

CURSO F1401007

INTRODUCCIÓN ÁS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS EN BIOLOXÍA MOLECULAR

Xoves 4 de setembro do 2014

PRÁCTICA 7: COLONY-PCR

MATERIAIS E EQUIPOS:

- Rotulador permanente
- Placa petri con colonias
- Tubos eppendorf 0,2 ml
- Tubos eppendorf 1,5 ml
- Auga destilada estéril
- Termociclador
- Micropipetas
- Puntas estériles de micropipeta
- Kit de PCR
- Xel de Agarosa 2,5% con Redsafe
- Transiluminador UV

PROTOCOLO:

- ☐ 1) Marcar un tubo de 0,2 ml co número do voso grupo e engadirlle 50 µl de auga destilada estéril.
- ☐ 2) Coller a placa cultivada e observar a presenza de colonias.
- ☐ 3) Marcar na placa a posición dunha colonia co número do voso grupo.
- ☐ 4) “Picar” cunha punta de pipeta a vosa colonia raspandoa, e remexela nos 50 µl de auga.
- ☐ 5) Poñer os tubos de PCR dos cinco gupos no termociclador 10 minutos a 95 °C.
- ☐ 6) Centrifugar 5 minutos a 16000xg (ou á máxima velocidade se é menor).

Empregaremos o sobrenadante como ADN para a ColonyPCR.

☐ 7 Deseño da PCR, 4 tubos con 25 µl a 2.5 mM de MgCl₂:

Facede os cálculos das cantidades por tubo de 25 µl e as cantidades finais para 4 tubos:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$V_i = C_f \times V_f / C_i$$

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)		
MgCl₂	25 mM	2.5 mM		
dNTPs	10 mM (2.5 mM cada un)	0,8 mM (0.2 mM cada un)		
Cebador M13F.1	20 µM	0.4 µM		
Cebador M13R.2	20 µM	0.4 µM		
KAPA Taq DNA Polymerase	5 U/µl	1 U/50 µl = 0,02 U/µl		
ADN (sobrenadante bacteriano)			(2)	(8)
H₂O desionizada autoclavada				

☐ 9) Numerar 4 tubos pequenos, indicando tamén o grupo.

☐ 10) Coller un tubo de 1,5 ml (MIX).

☐ 11) Engadirllle _____ µl de auga desionizada autoclavada (redondeade para arriba os decimais).

☐ 12) _____ µl de buffer.

☐ 13) _____ µl de MgCl₂.

☐ 14) _____ µl de nucleótidos (dNTPs).

☐ 15) _____ µl do cebador M13F.1.

☐ 16) _____ µl do cebador M13R.2.

☐ 17) _____ µl da polimerasa.

☐ 18) Mezclar todo pipeteando ou cun vortex (pode ser necesario centrifugalo despois para baixar as gotas das paredes).

☐ 19) Pipetear **23** µl do MIX en cada un dos tubos (25 µl – 2 de ADN = 23).

☐ 20) Pipetear 1, 2 e 4 µl do sobrenadante no seu correspondente tubo.

Non se carga nada no C-.

Tubo	1	2	3	4
µl DNA	1 µl	2 µl	4 µl	0 µl
				C-

☐ 21) Poñer os tubos no termociclador, co ciclo:
95° C -3', (95° C -30", 55° C -30", 72° C -1')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	1 minuto	
Extensión final:	72° C	5 minutos	
Enfriamento:	4° C	1 minuto	

☐ 22) Poñer o xel de electroforese do 2,5 % na cubeta co buffer TBE 1x.

☐ 23) Cargar en cada pocillo 5 µl de pcr misturado con 1 µl de buffer de carga 6x.

☐ 24) Conectar a fonte de alimentación a 120 V durante 15 minutos.