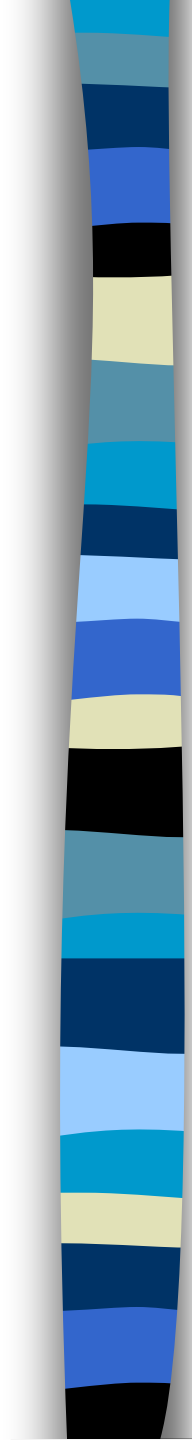




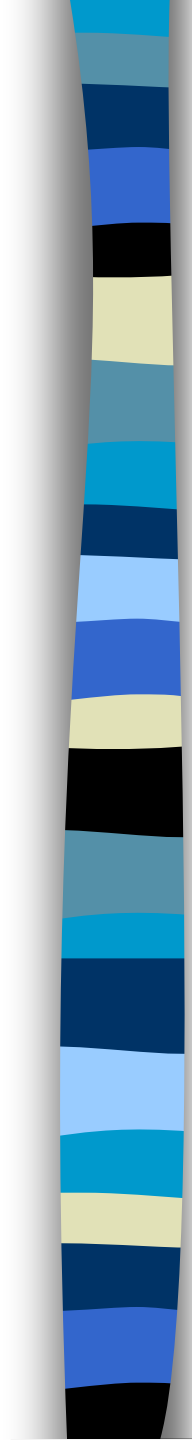
TÈCNIQUES MOLECULARS DE MILLORA GENÈTICA (CURS 2016-2017)

OBJECTIU

Detectar lligament entre un marcador molecular i un gen responsable d'un fenotip mutant.



Sessions	Dates	Activitats
1	23 de març	Fonaments de la pràctica. Preparar l'encreuament parental.
1a (U)	30 de març	Eliminar parentals.
2	6 d'abril	Observar F1 i preparar encreuament prova. Extraure DNA d'individus parentals i de la F1. Preparar PCR amb encebadors RAPD.
2a	12 d'abril	Eliminar parentals.
3	27 d'abril	Electroforesi dels amplificats. Observar F2 i extraure DNA d'individus amb diferents fenotips.
3a	4 de maig	Preparar PCR amb encebador RAPD seleccionat.
4	11 de maig	Electroforesi. Observació dels resultats i anàlisi.



Sessions	Dates	Activitats
1	23 de març	Fonaments de la pràctica. Preparar l'encreuament parental.
1a (U)	30 de març	Eliminar parentals.
2	6 d'abril	Observar F1 i preparar encreuament prova. Extraure DNA d'individus parentals i de la F1. Preparar PCR amb encebadors RAPD.
2a	12 d'abril	Eliminar parentals.
3	27 d'abril	Electroforesi dels amplificats. Observar F2 i extraure DNA d'individus amb diferents fenotips.
3a	4 de maig	Preparar PCR amb encebador RAPD seleccionat.
4	11 de maig	Electroforesi. Observació dels resultats i anàlisi.



OBJECTIU

Detectar lligament entre un marcador molecular i un gen responsable d'un fenotip mutant

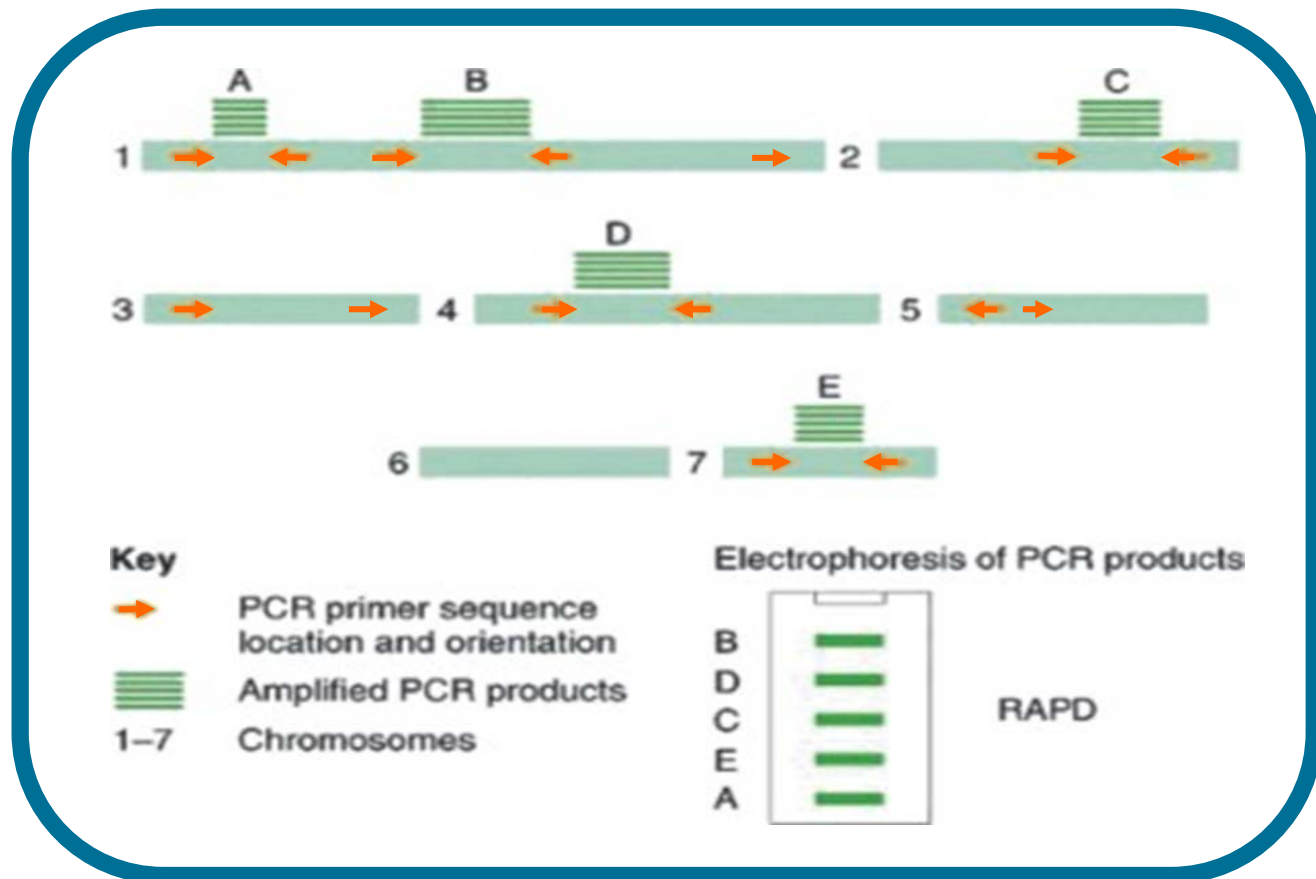
APLICAR els coneixements que heu adquirit en la part teòrica de l'assignatura TÈCNIQUES MOLECULARS EN MILLORA GENÈTICA

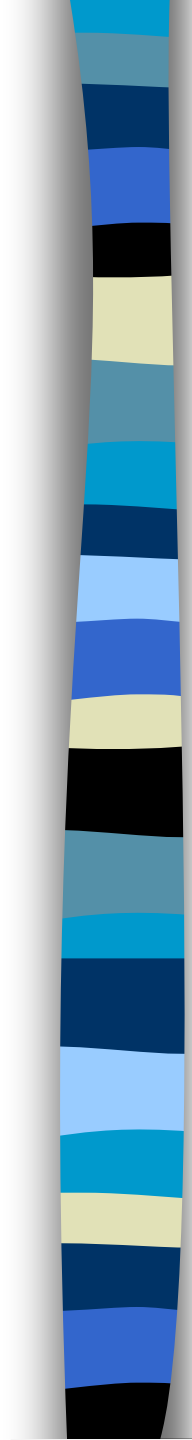
OBJECTIU

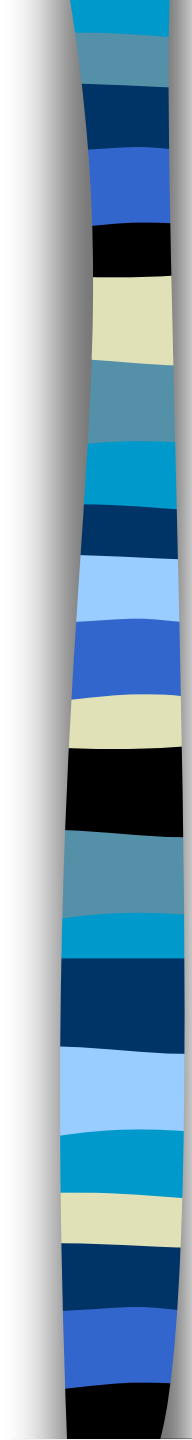
Detectar lligament entre un marcador molecular i un gen responsable d'un fenotip mutant.

- En els sistemes de millora genètica, resulta necessari tenir una estimació de les freqüències al·lèliques existents en la població. Normalment, els gens de interès tenen una herència recessiva.
- La introducció de tècniques de Genètica molecular ha permès augmentar considerablement el nombre d'aquests marcadors genètics.
- El 1990, Williams i col·laboradors van desenvolupar un mètode basat en la tècnica de PCR que tenia com a característica principal que no es requeria, a priori, cap informació sobre seqüències de nucleòtids presents.
- La tècnica es va denominar RAPD-PCR o simplement RAPD, sigles que signifiquen 'DNA polimòrfic amplificat a l'atzar' (Random Amplified Polymorphic DNA).

- El mètode utilitza un encebador curt (10 nucleòtids) el qual pot ser complementari per simple atzar a multitud de llocs dins del genoma.
- Això pot ocórrer en diferents posicions del genoma (8 o 9 bandes).



- 
- El mètode utilitza un encebador curt (10 nucleòtids) el qual pot ser complementari per simple atzar en multitud de llocs dins del genoma.
 - Això pot ocórrer en diferents posicions del genoma (8 o 9 bandes).
 - El nombre i la intensitat de les bandes produïdes quan s'observa l'electroforesi depèn molt de les condicions d'amplificació, incloses la quantitat de DNA de partida, la temperatura d'hibridació, etc.
 - Si s'aconsegueixen unes condicions de bona reproductibilitat, es pot detectar la presència de polimorfismes en el DNA entre soques o individus que solen basar-se en el canvi d'algun nucleòtid de la seqüència complementària a l'encebador o de la presència de delecions, insercions i altres alteracions de la seqüència de DNA.

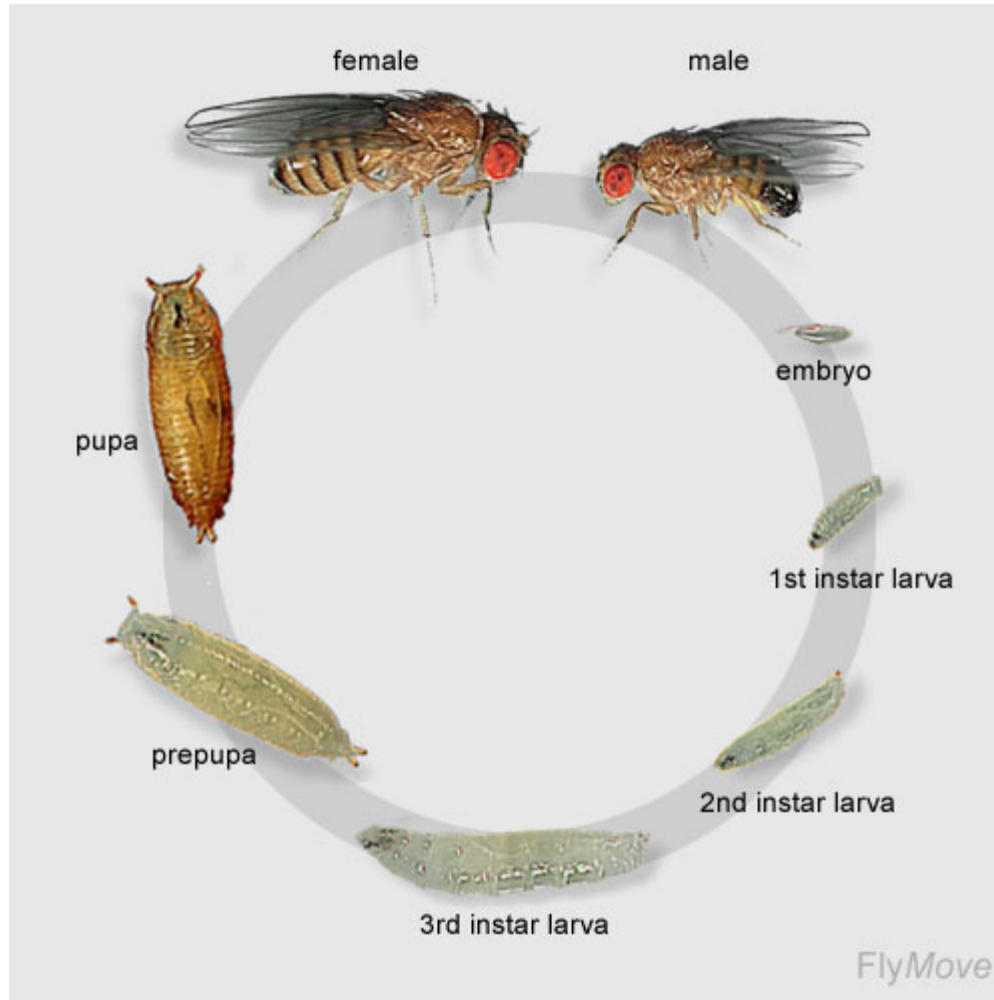
- 
- Un marcador molecular localitzat a una distància molt curta del gen problema pot ser utilitzat per a seguir un gen responsable d'un fenotip recessiu.
 - La detecció d'un marcador genètic estretament lligat al gen que produeix cert fenotip mutant pot permetre dur a terme aproximacions per a l'aïllament d'aquest gen (clonació posicional).
 - El marcador també pot ser utilitzat en poblacions per fer una estimació dels al·lels presents del gen d'interès.



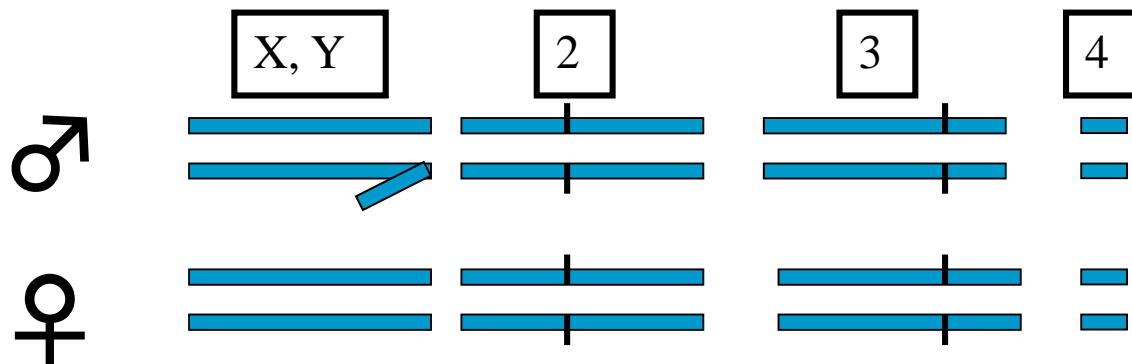
OBJECTIU

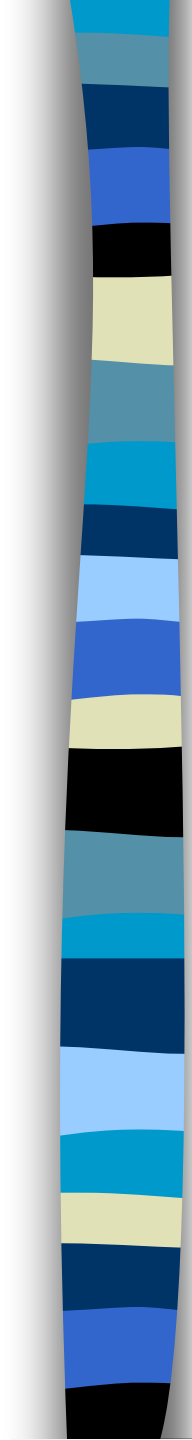
Detectar lligament entre un marcador molecular i un gen responsable d'un fenotip mutant

The life cycle of *Drosophila melanogaster*

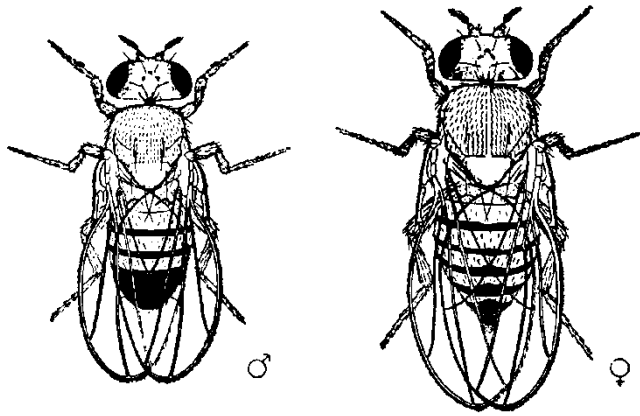


- ✓ *Drosophila melanogaster* té tres parells d'autosomes (cromosomes 2, 3 i 4) i un parell de cromosomes sexuals (cromosomes X i Y).
- ✓ Els cromosomes 2 i 3 són metacèntrics i el 4 és puntiforme.
- ✓ Els cromosomes sexuals són telocèntrics.

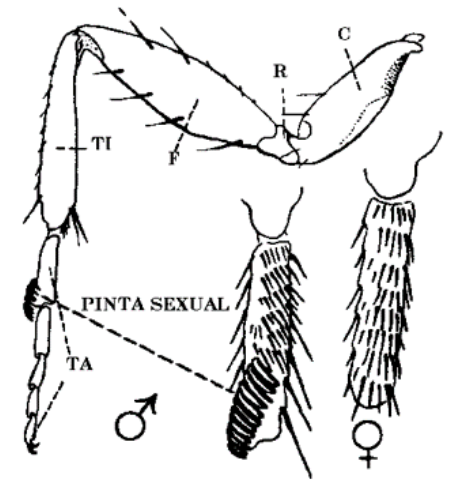


- 
- ✓ La determinació del sexe en aquest organisme és XX per a les femelles i XY per als mascles.
 - ✓ Els mascles no recombinen.

Mascles i femelles de *Drosophila* es diferencien en adults i nimfes.



Pintes sexuals



MATERIAL

Marcador fenotípic → color d'ulls:

- al·lel dominant (+), ulls rojos
- al·lel recessiu Hn^{r3} (h), ulls foscos



Or-R





Hn^{r3}

Marcador molecular → banda RAPD:


- al·lel dominant (B), banda present
- al·lel recessiu (b), banda absent

Encreuament parental:



Fenotips	Ulls foscos	Ulls rojos (salvatge)
		
Genotips	hh bb	++ BB

F1

Fenotip	Ulls rojos (salvatge)
	
Genotip	h+ Bb

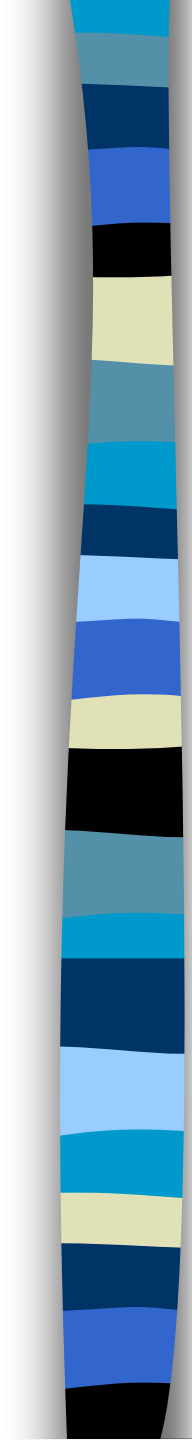


Encreuament prova:

Femelles de la F1 x Mascles Hn^{r-3}



Observació de color d'ulls i marcador molecular...
Lligament?



Sessions	Dates	Activitats
1	23 de març	Fonaments de la pràctica. Preparar l'encreuament parental.
1a (U)	30 de març	Eliminar parentals.
2	6 d'abril	Observar F1 i preparar encreuament prova. Extraure DNA d'individus parentals i de la F1. Preparar PCR amb encebadors RAPD.
2a	12 d'abril	Eliminar parentals.
3	27 d'abril	Electroforesi dels amplificats. Observar F2 i extraure DNA d'individus amb diferents fenotips.
3a	4 de maig	Preparar PCR amb encebador RAPD seleccionat.
4	11 de maig	Electroforesi. Observació dels resultats i anàlisi.



Observació dels individus (Eter)

1. Es prepara l'eterificador (una ampolla o tub de vidre) amb un embut amb tap.
2. Es pren la botella on hi ha els adults i es colpeja suaument en un suro perquè caiguen cap al fons.
3. Es retira el cotó i es bolca el pot sobre l'eterificador.
4. Es tapa l'eterificador amb un cotó impregnat d'èter.
5. Quan les mosques estan adormides s'aboquen a un paper i s'observen amb la lupa.



Consells pràctics

1. Una exposició prolongada a l'èter els pot **produir la mort**.
2. Cal mantenir **tancada la botella del cultiu**.
3. **No deixeu obert l'eterificador** i l'ampolla d'èter. No fumeu.
4. Comproveu que no queden mosques al fons de l'eterificador.
5. Reeterifiqueu (si cal), sense matar-les.
6. Per a facilitar l'observació dels individus és recomanable que alineeu totes les mosques a la cartolina.
7. Quan es retornen les mosques adormides a una botella de cultiu amb menjar, poseu-les en un cucurutxo de paper, que també s'ha de deixar dins de la botella.

En finalitzar l'observació, els individus que no ens interessin s'han d'introduir en un flascó (*morgue*) que conté oli o una barreja [H₂O: EtOH: èter] que n'evita la descomposició.



Tasca experimental (per parelles)

1. Anoteu minuciosament i ordenadament tota la tasca desenvolupada al laboratori.
2. Observeu el fenotip mutant (Hn^{r3}) i compareu-lo amb el salvatge (Or-R).
3. Cada alumne ha de triar tres nimfes femelles de la soca Or-R.
4. Cada alumne ha de preparar un tub per a fer l'encreuament.
5. Introduïu les nimfes separades en els tubs. Retoleu cada tub amb l'encreuament fet.



Tasca experimental (per parelles)

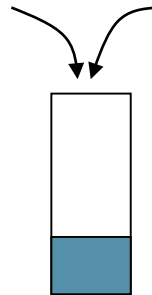
6. Adormiu els adults Or-R corresponents. Observeu els fenotips i compareu-los amb Hn^{r3} .
7. Trieu huit mascles.
8. Introduïu quatre mascles a cada un dels tubs preparats, abans que desperten.
9. Poseu els tubs a la safata.
10. Netegeu i ordeneu tot el lloc de treball.

1ª setmana: encreuament parental

3 nimfes Or-R



4 adults Hn^{r3}



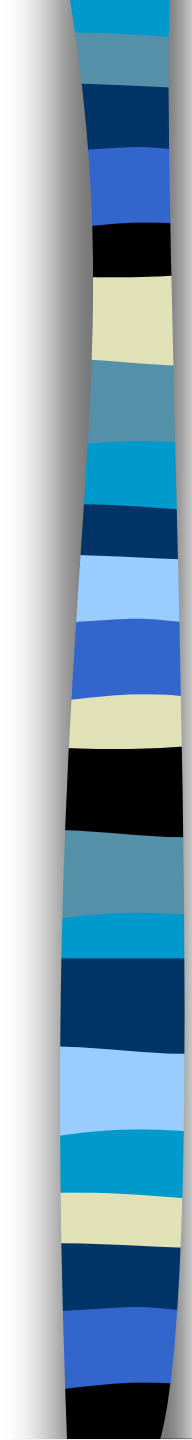
Cada parella prepara dos tubs.



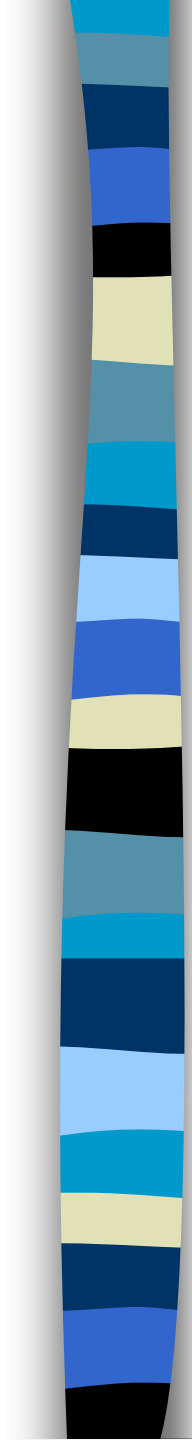
TÈCNIQUES MOLECULARS DE MILLORA GENÈTICA (CURS 2016-2017)

OBJECTIU

Detectar lligament entre un marcador molecular i un gen responsable d'un fenotip mutant.



Sessions	Dates	Activitats
1	23 de març	Fonaments de la pràctica. Preparar l'encreuament parental.
1a (U)	30 de març	Eliminar parentals.
2	6 d'abril	Observar F1 i preparar encreuament prova. Extraure DNA d'individus parentals i de la F1. Preparar PCR amb encebadors RAPD.
2a	12 d'abril	Eliminar parentals.
3	27 d'abril	Electroforesi dels amplificats. Observar F2 i extraure DNA d'individus amb diferents fenotips.
3a	4 de maig	Preparar PCR amb encebador RAPD seleccionat.
4	11 de maig	Electroforesi. Observació dels resultats i anàlisi.



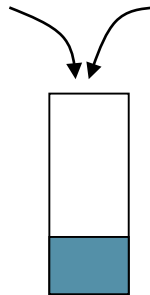
Sessions	Dates	Activitats
1	23 de març	Fonaments de la pràctica. Preparar l'encreuament parental.
1a (U)	30 de març	Eliminar parentals.
2	6 d'abril	Observar F1 i preparar encreuament prova. Extraure DNA d'individus parentals i de la F1. Preparar PCR amb encebadors RAPD.
2a	12 d'abril	Eliminar parentals.
3	27 d'abril	Electroforesi dels amplificats. Observar F2 i extraure DNA d'individus amb diferents fenotips.
3a	4 de maig	Preparar PCR amb encebador RAPD seleccionat.
4	11 de maig	Electroforesi. Observació dels resultats i anàlisi.

1ª setmana: encreuament parental

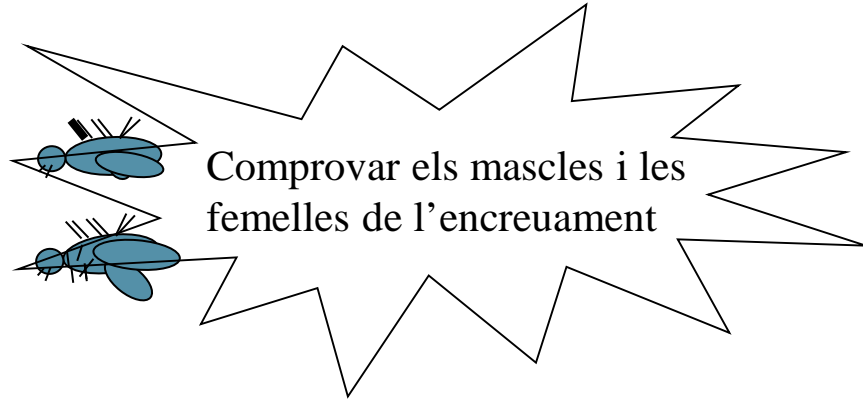
3 nimfes Or-R



4 adults Hn^{r3}



2a setmana: comprovar, treure i guardar
parentals



Matar parentals

**Guardar els individus parentals
ben identificats**

Encreuament parental:



Hn^{r-3}



Or-R

Fenotips

Ulls foscos

Ulls rojos (salvatge)



Genotips

hh bb

++ BB

F1

Fenotip

Ulls rojos (salvatge)



Genotip

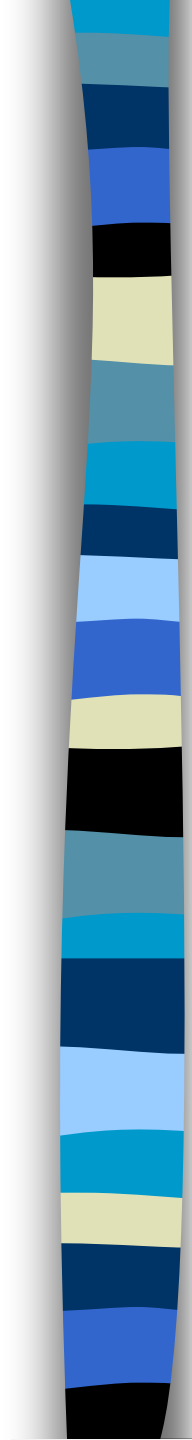
h+ Bb



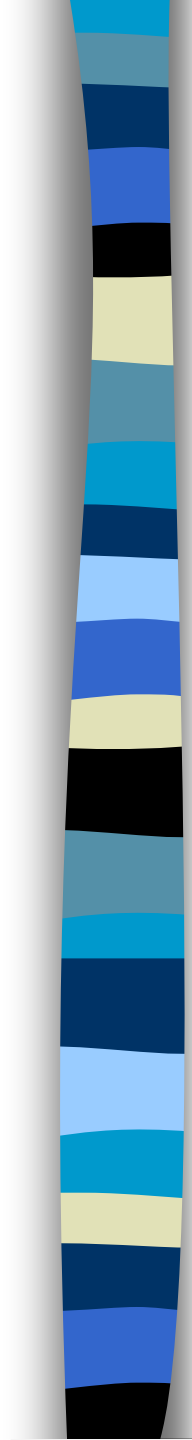
TÈCNIQUES MOLECULARS DE
MILLORA GENÈTICA
(CURS 2016-2017)

OBJECTIU

Detectar lligament entre un marcador molecular i un gen responsable d'un fenotip mutant.



Sessions	Dates	Activitats
1	23 de març	Fonaments de la pràctica. Preparar l'encreuament parental.
1a (U)	30 de març	Eliminar parentals.
2	6 d'abril	Observar F1 i preparar encreuament prova. Extraure DNA d'individus parentals i de la F1. Preparar PCR amb encebadors RAPD.
2a	12 d'abril	Eliminar parentals.
3	27 d'abril	Electroforesi dels amplificats. Observar F2 i extraure DNA d'individus amb diferents fenotips.
3a	4 de maig	Preparar PCR amb encebador RAPD seleccionat.
4	11 de maig	Electroforesi. Observació dels resultats i anàlisi.



Sessions	Dates	Activitats
1	23 de març	Fonaments de la pràctica. Preparar l'encreuament parental.
1a (U)	30 de març	Eliminar parentals.
2	6 d'abril	Observar F1 i preparar encreuament prova. Extraure DNA d'individus parentals i de la F1. Preparar PCR amb encebadors RAPD.
2a	12 d'abril	Eliminar parentals.
3	27 d'abril	Electroforesi dels amplificats. Observar F2 i extraure DNA d'individus amb diferents fenotips.
3a	4 de maig	Preparar PCR amb encebador RAPD seleccionat.
4	11 de maig	Electroforesi. Observació dels resultats i anàlisi.



OBJECTIU

Detectar lligament entre un marcador molecular i un gen responsable d'un fenotip mutant.

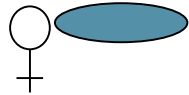
MATERIAL

Henna recessive-3 (Hn^{r3}): ulls de color roig fosc que es tornen gairebé negres amb l'edat.

Or-R: ulls rojos.

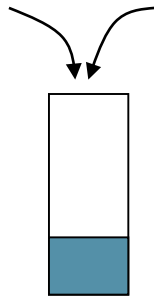
1a setmana:
encreuament
parental

3 nimfes *Or-R*

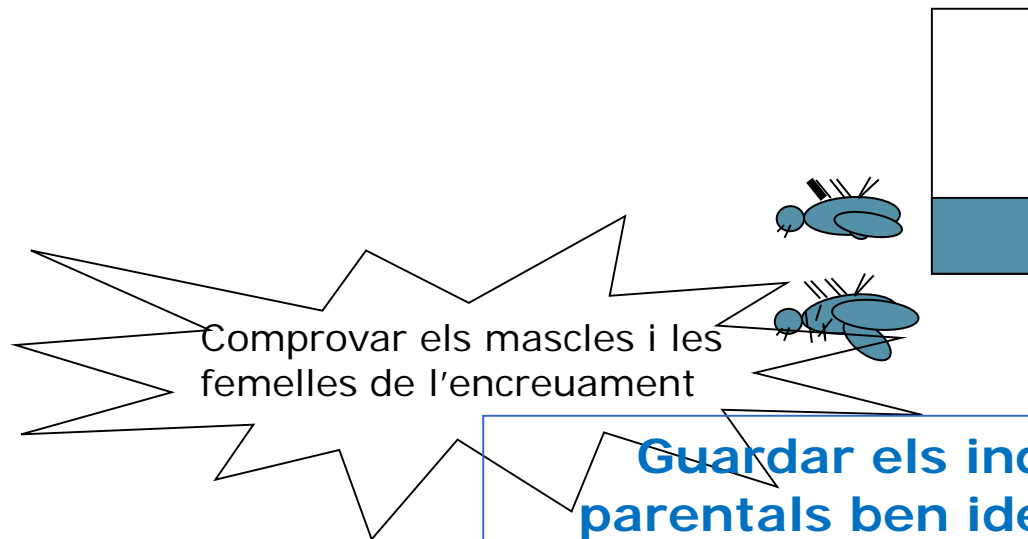


X

4 adults *Hn^{r3}*



2a setmana:
comprovar i
eliminar
parentals



3a setmana:

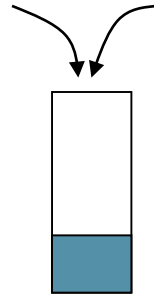
- Observació de la F1
- Encreuament prova

4 nimfes F1



×

4 adults Hn^{r3}



Metodologia

- ✓ Extracció d'ADN genòmic.
- ✓ Reacció d'amplificació per PCR.

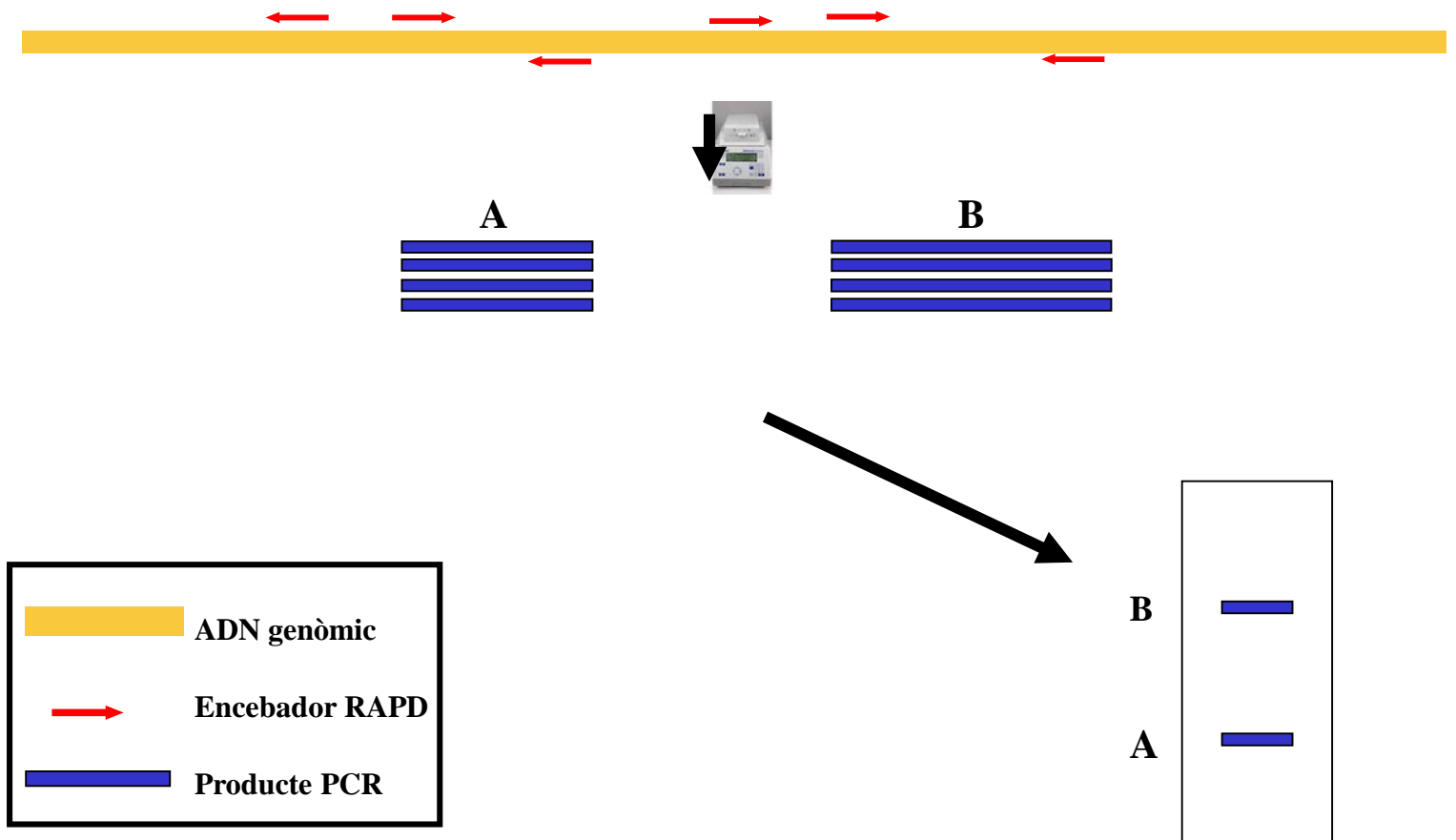
➤ Detectar marcadors de tipus RAPD



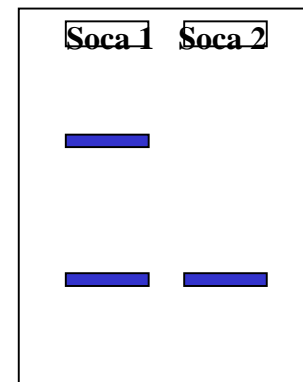
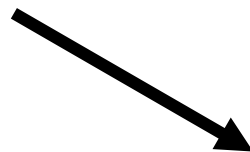
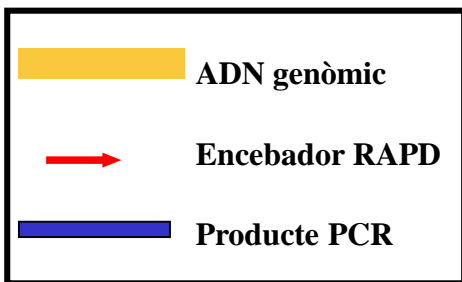
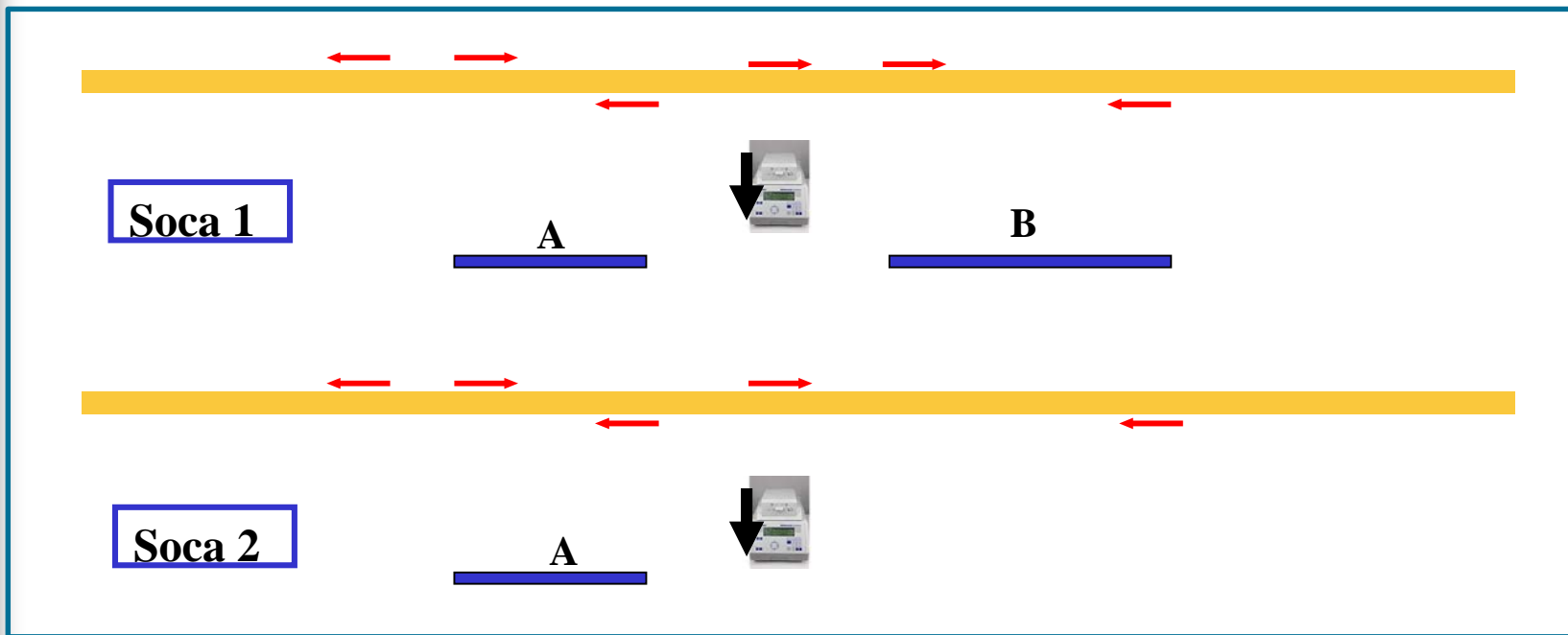
RAPD (Random Amplified Polymorphic ADN o DNA polimòrfic amplificat a l'atzar)

- Es sintetitzen uns encebadors molt curts de seqüència triada a l'atzar.
- Al principi es desconeix a quins llocs del genoma s'uniran els encebadors.
- Quan l'encebador s'uneix a dues zones properes (menys de 2 kb), si ho fa en cadenes complementàries i en l'orientació adequada, es pot produir l'amplificació d'un petit fragment d'ADN.

Cada individu pot produir un patró de fragments. Els fragments obtinguts a l'atzar permeten obtenir ràpidament un gran nombre de marcadors genètics que es comporten com UNITATS mendelianes.



Encreuament de dues soques que difereixen en una banda de RAPD



RAPD

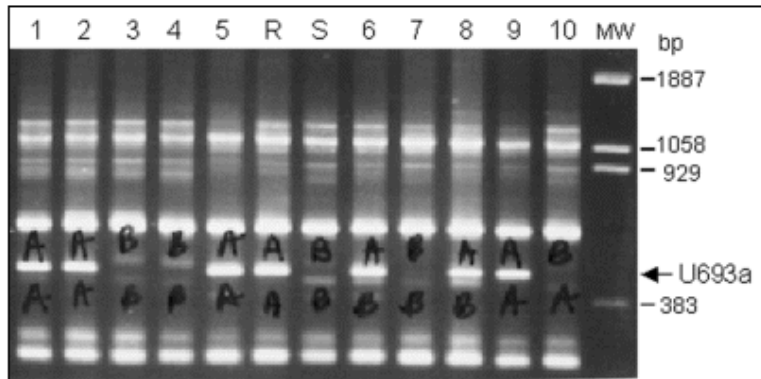
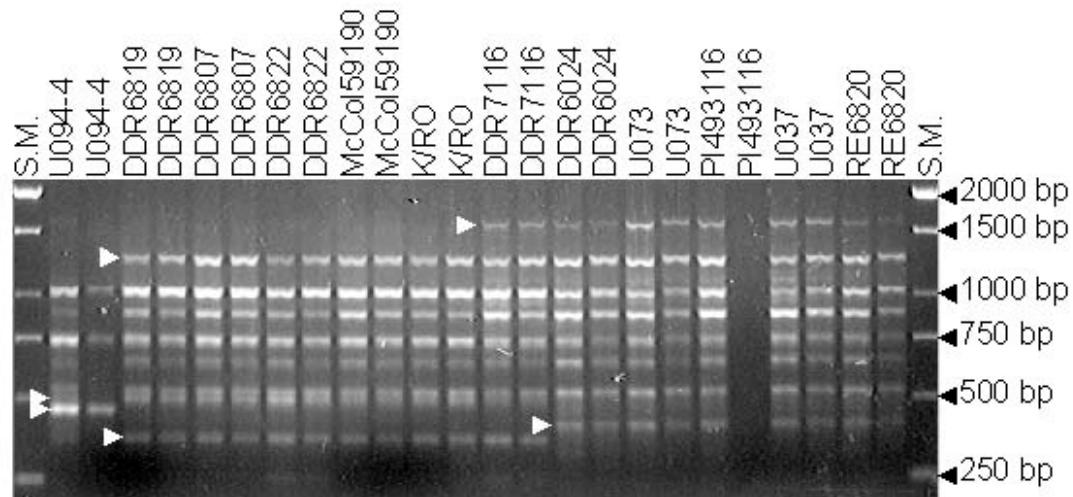
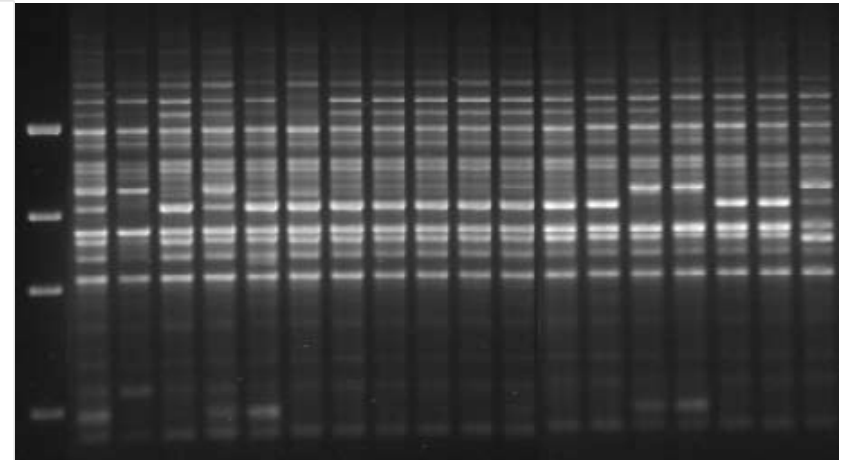


Fig. 2. Segregation of RAPD U693a (arrow) in resistant (R) 74SN3B and susceptible (S) A83-22-4(e)-A parental lines and a subset of recombinant inbred lines (1-10) from the mapping population.





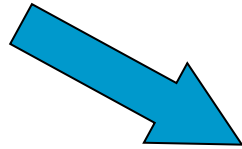
Requisits que ha de complir el primer o encebador perquè siga un marcador molecular d'interés:

- El marcador (banda amplificada pel primer) **ha d'estar present en una de les soques parentals (a la població Or-R (+ / +)) i completament absent en l'altra.** Serà la primera indicació que el marcador està associat a la soca paterna.
- EL marcador tipus RAPD (la banda amplificada) **ha de detectar-se en TOTS els individus de la F1.**
 - Això ens confirmarà que el marcador està present en homozigosi en la soca paterna, és a dir, està fixat en la població parental.
 - El marcador es comportarà com una unitat mendeliana, com un marcador dominant.

Si hi ha un encebador que després de la reacció PCR amplifica una banda que compleix tots aquests requisits, podem dir que el marcador està fixat en la soca paterna i s'hereta mendelianament.

Lligament

- Disposem d'una soca amb fenotip normal per al caràcter estudiat (+) i una soca amb fenotip mutant per a aquest caràcter (m).
- S'extrau ADN genòmic de les dues soques, i es fa una PCR amb varios encebadors curts de seqüència a l'atzar.

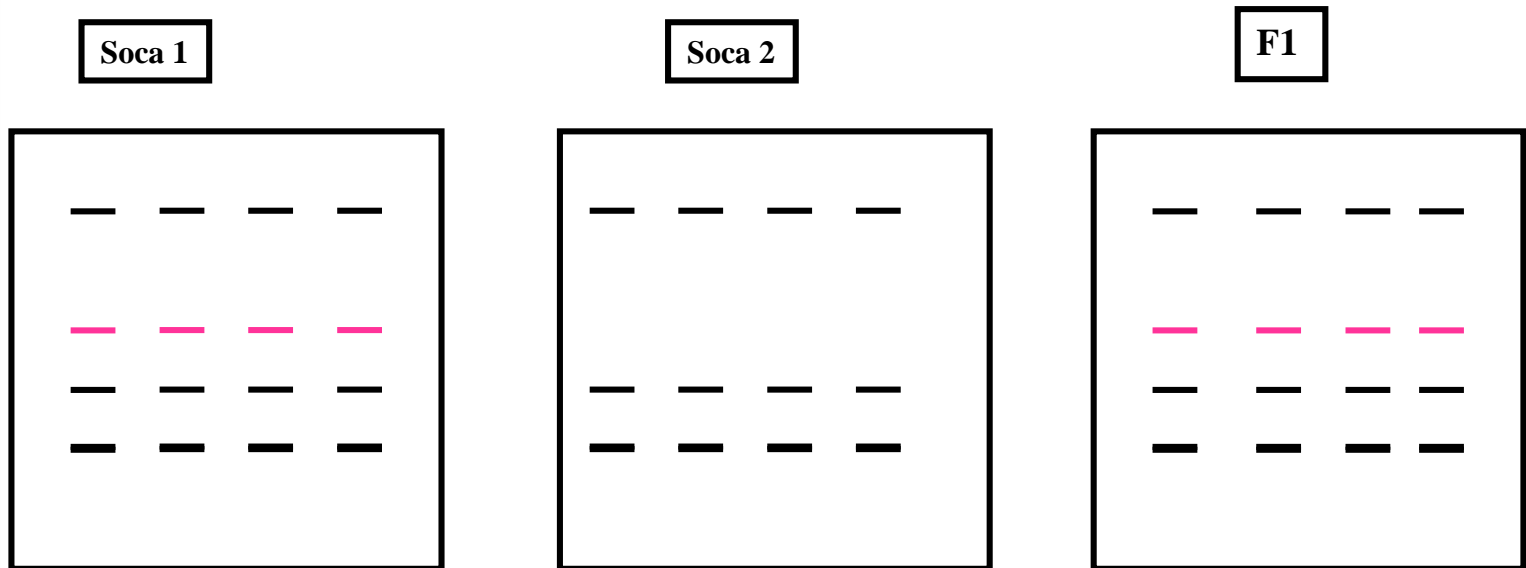


RESULTAT DE LA PCR



Triar un marcador de tipus RAPD que ens dóna resultats diferents en les dues soques (normal i mutant).

1. Polimorfisme: banda que apareix en la soca 1 i no apareix en la soca 2.
2. La banda ha d'estar present en tots els individus de la soca 1, i absent en tots els individus de la soca 2.
3. Transmissió mendeliana del polimorfisme.



Encreuament parental:

Hn^{r-3}
Ulls foscós

Or-R
Ulls rojos (salvatge)



hhbb



++BB

F1

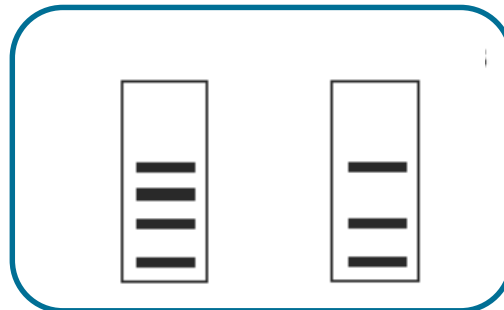
Ulls rojos (salvatge)



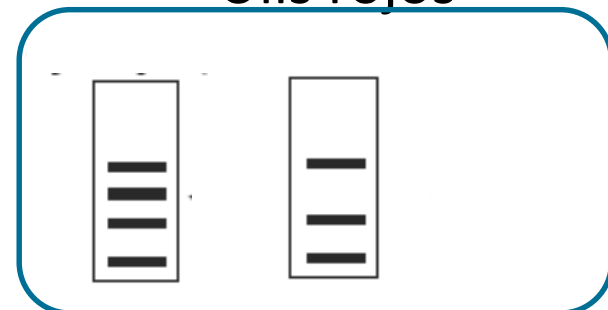
h+Bb

F2

Ulls foscós



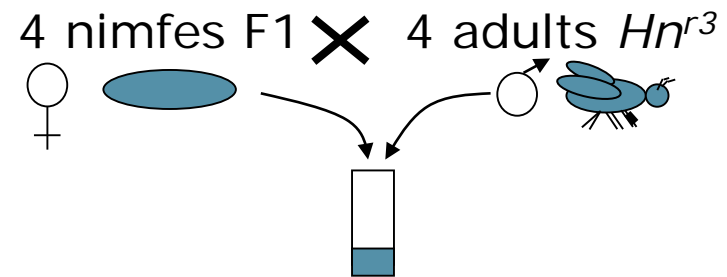
Ulls rojos



Objetius

- Detectar marcadors de tipus RAPD que diferisquen entre la soca Or-R i la soca Hn^{r3}
- Comprovar lligament del marcador amb el locus Hn^{r3} en la F2 de l'encreuament entre aquestes dues soques.
- En cas de trobar lligament, s'ha de determinar la freqüència de recombinació entre el marcador detectat i el locus Hn^{r3} .

- **OBSERVACIÓ DE LA F1**
- **ENCREUAMENT PROVA**



- **EXTRACCIÓ DE L'ADN GENÒMIC:**
EXTRACCIÓ DE L'ADN TOTAL A PARTIR D'UN INDIVIDU

Cada parella ha de processar sis insectes (si pot ser) dels encreuaments:

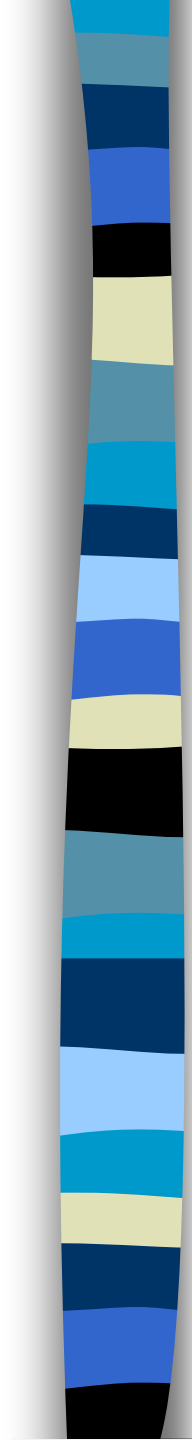
- + dos adults **parentals de fenotip salvatge** (ulls rojos)
- + dos adults **parentals mutants** d'ulls foscos
- + dos adults de la **F1** (heterozigots)

EXTRACCIÓ DE L'ADN TOTAL A PARTIR D'UN INDIVIDU

1. Afegiu 160 µl de dissolució I freda, i homogeneïtzeu amb una vareta o punta blava.
2. Afegiu 200 µl de dissolució II i agiteu per inversió diverses vegades.
3. Incubeu a 65 °C durant 30 min (**no s'ha d'acurtar el temps de la incubació**).
4. Afegiu 60 µl d'acetat potàssic 3 M (pH = 5.0) fred. S'ha d'agitar per inversió diverses vegades.
5. Incubeu 20 min a – 20 °C.

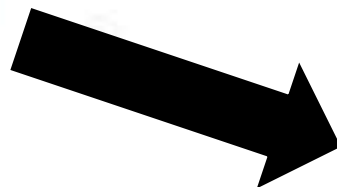
Dissolució I (Tris 10 mM, NaCl 60 mM, sacarosa 5%, EDTA 10 mM, pH 7.8)

Dissolució II (Tris 300 mM, SDS 1,25%, sacarosa 5%, EDTA 10 mM, pH = 8.0)

- 
6. Centrifugueu deu minuts a màxima velocitat en una microcentrifugadora.
 7. Transferiu el sobrenadant a un nou tub i afegiu el mateix volum d'isopropanol. Agiteu per inversió.
 8. Incubeu 5 minuts a temperatura ambient.
 9. Centrifugueu 10 minuts i rebutgeu el sobrenadant.
 10. Renteu el precipitat amb 500 μ l d'etanol 70%.
 11. Centrifugueu 3 minuts, rebutgeu el sobrenadant i assequeu al buit.
 12. Suspeneu de nou en 50 μ l de TE.

TE (TrisHCl 10 mM, 1 mM EDTA; pH = 8.0)

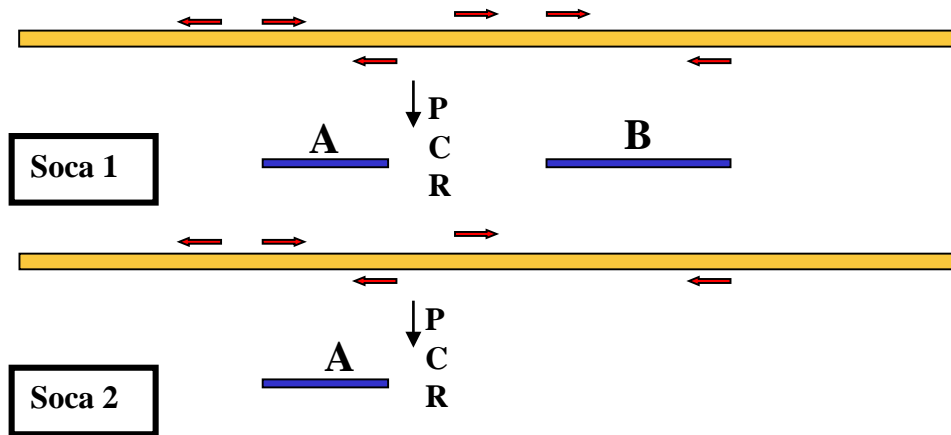
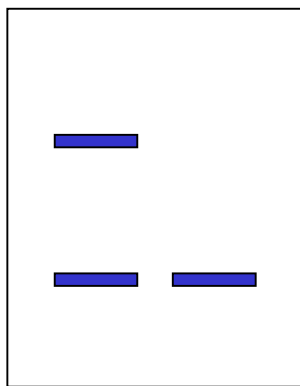
Cada adult



PCR amb diferents
encebadors que
generen bandes
diferents entre
les dues soques
parentals
(polimorfisme)

- Encebador 1
- Encebador 2
- Encebador 3
- Encebador 4

Electroforesi amb l'
encebador 1/2/3/4



AMPLIFICACIÓ D'ADN PER RAPD-PCR

- ✓ **Tampó de la Taq polimerasa** (50 mM KCl,, 10 mM Tris ClH pH = 9.0), (solució estoc a 10X): 4 μ l
- ✓ 1,5 mM MgCl₂: 2,5 μ l
- ✓ 250 μ M dels quatre desoxinucleòtids (**dNTP**), (solució estoc a 5 mM): 2 μ l
- ✓ 2,5 unitats de la **Taq polimerasa** (estoc a 5 U/ μ l): 0,5 μ l
- ✓ 0.2 μ M d'**encebador** (solució estoc a 2 μ M): 4 μ l
- ✓ **Aigua**: 25 μ l
- ✓ **ADN**: 2 μ l

Còctel (15 reaccions per encebador)

- ✓ Tampó de la Taq polimerasa: 60 μ l
- ✓ MgCl₂: 37,5
- ✓ dNTP: 30 μ l
- ✓ Taq polimerasa: 7,5 μ l
- ✓ **Encebador**: 60 μ l
- ✓ Aigua: 375 μ l

2 μ l **ADN** d'un individu

38 μ l del còctel



AMPLIFICACIÓ D'ADN PER RAPD-PCR

38 μ l del còctel, amb tots els components necessaris per a l'amplificació, excepte l'ADN.

2 μ l ADN d'un individu (aproximadament 5 ng d'ADN).



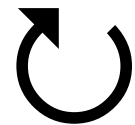
Cada costat de cada bancada ha de fer servir un encebador.

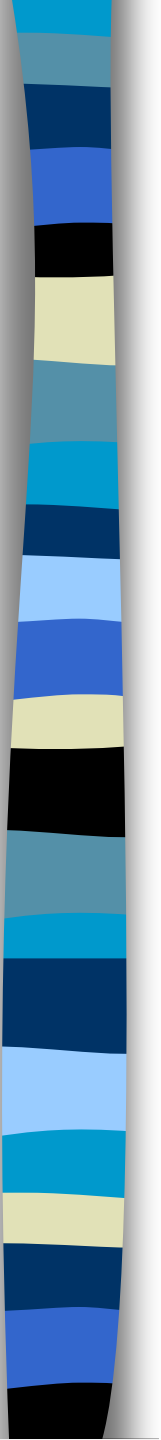
El volum total de la reacció ha de ser de 40 μ l.

Condicions de l'amplificació

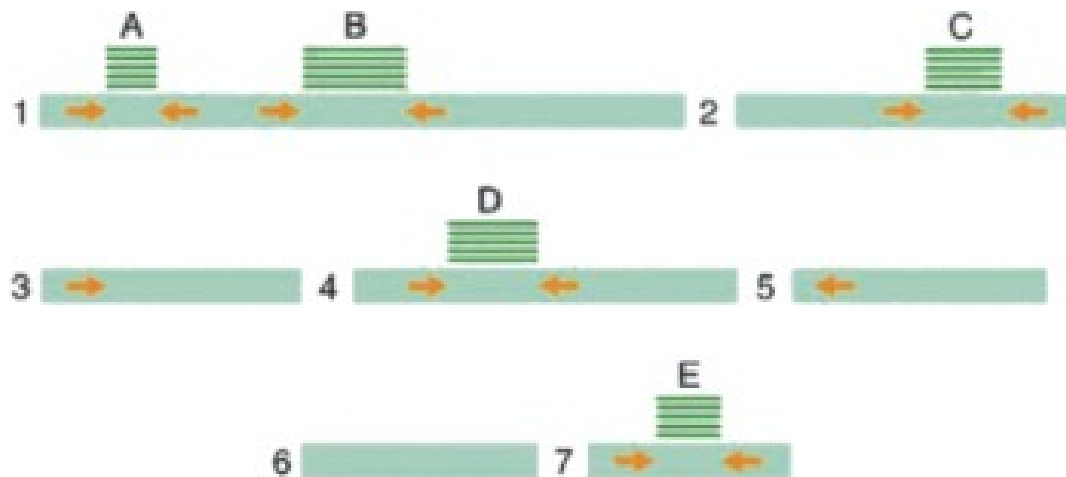
Els tubs amb la barreja de PCR s'han de col·locar en un termociclador i s'hi ha d'aplicar el programa següent (nom TAG):

Pas	Cicles	Temperatura	Durada	
1	1	94 °C	5 min	Desnaturalització inicial
2	40	94 °C	60 s	Desnaturalització
		38 °C	60 s	Hibridació
		72 °C	70 s	Elongació
3	1	72 °C	4 min	Extensió final
4	1	4 °C	∞	







Cada individu pot produir un patró de fragments. Els fragments obtinguts a l'atzar permeten obtenir ràpidament un gran nombre de marcadors genètics que es comporten com UNITATS mendelianes.



Key

-  PCR primer sequence location and orientation
-  Amplified PCR products
- 1-7 Chromosomes

Electrophoresis of PCR products



MATERIAL

Marcador fenotípic → Color d'ulls:

- al·lel dominant (+), ulls rojos
- al·lel recessiu Hn^{r3} (h), ulls foscos



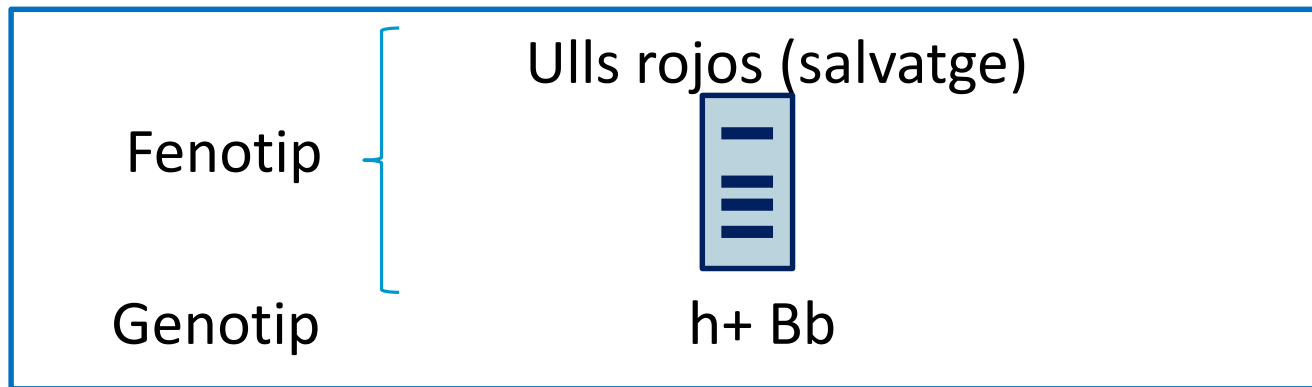
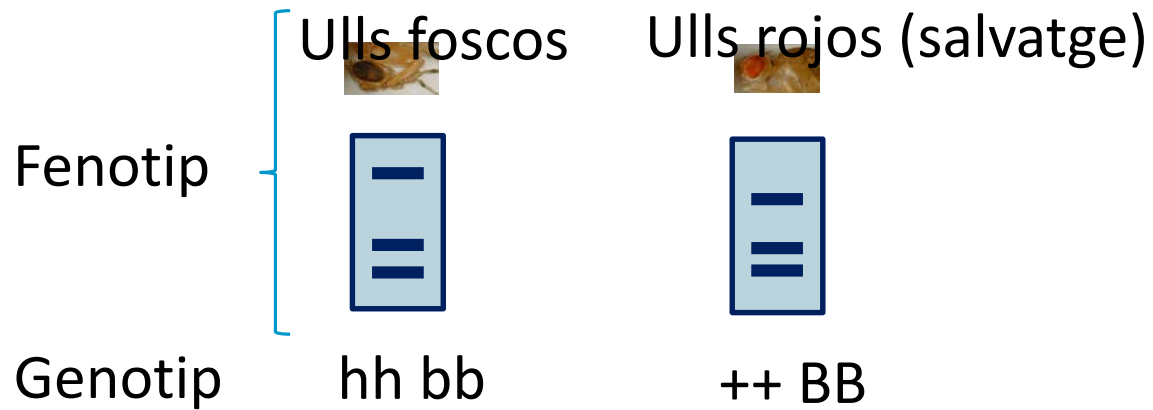
Or-R



Hn^{r3}

Marcador molecular → Banda RAPD:

- al·lel dominant (B), banda present
- al·lel recessiu (b), banda absent



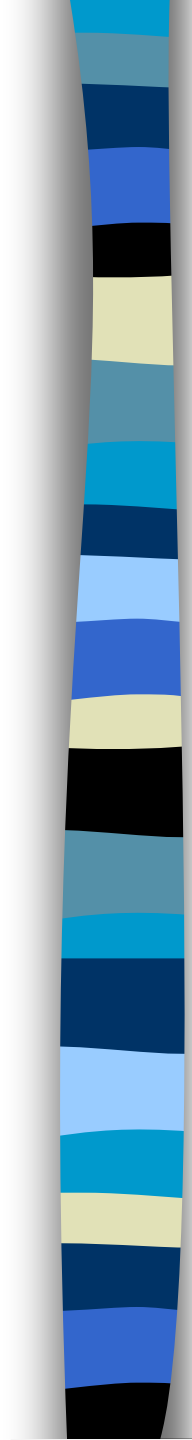
➤ Determinar el fenotip de la F1 i fer l'encreuament prova.



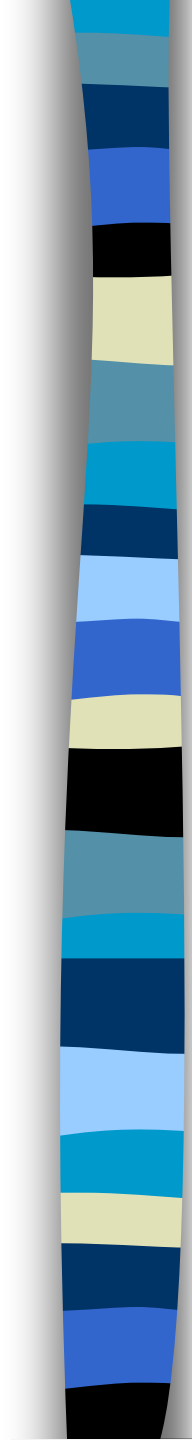
TÈCNIQUES MOLECULARS DE
MILLORA GENÈTICA
(CURS 2016-2017)

OBJECTIU

**Detectar lligament entre un marcador
molecular i un gen responsable d'un
fenotip mutant.**

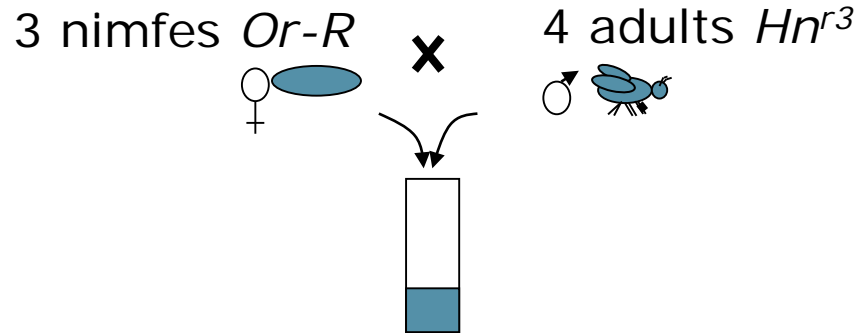


Sessions	Dates	Activitats
1	23 de març	Fonaments de la pràctica. Preparar l'encreuament parental.
1a (U)	30 de març	Eliminar parentals.
2	6 d'abril	Observar F1 i preparar encreuament prova. Extraure DNA d'individus parentals i de la F1. Preparar PCR amb encebadors RAPD.
2a	12 d'abril	Eliminar parentals. Electroforesi dels amplificats.
3	27 d'abril	Observar F2 i extraure DNA d'individus amb diferents fenotips.
3a	4 de maig	Preparar PCR amb encebador RAPD seleccionat.
4	11 de maig	Electroforesi. Observació dels resultats i anàlisi.

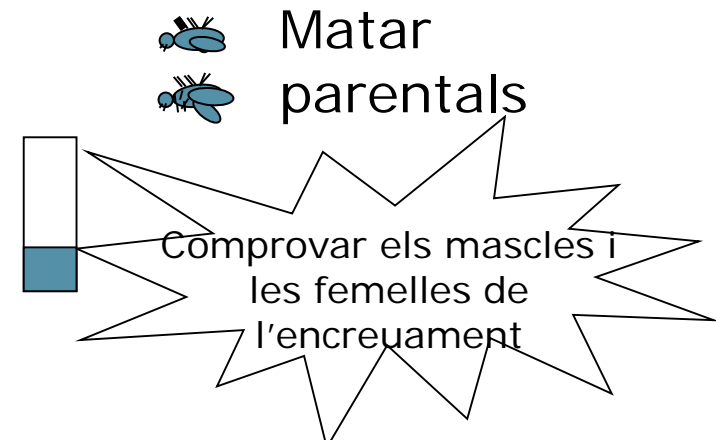


Sessions	Dates	Activitats
1	23 de març	Fonaments de la pràctica. Preparar l'encreuament parental.
1a (U)	30 de març	Eliminar parentals.
2	6 d'abril	Observar F1 i preparar encreuament prova. Extraure DNA d'individus parentals i de la F1. Preparar PCR amb encebadors RAPD.
2a	12 d'abril	Eliminar parentals. Electroforesi dels amplificats.
3	27 d'abril	Observar F2 i extraure DNA d'individus amb diferents fenotips.
3a	4 de maig	Preparar PCR amb encebador RAPD seleccionat.
4	11 de maig	Electroforesi. Observació dels resultats i anàlisi.

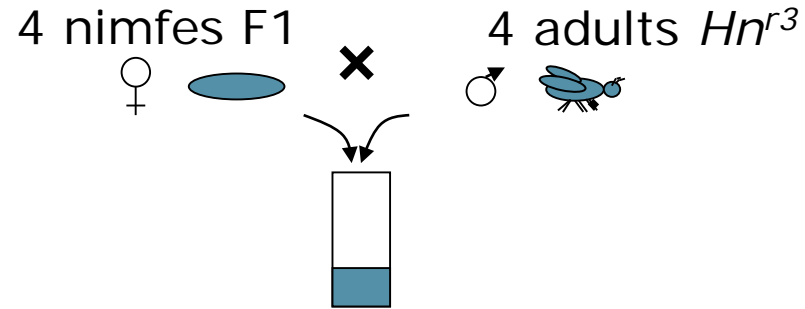
1a setmana: encreuament parental



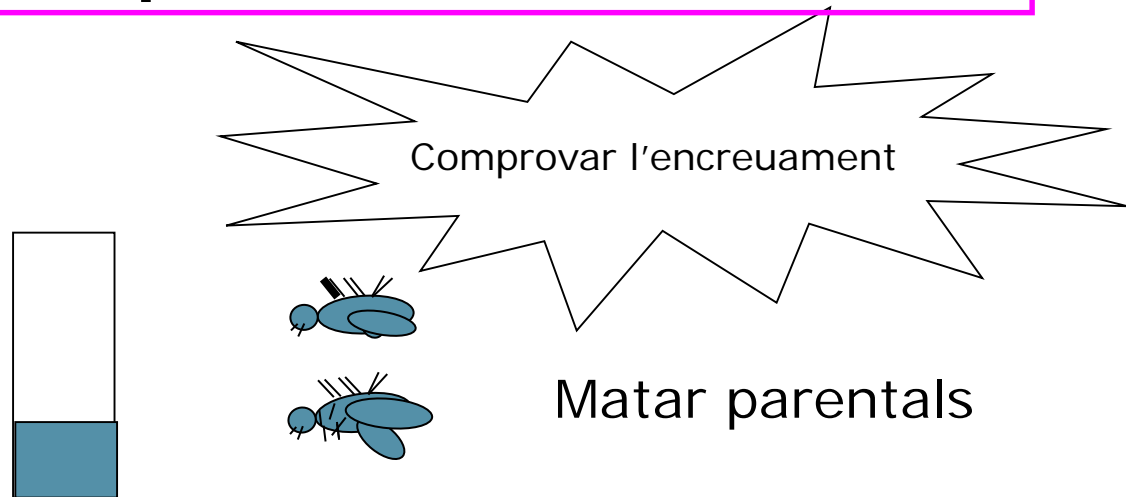
2a setmana: comprovar i eliminar parentals



3a setmana: encreuament prova



4a setmana: comprovar i eliminar parentals



- Observar 20 insectes de la F1



RAPD:

Electroforesi dels amplificats de PCR en gel d'agarosa

Es procedirà a la **càrrega del gel**, a partir d'agarosa al 0,8% (p / v) en tampó TBE 1x (0,1 M Tris-borat, 0.002 M EDTA, pH 8.0).

4 μ l solució càrrega (6x)

20 μ l DNA amplificat

TOTAL = 24 μ l

5 μ l marcador de mida de l'ADN

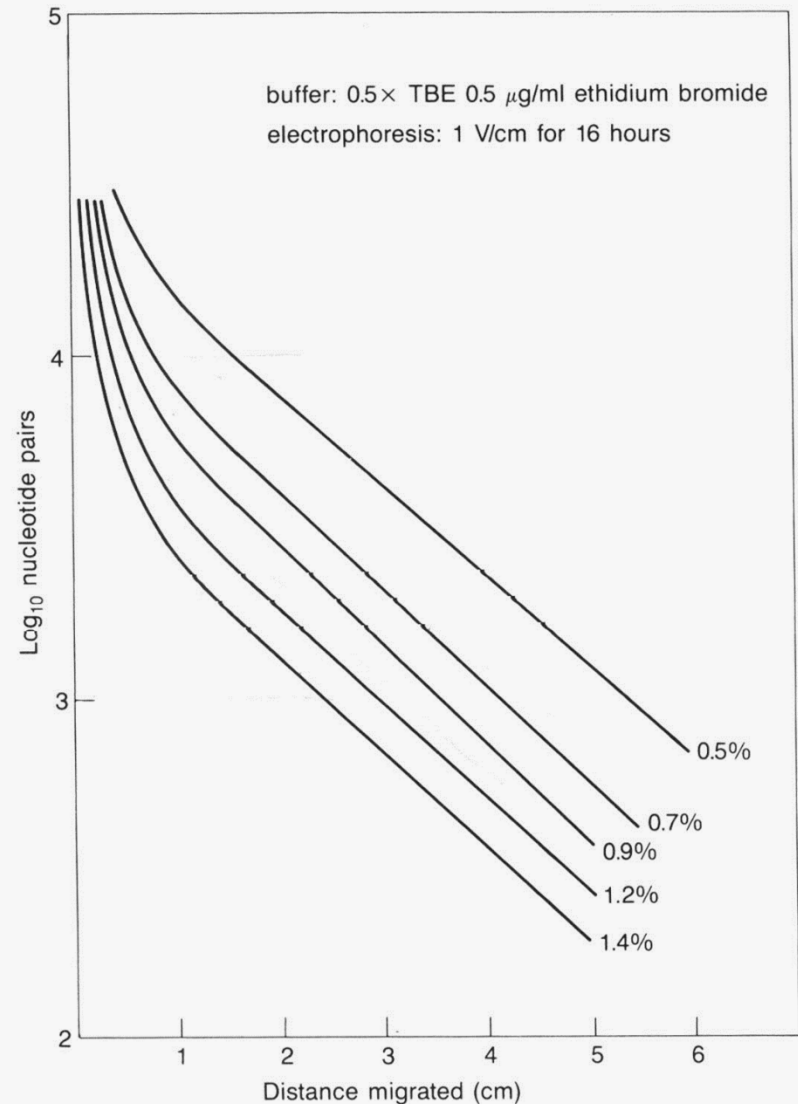


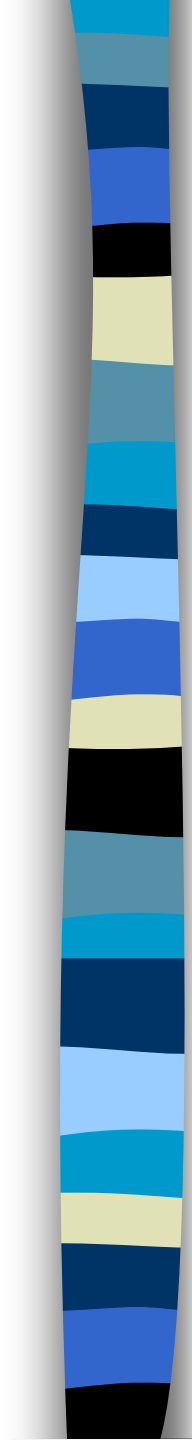
Electroforesi en agarosa

- L'agarosa és un polímer lineal de D-galactosa i 3,6-anhidro-L-galactosa.
- Els gels d'agarosa es preparen calfant-la en el tampó desitjat. La solució, encara calenta, s'aboca a un recipient en el qual polimeritza (solidifica), i forma una matriu la densitat de la qual està determinada per la concentració d'agarosa.
- Quan a través del gel s'aplica un camp elèctric, el DNA (que a pH neutre està carregat negativament) migra cap a l'ànode.
- Un fragment de DNA lineal migrarà diferencialment al gel depenent de la mida i a una velocitat inversament proporcional al \log_{10} del nombre de parells de bases que conté.

➤ L'electroforesi en gel d'agarosa permet separar els fragments de DNA i estimar-ne la grandària.

➤ Hi ha una relació lineal entre el logaritme de la mobilitat electroforètica del DNA i la concentració d'agarosa al gel, de manera que dependrà de la mida dels fragments que s'ha de separar.





➤ A més de la concentració d'agarosa al gel, hi ha un conjunt de paràmetres que cal tenir en compte en fer una separació electroforètica, com ara:

- el voltatge que s'hi ha d'aplicar
- la direcció del camp elèctric
- la temperatura
- el tampó d'electroforesi, etc.

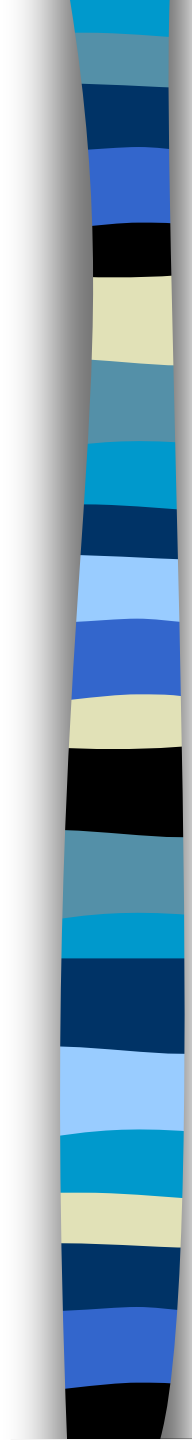


PREPARACIÓ DEL GEL D'AGAROSA

- Deixeu refredar la solució d'agarosa (agarosa al 0,8% (p / v) en tampó TBE 1x (0,1 M Tris-borat, 0.002 M EDTA, pH 8.0), fins a aproximadament 60 °C i afegiu bromur d'etidi, fins a una concentració final de 0,5 mg / ml.

EL BROMUR D'ETIDI ÉS UN AGENT QUE INTERCALA ENTRE LES BASES DE L'ADN I QUE ÉS INDISPENSABLE PER A PODER VISUALITZAR ELS FRAGMENTES D'ADN A LA LLUM UV. AQUEST COMPOST ÉS UN PODERÓS AGENT CARCINOGEN QUE HA D'UTILITZAR-SE AMB EXTREMA PRECAUCIÓ.

- Aboqueu la solució encara calenta en una cubeta d'electroforesi degudament preparada i col·loqueu el formador de pouets («pinta») en la posició adequada.
- Deixeu que l'agarosa gelifique (aproximadament 30 minuts a temperatura ambient).

- 
- Submergiu el gel en el tanc d'electroforesi. Afegiu el tampó d'electroforesi TBE 1x, de manera que sobrepassi per damunt del gel aproximadament 1 mm.
 - Les mostres es preparen barrejant 20 μ l de l'amplificat de PCR amb 4 μ l de «tampó de càrrega».

EL TAMPÓ DE CÀRREGA S'UTILITZA PER A INCREMENTAR LA DENSITAT DE LES MOSTRES, DONAR COLOR I PODER SEGUIR VISUALMENT EL DESENVOLUPAMENT DE L'ELECTROFORESI.

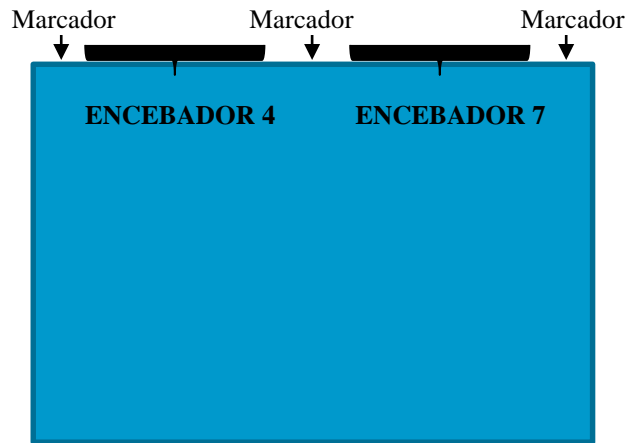
- Després d'un colp de centrifuga, es carreguen les mostres al gel. A més de les mostres, s'hi ha d'incloure un marcador de mides de DNA.
- El gel es deixarà córrer aproximadament 2 hores a 100 volts.
- El procés finalitza amb l'observació del gel sota llum UV, del qual se n'ha de fer una fotografia.

RAPD: Electroforesi dels amplificats de PCR en gel d'agarosa

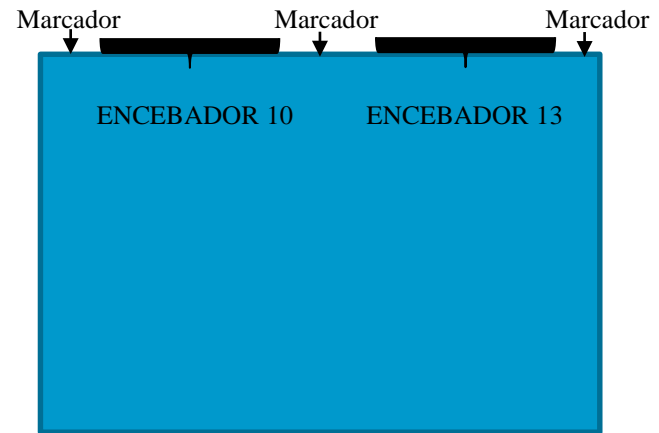
4 μl solució càrrega (6x)
20 μl DNA amplificat

TOTAL = 24 μl

5 μl marcador de mida de l'ADN



Gel 1



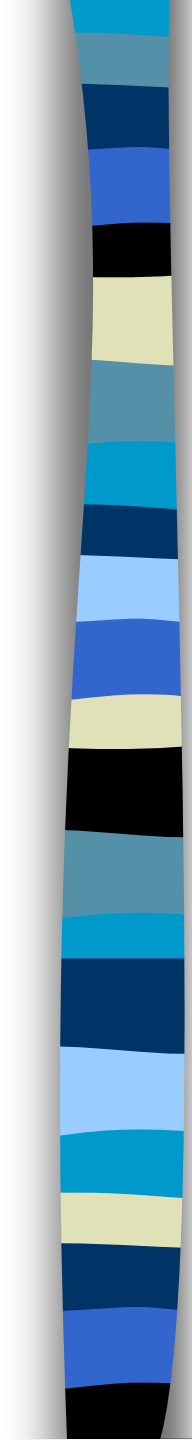
Gel 2



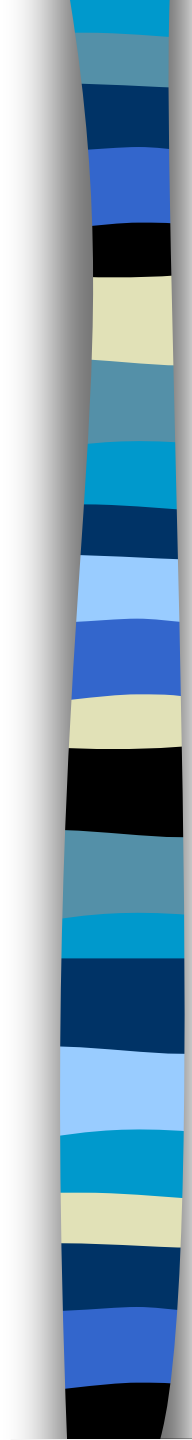
TÈCNIQUES MOLECULARS DE
MILLORA GENÈTICA
(CURS 2016-2017)

OBJECTIU

Detectar lligament entre un marcador molecular i un gen responsable d'un fenotip mutant.

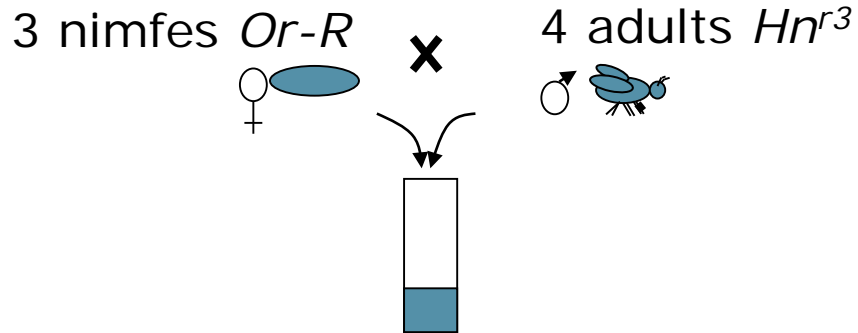


Sessions	Dates	Activitats
1	23 de març	Fonaments de la pràctica. Preparar l'encreuament parental.
1a (U)	30 de març	Eliminar parentals.
2	6 d'abril	Observar F1 i preparar encreuament prova. Extraure DNA d'individus parentals i de la F1. Preparar PCR amb encebadors RAPD.
2a	12 d'abril	Eliminar parentals. Electroforesi dels amplificats.
3	27 d'abril	Observar F2 i extraure DNA d'individus amb diferents fenotips.
3a	4 de maig	Preparar PCR amb encebador RAPD seleccionat.
4	11 de maig	Electroforesi. Observació dels resultats i anàlisi.



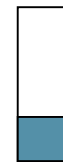
Sessions	Dates	Activitats
1	23 de març	Fonaments de la pràctica. Preparar l'encreuament parental.
1a (U)	30 de març	Eliminar parentals.
2	6 d'abril	Observar F1 i preparar encreuament prova. Extraure DNA d'individus parentals i de la F1. Preparar PCR amb encebadors RAPD.
2a	12 d'abril	Eliminar parentals. Electroforesi dels amplificats.
3	27 d'abril	Observar F2 i extreure ADN d'individus amb diferents fenotips.
3a	4 de maig	Preparar PCR amb encebador RAPD seleccionat.
4	11 de maig	Electroforesi. Observació dels resultats i anàlisi.

1a setmana: encreuament parental



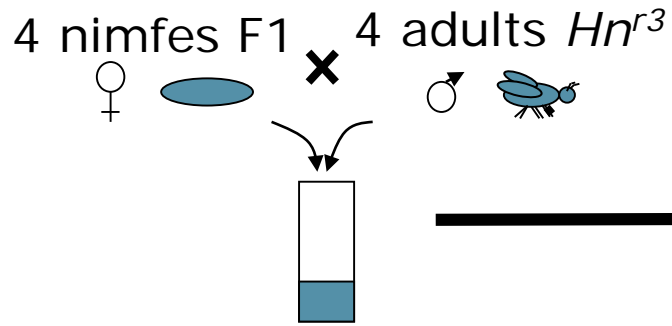
2a setmana: comprovar i eliminar parentals

 Matar
 parentals

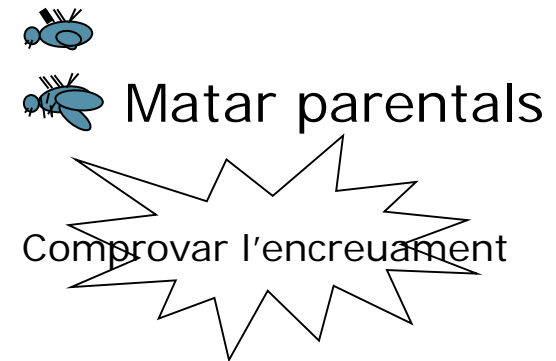


Comprovar els mascles i
les femelles de
l'encreuament

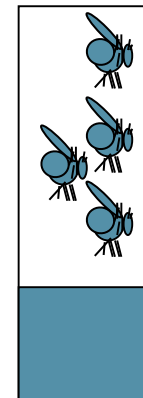
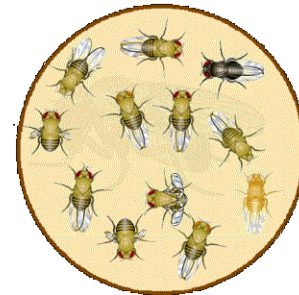
3a setmana: **encreuament prova**



4a setmana: **comprovar i eliminar parentals**



5a setmana: **comptar individus F2**



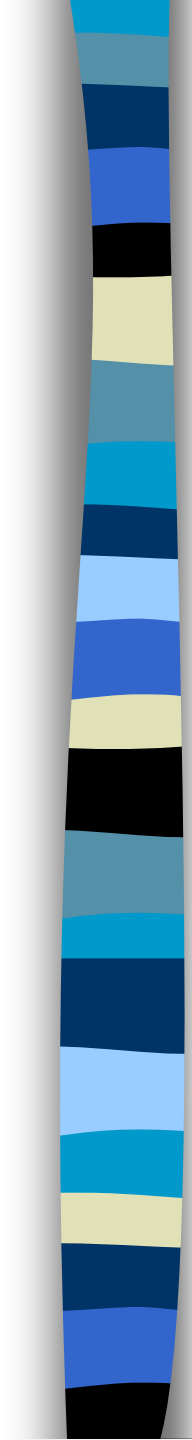


MATERIAL

Henna recessive-3 (Hnr^3): ulls de color roig fosc que es tornen quasi negres amb l'edat.

Or-R: ulls color roig.

Encebador triat tipus RAPD.



Extracció de l'ADN total
d'individus de la F2

Per parella:

- **3** adults amb fenotip de color **d'ulls rojos (salvatge)**
- **3** adults amb fenotip mutant de color **d'ulls foscos**

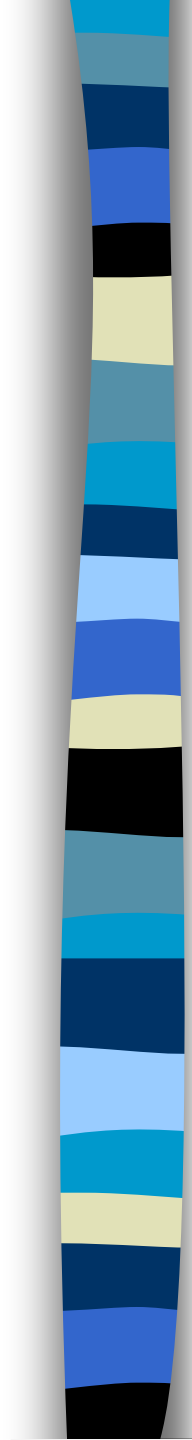


Extracció de DNA total

1. Afegiu 160 μ l de dissolució I freda i homogeneïtzeu amb una vareta o punta blava.
2. Afegiu 200 μ l de dissolució II i agiteu per inversió unes quantes vegades.
3. Incubeu a 65 °C durant 30 minuts.
4. Afegiu 60 ml d'acetat potàssic 3 M (pH = 5.0) fred, agiteu per inversió unes quantes vegades.
5. Incubeu 20 minuts a – 20 °C.

Dissolució I (Tris 10 mM, NaCl 60 mM, sacarosa 5%, EDTA 10 mM, pH 7.8)

Dissolució II (Tris 300 mM, SDS 1,25%, sacarosa 5%, EDTA 10 mM, pH = 8.0)

- 
6. Centrifugueu 10 minuts a màxima velocitat en una microcentrifugadora.
 7. Transferiu el sobrenadant a un nou tub i afegiu-hi el mateix volum d'isopropanol. Agiteu per inversió.
 8. Incubeu 5 minuts a temperatura ambient.
 9. Centrifugueu 10 minuts i rebutgeu el sobrenadant.
 10. Renteu el precipitat amb 500 μ l d'etanol 70%.
 11. Centrifugueu 3 minuts, rebutgeu el sobrenadant i assequeu al buit.
 12. Torneu a suspendre en 50 μ l de TE.

TE (TrisHCl 10 mM, 1 mM EDTA; pH = 8.0)

LTE (TrisHCl 10 mM, 0.11 mM EDTA; pH = 8.0)



Amplificació de DNA per PCR-RAPD

A cada tub de reacció de PCR s'afeg una certa quantitat del DNA d'un únic individu (procedent de l'extracció anterior).

- Tubs amb **38 μ l d'un còctel** que té tots els components necessaris per a l'amplificació, excepte el DNA.
- Afegiu **2 μ l de la solució de DNA** obtinguda a partir d'una mosca (aproximadament 5 ng de DNA).

Caràcters objecte d'estudi

Marcador fenotípic → color d'ulls:

- al·lel dominant (+), ulls rojos
- al·lel recessiu Hn^{r3} (h), ulls foscos



Or-R



Hn^{r3}

Marcador molecular → banda RAPD:

- al·lel dominant (B), banda present
- al·lel recessiu (b), banda absent

Encreuament parental:

Hn^{r-3}
Ulls foscós

Or-R
Ulls rojos (salvatge)



hhbb



++BB

F1

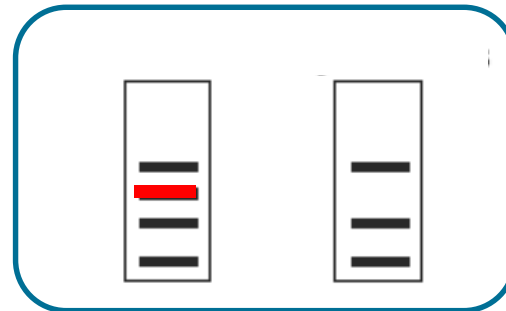
Ulls rojos (salvatge)



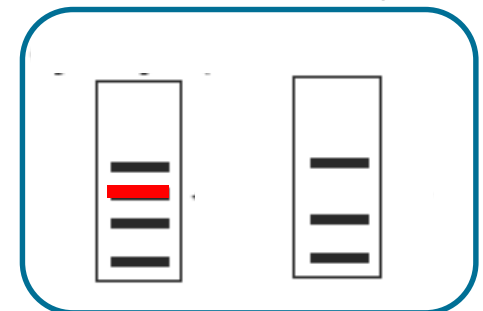
h+Bb

F2

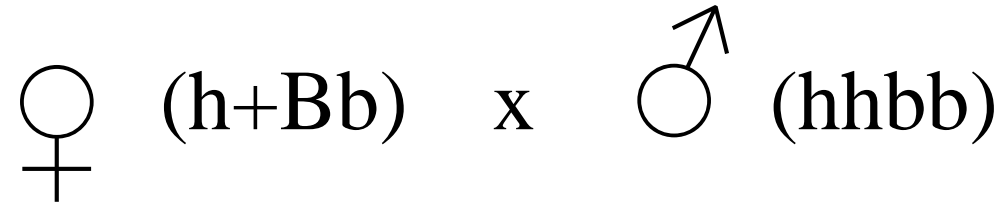
Ulls foscós



Ulls rojos



Encreuament prova



Dos resultats possibles segons tinguem lligament o no en tinguem entre el gen Hn^{r3} i el marcador molecular:

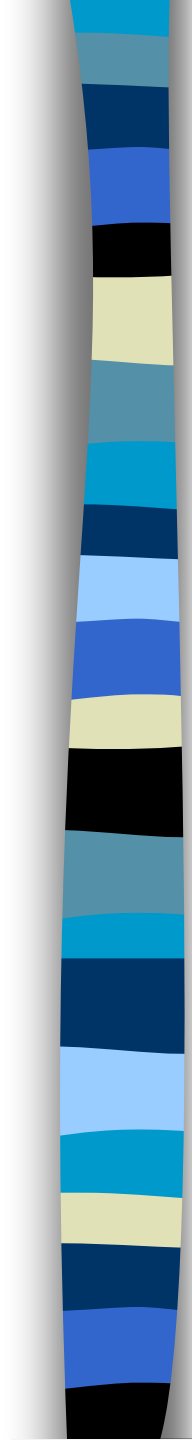
Fenotips	(genotips)	No lligament	Lligament
Ulls rojos i banda	(+h; Bb)	$\frac{1}{4}$	$>\frac{1}{4}$
Ulls foscos sense banda	(hh; bb)	$\frac{1}{4}$	$>\frac{1}{4}$
Ulls rojos sense banda	(+h; bb)	$\frac{1}{4}$	$<\frac{1}{4}$
Ulls foscos i banda	(hh; Bb)	$\frac{1}{4}$	$<\frac{1}{4}$



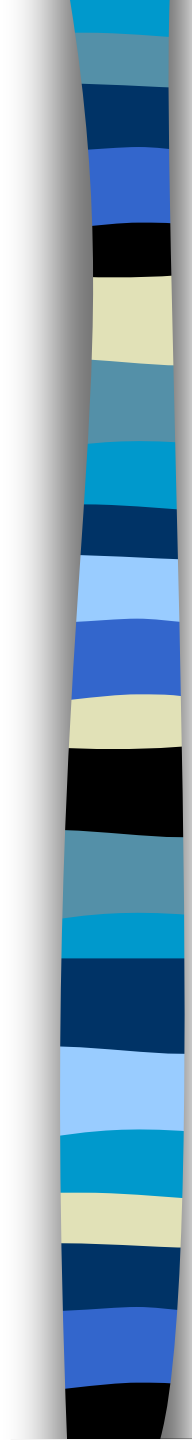
TÈCNIQUES MOLECULARS DE
MILLORA GENÈTICA
(CURS 2016-2017)

OBJECTIU

Detectar lligament entre un marcador molecular i un gen responsable d'un fenotip mutant.

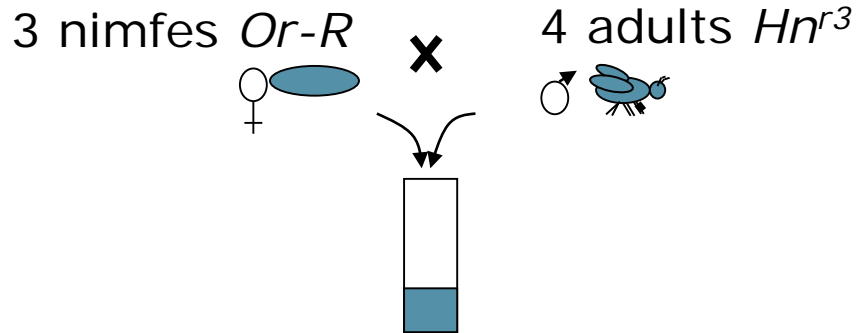


Sessions	Dates	Activitats
1	23 de març	Fonaments de la pràctica. Preparar l'encreuament parental.
1a (U)	30 de març	Eliminar parentals.
2	6 d'abril	Observar F1 i preparar encreuament prova. Extraure DNA d'individus parentals i de la F1. Preparar PCR amb encebadors RAPD.
2a	12 d'abril	Eliminar parentals. Electroforesi dels amplificats.
3	27 d'abril	Observar F2 i extraure DNA d'individus amb diferents fenotips.
3a	4 de maig	Preparar PCR amb encebador RAPD seleccionat.
4	11 de maig	Electroforesi. Observació dels resultats i anàlisi.



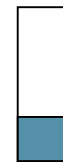
Sessions	Dates	Activitats
1	23 de març	Fonaments de la pràctica. Preparar l'encreuament parental.
1a (U)	30 de març	Eliminar parentals.
2	6 d'abril	Observar F1 i preparar encreuament prova. Extraure DNA d'individus parentals i de la F1. Preparar PCR amb encebadors RAPD.
2a	12 d'abril	Eliminar parentals. Electroforesi dels amplificats.
3	27 d'abril	Observar F2 i extraure DNA d'individus amb diferents fenotips.
3a	4 de maig	Preparar PCR amb encebador RAPD seleccionat.
4	11 de maig	Electroforesi. Observació dels resultats i anàlisi.

1a setmana: encreuament parental



2a setmana: comprovar i eliminar parentals

 Matar
 parentals



Comprovar els mascles i
les femelles de
l'encreuament

AMPLIFICACIÓ D'ADN PER RAPD-PCR: CRIBRATGE, **utilitzant 4 encebadors** diferents

- ✓ **Tampó de la Taq polimerasa** (50 mM KCl,, 10 mM Tris ClH pH = 9.0), (solució estoc a 10X): 4 μ l
- ✓ 1,5 mM MgCl₂: 2,5 μ l
- ✓ 250 μ M dels quatre desoxinucleòtids (**dNTP**), (solució estoc a 5 mM): 2 μ l
- ✓ 2,5 unitats de la **Taq polimerasa** (estoc a 5 U/ μ l): 0,5 μ l
- ✓ 0.2 μ M d'**encebador** (solució estoc a 2 μ M): 4 μ l
- ✓ **Aigua**: 25 μ l

✓ **ADN: 2 μ l**

ADN d'un individu

Còctel (15 reaccions per encebador)

- ✓ Tampó de la Taq polimerasa: 60 μ l
- ✓ MgCl₂: 37,5
- ✓ dNTP: 30 μ l
- ✓ Taq polimerasa: 7,5 μ l
- ✓ **Encebador: 60 μ l**
- ✓ Aigua: 375 μ l

38 μ l del còctel



Condicions de l'amplificació

Els tubs amb la barreja de PCR s'han de col·locar en un termociclador i s'ha d'aplicar el programa (nom TAG) següent:

Pas	Cicles	Temperatura	Durada	
1	1	94 °C	5 min	Desnaturalització inicial
2	40	94 °C	60 s	Desnaturalització
		38 °C	60 s	Hibridació
		72 °C	70 s	Elongació
3	1	72 °C	4 min	Extensió final
4	1	4 °C	∞	

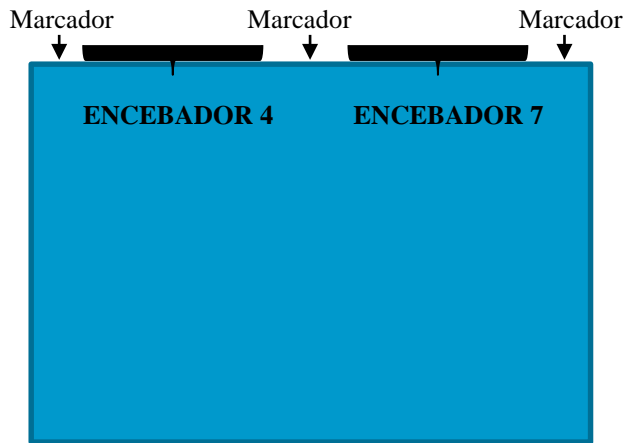


RAPD: Electroforesi dels amplificats de PCR en gel d'agarosa

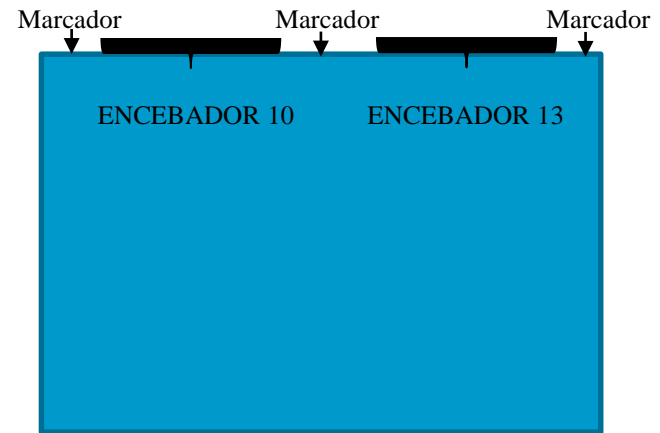
4 μl solució càrrega (6x)
20 μl DNA amplificat

TOTAL = 24 μl

5 μl marcador de mida de l'ADN



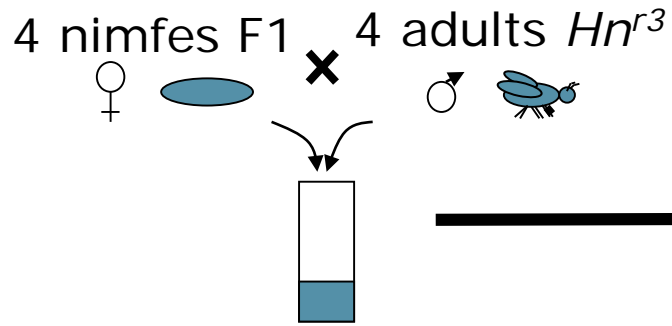
Gel 1



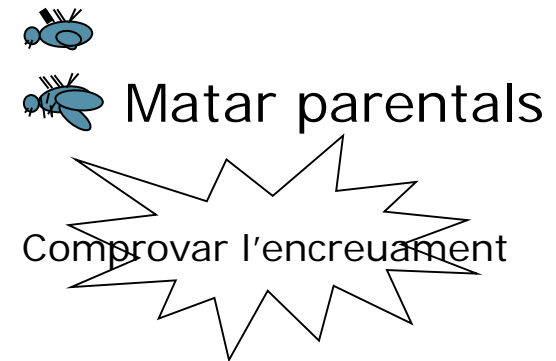
Gel 2

Tenim bandes candidates a ser el nostre Marcador Molecular?

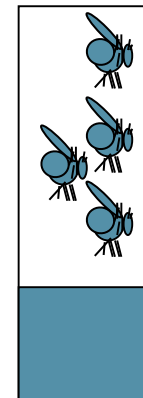
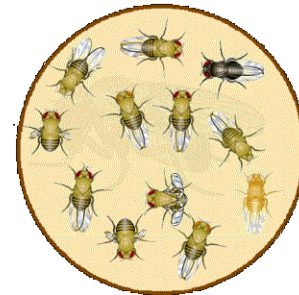
3a setmana: **encreuament prova**



4a setmana: **comprovar i eliminar parentals**



5a setmana: **comptar individus F2**



Encreuament parental:

Hn^{r-3}
Ulls foscós



hhbb

Or-R
Ulls rojos (salvatge)



++BB

F1

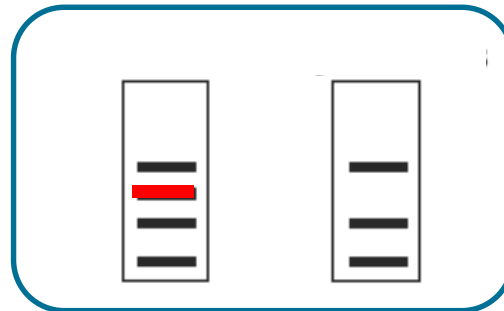
Ulls rojos (salvatge)



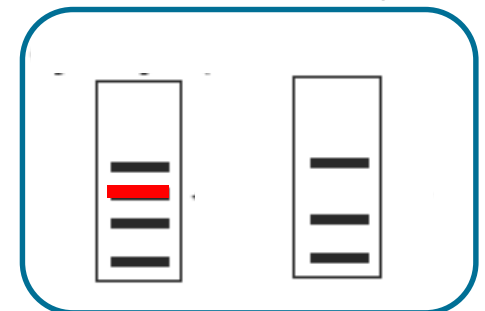
h+Bb

F2

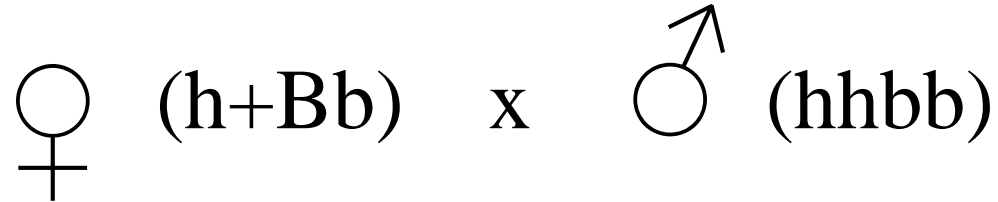
Ulls foscós



Ulls rojos



Encreuament



Dos resultats possibles segons tinguem lligament o no en tinguem entre el gen Hn^{r3} i el marcador molecular:

Fenotips	(genotips)	No lligament	Lligament
Ulls rojos i banda	(+h; Bb)	$\frac{1}{4}$	$>\frac{1}{4}$
Ulls foscos sense banda	(hh; bb)	$\frac{1}{4}$	$>\frac{1}{4}$
Ulls rojos sense banda	(+h; bb)	$\frac{1}{4}$	$<\frac{1}{4}$
Ulls foscos i banda	(hh; Bb)	$\frac{1}{4}$	$<\frac{1}{4}$

Encebador 4

Encebador 7

Encebador 10

Encebador 13

Gel 1

Pouet No.	Mostra
1	MARCADOR
1.2	Parental Oregon XA
2	Parental Oregon XA
3	Ai:J 3
4	Ai:J 4
5	Parental Hn XA
6	Parental Hn XA
7	Ai:J 1
8	Ai:J 2
9	F1 XA ♀
10	F1 XA Ai:J ♂
11	F1 XA ♂
12	Ai:J 5
14	MARCADOR 100bp
15	Parental Oregon SC C
16	Parental Oregon SC D
17	P. Oregon ES 12
18	P. Oregon ES 25 (16 µL)
19	P. Hn ³ SC C
20	P. Hn ³ SC F
21	P. Hn ³ ES 12
22	P. Hn ³ ES 15 (16 µL)
23	F1 SC ♀ A
24	F1 SC ♂ B
25	F1 ES ♀ 3E
26	F1 ES ♂ 3S (19 µL)
27	MARCADOR 100bp

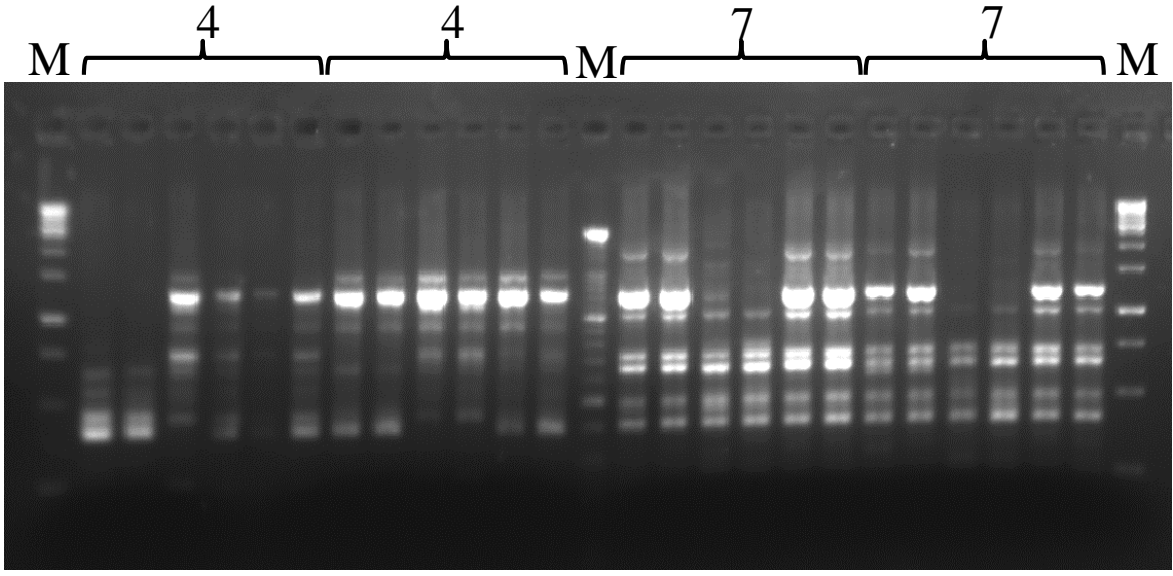
Handwritten notes: "Encebador 4" (bracketed next to rows 1-12), "Encebador 7" (bracketed next to rows 14-26)

Gel 2

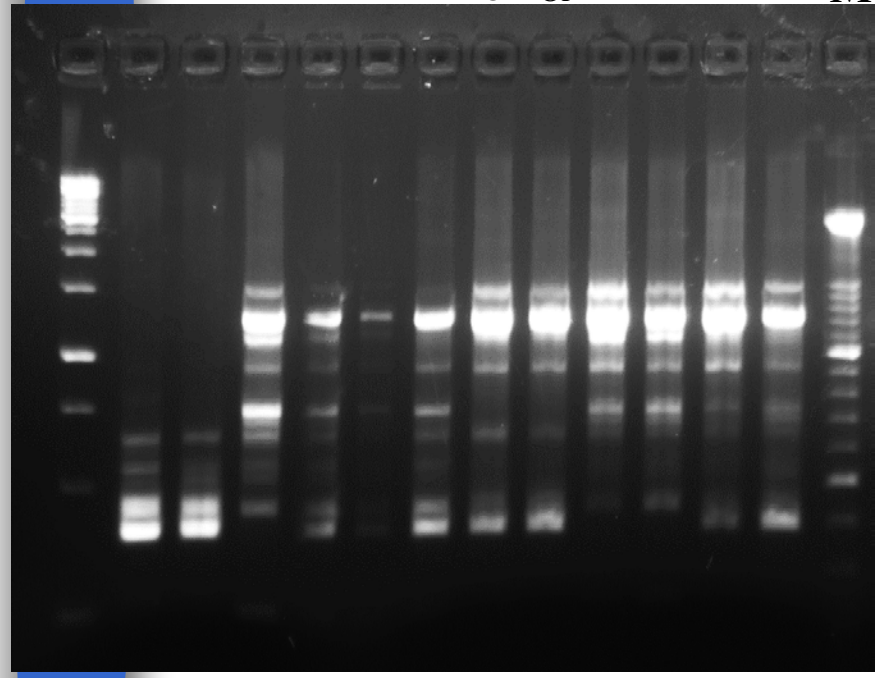
Pouet No.	Mostra
1	MARCADOR 100bp
2	Parental Or-R P1
3	Parental Or P1
4	Parental Or P2
5	Parental Or P2
6	MARCADOR
7	Parental Hn ³ P1
8	Parental Hn ³ P1
9	Parental Hn ³ P2
10	Parental Hn ³ P2
11	MARCADOR
12	F1 P1
13	F1 P1 -
14	F1 P2
15	F1 P2
16	MARCADOR 100bp
17	Parental macho Or-R
18	Parental macho Or-R
19	Parental macho Hn ³
20	Parental macho Hn ³
21	F1 macho Or-R
22	F1 macho Or-R (señal del poallo)
23	MARCADOR MARCADOR 100bp
24	Parental macho Or-R (17 µL)
25	Parental macho Or-R (17 µL)
26	Parental macho Hn ³ (17 µL)
27	Parental macho Hn ³
28	F1 macho Or-R } 18 µL
29	F1 macho Or-R }
30	MARCADOR 100bp

Handwritten notes: "Encebador 10" (bracketed next to rows 2-5), "Encebador 13" (bracketed next to rows 17-27)

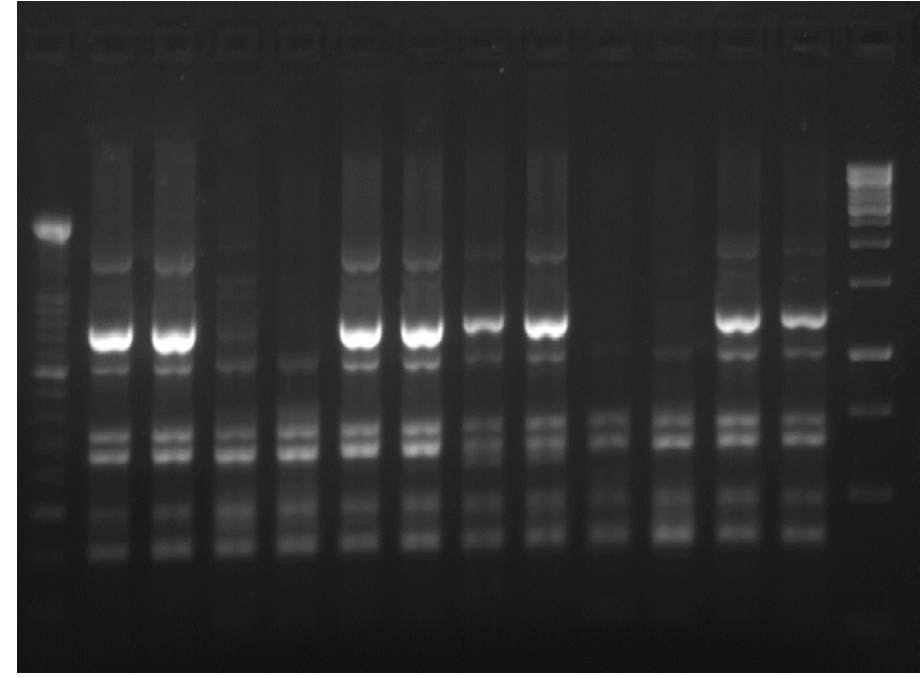
REPETIR



M Or Or Hn^{r3} F1 F1 F1 Or Or Hn^{r3}Hn^{r3} F1 F1 M



M Or Or Hn^{r3}Hn^{r3} F1 F1 Or Or Hn^{r3}Hn^{r3} F1 F1 M



AMPLIFICACIÓ D'ADN PER RAPD-PCR

- ✓ **Tampó de la Taq polimerasa** (50 mM KCl,, 10 mM Tris ClH pH = 9.0), (solució estoc a 10X): 4 μ l
- ✓ 1,5 mM MgCl₂: 2,5 μ l
- ✓ 250 μ M dels quatre desoxinucleòtids (**dNTP**), (solució estoc a 5 mM): 2 μ l
- ✓ 2,5 unitats de la **Taq polimerasa** (estoc a 5 U/ μ l): 0,5 μ l
- ✓ 0.2 μ M d'**encebador** (solució estoc a 2 μ M): 4 μ l
- ✓ **Aigua**: 25 μ l

- ✓ **ADN: 2 μ l**

ADN d'un individu

Còctel

- ✓ Tampó de la Taq polimerasa: 60 μ l
- ✓ MgCl₂: 37,5
- ✓ dNTP: 30 μ l
- ✓ Taq polimerasa: 7,5 μ l
- ✓ **Encebador seleccionat: 60 μ l**
- ✓ Aigua: 375 μ l

38 μ l del còctel



Condicions de l'amplificació

Els tubs amb la barreja de PCR s'han de col·locar en un termociclador i s'ha d'aplicar el programa (nom TAG) següent:

Pas	Cicles	Temperatura	Durada	
1	1	94 °C	5 min	Desnaturalització inicial
2	40	94 °C	60 s	Desnaturalització
		38 °C	60 s	Hibridació
		72 °C	70 s	Elongació
3	1	72 °C	4 min	Extensió final
4	1	4 °C	∞	



RAPD: Electroforesi dels amplificats de PCR en gel d'agarosa

4 μl solució càrrega (6x)
20 μl DNA amplificat

TOTAL = 24 μl

5 μl marcador de mida de l'ADN

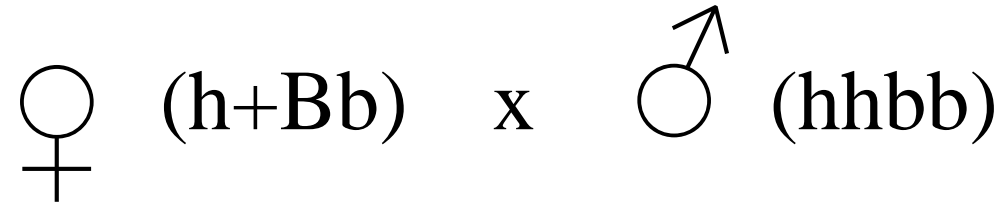


Gel 1



Gel 2

Encreuament prova



Dos resultats possibles segons tinguem lligament o no en tinguem entre el gen Hn^{r3} i el marcador molecular:

Fenotips	(genotips)	No lligament	Lligament
Ulls rojos i banda	(+h; Bb)	$\frac{1}{4}$	$>\frac{1}{4}$
Ulls foscos sense banda	(hh; bb)	$\frac{1}{4}$	$>\frac{1}{4}$
Ulls rojos sense banda	(+h; bb)	$\frac{1}{4}$	$<\frac{1}{4}$
Ulls foscos i banda	(hh; Bb)	$\frac{1}{4}$	$<\frac{1}{4}$

- Preparar les mostres para la PCR:

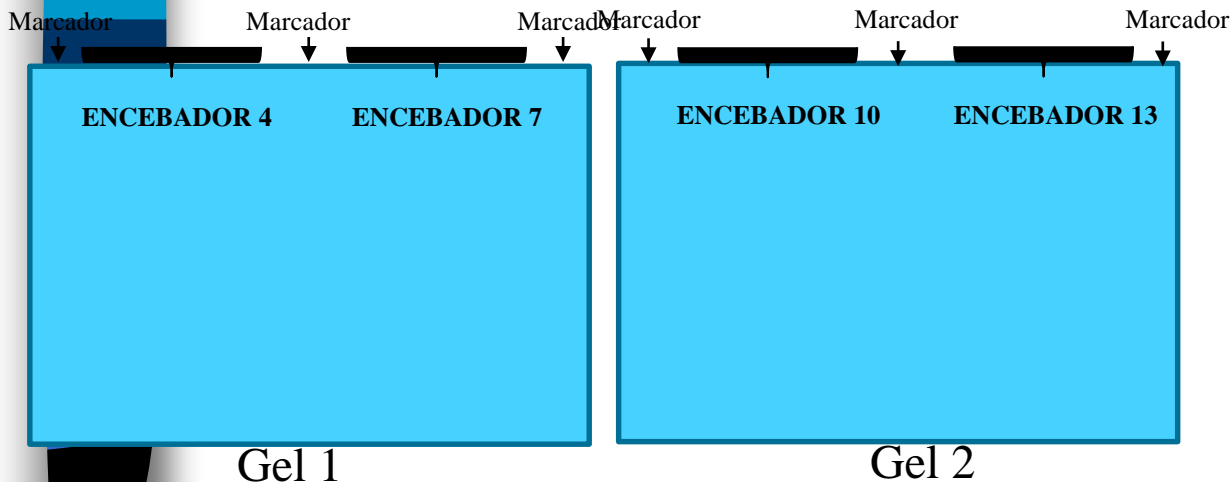
2 μ l ADN d'un individu

38 μ l del còctel de PCR



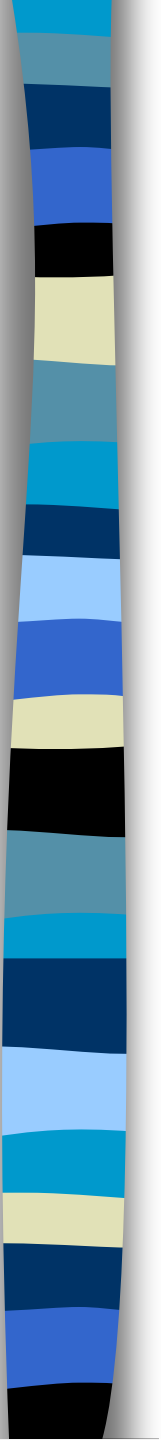
PCR

- Repetir els gels d'electroforesi del “screening” d'encebadors



4 μ l solució càrrega (6x)
20 μ l DNA amplificat

5 μ l marcador de mida de l'ADN



Caràcters objecte d'estudi

Marcador fenotípic → Color d'ulls:

- al·lel dominant (+), ulls rojos
- al·lel recessiu Hn^{r3} (h), ulls foscos



Or-R



Hn^{r3}

Marcador molecular → Banda RAPD:

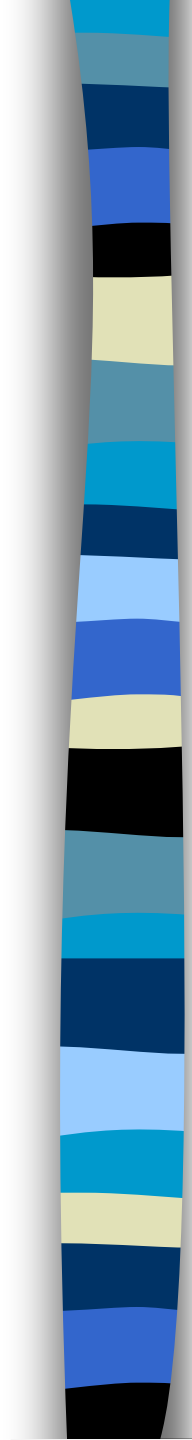
- al·lel dominant (B), banda present
- Al·lel recessiu (b), banda absent



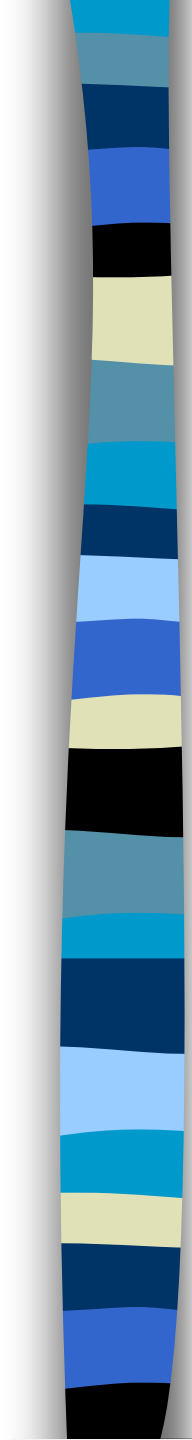
TÈCNIQUES MOLECULARS DE MILLORA GENÈTICA (CURS 2016-2017)

OBJECTIU

Detectar lligament entre un marcador molecular i un gen responsable d'un fenotip mutant.



Sessions	Dates	Activitats
1	23 de març	Fonaments de la pràctica. Preparar l'encreuament parental.
1a (U)	30 de març	Eliminar parentals.
2	6 d'abril	Observar F1 i preparar encreuament prova. Extraure DNA d'individus parentals i de la F1. Preparar PCR amb encebadors RAPD.
2a	12 d'abril	Eliminar parentals. Electroforesi dels amplificats.
3	27 d'abril	Observar F2 i extraure DNA d'individus amb diferents fenotips.
3a	4 de maig	Preparar PCR amb encebador RAPD seleccionat.
4	11 de maig	Electroforesi. Observació dels resultats i anàlisi.



Sessions	Dates	Activitats
1	23 de març	Fonaments de la pràctica. Preparar l'encreuament parental.
1a (U)	30 de març	Eliminar parentals.
2	6 d'abril	Observar F1 i preparar encreuament prova. Extraure DNA d'individus parentals i de la F1. Preparar PCR amb encebadors RAPD.
2a	12 d'abril	Eliminar parentals. Electroforesi dels amplificats.
3	27 d'abril	Observar F2 i extraure DNA d'individus amb diferents fenotips.
3a	4 de maig	Preparar PCR amb encebador RAPD seleccionat.
4	11 de maig	Electroforesi. Observació dels resultats i anàlisi.

Encreuament parental:

Hn^{r-3}
Ulls foscos



hhbb

$Or-R$
Ulls rojos (salvatge)



++BB

F1

Ulls rojos (salvatge)



h+Bb

Els individus de la **F1** són heterozigots per als dos caràcters:

- **Color d'ulls:** tenen els dos al·lells (h , +), però es manifesta el dominant (+).
- **Banda RAPD:** tenen els dos al·lells (present i absent), però es manifesta el dominant (banda present).

Encreuament parental:

Hn^{r-3}
Ulls fosc



hhbb

Or-R
Ulls rojos (salvatge)



++BB

F1

Ulls rojos (salvatge)



h+Bb

x

Ulls fosc

hhbb



Encreuament parental:

Hn^{r-3}
Ulls foscós



hhbb

Or-R
Ulls rojos (salvatge)



++BB

F1

Ulls rojos (salvatge)



h+Bb

x

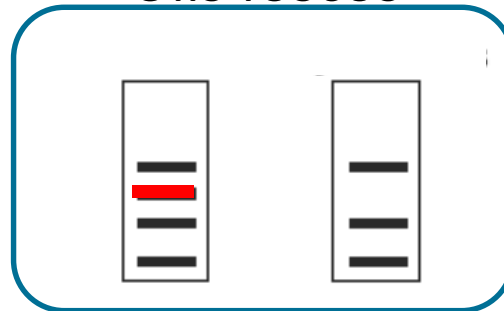
Ulls foscós



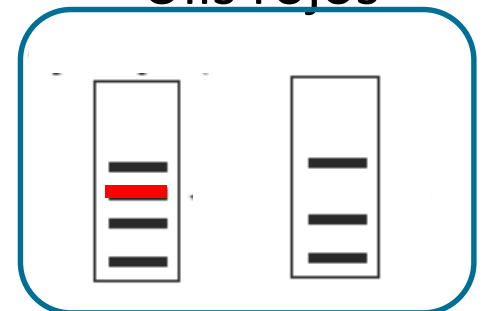
hhbb

F2

Ulls foscós



Ulls rojos



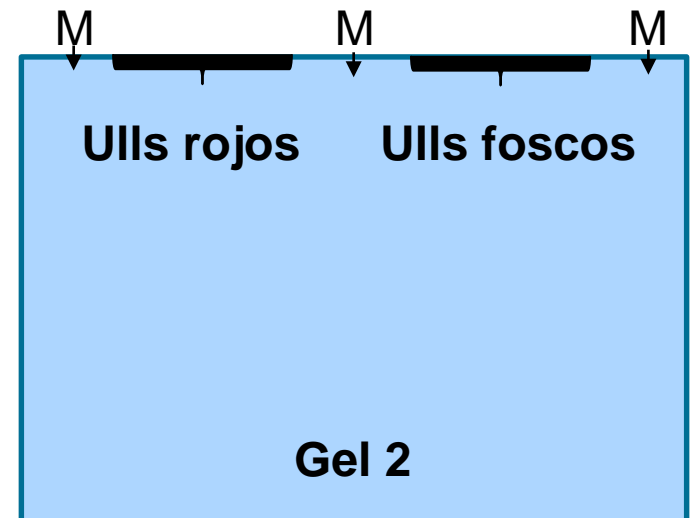
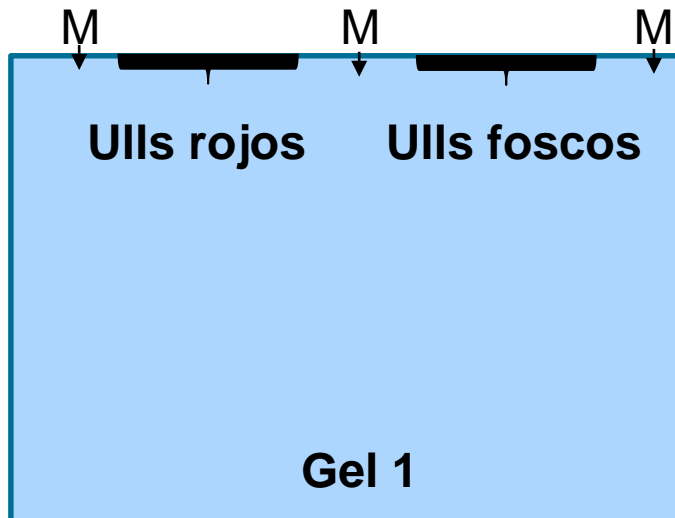
Electroforesi

*** S'ha de procedir a preparar el gel, a partir d'agarosa al 0,8% (p / v) en tampó TBE 1× (0,1 M Tris-borat, 0.002 M EDTA, pH 8.0).

3 μ l solució càrrega (6×)
15 μ l DNA

} 18 μ l

5 μ l marcador de
mida de l'ADN





Informe de pràctiques

- 1) Diari de laboratori
- 2) Rastreig d'encebadors
- 3) Anàlisi de l'herència de la mutació
- 4) Anàlisi de lligament
- 5) Discussió de resultats

Sempre identificar els resultats propis



Informe de pràctiques

1) **Diari de laboratori**

2) Rastreig d'encebadors

3) Anàlisi de l'herència de la mutació

4) Anàlisi de lligament

5) Discussió de resultats



Diari de laboratori

S'han d'exposar de manera simplificada les tasques i observacions fetes al laboratori.

Esquema:

<u>Data</u>	<u>Experiència</u>	<u>Resultats observats</u>
-------------	--------------------	----------------------------



Informe de pràctiques

1) Diari de laboratori

2) Rastreig d'encebadors

3) Anàlisi de l'herència de la mutació

4) Anàlisi de lligament

5) Discussió de resultats

Encreuament parental:

Hn^{r-3}

Or-R

Fenotips

Ulls foscós

Ulls rojos (salvatge)



Genotips

hhbb

++BB

F1

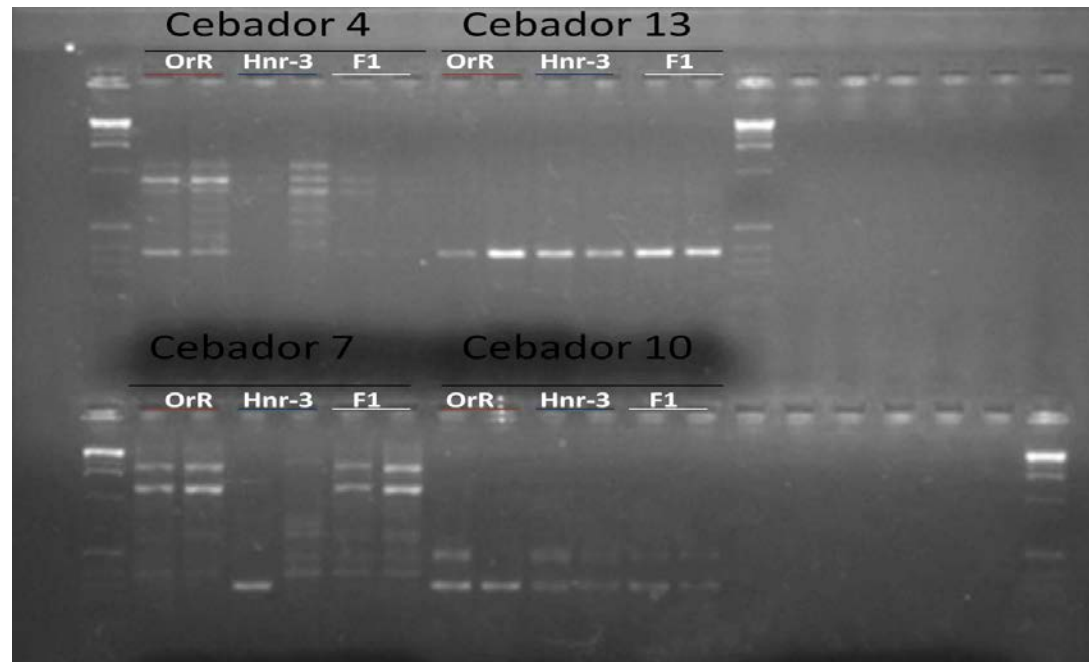
Fenotips

Ulls rojos (salvatge)

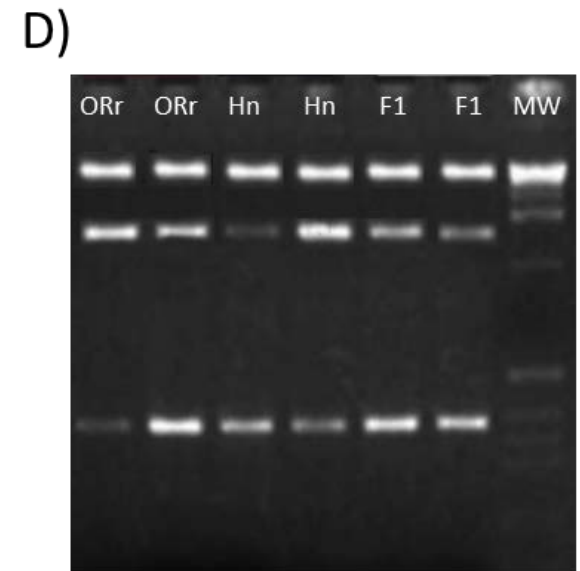
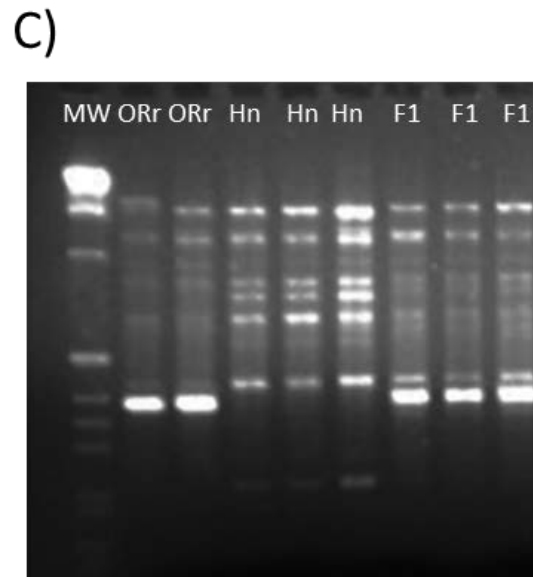
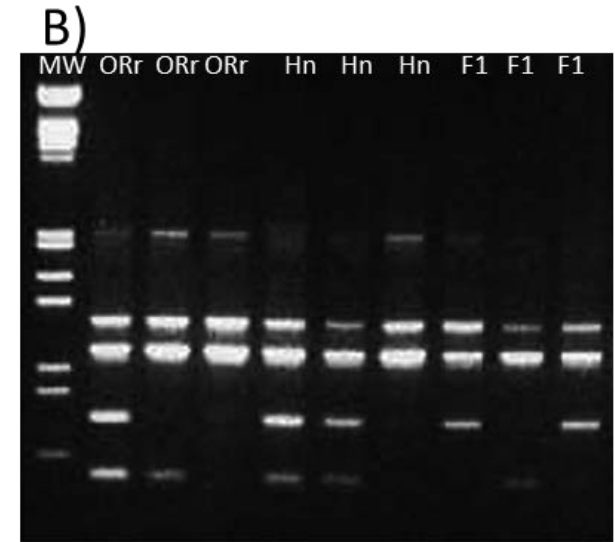
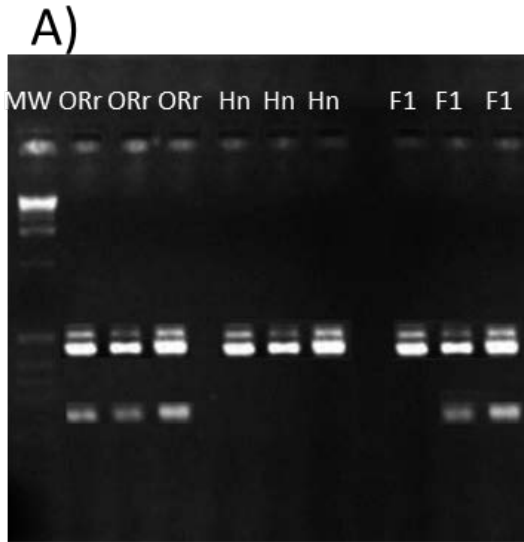
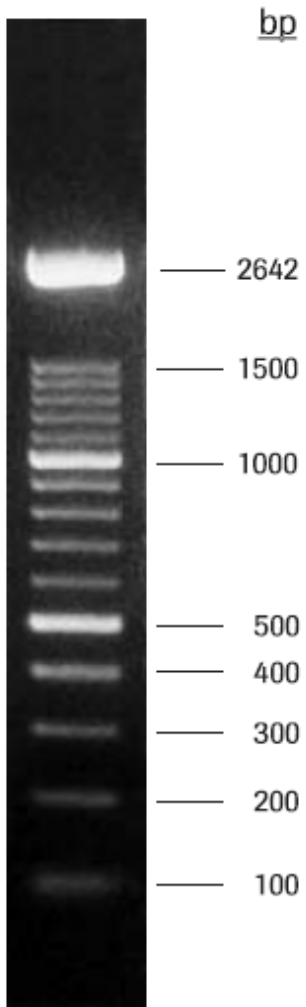


h+Bb

- ✓ Preparar els gels propis obtinguts experimentalment per tots els grups, per a tots els encebadors.
- ✓ Codificar les bandes d'aquests gels.
- ✓ Quadre de presència / absència de bandes.
- ✓ Classificar marcadors homozigots / heterozigots segons les soques.
- ✓ Indicar marcadors amb herència no mendeliana.
- ✓ Identificar marcadors (si és possible).



DNA Molecular Weight Marker XIV (Roche)





Informe de pràctiques

- 1) Diari de laboratori
- 2) Rastreig d'encebadors
- 3) Anàlisi de l'herència de la mutació
- 4) Anàlisi de lligament
- 5) Discussió de resultats

□ Base genètica del fenotip del mutant *Henna*.

Encreuament parental:	Hn^{r3}	X	Or-R
Fenotips	Ulls foscos		Ulls rojos (salvatge)

F1 Fenotip Ulls rojos (salvatge)

Encreuament prova:	F1	X	Hn^{r3}
Fenotip	Ulls rojos (salvatge)		Ulls foscos

F2 Fenotip Ulls foscos Ulls rojos (salvatge)



Base genètica del fenotip del mutant Henna.

Determinar la base hereditària del caràcter ulls foscos (dominant / recessiva, autosòmica / lligada sexe).

- Amb dades pròpies
- Amb dades històriques:

F2 ulls rojos	F2 ulls foscos	TOTAL
1313	1308	2621



Informe de pràctiques

- 1) Diari de laboratori
- 2) Rastreig d'encebadors
- 3) Anàlisi de l'herència de la mutació
- 4) Anàlisi de lligament
- 5) Discussió de resultats

Encreuament prova: femelles (h+Bb) × mascles (hhbb)

Dos resultats possibles segons tinguem lligament o no en tinguem entre el gen Hn^{r3} i el marcador molecular:

Fenotips	(genotips)	No lligament	Lligament
Ulls rojos i banda	(+h; Bb)	$\frac{1}{4}$	$>\frac{1}{4}$
Ulls foscos sense banda	(hh; bb)	$\frac{1}{4}$	$>\frac{1}{4}$
Ulls rojos sense banda	(+h; bb)	$\frac{1}{4}$	$<\frac{1}{4}$
Ulls foscos i banda	(hh; Bb)	$\frac{1}{4}$	$<\frac{1}{4}$

El fenotip per color d'ulls dels individus resultants de l'encreuament prova s'observa directament.

Per determinar el fenotip del segon caràcter (presència-absència de banda) cal fer una PCR amb el DNA de cada individu.

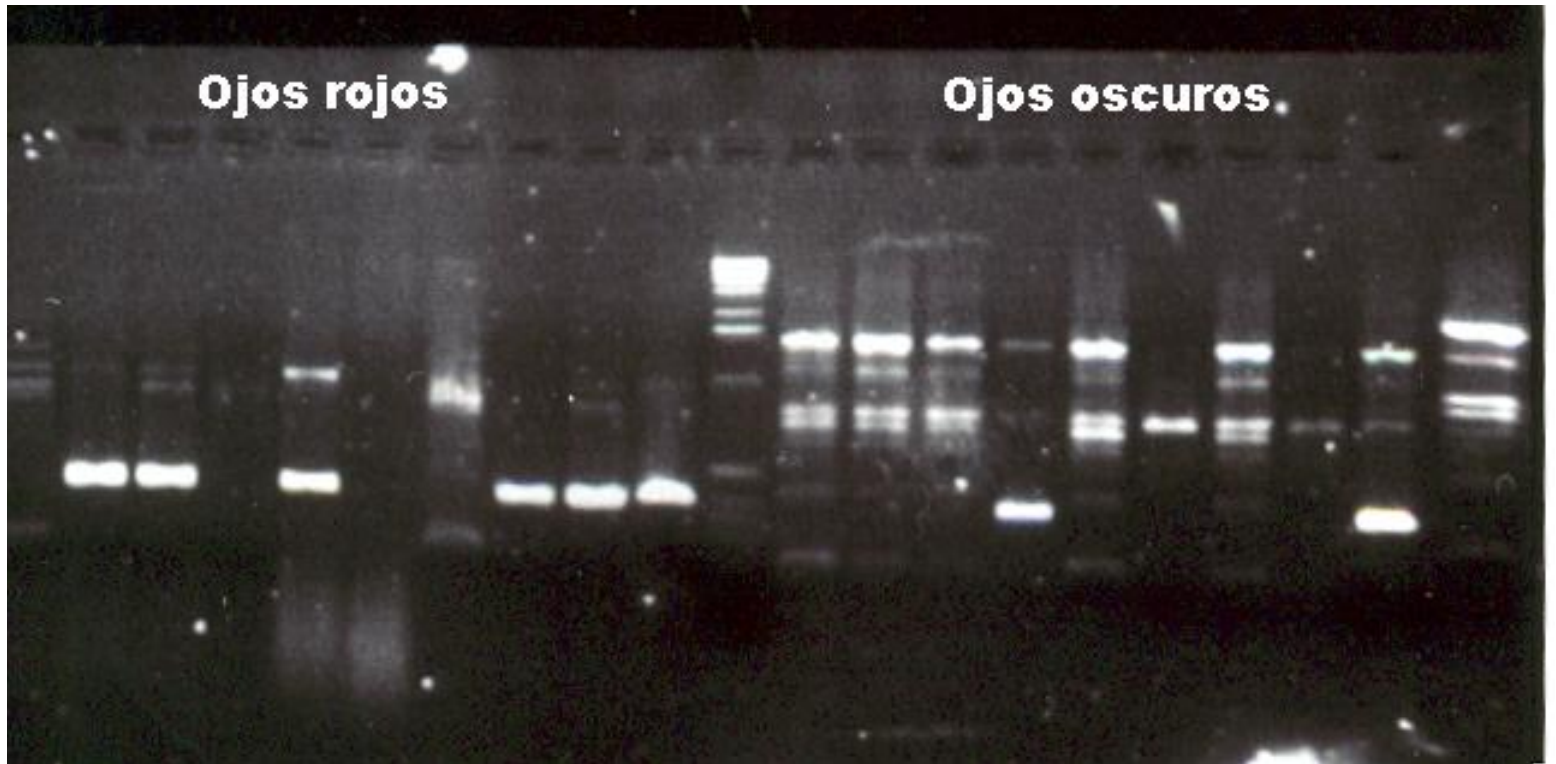
Anàlisi de lligament

- Identifiqueu la presència del marcador (aprox. 390 pb) en els resultats de la F2 dels tres grups de pràctiques d'enguany.
- Classifiqueu les dades de fenotip d'individus i presència de marcador.
- Contrasteu lligament del fenotip de color d'ulls amb el marcador. Estimeu la freqüència de recombinació.
 - Amb dades dels tres grups
 - Amb dades unides al registre històric

F2 ulls rojos		F2 ulls foscos		
AMB BANDA	SENSE BANDA	AMB BANDA	SENSE BANDA	TOTAL
1012	301	285	1023	2621

Ojos rojos

Ojos oscuros.





Informe de pràctiques

- 1) Diari de laboratori
- 2) Rastreig d'encebadors
- 3) Anàlisi de l'herència de la mutació
- 4) Anàlisi de lligament
- 5) **Discussió de resultats**

Discussió de resultats

- Dissenyeu el que ocurreria en la F2 si el marcador estiguera associat a la soca mutant i proposeu encreuaments per resoldre el lligament. Indiqueu si en algun dels encebadors utilitzats hi ha aquesta situació.
- Comentari general de totes les anàlisis fetes.



Data límit de lliurament

25 maig 2017