

PROTOCOLO PARA PCR1

El objetivo de este protocolo es detallar el paso a paso necesario para realizar una PCR estándar.

Equipos, Accesorios y Consumibles Necesarios

- Microcentrífuga
- Centrifuga de platos de 96
- Vórtex para platos de 96
- Micropipetas (y puntas respectivas): 2µL, 10µL, 20µL, 200µL, 1000µl
- Nevera de -20°C ± 5°C
- Nevera de 4°C ± 2°C
- Termociclador
- Transiluminador UV
- Cámara de Electroforesis para geles de agarosa
- Guantes desechables libres de talco
- Plato de 96 pozos de 0,2 mL.
- Tubos eppendorf (1,5mL y 0,2mL)
- Gradillas para tubos de microcentrífuga de 0.2, 0.5 y 1.5 mL.

Reactivos

- Buffer (X)
- MgCl₂ (mM)
- Platinum™ Multiplex PCR Master Mix
- dNTPs
- Primer forward
- Primer reverse
- Colas (según protocolo)
- Taq DNA Polimerase, Platinum
- Enhancer (según protocolo)
- DMSO (según protocolo)
- BSA (según protocolo)
- Formamida (según protocolo)
- DNA (ng/µL)
- Agua ultrapura

Procedimiento paso a paso de laboratorio

1. PCR1

A partir de un ADN con una pureza optima (relación A_{260}/A_{280} entre 1.7 y 1.9), integridad (evidenciado en un gel de agarosa al 1%) y concentración (5 a 10 ng/ µL), es necesario

realizar una amplificación de la región de interés para poder determinar el orden exacto de los nucleótidos de este fragmento.

Para cada reacción de PCR, agregue en un plato de reacción apropiada o en tubos de 0.2 ml los componentes detallados en la Tablas 2.

TABLA 2. Volúmenes de mezcla de reacción para la amplificación de ADN (ejemplo).
Para información detallada de loci específicos vea el anexo **Loci_Primers&lifications.xls**

Reactivo	x1 Reacción
Buffer de PCR 10X	2.5 µL
DNTPs 10mM	0.5 µL
MgCl ₂ 50mM	1.25 µL
Primer Forward 10uM	0.4 uL
Primer Reverse 10uM	0.4 uL
Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) 5U/uL	0.2 uL
Agua	17.75uL
ADN genómico [10 ng/µL]	2 µL
Volumen Final	25 µL

Para cada reacción realizar un pipeteo de manera que se garantice una mezcla homogénea. Posteriormente selle el plato. Las condiciones de corrido se detallan en la tabla 3.

TABLA 3. Perfil térmico para amplificación (ejemplo). Para información detallada de loci específicos vea el anexo **Loci_Primers&lifications.xls**

35 Ciclos					
96 °C	94 °C	58 °C	68 °C	72 °C	4 °C
5 m	30 s	45 s	45 s	2 m	∞