

9/VII/2014

S1401014

0.242796

APLICACIONES BIOTECNOLOXICAS DE PCR EN TEMPO REAL

DESEÑO DA PCR EN TEMPO REAL 2

Recopilado por Jorge Rodríguez Castro

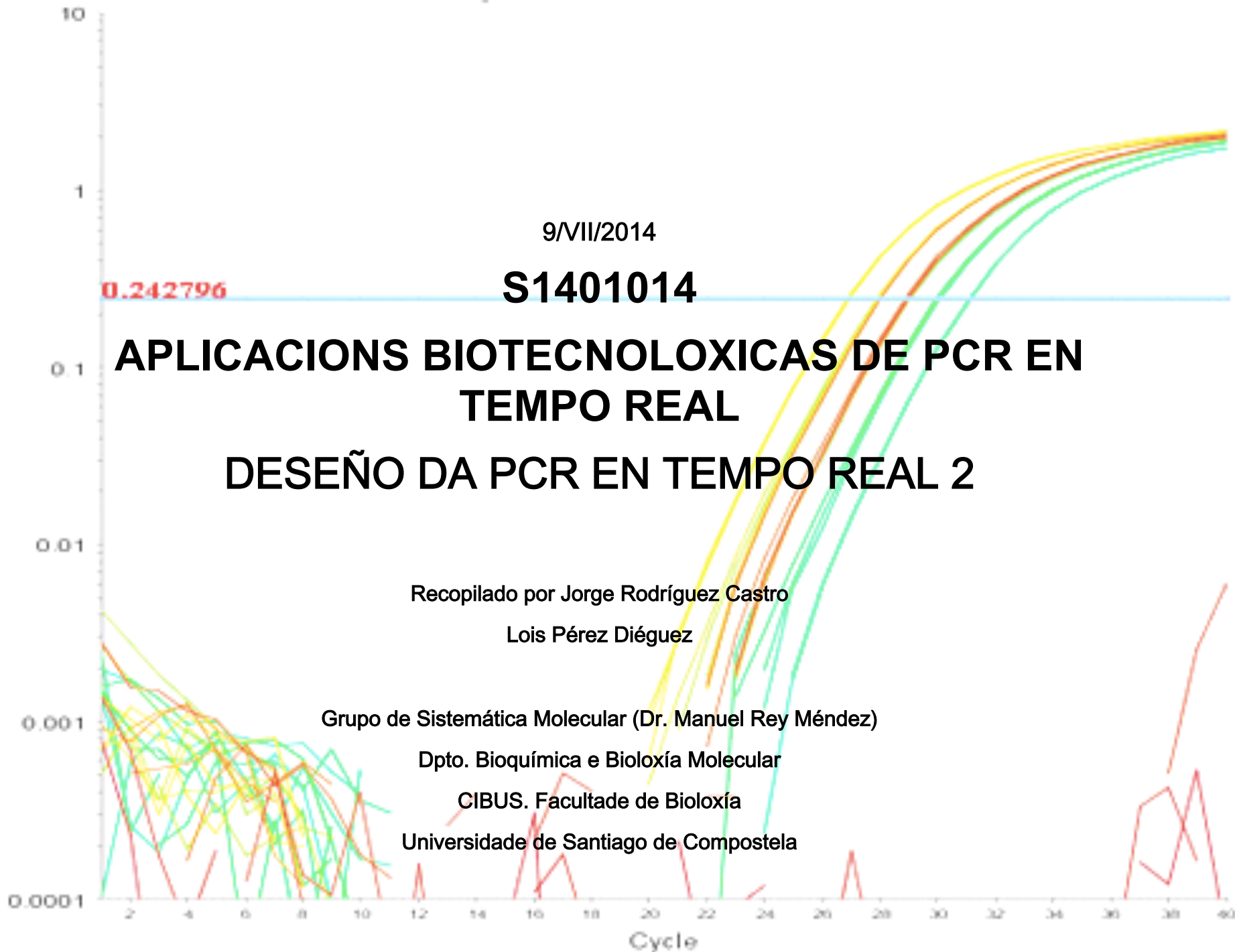
Lois Pérez Diéguez

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

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)
H ₂ O desionizada autoclavada	-	-	9	27

- 2) Identificar un tubo de 1.5 ml como MIX Porco e outro como MIX Galiña.
- 3) Engadirllles 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.

PCR EN TEMPO REAL

PROTOCOLO

- 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-

PCR EN TEMPO REAL

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

PCR EN TEMPO REAL

PREPARACIÓN DA RECTA PATRÓN

- 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 despóis 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	-

PCR EN TEMPO REAL

PREPARACIÓN DA PLACA

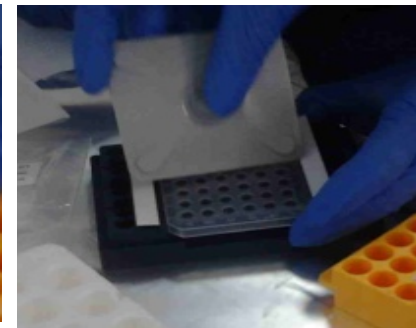
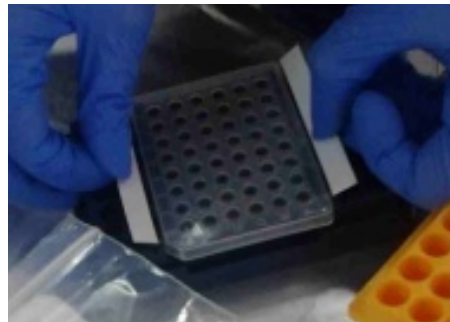
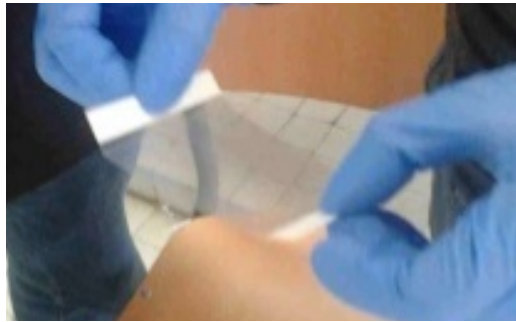
- 22) Pasar o contido dos tubos á placa de 48 posta no soporte para evitar que se manche a parte inferior.

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

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''

