

# Conceptos y técnicas en ecología fluvial

Edición a cargo de:

**ARTURO ELOSEGI**

Profesor titular de Ecología en la Universidad del País Vasco

**SERGI SABATER**

Catedrático de Ecología en la Universidad de Girona

---

Separata

## APÉNDICE A

Primera edición: abril 2009

ISBN: 978-84-96515-87-1

© los autores, 2009

© de la edición en español, Fundación BBVA, 2009



## Preparación de soluciones *stock* y reactivos (Técnica 24)

### A.1. Preparación de las soluciones *stock* utilizadas en el procedimiento de extracción y purificación del DNA

#### Tris 1 M (1 L)

- Disolver 121,1 g de Tris base en 800 mL de agua Milli-Q.
- Ajustar el pH a 8 añadiendo aproximadamente 42 mL de HCl.
- Llevar el volumen a 1 L con agua Milli-Q.
- Autoclavar durante 30 minutos.
- Almacenar a 4 °C. Si la solución es amarillenta descartarla y preparar una nueva con Tris Base de mejor calidad.

#### Tampón Tris 10 mM (500 mL)

- Añadir 5 mL de la solución *stock* Tris base 1 M a 490 mL de agua Milli-Q.
- Ajustar el pH a 7,4 con unas gotas de HCl.
- Llevar el volumen a 500 mL con agua Milli-Q.
- Autoclavar durante 30 minutos.
- Almacenar a 4 °C.

#### EDTA 0,5 M (1 L)

- Disolver 186,1 g de EDTA disódico - 2H<sub>2</sub>O en 800 mL de agua Milli-Q.
- Ajustar el pH a 8 mediante la adición de unos 20 g de lentejas de NaOH. El EDTA no se disuelve hasta que el pH está ajustado a 8.

- Llevar el volumen a 1 L con agua Milli-Q.
- Autoclavar durante 30 minutos.
- Almacenar a 4 °C.

#### **Tampón TE (Tris-EDTA) (500 mL)**

- Tomar 495 mL de la solución *stock* de tampón Tris 10 mM.
- Añadir 1 mL de la solución *stock* 0,5 M de EDTA.
- Ajustar el pH a 7,4 con unas gotas de HCl.
- Llevar el volumen a 500 mL con agua Milli-Q.
- Autoclavar durante 30 minutos.
- Almacenar a 4 °C.

#### **Solución CTAB/NaCl (10% CTAB en 0,7 M de NaCl)**

- Disolver 4,1 g de NaCl en 80 mL de agua Milli-Q.
- Calentar a 65 °C en un agitador magnético con bloque calefactor.
- Agitando, añadir lentamente 10 g de CTAB (bromuro de hexadecil trimetil amonio).
- Ajustar el volumen final a 100 mL con agua Milli-Q.
- Almacenar a temperatura ambiente (no refrigerar, porque el CTAB precipita).

#### **Tampón TESC (1 L)**

- Disolver 87,66 g de NaCl en 500 mL de agua Milli-Q (solución 1,5 M de NaCl).
- Añadir 100 mL de la solución *stock* Tris base 1 M.
- Añadir 200 mL de la solución *stock* 0,5 M de EDTA.
- Calentar a 65 °C en un agitador magnético con bloque calefactor.
- Agitando, añadir lentamente 10 g de CTAB (bromuro de hexadecil trimetil amonio).
- Llevar el volumen a 1 L con agua Milli-Q.
- Comprobar el pH (debe ser aproximadamente 8), ajustar si es necesario.
- Autoclavar durante 30 minutos.
- Almacenar a temperatura ambiente (no refrigerar, porque el CTAB precipita).

#### **Solución 10% de SDS**

- Para pesar el SDS (dodecilsulfato sódico) debe utilizarse mascarilla, ya que el SDS se dispersa fácilmente, y debe limpiarse cuidadosamente la balanza y el área de pesado. La solución se prepara en una botella estéril de vidrio Pyrex.
- Disolver 25 mL de SDS en 175 mL de agua Milli-Q estéril, calentando para favorecer la disolución.
- Llevar el volumen a 250 mL con agua Milli-Q.
- Ajustar el pH a 7,2 con soluciones estériles de HCl (1% v/v) o NaOH (1% p/v).

- Aflojar el tapón y poner en el microondas durante 2 o 3 minutos, para inactivar posibles enzimas.
- Almacenar a temperatura ambiente (no refrigerar, porque el SDS precipita).

### **Solución de proteinasa K**

- Disolver 20 mg de proteinasa K en 1 mL de agua Milli-Q.
- Filtrar a través de un filtro estéril de 0,2  $\mu\text{m}$  de poro y colocar en un tubo Eppendorf estéril de 1,5 mL.
- Congelar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **Solución 10 mg/mL de lisozima**

- Inmediatamente antes de su uso, disolver lisozima en polvo a una concentración de 10 mg/mL en la solución 10 mM de Tris (pH = 8, comprobar antes de añadir la lisozima).

### **Solución PCI (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico) (25:24:1) (250 mL)**

- Preparar la mezcla en una campana de gases, con guantes. La solución PCI es inflamable y el fenol y el cloroformo son potencialmente cancerígenos. La solución se prepara en una botella estéril de vidrio Pyrex.
- Añadir 5 mL de alcohol isoamílico.
- Añadir 120 mL de cloroformo.
- Añadir 125 mL de fenol.
- Mezclar bien.
- Cubrir la botella con papel de aluminio para evitar la incidencia de la luz.
- Almacenar a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **Solución CI (cloroformo:alcohol isoamílico) (24:1) (250 mL)**

- Preparar la mezcla en una campana de gases, con guantes. La solución CI es inflamable y el cloroformo es potencialmente cancerígeno. La solución se prepara en una botella estéril de vidrio Pyrex.
- Añadir 10 mL de alcohol isoamílico.
- Añadir 240 mL de cloroformo.
- Mezclar bien.
- Cubrir la botella con papel de aluminio para evitar la incidencia de la luz.
- Almacenar a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## **A.2. Procedimiento para realizar la electroforesis en gel de agarosa del producto amplificado. Preparación de reactivos**

Los reactivos utilizados se prepararan de la siguiente manera:

**Solución stock 50X de tampón TAE (Tris/acetato/EDTA)**

- Pesar 242 g de Tris base.
- Añadir 57,1 mL de ácido acético glacial.
- Añadir 37,2 g de EDTA disódico dihidratado.
- Llevar a 1 litro con agua Milli-Q.

**Tampón de carga con azul de bromocresol (para 50 mL)**

- En un frasco Erlenmeyer de 50 mL, añadir 6 mL de tampón TAE 50X.
- Añadir 7,5 g de ficol.
- Añadir 0,125 g de azul de bromocresol.
- Calentar en un baño a 60 °C hasta que se disuelva.
- Completar el volumen hasta 50 mL.

El tampón transparente se prepara de la misma manera pero sin añadir azul de bromocresol.

**A.3. Reactivos específicos DGGE**

- Solución 40% de acrilamida:bisacrilamida (37:1). Usar preferiblemente la mezcla comercial preparada para su uso directo.
- Solución de APS (persulfato amónico). Preparar una solución al 10% (p/v) en agua Milli-Q. Preparar alícuotas y congelar a -20 °C hasta su utilización.