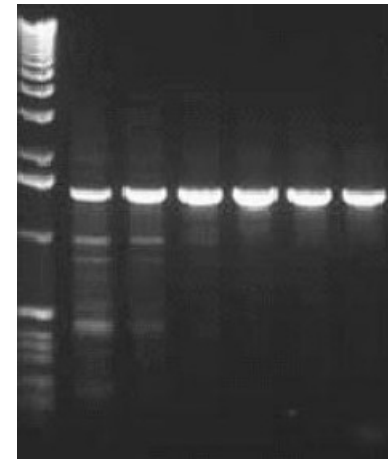
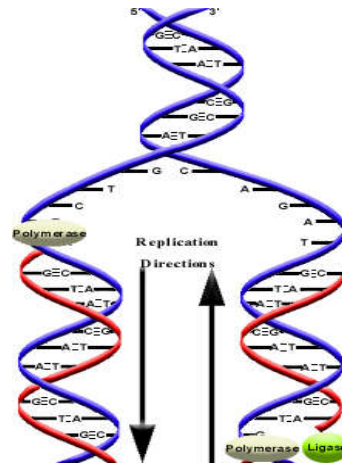


PCR:

Polymerase

Chain

Reaction



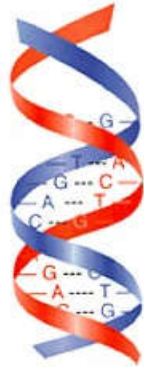
Un poco de historia...

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"



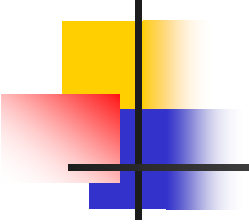
Robert W. Holley
1/3 of the prize
USA
Cornell University
Ithaca, NY, USA



Har Gobind Khorana
1/3 of the prize
USA
University of Wisconsin
Madison, WI, USA

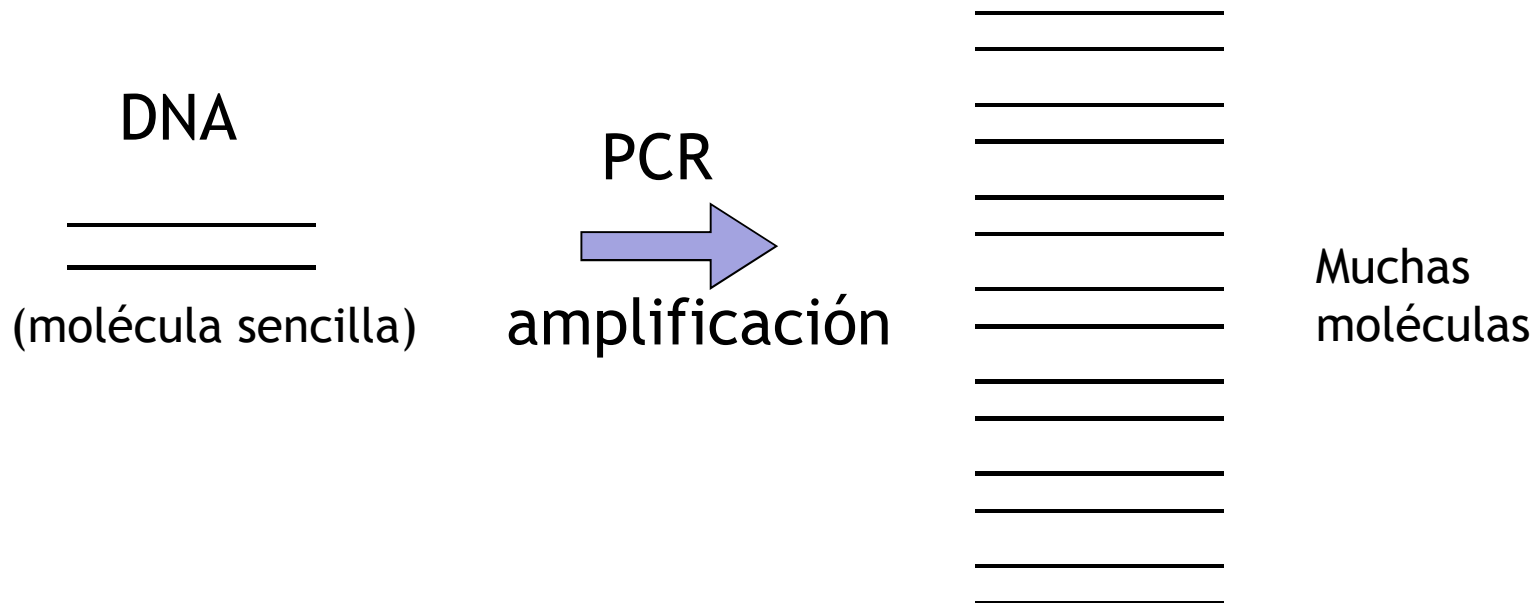


Marshall W. Nirenberg
1/3 of the prize
USA
National Institutes of Health
Bethesda, MD, USA



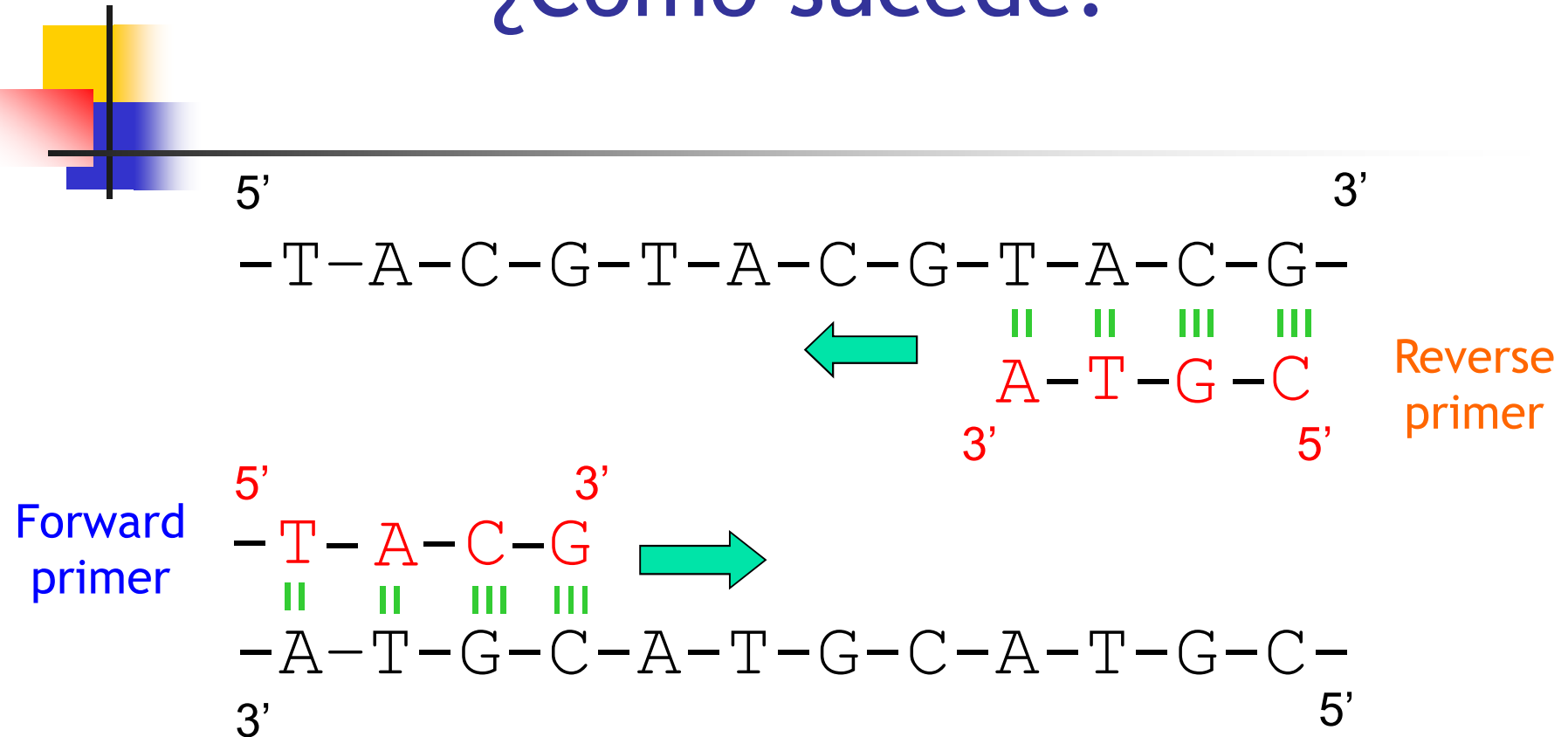
¿De qué se trata?

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



PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

¿Cómo sucede?



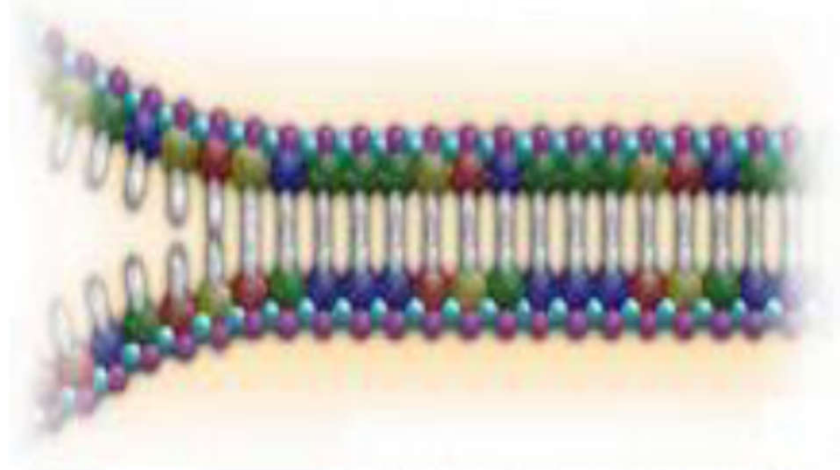
Forward primer: 5' TACG 3'

Reverse primer: 5' CGTA 3'

Etapas de la reacción

I) Desnaturalización

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

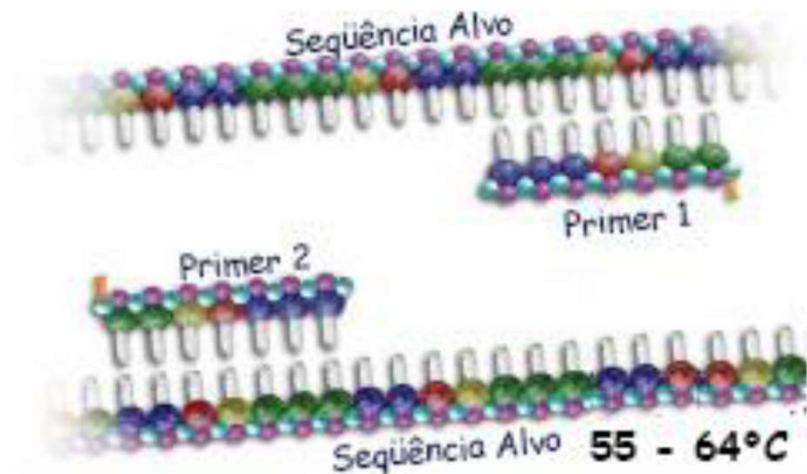


Las muestras son calentadas a 94-96 °C durante 30 segundos a varios minutos.

Etapas de la reacción

II) Hibridación o *annealing*

Los primers hibridan con las secuencias complementarias del molde.

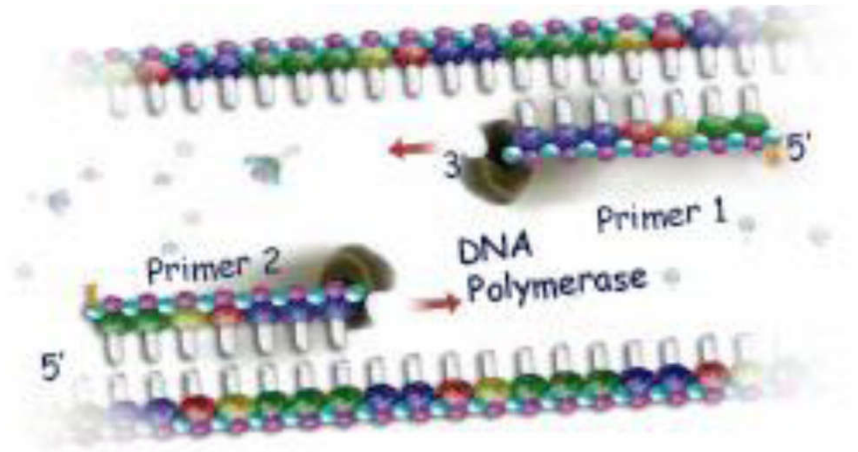


La temperatura es reducida a 55-65 °C durante algunos segundos (30 a 60 seg).

Etapas de la reacción

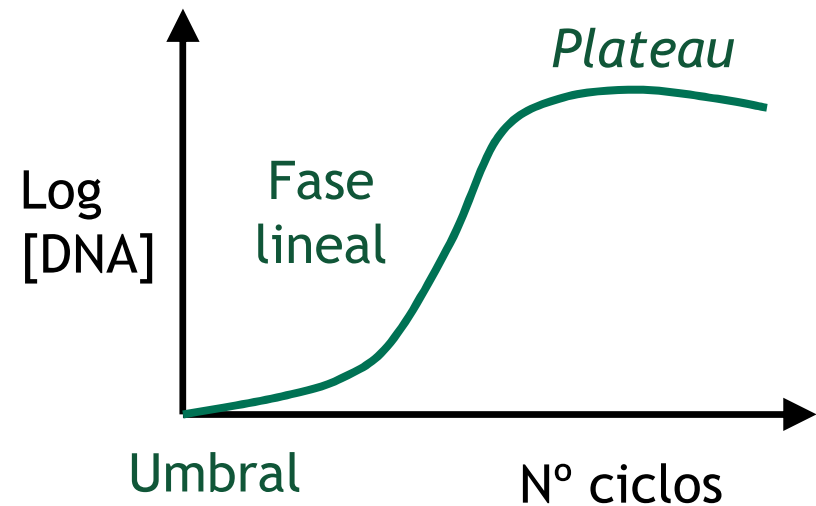
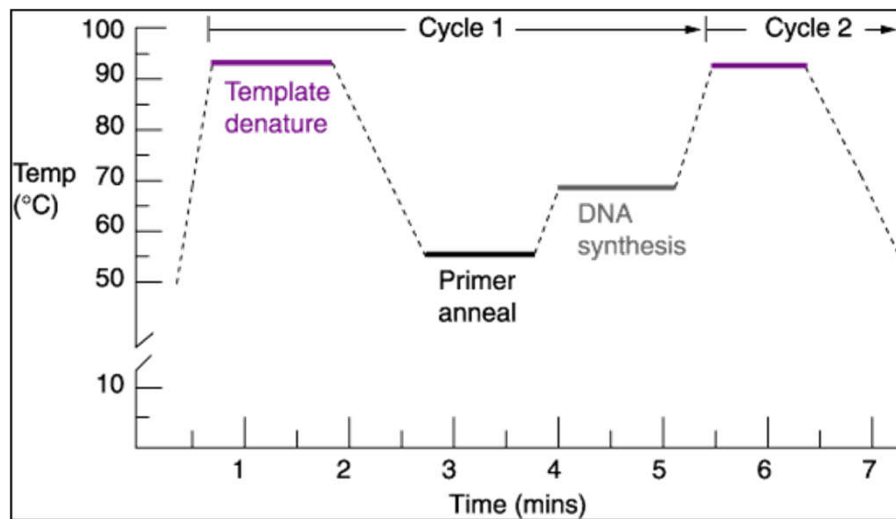
III) Extensión

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

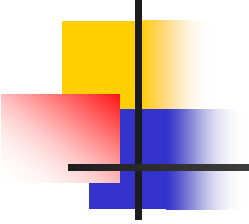


La temperatura se eleva a 70-75°C durante 30 a 60 segundos.

¿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.

DNA molde



✓ Calidad:

- ✓ Fragmentación.
- ✓ Fuente.

✓ Concentración:

- ✓ N° de copias.

✓ Secuencia:

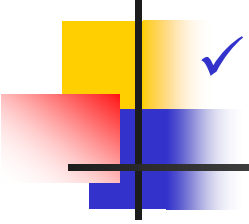
- ✓ Contenido G+C.
- ✓ Restricciones estructurales.

El DNA proveniente de ciertos protocolos de extracción puede estar parcialmente degradado. Este DNA no puede ser utilizado para experimentos tales como Southern blot, que requiere sustratos de alto peso molecular y muy buena calidad. Sin embargo, dado que en general los productos de PCR son relativamente cortos, la fragmentación parcial no es un problema, mientras que un número suficiente de moléculas queden intactas entre los sitios de unión de los primers. Esta capacidad para recuperar información a partir de material parcialmente degradado hace que la PCR sea ideal en casos de análisis forense.

La PCR es lo suficientemente sensible como para amplificar DNA a partir de pequeñas cantidades de material de partida. Normalmente, se parte de DNA molde en el orden de los nanogramos (por ejemplo, 50 ng o 100 ng), aunque la cantidad de material de partida debe ponerse a punto para cada PCR.

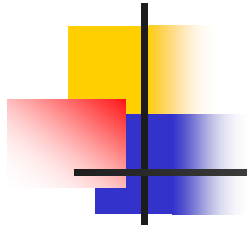
El alto contenido de GC o la complementariedad interna en la secuencia del DNA molde pueden reducir la eficiencia de la reacción de PCR debido a que el DNA molde puede formar estructuras secundarias o terciarias estables a la temperaturas utilizadas para los pasos de hibridación y extensión. En estos casos se deben realizar estudios bioinformáticos previos.

Primers

- 
- ✓ Requerimientos o cuidados para su diseño:
 - ✓ 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 [entre 0.25 y 1 μM]_f.

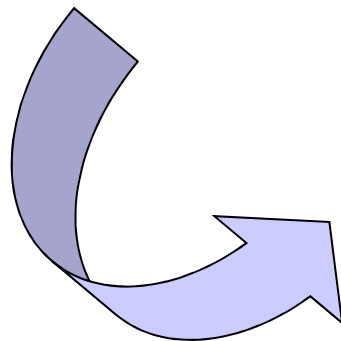
$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T) \text{ (para secuencias menores a 25 nt)}$$
$$T_{\text{annealing}} = T_m - 5^\circ\text{C}$$

Diseño de los primers



Online:

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



Free software:

<http://perlprimer.sourceforge.net/>

Open source primer design

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.

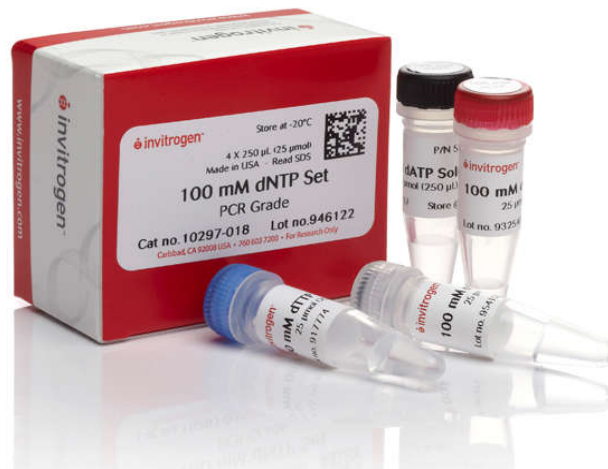
No masking ☒ Human (hg18) ☐ Mouse (mm8) ☐ Score

Reference sequence

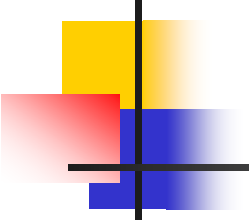
An EMBL formatted sequence file will be generated containing exons and intron/exon boundaries. The sequence can be imported as reference sequence into the Staden package. If 'CDS start' and 'CDS end' are empty, the coding sequence will extend from position 1 up to the end.

CDS start CDS end Maximal intron length

dNTPs



- ✓ Consisten en una mezcla con iguales cantidades de dA**T**TP, dC**T**TP, dG**T**TP y dT**T**TP.
- ✓ Se usan a una concentración final de 200 μ M c/u.



Mg⁺²

- ✓ Es el cofactor de la Taq polimerasa, agregado comúnmente como 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.

Buffers

✓ Sales: K^+ / Mg^{+2}

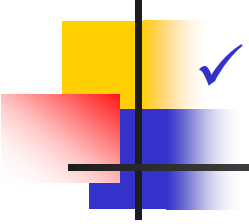
✓ Ejemplo: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.5

✓ Modificadores:

✓ Ejemplo: DMSO
(dimetilsulfóxido)
se usa para reducir
el *background*.



Enzimas

- 
- ✓ Originalmente: Se usó el fragmento **Klenow de la DNA pol I** (no es termoestable) → agregado de enzima después de cada ronda de desnaturalización (mayor riesgo de contaminación, alteración del volumen de reacción, muy laborioso).
 - ✓ Ahora: **DNA pol termoestables** (ej: *Taq: Thermus aquaticus*, *Pwo: Pyrococcus woesei*, *Pfu: Pyrococcus furiosus*, *Tli: Thermococcus littoralis*).

- ✓ La más comúnmente usada : *Taq* polimerasa.
- ✓ Estabilidad : *Taq* (9 min at 97° C), *Pwo* (>2 hr a 100° C).
- ✓ Fidelidad: *Taq* (baja, 2×10^4), *Pfu* (alta 7×10^7).
- ✓ Algunas presentan actividad transferasa terminal en el extremo 3' (Ej: *Taq* agrega una A, especialmente si en el extremo hay una C).
- ✓ Cantidad usada = 5×10^{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 $\times 10^{-6}$	Accuracy $\times 10^5$
<i>Pfu</i>	1.3 ± 0.2 S.D.	7.7
Deep Vent _R [™]	2.7 ± 0.2 S.D.	3.7
<i>Tli</i> (Vent _R [®])	2.8 ± 0.9 S.D.	3.6
<i>Taq</i>	8.0 ± 3.9 S.D.	1.3
ULTma [®]	$55.3 \pm 2.0^*$	0.2
<i>*Range of duplicates.</i>		

Precios (Invitrogen):

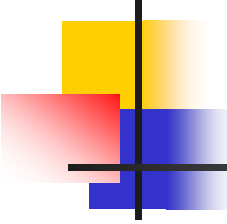
Taq DNA pol, 500 unidades USD 222

Platinum Taq DNA pol, 500 reacciones USD 686

Accuprime Pfx DNA pol, 500 reacciones USD 765

Enzima usada en el TP: TransTaq® DNA Polymerase High Fidelity
(Transgene Biotech)

Programación de los ciclos



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

- ✓ Desnaturalización 95°C (15-60 seg).

- ✓ Annealing (20-60 seg).

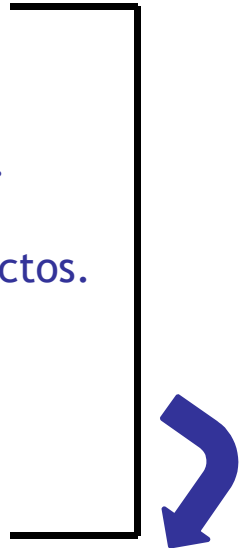
La T° debe ser calculada o empíricamente para cada par de primers.
demasiado alta = poco o nada de producto.
demasiado baja = annealing no específico = productos incorrectos.

- ✓ Extensión (desde 30 seg)

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

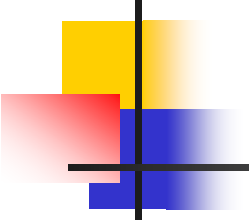
- ✓ Extensión final 72°C.

- ✓ Hold 4-10°C.



28-35
ciclos

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

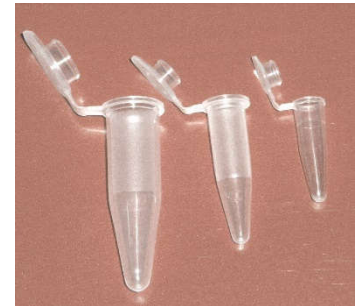
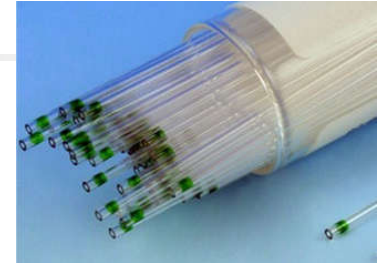


Controles experimentales

- ✓ Control positivo (muestra conocida).
- ✓ Control negativo (todos los reactivos, sin molde, en su lugar, agua, para controlar contaminación).

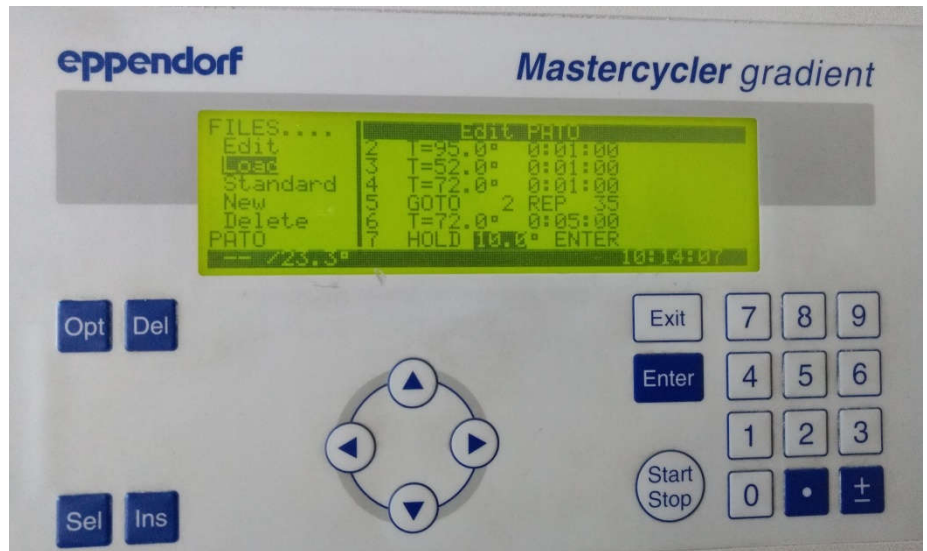
Termocicladores

- ✓ Los primeros cicladores funcionaban con capilares.
- ✓ Los cicladores actuales usan tubos tipo eppendorf de 0,2 y 0,5 ml. También hay bloques que aceptan microplacas de 96 wells.



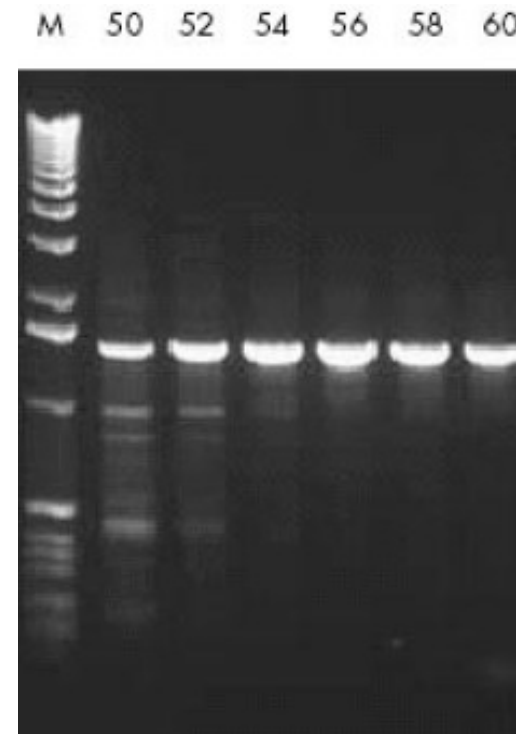
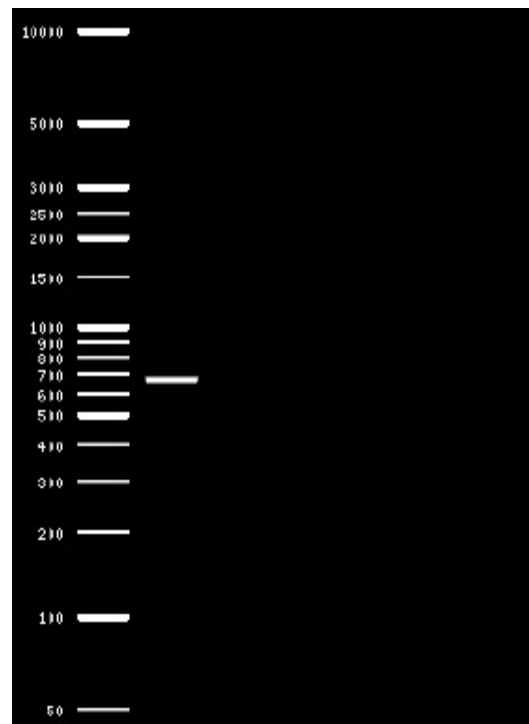
Termocicladores

- ✓ Termociclador a utilizarse en el TP: *Mastercycler gradient* (Eppendorf).



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:** Uso de 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.
- ✓ **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.

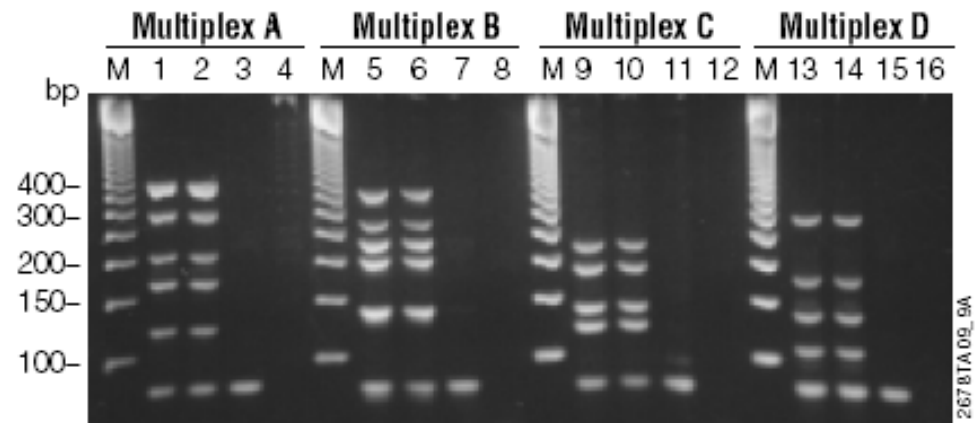
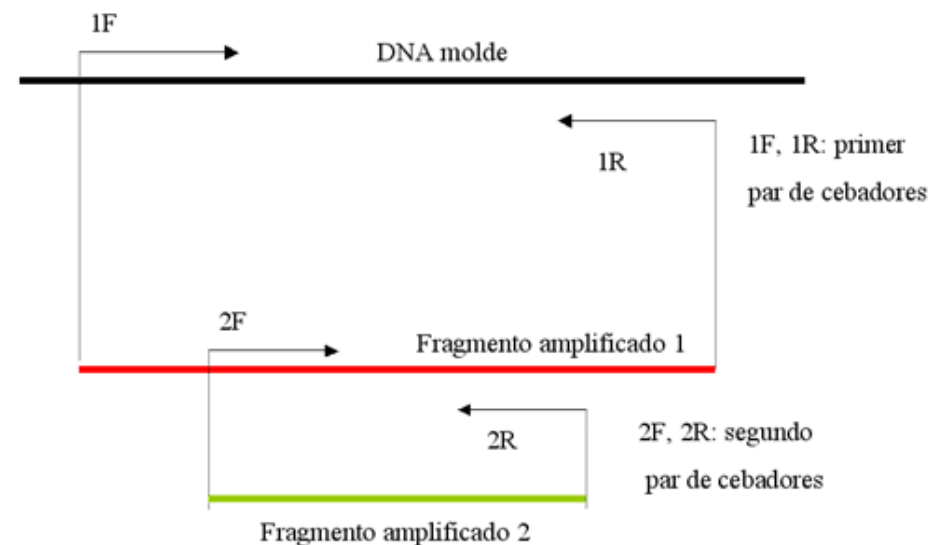


Figure 2. Multiplex analysis of wildtype male and female genomic DNA.

PCR anidada (nested)



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.

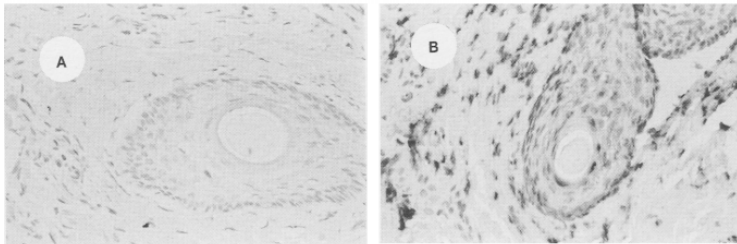
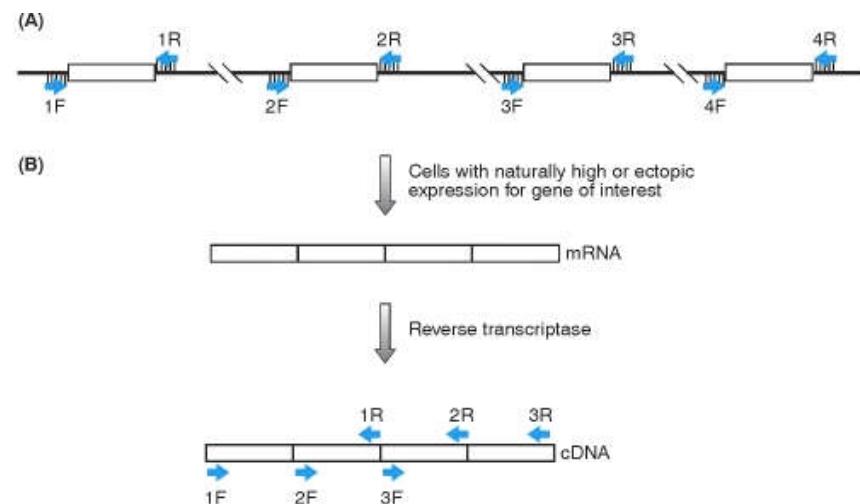
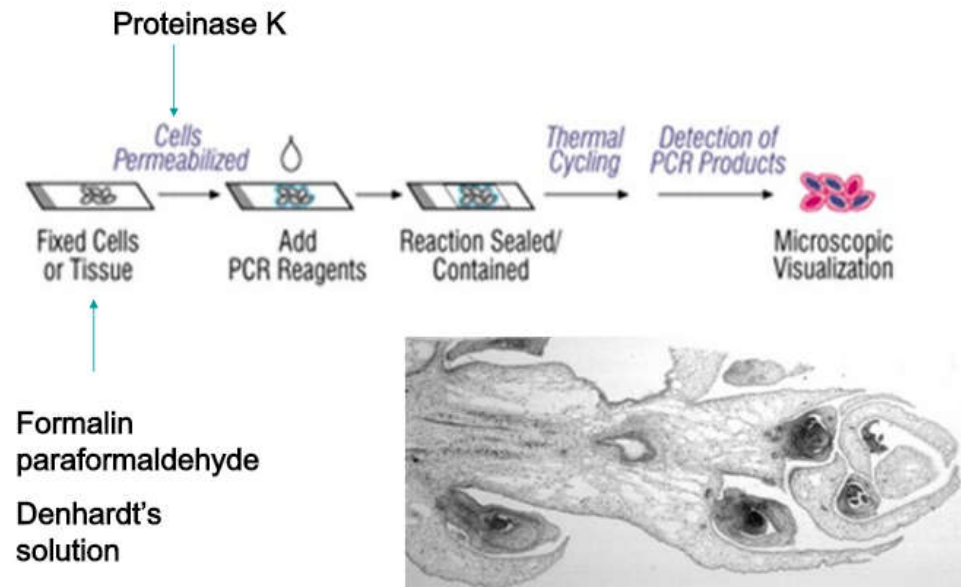


FIGURE 2 Relationship of protease digestion and formalin fixation times for successful *in situ* PCR. This skin biopsy was fixed in buffered formalin for 8 hr. No signal is evident with *in situ* PCR if the pepsin digestion time was for 15 min (A). An intense signal is evident if the digestion time is increased to 45 min (B).

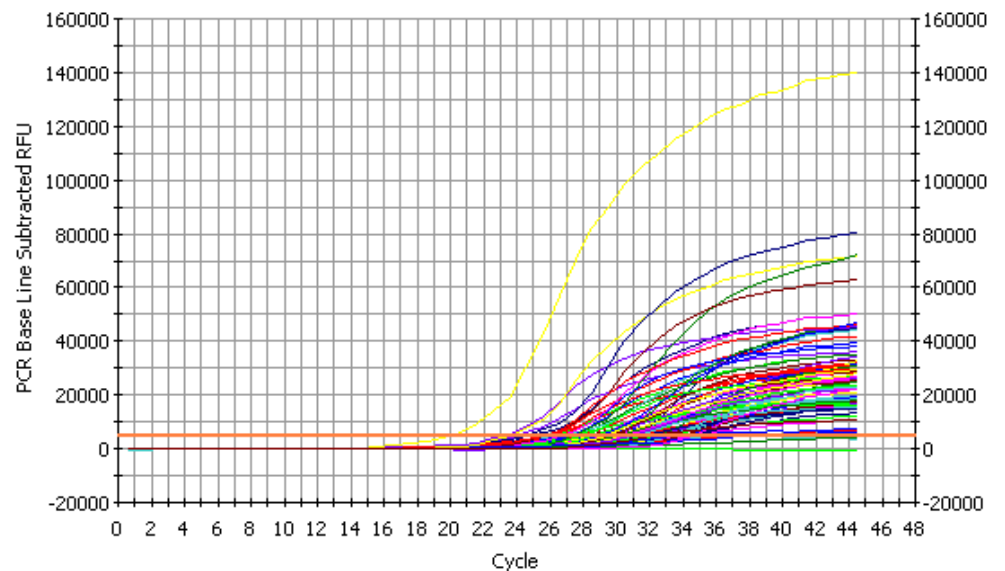
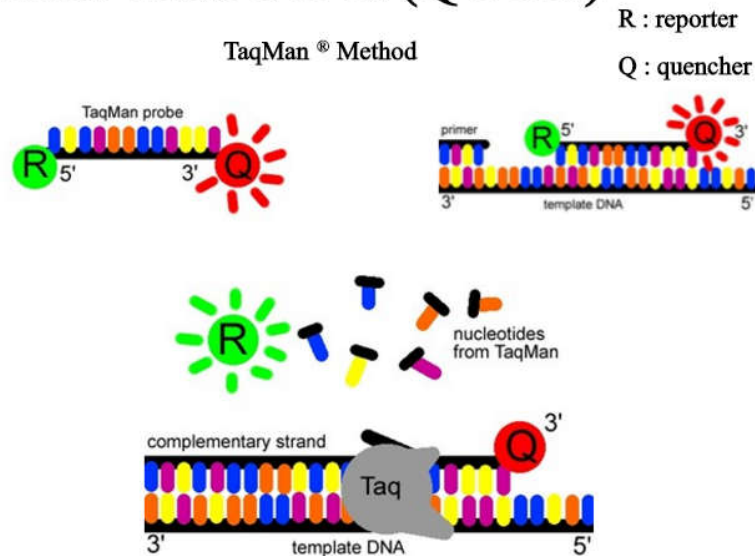


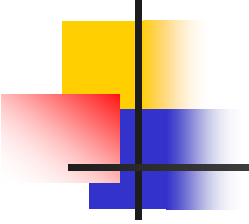
- ✓ **RT-PCR:** Amplificación de un fragmento cuyo material de partida es cDNA, el cual fue generado por transcripción reversa a partir de una muestra de RNA.

Tipos de PCR

- ✓ **PCR en tiempo real:** Los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea, 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 DNA formado**. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.
Se requiere un termociclador apto para Real Time.

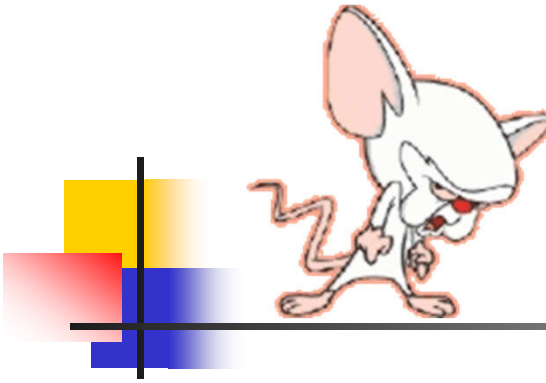
Real-Time PCR (Q-PCR)





Aplicaciones de la técnica de PCR

- ✓ Secuenciación de DNA.
- ✓ Mutagénesis in vitro.
- ✓ Clonado de cDNA.
- ✓ Estudios de expresión de genes.
- ✓ Medicina: diagnóstico molecular.
enfermedades genéticas.
enfermedades infecciosas (ej, detección de carga viral).



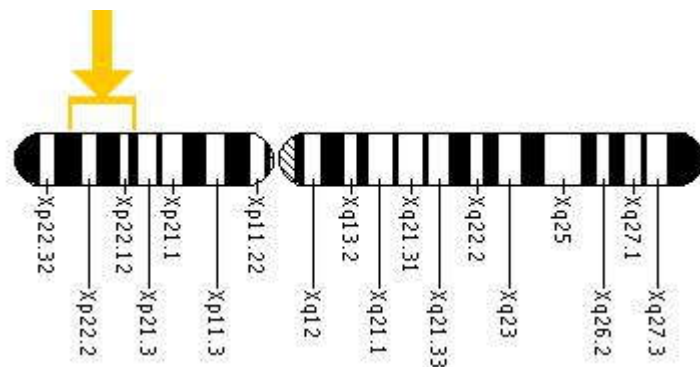
Práctico N°2

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

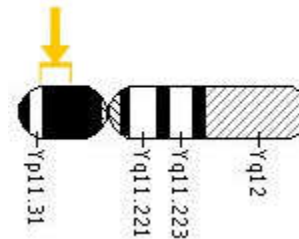


¿De qué se trata?

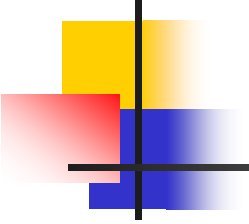
- ✓ El gen de amelogenina (AMG) codifica para una proteína del esmalte dental, y se encuentra en ambos cromosomas sexuales.
- ✓ La secuencia de este gen en el cromosoma Y se diferencia de la del X por una deleción de aproximadamente 200 pb.
- ✓ Para el par de primers elegidos, en mujeres se espera obtener una banda de 360 pb y en varones 2 bandas (360 pb y 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.

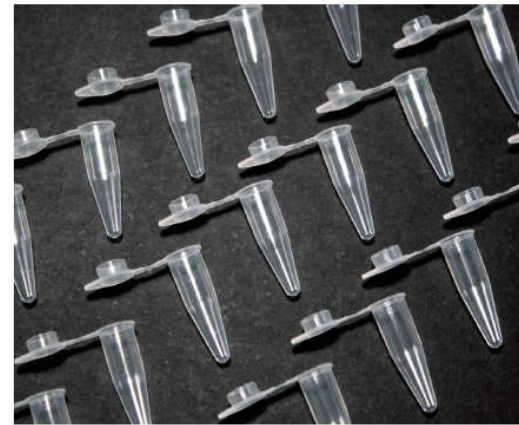
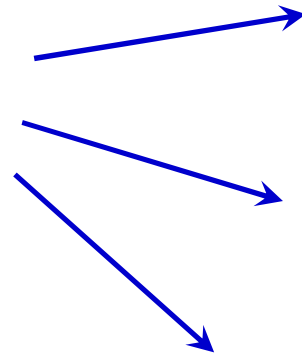
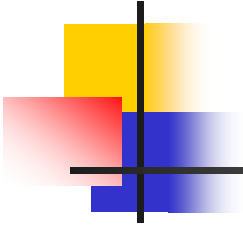
Se puede usar la fórmula: $[C]_f \times V_f = [C]_i \times V_i$

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

Reactivos	Conc final	premix X1 (µl)	premix X 10 (µl)
Buffer 10X (posee Mg ⁺²)	1 X		
dNTPs 10 mM	0,2 mM		
Primers AMG 25 µM	0,25 µM		
TAQ 0.6 ul/100 ul			
DNA (40 ng/ul)	100 ng		
H ₂ O			
total mix (µl)		Vf = 15 µl	Vf = 150 µl

45,5 µl

Mix: en tubos eppendorff de 0.5 ml



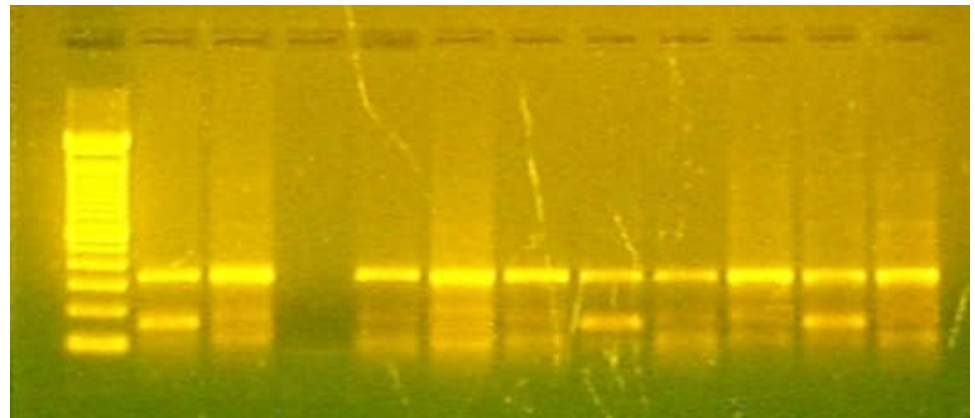
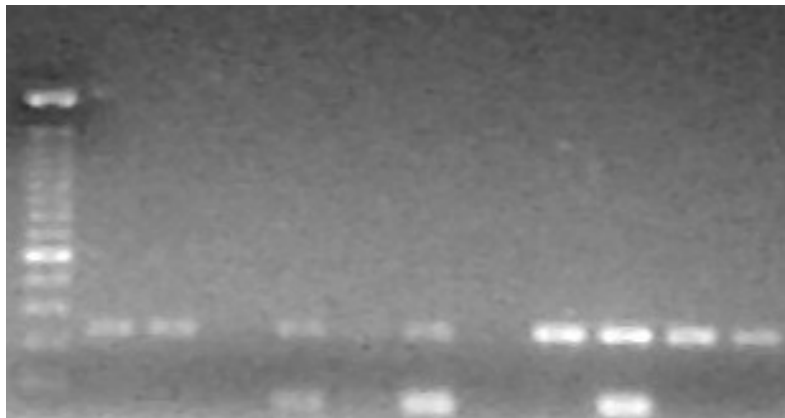
Luego se reparte en tubos de 0.2 ml

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?

**"That's
all
folks!"**

