

# CURSO S1401014

## APLICACIÓNS BIOTECNOLÓXICAS DA PCR EN TEMPO REAL

### PRÁCTICA 1: EXTRACCIÓN DE ADN

Luns 7 de xullo

#### FUNDAMENTO:

Extracción de ADN de tecido animal procesado empregando un kit comercial (GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit).

Rotura das células axudada pola dixestión das proteínas para permitir a liberación do ADN intracelular.

Precipitación do ADN co etanol, quedando retido pola membrana da columna.

Limpeza das impurezas.

Eliminación dos restos de etanol (que interferiría nas reaccións encimáticas posteriores)

Disolución do ADN e almacenaxe.

#### MATERIAIS E EQUIPOS:

Rotulador permanente

Tesoiras

Pinzas

Tubos de 1.5 ml

Tubos de 2 ml (veñen co kit)

Micropipeta 10-100

Micropipeta 100-1000

Puntas de micropipeta 200

Puntas de micropipeta 1000

Etanol para almacena mostras (*pode ser o de farmacia, absoluto ou 80%*)

Etanol absoluto (96~100) / de farmacia

Etanol 50% (grado molecular)

Balanza

Baño quente a 56 °C (*ou estufa ou bloque térmico*)

Microcentrifuga

#### PROTOCOLO (A: Tecido animal)

- 1) Identificar dous tubos de 1.5 ml escribindo o número da mostra.

|         |  |
|---------|--|
| Grupo 1 |  |
| Grupo 2 |  |
| Grupo 3 |  |
| Grupo 4 |  |
| Grupo 5 |  |

2) Pesar 50 mg da mostra, cortar en anaquiños, para facilitar a dixestión, e meter no primeiro tubo:

3) Meter no outro tubo un fragmento maior da mostra, e engadir etanol para almacenalo no conxelador

4) Engadir no primeiro tubo

180  $\mu$ l de **Digestion Solution**

20  $\mu$ l de **Proteínasa K**

5) Incubar a 56 °C durante 3 horas ou toda a noite. Pódese acelerar o proceso remexendo o contido do tubo.

6) Engadir 200  $\mu$ l de **Lysis Solution**. Mesturalo completamente co vortex 15 segundos.

7) Engadir 400  $\mu$ l de **etanol 50%**. Mesturalo como no paso anterior.

8) Coller unha columna e poñela dentro dun tubo de 2 ml.

9) Pipetear todo o contido do tubo de 1.5 ml dentro da columna (~800  $\mu$ l).

10) Centrifugar a 6.000 xg durante 1 minuto (o ADN queda retido na membrana).

11) Poñer a columna nun novo tubo de 2 ml e tirar o vello co filtrado.

12) Pipetear 500  $\mu$ l de **Wash Buffer I** na columna.

(antes de usalo, asegurarse de que o stock xa ten engadido o etanol).

13) Centrifugar a 8.000 xg durante 1 minuto (o ADN permanece retido na membrana).

14) Tirar o líquido filtrado e volver a empregar o tubo de 2 ml.

15) Pipetear outros 500  $\mu$ l de **Wash Buffer II** na columna.

16) Centrifugar a  $\geq$ 12.000 xg durante 3 minutos.

17) Poñer a columna nun tubo de 1.5 ml e tirar o de 2  $\mu$ l co filtrado.

18) Centrifugar a  $\geq$ 12.000 xg durante 1 minuto (eliminamos os restos de etanol).

19) Poñer a columna nun novo tubo de 1.5 ml co número da mostra, e tirar o que contén os resto de etanol.

20) Pipetear 100  $\mu$ l de **Elution Buffer** (Tris-HCl pH 8.0, no que se dissolve o ADN) (pódese aumentar a concentración final reducíndoo a 50  $\mu$ l, aínda que se recuperará menos cantidade total).

21) Incubar 2 minutos a temperatura ambiente (pódese aumentar a cantidade de ADN incubándoo a 60°C e co buffer prequentado).

22) Centrifugar a 8.000 xg durante 1 minuto (o ADN atravesa a membrana).

23) Tirar a columna.

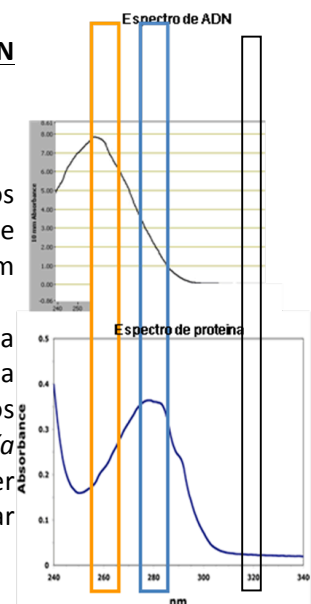
Almacenar (cuantificar, ver a calidade e a integridade, PCR,...) o tubo de 1.5  $\mu$ l co ADN.

## PRÁCTICA 2: CUANTIFICACIÓN E PUREZA DO ADN

### FUNDAMENTO:

Empregando o máximo de absorbancias do ADN a 260 nm podemos cuantificalo (1 O.D. 260 = equivale a 1000  $\mu$ g/ml para unha lonxitude de paso de 0,5 mm) e coa súa relación co das proteínas a 280 nm mediremos cantas impurezas contén.

Medir únicamente A260 podería levar a unha sobreestimación da cantidade de ADN, porque as proteínas tamén absorben esa lonxitude de onda. Calculando a relación A260/A280 determinamos se o ADN é máis ou menos puro: 1.9-1.7 (se o valor é moi baixo sería necesario purificalo para eliminar esas impurezas). Pódese facer unha lectura a 320 (non hai absorbancia de ADN) para comprobar determinar o background e eliminalo.



### MATERIAIS E EQUIPOS:

Micropipeta 0,5-2

Auga autoclavada

Espectrofotómetro Epoch Microplate (Biotec) coa placa Take 3

Ordenador co programa GEN 5

### PROTOCOLO DE CUANTIFICACIÓN CON ESPECTROFOTÓMETRO DE MICROVOLÚMENES

- 1) Extraer o lector do casete e limpar con auga a superficie
- 2) Pipetear 2  $\mu$ l de auga ou buffer de elución como branco na posición A1
- 3) Pipetear 2  $\mu$ l de cada ADN no soporte lector anotando a posición
- 4) Pechar o casete e introduci-lo dentro do lector
- 5) Indicar no programa GEN 5 a posición do branco e de cada mostra
- 6) Facer a lectura (260/280/320nm)
- 7) Exportar o documento cos resultados
- 8) Limpar o casete de novo e gardalo



### RESULTADOS DAS NOSAS MOSTRAS:

| MOSTRA | Sample Read# | Location | 260 Raw | 280 Raw | 320 Raw | 260 | 280 | 260/280 | ng/ $\mu$ L |
|--------|--------------|----------|---------|---------|---------|-----|-----|---------|-------------|
|        | 1            |          |         |         |         |     |     |         |             |
|        | 1            |          |         |         |         |     |     |         |             |
|        | 1            |          |         |         |         |     |     |         |             |
|        | 1            |          |         |         |         |     |     |         |             |
|        | 1            |          |         |         |         |     |     |         |             |

### PROTOCOLO ALTERNATIVO CON ESPECTROFOTÓMETRO:

#### MATERIAIS E EQUIPOS ESPECTROFOTÓMETRO:

Rotulador permanente

Tubo de 1.5 ml

Micropipeta 2-20

Micropipeta 20-200

Cubeta de espectofotómetro de 50  $\mu$ l

Espectrofotómetro

#### PROTOCOLO:

- 1) Marcar un tubo como Branco e pipetear nel 50  $\mu$ l de auga desionizada.
- 2) Marcar o outro tubo como 1/5 e pipetear nel 10  $\mu$ l de ADN e 40  $\mu$ l de auga desionizada.
- 3) Poñer o espectofotómetro en modo absorbancia 260nm.
- 4) Cargar os 50  $\mu$ l do branco na cubeta de espectofotometría e pulsar o botón de branco.
- 5) Retirar o branco da cubeta e cargar os 50  $\mu$ l de 1/5 e facer a medida (*a medida ideal estaría entre 0.100 e 1.000, é importante que sexa maior de 0.010, os valores no terceiro decimal varían entre medidas*).
- 6) Cambiar a absorbancia a 280 nm e medir de novo.
- 7) Calcular a cantidade de ADN e a súa pureza.

| A260 | DILUCIÓN | CONCENTRACIÓN<br>(A260*50*5) ng/ $\mu$ l |
|------|----------|--|
|      | 1/5      |  |

| A280 | A260/A280 |
|------|-----------|
|      |           |

*Se obtemos un valor moi pequeno de A260 pódemos facer unha nova medida con a menor concentración*