

7/VII/2014

S1401014

0.242796

# APLICACIONES BIOTECNOLOGICAS DE PCR EN TEMPO REAL

## EXTRACCIÓN DO ADN e CUANTIFICACIÓN

Recopilado por Jorge Rodríguez Castro

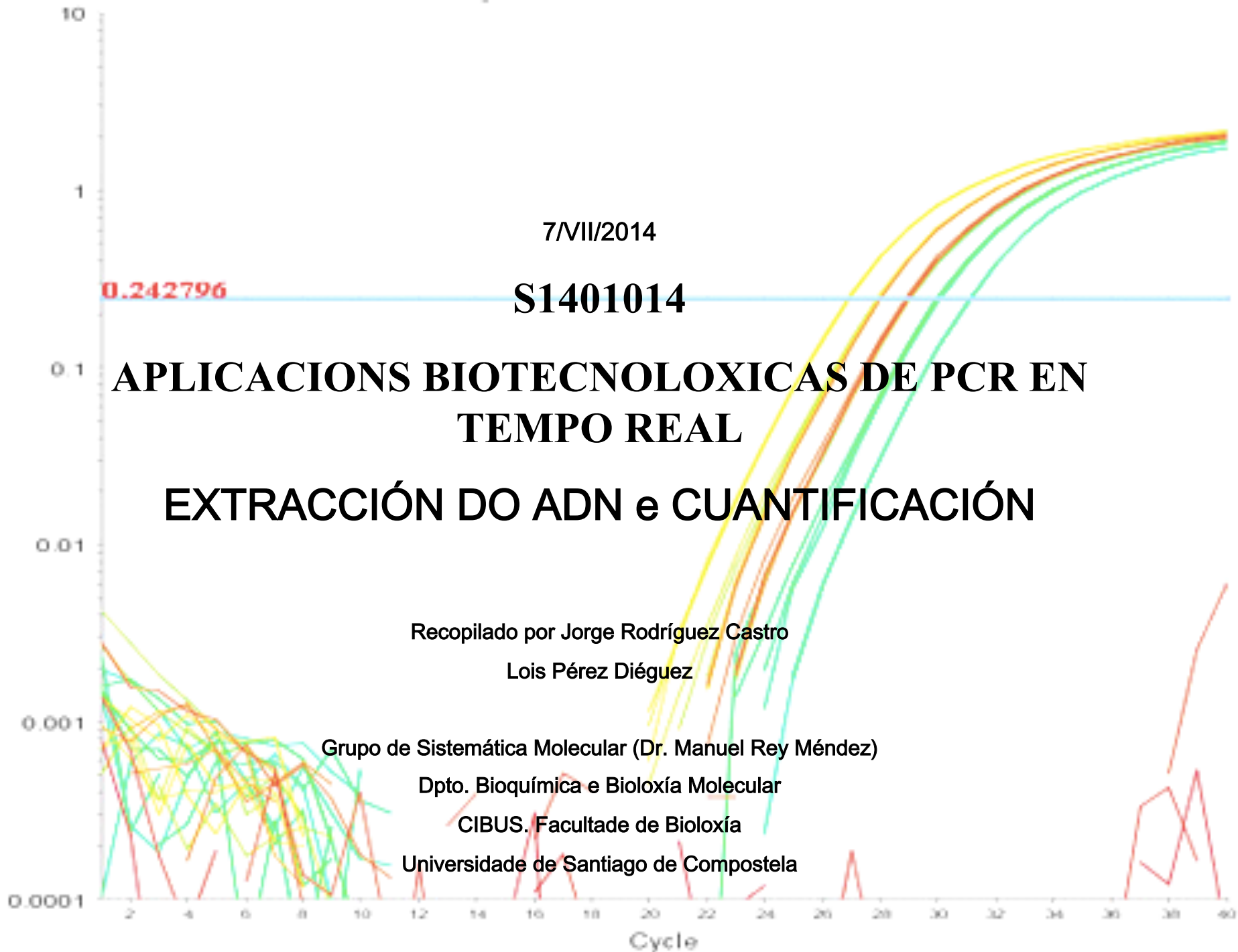
Lois Pérez Diéguez

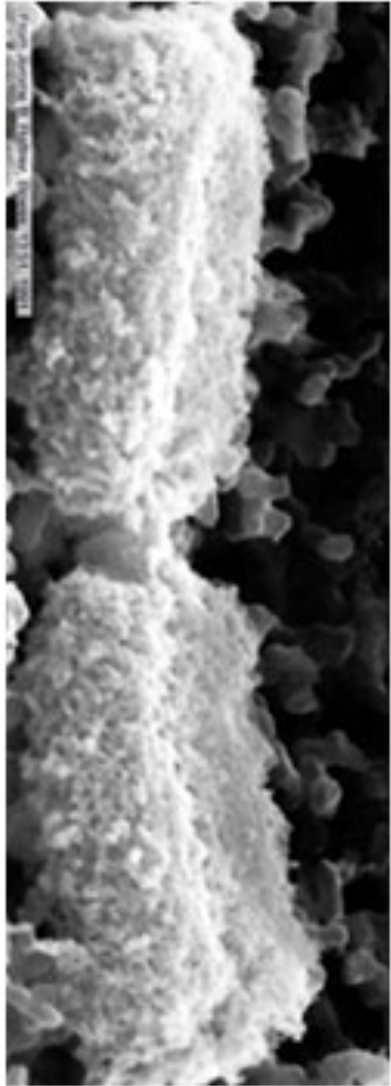
Grupo de Sistemática Molecular (Dr. Manuel Rey Méndez)

Dpto. Bioquímica e Bioloxía Molecular

CIBUS. Facultade de Bioloxía

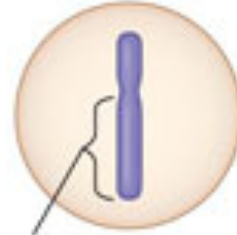
Universidade de Santiago de Compostela





**Sister chromatids**

**Chromosomes**



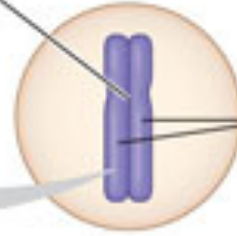
INTERFASE: G1

**Chromosome arm**

**Chromosome duplication (including DNA synthesis)**

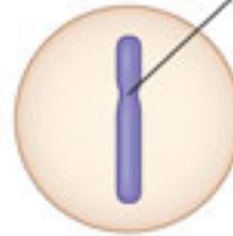
INTERFASE: S

**Centromere**



**Sister chromatids**

**Separation of sister chromatids**

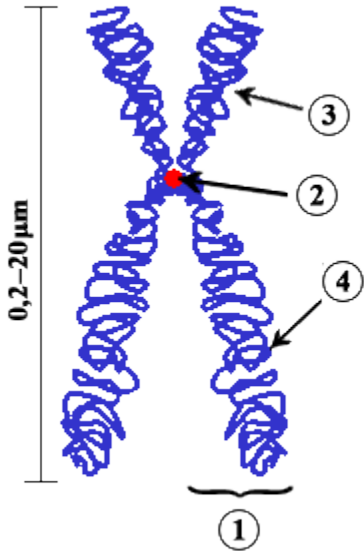


**Centromere**

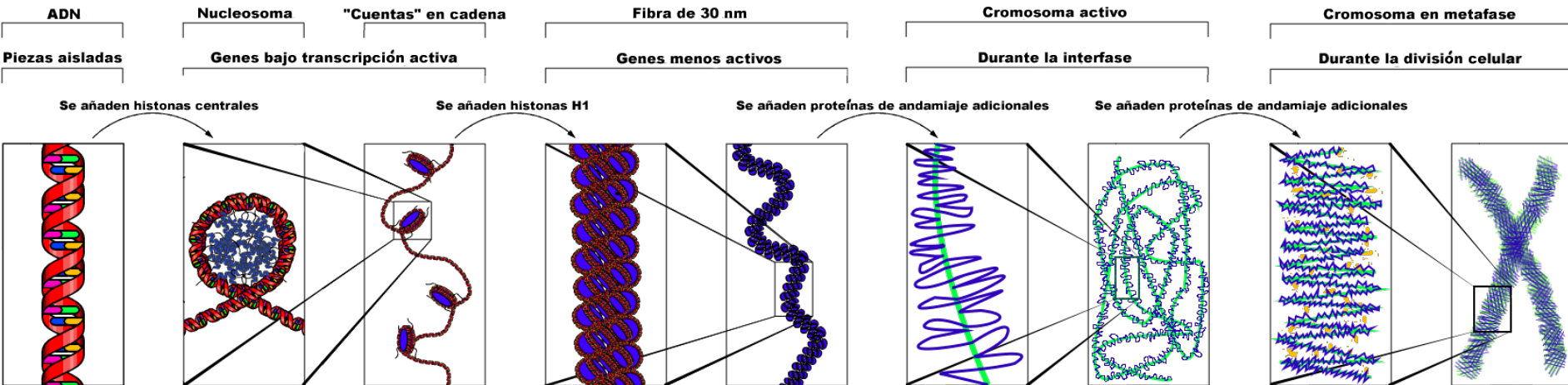
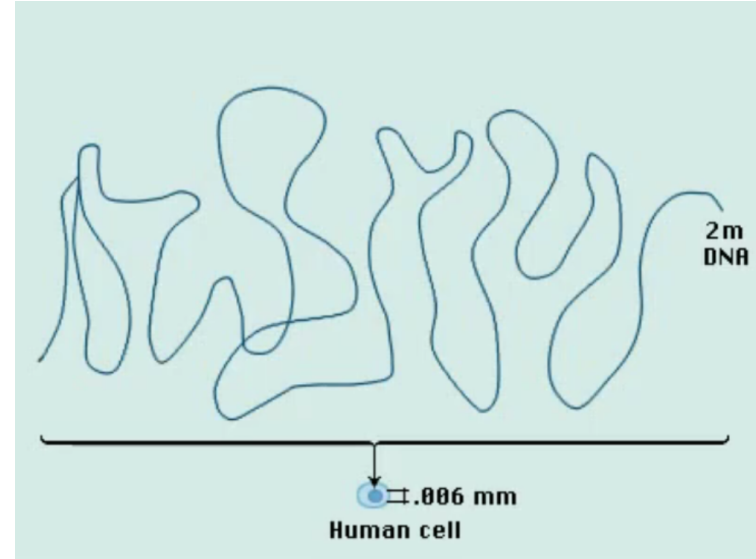
**DNA molecules**

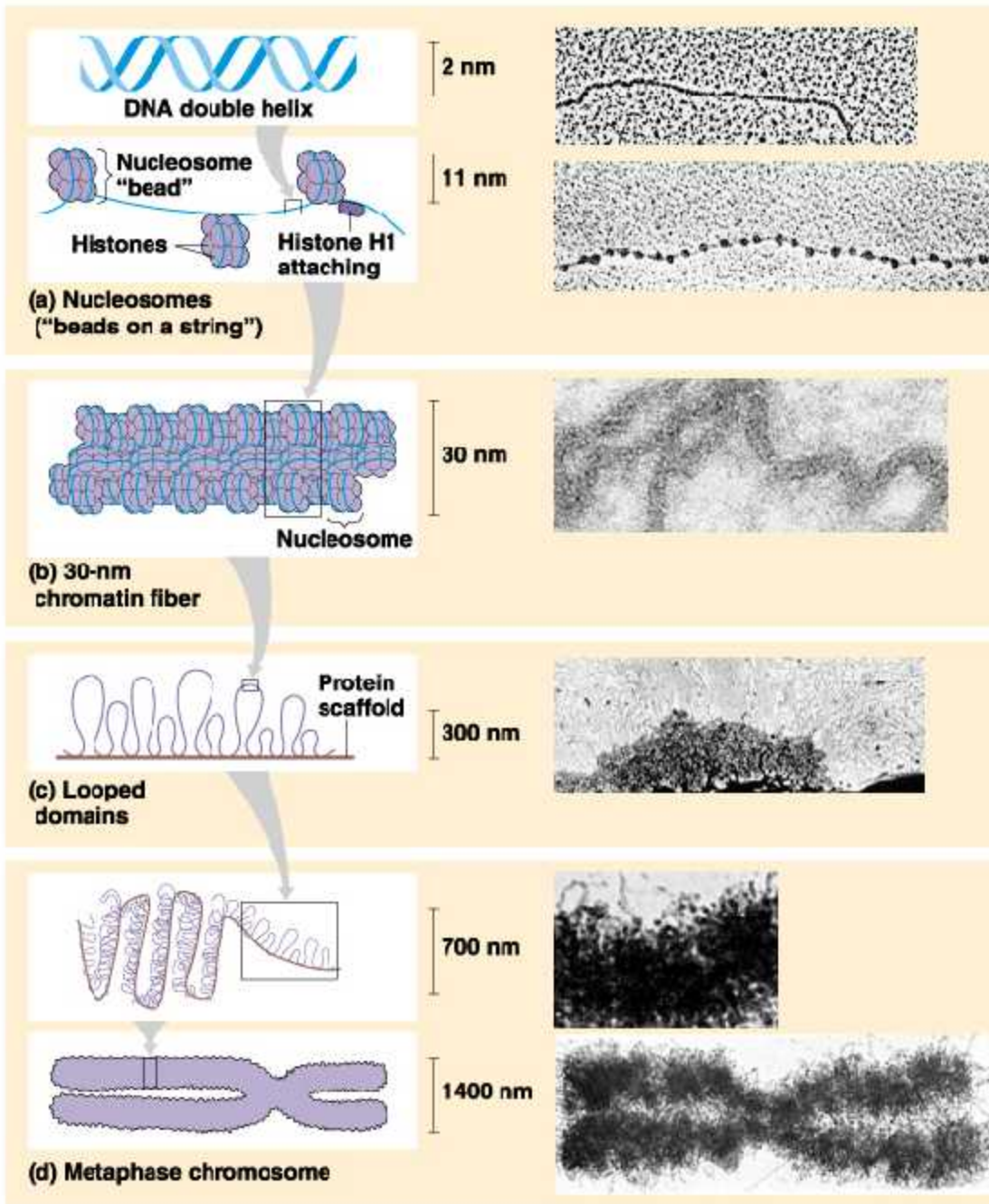


Célula: hepatocitos con 20 micras, espermatozoides de 53  $\mu\text{m}$ , óvulos de 150  $\mu\text{m}$ .  
 Núcleo: 6  $\mu\text{m}$ .  
 El cromosoma 1 humano: 247.199.719 pb, 7,3 cm (46 cromosomas: 2 metros)  
 En metafase mitótica: 0,001 cm (0,01 mm, 10  $\mu\text{m}$ )



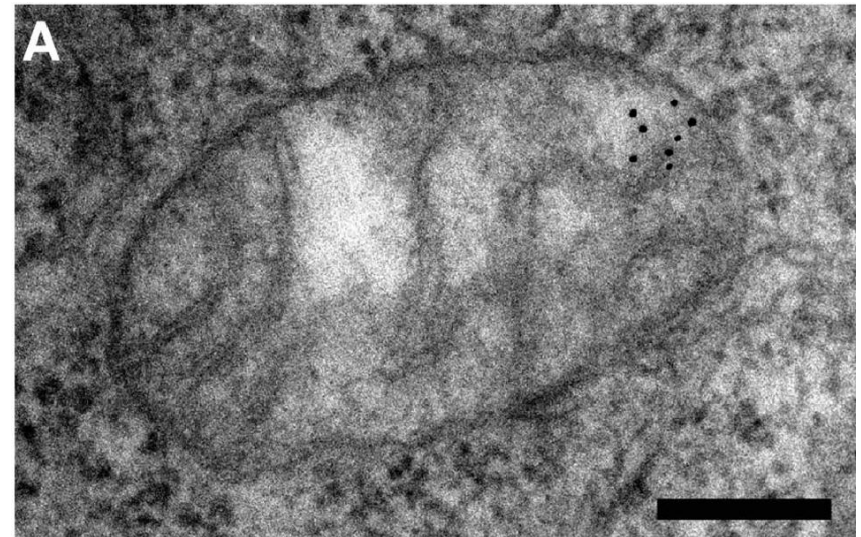
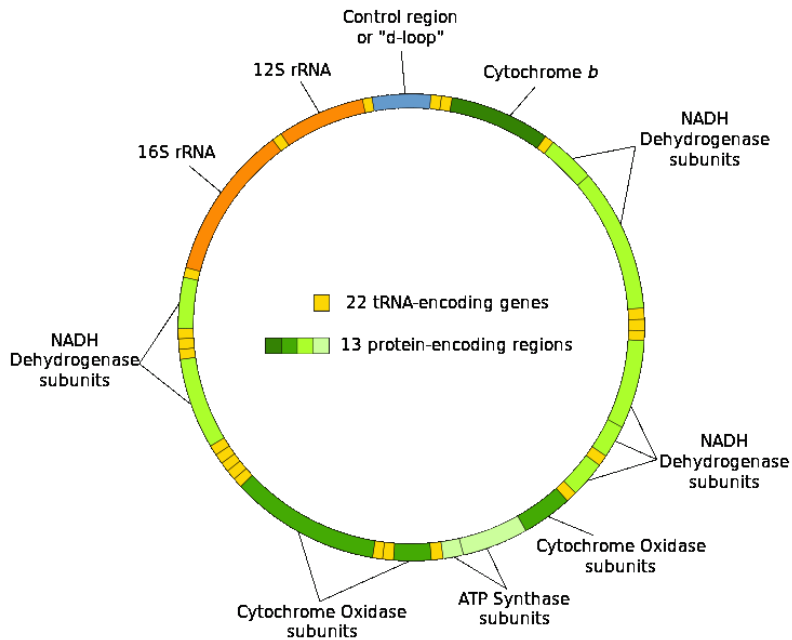
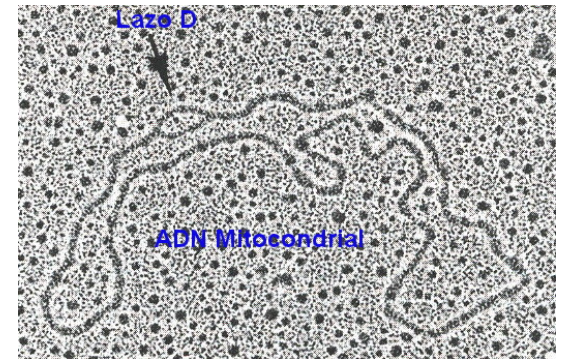
Cromosoma eucariótico duplicado y condensado (metafase mitótica).  
 (1) Cromátida, cada una de las partes idénticas de un cromosoma luego de la duplicación del ADN (en la interfase).  
 (2) Centrómero: lugar del cromosoma en el cual ambas cromátidas se tocan.  
 (3) Brazo corto.  
 (4) Brazo largo.





# ADN MITOCONDRIAL

- En organismos unicelulares pode haber unha soa mitocondria, e nunha células do fígado 1.000-2.000
- 2 a 10 copias de ADN en cada mitocondria
- 100 a 10.000 copias en cada célula, como excepción un óvulo contén 100.000 a 1.000.000 de copias e un esperma 100 a 1.000.
- Nos mamíferos ten unha lonxitude de 15.000 a 17.000 pb.



Electron microscopy reveals mitochondrial DNA in discrete foci. Bars: 200 nm.  
(A) Cytoplasmic section after immunogold labelling with anti-DNA; gold particles marking mtDNA are found near the mitochondrial membrane

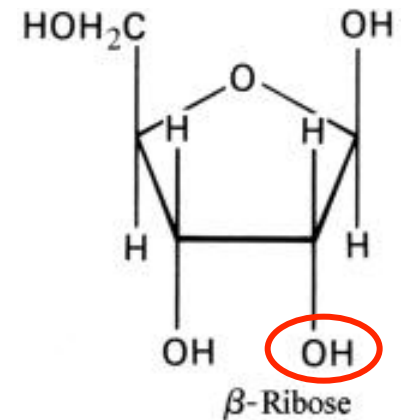
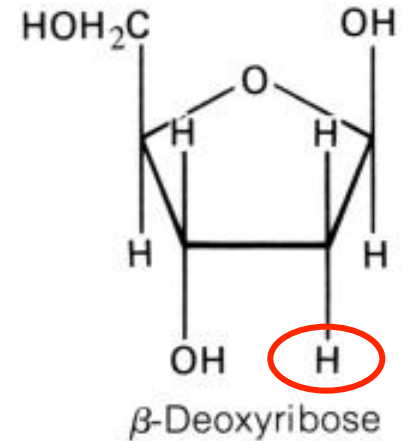
# ÁCIDOS NUCLEICOS, NUCLEÓTIDOS, NUCLEÓSIDOS E BASES NITROXENADAS

EXISTEN 8 NUCLEÓTIDOS, QUE SE DIVIDEN EN DOUS GRUPOS:

- DESOXIRRIBONUCLEÓTIDOS (4): COMPOÑEN O ADN
- RIBONUCLEÓTIDOS (4): COMPONEN O ARN

OS NUCLEÓTIDOS ESTÁN COMPOTOS POR:

- UNHA PENTOSA: AZUCAR DE TIPO DESOXIRRIBOSA O RIBOSA
- UNHA BASE NITROXENADA: PÚRICA (A,G) O PIRIMIDÍNICA (T, U, C)
- GRUPO FOFATO: UNE OS NUCLEÓSIDOS (PENTOSA +BASE NITROXENADA)



# BASES NITROXENADAS

SON CINCO:

•2 PÚRICAS (AS DOS ATÓPANSE TANTO NO ADN COMO NO ARN) :

-ADENINA

-GUANINA

•3 PIRIMIDÍNICAS:

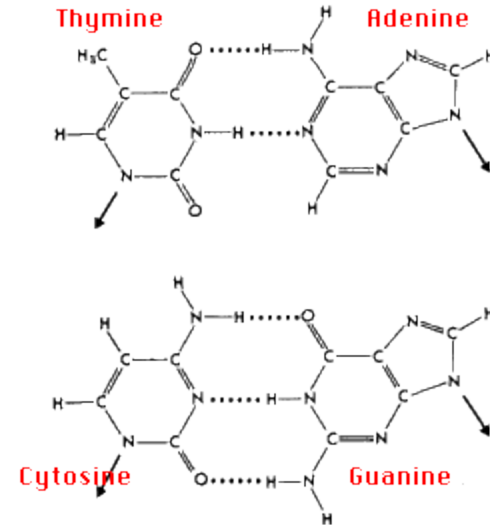
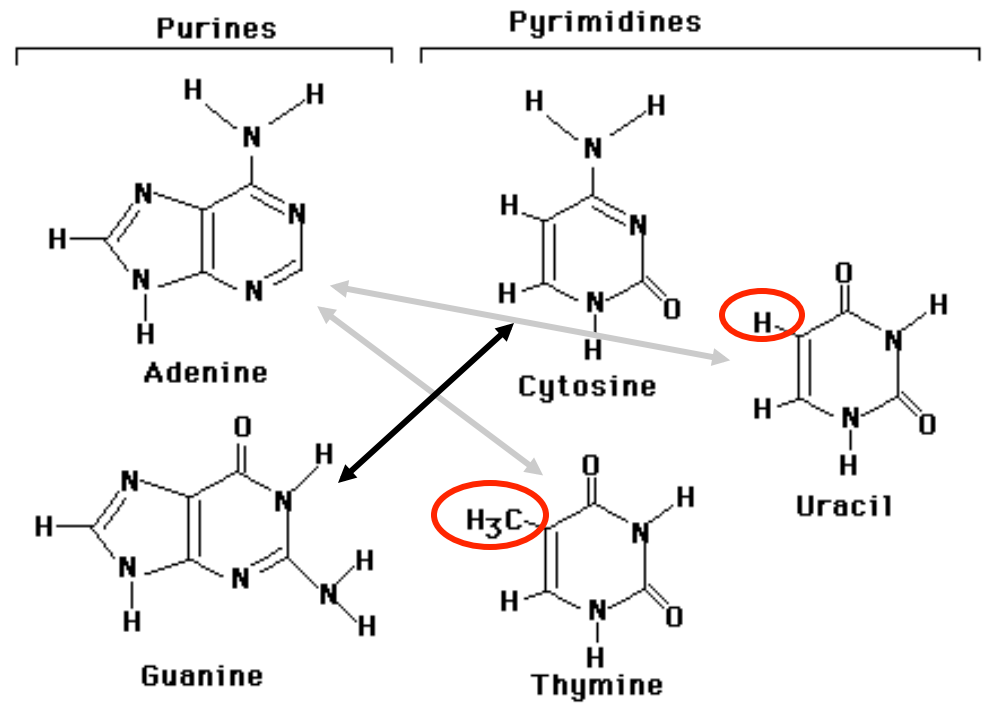
-TIMINA (ADN)

-URACILO (ARN)

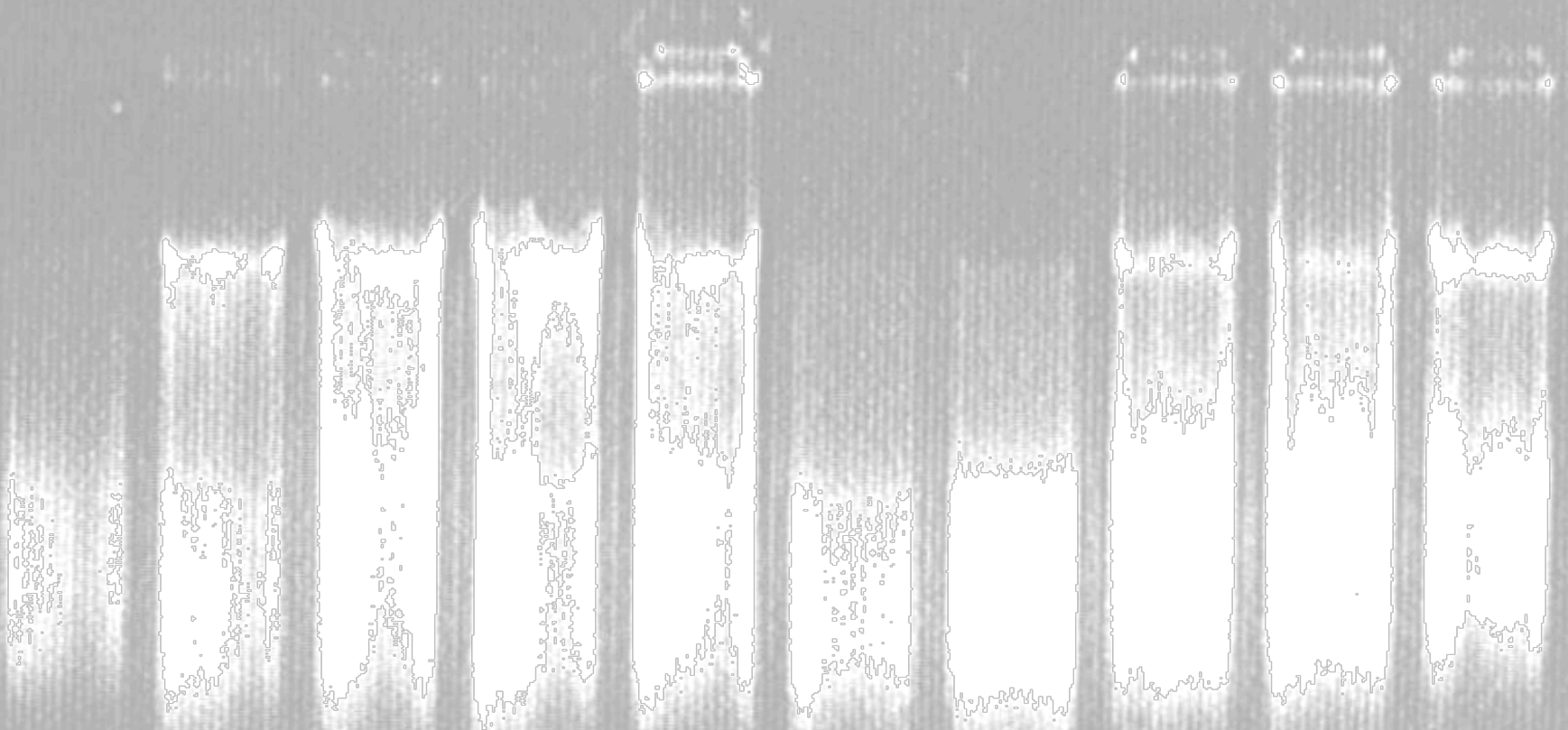
-CITOSINA (ADN E ARN)

UNHA PÚRICA TEN COMO COMPLEMENTARIA UNHA PIRIMIDÍNICA, Á QUE SE UNE POR PONTES DE HIDRÓXENO

C-G, A-T (A-U NOARN)



# EXTRACCIÓN DO ADN





# EXTRACCIÓN DO ADN

## EXTRACCIÓN “CASEIRA”

**1º DISGREGACIÓN DO TEXIDO:** En caso de usar tejidos duros, como as lentellas: Engadir auga e usar a batidora.

**2º ELIMINACIÓN DOS RESTOS NÓN DISGREGADOS:** Filtrado cun pano (non necesario no caso da extracción de cuspe).

**2º ROTURA DAS MEMBRANAS CELULARES:** Mezclar cun chorriño de deterxente ou xabón.

**3º FACILITAR A AGREGACIÓN DO ADN:** Engadir unha pizca de sal para que anule a repulsión entre hebras de ADN causada pola carga negativa das mesmas.

**4º ENGADIR O ALCOHOL:** Unha vez a sal está disolta, depositar con coidado o alcohol polas paredes do vaso para que se formen dúas fases.

**5º OBSERVAR O ADN:** O ADN está disolto na auga, pero é insoluble no alcohol, polo que as hebras agréganse frotando nel, arrastradas por pequenas burbullas de gas, semellando “pelusilla” de algodón.



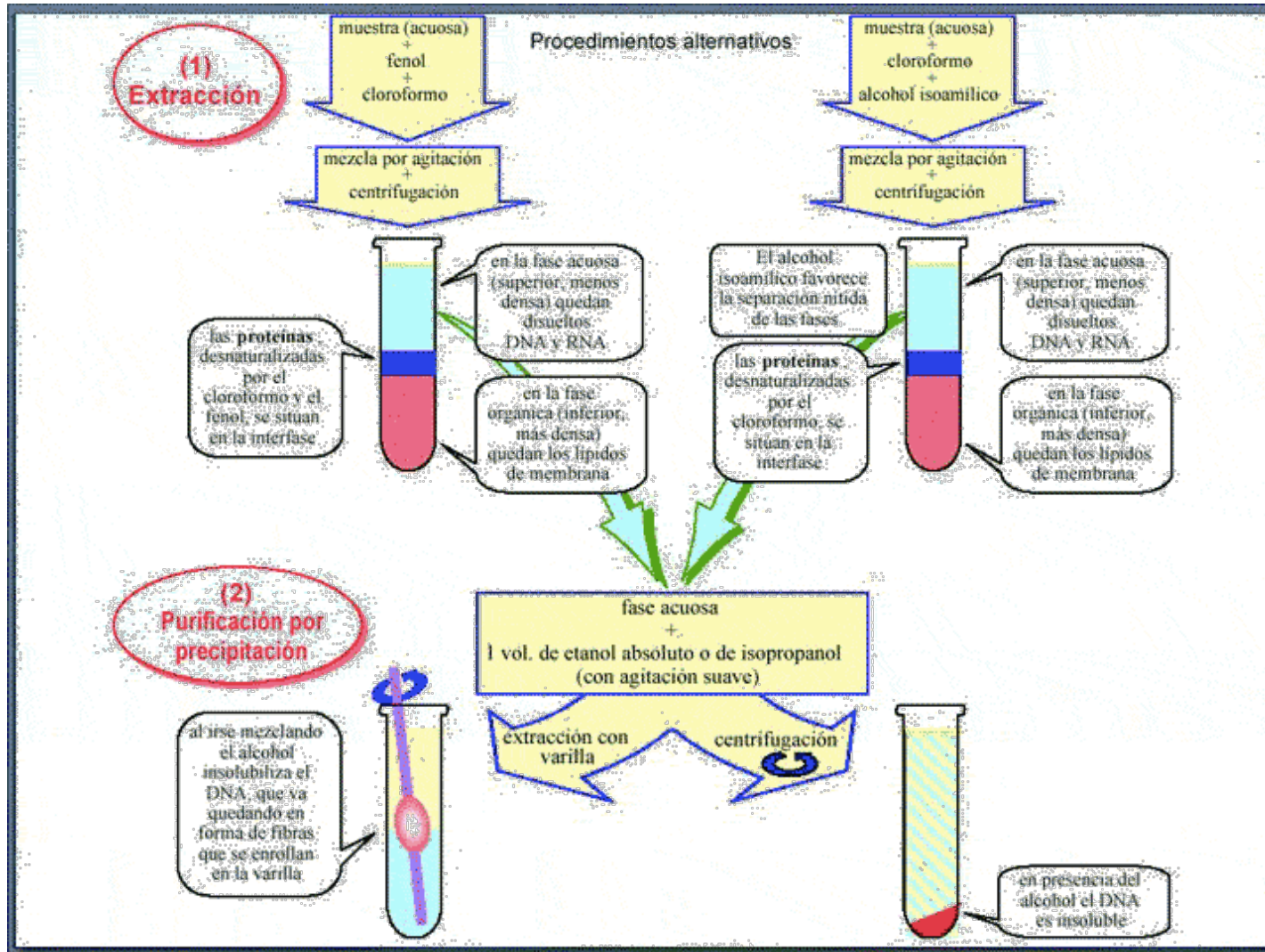
# EXTRACCIÓN DO ADN

## MÉTODO DO FENOL CLOROFORMO

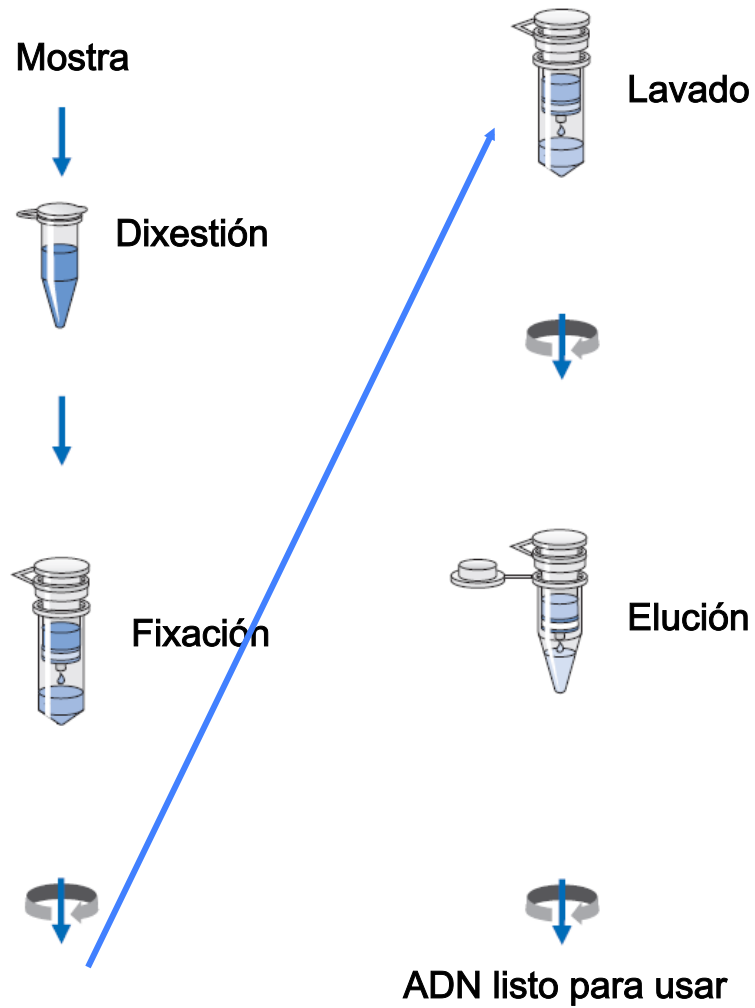
1. Trocear e introducir no tubo.
2. 200 ul de tampon de dixestión: TENS (Tris, EDTA, SDS).
3. 10 ul de Proteinasa K.
4. Incubación a 37°C.
5. Un volúmen de fenol/cloroformo/isoamilalcohol (25:24:1).
  - Axitar 1´.
  - Centrifugar.
    - Fase acuosa superior: ADN e ARN.
    - Interfase: proteínas desnaturalizadas polo fenol e o cloroformo.
    - Fase orgánica inferior: lípidos de membrana.
    - O isoamilalcohol favorece a separación das fases.
6. Recoller a fase superior.
  - Repetir 3 veces os pasos 5 e 6.
7. Un volúmen de etanol 95%=> insolubilización do ADN (precipita).
8. Centrifugar.
9. Secar pélllet (ADN e ARN).
10. Resuspender en Tris-HCl ou auga estéril.

# EXTRACCIÓN DO ADN

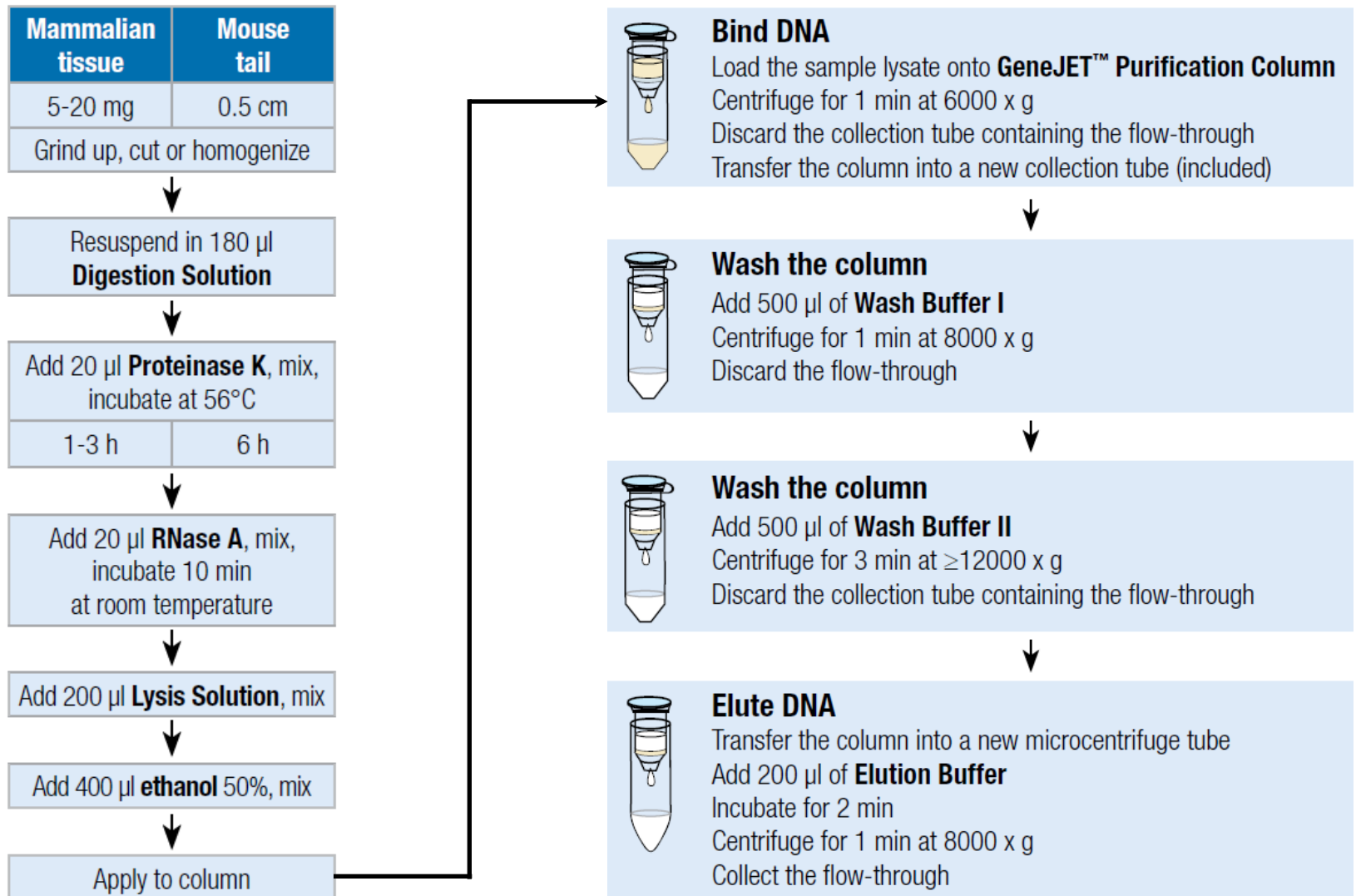
## MÉTODO DO FENOL CLOROFORMO



# EXTRACCIÓN DO ADN



# GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit



# EXTRACCIÓN DO ADN

## PROTOCOLO (A: Tecido animal)

- 1) Identificar dous tubos de 1.5 ml escribindo o número da mostra.

<b>Grupo 1</b>	<b>10% CABALO EN VACA</b>
<b>Grupo 2</b>	<b>HAMBURGUESA</b>
<b>Grupo 3</b>	<b>SALCHICHA</b>
<b>Grupo 4</b>	<b>COMIDA DE GATO</b>
<b>Grupo 5</b>	<b>PENSO SECO DE GATO</b>

- 2) Pesar 50 mg da mostra, cortar en anaquiños, para facilitar a dixestión, e meter no primeiro tubo:
- 3) Meter no outro tubo un fragmento maior da mostra, e engadir etanol para almacenalo no conxelador
  - 4) Engadir no primeiro tubo
    - 180 µl de **Digestion Solution**
    - 20 µl de **Proteinasa K**
- 5) Incubar a 56 °C durante 3 horas ou toda a noite. Pódese acelerar o proceso remexendo o contido do tubo.

# EXTRACCIÓN DO ADN

6) Engadir 200  $\mu$ l de **Lysis Solution**. Mesturalo completamente co vortex 15 segundos.



7) Engadir 400  $\mu$ l de **etanol 50%**. Mesturalo como no paso anterior .



8) Colle unha columna dentro dun tubo de 2 ml.

9) Pipetear todo o contido do tubo de 1.5 ml dentro da columna (~800  $\mu$ l).



10) Centrifugar a 6.000 xg durante 1 minuto (o ADN queda retido na membrana).

11) Poñer a columna nun novo tubo de 2 ml e tirar o vello co filtrado.



12) Pipetear 500  $\mu$ l de **Wash Buffer I** na columna.

(antes de usalo, asegurarse de que o stock xa ten engadido o etanol).



13) Centrifugar a 8.000 xg durante 1 minuto (o ADN permanece retido na membrana).

14) Tirar o líquido filtrado e volver a empregar o tubo de 2 ml.



15) Pipetear outros 500  $\mu$ l de **Wash Buffer II** na columna.



16) Centrifugar a  $\geq 12.000$  xg durante 3 minutos.

17) Poñer a columna nun tubo de 1.5 ml e tirar o de 2 ml co filtrado.




18) Centrifugar a  $\geq 12.000$  xg durante 1 minuto (eliminamos os restos de etanol).



19) Poñer a columna nun novo tubo de 1.5 ml co número da mostra, e tirar o que contén os restos de etanol.

# EXTRACCIÓN DO ADN

- 20) Pipetear 100  $\mu\text{l}$  de **Elution Buffer** (Tris-HCl pH 8.0, no que se dissolve o ADN) (*pódese aumentar a concentración final reducíndoo a 50  $\mu\text{l}$ , aínda que se recuperará menos cantidade total*).
- 21) Incubar 2 minutos a temperatura ambiente (*pódese aumentar a cantidade de ADN incubándoo a 60  $^{\circ}\text{C}$  e co buffer prequentado*).
-  □ 22) Centrifugar a 8.000 xg durante 1 minuto (o ADN atravesará a membrana).
- 23) Tirar a columna. Almacenar (cuantificar, ver a calidade e a integridade, PCR,...) o tubo de 1.5  $\mu\text{l}$  co ADN.



# CUANTIFICACIÓN

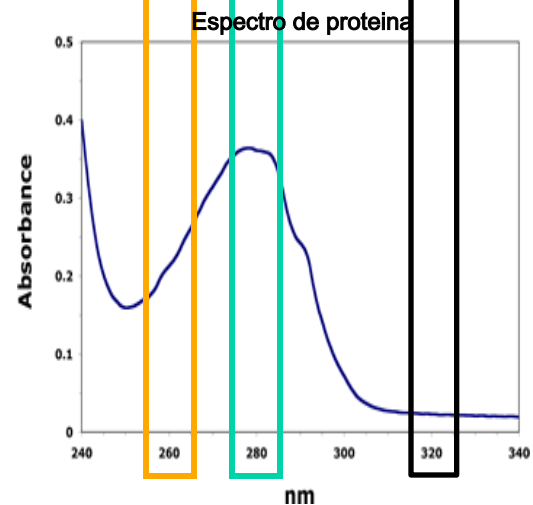
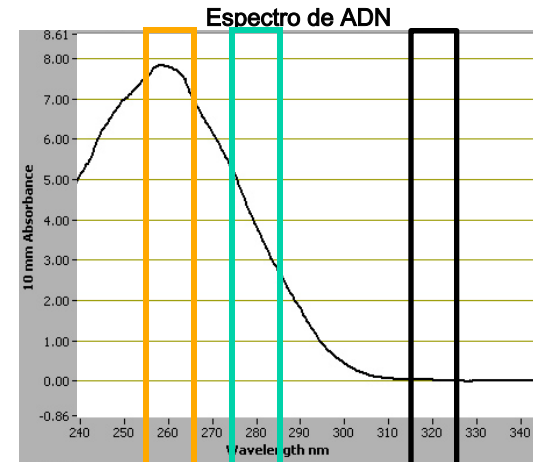
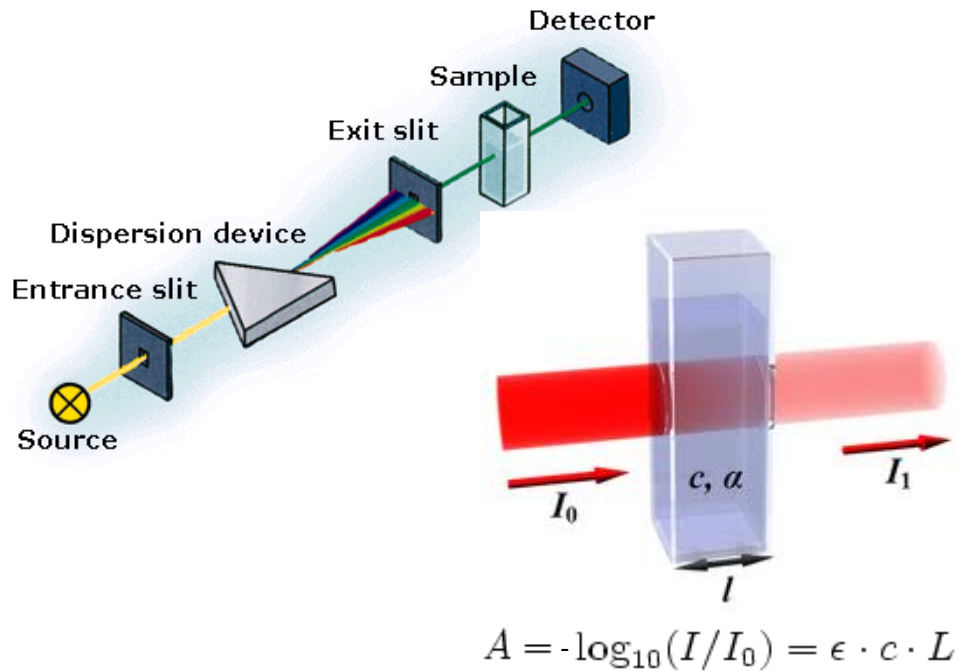
- **ESPECTROFOTÓMETRO:** Cuantificación da concentración do ADN extraído.

Medimos a absorbancia a dúas lonxitudes de onda:

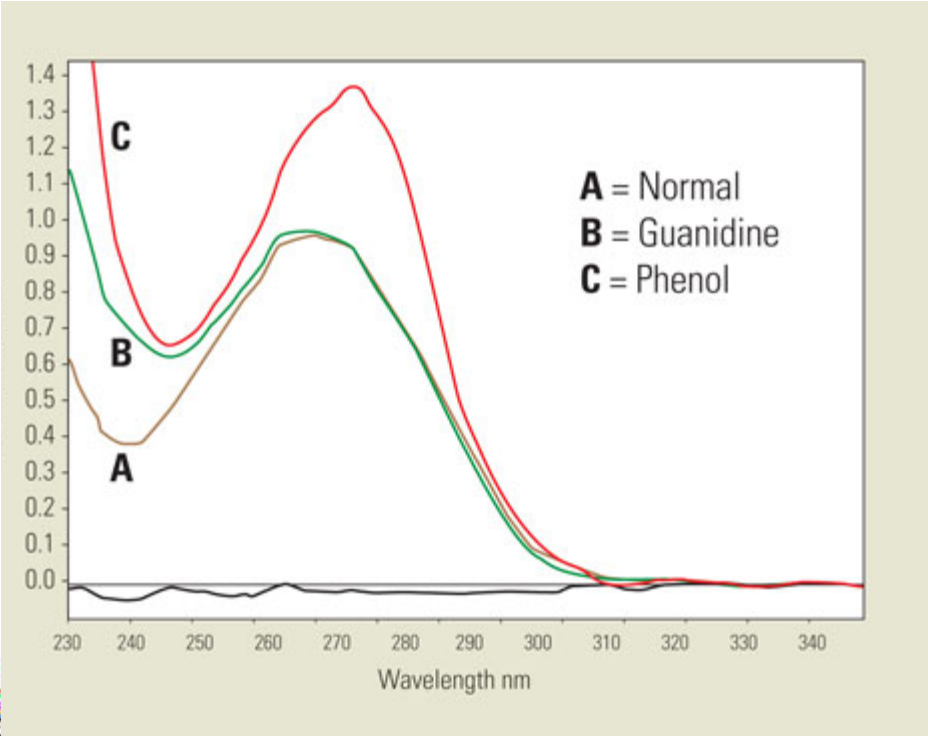
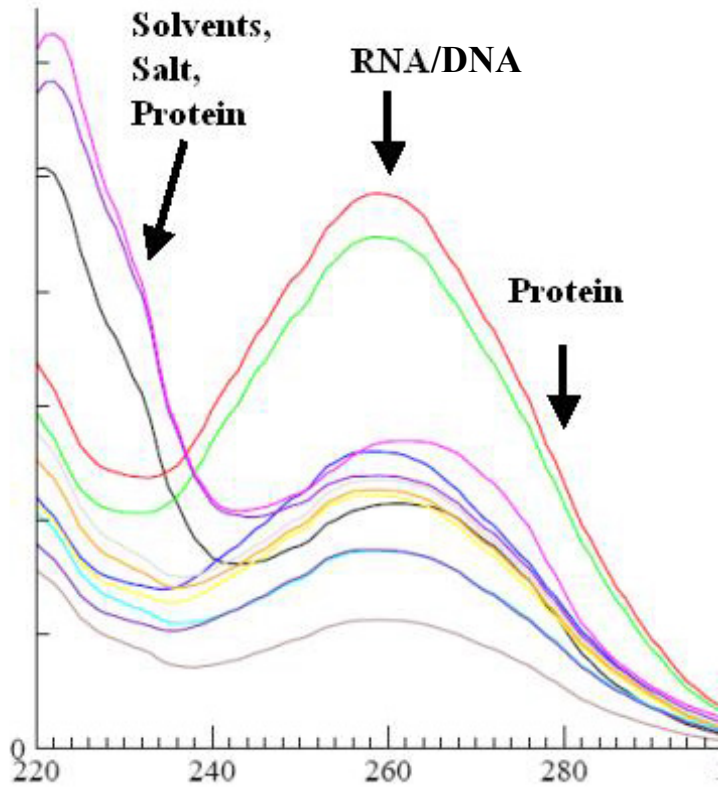
- **A260** nm: 1 unidade de absorbancia (OD) = 1000 ng/μl (Take 3: lonxitude de paso de 0,5 mm)  
= 50 ng/ μl (cubeta de espectrofotómetro: 1 cm)
- **A280** nm: sin proteínas si A260/A280 é maior que 1.8

Outras medidas:

- **A230** nm: fenol, cloroformo ou carbohidratos
- **A320** nm: material particulado, background

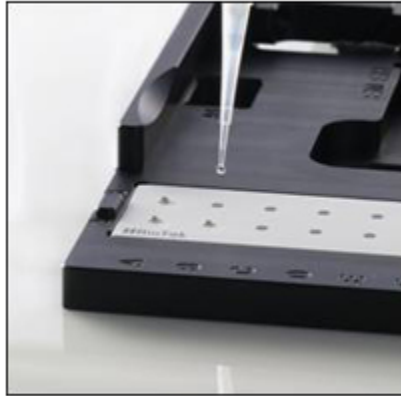


# Pureza



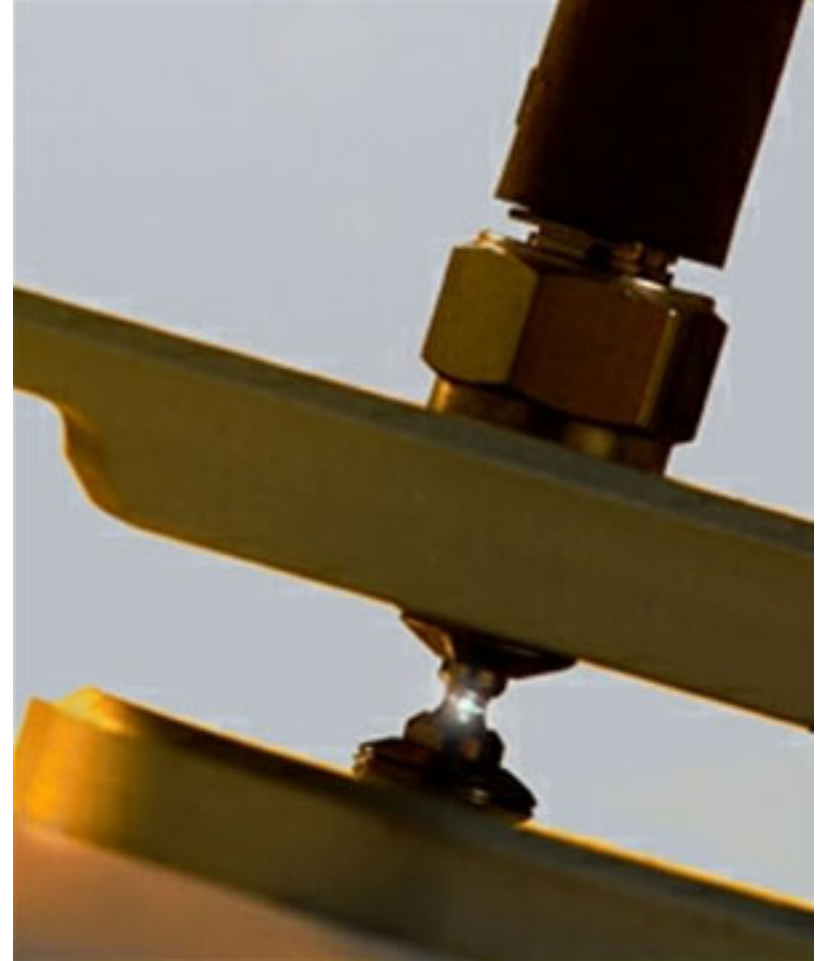
# EXTRACCIÓN DO ADN

Epoch Microplate (Biotec) coa placa Take3



# EXTRACCIÓN DO ADN

Espectofotómetro NanoDrop





# EXTRACCIÓN DO ADN

Epoch Microplate (Biotec) coa placa Take3



# CUANTIFICACIÓN

Epoch Microplate (Biotec) coa placa Take3

The image shows a screenshot of the Gen5 Secure software interface. The main window is titled "Gen5 Secure - Experiment1\*" and has a menu bar with "File", "Plate", "Protocol", "Take3", "Quality Control", "Window", "System", and "Help". A "File" menu is open, showing a list of options: "Procedure", "Plate Layout", "Data Reduction", and "Report / Export Builders". A yellow arrow points from the "File" menu to the "Procedure" option. In the background, a "Plate 1" window is visible, showing a grid with rows A-H and columns 1-12. The "Matrix" is set to "Statistics" and the "Data" is "450".

File

- Procedure
- Plate Layout
- Data Reduction
- Report / Export Builders

Plate 1

Matrix: Statistics

Data: 450

A															
B															
C															
D															
E															
F															
G															
H															

Edit Mask Help

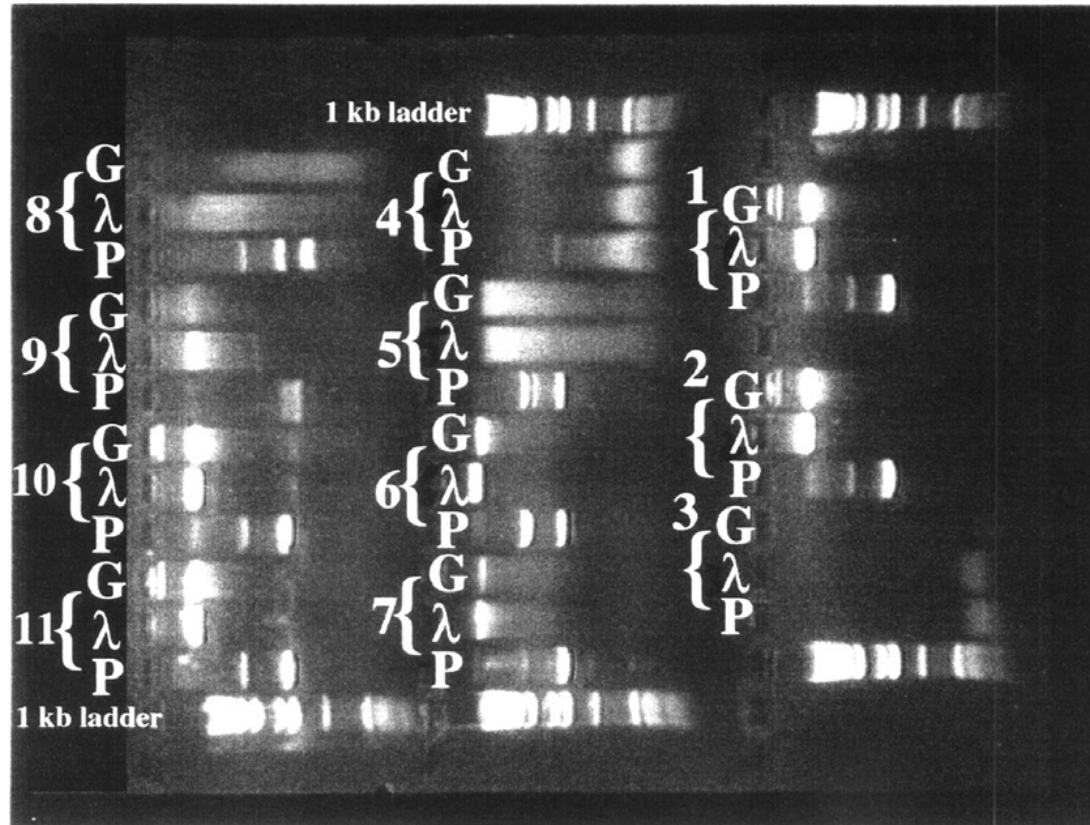
Ready Simulate read System Administrator CAR\_NUM SCR1

# CUANTIFICACIÓN

	2	3	
10% C	0,025 0,043 0,58 <b>24,7</b>		260 280 260/280 ng/μL
HAMBURGUE SA	0,347 0,231 1,502 <b>347,4 78</b>	0,003 0,002 1,435 <b>3,322</b>	260 280 260/280 ng/μL
SALCHICHA	0,03 0,017 1,731 <b>29,50 6</b>	0,002 0,001 1,833 <b>2,212</b>	260 280 260/280 ng/μL
PENSO	0,014 0,025 0,576 <b>14,23 7</b>	0,001 0 12 <b>1,229</b>	260 280 260/280 ng/μL
PENSO SECO	0,098 0,061 1,593 <b>97,97 4</b>	0,001 0 2 <b>0,616</b>	260 280 260/280 ng/μL



# DEGRADACIÓN



1. Control, DNA not treated
2. Physical shearing
3. Autoclave
4. Sonication
5. Mouth nucleases

6. Skin nucleases
7. Freezing
8. Boiling
9. Alkali treatment
10. UV exposure

G: genómico

Lambda DNA : AND lineal de 48 kb

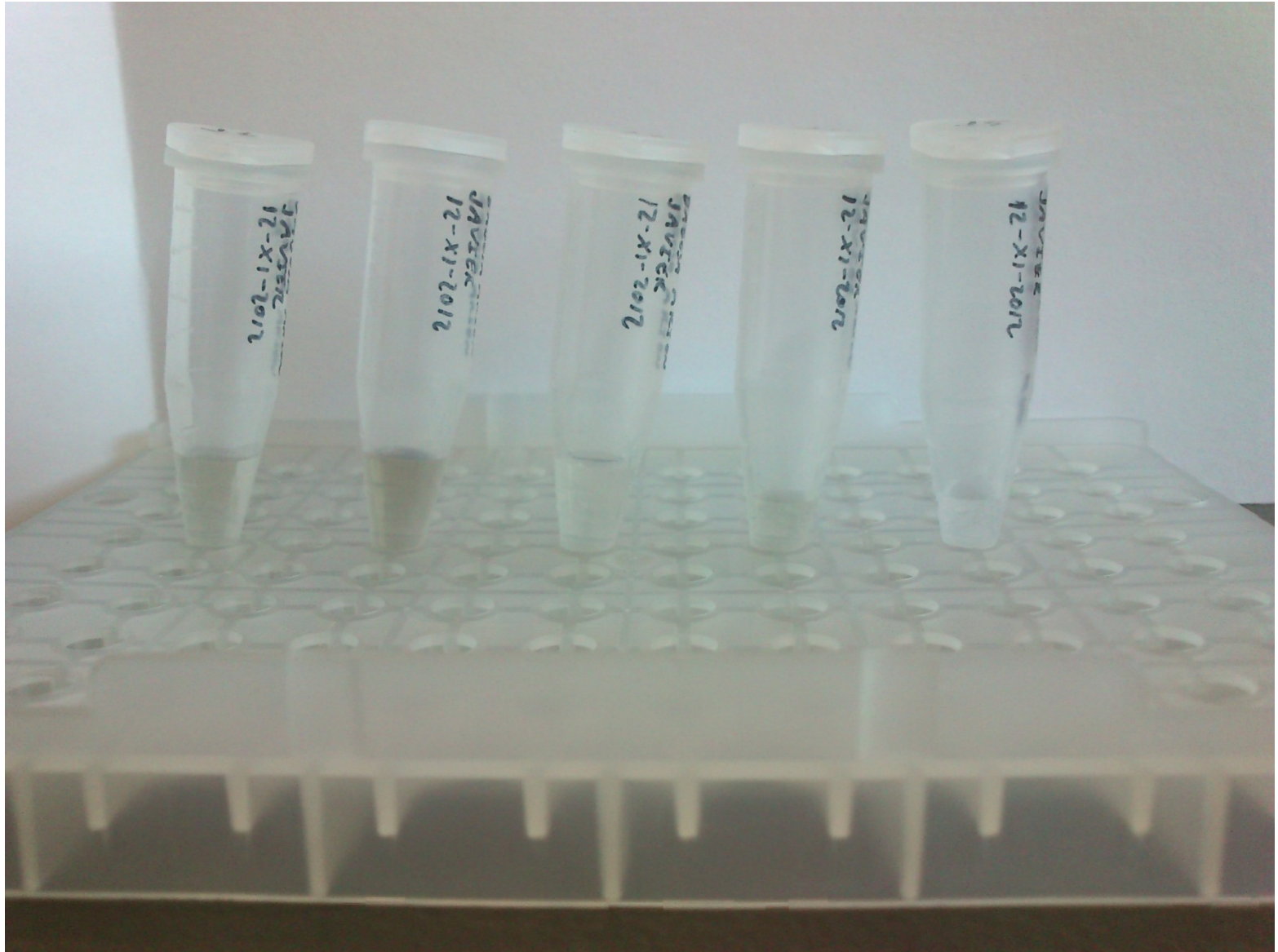
Plásmido: AND circular con tres conformaciones:

-nicked (una de las cadenas está rota)

-linear (las dos cadenas se han roto)

-circular covalentemente cerrada (ccc; puede presentar una conformación superenrollada, supercoiledmatión).

# CONTAMINACIÓN



# Polimerasa Chain Reaction: Reacción en Cadena da Polimerasa

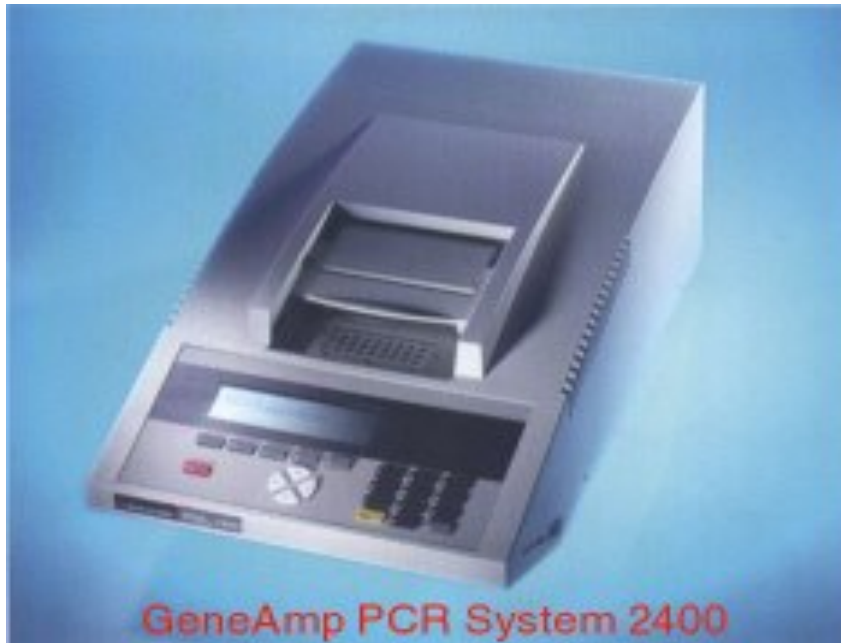


- Foi deseñada polo Dr. Kary Mullis en 1987.
- Gañou o premio Nóbel de Química en 1993 polo seu invento.
- Utilizou a PCR para amplificación do gen de  $\beta$ -hemoglobina humana, e a diagnose prenatal de anemia falciforme.

# REACCIÓN EN CADENA DA POLIMERASA (PCR)

## COMPOÑENTES

1. Auga desionizada estéril.
2. Os 4 dNTPs: dATP, dCTP, dTTP, dGTP.
3. Enzima: Por exemplo Taq polimerasa (Termus Aquaticus). Termoestable.
4. Cofactor para enzima:  $Mg^{+2}$ .
5. Dous cebadores.
6. Termociclador: Ciclos variando as temperaturas en cada paso.

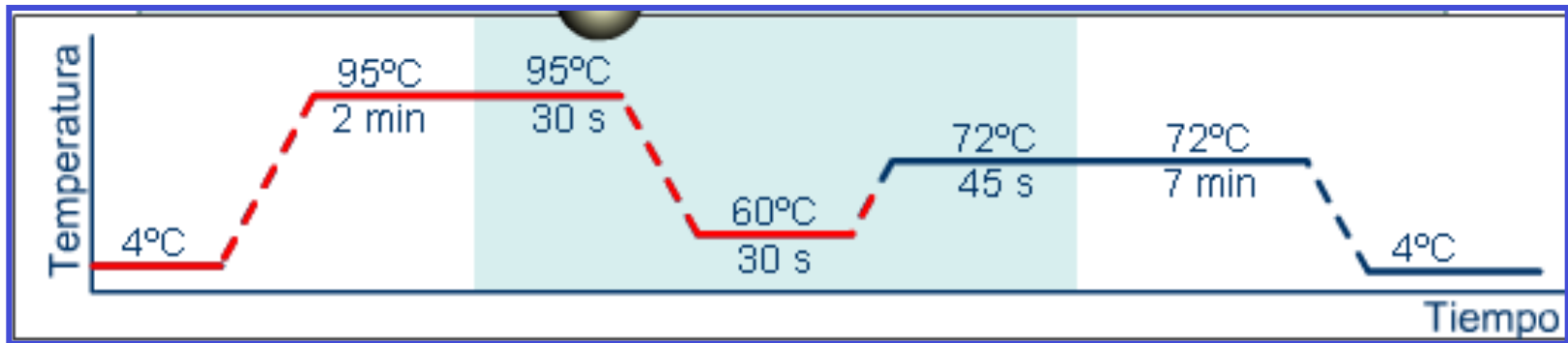




# REACCIÓN EN CADENA DA POLIMERASA (PCR)

## TERMOCICLADOR: CICLOS

1. **Desnatuarización** (95°C) para separar as dúas hebras da dobre hélice.
  2. **Anilamento** (40°-70°, según a secuencia dos oligos) para permitir a unión dos cebadores ás súas secuencias dianas.
  3. **Extensión** (60°) para que a enzima que se uniu ó oligo empece a engadirlle os nucleótidos complementarios á cadea molde.
- Este ciclo repítese un número de veces (30-40)



(Abrir)

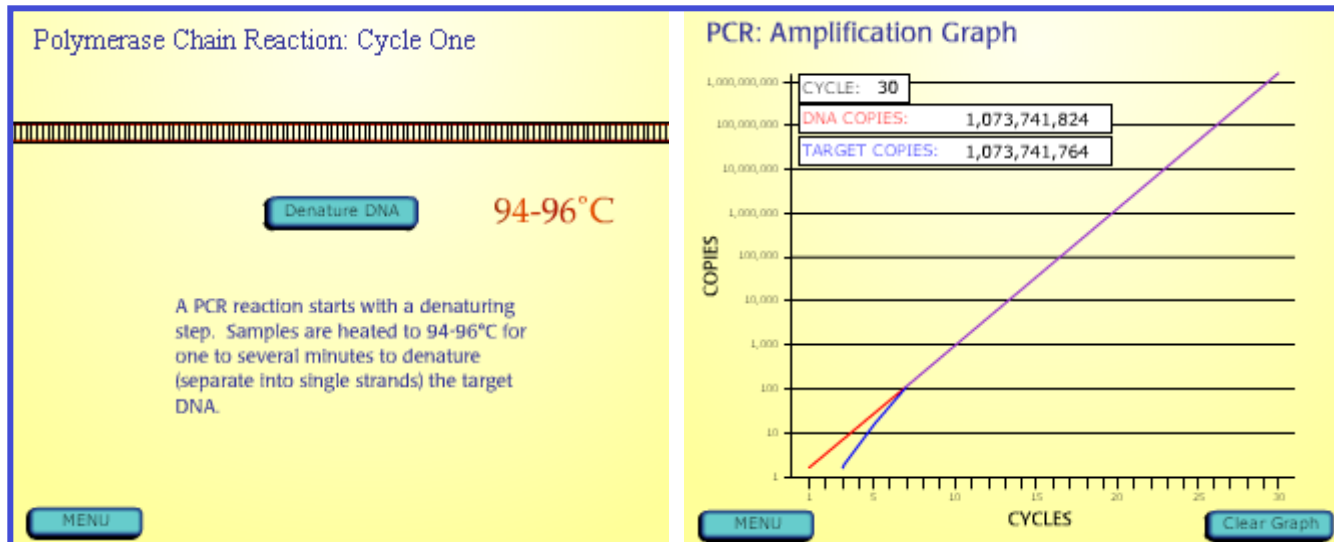
# REACCIÓN EN CADENA DA POLIMERASA (PCR)

## TERMOCICLADOR: CICLOS

Por cada copia de ADN inicial obtémos mil millóns:

- ciclo 1: un
- ciclo 10: mil ( $10^3$ )
- ciclo 20: un millón ( $10^6$ )
- ciclo 30: mil millóns ( $10^9$ )

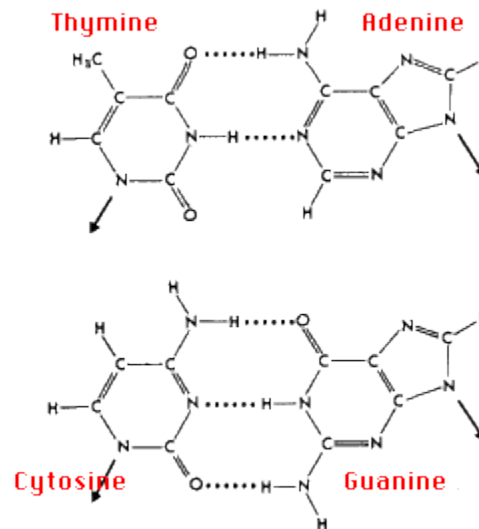
## AMPLIFICACIÓN DE PCR



(Abrir)

Os cebadores ou primers previamente deseñados, reaccionan coa febra sinxela de DNA e xúntanse en lugares específicos por complementariedade de bases. Para isto, báixase a temperatura (ex: 55°C durante 30''). A temperatura e o tempo pode variar entre cebadores segundo a fórmula:

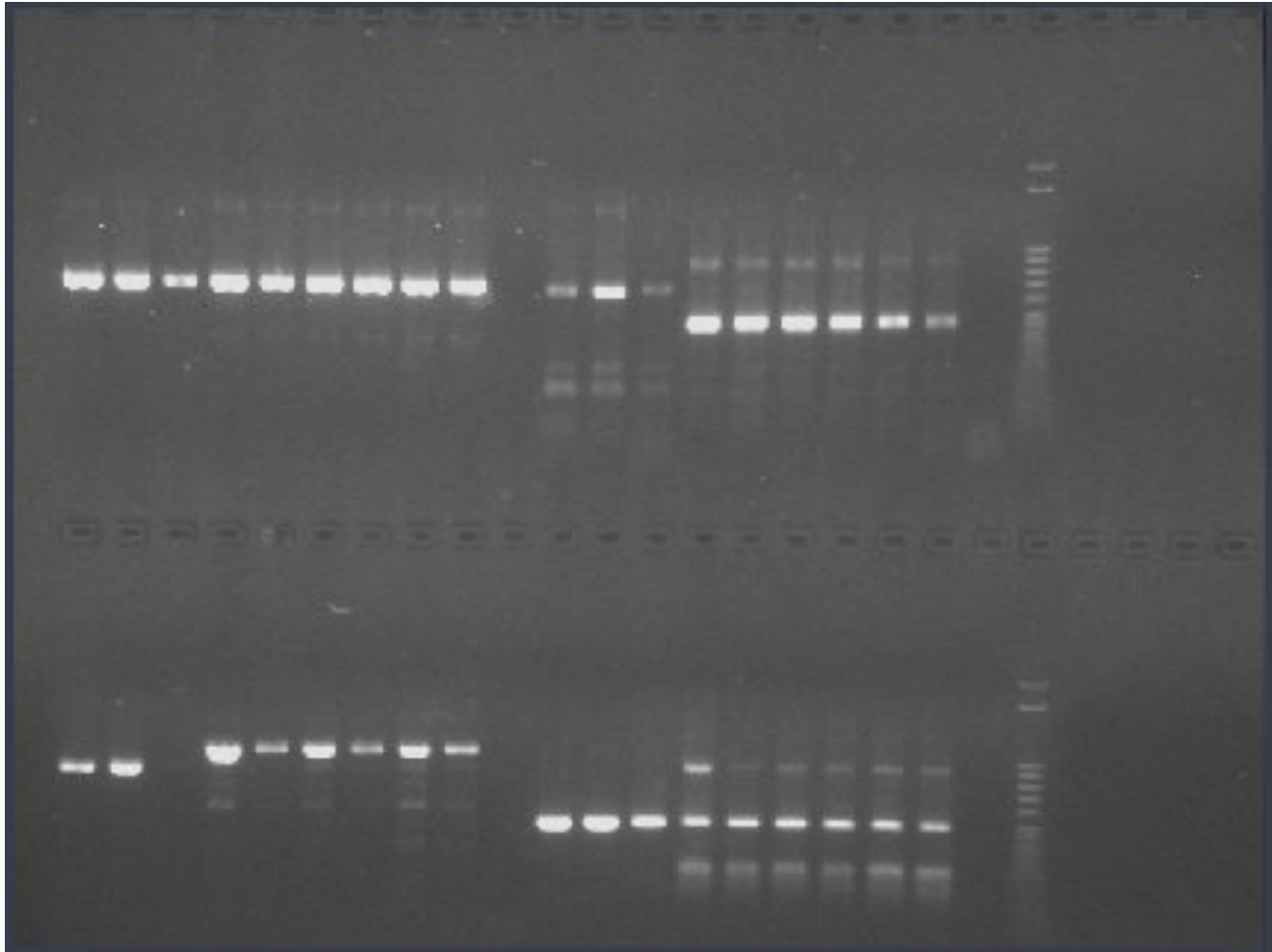
$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$





# REACCIÓN EN CADENA DA POLIMERASA (PCR)

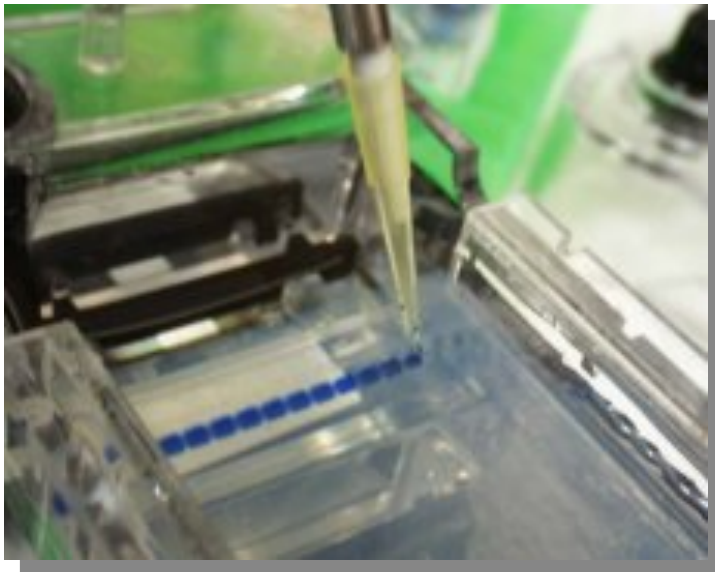
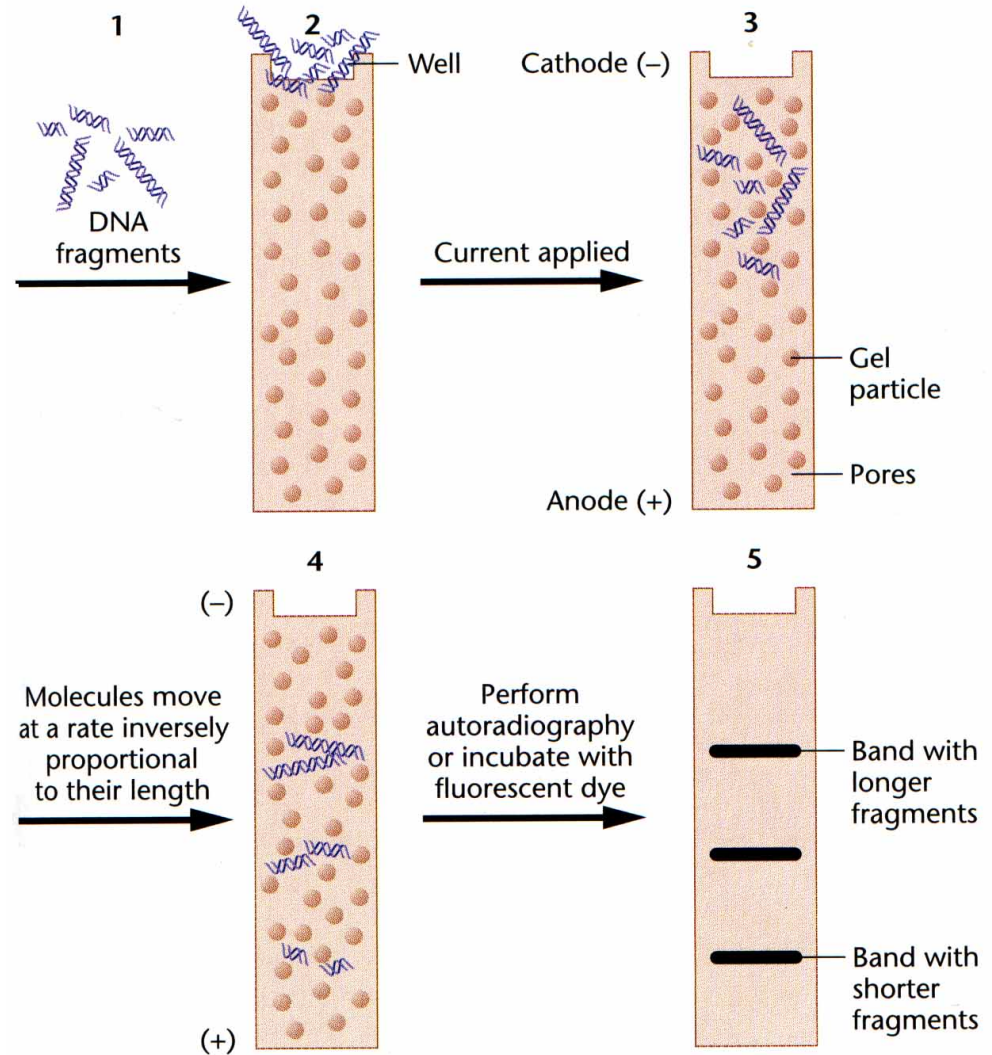
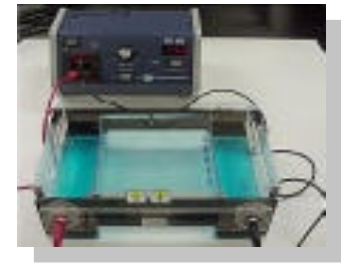
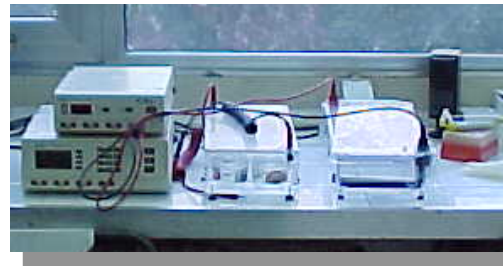
FOTO DE XEL CON PRODUCTOS INESPECÍFICOS



# A ELECTROFORESIS

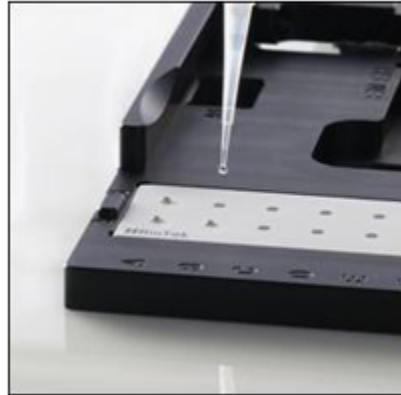
•O ADN, CON CARGA NEGATIVA, NUN CAMPO ELÉCTRICO, VESE ATRAIDO Ó POLO POSITIVO.

•O XEL É UN MEDIO POROSO, UN TAMIZ, POLO CAL OS FRAGMENTOS MÁIS PEQUENOS PASAN MÁIS RÁPIDO QUE OS GRANDES



# CUANTIFICACIÓN

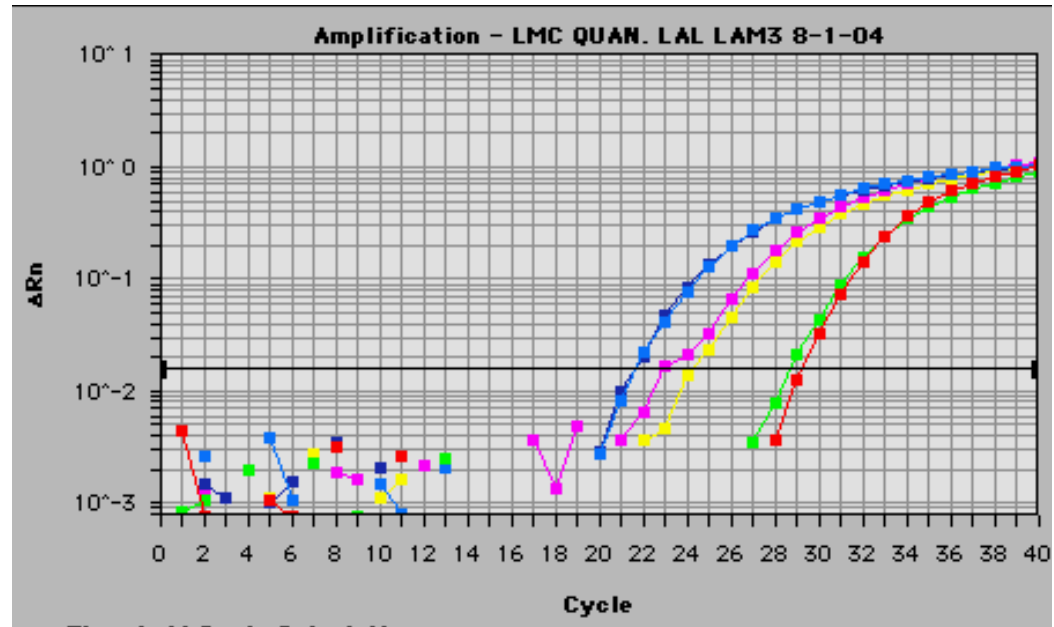
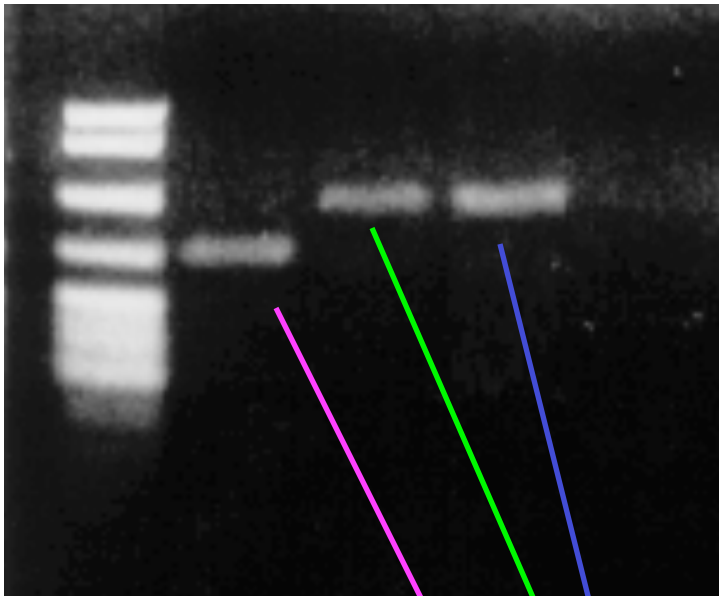
Epoch Microplate (Biotec) coa placa Take3



# CUANTIFICACIÓN

*PCR Tradicional*

*PCR en tiempo real*

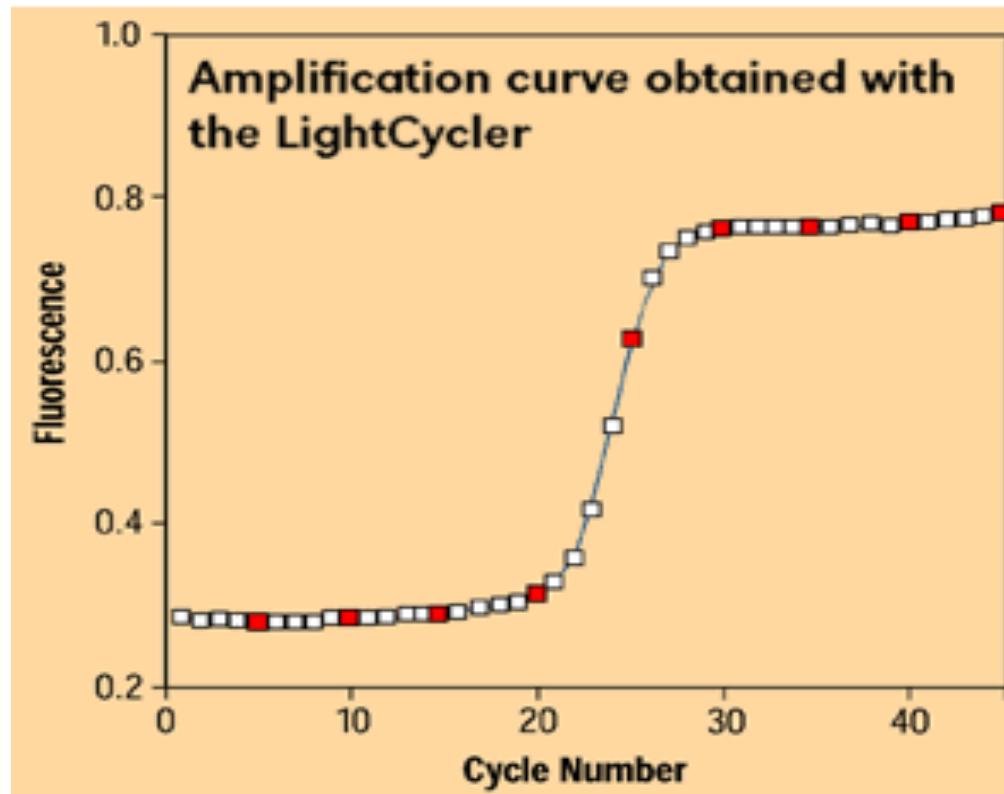
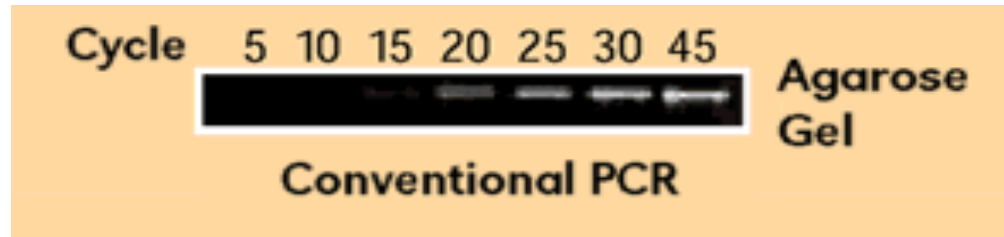


**7000 copias**

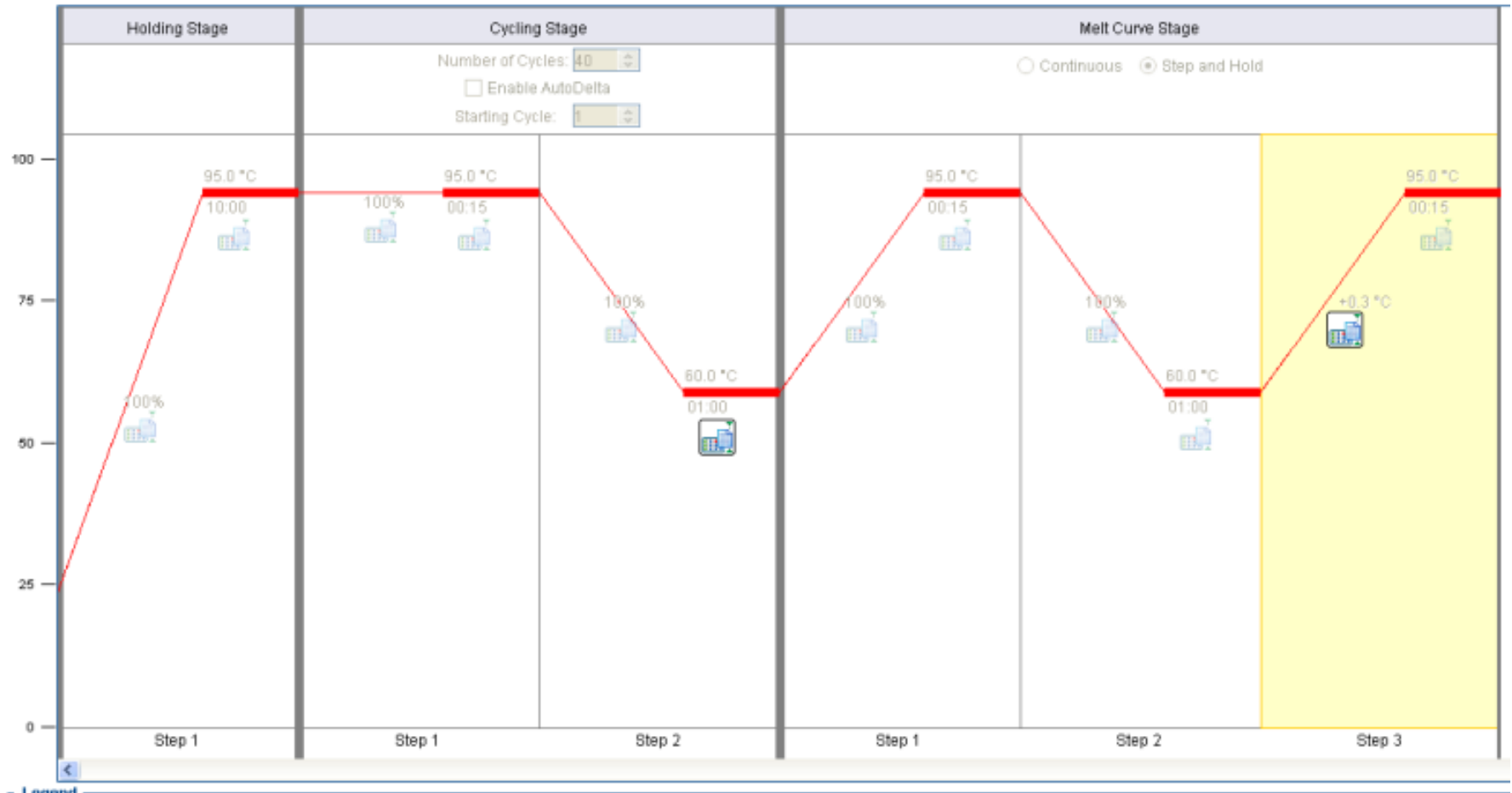
**100 copias**

**2500 copias**

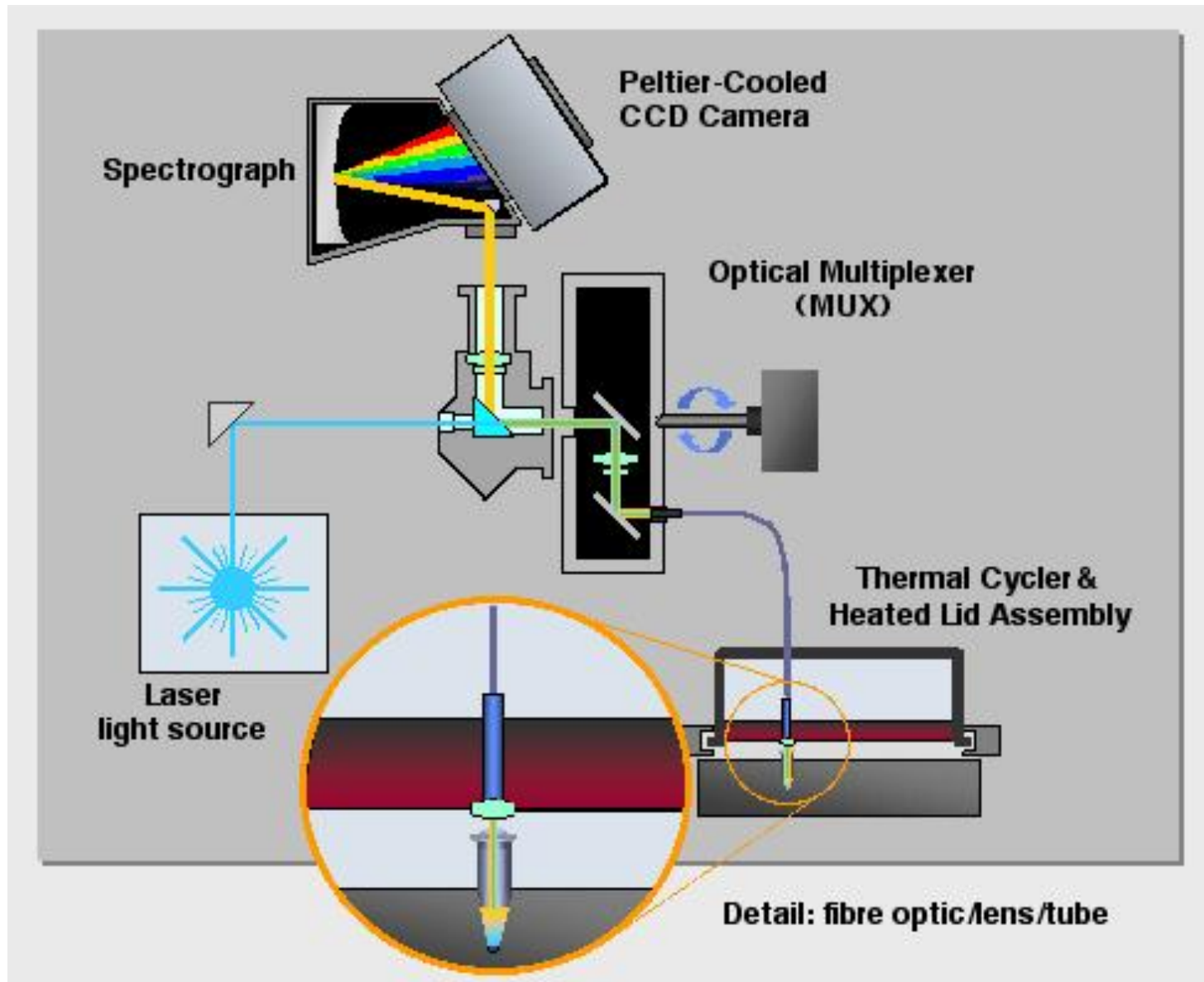
# PCR EN TEMPO REAL



# PCR EN TEMPO REAL

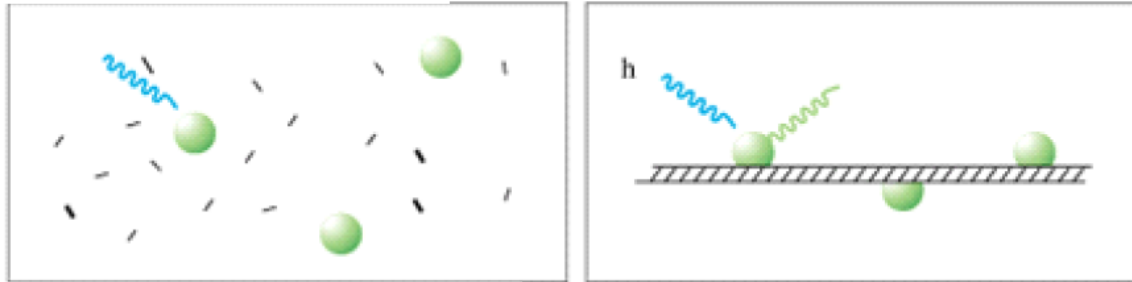


# PCR EN TEMPO REAL



# PCR EN TIEMPO REAL

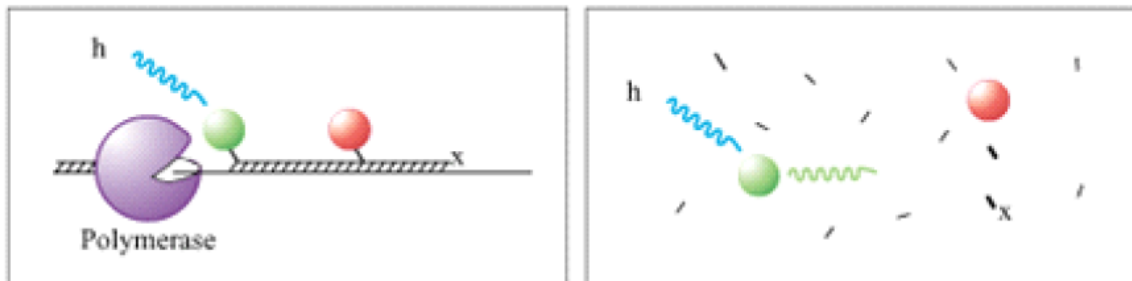
## I. SYBR Green: AXENTES INTERCALANTES



## II. Sondas de hibridación: FRET (Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente)



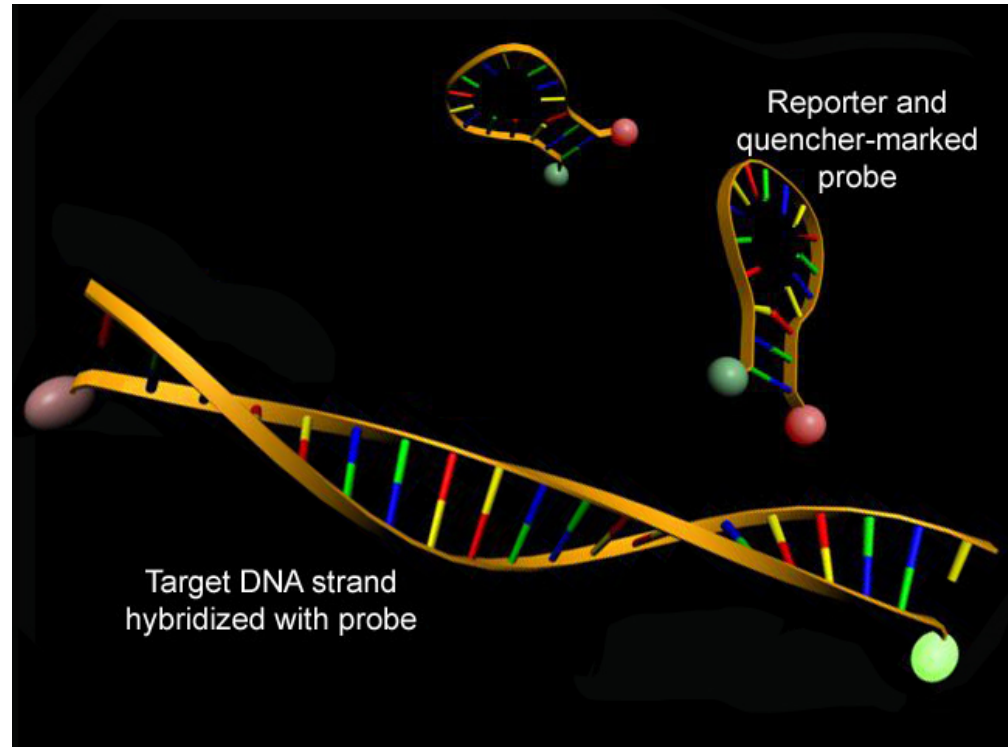
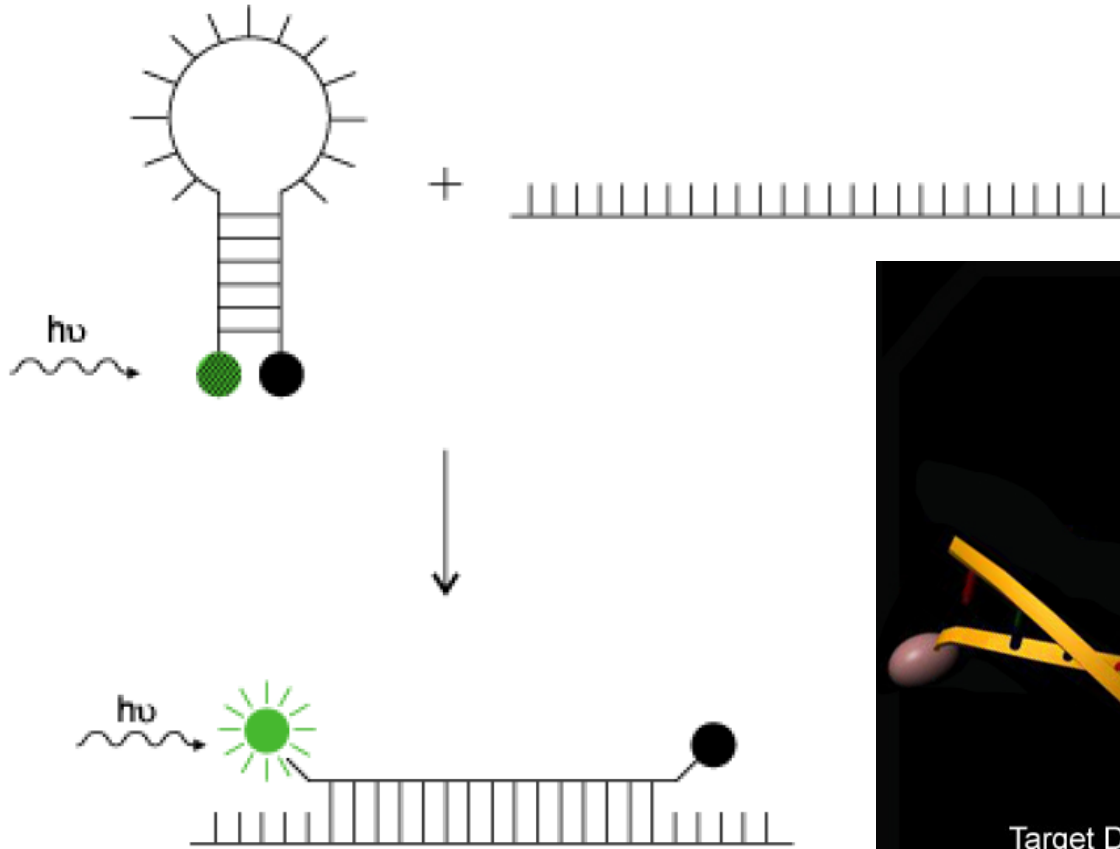
## III. Sondas TaqMan: DE HIDRÓLISIS O DEGRADACIÓN





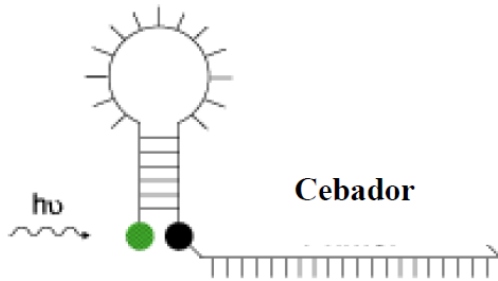
# PCR EN TEMPO REAL

## BALIZAS MOLECULARES

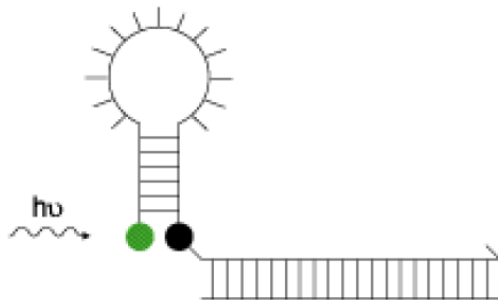


# PCR EN TIEMPO REAL

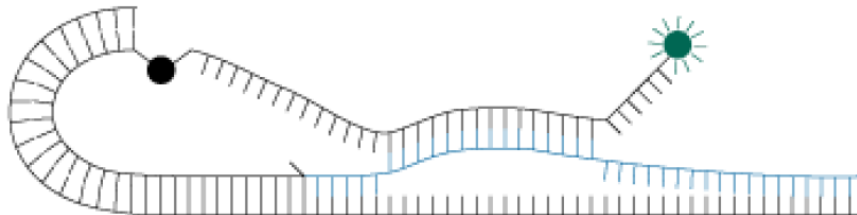
## SCORPIONS



**Desnaturalización**



**Hibridación**



**Extensión**

# PCR EN TIEMPO REAL

TaqMan MGB (UNIÓN AL SURCO MENOR)

NFQ



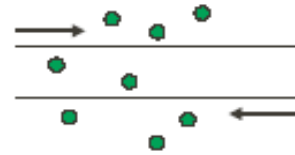
O MGB estabiliza o enlace incorporándose ó surco menor do ADN bicatenario creado entre a sonda e a secuencia diana. A maior estabilidade fai que sexa máis curtas (normalmente de 13 a 20 bases frente as 18 a 40 bases das estándar)

# PCR EN TEMPO REAL

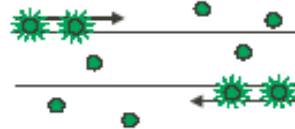
## AXENTES INTERCALANTES

a SYBR Green I

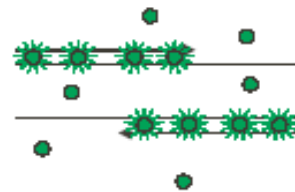
Annealing phase



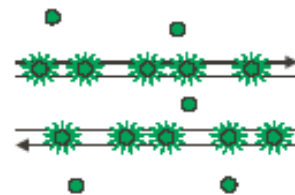
Extension phase (I)



Extension phase (II)

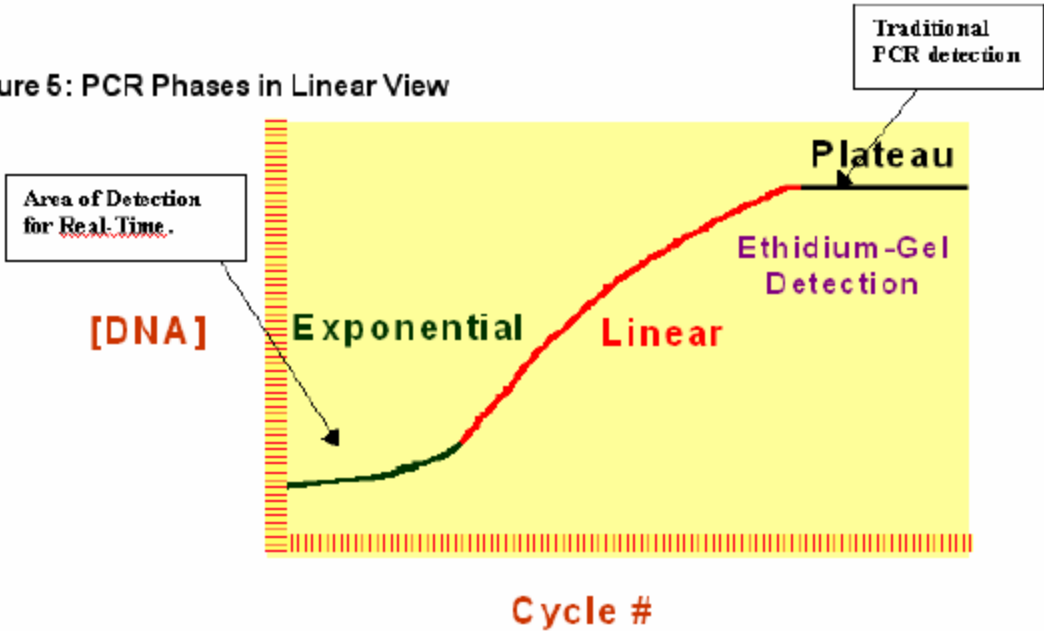


End of PCR cycle

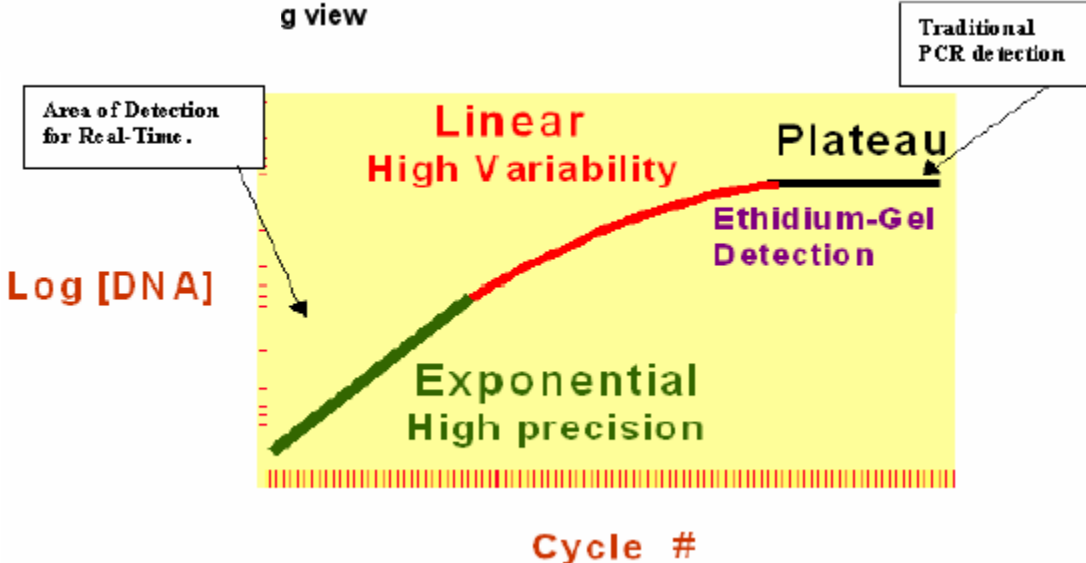


# PCR EN TEMPO REAL

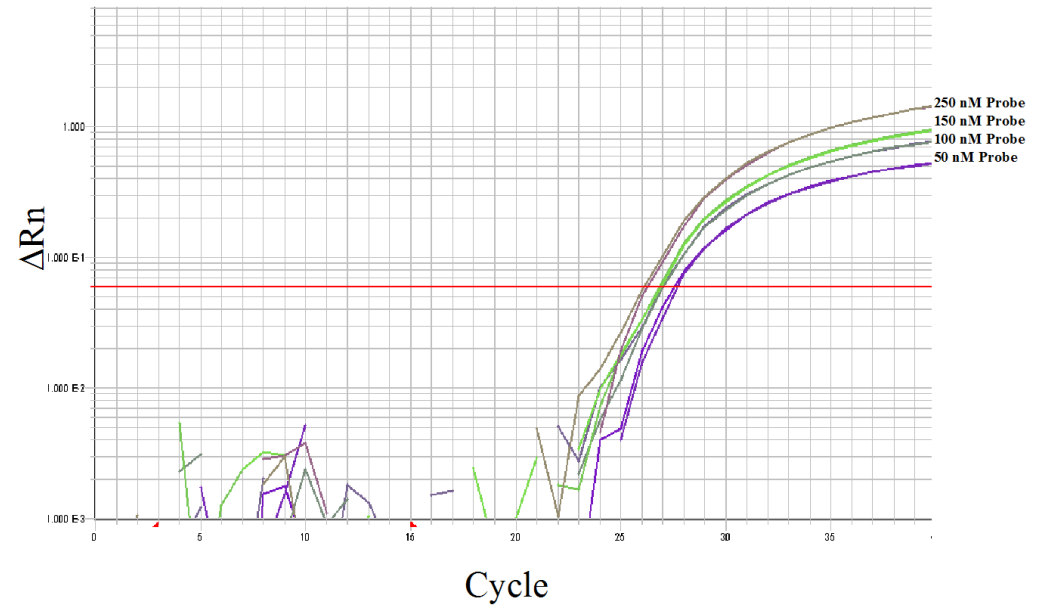
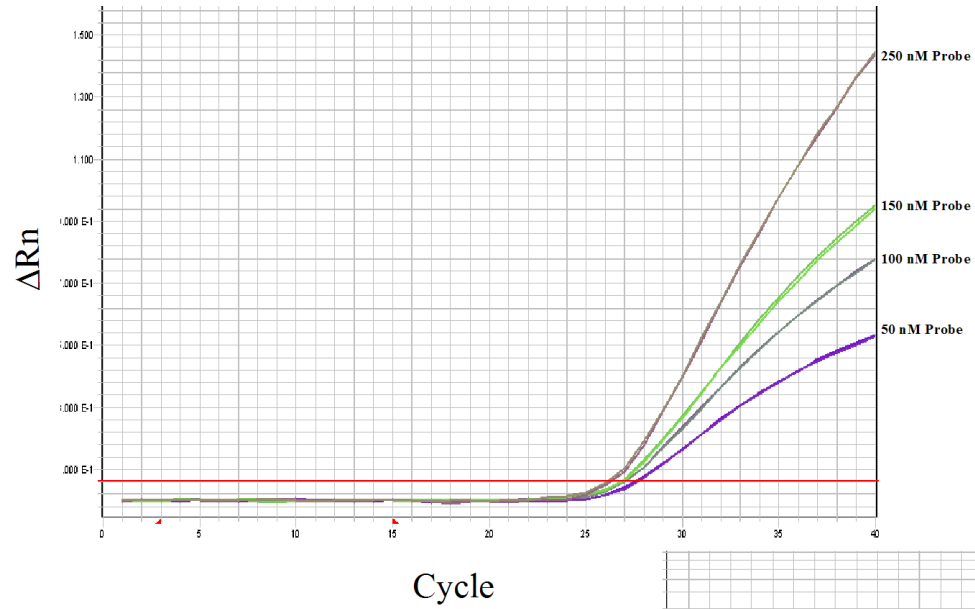
Figure 5: PCR Phases in Linear View



Log view

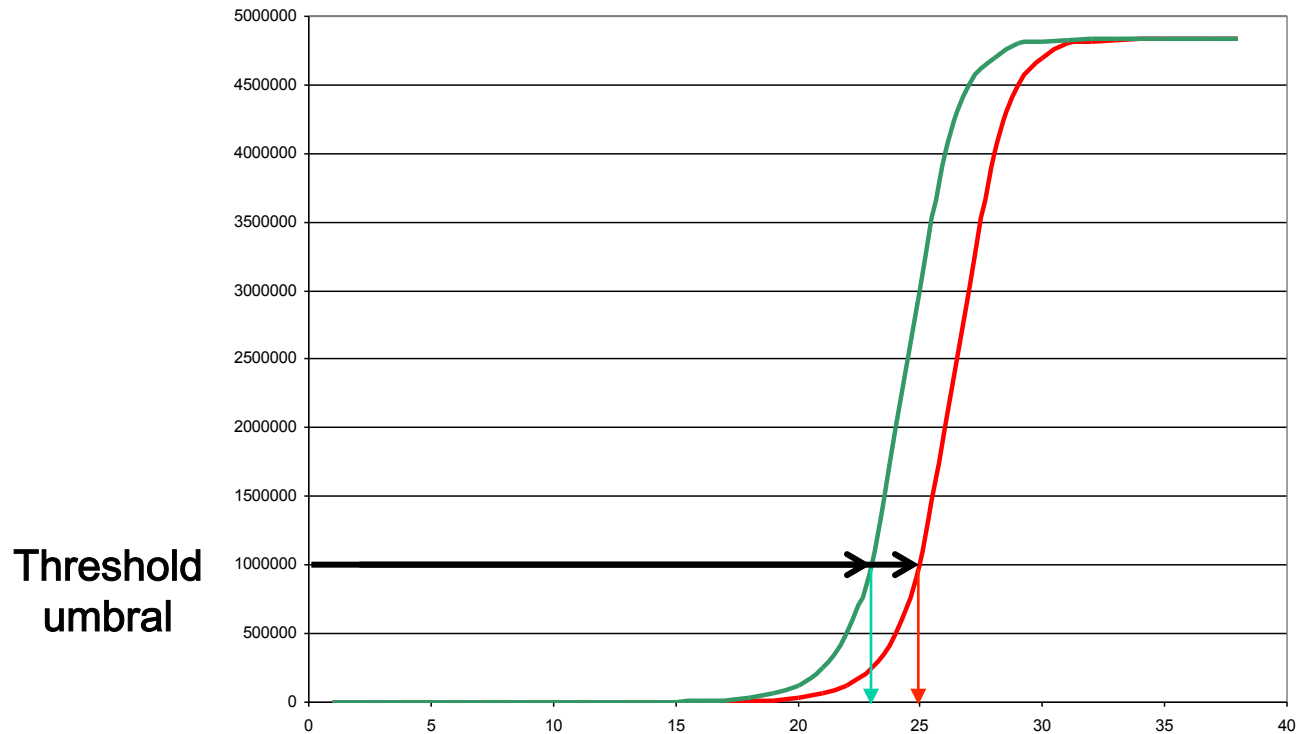


# PCR EN TEMPO REAL



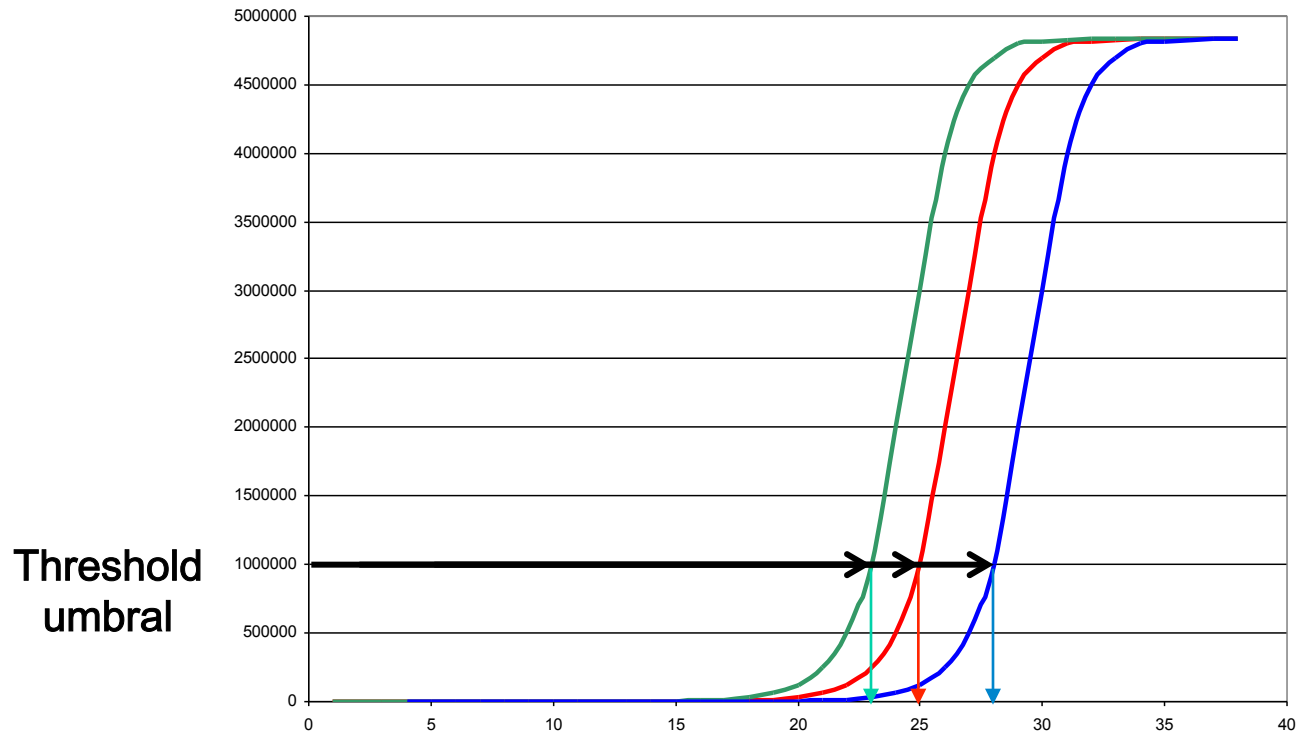
# PCR EN TEMPO REAL

Ciclo	A	B
<b><u>23</u></b>	<b>250,000</b>	<b>1,000,000</b>
<b>24</b>	<b>500,000</b>	<b>2,000,000</b>
<b><u>25</u></b>	<b>1,000,000</b>	<b>4,000,000</b>



# PCR EN TEMPO REAL

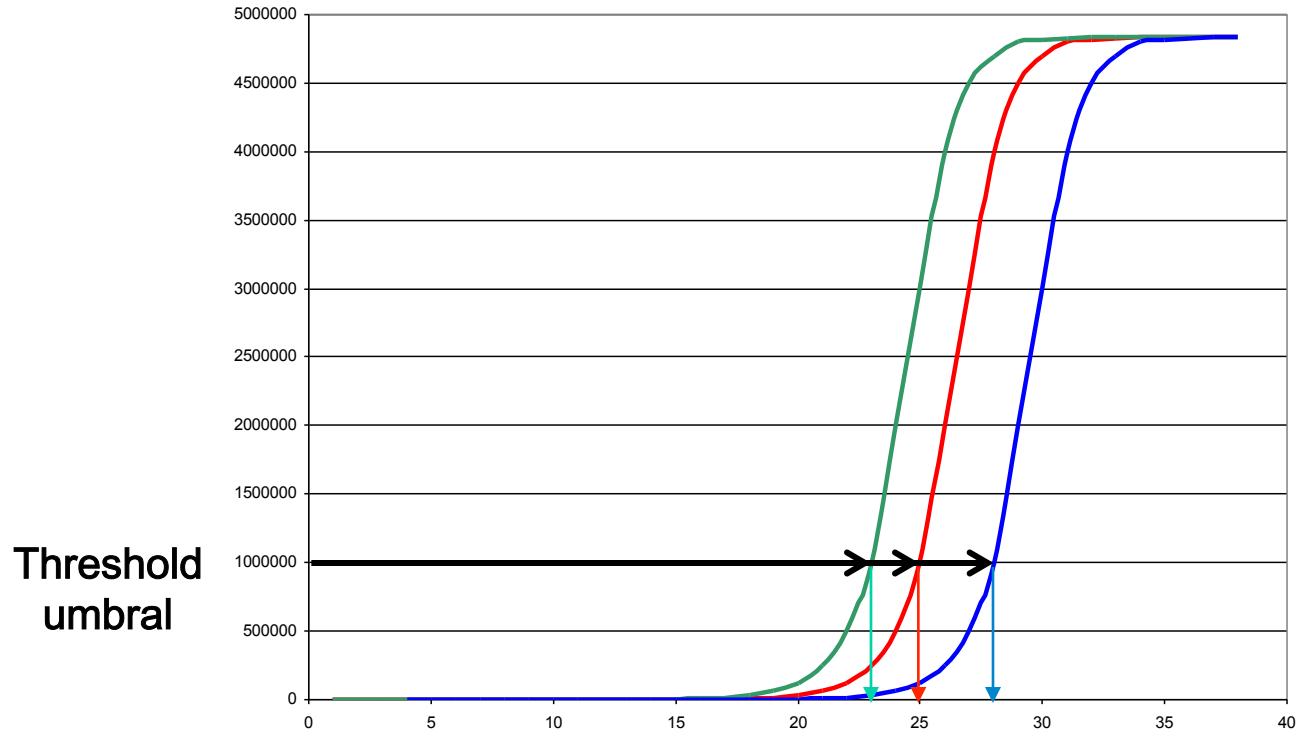
<b>Ciclo</b>	<b>A</b>	<b>C</b>
<b><u>25</u></b>	<b>1,000,000</b>	<b>125,000</b>
<b>26</b>	<b>2,000,000</b>	<b>250,000</b>
<b>27</b>	<b>4,000,000</b>	<b>500,000</b>
<b><u>28</u></b>	<b>8,000,000</b>	<b>1,000,000</b>





# PCR EN TEMPO REAL

## $C_T$ : Ciclo umbral (Threshold)

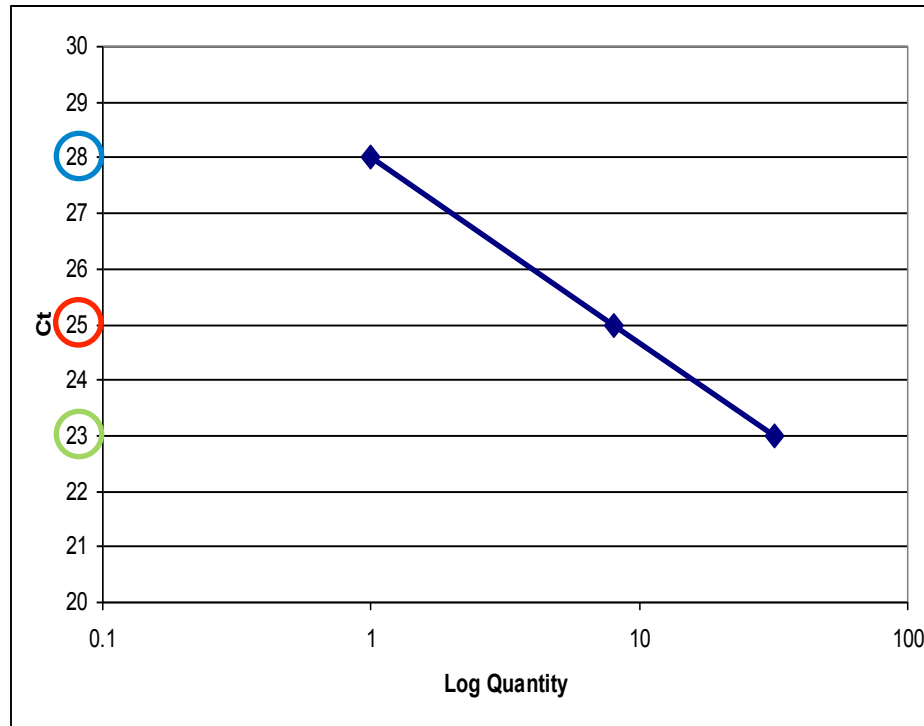


Threshold  
umbral

MOSTRA	$C_T$
B	23
A	25
C	28

# PCR EN TEMPO REAL

## $C_T$ : Ciclo umbral (Threshold)

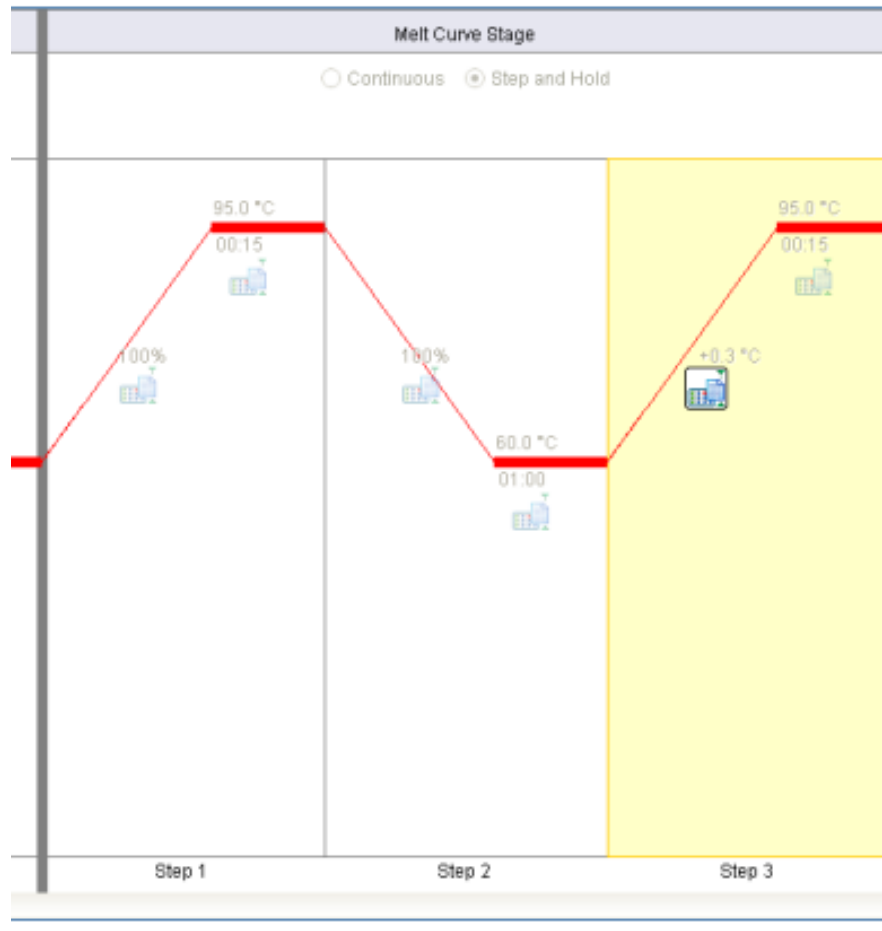


<b>MOSTRA</b>	<b><math>C_T</math></b>
<b>B</b>	<b>23</b>
<b>A</b>	<b>25</b>
<b>C</b>	<b>28</b>



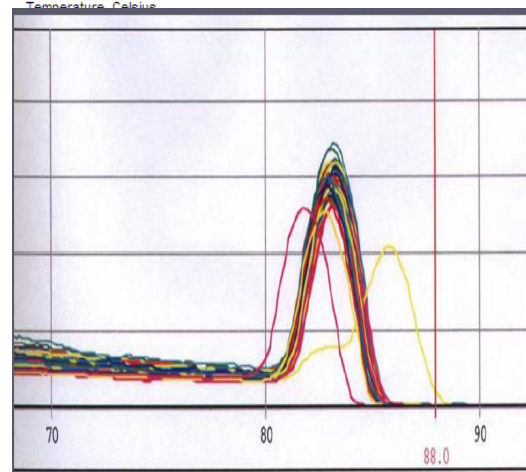
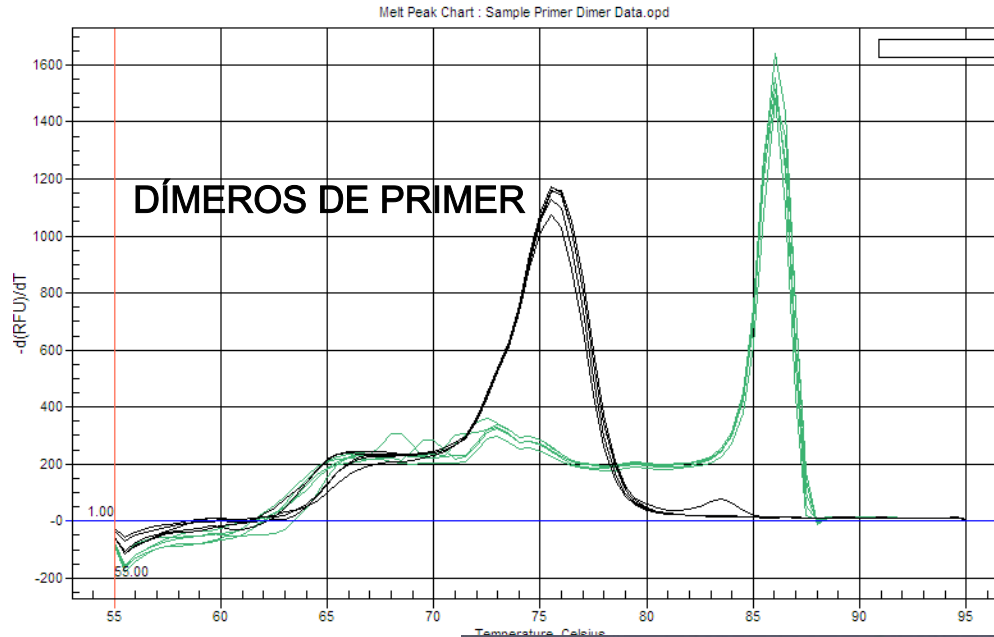
# PCR EN TEMPO REAL

## MELTING CURVE: CURVA DE DISOCIACIÓN



# PCR EN TIEMPO REAL

## MELTING CURVE: CURVA DE DISOCIACIÓN



**PRODUCTOS  
INESPECÍFICOS**