

Materiais

- Gelo
- Tubos eppendorf 0,6 mL ou 1,5mL
- Tubos e estantes p/ tubos de PCR 0,2 ml e 1,5mL
- Caneta permanente (tinta não sai com álcool)
- Taq polimerase 5 u/µl (Magic, Special ou HotStart)
- dNTP 10mM
- Primers (normalmente 10 µM)
- Tampão Colorless 5x GoTaq ou Flexi Buffer Colorless Promega (cat# M890) ou Green Flexi com MgCl₂ (cat# M7911)
- Alíquota água milli Q (Q)
- MgCl₂ 25mM (Promega cat# A351H)

Procedimentos

1- Definir PCRs a serem feitos, checando a lista de camundongos;

2- Descongelar reagentes do Mix (*Água Q, dNTP, primers, tampão 5X e MgCl₂*) que ficam localizados na caixa "**REAGENTES DE PCR**";

Checar protocolo de genotipagem!

OBS: Taq só deve ser retirada do freezer quando for ser usada. Conferir se o tampão é Colorless sem MgCl₂ ou green que já possui MgCl₂ adicionado.

3- Separar protocolos de PCR necessários;

4- Definir o número de amostras (Incluir controles positivos - que ficam localizados na caixa "**CONTROLES DE PCR**"- e controle sem DNA - branco) para cada PCR;

5- Definir o volume de Mix a ser preparado baseado no número total de amostras sem esquecer de adicionar margem de erro de pipetagem;

6- Preencher **ficha de verificação** PCR/Gel anotando a ordem das amostras, tipo de PCR, dia e quem realizou;

7- Organizar e identificar tubos de PCR de acordo com a organização listada na ficha de verificação PCR/Gel
OBS: podem ser utilizados tubos PCR individuais ou tubos fita em strip de 8.

8- Verificar se reagentes estão descongelados

9- Quando completamente descongelados, vortexar todos

10- Vortexar amostras de DNA, incluindo os controles

11- Preparar Mix adicionando reagentes abaixo:

Água Q > tampão 5X > MgCl₂ > Primers > dNTP > Taq Polimerase (pegar apenas na hora do uso e devolver imediatamente);

Procedimentos (cont.)

12- Vortexar Mix;

13- Adicionar Mix aos tubos de PCR;

14- Adicionar 2 µl de DNA aos tubos de PCR, pipetando diretamente no Mix;

OBS: O volume de Mix e DNA a ser adicionado pode variar entre PCRs, conferir no protocolo

15- Tampar bem os tubos de PCR e identificar, caso não tenha pré-identificado os tubos;

16- Certificar que as amostras estão no fundo dos tubos; centrifugar brevemente, caso necessário;

17- Colocar tubos na máquina de PCR imediatamente e iniciar o programa de PCR listado no protocolo.

Em caso de dúvida, pré-visualize o programa antes de iniciá-lo

18- Desligar o termociclador, retirar as amostras e correr ou armazenar a 4°C na geladeira

OBS: É possível deixar a máquina ligada overnight e retirar no dia seguinte. Pedir para outra pessoa retirar, se necessário.

OBS: Sempre que seja necessário, repor os reagentes do Mix a partir do estoque / avisar caso o estoque esteja acabando.

Reagentes

Fonte

5x GoTaq Flexi Buffer Colorless 1mL
(Promega M890)

5x Green GoTaq Buffer 5mL (já contém MgCl₂)
(Promega M7911)

MgCl₂ 25mM
(Promega A351H)

dNTP mix 10mM
(Promega U1515)

GoTaq® Hot Start Polymerase
(Promega M5005)

Água DNA-free
(Invitrogen cat# 10977-015)