caducidad automático. Almacenar entre 2°C y 8°C.

11. Contenedor de tampón aniónico (CTA)



El CTA es una cubeta que contiene el tampón para llevar a cabo las electroforesis en el instrumento. Contiene etiqueta de identificación por radiofrecuencia, por lo que lleva un control de caducidad automático. A pesar de que la casa comercial aconseja su uso con un rendimiento óptimo hasta 120 inyecciones, en el laboratorio BIOMOL se han superado este número de inyecciones manteniendo la calidad de los resultados. Almacenar entre 2°C y 8°C.

Tabla 7: Partes del Analizador Genético ABI3500 y su función.

El DATA COLLECTION software (Applied Biosystems), es el programa informático que interactúa con el Instrumento y permite, durante la carrera:

- Controlar el Instrumento y generar archivos de datos de las muestras: .ab1, .fsa
- Realizar análisis primario y presentar informes que evalúan la calidad de los datos.
- Realizar análisis secundario (auto-análisis) con las siguientes aplicaciones de software de Applied Biosystems (Opcional): Secuenciación - SeqScape® Software v2.7, Fragmentos GeneMapper® Software v4.1.

Cuando se abre el software, aparece directamente el Panel principal (*Dashboard*), el cual proporciona acceso rápido a la información y las tareas necesarias para configurar y ejecutar. A continuación se definen cada una de sus partes principales, ilustradas además en la Figura 11:

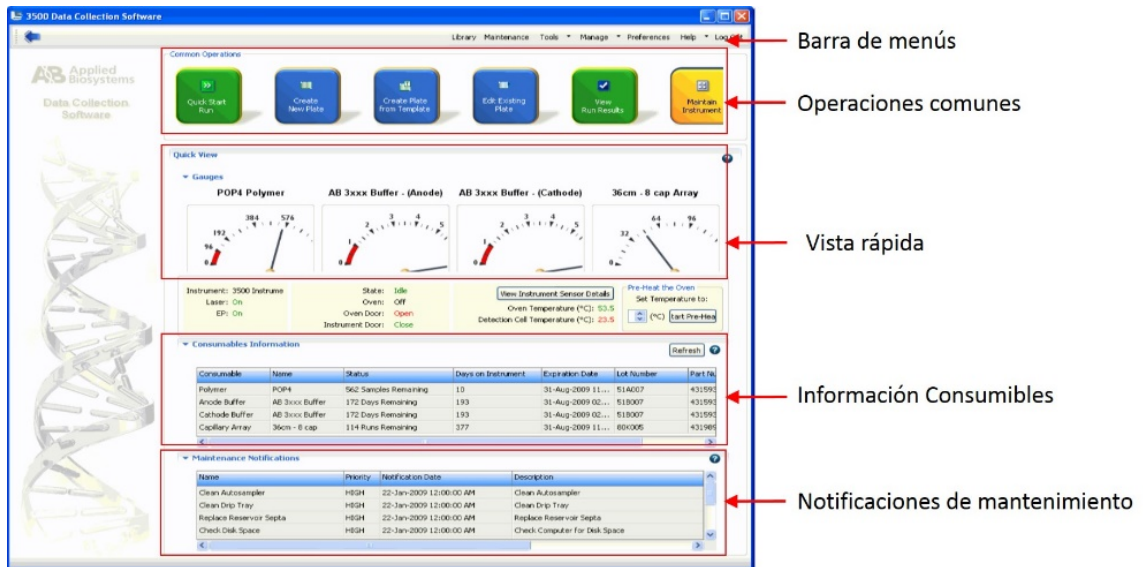


Figura 11: Panel principal (Dashboard) del DATA COLLECTION.

- **Barra de menús:** Permite acceder a todas las demás partes del software. La barra de menú se muestra en todas las pantallas.
- **Operaciones comunes:** Le permite arranque rápido (cargar una placa que está configurada), crear o editar placas, ver resultados, y tener acceso al flujo de trabajo de mantenimiento.
- **Vista rápida:** Permite visualizar los indicadores que muestran el uso restante de los consumibles y da el estatus de condiciones instrumentales. El uso de consumibles se sigue automáticamente por la identificación de radio-frecuencia (RFID).
- **Información de los consumibles:** Proporciona detalles de los consumibles instalados e indica en rojo si algún consumible está a punto de expirar basado en etiquetas RFID. Los contenedores consumibles incluyen frecuencia de identificación de infrarrojos que identifican el consumible y permiten al software monitorear el número de carreras o días restantes, el número de días en el instrumento, la fecha de vencimiento, número de lote y números de pieza.
- **Notificaciones de mantenimiento:** Enumera las tareas de mantenimiento programadas.

El secuenciador ABI3500 es totalmente automático, desde la carga de las muestras en los capilares hasta el análisis primario de los electroferogramas obtenidos. No obstante, antes de iniciar una carrera en el secuenciador debe verificarse la disponibilidad de todos los materiales y reactivos consumibles necesarios para llevarla a cabo. Una vez chequeado todo el material se seguirá el protocolo de trabajo que se realiza en el laboratorio BioMol, adaptado de las indicaciones sugeridas por la casa comercial y que, según la experiencia acumulada, se ha dividido en 5 pasos:

- Encender el ordenador e introducir el nombre de usuario y la contraseña.
- Preparar el instrumento así como sus partes y reactivos consumibles.

- Configurar el 3500 Data Collection Software v1.0 para correr una placa con muestras.
- Monitorear la carrera a tiempo real y observar los resultados obtenidos.
- Finalizar la carrera, evaluar los resultados obtenidos. Apagar el ABI3500 y el ordenador.

A continuación se detalla cada uno de ellos:

1. Encender el ordenador e introducir el nombre de usuario y la contraseña.

Lo primero que se debe hacer es encender el ordenador conectado al Analizador Genético ABI3500 (Applied Biosystems); entrar a través del usuario *3500-ADMIN* introduciendo la contraseña. Una vez dentro podemos dejar de lado el ordenador, de momento, para centrarnos en el ABI3500.

2. Preparar el instrumento así como sus partes y reactivos consumibles.

Una vez encendido el ordenador, apretar el botón de encendido situado en la parte inferior izquierda en el frente del instrumento (Figura 12).

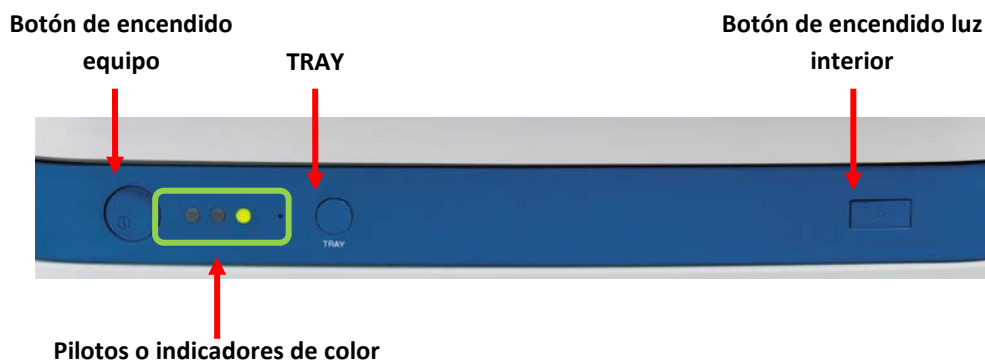


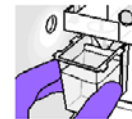
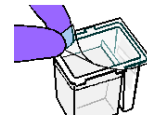
Figura 12: Frente del secuenciador ABI3500, debajo de la puerta donde se observan diferentes botones e indicadores.

Seguido a su derecha, hay 3 pilotos o indicadores que emiten color que informan sobre el estado del instrumento. En funcionamiento cuando el indicador emite una luz verde y en naranja cuando se encuentra en espera, no debiendo abrir nunca la puerta en este estado. A continuación, el agujero de reseteado y el botón menor **TRAY**. Este último debe pulsarse siempre antes de abrir la puerta de la cabina de secuenciación. Al otro extremo, el botón rectangular de encendido de una luz situada en el interior de la cabina de secuenciación (Figura 12).

Una vez el secuenciador esté en funcionamiento y antes de abrir el software, se necesita tener el secuenciador preparado para su uso. Esto implica colocar algunas de sus partes y reactivos consumibles a utilizar durante la carrera.

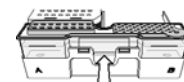
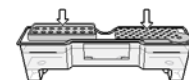
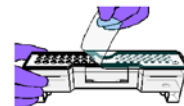
- ❖ **Sustituir el CTA** del interior del secuenciador:

- Sacar el CTA del frigorífico donde está almacenado y dejar atemperar antes de colocarlo en su posición en el ABI3500.
- Antes de retirar la tapa plástica del CTA, verificar que todo el tampón está en el reservorio grande. Si no lo estuviera, inclinar levemente el CTA y hacer el trasvase del tampón como ilustra la figura de la derecha y confirmar que el nivel del tampón está en o por encima del nivel de llenado. ATENCIÓN: No usar si el nivel es demasiado bajo (tolerancia $\pm 1\text{mm}$).
- Despegar la tapa plástica del CTA y a continuación colocarlo en su posición en el ABI3500, debajo de la bomba. Para ello debemos apretar primero el botón "TRAY" y abrir la puerta del equipo. Para colocarlo, la etiqueta de identificación por radiofrecuencia deberá mirar hacia el interior del instrumento y las lengüetas deben encajarse con un movimiento hacia atrás.



❖ **Sustituir el CTC de la bandeja de carga del secuenciador.**

- Sacar el CTC del frigorífico donde está almacenado y dejar atemperar antes de colocarlo en su posición en el ABI3500. Retirar la bolsa plástica y confirmar que el nivel del tampón está en o por encima del nivel de llenado. ATENCIÓN: No usar si el nivel es demasiado bajo (tolerancia $\pm 0.5\text{ mm}$).
- Retirar la tapa plástica del CTC. Limpiar el tampón que haya podido quedar en la parte superior del CTC con un paño que no suelte pelusa y confirmar que la parte superior del recipiente está seca.
- Insertar las 2 tapas grises de goma en la parte superior del CTC. Cada una acoplada a los agujeros de cada reservorio, como muestra la figura. Luego, instalar correctamente el CTC en su posición sobre la bandeja de carga. Para ello, la lengüeta que tiene el CTC quedará mirando al usuario y deberá oírse un "click" una vez se han enganchado a las ranuras que fijan el CTC.



❖ **Colocar el polímero (POP7)**

Sacar el POP7 del frigorífico donde está almacenado y dejar atemperar antes de colocarlo en su posición en el ABI3500. Luego, retirar el POP7 antiguo de su posición y limpiar la ranura del equipo con un trozo de papel y agua destilada; de este modo se eliminan las sales que hayan podido cristalizar. Luego, tomar el POP7 que se vaya a utilizar y colocar la boca del mismo en la ranura de la estructura conectada a la palanca de plástico que hay a la derecha. Seguidamente, empujar la palanca hacia arriba hasta que el conector de la bomba del instrumento se ha introducido en el polímero.



Una vez se han colocado los consumibles en el equipo, se cierra la puerta y se espera a que el piloto de encendido se ponga de color verde. De este modo, el usuario ya estará preparado para poder trabajar con el equipo desde el ordenador. Los pasos a seguir se explican a continuación.

❖ **Configuración del 3500 Data Collection Software v1.0 para correr una placa.**

- Lo primero que debe revisarse es el icono de estado, en la parte inferior derecha de la pantalla, el cual muestra cuando el monitor del servidor 3500 está activado. Tardará unos 2 minutos aproximadamente en configurarse. Podemos verificarlo debido a la transformación del icono, el cual pasará de un círculo rojo con una X en su centro (indicando que NO todos los servicios del 3500 están activos) a un reloj de arena para pasar finalmente a un **✓**, indicando que todos los servicios del secuenciador están activados (Figura 13).

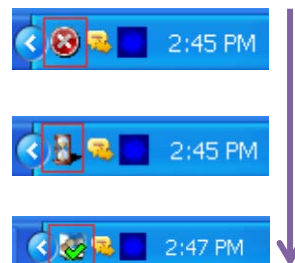



Figura 13: Icono de estado.

Nota: No cerrar este icono. Si ocurre, impedirá el correcto funcionamiento del programa.



Figura 14: Ventana de presentación del 3500 Data Collection Software v1.0 (Applied Biosystems).

Una vez se tengan los servicios del secuenciador activados, abrir el 3500 Data Collection Software v1.0 (Applied Biosystems), cuyo icono se encuentra en la parte inferior izquierda del monitor (). A continuación se abrirá el programa y aparecerá la ventana de presentación del mismo (Figura 14).

- A continuación, se abrirá automáticamente el Panel Principal (**Dashboard**), donde se revisa el estado de los reactivos consumibles que hay colocados en el instrumento a través de las ventanas **Quick View** o **Consumables Information**, en las que se puede confirmar:
 - La fecha de caducidad o número de muestras que restan por consumir.
 - Los niveles de los tampones (CTC y CTA): Se encuentran en la línea de llenado de cada contenedor.
- ❖ Poner la temperatura del horno adecuada según el polímero, clicando el botón **Start Pre-heat**. En el laboratorio BioMol se usa el POP7, por lo que se fija la temperatura a 60°C, que es la indicada para este polímero por la casa comercial.
- ❖ Verificar que no haya burbujas de aire en los canales de la bomba de liberación de polímero. Si se diera el caso, clicar en el botón **Maintain Instrument** (Figura 15) en

Operaciones comunes dentro del panel principal y activar las ayudas **Maintenance Wizards** situadas en el panel izquierdo del monitor.

Una vez abierta la ayuda, seleccionar la opción **Remove Bubbles** para eliminar burbujas de los canales de la bomba y seguir los pasos indicados por el programa (Figura 16).

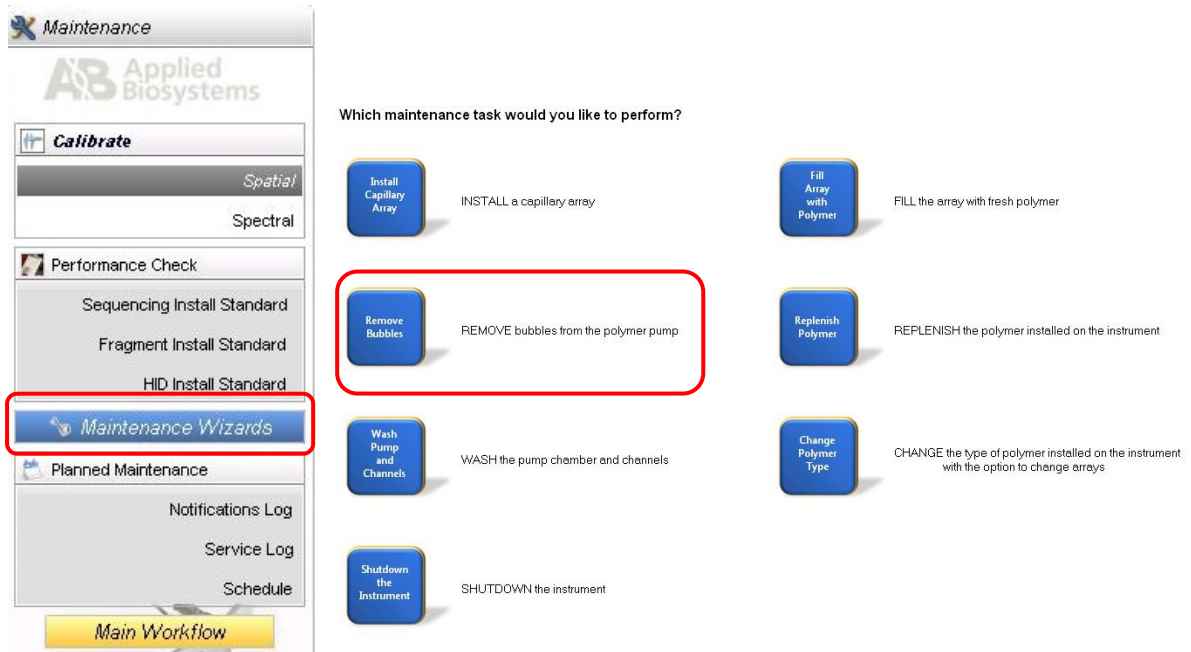


Figura 16: Ventanas activas que se deben activar para eliminar burbujas de los canales de la bomba de liberación de polímero utilizando la ayuda del software **Maintenance Wizards** y **Remove bubbles**.

- ❖ Introducir la información de la placa que se va a secuenciar. Para ello, se cliquea en el botón **Create New Plate** (Figura G) en la ventana **Common Operations** situada en el Panel Principal.



Figura 15: Ventana de operaciones comunes donde se accede al botón para crear una placa nueva.

Esta acción se refiere a la información que debe proporcionarse a cada placa que se carga en el secuenciador, cuyas muestras serán secuenciadas. Así, cada placa será caracterizada a través del **software** en seis pasos:

1. Una vez se ha clicado el botón **Create New Plate**, aparecerá una ventana donde se definen las propiedades de la placa (Figura 17). una vez rellenado cada campo, clicar **Assign Plate Contents**.

- 1. **Nombre:** nombre de la placa
- 2. **Nº de pocillos:** 96 (siempre)
- 3. **Tipo de placa:** Secuenciación y/o fragmentos
- 4. **Longitud de los capilares:** 50 cm
- 5. **Polímero:** POP-7
- 6. **Texto opcional:** Propietario, Código de barras, Descripción.

Figura 17: Descripción de las propiedades de la nueva placa.

2. Anotar los códigos o nombres de las muestras. El programa tiene por defecto una plantilla de placa de 96 celdas, en las que anotaremos sus códigos (Figura 18).

	1	2	3
A	PHUL001VL	PHUL009VT	LNUC001CC
B	PHUL002VL	PHUL010VT	CTRU001CC
C	PHUL003VL	PHUL011VT	CTRU002CC
D	PHUL004VT	PHUL012VT	CTRU003CC
E	PHUL005VT	URON002CC	CTRU004CC

Figura 18: Plantilla donde se anotan los códigos de las muestras contenidas en la placa a secuenciar.

3. Una vez nombradas las celdas de la placa, se selecciona el protocolo de carrera apropiado mediante el recuadro **Assays**. El protocolo escogido debe ser el mismo para cada inyección, es decir, una carrera de una columna completa u 8 muestras. No obstante, el protocolo puede ser diferente entre las sucesivas inyecciones para la

misma placa. Según la longitud de la secuencia, los reactivos químicos utilizados en la reacción, así como el polímero variarán. En el laboratorio BioMol, se utiliza *BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems) para la reacción de secuenciación y *BigDye X-TERMINATOR Purification Kit* (Applied Biosystems) para su purificación, además del polímero *POP-7* (Applied Biosystems), por lo que activaremos alguno de los protocolos que contengan las siglas **BDX** y **POP7** en su nombre. El tiempo de carrera (short, rapid, fast o standard) está determinado por la longitud de la secuencia problema. En la Tabla 8 se muestran los protocolos comúnmente usados en el laboratorio BioMol.

Tipo de Módulo & Nombre de Módulo	Tipo de polímero	Tiempo/carrera (minutos)	Rendimiento o 23horas *	Longitud lectura continua **
Rapid sequencing BigDye® XTerminator™ RapidSeq_BDX_50_POP7	POP-7™	≤40	≥280	≥500
Fast sequencing BigDye® XTerminator™ FastSeq_BDX_50_POP7	POP-7™	≤65	≥168	≥700
Standard sequencing BigDye® XTerminator™ StdSeq_BDX_50_POP7	POP-7™	≤125	≥88	≥850
Short read sequencing BigDye® XTerminator™ ShortReadSeq_BDX_POP7	POP-7™	≤30	≥368	≥300

* Número de muestras secuenciadas en 23 horas (teniendo en cuenta 0.5 horas para la interacción del usuario y 0.5 horas para el calentamiento a 60°C del horno).

** Número máximo de bases contiguas de la secuencia analizada.

Tabla 8: Protocolos de Secuenciación.

La elección del/los protocolo/s se realiza mediante el botón **Add from Library** (en caso de usar un protocolo registrado previamente) o **Create New Assay**. Luego, con el botón derecho del ratón, se seleccionan las columnas deseadas (Figura 19.A) y a continuación con un "tip" el protocolo que se le quiera asignar a las mismas (Figura 19.B). Lo mismo ahora con el resto de columnas o carreras.

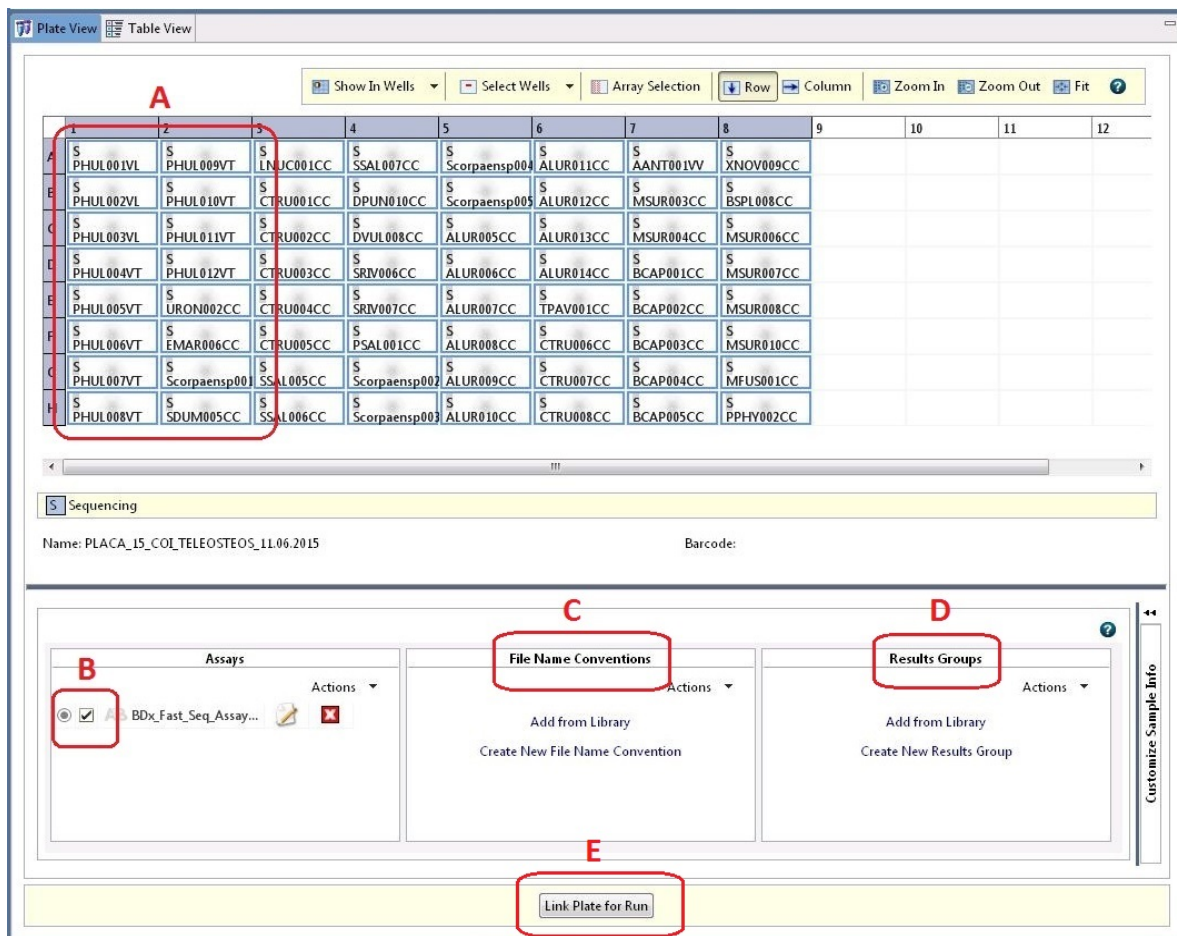


Figura 19: A) Para seleccionar las casillas, se aprieta el botón derecho y se arrastra seleccionando las columnas a las que se les desea asignar un protocolo determinado. B) Una vez seleccionadas las columnas, se les asigna el protocolo deseado con un tip. C) Para activar archivo de salida de información, se selecciona File Name Conventions y se siguen los mismos pasos que con Assays. D) Para seleccionar la carpeta donde se guardarán las secuencias, se marca la opción Results Groups. E) Una vez se coloca la placa en su posición dentro del equipo, se procede a su vinculación con la información introducida previamente.

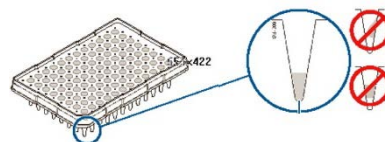
Por tanto, por orden de ejecución se realizarán las siguientes acciones:

- I. Activar los módulos/protocolos necesarios.
- II. Seleccionar las muestras correspondientes al módulo activado.
- III. Ligar estas muestras al módulo clicando como muestra la imagen.
- IV. Repetir pasos II y III para cada módulo.

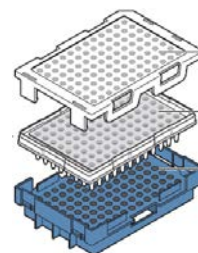
4. Seleccionar *File Name Conventions* (“nombre archivo”.ab1) de salida de cada muestra, que ha sido diseñado previamente (Figura 19.C). Para ello, se despliegan las opciones que aparecen en una nueva ventana y selecciona la más indicada o creamos una nueva si fuera el caso. Si no se activa esta información, el equipo activará la información **nombre de muestra_posición pocillo** por defecto a cada muestra.

5. Seleccionar la carpeta donde el software guarda los archivos de secuencias resultantes de cada muestra (Figura 19.D). Para ello, desplegamos las opciones que aparecerán en una nueva ventana y seleccionamos la más indicada ó creamos una nueva si fuera el caso.

Nota: Antes de iniciar el siguiente paso, hay que cerciorarse de que no hayan burbujas de aire en la dilución de cada pocillo, como muestra la imagen al lado.



6. Ligar la configuración completa de la nueva placa creada, a una de las 2 posiciones (A o B) de carga de la placa que se colocará en la bandeja de carga. Para ello, primero se prepara la placa poniéndole una tapa plástica gris y acoplándola a la carcasa, siguiendo la imagen. Luego se aprieta el botón **TRAY SIEMPRE** antes de abrir la puerta del equipo y esperar hasta que la bandeja de carga quede en su posición y el indicador luminoso de encendido vuelva al color verde. Colocar la placa y cerrar la puerta del Instrumento. A continuación se vincula la placa clicando en el botón **Link Plate for Run** (Figura 19.E).





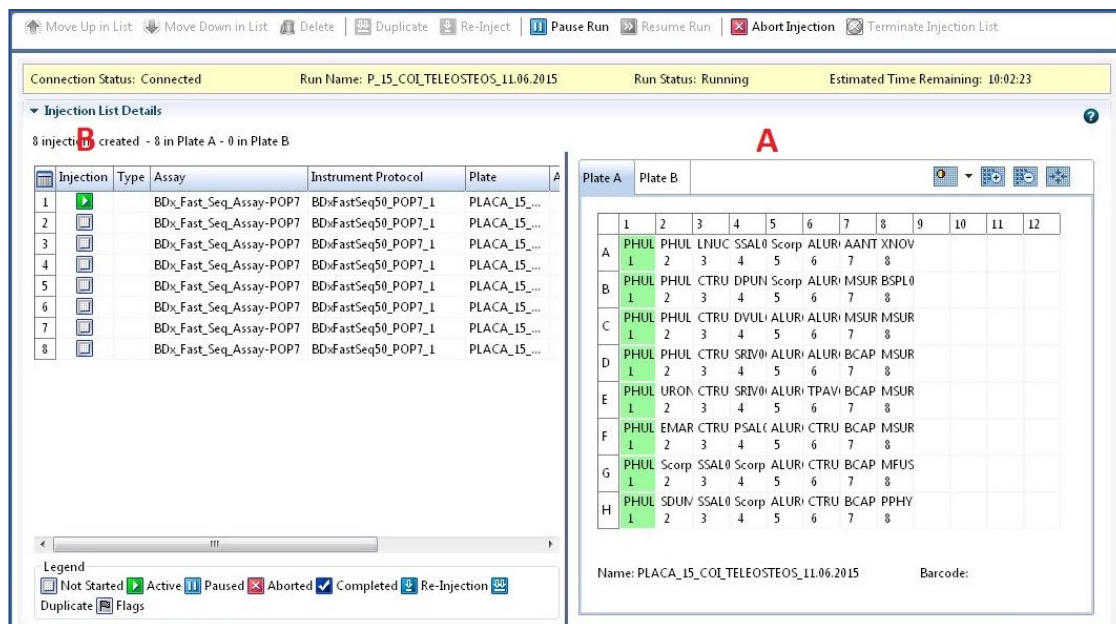
Finalmente aparecerá una nueva ventana en la que se debe seleccionar la posición (A o B) donde se cargó la placa en la bandeja de carga y clicar **Start run**. Una vez hecho esto, la placa estará ligada y el software realizará un chequeo de los consumibles a través de la etiqueta de identificación por radiofrecuencia que posee cada uno de ellos. Por lo tanto, debemos esperar que todo esté correcto y que aparezca la pantalla de monitoreo de la secuenciación.

Si algún consumible estuviera caducado y/o el número máximo de muestras o carreras haya sido superado, no se iniciará la carrera hasta que la incidencia haya sido solventada. Por lo tanto, se debe chequear la ventana de aviso en la que se puede leer cuál ha sido la causa de dicha incidencia. Cuando la hayamos resuelto, clicar de nuevo **Start run** y esperar nuevamente al inicio de la carrera.

7. Monitorear la carrera a tiempo real y observar los resultados obtenidos.

Una vez en marcha el proceso de secuenciación, aparece una pantalla de monitoreo de la, en la que se puede chequear a tiempo real y de modo continuado todos los parámetros electroforéticos y de temperatura del instrumento así como evaluar los electroferogramas de las bases nucleotídicas que conforman la secuencia de ADN de cada muestra. En el lado derecho del monitor (Figura 20.A), se observa la placa con los nombres de las muestras en la que se resalta en verde la lista de las 8 muestras que actualmente están en proceso de secuenciación. Una vez finalizada la carrera de cada inyección, las 8 muestras analizadas quedan resaltadas en amarillo hasta el final de la carrera. Por otro lado, en la ventana

izquierda (Figura 20.B), aparece un icono indicando si la carrera actual está en proceso  o se ha finalizado .



The screenshot shows a software interface for managing injections. At the top, there is a toolbar with icons for 'Move Up in List', 'Move Down in List', 'Delete', 'Duplicate', 'Re-Inject', 'Pause Run', 'Resume Run', 'Abort Injection', and 'Terminate Injection List'. Below the toolbar, the 'Connection Status' is 'Connected', 'Run Name' is 'P_15_COL_TELEOSTEOS_11.06.2015', 'Run Status' is 'Running', and 'Estimated Time Remaining' is '10:02:23'. The 'Injection List Details' section shows 8 injections created in Plate A. A table lists the injection details:

Injection	Type	Assay	Instrument Protocol	Plate
1		BDx_Fast_Seq_Assay-POP7	BDxFastSeq50_POP7_1	PLACA_15_...
2		BDx_Fast_Seq_Assay-POP7	BDxFastSeq50_POP7_1	PLACA_15_...
3		BDx_Fast_Seq_Assay-POP7	BDxFastSeq50_POP7_1	PLACA_15_...
4		BDx_Fast_Seq_Assay-POP7	BDxFastSeq50_POP7_1	PLACA_15_...
5		BDx_Fast_Seq_Assay-POP7	BDxFastSeq50_POP7_1	PLACA_15_...
6		BDx_Fast_Seq_Assay-POP7	BDxFastSeq50_POP7_1	PLACA_15_...
7		BDx_Fast_Seq_Assay-POP7	BDxFastSeq50_POP7_1	PLACA_15_...
8		BDx_Fast_Seq_Assay-POP7	BDxFastSeq50_POP7_1	PLACA_15_...

Below the table is a legend with icons for 'Not Started', 'Active', 'Paused', 'Aborted', 'Completed', 'Re-Injection', and 'Duplicate Flags'. To the right, a plate layout grid is shown for Plate A and Plate B. The grid has 12 columns and 8 rows (A-H). The first column of each row is highlighted in green, indicating that the injection is in progress for that well. The grid contains various assay names and codes.

Figura 20: A) Columnas resaltadas en verde indican que están en proceso de secuenciación. B) Según el icono que aparezca en el campo Injection, se puede conocer el estado en el que se encuentra una determinada columna.

En la parte superior del monitor aparecen varios iconos que, una vez activados, permiten:



Pausar: Este icono pausará la carrera una vez haya finalizado la inyección actual.



Resumir: Obtener un resumen de la carrera.



Abortar: Parar la inyección actual. Sólo puede detenerse la inyección actual cuando el piloto o indicador de color verde del equipo (Figura 12) esté parpadeando, es decir, cuando el sistema todavía está inyectando las muestras en el capilar. Si se clikea este icono cuando el piloto verde ha dejado de parpadear, aunque el ordenador todavía se encuentre procesando la información, el programa mostrará un mensaje indicando que no hay inyección en proceso.



Terminado: Parar la carrera en cualquier momento, aunque para activarlo se debe pausar la carrera primero.

8. Modos de vista en tiempo real de la carrera.

En la mitad inferior izquierda del monitor se pueden observar diferentes vistas de la carrera. La pestaña **Sample** (Figura 21), muestra la vista de las concentraciones relativas de fluorocromo (en el eje vertical del gráfico) así como una función del número de escaneado del instrumento (tiempo, en el eje horizontal superior del gráfico) para el capilar seleccionado. Esta vista incorpora opciones para seleccionar y anular la selección de los colores de fluorocromo que desean verse u ocultarse.

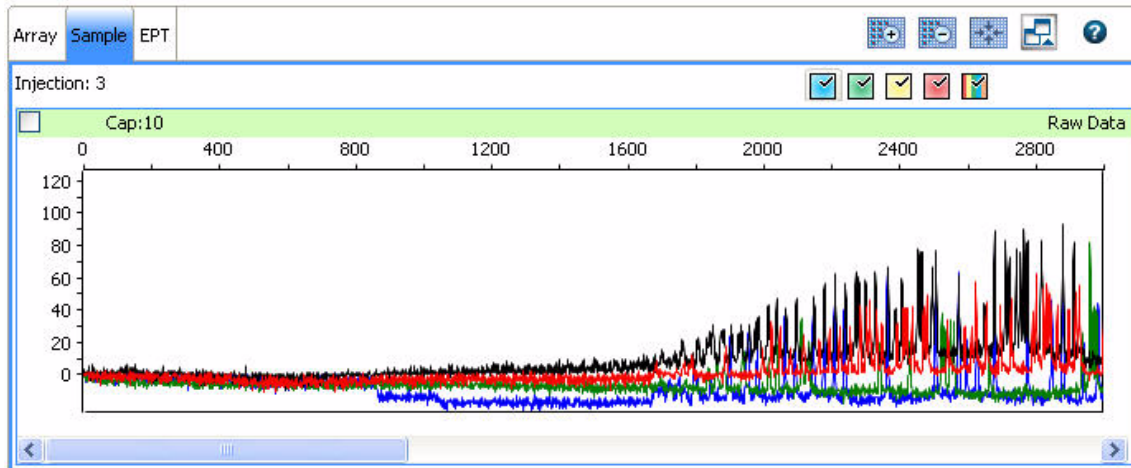


Figura 21: Vista a tiempo real de una carrera.

La pestaña **Array** muestra la vista de los datos de color (basado en el color de la fluorescencia dominante) para cada capilar como una función del número de escaneado del equipo (tiempo). Esta vista incorpora opciones de ajuste del brillo y del color, mediante el uso de las barras de desplazamiento por encima de la vista.

La pestaña **EPT** (*ElectroPhoresis Telemetry*) muestra los datos de las condiciones del instrumento (Figura 22). Las variables son las siguientes: potencia del láser, temperaturas (del horno, del ambiente y de la célula de detección), voltaje (KV) e intensidad (mA) de la electroforesis. Todas ellas muestran el valor en función del tiempo. Esta vista incorpora opciones para seleccionar y anular la selección de las variables que desean verse u ocultarse.

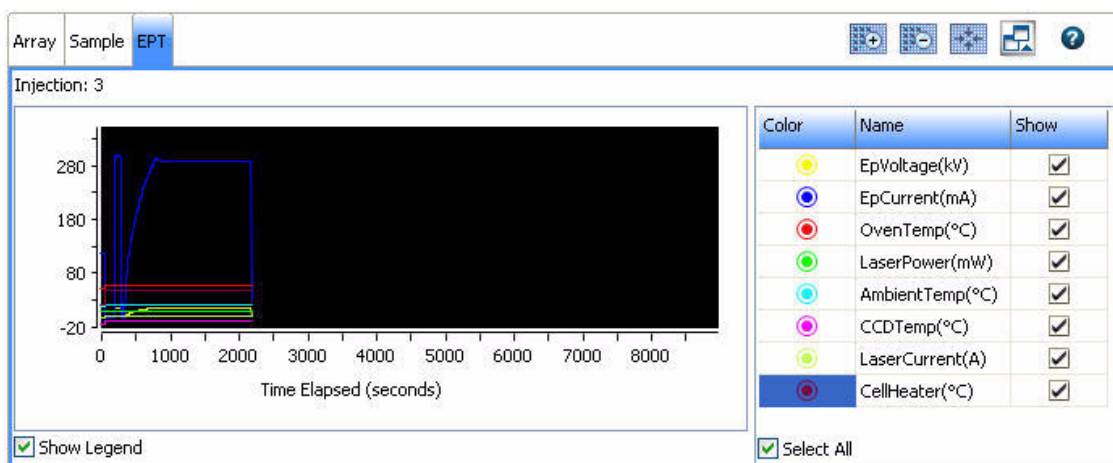


Figura 22: La pestaña EPT muestra los datos de las condiciones del equipo.

Una vez la carrera ha finalizado, se deben revisar los resultados obtenidos. Se puede acceder a la vista de los resultados a través de 3 vías (Figura 23):

- La pantalla de monitoreo de la carrera, donde se cliquee **Review Results**.
- El panel de navegación, donde se selecciona **View Sequencing Results**.
- El panel Principal, donde se cliquee el botón verde **View Run Results** que indica la vista de resultados de secuenciación.

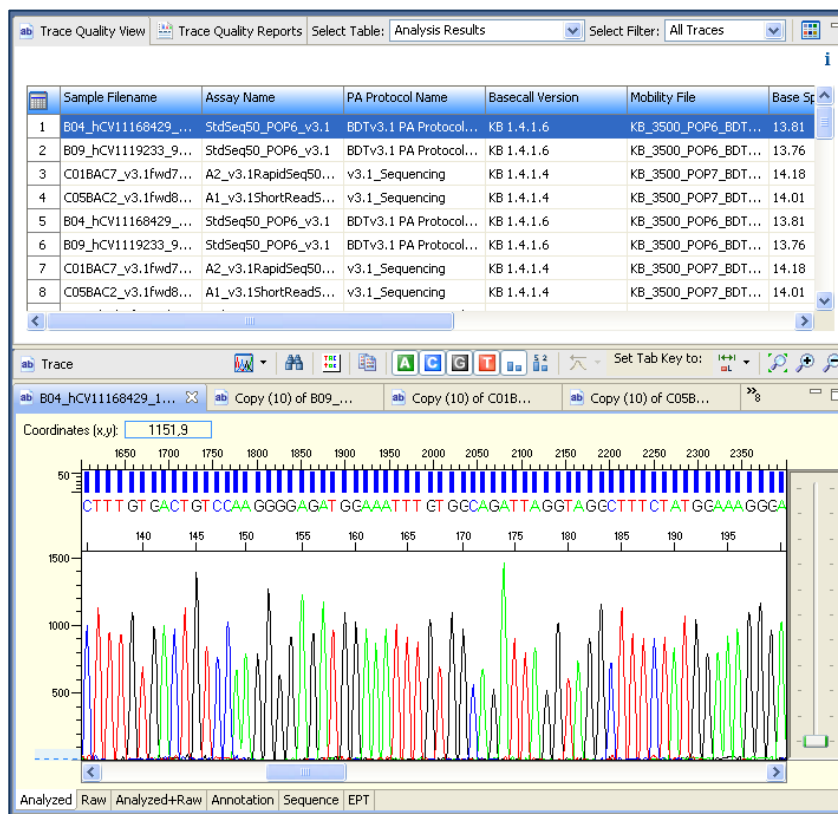


Figura 23: Ventana de vista de resultados de secuenciación del software DATA COLLECTION (Applied Biosystems).

El programa permite seleccionar una muestra de cada vez haciendo doble clic sobre alguna de las de la lista que aparece en el cuadro central del monitor. Una vez abierta, se mantiene oculta en otra pestaña cuando se selecciona la siguiente muestra. El electroferograma que aparece en la nueva ventana contiene las bases detectadas por el láser y discriminadas por el software según el fluorocromo de cada una de ellas. Ordenadas además, de izquierda a derecha según su posición 5' - 3' en la secuencia analizada. La altura del pico puede interpretarse como la cantidad de producto de PCR estimado. Entonces, el programa calcula automáticamente para cada base un Valor de Calidad (VC), que es expresado mediante una barra de color.

En la figura 24 se indican las diferentes opciones para visualizar los electroferogramas de secuenciación que aparecen en la ventana de resultados de cada muestra. Es importante anotar qué muestras han de repetirse.

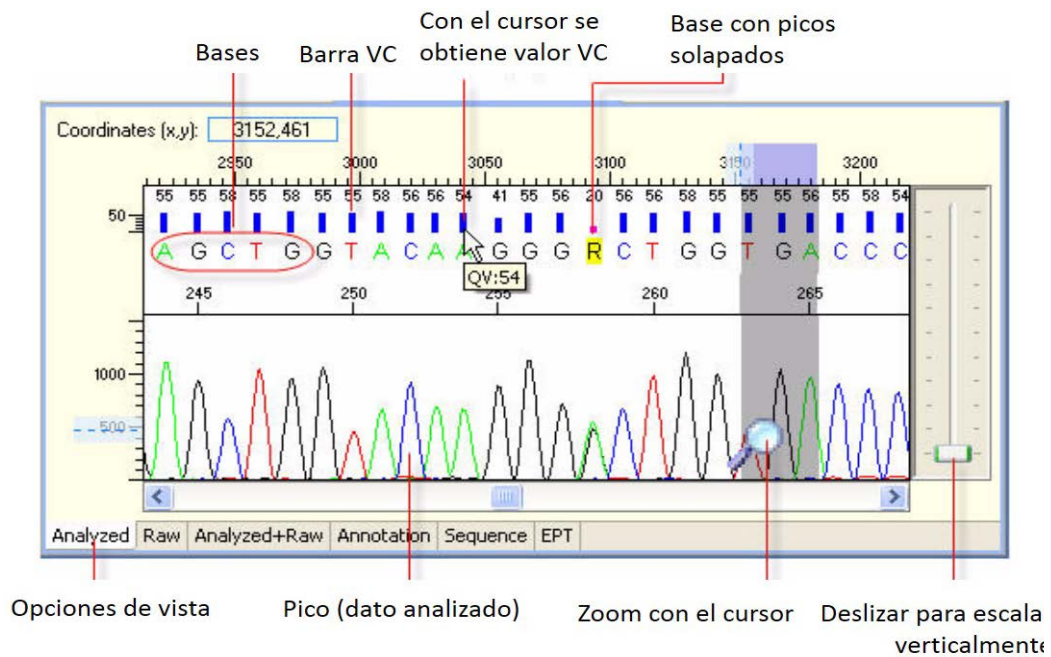


Figura 24: Distintas opciones para observar los electroferogramas de secuenciación.

Una vez revisadas todas las muestras de la carrera, si no se pretende llevar a cabo otra carrera, se debe apagar el equipo. Para ello, el monitor incorpora un icono para finalizar la carrera actual.



Terminado: Parar la carrera. Este icono únicamente está activado cuando la carrera ha sido pausada o se ha finalizado.

Finalmente se cierra el software y antes de apagar el secuenciador, se valora si dejar los consumibles en el aparato para la próxima carrera que haya sido planeada o si por el contrario, se quitan y se almacenan inmediatamente en el frigorífico a 8°C. Si se deja la estructura capilar, entonces se reemplazará el CTC de la carrera por algún otro que ya no se use pero que ayude a preservar las condiciones del capilar manteniendo las puntas de los capilares embebidas en el CTC.

En este momento ya se puede apagar definitivamente el Analizador Genético ABI3500 y luego hacer lo mismo con el ordenador para acabar la sesión de secuenciación.

10. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (PCR – RFLP)

Un método alternativo a la Secuenciación para la identificación de especies de organismos marinos, es la PCR-RFLP. Un fragmento amplificado es cortado por endonucleasas, las cuales reconocen sitios de restricción específicos, dando lugar a fragmentos cuyo número o tamaño puede ser distinto entre individuos, poblaciones, especies u otros niveles taxonómicos.

Esta técnica consiste en:

- Extraer y purificar el ADN de un individuo.
- Amplificar dicho ADN usando la técnica de la PCR.
- Seleccionar las enzimas de restricción adecuadas para que produzcan un patrón de bandas específico que se distinga de otras especies.
- Poner el producto de PCR en digestión con enzimas de restricción específicas para que produzcan fragmentos de ADN de diferentes longitudes.
- Finalmente los fragmentos de restricción son separados mediante electroforesis en gel de agarosa y visualizados con un transiluminador de luz ultravioleta.
-

Esta técnica permite detectar alteraciones de al menos un único nucleótido en la secuencia y se usa como marcador para identificar grupos particulares de individuos, ya que puede mostrar la relación genética entre ellos (Mirhendi et al. 2005).

11. BIBLIOGRAFÍA

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2008. *Biología Molecular de la Célula*. Ediciones Omega. España. 1602pp.

Brás, N. (2014). Caracterização e traçabilidade genética de conservas de cavalas produzidas em Cabo Verde. Relatório de Estágio do Curso de Licenciatura em Biologia Marinha e Pescas. Universidade de Cabo Verde (UNICV DECM). Ilha de São Vicente (Cabo Verde). 57 pp.

dos Santos, K. S. G. (2014). Identificação genética dos stocks da garoupa, *Cephalopholis taeniops* (Valenciennes, 1828), no Arquipélago de Cabo Verde. Relatório de Estágio do Curso de Licenciatura em Biologia Marinha e Pescas. Universidade de Cabo Verde (UNICV_DECM). Ilha de São Vicente (Cabo Verde). 49 pp.

Doyle and Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.

Ferris M.J., Sheehan K.B., Kühl M., Cooksey K., Wigglesworth-Cooksey B., Harvey R., Henson J.M. 2005. Algal species and light microenvironment in a low-pH, geothermal microbial mat community. *Applied Environmental Microbiology*. 71(11), 7164-7171.

Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. ADN primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3(5), 294-299.

Goff L.J., Moon D.A., Coleman A.W. 1994. Molecular delineation of species and species relationships in the red algal agarophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariales). *Journal of Phycology*. 30, 521-537.

Mesa D. P., Bernal A. A. 2005. Protocolos para la Preservación y Manejo de Colecciones Biológicas. *Boletín Científico - Centro de Museos – Museo de Historia Natural*. Vol. 10.

Mirhendi H., Makimura K., Zomorodian K., Yamada T., Sugita T., Yamaguchi H. 2005. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. *Journal of Microbiological Methods*.

Palmer, et al. (1989). *Ann. Miss. Bot. Gard.* 75: 1180—1206

Palumbi S.R. 1996. Nucleic acid II: the polymerase chain reaction. In: *Molecular systematics*. Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. (eds). 205-247 pp. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Vol 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press. United States of America.

Sambroock J., Russell D. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. VOL 1, 3ªed. Cold Spring Harbor Laboratory press. United States of America.

Shubart C.D. 2009. Mitochondrial DNA and Decapod Phylogenies: The Importance of Pseudogenes and Primer Optimization. 47–65pp. In: Decapod crustacean Phylogenetics, Joel W. Martin, Keith A. Crandall and Darryl L. Felder (eds.). CRC Press.

Teletchea F. 2009. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Rev Fish Biol Fisheries* 19:265-293.

Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.H., Last P.R., Hebert P.D.N. 2005. Barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 360, 1847-1857.

Wolf C., Burgener M., Hübner P., Lüthy J. 2000. PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: Differentiation of Fish Species. *LWT-Food Science and Technology*.

ANEXO II

ELABORACIÓN DE ETIQUETAS

1. Etiquetas para bolsas de muestreo

Nº Hoja de muestreo:
Nº de muestra:
Observaciones:

2. Etiquetas para disoluciones preparadas

[Nombre y Apellidos] (1)	[Fecha] (2)
[Nombre y Fórmula molecular] (3)	
[Concentración de la disolución]	

(1) Nombre y apellidos de la persona que ha preparado la disolución.

(2) Fecha de preparación de la disolución.

(3) Nombre y Fórmula molecular de la disolución preparada.

ANEXO III

PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

1. DNA Wash Buffer

Diluir el *DNA wash buffer* con etanol absoluto en las proporciones que aparecen en la siguiente tabla y almacenar a temperatura ambiente.

KIT	Volumen etanol (mL)/Botella de buffer
D3373-00 y D3396-00 (5 preparaciones)	6
D3373-01 y D3396-01 (50 preparaciones)	60
D3373-02 y D3396-02 (200 preparaciones)	100

2. HBC Buffer

Diluir el *HBC Buffer* con isopropanol en las proporciones que aparece en la siguiente tabla y almacenar a temperatura ambiente.

KIT	Volumen isopropanol (mL)/Botella de buffer
D3373-00 (5 preparaciones)	1.6
D3373-01 (50 preparaciones)	10
D3373-02 (200 preparaciones)	32

3. TAE 1X

- Partiendo de una solución TAE 10X se prepara una solución TAE 1X. Puesto que se trata de una dilución, se aplica la siguiente ecuación:

$$[\text{TAE10X}] * V_i = [\text{TAE1X}] * V_f$$

Siendo:

$$[\text{TAE10X}] = 10$$

$$[\text{TAE1X}] = 1$$

V_i = Volumen de TAE 10X que se necesita para preparar TAE 1X → INCÓGNITA

V_f = Volumen de TAE 1X que se desea preparar

- Una vez conocido el valor de V_i , se calcula el volumen de agua MiliQ necesario para preparar el TAE 1X:

$$V_{H_2O_{add}} = V_f - V_i$$

- Añadir el volumen de TAE 10X calculado en una botella de vidrio borosilicatada y agregar la cantidad de agua MiliQ correspondiente.
- Etiquetar la botella con el nombre de la disolución, concentración, fecha y nombre de la persona que realizó la disolución.
- Almacenar a temperatura ambiente.

4. Gel de agarosa

- Gel de agarosa al 1%: Pesar 1 gramo de agarosa y añadir 100mL de TAE 1X.
- Gel de agarosa al 2%: Pesar 2 gramos de agarosa y añadir 100mL de TAE 1X.

5. Solución CHELEX 10%

- Pesar 1g de *chelex 100 Molecular Biology Grade Resin* (REF: 142-1253 BIORAD) y resuspender en 10mL de agua desionizada autoclavada.
- Hacer alícuotas de 300 μ L en tubos de microcentrífuga de 1.5-2mL y agitar frecuentemente con el vórtex, ya que la resina es muy pesada y se va al fondo.
- Rotular cada tubo con el nombre de la disolución y la concentración.
- Almacenar las alícuotas a -20°C.

6. CTAB 2X

Para un volumen total de 1L se necesita: CTAB, EDTA 0.5M, NaCl 1.4M, PVP 1%, Tris HCl 1M pH8 y 2-Mercaptoetanol.

- Par una disolución CTAB 2X, tomar 20mL de Hexadecyltrimethylammonium bromide.

- Para una disolución EDTA 20mM, tomar 40mL de EDTA 0.5M:

$$[EDTA]_i * V_i = [EDTA]_f * V_f$$

$$0.5M * V_i = 0.02M * 1000mL$$

$$V_i = 40mL$$

- Para obtener NaCl 1.4M, pesar 81.82g de NaCl.

$$M = \frac{\text{gramos} / P_m (\text{solute})}{\text{Litros} (\text{disolución})} \quad \text{masa} = 1.4 * 1 * 58.44 = 81.82g$$

- Para 1L de disolución añadir 10g de PVP.

- Para una disolución Tris HCl 100mM pH8, tomar 100mL de Tris HCl 1M pH8.

$$[\text{TrisHCl}]_i * V_i = [\text{TrisHCl}]_f * V_f$$

$$1\text{M} * V_i = 0.1\text{M} * 1000\text{mL}$$

$$V_i = 100\text{mL}$$

- Disolver las cantidades de reactivos calculadas anteriormente en 0,75L de agua destilada y autoclavada.
- Dejar la disolución agitándose mientras se añaden los productos.
- Dejar reposar la disolución ya que genera espuma.
- Enrasar a 1L e introducir en una botella de vidrio opaco. Después de un tiempo en reposo la espuma desaparece.
- Etiquetar la botella con el nombre de la disolución, concentración, fecha y nombre de la persona que realizó la disolución.
- Almacenar a temperatura ambiente.
- Puesto que el mercaptoetanol se degrada con facilidad, sólo se añade la cantidad que se va a utilizar en el momento de su utilización (añadir 2µL por muestra).

7. Tris HCl 1M pH 8

Para un volumen total de 1L se necesita: [Trizma® Base](#) y [Agua MiliQ autoclavada](#).

- Pesar 121.1g de Trizma Base y añadir a 400mL de agua MiliQ autoclavada hasta disolución.
- Ajustar a pH 8 con ayuda de HCl concentrado y posteriormente enrasar a 1 litro con agua MiliQ autoclavada.
- Etiquetar la botella con el nombre de la disolución, concentración, fecha y nombre de la persona que realizó la disolución.
- Almacenar en frigorífico a -8°C.

8. EDTA 0.5M

Para un volumen total de 0.5L se necesita: [EDTA](#) (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate), Tris y [Agua MiliQ autoclavada](#).

- Pesar 93.06g de EDTA y añadir a 200mL de agua MiliQ autoclavada hasta disolución.
- Ajustar a pH8 con Tris en polvo y posteriormente enrasar a 0.5 litros con agua MiliQ autoclavada.
- Introducir la disolución en una botella previamente autoclavada.
- Etiquetar la botella con el nombre de la disolución, concentración, fecha y nombre de la persona que realizó la disolución.
- Almacenar en frigorífico a -8°C.

9. NaCl 5M

Cálculos para un volumen de medio litro de disolución:

$$M = \frac{\text{gramos} / P_m (\text{solute})}{\text{Litros (disolución)}} \quad \text{masa} = 5 * 0,5 * 58.44 = 146,10g$$

- Disolver 146,10g de NaCl en 300mL de agua destilada.
- Enrasar a 0,5L de agua.
- Etiquetar la botella con el nombre de la disolución, concentración, fecha y nombre de la persona que realizó la disolución.
- Almacenar a temperatura ambiente.

10. TE (Tris-EDTA)

Para preparar 1L de tampón se parte de una disolución **Tris-HCl** 1M pH=8 y **EDTA** 0.5M.

- Preparar Tris-HCl 100mM a partir de Tris-HCl 1M:

$$\begin{aligned} [\text{Tris-HCl}]_i * V_i &= [\text{Tris-HCl}]_f * V_f \\ 1M * V_i &= 0.1M * 1000mL \\ V_i &= 100mL \end{aligned}$$

- Preparar EDTA 1mM a partir de EDTA 0.5M:

$$\begin{aligned} [\text{EDTA}]_i * V_i &= [\text{EDTA}]_f * V_f \\ 0.5M * V_i &= 0.001M * 1000mL \\ V_i &= 2ml \end{aligned}$$

- Tomar una botella borosilicatada de 1L y añadir 100mL de Tris-HCl 100mM y 2mL de EDTA 1mM.
- Enrasar con agua MiliQ autoclavada. Volver a autoclavar.
- Etiquetar la botella con el nombre de la disolución, concentración, fecha y nombre de la persona que realizó la disolución.
- Almacenar a -8°C.

ANEXO IV

PLANILLAS PCR Y SECUENCIACIÓN

PCR N°:

Fecha:

Región del gen amplificada:

Organismo marino:

Técnico:

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

N° de reacciones:

Volumen de ADN/reacción:

Programa termociclador:

Perfil térmico:

Termociclador:

Applied Biosystem 2720 Simpliamp

Reactivo	Volumen/reacción (µL)	Volumen/reacción x N° de reacciones (µL)
Agua MiliQ		
Taq Go Buffer		
MgCl ₂		
dNTPs		
Fw:		
Rv:		
Go Taq		
TOTAL		

PURIFICACIÓN PCR N°:
Región del gen purificada:
Técnico:

Fecha:
Organismo marino:

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

Volumen de producto de PCR purificado:

Programa termociclador:

Termociclador: Applied Biosystem 2720 Simplicamp

REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN N°:

Fecha:

Región del gen:

Organismo marino:

Técnico:

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

Programa termociclador:

Termociclador: Applied Biosystem 2720 Simpliamp

REACTIVO		VOLUMEN (µL)
Mix de reacción	Big DyeMix	0,5
	Buffer de Secuenciación	1,75
ADN molde		2
Primer (3,2µM)		1
H ₂ O		4,75
Volumen Total de Reacción		10

ANEXO V

MANEJO DE EQUIPOS PRINCIPALES

AUTOCLAVE VERTICAL

Modelo: Selecta 20 litros

1. Poner el material a autoclavar dentro de la cesta de autoclave.
3. Comprobar que la resistencia del equipo está cubierta de agua, es decir, cuando observemos el interior y no veamos el reflejo del agua por los agujeros del fondo, entonces se debe añadir agua destilada.
2. Introducir la cesta en el interior del autoclave.
3. Cerrar la tapa del autoclave y poner la manecilla en modo "CLOSED".
4. Comprobar que la rueda situada en el lateral del autoclave indique hacia arriba.
5. Presionar el botón de encendido.
6. Presionar el botón de temperatura para que marque 121°C.
7. Girar la rueda del temporizador hasta que marque 20 minutos a 60Hz (línea azul).
8. Pasado el tiempo de autoclavado, esperar unos minutos antes de abrir el aparato para que se despresurice.

Importante!

Al girar la manecilla en modo "OPEN" puede ocurrir que no se abra la tapa, en este caso girar la rueda 90° a la izquierda (en sentido contrario a las agujas del reloj), situada en el lateral del autoclave. Una vez ha salido el vapor, se vuelve a girar la rueda a la derecha hasta que la flecha apunte hacia arriba.

BLOQUE TÉRMICO

Lan Technics – Mixing Block MB-102

1. Encender el equipo.
2. Ajustar la temperatura, el tiempo y la velocidad de agitación. Tener en cuenta que el equipo no se ajusta a 0 r.p.m.
3. Para su limpieza, utilizar papel absorbente e incluso bastoncillos de algodón impregnados en etanol y limpiar los orificios. Para una limpieza más profunda, desatornillar el bloque de orificios con una llave allen adecuada y limpiar con agua y etanol.

CENTRÍFUGA DE SOBREMESA

Modelo: Eppendorf Centrifuge 5430

1. Encender el equipo.
2. Apretar el botón "Open" y colocar el rotor para placas o el rotor para tubos de centrífuga.
3. Introducir la placa o en su caso, los tubos en el interior del rotor.

Nota: Al realizar el cambio del rotor de tubos por el de placas (o viceversa) puede ocurrir que la centrífuga no reconozca dicho cambio y de un error. En tal caso, se aprieta el botón **open** y se vuelve a cerrar la tapa del aparato. Luego se vuelve

4. Cerrar la tapa.
5. Ajustar el tiempo y la velocidad y apretar el botón "START/STOP".

Nota: Antes de poner en marcha la centrífuga, debemos asegurarnos de que las unidades de la velocidad de giro del rotor sean las adecuadas. El algoritmo utilizado para la conversión de unidades es el siguiente:

$$G = (\text{r.p.m.})^2 \cdot 1,118 \cdot 10^{-5} \cdot r$$

Donde:

G = Velocidad de giro del rotor en Fuerza G

r.p.m. = Velocidad de giro de rotor en revoluciones por minuto

r = Radio del rotor en centímetros

TERMOCICLADOR

Modelo: Applied Biosystems. SimpliAmp Thermal Cyclers

1. Presionar el botón de encendido.
2. Introducir la placa con las muestras. Si en vez de placas, tenemos tubos, se debe utilizar un adaptador de tubos.
3. Seleccionar el programa a utilizar:

"Open methods" → Seleccionar método → Cambiar volumen de la reacción al deseado → "Enter" → "Next start run"

4. Si el programa que necesitamos no está registrado en el equipo, se procede del siguiente modo:

- **MÉTODO 1**

"New Method" → "Open template" → "Blank PCR" → "Basic PCRtaq" → "Edit" → Introducir parámetros.

- **MÉTODO 2**

"Open methods" → Seleccionar un método de amplificación que esté registrado en el equipo → Ajustar las características a las deseadas → "Save" → "Name" → Asignar un nombre al nuevo método introducido.

5. Una vez termina el proceso y vemos que el temporizador llega a su fin (cuando el perímetro del círculo es completamente amarillo) → "Infinite Hold" → "Stop Run" → Confirmar → Cuando en la pantalla se lea "Remove Samples", abrir el termociclador y sacar las muestras.

6. Apagar el equipo.

Importante!

Una vez la placa se ha sacado del termociclador, no cerrar inmediatamente la tapa del mismo para evitar que con el calor se genere condensación en su interior.