

PCR gen 18S ARNr humano

Ref. PCR18S

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es introducir a los estudiantes en los principios y práctica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) mediante la amplificación de un fragmento del gen 18S rRNA humano utilizando para ello la técnica de la PCR.

No es necesario aislar el ADN de los alumnos, ya que se suministra una muestra de ADN genómico humano para llevar a cabo las amplificaciones.

2. INTRODUCCION

2.1 PCR

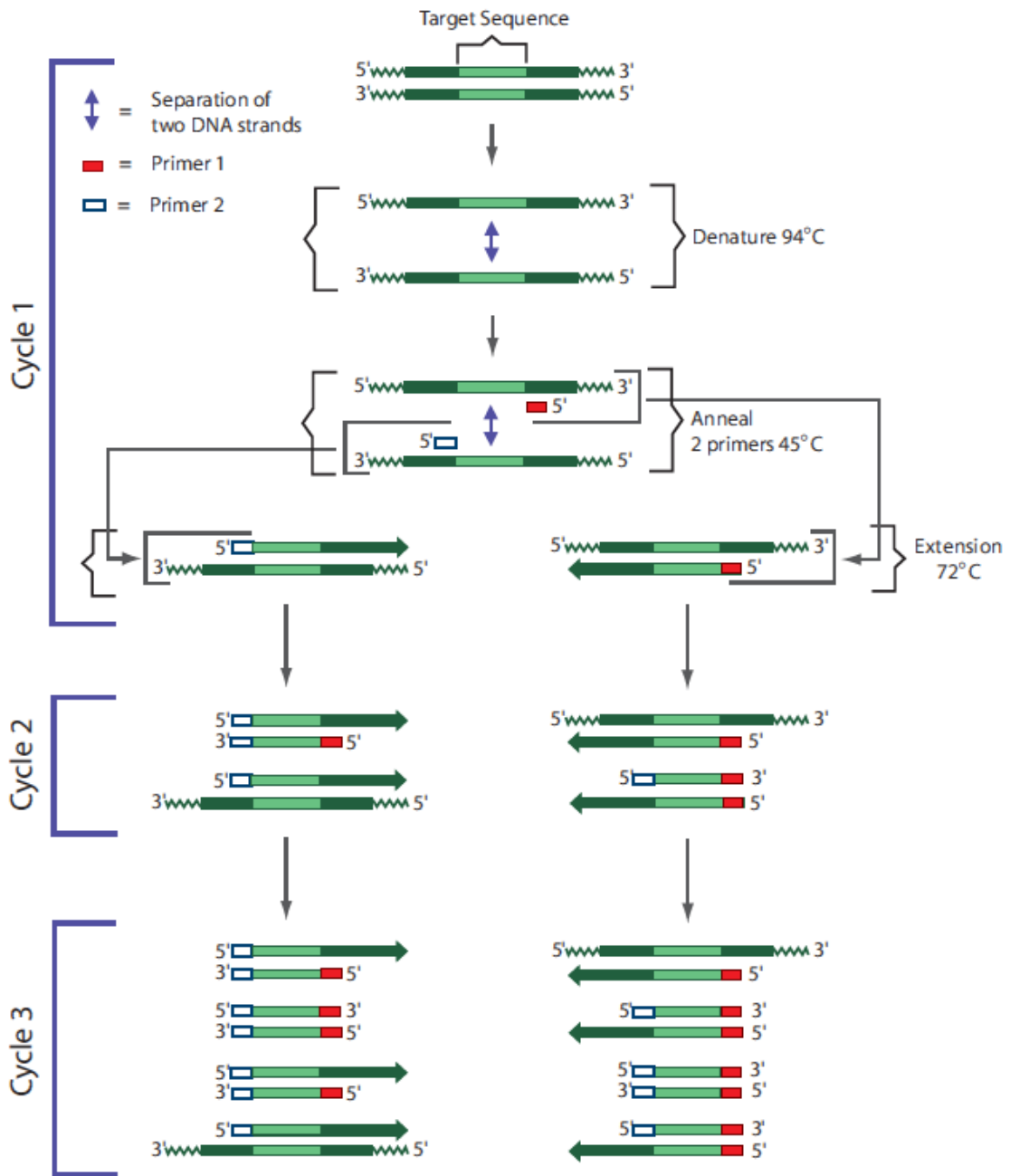
La PCR ha revolucionado la investigación y diagnóstico basado en la Biología Molecular. La PCR es un proceso simple, exacto y altamente reproducible que proporciona la ventaja de empezar con una pequeña cantidad de ADN y ser capaz de amplificarlo de forma que se tenga suficiente para realizar experimentos.

Se han desarrollado gran cantidad de test diagnósticos, también se ha utilizado en mapaje y secuenciación de ADN en proyectos de genoma y está siendo utilizado en determinaciones forenses, paternidades, diagnóstico clínico, etc.

En todos los casos se amplifican segmentos de ADN que posteriormente son sometidos a análisis y estudios varios.

En una reacción de PCR, el primer paso es la preparación de la muestra de ADN que es extraída de varias 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 y los 4 dNTPS en un tampón de reacción apropiado. El volumen total de reacción es de 25-50 μ l. En el primer paso de la reacción de PCR, las cadenas complementarias de ADN se separan (desnaturalizan) la una de la otra a 94°C, mientras que la Taq polimerasa permanece estable. En el segundo paso, conocido como emparejamiento, 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.



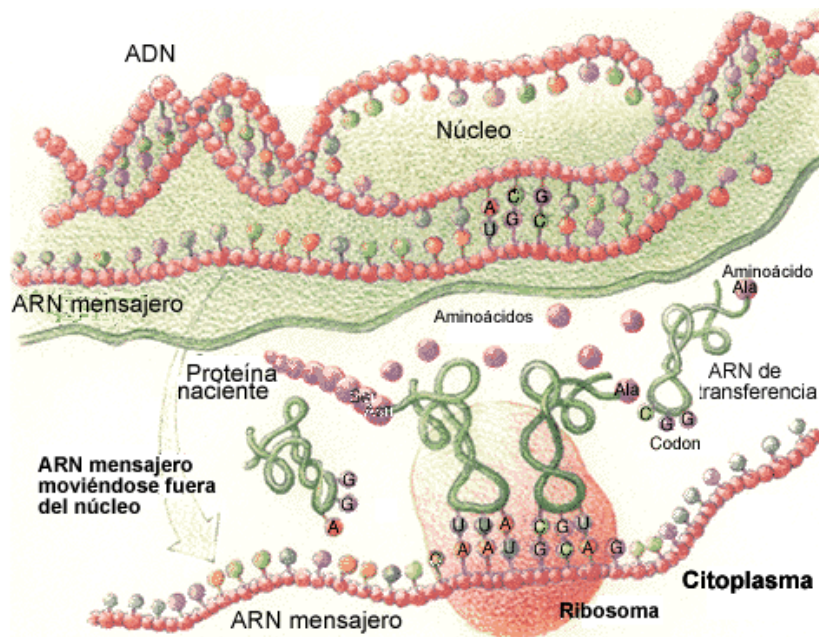
Estos tres pasos, desnaturalización-emparejamiento-extensión, constituye un ciclo de PCR. Este proceso se repite durante 20-40 ciclos amplificando la secuencia objeto exponencialmente. La PCR se lleva a cabo en un termociclador, un instrumento que es programado para un rápido calentamiento, enfriamiento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

2.2 ARN ribosómico 18S

El nucleolo es el lugar donde tiene lugar la transcripción y el procesamiento del ARNr y del ensamblaje de las pre-subunidades de los ribosomas, el nucleolo es pues la fábrica de producción de los ribosomas. Los ribosomas de las células eucariotas contienen cuatro diferentes moléculas de ARN ribosómico (ARNr): 28S, **18S**, 5,8S, y 5S. La subunidad mayor 60S del ribosoma contiene los RNA ribosómicos 28S, 5,8S y 5S, mientras que la subunidad menor 40S contiene el ARNr 18S. Las tres ARNr moléculas, 18S, 5,8S y 28S son sintetizadas en el nucleolo, mientras que el 5S ARNr es sintetizado por la ARN polimerasa III fuera del mismo en otra región del nucleoplasma. Los ARNr constituyen el 80 % de las moléculas de ARN encontradas en una célula eucariota.

Las células contienen múltiples copias de los genes para los ARNr para poder satisfacer la demanda de transcripción de elevado número de moléculas de ARNr que son necesarias para sintetizar los ribosomas. Por ejemplo, las células de mamífero en continuo crecimiento contienen 5 y 10 millones de ribosomas, que deben sintetizarse cada vez que la célula se divide. Las células contienen por ello múltiples copias de los genes ARNr. El genoma humano por ejemplo contiene aproximadamente unas doscientas copias del gen que codifica para los ARNr 28S, 18S, 5,8S dispuestas de manera secuencial (en tándem) con un ADN espaciador que no se transcribe separando cada unidad repetida en cinco cromosomas humanos diferentes (13,14,15,21,22) y aproximadamente 200 copias del gen que codifica para el ARNr 5S en el cromosoma 1.

Los ARNr nucleolares 18S, 5,8S y 28S son sintetizados (transcritos) por la ARN polimerasa I a partir de los genes (ADNr) que codifican los ARNr. Lo que permite que la transcripción se pueda visualizar fácilmente con microscopía electrónica, cada uno de los genes de ARNr están colocados en serie y se encuentran rodeado de ARN en crecimiento densamente empaquetados, (unidos a diferentes proteínas de procesamiento y ribosómicas) dando lugar a estructuras en forma típica de "árbol de navidad".

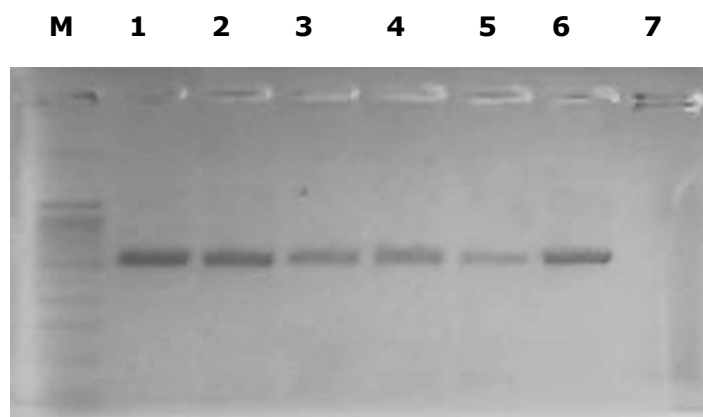


ARN mensajero	Actúa como molde y transporta la información para la síntesis de proteínas. Presenta codones, grupo de 3 nucleótidos.
ARN de transferencia	Transporta los aminoácidos hacia los ribosomas para la síntesis proteica. Se encuentra en el citoplasma y contiene anticodones.
ARN ribosómico	Se sitúa en el ribosoma, orgánulo donde se sintetizan las proteínas. Recibe la información genética y traduce las proteínas.
ARN heteronuclear	Es el precursor de los ARN.

Los ARNr maduros 5,8S, 18S y 28S y el ARNr 5S se combinan en el nucleolo con las proteínas ribosómicas (importadas desde el citoplasma) para formar las subunidades ribosomales pre-40S y pre-60S. Estas pre-subunidades son exportadas a través de los complejos del poro nucleares (NPCs) al citoplasma donde se termina la maduración.

Los genes que codifican para las diferentes proteínas ribosomales se transcriben fuera del nucleolo por la RNA polimerasa II, originando ARNm que son transportados a través de los NPCs al citoplasma donde son traducidos en proteínas ribosomales en los ribosomas citoplasmáticos. Las proteínas ribosomales son transportadas entonces de nuevo a través de los NPCs al nucleolo donde se ensamblan con los ARNr maduros para formar las partículas pre-ribosómicas.

Este kit permite la amplificación de un fragmento de 554 pares de bases del gen ARNr 18S.



Análisis de PCR de diferentes individuos para la amplificación del gen 18S rRNA humano.

Se utiliza un gel de agarosa 2 % 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.

Marker: DanaMarker Shumman.

Pocillo 1al 6: Amplificación a partir de diferentes individuos.

Pocillo 7: Control negativo.

3. COMPONENTES

Se suministran reactivos suficientes para la realización de 25 PCR individuales y la realización de 4 geles de **electroforesis en agarosa al 2 %***.

Tampón de electroforesis concentrado 10x	100 ml	
Agarosa	2,5 gr	
PCR MIX	750 µl	Conservar a -20°C
ADN humano	75 µl	

Tampón de electroforesis 10x para elaborar 2 x 500 ml de Tampón de electroforesis 1x que es el tampón de trabajo.

*** La concentración de agarosa al 2% permite una mejor separación de los fragmentos menores de 1000 pares de bases.**

3.1 PCR MIX

Lista para su uso, permite amplificar cualquier fragmento a partir de ADN, de forma que el usuario sólo ha de añadir la muestra del ADN aislado.

4. PRÁCTICA

4.1 Extracción del ADN

El paso previo a cualquier estudio genético suele ser el aislamiento del ADN genómico, esto se puede llevar a cabo de diferentes formas (métodos caseros, kits comerciales, etc.) y a partir de diferentes muestras (sangre, tejido, etc.).

Para la realización de esta práctica no es necesario la extracción del ADN de los alumnos, ya que suministra una muestra de ADN genómico humano.

4.2 Reacción de la PCR

NOTA: Utilizar siempre puntas con filtro y cambiar de punta cada vez que se realiza una acción para evitar contaminaciones que puede dar lugar a falsos resultados.

1. Utilizar **2,5 µl** (100-250 ng) del ADN genómico humano para cada reacción de PCR.

IMPORTANTE: preparar un control negativo de amplificación, para ello colocar **2,5 µl de agua libre de nucleasas** en lugar del ADN, esto sirve para saber si los reactivos pueden estar contaminados con ADN.

REACTIVOS	VOLUMEN
PCR MIX	22,50 µl
ADN humano (100-250 ng)	2,5 µl
Volumen Total	25 µl

- Mezclar bien.
- Para aquellos termocicladores que no tengan un “heated lid”, añadir 25 µl de aceite mineral para prevenir la evaporación.

PROGRAMA Determinación sexo

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización inicial	96°C	1 minuto
Ciclos PCR Realizar 35 ciclos	94°C	1 minuto
	58°C	1 minuto
	72°C	1 minuto
Extensión final	72°C	10 minutos
Final	4°C	

- El producto de la PCR debe ser sembrado directamente en un gel de agarosa después de la PCR añadiendo un tampón de carga.
- Utilizar el método de detección o tinción del ADN que se use en el laboratorio. Le recomendamos el uso del DANABLUE, nuestro método no tóxico.
- Se ha de obtener un resultado similar al observado en la figura.

Para cualquier duda o consulta adicional, por favor, contacte con nosotros info@bioted.es