INTRODUCCIÓN A LA PCR EN TIEMPO REAL

Ref.PCR8

1.INTRODUCCIÓN

La PCR permite la amplificación de una región objetivo a partir de una plantilla de ADN mediante el uso de oligonucleótidos específicos. En la PCR en tiempo real (qPCR), el producto amplificado que se acumula puede detectarse en cada ciclo con colorantes fluorescentes.

Este kit es una introducción a la PCR en tiempo real. Los estudiantes podrán preparar curvas estándar y cuantificar muestras problemas de ADN humano. El producto amplificado acumulado se puede detectar en cada ciclo con colorantes fluorescentes.

Se presenta como microtubos listos y contiene todos los componentes necesarios para realizar el análisis cuantitativo por PCR.

El objetivo es un gen de múltiples copias, 200 copias por genoma, con una tasa evolutiva lenta. Debido a la copia múltiple y al alto grado de conservación se puede usar para cuantificar cantidades bajas de ADN humano

2. COMPONENTES

- **Este kit** contiene una mezcla de cebadores específicos y sonda marcada, dNTP, BSA, polimerasa y tampón a concentraciones óptimas y liofilizados después de la síntesis.
- **DNase/RNase free wáter (tapa verde)**, 1.5 ml.
- **Standard Template (tapa roja)** copias objetivo deshidratadas para la curva estándar.
- **Control Positivo (tapón naranja)** copias deshidratadas del control positivo.
- **Template buffer (tapa negra),** para la hidratación del Standard template o el control positivo.

2.1 Condiciones de almacenamiento

Todos los componentes son estables a temperatura ambiente para el transporte, pero deben almacenarse a -20 ºC si no se usan de inmediato. Son estables durante un año en estas condiciones.

Para el **Standard Template (red cap)** o control positivo. Recomendamos, una vez disuelto, almacenar en una caja exclusiva a -20ºC.

2.2 Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- Kit de aislamiento del ADN humano. Recomendamos nuestro DANAGENE SALIVA KIT.
- DNase/RNase free water para preparar la dilución de la curva patrón.
- Micropipetas.
- Puntas estériles con filtro.
- Vortex.
- Centrifuga.
- Aparato de PCR a Tiempo Real.

3. PRÁCTICA

3.1 Extracción del ADN

El paso previo a cualquier estudio genético suele ser el aislamiento del ADN genómico, esto se puede llevar a cabo de diferentes formas (métodos caseros, kits comerciales, etc) y a partir de diferentes muestras (sangre, tejido, etc).

Para la realización de esta práctica se recomienda que la fuente del ADN provenga de la **saliva del alumno,** ya que es la fuente de ADN más accesible y no supone ningún riesgo como pueda ser la extracción de sangre. Para ello se recomienda el uso del DANAGENE SALIVA KIT que permite obtener el ADN genómico a partir de una muestra de saliva o frotis bucal.

3.2 Preparación de la serie de diluciones para la curva patrón

1. Pipetear 900 ul de **DNAse/RNase free water** en 5 tubos y marcar de 2 a 6.

2. Centrifugar brevemente (pulso) **Standard Template (tampón rojo)**, hidratar con 120 ul de **Standard buffer (tampón negro)** y hacer vortex vigoroso. **Marcar como n.1.**

3. Pipetear 100 ul del **Standard Template (tampón rojo)** en el tubo 2.

4.Vortex vigoroso y pulso de centrifuga.

5. Cambiar la punta y pipetear 100 ul del tubo 2 al tubo 3.

6. Vortex vigoroso y pulso de centrifuga.

7. Repetir los pasos 5 y 6 con los tubos 4 a 6 para completar la serie de diluciones.

PREPARATION OF STANDARD CURVE DILUTION SERIES

1) Pipette 900 µl of **DNAse/RNAse free water** (not provided) into five tubes and label as 2 to 6
2) Pulse-spin the **Standard Template** (RED CAP), reconstitute with 120 µl of **Standard buffer** (BLACK CAP) and vortex thoroughly, label as num. 1

Para la curva patrón, pipetear **5 ul** de cada dilución (1 a 6) + **15 ul** DNase/RNase free water (tampón verde) en diferentes **Microtubos individuales MONODOSIS dtec-qPCR**.

3.3 Preparación del Control Positivo

El control positivo debe de ser preparado sólo cuando se requiera un análisis de detección y no cuantificación.

Centrifugar brevemente (pulso) el **Control Positivo (tapón naranja),** hidratar con 120 ul de **Standard buffer (tampón negro)** y hacer vortex vigoroso.

3.4 Protocolo de amplificación

1. **Para las muestras a cuantificar**, añadir la cantidad deseada de muestra en un rango de 5 ul hasta un máximo del volumen total de la qPCR de 20 ul, cuando sea necesario, completar el volumen final hasta 20 ul con DNase/RNase free water (tampón verde), por ejemplo 5 ul muestra + 15 ul agua). Vortex vigoroso y hacer pulso con centrifuga. Para determinar el volumen de la muestra tener en cuenta la posible presencia de inhibidores.

2. **Para la curva patrón**, pipetear **5 ul** de cada dilución (1 a 6) + **15 ul** DNase/RNase free water (tampón verde) en diferentes **Microtubos individuales MONODOSIS dtec-qPCR**.

3. **Control Positivo,** añadir **5 ul** de control positivo + **15 ul** DNase/RNase free water (tampón verde). Un resultado positivo indica que la qPCR trabaja correctamente.

4. **Control Negativo**, añadir hasta 20 ul DNase/RNase free water (tampón verde) a un microtubo. Esta reacción deberá ser negativa. Un resultado positivo indicará contaminación de ADN en el agua y deberá ser reemplazada. El resultado del test no será inclusivo.

5. **Programa: 40 ciclos**

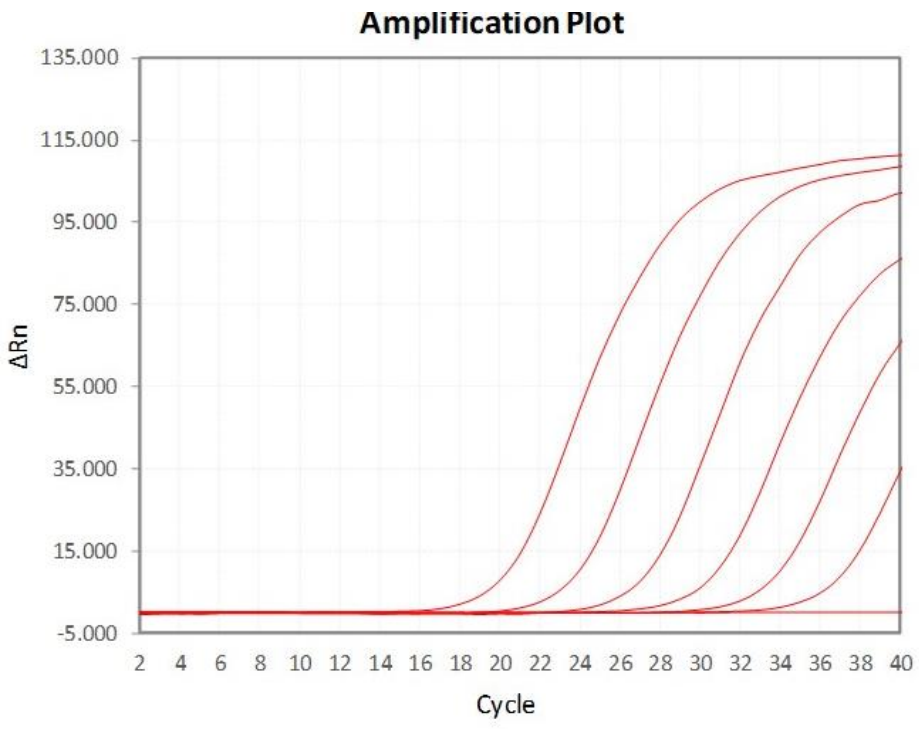
	Paso	Tiempo	Temperatura
	Activación	2 minutos	95ºC
40 CICLOS	Desnaturalización	5 segundos	95ºC
	Hibridación/Extensión y colección de datos[1]	20 segundos	**60ºC**

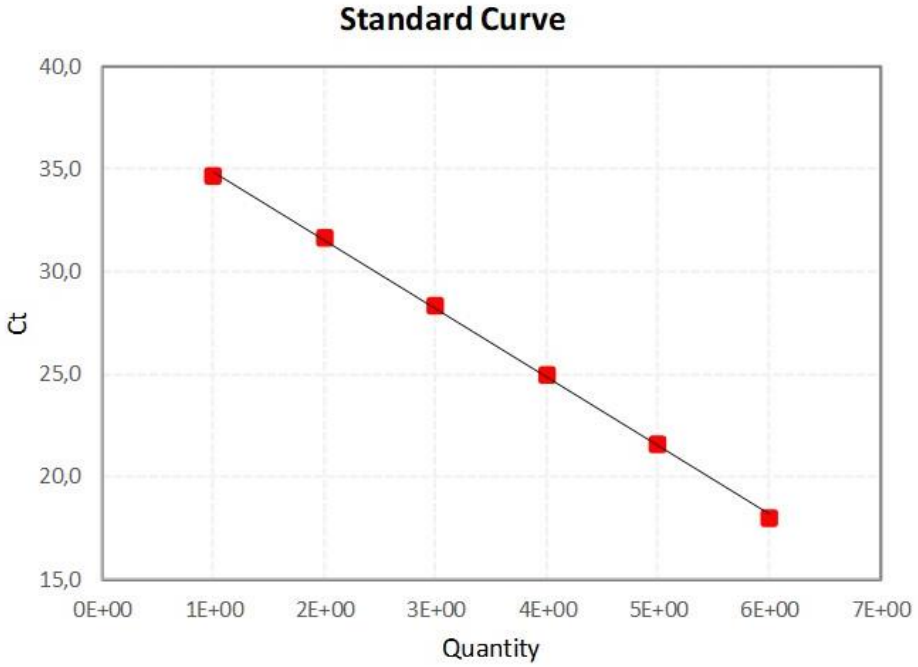
1 La señal fluorogénica deberá ser recolectada durante este paso utilizando el canal de **FAM**

4. RESULTADOS

Presentamos un ejemplo de gráfica con un dilución decimal de la amplificación del estándar.

Copias	Ct
10^6	18,0
10^5	21,6
10^4	25,0
10^3	28,3
10^2	31,6
10	34,7


Amplification Plot
135.000
115.000
95.000
75.000
55.000
35.000
15.000
-5.000
ΔRn
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40
Cycle


Standard Curve
40,0
35,0
30,0
25,0
20,0
15,0
Ct
0E+00 1E+00 2E+00 3E+00 4E+00 5E+00 6E+00 7E+00
Quantity