Práctico N°4

Determinación de un índice de familiaridad mediante análisis de DNA mitocondrial por PCR y RFLP. Etapa 2: detección de polimorfismos para *MnlI* en DNAmt

Vamos a digerir el fragmento de DNAmit de 312 pb (16108pb-16420pb) amplificado durante el TP anterior, con la enzima *MnlI* (CCTC▼ N_7). La enzima reconoce la secuencia CCTC y corta 7pb *downstream* (más adelante) al sitio de reconocimiento.

De acuerdo a la secuencia de referencia de Anderson et al, el fragmento de 312 pb contiene 5 sitios de restricción para la enzima, generando fragmentos de 118 pb, 89 pb, 39 pb, 35 pb, 28 pb y 3 pb. Con excepción del fragmento de 3pb, el cual no puede identificarse debido a su pequeño tamaño, todos los otros fragmentos y sus correspondientes **RFLPs (*Restriction Fragment Lenght Polymorphism*)** serán detectados la próxima clase en un gel de poliacrilamida no-desnaturalizante al 10%.

Digestión:

Vamos a digerir 6 μl de la amplificación por PCR en un volumen total de digestión de 15 μl.

Buffer 10 X (incluye BSA)	1,5 μl
MnlI (10 U/μl), 5 U / muestra	0,5 μl
DNA	6,0 μl
H_2O	7,0 μl

Vf: 15 μl.

Luego de preparar la reacción llevamos a digerir a 37°C durante 4 horas. Las muestras se guardarán luego a -20º C hasta la próxima clase, en la cual se correrá el gel de poliacrilamida.

Gel de poliacrilamida no-desnaturalizante al 10%:

Volumen final = 50 ml

Acri-Bis 10%	16,67 ml (stock: 30%)
TBE 1 X	10 ml (stock: 5 X)
H_2O	23,112 ml
Persulfato de Amonio (APS)	168 μl (1:300 del stock: 10%)
TEMED	50 μl (1:1000 del stock)

Tiempo de polimerización: aproximadamente media hora.

La corrida se realizará a 250 V durante dos horas y media. Los RFLPs serán detectados mediante tinción del gel con el agente intercalante *SYBR Green* y posterior visualización con transiluminador U.V. o azul. La tinción con *SYBR Green* se realizará luego de finalizada la corrida del gel. Se teñirá durante al menos 20 minutos en oscuridad.