

CURSO F1401007

INTRODUCCIÓN ÁS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS EN BIOLOXÍA MOLECULAR

PRÁCTICA 1: EXTRACCIÓN DE ADN

Martes 2 de setembro

FUNDAMENTO:

Extracción de ADN de sangue empregando un kit comercial (NucleoSpin Blood).

Rotura das células axudada pola dixestión das proteínas para permitir a liberación do ADN intracelular.

Precipitación do ADN co etanol, quedando retido pola membrana da columna.

Limpeza das impurezas.

Eliminación dos restos de etanol (que interferiría nas reaccións encimáticas posteriores)

Disolución do ADN e almacenaxe.

MATERIAIS E EQUIPOS:

Rotulador permanente

Sangue de fígado de terneira en tubo con EDTA

Tubos de 1.5 ml

Tubos de 2 ml (veñen co kit)

Micropipeta 100

Micropipeta 1000

Puntas de micropipeta 200

Puntas de micropipeta 1000

Etanol absoluto (96~100)

Termobloque a 70 °C (*ou estufa ou baño*)

Microcentrifuga 11000 x g

PROTOCOLO

- ☐ 1) Identificar un tubo de 1.5 ml escribindo o número do grupo.
- ☐ 2) Pipetear 200 µl da mostra no tubo. 
- 3) Engadir no tubo
 - ☐ 25 µl de **Proteinasa K**
 - ☐ 200 µl de **Buffer B3**
 - ☐ Mezclar vigorosamente con vortex (15s)
- ☐ 4) Incubar a 70 °C durante 15 minutos.
- ☐ 5) Engadir 210 µl de **Etanol 96-100%**. Mesturalo completamente co vortex 15 segundos.
- ☐ 6) Coller unha columna do kit e numerala na tapa.
- ☐ 7) Pipetear todo o contido do tubo de 1.5 ml dentro da columna (~635 µl). 
- ☐ 8) Centrifugar a 11.000 xg durante 1 minuto (o ADN queda retido na membrana). 

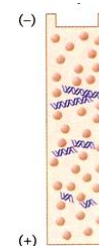
- ☐ 9) Poñer a columna nun novo tubo de 2 ml e tirar o vello co líquido filtrado.
- ☐ 10) Pipetear 500 µl de **Buffer BW** na columna. 
- ☐ 11) Centrifugar a 11.000 xg durante 1 minuto (o ADN permanece retido na membrana). 
- ☐ 12) Poñer a columna nun novo tubo de 2 ml e tirar o vello co líquido filtrado.
- ☐ 13) Pipetear 600 µl de **Buffer B5** na columna. 
 - ☐ (antes de usalo, asegurarse de que o stock xa ten engadido o etanol).
- ☐ 14) Centrifugar a 11.000 xg durante 1 minuto. 
- ☐ 15) Descartar o líquido filtrado e volver a poñer a columna no mesmo tubo.
- ☐ 16) Centrifugar a 11.000 xg durante 1 minuto (eliminamos os restos de etanol). 
- ☐ 17) Poñer a columna nun tubo de 1.5 ml co número do grupo, e tirar o que contén os restos de etanol. 
- ☐ 18) Pipetear 100 µl de **Buffer BE** prequentado a 70°C (*pódese aumentar a concentración final reducíndoo a 50 µl, aínda que se recuperará menos cantidade total*).
- ☐ 19) Incubar 1 minuto a temperatura ambiente (o ADN disólvese).
- ☐ 20) Centrifugar a 11.000 xg durante 1 minuto (o ADN atravesa a membrana). 
- ☐ 21) Tirar a columna. Almacenar (cuantificar, ver a calidade e a integridade, PCR,...) o tubo de 1.5 µl co ADN. 

PRÁCTICA 2: BÚFFERES E XELES DE ELECTROFORESE

FUNDAMENTO:

O ADN ten carga negativa nas condicións do buffer (cargas negativas dos fosfatos), polo que baixo a influencia dun campo eléctrico dirixirase ó polo positivo (ánodo). Se o facemos atravesar a peneira que é a matriz dun xel de agarosa, as moléculas máis pequenas moveranse máis rapidamente que as grandes, e aquelas do mesmo tamaño migrarán xuntas. Canto máis concentrado sexa o xel máis lle custará ó ADN moverse e maior será a diferenza de velocidade entre uns tamaños e outros, pero máis difícil diferenciar as moléculas máis grandes pois case non se moverán.

% AGAROSA	Tamaños
0.5	1 000-30 000
0.7	800-12 000
1.0	500-10 000
1.2	400-7 000
1.5	200-3 000
2.0	100-2 000



Stock de TBE 10x (tamén se pode facer a 5x, que permanece máis tempo sen precipitados), A dilución de traballo é 1X (pódese usar a 0.5x)

Noutros laboratorios fan TAE 50X (Tris, Ácido Acético e EDTA) con disolución de traballo 1x (separaría mellor fragmentos grandes)

A partires do ano 2004 empezouse a utilizar SB 20x que permite correr os xeles a maior voltaxe reducindo os tempos (ata 35 V/cm de xel fronte a los 1-10 V/cm dos outros dous, pero non tan bo para fragmentos de mais de 2kb).

SB 10X:

- ☐ 1) 20 g de Borax deshidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)
- ☐ 2) 1L de auga

MATERIAIS E EQUIPOS:

Rotulador permanente

Probeta

Matraz aforado (ou probeta)

Botella

Papel de aluminio

Auga destilada

Tris

Ácido Bórico

EDTA

Agarosa

Balanza

Guantes ignífugos

Bandexa de electroforese

Peite

Imán

Axitador magnético

Microondas

PROTOCOLO:

TBE 10X

- ☐ 1) Botar uns 75 ml de auga destilada nun matraz aforado cun imán.
- ☐ 2) Pesar 0.93 g de EDTA e botalos no matraz.
- ☐ 3) Pesar 5.5 g de Ácido Bórico e disvelo un pouco no matraz (rematará de disolverse cando engadamos o tris).
- ☐ 4) Pesar 10.8 g de Tris e botalo no matraz segundo se vaia dissolvendo (para volumes maiores é recomendable facelo así para que non quede o imán enterrado). O pH estará arredor de 8, xa que se non o Tris non se dissolve, razón pola que se bota de último.
- ☐ 5) Unha vez se volva transparente pódese retirar o imán e enrasar a 100 ml con auga destilada.

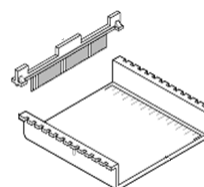
PREPARACIÓN DO XEL

- ☐ 1) Botar nun matraz 5 ml de TBE 10X
- ☐ 2) engadirlle 45 ml de auga destilada (así temos TBE 1x).
- ☐ 3) Pesar

0,5 g de agarosa (grupos 1 e 2: Xel do 1%)	e botalos no matraz.
1,25 g de agarosa (grupos 3, 4 e 5: Xel do 2,5%)	
- ☐ 4) Quentar o matraz coa agarosa no microondas a unha potencia media-alta un par de minutos, vixiando que non ferva demasiado para que non desborde nin se evapore de máis. Repetir ata que estea completamente disolto (o xel estará tan líquido que ó parar de remexer desaparecerán por completo as burbulliñas que se formen), remexendo cada vez que se pare o

microondas mediante movementos circulares da base do matraz, **tendo moito coidado de que a boca do matraz non apunte a ninguén** (o movemento desencadeará a ebulición e pode disparar xel fervendo).

- 5) Engadir 1.5 µl de RedSafe ós 50 ml e remexer suavemente para disolver, tendo coidado de que non se formen moitas burbullas (demasiado frío).
- 6) 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.
- 7) Verter o xel en cadansúa bandexa de electroforesis (co peite para facer os pociños de carga). Apartar ou eliminar as burbullas e sucidade cunha punta de pipeta ou papel de aluminio.
- 8) Deixar arrefriar (pódese acelerar meténdoo na neveira).

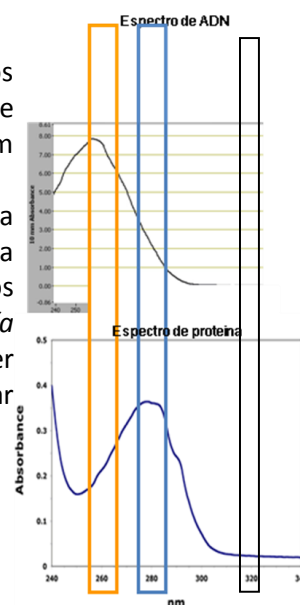


PRÁCTICA 3: CUANTIFICACIÓN E PUREZA DO ADN

FUNDAMENTO:

Empregando o máximo de absorbancias do ADN a 260 nm podemos cuantificalo (1 O.D. 260 = equivale a 50 µg/ml para unha lonxitude de paso de 1 cm) e coa súa relación co das proteínas a 280 nm mediremos cantas impurezas contén.

Medir únicamente A260 podería levar a unha sobreestimación da cantidade de ADN, porque as proteínas tamén absorben esa lonxitude de onda. Calculando a relación A260/A280 determinamos se o ADN é máis ou menos puro: 1.9-1.7 (*se o valor é moi baixo sería necesario purificalo para eliminar esas impurezas*). Pódese facer unha lectura a 320 (non hai absorbancia de ADN) para comprobar determinar o background e eliminalo.



MATERIAIS E EQUIPOS ESPECTROFOTÓMETRO:

Rotulador permanente
 Tubo de 1.5 ml
 Micropipeta 2-20
 Micropipeta 20-200
 Cubeta de espectofotómetro de 50 µl
 Espectrofotómetro

PROTOCOLO:

- 1) Marcar un tubo como Branco e pipetear nel 50 µl de auga desionizada.
- 2) Marcar o outro tubo como 1/5 e pipetear nel 10 µl de ADN e 40 µl de auga desionizada.
- 3) Poñer o espectofotómetro en modo absorbancia 260nm.
- 4) Cargar os 50 µl do branco na cubeta de espectofotometría e pulsar o botón de branco.
- 5) Retirar o branco da cubeta e cargar os 50 µl de 1/5 e facer a medida (*a medida ideal estaría entre 0.100 e 1.000, é importante que sexa maior de 0.010, os valores no terceiro decimal varían entre medidas*).
- 6) Cambiar a absorbancia a 280 nm e medir de novo.
- 7) Calcular a cantidade de ADN e a súa pureza.

A260	DILUCIÓN	CONCENTRACIÓN (A260*50*5) ng/µl
	1/5	

A280	A260/A280

Se obtemos un valor moi pequeno de A260 pódemos facer unha nova medida con a menor concentración

PRÁCTICA 4: CARGA NO XEL- CUANTIFICACIÓN E PUREZA DO ADN

FUNDAMENTO:

Cargamos o produto da extracción nun xel de baixa concentración (0.8-1%) para observar a presenza de ADN, as súas cantidades relativas e a súa integridade-degradación.

MATERIAIS E EQUIPOS:

Parafilm
Micropipeta 2-20
Puntas de micropipeta
Buffer de carga
Cubeta de electroforese
Fonte de alimentación de electroforese
Transiluminador ultravioleta

PROTOCOLO:

- ☐ 1) Preparar unha cubeta de electroforese con buffer TBE 1x.
- ☐ 2) Poñer dentro o gel do 1%.
- ☐ 3) Poñer nun trozo de parafilm unha gota de 2 μ l de buffer de carga
- ☐ 4) Pipetear 10 μ l do ADN extraído na gota de buffer de carga ata que se homoxenice a cor .
- ☐ 5) Cargar os 12 μ l no pocillo correspondente ó voso grupo (tamén se cargarán 5 μ l de Ladder)
- ☐ 6) Correr 15 minutos a 60V (cubeta de electroforesis pequena).
- ☐ 6) Poñer os xeles no transiluminador ultravioleta para observar a calidade do ADN (degradación). *(¡¡Coidado coas quemaduras pola radiación ultravioleta!!; mangas longas e guantes)*
- ☐ 7) Sacar foto e interpretala.
- ☐ 8) Se é preciso repetir dexándoo mais tempo.

