

Amplificación por PCR y electroforesis en gel de agarosa

Protocolo. Preparación y realización de PCR para amplificación de ADN en plantas

El objetivo de este protocolo es amplificar el gen de la Citocromo Oxidasa I de las muestras de ADN extraídas de cada una de las especies. De esta forma obtendremos una concentración del gen suficiente para mandar a secuenciar y poder realizar el análisis bioinformático.

Preparación de la zona de trabajo

1. Limpiar con alcohol 70° la superficie de cristal sobre la que vamos a trabajar.
2. Preparar un recipiente con hielo para poner los componentes del mix de la PCR.
3. Preparar una encimera para el tubo de la polimerasa.

Material

- Termociclador o equipo de PCR. Se ha usado el termociclador TC-512 de Techne, modelo FTC51H2D.
- Tubo eppendorf para el mix. Rotular como "MIX".
- Rejilla con el número de tubos de PCR que se van a usar. Rotular como C- (Control negativo), C+ (Control positivo) y numerar empezando por el número 1 los tubos PCR para las muestras, las réplicas se identificarán por letras minúsculas (a y b).
- Muestra para el control positivo. Se ha usado una muestra de *Ginkgo biloba*, extraída mediante el kit comercial DNeasy® Plant Pro Kit y, cuyos valores son OD=7,8 ng/μl, 260:280= 2,04 y 260:230=0,38)
- Muestras de ADN para analizar. Dar un spin.
- Componentes de la PCR (tubo con agua Milli-Q, Buffer 5x Colorless (Go Taq Flexi Buffer), Mg²⁺, dNTPs, primer Forward, primer Reverse, DNA polimerasa (GoTaq).

Procedimiento

1. Dar un spin a todas las muestras de ADN que se van a analizar, incluidas las del control positivo.
2. Preparación del mix para la PCR. Añadir cada uno de los componentes en el tubo rotulado como "MIX".

Tabla 1. En esta tabla se indica la concentración de cada uno de los componentes de la reacción de PCR del tubo de stock y la concentración final que requiere la reacción. En base a estos datos se ha calculado la cantidad en μl de cada uno de los componentes para una y 9 reacciones de PCR, teniendo en cuenta un volumen final de 50 μl. El volumen para más de un tubo es el que denominamos "MIX". Cuando se han realizado los cálculos se ha añadido un volumen de un tubo adicional, para suplir posibles errores de pipeteo.

Componentes	Concentración del stock	Concentración final	μl/tubo	μl/9 tubos
H2O Milli-Q	-		27,8	240,2
Buffer S/C	5X	1X	10	90
MgCl ₂	25 mM	1,0-4,0 mM	4	36
dNTPs	10 mM each	0,2 mM each	1	9
Primer Forward (LCO 1490)	10 mM	0,1-1,0 μM	1	9
Primer Reverse (HCO 2198)	10 mM	0,1-1,0 μM	1	9
DNA polimerasa (GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase)	5u/μl	1,25 u	0,2	1,8
Muestra DNA (Ver tabla 2)	-	<0,5 μg/50 μl	5	5
		Volumen total (μl)	50	450

3. Añadir 45 µl de mix en cada tubo de PCR.
4. Añadir en el tubo de PCR rotulado como C-, 5 µl de H₂O Milli-Q.
5. Añadir en el tubo de PCR rotulado como C+, hasta 5 µl de la muestra control (Ver tabla 5).
6. Añadir en los tubos de PCR restantes las muestras correspondientes, resuspendiendo con la micropipeta. Tener en cuenta que, el volumen añadido va a depender de la densidad óptica (OD) medida con el equipo de espectrofotometría del NanoDrop ND-100 Spectrophotometer (Ver tablas del punto 3).

Tabla 2. En esta tabla, se recoge la cantidad de ADN que vamos a añadir a cada reacción de PCR teniendo en cuenta la densidad óptica (OD) obtenida al medir con el equipo de espectrofotometría del NanoDrop ND-100 Spectrophotometer. Para ello se ha adjudicado un volumen de ADN y H₂O para cada uno de los rangos de densidad óptica recogidos en la tabla.

Rango de densidad óptica (OD)	Volumen ADN (µl)	Volumen H ₂ O (µl)
300-400	1,5	3,5
200-300	2	3
100-200	4	1
<100	5	-

7. Cerrar y dar un spin a los tubos de PCR que se han preparado.
8. Preparación del equipo de PCR (termociclador) TC-512 de Techne, modelo FTC51H2D.
 - Configurar el programa de PCR adecuado a los primers elegidos.

Para los primers **rbclLaF/rbclLaR** el programa consta de:

- a) Paso inicial: 94°C 1 minuto
- b) 35 ciclos:
 - Paso de desnaturalización: 94°C 15 segundos
 - Paso de “annealing”: 54°C 15 segundos
 - Paso de extensión: 72°C 30 segundos
- c) Paso de conservación de la muestra: 4°C

Para los primers **matK-3F/matK-1R** el programa consta de:

- a) Paso inicial: 94°C 3 minutos
- b) 35 ciclos:
 - Paso de desnaturalización: 94°C 30 segundos
 - Paso de “annealing”: 48°C 40 segundos
 - Paso de extensión: 72°C 1 minuto
- c) Paso de extensión adicional: 72°C 10 minutos
- d) Paso de conservación de la muestra: 10°C

Para los primers **nrITS2-S2F/nrITS2-S3R** el programa consta de:

- a) Paso inicial: 95°C 2 minutos y 30 segundos
- b) 35 ciclos:
 - Paso de desnaturalización: 95°C 30 segundos
 - Paso de “annealing”: 56°C 30 segundos
 - Paso de extensión: 72°C 30 segundos
- c) Paso de extensión adicional: 72°C 10 minutos
- d) Paso de conservación de la muestra: 10°C

Para los primers **Gym_R1B_Fwd/Gym_F1B_Rev** el programa consta de:

- a) Paso inicial: 94°C 3 minutos
- b) 35 ciclos:
 - Paso de desnaturalización: 94°C 30 segundos

- Paso de “annealing”: 52°C 30 segundos
- Paso de extensión: 72°C 45 segundos
- c) Paso de extensión adicional: 72°C 10 minutos
- d) Paso de conservación de la muestra: 10°C

Para los primers **Eph_F/Eph_R** el programa consta de:

- a) Paso inicial: 94°C 3 minutos
 - b) 35 ciclos:
 - Paso de desnaturalización: 94°C 30 segundos
 - Paso de “annealing”: 52°C 30 segundos
 - Paso de extensión: 72°C 45 segundos
 - c) Paso de extensión adicional: 72°C 10 minutos
 - d) Paso de conservación de la muestra: 10°C
-
- Seleccionar el programa y esperar a que la tapa se caliente para meter los tubos de PCR.
 - Introducir los tubos de PCR con las muestras, cerrar adecuadamente la tapa y esperar a que termine el programa seleccionado.

Protocolo: Electroforesis en gel de agarosa

El objetivo de este protocolo es visualizar los resultados de la PCR en un gel de agarosa. Además podremos obtener datos sobre el tamaño y cantidad de ADN obtenido en cada banda.

Este protocolo se divide en tres partes:

- a) Preparación del gel de agarosa.
- b) Electroforesis en gel de agarosa.
- c) Fotografía del gel de agarosa.

a) Preparación del gel de agarosa.

Este protocolo está adaptado a geles de cubetas medianas (80ml) y de un porcentaje de agarosa del 1%, recomendado por la casa comercial Meridium del marcador de peso molecular (MPM) HyperLadder 1 kb que vamos a usar para la visualización de bandas entre 500-10000 bp.

Material

- Tampón Tris Borato EDTA (TBE 1x)
- Agarosa (Agapure)
- RedSafe o SyberSafe.
- Papel de aluminio.

Procedimiento

1. Llevar el TBE a 1x. Tenemos TBE 10x, vamos a preparar un volumen de 4000 ml.

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

$$10x \cdot V_i = 1x \cdot 4000 \text{ ml}$$

$$V_i = 4000 \text{ mL de TBE } 10x \text{ -----} > V \text{ H}_2\text{O} = 3600 \text{ ml}$$

2. Medir con una probeta 80 ml de TBE 1x y añadirlos a un matraz.
3. Añadir 0,8g de agar en el mismo matraz.
4. Mezclar suavemente y calentar en el microondas hasta que se vea homogéneo. Usar guantes y gafas de protección y al agitar con suavidad, evitar que la boca del matraz esté en la misma dirección del cuerpo.
5. Atemperar metiendo el matraz debajo del grifo o en hielo.
6. Añadir 8 µl de SyberSafe (10000X) o 4 µl de RedSafe (20000X) y mezclar suavemente
7. Montar el molde para el gel de agarosa hasta que la cubeta quede perfectamente sellada y poner una o dos filas de peines con las calles que necesitamos. Se han usado peines de 15 calles y una fila para geles de 14 muestras (más el MPM) y de dos filas para geles de 28 muestras (más 2 pocillos con MPM).
8. Verter sobre la cubeta el contenido del matraz. Si han quedado burbujas, es muy importante eliminarlas, ya que podrían interferir en la correcta migración de las muestras.
9. Tapar con papel de aluminio y esperar a que se solidifique. A temperatura ambiente este proceso puede tardar unos 40 min aproximadamente. Pero podemos acelerarlo usando una cámara fría durante 10 min.

NOTA: Estas cantidades son las indicadas por la casa comercial para una banda entre 500-10000 bp. Para cualquier otro tamaño tener en cuenta la concentración de agarosa para obtener una separación efectiva en las bandas que queremos visualizar.

b) Electroforesis

Material:

- Máquina de electroforesis.
- TBE 1x.
- Gel de agarosa.
- Muestras de PCR.

- Loading Buffer.
- Papel de parafina.
- Marcador de peso molecular (M.P.M.) HyperLadder 1kb Meridiam Bioscience™.
- Micropipetas P2 y P10, puntas con filtro.
- Tubos del resultado de la PCR.
- Tabla con la identificación de las muestras y número de calle en la que se ha cargado.

Procedimiento:

1. Construir una tabla en la que especifiquemos la muestra cargada en cada una de las calles. Es muy importante una correcta identificación de las muestras (Ver tabla 6).

Tabla 6. Tabla identificativa del gel de agarosa. Se recogen datos sobre la calle y la muestra. Si el gel usado es de doble fila (28 muestras), el M.P.M se carga en las calles 1 y 30, las calles 15 y 16 no se cargan y se podrá poner un control positivo adicional en la calle 29 (opcional).

Calle	Nº tubo de PCR	Identificación de la muestra
1	M.P.M.	HyperLadder 1kb
2	C-	MIX + H ₂ O
3	C+	MIX + Muestra control (<i>Achatina fulica</i>)
4	1	Muestra X ₁
5	2	Muestra X ₂
...

2. Añadir TBE 1x a la máquina de electroforesis hasta un poco antes de llegar al máximo marcado. Cambiar el TBE 1x cada 2-3 electroforesis.
3. Encajar la cubeta con el gel de agarosa en la máquina de electroforesis, de forma que el gel quede totalmente cubierto por TBE 1x. Se puede añadir TBE 1x hasta cubrirlo.
4. Cargar 5 µl de M.P.M. en las calles correspondientes según la tabla que hemos construido.
5. Añadir Loading Buffer a las muestras de PCR. Para ello coger un trozo de papel de parafina y poner tantas gotas de 1 µl de Loading Buffer como tubos de PCR tengamos.
6. Coger 10 µl de muestra y mezclar con una de las gotas de 1 µl de Loading Buffer que hemos preparado.
7. Cargar el gel teniendo en cuenta la tabla que hemos construido.
8. Poner la tapa, configurar a 90V y correr el gel. Esperar aproximadamente 40-45 min. Si disponemos de unas gafas de luz azul se puede seguir el proceso en tiempo real.

c) Fotografía del gel

Una vez finalizada la electroforesis se lleva la cubeta con el gel al equipo revelador de geles, nuestro laboratorio usa la GelDoc Go Imaging System de BioRad.

Encender el equipo, preparar la bandeja y el molde. Usando guantes, colocar sobre la bandeja de “Luz Azul” el gel. El resto de protocolo sin guantes. Colocamos la bandeja sobre el cajón y lo cerramos. Ajustamos el tamaño e indicamos que vamos a usar RedSafe y obtenemos la imagen. Ajustar el contraste de forma que se vea mejor, cargar los archivos en el pen. Una vez instalado el software se puede modificar los parámetros usando el ordenador personal.