



Apr 18, 2022

Protocolo Tcg4

dgalvana 1

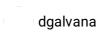
¹Universidad Autónoma del Estado de México





dx.doi.org/10.17504/protocols.io.8epv59nq5g1b/v1





Protocolo para realizar PCR de Tcg4

DOI

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.8epv59nq5g1b/v1

dgalvana 2022. Protocolo Tcg4. **protocols.io** https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.8epv59nq5g1b/v1

•

_____ protocol,

Apr 18, 2022

Apr 18, 2022

60953



1

Material

- *Micropipetas
- *Puntas para PCR
- *Tubos para PCR
- *Gradilla
- *Termociclador

Reactivos

- *Aqua libre de nucleasas
- *DNA
- *Buffer 10x plus Mg
- *dNTPs
- *Primers

F1 5'TAA TAC GAC TCA TAG GGA3' R4 5'TAG AAG GCA CAG TCG AGG CT3'

*Taq polimerasa

Protocolo de Tcg4

- NOTA: Antes de comenzar es recomendable preparar la reacción sobre hielo. Todos los materiales deben estar estériles y limpios. Todo el procedimiento debe ser llevado a cabo dentro de la campana negra (previamente limpia con solución agua: cloro y esterilizada con UV durante 15 min)
- 2 Prepare los tubos que habrá de utilizar para su PCR en una gradilla. NOTA: Preferentemente NO etiquete la tapa del tubo ya que se puede borrar, mejor etiquete en los costados
- 3 Realice los cálculos de para preparar las reacciones necesarias (En este caso son 5 reacciones cada una con su control correspondiente, en total 10).
- 4 Agregue cada componente de la tabla 1 en orden descendente en un tubo y marque como MasterMix (no agregar ADN ni primers). NOTA: coloque la polimersa al final. Saque del congeador la enzima y regresela inmediatamente después.

TABLA 1: Reactivos para PCR MasterMix

Reactivos	Una reacción	10 reacciones
Agua libre de	40.75 μL	407.5 μL
nucleasas		
Buffer 10x plus	5 μL	50 μL
Mg		
dNTPs	1 μL	10 μL
Taq polimerasa	.25 μL	2.5 μL



■ Se empelo el Kit PCR Reagent System

Primers	2.5μL (1.25 μL de c/u)	
ADN	.5 μL	
molde		

- 5 Coloque la cantidad correspondiente del MasterMixa cada uno de los tubos (47μL).
- Posteriormente coloque en cada tubo los primers y el ADN ha utilizar (volumen total de cada tubo 50 μ L) NOTA: A los controles negativos no coloque ADN, en su lugar agregue agua libre de nucleasas.
- 7 Coloque los tubos en el termociclador ya programado con las condiciones de la PCR (ver tablas abajo).

Condiciones del Termociclador

Α	В	С
Pasos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 OC	3min
Desnaturalización	94 OC	45s
Hibridación	53 OC	30s
Extensión	72 OC	1 min
Incubación final	72 OC	10min
	4 OC	infinito
30 ciclos		

8 Al terminar su PCR analice su producto en electroforesis.