Protocolo: Amplificação do microssatélite D4Mgh22 através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Soluções Necessárias:

- DNA genômico a 10ng/ul
- Mix dos primers para D4Mgh22 (contendo 1pmol de cada primer/ul)
- Solução tampão para PCR acrescido de 40 ul de dNTP (à 10mM)
- Enzima Taq Polimerase (à 5u/ul)

Preparo:

➔ Colocar, utilizando uma micropipeta, 5ul da solução dos primers na parede esquerda de cada poço da placa, utilizando sempre a mesma ponteira. Um aluno da cada dupla aplicará os primers em uma coluna inteira da microplaca, a qual será passada à dupla seguinte.

➔ Acrescentar, na parede oposta ao primer, 5ul da amostra de DNA genômico, trocando de ponteira a cada nova amostra utilizada (pode-se utilizar a mesma ponteira no caso da mesma amostra ser pipetada mais de uma vez). Esta etapa será realizada pelo outro aluno da dupla.

➔ O monitor preparará, em um microtubo, uma solução com 10ul de tampão e 0,076ul de Taq Polimerase por poço utilizado (preparar cerca de 10% a mais para compensar perdas). Por exemplo, para 48 poços (meia placa):

52 x 10ul (= 520ul de tampão) + 52 x 0,076ul (= 3,95ul de Taq Polimerase)

➔ O monitor adicionará 10ul da solução de tampão+Taq em cada poço da microplaca, utilizando sempre a mesma ponteira, cuidando para não encostar a ponteira nas soluções já acrescentadas;

➔ Cobrir a microplaca com o filme adesivo e certificar-se se todas as soluções encontram-se no fundo dos poços da mesma. Caso alguma solução ainda esteja na parede do poço, bater levemente a microplaca sobre uma superfície rígida para que desçam ao fundo;

➔ Levar a microplaca devidamente vedada ao termociclador, utilizando a seguinte programação:

(96° 5') x 1	; (92° 30"	/ 59° 1'	/ 72° 31") x 35	; (72° 2') x 1
step 1	step 1	step 2	step 3	step 1
stage 1	stage 2			stage 3

➔ Aguardar o fim do programa e aplicar as amostras em gel de agarose.