Cuantificación del genoma viral mediante qPCR con estándar externo

Para determinar el número de partículas virales mediante qPCR se realizará una curva de calibración con un plásmido recombinante conteniendo el gen egt de AgMNPV (pZERO (AGN) Not1), el cual se encuentra cuantificado. Mediante la técnica de qPCR basada en SyBR Green se determinaran los valores de C_T de las distintas diluciones del plásmido y de las muestras de gDNA viral purificado por cada grupo. Una vez obtenidos estos valores, y utilizando un software adecuado, se construirá una curva estándar a partir de la cual se podrá establecer el número de moléculas de gDNA viral presente en cada una de las muestras.

- *Primers*

Primer	Secuencia	Longitud	%GC	Tm	Amplicón (pb)	%GC producto
EGTa-14577	TAATCGGCAAACGCCTCTAC	20	50	62	261	50
EGTb-14837c	CGATGCGGCAAACAAACAAC	20	50	63		

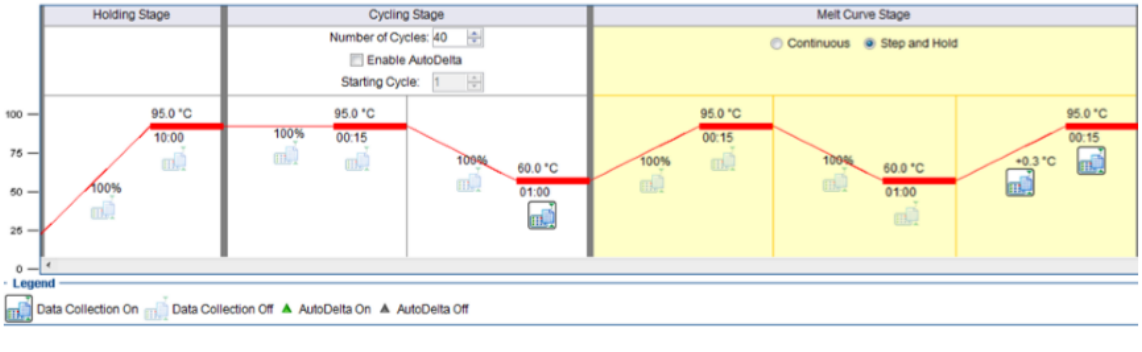
- Preparación de la Mezcla de Reacción

	x1 (µl)	X40 (µl)
EGT (a)	0,5	20
EGT (b)	0,5	20
Power SYBR® Master Mix (2X)	5	200
H_2O_{dd}	3	120
Muestra	1	-
Volumen Final	10	-

- Esquema de Siembra

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	pZERO/EGT 10^7	pZERO/EGT 10^6	pZERO/EGT 10^5	pZERO/EGT 10^4	pZERO/EGT 10^3	pZERO/EGT 10^2		
B	pZERO/EGT 10^7	pZERO/EGT 10^6	pZERO/EGT 10^5	pZERO/EGT 10^4	pZERO/EGT 10^3	pZERO/EGT 10^2		
C	pZERO/EGT 10^7	pZERO/EGT 10^6	pZERO/EGT 10^5	pZERO/EGT 10^4	pZERO/EGT 10^3	pZERO/EGT 10^2		
D	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	C (-)		
E	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	C (-)		
F	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	C (-)		

- Perfil de Ciclado



- Termociclador: StepOne™ Real-Time PCR Systems - Applied Biosystems

- Software para el Análisis: StepOne™ Software v2.3- Applied Biosystems

- Para tener en cuenta:

  - ✓ Trabajar con guantes sin talco (Si no hay, lavarse las manos con guantes con agua y jabón previo al experimento).
  - ✓ Utilizar *tips* con filtro y micropipetas calibradas (en lo posible, que sean exclusivas para qPCR).
  - ✓ Evitar que se formen burbujas en los *wells* de la placa al sembrar tanto la *mix* como el molde. En caso que se formen, empujar las burbujas hacia la superficie con un *tip* limpio