

3. BIRULENTZIA-GENEEN ANPLIFIKAZIOA POLIMERASAREN KATE-ERREAKZIOAREN BIDEZ (PCR)

Materialak

- 1,5 mlko eppendorf hodi esterilak
- Horma meheko eppendorf esterilak
- Erabili eta botatzeko punta esterilak
- Agarosa
- Eskularruak
- Izotza
- Fluxu laminarreko kabina
- Transiluminadore ultramorea
- Termozikladorea

Disoluzioak

- Ur molekularra autoklabatuta
- %70 etanola edo gainazalak desinfektatzeko soluzioak
- 10X *Taq polimerasa* tanpoia
- 50 mM Magnesio kloruroa
- Abiarazleak (25 pm bakoitzeko)
- dNTPn soluzioa (dTTP, dGTP, dCTP, dATP) (50 μ M dNTP bakoitzetik)
- *Taq polimerasa* 5 U/ μ l (INVITROGEN)
- Markatzailea 100 bp DNA ladder (INVITROGEN)
- 1X TBE
- ADNren soluzioa

Protokoloa egin baino lehen kontutan hartzeko neurriak:

PCRak DNAko molekula bakar bat anplifikatzeko gai da, beraz neurriak hartu behar dira laginen zeharkako kontaminazioa ekiditeko:

- Erreakzioa fluxu laminarreko kabinan prestatu, izotzan, eta DNA erauzten den gune fisiko desberdin batean.
- Material eta soluzio autoklabatuak erabili
- Erreakzioaren material guztiak egokiak, isolatuak eta PCRentzako espezifikoak diren guneetan mantendu.
- Eskularru esterilak erabili hasieratik.
- Erreakzioaren osagaien “set” desberdinak prestatu (abiarazleak, tanpoiak...), alikuotan banatu eta -20°C tan gorde..
- Anplifikazio bakoitzean kontrol bat sartu zein erreakzioaren osagai guztiak dituen DNA ezik, eta esperimentu horretarako kontrol positibo eta negatiboak.
- Lanarekin hazi baino lehen fluxu laminarreko kabinaren argi ultramorea piztu egin behar da (esterilizatzeko). Lan egiteko itzali behar da, eta lana bukatu ondoren komeni da berriro piztea.



Protokoloa

1. Fluxu laminarreko kabinan behar den materiala kokatu: izotzan, PCR egiteko errektiboak: ur bidistilatua, 10X *Taq* polimerasa tanpoia, abiarazleak eta nukleotidoen soluzioak, PCR egiteko horma meheko eppendorfak (lagin bakoitzeko eta kontrolentzako).



2. “Master mix” (osagaien nahasketa) bat prestatu lagin guztientzako komunak diren osagaiekin, hurrengo ordena jarraituz: ur bidistilatua, 10X *Taq* polimerasa tanpoia, $MgCl_2$, detektatu nahi den genearen *forward* eta *reverse* abiarazleak, nukleotidoen soluzioa eta *Taq* polimerasa. Ondo nahastu eta eppendorfetan banatu. Erreakzioaren bolumena 25 μ l-koa izaten da.

3. Gehitu behar diren kantitateak kalkulatzeko orduan kontutan hartu behar da erreakzioa 25 μ lko bolumen batean egiten dela, eta osagaien kontzentrazioa honako hau dela: 25 pmol abiarazle bakoitzeko, 50 μ M dNTP bakoitzeko eta 0.6 U *Taq* polimerasa

4. Irakite-metodoaren bidez lortutako DNAREN soluziotik 5 μ l gehitu (25 ng inguruan.).

5. eppendorfak termozikladorean kokatu eta detektatu nahi den genearentzako egokiak diren zikloak programatu.



6. Agarosa-gel elektroforesi bat egin (ikus 2. teknika); amplifikazioaren 25 μ lak, 3-5 μ bromofenol urdinarekin nahastu eta putzuetan kargatu

7. Laginak eta markatzailea kargatu eta gero dagokion boltajea ipini migrazioa burutzeko.

8. Bistaratu DNA transiluminadore ultramorean.

9. Emaiz positibo batean laginetan kontrol positiboan agertzen diren tamaina berdineko marrak ikusiko dira.

