

CURSO F1401007

INTRODUCCIÓN ÁS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS EN BIOLOXÍA MOLECULAR

Mércores 3 de setembro do 2014

PRÁCTICA 5: PCR

FUNDAMENTO:

Na Reacción en Cadea da Polimerasa empregamos un cebador (primer, oligo) “forward” e outro “reverse” situados, como indican os seus nomes, ó comenzo e ó final do fragmento a copiar.

Cando os dous cebadores se unen especificamente ás súas correspondentes dianas, a polimerasa pode empezar a copiar a secuencia molde unindo os nucleótidos complementarios (A-T, C-G). Ó final de cada ciclo temos dobrada a cantidade do fragmento que nos interesa: en 10 ciclos teremos mil copias por cada unha orixinal (2^{10}), e en trinta temos mil millóns (2^{30}).

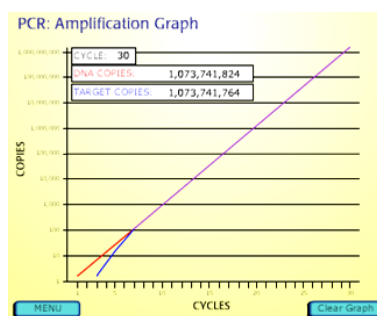
Poden existir secuencias moi parecidas ás dianas dos nosos cebadores, polo que eles se unen tamén a elas e xeran produtos inespecíficos (bandas accesorias).

Para aumentar a especificidade da unión incrementamos a temperatura de anelamento (pero unha temperatura demasiado alta reducirá tamén a unión ás dianas).

Para aumentar a cantidade de copias:

- poñemos máis ADN (pero diminúe a especificidade e tamén pode inhibir a PCR).
- incrementamos a actividade da encima polimerasa engadindo máis do cofactor cloruro de magnesio ($MgCl_2$) (pero tamén diminúe a especificidade: bandas accesorias e “smear”).
- aumentamos a cantidade de primers ou de polimerasa (tamén menos especificidade).

Ímos empregar os cebadores 16SA e 16SB, que amplifican un framento duns 600 pb.



MATERIAIS E EQUIPOS:

Rotulador permanente

Tubo de 1.5 ml

Tubo de 200 μ l: 4

Micropipeta 2-20

Micropipeta 10-100

Puntas de micropipeta 10

Puntas de micropipeta 200

H₂O desionizada autoclavada

Kit de PCR: KAPA Taq PCR Kit

Buffer A (10x) con $MgCl_2$ a 15 mM

$MgCl_2$ (25 mM)

KAPA Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)

dNTPs 10 uM (2,5 x4)

Cebador forward: 16SA-5' 20 μ M (5'-CGCCTGTTTATCAAAAAC-3')

Cebador reverse: 16SB-3' 20 μ M (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3')

Termociclador

PROTOCOLO

- ☐ 1) Deseño da PCR tres tubos con tres cantidades de ADN e un control negativo:

Reactivo	Conc. inicial	Conc. final tubo	Por tubo: 25 µl	x 4 tubos (MIX)
10x Buffer A (con MgCl_2 15 mM)	10X	1X (1.5 mM de MgCl_2)	2.5	10 µl
MgCl_2	25 mM	1.5 mM (Grupo 1) 2.5 mM (Grupos 2 e 4) 3.5 mM (Grupos 3 e 5)	0 (Grupo 1) 1 (Grupos 2 e 4) 2 (Grupos 3 e 5)	0 µl (Grupo 1) 4 µl (Grupos 2 e 4) 8 µl (Grupos 3 e 5)
dNTPs	10 mM (2.5 mM cada un)	0,8 mM (0.2 mM cada un)	2	8 µl
Cebador 16SA-5'	20 µM	0.4 µM	0.5	2 µl
Cebador 16SB-3'	20 µM	0.4 µM	0.5	2 µl
KAPA Taq DNA Polymerase	5 U/µl	1 U/50 µl = 0,02 U/µl	0.1	0.4 µl
ADN (A1 ou B2)			1 (ou 0,5 ou 2)	(4)
H_2O desionizada autoclavada			18.4 (Grupo 1) 17.4 (Grupos 2 e 4) 16.4 (Grupos 3 e 5)	73.6 µl (Grupo 1) 69.6 µl (Grupos 2 e 4) 65,6 µl (Grupos 3 e 5)



- ☐ 2) Identificar un tubo de 1.5 ml como MIX e co nome do voso.
- ☐ 3) Engadirlle

73.6 µl (Grupo 1)
69.6 µl (Grupos 2 e 4)
65,6 µl (Grupos 3 e 5)

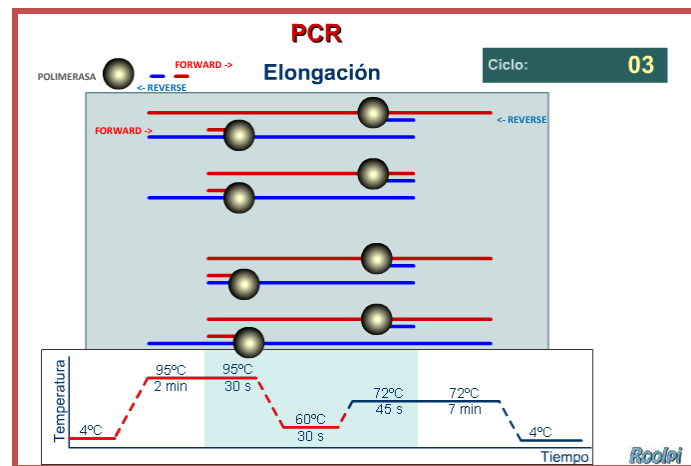
 de auga desionizada autoclavada.
- ☐ 4) Engadirlle 10 µl de Buffer.
- ☐ 5) Engadirlle

0 µl (Grupo 1)
4 µl (Grupos 2 e 4)
8 µl (Grupos 3 e 5)

 Do Cloruro de Magnesio 25 mM.
- ☐ 6) Engadirlle 8 µl de nucleótidos.
- ☐ 7) Engadirlle 2 µl de cebador 16SA-5'.
- ☐ 8) Engadirlle 2 µl de cebador 16SB-3'.
- ☐ 9) Engadirlle 0.4 µl da polimerasa.
- ☐ 10) Mezclar todo cun vortex (*pode ser necesario centrifugalo despois para baixar as gotas das paredes*) ou pipeteando.
- ☐ 11) Coller catro tubos de 200 µl e identificalos do 1 ó 4 e co nome do voso grupo.
- ☐ 12) Pipetear en cada un 24 µl do MIX.
- ☐ 14) No tubo 1 pipetear 0.5 µl de ADN.
- ☐ 15) No tubo 2 pipetear 1 µl de ADN.

- ☐ 16) No tubo 3 pipetear 2 µl de ADN.
- ☐ 17) Poñer os 4 tubos no termociclador e programar o ciclo 16S:
(95° C-3', (95° C-30'', 55° C-30'', 72° C-30'')x35, 72° C-5', 4° C-1'):

Desnaturalización inicial:	95° C	3 minutos
Desnaturalización:	95° C	30 segundos
Anillamento:	55° C	30 segundos x35 ciclos
Extensión:	72° C	30 segundos
Extensión final:	72° C	5 minutos
Enfriamento:	4° C	1 minuto



PRÁCTICA 6: VISUALIZACIÓN DOS PRODUCTOS DE PCR

Visualizar os produtos da PCR nun xel de agarosa. Se a PCR funcionou correctamente debería verse só unha banda, a correspondente ó fragmento que queríamos amplificar.

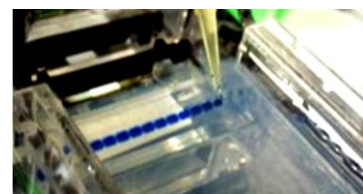
MATERIAIS E EQUIPOS:

Rotulador permanente
Micropipeta 2-20
Puntas de micropipeta 20
6x Loading Dye Solution
Parafilm
Cubeta de electroforesis
Fonte de alimentación de electroforesis
Transiluminador ultravioleta



PROTOCOLO:

- ☐ 1) Poñer o xel do 2.5 % na cubeta de electroforesis con buffer TBE 1x.
- ☐ 2) Poñer nun trozo de parafilm catro gotas de 1 µl de buffer de carga 6x



- ☐ 3) Pipetear 5 μ l do produto de PCR na gota de buffer de carga ata que se homoxenice a cor.
- ☐ 4) Cargar os 6 μ l no pocillo correspondente ó voso grupo (tamén se cargarán 5 μ l de Ladder). Facer o mesmo cos outros 4 tubos.
- ☐ 5) Correr 15 minutos a 100V (cubeta de electroforesis pequena).
- ☐ 6) Poñer os xeles no transiluminador ultravioleta para observar os produtos da PCR.
(¡¡Coidado coas queimaduras pola radiación ultravioleta!!; mangas longas e guantes)
- ☐ 7) Sacar foto e interpretala: Determinar as mellores condicións.
- ☐ 8) Se é preciso repetir deixándoo mais tempo.