

Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a la identificación de especies.

Amplificación de la región codificante y el espaciador no transcrito (NTS) de los genes del RNA 5S de salmón, trucha y trucha arco iris. Ver Pendás et al. (1995).

SESIÓN 1

1 Extracción de ADN.

1.1 Colocar un pequeño trozo de tejido en un tubo de **1,5 ml**.

1.2 Añadir **300 µl de tampón de extracción** y disgregar el tejido.

1.3 Añadir **330 µl de tampón de extracción**, **4 µl de proteinasa K** (stock a 20mg/ml) y **70 µl de SDS** al 10%. **Agitar** para resuspender el tejido.

1.4 Incubar a **56° C** durante **45 min**. Mientras se incuba la muestra **centrifugar 1 min** 2 tubos **Phase Lock** vacíos.

1.6 Centrifugar 2 min. Recuperar **600 µl** de sobrenadante y transferirlo a un tubo **Phase Lock**.

1.7 Extraer con **fenol-CIA** (fenol, cloroformo, alcohol isoamílico 25:24:1): Añadir un volumen de **fenol-CIA (600 µl)**. **Mezclar** manualmente durante **1 min** y **centrifugar 2 min**. Recuperar la fase acuosa en el otro tubo **Phase Lock**.

1.8 Extraer con CIA (cloroformo-isoamílico 24:1): se añade **1 vol (600 µl)** de **CIA**. **Mezclar** manualmente durante **1 min** y **centrifugar 2 min**. Se recupera la fase de acuosa y se pone en un tubo Eppendorf nuevo.

1.9 Añadir **1 vol** de **isopropanol (600 µl)** y **0,1 vol (60 µl)** de **acetato sódico**. Mezclar invirtiendo el tubo y dejar en **hielo** durante **5 minutos** para que precipiten los ácidos nucleicos.

1.10 Centrifugar durante **5 minutos**, poniendo la bisagra del tubo Eppendorf hacia el exterior de la centrífuga para facilitar la localización del precipitado. Comprobar la presencia de precipitado en el tubo. Eliminar el sobrenadante.

1.11 Lavar el precipitado con **500 µl** de **etanol** al **70 %**. Lavar invirtiendo el tubo, **centrifugar 1 minuto** y eliminar completamente el sobrenadante con una pipeta. Secar en una cámara a **50°C**.

1.12 Resuspender en **20 µl** de tampón **TE** pH8.

1.13 Añadir **1 µl** de **RNAsa** e **incubar 1h** a **37°C**.

SESIÓN 2

2 Cuantificación en gel

Este método se utiliza para cuantificar el ADN cuando la concentración es pequeña o está contaminado con otras sustancias. Está basado en la comparación cantidad de fluorescencia emitida por el bromuro de etidio intercalado entre el ADN después de su tinción.

El ADN de alto peso molecular bien conservado formará una banda (más o menos ancha) de un tamaño mayor de 50 kb. El ADN que aparezca por debajo de esta banda corresponde a ADN más o menos degradado en función de los tamaños menores o mayores de los fragmentos que presente.

2.1 Se preparan tres diluciones sucesivas; **1/10, 1/100 y 1/1000** partiendo de **5 µl** de la muestra del ADN inicial.

Se prepara un gel de **agarosa al 0,7%** en **tampón TBE** conteniendo **0.50 µg/ml** de bromuro de etidio

2.2 Se mezclan **10 µl** de cada una de las diluciones de nuestro ADN con **2 µl** de **tampón de carga** y se cargan en el gel. Como controles se cargarán cantidades conocidas de **ADN del fago lambda (48Kb)**, p. ej. 200, 50 y 10 ng.

El gel se corre a 100V hasta que el azul de bromofenol haya migrado 2-3 cm. Posteriormente se mira en el transiluminador de luz UV y se fotografía.

SESIÓN 3

3 Preparación de la PCR

3. 1 En un tubo de **0,2 ml** mezclar:

Cebador F	1µl	F: 5' TACGCCCGATCTCGTCCGATC 3'
Cebador R	1µl	R: 5' CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC 3'
DNA	4µl	
Agua bidestilada	6,5µl	

3.2 Añadir **12,5 µl** de la **PCR Mix** (Nucleótidos, tampón y polimerasa *Taq*). Mantener en hielo hasta colocar en el termociclador.

4 Programación del termociclador

Pasos

1 Desnaturalización	5 min	94°C
2 Desnaturalización	30 seg	94°C
3 Unión cebadores	30 seg	56°C
4 Extensión	45 seg	72°C
5 Extensión	7 min	72°C

Repetir los pasos 2, 3 y 4 30 veces. Duración: 1h 45 min aprox

SESIÓN 4

5 Electroforesis

Comprobar el resultado de las digestiones en un gel de **agarosa al 2,5%**, con **Marker V** como control.