

PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA PCR

Este protocolo ha sido elaborado durante el desarrollo del Proyecto de Innovación, "La fina hebra que nos une", en el I.E.S Juan Carlos I y coordinado por José María Espinosa Bernal. La financiación corrió a cargo del Centro de Profesores y Recursos, C.P.R. de la Consejería de Educación y Cultura de Murcia.

This protocol has been designed during the development of our Innovation Project "The fine thread that connects us" in our Secondary School, Juan Carlos I. Funding was provided by the Center for Teachers and Resources of the Ministry of Education and Culture of Murcia.



El contenido está disponible bajo la Licencia Internacional Reconocimiento-No Comercial-Sin Derivados de Creative Commons. Contacta con (josemaria.espinosa@murciaeduca.es) si quieres realizar adaptaciones para su distribución fuera del aula.

Content is made available under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivatives International License. Contact (josemaria.espinosa@murciaeduca.es) if you would like to make adaptations for distribution beyond the classroom.

Fundamento

Los productos de la P.C.R. que hemos comprobado dan señal en la electroforesis, debemos purificarlos para que puedan ser secuenciados. En la purificación se eliminan todos los productos secundarios de la P.C.R y los reactivos (como oligonucleótidos, nucleótidos, enzimas) que han sobrado.

Equipamiento

NOMBRE	FUNCIÓN	<input checked="" type="checkbox"/>
Centrífuga para microtubos convencional	Centrifugar los microtubos a velocidades de hasta 14.000 r.p.m	<input type="checkbox"/>
DremelFuge	Centrifugar los microtubos a velocidades de hasta 14.000 r.p.m	<input type="checkbox"/>
Vortex	Mezclar el contenido de un microtubo	<input type="checkbox"/>
Micropipetas de diferentes volúmenes.		<input type="checkbox"/>

Reactivos

NOMBRE	FUNCIÓN	PREPARACIÓN	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>ChargeSwitch™-Pro PCR Clean-Up Kit</i>	Kit de la casa comercial Thermofisher Scientific, que permite purificar los productos de la PCR de hasta 50 muestras.		<input type="checkbox"/>

Material de plástico.

MATERIAL	<input checked="" type="checkbox"/>
Microtubos de 1,5 mL.	<input type="checkbox"/>
Gradillas para microtubos	<input type="checkbox"/>
Puntas de 1000, 100, 20 y 10 microL	<input type="checkbox"/>



Procedimiento

Unión

- 1 Añadir al tubo de PCR donde queda el resto de la amplificación (una parte se ha consumido en la electroforésis) un volumen igual de tampón de purificación ChargeSwitch®-Pro PCR. Agitar con vortex.
- 2 Transferir la mezcla en la columna ChargeSwitch®-Pro PCR inserta en un microtubo colector.
- 3 Centrifugar la columna a 10.000 x g durante 30-60 segundos.

Lavado

- 4 Proceder a lavar la columna añadiendo 500 µL de tampón de lavado ChargeSwitch®-Pro PCR.
- 4 Centrifugar la columna a 10.000 x g durante 60 segundos.
- 5 Descartar el líquido y el tubo colector.
- 6 Insertar la columna en un nuevo tubo estéril.

Elución

- 7 Añadir 50 µL de tampón de elución ChargeSwitch®-Pro PCR en la columna e incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- 8 Centrifugar la columna a 10.000 x g durante 30-60 segundos. El líquido que sale contiene el ADN purificado.
- 9 Guardar el ADN purificado a -20 °C.