

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA RUM

BIOL 3770L

MÓDULO II: PCR Y PURIFICACIÓN PCR

Objetivos:

- ◆ Analizar resultados de extracción de ADN genómico mediante geles de electroforesis.
- ◆ Amplificación del gen del 16 SrRNA mediante PCR y purificar el Producto del PCR.

Resumen:

En el Módulo I se realizó una extracción del DNA Genómico a cinco bacterias Gram negativas. Se corrió una gel de agarosa al .8% para observar si la extracción resultó adecuada. Para esto se utilizó un Kit de extracción de la compañía PROMEGA, DNA Purification Kit.

Una vez realizada la extracción, se corrió el PCR en el Termocycler utilizando el programa del 16 SrRNA. Finalizado el mismo, las muestras se colocaron a -20°C para ser utilizadas en el Módulo II.

En este segundo módulo se realizará lo siguiente:

1. Una electroforesis al producto del PCR amplificado.
2. Una purificación del PCR utilizando el “ QIAquick PCR Purification Kit” de la Compañía QIAGEN.

El mismo contiene los siguientes Buffers:

1. **Buffer PB** –“ Binding Buffer”

Provee un pH y concentraciones de sales adecuadas para que el DNA se absorba y se pegue a la membrana de sílica que posee la columna de QIA quick.

La absorción de los ácidos nucleicos a la superficie de sílica ocurre solamente en la presencia de estas altas concentraciones de sales

2. **Buffer PE** - “Washing Buffer” (Contiene Etanol)

Durante el paso de la absorción del DNA (utilizando el PB), aquellas impurezas no deseadas, como sales, enzimas, agarosa, tintes, bromuro de etidio, aceites y detergentes no se adhieren a la membrana de sílica, pero fluyen a través de la columna.

Las sales son lavadas por el etanol que posee el Buffer PE. Cualquier residuo de este buffer que pueda interferir con otras reacciones enzimáticas, es removido en el paso de centrifugación.

3. **Buffer EB** – “Elution Buffer”

Contiene 10mM Tris-Cl, pH 8.5.

Contrario a la absorción, eluir es más eficiente bajo condiciones básicas y bajas concentraciones de sales.

Este “buffer” va a despegar el DNA de la membrana de sílica de la columna permitiendo que atravesase ésta una vez se centrifugue.

PARTE PRÁCTICA

A. Electroforesis del PCR

1. Preparar gel de agarosa al 1%. (Se le dará hecha).
2. Preparar las muestras de la siguiente forma:

- a. Preparación del Marcador 1Kb
2ul de 1Kb
6ul TE1X
2ul Bromofenol Blue

Total:10 ul

- b. Preparación muestra PCR
2ul XX (Tinte xylene cyanol)
5ul TE1X
3ul Producto PCR

➤ Esta Gel se correrá a **150V** por **40** minutos.

B. Purificación del PCR

1. Añadir 5 volúmenes de Buffer PB a un volumen de la muestra y mezcle.
(Ej. $27\mu\text{l} \times 5 = 135$) Nota: Se utilizaron $3\mu\text{l}$ para correr la gel de agarosa 1%.
2. Verificar que el color de la muestra es amarillo. Si la muestra está anaranjada o violeta, añada $10\mu\text{l}$ de acetato de sodio 3M y mezclar. Necesitamos que se mantenga a un pH de 7.5
3. Coloca toda la muestra en una columna (violeta). NO retire la columna del tubo.
4. Centrifugar por 1 min. a 13,000 rpm.
5. Retira la columna, descarta lo que queda en el tubo y coloca la columna de nuevo en el tubo.
6. Añadir $750\mu\text{l}$ de buffer PE a la columna y centrifugar por 1 min. a 13,000 rpm.

Tener cuidado de NO tocar con la punta del Tip el fondo de la columna.

7. Retira la columna, descarta lo que queda en el tubo y coloca la columna de nuevo en el tubo.
8. Centrifugar 1 min. a 13,000rpm.
9. Coloca la columna en un microtubo nuevo.
10. Añadir $50\mu\text{l}$ de Buffer EB al centro de la columna.

Centrifugar 1 min. y descarta la columna, guarda tu producto a -20°C hasta el próximo laboratorio (Módulo III).