



**1. TÍTULO PRÁCTICA DE LABORATORIO:  
AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA-PCR (PRÁCTICA VIRTUAL)**

<b>Integrantes:</b>	<b>Código:</b>
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

**2. OBJETIVOS**

**General:**

Comprender los principios físico-químicos que permiten la amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa de manera virtual.

**Específicos:**

- Entender el fundamento básico y las aplicaciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Familiarizarse con el procedimiento metodológico que se emplea para la realizar una reacción en cadena de la polimerasa desde la virtualidad.

**3. REFERENTES CONCEPTUALES**

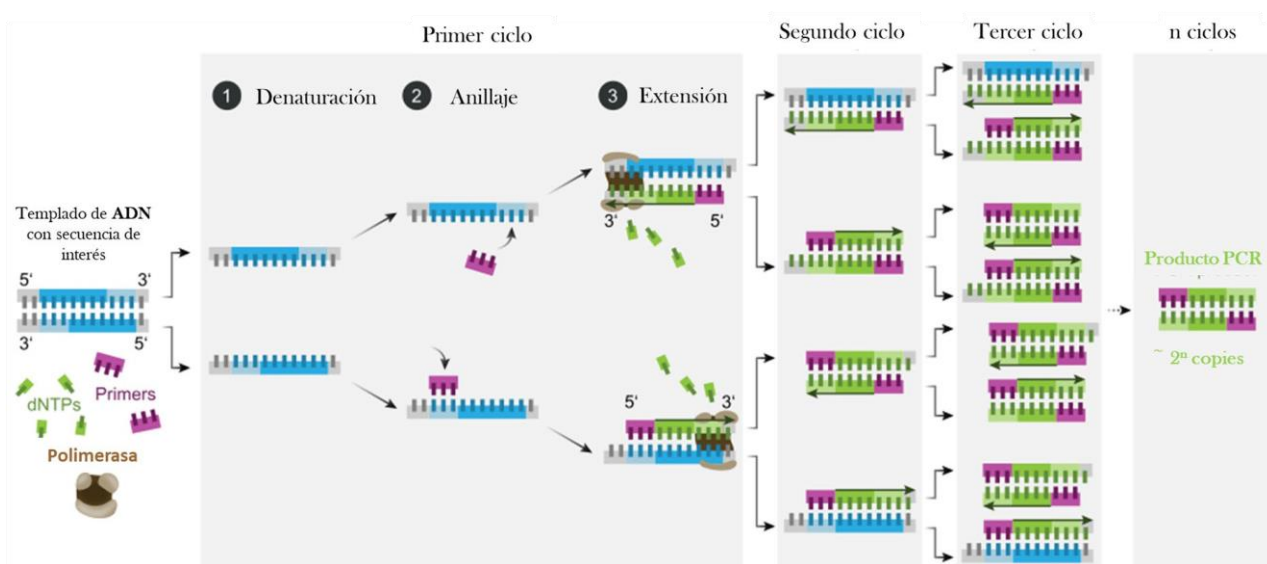
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés, Polymerase Chain Reaction) es una técnica ampliamente usada en biología molecular dado que permite producir millones de moléculas de ADN a partir de un ADN molde. Esta técnica fue desarrollada en 1987 y a partir de ese momento generó una revolución en cuanto a investigación en biología molecular. Dado que la PCR permite amplificar el número de moléculas de ADN, produciendo millones de moléculas a partir de unas pocas, sus aplicaciones son múltiples. La PCR suele emplearse para clonar genes de interés, realizar mutagénesis dirigida, identificación y detección de patógenos, entre otros. Esta técnica se fundamenta en la reacción de polimerización del ADN que realiza la enzima ADN polimerasa, de manera similar a como ocurre en el proceso de replicación del ADN<sup>1,2</sup>.

La PCR se basa en la repetición de tres etapas o fases llamadas: desnaturalización, anillamiento (o hibridización) y extensión (o elongación). Durante el desarrollo de la PCR la desnaturalización se realiza drásticamente sometiendo el ADN a altas temperaturas (cerca de



95°C). Con el fin de amplificar una región de interés se diseñan “primers” o cebadores, los cuales consisten en pequeños fragmentos de ADN que delimitan la región a ser amplificada. En la etapa de anillamiento se hibridizan los “primers” en cada una de las hebras de ADN. Esto se realiza bajando la temperatura de la reacción a valores que suelen oscilar entre 48°C y 65°C. Una vez se hibridizan los “primers”, ocurre el proceso de síntesis o extensión de la nueva cadena de ADN por medio de la polimerización del ADN. Para esto se suele emplear una ADN polimerasa aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, de ahí el nombre Taq polimerasa. La Taq polimerasa es estable a 95°C y su actividad óptima ocurre a 72°C, es por esto que la fase de extensión se realiza a 72°C<sup>2</sup>.

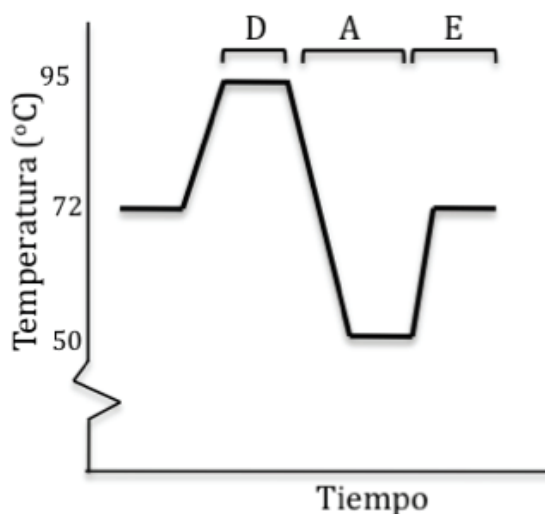
En la Figura 1 se pueden observar las distintas fases de la PCR y cómo ocurre la amplificación del ADN a medida que se repiten los ciclos de denaturación, anillamiento y extensión. Para amplificar una región de interés el investigador debe conocer la secuencia de nucleótidos correspondiente a la región que desea amplificar con el fin de diseñar “primers” específicos para esa región. Se requieren dos “primers” para realizar la amplificación de un fragmento, uno directo (también llamado “forward”) y otro reverso (“reverse”), los cuales se muestran en la Fig. 1 como barras de color morado. En el primer ciclo de la PCR, se denatura el ADN formando dos hebras de cadena sencilla o ssADN (denaturación), se hibridan los “primers” por complementariedad de bases (anillamiento) a partir de los cuales se elonga la nueva cadena de ADN (extensión). Al finalizar el primer ciclo se tienen dos moléculas de ADN sintetizadas a partir de una molécula de ADN molde. Este proceso se repite muchas veces de tal manera que después de 25 ciclos se obtienen aproximadamente 33 millones de moléculas nuevas de ADN sintetizado<sup>1,3</sup>.



**Figura 1.** Representación esquemática del proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Tomado y modificado de [https://es.qaz.wiki/wiki/Polymerase\\_chain\\_reaction](https://es.qaz.wiki/wiki/Polymerase_chain_reaction).



La desnaturalización (D) de las dos cadenas de ADN se lleva a cabo a una temperatura elevada (cerca de 95 °C), con una duración típica de 15-40 segundos (según el tamaño del ADN). A continuación, la hibridación o annealing (A) de los “primers” se realiza normalmente entre 40 y 65 °C por 30 segundos (según los “primers”). Por último, se lleva a cabo la reacción de elongación (E) catalizada por la ADN polimerasa cuya temperatura optima es de 72 °C, con un tiempo de duración dependiente del tamaño del fragmento de ADN que se desea amplificar, así por cada 1 Kb se programa 1 minuto de elongación (Figura 2).



**Figura 2.** Representación de los cambios de temperatura que ocurren durante la PCR. Se evidencian los procesos de desnaturalización (D), hibridación o anillamiento de “primers” (A) y elongación (E). Tomado de López et al, 2011.

A nivel experimental, la PCR inicia con la preparación de la pre-mezcla que contiene todos los factores necesarios (Agua libre de nucleasas, Buffer, Taq polimerasa, Cloruro de magnesio, dNTPs y el set de primers) (tabla 1). Una vez hecha la pre-mezcla se adiciona el ADN y se lleva al termociclador donde se programa para llevar a cabo la amplificación de ADN del fragmento de interés.

Reactivo	Concentración stock	Concentración final	Volumen para 50 µl de reacción
H <sub>2</sub> O desionizada y estéril		-----	Variable
Buffer PCR	10 X	1 X	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM	5 µl
dNTPs	20 mM	0,2 mM	0,5 µl
Primer forward	10 mM	0,1 mM	0,5 µl
Primer reverse	10 mM	0,1 mM	0,5 µl
Taq ADN polimerasa			0,3 µl
ADN			5 µl

**Tabla 1.** Preparación de la pre-mezcla para la reacción de PCR. Tomado de López et al, 2011.



#### **4. ACTIVIDADES PREVIAS (revise al final de la guía el formato para el desarrollo de estas actividades en el informe de la práctica)**

##### 4.1. Resuelva las siguientes preguntas:

- ✓ Investigue que son “primers” o cebadores y su utilidad para el desarrollo de la PCR.
- ✓ En el contexto de la PCR ¿qué es temperatura melting? y ¿qué es temperatura de anillaje?
- ✓ Mencione que características deben cumplir los primers para una PCR exitosa.
- ✓ Investigue cuáles son los principales inhibidores de la PCR.
- ✓ Compare las diferentes polimerasas que se usan en la PCR (ejemplo: Polimerasa de alta fidelidad, Hot start y baja fidelidad entre otras).
- ✓ ¿Cuál es el principal cofactor de la enzima polimerasa y cómo ayuda en el proceso de polimerización?

#### **5. PROCEDIMIENTO VIRTUAL**

##### 5.1 Acceda al siguiente link

<https://www.biointeractive.org/classroom-resources/bacterial-identification-virtual-lab>.

Una vez allí de click en Launch Interactive y siga cada uno de los pasos mencionados en la simulación.

#### **6. BIBLIOGRAFÍA**

1. Lodish et al. 2016. 8 Ed. *Molecular Cell biology*. W. H. Freeman & Co.
2. López, C. (Editor). *Fundamentos y técnicas básicas en biología molecular*. Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá). Facultad de Ciencias. 2011. Editorial Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. ISBN 978-958-761-031-4.
3. Sambrook, J.; Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. NewYork, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

#### **7. GUÍA PARA LA REALIZACIÓN DEL INFORME DE LABORATORIO**

- A continuación encontrará el formato para realizar el informe.



## INFORME DE PRÁCTICA DE LABORATORIO

### 1. TÍTULO PRÁCTICA DE LABORATORIO: AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA-PCR

**Integrantes:**

**Código:**

---

---

---

---

---

---

### 1. DISCUSIÓN DE RESULTADOS (valor 3,0)

1.1. Desarrolle aquí las preguntas del numeral 4 de la guía (actividades previas).

1.2. De acuerdo a la práctica de simulación conteste:

Elabore un flujograma que muestre los pasos necesarios para la identificación de bacterias utilizando como herramienta la PCR.

Describa las temperaturas que se utilizan en el proceso de amplificación y mencione con sus propias palabras cuál es la función de cada una de estas.

### 3. CONCLUSIONES (valor 1,5)

Redacte una conclusión en la que establezca en qué otros escenarios médicos se utiliza la PCR

### 4. BIBLIOGRAFÍA (valor 0,5)

Ingrese la lista de referencias utilizadas para la resolución del informe. Cite de acuerdo con la norma Vancouver.