

Análisis de ADN mediante AFLP

1.- Restricción del DNA

- | | |
|--|--|
| 1.1.- Mezcla de la reacción | vol (ul) |
| • 250 ng DNA genómico (10 uL) | 10 |
| • 2,5 U MseI (0,25 µl de enzima NEB) | 0,25 |
| • 2,5 µl de buffer 10X NEB2
para ambas enzimas) | 2,5 (usar buffer NEB2 100% de actividad) |
| • 0,25 µl de BSA 100X NEB | 0,25 |
| • H ₂ O hasta volumen final de 25 µl | 12 |
- 1.2.- Incubar a 37° C durante 2 horas
1.3.- Inactivar la enzima a 65°C durante 20 minutos
1.4.- Agregar 20 U *EcoRI* (1 µl de enzima NEB)
1.5.- Incubar a 37° C durante 2:30 horas
1.6.- Inactivar la enzima a 65°C durante 20 minutos
1.7.- Tomar 5 ul de cada muestra y verificar la digestión completa del ADN en gel de agarosa al 1.5 %.

2.- Ligación de adaptadores

2.1.- Preparación de adaptadores

2.1.1 Adaptador *EcoRI*: 5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3' oligo 1 *EcoRI*
3'CAT CTG ACG CAT GGT TAA-5' oligo 2 *EcoRI*

- Preparar inicialmente una solución de 50 pmoles/ µl mezclando 5 µl de oligo 1 + 5 µl oligo2 (stock 100 pmoles/ µl).
- Alinear adaptadores a 65° C por 15 minutos y enfriar a temperatura ambiente (30 minutos).
- Diluir a 5 pmoles / µl, (vol final, 100 µl) preparar lo necesario cada vez.
- Guardar a 4° C hasta su próximo uso (una vez)

2.1.2 Adaptador *MseI*: 5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3' oligo 1 *MseI*
TA CTC AGG ACT CAT-5' oligo 2 *MseI*

- Preparar una solución 50 pmoles/ µl mezclando partes iguales de oligo 1 y oligo 2 (stock 100 pmoles/ µl), volumen final, 100 µl.
- Alinear adaptadores a 65° C por 15 minutos y enfriar a temperatura ambiente (30 minutos)
- Guardar a 4° C hasta su próximo uso.

Los adaptadores no deben estar fosforilados, para prevenir ligaciones de los propios adaptadores. Ambos adaptadores están diseñados de manera que cuando se ligan a los sitios de restricción, se pierda la secuencia específica del sitio de restricción.

**Unidad de Biotecnología
INIA-CRI La Platina**

2.2.- Reacción de ligación (para 1 reacción)

2.2.1 Mezcla de ligación (para una reacción)

- 0,5 µl adaptador *EcoRI*
- 0,5 µL adaptador *MseI*
- 2,5 ul de Buffer T4 DNA ligasa 10X
- 0,3 µL T4 DNA ligasa (100 U de enzima NEB)
- H₂O (1,2 µL) hasta 5 ul de volumen final

2.2.2 Agregar a 20 µL de la reacción de digestión del punto 1.1 (Se liga todo dejando un volumen final de 25 µl)

2.2.3 Incubar toda la noche a 16°C.

2.2.4 Preparar una solución de trabajo 1/10 utilizando agua ultrapura.

2.2.5 Guardar el stock de DNA digerido y ligado a -20°C.

3.- Pre-amplificación del DNA templado

Estructura general de los partidores:

EcoRI+n: 5'-GAC TGC GTA CCA ATT Cxy z-3'

MseI+n: 5'-GAT GAG TCC TGA GTA Axy z-3'

(donde x, y, z representan las bases selectivas en el extremo 3' del oligonucleótido).

La preamplificación ayuda a limpiar de suciedad de fondo observada en geles que no han sido preamplificados. Se obtiene también una mayor cantidad de fragmentos ligados.

NOTE: The AFLP procedure reported in NAR by Vos et al. (1995) uses a preamplification with both *EcoRI* and *MseI* primers having 1-bp, 3'-extensions, followed by AFLP-PCR with primers having 3-bp, 3'-extensions, whereas our preamplification uses only our "EcoRI-oligo.1" (adapter oligo with no extension) (see below), and our AFLP-PCR uses only 2-bp, 3'-extensions (see 2.2). Life Technology and Perkin Elmer protocols use the Vos et al. (1995) preamplification and AFLP-PCR. In our experience the single primer amplification (EcoRI-oligo.1) works quite well in comparison to the 1-bp two primer preamplification without reducing the number of polymorphic bands in the subsequent AFLP-PCR reactions. However, it should be noted that there is a lot of room for "personalizing" the preamplification and AFLP-PCR steps to fit ones needs.]

3.1.- Pre-amplificación (AFLP+1)

Mezcla de reacción (para 1 Rx)

- 5 µl de dilución 1/10 de DNA.
- 13,8 µl de H₂O.
- 2,5 µl buffer PCR 10X
- 1,0 µl MgCl₂ 50mM
- 1,0 µl dNTPs 10mM
- 0,6 µl de partidor *EcoRI*+1 10 pmoles/ µl *
- 0,6 µl de partidor *MseI*+1 10 pmoles/ µl *
- 0,5 µl Taq polimerasa

Volumen final: 25 µL

**Unidad de Biotecnología
INIA-CRI La Platina**

* La solución stock de los partidores es 100 pmoles/ μ l. La solución de trabajo se prepara diluyendo los partidores con agua bidestilada a 10 pmoles/ μ l

3.2.- AFLP+1 Programa de temperaturas

- 1° 94° C, 2 min
- 2° 94° C, 30 seg
- 3° 55° C, 1 min
- 4° 72° C, 1 min
- 5° repetir el paso 2 a 4, 20 veces
- 6° 72° C 5 min
- 7° mantener a 4° C.

- Revisar la amplificación analizando 5 μ l de la reacción en agarosa 1%, utilizando un marcador de peso molecular como 100bp para verificar que el tamaño de los fragmentos amplificados es igual y menor a 500 pb.
- **Diluir los productos PCR entre 10 y 100 veces para evaluar la mejor dilución en el AFLP+3.**
- Guardar la solución de trabajo a 4° C para su uso inmediato, ó a -20° C si el almacenaje es por largo tiempo.

4.- Amplificación selectiva (AFLP+3)

4.1- Mezcla de reacción para la amplificación
(para 1 reacción)

- 5 μ L DNA preamplificado diluido
- 8,1 μ L H₂O_{bd}
- 2 μ l buffer de PCR 10X
- 0,8 μ L MgCl₂ 50 mM
- 1,6 μ L dNTPs 10 mM
- 1 μ L primer *EcoRI*+3 1pmol/ μ L
- 1 μ L primer *MseI*+3 5 pmoles/ μ L
- 0,5 μ l Taq polimerasa

Volumen final 20 μ L

- solución stock de primer *EcoRI* se prepara a 100 pmoles/ μ l. La solución de trabajo se diluye 100 veces con agua bidestilada **(1pmol/ μ L)**.
- solución stock de primer *MseI* se prepara a 100 pmoles/ μ l. La solución de trabajo se diluye 20 veces con agua bidestilada **(5 pmoles/ μ L)**.

4.2.- AFLP+3 Programa de temperaturas

- 1° 94° C, 4 min
- 2° 94° C, 30 seg
- 3° 65° C, 30 seg, -0.7° C por ciclo partiendo del próximo ciclo, hasta llegar a 56° C
- 4° 72° C, 1 min
- 5° repetir paso 2 a 4, 11 veces
- 6° 94° C, 30 seg
- 7° 56° C, 30 seg
- 8° 72° C, 1 min
- 9° repetir paso 6 a 8, 25 veces
- 10° 72° C, 5 min
- 11° mantener a 4° C

4.3.- Tomar 5 ul de reacción y verificar en agarosa al 1.5 % que el tamaño de los fragmento amplificados sea igual y menor a 500 pb.

4.4.- Preparación de la muestra:

- Mezclar los 20 ul de cada reacción con 10 ul de buffer de formamida (95% formamida, 10 mM EDTA pH 8.0, más azul de bromophenol y xylen cyanol a 1mg/ml).
- Denaturar las muestras por, 5 min a 95° C.
- Colocar las muestras en una gradilla enfriada por un par de horas a -20°C sobre hielo.
- Cargar las muestras en un gel de secuenciación de PAA para su visualización definitiva.