

Actividad 3. Simulación de una PCR con los primers diseñados (JAC)

DOMINGO, 19/2/2023

Este cuaderno de actividades te explicará como amplificar por PCR un fragmento de DNA con primers diseñados previamente. También podrás simular una reacción de PCR para optimizar el resultado de la amplificación.

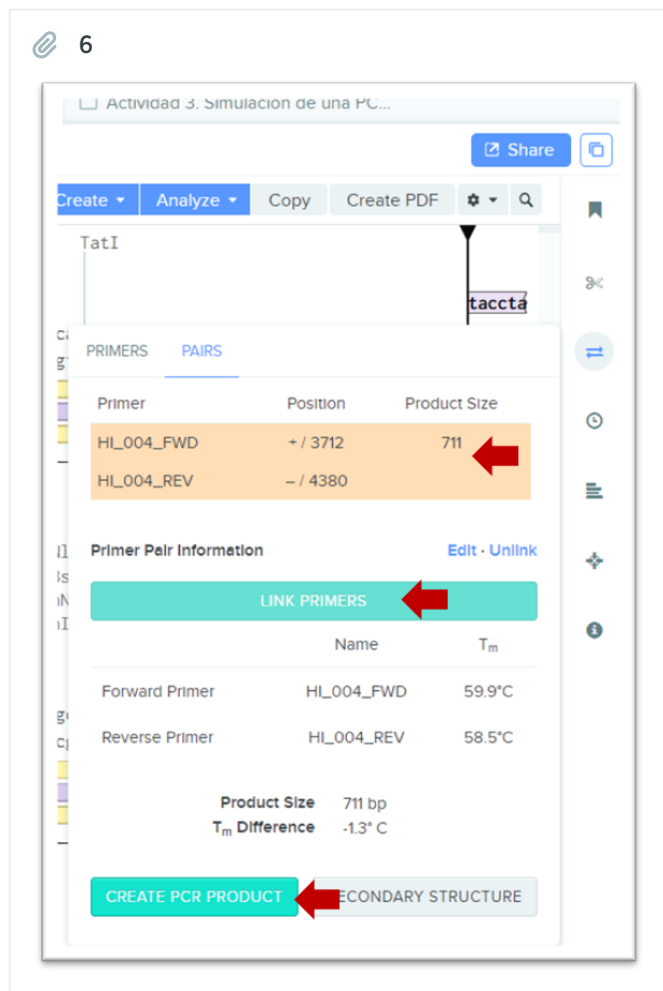
1. Haz click derecho en la Actividad 3 y cópiala en tu carpeta. Este paso lo repetirás con todas las actividades.
2. Ahora que los grupos de investigación tienen los primers adecuados para cada gen, se disponen a amplificarlos y optimizar la PCR para obtener suficiente material genético. Abre el genoma de [Haemophilus Influenzae](#) . Busca el gen que se te ha asignado para trabajar con él usando la **función lupa**. Si no sabes que gen es, pregunta a tus compañeros de equipo.
3. Selecciona el gen asignado y veras como su secuencia se resalta.
4. Los primers diseñados anteriormente deben aparecer asociados a la secuencia próxima al gen que te corresponde. Explora la secuencia para confirmarlo.
5. Haz click en el icono primers (**dos flechas antiparalelas**) y selecciona en parejas los primers que has diseñado para resaltarlos. Es posible que haya mas primers si otros estudiantes han creado los suyos, es por eso que **el nombre adecuado de los primers es muy importante**.

The screenshot shows a web-based bioinformatics tool interface. At the top, there's a tab labeled 'Actividad 3. Simulación de una PC...'. Below the tab, there are buttons for 'Create', 'Analyze', 'Copy', and 'Create PDF'. The main area displays a DNA sequence with a highlighted region. A table titled 'PRIMERS' is overlaid on the sequence, showing the following data:

Primer	Position	Product Size
HL_004_FWD	+ / 3712	711
HL_004_REV	- / 4380	

Red arrows point to the 'PRIMERS' table and the 'HL_004_REV' primer. The interface also includes a search bar, a 'Share' button, and a sidebar with various icons for navigation and analysis.


6. Al seleccionar el par de primers se resaltarán y podrás unirlos y crear el producto de PCR (Imagen 6)



7. Al guardar el producto de PCR hay una opción **importante** que se debe seleccionar **si, y sólo si**, la orientación del gen seleccionado es inversa ("Use reverse complement instead", **Imagen 7**) como ocurre con el gen HI_004 en el ejemplo . Esta opción hará que el producto de PCR se genere en la orientación correcta.

Copy Selection to New DNA

Customize what gets copied over:

- ☒ Use primer bases instead of sequence (Includes overhang if any)
- ☒ Annotations, translations, and primers
- ☒ Include annotations and translations not fully contained by selection
- ☒ Use reverse complement instead 
- ☐ Preserve sequence indices
- ☒ Tags
- ☒ Description

CANCEL


COPY

8. Guarda el producto de PCR en tu carpeta.

Select a folder

Projects

Filter...

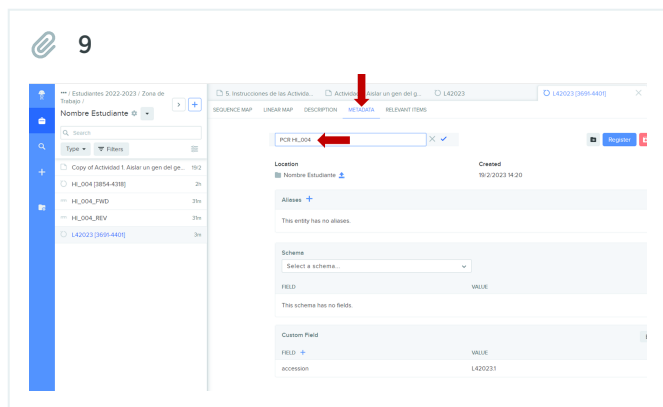
- ★ Molecular Biology Teaching Lab Shared Project MBTL
 - Project Pharmaling
 - Biología Farmacéutica
 - Estudiantes 2022-2023
 - Cloning Results
 - Haemophilus influenzae Rd KW20 chromosome
 - PCR Products
 - Primers
 - Vectores de clonación
 - Zona de Trabajo
 - ✓ Nombre Estudiante 
 - Profesores

Create new folder (MBTL / Molecular Biology Teaching Lab Shared Project / Project Pharmaling / Biología Farmacéutica / Estudiantes 2022-2023 / Zona de Trabajo / Nombre Estudiante)

Select

9. El producto de PCR debe estar en tu carpeta. Ahora hay que nombrarlo correctamente. Puedes hacer click derecho y renombrar o puedes ir a la sección **Metadata** del archivo y cambiar el nombre allí. No olvides hacer click en el check box para guardar los cambios o pulsa enter. Usa un nombre descriptivo como **PCR_ID del gen**.

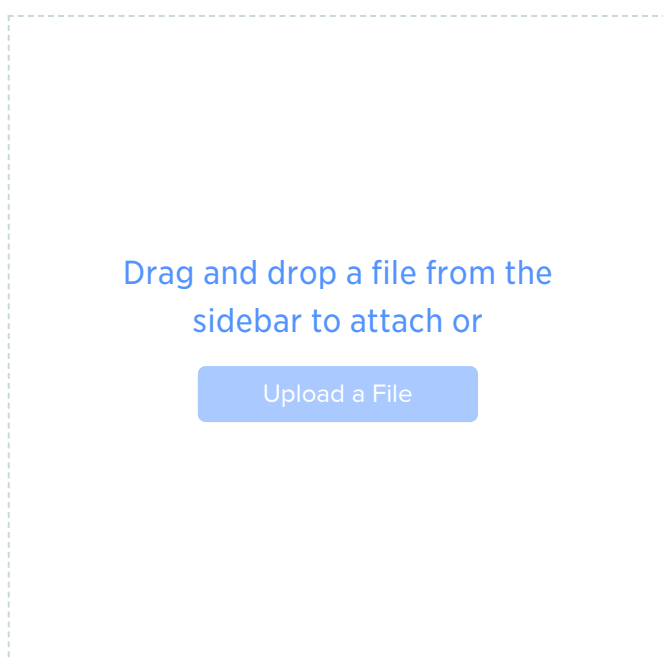




En la ventana de **mapa lineal** podrás ver los **primers**, **sitios de corte de enzimas** e **información** del fragmento amplificado.

Crea un PDF de ese mapa y súbelo entre las líneas

Mapa Lineal del Producto de PCR



10. Al preparar todos los reactivos para la reacción de PCR los grupos de investigación no saben que polimerasa será la mejor para este trabajo, por lo que deben optimizar el proceso. Usaremos esta herramienta [Virtual PCR](#) que nos permite jugar con todos los parámetros que influyen en una PCR. Los creadores de la herramienta son:

Fellermann H, Shirt-Ediss B, Kozyra JW, Linsley M, Lendrem DW, Howard T

[The PCR Simulator: an on-line application for teaching Design of Experiments and the polymerase chain reaction](#) (2018)

INSTRUCCIONES

Tus primers de PCR han llegado y te diriges al laboratorio para clonar tu gen. Los cebadores que has diseñado deberían amplificar un gen que queremos usar para producir una vacuna, afortunadamente, el Prof. E. M. Eritus nos envió el gDNA, pero tenemos que pasar el gen a un vector de clonación.

Todo lo que necesitas hacer es amplificarlo, moverlo a tu vector de clonación favorito y comenzar el trabajo real.

Tienes acceso a dos polimerasas en el laboratorio. La polimerasa [NEB Taq estándar](#) y la polimerasa [Phusion](#) (Pagina 2 del enlace). Cada una viene con su propio buffer e instrucciones ligeramente diferentes para ejecutar la PCR.

Las secuencias de tus cebadores son las siguientes:

Table1		
	A	B
1	Nombre del cebador	Secuencia del cebador
2	FWD1	GCAACGTGCTGGTTATTGTG
3	REV1	AGCGGATAACAATTTCACACAGG

Normalmente la temperatura de annealing (apareamiento) para una PCR es **5 grados menor que la Tm** de los primers, la cantidad de ADN molde que se usa puede ser alrededor de 1ng o menos. Para preparar la reacción has usado **0,5 µL de cada dNTP, 1 µL de cada primer y 1 U de polimerasa**.

Has preparado tus soluciones estándar como de costumbre y estás list@ para comenzar. Usando el simulador virtual de PCR, primero pon tu nombre en la ventana de **USERNAME**, cambia los parámetros de la PCR y haz tres simulaciones para ver como afectan al resultado. Toma fotos de la pantalla, guárdalas como imagen y súbelas aquí para registrar tus simulaciones.

Drag and drop a file from the sidebar to attach or

Upload a File

Drag and drop a file from the sidebar to attach or

Upload a File

Drag and drop a file from the sidebar to attach or

Upload a File

¿Cómo afecta el cambio de los parámetros al rendimiento?

Tu respuesta aquí:


¿Qué rendimiento máximo has conseguido?

Tu respuesta aquí:

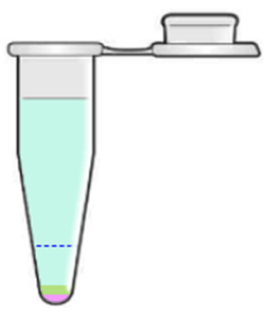
¿Qué pureza máxima has conseguido?

Tu respuesta aquí:

Finalmente, con tu equipo de trabajo, lee las especificaciones de las polimerasas y estableced las condiciones de la PCR para maximizar el rendimiento y la pureza. Los volúmenes de reactivos son estos:

 Volúmenes de reactivos

Each dNTP	<input type="text" value="0,5"/>	μL *
Each primer	<input type="text" value="1"/>	μL **
Plasmid	<input type="text" value="1"/>	ng
Polymerase	<input type="text" value="1"/>	U
of	<input type="text" value="Taq"/>	



Haced una simulación de las mejores condiciones. No olvidéis poner el **nombre de vuestro equipo**. Haced una foto de la pantalla y subidla aquí.

Drag and drop a file from the sidebar to attach or

[Upload a File](#)

¿Qué polimerasa creéis que sería la mejor para este tipo de trabajo?

Tu respuesta aquí:

Con esto has completado la actividad 3.

Si has visto errores en las actividades o piensas que algo no queda claro, toma nota y compártelo con el profesor.