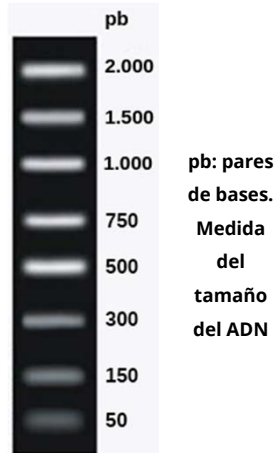


Sembrar marcador de peso molecular

- Muchos fragmentos de ADN de tamaño conocido.
- Sirve de referencia para comparar con nuestro ADN de interés. Hay un montón dependiendo del rango deseado

Usaremos el Ladder 100 pb de PB-L que contiene 12 fragmentos de ADN de rango de 100 a 1000 pb con incrementos de 100 pb, y dos bandas adicionales de 1500 y 2000 pb



Agentes intercalantes de ADN.

Solamente fluorescen al intercalarse en el ADN. Pueden estar presente en el gel o en el buffer se siembra

Más comunes:

- * Bromuro de etidio (altamente mutagénico, poca sensibilidad, no permite ver ADN pequeños)
- * GelRed (muy estable y de mayor sensibilidad al bromuro. Puede alterar el tamaño del ADN durante la corrida)
- * SYBR SAFE (poco estable pero puede observarse con luz azul)

Notas



C E P A V E

Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores

Diagnóstico molecular y genotipificación del agente etiológico de la Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, en vectores triatominos

La Plata, 26 al 30 de septiembre de 2022

Taller Teórico - Práctico

Procesamiento de muestras y PCR convencional

Comité organizador

Dra. Marina Ibáñez Shimabukuro

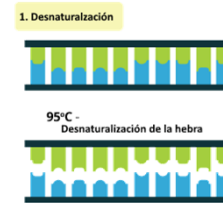
Dra. Soledad Ceccarelli

Dr. Darío Balcazar

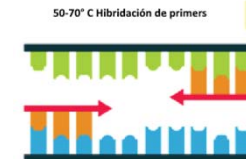
Dr. Gerardo A Marti

PCR de PUNTO FINAL – Fundamentos & Notas

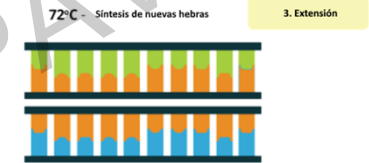
1. DESNATURALIZACIÓN
Es un paso crucial y usualmente con ~30 segundos a 94-95°C se garantiza la disociación de las hebras. El tiempo puede acrecentarse si el contenido GC es extremadamente elevado.



2. ANNEALING O HIBRIDACIÓN
Dependiendo la T_m de los primers (que dependen a su vez de su longitud y secuencia) se optimiza la Temperatura de annealing.



3. EXTENSIÓN
Su temperatura estará dada principalmente por las características de la enzima (típicamente 72 °C). Se recomienda atender las especificaciones del fabricante. La duración se vincula a la longitud del amplión. Suele calcularse a partir de la relación de 1min para 1Kb.

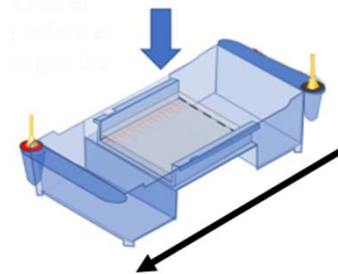


Las repeticiones de este ciclo amplifican exponencialmente el fragmento de interés.

30-35 ciclos suele ser un buen compromiso entre la eficiencia de la enzima, la especificidad y la sensibilidad, aunque depende de varios factores.

Como regla general se puede probar inicialmente una $T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$ y se varía de a 1-2 °C para ver su efecto.

Electroforesis en gel de Agarosa – Notas



Sentido de migración del ADN

* Gracias a una fuente eléctrica, se genera un campo eléctrico que permite que los fragmentos de ADN (cargado negativamente por sus grupos fosfatos) migren hacia el electrodo positivo a través de la matriz del gel a diferentes velocidades separándose unas de otras.

*El tiempo de corrida y el voltaje depende de lo que se quiera separar.

¿Por qué se separa por tamaño?

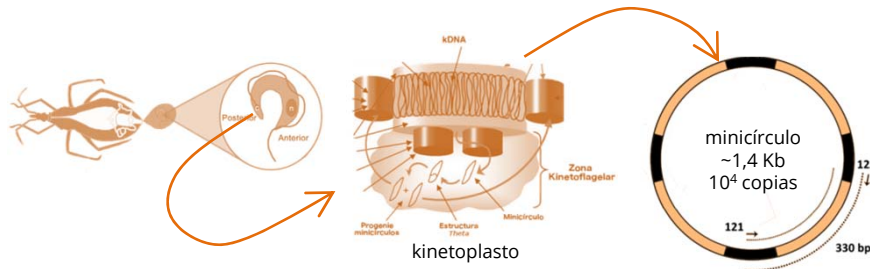
ADN grande migra más lento (le cuesta atravesar gel)

ADN pequeño migra más rápido (atravesa más fácil el gel)

PCR de PUNTO FINAL para detección de *T. cruzi*

En la PCR de punto final se amplificará una secuencia de los minicírculos del ADN del kinetoplasto. Junto con las secuencias repetidas del ADN satélite, el ADNk de minicírculos representan los blancos o dianas más utilizados para la detección de *T. cruzi* dado que un solo parásito posee alrededor de 10^4 minicírculos y $10^4 - 10^5$ copias de ADN satélite.

Los minicírculos de *T. cruzi* tienen una longitud de ~1,4 kb organizados en 4 segmentos. Cada uno de estos segmentos consta de una región corta, altamente conservada (en color negro) y una región más larga con alta variabilidad de secuencia (sombreado claro). Los primers o partidores que utilizaremos, denominados 121Tc y 122Tc hibridan en dos de esas regiones conservadas, amplificando una secuencia de 330pb.



Mezclas de reacción para PCR

Muestras: VC47, VC47+, 3 y 5.

Reactivos: MasterMix Pegasus PB-L

Componente	Vol (uL)
MasterMix 2x	6,25
Primer F (121Tc) (10 uM)	0,5
Primer R (122Tc) (10 uM)	0,5
H ₂ O (csp Vf: 12,5ul)	4,25

ADN muestra 1ul

- ✓ La MasterMix contiene buffer, polimerasa, dNTPs, Mg²⁺ y cofactores en concentraciones optimizadas.
- ✓ Se debe incluir un control negativo en donde un volumen de H₂O reemplaza al de muestra.

Programa de Ciclado

	T (°C)	t	
Desnat Inicial	94	5 m	
Desnat	94	45 s	} x30
Hibridación	55	30 s	
Extensión	72	25 s	
Ext. final	72	3 m	

Análisis de los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa

- 1) Preparar un gel de agarosa 1,5% en buffer TBE 0.5X.
- 2) Sembrar 8ul de la PCR con 1,25 uL de loading buffer+GelRed.
- 3) Correr a 90 V por 60 min. Observar en transiluminador UV y registrar foto.

Diagnóstico molecular de *T. cruzi* en *T. infestans*

El diagnóstico molecular de *T. Cruzii* suele realizarse a partir de las fecas secas de la vinchuca que quedan depositadas en papel de filtro. Para ello, se recorta un pequeño círculo del papel con ayuda de pinzas y tijera previamente desinfectadas con EtOH 70%.

Por cuestiones de Bioseguridad, durante el taller practicaremos la extracción sobre una muestra alternativa que no posea la forma infectiva del parásito. En particular trabajaremos sobre muestras de sangre de vizcacha (tratada con Guanidina HCl-EDTA), aplicando un protocolo semejante al que realizaríamos sobre las fecas de vinchuca.

Dejamos a continuación las recomendaciones que deben atenderse para la manipulación segura de las muestras potencialmente infectivas.

IMPORTANTE

Recordar que las muestras pueden contener la forma infectiva de *T. cruzi*.

- Utilizar elementos de protección personal (guardapolvo, guantes, mascarilla y/o antiparras).
 - Trabajar en cabina de seguridad biológica Tipo II.
- Evitar en todo momento la generación de salpicaduras y aerosoles.
- Tener preparada solución diluida de hipoclorito de sodio para desinfectar superficies y para la eliminación de los descartables que tengan contacto con la muestra infectiva.
- Los tips y tubos se dejan decontaminando al menos unas horas en lavandina diluida antes de desecharlos en la bolsa de residuos patogénicos.
 - En lo posible utilizar tips con filtro.

Extracción ADN - Protocolo

Método de unión a partículas de sílica en columna (comercial, PB-L)
Adaptado sobre indicaciones del fabricante.

- 1) A cada tubo conteniendo 200 μ L de muestra añadir 20 μ L de proteinasa K y vortexear para homogeneizar. Luego realizar un *spin down*.
- 2) Añadir 200 μ L de Buffer GA y vortexear bien.
- 3) Incubar a 56°C 15 minutos. *Spin down*.
- 4) Añadir 200 μ L de Etanol (96-100%). Mezclar con vórtex 15 seg.
- 5) Centrifugar 5 min a 13400 g.
- 6) Transferir sobrenadante a columna.
- 7) Centrifugar 30 segundos a 13400 rpm. Desechar el eluato y colocar la columna nuevamente en el tubo de recolección.
- 8) Agregar 500 μ L de buffer GB.
- 9) Centrifugar 1 min a 13400 g. Desechar el eluato y colocar la columna nuevamente en el tubo de recolección.
- 10) Centrifugar 3 minutos a 13000 g para secar bien la membrana.
- 11) Colocar la columna en un nuevo tubo de 1,5 mL limpio y agregar 50 μ L de buffer GC procurando que caiga en el centro de la membrana (sin tocar con el tip).
- 12) Incubar a T amb. entre 15 y 20 min. (Puede realizarse una incubación más prolongada o incluso realizar una segunda incubación *overnight* para recoger otra alícuota).
- 13) Centrifugar 2 minutos a 13400 g. Almacenar en freezer (-20 °C) correctamente rotulado hasta su uso.

Extracción ADN – Fundamentos & Notas

✓ Para evitar la contaminación cruzada, los tubos se deben centrifugar brevemente ("spin down") luego de cada agitación con vórtex o incubación. De esta manera, se eliminan las gotas en la tapa del tubo.

