

44. Amplificación de DNA mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Gabriel Dorado Pérez

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales,
Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba*

RESUMEN

Las técnicas de biología molecular están basadas en la manipulación y detección de gran número de moléculas. Dicho con otras palabras, la tecnología actual no permite, en general, el estudio de moléculas aisladas o únicas. Es por ello que uno de los pasos de los proyectos de biología molecular consiste en la amplificación de secuencias de DNA. La PCR puede sustituir a la clonación in vivo clásica en muchos casos, siendo en otros un aliado esencial para simplificar el proceso e incrementar la probabilidad de éxito. La historia del desarrollo de la PCR es ciertamente curiosa. La técnica tuvo tanto impacto en el mundo científico, que en 1993 le fue concedido el Premio Nobel de Química a su inventor “oficial”, Kary B. Mullis, quien describió el proceso en 1985 y 1988. Sin embargo, catorce años antes (1971 y 1974), el Dr. Molineux, del grupo de Khorana, describió la misma técnica con exquisito detalle, aunque, lamentablemente, consideraron que dicha metodología no era funcional. Desde su “redescubrimiento oficial” en 1985, la PCR se ha consolidado como la técnica clave de la biología molecular actual.

Palabras clave: amplicón, amplificación exponencial, amplificación logarítmica, cebador, enzima termoestable, iniciador.

Abreviaturas empleadas. DNA: ácido desoxirribonucleico; BrEt: bromuro de etidio; LB: medio rico Luria-Bertani; Na₂-EDTA: sal disódica del ácido etilén diamino tetra-acético; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; TAE: solución amortiguadora Tris-Acético-EDTA; TBE: solución amortiguadora Tris-Bórico-EDTA.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las técnicas de biología molecular están basadas en la manipulación y detección de gran número de moléculas. Dicho con otras palabras, la tecnología actual no permite, en general, el estudio de moléculas aisladas o únicas. Es por ello que uno de los pasos de los proyectos de biología molecular consiste en la amplificación de secuencias de DNA.

Tradicionalmente, la amplificación del DNA se ha realizado in vivo, mediante un proceso conocido de forma genérica como clonación. Ésta abarca la manipulación del DNA, la transformación de células con dicho DNA recombinante y la replicación del DNA huésped en las células hospedadoras hasta alcanzar un número suficiente que permita su estudio por las técnicas

clásicas de biología molecular. La clonación clásica in vivo será abordada en otras prácticas.

El inconveniente fundamental de la tecnología clásica de clonación in vivo estriba en que suele ser un proceso muy laborioso. Hasta hace poco, un proyecto de clonación clásica in vivo solía requerir el trabajo correspondiente a una Tesis Doctoral (unos cuatro años y un investigador dedicado). Por suerte, esta tecnología se ha visto simplificada muy significativamente con el advenimiento de la amplificación de DNA mediante la llamada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR; del inglés, "*Polymerase Chain Reaction*"). Podemos considerar la PCR como una clonación in vitro, en el sentido de que podemos amplificar en un tubo de ensayo una secuencia de DNA determinada millones de veces y además en un tiempo mínimo de horas o incluso minutos. La PCR puede sustituir a la clonación in vivo clásica en muchos casos, siendo en otros un aliado esencial para simplificar el proceso e incrementar la probabilidad de éxito. En este capítulo se describirá y analizará la PCR.

3. INVENCION DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN IN VITRO MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La historia del desarrollo de la PCR es ciertamente curiosa. La técnica tuvo tanto impacto en el mundo científico (ver aplicaciones más abajo), que en 1993 le fue concedido el Premio Nobel de Química a su inventor "oficial", Kary B. Mullis, quien describió el proceso en 1985 y 1988. Sin embargo, catorce años antes (1971 y 1974), el Dr. Molineux, del grupo de Khorana, describió la misma técnica con exquisito detalle, aunque, lamentablemente, consideraron que dicha metodología no era funcional (!).

Desde su "redescubrimiento oficial" en 1985, la PCR se ha consolidado como la técnica clave de la biología molecular actual, como lo demuestra el número creciente de trabajos científicos que la utilizan.

4. DESCRIPCIÓN DE LA PCR

La amplificación in vitro del DNA se logra en tres pasos básicos:

a).-Desnaturalización del DNA a copiar (molde o diana). Ello se consigue incrementando la temperatura para separar las dos cadenas que componen la doble hélice del DNA.

b).-Hibridación o apareamiento de los cebadores u oligos al DNA molde. Para ello se baja la temperatura de reacción, de forma que pequeñas secuencias de DNA de cadena sencilla (típicamente, entre 10 y 30 bases o meros) se unan a sus secuencias complementarias del DNA diana. Cada uno de ellos se une a una de las cadenas del DNA diana, de forma que sus extremos 3'-OH apuntan el uno hacia el otro, delimitando la secuencia a amplificar.

c).-Copia de las cadenas delimitadas por los cebadores. Se consigue elevando la temperatura de la reacción a la óptima de la polimerasa de DNA

utilizada. Cada uno de los extremos 3'-OH de los oligos apareados a las cadenas directa y reversa serán extendidos, generándose las cadenas hijas correspondientes. El resultado son dos hélices completas Watson & Crick en la región delimitada por los oligos. Dicho de otra forma, se duplica el número inicial de moléculas de DNA.

Estos tres pasos de desnaturalización, hibridación y polimerización se repiten "*n*" veces, duplicándose en cada ciclo el número de cadenas delimitadas por los oligos. Se trata, pues, de una amplificación exponencial o logarítmica, en que las cadenas previamente sinterizadas pueden servir de molde a futuras amplificaciones. Por tanto, y mientras los reactivos no se agoten, el número de moléculas amplificadas responde a la siguiente fórmula:

Número de moléculas finales por cada molécula inicial = 2^n

siendo "*n*" el número de ciclos. Ello significa que 20 ciclos generarían 106 moléculas; 30 ciclos producirían 109 moléculas. Una PCR típica amplifica de 106 a 106 veces.

Inicialmente (1971, 1974 y a partir de 1985), la PCR se realizaba con el fragmento *Klenow* de *Escherichia coli*, que es una DNA polimerasa termolábil. Ello significa que había que añadir enzima después de cada paso de desnaturalización (94°C), ya que dicha temperatura inactiva a *Klenow*. Posteriormente (1988), la técnica se optimizó con la introducción de una DNA polimerasa termoestable aislada de *Thermus aquaticus*, y conocida comercialmente como *Taq* (nativa) y *AmpliTaq* (modificada por ingeniería genética) de Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA). Otras muchas DNA polimerasas termoestables han sido posteriormente aisladas y modificadas por ingeniería genética para determinadas aplicaciones. Entre ellas cabe destacar (algunas de ellas se explican con más detenimiento a lo largo de esta sesión):

- La *AmpliTaq Gold*, que usaremos en esta sesión. Representa un "arranque en caliente" (del inglés, "*hot start*") automático, incrementando la especificidad y rendimiento de la reacción.

- El fragmento *Stoffel* (Perkin-Elmer) para tipaje por RAPDs, porque genera fragmentos polimórficos de forma generosa y consistente.

- La *Pfu* de Stratagene (La Jolla, CA, USA), por ser la más fiel.

- La *AmpliTaqFS* (PerkinElmer), por sus mejores resultados en secuenciación.

- La *ExTaq* de Panvera (Madison, WI, USA), por generar los productos más largos.

Se espera que en los próximos años salgan al mercado un abanico mucho mayor de polimerasas de DNA termoestables, para su uso en las diferentes aplicaciones de la PCR.

Por otra parte, en un principio, los procesos de desnaturalización, hibridación y polimerización se realizaban moviendo manualmente los tubos de reacción de un baño a otro. Por suerte, actualmente existen máquinas termocicladoras programables que simplifican el proceso.

5. APLICACIONES DE LA PCR

La PCR es una técnica tan poderosa y versátil, que prácticamente está resultando imprescindible en todas aquellas disciplinas que tienen que ver con las ciencias de la vida. Así, se emplea:

a).-En biología molecular para amplificar secuencias de DNA que luego son fácilmente clonadas y/o secuenciadas. Asimismo, tiene otras múltiples y muy interesantes aplicaciones. Por ejemplo, para generar mutaciones aleatorias o dirigidas (del inglés, "*site-directed mutagenesis*"); identificar genes expresados de forma diferencial (del inglés, "*differential display PCR*"); rastrear rápida y eficientemente bibliotecas génicas o de cDNA; construcción de bibliotecas sustractivas de cDNA (del inglés, "*subtractive cDNA libraries*"); secuenciar mediante secuenciación cíclica (del inglés, "*cycle sequencing*"); etc.

b).-En biotecnología, para la identificación rápida y temprana de animales y plantas transgénicos.

c).-En genética general, de poblaciones y evolutiva, se emplea para cartografiar genes mediante estudios de ligamiento. Asimismo, para amplificar y detectar diferentes genotipos y estudiar su evolución dentro de las poblaciones.

d).-En mejora de plantas y animales. Cabe destacar las técnicas de RFLPs (del inglés, "*Restriction Fragment Length Polymorphisms*"), RAPDs (del inglés, "*Randomly Amplified Polymorphic DNAs*"), SSRs (del inglés, "*Simple Sequence Repeats*"), y —la más poderosa— AFLPs (del inglés, "*Amplified Fragment Polymorphism*"). Todas ellas generan, por diversos métodos, bandas de DNA que son resueltas mediante electroforesis en gel, dando origen a patrones denominados "huellas digitales" (del inglés, "*fingerprints*"). De este modo pueden distinguirse especies, variedades e incluso individuos (ver más adelante). Estos patrones pueden asociarse con características interesantes para el mejorador.

e).-En espectrometría mutacional, toxicología y tratamiento del cáncer, para amplificar y detectar mutaciones y translocaciones cromosómicas.

f).-En salud pública humana y veterinaria, para la detección de gérmenes en aguas, suelo, alimentos, plantas, animales, etc.

g).-En medicina resulta muy valiosa para el diagnóstico precoz de enfermedades infecciosas como el SIDA, el sexo antes del nacimiento, o la posible existencia de enfermedades hereditarias en el embrión o adultos.

h).-En microbiología, botánica y zoología, para la identificación de microorganismos, plantas y animales, ya que usando los cebadores apropiados pueden amplificarse secuencias específicas que generan patrones de bandas típicos de cada especie e incluso de cada individuo (fingerprinting). A tal fin se usan rRNAs, microsatélites (VNTR; del inglés, "*Variable Number of Tandem Repeats*") y secuencias HLA y Alu en humanos.

i).-Por el motivo anterior, en medicina forense y lucha contra el crimen y determinación precisa de la paternidad, ya que a partir de un pelo, un espermatozoide o restos de huesos es posible inculpar o exonerar a un presunto asesino o violador. Asimismo, pueden identificarse restos humanos y asignar o descartar presuntas paternidades, prácticamente con total certeza. Por este motivo, es una prueba aceptada por los juzgados. La PCR se ha usado en Japón para condenar a una empresa que, ilegalmente, estaba añadiendo carne de ballena a sus preparados de alimentos para animales domésticos. La amplificación de secuencias específicas de rRNA de esta ballena a partir del contenido de las latas de alimentos reveló su presencia e incluso su porcentaje.

j).-En antropología y geología, pues por sorprendente que parezca, se ha amplificado DNA de restos humanos momificados del faraón Tutankamon (hace 3.000 años), así como DNA de hojas fósiles de magnolia procedente del Mioceno (hace 18 millones de años) e incluso DNA de huesos fósiles del dinosaurio carnívoro *Tyrannosaurus rex*, que vivió en el Jurásico (hace 70 millones de años). La edad del DNA de magnolia fósil, determinada mediante técnicas que miden la evolución molecular (comparando las diferencias entre dicha secuencia y la de las magnolias actuales), ha sido confirmada por la datación geológica de los estratos donde se encontraron las hojas fósiles.

6. VARIANTES DE LA PCR

En una PCR clásica, se amplifica exponencialmente el DNA diana a partir de dos cebadores que delimitan la secuencia a copiar (siguiendo el proceso descrito anteriormente). Es lo que se denomina una amplificación simétrica exponencial o logarítmica. Existen, sin embargo, otras variantes que pueden no ser mutuamente excluyentes:

a).-Amplificación con inicio o arranque en caliente. Esta técnica (del inglés, “*hot start*”) consiste en comenzar la reacción cuando y sólo cuando la temperatura de la mezcla es suficientemente alta, de forma que no se produzcan hibridaciones —y por consiguiente amplificaciones— inespecíficas. Ello se puede lograr de diferentes formas. Por ejemplo, precalentando el bloque antes de insertar en ellos los tubos (es poco eficiente por razones obvias); añadiendo la enzima tras la primera rampa de desnaturalización/hibridación: justo durante la primera etapa de polimerización (es incómodo y se presta a contaminaciones cruzadas); separando la reacción en dos fases mediante una capa de cera que se funde al alcanzarse la temperatura crítica (es incómodo); mediante el uso de anticuerpos termolábiles que inactivan inicialmente a la polimerasa (cómodo pero caro); y, —de forma cómoda y mucho más eficiente—, mediante una enzima inactiva que se activa con el calor, como es la *AmpliTaq Gold*. Otra de sus ventajas se explica a continuación.

b).-Amplificación mediante activación progresiva de la polimerasa. Esta tecnología (del inglés, “*time-release PCR*”) ha visto la luz con el desarrollo de la *AmpliTaq Gold* (Perkin-Elmer). Como se ha indicado, la enzima se va activando progresivamente con el calor; con cada ciclo de PCR. De esta forma, se optimiza la amplificación: al principio hay pocas copias diana para copiar y

también poca enzima activa; al final hay muchas copias diana y también mucha enzima activa. No sólo se consigue una mayor especificidad al inicio, sino también un mayor rendimiento al final.

c).-Amplificación con rampa decreciente de temperaturas. Esta técnica (del inglés, “*touch down*”) se base en comenzar la reacción de PCR a temperaturas altas, evitando así amplificaciones inespecíficas, para ir bajándola progresivamente una vez copiadas las primeras secuencias diana.

d).-Amplificación a partir de RNA (RT-PCR). En realidad, no se realiza la amplificación del RNA tal cual. Sería problemática por el uso de RNA (que es más lábil y sensible a las nucleasas que el DNA) y requeriría el empleo de RNA polimerasas. La estrategia seguida consiste en copiar el RNA en DNA primero (mediante una transcriptasa inversa como la *MuLV*), y luego realizar una amplificación del DNA (generalmente conocido como cDNA o DNA copia). Una técnica muy eficiente que explota la PCR para amplificar cDNAs prácticamente completos de eucariotas e incluso procariontes es el kit Marathon de Clontech (Palo alto, CA, USA). Puede incluso usarse una sola enzima para realizar ambas reacciones. Así, la polimerasa de DNA termoestable *Tth* (obtenida de *Thermus thermophilus*) es capaz de funcionar también como transcriptasa inversa en presencia de iones Mn^{2+} (p.ej., $MnCl_2$). Ello simplifica y optimiza el proceso de amplificación de DNA a partir de RNA.

e).-Amplificación asimétrica. Utiliza un solo cebador y por tanto sólo consigue una amplificación aritmética lineal (no logarítmica exponencial) de una sola de las hebras de la doble hélice. Se utiliza fundamentalmente para amplificar las reacciones de secuenciación y suele llamarse secuenciación cíclica. También se emplea para enriquecer una muestra de dsDNA (DNA de cadena doble; del inglés, “*double-stranded DNA*”) en ssDNA (DNA de cadena sencilla; del inglés, “*single-stranded DNA*”).

f).-Amplificaciones múltiples. Consiste en la coamplificación en el mismo tubo de diversas secuencias. De esta forma se consigue reducir muy significativamente el gasto de reactivos y tiempo invertido. Se han descrito amplificaciones múltiples de decenas de secuencias. El problema fundamental de esta variante es su puesta a punto, ya que es desesperadamente empírica, respondiendo a leyes no del todo conocidas. Así, al añadir o eliminar una pareja de cebadores de una PCR múltiple, se pueden alterar extraordinariamente los rendimientos previos del resto de secuencias amplificadas. Por ello, se recomienda hacer la optimización incluyendo desde el inicio todas las secuencias que se deseen coamplificar y utilizar kits especialmente diseñados que incorporan varios tampones, como el Multiplex PCR kit de MaximBiotech (San Francisco, CA, USA). Las amplificaciones sucesivas se realizan en aquella solución amortiguadora (“buffer”) que diera los mejores resultados de coamplificación.

g).-Amplificación cuantitativa y cuantificación de la expresión génica. Es muy útil para determinar la cantidad inicial de RNA, cDNA o DNA de una muestra. Esta técnica puede llegar a sustituir completamente e incluso mejorar la cuantificación de la expresión génica realizada clásicamente mediante técnicas de “*Northern*”. El problema es que una vez se llega a la fase de meseta, la PCR deja de ser lineal, por lo que habría que parar la reacción en su fase

exponencial; antes de llegar a la meseta. Por otra parte, la eficiencia de amplificación depende mucho de la pareja de oligos que se estén empleando y se rige por unas leyes no del todo conocidas. Se han desarrollado diferentes estrategias con el fin de soslayar estos problemas. Entre ellas cabe destacar la amplificación simultánea de secuencias competidoras que pueden ser similares a las secuencias problema (incluyendo una mutación que genera/destruye un sitio de restricción) o completamente diferentes (para evitar la formación de heterodúplexes competidor+problema). La precisión en la cuantificación incrementa muy significativamente si se emplean competidores con secuencias diferentes pero que estén flanqueados por los mismos oligos utilizados en la amplificación de las secuencias problema. La máquina ideal para llevar a cabo PCR cuantitativas es el "ABI PRISM 7700 Sequence Detection System" de Perkin-Elmer/AppliedBiosystems (Foster City, CA, USA). Esta máquina permite usar muestras que contengan sólo unas pocas o varios millones de secuencias diana, cuantifica la amplificación real de cDNA o DNA en tiempo real, permite llegar a la fase de meseta, y presenta un rango dinámico lineal de al menos cinco órdenes de magnitud, lo cual evita la necesidad de realizar diluciones sucesivas de las muestras.

h).-Amplificación de células y tejidos. Siempre y cuando no existan inhibidores, o éstos se anulen convenientemente, es posible realizar PCR a partir de células o tejidos, sin pasos previos de purificación de ácidos nucleicos. Ello acelera significativamente el proceso de PCR. Así se ha descrito la amplificación de DNA a partir de sangre o de bacterias.

i).-Amplificación in situ. Consiste en amplificar DNA o cDNA en la cámara formada por el portaobjetos y el cubreobjetos de una preparación, para su posterior visualización al microscopio óptico. Es una técnica muy poderosa ya que permite localizar el material amplificado en determinadas células, orgánulos celulares, e incluso cromosomas. Su gran inconveniente es que actualmente requiere un esfuerzo muy considerable de puesta a punto y optimización de los procesos de fijación del material, posterior amplificación y detección. Podemos asegurar que se cuentan con los dedos de la mano los laboratorios que consiguen reproducirla en todo el mundo. Se emplea fundamentalmente con tejidos animales. En el caso de las plantas, la situación es todavía más desfavorable, dada la barrera que supone la pared celular vegetal.

j).-Amplificación fiel. Es sabido que las DNA polimerasas empleadas rutinariamente en PCR carecen de actividad correctora 3'→5'. Por ello, su frecuencia de error suele ser elevada (típicamente de 1,25·10⁵ bases antes de error para la *Taq* o *AmpliTaq*). Cuando los productos amplificados van a ser visualizados en gel o secuenciados, esto no representa ningún problema. Las mutaciones no serán detectados, ya que estarán distribuidas por toda la secuencia y pasarán desapercibidas al poder de resolución del gel o la secuenciación. Sin embargo, cuando los productos de amplificación son clonados, existe la posibilidad de que una molécula mutada transforme al clon de bacterias que posteriormente se elija. Por ello, generalmente se recomienda secuenciar en ambos sentidos tres clones independientes y, si es posible, amplificar el DNA utilizando una DNA polimerasa con actividad correctora 3'→5'. La mejor del mercado actual es sin duda la *Pfu* de Stratagene, con una

fidelidad de 7'67·10⁵ bases antes de error; esto es, unas seis veces más fiel que la *Taq* o *AmpliTaq*.

k).-Amplificación de varias kilobases. Aunque una PCR típica optima amplifica secuencias de unas 500 bases, actualmente es posible copiar secuencias de hasta 50 kilobases. Para ello se emplean diferentes estrategias, siendo la más común el uso de mezclas de diferentes “aditivos” y DNA polimerasas (generalmente una con actividad correctora 3'—>5' y otra sin dicha actividad) como la *ExTaq* de Panvera, *TaqPlus* de Stratagene, *LA Taq* de TaKaRa (Otsu, Japón), *TaqExtender* de Boehringer–Mannheim (Mannheim, Alemania), *Advantage* de Clontech, etc.

l).-Amplificación de regiones difíciles. Por ejemplo, las secuencias ricas en GC y/o con estructuras secundarias pueden ser difíciles de amplificar mediante PCR. Para solucionarlo, se suelen incrementar las temperaturas y/o tiempos de desnaturalización. Asimismo, se suelen emplear aditivos, como por ejemplo el DMSO (dimetil sulfóxido).

m).-Amplificación capilar. Se realiza en tubos capilares de unos 2 a 10 microlitros, con lo cual se logra una relación superficie/volumen elevada. Ello permite tiempos mínimos de transferencia de calor, pudiéndose reducir una amplificación típica de cuatro horas a diez minutos. Puede realizarse con la máquina RapidCycler de IdahoTechnology (Idaho Falls, ID, USA).

n).-Amplificación en "chips". Está en fase experimental y consiste en amplificar en volúmenes microscópicos cantidades mínimas (nanolitros) de DNA, automatizando y abaratando todo el proceso en aplicaciones analíticas.

7. ESTRATEGIAS DE AMPLIFICACIÓN CUANDO LAS SECUENCIAS FLANQUEANTES NO SON TOTALMENTE CONOCIDAS

La PCR clásica amplifica una secuencia de DNA cuyos extremos (donde se unen los cebadores) son conocidos. No obstante, actualmente ya es posible amplificar en otras circunstancias menos favorables. Por ejemplo:

a).-La secuencia es conocida en otras especies. Pueden diseñarse cebadores degenerados en las regiones más conservadas que sirvan para realizar la amplificación.

b).-Se conoce la secuencia de aminoácidos del péptido codificado por la secuencia de DNA deseada. Pueden diseñarse cebadores degenerados que sirvan para realizar la amplificación. Del mismo modo, cuando se conoce la secuencia del péptido en otras especies, diseñándose los cebadores degenerados en las regiones más conservadas (ver apartado anterior).

c).-Sólo se conoce un flanco de secuencia del DNA o proteína de la especie problema o de otras especies. Es posible amplificar DNA cuando sólo se conoce uno de sus extremos, mediante diversas técnicas entre las que caben resaltar la unión de adaptadores (del inglés, “*linkers*”) o la PCR anclada (del inglés, “*anchored PCR*”), incluyendo la llamada PCR “angosta” (del inglés, “*panhandle PCR*”). Por otra parte, siempre es posible tratar de localizar el gen o

secuencia de interés hibridando una genoteca o biblioteca (del inglés, “library”) génica o de cDNA con la sonda apropiada. El(los) clon(es) positivos pueden secuenciarse para obtener datos más precisos de la secuencia, que pueden servir para diseñar nuevos oligos específicos para amplificar mediante PCR dicha secuencia.

8. FACTORES QUE AFECTAN LA EFICIENCIA DE LA PCR

Existen diversos factores que afectan la eficiencia de la PCR. Básicamente, cualquiera de los elementos que intervienen en una amplificación mediante PCR puede modular el resultado final. Veamos los más significativos:

a).-Termociclador. No todas las máquinas del mercado son igualmente eficientes a la hora de amplificar DNA. En principio, cada modelo requiere unas condiciones propias y una optimización empírica, dependiendo incluso de la secuencia que se desee amplificar y de la pureza del material empleado. Por ello, resulta ventajoso en general adquirir un equipo que esté soportado por protocolos y técnicas desarrolladas por la empresa fabricante. Entre los mejores se encuentran los de Perkin-Elmer. Dado que la optimización de la PCR es eminentemente empírica, disponer de unas buenas condiciones de partida puede acelerar días o incluso meses la optimización de la amplificación de una secuencia dada. Por supuesto, el uso de un termociclador capilar como el RapidCycler de IdahoTechnology requiere unos protocolos específicos que deberán seguirse consultando el manual del instrumento.

b).-Pureza del DNA. Las DNA polimerasas empleadas en PCR pueden ser inhibidas por diversas sustancias presentes en el material a amplificar. Éstas pueden derivar del organismo del que procede el DNA, o bien de los reactivos utilizados para su aislamiento. Por ello, puede ser aconsejable en determinados casos amplificar DNA a partir de células o tejidos, mientras que en otros casos es necesaria una purificación previa de los ácidos nucleicos. Curiosamente, incluso un exceso de DNA puede inhibir la reacción de PCR. Típicamente se emplean entre miles y cientos de miles de moléculas de DNA diana (idealmente, $>10^4$), lo cual suele representar unos cuantos ng de DNA (idealmente, $<1 \mu\text{g}$). O sea, el tamaño del DNA diana y su peso en la reacción deben estar en proporción directa; a menor tamaño, menos peso es necesario para tener el mismo número de moléculas. Por ello, conviene trabajar con relaciones molares en vez de relaciones de peso.

c).-Diseño de los oligos. El diseño de los cebadores de PCR es un paso crítico para facilitar el éxito de la misma. Los oligos deben tener una baja estabilidad en el pentámero 3'-OH ($\Delta G \geq 9,5 \text{ kcal/mol}$); no formar dímeros consigo mismos o con la pareja (sobre todo los que proporcionen un extremo 3'-OH libre apareado), no formar estructuras secundarias en horquilla consigo mismo (sobre todo las que generen un extremo 3'-OH libre apareado); tener temperaturas de fusión altas y parecidas (T_m , calculada con el algoritmo del vecino más próximo) para realizar, si es posible, PCRs de dos ciclos sólo (p.ej., 96°C y 72°C); tener un porcentaje GC/AT cercano al 50%; carecer de regiones homopoliméricas; ser específicos (no tener homología con secuencias no deseadas); y una longitud dependiente de su aplicación: en general, desde 10 meros (RAPDs) a 30 meros (aunque hay descritos oligos mayores, para

aplicaciones especiales, de 40 y 50 meros). Por otra parte, cuando se empleen oligos degenerados, el grado de degeneración debe ser (en la medida de lo posible) similar para ambos miembros de la pareja, y no muy elevado, aunque hay descritas amplificaciones con grados de degeneración de 75.000 y más. Obviamente, todas estas consideraciones han de seguirse en el caso de PCRs múltiples, complicando significativamente el diseño de los oligos. Por suerte, existen muy buenas aplicaciones informáticas para el diseño de oligos, destacando PrimerSelect (paquete LaserGene) de DNASTar (Madison, WI, USA) y Oligo de NationalBiosciences (Plymouth, MN, USA). No obstante, por ahora, el diseño de oligos requiere un importante optimización manual: sigue siendo un “arte”. Es decir, los programas existentes no son perfectos. Además programas diferentes, suelen dar resultados no siempre similares (!). El problema de base es que realmente no se conocen todas las leyes que rigen un proceso teóricamente tan simple como la hibridación de secuencias de ácidos nucleicos y su posterior extensión por una DNA polimerasa.

d).-Almacenamiento de los oligos. Se recomienda guardar los oligos disueltos en agua destilada estéril tipo milli-Q y congelados (solución de trabajo) o bien secos a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ (solución stock). Los oligos marcados con fluoróforos de Perkin-Elmer deben almacenarse siempre disueltos en TE pH 8 y congelados (solución de trabajo) o bien secos a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ (solución stock). En cualquier caso, se ha demostrado que la estabilidad sigue el siguiente orden: Rojo (Rox o Tamra) \geq Azul (6-Fam) \gg Amarillo (Hex) $\gg\gg$ Verde (Tet).

e).-DNA polimerasa termoestable. Dependiendo de la aplicación, deberá usarse una u otra. Por ejemplo, en general es recomendable la *AmpliTaq* Gold de Perkin-Elmer, para RAPDs el fragmento *Stoffel* de la misma empresa, en amplificaciones fieles la *Pfu* de Stratagene, y en amplificaciones de secuencias grandes (hasta 40 kb) la *ExTaq* de Panvera.

f) Cloruro de magnesio. El MgCl_2 es un cofactor necesario para la actividad enzimática de las DNA polimerasas. La concentración óptima de MgCl_2 debe determinarse empíricamente para cada polimerasa, secuencia y par de cebadores. Demasiado poco o mucho puede reducir la eficiencia de amplificación o generar productos inespecíficos, respectivamente. Además, hay que tener en cuenta que la concentración libre de magnesio en el tubo de reacción disminuye proporcionalmente con la de agentes quelantes como el EDTA. Los nucleótidos o el propio DNA también reducen el magnesio libre y éste debe ajustarse en paralelo con cambios significativos en dichas concentraciones. En general, se emplean concentraciones de 1 a 5 mM de MgCl_2 . De nuevo, la solución es empírica, probando diferentes concentraciones preparadas manualmente o utilizando kits comerciales producidos para este fin, como el PCR Optimizer kit de Invitrogen (San Diego, CA, USA) o el Opti-Prime PCR Optimization kit de Stratagene.

g).-Otros reactivos. Los demás reactivos (incluyendo el agua) deben ser de suficiente pureza y —sobre todo— carentes de inhibidores de la DNA polimerasa que se esté empleando en la amplificación. No es raro que una reacción de PCR deje de funcionar de repente, descubriéndose al cabo de meses que todo se arregla al cambiar el agua. O bien que los nucleótidos (dNTPs) utilizados se han degradado. Conviene guardar la solución madre de éstos a la menor temperatura posible (-80°C o inferior) y la solución de trabajo

en congelador estándar (-20°C). Puede conseguirse prolongar la vida útil de los nucleótidos empleando sal de litio (en vez de sal de sodio), como la suministrada por Boehringer-Mannheim.

h).-Perfil de los ciclos de amplificación. Aunque la PCR es un proceso eminentemente empírico, pueden seguirse algunas recomendaciones generales. El número de ciclos de PCR suele oscilar entre 25 y 40, dependiendo de la aplicación. En general 30 ciclos son suficientes, usándose 25 para reamplificar y 40 para amplificaciones complejas tipo RT-PCR y/o con oligos degenerados. Idealmente, y si la T_m de los oligos lo permite, la PCR debe realizarse en sólo dos etapas (p.ej., desnaturalización a 94°C e hibridación+polimerización a 72°C). Dependiendo de los perfiles (velocidad) del termociclador e inercia térmica del bloque y tubos empleados, la desnaturalización suele realizarse durante 15-60 segundos y la hibridación+polimerización durante 30-120 segundos (dependiendo también en este caso de la longitud del DNA diana a copiar y la actividad de la DNA polimerasa usada).

i).-Contaminaciones cruzadas. La gran ventaja de la PCR (amplificación exponencial rápida) puede ser también su principal inconveniente. Si no se toman medidas apropiadas, el DNA amplificado contaminará el laboratorio, de forma que tras uno o dos años de amplificaciones de la misma diana, acabará “amplificándose el agua”; esto es, muestras sin DNA añadido por el investigador. Para evitar estos problemas de contaminación cruzada (del inglés, “*carry over*”), existen diversos métodos. El más cómodo es el kit AmpErase® Uracil N-glycosilase de Perkin-Elmer. Usa dUTP en vez de dTTP para amplificar. Antes de realizar una amplificación, la mezcla de reacción se trata con una *uracil N-glicosilasa* termolábil, de forma que la glicosilasa eliminará las bases U de cualquier DNA contaminante, dejando un sitio apirimidínico, y por tanto inutilizando dicho DNA antes de que pueda ser amplificado. Otras opciones están basadas en seguir escrupulosamente una normativa estricta, consistente en usar sitios diferentes para preparar las muestras, para amplificar y para analizar el material amplificado. En estos lugares debe disponerse de lámparas de luz U.V., así como de juegos completos e independientes de pipetas. También es aconsejable usar puntas con filtro y una campana de flujo laminar (al menos para “alicuotar” o repartir los reactivos antes de preparar las reacciones de amplificación propiamente dichas).

9. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR

A continuación describiremos las mezclas de reacción y ciclos de PCR para los kits *AmpliTaq Gold* y *AmpliTaq* de Perkin-Elmer.

9.1. Mezcla de reacción (*AmpliTaq Gold* y *AmpliTaq*)

Nota: Una concentración típica de la solución de reacción para la DNA polimerasa *AmpliTaq* (Perkin-Elmer) es como sigue:

Tabla 1. Mezcla de reacción para amplificación por PCR (kit <i>AmpliTaq Gold</i> o <i>AmpliTaq</i>)	
Componentes	Volumen Final [Concentración Final]
Agua destilada milli-Q	66,5 µl (Hasta 100 µl)
“10X PCR Buffer II” [100 mM (=100 nmoles/µl) Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl (=500 nmoles/µl)]	10 µl [10 mM (=10 nmoles/µl = 1 µmol) Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM (=50 nmoles/µl = 5 µmoles) KCl]
MgCl ₂ [25 mM] = 25 nmoles/µl	10 µl [2,5 mM (=2,5 nmoles)]
10X dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) [10 mM de cada] = 10 nmoles/µl de cada	10 µl [1 mM (=1 nmoles) de cada]
100X Cebador 1 [100 µM] = 100 nmoles/µl	1 µl [1 µM (=1 nmol)]
100X Cebador 2 [100 µM] = 100 nmoles/µl	1 µl [1 µM (=1 nmol)]
“ <i>AmpliTaq Gold</i> o <i>AmpliTaq DNA Polymerase</i> ” [5 U/µl]	0,5 µl [2,5 U]
DNA molde (cromosoma de <i>Salmonella typhimurium</i>) [~25 ng/µl] = 2'5·10 ⁶ moléculas/µl	1 µl [2,5 ng (~2,5·10 ⁵ moléculas)]
Total	100 µl

Nota: Añadir los reactivos en el orden de la tabla, comenzando por el agua.

Nota: Se recomienda una [MgCl₂] libre de 1,0–4,0 mM. Como se ha indicado, si las muestras contienen EDTA u otros agentes quelantes, debe incrementarse la [MgCl₂] proporcionalmente. Asimismo, dicha concentración debe alterarse si se incrementan o disminuyen las [DNA] o las [dNTPs].

Nota: Mantener la [dNTPs] equilibrada. En caso contrario podrían introducirse mutaciones en el DNA copiado.

Nota: Mantener la [cebadores] equilibrada. En caso contrario podrían generarse más copias de una cadena que de la otra.

Nota: Se recomienda una concentración de cada cebador de 0,2–1,0 µM.

Nota: Se recomienda una concentración de DNA diana >10⁴ moléculas; pero < 1 µg de DNA.

Nota: Es aconsejable preparar una mezcla madre con los reactivos comunes, según se indica a continuación.

a).-Preparar la solución madre, según la tabla siguiente

Nota: Según el caso, la mezcla madre (puede o no contener los cebadores o el MgCl₂)

Componentes	Para 4 (x4,2)	Para 5 (x5,2)	Para 6 (x6,2)	Para 7 (x7,2)	Para 8 (x8,2)	Para 9 (x9,2)	Para 10 (x10,2)
Agua	279,3	345,8	412,3	478,8	545,3	611,8	678,3
10X PCR Buffer II"	42	52	62	72	82	92	102
MgCl ₂	42	52	62	72	82	92	102
10X dNTP	42	52	62	72	82	92	102
100X Cebador 1	4,2	5,2	6,2	7,2	8,2	9,2	10,2
100X Cebador 2	4,2	5,2	6,2	7,2	8,2	9,2	10,2
" <i>AmpliTaq</i>	2,1	2,6	3,1	3,6	4,1	4,6	5,1
DNA molde	—	—	—	—	—	—	—
Total (con DNA molde)	420	520	620	720	820	920	1020

Nota: Mezclar bien antes de usar.

b).-Añadir a razón de 100 – 1 = 99 µl por tubo de reacción de 0'5 ml.

c).-Añadir a cada tubo de reacción 1 µl de la solución de DNA diana.

d).-Añadir una gota (25 µl) de aceite o —mejor— cera fundida.

9.2. Ciclos de amplificación (*AmpliTaq* Gold o *AmpliTaq*)

Programar el ciclador térmico "DNA Thermal Cycler 480", según se indica a continuación:

Ciclador	Activación	Desnaturalización	Hibridación y Polimerización	Terminación	Espera
Ciclos	1 ciclo	30 ciclos		1 ciclo	°C ambiente
<i>AmpliTaq</i> Gold (programa 69)	94°C 10 min	94°C 1 min	72°C 2 min + Δ 9 seg/ciclo	72°C 5 min	
<i>AmpliTaq</i> (programa 70)	—				

Nota: la extensión de 9 segundos/ciclo no es esencial, pero puede mejorar el rendimiento.

a).-Añadir una gota de aceite por pocillo (en caso de que éstos estuvieran secos).

b).-Precalentar el bloque a 94°C.

Nota: el precalentamiento del bloque no es necesario en caso de usar la *AmpliTaq* Gold.

c).-Una vez acabada la PCR, retirar los tubos y almacenarlos a -20°C hasta su uso.

10. ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

a).-Analizar un 5% (5 μl) de los productos de reacción en gel de agarosa. Para ello añadir 5 μl de los productos amplificados a 5 μl de 2X Ficoll tipo II (según se detalla en la sesión 1).

Nota: en caso de que se hubiera usado aceite, eliminarlo por aspiración (trompa de agua) cuando la muestra está todavía congelada y pasar la muestra a un tubo nuevo. En el caso de haber usado cera, basta perforar la capa de ésta con una punta, expulsar el tapón de cera de la punta y coger la muestra por el agujero perforado.

b).-Fotografiar el resultado.

Nota: Para la preparación de un gel de agarosa, consultar la sesión 1. Para la visualización del DNA en dicho gel, consultar la sesión 2.

Como se describirá en otros capítulos, el DNA amplificado puede utilizado para detección “*Southern*”, puede ser purificado y clonado en *Escherichia coli*, aislado de las células hospedadoras transformada y, finalmente, secuenciado para determinar su identidad molecular..

5. BIBLIOGRAFÍA COMENTADA

- + Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds) (2005): “Current Protocols in Molecular Biology”. Vols 1 a 4. New York: Greene & John Wiley (New York). Manual de protocolos. “La nueva «Biblia» del Biólogo Molecular” actualizada trimestralmente. Clasificación: PROTOCOLOS.
- Dieffenbach, CW, Dveksler GS (eds) (2003): “PCR Primer. A Laboratory Manual”. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York). Pretende ser la “biblia de la PCR” como el Sambrook lo es de la biología molecular. PROTOCOLOS AVANZADO.
- + DNASTar, Inc. (2005): “LaserGene. Biocomputing Software for lthe Macintosh”. Versiones para los diferentes módulos actualizadas bimestralmente. Manual del paquete LaserGene para la búsqueda, edición y análisis de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas. El mejor paquete de biología molecular. Clasificación: SOFTWARE MANUAL.
- Erlich, HA (ed) (1989): “PCR technology. Principles and Applications for DNA Amplification”. Probablemente, el primer tratado sobre métodos relacionados con la PCR. Stockton Press: New York. PROTOCOLOS AVANZADO.
- Griffin, HG, Griffin, AM (eds) (1994): “PCR Technology. Current Innovations”. Boca Ratón: CRC Press. Diversos protocols sobre técnicas que explotan la PCR. PROTOCOLOS AVANZADO.

- Gu, J (ed) (1995): "In Situ Polymerase Chain Reaction And Related Technology". Eaton Publishing: Natick. Libro pionero sobre la PCR in situ. PROTOCOLOS AVANZADO.
- Innis, MA, Gelfand, DH, Sninsky, JJ, White, TJ (eds) (1990): "PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications". San Diego: Academic Press. Libro pionero sobre metodología de PCR. PROTOCOLOS AVANZADO.
- Kleppe, K, Ohstuka, E, Kleppe, R, Molineux, L, Khorana, HG (1971): Studies in polynucleotides XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. J Mol Biol 56:341–361. Primera descripción de la que casi quince años después sería llamada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Desgraciadamente, sus autores consideraron que esta técnica no era funcional. TEORÍA AVANZADO.
- McPherson, MJ, Quirke, P, Taylor R (eds) (1991): "PCR. A Practical Approach". Otro de los primeros libros de métodos para PCR. Oxford: Oxford University Press. PROTOCOLOS AVANZADO.
- Old RW, Primrose SB, Twyman RM, Old RW (2002): "Principles of Gene Manipulation". 6th edition. Blackwell (Oxford). Uno de los mejores libros sobre Ingeniería Genética. Nivel elevado. Didáctico y con excelente material gráfico. Recomendado para estudiantes y profesionales que quieran refrescar conceptos y ponerse al día en este campo. Clasificación: TEORÍA AVANZADO.
- Panet, A, Khorana, HG (1974): Studies on Polynucleotides. The linkage of deoxyribopolynucleotide templates to cellulose and its use in their replication. J Biol Chem 249:5213–5221. Segunda descripción de la que once años después sería llamada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Desgraciadamente, sus autores consideraron que esta técnica no era funcional. TEORÍA AVANZADO.
- + Rychlik W (1996): "Oligo. Primer Analysis Software for the Apple Macintosh Computers". Versión 5.0. Manual de la aplicación Oligo para diseño de cebadores para PCR, secuenciación e hibridación. Muy útil por sus algoritmos termodinámicos. Clasificación: SOFTWARE MANUAL.
- Rychlik W, Rhoads RE (1989): A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. Nucleic Acids Res 17:8543–8551. Discusión sobre los diferentes parámetros que afectan al diseño de oligos para hibridación, secuenciación y PCR. Clasificación: SOFTWARE ESPECÍFICO.
- Saiki, R K, Gelfand, DH, Stoffel, S, Scharf, SJ, Higuchi, R, Horn, GT, Mullis, KB, Erlich, HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487–491. Optimización y automatización de la técnica de PCR mediante el uso de una DNA polimerasa termoestable. TEORÍA ESPECÍFICO.
- Saiki, RK, Scharf, SJ, Faloona, F, Mullis, KB, Horn, GT, Erlich, HA, Arnheim, N (1985): Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia. Science 230:1350–1354. Descripción "oficial" de la amplificación de DNA mediante PCR. Supuso el Premio Nobel para su inventor, Karl Mullis. TEORÍA ESPECÍFICO.
- + Sambrook J, Russell D (2001): "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 3rd edition, Vols 1–3. New York: CSH Laboratory Press. Manual de protocolos. "La «Biblia» clásica del Biólogo Molecular". Clasificación: PROTOCOLOS.
- Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M (1992): "Recombinant DNA" New York: Freeman and Company. Divulgativo y a la vez con nivel y rigor

científico. Clásico sobre Ingeniería Genética y sus aplicaciones. Claro, didáctico y con numerosos esquemas e ilustraciones explicativas. Muy recomendable. Clasificación: TEORÍA DIVULGATIVO.

White, BA (ed) (1993): "PCR Protocols. Current Methods and Applications". Volume 15 of Methods in Molecular Biology. Totowa: Humana Press. Diversos protocolos para PCR. PROTOCOLOS AVANZADO.

Nota: las referencias fundamentales para la preparación de la sesión se indican con el símbolo "+".

AGRADECIMIENTOS

Proyecto PAFPU 'FORMAPROFE' ('UCO-N-031') de Formación del Profesorado Universitario, Junta de Andalucía.

ANEXO 1: MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

Pesar o añadir las cantidades o volúmenes que se indican en las tablas correspondientes del anexo, disolver en agua (en el caso de que se desee repartir en botes) y esterilizar en autoclave ("autoclavar") a 120°C y 1 bar (= 1 kg/cm²) de presión durante 20 minutos. Una vez esterilizados, los medios con agar pueden conservarse líquidos en una estufa a 63°C hasta su uso.

Normas para el manejo del autoclave: Comprobar que el autoclave tiene suficiente agua. En caso contrario, añadir agua destilada hasta la rejilla del fondo de la máquina. Asimismo, comprobar que las salidas de agua y de aire se encuentran cerradas. Si no se toman estas precauciones podría quemarse el autoclave. Una vez haya terminado el autoclave hay que esperar que baje la presión y la temperatura para abrirlo sin peligro.

ATENCIÓN: Como norma general, no se deben "autoclavar" soluciones concentradas de ácidos (clorhídrico, sulfúrico) o álcalis (NaOH). Como es obvio, estas soluciones son "estériles" per se. Además, pueden dañar la estructura de acero del autoclave. Tampoco se autoclavan soluciones concentradas de disolventes orgánicos (acetona, tolueno, éter, metanol, etanol, etc).

Generalmente las soluciones se preparan en botes de vidrio tipo Pyrex.

ATENCIÓN: Los álcalis como la sosa (NaOH) o la potasa (KOH) atacan al vidrio. En estos casos deberán usarse botes de plástico para su almacenamiento.

Medio rico Luria–Bertani

A continuación se indica la composición del medio rico de cultivo de *Escherichia coli*.

Tabla 4. Preparación de medio rico Luria–Bertani		
	Medio líquido	Medio sólido

	(g)	(g)
Bacto triptona	10	10
Extracto de levadura	5	5
CINa	10	10
Agar	—	15
Agua destilada	Hasta 1 litro	Hasta 1 litro

El medio rico líquido puede prepararse en botes Pyrex o en matraces erlenmeyer para cultivos (10 ml de medio rico en matraz de 100 ml). El medio sólido también se prepara en matraz de 100 ml, se deja enfriar un poco después de la esterilización (~63 °C) y se reparte a razón de 25 ml por caja de petri de 9 cm Ø. Por lo tanto, cada alumno preparará 10 ml de medio líquido y 25 ml de medio sólido.

Las cajas de medio rico, una vez haya solidificado el medio, se dejan boca abajo en la estufa a 37°C hasta el día siguiente (para secar el vapor condensado). El secado puede realizarse rápidamente colocando las cajas abiertas en una cabina estéril de flujo laminar durante una hora.

El medio rico líquido se almacena a temperatura ambiente. Las cajas de medio rico se guardan en bolsas cerradas a 4°C hasta su uso. El medio rico permanece estable durante meses.

Nota: No conviene añadir los agentes selectivos (en su caso) a las cajas con medio sólido que vayan a ser conservadas en frigorífico. Es mejor prepararlas sin dichos agentes (p.ej., antibióticos), y añadirlos en la superficie con un asa de siembra triangular justo antes de usarse. Así se asegura que el antibiótico no ha sido degradado.

Solución amortiguadora TBE

A continuación se indica la composición de la solución amortiguadora TBE para electroforesis.

Tabla 5. Solución amortiguadora 5X TBE		
	3,8 litros (g)	1 litro (g)
Tris base	212	55,8
Ácido bórico	160	42,1
Na ₂ -EDTA	18'6	4,9
Agua destilada	Hasta 3,8 litros	Hasta 1 litro

ATENCIÓN: La solución amortiguadora 10X TBE puede prepararse también, pero con el tiempo y las bajas temperaturas acaba por precipitar, siendo luego imposible volver a disolverlo. Por ello se recomienda preparar la máxima concentración como 5X TBE.

Solución amortiguadora TAE

A continuación se indica la composición de la solución amortiguadora TAE para electroforesis.

Tabla 6. Solución amortiguadora TAE		
	50X	1X
Tris base	242 g	4,84 g
Ácido acético glacial	57,1 ml	1,14 ml
Na ₂ -EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100 ml	2 ml
Agua destilada	Hasta 1 litro	Hasta 1 litro

Solución 20X Bromuro de etidio

A continuación se indica la composición de la solución de bromuro de etidio.

Tabla 7. Solución 20X Bromuro de etidio (10 mg/ml)		
	10 ml	1 ml
Bromuro de etidio	100 mg	10 mg
Agua destilada	Hasta 10 ml	Hasta 1 ml

ATENCIÓN: El BrEt es un mutágeno potente. NO es necesario esterilizarlo. NO se debe “autoclavar” por precaución. Deben seguirse escrupulosamente medidas estrictas de seguridad (guantes, mascarilla, campana extractora) en su preparación a fin de evitar la inhalación del polvo o su contacto con la piel. Una vez en solución es más fácil de manipular.

ATENCIÓN: El BrEt es sensible a la luz. Proteger la solución en bote envuelto por papel aluminio o —mejor— en bote con cristal ámbar.

Gel de agarosa (0,7%)

A continuación se indica la preparación de un gel de agarosa.

Tabla 8. Gel de agarosa (0,7%)			
	Agarosa (g) [Final] = 0,7%	1xTBE (o TAE) (ml)	EtBr (10 mg/ml) (μ l) [Final] = 0,5 μ g/ml
Gel grande (15 x 25 cm)	1,75	250	12,50
Gel mediano (15 x 10 cm)	0,70	100	5,00
Gel pequeño (7 x 10 cm)	0,28	40	2,00