

Práctica 4. Amplificación de ADN por PCR y electroforesis

P4A: Ampliación de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa

Estudio de polimorfismos humanos ALU por PCR (BioTed, cod. PCR3)

P4B: Separación de ADN mediante electroforesis

(BioTed, cod. ELECTAVANZA)

Fundamento

PCR

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

Se utiliza en test diagnósticos, secuenciación de ADN en proyectos de genoma, mapeo y está siendo utilizada en determinaciones forenses y paternidades. En todos los casos se amplifican segmentos de ADN que posteriormente son sometidos a análisis y estudios.

En una reacción de PCR, el primer paso es la preparación de la muestra de ADN que es extraída de diferentes 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 (enzima de amplificación) y los 4 dNTPS [Adenina, Timina, Citosina y Guanina] en un tampón de reacción apropiado. El volumen total de reacción es de 25-50 ml. En el primer paso de la reacción de PCR, las cadenas complementarias de ADN se separan la una de la otra a 94°C (**desnaturalización**), mientras que la Taq polimerasa permanece estable. En el segundo paso, conocido como emparejamiento (**annealing**), 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.

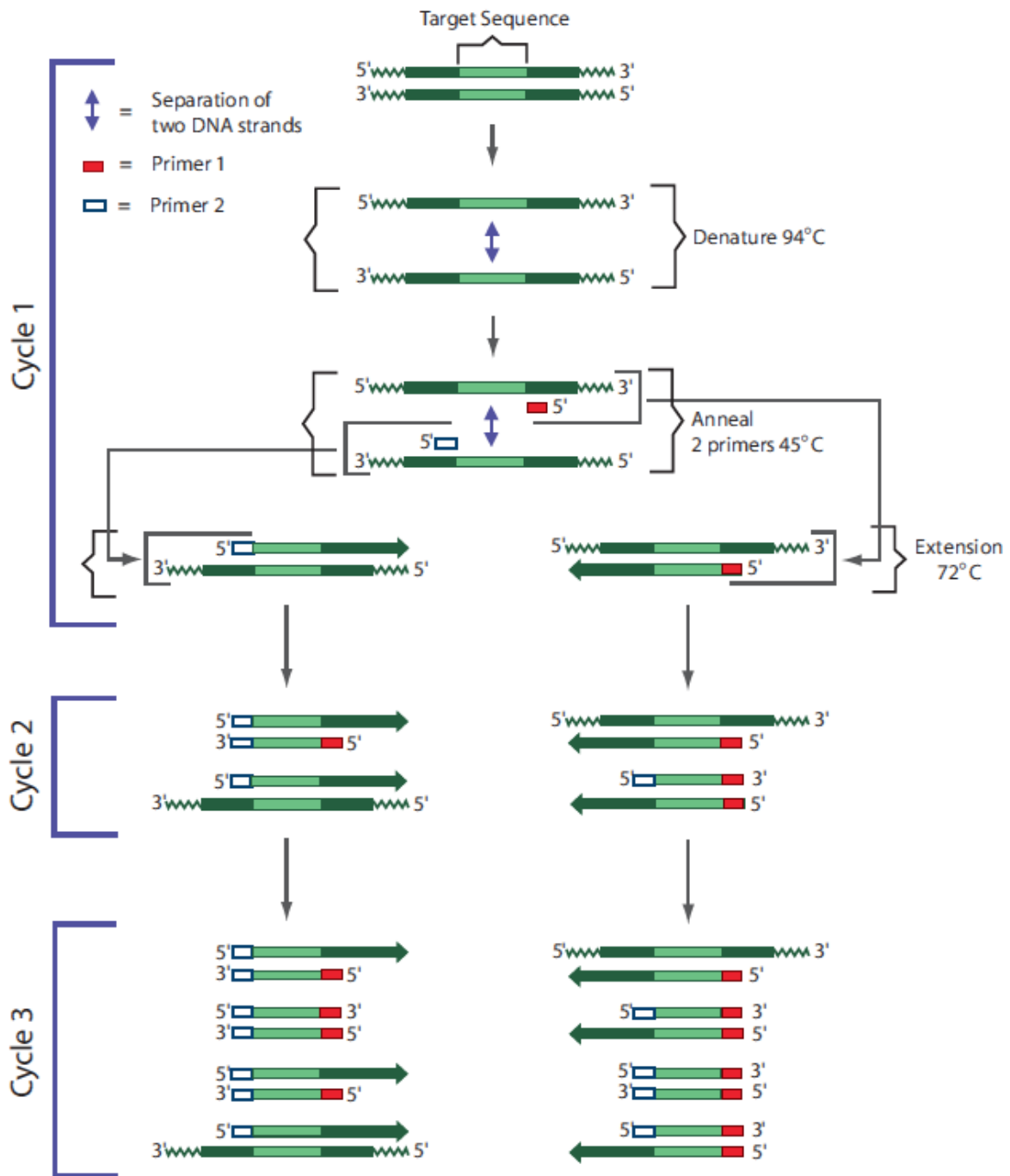


Figura 1: Estos tres pasos, desnaturalización-emparejamiento-extensión, constituye un ciclo de PCR. Este proceso se repite durante 20-40 ciclos amplificando la secuencia objeto exponencialmente. La PCR se lleva a cabo en un termociclador, un instrumento que es programado para un rápido calentamiento, 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.

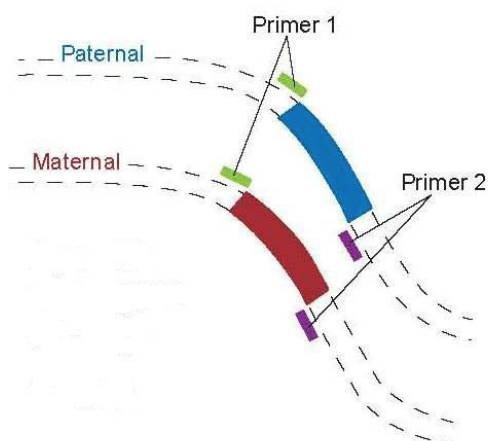
POLIMORFISMOS ALU

El genoma humano contiene cerca de 3 billones de pares de base de ADN. De este total, sólo un 5% consiste en **exones** los cuales codifican para proteínas. Los **intrones** y otras secuencias no codificantes pueden poseer funciones que están por descubrir aunque muchas secuencias parecen no tenerlas. Muchas de estas secuencias están repetidas cientos o miles de veces a través del genoma representando algo más del 20 % del genoma humano.

En 1979, se descubrió que el ADN humano contiene un elemento repetitivo de 300 pares de bases. Las copias de este elemento contienen un lugar de reconocimiento para el enzima de restricción Alu I, de forma que se denominaron **elementos Alu**. Se han encontrado estos elementos en exones, intrones y en otras regiones no codificantes. Cuando las secuencias Alu se insertan en una región codificante para una proteína, la rotura del gen, normalmente conduce a un daño en el organismo.

Aunque todos los humanos y otros primates poseen miles de elementos Alu, variaciones en su emplazamiento pueden observarse. Las secuencias de ADN que varían entre individuos son conocidas como **POLIMORFISMOS**. Por ejemplo, una persona presenta una inserción Alu en un locus específico del ADN, mientras que otro individuo no la posee. Además, la inserción puede estar presente o ausente en cada uno de los cromosomas homólogos. **El polimorfismo Alu que vamos a estudiar en esta práctica, es la inserción que se encuentra en el intrón 8 del gen activador del plasminógeno tisular TPA Alu**. Esta sección tiene unos 260-270 nucleótidos de longitud y la inserción tiene aproximadamente unas 300 pares de base de longitud, de forma que la inserción producirá un aumento de la longitud en 570 pares de bases.

Se puede testar si una persona posee una inserción Alu al locus TPA por amplificación del locus utilizando la PCR. Si una persona no tiene la inserción en ambos cromosomas homólogos, la PCR resultará en una sola banda de 260 pares de bases. Si una persona es homocigoto para la inserción, la electroforesis en gel de agarosa del producto de la PCR producirá un única banda de **570 pares de bases**. Si una persona es heterocigoto, posee la inserción en uno de los cromosomas homólogos pero no en el otro, 2 bandas aparecerán en el gel, una de 570 pares de bases y otra de 260 pares de bases.



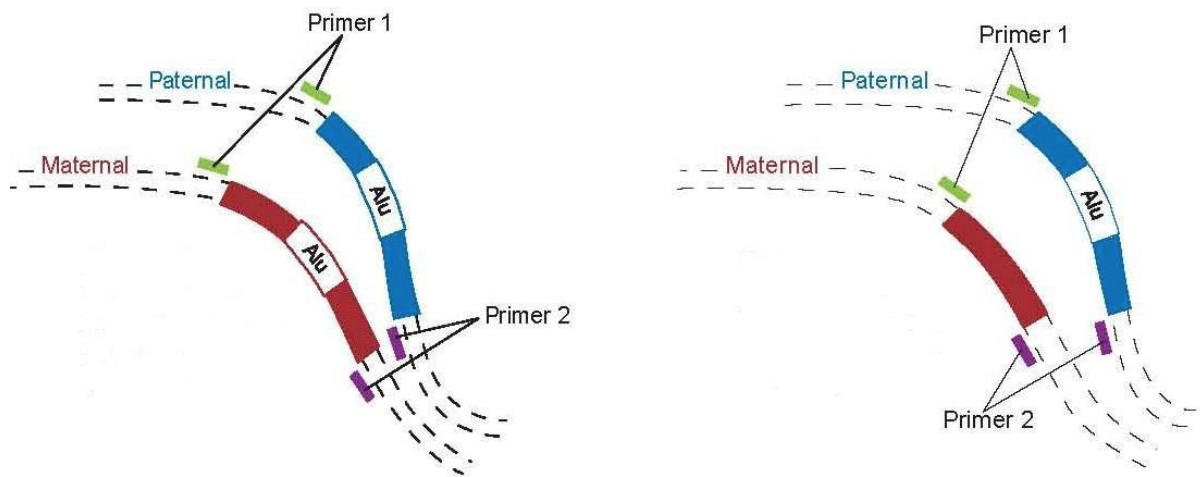


Figura 1-4: Análisis de PCR de diferentes individuos para el estudio de la inserción ALU en el intrón 8 del gen activador del plasminógeno tisular (TPA).

Se utiliza un gel de agarosa 2.5 % que se tiñe con el DanaBlue de DanaGen-Bioted para la detección de los productos de la PCR amplificados utilizando ADN genómico de diferentes individuos y utilizando los primers PLAT.A y PLAT.B.

Marker: DanaMarker Shuman, contiene 11 bandas de 1.250 pb hasta 100 pb

Homocigotos para el alelo Alu(+) produce un fragmento de 570 pb. (pocillos 1 y 7)

Homocigotos para el alelo Alu(-) produce un fragmento de 260 pb. (pocillos 3 y 5)

Heterocigotos producen fragmentos para ambos tamaños 570 y 260pb (pocillos 2, 4 y 6).

En este último caso además se observa una ligera formación de bandas de heteroduplex que se forman por el anillamiento de cadenas de Alu(+) y Alu (-).

P4A: Ampliación de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa

Estudio de polimorfismos humanos ALU por PCR (BioTed, cod. PCR3)

Equipos y materiales de laboratorio

1. Microtubos estériles tipo Eppendorf de 0,2 mL y gradillas
2. Agitador magnético y barra de agitación.
3. Vortex
4. Microcentrífuga
6. Rotores de centrífuga para tubos de 1,5 mL y tubos Eppendorf de 1,5 mL
7. Juego de micropipetas (P10, P20, P200, P1000)
8. Puntas de pipeta con filtro libre de DNAsas
9. Termociclador (figura 6)
10. Rotulador indeleble

Reactivos necesarios

1. PCR-Alu Kit de BioTed. Contiene:
 - MIX PCR: Incluye cebadores [Forward (PlatA) y Reverse (PlatB)], 4 dNTPs, Polimerasa hot star y tampón específico (figura 5).
 - Control positivo heterocigoto Alu (+/-)
 - Tampón electroforesis 10X (2x50 mL). Tampón trabajo 1X: Añadir 450 mL agua
 - Agarosa 3 g
2. Agua mili-Q o destilada estéril.
3. Hielo picado

Muestra

DNA genómico de saliva o sangre (procedente de práctica 3)

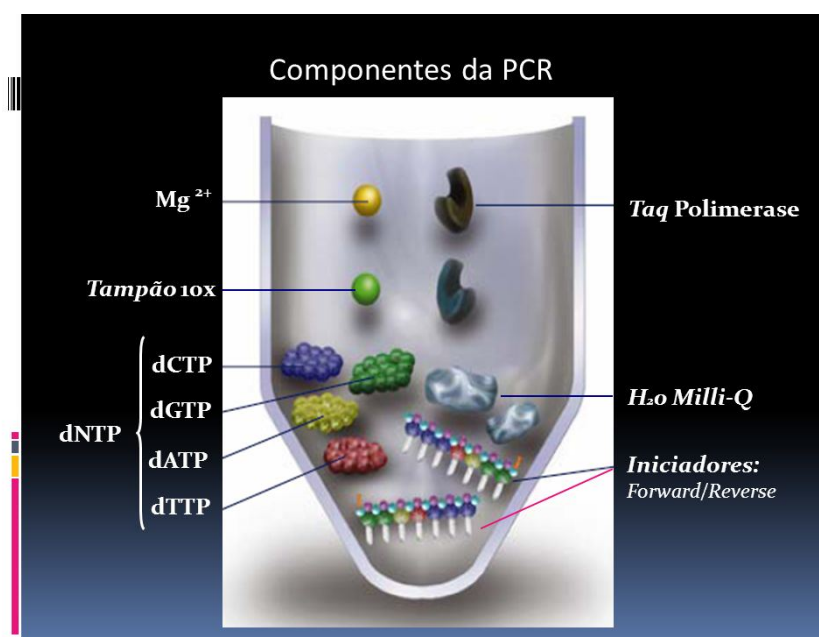
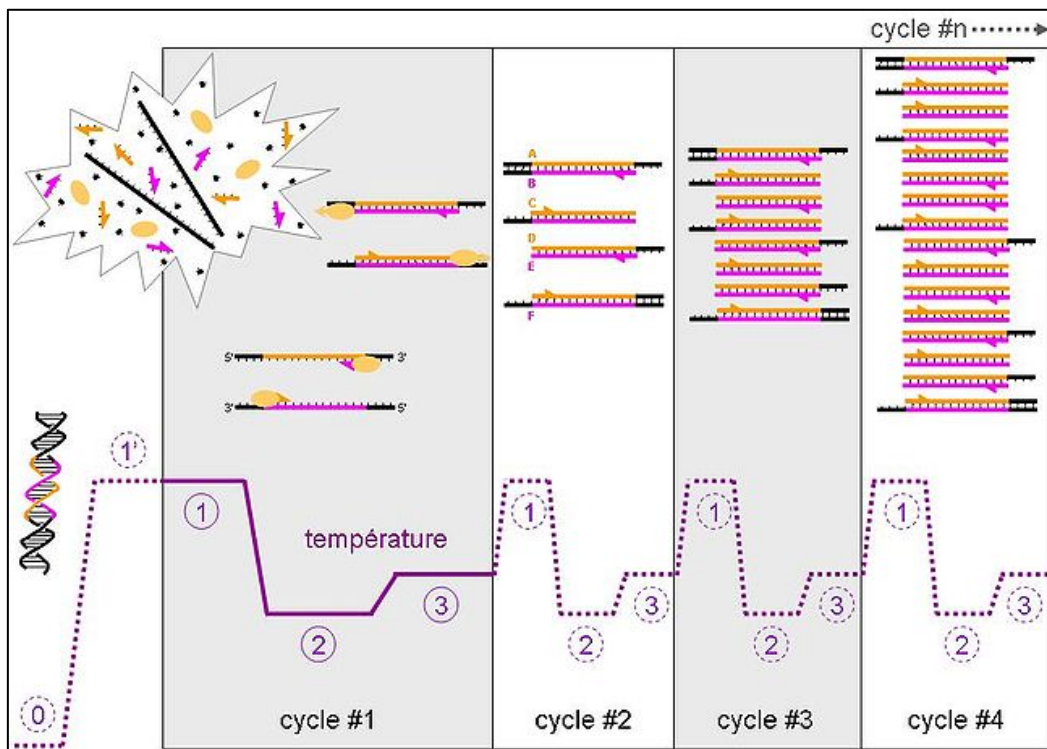


Figura 5. Mezcla maestra o master mix



Figuras 6-7: Termociclador (arriba) y ciclos de amplificación (abajo).

Protocolo [duración 2 h + 1,5 h (overnight)]

Muestra de DNA genómico

1. Descongelar la muestra de DNA de saliva o sangre extraída en la práctica 3. La concentración ideal de DNA a utilizar es de aprox. 50 ng/uL

Ojo: La muestra de DNA se debe guardar cuantificada y congelada a -20°C cuando no se utiliza inmediatamente después de su extracción.

Reacción de amplificación (PCR)

2. Preparar tantas reacciones de amplificación (volumen de reacción 25 μL) como muestras problema tengamos y añadir un control positivo y un control negativo siguiendo el ejemplo de la tabla (Ej. Si tenemos 10 muestras problema debemos añadir un control (+) y (-), en total 12 muestras).

Reactivo	1 Muestra	12 Muestras*
Master Mix (MMix): Tampón específico Cebador Forward Cebador Reverse dNTPs [A, C, G, T] Taq DNA Polimerasa	22,5 μL	270 μL
DNA muestra (100-250 ng)	2,5 μL	
Volumen de reacción	25,0 μL	

* Cuando la MMix se elabora en el laboratorio a partir de reactivos separados, primero se pipetea el volumen correspondiente de cada reactivo para el total de muestras y luego se divide la MMix en 12 tubos de PCR; 10 para problema y 2 para control (+) y (-)

3. Procedimiento a preparar en cada tubo de PCR sobre hielo picado: Primero coger **22,5 μL** de MMix y luego añadir **2,5 μL** de la muestra problema. Para el control (-) de amplificación se añaden **2,5 μL** de agua milli-Q libre de DNAsas y para control (+) de amplificación se añaden **2,5 μL** de la muestra Alu (+) del kit.

Ojo: Se debe utilizar siempre puntas con filtro y cambiar de punta por cada acción de pipeteo para evitar contaminaciones que pueden dar lugar a falsos positivos.

3. Mezclar bien la mezcla de reacción (MMix + muestra) con un vortex y un spin. El colorante rojo incluido en la polimerasa facilita ver este proceso.

4. Cuando los termocicladores no tienen calor en la tapa, se debe añadir 25 μL de aceite mineral para prevenir la evaporación de la mezcla de reacción.

Programación del termociclador y amplificación

5. Introducir en el termociclador el siguiente **programa Alu** de amplificación. La duración del programa es de 90 min incluidas las rampas de cambio de etapa.

Etapas		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial "HOT STAR"		95°C	10 min
Desnaturalización	35 ciclos PCR	95°C	30 seg
Annealing		65°C	30 seg
Extensión		72°C	45 seg
Extensión final		72°C	10 min
Final		4°C	∞

Ojo: La Taq DNA polimerasa Hot Star del kit viene inactiva y para activarla es necesario un tratamiento inicial de 95°C durante 10 min.

Ojo: Durante el periodo de amplificación se puede preparar el gel de electroforesis para analizar los productos de amplificación (ver apartado siguiente)

6. El producto de la amplificación PCR se puede cargar directamente en los pocillos del gel de agarosa ya que el colorante rojo actúa como tampón de carga al contener una sustancia que aumenta la densidad de la muestra.

P4B: Separación de ADN mediante electroforesis

La electroforesis es una técnica que permite separar moléculas con carga eléctrica en un soporte (ejemplo gel de agarosa) en función del tamaño sometidas a un campo eléctrico. El DNA tiene carga neta negativa y en un campo eléctrico migra hacia el lado positivo (rojo).

Equipos y materiales de laboratorio

1. Microtubos estériles tipo Eppendorf de 0,2 o 1,5 mL y gradillas
2. Agitador magnético y barra de agitación.
3. Vortex
4. Microcentrífuga
5. Rotores de centrífuga para tubos de 1,5 mL
6. Juego de micropipetas (P10, P20, P200)
7. Puntas de pipeta con filtro libre de DNAsas
8. Equipo de electroforesis
 - Cubeta de electroforesis con plataforma y peines
 - Fuente de electroforesis
 - Transiluminador (opcional dependiendo del sistema de visualización del DNA)
 - Gafas de protección de luz UV.
9. Balanza con espátulas y pesa sustancias
10. Microondas
11. Peachímetro.

Reactivos necesarios

1. ELECTROFORESIS Kit de Danagen (ELECKIT). Contiene:
 - Tabletas de agarosa
 - Tampón de gel TAE 50X (Ojo: este TAE es sólo para hacer el gel de agarosa)
 - Sistema de tinción de ácidos nucleicos GELSAFE
 - Tampón de carga de DNA.
- Ojo:** Para uso rutinario, como alternativa más económica al kit, se recomienda la compra de los diferentes componentes por separado.
2. Agua mili-Q o destilada estéril.
 3. Agarosa del laboratorio.
 4. Tampón de electroforesis 50X TAE (Tris-acetato-EDTA). El tampón de electroforesis de trabajo es 1X. Ver Molecular cloning.
 5. Colorante de DNA tipo GELSAFE o DanaBlue 0,1% (BioTed)
 6. Marcador de peso molecular dependiendo del fragmento a analizar
 7. Tampón de carga de DNA en pocillo de gel de agarosa
 8. Hielo picado

Muestra

DNA genómico (ej. procedente de práctica 3) o producto PCR

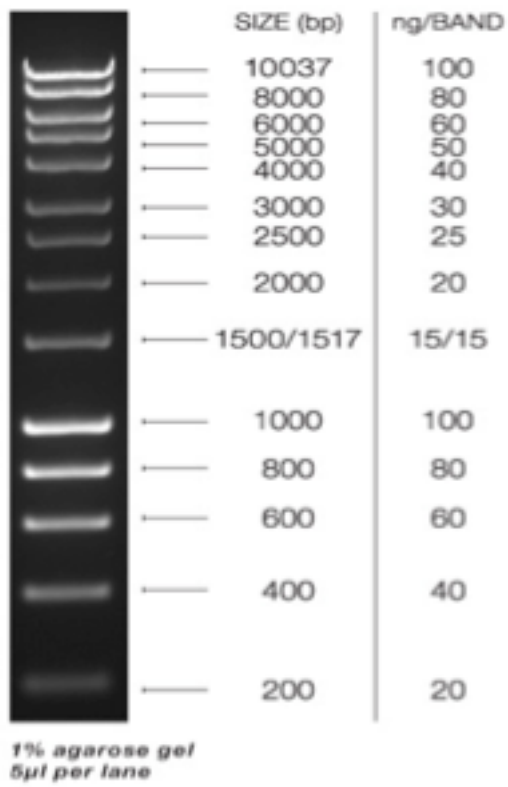


Figura x: Marcador de peso molecular

Protocolo (duración 2-3 horas)

Preparación del gel de agarosa

- 1.** Preparar geles de agarosa a una concentración del 1%: La cantidad de agarosa a pesar depende del volumen del gel. Ejemplo:
 - Maxigeles (120 mL): **1,2 g** de agarosa en 120 mL de tampón TAE 1X
 - Minigeles (40 mL): **0,4 g** de agarosa en 40 mL de tampón TAE 1X
- 2.** Añadir la agarosa al Erlenmeyer y se agita ligeramente la disolución con la mano. Se puede añadir un barra imantada y utilizar un agitador magnético.
- 3.** Llevar hacia ebullición en un microondas, procurando agitar de vez en cuando, para disolver la agarosa. Parar 3-5 min después de alcanzar la ebullición.
- 4.** Dejar enfriar hasta unos 60°C, añadir la sustancia seleccionada para visualizar el DNA y agitar ligeramente. En el caso de usar GELSAFE de Danagen usar la cantidad indicada en el folleto (aprox. 9 uL).
- 5.** Dejar enfriar hasta **50-60°C** a temperatura ambiente (TA) antes de verter en el plato de electroforesis.

Preparación del equipo y electroforesis

- 6.** Colocar el plato del gel sellado y con el peine deseado para hacer los pocillos (número, ancho y grosor de los pocillos) en una superficie plana. Comprobar que está nivelado con ayuda del nivel que incluye el equipo.
- 7.** Verter la solución de agarosa templada en el centro del plato evitando la formación de burbujas y dejar gelificar durante **30-60 min** a TA.
- 8.** Centrifugar brevemente (spin) las muestras de DNA o PCR y añadir **2 uL** de tampón de carga para incrementar la densidad de la muestra. Dependiendo del kit de PCR este paso puede ser evitado. Agitar brevemente (vortex) y spin.
- 9.** Introducir el gel de agarosa frío en la cubeta de electroforesis, retirar el peine y añadir el tampón de electroforesis (TAE) hasta cubrir **1 cm** por encima la superficie del gel. El volumen de TAE depende del volumen de la cubeta.
- 10.** Agitar con los dedos las muestras y cargarlas (25 uL PCR + 2 uL tampón de carga) en los pocillos con ayuda de una micropipeta y punta correspondiente. Utilizar una punta para cada muestra para evitar contaminaciones.

Ojo: La carga de muestra en los pocillos es submarina pues el gel ya está sumergido en el tampón de electroforesis. Para ello, verter la muestra sobre la pared lateral del pocillo y comprobar que la muestra queda depositada en el fondo del pocillo debido a la mayor densidad aportada por el tampón de carga.

11. Cargar el marcador de peso molecular en un pocillo lateral del gel reservado para este fin (comprobar sí el marcador viene con tampón de carga incluido; en caso contrario se debe añadir como a las muestras).

12. Realizar la separación electroforética a 80-100 voltios (V) durante **40-60 min** dependiendo del gel. Normalmente, para facilitar la entrada del DNA en la malla de agarosa, se empieza a mitad de voltios durante **5-10 min**.

Visualización de la separación electroforética

13. Dependiendo del sistema de visualización utilizado (colorante) la separación se puede ver directamente o con ayuda de un transiluminador con luz UV y las gafas protectoras.

Ojo: En ciertos casos, después de la separación, los geles se debe sumergir en una solución del sistema de visualización durante 10-20 min para favorecer ver con mayor nitidez las bandas.

14. Los geles se pueden fotografiar con cualquier dispositivo electrónico. La mejor solución es una cámara integrada en el transiluminador asociada con un programa informático para analizar los geles.

Tiempo estimado de la práctica 1 hora + 1 hora

Revisión de material y reactivos 15 min.

Preparación del gel de electroforesis aprox. 1 hora

Separación electroforética y visualización aprox. 1 hora

Ojo: Requiere tener preparado previamente algún material como TAE 50X o 1X (Ver Molecular cloning, A1, 17) y tampón de carga.

Tampón	Solución Stock / 1 litro	Solución de trabajo
TAE	50X	1X
	242 g de Tris base	40 mM Tris-acetato
	57,1 mL ácido acético glacial	
	100 mL de EDTA 0,5 M (pH=8,0)	1 mM EDTA