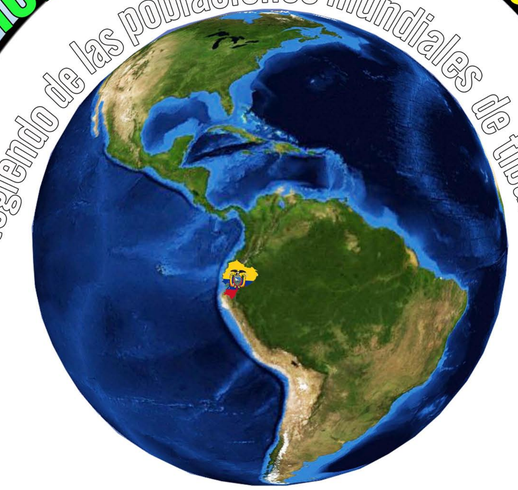
Pasos de Extracción de ADN y PCR

Extracción de ADN

Protegiendo de las poblaciones mundiales de tiburones

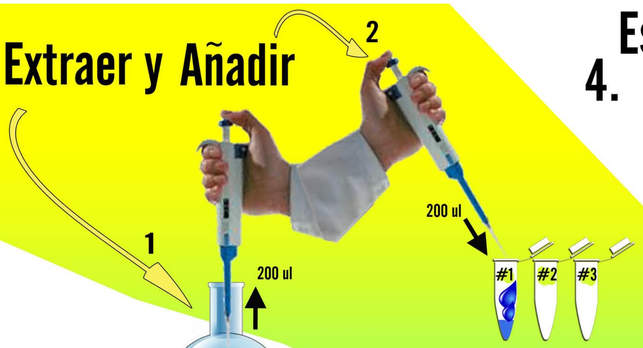


Comienzo

1. Etiqueta (# muestra, fecha, especies (si es aplicable))

2. Mezclar

3. Extraer y Añadir



4. Esterilizar

5. Cortar

6. Mezclar (Vortex)

10 segundos

Incubación

7. Calor

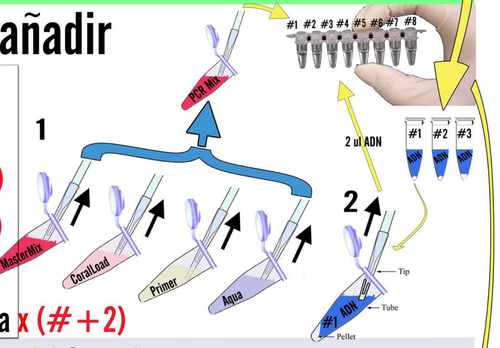
60°C por 20 min
99°C por 30 min

Pasos de PCR

8. Preparar y añadir

Receta de PCR = 11 ul RXN

1. 2.0 ul ADN para cada tubo
2. 5.0 ul MasterMix x (# + 2)
3. 1.0 ul CoralLoad x (# + 2)
4. 0.25 ul Primer x (# + 2)
5. 2.75 ul de Aqua Calidad Alta x (# + 2)



Pasos de PCR (Primera prueba = Identificación del Grupo) # = numero de muestras

* Total PCR MIX = (Cantidad de receta 2+3+4+5) x (# Muestras +2) ⟹ Pipet = Cantidad total / (# +2)

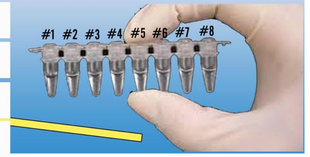
1. El ADN del Thermocycler es su "DNA Stock". Utilizar esto para su reacción y guardarlo para más tarde.
2. Para identificar inicialmente su grupo tiburón utilizar el Primer COI universales (Fish Cox 1F).

Pasos de PCR (Segunda prueba = Identificación del Especies)

¿Amplificación, no o si? ⟹ Proceder a la identificación de especies con especies primers

Vuelva a probar, o empezar de nuevo

- Sphyrna spp. ver Abercrombie et al. 2005
- Charcharinidae ver Shivji et al. 2002
- Lamnidae ver Chapman et al. 2003
- Alopias spp. ver Caballero et al. 2012
- Cetorhinus maximus ver Magnussen et al. 2007



Amplificación

9. Mezclar

5 segundos

10. Añadir los tubos a la máquina

Fin

11. Elegir el Protocolo y Correr

1. 95°C por 5 min
2. 2 por 35 x { 94°C por 30 sec; 63°C por 60 sec; 70°C por 90 sec }
3. 70°C por 10 min
4. 4°C por infinito

2 horas

Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca — Viceministerio de Acuacultura y Pesca

WWF

NOAA