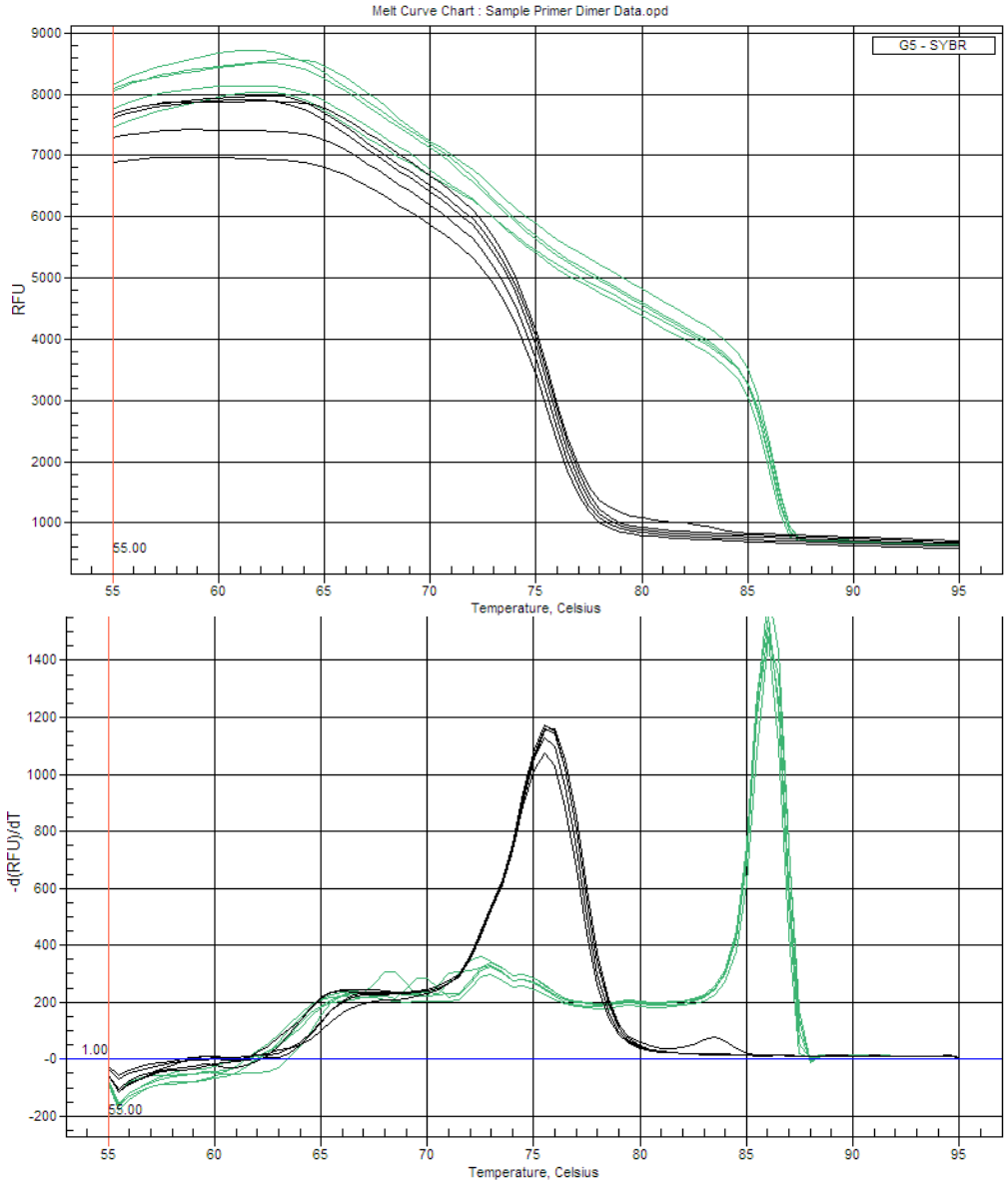
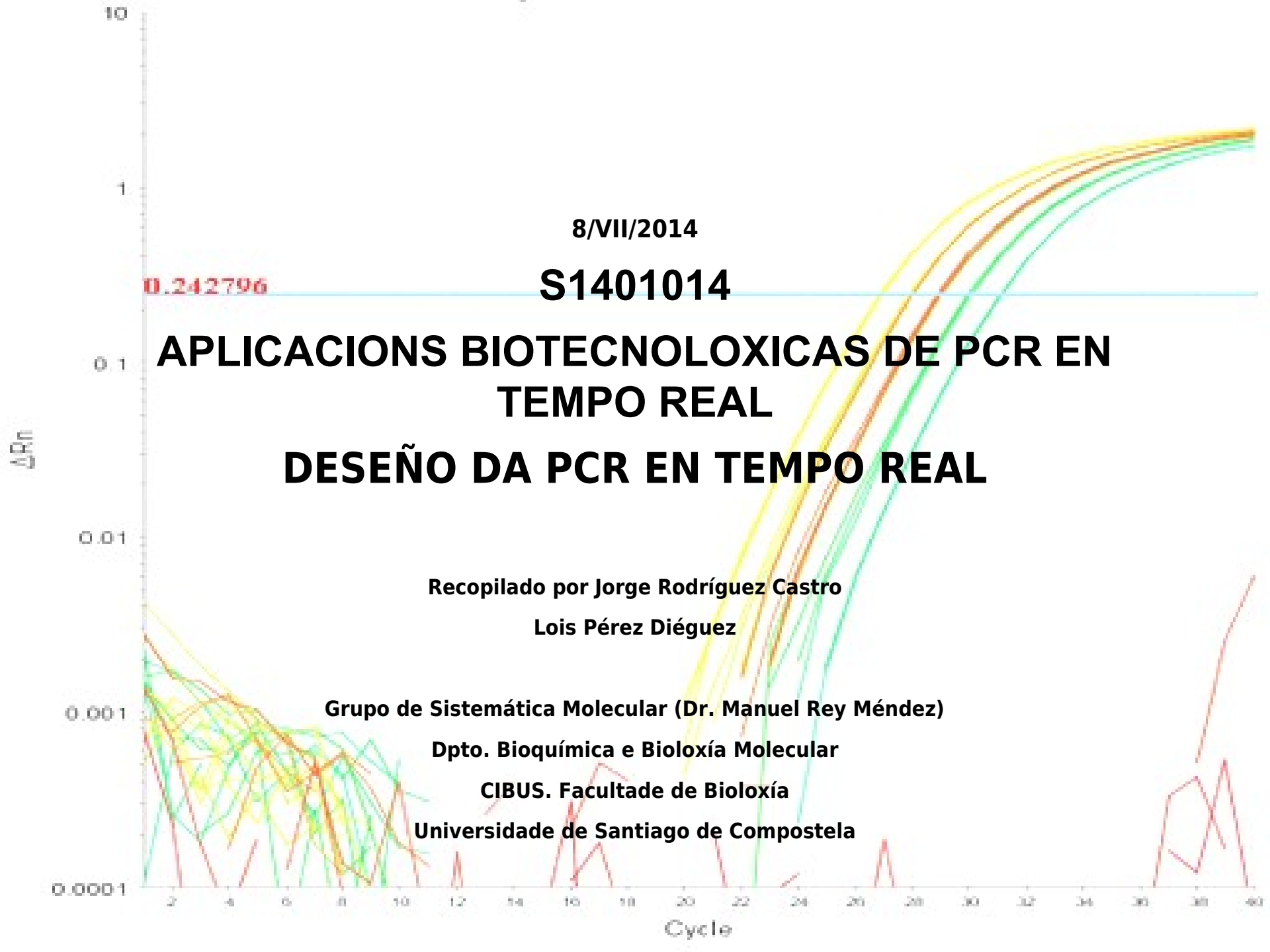
PCR EN TEMPO REAL

MELTING CURVE: CURVA DE DISOCIACIÓN





8/VII/2014

S1401014

APLICACIONS BIOTECNOLOXICAS DE PCR EN TEMPO REAL

DESEÑO DA PCR EN TEMPO REAL

Recopilado por Jorge Rodríguez Castro

Lois Pérez Diéguez

Grupo de Sistemática Molecular (Dr. Manuel Rey Méndez)

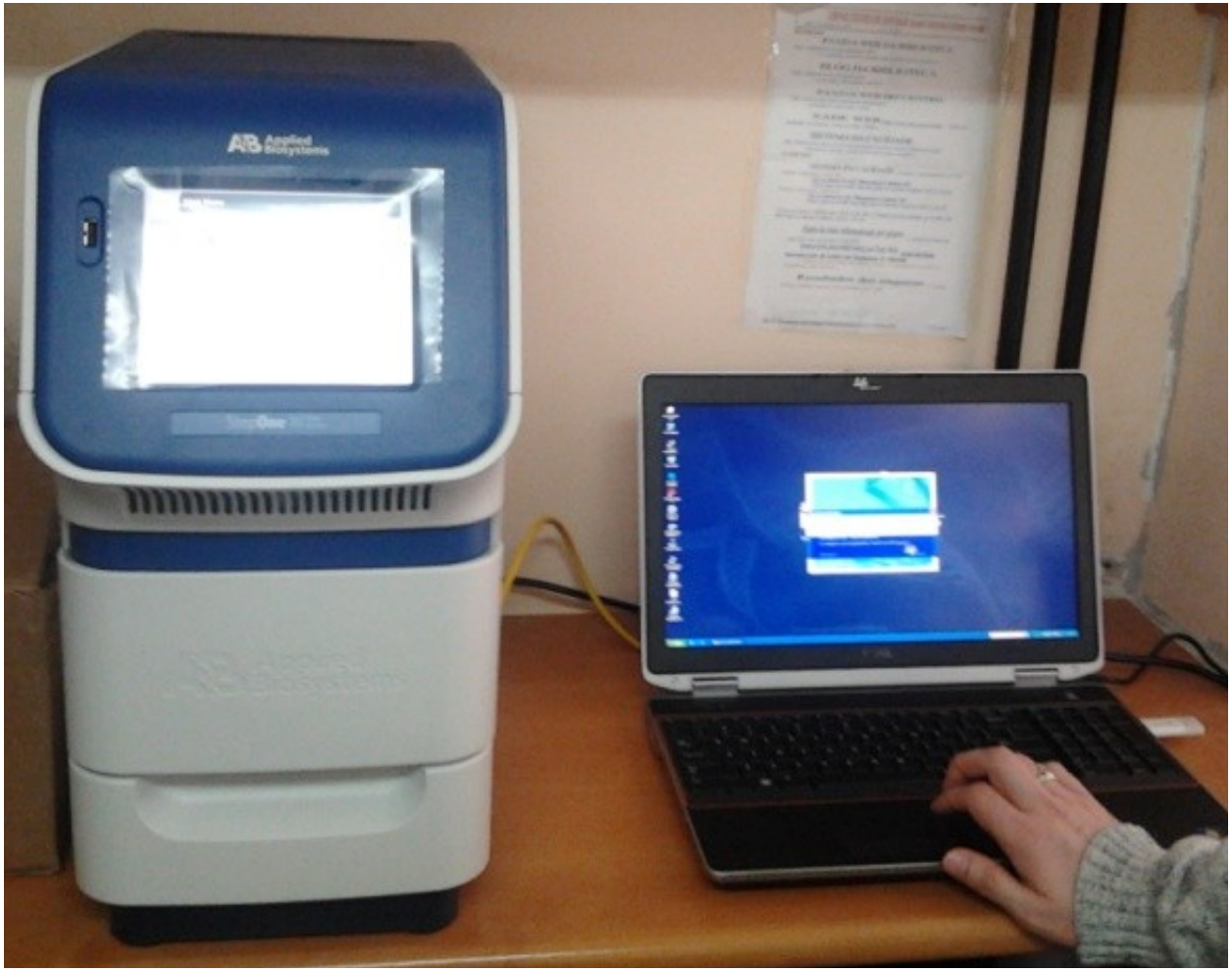
Dpto. Bioquímica e Bioloxía Molecular

CIBUS. Facultade de Bioloxía

Universidade de Santiago de Compostela

PCR EN TEMPO REAL

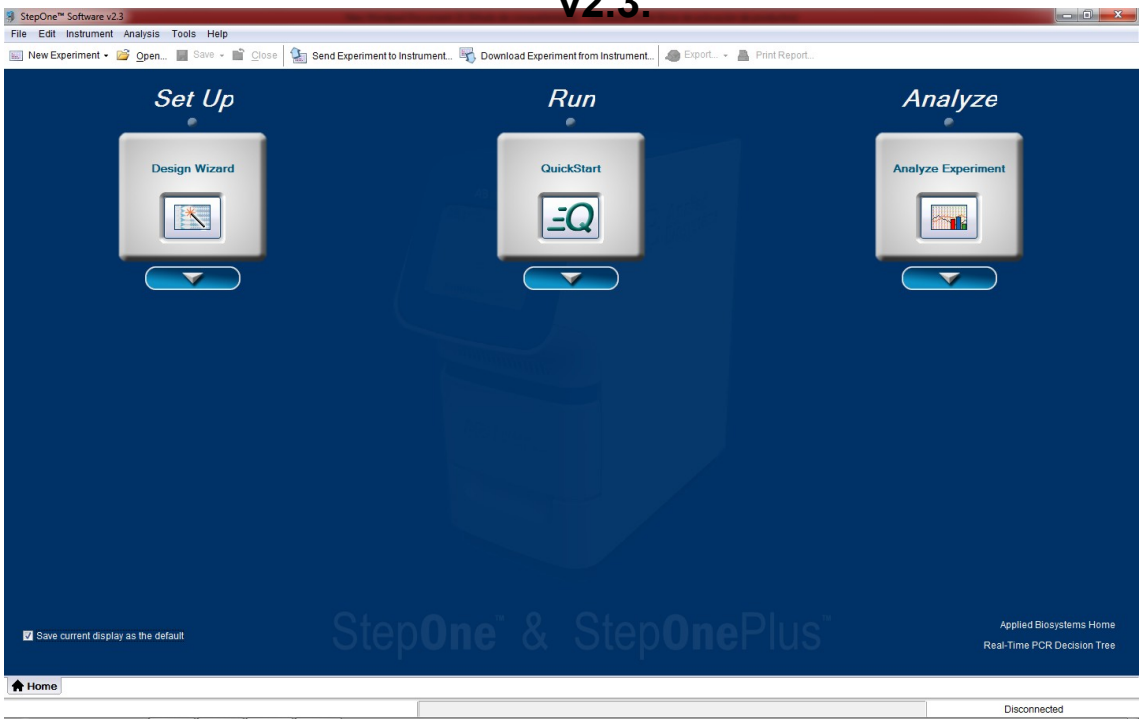
ABI PRISM STEPONE



PCR EN TEMPO REAL

ABI PRISM STEPONE

Entramos no programa **SetpOne Software v2.3.**

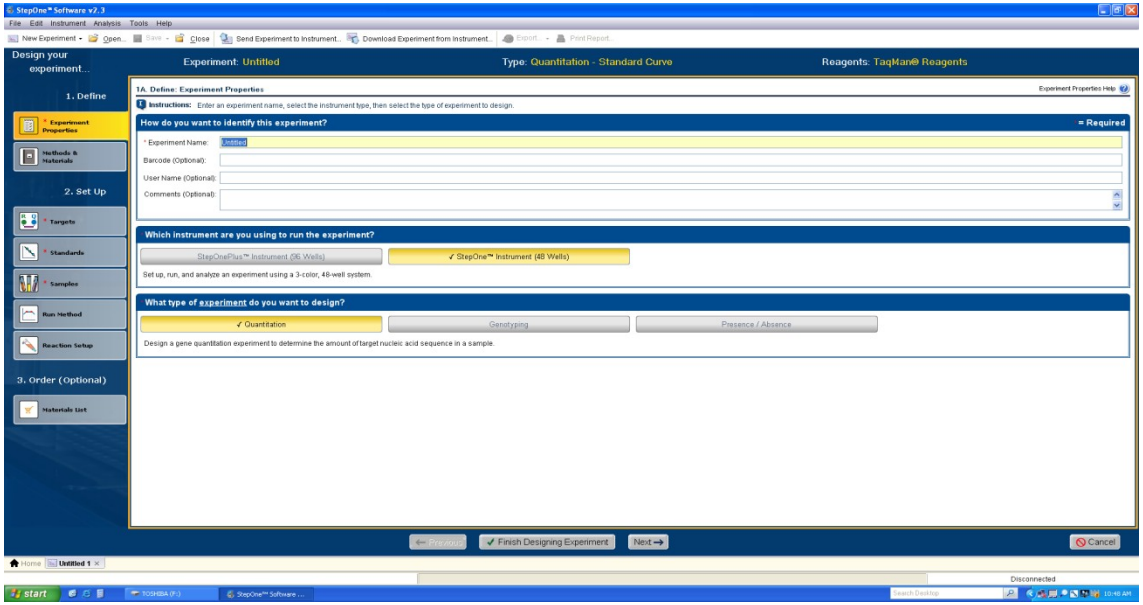


Prememos **SETUP**.

PCR EN TEMPO REAL

ABI PRISM STEPONE: Experiment Properties

Pantalla de **Experiment Properties**

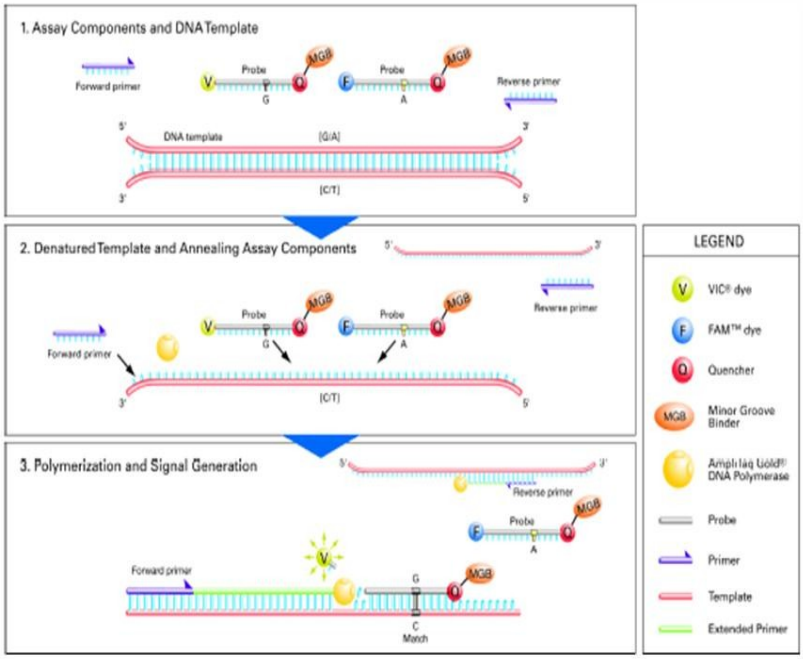


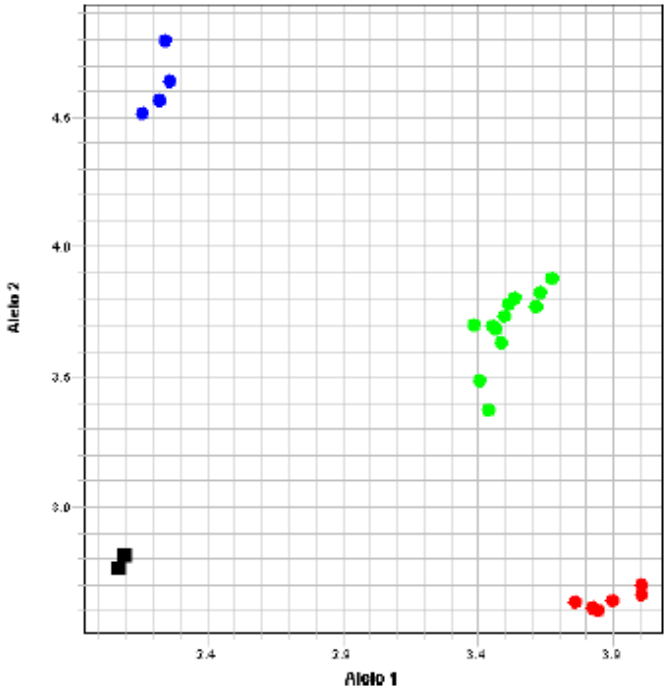
Nomeamos o experimento
Usuario e comentarios.
Marcamos experimento de 48 pociños.
Quantification (Genotyping, Presence Absence).
Next

PCR EN TEMPO REAL

ABI PRISM STEPONE: XENOTIPADO

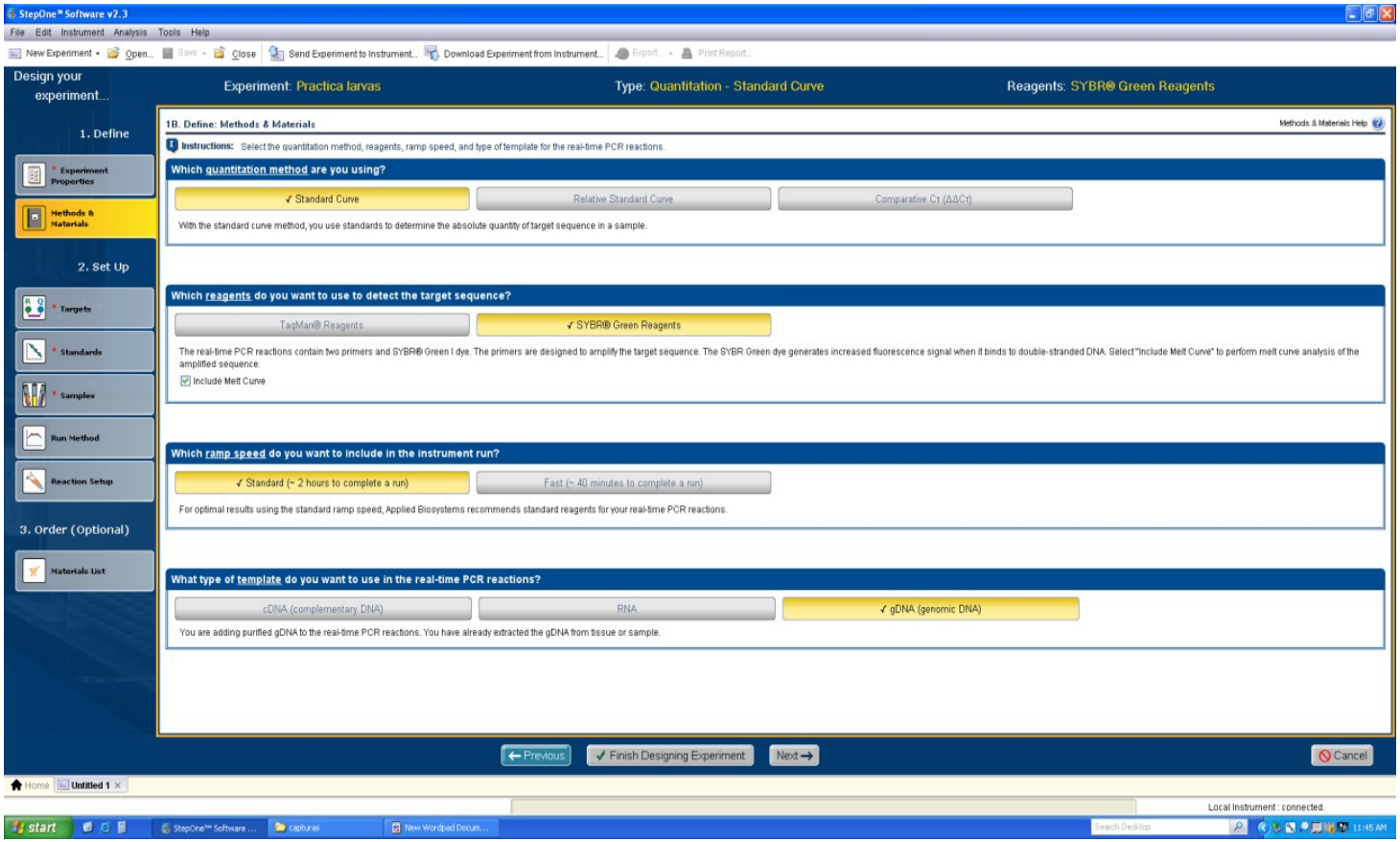
Taqman: Engádese unha sonda complementaria a unha zona interna do fragmento de ADN amplificado. Leva un fluorocromo (emisor) e un “quencher” (captador de fluorescencia), que na etapa de extensión, pola función exonucleasa 5'-3' da polimerasa, se separan e pode detectarse a luz do fluorocromo. Empregando xogos de sondas con fluorocromos de diferentes cores permite estudos de SNPs, diferencias entre secuencias dun só nucleótido. Diferenzar alelos.





PCR EN TEMPO REAL

ABI PRISM STEPONE: Methods & Materials



Curva Standard, curva estandard relativa,Comparativa de C_T

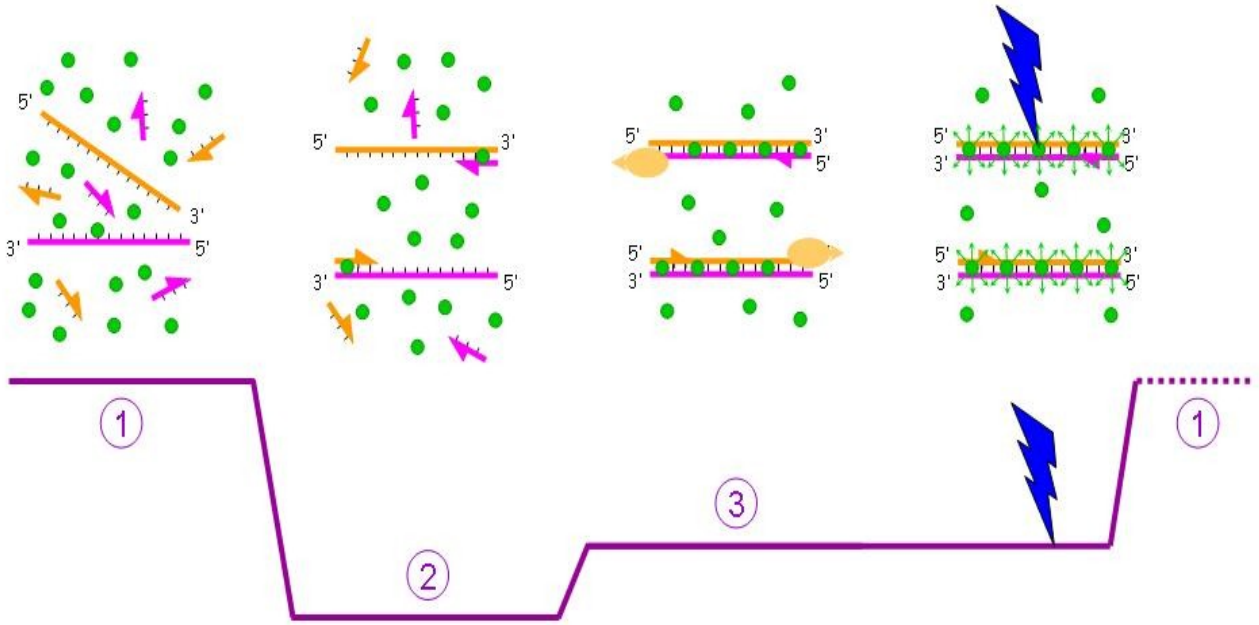
Reagents. Tipo de química:

SYBR Green, TaqMan

PCR EN TEMPO REAL

ABI PRISM STEPONE

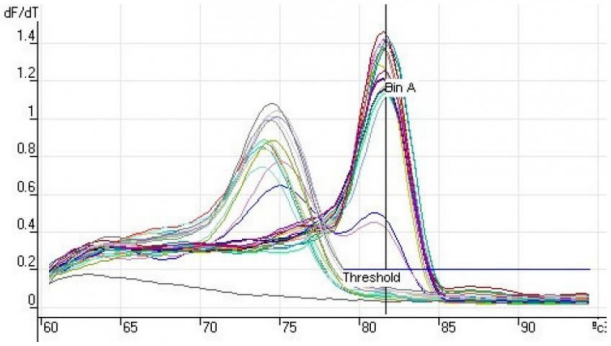
SYBR Green: Sustancia fluorocrómica, que se coloca entre as febras do ADN, producindo maior fluorescencia a maior número de febras de ADN.



PCR EN TEMPO REAL

ABI PRISM STEPONE

Nós imos a empregar o **SYBR Green**, que por defecto marca tamén a **curva de melting** ou fusión. Que vainos a indicar se existen amplificacións non buscadas e observar heterocigosidades.



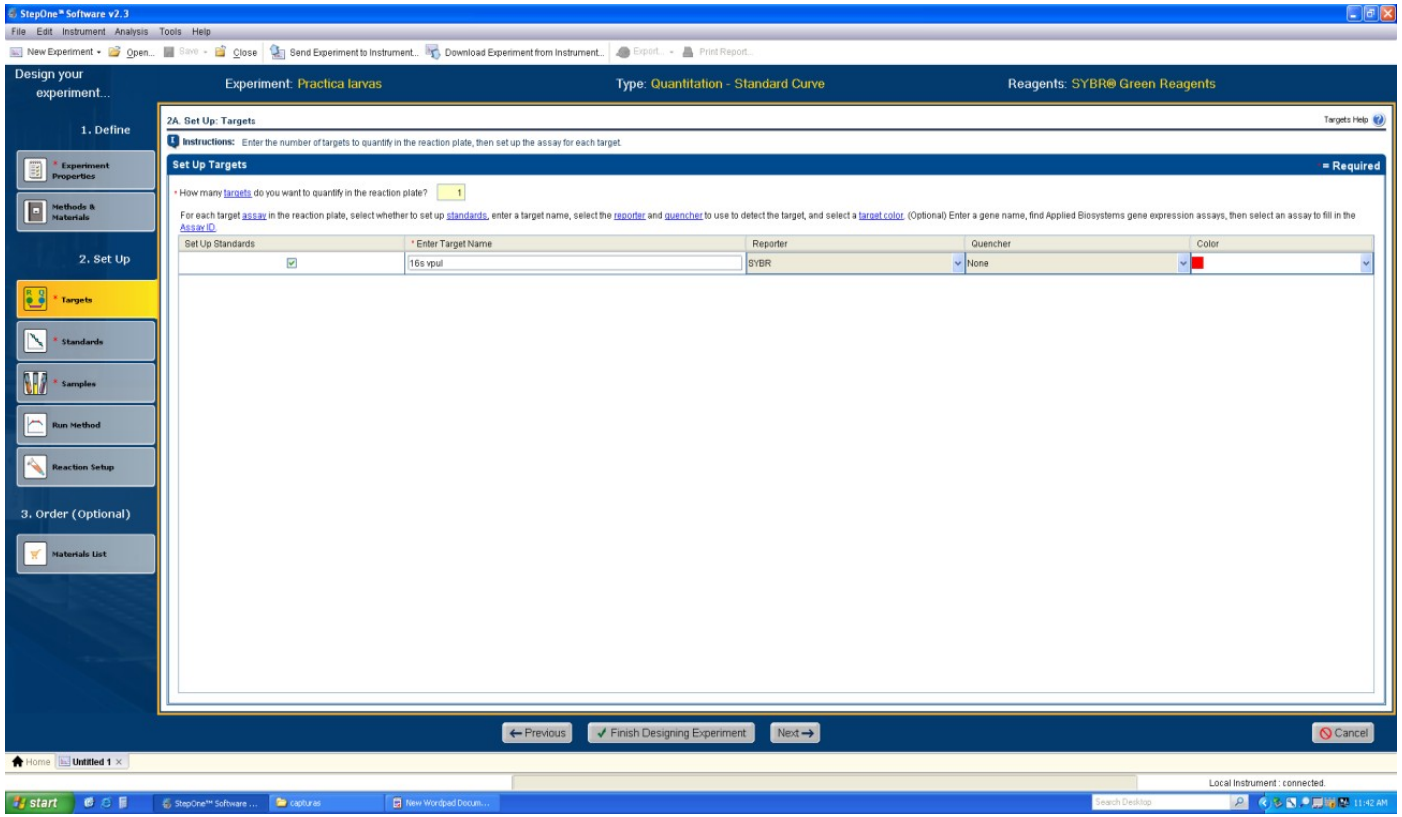
Velocidade das reaccións: **Reacción estándar de 2 horas**, Fast RT de 40´. (precisa reactivos específicos)

Template: cDNA (ADN complementario, a partires de ARN), RNA, **gDNA (ADN xenómico)**

NEXT

PCR EN TEMPO REAL

ABI PRISM STEPONE: SETUP TARGETS



Indicamos o número de mixes distintos (xogos de primers) empregados. O núméor de dianas (Targets), zonas do ADN que imos analizar.

Método **SYBR**.

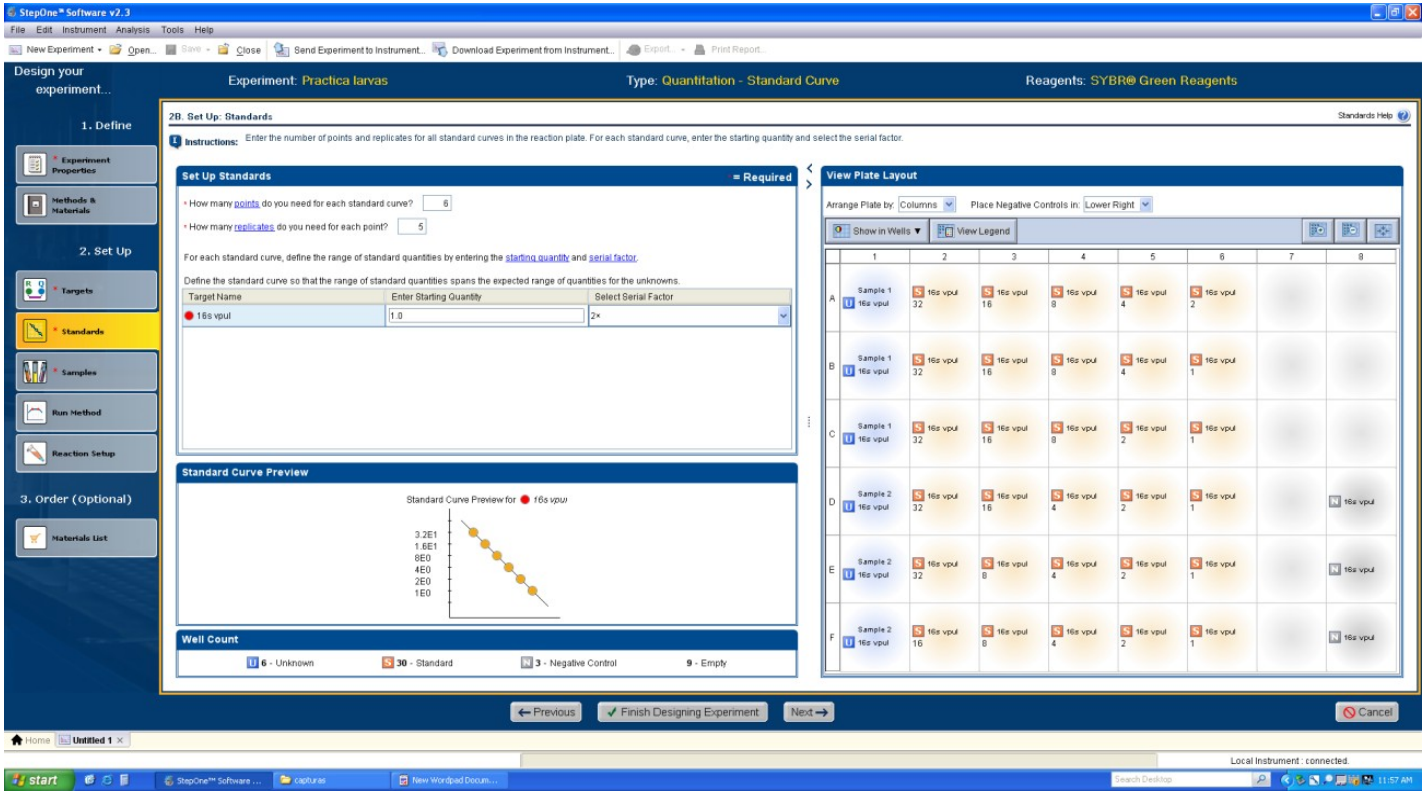
Quencher **NONE.** Ningún pois non é un método Taqman.

E asignámoslle unha cor.

NEXT.

PCR EN TEMPO REAL

ABI PRISM STEPONE: SETUP STANDARD



P**untos da recta patrón**. Polo xeral 5 ou 6

N**úmero de replicas** para cada punto

Concentración inicial

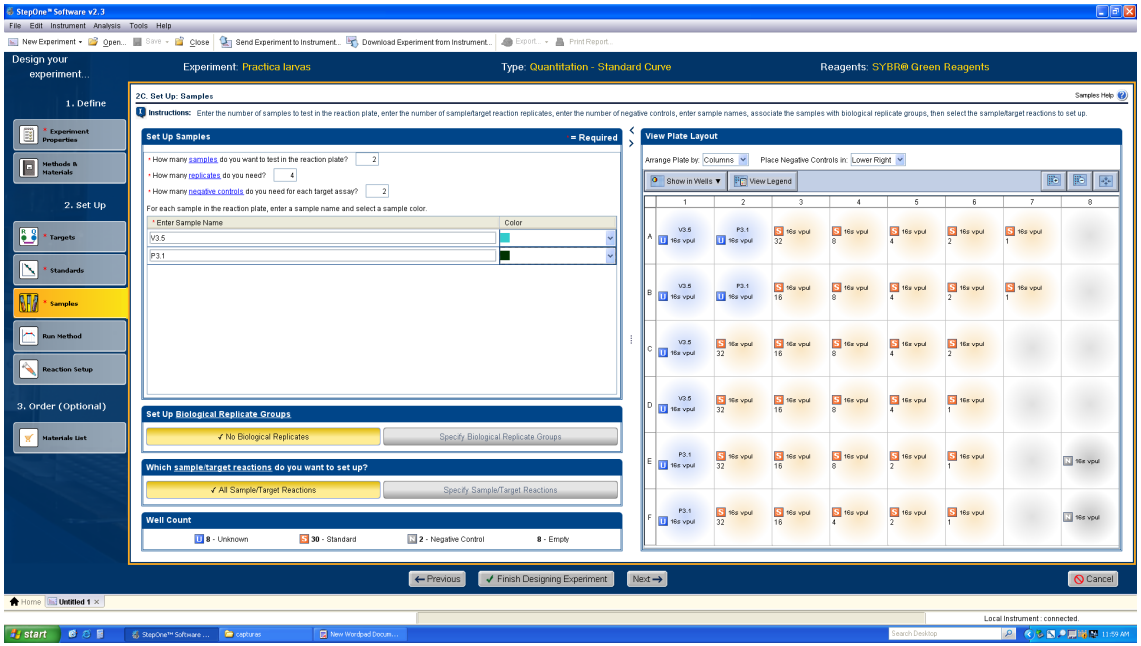
Factor de dilución x2

Organización das mostras e controis negativos na placa: Filas ou por columnas.

Next

PCR EN TEMPO REAL

ABI PRISM STEPONE: SETUP SAMPLES

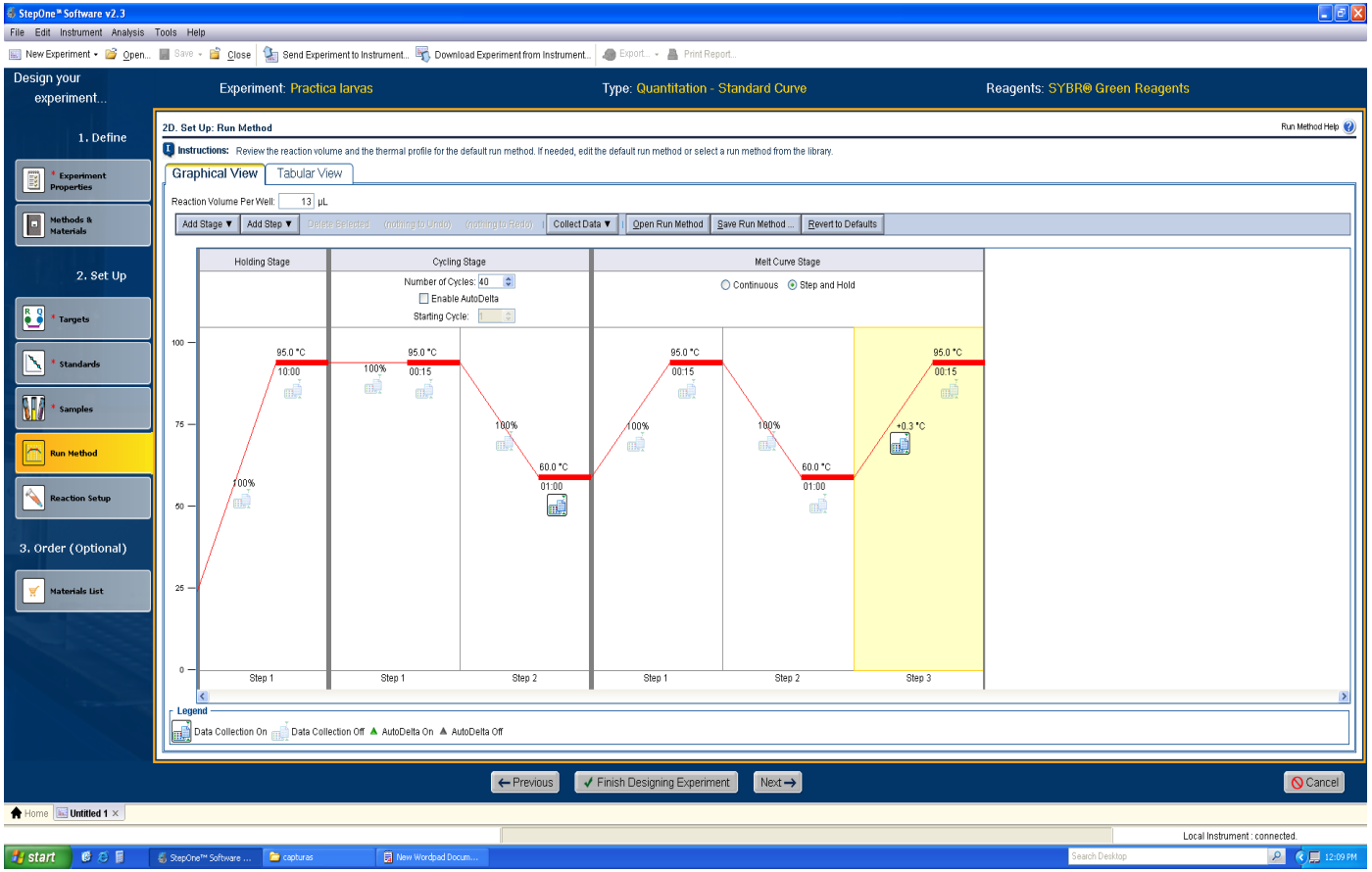


Número de mostras de ADN
Número de replicas por mostras
Número de controis negativos.

Cores das mostras
No Biological Replicates (só unha extración de cada ADN)
Imos cargar na placa todas as mostras con tódolos xogos de primers: ***All Sample***.
Next

PCR EN TEMPO REAL

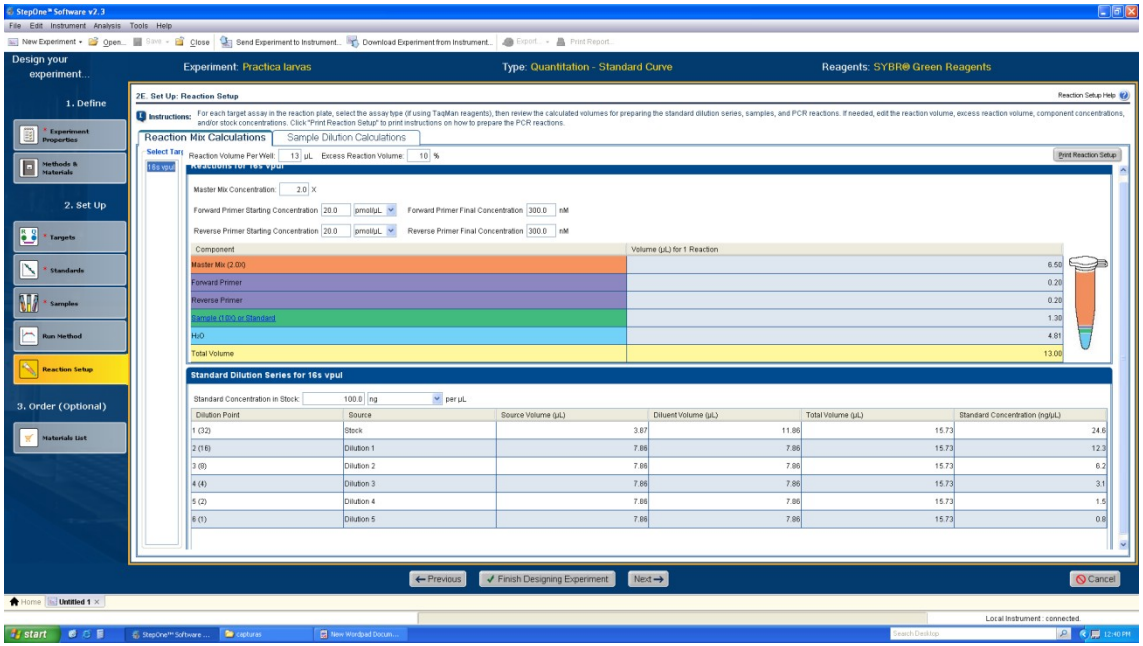
ABI PRISM STEPONE: RUN METHOD



Volume final dos pociños.
Número de ciclos.
Next

PCR EN TEMPO REAL

ABI PRISM STEPONE: REACTION SETUP



Cálculos das cantidades de cada un dos reactivos

Exceso de MIX: 10%, necesario para compensar os “erros” de pipeteo.

Master Mix posúe unha concentración inicial de 2x, polo queno volúmen final queda diluílo a metade.

Concentración inicial dos primers.

Concentración final dos primers (50 a 900nM)

A cantidade de ADN aparece fixada nun 10% do volume final

Next

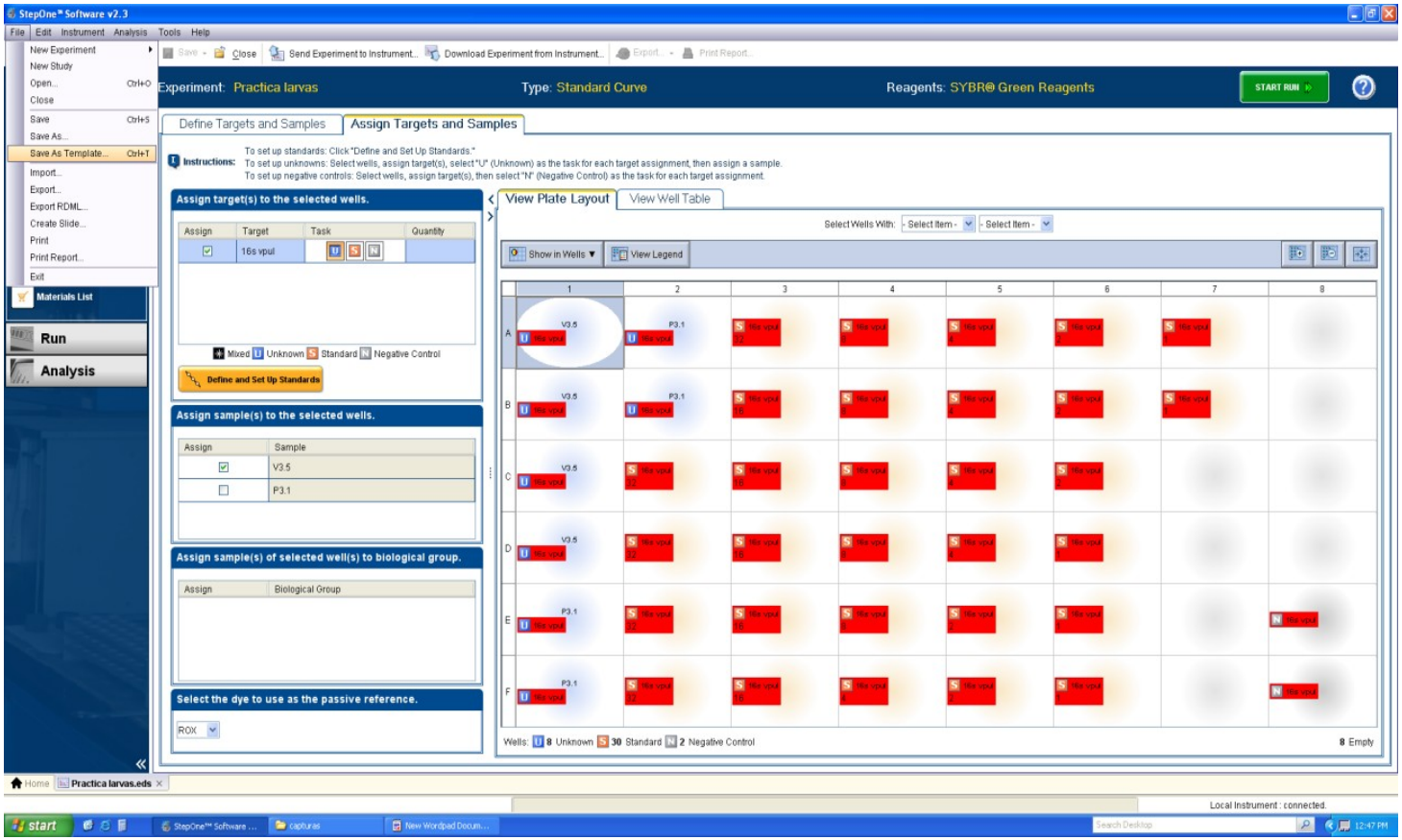
PCR EN TEMPO REAL

ABI PRISM STEPONE: MATERIALS LIST

Para mercar os reactivos necesarios de BIOSYSTEM vía Internet.

PCR EN TEMPO REAL

ABI PRISM STEPONE



Antes de comezar a PCR picando en **RUN** (parte superior dereita en verde) podemos editar o deseño da placa modificando a posición e cores das dianas, mostras e controis negativos
Podemos salvar o archivo e o deseño da placa para outras reaccións

RUN START

PCR EN 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)**
H_2O desionizada autoclavada	-	-	9	**27**

□ 2) Identificar un tubo de 1.5 ml como MIX Cabalo e outro como MIX Vaca.
□ 3) Engadirlles a cada un **27 µl** de **auga** desionizada autoclavada.
□ 4) Engadirlles **37,5 µl** de **SYBR Green Master mix 2X**.
□ 5) Engadirlles **1,125 µl** do **Cebador F** correspondente.
□ 6) Engadirlles **3,375 µl** do **Cebador R** correspondente.
□ 7) Mezclade cada tubo cun vortex (pode ser necesario centrifugalo despóis para baixar as gotas das paredes) ou pipeteando.

PCR EN TEMPO REAL

PROTOCOLO

□ 8) Coller 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-

PCR EN TEMPO REAL

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)**
H_2O desionizada autoclavada	-	-	9	**45**

PCR EN TEMPO REAL

PREPARACIÓN DA **RECTA PATRÓN**

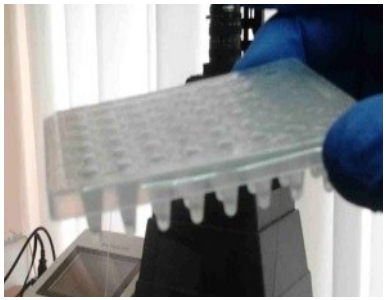
□ 13) Identificar un tubo de 1.5 ml como MIX Cabalo e outro como MIX Vaca.
□ 14) Engadirlles a cada un **45** µl de auga desionizada autoclavada.
□ 15) Engadirlles **62,5** µl de SYBR Green Master mix 2X.
□ 16) Engadirlles **1,875** µl do Cebador **F correspondente a cada grupo**.
□ 17) Engadirlles **5,625** µl de Cebador **R correspondente a cada grupo**.
□ 18) Mezclade cada tubo cun vortex *(pode ser necesario centrifugalo despóis 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).

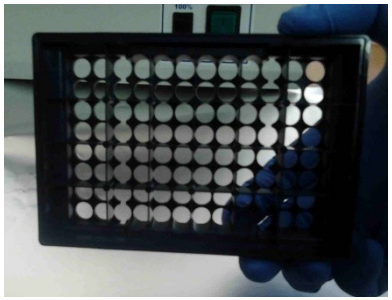
1/1	1/10	1/100	1/1000	C-
2 µl do Patrón sen diluir	2 µl	2 µl	2 µl	-

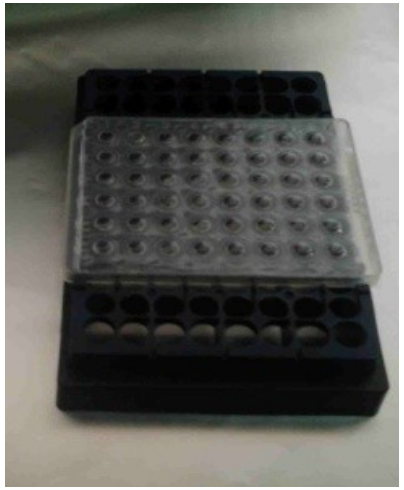
PCR EN TEMPO REAL

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 parte inferior..





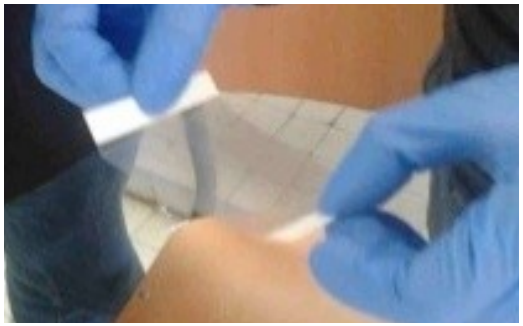
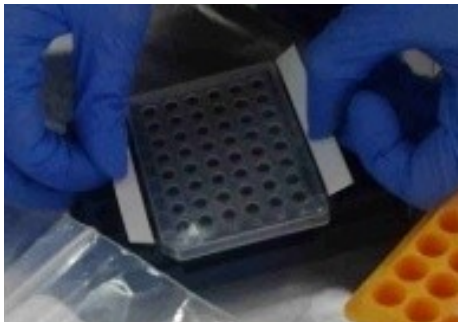
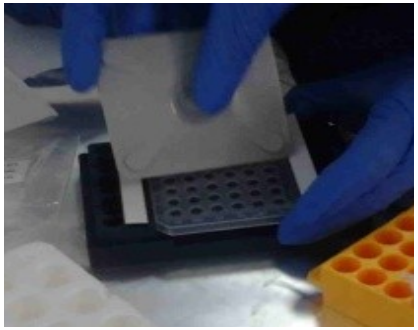


	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Grupo1 Cabalo	Grupo1 Cabalo	Grupo1 C-	Grupo1 Vaca	Grupo1 Vaca	Grupo1 C-	Patrón 1/1 Vaca	Patrón 1/1 Vaca
B	Grupo2 Cabalo	Grupo2 Cabalo	Grupo2 C-	Grupo2 Vaca	Grupo2 Vaca	Grupo2 C-	Patrón 1/10 Vaca	Patrón 1/10 Vaca
C	Grupo3 Cabalo	Grupo3 Cabalo	Grupo3 C-	Grupo3 Vaca	Grupo3 Vaca	Grupo3 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

PCR EN TEMPO REAL

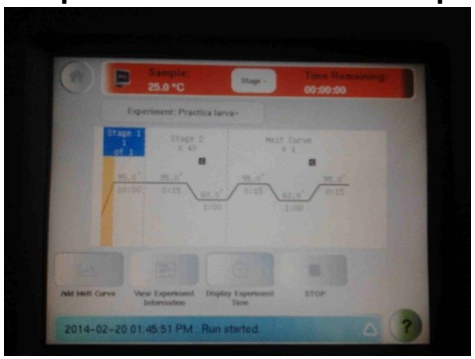
PREPARACIÓN DA PLACA

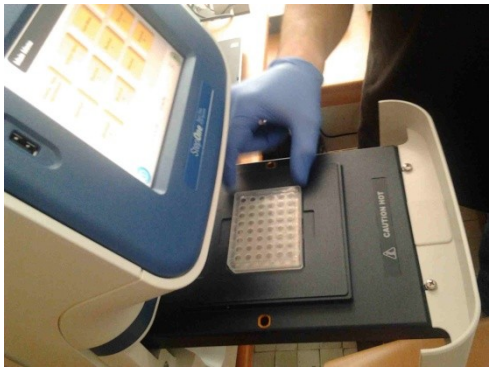
□ 23) Selar a placa coa tapa adhesiva transparente, tendo coidado de tocar só no borde da mesma.

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

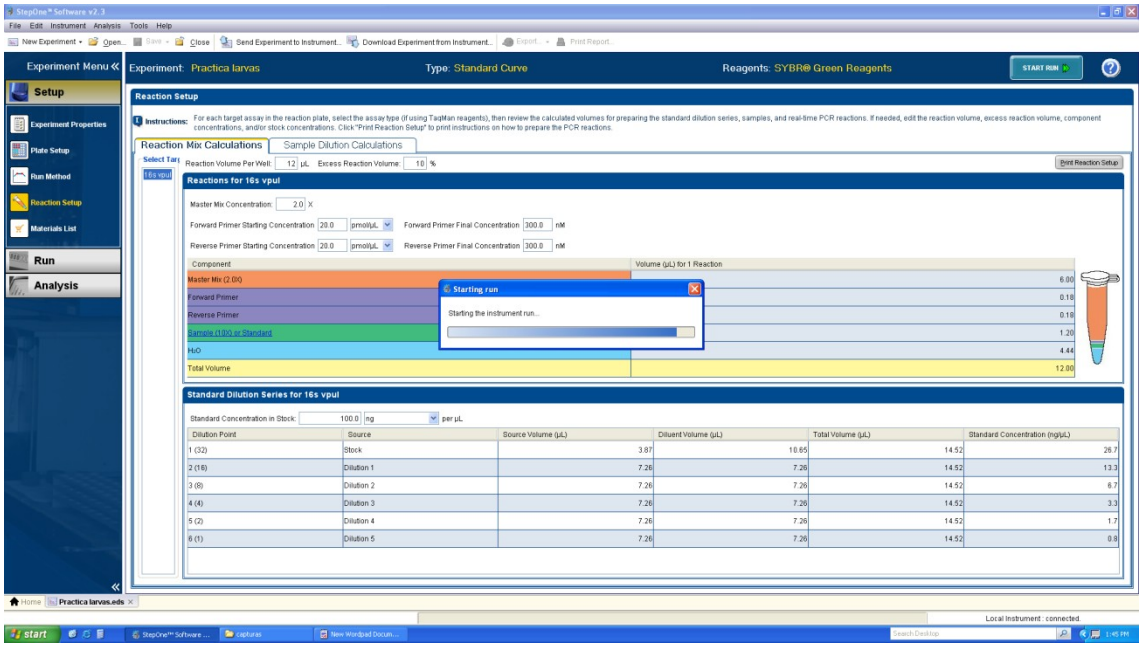
Ciclo de PCR:
95°C-10', (95°C-15'', 60°C-1')x40,
Curva de disociación
95°C-15'', 60°C-1', 95°C-15''





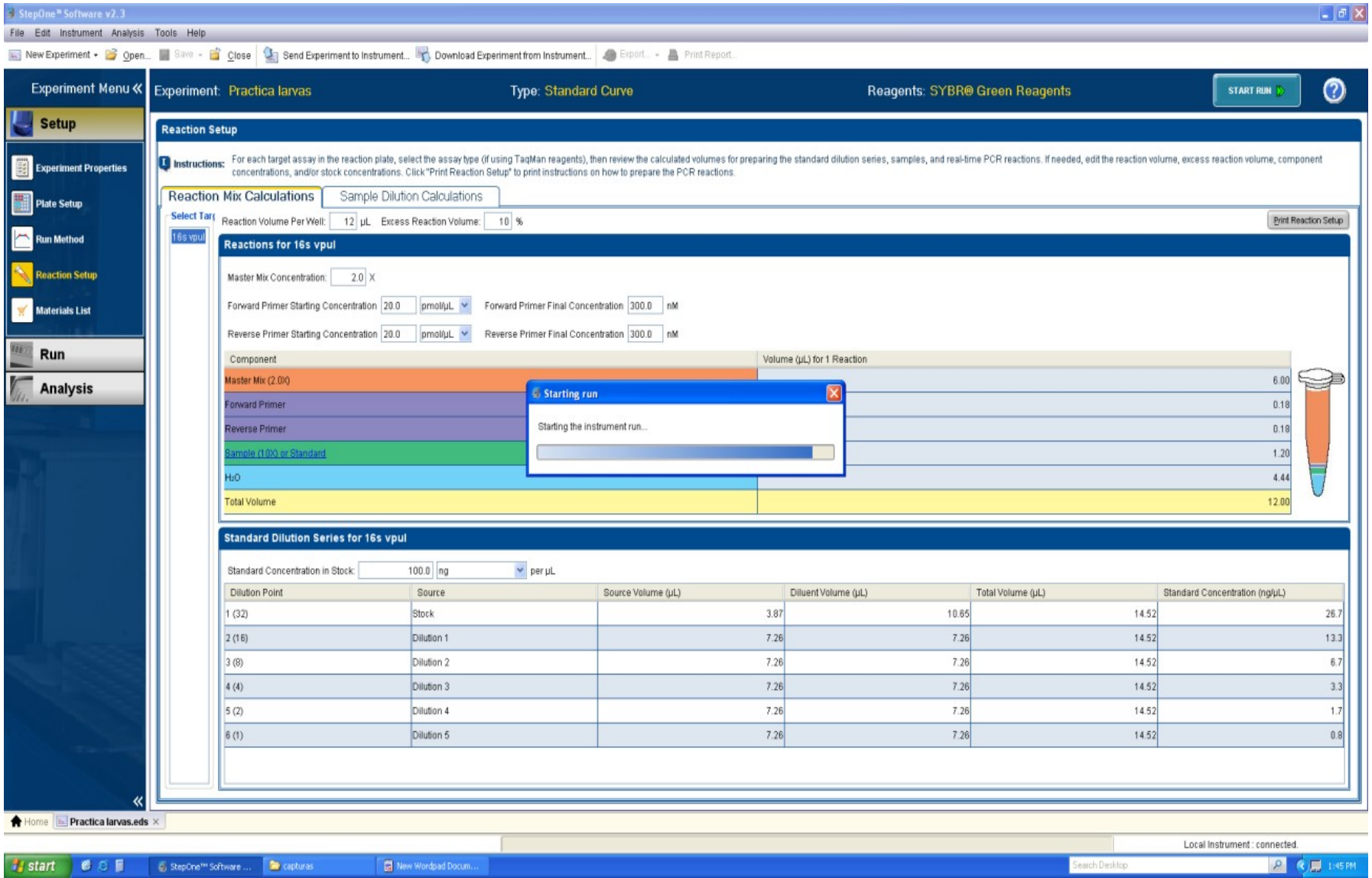
PCR EN TEMPO REAL

RUN



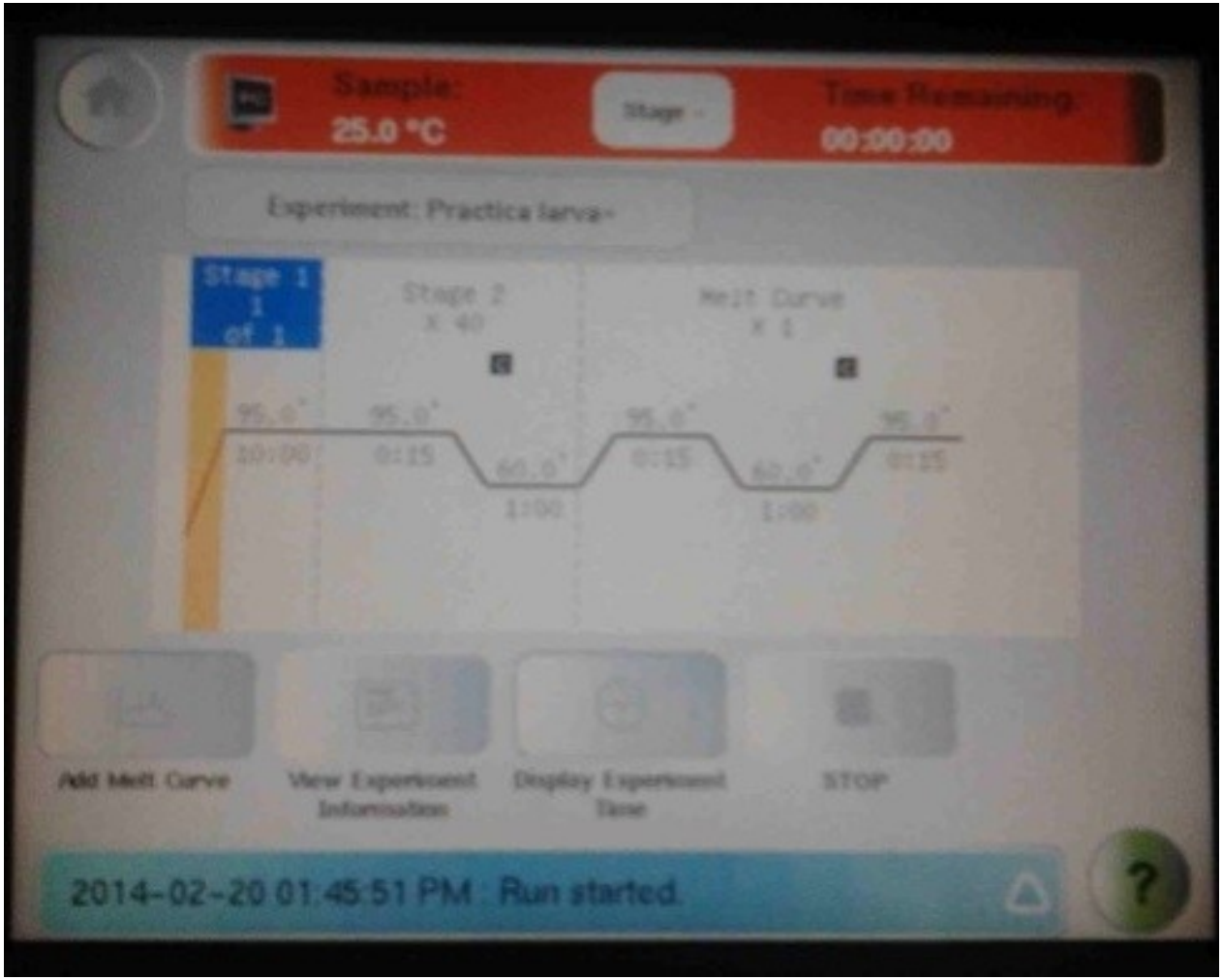
PCR EN TEMPO REAL

RUN



PCR EN TEMPO REAL

RUN



PCR EN TEMPO REAL

RUN