

Test para detectar la presencia de un patógeno en agua de lavado de patata por PCR

PROTOCOLO

Una muestra de agua de lavado fue tomada e inoculada en el medio de cultivo LB (Luria-Bertani) Posteriormente la manipulación se hará a partir de colonias aisladas presentes en este medio.

1. Extracción del DNA

- 1.1. Pipetea 50µL de agua destilada en un microtubo esteril (P1)
- 1.2. Coge una colonia bacteriana con un asa esteril de 1µL calibrada
- 1.3. Hacer una suspensión con la colonia bacteriana en un microtubo (P1)
! Cuidado para obtener la suspensión homogénea!
- 1.4. Pon el microtubo (P1) en un baño de agua a 100°C durante 1 minuto.
- 1.5. Pon el microtubo (P1) en la centrífuga.
- 1.6. Centrifuga el microtubo (P1) 5 minutos a 4500 rpm.
- 1.7. Sacar el tubo y transfiere el sobrenadante que contiene el DNA a otro microtubo esteril (P2).

2. Preparación de la PCR Mix (M)

- 2.1. Meter en un microtubo esteril :
 - 90 µL agua destilada
 - 50 µL buffer 10X
 - 28 µL MgCl₂ 25mM
 - 28 µL dNTP 0,2µM
 - 4 µL Taq polimerasa
- 2.2. Congelar el tubo si la PCR no se va a hacer en el mismo día.
- 2.3. En el momento que se use, descongelar si es necesario y después centrifugar rápidamente.

! La PCR mix ya está preparada!

3. Amplificación del DNA

- 3.1. En un microtubo (A) para PCR pipetear 10µL de solución de DNA desde el microtubo (P2).
- 3.2. Añadir 20µL de la PCR mix (M).
- 3.3. Añadir 10µL de cada primers metkRPECTO y metkFPECTO o 16SR y 16SF.
Es posible usar los dos pares de primers a la vez. Entonces el volumen de los primers es 5µL.
- 3.4. Centrifuga rápidamente el microtubo (A).
- 3.5. Poner el microtubo (A) en el termociclador. Localiza la posición.
- 3.6. Haz dos controles repitiendo los pasos de 3.1. a 3.5. reemplazando la solución de DNA (P2) por:

- Agua para el **control negativo**(C-)
- Solución de DNA *Pectobacterium atrosepticum* para el **control positivo** (C +)

3.7. Enciende el termociclador:

- 96°C, 5min
- 40 ciclos :
 - o 94°C, 30s
 - o 58°C, 30s
 - o 72°C, 50s
- 72°C 5min
- conservar a 4°C

3.8. Inicia la amplificación.

4. Electroforesis de fragmentos de DNA

- 4.1. En tres microtubos esteriles (E1, E2, E3), pon 10µL de la solución de PCR (A, C-, C+).
- 4.2. Añade 2µL de loading buffer (X) y mezcla.
- 4.3. Coge el gel de electroforesis y quita la protección.
- 4.4. Enjuaga los pocillos con agua desmineralizada. Inclina el casete para mover el exceso de liquido al borde y después golpes secos.
- 4.5. Pon en un pocillo, 5 µL de la solución E1.
- 4.6. Pon en los dos siguiente pocillos, 5 µL de los controles E2 y E3.
- 4.7. Pon en el cuarto pocillo 5µL de la solución de marcadores moleculares (W)

! Un gel de electrophoresis se usará para 3 grupos (12 pocillos) !

- 4.8. Inicia la migración diez minutos a 220V.
- 4.9. Para la migración cuando la primera línea de la solución de los marcadores moleculares alcance el final del gel.

5. Analiza tus resultados