

PCR gen 16S ARNr bacteriano

Ref.PCR16S

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) mediante la amplificación de un fragmento del gen 16S rRNA bacteriano utilizando para ello la técnica de la PCR.

No es necesario aislar el ADN de bacterias ya que se suministra una muestra de ADN bacteriano para llevar a cabo las amplificaciones.

2. INTRODUCCION

2.1 PCR

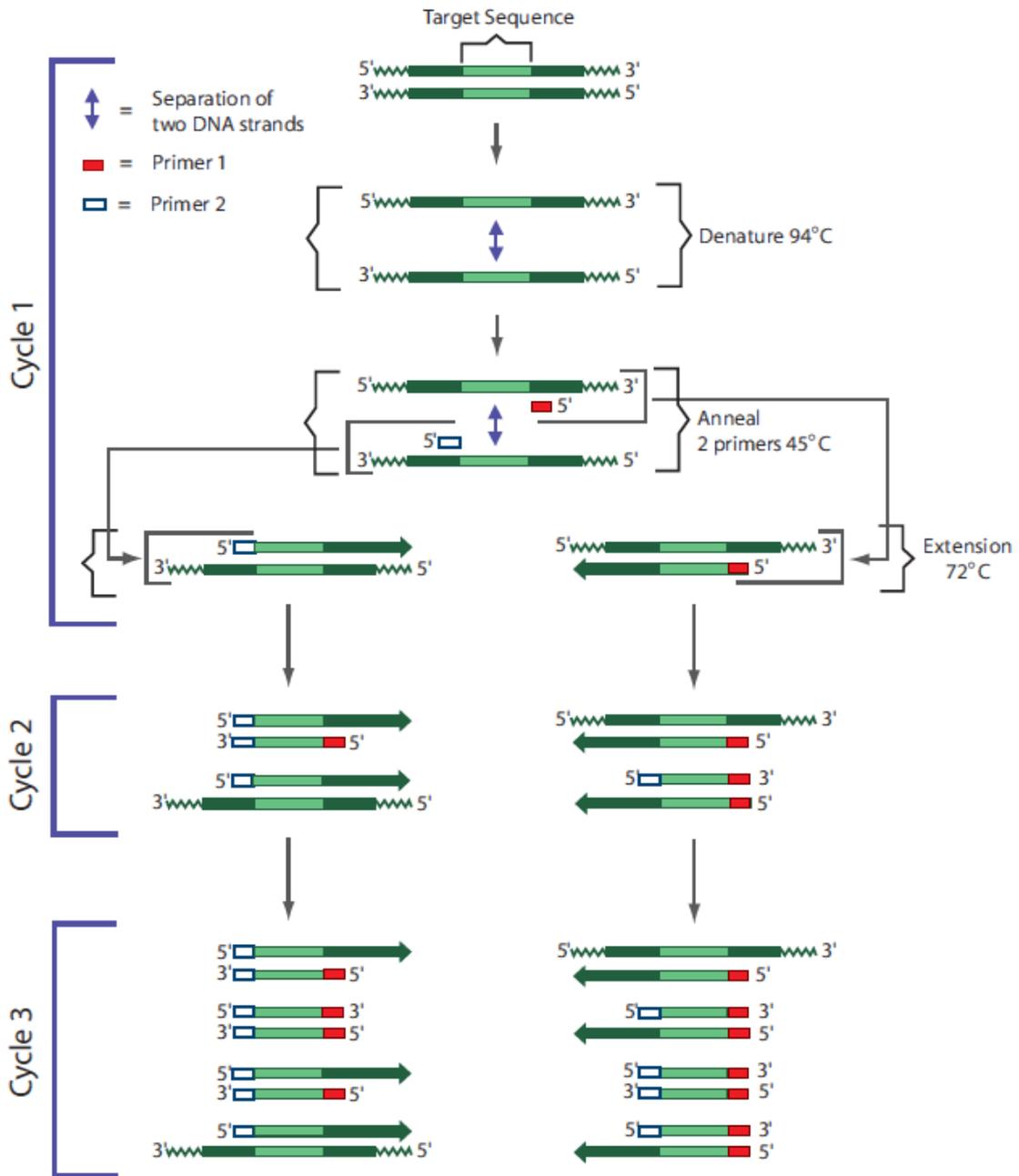
La PCR ha revolucionado la investigación y diagnóstico basado en la Biología Molecular. La PCR es un proceso simple, exacto y altamente reproducible que proporciona la ventaja de empezar con una pequeña cantidad de ADN y ser capaz de amplificarlo de forma que se tenga suficiente para realizar experimentos.

Se han desarrollado gran cantidad de test diagnósticos, también se ha utilizado en mapeo y secuenciación de ADN en proyectos de genoma y está siendo utilizado en determinaciones forenses, paternidades, diagnóstico clínico, 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 de 2 cebadores de entre 20-45 nucleótidos 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.

2.2 ARN ribosómico 16S

Es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica de los procariotas.

El ARNr se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla. En eucariotas el ARNr 18 S es la macromolécula equivalente. Sus secuencias se encuentran altamente conservadas, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen variaciones que se concentran en zonas específicas.

El análisis de la secuencia de los ARNr 16S de distintos grupos filogenéticos reveló la presencia de una o más secuencias características que se denominan **oligonucleótidos firma**. Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca (o sólo raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos.

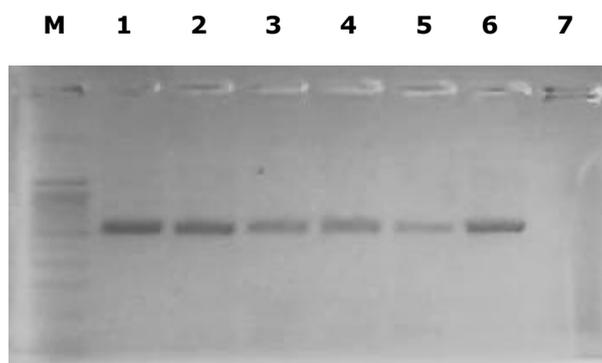
La comparación de las secuencias de los ARNr 16S (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. En microbiología clínica la identificación molecular basada en ADNr 16S se utiliza fundamentalmente para bacterias cuya identificación mediante otro tipo de técnica resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo.

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S incluye tres etapas:

- a) Amplificación por PCR del gen a partir de la muestra apropiada. **Lo que haremos en esta práctica.**
- b) Determinación de la secuencia de nucleótidos del producto de la PCR.
- c) Análisis de la secuencia.

La amplificación del ADNr 16S se consigue mediante un termociclador gracias a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como sustrato se utiliza normalmente ADN purificado a partir de un cultivo puro del agente patógeno. Alternativamente, el ADN podrá obtenerse directamente de la muestra clínica.

En esta práctica vamos a realizar la amplificación del gen ADNr 16S utilizando unos primers universales que producirán un fragmento de 466 pares de bases, como ADN molde se puede utilizar, bien ADN bacteriano aislado por los alumnos a partir de algún cultivo bacteriano, o bien, ADN bacteriano que se suministra como control positivo.



Análisis de PCR de diferentes individuos para la amplificación del gen 16S rRNA bacteriano.

Se utiliza un gel de agarosa 1.5 % que se tiñe con el DanaBlue de DanaGen-Bioted para la detección de los productos de la PCR amplificados utilizando ADN bacteriano.

Marker: DanaMarker Shumman.

Pocillo 1al 6: Amplificación a partir de diferentes muestras.

Pocillo 7: Control negativo.

3. COMPONENTES

Se suministran reactivos suficientes para la realización de 25 PCR individuales y la realización de 4 geles de electroforesis en agarosa al 1.5 %.

Tampón de electroforesis concentrado 10 X	100 ml	
Agarosa	2.5 gr	
PCR MIX	700 µl	Conservar a -20°C
ADN bacteriano control positivo	75 µl	Conservar a -20°C

Tampón de electroforesis 10 X para elaborar 2 x 500 ml de Tampón de electroforesis 1 X que es el Tampón de trabajo.

3.1 PCR MIX

Lista para su uso, que permite amplificar cualquier fragmento a partir de ADN, de forma que el usuario sólo ha de añadir la muestra del ADN aislado. Los primers utilizados son los siguientes:

Procariota universal

331F	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	19	Nadkarni et al., 2002
797R	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	25	Nadkarni et al., 2002

4. PRÁCTICA

4.1 Extracción del ADN

El paso previo a cualquier estudio genético suele ser el aislamiento del ADN genómico, esto se puede llevar a cabo de diferentes formas (métodos caseros, kits comerciales, etc) y a partir de diferentes muestras (sangre, tejido, bacterias etc). Para la realización de esta práctica no es necesario la extracción del ADN de los alumnos ya que suministra una muestra de ADN bacteriano para realizar la práctica, aunque se puede utilizar ADN bacteriano aislado por los alumnos a partir de cultivos bacterianos.

4.2 Reacción de la PCR

NOTA: Utilizar siempre puntas con filtro y cambiar de punta cada vez que se realiza una acción para evitar contaminaciones que puede dar lugar a falsos resultados.

1. Utilizar **2.5 µl** (100-250 ng) del ADN bacteriano para cada reacción de PCR. **IMPORTANTE:** preparar un control negativo de amplificación, para ello colocar **2.5 µl de agua libre de nucleasas** en lugar del ADN, esto sirve para saber si los reactivos, micropipetas o puntas pueden estar contaminados con ADN.

REACTIVOS	VOLUMEN
PCR MIX	22.50 µl
ADN bacteriano (100-250 ng)	2.5 µl
Volumen Total	25 µl

2. Mezclar bien.
3. Para aquellos termocicladores que no tengan un “heated lid”, añadir 25 µl de aceite mineral para prevenir la evaporación.

PROGRAMA 16S ARNr

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos
Ciclos PCR Realizar 35 ciclos	95°C	30 segundos
	55°C	30 segundos
	72°C	45 segundos
Extensión final	72°C	10 minutos
Final	4°C	

4. El producto de la PCR puede ser sembrado directamente en un gel de agarosa después de la PCR ya que la MIX contiene tampón de carga de color rojo.
5. Utilizar el método de detección o tinción del ADN que se use en el laboratorio. Le recomendamos el uso del DANABLUE o GELSAFE, nuestros métodos no tóxicos.
6. Se ha de obtener un resultado similar al observado en la figura.

Para cualquier duda o consulta adicional, por favor , contacte con nosotros info@danagen.es