



Reconstitución de Oligonucleótidos

Created: Feb 18, 2008; Last modified: May 19, 2009, Version: 3.0

Este protocolo describe el procedimiento empleado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la UASLP para reconstituir los oligonucleótidos cebadores liofilizados para generar soluciones stocks (50 μM) y diluciones de trabajo (10 μM). Para esto se deberá contar con la hoja de datos de síntesis de los oligos brindada por el fabricante mostrada abajo (en este caso los oligos fueron sintetizados por Invitrogen®).

| Invitrogen Custom Primers | | | |
|---|---|-----------------------------------|------------------|
| <i>Certificate of Analysis</i> | | | |
| | | | ACCESOLAB |
| Order Number: | | | 47367844 |
| Order Date: | | | 28-Jan-2008 |
| Primer: 11 (Order Line No.: 115) | | | |
| Primer Name: | HBV-Fwd | Primer Number: | 122928D06 |
| Researcher: | Dr. Christian Garcia Sep?lveda | Primer Length: | 25 |
| Sequence (5' to 3'): | (DNA) - CAC CAT GCA ACT TTT TCA CCT CTG C | Scale of Synthesis: | 50 N |
| Molecular Weight ($\mu\text{g}/\mu\text{mole}$): | 7,489.0 | μg per OD: | 30.14 |
| Millimolar Extinction Coeff.: (OD/ μmol): | 248.5 | nmoles per OD: | 4.02 |
| Purity | Desalt | OD's | 10.87 |
| T_m (1M Na⁺) | 90.00 | μg's | 327.49 |
| T_m (50 mM Na⁺) | 68.00 | nmoles | 43.7 |
| % GC Content: | 48.00 | | |
| Notes: | | | |

Procedimiento:

1. Introduzca los crioviales que contienen el oligonucleótido liofilizado, el frasco con Buffer TE 10:1 (refiérase al protocolo "**Buffer TE**" para su preparación) y una alícuota de dH_2O grado III al Cuarto de RNA.
2. Encienda el Gabinete de Flujo Laminar, descontamine la superficie de trabajo con etanol al 70% y encienda la lámpara ultravioleta durante 5 minutos. Desocupe el cuarto de RNA durante este tiempo y manténgalo cerrado bajo llave.
3. Identifique en la hoja de datos del fabricante la cantidad (expresada en moles) de oligonucleótido que fue sintetizada.
4. Calcule el volumen de buffer TE 10:1 que será necesario emplear para preparar una solución stock 50 μM empleando la fórmula: $v = n/M$ en donde v corresponde al volumen de TE 10:1 por agregar, n corresponde a la cantidad de moles que fueron sintetizados y M corresponde a la molaridad de la solución deseada (en el caso de la solución stock esta cifra es de 50 μM).





Ejemplo: Para el caso citado $v = 43.7 \times 10^{-9}$ moles/ 50×10^{-6} Molar; $v = 8.74 \times 10^{-4}$ Litros lo que equivale a 874 μ L.

- Ingrese nuevamente al Cuarto de RNA, apague la lámpara ultravioleta y encienda la luz fluorescente. Limpie el exterior tanto de los crioviales con oligonucleótidos liofilizados como del frasco con TE 10:1 con etanol al 70%.
- Agregue el volumen de TE 10:1 a cada criovial con oligonucleótido liofilizado de acuerdo a los cálculos programados y teniendo cuidado de solamente abrir un criovial de oligonucleótido a la vez. Mezcle en vortex durante 10 segundos.
- Para preparar soluciones de trabajo de los oligonucleótidos calcúlese primero la cantidad de solución stock que deberá agregar de cada oligonucleótido empleando la siguiente fórmula : $V_i = (C_f V_f) / C_i$ en donde V_i corresponde al volumen de la solución stock que deberá dispensarse, C_f corresponde a la concentración final deseada, V_f corresponde al volumen final deseado (considere el volumen aportado por otros oligos en caso de que se mezclen dos o más oligonucleótidos) y C_i corresponde a la concentración inicial de la solución stock (50 μ M).

Ejemplo: Para preparar un mililitro de una mezcla de trabajo 10 micromolar del oligonucleótido citado y su oligonucleótido reversa $V_i = [(10 \times 10^{-6} \text{ Molar})(1 \times 10^{-3} \text{ Litros})] / 50 \times 10^{-6} \text{ Molar}$, $V_i = 2 \times 10^{-4}$ Litros lo que equivale a 200 μ L de cada oligonucleótido. Este volumen deberá entonces aforarse a V_f con dH_2O grado III.

- Etiquete el número apropiado de microtubos de 1.5 o 0.6 mL con el nombre del oligonucleótido (o el nombre de la mezcla de oligonucleótidos) por preparar e indique la molaridad de la solución de trabajo (ya que diferentes protocolos de PCR requieren de diferentes concentraciones de trabajo).
- Dispense la cantidad calculada de solución stock de cada oligonucleótido al microtubo y afore el volumen al V_f deseado.
- Homogeneice la solución de trabajo en vortex durante 10 segundos.
- Mantenga los microtubos con soluciones de trabajo refrigerados hasta su uso (entre 2-8°C).
- Mantenga los crioviales con soluciones stock congelados a -20°C.

Notas:

- De manera alternativa los oligonucleótidos pueden ser reconstituidos con dH_2O grado III o con Tris 10 mM pH 8.0.





Referencias:

1. Comunicación personal Dr. Alejandro de las Peñas y Dra. Irene Elizabeth Castaño, División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), San Luis Potosí. México, 2007.
2. Comunicación personal Alisdair Mcwhinnie, HLA Informatics Group and Histocompatibility Typing Laboratory, Anthony Nolan Research Institute, Royal Free Hospital and University College School of Medicine, Londres, Reino Unido, 2007.

Revision history

- 1.0 Original document.
- 2.0 Optimized protocol.
- 3.0 Changes to document format only.

