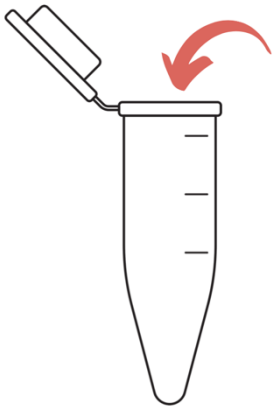
PCR: Simulación en papel

1. ¿Qué reactivos se necesitan para realizar una PCR? Rellena el tubo indicando muy brevemente para qué se añaden cada uno de los reactivos necesarios.



* .....

* .....

* .....

* .....

* .....

2. ¿Por qué en la PCR es necesario un termociclador que alcance cíclicamente temperaturas >90ºC para sintetizar ADN si, por ejemplo, en nuestras células se sintetiza el ADN a 37ºC?

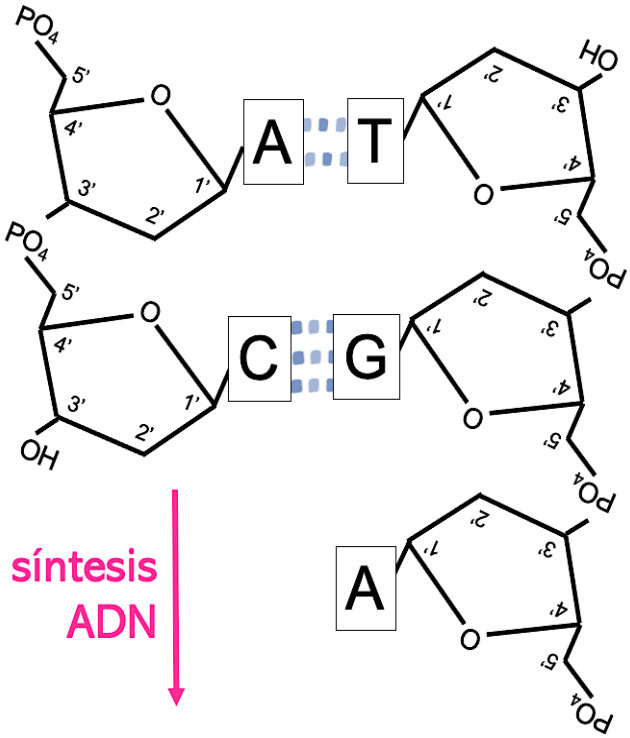
3. 1ª ETAPA DEL CICLO → DESNATURALIZACIÓN: Observa la siguiente imagen de un pequeño fragmento de ADN y contesta las cuestiones:

a. Señala el extremo 3' y 5' de cada hebra.

b. ¿Por qué una Tª de 95ºC separa las dos hebras pero no los nucleótidos entre sí?

c. ¿Crees que depende el % de C y G en la Tª necesaria para la desnaturalización??

d. ¿Es una desnaturalización irreversible?



4. 2ª ETAPA DEL CICLO → HIBRIDACIÓN: Los oligos o *primers* se alinean con cada cadena del ADN molde por complementariedad de bases formándose otra vez los enlaces de H.

a. ¿Por qué las hebras del ADN muestra hibridan con los *primers* y no se vuelven a unir entre sí?

b. En la simulación los oligos tienen sólo 6 nucleótidos pero, en realidad, suelen tener unos 20 nucleótidos y se escriben por convenio siempre en sentido 5'→3'. Diseña los *primers forward* y *reverse* que encargarías al laboratorio para amplificar el fragmento de ADN en negrita:

5′ TACG**GAAATTGGTTTCTGATAATACGTAGTACTAGCGCTAGTCCATGGTGCAATAGCACT** 3′
3′ ATGC**CTTTAACCAAAGACTATTATGCATCATGATCGCGATCAGGTACCACGTTATCGTGA** 5′

5′ **CGGGTAATGCCGCGTATCGTGGTACTATGAGCACAGTAGCATGCTACCTCT**TGTGCAAAT 3′
3′ **GCCCATTACGGCGCATAGCACCATGATACTCGTGTCATCGTACGATGGAGA**ACACGTTTA 5′

- *Primer forward* 5'→ 3':
- *Primer reverse* 5'→ 3':

5. 3ª ETAPA DEL CICLO → ELONGACIÓN: Para poder sintetizar ADN, la polimerasa va añadiendo en el extremo 3' los nucleótidos trifosfato complementarios a la hebra de ADN molde. ¿Por qué la ADN polimerasa únicamente funciona en un determinado rango de pH y temperatura?

6. Estos ciclos se repiten decenas de veces para así obtener una cantidad significativa del fragmento de ADN diana, es decir, el fragmento comprendido entre los *primers forward* y *reverse*. Observa la tabla y responde las cuestiones:

a. Completa la tabla con la cantidad de moléculas de ADN bicatenario que se obtienen en cada ciclo, sabiendo que el nº de copias totales es 2^n siendo n el nº de ciclo.

b. ¿Cuántas de esas moléculas de ADN tienen la longitud deseada? Completa la tabla con el nº de copias diana.

c. Normalmente en una PCR se realizan al menos 30 ciclos. ¿Cuántas copias totales se obtendrán en ese caso?

d. Observando la tabla, ¿por qué crees que esta técnica se denomina "reacción en cadena de la polimerasa"?

nº CICLO	nº copias TOTALES	nº copias DIANA
1		
2		
3		
4		
5		
6	64	52
7	128	114
8	256	240
9	512	494
10	1,024	1,004
11	2,048	2,026
12	4,096	4,072
13	8,192	8,166
14	16,384	16,356
15	32,768	32,738
16	65,536	65,504
17	131,072	131,038
18	262,144	262,108
19	524,288	524,250
20	1,048,576	1,048,536

MODIFICADO de www.theminione.com