Guía Docente: Protocolo

2023 - 2024_v2

Control de versiones

Document name	Date	Comments
CitizenFlyLab_protocol 2021-2022_v0 (no borrar)		Original document
CitizenFlyLab_protocol 2021-2022_v1		This version was used for the in person training with MCTF teachers on 9 and 10th Dec 2021
CitizenFlyLab_protocol 2021-2022_v2	31/01/2022	New version including comments of the MCTF in person training
CitizenFlyLab_protocol 2021-2022_v2	22/03/2022	New version including the QR link to the form "Formulario materiales y reactivos"
CitizenFlyLab_protocol 2021-2022_v3		New version modifying QR codes that did not work
CitizenFlyLab_protocol 2022-2023_v1	09/01/2023	New version including the QR link to the form "Formulario materiales y reactivos" 2022-2023 edition
CitizenFlyLab_protocol 2023-2024_v1	18/09/2023	New version including a new DNA extraction protocol and also comments of the Teach&Fly training
CitizenFlyLab_protocol 2023-2024_v1	07/11/2023	New version including a new section on the CFL application "Reservas del Citizen Fly Lab a través de la aplicación"

Funding entities: Ministerio de Ciencia e Innovación, FECYT Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología, erc, Fundación General CSIC
Partners: DROSEU European Drosophila Population Genomics Consortium, Genomics, Bioinformatics & Evolutionary Biology UAB Universitat Autònoma de Barcelona
Organizers: LCATM La Ciència Al Teu Món, González Lab Evolutionary and Function Genomics, IBE

ÍNDICE

RESERVAS DEL CITIZEN FLY LAB A TRAVÉS DE LA APLICACIÓN 4

PRESENTACIÓN 5

ELEMENTOS MÓVILES O TRANSPOSONES 6

PCR 7

ELECTROFORESIS 9

PROTOCOLO EXTRACCIÓN ADN (30-45 min) 10

PROTOCOLO REACCIÓN DE PCR (2,5 horas) 14

PROTOCOLO ELECTROFORESIS (1,5 horas) 20

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS 23

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS 27

REPORTAR LOS RESULTADOS 30

VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD 30

FORMULARIO REACTIVOS Y MATERIALES 30

ANEXO 1. USO DE LAS MICROPIPETAS 31

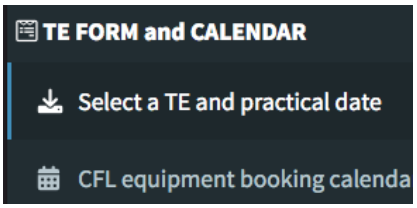
ANEXO 2. CARGAR UN GEL DE ELECTROFORESIS 32

ANEXO 3. MARCADOR 100bp / 1kb 33

Funding entities: Partners: Organizers:

RESERVAS DEL CITIZEN FLY LAB A TRAVÉS DE LA APLICACIÓN

Las reservas del laboratorio móvil de Citizen Fly Lab (CFL) se efectúan a través de su aplicación (https://melanogaster.eu/appCitizenFlyLab/). En el apartado de la web "Select a TE and practical date", en la columna de la izquierda, se puede seleccionar qué elementos transponibles se quieren testar, en qué cepas, y los días en los que se desea usar el laboratorio de CFL. Se accede con el usuario y contraseña previamente facilitados por el equipo del proyecto (si se necesita crear un usuario, o recuperar una contraseña, el contacto es citizenflylab@fruifly.eu).



Una vez en la página "Select a TE and practical date", en el apartado TE selection form se seleccionará el TE que se quiere analizar, la cepa, y los *primers* que se van a usar.

En el apartado Practical date and equipment form debe seleccionarse a qué grupo de CFL se pertenece y las fechas en las que se desea hacer la práctica (*Practical* (*2 weeks*)) y, en caso de haberlos tomados prestados, las fechas en las que se va a devolver o enviar los materiales al siguiente centro educativo (*Delivery* (*1 week*)). Es importante revisar que las fechas estén disponibles consultando el Google Calendar enlazado en el subapartado 2 ("Select a 3-week range period in the following Google Calendar"). Se debe especificar también el número de veces que se va a validar cada TE (por ejemplo, si más de un grupo de estudiantes van a validar el mismo TE).

Los reactivos se enviarán la semana anterior a la de la realización de las PCRs.

Para cada se TE tiene que rellenar un nuevo formulario. Es importante refrescar la página, ésto es, acceder de nuevo al aplicativo, para evitar errores en el nuevo formulario. También debe tenerse en cuenta la necesidad de poner siempre las mismas fechas en los distintos TEs que se vayan a testar.

Funding entities: Gobierno de España Ministerio de Ciencia e Innovación · FECYT Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología · erc · Fundación General CSIC
Partners: DROSEU European Drosophila Population Genomics Consortium · Genomics, Bioinformatics & Evolutionary Biology UAB Universitat Autònoma de Barcelona
Organizers: LCATM La Ciència Al Teu Món · González Lab Evolutionary and Function Genomics · IBE CSIC

PRESENTACIÓN

Citizen Fly Lab es un laboratorio móvil de biología molecular que permite a los estudiantes de secundaria y bachillerato participar en la validación experimental de los resultados obtenidos por los científicos del Consorcio Europeo de Genómica de Poblaciones de *Drosophila* (DrosEU), co-liderado por el Laboratorio de Genómica Evolutiva y Funcional (González Lab) del Instituto de Biología Evolutiva (IBE, CSIC-UPF). En el *Citizen Fly Lab* los y las estudiantes validan mediante la técnica de PCR la presencia de elementos móviles en el genoma de diferentes poblaciones de *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) previamente identificados mediante programas bioinformáticos. Los elementos móviles son fragmentos de ADN con la capacidad de moverse de una posición a otra en el genoma generando una gran cantidad y variedad de mutaciones. Identificarlos es por tanto de gran importancia para estudiar la adaptación, ya que algunas de las muchas mutaciones provocadas por los elementos móviles pueden ser adaptativas.

Las muestras a analizar en el *Citizen Fly Lab* han sido previamente obtenidas por el alumnado y el profesorado de centros escolares españoles y de otros países europeos localizados en zonas climáticas de interés científico. Estos centros escolares participan en el proyecto de ciencia ciudadana *Melanogaster: Catch the Fly!* (#MelanogasterCTF) mediante la recolección y clasificación de moscas del género *Drosophila*, en campos cercanos a sus centros educativos. #MelanogasterCTF ha nacido con el objetivo de ayudar a la comunidad científica que forma parte (DrosEU) a identificar los cambios genéticos, los mecanismos moleculares, y los caracteres fenotípicos (observables) más relevantes para la adaptación de los organismos a diferentes condiciones ambientales.

Citizen Fly Lab es una iniciativa pionera de ciencia ciudadana que forma parte del proyecto de ciencia ciudadana #MelanogasterCTF organizado por González Lab y la plataforma de divulgación científica La Ciencia en Tu Mundo (LCATM). En el proyecto colaboran también el grupo de Genómica, Bioinformática y Evolución (GGBE) del Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) y DrosEU. Este proyecto cuenta con financiación pública del Consejo Europeo de Investigación (ERC, H2020-ERC-2014-CoG-647900), la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT)-Ministerio de Ciencia e Innovación y la Fundación General CSIC (FGCSIC).

Funding entities: Partners: Organizers:

ELEMENTOS MÓVILES O TRANSPOSONES

Los elementos móviles o transposones son secuencias de ADN repetitivas que tienen la capacidad de moverse por el genoma. Dada su naturaleza móvil y repetitiva, producen muchos tipos de mutaciones. Fueron descubiertos en los años 1940s por Barbara McClintock en la planta del maíz, por lo que fue galardonada con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina el año 1983. McClintock descubrió cómo los elementos móviles variaban las pautas de coloración del maíz.

Los elementos móviles están presentes en casi todas las especies, y constituyen una proporción variable pero importante de los genomas. Por ejemplo, en los humanos, se estima que los elementos móviles constituyen más del 66% del genoma, y en *Drosophila*, un 20%.

En el Laboratorio de Genómica Evolutiva y Funcional (González Lab) del Instituto de Biología Evolutiva (IBE, CSIC-UPF), estudiamos las bases genéticas de la adaptación usando la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) como organismo modelo. Debido a que producen muchas mutaciones, como hemos mencionado anteriormente, los elementos móviles son una buena herramienta para estudiar la adaptación.

En el *Citizen Fly Lab* se validará la presencia de elementos móviles que han sido identificados mediante técnicas bioinformáticas en 16 poblaciones naturales de *Drosophila melanogaster* de diferentes continentes. Es decir, comprobaremos mediante la técnica de PCR su presencia o ausencia en el genoma.

Funding entities: Gobierno de España Ministerio de Ciencia e Innovación · FECYT Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología · erc · Fundación General CSIC
Partners: DROSEU European Drosophila Population Genomics Consortium · Genomics, Bioinformatics & Evolutionary Biology UAB Universitat Autònoma de Barcelona
Organizers: LCATM La Ciència Al Teu Món · González Lab Evolutionary and Function Genomics · PRBB · IBE CSIC

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El objetivo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR de sus siglas en inglés: *Polymerase Chain Reaction*) es hacer múltiples copias de una región específica de ADN: la secuencia *target*. Para copiar la secuencia *target* usando la técnica de PCR, se deben añadir los siguientes reactivos en un tubo:

- ADN molde: al ADN que contiene la región específica de ADN que queremos copiar se le llama *molde*. Éste puede ser diferente en cada experimento y puede ser de cualquier organismo (vivo o muerto). De este molde, solamente la secuencia *target* será copiada.
- ADN polimerasa: la ADN polimerasa es una enzima que puede leer una hebra de ADN y sintetizar una copia complementaria siguiendo la regla de apareamiento de bases. En la PCR, se usa una ADN polimerasa en particular llamada Taq polimerasa. Se usa la Taq polimerasa porque proviene de una bacteria termófila (puede vivir en altas temperaturas), y, por lo tanto, es estable y activa en las altas temperaturas usadas en la PCR.
- *Primers* o cebadores: los *primers* son fragmentos cortos (unos 20-30 nucleótidos) de ADN monocatenario sintético que puede unirse a regiones complementarias del ADN molde. En la PCR, se diseñan dos *primers* que flanquean la secuencia de ADN que se quiere copiar. Uno de los *primers* (normalmente llamado *forward* primer) se unirá al inicio de la secuencia *target*. El otro primer (normalmente llamado *reverse* primer) se unirá en la otra cadena del ADN al final de la secuencia *target*. Los *primers* son necesarios para que la ADN polimerasa empiece a copiar.
- dNTPs: los nucleótidos son la unidad estructural del ADN y están compuestos de un grupo fosfato, un azúcar y una base nitrogenada, que puede ser Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) o Guanina (G). El término dNTPs se refiere a una mezcla de los cuatro nucleótidos. La polimerasa usa estos dNTPs para sintetizar la nueva cadena de ADN.
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2$): se utiliza como fuente de iones Magnesio, un cofactor necesario para la correcta actividad de la ADN polimerasa.
- Solución tampón o "*buffer*": es una solución que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.

Durante la replicación del ADN en la célula, se produce una única copia de todo el ADN presente en el núcleo. En cambio, en la PCR, solamente una región específica del ADN se copia y el proceso de copia se repite muchas veces. En la PCR, se repite el proceso de copia cambiando la

Funding entities: Partners: Organizers:

temperatura de la reacción usando una máquina llamada termociclador. El termociclador realiza tres pasos, cada uno con una temperatura determinada.

- Desnaturalización: para separar las dos cadenas de ADN, las muestras son calentadas a unos 95°C. A estas altas temperaturas, los puentes de hidrógeno que unen las dos cadenas complementarias se rompen y se desnaturaliza el ADN.
- Alineamiento / *annealing*: para permitir a los *primers* unirse a cada cadena de la secuencia molde, la muestra se enfría entre 50°C-65°C (dependiendo de las secuencias de los *primers* que se vayan a usar). En la temperatura de alineación se crean puentes de hidrógeno entre los *primers* y el ADN molde, creando fragmentos cortos de ADN de doble cadena que delimitan la secuencia *target*.
- Elongación / extensión: para permitir a la polimerasa copiar el ADN, la muestra es calentada a alrededor de 72°C. Esta es la temperatura óptima de funcionamiento de la Taq polimerasa en una reacción de PCR. Dado que la Taq polimerasa añade nucleótidos empezando por dónde se encuentran los *primers*, extendiendo así la cadena de ADN, el tercer paso se llama elongación o extensión.

Después de estos tres pasos, se habrá doblado el número de copias de la secuencia *target*. ¡Pero la cosa no acaba aquí! El termociclador repite el proceso y el fragmento recién creado de ADN vuelve a ser copiado en el siguiente ciclo. Después de un ciclo, por cada copia de nuestra secuencia *target* con la que empezamos, se obtendrán dos copias; después de dos ciclos, se obtendrán cuatro. Luego 8, 16, 32, etc. Este tipo de copia exponencial del ADN es como una reacción en cadena (de ahí el nombre de la PCR: reacción en cadena de la polimerasa). Este ciclo de tres pasos (desnaturalización, alineamiento y elongación) normalmente se repite cerca de 30 veces, sintetizando alrededor de un billón de nuevas moléculas de la secuencia target por cada copia de ADN inicial.

En el *Citizen Fly Lab* usaremos la técnica de la PCR para copiar la región dónde se ha descrito que se encuentran los elementos móviles. De este modo, podremos validar su presencia en el genoma.

Funding entities: Partners: Organizers:

ELECTROFORESIS

Uno de los métodos más usados para separar y visualizar moléculas biológicas en el laboratorio es la electroforesis. El gel de electroforesis se usa comúnmente para separar fragmentos de ADN en función de su tamaño. Durante la electroforesis, la aplicación de un campo eléctrico impulsa las moléculas de ADN a través de un gel. A nivel molecular, la estructura interna de este gel se parece a una red de malla a través de la cual las moléculas se pueden mover.

Dado que el ADN está cargado negativamente, éste se mueve hacia el electrodo positivo en un campo eléctrico. Los fragmentos más pequeños de ADN, al caber mejor por la red del gel, viajan más rápidamente y por lo tanto más lejos que los fragmentos más grandes. De este modo, se pueden separar fragmentos de ADN dependiendo de su tamaño.

En el *Citizen Fly Lab* usaremos la electroforesis para visualizar el fragmento de ADN que previamente hemos copiado mediante la técnica de PCR. De este modo, dependiendo de su tamaño podremos validar (o no) la presencia del elemento móvil que estemos estudiando en una población determinada de *Drosophila melanogaster*.

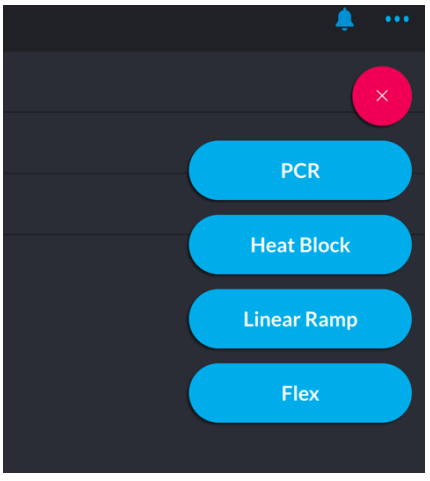
Funding entities: Gobierno de España Ministerio de Ciencia e Innovación · FECYT Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología · erc · Fundación General CSIC
Partners: DROSEU European Drosophila Population Genomics Consortium · Genomics, Bioinformatics & Evolutionary Biology UAB Universitat Autònoma de Barcelona
Organizers: LCATM La Ciència Al Teu Món · González Lab Evolutionary and Function Genomics · PRBB · IBE CSIC

PROTOCOLO EXTRACCIÓN ADN (1,5 horas)

*Todos los equipos y reactivos utilizados en *Citizen Fly Lab* se pueden conseguir en www.minipcr.com

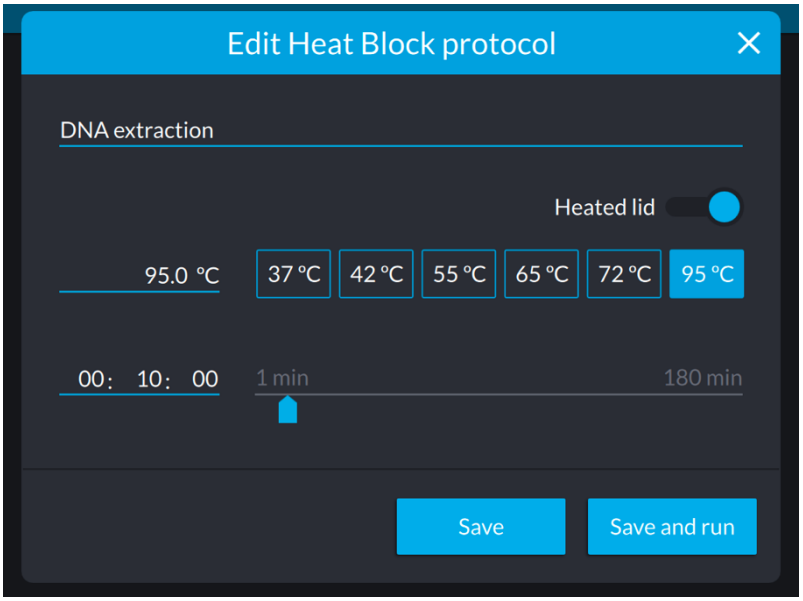
Para obtener el ADN molde necesario para realizar la reacción de PCR, se extraerá ADN de 10 hembras de *Drosophila melanogaster* de diferentes poblaciones (en cada caso, se extraerá ADN de la población donde se ha identificado el elemento móvil que se vaya a validar. La información la encontraréis en los mails recibidos cuando se escogieron los elementos móviles en la aplicación, o directamente en la aplicación, https://melanogaster.eu/appCitizenFlyLab/). Las muestras biológicas se proporcionarán desde el Laboratorio de Genómica Evolutiva y Funcional (González Lab).

1. Configurar la miniPCR para la incubación.
    - Conectar la miniPCR a un ordenador (MAC, PC) o a un dispositivo Android. Encender el interruptor de la miniPCR.
    - Programar el protocolo desde el *software*. El *software* se puede descargar en: https://www.minipcr.com/downloads/
      Comprobar que la versión del *software* descargada es compatible con la máquina de PCR.
    - Abrir el software y clicar sobre el botón "+" que aparece en la esquina superior derecha de la pantalla y seleccionar "Heat block".

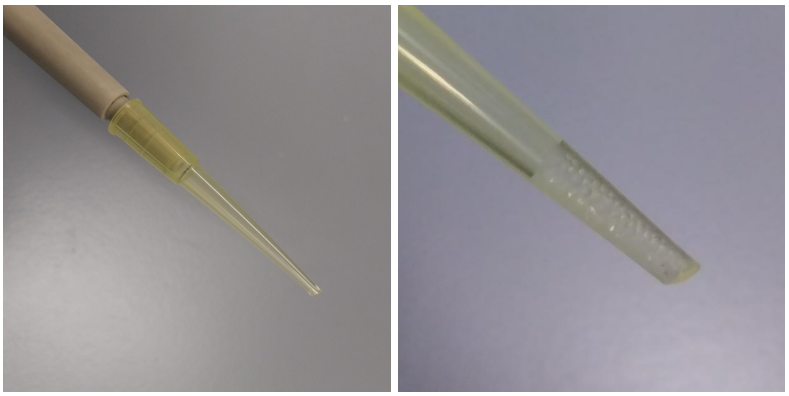


    - Modificar la temperatura del protocolo a 95°C y el tiempo a 10 minutos. Modificar el nombre del protocolo (por ejemplo: "Extracción ADN"). Clicar "save".

Funding entities: Partners: Organizers:



2. Homogenizar la muestra
    - Añadir 30 ul de PBS 10X buffer en el tubo *eppendorf* que contiene las muestras de *Drosophila melanogaster* (ver Anexo 1 para saber más sobre cómo usar las micropipetas). Las puntas de pipeta usadas se deberán tirar en la caja de residuos.
    - Homogeneizar bien la muestra chafando con una punta de pipeta (aconsejamos usar la azul) sin introducirla en la pipeta.
    - Añadir 30 ul más de PBS 10X buffer en el tubo *eppendorf* que contiene las muestras y acabar de homogeneizar la muestra.
    - Añadir 15 ul de Chelex-100 (suspensión de bolitas de resina). Cortar con unas tijeras el extremo de la punta amarilla (unos 5 mm) para poder pipetearlo. Asegurarse de pipetear el máximo de bolitas posible (como ejemplo ver fotografía inferior derecha).

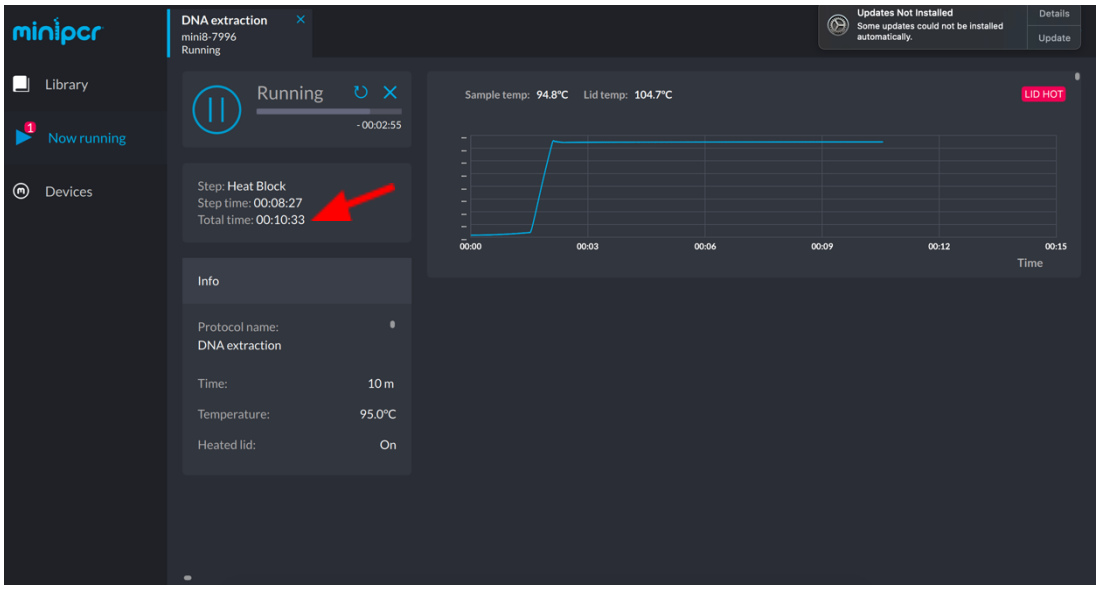


Izquierda: Punta amarilla cortada; Derecha: Aspecto de la solución con Chelex-100 pipeteada

Funding entities: Partners: Organizers:

- Rotular un tubo pequeño poniendo en la tapa del tubo el nombre de la muestra con un rotulador permanente. Para evitar contaminar los tubos, no introducir la mano en el bote que contiene los tubos, dejar caer unos pocos tubos en la tapa y coger tocando solo el que se va a utilizar.
- Transferir la mezcla al tubo pequeño de PCR rotulado previamente. Para poder hacerlo cortar la punta de una pipeta amarilla.
- Comprobar que los tubos estén bien cerrados.

3. Incubar 10 minutos a 95°C en la miniPCR
    - Poner las muestras en la miniPCR. Abrir la tapa de la miniPCR con cuidado, poner los tubos dentro y cerrar la tapa. Asegurar que los tubos estén bien cerrados. Intentar distribuir los tubos de manera homogénea dentro de la máquina para evitar que la tapa no cierre bien.
    - Abrir el software de miniPCR. Clicar en "Library" en la parte superior izquierda y seleccionar el protocolo previamente configurado en el paso 1. Clicar "Run".
    - Esperar el tiempo establecido
    - El tiempo necesario aparecerá en pantalla al lado de "Total time".



4. Quitar las muestras de la miniPCR
    - Una vez el protocolo haya finalizado sonará un timbre (si se tiene el sonido activado en el dispositivo). Abrir la tapa de la miniPCR y quitar las muestras.

¡OJO! ¡La tapa puede quemar!

Funding entities: Partners: Organizers:

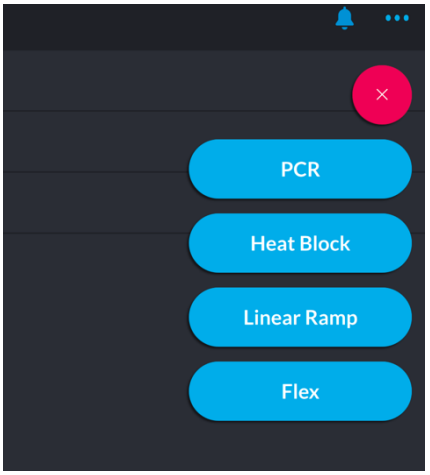
5. Centrifugar la muestra
    - Comprobar que los tubos estén bien cerrados.
    - Abrir la tapa de la centrífuga apretando el botón verde "Open". Introducir los tubos usando los adaptadores para tubos pequeños y cerrar la tapa. Comprobar que los tubos en la centrífuga están equilibrados; en caso de tener muestras impares, utilizar un tubo con el mismo volumen de agua para equilibrar, o centrifugar en dos tandas.
    - Apretar el botón rojo en la posición "On".
    - Pulsar el botón con una flecha a la derecha del marcador hasta que indique 12. Si en vuestra centrífuga no se puede modificar la velocidad, pasad al siguiente paso.

    - Apretar el botón de Start/Stop y esperar 2 minutos. Cuando hayan pasado los 2 minutos, apretar el botón Start/Stop otra vez.
    - Apretar el botón rojo en la posición "Off". Abrir la tapa de la centrífuga apretando el botón verde "Open" y quitar las muestras.
6. Transferir la parte líquida (contiene el ADN) a un tubo pequeño previamente rotulado con cuidado de no pipetear el resto sólido del fondo. Tirar el tubo con el resto sólido, conservar el tubo con la parte líquida.
7. Centrifugar el tubo con la parte líquida obtenido en el paso 6 de la misma manera que se detalla en el paso 5.
8. Volver a transferir la parte líquida (contiene el ADN) a un tubo pequeño previamente rotulado con cuidado de no pipetear el resto sólido del fondo. Si el punto 6 se ha realizado correctamente, no se observará parte sólida. Tirar el tubo ahora vacío, conservar el tubo con la parte líquida.
9. Preparar una dilución 1:10 (1 parte de ADN y 9 de agua) de la extracción de ADN recién obtenida (final del paso 8): poner 2 ul de la extracción en un tubo nuevo bien rotulado y añadir 18 ul de agua nuclease-free water.
10. El ADN ya está listo para ser utilizado en la reacción de PCR. Usar la dilución 1:10 obtenida en el paso 8 inmediatamente o guardarla en el congelador durante un tiempo máximo de un mes. El ADN sin diluir también se puede guardar en el congelador durante un tiempo máximo de un mes.

Funding entities: Gobierno de España Ministerio de Ciencia e Innovación · FECYT Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología · erc · Fundación General CSIC
Partners: DROSEU European Drosophila Population Genomics Consortium · Genomics, Bioinformatics & Evolutionary Biology UAB Universitat Autònoma de Barcelona
Organizers: LCATM La Ciència Al Teu Món · González Lab Evolutionary and Function Genomics · PRBB · IBE CSIC

PROTOCOLO REACCIÓN DE PCR (2,5 horas)

1. Configurar la miniPCR para la reacción de PCR.
    - Conectar la miniPCR a un ordenador (Chrome, MAC, PC) o a un dispositivo Android. Encender el interruptor de la miniPCR.
    - Programar el protocolo desde el software.
    - Abrir el software y clicar sobre el botón "+" que aparece en la esquina superior derecha de la pantalla y seleccionar "PCR".

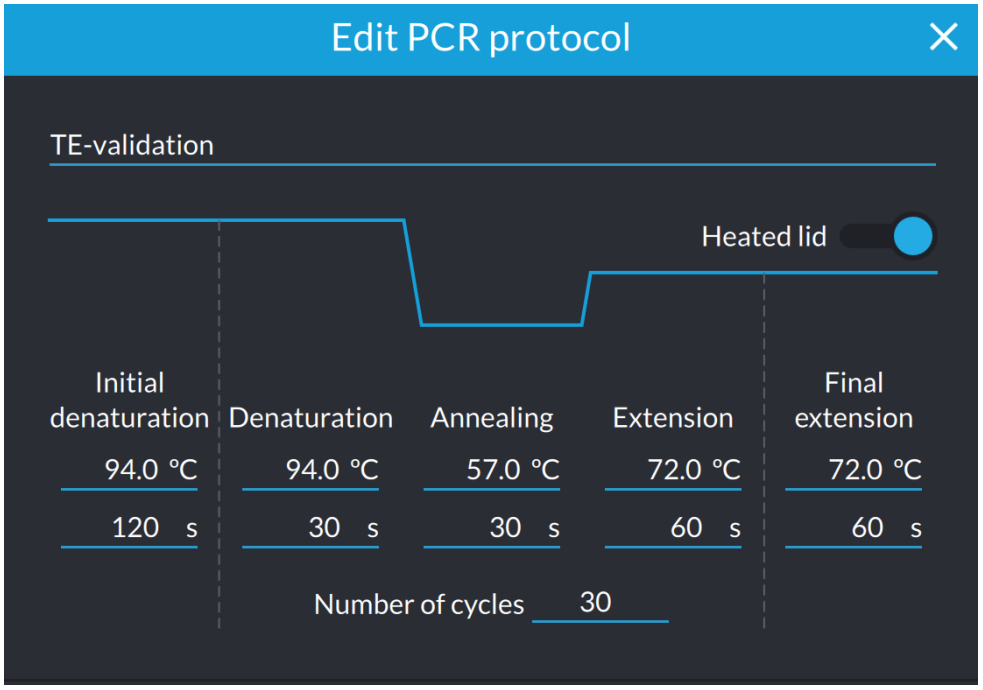


    - Cambiar la temperatura de *annealing* (alineamiento) a 57°C y el tiempo de extensión teniendo en cuenta la banda más grande que esperéis.

      ¡OJO! El tiempo de extensión se debe calcular teniendo en cuenta los tamaños de banda esperados (1 minuto por cada kilobase que queremos amplificar). Encontraréis los tamaños de banda esperados en los mails recibidos cuando se escogieron los elementos móviles en la aplicación. Configurar el tiempo de extensión teniendo en cuenta la banda más grande que esperáis considerando también los controles.

    - Modificar el nombre del protocolo (por ejemplo: "TE-validation"). Clicar "save".

Funding entities: Gobierno de España Ministerio de Ciencia e Innovación · FECYT Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología · erc · Fundación General CSIC
Partners: DROSEU European Drosophila Population Genomics Consortium · Genomics, Bioinformatics & Evolutionary Biology UAB Universitat Autònoma de Barcelona
Organizers: LCATM La Ciència Al Teu Món · González Lab Evolutionary and Function Genomics · PRBB · IBE CSIC



*El tiempo de extensión dependerá del tamaño de banda esperado

2. Etiquetar los tubos pequeños de PCR según la reacción de PCR que se vaya a preparar.

   Por cada elemento móvil a validar en su correspondiente cepa de moscas se prepararán 3 reacciones de PCR:

   - Reacción de PCR con el ADN extraído anteriormente por los participantes de la práctica (*muestra A*).
   - Reacción de PCR con ADN de la misma cepa de moscas extraído en el laboratorio con un kit específico de extracción de ADN (*muestra B*). Esta muestra será proporcionada por el Laboratorio de Genómica Evolutiva y Funcional, y será el control positivo de la extracción de ADN, ya que este ADN sabemos que es de una calidad y pureza buenas.
   - Reacción de PCR sin ADN (*muestra C*). Esta muestra será el control negativo de la reacción de PCR, ya que al no haber ADN molde, no esperamos ver resultados. Por lo tanto, si en esta muestra vemos presencia de ADN después de hacer la reacción de PCR, significa que ha habido algún tipo de contaminación y, por lo tanto, todos los resultados obtenidos en todas las muestras (A y B) deberán ser descartados.

Funding entities: Partners: Organizers:

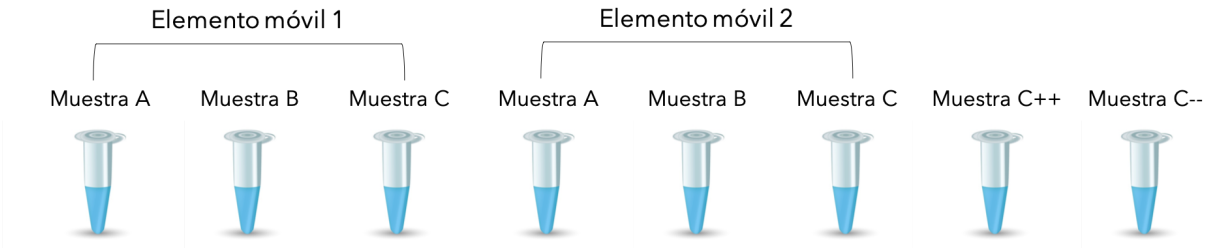
Además de las indicadas anteriormente, por cada práctica que se lleve a cabo en el *Citizen Fly Lab* se deberán realizar dos reacciones más de PCR como controles:

- Reacción de PCR con ADN de la cepa STO-022 extraído en el laboratorio (*muestra C++*) para amplificar la región donde se encuentra el elemento móvil 2R_19330318_19330325_Quasimodo2. Esta muestra será el control positivo de la reacción de PCR, ya que se conoce que el elemento móvil sí está presente en la cepa STO-022.
- Reacción de PCR sin ADN (*muestra C--*). Esta muestra será el control negativo de la reacción de PCR utilizando los reactivos para amplificar el elemento móvil 2R_19330318_19330325_Quasimodo2.

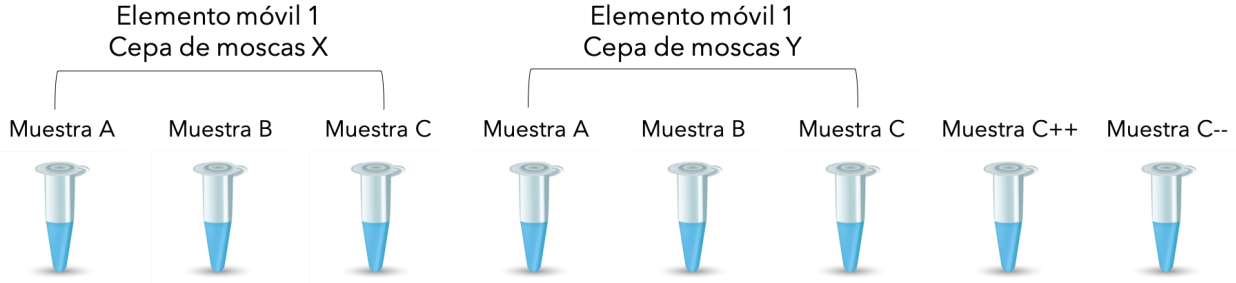
NOTA: dependiendo del termociclador caben un máximo de 8 ó 16 muestras. En el termociclador de 8 muestras, se podrían validar un máximo de 2 elementos móviles diferentes simultáneamente o un mismo elemento móvil en 2 cepas de moscas distintas. En cambio, en el termociclador de 16 muestras, se podrán validar un máximo de 4 elementos móviles diferentes simultáneamente o un mismo elemento móvil en 4 cepas de moscas distintas.

Ejemplo termociclador de 8 muestras:

Validación de dos elementos móviles



Validación de un elemento móvil en dos cepas de moscas distintas



Funding entities: Partners: Organizers:

En la siguiente tabla se encuentran los volúmenes de cada reactivo que son necesarios para realizar 1 reacción de PCR. Preparar un mix que contenga estos componentes teniendo en cuenta que se usará para 3 reacciones (muestras A, B y C). Rotular el tubo donde se va a preparar el mix poniendo "mix" en la tapa. Preparar el mix para 5 reacciones, ya que puede haber errores de pipeteo que hagan que no se tenga el volumen final exacto y no se disponga de mix suficiente para todos los tubos.

Componente	Volumen para 1 reacción
5x EZ PCR Master Mix, Load Ready / DreamTaq Green PCR Master Mix	4 ul
Forward primer (10 pmol/ul)	0,5 ul
Reverse primer (10 pmol/ul)	0,5 ul
H_2O	13 ul

- "5x EX PCR Master Mix, Load Ready" o "DreamTaq Green PCR Master Mix" es una solución pre-mezclada lista para usar que contiene la Taq polimerasa, los dNTPs, el cloruro de magnesio y la solución tampón. También contiene un componente adicional necesario para posteriormente cargar las muestras en el gel de electroforesis.
- Los *primers* forward y reverse son específicos de cada elemento móvil a validar (ver excel). Los *primers* forward y reverse para la muestra C++ se llaman *Quasi2_F* y *Quasi2_R*.

Mezclar todos los componentes del mix cogiendo y soltando suavemente el volumen total del líquido con una pipeta. Una vez preparado el mix, etiquetando correctamente según los *primers* usados, poner 18 ul de mix en tubos pequeños de PCR (uno para cada una de las muestras).

Añadir a las muestras A y B 2 ul de una dilución 1/10 de la muestra de ADN correspondiente.

Resumiendo, cada muestra debe contener los siguientes componentes:

Muestra A: 18 ul mix + 2 ul de una dilución 1/10 de la muestra de ADN correspondiente extraído en el paso anterior.

Muestra B: 18 ul mix + 2 ul ADN de una dilución 1/10 de la misma cepa que la muestra A pero proporcionada por el laboratorio González Lab.

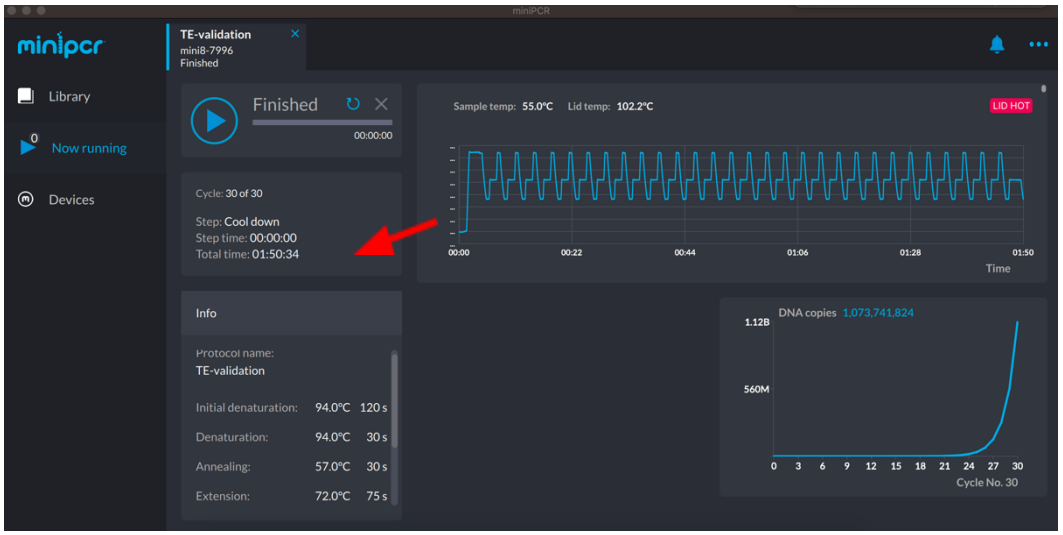
Funding entities: Partners: Organizers:

Muestra C: 18 ul mix (sin ADN).

Muestra C++: 18 ul mix control + 2 ul ADN de una dilución 1/10 de la cepa STO-022 proporcionada por el laboratorio González Lab.

Muestra C--: 18 ul mix control (sin ADN).

3. Centrifugar las muestras.
    - Abrir la tapa de la centrífuga apretando el botón verde "Open". Comprobar que los tubos están bien cerrados. Introducir los tubos y cerrar la tapa. Asegurar que los tubos estén bien cerrados.
    - Apretar el botón rojo en la posición "On" y esperar 5 segundos.
    - Apretar el botón rojo en la posición "Off". Abrir la tapa de la centrífuga apretando el botón verde "Open" y quitar las muestras.
4. Poner las muestras en la miniPCR.
    - Abrir la tapa de la miniPCR, poner los tubos dentro y cerrar la tapa. Asegurar que los tubos estén bien cerrados. Intentar distribuir los tubos de manera homogénea dentro de la máquina para evitar que la tapa no cierre bien.
    - Abrir el software de miniPCR. Clicar en "Library" en la parte superior izquierda y seleccionar el protocolo de PCR previamente configurado. Clicar "Run".
    - Esperar el tiempo establecido
    - El tiempo necesario aparecerá en pantalla al lado de "Total time".



5. Quitar las muestras de la miniPCR

Funding entities: Partners: Organizers:

- Una vez el protocolo haya finalizado sonará un timbre (si se tiene el sonido activado en el dispositivo). Abrir la tapa de la miniPCR y quitar las muestras.

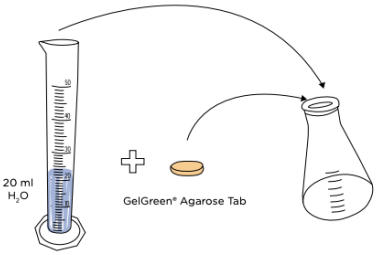
  ¡OJO! ¡La tapa puede quemar!

- Proceder con la electroforesis. Si no se pudiera, las muestras pueden guardarse en la nevera.

Funding entities: Gobierno de España Ministerio de Ciencia e Innovación · FECYT Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología · erc · Fundación General CSIC
Partners: DROSEU European Drosophila Population Genomics Consortium · Genomics, Bioinformatics & Evolutionary Biology UAB Universitat Autònoma de Barcelona
Organizers: LCATM La Ciència Al Teu Món · González Lab Evolutionary and Function Genomics · PRBB · IBE CSIC

PROTOCOLO ELECTROFORESIS (1,5 horas)

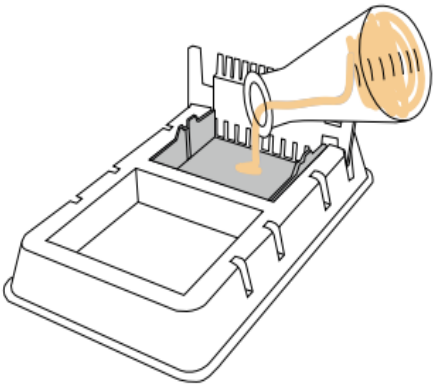
1. Preparar una solución del 1% de agarosa
    - Coge un recipiente resistente al calor como un frasco Erlenmeyer.
    - Añade 40 ml de agua destilada y una pastilla de GelGreen® Agarose Tab™.
    - Agita el frasco cuidadosamente con la mano hasta que todos los reactivos estén bien mezclados. Comprueba que la GelGreen® Agarose Tab™ está completamente desintegrada antes de proceder con los siguientes pasos.



2. Calentar la solución
    - Calentar unos 45 segundos en un microondas hasta que la agarosa esté completamente disuelta y la solución sea completamente transparente. La pastilla de GelGreen® Agarose Tab™ da a la solución un color anaranjado, pero igualmente la solución se debe ver uniformemente transparente. Este color es debido a la presencia de un tinte para el ADN que permitirá visualizarlo más fácilmente.

¡OJO! La solución puede estar muy caliente y rebosar por encima de los bordes del frasco.

3. Preparar el gel de agarosa
    - Preparar la cubeta de electroforesis con una bandeja para geles y un peine de pocillos. Los peines se encuentran detrás de la bandeja, quitarlos para usarlos. Estos peines tienen dos lados: uno con 9 pocillos y otro con 13. Dependiendo de la cantidad de muestras, poner boca abajo el lado del peine que más convenga. Si aún así se necesitan más pocillos, se puede preparar otro gel de manera simultánea. Poner los peines en la parte superior de la cubeta como indica el dibujo.



Funding entities: Gobierno de España Ministerio de Ciencia e Innovación · FECYT Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología · erc · Fundación General CSIC
Partners: DROSEU European Drosophila Population Genomics Consortium · Genomics, Bioinformatics & Evolutionary Biology UAB Universitat Autònoma de Barcelona
Organizers: LCATM La Ciència Al Teu Món · González Lab Evolutionary and Function Genomics · PRBB · IBE CSIC

- Verter la solución de agarosa mientras esté caliente en la cubeta previamente preparada. Es muy importante verter la solución rápidamente en la cubeta, ya que al enfriarse se solidifica.

¡OJO! Limpiar el frasco rápidamente antes de que la solución solidifique. Sinó, costará mucho limpiarlo.

- Dejar enfriar unos 20 minutos a temperatura ambiente hasta que tenga una consistencia de gelatina.

4. Preparar 1X TBE *buffer*
    - Preparar aproximadamente 100 ml de 1X TBE *buffer*.

El buffer TBE se encuentra normalmente preparado a una concentración 5X. Añade 1 parte de TBE buffer 5X a 4 partes de agua destilada para obtener TBE buffer a una concentración 1X (es decir, 20 ml de TBE buffer 5X y 8 0ml de agua destilada).

5. Poner el gel en la cámara de electroforesis
    - Quitar el peine de pocillos con cuidado de no romper el gel.
    - Poner el gel en la cámara
    - Cubrir la cámara con TBE buffer 1X (aproximadamente se necesitan 50 ml), que permite la conducción de la electricidad a través de la cámara. Es muy importante que el gel quede completamente sumergido en TBE buffer 1X. La cámara se puede dejar llena de TBE buffer 1X durante unos días para así reutilizarlo. El buffer se deberá cambiar cuando se vean partículas blancas en suspensión.
6. Cargar 10 ul del producto de la PCR en cada pocillo.
    - Introducir la pipeta encima del pocillo que quereis cargar hasta tocar el líquido. Expulsar el líquido de la pipeta lentamente y sacar la pipeta sin dejar de presionar el émbolo. (En el Anexo 2 podrás encontrar información de cómo cargar las muestras en los pocillos.)

¡OJO! No olvidar cargar también 5ul de marcador. El marcador nos permitirá saber la medida de las bandas obtenidas. Ver Anexo 3 para saber la medida de las bandas del marcador.

- Tapar la cámara de electroforesis con su tapa.

7. Encender la cámara de electroforesis para aplicar electricidad
    - Encender la cámara de electroforesis apretando el botón con el símbolo de encendido. Comprobar que salen pequeñas burbujas de los electrodos. En caso negativo, mirar que todo esté correctamente enchufado.

Funding entities: Partners: Organizers:

- Esperar unos 30-40 minutos antes de visualizar el ADN.

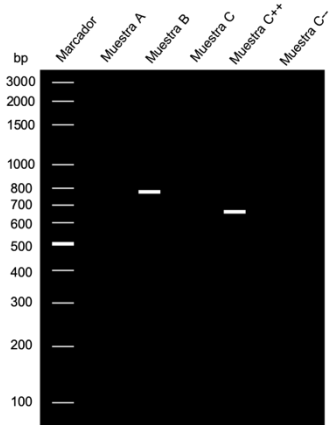
8. Visualizar el ADN
    - Como el tinte de ADN usado se une directamente a las moléculas de ADN produciendo fluorescencia, los resultados se pueden ver simplemente encendiendo una luz azul apretando el botón con la bombilla.
    - Se puede visualizar el ADN mientras se está aplicando corriente o se puede visualizar una vez pasados los 30-40 minutos y se haya apagado la cámara de electroforesis.
    - Si todas las bandas del marcador no están correctamente separadas significa que no se ha aplicado corriente. En ese caso, volver a encender la cámara de electroforesis.
    - Hacer una foto del gel con el móvil con la ayuda de la cámara oscura.
9. Tirar el gel en un recipiente para residuos de agarosa y limpiar la cubeta y el peine con agua destilada

Funding entities: Ministerio de Ciencia e Innovación, FECYT Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología, erc, Fundación General CSIC
Partners: DrosEU European Drosophila Population Genomics Consortium, Genomics, Bioinformatics & Evolutionary Biology, UAB Universitat Autònoma de Barcelona
Organizers: LCATM La Ciència Al Teu Món, González Lab Evolutionary and Function Genomics, IBE

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

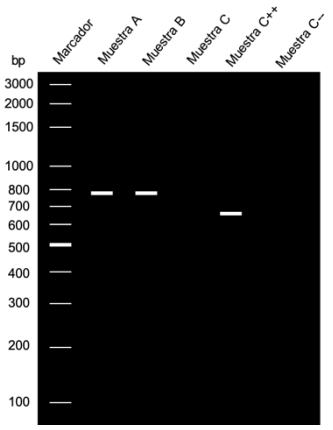
1. Comprobación del marcador
    - Si vemos todas las bandas del marcador correctamente separadas significa que no ha habido ningún problema durante el proceso de la electroforesis.
2. Comprobación de los controles (muestras C++ y C--)
    - Comprobar que la *muestra C++* para amplificar la región donde se encuentra el elemento móvil 2R_19330318_19330325_Quasimodo2 tiene una banda de aproximadamente 650 bp. Esta muestra es el control positivo de la reacción de PCR, por lo tanto, si no hay banda significa que técnicamente no ha funcionado la PCR y no podremos extraer ninguna conclusión de ninguna otra muestra.
    - Comprobar que la *muestra C--*, el control negativo de la reacción de PCR, no contiene ninguna banda. En caso afirmativo, estaría indicando que algún componente de la reacción ha sido contaminado con ADN. Por lo tanto, no podremos extraer ninguna conclusión de ninguna otra muestra.
3. Comprobación de los controles (muestra C)
    - Comprobar que la *muestra C*, el control negativo de la reacción de PCR para un elemento móvil en concreto, no contiene ninguna banda. En caso afirmativo, estaría indicando que algún componente de la reacción ha sido contaminado con ADN. Por lo tanto, no podemos extraer ninguna conclusión para ese elemento móvil en concreto.
3. Análisis de las otras muestras
    - Podemos encontrarnos con diferentes escenarios:
        i. No hay banda en la muestra A (ADN extraído por vosotr@s), mientras que si hay banda en la muestra B (ADN extraído en el laboratorio). Eso significa que ha habido algún error técnico durante la extracción del ADN.

Funding entities: Partners: Organizers:



Ejemplo caso i

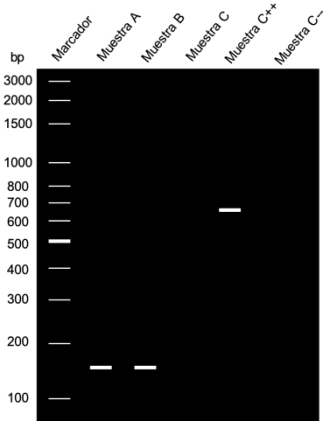
ii. Hay una sola banda en la muestra A y B del tamaño esperado si el elemento móvil está presente. En este caso hemos validado la presencia del elemento móvil en la cepa de moscas en la que se ha hecho la reacción de PCR.



Ejemplo caso ii

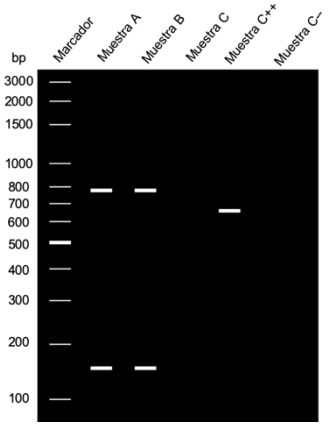
iii. Hay una sola banda en la muestra A y B del tamaño esperado si el elemento móvil está ausente. En este caso NO hemos validado la presencia del elemento móvil en la cepa de moscas en la que se ha hecho la reacción de PCR.

Funding entities:
Partners:
Organizers:



Ejemplo caso iii

iv. Hay dos bandas en las muestras A y B, ambas del tamaño esperado si el elemento móvil está ausente y presente. En este caso hemos validado la presencia del elemento móvil en la cepa de moscas en la que se ha hecho la reacción de PCR. Las dos bandas pueden aparecer si el elemento móvil es polimórfico, es decir, está presente en algunas moscas de la cepa, pero en otras no. Por eso encontramos tanto la banda correspondiente a su presencia como a la de su ausencia.

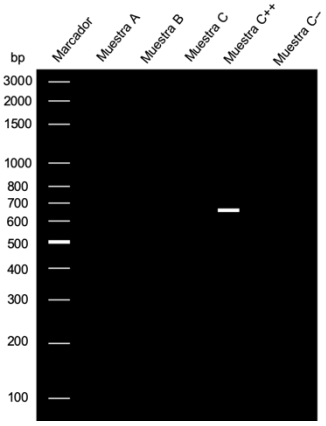


Ejemplo caso iv

v. No hay ninguna banda en las muestras A y B. En ese caso, podría haber varias causas:
   - Problema técnico ocurrido durante la realización del protocolo, como por ejemplo que no se haya hecho bien la mix o que no se haya introducido el ADN en las muestras.
   - Los *primers* no funcionaran correctamente.

Funding entities: Gobierno de España Ministerio de Ciencia e Innovación · FECYT Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología · European Research Council · Fundación General CSIC
Partners: DROSEU European Drosophila Population Genomics Consortium · Genomics, Bioinformatics & Evolutionary Biology UAB Universitat Autònoma de Barcelona
Organizers: LCATM La Ciència Al Teu Món · González Lab Evolutionary and Function Genomics · PRBB · IBE CSIC

- Cálculo erróneo del tiempo de elongación, impidiendo así que toda la región sea amplificada.
- Temperatura de *annealing* errónea. Otras temperaturas deberían probarse para descartar este problema.
- Estimación de la longitud del elemento móvil errónea. Puede ser que el programa bioinformático haya subestimado la longitud del elemento móvil haciendo que el cálculo del tiempo de elongación también sea erróneo y por lo tanto, la región no se haya podido amplificar.



Ejemplo caso v

vi. Hay múltiples bandas en A o en B. Podría ser que la temperatura de annealing no fuera suficientemente alta y por tanto se amplifican bandas inespecíficas. Repetir la PCR subiendo 2 °C la temperatura de annealing de la PCR.

vii. Se obtienen una sola banda pero no es del tamaño esperado. Podría ser que la estimación del tamaño del elemento móvil fuera errónea. Reportar el resultado anotando el tamaño obtenido.

Funding entities: Partners: Organizers:

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Muchos de los problemas comunes de las reacciones de PCR se pueden identificar durante el proceso de electroforesis. Un resumen de las posibles causas y soluciones para estos problemas se encuentran en la siguiente tabla.

PROBLEMA	POSIBLE CAUSA	SOLUCIÓN
AUSENCIA DE BANDAS	El termociclador no ha funcionado correctamente	Si no se ha preparado un control positivo, se puede repetir la PCR con una muestra de ADN y un par de *primers* que hayan funcionado previamente.
	Insuficiente / demasiado ADN molde	Valorar la cantidad de ADN molde
	ADN molde de baja calidad	Usar ADN fresco o extraído por otros métodos.
	Concentración de *primers* demasiado baja	Asegurarse que la concentración de *primers* es la recomendada y que la concentración de ambos *primers* es la misma.
	Reactivos no correctamente descongelados antes de su uso	Descongelar y mezclar cuidadosamente todos los reactivos antes de preparar las reacciones.
	Temperatura de *annealing* demasiado alta	Disminuir la temperatura de *annealing*.
	Tiempo de extensión demasiado corto	Incrementar el tiempo de extensión

FUNDING ENTITIES: PARTNERS: ORGANIZERS:

	El termociclador no está a la temperatura correcta	Reparar/calibrar el termociclador o usar otra máquina diferente
PRESENCIA DE BANDAS EXTRA/NO ESPECÍFICAS	Los *primers* se han unido a una segunda región del ADN molde	Diseñar nuevos *primers* que sean más específicos. Incrementar la temperatura de *annealing*.
	Contaminación del ADN, *primers* o cualquier otro reactivo	Si no se ha preparado un control negativo, prepararlo. Preparar reactivos nuevos si se ha encontrado contaminación.
	Demasiado ADN molde	Asegurar la correcta cantidad de ADN molde para la reacción.
	Concentración de *primers* demasiado alta	Asegurar la correcta cantidad de *primers* para la reacción.
	El termociclador no está a la temperatura correcta	Reparar/calibrar el termociclador o usar otra máquina diferente
EXCESIVA CANTIDAD DE ADN AMPLIFICADO	Demasiado ADN molde	Asegurar la correcta cantidad de ADN molde para la reacción.
	Demasiados ciclos en la reacción de PCR	Reducir el número de ciclos de la reacción de PCR.
	Temperatura de *annealing* demasiado baja	Aumentar la temperatura de *annealing*.
	Concentración de *primers* demasiado alta	Asegurar la correcta cantidad de *primers* para la reacción.
	Tiempo de extensión demasiado largo	Reducir el tiempo de extensión

FUNDING ENTITIES: PARTNERS: ORGANIZERS:

	ADN molde de baja calidad	Usar ADN fresco o extraído por otros métodos.
	Demasiado ADN cargado en el gel	Volver a correr el gel añadiendo menos muestra de ADN.

Funding entities: Gobierno de España Ministerio de Ciencia e Innovación FECYT Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología erc Fundación General CSIC
Partners: DROSEU European Drosophila Population Genomics Consortium Genomics, Bioinformatics & Evolutionary Biology UAB Universitat Autònoma de Barcelona
Organizers: LCATM La Ciència Al Teu Món González Lab Evolutionary and Function Genomics

REPORTAR LOS RESULTADOS

Es muy importante informar de los resultados obtenidos a los científicos/as. Para ello, sube tus resultados a la aplicación:

https://melanogaster.eu/appCitizenFlyLab/

VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD

Para nosotros/as es muy importante vuestra valoración. Por favor, contestad a los siguientes cuestionarios escaneando los siguientes códigos QR. Con vuestros comentarios nos ayudaréis a mejorar futuras ediciones del *Citizen Fly Lab*.

Participantes: Docentes:

FORMULARIO REACTIVOS Y MATERIALES

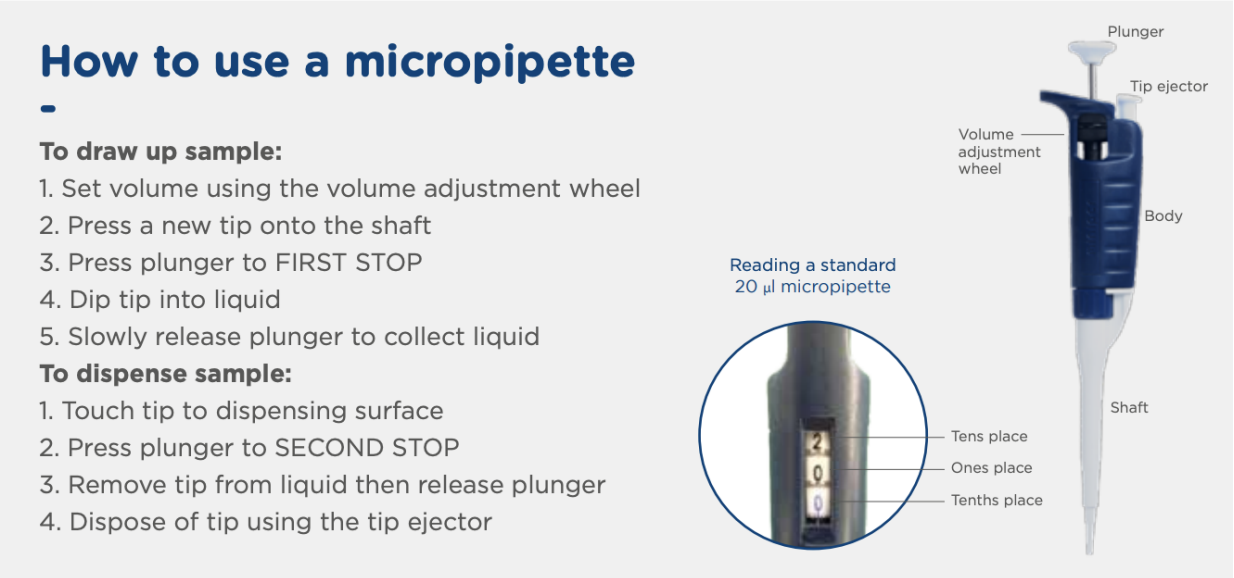
Al acabar la actividad, contestad al siguiente formulario de inventario de reactivos y materiales escaneando el siguiente código QR. Esta información servirá para saber qué reactivos o materiales se tienen que añadir o reemplazar en el kit de la actividad para que los siguientes participantes puedan realizar la actividad con éxito.

https://forms.gle/h8gdWVj4FPVkuhp37

Funding entities: Partners: Organizers:

ANEXO 1. USO DE LAS MICROPIPETAS

La pipeta de la figura es una pipeta para volúmenes de 2 ul ul a 20 ul y permite introducir volúmenes con decimales. Fijaros siempre en los volúmenes de las pipetas y utilizar la que más se ajuste al volumen que queréis pipetear. Las pipetas de 20 ul a 200ul no suelen tener precisión de decimales, para pipetear por ejemplo 50 ul, en el visor tendréis que poner "050", para pipetear 180 tendréis que poner "180".



Funding entities: Ministerio de Ciencia e Innovación · FECYT Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología · erc · Fundación General CSIC
Partners: DROSEU European Drosophila Population Genomics Consortium · Genomics, Bioinformatics & Evolutionary Biology UAB Universitat Autònoma de Barcelona
Organizers: LCATM La Ciència Al Teu Món · González Lab Evolutionary and Function Genomics · IBE

ANEXO 2. CARGAR UN GEL DE ELECTROFORESIS

How to load a gel

• Using a 2-20 µl micropipette with a new tip, pick up the sample you wish to load.

• Load between 5 and 15 µl in the larger wells. Load between 5 and 10 µl in the smaller wells.

• Place the tip of your micropipette just inside the upper edge of the well. There is no need to try to get your tip near the bottom of the well.

• When dispensing liquid into a well, only press the plunger to the first stop. Pressing to the second stop will add bubbles to the well and may displace your sample.

• After dispensing your sample, remove the pipette tip from the buffer before releasing the plunger.

Tips of the trade

• Loading dye is more dense than the buffer your gel sits in. This means your sample will sink when it is added to the well and will displace the liquid that is already there. There is no need to get your tip to the bottom of the well.

• Don't stab the gel. Putting your tip too deep in a well or against the side of the well can result in puncturing the gel. In an agarose gel, this can damage the gel and create a hole that your sample may leak out of. You will know that you have stabbed the well if the sample does not leave the pipette tip when you depress the plunger.

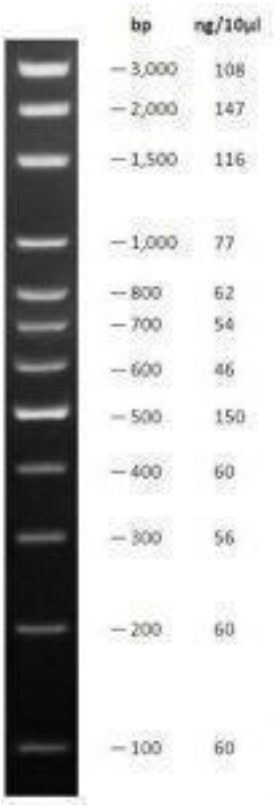
• Two hands on the pipette! You are aiming for a small target. Use your dominant hand to operate the pipette. Use your other hand to steady your pipette by placing a finger on the pipette shaft near where it meets the pipette tip.

• Steady your arms by resting your elbows on the lab bench.

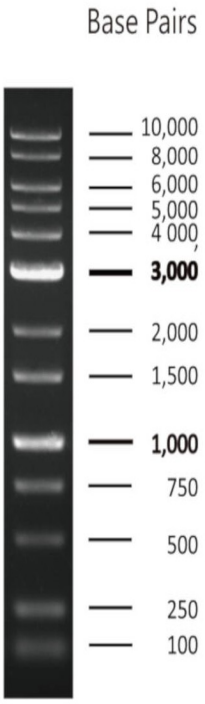
Funding entities: Partners: Organizers:

ANEXO 3.

MARCADOR 100 bp



MARCADOR 1 kb



Funding entities:
Partners:
Organizers: