

## Protocolo de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) de genes *mcy*

Claudia Piccini y Gabriela Martínez de la Escalera  
Departamento de Microbiología  
IIBCE

**PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR):** El PCR en tiempo real se ajusta utilizando *primers* específicos (Tabla 1). Para las reacciones se emplea el kit Power SYBR Green PCR (Invitrogen) con un volumen final de reacción de 20  $\mu$ l: 10  $\mu$ l de agua, 7,76  $\mu$ l de mix (Power SYBR Green PCR), 0,12  $\mu$ l de cada primer (50  $\mu$ M) y 2  $\mu$ l de ADN de la muestra.

**Curva de calibración y cuantificación del número de copias génicas:** La eficiencia de amplificación de los genes se determinará empleando vectores (plásmidos) que contienen los fragmentos génicos amplificados clonados. Para cuantificar el número de copias de cada gen en las muestras se realizan diluciones seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  de los genes clonados, se realiza el ajuste de la curva y se determina el número de copias. Una vez conocido el número de copias génicas que contiene cada reacción de PCR, se calcula el número original de copias en la muestra (basados en el volumen filtrado y el rendimiento de ADN obtenido).

**Tabla 1- Primers empleados para desarrollar el método**

Nombre	Secuencia (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)	Tamaño esperado (pb)	Referencia
mcyAMSF	ATCCAGCAGTTGAGCAAGC	55,8	210	Tillett et al., 2001
mcyAMSR	TGCAGATAACTCCGCAGTTG	55,2	210	Tillett et al., 2001
mcyJMF	TAGCTAAAGCAGGGTTATCG	51,7	242	Kim et al., 2010
mcyJMR	TCTTACTATTAACCCGCAGC	51,9	242	Kim et al., 2010
mcyDF2	GGTTCGCCTGGTCAAAGTAA	55,2	297	Kaebnick 2000
mcyDR2	CCTCGCTAAAGAAGGGTTGA	54,4	297	Kaebnick 2000
mcyBHF03	AGATTTTAATCCACAAGAAGCTTTATTAGC	54,4	104	Hautala et al., 2012
mcyBHR04	CTGTTGCCTCCTAGTTCAAAAAATGACT	57,5	104	Hautala et al., 2012
mcyE127F	AAGCAAAGCTGCTCCCGGTATC	57,6	120	Sipari et al., 2010
mcyE247R	CAATGGGAGCATAACGAGTCAA	55,1	120	Sipari et al., 2010