

PRÁCTICA 4: PCR EN TEMPO REAL II

Mércores 9 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, galiña 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 Porco e Galiña, 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 Porco e outro como MIX Galiña.
- ☐ 3) Engadirlles a cada un **27** µl de auga desionizada autoclavada.
- ☐ 4) **37,5** µl de SYBR Green Master mix 2X.
- ☐ 5) **1,125** µl do Cebador **F correspondente**.
- ☐ 6) **3,375** µl de Cebador **R correspondente**.
- ☐ 7) Mezclade cada tubo cun vortex (*pode ser necesario centrifugalo despois para baixar as gotas das paredes*) ou pipeteando.
- ☐ 8) Coller seis tubos de 200 µl e identificalos P1, P2, P3, G4, G5, G6 e o código da vosa mostra.

- ☐ 9) Pipetear nos tres P **23** µl do MIX Porco e nos tres G **23** µl do MIX Galiña.
- ☐ 10) Pipetear 2 µl de ADN nos tubos 1, 2, 4 e 5 (os tubos 3 e 6 son os controis negativos).

P1	P2	P3	G4	G5	G6
2 µl	2 µl	C-	2 µl	2 µl	C-

PREPARACIÓN DA RECTA PATRÓN

- ☐ 11) Os grupos 2 e 3 farán a preparación da recta patrón de Porco e os grupos 4 e 5 as de Galiña.
- ☐ 12) Cada grupo colle o ADN Patrón que lle corresponda e fará 3 dilucións seriadas en tres tubos de 1,5 ml.

	1	0.1	0.01
(1/1)	(1/10)	(1/100)	(1/1000)
Patrón	2 ul Patrón +18 ul H ₂ O	2 ul 1/10 +18 ul H ₂ O	2 ul 1/100 +18 ul H ₂ O

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 Porco e outro como MIX Galiña.
- ☐ 14) Engadirilles a cada un **45** µl de auga desionizada autoclavada.
- ☐ 15) **62,5** µl de SYBR Green Master mix 2X.
- ☐ 16) **1,875** µl do Cebador **F** **correspondente a cada grupo.**
- ☐ 17) **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 10, 1, 0.1, 0.01, C- e o código do voso patrón (P ou G).
- ☐ 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).

10	1	0.1	0.01	C-
(1/1)	(1/10)	(1/100)	(1/1000)	
2 µl do Patrón sen diluir	2 µl	2 µl	2 µl	-

- ☐ 22) Pasar 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 Porco	Grupo1 Porco	Grupo1 C-	Grupo1 Galiña	Grupo1 Galiña	Grupo1 C-	Patrón 10 Galiña 1/1	Patrón 10 Galiña 1/1
B	Grupo2 Porco	Grupo2 Porco	Grupo2 C-	Grupo2 Galiña	Grupo2 Galiña	Grupo2 C-	Patrón 1 Galiña 1/10	Patrón 1 Galiña 1/10
C	Grupo3 Porco	Grupo3 Porco	Grupo3 C-	Grupo3 Galiña	Grupo3 Galiña	Grupo3 C-	Patrón 0,1 Galiña 1/100	Patrón 0,1 Galiña 1/100
D	Grupo4 Porco	Grupo4 Porco	Grupo4 C-	Grupo4 Galiña	Grupo4 Galiña	Grupo4 C-	Patrón 0,01 Galiña 1/1000	Patrón 0,01 Galiña 1/1000
E	Grupo5 Porco	Grupo5 Porco	Grupo5 C-	Grupo5 Galiña	Grupo5 Galiña	Grupo5 C-		
F	Patrón 10 Porco 1/1	Patrón 10 Porco 1/1	Patrón 1 Porco 1/10	Patrón 1 Porco 1/10	Patrón 0,1 Porco 1/100	Patrón 0,1 Porco 1/100	Patrón 0,01 Porco 1/1000	Patrón 0,01 Porco 1/1000

- ☐ 23) Sellar 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:

50° C-2', 95° C-10', (95° C-15'', 60° C-1')x40,

Curva de disociación

95° C-15'', 60° C-1', 95° C-15''