

GUÍA PRÁCTICA SOBRE LA TÉCNICA DE PCR

Laura Espinosa Asuar

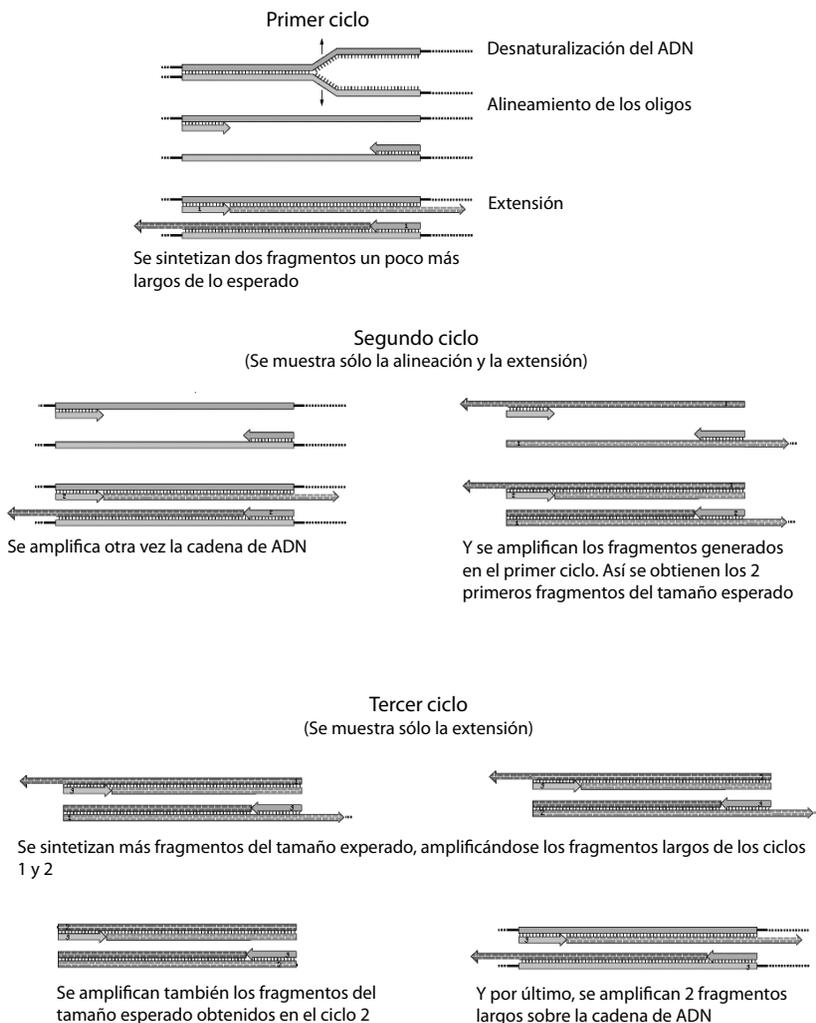
PCR son las siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction* o Reacción en Cadena de la Polimerasa. La idea básica de la técnica es sintetizar muchas veces un pedazo o fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C), de ahí su nombre comercial más conocido: *taq* polimerasa. Cuando hacemos una reacción de PCR simulamos lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN y en el tubo se mezclan todos los ingredientes necesarios para hacerlo: la polimerasa, el ADN del organismo que queremos estudiar –donde se encuentra el fragmento que queremos sintetizar–, los oligonucleótidos (llamados también *primers*, iniciadores, cebadores, “oligos”, etc.) necesarios para que se inicie la transcripción, dinucleótidos (dNTPs), y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (cierto pH, determinadas cantidades de magnesio en forma de MgCl₂, KCl, y pueden necesitarse otras sales o reactivos, dependiendo de cada polimerasa). Esta técnica tan ingeniosa tiene muchísimas aplicaciones distintas y se ha convertido en una herramienta muy importante en la biología molecular; sus aplicaciones van desde la genética de poblaciones, evolución molecular y genómica hasta la medicina forense.

¿Pero cómo funciona el PCR? Supongamos que ya tenemos los tubos listos con todo lo necesario para que la síntesis del fragmento que nos interesa que se lleve a cabo (*taq* polimerasa, dinucleótidos, ADN, agua, buffer con mag-

nesio y otras sales, y oligonucleótidos). El siguiente paso es colocar los tubos en una máquina conocida como termociclador, que básicamente sirve para calentarlos o enfriarlos a temperaturas muy precisas. ¿Cómo es que se amplifica el (o los) fragmento(s) que queremos? Primero, para hacer más sencilla la explicación, vamos a suponer que esperamos un solo fragmento de un tamaño determinado, y lo que sucede es lo siguiente (ver el primer ciclo de la figura 1): el termociclador calienta o enfría los tubos a tres temperaturas distintas, que se repiten una y otra vez (lo que se llama los ciclos de reacción), la primera es a 95°C (y a este paso se le llama desnaturalización) durante la cual las dobles cadenas del ADN se abren o desnaturalizan, quedando en forma de cadenas sencillas; después el termociclador ajusta la temperatura en un intervalo entre 40° y 60°C (llamada de alineamiento), a esta temperatura se forman y se rompen constantemente los puentes de hidrógeno entre los oligonucleótidos y el ADN, y aquellas uniones más estables (las que son complementarias) durarán mayor tiempo, quedando los oligonucleótidos “alineados” formando una pequeña región de doble cadena. La polimerasa se une a este pequeño pedazo de ADN de doble cadena y comienza a copiar en sentido 5' a 3'; al agregar unas bases más, los puentes de hidrógeno que se forman entre las bases estabilizan más la unión y el oligonucleótido permanece en este sitio para el siguiente paso. Después la temperatura sube a 72°C (paso que se conoce como extensión), ya que 72°C es la temperatura en la cual la polimerasa alcanza su máxima actividad, y continúa la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los oligonucleótidos que ya se habían alineado.

En el primer ciclo, con estas tres temperaturas, se sintetizarán los primeros fragmentos a partir del ADN genómico. Estos primeros fragmentos no tendrán el tamaño esperado, serán un poco más grandes ya que la *taq* copiará hasta donde le sea posible, pero como veremos más adelante, se obtendrán en cantidades tan pequeñas que al final no podremos detectarlos. Después se repiten una vez más las tres temperaturas, pero en este segundo ciclo, los oligonucleótidos, además de unirse al ADN que pusimos al inicio, también se unirán a los fragmentos recién sintetizados del primer ciclo (ver segundo ciclo de la figura 1), por lo tanto en este segundo paso la polimerasa sintetizará 2 fragmentos largos copiados directamente del ADN y 2 fragmentos del tamaño esperado, que es el tamaño que hay entre los dos oligonucleótidos que hemos usado. De esta forma con cada ciclo aumentará el número de fragmentos del tamaño que queremos. Cabe mencionar que antes y después de estos ciclos se programan dos pasos, uno de 95°C durante varios minutos para iniciar con desnaturalización, y al final de los ciclos, un paso último de extensión a

Figura 1. Descripción del proceso de un PCR en los primeros ciclos de reacción. Comúnmente se utilizan 35 ciclos para amplificar el fragmento que se requiere (modificada de Parkes, 2003)



Fuente: Parkes H. 2003. Food for Thought http://www.chemsoc.org/chembytes/ezine/1999/parkes_may99.htm, accesado 08/03.

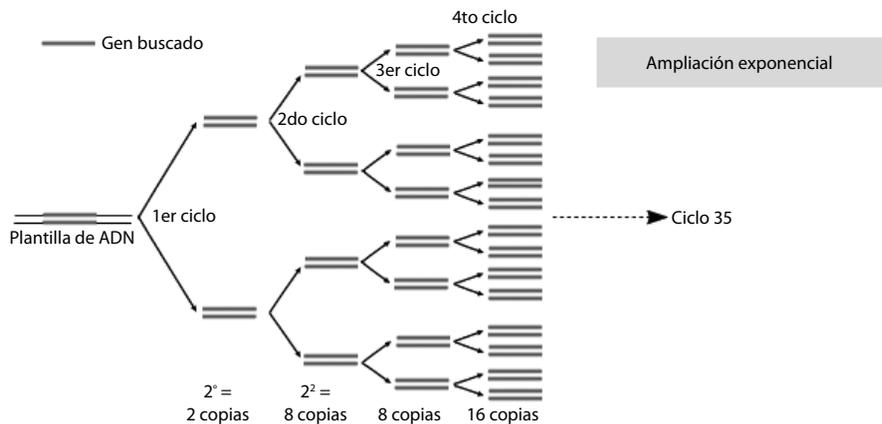
72°C para permitir que la *taq* termine de sintetizar todos los fragmentos que pueden haber quedado incompletos.

Para este tipo de PCR es necesario que uno de los oligonucleótidos tenga la misma secuencia que se encuentra en una de las cadenas del ADN, y el otro deberá llevar la secuencia complementaria que estará al final del fragmento que se quiere amplificar (por lo cual se les llama *forward* y *reverse*) para que uno sea complementario a la cadena que forma el otro; si no es así no podría amplificarse el sitio que se necesita. Como cada pedazo sintetizado sirve como base para sintetizar otros en el siguiente ciclo, el número de copias aumentará en forma exponencial (ver tercer ciclo de las figuras 1 y 2). Con una sola molécula de ADN, en el ciclo 1 se producen $2^1=2$ nuevos fragmentos, en el ciclo 2 serán 2^2 , esto es, 4 fragmentos recién sintetizados, y así, con 35 ciclos de PCR se producirán $2^1+2^2+\dots+2^{34}+2^{35}=2^{36}$ nuevos fragmentos, de los cuales sólo 70 serán fragmentos de un tamaño mayor al esperado (2 por cada ciclo) obtenidos al sintetizarlos directamente del ADN genómico; esta pequeña cantidad es casi imposible de detectar al analizar nuestros productos.

TIPOS DE TÉCNICAS

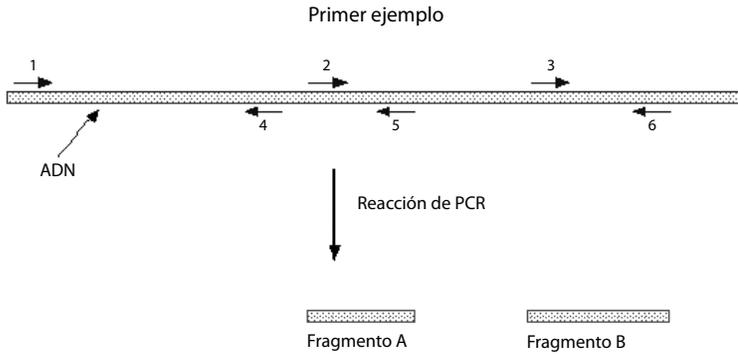
El PCR tiene diferentes métodos o aplicaciones en función de lo que nos interese investigar (como son los RAPDs, AFLPs, ISSRs, SSCP... véase los capítulos 18 y 19 de este libro) y el primer paso es tener claro el tipo de información que necesitamos para elegir o diseñar la estrategia más apropiada para nuestro trabajo. Brevemente podemos dividir la técnica en dos categorías:

Figura 2. En una reacción de PCR los fragmentos se amplifican en forma exponencial (tomado de Vierstraete, 2001)



- 1) PCRs para la amplificación de un solo sitio conocido del genoma (locus). Estos PCRs requieren conocer la secuencia que se trabaja (por ejemplo cuando amplificamos un gen específico como el 16S), en cuyo caso se utilizan oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de ese gen y se obtiene un solo fragmento de un tamaño ya conocido. Con este tipo de PCRs es posible hacer filogenias, y para obtener los datos hay distintos caminos: desde hacer geles especiales que detectan cambios hasta de una sola base entre las secuencias (SSCP), hasta utilizar enzimas de restricción para generar patrones de cada individuo, aunque lo ideal es obtener la secuencia completa del gen que amplificamos, sobre todo cuando se desea responder a preguntas relacionadas con las fuerzas evolutivas que han actuado sobre él. El gen secuenciado puede ser analizado desde varias perspectivas y muchas de ellas se encuentran en los diversos capítulos de este libro.
- 2) PCRs en los que no es necesario conocer la región que se está amplificando (se amplifican regiones no conocidas, como zonas hipervariables del genoma), por lo cual no se sabe el tamaño del fragmento (o fragmentos) que se esperan. Éstos se utilizan para determinar polimorfismo genómico y son los más comunes para *fingerprint*, ya que es sencillo obtener los datos (un gel de agarosa después del PCR es suficiente), se observan varios loci simultáneamente y la información de las zonas variables permite inferir los datos necesarios para análisis de genética de poblaciones. En general este tipo de PCRs utiliza un solo oligonucleótido con 2 características importantes: que sea de pequeño a mediano (de 6 a 18 bases) y sobre todo que su secuencia esté presente muchas veces en el ADN del organismo que estudiamos. Existen zonas repetidas hipervariables del ADN que pueden amplificarse de esta manera, por ejemplo los sitios que sirven para iniciar la síntesis de ADN en los cromosomas, conocidas como microsatélites. En el primer ciclo de reacción lo que sucederá es que el oligonucleótido utilizado hibridará en distintas zonas del ADN, y primero comenzarán a sintetizarse fragmentos de tamaños variables e indefinidos (hasta donde la polimerasa logre copiarlos). En el segundo ciclo las cadenas sintetizadas a partir de las primeras copias formadas serán del tamaño que existe entre dos oligonucleótidos que no estén muy alejados entre sí. Estos fragmentos se copiarán una y otra vez, y de esta manera al final obtendremos muchos fragmentos de tamaños diferentes, de los que conoceremos la secuencia con que inician y terminan, pero no la secuencia completa de cada uno. En la figura 3 se explica con más detalle un PCR de este tipo.

Figura 3. Los PCR que amplifican zonas no conocidas utilizan oligonucleótidos pequeños y amplifican zonas repetidas en el genoma (tomado de Harlocker, 2003)

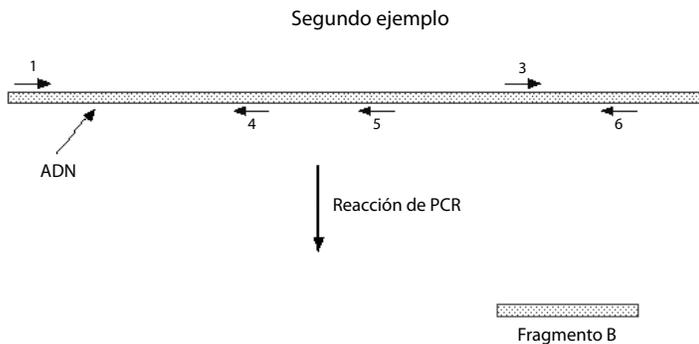


Supongamos que hacemos una reacción de PCR con un individuo hipotético utilizando un oligo para microsatélites. En este primer ejemplo el oligo ha hibridado en el ADN en 6 sitios diferentes, y al amplificar se generan 2 fragmentos:

1) Fragmento A es sintetizado a partir de la secuencia de ADN que se encuentra entre los oligos que se han unido en las posiciones 2 y 5

2) El fragmento B es sintetizado a partir de los oligos unidos en las posiciones 3 y 6.

No hay productos de PCR entre las posiciones 1 y 4 ya que están muy lejos entre sí como para permitir que ocurra la reacción de PCR. Los oligos unidos a las posiciones 4 y 2 ó 5 y 3 tampoco amplifican ya que no están orientados uno hacia el otro.



En el segundo ejemplo hay que suponer que es un individuo que tiene un cambio en el segundo sitio, y el oligo no se ha unido en la segunda posición, por lo tanto sólo se genera el fragmento B.

¿QUÉ SE NECESITA PARA HACER UN PCR Y CÓMO CONSEGUIR ESTOS REACTIVOS EN MÉXICO?

La polimerasa comercial siempre viene acompañada de un buffer o amortiguador con las sales que se requieren, y si es necesario afinar las condiciones del PCR, se puede pedir el cloruro de magnesio, $MgCl_2$, aparte. Nosotros utilizamos frecuentemente la polimerasa que se produce en la facultad de Veterinaria de la UNAM (*Amplificasa*, de Biotecnologías Universitarias), y nos ha funcionado bastante bien para casi todos nuestros PCRs. Si se trata de un PCR que ha dado problemas, utilizamos una polimerasa más cara (por ejemplo la marca Applied Biosystem). También hemos utilizado distintas marcas de dinucleótidos, y en general todos han funcionado bien. Lo importante es que una vez decididos por una marca, si es posible, hay que tratar de no cambiarla, pues el cambio de marca implica estandarizar otra vez el PCR que ya había salido. Hemos visto que es mejor utilizar la misma marca de polimerasa y de dinucleótidos, ya que cada compañía estandariza sus condiciones con sus propios reactivos, y sobre todo para PCRs difíciles nos ha funcionado mejor de esta manera. Si es un PCR no tan complicado, la polimerasa de la UNAM trabaja bien con distintas marcas de dinucleótidos.

Los oligonucleótidos deben ser sintetizados por alguna compañía comercial, y dentro de la UNAM también hay unidades de síntesis en varios institutos de investigación, como los de Fisiología Celular y Biotecnología. Para mayor información al final del capítulo hay un pequeño directorio con algunos de estos servicios que es posible obtener en la UNAM.

Un asunto crítico que a veces uno no considera es el agua. El agua que se utiliza en una reacción de PCR debe tener muy pocas sales (bidestilada) y si hay variaciones en la cantidad de iones entre una reacción y otra podría haber problemas. Si se cuenta con un buen desionizador en el laboratorio será suficiente con sólo esterilizarla (ver apartado sobre contaminación del PCR para evitar riesgos), si no es así será necesario recurrir al agua que venden las compañías comerciales, embotellada y libre de nucleasas.

Tubos y puntas, será elección de cada quien. Casi todos los termocicladores funcionan con tubos de 0.2 ml cuyas paredes son muy delgadas para que se ajuste mejor la temperatura al interior del tubo cuando se hace la reacción. Hay marcas más baratas, algunas de ellas con la gran desventaja de que las tapas de los tubos no cierran bien y el contenido se evapora, pero hay que probar, pues no siempre es así. Desde luego, todo el material deberá venir certificado: libre de ARNasas y ADNasas.

Los termocicladores también son una elección personal que depende en gran parte del presupuesto. Los hay de todos tipos y para todas las necesidades: que le quepan muchos tubos, que hagan gradientes de temperatura, que sean muy rápidos y exactos para alcanzar las temperaturas programadas... hemos tenido de distintas marcas y nuestra experiencia ha sido que han funcionado mejor los más sencillos que sólo suben y bajan temperaturas con precisión y rapidez. Los termocicladores de modelos más viejitos son menos precisos, ya que los tubos que utilizan son de plástico grueso y la temperatura a la que trabajan no es tan exacta; otra desventaja es que son muy lentos y el PCR tarda mucho en estar listo.

HACIENDO PCR: CÓMO HACERLO Y ALGUNOS TIPS PARA QUE SALGA MEJOR

El PCR es una técnica aparentemente sencilla y fácil de hacer. El problema es que no siempre es así. La reacción de PCR es muy sensible a cambios de iones, temperaturas, contaminantes que pueden estar en el ADN o en el agua... de un termociclador a otro puede haber variaciones ¡y a veces es difícil entender porqué no sale nada! En este apartado trataremos de mencionar todos los detalles que consideramos podrían ser de ayuda, sobre todo para aquéllos que están empezando a montar la técnica.

ANTES DE EMPEZAR

A nosotros nos ha funcionado bien preparar todos los reactivos en alícuotas congeladas (los guardamos a -20°C), calculando que cada alícuota sirva para unas 5 reacciones como máximo. Sólo para hacer las alícuotas utilizamos puntas especiales con filtro, para evitar contaminarlas, y nos hemos dado cuenta que de esta manera congelamos y descongelamos los reactivos pocas veces, por lo que nos duran más (sobre todo la *taq* y los dNTPs) y además si tenemos algún tipo de contaminación, tiramos las alícuotas que usamos en ese momento, se descongelan nuevas, y de esta forma no tenemos que tirar todos los reactivos a la basura. Es importante considerar que los refrigeradores comerciales con *defrost* automático deshidratan las muestras por lo que hay que utilizar los refrigeradores y congeladores de laboratorio sin esta función.

CONDICIONES DEL PCR

Lo mejor es tratar de empezar con las mismas condiciones que se hayan reportado para el oligonucleótido que estemos utilizando. Cuando se trata de un oligo diseñado en el laboratorio (o que no está reportado) se puede empezar a montar la técnica en condiciones estándares, y dependiendo del resultado, se hacen o no modificaciones (tabla 1). Para ello sugerimos probar primero con pocas muestras (por ejemplo, de 5 a 10 ADN's diferentes), y una vez que esté montado el PCR, entonces sí hacer el experimento con las muestras que se necesiten.

Tabla 1. Condiciones estándar para un PCR
(cálculos para 50 µl en cada tubo)

	Concentración inicial*1	Concentración final en la reacción	Cantidad para un tubo	Cantidad para 10 tubos
dNTPs	10mM (todos) *2	200µM varía de acuerdo al magnesio	1 µl	10 µl
Magnesio	25mM	1.5mM puede probarse de 1 a 4 mM	3 µl	30 µl
Oligo forward	10µM	1µM puede probarse de 0.1 a 1 µM	5 µl	50 µl
Oligo reverse	10µM	1µM puede probarse de 0.1 a 1 µM	5 µl	50 µl
Enzima	5U/µl	1U	0.2 µl	2 µl
Buffer	10x	1x	5 µl	50 µl
Agua	--	--	29.8 µl	298 µl
ADN (agregar después de dividir el mix)	0.1mg/ml	0.1mg genómico (máximo 500 ng; de bacteria de 1 a 10 ng y si es plásmido de 0.1 a 1 ng)	11 µl	---

*1Las concentraciones iniciales son las más comunes del mercado, para los dNTPs o los oligos son las concentraciones a las que más comúnmente se preparan.

*2La concentración de los dNTPs a 10 mM, se refiere a la suma de los 4 dNTPs, y cada uno está a 2.5 mM.

En esta tabla hemos anotado las concentraciones finales de cada reactivo, y en las columnas siguientes anotamos cómo haríamos un PCR con estas concentraciones en el laboratorio. Por cada tubo sabemos qué cantidad agregar, y dependiendo del número de muestras que usaremos se calcula la cantidad necesaria de cada reactivo. En este caso pusimos de ejemplo un experimento con 10 muestras: en un tubo eppendorf de 1.5 ml mezclamos las cantidades calculadas (excepto el ADN) y cada uno de los 10 tubos se llena con 49 μ l de mezcla, y al final se agrega el ADN de cada muestra.

Una recomendación importante es hacer la mezcla del PCR lo más homogénea posible. Una causa muy común de errores la encontramos aquí, el congelar y descongelar cambia las concentraciones de los reactivos y/o forma gradientes dentro de los tubos, y al homogeneizarlos aseguramos obtener resultados reproducibles. Para hacerlo, nos aseguramos de que todos los reactivos se descongelen totalmente sobre el hielo, y para utilizar siempre la misma cantidad de reactivo en el experimento, cada tubo se invierte y se le dan golpecitos con los dedos; como el contenido queda regado en las paredes utilizamos una picofuga (centrífuga pequeña) para juntar el líquido (también se puede juntar a mano con varias sacudidas fuertes hacia abajo aunque esto no es tan eficiente). Estas indicaciones las seguimos con todos nuestros reactivos, excepto la polimerasa, que nunca sacamos del congelador de -20°C ; cuando necesitamos usarla, en el mismo congelador tomamos lo que se necesite. Al final, cuando ya hicimos la mezcla en el tubo y hemos agregado la *taq*, se invierte suavemente varias veces (sin hacer burbujas pues se desnaturaliza la polimerasa) y se baja la mezcla en la picofuga. Ya preparados, los tubos deben mantenerse en hielo o a 4°C hasta meterlos al termociclador, para evitar que la polimerasa sintetice fragmentos inespecíficos.

TEMPERATURAS Y CICLOS

Recomendamos buscar algunos artículos que han trabajado con sistemas parecidos, ya sea el organismo, el gen o el tipo de ADN que se desea trabajar, y empezar a trabajar con las temperaturas que se reportan. Si esto no funciona, o no hay reportes de esos oligonucleótidos, las temperaturas y los ciclos estándares que en general se recomiendan para empezar a probar son los siguientes:

- Desnaturalización inicial: 95°C por 5 a 10 mn;
- 30 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 50°C por 30 s y extensión a 72°C por tiempo variable (ver más adelante);

- Extensión final a 72°C por 10 mn (aunque no es estrictamente necesario este último paso, es sólo para asegurar que los fragmentos incompletos se terminen de sintetizar);
- Al final se programa la máquina para que conserve los tubos a 4°C.

En cuanto al tiempo, existe una regla que puede aplicarse a casi todos los PCRs: la temperatura de desnaturalización y de alineamiento es suficiente de 30 a 60 s. Si es una buena máquina que llega rápidamente a la temperatura programada, con 30 s es suficiente. Para la extensión, dependiendo del tamaño que esperemos se utiliza más o menos tiempo para permitir que la polimerasa trabaje adecuadamente, si se espera un producto de 1 kb, con 1 min es suficiente, si es de 2 kb, 2 minutos, y si es menos, se hace la conversión equivalente (Henegariu, 1997).

Casi todos los PCRs funcionan bien con 30 ciclos, aunque pueden usarse desde 20 ciclos hasta 35. Alguna vez nosotros utilizamos menos ciclos para un PCR que nos daba problemas: por más que hicimos, era imposible quitar una banda inespecífica que se amplificaba en poca cantidad, y bajando los ciclos logramos deshacernos de ella, logrando tener el PCR que esperábamos, de una sola banda (aunque obtuvimos menos producto).

LA TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO

Si con estas temperaturas estándares el PCR no está dando buenos resultados se pueden hacer variaciones en la temperatura de alineamiento. Si la temperatura de alineamiento es muy baja, obtendremos un PCR menos específico, y si es muy alta, la especificidad será mayor (aunque si es demasiado alta no se amplificará nada, pues la unión de los oligonucleótidos con sus sitios complementarios será poco estable y la polimerasa no podrá iniciar la síntesis).

Para PCRs muy específicos en los que se amplifica una sola banda es importante elegir una temperatura de alineamiento que sea la correcta y que nos asegure que el gen que amplificamos es realmente el que queremos. En el caso de PCRs de más de una banda si la temperatura que utilizamos no es tan específica podemos obtener poca reproducibilidad en los experimentos, ya que el oligo se pegará en cualquier parte al azar y no solamente en los sitios que son complementarios, lo que hará que se amplifiquen zonas distintas en un PCR y otro.

Para tener una idea de la temperatura de alineamiento que podría ser la mejor para nuestros oligos podemos calcular la T_m de cada oligo que utiliza-

mos. T_m significa en inglés *melting temperature* y se refiere a la temperatura a la que se hibridan o se pegan los oligonucleótidos en los sitios que son complementarios. Este proceso dependerá principalmente del tipo de uniones (dobles o triples enlaces de hidrógeno) que formarán sus bases, y por eso la secuencia de cada oligo es la que se toma en cuenta para conocer cuál es la temperatura óptima para su alineamiento. Existen muchas maneras de calcularla, por ejemplo una sencilla es:

$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ (Entrala, 2000), aunque hay muchas otras que también pueden utilizarse (hay sitios en internet que lo calculan, ver referencias al final). Conocer la T_m puede darnos una idea, pero no siempre es la temperatura que se utiliza en el termociclador, ya que también los iones y otras sustancias que haya en la reacción pueden influir en la forma en que se unen los oligos. Una de estas fórmulas toma en cuenta los iones, pero en general hay que probar experimentalmente hasta encontrar la temperatura óptima.

¿QUÉ HACER CUANDO TODO EMPIEZA A FALLAR?

Si al probar las condiciones estándares obtenemos demasiadas bandas, o no hay ninguna, algunas posibilidades de lo que esté pasando podrían ser:

1) ¿Cuál es la calidad del ADN que tenemos?

Muchas veces cuando no sale un PCR el problema está aquí (para mayor información puede consultarse el capítulo 16 de este libro). El ADN puede estar contaminado con proteínas o alguna sustancia que inhibe la reacción de PCR. Nuestra experiencia ha sido que ahorra más tiempo y dinero a la larga extraer el ADN con un kit comercial que esté diseñado específicamente para el tipo de organismo con el que trabajemos. En general todas las técnicas de extracción tiene principios básicos comunes: primero romper el tejido y las membranas celulares y nucleares, casi siempre con algún tipo de detergente (por ejemplo el SDS o el CTAB). Si quedan restos de SDS la reacción puede inhibirse, aunque esto puede neutralizarse utilizando 0.5% de Tween 20 o 40 en la reacción de PCR (para más información, consultar el sitio de Lieb B., 2003). Después es necesario deshacerse de todos los componentes celulares que se liberan, y dejar al ADN limpio para poder amplificarlo. A veces se usan sales (como acetatos por ejemplo) que precipitan las proteínas pero no el ADN; o cloroformo y fenol que “atrapan” los lípidos y proteínas y dejan al ADN disuelto en agua. También el cloroformo y el fenol inhiben la reacción de PCR, así como el etanol. Además cada tipo de célula o tejido tiene

componentes característicos, que a veces no podemos quitar y que también inhiben la reacción de PCR, por lo que es necesario investigar qué protocolo es el mejor para el tipo de organismo que trabajemos. Otra posibilidad es que el ADN esté degradado, y para saberlo recomendamos correr una pequeña muestra de nuestro ADN en un gel, hemos visto que de esta manera incluso podemos notar si la cantidad de ADN que estamos utilizando es la correcta o no, y aunque sea indirectamente (no es una medida exacta) podremos hacer un cálculo visual de cuánto ADN tenemos por muestra.

2) Hacer curvas de cloruro de magnesio

Es de las primeras cosas que ajustamos para una reacción de PCR que no ha salido del todo bien. La polimerasa necesita de iones de magnesio para funcionar adecuadamente y en general la concentración de 1.5 mM de magnesio es la más común, pero puede probarse en un rango de 1 a 4 mM. Mucho magnesio inhibe a la polimerasa, y poco puede generar productos inespecíficos.

3) Revisar la concentración y el manejo de los dNTPs

Los dinucleótidos unen iones de magnesio. Para 1.5 mM de magnesio en la reacción de PCR, una concentración ideal de dNTPs es de 200 μ M. Pequeños incrementos en la concentración de dNTPs pueden inhibir la reacción porque atraparán el magnesio necesario para que la polimerasa trabaje. Si cambiamos la concentración de dinucleótidos es importante tener en cuenta que existe una relación entre las cantidades de magnesio y las de dinucleótidos en la reacción. También es necesario saber que los dNTPs son muy inestables, si se descongelan más de 3 a 5 veces pueden no funcionar tan bien. Por eso recomendamos hacer pequeñas alícuotas, calculando que sirvan para 3 o 5 experimentos.

4) Revisar el buffer y agregar aditivos

En general cada polimerasa viene con un buffer ya preparado con los reactivos necesarios para que funcione de forma adecuada. Casi todos están preparados con KCl y tris (un buffer 10X estándar contiene 500 mM KCl y 100 mM Tris-HCl, pH 8.3). Algunos buffer incluyen el magnesio necesario para la reacción, y puede suceder que al no notarlo y agregar magnesio extra se esté trabajando en concentraciones mayores a las que suponemos. Será necesario entonces pedir un buffer sin magnesio, y/o tomar en cuenta la concentración del magnesio que incluye (usualmente están preparados para quedar a 1.5 mM

final en la reacción). También es posible utilizar aditivos que en ocasiones mejoran el rendimiento de los PCRs, aunque no siempre funcionan, a veces no tienen ningún efecto o a veces incluso podrían bajar el rendimiento en lugar de aumentarlo, así que hay que probar. Brevemente expondremos aquí algunos de los más comunes (Lieb, 2003). **Formamida**: estabiliza la estructura secundaria del ADN. Generalmente se recomienda utilizarla de 1% hasta 5%. Existen algunos reportes que la utilizan cerca del 10%, pero podría inhibir la reacción de PCR, así que es mejor no utilizar concentraciones mayores a las estrictamente necesarias para una óptima amplificación. **Detergentes no iónicos**: estabilizan la *taq* y evitan la formación de estructuras secundarias. 0.1 a 1% de Tritón X-100, Tween 20 o NP-40 pueden incrementar el rendimiento de la reacción, pero también pueden incrementar la cantidad de productos inespecíficos. **BSA (Bovine Serum Albumin o Albúmina Sérica Bovina)**: a concentraciones por encima de 0.8 µg/µl el BSA incrementa la eficiencia de la PCR, ya que actúa como una proteína captadora de iones y otros inhibidores de la *taq* polimerasa como la melanina. **DMSO (Dimetil Sulfoxido)**: para algunas amplificaciones podría ser necesario utilizarlo del 2 al 10%, ya que reduce la estructura secundaria del ADN y es útil sobre todo para amplificar regiones con gran cantidad de GCs, aunque se ha visto que al 10% inhibe la actividad de la *taq* en un 50 %.

4) Revisar los oligonucleótidos

Podrían estar degradados, defectuosos, mal diseñados o incluso que la cantidad utilizada no sea la correcta. Si hay mucha cantidad aumenta el rendimiento del PCR, pero podrían formarse productos inespecíficos, y si se agrega aún mayor cantidad los oligos pueden formar dímeros, en vez de unirse al ADN, y eso impide la amplificación del producto. Si utilizamos muy poco podríamos tener mayor especificidad en el producto, pero puede suceder que no veremos el amplificado (pues baja el rendimiento), así que será necesario encontrar el óptimo para nuestra reacción.

CONTAMINACIÓN

Es muy frecuente que los PCRs se contaminen. Para monitorearlo, siempre hay que trabajar con un control negativo: un tubo extra al que se le agreguen todos los reactivos utilizados en el PCR, **excepto ADN**. Si en esta muestra hay amplificación significa que en algún reactivo hay restos de ADN o de producto de PCR que está contaminando el experimento. Si esto sucede, consideramos

que lo más fácil es deshacerse de todas las alícuotas sospechosas (por eso es importante preparar alícuotas de todos los reactivos) y tomar alícuotas nuevas. Para prevenirlo sugerimos algunas medidas que podrían ser de utilidad: los productos de PCR son frecuentemente los que contaminan, al ser moléculas de tamaño muy pequeño y al estar tan concentradas es fácil que una gotita de producto quede en una pipeta (las pipetas absorben el líquido por aspersion y las gotitas quedan regadas como si fueran spray); al preparar una mezcla posteriormente, esto contamina alguno de los reactivos que se utilizan. Para evitarlo existen puntas con filtro y pipetas especiales, pero son caras. También existen cabinas con luz UV y flujo laminar, aunque también son caras. La luz UV forma dímeros de pirimidina entre las dobles cadenas de ADN, por lo que estas moléculas se vuelven imposibles de amplificar. Por otro lado, el flujo laminar evita contaminación de un tubo a otro, y es útil sobre todo si se trabaja con plásmidos o reamplificando productos de PCR ya que las moléculas pequeñas son altamente contaminantes.

Sugerimos también separar las áreas de trabajo (la zona de preparación y la zona de amplificación; si no es posible, limpiar muy bien la zona con alcohol antes de preparar la mezcla del PCR, y trabajar siempre sobre un papel) y tener un juego de pipetas exclusivo para trabajar la mezcla para la reacción de PCR, separadas de las pipetas con las que se manejen los productos de PCR ya amplificados. Otra fuente de contaminación es el ADN que amplificamos (¡ya sea de las muestras o el nuestro!), aquí el problema puede ser sobre todo los dedos, al abrir y cerrar los tubos. La sugerencia más común es utilizar guantes, pero para los que tenemos manos pequeñas pueden ser un gran estorbo y las puntas del guante se atorán en todos lados, por lo que consideramos que debe ser una decisión personal, lo importante entonces es estar consciente de dónde pone uno los dedos. También sugerimos agregar el ADN al final en cada tubo, si es posible utilizar una pipeta sólo para el ADN, y si no hay, tener mucho cuidado y limpiar muy bien las pipetas después de agregarlo. También se evita la contaminación si se guardan en lugares y/o cajas distintas los reactivos del PCR, las muestras de ADN y los productos de PCR.

Otra sugerencia es utilizar material que haya sido esterilizado en autoclave para que esté libre de ADN y de nucleasas. Esta es una medida muy común, pero hemos tenido contaminaciones provenientes del agua de la autoclave, que contenía gran cantidad de algas, y el proceso de esterilización no fue suficiente para eliminar el ADN de estos microorganismos. Desde entonces decidimos no esterilizar el material del PCR, y para descontaminar utilizamos luz ultravioleta en las pipetas; las puntas y tubos los utilizamos directamente

de las bolsas (de marcas certificadas, libres de ADNasas, ARNasas y ADN), con lo cual logramos eliminar la contaminación.

Además del control negativo que nos permite visualizar posibles casos de contaminación, una vez que se ha ajustado el protocolo de nuestro PCR es siempre recomendable incluir un *control positivo*. Éste es un tubo que contiene ADN de una muestra que haya amplificado adecuadamente y cuyo patrón de bandas es conocido. De esta manera, puede esperarse que si la reacción se llevó a cabo correctamente, esta muestra siempre salga. En caso contrario, si nuestro PCR no generó bandas en ninguna de las muestras, ni siquiera en el control positivo, puede suponerse que el error radica en que se nos olvidó agregar algún ingrediente o bien que los ciclos de temperatura no se llevaron a cabo adecuadamente, ya sea por problemas de la máquina o bien por error al elegir el programa de amplificación.

MÉTODOS PARA VISUALIZAR EL PCR

PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA ELECTROFORESIS

La idea ahora es poder analizar el o los fragmentos obtenidos en el PCR, y la electroforesis, ya sea en geles de agarosa o de acrilamida, permite separar estos fragmentos de acuerdo al tamaño de cada uno. Tanto la agarosa como la acrilamida forman una especie de red con agujeros de tamaños diferentes, por la cual obligamos a pasar los fragmentos de ADN, “jalándolos” a través de corriente eléctrica, hacia el polo positivo, ya que la carga de una molécula de ADN es negativa por la presencia de grupos fosfato (P). Los fragmentos más pequeños pasarán primero a través de la red de agujeros, mientras que los más grandes se irán retrasando y atorando en los hoyos; de esta manera los fragmentos de tamaños similares migrarán a ritmos similares. Si hay muchos fragmentos de un mismo tamaño se agruparán todos juntos, por lo que podremos verlos formando lo que llamamos una **banda** en el gel.

¿Hacemos nuestro gel con agarosa o acrilamida? Las moléculas de acrilamida forman redes con tamaños de poros más uniformes y más pequeños que la agarosa, por lo que este tipo de gel es útil si los tamaños de los fragmentos que manejamos son pequeños; la separación puede ser tan fina que con algunas técnicas es posible separar moléculas de ADN que tienen una sola base de diferencia. El problema es que las técnicas de acrilamida son muy laboriosas y la tinción con plata (si no quiere usarse radioactividad) tiene muchos trucos, por lo que en este apéndice sólo anotaremos algunas recetas para lo más

sencillo, que son los geles de agarosa. Para más información sobre geles de acrilamida pueden consultarse los sitios de internet que sugerimos al final del capítulo. La agarosa no forma redes tan uniformes, pero permite separar las moléculas de ADN en un intervalo muy grande. Utilizarla es muy sencillo y teñir los geles también lo es.

a) Métodos para geles de agarosa

Será necesario tener en el laboratorio equipo que nos permita trabajar con los geles: una cámara de electroforesis, una fuente de poder, un transiluminador de luz UV y equipo de fotografía (lo más sencillo: una cámara polaroid, un filtro para luz UV y un cono adaptado a la cámara, o también existen cámaras especiales y equipo de cómputo específico para ello) para guardar la imagen del gel. Para empezar hay que preparar el buffer de corrida, el cual tendrá el pH requerido y los iones necesarios para que fluya la corriente y pueda migrar el ADN. Si en lugar de buffer utilizáramos agua, el ADN se quedaría inmóvil y no veríamos migración en los geles, y si por el contrario utilizáramos un exceso de sales, el gel se calentaría tanto que al final acabaría por derretirse. El buffer más común es el TBE (Tris Boratos EDTA), que por ser muy estable puede reutilizarse varias veces. También se utiliza con frecuencia el buffer TAE (Tris Acetatos EDTA), que es menos estable que el TBE y tiende a ionizarse más rápido, pero permite obtener mejor separación de bandas, sobre todo si son de gran tamaño (1 kb o más). Las recetas para preparar éstas y otras soluciones están al final de este apartado. Dependiendo del tamaño de los fragmentos que esperamos se utilizará una concentración de agarosa mayor o menor para obtener agujeros menos o más grandes y una mejor resolución de nuestras bandas. Si no conocemos el tamaño, se puede empezar con agarosa al 1%, pero si se conoce, se puede usar esta tabla como guía:

Rango efectivo de separación (kb)	Agarosa (%)
30 a 1	0.5
12 a 0.8	0.7
10 a 0.5	1.0
7 a 0.4	1.2
3 a 0.2	1.5

Fuente: Tomado de Sosnick, 2003.

La agarosa se disuelve en el mismo buffer que utilizaremos para la corrida, y se calienta hasta ebullición para disolver bien el polvo. Hay que tener cuidado

de retirarla del calor o del microondas en cuanto comienza a hervir, pues podría derramarse. Si es un gel muy importante, en el laboratorio pesamos el matraz donde se prepara el gel antes y después de calentarlo, y le agregamos el agua que haya perdido durante el calentamiento, para asegurar que la concentración de agarosa sea la correcta. La solución se agitará suavemente para evitar la formación de burbujas, y cuando se enfríe un poco (aprox. 60°C) se vierte de una sola vez en el contenedor de geles al que ya le colocamos el peine para que se formen los pozos en donde cargaremos las muestras. Si quedan algunas burbujas, rápidamente con la punta de una pipeta podemos picarlas y quitarlas; si se dejan pueden hacer que la electroforesis no migre en forma homogénea. Cuando se enfríe y solidifique agregamos el buffer necesario hasta cubrir BIEN el gel (hemos visto que de esta forma el peine se puede quitar más fácilmente), y después se retira el peine con cuidado para no romper el fondo de los pozos.

b) Cargando el gel

Con una pipeta, cada muestra se vierte en un pozo, mezclada previamente con 1 ó 2 microlitros de colorante de corrida (receta al final). Generalmente los colorantes de corrida llevan alguna sustancia espesa, como glicerol o sacarosa, que permite que la muestra caiga hacia el fondo del pozo, y los colorantes (como el xilen-cianol o azul de bromofenol) nos dan una idea de cómo van migrando los fragmentos (en un gel de agarosa al 1%, el azul de bromofenol migra junto con los fragmentos de 300 pb, y el xilen-cianol migra igual que los fragmentos de 4 kb). No es necesario utilizar toda la muestra de PCR en una corrida, puede utilizarse del 10% al 20% de la cantidad total del PCR que hicimos (*i.e.* si en total son 50 µl, se cargarán 5 µl de muestra).

Nosotros en un parafilm depositamos unas gotitas de colorante (las necesarias para el número de muestras que usemos) y después agregamos la gotita de la muestra a cargar sobre la gota de colorante. Con cuidado de no hacer burbujas las mezclamos subiendo y bajando con la pipeta. La punta de la pipeta se mete un poco en el pozo (¡sin romperlo!) y lentamente se vacía la pipeta para cargar el gel. Para que las muestras no se derramen y no se mezclen unas con otras hay que evitar llenar el pozo hasta arriba. Por lo menos un carril del gel siempre deberá tener un marcador de peso molecular (muchas casas comerciales los venden) como control para saber el tamaño de las bandas que tendremos. Tampoco debe olvidarse poner en el gel los controles negativo y positivo. El PCR sobrante lo guardamos congelado a -20°C por si lo necesitamos después. Cuando el gel está listo se conectan los cables, lo más común es un cable rojo para conectarlo al polo positivo y uno negro

en el negativo. El ADN migrará hacia el polo positivo ya que los fosfatos de la molécula le confieren carga negativa, por lo que hay que asegurarse que la corrida del gel sea HACIA el cable rojo, o polo positivo. Para el voltaje, se recomienda utilizar 5 volts por cada centímetro que exista entre los dos electrodos de nuestra cámara (i.e. si la cámara mide 30 cm se correrá a 150V), esta medida se aplica cuando tenemos fragmentos grandes, de más de 2 kb; para un PCR con fragmentos pequeños, de 100 pb hasta 1 kb, nosotros utilizamos casi siempre 90 a 100 volts para geles chicos y/o grandes, y los dejamos 1 ó 2 horas, dependiendo del largo del gel.

c) Tinción del gel

Lo más común es utilizar bromuro de etidio, que es una molécula con dos propiedades importantes: se intercala en las bases del ADN y brilla con luz UV a una longitud de onda determinada (264-366 nm) con lo cual podemos observar las bandas de ADN en el gel. El bromuro de etidio es un mutágeno y es altamente tóxico, por lo cual es necesario utilizar guantes y bata para su manejo. Es recomendable apartar un área del laboratorio y material exclusivo para su uso. Los geles con bromuro deberán juntarse y desecharse con alguna compañía de desechos tóxicos, así como las puntas y guantes contaminados. Las soluciones con bromuro pueden inactivarse, al final hay una lista de 3 sitios en los que dan indicaciones de cómo hacerlo. Si de derrama una pequeña cantidad, hay que absorber muy bien con toallas de papel y después con alcohol (las toallas se juntan en una bolsa para inactivar el bromuro que quede en ellas). Cuando no estamos seguros si algo está o no contaminado con bromuro lo exponemos a la luz UV y si no hay fluorescencia es que no hay bromuro. Hay dos maneras de teñir el gel: cuando la agarosa está a unos 60°C, antes de verterla, se añade el bromuro de etidio directamente para que quede a una concentración de 0.5 µg/ml en el gel. De esta forma al terminar la corrida puede verse el gel. La desventaja es que el bromuro retarda la migración de las moléculas de ADN, y además la cámara de electroforesis queda contaminada con el bromuro, es por esto que hay quien prefiere teñirlo después de la corrida: el gel se sumerge en una solución de 0.5 µg/ml de bromuro de etidio por 30 a 40 mn y así no se contaminan las cámaras y el ADN migra más rápido, pero es un método más lento. Para los dos métodos será necesario preparar una reserva de bromuro de etidio como se indica al final del capítulo. Al terminar se pone el gel en el transiluminador para verlo. La luz UV puede dañar la piel y los ojos, por lo que será necesario protegerse a través de un acrílico especial y protectores de la cara y/o los ojos.

RECETAS

EDTA	Para preparar ambos buffer TBE y TAE es necesario tener una solución de EDTA 0.5M pH8. Para preparar 100 ml, pesar 18.61g de EDTA y disolver en 70 ml agua. Sólo se disolverá hasta que la solución alcance un pH de 8. Ajustar primero con lunetas de sosa (unas 10), dejar que se disuelvan e ir agregando poco a poco más lunetas hasta llegar a pH de 6 o 7, y aquí ajustar hasta 8 con gotitas de sosa 5 o 10 M, después aforar a 100 ml.
TBE	Se prepara un stock concentrado a 5X, y para hacer el gel, se diluye y se utiliza a 1X o 0.5X. Es común que el TBE se precipite, por eso hay que preparar cantidades que se utilicen constantemente. La receta del TBE 1X es: 0.089M tris, 0.089M ácido bórico y 0.002M EDTA. Para preparar una solución 5X, pesar 54 g de tris-base y 27.5 g de ácido bórico. Disolver en 800 ml de agua y añadir 20 ml de EDTA 0.5M pH8. Aforar a 1 litro. Una solución de TBE bien preparada deberá tener un pH cercano a 8.3 sin necesidad de ajustarla.
TAE	No se precipita y es posible prepararlo muy concentrado, aquí escribiremos la receta al 50X y para la corrida se diluye al 1X. TAE 1X: 0.04M tris-acetatos, 0.002M EDTA. Para una solución 50X: pesar 242 g de tris base y disolverlo en 500 ml de agua estéril, agregar 57.1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8. Aforar a 1 litro.
Colorante de corrida	xilen-cianol al 0.02%, azul de bromofenol al 0.02 % en glicerol al 50%.
Bromuro de etidio	La costumbre es hacerlo a 10 mg/ml, se guarda a 4°C protegido de la luz en una botella oscura, envuelta con aluminio.

BIBLIOGRAFÍA

INFORMACIÓN GENERAL DE LA TÉCNICA

- Afseth G.1997. PCR primer, strategies to improve results <http://www.biotechlab.nwu.edu/pe/> , accesado 08/03.
- Casas Ciria FJ, 2003. Microbiología química en la www <http://www.microbiologia-clinica.com/generalidades.htm>, accesado 08/01.
- Entrala C. 2000. Técnicas de análisis del adn en genética forense <http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/forensetec.htm>, accesado 08/01.

- Prilusky J. 2003. BioGuide-PCR <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/mb/bioguide/pcr/contents.html>, accesado 08/01.
- Roolpi P. 2002. Polymerase Chain Reaction <http://palou.uib.es/roolpi/PCR/> accesado 08/03.
- Vierstraete A. 2001. Principle of the PCR <http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html>, accesado 08/01.

SITIOS COMERCIALES

- Biotools. 2003. Amplificación de ADN <http://www.biotools.net/esp/tecnica/t3.htm>, accesado 08/03.
- Roche. 2000. Innovative tools for amplification http://www.roche-applied-science.com/pcr/application_hints_01_4a1.htm, accesado 08/03.

SITIOS CON TIPS CUANDO HAY PROBLEMAS

- Frame P. 2002. Ten Things That Can Kill Your PCR http://www.biowire.com/nucleus/nucleus_1_1.jsp accesado 08/03.
- Henegariu O. 1997. PCR and multiplex PCR: guide and troubleshooting <http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/PCR.html> accesado 08/03.
- Krivokapich S. J. 2003. PCR links.com la guía web de la técnica de PCR <http://www.espanol.pcrlinks.com/generalidades/aditivos.htm>, accesado 08/03.
- Lieb B. 2003. PCR additives <http://www.uni-mainz.de/~lieb/additiva.html>, accesado 08/03.

SITIOS CON TIPOS DE PCRS (RAPDS, AFLPs, ISSRs...)

- Gillet E. (2000) Which marker for wich purpose? <http://www.metla.fi/archive/forestgen/2000/02/msg00010.html>, accesado 08/03.
- Harlocker S (2003) RAPD PCR <http://avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholars/project/archives/onions/rapd.html> , accesado 08/03.
- Howis S.(2001) PCR techniques <http://rucus.ru.ac.za/~wolfman/Essays/PCR1.html> accesado 08/03.
- SIUC / College of Science (2001) DNA-Based techniques for studies at population & species level. <http://www.science.siu.edu/Plant-Biology/PLB449/DLN.449lectures/PCR&RAPD.htm>, accesado 06/03.

SITIOS CON INFORMACIÓN SOBRE GELES DE AGAROSA O ACRILAMIDA

- Binder A. 1997. Agarose gel electrophoresis <http://www-ang.kfunigraz.ac.at/~binder/thesis/node41.html>, accesado 08/03.
- Wallman S. 2001. Technical tutorials: Polyacrilamide gel electrophoresis <http://biotech.tec.nh.us/BT210/tutorial10.html>, accesado 08/03.
- Sosnick T. 2003. Agarose gels http://sosnick.uchicago.edu/agarose_gels.html.

SITIOS PARA DESCONTAMINACIÓN DE BROMURO DE ETIDIO

- OEHS. 1998. Methods for the destruction and decontamination of ethidium bromide <http://www.utexas.edu/safety/ehs/resources/info.ethidium.pdf> accesado 08/03.
- ORS Chemical Safety. 2001. Decontamination of Ethidium Bromide <http://www.northwestern.edu/research-safety/chem/ethid2.htm>, accesado 08/03.
- UCSC Laboratory Safety Services. 1990. Ethidium bromide, chemical information sheet http://ehs.ucsc.edu/Lab_Research_Safety/Pubs/Facts/ETBR.pdf, accesado 08/03.

SITIOS CON OTRAS REFERENCIAS Y/O VÍNCULOS

- Gannon P. 2000. Cell and molecular biology on line <http://www.cellbio.com/protocols.html>, accesado 08/03.
- Highveld. 2003. The World Famous PCR Jump Station <http://highveld.com/f/fpcr.html>, accesado 08/03.

CALCULAR T_M

- Buehler E. 2003. Oligo calculador <http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html>. Consultado el 08/03.
- Cao Q. 2002. Oligonucleotide Properties Calculator <http://www.basic.nwu.edu/bio-tools/oligocalc.html>, accesado 08/03.
- Proligo. 1998. PROLIGO - Oligos Parameter Calculation <http://www.gensetoligos.com/Calculation/calculation.html>, accesado 08/03.

BIBLIOGRAFÍA SUGERIDA QUE PUEDE CONSEGUIRSE EN LA UNAM

- Bej, A.K., M.H. Mahbubani y R.M. Atlas. 1991. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Critical*

Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 26:301-334.

Burke J. (ed.). 1996. PCR : essential techniques. Wiley Europe, New York, EUA.

Dieffenbach, C.W y G.S. Dvksler. 1995. PCR primer: a laboratory manual. CSHL Press, Cold Spring Harbor, EUA.

Eeles, Rosalind A.. 1993. Polymerase chain reaction (PCR) : The technique and its application. R. G. Landes, Austin.

Erlich, H. A. 1989. PCR technology: Principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, New York, EUA.

Innis M.A., H. David, D.H. Gelfand y J.J. Sninsky (eds.). 1995. PCR strategies. Academic Press, San Diego, EUA.

Mcpheerson M.J., P. Quirke y G.R. Taylor. 1995. Polymerase chain reaction : a practical approach . Oxford university, New York, EUA.

McPherson M.J., B.D. Hames y G.R. Taylor. 1995. PCR 2 a practical approach . Oxford University, New York, EUA.

Mullis K.B., Ferre F, Gibbs R.A eds. 1994. The polymerase chain reaction. Birkhauser, Boston, EUA.

Newton C.R. ed. 1995. PCR essential data. Wiley Europe. Chichester USA.

Rapley R ed. 1996. PCR sequencing protocols. Methods in molecular biology: 65. Humana Press, Totowa, New Jersey.

White B.A. (ed.). 1993. PCR protocols: current methods and applications. Humana Press, Totowa, New Jersey.

White B. A. (ed.). 1997. PCR cloning protocols : from molecular cloning to genetic engineering. Methods in molecular biology: 67. Humana Press. Totowa, New Jersey.

Número de referencia

Lugar en la UNAM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Centro de Neurobiología				x		x	x	x					
Centro Inv. Fijación Nitróg.								x			x	x	
ENEP iztacala			x		x		x						
Facultad de Ciencias	x				x				x		x	x	x
Facultad de Medicina			x			x							
Facultad de Medicina. Investigaciones Clínicas			x		x		x					x	
Facultad de Med. Veterinaria							x	x					
Facultad de Química			x				x	x	x				
Facultad de Química, Posg.			x				x					x	
FES Cuahutitlán							x						

(Continúa)

Lugar en la UNAM	Número de referencia												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
FES Zaragoza Campus 1							x						
FES Zaragoza Campus 2				x			x	x			x	x	x
Instituto de Biología		x									x		
Instituto de Ecología			x		x								
Instituto de Fisiología celular			x	x	x	x		x	x	x		x	x
Inst. Inv. Biomédicas	x		x	x	x	x	x	x			x	x	x
Instituto de Química												x	x
Programa Universitario del medio ambiente									x				
UACP CCH			x		x		x						

DIRECCIONES PARA CONSEGUIR OLIGOS O TAQ EN LA UNAM

1. Unidad de Síntesis. Instituto de Biotecnología, UNAM. Apdo. Postal 510-3 Cuernavaca, Morelos, MEXICO. C.P. 62250. Tel. (01777) 329 1604, (0155) 5622 7604; Fax.(01777) 317 2388. Responsable: Dr. Rubén Paul Gaytán Colín. <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/oligos.html>.
2. Unidad de Síntesis. Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510, México DF. Responsable: Dra Laura Ongay. Teléfono 56 22 56 52. <http://www.ifisiol.unam.mx/UBM.html>
3. Facultad de Medicina Veterinaria. Responsable: Dr. Rogelio Alonso. Tél 56 22 58 94.