

40. Identificación de clones y fragmentos de ADNc mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

José Luis Caballero Repullo, Enriqueta Moyano Cañete, Juan Muñoz Blanco

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba

RESUMEN

La capacidad de amplificar segmentos específicos de DNA in vitro mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) hacen de ésta técnica una herramienta imprescindible en el laboratorio de Biología Molecular. El objetivo de esta práctica es la amplificación de fragmentos de ADNc correspondientes a genes de fresa subclonados en el plásmido pB/S(-) mediante PCR y su posterior visualización en gel de agarosa.

Palabras clave: amplificación, cebadores, hibridación, polimerasa

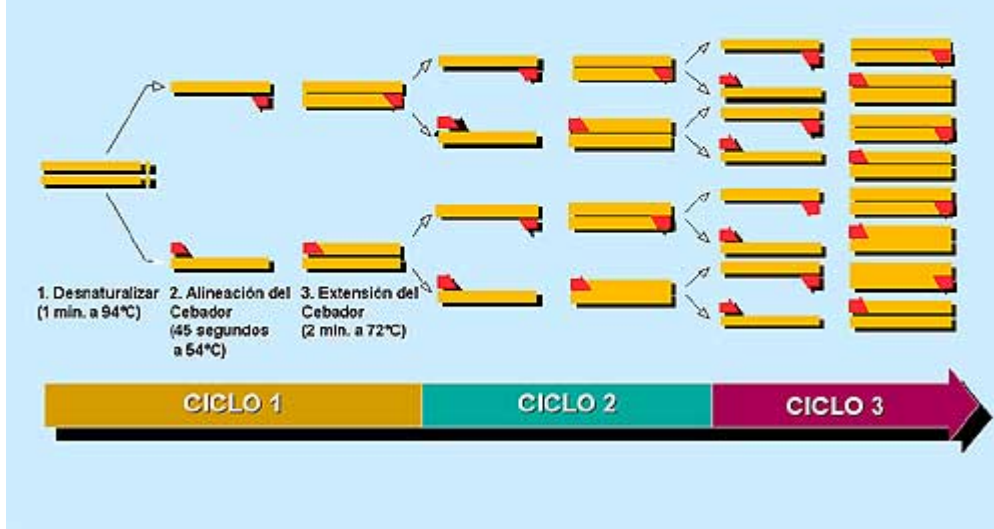
Abreviaturas empleadas ADN: ácido desoxirribonucleico; ADNc: ADN complementario; BrEt: bromuro de etidio; dNTPs: desoxirribonucleótidos; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; TA: temperatura ambiente; UV: luz ultravioleta.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Durante la corta historia de la Biología Molecular la aparición de una nueva técnica ha transformado, a menudo, tanto en ciencia básica como en aplicada, la forma de enfocar la solución a determinados problemas biológicos. La técnica de PCR, o lo que es lo mismo la capacidad de amplificar segmentos específicos de DNA, es, sin duda alguna, una de las más representativas en este sentido y prácticamente ha revolucionado todos los campos de la Biología Molecular.

La técnica, inventada por Kary Mullis en 1985-86 fue aplicada originalmente por un grupo del Departamento de Genética Humana de la compañía Cetus para amplificar DNA de la globina de humanos y para diagnóstico prenatal de la anemia falciforme (Saiki y otros, 1985; 1988).

Reacción en cadena de la polimerasa



El procedimiento es básicamente simple y consiste en la repetición sucesiva (entre 30-35 veces) de un ciclo de tres periodos consecutivos de desnaturalización, hibridación y extensión (polimerización) del DNA muestra, en presencia de dos cebadores de secuencia conocida y de orientación opuesta, dNTPs, buffer adecuado y una enzima de polimerización de DNA (Klenow, TAQ DNA polimerasa, etc.).

Inicialmente se utilizaba el fragmento Klenow de la DNA Polimerasa de *Escherichia coli* para “extender” el DNA. Esta enzima presentaba un problema de inactivación a alta temperatura, que se solucionaba con la adición de más enzima en cada ciclo.

Con el descubrimiento y uso de la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (TAQ polimerasa) (resistencia a 75 °C) en la reacción se solventó el anterior problema y la PCR se pudo controlar de forma automática (en un ciclador térmico) y en condiciones altamente repetitivas. El uso de esta enzima tuvo además otras consecuencias beneficiosas:

- **mayor T_a de hibridación** ↔ mayor selectividad ↔ mayor proporción (cantidad) final de DNA amplificado correcto frente a incorrecto.
- **Meseta (“Plateau”) alcanzada más tarde**: 30 ciclos en vez de 20 ciclos cuando se comienza la reacción con 1 µg DNA. En la meseta la reacción se hace lineal al final de los ciclos debido, en parte (inicialmente), a que en los últimos ciclos la enzima no es capaz de terminar de extender todos los complejos DNA/cebadores ya presentes, en un simple ciclo (por eso normalmente el último ciclo de extensión se le da al menos 15 min.). Otros efectos también contribuyen a la formación de la meseta y son discutidos aparte.
- **obtención de fragmentos más largos** (hasta 10 kpb, aunque con menor eficiencia) que usando Klenow (<400 pb).

Establecer las condiciones de la PCR requiere el conocimiento previo del par de cebadores a utilizar. Condiciones óptimas para un par de cebadores no son obligatoriamente para otro, por lo que en cada caso se necesitarán establecer las condiciones de la reacción.

La reacción estándar de PCR está formada por los siguientes componentes:

-DNA	($>10^2$ - 10^5 copias de ADN molde)	
	(0,1 μ g aprox. DNA genómico humano)	
-KCl ⁽¹⁾	50 mM	-Tris-HCl
	10 mM (pH 8,4, TA)	
-MgCl ₂ ⁽²⁾	1,5 mM	-Gelatina ⁽³⁾
	100 μ g/ml	-Cebadores ⁽⁴⁾
μ M (cada uno)		250
	-dNTPs ⁽⁵⁾	200 μ M (cada uno)
	-Polimerasa Taq ⁽⁶⁾	2,5 unidades (0,25 μ l)
-Volumen final	50 μ l o 100 μ l	
-Aceite mineral	100 μ l	

Notas:

- (1) Se puede omitir (aunque puede ser beneficioso)
- (2) A $>Mg^{++}$ = no especificidad (se va perdiendo especificidad)
A $<Mg^{++}$ =se reduce le cantidad final de producto obtenido.
- (3) Se puede omitir (aunque puede ser beneficioso)
- (4) Los cebadores, más que ningún otro factor, son los que condicionan el éxito o fracaso de la PCR. Su selección y diseño, por tanto, han de hacerse con cuidado. Generalmente su tamaño oscila entre 20-30 nucleótidos en longitud, aunque se utilizan más pequeños. Tres factores influyen principalmente en su diseño:
- **contenido GC:** mientras sea posible usar cebadores con distribución al azar de bases y contenido en GC semejante al fragmento que se quiera amplificar (a ser posible evitar zonas contiguas de purinas, pirimidinas o secuencias raras)
 - **estructuras secundarias:** evitarlas a toda costa, particularmente en el extremo 3'. Existen paquetes de programas de computación como el la Universidad de Wisconsin con programas como Squiggles o Circles muy buenos para revelar estructuras secundarias.
 - **complementariedad:** buscar no complementariedad entre los cebadores, particularmente evitando que solapen en su extremo 3'. Esto evita la formación de artefactos como el de dímeros de cebadores, artefacto de aproximadamente la suma del tamaño de ambos cebadores y que se origina por el apareamiento de los mismos y posterior polimerización (extensión) en los sucesivos ciclos por la polimerasa Taq.
- (5) Entre 50-200 μ M cada uno, suficiente para 6.5-25 μ g de DNA, respectivamente.
A $>dNTPs \leftrightarrow$ mas incorporación.
Tienen que ser soluciones neutralizadas y concentraciones determinadas exactamente mediante luz UV.
Si cambio la concentración de dNTPs hay que cambiar la concentración de MgCl₂ ya que los dNTPs ligan Mg⁺⁺ y a $>dNTPs=<Mg^{++}$ libre.

⁽⁶⁾A >TAQ, menos especificidad

Un ejemplo de programa utilizado en un termociclador para la realización de una PCR:

30 ciclos de:	Pasos	Comentarios
94 °C, 20 s	Desnaturalización	Tiempo corto para mantener la TAQ activa
55 °C, 20 s	Hibridación	Depende del contenido en GC
72 °C, 30 s	Extensión	Tiempo +/- 1 min por cada 1 kb de secuencia

El objetivo de esta práctica es la amplificación de fragmentos de ADNc mediante PCR de genes de fresa subclonados en el vector pBluescript SK (-). El ADN molde que se utilizará será el obtenido en la Práctica 1. El producto de la reacción de PCR se visualizará mediante electroforesis en gel de agarosa como se describió en la Práctica 1.

2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

dNTPs
Cebadores
MgCl₂
KCl
10 x Buffer PCR
Taq polimerasa
Triton X-100
Puntas estériles con filtro
Pipetas automáticas.
Termociclador.
Hielo picado en escamas.
Agua destilada estéril.
Tubos de 0'2 ml.
Sistema de electroforesis
Erlenmeyer de 100 ml
Microondas

3. PROTOCOLO A REALIZAR

1. Preparación en hielo de la mezcla de reacción de PCR a partir de soluciones concentradas de los diferentes componentes de la misma:

Para 50 µl:

10 x Buffer PCR = 5 µl

MgCl₂ (25 mM) = 3 µl

Mezcla de dNTPs (5 mM) = 4 µl

cebador 1 (50 µM) = 1 µl

cebador 2 (50 µM) = 1 µl

DNA (cada grupo, diferente) = x µl (aprox. 50 ng ADN plasmídico)

TAQ Pol (5 unidades/µl) = 0,5 µl

dH₂O = hasta 50 µl

Las cantidades de esta mezcla de reacción se multiplicará por el número de reacciones que se van a llevar a cabo más 1.

Nota: Siempre hay que preparar una muestra control que lleve todos los componentes de la reacción excepto el ADN molde. Esto nos permitirá determinar si existen contaminaciones en la mezcla de reacción que pudieran interferir en nuestros resultados.

2. Añadir a cada tubo de 0,2 ml el ADN molde y la correspondiente mezcla de reacción. La muestra control llevará la misma cantidad en agua. Dar un pequeño pulso en la microfuga y colocarlos en el bloque térmico del ciclador al cual se le ha introducido previamente el programa a desarrollar:

CONDICIONES DE LA PCR

1 Ciclo

94 °C 1 min

30 Ciclos

94 °C 30 seg

55 °C 1 min

72 °C 1 min

1 Ciclo

72 °C 7 min

Dejar a 4 °C

3. Una vez finalizado dicho programa de PCR se realizará una electroforesis con 25 µl en gel de agarosa al 2%, junto a fragmentos de ADN de tamaño conocido (patrones: λ -HindIII, escalera de 1 kpb ("ladder"), etc.) como se describió en la Práctica 1

4. Observar el fragmento amplificado en un transiluminador con luz UV.

Nota: la manipulación del material en contacto con BrEt se debe realizar con guantes.

4. RESULTADOS ESPERADOS

Al visualizar en el transiluminador de luz UV se deberán observar fragmentos de ADN de diferentes tamaños. Se podrá determinar sus tamaños aproximados por comparación con los de los fragmentos del patrón utilizado.

5. BIBLIOGRAFÍA

Libros

Bridge PD, Arora DK, Reddy CA, Elander RP, Eds. (1998) "Applications of PCR in Mycology". CAB International.

Dieffenbach C, Dveksler G (1995) "PCR Primer: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Ellingboe J, Gyllensten UB (1992) "The PCR Technique: DNA Sequencing". Eaton Publishing Co.
- Erlich HA, Ed. (1989) "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification". Stockton Press.
- Griffin HG, Griffin AM (1994) "PCR Technology: Current Innovations". CRC Press.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, Eds. (1999) "PCR Applications. Protocols for Functional Genomics. Academic Press.
- Innis MA, Helfand DH, Sninsky JJ, White TJ (1990) "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications". Academic Press.
- Mc Pherson MJ, Hames BD, Taylor GR (1995) "PCR2: A Practical Approach". IRL Press.
- Mc Pherson MJ, Quirke P, Taylor GR (1992) "PCR: A Practical Approach". IRL Press 1992.
- Mullis K (1994) "The Polymerase Chain Reaction". Birkhauser Press.

Artículos

- Bloch W (1991): A biochemical perspective of the polymerase chain reaction. *Biochemistry* 30: 2735-2747.
- Erlich HA, Gelfand D y Sninsky JJ (1991): Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252:1643-1651.
- Mullis KB (1990) Reacción en cadena de la polimerasa. *Investigación y Ciencia*, número de junio, página 30-37.
- Mullis KB y Faloona FA (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 155: 335-350.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB y Erlich HA (1988) Primed-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-494.
- Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA y Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Taylor GR y Robinson P (1998):The polymerase chain reaction: from functional genomics to high-school practical classes. *Current Opinion Biotechnology* 9: 35-42.
- White TJ, Arnheim N y Erlich HA (1989) The polymerase chain reaction. *Trends Genet.* 5: 185-189.