



Apr 18, 2022

🌐 Protocolo Tcg4

dgalvana¹¹Universidad Autónoma del Estado de México

1

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.8epv59nq5g1b/v1**FMVZ-UAEM** dgalvana

Protocolo para realizar PCR de Tcg4

DOI

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.8epv59nq5g1b/v1dgalvana 2022. Protocolo Tcg4. **protocols.io**<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.8epv59nq5g1b/v1> protocol ,

Apr 18, 2022

Apr 18, 2022

60953

Material

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

Reactivos

- *Agua 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

- 1 *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 polimerasa al final. Saque del congelador la enzima y regrese inmediatamente después.*

TABLA 1: Reactivos para PCR MasterMix

Reactivos	Una reacción	10 reacciones
Agua libre de nucleasas	40.75 µL	407.5 µL
Buffer 10x plus Mg	5 µL	50 µL
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 molde	.5 µL

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

Condiciones del Termociclador

A	B	C
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		

- Al terminar su PCR analice su producto en electroforesis.