

PCR

“Polymerase Chain Reaction”

Historia

- PCR es una invención, no un descubrimiento.
- Kary Mullis, el inventor del PCR, obtuvo el Premio Nobel en Química en 1993.
- Revolucionó el clonamiento molecular.



- 1983, Cetus Corporation, California.

1. Múltiples rondas de replicación in vitro agregando DNA Polimerasa

2. Incorporación de Taq Polimerasa (*Thermus aquaticus*)



Conceptualmente... nada nuevo, salvo la velocidad.

PCR

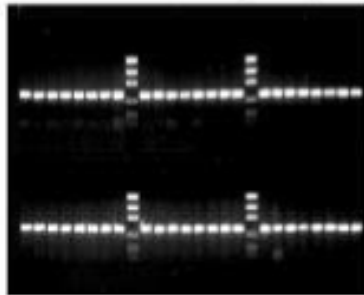


Agarose gel electrophoresis

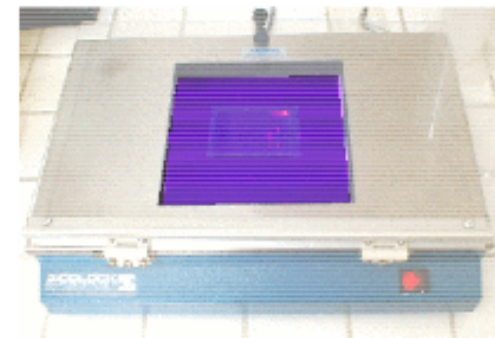


3-4 hours

Reliable PCR from Every Sample



The final product



UV visualisation

Que permite el PCR:

Que permite el PCR:

- Genera múltiples copias de un DNA templado

Que permite el PCR:

- Genera múltiples copias de un DNA templado
- Partiendo con una copia (teórica) puede amplificar su número infinitas veces

Que permite el PCR:

- Genera múltiples copias de un DNA templado
- Partiendo con una copia (teórica) puede amplificar su número infinitas veces
- Fragmentos de DNA amplificado pueden ser secuenciados, clonados, usados como sondas o analizados por electroforesis

Que permite el PCR:

- Genera múltiples copias de un DNA templado
- Partiendo con una copia (teórica) puede amplificar su número infinitas veces
- Fragmentos de DNA amplificado pueden ser secuenciados, clonados, usados como sondas o analizados por electroforesis
- Genes defectuosos pueden ser amplificados para diagnosticar enfermedades

Que permite el PCR:

- Genera múltiples copias de un DNA templado
- Partiendo con una copia (teórica) puede amplificar su número infinitas veces
- Fragmentos de DNA amplificado pueden ser secuenciados, clonados, usados como sondas o analizados por electroforesis
- Genes defectuosos pueden ser amplificados para diagnosticar enfermedades
- Amplificación de secuencias de patógenos para su identificación (p. ej., HIV)

Que permite el PCR:

- Genera múltiples copias de un DNA templado
- Partiendo con una copia (teórica) puede amplificar su número infinitas veces
- Fragmentos de DNA amplificado pueden ser secuenciados, clonados, usados como sondas o analizados por electroforesis
- Genes defectuosos pueden ser amplificados para diagnosticar enfermedades
- Amplificación de secuencias de patógenos para su identificación (p. ej., HIV)
- Fragmentos amplificados pueden usarse como marcadores identificatorios en forense (“fingerprints”).

Como funciona el PCR

Como funciona el PCR

- Replicación artificial, *in vitro*

Como funciona el PCR

- Replicación artificial, *in vitro*
- No se replica todo el DNA presente en la muestra templado sino que solo un pequeño fragmento (1-20000 bases).

Como funciona el PCR

- Replicación artificial, *in vitro*
- No se replica todo el DNA presente en la muestra templado sino que solo un pequeño fragmento (1-20000 bases).
- Al igual que en replicación, el PCR involucra:
 - Denaturación del DNA
 - “Priming”
 - Polimerización

Iniciación - Formación del “ojo” de replicación

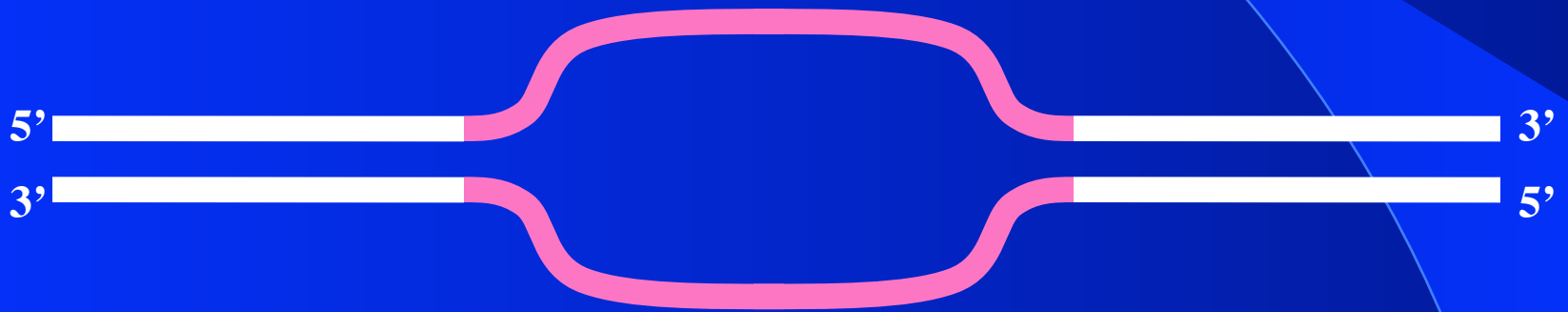
Iniciación - Formación del “ojo” de replicación

Orígen de replicación



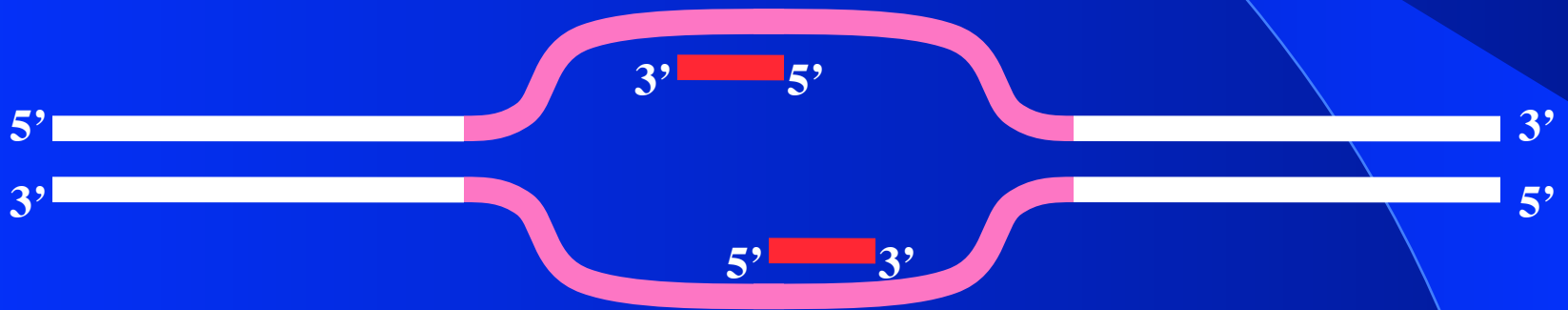
Iniciación - Formación del “ojo” de replicación

Orígen de replicación



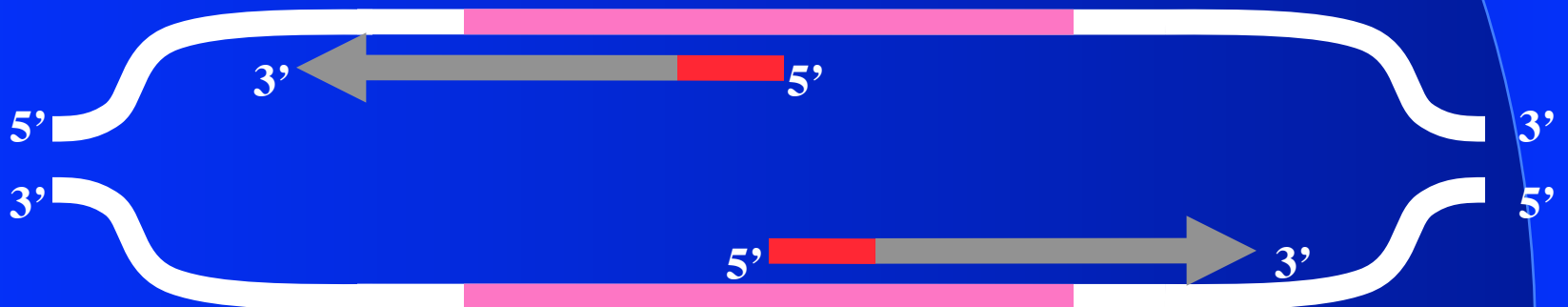
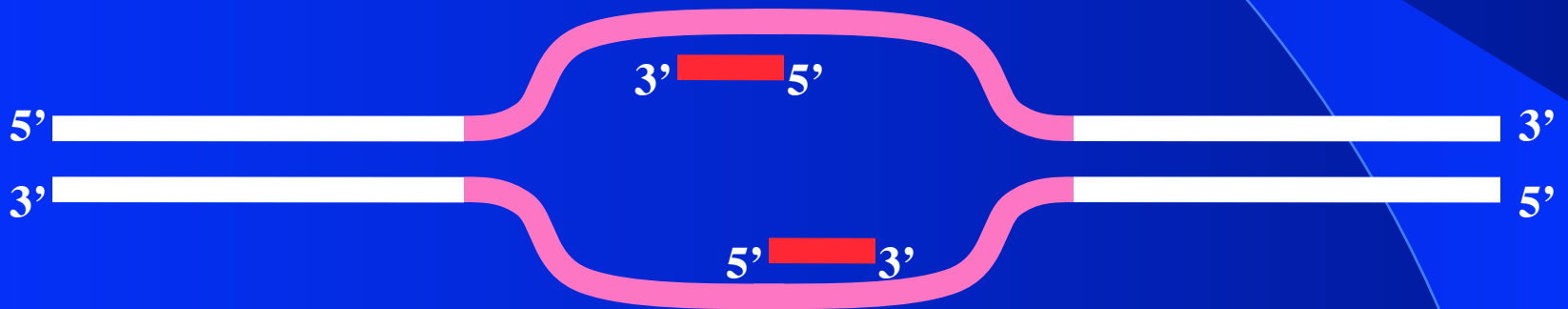
Iniciación - Formación del “ojo” de replicación

Orígen de replicación



Iniciación - Formación del “ojo” de replicación

Orígen de replicación



Funciones de replicación y las enzimas asociadas

Función

Enzima

Funciones de replicación y las enzimas asociadas

Función

Enzima

- Denat. DNA

Funciones de replicación y las enzimas asociadas

Función

- Denat. DNA

Enzima

- ➔ Helicasa
- ➔ Proteínas SSB
- ➔ Topisomerasa

Funciones de replicación y las enzimas asociadas

Función

Enzima

- Denat. DNA

- ➔ Helicasa

- ➔ Proteínas SSB

- ➔ Topisomerasa

- Polimerización

Funciones de replicación y las enzimas asociadas

Función

Enzima

● Denat. DNA

→ Helicasa

→ Proteínas SSB

→ Topisomerasa

● Polimerización

→ DNA Polimerasa

Funciones de replicación y las enzimas asociadas

Función

Enzima

● Denat. DNA

→ Helicasa

→ Proteínas SSB

→ Topisomerasa

● Polimerización

→ DNA Polimerasa

● Primer

Funciones de replicación y las enzimas asociadas

Función

Enzima

● Denat. DNA

→ Helicasa

→ Proteínas SSB

→ Topisomerasa

● Polimerización

→ DNA Polimerasa

● Primer

→ Primasa

Funciones de replicación y las enzimas asociadas

Función

Enzima

● Denat. DNA

→ Helicasa

→ Proteínas SSB

→ Topisomerasa

● Polimerización

→ DNA Polimerasa

● Primer

→ Primasa

● Unión de extremos

Funciones de replicación y las enzimas asociadas

Función

Enzima

● Denat. DNA

→ Helicasa

→ Proteínas SSB

→ Topisomerasa

● Polimerización

→ DNA Polimerasa

● Primer

→ Primasa

● Unión de extremos

→ Ligasa

Las funciones de replicación son reemplazadas en el PCR

Función

PCR

Las funciones de replicación son reemplazadas en el PCR

Función

PCR

- Denat. DNA

Las funciones de replicación son reemplazadas en el PCR

Función

PCR

● Denat. DNA

→ Calor

Las funciones de replicación son reemplazadas en el PCR

Función

PCR

- Denat. DNA
- Pol. DNA

→ Calor

Las funciones de replicación son reemplazadas en el PCR

Función

- Denat. DNA
- Pol. DNA

PCR

→ Calor

→ *Taq* DNA
Polimerasa

Las funciones de replicación son reemplazadas en el PCR

Función

- Denat. DNA
- Pol. DNA
- Fuente del primer

PCR

- Calor
- *Taq* DNA Polimerasa

Las funciones de replicación son reemplazadas en el PCR

Función

- Denat. DNA
- Pol. DNA
- Fuente del primer

PCR

- ➔ Calor
- ➔ *Taq* DNA Polimerasa
- ➔ Primers se agregan a la reacción

Las funciones de replicación son reemplazadas en el PCR

Función

- Denat. DNA
- Pol. DNA
- Fuente del primer
- Unión de frag.

PCR

- ➔ Calor
- ➔ *Taq* DNA Polimerasa
- ➔ Primers se agregan a la reacción

Las funciones de replicación son reemplazadas en el PCR

Función

- Denat. DNA
- Pol. DNA
- Fuente del primer
- Unión de frag.

PCR

- ➔ Calor
- ➔ *Taq* DNA Polimerasa
- ➔ Primers se agregan a la reacción
- ➔ N/A ya que son fragmentos cortos

Componentes de una reacción de PCR

Componentes de una reacción de PCR

- Buffer (contiene Mg^{++}), pH 8.2

Componentes de una reacción de PCR

- Buffer (contiene Mg^{++}), pH 8.2
- DNA templado

Componentes de una reacción de PCR

- Buffer (contiene Mg^{++}), pH 8.2
- DNA templado
- 2 Primers que flanquean el fragmento de DNA a ser amplificado

Componentes de una reacción de PCR

- Buffer (contiene Mg^{++}), pH 8.2
- DNA templado
- 2 Primers que flanquean el fragmento de DNA a ser amplificado
- dNTPs

Componentes de una reacción de PCR

- Buffer (contiene Mg^{++}), pH 8.2
- DNA templado
- 2 Primers que flanquean el fragmento de DNA a ser amplificado
- dNTPs
- *Taq* DNA Polimerasa (u otra DNA polimerasa termoestable)

PCR



PCR



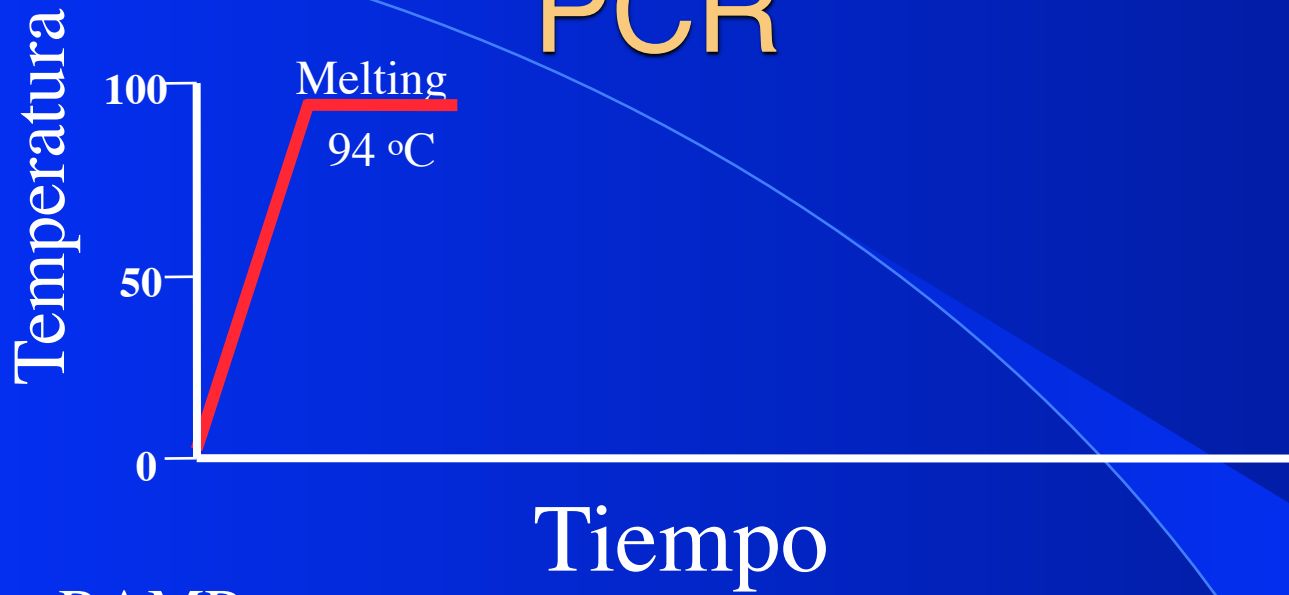
PCR



- RAMP
- HOLD



PCR

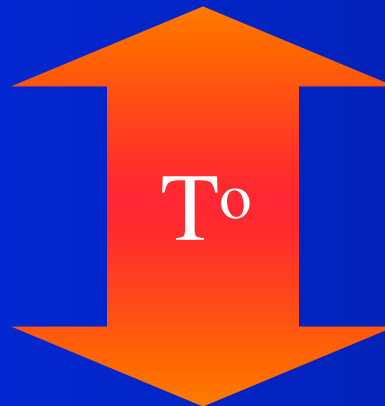


•RAMP

•HOLD



PCR



PCR

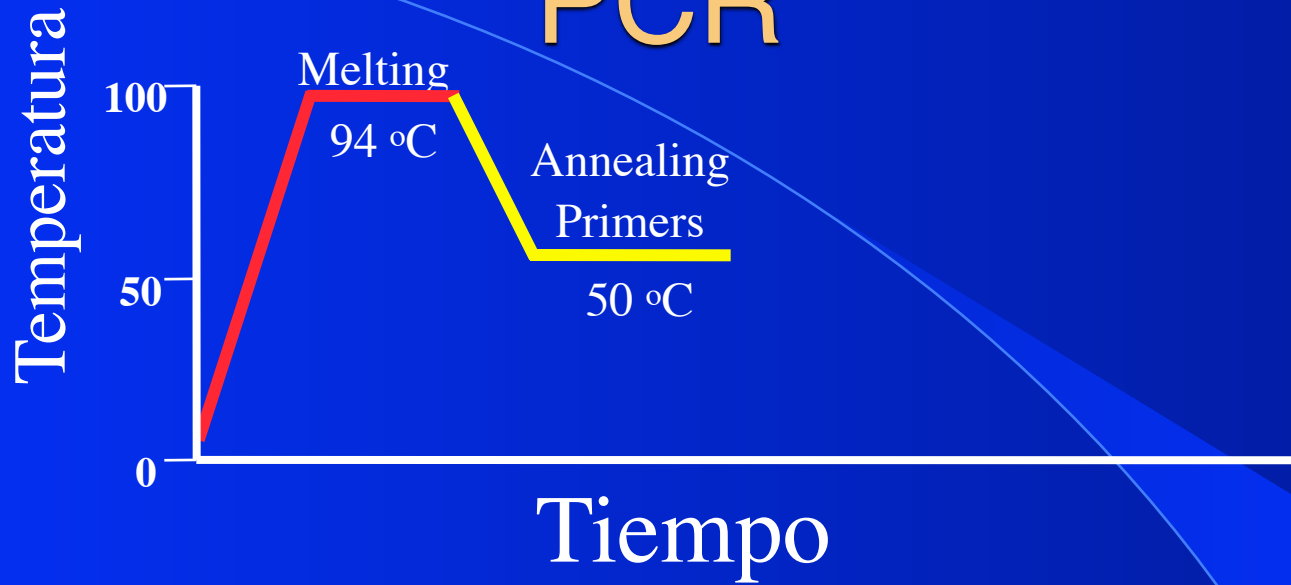


Annealing:
Depende de
 T_m de primers

Extensión:
1 min./Kb



PCR

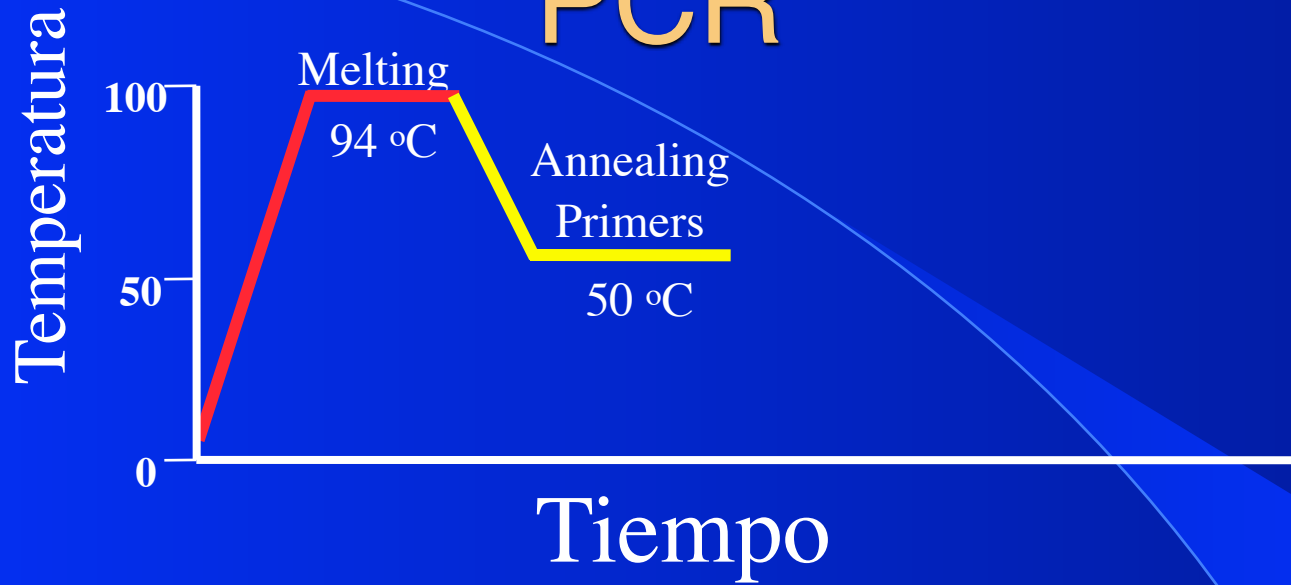


Annealing:
Depende de
 T_m de primers

Extensión:
1 min./Kb



PCR

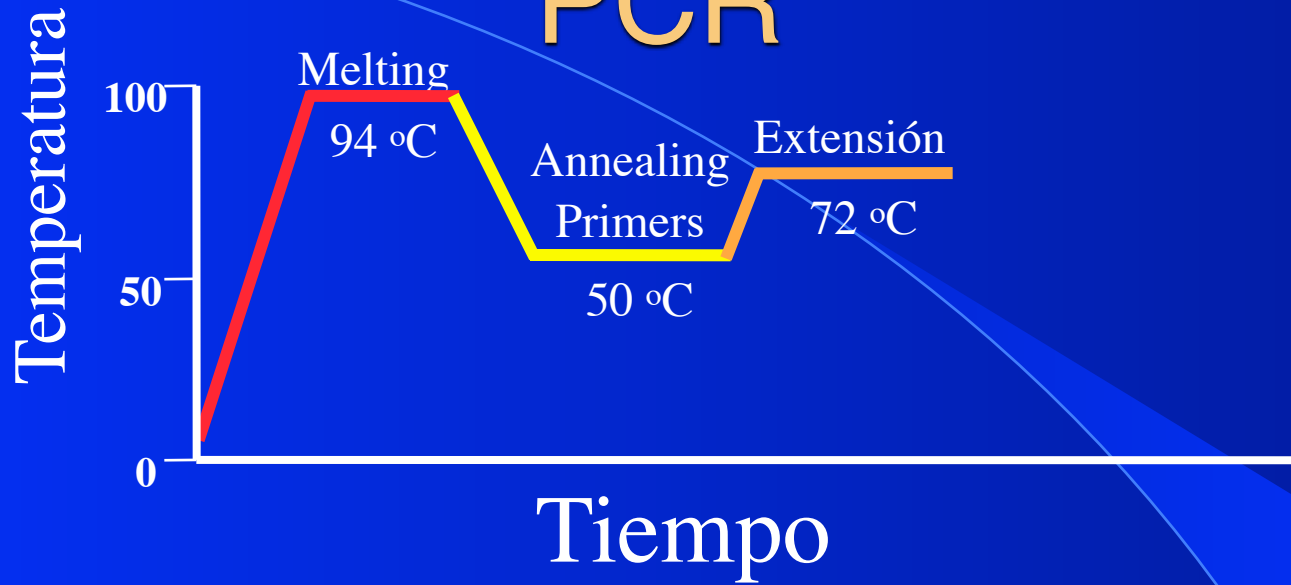


Annealing:
Depende de
 T_m de primers

Extensión:
1 min./Kb



PCR

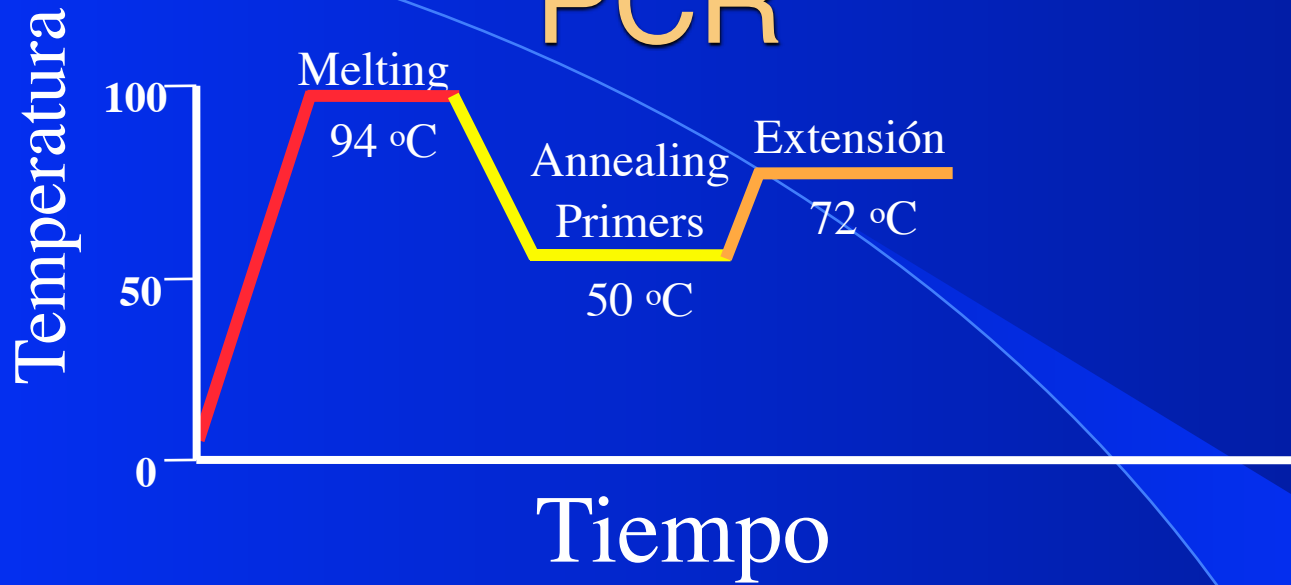


Annealing:
Depende de
 T_m de primers

Extensión:
1 min./Kb



PCR

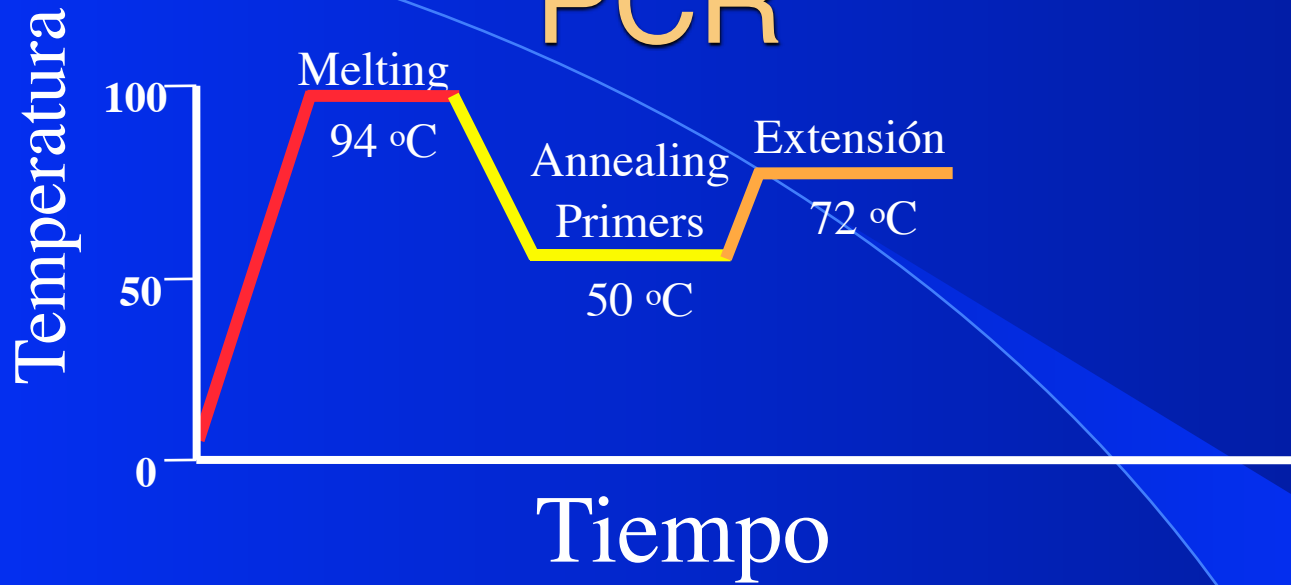


Annealing:
Depende de
 T_m de primers

Extensión:
1 min./Kb



PCR

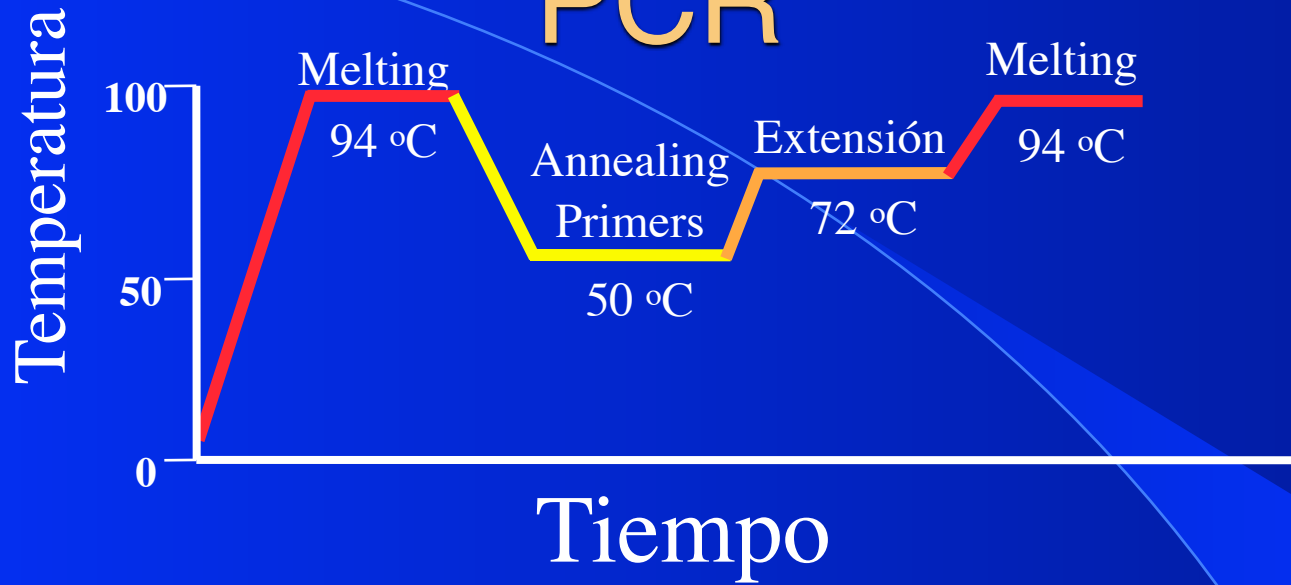


Annealing:
Depende de
 T_m de primers

Extensión:
1 min./Kb



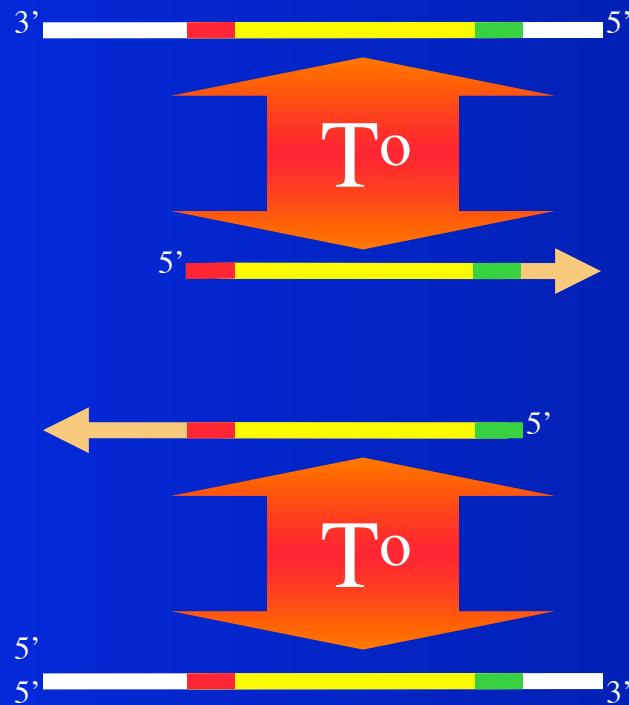
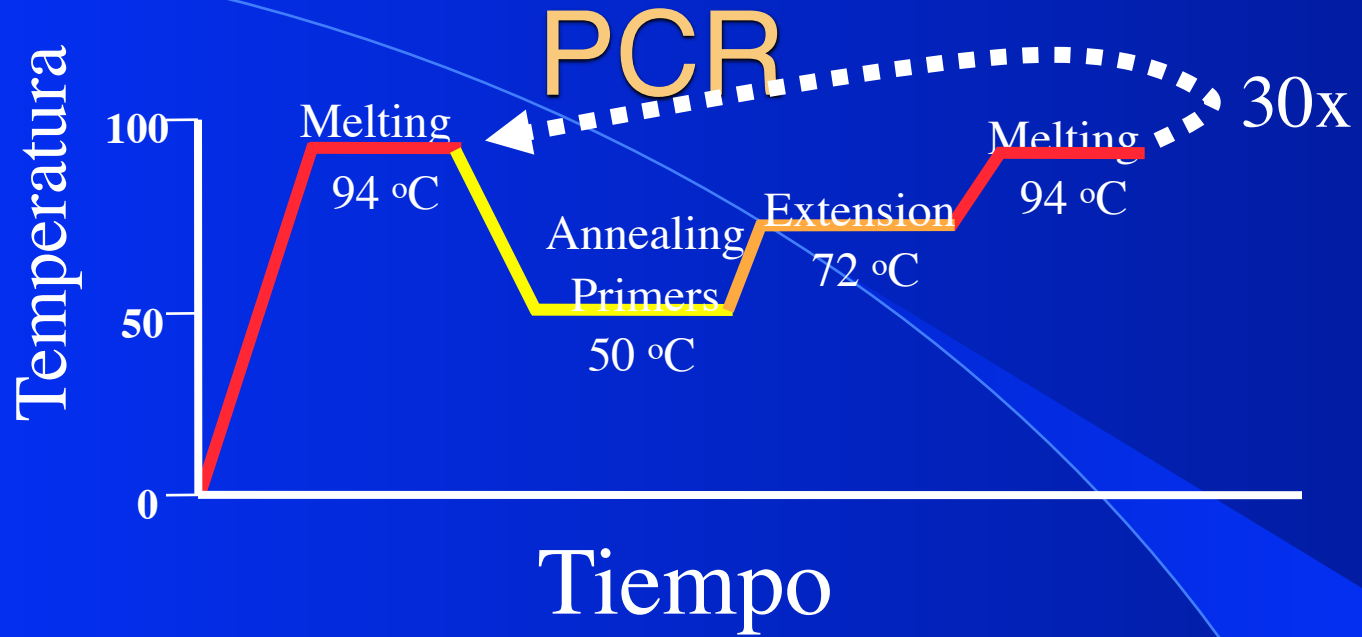
PCR

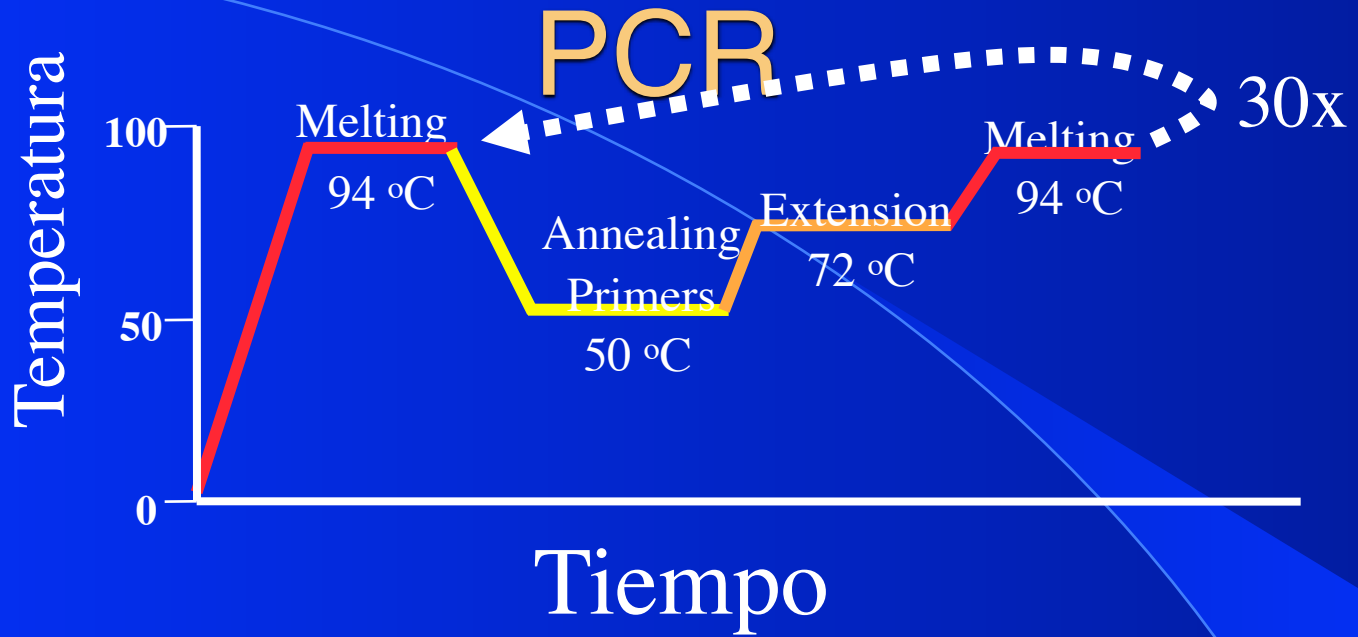


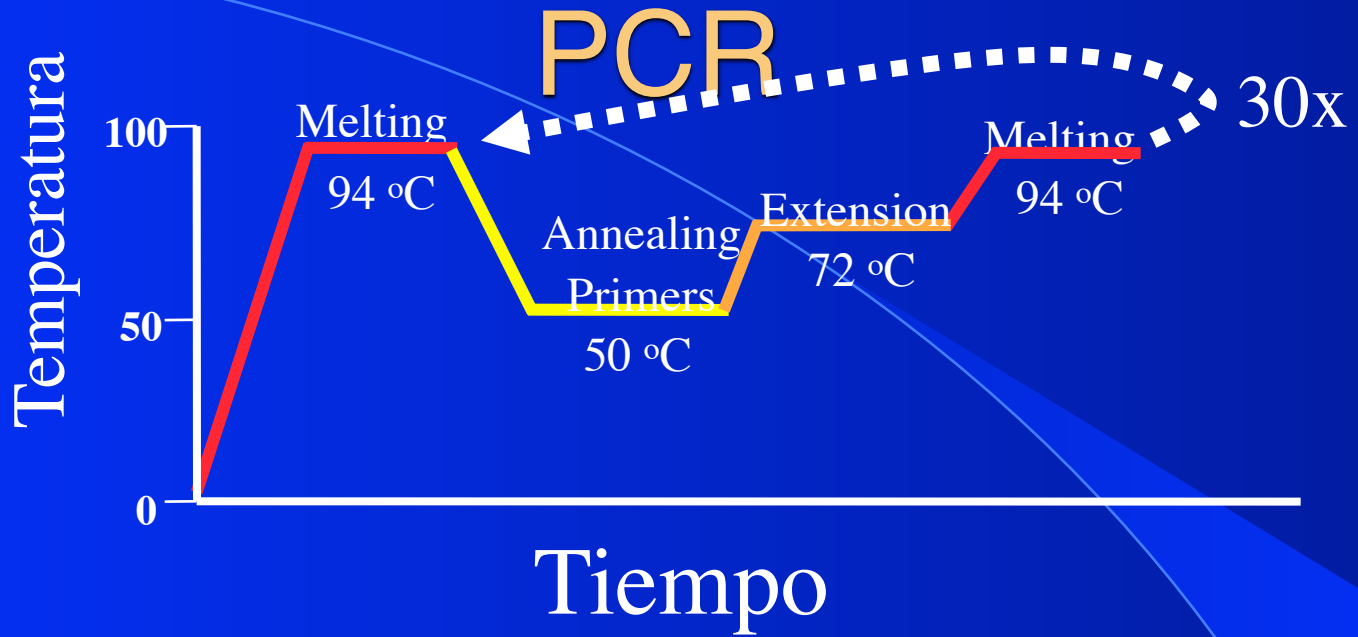
Annealing:
Depende de
 T_m de primers

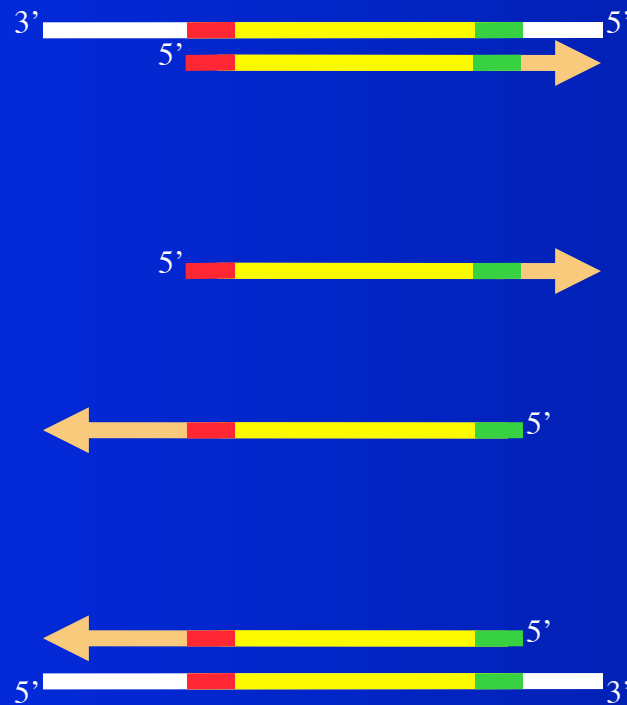
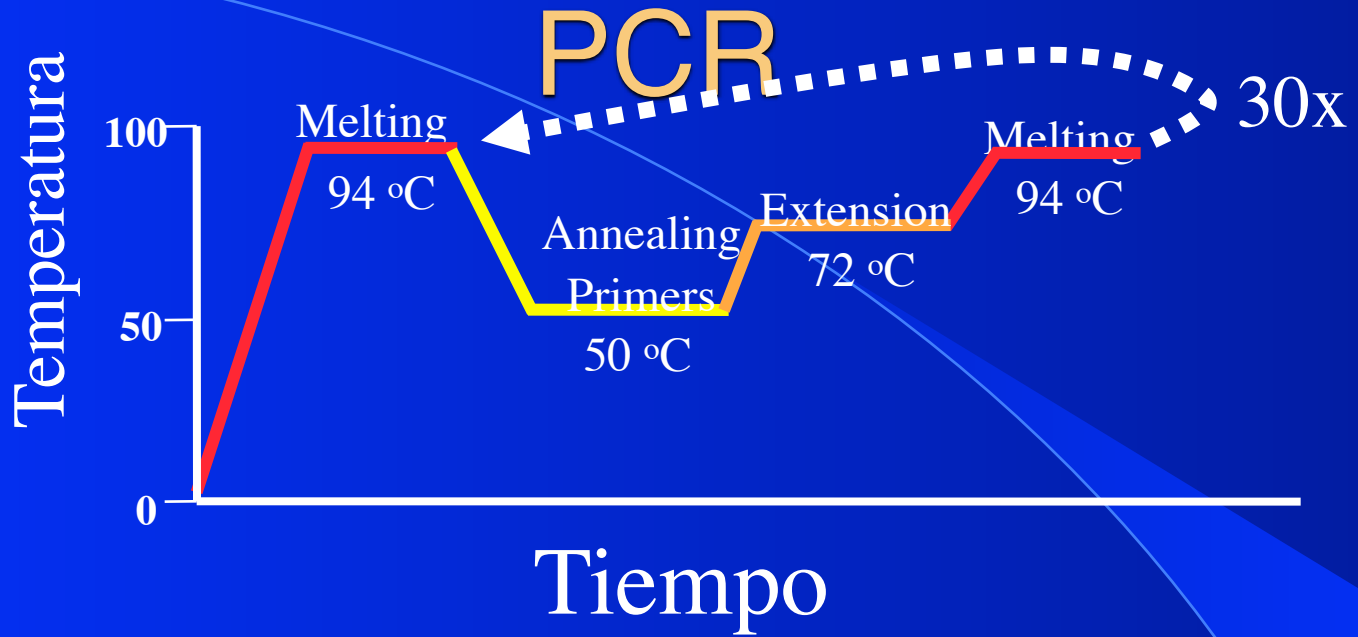
Extensión:
1 min./Kb

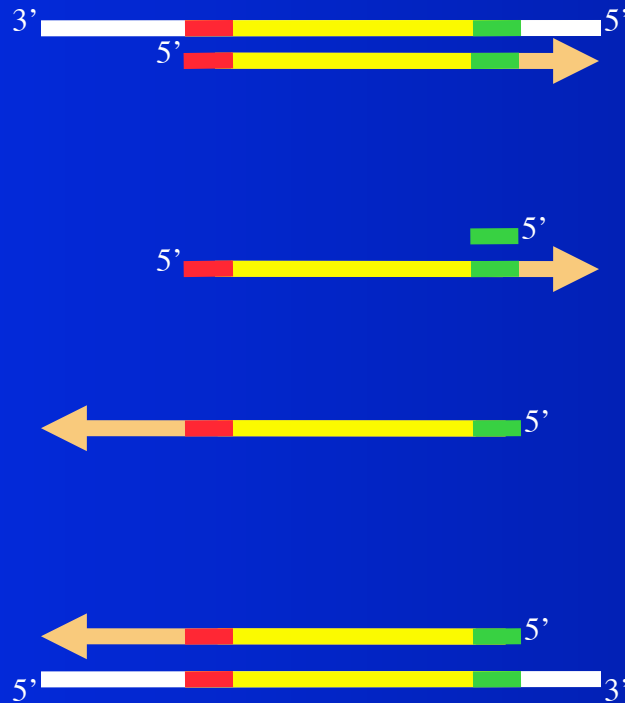
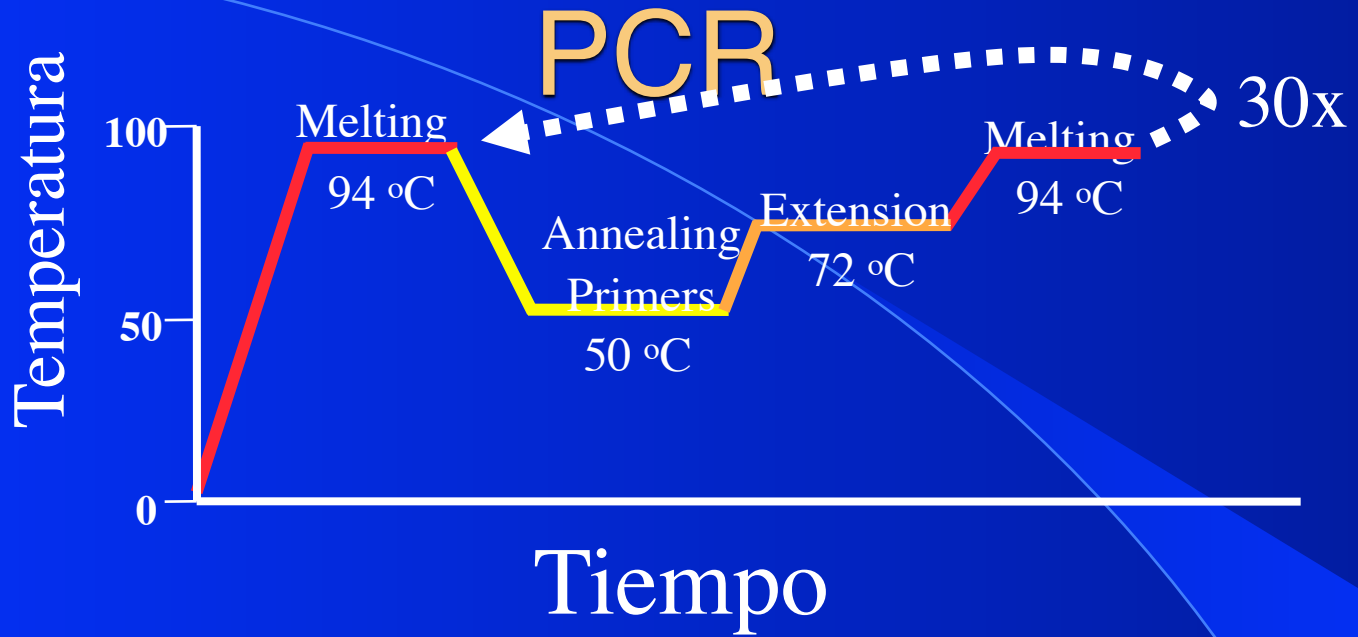


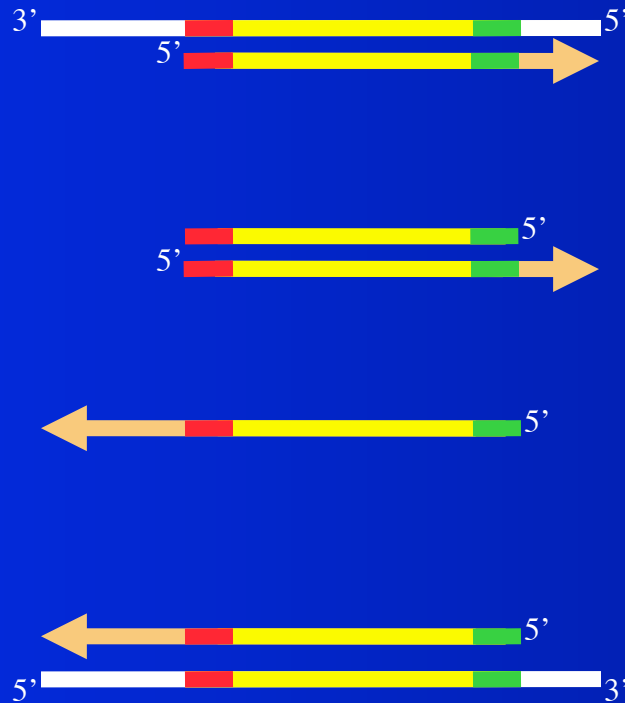
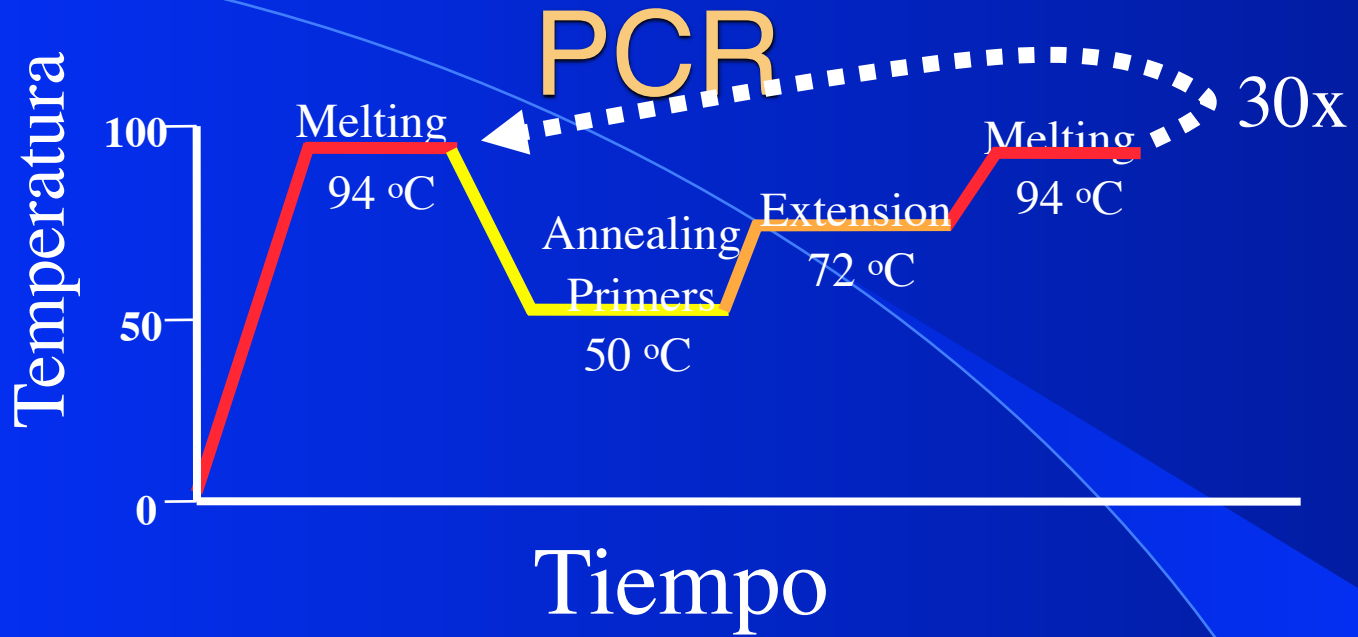


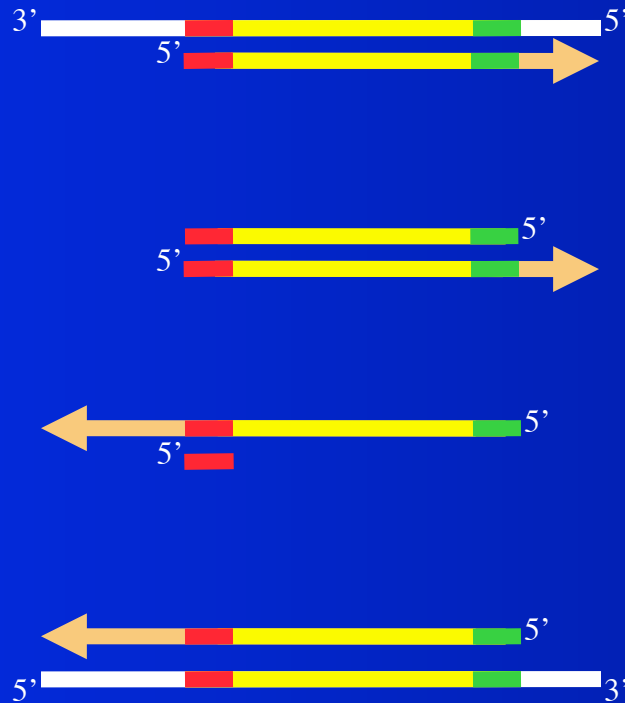
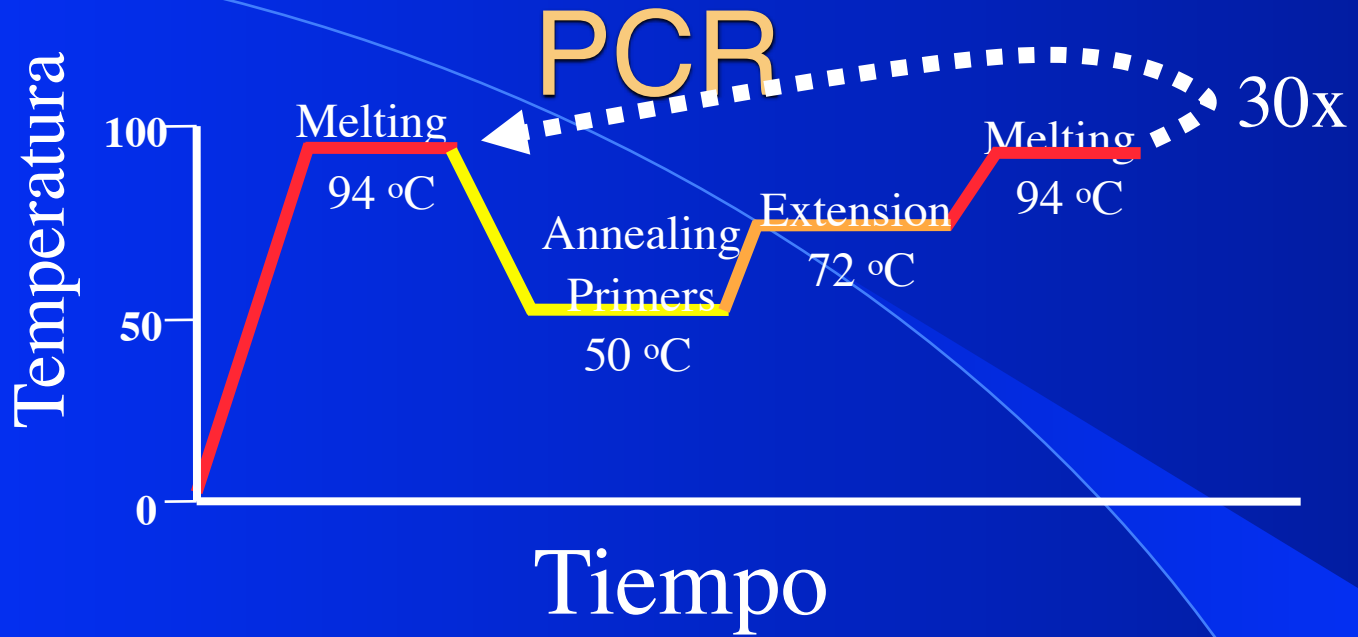


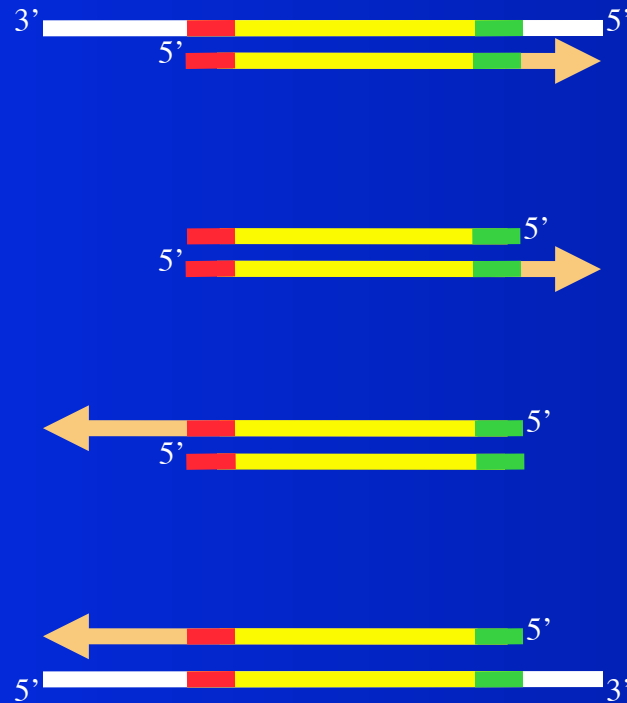
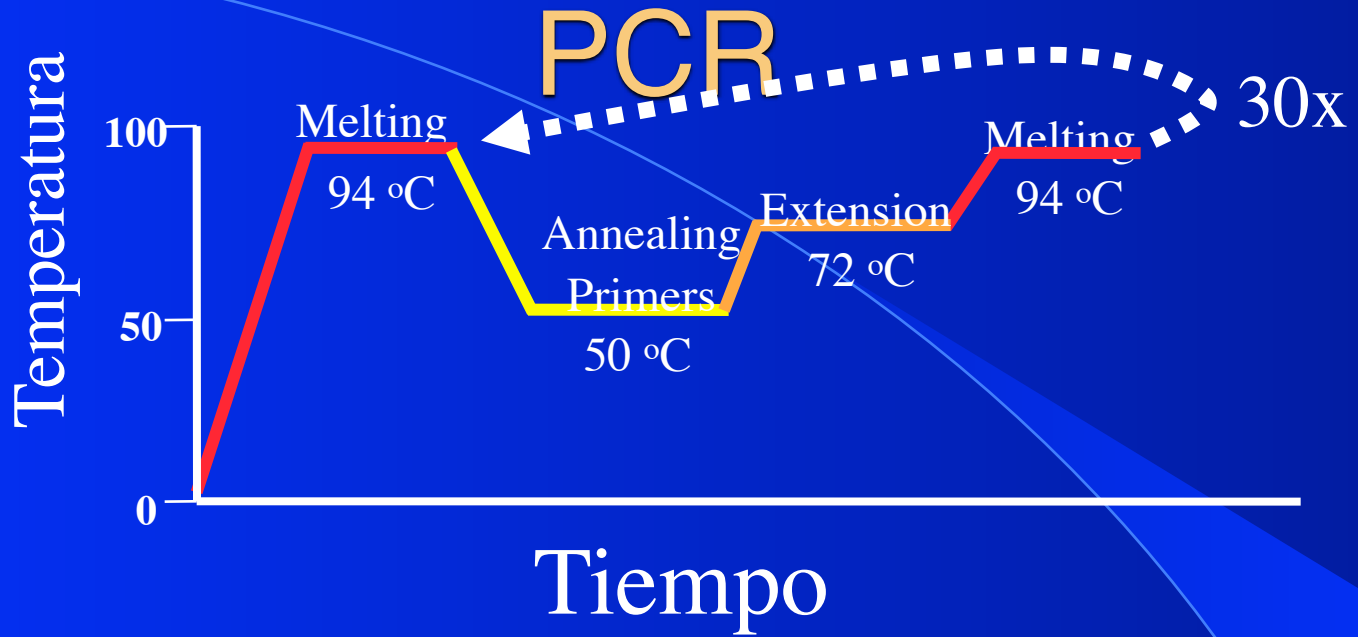




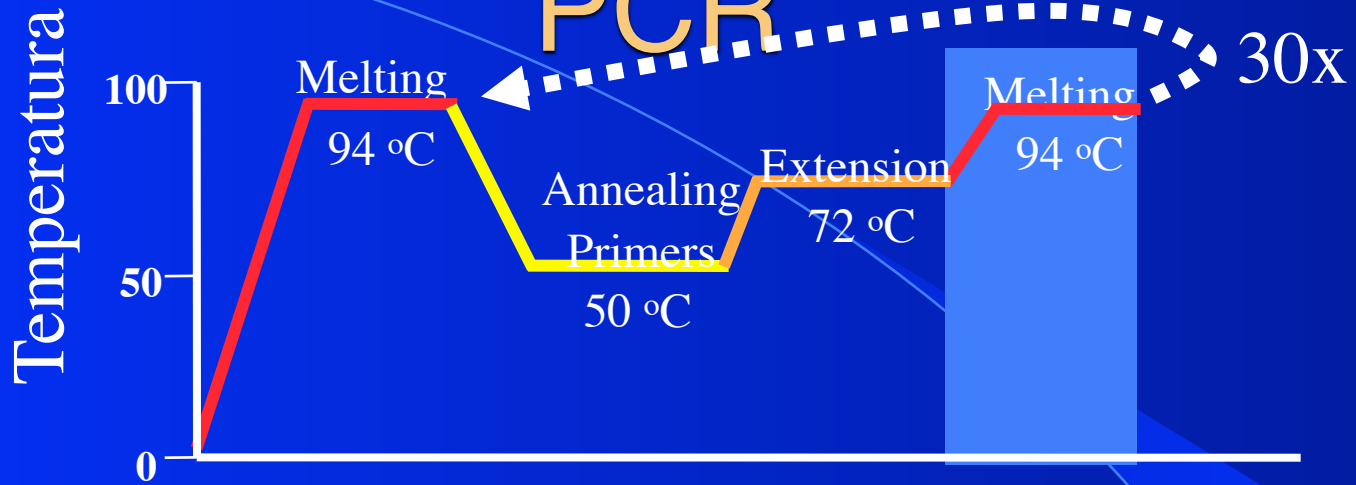




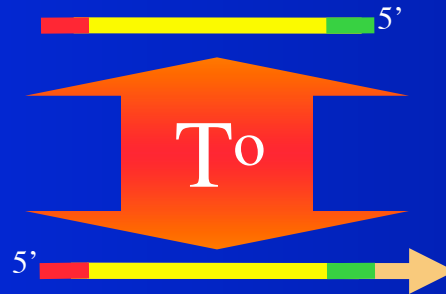


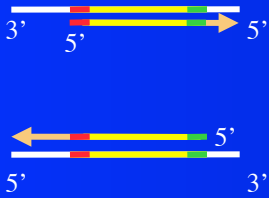
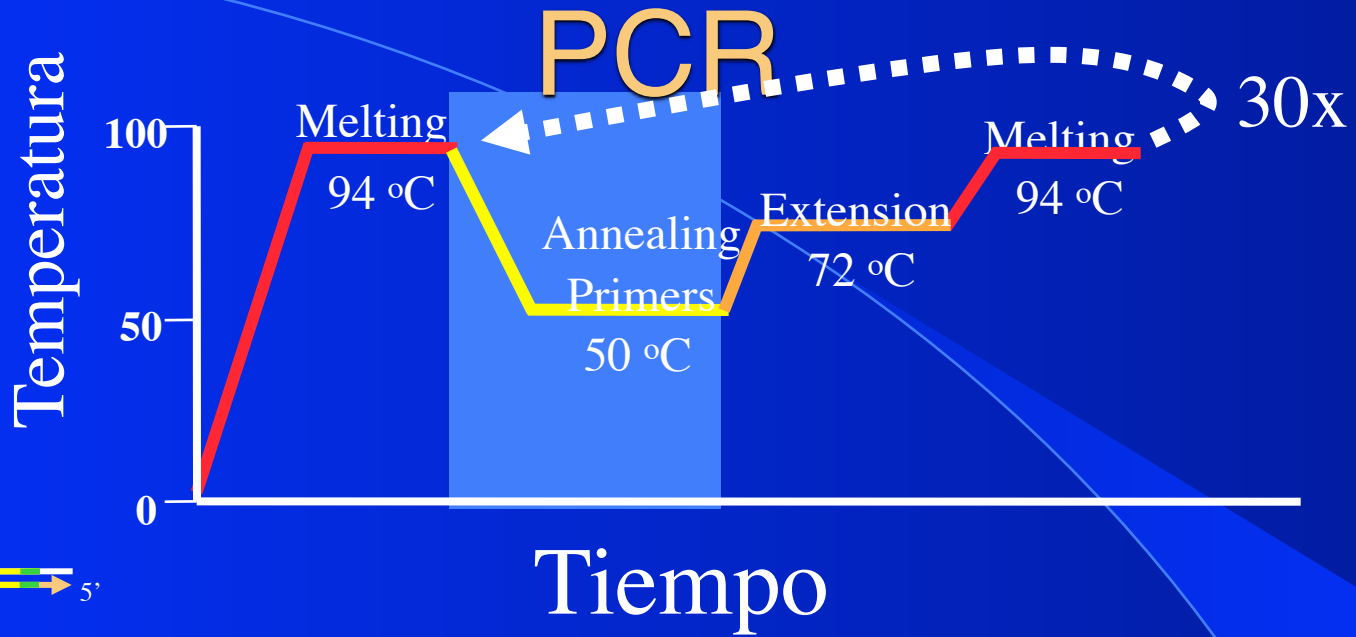


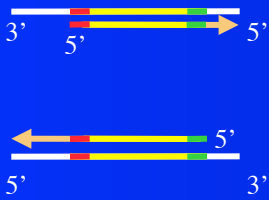
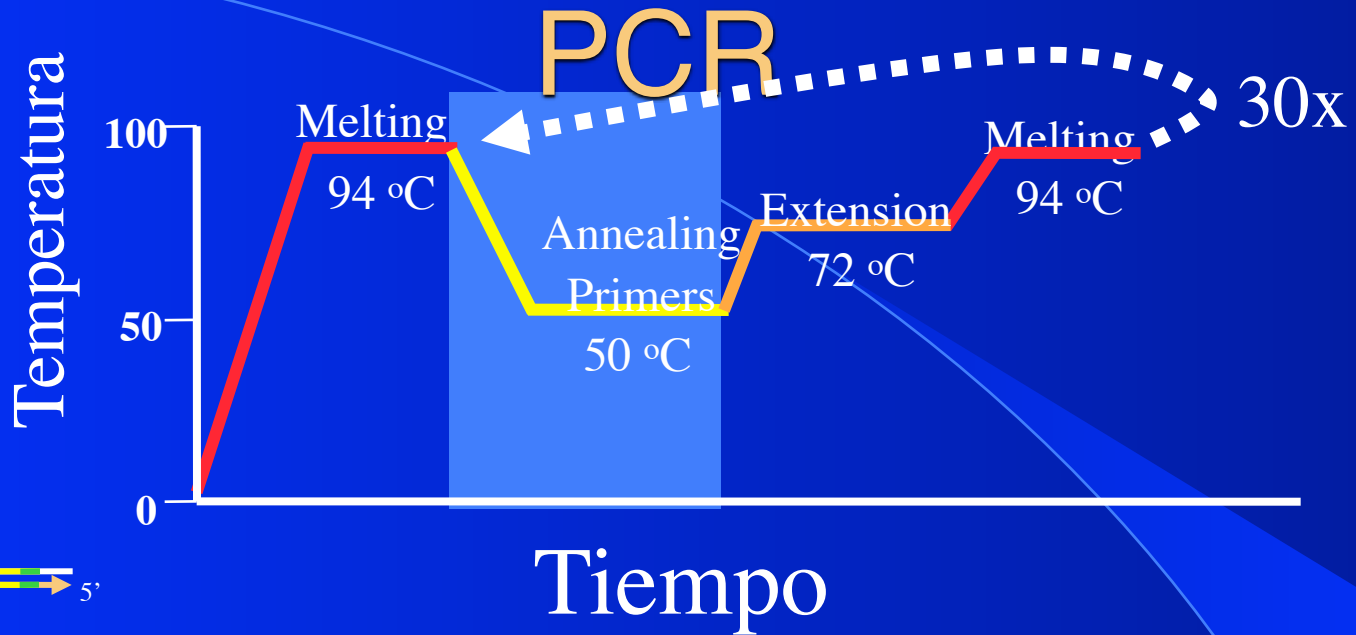
PCR



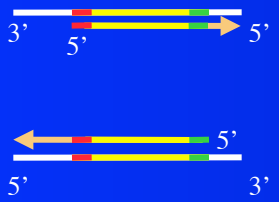
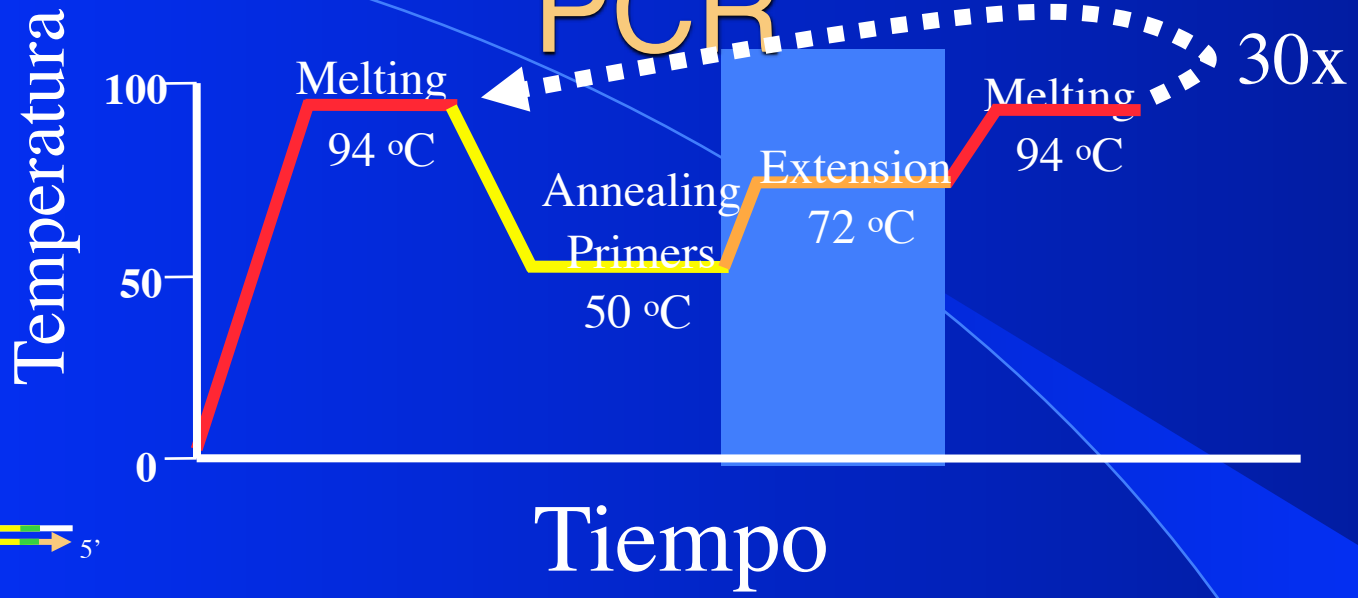
Tiempo

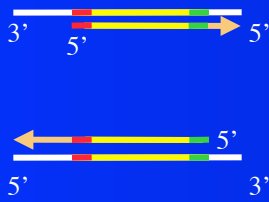
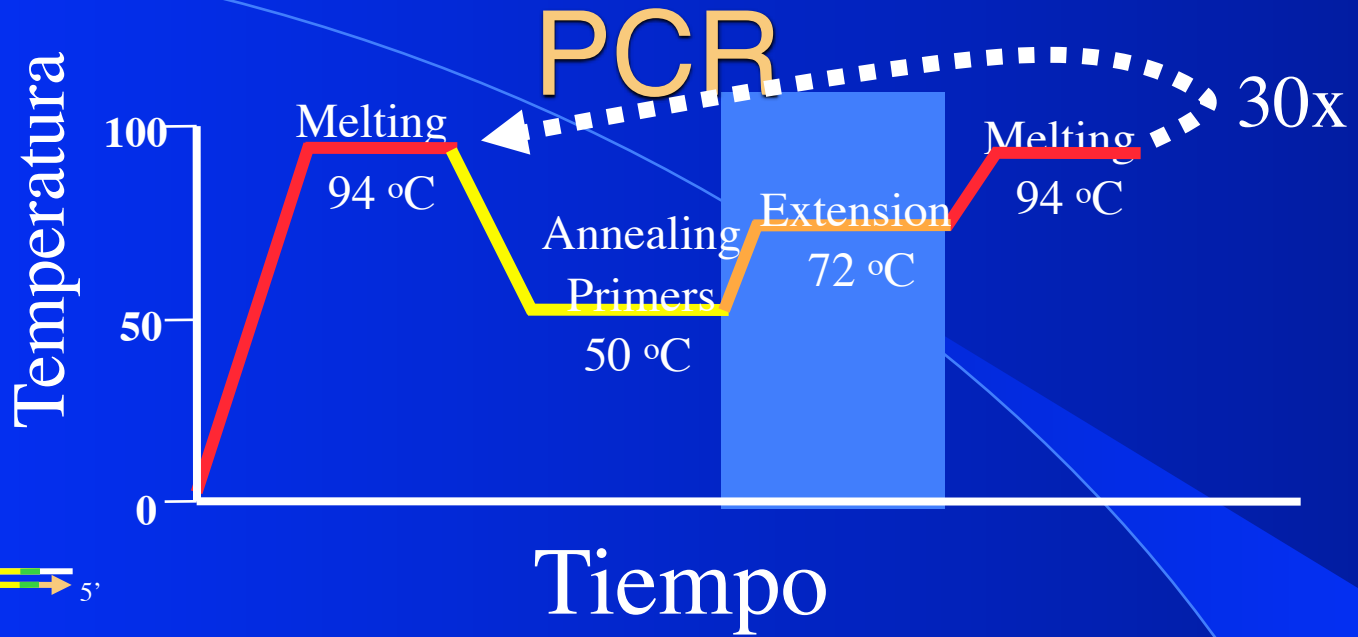




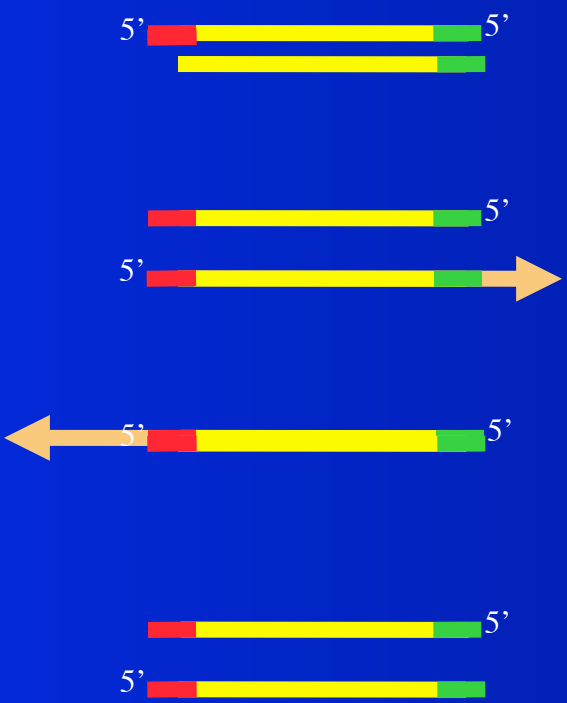
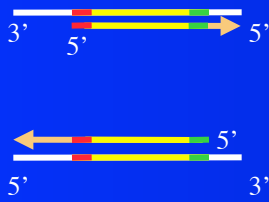
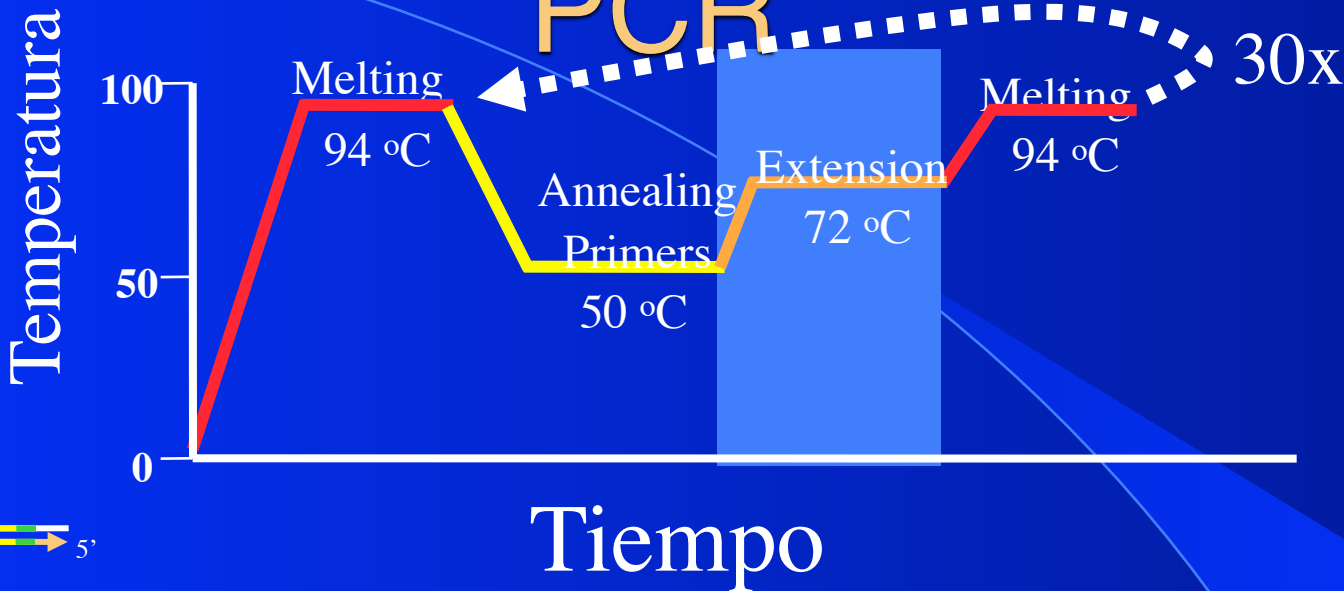


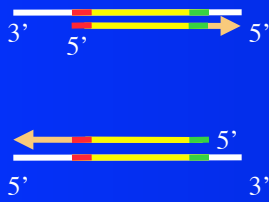
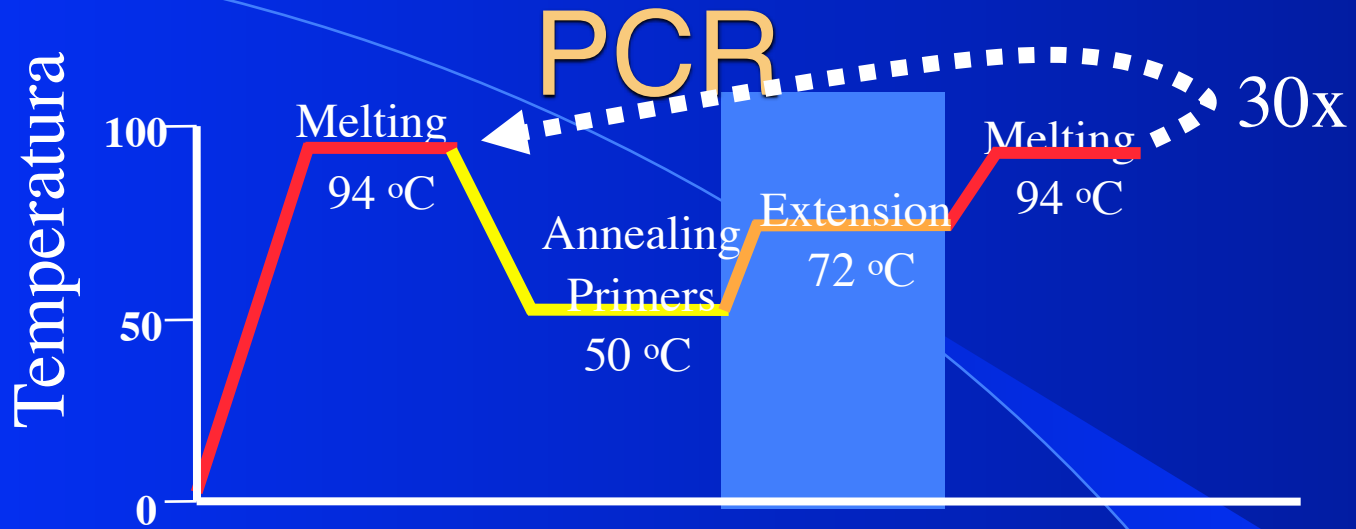
PCR





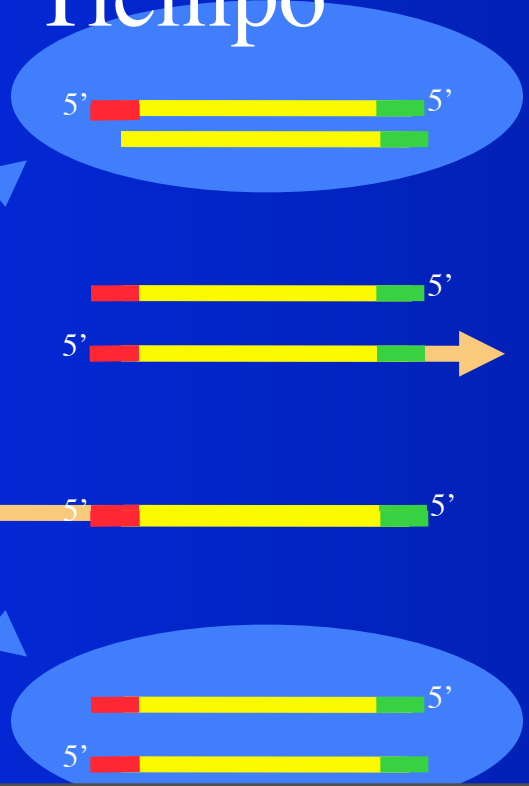
PCR





Tiempo

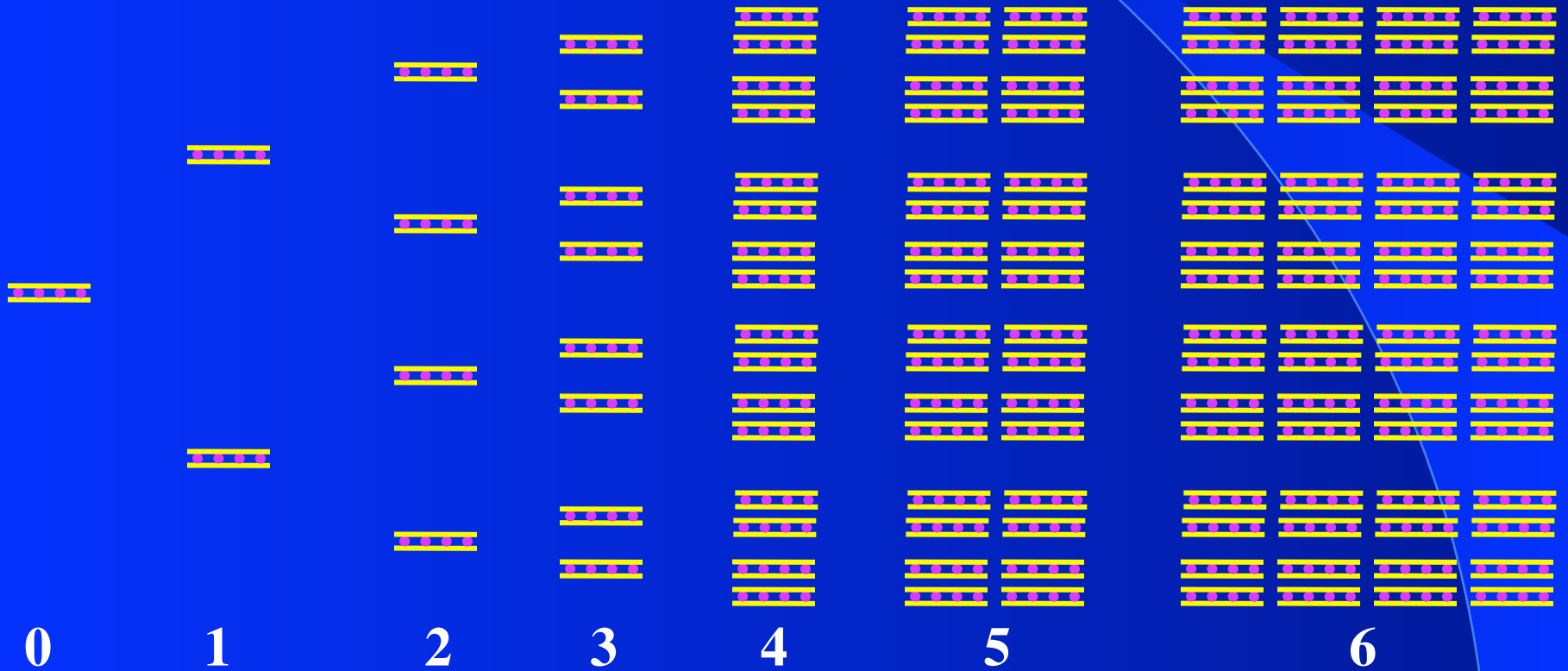
Fragmentos de largo definido



DNA entre los partidores se duplica con cada ciclo térmico

Número

1 2 4 8 16 32 64



0
Ciclos

1

2

3

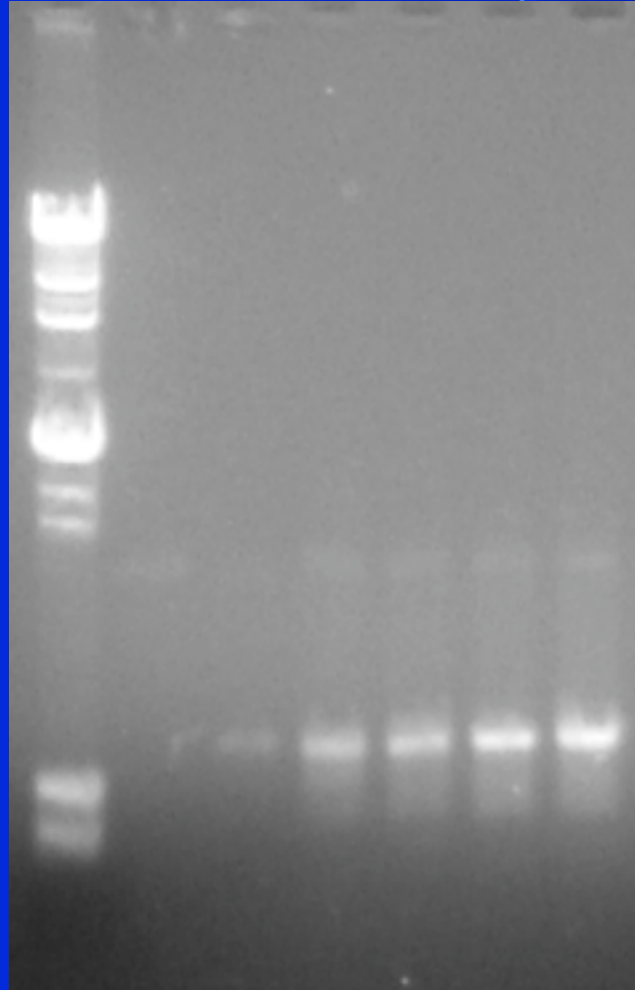
4

5

6

Más Ciclos = Más DNA

Marcador Número de ciclos
De tam. 0 10 15 20 25 30



Amplificación teórica del PCR

$$\text{Copias} = 2^n \times y$$

donde y = número inicial de copias

n = número de ciclos térmicos

Si se parte con 100 copias, ¿cuántas copias se hacen en 30 ciclos?

$$2^n \times y$$

$$= 2^{30} \times 100$$

$$= 1,073,741,824 \times 100$$

$$= 107,374,182,400$$

¿Porque no se alcanza esta eficiencia?

TYPICAL REACTION MIXTURE

25 or 50 μ ls in a micro Eppendorf (0.5ml) tube

COMPONENT	VOLUME	Final Concentration
10 X PCR Buffer	5μl	1X
10 X dNTPs (2mM)	5μl	200μM
Forward primer (10pmols/μl)	5μl	1 μ M (50pmols/50 μ l)
Reverse primer (10pmols/μl)	5μl	1 μ M (50pmols/50 μ l)
Genomic DNA template	2μl	1μg =10 ⁶ copias (DNA humano)
Thermostable polymerase (2U/μl)	0.5μl	1 unit
H₂O (to 50μl Final volume)	27.5μl	

Frecuencia de error en la polimerización por Taq Pol

Frecuencia de error en la polimerización por Taq Pol

- Taq Pol: 1-2 / 10^4 pb

Frecuencia de error en la polimerización por Taq Pol

- Taq Pol: 1-2 / 10^4 pb
- DNA Pol I de *E. coli*: 1 / 10^9 pb

Frecuencia de error en la polimerización por Taq Pol

- Taq Pol: 1-2 / 10^4 pb
- DNA Pol I de *E. coli*: 1 / 10^9 pb
- Cálculo de error: amplificación de *lacZ* (marcador), test *in vivo*.

Frecuencia de error en la polimerización por Taq Pol

- Taq Pol: 1-2 / 10^4 pb
- DNA Pol I de *E. coli*: 1 / 10^9 pb
- Cálculo de error: amplificación de *lacZ* (marcador), test *in vivo*.

- Moraleja: siempre secuenciar el producto si se requiere secuencia precisa.

Frecuencia de error en la polimerización por Taq Pol

- Taq Pol: $1-2 / 10^4$ pb
- DNA Pol I de *E. coli*: $1 / 10^9$ pb
- Cálculo de error: amplificación de *lacZ* (marcador), test *in vivo*.
- Moraleja: siempre secuenciar el producto si se requiere secuencia precisa.
- Errores aumentan con $>[Mg]$, $>[dNTPs]$

Optimización del PCR

Optimización del PCR

- General: componentes, ciclos, viales

Optimización del PCR

- General: componentes, ciclos, viales
- Partidores, diseño, cantidad

Optimización del PCR

- General: componentes, ciclos, viales
- Partidores, diseño, cantidad
- Volúmenes de reacción

Optimización del PCR

- General: componentes, ciclos, viales
- Partidores, diseño, cantidad
- Volúmenes de reacción
- Buffers, sales, dNTPs, $MgCl_2$

Optimización del PCR

- General: componentes, ciclos, viales
- Partidores, diseño, cantidad
- Volúmenes de reacción
- Buffers, sales, dNTPs, $MgCl_2$
- Programa: tiempos, $T^{\circ}s$.

Optimización del PCR

- General: componentes, ciclos, viales
- Partidores, diseño, cantidad
- Volúmenes de reacción
- Buffers, sales, dNTPs, $MgCl_2$
- Programa: tiempos, $T^{\circ}s$.
- Taq: tipo, cantidad

Principal problema del PCR

Sensibilidad.

- Contaminación de muestras con DNA no deseado.
- Siempre tener control negativo y positivo
- Usar reactivos y condiciones óptimas
- Sector dedicado, puntas con filtro, etc.



Primer design

Specificity

Primer specificity is at least partly dependent on primer length: there are many more unique 24 base oligos than there are 15 base pair oligos

Probability that a sequence of length n will occur randomly in a sequence of length m is:

$$P = (m - n + 1) \times (1/4)^n$$

Example: the mtDNA genome has about 20,000 bases, the probability of randomly finding sequences of length n is:

n	P_n
5	19.52
10	1.91×10^{-2}
15	1.86×10^{-5}

2. Length of primer determines specificity of binding to template DNA

*Probability of finding a given sequence "at random" decreases as the length of that sequence increases.

4 bases:

5'-GATC-3' Probability is $(1/4)^4 = 1/256$ (pretty common)
3'-CTAG-5'

20 bases:

5'-GATCCTAGATTTGATCGCGC-3' Probability is $(1/4)^{20} = 1/1 \times 10^{12}$ (pretty uncommon)
3'-CTAGGATCTAAACTAGCGCG-5'

Compared to size of E. coli genome (4.6×10^6 bp) or human genome (3×10^9 basepairs)??

Primer design

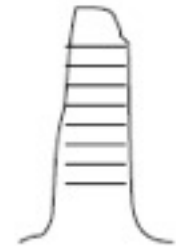
Hairpin:

- when the primer can form basepairs with itself (within its own sequence)

5'—GAGCCGTATGGGATACGGCAC—3'



Get a structure that looks like a hairpin:



- If PCR primer forms a hairpin, it won't bind to template-->reducing the ability to copy the template and exponentially amplify the DNA-->lower yield of desired product

Primer design

Complementary primer sequences

- primers need to be designed with absolutely no **intra-primer** homology beyond 3 base pairs. If a primer has such a region of self-homology, "snap back" can occur
- another related danger is **inter-primer** homology: partial homology in the middle regions of two primers can interfere with hybridization. If the homology should occur at the 3' end of either primer, primer dimer formation will occur

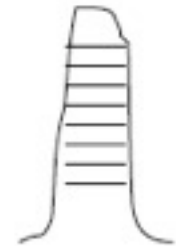
Hairpin:

- when the primer can form basepairs with itself (within its own sequence)

5'—GAGCCGTATGGGATACGGCAC—3'



Get a structure that looks like a hairpin:



- If PCR primer forms a hairpin, it won't bind to template-->reducing the ability to copy the template and exponentially amplify the DNA-->lower yield of desired product

Primer design

Complementary primer sequences

- primers need to be designed with absolutely no **intra-primer** homology beyond 3 base pairs. If a primer has such a region of self-homology, "snap back" can occur
- another related danger is **inter-primer** homology: partial homology in the middle regions of two primers can interfere with hybridization. If the homology should occur at the 3' end of either primer, primer dimer formation will occur

G/C content

- ideally a primer should have a near random mix of nucleotides, a 50% GC content
- there should be no PolyG or PolyC stretches that can promote non-specific annealing

Hairpin:

- when the primer can form basepairs with itself (within its own sequence)

5'—GAGCCGTATGGGATACGGGCAC—3'



Get a structure that looks like a hairpin:



- If PCR primer forms a hairpin, it won't bind to template-->reducing the ability to copy the template and exponentially amplify the DNA-->lower yield of desired product

Primer design

Complementary primer sequences

- primers need to be designed with absolutely no **intra-primer** homology beyond 3 base pairs. If a primer has such a region of self-homology, "snap back" can occur
- another related danger is **inter-primer** homology: partial homology in the middle regions of two primers can interfere with hybridization. If the homology should occur at the 3' end of either primer, primer dimer formation will occur

G/C content

- ideally a primer should have a near random mix of nucleotides, a 50% GC content
- there should be no PolyG or PolyC stretches that can promote non-specific annealing

3'-end sequence

- the 3' terminal position in PCR primers is essential for the control of mis-priming
- inclusion of a G or C residue at the 3' end of primers helps to ensure correct binding (stronger hydrogen bonding of G/C residues)

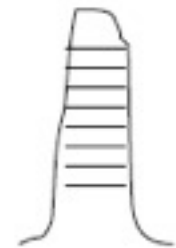
Hairpin:

- when the primer can form basepairs with itself (within its own sequence)

5'—GAGCCGTATGGGATACGGGCAC—3'



Get a structure that looks like a hairpin:



- If PCR primer forms a hairpin, it won't bind to template-->reducing the ability to copy the template and exponentially amplify the DNA-->lower yield of desired product

Primer design

Melting temperature (T_m)

- the goal should be to design a primer with an annealing temperature of at least 50°C
- the relationship between annealing temperature and melting temperature is one of the "Black Boxes" of PCR
- a general rule-of-thumb is to use an annealing temperature that is 5°C lower than the melting temperature
- the melting temperatures of oligos are most accurately calculated using nearest neighbor thermodynamic calculations with the formula:

$$T_m = H [S + R \ln (c/4)] - 273.15 \text{ } ^\circ\text{C} + 16.6 \log_{10} [K^+]$$

(H is the enthalpy, S is the entropy for helix formation, R is the molar gas constant and c is the concentration of primer)

- a good working approximation of this value can be calculated using the **Wallace** formula:

$$T_m = 4x (\#C + \#G) + 2x (\#A + \#T) \text{ } ^\circ\text{C}$$

- both of the primers should be designed such that they have similar melting temperatures. If primers are mismatched in terms of T_m , amplification will be less efficient or may not work: the primer with the higher T_m will mis-prime at lower temperatures; the primer with the lower T_m may not work at higher temperatures.

Diseño de partidores

- Al menos 15 bases
- Al menos 50% G/C
- Extremo 3' G o C
- Temperatura de annealing de 50-65 °C
- Temperaturas (T_m) más altas son mejores (más especificidad para el blanco deseado)
- Partidores forward y reverse debieran tener T_m s aproximadamente iguales

Problemas de los partidores

- partidores deben flanquear la secuencia de interés
- secuencias de partidores deben ser únicas
- partidores que reconocen secuencias múltiples darán productos múltiples
- Las secuencias repetidas pueden ser amplificadas, pero sólo si se usan regiones únicas que flanquean las sec. repetidas
- Partidores pueden tener secuencias internas de auto-annealing (horquillas o loops)
- Partidores pueden unirse entre ellos ("primer dimers")

Diseño de partidores en la Web

- Programas para diseño de partidores de PCR en la web:

- **Primer 3** MIT Whitehead Institute

http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi

- **Cassandra** Univ. of Southern California

http://www-hto.usc.edu/software/procrustes/cassandra/cass_frm.html

- **GeneFisher** by Folker Meyer & Chris Schleiermacher at Bielefeld University, Germany

<http://bibiserv.TechFak.Uni-Bielefeld.DE/genefisher/>

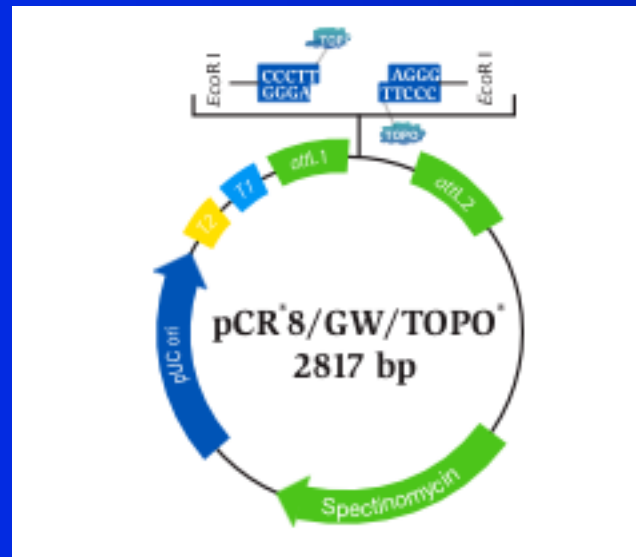
- **Xprimer**, Virtual Genome Center, Univ. Minnesota Medical School

<http://alces.med.umn.edu/rawprimer.html>

TA Cloning

- Taq tiene actividad de transferasa terminal; deja As extras en extremos 3'OH

GATAC.....GGTTCTA
ACTATG.....CCAAGA



Variantes de PCR

- Anidado (nested)
- Mismatch (mutación, sitio de restricción)

- Inverso
- RT-PCR