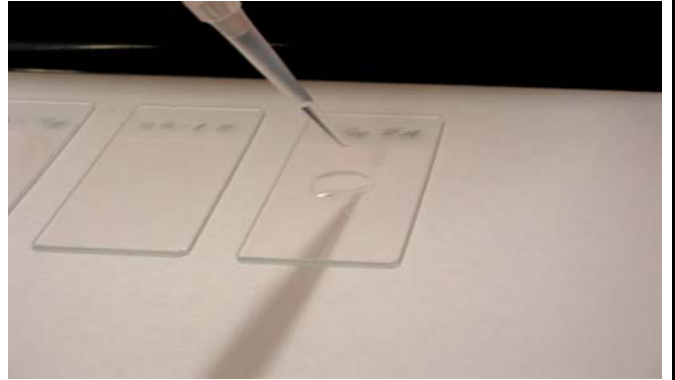


Technical Tips

Número: 00013

Data: 06/24/05



ASSUNTO: PROTOCOLO DE DNA PCR, USANDO O **Liqui-**PREP**TM**

TECHNICAL TIP OVERVIEW:

Esse protocolo vem de Israel, de um usuário do Liqui-**PREP**TM, é o DNA PCR REFLEX TESTING, está sendo usado com muito sucesso rotineiramente.

PROTOCOLO :

EXTRAIR O DNA:

- * Transfira o Pellet Celular **Liqui-**PREP**TM** completo, junto com o fluido remanescente, para um tubo eppendorf de 1.5 ml.
- * Centrifugue a amostra por 10 minutos a 1000 xg.
- * Remova o sobrenadante, invertendo o tubo e batendo para retirar o fluido do tubo.
- * Adicione 400µl de água classificada para PCR.
- * Misture o pellet usando vortex.
- * Coloque o tubo na DRY HEAT BLOCK a 100^o C por 10 minutos. (que causa a citólise da célula e libera o citoplásmico e nucleico DNA, dentro da solução)
- * Deixe esfriar a amostra em temperatura ambiente.
- * Adicione 10 µl de Proteinase K (para proteólise) e incube durante a noite em 37^o C , ou incube em 55^oC por 5 horas.
- * Parar a proteólise, coloque o tubo em DRY HEAT BLOCK , a 100^oC por 10 minutos.

O sobrenadante agora contém sequências de DNA, que podem ser identificadas em PCR.

- * Prepare a solução de DNTP'S, para a hibridização com o DNA, caso presente.
- * Em 90ul de DNTP'S, adicione 10ul de cada amostra e faça o processo de PCR rotineiro. As amostras são rodadas em GEL, em paralelo com os controles conhecidos. E os resultados lidos como usualmente em PCR gels.