

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Nombre: Isaac Falconí

Informe de actividades

Desarrollo de PCR de las muestras de saliva

Las muestras sometidas a las PCR's provienen de la población Kwecha de NAPO, donde se les realizó extracción de ADN en saliva y luego una metilación por conversión de bisulfito. Una vez terminada la conversión con bisulfito, estas muestras se someten a 3 PCR's distintas que seguirán un orden específico hasta ser secuenciada, la primera PCR es para amplificar el gen de interés de Leptina y TNF usando primers específicamente diseñados para estas regiones. Para este proceso se realiza mediciones de calidad y concentración mediante el uso del Nanodrop y el Quantus, que muestran la cantidad de ADN en nanogramos y las relaciones de absorbancia de 260/280 - 260/230. A partir de las concentraciones de ADN se determina el volumen de cada muestra que se vaya a emplear y según esto, se calcula la cantidad y proporción de cada reactivo de la reacción, lo que va a asegurar la eficacia de esta primera PCR. Una vez efectuada la primera amplificación, se verifican los resultados por electroforesis en gel de agarosa al 3% con el tinte SybrSafe. En el gel se debe observar una única banda de un tamaño específico que corresponde al amplicón.

La segunda PCR es para añadir un cebador universal llamado LoRo que utiliza como base al producto obtenido de la primera PCR. la adición de los primers LoRo servirá como un sitio de reconocimiento para que los primers de la PCR3, formados por adaptadores e índices, puedan identificar y adherirse a esta nueva secuencia extendida de la PCR1. En este procedimiento se realizan diluciones del producto de PCR1 para llegar a una concentración de ADN determinada, que se usará en los cálculos necesarios para realizar la PCR2. Posteriormente, se verifican los resultados por electroforesis y al ver que todo está bien se procede a realizar una purificación del producto de la PCR2 que eliminará los residuos de los reactivos de PCR que estén presentes dentro del mismo. Y finalmente se comprobará por electroforesis si la purificación del producto de PCR2 fue realizada adecuadamente.

Por último, la tercera PCR es para preparar la librería genética que incluyen adaptadores e índices específicos que serán necesarias para que el secuenciador identifique cada muestra dentro del pool. Para esto se usa como producto base al producto de la PCR2 purificada donde está el tag universal LoRo. Primero medimos la calidad y concentración de ADN, y se hacen los respectivos cálculos para determinar los volúmenes de reactivos

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Nombre: Isaac Falconí

empleados en cada reacción de PCR. En la cabina se realizan diferentes combinaciones de primers para cada muestra. Estos primers estarán formados por una única combinación de indicadores y adaptadores que no se repetirán en ninguna de las muestras a secuenciar, lo que permitirá al secuenciador identificar hasta 96 muestras como individuos diferentes.

Al obtener el producto de esta PCR se verifica por electroforesis su efectividad y se realiza un proceso de purificación que eliminará los DNTPs y cebadores sobrantes de la reacción de PCR que puedan alterar a la secuenciación. Se verifica por electroforesis el producto de la purificación de PCR3 y viene un paso importante, que es verificar que la calidad y concentración del producto purificado de PCR3 sea buena lo que se evidencia en las relaciones de absorbancia. En caso de que los valores de concentración, calidad y pureza no sean óptimos entonces se generará ruido al momento de la secuenciación, lo que generará ruido y resultados incorrectos.

Actualizado:

La PCR2 de Leptina 3 se ha cambiado debido a los problemas que ha presentado la PCR3. Ahora ya no se cortará y purificará en esta PCR para este gen, sino solo se purificará directamente el producto de PCR. Esto se debe, a que se estandarizó la PCR para que solo aparezca una sola banda. Sin embargo, la purificación esta presentando problemas, provocando que no exista banda en el gel después de la purificación.