

P

C

R

Reacción en Cadena de la Polimerasa



Utilidad de esta técnica



Tamaño del genoma:
4,284,050 bp



El gen de interés: 500-
1000pb

Todo el genoma
de *Vibrio fischeri*
ES114



Nos interesa el
gen de la porina
de quitina



¿Cómo
amplificar sólo
este gen?

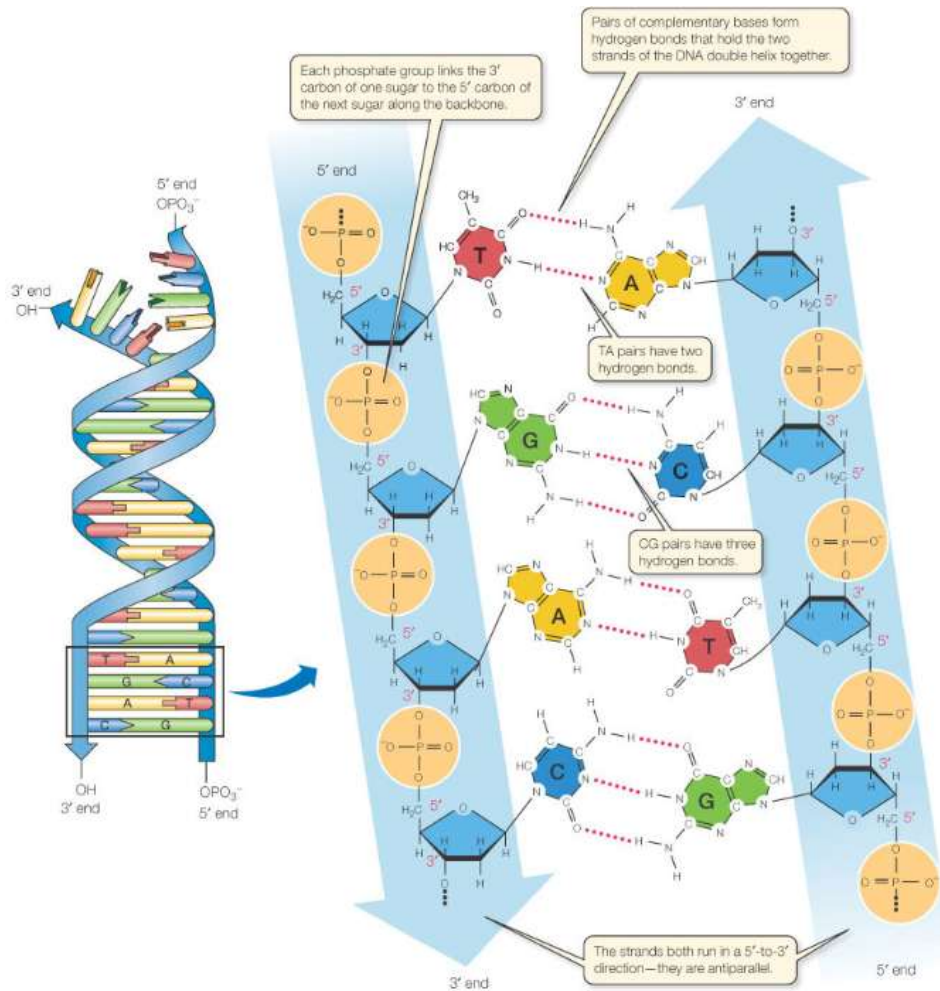
Invención de la Técnica de PCR

Kary Mullis

- 1983
- “Beginning with a single molecule of the genetic material DNA, the PCR can generate 100 billion similar molecules in an afternoon”.
- Premio Nobel en Química 1993.

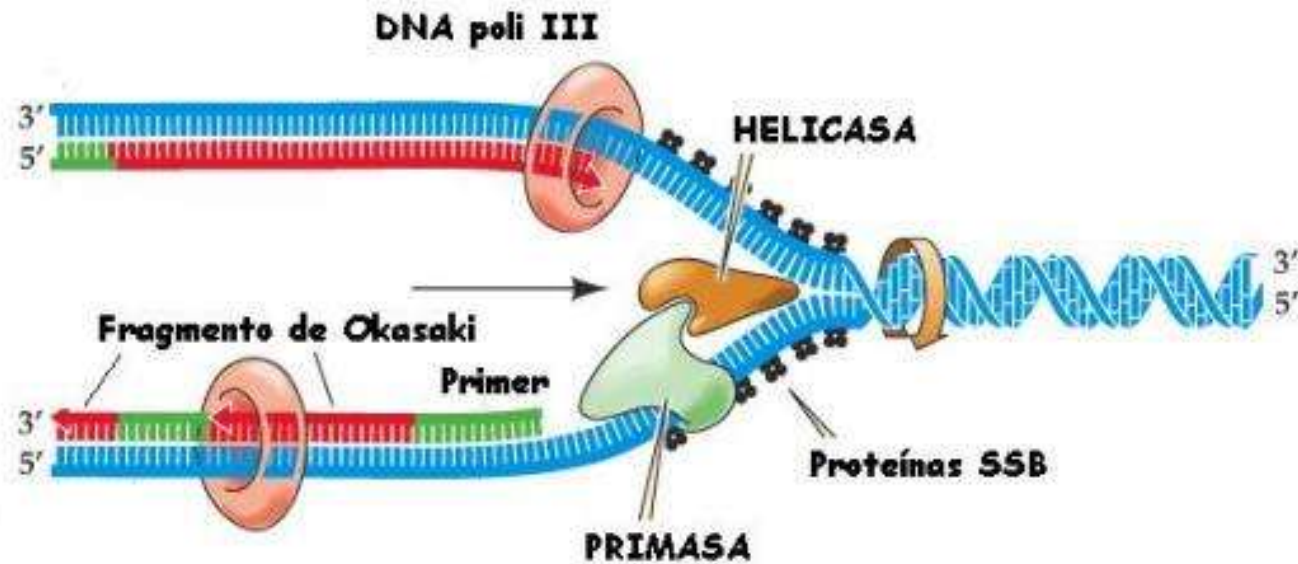


Conformación del ADN



- Nucleótidos
 - Azúcar: Desoxirribosa
 - Base nitrogenada (A, T, G o C)
 - Grupo fosfato
- Puentes de hidrogeno y enlaces fosfodiester

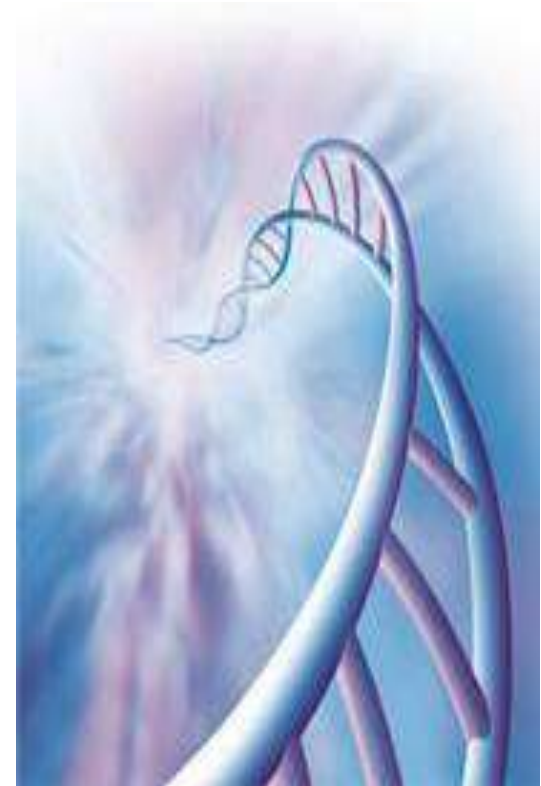
Cómo pasa *in vivo*



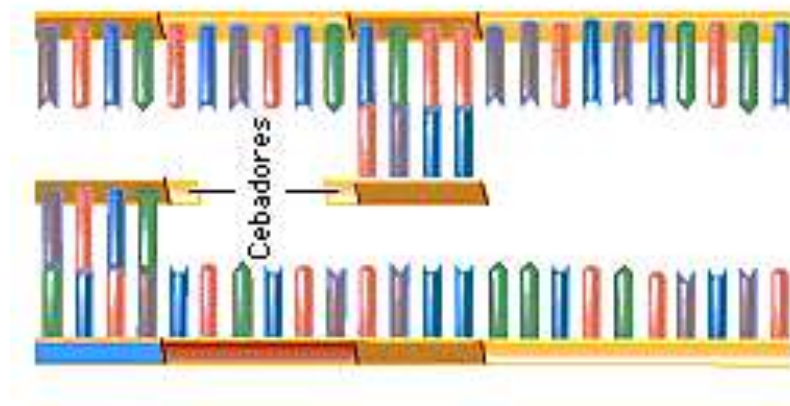
Reacción en Cadena de la Polimerasa

Que necesitamos para hacer un PCR?

- Iniciadores (Primers)
- Taq Polimerasa
- ADN Templado
- Cloruro de Magnesio
- Buffer 10x
- Deoxinucleotidos (dNTPs)
- Agua Destilada Estéril

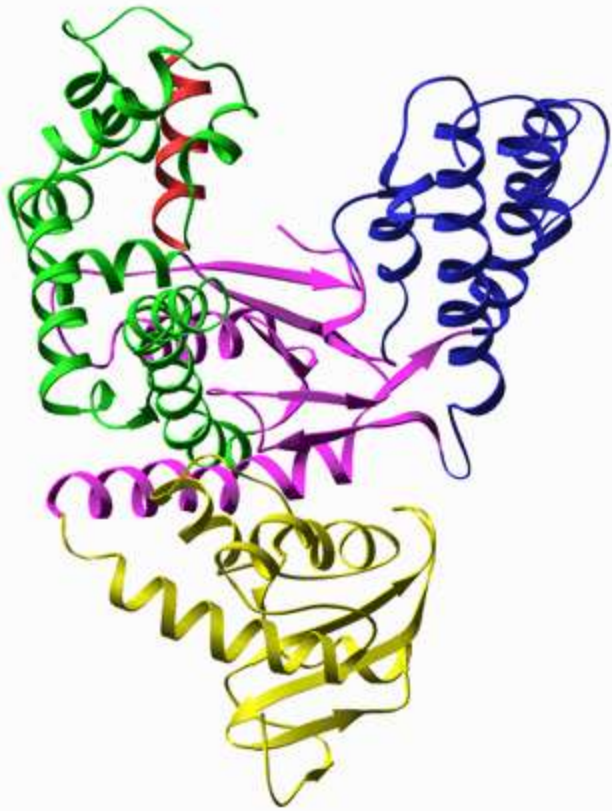


Iniciadores/Cebadores/Primers



- Complementarios a hebras de ADN
- Secuencias cortas (6-40 nts) (Promedio 20 nts)
- Flanquean la zona (< 4Kpb) Para tener en cuenta :
 - Melting Temperature → $TM = 4(G + C) + 2(A + T)^{\circ}C$
 - Temperatura de anillaje → depende de la TM de los 2 primers.

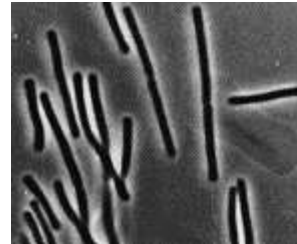
Taq Polimerasa



- Termoestable
- Alta procesividad
- Capacidad de Proofreading
- Reconoce extremos 3' libres

Taq Polimerasa

R
E
A
C
T
I
V
O
S



Microorganismos adaptados:

Thermus aquaticus (Taq)

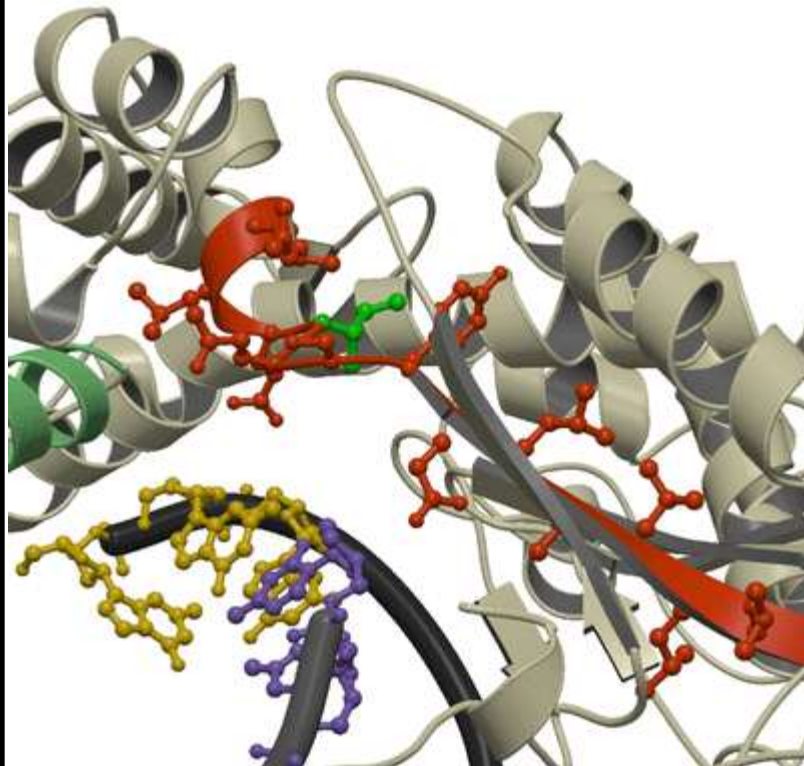
Pyrococcus furiosus (Pfu)

Thermococcus litoralis (Vent)

Thermus thermophilus (Tth)

<http://www.bact.wisc.edu/bact303/b27>

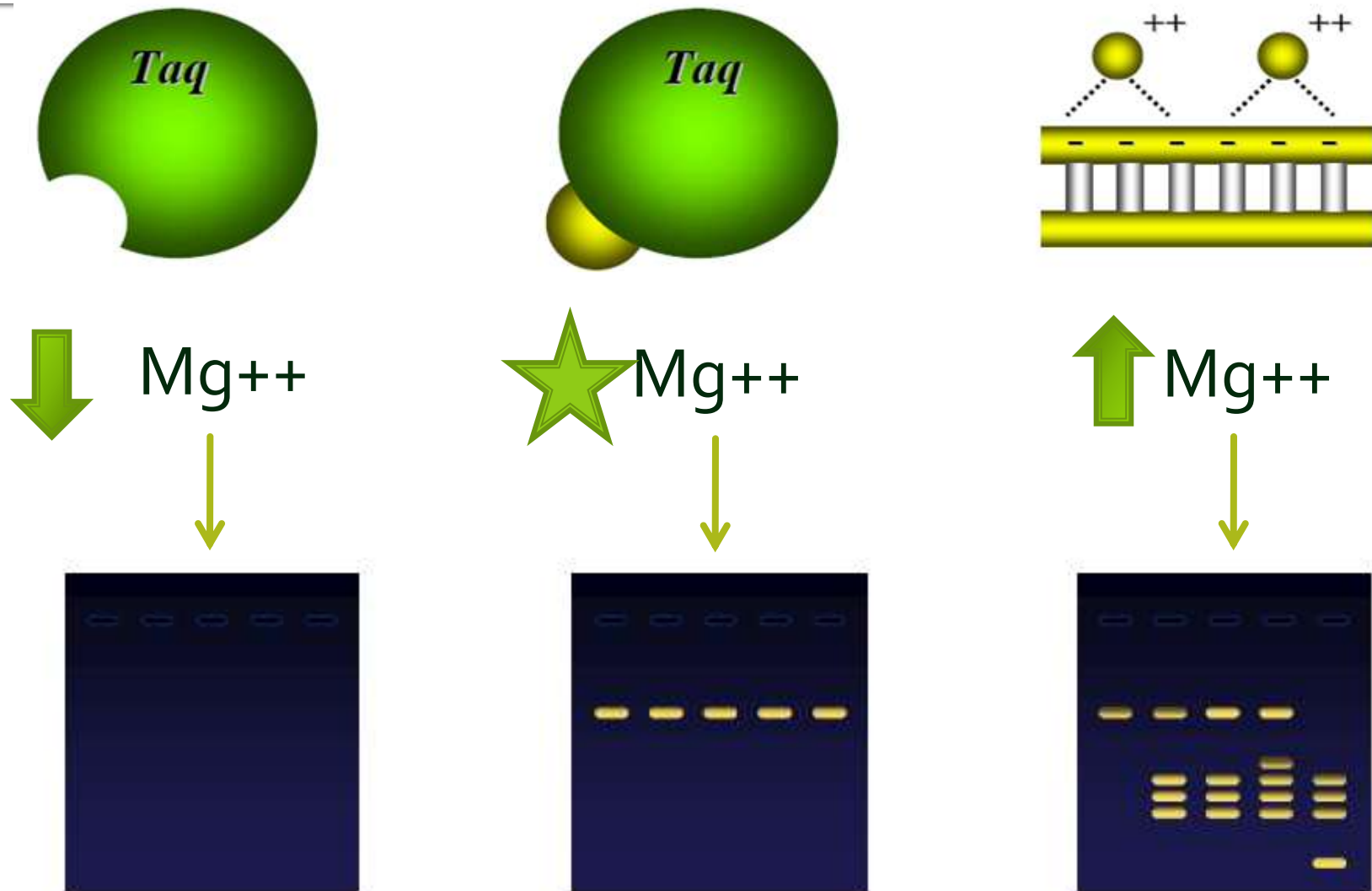
Magnesio



- Cofactor de la polimerasa.
- Los iones de magnesio estimulan a la enzima TaqPol para que incorpore los dNTP's.
- Especificidad de la Reacción
- Quelar Mg^{2+} inhibe la reacción

Magnesio

R
E
A
C
T
I
V
O
S



Buffer 10X

- Mantiene las condiciones de pH estables para el funcionamiento de la polimerasa.

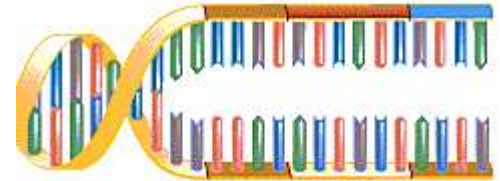
Agua calidad Biología Molecular

- Libre de nucleasas (DNAsas y Rnasas)
- Desionizada
- Purificada por UV y ozono

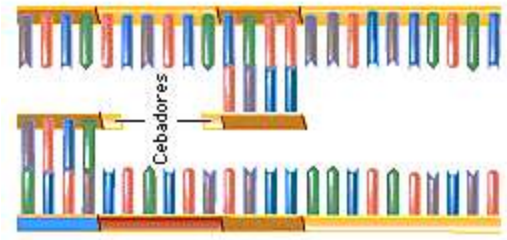
Reacción en Cadena de la Polimerasa

PCR

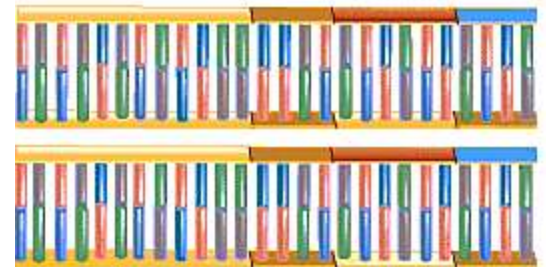
Denaturación



Anillaje

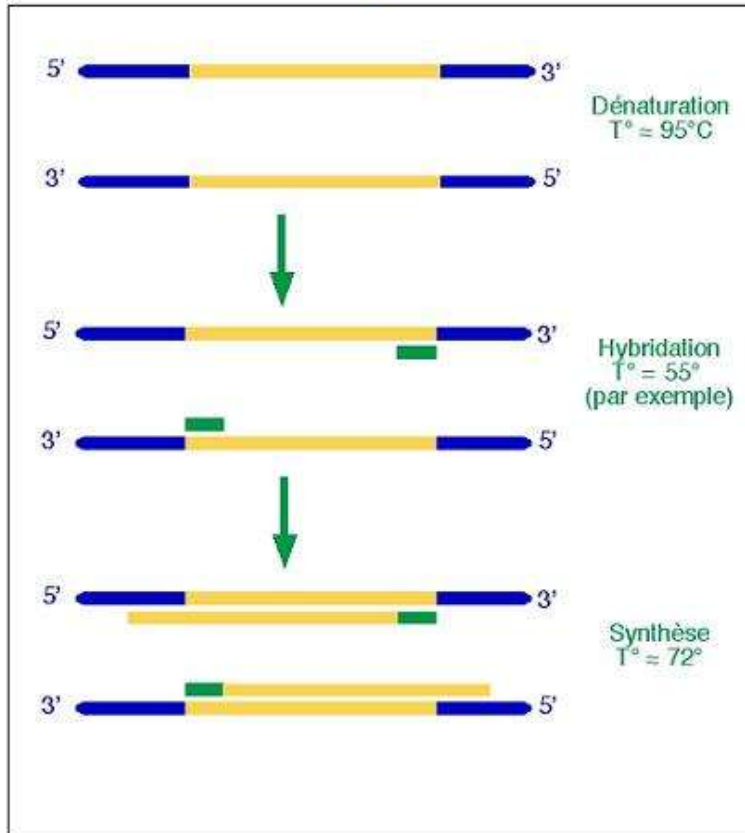


Elongación

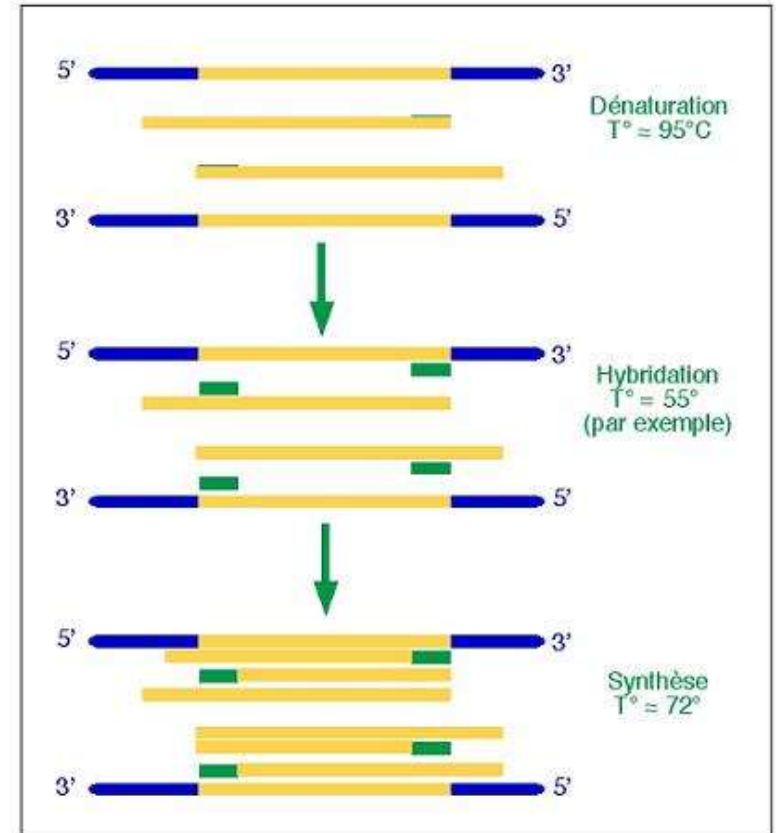


F
U
N
D
A
M
E
N
T
O

Premier cycle



Second cycle



L'ADN génomique est représenté en bleu. La région de l'ADN génomique que l'on souhaite amplifier est représentée en jaune. Les amorces de PCR (oligonucléotides) sont représentées en vert.

Animación

<http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/pcr.html>

P

C

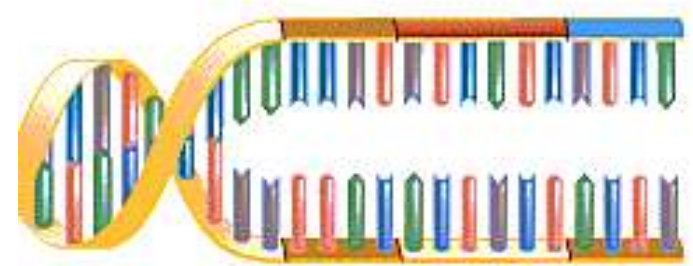
R

Perfil Térmico



Denaturación

- 90 - 95°C
- Rompe H-H



↑ Contenido G-C
Longitud del Fragmento

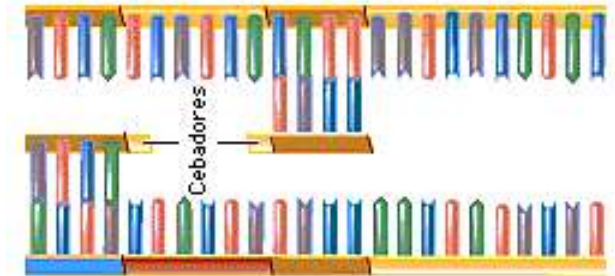
↑ Tiempo

Perfil Térmico



Anillaje

- 50-65°C
- Unión de los Primers



Temperatura de Anillaje

Depende de la TM de los 2 primers.

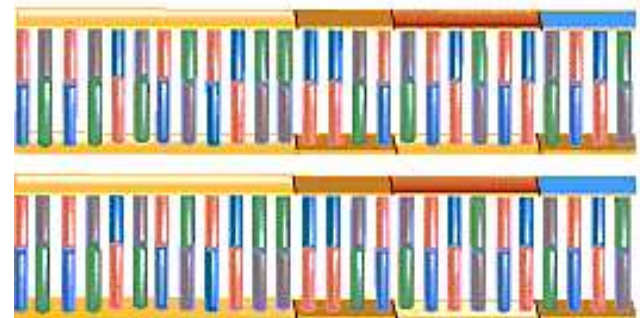
Melting Temperature

$$TM = 4(G + C) + 2(A + T)^{\circ}C$$

Perfil Térmico

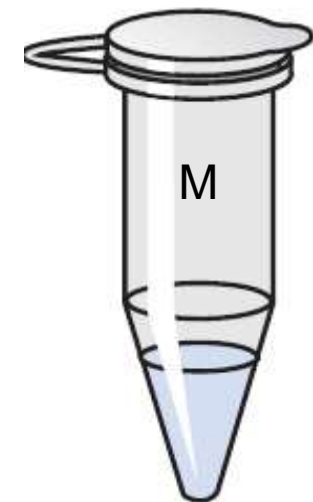
Elongación

- 72°C
- Limitada por el tiempo



Preparación de la Mezcla de Reacción (Master Mix)

Reactivo	Concentración final	Volumen (μ l)	Master Mix (x3)
Buffer	1X	2.50	7.5
MgCl ₂	3mM	1,5	4.5
dNTPs	0,2mM c/u	0.2	0.60
Primers	0.2 μ M c/u	0.5	1.5*2
Taq Pol	2.5U/ μ l	0.5	1.5
Agua		17,3	51.9
Volumen Total		23	69



Cálculos PCR

Reactivos	[] _i	[] _F
Buffer	10X	1X
dNTPs	100mMc/u	0.2 mMc/u
MgCl ₂	50mM	3 mM
Iniciadores (ERG11 C)	10uM /ul	0.2 uM/ul
Taq Polimerasa	5 U/ul	2.5 U
ADN		2 μl

P
C
R

Cálculos PCR

$$V_i C_i = V_f C_f$$

■ Buffer

$$V_i = \frac{25 \text{ ul} \times 1X}{10X}$$

$$V_i = 2.5 \text{ ul}$$

■ Magnesio

$$V_i = \frac{25 \text{ ul} \times 3 \text{ mM}}{50 \text{ mM}}$$

$$V_i = 1.5 \text{ ul}$$

■ Primers

$$V_i = \frac{25 \text{ ul} \times 0.2 \text{ uM/ul}}{10 \text{ uM/ul}}$$

$$V_i = 0.5 \text{ ul}$$

P
C
R

Cálculos PCR

$$V_i C_i = V_f C_f$$

■ dNTPs

$$V_i = \frac{25 \times 0.2 \text{ mM}}{100 \text{ mM}}$$

$$V_i = 0.05 \text{ ul c/u}$$

$$V_i = 0.2 \text{ ul}$$

■ Taq Pol

Para cada 100uL de reacción se requieren 5U.

Para cada 25uL de reacción se requieren 1.25 U.

$$\begin{array}{r} 5 \text{ U} \quad 1 \text{ ul} \\ 2.5 \text{ U} \quad X \\ X = 0.5 \end{array}$$

P
C
R

Cálculos PCR

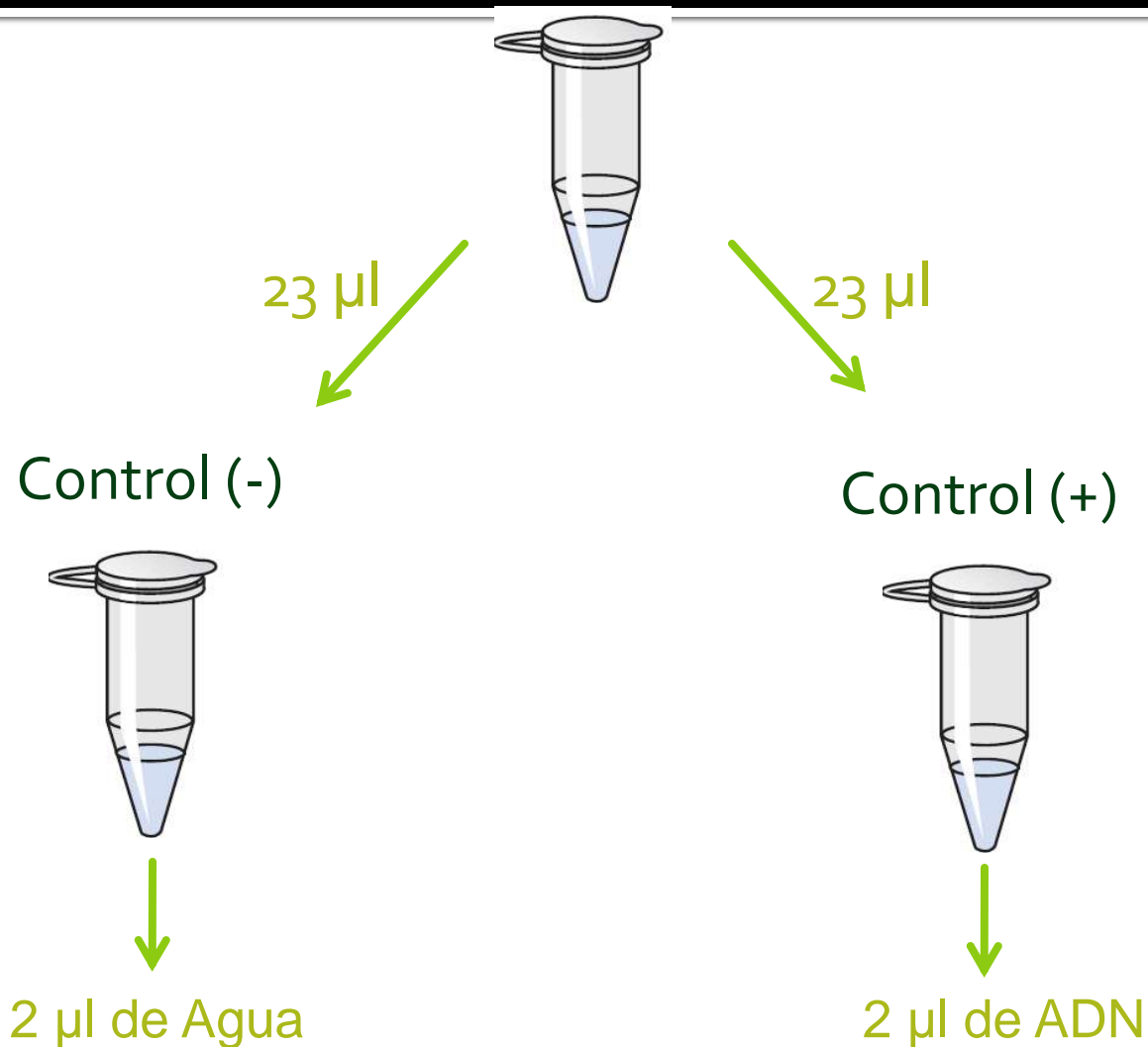
Reactivos	[] _F	[] _F	Vol. (μl)
Buffer	10X	1X	2.5
dNTPs	100mM c/u	0.2 mM c/u	0.2
MgCl ₂	50mM	3 mM	1.25
Iniciadores (ERG11C)	10 uM/ul	0.2uM/ul	0.5
Taq Polimerasa	5 U/ul	2.5 U	0.5
ADN			2
H ₂ O			17.3

P

C

R

Preparación de la Mezcla de Reacción



Perfil Térmico



N. Ciclos	Temperatura	Tiempo
1X	94°C	5'
	94°C	1'
35X	58°C	1'
	72°C	1'
1X	72°C	1'
1X	10°C	∞

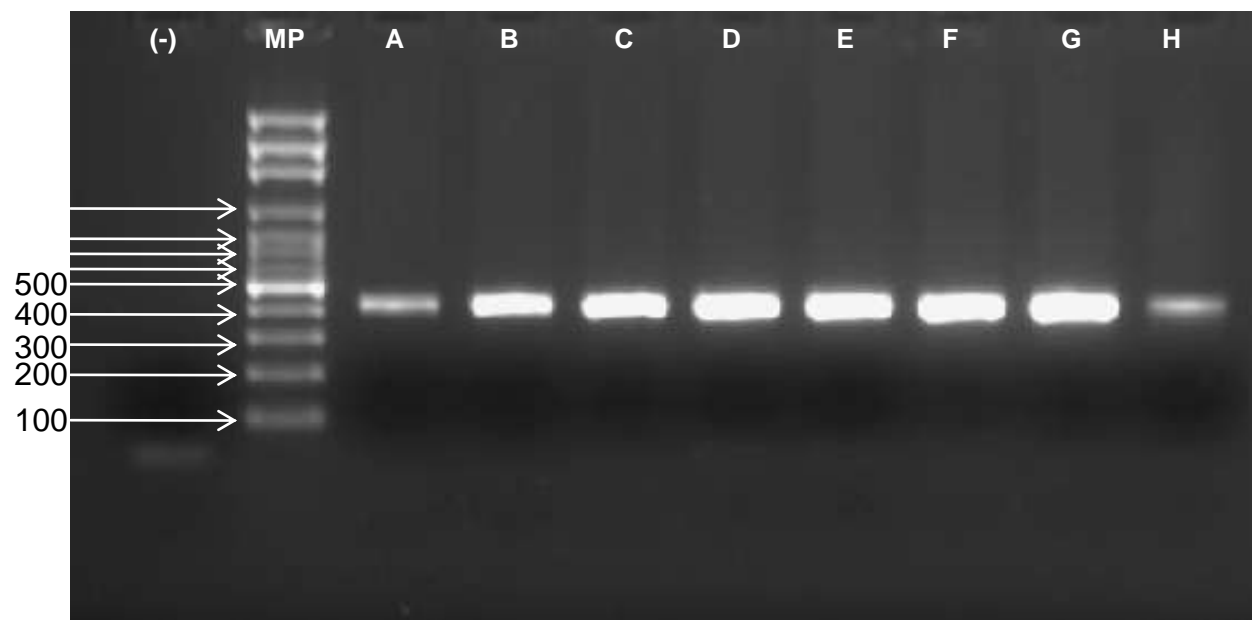
RESULTADOS

Reacción en Cadena de la Polimerasa

Resultados

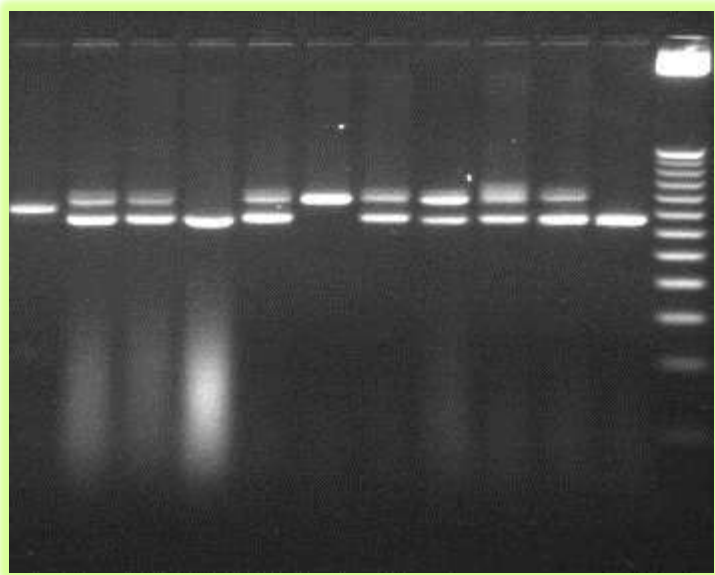


Resultados esperados



R
E
S
U
L
T
A
D
O
S

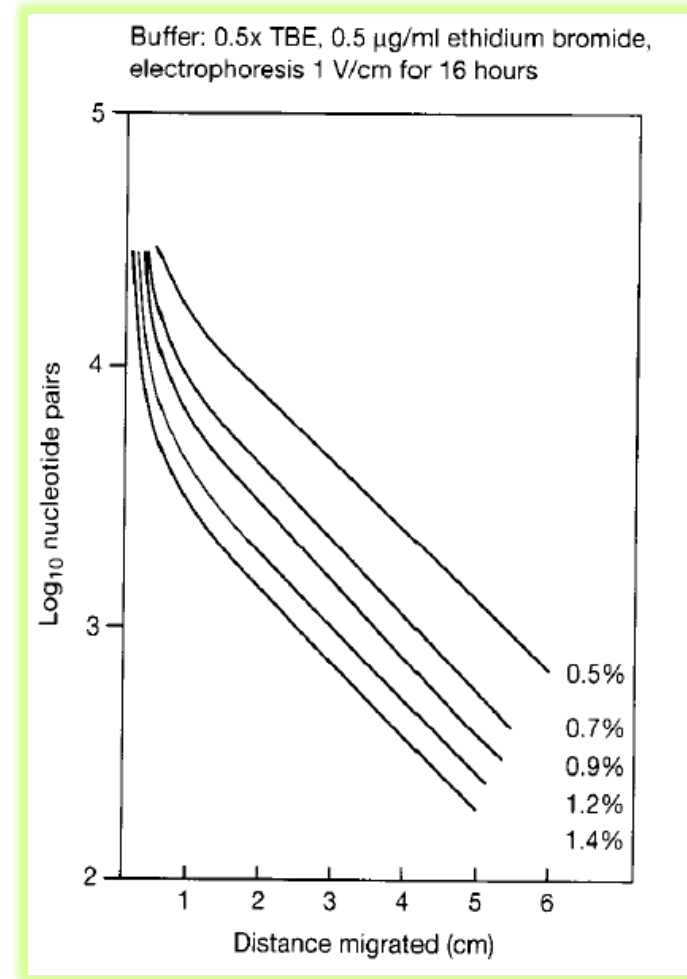
Electroforesis



- Separar biomoléculas a partir de un tamaño y carga eléctrica dada.

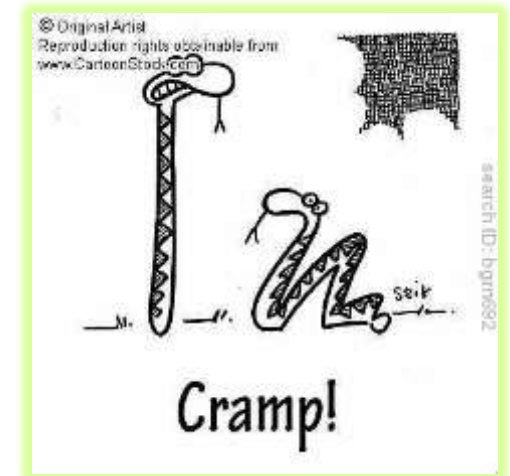
Velocidad de migración en geles de agarosa

- El tamaño molecular del ADN
 - Inversamente proporcional al \log_{10} de su peso molecular
- La concentración de agarosa



Velocidad de migración en geles de agarosa

- Conformación del ADN
- Presencia de bromuro de etidio:
 - Aumento de carga (-) → más lento en un 15%
- Voltaje aplicado
 - La separación disminuye al aumentar el voltaje



Velocidad de migración en geles de agarosa

- Tipos de agarosa

TABLE 5-2 Range of Separation of DNA Fragments through Different Types of Agaroses

SIZE RANGE OF DNA FRAGMENTS RESOLVED BY VARIOUS TYPES OF AGAROSSES

AGAROSE (%)	STANDARD	HIGH GEL STRENGTH	LOW GELLING/MELTING TEMPERATURE	LOW GELLING/MELTING TEMPERATURE LOW VISCOSITY
0.3				
0.5	700 bp to 25 kb			
0.8	500 bp to 15 kb	800 bp to 10 kb	800 bp to 10 kb	
1.0	250 bp to 12 kb	400 bp to 8 kb	400 bp to 8 kb	
1.2	150 bp to 6 kb	300 bp to 7 kb	300 bp to 7 kb	
1.5	80 bp to 4 kb	200 bp to 4 kb	200 bp to 4 kb	
2.0		100 bp to 3 kb	100 bp to 3 kb	
3.0			500 bp to 1 kb	500 bp to 1 kb
4.0				100 bp to 500 bp
6.0				10 bp to 100 bp

Velocidad de migración en geles de agarosa

- Buffer de corrida: Composición de la fuerza iónica
 - Agua: El ADN migraría muy lento

TAE	TBE, TPE
Más barato	Mejor capacidad
dsADN migra 10% más rápido	Moléculas de bajo PM se resuelven mejor
Moléculas de alto PM y ADNc se resuelven mejor	Mantiene más estable la Temperatura