



FACULTAD REGIONAL ROSARIO

CATEDRA BIOTECNOLOGIA

PROFESOR: Ing. Eduardo Santambrosio

JTP: Ing. Marta Ortega

AUX 1ª : Ing. Pablo Garibaldi

PCR (Polymerase chain reaction)

Reacción en cadena de
la polimerasa

Definición

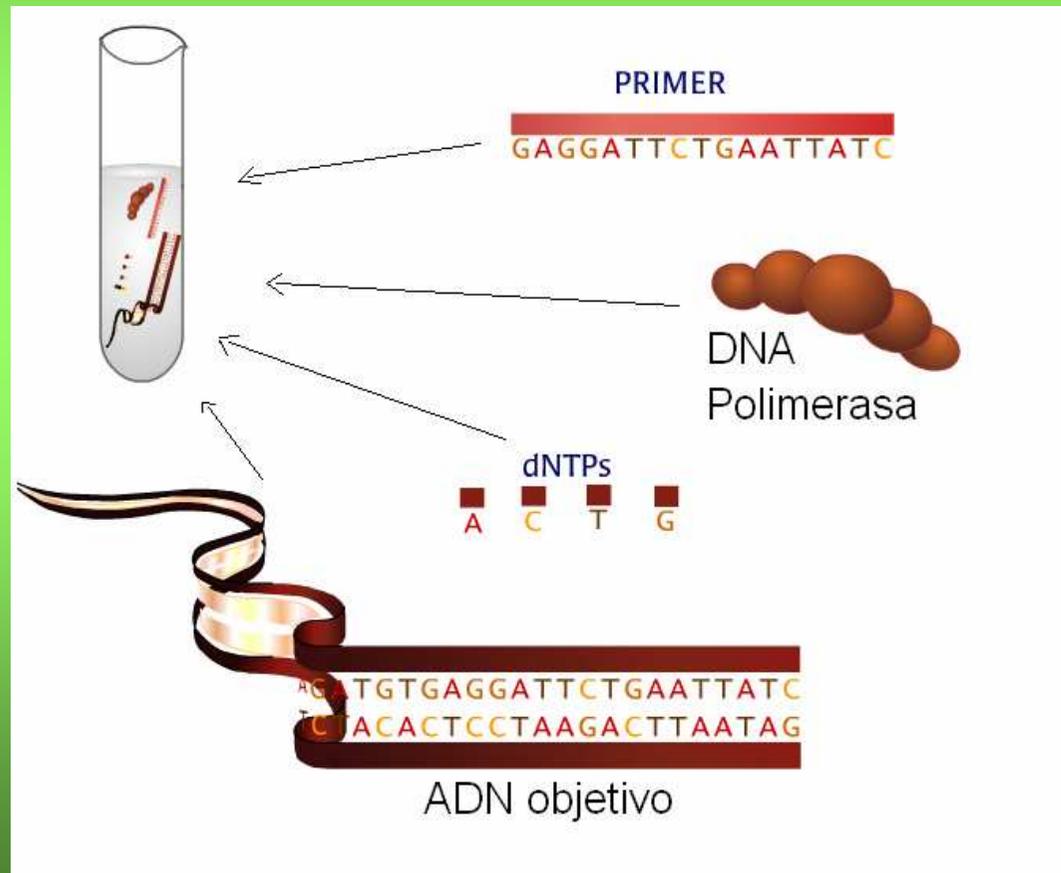
La reacción en cadena de la polimerasa, ya más conocida como PCR, es una técnica que permite replicar entre cientos de miles y millones de veces, en el transcurrir de pocas horas e in vitro, pequeñas cantidades de ADN.

Etapas de la PCR

- 1- Desnaturalización del ADN doble cadena.
- 2- Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras.
- 3- Extensión del cebador por actuación de la DNA polimerasa.

Para que el proceso se lleve a cabo en el tubo de reacción debemos encontrar:

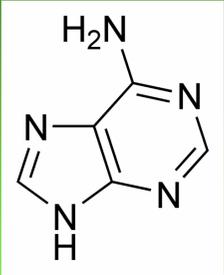
- a- ADN objetivo (el que se quiere amplificar)
- b- ADN Polimerasa
- c- Deoxinucleótidos
- d- Primers



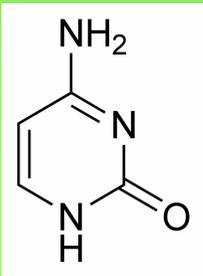
Para replicar el ADN, la técnica PCR hizo uso, en un principio, de la ADN polimerasa de la bacteria *Escherichia coli*. Pero esta enzima resulta desactivada debido a la alta temperatura requerida para desnaturalizarla doble cadena del ADN, por lo cual debía agregarse enzima fresca al comenzar el tercer paso de cada ciclo. Este inconveniente fue solucionado de manera ingeniosa cuando se la reemplazó por su equivalente de la bacteria "termófila" *Thermus aquaticus*. En efecto, la ADN polimerasa de este microorganismo, denominada Taq polimerasa, actúa eficientemente entre los 75° C y los 80° C y resiste más de dos horas a 93° C. De esta manera es posible mezclar todos los componentes de la PCR al comenzar el primer ciclo y la reacción en cadena puede llevarse a cabo mediante equipos automatizados que realizarán los ciclos térmicos programados.

Los **primers**, también conocidos como “**iniciadores**” o “**cebadores**”, son cadenas cortas de nucleótidos (oligonucleótidos). Cada uno de ellos debe ser complementario del tramo al que tienen que unirse en las cadenas separadas del ADN objetivo. Es importante aclarar que los primers no deben ser complementarios entre sí para evitar la propia replicación.

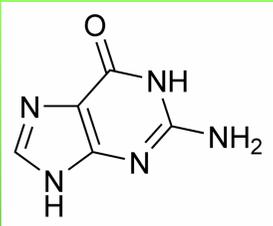
Bases nitrogenadas



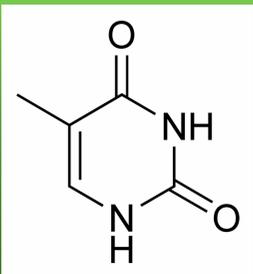
Adenina



Citosina



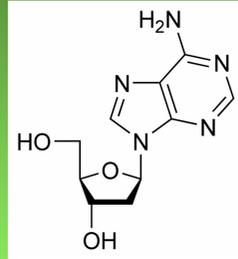
Guanina



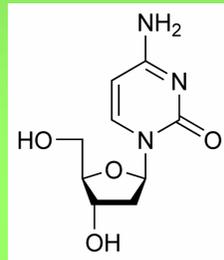
Timina

Deoxinucleósidos

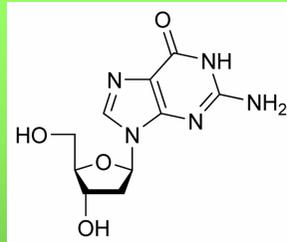
Base + Azúcar



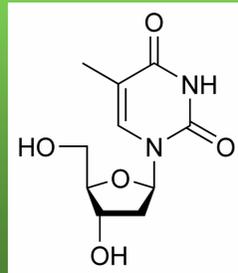
Deoxiadenosina



Deoxicitidina



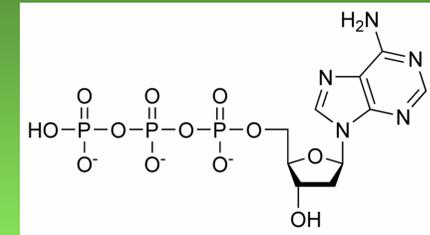
Deoxiguanosina



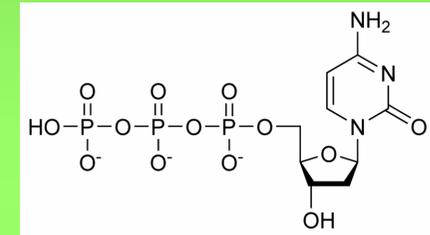
Deoxitidimina

Deoxinucleótidos (dNPTs)

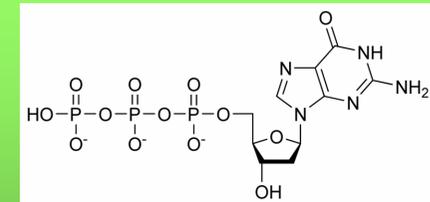
Base + Azúcar + Fosfato



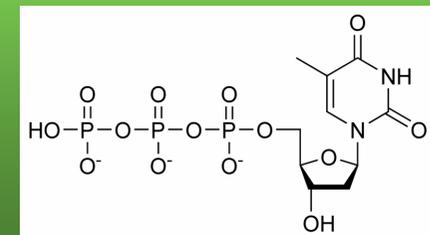
Deoxiadenosina trifosfato



Deoxicitidina trifosfato

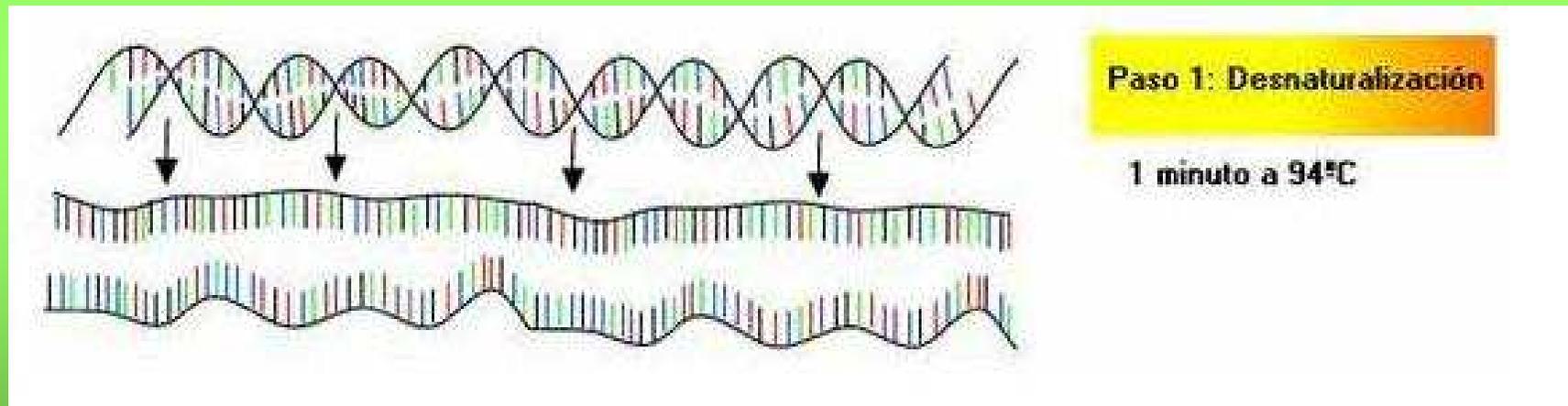


Deoxiguanosina trifosfato

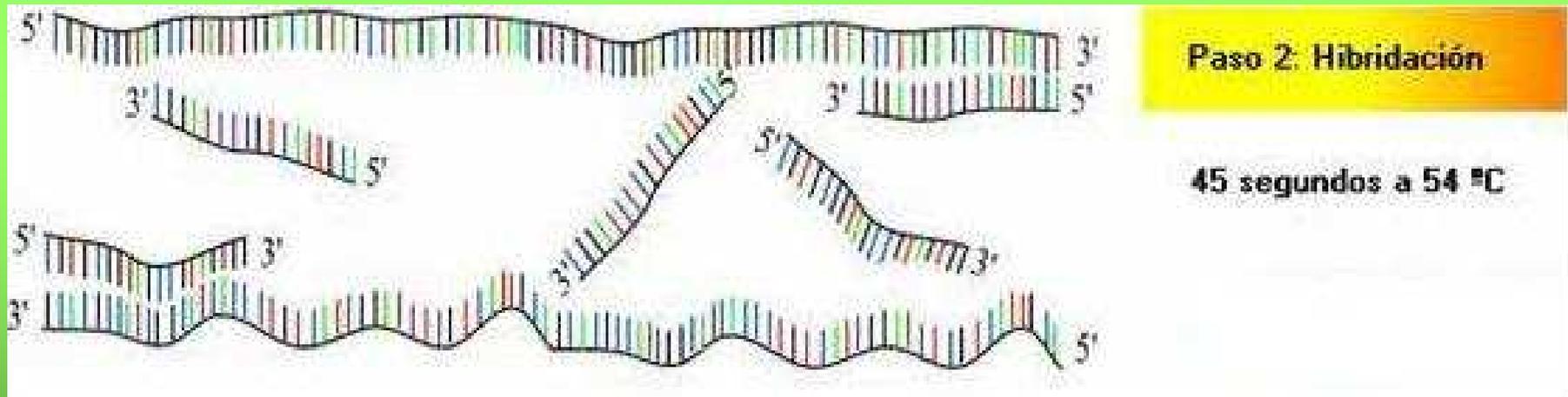


Deoxitidimina trifosfato

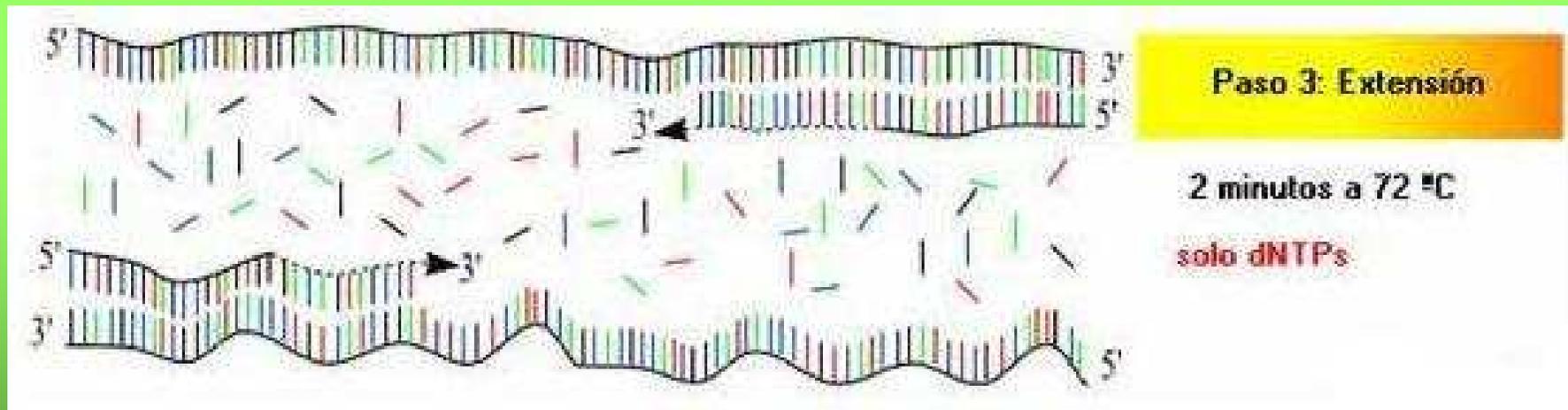
En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya.

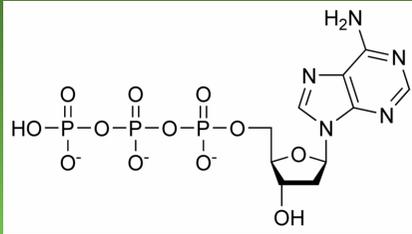


En el segundo paso (hibridación) los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza gracias a la bajada de la temperatura (50-65° C)

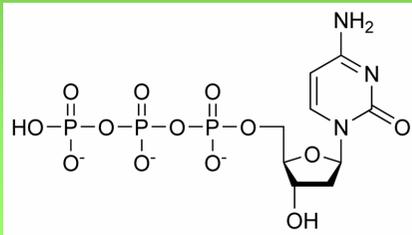


En la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección $5' \rightarrow 3'$ mediante la enzima DNA polimerasa, la cual incorpora los deoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde.

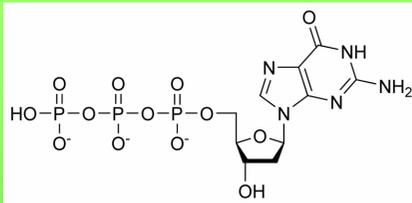




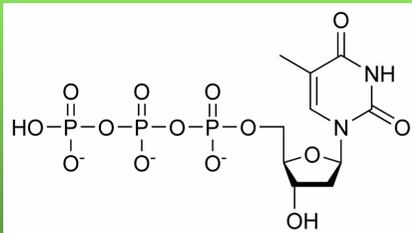
Deoxiadenosina trifosfato



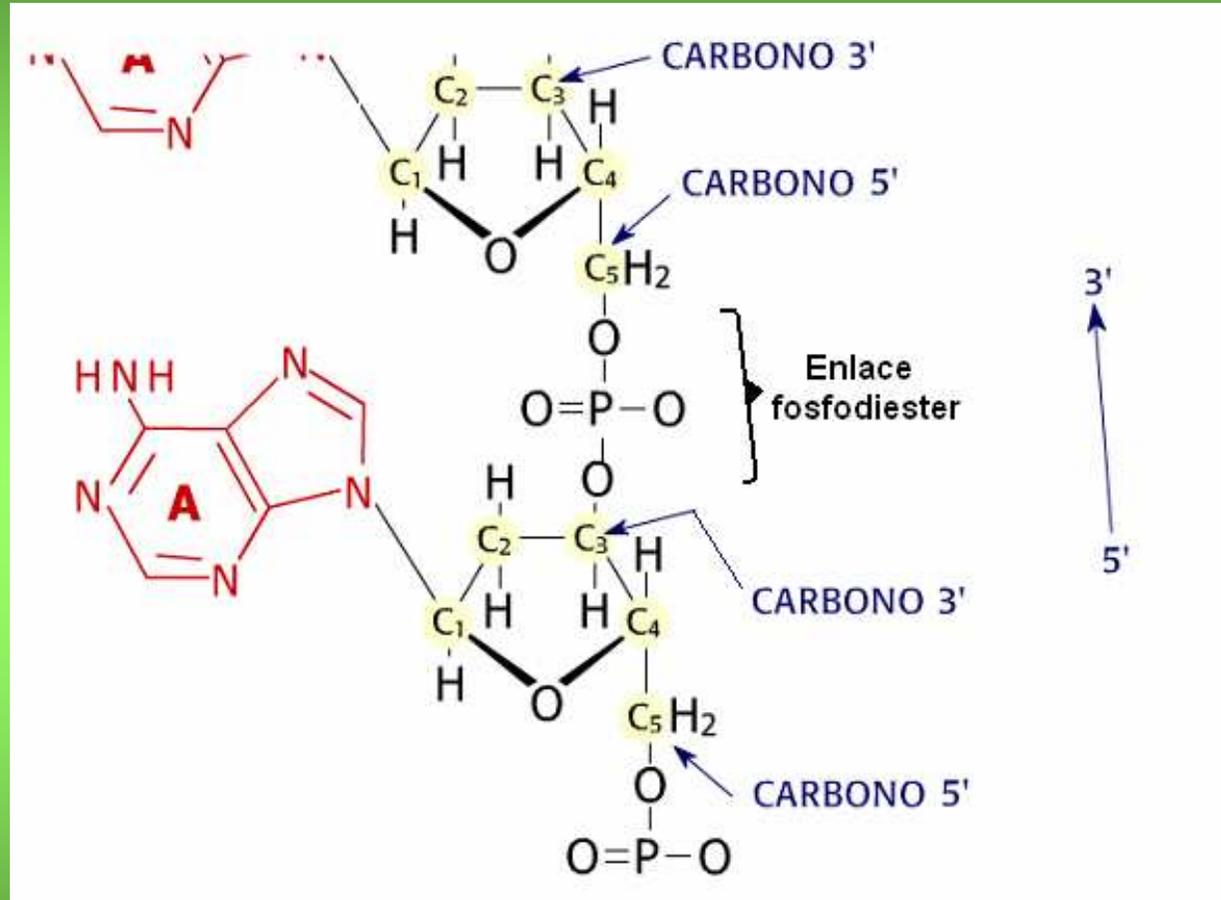
Deoxicitidina trifosfato



Deoxiguanosina trifosfato



Deoxitimidina trifosfato



Al cabo del primer ciclo de tres reacciones (desnaturalización, apareamiento, extensión) el tramo de ADN elegido se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. El resultado de la aplicación de numerosos ciclos "en cadena" da lugar a la amplificación geométrica del segmento de ADN delimitado por los *primers*.

Este proceso se lleva a cabo en un equipo llamado termociclador. Este aparato realiza los ciclos en los tiempos y temperaturas programadas de forma exacta.



POLYMERASE CHAIN REACTION



Aplicaciones

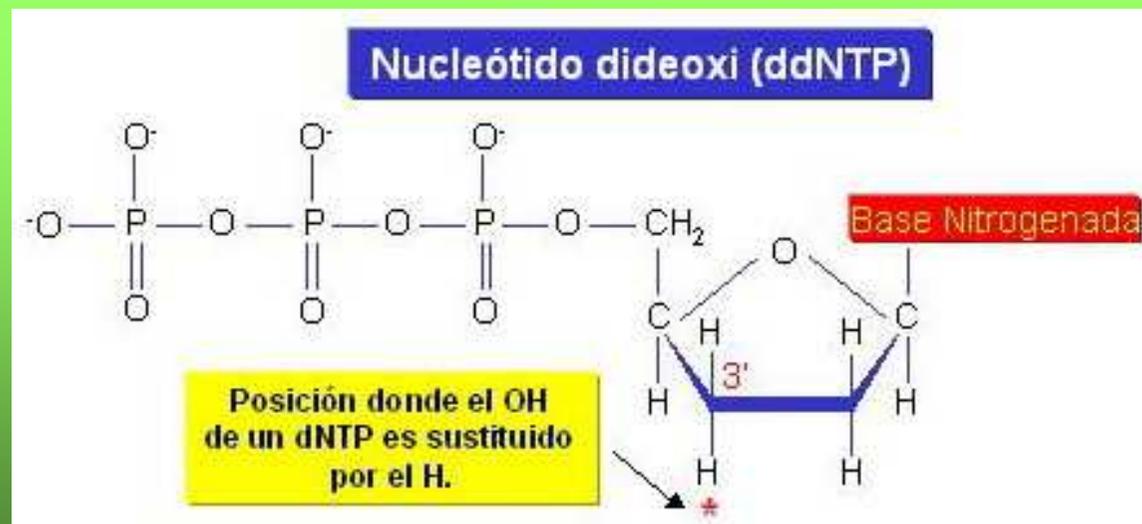
- Biotecnología y Ciencias agropecuarias
- Secuenciación de ADN
- Estudios de evolución molecular
- Diagnóstico de enfermedades hereditarias
- Diagnóstico de enfermedades oncológicas
- Diagnóstico prenatal

Secuenciación de ADN

Es una técnica propia de la Ingeniería Genética que consiste en la determinación de la secuencia de nucleótidos de un ADN.

Secuenciación de ADN

El método dideoxi de secuenciación ideado por Sanger está basado en el empleo de dideoxinucleótidos, que son nucleótidos que carecen de uno de los grupos hidroxilo de la pentosa, de manera que cuando uno de estos nucleótidos se incorpora a la cadena de ADN en crecimiento, la misma no puede continuar elongándose ya que la ADN polimerasa necesita un extremo 3' OH para añadir el siguiente nucleótido.



Secuenciación de ADN

