

27/11/2013

S1301005

A REACCIÓN EN CADEA DA POLIMERASA (PCR) NA INDUSTRIA ALIMENTARIA

PCR de Bacterias

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

□ 1) Deseño dunha PCR a 2,5 mM de $MgCl_2$ con dúas mostras de ADN e un control negativo (tres tubos):

	1	2	3
	1 μ l	1 μ l	C-
	Bacterias		

Reactivo	Conc. inicial	Conc. final	20 μ l	x 3 tubos
10x PCR Buffer (con $MgCl_2$ 20 mM)	10X	1X (2mM de $MgCl_2$)	2	6
$MgCl_2$	25 mM	+0,5 mM	0,4	1,2
dNTPs	10 mM (2,5 mM cada un)	0,3 mM (0,2 mM cada un)	1,6	4,8
Cebador ITSf	10 μ M	0,25 μ M (5 pmoles/20 μ l)	0,5	1,5
Cebador ITSRevb	10 μ M	0,25 μ M (5 pmoles/20 μ l)	0,5	1,5
i-Taq DNA Polymerase	5 U/ μ l	0,06 U/ μ l (1,2 U/20 μ l)	0,24	0,72
ADN			(1)	(3)
H ₂ O desionizada autoclavada			13,76	41,28

- 3) Engadirlle 41,28 μ l de auga desionizada autoclavada.
- 4) Engadirlle 6 μ l de buffer.
- 5) Engadirlle 1,2 μ l de $MgCl_2$.
- 6) Engadirlle 4,8 μ l de dNTPs.
- 7) Engadirlle 1,5 μ l de cebador ITSf.
- 8) Engadirlle 1,5 μ l de cebador ITSRevb.
- 9) Engadirlle 0,72 μ l da polimerasa.
- 10) Mezclar todo cun vortex (pode ser necesario centrifugalo despois para baixar as gotas das paredes) ou pipeteando.
- 11) Coler tres tubos de 200 μ l e identificalos do 1 ó 3 e co número do voso grupo.
- 12) Pipetear en cada un 19,5 μ l do MIX.
- 13) Pofier os tres tubos no transiluminador UVA dirante 1 minuto (para desactivar posibles contaminacións).
- 14) No tubo 1 pipetear 1 μ l do ADN da vosa mostra.
- 15) No tubo 2 pipetear 1 μ l do ADN das bacterias.
- 16) Pofier os 3 tubos no termociclador e programar o ciclo:
(94 □C-3', (94 □C-45", 55 □C-60", 72 □C-2')x30, 72 □C-7', 4 □C-1')

1-2: 1 ul de cultivo de Salmonella en 50 ul H2O 10 min a 95 °C

2-2: 1 ul de cultivo de Escherichia coli

3-2: 1 ul de saliva en 50 ul H2O 10 min a 95 °C

4-2: 1 ul de cultivo de Escherichia coli en 50 ul H2O 10 min a 95 °C

5-2: Contaminación de la PCR con punta de pipeta frotada en la piel.

