



FUNDAMENTOS BASICOS EN PCR

Dr. Francisco Pérez Bravo
Laboratorio de Genómica Nutricional
Departamento de Nutrición
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

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 (animal)

Metodología

Enzimas restricción
DNA polimerasas
Clonación
Transcriptasa
Southern Blot
Northern Blot
PCR
Transfección
Transgénicos

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 cDNA, primers, $MgCl_2$)
- Fidelidad: estará dada por la obtención de un producto representativo del protocolo programado

PCR

Transcriptasa Reversa

Taq polimerasa

DNA doble hebra
cDNA o híbrido DNA/RNA

Desnaturalización (94°C)

Primers

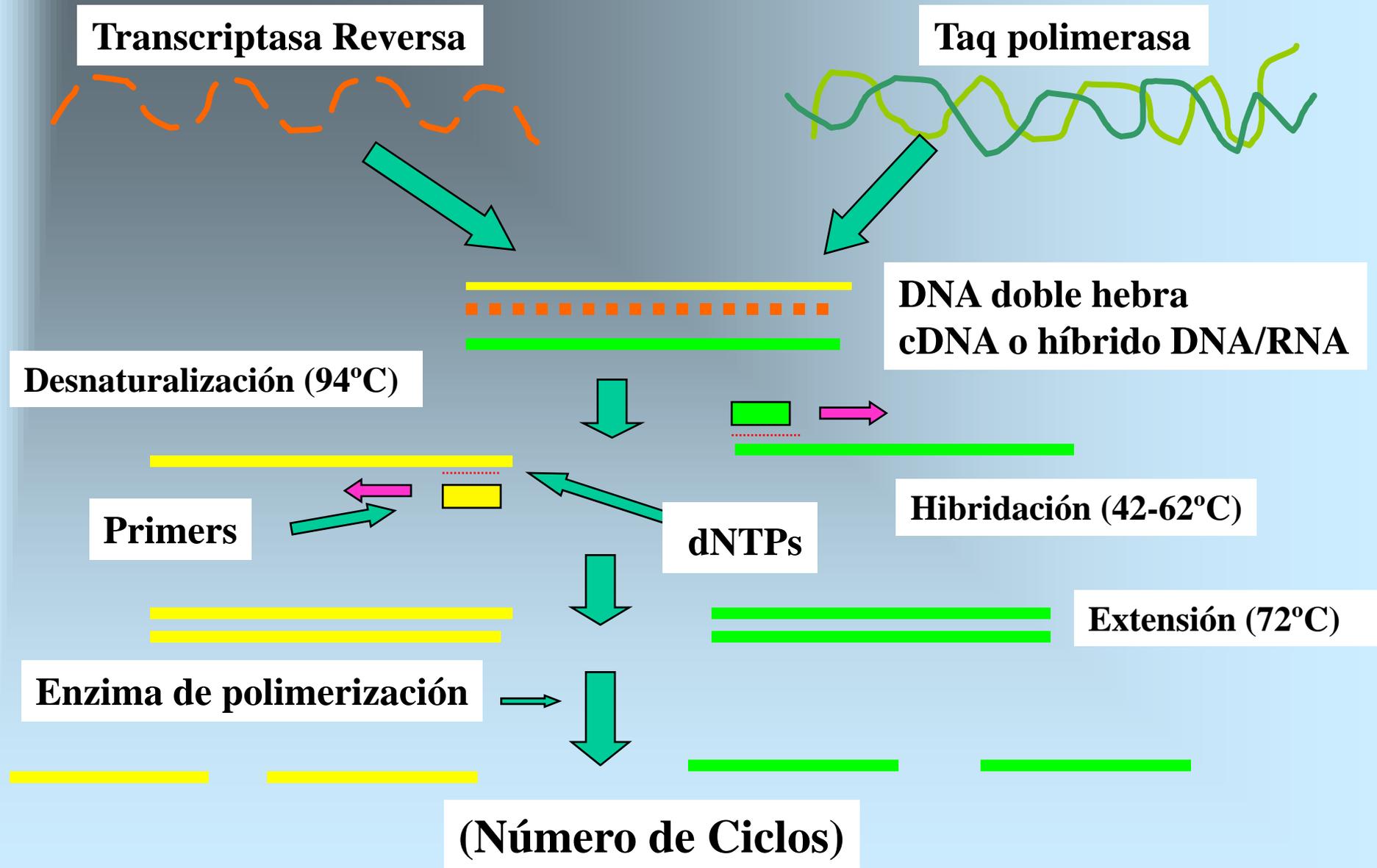
dNTPs

Hibridación (42-62°C)

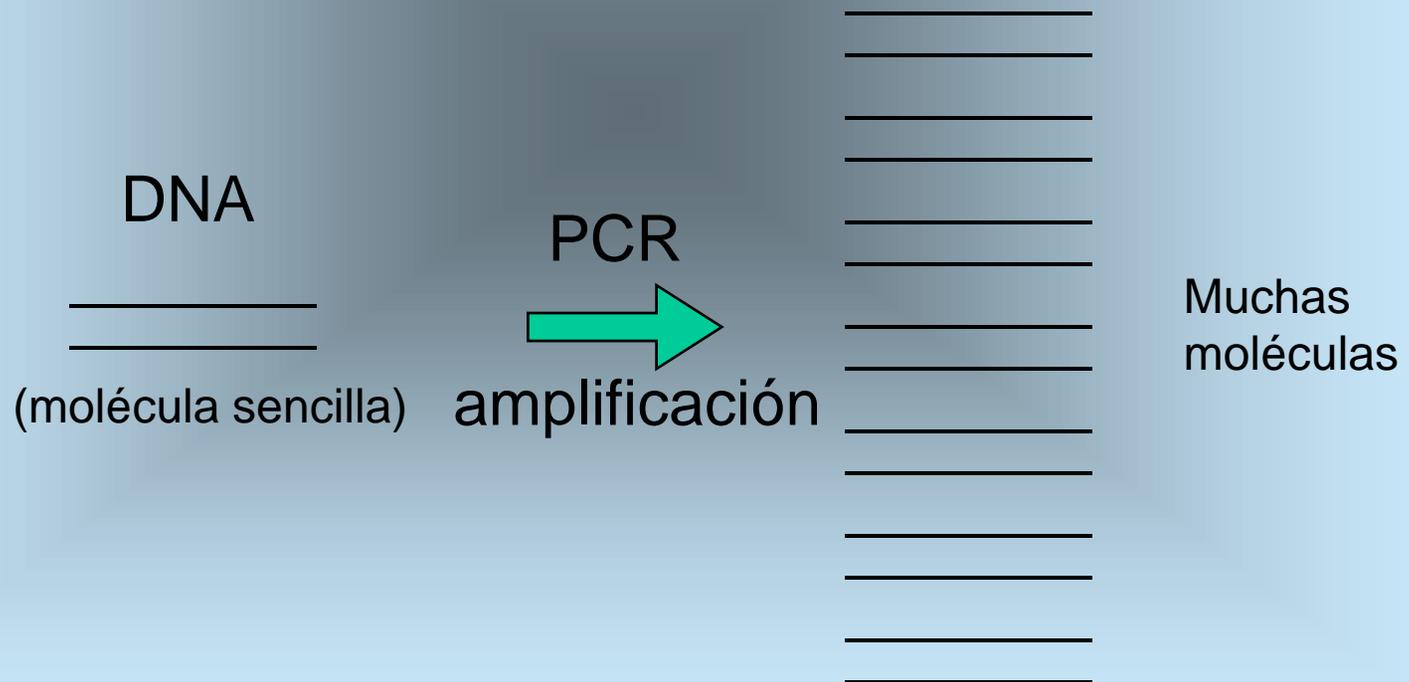
Extensión (72°C)

Enzima de polimerización

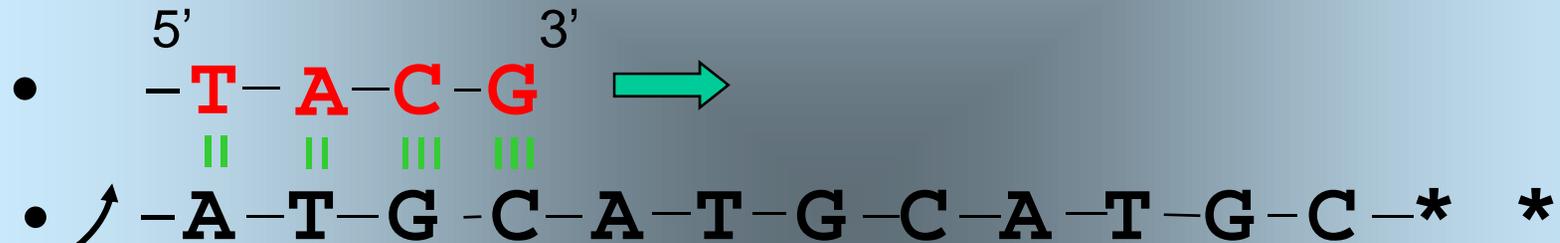
(Número de Ciclos)



PCR es básicamente una técnica de amplificación del DNA

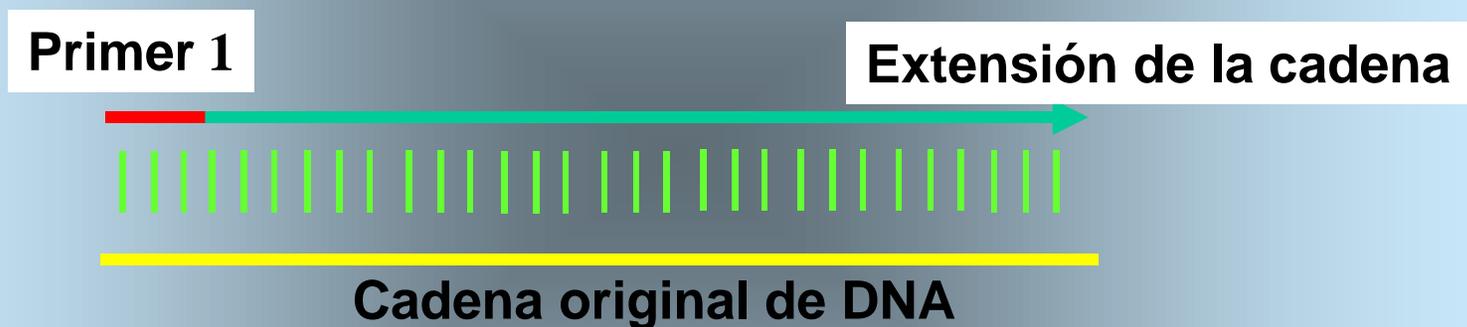


- **Síntesis por DNA polimerasa**

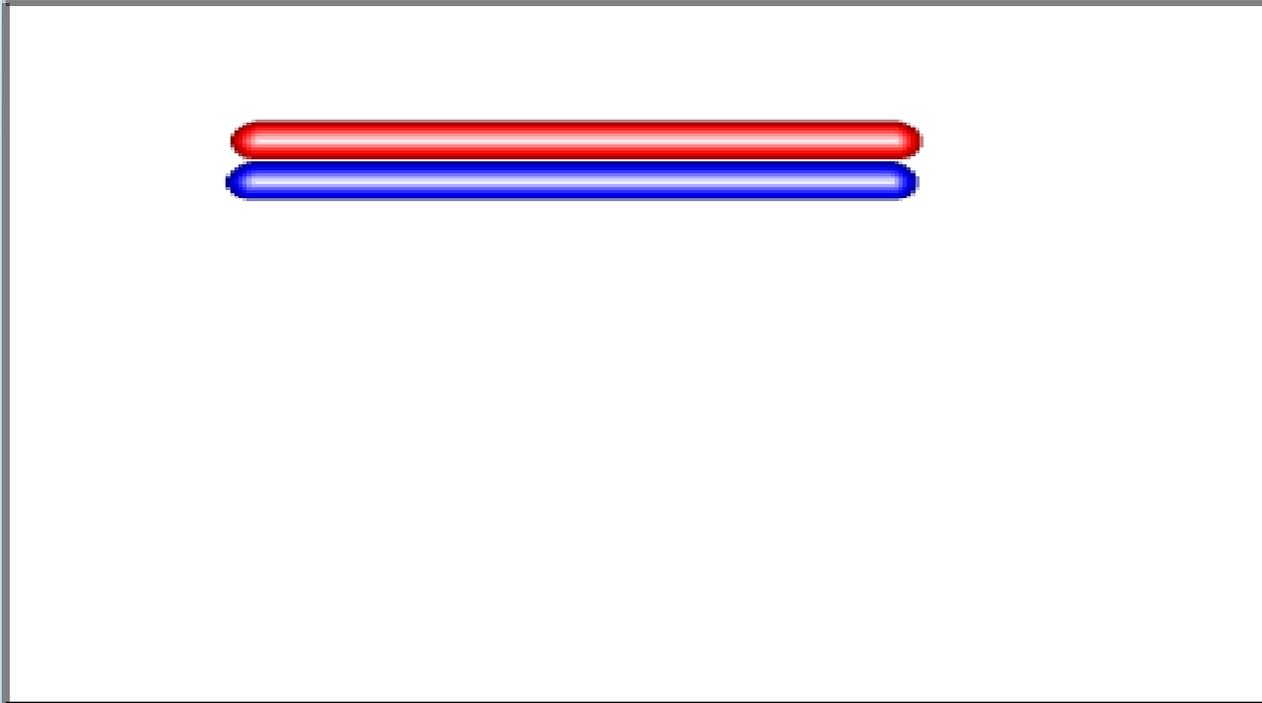


Cortos primers de DNA específicos hibridizan con la cadena que tiene que ser copiada

**Después del primer período de síntesis de DNA,
tenemos copiada una cadena de DNA**



¿Cómo produce este proceso una AMPLIFICACIÓN?

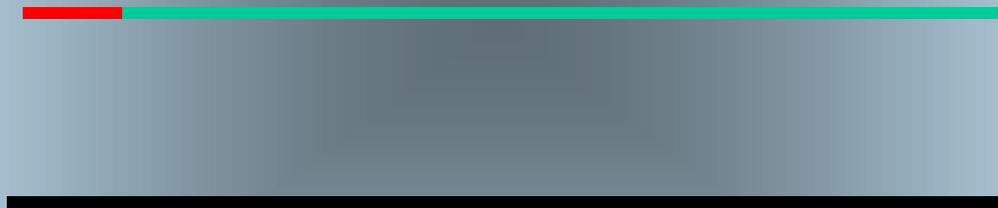


Las dos hebras se separan, en cada hebra se fija una pequeña cadena de nucleótidos (el cebador o partidor, en color amarillo), que se fija sobre una parte concreta del DNA y a continuación empieza el proceso de la replicación. En unos segundos se completa el ciclo

Primero, el proceso de denaturación separa las dos cadenas de DNA a alta temperatura (~100°C)

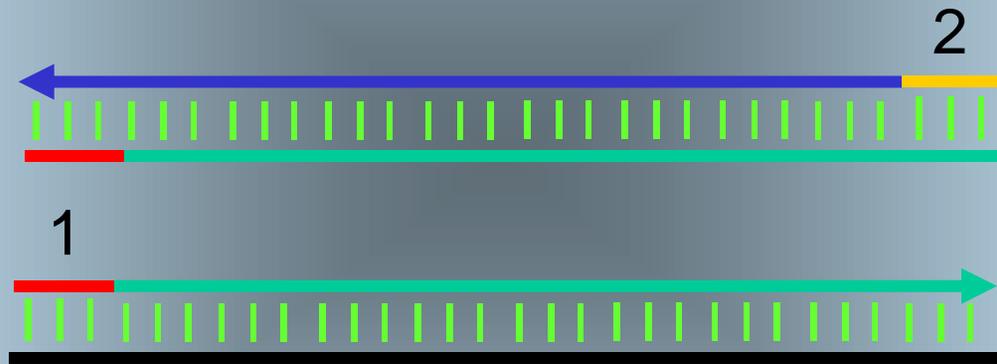


Primero, la fusión separa las dos cadenas de DNA a alta temperatura ($\sim 100^{\circ}\text{C}$)



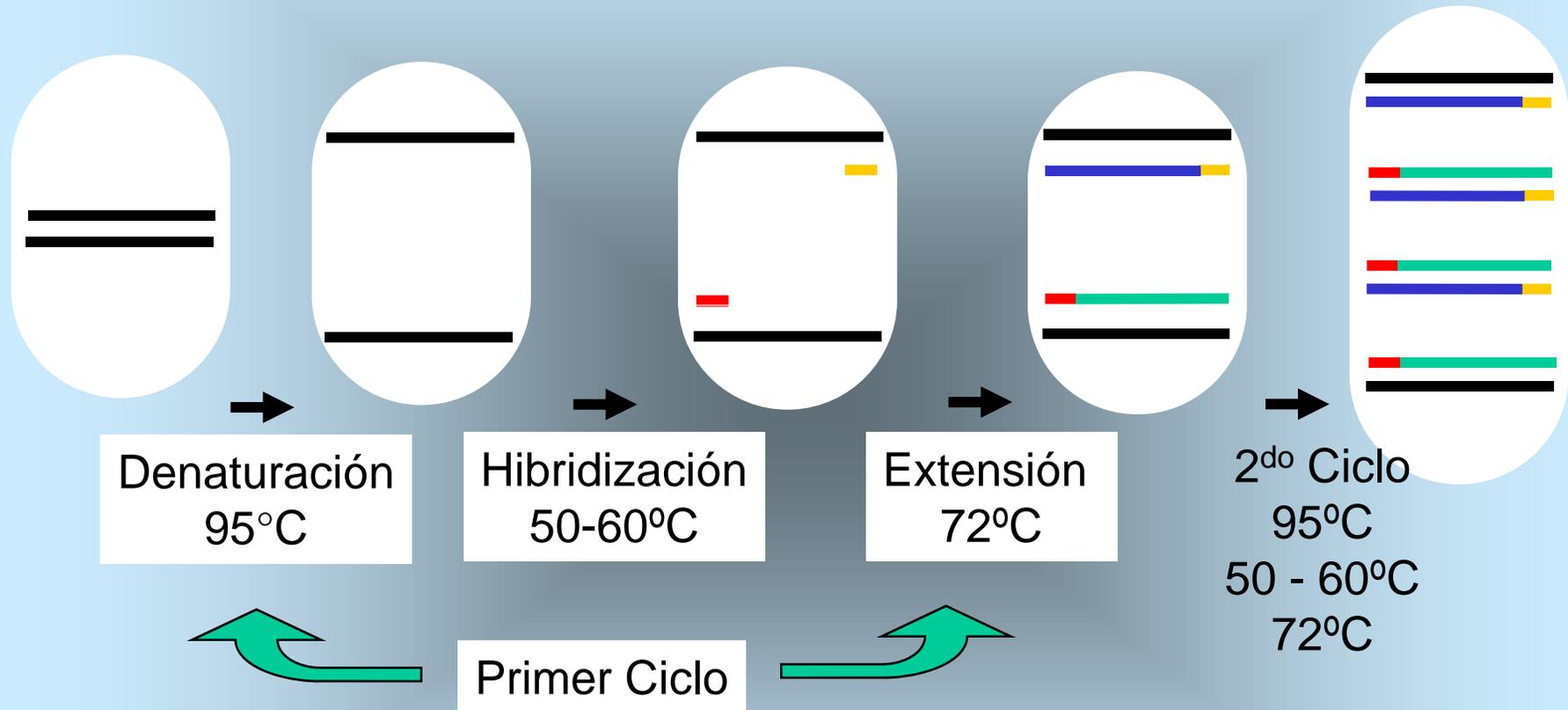
Primero, la denaturación separa las dos cadenas de DNA a alta temperatura (~100°C)

Luego, usando un segundo primer, se copia la nueva cadena con la DNA polimerasa



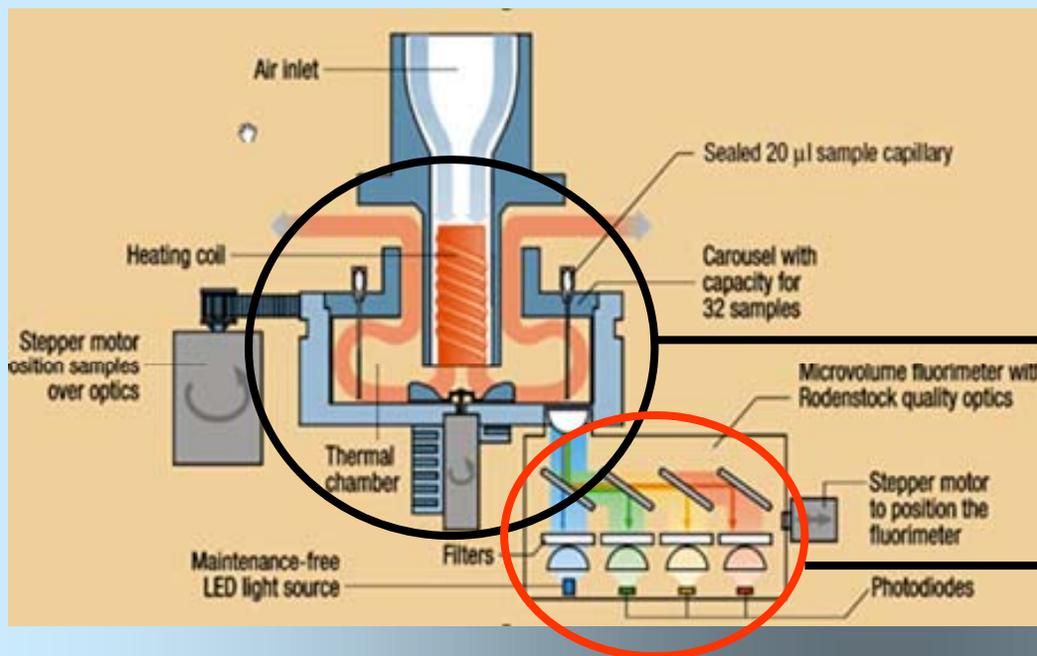
Al mismo tiempo, la cadena original se copia nuevamente, dado que hay un exceso de Primer 1

Para controlar el proceso, necesitamos controlar la temperatura



Si repetimos el ciclo, tendremos cuatro copias

Múltiples ciclos darán un incremento exponencial en el número de copias



EQUIPOS

ZONA DE TEMPERATURA

ZONA DE RESOLUCIÓN

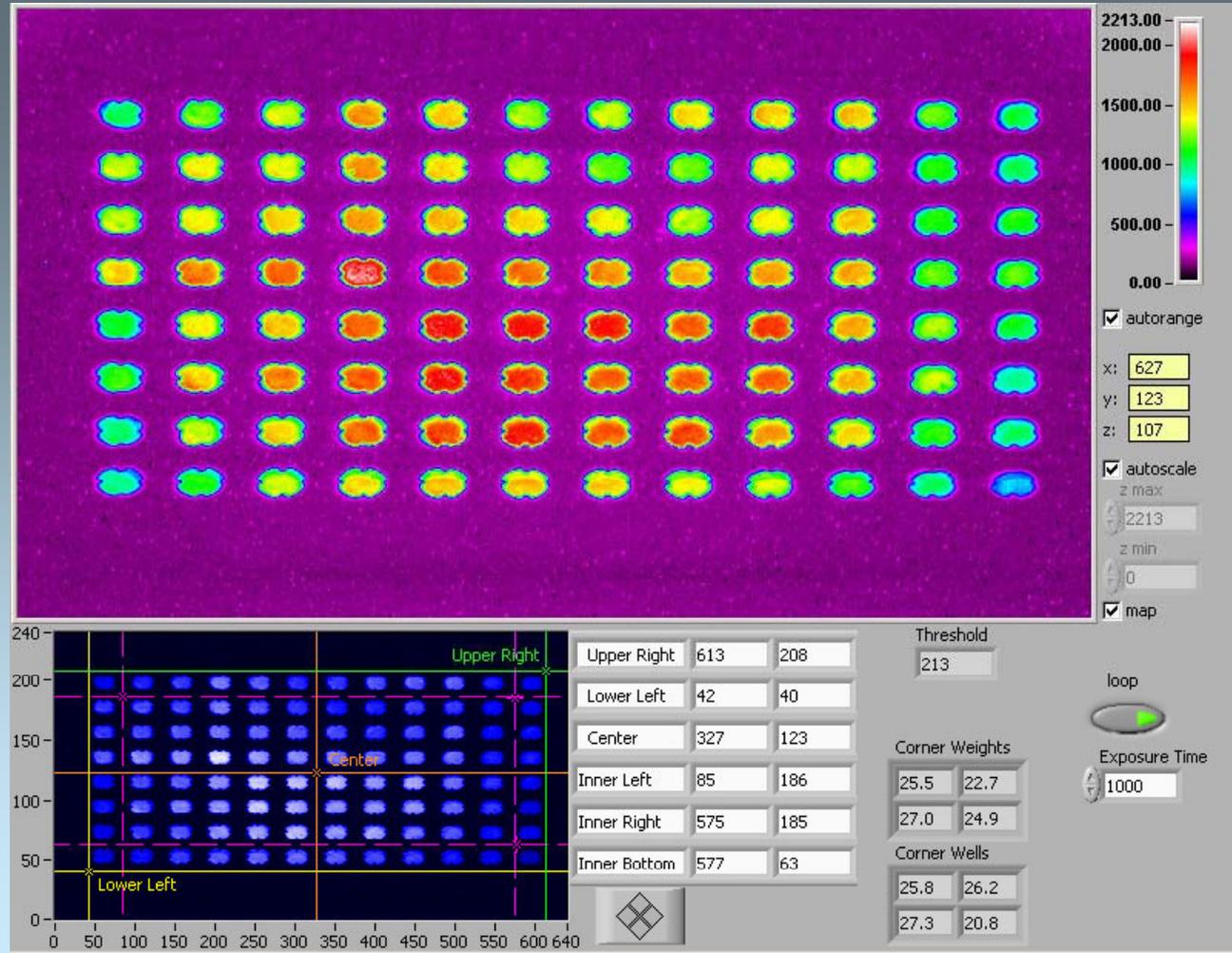
✓ Importa el orden de inercia hasta que la temperatura cambia: unos utilizan tubos capilares donde la temperatura se modifica rápidamente ($20^{\circ} \text{C} / \text{seg}$)
CALIDAD DEL EQUIPO

✓ Otras técnicas utilizan elementos metálicos (Pelletie) para difusión de calor.

✓ La mayoría de los termocicladores realizan reacciones en placas de 96 pocillos, en la actualidad incorporan fibra óptica para la transmisión de señales internas.

Typical 96-Well lamp illumination uneven illumination of samples

Color-enhanced



Actual

How does the rotary format work?

Samples spin continually during a run

- 400 RPM heating and cooling

High-speed data collection

- all samples read in one revolution (0.15 sec)

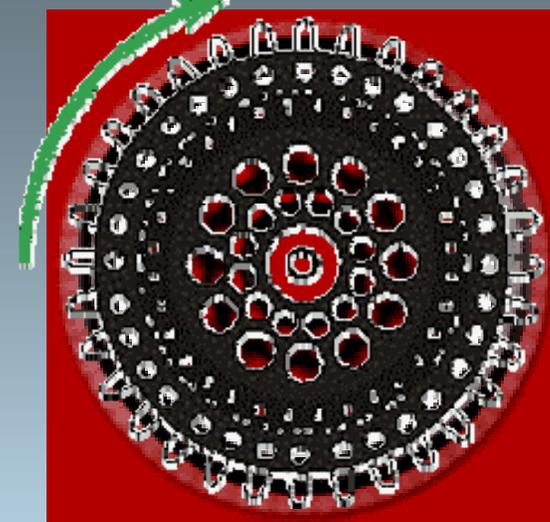
G-force keeps reagent at base of tube

- removes bubbles & condensation
- will not pellet components

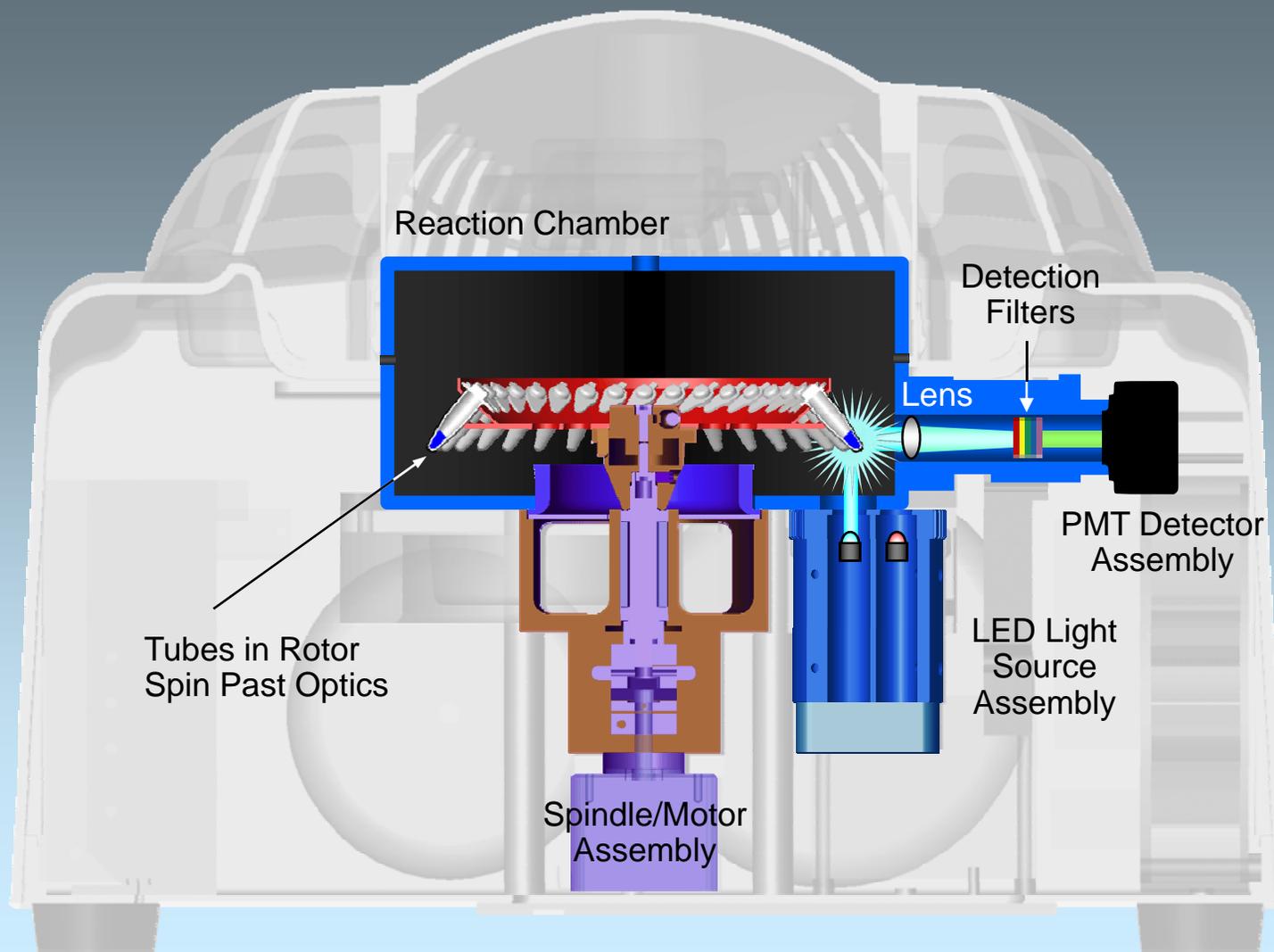
Continuous movement means no variation

- well-to-well thermal or optical

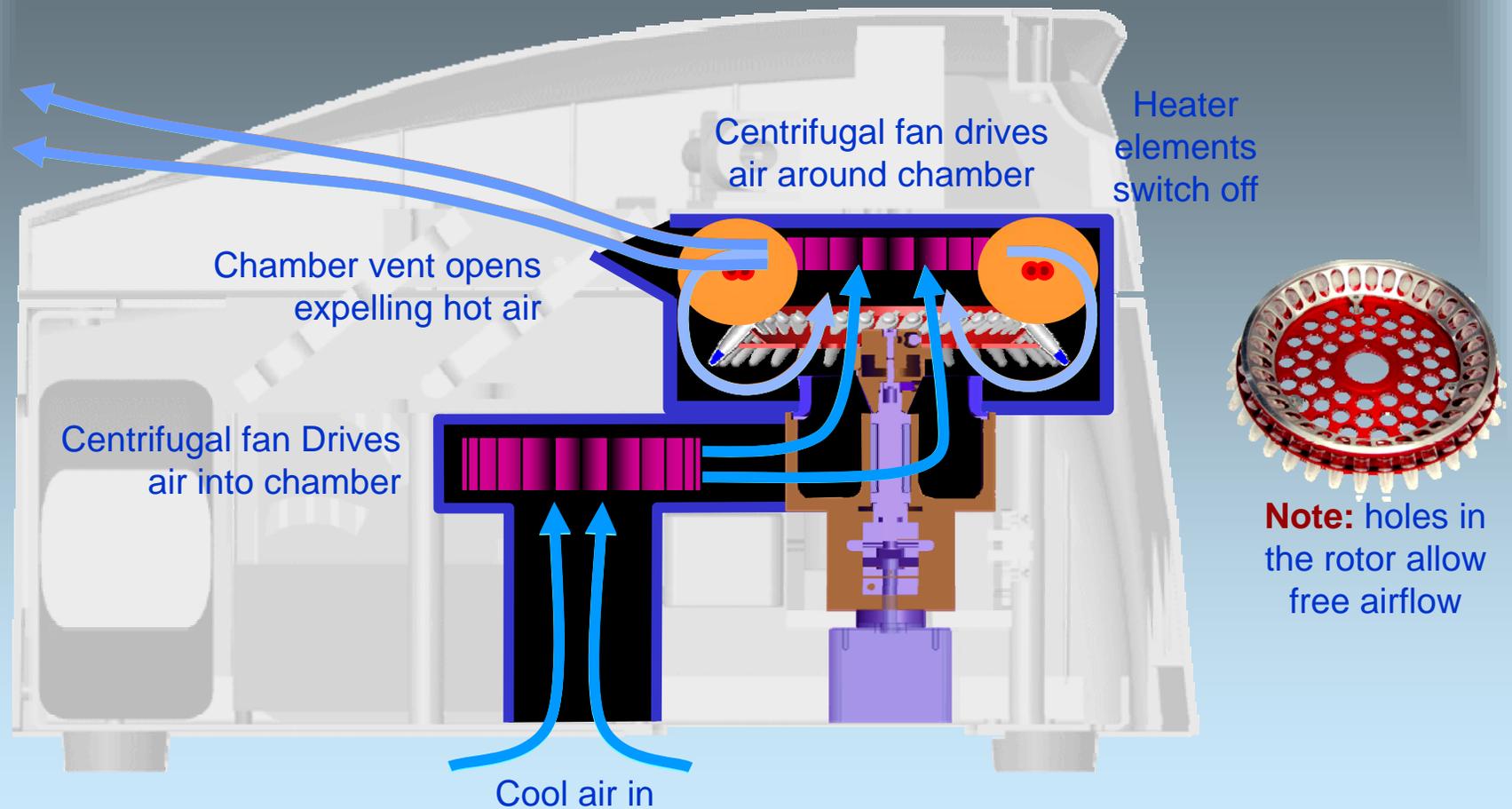
400 RPM



CROSS-SECTION of rotary optics



COOLING MECHANISM



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

Protocolo Básico PCR

- **DNA o RNA de partida**
- **0.1 – 1.0 μ M 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**
- **MgCl₂ o MgSO₄**
- **Agua bidestilada**
- **Formamida, BSA, DMSO, gelatina, etc**

Hay 7 componentes esenciales en el proceso estandar de PCR

- DNA polimerasa termoestable
- Oligonucleotidos iniciadores (“primers”)
- Desoxiribonucleótidos trifosfatados (dNTPs)
- Cationes divalentes (Mg^{+2})
- Buffer (para mantener el pH)
- DNA molde (Templado)
- **BSA, formamida, DMSO**

DNA polimerasas termoestables

- Llevan a cabo la síntesis de DNA dependiente del templado
- Estabilidad – *Taq*: 9 min at 97°C, *Pwo* >2 hr a 100°C
- Fidelidad – *Taq*: baja, *Pfu*: alta
- Algunas presentan actividad transferasa terminal en el extremo 3', ej. *Taq* agrega una A al extremo 3', especialmente si en el extremo hay una C. *Pwo* y *Tli* generan extremos romos
- Cantidad usada = 5×10^{12} moléculas (1.5 unidades)
- La más comúnmente usada = *Taq* DNA polimerasa

Taq *Thermus aquaticus*, *Pwo* *Pyrococcus woesei*, *Pfu* *Pyrococcus furiosus*, *Tli* *Thermococcus littoralis*

Oligonucleótidos iniciadores (partidores)

- **Se conoce su secuencia**
- **Es el factor mas importante para la eficiencia y la especificidad del proceso**
- **Deben estar presentes en exceso ($10^{13} = 30$ ciclos, 1 kb)**
- **Requieren de un cuidadoso diseño**
- **Reglas de diseño:**
 - (a) longitud = 18-25
 - (b) Contenido de G+C entre 40-60%
 - (c) **Evitar las secuencias repetidas**

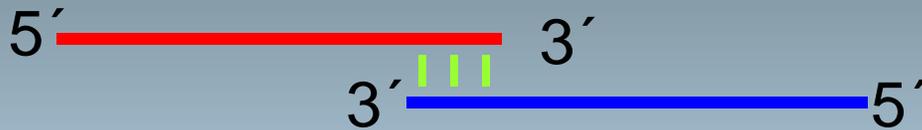
Evitar las secuencias repetidas

5'-NNNNNNNNNNNNNNNTATA-3'
5'-NNNNNNNNNNNNNNNTATA-3'

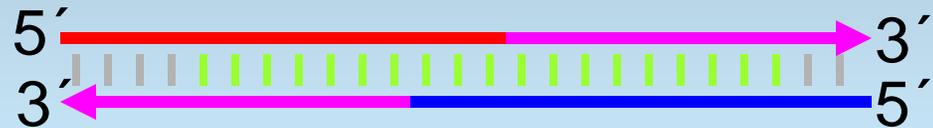


5'-NNNNNNNNNTATA-3'
3'-ATATNNNNNNNNNN-5'

3' repetido



PCR
→



Dímero de primer

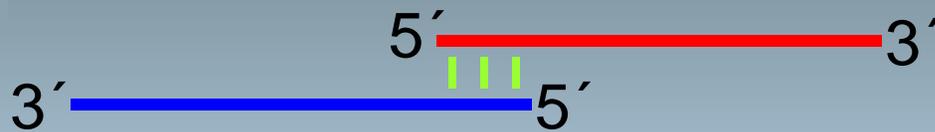
Evitar las secuencias repetidas

5'-TATANNNNNNNNNNNNN-3'
5'-TATANNNNNNNNNNNNN-3'



5'-TATANNNNNNNNNN-3'
3'-NNNNNNNNNATAT-5'

5' repetido



PCR



no hay extensión

Evitar las secuencias repetidas



Formación de horquillas



Productos de PCR no deseados

Oligonucleótidos iniciadores (primers)

- Se conoce su secuencia
- Es el factor mas importante para la eficiencia y la especificidad del proceso
- Deben estar presentes en exceso (10^{13} = 30 cycles, 1 kb)
- Requieren de un cuidadoso diseño
- Reglas de diseño:
 - (a) longitud = 18-25
 - (b) Contenido de G+C entre 40-60%
 - (c) Evitar las secuencias repetidas
 - (d) Valores de T_m de no más de 5°C uno del otro

DNA molde (templado)

- Puede ser ssDNA o dsDNA (simple o doble cadena)
- DNA circular y cerrado es levemente menos efectivo que el DNA lineal
- Usualmente se utilizan varios miles de copias, ej: 1 μ g de humano, 10 ng de levadura, 1 ng de bacteriano o 1 pg of plasmidial
- Se puede amplificar a partir de una sola molécula de DNA molde, pero las condiciones deben estar muy optimizadas

TEMPERATURAS EN PCR

- **Denaturación**: **94-95°C por 45 segundos** si **G+C < 55%**
- **Hibridización (annealing)**: **debe ser calculada empíricamente para cada par de primers**

Demasiado alta = poco o nada de producto

Demasiado baja = annealing no específico (producto incorrecto)

- **Extensión**: a la temperatura óptima de la DNA polimerasa utilizada

ej.: 72°C para *Taq*, 1 min/kb de longitud, dado que la *Taq* polimeriza 2000 pb/min

Sólo a partir del 3º ciclo se producen DNAs duplex de la longitud deseada, los cuales a partir de allí se tornan en el producto principal

CICLOS DE PCR

- Número de ciclos:
 - Algunos componentes se tornan limitantes después de 30 ciclos
 - Se necesitan >25 ciclos para amplificar un gen de copia única a partir de DNA genómico

VARIANTES DE LA PCR

- Gradient PCR
- Touchdown PCR
- Colony PCR
- Multiplex PCR
- Hot start PCR
- Nested PCR
- Long PCR
- Real Time PCR

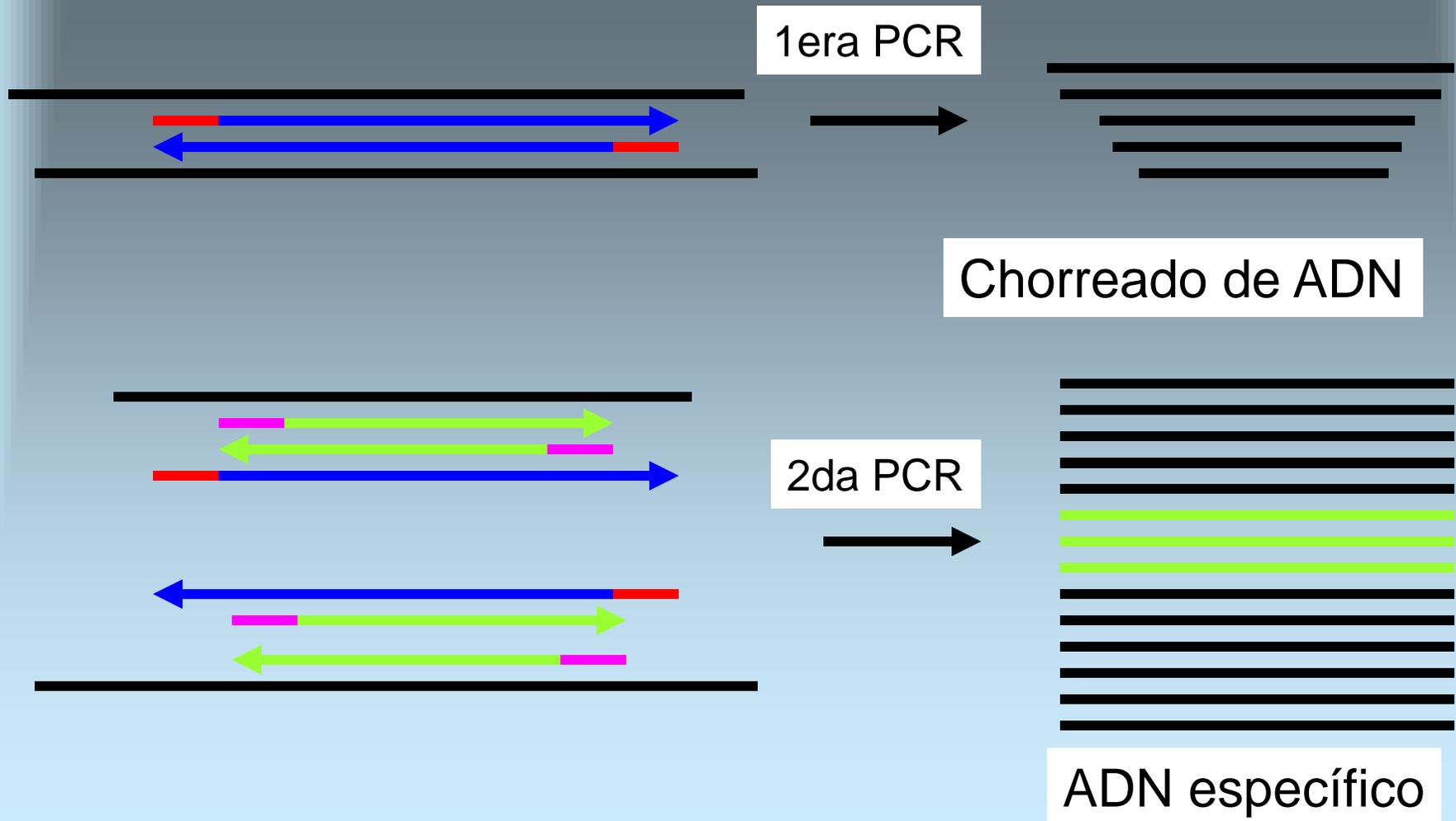
Multiplex PCR

- Describe una PCR en la cual hay presentes múltiples pares de primers (hasta 8) lo que da una serie de productos. Los mismos pueden verse como múltiples bandas en un gel de agarosa
- Multiplex PCR es frecuentemente usada en diagnóstico médico
- Ahorra templado, tiempo y gastos
- Requiere una cuidadosa optimización

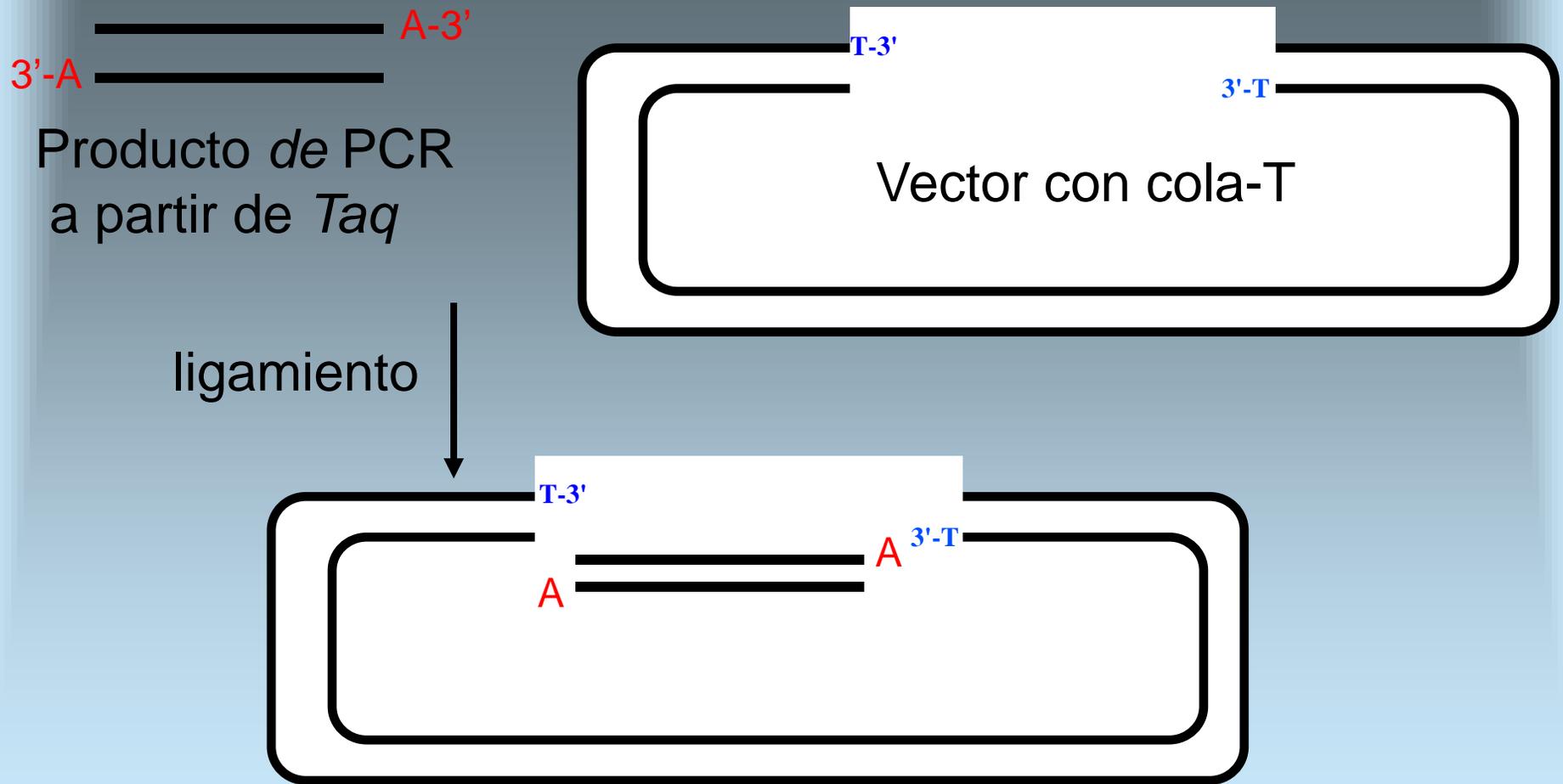
Nested PCR

- A veces 1 ronda de PCR no da un producto único producido a partir de un templado complejo, apareciendo un “chorreado”
- Se puede resolver utilizando un segundo par de primers que hibriden un poco mas internamente que los primeros
- Realizar una segunda ronda de PCR usando el producto de la primera (chorreado)
- Rinde un producto único porque solo el fragmento correcto de DNA posee los sitios correctos de hibridización para el segundo par de primers

Nested PCR



Clonado con PCR: clonado T-A

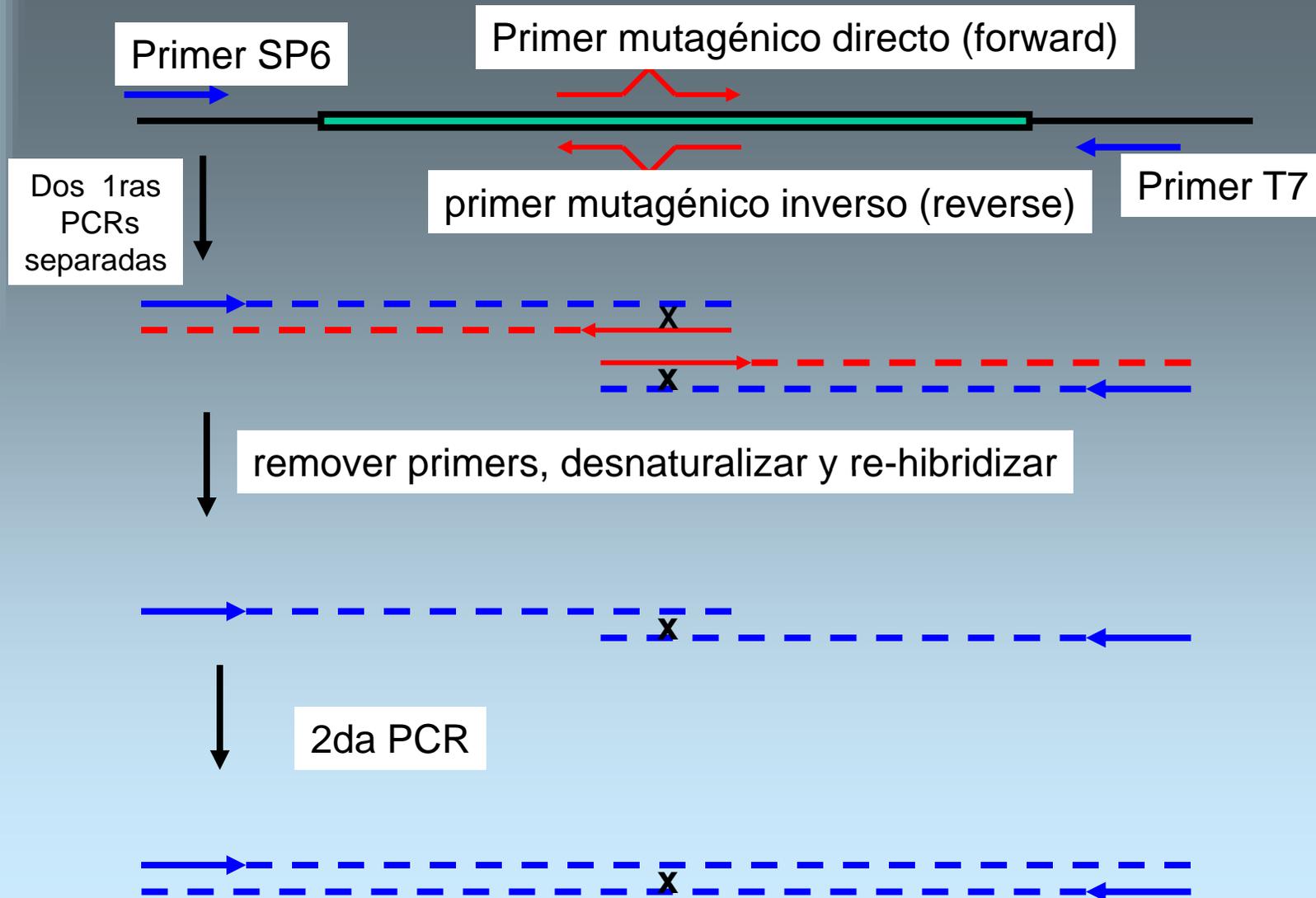


Ligamiento con extremo adhesivo de 1 base = 50 veces mejor que ligamiento con extremos romos

Mutagénesis por PCR

- Introduce cambios de secuencia dentro de fragmentos (clonados) de DNA
- El método de extensión solapada requiere 2 primers mutagénicos y otros 2 normales
- Amplifica un fragmento 5' y un fragmento 3' que se solapan. Ambos portan la mutación
- Usa los productos en otra reacción para producir el DNA mutado de longitud completa

Mutagenesis con PCR- extension solapada



RT-PCR

- Para amplificar copias de cDNA a partir de RNA
- Es especialmente útil cuando solo se dispone de pequeñas cantidades de RNA
- Frecuentemente usada para amplificar genes específicos (como cDNAs) si algo de su secuencia es conocida
- Requiere primer “antisense” y una DNA polimerasa dependiente de RNA
- Puede ser usada para construir bibliotecas de cDNA
- Primero se hace un cDNA a partir del templado de RNA
- Luego se usa un segundo primer (“sense”) para hacer el duplex de cDNA por PCR

RT-PCR

mRNA (sense) ————— AAAAAAAAAA-3' Primer Antisense:
TTTTTTTTTT-5' oligo(dT)o

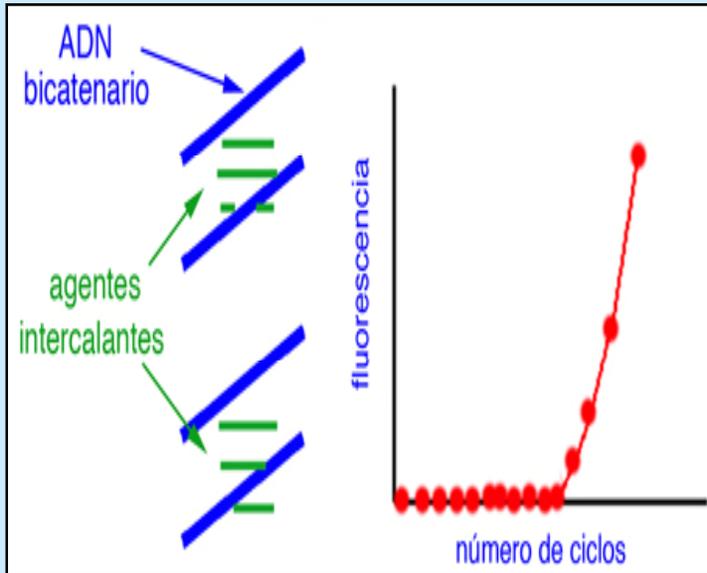
Transcripción reversa

GSP1 (sense) →
1ra cadena cDNA ————— AAAAAAAAAA-3'
← TTTTTTTTTT-5'
← GSP (antisense)

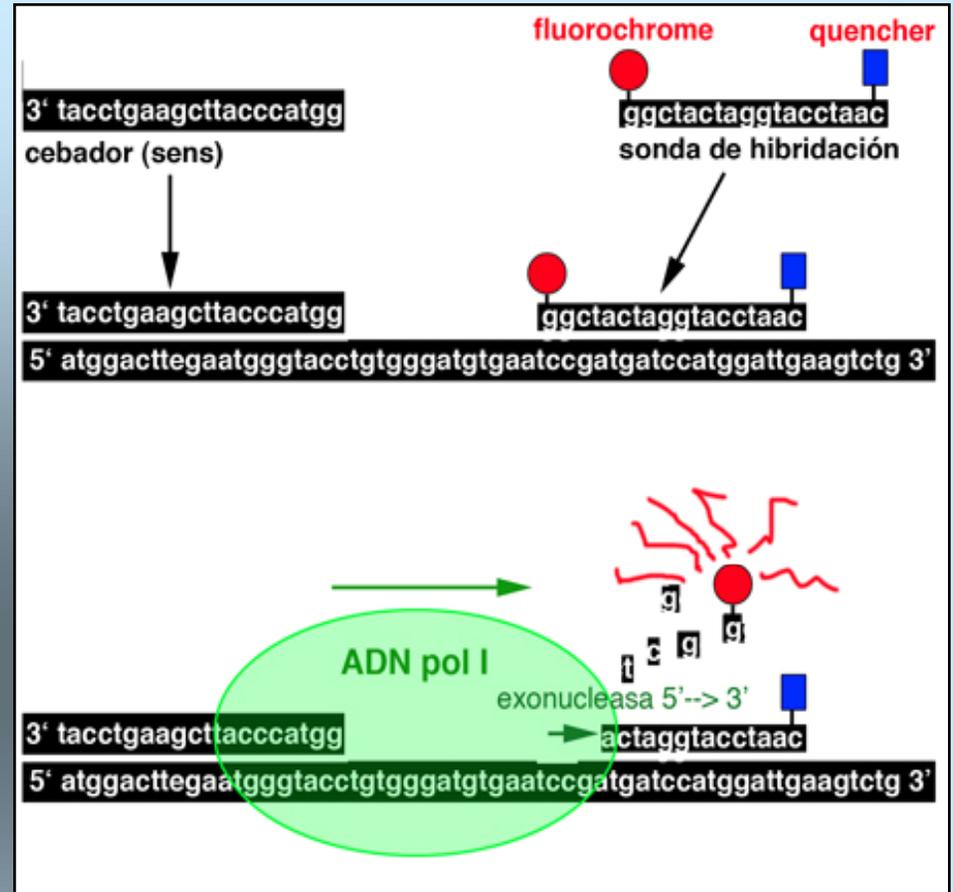
PCR usando
GSP + GSP1

GSP1 →
← GSP

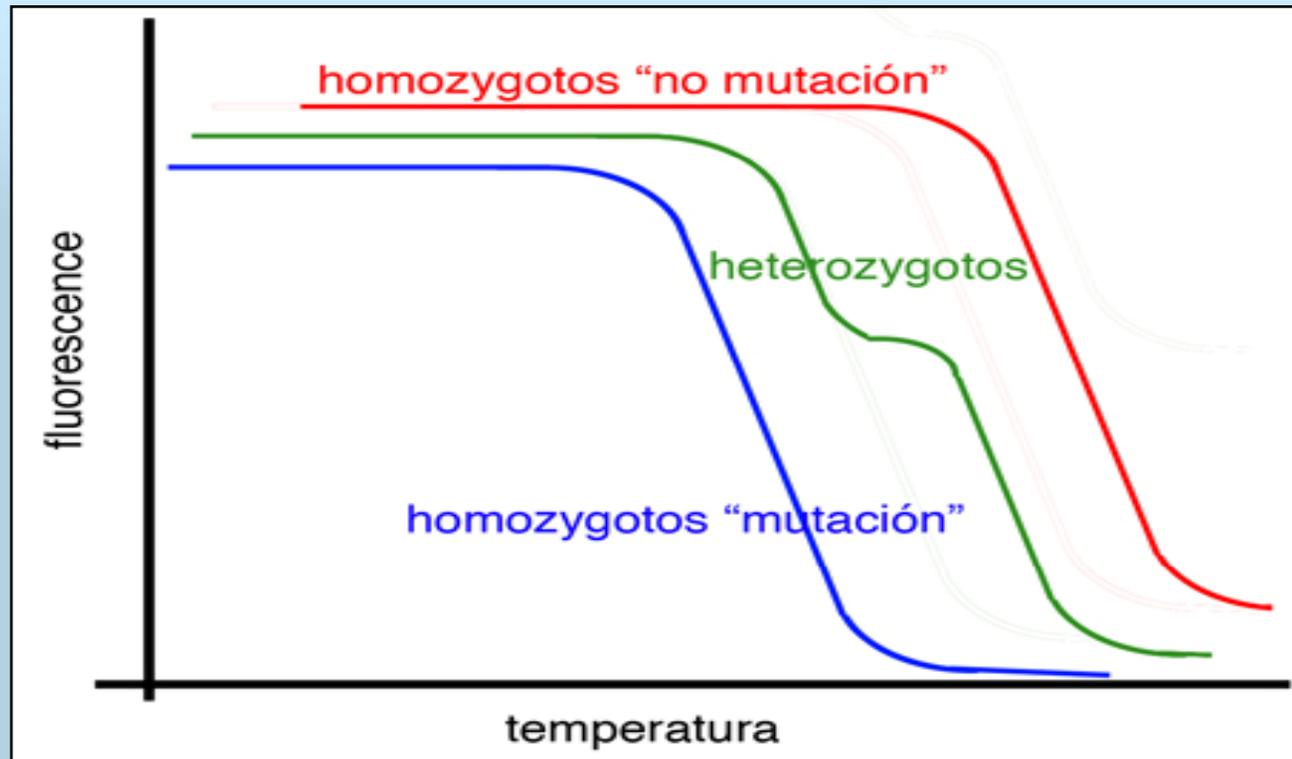
Requiere el conocimiento de la secuencia para diseñar GSP and GSP1



El SYBR Green, al igual que el bromuro de etidio, se une preferentemente al DNA de doble cadena, y al hacerlo incrementa fuertemente su fluorescencia



Se emplea una sonda que tiene unidos un fotocromo reportero “reporter” y un fotocromo “quencher”. Cuando ambos fotocromos están unidos a la sonda, el *reporter* no emite señal. Pero, cuando la sonda hibrida con la secuencia de interés (*target*) durante la reacción de PCR, la actividad exonucleasa 3' --> 5' de la Taq polimerasa separa al fotocromo *reporter* del resto de la sonda, permitiendo la emisión de una señal fluorescente



- ✓ Si no existe una mutación en el DNA diana, se producirá una hibridación perfecta
- ✓ Si la mutación está presente, existirá una zona de mismatch o desapareamiento que producirá un descenso en la temperatura de fusión del híbrido formado

ANÁLISIS MOLECULAR

EXTRACCION de DNA



PCR
(amplificación)

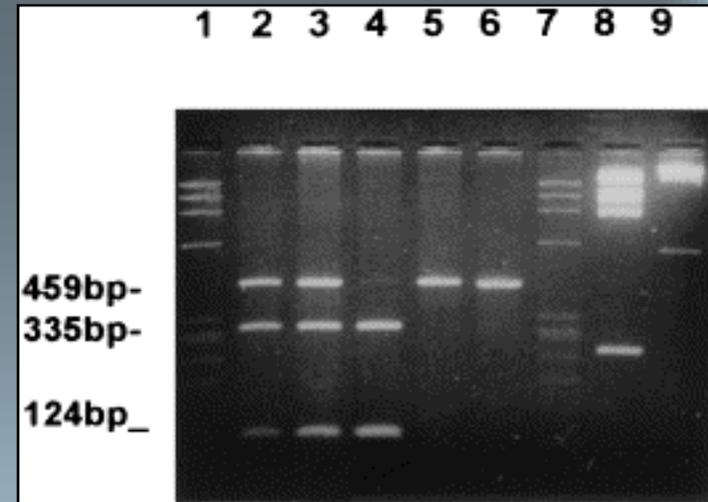


CORTE ENZIMA RESTRICCIÓN



MAPA DE RESTRICCIÓN
(Gel agarosa o Acrilamida)

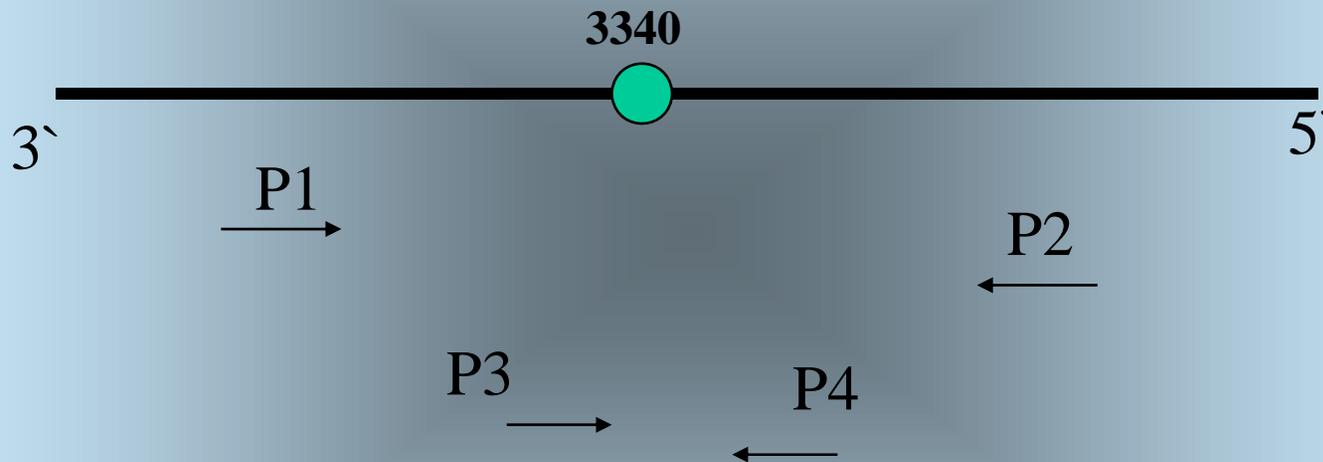
- Tipo salvaje.
- Heterocigota.
- Homocigota.



	<u>WT</u>	<u>HE</u>	<u>HO</u>
159	—	—	
108		—	—
81	—	—	—
51		—	—
23	—	—	—

ARMS PCR: Sistema refractario de amplificación de mutaciones

Método simple y rápido para detectar alguna variante genética que involucre el cambio en una sola base o pequeñas deleciones. Permite el análisis con cantidades mínimas de DNA, no requiere de una preparación previa de DNA de alta pureza, lo cual si es necesario para análisis de RFLPs o secuenciación



P3 Y P4: están diseñados de tal modo que sus extremos 3' coinciden
Con la posición 3340G : P3 es complementario a 3340A y P4 es
Complementario a 3340G