

PCR SIMULADA

Ref.PCR Simulada (4 prácticas)

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es introducir a los estudiantes en los principios y práctica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Los estudiantes aprenderán la relación entre el número de ciclos de PCR y la cantidad de ADN amplificado.

2. INTRODUCCION

La PCR ha tenido un extraordinario impacto en varios aspectos de la Biotecnología.

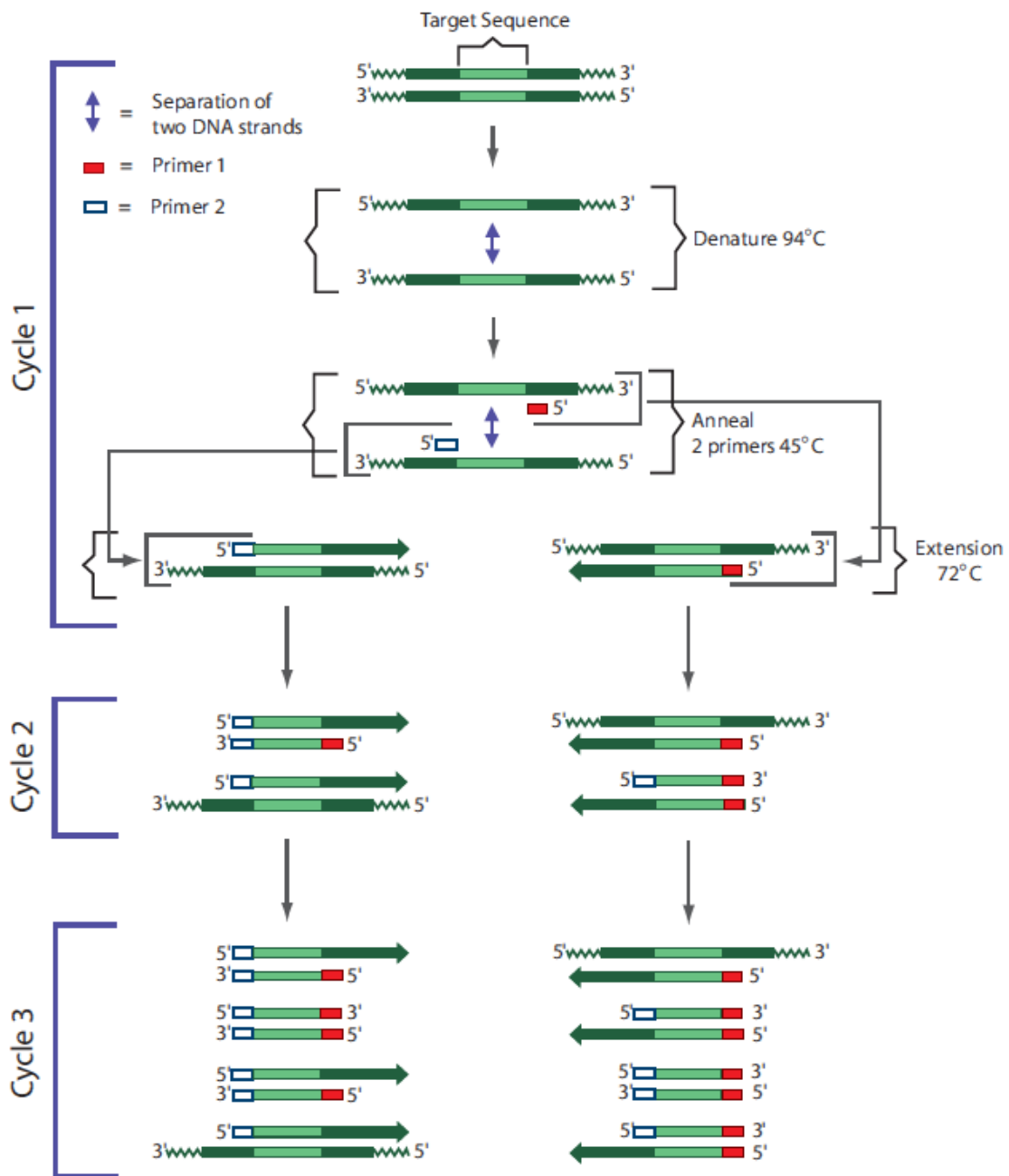
La PCR ha revolucionado la investigación y diagnóstico basado en la Biología Molecular. La PCR es un proceso simple, exacto y altamente reproducible que proporciona la ventaja de empezar con una pequeña cantidad de ADN y ser capaz de amplificarlo de forma que se tenga suficiente para realizar experimentos.

Se han desarrollado gran cantidad de test diagnósticos, también se ha utilizado en mapaje y secuenciación de ADN en proyectos de genoma y está siendo utilizado en determinaciones forenses, paternidades, etc.

En todos los casos se amplifican segmentos de ADN que posteriormente son sometidos a análisis y estudios varios.

En una reacción de PCR, el primer paso es la preparación de la muestra de ADN que es extraída de varias fuentes biológicas o tejidos. En la PCR, el ADN o gen a amplificar se define como “target” (diana) y los oligonucleótidos sintéticos utilizados se definen como “primers” (cebadores). Un set consta de 2 cebadores de entre 20-45 nucleótidos que son sintetizados químicamente para que se correspondan con los extremos del gen a amplificar. Cada cebador se une a uno de los extremos de cada cadena de ADN y es el punto de inicio de la amplificación.

Una reacción típica de PCR contiene ADN molde, Taq polimerasa y los 4 dNTPS en un tampón de reacción apropiado. El volumen total de reacción es de 25-50 μ l. En el primer paso de la reacción de PCR, las cadenas complementarias de ADN se separan (desnaturalizadas) la una de la otra a 94°C, mientras que la Taq polimerasa permanece estable. En el segundo paso, conocido como emparejamiento, la muestra es enfriada a una temperatura entre 40-65°C que permita la hibridación de los 2 cebadores, cada uno a una hebra del ADN molde. En el tercer paso, conocido como extensión, la temperatura es elevada a 72°C y la Taq polimerasa añade nucleótidos a los cebadores para completar la síntesis de una nueva cadena complementaria.



Estos tres pasos, desnaturalización-emparejamiento-extensión, constituye un ciclo de PCR. Este proceso se repite durante 20-40 ciclos amplificando la secuencia objeto exponencialmente. La PCR se lleva a cabo en un termociclador, un instrumento que es programado para un rápido calentamiento, enfriamiento y mantenimiento de las muestras durante varias veces. El producto amplificado es luego detectado por separación de la mezcla de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa.

En esta práctica se realizará una PCR simulada ya que el instrumento para llevar a cabo la PCR tiene un coste muy elevado, para ello se utilizarán colorantes NO TOXICOS que migrarán en el gel de agarosa como si se tratasen de los fragmentos de ADN amplificados, además se podrá observar la relación que existe entre el número de ciclos y la cantidad de ADN amplificada.

3. COMPONENTES

Tampón de electroforesis concentrado 10 X (2 envases 500ml)	2 x 50 ml
Agarosa	1.75 gr
Micropipeta 20 microlitros	1
Rack de puntas	1
Microtubos de muestras	5

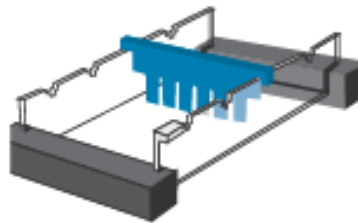
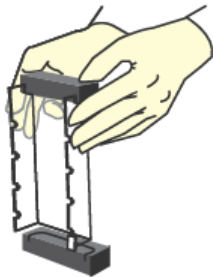
Añadir 450 ml de agua destilada a cada envase de Tampón de electroforesis 10 X para elaborar 2 x 500 ml de Tampón de electroforesis 1 X que es el Tampón de trabajo.

4. PRACTICA

4.1 PREPARACION GEL DE AGAROSA

A) Preparación del molde

Coger el molde para hacer los geles y cerrar los extremos con los topes para que no se salga la agarosa. Después colocar el peine para formar los pocillos



B) Preparación del gel de agarosa

1.b) Utilizar un vaso o erlenmeyer de 100 ml para preparar la solución del gel:

2.b) **Para geles de 7 x 7 cm:** Añadir **32 ml de Tampón de electroforesis 1 X** más **0.30 gr de agarosa**, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa.

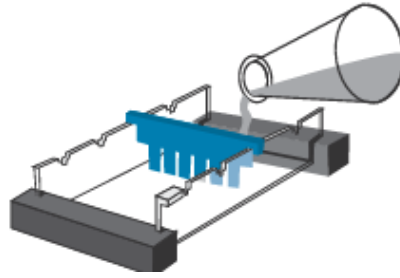
Para geles de 7 x 10 cm: Añadir **42 ml de Tampón de electroforesis 1 X** más **0.40 gr de agarosa**, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa

Asegurarse que se ha añadido los 450 ml de agua destilada al Tampón de electroforesis 10 X

3.b) Calentar la mezcla para disolver la agarosa, el método más rápido es la utilización de un microondas, también puede utilizarse una placa calefactora, en ambos casos, para que la agarosa se disuelva se ha de llevar **la solución a punto de ebullición**. La solución final debe aparecer clara sin partículas aparentes.

4.b) **Enfriar** la solución de agarosa más o menos a 55°C (para acelerar el proceso se puede enfriar colocando el envase debajo de un grifo de agua y agitar). Si se produce mucha evaporación del líquido, añadir tampón de electroforesis.

5.b) Añadir la solución de agarosa al molde.

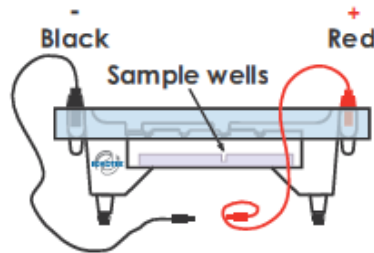


6.b) Permitir que el gel solidifique. Para acelerar el proceso se puede sembrar el gel en una nevera (si la electroforesis se realizará al día siguiente, conservar el gel a 4°C).

C) Preparación del gel para la electroforesis

1.c) Después que el gel se ha solidificado con mucho cuidado sacar los toques.

2.c) Colocar el gel en la cámara de electroforesis correctamente orientada con los pocillos más cerca del polo negativo (color negro).



3.c) Llenar la cámara de electroforesis con **300 ml de Tampón de electroforesis**. *El tampón de electroforesis se puede utilizar para 2 experimentos de electroforesis, una vez terminada la electroforesis guardar este tampón utilizado en un envase diferente al suministrado para utilizarlo en una nueva electroforesis.*

4.c) Asegurarse que el gel está completamente cubierto de tampón.

5.c) Sacar el peine que ha formado los pocillos con mucho cuidado de no romper ningún pocillo.

6.c) Proceder a la siembra del gel y llevar a cabo la electroforesis.

4.2 SIEMBRA DEL GEL Y ELECTROFORESIS

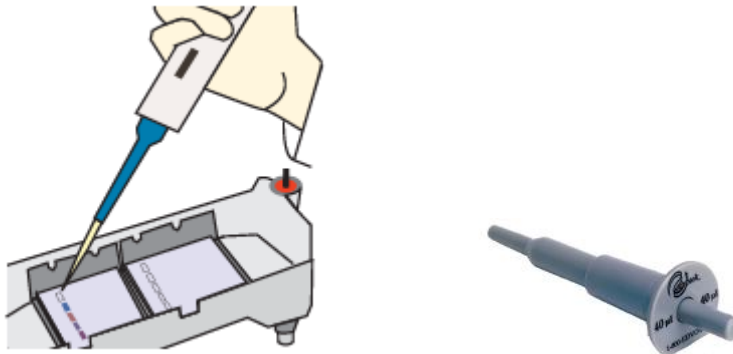
Nota: Si usted no está familiarizado con la siembra de geles de agarosa, es recomendable que practique la siembra antes de llevar a cabo el experimento, o llevar a cabo el experimento completo antes de realizarlo con los alumnos.

A) Muestras de electroforesis: *Chequear el volumen de las muestras. Algunas veces pequeñas gotas de la muestra puede estar en las paredes de los microtubos. Asegurarse de que toda la cantidad de muestra se encuentra uniforme antes de sembrar el gel. Centrifugar brevemente los microtubos de muestra, o golpear los microtubos contra una mesa para obtener toda la muestra en la parte inferior del microtubo.*

1.a) Se suministran 5 muestras diferentes presentadas en 5 tubitos cada uno de un color, sembrar o cargar las muestras en el siguiente orden:

Pocillo	Muestra	Descripción
1	Verde	Marcador de peso molecular
2	Negro	Muestra después de 10 ciclos
3	Lila	Muestra después de 20 ciclos
4	Blanco	Muestra después de 30 ciclos
5	Amarillo	Muestra después de 40 ciclos

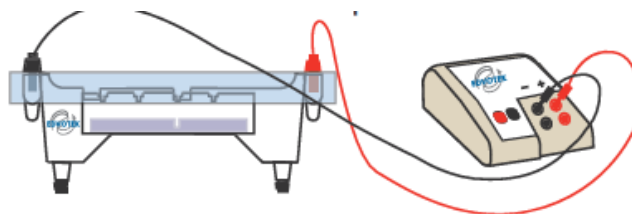
2.b) Sembrar 20 microlitros de cada muestra, utilizar para ello la micropipeta de volumen fijo que se suministra con una punta de pipeta.



B) Llevar a cabo la electroforesis

1.b) Después que se han sembrado las muestras, cuidadosamente colocar la cubierta del aparato de electroforesis en los terminales de los electrodos.

2.b) Insertar la clavija del cable negro en la entrada de color negro de la fuente de corriente (entrada negativa). Insertar la clavija del cable rojo en la entrada de color rojo de la fuente de corriente (entrada positiva).



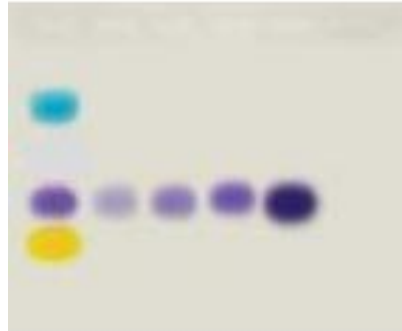
3.b) Configurar la fuente de corriente a **75 voltios (30 minutos)** o a **150 voltios (20 minutos)** . **Vigilar que los colorantes no salen fuera del gel.**

4.b) Después de 10 minutos empezará a observarse la separación de los colorantes.

5.b) Después de que la electroforesis ha terminado, **apagar la fuente de corriente**, desconectar los cables y sacar la cubierta.

6.b) Colocar el gel en un transiluminador de luz blanca (si no se dispone, una hoja de papel blanco también puede utilizarse).

5. RESULTADOS



1. En esta simulación de PCR se puede observar como la intensidad de la banda de colorante incrementa con el número de ciclos, esto es lo que ocurre realmente a mayor número de ciclos mayor cantidad de nuestro fragmento de ADN amplificado y eso es lo que se observará en un gel de agarosa con fragmentos de ADN.
2. El marcador de peso molecular se compone de fragmentos de ADN de tamaño conocido y sirve como control ya que tú conoces el tamaño de tu fragmento que quieres amplificar. En nuestro experimento, estamos amplificando un fragmento que debe coincidir con el fragmento de color azul intenso.

6. PREGUNTAS Y RESPUESTAS SOBRE LA PRACTICA

Una serie de preguntas se pueden realizar a los alumnos sobre la práctica:

1. **¿Por qué la amplificación de ADN es importante?** Se han desarrollado gran cantidad de test diagnósticos, también se ha utilizado en mapaje y secuenciación de ADN en proyectos de genoma y está siendo utilizado en determinaciones forenses, paternidades, etc. Además cuando la muestra inicial es limitante (poca cantidad), el proceso de la PCR puede producir suficiente cantidad de ADN para hacer posible el análisis.
2. **¿Cuál es la diferencia entre la reacción de PCR y la replicación en células?** En la replicación (síntesis de ADN en células) intervienen gran cantidad de proteínas en todos los pasos de síntesis y división celular y las reacciones se llevan a cabo a 37°C (temperatura corporal). En la PCR, sólo se realiza la síntesis y se realiza a temperaturas no fisiológicas.
3. **¿Cuál es la función de los 4 nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en una reacción de PCR?** Los 4 dNTPs son los componentes del ADN. Para la síntesis de ADN se requiere un ADN molde y 2 cebadores, la cadena opuesta del molde es sintetizada siguiendo la regla de emparejamiento de bases de Watson-Crick.
4. **¿Por qué hay 2 diferentes cebadores o “primers”?** Presentan una secuencia diferente que coincide con el inicio y final del gen o secuencia a amplificar (ADN molde).

**Para cualquier duda o consulta adicional, por favor, contacte con nosotros
bioted@arrakis.es**