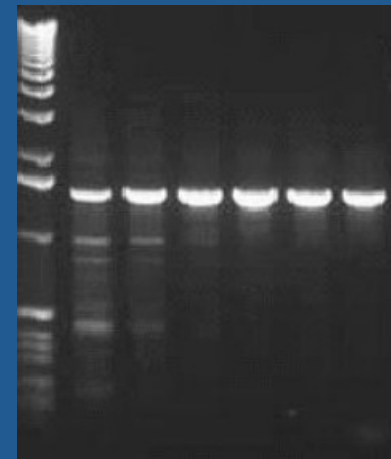
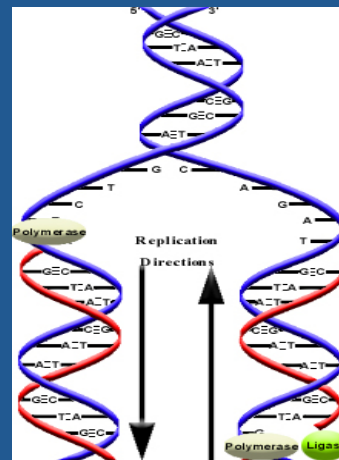


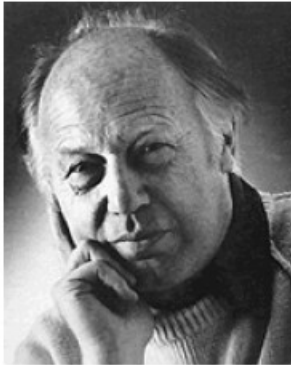
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)



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.

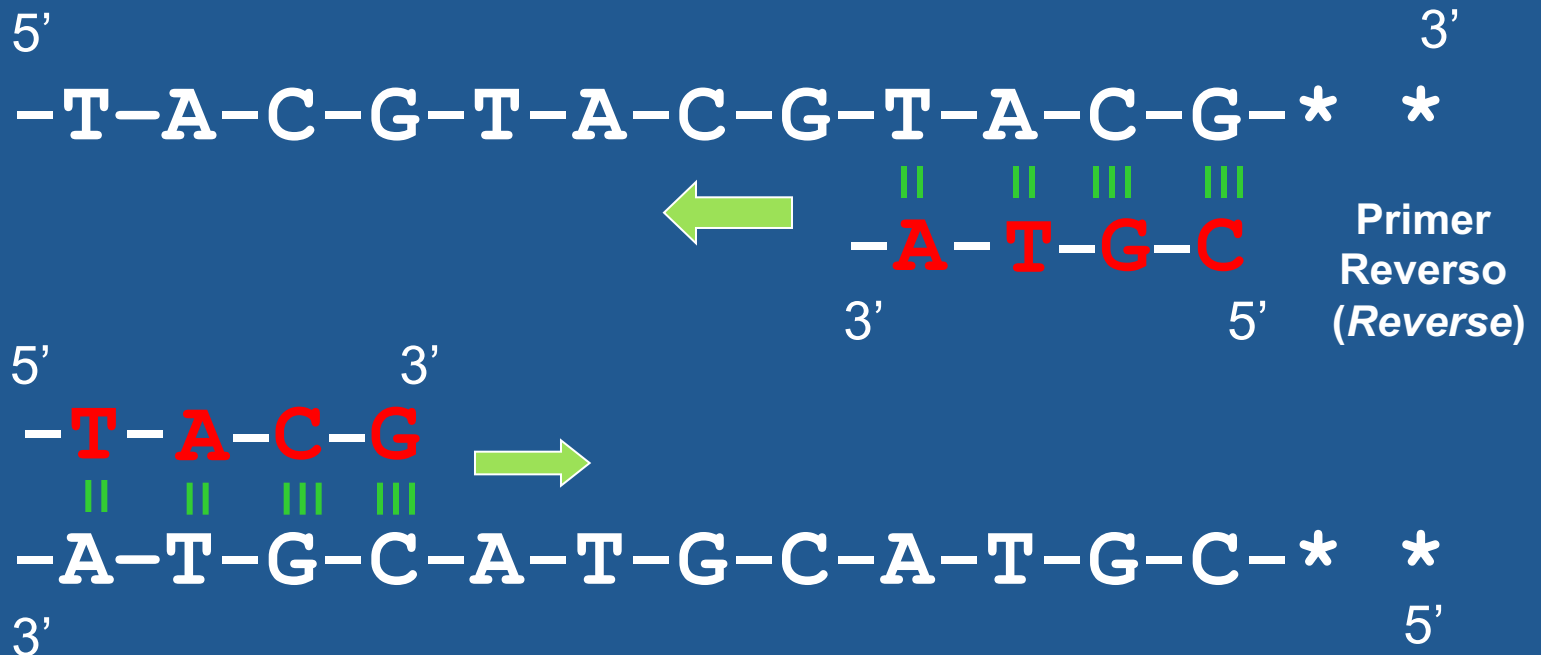


¿Cómo sucede?



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

Dirección de los *primers*

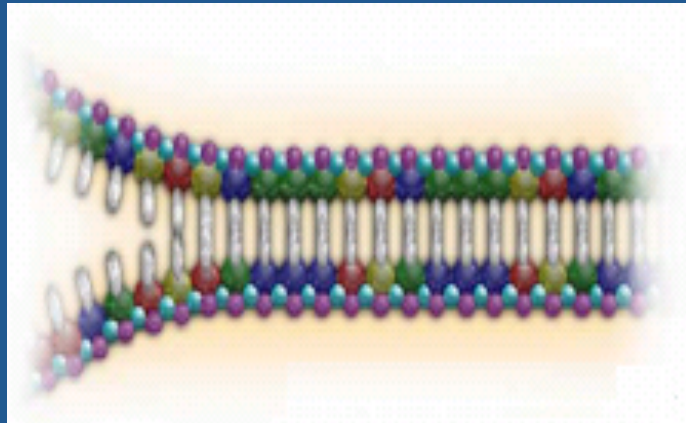


Primer Directo:	5'	TACG	3'
Primer Reverso:	5'	CGTA	3'

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.

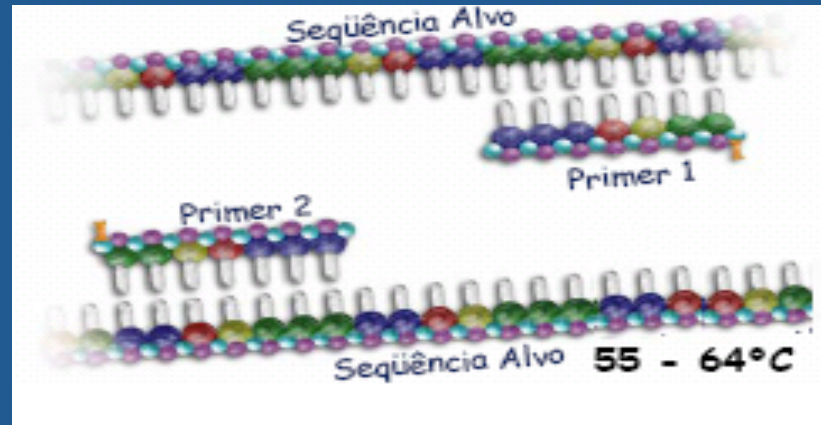


Las muestras son calentadas a 94-96 °C durante 0,5 o varios minutos.

Etapas de la reacción:

Hibridación

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

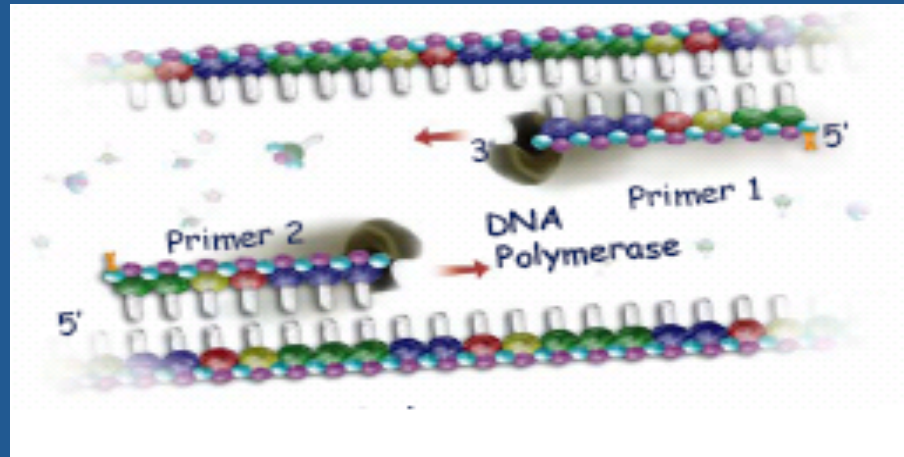


Los primers hibridan con las secuencias complementarias del molde.

Etapas de la reacción:

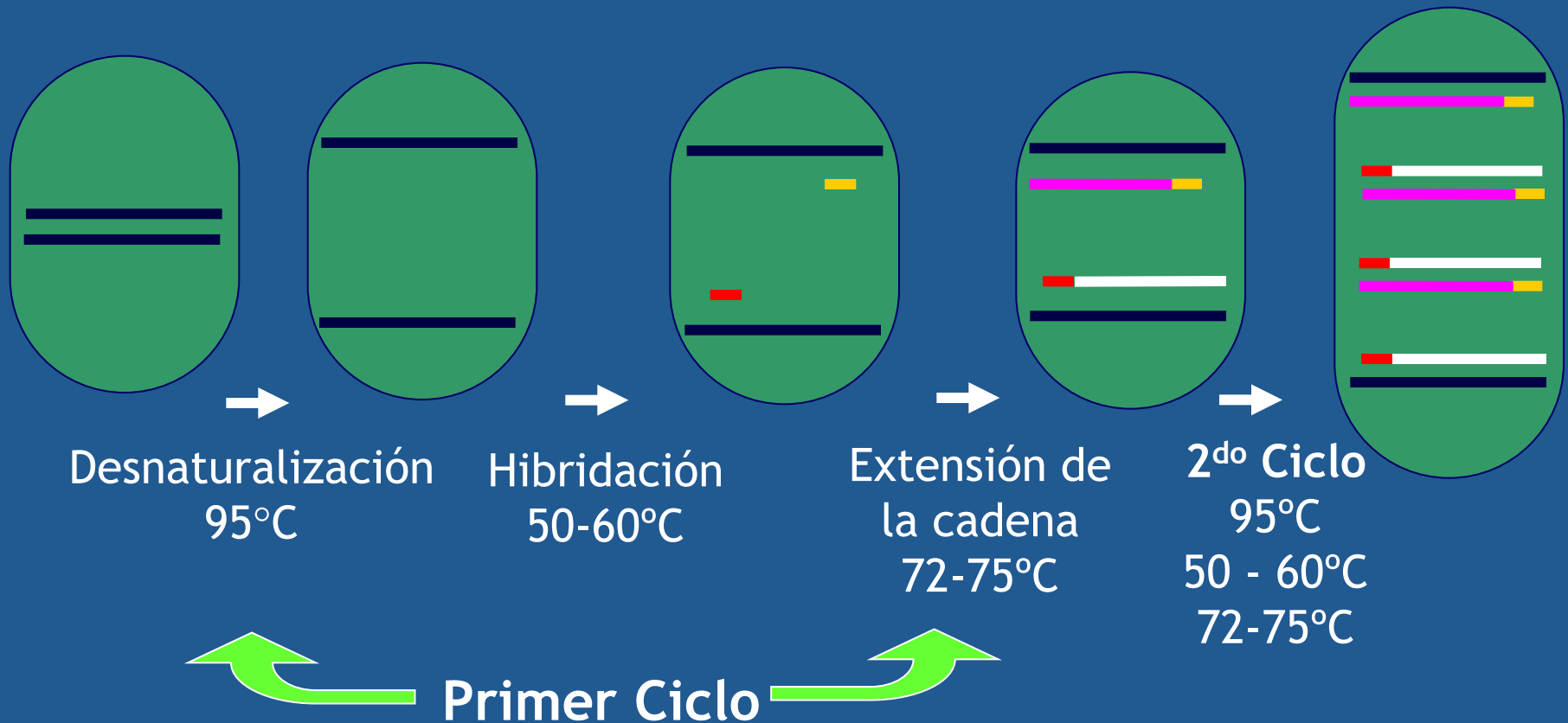
Extensión

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



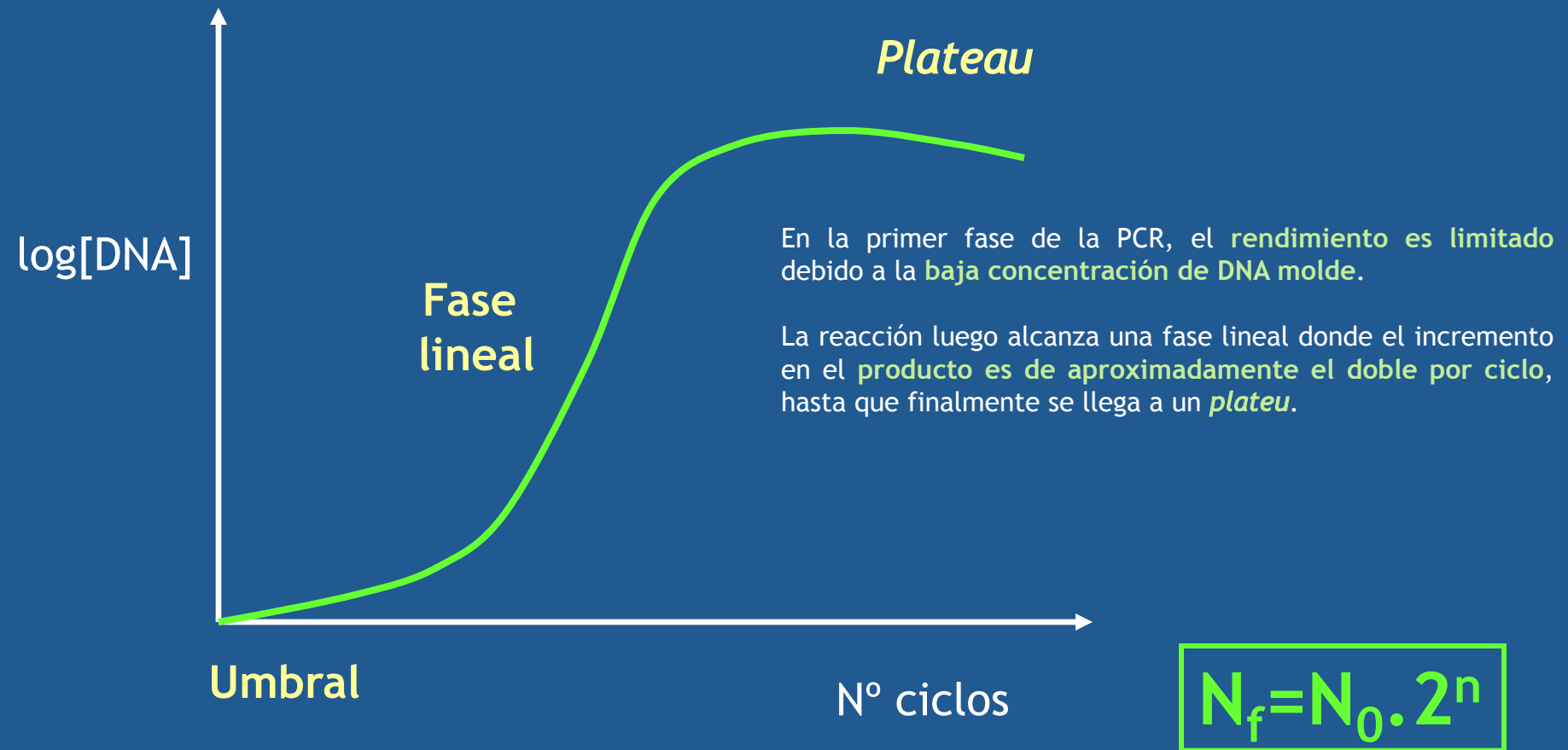
La DNA polimerasa actúa sobre los *primers* que hibridaron, comenzando la duplicación de la cadena, tomando del medio los nucleótidos complementarios disponibles.

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 µl 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 (s/exo 5->3), 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*, *Pfu*: *Pyrococcus furiosus*, *Pwo*: *Pyrococcus woesei*, *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 20 a 200 μM c/u.

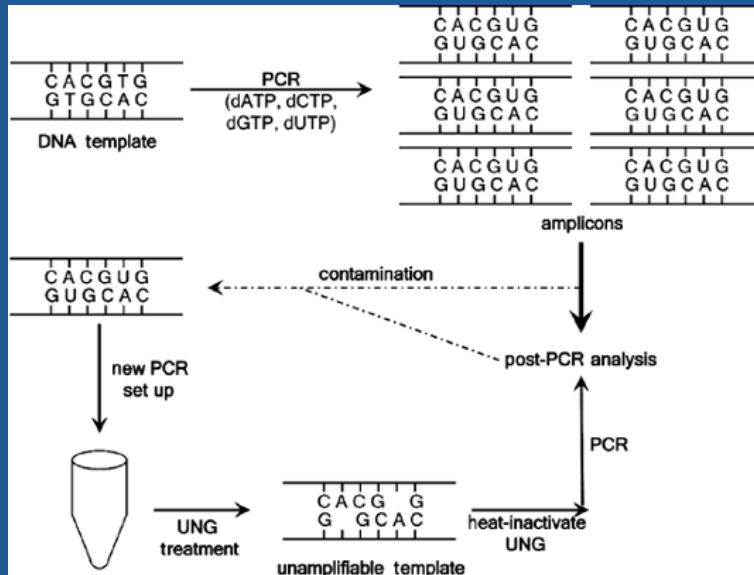
Buffers

- 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

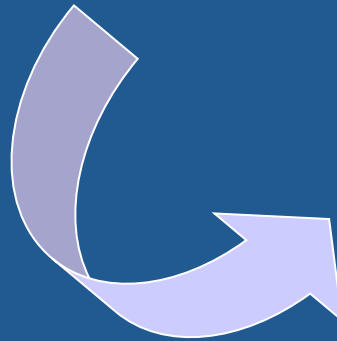
$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T) \text{ (para secuencias menores a 25 nt)}$$

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

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 AAAA.
 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/>

Diseño de los *primers*

Primer designing tool - NCBI - NIH

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

← ⓘ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ 90% 🔍 Buscar ☆ 📄 ⬇️ 🏠 🌐

Primer-BLAST

A tool for finding specific primers

► **NCBI/ Primer-BLAST: Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).**

[Reset page](#) [Save search parameters](#) [Retrieve recent results](#) [Publication](#) [Tips for finding specific primers](#)

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) [Clear](#)

```
GTGAAGAATCAGGGACATGGAGACCTGGAGGGAGGAGAGACGGTGAGACAGGGATAGAGACACTGAGAGAGAGAATG
AGGCGTGATGGGGAGGCAGAAATAGAGTCAGAGAGAGACTGAGAGAAGGAAGATGAGCAAAAACAAGACAAAGAAGA
GCAGAAATCAAGAGATTCTGAGAGACAGAGTTGATGAGAATGAGTGTGAAAGAGAGGGAGAGAGAGAGAACGAATAA
GGCTTTGGGCTTCAITGCT
```

Range

	From	To
Forward primer		
Reverse primer		

[Clear](#)

Or, upload FASTA file No se seleccionó un archivo.

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand) [Clear](#)

Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand) [Clear](#)

PCR product size

Min	Max
200	1000

of primers to return

Primer melting temperatures (T_m)

Min	Opt	Max	Max T _m difference
57.0	60.0	63.0	3 ?

Exon/intron selection

Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section ?

Exon junction span

No preference ?

Exon junction match

Exon at 5' side Exon at 3' side

7

4

Minimal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction ?

Intron inclusion

☐ Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA ?

Intron length range

Min

Max

1000

1000000 ?

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check

☒ Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template ?

Search mode

Automatic ?

Database

Refseq mRNA ?

Exclusion

☐ Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) ☐ Exclude uncultured/environmental sample sequences ?

Organism

Homo sapiens

Enter an organism name (or organism group name such as enterobacteriaceae, rodents), taxonomy id or select from the suggestion list as you type. ?

[Add more organisms](#)

Entrez query (optional)

?

Primer specificity stringency

Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including

at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end. ?

Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer. ?

Max target size

4000 ?

Allow splice variants

☐ Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input) ?

Get Primers

☐ Show results in a new window ☒ Use new graphic view ?

► [Advanced parameters](#)

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGAATTACGCGTGACGTGC	Plus	19	330	348	59.94	57.89	6.00	3.00

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.

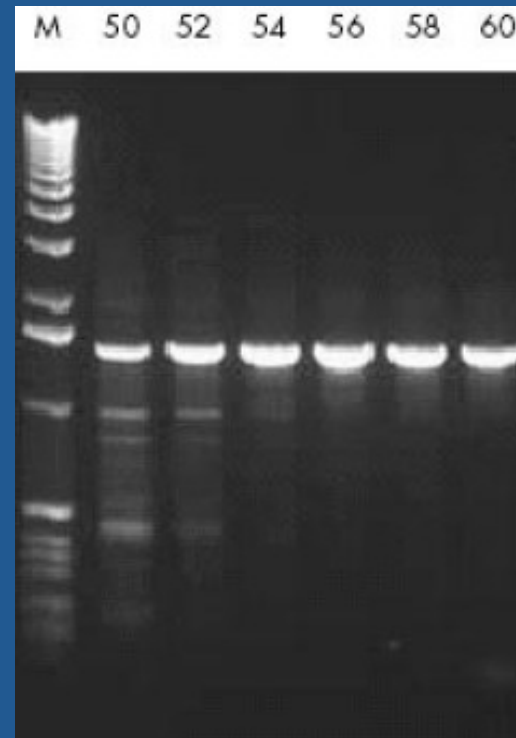
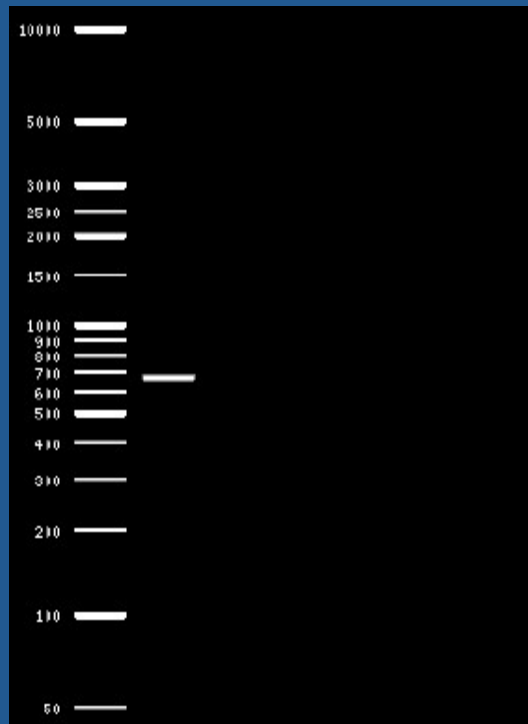
Termocicladores

- 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*.



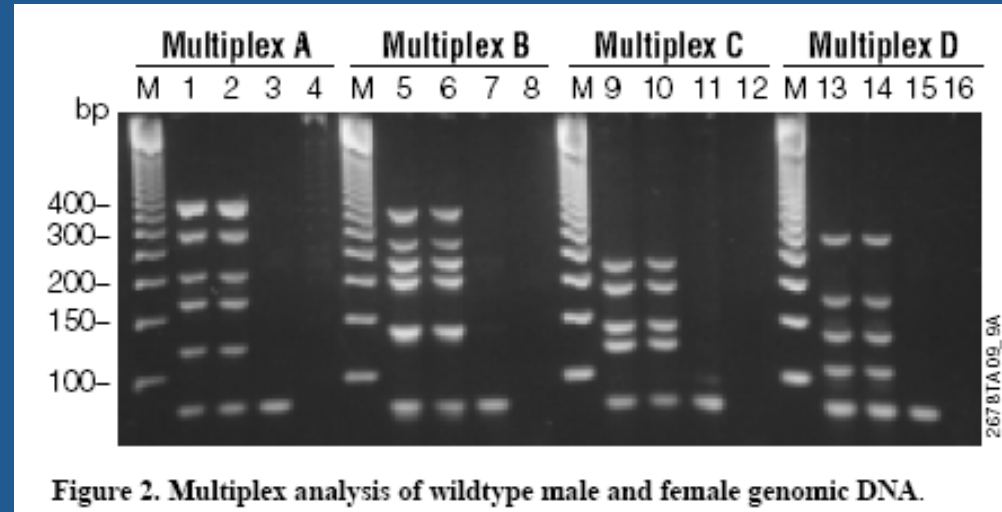
Visualización de los resultados

- 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**

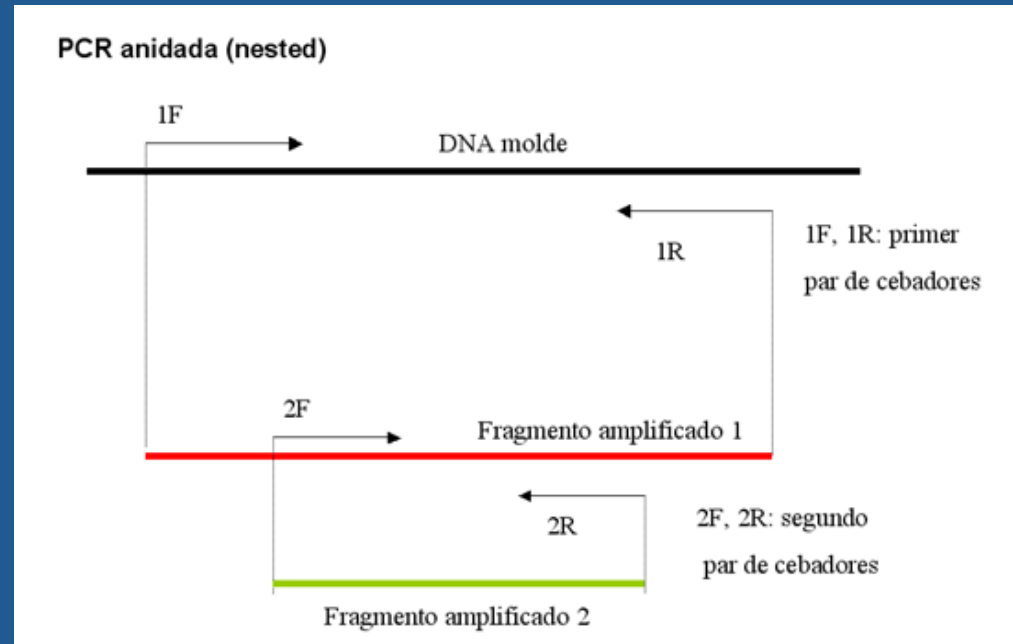


Tipos de PCR

➤ **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.

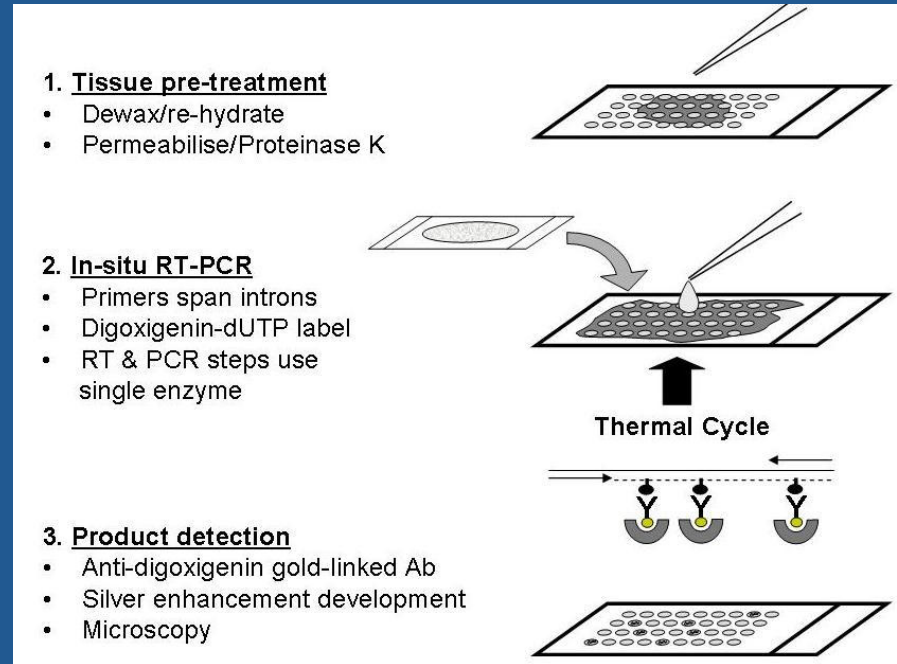


➤ **Nested PCR (o PCR anidada):** Para reducir productos indeseados. Se realiza una segunda ronda de PCR utilizando un segundo par de *primers* que hibriden un poco más internamente que los primeros. Rinde un único producto debido a que sólo el fragmento correcto de DNA posee los sitios correctos de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



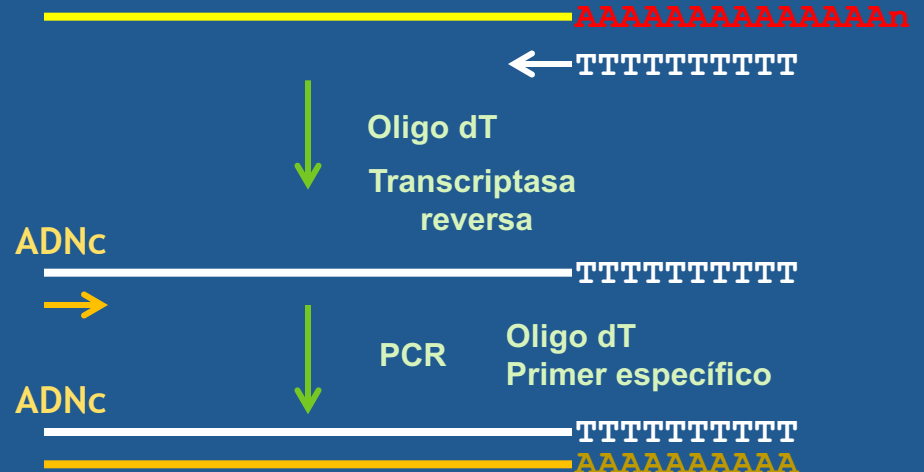
Tipos de PCR

➤ **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.

ARNm



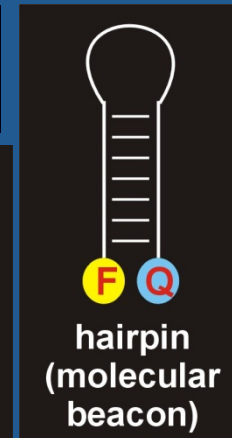
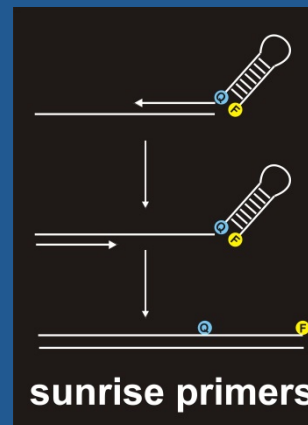
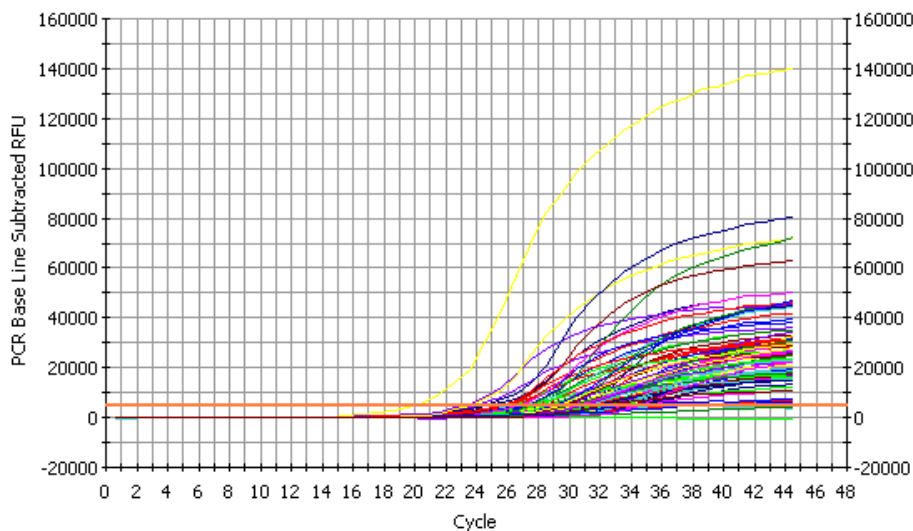
Tipos de PCR

➤ **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



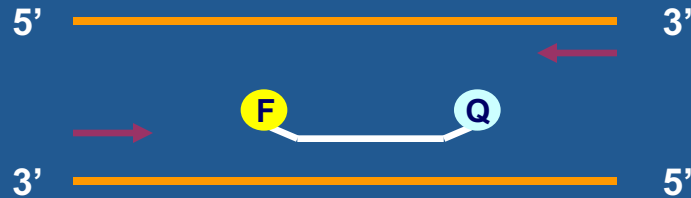
PCR en tiempo real o *Real time PCR*



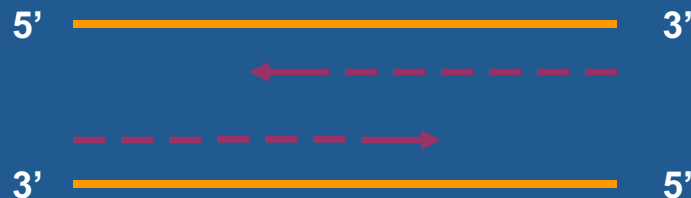
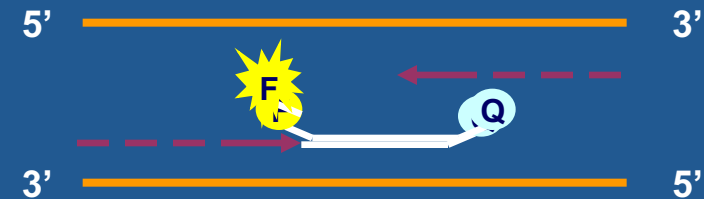
desnaturalización



hibridación



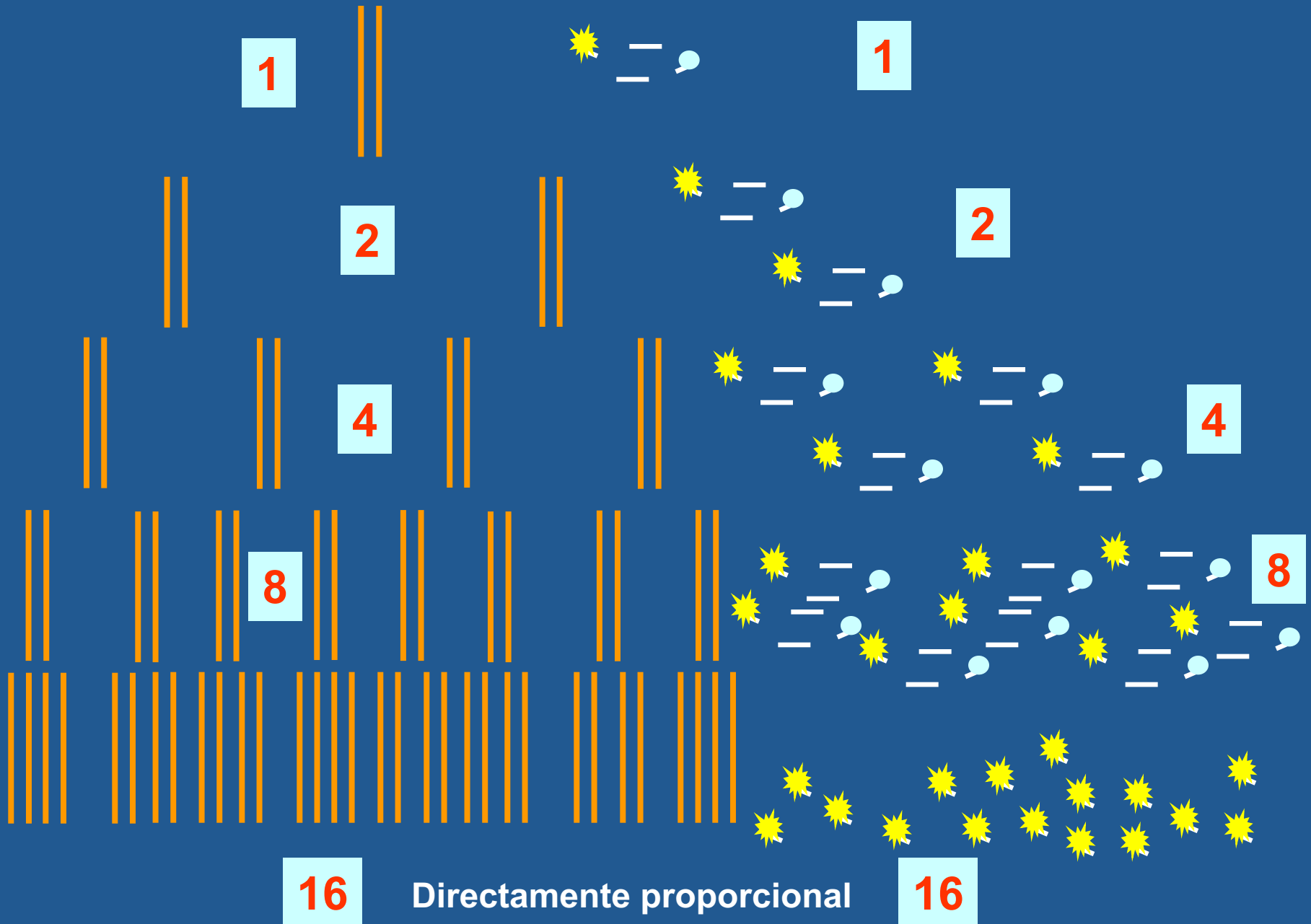
Extensión y degradación de la sonda



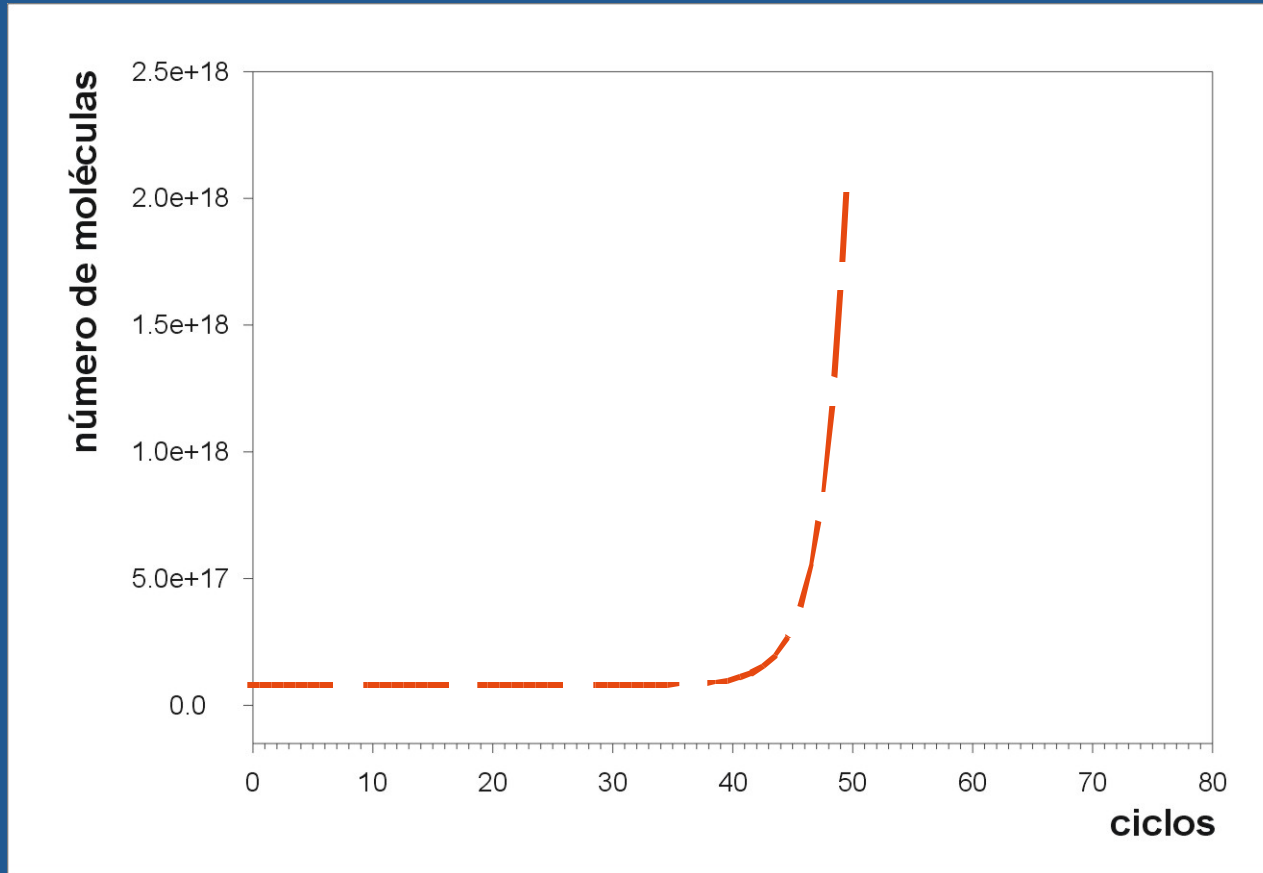
Fluoróforo liberado

Emisión

PCR en tiempo real o *Real time PCR*



PCR en tiempo real o *Real time PCR*



Algunas aplicaciones de la técnica de PCR

 *DNA Sequencing*

 *In vitro mutagenesis*

 *Genome walking*

 *cDNA cloning*

 *Gene expression studies*

Algunas aplicaciones de la técnica de PCR

DIAGNOSTICO DE:

Enfermedades infecciosas

virales, bacterianas, fúngicas, parasíticas

Enfermedades genéticas

Tumorales, Autoinmunes, Metabólicas

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

Tipificación de microorganismos

MEDICINA FORENSE

Pertenencia familiar

Tipificación de sospechosos

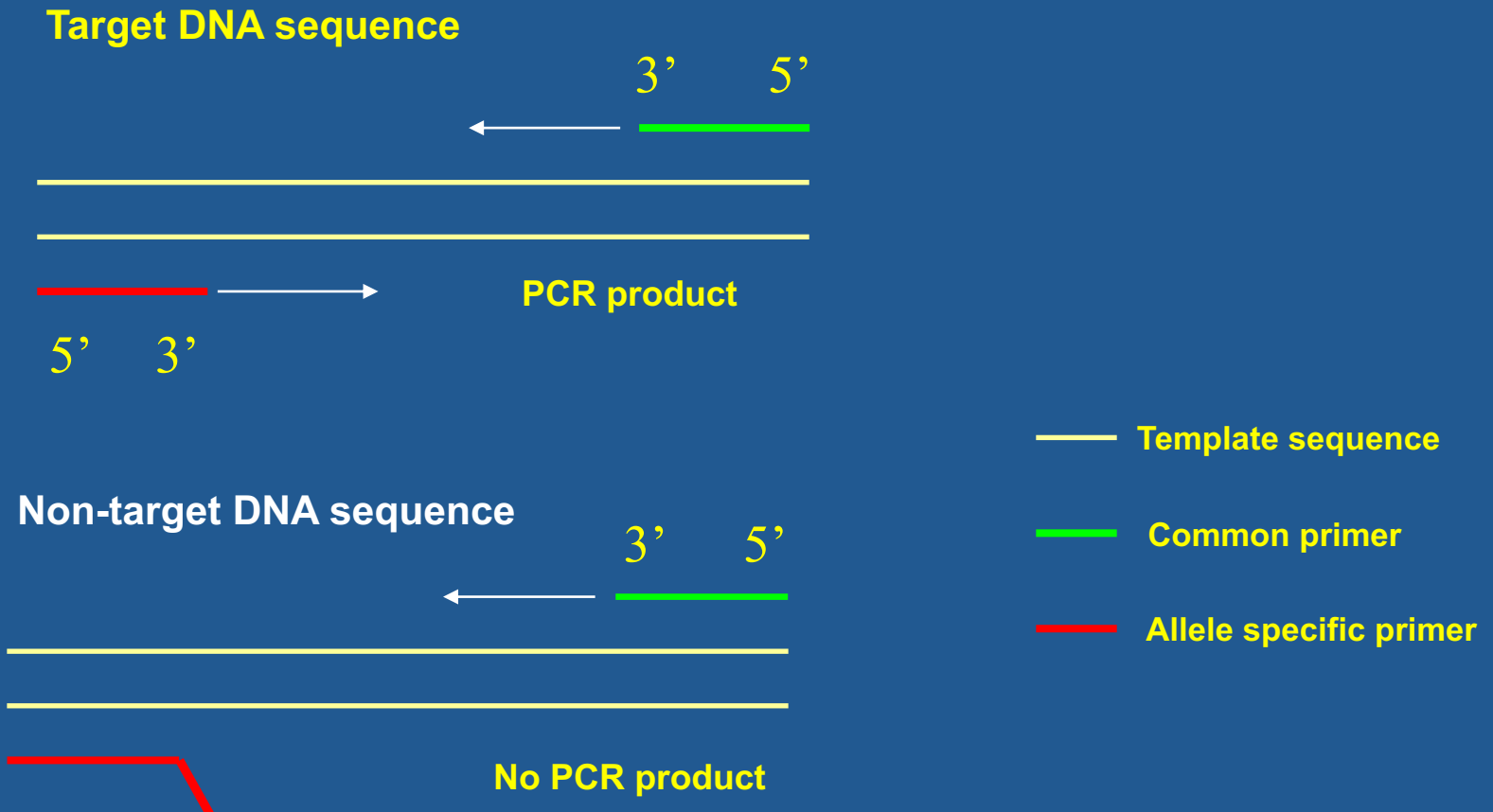
CERTIFICACION DE IDENTIDAD

Tipificación de Vegetales, Animales

BIOLOGIA DE POBLACIONES

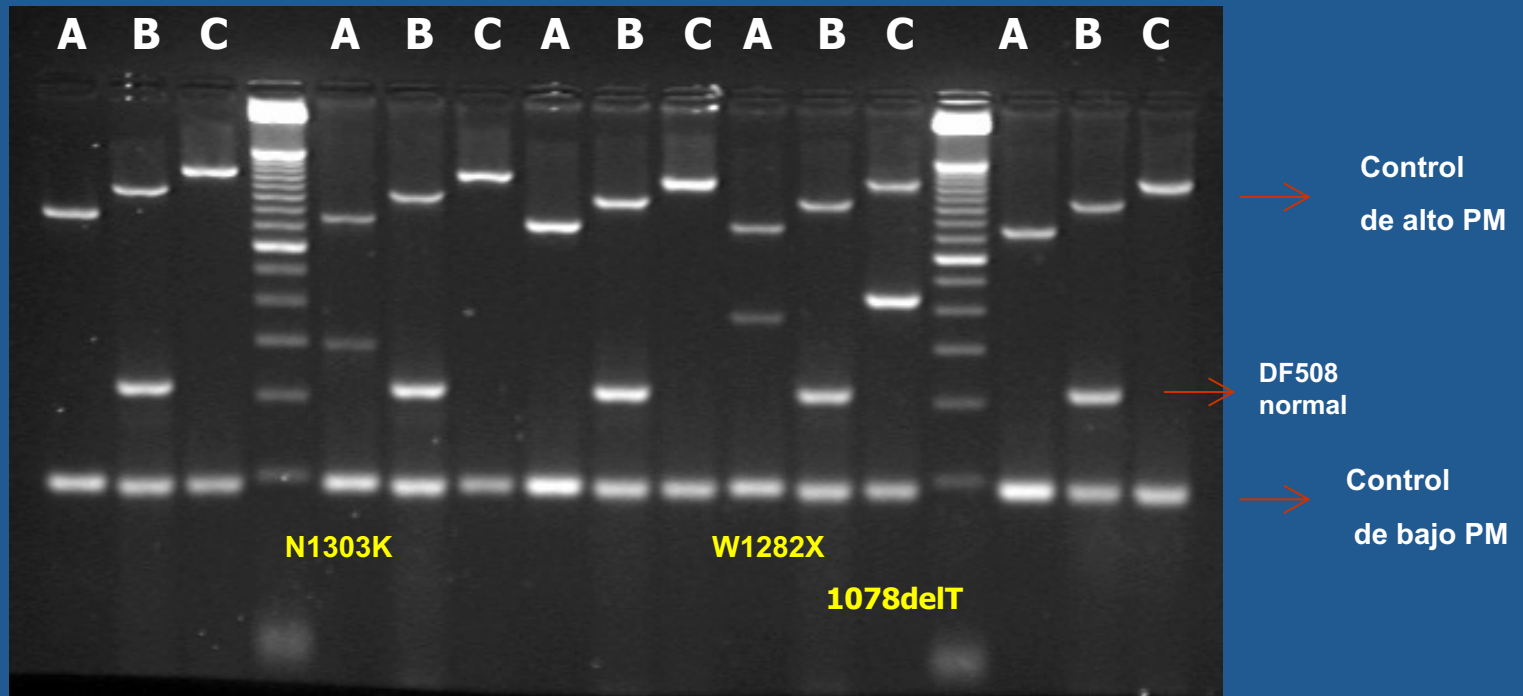
Amplificación Refractaria de la secuencia mutada (ARMS)

Esta técnica permite amplificar específicamente los fragmentos de ADN que contienen mutaciones, utiliza un primer común a las secuencias normal y mutada y un primer específico de la mutación



ARMS

Reacción de amplificación alelo específica por PCR



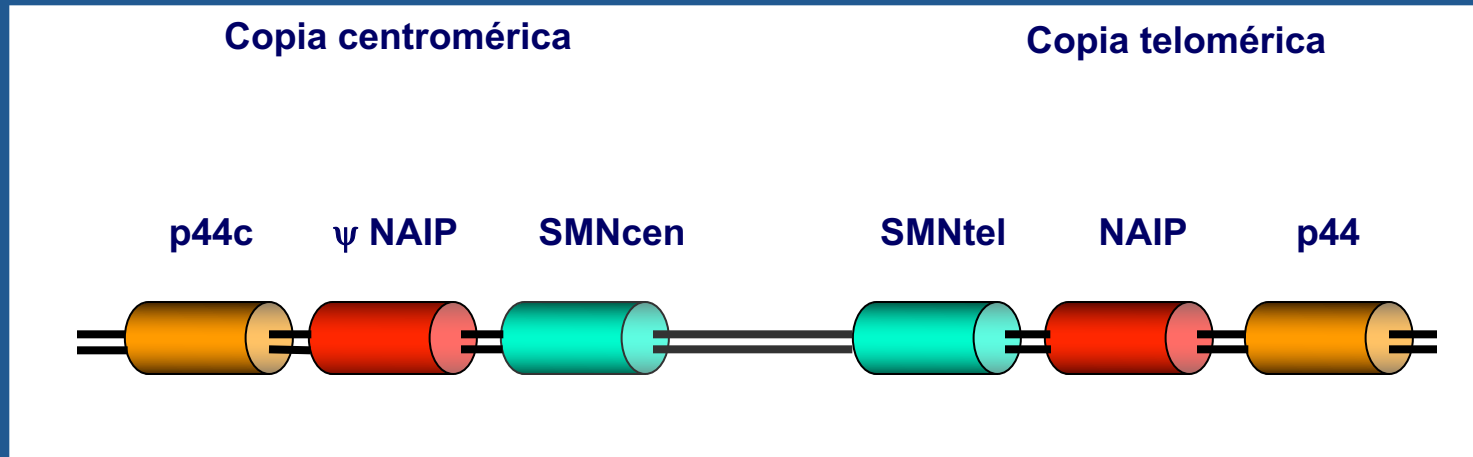
PCR-RFLP

Atrofia Muscular Espinal (SMA)

Es una enfermedad neuromuscular caracterizada por la pérdida y degeneración de las neuronas motoras del asta anterior de la médula espinal. Se manifiesta con debilidad proximal y simétrica, y atrofia progresiva de grupos musculares.

- Herencia: autosómica recesiva
- Incidencia: 1/10000 nacidos vivos
- Frecuencia de portadores: 1/50
- Gen afectado: SMN (*survival motor neuron*), cromosoma 5

Genes de la región SMA



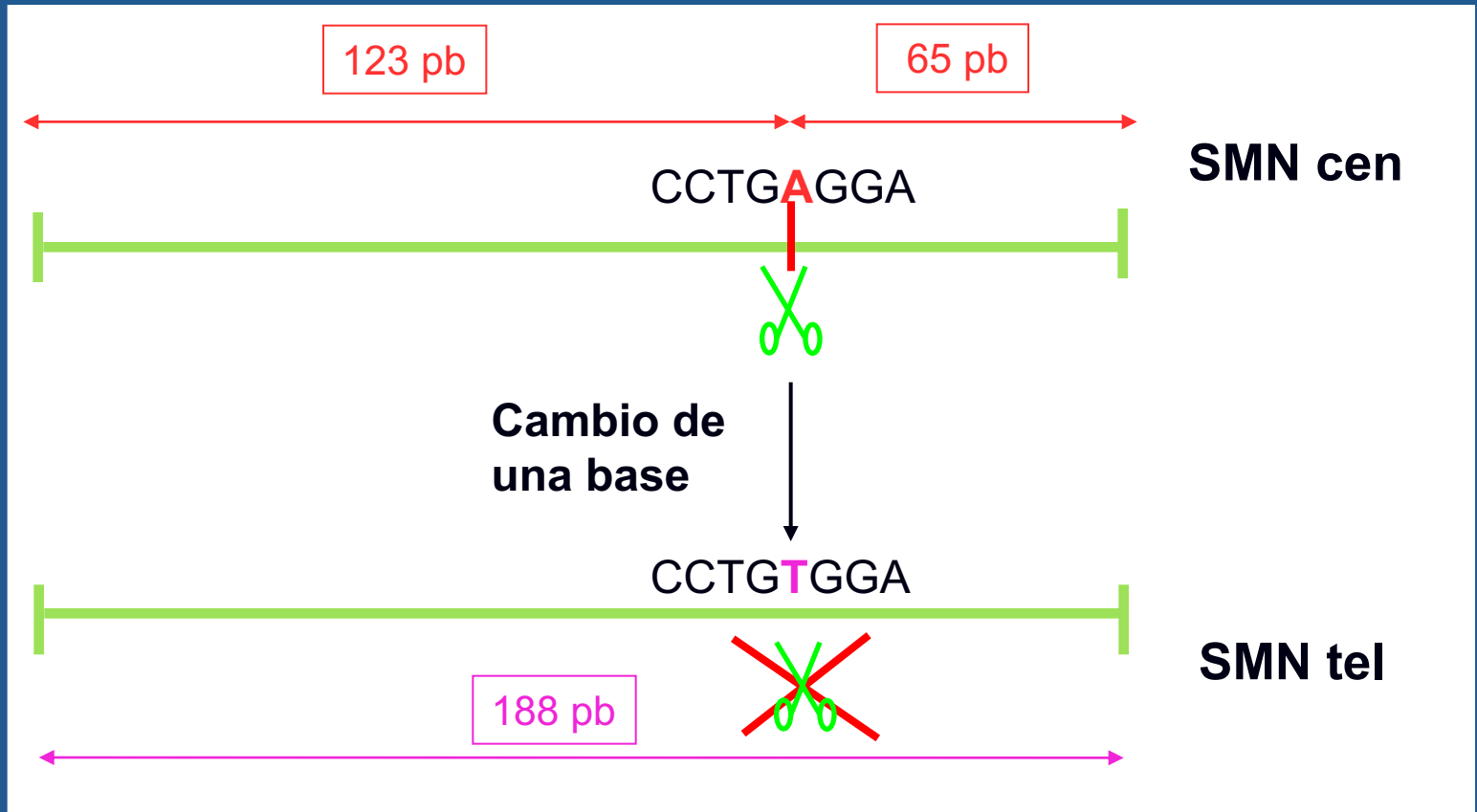
SMN (survival motor neuron)

NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein)

p44 (proteína p44)

En el 95 % de los pacientes con SMA hay una delección homocigota del exón 7 del gen SMN tel (90% también tiene delección en el exón 8) .

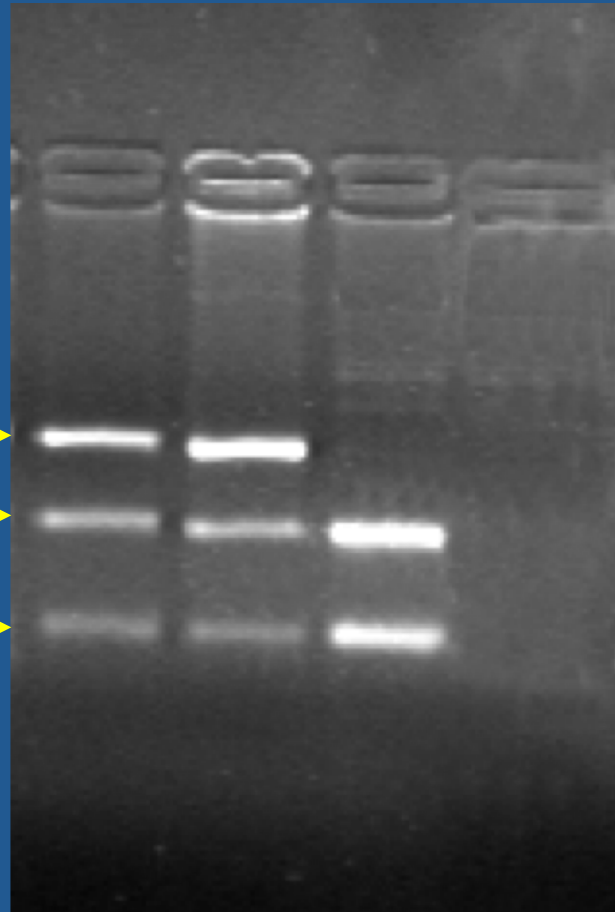
PCR-RFLP (Exón 8)



Exon 8: PCR + Corte con enzima de restricción *Ddel*

Análisis de la delección del gen SMN tel (Exón 8) por PCR-RFLP

SMN tel 188 pb →
SMN cen { 123 pb →
65 pb →

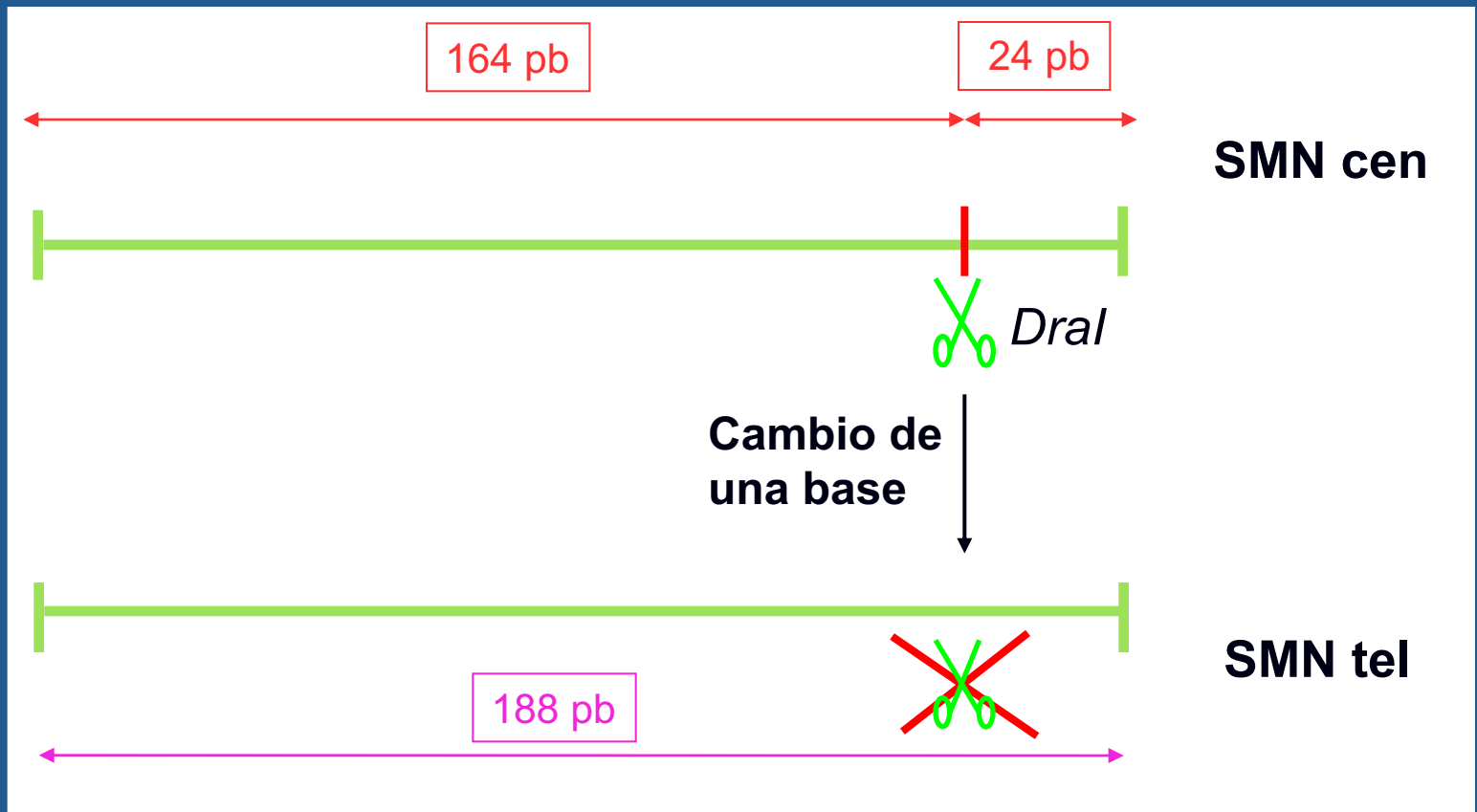


Normal Normal **SMA**

¿Cómo analizamos el
resultado del gel?

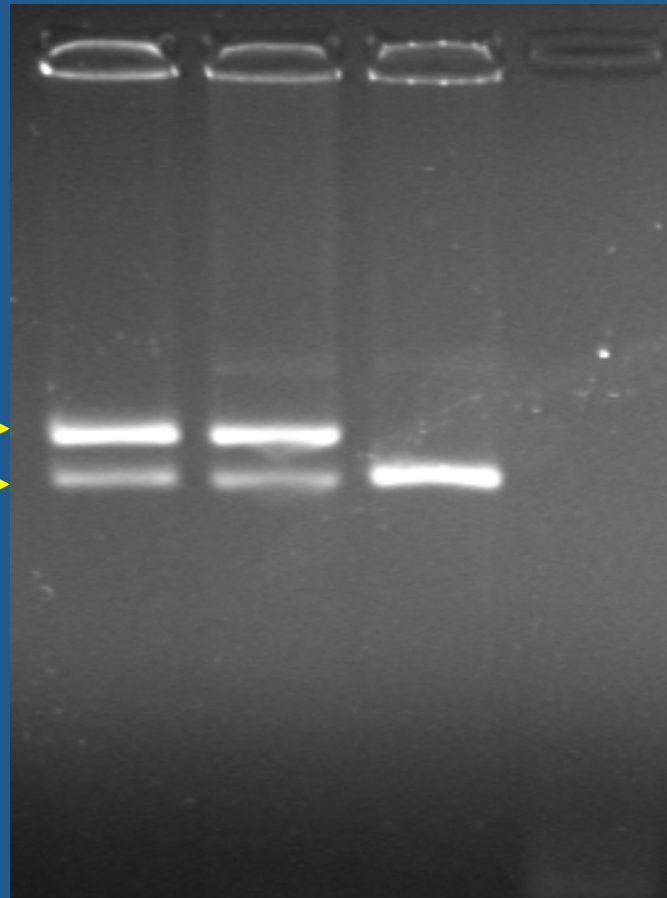
La ausencia de la banda
correspondiente al
SMNtel indica una
delección homocigota del
exon 8 del SMN tel.

PCR-RFLP (Exón 7)



El sitio para *DraI* se crea artificialmente por modificación de un primer

Análisis de la delección del gen SMN tel (Exon 7) por PCR-RFLP



SMN tel 188 pb →
SMN cen 164 pb →

Normal Normal SMA

¿Cómo analizamos el
resultado del gel?

La ausencia de la banda
correspondiente al SMNtel
indica una delección
homocigota del exón 7.

Minisatellites: VNTRs = Variable Number Tandem Repeats

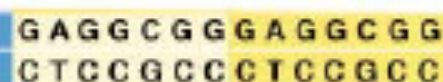
Repeated units of 6 to 100 bp (approx.)

Minisatellites are usually defined as the repetition in tandem of a short (6- to 100-bp) motif spanning 0.5 kb to several kilobases ("Minisatellites: Mutability and Genome Architecture"; G. Vergnaud & F. Denoeud *Genome Res.* 2000. 10: 899-907).

Microsatellites: STRs = Short Tandem Repeats

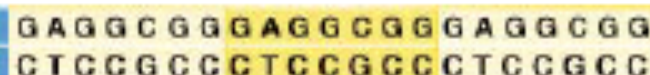
SSRs = Simple Sequence Repeats

Repeated units of 2-6 bp



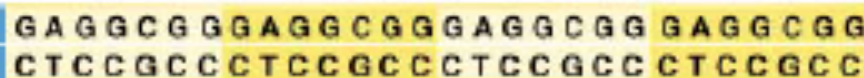
GAGGCGGGAGGCGG
CTCCGCCCTCCGCC

2 repeats



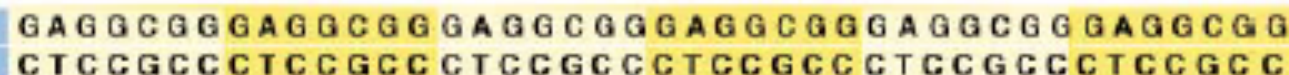
GAGGCGGGAGGCGGGAGGCGG
CTCCGCCCTCCGCCCTCCGCC

3 repeats



GAGGCGGGAGGCGGGAGGCGGGAGGCGG
CTCCGCCCTCCGCCCTCCGCCCTCCGCC

4 repeats



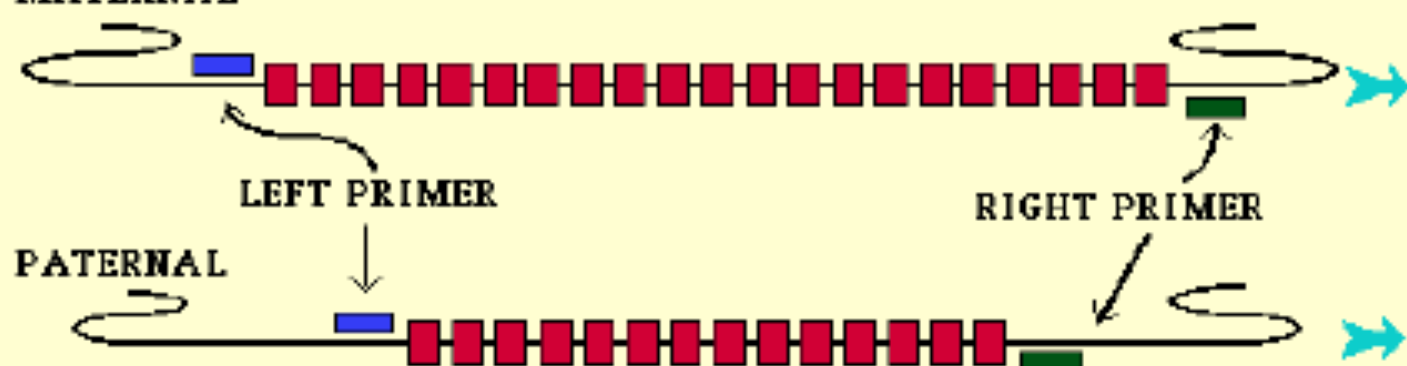
GAGGCGGGAGGCGGGAGGCGGGAGGCGGGAGGCGGGAGGCGG
CTCCGCCCTCCGCCCTCCGCCCTCCGCCCTCCGCCCTCCGCC

6 repeats

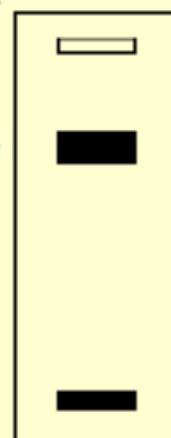
los *fingerprints* de DNA dependen de las longitudes de los segmentos de **secuencias simples repetidas**

D1S80 Locus on Chromosome 1

MATERNAL



Results of Gel Electrophoresis



Pertenencia Familiar e identificación de sospechosos

17.4 DNA profiling can be used for identifyli

VNTR

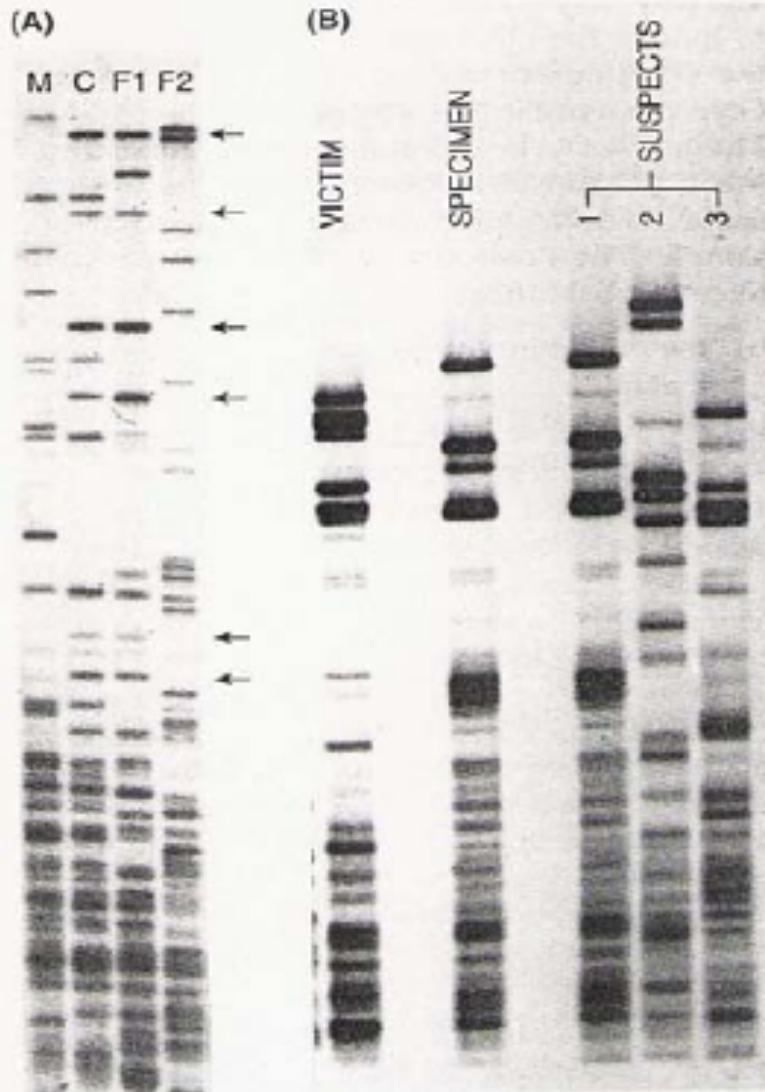


Figure 17.19: Legal and forensic use of DNA fingerprinting.

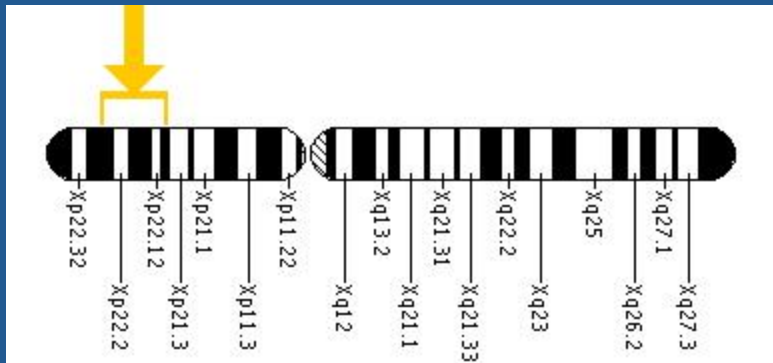
(A) A paternity test. 'Fingerprints' are shown from the mother (M), child (C) and two possible fathers (F1, F2). The DNA fingerprint of F1 contains all the paternal bands found in the child, whereas that of F2 contains only one of the paternal bands. (B) A rape case. The 'fingerprint' of suspect 1 exactly matches that from the semen sample S on a vaginal swab from the victim. As a result of this evidence, Suspect 1 was charged with rape and found guilty.

Práctico N°2

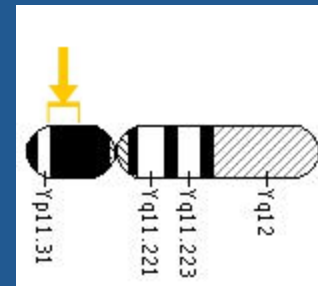
Caracterización del sexo de muestras de DNA mediante amplificación por PCR de secuencias del gen de amelogenina.

¿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 delección 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*:

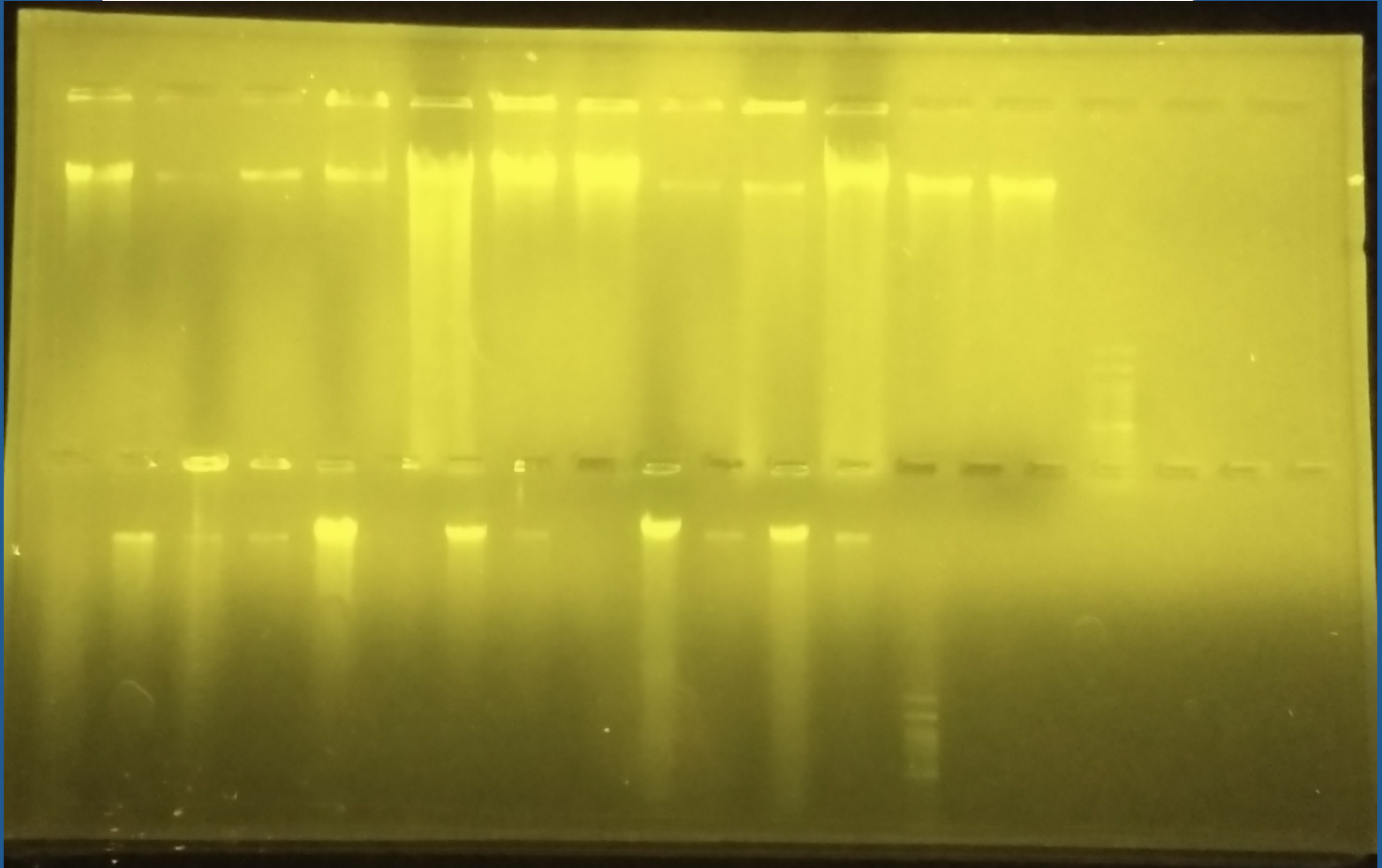
AME F 488 : 5' CAT TCA TgA ACC ACT gCT CAg 3'

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).

Preparación del molde de reacción

Resultado Tp 1: Extracción de ADN



¿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 µl / tubo:

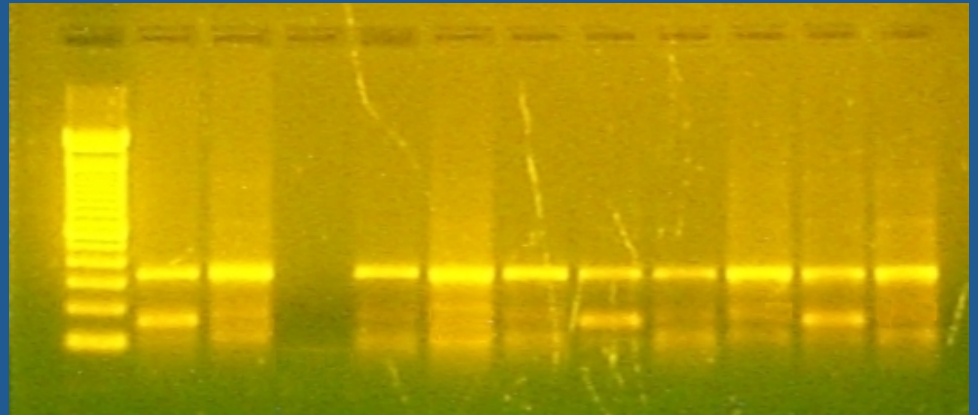
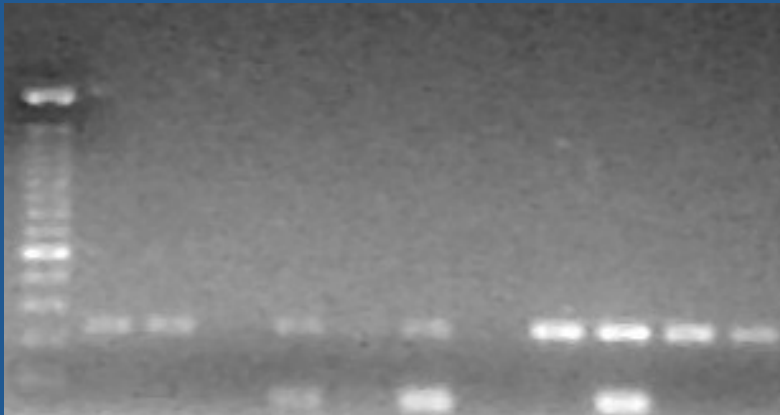
Reactivos	Concentración stock (KAPA Taq)	Concentración final por reacción	1 Tubo	10 Tubos
			Volumen de Premix X1 (µl)	Volumen de Premix X N reacciones (µl)
Buffer	5X	1 X	3	3 x N= 30
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,3	0,3 x N= 3
Primers (5' y 3') AMG	25 µM	0,25 µM	0,15	0,15 x N= 1.5
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	0,9	0,9 x N=9
KAPA TAQ	5U/µl	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:

Desnaturalización inicial	95°C	5 min	
Desnaturalización	95°C	20 seg	35 ciclos
<i>Hibridación (Annealing)</i>	52°C	30 seg	
Extensión	72°C	40 seg	
Extensión final	72°C	5 min	

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

Ejemplos:



Preguntas ¿?

