



Genética molecular

Universidad Nacional de Quilmes



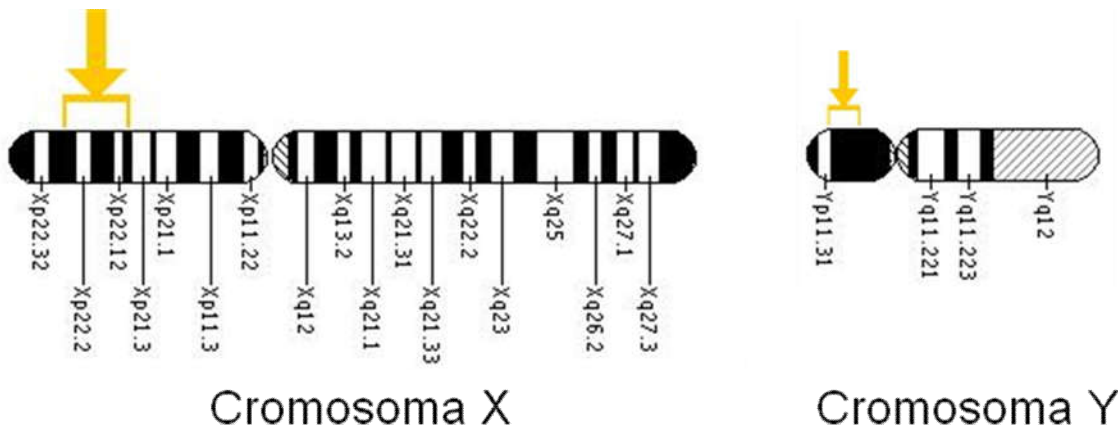
Trabajo práctico N°2

Caracterización de un polimorfismo genómico asociado a los cromosomas sexuales.

El gen de amelogenina **AMG** codifica para una proteína del esmalte dental, y se encuentra en ambos cromosomas sexuales. En mujeres, AMG se ubica en Xp 22.1-22.3 y en hombres el AMGL (*amelogenine like gen*) se encuentra cerca del centrómero del cromosoma Y.

La secuencia de este gen en el cromosoma Y se diferencia de la del X por una delección de aproximadamente 200 pb.

Para el par de *primers* elegidos, en mujeres se espera obtener una banda de 360 pb. y en varones 2 bandas, una correspondiente al X de 360pb. y otra al Y de 160 pb.



La reacción de PCR se llevará a cabo con el siguiente par de *primers*:

AME F 488 : 5' CAT TCA TgA ACC ACT gCT CAG 3'

AME B 648 : 5' AAA TgA gAA AAC CAg ggT TCC 3'

La mezcla de reacción se realizará en 15 µl finales, conteniendo la cantidad en µl de DNA correspondiente a 100 ng (dependiendo de la concentración de cada muestra).

Muestras a amplificar: Extracciones de mucosa bucal, dos controles positivos (una mujer y un varón) y un control negativo.

Concentraciones de los reactivos:

Buffer 1 X (stock 10 X)	(10/100 µl)
MgCl ₂ 1.5 mM (stock 50 mM)	(3/100 µl)
dNTPs 200 µM	(2/100 µl)
Primers 0.25 µM	(1/100 µl)
Taq Polimerasa 2.8 U	(0.6/100 µl)
H ₂ O	(llevar a 100 µl)
DNA (100 ng)	(µl necesarios según concentración)

<u>Programa de amplificación :</u> 35 ciclos	Desnaturalización inicial	95°C	5'
	Desnaturalización	95°C	1'
	Annealing	52°C	1'
	Extensión	72°C	1'
	Extensión final	72°C	5'

Luego de la amplificación, conservar las muestras a -20°C.

Para la verificación de la reacción de PCR se correrá un gel de agarosa 2%.

- Pesar 2 gramos de agarosa, agregarle 100 ml de buffer TAE o TBE 1X.
- Disolver la mezcla en microondas hasta no observar grumos.
- Agregar 5 µl del agente intercalante GelRed.
- Enfriar y volcar en la cuba de armado del gel.

- Colocar en la cuba de corrida que contiene el buffer correspondiente (TAE o TBE); retirar los peines con cuidado para no romper los slots.

Siembra de las muestras

- Tomar el volumen de PCR indicado por los instructores y mezclar con 4 μ l de *loading buffer* (buffer de carga); sembrar en los slots.
- Sembrar un marcador de peso molecular (*ladder*)
- Correr el gel a 95-100 volts.
- Frenar la corrida luego de aproximadamente 45'. Visualizar las bandas en transiluminador de luz U.V.