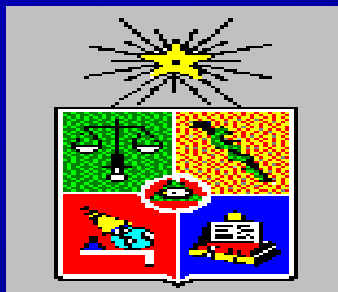


Algunos conceptos básicos en PCR

Dr. Francisco Pérez Bravo

Programa Epidemiología Genética

INTA-Universidad de Chile



Marco General

- Gracias a la ingeniería genética y a la tecnología del DNA recombinante, en los últimos 25 años el DNA pasó de ser la molécula más complicada y difícil de estudiar a ser una de las más utilizadas en el análisis en el diagnóstico clínico.
- Gracias a esta tecnología ha sido posible manipular in vitro el material genético de manera que el operador puede analizar un sin número de aspectos relacionados a un determinado gen, sección de este gen o productos de este gen.

Manipulación del DNA en el uso diagnóstico

Principio

Fragmentos DNA

Secuenciación DNA

Reproducción DNA

Síntesis de cDNA

Detección DNA bloque

Detección RNA bloque

Amplificación DNA

Traslado DNA a células

Traslado DNA a animales

Métodología

Enzimas restricción

DNA polimerasas

Clonación

Transcriptasa reversa

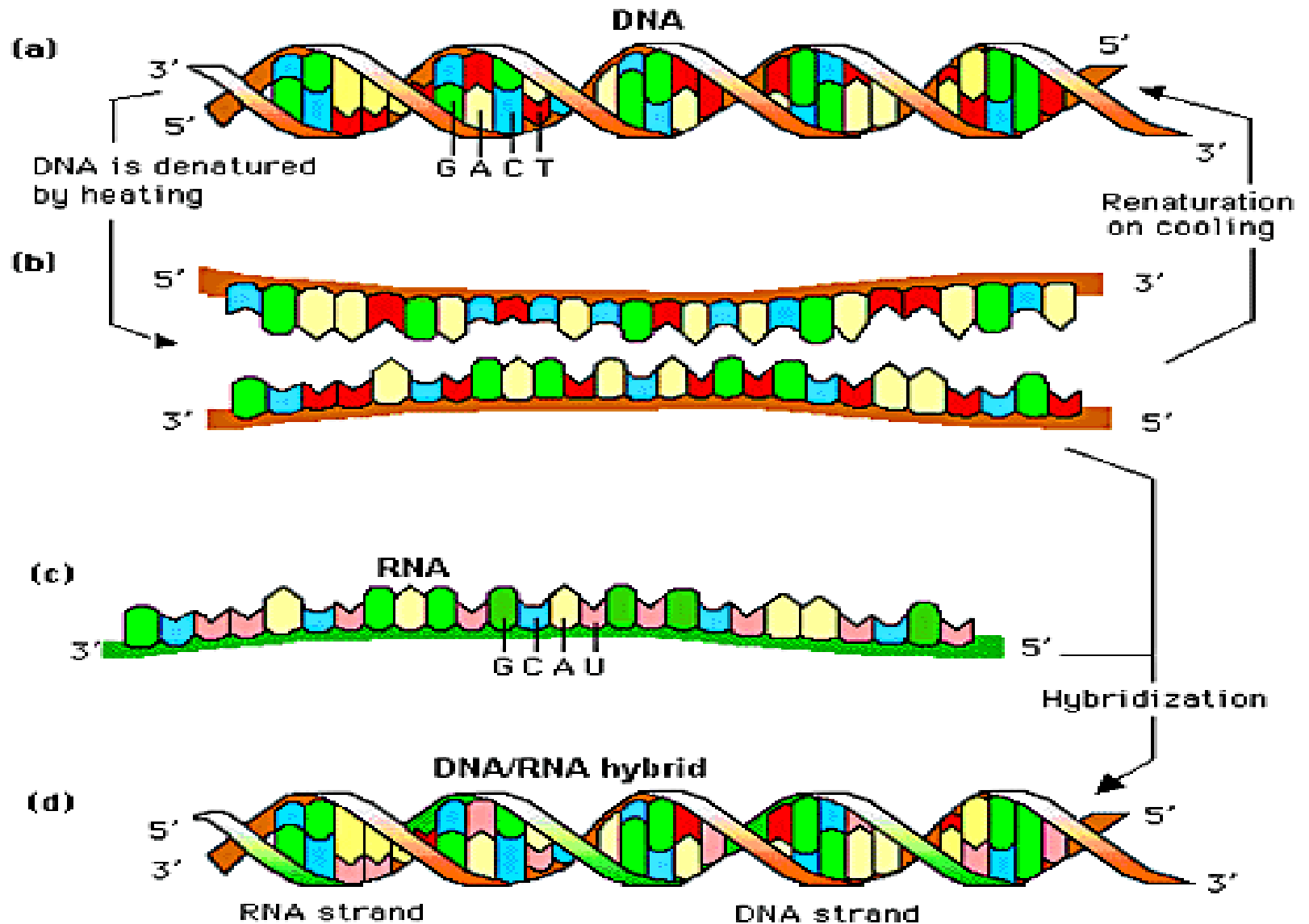
Southern Blot

Northern Blot

PCR

Transfección

Transgénicos



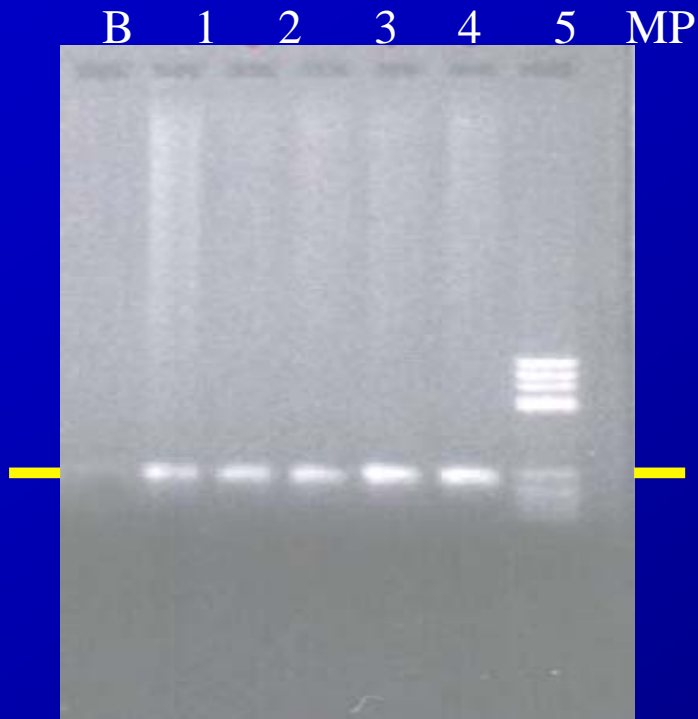
Nucleic Acid Hybridization

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

**Descubierta en 1986 (Mullis).
En el Año 1986 se describen sus
primeras aplicaciones diagnósticas.**

**Su protocolo básico se ha
mantenido en el tiempo y sólo ha
cambiado la utilización de nuevos
equipos.**

**Básicamente consiste en la
multiplicación exponencial del
número de copias de un gen.**

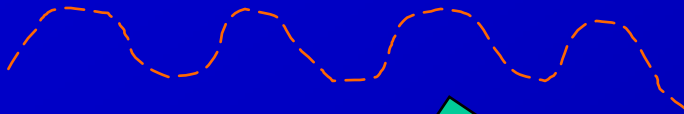


Historia

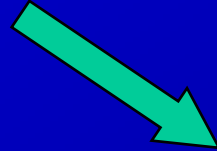
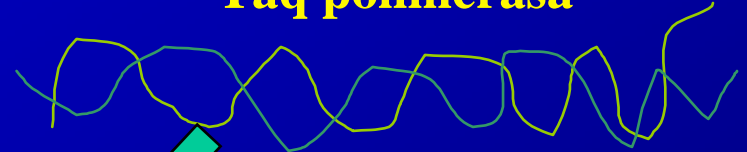
- Los primeros antecedentes de su uso aparecen a fines de 1986 (A. Mullis).
- En 1988 ya se utiliza en diversos laboratorios empleando DNA polimerasa nativa (*E. Coli*). Su gran limitante por estos años radicaba en: mayor cantidad de enzima, resistencia limitada a la T° y alto riesgo de contaminación.
- En 1989 (K. Saiki) patenta el empleo de Taq polimerasa (*Thermophilus aquaticus*) reduciendo la cantidad de enzima utilizada en cada ensayo y aumentando significativamente la resistencia a la alta temperatura.

PCR

Transcriptasa Reversa



Taq polimerasa



**DNA doble hebra
cDNA o híbrido DNA/RNA**

Desnaturalización (94°C)



Primers



Hibridación (42-62°C)

dNTPs



Extensión (72°C)

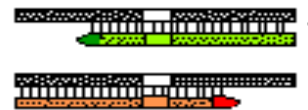
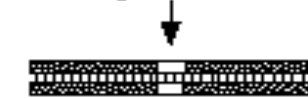
Enzima de polimerización



(Número de Ciclos)

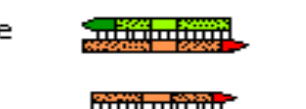
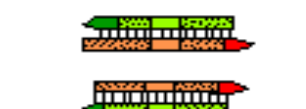
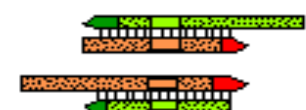
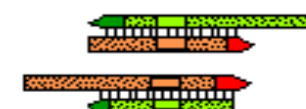
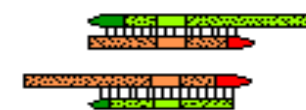
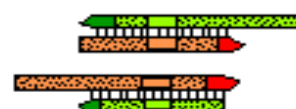
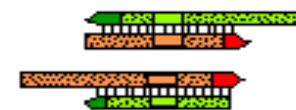
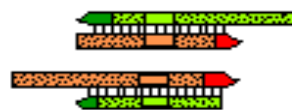
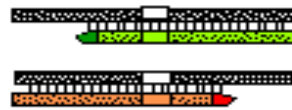
POLYMERASE CHAIN REACTION

DNA region of interest.



primer

1.
DNA is denatured. Primers attach to each strand. A new DNA strand is synthesized behind primers on each template strand.



2.
Another round: DNA is denatured, primers are attached, and the number of DNA strands are doubled.

3.
Another round: DNA is denatured, primers are attached, and the number of DNA strands are doubled.

4.
Another round: DNA is denatured, primers are attached, and the number of DNA strands are doubled.

5.
Continued rounds of amplification swiftly produce large numbers of identical fragments. Each fragment contains the DNA region of interest.

Protocolo Básico PCR

- DNA o RNA de partida.
- 0.1 – 1.0 μM de cada partidor.
- 0.5 – 2.5 U de Taq polimerasa.
- Buffer de reacción (10XPCR) 10–50 mM Tris HCl y 6–50 mM de KCl.
- MgCl_2 o MgSO_4 .
- Agua bidestilada.
- Formamida, gelatina, etc.

Objetivos de la Técnica

- Especificidad: Corresponderá a la obtención de un producto, sin bandas aleatorias (dNTPs, $MgCl_2$).
- Eficiencia: estará dada por la obtención del producto deseado en tamaño y concentración (concentración DNA o RNA, primers).
- Fidelidad: estará dada por la obtención de un producto representativo del protocolo programado.

Otros condicionantes

- Desnaturalización del DNA
(usualmente temperaturas entre 92-96°C)
- Complejidad del DNA.
- Volumen de la Reacción.
- Geometría del tubo.
- Características del termociclador.

Otros condicionantes

- Alineamiento de los partidores
(usualmente temperaturas entre 50-65°C)
- Complejidad de la secuencia.
- Número de bases.
- Extensión del partidador.
- Número de partidores.

Otros condicionantes

- Extensión de la nueva hebra
(por lo general 72°C)
- Los elementos a controlar en el período de copiado o extensión están limitados principalmente al tiempo más que a la temperatura y esto también estará relacionado a complejidad de la secuencia a amplificar.

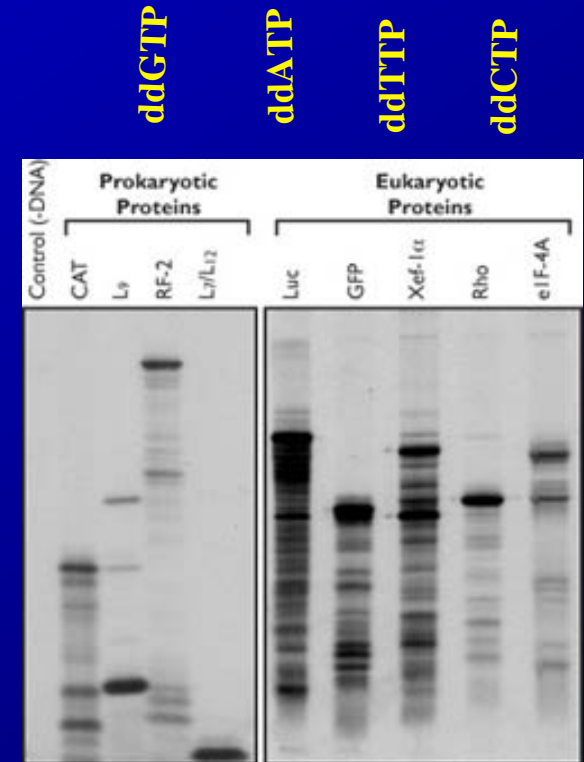
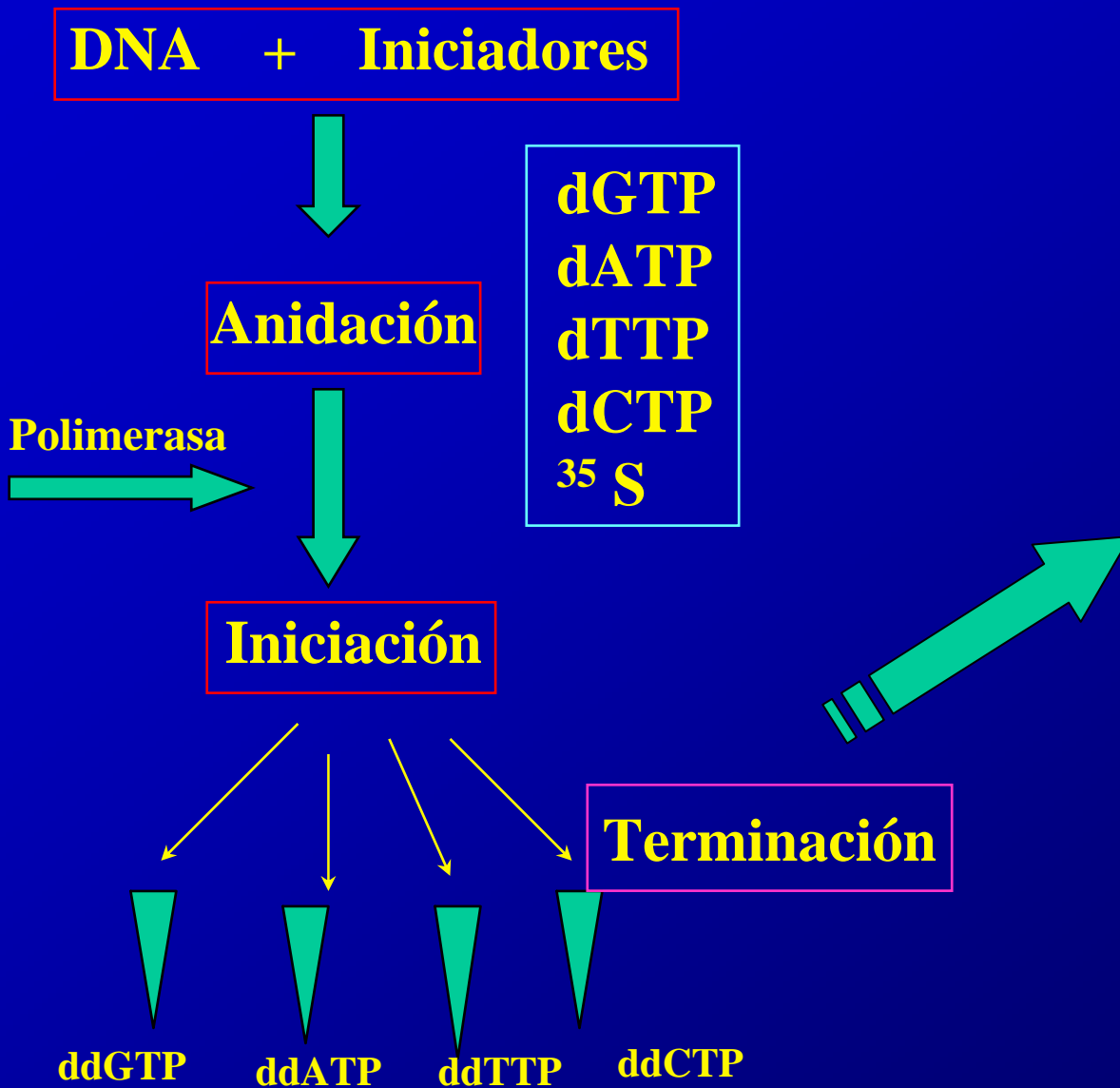
Control de Contaminación

- Siempre se deben utilizar “blancos de reacción”.
- Utilizar reactivos “grado BM” puesto que no introducen nucleasas, metales pesados y otros posibles contaminantes inespecíficos.
- Adición controlada de agentes antimicrobianos (0.025% azida de sodio).
- Pipetas solo para PCR y puntas con filtro (efecto aerosol).
- Soluciones concentradas de trabajo: 10XPCR, 50 mM $MgCl_2$, 20 mM dNTPs.

PCR: modalidades

- PCR clásica para la amplificación de un fragmento cuya secuencia es conocida.
- RT-PCR , amplificación de un gen cuyo material de partida es RNA estabilizado como cDNA.
- PCR "in house", amplificación para fragmentos de DNA o RNA muy inestables.
- PCR multiplex, amplificación con un número variable de partidores (+ de 4 primers).
- Nested PCR: Anidación para reducir productos indeseados.
- Hot Start PCR: Para T_m bajas, evita formación de dímeros)
- PCR en tiempo real, utiliza principalmente partidores marcados, se realiza en sistema capilar y permite ver resultados en aproximadamente 20 minutos. Su importancia radica en el ahorro de tiempo y en la visualización de la cinética de reacción.

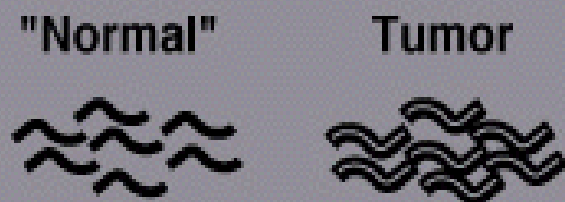
Métodos de Secuenciación



TAAGGACGTCGGG
TAAGGACGTCGG
TAAGGACGTCG
TAAGGACGTC
TAAGGACGTC

Prepare cDNA Probe

"Normal" Tumor



RT / PCR

Label with
Fluorescent Dyes



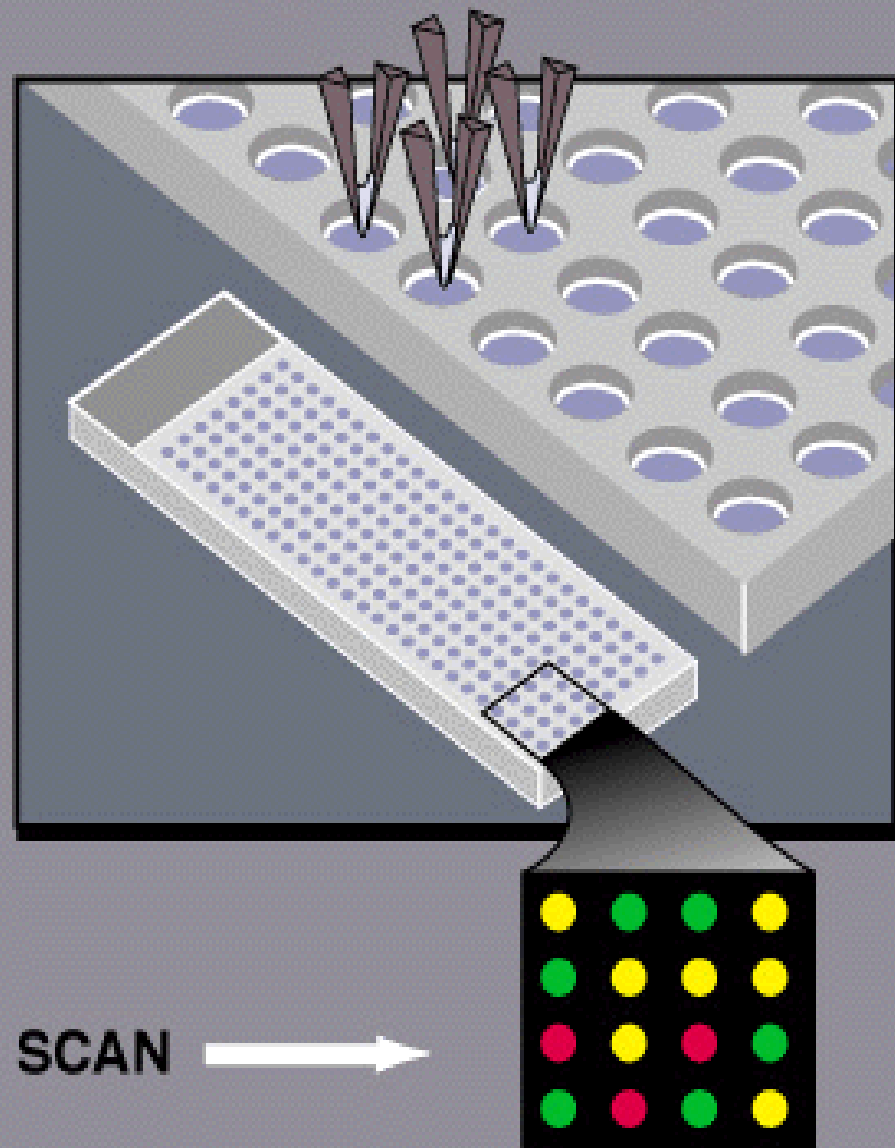
Combine
Equal
Amounts

Hybridize
probe to
microarray

SCAN

Microarray Technology

Prepare Microarray



Análisis Molecular

EXTRACCION de DNA



PCR

(amplificación)

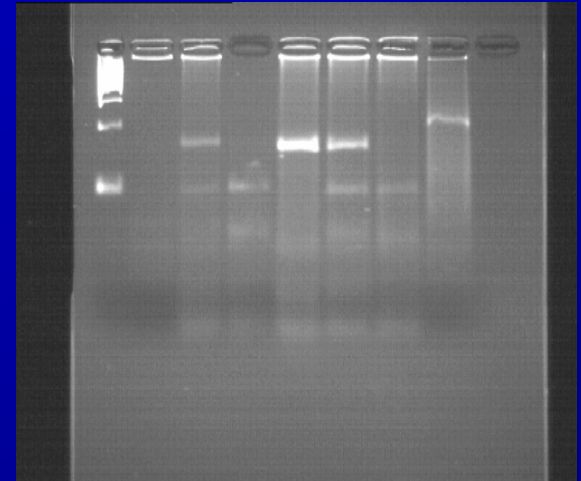


CORTE ENZIMA RESTRICCION



MAPA DE RESTRICCION
(Gel agarosa)

- Tipo salvaje.
- Heterocigota.
- Homocigota.



	WT	HE	HO
	—	—	—
159	—	—	
108		—	—
81	—	—	—
51		—	—
23	—	—	—

PCR en Biomedicina

- Areas de mayor aplicación:
 - Enfermedades Hereditarias
 - Enfermedades Infecciosas
 - Enfermedades Neoplásicas
- Enfermedades Hereditarias:
 - Diagnóstico Prenatal
 - Diagnóstico en fase asintomática
 - Diagnóstico preimplantación
 - Consejo Genético

PCR en Infectología

- Enfermedades Infecciosas:

- Ventana inmunológica

Hepatitis B,C, G o HIV.

- Factor pronóstico

Isotipos virales

Carga viral

- Respuesta a tratamiento

Carga viral en tratamiento

Detección de cepas resistentes

PCR en Neoplasias

- Enfermedades Neoplásicas:

Probablemente en el futuro cercano se va a constituir en un apoyo diagnóstico importante, particularmente en la pesquisa de neoplasias frecuentes: cáncer de colon, cervicouterino, cáncer de mama, cáncer de vejiga.

**Variante
Genética**



Susceptibilidad