

# **METODOLOGIA DEL PCR**

**Lic. Jorge Mato Luis**

**Laboratorio de Genética Molecular  
Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”**



# Desnaturalización del DNA

5' A G G T T A G T G G A C C C T T G A T 3'

| | | | | | | | | | | | | | | |

3' T C C A A T C A C C T C C C T T C T A 5'

Denaturalización



Renaturalización

5' A G G T T A G T G G A C C C T T G A T 3'

3' T C C A A T C A C C T C C C T T C T A 5'

# Formación de moléculas híbridas de DNA

5' AGGTTAGTGGACCCTTGAT 3'  
3' TCCAATCACCTGGGAACTA 5'



5' AGGTCAGTGGACCCTTGAT 3'  
3' TCCAGTCACCTGGGAACTA 5'



95°C



**Enfriamiento lento**

T  
AGGT AGTGGACCCTTGAT  
TCCA TCACCTGGGAACTA  
G

**HIBRIDOS**

C  
AGGT AGTGGACCCTTGAT  
TCCA TCACCTGGGAACTA  
A

AGGTTAGTGGACCCTTGAT  
TCCAATCACCTGGGAACTA

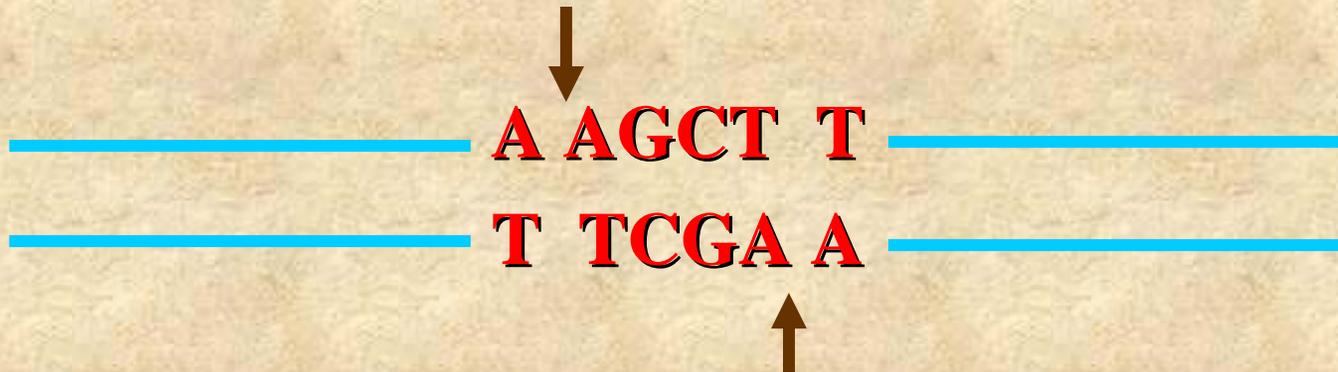
**NATIVOS**

AGGTCAGTGGACCCTTGAT  
TCCAGTCACCTGGGAACTA

# Enzimas de restricción

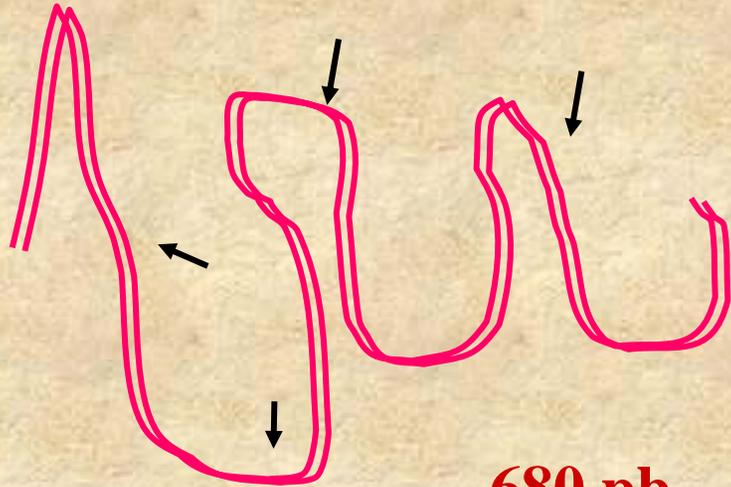
**Son enzimas que cortan el DNA de doble cadena mediante el reconocimiento de una secuencia específica.**

Hind III

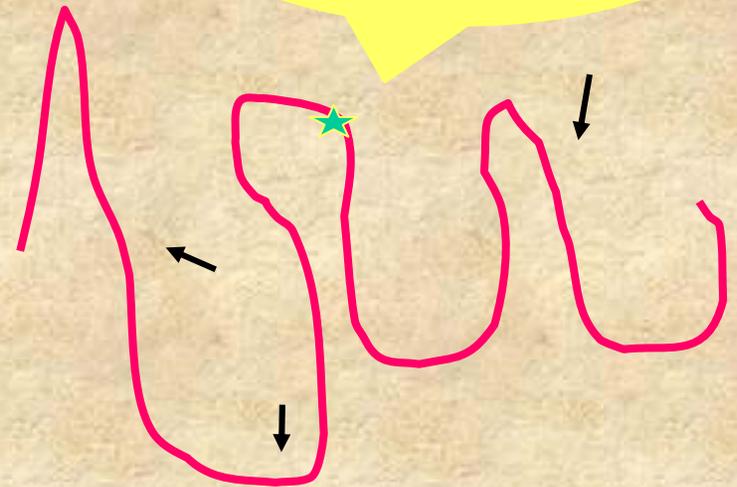


# Enzimas de restricción

Una mutación que elimina un sitio de corte



680 pb



100 pb 70 pb 200 pb 250 pb 150 pb



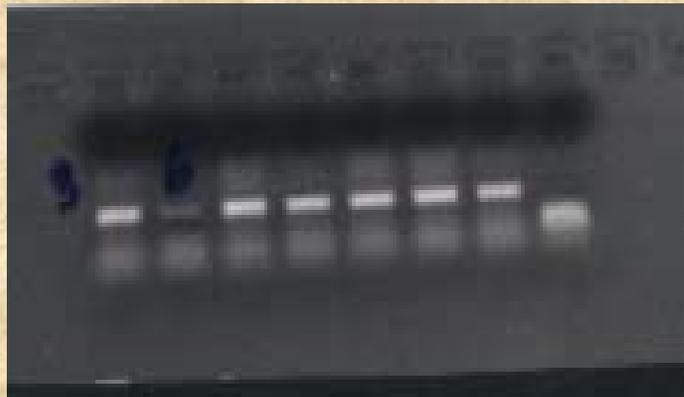
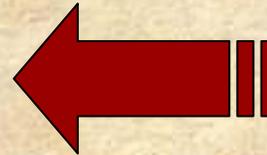
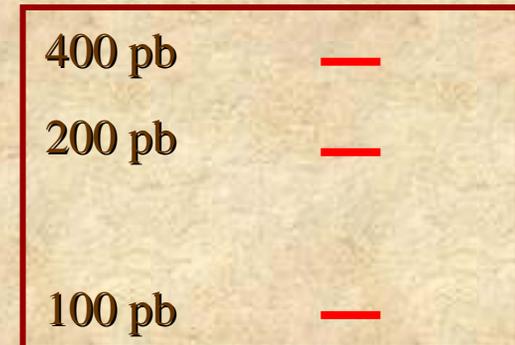
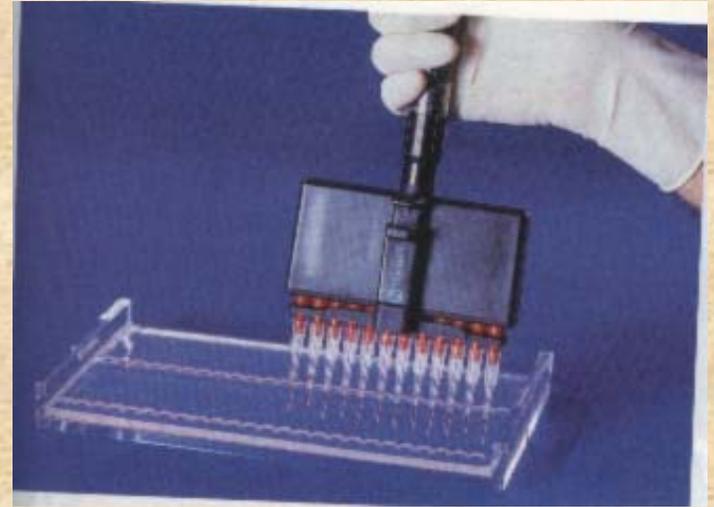
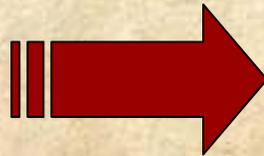
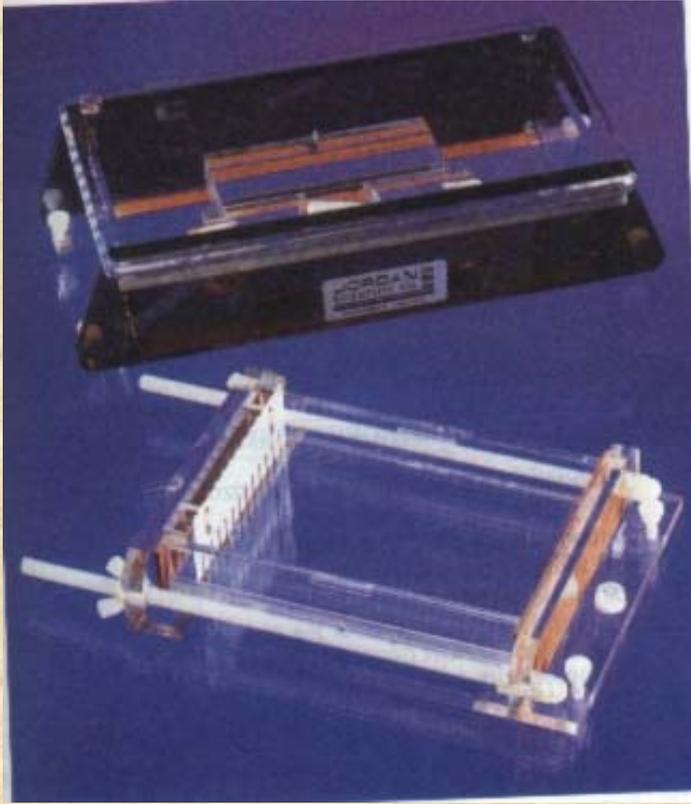
100 pb 70 pb 450 pb 150 pb

# **Formas de diferenciar a los fragmentos de DNA entre sí**

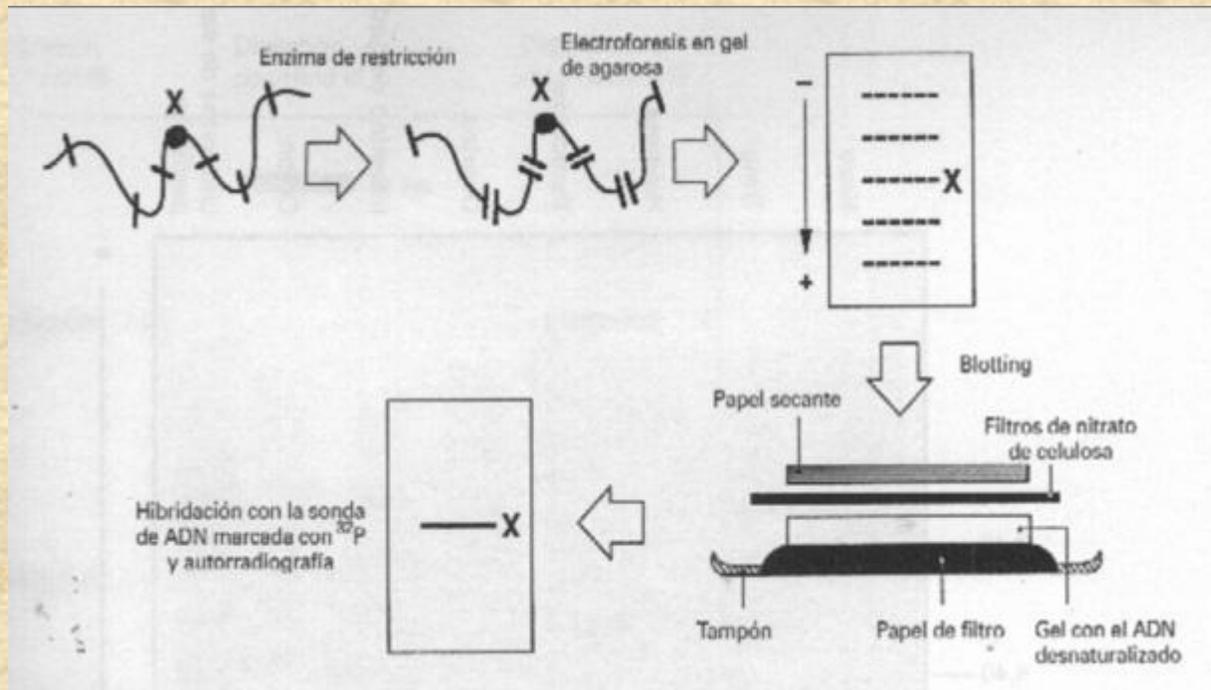
## **A partir de diferencias en sus tamaños**

- Separación de los fragmentos de acuerdo a su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida
- Los fragmentos migran del polo negativo al positivo con velocidad inversamente proporcional a su tamaño

# Sistema electroforesis



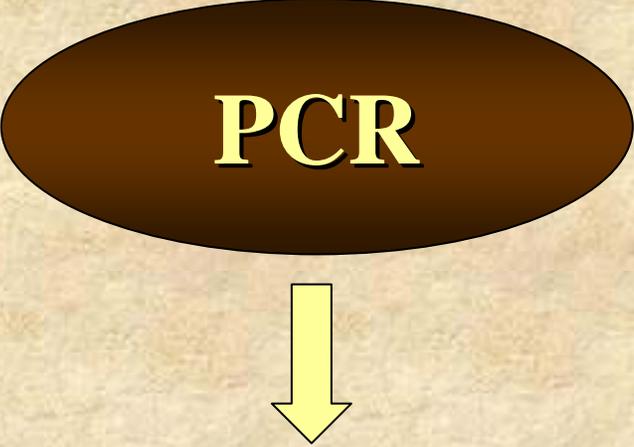
# Hibridación de ácidos nucleicos (Southern Blot)



# **Limitaciones del Southern Blot**

- **Requiere cantidades apreciables de DNA (alrededor de un microgramo)**
- **Exige el empleo de DNA de alta integridad y alto grado de purificación**
- **Costo relativamente alto**
- **Tiempo prolongado del análisis (aproximadamente una semana)**
- **Poca flexibilidad tecnológica**

**PCR**



**REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

**Del Inglés: “*Polymerase Chain Reaction*”**

**Desarrollada por Mullis en 1985 y  
automatizada a partir de 1988 gracias  
al empleo de la Taq DNA Polimerasa**

# Tecnología del PCR



Reproducción (amplificación) en ciclos consecutivos de un fragmento del DNA cuya longitud está definida por la ubicación de los cebadores (*primers*) utilizados

TGGCC

ACCGGTTAAGGGAATTCCGGCGCG

TGGCCAATTCCCTTAAGGCCGCGC

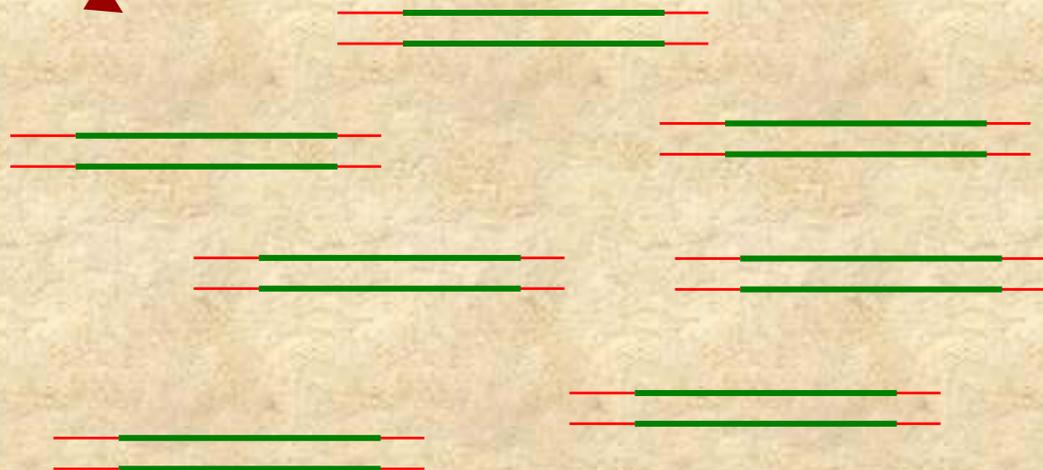
CGCG

# Tecnología del PCR

Reproducción (amplificación) en ciclos consecutivos de un fragmento del DNA cuya longitud está definida por la ubicación de los cebadores (*primers*) utilizados



PCR



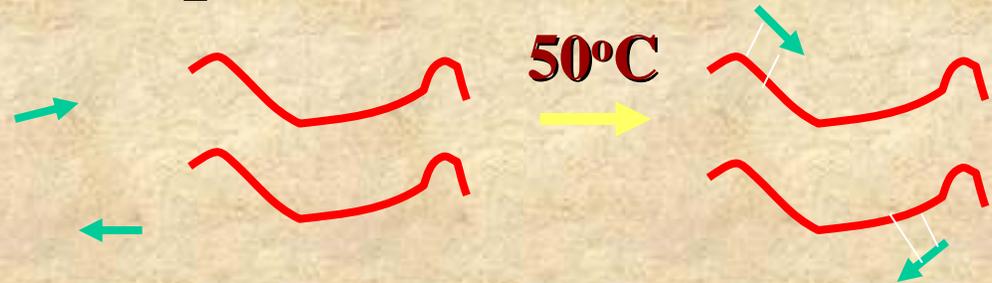
# Tecnología del PCR

➤ Cada ciclo consiste en tres etapas:

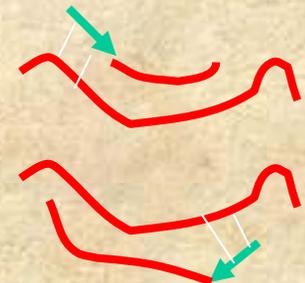
➤ Denaturalización

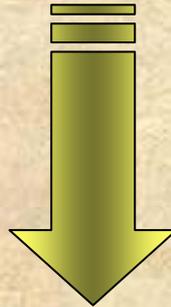


➤ Hibridación de los *primers*  
(*Annealing*)



➤ Polimerización (*extension*)





**TERMOCICLADORES**

# **Tecnología del PCR**

## **RESUMEN**

**El PCR fue concebido como una tecnología dirigida a:**

- ✓ **Multiplicar el número de moléculas de DNA disponibles para el trabajo**
- ✓ **Eliminar del material a utilizar las secuencias que no interesan en el análisis**

# **Tecnología del PCR**

## **Principales ventajas**

- **Alta sensibilidad (hasta una copia del DNA genómico)**
- **Permite el empleo de DNA parcialmente degradado**
- **Alta especificidad al eliminar el resto del DNA que no es de interés**
- **Aumenta en el orden de al menos  $10^6$  veces la secuencia de DNA motivo de estudio**
- **Alta flexibilidad tecnológica**
- **Costo relativamente bajo**

# Métodos directos de diagnóstico

## 1. Detección de mutaciones

- **Detección de reordenamientos cromosómicos**
- **RFLP**
- **PCR con primers específicos de alelos (ARMS-ASO-SSP)**
- **Secuenciación del DNA**

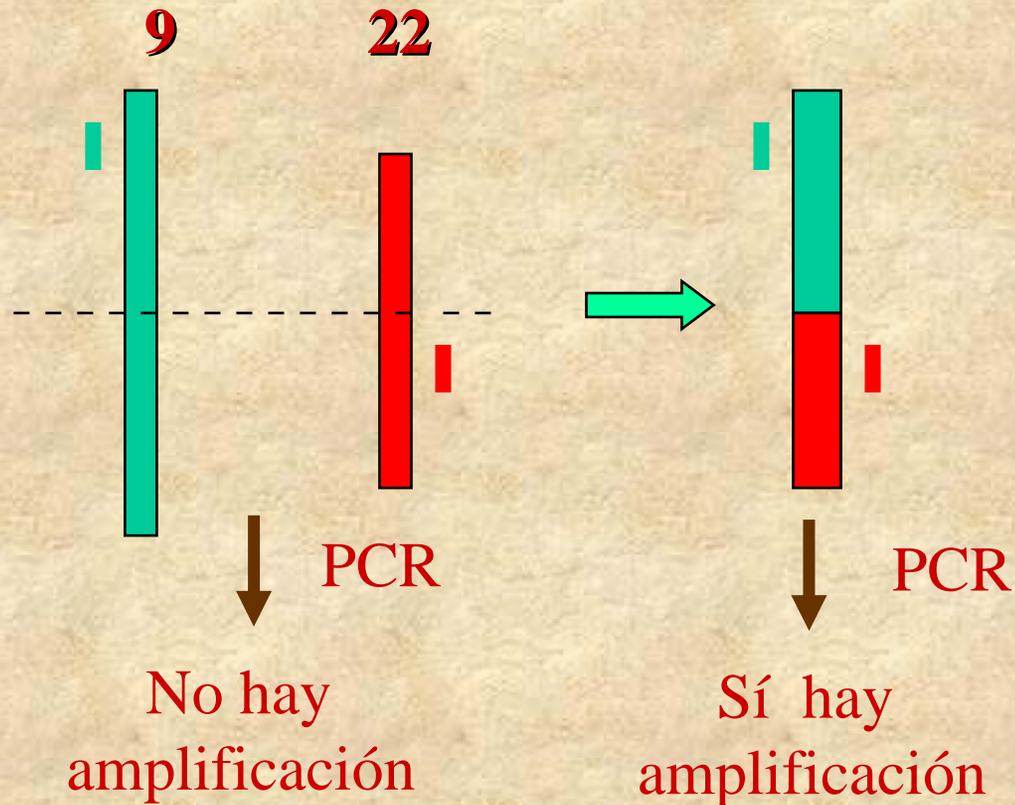
## 2. Localización de mutaciones

- **Heteroduplex**
- **SSCP**
- **DGGE**

# **Métodos para la detección de mutaciones**

# PCR en la detección de translocaciones cromosómicas recíprocas

## Cromosomas

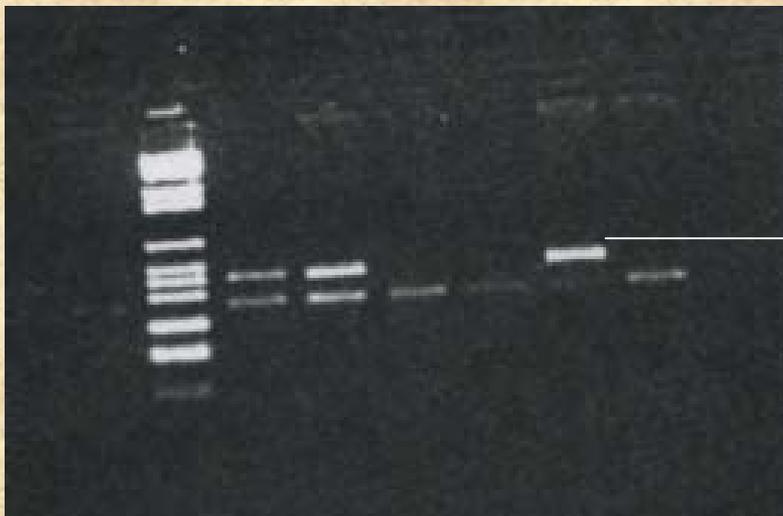
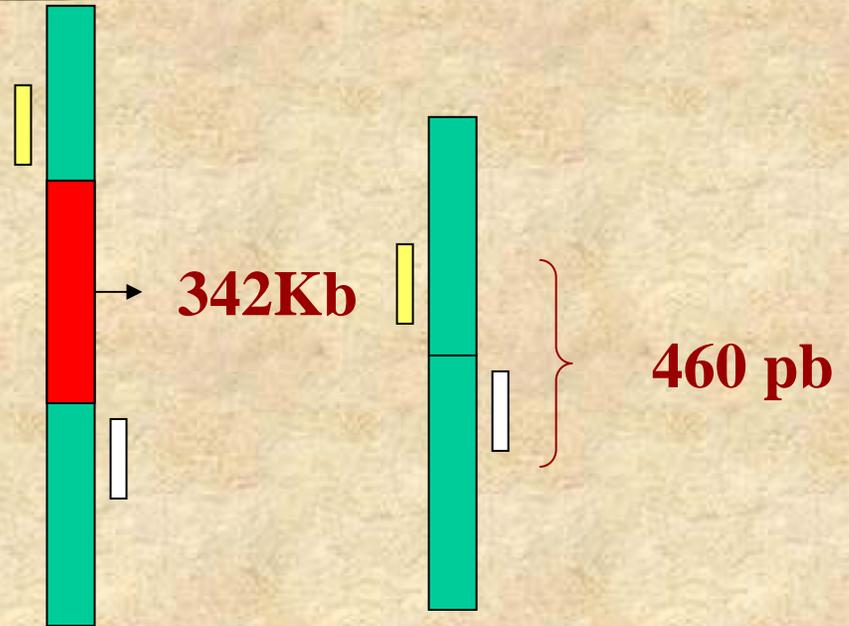


Ejemplos:

Translocaciones en hemopatías malignas

# PCR en la detección de una deleción ( gen de la conexina 30)

**Deleción de 342 Kb  
 $\Delta(\text{GJB6-D13S1830})$**



# PCR-RFLP

**Polimorfismo en la Longitud de los fragmentos de restricción**

**Del inglés:**

***Restriction Fragment Length  
Polymorphism***

# PCR-RFLP



AAGCTT  
TTCGAA



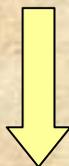
Gen normal



AAGCGT  
TTCGCA



Gen mutado



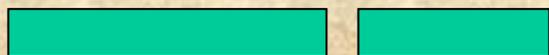
PCR

AAGCTT  
TTCGAA

240 pb



AAGCTT  
TTCGAA



200 pb

40 pb

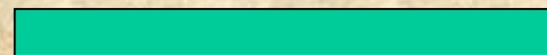
AAGCGT  
TTCGCA

240pb



Digestión con  
BcL I

AAGCGT  
TTCGCA

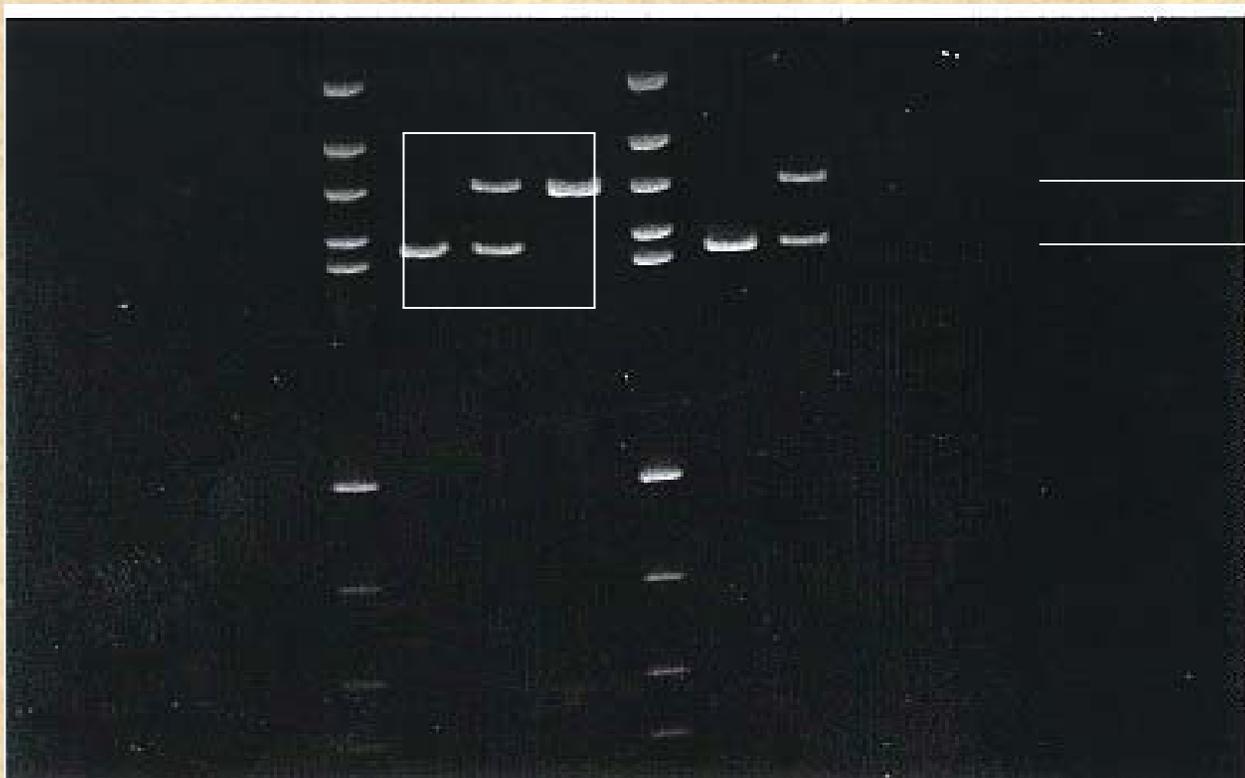


240 pb

# PCR-RFLP

**Determinación de la mutación W24X en el gen Conexina 26 Hipoacusia prelocutiva con herencia autosómica recesiva**

1 2 3



114 pb

88 pb

1 M / M

2 N / M

3 N / N

**PCR-SSP**

**SPECIFIC SEQUENCE PRIMER**

# PCR-SSP

Locus con dos alelos **A** y **B**

PCR con primers común y **A**

PCR con primers común y **B**



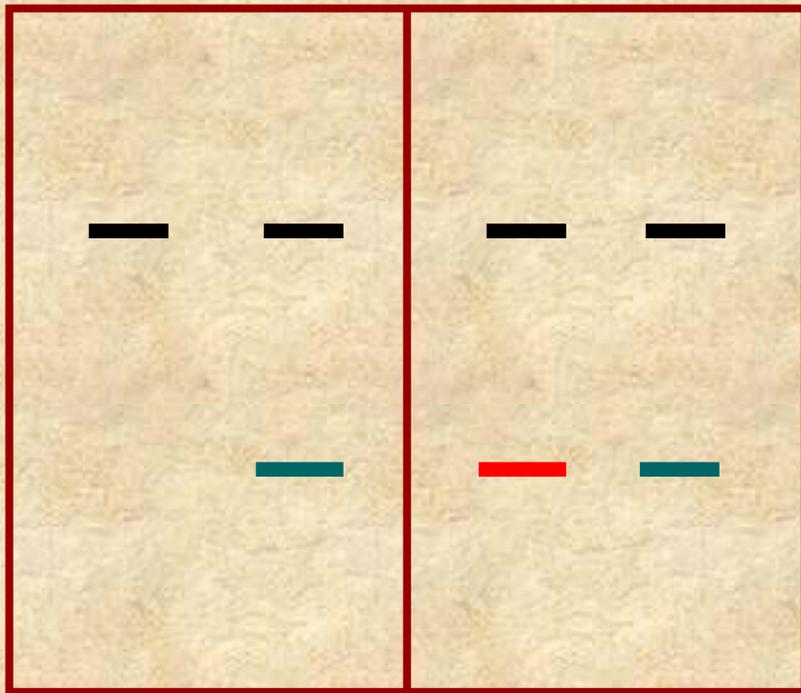
**(\*) En todas las reacciones se incluye además los dos primers correspondientes al control interno**

# PCR-SSP

## Interpretación de Resultados

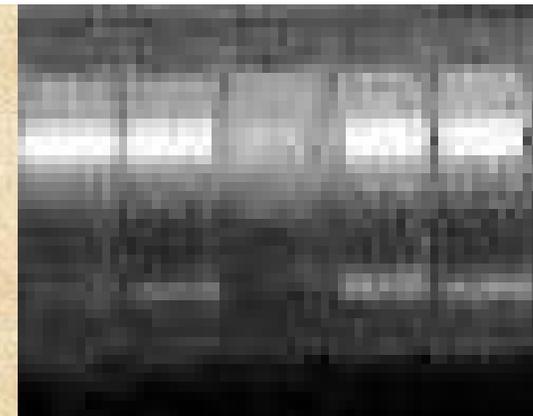
*Individuo 1*    *Individuo 2*

PCR **A**   PCR **B**   PCR **A**   PCR **B**



-  
↓  
+

1                      2  
**A**   **B**                      **A**   **B**



Control interno

Alelo de interés

Genotipo **B / B**    Genotipo **A / B**

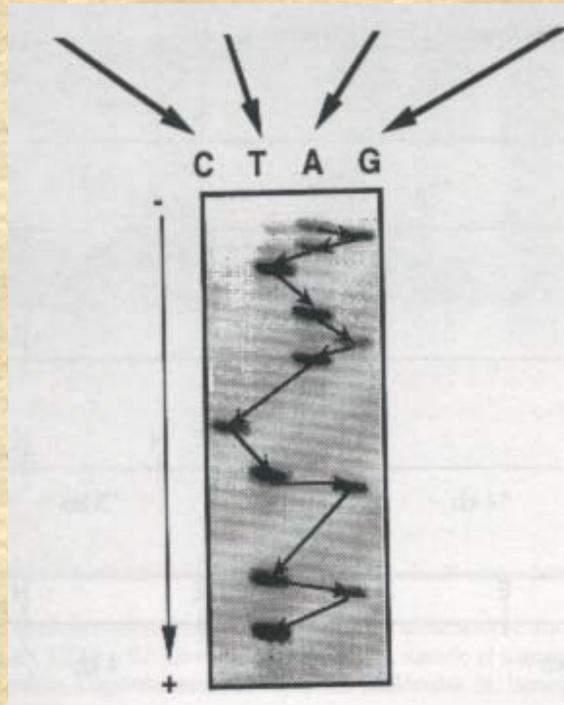
# **SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

**Determinación del orden preciso de los nucleótidos dentro de un gen u otro fragmento determinado**

# MÉTODOS DE SECUENCIACIÓN

## Método de terminación de la cadena de Sanger

(Tecnología muy laboriosa y cara)

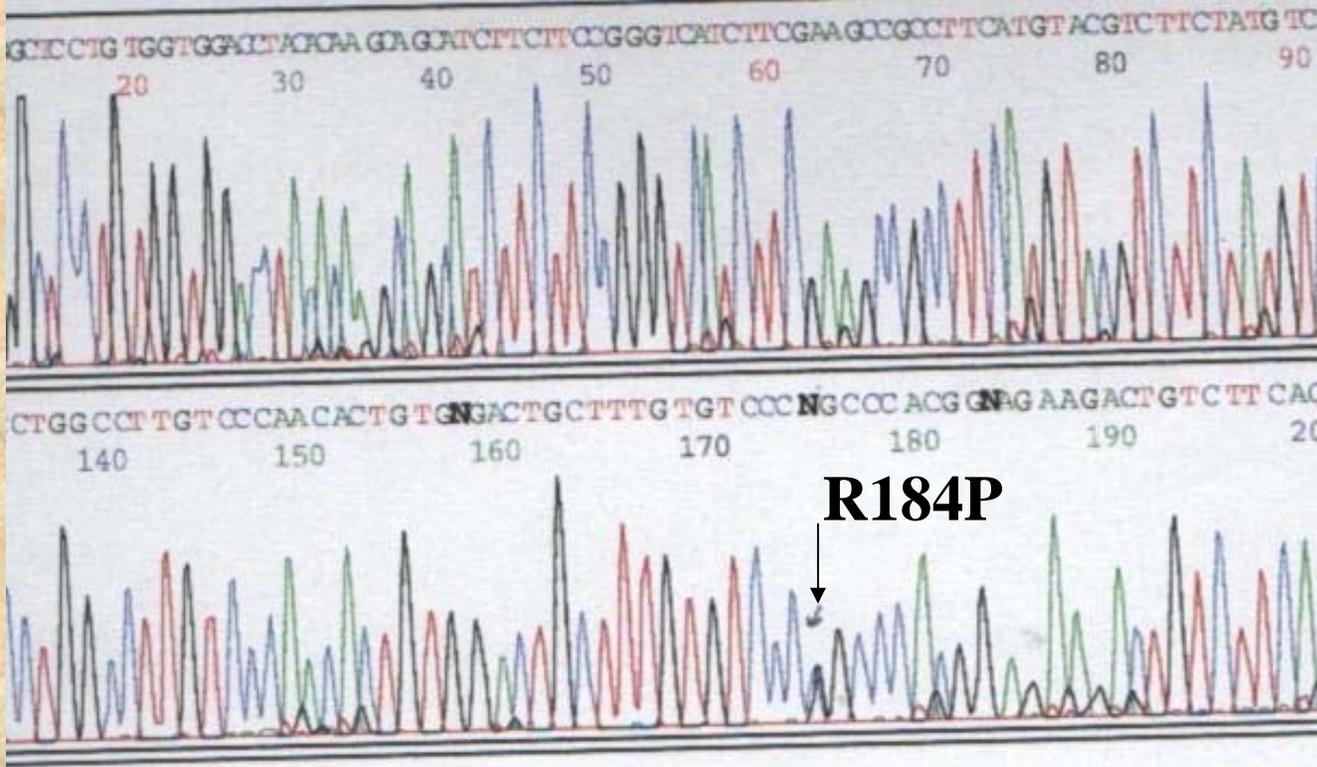


# **MÉTODOS DE SECUENCIACIÓN**

**Secuenciación mediante sistemas automatizados**

**(Gana en rapidez y seguridad)**

# MÉTODOS DE SECUENCIACIÓN



# **Cómo enfrentar el diagnóstico de las enfermedades hereditarias con heterogeneidad molecular?**



**MÉTODOS PARA LA LOCALIZACIÓN  
DE MUTACIONES**

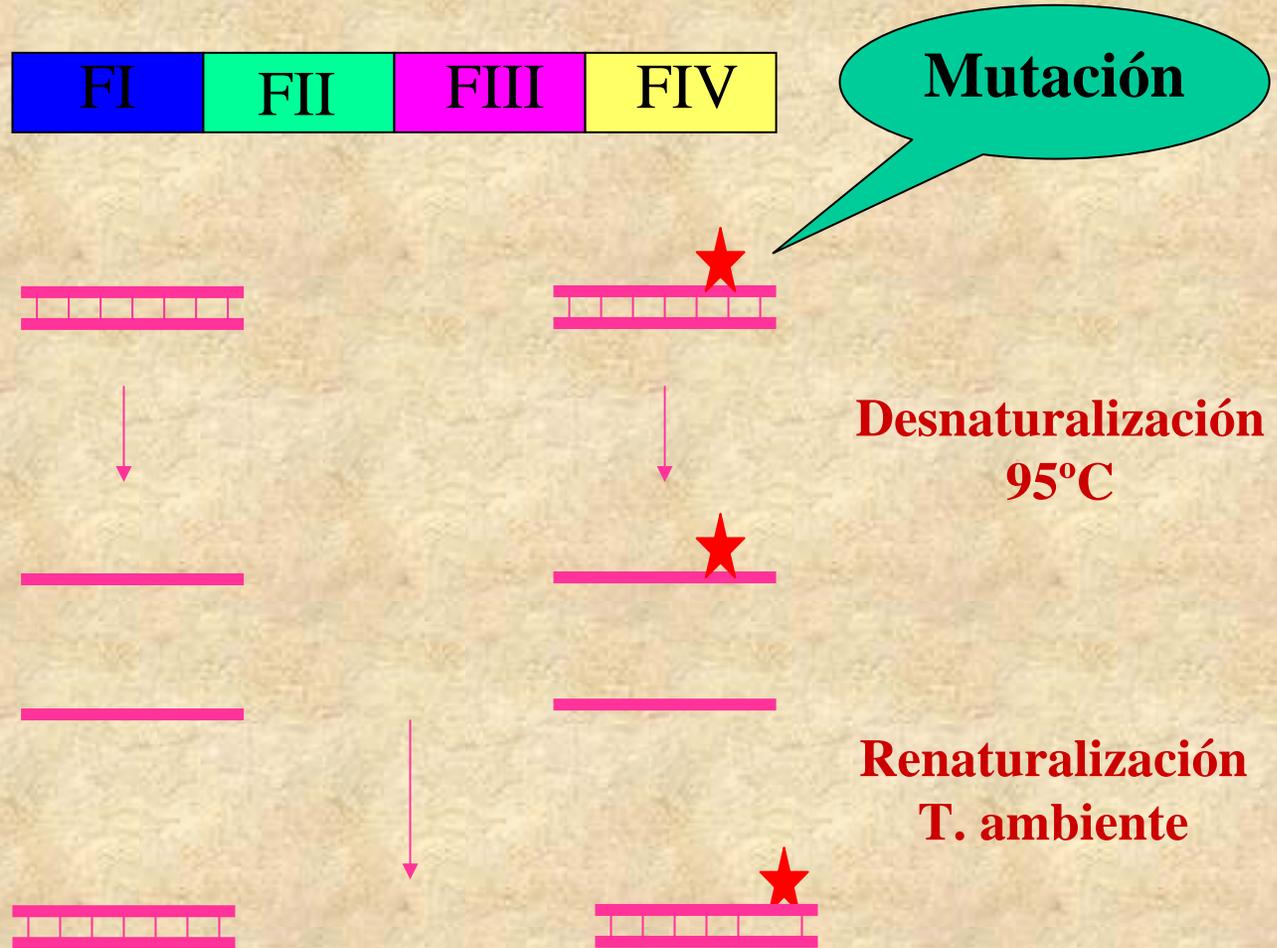
# **Métodos de localización de mutaciones en un fragmento por cambios conformacionales**

**SSCP: Polimorfismo Conformacional de Simple Cadena**  
*Single Strand Conformation Polymorphism*

**DGGE: Electroforesis en Gel c/ Gradiente Denaturalizante**  
*Denaturant Gradient Gel Electrophoresis*

**HETERODUPLEX**

# HETERODUPLÉX



# HETERODUPLEX



**Formación del Heteroduplex**