

DNA Barcoding

“El codi de barres dels éssers vius”



Alumnes: Óscar Baeza

Núria Carreras Roca

Professora: Felicitat Betes Saura

Curs: 2on Batxillerat A

IES Maremar

13 d'Octubre de 2014

Agraïments

Aquest treball ha estat possible gràcies a la Feli, que ens ha donat la oportunitat de treballar en un entorn únic, amb un ambient científic i de recerca insuperable al CRG.

Gràcies també al CRG, que a part de dur a terme aquests projectes per a apropar la ciència als estudiants de batxillerat, investiga el funcionament del genoma, aportant saber a la humanitat. Gràcies al PRBB, un centre que potencia la investigació a Barcelona i dóna espai i oportunitats per a que es creï coneixement per a la humanitat.

En el CRG vam conèixer a l'Annick, que ens va guiar durant tot el treball, especialment per a plantejar la investigació, fer la part pràctica i trobar-ho tot en el laboratori. També va resoldre tots els nostres dubtes sobre primers, DNA, i tots els termes científics en anglès que ens sonaven a xinès.

També agrair als companys que ens vam trobar al CRG, la Laura, el Miquel Àngel, el Paul, la Laura, la Irene, la Mercè i l'Oscar. Ens vam fer un equip, i vam ajudar-nos en els moments més difícils.

Índex

Introducció pg 4

Part teòrica pg 6

 Àcids nucleics pg 6

 DNA pg 6

 RNA pg 6

 DNA Barcoding pg 7

 Platanus

 Platanus x hispanica

 Platanus orientalis

 Platanus occidentalis

Part pràctica

 Recollida de mostres

 Extracció del DNA

 PCR

 Nanodrop

 Gel d'electroforesi

Apèndix

 Llibreta de laboratori

Introducció

La identificació d'espècies es basa en gran mesura en observacions taxonòmiques fetes a simple vista. És un mètode que funciona molt bé, però hi ha casos en que no és possible identificar un ésser, ja que encara no està del tot format, com podrien ser una larva de insecte desconegut, o perquè l'ésser ha quedat en un estat irreconeixible, com per exemple en una hamburguesa, o que un ésser es molt semblant però no es correspon a la espècie descrita.

El DNA barcoding és una solució per a aquests problemes, ja que només cal una fulla, un pessic de la carn, o un tros de larva, per a obtenir la seva seqüència i comparar-la amb la base mundial de dades del BOLD Systems. En aquest treball de recerca hem investigat dos plataners, un de Teià i un del Masnou.

Hem estructurat el nostre treball en dues parts, la teòrica i la pràctica. En la part teòrica expliquem en qué es basa el DNA Barcoding, els àcids nucleics, i també alguns processos que hem utilitzat en la part pràctica. En aquesta part hem fet un petit resum del treball realitzat al CRG, i la nostra experiència fent el Barcoding dels plataners.

Hipòtesi:

La nostra teoria era que es tractava en els dos casos de l'espècie *Platanus*, però no sabíem exactament si es tractava d'un híbrid entre *Platanus Orientalis* i *Platanus Occidentalis*, el nom del qual varia entre *Platanus x Hispanica* i *Platanus Acerifolia*, o una espècie "pura".

Elecció del tema:

Vam interessar-nos en aquest tema perquè ens oferia “treballar” en un laboratori real, on podríem utilitzar tècniques i procediments que estan molt lluny de les nostres possibilitats com a estudiants de batxillerat. A part el tema de la genètica, DNA i identificació d'espècies ens atreu especialment, dins de tot l'àmbit de la biologia.

Vam escollir els plataners perquè son dos arbres que tenim molt a prop en la nostra vida quotidiana, i ens semblava molt curiós que poguéssim analitzar DNA de uns arbres que ens han acompanyat tota la vida.

Metodologia:

En el CRG (Centre de Regulació Genòmica), emplaçat en el PRBB (Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona), s'investiga per a entendre la relació que hi ha entre el genoma i les malalties, que permet millorar la qualitat de vida a llarg termini d'aquests malalts.

Hem treballat seguint protocols ja elaborats de l'empresa QuiaGen i Sun Chemical. Hem utilitzat uns kits d'aquestes dues empreses, on ja hi havien tots els reactius necessaris per a la obtenció del DNA i, posteriorment, el gen d'interès. Ens van planificar la setmana idealment, però al final cada grup va anar fent feina al seu ritme.

Dificultats:

Molts dels termes científics que ens vam trobar als protocols, a més de estar en anglès, eren totalment nous per a nosaltres, cosa que era molt frustrant ja que ens teníem que parar a cada moment per preguntar a l'Annick o a algun company. Les quantitats eren tan petites que qualsevol error, encara que fos de 1 ul, podia embrollar tot el procés posterior.

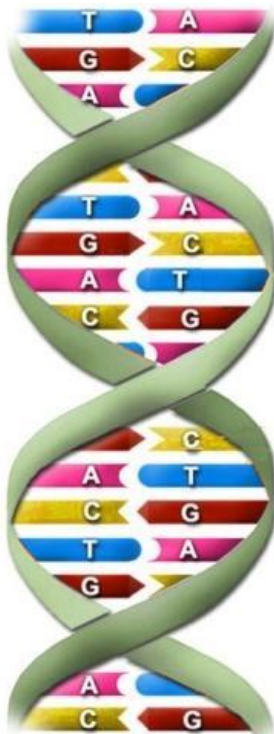
PART TEÒRICA

1. Àcids nucleics

Està format per àtoms de Carboni, Hidrogen, Oxigen, Fòsfor i Nitrogen. Els àcids nucleics es basen en els nucleòtids, que són molècules formades per una pentosa, un àcid fosfòric i una base nitrogenada (Adenina, Citosina, Guanina, Timina o Uracil). N'hi ha de dos tipus, el DNA i l'RNA.

1.1 DNA

S'anomena àcid desoxiribonucleic (en anglès, desoxiribonucleic acid), i porta la informació genètica de l'individu al qual pertany. La diferència entre ADN's radica en l'ordre de les seves bases. El DNA és un polímer format per subunitats anomenades nucleòtids. Es troba en les plantes en forma de doble hèlix, i es manté aquesta estructura gràcies als enllaços que es creen entre les bases nitrogenades de les dues cadenes. Aquesta unió es dona només entre Adenina(A) i Timina(T), i entre Citosina(C) i Guanina(G). Per això es diu que són complementàries, i si trobem una podem trobar l'altra indirectament.



1.2 RNA

S'anomena àcid ribonucleic (en anglès ribonucleic acid) i està format per nucleòtids i les bases Adenina, Citosina, Guanina i Uracil. Aquesta última base és el que el diferencia del DNA. El RNA actua en la síntesi de proteïnes, i és el portador de la informació genètica del virus.

2. DNA Barcoding

El DNA Barcoding és un mètode de taxonomia, és a dir, per identificar espècies, basat en un marcador genètic que identifica l'espècie a la qual pertany l'individu del qual s'ha extret el DNA. Algunes de les aplicacions d'aquest mètode són: per detectar frauds alimentaris, identificar larves d'insectes que són impossibles de classificar degut al seu desenvolupament, o simplement per donar més precisió a una identificació a ull nu.

Per a trobar aquest marcador genètic, cal extreure el DNA per mètodes tant físics com químics, amplificar-lo mitjançant PCR, purificar-ne el resultat i seqüenciar el producte

2.1 Barcoding d'animals

En els animals el marcador genètic que dona millors resultats és el gen mitocondrial Citocrom Oxidasa I, abreviat com COI, que té uns 600 parells de bases. El procés de laboratori és el mateix excepte els primers de la PCR, que necessita uns específics per al gen COI.

2.2 Barcoding de plantes

En les plantes el procés és més complicat, ja que aquestes tenen una paret cel·lular de cel·lulosa que fa més complicat la extracció de DNA així com el seu purificament. El gen que es busca és el rbcL o el matk, els dos aptes per a fer el Barcoding.

2.2.1 rbcL

Gen cloroplàstic, és a dir, localitzat al cloroplast, que codifica per a la proteïna RuBisCo, la més important en quant a proteïnes acceptors d'oxigen. Aquest gen va ser escollit degut a la seva quasi universalitat en plantes, totes el tenen menys les paràsites, i la seva longitud d'uns 1400 parells de bases i la gran quantitat de còpies en els cloroplasts. Té una taxa de mutacions molt baixa, cosa que el fa poc adient per a establir relacions filogenètiques entre gèneres molt propers. Degut a la seva localització en els cloroplasts, s'hereta de part materna.

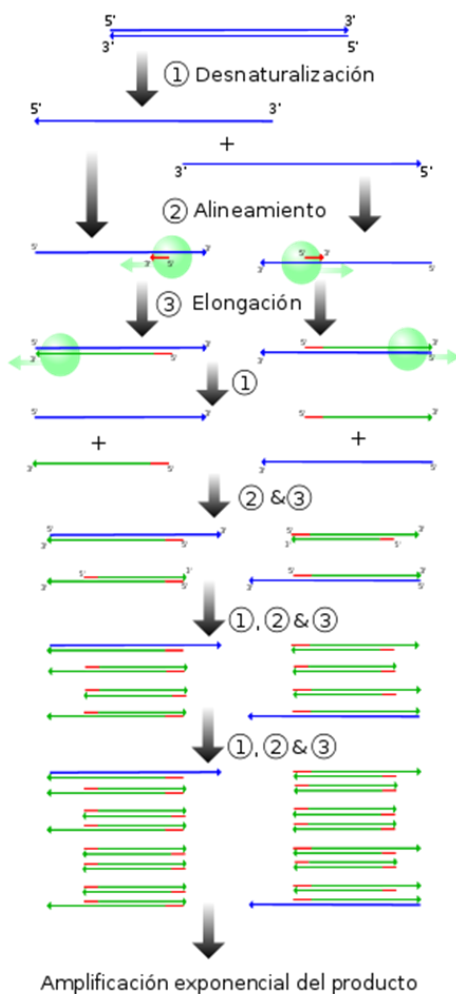
2.2.2 matK

És un gen que codifica per a una maturasa, és a dir, per a una proteïna que talla introns. Es troba als cloroplasts, com el rbcL, i segueix una transmissió materna com aquest. Al contrari del rbcL, aquest gen experimenta moltes mutacions que sobreviuen, per tant és bastant corrent per a identificar relacions filogenètiques.

3. Processos

3.1 PCR

La PCR és una tècnica que permet obtenir moltes còpies d'un sol fragment de DNA. Va ser descoberta per Kary Mullis, l'any 1983. La PCR consisteix en una sèrie de 20-40 cicles de calor-fred. En primer lloc, se separen les dues cadenes del DNA mitjançant calor. A continuació, es produeix la unió del primer (petit fragment de DNA complementari del troç que volem replicar) amb el DNA. Per això és necessari baixar la temperatura a 40-70 °C. Aleshores la Polimerasa s'uneix al primer i comença a sintetitzar la nova cadena, en direcció 5'-3', complementaria a la cadena que volem. Un cop acabada, es manté a 4°C fins la seva utilització.

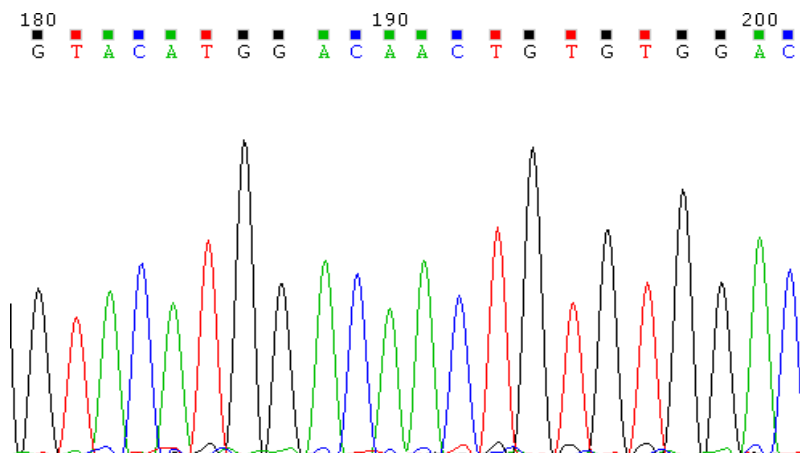


3.2 Seqüenciació

Són els mètodes per a trobar l'ordre exacte de les bases en un fragment d'ADN. Les tècniques actuals de seqüenciació són essencials per al progrés de la biologia molecular i la biomedicina, ja que es basen en el coneixement dels gens del genoma del malalt. Actualment son tècniques molt depurades, que permeten una exactitud del 99,999%, a més s'aua un cost relativament baix i a una velocitat bastant elevada.

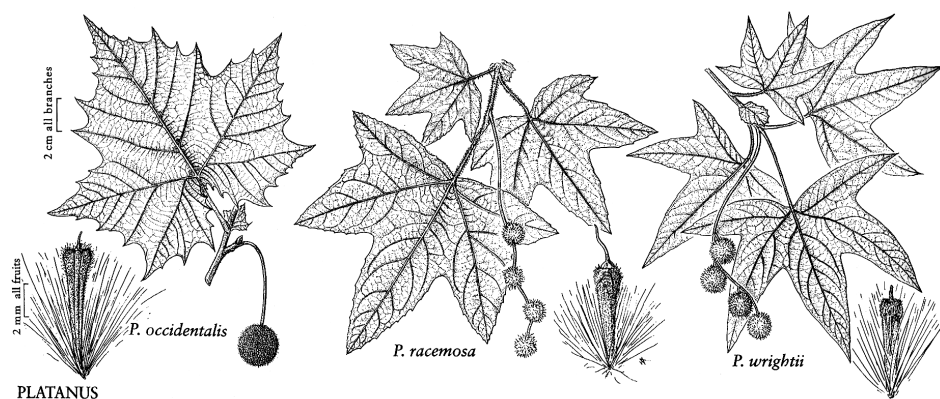
3.2.1 Electroforesi capil·lar

És el mètode que nosaltres vam utilitzar, que es basa en la relació masa/càrrega de les bases nitrogenades. En aplicar una diferència de potencial entre els dos extrems d'un tub molt prim (menys de 50µ de diàmetre), fent que les molècules d'ADN es moguin cap a un extrem. Els fragments de DNA a analitzar es troben units a marques fluorescentes, que són excitades i detectades per un làser d'argó, localitzat en un extrem del capil·lar. Dona uns resultats com aquests:



PLATANUS

Regne: Plantae	Ordre: Proteales	Origen: de l'hemisferi nord, on viuen al costat de corrents d'aigua o on la capa freàtica és alta
Divisió: Magnoliophyta	Família: Platanaceae (Platanàcies)	Nom comú: plàtan
Classe : Magnoliopsida	Gènere: Platanus	Espècies: Platanus Kerry Platanus Gentryi Platanus Rzedowskii Platanus Mexicana Platanus Chiapensis Platanus Orientalis Platanus Occidentalis Platanus Racemosa Platanus Wrightii Platanus Oaxacana Platanus x Hispanica
Característiques: - Arbres caducifolis - De 30 a 50 m d'alçada - Fulles grosses amb forma palmada amb cinc lòbuls - Flors unisexuals monoiques		





Platanus.
♀ branch.



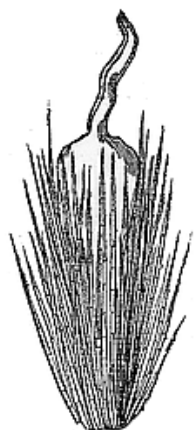
Platanus.
♀ and sterile
flowers
(mag.).



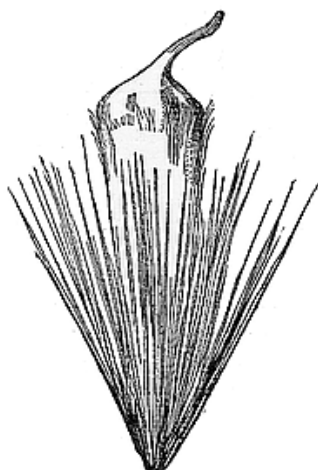
Platanus.
♀ flower cut
vertically
(mag.).



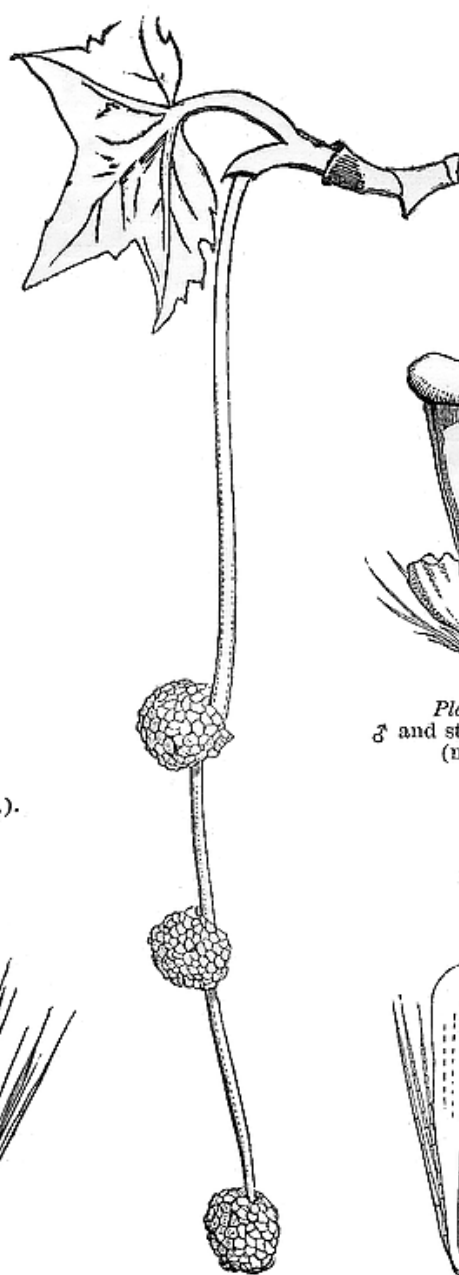
Platanus.
Transverse section of anthers (mag.).



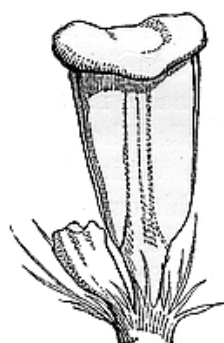
Platanus.
Young fruit (mag.).



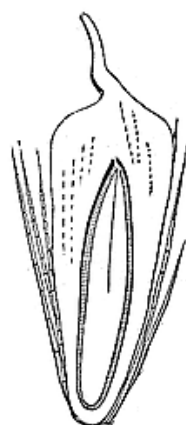
Platanus.
Ripe fruit (mag.).



Platanus.
♂ branch.



Platanus.
♂ and sterile flowers
(mag.).



Platanus.
Fruit cut vertically
(mag.).

PLATANUS X HISPANICA

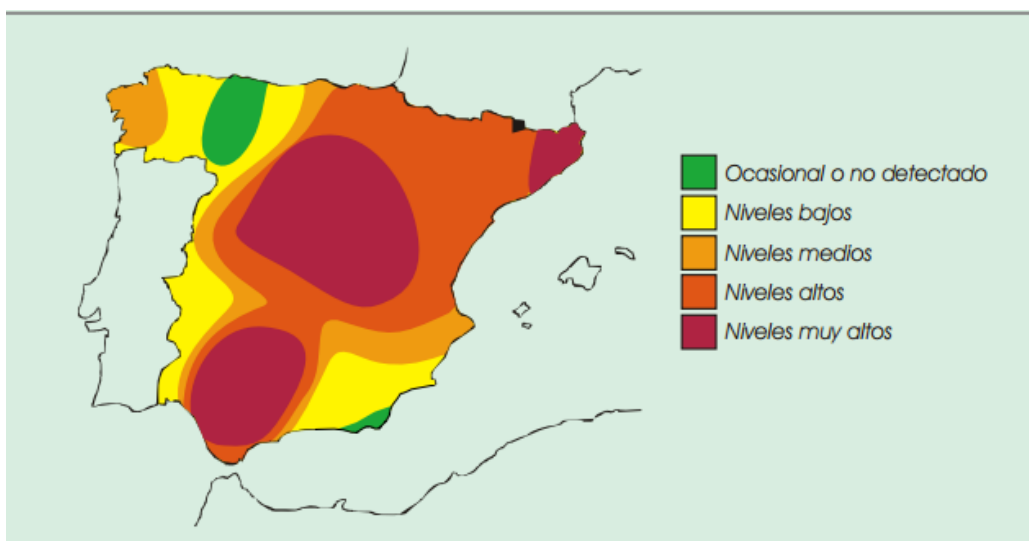
Regne: Plantae	Ordre: Proteales	Espècie: hispànica
Divisió: Magnoliophyta	Família: Platanaceae platanàcies	Nom comú: plàtan d'ombra
Classe : Magnoliopsida	Gènere: Platanus	Característiques: - Arbore caducifoli que supera els 30 metres d'alçada - Esperança de vida de 300 anys - Tronc recte amb tons grisos i verdosos - Fulles palmades - Flors en inflorescències, sense sentit ornamental - Floreix a la primavera - Cada fruit és un aqueni, amb la base rodejada per pels de color marró.
Origen: hortícola (híbrid entre Platanus orientalis i Platanus occidentalis)	Etimologia: platanus prové del grec que significa arbre, mentre que hispànica fa referència a Hispania, d'on va ser descrit el 1770.	



A la primera fotografia podem observar un platanus x hispànica

La segona fotografia ens mostra el tronc d'un platanus x hispànica, amb els seus tons marronosos i verdosos.

Distribució:



Com podem observar, Catalunya és una zona on s'hi poden trobar molts *platanus x hispanica*

PLATANUS X ORIENTALIS

Regne: Plantae	Ordre: Proteales	Espècie: platanus orientalis
Divisió: Magnoliophyta	Família: Platanaceae (platanàcies)	Nom comú: plàtan oriental
Classe : Magnoliopsida	Gènere: Platanus	Característiques: - Creix fins a uns 30m - Arbre caducifoli
Origen: Euràsia, des dels Balcans fins a l'Iran	Etimologia: platanus prové del grec que significa arbre, mentre que orietalis fa referència al seu origen que és Euràsia	- Fulles palmatipartides , amb lòbuls més llargs que amples - Adaptable a climes marítims - Té gran resistència a tot tipus d'ambients , fins i tot els contaminats - Accepta qualsevol tipus de sòl amb regs normals - Amb les seves llavors proveïdes de pèls causen irritacions als ulls i coll a certes persones - Pot suportar gelades inferiors als -15°C



PLATANUS OCCIDENTALIS

Regne: Plantae	Ordre: Proteales	Espècie: platanus occidentalis
Divisió: Magnoliophyta	Família: Platanaceae (platanàcies)	Nom comú: plàtan americà
Classe : Magnoliopsida	Gènere: Platanus	Característiques: - De 30 a 40 metres d'alçada - Prospera ja sigui en climes secs o humits - No creix a l'ombra - Pot tolerar la contaminació atmosfèrica - Floreix durant el mes de maig i les seves llavors maduren des de l'octubre fins al març - Les seves flors són monoiques
Origen: és una espècie nativa de L'Amèrica de Nord	Etimologia: platanus prové del grec que significa arbre, mentre que occidentalis fa referència al seu origen que és Amèrica del Nord	



PART PRÀCTICA

Objectiu

Extreure la seqüència de nucleòtids de les dues mostres de fulla de dos plataners, per així esbrinar de quina espècie eren per , posteriorment, mitjançant programes informàtics ,comprar-les amb les espècies pures, i entre elles.

Introducció

El primer que vam fer abans d'anar al CRG, després de recollir informació sobre els plataners, va ser recol·lectar les mostres (unes fulles) dels plataners a estudiar. Les vam congelar i, una vegada vam estar en el CRG, vam començar amb els altres passos. Vam començar amb el primer pas , l'extracció del DNA. Vam tenir certes dificultats amb aquest pas, ja que de plantes seques és més difícil extreure el DNA, i l'altre era que teníem dos protocols a provar, un d'ells no vam poder repetir-lo quant no ens va donar el resultat, ja que ens vam quedar sense un dels productes, i mitjançant l'altre no aconseguíem extreure DNA , fins que el final vam pensar en repetir un pas que es feia filtrant, on, degut a un mal disseny o funcionament, el DNA es quedava retingut.

Després de l'extracció del DNA vam començar a preparar la PCR d'amplificació. Vam tenir també moltes dificultats en aquest pas, tantes que vam haver de repetir aquest pas 7 cops. Durant les primeres 4 PCR, no vam canviar cap paràmetre referent a la concentració o a la temperatura, però al final, a la 5a, 6a i 7a PCR vam canviar les concentracions i les temperature i vam tenir resultats de dues d'elles.

A continuació vam purificar la PCR seguint el protocol. No vam tenir cap mena de dificultat en aquest pas, ja que no hi havia cap pas complicat, es tractava només de seguir el protocol. Després d'haver purificat la PCR d'amplificació, vam preparar la PCR de seqüenciació tot seguint el protocol. Un cop preparada li vam donar tot ben etiquetat a l'Annick , que la va portar a la planta de Seqüenciació del PRBB on es van encarregar de purificar-ho un cop va acabar. Al final, de les 6 mostres que vam enviar a seqüenciar (en realitat eren 3, però vam utilitzar cada mostra amb els dos primers R i F i per tant ens van sortir 6 mostres) només vam obtenir 3 resultats.

MATERIAL

Productes:

- Dues mostres de fulles de dos arbres diferents (un de Teixidors i un de Masnou)
- Kit Quiagen
- Spin-Kit
- Big dye
- Primers
-
- Aigua destil·lada
- Mescla de nucleòtids
- Etanol 70% S
- Syver safe
- Per a preparar el gel : Agar, aigua destil·lada

Eines:

- Micropipetes
- Eppendorfs
- Guants
- Bata
- Gradeta
- Màquina de PCR
- Vòrtex
- Microcentrifugadora
- Centrifugadora
- Microones
- Sala freda (4°C)
- Congelador (-20°C i un altre a -80°C)
- Nevera
- Màquina de seqüenciació

- Nanodrop
- Gel d'electroforesi – màquina d'electroforesi
- Tubs
- Puntetes micropipetes
- Escombraries especials per productes biològics
- Per a preparar el gel : guants especials

RECOLLIDA DE MOSTRES

La recollida de mostres la vam fer el divendres anterior a començar les practiques al PRBB. Vam agafar un total de sis mostres, tres provinents de Teià, i les altres tres de Masnou.

(Al final, però, només vam utilitzar dues mostres, una de Teià i l'altre de Masnou ☺)



Un cop vam recollir les mostres, les vam deixar al congelador per els pròxims tres dies. Quan vam arribar al PRBB, ens van dir que per a començar amb l'extracció del DNA, primer havíem de congelar les mostres, ja tallades, a -80°C durant uns minuts.

EXTRACCIÓ DE DNA:

Per extreure DNA, vam necessitar dues mostres vegetals seques corresponents als dos arbres que vam escollir. A continuació les vam deixar durant uns minuts al congelador a -80°C .

Un cop congelades, les trossegàvem tant com podíem per fer-les ven petites dins d'un eppendorf, i a continuació les posàvem al vòrtex. A partir d'aquest punt, podíem fer servir el Kit Qiagen o el Spin-Kit. Ens vam decidir per el Kit Qiagen , però no vam obtenir resultats en la prova del Nanodrop. Al voler-ho repetir, però, ens vam adonar que ja no quedava RNasa, i per tant ens era impossible fer servir el Kit Quiagen.

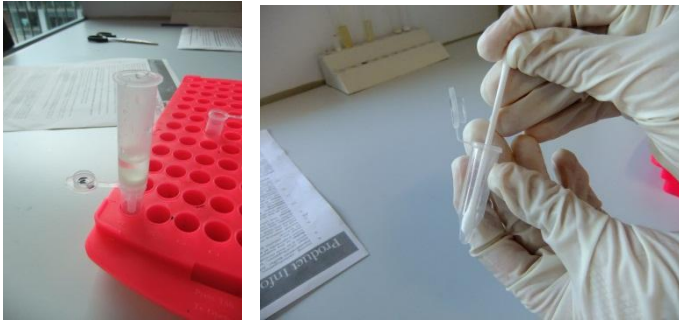


Ens vam posar a extreure DNA a partir del protocol del Spin-Kit i la primera vegada no ens va sortir tampoc, però al repetir-ho ens vam adonar que el material genètic es quedava retingut al filtre del tub i per tant, només calia tornar-lo a rentar per obtenir el DNA. Vam obtenir quatre mostres de DNA en total, dues corresponents al arbre de Teixidors i l'altre al de Masnou. Tot i que en el Nanodrop marcava poca quantitat de DNA, se'n va fer possible continuar el procés.



La primera fotografia ens mostra els tubs on vam deixar les dues mostres de les fulles dels plataners que vam deixar al congelador a -80°C abans de començar amb la pràctica

La segona fotografia fa referència a la mostra ja triturada dins del eppendorf



La primera fotografia ens mostra un dels passos del protocol del Spin-Kit on a partir d'un filtre fèiem un rentat per més endavant extreure'n el DNA

A la segona fotografia podem observar com amb un bastonet esterilitzat assecàvem les restes de dissolució sense emportar-nos el punt blau, referent al DNA

PCR

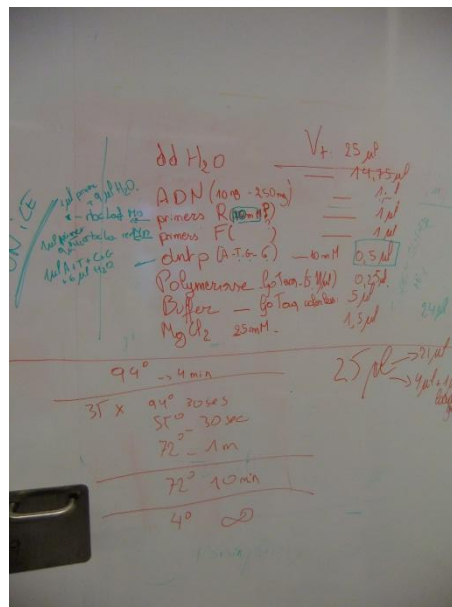
La PCR és el procés d'amplificació del gen escollit. En aquest cas, el rbcl

PCR d'amplificació:

Per a fer la PCR d'amplificació, vam necessitar diferents productes (mescla de nucleòtids, primer R i F, Polymerase GoTaq, Buffer(diss. Tampó) GoTaq colorless, MgCl, aigua destil·lada i les diferents mostres de DNA)

Per a preparar-la vam haver de preparar una dissolució amb tots el productes esmentats anteriorment i

deixar que la màquina de PCR fes la seva feina seguint aquest programa :



94 ° C	4 minuts
35 x	
- 94 ° C	30 segons
- 55 ° C	30 segons
- 72 ° C	1 minut
72 ° C	10 minuts
4 ° C	infinít

Tot i que vam seguir el protocol al peu de la lletra, les quatre primeres PCRs no ens van donar cap mostra de DNA en la prova de la electroforesis. Només s'observava el ladder.

Per últim vam preparar 3 PCRs diferents, amb diferents concentracions i temperatures, i vam obtenir resultats de dues d'elles a través de la prova del gel

d'electroforesis, amb la qual cosa vam poder avançar cap a la PCR de purificació.

Purificació de la PCR:

La purificació de la serveix per purificar fragments de DNA de doble hèlix o d'una sola hèlix de la PCR d'amplificació.

Per a fer la purificació de la PCR vam fer servir el Spin Protocol, on vam preparar una dissolució de 25 µl de la mescla de PCR i 125 µl de Buffer PB (Tampó PB).

A continuació ho vam portar a fer el control Nanodrop i vam obtenir bons resultats que ens van permetre fer la PCR de seqüenciació per després purificar-ho i així obtenir la seqüència de nucleòtids.

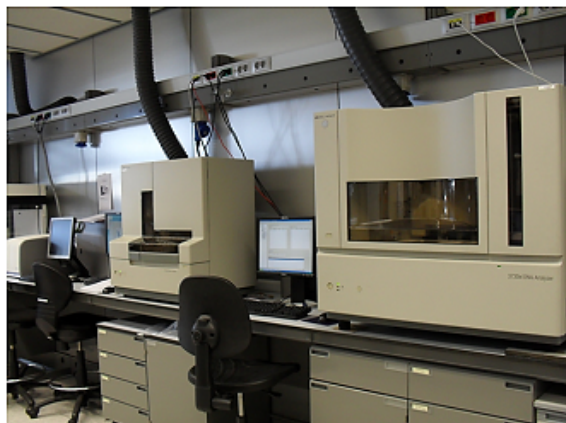


PCR de seqüenciació:

La PCR de seqüenciació serveix per a obtenir, a partir de les mostres de DNA un cop ja purificades, la seqüència de nucleòtids. És un procés de llarga durada i complexitat, així que el vam deixar al departament de Seqüenciació del PRBB.

Per a preparar-la, vam necessitar: el BIG DYE, els primers F i R, aigua destil·lada, les mostres de DNA i el Buffer de Seqüenciació de DNA.

Vam fer un tub de primer F i un altre tub de primer R per a cadascuna de les sis mostres obtingudes dels resultats que vam obtenir, només dos eren acceptables degut a que no hui havia informació genètica per llegir.



CONTROL NANODROP:

El control Nanodrop serveix per indicar-nos la qualitat i quantitat de DNA que conté una dissolució. Es tracta d'un sistema lligat (preferentment) a un ordinador, on agafant 1 µl de la teva dissolució amb la micropipeta, el deixes a la placa metàl·lica i hi col·loques el suport a sobre per tal que aquest enviï la informació a l'ordinador i es pugui llegir. Les unitats que es fan servir en el control Nanodrop són: ng /uL

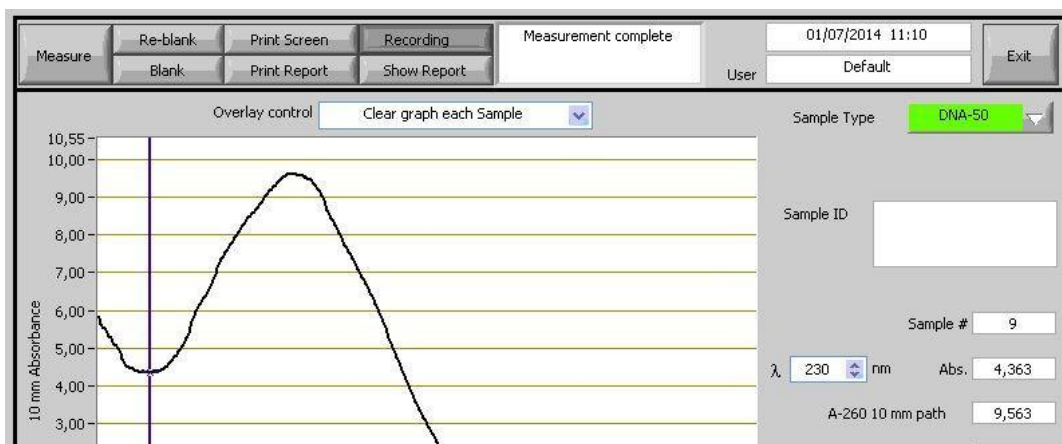


Aquest control el vam fer dues vegades. El primer el vam fer després de l'extracció de DNA, si sortia DNA inferior a 8-10 ng /uL, significava que aquella dissolució no contenia gaire quantitat de DNA, per tant era millor repetir l'extracció per tal d'obtenir millors resultats. Nosaltres vam haver de repetir-lo entre dos i tres cops fins a aconseguir superiors a 8.

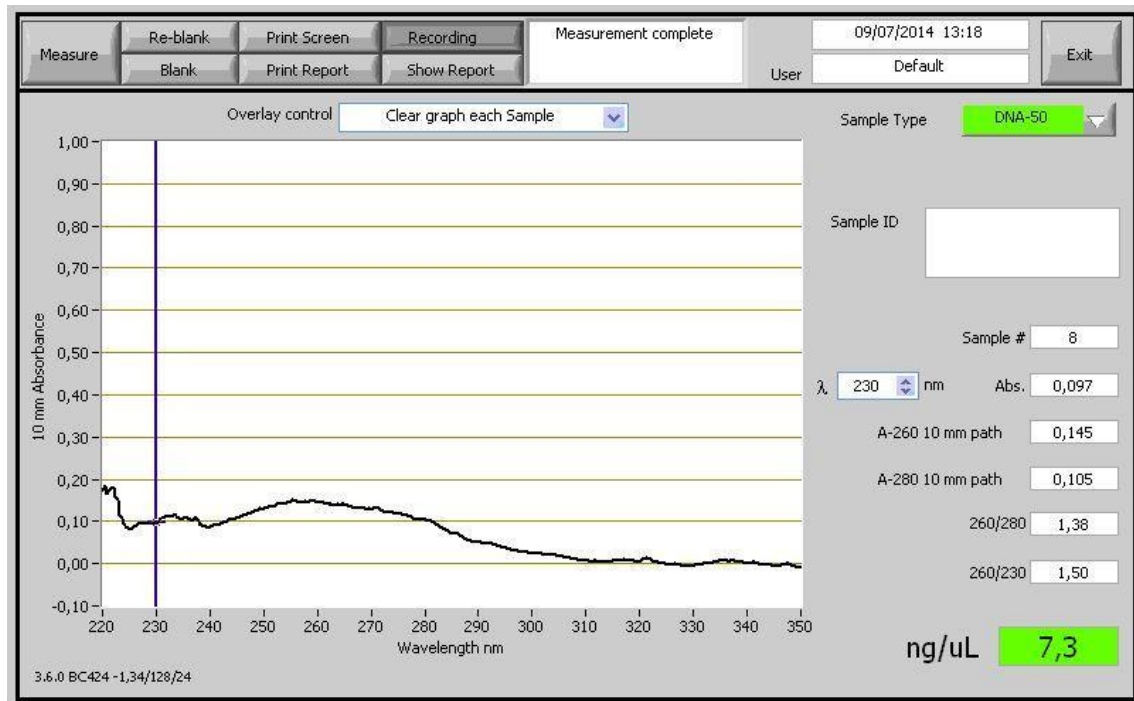
El segon control Nanodrop el vam fer després de la purificació de la primera PCR. Per tal d'aconseguir una bona qualitat, l'ideal era aconseguir DNA d'uns 50 ng /uL, tot i que nosaltres també en vàrem acceptar un que rondava als 30 ng /uL.

Si ens surt un nombre molt baix de ng /uL, es que aquella conté, a més de DNA, altres substàncies, com per exemple proteïnes.

A les següents fotografies podem observar dos tipus de resultats que podem obtenir del control Nanodrop:



Aquesta dissolució, presenta una gran quantitat de DNA (la corba és gran i està ben formada)



Aquesta dissolució presenta molt poca quantitat de DNA, per el que podríem dir que la dissolució està formada preferentment per altres substàncies.

EL GEL D'ELECTROFORESIS

El gel d'electroforesis és una tècnica que serveix per aïllar molècules d'una mescla (en el nostre cas d'una dissolució).

Nosaltres vam fer servir el control de gel d'electroforesi en acabar la primera PCR (PCR d'amplificació) per saber si hi havia constància de DNA en la dissolució.

Per a preparar el gel vam necessitar:

- Tae 100 ml
- SYBR Safe
- Agar 1,2 g

A col·locar en cada pou :

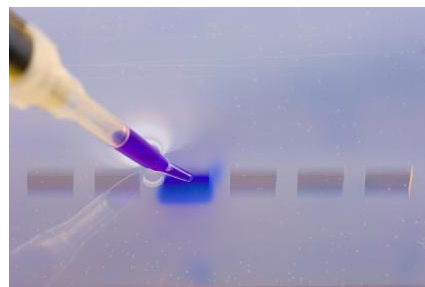
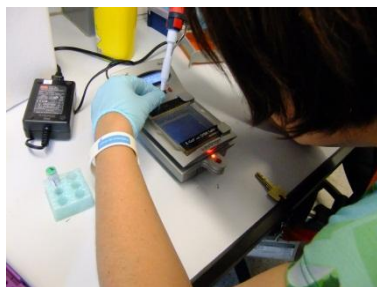


- 4 µl DNA + 1 µl loading gel

- 5 µl ladder

Un cop ho teníem preparat, aprestàvem al botó de GO i al cap d'uns minuts ja podíem observar com el DNA i el ladder s'havien desplaçat al llarg del gel.

(* per a col·locar la dissolució de DNA en els pous, hem de fer servir les micropipetes i anar amb molt de compte, ja que si no ho fem bé el DNA se'ns pot sortir del pou, i aleshores no es desplaçarà bé i no funcionarà.)



RESULTATS:

Resultats de l'extracció de DNA (control Nanodrop):

Mostres	ng /uL	Interpretació
1	11,4	hi ha DNA i altres coses (ex: proteïnes)
6	8,2	hi ha menys DNA que la mostra 1

Resultats de la PCR d'amplificació (gel electroforesis de 5a, 6a i 7a PCRs):

Pous	Constància de DNA
2	Sí
3	No

4	Sí
5	No
7	No
8	Sí

Resultats de la purificació de la PCR (mostres dels pous 2, 4 i 8 al control Nanodrop)

Mostres	ng /uL
6: 50°	35,6
1: 50°	82,5
1: 55°	53,1

Resultats PCR de seqüenciació:

Mostres	S'ha seqüenciat?
F - 6 50° - mostra 9	Sí
R - 6 50° - mostra 10	No
F - 1 50° - mostra 11	Sí
R - 1 50° - mostra 12	No
F - 1 55° - mostra 13	Sí
R - 1 55° - mostra 14	No

Conclusió

Amb aquest treball volíem ser capaços de respondre a la nostra pregunta i saber si realment els dos arbres, de Teià i de Masnou, eren de la mateixa espècie. Amb les investigacions que vam fer al CRG, vam poder obtenir les seqüències de nucleòtids de les dues mostres i interpretar-les . segons les nostres interpretacions, i amb l'ajuda d'un programa especialitzat en el reconeixement de les seqüències de nucleòtids de les diverses espècies del món, vam poder respondre a la nostra pregunta.

Vam poder trobar semblances a simple vista entre els dos arbres, però tot i així volíem fer la prova mitjançant els seus ADN per estar-ne segurs del tot i confirmar-ho científicament.

Amb els resultats obtinguts podem afirmar que les dues seqüències de nucleòtids de les mostres corresponents a Teià i Masnou s'assemblen en més d'un 90% a l'espècie del platanus x hispànica, per tant podem dir que els dos arbres fan referència a la mateixa espècie. D'altre banda ja teníem confirmat per l'ajuntament de Teià que els plataners del poble eren de l'espècie platanus x hispànica, per tant, realment havíem de descobrir si els de Masnou també ho eren.

Conclusions generals

Amb aquest treball hem tingut la oportunitat de treballar en un laboratori de veritat, en condicions en que una escola normal no hi treballaria, i amb materials i productes dels que no disposem normalment.

Va ser només una setmana, però el temps que vam estar allà el vam aprofitar al màxim i en vam treure profit. Vam treballar amb 7 companys provinent de diferents escoles i ens vam ajudar els uns als altres amb els nostres respectius treballs. El treball en grup juntament amb l'Annick, qui ens vigilava i supervisava va ser molt gratificant, i podem dir amb certesa que si no fos per alguns d'ells potser no haguéssim tret els resultats que hem obtingut.

D'altre banda, cal destacar que ens hi estàvem de 8 del matí a les 14:30 de la tarda, però les hores passaven volant ja que estàvem immersos en el nostre treball. Alguna

tarda ens vam quedar a continuar amb la nostre feina perquè al ritme que anàvem, a causa de les dificultats i errors, no acabaríem a temps, i així va ser. Vam haver de tornar al PRBB per treballar dos dies més ja que no havíem acabat el nostre treball, sempre ens estancàvem a la PCR, però al final ens va sortir i vam obtenir els resultats esperats.

Per últim, podem dir que aquesta oportunitat ha sigut una bona experiència ja sigui laboral com personalment.

APÈNDIX

LLIBRETA DE LABORATORI:

Planificació de la setmana

1	Extreure DNA
2	Control Nanodrop $\mu\text{g/ml}$
3	PCR ampl.
4	Control gel (electroforesis)
5	PCR purif.
6	Nanodrop (control) $\mu\text{g/ml}$
7	PCR seq.
8	Purificació PCR seq.

7/7/2014

Objectiu: extreure el DNA de les dues mostres de plataner

- Agafem les fulles i en tallem un tros per a continuació tallar-los ben petits i així posar-los 20-30 minuts al congelador a -80°C
- Seguim per primera vegada el protocol del kit QuiaGen en 100mg de les dues mostres de fulles.
- No hem trobat DNA així que repetim el kit QuiaGen a partir del pas 18 (el pas del filtre, ja que el DNA podria trobar-se encara allà)
- Com que hem trobat molt poca concentració de DNA, decidim provar amb el spin kit.
- La primera vegada que en seguit el protocol del spin kit no hem trobat DNA, així que el repetim i deixem una mostra tota la nit a incubar.

RESULTATS

Dia 1	Kit Quiagen	Spin-Kit
PROVA 1	No hi ha constància de DNA	No hi ha constància de la marca blava que simbolitza el DNA
PROVA 2	Poca concentració de DNA, no es pot seguir el protocol	No hi ha constància de la marca blava que simbolitza el DNA

8/7/2014

Objectiu: extreure DNA i fer el control Nanodrop

- El protocol del kit QuiaGen no ens ha donat resultat i no es pot tronar a repetir per tercera vegada ja que no tenim més RNasa,
- El protocol del spin kit està donant resultat al haver-hi centrifugat durant 30 minuts a 50° C (el pas 6 i 7)
- Hem deixat una segona tanda overnight (tota la nit) a 50° C per tal d'obtenir resultats demà.

RESULTATS:

{ -kit QuiaGen : baixa concentració de DNA a les fulles i hi ha constància de proteïnes.

- L'overnight d'ahir comença a donar millor resultats que els anteriors
- Els passos 6 i 7 del spin-kit els centrifuguem a 1000 rpm durant 7-10 minuts
- Tornem a centrifugar a 1250 rpm 5 minuts perquè el líquid no baixa dels passos 6 i 7
- Per el pas 8 centrifuguem uns altres 5 minuts a 1250 rpm

- El resultat que esperem és la manifestació del DNA de color blau
- << deixem el protocol a mitges (pas 8) >>

9/7/2014

Objectiu: aconseguir extreure DNA i fer el control Nanodrop, si ens dona temps podem fer la primera PCR.

- Primer comencem amb l'overnight del spin-kit que vam deixar ahir per extreure'n el DNA i ens quedem al pas 3 del protocol
- *Continuem amb l'extracció del DNA d'ahir que vam deixar a la nevera a 4° C
- Posem a centrifugar el overnight d'ahir
- * continuem el protocol fins arribar el pas 11, on hi trobem constància de DNA (marca blava)
- << continuem els dos protocols alhora (l'overnight d'ahir i el que ens vam deixar a mitges). Els passos 6 i 7 del spin-kit són massa lents i per tant centrifuguem.
- Anem a fer el control Nanodrop amb el protocol d'ahir:

RESULTATS:

- Mostra 1 : 11,4 ng /uL ☐ hi ha DNA i altres coses (ex: proteïnes)
- Mostra 6 : 8,2 ng /uL ☐ hi ha menys DNA que la mostra 1

- Continuem l'overnight d'ahir però no trobem resultats = 3er fallo
- El repetim i ens surt DNA a la mostra 1. Repetim a partir del pas 9 (spin column) i es manifesta el DNA (de color blau).
- Comencem a preparar la PCR, fem les mescles de nucleòtids

*Per a la PCR necessitem :

- a. ADN (10ng) – 250 ng ☐ 1 µl

- b. Primers R – (mM 10) □ 1 µl
- c. Primers F – (25 mM) □ 1 µl
- d. 1 µl A + T C+ G □ DNTTP (A –T –G –C) – (10 mM) □ 0,5 µl
- e. Polymerase GoTaq □ 0,25 µl
- f. Buffer (Tampó) GoTaq colorless □ 5 µl
- g. MgCl 2 –(25mM) □ 1,5 µl
- h. Dd H2O (aigua destil·lada) □ 14,75 µl

TOTAL : 25 µl

Primer R – rbcL – R + 9 µl H2O

Primer F – rbcL – F + 9 µl H2O

1 µl A + T + G + C + 6 µl H2O

*PCR:

94 ° C

35 x

- 94 ° C
- 55 ° C
- 72 ° C

72 ° C

4 ° C

4 minuts

30 segons

30 segons

1 minut

10 minuts

Infinít

- PCR □ ajuntem tots els materials per a la PCR en un mateix tub (x 2 □ 2 mostres)
 - o Fallo □ la mescla de nucleòtids està mal feta
- Ho repetim per 2n cop
- * PCR □ fem la mescla de nucleòtids amb H2O abans de fer la mescla la mescla gran
 - o 2 µl · (A, T, G, C)
 - o 12 µl H2O

- Acabem de preparar el material necessari per a la PCR i els col·loquem a la màquina (H1 i H2), però sense haver-hi afegit 1 µl de DNA
- Hem acabat el protocol de l'overnight i el portem a fer el control

Nanodrop

RESULTATS:

- Mostra 6 □ 7,3 ng /uL
- Mostra 1 □ 5,7 ng /uL

El Nanodrop hauria de donar almenys 10 (tot i que amb 8 es pot continuar el protocol però serà més difícil obtenir bons resultats)

- Per a la PCR fem servi el DNA de 11,4 ng /uL i de 8,2 ng /uL, ja que hi ha més concentració de DNA que els altres dos resultats que hem obtingut.

*Electroforesi:

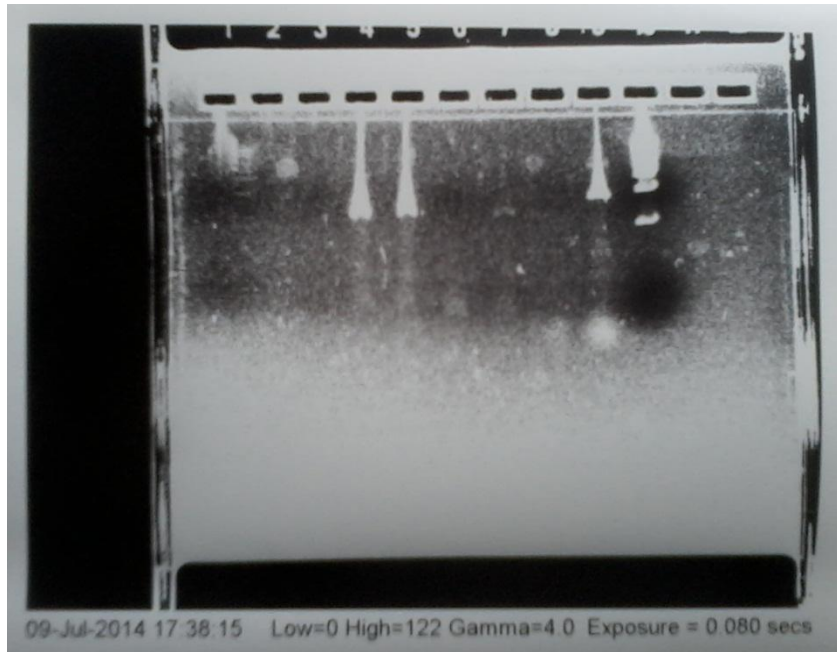
Esperem DNA sobre 600 (mida)

Per el control d'electroforesi, 25 µl tot. DNA

- 4 µl DNA + 1 µl loading gel
- 21 µl per continuar, els posem a la nevera (4° C)

1	2	3	4-15
ladder	1 ON	6 ON	buit

- Ens falla la PCR. Repetim la PCR amb els mateixos passos durant la nit.



1 PCR.. no hi ha mostres de DNA en cap dels pous.

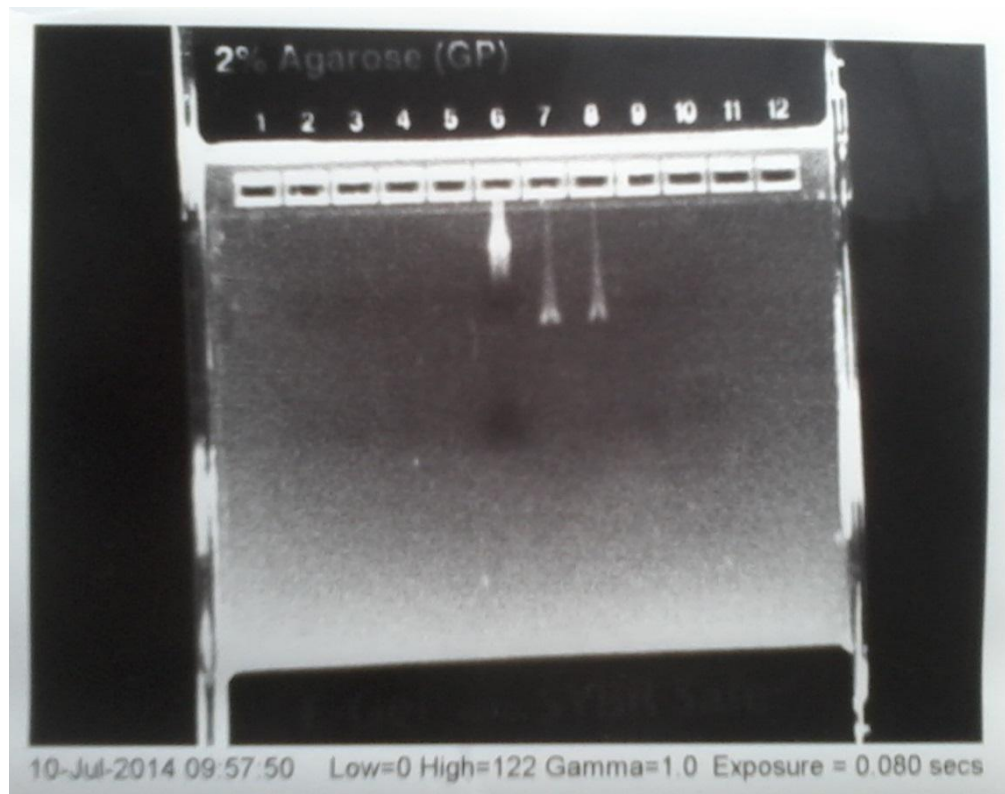
10/7/2014

- Fem una electroforesi amb la PCR que vam deixar ahir a la nit . Canviem, i posem 4,25 μ l de DNA i 1,25 μ l de loading gel.

Leader (guia) 6 μ l –(posició 2 i 3)

RESULTATS:

- No hi ha mostres de DNA



2 PCR. No hi ha mostres de DNA

- Fem una tercera PCR (amb més concentració de primers) □ 1 µl Primer + 3 µl H2O Milli-Q = 25 mM
- Per fer la nova concentració de primers utilitzem el primer M13R i el M13F
- Un cop preparats el Primers i el mix de nucleòtids col·locats fem la tercera PCR amb el mateix programa que el del protocol

94 ° C

35 x

- 94 ° C
- 55 ° C
- 72 ° C

72 ° C

4 ° C

4 minuts

30 segons

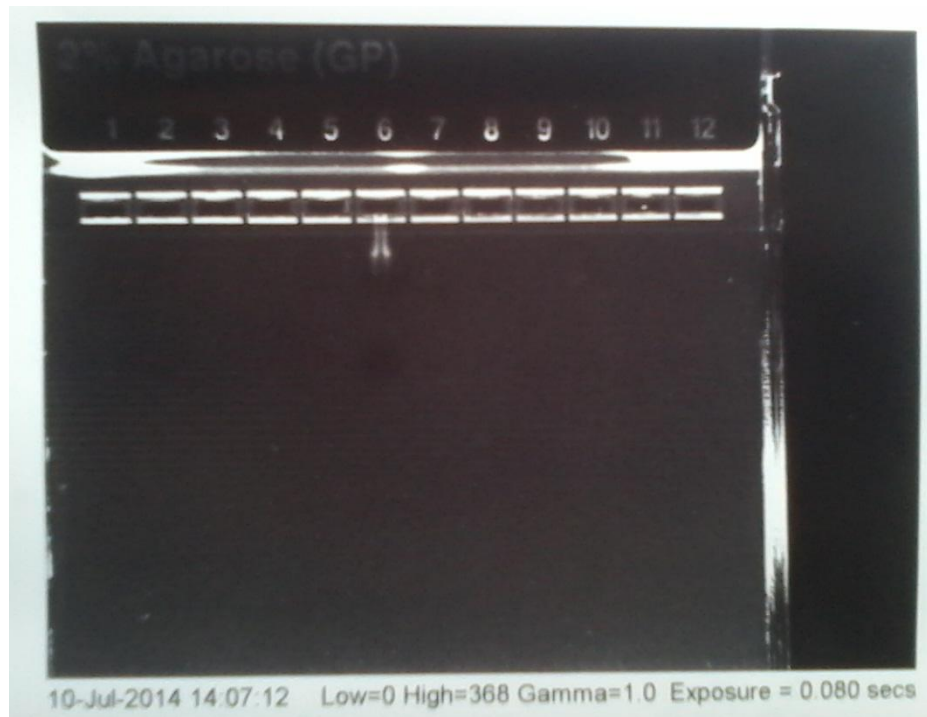
30 segons

1 minut

10 minuts

infinít

- Falla la segona PCR no trobem mostres de DNA en el gel)
- Extraïem més DNA per si en necessitem en cas que fallessin els protocols
- Hem continuat amb la tercera PCR i fem l'electroforesi
- Falla la tercera PCR.



3 PCR. no trobem mostres de DNA en el gel.

- Tornem a preparar una quarta PCR amb diferents concentracions:
 - a. 5 μ l DNA
 - b. 29,5 μ l de ddH₂O (aigua destil·lada)
 - c. 2 μ l Primer R
 - d. 2 μ l Primer F
 - e. 1 μ l dnTP
 - f. 0,5 μ l Polymerase
 - g. 10 μ l de Buffer (Tampó)
 - h. 3 μ l MgCl₂

*Servei de seqüenciació :

- Hi ha dos màquines, una d'elles és la de seqüenciació d'electroforesis capil·lar
- En la reacció de seqüenciació, on es treballa amb un sol primer
- El ddNTP es dirigeix cap als nucleòtids i s'hi incorpora. Després es purifica (per eliminar els primers)
- Com més gran és la longitud dels capil·lars, més resolució obtindrem.
- * si es posen dos primers a la seqüència, aleshores s'enganxarien les dues cadenes de nucleòtids.

11/7/14

- Ha acabat la quarta PCR i farem el gel per a fer el control d'electroforesi.

*per a fer el gel necessitem:

- 4 µl de DNA i 1 µl de loading
- 5 µl de leader
- Tae + SYBR Safe 100 ml
- Agar 1,2 g

1	2	3	4	5	6	7	8-15
buit	buit	buit	1 ON	6 ON	ladde r	buit	Paul

- Falla la quarta PCR □ es manifesten els primers però no hi ha prou constància de DNA per a continuar el procés i purificar-lo.



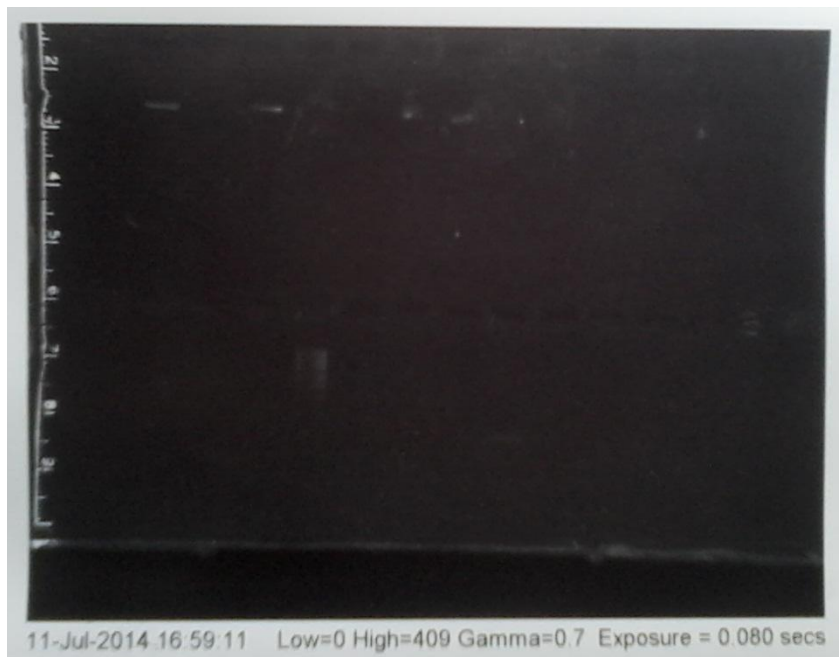
4 PCR, com es pot observar es manifesta el ladder en el pou 6 però no hi ha constància de DNA en cap dels altres pous.

- Comencem la cinquena PCR amplificant el Matk (tot per 2 i 5 µl de DNA)
 - 1 - 50°
 - 6 - 50°
 - 1 - 55°
 - 6 - 55°
 - 1 - 50° rbcL
 - 6 - 50° rbcL
- * dividim les mostres en 3 i per tant col·loquem 3 PCR's, cadascuna amb diferents programacions adaptades.
- Preparem la electroforesis. Fem el gel (1 gram) i el deixem reposar al congelador per a que solidifiqui més ràpid.

1	2	3	4	5	6	7	8	9-15
buit	1 - 50°	6 - 50°	1 - 55°	6 - 55°	ladder	1 - 50° rbcL	6 - 50° rbcL	buits

- Per fer el gel de la cinquena, sisena i setena PCR, hem necessitat:

- 10 µl ladder
- 4 µl DNA + 1 µl loading gel



5 PCR. Trobem mostres de DNA en els pous 2, 4 i 8

23/7/14

- Agafem les mostres 2, 4 i 8 i comencem el cinquè pas, la PCR de purificació.
- Passem dels tubs de PCR als de 1,5 ml. Agafem 25 µl de la mescla de la PCR i 125 µl de Buffer PB (Tampó PB):
 - 1 50° - 25 PCR – 125 Buffer
 - 1 55° - 20 PCR – 120 Buffer
 - 6 50° - 25 PCR – 125 Buffer
 - (no fem el pas 2 del protocol de purificació de la PCR)

RESULTATS:

{ 6: 50° ± 35,6 ng /uL
 1: 50° ± 82,5 ng /uL
 1: 55° ± 53,1 ng /uL

- A partir dels resultats obtinguts, començarem a preparar els tubs per a seqüenciar-los. Farem amb cada mostra un tub F i un tub R

25/7/14

- La PCR de seqüenciació està feta:
 - F - 6 50° □ mostra 9
 - R - 6 50° □ mostra 10
 - F - 1 50° □ mostra 11
 - R - 1 50° □ mostra 12
 - F - 1 55° □ mostra 13
 - R - 1 55° □ mostra 14
- Ens donen resultats les mostres 9 i 11, la 13 dóna resultats, però molt baixos.

		Mostra 9	occidental	oriental
	C	1	2	3
C	-----	99,65	100,00	99,83
1	99,65	-----	99,65	99,48
2	100,00	99,65	-----	99,83
3	99,83	99,48	99,83	-----

		Mostra 11	Occidentalis
	C	1	2
C	-----	99,61	99,48
1	99,61	-----	99,09
2	99,48	99,09	-----

NOTES IMPORTANTS

Recollida i emmagatzematge de material de partida

Després de la collita, si el teixit de la planta no s'ha d'utilitzar immediatament, s'ha de congelar en nitrogen líquid. A continuació pot ser emmagatzemat a -80 ° C per al seu posterior processament. Alternativament, el teixit pot assecar-se o liofilitzar-se després de ser recollit per permetre l'emmagatzematge a temperatura ambient (15-25 ° C). Per garantir la qualitat de DNA, les mostres han de ser completament assecades dins de les 24 hores de la seva recol·lecció. Si és possible, és preferible recollir materials joves (per exemple, fulles, agulles), ja que contenen més cèl·lules per pes, i per tant tindrem resultats en rendiments més alts. A més, les fulles joves contenen petites quantitats de polisacàrids i polifenols i per tant són més fàcils de manejar.

Quan es treballa amb fongs, collim miceli directament d'un plat de cultiu o de cultiu líquid. Per cultiu líquid, les primeres cèl·lules de pellets per centrifugació. Eliminem el sobrenedant completament abans de la interrupció i la lisi. Material congelat, f fresc i/o liofilitzat pot ser utilitzat.

Grandària de la mostra

Els procediments DNeasy Plant estan optimitzats per a un màxim de 100 mg (Mini), 1 g (Maxi), o 50 mg (DNeasy 96) * del material del pes-de-partida humit. Si s'utilitza material sec de partida, la quantitat màxima que pot ser processada ha de ser reduïda per un factor d'aproximadament 5. Excedir la quantitat màxima recomanada de material de partida tindrà com a resultat la lisi ineficient, resultant en baix rendiment i puresa.

***Kit Quiagen**

Protocol: purificació total de DNA de teixits vegetals (mini protocol)

Punts importants abans de començar:

- ✓ Si s'utilitza el kit DNeasy Plant Mini per primera vegada, llegiu "Notes Importants" (Pàgina 14).
- ✓ Assegureu-vos que està familiaritzat amb el funcionament del TissueRuptor o la TissueLyser. veure "La interrupció i l'homogeneïtzació mitjançant el TissueRuptor", pàgina 15, o "La interrupció i homogeneïtzació utilitzant el Sistema TissueLyser ", pàgina 15. Consulteu la TissueRuptor Manual de l'usuari o el manual d'instruccions de funcionament TissueLyser.
- ✓ Buffer AP1 pot desenvolupar un color groc durant l'emmagatzematge. Això no afecta la procediment.
- ✓ Totes les etapes de centrifugació es duen a terme a temperatura ambient (15-25 ° C) en una microcentrifugadora.

Coses a fer abans de començar

- ✓ El Buffer AP1 i el Tampó AW1 concentrats poden formar precipitats durant l'emmagatzematge. Si és necessari, s'escalfa a 65 ° C per re-dissoldre (abans de l'addició d'etanol al Tampó AW1). No escalfar el Buffer AW1 després que l'etanol hagi sigut afegit.

- ✓ EL Buffer AW2 i el Buffer AW1 es subministren com concentrats. Abans d'usar-ho per primer cop, afegim la quantitat apropiada d'etanol (96-100%) com s'indica en l'ampolla per obtenir una solució.
- ✓ Pre-escalfem un bany d'aigua o bloc d'escalfament a 65 ° C.

Procediment:

1. Afegim 400 µl de dissolució de tampó AP1i 4 µl RNasa A, una solució mare (100 mg / ml) a un màxim de 100 mg (pes en humit) o 20 mg (dessecat a -80) de la planta o teixit de fongs i li fem un vòrtex per tal que es mescli.
2. Incubem la barreja durant 30 minuts a 65 °C. Ho mesquem 2 o 3 cops durant la incubació invertint el tub.
3. Afegim 130 µl de tampó P3 a la mescla, barregem i l' incubem durant 5 minuts en gel.
4. Es recomana que es centrifugui la mescla durant 5 minuts a 3400rpm
5. Pipetegem la mescla en la columna QIAshredder Mini que es troba en un eppendorf (tub) de 2ml, i ho centrifuguem 2 minuts a 14000rpm
6. Transferim la fracció líquida sobrant del pas 5 a un nou tub
7. Afegim 1,5 volums del tampó AW1 a la mescla neta i ho barregem. (Per exemple, per 450 µl, afegim 650 µl del tampó AW1.
8. Pipetegem 650 µl de la mescla del pas7,incluint qualsevol precipitat que s'hi hagi format, en la columna DNeasy Mini que es troba en un tub de 2ml. Ho centrifuguem 1 minut a ≥8000 rpm, i n'hi traiem la fracció líquida sobrant. Tornem a usar el tub que conté la mescla en el següent pas
9. Repetim el pas 8 amb la mostra restant. Rebutgem la fracció líquida sobrant i tub.
10. Col·loquem la columna de centrifugació DNeasy Mini en un nou tub de 2 ml, i hi afegim 500 µl de tampó AW2, i ho centrifuguem durant 1 min a ≥8000 rpm. A continuació rebutgem la fracció líquida restant i reutilitzem el tub.

11. Afegim 500 µl de tampó AW2 a la columna de centrifugació DNeasy Mini, i ho centrifuguem durant 2 min a 14.000 rpm (per assecar la membrana).
12. Transferir la columna de centrifugació DNeasy Mini a un tub de micro-centrifugació de 1,5 ml o 2 ml i pipetegem 100 µl Buffer AE directament sobre la membrana DNeasy (el filtre). Ho incubem durant 5 minuts a temperatura ambient (15-25 ° C), i centrifuguem durant 1 min a ≥8000 rpm per eluir-ho.
13. Repetim el pas 18 una vegada
14. * si no hi trobem cap mostra de DNA, repetim el pas 18 una altra vegada

***Spin-Kit**

Protocol: kit per l'aïllament total del DNA genòmic de les plantes a través de les spin minicolumns

Descripció:

- ✓ Components del kit:
 - o A -Lysis Buffer (per trencar les proteïnes) □ 60 ml
 - o B –Protease solution □ 1.3 ml
 - o C –Equilibration Buffer □ 55 ml
 - o D –Washing Buffer □ 190 ml
 - o E –Elution Buffer □ 90 ml
 - o F –Precipitation Enhancer □ 55 ml
 - o G –Geno/mini AX Columns □ 60 pcs
 - o H –Precipitation tubes □ 60 pcs
- ✓ Material característic:
 - o Ió d'intercanvi de membrana
- ✓ Capacitat vinculant:
 - o 20 µg
- ✓ Operant:
 - o Gravetat
- ✓ Mida màxima de les mostres:

- o 20 mg de mostra seca o 100mg de mostra fresca (material de planta en pols)
- o aigua i tampó Tris
- ✓ Volum mínim d'elució:
 - o 1 ml
- ✓ Aplicacions posteriors:
 - o clonació de DNA
 - o transferència de Southern
 - o PCR
 - o RT-PCR
 - o la seqüenciació de DNA
 - o DNA RCA (amplificació per cercle rodant)
- ✓ Avantatges:
 - o més alta puresa de DNA
 - o fàcil seguiment òptic de sediment de DNA
 - o concentració final d'ADN ajustable
 - o aïllament de DNA amb alt pes molecular (<20 kB)

Procediment

1. col·loquem mostres de teixit vegetal en pols (100 mg de teixit fresc congelat o 20 mg de teixit vegetal sec) en un tub de reacció de 1,5 mli hi afegim 0,9 ml de suspensió de Tampó lisi (Lysis Buffer) i 20 µl de solució de proteasa.
2. barregem tot el contingut i ho incubem a 50 °C tota la nit. Barregem el tub de tant en tant invertint-lo.
3. després de la incubació, ho posem al vòrtex per tal que es barregi i ho deixem centrifugant durant 5 minuts a 10000-14000 rpm.
4. Durant la centrifugació, equilibrem la columna tot afegint-hi 0,8 ml de Equilibration Buffer. Deixem passar tot el volum de la solució per gravetat.

5. Després de centrifugar, transferim el sobrenedant a una columna equilibrada i permetem que aquest hi flueixi a través de la gravetat.
 - a. **Nota:** a la part inferior del tub de 2 ml hi hauria d'haver un pellet (petita massa comprimida d'una substància) sòlid i visible. És una barreja de fragments no lisats de material de la mostra i de les partícules de la suspensió de tampó de lisi.
6. Rentem la columna tot afegint-hi 1,5 ml of Washing Buffer (tampó de rentat). deixem que passi tot el volum del Washing Buffer (tampó de rentat) per gravetat.
7. Repetim el pas 6 (al repetir posem només 1 ml de Washing Buffer)
8. Afegim a la columna 0,25 ml of Elution Buffer (tampó d'elució) i deixem que flueixi per la columna. L'objectiu d'aquest pas és reduir el volum total d'eluït tenint en compte que el volum de la columna és de 0,3 ml.
9. Transferim la columna a un nou tub de precipitació de 2 ml (inclòs) i eluïm el DNA tot afegint-hi 1 ml d'Elution Buffer (tampó d'elució).
10. afegim al DNA eluït 0,8 ml de Precipitation Enhancer (potenciador de precipitació). Barregem la mostra invertint el tub unes quantes vegades i centrifuguem durant 10 minuts a 12.000 rpm
11. . Rebutgem amb cura el sobrenedant i afegim 0,5 ml d'etanol 70% al tub de precipitació.
 - a. **Nota:** a la part inferior del tub de precipitació hi ha de ser visible un sediment d'ADN blau clar. Barregem la mostra i centrifuguem durant 3 minuts a 12.000 rpm.
12. Rebutgem amb cura el sobrenedant i deixem assecar a l'aire el sediment d'ADN durant 5 minuts.
 - a. **Nota:** per accelerar el procés d'assecat d'ADN de l'alcohol restant, podem eliminar-lo tocant les parets i el fons del tub amb punta de pipeta estèril, tot retirant les gotes d'alcohol.
13. Si hi ha sobres (petites gotes) d'alcohol en les parets dels tubs han de ser remogudes amb un bastonet de cotó estèril. El sediment de DNA sec pot ser dissolt en aigua estèril, tampó TE o en 10mM tampó Tris pH 0.8

- a. **Nota** : el color blau del DNA precipitat permet el control visual del procés de dissolució de DNA

*** Kit de purificació QIAquick PCR utilitzant una microcentrifugadora**

Protocol: aquest protocol està dissenyat per purificar els segments de DNA provinents de la PCR i altres reaccions enzimàtiques.

Punts importants abans de començar:

- ✓ Afegir etanol (96-100%) en el Buffer PE (tampó PE) abans del seu ús.
- ✓ Tots els passos de centrifugació es duen a terme en 13000 rpm en una microcentrifugadora a temperatura ambient (15-25°C)
- ✓ Afegim 1:250 d'indicador de volum pH I Buffer PB (és a dir, afegim 120 µl indicador de pH per cada 30 ml de Buffer PB, o afegim 600 µl d'indicador de pH I per cada 150 ml de Buffer PB). El color groc de Buffer PB ens indica un pH de 7.5.
- ✓ Afegim indicador de pH en els tots els continguts de la memòria intermèdia. No afegim indicador de pH per esmorteir alíquotes.
- ✓ Si el producte de PCR purificat s'utilitza en aplicacions de xips de DNA sensibles, pot ser beneficiós utilitzar Buffer PB sense l'addició d'indicador de pH I.

Protocol:

1. Afegim 5 volums de tampó PB a 1 volum de la mostra de PCR i no ho barregem. No és necessari per eliminar l'oli mineral o querosè.
2. Col·loquem una columna de centrifugació QIAquick en un tub de 2 ml proporcionat.
3. Per unir el DNA, afegim la mostra a la columna i la centrifuguem durant 30-60 s.
4. Rebutgem el filtrat. Col·loquem la columna de QIAquick de nou en el mateix tub.
5. Per rentar, afegim 0,75 ml Buffer PE a la columna de QIAquick i ho centrifuguem durant 30-60 s.
6. Descartem el filtrat i posem la columna QIAquick de tornada en el mateix tub. Centrifuguem la columna durant 1 min.
 - a. **Important** : l'etanol residual del Buffer PE no s'eliminarà per complet a menys que fracció líquida restant es descarti abans d'aquesta centrifugació addicional.
7. Col·loquem la columna QIAquick en un tub de microcentrifugació de 1,5 ml net.
8. Afegim 30 µl de tampó d'elució al centre de la membrana QIAquick, i deixem reposar la columna durant 1 min, i després centrifuguem

***Seqüenciació PCR: PROTOCOL PER v3.1 BIG DYE™**

1º) PREPARACIÓ DE LA SEQÜÈNCIA PCR

REACTIUS	PROTOCOL RECOMANAT
BIG DYE V3.1	2.0 µl
Seqüenciació de DNA Buffer 5X *	1 µl
PRIMER	3.2 pmol.
MOSTRA DNA **	Ref table**
DMSO (opcional) ***	0.1 – 0.14 µl (conc. final 5 -7%)
ddH2O	Fins 10 µl Vol. Final

* Aquest també és opcional. S'utilitza amb 2UL de BigDye o menys per garantir les condicions de PCR i prevenir d'una possible degradació de la qualitat de seqüència.

** Quantitat d'ADN recomana per a la seqüenciació PCR.

DNA		Quantitat
Producte de PCR	100-200bp	1-3 ng
	200-500bp	3-10 ng
	500-1000bp	5-20 ng
	1000-2000bp	10-40 ng

>2000bp	20-50
<i>Single Strand</i>	25-50 ng
Double Strand	150-300 ng
Cosmid, BAC	0.5-1.0 ug
Genomic bacteria DNA	2-3 ug

*** Es recomana 5 a 7% del DMSO que s'afegeixen en el cas d'ADN ric en GC, amb l'estructura secundària, o amb fragments grans d'ADN. 5% de DMSO-5% de glicerol també pot ser afegit per l'ADN ric en GC (glicerol pot causar algunes dificultats amb el lloc de PCR-precipitació)

2º) PROGRAMA THERMOCYLCE

Seqüenciació amb GeneAmp® PCR 2400, 9600, 9700 o similars

94°C 3 min.

96°C 10 sec.

50°C * 5 sec. **25 Cicles**

60°C 4 min.

4°C ∞

* T_a es pot ajustar depenent de la T_m del primer

BigDye™ terminadors i els ADN amb zones de Gs o regions riques en GT poden aturar la reacció de seqüenciació en condicions normals.

Disminuïm la temperatura d'extensió fins a 50 ° C per tal de resoldre les reaccions de frenada en aquestes zones. El Kit BDT conté dITPs lloc de dGTPs perquè la temperatura d'extensió podria disminuir fins a 50 ° C. vegeu també el Kit dGTP BigDye™ Terminator (100rxns) Ref. 4307175

94°C	3 min.	
96°C	30 sec.	25 Cicles
50°C	4 min.	
4°C	∞	

*** Purificació dels ddNTPs no incorporats en la reacció de seqüenciació**

1) ABI Prism™ BigDye® Terminator (versió 1.1 i 3.1) - precipitació amb EDTA / NaOAc

(Protocol útil per a 20 µL de reacció de seqüenciació !!!!!)

Utilitzem un eppendorf de 1,5 ml (tub). Preparem aquesta barreja: 12 µl de 125 mM EDTA (interromp la PCR) + 12 µl de 3M NaOAc + 300 µl de Etanol 100%

1. Afegim 10 µl H₂O per la reacció de seqüenciació per arribar a 20 µl per tal d'aplicar el protocol.
2. Afegir 54 µl de la barreja als 20 µl de la reacció de seqüenciació.
3. Barregem i ho mantenim a temperatura ambient durant 15 min.
4. Ho centrifuguem 20 minuts a 14000 rpm i, a 4 ° C
5. Eliminem la solució d'etanol
6. Afegim 200 µl d'etanol al 70%
7. Centrifuguem 2 minuts. a 14.000 rpm i 4 ° C
8. Eliminem completament el EtOH - Si cal, centrifuguem una vegada més per qualsevol rastre d'EtOH
9. Assequem el pellet
10. Mantenim a -20 ° C (un any com a màxim).

* Aquest protocol l'hem de fer per a 6 tubs o eppendorfs, per tant multipliquem les quantitats per 6.(Això només en el nostre cas)

*** Purificació dels ddNTPs no incorporat en la reacció de seqüenciació**

2). Centri. SEPColumnes (REF: 401.762; Applied Biosystems)

Hidratem la resina amb 800 µl ddH₂O durant 2 hores. Ens Assegurem que tot està embegut i sense bombolles.

Centrifuguem a 750 g (Ràdio = 5 cm; 4.000 rpm), 2 min per eliminar l'H₂O.

$$g = 11.18 \times r \times (\text{rpm}/1000)^2$$

g = força centrífuga relativa

r = radi del rotor (part giratòria d'una màquina o vehicle en particular) en cm

rpm = revolució/min

1. Posem els 20 µl de reacció de seqüenciació al centre de la columna lentament i sense tocar la columna.
2. La mostra ha de ser completament absorbida per la resina.
3. Ho centrifuguem a 750 g, 2 minuts. No hem d'augmentar el temps de centrifugació.
4. Recuperem 25-30 µl de la mostra
5. Assequem la mostra
6. Ho mantenim a -20°C (màxim un any)

3). La digestió amb SAP (gambeta fosfatasa alcalina) - opcionalment + precipitació

Afegim als 20 µl de la reacció de seqüenciació:

- 2 µl de SAP (1 U /µ l) + 18 µl de tampó de SAP.
- Incubem 30 min a 37 ° C

Precipitem la digestió seguint un dels dos passos anteriors.

BIBLIOGRAFIA

WEBGRAFIA

http://w110.bcn.cat/portal/site/MediAmbient/menuitem.0d4d06202ea41e13e9c5e9c5a2ef8a0c/?vgnextoid=98b4f3e3fc55a210VgnVCM10000074fea8c0RCRD&vgnnextchannel=3cc37037aed1a210VgnVCM10000074fea8c0RCRD&vgnnextfmt=formatDetall&lang=ca_ES

[http://ca.wikipedia.org/wiki/Pl%C3%A0tan_\(arbre\)](http://ca.wikipedia.org/wiki/Pl%C3%A0tan_(arbre))

<http://www.rhs.org.uk/Plants/96764/London-plane/Details>

<http://es.paperblog.com/platano-de-sombra-platano-hibrido-platanus-hispanica-platanus-x-hybrida-835346/>

<http://www.barcodeoflife.org/content/about/what-dna-barcoding>

<http://www.barcodeoflife.org/>

<http://www.barcoding.si.edu/dnabarcoding.htm>

http://www.boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=GBVG2232-11

http://www.boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=GBVG2238-11

http://en.wikipedia.org/wiki/Platanus_%C3%97_acerifolia

<https://plantdatabase.kwantlen.ca/plant/plantDetail/125>

http://www.barcodinglife.com/index.php/Public_RecordView?processid=GBVG2239-11

<http://www.barcodinglife.com/index.php/>

http://www.fedoa.unina.it/2626/1/Lozada_Garcia_Biologia_Avanzata.pdf

<http://www.asturnatura.com/especie/platanus-hispanica.html>

<http://mediambient.itineraris.bcn.cat/node/229/362>

https://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=OCEAQFjAH&url=http%3A%2F%2Fes.wikipedia.org%2Fwiki%2FPlatanus_occidentalis&ei=hWU1VPupB8vIsASXzIAo&usg=AFQjCNHqfmseCtX2vpE6iXVybch-N_ANvw&sig2=PoXt7i7mO-qeXMPicns1Og&bvm=bv.76943099,d.ZGU

https://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=OCB8QFjAA&url=http%3A%2F%2Fen.wikipedia.org%2Fwiki%2FPlatanus_orientalis&ei=oGU1VPHfEY3hsAT4g4DYCw&usg=AFQjCNFFMGHVPjFe0n8zCMGNhwKMzbFIBw&sig2=K_JgJEn1ZqZfehTMO4dS9g&bvm=bv.76943099,d.ZGU