

# Amplificación de ADN in vitro (PCR): instrumentación y metodología básica

Hirigoyen D. (1) Bruzzoni Giovanelli H. (1) Azambuja C. (2) Stoll M. (1) (2)

## RESUMEN

Desde la corta existencia de la biología molecular como ciencia varios aportes han impulsado la vertiginosa revolución tecnológica a la que hoy asistimos. La amplificación de ADN in vitro (PCR) es una poderosa técnica que permite identificar nuevos genes, así como cuantificar y caracterizar secuencias nucleotídicas. En este trabajo se presenta una breve descripción del revolucionario método (PCR), capaz de estimular la investigación científica en todos los órdenes y modificar el área diagnóstica en un futuro próximo. Se plantean brevemente algunos de los recientes desarrollos en su instrumentación y metodología.

Palabras clave: REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA, AMPLIFICACION DE ADN, TECNICAS BIOQUIMICAS, GENES

## INTRODUCCION

La REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR), es un nuevo y poderoso método de síntesis enzimática "in vitro" de ADN que permite amplificar velozmente segmentos de ácidos nucleicos copiándolos millones de veces en pocas horas. Su uso y popularidad está creciendo rápidamente en la medida que se exploran nuevos campos de aplicabilidad.

La técnica fue desarrollada en 1985 por un grupo del Departamento de Genética Humana de CETUS Corporation en Emeryville, California para la amplificación del gen de la B-globina humana (17) y diagnóstico prenatal de la anemia falciforme. (2) (19)

Avances simultáneos en el campo de caracterización y purificación de proteínas así como el avance de la técnica, surgiendo

rápidamente diversas aplicaciones en el campo de la biología molecular y esfera diagnóstica, como lo indican la gran variedad de publicaciones que se reportan.

Es la intención de este trabajo introducir a los lectores en el manejo de esta poderosa herramienta molecular, describir su desarrollo, factores limitantes y etapas críticas, de la manipulación y del diseño experimental.

## DESCRIPCION DE LA TECNICA DE AMPLIFICACION IN VITRO DE ADN (PCR)

El principio del método de PCR (fig. 1) es una amplificación enzimática de secuencias de ADN que son flanqueadas por 2 oligonucleótidos (primers) que hibridizan en hebras opuestas de la secuencia a amplificar.

## SUMMARY

During the short time in which molecular biology exists as a science, several contributions have been made to improve the technical revolution we are attending nowadays.

The DNA Polymerase Chain Reaction (PCR) is a technic that allows to identify new genes, to quantify and characterize nucleotide sequences.

This paper makes a brief description of a revolutionary method that may improve scientific research and may modify diagnostic areas in a close future. Some of the recent developments, its instrumentation and methodology are established here.

Key words: POLYMERASE CHAIN REACTION, DNA AMPLIFICATION, BIOCHEMICAL TECHNIQUES, GENES

Los oligonucleótidos sintéticos tiene generalmente un tamaño que oscila entre los 10 y 30 bases de largo. Cuando las 2 hebras de ADN blanco se ha separado (desnaturalizado), los oligonucleótidos hibridizan en cadenas antiparalelas con sus extremos 3' orientados hacia el centro del segmento a amplificar. La DNA-Polimerasa lee la información contenida en la hebra molde (templado) y va extendiendo la hebra en formación por incorporación de deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) en los extremos 3' de cada cadena (fig. 2). De esta manera se genera un par de secuencias complementarias al ADN molde original que pasarán a enriquecer el próximo ciclo de amplificación actuando como nuevos templados.

Sucesivos ciclos que constan de distintas fases: 1) desnaturalización del ADN, 2) Hibridización del primer, y 3) extensión por la DNA polimerasa-, se repiten uno a otro,

1) División Citogenética. Instituto de Investigaciones Biológicas "Clemente Estable" (IIBCE). Avda Italia 3318

2) Departamento de Biotecnología. Estación Experimental "Las Brujas" INIA. Dpto. de Canelones

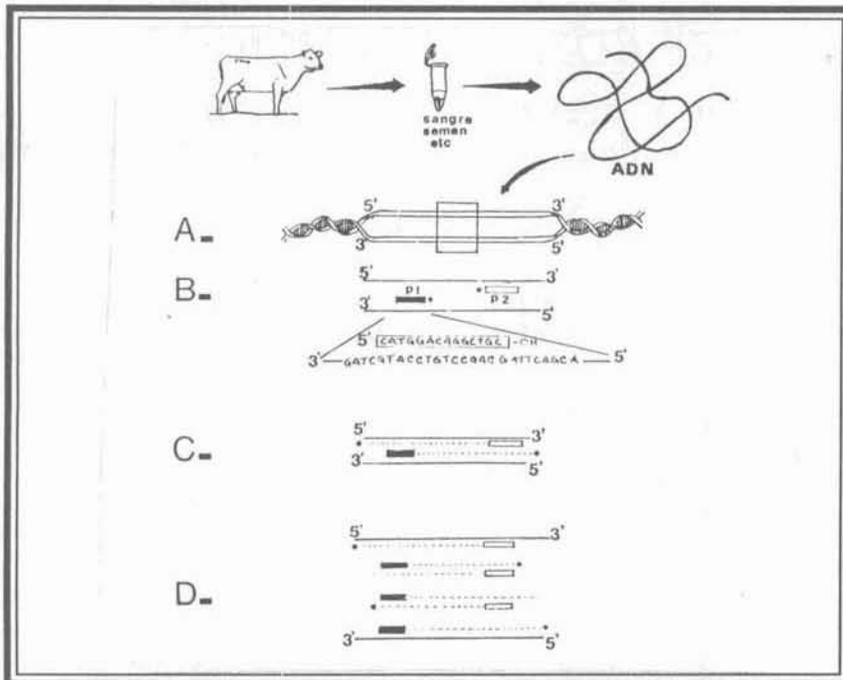
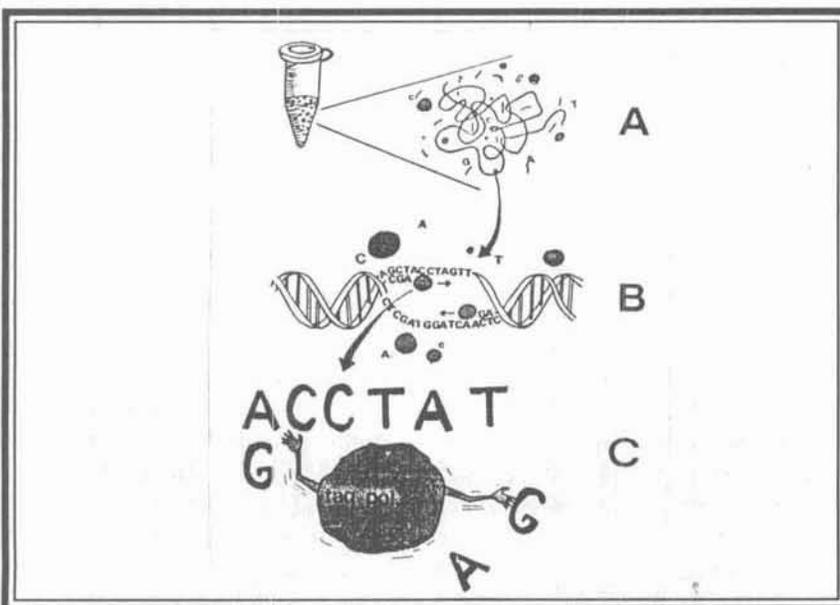


Fig. 1. El ADN puede extraerse de diferentes fuentes celulares por técnicas convencionales. A) La secuencia a amplificar de la molécula de ADN doble hebra aparece indicada dentro del recuadro. B) Luego que el ADN se ha desnaturizado los 2 oligonucleótidos (P1 y P2) se pegan a las zonas que le son complementarias, flanqueando el fragmento deseado. Se observa un detalle del apareamiento del oligonucleótido con la hebra de ADN que figura dentro del recuadro. C) La Polimerasa extiende los 2 oligonucleótidos, copiando las hebras moldes. D) En este segundo ciclo de PCR, cada una de las cuatro hebras mostradas en C, aparecen unidas a nuevas moléculas de oligonucleótidos, y van a ser también extendidas. Así al final de este segundo ciclo se obtiene cuatro copias doble hebra que son idénticas a las iniciales. Estos productos se van acumulando exponencialmente durante los sucesivos ciclos.



con temperaturas apropiadas logrando la polimerización de nuevas copias de ADN que incrementan el producto final.

La reacción puede efectuarse en hebras simples o dobles de ADN, así como ADN complementario (ADNc) originado por transcripción reversa de ARN.

El producto generado durante la amplificación tiene una longitud que es igual a la suma de las longitudes de las 2 primeras, más la distancia entre ambos.

Este método de síntesis "in vitro" altamente preciso y eficaz permite en teoría duplicar el número de copias de las hebras de ADN en cada ciclo.

Como el producto obtenido de esa síntesis sirve de modelo para los siguientes, cada vez que se repiten los mismos la cantidad de secuencias amplificadas se incrementa por  $2^n$ , donde (n) es el número de ciclos (fig.3). De esta manera un PCR de 20 ciclos producirá en teoría al cabo de 2 horas aproximadamente una amplificación de un millón de veces, ( $2^{20}$ )

Fig. 2. En el seno de la muestra a amplificar se establecen diversas interacciones entre los componentes. A) Se esquematizan las moléculas de ADN que sirven de molde, los dNTPs, sustrato para que las nuevas hebras crezcan, los oligonucleótidos que inician el evento de neoformación y la enzima que polimeriza la reacción. B) Luego de desnaturizar las hebras de ADN los oligonucleótidos y las moléculas de enzima se disponen entre las cadenas separadas donde tiene lugar la copia de nuevas cadenas, basadas en la información del molde. C) La enzima trabajando en condiciones de pH y fuerza iónica proporcionadas por su buffer, capta del medio dNTPs y los incorpora a partir del extremo 3' del oligonucleótido, donde se establecen sucesivos enlaces fosfodiéster que integran la nueva cadena.

**COMPONENTES DE LA REACCION**

El desarrollo del PCR involucra básicamente la combinación de una muestra de ADN, oligonucleótidos, dNTPs y la enzima Taq Polimerasa con su buffer, los cuales se someten a reiterados ciclos de aumento de temperatura y enfriamiento.

De lo anterior se deduce que las complejas interacciones cinéticas y bioquímicas que tienen lugar entre los componentes de la reacción determinan la calidad del producto y por consiguiente el correcto ajuste de los mismos.

A continuación se analizan varios de los elementos que se deben tener en cuenta para realizar una amplificación tipo de ADN.

**DISEÑO DE OLIGONUCLEOTIDOS**

Los iniciadores de la reacción "oligonucleótidos" son pequeños segmentos de ADN de 10 a 30 bases en promedio, imprescindibles para la correcta amplificación de segmentos génicos.

Existen publicados bancos de secuencias génicas donde figuran la composición en bases de los diferentes genes animales, vegetales, humanos, de agentes microbianos, etc.

Es posible acceder a ellos para efectuar consultas buscando la o las regiones más adecuadas en el diseño de los oligonucleótidos, seleccionando aquellas zonas que permitan amplificaciones más eficientes.

Para facilitar aún más su diseño

se dispone de programas de computación específicos para los oligonucleótidos, los cuales contemplan el tamaño que debe tener el primer, contenido en Guanina-Citocina, energía libre, lugar y grado de pegado al templado, etc.

Al elegir los 2 oligonucleótidos para PCR es importante que no tengan bases complementarias entre sí, particularmente en los extremos 3' a fin de evitar la incidencia de dimerización entre ellos. Este artefacto de la amplificación, al igual que la formación de estructuras secundarias dentro de cada primer deben tenerse en cuenta porque ambos disminuyen la eficacia de la reacción.

La especificidad del pegado del oligonucleótido al ADN a amplificar es proporcional a la longitud de los mismos, es decir, cuanto más bases

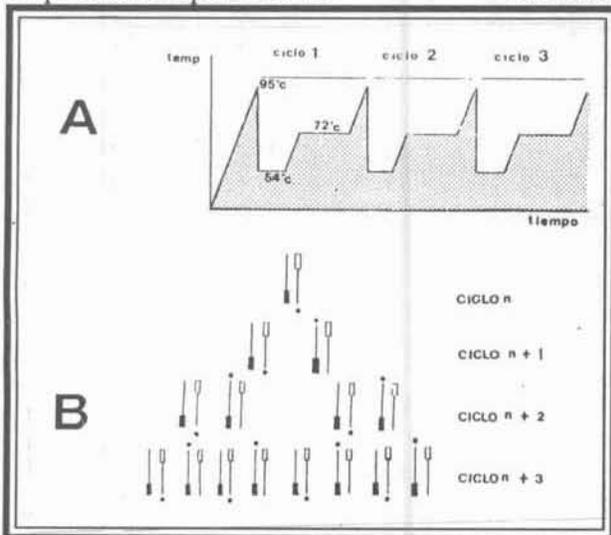


Fig. 3. A) Gráfica del perfil termal con tres ciclos consecutivos de una reacción de PCR convencional. En este ejemplo: se utiliza 95°C para desnaturalizar las dobles hebras de ADN, 54°C para permitir el pegado de los oligonucleótidos a sus sitios complementarios, y 72°C para que la enzima incorpore sNTPs extendiendo la hebra naciente. B) Incremento exponencial de secuencias amplificadas, la cantidad de producto obtenido es función del número de ciclos a que se somete la reacción. Como se indica en el esquema si todas las hebras molde son extendidas en cada ciclo, se obtiene un producto que nuevamente servirá de molde y que es el doble del ciclo anterior. En estas condiciones una reacción de amplificación con 20 ciclos incrementaría los fragmentos aproximadamente un millón de veces.

**casa del criador** RT

**TIJERA DESVASADORA**

TECNOLOGIA ALEMANA

- MAS LIVIANA
- MAS FUERTE

ACERO DE UNA PIEZA. SE COMPRA UNA SOLA VEZ. NO SE AFILA NUNCA.

**RENETAS PARA CASCOS**

- DE ACERO
- MANGO DE MADERA
- 5 MODELOS

DISTRIBUIDOR DE LOS AFAMADOS PRODUCTOS "WALMUR"

GRAL. FLORES 3269 CASI L.A. DE HERRERA  
TELS. 23.60.13 / 20.80.40

tenga el primer menos posibilidad existe de que su secuencia se repita en la hebra molde.

Cuando se realiza la unión de un par de bases Guanina y Citocina (G+C) se hace por 1 puente de hidrógeno más que el par Adenina-Timina (A+T), volviendo la unión más estable.

Basado en esto se busca que los oligonucleótidos tengan un mayor contenido en G y C que de A y T, así se asegura una buena hibridación del complejo oligo-templado.

Las amplificaciones convencionales (PCR simétrico) utilizan la misma concentración de cada oligonucleótido, sin embargo cuando se hace PCR asimétrico se efectúan amplificaciones con uno de los dos primers en concentración limitante. De esta forma luego de 10 o 15 ciclos uno de los oligonucleótidos disminuye y en los ciclos restantes se generan copias solamente de una hebra del ADN original (9). Este método se puede efectuar en 2 etapas, o bien en una sola colocando inicialmente una relación desequilibrada en la concentración molar de primers.

Con este encare metodológico se puede efectuar el secuenciamiento de la hebra amplificada (13) (14).

Los oligonucleótidos al igual que las proteínas y los anticuerpos permiten diseñar interesantes estrategias de acoplamiento de sustratos.

Es posible la adición de información sin alterar la reacción de amplificación, por ejemplo, secuencias no complementarias al templado que se fijan en el extremo 5' de los oligonucleótidos y que se incorporan en el producto amplificado bajo forma de nuevos sitios de restricción enzimática (20) o elementos regulatorios (promotores).

Se pueden marcar los oligo-

nucleótidos con fluorocromos (Isotiocianato de Fluoresceína), Rodamina, etc) o componentes enzimáticos (Biotina, etc), desarrollando ingeniosos ensayos de complementación de colores que permiten distinguir varios agentes infecciosos o distintos loci de ADN amplificados simultáneamente (3)

Con la utilización de oligonucleótidos diseñados al azar, que pegan arbitrariamente en diferentes zonas del ADN también es posible encarar un rastreo genómico, identificado los patrones de bandas genotipo específicos obtenidos luego de una amplificación con estos primers (1) (24).

Este es uno de los más recientes encares de mapeo genómico por PCR que se viene llevando a cabo con múltiples aplicaciones entre los que se destacan el identificar marcadores que identifiquen loci asociados a caracteres de interés productivo. (11) (12) (23).

## ENZIMAS

Inicialmente la amplificación del ADN se efectuaba con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (16), una enzima que se inactiva con altas temperaturas a las que se somete la reacción para desnaturar el ADN en cada ciclo.

Hoy gracias a la existencia de microorganismos arqueobacteriales termofílicos capaces de crecer a 70° y 75°, y al ingenio del hombre por reconocer su aplicabilidad se puede obtener a partir de *Thermophilus aquaticus*, cepa YT1, aislada de un geiser en Yellowstone National Park (2), enzimas que trabajan con temperaturas óptimas más elevadas (18).

Con esta enzima, y otras comercialmente disponibles, ya sea naturales o recombinantes, se simplifica su adición una sola vez,

permitiendo que la enzima "fotocopie" el ADN en millones de ejemplares mejorando la especificidad del producto amplificado.

Estas polimerasas son muy rápidas llegando en el caso de la Taq ADN Polimerasa a sintetizar aproximadamente 150 nucleótidos /segundo /mol de enzima. (8)

La Taq Polimerasa nativa purificada de *Thermophilus aquaticus* existe de forma recombinante expresada en *E. coli*, presentando ambas actividad 5'-3' exonucleásica equivalente.

Se estima que el porcentaje de incorporación errónea por parte de estas durante cada ciclo es de una base cada 10<sup>4</sup> nucleótidos (18), variando esta cifra según sean las condiciones en que se efectúe la reacción (4).

La Vent-Polimerasa obtenida de una Archibacteria marina termofílica *Thermococcus litoralis* ofrece una mayor resistencia térmica, pero también mayor actividad exonucleásica que debe tenerse en cuenta al momento de su uso.

Sin embargo, están surgiendo nuevas enzimas mutadas para estas actividades exonucleásicas que reúnen mejores condiciones de termoestabilidad.

Hay enzimas que poseen además de la función polimerizante actividad de transcriptasa reversa, permitiendo obtener eficientemente cADN directamente de ARN (15), luego amplificarlo en un simple tubo, con tan sólo modificar las condiciones iónicas.

Tienen la ventaja de que funcionan a elevadas temperaturas desestabilizándose las regiones secundarias de RNA y superando los problemas vistos con la Transcriptasa reversa del virus de leucemia murina (RT).

## OBTENCION Y TIPOS DE MUESTRAS

La efectividad de la reacción depende del estado de pureza en que se encuentra la muestra que se va a analizar. Es posible efectuar diagnósticos a partir de muestras crudas o semiprocadas sin necesidad de extraer totalmente el ADN, al tratar los especímenes con algunos detergentes y solventes que los exponen facilitando la reacción de amplificación. Entre los especímenes a analizar se cuentan sangre entera, suero, leche, semen, detritus celulares, médula ósea, restos tisulares en diferentes grados de descomposición, etc. (7) (10). También es posible rastrear patógenos en aguas residuales donde existe bastante materia orgánica agregada, o en alimentos

donde es similar el caso.

Debido a la enorme capacidad amplificadora del método, se pueden generar millones de copias de una secuencia génica, así como de secuencias no deseables. Esto último se ve agudizado fundamentalmente por contaminación con productos de amplificaciones

previas (carry over), o bien material exógeno que incide cuando la secuencia blanco se halla en poca cantidad al iniciarse la reacción.

El carry over ha sido un punto sobre el cual se dirige mucho la atención, pues es posible que la contaminación con secuencias de ADN multiplicadas millones de

TABLA 1. PROCEDIMIENTOS PARA MINIMIZAR LOS ERRORES DE LA REACCION

- \* SEPARAR LAS REACCIONES ANTES Y DESPUES DEL PCR
- \* ALICUOTAR TODOS LOS REACTIVOS
- \* DISPONER CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS
- \* USAR PIPETAS DE DESPLAZAMIENTO POSITIVO
- \* SELECCIONAR CRITERIOSAMENTE CADA CONTROL
- \* EN LO POSIBLE DESTINAR UN AREA EXCLUSIVA PARA PCR

# Albendazole polvo

**ALBENDAZOLE AL 75%**

**Antihelmíntico  
de amplio espectro**

LABORATORIO

**Revan**

**Guayaquí 3095 Montevideo**

**VETERINARIA 17**

Vol 28 N° 115 ENERO-MARZO 1992

veces en PCR anteriores puedan interferir con la reacción, al ser vehiculizadas por los buffers, agua, micropipetas de trabajo, etc.

Para reducir estos problemas se prescriben una serie de medidas (5), como las que se resumen en la Tabla 1, y otras que se citan seguidamente: reducir el número de ciclos al mínimo para evitar el aumento del contaminante. Seleccionar con buen criterio los controles positivos y negativos. Colocar tubos sin ADN que permitan detectar productos no deseables.

Usar buffers y reactivos alícuotados; utilización de áreas y micropipetas exclusivas para el desarrollo de la técnica.

Adicionar los distintos componentes de la reacción de amplificación antes de adicionar el ADN.

Tapar cada tubo luego de la adición de ADN y antes de proceder con los otros tubos.

Inactivar el producto con irradiación ultravioleta de corta longitud de onda previa a la amplificación de la mezcla (21).

#### LIMITES DE LA AMPLIFICACION

El tamaño del fragmento génico capaz de copiarse por la repetición de los ciclos es bastante grande existiendo reportes de fragmentos de 10.2 kb que han podido ser amplificados a partir de tejidos fijados y embebidos en parafina (22). Con la purificación de nuevas y más potentes enzimas, así como con el desarrollo de mejores cicladores (6), se van optimizando las condiciones técnicas de amplificación y por consiguiente aumentando el tamaño de los fragmentos obtenidos; por otro lado el método también va cobrando mayor especificidad.

La atenuación de la velocidad de amplificación exponencial del producto acumulado ocurre en los últimos ciclos, existiendo una marcada caída a partir de los ciclos 30. En este fenómeno la propia enzima determina el agotamiento además de varios otros factores; como ser: 1) utilización de sustratos (dNTPs), enzima, 3) competencia de los reaccionantes por productos no específicos 4) incompletas desnaturalizaciones del producto por aumento de su concentración, 5) polimerización y reanillamiento del producto de la amplificación cuando supera los  $10^{-8}$  moles.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Anolles, G.C.; Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. (1991) DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Nature* 329:293-294
2. Chehab, F.F.; Doberty, M.; Cair, Kan Yw; Cooper, S.; Rubein, E.M. (1987) Detection of Sick cell anaemia and Thalassemias. *Nature* 329:293-294
3. Chehab, F.F. and Kan, Y.W. (1989) Detection of specific DNA sequences by fluorescence amplification: A color complementation assay. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:9178-9182
4. Eckert, K.A. and T. a. Kunkes (1990) High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 18:3739
5. Erlich, H.A.; Gelfand D.; Sninsky J.J. (1991) Recent advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science* 252:1643-51
- 6) Franco, R.; Augusto, A. and Roberto Salvi (1988) A simple and low cost DNA amplifier. *Nucleic Acids Res.* 16:3105-3106
- 7) Gasparin, P.; Savoia, A.;

Pignatti, P.F.; Dalpiccola, B. and Novelli, G. (1989) Amplification of DNA from epithelial cells in urine. *New. Engl. J. Med.* 320: 809

8) Geifand, D.H. (1989) Taq DNA polymerase PCR technology, Principles and Applications for DNA amplification. Ed. Henry A. Erlich, cap 2:17-22

9) Gyllesten, U.B. and H.A. Erlich (1988) Generation of simple stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:7652

10) Hanghira Li; Gyllesten, V.B.; Xiang feng, C.; Saiki, R.K.; Erlich, H.A. and Arheim, N. (1988) Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* 335:414-417

11) Hirigoyen, D.; Bruzzoni Giovanelli, H.; Azambuja, C. y M. Stoll (1991) Aplicaciones del PCR al mejoramiento bovino. In: Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias, 6a., Piriápolis, Uruguay.

12) Lopes, R.F.F.; Perseu, J.A.S.; Bruzzoni, H.; Hirigoyen, D.; Azambuja, C.J.; Termignoni, C; Maia, and M. Stoll (1991) PCR technology applied to the analysis of bovine genome. In: II National and Congress of Biotechnology and I. Latin American fair and Congress of Biotechnology, San Paulo, Brasil.

13) Mazars, G.R.; Mayret, C.; Leanteur, P. and Theillet, C.G. (1991) Direct sequencing by thermal asymmetric PCR. *Nucl. Acids Res.* 19:4783.

14) Milohilonic, M. and J. E. Lee (1989) An efficient method for sequencing PCR amplified DNA. *Biotechniques* 7 (1): 14

15) Miyere, T.W. and Gelfand D.H. (1991) Reverse Transcription and DNA amplification by a *thermus thermophilus* DNA

polymerase. *Biochemistry* 30:7661-65.

16) Mullis, K.B. and F. Falloona (1987) Specifics synthesis of DNA in vitro via polimerasa catalized chain reaction. In: *Methods in Enzimology*, R. Wu., Ed. Vol 155, p335-350

17) Saiki, R.K.; Bugawan, T.L.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A. (1986) Analysis of enzymaticallu amplified betaglobin and HLa'DQ Alpha DNA with allele specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166.

18) Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S. et al. (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polimerase *Science* 239: 487-491.

19) Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mulis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A and N. Arnheim (1985). Enzimatic amplification of

betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle cell anaemia. *Science* 230:1350'1354.

20) Saiki, R.K. (1989) The de-sing and optimization of the PCR. PCR technology by H.A. Erlich p.7-16

21) Sakar, G.; Sommer, S.S. (1990) Shedding lighth on PCR contamination., *Nature* 343:27.

22) Shibata, D.K.; Martin, J.W. and Arnheim, N. (1988) Analisis of DNA sequences in party-year old paraffin thin'tissue sections: a bridge between molecular biology and clasical histology. *Cancer Res.* 48: 4564-4566.

23) Welsh and McClelland M. (1990) Fingerprintig genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids. Res.* 18:7213-7218.

24) (Williams, J.G.K.; Kubelic, A.R.; Rafaski, J.A. and Tingey 18: 6531-6535.

**SUSCRIPCIONES  
A LA REVISTA  
VETERINARIA**

ANTEL : 62.08.73c/u N\$ 10.000, anual (4) N\$ 32.000. Las suscripciones no canceladas antes del 31 de diciembre de cada año se considerarán tácitamente renovadas para el año siguiente.

Canje de Revista "VETERINARIA" a cargo del Departamento de Documentación y Biblioteca de la Facultad de Veterinaria

**CON** **CIENCIA**

**EN LA SANIDAD ANIMAL**

**LABORATORIO CIENCIA  
"EL DE LAS GRANDES MARCAS"**

**DERRAMIN**

GARRAPATICIDA INSECTICIDA

LUIS A. DE HERRERA 4009 - TELS.: 20 86 74 - 29 69 11