

BIOLOGÍA MOLECULAR

Técnicas para estudiar el ADN (Southern blot y PCR)

José Salvador Montaña Lara
Departamento de Microbiología

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA



Febrero 15 de 2022



¿Qué preguntas se pueden responder empleando las técnicas que estudian el ADN?

¿Se encuentra un gen particular en el genoma de un organismo?

¿Cuál es el número de copias de un gen en el genoma de un organismo?

¿Es posible detectar una mutación causante de una enfermedad?

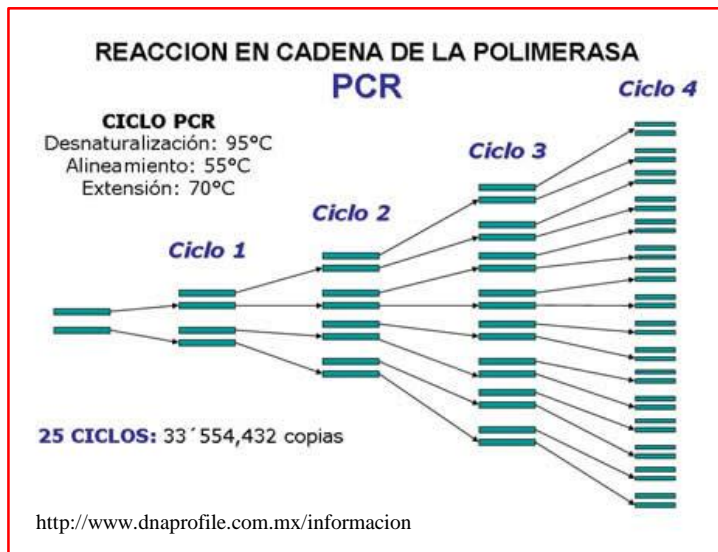
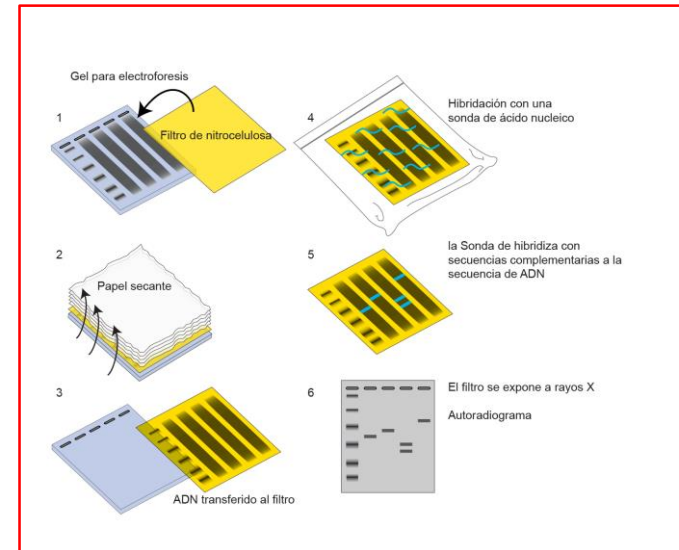
¿Es posible detectar la presencia de un microorganismo patógeno en un alimento?

¿Es posible detectar la presencia de un agente infeccioso?

¿Cuántos genes codifican por proteínas en un genoma?

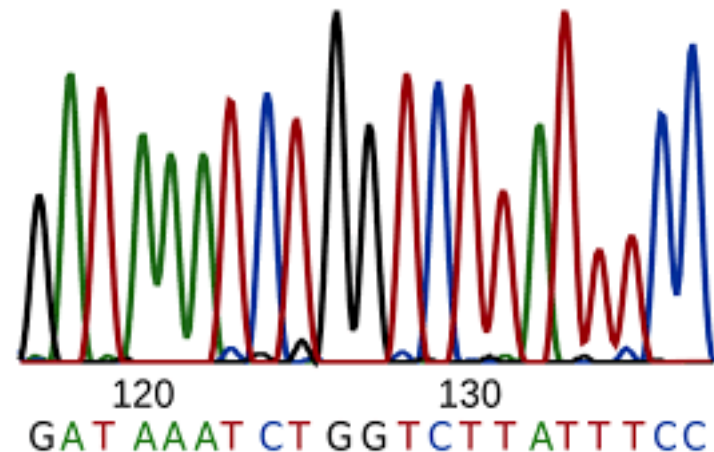
Algunas técnicas que ayudan a responder estas preguntas!

Hibridación con sondas de ADN (Southern Blot)



Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Secuenciación de ADN

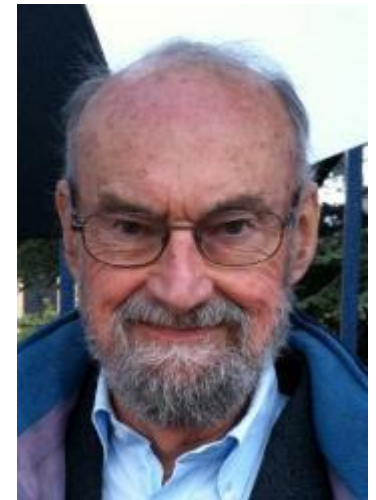
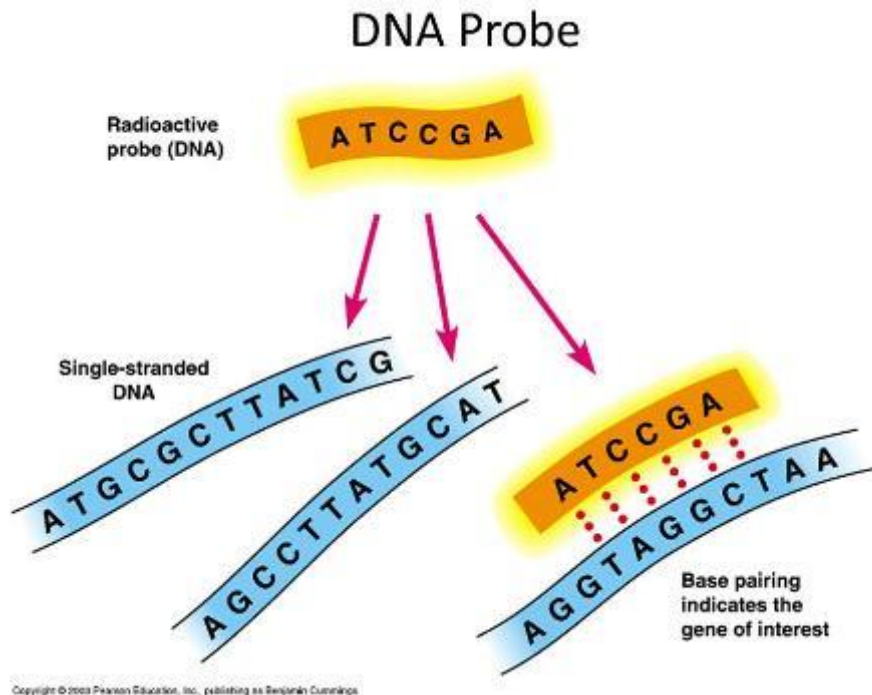


Bases de las técnicas de “blotting”

- Uso de **sondas** para la detección de secuencias específicas en el **DNA/RNA**

Sonda: secuencia específica de **DNA** “**marcada***

Que se hibridará con una secuencia complementaria de **DNA** o **RNA**

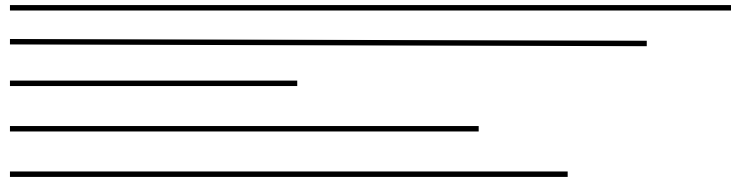


Edwin Southern

Southern blot

Fragmentos de ADN

Sonda: **ATCCGA***



DNA + Sonda
Southern blot

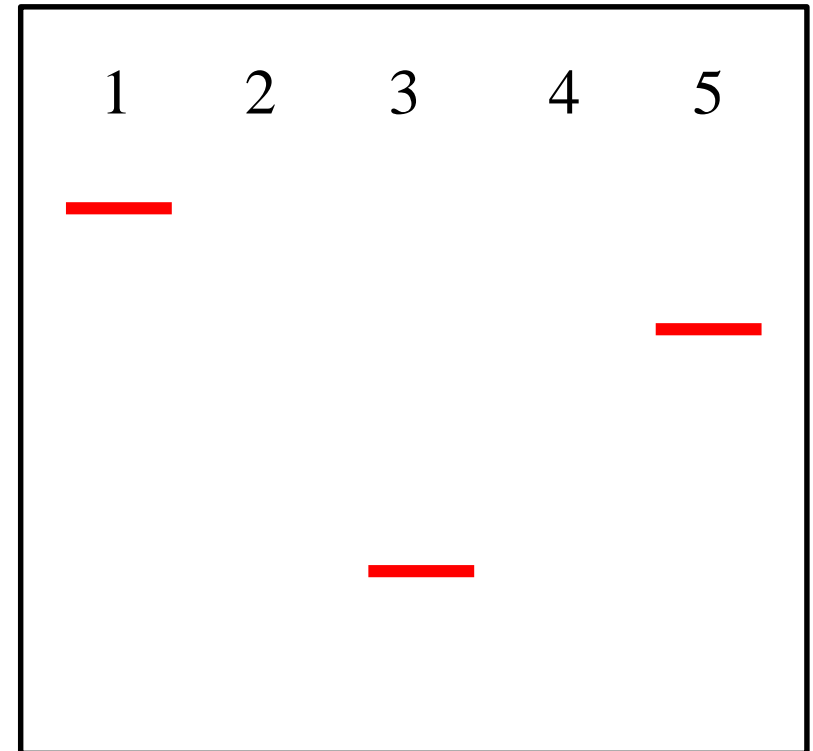
1 **ATCCGA***
CCCGTAGGCTGTTTATC

2 CCCGGTTTATCCACA

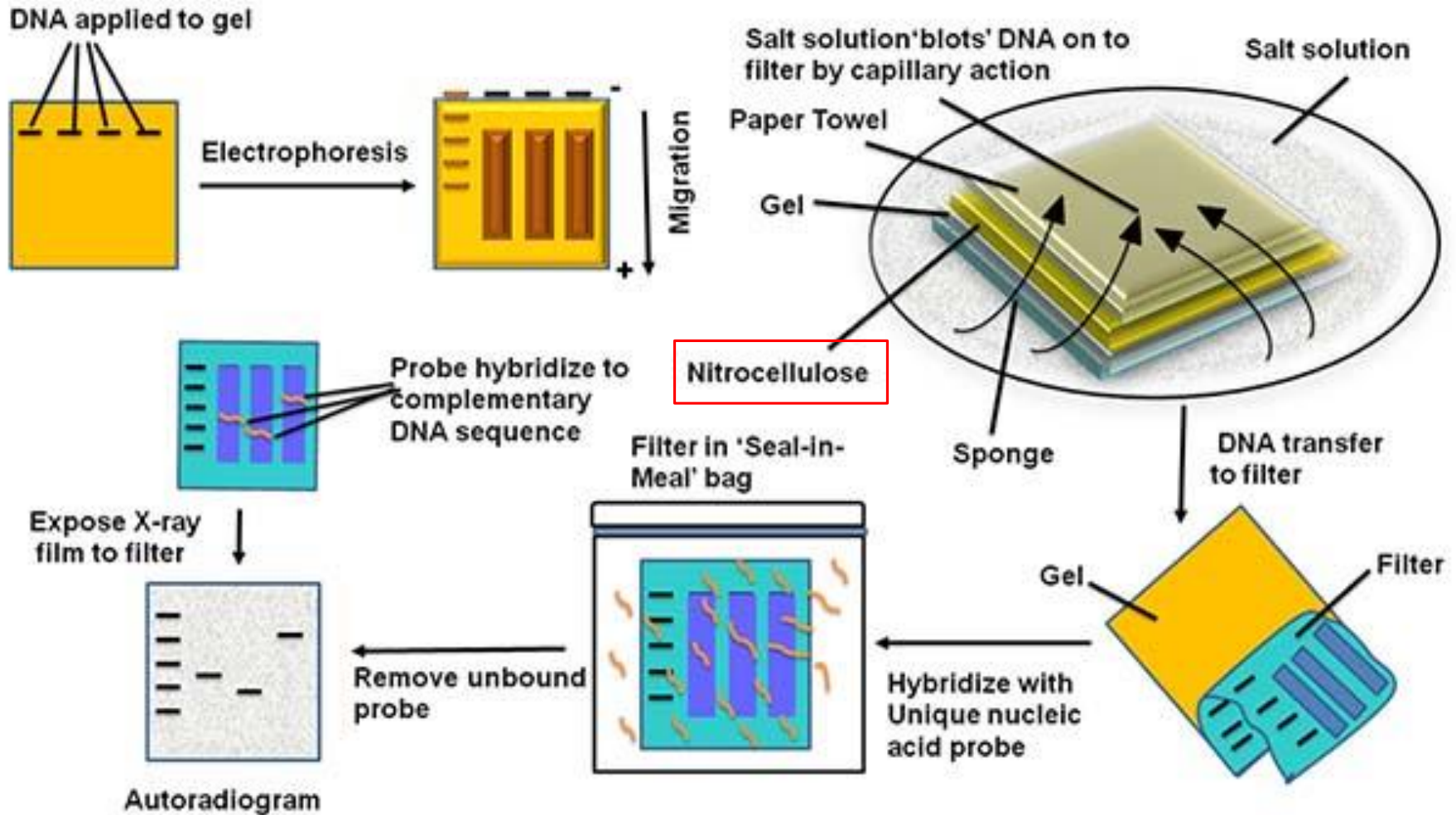
3 **ATCCGA***
TAGGCTC

4 CCCGAACCATA

5 **ATCCGA***
ATCCCGTAGGCT



Metodología para realizar “Southern blot”



Clave!. Conocimiento de la sonda (secuencia, longitud)

P. C. R.

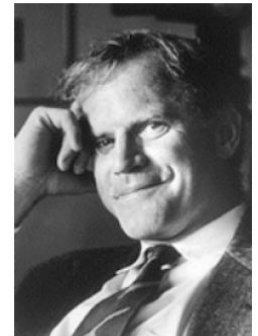
(Polimerase Chain Reaction)

Reacción en Cadena de la Polimerasa

Técnica rápida y fácil de "replicación"
de ADN y ARN a partir de pequeñas
cantidades.

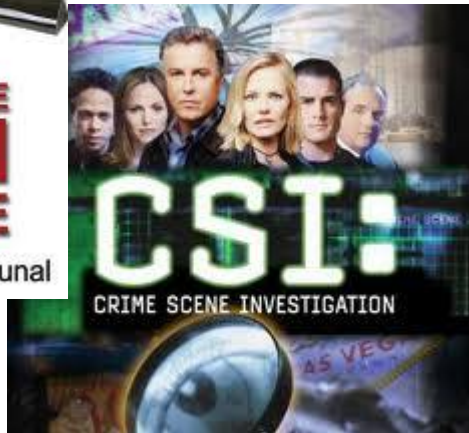
*Kary Mullis, Desarrolla
la PCR en Cetus Corporation
en 1983*

*Premio Nobel
de química, 1993*



Dr. Kary Mullis

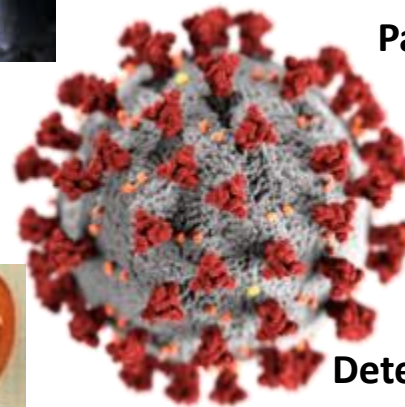
¿Por qué la PCR revolucionó la investigación biológica?



Ciencias forenses y criminalística



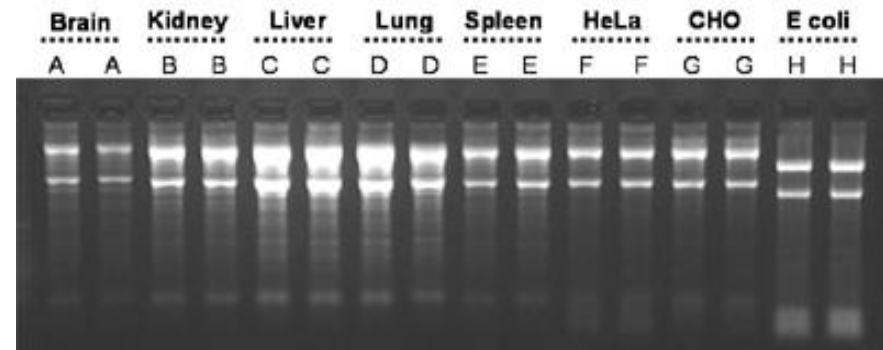
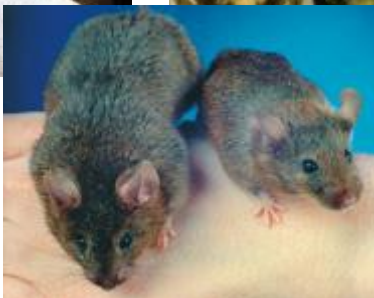
Paternidad



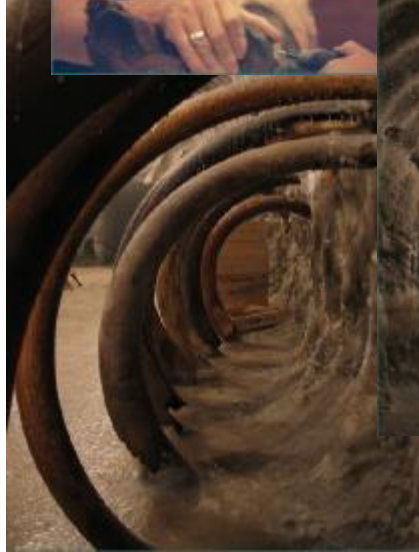
Detección virus ADN y ARN



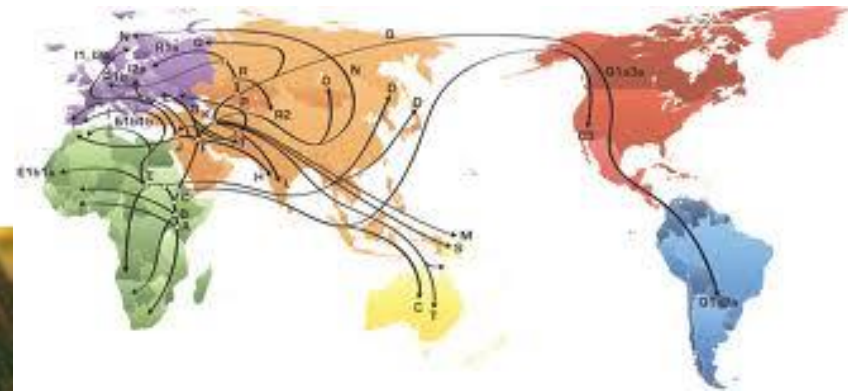
Detección de OGMs



Cuantificación de la expresión de genes



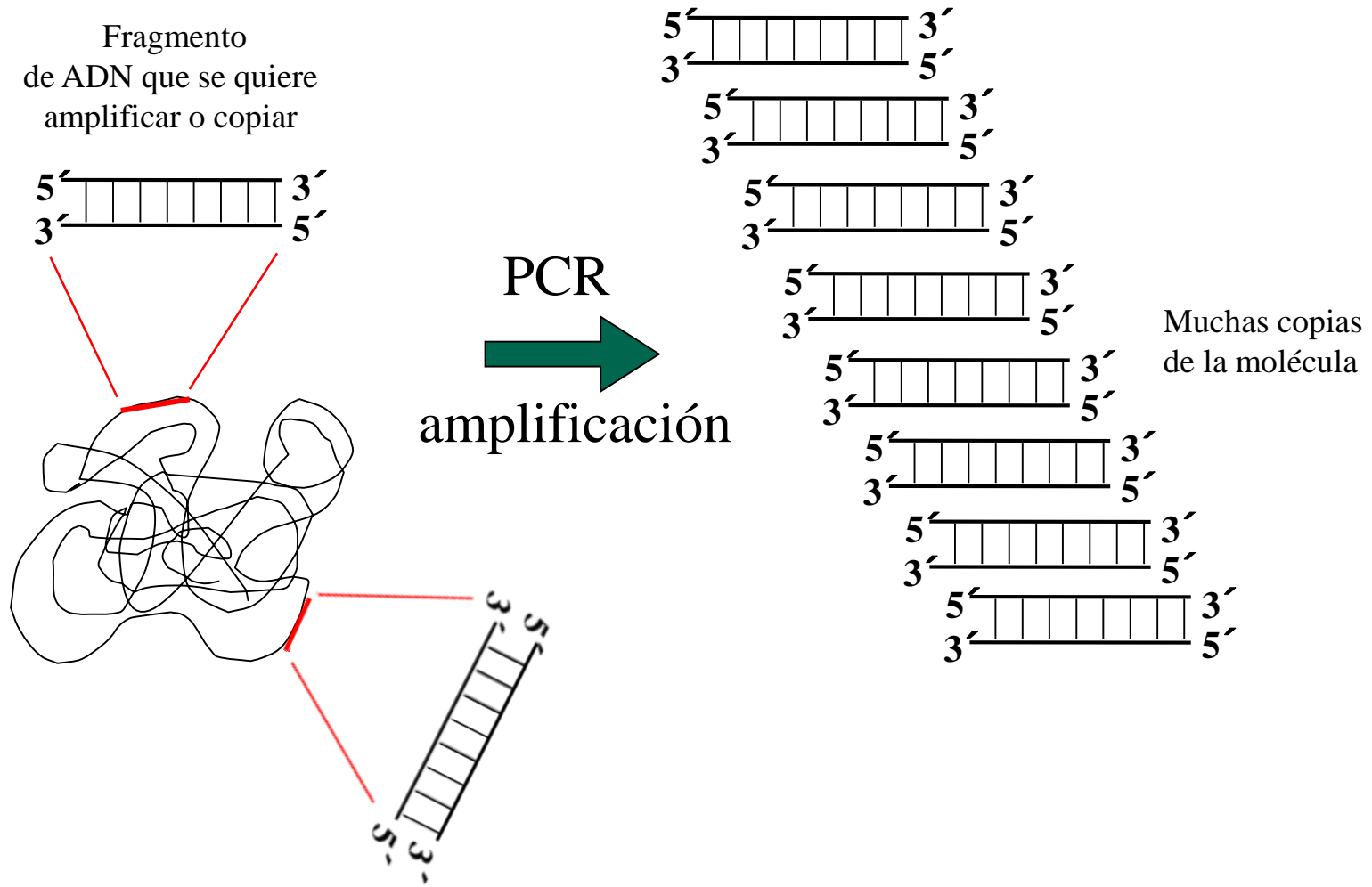
migraciones



Proyecto hombre de Neanderthal 2006

Reacción en cadena de la DNA polimerasa

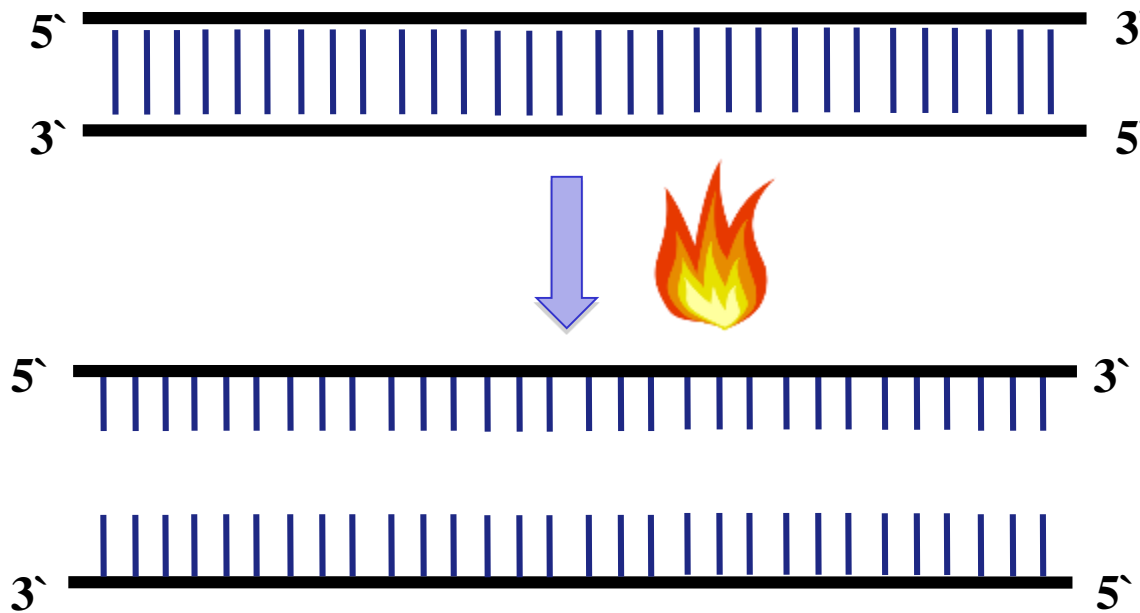
Es básicamente una técnica de amplificación *in vitro* de ADN, basada en el principio de la replicación



¿En que consiste la técnica?

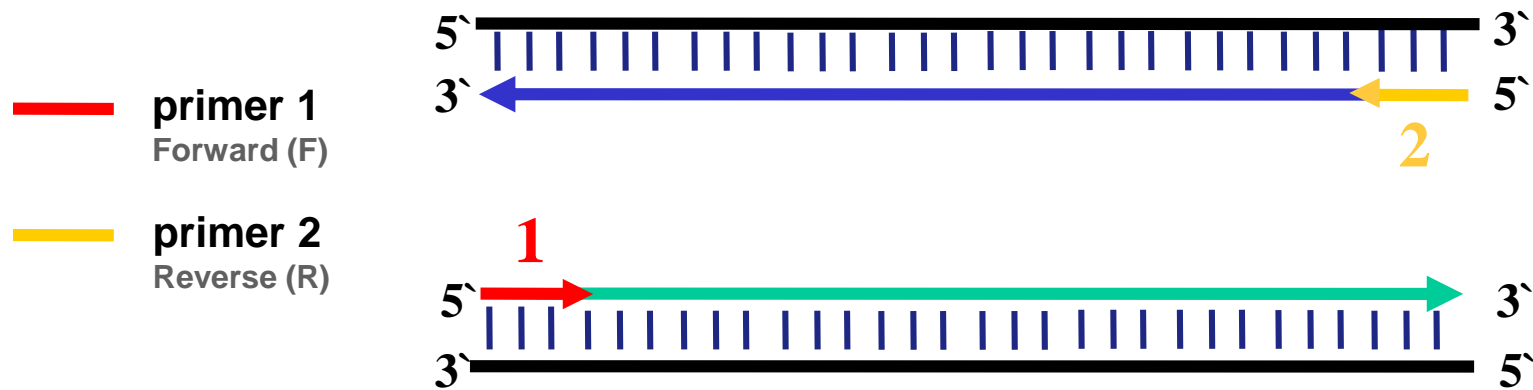
Reacción en cadena de la DNA polimerasa

Primero, separación de las dos cadenas de ADN con alta temperatura
(~95 -100° C)



Reacción en cadena de la DNA polimerasa

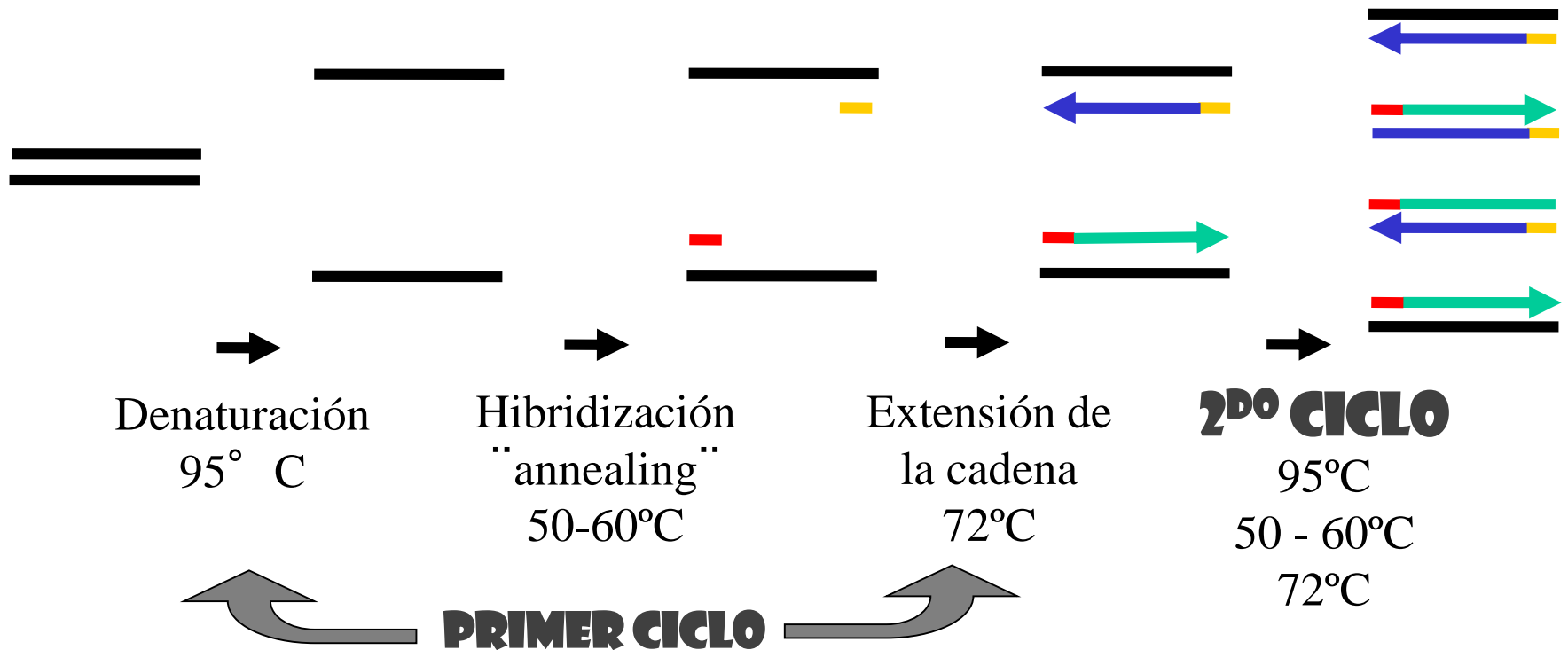
Luego, usando los iniciadores o *primers*, se sintetiza la nueva cadena por acción de la DNA polimerasa



¡Ahora tenemos dos copias de la molécula original!

Reaccion en cadena de la DNA polimerasa

Para controlar el proceso, es necesario controlar la temperatura



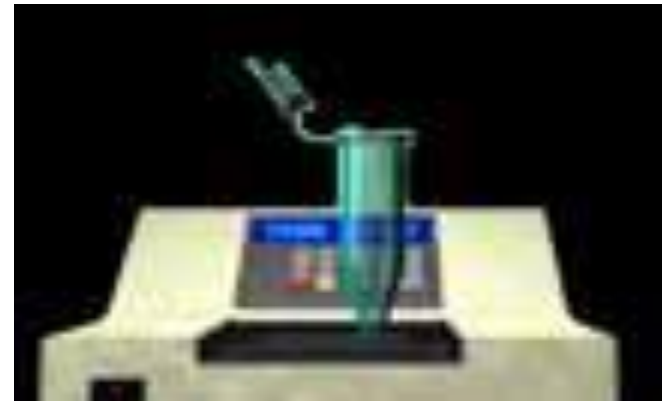
Si repetimos el ciclo, tendremos cuatro copias

Múltiples ciclos darán un incremento exponencial en el número de copias (2^n)

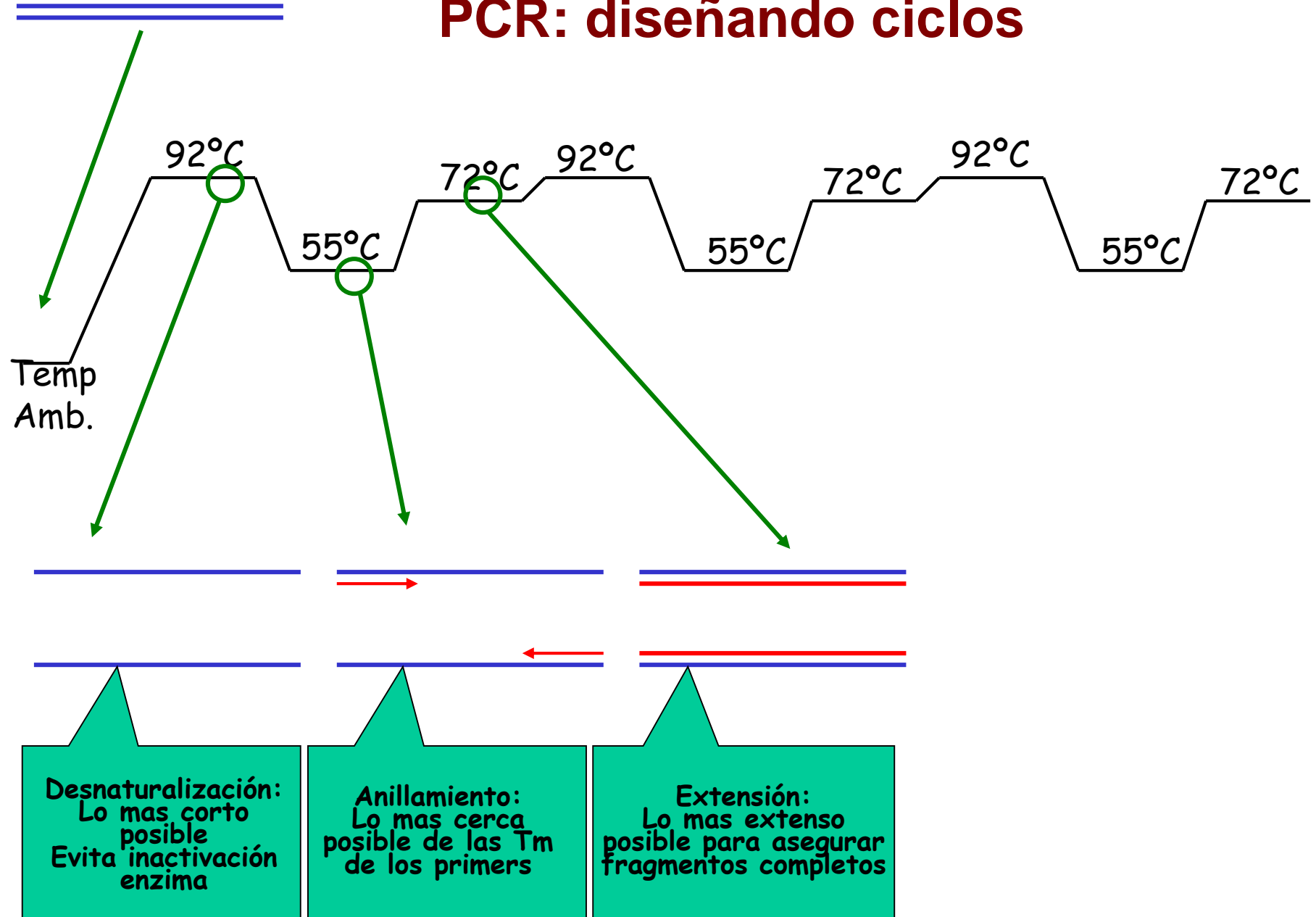
TÉCNICA

3 pasos = 1 ciclo

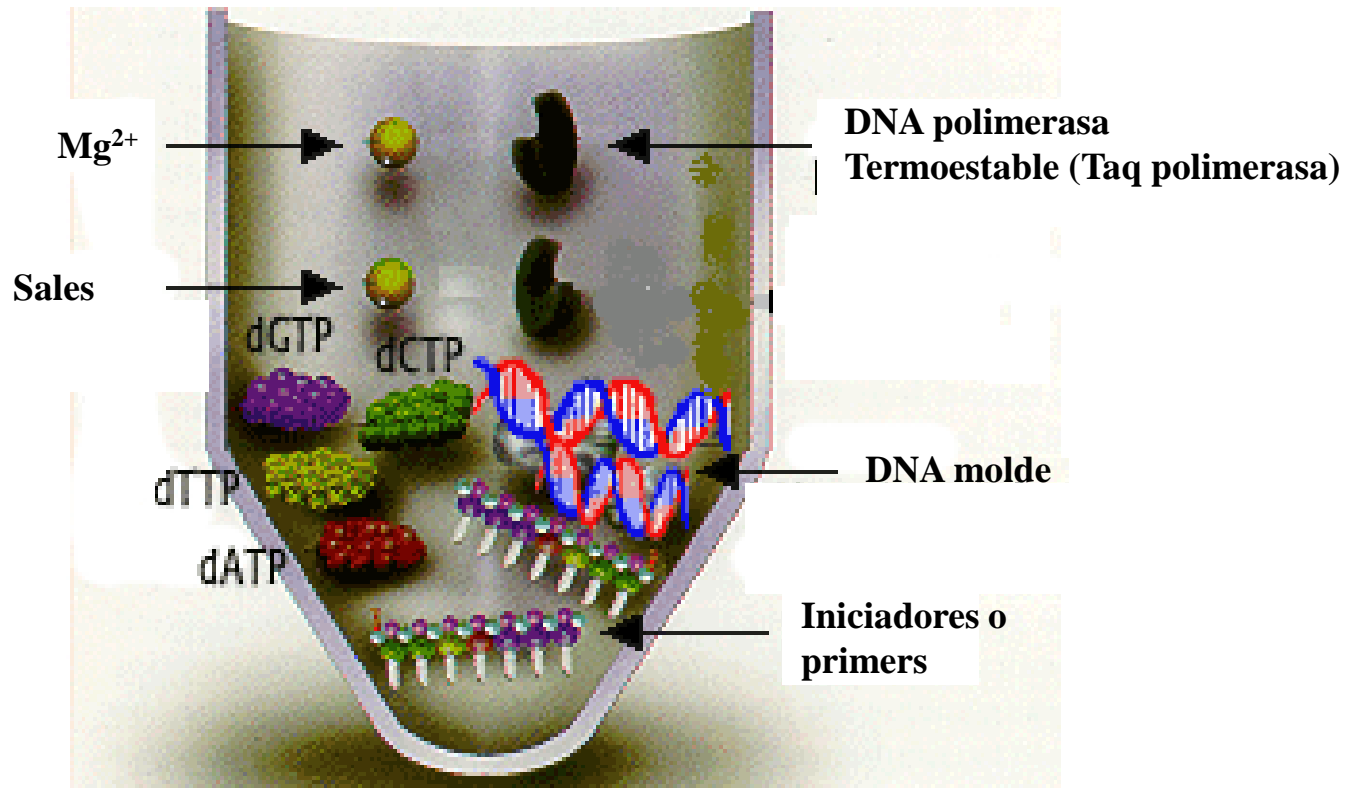
- DESNATURALIZACIÓN
- HIBRIDACIÓN (*annealing*)
- SÍNTESIS O EXTENSIÓN



PCR: diseñando ciclos



La reacción de PCR se puede llevar a cabo en un pequeño tubo con capacidad de 200 μ l



Componentes esenciales en una reacción de PCR

- ADN polimerasa termoestable
- Buffer (mantener el pH)
- Cationes divalentes (Mg^{+2})
- Oligonucleotidos iniciadores (*primers*)
- Desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs)
- ADN molde (plantilla)

Oligonucleótidos, iniciadores (*primers*)

- Son de cadena sencilla
- Se conoce su secuencia (¡clave!).
- Es el factor más importante para la eficiencia y la especificidad del proceso
- Deben estar presentes en exceso
- Requieren de un cuidadoso diseño (programas de diseño)
- Reglas de diseño:
 - (a) longitud = 18-25 mer (nt)
 - (b) Contenido de G+C entre 40-60%
 - (c) Evitar secuencias repetidas
 - (d) La diferencia en el T_m de los *primers* no debe exceder los 3° C (¡clave!)

Ejemplo:

**Diseñar los dos primers (18nt c/u) para amplificar la secuencia
contenida entre **la T** y **la G****

5'- ATG**T**ATATCAAACCATTCATCCTTCCTGCCCTTGCGGCA
GTTGCGCAAGCTGCCAGCTATTCTGGAGACCTTCGGCCTCA
AACTCACTTCTCTCCACCTTCCAATTTTCATGAACGATCCAA
ACGGTCTCTTCTATGATAGCAAGAGGGGGCGTGTATCACTTAT
ACTATCAGTATAATCCTACAGCGACAGTAGCTGGGAATCAG
CACTGGGGGTCATGCCACCAGCCCTGATCTATACCACTGGAC
GAATCAACCTATCGCCCTCGCTGGGGGATAAGCCTGAGGAGT
ATATCTTCTCAGGCT**CTGCTGTGGTGGACA****G**CAACAAC -3'

Delantero (forward)

5' _____ 3'

Reverso (reverse)

5' _____ 3'

¿Como diseñamos los *primers* para amplificar la secuencia del ejemplo?

Opción 1

5'-ATG**T**ATATCAAACCATTCATCCTTCCTGCCCTATAGCAAATTAGGCTCTGCTGTGGTGGACA**G**-3'
← 3'-GAGACGACACCACCTGTC-5'
Primer reverse

Primer forward

5''-TATATCAAACCATTCATCC-3' →
3'-TACATATAGTTTGGTAAGTAGGAAGGACGGGATATCGTTTAATCCGAGACGACACCACCTGTC-5'

Delantero (forward)

5'-TATATCAAACCATTCATC-3'

Reverso (reverse)

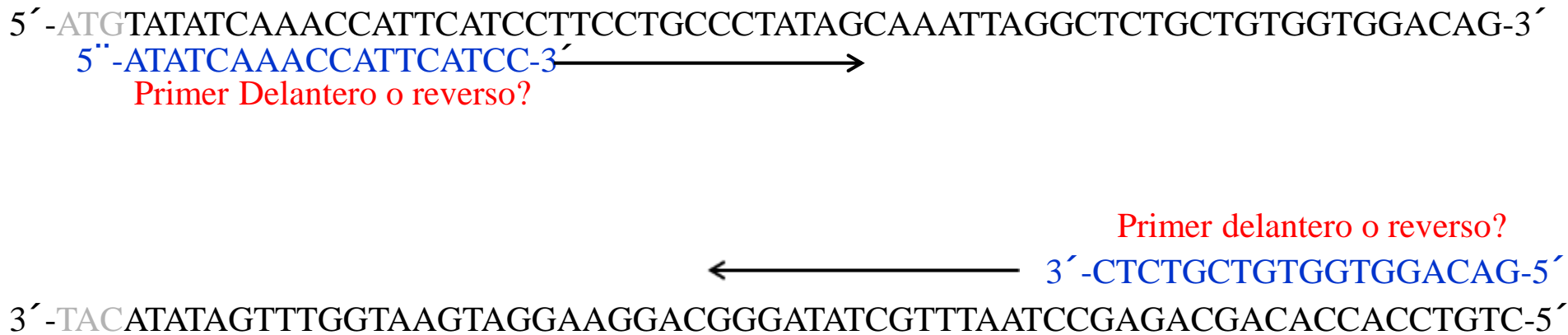
5'-CTGTCCACCACAGCAGAG-3'



Recordar!! Primers en direcciones opuestas, convergentes y alineados de forma antiparalela a la plantilla o molde

¿Como diseñamos los *primers* para amplificar la secuencia del ejemplo?

Opción 2



Delantero (forward)

5' ATATCAAACCATTCATCC 3'

Reverso (reverse)

5' GACAGGTGGTGTCTCTC 3'



ADN molde (templado o plantilla)

- Puede ser ssADN o dsADN (simple o doble cadena)
- ADN circular y cerrado es levemente menos efectivo que el ADN lineal
- Usualmente se utilizan varios cientos o miles de copias:
- Se puede amplificar a partir de una sola molécula de ADN molde, pero las condiciones deben estar optimizadas

Variantes de la PCR

- **PCR Anidada (nested PCR)**

Producto de una PCR es usado para realizar una segunda PCR empleando cebadores que se unen dentro del primer fragmento.

- **PCR Múltiple (multiplex PCR)**

Se amplifica más de una secuencia al tiempo utilizando varias parejas de *primers*. Como resultado se detectan varios productos

- **PCR *In-situ***

La reacción se realiza en muestras histológicas o de células y el producto se evidencia en el sitio de amplificación.

- **PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR)**

Se obtienen copias de ADN a partir de ARN

- **PCR en tiempo real**

RT-PCR = PCR con transcriptasa reversa

Variante de la PCR que usa ARN como molde inicial

- Para obtener copias de DNA a partir de molde ARN
- Es especialmente útil cuando solo se dispone de pequeñas cantidades de ARN
- Primero se hace un ADNc a partir del molde de ARN
- Luego se usa un segundo primer para hacer el duplex de cDNA-ADN por PCR
- ¡Útil para estudiar la expresión de genes!
- ¡Útil para el diagnóstico de virus RNA!

PCR con transcriptasa reversa RT-PCR

**Transcriptasa reversa
(RT)**

ARNm



ADNc + primer 1

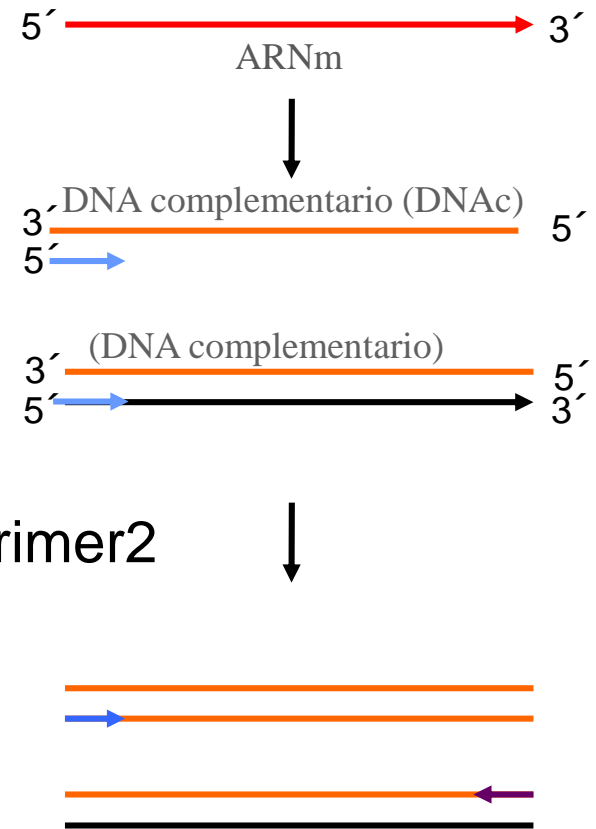


ADNc + primer1 + primer2



ADNds

**DNApolimerasa(Taq)
(PCR)**



Cinética de la PCR

- El desarrollo de un proceso de PCR se puede dividir en tres fases que son comparables a la curva de crecimiento de un microorganismo:
- **Inicial:** poco producto de amplificación, reactivos disponibles y sin degradar.
- **Exponencial:** en esta fase se obtiene el doble de producto, por ciclo de amplificación, la reacción alcanza el 100% de eficiencia, la reacción es muy específica y precisa.
- **Tardia - Plateau (End-Point):** la reacción comienza a detenerse en términos de eficiencia, se alteran los productos y se pierde la pureza de la reacción, amplificación de productos inespecíficos, dímeros de iniciadores (Primers).

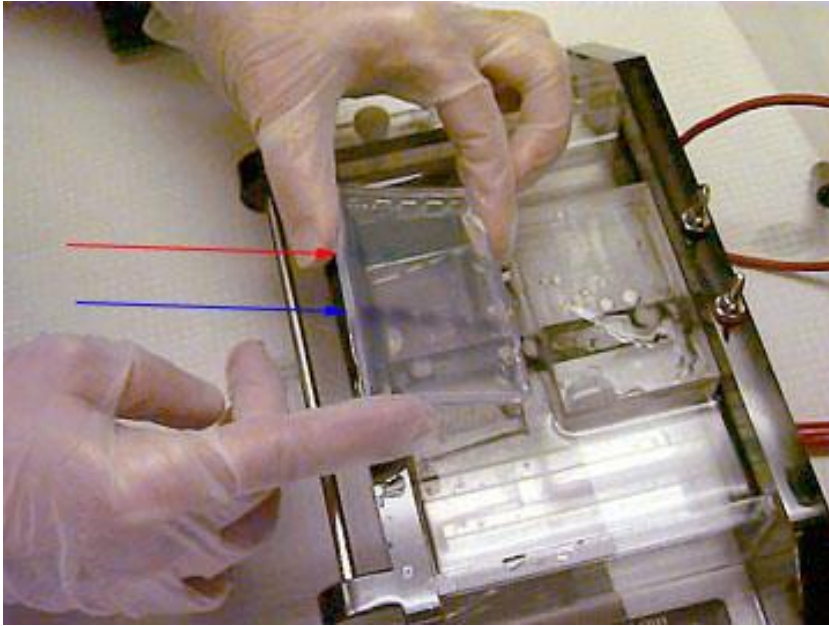
PREGUNTA

Como confirmar que se logró amplificar o copiar una secuencia de DNA, si la reacción está ocurriendo en un pequeño tubo en un termociclador?



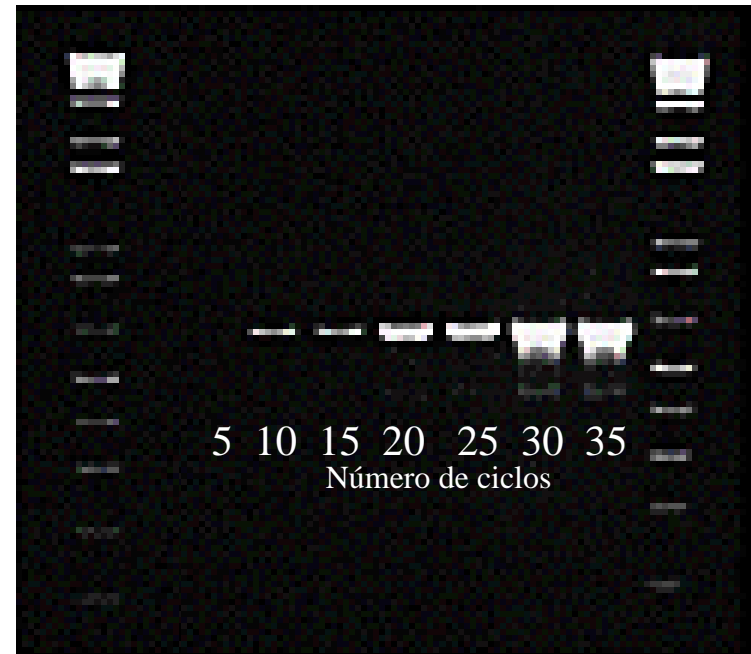
RESPUESTA

Mediante una técnica llamada
“Electroforesis”
que permite visualizar
el DNA amplificado como una banda
fluorescente o coloreada, (PCR a punto final)

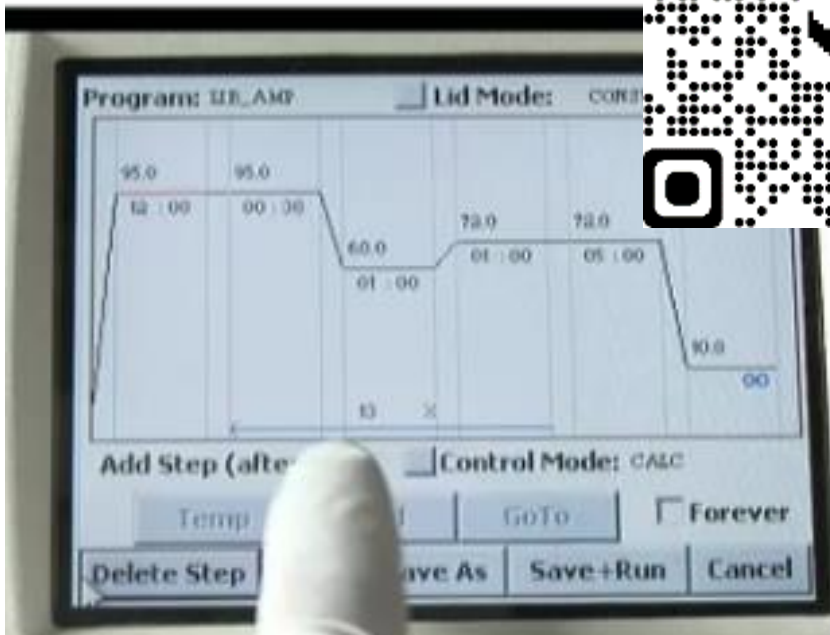
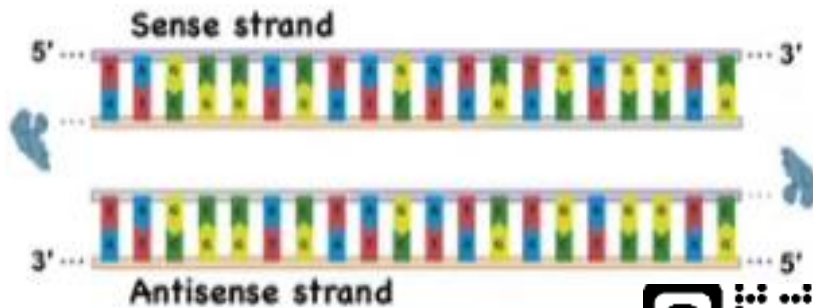


← Corrido electroforético

Visualización del
Producto amplificado →



¡Resumiendo!



Aplicaciones de la PCR

- Identificación y aislamiento de genes (clonación)
- Diagnóstico de enfermedades detección de mutaciones)
- Establecimiento de huella genética
- Secuenciación
- Mutagénesis
- Expresión de genes (RT-PCR, Transcriptasa reversa)

PCR Tiempo Real

- PCR en tiempo real es una de las pruebas más sensibles y específicas para el análisis de la expresión de RNA o cuantificación de DNA.

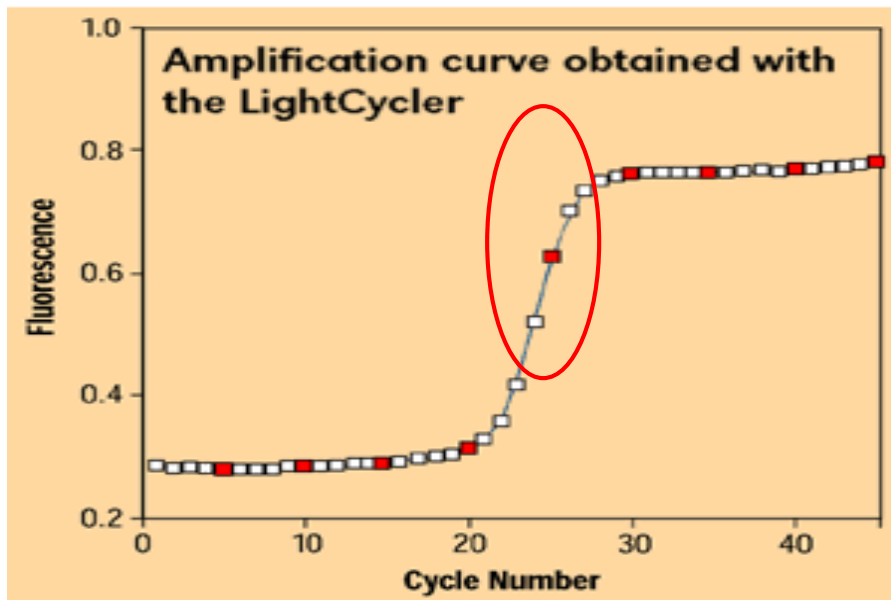
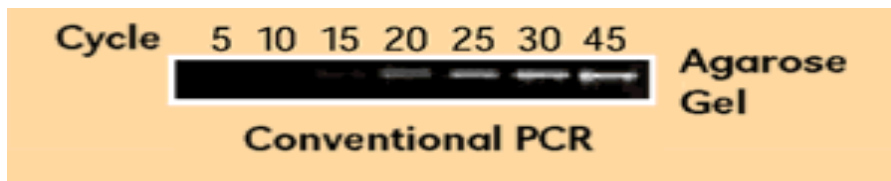


PCR cuantitativa

qPCR o qRT-PCR

PCR cuantitativa en tiempo real q-PCR

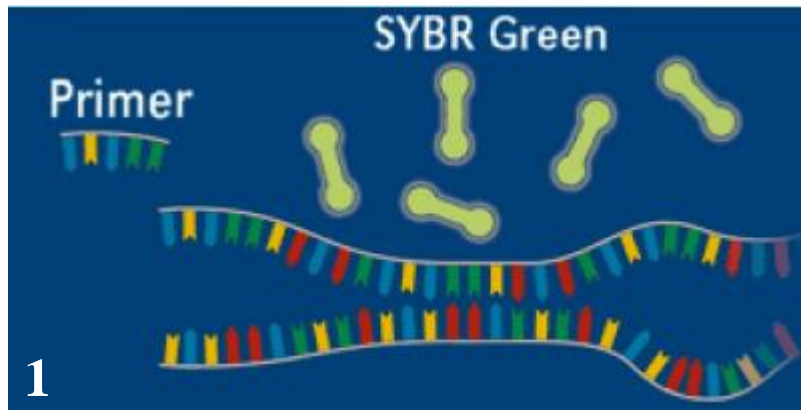
La técnica mide en tiempo real la amplificación de DNA mediante cuantificación constante del producto de PCR en cada ciclo. **No es necesario realizar una electroforesis!!**



La PCR cuantitativa se diseña de modo que el incremento de la cantidad de producto produce un incremento de fluorescencia

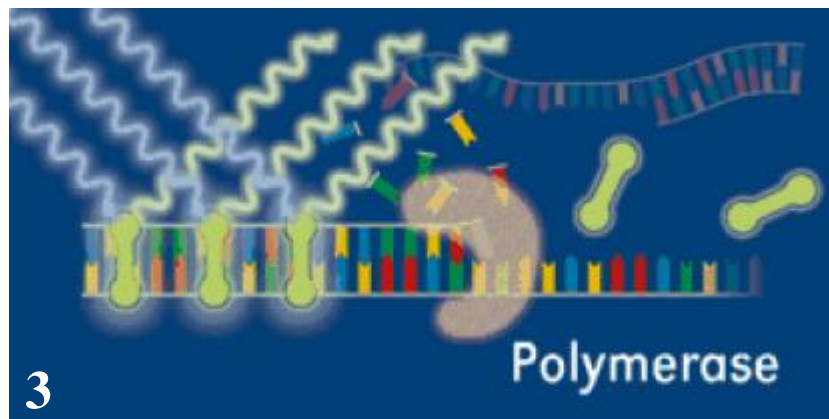
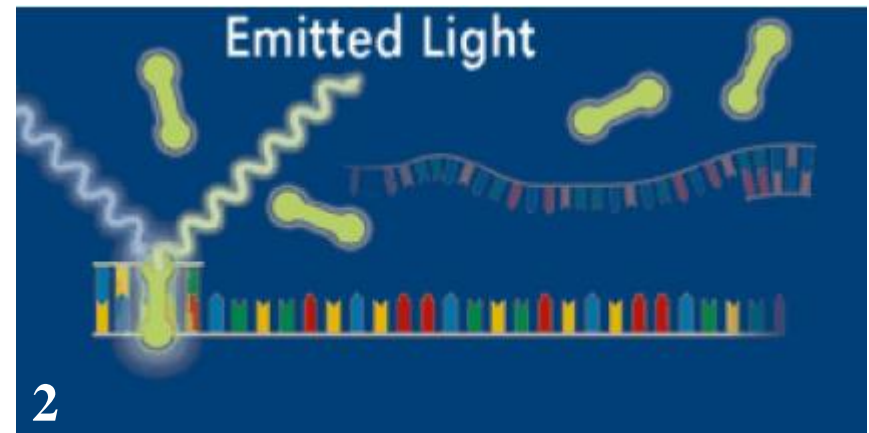
Lo que se cuantifica es la fluorescencia emitida por un colorante intercalado en el ADN o por una sonda marcada .

Medida de la fluorescencia en tiempo real



Alinamiento de los primers

El colorante libre emite muy poca fluorescencia



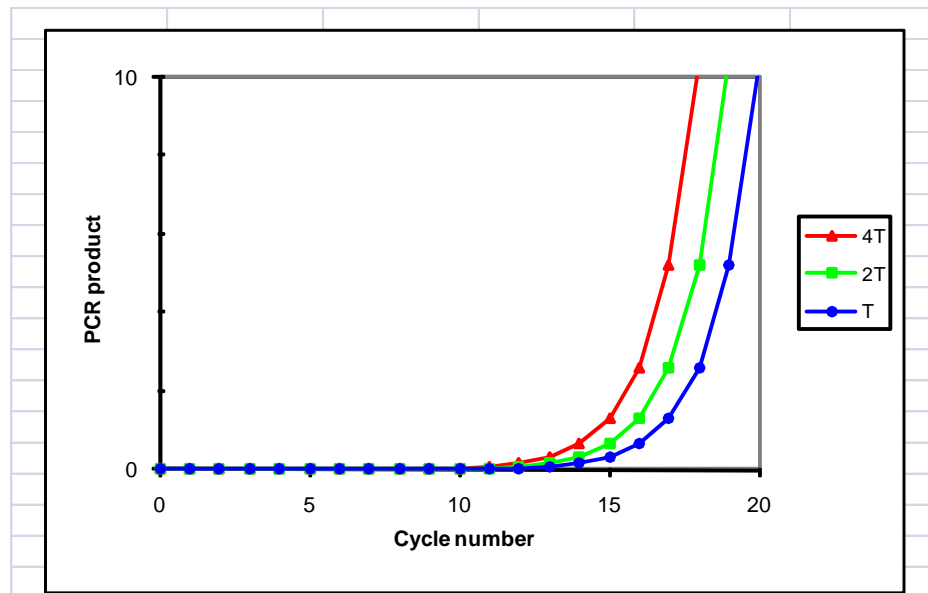
La fluorescencia aumenta con cada enlace de DNA. Fluorescencia es observada en tiempo real.

PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

- En teoría el Producto (P) se incrementa exponencialmente con el número de ciclos (n).
- Esto dependerá del número de copias de molde iniciales (T)

$$P = (2)^n T$$

HSQ: ¿Cual será el número de copias esperado (producto) en el ciclo 15 en una PCR que inició con 4 copias de DNA molde?



$$P = 131.072$$

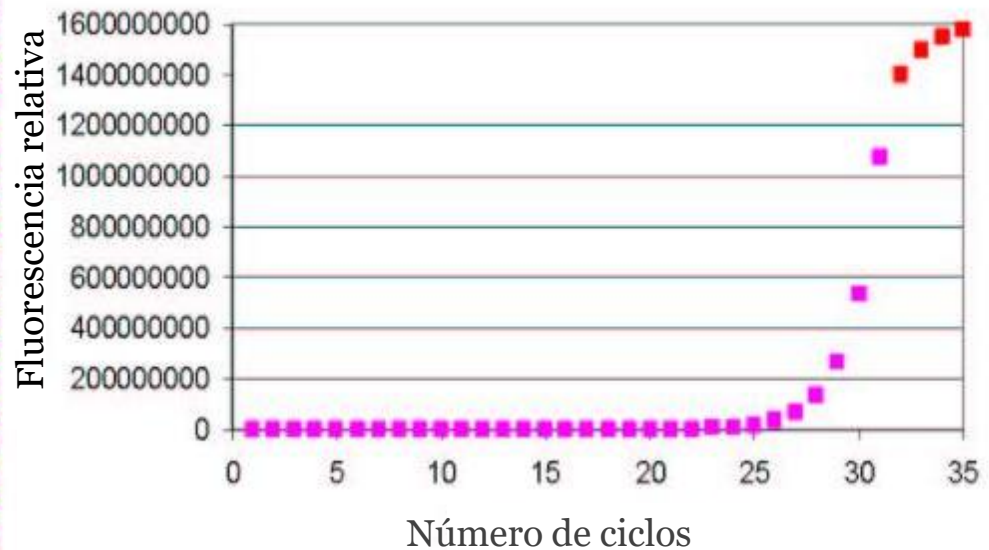
$$P = ?$$

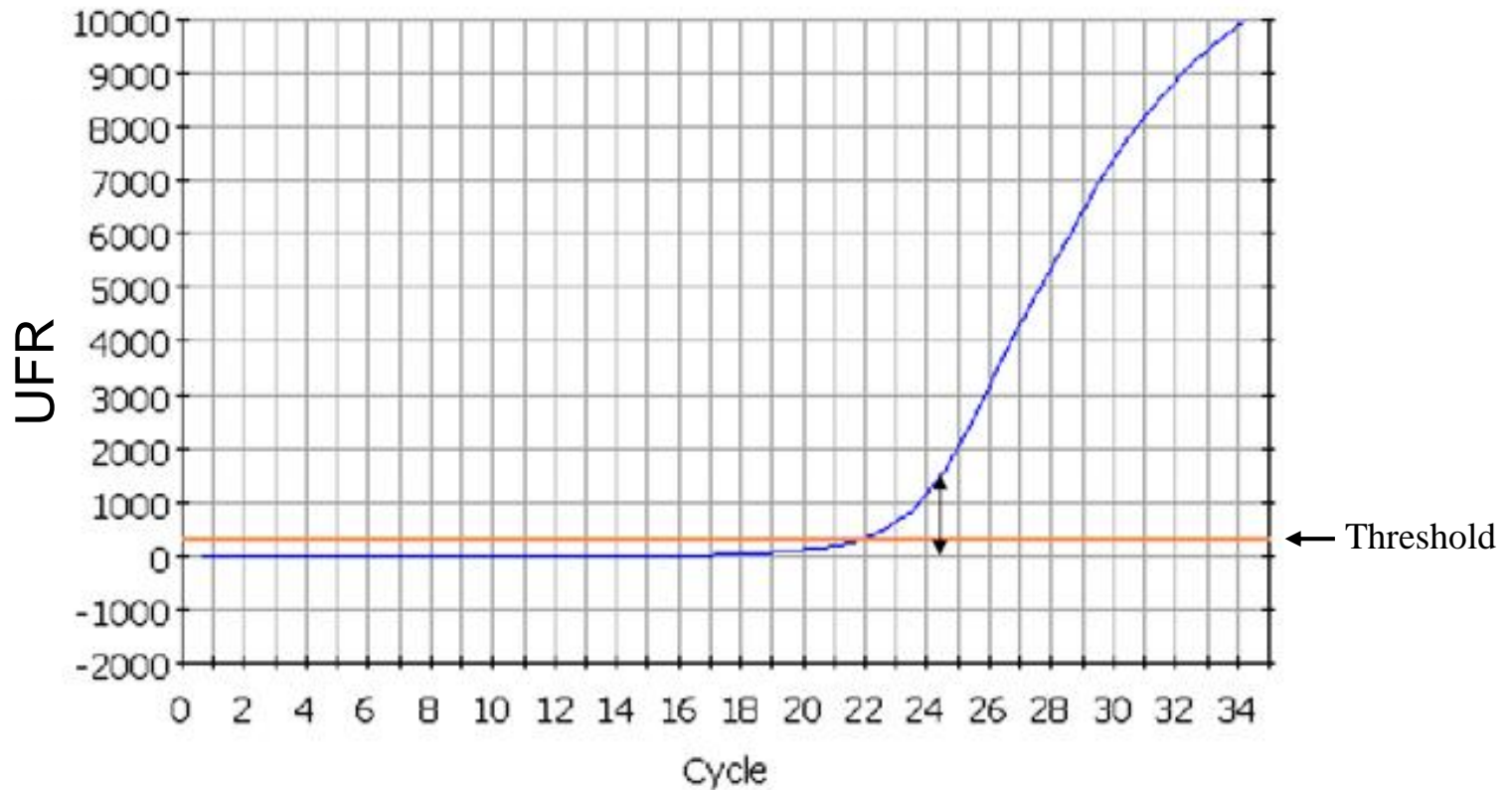
$$P = ?$$

Ejemplo, iniciando con una copia del molde

Numero de ciclos Cantidad de copias
de AND molde

0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1,073,741,824
31	1,400,000,000
32	1,500,000,000
33	1,550,000,000
34	1.580,000,000





Para cada muestra, el software determina en qué ciclo, el valor de la fluorescencia emitida cruza la línea arbitraria (Threshold).

Este punto se denomina C_T (Ciclo crítico / Threshold cycle). Este valor es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas específicas en la muestra original. (# de copias de ADN inicial)

A mayor # de copias de ADN inicial, menor C_t

Desventaja del uso de agentes intercalantes

Ruido:

- Nivel de fluorescencia no necesariamente corresponde a los productos de PCR amplificados.
- No es específico del producto de PCR buscado



Una alternativa

Marcaje fluorescente de secuencias específicas = SONDAS (probes) que fluorescen sólo en presencia del producto diana:

- Sondas Taq-Man
- Sondas Beacon
- Sondas Dual-FRET
- Scorpions

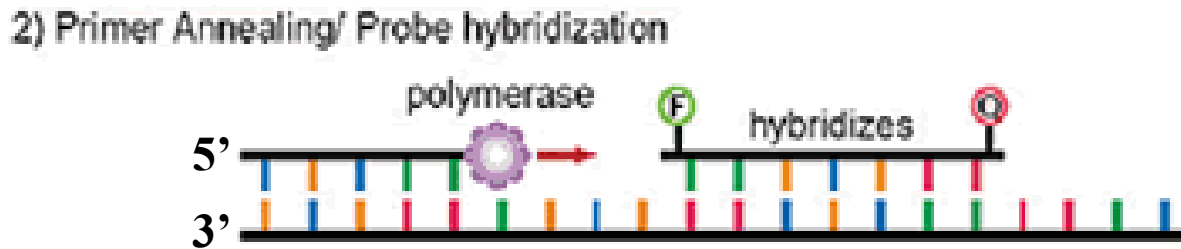


Aumentan la sensibilidad de la técnica

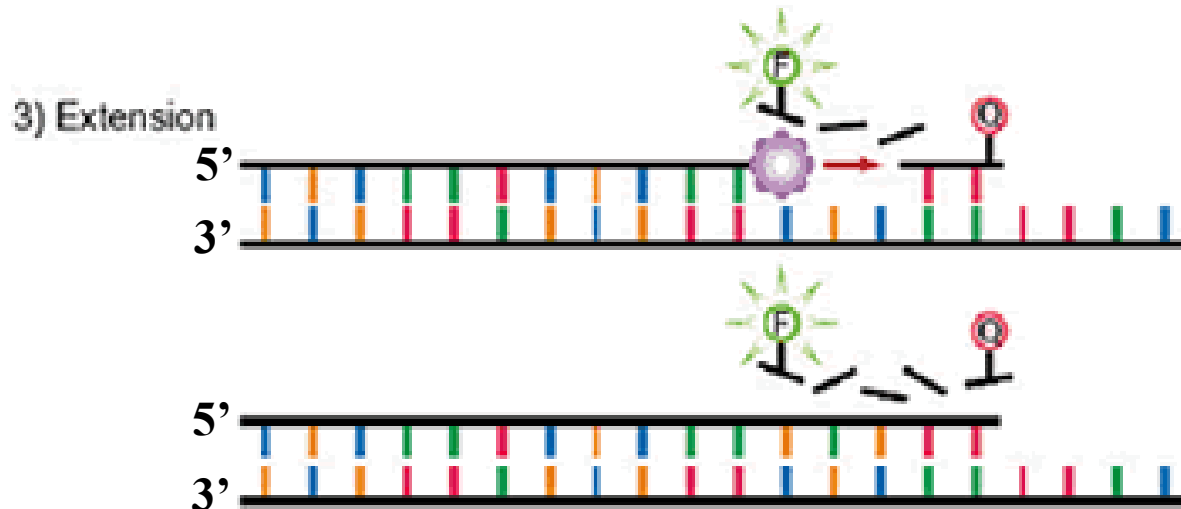
Sondas Taq-Man



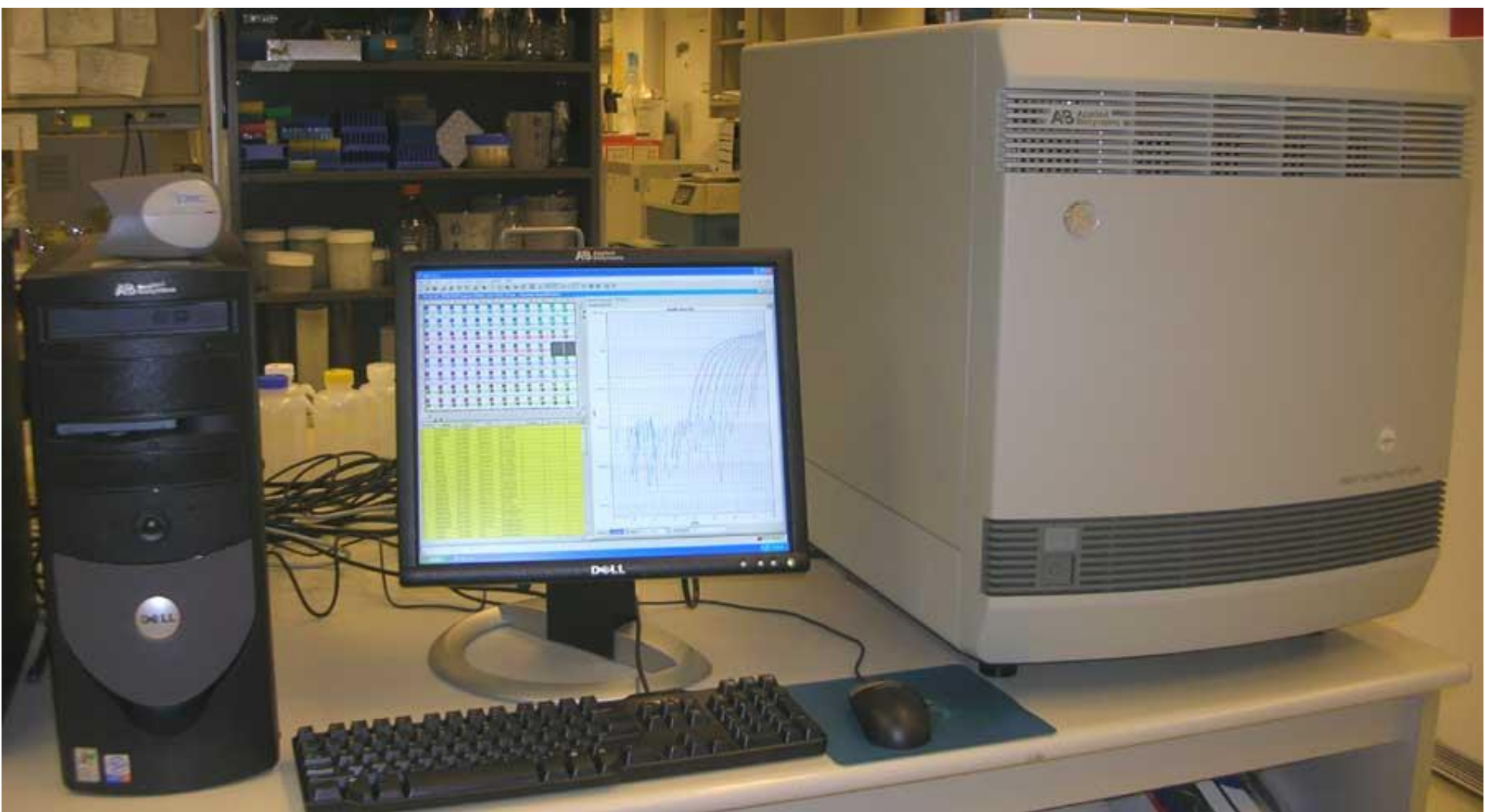
Sonda (ssADN) hibrida con un fragmento específico



Marcador fluorescente en 5' y una molécula que absorbe la fluorescencia emitida por el marcador en 3' "quencher"



Actividad exonucleasa 5'-3' libera fluoróforo del quencher



Aplicaciones de la PCR en Tiempo Real

Cuantificación viral (carga viral en pacientes VIH positivos,
detección de SARS Cov 2)

Cuantificación de expresión génica

Detección de patógenos; bacterias, hongos, virus

Diagnóstico de tumores

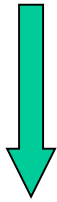
Discriminación alélica

Control de eficacia de fármacos

PCR Standard

vs.

PCR Tiempo Real



Análisis de punto final

Detección del producto por
electroforesis en gel

experimentalmente



Análisis de la cinética de
la reacción

Detección del producto en
cada ciclo de la reacción

Software



<http://www.youtube.com/watch?v=QVeVIM1yRMU>

<http://www.dnatube.com/video/4307/Realtime-PCR>

GRACIAS