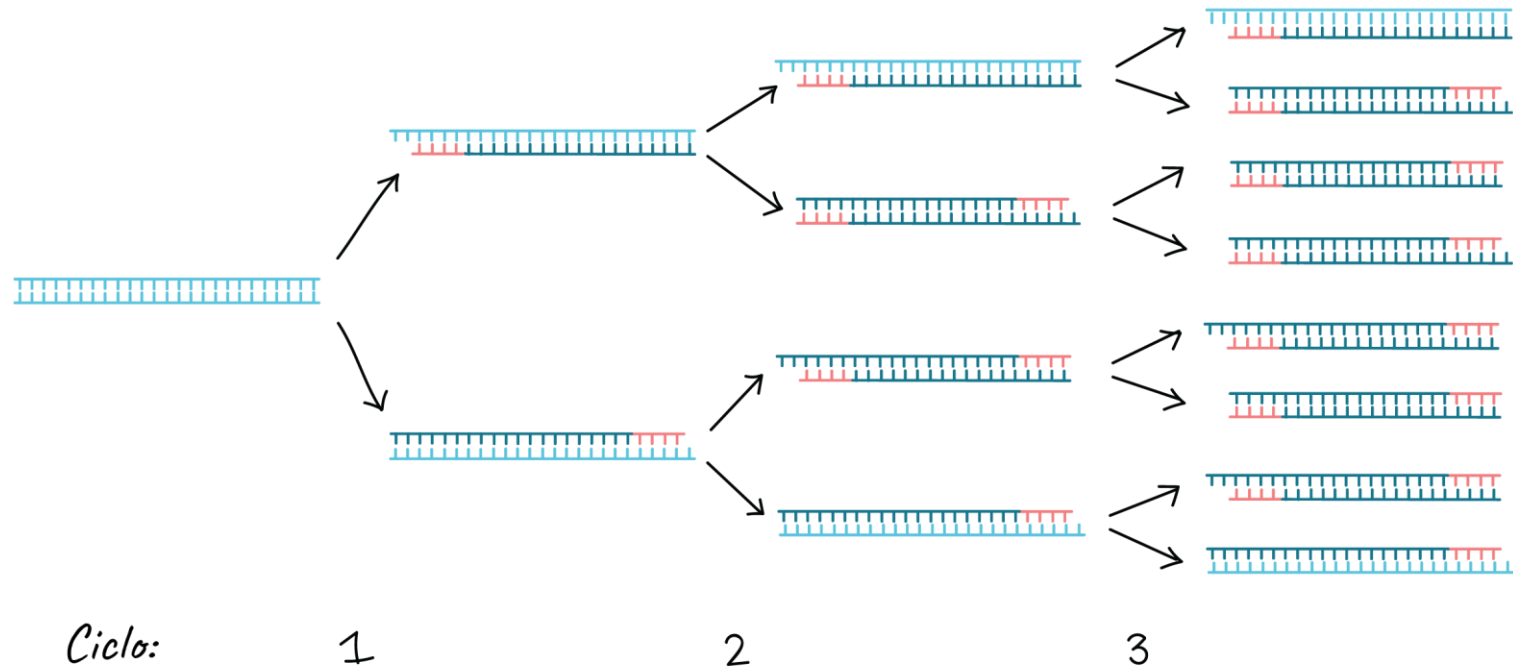




REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA: PCR

PCR

Es una técnica in vitro de amplificación de ADN que permite obtener millones de copias iguales de un fragmento concreto de ADN, partiendo de una cantidad mínima de ADN molde.

Se han desarrollado **diferentes variantes** que permiten:

- Amplificar varios fragmentos distintos en una única reacción (PCR múltiple).
- Amplificar fragmentos de ARN (RT-PCR).
- Cuantificar la concentración de una molécula concreta de ácido nucleico presente en una muestra (PCR cuantitativa, PCR a tiempo real).

PCR

VENTAJAS sobre otras técnicas

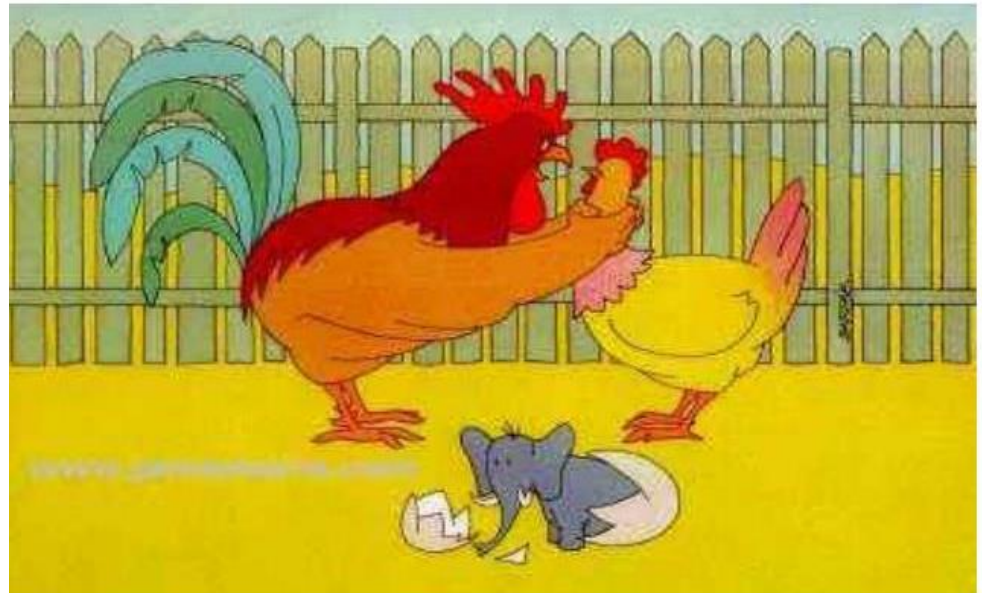
- **Como técnica de amplificación** → Frente a la técnica de ADN recombinante
 - La PCR tiene lugar en horas, mientras que la clonación requiere días de trabajo
 - Está automatizada (la clonación es un proceso manual).
 - Por ello supone ahorro de tiempo
 - **Como técnica de detección** → Respecto a las técnicas de hibridación
 - La PCR requiere una cantidad de muestra mucho menor
 - Permite la cuantificación de secuencias concretas (PCR en tiempo real).
-
- La **principal ventaja** de la PCR, que es **su gran sensibilidad**.
 - Es también la causa de su **principal problema**: la **contaminación**, que puede producirse por material no amplificado, como aerosoles, microorganismos ambientales, células de descamación, etc. o por material amplificado de PCR anteriores.

PCR

Tiene aplicaciones en todos los campos de la **biología**, la **medicina**, y en la **paleontología**.

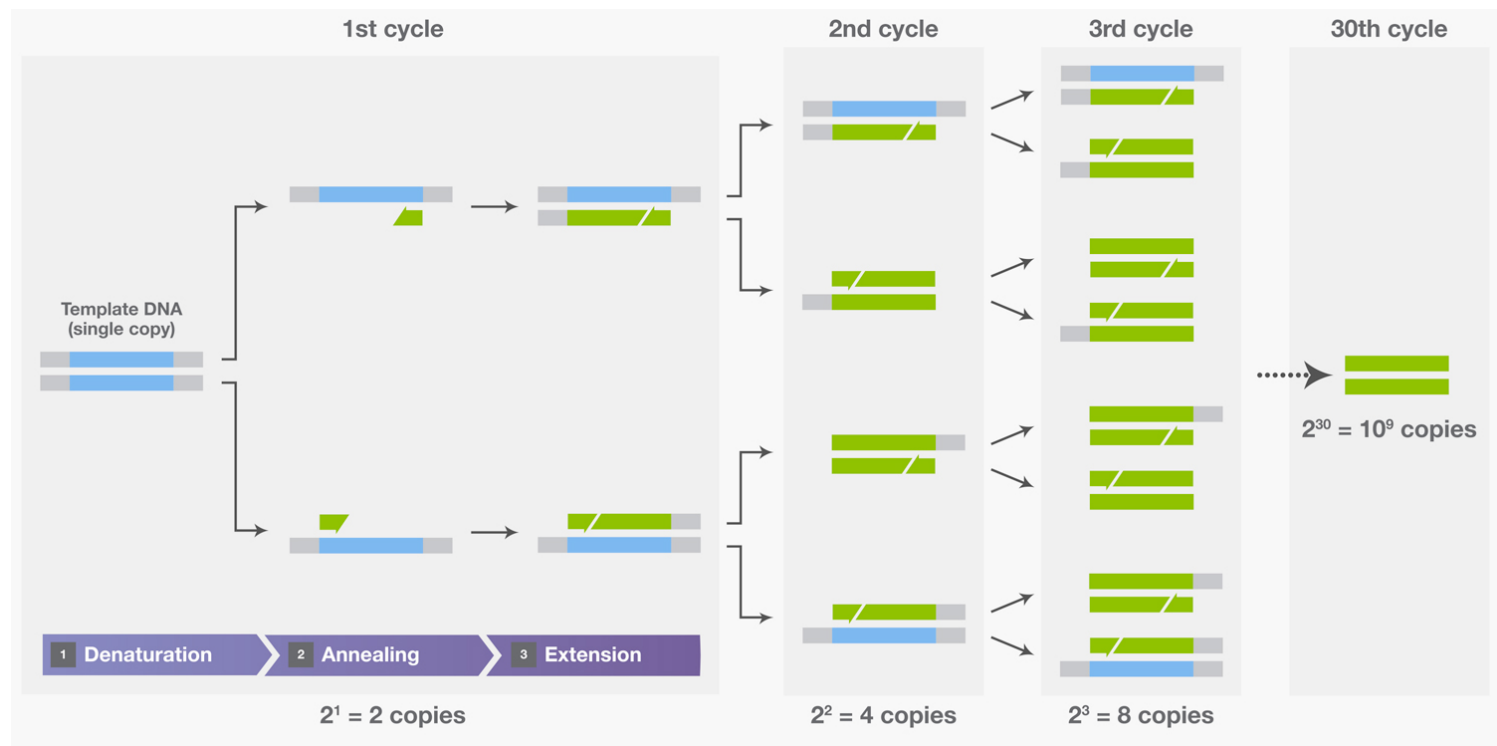
Algunos ejemplos son:

- El diagnóstico y pronóstico de ciertas enfermedades.
- La evolución y respuesta a tratamientos.
- Los estudios de expresión génica.
- Mutagénesis.
- Estudios filogenéticos.
- Genotipado.
- Medicina forense, etc.



BASES TEÓRICAS DE LA PCR

- La PCR es un **proceso enzimático**, catalizado por una **ADN polimerasa**, basado en la replicación del ADN.
- El **proceso repetitivo** es la clave de la amplificación donde las **copias nuevas** obtenidas en cada ciclo **sirven de molde para sintetizar otras nuevas copias** en los ciclos siguientes, esto supone un aumento exponencial en el número de copias a cada ciclo de replicación que se realice.



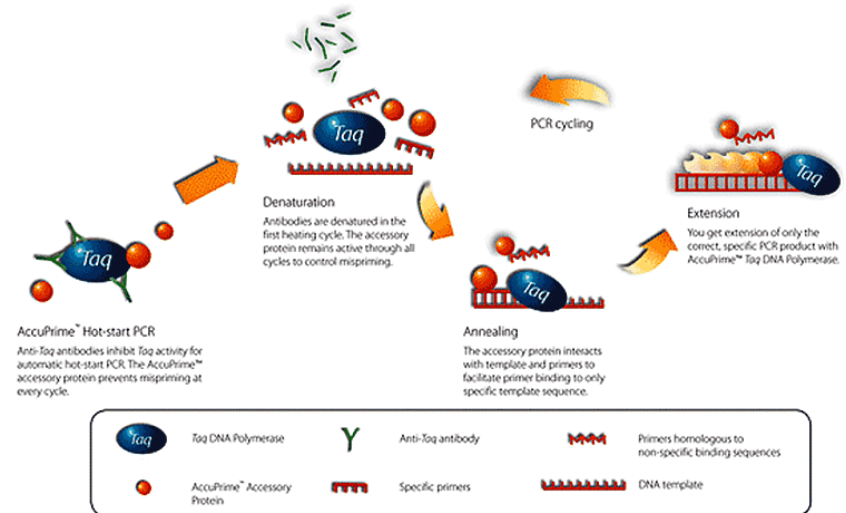
BASES TEÓRICAS DE LA PCR

En una PCR hay que solucionar dos problemas:

- Conseguir que **en cada ciclo** de la técnica únicamente **se copie** (se replique) **el fragmento que nos interesa** □ Para ello se diseñaron **cebadores específicos** que permiten la amplificación exclusiva de un fragmento concreto de ADN
- Conseguir que **no se inactive la ADN polimerasa por la temperatura elevada** necesaria en la fase de desnaturalización del ADN molde □ Esto se solucionó con el descubrimiento de las **ADN polimerasas termoestables**

IMPORTANTE □

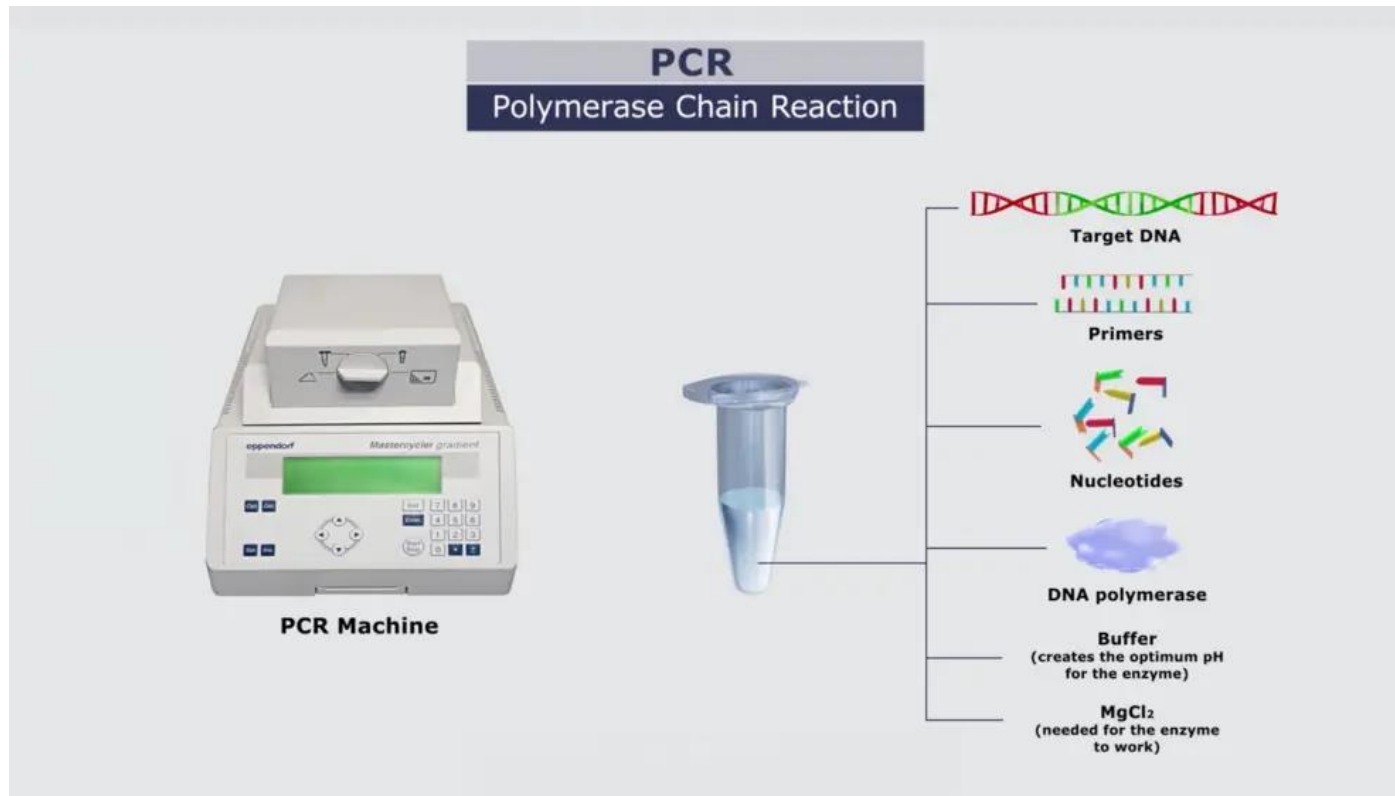
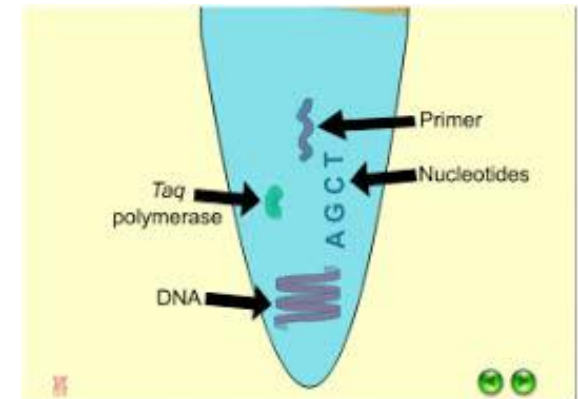
➤ La ADN polimerasa no inicia la síntesis de una nueva cadena de ADN, sino que elonga una preexistente



BASES TEÓRICAS DE LA PCR

Para llevar a cabo una PCR necesitamos:

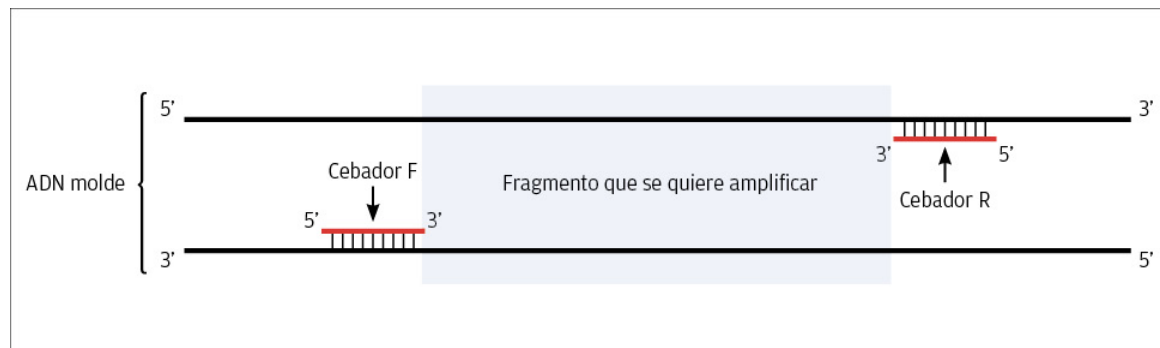
- El ADN para replicar
- Nucleótidos
- Los cebadores o primers
- ADN polimerasas termoestables



BASES TEÓRICAS DE LA PCR

Cebadores o primers

- Son **oligonucleótidos monocatenarios** cuya secuencia es complementaria de las regiones que flanquean el fragmento que se quiere amplificar.
- Se diseñan por parejas y cada uno es complementario de una secuencia adyacente a la región de interés pero en extremos y cadenas opuestas:
 - El cebador que se va a unir a la hebra molde que tiene dirección 3'5' se denomina **cebador F o forward**.
 - El que se va a unir a la hebra molde que tiene dirección 5'3' se denomina **cebador R o reverse**.
 - El sustrato idóneo para la actividad enzimática de la ADN polimerasa es una molécula monocatenaria de ADN (molde) con una pequeña región en doble hélice, a la que se une y empieza a incorporar nucleótidos con bases complementarias a las de la hebra molde.



BASES TEÓRICAS DE LA PCR

ADN polimerasas termoestables

El descubrimiento de las ADN polimerasas termoestables posibilitó el desarrollo de la PCR.

- Son enzimas aisladas de un grupo especial de arqueobacterias extremófilas, con actividad polimerasa a temperaturas elevadas.
- Estas enzimas catalizan la incorporación de nucleótidos en dirección 5'3' a partir de una pequeña región con doble hélice utilizando como molde un ADN monocatenario y en presencia de iones magnesio (Mg^{2+})
- Tienen dos características que las hacen idóneas para su uso en PCR:
 - Realizan su actividad polimerasa a una temperatura óptima comprendida entre 70 °C y 75 °C.
 - Tienen capacidad de mantener su actividad polimerasa tras tiempos prolongados de incubación a 95 °C (por encima de los 40 minutos), lo que garantiza que la enzima no se va a inactivar durante las fases de desnaturalización del ADN.

BASES TEÓRICAS DE LA PCR

TIPOS DE ADN POLIMERASAS TERMOESTABLES

Se pueden clasificar en función de sus capacidades enzimáticas secundarias. La capacidad primaria es la síntesis de ADN

➤ **Actividad exonucleasa 5'3', SIN actividad exonucleasa 3'5'.** Tienen actividad exonucleasa 5'3', pero carecen de actividad exonucleasa 3'5'.

Esto hace que **no** sean capaces de corregir errores por lo que tiene una tasa de error de aproximadamente 1 por cada 100000 nucleótidos incorporados.

➤ **Actividad exonucleasa 5'3' CON actividad exonucleasa 3'5'.** Son enzimas con actividad correctora, ya que detectan cuando se incorpora un nucleótido erróneo, lo eliminan y continúan la elongación de la cadena incorporando el nucleótido correcto.

La tasa de error de estas enzimas es mucho menor,

Son especialmente útiles para aplicaciones de PCR que requieren alta fidelidad de replicación.

➤ **Actividad transcriptasa inversa.** Son ADN polimerasas termoestables que tienen capacidad para utilizar ARN como molde, en presencia de iones manganeso (Mn^{2+}), por lo que pueden utilizarse para sintetizar y amplificar ADNc a partir de ARN.

BASES TEÓRICAS DE LA PCR

Las ADN polimerasas termoestables se nombran de acuerdo con el organismo en el que se han aislado:

- la primera letra mayúscula del género y
- las dos primeras letras minúsculas de la especie.
- Así, por ejemplo, la polimerasa termoestable aislada del organismo

Thermus aquaticus se denomina Taq ADN polimerasa.

CICLO BÁSICO DE UNA PCR

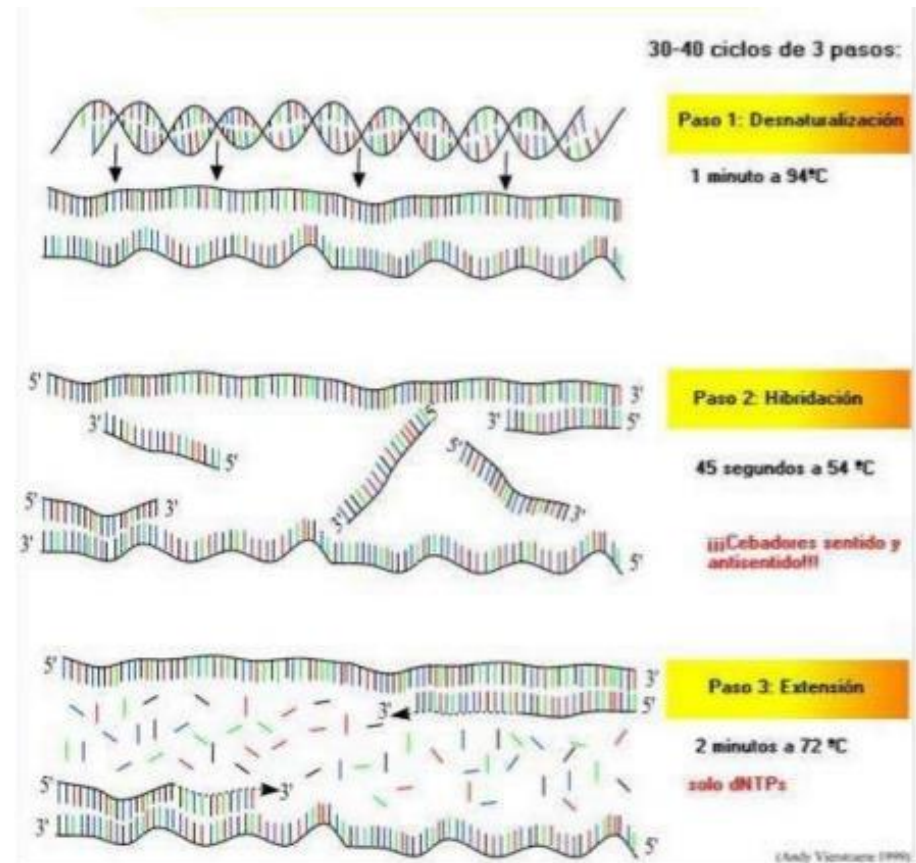
La PCR se basa en la repetición secuencial de ciclos de replicación.

Cada **ciclo** consta de **tres fases**:

- **Desnaturalización del ADN molde.**
- **Hibridación de los cebadores con el ADN molde.**
- **Extensión de los cebadores.**

El resultado final de cada ciclo es la síntesis de una molécula de ADN nueva por cada fragmento de ADN molde presente en la mezcla de reacción.

Esta molécula de ADN nueva servirá también de molde en el siguiente ciclo.



CICLO BÁSICO DE UNA PCR

Fase I. Desnaturalización

- Normalmente, se realiza a 94-95 °C durante 15-30 segundos.
- La Taq ADN polimerasa pierde actividad cuando es sometida a 95 °C por un tiempo de más de 40 minutos.

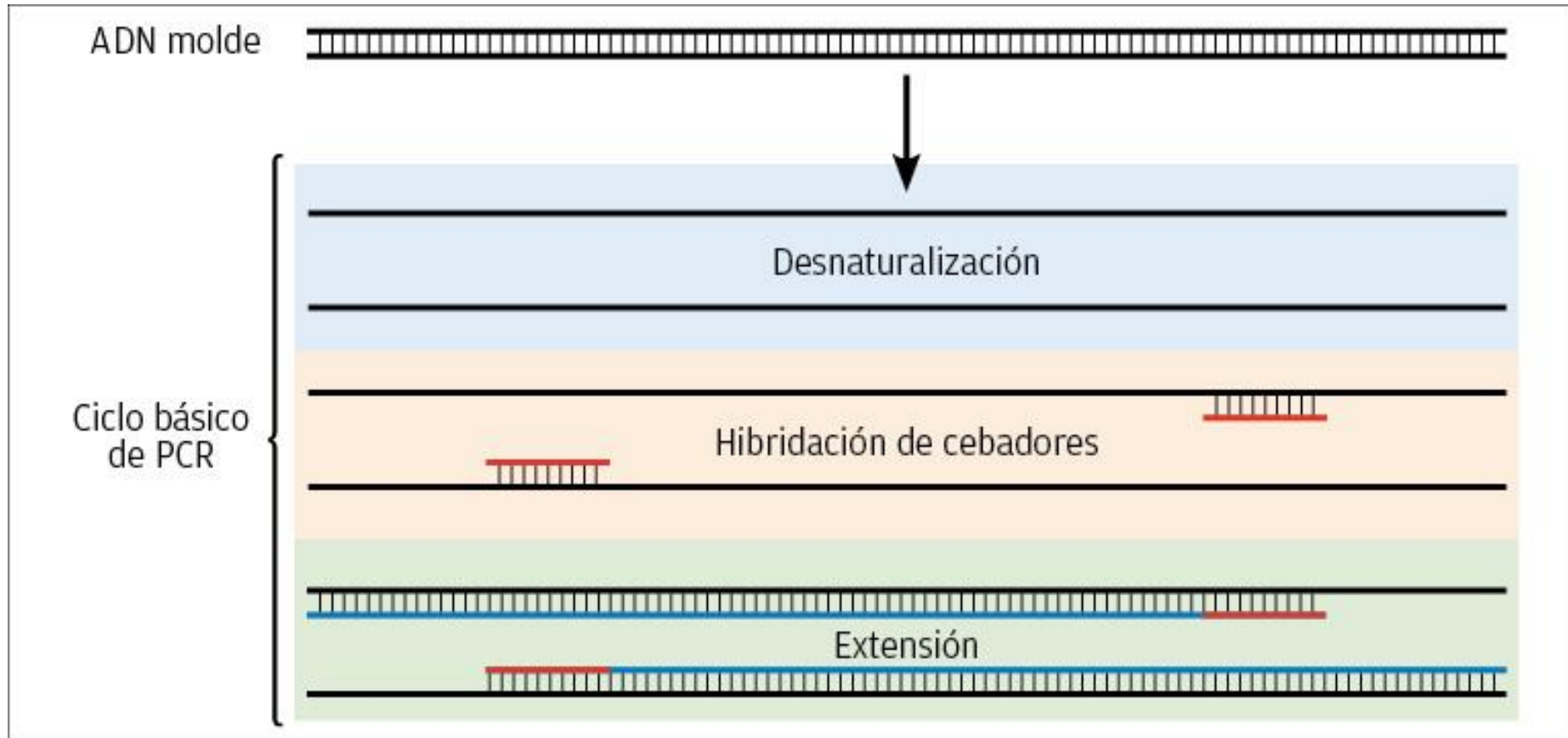
Fase II. Hibridación

- La hibridación de los cebadores con el ADN molde (annealing) se realiza habitualmente a una temperatura de entre 50 °C y 65 °C
- El tiempo estándar de la fase de hibridación oscila entre 30 y 60 segundos.

Fase III. Extensión

- Copiado de la hebra molde a la temperatura óptima de polimerización de la enzima empleada, que en el caso de la Taq polimerasa es de 72 °C.
- El tiempo de la fase de extensión está condicionado por la velocidad de polimerización de la enzima y la longitud del fragmento que se va a amplificar.
- Para enzimas con actividad correctora hay que considerar tiempos de extensión más prolongados

CICLO BÁSICO DE UNA PCR



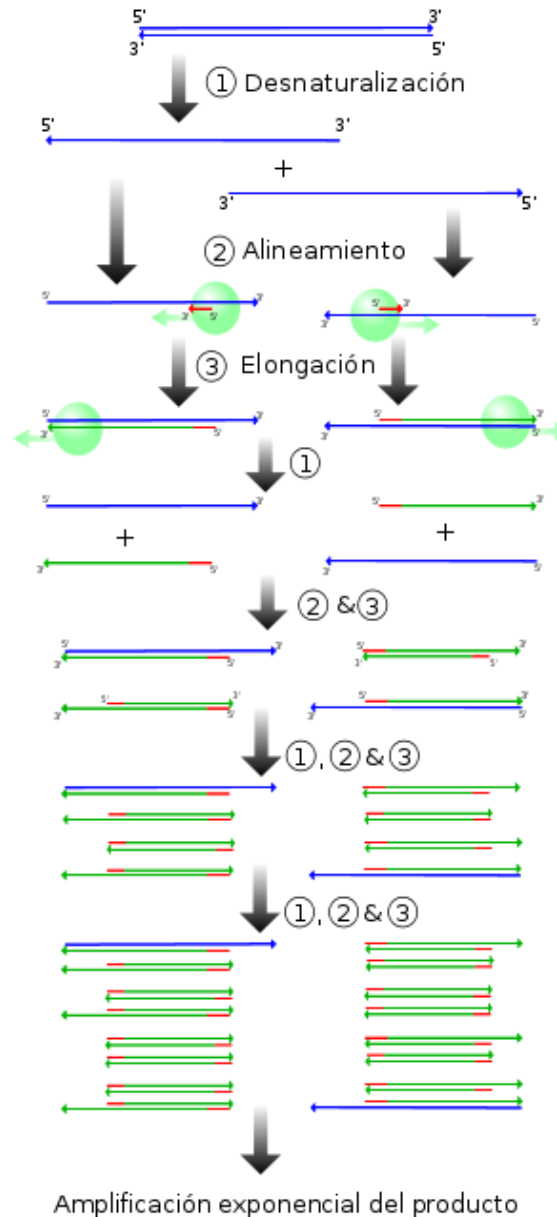
PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN DE LA PCR

Al finalizar la PCR

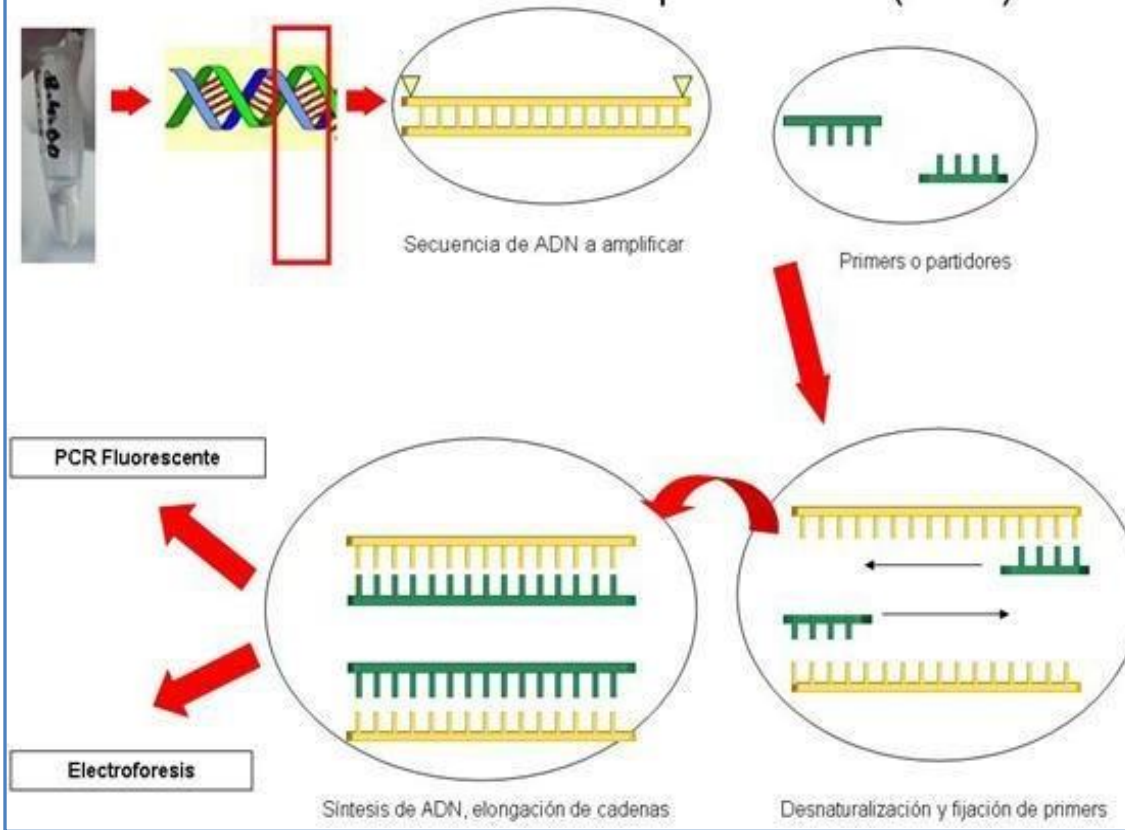
Tras **n ciclos de amplificación**:

- El número de productos no deseados será **$2n$** (20 para 10 ciclos de amplificación).
- El número de **amplicones** se aproximará a **2^n** ($> 2^{10}$ para 10 ciclos de amplificación).
- Aunque el rendimiento de la técnica nunca es del 100%, es evidente que la reacción en cadena de la polimerasa permite obtener millones de copias de cada molécula molde presente en la muestra original.

PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN DE LA PCR



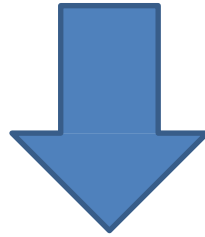
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)



**TÉCNICAS DE PCR: PCR
ESTÁNDAR o
CONVENCIONAL**

PCR ESTÁNDAR O CONVENCIONAL

La PCR estándar, convencional o básica es la forma más simple de PCR, en la que se amplifica un único fragmento de ADN, con un único par de cebadores y un único proceso de amplificación a tiempo final.



- COMPOSICIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN
- PREPARACIÓN DE LA MEZCLA
- PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR
- ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN

LA MEZCLA DE REACCIÓN

La **mezcla de reacción** contiene todos los reactivos necesarios que deben estar presentes en el medio de reacción para que la PCR se desencadene de forma adecuada.

Contiene: Un **tampón** *adecuado que contendrá disueltos todos los reactivos necesarios para la replicación del ADN.*

- El **tampón** aporta el **pH** y la **concentración salina** adecuada para la **óptima actividad de la ADN polimerasa** con un máximo de fidelidad.
- Suelen ser tampones a base de **Tris con cloruro potásico** (KCl), a un pH entre 8,3 y 9,0.
- Normalmente el tampón se suministra en forma concentrada (2X, 5X o 10X) conjuntamente con la ADN polimerasa.
- Los **reactivos que se disuelven en el tampón** son principalmente:
 - Cloruro magnésico
 - Desoxinucleótidos trifosfato
 - Cebadores
 - ADN polimerasa
 - ADN molde
 - Otros aditivos o potenciadores para optimizar la PCR

LA MEZCLA DE REACCIÓN

CLORURO MAGNÉSICO (MgCl_2)

Las ADN polimerasas termoestables:

Requieren iones de magnesio como cofactor para desarrollar su actividad.

- Estos iones se aportan a la mezcla de reacción en forma de cloruro magnésico (MgCl_2)
- La **ausencia** o una **concentración excesivamente baja** de **Mg libre** en la mezcla de reacción **determina la inactividad de la ADN polimerasa**.
- Una **concentración excesivamente alta** determina una **menor fidelidad en la replicación**.

Cada ADN polimerasa tiene una concentración óptima de Mg libre para su funcionamiento.

Como referencia la concentración final estándar de MgCl_2 en la mezcla de reacción para la Taq Polimerasa es de 1,5 mM.

LA MEZCLA DE REACCIÓN

DESOXINUCLEÓTIDOS TRIFOSFATO (dNTPs)

La mezcla de reacción debe contener:

- *Desoxinucleótidos trifosfato* para que la ADN polimerasa pueda usarlos como sustrato para incorporarlos a las cadenas en crecimiento.
- Deben estar presentes **en la misma concentración**, pues en caso contrario disminuye la fidelidad de la enzima.
- La concentración final estándar de la mezcla de reacción de cada dNTP es de 200 μM

CEBADORES

- Los cebadores son *claves para realizar una amplificación específica con éxito*.
- La concentración final de cada cebador en la mezcla de reacción debe ser la misma y debe establecerse de forma experimental para cada pareja.
- Como referencia, concentraciones finales de entre 200 y 400 nM de cada cebador suelen dar buenos resultados.

LA MEZCLA DE REACCIÓN

ADN polimerasa

- La ADN polimerasa es el *otro reactivo clave para realizar una PCR con éxito*.
- La elección de la ADN polimerasa dependerá:
 - De la fidelidad requerida en la amplificación
 - De la longitud del fragmento que se va a amplificar
 - En ocasiones, de la secuencia que se va a amplificar
 - El uso de concentraciones excesivas de ADN polimerasa no supone ninguna mejora en el rendimiento de la reacción

LA MEZCLA DE REACCIÓN

ADN MOLDE

Es un componente imprescindible de la mezcla de reacción, ya que **contiene el fragmento de interés que se quiere amplificar**.

Hay que tener en cuenta tanto la calidad como la cantidad de ADN molde:

➤ CALIDAD DEL ADN MOLDE:

- **Alto grado de integridad** (no degradado ni fragmentado y de alto peso molecular)
- **Libre de contaminantes** (pueden inhibir la reacción de PCR)

➤ CANTIDAD DEL ADN MOLDE:

- La cantidad idónea para obtener los mejores resultados en una PCR dependerá de la complejidad del ADN que se estudia (ADN genómico humano, cantidades entre **100 y 300 ng** suele dar buenos resultados)

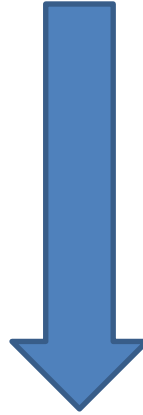
CONTAMINANTES DEL ADN MOLDE, INHIBIDORES DE PCR

ORIGEN		CONTAMINANTE
MUESTRA BIOLÓGICA	TEJIDO MUSCULAR	MIOGLOBINA
	PIEL	MELANINA
	HECES	SALES BILIARES
	TEJIDOS VEGETALES	POLISACÁRIDOS
	TEJIDOS ANIMALES	COLÁGENO
	SUELOS Y VEGETALES	ÁCIDO HÚMICO
	SANGRE	HEMOGLOBINA (GRUPO HEM)
	SANGRE ANTICOAGULADA	EDTA, CITRATO SÓDICO Y HEPARINA
REACTIVOS EMPLEADOS EN LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN		SDS
		ACETATO SÓDICO
		FENOL
		CLOROFORMO
		ISOPROPANOLOL
		ETANOL
		XILOL

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS



**AJUSTE DEL VOLUMEN
DE REACCIÓN**



**ELABORAR LA MEZCLA
“MASTER”**



**ESTABLECER LOS
CONTROLES POSITIVO
Y NEGATIVO**

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

AJUSTE DEL VOLUMEN DE REACCIÓN

- Al diseñar una PCR, hay que decidir el volumen final de mezcla de reacción en el que se llevará a cabo la reacción.
- Normalmente este volumen es de **25 a 50 μ l**.
- Una vez fijado este parámetro, hay que *calcular los volúmenes de cada reactivo que se añadirá a la mezcla, dependiendo de la concentración final que queremos obtener*.
- La diferencia entre la suma de los volúmenes de cada componente y el volumen final de mezcla de reacción se completa con agua estéril grado PCR.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

ELABORACIÓN DE LA MEZCLA MÁSTER (MÁSTER MIX)

- Como las reacciones de PCR se realizan en volúmenes muy pequeños y los componentes se suministran concentrados, las cantidades que se van a pipetear de cada uno de ellos son muy pequeñas (entre 0,5 y 5 μ l), por lo que la posibilidad de introducir errores de pipeteo es elevada.
- Para evitar este problema y conseguir que la composición de la mezcla de reacción sea homogénea , *es preferible preparar una única mezcla de reacción, denominada mezcla máster (máster mix) que incluya todos los componentes, excepto el ADN molde*.
- Una vez completada la mezcla, se reparte la cantidad adecuada en cada tubo de reacción y se añaden los respectivos ADN molde.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

CONTROL POSITIVO Y NEGATIVO

Además de las muestras problema en las que tendrá lugar la reacción de PCR, en cada tanda se preparará un **control positivo** y **negativo** de la técnica:

- **CONTROL POSITIVO**: es un tubo con mezcla máster al que se le añade **ADN molde control** que contiene el fragmento que se quiere amplificar.
- **CONTROL NEGATIVO O BLANCO**: es un tubo con mezcla máster en el que se sustituye el ADN molde por un volumen igual de agua de grado de PCR, de manera que **no habrá ADN presente en la reacción**.

Una vez que las muestras y los controles ya están preparados, se llevan al y termociclador para iniciar la PCR

PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR

El termociclador es el aparato en el que se lleva a cabo la reacción de PCR

- Permite programar los ciclos repetitivos con **varias temperaturas y tiempos de incubación** para que se desarrollen de forma automatizada.
- La programación del termociclador para amplificar un fragmento de ADN mediante PCR estándar incluye **tres etapas principales**, que terminan con una **incubación final** para el mantenimiento de los productos de la reacción hasta su retirada de la máquina.

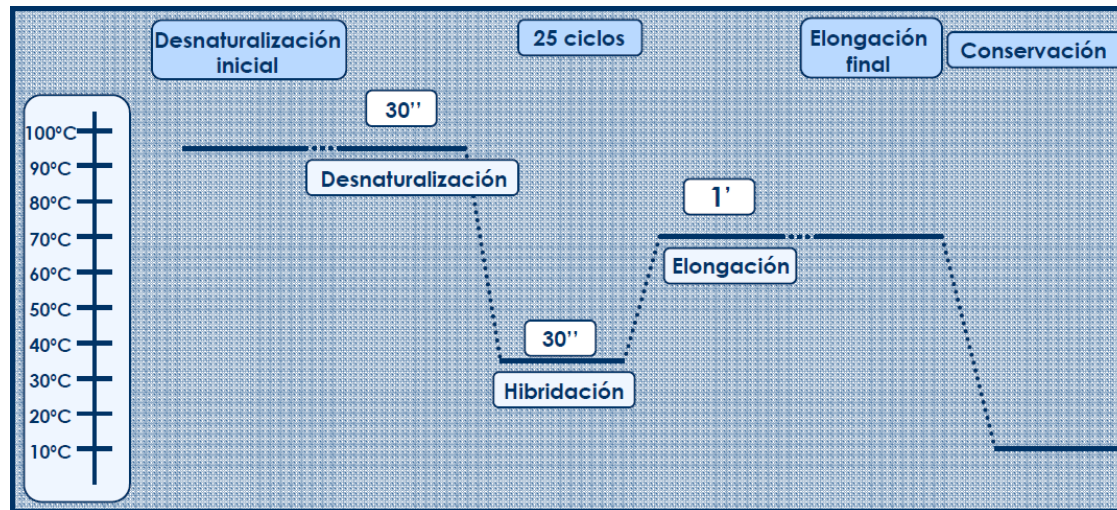


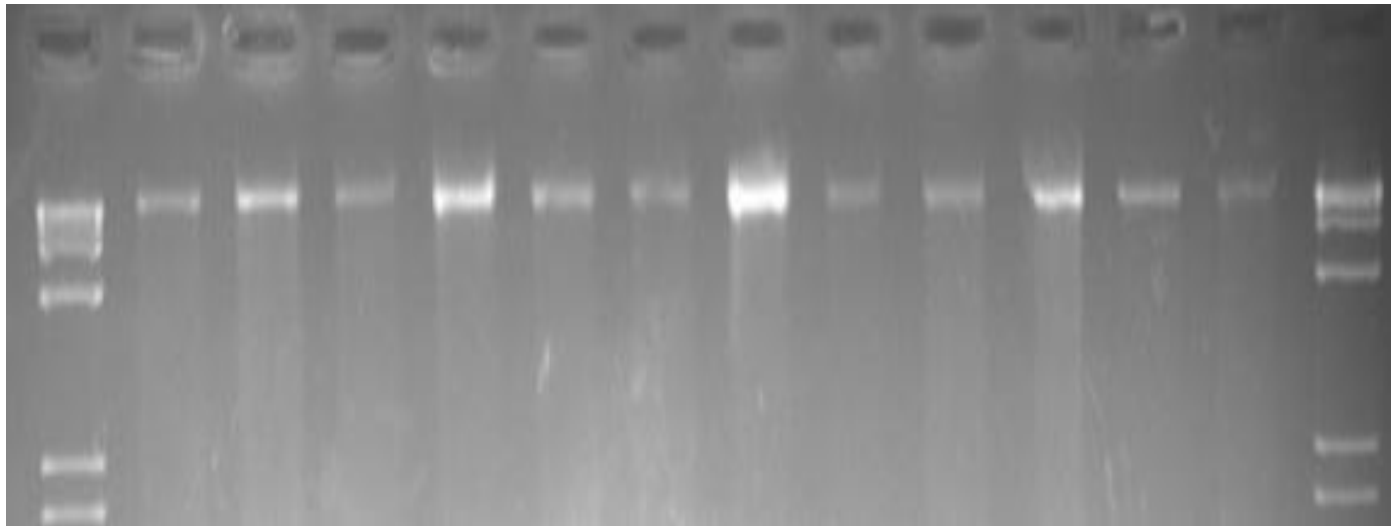
Figura 5. Perfil térmico típico de una PCR. Los tiempos de cada fase son orientativos. La temperatura de hibridación puede variar en función de la especificidad de la reacción.

PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR

- **DESNATURALIZACIÓN INICIAL**: es la **etapa que inicia la reacción de PCR**. Consiste en calentar la mezcla de reacción a 94-95°C durante varios minutos para desnaturalización de todas las cadenas bicatenarias de ADN presentes en la mezcla de reacción.
- **CICLOS DE REPLICACIÓN**: para esta etapa se programan:
 - Las **temperaturas** y los **tiempos** de incubación de cada una de las fases del ciclo de PCR: desnaturalización, hibridación de cebadores y extensión.
 - **El número de veces que se va a repetir el ciclo**, es decir, el número de ciclos de repetición.
 - *Cuanto más abundante sea el fragmento que se va a amplificar, menor número de ciclos de replicación serán necesarios para acumular una cantidad suficiente de amplicones.*
 - Típicamente el número de ciclos oscila entre 25 y 35, aunque para moldes escasos o problemáticos se puede aumentar hasta 40.
- **EXTENSIÓN FINAL**: Consiste en una incubación a la temperatura óptima de polimerización de la ADN polimerasa durante 5-10 minutos.
- **MANTENIMIENTO**: la programación del termociclador finaliza con una última incubación a 4°C sin límite de tiempo para mantener las muestras hasta que se retiren del termociclador, anulando la actividad de la enzima.

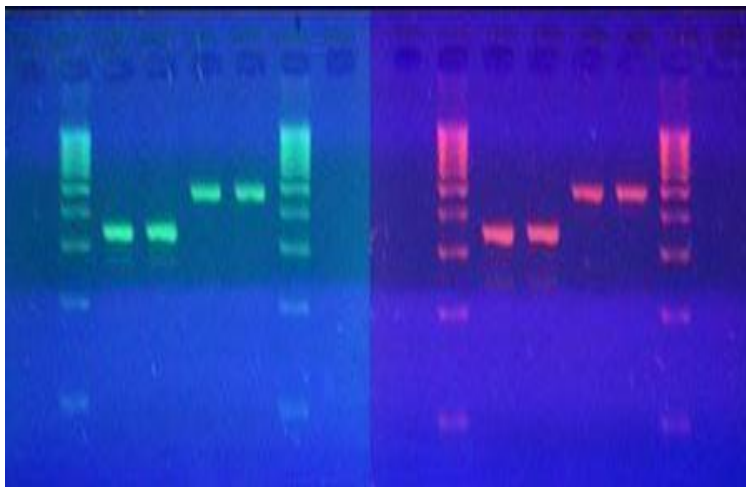
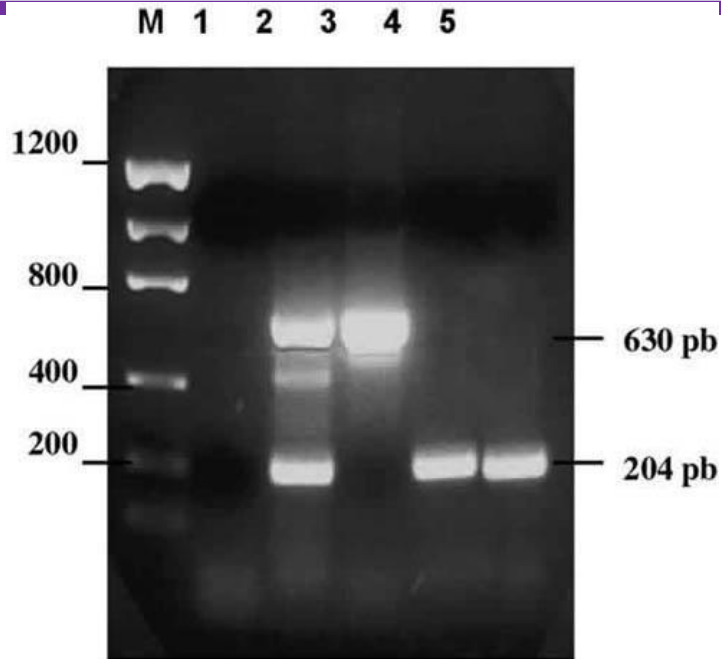
ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

Una vez finalizada la reacción de PCR se recuperan las distintas muestras amplificadas del termociclador y se analiza el resultado (detección de los productos amplificados) mediante una *electroforesis en gel*, normalmente *agarosa*, junto con marcador de tamaños.



La presencia de **una única banda** del tamaño adecuado indica que la PCR ha funcionado correctamente.

ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS



- La observación de *varias bandas de distintos tamaños indica la presencia de productos de amplificación no deseados*.
- Esto es debido a que durante la PCR se han amplificado inespecíficamente fragmentos de ADN distintos de la diana específica, por lo que habrá que repetir la reacción variando la programación del termociclador o la composición de la mezcla de reacción hasta conseguir un resultado específico.

ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

RESULTADO POSITIVO

Cuando la PCR se realiza con fines exclusivos de detección, la observación de una banda específica es suficiente para afirmar que la secuencia diana está presente en la muestra que se estudia y garantizar por tanto un resultado positivo.

Pero si existieran problemas de contaminación en la muestra máster **¿Cómo descartar que no se trate de un falso positivo?**

- En cada banda se procesa simultáneamente un control negativo o blanco, en el que el ADN molde se sustituye por agua de PCR.
- En el gel de electroforesis la calle correspondiente al blanco debe aparecer limpia, sin bandas.
- Si en el blanco se detecta alguna banda, ello indicaría contaminación de algún reactivo o pipeta que se hayan usado en la técnica, lo que invalida los resultados de la tanga.

ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

RESULTADO NEGATIVO

La ausencia de banda específica en una muestra problema indica, a priori, que la muestra no contiene la secuencia diana y, por tanto, el resultado sería negativo.

Pero, realmente esta no es una condición suficiente para afirmar que el resultado es negativo, puesto que algún reactivo empleado puede no funcionar correctamente o la muestra puede contener inhibidores de PCR. **¿Cómo se descartan estas posibilidades?**

✓ **El control positivo de la técnica, que se procesa simultáneamente con las muestras, sirve para validar la mezcla de reacción. Si todos los reactivos funcionan bien, en el control positivo se observará la banda específica. En caso contrario hay algún problema en la mezcla máster y se invalida la tanda.**

✓ **Para descartar la presencia de inhibidores en una muestra hay que realizar un control positivo de la muestra, consistente en una nueva PCR en la que se amplifique un gen control presente en la muestra. Si este control amplifica bien, se confirma que la muestra es negativa para la secuencia que se estudió inicialmente. Si el control positivo de la muestra no amplifica, la muestra no es apta para PCR.**

PRINCIPALES FACTORES A VALORAR CUANDO FALLA LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

FACTORES A REVISAR	ACCIONES A REALIZAR
No hay buena calidad de ADN ADN contaminado con proteínas o alguna sustancia que inhibe la reacción de PCR (restos de SDS, cloroformo, fenol y etanol)	-Eliminar estos componentes del proceso de extracción de ADN - Evitar la degradación del ADN
Inadecuada cantidad de cloruro de magnesio La polimerasa necesita iones de magnesio para funcionar adecuadamente, pero mucho magnesio inhibe la polimerasa y poco magnesio puede generar productos inespecíficos.	- Realizar curvas de cloruro de magnesio: probar a ajustar la concentración adecuada. 1,5mM es la más común, pero puede variar de 1 a 4 mM
Inadecuada concentración de los dNTP Los nucleótidos unen iones de magnesio; pequeños incrementos en la concentración de dNTP pueden inhibir la reacción porque atraparán el magnesio necesario para que la polimerasa trabaje.	-Revisar las concentración de dNTPs - Preparar alícuotas de dNTP, ya que son muy inestables , para evitar descongelaciones sucesivas
Buffer mal preparados Trabajar con concentraciones de magnesio en exceso	- Valorar si el buffer comercial lleva incorporado magnesio, si es así y se añade magnesio extra, se trabajaría con exceso de magnesio.

MODALIDADES DE LA PCR ESTÁNDAR

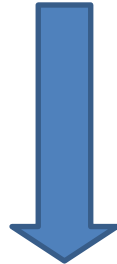
El intento de minimizar la generación de productos no deseados o la necesidad de amplificar fragmentos de gran tamaño ha derivado en el desarrollo de **variantes o modalidades de la PCR estándar** adaptadas a cada necesidad.



PCR CON INICIO EN CALIENTE



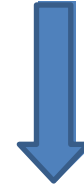
Se basa en evitar la actividad de la enzima a bajas temperaturas.



PCR DE GRANDES FRAGMENTOS



Permite aumentar el rendimiento cuando se amplifican fragmentos de entre 5 y 35Kb



PCR DE ALTA FIDELIDAD



Realizadas en condiciones especiales para evitar introducir en los amplicones mutaciones puntuales por incorporación de nucleótidos erróneos.

MODALIDADES DE LA PCR ESTÁNDAR

PCR CON INICIO EN CALIENTE

- En el período de preparación de la mezcla de reacción
- Su transporte al termociclador
- Durante la rampa ascendente de la temperatura hasta alcanzar por primera vez la temperatura de desnaturalización,



se pueden
generar productos
de amplificación
no deseados.

La PCR con inicio en caliente se ideó para *evitar la aparición de productos de amplificación no deseados*, relacionada principalmente con la naturaleza de los cebadores.

MODALIDADES DE LA PCR ESTÁNDAR

PCR CON INICIO EN CALIENTE

- Preparar la mezcla de reacción sin ADN polimerasa:
 - Se añade la enzima individualmente a cada tubo una vez que la temperatura del termociclador esté por encima de los 65°C.
 - Esta metodología aumenta el riesgo de contaminación.
- Aislando la ADN polimerasa del resto de los componentes de la mezcla:
 - Incluir la ADN polimerasa en el interior de esferas de cera que se funden al alcanzar la temperatura de desnaturalización y la enzima se libera.
- Suministrando la ADN polimerasa inactiva:
 - Se bloquea con anticuerpos específicos y al alcanzar la temperatura de desnaturalización la enzima recobra su actividad.

MODALIDADES DE LA PCR ESTÁNDAR

PCR DE GRANDES FRAGMENTOS

El rendimiento de la PCR estándar suele disminuir drásticamente cuando se amplifican fragmentos mayores de 5 kb.

La PCR de grandes fragmentos es una variante de la PCR estándar que *permite aumentar el rendimiento cuando se amplifican fragmentos de entre 5 y 35 kb*.



- Mezcla de ADN polimerasas (modificación más importante): consiste en la **utilización de una mezcla de dos ADN polimerasas termoestables**.
- Uso de aditivos en la mezcla de reacción (Por ejemplo glicerol que estabiliza las ADN polimerasas)
- Concentraciones bajas de potasio en el tampón de reacción (favorece la eficiencia de la amplificación de fragmentos largos)
- Programación del termociclador: aumentar considerablemente el tiempo de extensión en cada ciclo.

MODALIDADES DE LA PCR ESTÁNDAR

PCR DE ALTA FIDELIDAD

Para algunas aplicaciones a las que van a ser destinados los productos de PCR, como expresión génica o clonación, se requiere una PCR de alta fidelidad.

Las PCR de alta fidelidad son PCR realizadas en condiciones especiales para *evitar introducir en los amplicones mutaciones puntuales* por incorporación de nucleótidos erróneos.



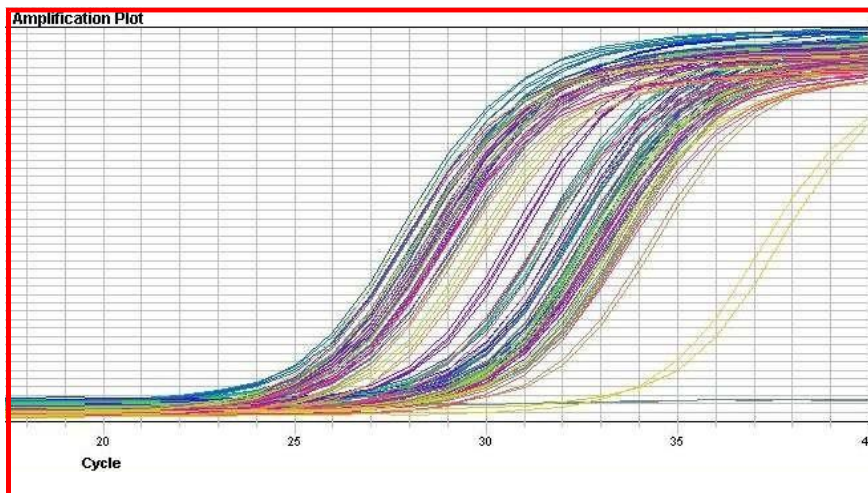
- Utilización de ADN polimerasas termoestables con actividad correctora.
- Favorecer las condiciones óptimas de mayor fidelidad de la enzima, ajustando:
 - El pH de la reacción.
 - La concentración de Mg.

PCR A TIEMPO REAL

*En la **PCR a tiempo real** se monitoriza el proceso de amplificación mediante el empleo de productos fluorescentes, de manera que la detección de los amplicones se realiza ciclo a ciclo.*

Se realiza en un termociclador a tiempo real, que,

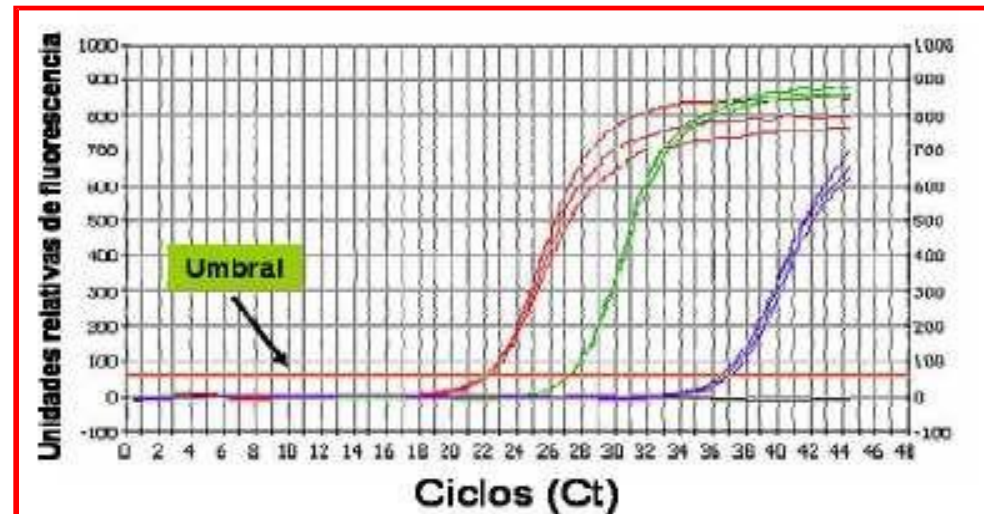
- Tiene las funciones típicas de un termociclador convencional
- Incorpora un lector de fluorescencia, de manera que puede medir la intensidad de fluorescencia en cada tubo de reacción según va ocurriendo la PCR
- Recoge datos durante el proceso, no solo al final



PCR A TIEMPO REAL

Las ventajas de la PCR a tiempo real son:

- **Mayor rapidez en la detección cualitativa de secuencias diana** en una muestra, ya que el resultado se puede obtener incluso antes de que termine la PCR.
- **Resultados más fidedignos**, puesto que la detección instrumental de fluorescencia es más objetiva y sensible que la tinción con bromuro de etidio de un gel de electroforesis.
- **Minimiza los problemas de contaminación**, ya que tanto la amplificación como la detección se realizan en el mismo tubo cerrado

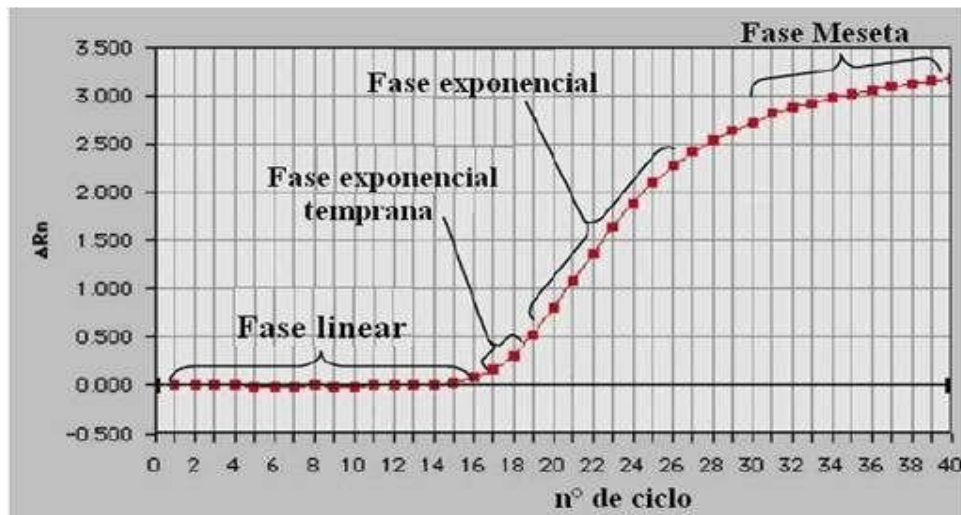


PCR A TIEMPO REAL

CINÉTICA DE LA AMPLIFICACIÓN

La **curva de amplificación** es una curva de tipo sigmoide que se obtiene al representar la emisión de fluorescencia en cada ciclo de PCR respecto del número de ciclo en que se produce.

La curva tiene **tres zonas** claramente diferenciadas, que **corresponden a tres fases de la cinética de amplificación**



- ☐ Zona o fase de ruido (linear)
- ☐ Zona o fase de crecimiento exponencial
- ☐ Zona o fase de meseta

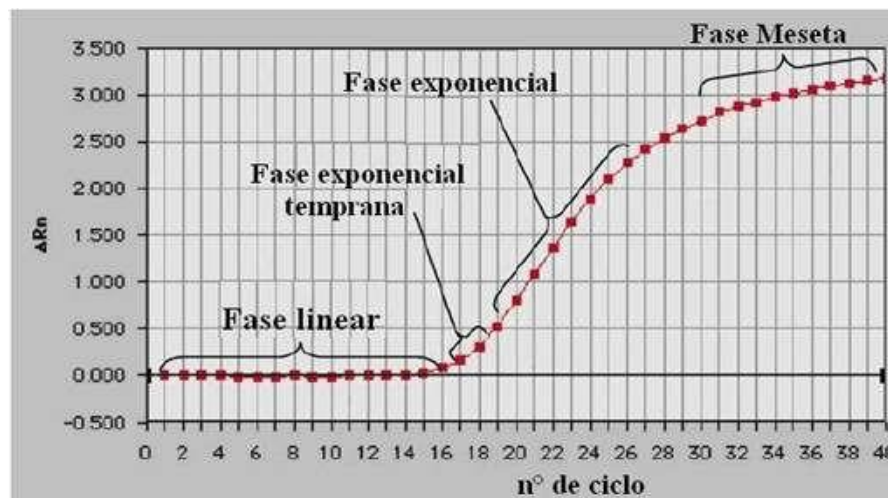
PCR A TIEMPO REAL

ZONA O FASE DE RUIDO

Corresponde a los primeros ciclos de PCR, en los que el número de amplicones sintetizados está por debajo del nivel de detección del aparato, y por lo tanto lo está la fluorescencia asociada a ellos.

La amplitud de esta zona de la curva va a depender de la cantidad de la secuencia diana en la muestra

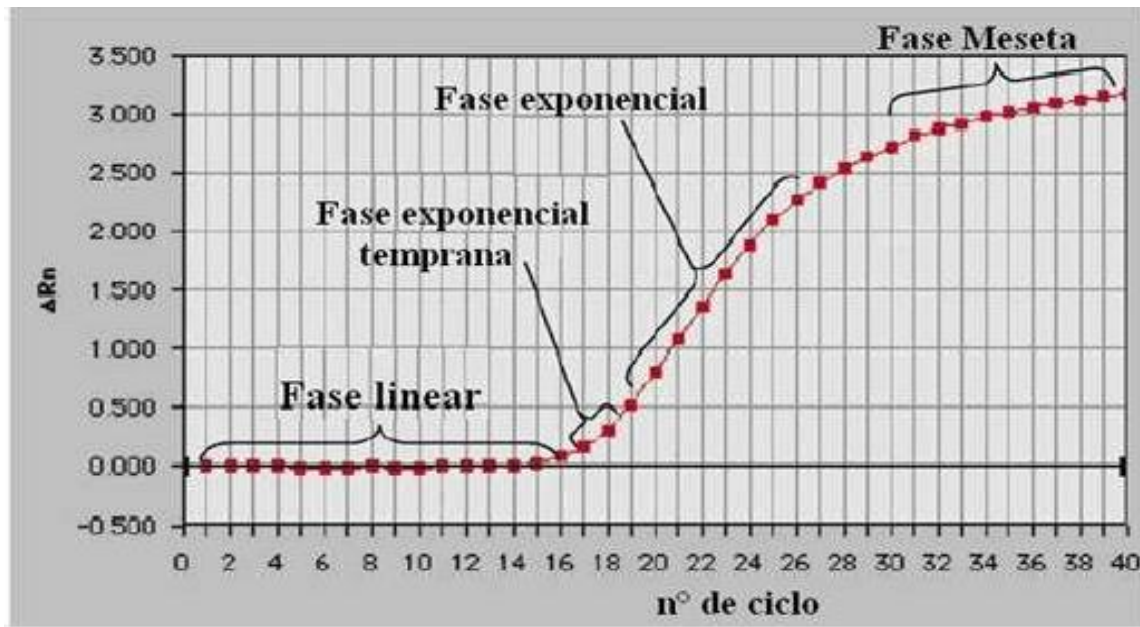
Cuanto menor es el número de secuencias diana en la muestra, más ciclos se necesitan para obtener un número de amplicones por encima del nivel de detección del aparato



PCR A TIEMPO REAL

ZONA O FASE DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL

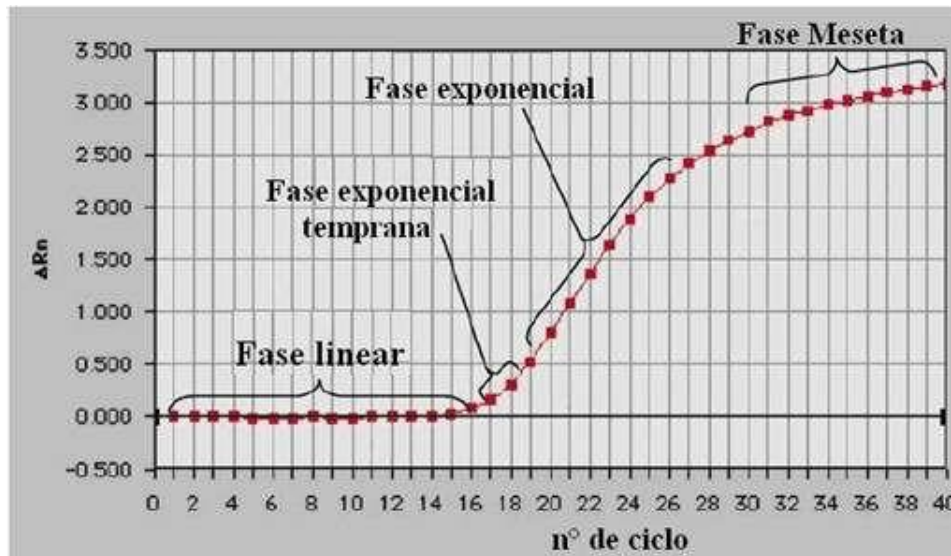
- La curva en esta zona es lineal y de *gran pendiente*.
- Abarca un número reducido de ciclos (de 4 a 6) y corresponde a *la auténtica fase exponencial de producción de amplicones*.



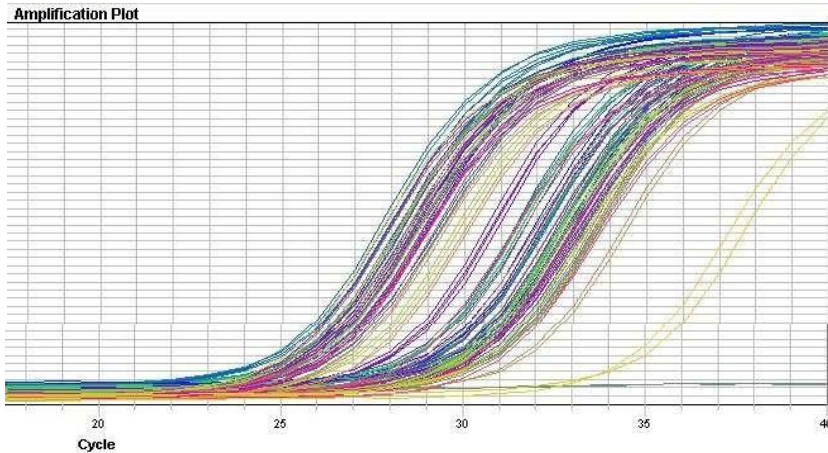
PCR A TIEMPO REAL

ZONA O FASE DE MESETA

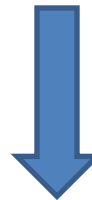
En esta zona la curva es también lineal pero de pendiente reducida, debido a la drástica *disminución del rendimiento en los últimos ciclos de PCR*, probablemente por agotamiento de sustratos, pérdida progresiva de la actividad polimerasa, saturación de la enzima ...



PCR A TIEMPO REAL



Estas curvas son producidas por el termociclador a tiempo real para cada reacción y para ello se necesita añadir a la mezcla de reacción un sistema fluorescente de detección de los amplicones.



SYBR GREEN