Reacción en Cadena de la Polimerasa

(PCR)

en tiempo real

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Elaboró: | Revisó: | Autorizó: |
| Nombre: | Dr. Oscar Medina Contreras | Dr. Oscar Medina Contreras | Dra. Jenny Vilchis Gil |
| Firma: |  |  |  |
| Fecha: | 2020-04-08 | 2020-04-08 | 2020-05-01 |

1. **Propósito**

Conocer de manera cuantitativa la expresión de un gen o genes de interés de en una muestra de cDNA.

1. **Alcance**

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que necesiten conocer la expresión de un gen o genes de interés en una muestra de cDNA en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Instituto Nacional de Salud Hospital Infantil de México Federico Gómez.

1. **Políticas de operación, normas y lineamientos**

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Instituto Nacional de Salud Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento.

Los residuos de tipo CRETI (Corrosivas, Reactivas, Explosivas, Toxicas e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052-SEMARNAT-2005.

1. **Descripción del Protocolo**

* Al cDNA de la muestra adicionar 100uL de agua MiliQ dilución 1:5
* En una placa de 96 pozos para PCR añadir para cada muestra por triplicado los 25 uL de reacción para el gen GAPDH (housekeepin gene) en los pozos y para el gen de interés el volumen de 25uL de la reacción como se muestra en la tabla 1 de los Anexos.
* Homogenizar las reacciones.
* Cubrir la placa con las películas adhesivas.
* Analizar las muestras siguiendo la programación de la reacción se muestra en la tabla 2 de los Anexos.

**Notas**:

Antes de usar cualquier reactivo homogenizarlo.

Durante el proceso mantener todos los reactivos en hielo.

Realizar la preparación en un periodo de tiempo corto

Asegúrese de homogenizar correctamente las reacciones finales.

Verificar que los pozos no contengan burbujas y que el volumen final de la reacción se encuentre en la superficie del pozo.

1. **Diagrama de Flujo**
2. **Documentos de Referencia**
3. **Anexos**

**Tabla 1. Preparación de la reacción:**

|  |  |
| --- | --- |
| Componente | Volumen final 25 uL |
| SYBER green Master Mix qPCR | 12.5 uL |
| Primer Fw (10 mM) | 1 uL |
| Primer Rv (10 mM) | 1 uL |
| cDNA (1:5) | 1uL |
| Agua MiliQ | 9.5 uL |

**Tabla 2. Programación qPCR:**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Paso | Temperatura | Tiempo |
| Desnaturalización inicial | 94°C | 5 minutos |
| 40 ciclos | 94°C  60°C  72°C | 30 segundos  30 segundos  1 minuto |

Nota: Temperatura de adquisición 60°C

**Reactivos y Soluciones**

SYBER Green Master Mix qPCR

Primer Fw 10 mM

Primer Rv 10 mM

Agua MiliQ