

PRÁCTICA 3: PCR EN TEMPO REAL

Martes 8 de xullo

MATERIAIS E EQUIPOS:

Rotulador permanente

Tubos de 1.5 ml

Tubos de 200 µl

Micropipeta 2-20

Micropipeta 10-100

Puntas de micropipeta 10

Puntas de micropipeta 200

H₂O desionizada autoclavada

eXTreme ID Meat X4 SYBR Detection kit (Xenotechs laboratorios) para vaca, porco, polo e cabalo:

Master Mix 2X SYBR green

Cebador F (20uM)

Cebador R (20uM)

Auga de grado molecular

DNA patrón (10ng/ul)

Placas de 48 pociños para Tempo Real

Tapas de film transparente para Tempo Real

Soporte para placas

Selador manual

Termociclador de Tempo Real

PROTOCOLO

☐ 1) Deseño de dúas PCRs para a detección de ADN de Cabalo e Vaca, con dúas réplicas e un control negativo para cada especie (tres tubos cun volume de 25ul para cada especie):

Reactivo	Conc. inicial	Conc. final	25 µl	x 3 tubos
SYBR Green Master mix 2X	2X	1X	12,5	37,5
Cebador F	20 µM	300 nM	0,375	1,125
Cebador R	20 µM	900 nM	1,125	3,375
ADN			(2)	(6)
H₂O desionizada autoclavada	-	-	9	27

☐ 2) Identificar un tubo de 1.5 ml como MIX Cabalo e outro como MIX Vaca.

☐ 3) Engadirilles a cada un **27** µl de auga desionizada autoclavada.

☐ 4) Engadirilles **37,5** µl de SYBR Green Master mix 2X.

☐ 5) Engadirilles **1,125** µl do Cebador **F correspondente**.

☐ 6) Engadirilles **3,375** µl do Cebador **R correspondente**.

☐ 7) Mezclade cada tubo cun vortex (*pode ser necesario centrifugalo despois para baixar as gotas das paredes*) ou pipeteando.

☐ 8) Colle seis tubos de 200 µl e identificalos C1, C2, C3, V4, V5, V6 e o código da vosa mostra.

☐ 9) Pipetear en tres deles **23** µl do MIX Cabalo e nos outros tres, **23** ul do MIX vaca.

☐ 10) Pipetear 2 µl de ADN nos tubos 1 e 2 de cada especie (os tubos 3 son os controis negativos).

C1	C2	C3	V4	V5	V6
2 µl	2 µl	C-	2 µl	2 µl	C-

PREPARACIÓN DA RECTA PATRÓN

☐ 11) Os grupos 1 e 2 farán a preparación da recta patrón de Cabalo e os grupos 3 e 4 as de Vaca.

☐ 12) Cada grupo colle o ADN Patrón que lle corresponda (Grupos 1 e 2 o ADN de Cabalo e Grupos 3 e 4 o de Vaca) e fará 3 dilucións seriadas en tres tubos de 1,5 ml.

1/1	1/10	1/100	1/1000
Patrón	2 ul Patrón +18 ul H2O	2 ul 1/10 +18 ul H2O	2 ul 1/100 +18 ul H2O

Reactivo	Conc. inicial	Conc. final	25 µl	x 5 tubos
SYBR Green Master mix 2X	2X	1X	12,5	62,5
Cebador F	20 µM	300 nM	0,375	1,875
Cebador R	20 µM	900 nM	1,125	5,625
ADN			(2)	(10)
H₂O desionizada autoclavada	-	-	9	45

☐ 13) Identificar un tubo de 1.5 ml como MIX Cabalo e outro como MIX Vaca.

☐ 14) Engadirlles a cada un **45** µl de auga desionizada autoclavada.

☐ 15) Engadirlles **62,5** µl de SYBR Green Master mix 2X.

☐ 16) Engadirlles **1,875** µl do Cebador **F correspondente a cada grupo**.

☐ 17) Engadirlles **5,625** µl de Cebador **R correspondente a cada grupo**.

☐ 18) Mezclade cada tubo cun vortex (*pode ser necesario centrifugalo despois para baixar as gotas das paredes*) ou pipeteando.

☐ 19) Coller cinco tubos de 200 µl e identificalos 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000, C- e o código do voso patrón (C ou V).

☐ 20) Pipetear en cada un deles **23** µl do MIX.

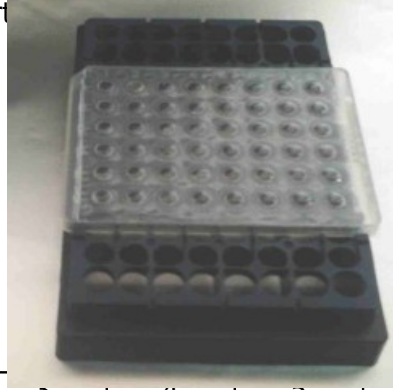
☐ 21) Pipetear 2 µl de cada dilución do Patrón que lle corresponda (excepto no primeiro que vai o patrón sen diluir).

1/1	1/10	1/100	1/1000	C-
			0	

2 μ l do Patrón sen diluír	2 μ l	2 μ l	2 μ l	-
--------------------------------------	-----------	-----------	-----------	---

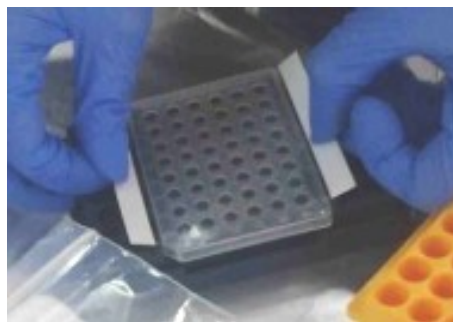
PREPARACIÓN DA PLACA

- ☐ 22) O grupo 5 pasa o contido dos tubos á placa de 48 posta no soporte para evitar que se manche a part



	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Grupo1 Cabalo	Grupo1 Cabalo	Grupo1 C-	Grupo1 Vaca	Grupo1 Vaca	Grupo1 C-	Patrón 1/1 Vaca	Patrón 1/1 Vaca
B	Grupo2 Cabalo	Grupo2 Cabalo	Grupo2 C-	Grupo2 Vaca	Grupo2 Vaca	Grupo2 C-	Patrón 1/10 Vaca	Patrón 1/10 Vaca
C	Grupo3 Cabalo	Grupo3 Cabalo	Grupo3 C-	Grupo3 Vaca	Grupo3 Vaca	Grupo3 C-	Patrón 1/100 Vaca	Patrón 1/100 Vaca
D	Grupo4 Cabalo	Grupo4 Cabalo	Grupo4 C-	Grupo4 Vaca	Grupo4 Vaca	Grupo4 C-	Patrón 1/1000 Vaca	Patrón 1/1000 Vaca
E	Grupo5 Cabalo	Grupo5 Cabalo	Grupo5 C-	Grupo5 Vaca	Grupo5 Vaca	Grupo5 C-		
F	Patrón 1/1 Cabalo	Patrón 1/1 Cabalo	Patrón 1/10 Cabalo	Patrón 1/10 Cabalo	Patrón 1/100 Cabalo	Patrón 1/100 Cabalo	Patrón 1/1000 Cabalo	Patrón 1/1000 Cabalo

- ☐ 23) Selar a placa coa tapa adhesiva transparente, tendo coidado de tocar só no borde da mesma.



- ☐ 24) Centrifugar a placa se non está todo o líquido no fondo.
- ☐ 25) Programar o termociclador de tempo real e meter a placa.

Ciclo de PCR:
 95°C-10', (95°C-15'', 60°C-1')x40,
 Curva de disociación
 95°C-15'', 60°C-1', 95°C-15''

