

Duna-de-Luis-Moura-Problemas-PCR...



DL_Moura



Biotecnología



3º Grado en Ingeniería de la Salud



**Escuela Técnica Superior de Ingeniería Informática
Universidad de Málaga**

Problemas PCR

1- Muchos fármacos son metabolizados por un grupo de enzimas, pertenecientes a la superfamilia citocromo p450 (también llamadas CYP). De esta superfamilia, la enzima CYP2B6 metaboliza al Efavirenz, un fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa que se emplea como parte de la terapia antirretroviral altamente activa (TARAAA, equivalente al inglés HAART) en el tratamiento de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (HIV).

Cuando el gen que codifica para esta enzima presenta un cambio de una guanina por una timina en la posición 516 de la secuencia nucleotídica se produce un cambio del aminoácido glutamina por histidina en la posición 172 de la proteína (p. Gln172 His). Esta modificación produce que la enzima CYP2B6 tenga menos actividad y en consecuencia el fármaco se mantiene más tiempo en el plasma. Por tanto los pacientes que presentan el gen mutado necesitan menos dosis de Efavirenz para su tratamiento.

Necesitas realizar el estudio de la farmogenética del fármaco y para ello tienes que amplificar la región del exón 4 del gen CYP2B6 para ello tienes dos primers que te prestó un amigo que trabaja en otro laboratorio:

Primer forward (CYP2B6-4F): 5' – GGTCTGCCCCATCTATAAAC – 3'

Primer reverse (CYP2B6-4R): 5' – CTGATTCTTCACATGTCTGCG – 3'

a) Ubícalos en la secuencia que se presenta a continuación.

El primer forward es sencillo de buscar ya que va en la misma dirección y es complementario a la otra hebra (por lo que su secuencia es igual a la hebra que vemos), se localiza en la línea 5 en el primer recuadro azul de la *figura 1*. Para encontrar el primer reverse tenemos que saber que este es complementario a la hebra que vemos y está revertido, por tanto buscaré en la secuencia la cadena:

5' – CGCAGACATGTGAAGAATCAG – 3'

La localizamos en la línea 13, marcado con el segundo recuadro azul tal y como se muestra en la *figura 1*.

b) Para que no se enteren los jefes de tu amigo decides diseñar otros primers que amplifiquen el exón 4 (resaltado en naranja). No olvides escribirlos en la orientación adecuada según la convención.

Como vemos en la *figura 1* ninguno de los dos primers están bien diseñados para amplificar el exón 4 resaltado en naranja. Por lo tanto rediseño ambos primers desde cero:

Primer forward: 5' – GGG CCC TCA TGG AC – 3' T_m = 52°C, 15nt.

Primer reverse: 5' – TTC CAA GGA TAA GCT GC – 3' T_m = 50°C, 17nt.

El primer forward es mucho más rico en GC que el reverse, por ello para tener temperaturas de melting similares he tenido que acortar su secuencia, asegurándome de mantener la especificidad del extremo 3' de ambos primers. Siguen manteniendo una especificidad alta al tener 15 y 17 nt de longitud respectivamente pero la distribución de los nucleótidos no es tan aleatoria como se recomienda y existe cierto riesgo de formación de estructuras secundarias como dímeros. Ahora los primers si están bien diseñados para amplificar el exón 4.

```

GCTGGGTTTAGAGGTATGGGCCCTGTGCCACCCAGGGCTTTTAAATTATATAAGCAATT
GATTGAACACCTACTCTGCCCAGCCCTATCCCTGGGATTTAACTGTACTCACTCCCAGAGT
CAGAGGTGGGGCTGAGAGGAGTGCAGAGTGAGAACCGGCTGCATGGACTCTATAGCTGTG
TTGCCTGGGTCTAAATCCTGGCCTCAGTAATGAGTAGCTGTGCAACTTTGGTCAAATTACTC
AGCCTCTCEGTCTGCCCATCTATAAATGGAGCTAATAATCAAATTGCATCTGCCTCACATT
GTTGTAGTGAGAGTTCAATGGAATTACGCGTGACGTGCTGGTACATAATTAGCTGTTACGGT
TATTCTCATGTTTACCATTACTGAGTGATGGCAGACAATCACACAGAGATAGGTGACAGCCT
GATGTTCCCCAGGCACCTTCAGTCTGTGTCTTGACCTGCTGCTTCTTCTAGGGGCCCTCAT
GGACCCACCTTCCTCTTCCAGTCCATTACCGCCAACATCATCTGCTCCATCGTCTTTGGAA
AACGATTCCACTACCAAGATCAAGAGTTCCCTGAAGATGCTGAACCTTGTCTACAGACTTTT
TCACTCATCAGCTCTGTATTTCGGCCAGGTCAGGGAGACGGAGAGGGACAGGGGGTGTGGGGG
TGAGGTGAACACCCAGAACACAGAGAAAAGGATGACCTGTCTTGGGGCTCAGAAATGCAG
CTTATCTCTGGAAGAAACGCAGACATGTGAAGAATCAGGGACATGGAGACCTGGAGGGAGGA
GAGACGGTGAGACAGGGATAGAGACACTGAGAGAGAGAATGAGGCGTGATGGGGAGGCAGAA
ATAGAGTCAGAGAGAGACTGAGAGAAGGAAGATGAGCAAAAACAGACAAAGAAGAGCAGAA
ATCAAGAGATTCTGAGAGACAGAGTTGATGAGAATGAGTGTGAAAGAGAGGGAGAGAGAG
AACGAATAAGGCTTTGGGCTTCATGTCT

```

figura 1. Localización de los primers forward y reverse en la secuencia.

2- Estas estudiando la siguiente secuencia de ADN:

5' – TATCCCAGTGCCAATTGCTGGGTATAATACTGTCCAGTCTCTCTCGGAGCTGCTGCGAA – 3'

3' – ATAGGGTCACGGTTAACGACCCATATTATGACAGGTCAGAGAGAGCCTCGACGACGCTT – 5'

Tu idea es amplificar la secuencia por PCR y tienes que comprar los primers de 10 pb. ¿Cómo escribirías la secuencia de los primers al hacer el pedido?

Primer forward: 5' – TAT CCC AGT G – 3' T_m = 30°C, 10nt.

Primer reverse: 5' – TTC GCA GCA G – 3' T_m = 34°C, 10nt.

Escribo los primers con la orientación adecuada según la convención. Para comprobar si el diseño era el adecuado he introducido los primers en la página web de *Thermo Fisher Scientific*¹ donde me permite comprar oligonucleótidos con las secuencias y características que me interesen.

Como se puede ver en la *figura 2*, debo introducir ambas cadenas en sentido 5'-3'. Es muy interesante esta página ya que me ofrece todo tipo de información sobre mis oligos y me permite modificarlos de múltiples formas para adaptarlo exactamente a lo que necesito.

¹ <https://www.thermofisher.com/order/custom-standard-oligo>

ThermoFisher SCIENTIFIC

Buscar Buscar por número de catálogo, nombre del producto, palabra clave, aplicación

1

Oligo Sequence (5' to 3')
TAT CCC AGT G

5' Mod
3' Mod

-Mixed Bases | Base Count: 10 Tm: 17.1 (50mM), 38.7 (1M) GC%: 50
Minimum Yield: 28.8 (µg), 9.6 (nmol)

Synthesis Scale Purification Formulation

☒ Standard Shipping ☐ Next Day Shipping Ship by 30 de marzo. Order within 11 hr 43 min. PRICE EUR 1,60

2

Oligo Sequence (5' to 3')
TTC GCA GCA G

5' Mod
3' Mod

-Mixed Bases | Base Count: 10 Tm: 31.4 (50mM), 52.9 (1M) GC%: 60
Minimum Yield: 28.4 (µg), 9.4 (nmol)

Synthesis Scale Purification Formulation

☒ Standard Shipping ☐ Next Day Shipping Ship by 30 de marzo. Order within 11 hr 43 min. PRICE EUR 1,60

2 Oligo EUR 3,20

figura 2. Captura de pantalla de la web Thermo Fisher con los oligos introducidos.

3- Existe un solo gen para la pirulasa en cada célula de mamífero (en realidad dos copias dado que hay dos alelos). El gen tiene 70 kb de longitud. Sin embargo, se han encontrado en el citoplasma de diferentes tipos de células de un mismo organismo dos mRNA de 7,7 y 8 kb de longitud. El de 7,7 es idéntico en secuencia al de 8 kb, excepto por el hecho de que carece de un segmento interno de 0,3 kb.

a. ¿Cómo explicas la gran diferencia de tamaño entre el gen (70 kb) y sus mensajeros?

El gen está compuesto por 70kb, pero tal y como descubrieron Philip Sharp y Richard Roberts en 1997 (lo que les valió el premio Nobel de Medicina y Fisiología), los genes no son largos fragmentos continuos de DNA sino que están formados por regiones codificadoras o exones y regiones denominadas intrones que no codifican para la proteína final sino que desempeñan un papel estructural y de regulación de la expresión (estamos hablando siempre de células eucariotas).

Cuando la RNA polimerasa II transcribe los miles de transcritos primarios de RNA, cada uno de ellos deberán madurar antes de poder salir del núcleo para traducirse. Esta maduración consiste (entre otros muchos procesos) en eliminar los intrones y juntar de forma adecuada los exones. Se obtiene finalmente un mRNA maduro que podrá viajar a los ribosomas para traducirse. Por tanto al eliminar todos los intrones, que además son mucho más abundantes que los exones, la longitud de los mensajeros es mucho menor que la del gen inicial del que se obtuvieron.

b. ¿Cómo explicas la existencia de dos tipos de mRNA diferentes de pirulasa?

Esto se debe a que cada tipo celular dentro de un mismo organismo expresará una región u otra de su genoma (eucromatina), por ello según el tipo celular, la edad, condiciones o necesidades de la célula variará la regulación permitiendo que se exprese una u otra región del gen. Esto dará lugar a RNA mensajeros diferentes como ocurre en el enunciado.

4- En tu nuevo trabajo de laboratorio te han pedido que clones el cDNA de la insulina humana para poder prepararla para uso farmacológico. En la base de datos aparece la secuencia mostrada abajo. Si la proteína tiene 51 aminoácidos describe un método para realizar la clonación del marco de lectura codificante de esta proteína. ¿A que se debe la discrepancia de tamaños?

```

1   gtgccgagct gagttcctta taagaattaa tcttaatttt gtatTTTTTt ctgtaagaca
61  ataggccatg ttaattaaac tgaagaagga tatatttggc tgggtgtttt caaatgTcag
121 cttaaaattg gtaattgaat ggaagcaaaa ttataagaag aggaaattaa agtcttccat
181 tgcattgtatt gtaaacagaa ggagatgggt gattccttca attcaaaagc tctctttgga
241 atgaacaatg tgggcgtttg taaattcttg aaatgtcttt ctattcataa taaactagat
301 actgttgatc ttttaaaaaa aaaaaa

```

Nos dan la secuencia de cDNA que codifica para la insulina humana, esta se ha obtenido con una reverse transcriptasa que es capaz de sintetizar una hebra de DNA complementaria al RNA mensajero que se traducirá en esta proteína. Como es mRNA maduro eucariota sabemos que vamos a encontrar la secuencia CAP en el extremo 5', la cola de poliA en el 3' y entre ellos el gen formado únicamente por sus exones o regiones codificantes expresadas por el tipo celular del que se extrajo.

Nos dicen que la proteína tiene 51 aminoácidos, cada uno codificado por un codón de 3 nucleótidos repartidos de forma consecutiva, por tanto la secuencia que buscamos será de 153 nucleótidos al que hay que añadir el codón de stop que no codifica ningún aminoácido pero permite al ribosoma terminar la traducción, 156 nt en total. La secuencia contiene 326 nucleótidos, de estos 156 se corresponden con el gen y el resto las secuencias mencionadas de regulación de la traducción y expresión del gen. A esto se debe la discrepancia de tamaños entre la secuencia total y el marco de lectura codificante de la proteína.

Buscamos la primera ATG de la secuencia ya que todos los genes comienzan con una metionina y a partir de esta contamos 150 nucleótidos y deberíamos tener el codón de stop. Si no deberemos avanzar hasta la siguiente metionina, en este caso la primera Met que encontramos no nos sirve pero la segunda reúne todas las condiciones mencionadas (marcados en naranja los codones met y stop).

Para clonar el marco de lectura como conocemos la secuencia entera diseñaría dos primers que hibridasen con el extremo 5' del marco y otro con el 3' de la hebra complementaria (ya que recordemos que las dos hebras son de DNA aunque se han obtenido a partir de la secuencia de un RNA mensajero). Yo utilizaría los siguientes primers:

Primer forward: 5' – atg tca gct taa aat tgg – 3' Tm = 48°C, 18nt.

Primer reverse: 5' – tta caa acg ccc aca ttg – 3' Tm = 52°C, 18nt.

NOTA: el marco de lectura que he encontrado mide en realidad 150 nt, por lo que se codifican 49 aminoácidos (ya que el codón de stop no codifica ningún AA). Debe de haber algún error en el enunciado ya que no he podido encontrar ningún otro marco de lectura con más de 150 nt.

5- La siguiente secuencia obtenida por RT-PCR, corresponde a la región 5' no codificante del cDNA del virus de la hepatitis C (VHC). Se desea desarrollar un protocolo de amplificación por PCR de dicha secuencia que será utilizado para el diagnóstico de infección por VHC.

```

5'...GTGAGGAAGTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTAT.....180....
...GCCTTGTTGGTACTGCCTGATAGGGTCGTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCA
TGAGCA...3'

```

a) Diseña un par de cebadores adecuados (< 22) y un protocolo de PCR que permita la amplificación de la región de interés. Marca claramente en qué región hibridan los oligonucleótidos diseñados y su T_m.

Primer forward: 5' – GTG AGG AAC TAC TGT CTT C – 3' T_m = 56°C, 19 nt.

Primer reverse: 5' – TGC TCA TGG TGC ACG GTC – 3' T_m = 58°C, 18 nt.

b) Indica el tamaño del producto de amplificación obtenido y que sistema utilizarías para visualizarlo

Obtendría amplificaciones de producto con un tamaño de 302 nt, es decir, todos los nucleótidos mostrados en la secuencia del enunciado más los 180 que se indican del dominio central.

Para visualizarlo realizaría un Southern Blot sobre un gel de agarosa que me permitirá visualizar bandas específicas. Para ello una vez realizada la electroforesis transfiero el DNA a una membrana de nailon, generando una copia que incubaremos con una sonda de DNA monocatenario marcada con un isótopo radiactivo que hibridará con una región intermedia de la secuencia (para que no coincida con la de los primers y genere falsos positivos). Se lava el exceso de sonda y realizamos una autoradiografía para visualizar las bandas en las que ha hibridado la sonda y que por tanto contienen en producto de amplificación.

c) ¿Qué control diseñarías para evaluar la presencia de sustancias inhibitorias en la muestra de un paciente a procesar?

Realizaría un control positivo (además del negativo que debo incluir siempre) para asegurarme de que la amplificación está funcionando correctamente, es decir, emplearía todos los componentes de la PCR incluyendo la secuencia del virus de la hepatitis C que pretendo amplificar. Así cuando realice la electroforesis del control positivo y de la prueba real puedo comprobar si la cantidad de producto obtenida es la misma, menor o ninguna. Si no obtengo ninguna amplificación con la muestra del paciente significará que la secuencia del virus no está presente, si obtengo menos que en el control positivo sabré que están actuando sustancias inhibitorias y si obtengo las misma cantidad no hay ninguna inhibición y el paciente es positivo para la VHC.

d) Realiza un esquema de las bandas que se visualizarían en un gel en el que se corrieron las siguientes muestras:

calle 1: control negativo

calle 2: control positivo

calle 3: muestra de un paciente positivo para VHC

calle 4: marcador de tamaño molecular tipo ladder 100pb

En la calle del control negativo esperaríamos no visualizar ninguna banda ya que la presencia de bandas en esta calle implicaría que se ha producido una contaminación y tendríamos que repetir la prueba. En las calles del control positivo y la muestra del paciente positivo deberíamos observar una banda de 302bp ya que se está amplificando la secuencia del virus de la hepatitis, y el marcador tendrá bandas con longitudes conocidas que nos permitirán calcular los pares de bases de mis bandas. El resultado quedaría como el que se muestra en la *figura 5*.

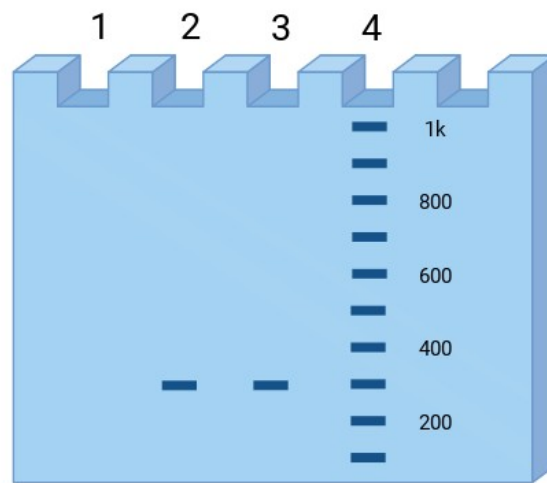


figura 5. Resultado de la electroforesis en gel de agarosa.