

28/VI/2013

S1301005

## A REACCIÓN EN CADEA DA POLIMERASA (PCR) NA INDUSTRIA ALIMENTARIA

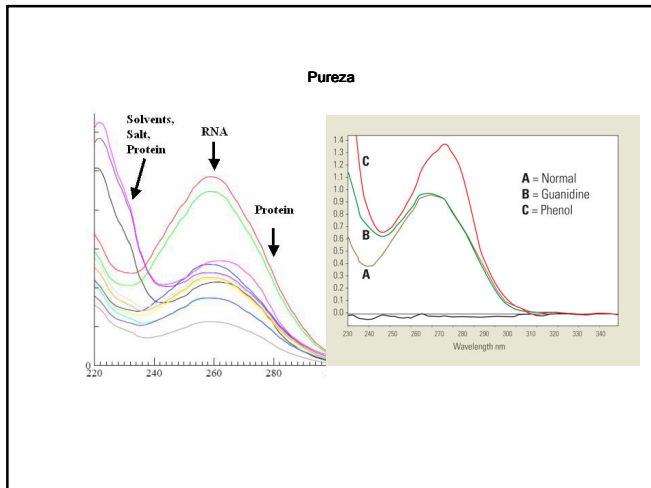
Recopilado por Jorge Rodríguez Castro  
Lois Pérez Diéguez

Grupo de Sistemática Molecular (Dr. Manuel Rey Méndez)  
Dpto. Bioquímica e Bioloxía Molecular  
CIBUS, Facultade de Bioloxía  
Universidade de Santiago de Compostela

### CUANTIFICACIÓN

**- ESPECTROFOTÓMETRO:** Cuantificación da concentración do ADN extraído. Medimos a absorbancia a dúas lonxitudes de onda:

- **A260 nm:** 1 unidade de absorbancia (OD) son 1000 ng/μl (depende da lonxitude de paso)
- **A280 nm:** sin proteínas si A260/A280 es mayor que 1.8
- **A230 nm:** fenol, cloroforno o carbohidratos
- **A320 nm:** material particulado

$$A = -\log_{10}(I/I_0) = \epsilon \cdot c \cdot L$$


### EXTRACCIÓN DO ADN

Espectrofotómetro NanoDrop

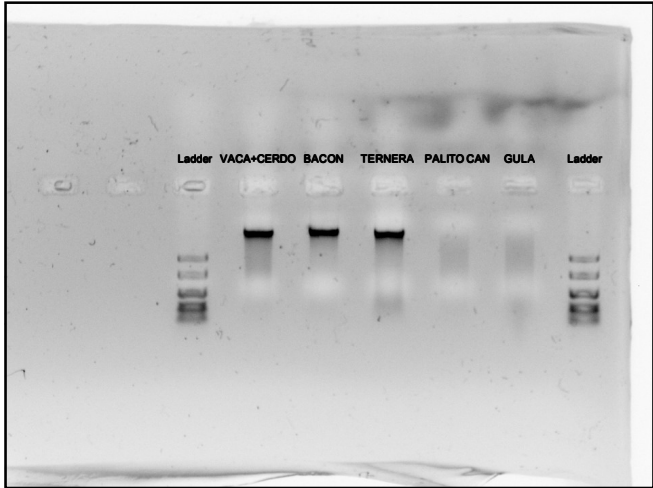
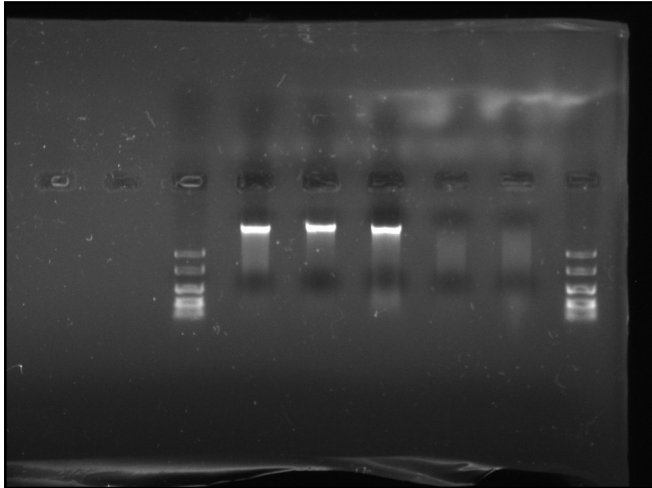
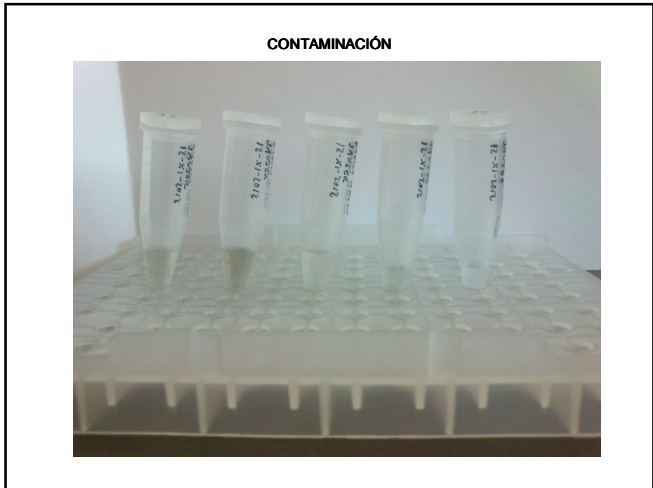
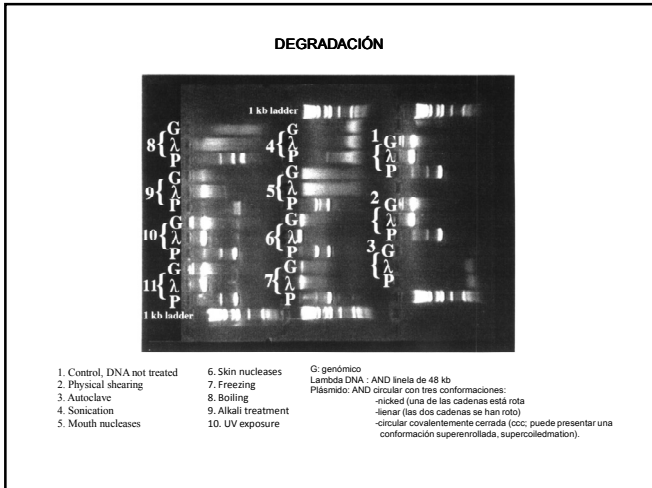
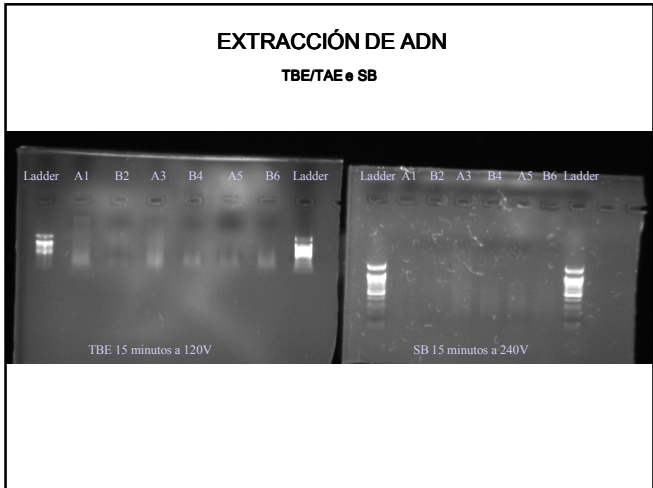
### CUANTIFICACIÓN

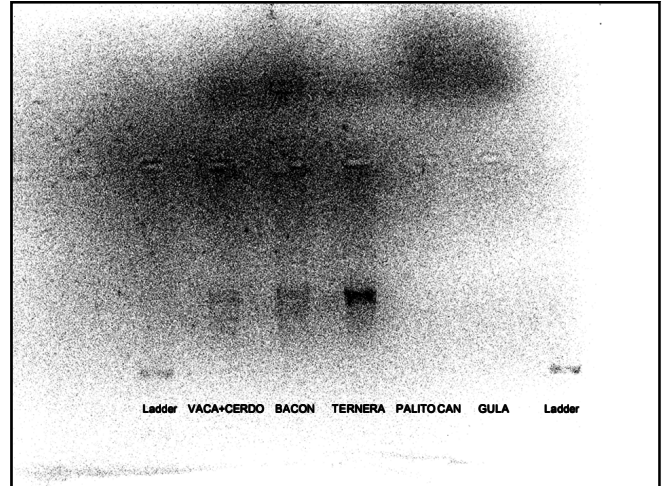
	260	280	260/280	ng/μL
<b>1</b> Carne picada Cerdo+Vaca	0,018	0,01	1,845	<b>18,004</b>
<b>2</b> Bacon	0,017	0,009	1,989	<b>17,31</b>
<b>3</b> Hamburguesa de ternera	0,028	0,016	1,687	<b>27,683</b>
<b>4</b> Palito de cangrejo	0,007	0,004	2,086	<b>7,341</b>
<b>5</b> Gula al ajillo	0,021	0,012	1,805	<b>21,232</b>

### EXTRACCIÓN DO ADN

ESTADO E CANTIDADE

**- ELECTROFORESIS:** Observación do grado de degradación correndo nun xel de agarosa






28/VI/2013

## REACCIÓN EN CADENA DA POLIMERASA (PCR)

Recopilado por Jorge Rodríguez Castro  
 E Lois Pérez Diéguez  
 Grupo de Sistemática Molecular (Dr. Manuel Rey Méndez)  
 Dpto. Bioquímica e Bioloxía Molecular  
 CIBUS. Facultade de Bioloxía  
 Universidade de Santiago de Compostela

## Polimerasa Chain Reaction: Reacción en Cadena da Polimerasa



- Foi deseñada polo Dr. Kary Mullis en 1987.
- Gañou o premio Nóbel de Química en 1993 polo seu invento.
- Utilizou a PCR para amplificación do gen de  $\beta$ -hemoglobina humana, e a diagnose prenatal de anemia falciforme.

Diapositiva de Juan Carlos Codesido

## REACCIÓN EN CADENA DA POLIMERASA (PCR)

### COMPOÑENTES

1. Auga desionizada estéril.
2. Os 4 dNTPs: dATP, dCTP, dTTP, dGTP.
3. Enzima: Por exemplo Taq polimerasa (Termus Acquaticus). Termoestable.
4. Cofactor para enzima: Mg+2.
5. Dous cebadores.
6. Termociclador: Ciclos variando as temperaturas en cada paso.



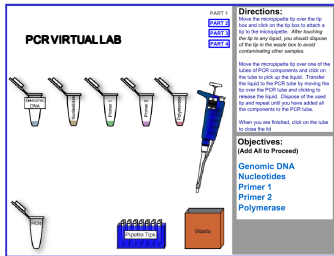

GeneAmp PCR System 2400



## REACCIÓN EN CADENA DA POLIMERASA (PCR)

### TERMOCICLADOR: CICLOS

1. Desnaturación (95°C) para separar as dúas hebras da dobre hélice.
  2. Anilamento (40°-70°, según a secuencia dos oligos) para permitir a unión dos cebadores ás suás secuencias dianas.
  3. Extensión (60°) para que a enzima que se uniu ó oligo empece a engadirle os nucleótidos complementarios á cadea molde.
- Este ciclo repítese un número de veces (30-40)

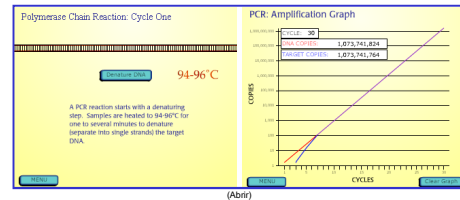


## REACCIÓN EN CADENA DA POLIMERASA (PCR)

### TERMOCICLADOR: CICLOS

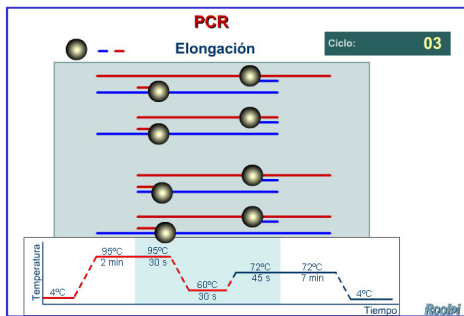
- Por cada copia de ADN inicial obtémos mil millóns:
- ciclo 1: un
  - ciclo 10: mil (10<sup>3</sup>)
  - ciclo 20: un millón (10<sup>6</sup>)
  - ciclo 30: mil millóns (10<sup>9</sup>)

### AMPLIFICACIÓN DE PCR



## REACCIÓN EN CADENA DA POLIMERASA (PCR)

### TERMOCICLADOR: CICLOS



Os cebadores ou primers previamente deseñados, reaccionan coa febra sinxela de DNA e xúntanse en lugares específicos por complementariedade de bases. Para isto, báixase a temperatura (ex: 55°C durante 30''). A temperatura e o tempo pode variar entre cebadores segundo a fórmula:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

Diapositiva de Juan Carlos Codesido

## REACCIÓN EN CADENA DA POLIMERASA (PCR)

### 1) Deseño da PCR:

Reactivo	Conc. inicial	Conc. final	20 µl	x 3 tubos
10x PCR Buffer (con MgCl <sub>2</sub> 20 mM)	10x	1x (2mM deMgCl <sub>2</sub> )		
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	+1,5 mM		
dNTPs	10 mM (2,5 mM cada un)	1 mM (0,25 mM cada un)		
Cebador 165A-5'	20 µM	0,25 µM (5 pmoles/20 µl)		
Cebador 165B-3'	20 µM	0,25 µM (5 pmoles/20 µl)		
Taq DNA Polymerase	5 U/µl	0,05 U/µl (1 U/20 µl)		
ADN				
H <sub>2</sub> O desionizada autoclavada				

## REACCIÓN EN CADENA DA POLIMERASA (PCR)

### 1) Deseño da PCR:

Reactivo	Conc. inicial	Conc. final	20 µl	x 3 tubos
10x PCR Buffer (con MgCl <sub>2</sub> 20 mM)	10x	1x (2mM deMgCl <sub>2</sub> )	2	6
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	+1,5 mM	1,2	3,6
dNTPs	10 mM (2,5 mM cada un)	1 mM (0,25 mM cada un)	2	6
Cebador 165A-5'	20 µM	0,25 µM (5 pmoles/20 µl)	0,25	0,75
Cebador 165B-3'	20 µM	0,25 µM (5 pmoles/20 µl)	0,25	0,75
Taq DNA Polymerase	5 U/µl	0,05 U/µl (1 U/20 µl)	0,2	0,6
ADN			(0,5)	(1,5)
H <sub>2</sub> O desionizada autoclavada			13,6	40,8

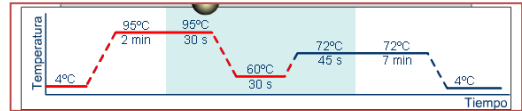


- 2) Identificar un tubo de 1,5 ml como MIX.
- 3) Engadirle 40,8 µl de auga desionizada autoclavada.
- 4) Engadirle 6 µl de buffer.
- 5) Engadirle 3,6 µl de MgCl<sub>2</sub>.
- 6) Engadirle 6 µl de nucleótidos.
- 7) Engadirle 0,75 µl de cebador 16SA.
- 8) Engadirle 0,75 µl de cebador 16SB.
- 9) Engadirle 0,6 µl da polimerasa.
- 10) Mezclar todo cun vortex (*pode ser necesario centrifugalo despóis para baixar as gotas das paredes*) ou pipeteando.
- 11) Coller 3 tubos de 200 µl e numeralos do 1 ó 3 e co número da mostra.

- 12) Pipetear en cada un 19,50 µl do mix
- 13) Poñer os tres tubos 1 minuto no transiluminador UVA (desactivar ADN contaminante)
- 14) No tubo 1 engadir 0,5 µl de ADN.
- 15) No tubo 2 engadir 2 µl de ADN.
- 16) Poñer os tres tubos no termociclador, ciclo:

94°C -2', (94°C -20", 55°C -10", 72°C -40")x35, 72°C -5', 4°C -1':

Desnaturalización inicial:	94°C	2 minutos	
Desnaturalización:	94°C	20 segundos	
Anillamento:	55°C	10 segundos	x35 ciclos
Extensión:	72°C	30 segundos	
Extensión final:	72°C	5 minutos	
Enfriamento:	4°C	1 minuto	



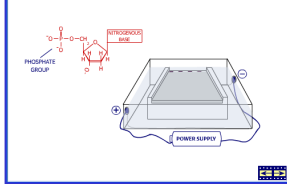
## REACCIÓN EN CADENA DA POLIMERASA (PCR)

### ELECTROFORESIS

- Para saber a calidade e cantidade do ADN copiado durante a PCR empregamos un xel de agarosa (ou acrilamida) que, como un tamiz, separa as moléculas por tamaño, pasando con maior facilidade e rapidez as máis pequenas.
- O ADN desprázase nun campo eléctrico cara o polo positivo, porque ten unha carga negativa.
- Para ver as bandas dos agregados de cadeas de ADN do mesmo tamaño utilízase a tinción con bromuro de etidio, que se sitúa dentro das dobre hebras e emite unha luz alaranxada baixo os raios UVA.

### GEL ELECTROPHORESIS

The phosphate groups in the DNA backbone carry negatively-charged oxygens - giving a DNA molecule an overall negative charge. In an electric current, the negatively-charged DNA moves toward the positive pole of the electrophoresis chamber.



## LA ELECTROFORESIS

•AL PONER EL ADN, CON CARGA NEGATIVA, DENTRO DE UN CAMPO ELÉCTRICO, SE VE ATRAIDO POR EL POLO POSITIVO.

•UN GEL ES UN MEDIO POROSO, UN TAMIZ, POR EL CUAL LOS FRAGMENTOS MÁS PEQUEÑOS PASAN MÁS RÁPIDO QUE LOS PEQUEÑOS

