

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	GLA-01 V. 00
		Página	1 de 1

AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA

1. **Título: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

2. **Objetivo:**

Conocer los principios básicos que permitieron el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa y aplicarlos para su realización en el laboratorio

3. **Marco teórico:**


El PCR es un procedimiento rápido para la amplificación enzimática in-vitro de un fragmento de DNA. El PCR ha permitido el desarrollo de una serie de procedimientos que anteriormente eran imposibles de hacer. El número de aplicaciones parece infinito y continúa creciendo. Por ejemplo: clonación de DNA genómico o cDNA, mutagénesis in-vitro, caracterización de muestras forenses, detección de agentes infecciosos, diagnóstico prenatal de enfermedades, polimorfismo genético en los individuos, análisis estructural de genes y RNA, mapeo genético, secuenciamiento directo de DNA o cDNA, etc.

El PCR es básicamente la aplicación de los principios y elementos del proceso de replicación del material genético, una de las características es la sustitución de la enzima primasa por unos iniciadores o “primers” diseñados previamente, esto se hace para obviar el uso de primasa pero fundamentalmente para iniciar el proceso de polimerización en genes y en sitios predefinidos específicamente. Para el PCR se necesita: un DNA de doble cadena que va a ser amplificado, dos oligonucleótidos o “primers”, una DNA polimerasa resistente al calor (Taq polimerasa), desoxiribonucleótidos (dATP, dTTP, dGTP y dCTP), un buffer o amortiguador y sales (MgCl₂).

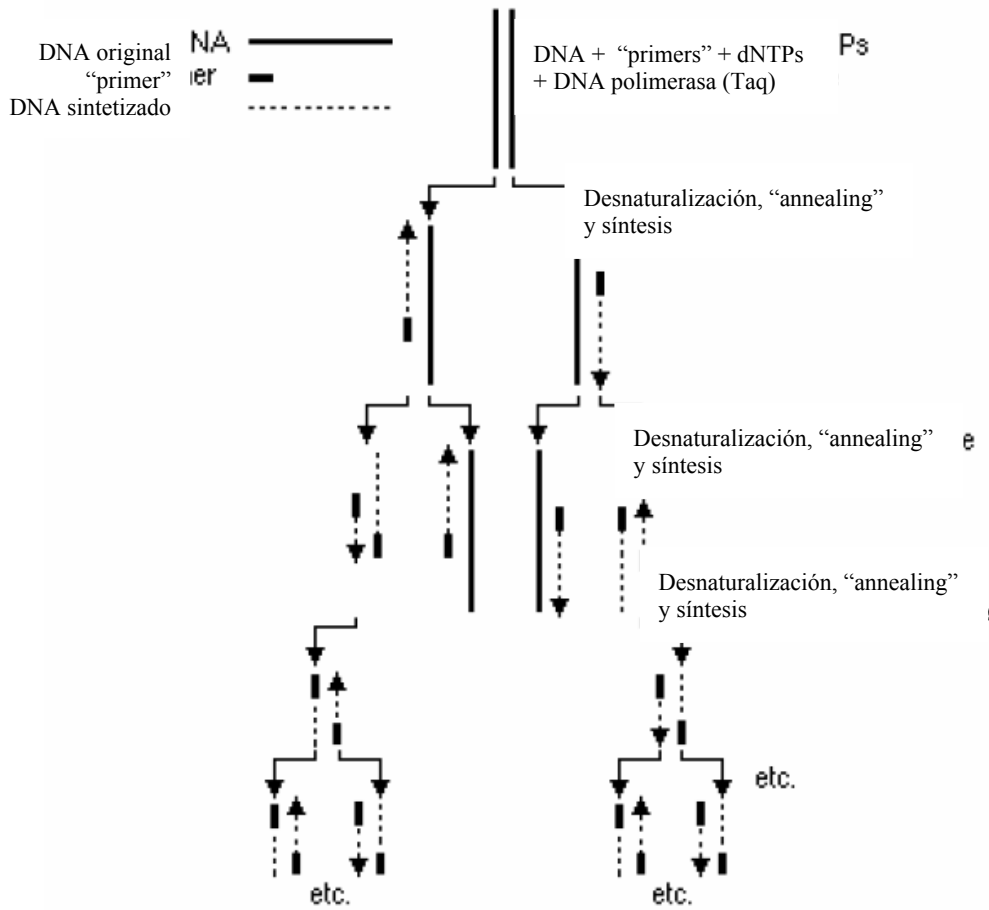
El DNA de doble cadena a ser amplificado es desnaturalizado (separación de las dos cadenas del DNA por calentamiento, los “primers” hibridizan (“annealing”) (se unen por complementaridad de bases) cada uno a una cadena del DNA en los sitios predefinidos según la secuencia de nucleótidos. La DNA polimerasa (Taq) inicia la síntesis y extiende las cadenas a partir del extremo 3’ de los “primers” amplificando el segmento de DNA localizado entre los 2 “primers”. Ciclos repetidos de desnaturalización, “annealing” y polimerización producen millones de copias del segmento de DNA localizado entre los dos “primers”. Ver gráfico anterior:

Dos variables importantes que influyen el resultado del PCR son la concentración de MgCl₂ y la temperatura de “annealing”.

En el PCR se pueden utilizar aditivos como dimetilsulfóxido (DMSO) o glicerol con el fin de aumentar la estabilidad y procesividad de la polimerasa. En el presente protocolo se quiere comparar los resultados sin aditivos y utilizando DMSO y glicerol.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	GLA-01 V. 00
		Página	2 de 1

AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA



4. Materiales equipos e insumos

Termociclador
 Equipo y reactivos para electroforesis horizontal en gel de agarosa
 Micropipetas P200 y P20
 Puntas amarillas para micropipeta

5. Reactivos

H₂O desionizada estéril
 15 mM, 30 mM, y 45 mM MgCl₂
 Buffer de amplificación 10x sin MgCl₂
 Mezcla 25 mM de los 4 dNTPs

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	GLA-01 V. 00
		Página	3 de 1

AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA

50 µM primer 1: 50 pmol/µL en H₂O estéril (almacenado a -20°C)
 50 µM primer 2: 50 pmol/ µL en H₂O estéril (almacenado a -20°C)
 DNA a ser amplificado: DNA humano 1 µg/10 µL o DNA de plásmido 0.1 ng/10 µL
 Taq DNA polimerasa 5 U/ µL
 DMSO, grado cultivo celular
 Glicerol
 Aceite Mineral
 DNA Lambda Hind

6. Procedimiento

1. Prepare para todo el grupo tres mezclas patrón se acuerdo con la siguiente tabla :

	Patrón I (µL)	Patrón II (µL)	Patrón III (µL)
Buffer PCR 10 X	40	40	40
Primer 1 (50 µM)	4	4	4
Primer 2 (50 µM)	4	4	4
DNA plantilla	40	40	40
dNTPs (25 mM)	3.2	3.2	3.2
Taq (5 U/ µL)	2	2	2
DMSO	0	20	0
Glicerol	0	0	40
Agua desionizada	266.8	246.8	226.8

2. Alicuote 90 µL de cada mezcla patrón en 3 tubos de 500 o 200 µL (según el termociclador) y agregue 10 µL de 15 mM, 30 mM o 45 mM de MgCl₂, marque los tubos según la siguiente tabla:

	Patrón I (90 µL)	Patrón II (90 µL)	Patrón III (90 µL)
MgCl ₂ 15 mM (10µL)	I-1.5	II-1.5	III-1.5
MgCl ₂ 30 mM (10 µL)	I-3	II-3	III-3
MgCl ₂ 45 mM (10 µL)	I-4.5	II-4.5	III-4.5

3. Cubra la mezcla de la reacción con 50 a 100 µL de aceite mineral.
4. El termociclador se programa de acuerdo con las características de cada equipo, siga las instrucciones del fabricante. Tenga en cuenta las siguientes recomendaciones.
 - Programe el equipo para 30 ciclos.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	GLA-01 V. 00
		Página	4 de 1

AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA

- Desnaturalice 1 min at 94°C
- Hibridice 1 minuto a ____°C: si el contenido de GC es ≤50%, hibridice a 55°C; si el contenido de GC es >50%, hibridice a 60°C.
- Permita la polimerización o extensión ____ minutos a 72°C: si la longitud del fragmento a amplificar es ≤500 nucleótidos, extienda 1 minuto; si tiene >500 nucleótidos, extienda 3 minutos.
- Para asegurar que todos los productos de PCR tengan una longitud completa se deja el último paso de extensión por 7 minutos.

El número de ciclos depende tanto de la eficiencia de la reacción como de la cantidad de plantilla o DNA que se quiere amplificar. Para DNA humano se recomienda trabajar con 100 ng (aproximadamente 10⁴ células) para 30 ciclos, si se utiliza una menor cantidad de DNA se debe aumentar el número de ciclos.

5. Analice los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % utilizando 10 µL de la reacción de PCR .

7. Bibliografía

- J. Sambrook; E.F. Fritsch, T. Maniatis, **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** CSHL press 2001
- Fred M. Ausubel; Roger Brent; Robert E. Kingston; David D. Moore; J.G. Seidman; John A. Smith; Kevin Struhl **Current Protocols in Molecular Biology**, John Wiley and Sons, Inc, 1998
- Contreras J, Pinilla G, Beltrán R, Wasserman M, Rojas M O **Manual de Técnicas Básicas. Primer Curso Institucional sobre Biología Molecular** ISBN 958-13-0083-X .1 ed. Bogotá : Instituto Nacional de Salud, 1991, v.1. p.30.
- Concepción Puerta y Claudia Urueña. **Prácticas de Biología Molecular**. Editorial Pontificia Universidad Javeriana, 2005