

CÓMO MANIPULAR Y DILUIR LOS CEBADORES PARA SU USO EN EL PCR

Premisas, definiciones y recomendaciones

1. Cada vez que hablamos de concentración **hace referencia a la cantidad de reactivo o producto que hay o tenemos en un litro**. Esta es una de las partes más importantes que tenéis que considerar. Así que cuando hablamos de que una disolución es $5\mu\text{M}$, eso significa que tenemos $5\mu\text{moles}$ de esa sustancia en un volumen final de 1 litro. Obviamente, podemos reducir las proporciones manteniendo la concentración. Por ejemplo, la misma concentración $5\mu\text{M}$ la tendríamos si tuviéramos $2,5\mu\text{moles}$ en $0,5\text{L}$ (hemos reducido ambas cantidades a la mitad). Y lo mismo si tuviésemos $0,25\mu\text{moles}$ en $0,05\text{L} = 50\text{mL}$ (he dividido las cantidades anteriores por 10)
2. $1\text{M} = 1\text{mol/litro}$; $1\text{mM} = 1\text{mmol / litro}$; $1\mu\text{M} = 1\mu\text{mol/litro}$; $1\text{nM} = 1\text{nmol/litro}$
3. $1\text{ litro} = 10^3\text{ mL} = 10^6\ \mu\text{L} = 10^9\ \text{nL} = 10^{12}\ \text{pL}$
4. $1\text{ mol} = 10^3\ \text{mmol} = 10^6\ \mu\text{mol} = 10^9\ \text{nmol} = 10^{12}\ \text{pmol}$

Es conveniente hacer todas las conversiones y cálculos considerando el litro como volumen para evitar problemas

- La Tabla 1 que veis abajo muestra el contenido normal y aconsejado en una reacción de PCR
- Lo más normal es hacer una reacción de PCR con un volumen total de $25\ \mu\text{L}$.
- **Conviene tener en cuenta que conviene añadir al menos 1 ó 2 μL de los reactivos o productos para ser capaz de pipetear adecuadamente** (mejor $2\ \mu\text{L}$ que 1, porque sencillamente se añaden con más precisión y seguridad). Para pipetear menos volúmenes, existen pipetas especiales que son muy caras y que nadie suele comprar solo por el hecho de que si puedes pipetear $2\ \mu\text{L}$ en vez de $0,1\ \mu\text{L}$, preferirás usar una mayor dilución de la solución madre a tener que comprar dicha pipeta especial que tiene un precio muy elevado
- Para que no haya confusiones, vamos a hacer lo que nos indica la tabla que ves abajo: añadir $0,5\ \mu\text{L}$ de una solución madre (en la columna Component) y más concentrada de cebadores para añadirlo a una mezcla cuyo volumen final será de $25\ \mu\text{L}$ para obtener finalmente una concentración de cebadores $0,2\ \mu\text{M}$. Pero insisto. Es mejor añadir $2\ \mu\text{L}$ que $0,5\ \mu\text{L}$. **Algo importante es que la tabla indica que debemos preparar las soluciones madre de los cebadores a una concentración de $10\ \mu\text{M}$.**
- Aunque la concentración **final** de cebadores en el tubo de reacción (el de los $25\ \mu\text{L}$) que se puede usar es variable (fijaros que pone que se puede usar entre $0,05$ y $1\ \mu\text{M}$) , **vamos a usar para estos cálculos $0,2\ \mu\text{M}$ como referencia porque es la decisión que se ha tomado en la propia tabla.**

Component	25 μ l reaction	50 μ l reaction	Final Concentration
10X Standard Taq Reaction Buffer	2.5 μ l	5 μ l	1X
10 mM dNTPs	0.5 μ l	1 μ l	200 μ M
10 μ M Forward Primer	0.5 μ l	1 μ l	0.2 μ M (0.05–1 μ M)
10 μ M Reverse Primer	0.5 μ l	1 μ l	0.2 μ M (0.05–1 μ M)
Template DNA	variable	variable	<1,000 ng
Taq DNA Polymerase	0.125 μ l	0.25 μ l	1.25 units/50 μ l PCR
Nuclease-free water	to 25 μ l	to 50 μ l	

Tabla 1. Concentración de reactivos que hay que añadir a unos tubos para realizar la reacción de la PCR. En el caso de los cebadores (primers) se indica un rango de concentraciones permisibles que oscilan entre los 0,05 a 1 μ M. La cantidad óptima que debería usarse puede calcularse mediante la optimización de la reacción. En clase puedo dar algunas puntadas sobre cómo se optimiza una reacción de PCR. Fijaros que puede hacerse una reacción de PCR en un volumen final de 25 o de 50 μ L. **Normalmente, las reacciones de PCR se hacen en un volumen de 25 μ L.** En el apartado Component nos referimos a las soluciones “madre” más concentradas y recomendadas de los diferentes componentes de la mezcla para que añadiendo el volumen indicado en la segunda o tercera columna, se obtenga la concentración final indicada en la cuarta columna.

PROBLEMA 1. ¿Cómo preparamos una disolución madre 10 μ M en cebadores, si la empresa suministradora nos proporciona un tubo con 25 nmoles en total de dicho cebador y el tubo es capaz de albergar como máximo 1,5 mL ?

En la Tabla 1 se nos indica la conveniencia de preparar una solución “madre” de cada uno de los cebadores a una concentración 10 μ M

Por definición:

10 μ M de solución madre significa que hay 10 μ moles en un litro = 10⁴ nmoles en un total de 10³ mL
 Al convertir los μ moles en nmoles, ya podemos utilizar la información que nos han dado de los 25 nmoles

$$\begin{array}{l} 10^4 \text{ nmoles} \text{ ----- } 10^3 \text{ mL} \\ 25 \text{ nmoles} \text{ ----- } X \end{array}$$

$$X = 2,5 \text{ mL}$$

Es decir, si pudiésemos añadir 2,5 mL de tampón TE a uno de esos tubos que nos envían con los 25 nmoles de cebador, ya conseguimos la concentración madre 10 μ M deseada

Pero siempre nos mandan un tubo en el que no nos caben los 2,5 mL (y esto es un caso real, siempre ocurre lo mismo). Como no podemos añadir los 2,5 mL, lo que vamos a hacer es

Así que una sugerencia es la siguiente

1. En vez de añadir 2,5 mL (=2500 μ L) de agua al tubo, añadimos 0,25 mL = 250 μ L = echar 10 veces menos de lo que tenemos que añadir finalmente, por lo que tendremos en el tubo original una concentración de cebadores 10X, esto es, 10 veces más de lo necesario . Para comprobarlo podemos hacer una regla de 3 de nuevo.
 - a. Si en 250 μ L tenemos un total de 25 nmoles,
 - b. en 10E6 μ L (=1L), tenemos que tener 100000 nM = 100 μ M (confirmamos que tenemos 10X)
2. Cerramos el tubo y agitamos vigorosamente.
3. Centrifugamos brevemente el tubo para que toda la disolución se vaya al fondo y no se quede en el tapón.
4. Luego solo tenemos que diluir nuestra solución madre 10 veces, por ejemplo, añadiendo 10 μ L de solución madre a 90 μ L de tampón (de 100 μ M pasa a ser 10 μ M). Con esta dilución obtendremos 100 μ L que es suficiente para hacer 200 reacciones de 25 μ L. Si vamos a hacer unos pocos tubos de PCR, también podríamos diluir la solución madre añadiendo 1 μ L de solución 100 μ M de cebadores + 9 μ L de tampón.
5. Esto lo podemos distribuir, por ejemplo, en un total de 10 tubos (dilución 10+90) ó 100 tubos (dilución 1 + 9) por separado de forma que obtenemos 10 o 100 tubos independientes. Si se nos contamina alguno, lo tiramos y usamos uno nuevo.

PROBLEMA 2. ¿ Qué concentración de solución madre de cebadores (la de la columna Components) debo preparar para que al añadir 0,5 μ L de dicha solución madre, se obtenga en un tubo para PCR con 25 μ L una concentración final de cebadores 0,2 μ M ?

Lo primero que vamos a calcular es la cantidad de cebadores que tiene que haber en esos 25 μ L de volumen final del tubo de PCR para que haya una concentración final 0,2 μ M de cebadores. Esta cantidad es lo que vamos a introducir en cada tubo y de cada cebador para hacer la reacción de PCR.

Fijaros que lo primero que hacemos es usar el concepto de que la concentración se define para un litro. Esto es esencial, y facilita mucho todos los cálculos posteriores.

$$1 \text{ L} = 10^6 \mu\text{L} \text{ ----- } 0,2 \mu\text{moles} \quad (\text{definición de } 0,2 \mu\text{M}, \text{ que es lo que nos indica la Tabla 1})$$

$$25 \mu\text{L} \text{ ----- } X \quad (\text{Calcula la cantidad de cebador que necesitamos en los } 25 \mu\text{L del PCR})$$

$$X = 0,000005 \mu\text{moles} = 0,005 \text{ nmoles} = 5 \text{ pmoles}$$

Comentario 1: *Pues ya véis, en un tubo de PCR con 25 μ L, hace falta añadir 5 pmoles de cada uno de los cebadores para obtener una una concentración final 0,2 μ M de cada uno de los cebadores. No os lieis, cada cebador se usa de forma individual y por separado.*

La Tabla 1 señala que esos 5 pmoles han de ser añadidos en un volumen de 0,5 μ L. En realidad conviene añadirlo en un volumen un poco mayor (por ejemplo, 2 μ L), porque es más fácil de pipetear y dará menos errores, pero por el momento no vamos a complicar esto más.

Ahora tenemos que averiguar cuál es la concentración madre de cebadores que necesitamos para que en esos 0,5 μ L que queremos añadir, añadamos esos 5 pmoles.

0,5 μL ----- 5 pmoles (esto es lo que nos piden que hagamos, añadir 5 pmoles en los 0,5 μL que queremos pipetear)

1 litro = $10^6 \mu\text{L}$ ----- X (al calcularlo en 1L, estamos calculando la concentración)

$$X = 10^7 \text{ pM} = 10^4 \text{ nM} = 10 \mu\text{M}$$

Por tanto ya tenemos la respuesta. Debemos preparar una solución madre 10 μM en cebadores. O dicho de otro modo. Si tenemos una disolución en la que si cogemos 0,5 μL estamos obteniendo 5pmoles de cebadores, lo que en realidad tenemos es una solución madre 10 μM de esos cebadores.

Comentario 2: Efectivamente, la propia Tabla 1 (ver página anterior) nos indica que la solución madre debe ser 10 μM en cebadores para que añadiendo 0,5 μL de la misma a un tubo con un volumen final de 25 μL , se consiga una concentración final 0,2 μM de cada uno de los cebadores.

Pero al menos, ahora ya sabemos cómo se calcula.

PROBLEMA 3 ¿Cuántas reacciones de PCR con los volúmenes y concentraciones indicadas en la Tabla 1 (25 μL y 0,2 μM de cada uno de los cebadores) podemos llegar a realizar si solicitamos a la empresa fabricante de cebadores que nos suministre 25 nmoles de cada uno de los cebadores ?

En el apartado anterior se calculó que en un tubo de 25 μL , 0,2 μM en cebadores, era necesario añadir 5 pmoles de cada uno de los cebadores

$$25\text{nmoles} = 25000 \text{ pmoles}$$

$$25000 \text{ pmoles en total} / 5 \text{ pmoles en cada tubo} = 5000 \text{ reacciones posibles}$$

Otra forma de hacerlo es viendo el volumen total que obtenemos disolviendo los cebadores y lo dividimos por el volumen que añadimos a cada tubo

NOTA: esta cantidad variará como es lógico si añadimos más concentración de cebadores en cada tubo o simplemente un volumen diferente de los 25 μL

Variantes de estos problemas y que pueden formar parte de un examen

1. ¿Cuál debería ser la concentración de la solución madre de los cebadores para que en vez de tener que pipetear 0,5 μL tal y como se indica en la Tabla 1, podamos hacerlo añadiendo 2 μL para obtener la misma concentración final (0,2 μM)?. La racionalidad de este apartado es la de ser capaz de pipetear un volumen con más eficiencia y seguridad.
2. Cuántas reacciones de PCR podemos hacer con 25nmoles de los cebadores si respetamos las condiciones indicada en la Tabla 1 si en vez de hacer la reacción en un volumen final de 25 μL , la hacemos en un volumen de 20 μL .
3. Calcular cómo preparar una solución madre de cebadores añadiendo 2 μL de cebadores a un tubo con un volumen final de 20 μL para obtener una concentración final de 0,3 μM de cada uno de los cebadores. La empresa nos ha enviado 20nmoles del cebador.

4. ¿Qué cantidad de cebadores (en nmoles o mmoles) necesitamos solicitar a una empresa si queremos desarrollar 10.000 reacciones diagnósticas de PCR usando un volumen de 50 μ L con una concentración 0,1 μ M de cada uno de los cebadores.