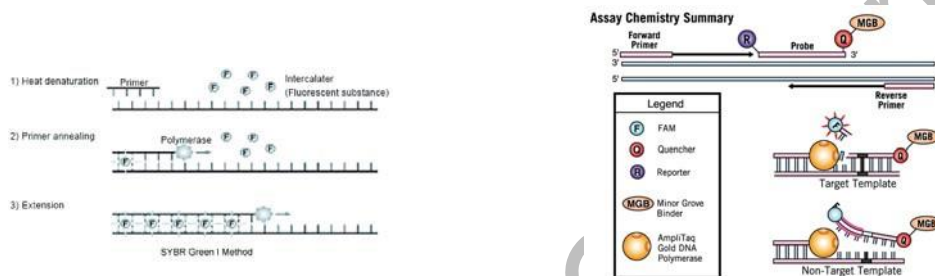


PCR EN TIEMPO REAL PARA EXPRESIÓN GÉNICA

El sistema de Applied Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR para cuantificación absoluta o relativa de **expresión génica** emplea para la cuantificación una reacción de PCR acoplada a un ensayo de emisión de fluorescencia.

En el caso de la sonda fluorescente SYBR Green ésta se incorpora a los productos de PCR de doble cadena que se van generando durante la reacción. La principal desventaja de la utilización de esta química es la posibilidad de que la sonda fluorescente se una a subproductos de la reacción de PCR como primer-dimers o productos inespecíficos que también podrían generarse. Estos productos son fácilmente visibles cuando al final del ensayo de QRTPCR hacemos una curva de disociación del conjunto de los productos presentes en la reacción. Todas estas desventajas desaparecen cuando se emplean sondas Taqman en los ensayos de cuantificación de expresión génica



Cómo traer las muestras al Servicio:

RNA:	100ng/μl
Volumen:	10μl
Tubos:	0.2ml
Primer:	5μM
Volumen:	100μl
Tubos:	1.5ml

Los usuarios traerán las muestras al Servicio en hielo, para evitar su degradación, junto con las sondas y/o oligos que se emplearán en el ensayo. Tanto las muestras como los oligos deberán estar adecuadamente etiquetados (nombre y concentración del stock) para su correcta identificación. Los usuarios se dirigirán a la persona encargada de los ensayos de PCR en tiempo real para que haga la recepción de las muestras y anote las características del ensayo. Las muestras y los oligos se conservarán en el Servicio a -80°C y las sondas a -20°C en cajas propias de cada usuario.

Los usuarios prepararán cada muestra de RNA en un tubo eppendorf de 0.2 ml y en un volumen final de 10 μl. Las muestras de RNA deberán tener una concentración aproximada de 100 ng/μl, que será verificada por el Técnico responsable. El RNA no deberá estar degradado. Los oligos utilizados los preparará el usuario en tubos eppendorf de 1.5 ml en un volumen final de 100 μl, y a una concentración de 5 μM. En el caso de sondas se traerá el tubo enviado por la casa comercial o una alícuota del mismo adecuadamente etiquetada y protegida de luz.

Los usuarios indicaran en el Registro adecuado del Servicio, los nombres de las muestras y sondas/oligos a analizar, las sondas correspondientes a los genes endógenos y la muestra calibradora a emplear en el estudio.

Para que el ensayo se lleve a cabo los usuarios del IIBm deberán indicar en el Servicio de Genómica el número de pedido del mismo tras solicitar el análisis a través de la web del Servicio de Compras y Almacén. No se llevaran a cabo los ensayos para los que no se haya realizado el pedido correspondiente.

Los usuarios recibirán por correo electrónico una hoja excell con los resultados de la cuantificación relativa/absoluta. Una vez finalizado el ensayo los usuarios deberán recoger lo antes posible del Servicio sus muestras (RNAs, cDNAs), sondas, oligos...

El Servicio dispone además de una licencia del software Statminer qPCR Analysis para el análisis de experimentos de expresión génica.

GENOMICA IIBm