

3. AMPLIFICACION DE GENES DE VIRULENCIA MEDIANTE LA TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Materiales

- Eppendorf de 1,5 ml estériles
- Eppendorf de pared fina estériles
- Puntas de pipeta estériles desechables
- agarosa
- guantes
- Hielo
- Campana de flujo laminar
- Transiluminador
- Termociclador

Soluciones

- Agua molecular autoclavada
- Etanol al 70 % o soluciones desinfectantes para limpieza de superficies
- Tampón *Taq polimerasa* 10X
- Cloruro de magnesio 50 mM
- Iniciadores (25 pm de cada uno)
- Solución de dNTPs (dTTP, dGTP, dCTP, dATP) (50 µM de cada dNTP)
- *Taq polimerasa* 5 U/ µl (INVITROGEN)
- Marcador *100 bp DNA ladder* (INVITROGEN)
- TBE 1X
- Solución con el ADN

A tener en cuenta antes de comenzar el procedimiento:

Debido a que la PCR es capaz de amplificar hasta una sola molécula de ADN se deben tomar **precauciones para evitar la contaminación cruzada** de las muestras :

- Realizar la mezcla de la reacción en campana de flujo laminar, en hielo y en una zona físicamente diferente de la área de extracción y amplificación del ADN.

- Utilizar todo el material y soluciones autoclavadas.
- Mantener los materiales de la reacción en lugares adecuados, aislados y específicos para PCR.
- Utilizar guantes estériles desde el inicio de la reacción y cambiarlos frecuentemente.
- Preparar diferentes "sets" de los componentes de la reacción (iniciadores, tampones...), que se almacenarán en alícuotas a -20°C .
- Incluir en cada amplificación un control de reacción que contenga todos los componentes de la reacción excepto el ADN y también controles positivos y negativos del experimento.
- Es recomendable activar la luz ultravioleta en la zona de trabajo antes y después de la preparación de la mezcla de amplificación.



Protocolo

1. Colocar en la cabina de flujo laminar, en el hielo, los reactivos necesarios para la realizar la PCR: agua bidestilada, tampón *Taq* polimerasa 10X, $MgCl_2$, iniciadores y las soluciones de nucleótidos; así como los tubos de PCR autoclavados, de manera que haya un tubo por muestra, otro para el control positivo y otro para el negativo.



2. Preparar una “master mix” (mezcla de componentes) que se añaden de forma común a todas las muestras, y en el siguiente orden: agua bidestilada, tampón *Taq* polimerasa 10X, $MgCl_2$, iniciadores *forward* y *reverse* del gen que se quiere detectar, la solución de nucleótidos y *Taq* polimerasa. Repartir en tantos tubos como muestras a amplificar. El volumen final habitual de la reacción suele ser 25 μ l.

A la hora de calcular las cantidades a añadir, hay que tener en cuenta que cada reacción se realiza en un volumen total de 25 μ l con 25 pmol de cada iniciador, 50 μ M de cada dNTP y 0.6 U de *Taq* polimerasa.

3. Añadir 5 μ l (aprox. 25 ng) de la solución de ADN obtenida por hervido.
4. Colocar los tubos en el termociclador y programar los ciclos adecuados para el gen que se quiere detectar.



5. Realizar una electroforesis en gel de agarosa (ver protocolo y vídeo de la técnica 2) cargando en cada pocillo del gel 25 μ l de la muestra obtenida de la reacción de amplificación junto con 3-5 μ l de azul de bromofenol.
6. Una vez cargadas las muestras y el marcador, poner el voltaje adecuado para que se produzca la migración.

7. Teñir los geles de agarosa y visualizar el ADN en el transiluminador UV.
8. Se considerará un resultado positivo si en las muestras problema aparecen bandas del mismo tamaño que en el control positivo.

