

# Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)



# Agenda

## Fundamentos de la PCR, parte I

## Fundamentos de la PCR, parte II

## Fundamentos de la PCR, parte III

## Fundamentos de biología molecular

### Definición de PCR

### Las fases de la PCR

Definición de PCR en tiempo real

PCR en tiempo real cualitativa

PCR en tiempo real cuantitativa

Definición de la temperatura de fusión

Análisis de la curva de melting

# Objetivos de aprendizaje

El objetivo general de este módulo es proporcionarle una idea de los métodos de PCR utilizados con el GeneXpert.

Al final del curso de formación, será capaz de:

- Mencionar los elementos que participan en el proceso de la PCR
- Explicar el proceso de la PCR y describir los pasos de la misma
- Definir “RT-PCR” (2 significados posibles)
- Describir las curvas de RT-PCR, definir el Ct
- Explicar cómo se lleva a cabo la cuantificación con la RT-PCR
- Definir la temperatura de fusión
- Explicar cómo el análisis de las curvas de melting permite identificar la resistencia microbiana

# Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) - I





# Fundamentos de biología molecular

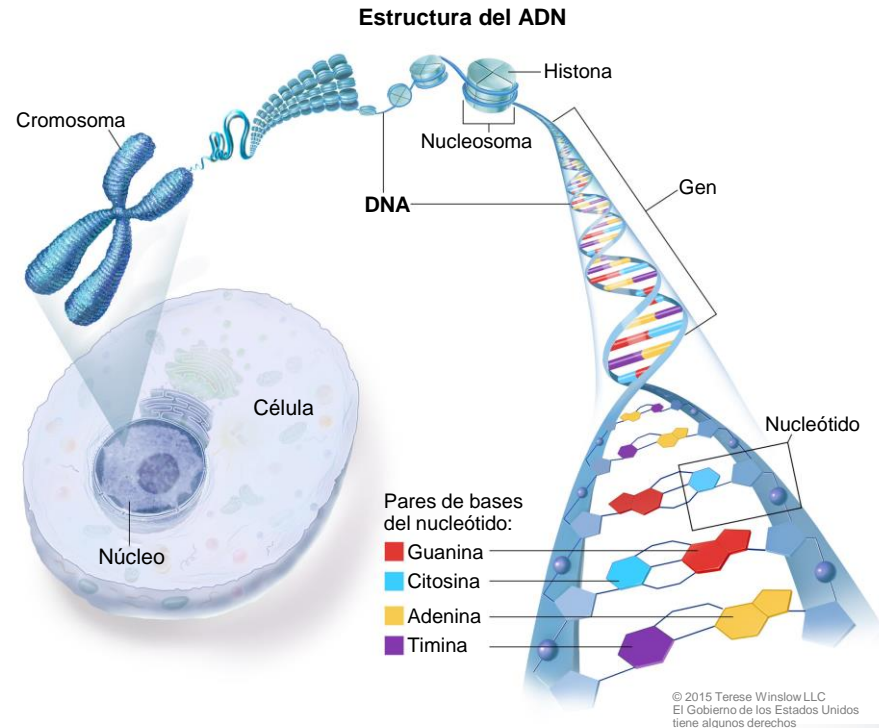
*Un recordatorio rápido*



# Fundamentos de biología molecular

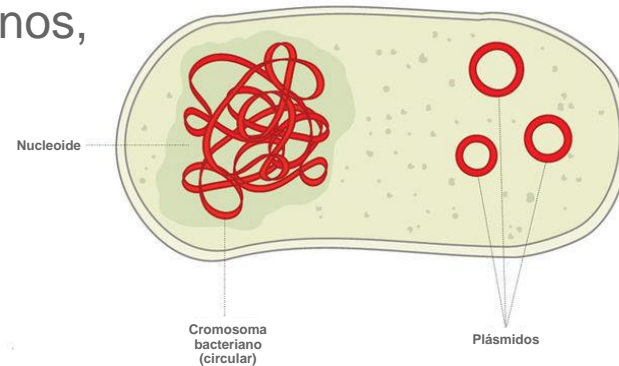
## Información genética contenida en el ADN

- La estructura del ADN es una doble hélice
- El ADN codifica la información genética (genes diferentes, información diferente)
- El ADN se organiza en una cadena larga llamada cromosomas
- En el núcleo de las células humanas hay 23 pares de cromosomas



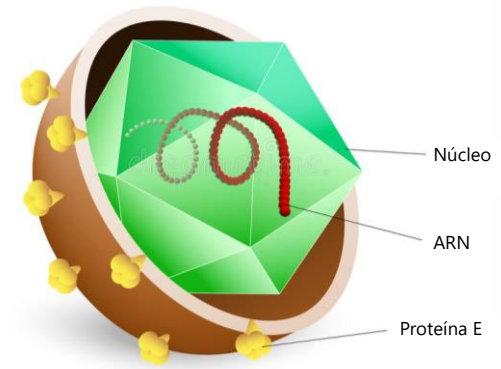
# Material genético en las bacterias

- La información genética de las bacterias se codifica en el ADN
- La mayor parte de las bacterias tienen un genoma que consta de una molécula individual de ADN circular, ubicada en una región llamada nucleoide (no rodeada por una membrana)
- Los elementos genéticos extracromosómicos, como los plásmidos y los bacteriófagos, determinan con frecuencia la resistencia a agentes antimicrobianos, la producción de factores de virulencia y otras funciones.



# Material genético en los virus

- Un virus es un pequeño parásito que no puede reproducirse por sí mismo. Depende de los mecanismos de la célula anfitriona.
- El genoma vírico se puede encontrar de diversas formas: ARN o ADN, mono o bicatenario, lineal circular o incluso segmentado.



Ej.: Virus de la hepatitis C



# Los elementos fundamentales del ADN

El ADN se compone de 4 nucleótidos

- A = Adenina
- T = Timina
- C = Citosina
- G = Guanina



Las 4 bases se unen para formar una secuencia (ADN monocatenario)

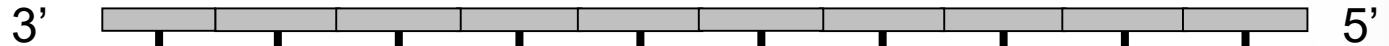


# Biología molecular básica

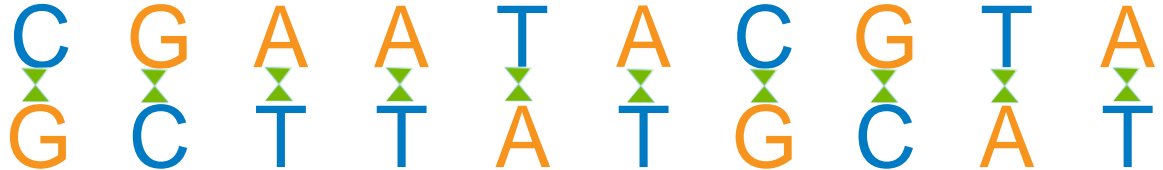
La mayor parte del ADN es bicatenario y se empareja de un modo singular:



Hebra no  
codificante



*Puentes de  
hidrógeno*

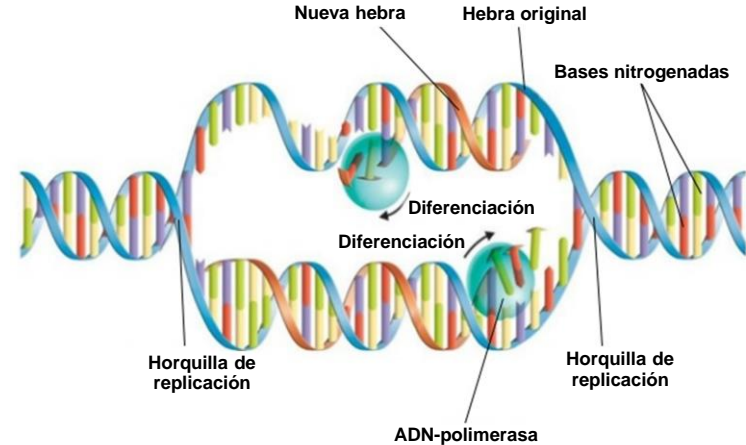


Hebra codificante



# Replicación del ADN

- El nuevo ADN lo fabrican enzimas denominadas **ADN polimerasas**. Sintetizan el ADN solo en la dirección 5' a 3'.
- Otra enzima denominada primasa fabrica un **cebador** de ARN para cebar la polimerasa.
- Una vez que se ha creado el cebador de ARN, la ADN-polimerasa lo “amplía”, añadiendo nucleótidos uno por uno, para formar una nueva hebra de ADN que es complementaria de la hebra no codificante.



Copyright Pearson Prentice Hall

# Definición de PCR



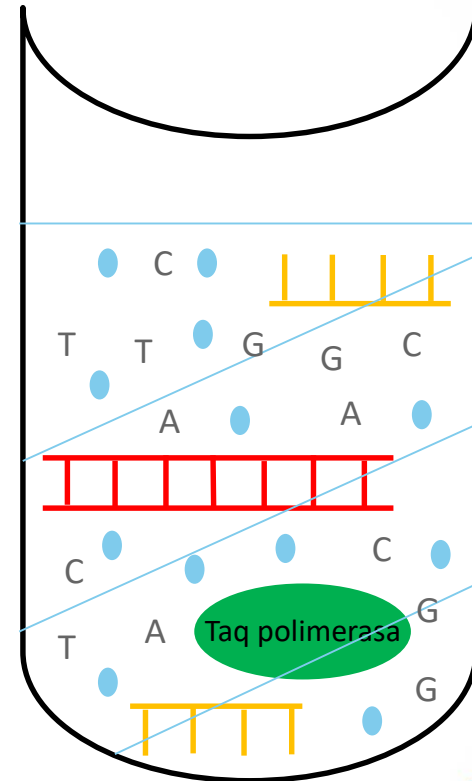
# ¿Qué es la PCR?

1. La PCR (**reacción en cadena de la polimerasa**) es una **reacción** en **cadena** que genera múltiples copias de una secuencia específica de ADN presente en la muestra.
2. La amplificación del ADN se produce a través de **ciclos térmicos repetidos**
3. El número de copias de la secuencia específica se **duplica** después de cada ciclo
4. Después de cuarenta ciclos, una copia individual se convierte en aproximadamente 2 billones de copias



# Componentes de la reacción de una PCR

- **Plantilla de ADN** (gen vírico, bacteriano o humano)
- **Desoxinucleósidos trifosfatos (dNTP)** (una combinación de los cuatro nucleótidos necesarios para fabricar nuevas hebras de ADN: A, T, C, G)
- **Cebadores** (oligonucleótidos de unos 20 nucleótidos, que se hibridarán con el ADN diana)
- **Polimerasa** (Taq polimerasa termoestable natural que puede funcionar a una temperatura óptima de unos 70 °C)
- **Amortiguador** (Mg<sup>2+</sup>, Tris-HCl, Tritón: proporciona las condiciones óptimas para que trabaje la polimerasa)

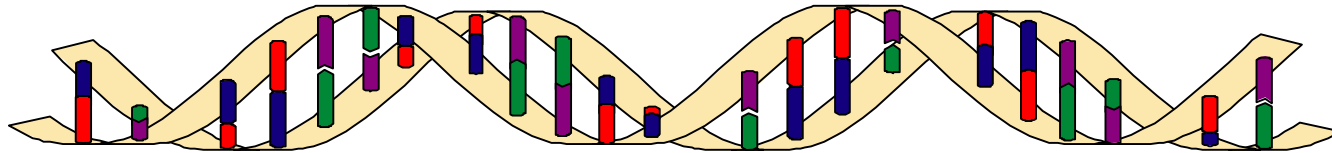


# Las fases de la PCR



# La primera fase de un ciclo de PCR: **desnaturalización**

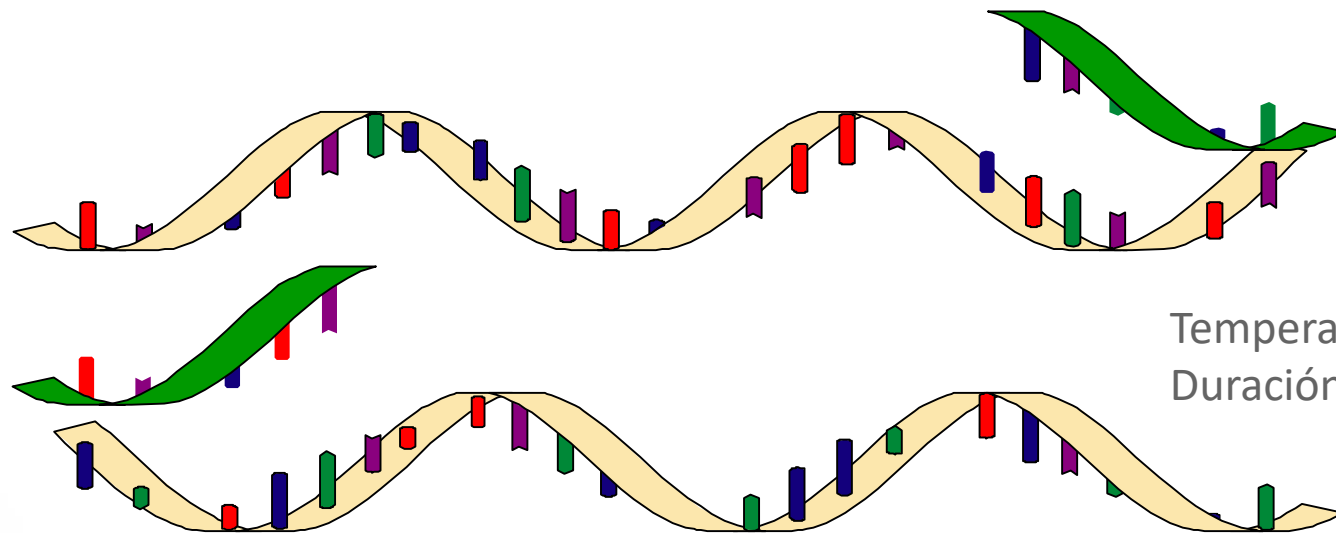
separación de las hebras de ADN



- 90-95 °C
- 20-30 s

# La segunda fase de un ciclo de PCR: **hibridación**

unión de cebador específico



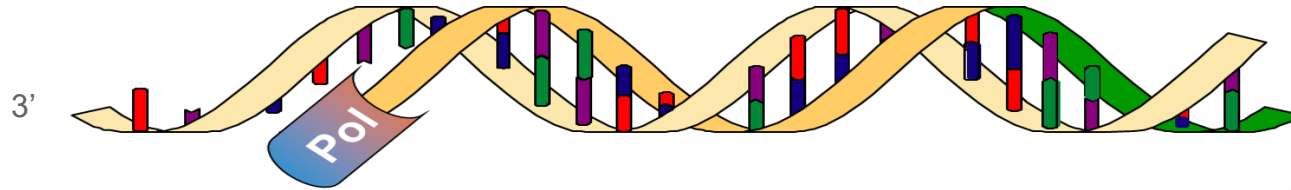
Cebador inverso 5'

Temperatura: 40-65 °C  
Duración: 20-40 segundos

Cebador directo 5'

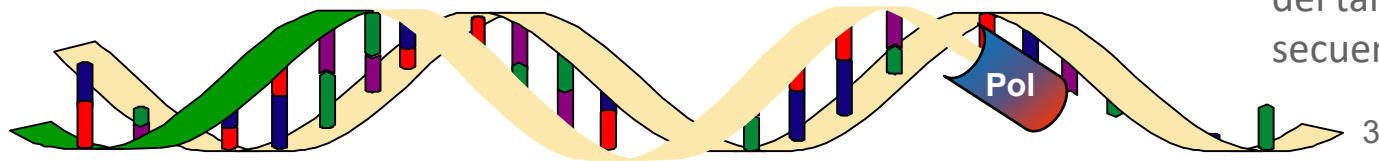
# La tercera fase de un ciclo de PCR: **extensión**

## Síntesis de la hebra de ADN



- 60-75 °C

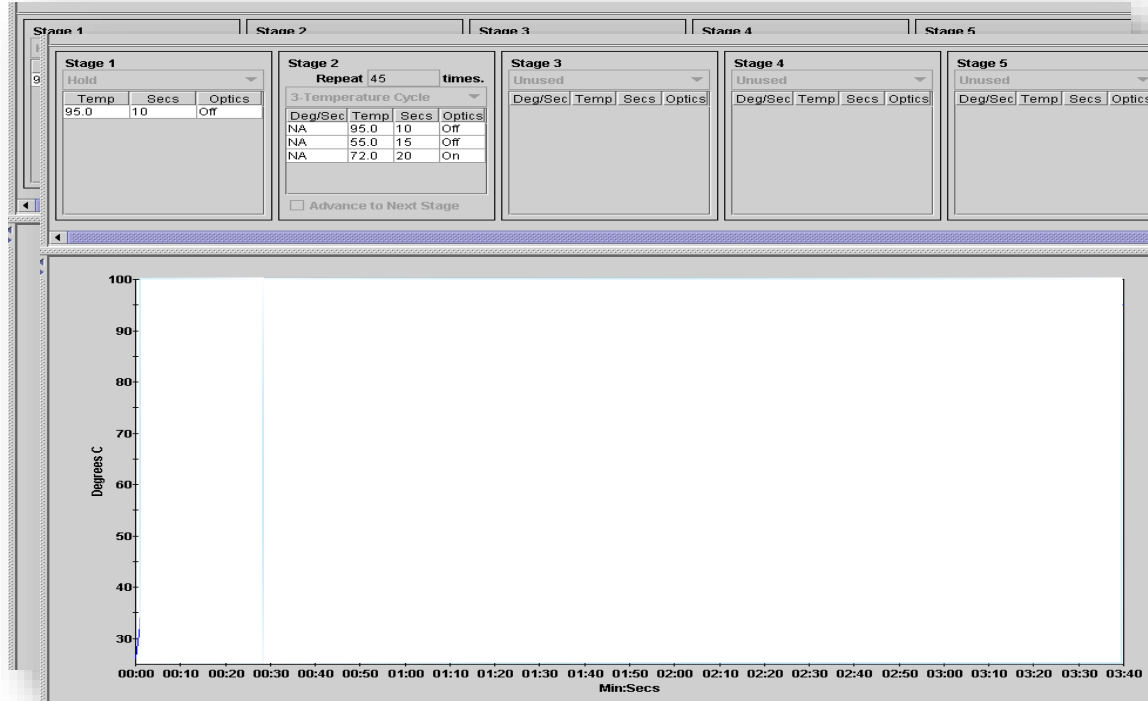
La duración depende del tamaño de secuencia a amplificar



Cebador directo 5'



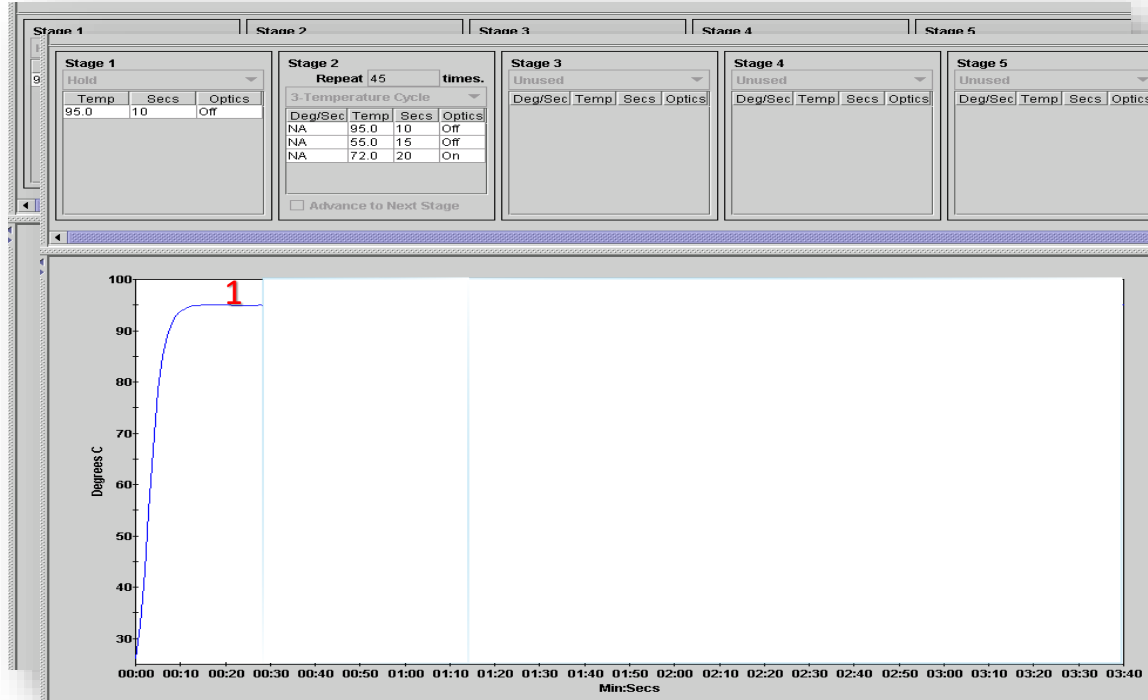
# Perfil térmico de los ciclos de la PCR



## 1. Desnaturalización

Nota: una PCR habitualmente consta de 30 a 40 ciclos

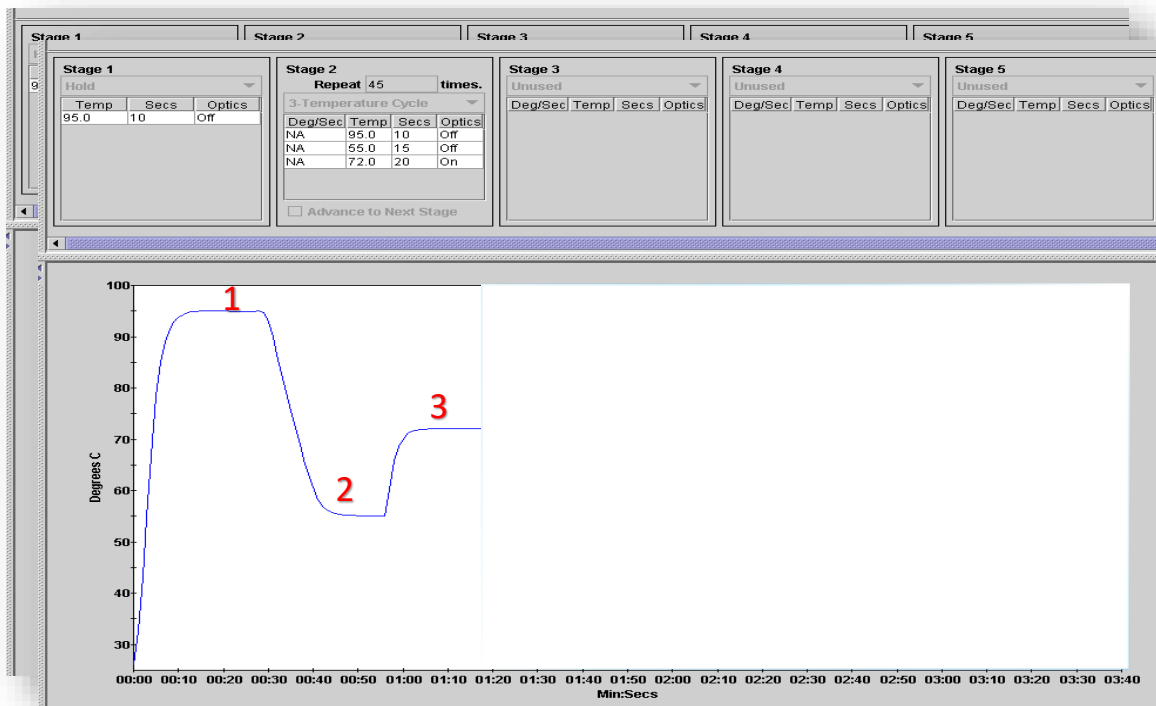
# Perfil térmico de los ciclos de la PCR



2. Hibridación

Nota: una PCR habitualmente consta de 30 a 40 ciclos

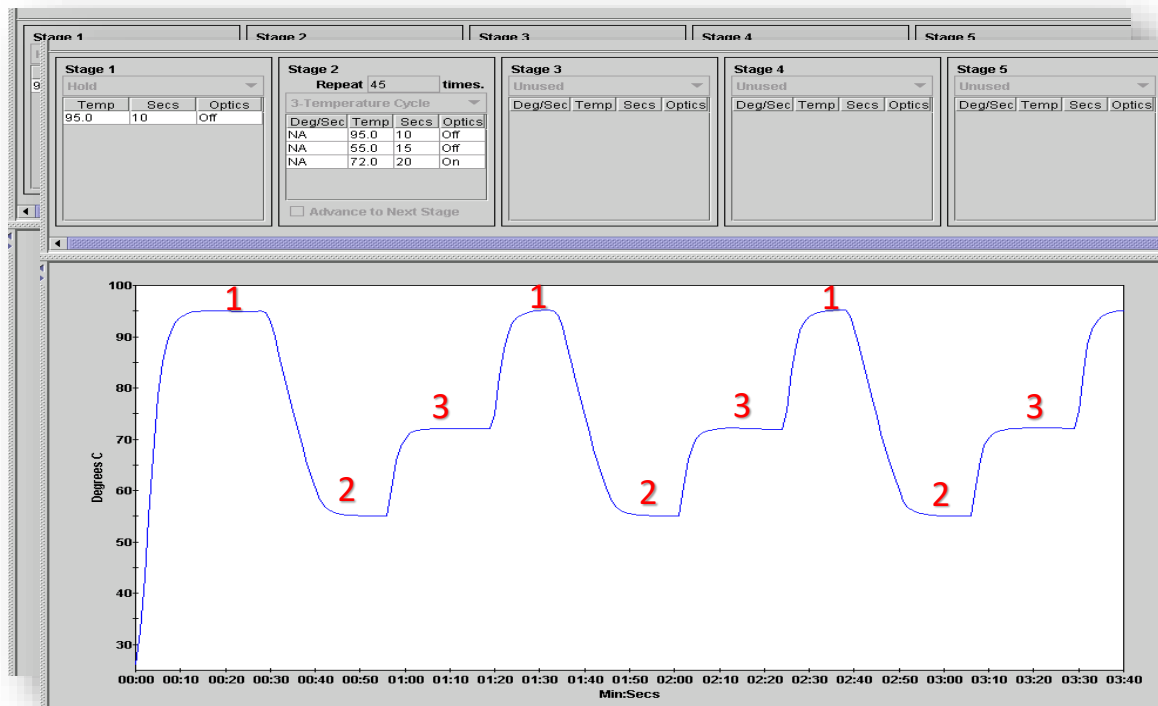
# Perfil térmico de los ciclos de la PCR



3. Extensión

Nota: una PCR habitualmente consta de 30 a 40 ciclos

# Perfil térmico de los ciclos de la PCR



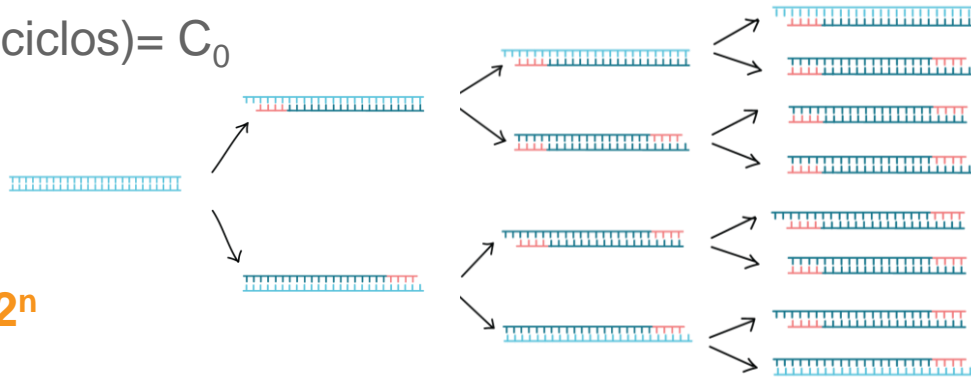
1. Desnaturalización
2. Hibridación
3. Extensión

Nota: una PCR habitualmente consta de 30 a 40 ciclos

# Número de copias de ADN obtenidas por PCR

– **En teoría**, el número de copias de ADN diana se duplica con cada ciclo, lo que significa un factor de eficiencia de la PCR de  $E = 2$

- Concentración de partida (0 ciclos) =  $C_0$
- Después de un ciclo:  $C_0 \times 2$
- Después de 2 ciclos:  $C_0 \times 4$
- Después de 3 ciclos:  $C_0 \times 8$
- **Después de n ciclos:  $C_0 \times 2^n$**



– **En la realidad**, esta tasa de replicación no se puede mantener indefinidamente, y la duplicación se convierte en menos de una duplicación, posteriormente en ninguna replicación



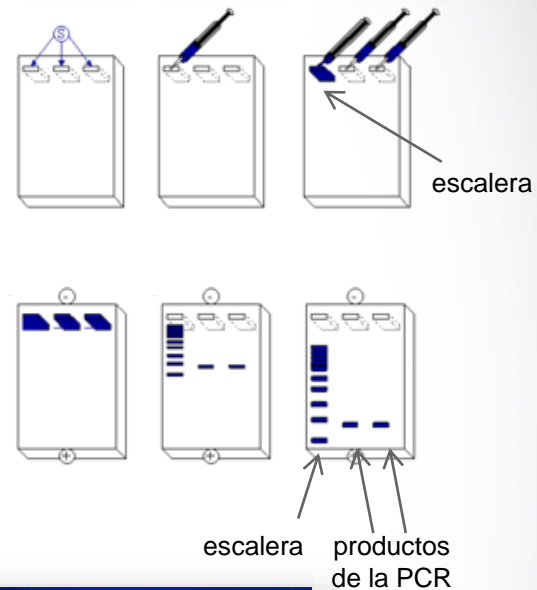
# Factores que influyen en la eficacia de la PCR

- Diseño de la prueba (Fabricante)
  - Diseño del cebador/sonda
  - Tipo de ADN-polimerasa
  - Calidad de los reactivos
  - Mezcla principal
  - Condiciones de los ciclos de la PCR: temperaturas y duración de las fases
- Previos al análisis (Técnico de laboratorio)
  - Calidad de los **reactivos**, como consecuencia de las **condiciones de transporte y conservación**
  - Calidad de la **muestra**: presencia de **inhibidores** de la PCR

# Detección de productos en el punto final

En la PCR clásica, la detección se realiza en el punto final (final de la PCR)

1. Una mezcla de fragmentos de tamaños conocidos (escalera) se carga en un gel de agarosa, como referencia, para calcular el tamaño de los productos de la PCR.
2. El producto de la PCR también se carga en el gel
3. Se aplica un campo eléctrico, de modo que las moléculas cargadas negativamente migren hacia el polo positivo
4. El producto de la PCR migra en función del tamaño
5. El ADN se tiñe utilizando bromuro de etidio, visible bajo una lámpara de rayos UV
6. Si la diana que estamos buscando está presente en la muestra, está presente un producto de la PCR del tamaño previsto





Muchas gracias.

[www.Cepheid.com](http://www.Cepheid.com)

