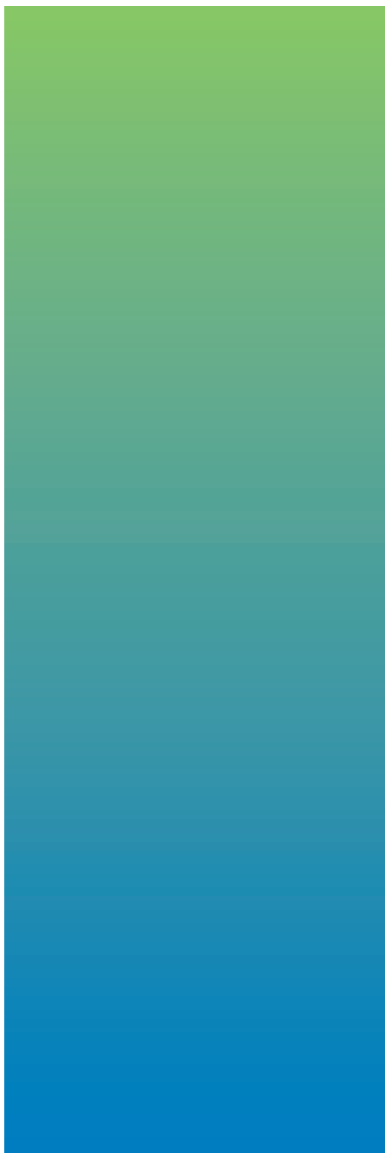


Experiencia en biotecnología de **AMGEN**[®]

Descubrimiento científico para el aula

Guía para el estudiante



PCR de colonias

ÍNDICE

Introducción	3
¿Qué es la PCR?	4
Laboratorio 5-EXT: Uso de PCR para amplificar el gen <i>rfp</i>	8
<i>Parte A: Realización de la PCR</i>	9
<i>Parte B: Separación de productos de la PCR mediante electroforesis en gel</i>	12
Preguntas del Capítulo 5-EXT	15
Capítulo 5-EXT Glosario	16

INTRODUCCIÓN

Una de las técnicas más utilizadas en biotecnología es la *reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*. La PCR es como una máquina de copia molecular: se usa para hacer muchas copias (¡muchas veces de varios miles de millones!) de material genético. La PCR fue desarrollada por primera vez en 1983 por Kary Mullis, un bioquímico estadounidense que más tarde recibió el Premio Nobel por su trabajo. La PCR ha tenido un profundo impacto en la biotecnología y ahora se utiliza en muchas áreas de la investigación y la biotecnología aplicada, incluida la ingeniería genética, el *análisis forense* (el uso de pruebas o técnicas científicas en la investigación de delitos) y la medicina.

En este capítulo, aprenderá sobre los múltiples usos de la PCR y luego la usará para determinar si las colonias bacterianas transformadas portan el gen de interés, *rfp*. Este tipo de PCR se conoce como PCR de colonias.

OBJETIVOS

Al final de este capítulo, podrá hacer lo siguiente:

- Utilizar la PCR para detectar la presencia de un gen de interés
- Describir algunas de las aplicaciones de la PCR
- Explicar el papel de las enzimas y los iniciadores de ADN en la PCR

¿QUÉ ES LO QUE YA SABE?

Discuta las siguientes preguntas con su compañero y escriba sus ideas en su cuaderno. Está preparado para discutir sus respuestas con la clase. No se preocupe si no sabe todas las respuestas; discutir estas preguntas lo ayudará a reflexionar acerca de lo que ya sabe sobre la clonación de genes y la PCR, y sobre las preguntas que pueda tener.

1. ¿Cuáles podrían ser algunas razones para hacer muchas copias de un gen?
2. ¿En qué casos podría ser importante copiar el ADN rápidamente usando la PCR?
3. ¿En qué situaciones querría saber si un organismo porta un gen o secuencia de ADN en particular?

¿QUÉ ES LA PCR?

La clonación de genes se puede llevar a cabo *in vivo* (dentro de un organismo vivo) agregando genes a plásmidos recombinantes y asegurándose de que se repliquen dentro de las células bacterianas. Esto es lo que sucede durante la transformación bacteriana: un plásmido con un gen de interés se agrega a una célula bacteriana y las bacterias comienzan a replicar ese gen de interés. También se puede llevar a cabo la clonación de genes *in vitro* (fuera de un organismo vivo, por ejemplo, en un tubo de ensayo) mediante la PCR.

La clonación de genes *in vitro* e *in vivo* se utiliza actualmente por razones muy diferentes. La clonación de genes *in vivo* permite la producción del **producto genético**: la proteína que resulta de la expresión de un gen, como la proteína roja fluorescente o una proteína terapéutica humana como la insulina. Por otra parte, la clonación de genes *in vitro* produce muchas copias de un fragmento de ADN. Estos fragmentos son solo piezas de material genético; no producirán una proteína a menos que se introduzcan en una célula viva. Recientemente, los científicos han comenzado a desarrollar métodos que permiten la expresión de proteínas sin células de manera rentable. Estos métodos se llaman **IVT** (Transcripción in vitro y reacciones de traducción).

La PCR copia una región específica de ADN de una muestra, luego produce muy rápidamente miles de millones de copias de esa región específica de ADN. Los científicos a veces llaman a la PCR **amplificación de ADN** porque permite que una pequeña cantidad de ADN sea “escuchada”. Esencialmente, la PCR duplicará un segmento deseado de ADN para que haya muchas copias de él. Esas copias superarán ampliamente a cualquier otro ADN en una muestra, haciendo que la secuencia sea mucho más fácil de detectar y analizar. Antes del desarrollo de la PCR, la única forma de hacer copias múltiples de una secuencia específica de ADN era a través de la amplificación biológica en bacterias, que era muy costosa y demoraba mucho tiempo. La PCR es mucho menos costosa y se puede hacer muy rápidamente.

¿CÓMO FUNCIONA LA PCR?

Al igual que otros métodos de biotecnología, la PCR se basa en descubrimientos científicos básicos. La PCR se basa en descubrimientos relacionados con la replicación del ADN. Implica múltiples rondas de replicación de ADN, lo que conduce a la producción de más de mil millones de copias de una porción específica de ADN.

Se necesitan cinco ingredientes para configurar una reacción de PCR:

1. ADN, del que hará copias.
2. **Iniciadores**, que son tramos cortos de ADN diseñados para coincidir con el principio y el final de la sección de ADN que desea copiar.
3. Bases de nucleótidos de ADN (dNTP) que usará para construir las nuevas copias de ADN.
4. **Enzima polimerasa taq**, que viene de *Thermus aquaticus*, un tipo de bacteria que se desarrolla a altas temperaturas. La polimerasa *Taq* es muy estable a altas temperaturas (a diferencia de otras polimerasas) y puede soportar el

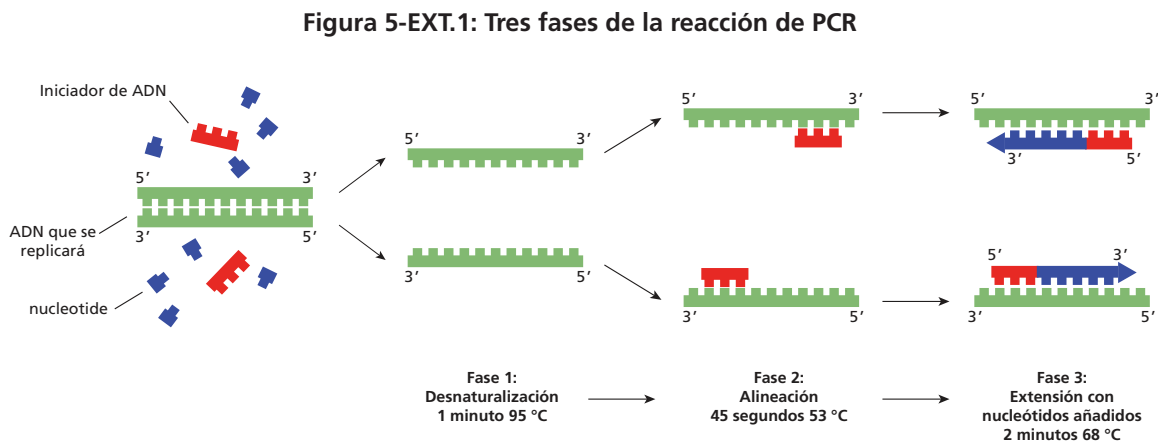
calor utilizado para desnaturalizar el ADN. Esta enzima cataliza la reacción que construirá las nuevas cadenas de ADN.

5. Un tampón que crea las condiciones óptimas para la reacción.

Hay tres fases en la PCR:

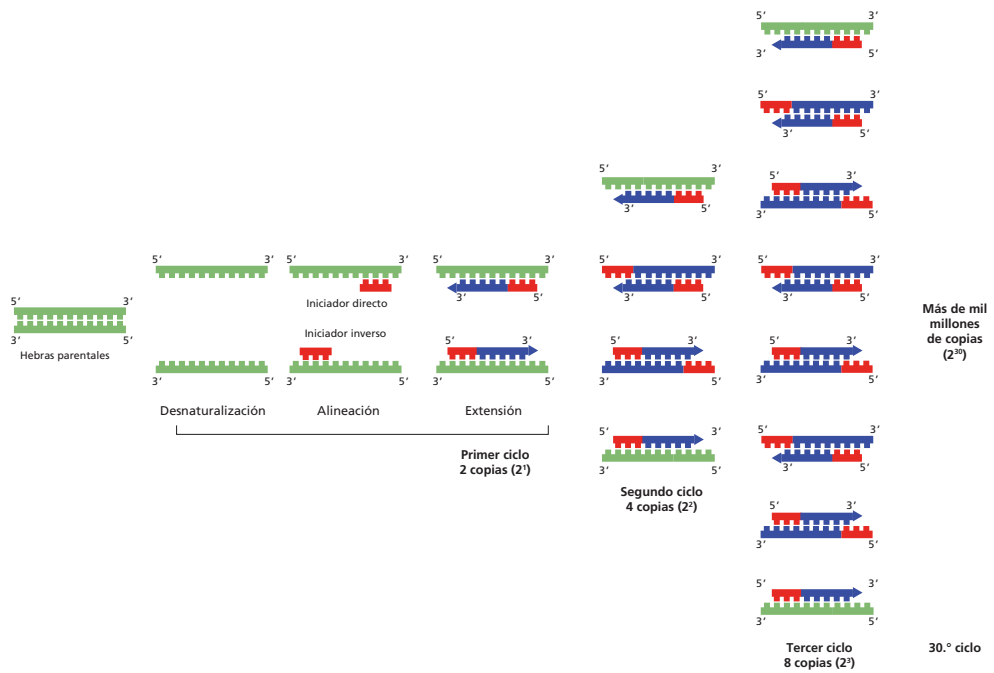
1. *Fase de desnaturalización*: el ADN se convierte en una sola cadena a altas temperaturas porque los enlaces de hidrógeno entre las bases en dos cadenas de ADN se rompen, lo que permite que las cadenas se separen. La **temperatura de fusión del ADN** (la temperatura a la que el 50 % del ADN en una muestra es monocatenaria y el 50 % es bicatenaria) depende de sus propiedades físicas, pero en general las temperaturas superiores a 70 °C hacen que el ADN se derrita. En la PCR, la mezcla se calienta a 94–95 °C el tiempo suficiente para asegurar que las cadenas de ADN se hayan separado por completo.
2. *Fase de alineación*: En esta fase, la mezcla se enfría, permitiendo que los iniciadores **alineen** (adjunten) al ADN monocatenario desnaturalizado. La temperatura de alineación se calcula en función de la temperatura de fusión de los iniciadores que se utilizan en la reacción de la PCR.
3. *Fase de extensión*: en esta fase, la temperatura se eleva. La polimerasa *taq* replica la región de interés agregando los dNTP al extremo 3' de los iniciadores.

Estas tres fases conforman un ciclo de PCR. A continuación se muestra un ejemplo de un solo ciclo de una reacción de PCR.



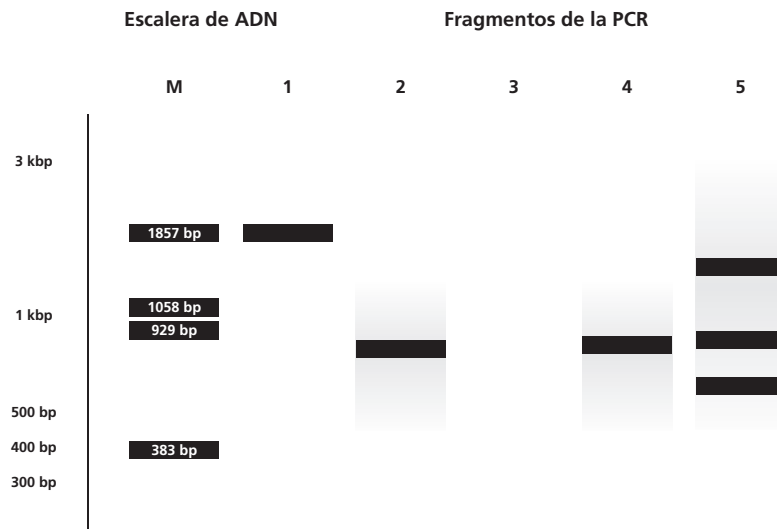
La PCR se lleva a cabo en un instrumento llamado **termociclador**, que controla la temperatura y el tiempo de duración de cada fase de la reacción. Durante el ciclo, el número de copias de ADN de la región de interés se duplica. En el ejemplo de la reacción anterior, un ciclo tomaría aproximadamente cuatro minutos. Este ciclo se repite para hacer más copias. Una reacción que dura 30 ciclos puede resultar en más de mil millones de copias. La **Figura 5-EXT.2** muestra los resultados después de solo tres ciclos.

Figura 5-EXT.2: Amplificación de ADN en PCR



El éxito de la PCR se determina después mediante el uso de la electroforesis en gel para analizar los productos. Al comparar los productos de la PCR con piezas de ADN de tamaño estándar en una escalera de ADN, es posible determinar si la reacción ha sido exitosa. El gel mostrará si se ha elaborado el producto esperado, si tiene la longitud esperada y si solo se ha sintetizado un tipo de producto. En el gel de muestra que se observa en la **Figura 5-EXT.3**, la línea 1 muestra un producto de la PCR de aproximadamente 1,850 pares de bases, las rutas 2 y 4 representan un producto de la PCR de aproximadamente 800 pares de bases, y las rutas 3 y 5 muestran fallas de la PCR. En la ruta 3 no se formó ningún producto, y en la ruta 5, varias bandas muestran que algo salió mal en la reacción.

Figura 5-EXT.3: Verificación del producto de la reacción de PCR



La PCR se utiliza en diagnósticos, pruebas genéticas, análisis forense e investigación básica. La **Tabla 5-EXT.1** da ejemplos de cómo se usa actualmente la PCR.

Tabla 5-EXT.1: Aplicaciones y ejemplos de PCR

Prueba genética	Ejemplo
Pruebas genéticas (prenatal y posnatal)	<ul style="list-style-type: none"> • Detectar mutaciones que conducen a enfermedades genéticas (por ejemplo, <i>enfermedad de células falciformes</i>, fibrosis quística) • Detectar aberraciones cromosómicas (p. ej., duplicaciones o supresiones)
Tipificación tisular	<ul style="list-style-type: none"> • Determinación de la coincidencia de tejidos antes del trasplante de órganos para evitar el rechazo inmunológico
Diagnósticos	Ejemplo
Detección y tratamiento del cáncer	<ul style="list-style-type: none"> • Diagnóstico de cánceres (p. ej., mama y páncreas) • Determinación de los orígenes del cáncer durante la metástasis • Predicción de la respuesta, resistencia o toxicidad de los fármacos terapéuticos
Detección e identificación de organismos patógenos	<ul style="list-style-type: none"> • Diagnóstico de virus (p. ej., VIH, VPH y ébola), bacterias (p. ej., las que causan tuberculosis o estreptococos en la garganta) y parásitos (p. ej., los que causan malaria o triquinosis) • Determinación de sensibilidades a fármacos de agentes infecciosos • Mapeo de la propagación de enfermedades infecciosas para estudios epidemiológicos
Análisis forense	Ejemplo
Identificación de restos	<ul style="list-style-type: none"> • Identificación de víctimas de delitos y desastres naturales (p. ej., terremotos)
Identificación de sospechosos	<ul style="list-style-type: none"> • Identificación del ADN de sangre, semen, saliva en colillas de cigarrillos u otra evidencia que haya quedado en las escenas del crimen
Determinación de las relaciones familiares mediante pruebas	<ul style="list-style-type: none"> • Identificación de las relaciones familiares (p. ej., pruebas de paternidad)
Determinación de los orígenes	<ul style="list-style-type: none"> • Determinación de linajes familiares
Investigación básica	Ejemplo
Descubrimiento de fármacos	<ul style="list-style-type: none"> • Examinar la efectividad de un fármaco de prueba midiendo la producción de enzimas en el cuerpo que facilita la distribución o eliminación del fármaco
Antropología molecular, arqueología y evolución	<ul style="list-style-type: none"> • Investigación de los vínculos evolutivos entre los humanos antiguos y modernos • Identificación de ancestros comunes entre organismos
Patrones de expresión génica	<ul style="list-style-type: none"> • Investigación de mecanismos y regulación de la embriogénesis, diferenciación celular e iniciación del cáncer • Investigación de respuestas moleculares a factores ambientales
Mapeo genético	<ul style="list-style-type: none"> • Determinación de la posición física de los genes dentro de los cromosomas

LABORATORIO 5-EXT: USO DE PCR PARA AMPLIFICAR EL GEN *rfp*

El laboratorio de transformación (Laboratorio 5/5A/5B) produjo colonias bacterianas rojas y blancas. Todas las colonias que crecen en la placa de ampicilina contendrán el gen de resistencia a los antibióticos, pero solo las colonias de bacterias que se han transformado correctamente son rojas, mientras que todas las demás colonias son blancas. Esta expresión de color hace que sea muy fácil determinar si una colonia ha absorbido el plásmido correcto. Sin embargo, la producción de otras proteínas, incluidas las proteínas terapéuticas humanas, no se puede confirmar visualmente; los científicos necesitan otro método para verificar que una colonia se ha transformado con el plásmido correcto. Esta confirmación se puede hacer con la PCR.

PCR DE COLONIA

En este laboratorio, utilizará PCR y electroforesis en gel para examinar el ADN de las colonias producidas en el laboratorio de transformación (Laboratorio 5/5A/5B) y confirmar si las células bacterianas en sus placas se han transformado con el plásmido portador del gen *rfp*, pARA-R, mediante el uso de PCR para hacer copias del ADN y luego analizar sus resultados, utilizando electroforesis en gel.

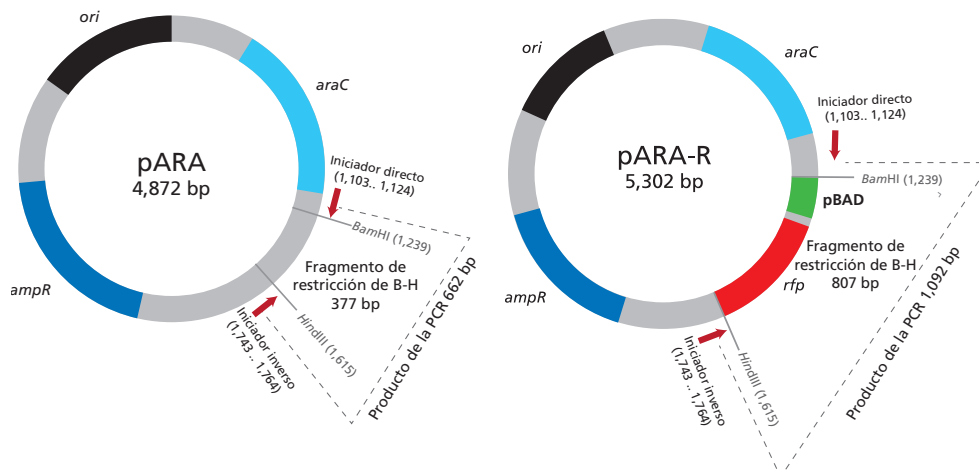
Para obtener muestras de plásmidos, utilizará la punta de la pipeta para transferir células de una colonia roja a un tubo de microcentrífuga de PCR. El tubo de microcentrífuga contendrá una mezcla de reactivos, llamada mezcla maestra, que contiene todos los reactivos necesarios para la replicación del ADN, incluidos los dNTP, la polimerasa *Taq* y los iniciadores de ADN apropiados. Las secuencias de los dos iniciadores utilizados en este laboratorio se muestran en **Tabla 5-EXT.2**. La secuencia de cada iniciador es única para el fragmento grande de restricción de pARA y no se encuentra en ningún otro lugar en el plásmido o genoma de *E. coli*.

Tabla 5-EXT.2: Iniciadores para ABE PCR

Iniciador directo	5'-TGTAACAAAGCGGGACCAAAGC-3'
Iniciador inverso	5'-GCGTTTCACTTCTGAGTTCGGC-3'

También tomará muestras de células de una colonia blanca que no produce proteína roja fluorescente y establecerá tubos de control que transportan los dos plásmidos: pARA y pARA-R. La figura en la página siguiente muestra los componentes importantes en los plásmidos pARA y pARA-R, incluidos los dos sitios donde se unirán los iniciadores de ADN. La PCR replica la secuencia de ADN entre esos dos sitios.

Figura 5-EXT.4: Componentes de plásmidos pARA y pARA-R



ANTES DEL LABORATORIO

Responda a las siguientes preguntas con su grupo y prepárese para compartir sus respuestas con la clase.

1. En este laboratorio, utilizamos la PCR y la electroforesis en gel para confirmar si las bacterias se han transformado con el plásmido correcto. ¿Por qué es necesario realizar la PCR antes de la electroforesis en gel? ¿Qué podría suceder si intentara realizar una electroforesis en gel en la muestra de la placa de agar?
2. Leyeron acerca de la importancia de usar iniciadores específicos para plantear la secuencia objetivo para la PCR. Si un científico agrega iniciadores muy cortos al ADN, ¿cómo podría impactar en los productos de la PCR?
3. Leer las secciones de *Métodos* la Parte A (en las páginas 10–12) y la Parte B (en la página 13), y describa brevemente los pasos para la Parte A y la Parte B, utilizando palabras y un diagrama de flujo.

PARTE A: PIPETEAR EN LOS POCILLOS

MATERIALES

PARA CADA GRUPO DE ALUMNOS

Reactivos mantenidos en hielo

- Mezcla maestra de PCR (PCR)
- 0.025 ng / μ L de pARA-R (+)
- 0.025 ng / μ L pARA (-)

Otros equipos y suministros

- Copa con hielo húmedo
- 4 tubos vacíos para PCR de 0,25 ml y tapas
- Marcador permanente de punta fina
- Caja de puntas vacía para usar como gradilla para tubos de PCR
- Micropipeta P-20
- Caja de puntas de pipetas desechables
- Contenedor de basura
- 2 guantes desechables
- 1 placa de LB/amp/ara con colonias transformadas (la placa puede ser compartida por 3 a 4 grupos)

PARA LA CLASE

- Microcentrífuga con adaptador para tubos de PCR
- Termociclador



SEGURIDAD: Este procedimiento consiste en abrir placas de agar que contienen bacterias modificadas genéticamente. No es una buena práctica abrir placas de agar que contengan microbios desconocidos después de la incubación, por lo tanto, solo se deben utilizar placas de agar no contaminadas (que contienen las colonias esperadas de *E. coli* rojas y blancas). Las placas y todos los demás materiales desechables utilizados en este laboratorio deben esterilizarse antes de su eliminación. Siga las instrucciones de su profesor para eliminar todos los desechos de este laboratorio. Use guantes desechables durante el procedimiento y lávese bien las manos con agua tibia y jabón después de terminar este laboratorio.

MÉTODOS

1. Obtenga un tubo de mezcla maestra de PCR (PCR) y dos tubos de plásmidos de control (pARA-R [+] y pARA [-]) en una taza de hielo húmedo. Los reactivos en este laboratorio deben mantenerse fríos; asegúrese de levantar los tubos solo por el borde superior para evitar calentar el contenido con la mano.
2. Etiquete los cuatro tubos vacíos de PCR del 1 al 4, y coloque sus iniciales. Etiquete los tubos de PCR tanto en el lateral como en la parte superior, porque la tinta puede salirse de la parte superior del tubo en el termociclador. Coloque los tubos en la gradilla de puntas vacía.
3. Preparará cuatro reacciones: una con células de una colonia roja, una con células de una colonia blanca y dos con controles de plásmidos. Revise la tabla a continuación, que resume los reactivos que agregará a los tubos de PCR en los pasos 4–8. Suponga que cada muestra de células tiene aproximadamente 2 μ L.

Tabla 5-EXT.3: Adición de reactivos a los tubos de PCR

	1	2	3	4
Paso 4: mezcla maestra de PCR (PCR)	23 μ L	23 μ L	23 μ L	23 μ L
Paso 5: colonia roja	2 μ L			
Paso 6: colonia blanca		2 μ L		
Paso 7: pARA-R (+)			2 μ L	
Paso 8: pARA (-)				2 μ L
Volumen total	25 μL	25 μL	25 μL	25 μL

4. Gradúe la pipeta P-20 a 11.5 μ L y dispense cuidadosamente 23 μ L ($2 \times 11.5 \mu$ L) de mezcla maestra en cada uno de los cuatro tubos. Coloque cada tubo en hielo tan pronto como agregue la mezcla maestra.
5. Decida quién elegirá la colonia roja. Este estudiante debe ponerse un guante en su mano dominante y, con su mano enguantada, sacar con cuidado una punta de pipeta de la caja. El procedimiento para tomar muestras de células es el siguiente:
 - a. Localice una colonia roja que esté aislada de otras colonias.
 - b. Abra la placa de Petri como una almeja, y use la punta de la pipeta para tocar ligeramente la colonia roja. **No** recoja de cualquier agar. Examine la punta de la pipeta: debe poder ver las células de la colonia. Bájela hacia dentro del tubo de PCR previamente marcado para células rojas (Tubo 1).
 - c. Transfiera las bacterias a la mezcla de PCR girando suavemente la punta de la pipeta en la mezcla de PCR sin crear burbujas. Coloque la punta en el contenedor de residuos. Vuelva a colocar el tubo de PCR en el hielo. Tire el guante usado en el contenedor de residuos.
6. Elija a otro estudiante para transferir las células de una colonia blanca. Pídale a este estudiante que se ponga un guante en su mano dominante. Con una nueva punta de pipeta, repita los pasos 5a a 5c, pero esta vez transfiera las células de una colonia blanca aislada al segundo tubo de PCR (Tubo 2).
7. Prepare el **control positivo** (una muestra experimental con una respuesta conocida que se compara con muestras experimentales con respuestas desconocidas) pipeteando cuidadosamente 2 μ L de pARA-R en su tubo de PCR etiquetado (Tubo 3). Pipetee dentro y fuera varias veces para mezclar. Evite salpicar los reactivos o crear burbujas. Vuelva a colocar el tubo de PCR en el hielo.
8. Usando una nueva punta de pipeta, repita el paso 7 para configurar el plásmido de control pARA (Tubo 4). Vuelva a colocar el tubo de PCR en el hielo.
9. Si hay burbujas o reactivos salpicados en los lados de los tubos, golpee suavemente la parte inferior del tubo de PCR sobre una mesa. Si hay burbujas grandes, haga que su profesor centrifugue su tubo de PCR. Vuelva a colocar el tubo de PCR en el hielo.
10. Lleve la taza de hielo con sus tubos de PCR a su profesor. Una vez que su profesor haya recolectado todos los tubos, se colocarán en un termociclador que ha sido preprogramado para esta reacción. El programa de PCR que

utilizará se muestra en la tabla a continuación. La amplificación tardará aproximadamente dos horas en completarse. Cuando termine, el termociclador mantendrá la temperatura de los tubos de PCR a 4 °C hasta que sus muestras puedan transferirse al congelador, donde se almacenarán hasta que pueda realizar la electroforesis en gel de agarosa.

Tabla 5-EXT.4: Programa del termociclador para PCR de colonias

	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)
Desnaturalización inicial	95	270
30 ciclos	Alineación	30
	Desnaturalización	30
	Extensión	60
Extensión final	68	300
Mantener	4	Indefinido

PARTE B: SEPARAR LOS PRODUCTOS DE LA PCR UTILIZANDO LA ELECTROFORESIS EN GEL

MATERIALES

Equipo y suministros

- 4 tubos de PCR con productos de amplificación (de la Parte A) en gradilla
- Tubo de micrócentrífuga de escalera de ADN (marcado con una "M")
- Gradilla plástica de tubos de microcentrífuga
- Micropipeta P-20
- Caja de puntas de pipetas desechables
- Caja de electroforesis cargada con un 0,8% de gel de agarosa (se compartirá entre grupos)
- Tampón SB 1x
- Contenedor de residuos para puntas y tubos de microcentrífuga usados
- Copias de **Diagrama de escalera de ADN (RM 5-EXT.1)** (1 por cada miembro del grupo)



SEGURIDAD:

- Use todas las precauciones de seguridad adecuadas y la vestimenta requerida para un laboratorio de ciencias, incluidas las gafas de seguridad. Por favor, consulte las instrucciones de su profesor.
- Lávese bien las manos con agua tibia y jabón después de completar el trabajo de laboratorio.

MÉTODOS

1. Obtenga sus tubos de PCR de la Parte A y revise su gradilla para asegurarse de que tiene los reactivos en la lista.
2. Prepare su caja de electroforesis en gel como lo indique su profesor.
3. Haga un dibujo en su cuaderno que muestre la ubicación de los pocillos en la caja de electroforesis. El orden de las muestras en cada pocillo debe ser el siguiente:
 - a. Escalera de ADN (M)
 - b. Colonia roja (Tubo 1)
 - c. Colonia blanca (Tubo 2)
 - d. pARA-R (Tubo 3)
 - e. pARA (Tubo 4)
4. Con una punta de pipeta nueva para cada muestra, dispense 10 μL de cada muestra preparada y de la escalera de ADN en sus pocillos designados.
5. Cuando haya cargado todas las muestras, cierre la tapa firmemente sobre la caja de electroforesis.
6. Encienda la fuente de alimentación y establezca el voltaje como lo indique su profesor.
7. Mientras espera que corra su gel, complete el **Diagrama de escalera de ADN**. El **diagrama de escalera de ADN** muestra 12 bandas de ADN de tamaños conocidos. Usando esta información, calcule las posiciones de las bandas de ADN producidas por el procedimiento de PCR dibujando su posición en el diagrama.
8. Deje que su gel corra hasta que el tinte azul-púrpura oscuro haya pasado la mitad del gel. Su profesor le explicará qué hacer con su gel una vez que haya terminado de correr.

¿SABÍA?

A algunos les gusta caliente

La PCR utiliza una enzima, la ADN polimerasa, que se usa para replicar el ADN en células vivas. La mayoría de los organismos vivos sobreviven a temperaturas entre 25 °C y 37 °C. Las enzimas normales y el ADN son estables a estas temperaturas; a temperaturas más altas, la mayoría de las proteínas se desnaturalizan y el ADN se descomprime, haciendo que las dos cadenas se separen. Sin embargo, en la década de 1960, se descubrió un nuevo tipo de microorganismo llamado termófilos. Los termófilos viven a temperaturas mucho más altas, que van desde 55 °C hasta 121 °C (mucho más alta que la temperatura del agua hirviendo). Las cepas de estos termófilos se pueden encontrar en cualquier lugar donde haga calor, desde pilas de compost hasta las fuentes hidrotermales en el fondo del océano hasta las aguas termales en ebullición en el Parque Nacional de Yellowstone. Originalmente, todos los termófilos se consideraban bacterias, pero algunos ganaron cierto reconocimiento como un nuevo dominio de la vida, la Archaea, porque son muy diferentes de las bacterias en su composición genética y bioquímica.



¿Cómo se mantienen vivos los termófilos a temperaturas que matarían a la mayoría de los otros organismos? Las proteínas que se encuentran en los termófilos contienen ciertos aminoácidos que pueden formar enlaces estabilizadores, y estos enlaces hacen que la proteína se doble de formas que son más resistentes a la desnaturalización por calor. El ADN en algunos termófilos está superenrollado, una forma que es más estable al calor. Además, los altos niveles de potasio y magnesio en las células evitan la degradación del esqueleto del fosfodiéster del ADN. Las proteínas y el ADN de los termófilos no solo sobreviven sino que en realidad funcionan mejor a temperaturas más altas.

La polimerasa *taq*, un tipo de polimerasa del ADN, fue descubierta en bacterias termofilas. La polimerasa *taq* puede funcionar a temperaturas más altas, un requisito previo clave para la PCR. La PCR requiere altas temperaturas para desnaturalizar el ADN y hacer que los nucleótidos sean accesibles para que los iniciadores se unan a ellos. La temperatura de alineación garantiza que solo los alineadores con la secuencia exacta se alinearán y permitirán la replicación en el sitio deseado en la secuencia de ADN. Sin la polimerasa *Taq*, la PCR no sería posible.

PREGUNTAS DEL CAPÍTULO 5-EXT

PARTE A

1. ¿Por qué se requieren múltiples ciclos de desnaturalización, alineación y extensión en la PCR?
2. Los plásmidos recombinantes utilizados para transformar las colonias en este laboratorio se realizaron en el laboratorio de clonación de genes (Lab 2 / 2A) y la construcción, en un laboratorio de plásmidos recombinantes (Laboratorio 3). La digestión inicial de la enzima de restricción del plásmido dio como resultado la formación de cuatro fragmentos diferentes, cada uno con un *Bam*HI y un extremo pegajoso *Hind*III.
 - a. ¿Cuántos plásmidos recombinantes de dos fragmentos diferentes esperaría que se formaran en el Laboratorio 3 (el laboratorio de ligación)?
 - b. De los plásmidos recombinantes de dos fragmentos que podrían formarse mientras se construye el plásmido recombinante, ¿qué esperaría que pudieran llevar las células que crecen en las placas LB/amp/ara utilizadas en este laboratorio?

INDICIO: La gran combinación de fragmentos grandes pARA y pKAN-R es poco probable debido a su gran tamaño y múltiples orígenes de replicación.
 - c. ¿Qué fragmento de restricción individual tendría que estar presente para cada plásmido en todas las células que crecieron en las placas LB/amp/ara?
 - d. De los plásmidos más probables, ¿cuál sería el tamaño del producto de amplificación de una colonia roja? _____bp ¿De una colonia blanca? _____bp

INDICIO: La Figura 5-EXT.4 debería ayudarlo a determinar los tamaños.

PARTE B

1. ¿Por qué es importante examinar los productos de PCR?
2. ¿Cómo se comparan los resultados de gel de este laboratorio con sus predicciones de gel? ¿Ha visto alguna banda que no se esperaba? ¿Qué podría explicar el origen de estas bandas inesperadas?
3. ¿La fotografía del gel muestra que su procedimiento de PCR fue exitoso? Describa la evidencia que utilizó para llegar a esta conclusión.
4. En este laboratorio, usó dos controles. ¿Puede pensar en algún control adicional que este laboratorio podría haber incluido? Explique.
5. ¿Por qué hay que desnaturalizar el ADN para llevar a cabo la PCR?
6. ¿Cuáles son las funciones de la ADN polimerasa y los iniciadores de ADN en el método de PCR?

CAPÍTULO 5-EXT GLOSARIO

Alineación: En biología molecular, es la unión de dos secuencias de ADN complementarias por enlaces de hidrógeno; por lo general, una secuencia es una secuencia corta de ADN, como un iniciador. Para que se produzca la alineación, las dos secuencias deben ser complementarias.

Amplificación de ADN: La producción de múltiples copias de una secuencia de ADN.

Análisis forense: El uso de pruebas o técnicas científicas en la investigación de un delito.

Producto genético: El ARN o proteína que resulta de la expresión de un gen.

In vivo: Que se lleva a cabo dentro de un organismo vivo.

In vitro: Que se lleva a cabo fuera de un organismo vivo, como en un tubo de ensayo.

Temperatura de fusión del ADN: Temperatura a la que el 50 % del ADN en una muestra es monocatenario y el 50 % es bicatenario.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Una técnica para amplificar secuencias de ADN: puede amplificar una secuencia específica de ADN hasta mil millones de veces.

Control positivo: Una muestra experimental con una respuesta conocida que se compara con muestras experimentales con respuestas desconocidas.

Iniciadores: Estiramientos cortos de ADN que se unen a una secuencia de ADN complementaria durante la etapa de alineación, lo que permite que la ADN polimerasa se extienda a una región específica del ADN.

Enfermedad de células falciformes: Un trastorno genético de la sangre que se caracteriza por glóbulos rojos de forma anormal.

Polimerasa *taq*: Una ADN polimerasa utilizada en la PCR. Se encuentra en la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, y funciona a altas temperaturas.

Termociclador: Un dispositivo de laboratorio que puede cambiar la temperatura de forma rápida y precisa y se utiliza en el método de PCR para llevar a cabo ciclos sucesivos de amplificación de ADN.