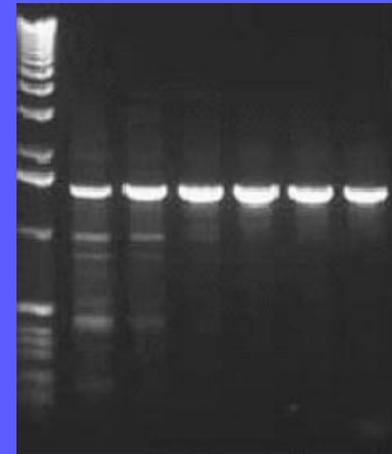
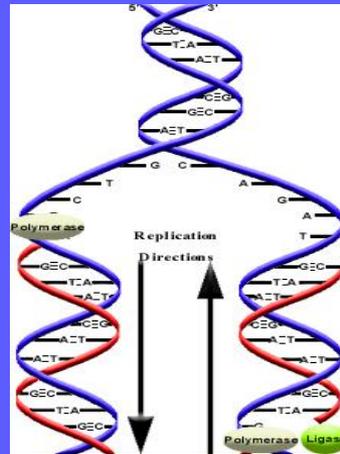


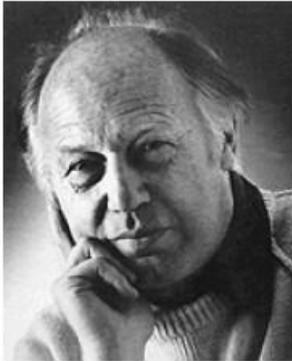
Polymerase Chain Reaction (PCR)



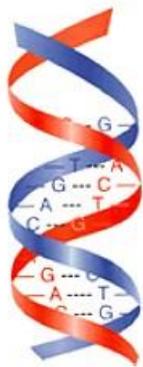
Un poco de historia...

The Nobel Prize in Chemistry 1993

The Royal Swedish Academy of Sciences awards this year's Nobel Prize in Chemistry to



Michael Smith
Canada, for his fundamental contributions to the establishment of oligonucleotide-based, site-directed mutagenesis and its development for protein studies



Kary B. Mullis
USA, for his invention of the polymerase chain reaction (PCR) method

- *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.

- 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 descrito por *Gobind Khorana* en **1971**.



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1968

"for their interpretation of the genetic code and its function in protein synthesis"



Robert W. Holley
🏆 1/3 of the prize
USA

Cornell University
Ithaca, NY, USA



Har Gobind Khorana
🏆 1/3 of the prize
USA

University of Wisconsin
Madison, WI, USA

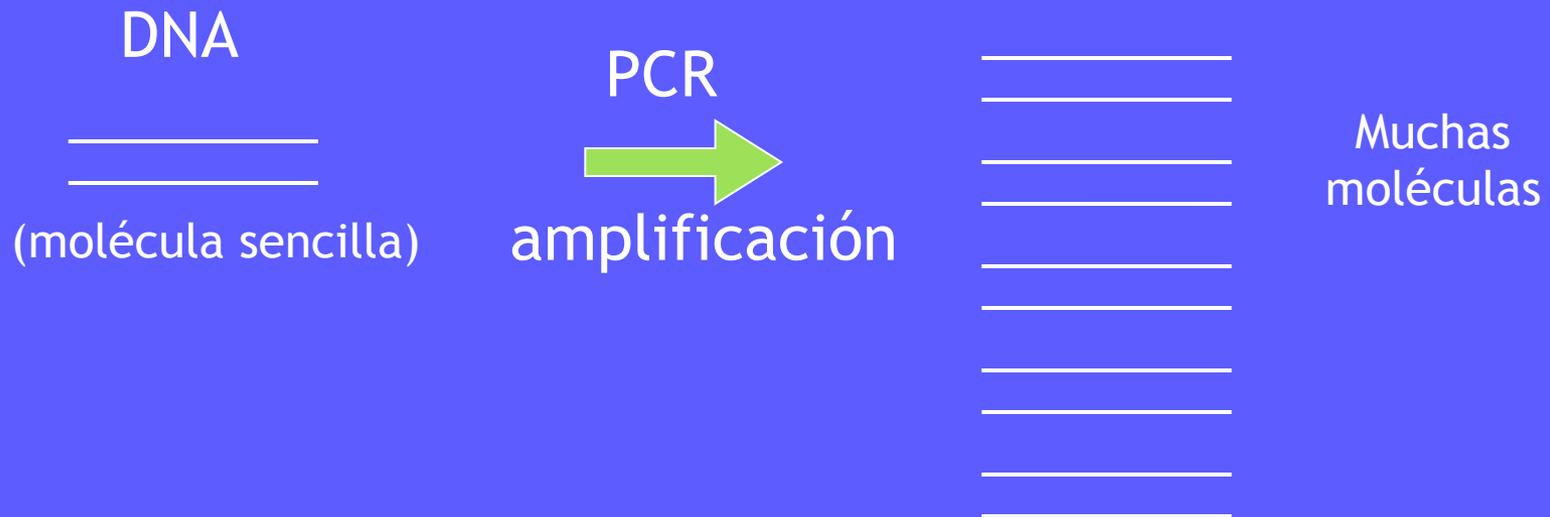


Marshall W. Nirenberg
🏆 1/3 of the prize
USA

National Institutes of Health
Bethesda, MD, USA

¿De qué se trata?

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

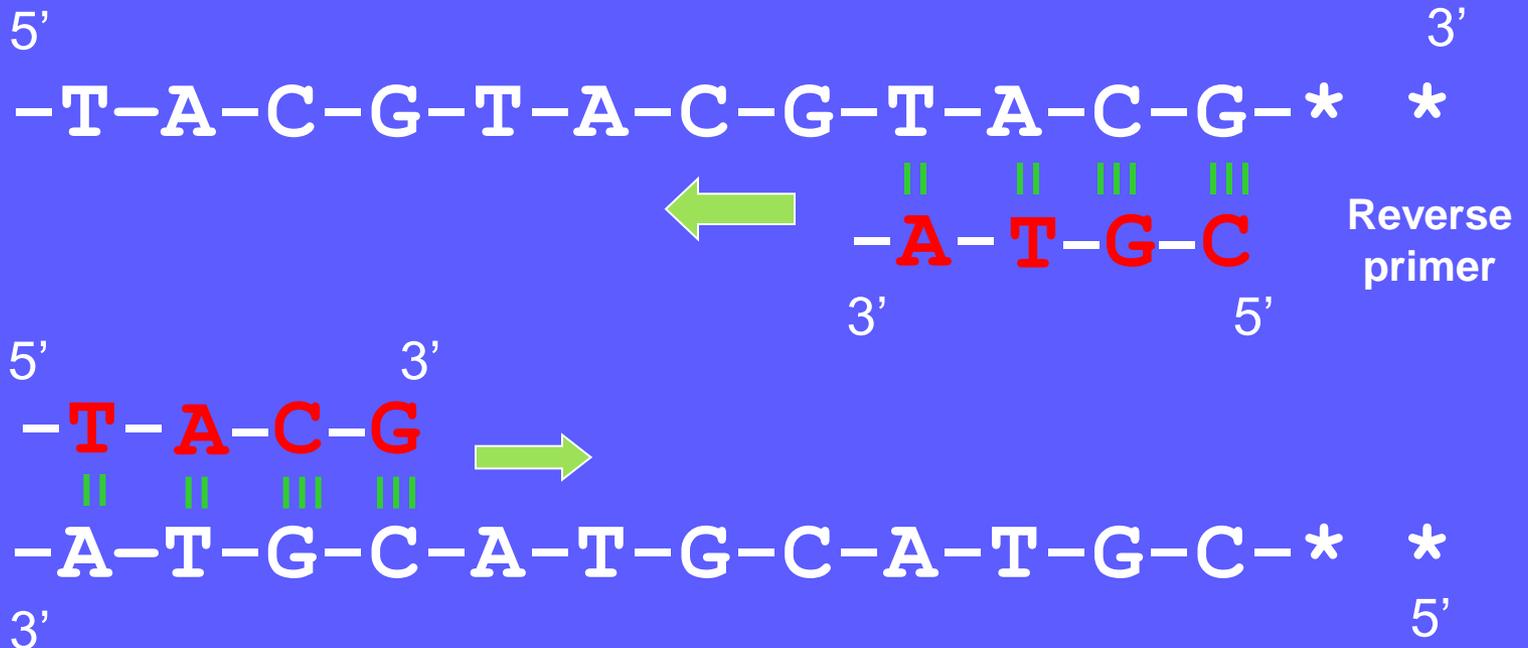


¿Cómo sucede?



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

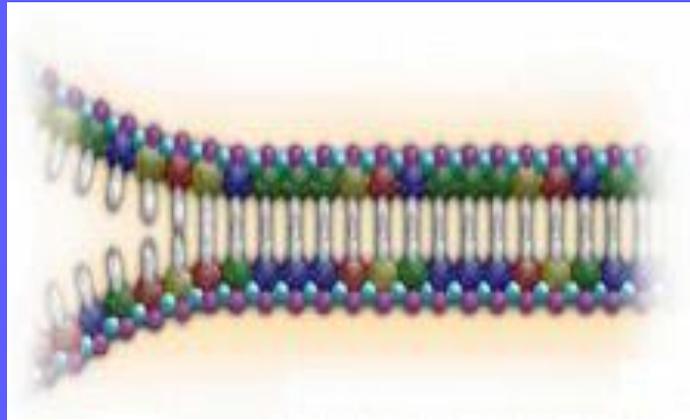
Dirección de los *primers*



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

Etapas de la reacción: Desnaturalización

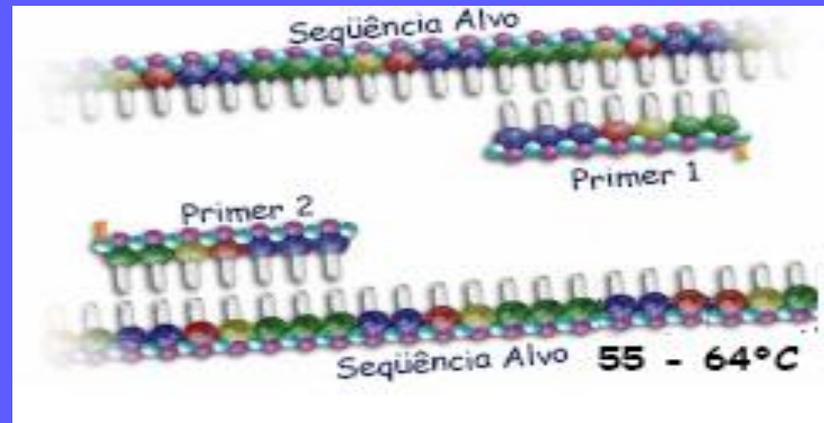
Proceso en el cual ocurre la separación de la doble cadena del DNA por medio de la elevación de la temperatura.



Las muestras son calentadas a 94-96 °C durante 0,5 o varios minutos.

Etapas de la reacción: Hibridación

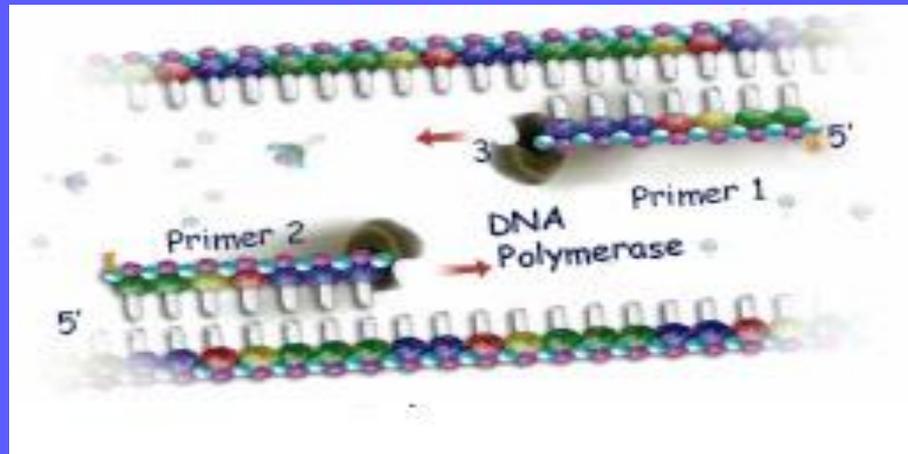
La temperatura es reducida a 55-65 °C durante algunos minutos.



Los primers hibridan con las secuencias complementarias del molde.

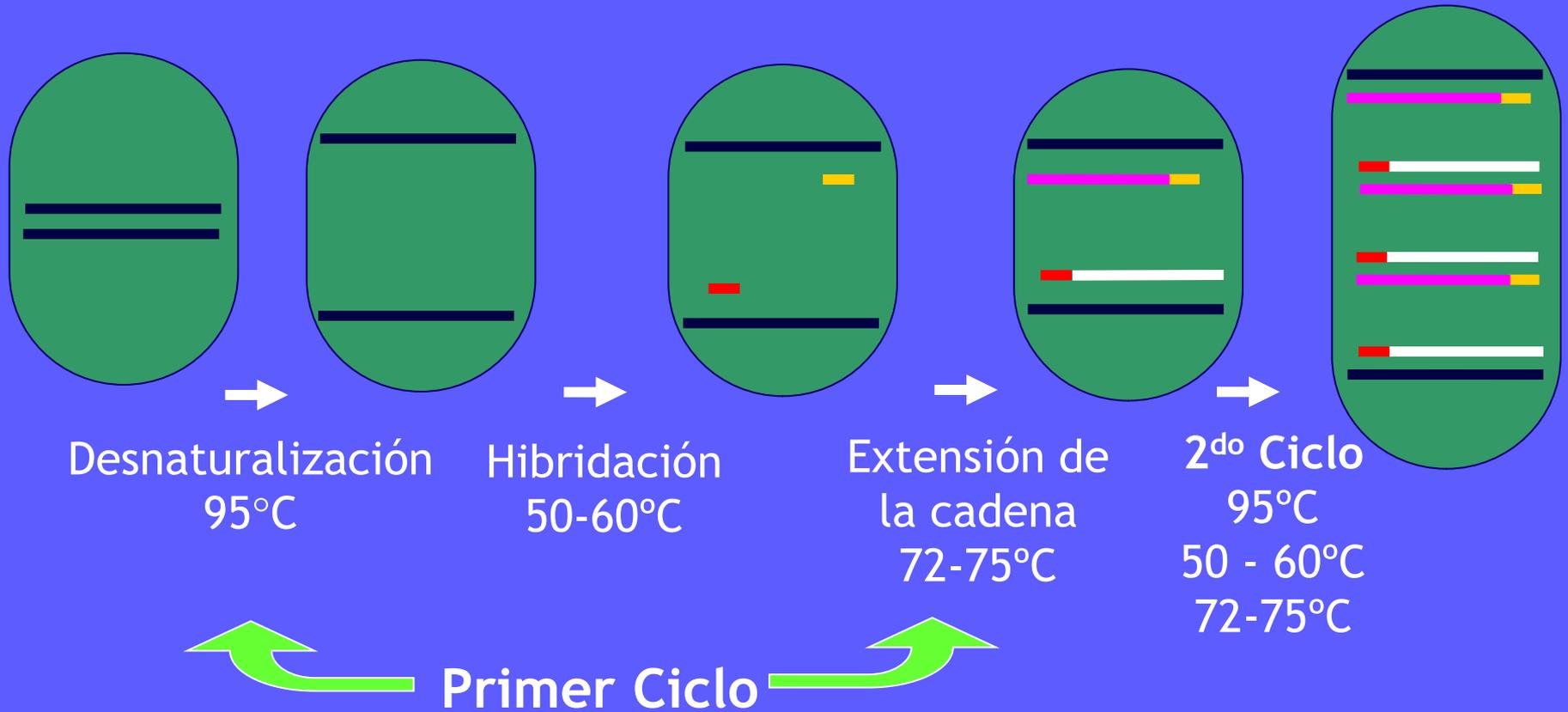
Etapas de la reacción: Extensión

La temperatura se eleva a 72°C durante 1 o varios minutos.



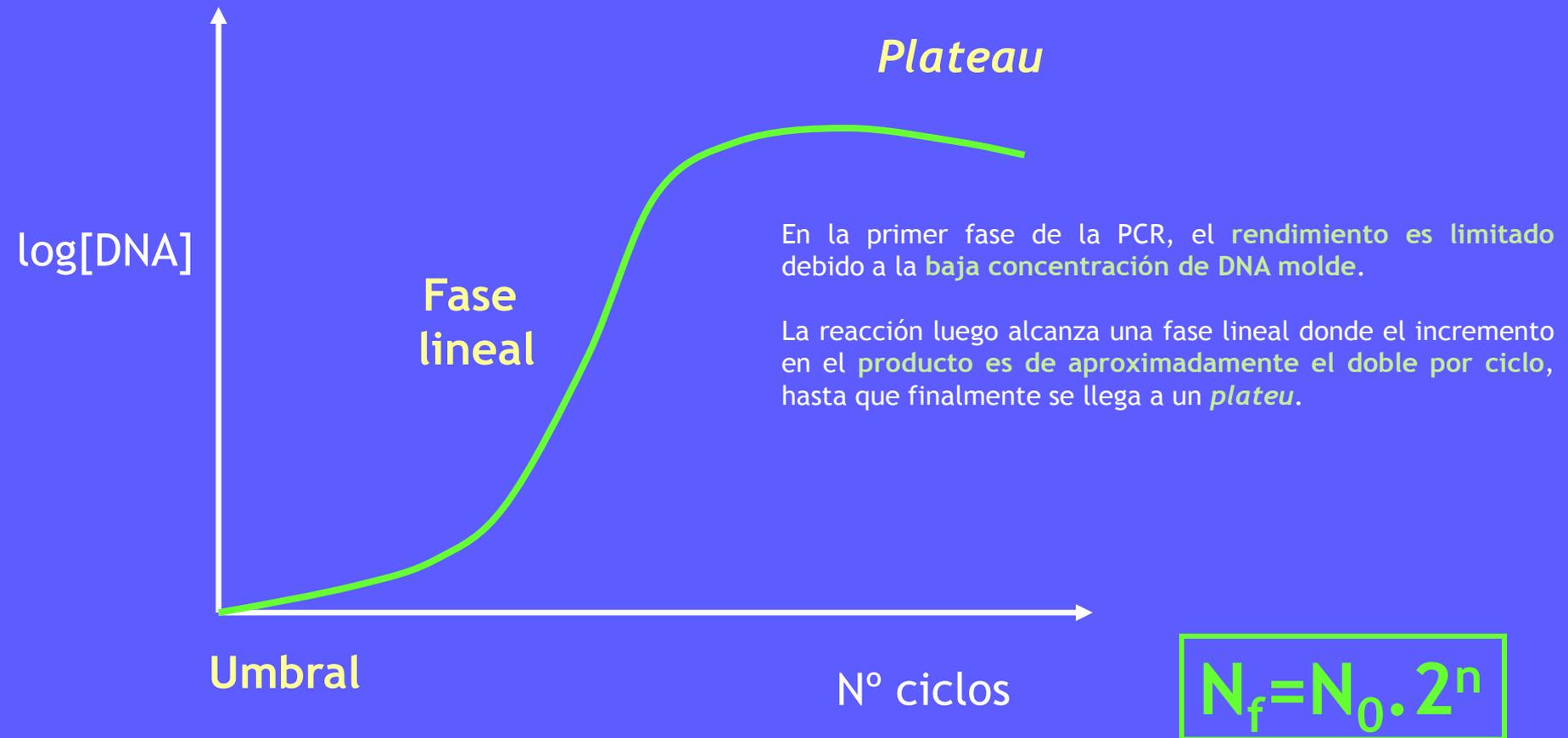
La DNA polimerasa actúa sobre los *primers* que hibridaron, comenzando la duplicación de la cadena, tomando del medio los nucleótidos complementarios disponibles.

Ciclos de amplificación



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

¿Cómo es el perfil de la reacción?



¿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

ADN 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 μ l PCR will contain **50 ng of genomic DNA**, or **$\sim 1.5 \times 10^4$ 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 utilizaba el fragmento Klenow de la DNA pol I, que no es termoestable, con lo cual había 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 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)

Mg⁺²

- Es el cofactor de la Taq polimerasa
- Agregado comúnmente como cloruro de magnesio (MgCl₂)
- **Mg⁺² ≈ 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.

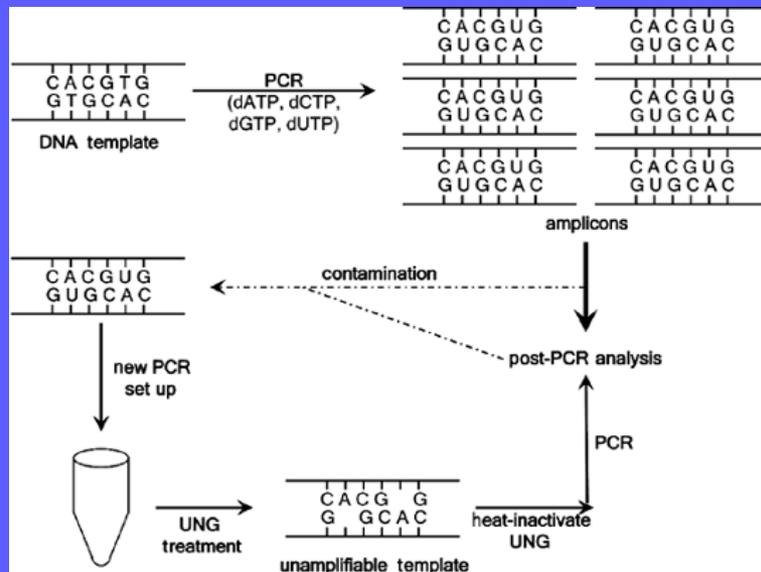
Buffers

- 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*
- Análogos de dNTP (como por ejemplo dUTP)



dUTP can be introduced in place of dTTP. Product with dUTP can be digested using UNG (Uracil-N glycosylase). This is useful where routine PCRs are carried out on a large scale. The pretreatment of reactions with UNG reduces cross-contamination of the template from previous products.

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 de 1 μ M

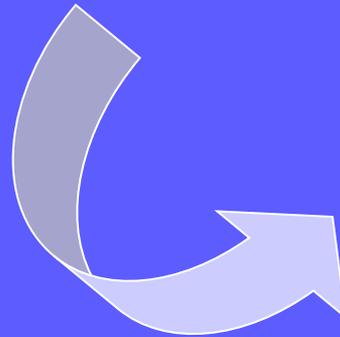
$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T) \text{ (para secuencias menores a 25 nt)}$$

$$T_{\text{annealing}} = T_m - 5^\circ\text{C}$$

Diseño de los *primers*

Online:

<http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html>



ExonPrimer options

cDNA sequence. Please, enter the sequences in fasta format.

Upload of a file with the cDNA sequence

Genomic sequence

Upload of a file with the genomic sequence (max: 500000 bp)

Minimal distance between primer and exon/intron boundary
 bp

Primer region
 bp

Maximal target (exon) size. Exons larger than 'maximal target size' will be divided.
 bp Overlap bp

Primer3 options

Annealing temperature °C GC clamp Mispriming library

Primer size
Minimum: bp Optimum: bp Maximum: bp

Maximum length of a mononucleotide repeat, for example AAAAA.
 bp

Masking

The exons and 600 base pairs upstream and downstream of the exons will be used for a Blat search against the entire genome. A score of 300 means that all hits with more than 300 identical base pairs will be masked. Higher scores will result in masking only duplicated regions. Lower scores will also mask repeats.

No masking Human (hg18) Mouse (mm8) Score

Reference sequence

An EMBL formatted sequence file will be generated containing exons and intron/exon boundaries. The sequence can be imported as reference sequence into the Staden package. If 'CDS start' and 'CDS end' are empty, the coding sequence will extend from position 1 up to the end.

CDS start CDS end Maximal intron length

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

Asegura que todas las moléculas del producto final tengan su longitud completa (*full length*)

- *Hold* 4°C

Permite conservar las muestras a 4°C hasta que estas sean retiradas y guardadas en el freezer para su posterior análisis.

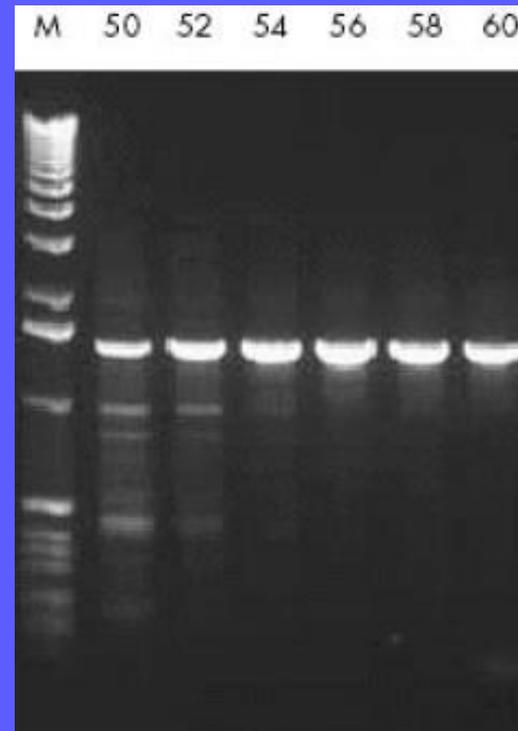
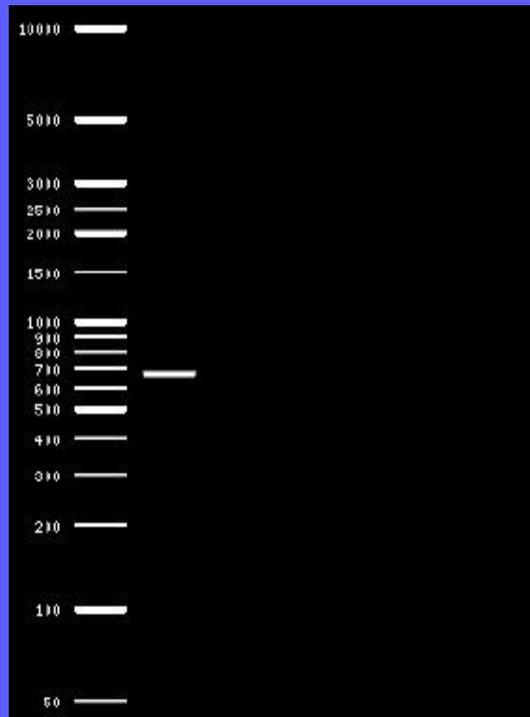
Termocicladores

- Los primeros cicladores funcionaban con capilares.
- Los cicladores actuales usan tubos tipo *ependorf* de 0,2 y 0,5 ml.
- Tambien hay bloques que aceptan micro-placas de 96 *wells*.



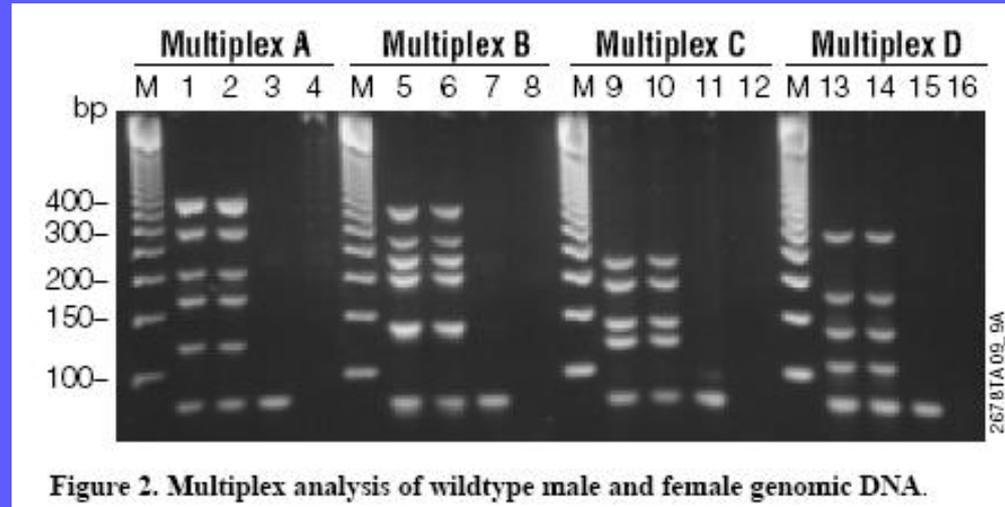
Visualización de los resultados

- 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

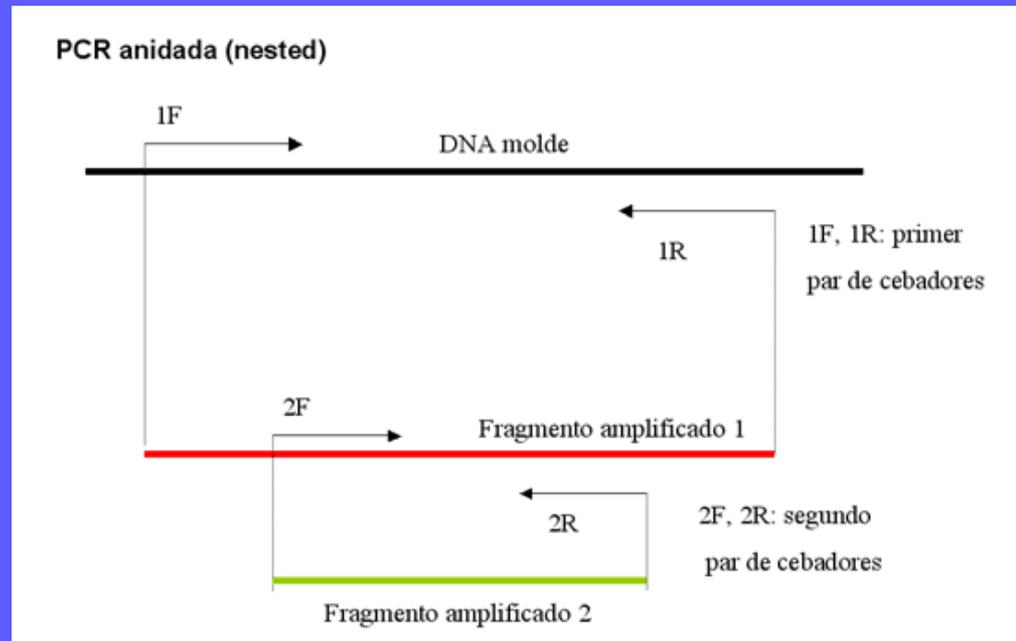


Tipos de PCR

➤ **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. Frecuentemente es usada en diagnóstico médico.

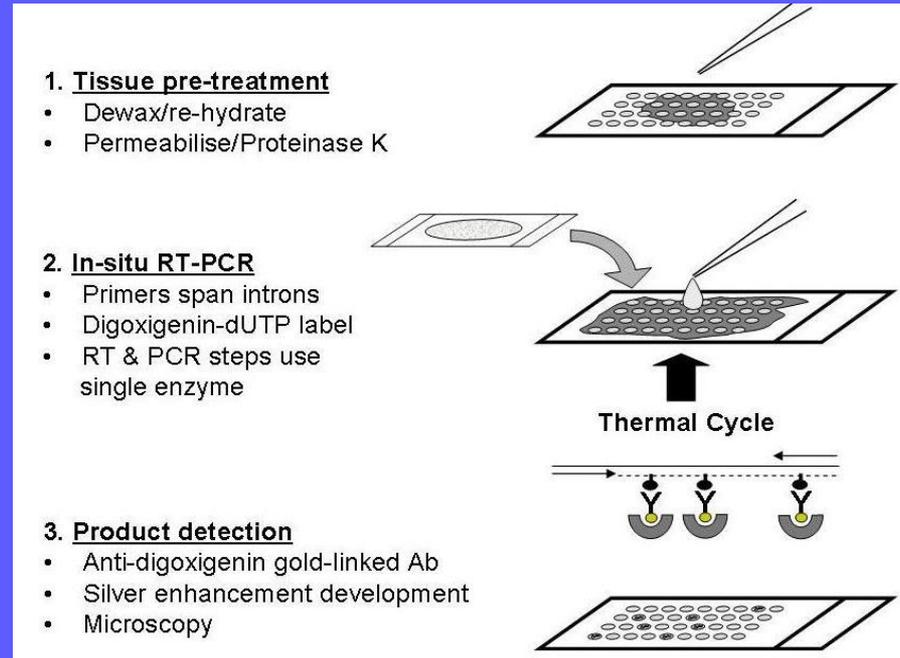


➤ **Nested PCR (o PCR anidada):** Para reducir productos indeseados. Se realiza una segunda ronda de PCR utilizando un segundo par de *primers* que hibriden un poco más internamente que los primeros. Rinde un único producto debido a que sólo el fragmento correcto de DNA posee los sitios correctos de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

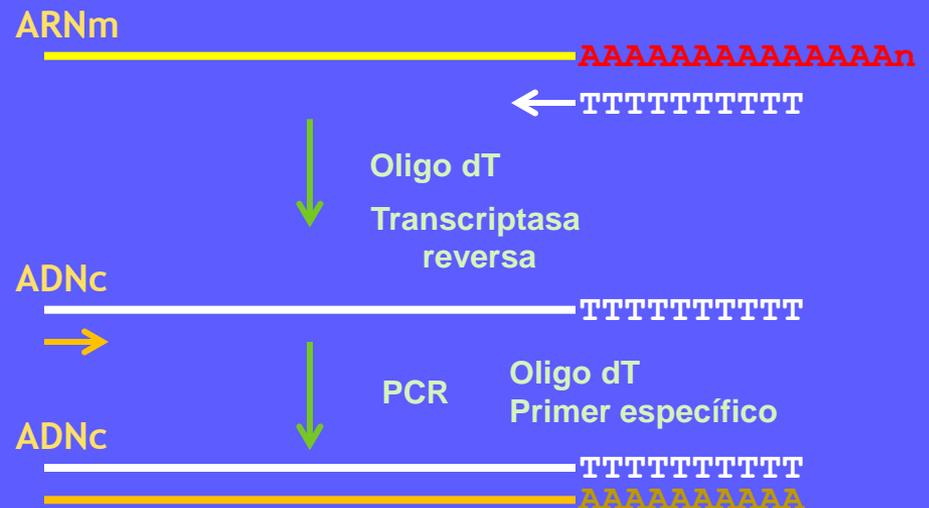


Tipos de PCR

➤ **PCR *in situ***: PCR realizada sobre preparaciones (tejidos o células) fijas en un portaobjetos. Primero se realiza la amplificación de DNA blanco y luego la 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.



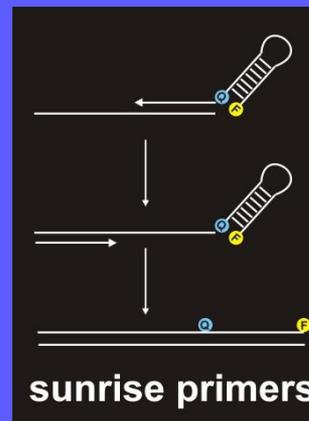
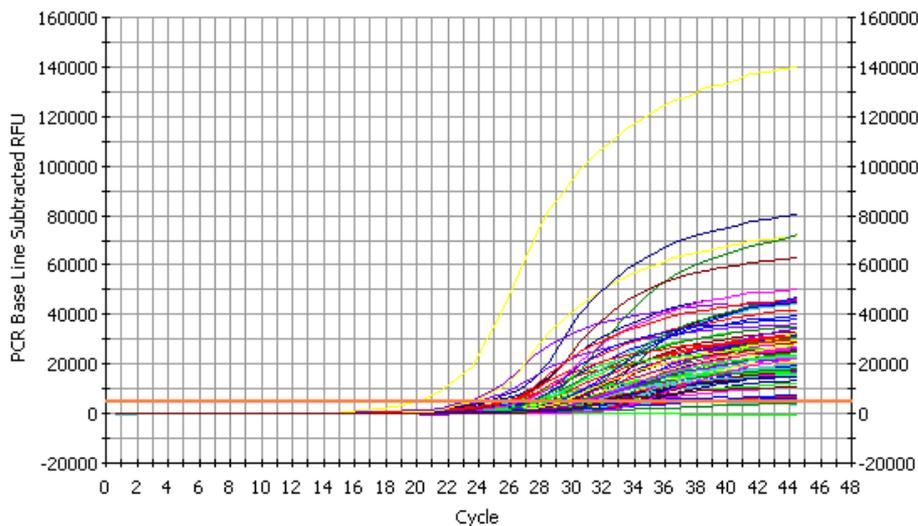
Tipos de PCR

➤ **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 sintetizado**.

Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

Se requiere un termociclador apto para Real Time.



Agentes intercalantes: SYBR™ Green



Algunas aplicaciones de la técnica de PCR

- ✚ *DNA Sequencing*
- ✚ *In vitro mutagenesis*
- ✚ *Genome walking*
- ✚ *cDNA cloning*
- ✚ *Gene expression studies*



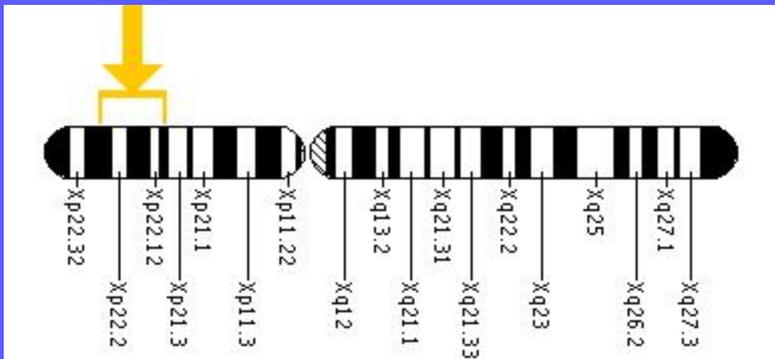
Práctico N°2

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

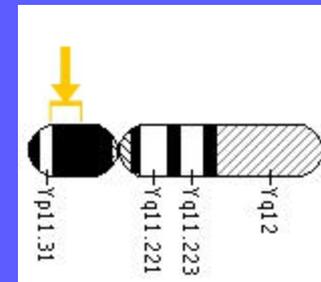


¿De qué se trata?

- 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 pre-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:

Reactivos	Concentración stock (KAPA Taq)	Concentración final por reacción	1 Tubo	10 Tubos
			Volumen de Premix X1 (µl)	Volumen de Premix X N reacciones (µl)
Buffer	5X	1 X		
dNTPs	10 mM	0,2 mM		
Primers (5' y 3') AMG	25 µM	0,25 µM		
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM		
KAPA TAQ	5U/µl	0,5 U		
ADN	(50 ng/µl)	100 ng		
H ₂ O				
Total mix (µl)			15	

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

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

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

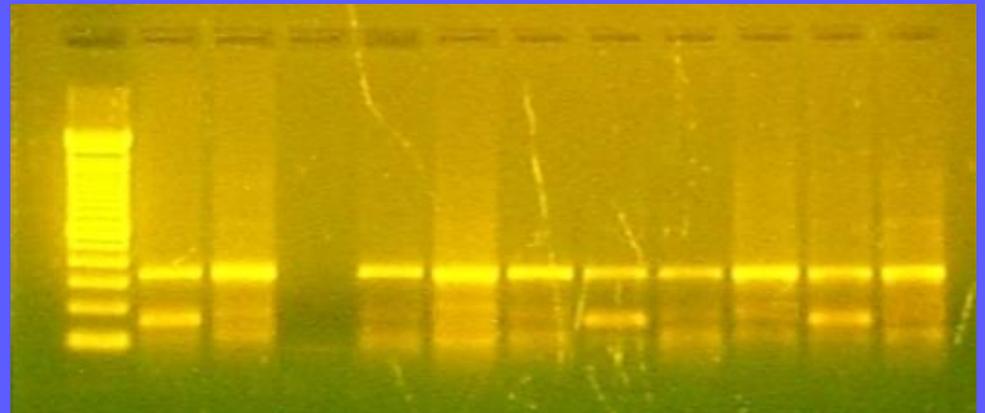
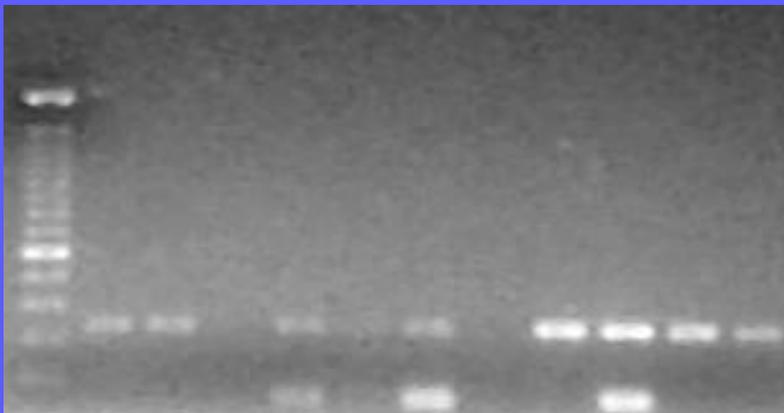
Reactivos	Concentración stock (KAPA Taq)	Concentración final por reacción	1 Tubo	10 Tubos
			Volumen de Premix X1 (μ l)	Volumen de Premix X N reacciones (μ l)
Buffer	5X	1 X	3	3 x N= 30
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,3	0,3 x N= 3
Primers (5' y 3') AMG	25 μ M	0,25 μ M	0,15	0,15 x N= 1.5
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	0,9	0,9 x N=9
KAPA TAQ	5U/ μ l	0,5 U	0,1	0,1 x N= 1
ADN	(50 ng/μl)	100 ng	2	2 x N
H ₂ O			8,55	8,55 x N=85,5
Total mix (μl)			15	150

Condiciones de ciclado:

<u>Programa de amplificación :</u>	Desnaturalización inicial	95°C	5'
	35 ciclos	Desnaturalización	95°C 1'
	Annealing	52°C	1'
	Extensión	72°C	1'
	Extensión final	72°C	5'

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

Ejemplos:



Preguntas ¿?

