

25/VI/2013

S1301005

A REACCIÓN EN CADEA DA POLIMERASA (PCR)

NA INDUSTRIA ALIMENTARIA

CUANTIFICACIÓN e PCR

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

ÁCIDOS NUCLEICOS, NUCLEÓTIDOS, NUCLEÓSIDOS E BASES NITROXENADAS

EXISTEN 8 NUCLEÓTIDOS, QUE SE DIVIDEN EN DOUS GRUPOS:

- DESOXIRRIBONUCLEÓTIDOS (4): COMPOÑEN O ADN
- RIBONUCLEÓTIDOS (4): COMPONEN O ARN

OS NUCLEÓTIDOS ESTÁN COMPOTOS POR:

- UNHA PENTOSA: AZUCAR DE TIPO DESOXIRRIBOSA O RIBOSA
- UNHA BASE NITROXENADA: PÚRICA (A,G) O PRIMIDÍNICA (T, U, C)
- GRUPO FOFATO: UNE OS NUCLEÓSIDOS (PENTOSA+BASE NITROXENADA)

BASES NITROXENADAS

SON CINCO:

- 2 PÚRICAS (AS DOS ATÓPANSE TANTO NO ADN COMO NO ARN) :
- ADENINA
- GUANINA
- 3 PRIMIDÍNICAS:
- TIMINA (ADN)
- URACILO (ARN)
- CITOSINA (ADN E ARN)

UNHA PÚRICA TEN COMO COMPLEMENTARIA UNHA PRIMIDÍNICA, Á QUE SE UNE POR PONTES DE HIDRÓXENO C-G, A-T (A-U NOARN)

Chromosomes

0.5 μ m

INTERFASE G1

Chromosome arm

Centromere

Chromosome duplication (including DNA synthesis)

INTERFASE S

Sister chromatids

Separation of sister chromatids

Centromere

DNA molecules

Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

Por M en C Rafael Govea Villaseñor

CROMOSOMAS

1.5% de su longitud son exones codificadores de proteínas.
70% de ADN extragénico
Un 70% son secuencias repetitivas dispersas (la mitad del genoma humano)
30 % de secuencias relacionadas con genes.
95% ADN no codificante: pseudogenes, fragmentos de genes, intrones, secuencias UTR, ...
Tradicionalmente consideradas regiones sin función, hay datos que demuestran que esas regiones desarrollan funciones relacionadas con la regulación de la expresión génica.

Adaptado de WIKIPEDIA

Cromosoma	Genes	Base	Forma
1	4.222	247.199.719	metacéntrico, grande.
2	2.613	242.751.149	submetacéntrico, grande.
3	1.859	199.446.827	metacéntrico, grande.
4	451	191.263.063	submetacéntrico, grande.
5	617	180.837.866	submetacéntrico, grande.
6	2.280	170.896.993	submetacéntrico, mediano.
7	2.758	158.821.424	submetacéntrico, mediano.
8	1.288	146.274.826	submetacéntrico, mediano.
9	1.924	140.442.209	submetacéntrico, mediano.
10	1.793	131.624.737	submetacéntrico, mediano.
11	449	131.130.853	submetacéntrico, mediano.
12	1562	132.289.534	submetacéntrico, mediano.
13	924	114.127.980	acrocéntrico, mediano, con satélite en su brazo corto.
14	1.803	106.360.585	acrocéntrico, mediano, con satélite en su brazo corto.
15	1122	100.114.055	acrocéntrico, mediano, con satélite en su brazo corto.
16	1098	88.822.254	submetacéntrico, pequeño.
17	1576	78.654.742	submetacéntrico, pequeño.
18	766	76.117.153	submetacéntrico, pequeño.
19	1859	63.806.651	metacéntrico, pequeño.
20	1012	62.436.224	metacéntrico, pequeño.
21	582	46.944.323	acrocéntrico, pequeño.
22	1816	49.528.953	acrocéntrico, pequeño.
Cromosoma X	1850	154.913.754	submetacéntrico, mediano.
Cromosoma Y	454	57.741.652	acrocéntrico, pequeño.

Adaptado de WIKIPEDIA

Célula: hepatocitos con 20 micras, espermatozoides de 53 μ m, óvulos de 150 μ m.
Núcleo: 6 μ m.
El cromosoma 1 humano: 247.199.719 pb, 7,3 cm (46 cromosomas: 2 metros)
En metafase mitótica: 0,001 cm (0,01 mm, 10 μ m)

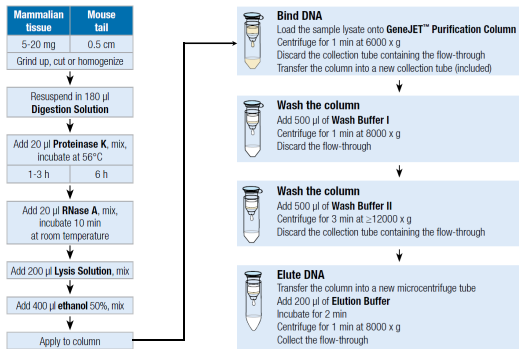
Cromosoma eucariótico duplicado y condensado (metafase mitótica).

- (1) Cromátida, cada una de las partes idénticas de un cromosoma luego de la duplicación del ADN (en la interfase).
- (2) Centrómero: lugar del cromosoma en el cual ambas cromátidas se tocan.
- (3) Brazo corto.
- (4) Brazo largo.

2m
0.001 mm
Human cell

Adaptado de WIKIPEDIA

GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit



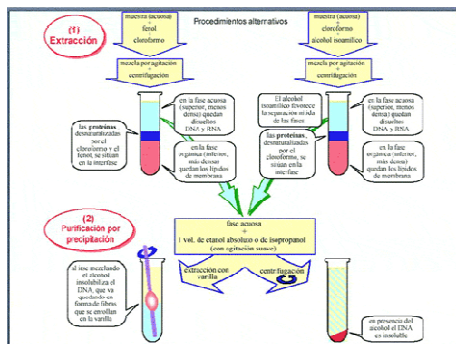
EXTRACCIÓN DO ADN

MÉTODO DO FENOL CLOROFORMO

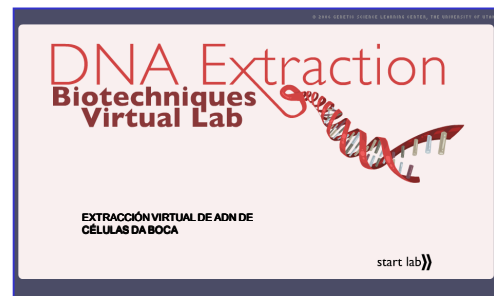
1. Trocear e introducir no tubo.
2. 200 µl de tampon de dixestión: TENS (Tris, EDTA, SDS).
3. 10 µl de Proteinasa K.
4. Incubación a 37°C.
5. Un volumen de fenol/cloroforno/isoamilalcohol (25:24:1).
 - Axitar 1'.
 - Centrifugar.
 - Fase acuosa superior: ADN e ARN.
 - Interfase: proteínas desnaturizadas polo fenol e o cloroforno.
 - Fase orgánica inferior: lípidos de membrana.
 - O isoamilalcohol favorece a separación das fases.
6. Recoller a fase superior.
 - Repetir 3 veces os pasos 5 e 6.
7. Un volumen de etanol 95%=> insolubilización do ADN (precipita).
8. Centrifugar.
9. Secar pélet (ADN e ARN).
10. Resuspender en Tris-HCl ou auga estéril.

EXTRACCIÓN DO ADN

MÉTODO DO FENOL CLOROFORMO

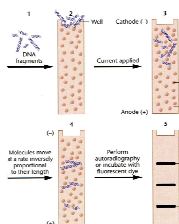


EXTRACCIÓN DO ADN

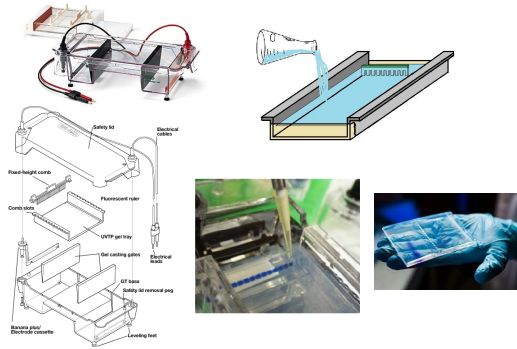


ELECTROFORESE

- Para saber a calidade e cantidade do ADN empregamos un xel de agarosa (ou acrilamida) que, como un tamiz, separa as moléculas por tamaño, pasando con maior facilidade e rapidez as máis pequenas.
- O ADN desprázase nun campo eléctrico cara o polo positivo, porque ten unha carga negativa.
- Para ver as bandas dos agregados de cadeas de ADN do mesmo tamaño utilízase a tinción con bromuro de etidio (ou RedSafe), que se sitúa dentro das dobre hebras e emite unha luz alaranxada (vedosa) baixo os raios UVA.

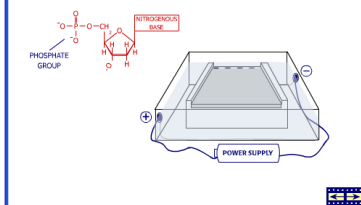


ELECTROFORESE



ELECTROFORESE

The phosphate groups in the DNA backbone carry negatively-charged oxygens – giving a DNA molecule an overall negative charge. In an electric current, the negatively-charged DNA moves toward the positive pole of the electrophoresis chamber.



(Abair)

EXTRACCIÓN DO ADN

	MOSTRAS
1	Carne picada Cerdo+Vaca
2	Bacon
3	Hamburguesa de ternera
4	Palito de cangrejo
5	Gula al ajillo

EXTRACCIÓN DO ADN

PROTOCOLO (A: Tecido animal)

- 1) Identificar dous tubos de 1.5 ml escribindo o número da mostra.
- 2) Pesar 20 mg da mostra, cortar en anaqüños, 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 µl de **Digestion Solution**
 - 20 µl de **Proteínasa K**
- 5) Incubar a 56 °C durante 3 horas ou toda a noite. Pódese acelerar o proceso remexendo o contido do tubo (30 minutos).
- 6) Engadir 200 µl de **Lysis Solution**. Mesturalo completamente co vortex 15 segundos.
- 7) Engadir 400 µl de **etanol 50%**. Mesturalo como no paso anterior .
- 8) Colleir unha columna dentro dun tubo de 2 ml.
- 9) Pipetear todo o contido do tubo de 1.5 ml dentro da columna (~800 µl).
- 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.

EXTRACCIÓN DO ADN

- 12) Pipetear 500 µl 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 vover a empregar o tubo de 2 ml.
- 15) Pipetear outros 500 µl de **Wash Buffer II** na columna.
- 16) Centrifugar a ≥12.000 xg durante 3 minutos.
- 17) Poñer a columna nun tubo de 1.5 ml e tirar o de 2 ml co filtrado.
- 18) Centrifugar a ≥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 restos de etanol.
- 20) Pipetear 100 µl de **Elution Buffer** (Tris-HCl pH 8.0, no que se dissolve o ADN) (*pódese aumentar a concentración final reducíndoo a 50 µl, 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 atravesará a membrana).
- 23) Tirar a columna. Almacenar (cuantificar, ver a calidade e a integridade, PCR,...) o tubo de 1.5 µl co ADN.

BÚFFERES E XELES DE ELECTROFORESE

- 1) Pesar 20 g de Borax deshidratado (Na2B4O7).
- 2) Diluir enrasando con 1 l de auga destilada cun imán.
- 3) Preparar 700 ml de SB 1X: Medir 70 ml de SB 10X e engadirlle 730 ml de auga.
- 4) Preparar o xel de agarosa nun matraz erlenmeyer (*maior do dobre do volume a preparar*)
 - GRUPOS 1 e 2: 100 ml de agarosa 1%: Pesar 1g e engadirlle 100 ml de buffer
 - GRUPOS 3 e 4: 100 ml de agarosa 2%: Pesar 2g e engadirlle 100 ml de buffer
 - GRUPOS 5 e 6: 100 ml de agarosa 3%: Pesar 3 g e engadirlle 100 ml de buffer
- 5) Quentar o matraz coa agarosa no microondas a unha potencia media-alta un par de minutos,
- 6) Engadir 2 µl de RedSafe por cada 100 ml e remexer suavemente para disolver, tendo coidado de que non se formen moitas burbullas (*demasiado frío*).

GRUPOS 1 e 2 (1% para observar o ADN extraído) (*os demais grupos gardarán os matraces tapados con papel de aluminio (ou plástico transparente de cociña ata o momento do uso)*):

- 7) Deixar arrefriar un pouco (por enriba dos 65 °C, se podería tocar o frasco sen que producise queimaduras). Pódese poñer a base do matraz debaixo dunha billa para acelerar o proceso.
- 8) Verter o xel en cadansúa bandexa de electroforesis (co peite para facer os pocinhos de carga). Apartar ou eliminar as burbullas e sucidade cunha punta de pipeta ou papel de aluminio.
- 9) Deixar arrefriar (pódese acelerar meténdoo na neveira).