AFLPs

1.-DIGESTIÓN

Dna	3-5µl (500ng)
T10Xligasa	1 µl
Mse[10u/µl]	0.6 µl
Eco [20 u/µl]	0.34 µl
NaCl 0.5M	1 µl
BSA 1mg/ml	0.5 µl
H_2O milliQ	2.56-0.56 µl
	Vf= 10 µl

-Incubar 2h a 37ºC

2.-LIGACIÓN DE ADAPTADORES

Digestión	10 µl
Eco-AD [10 µM]	1.5 µl
Mse-AD [10 µM]	1.5 µl
T10X ligasa	1 µl
H_2O milliQ	1 µl
Ligasa[5u/µl]	0.5µl
	Vf= 15 µl

-Incubar 2h a 20ºC

-Hacer una dilución “1:10” ---- 15 µl Dig-Lig + 45 µl H_2O

3.-PREAMPLIFICACIÓN (+1)

H_2O milliQ	17.8µl
T10X (A)	2.5 µl
Mg^{2+} [25mM]	1.5 µl
dNTPs [10]	1 µl
pre Eco[10µM]	0.5 µl
pre Mse[10µM]	0.5 µl
Taq [5u/µl]	0.2 µl

Vf= 23 **+2.5 µl dilución"1:10"**

-Hacer una dilución "1:50" ---- 8 µl preamplif + 42 µl H_2O

4.-AMPLIFICACIÓN SELECTIVA (+3)

H_2O milliQ	1.87µl
T10X (A)	2 µl
Mg^{2+} [25mM]	1.2 µl
dNTPs [10]	0.4 µl
Eco.primer[27.8nm/µl]	0.36 µl
Mse primer[20.1nm/µl]	9 µl
Taq [5u/µl]	0.12 µl

Vf= 23 **+5 µl dilución"1:50"**

CICLOS PCR

PCR+1 (preamplificación)

94ºC	**30s**	
56ºC	**1 min**	**X20**
72ºC	**1 min**	
72ºC	**1min**	
4ºC	**∞**	

PCR+3 (amplificación selectiva)

94ºC	**30s**		
65ºC *	**30 s**	**X13**	*** (-0.7ºC/ciclo)**
72ºC	**1 min**		

94ºC	**30s**	
56ºC	**30 s**	**X23**
72ºC	**1 min**	
4ºC	**∞**	

Preparación de adaptadores

Se preparan a [10µM] c/u

[5µlAD1+5µlAD2] + 40µl H_2O

Eco-AD: EcoAD1+EcoAD2

Mse-AD: MseAD1+MseAD2

-Incubar a 72ºC/10 min

-enfriar a RTº 20-30 min