

Control Positivo sRNA

Reactivación del plásmido pPOCtb.

Se preparó medio LB para la reactivación del plásmido pPOCtb.

Se plaqueó el plásmido mantenido en glicerol a -80°C en dos cajas de petri con ampicilina. La concentración final de la ampicilina por caja fue de 0,05 mg/ml. Las cajas se incubaron a 37°C toda la noche. Se tomo una colonia y se inoculó en 3 ml de medio LB líquido con ampicilina. Se incubó a 37°C en agitación toda la noche.

Miniprep

El plásmido pPOCtb fue aislado mediante miniprep empleando el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen), con modificaciones en el volumen de buffer de elusión en 30 µl y a una temperatura de 50°C.

Posteriormente se realizó cuantificación por Nanoprop

El blanco utilizado fue el buffer de elusión utilizado para la miniprep. A continuación, se observan los resultados obtenidos

ID de la muestra	Ácido nucleico	Unidad	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
sDNA1	516,7	ng/ul	10,334	5,426	1,9	2,22	DNA	50
sDNA2	362,6	ng/ul	7,252	3,813	1,9	2,27	DNA	50
sDNA3	403,3	ng/ul	8,066	4,237	1,9	2,23	DNA	50

De acuerdo a lo anterior se puede considerar la extracción de DNA plasmídico como pura ya que en las tres muestras la relación 260/280 es superior a 1.8 y la relación 260/230 es igual o mayor a 2.2

El plásmido fue visualizado en geles de agarosa al 0.8% teñidos con SYBR Green (Thermo Fisher). Se verificó que no hubiera presencia de DNA genómico de *E. coli*.

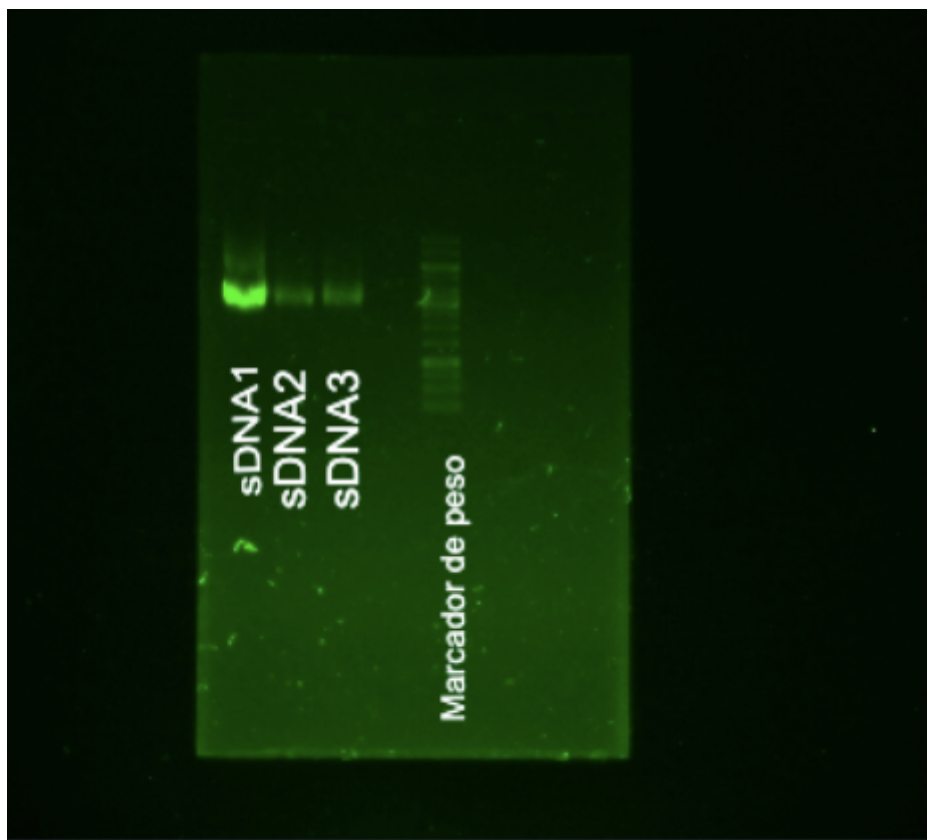
La muestra sDNA1 se sembró en el gel concentrada.

Las muestras sDNA2 y sDNA3 fueron diluidas.

Se utilizo un marcador de peso de 1Kb ya que el tamaño del plásmido es de 4Kb.

El gel se corrió a 90 V durante una hora.

A continuación, se observan los resultados del gel.



PCR:

Iniciadores: Se utilizaron iniciadores diseñados sobre el sRNA, no se publica su secuencia puesto que están protegidos para evaluar la posibilidad de patente.

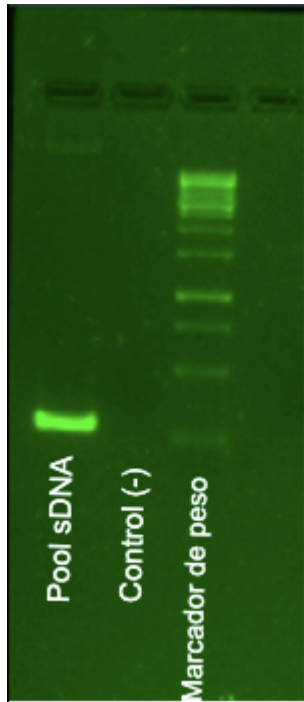
Se realizó PCR con el ADN previamente extraído en la Miniprep bajo las siguientes condiciones:

Composición de una reacción de PCR	Volumen	Master mix para 5 reacciones
Master mix Corpogen	10 ul	50ul
Primer directo	0.8ul	4ul
Primer reverso	0.8ul	4ul
Agua	7,4ul	37
Templado de DNA	1ul	

El perfil térmico utilizado fue

Temperatura	Tiempo
95°C	5 min
95°C	30 seg
53°C	30 seg
72°C	40 seg Hasta aquí 35 ciclos
72°C	2 min

Los productos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5 %. También se sembró el control negativo y el marcador de peso de 1Kb. A continuación, se observan los resultados obtenidos en el gel de electroforesis. El tamaño del amplicon de sDNA es el esperado (300 pb)



Purificación de productos de PCR

Se tomaron 35 ul de la reacción pool de PCR y se realizó la purificación utilizando el kit QIAquick PCR Purification Kit.

Posteriormente se procedió a realizar la cuantificación de la muestra usando nanodrop , (50 ng/ul) . Como se puede ver, el control positivo del sRNA está listo para ser empleado en los experimentos de DIAPOPs