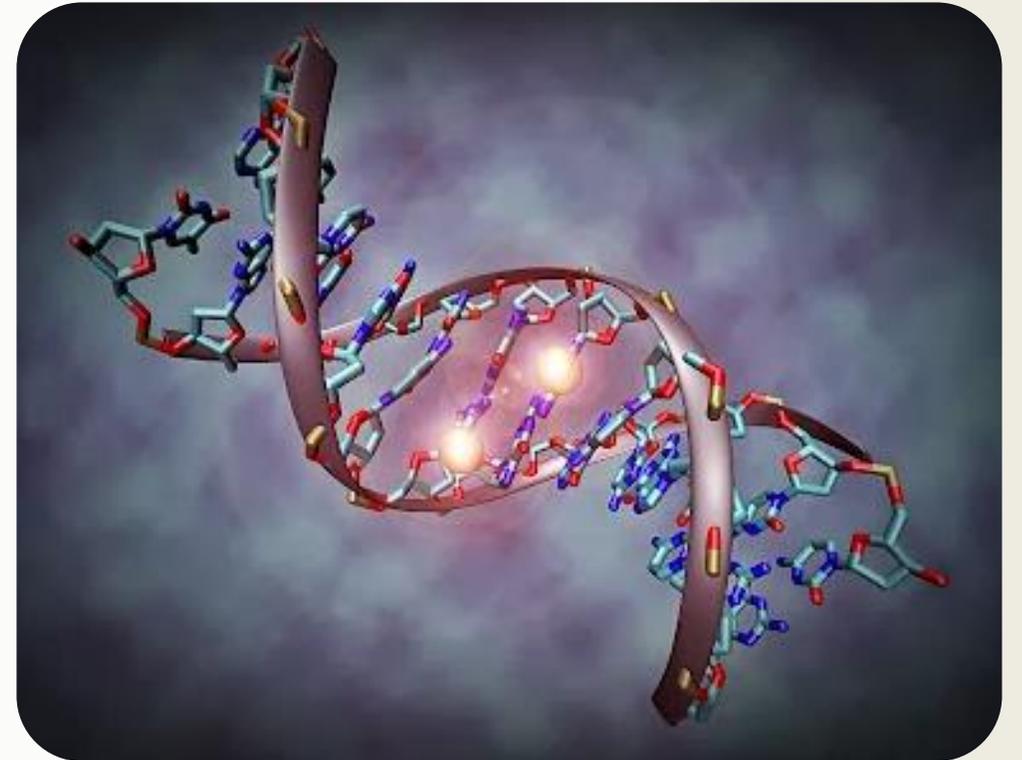


FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ASIGNATURA: GENÉTICA

UNIDAD 1: GENERALIDADES DE LA
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Karina Paredes Páliz PhD.



Unach

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
Libres por la Ciencia y el Saber

Introducción

- Es así como han ido apareciendo diferentes tecnologías cuyos protocolos están dirigidos al estudio del ADN; probablemente, la más importante sea la reacción en cadena de la polimerasa (**PCR**, por sus siglas en inglés), desarrollada por **Kary Mullis** y que revolucionó la biología molecular y la forma en cómo se estudiaban los ácidos nucleicos en ese momento.

Article Left Page Header... **ARTICLE**

A Tribute to Kary Mullis: Nobel Laureate Who Invented the PCR

AMd. Idrish Raja Khan

Department of Aquatic Health Environment, College of Fisheries, Central Agricultural University, Tripura

Kary Mullis (December 28, 1944 – August 7, 2019) was a Nobel Prize-winning American biochemist. In recognition of his invention of the polymerase chain reaction (PCR) technique, he shared the 1993 Nobel Prize in Chemistry with Michael Smith. His invention became a central technique in many biochemistry and molecular biology.



Mullis was born in rural North Carolina in the US. During high school, he developed an interest in science, and went on to study chemistry at the Georgia Institute of Technology, later completing a PhD in biochemistry at the University of California, Berkeley in 1973. In 1985, Kary Mullis invented the process known as polymerase chain reaction (PCR), in which a small amount of DNA can be copied in large quantities over a short period of time. PCR uses an enzyme, a heat-stable DNA polymerase that is cycled through sequences of heating and cooling to amplify DNA, creating millions of copies of a chosen sequence, which can then be used for analysis or experimentation.

Kary Mullis is generally credited with inventing PCR in 1985 while working for Cetus Corporation in Emeryville, California. Mullis' role at Cetus was to synthesise oligonucleotides for groups working on, amongst other things, methods to detect point mutations in human genes. Mullis was hatching an idea to detect the point mutations using Sanger-type DNA sequencing, employing DNA polymerase in the presence of an oligonucleotide primer and ddNTPs. The problem was that sequencing a single copy gene within the expanses of the human genome was impossible; the primer would bind in too many places. What he needed was a way to increase the concentration of the specific gene of interest.

While driving his Honda Civic on Highway, Mullis made an intellectual leap. He reasoned that by using two opposed primers, one complementary to the upper strand and the other to the lower, then performing multiple cycles of denaturation, annealing and polymerization he could exponentially amplify the piece of DNA between the primers.

The idea of PCR was born, but the technique was still very much in its infancy. The *E. coli* DNA polymerase used in the early days was destroyed during the denaturation step so had to be replenished after every cycle. Cetus workers quickly developed the first thermal cycler named "Mr Cycle", which automatically added new polymerase after each heating step.

In 1985, Mullis came up with the idea of using polymerase isolated from the extremophilic bacterium *Thermophilus aquaticus*. The polymerase, known as Taq polymerase, has optimal activity at 72°C and can withstand the 94°C required for denaturation of the DNA, meaning that many reaction cycles could be performed without being replenishing the enzyme. However, both *Science* and *Nature* rejected the resulting manuscript, which was ultimately published in *Methods in Enzymology* in 1987.

This breakthrough, together with advances in oligonucleotide synthesis made PCR both cost effective and convenient and it quickly entered mainstream research. It was hailed as one of the most important scientific inventions of the 20th century as it was a discovery that enabled scientists to make innovative applications and research.

idrish.raja.khan@gmail.com

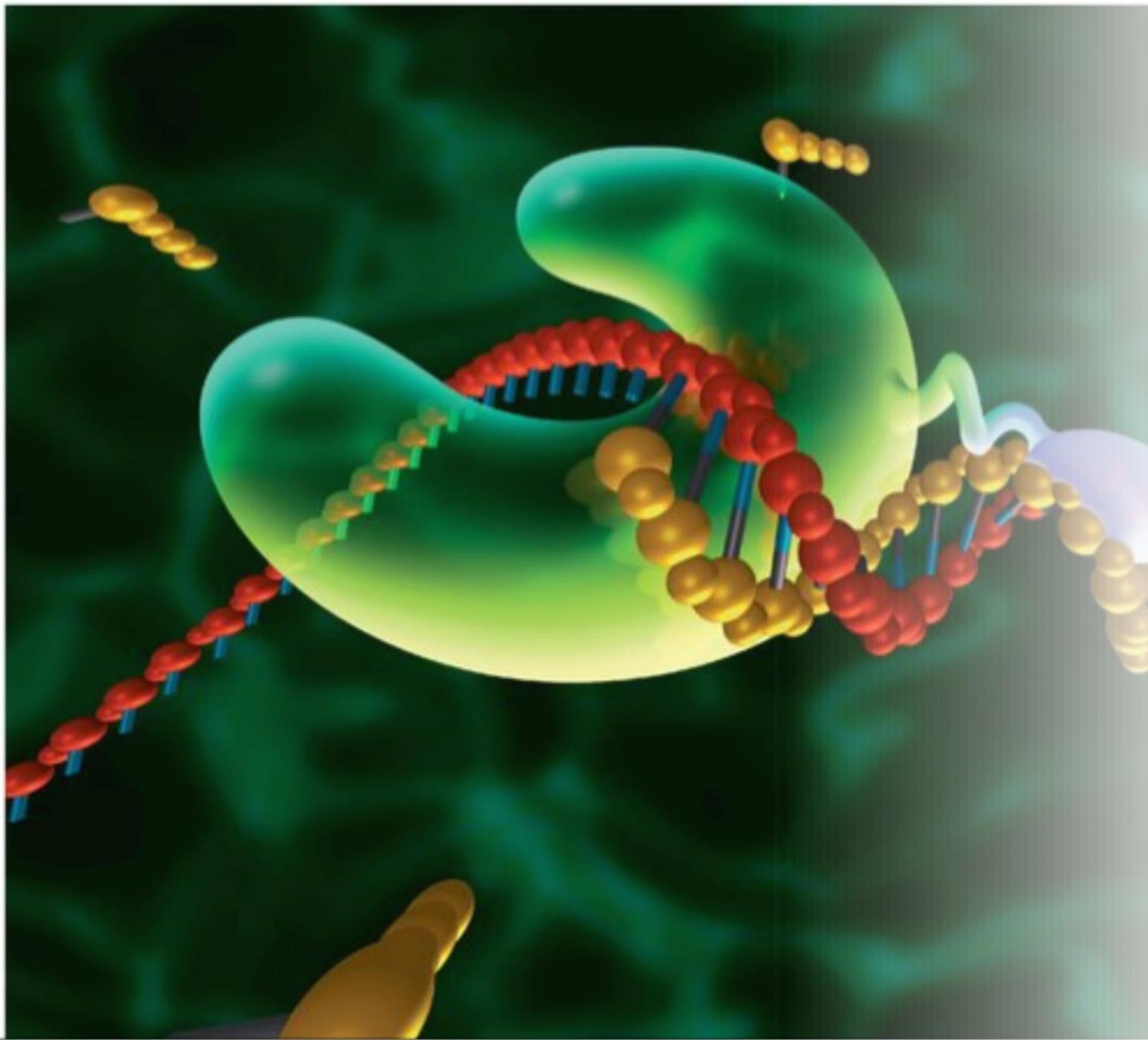
Read and Advertise in

Aqua International
National English Monthly Magazine

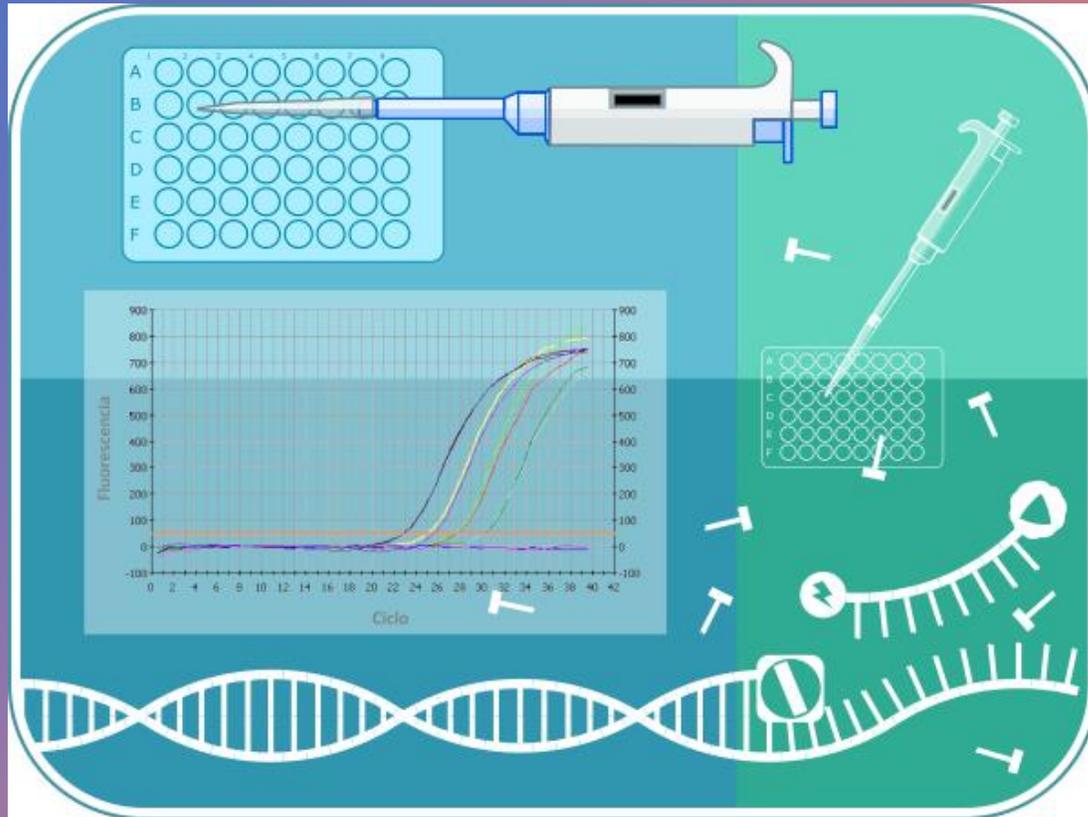
Annual Subscription Cost: Rs. 800

To subscribe, Contact:

NRS Publications
BG-4, Venkataramana Apartments,
11-4-634, A.C. Guards,
Hyderabad - 500 004, Telangana, India.
Tel: 040-2330 3989 • Mobile: 96666 89554
Email: info@aquainternational.in



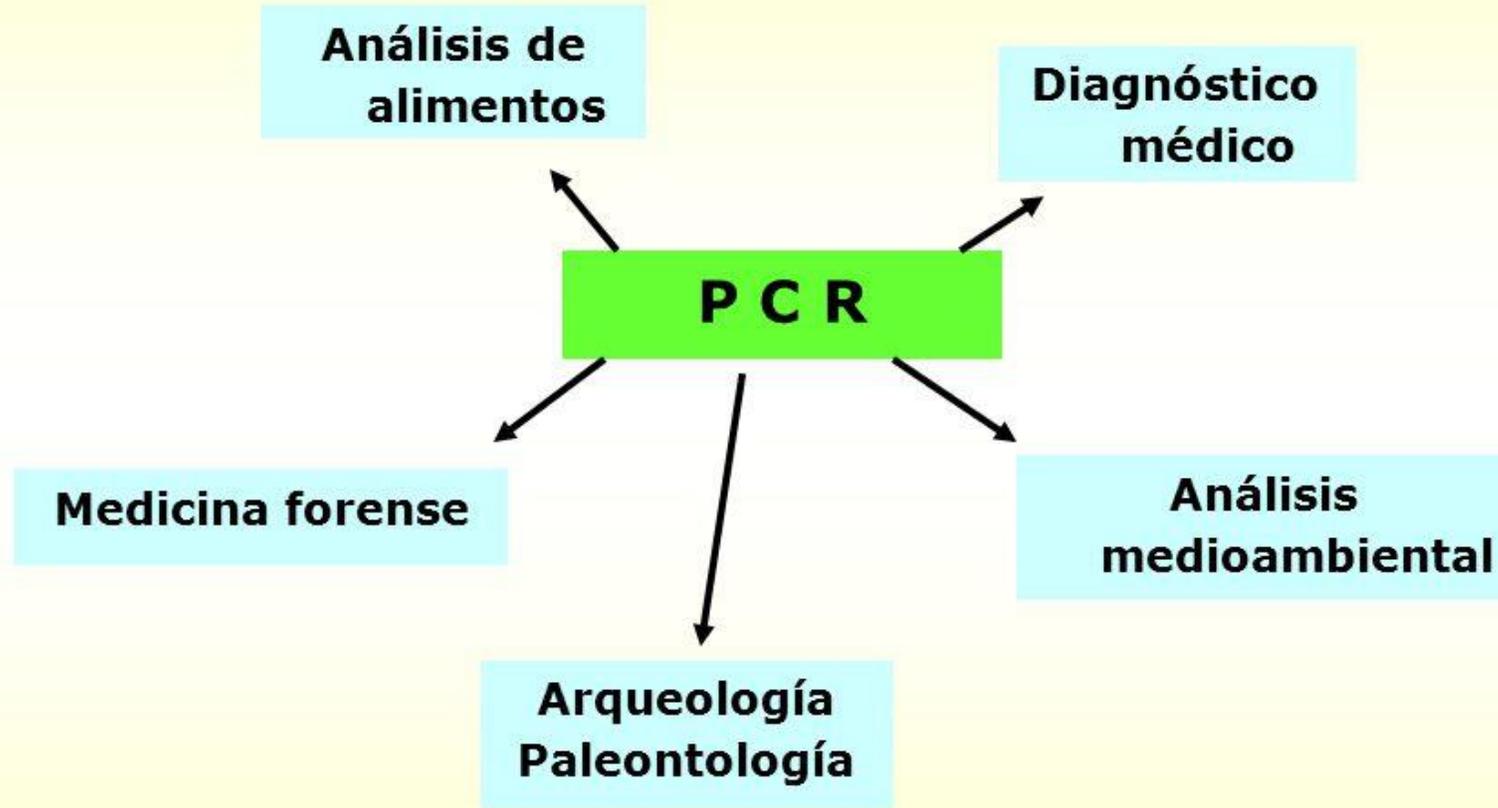
- Actualmente sabemos que la misión de la PCR es **copiar millones** de veces una secuencia específica de ADN blanco mediante una poderosa catálisis llevada a cabo por una enzima conocida como **ADN polimerasa**, de tal manera que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas fielmente para analizarse con diferentes fines.

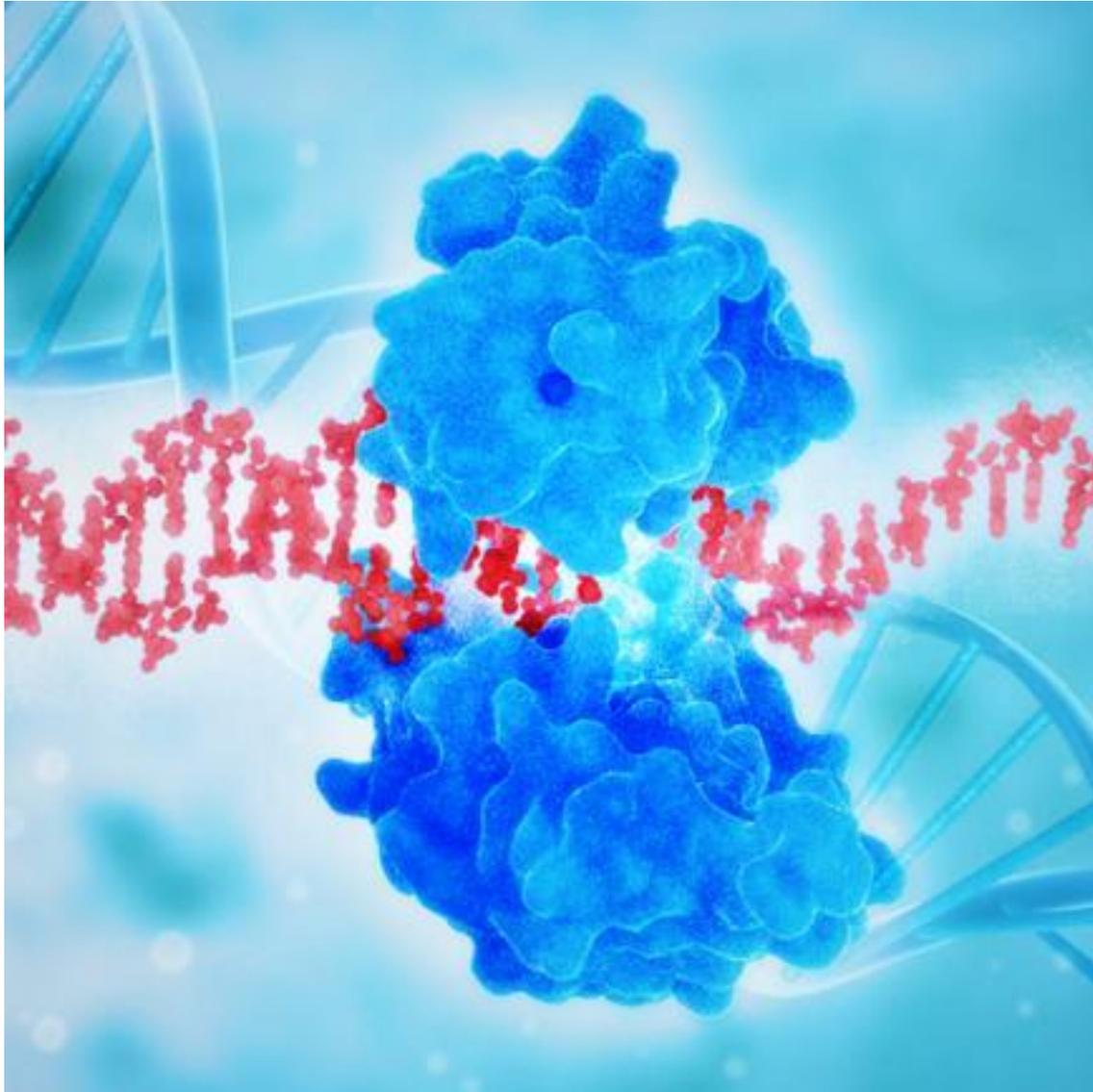


- El desarrollo de esta técnica permitió estudiar y manipular mejor al ADN, facilitando el establecimiento de protocolos experimentales en biología molecular.

- El progreso de esta técnica ha sido muy notable y ha ido en paralelo con los nuevos retos para estudiar y comprender mejor el rol de los genes, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Es por ello que una de las formas recientes para detectar y cuantificar a los ácidos nucleicos es a través de la **PCR en tiempo real**, la cual es una modalidad de la PCR considerada como una técnica **cuantitativa**.

Aplicaciones de la PCR

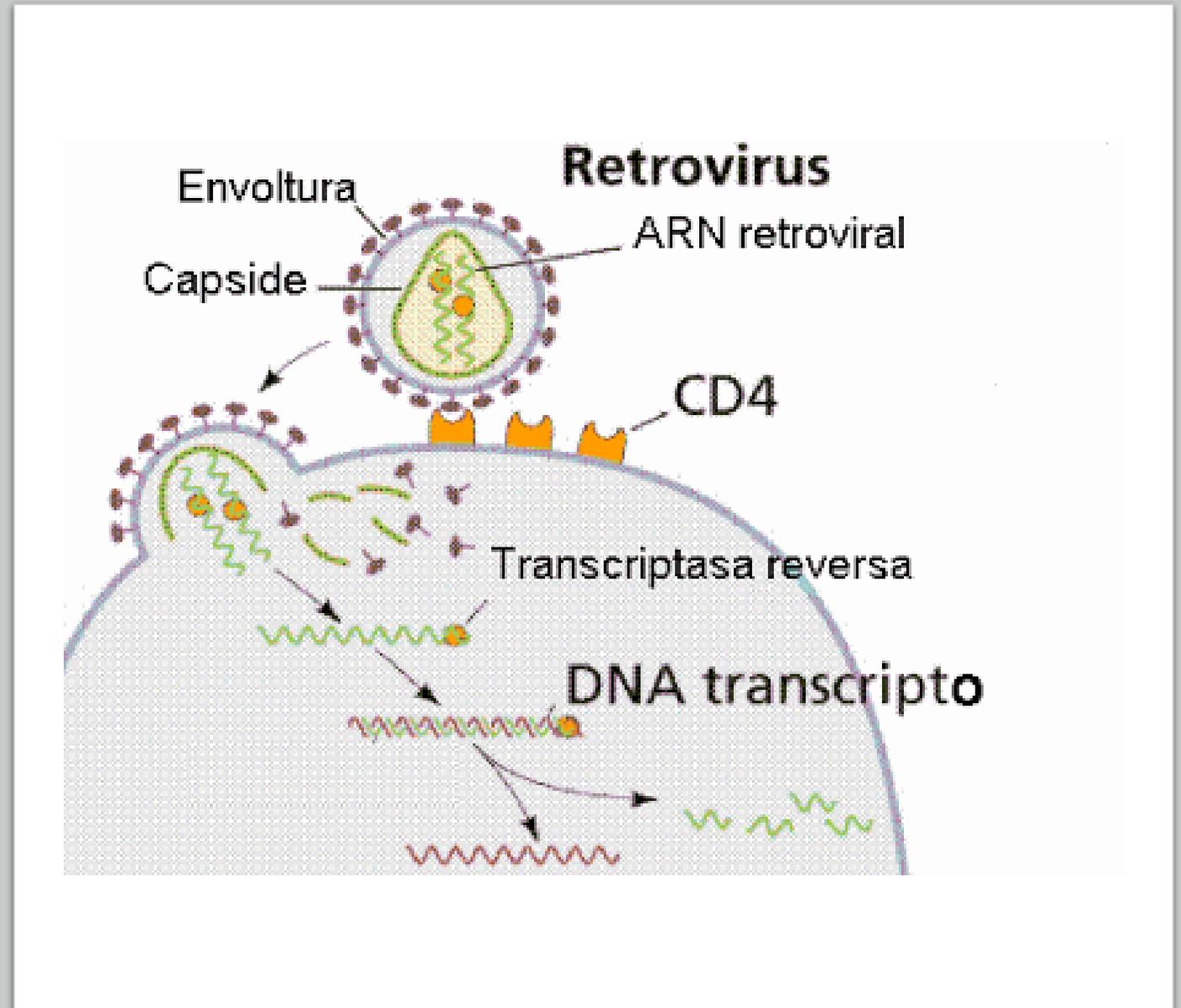




FUNDAMENTOS: QUÉ ES LA PCR?

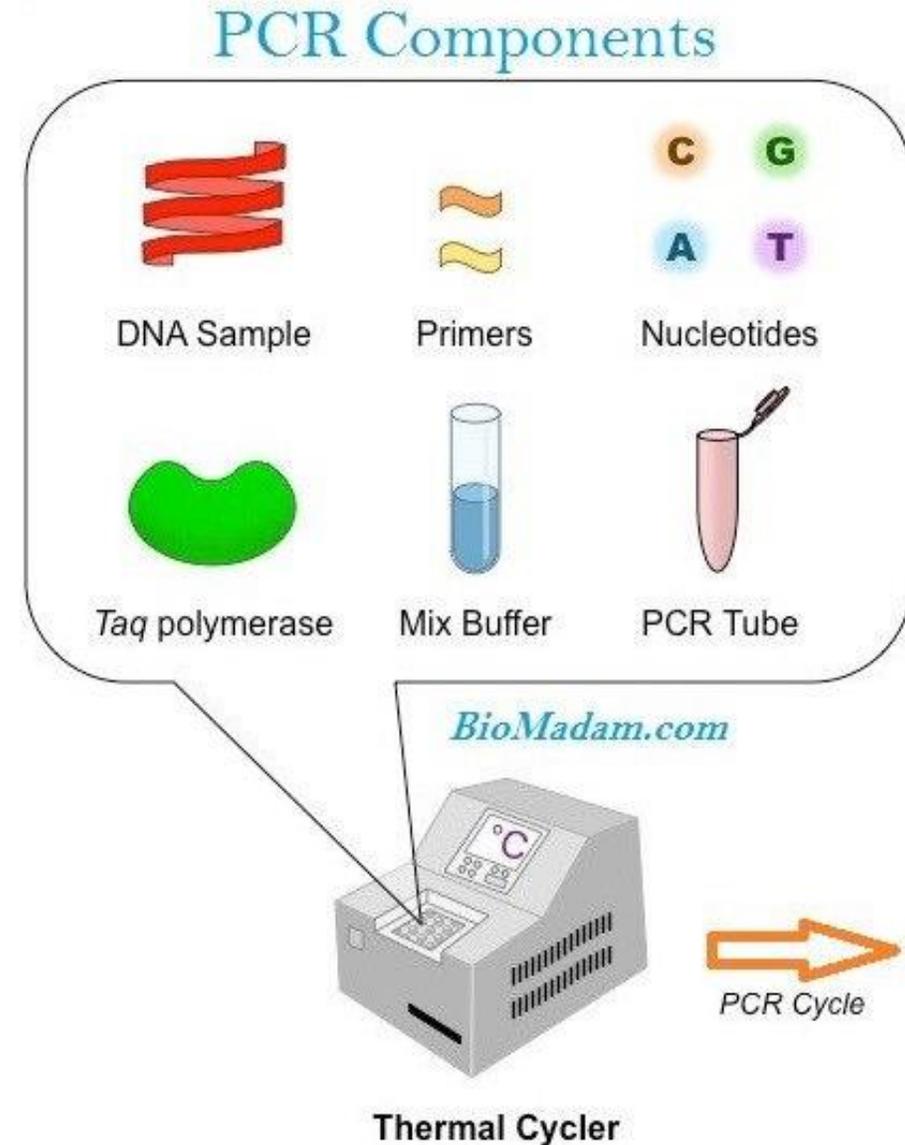
- La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente.
- Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células.

- En la reacción, si usamos como sustrato **ADN genómico**, entonces típicamente hablamos de una **PCR**, pero si usamos ADN complementario (**ADNc**) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como **RT-PCR** (*Reverse Transcription-PCR*, por sus siglas en inglés). Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el **ARNm en una molécula de ADNc**.
- Este método fue copiado de los retro virus que usan una **transcriptasa reversa** para convertir su genoma de ARN en ADN duplicarse en millones de partículas virales. El ADNc se utiliza cuando analizamos la expresión del ARNm de algún gen de interés.



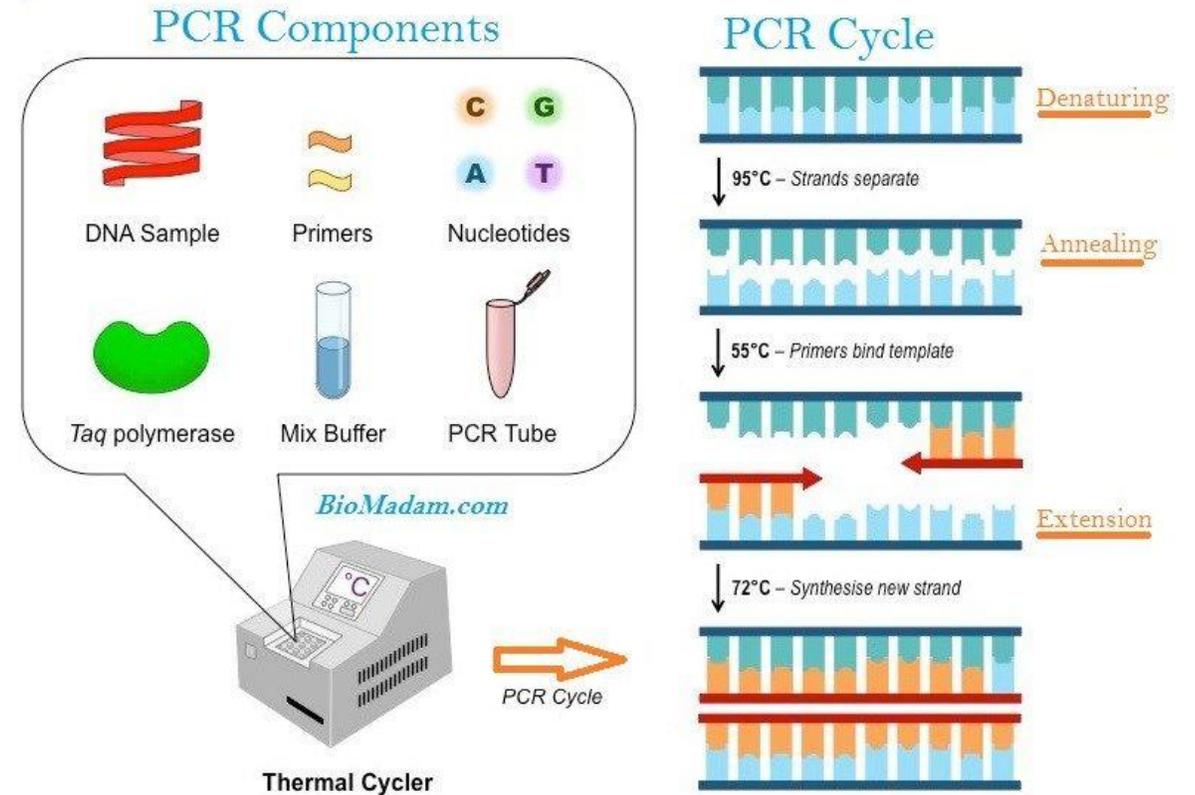
- Los elementos importantes en la reacción son:

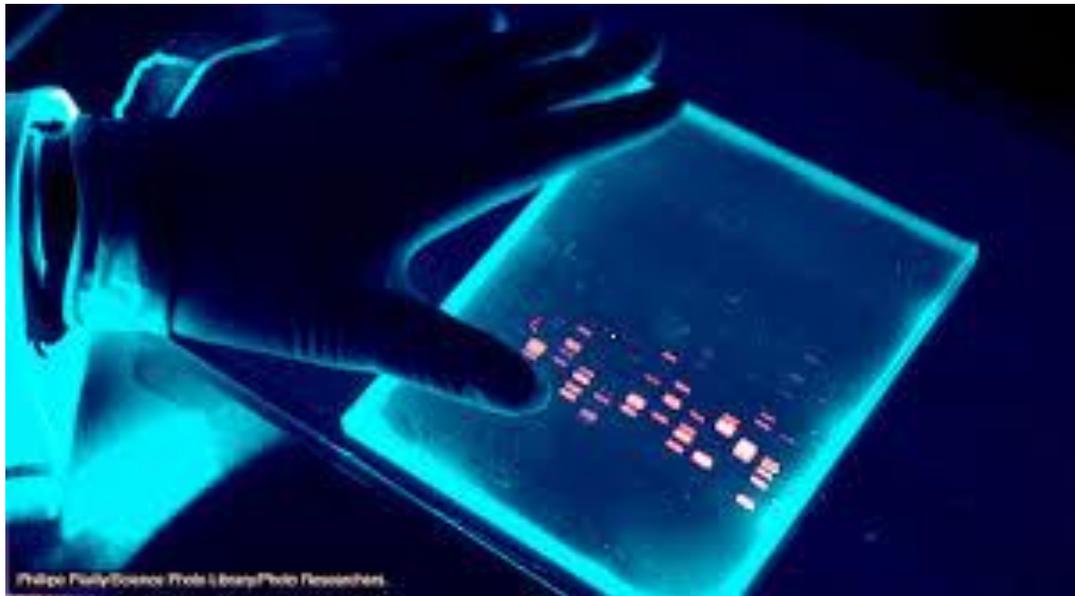
- El templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg^{+}), una solución amortiguadora o buffer y H_2O .



- Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: **desnaturalización, hibridación y extensión.**

- Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos.





Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados **amplicones** son analizados en **geles de agarosa** para confirmar si la reacción fue exitosa.

¿Qué elementos químicos se necesitan?

El elemento principal en la PCR es el ADN, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación. Para entrar en contexto, es importante recordar que la molécula de ADN está formada por tres componentes: un **azúcar** (desoxirribosa), un **grupo fosfato** y una **base nitrogenada** (adenina, timina, guanina o citosina) que es complementaria con la base de otra cadena de tal forma, que el ADN se estructura en una doble hélice.

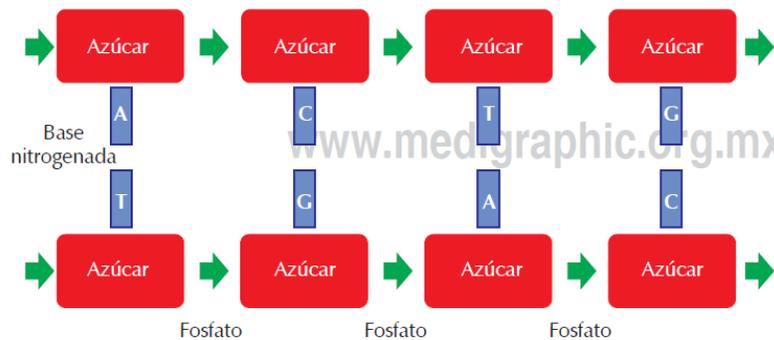
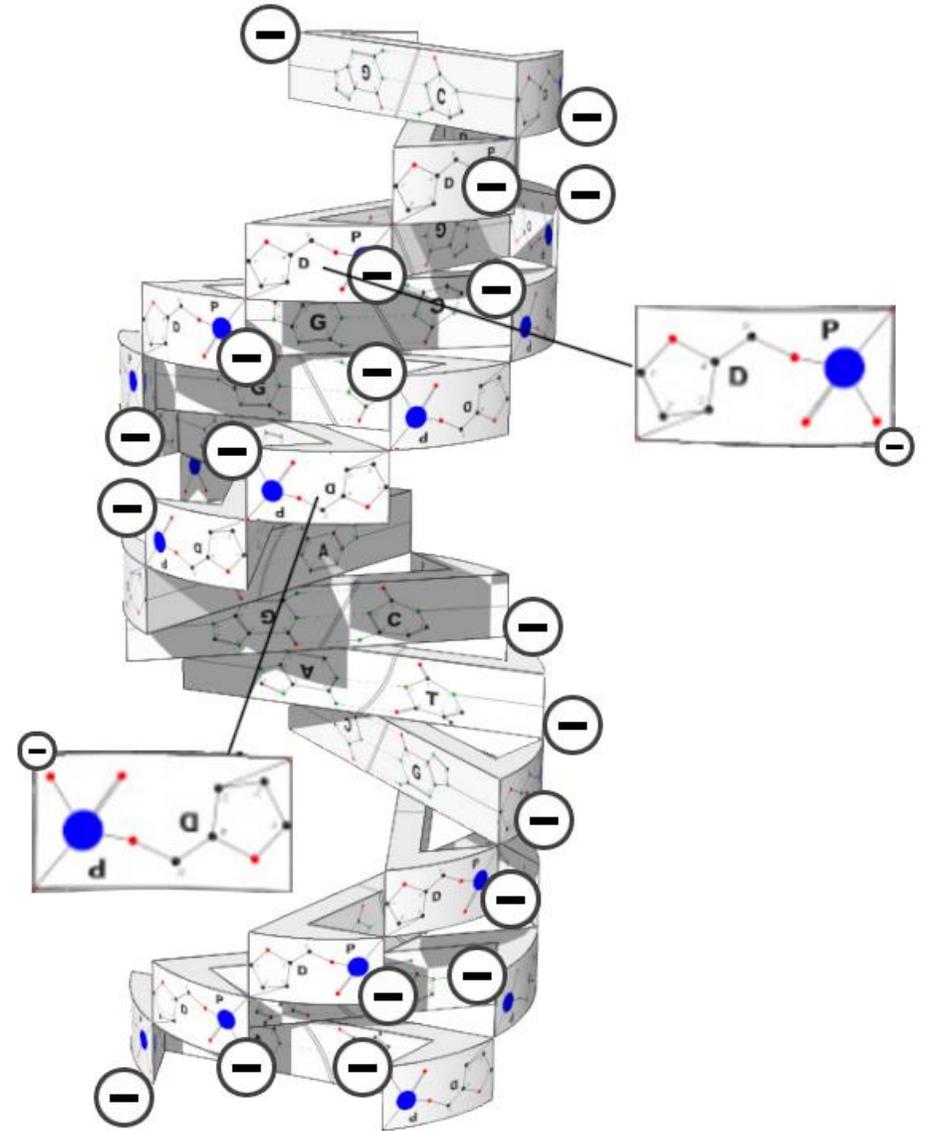


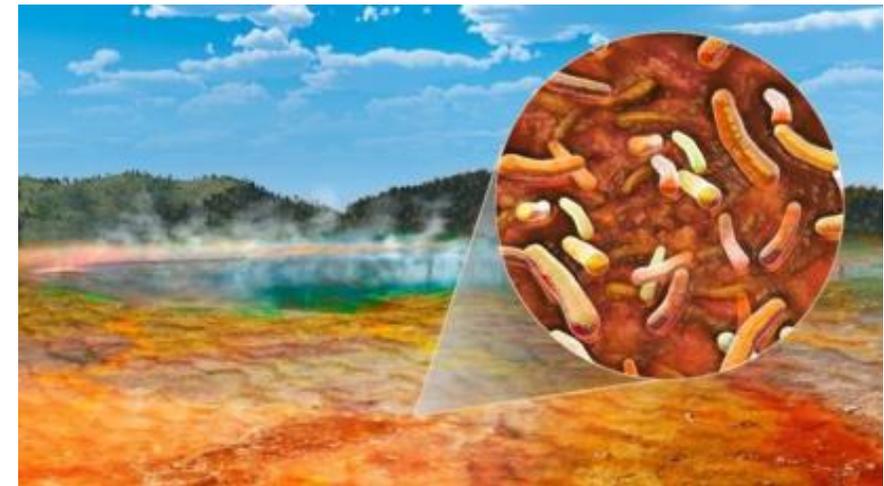
Figura 1.

Molécula de ADN de doble cadena. Cada cadena está formada por un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada que es complementaria con otra cadena: A = adenina, T = timina, C = citosina y G = guanina.

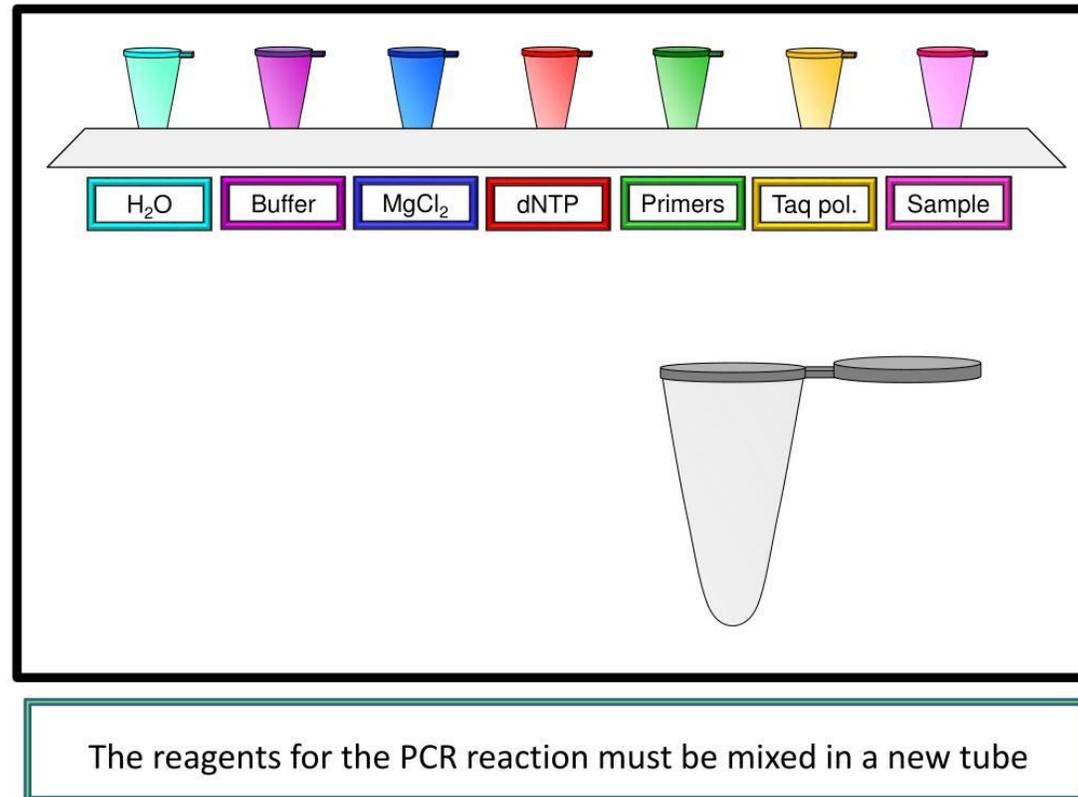
- La complementariedad entre las bases está dada por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, generando estabilidad a la doble hélice, la carga eléctrica del **ADN es negativa** y está dada por los **grupos fosfatos**.
- En la PCR, el **templado** son las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés. Por su parte, la ADN polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco.



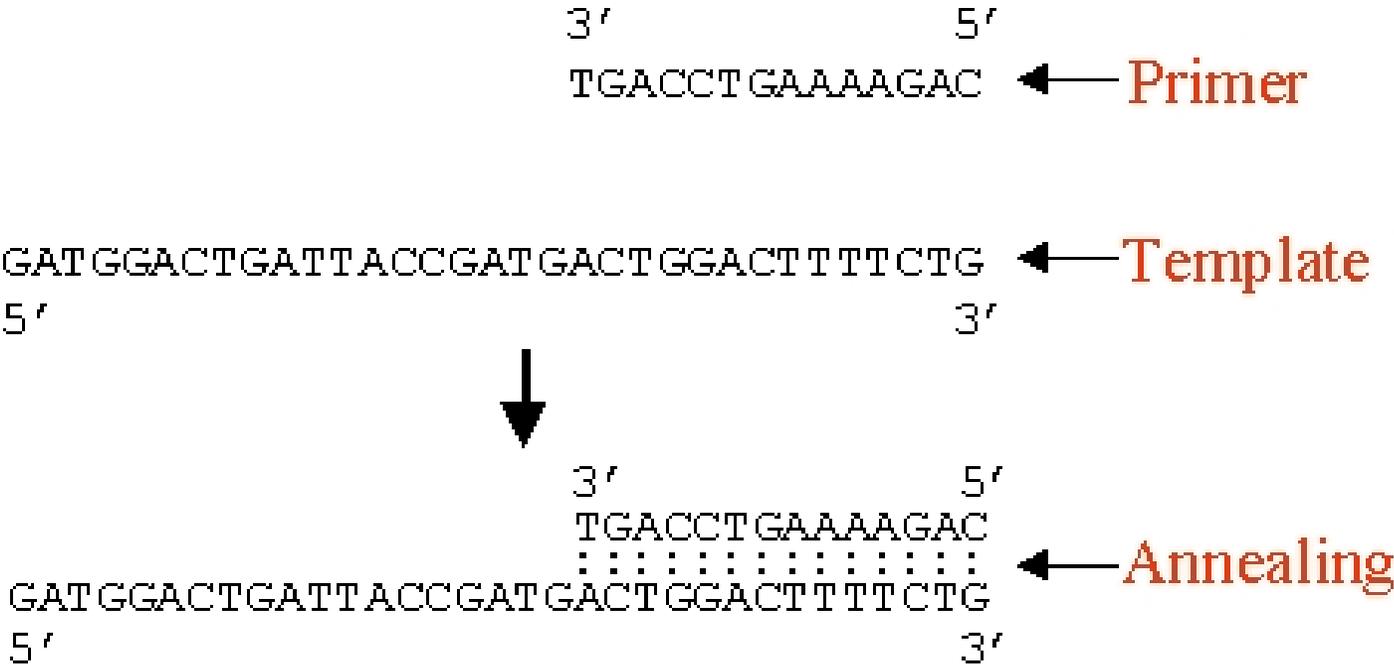
La enzima más usada con frecuencia se llama **Taq ADN polimerasa**, que proviene de una bacteria termófila llamada ***Thermus aquaticus***, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su ADN polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperaturas. El rasgo que distingue a esta enzima bacteriana de otras ADN polimerasas de otros organismos es su capacidad para mantener su funcionalidad a temperaturas altas, por lo que se le considera una **enzima termoestable**.



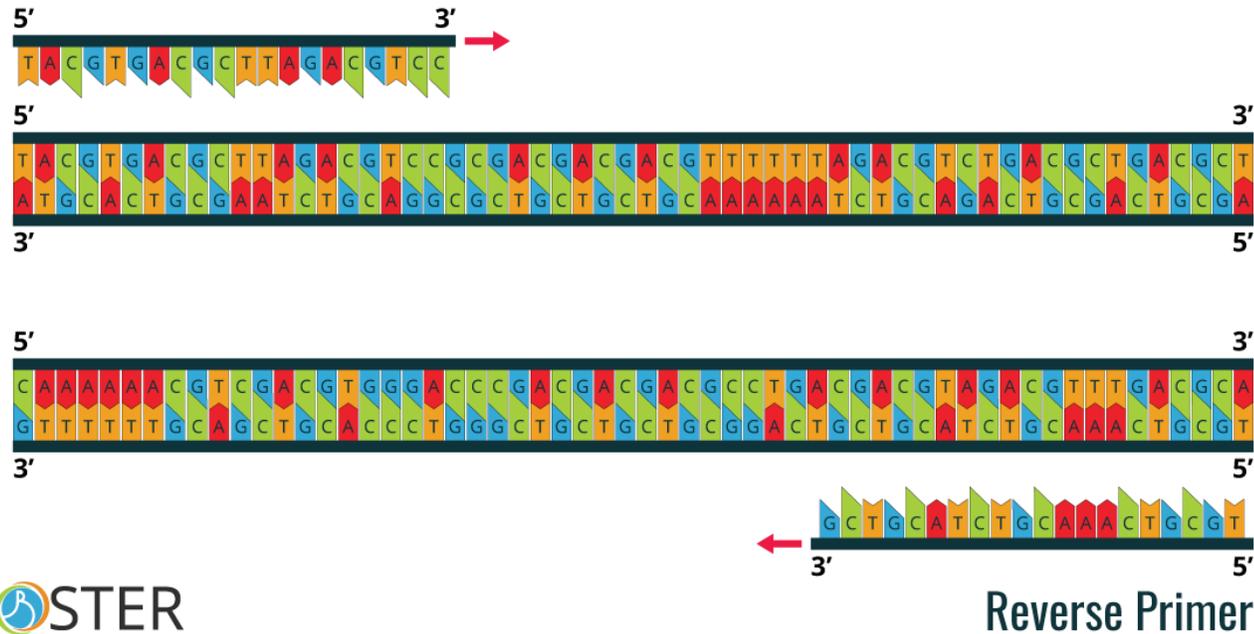
Para que la enzima funcione con alta especificidad y la reacción transcurra exitosamente, también se necesita de los elementos ya mencionados como: primers, dNTPs, Mg +, buffer y H₂O.



Los **primers** son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Generalmente su tamaño oscila entre **15-25 pares de bases** y la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia. Si no se respetan estas reglas, existe la posibilidad de la formación de dímeros de primers, es decir, de productos inespecíficos. Esto repercutiría en el rendimiento de la reacción, así como en la especificidad del producto esperado.

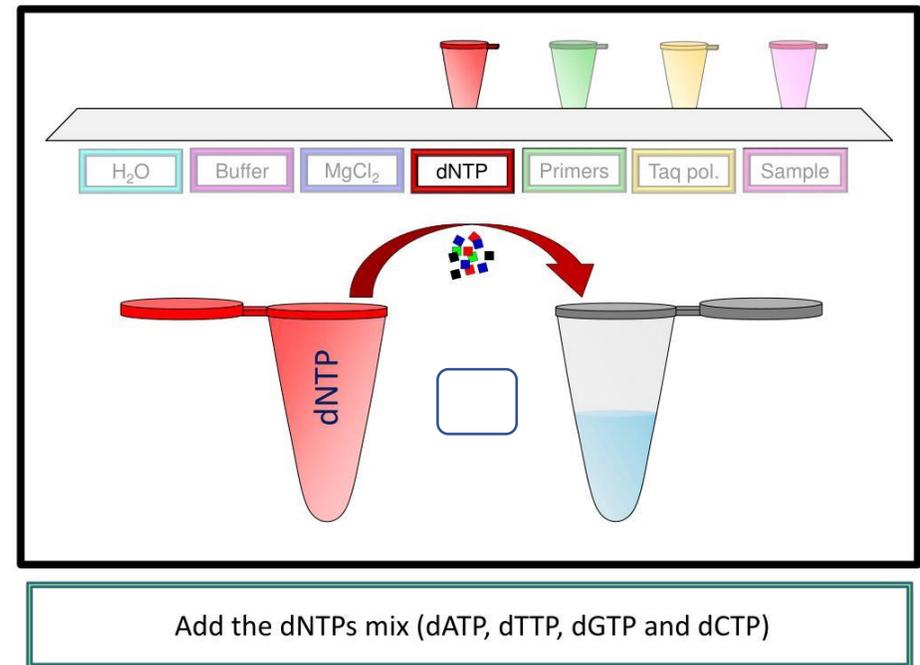
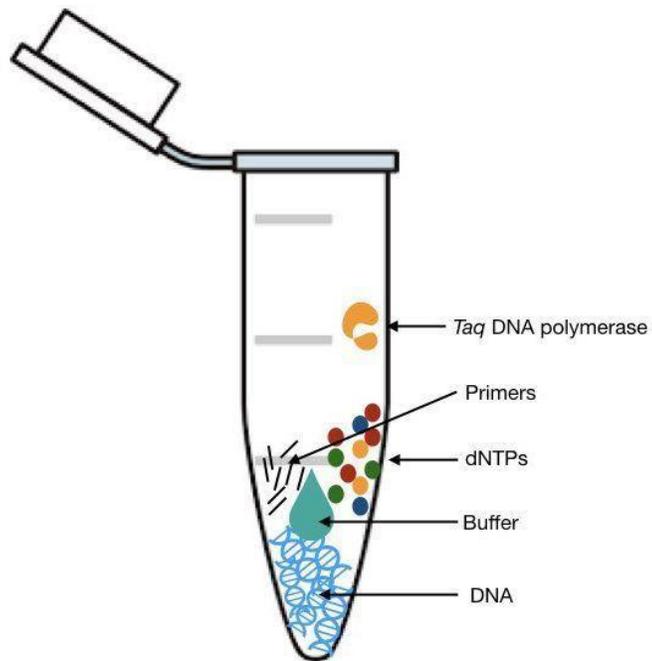


Forward Primer



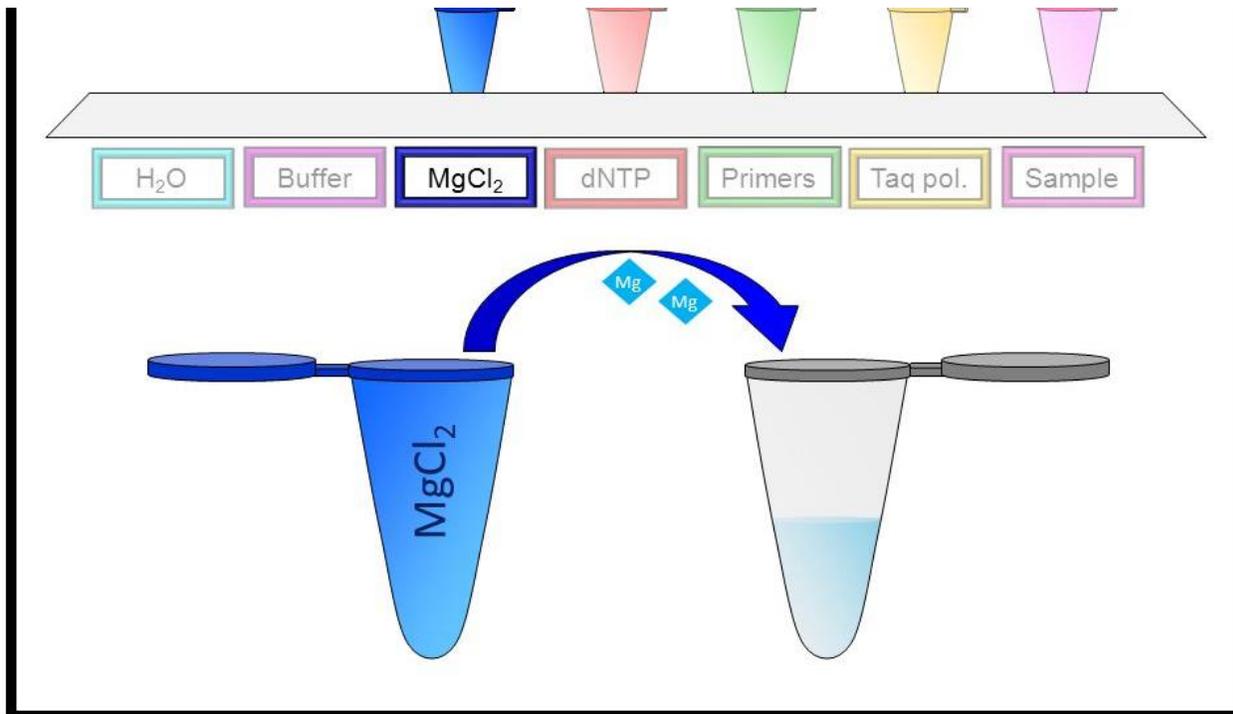
- Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una denominada «**forward**» o sentido y otra «**reverse**» o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5'-3' (como sucede endógenamente).
- Con la finalidad de garantizar la formación de un complejo estable entre el templado y los primers, hoy en día existen **programas informáticos** para diseñar primers con alta especificidad, por lo que se evita la formación de productos inesperados.

Por su parte, los **dNTP's** son los ladrillos o bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN. Son factores importantes que contribuyen a la especificidad de la reacción, por ello es importante que su concentración sea la adecuada ya que de lo contrario pueden afectar la función de la Taq polimerasa. Normalmente, se utilizan a una concentración que oscila entre 0.2 a 1.0 mM.



El **buffer** es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8) cuya concentración final de trabajo debe ser 1X. También se usan otros buffers de composición distinta que son fácilmente comprados en el mercado.





El **magnesio** es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, por eso se debe tener una concentración adecuada para que no afecte el rendimiento de la Taq polimerasa; regularmente su concentración oscila entre 0.5 y 2.5 mM. En ocasiones ya viene incluido en el buffer, pero en otras se le tiene que agregar. **El agua** es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleicos.

¿Cómo funciona la reacción?

Recordemos que cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: **desnaturalización**, **hibridación** y **extensión**.

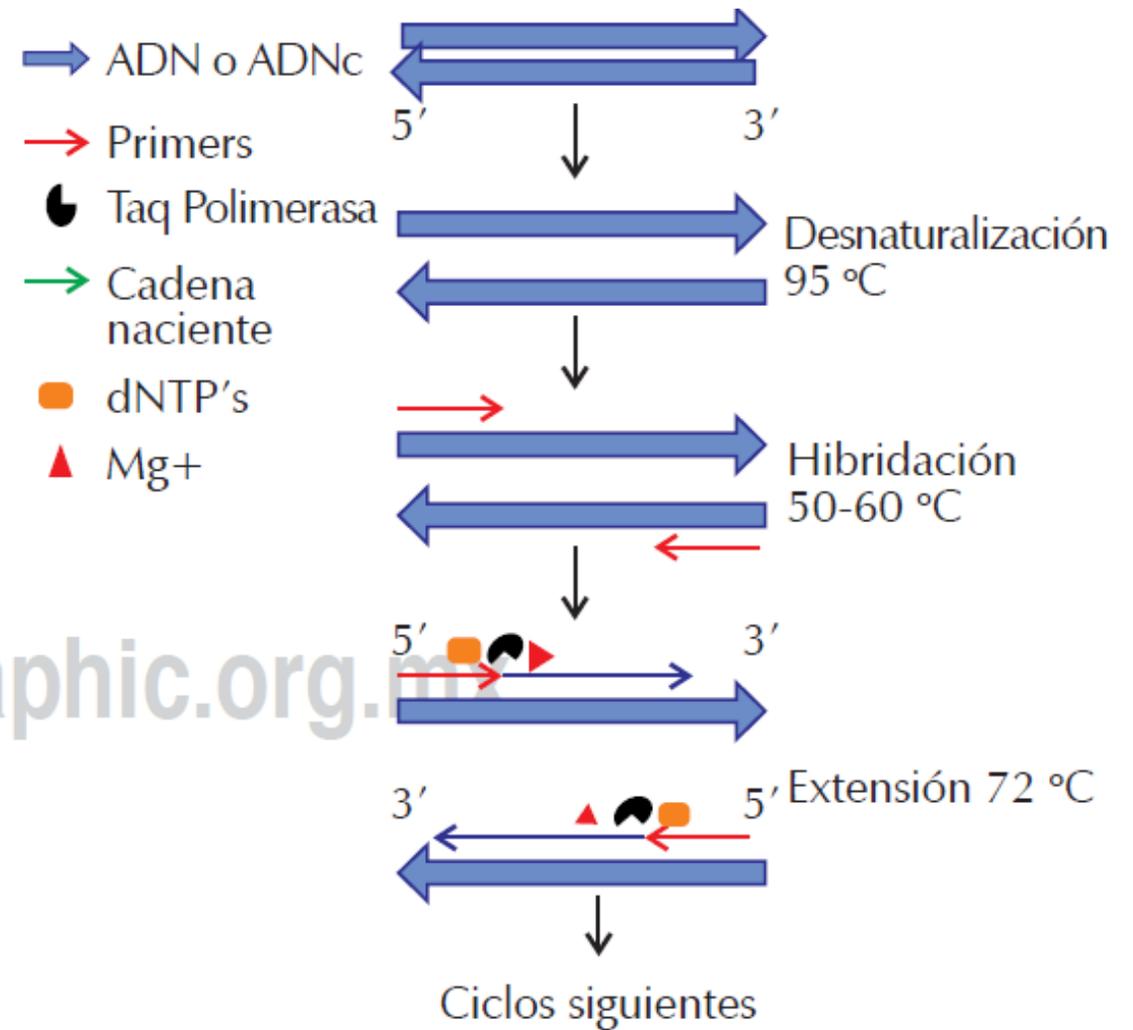
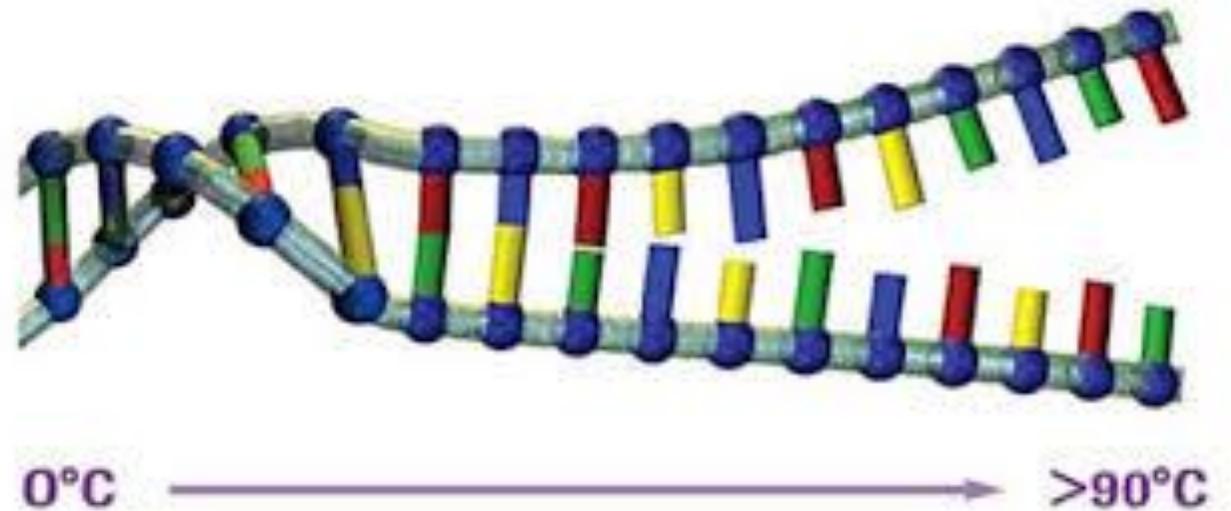
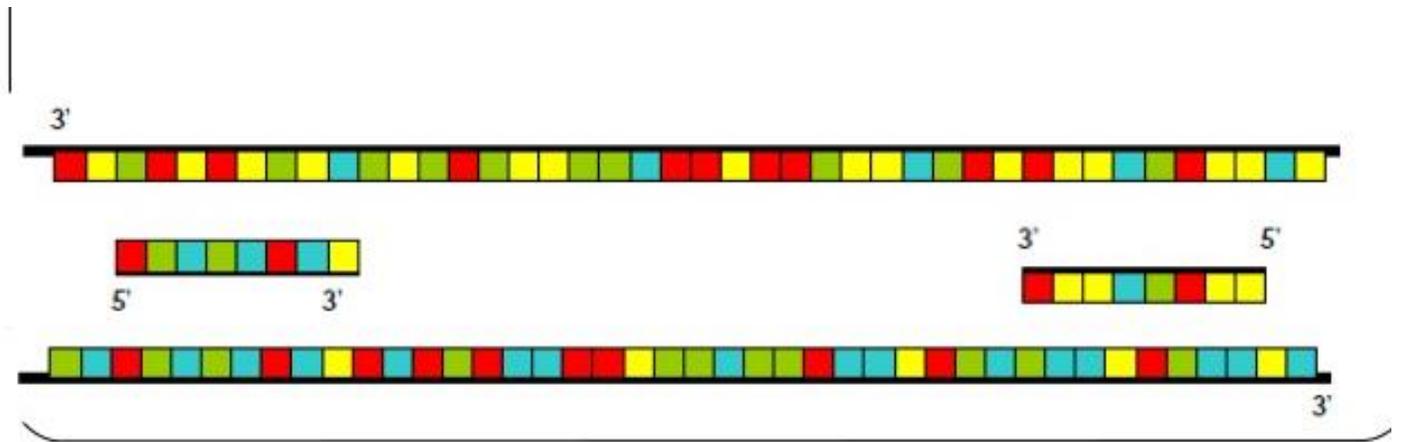


Figura 2. Pasos de un ciclo de la PCR

- **Desnaturalización.** En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de **95 °C** durante **20-30 segundos**; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T.
- Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso.

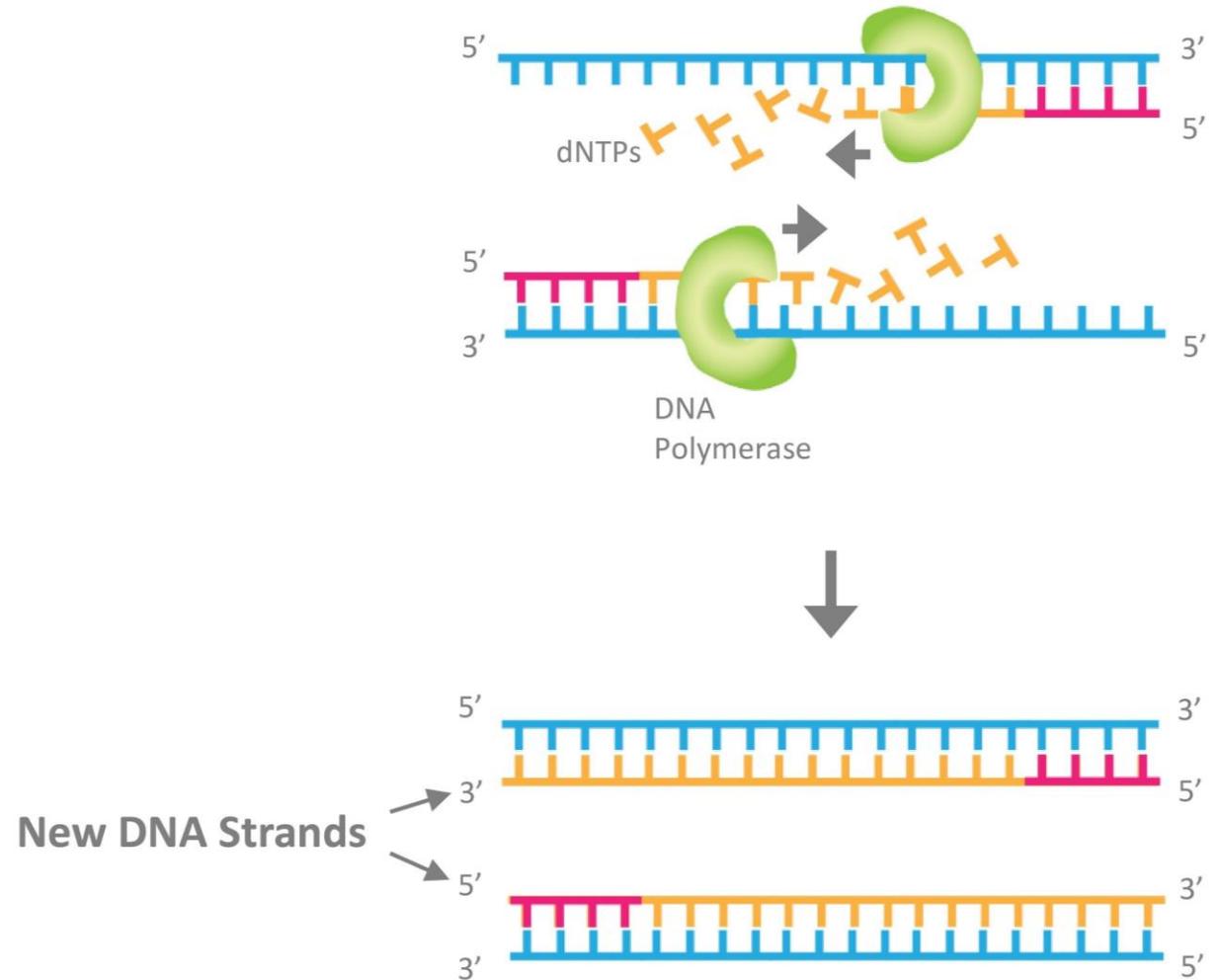


Hibridación. En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre **50-60 °C**. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.



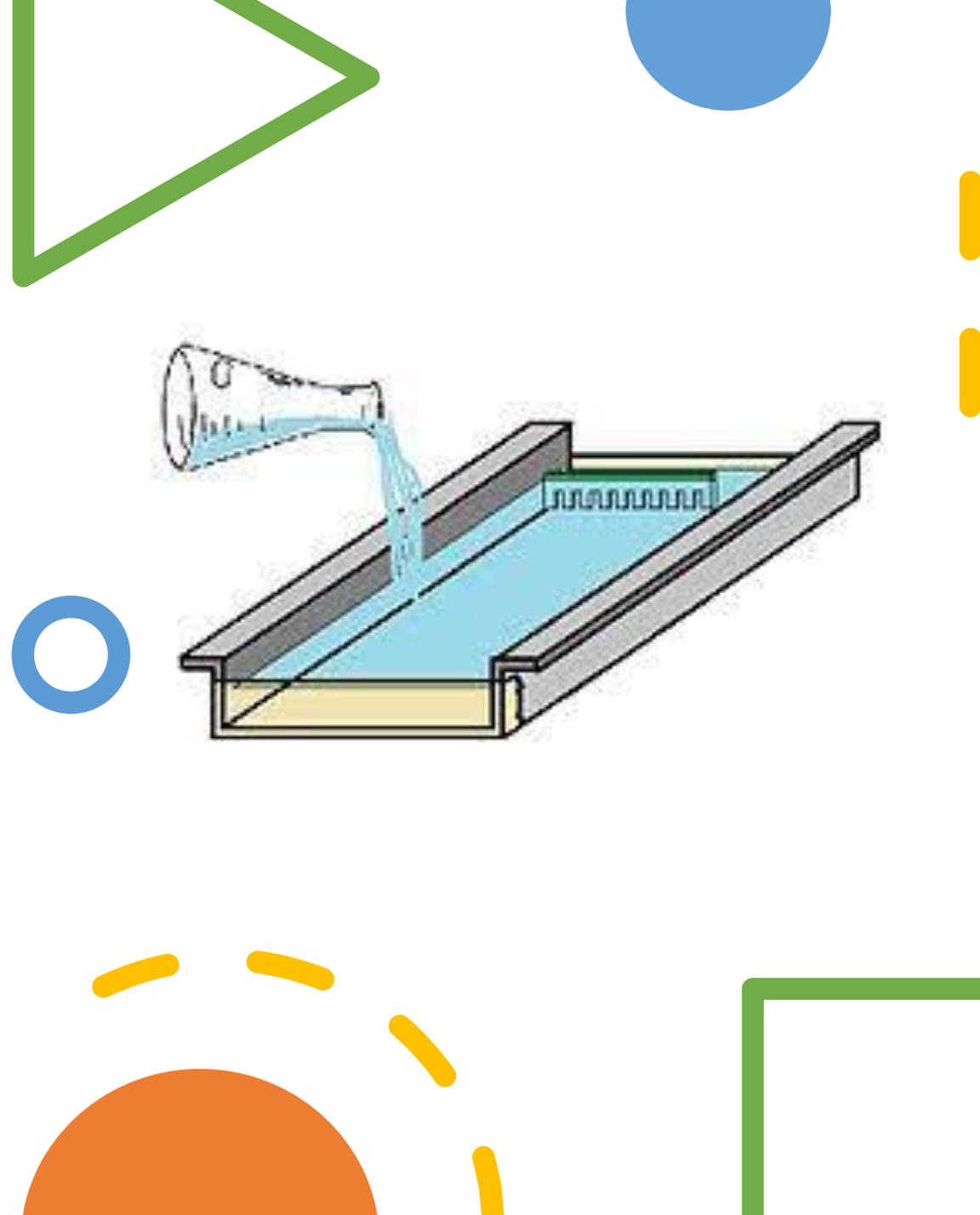
Extensión. En esta etapa, la **Taq polimerasa** actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'.

- La temperatura óptima para la reacción es de **72 °C**, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador.

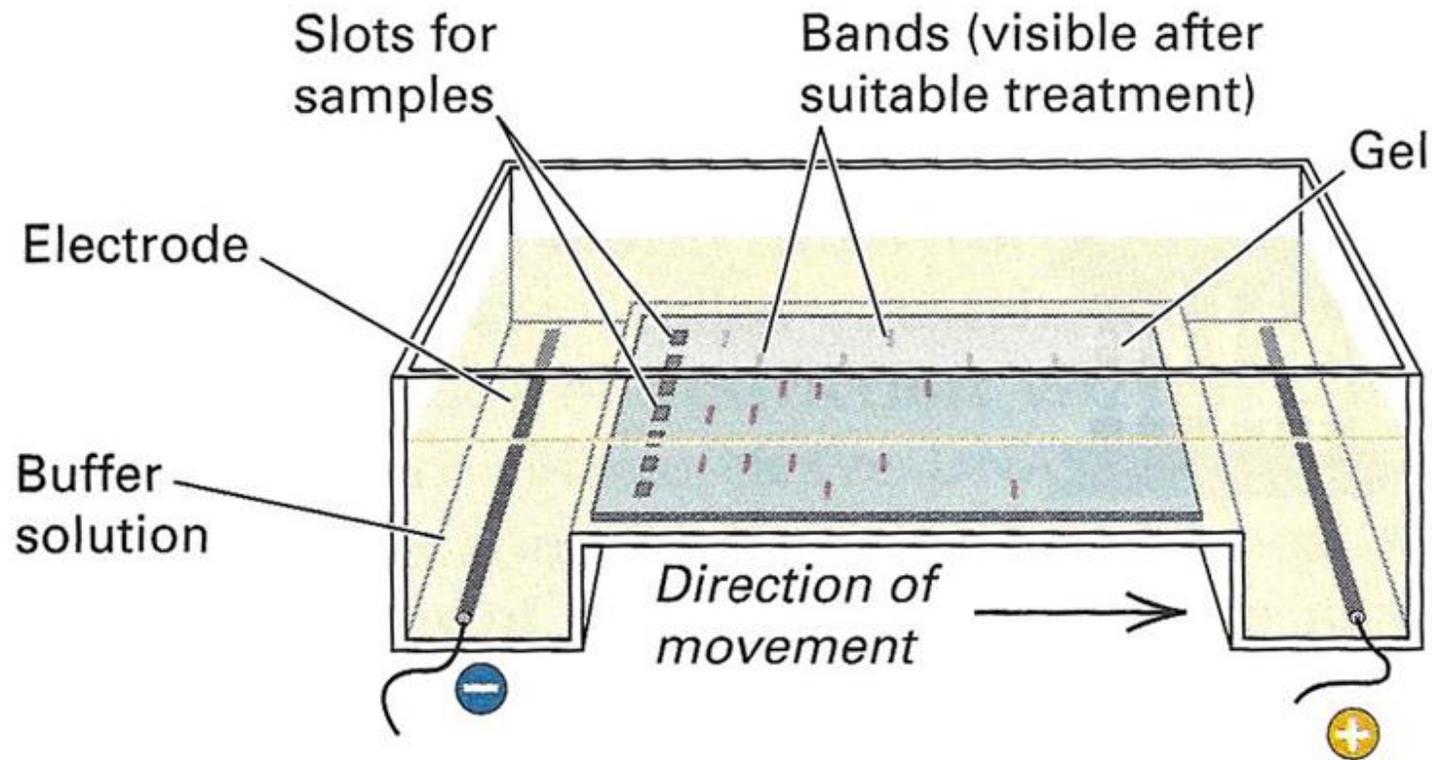


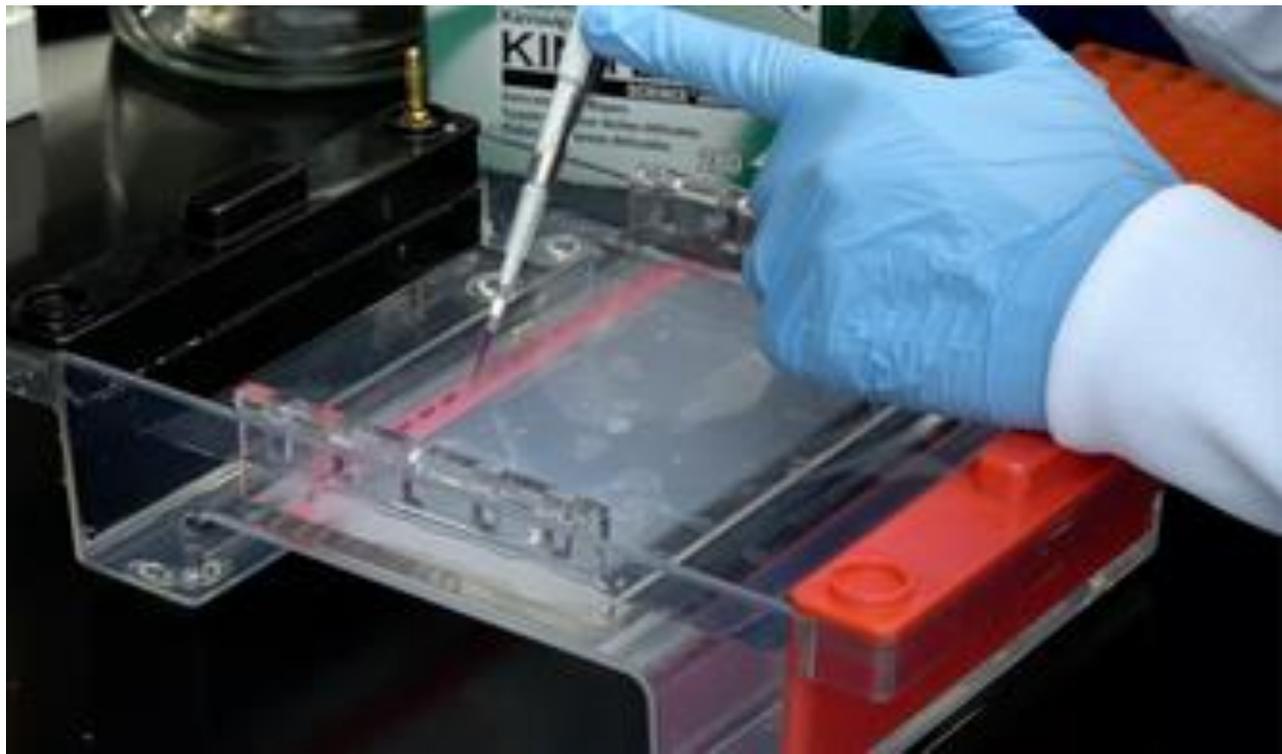
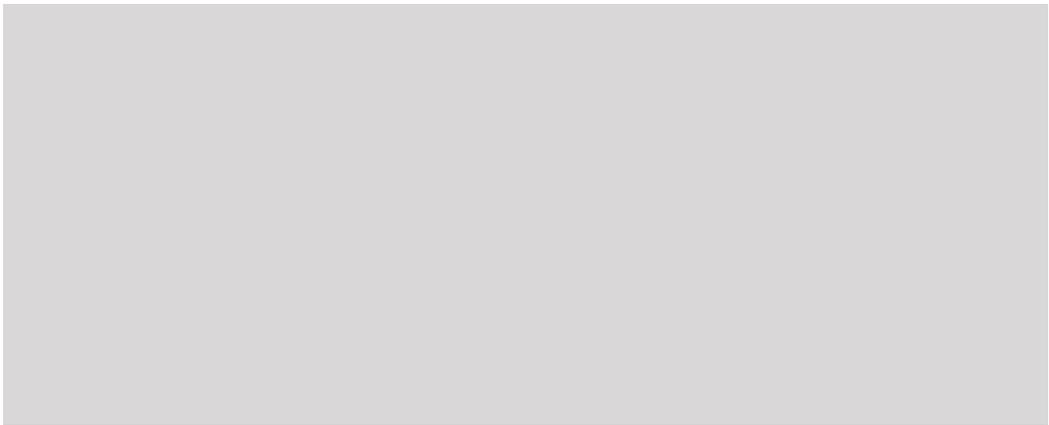
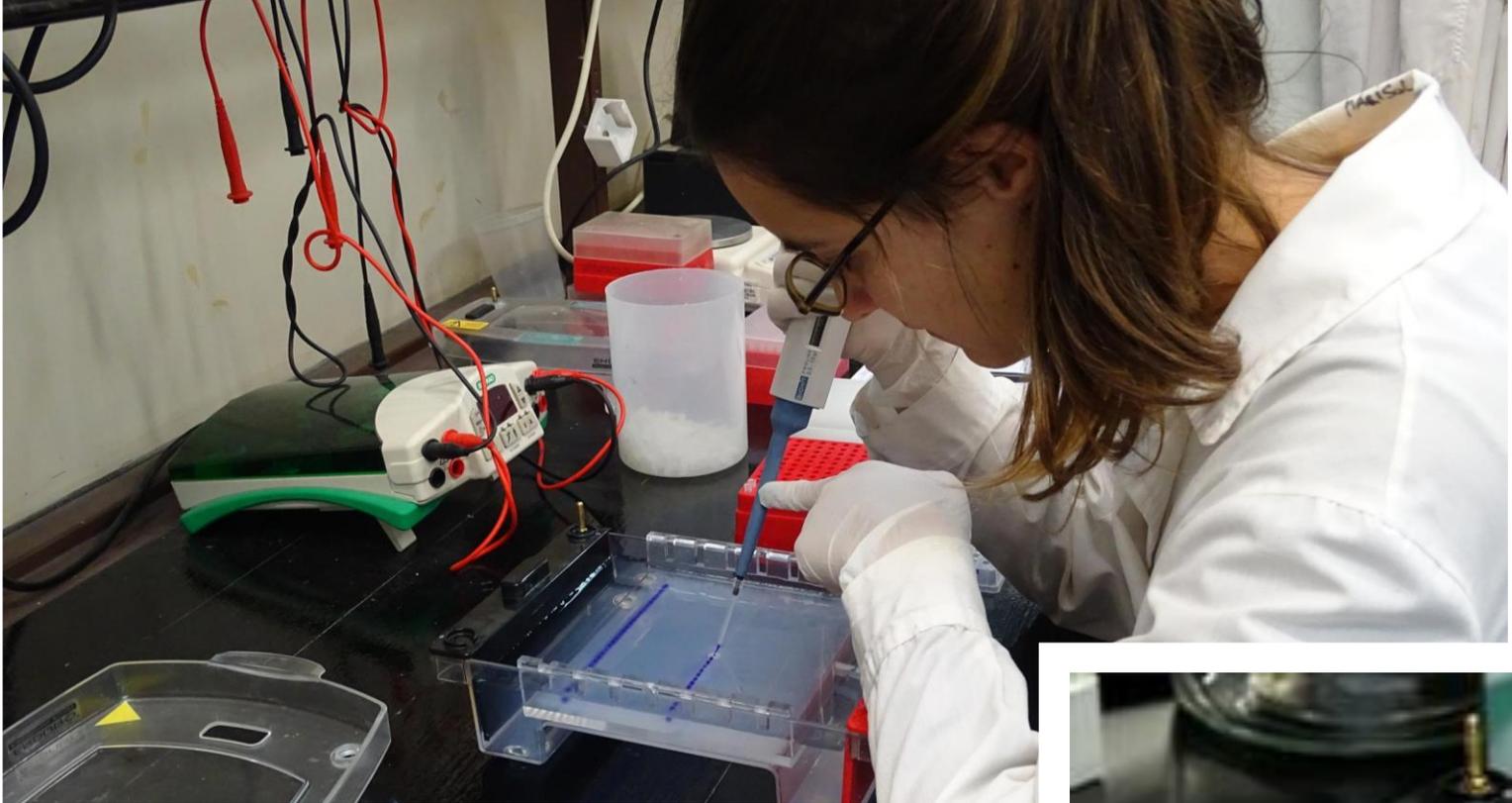
Cómo se analiza el producto de amplificación?

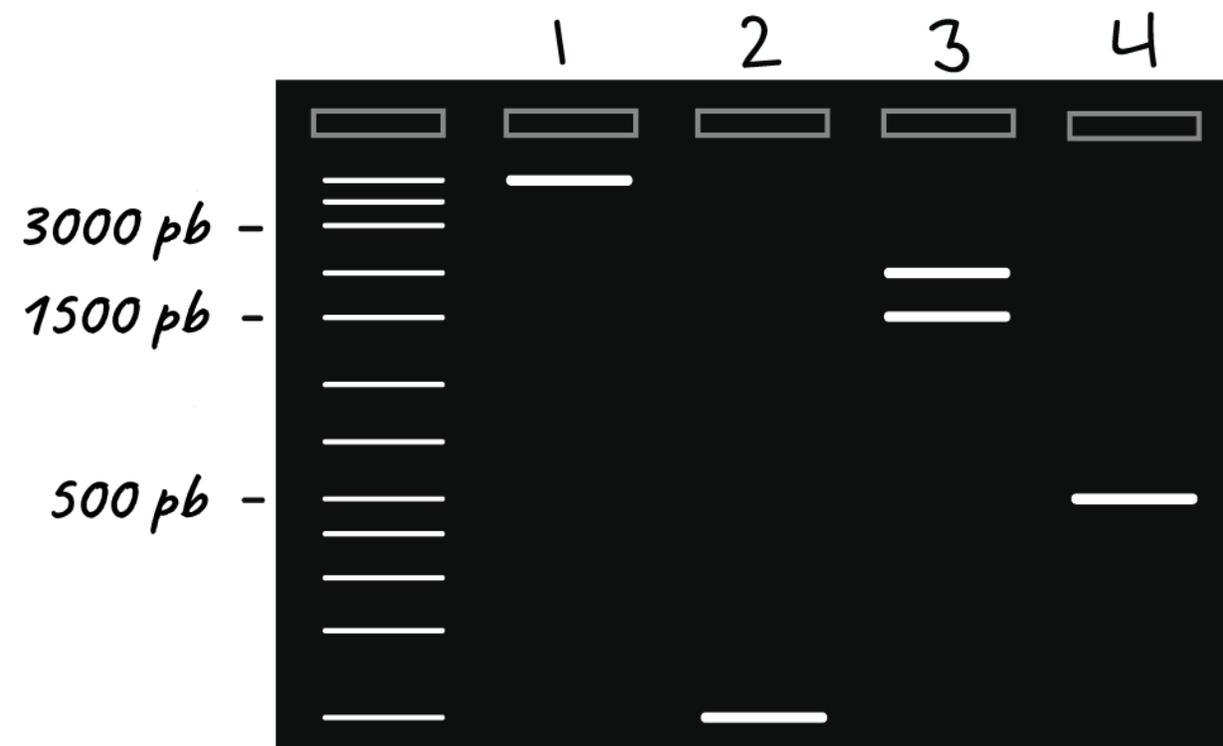
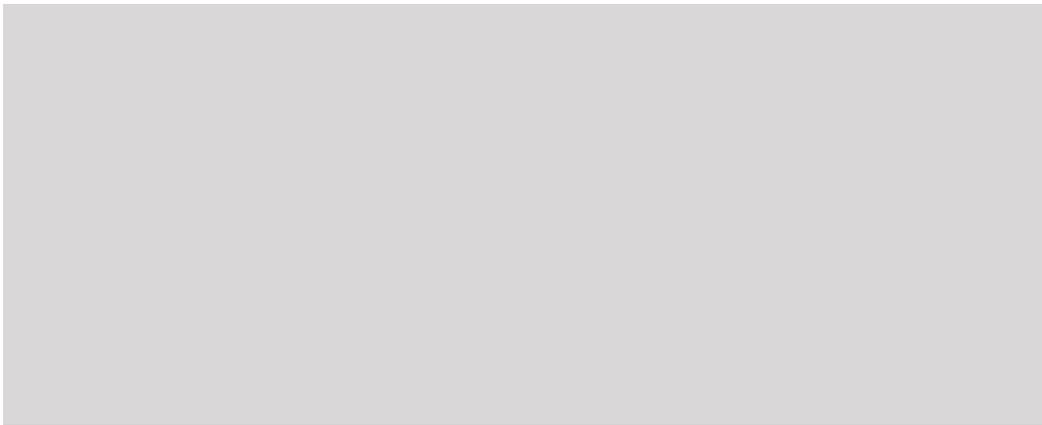
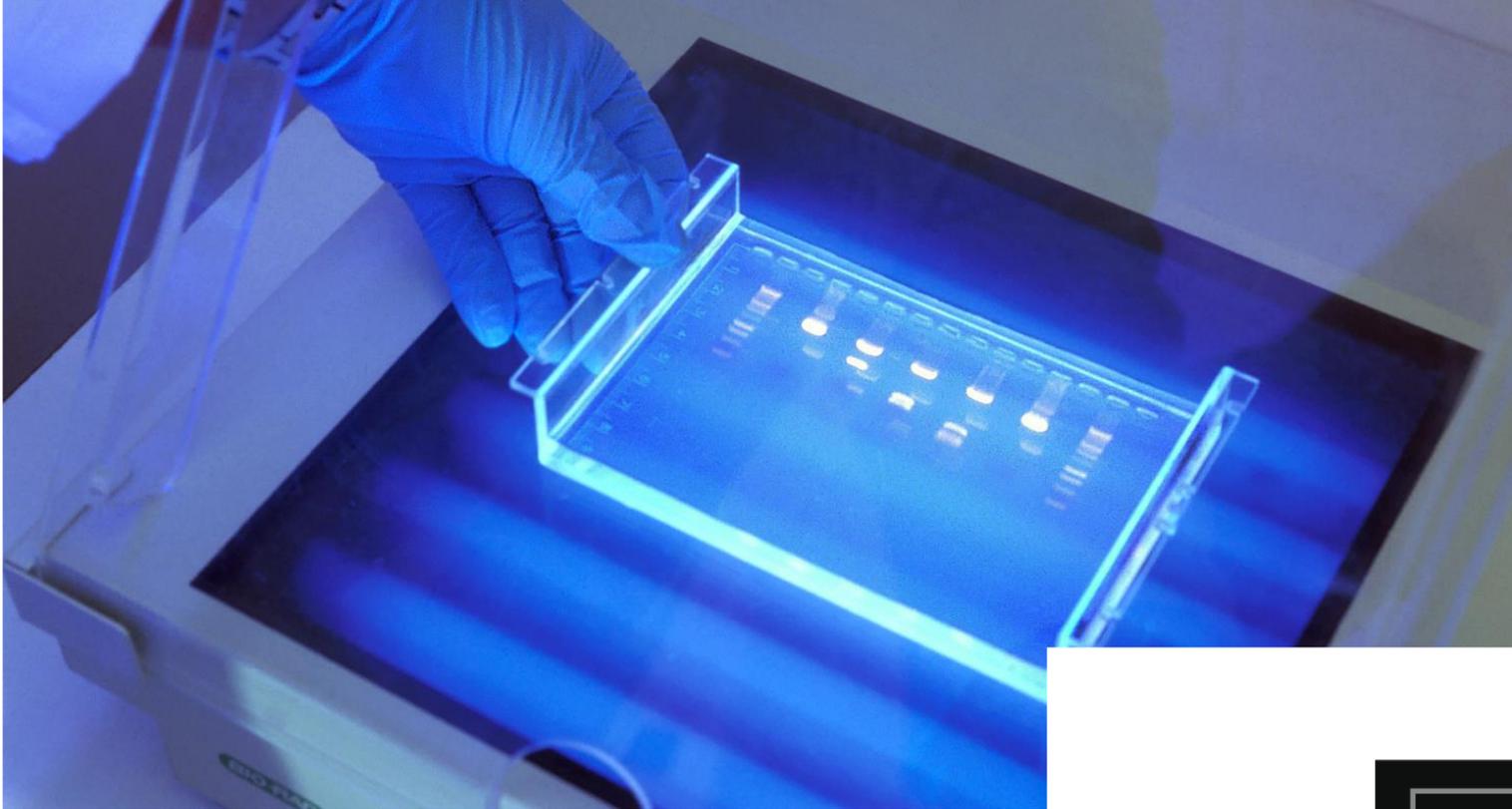
Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una **electroforesis en geles de agarosa**. La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo un buffer o tampón que puede ser TAE o TBE.



Agarose gel electrophoresis of DNA







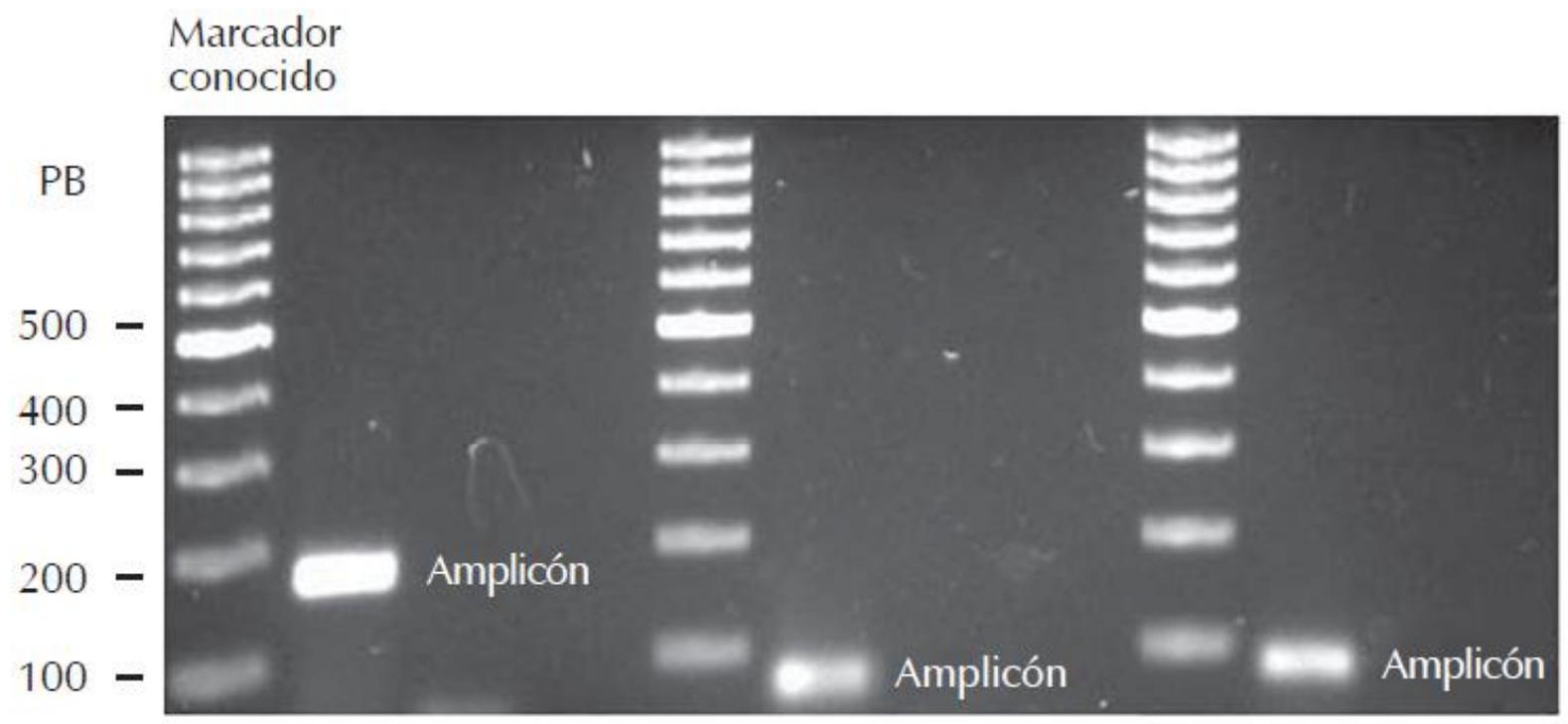
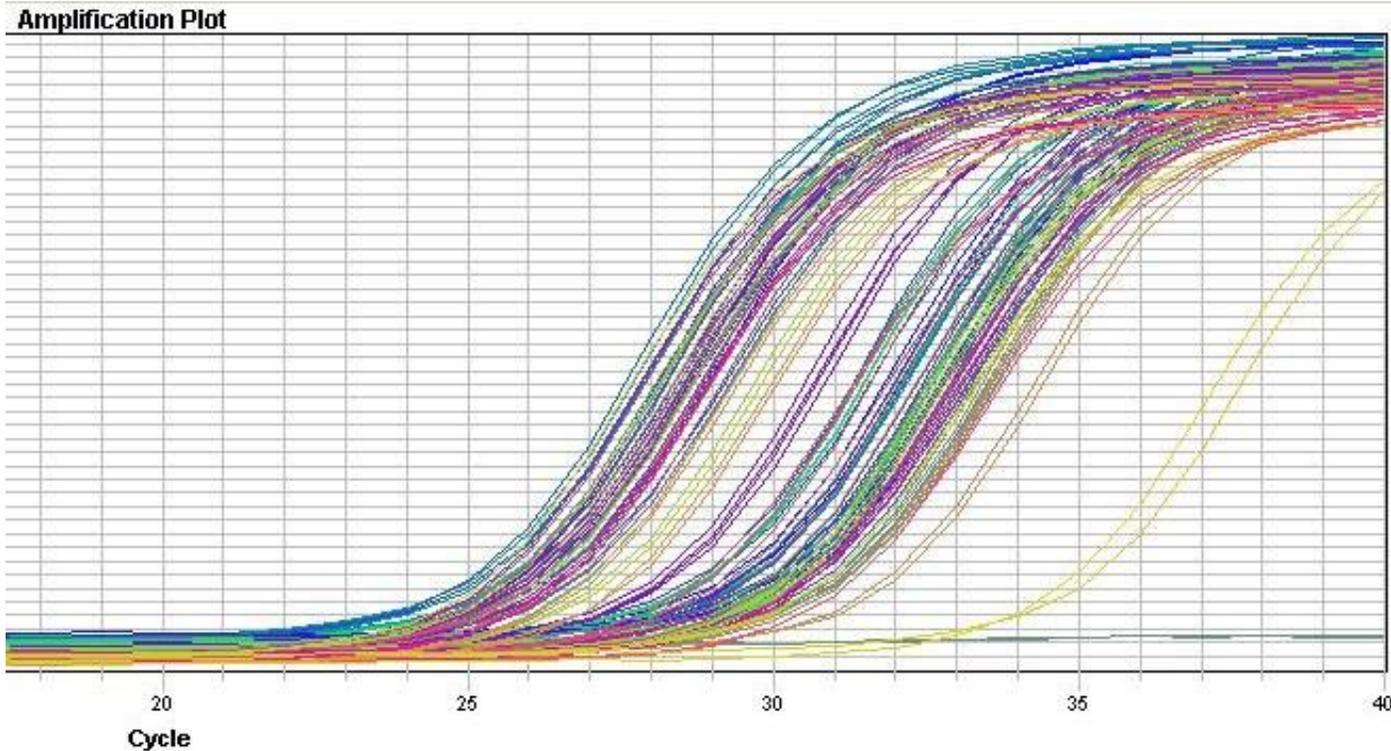


Figura 3.

Gel de agarosa. Los productos de la PCR o amplicones están representados mediante bandas de un tamaño específico y se comparan con un marcador de peso molecular conocido para determinar la especificidad de la reacción. PB = número de pares de bases.

PCR en tiempo real: fundamentos



Los primeros que sentaron las bases para desarrollar la PCR en tiempo real fueron Higuchi y colaboradores, en **1992**, al videograbar en tiempo real la incorporación de bromuro de etidio al ADN durante cada ciclo de la PCR realizada bajo luz UV. Desde entonces, el objetivo de la PCR en tiempo real ha sido **detectar y cuantificar** las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción.

- 
- El principio de la técnica se basa en la PCR punto final, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente.
 - El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada **ciclo de la reacción**. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible **cuantificar la cantidad de ADN** en la muestra, a diferencia de la PCR punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco.
 - Precisamente, estas últimas dos características representan grandes ventajas de la PCR en tiempo real, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final.

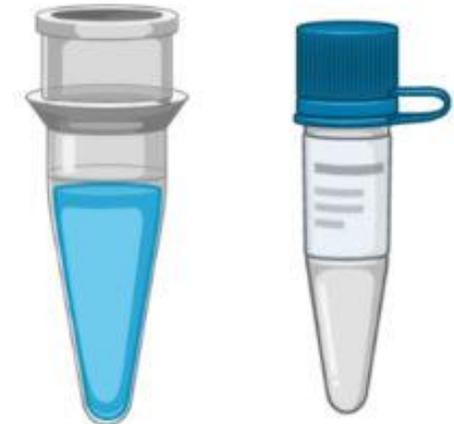
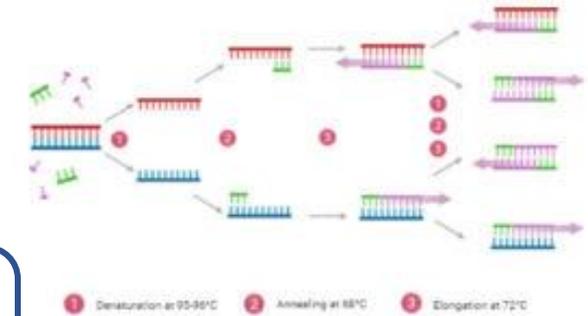
Types of PCR with definition and uses

1. AFLP PCR
2. Allele-specific PCR
3. Alu PCR
4. Assembly PCR
5. Asymmetric PCR
6. COLD PCR
7. Colony PCR
8. Conventional PCR
9. Digital PCR (dPCR)
10. Fast-cycling PCR
11. High-fidelity PCR
12. Hot-start PCR
13. In situ PCR
14. Intersequence-specific (ISSR) PCR
15. Inverse PCR
16. LATE (linear after the exponential) PCR
17. Ligation-mediated PCR
18. Long-range PCR



19. Methylation-specific PCR (MSP)
20. Miniprimer PCR
21. Multiplex-PCR
22. Nanoparticle-Assisted PCR (nanoPCR)
23. Nested PCR
24. Overlap extension PCR
25. Real-Time PCR (quantitative PCR or qPCR)
26. Repetitive sequence-based PCR
27. Reverse-Transcriptase (RT-PCR)
28. Reverse-Transcriptase Real Time PCR (RT-qPCR)
29. RNase H-dependent PCR (rhPCR)
30. Single cell PCR
31. Single Specific Primer-PCR (SSP-PCR)
32. Solid phase PCR
33. Suicide PCR
34. Thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR)
35. Touch down (TD) PCR
36. Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) PCR

Polymerase chain reaction - PCR



Actualmente, la **PCR en tiempo real** es el método **más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos**. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Una de sus aplicaciones más usadas es para cuantificar cambios muy pequeños en la **expresión génica** mediante la detección de los **niveles del ARNm** procedente de células o tejidos. La cantidad de ARNm que puede detectar la reacción puede ser a partir de concentraciones bajas a diferencia de la PCR, punto final que necesita una mayor concentración.

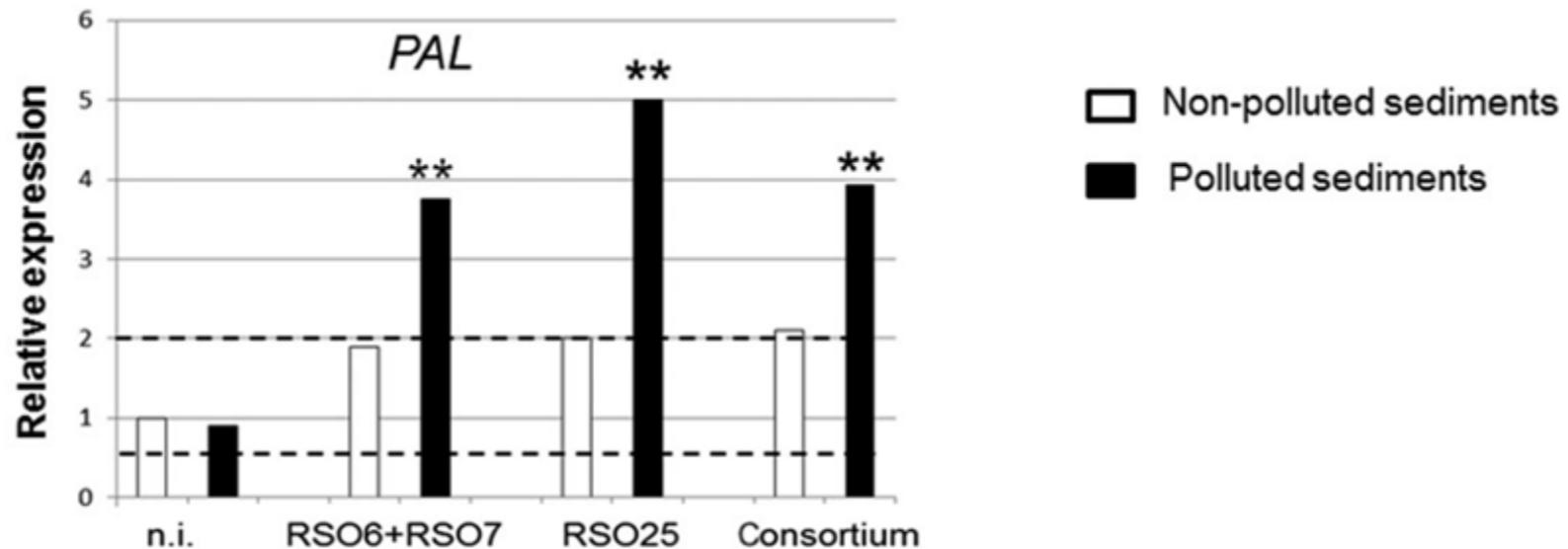


Fig. 5. Expression of glutathione reductase (*GR*), ethylene receptor (*ETR*) and phenylalanine ammonia lyase (*PAL*) in roots of plants grown on polluted and unpolluted sediment and subjected to different inoculation treatments. For each gene, expression level is relative to that of control plants, considered as 1. Expression levels were calculated using the geometric mean of *EF1- α* and *His1* as housekeeping genes. Dashed lines indicate expression between +2 and -2, considered as not significantly different in qRT-PCR.