



Técnica de PCR

Beatriz Bellosillo

Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

Biología Molecular

Estudio de los procesos que se desarrollan en los seres vivos desde un punto de vista molecular

Objetivo de la Biología Molecular

Conocer:

Cómo se regulan los genes

(cómo actúan en condiciones normales)

Cómo funcionan las proteínas resultantes

(afectación del organismo en función de la alteración)

Cómo se alteran en situaciones patológicas específicas

(tratamiento más adecuado)

Objetivo de la Biología Molecular

Para realizar:

Diagnóstico adecuado

Tratamiento adecuado

Realizar el seguimiento del paciente

Utilidad de la biología molecular en cáncer

	Diagnóstico	Predictivo	Monitorización
Leucemias/ linfomas	Sí	Sí	Sí
Tumores sólidos esporádicos	No	Sí	No
Cáncer Hereditario	Sí	No	No

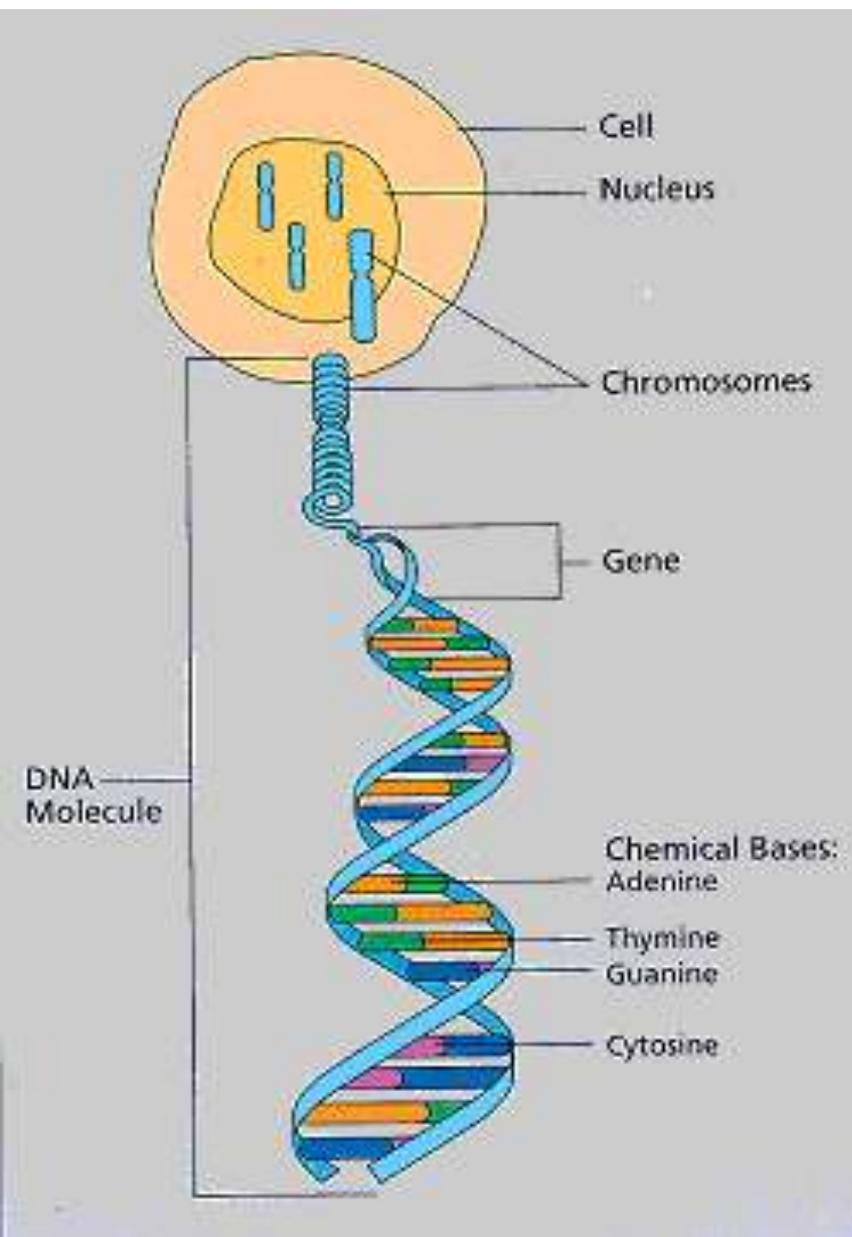
Utilidad de la biología molecular en anatomía patológica

- Detección de genes anómalos- genes de fusión
- Detección de clonalidad
- Detección de deleciones/inserciones
- Detección de mutaciones puntuales
- Monitorización de la enfermedad residual mínima

- Estudio de la presencia de virus/bacterias

¿Con qué muestras trabajamos?

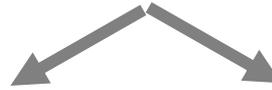
- Muestras en fresco
 - Biopsias
 - Citologías
 - Sangre periférica
 - Médula ósea
 - Líquidos
- Muestras en parafina
 - Biopsias
 - Bloques celulares (citologías)



Muestra



Extracción de ácidos nucleicos

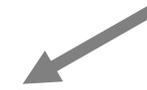


ADN

ARN



Retrotranscripción



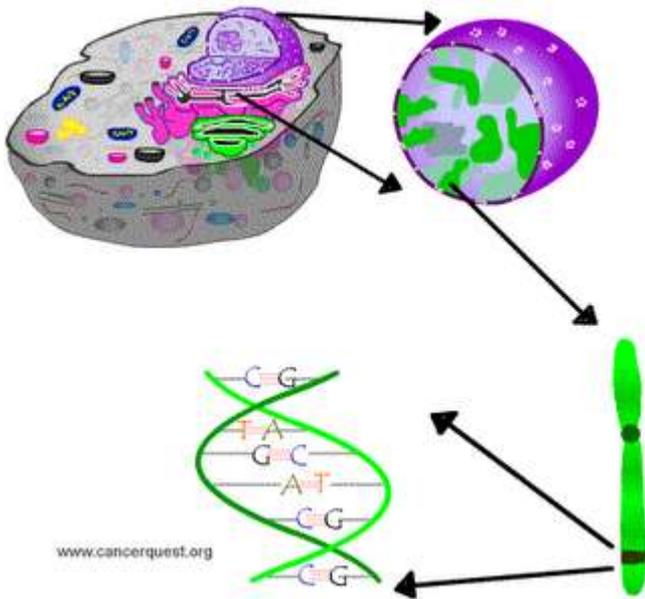
Amplificación por PCR



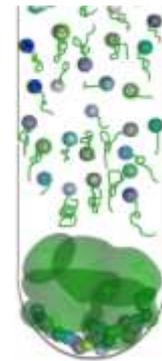
Visualización

Obtención de los Ácidos Nucleicos

1. Se provoca la ruptura de la pared celular para que el ADN quede libre en la mezcla



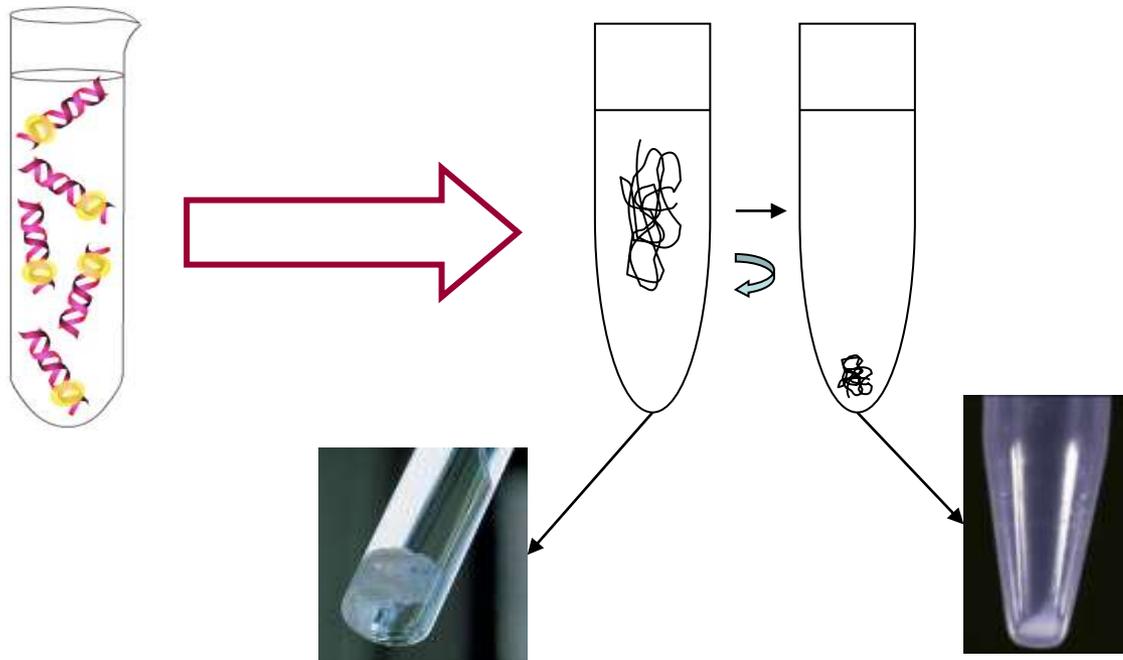
2. Separación del ADN del resto de componentes mediante centrifugación



Precipitación de los Ácidos Nucleicos

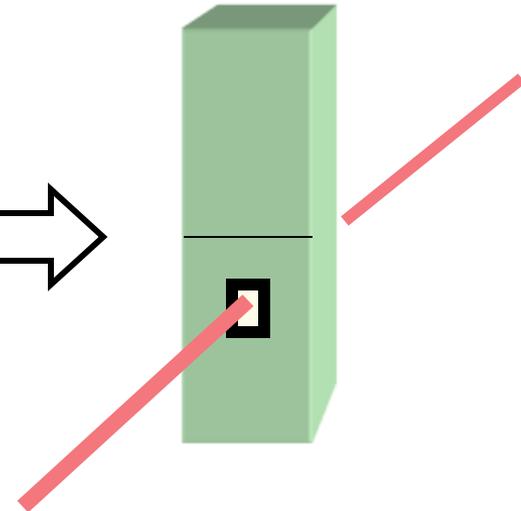
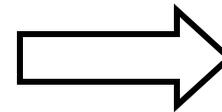
Nucleicos

3. Precipitación de los ácidos nucleicos para formar un pellet que resuspenderemos en un tampón adecuado y a una concentración óptima



Valoración calidad/pureza

El Espectrofotómetro mide la absorbancia de la luz a través de la muestra a una longitud de onda determinada



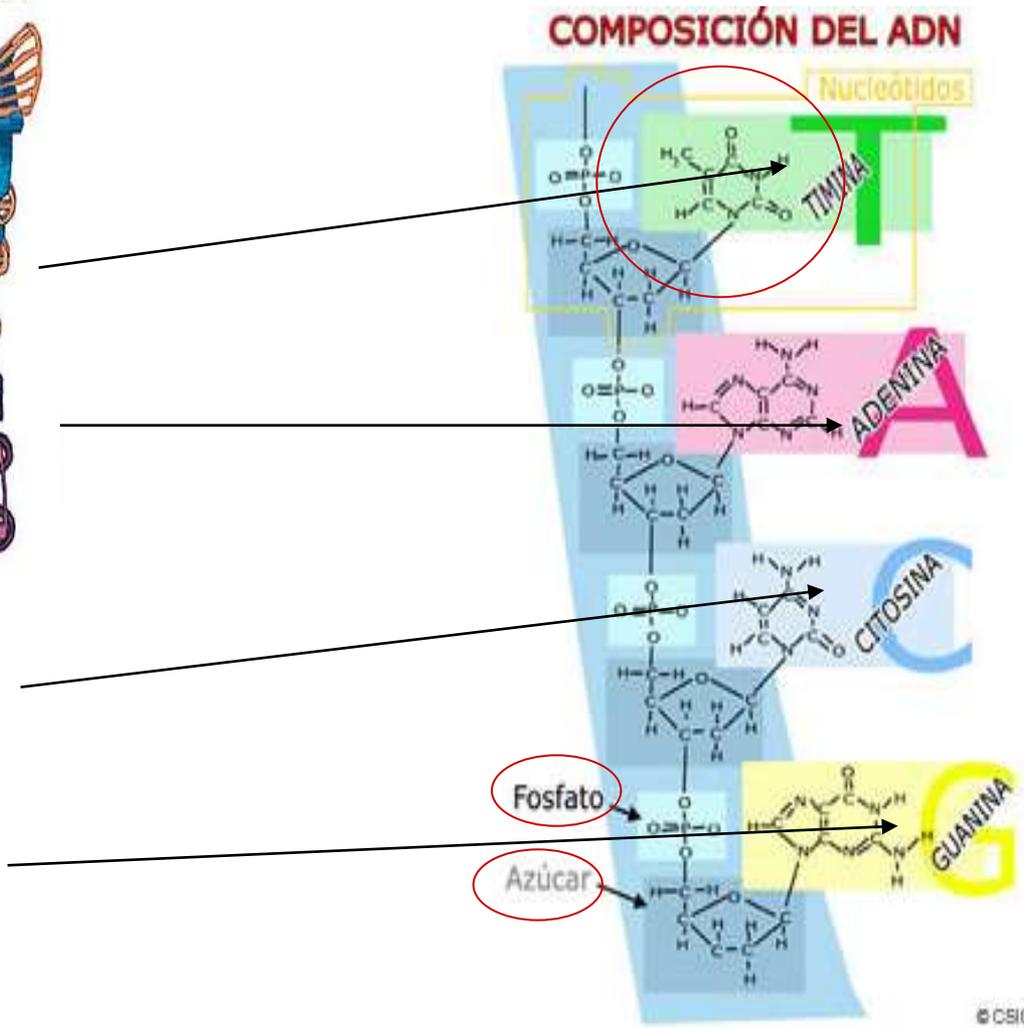
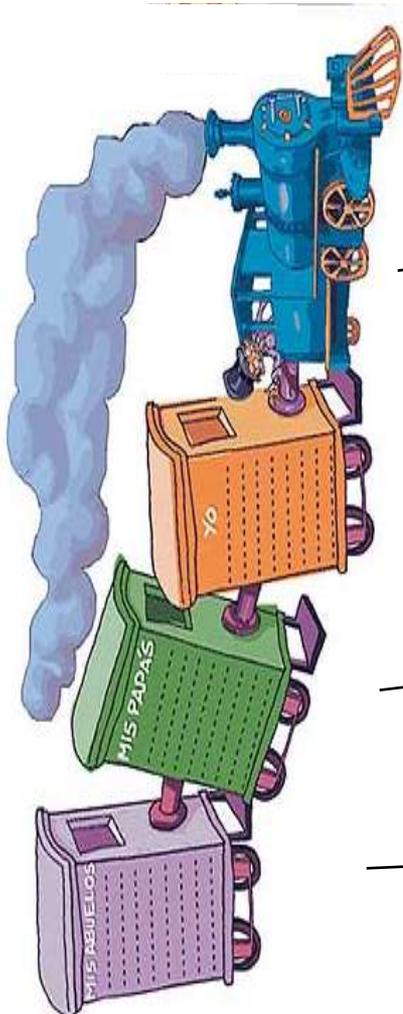
RATIO:

Abs 260/280

Concentración (ng)
de ácidos nucleicos

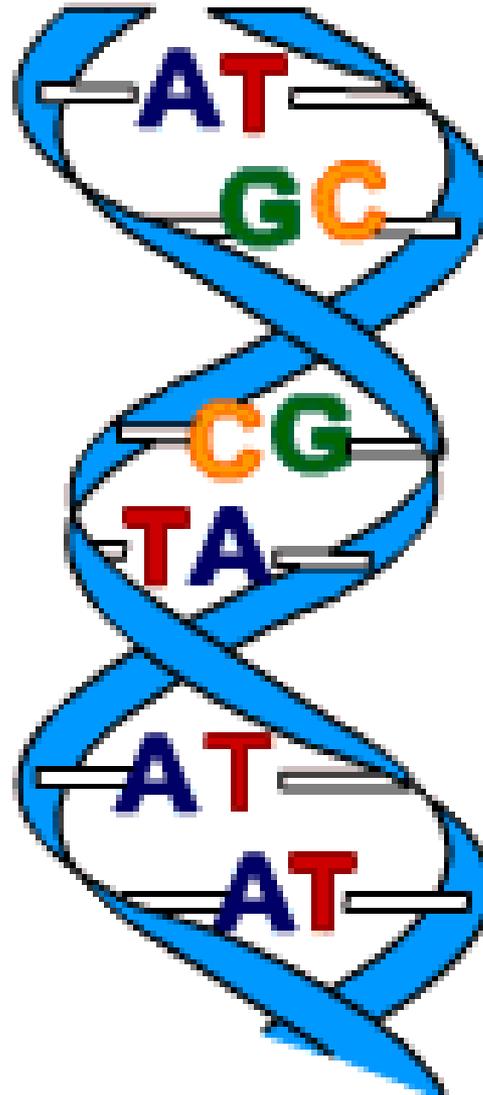
Restos de proteínas
y alcoholes

Un repaso a la molécula de ADN



**Azúcar
+
Base
Nitrogenada
+
Grupo fosfato**

Un repaso a la molécula de ADN



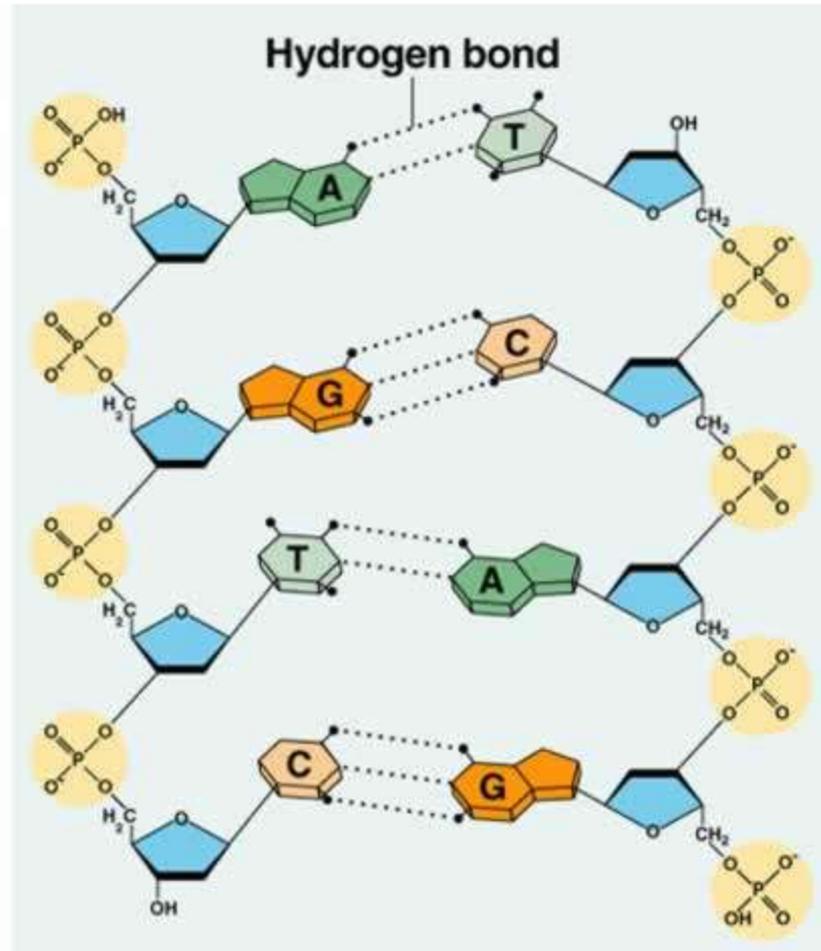
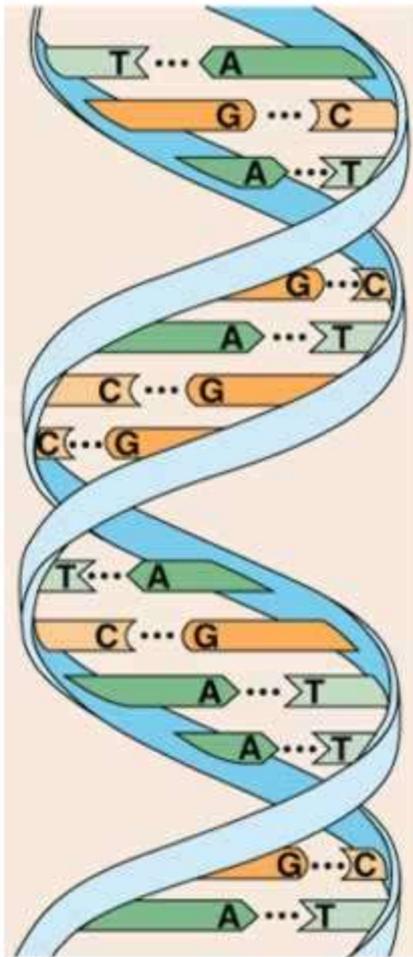
A Adenina

T Timina

C Citosina

G Guanina

Representación
gráfica del
ADN



The Central Dogma



DNA



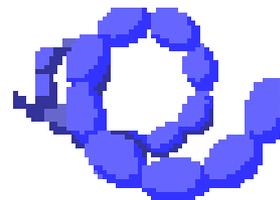
Transcription:
the synthesis of
an RNA copy of a
segment of DNA



RNA



Translation



Protein

Codón

2ª posición del codón

Nucleótido que ocupa la primera posición del codón

SECOND LETTER

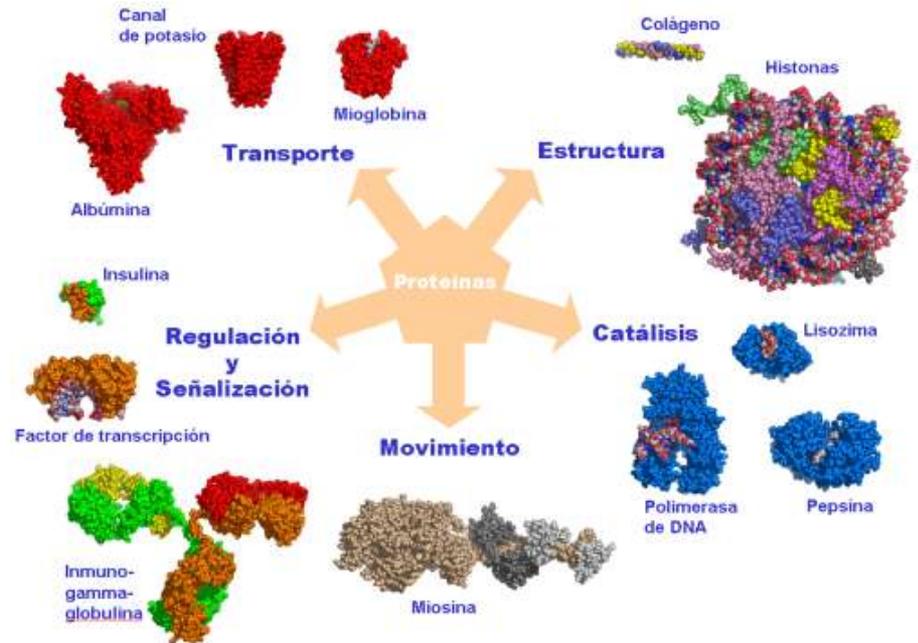
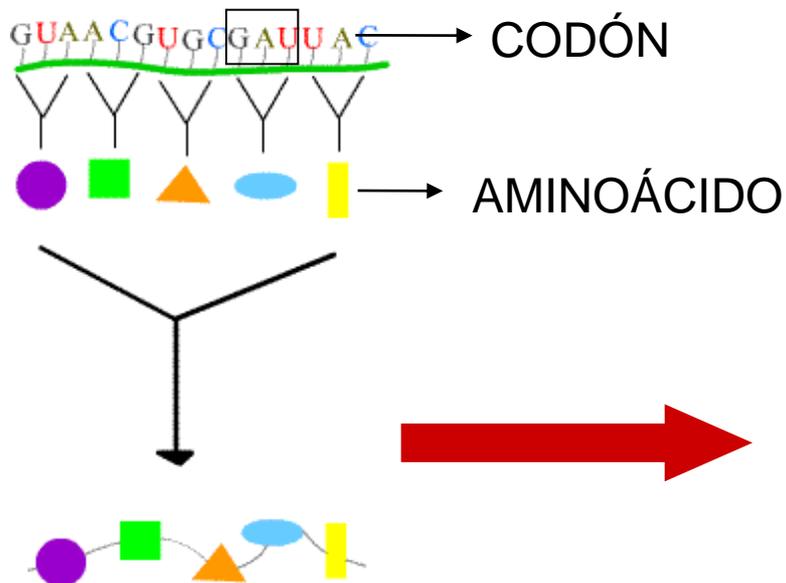
		U	C	A	G		
FIRST LETTER	U	UUU } PHE UUC } UUA } LEU UUG }	UCU } UCC } SER UCG } UCA }	UAU } TYR UAC } UAA } STOP UAG } STOP	UGU } CYS UGC } UGA } STOP UGG } TRP	U C A G	
	C	CUU } CUC } LEU CUA } CUG }	CCU } CCC } CCA } PRO CCG }	CAU } HIS CAC } CAA } CAG }	CGU } CGC } ARG CGA } CGG }	U C A G	
	A	AUU } AUC } ILE AUA } AUG } MET	ACU } ACC } ACA } THR ACG }	AAU } ASP AAC } AAA } LYS AAG }	AGU } SER AGC } AGA } ARG AGG }	U C A G	
	G	GUU } GUA } VAL GUC } GUG }	GCU } GCC } GCA } ALA GCG }	GAU } ASP GAC } GAA } GLU GAG }	GGU } GGC } GGA } GGG }	U C A G	

THIRD LETTER

Aminoácido

GENETIC CODE TABLE

Proteína



¿Qué técnicas utilizamos?

- Southern Blot
- PCR
- RT-PCR
- PCR en tiempo real
- Secuenciación Sanger

PCR:

Reacción en cadena de la polimerasa

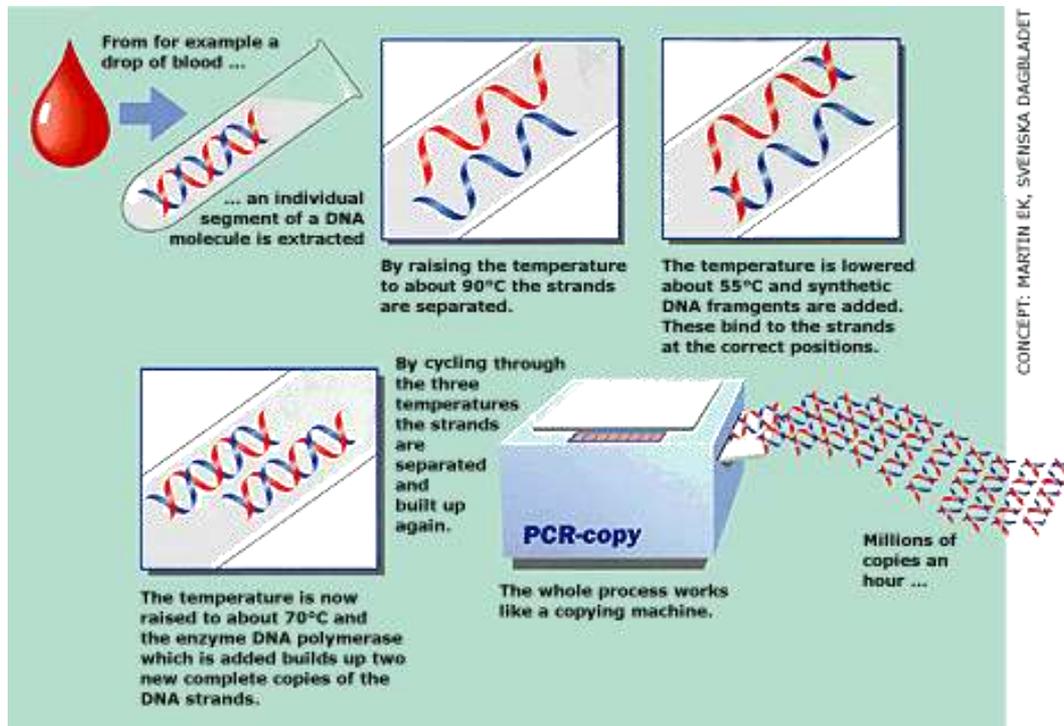
Inventada por Kary Mullis en 1983

- Primera publicación aparece en 1985
- Premio Nobel de Química en 1993

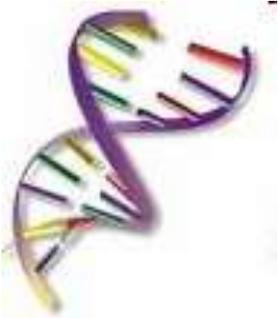


La reacción en cadena de la polimerasa

- Amplificación de secuencias específicas de DNA
- Diseño de dos oligonucleótidos “*primers*” complementarios a los extremos del fragmento a amplificar y que actúan como cebadores de la reacción

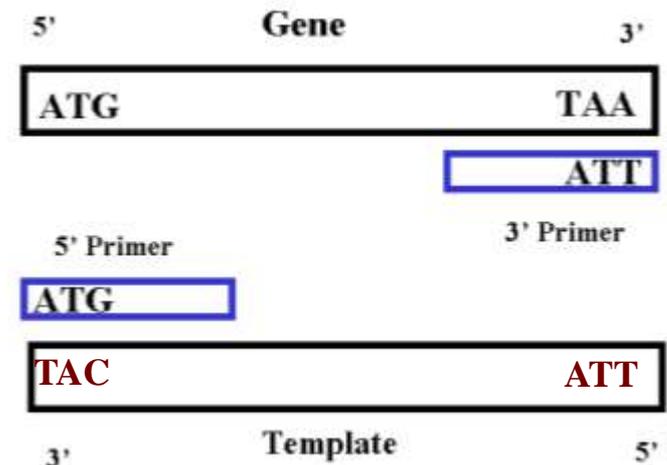


¿Qué necesitamos para la PCR?



1. DNA MOLDE. Segmento de DNA de doble cadena que contiene la secuencia diana que queremos amplificar

2. PRIMERS. Pequeños fragmentos de DNA de cadena simple.
Complementarios a los extremos flanqueantes del DNA molde.
Marcarán el punto de partida y delimitarán la zona de DNA a amplificar



¿Qué necesitamos para la PCR?

A C G T



3. dNTPs. Nucleótidos.
Sustrato que usará la Polimerasa cuando produzca el nuevo DNA



4. DNA POLIMERASA TERMOESTABLE. (Taq Polimerasa)
Enzima que produce las copias de DNA



5. Tampón y MgCl₂



The outflow channel this small spring has mats of orange-coloured cyanobacteria where it has cooled below 73C.

However, in the whitish areas at higher temperature, long stringy masses of *Thermus aquaticus* can be seen.



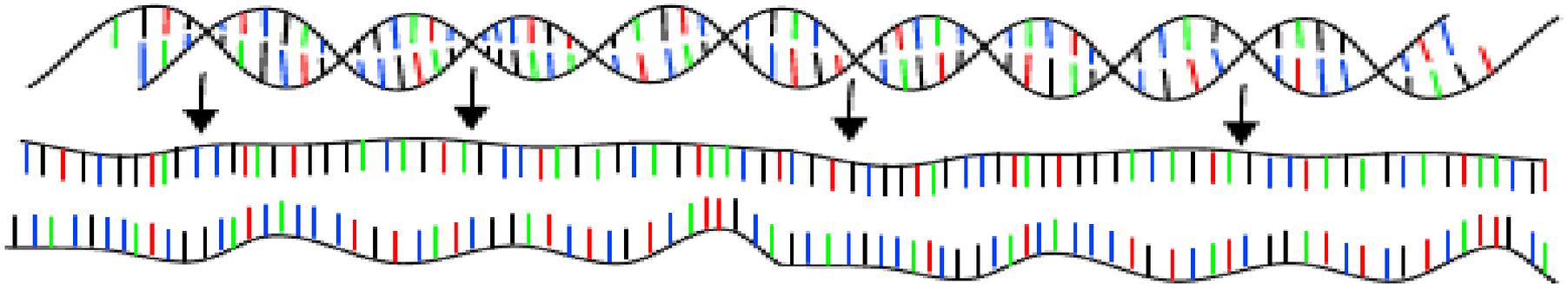
Thermus aquaticus

Taq polymerase - thermostable



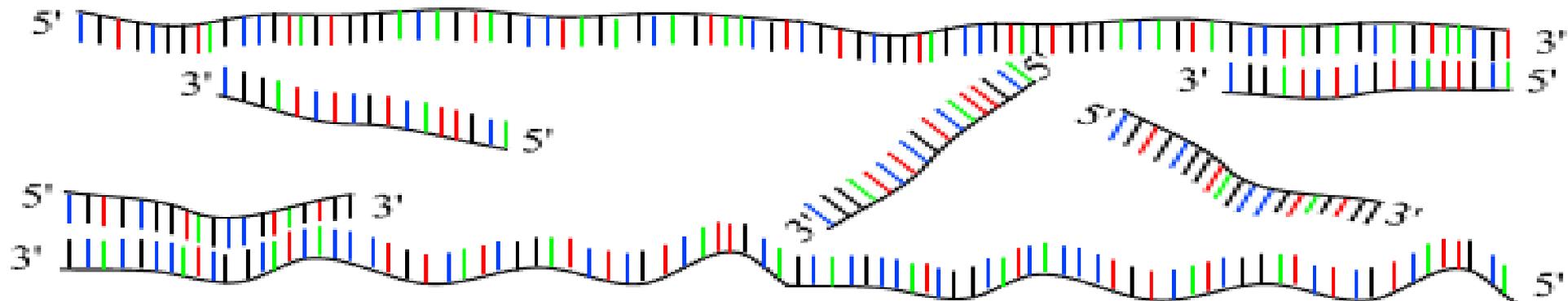
Desnaturalización

La muestra se lleva a una temperatura de 94-96 C para que se rompan los puentes de hidrógeno y las dos cadenas del ADN molde se separen



Hibridación

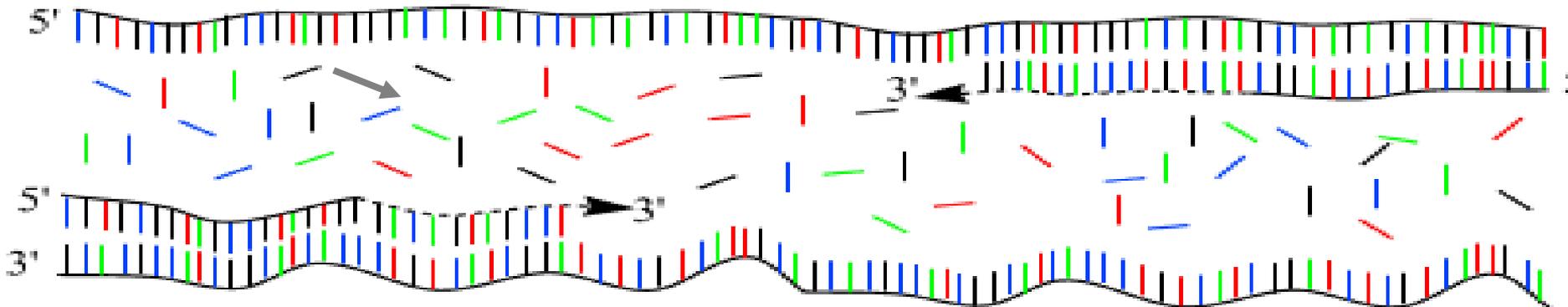
Los primers o cebadores que hemos añadido en la muestra actúan a una temperatura de entre 50 y 70°C para unirse uno por cada extremo a las cadenas de DNA molde de manera complementaria. De esta manera delimitarán la zona a amplificar



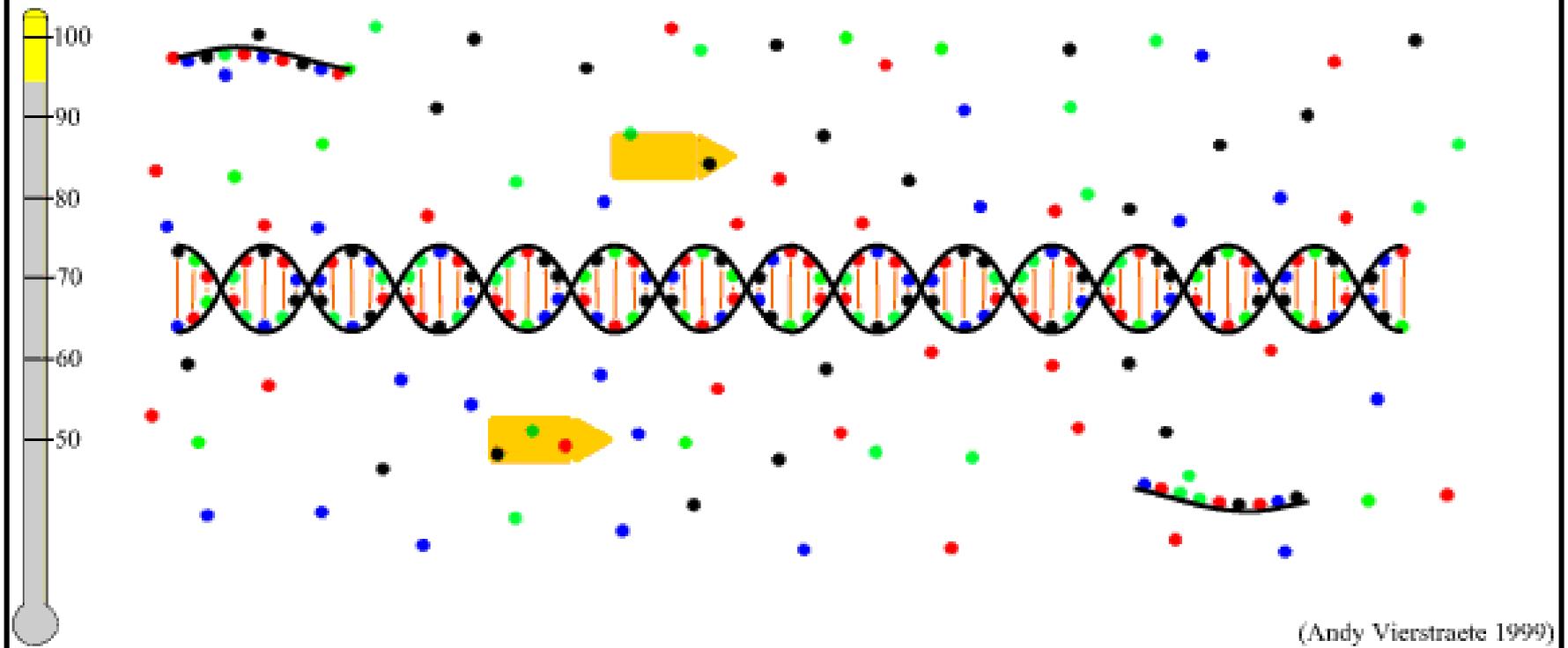
Extensión

La DNA polimerasa trabaja a 72°C

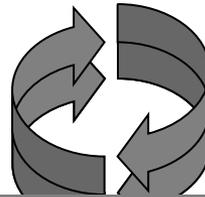
Realiza la extensión de las cadenas de ADN por complementariedad de bases entre los dNTPs y la cadena molde



PCR : Denaturation 94°C



(Andy Vierstraete 1999)

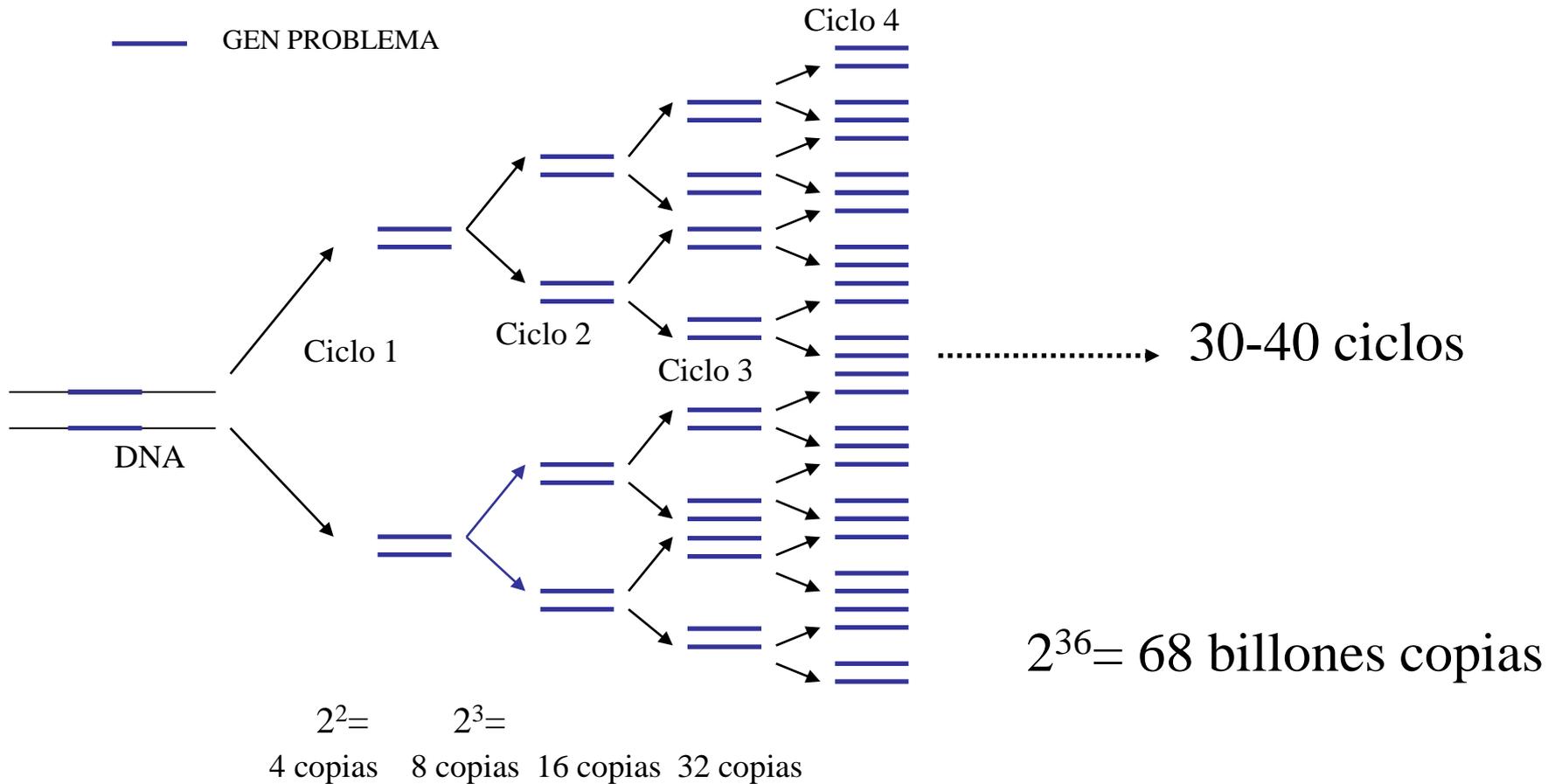


Thermal cycle
thermal cycle



En 32 ciclos, al 100% de eficiencia, se crean 1.07 billones de copias del ADN de interés

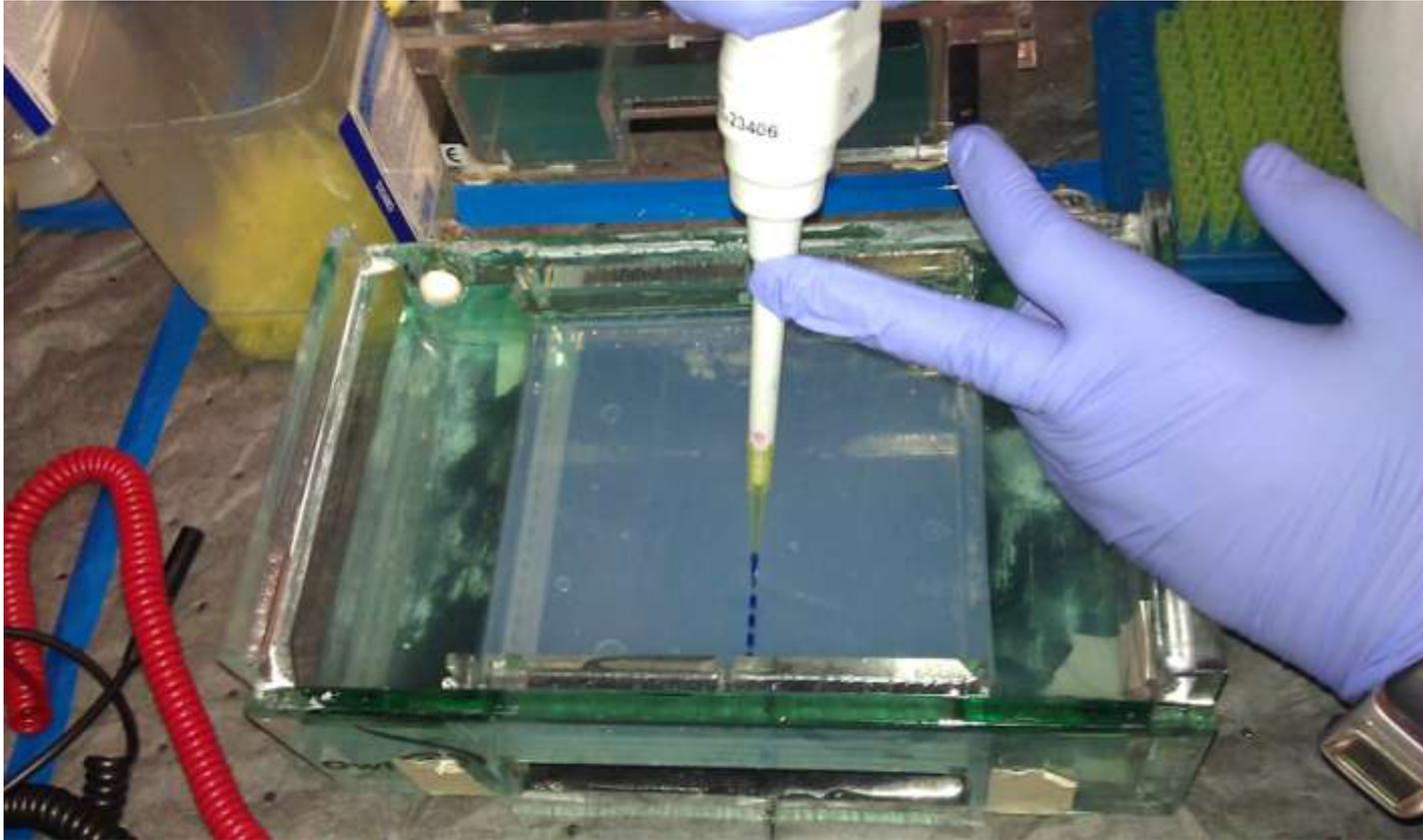
Reacción de la PCR



Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

- **Conseguir un gran número de copias de moléculas de un pequeño fragmento de ADN**
- **Diversos ciclos de desnaturalización y síntesis de ADN.**
- **Disponer de cantidad suficiente y utilizarlo posteriormente**

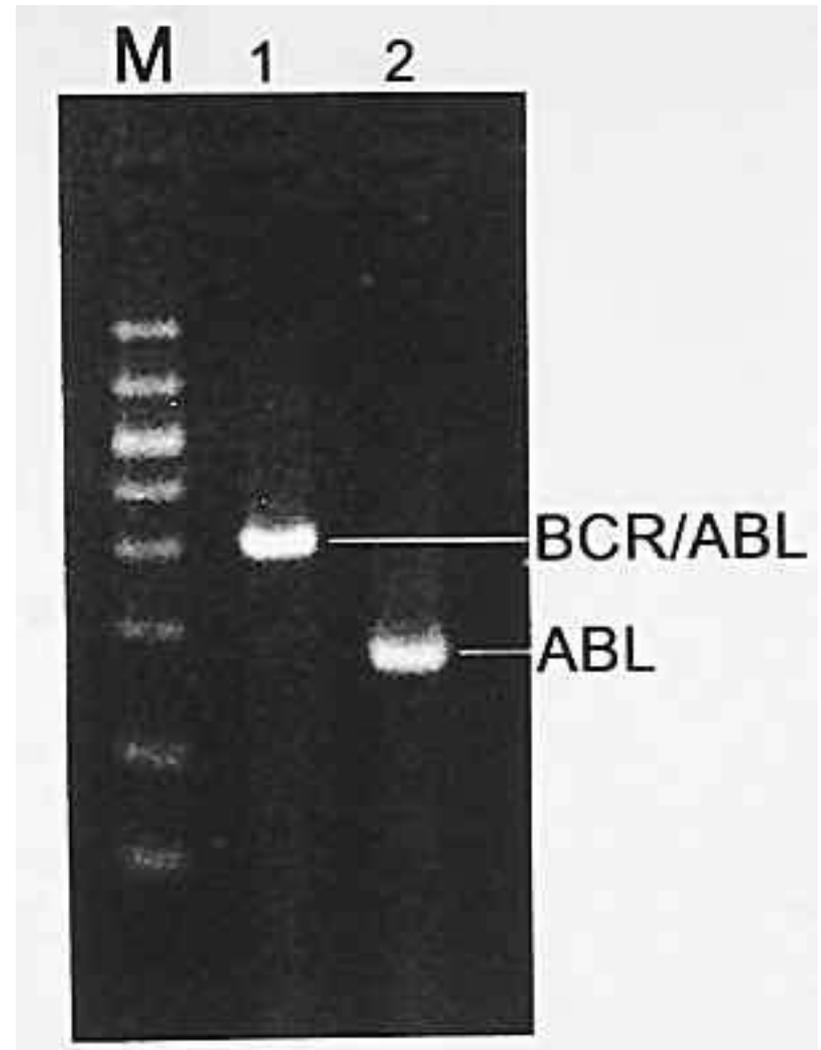
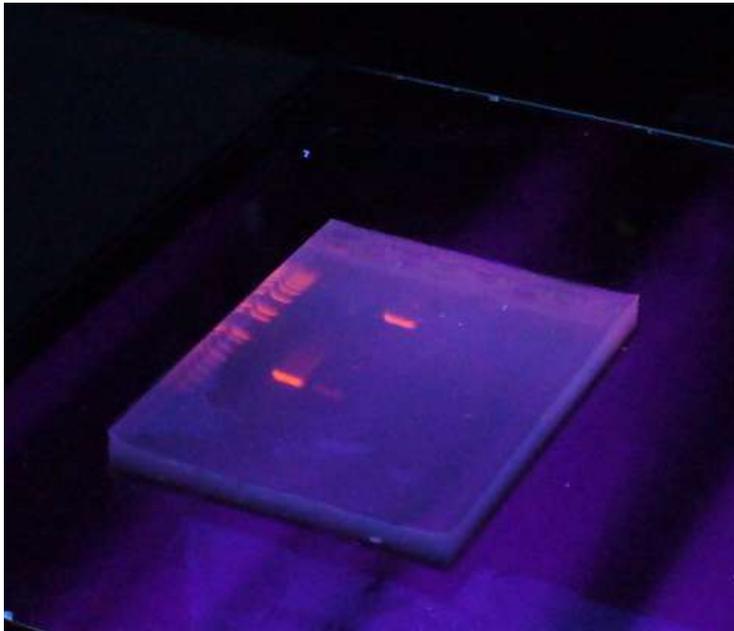
Electroforesis en gel de agarosa



Visualización del producto de PCR

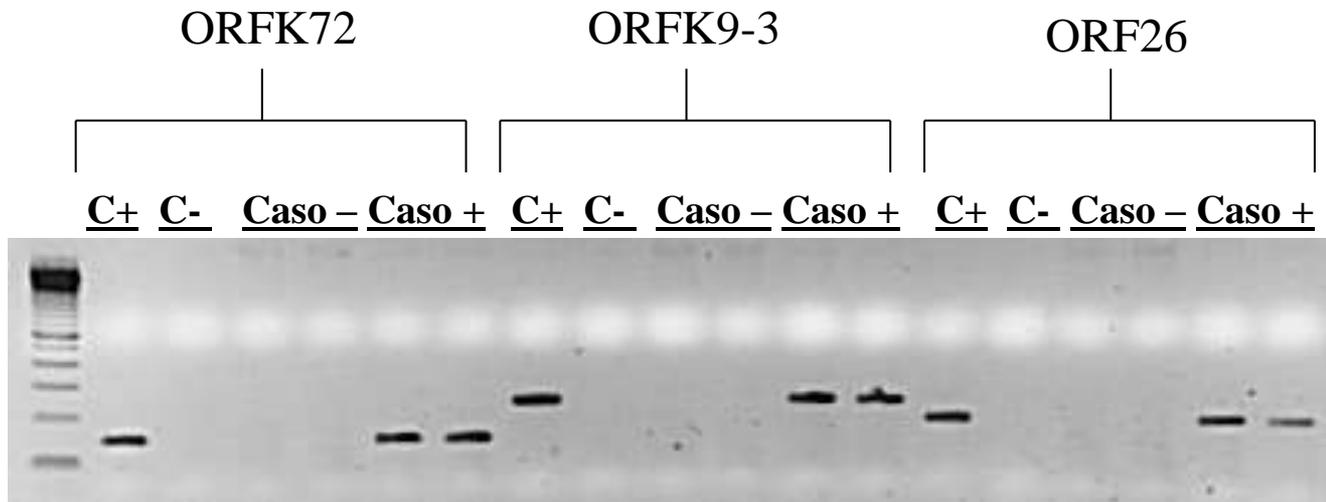
Electroforesis en gel de agarosa

Tinción con BrEt u otros



Detección del Herpes Virus Humano 8 (HHV-8)

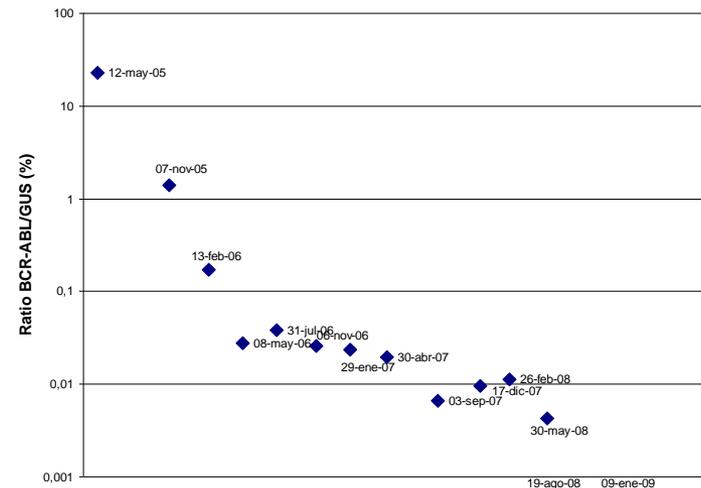
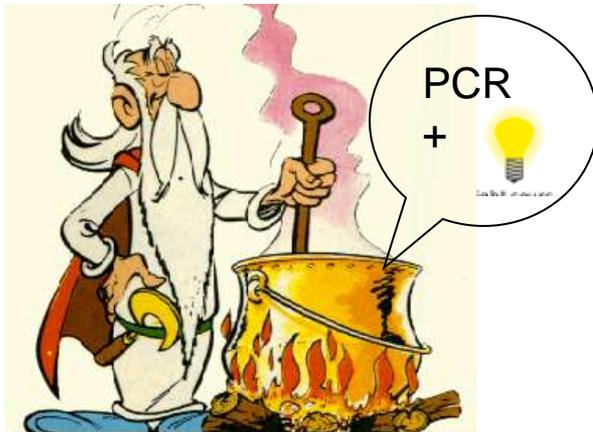
- La positividad en cualquiera de los segmentos analizados indica presencia de organismo en la muestra



PCR enTiempo Real

Es una variante de la PCR que permite cuantificar el producto de la amplificación.

Añadimos un fluorocromo que emitirá una fluorescencia con cada copia del ADN. Esto nos indicará si el gen está presente o no en la muestra, y de ser positivo, si se encuentra en mayor o menor cantidad

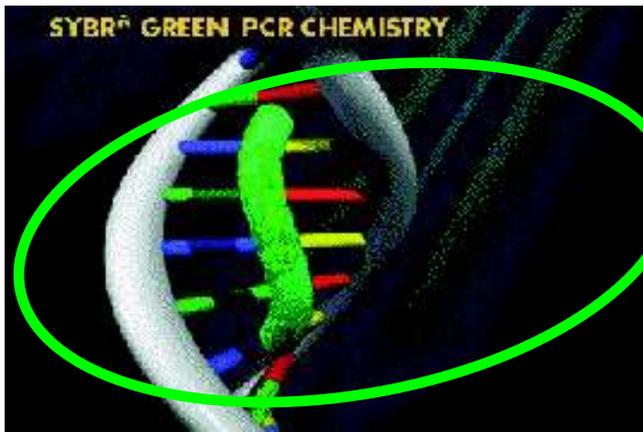
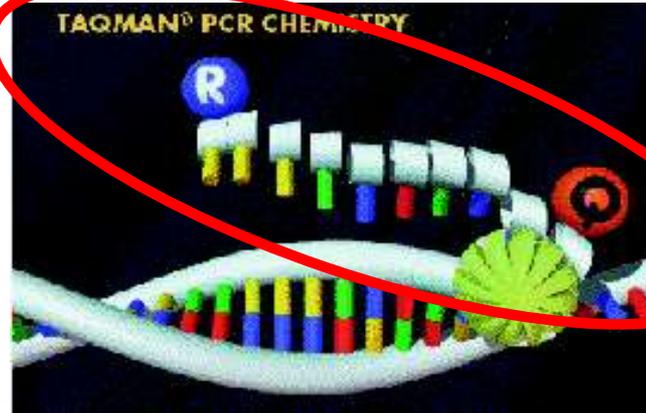


PCR Cuantitativa en Tiempo Real

La detección de la amplificación se basa en la presencia de fluorescencia

Sondas TaqMan[®]

Sondas FRET[®]



SYBR Green[®]

HRM DYE[®]

PCR Cuantitativa en Tiempo Real

Sondas Taqman:

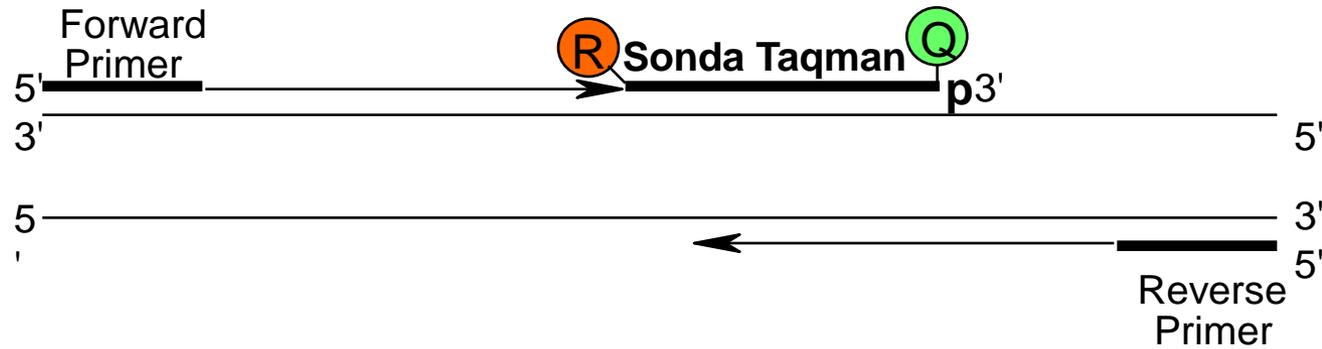
Reporter

Quencher

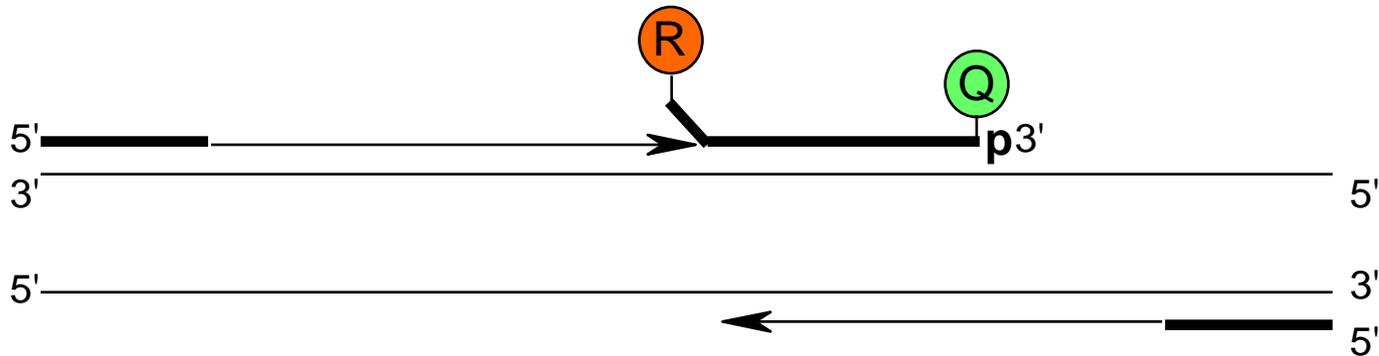


PCR Cuantitativa en Tiempo Real

1-Polimerización

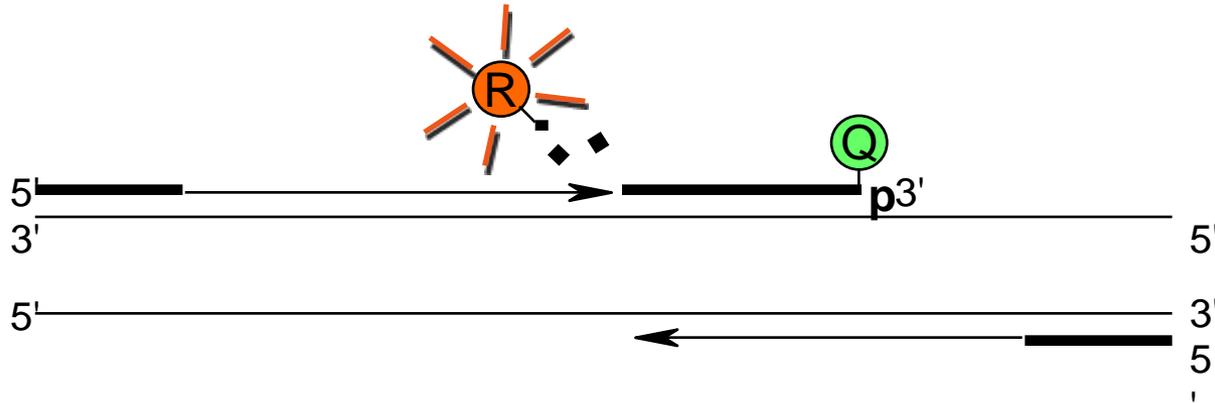


2-Desplazamiento de la sonda

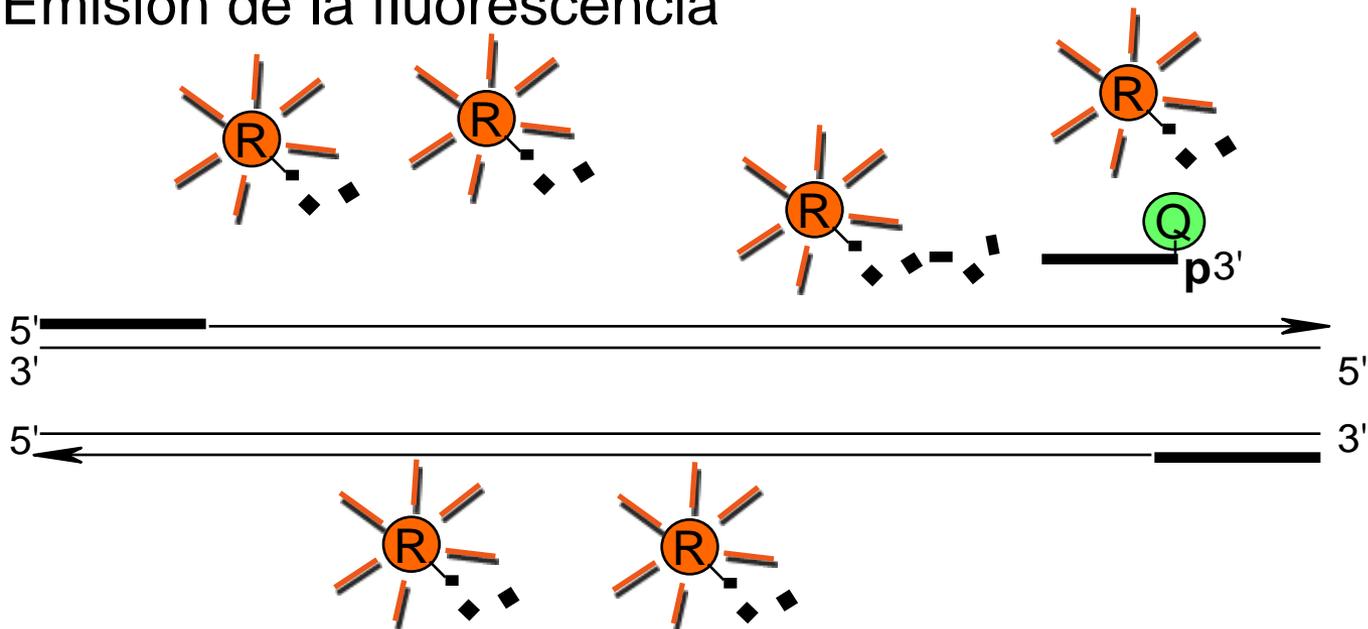


PCR Cuantitativa en Tiempo Real

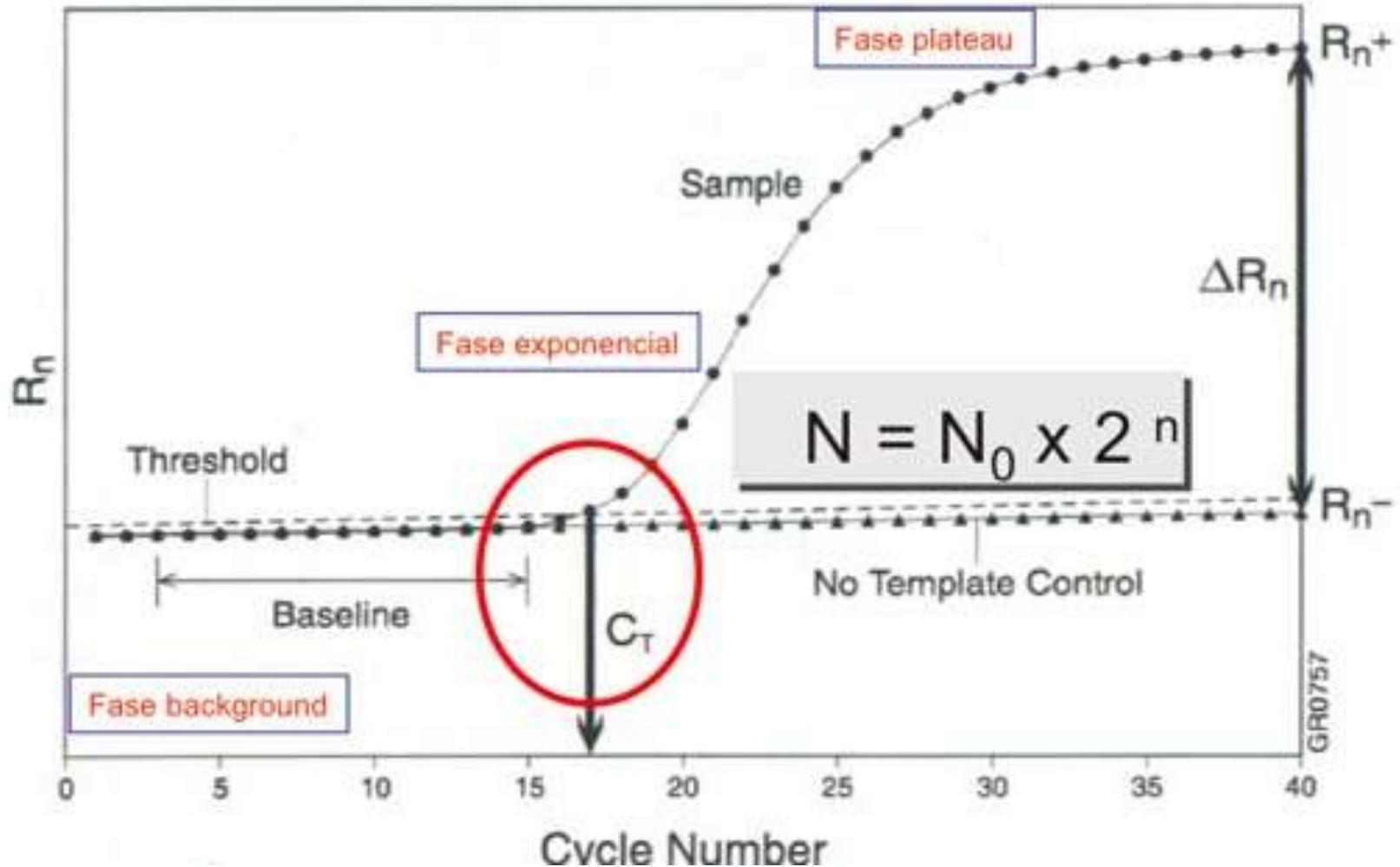
3-Hidrólisis de la sonda



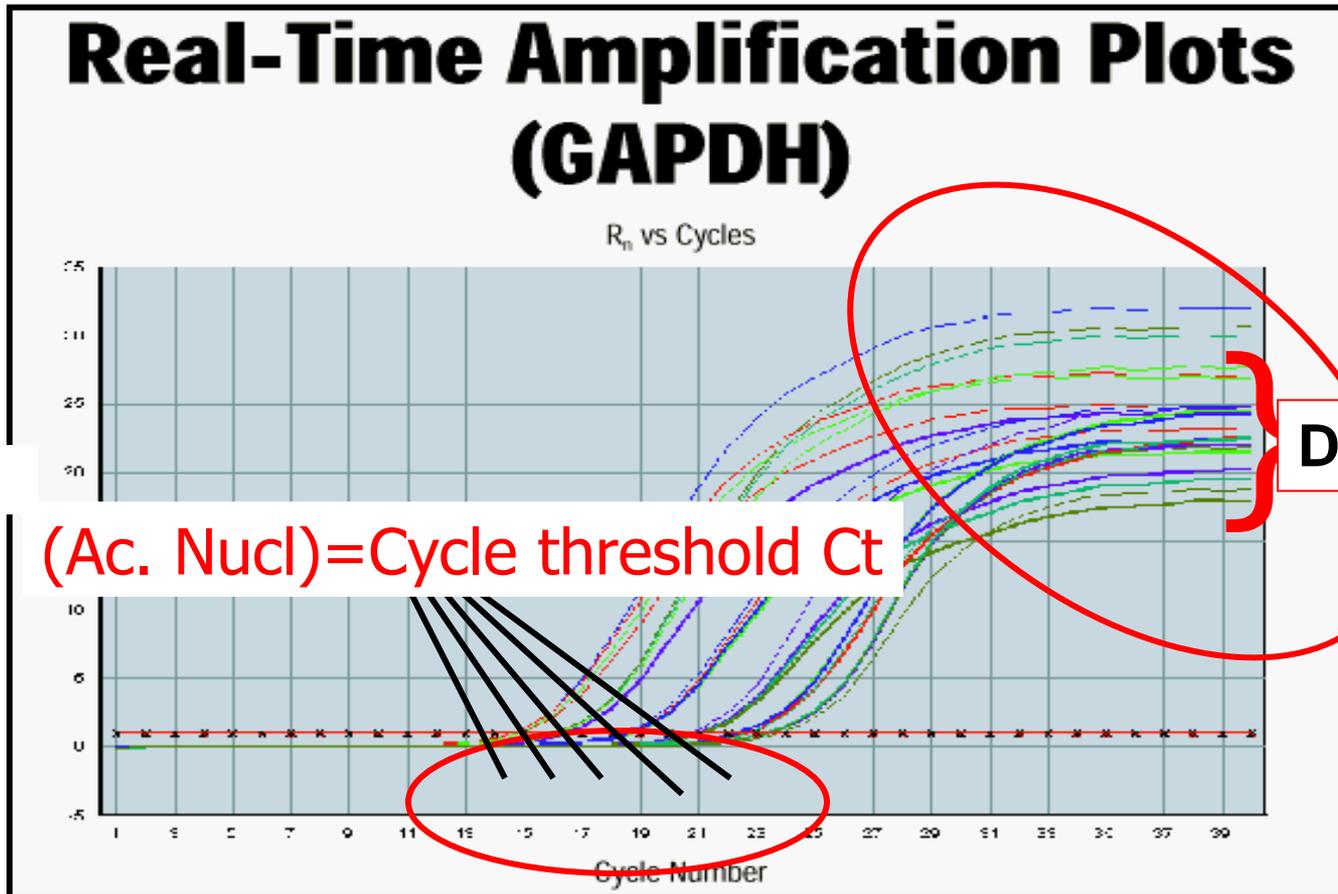
4-Emisión de la fluorescencia



Cycle threshold (Ct) o cross-point (Cp) : principio de cuantificación



PCR Cuantitativa en Tiempo Real



Detección

Cuantificación

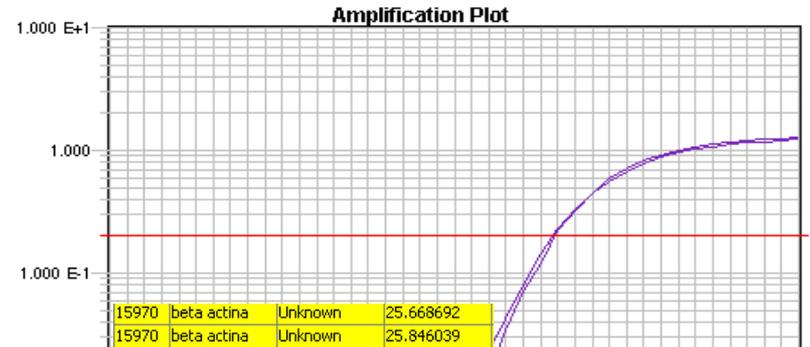
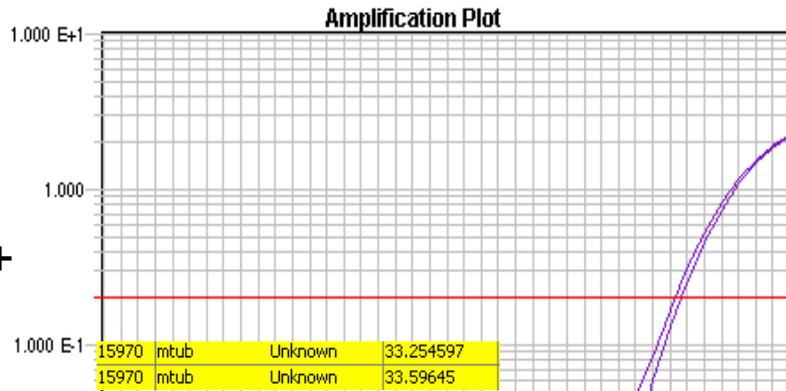
Ciclos

PCR Cuantitativa en Tiempo Real

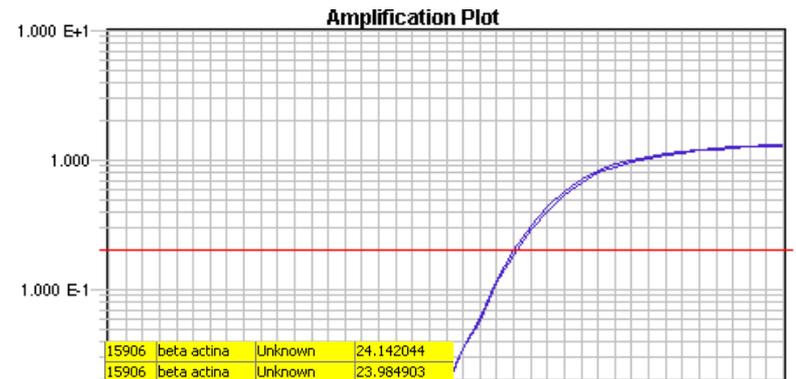
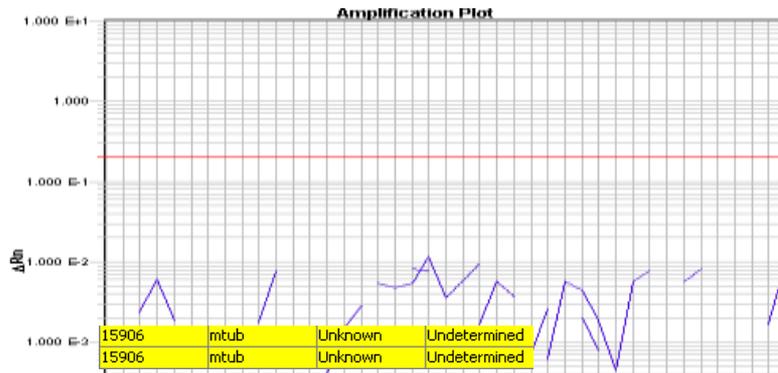
Sonda *M. Tuberculosis*

Sonda *Beta actina*

Caso +



Caso -



Mutación

Alteración de la secuencia del ADN original. Esto provoca cambios en la información genética del individuo.

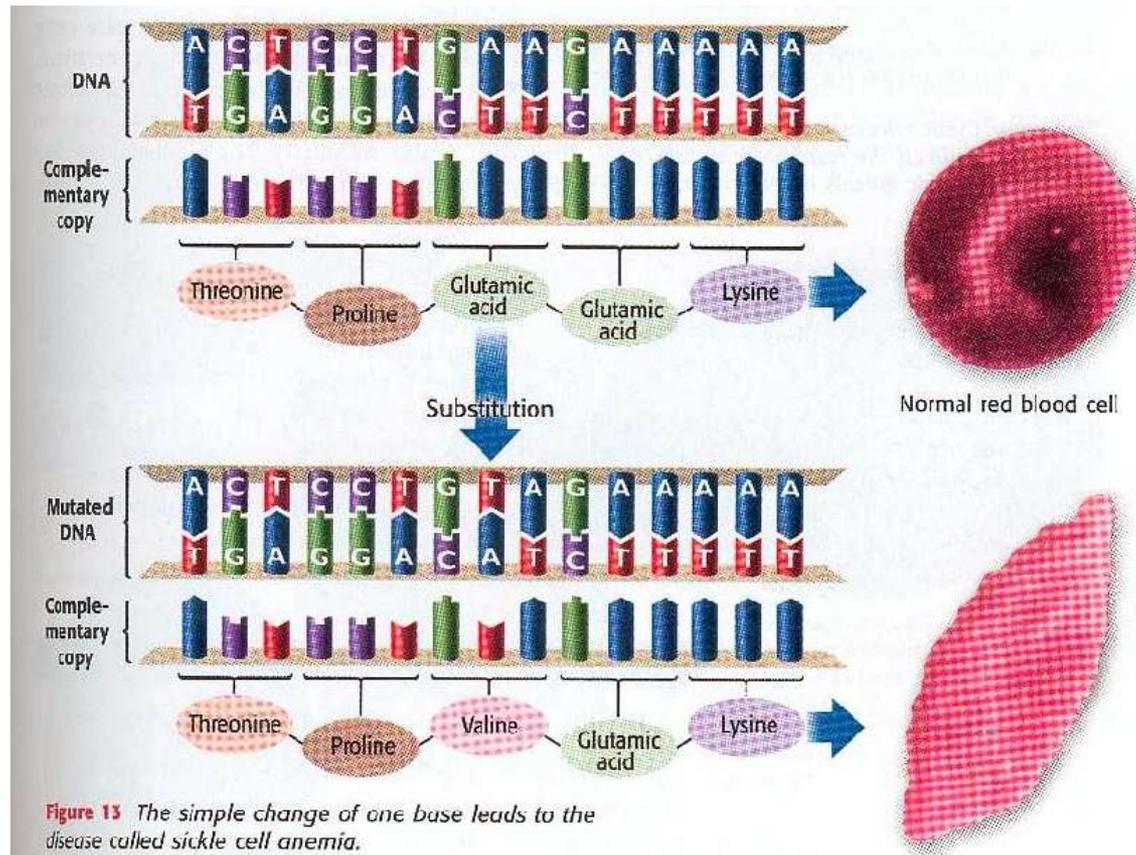


Figure 13 The simple change of one base leads to the disease called sickle cell anemia.

Secuenciación directa

- **Técnica “gold standard” para detectar mutaciones**
- **Es la técnica más informativa**
- **Sensibilidad 15-20%**
- **Coste elevado**
- **Laborioso**

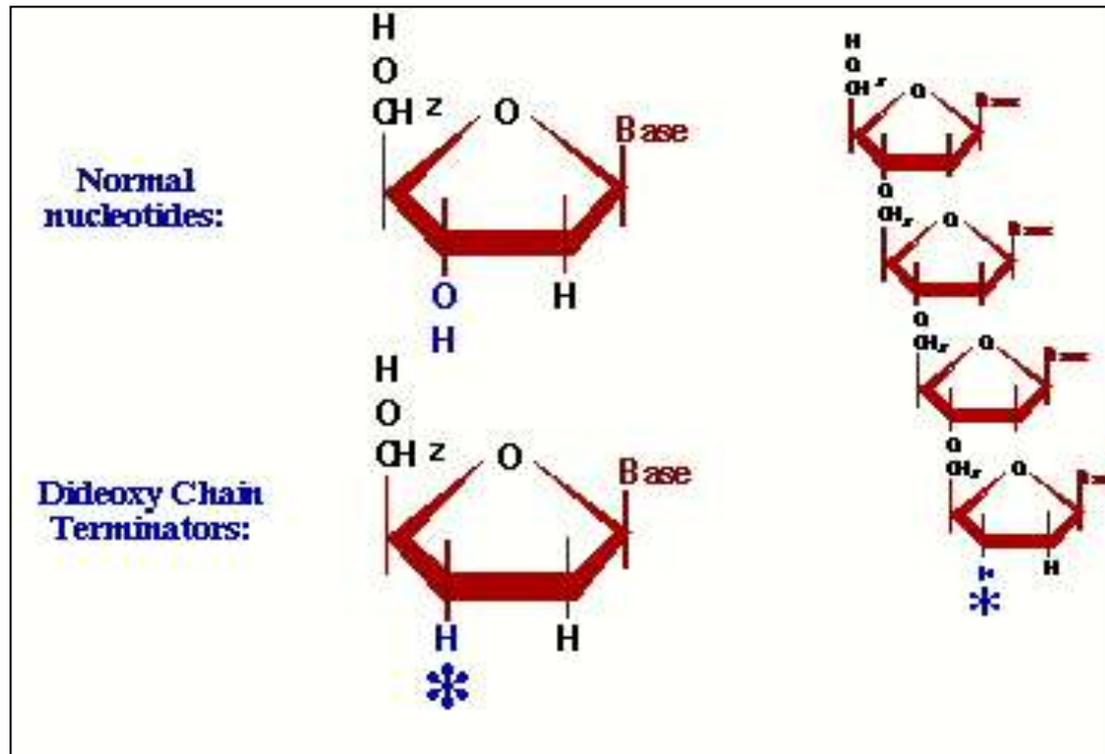
Reactivos de una reacción de secuenciación con terminadores marcados



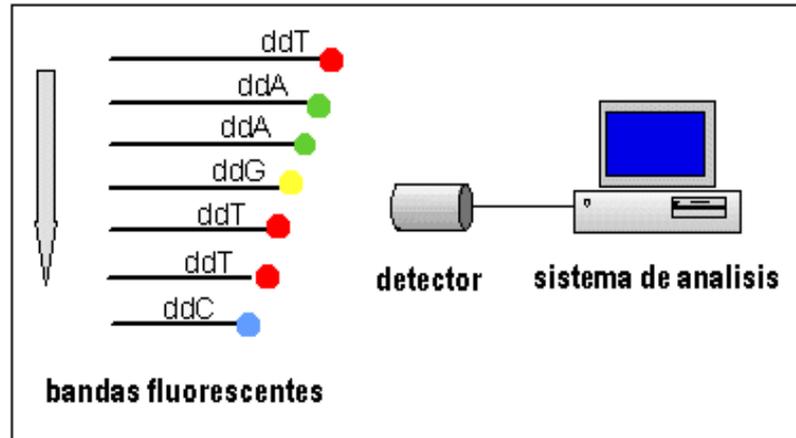
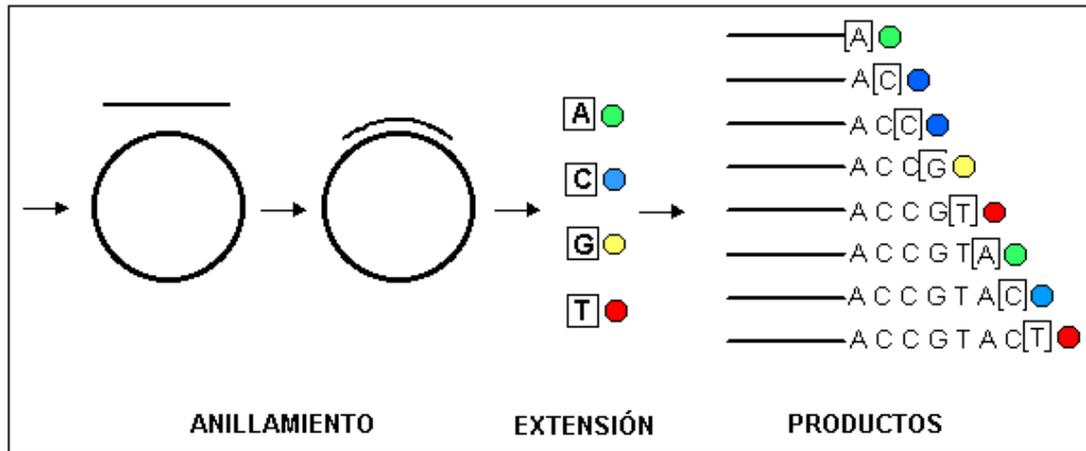
- Fragmento de ADN problema (producto de PCR)
- Cebador “*primer*” de secuenciación
Fw o Rv
- dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- ddNTPs (terminadors) (ddA, ddT, ddC, ddG)
- Taq polimerasa (*Thermus aquaticus*)
- Tampón (10x)
- MgCl₂ (cofactor)
- H₂O

Estructura de un dideoxynucleótido (ddNTP)

- Nucleótido sin grupo hidroxilo en el extremo 3'
- Cuando se añaden al fragmento de ADN que se está copiando no permiten la incorporación del siguiente nucleótido en la cadena

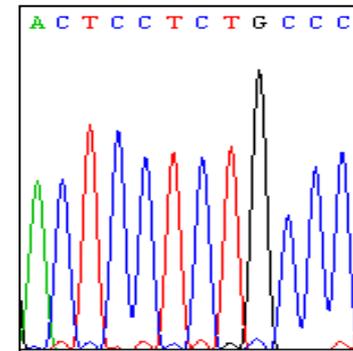


Producto Amplificado en PCR convencional: **ACCGTACT**

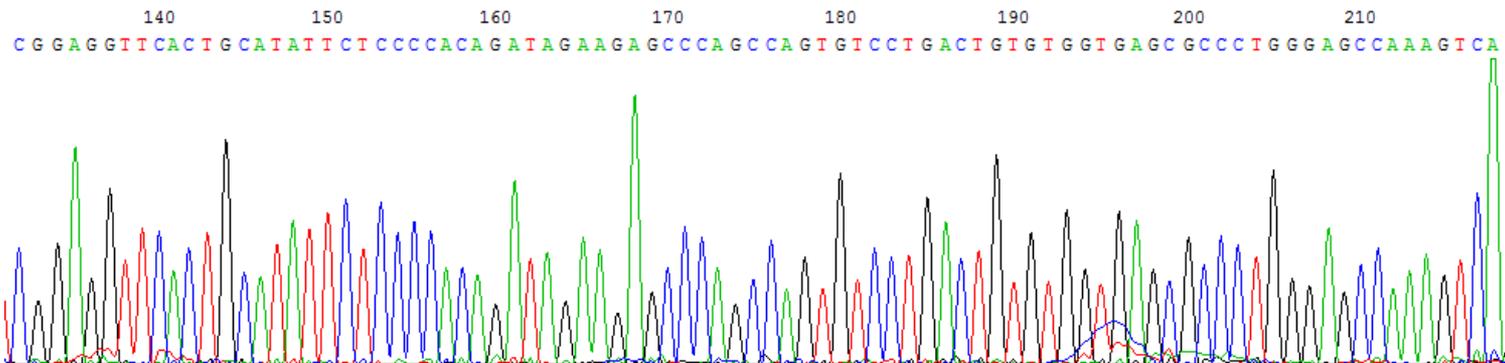
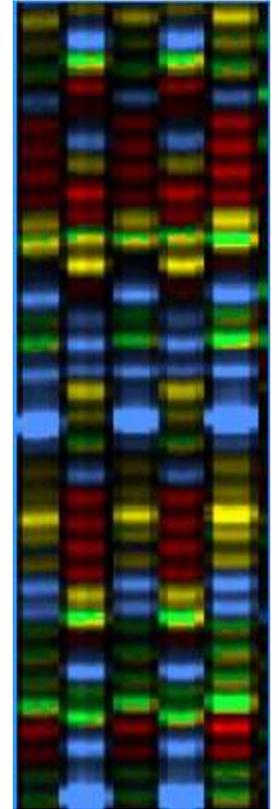


ACCGTACT

Cromatograma



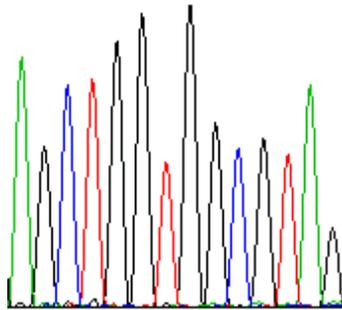
Secuenciador capilar



A: adenina ; T: timidina ; G: guanina ; C: citosina

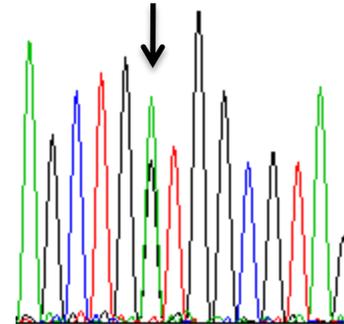
Detección de mutaciones en *KRAS*

A G C T G G T G G C G T A G



Wild type

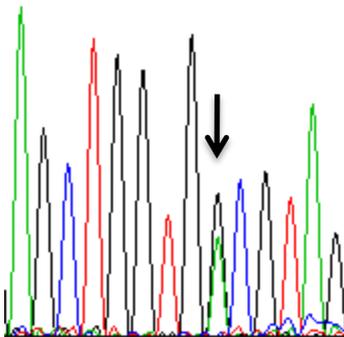
A G C T G N T G G C G T A G



Gly12Asp

G>A
GGT → GAT
Gly(G)→Asp(D)

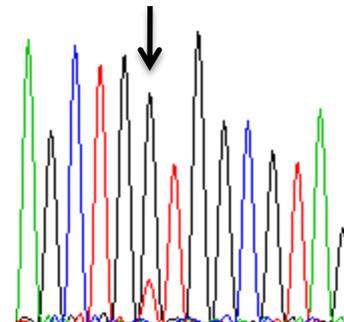
A G C T G G T G N C G T A G



Gly13Asp

G>A
GGC → GAC
Gly(G)→Asp(D)

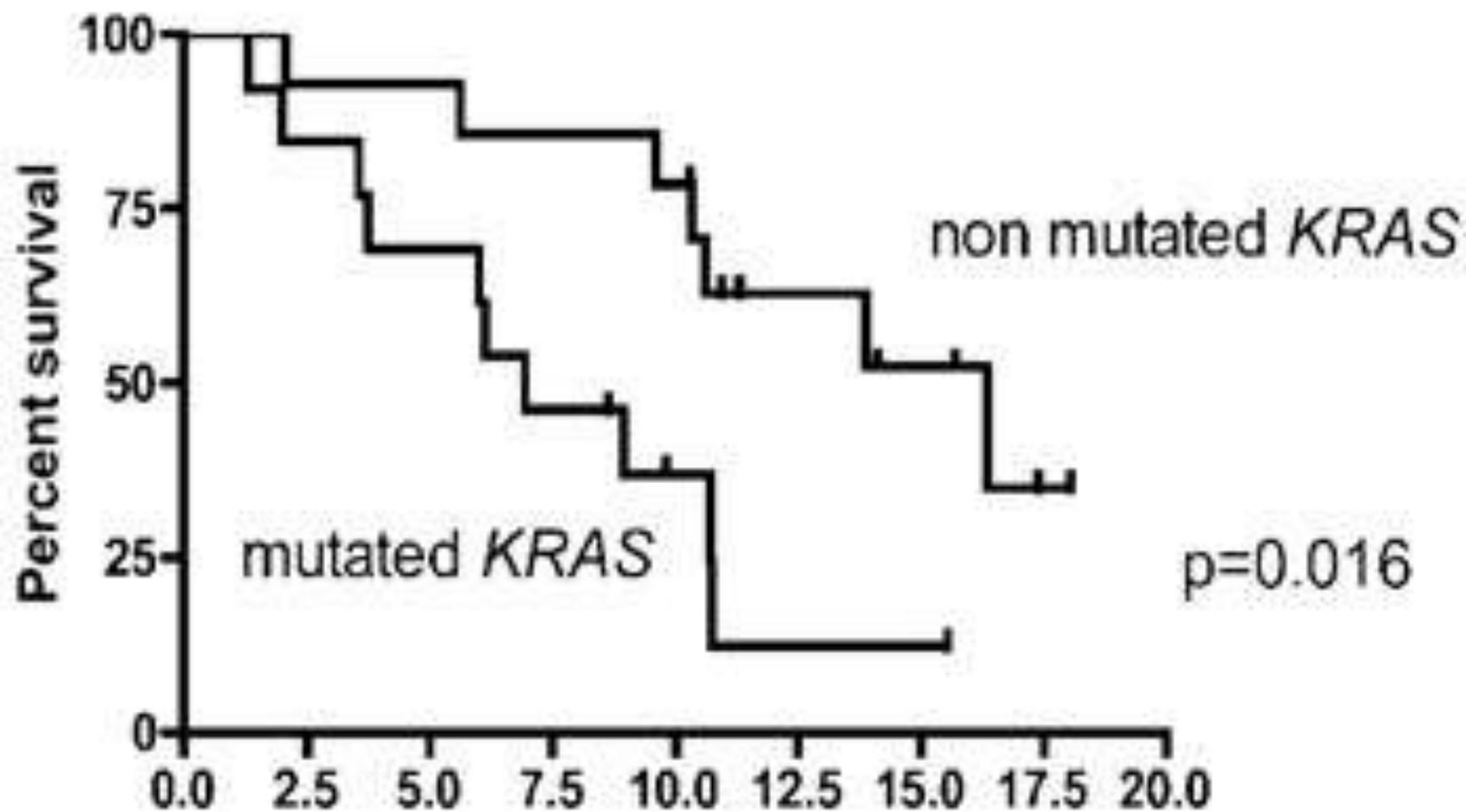
A G C T G N T G G C G T A G



Gly12Val

G>T
GGT → GTT
Gly(G)→Val(V)

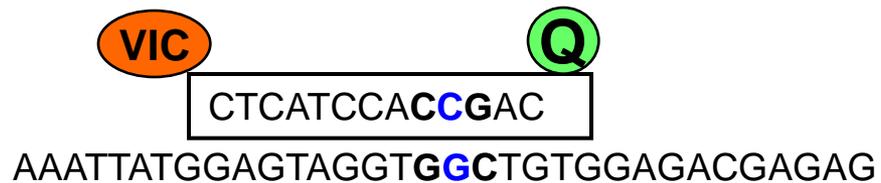
Overall survival according to *KRAS* mutation



Detección de mutaciones en *KRAS* por PCR en tiempo real

-Sondas Taqman alelo-específicas

Alelo *wild type*



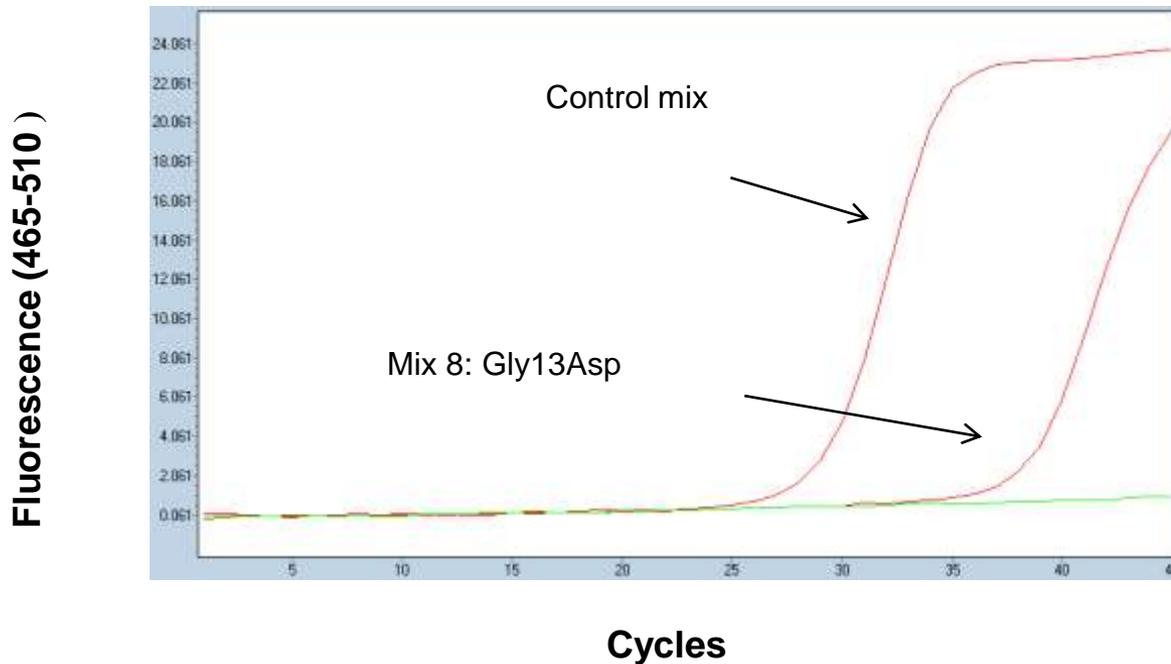
Alelo Mutado

KRAS



Detección de mutaciones en *KRAS*

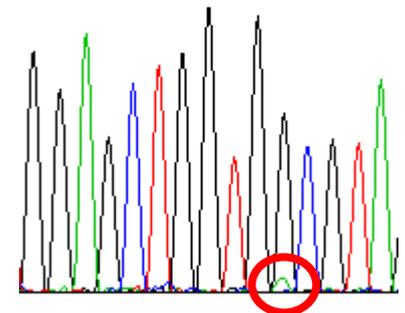
Amplification Curves



GGC → GAC

Gly13Asp

G G A G C T G G T G G C G T A



Resumen

- PCR: técnica fundamental en el diagnóstico molecular
- Amplifica segmentos concretos de ADN
- Permite analizar alteraciones del ADN
- Secuenciación: detectar mutaciones
- PCR en tiempo real:
 - Cuantificar
 - Mayor sensibilidad que secuenciación
- Proporciona información diagnóstica y predictiva

