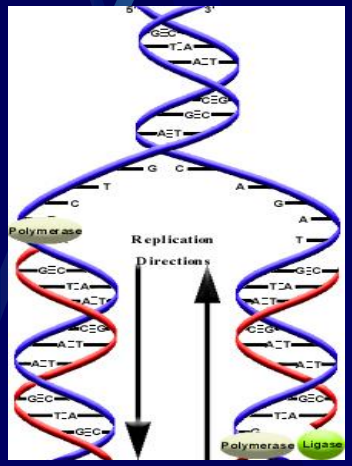
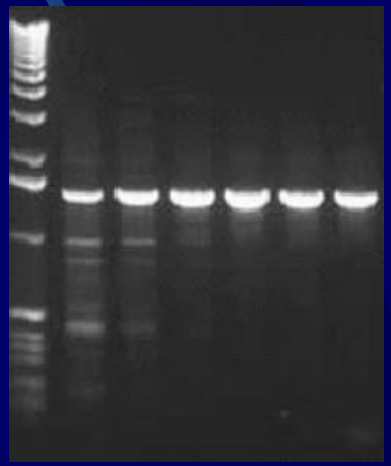
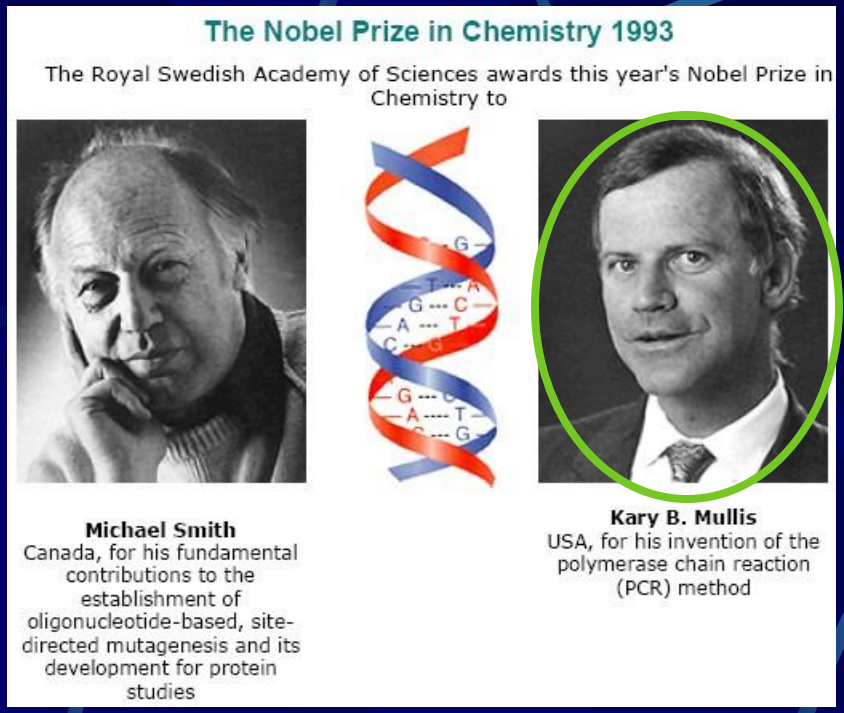
Polymerase Chain Reaction

(PCR)



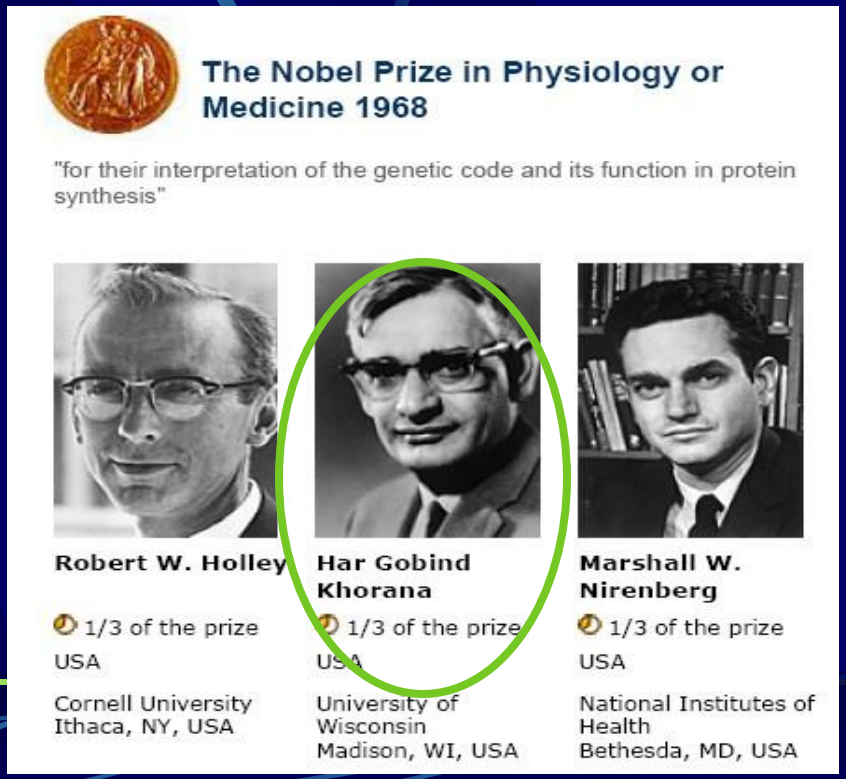


Un poco de historia…



- La técnica de PCR fue inventada por Kary B. Mullis en 1983.
- La primer publicación sobre PCR apareció en 1985, aunque el principio básico de replicar una muestra de DNA usando un par de primers ya había sido descripto por Gobind Khorana en 1971.

- Mullis recibió el premio Nobel de Química en 1993 por la invención del método de PCR.
- Khorana había recibido el premio Nobel en el área de Fisiología o Medicina en 1968 por su trabajo sobre el código genético y la síntesis de proteínas.



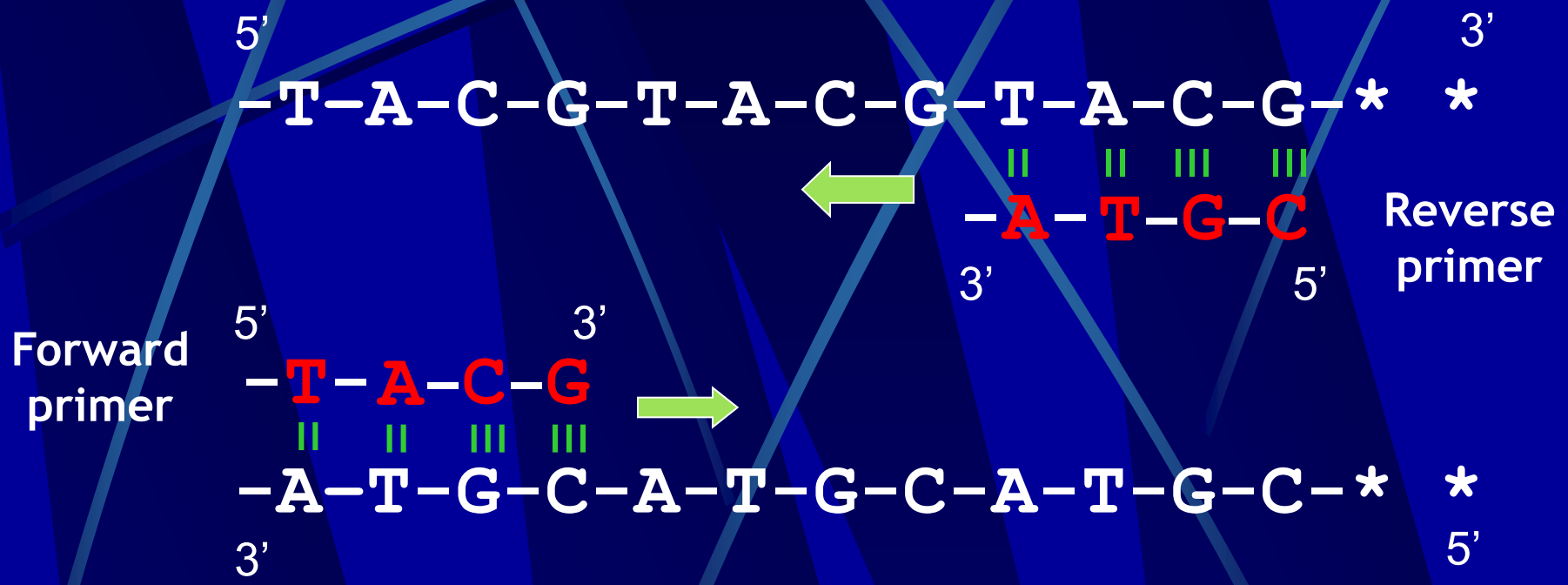
¿De qué se trata?

Consiste en la multiplicación exponencial del número de copias de un fragmento determinado de DNA.

¿Cómo sucede?

Síntesis de DNA: *Primers* específicos hibridan con la cadena que tiene que ser copiada.

Dirección de los primers

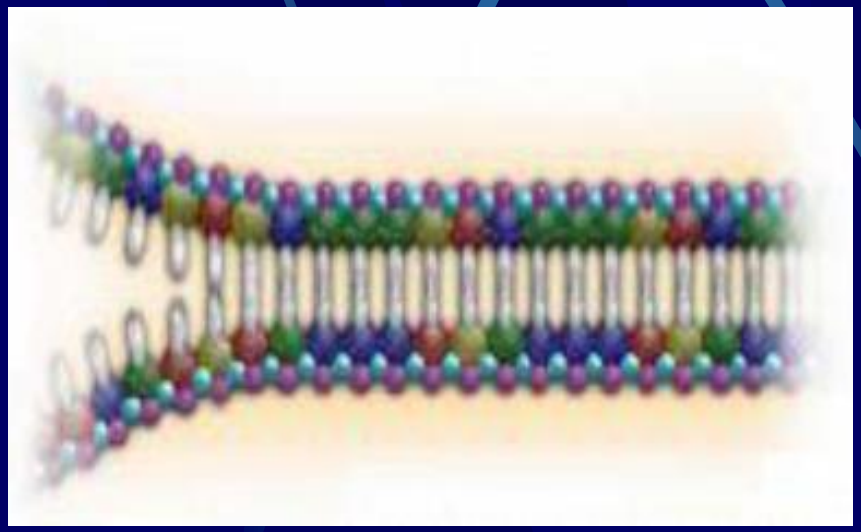


Forward primer: 5’ TACG 3’
Reverse primer: 5’ CGTA 3’

Etapas de la reacción

Desnaturalización

Proceso en el cual ocurre la separación de la doble cadena del DNA por medio de la elevación de la temperatura.

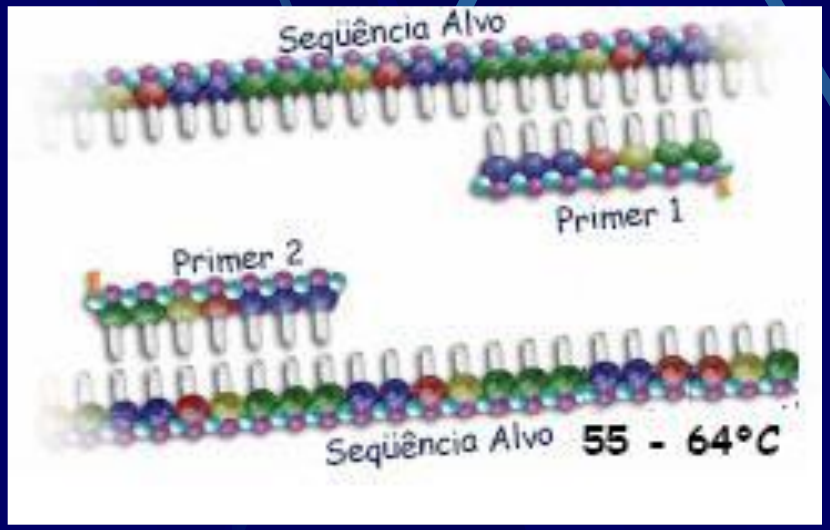


Las muestras son calentadas a 94-96 ºC durante 30 segundos a varios minutos.

Etapas de la reacción

Hibridación o *annealing*

Los primers hibridan con las secuencias complementarias del molde.

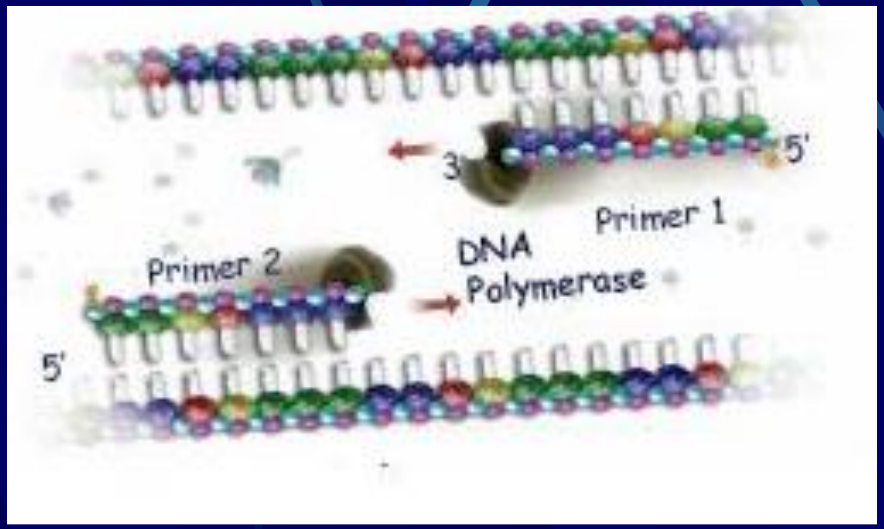


La temperatura es reducida a 55-65 ºC durante algunos segundos (30 a 60 seg)

Etapas de la reacción

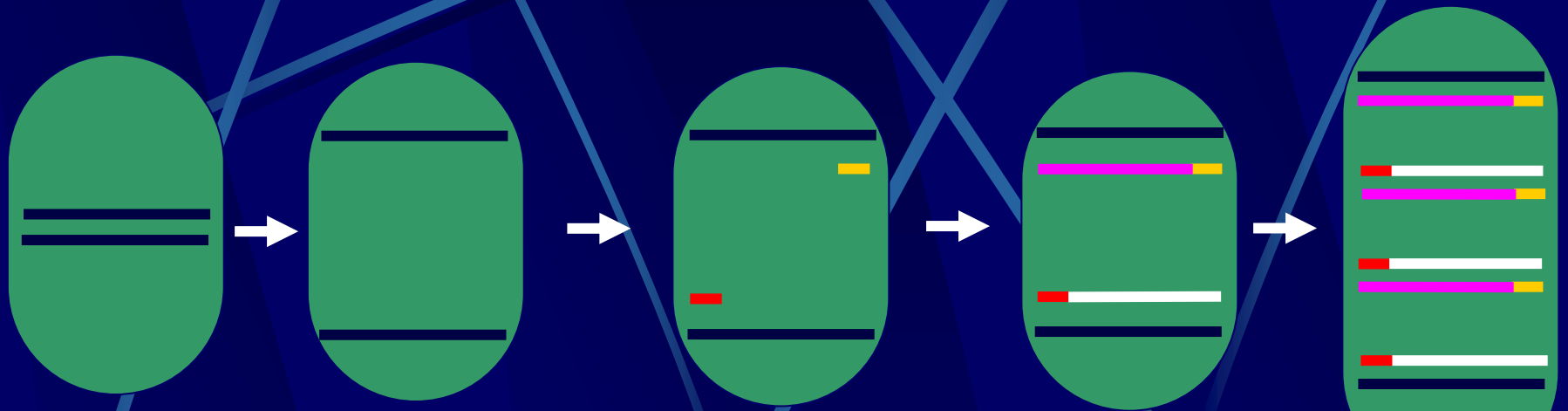
Extensión

La DNA polimerasa actua sobre los primers que hibridaron, comenzando la duplicación de la cadena, tomando del medio los nucleótidos complementarios disponibles.



La temperatura se eleva a 70-75ºC durante 30 a 60 segundos

Ciclos de amplificación



Desnaturalización
95°C

Hibridación
55-65°C

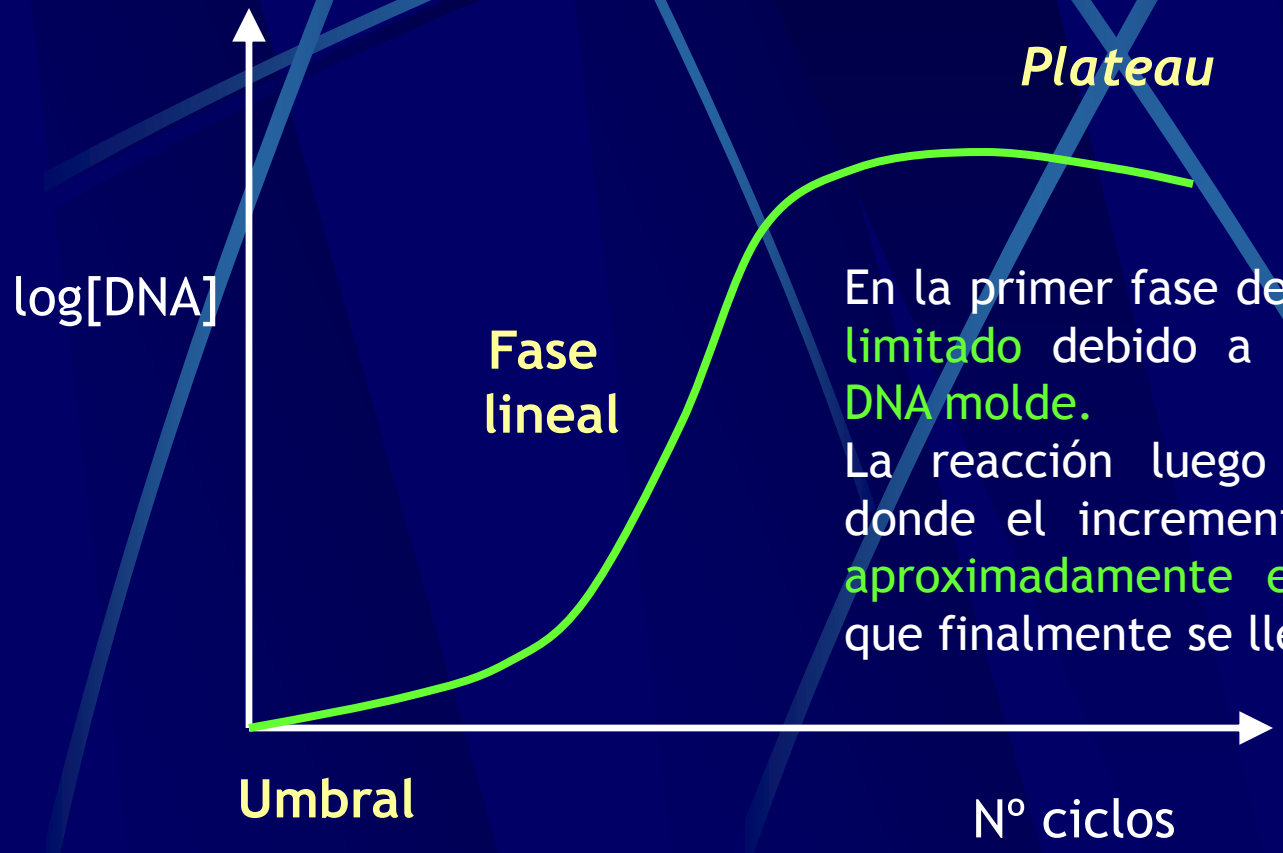
Extensión de
la cadena
72-75°C

2do Ciclo
95°C
55 - 65°C
72-75°C

Primer Ciclo

Múltiples ciclos darán lugar a un incremento exponencial en el número de copias

¿Cómo es el perfil de la reacción?



En la primer fase de la PCR, el rendimiento es limitado debido a la baja concentración de DNA molde.

La reacción luego alcanza una fase lineal donde el incremento en el producto es de aproximadamente el doble por ciclo, hasta que finalmente se llega a un *plateu*.

¿Cuáles son los componentes esenciales en el proceso *standard* de PCR?

- DNA molde
- Primers
- dNTPs
- Mg^{+2}
- Buffer (para mantener el pH)
- Enzima: DNA polimerasa termoestable

DNA molde

- Calidad
  - fragmentación
  - fuente
- Concentración
  - número de copias
- Secuencia
  - contenido G+C
  - restricciones estructurales

DNA from crude preparation protocols may be sheared. Such DNA cannot be used for methods such as Southern blotting, which require high quality and high molecular weight substrates. However, provided the PCR product is short, partial fragmentation is not an issue. Sufficient numbers of molecules remaining intact between the primer binding sites will be present.
This ability to retrieve information from degraded starting material makes PCR ideal in cases of forensic analysis.

PCR is sensitive enough to amplify from small amounts of starting material. Normally, a 50 µl PCR will contain 50 ng of genomic DNA, or ~1.5 x 10^4 copies of the target and should give a signal on an agarose gel after 30 cycles. However, modified protocols using a random primed pre-amplification of template can be used in conjunction with a second targeted PCR to allow detection of sequences from single cells, including haploid germ cells.

High GC content, or internal complementarity of sequence can reduce PCR efficiency if the template can form stable secondary or tertiary structures at the temperatures used for primer annealing and extension, as the enzyme cannot proceed along the template.

Enzimas

- Originalmente se usaba el fragmento Klenow de la DNA pol I, que no es termoestable, con lo cual habia que agregar enzima después de cada ronda de desnaturalización (mayor riesgo de contaminación, alteración del volumen de reacción, muy laborioso).

- Ahora se usan DNA pol termoestables (ej: *Taq: Thermus aquaticus*, *Pwo: Pyrococcus woesei*, *Pfu: Pyrococcus furiosus*, *Tli: Thermococcus littoralis*).
  - La más comúnmente usada = *Taq* DNA polimerasa
  - 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 exremo 3´, especialmente si en el extremo hay una C).
  - Cantidad usada = 5 x 10^{12} moléculas (1.5 unidades)

Ejemplo Enzimas

Slater et al, Promega Notes Number 68, 1998, p. 07

Table 2. Reported Fidelity for Several Different Thermal Stable DNA Polymerases Using the Forward Mutation Assay (1).

DNA Polymerase	Error Rate x 10^{-6}	Accuracy x 10^{5}
Pfu	1.3 ± 0.2 S.D.	7.7
Deep Vent$_R$™	2.7 ± 0.2 S.D.	3.7
Tli (Vent$_R$®)	2.8 ± 0.9 S.D.	3.6
Taq	8.0 ± 3.9 S.D.	1.3
UlTma®	55.3 ± 2.0*	0.2

*Range of duplicates.

Precios (Invitrogen):

Taq DNA pol, 500 unidades..... USD 222

Platinum Taq DNA pol, 500 reacciones..... USD 686

Accuprime Pfx DNA pol, 500 reacciones..... USD 765

Enzima uasada en el TP: Taq Platinum DNA Polymerase (PB-L). Sistema HotStart

Mg^{+2}

- Es el cofactor de la Taq polimerasa
- Agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$)
- $Mg^{+2} \approx$ 1,5 - 2 mM
- $Mg^{+2} <<$ 1,5 mM no hay reacción
- $Mg^{+2} > >$ 2 mM hibridización inespecífica, mayor tolerancia a errores
- $Mg^{+2} >$ 5 mM inhibición

dNTPs

- Consisten en una mezcla con iguales cantidades de dATP, dCTP, dGTP y dTTP.
- Se usan a una concentración final de 200 μM c/u.

Buffers

- Sales: K^+ / Mg^{+2}
  - Ejemplo: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.5
- Modificadores
  - Ejemplo: DMSO (dimetilsulfóxido) se usa para reducir el *background*

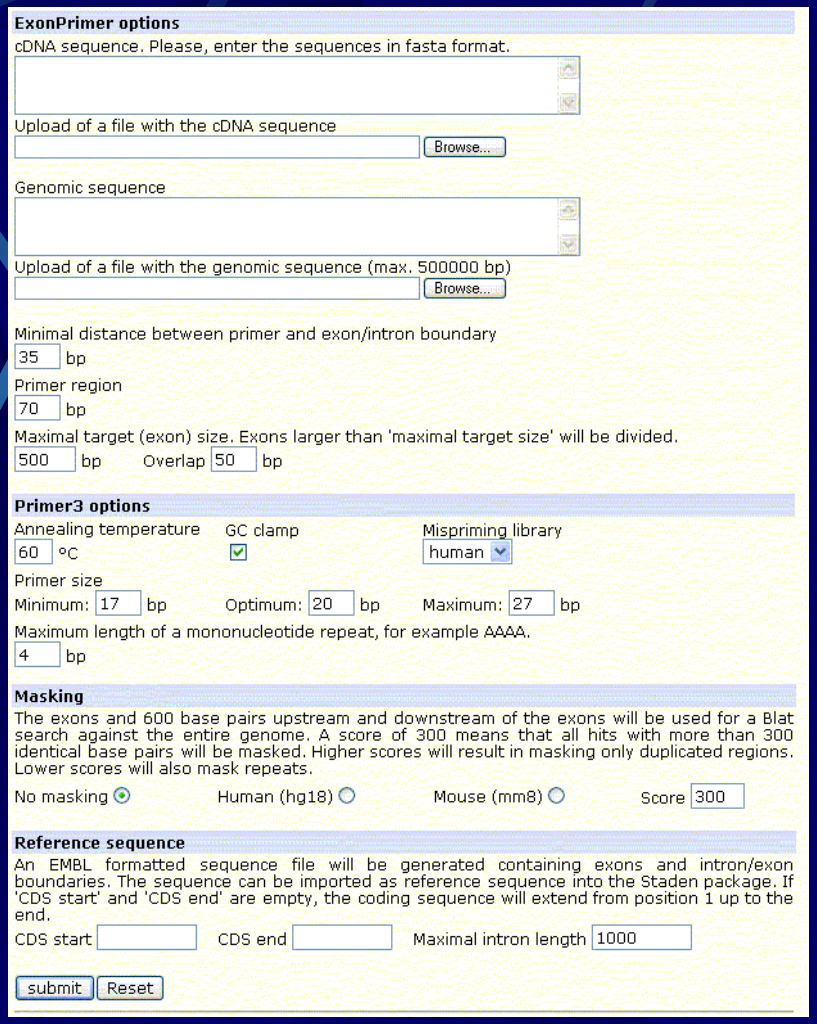
Primers

- Requieren de un cuidadoso diseño, en el cual debe considerarse:
  - Longitud: 18 – 25 bases (usualmente 20 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
  - Homología de secuencia
    - BLAST analysis
- Existen programas especiales para el diseño de primers
- En general se usan a una concentración final entre 0.25 y 1 μM

T_m = 4(G+C) + 2(A+T) (para secuencias menores a 25 nt)
T annealing = T_m - 5ºC

Diseño de los *primers*

Online:
http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html



Free software:
http://perlprimer.sourceforge.net/

Controles experimentales

- Control positivo (muestra conocida)
- Control negativo (agua en lugar de DNA, para controlar contaminación)

Programación de los ciclos

- Desnaturalización inicial 95°C (3-5 min)

- Desnaturalización 95°C (15-60 seg)
- Annealing (20-60 seg)

  La T° debe ser calculada o determinada empíricamente para cada par de primers

  demasiado alta = poco o nada de producto

  demasiado baja = annealing no específico = productos incorrectos
- Extensión (desde 30 seg)

  De acuerdo a la temperatura óptima de la DNA polimerasa utilizada (72°C Taq)

28-35 ciclos

- Extensión final 72°C

- Hold 4°C

La extensión final a 72°C asegura que todas las moléculas del producto final tengan su longitud completa (full length). El últinmo paso del programa permite conservar las muestras a 4°C hasta que estas sean retiradas y guardadas en el freezer para su posterior análisis.

Termocicladores

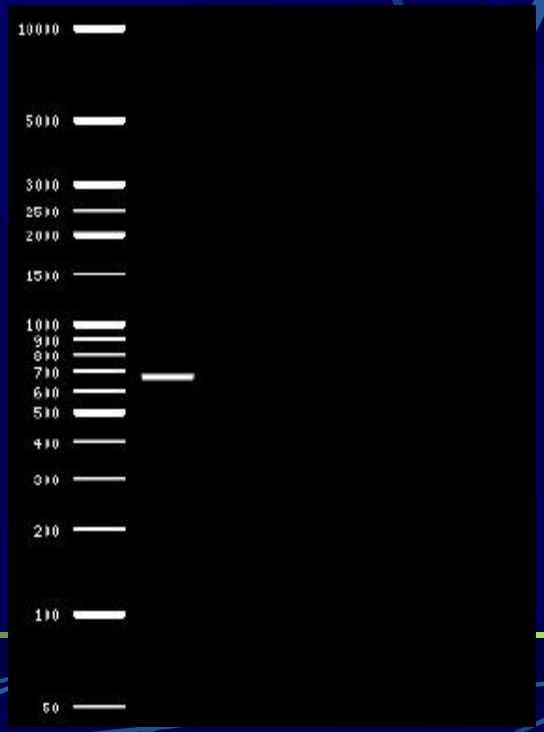
- Los primeros cicladores funcionaban con capilares.

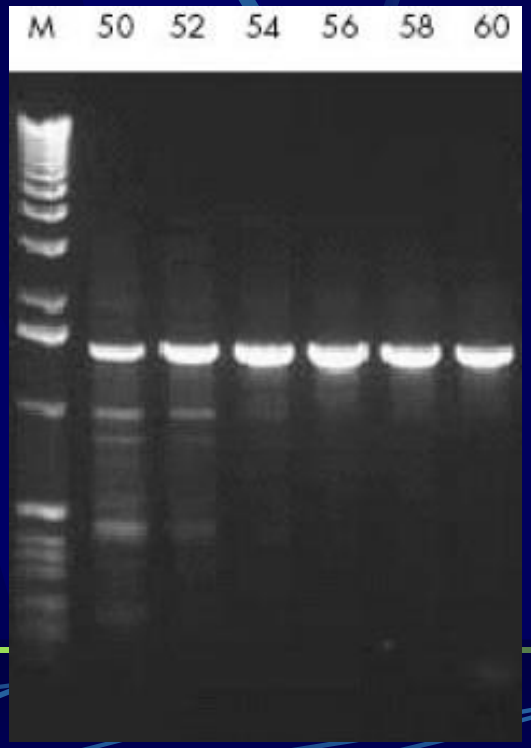
- Los cicladores actuales usan tubos tipo eppendorf de 0,2 y 0,5 ml. Tambien hay bloques que aceptan micro-placas de 96 wells.

Visualización de los resultados

•El producto de PCR se resuelve generalmente en un gel de agarosa. Se usan geles de poliacrilamida cuando se requiere mayor resolución.

• Se corre también un *ladder* o marcador de peso molecular





Tipos de PCR

➢Multiplex PCR: amplificación con múltiples pares de primers, lo que da lugar a una serie de productos que pueden verse como múltiples bandas en un gel de agarosa. Es frecuentemente usada en diagnóstico médico.

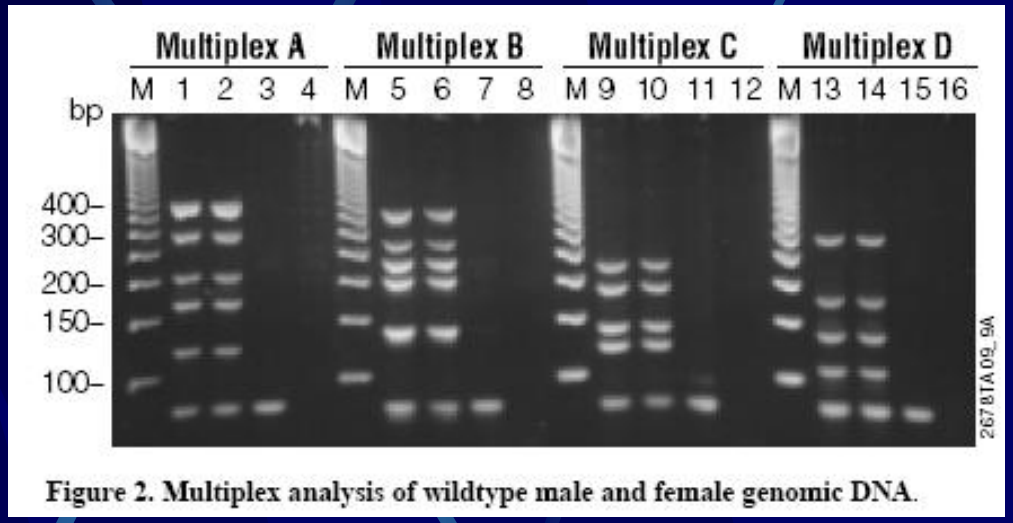
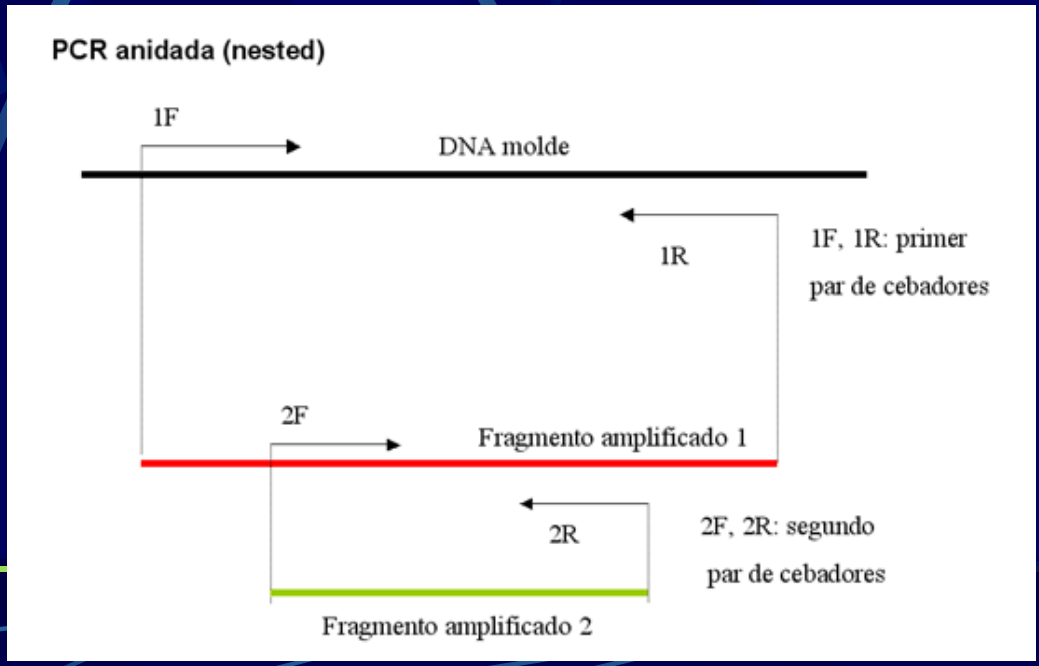


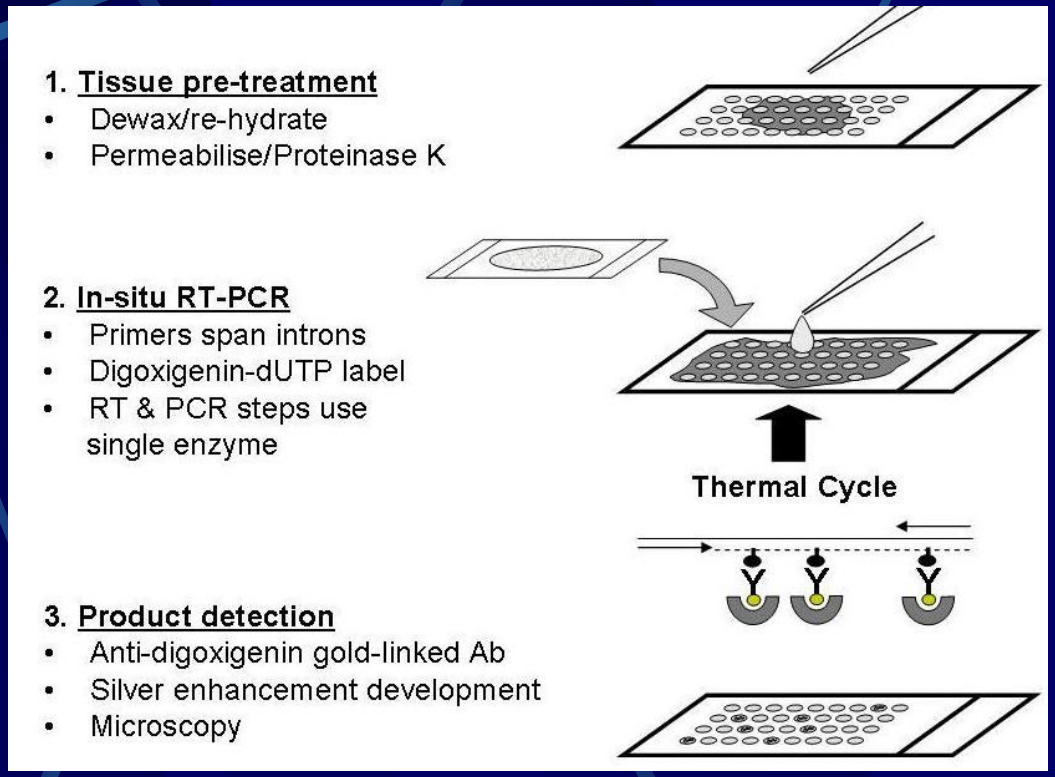
Figure 2. Multiplex analysis of wildtype male and female genomic DNA.

➢Nested PCR (o PCR anidada): para reducir productos indeseados. Se realiza una segunda ronda de PCR utilizando un segundo par de primers que hibriden un poco más internamente que los primeros. Rinde un único producto debido a que sólo el fragmento correcto de DNA posee los sitios correctos de hibridización para el segundo par de primers.

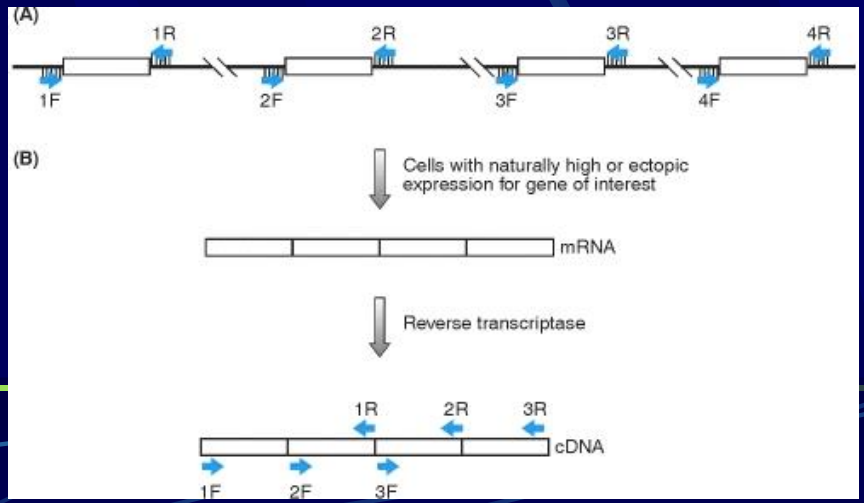


Tipos de PCR

➢PCR *in situ*: PCR realizada sobre preparaciones (tejidos o células) fijas en un portaobjetos. se realiza primero amplificación de DNA blanco y luego detección mediante hibridación in situ convencional con sondas DNA/RNA.



➢RT-PCR: amplificación de un fragmento cuyo material de partida es cDNA, el cual fue generado por transcripción reversa a partir de una muestra de RNA.

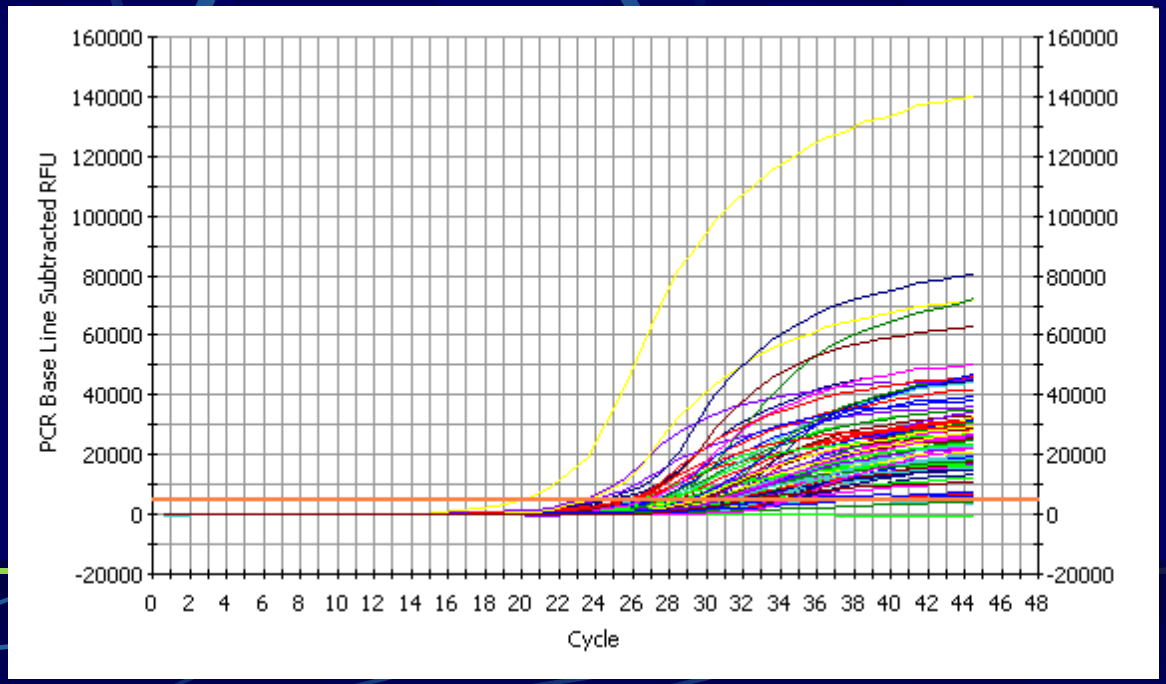


Tipos de PCR

➢PCR en tiempo real: los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

Se requiere un termocilcador apto para Real Time.

Agentes intercalantes: SYBR™ Green



Algunas aplicaciones de la técnica de PCR

- DNA Sequencing
- In vitro mutagenesis
- cDNA cloning
- Gene expression studies

Práctico N°2

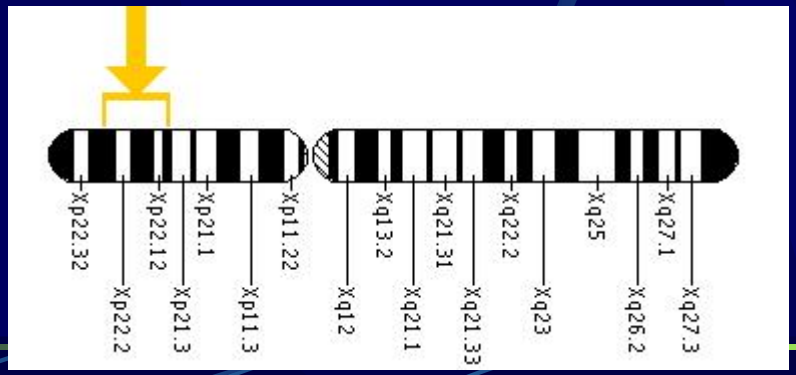
Caracterización del sexo de muestras de DNA mediante amplificación por PCR de secuencias del gen de amelogenina.

¿De qué se trata?

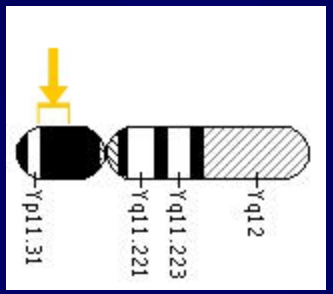
- El gen de amelogenina (AMG) codifica para una proteína del esmalte dental, y se encuentra en ambos cromosomas sexuales.

- La secuencia de este gen en el cromosoma Y se diferencia de la del X por una deleción de aproximadamente 200 pb.

- Para el par de primers elegidos, en mujeres se espera obtener una banda de 360 pb y en varones 2 bandas, una correspondiente al X de 360 pb y otra al Y de 160 pb.



Cromosoma X



Cromosoma Y

¿Qué vamos a hacer?

- Vamos a amplificar por PCR una región correspondiente al gen de amelogenina.
- La reacción se lleva a cabo con el siguiente par de primers:

  AME F 488 : 5’ CAT TCA TgA ACC ACT gCT CAG 3’
  AME B 648 : 5’ AAA TgA gAA AAC CAg ggT TCC 3’

- La mezcla de reacción se realizará en 15 µl conteniendo la cantidad en µl de DNA correspondiente a 100 ng (dependiendo de la concentración de cada muestra).

¿Cómo se prepara la mezcla de PCR (mix)?

La mix lleva todos los reactivos necesarios para realizar la PCR, menos el DNA.

Ejemplo: mix para 10 tubos, con volumen final de 15 µl / tubo:

		1 Tubo	10 Tubos
Reactivos	**Conc final**	**premix X1 (µl)**	**premix X 10 (µl)**
Buffer 10X (posee Mg^{+2})	1 X	1.5	15
dNTPs 10 mM	0,2 mM	0,3	3.0
Primers AMG 25 µM	0,25 µM	0,15	1.5
TAQ 0.6 ul/100 ul		0,09	1,0
DNA (50 ng/ul)	100 ng	2	20
H_2O			109,5
total mix (µl)		Vf = 15 µl	Vf = 150 µl

40,5 µl

Mix: en tubos eppendorff de 0.5 ml

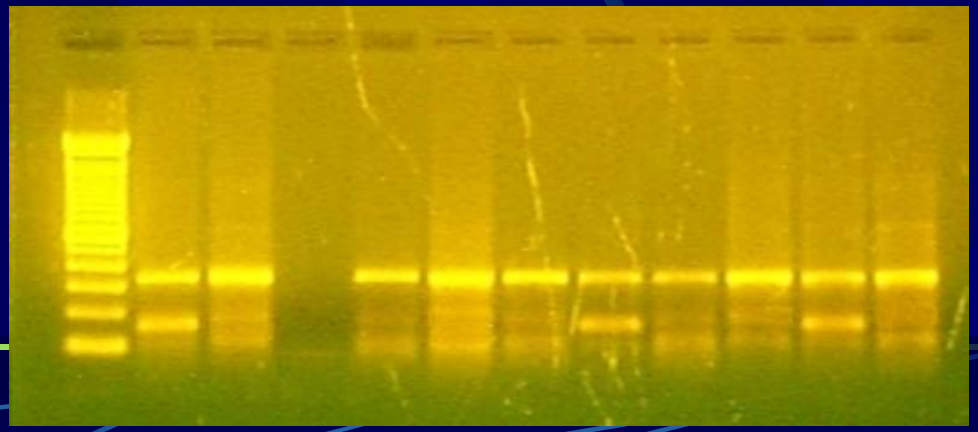
Luego se reparte en tubos de 0.2 ml

Condiciones de ciclado:

Programa de amplificación :	Desnaturalización inicial	95ºC	5’
35 ciclos	Desnaturalización	95ºC	1’
	Annealing	52ºC	1’
	Extensión	72ºC	1’
	Extensión final	72ºC	5’

Las muestras se correrán luego en un gel de agarosa 2%

Ejemplos:



¿Preguntas?