

Carpeta de protocolos

Indice: (adaptado de lab dgolombek/ssimonetta. UNQ/FIL)

- **NGM (Agar de crecimiento de gusanos)**
- **LB (medio para cultivo de E. Coli)**
- **Soluciones varias**
- **Soluciones M9**
- **Soluciones S basal y completa**
- **Congelado**
- **Sincronización con cloro**
- **Comida para gusanos**
- **Microscopia**
- **Datos útiles cant. Gus. p/experimentos**
- **Cuantificación Proteínas (Bradford)**
- **Western Blot**
- **Extraccion de RNA/RTPCR**

>> Agar de crecimiento de gusanos (NGM):

	Normal	Rico	Normal	Rico	Normal
Para NGM (ml)	60	60	180	180	500
ClNa (g)	0,18	0,072	0,54	0,216	1,5
Agar (g)	1,02	1,5	3,06	4,5	8,5
Peptona (g)	0,15	1,2	0,45	3,6	1,25
H2Od (ml)	58,5	58,5	175,5	175,5	487,5

Agregar buzo magnético al erlenmeyer y Autoclavar.

Luego de autoclavar, Agregar:

Para Volumen	60ml	180ml	500ml
Buffer PO4 (ml)	1,5	4,5	12,5
MgSO4 1M (ml)	0,06	0,18	0,5
CaCl2 (ml)	0,06	0,18	0,5
Colesterol	0,06	0,18	0,5

NOTA: OJO, hacerlo en orden: el buffer PO4 (mezclar), MgSO4 (mezclar), CaCl2 (mezclar) y colesterol (mezclar). Hay que hacerlo con el agar aún líquido pero no muy caliente. Si no se mezcla bien antes, el CaCl2 forma cristales.

Volumen que llevan las placas:

- Placas chicas: 6 ml
- Placas grandes: 18 ml

Recomendación de preparar las placas en flujo laminar. Dejar secar 30 minutos aprox antes de tapar. Dejar en la mesada hasta el otro día. Verificar que no creció contaminación antes de sembrar bacterias por monocapa.

>> LB-agar de crecimiento de E. coli:

LB-agar (ml)	15	25	30	50	60	75	90	100
Triptona (g)	0,15	0,25	0,30	0,50	0,60	0,75	0,90	1,00
Extracto de levadura (g)	0,08	0,13	0,15	0,25	0,30	0,38	0,45	0,50
NaCl (g)	0,08	0,13	0,15	0,25	0,30	0,38	0,45	0,50
Agar (g)	0,23	0,38	0,45	0,75	0,90	1,13	1,35	1,50

Llevar a volumen con H2Od, ajustar el pH a 7 y autoclavar.

>> Cultivo de E. coli (medio líquido):

LB (ml)	15	25	30	50	60	75	90	100	500
Triptona (g)	0,15	0,25	0,30	0,50	0,60	0,75	0,90	1,00	5,00
Extracto de levadura (g)	0,08	0,13	0,15	0,25	0,30	0,38	0,45	0,50	2,50
NaCl (g)	0,08	0,13	0,15	0,25	0,30	0,38	0,45	0,50	2,50

Llevar a volumen con H₂O_d, ajustar el pH a 7 y autoclavar.

>> Soluciones para los medios de cultivo:

Buffer fosfato		
Volumen (ml)	100	150
KH ₂ PO ₄ (g)	10,83	16
K ₂ HPO ₄ (g)	3,56	5,2
H ₂ O (ml)	100	150

Ajustar el pH a 6 con KOH concentrado y autoclavar.

Sulfato de Magnesio 1M	
Volumen (ml)	10
MgSO ₄ (g)	1,2
H ₂ O (ml)	10

Autoclavar.

Cloruro de Calcio 1M	
Volumen (ml)	10
CaCl ₂ (g)	0,555
H ₂ O (ml)	10
A partir del dihidratado	
Volumen (ml)	10
CaCl ₂ ·2H ₂ O (ml)	1,4702
H ₂ O (ml)	10

Autoclavar.

Colesterol (5mg/ml)	
Volumen (ml)	10
Colesterol sigma (g)	0,05
EtOH 100 %	10

*esta solución no se autoclava

NaOH 1N	
Volumen (ml)	10
NaOH (g)	0,4
H ₂ O (ml)	10

*esta solución no se autoclava

>> Buffer M9:

Volumen (ml)	1000 (1X)	500 (1X)	250 (1X)	1000 (1,25X)
KH ₂ PO ₄ (g)	3	1,5	0,75	3,75
Na ₂ HPO ₄ (g)	6	3	1,5	7,5
NaCl (g)	5	2,5	1,25	6,25
H ₂ O	1000	500	250	1000
Después de autoclavar agregar				
MgSO ₄ 1M	1 ml	500 ul	250 ul	1,25

Partiendo de MgSO ₄ sólido	
KH ₂ PO ₄ (g)	3
Na ₂ HPO ₄ (g)	6
NaCl (g)	5
MgSO ₄ 1M (g)	0,12
H ₂ O _d	1000

Autoclavar.

>> Preparación de medio S

Medio S basal

- 5,9 gr de ClNa
- 50 ml de fosfato de potasio 1M, pH = 6,0
- 1 ml de colesterol (5mg/ml en EtOH)
- Llevar a 1l con agua destilada
- Autoclavar

Medio S completo

Por cada litro de medio S basal adicionar:

- 10 ml de citrato de potasio 1M pH = 6,0
- 10 ml de trace metals solutions
- 3 ml de CaCl₂ 1M
- 3 ml de MgSO₄ 1M

Cada una de estas soluciones se autoclavan por separado.

>> **Sincronización con cloro:**

Solución de NaOH/Cl₂

Volumen (ml)	10	15	20	30	40
Cloro 5% (ml)	3,8	5,7	7,6	11,4	15,2
NaOH 1N (ml)	5	7,5	10	15	20
H ₂ O (ml)	1,2	1,8	2,4	3,6	4,8

Volumen (ml)	10	15	20	30	40
Cloro 6% (ml)	3,16	4,74	6,33	9,50	12,6
NaOH 1N (ml)	5	7,5	10	15	20
H ₂ O (ml)	1,84	2,76	3,67	5,5	7,4

Protocolo de sincronización:

- Lavar las placas (con gusanos con muchos huevos en la panza) con M9 aspirando y botando con pipeta (P1000). El producto lavado se pone en falcon de 15 ml.
- Centrifugar para pelletear los gusanos (en centrífuga ROLCO: 20seg a velocidad media). Eliminar el sobrenadante.
- Agregar 5 ml de la solución de NaOH/Cl₂ y agitar suavemente con la mano por 4 minutos (exactos).
- Agregar 2 volúmenes de M9 estéril (hasta arriba del tubo) para diluir la solución de cloro/NaOH. Con este tratamiento se rompen los gusanos y se desprenden los huevos. Se eliminan bacterias.
- Centrifugar y eliminar el sobrenadante (en centrífuga ROLCO: 20seg a velocidad media).
- Realizar dos lavados con M9 estéril (hasta arriba del tubo). Centrifugar entre ambos lavados.

- Los huevos se resuspenden en buffer M9 (Volumen final 3,5ml + 35ul de ATB 100X) y se crecen en agitación (110rpm) ON. Bajo esas condiciones los huevos eclosionan a larva L1 y permanecen en ese estadio larval hasta que se les dé de comer.

Los huevos sincronizados también se pueden colocar en placas con o sin comida, dependiendo del experimento. Los huevos se ponen en placas sin comida para que eclosionen las L1 y no puedan seguir creciendo (quedan sincronizadas en éste estadio luego de un día). Al día siguiente las L1 se ponen en una placa con comida y quedan sincronizadas.

>> Congelado

Congelado de gusanos en freezing solution:

- Lavar con 1ml de Freezing solution cada placa de agar mediano con muchos L1.
- Alicuotar 500ul en cada criotubo. Congelar a -80°C en caja de tergopol.

Soluciones:

Freezing solution: 50% M9 + 50% Buffer B.

Buffer B	1000ml	50ml	30ml
NaCl (g)	5.7	0,285	0,171
KH₂PO₄ 1M pH = 6 (ml)	50	2.5	1.5
Glicerol(ml)	300	15	9
H₂O (ml)	644	32.2	19.32

Ajustar a pH = 6 y autoclavar. Luego de autoclavar agregar 0,3ml de MgSO₄ 1M (esteril).

Preparación de 5ml de MgSO₄ 1M:

1mol MgSO₄ 120,37gr

1M = 120,37gr/1000ml*5ml = **0,6 gr/5ml**

Preparación de KH₂PO₄:

1M 136,1gr/l = 6,8gr/50ml = 0,34gr/2,5ml

Descongelado: Sacar de -80°C las muestras y dejar en la mesada hasta que los bordes se derritan.

Tirar todo el contenido del tubo en una placa con agar y E. Coli.

Congelado de gusanos en Soft agar:

- Derretir el Soft agar en baño a 50°C o microondas.

- Usar una placa grande (10cm) o 2-3 placas medianas con gusanos en estadio L1.
- Lavar con 0,6ml de S Buffer las placas. Pasar a un tubo estéril y mantener 15 minutos en hielo.
- Agregar igual volumen de agar y mezclar bien.
- Alicuotar 1ml a un criotubo y congelar a -80°C en caja de tergopol.

Soluciones:

S buffer: K_2HPO_4 0,05M 129ml

KH_2PO_4 0,05M 871ml

NaCl 5,85gr

pH = 6, autoclavar.

Soft agar: NaCl 0,58gr

KH_2PO_4 0,68gr

K_2HPO_4 0,87gr

Glycerol 30ml

Agar 0,4gr

H_2O 100ml

pH = 6, autoclavar.

Descongelado:

- Sacar el vial de -80°C y colocarlos en una caja con hielo (trabajar con rapidez para evitar que se descongele).
- Flamear una espátula. Remover 0,25ml del vial.
- Congelar el resto del vial nuevamente a -80°C .
- Pasar los gusanos de la espátula a una placa con agar y *E. coli*.

Congelado de bacterias:

- A 500ul de cultivo LB con las bacterias agregar 88ul de glicerol 100% estéril.
- Congelar a -80°C .

Descongelado: Sacar de -80°C los tubos. Dejar descongelar e inocular con ésta suspensión.

>> Comida para gusanos:

OP50 muertas: esto sirve para extracción de RNA, proteínas y experimentos de estrés.

- Preparar 3 erlenmeyer con 500ml de medio LB c/u.
- Sembrar cada erlenmeyer con 200ul de bacteria (OP50).
- Crecer ON a 37°C y 200 rpm.
- Centrifugar en falcon de 50ml durante 10 minutos a 5000 rpm.
- Descartar el sobrenadante (guardar algunos falcon con pellet sin tratamiento con N2 líquido).
- Matar el resto de las bacterias con N2 líquido.
- Pasar los falcon por H2O a 50°C (de la canilla).
- Agregar el doble de volumen de M9.
- Vortexear.
- Tomar una alícuota, hacer una dilución 1/250 o 1/500 de la misma y medir DO600.
- Almacenar a -20°C.

Usar para cultivo: máx. DO600 = 1,0 final (15 gusanos/20ul).

Comida para gusanos (placas grandes):

- Preparar 1 erlenmeyer con 500ml de medio LB.
- Sembrar 200ul de bacteria (OP50).
- Crecer ON a 37°C y 200 rpm.
- A cada placa grande se agrega 200ul del cultivo ON.
- Rastrillar.
- Dejar secar las placas.
- Almacenar a 4°C.

Comida para gusanos (placas chicas):

- Preparar 1 erlenmeyer con 500ml de medio LB.
- Sembrar 200ul de bacteria (OP50).
- Crecer ON a 37°C y 200 rpm.
- A cada placa chica agregar 5 gotas del cultivo ON distribuidas por la placa.
- Dejar secar las placas.
- Almacenar a 4°C.

>> Microscopía:

Fijación de gusanos GFP (metanol/acetona):

- Tomar muestras de gusanos (20ul del erlenmeyer) en eppendorf de 1,5ml.

- Remover el exceso de líquido por centrifugación (1 min. en centrífuga de células, 1500 rpm aproximadamente).
- Congelar rápidamente poniendo el eppendorf en isopropanol a -80°C mantenido en recipiente con hielo y sal (*cracking* por frío para permeabilizar la cutícula y que puedan fijarse mejor).
- Agregar 100ul de metanol -20°C.
- Incubar por 5 min. en agitación.
- Centrifugar. Remover el metanol.
- Agregar 10ul de acetona -20°C.
- Incubar 5 min. en agitación.
- Centrifugar. Remover la acetona.
- Rehidratar los gusanos en etanol 95% por 2 min.
- Remover el alcohol por centrifugación.
- Rehidratar los gusanos en etanol 75% por 2 min.
- Remover el alcohol por centrifugación.
- Rehidratar los gusanos en etanol 50% por 2 min.
- Remover el alcohol por centrifugación.
- Rehidratar los gusanos en etanol 30% por 2 min.
- Remover el alcohol.
- Montarlos.

Montaje:

Medio especial: Microscopía confocal

- 5ul DAKO + 1,5ul de gusanos.

Económico: Dura 3 días

- 4ul glicerol 40% + 1,5ul de gusanos.

Poner cubre y sellar con esmalte de uñas.

Tiempo previsto 23 minutos.

Fijación de gusanos inmuno fluorescentes (paraformaldehído):

Solución stock de fijación:

- 20% paraformaldehído: 250mg.
- Formaldehído en 1,125ml de NaOH 5mM.

Incubar 30 min. aproximadamente a 65°C para disolver (preparar solución fresca antes de usar).

Protocolo:

- Lavar las cepas de *C. elegans* en M9, PBS o H₂O en tubos de 15ml varias veces.
Durante los lavados preparar solución de fijación.
- Agregar aproximadamente 1ml de solución de fijación (4% paraformaldehído) a los gusanos en tubos de 15ml o eppendorf.
- Incubar 24hs a 4°C.

Protocolo modificado para estudios circadianos (mucho background):

- Tomar 20ul de gusanos en estadio L1 de erlenmeyer sincronizados por 4 días (más de 50 gusanos). Usar eppendorf de 1,5ml. Centrifugar y quitar buffers.
- Agregar 100ul de paraformaldehído 20%. Incubar 15min. a 4°C.
- Diluir con 400ul de PBS pH 7,4. Incubar ON a 4°C.
- Centrifugar 15". Remover el buffer y lavar en 1ml de PBS pH = 7,4.
- Centrifugar 15". Remover el buffer. Tomar 1,5ul de gusanos y montar en medio DAKO.

Anestesia (para mirar in vivo en microscopía):

- Azida 10% solución stock.
- Dilución: se agrega 3,5ul de azida stock en 700ul de H₂O.

Se utilizarán 3,5ul de esta solución para 20ul de gusanos en M9.

>> Cuenta de gusanos para experimentos:

Máximos volúmenes:

- 35ml en erlenmeyers de 250ml.
- 7ml en erlenmeyers de 50ml.

Por sincronización de placas grandes (100mm) de TJ1060 se obtienen 22.000 gusanos aproximadamente. Se crecen a 18°C. Para el experimento se lleva a 25,3°C.

Experimento de alimentación:

- Se usan cultivos de 6gusanos/20ul. Se toman muestras de 50ul por punto.
- Muestras por duplicado.

- Se usan alicuotas de 20 gusanos/20ul
- Se parte de *E. coli* con Abs (600) = 1,0 (dil = 1/50).

Experimento de extracción de RNA:

- ### Extracción de proteína:

- ### >> Cuantificación de Proteínas – Bradford:

- Preparar el reactivo diluyendo una parte del concentrado en 4 partes de agua desionizada. Se conserva a temperatura ambiente hasta 2 semanas.
- Preparar diluciones de la proteína estándar (BSA), la cual es representativa de la solución proteica a testear. El rango lineal de éste método es 0,05mg/ml a 0,5mg/ml aproximadamente.
- Pipetear 10ul de cada solución estándar o la muestra en cada well de una placa de 96 well. Realizar duplicados para cada muestra.
- Agregar 200ul del reactivo diluido a cada well. Mezclar bien la muestra con el reactivo utilizando la micro pipeta. Cambiar el tip para agregar el reactivo y mezclar en cada well.
- Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos por lo menos, hasta no más de una hora.
- Medir absorbancia a 595nm en un lector de micro placas.

[illegible]

BSA [ug/ul]	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5
--------------------	-----	------	-----	------	-----	------	-----	------	-----

Diluir las muestras 1/10.

Western blot

- 1- Realizar un gel de poliacrilamida (el porcentaje del gel depende de la proteína a separar).
- 2- Incubar el gel con el buffer de transferencia, 15 minutos a temperatura ambiente en agitación.
- 3- Transferencia del gel a la membrana: transferir 30 minutos a 10 volts.
- 4- Teñir la membrana con rojo Ponceau: 10 minutos en agitación.
- 5- Lavar la membrana con agua destilada: a través de la coloración con rojo ponceau visualizamos las bandas en la membrana. Escanear. Marcar las bandas del marcador de masa. Si se van a usar anticuerpos secundarios diferentes en este paso se debe cortar la membrana.
- 6- Bloquear la membrana con leche descremada en polvo, 1h a temperatura ambiente. Se usan aproximadamente 30ml de leche 10%P/V por membrana. Para diluir la leche en polvo se usa buffer TTBS.
- 7- Realizar 3 lavados de 10min cada uno con TTBS, en agitación y a temperatura ambiente.
- 8- Incubar la membrana con el anticuerpo primario. La membrana entera lleva 3ml de anticuerpo. Este paso hay que ponerlo a punto: 1) incubar durante 1h a temperatura ambiente y en agitación o 2) incubar ON en la cámara fría en agitación. Para melanopsina usar una dil 1/1000 del anticuerpo. Para la dilución usar buffer TTBS.
- 9- Realizar 3 lavados de 10min cada uno con TTBS, en agitación y a temperatura ambiente.
- 10- Incubar la membrana con el anticuerpo secundario, 2hs a temperatura ambiente y en agitación. Preparar una dil 1/5000 en TTBS.
- 11- Realizar 3 lavados de 10min cada uno con TTBS, en agitación y a temperatura ambiente.
- 12- Revelar:

Solución 1:

-100ul luminol (2,5mM)

- 44ul de p-coumaric acid (400uM)
- 1ml de tris-HCl 1M pH=8,5 (100mM)
- H₂O a 10ml

Alicuotar en fracciones de 1ml.

Solución 2: para preparar 1ml (se prepara en el momento)

- 0,61ul de H₂O₂ (5,4mM)
- 100ul de tris-HCl 1M pH=8,5 (100mM)
- 900ul de H₂O

Mezclar 1ml de la solución 1 con 1ml de la solución 2 (en el cuarto oscuro). Agregar la mezcla de a 500ul sobre la membrana. Dejar actuar 5min. Colocar la membrana en el cassette de revelado y encima colocar la placa de revelado cortada previamente (el tiempo de exposición se puede variar: 1, 2 o 3min, para melanopsina). Colocar la placa en la solución de revelado y luego en la solución de fijación. Finalmente colocar las placas reveladas en agua de la canilla.

Stripping

- 1- Incubar la membrana con el buffer de stripping (agregarle β -mercaptoetanol: por cada 100ml de buffer agregar 700ul de β -mercaptoetanol), 30minutos a 50°C en agitación.
- 2- Teñir la membrana con rojo Ponceau: 10 minutos en agitación.
- 3- Lavar la membrana con agua destilada.
- 4- Bloquear la membrana con leche descremada en polvo, 1h a temperatura ambiente. Se usan aproximadamente 30ml de leche 10%P/V por membrana. Para diluir la leche en polvo se usa buffer TTBS.
- 5- Realizar 3 lavados de 10min cada uno con TTBS, en agitación y a temperatura ambiente.
- 6- Incubar la membrana con el anticuerpo secundario, 2hs a temperatura ambiente y en agitación. Preparar una dil 1/5000 en TTBS.
- 7- Realizar 3 lavados de 10min cada uno con TTBS, en agitación y a temperatura ambiente.
- 8- Revelar.

>> Protocolo de síntesis 1er cadena cDNA:

Experimentos de ritmos TJ1060:

Toma de Muestras:

A tener en cuenta:

2000gusan = 16ug de RNA total (9ng/worm aprox)

Rotular eppendorf a usar de 2ml con marca con espátula caliente (el fibron se borra)

PROTOCOLO:

- Tomar 2ml gusanos [1 a 1.25gus/ul] y pasar a eppendorf de 2ml.
- Pelletear a 1600rpm 1.5minutos centrifuga eppendorf.
- Descartar sobrenadante con pipeta P1000.

3x lavados:

- Agregar 2ml de M9esteril, resuspender con el dedo.
 - Pelletear a 1600rpm 1.5minutos centrifuga eppendorf.
 - Descartar sobrenadante con pipeta P1000.
- Agregar 200ul trizol.
- Vortex 1' al máximo.
- Congelar sumergiendo eppendorf en falcon de 50ml con Alcohol isopropilico que se encuentre a -80~C

Al tomar la siguiente muestra sacar el anterior del alcohol isopropilico y meter en bolsa sellada a -80~C. Máximo de eppendorfs que entran por falcon de 50ml con isopropanol = 2

Una vez tomadas TODAS las muestras: Extracción de RNA:

DIA 1

MATERIAL NECESARIO:

- Pote de helado de ¼ con 2 cucharadas de Nitrógeno liquido, tapado.
- Jeringas de tuberculina: 1 por muestra.
- Rotulador y papel para secar el isopropilico antes de rotular.
- Vortex
- Centrifuga de eppendorf a 4~C (meter destapada en heladera 30min antes)
- Trizol: 100ul adicionales por muestra
- CLOROFORMO:ISOAMILICO 49:1 cant 60ul por muestra.
- Isopropanol para uso molecular a -20~C: 150ul aprox por muestra
- EtOH 75% para uso molecular preenfriado a -20~C.
- dH2O-DEPC cant. 12ul por muestra
- Eppendorf de 500ul estériles rotulados igual que muestras (por duplicado)

- Rack (tipo tapa de tacho de helado de telgopor agujereada) para meter los eppendorf en el Nitrogeno (tiene que entrar en el recipiente)
- Adaptadores para centrifugar los eppendorf de 500ul en la centrifuga.
- Tips varios estériles.
- Guantes y antiparras
- mechero

A tener en cuenta: posicionar siempre los eppendorf en la centrifuga todos de la misma forma a fin de saber de que lado queda el pellet por mas que este no se vea.

TIEMPO ESTIMADO: 3horas

PROTOCOLO: Todo cerca de mechero (ojo q los solventes son inflamables)

- Sacar la bolsa con las muestras y rotularlas (en hielo). Lo mas rápido posible.
- Agregar 100ul más de Trizol a cada muestra. ($V_f=300\text{ul}$).vortexear.
- Pasar a eppendorf de 500ul.
- Poner los eppendorf en rack de telgopor
- Congelar en Nitrogeno líquido y descongelar a 37°C (en ciclador) x 3veces (agitando en vortex a cada rato que va descongelando)
- Homogeneizar con jeringa de tuberculina 10 veces (o sea 10 pasadas). (cambiar la jeringa en cada muestra). OJO: USAR GUANTES, ANTIPARRAS Y MANGA LARGA. EL TRIZOL QUEMA.
- Dejar a T° ambiente 7,5 minutos.
- Agregar 54 ul de solucion cloroformo:isamilico 49:1.
- Vortexear
- Incubar 2min a T° ambiente.
- Centrifugar 15' a 14000rpm 4°C .
- Mantener tubos en hielo para que las fases no se junten.
- Transferir fase acuosa (la de arriba, Vol maximo 350ul) a otro tubo(eppendorf de 500ul). Usar P200.
- Agregar 150ul isopropanol a la fase acuosa y agitar c/vortex.
- Dejar a -20°C al menos 1hora (ON a -80°C funciona bien).
- Centrifugar 10' a 14000rpm 4°C .
- Remover sobrenadante con pipeta.
- Agregar 300ul de EtOH 75% despegar el pellet sin resuspender.
- Centrifugar 5' a 14000rpm x 4°C .

- Remover EtOH con pipeta P200 del otro lado del pellet.
- Secar dado vuelta en papel. air dry 5 a 10min.
- Resuspender en H₂O-DEPC. 12ul con pipeta P10.

DIA2

CUANTIFICACION Y CALIDAD DEL RNA:

CUANTIFICACION:

- Determinar la concentración de RNA x espectrofotometría tomando 1ul de RNA y llevándolo a 200ul con dH₂O estéril (dilución 1:200). Medir la absorbancia a 260 y 280 (cubetas para RNA de poco volumen); calcular la razón A₂₆₀/A₂₈₀ (ideal >1.6 si es menor hay contaminación con proteínas).
- Calcular [] como:

$$(A_{260} * 40\mu\text{g/ml} * 200(\text{fact dilución})) * 1\text{ml}/1000\mu\text{l} = X\mu\text{g RNA}/\mu\text{l}$$
- guardar el RNA con todos los datos a -80°C.
- Anotar todos los datos super bien.

CALIDAD: GEL p/RNA

Calculo para cuba grande 100ml(en caso de usar cuba chica calcular volumen=40ml)

- 1g de Agarosa en 82ml de Buffer 1xMOPS. Calentar microondas.

-esperar que se enfrie un poco y agregar 18ml de Formaldehído.

* Usar buffer 1x MOPS en cuba.

* Sembrar 1.5ug de RNA por calle (agregar loading buffer 3x para RNA)

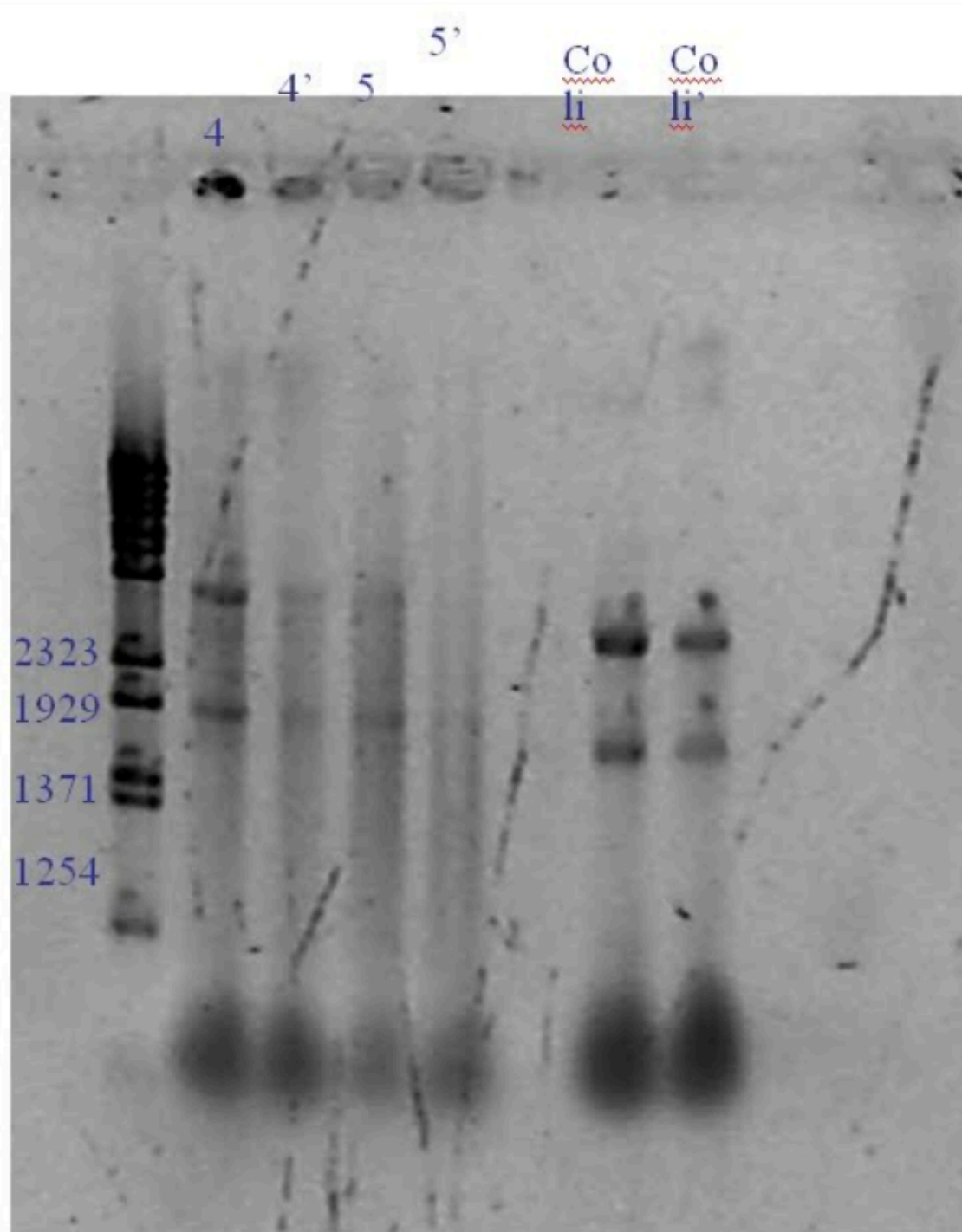
* Poner PM DNA BstEII 7ul

Correr gel hasta abajo en cuba chica.

Luego de correr el gel teñir con 50mlTBE+5ml SYB (Sybergreen tipo II) incubando por 1 hora con agitación en tachito de jabonera (tapado de la luz).

Mirar en transiluminador y sacar foto. Deben verse las bandas ribosomales de C. elegans (2,8Kpb y 1,8kpb), posible contaminación con Coli (2,3kpb y 1,6kpb) y poco chorreado (puede que se vea mancha debajo de todo correspondiente a tRNA).

Ejemplo:



En cuba chica. Peine de 13 calles.

Muestras 4 y 5 extracción RNA gusanos.

Muestras Coli ejemplo de Ribosomal bacteriano.

DIA 3

Síntesis de 1er cadena cDNA:

Se parte de 5ug de RNA (en dH2O-DEPC). (en caso extremo, minimo = 2,5ug)

1) Tratamiento con DNAsa

La DNAsa debe ser inactivable por calor. Este paso puede obviarse si los primers están diseñados para levantar el cDNA y no DNA genómico.

Xul dH2O

Xul RNA (5ug)

1ul DNAsa Buffer 10x

1ul DNAsaI

10ul final

- incubar 15' a 25°C
- Inactivar 10' a 65°C.
- Spin down (para bajar la condensación de las paredes)
- Pasar a hielo.

2) Hibridación de oligo-dT

- a los 10ul de la reacción anterior se agrega:

1ul oligo-dT (500ug/ml), incubación 5'a 65°C (ciclador)

preparar la MIX de RT mientras se espera la incubación.

- pasar a hielo
- esperar al menos 1' antes de poner la mix de RT (si es mas, mejor)

3)Mix de RT:

	Para 1x			
5x reaction Buffer	2ul			
dNTPs 10mM	1ul			
dH2O-DEPC	3ul			
DTT 0.1M	2ul			

8ul MIX

Agregar a los 11ul de la reacción anterior (oligodt cDNA)

- poner en ciclador 5' a 37°C
- Añadir 1ul de MMLV-RT (Transc. Reversa) = 20ul final de reacción
- 37°C 1hora β OJO!!!! Depende de la enzima. Algunas son a 42°C!!!
- inactivar 70°C 15'
- tratamiento con RNAsaH: 10' a 37°C (si no se trata anda igual para amplificar hasta 1k)

- spin down

*** Luego de cada mezcla dar vortex y spin corto en centrifuga de células.**

- Guardar a -20°C