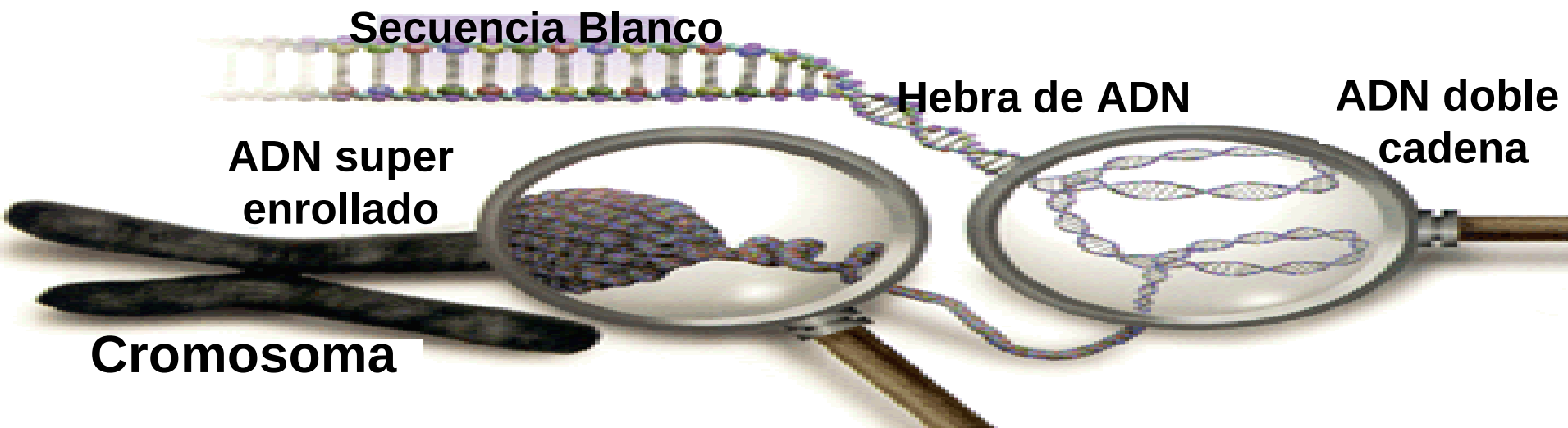


LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA



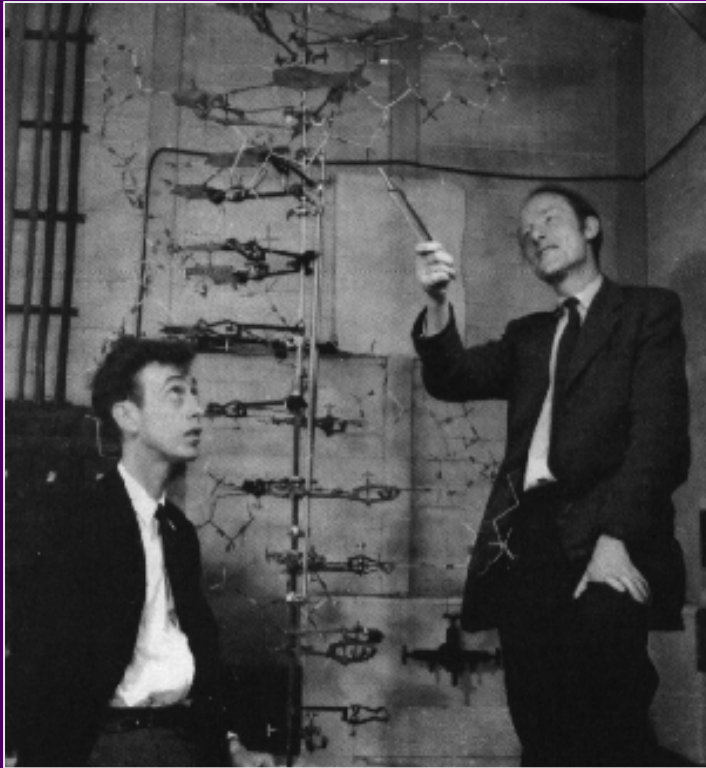
Dra. Cristina Gutiérrez García

Lab. Virología Molecular

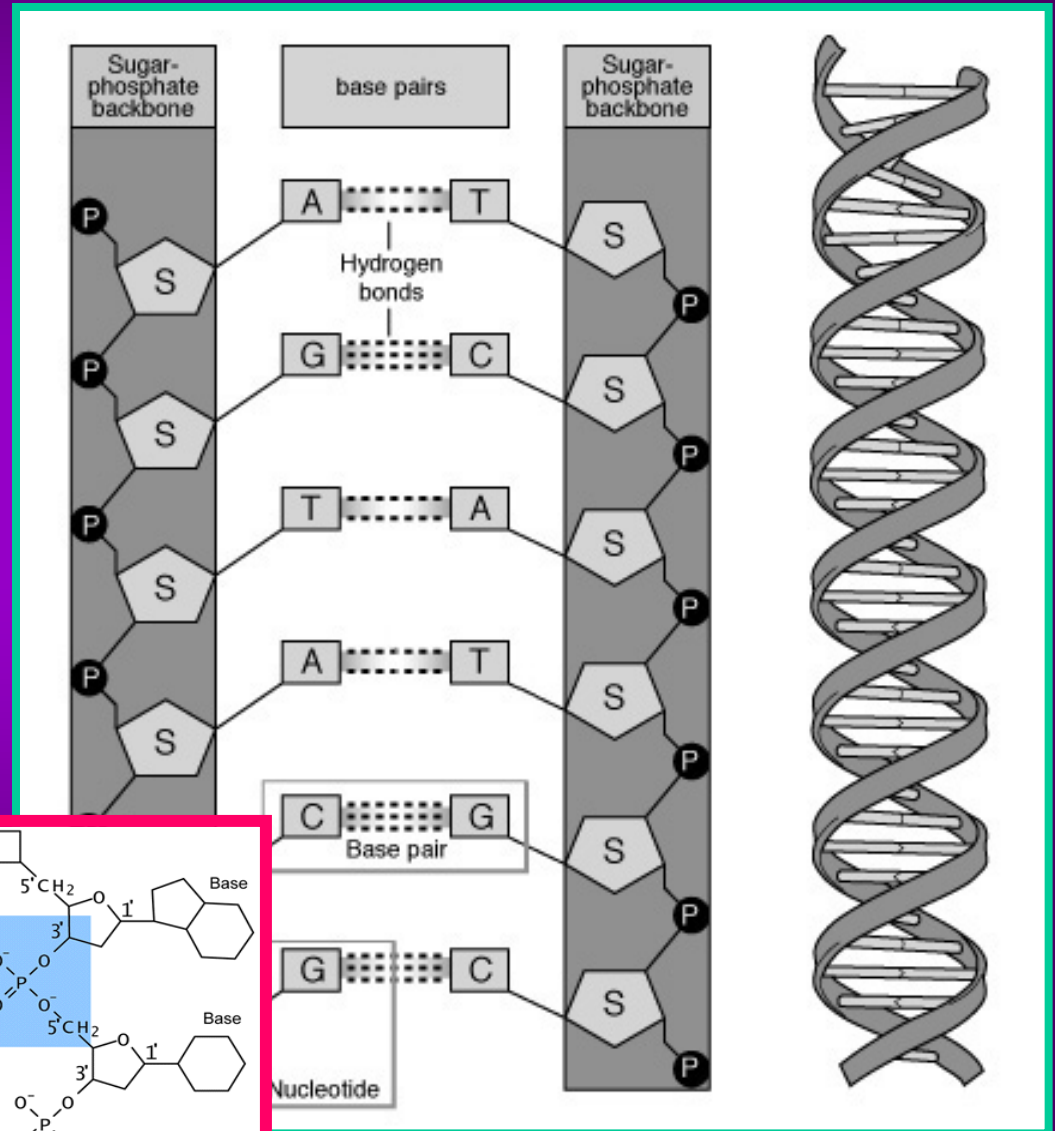
INHRR

ESTRUCTURA DEL ADN.

MODELO DE LA DOBLE HÉLICE.

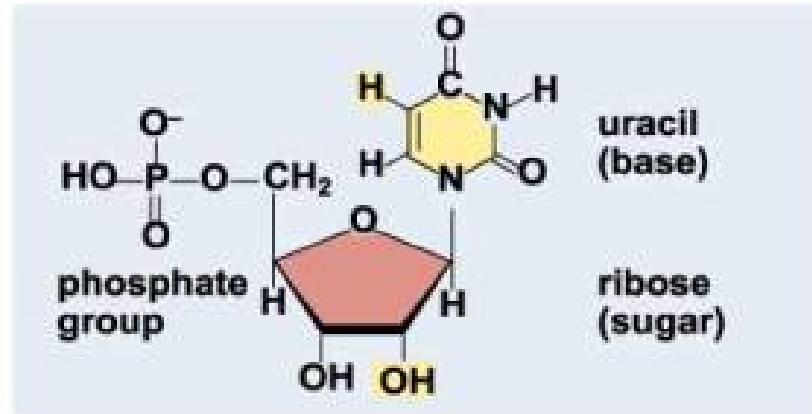


Watson y Crick, 1953

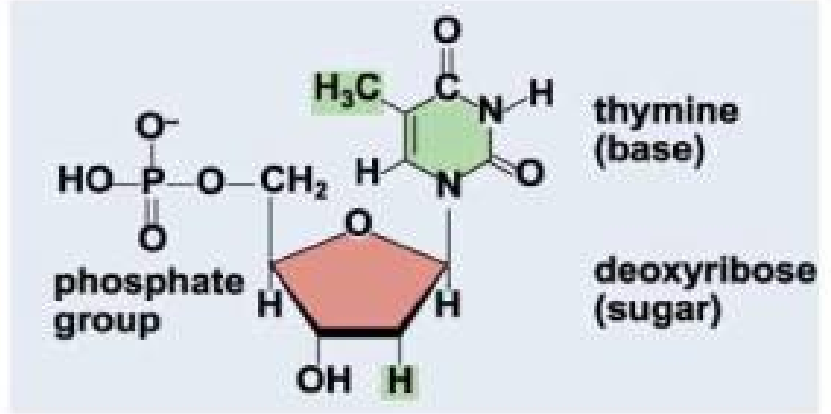


Diferencias estructurales entre ADN y ARN

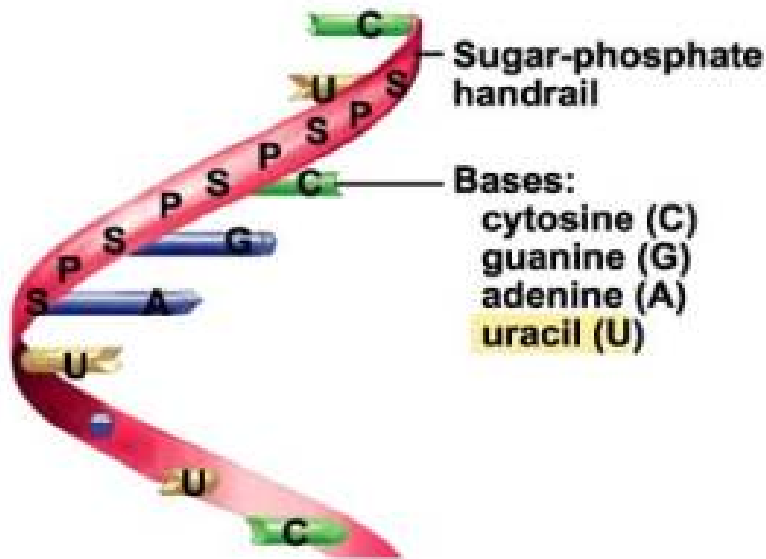
RNA nucleotide



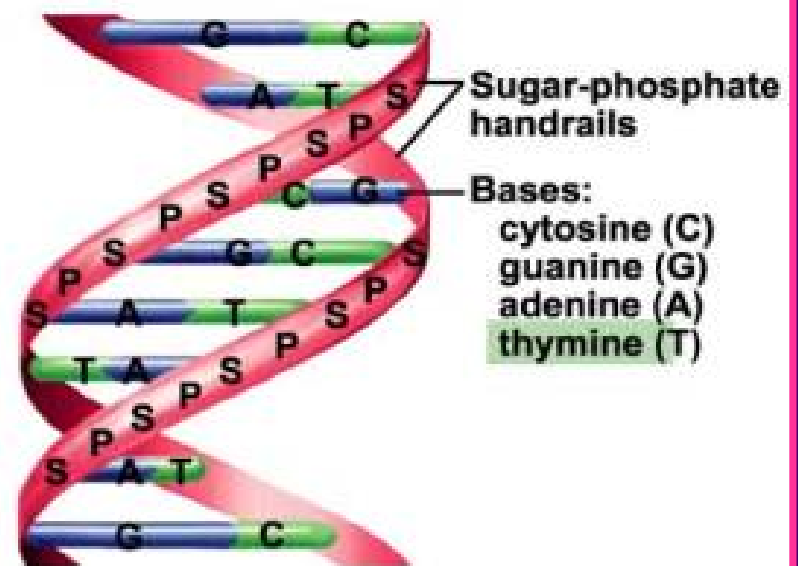
DNA nucleotide



RNA strand



DNA strand



INGENIERÍA GENÉTICA

- 1970: Temin, aisló la TR.
- 1972: Nathans. Enzimas de restricción.
- 1973/75: A. Chang y S. Cohen: ADN rec mantenida y replic. en *E. coli*.
- 1977: Fred Sanger. Método (dideoxy) secuenciación de ADN.
- 1977: se funda Genentech
- 1980: 1er. animal transgénico.
- 1981. Oncogenes humanos.
- **1985. Kary B. Mullis. PCR.**
- 1989: Alec Jeffreys. Estudio polimorfismo ADN.
- 1990. Terapia Génica e inicio del Proyecto Genoma Humano.
- 1995: H. Influenza (1830000 pb)
- 1996: E. Coli (4670000 pb).
- 1000 virus y 100 microorganismos.
- Secuencia genómica completa. Nature 2000 vol 406: 799.



Pasos de la PCR

1. Extracción de ácidos nucleicos
2. Síntesis de ADNc (ARN)
3. PCR: primera ronda y segunda ronda
4. Corrida electroforética (gel de agarosa)

Recolección de la muestra

```
graph TD; A[Recolección de la muestra] --> B[Extracción de Ácidos Nucleicos]; B --> C[ADN]; B --> D[ARN]; C --> E[Análisis Molecular PCR]; D --> F[RT]; F --> G[cADN]; G --> H[Análisis Molecular RT-PCR];
```

ADN

ARN

Extracción de Ácidos Nucleicos

RT

cADN

Análisis
Molecular
PCR

Análisis
Molecular
RT-PCR

MUESTRAS PARA ANÁLISIS

**Fluidos: sangre total, suero, plasma,
orina, semen
Tejidos frescos**

**DIAGNOSTICO
MOLECULAR**

**Tejidos fijados y embebidos en
parafina
Cortes de tejidos teñidos con H-E**

**ESTUDIOS
RETROSPECTIVOS**

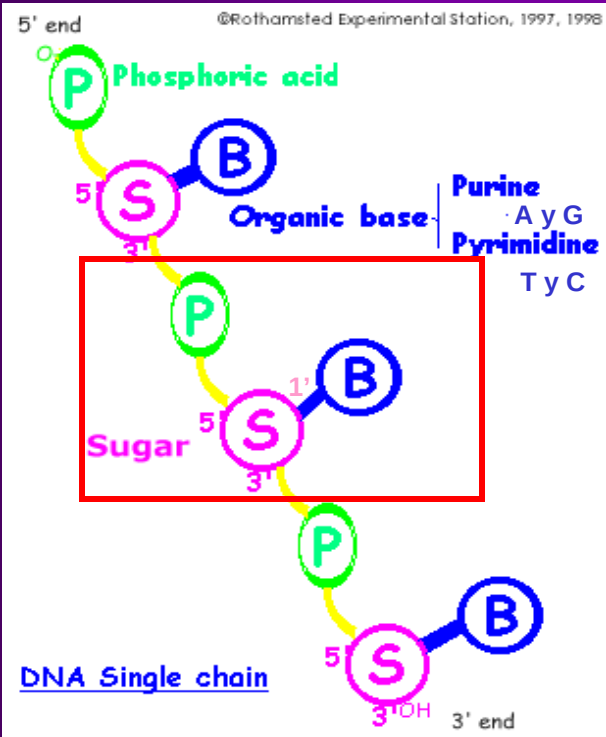
**Muestras de fósiles vegetales y
animales**

**ANTROPOLOGÍA
ARQUEOLOGIA
MOLECULAR**

**Hebras de cabello, gotas de sangre
seca**

CRIMINOLOGÍA

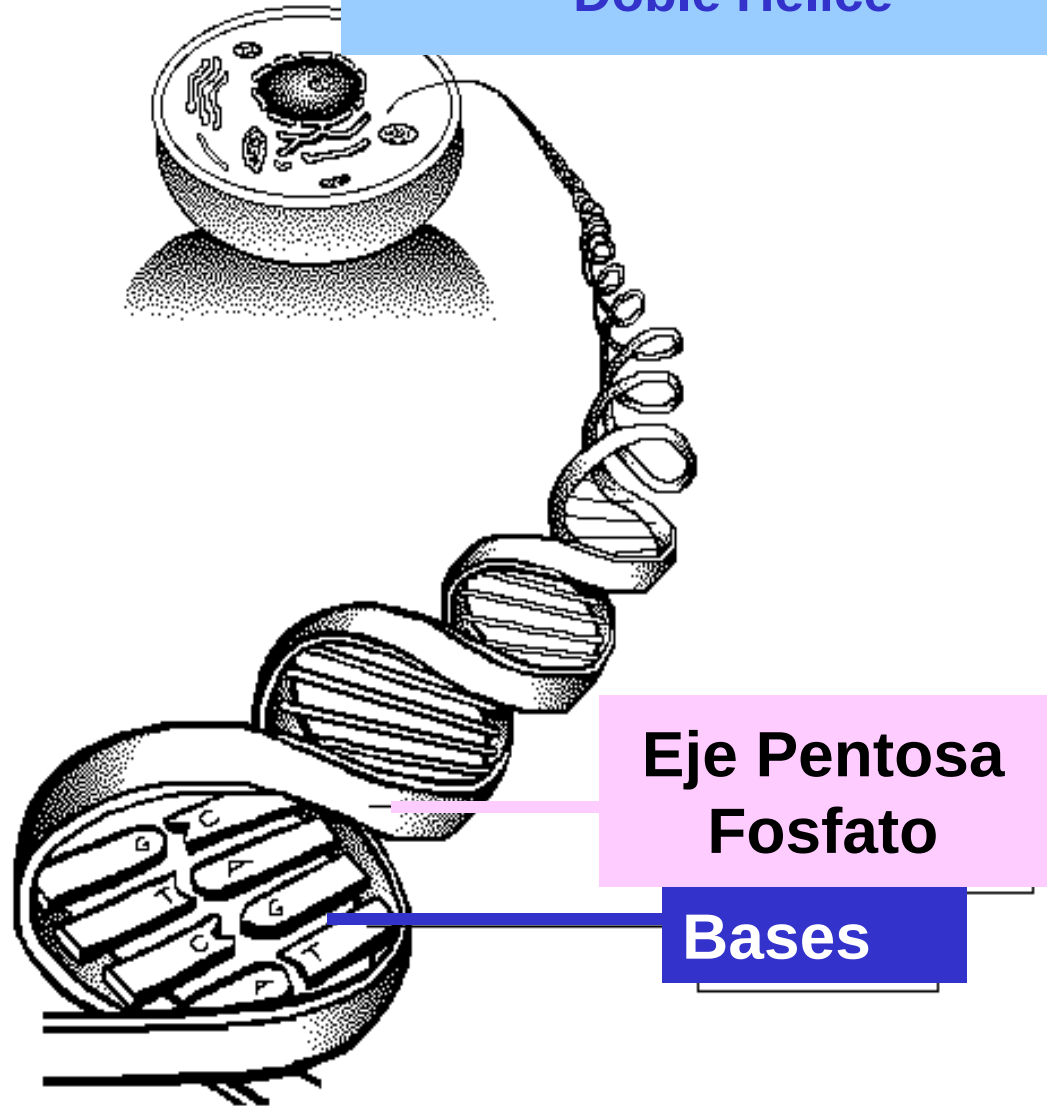
1869 Friedrich Miescher
1930 Kossel y Levene
(nucleosido)



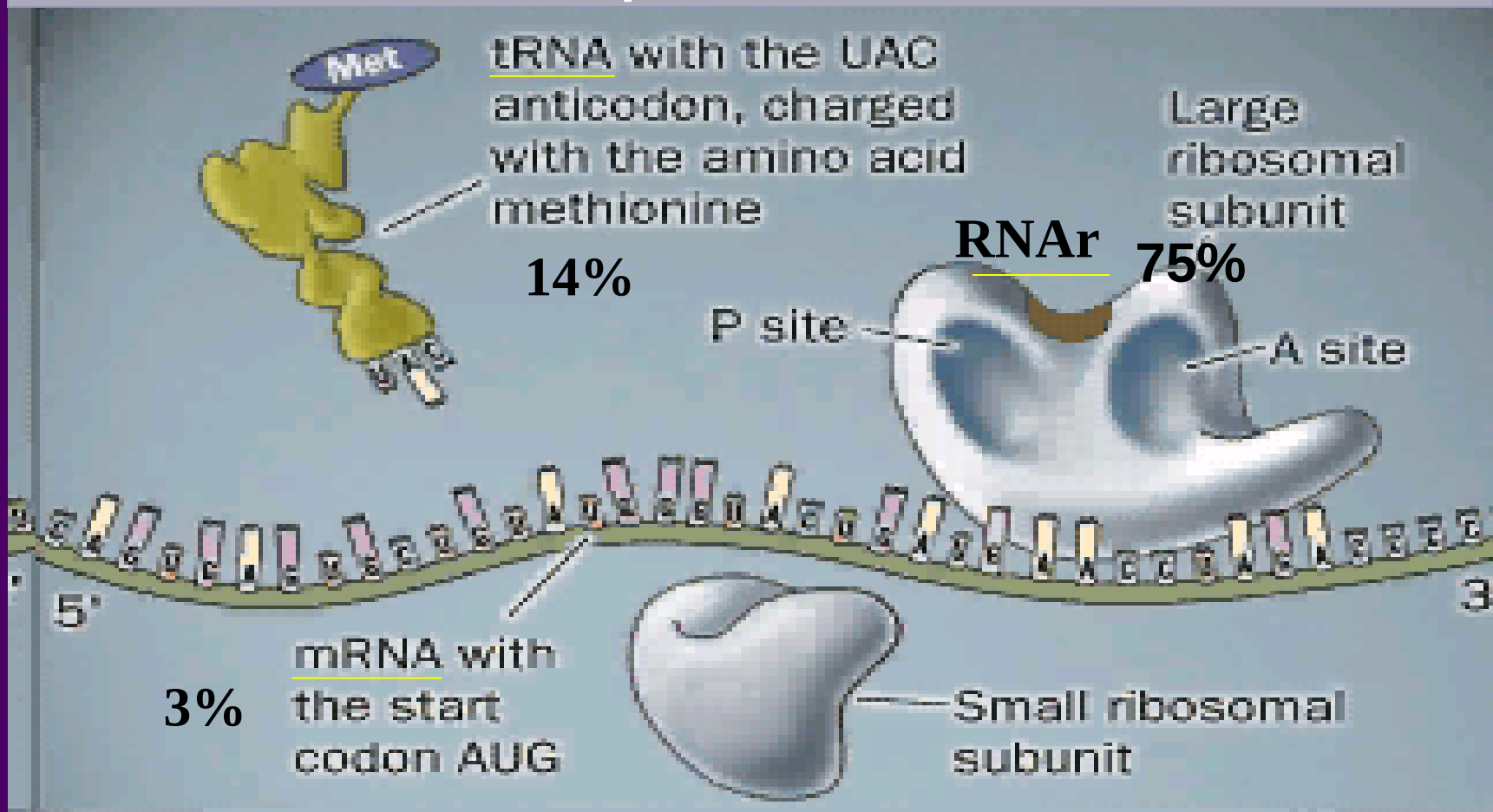
ADN cromosómico

ADN genómico

1953 Watson y Crick ESTRUCTURA DEL ADN Doble Hélice



Tipos de ARN



Especies ARN celulares menores (<1%)

Las moléculas de mRNA son menos estables que tRNA y rRNA

ARN genómico bacterias y virus

EXTRACCIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS

Selección del método mas adecuado:

- 1.- Tipo de Muestra (tejido fresco, suero, sangre total, etc)
- 2.- Tipo de A.N. a extraer
- 3.- Tipo de análisis a realizar

Etapas Generales:

- 1.- Romper las células por acción mecánica o con detergentes
- 2.- Digestión enzimática de proteínas u otros componentes celulares
- 3.- Extracción propiamente dicha con solventes orgánicos
- 4.- Purificación por precipitación con Etanol

EXTRACCIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS

Evitar contaminación con
A.N. externos

Realizar extracción
en campana libre de A.N.
Provista de luz U.V.

Utilizar juego de micro
pipetas único

Utilizar puntas aerosol

Utilizar guantes para evitar nucleasas



EXTRACCIÓN DE ADN



REMOCIÓN DE DNAsas (requieren iones
metálicos quelables con EDTA)

**INACTIVACIÓN Y REMOCIÓN DE PROTEÍNAS
E INHIBIDORES DE POL**

OBTENCIÓN DE ADN NO DEGRADADO

Extracción Fenol-Cloroformo: ADN y/o ARN

MUESTRA + Fenol equilibrado:Cloroformo (1:1)
desproteiniza e inhibe nucleasas

FASE ACUOSA: ácidos nucleicos

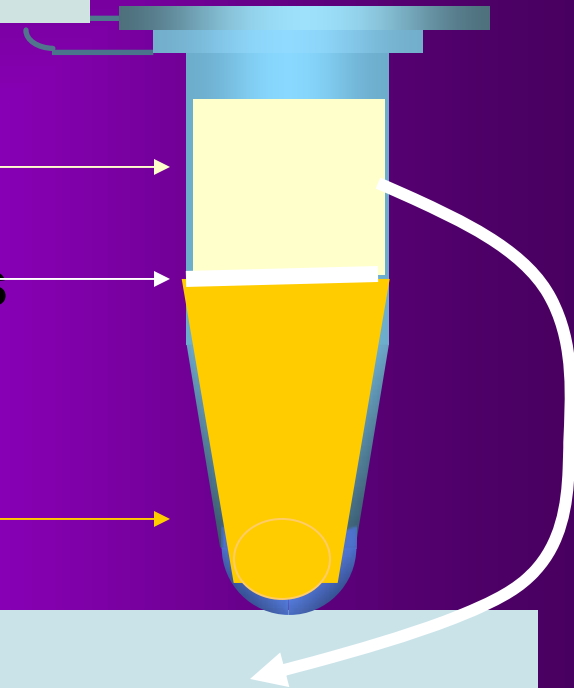
INTERFASE: proteínas desnaturalizadas
carbohidratos contaminantes

FASE ORGANICA: lípidos de
Membrana, inhibidores, contaminantes

CLOROFORMO-ALCOHOL ISOAMILICO (24:1)
(Clor.: elimina trazas de fenol y desnaturaliza nucleasas; Alcoh.Isoa.: reduce formación de espuma, facilita fases)

PRECIPITACION O.N. 2 o 3 vol ETANOL Y ALTA CONC. SALES
(NaOAc 3-1M, NaCl 5M, LiCl 2M) Opcional: ARNt o glicogeno o BSA

LAVAR CON ETANOL 70% para eliminar sales residuales y liofilizar



DIGESTIÓN CON PROTEINASA K

ADN y/o ARN

Extracción a partir de mezclas complejas: lisados celulares o de tejidos donde ocurre liberación proteínas

Muestra	+ Proteinasa K	+ Buffer de Lisis
	20 mg/ml	Tris-HCL, EDTA, NaCL, SDS

↓ 1 h - O.N. 56 °C

Extracción Fenol-Cloroformo
Precipitación con Alcohol

Ventajas: ADN de alto PM alta calidad, eficiente,
ADN extraído es estable por meses

EXTRACCIÓN DE ARN



REMOCIÓN DE Rnasas ENDOGENAS (células, tejidos) **Y EXOGENAS** (manos, piel, cabello, mesones, campanas)

**INACTIVACIÓN Y REMOCIÓN DE PROTEÍNAS
E INHIBIDORES DE RT (SDS y EDTA)**

OBTENCIÓN DE ARN NO DEGRADADO

ELIMINACIÓN DE RNasas

Endógenas:

Usar material nuevo
y autoclavado

Soluciones en DEPC
0,1%

Desnaturalizantes fuertes (sales de guanidinium, SDS, fenol)

Resuspender ARN en
RNAsin o vanadil-ribonucleósido

Exógenas:

Uso de guantes y bata

Cubrir superficies con
papel de laboratorio



EXTRACCIÓN CON SALES DE GUANIDINA

ARN total

Rompen las células, desnaturalizan las proteínas e inhiben las RNasas

Muestra + Tiocianato de Guanidina

Extracción Fenol pH ácido-Cloroformo
(Chomczynsky y Sacchi, 1987)
Para separar ARN del ADN

Uso de Sílica o colchón de CsCl
Para separar ARN del ADN



METODOS DE EXTRACCIÓN DE A.N. DE SEGUNDA GENERACIÓN

Eliminan el uso de solventes orgánicos

Minimizan manipulación —→ disminución de contaminación

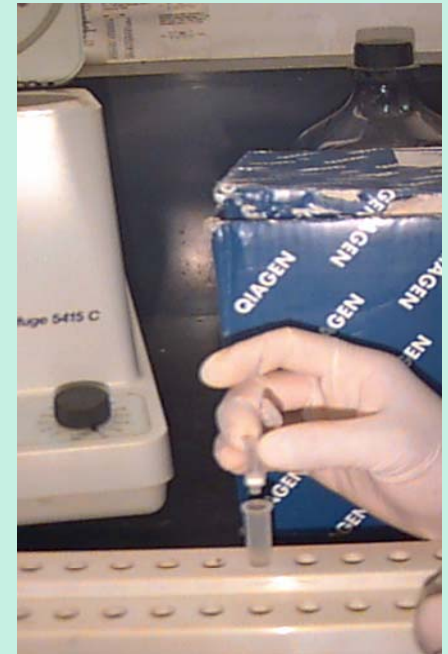
Tiempo de ejecución: minutos

No requiere precipitación con etanol

ADN libre de Dnasas y Rnasas

**Purificación de fragmentos de ADN de hasta
50 Kb**

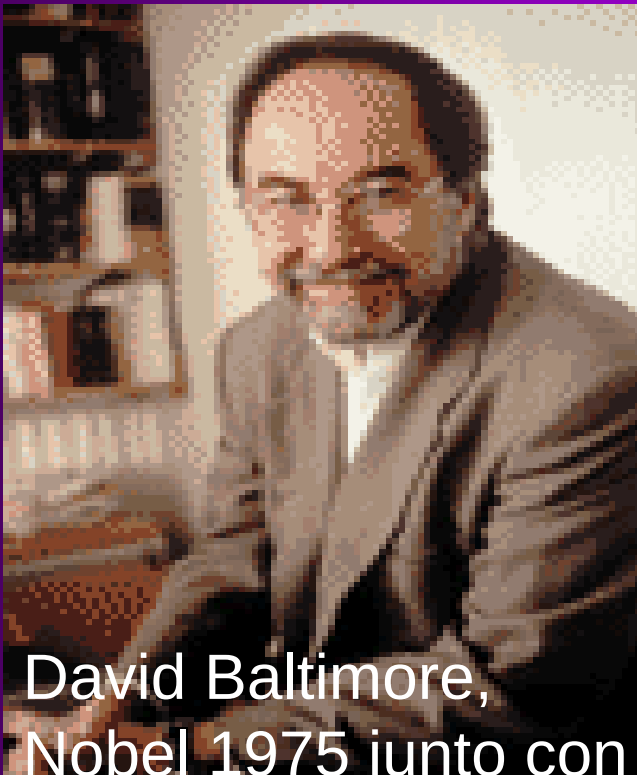
**Principio de Afinidad de A.N. a
Columnas con membranas Silica gel
Oligo-dT**



Menor rendimiento que métodos tradicionales

Pasos en la PCR

1. Extracción de ácidos nucleicos
2. Síntesis de ADNc (ARN)
3. PCR: primera ronda y segunda ronda
4. Corrida electroforética (gel de agarosa)



ARN → cDNA

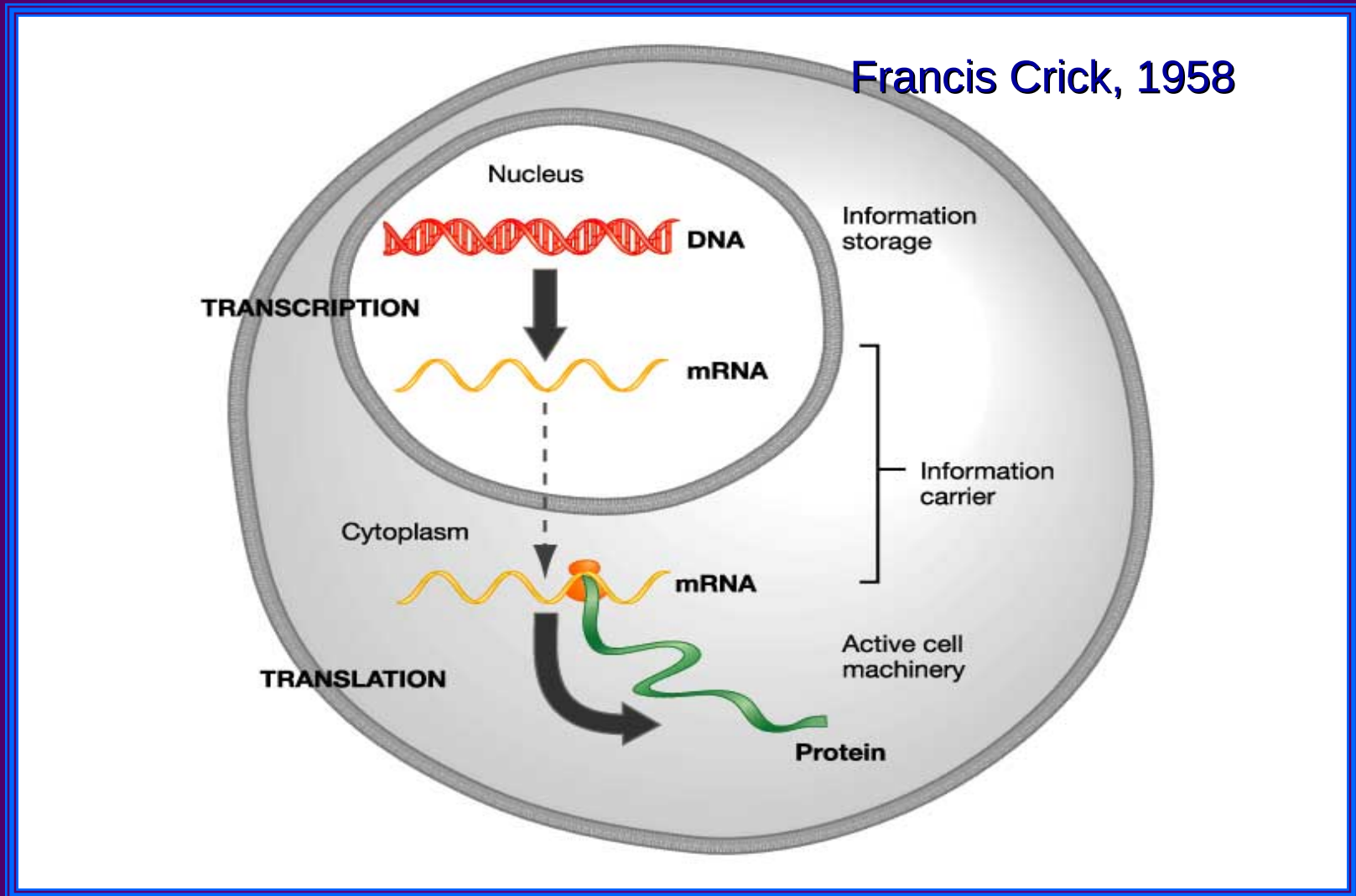


Polimerasa ADN dependiente
de ARN o Transcriptasa Reversa
de Retrovirus

David Baltimore,
Nobel 1975 junto con

Howard Temin y Renato Dulbecco

Dogma Central de la Biología Molecular



“El ADN dirige su propia replicación y su transcripción a ARN, el cual a su vez dirige su traducción a proteínas”

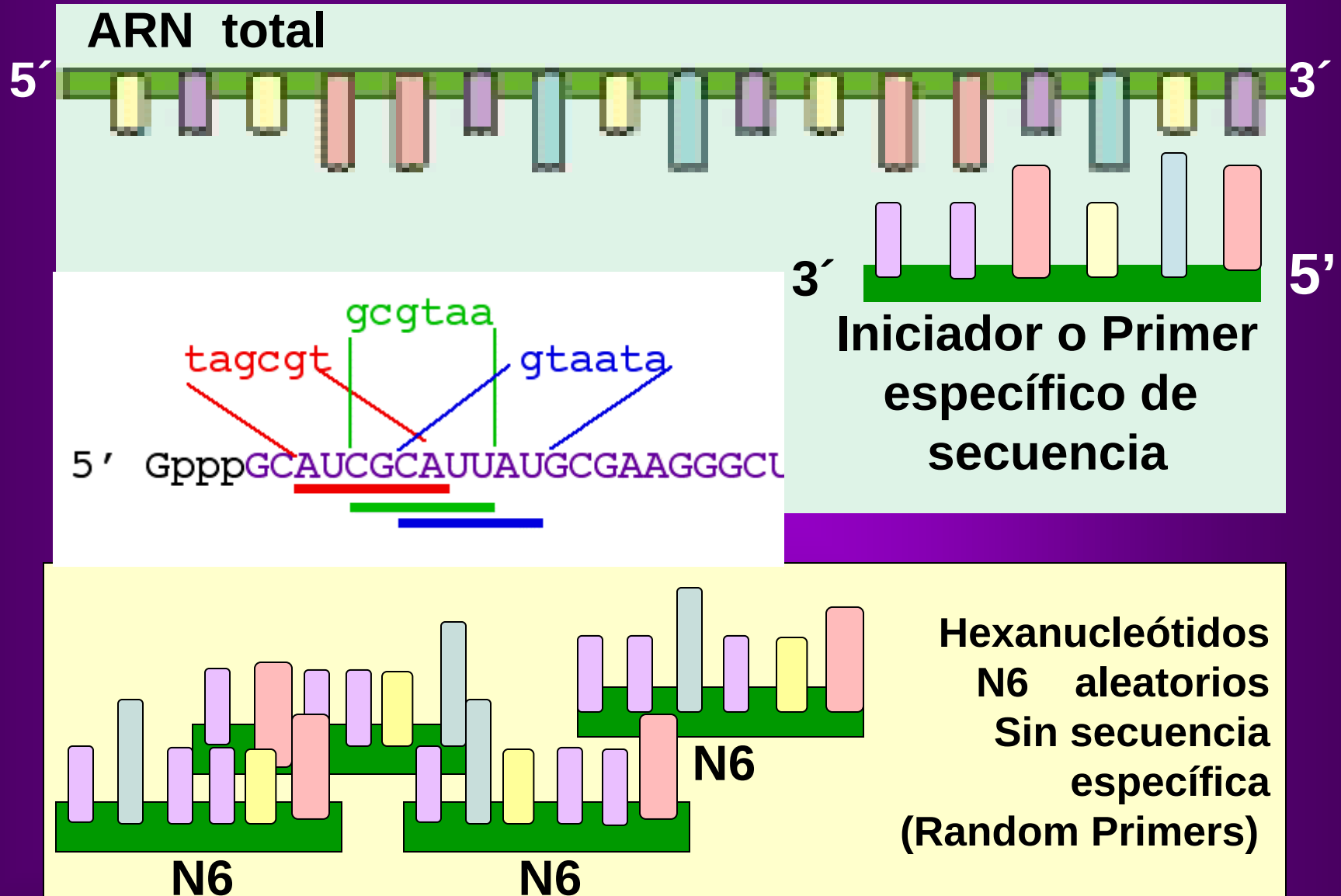
PROPIEDADES DE LAS TRANSCRIPTASAS REVERSAS COMERCIALES

	AMV	MMLV	Tth
Pol ARN depen ADN	+	+	++
Pol ADN depen. ARN	+	+	++
Pol ADN depen. ADN			++
Rnasas H	+	-	
Temperatura óptima	42 °C	37 °C	>42 °C
KCl	145 mM	72 mM	↓
pH óptimo	8,3	7,6	RT-PCR en un paso

AMV: Rnasa H puede degradar templado RNA prematuramente o el cADN recién sintetizado. No adecuada para cADN largos.

MMLV: baja temp. Óptima. No adecuada para ARNm con extensiva estructura secundarias

Síntesis de ADN complementario

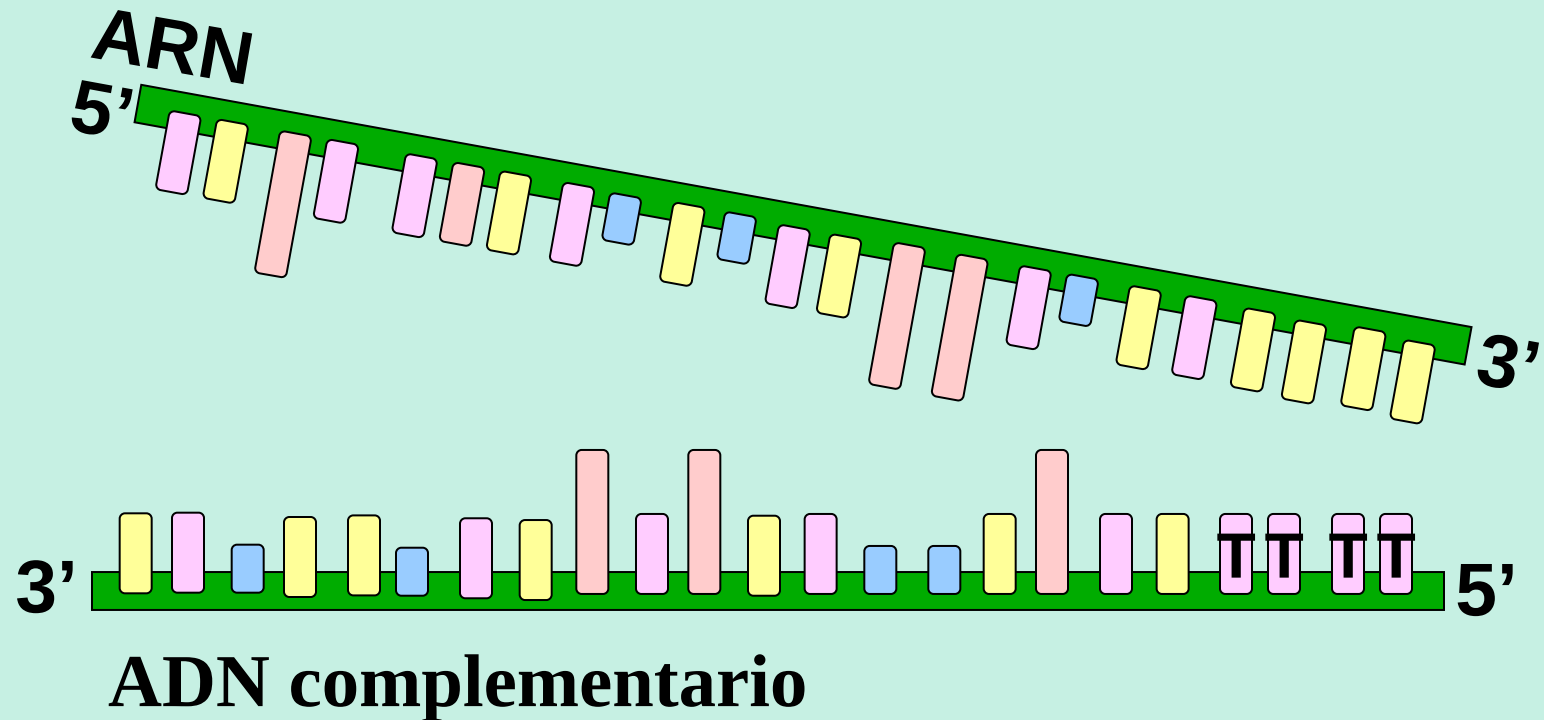


mRNA 5' 3'

3' 5'

Híbrido ADN-ARN

**Inactivación de RT por congelación o calor y
separación de hebras ARN y ADN por calor o Rnasa H**

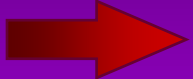


Pasos en la PCR

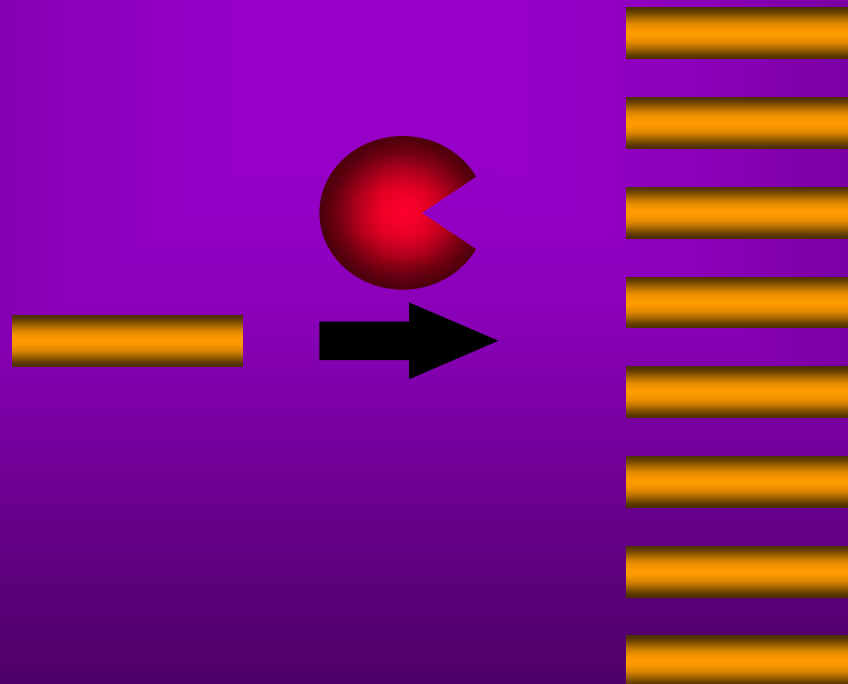
1. Extracción de ácidos nucleicos
2. Síntesis de ADNc (ARN)
3. PCR: primera ronda y segunda ronda
4. Corrida electroforética (gel de agarosa)
5. Análisis posterior de la muestra:
 - RFLP, SSCP, CFLP.
6. Secuenciación

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa):

Amplificación in vitro del ADN

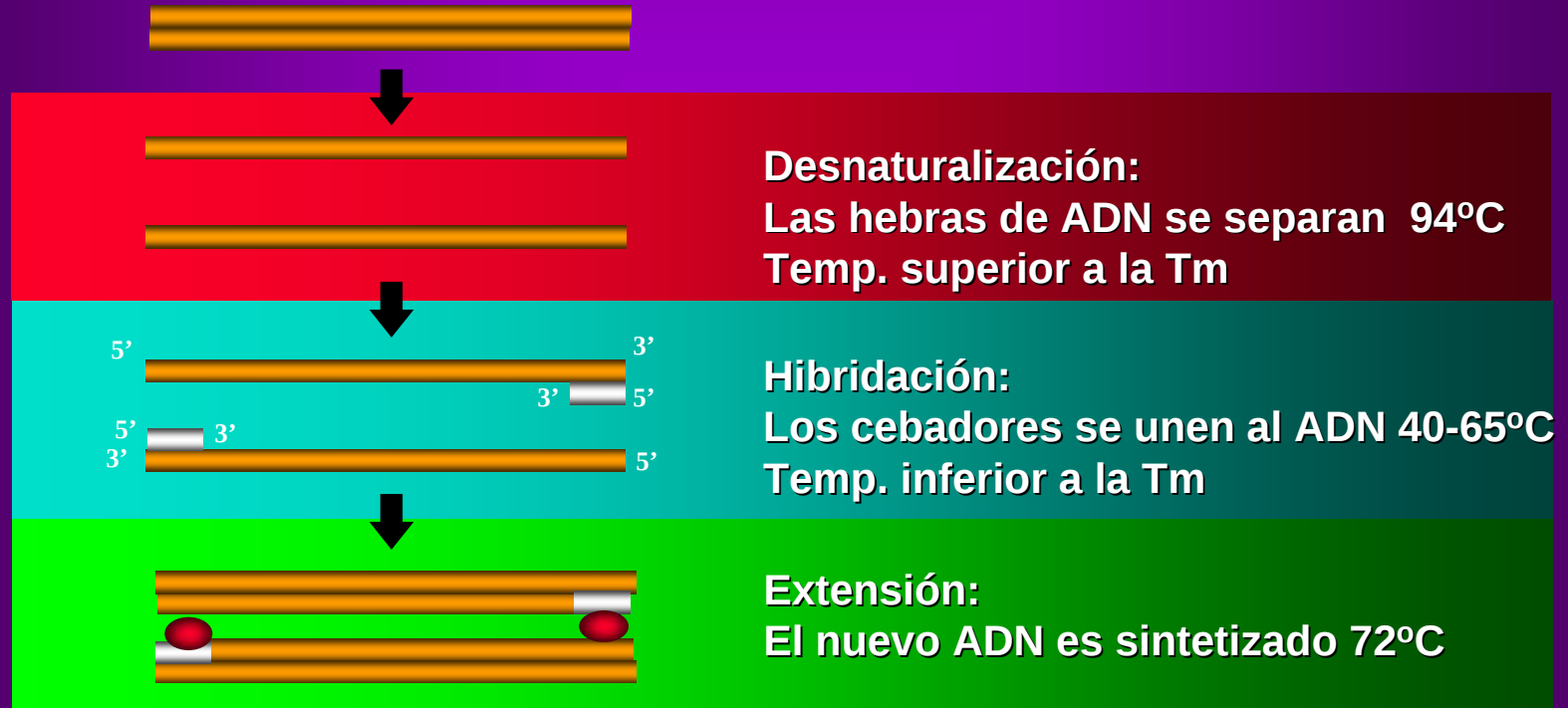
30 ciclos  10^5 copias

© *Método que amplifica las secuencias específicas.*

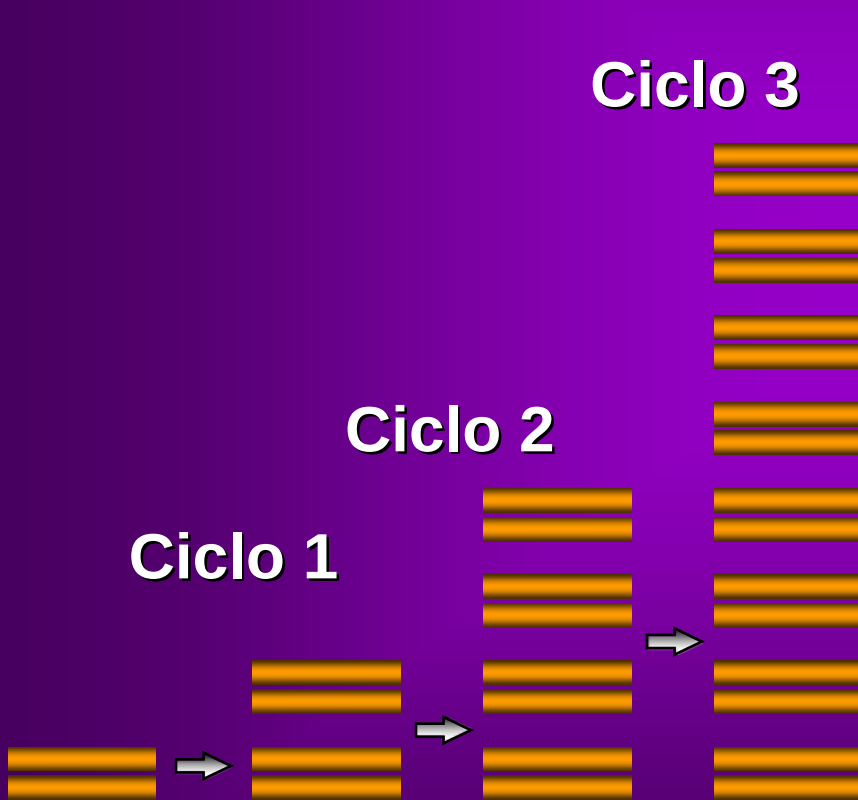


- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Ciclos de PCR



- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)



Luego de 30
ciclos el ADN es
amplificado cerca
de un millón de
veces

Amplificación Exponencial

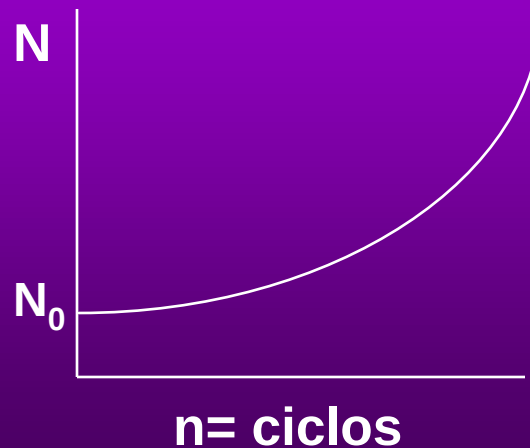
NATURALEZA EXPONENCIAL DE LA AMPLIFICACION

$$N = N_0 2^n$$

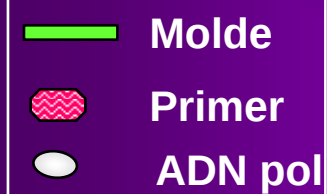
N = El número de moléculas amplificadas

N_0 = El número inicial de moléculas

n = El número de ciclos de amplificación



1 hebras ds



2 copias ds

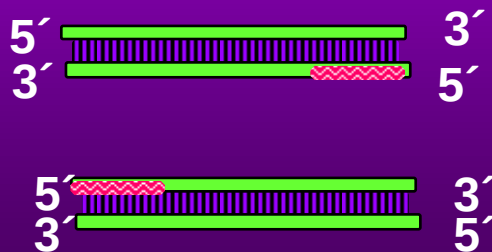
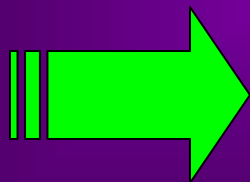
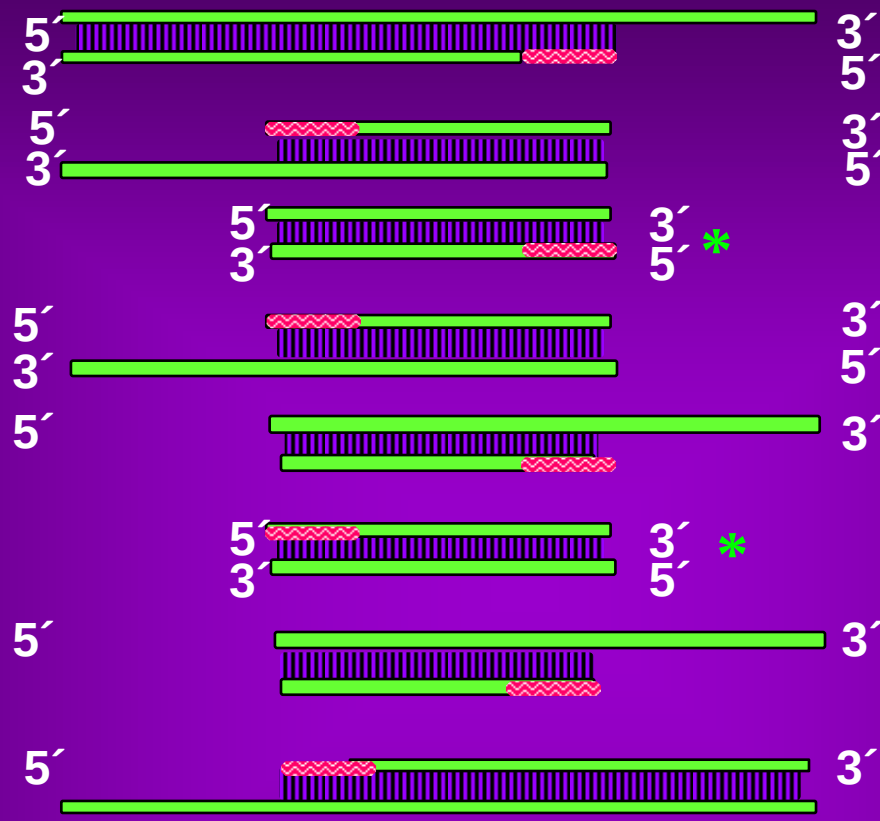
4 copias ds



1º ciclo

2º ciclo

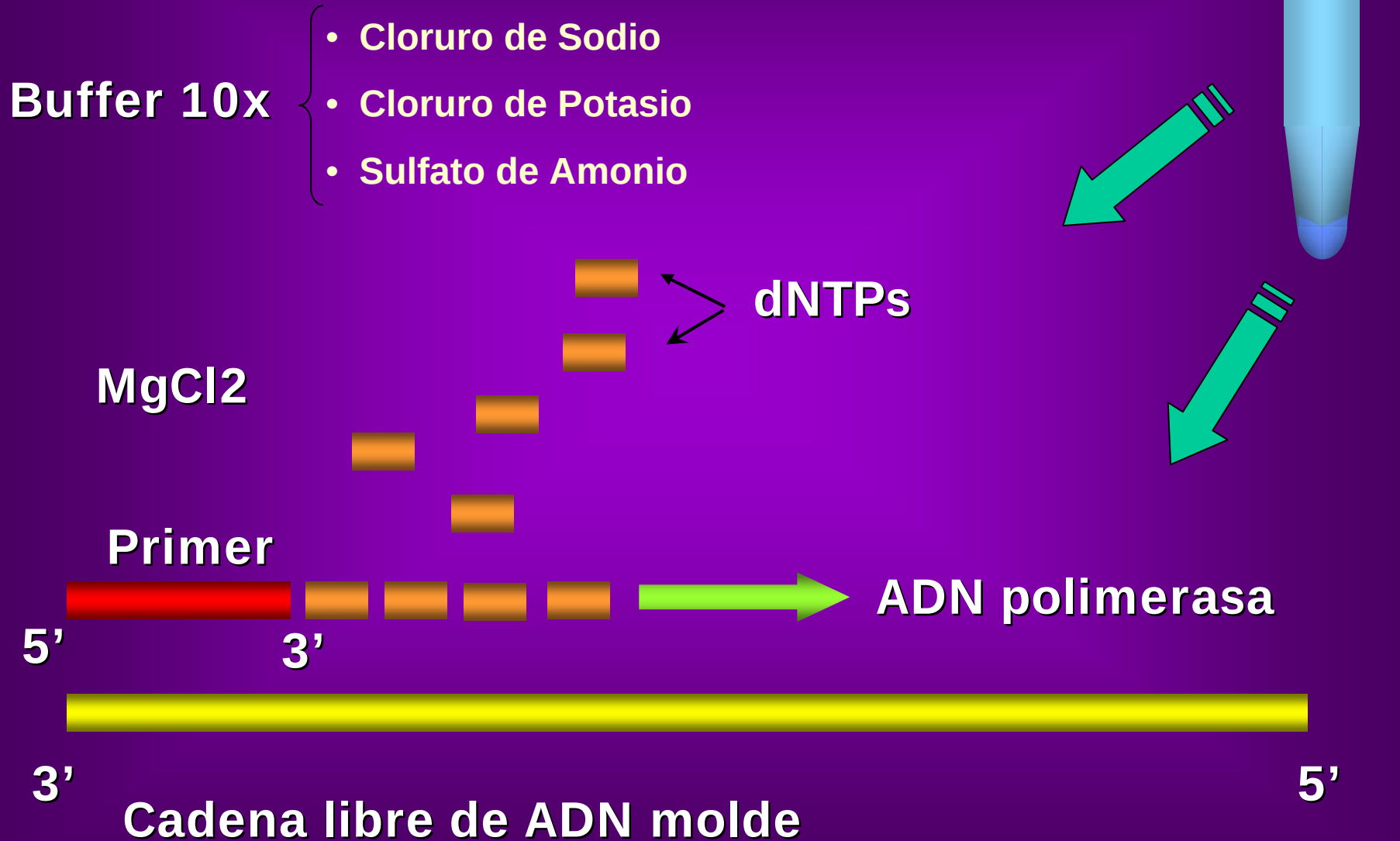
8 copias ds



Producto
Amplificado

Tamaño definido
por la ubicación
de los primers

Componentes de la PCR



MgCl₂

- Cofactor de la actividad enzimática de la ADN polimerasa
- Estabiliza el complejo replicativo molde-primer-taq pol.
- Su concentración es importante en la especificidad y en la eficiencia de la PCR

dNTPs

- Deben utilizarse en concentraciones equivalentes (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
- Se requiere colocar un exceso de dNTPs pero a una concentración menor de 50mM.

Taq ADN Polimerasa

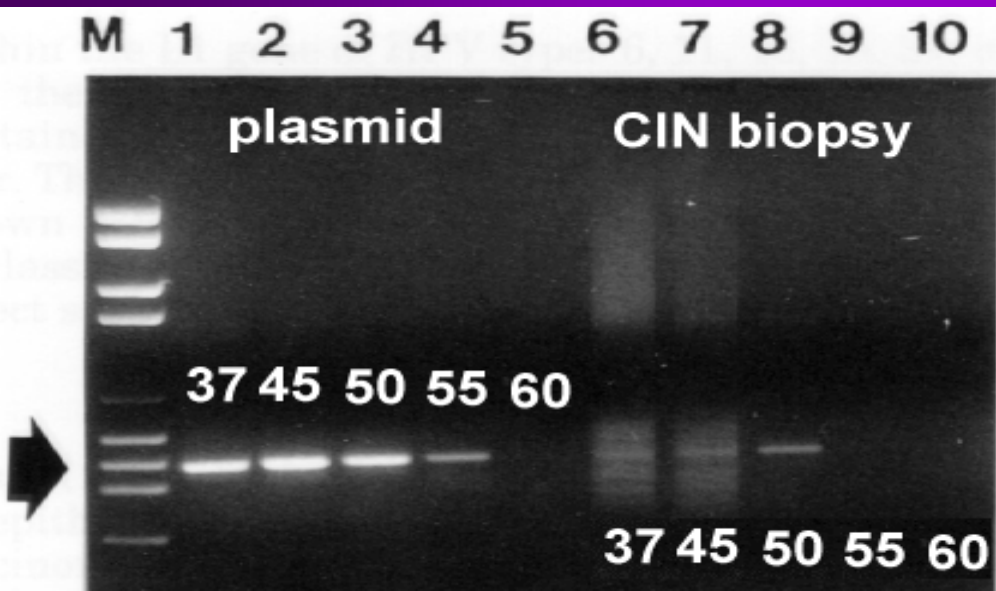
- Enzima termoestable, aislada de T. aquaticus
- Posee una vida media de aprox. 45 min a 95°
- Actividad optima a 74°C temperatura a la cual no se forman híbridos indeseados (especificidad)
- Altas concentraciones de Taq. Pol. genera la formación de productos no específicos.
- Bajas concentraciones de Taq. Pol. disminuye el rendimiento o la cantidad de producto amplificado.
- Se recomienda su uso entre 1 y 5 U.

Oligonucleótidos Iniciadores- Primers o Cebadores

- La secuencia del primer debe ser exacta o muy cercana a la secuencia blanco a ser amplificada.
- la secuencia del primer no debe ser homóloga a ninguna otra secuencia presente en la muestra a ser amplificada.
- Los primers diseñados no deben hibridar entre sí, y no deben ser complementarios internamente.
- Ninguno de los oligonucleotidos seleccionados debe comenzar con una **timina** en el ext. 3'.
- Los oligonucleótidos no deben presentar bases consecutivas **C o G** en el ext 3'.
- Se debe mantener un balance en la composición de bases C/G que no exceda el 60%.

TEMPERATURA DE HIBRIDACION

- PROBABLEMENTE LA TEMPERATURA DE HIBRIDACION ES EL FACTOR MÁS CRÍTICO PARA AUMENTAR LA ESPECIFICIDAD DE LA PCR Y DEBE SER OPTIMIZADA EMPÍRICAMENTE.
- SI ES MUY ALTA NO HABRÁ ASOCIACIÓN.
- SI ES MUY BAJA AUMENTA LA ASOCIACIÓN NO ESPECÍFICA.



Efecto de la Temperatura de Hibridación en la especificidad y en la eficiencia de la amplificación del VPH-16
(Williamson and Rybicki, 1991: J Med Virol 33: 165-171).

Pasos en la PCR

1. Extracción de ácidos nucleicos
2. Síntesis de ADNc (ARN)
3. PCR: primera ronda y segunda ronda
4. Corrida electroforética (gel de agarosa)

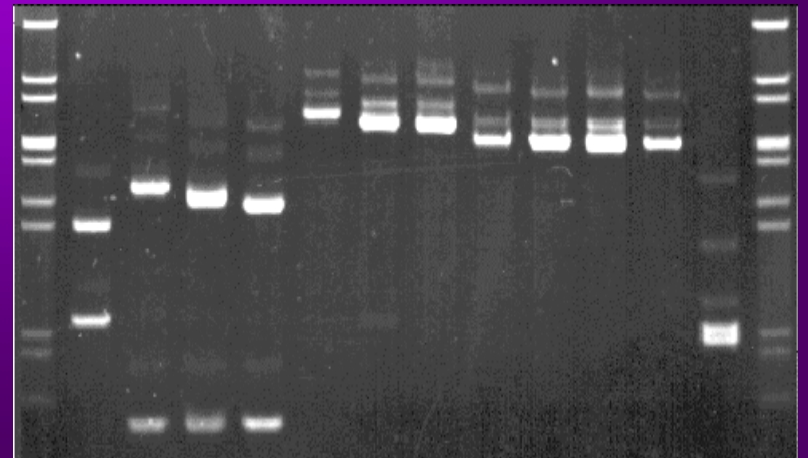
ELECTROFORESIS

geles de agarosa

Los productos amplificados se visualizan por medio de la fluorescencia de compuestos

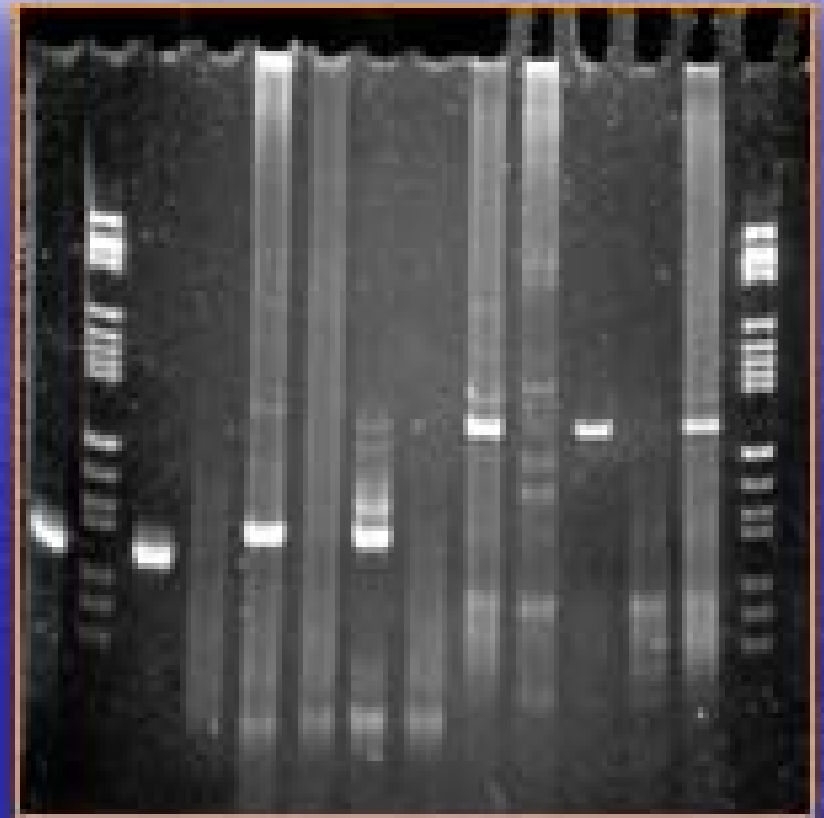
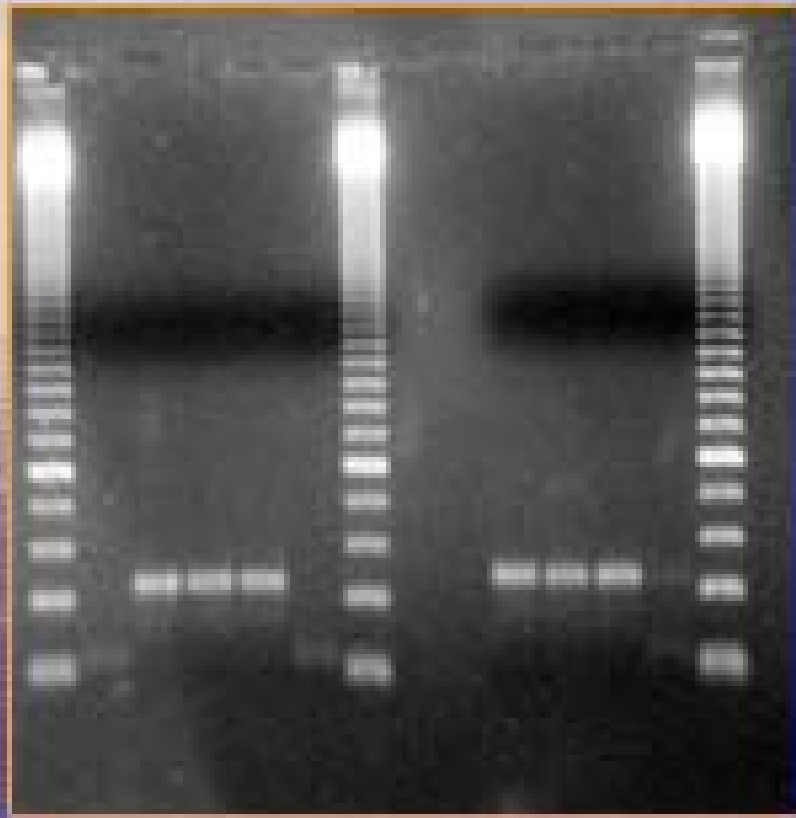
El Bromuro de Etidio es un agente intercalante que se introduce entre las bases apiladas del AND y abre un poco la doble hélice. Su fluorescencia aumenta cuando se une al AND (color naranja al iluminarlo con UV).

Debe manejarse con precaución debido a su caracter mutagénico

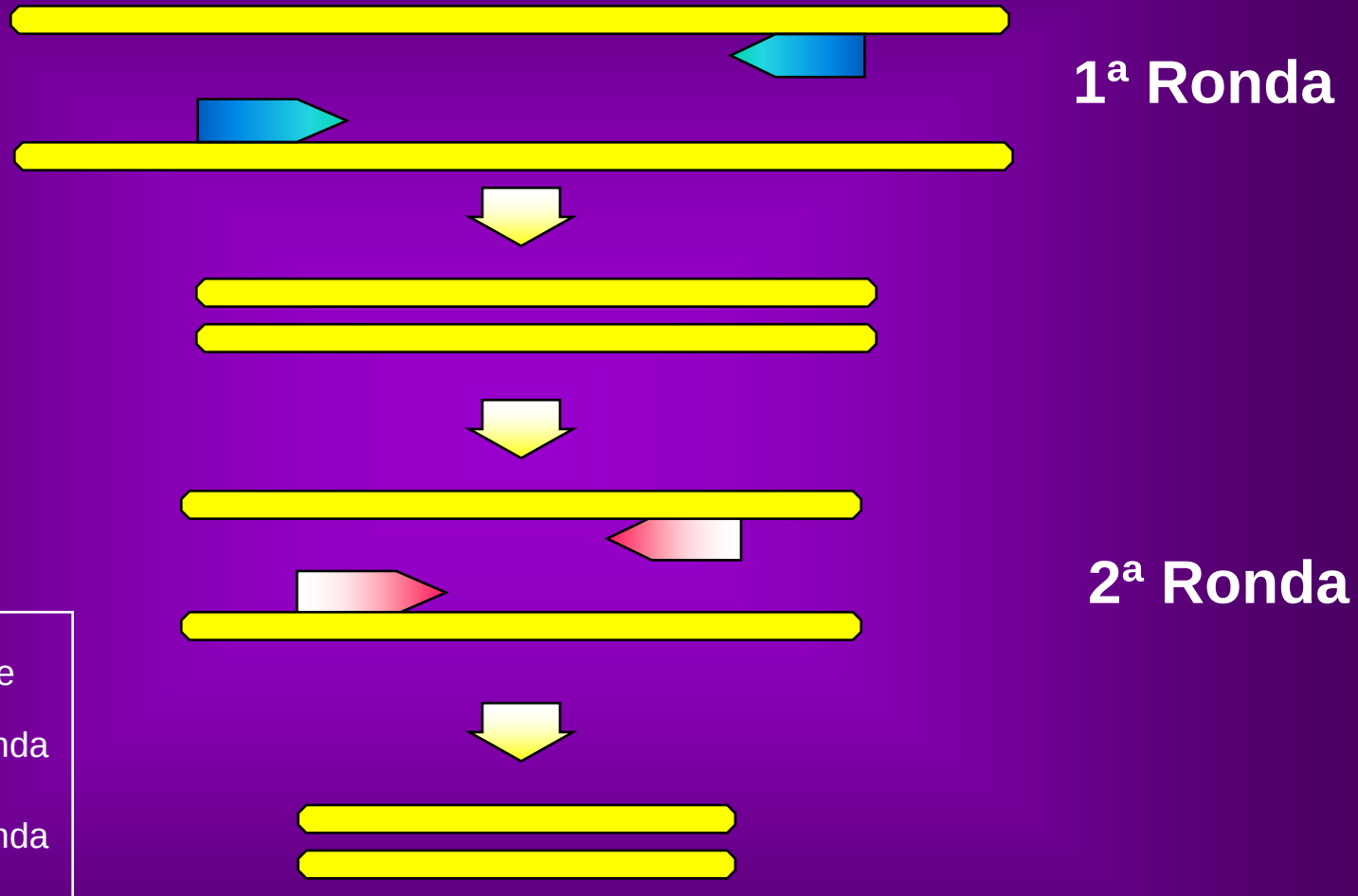


ENTEROVIRUS

Electrophoresis



nested PCR



Aumenta la especificidad y sensibilidad

PCR:



- Desnaturalización 94°C x 5'

- Desnaturalización 94°C x 30''

- Hibridación 55°C x 30''

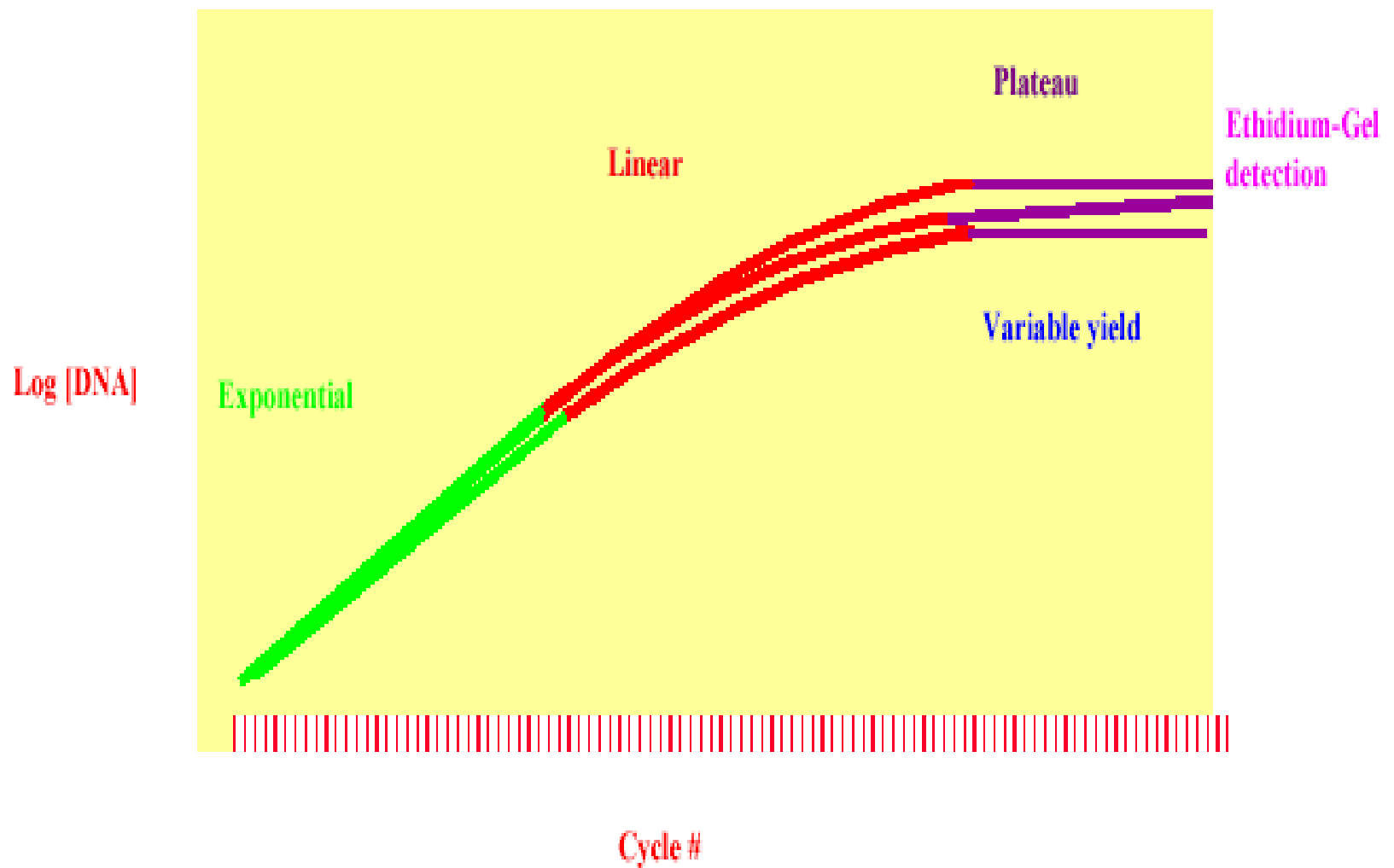
- Extensión 72°C x 45''

30x

- Extensión final 72°C x 7'



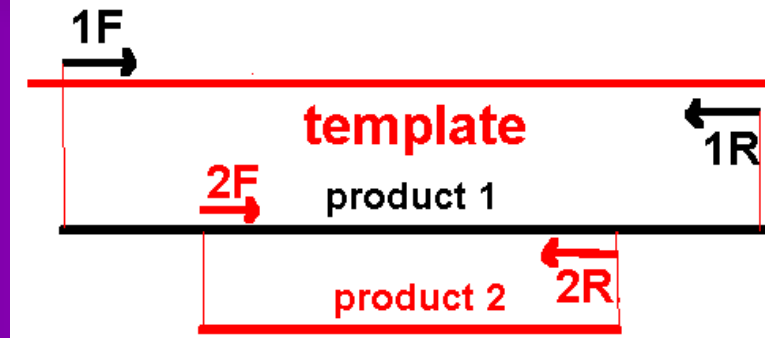
Figure 3: PCR Phases



Amplificación por Nested PCR de *Chicken anaemia virus*

(Soiné C, Watson SK, Rybicki EP, Lucio B, Nordgren RM, Parrish CR, Schat KA (1993) Avian Dis 37: 467-476).

NESTED PRIMER PCR:



EXITO DE LA PCR

ESPECIFICIDAD

Secuencia de los cebadores
Temp. hibridacion

EFICIENCIA

Conc. Mg^{2+} (1-4 mM)
Temp. hibridacion

FIDELIDAD

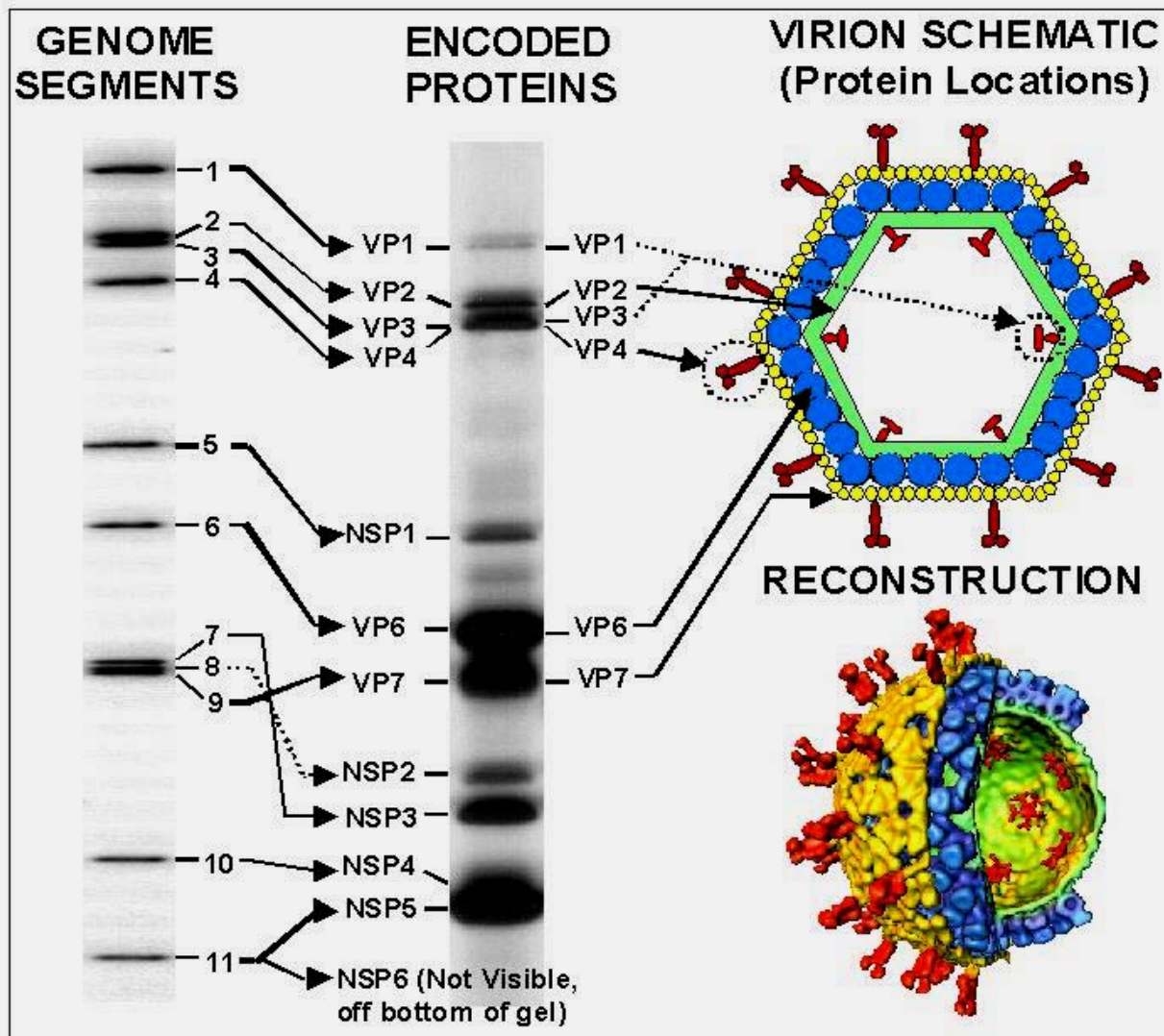
Capacidad de copiar
secuenciase con precision
Depende de la enzima
Taq

Limitaciones del Punto final del PCR

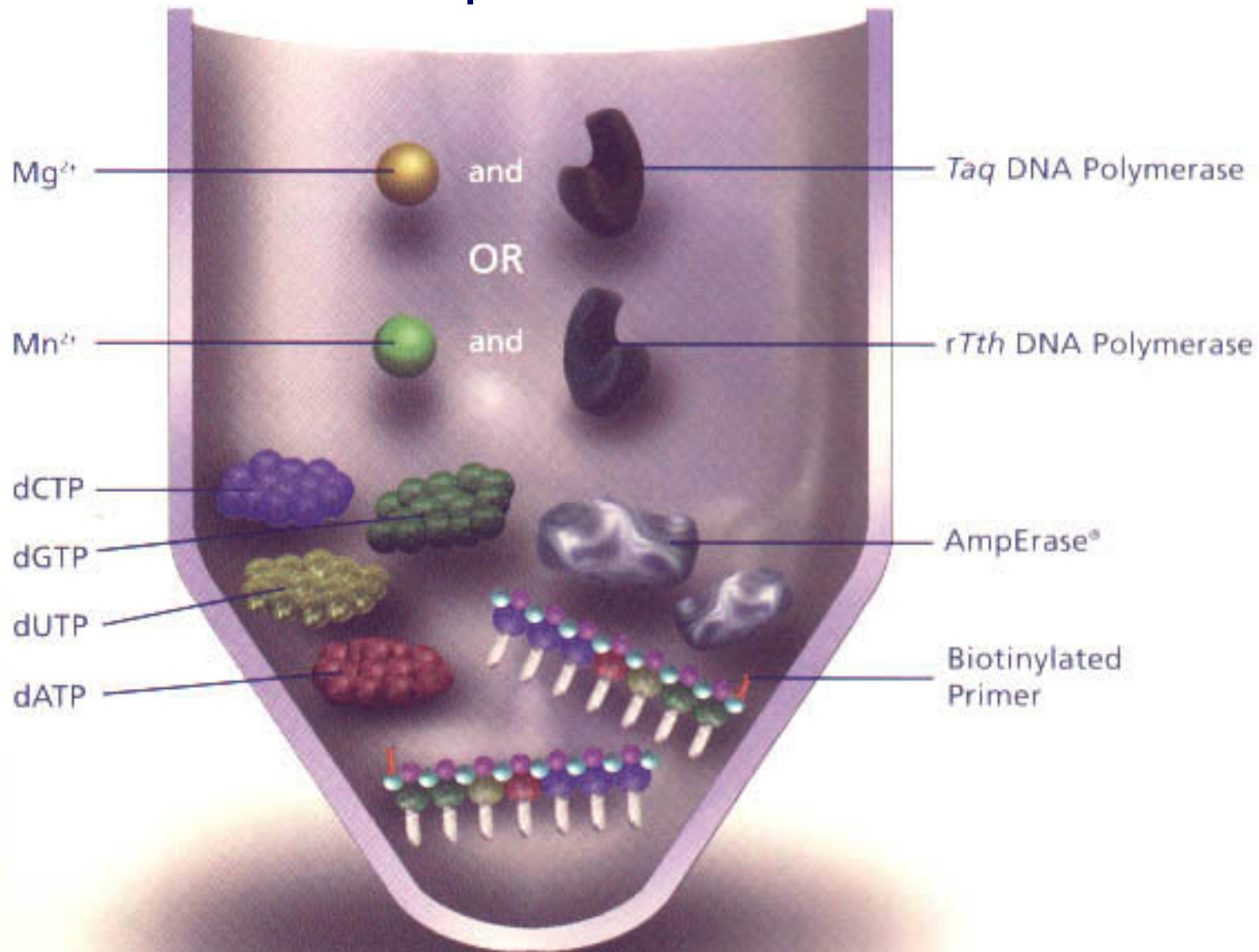
- Pobre Precisión
- Baja Sensibilidad
- Corto rango Dinámico $< 2 \log$
- Baja Resolución
- Es no Automatizado
- Discrimina solo tamaño
- Los resultados no son expresados en número
- Procesamiento Post PCR

PCR MÚLTIPLEX

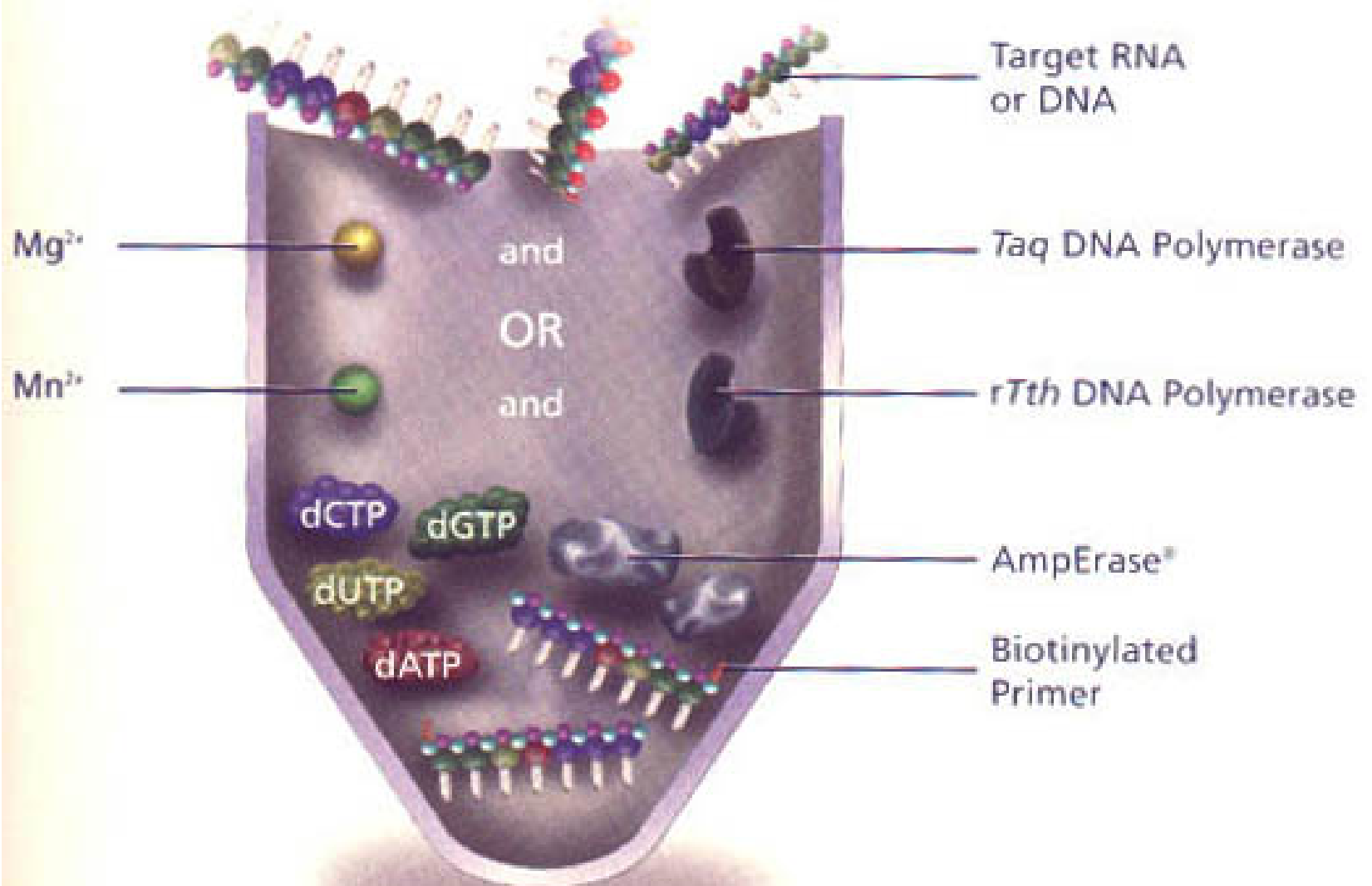
- Basado en una amplificación de diferentes tipos genómicos mediante cebadores tipo específicos.
- Nested-PCR.
- Uso de cebador “sense” común y cebadores “antisense” tipo específicos.
- Ejemplo: - Determinación de los 4 serotipos de virus dengue (Lancioti y col., 1992).
 - VPH (tipos 16, 18, 31, 33, 35, etc.)(Hubbard, RA. Arch of Pathol and Lab Med., 127(8): 940-945.



Método de Amplicor Roche

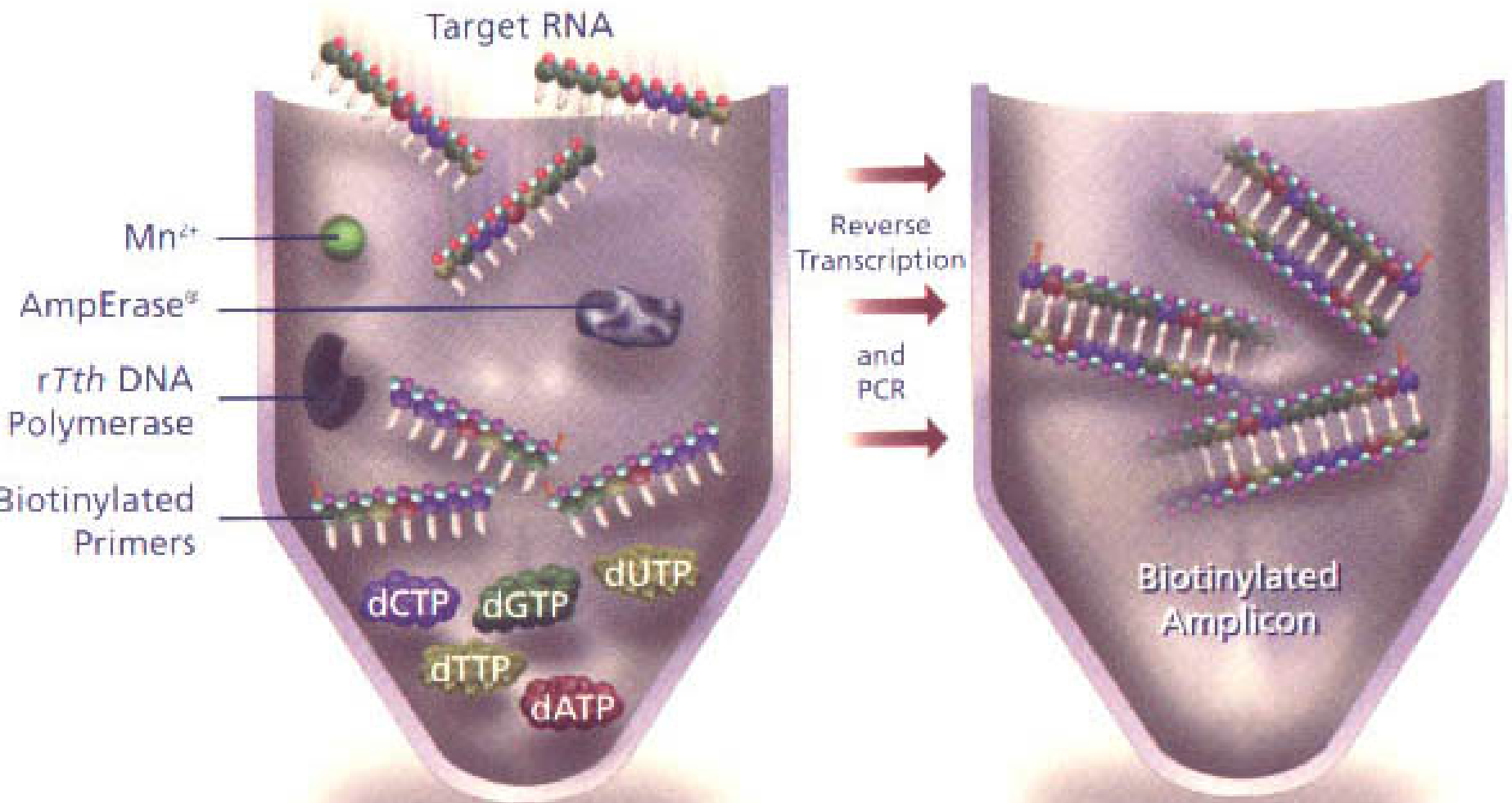


Paso 1 Mezcla de Componentes

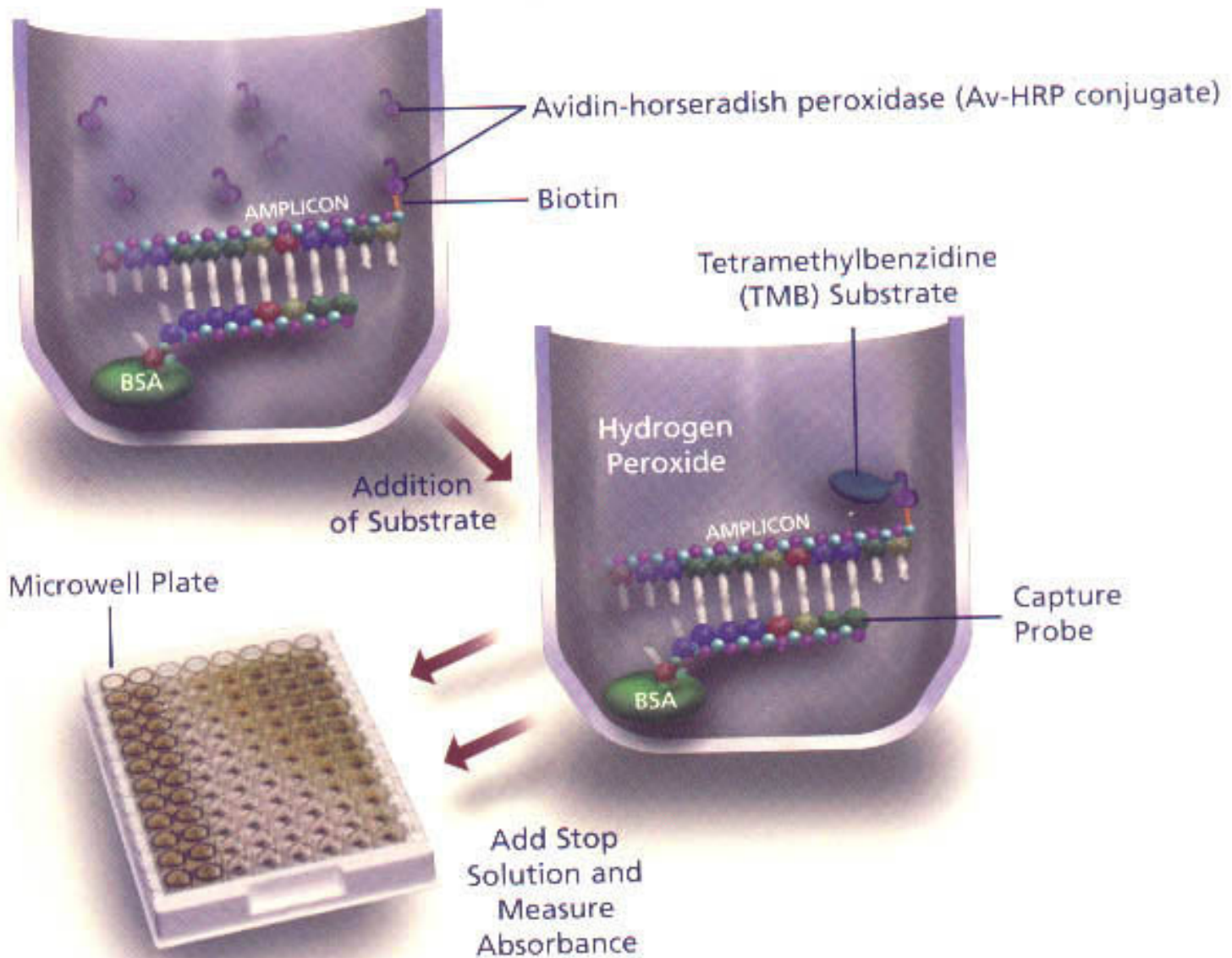


Paso 2 Amplificación por PCR de secuencias Blancas

Método de Amplicor Roche



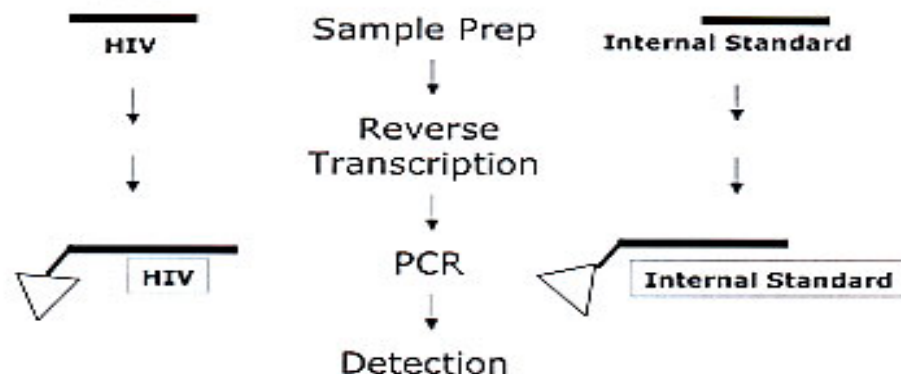
Paso 3 PCR con transcripción reversa



Paso 4 unión del conjugado adición del sustrato y medida de la absorbancia

PROTOCOLO LCX RNA HIV-1

La sonda "DIANA" y el Estándar Interno son, Extraídos,
Amplificados Y Detectados en forma simultanea
Los mismos "Primers" amplifican el "DIANA" y el Control
Interno



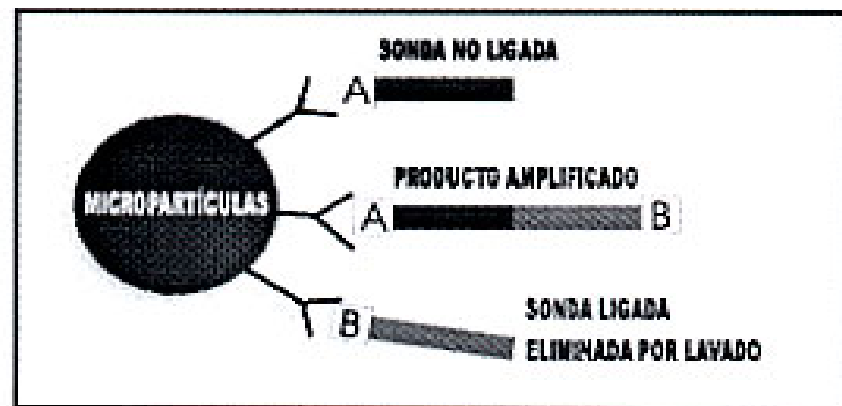
Internal Standard and Target RNA go through sample preparation, amplification and detection together. IS and Target sequences have identical primer binding sites but unique probe binding sites. Differently labeled probes allow dual detection within the same LCx Analyzer sample well.

PROTOCOLO LCX RNA HIV-1

Detección del Producto Amplificado

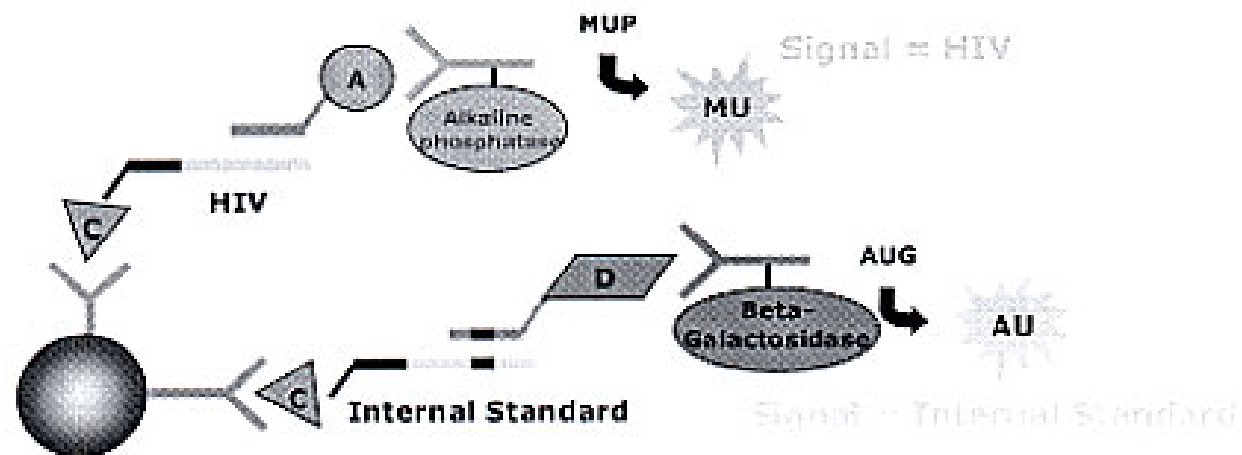
Procedimiento

1. El producto amplificado es capturado por las micropartículas marcadas con anticuerpos específicos contra el hapteno de las sondas



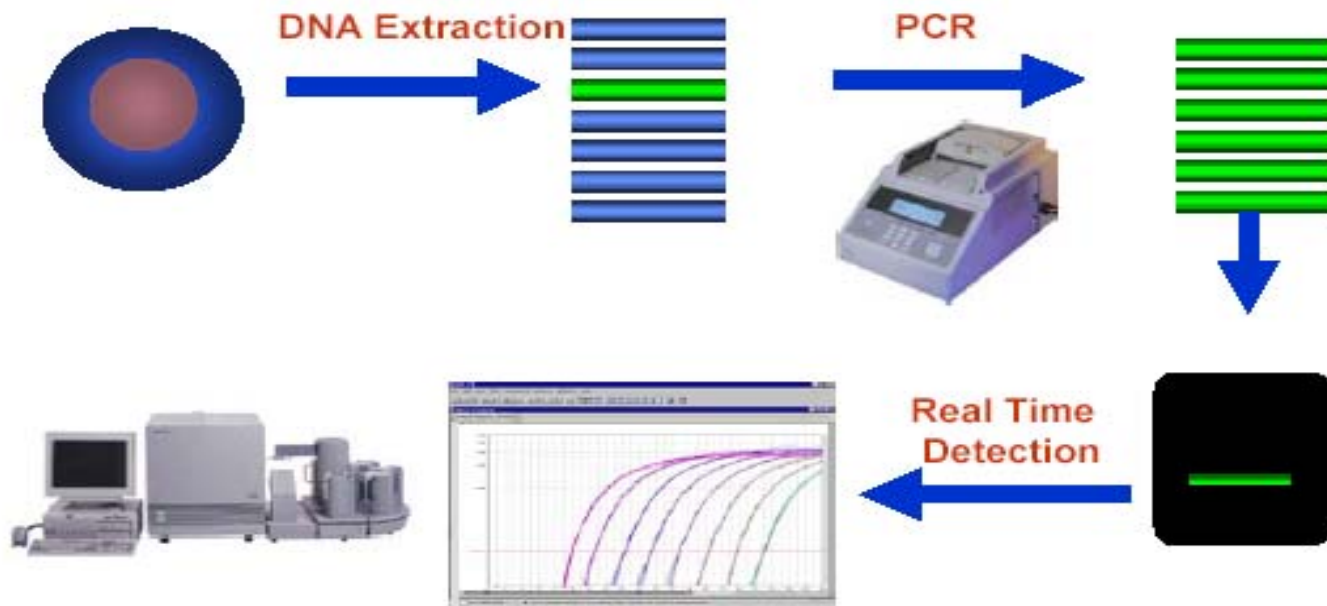
PROTOCOLO LCX RNA HIV-1

Detección del Producto Amplificado



Tiempo Real PCR

- Se basa en la cuantificación de ADN mediante la detección y cuantificación de una señal fluorescente, la cual se incrementa en proporción directa a la cantidad de amplicones producidos en cada ciclo de PCR (en tiempo real) (Higuchi, 1993; Raeymaekers, 2000).



- Mediante la cuantificación de la señal fluorescente en cada ciclo es posible monitorear la PCR durante la fase exponencial donde el primer incremento significativo del producto de PCR se correlaciona a la cantidad inicial de templado (Livak, 1995).

Figure 4: PCR Phases in Log view

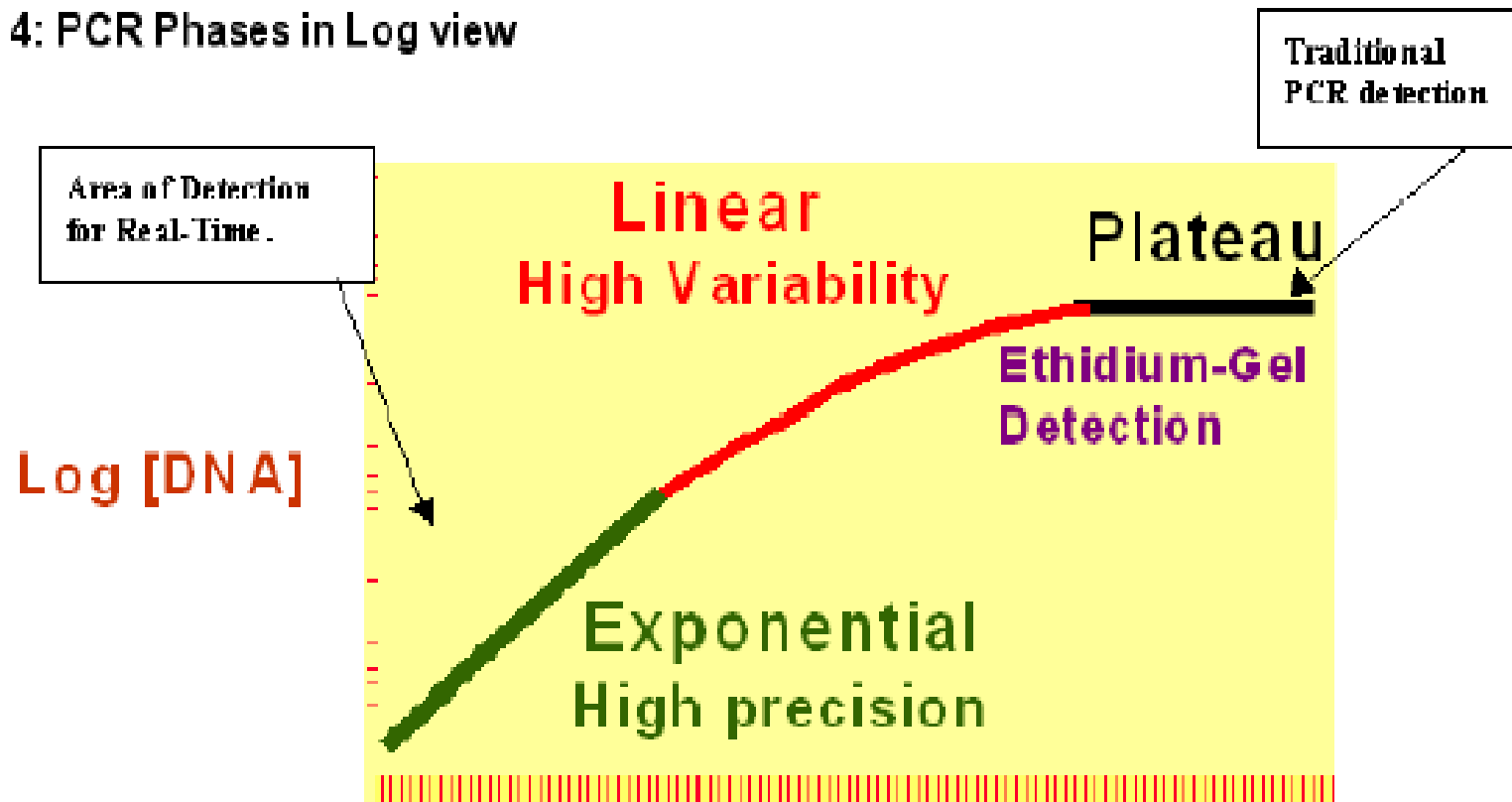
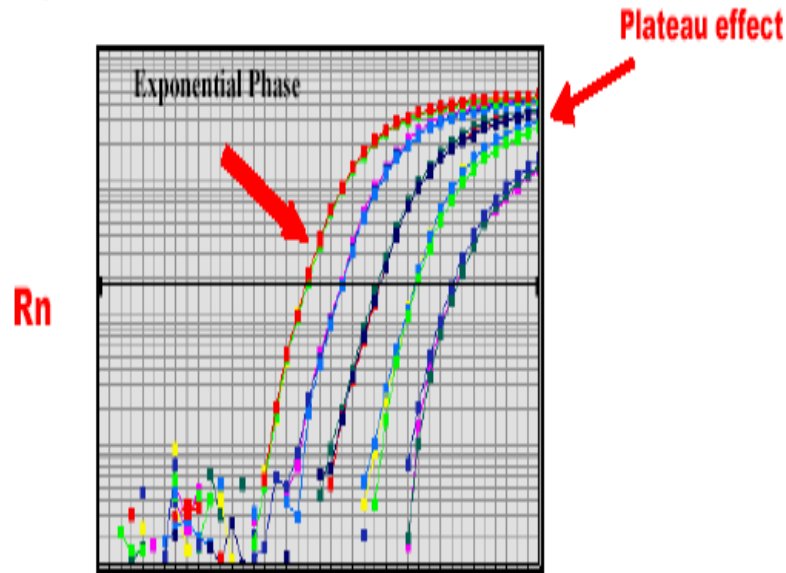


Figure 8: Log view 5-fold dilution series



R_n : Señal normalizada del reportero = $\frac{[\text{señal del reportero}]}{[\text{señal de ref}]}$

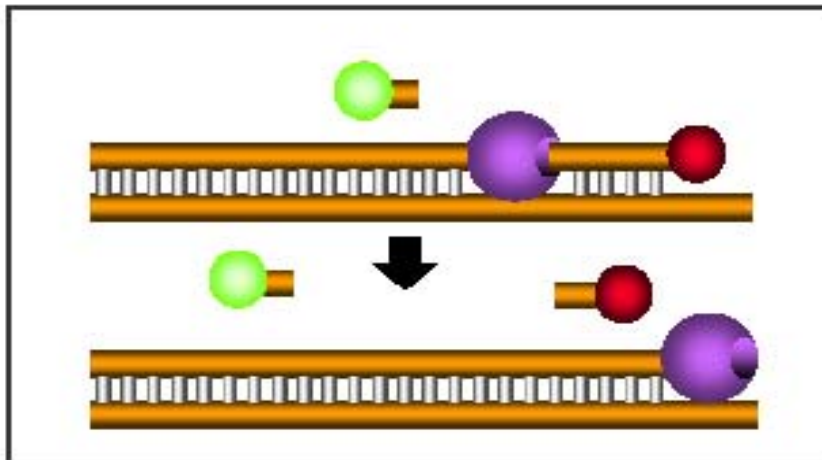
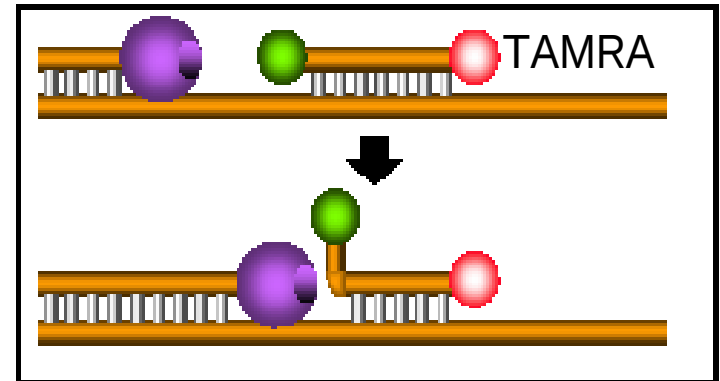


Figure 13: Polymerase collides with TaqMan® Probe



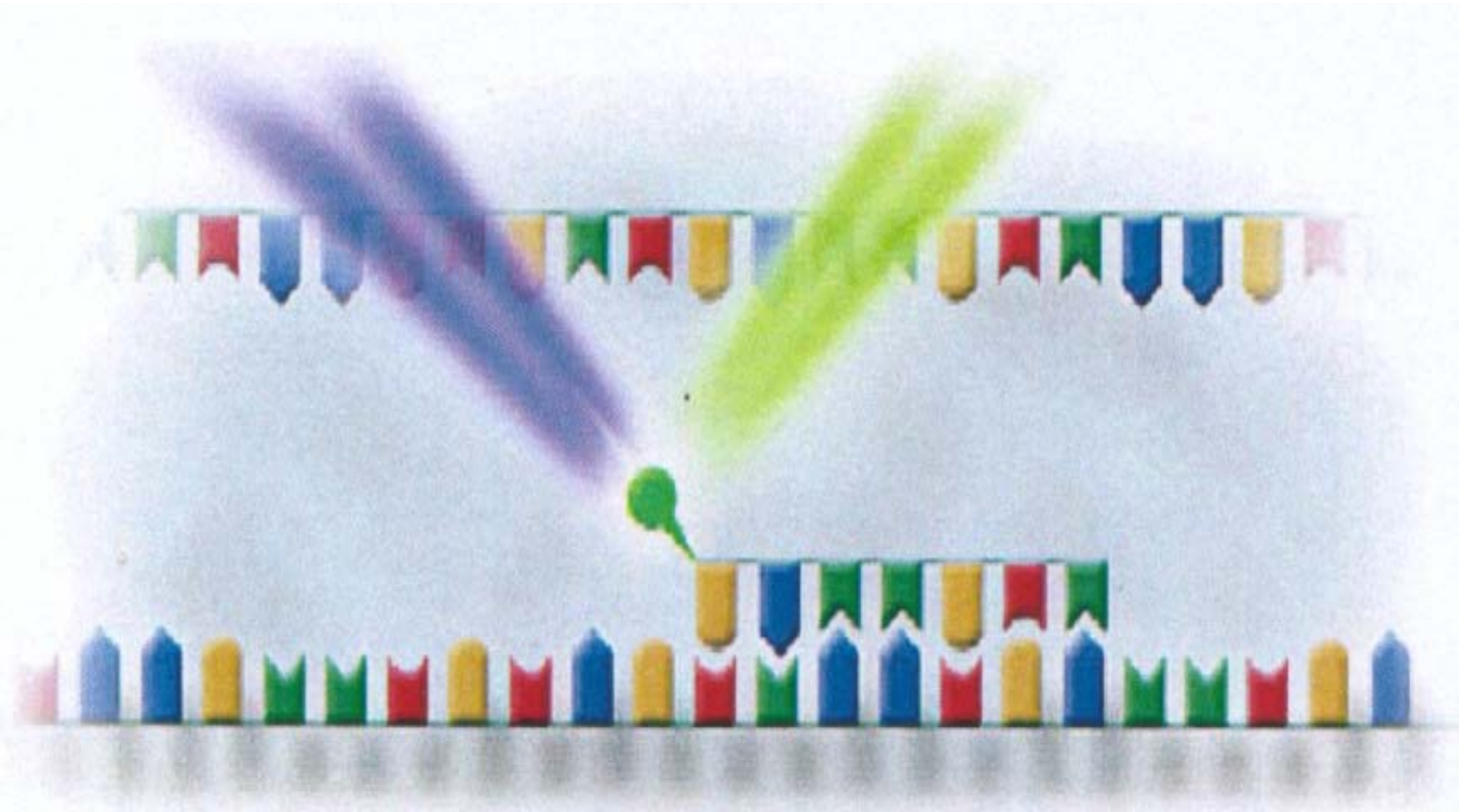
FRET: Transferencia de energía resonante fluorescente

Figure 14: Cleavage of the TaqMan® Probe

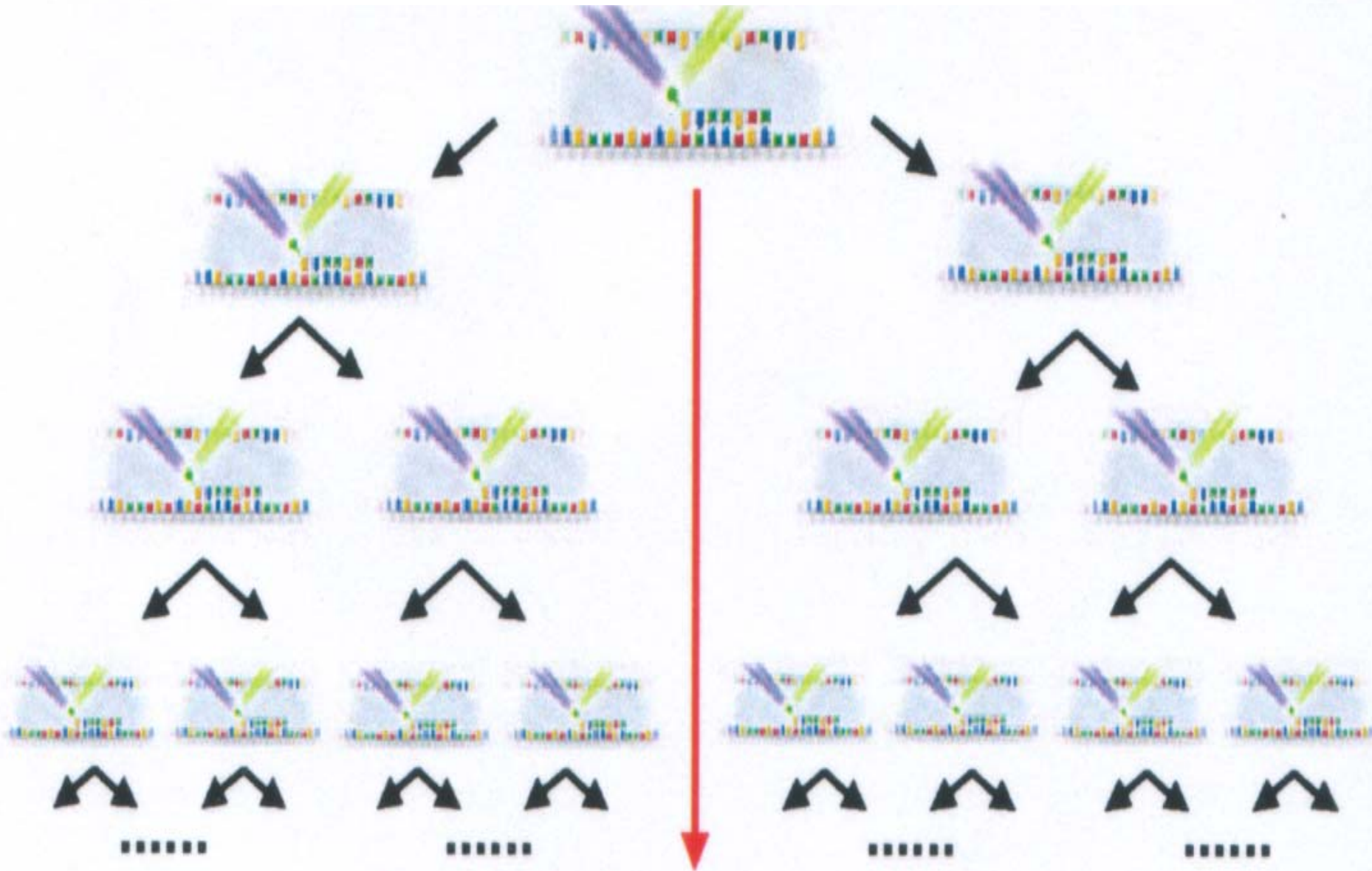
La emisión de luz fluorescente es proporcional a la tasa de sonda clivada.

No puede haber G en el extremo 5'

Detección por oligonucleótidos fluorescentes



Proceso de amplificación.



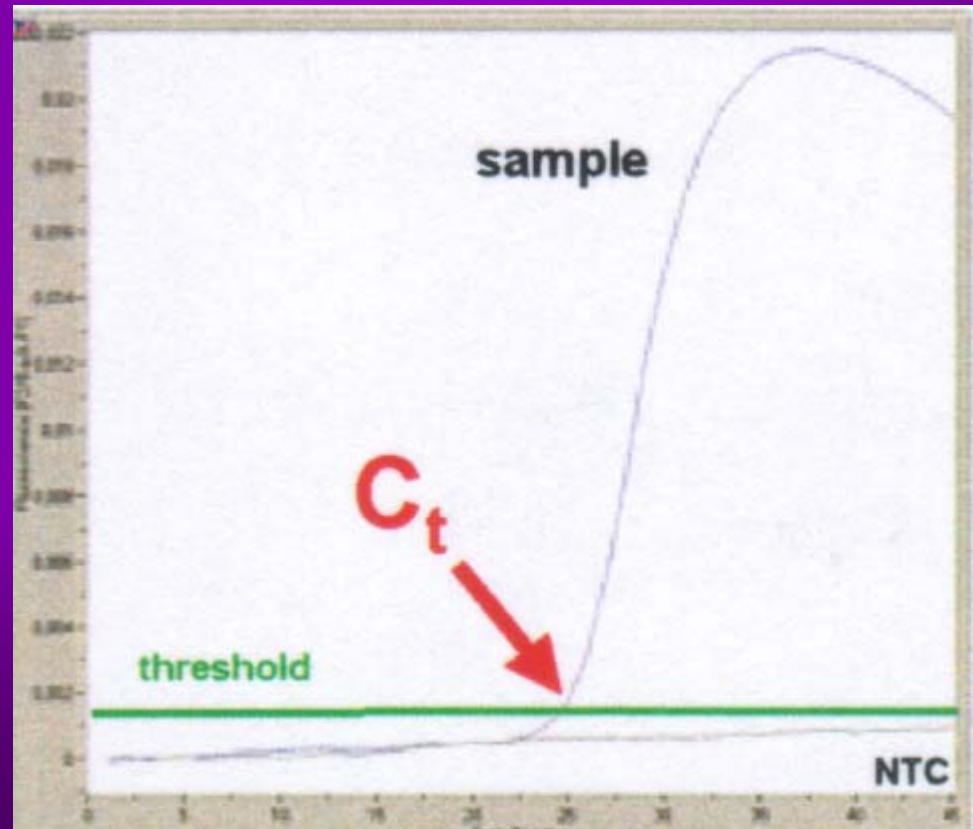
Incremento de la intensidad de la fluorescencia

Categorías de los Formatos de detección

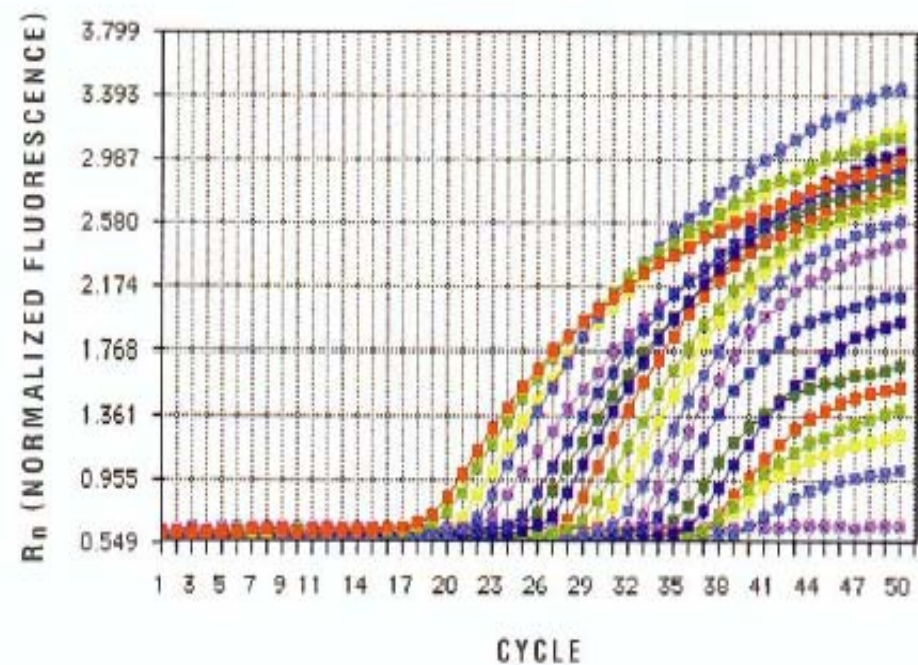
- Detección de **secuencias inespecíficas** usando agentes intercalantes (SYBR Green)
- Sondas **secuencias específicas**.
 - ✓ Hydrolysis probes
 - ✓ Hairpin probes (Molecular beacons)
 - ✓ Hybridization probes

Sistemas de monitoreo de la amplificación de ADN en PCR EN TIEMPO REAL

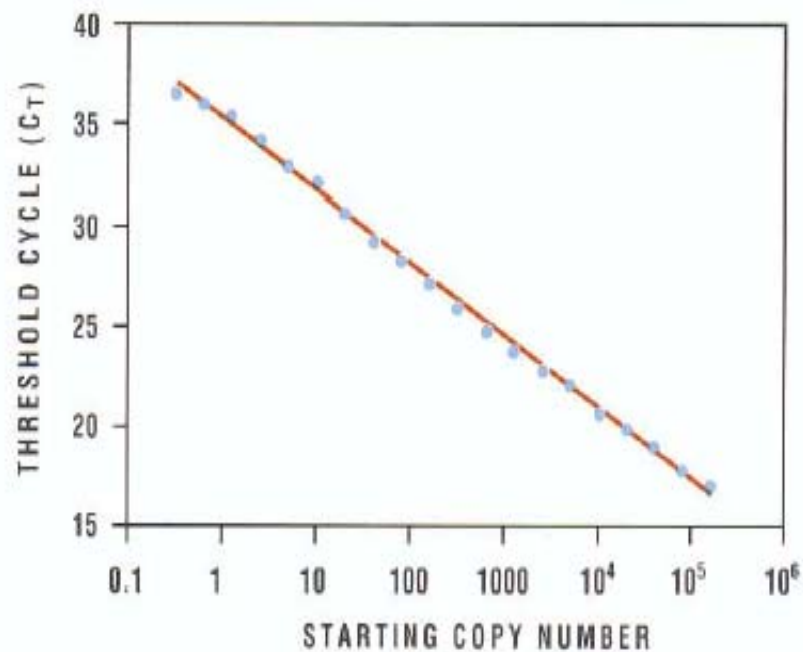
Ct (umbral de ciclos): N° de ciclos al cual la emisión de fluorescencia excede el umbral fijado.

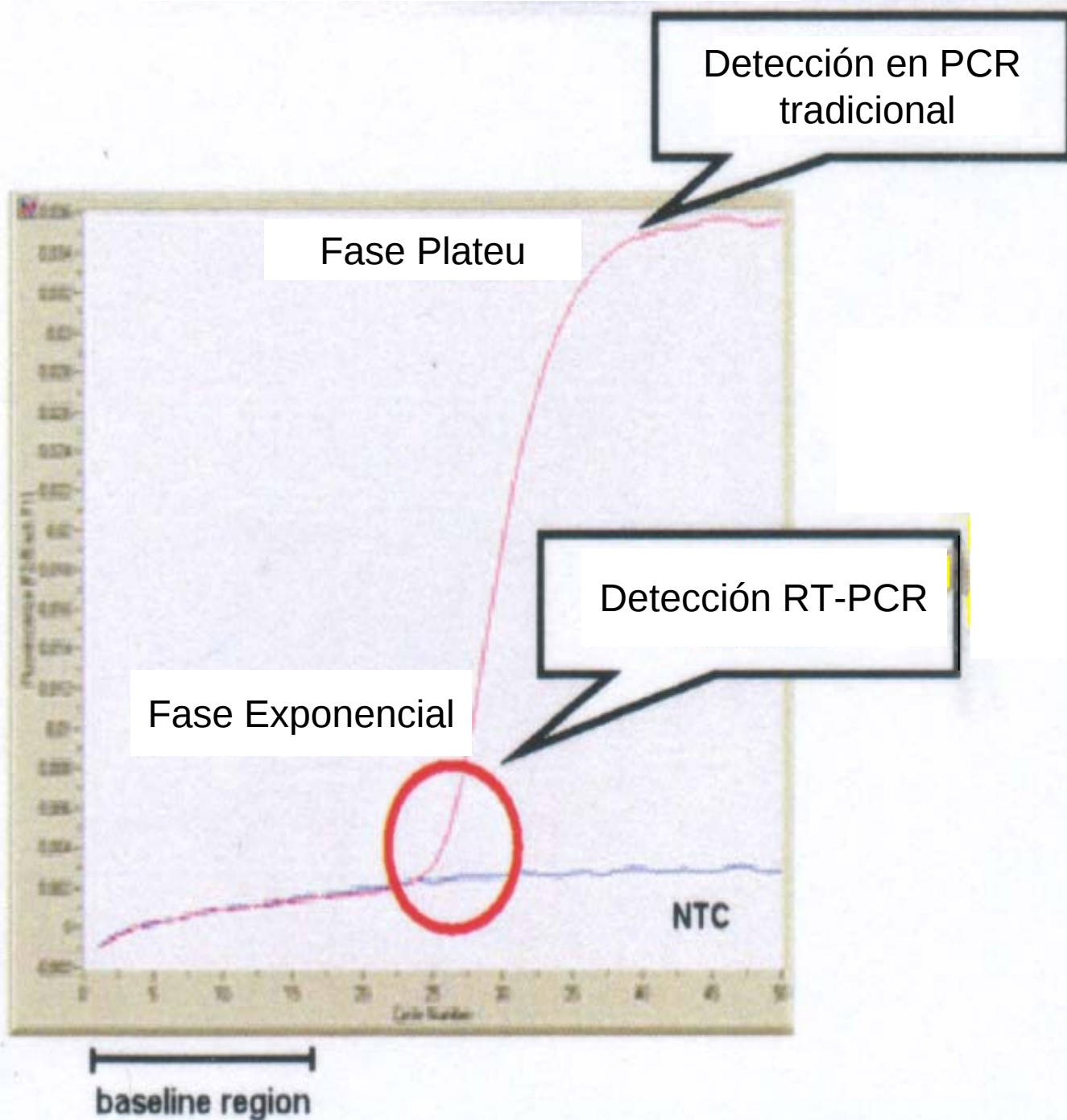


AMPLIFICATION PLOT



STANDARD CURVE





Aplicaciones del Tiempo Real PCR

1. Cuantificación Viral.
2. Cuantificación de expresión de genes.
3. Eficacia en la terapia de drogas.
4. Medida del ADN dañado
5. Control de Calidad y validación de ensayos.
6. Detección de patógenos.
7. Identificación de marcadores que puedan predecir sobrevivencia de pacientes con transplante de órganos
8. Recurrencia de cánceres hematológicos.
9. Fenómenos Inmunológicos.

Ventajas del Tiempo Real PCR

- Mayor especificidad, reproductibilidad y sensibilidad en la cuantificación del templado.
- Colecta los datos en la fase exponencial.
- El incremento en la señal de fluorescencia es directamente proporcional al número de amplicones generados.
- Incremento dinámico en el rango de detección (10^7 veces).
- No necesita procesamiento post PCR.
- Detecta cambios hasta 2 veces.



Mon Dieu...

**¿Podrías
hacer que
me de bién
hoy el PCR?**

Gracias por su atención

