



# Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal



## Protocolo de PCR para sequências repetitivas, incluindo o DNAr 5S

Obs:

Fazer inicialmente o teste dos *primers* novos em meia reação (25 µl) Para posterior marcação, fazer de 8 a 10 reações inteiras (50 µl)

### Reação para amplificação

Reagente	Concentração estoque	Volume	Concentração final
Tampão	10 ×	5 µl	1 ×
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	4 µl	2 mM
dNTPs	2,5 mM cada	2 µl	0,1 mM
Primer Forward	10 µM	2 µl	0,4 µM
Primer Reverse	10 µM	2 µl	0,4 µM
Taq polimerase	5 U/µl	0,25 µl (kit) ou 0,6 µl (Taq caseira)*	0,025 U/µl
Água	-	28,75 µl ou 28,4 µl *	-
DNA	50 ng/µl	2 µl	2 ng/µl
TBT	5x	4µl	0,4x
Total		50 µl	

\* Volumes adaptados ao uso de Taq caseira

### Programa

Ciclos	Temperatura	Duração
1 ×	94 °C	3 min
30 ×	94 °C	1 min
	55 °C, ou de acordo com os <i>primers</i> **	1 min
	72 °C	1 min
1 ×	72 °C	10 min
	10 °C	∞

\*\*Para a amplificação do DNAr 5S, usar temperatura de anelamento de 60 °C e os *primers*: UP46 (5'-GTGCGATCATACCAGC(AG)(CT)TAATGCACCGG-3') e UP47 (5'-GAGGTGCAACACGAGGACTTCCCAGGAGG-3')

### Precipitação de DNA

Juntar todas as reações de PCR (8 a 10 reações inteiras) em um só tubo.

Colocar 2,5× do volume total de etanol 100% MERCK gelado e 10% do volume total de Acetato de sódio 3M pH 5,2.

Deixar overnight a -20°C.

Centrifugar a 11.000 rpm por 30 min a 4°C. Descartar o sobrenadante.

Adicionar 200 µl de etanol 70% MERCK (pelo menos até cobrir o *pellet*). Centrifugar a 11.000 rpm por 5 min a 4°C. Descartar o sobrenadante.

Deixar secar o *pellet*.

Ressuspender em 1× TE (10 – 20 µl).