

PCR

Reacción en cadena de la polimerasa

Breve resumen histórico

Rosalind Franklin

Watson y Crick

1971

Kleppe y
Khorana

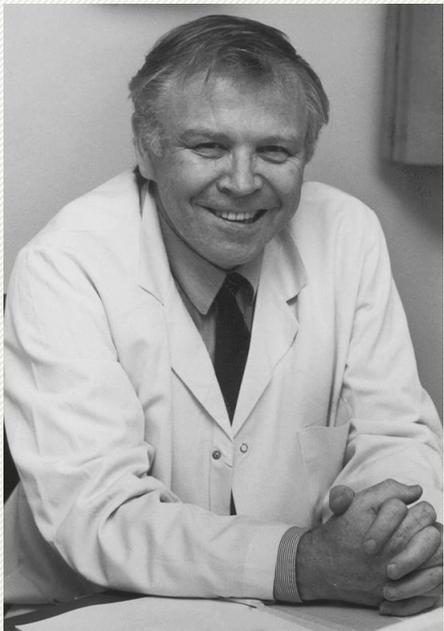
1953

2001



Invención de la PCR - Año 1971

Realizan la primer descripción de lo que podría ser un proceso de replicación del ADN *in vitro*



Kjell Kleppe (1934-1988)



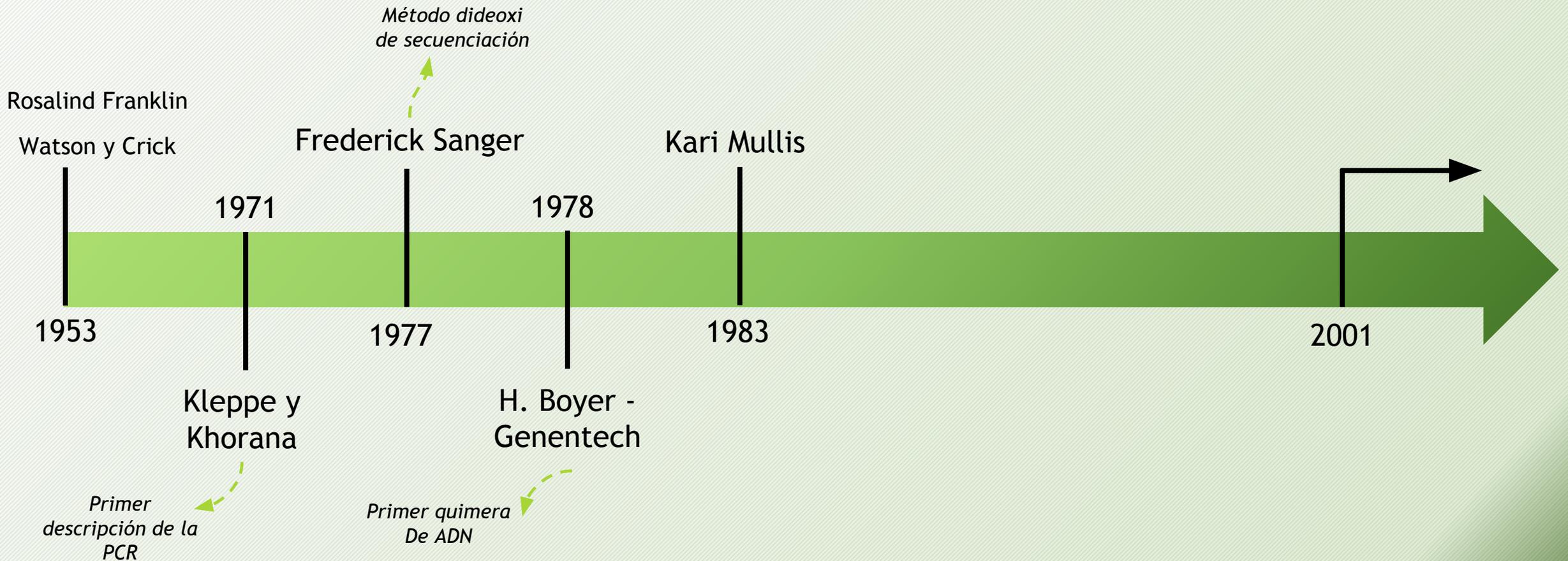
Har Gobind Khorana (1922-2011)

Kleppe, K., et al., Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* 56: 341-361 (1971).

- Desnaturalización
- *Primers*
- Uso de DNA polimerasa

No pudieron demostrarlo empíricamente

Breve resumen histórico

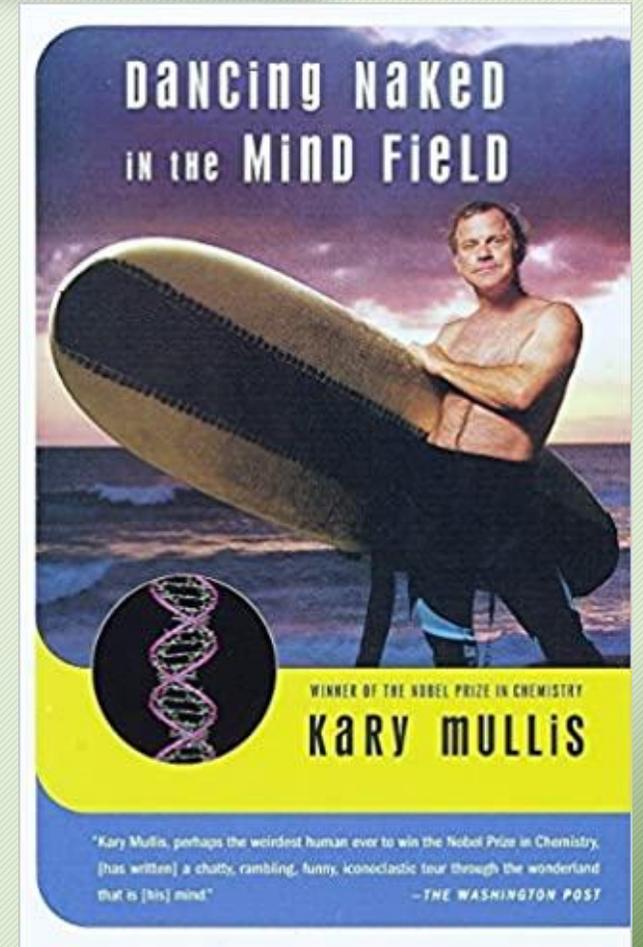


Invención de la PCR - Año 1983

“Los neumáticos delanteros de mi pequeña Honda plateada nos empujaron a través de las montañas. Mis manos palparon el camino y los giros. Mi mente regresó al laboratorio. Cadenas de ADN enrolladas y flotantes. Espeluznantes imágenes azules y rosas de moléculas eléctricas se inyectaron en algún lugar entre la carretera de la montaña y mis ojos.”

“Esta noche estoy cocinando. Las enzimas y los productos químicos que tengo en Cetus son mis ingredientes. Soy un niño grande con un auto nuevo y un tanque lleno de gasolina. Tengo zapatos que me quedan, tengo una mujer durmiendo a mi lado y un problema excitante, uno grande que está en el viento.”

“¿Qué ingenio sutil puedo idear esta noche para leer la secuencia del Rey de las moléculas?”

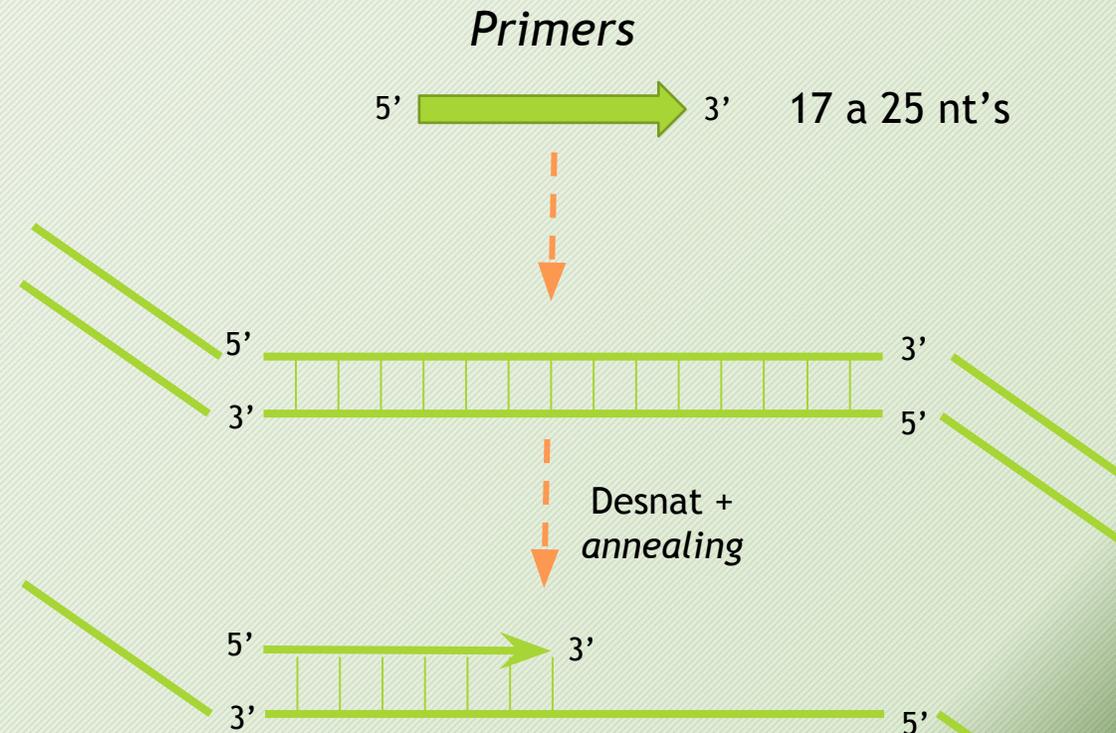


Invención de la PCR - Año 1983

“La clave del problema radica en los oligonucleótidos que mi laboratorio en Cetus ahora hace fácilmente.”

“Como un comando “FIND” en una búsqueda por computadora, una cadena corta de nucleótidos en una molécula sintética podría definir una posición a lo largo de una molécula de ADN natural mucho más larga.”

“Encontrar un lugar para comenzar es de suma importancia. El ADN natural es una bobina sin eje, como la cinta de audio enredada en el suelo del coche en la oscuridad.”

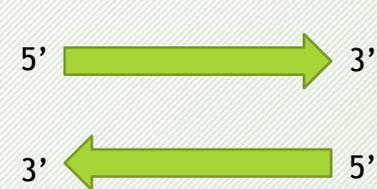


Invención de la PCR - Año 1983

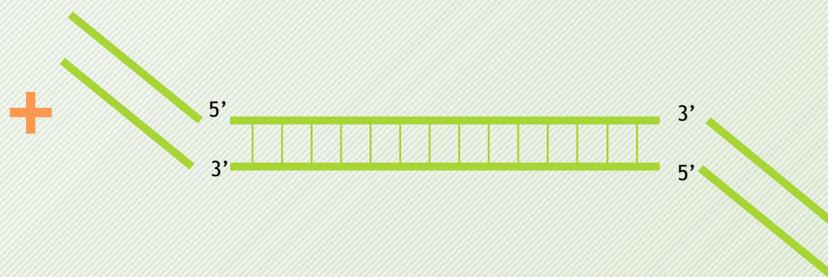
“Si pudiera disponer de un fragmento corto de ADN sintético para encontrar una secuencia particular y luego iniciar un proceso mediante el cual esa secuencia se reproduciría una y otra vez, entonces estaría cerca de resolver mi problema.”

“De repente, supe cómo hacerlo. Si pudiera localizar mil secuencias de miles de millones con un fragmento corto de ADN, podría usar otro fragmento corto para acotar la búsqueda.”

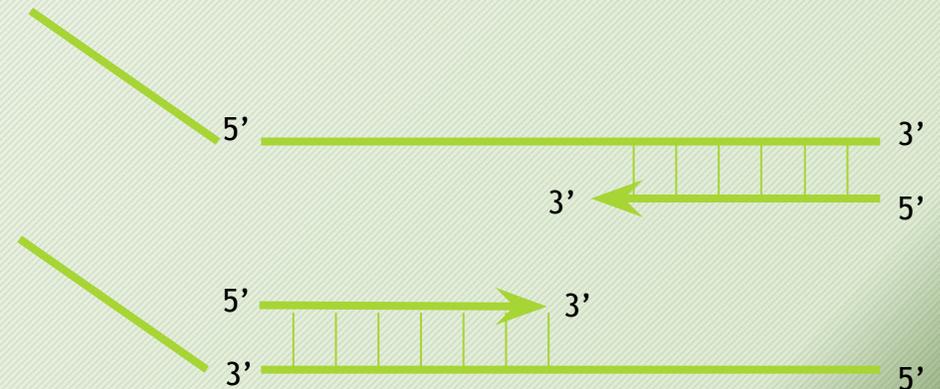
Primers



17 a 25 nt's

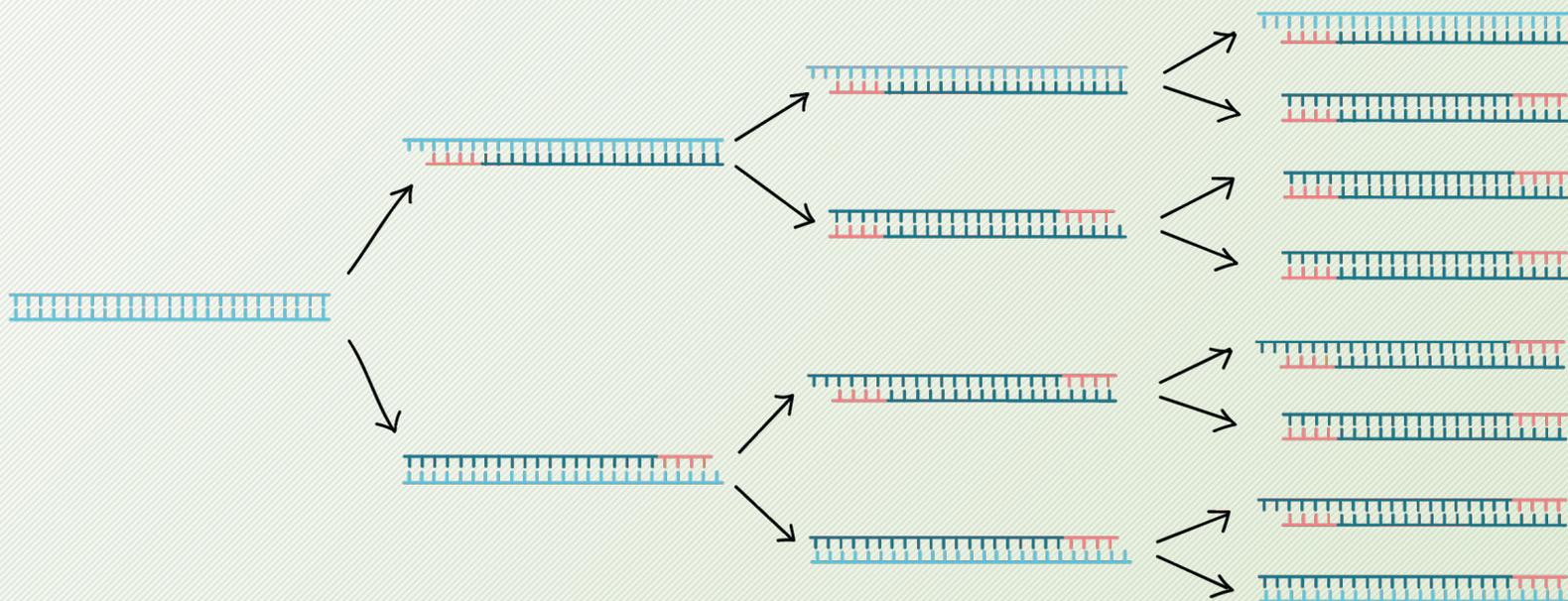


Desnat +
annealing



Invención de la PCR - Año 1983

“En un ciclo replicativo podría tener dos copias, y en dos ciclos podría tener cuatro, y en diez ciclos... Creí recordar que dos a la décima eran alrededor de mil.”



cycle:

1

2

3

Nro de copias = $n * 2^{\text{Nro ciclos}}$

<https://www.khanacademy.org>

/

Invención de la PCR - Año 1983

“¡Holy shit!” susurre y solté el acelerador. El coche se deslizó en una curva cuesta abajo. Estacioné. Un castaño de indias gigante sobresalía de la colina. Se frotó contra la ventana donde Jennifer, mi novia y compañera de trabajo, estaba dormida, y se movió. Encontré un sobre y un lápiz en la guantera. Jennifer quería moverse. Le dije que se me acababa de ocurrir algo increíble. Bostezó y se apoyó contra la ventana para volver a dormirse.”

*“Confirmé que 210 era 1.024. Debo haber sonreído. Si repetía esta nueva reacción diez veces, obtendría mil copias de algún fragmento de ADN, cualquier fragmento de ADN, **la molécula que lo sabía todo sobre todo**. Veinte ciclos me darían un millón, treinta me darían mil millones.”*

*“Aproximadamente a una milla por el cañón, volví a arrancar. La cosa acababa de explotar de nuevo. Una nueva y maravillosa posibilidad. No solo podía hacer un trillón de copias, sino que siempre serían del mismo tamaño. Eso fue importante. ¡Ese fue el todopoderoso, el aleluya! punto clave. Al diablo con Jennifer. Acababa de resolver los dos problemas principales de la química del ADN. **ABUNDANCIA y DISTINCIÓN.**”*

Invención de la PCR - Año 1983

Set Up de una reacción de PCR:

Componente	Volumen (ul)	Concentración
Buffer de reacción [10X]	2	1X
MgCl ₂ [50 mM]	0,6	1,5 mM
Primer Fw [10 uM]	1	0,5 uM
Primer Rv [10 uM]	1	0,5 uM
Molde	-	-
dNTP's [2 mM]	2	0,2 mM
Taq [10 U/ul]	0,2	1 U
Agua	c.p.s	-
Vf	20 ul	

“En septiembre de ese año hice mi primer experimento. Quise intentar la forma más fácil primero. Entonces una noche puse ADN humano y los primers de factor de crecimiento nervioso humano en un tubito con tapa purpura a rosca con un O-ring. Lo herví por unos minutos, lo enfrié, agregué la DNA polimerasa, lo cerré y lo dejé a 37° C.”

Invención de la PCR - Año 1983

Set Up de una reacción de PCR.

Componente	Volumen (ul)	Concentración
Buffer de reacción [10X]	2	1X
MgCl ₂ [50 mM]	0,6	1,5 mM
Primer Fw [10 uM]	1	0,5 uM
Primer Rv [10 uM]	1	0,5 uM
Molde	-	-
dNTP's [2 mM]	2	0,2 mM
Taq [10 U/ul]	0,2	1 U
Agua	c.p.s	-
Vf	20 ul	

Perfil de ciclado:

1. Desnaturalización inicial - 95° C
2. Desnaturalización - 95° C
3. Annealing - T_m - 5° C
4. Extensión - 68-72° C
5. Extensión final

Invención de la PCR - Año 1983

Diseño de Primers

- Longitud: 17 - 25 bases
- Evitar las secuencias repetidas, ya que puede producirse la formación de horquillas o de **dímeros de primers**
- Contenido de G+C: 40-60%
- Valores de T_m de no más de 2° C uno del otro
- El extremo 3' debe terminar en C o G
- Chequeo de secuencia

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$
$$T_{\text{annealing}} = T_m - 5^{\circ}\text{C}$$

Invención de la PCR - Año 1983

DNA Polimerasas dirigidas por DNA

	Taq DNA pol	Pfu DNA pol	Hot Start pol
Estabilidad	9 min a 97° C	20 veces más estable	Alta estabilidad
Tasa de error x10 ⁶	8	1,3	Baja tasa de error
Procesividad	1000 bases/min	~500 bases/min	Alta
Act. Transf Terminal	Sí	No	-
Temperatura óptima	72° C	68° C	-

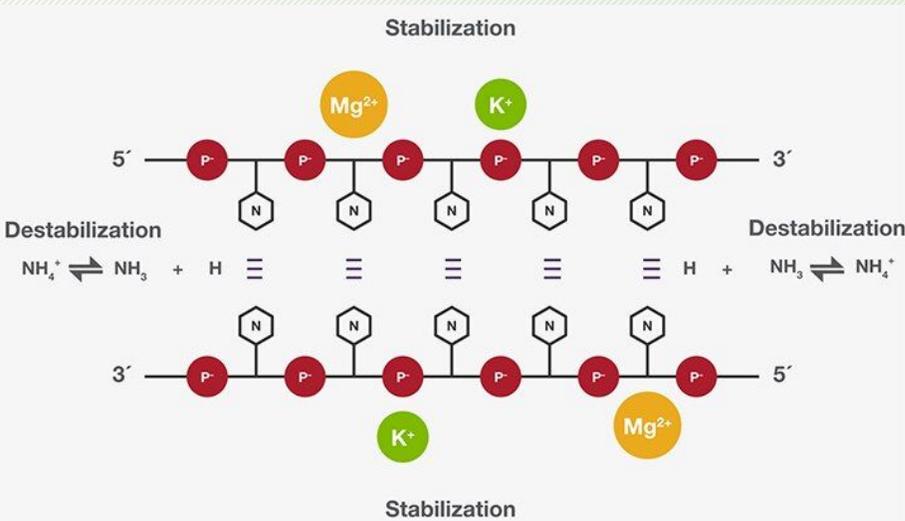
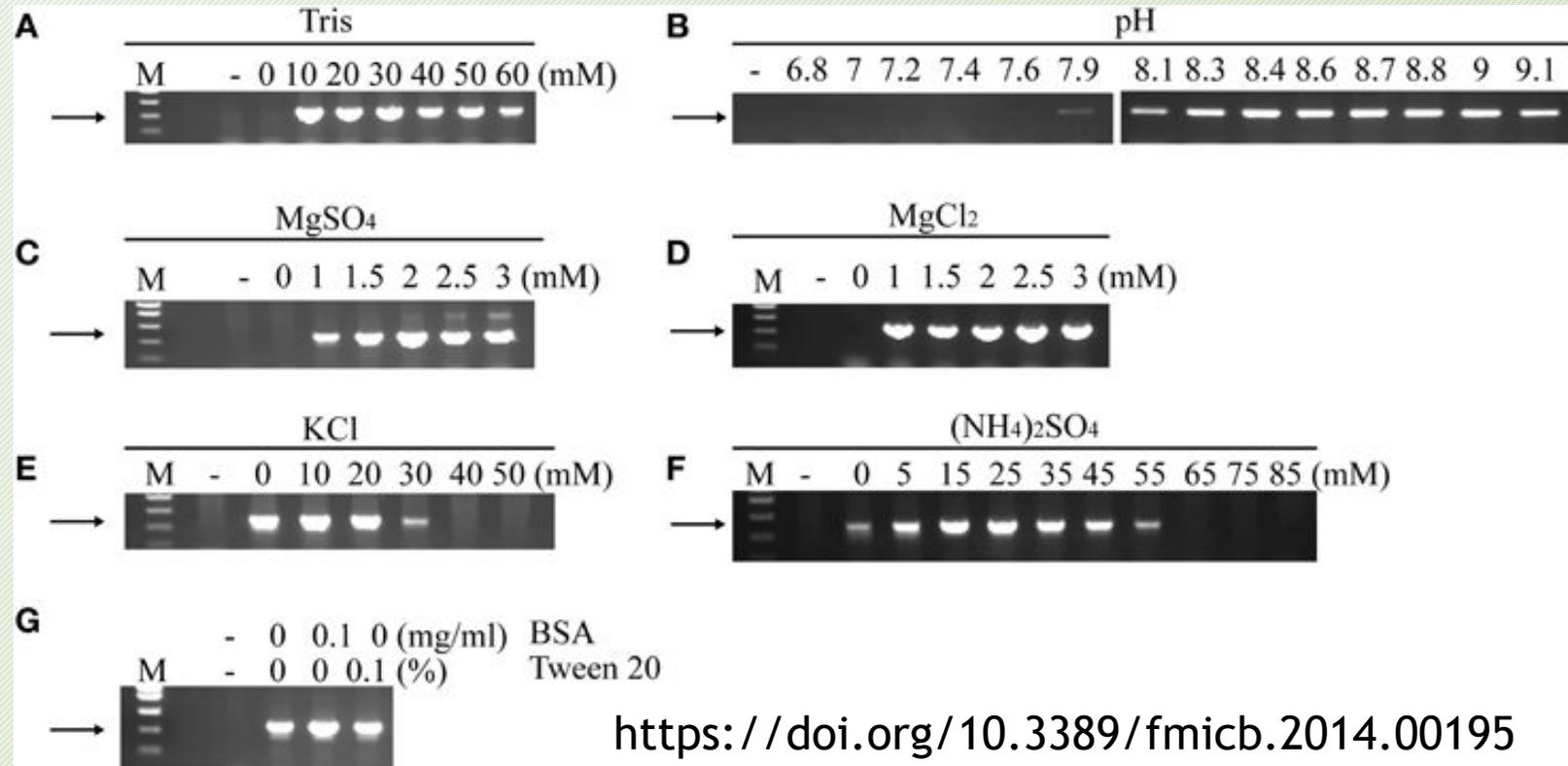
Invención de la PCR - Año 1983

Efecto del Magnesio (y otros componentes)



Cofactor de la DNA pol.

Coordina la interacción entre el 3' OH del primer y el fosfato del dNTP en la polimerización del DNA

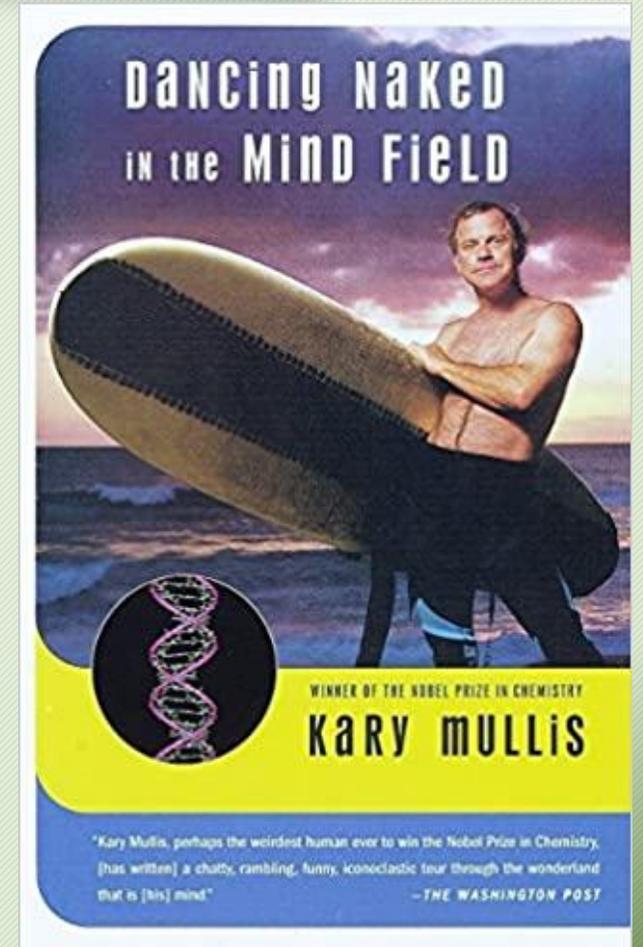


Invención de la PCR - Año 1983

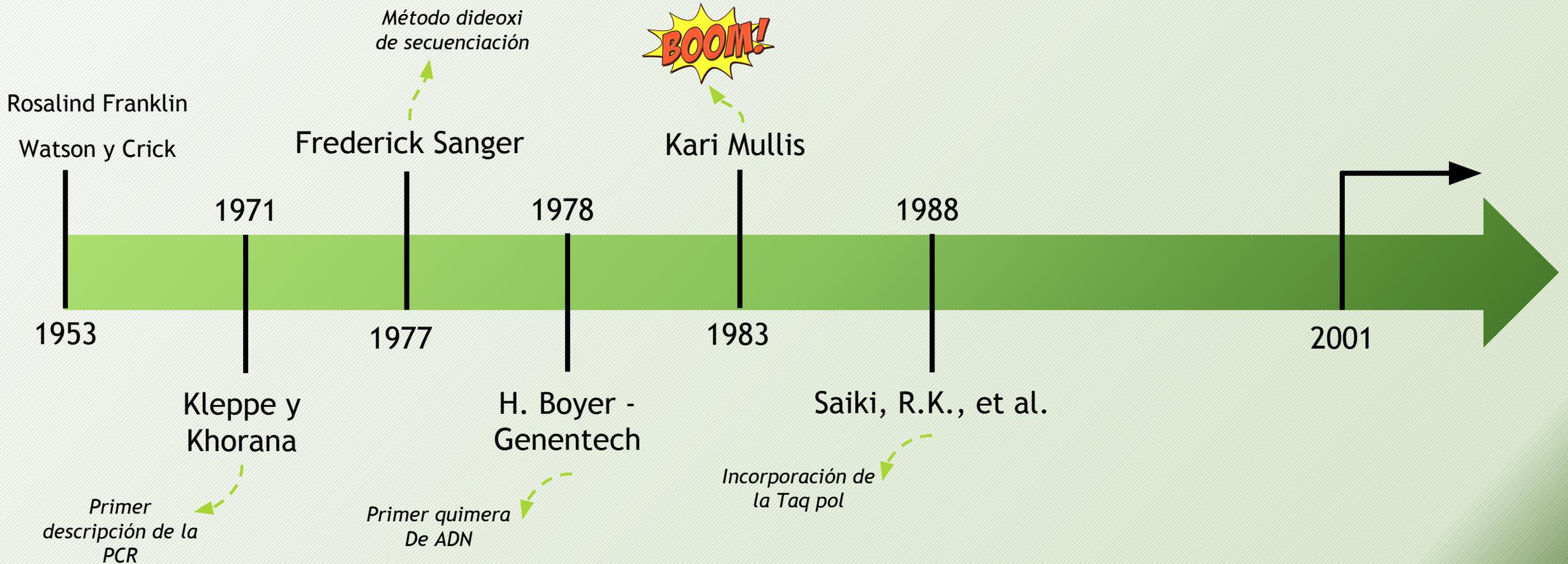
“Durante tres meses hice experimentos esporádicos mientras mi vida con Jennifer, en casa y en el laboratorio, se desmoronaba. El progreso en el laboratorio fue lento. Finalmente, me retiré de la idea de comenzar con el ADN humano. **Me decidí por algo más simple, llamado plásmido.** El primer experimento exitoso ocurrió el **16 de diciembre de 1983.** Estaba oscuro afuera cuando saqué el autorradiograma del congelador y lo desarrollé. Allí, justo donde debería haber estado, había una pequeña banda negra.”

Mullis, K., Faloona, R., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263–273.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**: 487–491.



Breve resumen histórico



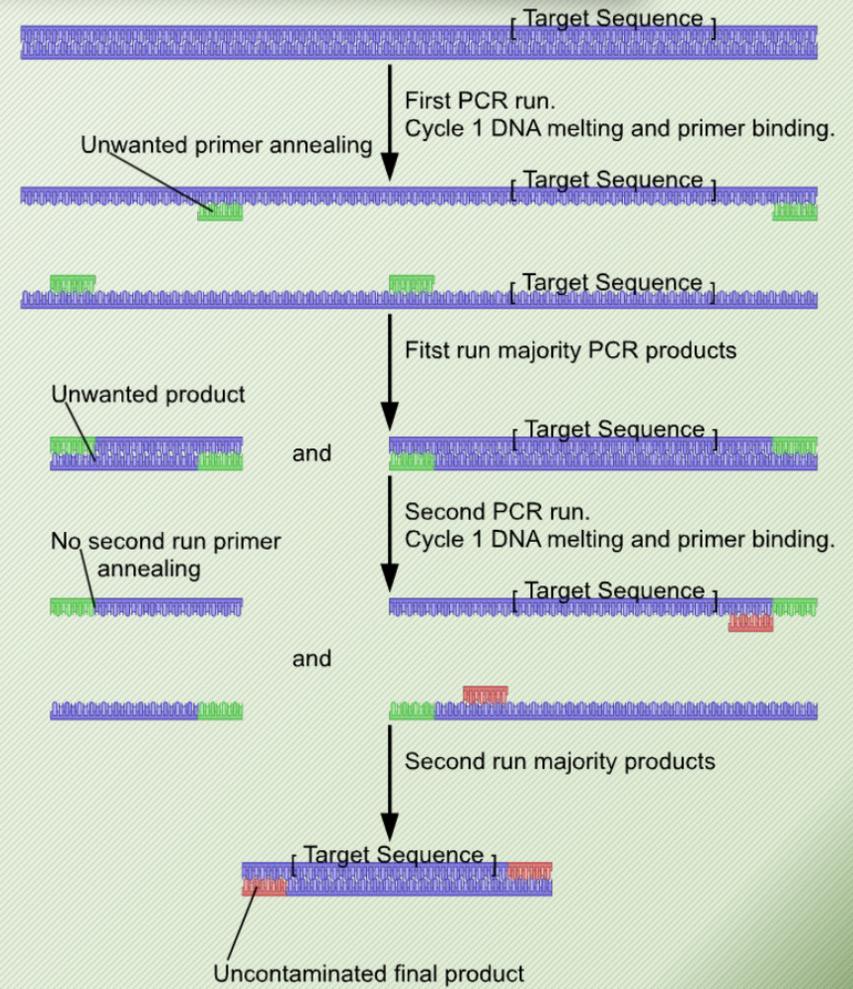
Variantes de la PCR

Nested y Heminested PCR

¿Qué es lo que pasa cuando optimizamos nuestra reacción de PCR y todavía vemos inespecificidad o baja sensibilidad?

- Problemas con el diseño de los *primers*
- Complejidad de la muestra
- Conservación de la muestra

Protocolos largos - Altas chances de contaminación



RT-PCR - Año 1991

- El arranque de las retrotranscriptasas



Howard M. Temin (1934-1994)
Junto a Dulbecco y Baltimore

- Avian Myeloblastosis Virus (AMV)
- Moloney-Murine Leukemia Virus (M-MLV)
- Intron II RT
- Y más mutantes....

¿Qué buscaría mejorar?!

Clasificación de Baltimore

ARN + Primers

Síntesis de cDNA

Amplificación por PCR

RT-PCR - Año 1991

- Set up de un RT-PCR en dos pasos

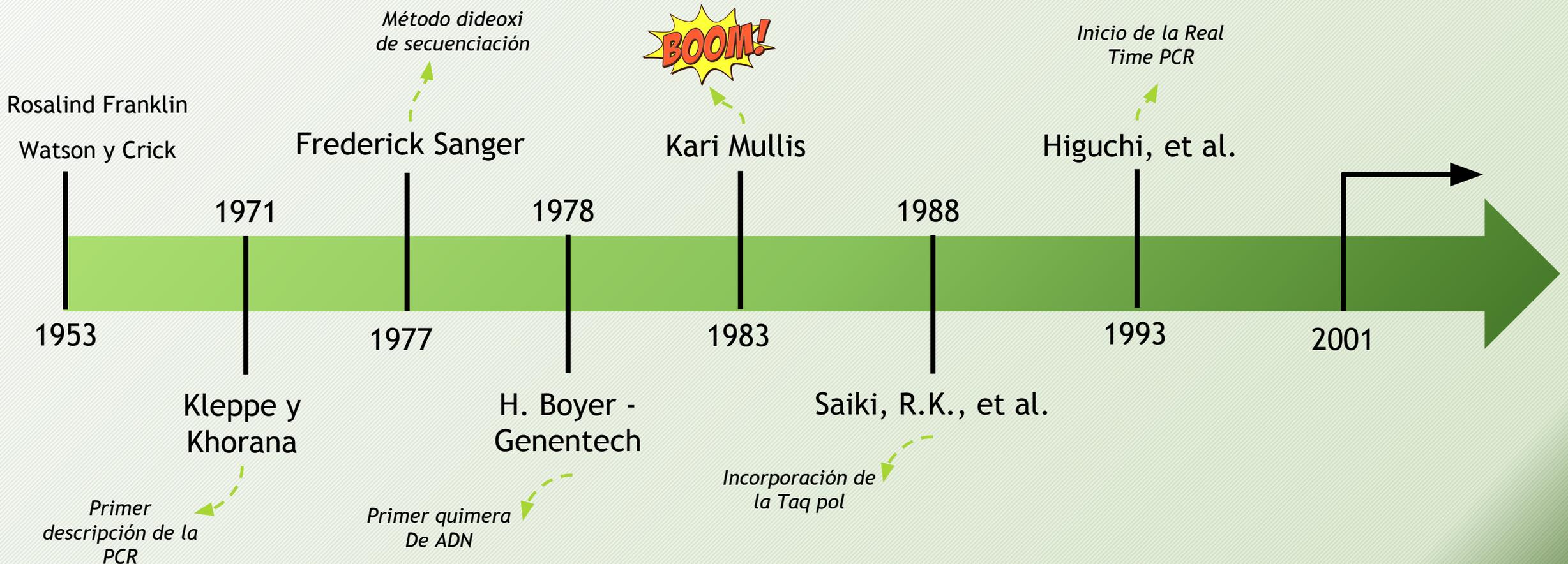
Componente	Volumen (ul)
ARN	5
Primer rv/ N6 / poly T	4
dNTP's [2mM]	2
Agua	c.p.s
Incuba 5 min - 65° C / se enfría	
Buffer RT [10X]	2
Enzima [200 U/ul]	1
Volumen final	20

ARN + Primers

Síntesis de cDNA

Amplificación por PCR

Breve resumen histórico



Real Time PCR

Real Time PCR

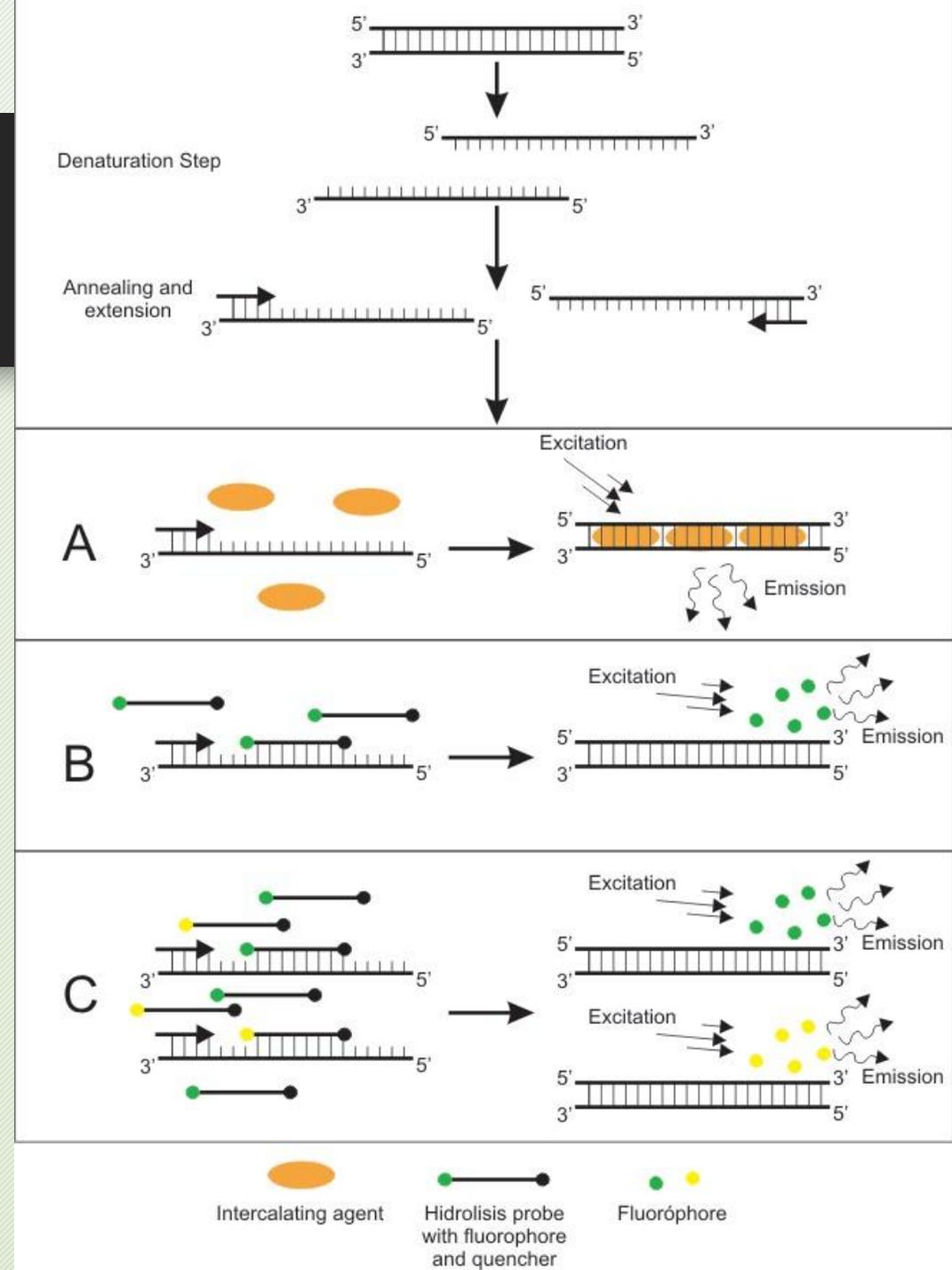
Principio de la Real Time PCR

El proceso de PCR podría monitorearse mediante la adición de una etiqueta fluorescente que se adhiera al producto de PCR acumulado. A medida que aumenta la concentración de producto de PCR, también aumenta la intensidad de la señal de fluorescencia.

- Tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción.
- El término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra

Real Time PCR

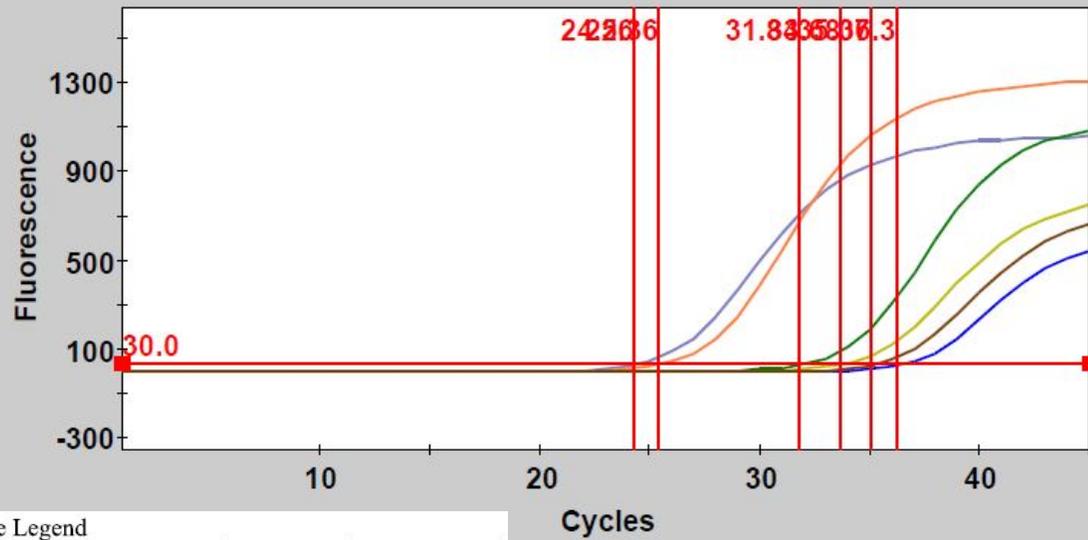
- Métodos de detección de fluorescencia:
 - Agentes intercalantes.
 - Emisión de Fluorescencia por unión a ADNdh.
 - Permiten realizar un HRM (High Resolution Melting).
 - BrEt, SYBR Green, SYBR Safe, EvaGreen.
 - Sondas con fluoróforos.
 - Sondas con fluoróforos y quencher
 - Permiten mayor sensibilidad y especificidad.
 - Múltiples secuencias.
 - Diferentes presentaciones.



Real Time PCR

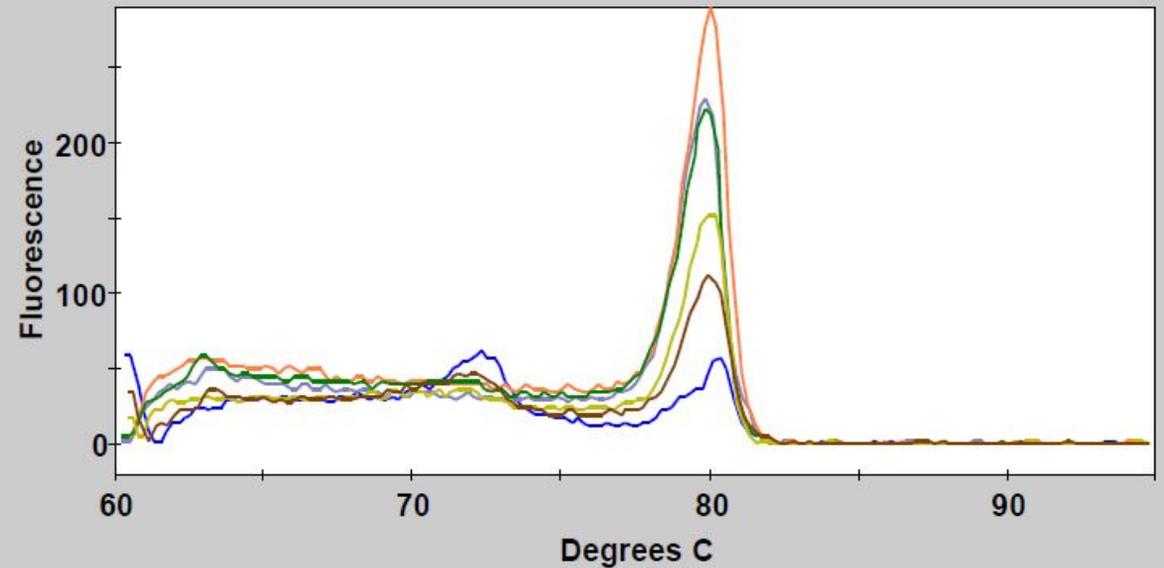
- ▣ Uso en diagnóstico.
- ▣ Usos microbiológicos
- ▣ Usos en investigación
- ▣ Cuantificación
- ▣ Detección de variantes genéticas OGM
- ▣ genotipificación

Real Time PCR



Site Legend

Site ID	Sample ID	Inteltr Ct	Protocol
A9	C(-)	36.30	DENV Probe DS Multiplex
A10	T4 (5)	24.26	DENV Probe DS Multiplex
A11	T4 (6)	25.36	DENV Probe DS Multiplex
A12	T4 (7)	31.84	DENV Probe DS Multiplex
A13	T4 (8)	33.68	DENV Probe DS Multiplex
A14	T4 (9)	35.07	DENV Probe DS Multiplex

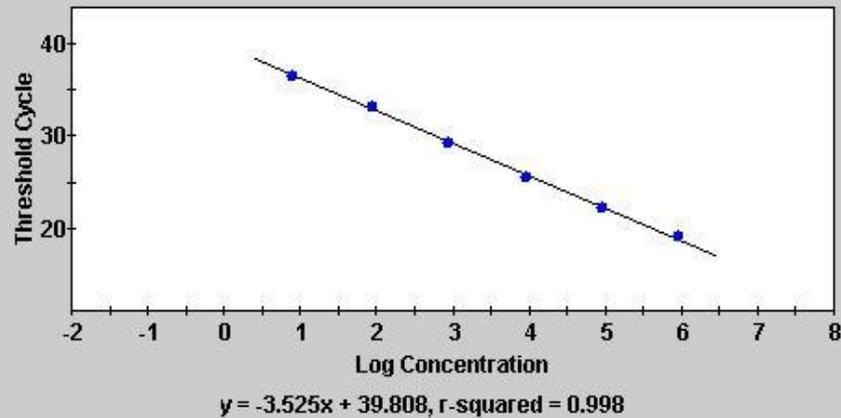
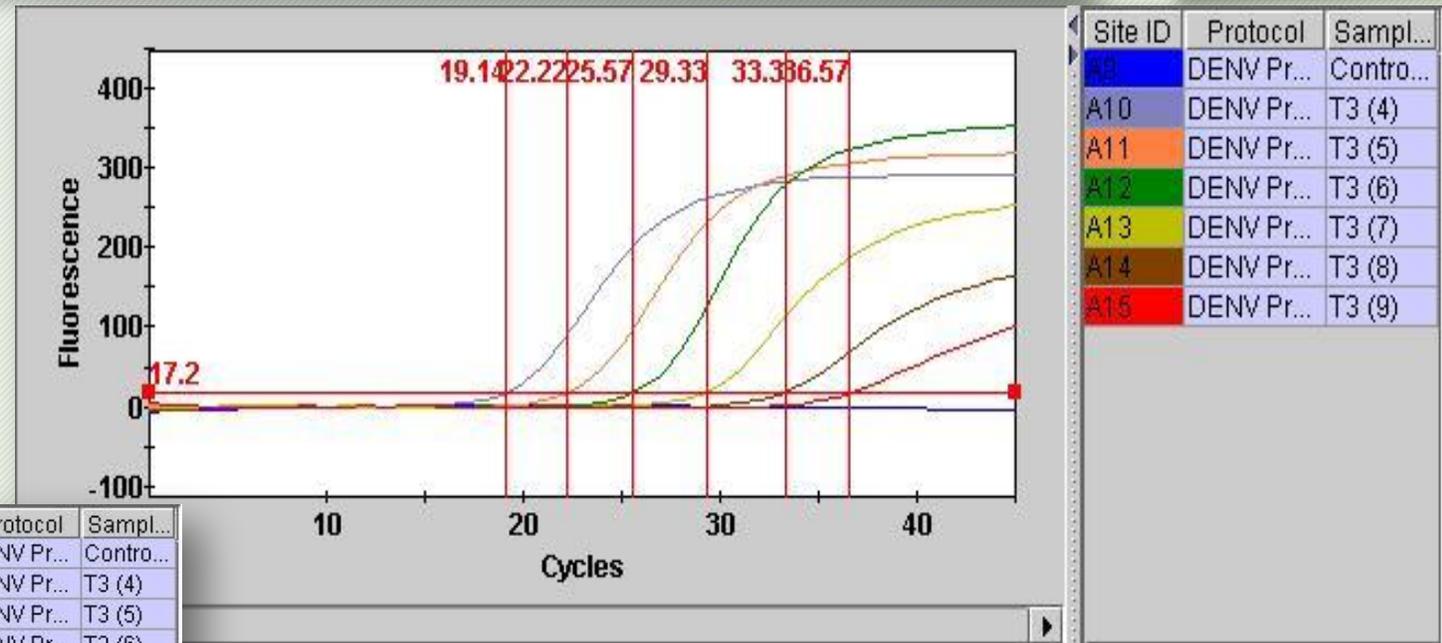


Real Time PCR

Serotipo 3

$R^2: 0,998$

Eficiencia: 92%



Site ID	Protocol	Sampl...
A9	DENV Pr...	Contro...
A10	DENV Pr...	T3 (4)
A11	DENV Pr...	T3 (5)
A12	DENV Pr...	T3 (6)
A13	DENV Pr...	T3 (7)
A14	DENV Pr...	T3 (8)
A15	DENV Pr...	T3 (9)

Breve resumen histórico

