



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

REVISIÓN ACTUALIZADA DE LA REACCIÓN EN CADENA
DE LA POLIMERASA (PCR)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A:
LAURA MARIAN VALENCIA PESQUEIRA

ASESOR:
M EN C MARITERE DOMÍNGUEZ ROJAS
CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



EL PRESENTE MATERIAL FUE APOYADO POR EL PROYECTO PAPIME PE2022912
“IMPLEMENTACIÓN DE ACTIVIDADES TEÓRICO-PRÁCTICAS PARA LA OBTENCIÓN DE
COMPETENCIAS EN GENÓMICA DE LAS CARRERAS BQD Y FARMACIA”.

Índice general

1. Introducción	1
1. Historia	6
2. Las fases de PCR	10
1. La fase exponencial de amplificación	14
2. La fase de meseta	15
3. <i>Booster</i> PCR	16
4. <i>Hot-start</i> PCR	16
5. <i>Touchdown</i> PCR	17
6. Adyuvantes	17
7. Inhibición	18
3. DNA polimerasa	21
1. Estructura y función	21
2. Mecanismo de polimerización	22
3. Utilidad del magnesio en la polimerización de nucleótidos	27
4. Actividad exonucleasa	29
5. Clasificación de las DNA polimerasas por familias	31

6.	DNA polimerasa de <i>E. coli</i> y el fragmento de Klenow	31
7.	<i>Taq</i> polimerasa	32
8.	Termoestabilidad de <i>Taq</i> polimerasa	34
9.	Tasa de mutación de la <i>Taq</i> polimerasa	34
4.	DNA polimerasas para PCR	35
1.	Precisión o fidelidad	35
2.	Selección geométrica	36
3.	Corrección de pruebas: Actividad 3' → 5' exonucleasa	36
4.	Procesividad	40
5.	Enzimas de alta fidelidad	41
1.	DNA polimerasa <i>Pfu</i>	43
2.	Mezclas de enzimas	43
6.	Muestra de DNA	45
1.	Tejido	45
2.	Plasma y suero	45
3.	Microdissección de preparaciones histológicas	46
4.	PCR directa en sangre completa sin extracción de DNA	46
5.	DNA/RNA	46
7.	Purificación de DNA	47
1.	<i>Salting in-out</i>	47
2.	Solventes orgánicos	47
3.	Gradientes de densidad con cloruro de cesio	48

4.	Intercambio iónico	48
5.	Sílica	48
6.	Valoración de la pureza de DNA	49
8.	Diseño de <i>primers</i>	50
1.	<i>Primers Forward</i> y <i>Reverse</i>	53
2.	Cociente <i>Primer-DNA</i> molde	54
3.	Temperatura de alineamiento	54
4.	Regla de los extremos	55
5.	Interacciones no deseadas	56
9.	Software para diseño de <i>primers</i>	58
1.	Retos en el desarrollo de software para diseño de <i>primers</i>	58
2.	<i>Primer3</i>	60
3.	<i>Primer-BLAST</i>	64
4.	Oligo	70
5.	Oligo Analyzer	73
6.	<i>Primer Bank</i>	77
10.	PCR <i>multiplex</i>	78
1.	Diseño de <i>primers</i> para mPCR	79
11.	PCR y secuenciación	80

12. Variantes de PCR	82
1. PCR anidada	84
2. Amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPD)	84
3. PCR inversa	87
4. PCR asimétrica	87
5. PCR de colonia	88
6. PCR de alelo específico	88
7. <i>Dial-out</i> PCR	88
8. Amplificación dependiente de helicasa	88
9. PCR específica de inter-secuencias (ISSR)	88
13. Aplicaciones de PCR	89
1. Medicina	89
2. Cáncer	90
3. Virología	90
4. Bacteriología	91
5. Micología	91
6. Parasitología	92
7. Microbiología y seguridad alimentaria	92
8. Ciencia forense	93
9. Ecología	93
10. Validación de resultados en microarreglos	93
14. Desafíos actuales en la aplicación de PCR	95

15. Anexos	102
16. Referencias bibliográficas	103
17. Referencias electrónicas	107

Índice de figuras

1.	Síntesis de DNA por la DNA polimerasa	2
2.	Proceso general de la amplificación	3
3.	Esquema de los diferentes ciclos de PCR	5
4.	Gráfico que describe los ciclos de PCR	11
5.	Ciclos de PCR	12
6.	Fases de la PCR	16
7.	Tres polimerasas simples, cada una con un fragmento de DNA	23
8.	La DNA polimerasa tiene una estructura básicamente similar a una mano	24
9.	La polimerización de los nucleótidos	25
10.	Residuos de <i>Taq</i> polimerasa en contacto con el DNA	26
11.	Localización aproximada de la cadena molde	26
12.	Mecanismo de los dos iones metálicos de la DNA polimerasa	28
13.	Actividad exonucleasa de la DNA polimerasa	30
14.	Dominios de la <i>Taq</i> polimerasa	33
15.	<i>Taq</i> polimerasa en la conformación compacta	33
16.	Exonucleasas $3' \rightarrow 5'$ o de corrección de pruebas	37

17.	Mecanismo de intercambio de sitios activos	39
18.	Geometría de las pares de bases correctas y erróneas	39
19.	Diagrama de flujo para el diseño de <i>primers</i>	52
20.	<i>Primer forward</i> y <i>primer reverse</i>	53
21.	Horquilla o “Hairpin”	56
22.	Otros ejemplos de interacciones entre <i>primers</i>	57
23.	Dímeros de <i>primers</i>	57
24.	Diseño de <i>primers</i>	57
25.	Ventana de primer3 input	62
26.	Después de seleccionar el botón <i>pick primers</i>	63
27.	Interfaz gráfica de <i>Primer-BLAST</i>	65
28.	Resultados del diseño de <i>primers</i>	67
29.	<i>Primer-BLAST</i> : vista gráfica del alineamiento de los <i>primers</i>	68
30.	Revisión de especificidad	69
31.	Temperatura y cambio de transición de forma en dúplex a cadena sencilla	70
32.	Ventana de T_m y ΔG	71
33.	Características calculadas de un <i>primer</i> en <i>Oligo</i>	71
34.	Estabilidad interna	72
35.	Perfiles adecuados para especificidad	72
36.	Perfil con buena especificidad aparente	72
37.	Diferentes análisis de una secuencia en <i>Oligo Analyzer</i>	73
38.	Pantalla completa de <i>input</i> de <i>Oligo Analyzer</i>	74

39.	<i>Output</i> (resultados) del análisis (primera elección), de <i>Oligo Analyzer</i>	75
40.	<i>Output</i> del análisis <i>Self-dimer</i>	76
41.	PCR Anidada 1	85
42.	PCR Anidada 2	85
43.	PCR anidada: Producto de PCR después de la primera ronda de amplificación	85
44.	El segundo par de <i>primers</i> anidados	86
45.	Producto final de PCR anidada	86
46.	Arquitecturas de dispositivos de PCR estacionarios	97
47.	PCR en dos dimensiones	98
48.	Protocolo experimental del concepto de 2D-PCR	99
49.	Arquitectura de PCR de flujo continuo	100

Índice de tablas

1.	Concentraciones de compuestos inhibitorios	20
2.	Tasas de error promedio de DNA polimerasas termoestables durante PCR .	43
3.	Comparaciones de tasas de error de DNA polimerasas y mezclas de enzimas	44

1. Introducción

La reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction) o PCR, se utiliza para el análisis de DNA. Con la PCR es posible aislar una secuencia específica de interés y extraerla de un contexto complejo de mayor tamaño, es decir de una molécula grande de DNA. Dicho aislamiento permite, ante todo, la multiplicación del material genético necesario que, sin la PCR, sería escaso tras la purificación desde una muestra biológica. La manipulación de dichas copias lleva a varias aplicaciones, como la secuenciación e identificación de dicha secuencia en el diagnóstico de enfermedades genéticas, cáncer, medicina forense (huella génica); las cuales permiten el monitoreo de poblaciones, control de calidad e investigación. Además, al poseer una secuencia específica en una concentración útil; la biotecnología es posible. Por ejemplo, al aislar una secuencia y amplificarla por medio de PCR, se pueden producir organismos transgénicos con características nuevas, según la secuencia insertada en su genoma; para la producción industrial de fármacos, alimentos y otros productos, así como la optimización de la producción misma (McPherson, 2007).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la replicación *in vitro* de secuencias específicas de DNA, con los elementos básicos de la naturaleza. Originalmente, la célula utiliza un sistema altamente complejo de replicación para producir otra cadena de DNA a partir de una previa, basándose en el principio de complementariedad de bases de Watson y Crick. Utiliza *primers*, secuencias cortas de DNA (oligonucleótidos) complementarios a la cadena de DNA, para apoyar a la DNA polimerasa en la iniciación de la replicación (Karp, 2010). En el caso de PCR, se utilizan dos *primers*, cada uno complementario a las cadenas opuestas de la región de DNA desnaturalizada (separada) con calor. Los *primers* se acomodan de tal manera que cada reacción de extensión del *primer* dirige la síntesis enzimática de DNA hacia el otro *primer*. Así, el *primer* “a” dirige la síntesis de una cadena de DNA que puede ser luego acoplada con el *primer* “b” y *viceversa*, para dirigir una nueva síntesis, lo que resulta en la síntesis *de novo* de la región de DNA flanqueada por el par de *primers*, que incluirá la secuencia del *primer* (figuras 1 y 2) (McPherson, 2007, 1991).

La reacción de PCR es un proceso de síntesis enzimática dinámico, de ahí su versatilidad. Sus componentes varían dependiendo del estado de la reacción y deben tomarse en cuen-

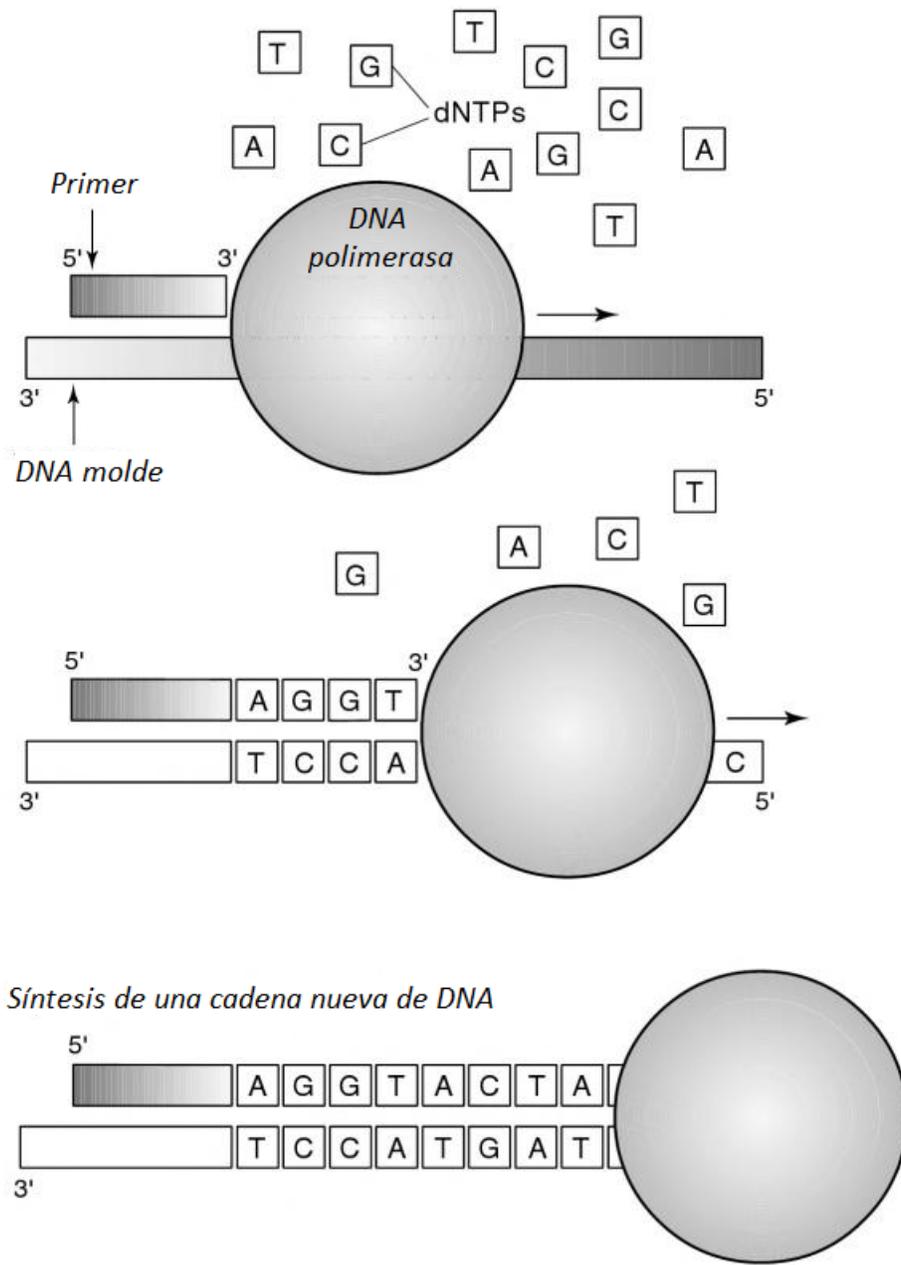


Figura 1. Síntesis de DNA por la DNA polimerasa. Añade desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) utilizando el principio de apareamiento de bases de Watson y Crick (McPherson, 2007).

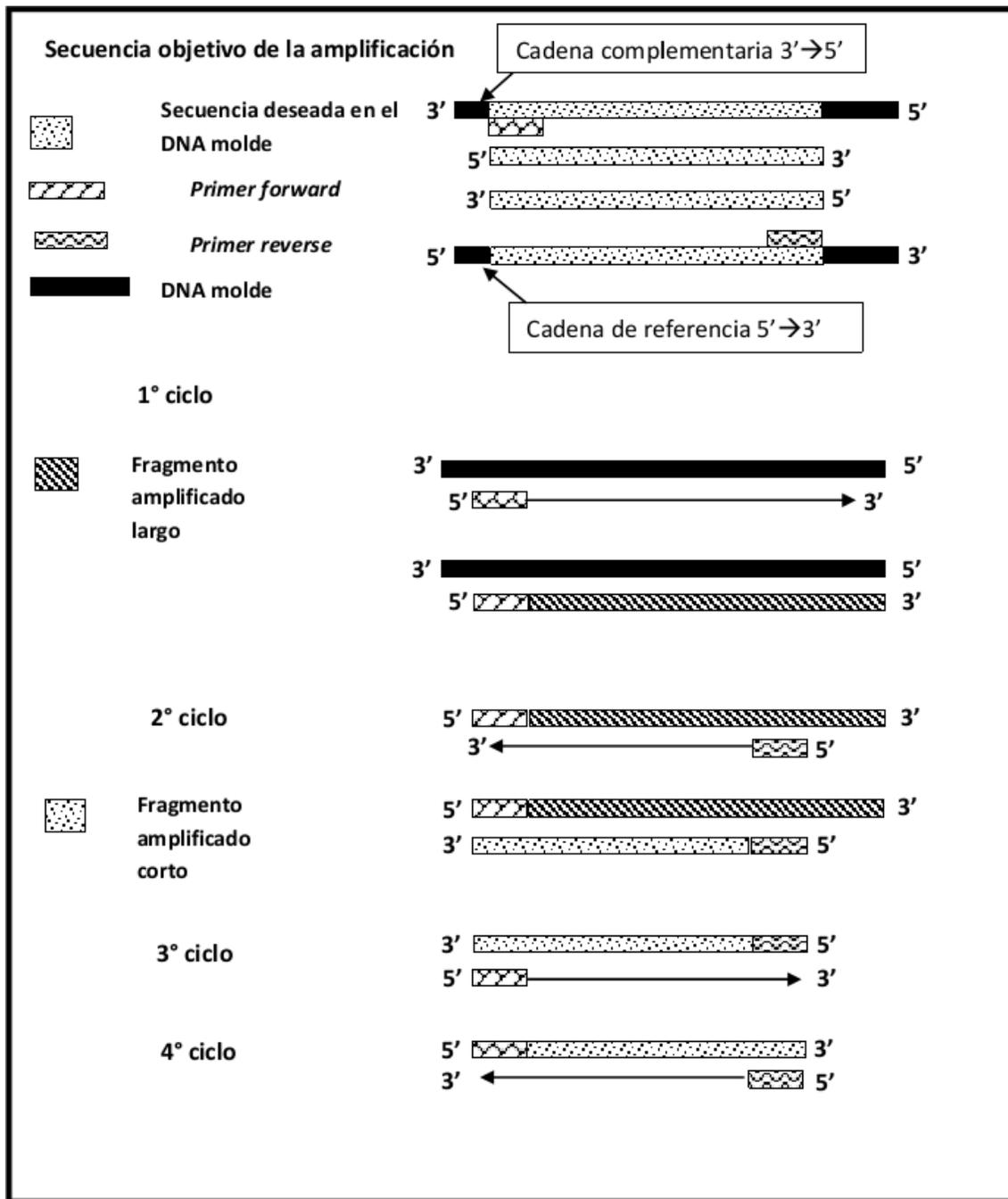


Figura 2. Proceso general de la amplificación de un fragmento de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (McPherson, 1991).

ta. Inicialmente, la síntesis continuará más allá de la secuencia complementaria del otro *primer*, pero con cada ciclo de calentamiento y enfriamiento, la cantidad de DNA en la región flanqueada por cada *primer* aumentará exponencialmente. Después de varios ciclos, el producto de reacción predominante será la fracción de DNA que esté flanqueada por los *primers*, e incluirá a los mismos (McPherson, 1991). La serie de reacciones en ciclos de PCR varían entre los ciclos tempranos, intermedios y tardíos (figura 3). Dado que la variable crucial es la síntesis neta del producto durante los ciclos de calor y enfriamiento, el balance molecular entre producto, DNA molde, DNA polimerasa, *primers* y desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), cambia con cada ciclo. De manera similar, las interacciones de alineación entre moléculas complementarias de DNA, como *primers* con DNA de la muestra o producto, o producto con producto, se encuentran bajo un flujo continuo en el proceso de PCR (McPherson, 1991).

La versatilidad de PCR es aún mayor que su aplicabilidad en diferentes situaciones. El poder de la técnica consiste en la cantidad de material genético que genera, así como su especificidad, lo que abre una nueva ventana a experimentos basados en PCR. Gracias al material generado, se pierde la dependencia de la experimentación por falta de material analizable (Rabinow, 1996). No es posible cubrir todas las variaciones de PCR en la presente revisión, sin embargo, se puede procurar tener una visión en conjunto de la técnica y sus posibilidades. Ésta revisión tiene además como finalidad compensar la carencia de información en español, pues la mayoría se encuentra en inglés, y aquella en español no profundiza lo suficiente o no es actual.

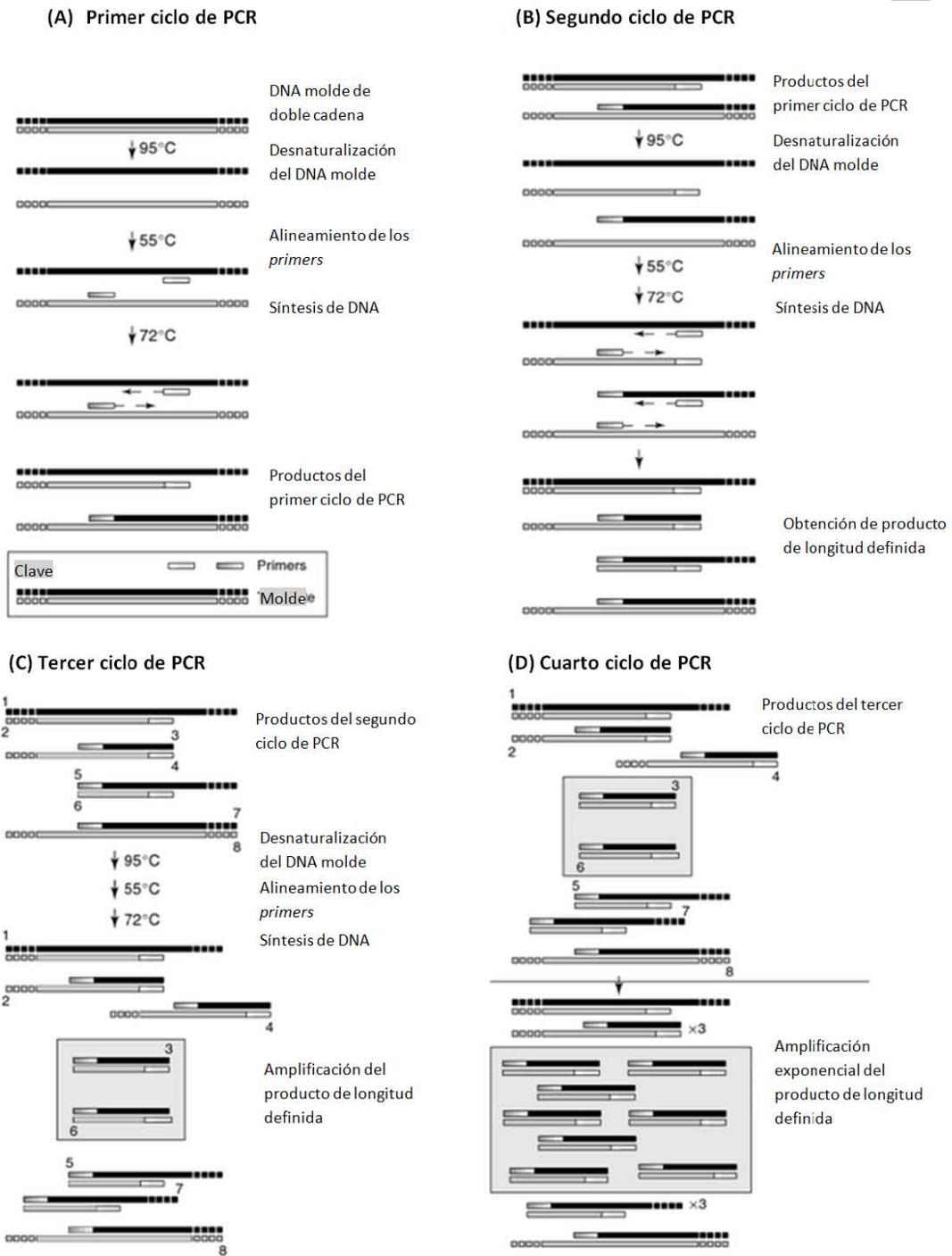


Figura 3. Esquema de los diferentes ciclos de PCR y sus productos (McPherson, 2007).

1. Historia

Una vez que se comprenda el funcionamiento básico de PCR, podrá entenderse la importancia que tiene la técnica, así como el porqué la historia de su “invención” es tan polémica. La PCR es la replicación *in vitro* de una secuencia de DNA que utiliza la herramienta biológica natural de los seres vivos, la DNA polimerasa.

Kary Mullis, en 1980, mientras trabajaba en la corporación CETUS (La primer compañía de DNA recombinante, fundada en 1971), en California, Estados Unidos de América, concibió la manera en que podría iniciar y detener la acción de la DNA polimerasa en secciones específicas a lo largo de la cadena simple de DNA. La técnica de PCR ya había sido descrita como una posibilidad por otros científicos, pero se le atribuye a Mullis la incorporación de un segundo *primer* y el establecimiento de un sistema periódico de ciclos de síntesis que permitió la producción exponencial de copias de DNA. La fuerza de la técnica de PCR podría considerarse como impulsora de la industria biotecnológica, pues gracias a ella, la dependencia de los laboratorios en la cantidad de material genético para su estudio, ya no era determinante (Rabinow, 1996).

PCR es el acoplamiento de varias técnicas de laboratorio previamente conocidas, de ahí que el nombramiento de Mullis como “inventor” es hasta la fecha polémico. Aunque PCR es una técnica, esa denominación, aunada a la compartimentalización en varias técnicas, oculta la manera en que emergió como idea innovadora, así como la práctica necesaria para lograr su aplicación. El enfoque alternativo, que permite una percepción más amplia, está en considerar a su inventor como autor del “concepto”. Kary Mullis, ganó el premio Nobel en química en 1993 por la invención de la PCR, aunque muchos otros científicos tuvieron un rol crucial, tales como Henry Erlich, Norman Arnheim, Randall Saiki, Glen Horn, Corey Levenson, Steven Scharf, Fred Faloona y Tom White (Rabinow, 1996).

Otro argumento dice que PCR no existió sino hasta que se hizo funcionar en un sistema experimental, es decir, tener el concepto no era suficiente, sino demostrar su éxito en la práctica. La técnica fue considerada en artículos científicos, de manera formal, hasta 1985. Tomó cuatro años a los especialistas ver el potencial de esta nueva tecnología, y mucho más a la comunidad científica para empezar a aplicarla y explorar sus posibilidades. En 1985, el prestigioso journal *Science* publicó el artículo relacionado a PCR. En marzo de 1986, *Science* rechazó un artículo enviado por Kary Mullis por “falta de espacio”, donde describía la PCR; y en 1989, cuando el mismo journal nombró a PCR la “molécula del año”, el editor Daniel Koshland Jr., jamás mencionó a Kary Mullis. No había autor, ni genios asociados a la técnica (Rabinow, 1996).

En un reporte que Mullis entregó al *Smithsonian Institution* de biotecnología, él define a la PCR no como una técnica, o una mezcla de varias técnicas, sino como un concepto. Para

Mullis, la PCR se inició en el momento en el que él la concibió. Para él, el trabajo práctico fue de importancia secundaria. En sus propias palabras:

El “¡Ahá!”, el “¡Eureka!” sobre PCR no fue solamente colocar todo junto... como decir que se puede simplemente desnaturalizar, replicar y renaturalizar... cuando era decir que podrías hacer eso tres veces(...). *La parte importante es que puedes tomar una pequeña pieza de DNA de su contexto, y esa es la que puedes amplificar. Eso fue lo que dijo, ‘Puedes usar esto para aislar un fragmento de DNA de una parte compleja de DNA, de su contexto’.* Eso fue lo que consideré algo genial... en cierto modo, junté elementos que ya existían, aunque eso es lo que los inventores siempre hacen. Usualmente, no puedes crear elementos nuevos. El elemento nuevo, si hubo alguno, fue la combinación, la forma en que (los elementos) fueron usados... El hecho de que podía hacerlo una y otra vez, y que podía hacerlo en exactamente la misma manera, es lo que hizo al invento... la definición legal es ‘presentar una solución no anticipada a un problema’, eso es una invención y claramente PCR lo es. (Bartlett, 2003; Rabinow, 1996)

A pesar de que Kary Mullis fue acreditado con la invención original de la PCR, su aplicación exitosa tuvo que ser desarrollada por la corporación CETUS, incluyendo el laboratorio de Henry Erlich, así como el aislamiento de la polimerasa termoestable de una bacteria de aguas termales (Bartlett, 2003).

Rabinow, 1996, hace notar que aunque Mullis decía que PCR era la solución a un gran problema, él nunca decía qué problema era. Un técnico de CETUS, Stephen Scharf, es más perceptivo cuando él menciona que lo verdaderamente sorprendente acerca de PCR es precisamente que no había sido diseñada para solucionar un problema; una vez que existió, empezaron a emerger problemas que podían ser enfrentados con la aplicación de PCR. La versatilidad de PCR es mayor a su aplicabilidad, y la convierte en una herramienta que tiene el poder de crear nuevas situaciones para su uso, así como nuevos campos para su aplicación (Rabinow, 1996).

Mucho del trabajo de desarrollo para la PCR de nuestros días se realizó sin duda en los laboratorios de Mullis y Erlich en la corporación CETUS a mediados de la década de los años ochenta (Bartlett, 2003). Un grupo de científicos de CETUS aún sostiene que sólo cuando el sistema experimental de PCR fue desarrollado, la técnica se convirtió en una entidad científica. Desde éste punto de vista, la PCR necesitaba ser más que varios elementos técnicos acoplados, y más que la ejecución de estos elementos en un nuevo concepto. Como Henry Erlich, científico principal de CETUS durante el desarrollo de PCR, lo describió: “Cuando PCR ya trabajaba correctamente, hasta entonces fue útil” (Rabinow, 1996).

Durante 1984 y 1985, dos grupos a CETUS se encontraron trabajando en PCR: Mullis y Fred Faloon; y un equipo de científicos mayores y los mejores técnicos en sus laboratorios. El segundo equipo tomó medio año en producir resultados confiables y publicables; y cerca de dos años para producir un sistema de reactivos y técnicas que producían resultados experimentales lo suficientemente específicos y sensitivos para poder demostrar el poder y flexibilidad que el concepto de Mullis prometía (Rabinow, 1996).

Aproximadamente cuando *Science* publicó a la PCR como “molécula del año”, los abogados de la corporación *Du Pont* iniciaron un litigio en contra de la corporación CETUS, por las patentes de PCR. *Du Pont* reclamaba que no había nada nuevo en PCR y que sus elementos constituyentes existían desde finales de 1960, cuando habían sido inventados en el laboratorio del premio Nobel H. Gobind Khorana. El jurado votó unánime en más de cincuenta puntos para afirmar las patentes de CETUS en 1987. Legalmente, quien había inventado a PCR estaba determinado. Rabinow en 1996, analiza la situación, argumentando que es un hecho que PCR sólo es una serie de técnicas, entonces hay apenas un caso plausible sobre la existencia de habilidades para diseñar la técnica antes de la conceptualización de Mullis en 1983, como un proceso de amplificación de DNA exponencial de una secuencia específica, aunque es curioso que por quince años después de la supuesta invención de PCR, ninguno de los alegados inventores aplicaron la técnica, la desarrollaron, o la patentaron. Así mismo, él considera que es aceptable que ellos tenían las técnicas, pero les hacía falta el concepto. Así, PCR no existía antes del concepto de Mullis (Rabinow, 1996).

No hay razón por la que el concepto no pudo ser pensado durante los años setentas, lo que permite especular qué factores podrían haber alejado la atención de biólogos y bioquímicos hacia otra parte. Una explicación de Rabinow se relaciona a las técnicas de manipulación de DNA de la época, las cuales seguían dominadas por conceptos y sistemas en biología molecular y bioquímica. Khorana y sus colaboradores se dedicaban a construir un gen y requerían múltiples copias de él. La clonación que inició tempranamente en los años setenta, proveía resultados *in vivo* suficientes para el propósito de su investigación. En retrospectiva puede parecer que los científicos del laboratorio de Khorana estaban cerca de la PCR, sin embargo, es un hecho histórico que la clonación y otras técnicas resolvían sus necesidades. Una vez que sus técnicas se adecuaron a su tarea, Khorana y sus colegas dejaron de explorar otras posibilidades para amplificar DNA (Rabinow, 1996). Es importante mencionar que Mullis no tenía un problema en biología para resolver, aunque otros en CETUS lo tenían durante su trabajo en la mutación del gen de la beta-globina. Él era empleado de CETUS para producir oligonucleótidos, un trabajo repetitivo y lento. Henry Erlich explica esta situación:

Khorana tenía su pregunta científica: ‘¿Se puede sintetizar un gen?’ Para ello, él no eligió ningún fragmento aleatorio de 158 pares de bases. El trabajo de Mullis era la construcción de oligonucleótidos. Él podría hablar de crear uno. Los genes

se convertían en material bioquímico manipulable. Khorana trataba de aprovechar un proceso biológico como parte de un proyecto mayor para crear una versión artificial de un gen. La descontextualización y la amplificación exponencial de Mullis eran el opuesto del esfuerzo de Khorana por mimetizar a la naturaleza. Mullis concibió un modo de convertir un proceso natural (polimerización) en una máquina; la naturaleza al servicio en forma de biomecánica. (Rabinow, 1996)

La creación del concepto de PCR resultó más que una innovación para sus días, una potente herramienta que impulsaría la industria tecnológica, y sigue impulsando hasta nuestros días.

2. Las fases de PCR

PCR es un proceso dinámico en un sistema cerrado. Los reactivos se transforman en producto, deseado o no, así como el reactivo y el producto tienen un equilibrio entre ellos que afecta la velocidad de reacción en sus diferentes etapas (figura 4). En esta sección, se revisarán las principales fases, así como algunas soluciones para enfrentar los diferentes problemas que se presentan en las fases de PCR.

PCR tiene dos fases principales:

Fase de selección: Durante los primeros ciclos, cuando el fragmento de DNA deseado es seleccionado por alineamiento específico de los *primers*.

Fase de amplificación: En los subsecuentes ciclos, cuando el número de copias del DNA deseado incrementa exponencialmente.

Todos los ciclos de PCR inician con la desnaturalización del DNA de la muestra y cualquier producto sintetizado previamente. Conforme la temperatura es disminuida, los *primers* se alinean en el DNA molde. El paso de alineación en los ciclos tempranos requiere que los *primers* exploren el DNA molde por su secuencia complementaria correcta. Después del alineamiento de *primers*, la DNA polimerasa se ancla al complejo *primer*-DNA molde, toma dNTPs del medio, y extiende la polimerización a lo largo de la cadena. Durante los ciclos intermedios, los *primers* tienen más afinidad con el producto recién sintetizado para alinearse e iniciar una nueva extensión. Finalmente, en los últimos ciclos, los productos amplificados en altas concentraciones se hibridizan o alinean entre ellos, por lo tanto, los sitios de unión para los *primers* están bloqueados (figura 5) (McPherson, 1991, 2007).

La fuerza termodinámica que dirige a la PCR es el exceso molar de reactivos con respecto a la cantidad de DNA proveniente de la muestra. Estos cocientes molares de los reactivos se encuentran altos en los primeros ciclos y declinan conforme el producto de PCR se acumula (McPherson, 1991, 2007).

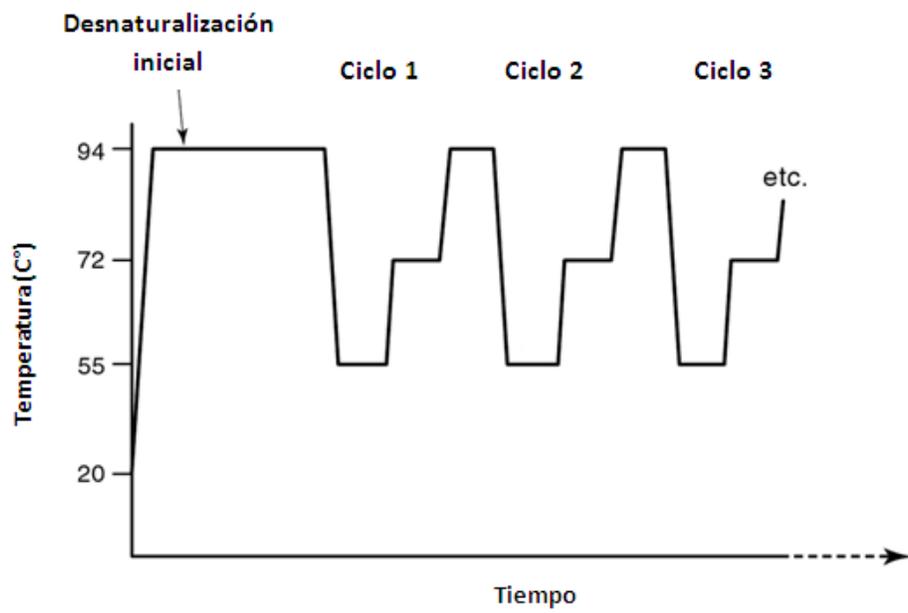


Figura 4. Gráfico que describe los ciclos de PCR de acuerdo a la temperatura y el tiempo (McPherson, 2007).

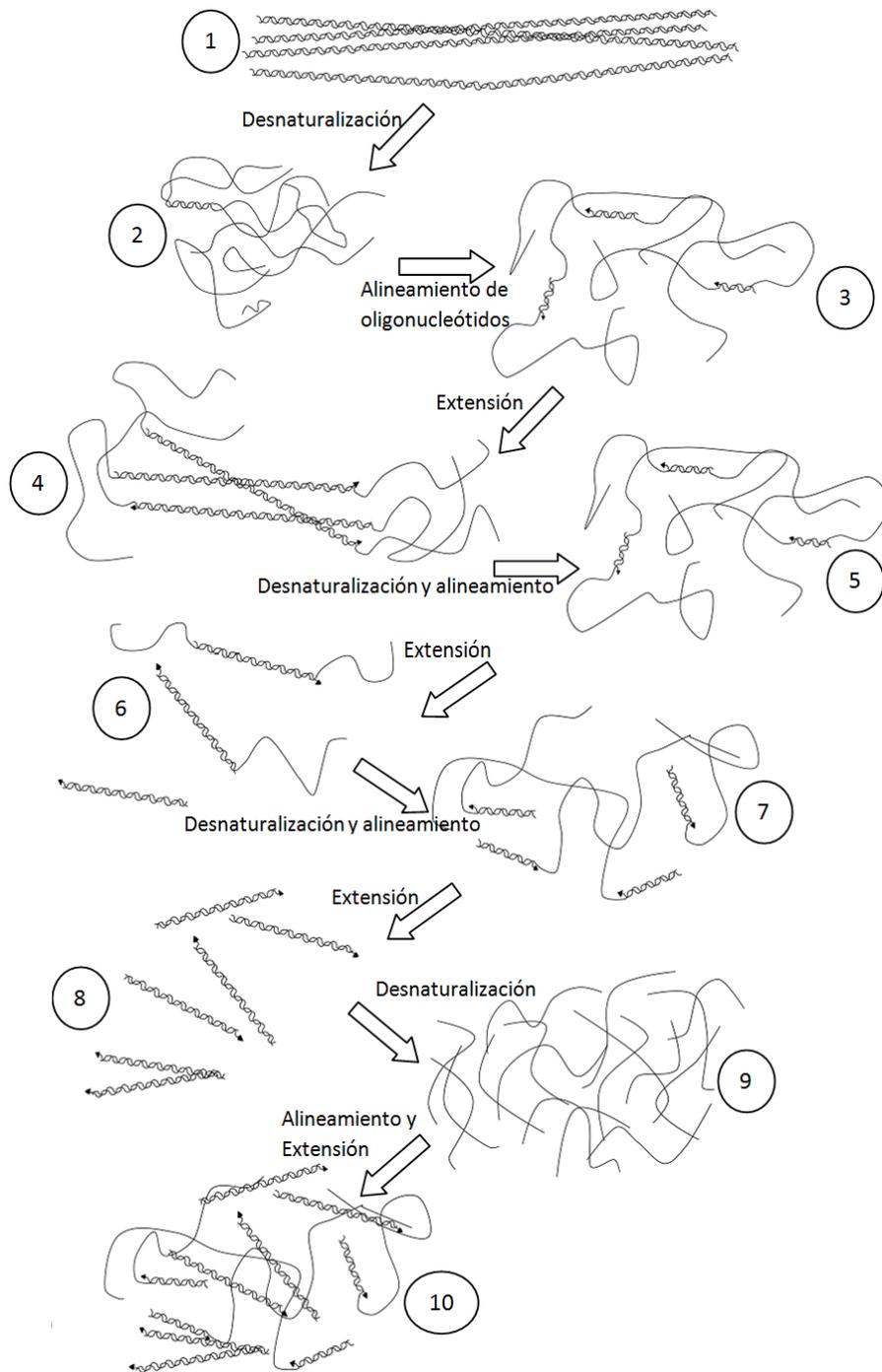


Figura 5. Ciclo de PCR (McPherson, 1991, 2007).

El primer ciclo de PCR consiste en una reacción de extensión del *primer* en la que se produce una cadena sencilla de DNA larga, donde el extremo 3' del *primer* se une suficientemente para iniciar la reacción de extensión (figura 5, números 1, 2 y 3). En los siguientes ciclos, las moléculas de DNA molde resultantes serán más cortas (figura 5, números 4, 6 y 8) que las moléculas iniciales (1, 2). En los últimos ciclos (figura 5, números 8, 9 y 10) las moléculas producidas serán idealmente de igual longitud. La variación del tamaño del producto de PCR también es explicado en la figura 3 (McPherson, 1991, 2007).

Durante los primeros ciclos, para tener resultados exitosos, es necesario que los *primers* se unan adecuadamente en los sitios deseados, pero con poca o nula afinidad por cualquier otra localización del DNA molde. Sólo el producto deseado produce un molde en el cual los *primers* pueden unirse para iniciar una reacción de síntesis de la cadena complementaria en los ciclos siguientes. La unión eficiente de los *primers* a la secuencia deseada es una función del diseño de *primers* (secuencia y longitud) y las condiciones de reacción (especialmente concentración de magnesio y temperatura). La especificidad y pureza del producto final depende de la frecuencia en la cual las reacciones de extensión ocurren de las posiciones o secuencias deseadas contra las no deseadas en la cadena molde (McPherson, 1991, 2007).

Los ajustes de las condiciones de reacción y de los ciclos son el refinamiento que permite mantener las proporciones *primer*-DNA molde y enzima-DNA molde compatibles con una alta especificidad durante la etapa de alineamiento de *primers* en el molde; permiten aumentar los reactivos después de que la amplificación ha logrado la secuencia simple como molde preferible a partir del DNA genómico más complejo. A partir de dichos ajustes, se pueden diseñar perfiles de ciclos térmicos con temperaturas de alineamiento más altas y tiempos de extensión más cortos para los primeros ciclos que para el resto de la PCR, con la finalidad de maximizar el rigor de la fase de alineamiento de *primers* (McPherson, 1991, 2007).

Esencialmente, dado el vasto exceso molar de posibles sitios de alineamiento en la cadena molde con respecto al sitio deseado, cualquier interacción de los *primers* con la cadena molde puede llevar a una extensión de un producto; por lo que la especificidad puede ser difícil de controlar durante los primeros ciclos. Aquello que permite una PCR, es la dependencia de la reacción en la especificidad de dos *primers* que deben unirse a cualquiera de las cadenas complementarias de DNA. Esta especificidad se ve aumentada cuando la hibridación de los *primers* tiene una estabilidad variable, determinada por la temperatura de alineamiento y concentración de magnesio, así como la distancia entre ellos, que debe ser no mayor de 10 kb (McPherson, 1991, 2007).

Al iniciar el segundo ciclo de PCR (figura 5, números 4 y 5), un *primer* puede alinearse en un sitio de una de las cadenas recién sintetizadas y utilizarla para sintetizar la cadena complementaria. En la mezcla de reacción existen cadenas cuyos ambos extremos 3' son precisamente complementarios a los *primers*, aunque la cadena molde original haya tenido

o no una complementariedad adecuada (figura 5, números 6, 7 y 8). Por lo tanto, la iniciación de la extensión de una manera relativamente no específica puede resultar en un producto que posee complementariedad precisa en ambos extremos de los *primers*. Estas moléculas adicionales, en una etapa temprana del proceso, resultarán en un producto heterogéneo (figura 5, número 4). En el peor de los casos, la secuencia deseada en el DNA molde se encontrará en un número de copias menor que el producto no deseado que permite alineación de *primers*. Aún cuando el alineamiento inicial podría haber sido menos eficiente, más moléculas nuevas son producidas a partir del molde “falso” durante los primeros ciclos y constituirán gran fracción del producto final. Esta situación ocurre en el alineamiento de *primers* en PCR de secuencias repetitivas o mitocondriales (McPherson, 1991, 2007).

Dado lo anterior, McPherson recomienda que:

- Las secuencias de los *primers* deben coincidir lo más exactamente posible con la cadena molde y deben tener virtualmente ninguna homología en otras secuencias. El diseño de *primers* se encarga de lograr dichos aspectos.
- Las condiciones de reacción durante los primeros ciclos deben tender a minimizar la posibilidad de que los *primers* inicien una reacción de extensión de cualquier parte del molde, para favorecer las secuencias deseadas.
- Las condiciones de reacción para los ciclos intermedios deben permitir que las moléculas recién sintetizadas sean replicadas perfectamente a una eficiencia alta y sean dobladas en número por cada ciclo.
- La reacción debe detenerse antes de que el producto en mayor proporción se sature y no pueda aumentar de manera exponencial, mientras que los productos contaminantes puedan ser amplificados (McPherson, 1991, 2007).

1. La fase exponencial de amplificación

Durante la mayoría de los ciclos de la fase de amplificación de PCR, los moldes son los segmentos perfectamente delimitados, amplificados en ciclos previos (figura 5). El número de dichos segmentos está determinado por la especificidad de la complementariedad de *primers* de los primeros ciclos. La función de alineamiento de secuencias complementarias por los *primers* se simplifica drásticamente durante la amplificación conforme la fracción del molde total contribuido por el DNA genómico inicial se vuelve insignificante. La complejidad de esta función es efectivamente reducida por el gran exceso de material recién amplificado que posee complementariedad perfecta para ambos *primers*.

Una vez que los productos existen con precisa complementariedad en sus extremos con los *primers*, la mayoría de las mezclas de reacción poseen una cantidad suficiente de *primers* y enzima para que todas las secuencias sean replicadas en cada ciclo. Cualquier molécula presente será multiplicada en número en cada ciclo y su proporción permanecerá sin alteraciones por varios ciclos mientras todas aumentan en número. Las condiciones en ésta fase permiten el crecimiento exponencial del producto, que puede observarse como una curva exponencial (figura 6). Los únicos requerimientos para que esta fase proceda es tener suficientes cantidades de *primers* y enzima; y las condiciones que permitan la alineación de *primers*, extensión y desnaturalización del producto antes de iniciar el próximo ciclo (McPherson, 1991, 2007).

2. La fase de meseta

Conforme los productos de reacción se acumulan, la enzima presente se ocupa completamente y la proporción *primer*-molde se reduce, promoviendo el alineamiento entre las cadenas producidas. Además, como los productos son secuencias más largas que los *primers*, el realineamiento entre productos puede suceder a temperaturas mucho más altas de aquellas que permitirían el alineamiento de *primers*, por lo que el alineamiento tiende a ocurrir inevitablemente conforme la mezcla de reacción se enfría después del paso de desnaturalización. Cuando la auto-alineación sea significativa o la cantidad de enzima sea limitante, la reacción comienza a saturarse y deja de ser exponencial. En ésta etapa, es posible observar un comportamiento constante en la gráfica fluorescencia normalizada de RT-PCR (figura 6) (McPherson, 1991, 2007).

La fase de amplificación es auto-limitada para cualquier secuencia. El ciclo térmico después de ésta etapa conduce a la amplificación de productos inespecíficos cuyos sitios podrían haber sido alineados en los primeros ciclos. Además, habrá un amortiguamiento del aumento exponencial tal que el número de las moléculas de mayor prevalencia aumentará con una velocidad menor y las moléculas menos comunes continuarán su aumento exponencial. Generalmente la molécula más frecuente será el producto deseado y las otras serán contaminantes de alineamientos inespecíficos (McPherson, 1991).

Existe una variedad de técnicas que han sido desarrolladas para balancear la dinámica de PCR hacia el producto deseado.

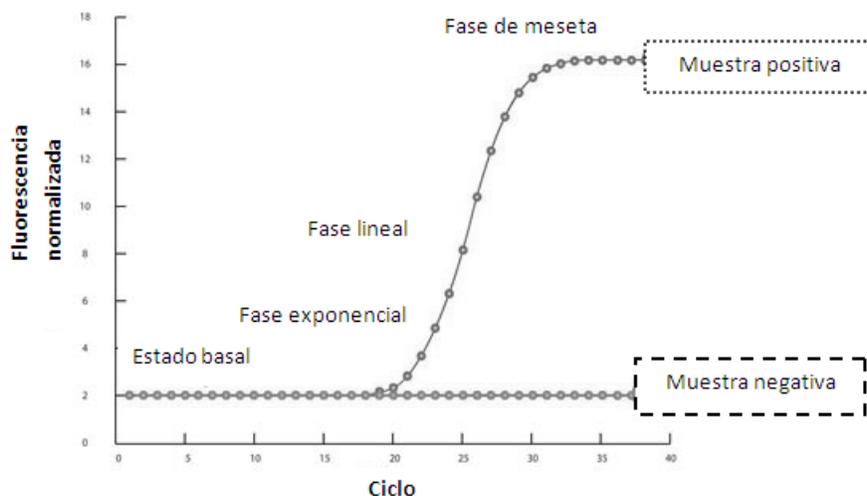


Figura 6. Fases de la PCR. Ciclos iniciales, fase exponencial, fase lineal, fase de meseta. La medición se realizó con DNA marcado con fluorescencia en RT-PCR. Éste tipo de curvas se utilizan en la evaluación de calidad de PCR en tiempo real (Abbot Molecular, 2013).

3. *Booster* PCR

Durante la fase de alineación se requiere un exceso de reactivos con respecto a las pocas moléculas de DNA molde disponible. Si el DNA en la muestra se encuentra diluido, esta fase será más difícil y la frecuencia de colisiones entre *primer*-molde se reduce considerablemente, tanto que los contactos *primer-primer* son más comunes, ocasionando una tendencia a formación de dímeros de *primers* y otros artefactos. Para enfrentar a una muestra diluida se utiliza la *Booster* PCR. En ésta los primeros ciclos se realizan con DNA de la muestra y *primers* diluidos, y en los siguientes ciclos, se aumenta el proceso de amplificación al aumentar la concentración de *primers* (McPherson, 1991).

4. *Hot-start* PCR

Hot-start PCR es popular en diagnóstico y medicina forense, pues es apropiada para la amplificación de DNA diluido. Consiste en la exclusión deliberada de al menos un reactivo esencial de la mezcla de reacción (dNTPs, Mg^{2+} , polimerasa o *primers*). El componente faltante es añadido sólo cuando la mezcla ha alcanzado una temperatura de 70 °C o más.

La finalidad es que el alineamiento de *primers* en las secuencias erróneas no ocurra bajo condiciones de baja especificidad, en la transición de temperatura ambiente a la temperatura del primer paso de desnaturalización (McPherson, 1991).

El efecto beneficioso de *Hot-start* PCR podría ser que hace vulnerable al DNA a una amplificación más selectiva durante los primeros ciclos e impide la síntesis de cualquier producto extraño que proceda de un alineamiento erróneo de *primer*-molde a temperaturas de 30-60 °C, un rango en el que *Taq* polimerasa posee una actividad parcial. Dichos productos indeseados serían sintetizados en el primer ciclo si la mezcla de reacción fuera inicialmente preparada a temperatura ambiente y luego calentada a 94 °C. En el segundo ciclo, estos productos serían amplificados (McPherson, 1991).

5. *Touchdown* PCR

La PCR *Touchdown* consiste en iniciar los ciclos por una temperatura de alineamiento muy alta y luego reducirla gradualmente en los siguientes ciclos. Por ejemplo, la temperatura de alineamiento puede reducirse 1 °C cada segundo ciclo, partiendo de 65 °C a 55 °C en 20 ciclos, y luego mantenerla a 55 °C por otros 10 ciclos. Mientras que exista más alineamiento de los *primers* a la secuencia de DNA correcta que a secuencias inespecíficas, el producto correcto será preferiblemente amplificado. Dado que esta preferencia ocurre en los primeros ciclos que permiten cualquier alineamiento, el cociente de producto correcto a incorrecto será mantenido cuando temperaturas más permisivas sean alcanzadas en ciclos posteriores (McPherson, 1991).

6. Adyuvantes

El rigor del alineamiento del primer con la secuencia deseada puede ser aumentado al añadir sustancias de desnaturalización a la mezcla de reacción de PCR. Estos reactivos incluyen formamida, DMSO, cloruro de tetrametilamonio y detergentes (McPherson, 1991).

La constitución del DNA molde puede afectar la especificidad, puede causar problemas especialmente severos en el caso de secuencias con concentraciones altas en GC. Estas secuencias difíciles pueden amplificarse si se añade el adyuvante adecuado a la mezcla de reactivos (Karuppiah, 2011). Se han utilizado adyuvantes como albúmina sérica bovina (BSA), dimetilsulfóxido (DMSO) y glicerol, que mejoran la eficiencia de amplificación (mayor cantidad de producto) y especificidad (ausencia de productos no específicos). DMSO se usa para mejorar la secuenciación de DNA con alto contenido en GC, aunque el mecanismo es desconocido. La eficiencia y especificidad de la PCR cambia proporcionalmente con la

concentración de DMSO. Una secuencia rica en GC, puede lograr una mejor amplificación con 5 % de DMSO (Kitade, 2003).

Se han propuesto varios mecanismos de optimización del DMSO para la PCR. Puede ser que el DMSO afecte la temperatura de fusión del DNA cebador, el perfil térmico de la DNA polimerasa y el grado de desnaturalización a una temperatura dada. Se ha observado que el DMSO tiene la capacidad de desestabilizar el DNA dúplex. La presencia de una alta tasa de contenido GC en el DNA dúplex, podría estabilizar la hélice tanto en productos de PCR y estructuras secundarias, y podría inhibir la PCR. En este contexto, se ha sugerido que el DMSO es efectivo para desestabilizar y amplificar DNA con alto contenido en GC (Karuppiyah, 2011).

El glicerol puede proteger a la DNA polimerasa y reduce la T_m al desestabilizar al DNA. Posiblemente, debido a sus propiedades; a 10 % ha probado ser útil en la amplificación de productos largos de PCR (más de 2500 bp). La formamida al 10 % estabiliza a la DNA polimerasa, en presencia de glicerol al 10 %. El efecto de esta combinación consiste en la reducción de T_m de la cadena doble de DNA sin dañar la enzima. La combinación de éstos dos adyuvantes así como la formamida sola, facilitan la amplificación a temperaturas más bajas de desnaturalización, y la amplificación de secuencias ricas en GC (Saunders, 1999).

También se han utilizado líquidos iónicos que promueven la amplificación por PCR. Los líquidos iónicos son sales fundidas con bajo punto de fusión, compuestas enteramente por iones, y la mayoría son líquidos a temperatura ambiental. Su uso mejora la amplificación de secuencias ricas en GC. La organización de las moléculas de agua alrededor de las bases de DNA tiene una influencia sobre la estabilidad del dúplex. La adición de líquidos iónicos, los cuales son menos polares que el agua, disminuyen la constante dieléctrica del solvente y debilitan las interacciones entre las cadenas, lo cual lleva a rigidez aminorada y finalmente desestabiliza y relaja los dúplex de DNA. Existe evidencia de que los líquidos iónicos reducen las temperaturas de alineamiento y promueven la amplificación de DNA, sin embargo los mecanismos aún no son completamente comprendidos (Shi, 2012).

7. Inhibición

La PCR puede ser inhibida o mejorada por la presencia de varias sustancias que pueden provenir del espécimen biológico mismo, del método y los reactivos involucrados para extraer el DNA. Una gran variedad de materiales biológicos son utilizados para PCR, incluyendo tejidos animales, fluidos corporales y muestras bacterianas. Muchos de éstos podrían ser obtenidos de muestras ambientales como alimentos, suelos o lodos. Las muestras pueden contener sustancias inhibitoras para la PCR, aunque los mecanismos de inhibición y si existen

efectos antagonistas entre componentes individuales, no siempre son conocidos (Saunders, 1999).

Asumiendo que sólo una fracción de una muestra o solución de extracción dadas, es transferida a la mezcla de PCR, sólo algunas sustancias alcanzarán concentraciones capaces de inhibir por sí mismas. Sin embargo, puede haber compuestos individuales que sean concentrados durante la extracción, por ejemplo por precipitación con la muestra de DNA. El modo de acción inhibitorio de algunos de los compuestos individuales puede estar relacionado a precipitación de DNA, desnaturalización de DNA o la DNA polimerasa, secuestro de iones magnesio o adición de exceso de magnesio (Saunders, 1999).

La PCR es sensible a muestras con grasas y proteínas, sin embargo el tratamiento con NaOH/SDS caliente reduce el efecto significativamente. Algunos medios de cultivo (Fraser, MLEB, MRB y Rappaport) interfieren con el análisis y en la mayoría de los medios de cultivo, es posible asignar un efecto inhibitorio a sus componentes. Varios compuestos como detergentes, lisozimas, NaOH, alcoholes, EDGA, EGTA, utilizados en procedimientos de extracción de DNA también tienen efectos inhibitorios. Varios compuestos utilizados en el laboratorio pueden tener un efecto inhibitorio dependiendo de su concentración (tabla 1) (Rossen, 1992).

Tabla 1. Concentraciones de compuestos comúnmente utilizados en biología molecular, que pueden ser tolerados o causar una inhibición cuando son incluidos en la mezcla de PCR.

Compuesto	Concentración tolerable	Concentración inhibitoria
Fenol	0.1 %	0.5 %
Cloroformo	5 %	n.d.
Dodecil sulfato de sodio	0.005 %	0.01 %
Dodecil sulfato de litio	0.005 %	0.05 %
Nonidet-P40	0.2 %	2 %
Tween 20	2 %	10 %
Triton X-100	1 %	2 %
Lisozimas	n.d.	0.5 mg/mL
Hidróxido de sodio	5 mM	8 mM
Acetato de amonio	75 mM	150 mM
Etanol	2.5 %	5 %
Isopropanol	0.5 %	1 %
Acetato de potasio	0.02 M	0.2 M
Ditiotreitol	10 mM	n.d.
Albúmina sérica bovina	10 mg/mL	25 mg/mL
EDTA	0.1 mM	1 mM
Ácido etilenglicol-bis(β -aminoetil éter)-tetraacético	0.1 mM	1 mM
Espermidina	0.1 mM	1 mM
Proteínasa K	0.5 mg/mL	n.d.
Bactotripsina	5 μ L/mL	n.d.
Bromuro de etidio	0.1 %	1 %
Acetonitrilo	2.5 %	10 %
Acetato de trietilamonio	20 mM	75 mM
Isocianato de Guanidina	20 mM	100 mM
Lauroil sarcosinato de sodio	0.01 %	0.05 %
Bromuro de cetiltrimetilamonio	0.001 %	0.01 %
Sucrosa	5 %	10 %

n.d.: no determinado. (Saunders, 1999, capítulo 6)

3. DNA polimerasa

La DNA polimerasa se encarga de duplicar con gran precisión la información genética durante la fase S del ciclo celular. La DNA polimerasa tiene menos de un error por cien millones de bases. La gran complementariedad entre citosina, guanina, adenina y timina, el lenguaje del DNA, es lo que permite esta gran especificidad y alta precisión de la enzima (Goodsell, 2000; Nelson, 2008). En PCR, la DNA polimerasa es la que construye una nueva secuencia a partir de la cadena de DNA molde. Las copias son luego calentadas y duplicadas, generando más copias. La enzima añade desoxiribonucleótidos (dNTPs) al hidroxilo libre del extremo 3' de un *primer* que inicia la replicación. Este *primer* (oligonucleótido) puede ser DNA o RNA, y ser corto o largo. Las DNA polimerasas no pueden iniciar la síntesis de DNA sin él y catalizan la adición de dNTPs al *primer*, moviéndose a lo largo de la cadena patrón en una dirección de 5' → 3'. La nueva cadena se sintetiza utilizando las reglas de apareamiento de bases de Watson y Crick: adenina con timina, y citosina con guanina (Thor, 2007).

1. Estructura y función

La estructura de la DNA polimerasa suele ser comparada con la forma de una mano por cuestiones didácticas. El espacio entre las estructuras de “dedos” y el “pulgar”, que son llamadas así por la similitud figurativa, es exactamente el tamaño de la doble hélice (figura 7) (Goodsell, 2000). La “palma” de la mano cataliza la reacción de transferencia del fosforil, los “dedos” interactúan con los nucleósidos trifosfato entrantes y la cadena patrón que son emparejados, y el “pulgar” ayuda a posicionar la cadena doble de DNA y la translación de la enzima a lo largo de la cadena patrón (Thor, 2007). En la figura 8, la cadena patrón está en morado y la cadena nueva en verde. La enzima contiene tres sitios activos separados: el sitio polimerasa, cercano a la parte superior de la imagen, que sintetiza la nueva cadena al añadir nucleótidos; el sitio 3' → 5' exonucleasa o de corrección de pruebas, cercano al centro en la polimerasa de *E. coli*; y el sitio 5' → 3' exonucleasa, que más tarde remueve el *primer* que es usado para originar la replicación de DNA. La polimerasa de *Thermus aquaticus* no

tiene la capacidad de corrección de pruebas, probablemente porque la alta temperatura en que vive compensa la misma función (Goodsell, 2000).

2. Mecanismo de polimerización

La DNA polimerasa no puede iniciar la polimerización por sí misma en la cadena inicial o molde. Sólo puede añadir nucleótidos en el hidroxilo del extremo 3' de una cadena preexistente (figura 9). La cadena que provee dicho hidroxilo terminal es llamada cadena cebadora o *primer*. Todas las DNA polimerasas, incluyendo las bacterianas y las eucariontes, tienen estos requerimientos específicos: una cadena de DNA a copiar y un *primer* al cual añadir nucleótidos (Karp, 2010).

Los residuos encontrados en el sitio activo de *Taq* polimerasa son Arg 682, Lys 758, Tyr 766, Arg 841 y His 881 (figura 10). La cadena patrón se acomoda de acuerdo a la posición de los residuos mencionados (figura 11). Un residuo separado, Phe 667, ha mostrado tener un papel importante en la unión de dNTP (Thor, 2007; Eom, 1996). Los dos iones metálicos se encuentran unidos a la enzima por residuos altamente conservados de ácido aspártico (Karp, 2010).

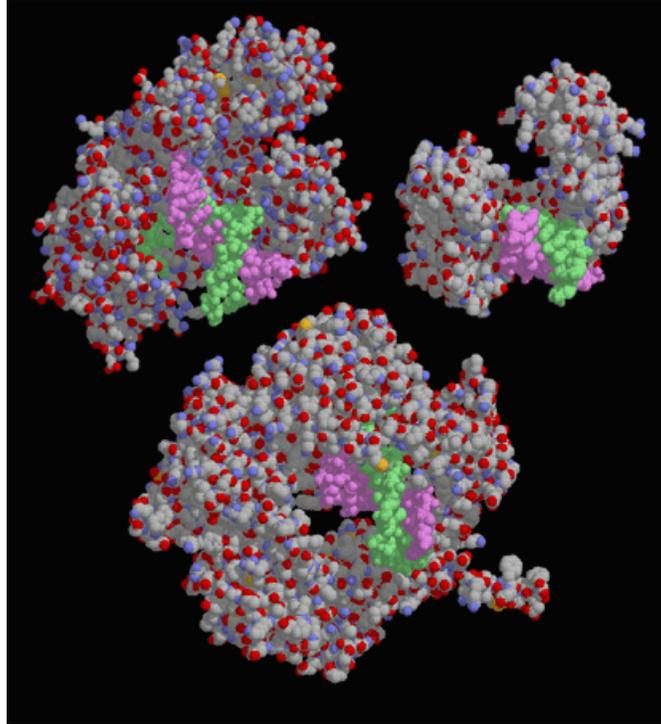


Figura 7. Tres polimerasas simples, cada una con un fragmento de DNA. En cada una, el DNA molde está en morado, y la cadena recién construida en verde. La DNA polimerasa I de *E. coli* está en la parte superior izquierda, y a la derecha está la DNA polimerasa humana. En la parte de abajo se encuentra una DNA polimerasa viral. Son bastante diferentes en tamaño y forma, pero es importante notar cómo todas envuelven al DNA, y encerrándolo en un espacio donde la reacción de síntesis se lleva a cabo. Estas ilustraciones fueron creadas con *RasMol* (Goodsell, 2000).

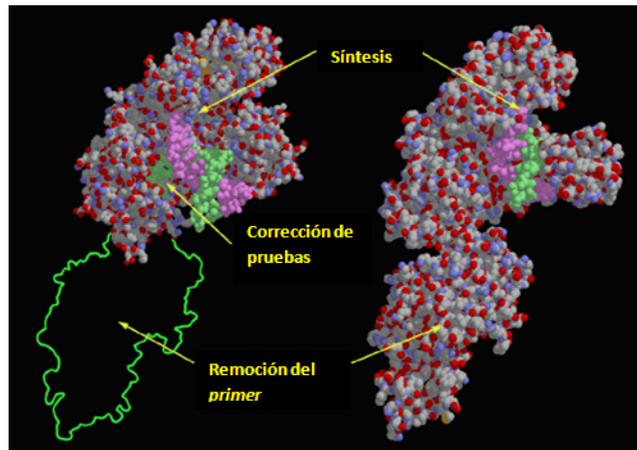


Figura 8. La DNA polimerasa tiene una estructura básicamente similar a una mano. La enzima a la izquierda proviene de *Escherichia coli*, y a la derecha de *Thermus aquaticus*. La parte faltante, contorneada en verde es parte de un estudio por separado de la enzima (ver Enzima de *E. coli* y fragmento de Klenow) (Goodsell, 2000).

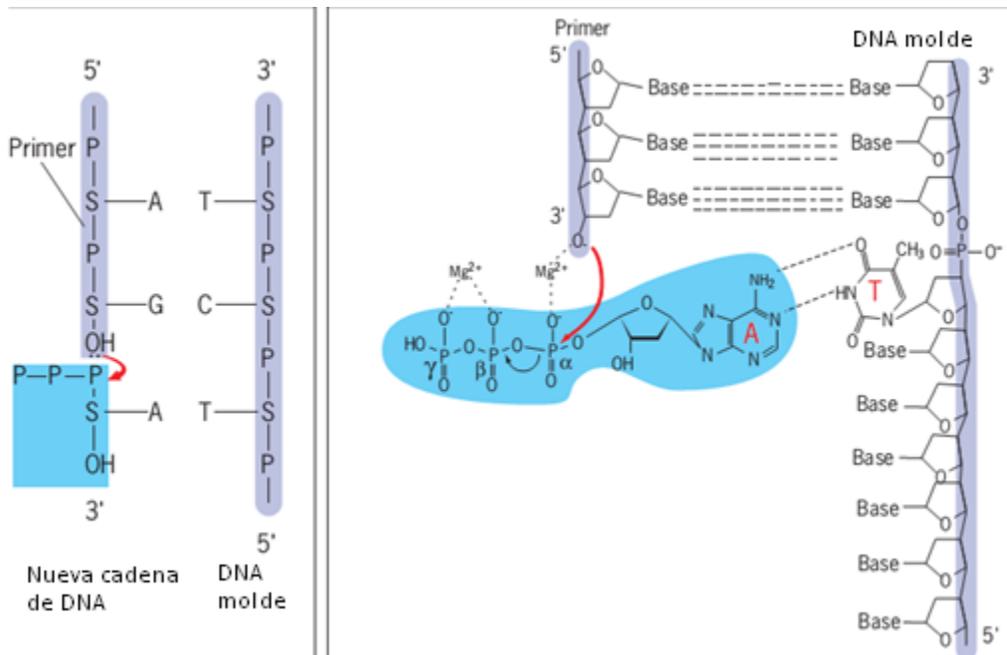


Figura 9. La polimerización de los nucleótidos sucede en la terminal 3' del *primer*. La enzima selecciona los nucleótidos para incorporarlos basándose en su habilidad de emparejarse con el nucleótido de la cadena plantilla. Derecha: modelo de polimerización con el mecanismo de reacción de los dos iones metálicos (Karp, 2010).

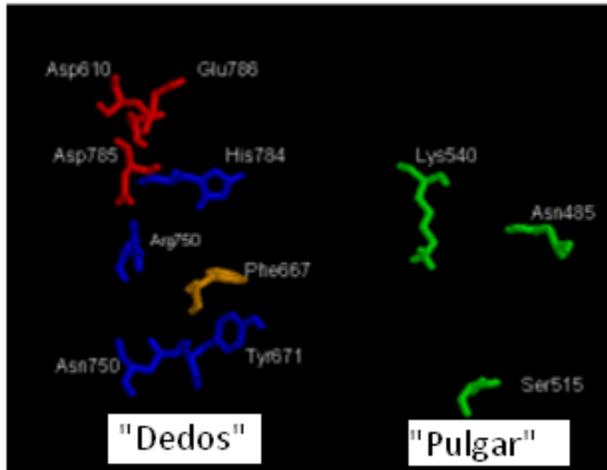


Figura 10. Residuos de *Taq* polimerasa en contacto con el DNA. Los residuos en rojo forman el centro catalítico del sitio activo. Entran en contacto con la terminal 3'-OH de la cadena patrón. Los residuos anaranjados están altamente conservados en comparación con Poli I de *E. coli* al igual que los residuos azules. Los residuos verdes se encuentran en la punta del *pulgar* e interactúan con la cadena patrón. Esta figura fue creada utilizando *Rasmol* (Thor, 2007; Eom, 1996).

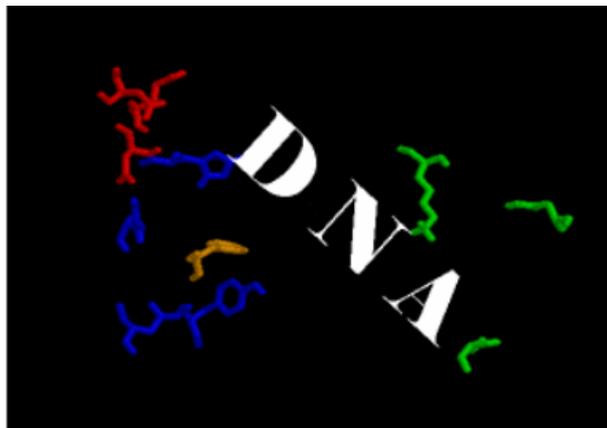


Figura 11. Localización aproximada de la cadena molde en relación con los residuos de la *mano*. Esta figura fue hecha utilizando *RasMol* (Thor, 2007; Eom, 1996).

Las enzimas que aquí se mencionan son relativamente sencillas, una enzima se encarga de todo. Sin embargo, en las células humanas, el proceso es más complejo. Incluye enzimas que se componen de proteínas separadas que desenrollan la hélice de DNA, construyen un RNA cebador o *primer*, y crean la nueva cadena. También poseen una proteína en forma de anillo que fija la polimerasa a la cadena de DNA. Una sola célula generalmente tiene diferentes polimerasas. Algunas polimerasas complejas hacen el gran trabajo de la replicación cuando la célula se divide, mientras que otras más simples se encargan del mantenimiento y reparación del DNA (Goodsell, 2000).

3. Utilidad del magnesio en la polimerización de nucleótidos

Todas las DNA polimerasas utilizan dos iones metálicos, usualmente magnesio, para la catálisis de la reacción de transferencia de fosforilos, llevada a cabo en la “palma”. Estos iones se unen a la enzima en un sitio activo con residuos asparato (carboxilato). Un ión metálico sirve para activar el hidroxilo (-OH) del nucleótido en el extremo 3' del *primer*. El ión retira el hidrógeno para facilitar un ataque nucleofílico del oxígeno cargado negativamente, hacia el α -fosfato de los dNTP entrantes. El segundo ión tiene dos funciones, estabiliza la carga negativa que se acumula por el oxígeno liberado y facilita la salida de los β - y γ -fosfatos (pirofosfato) (figura 12). Ambos iones metálicos sirven para estabilizar el estado de transición (Thor, 2007; Eom, 1996; Karp, 2010).

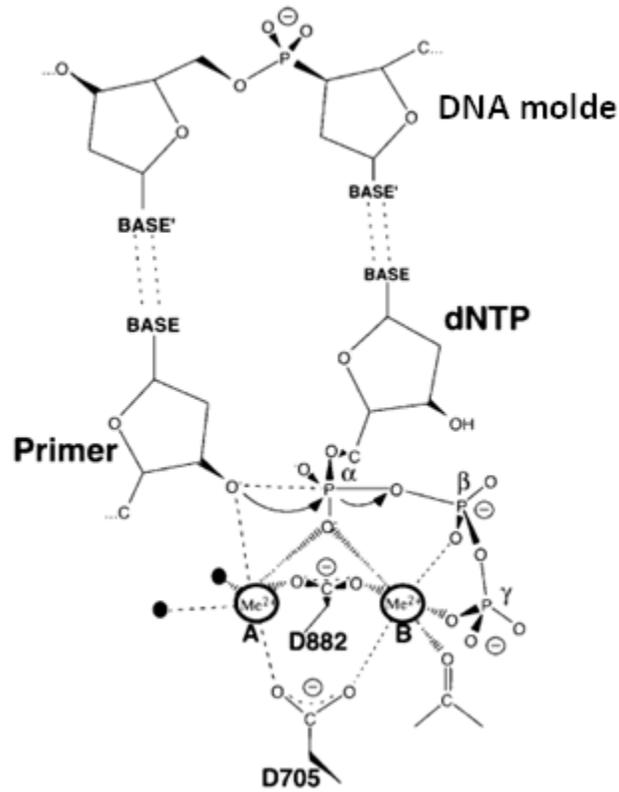


Figura 12. Mecanismo de los dos iones metálicos de la DNA polimerasa. Los números corresponden a los dos aspartatos conservados que tiene la DNA polimerasa de *E. coli*. El sitio activo posee dos iones metálicos. El ion metálico A activa el 3'-OH del primer para un ataque en el α-fosfato del dNTP. El ion metálico B tiene el doble rol de estabilización de la carga negativa que se incrementa por la liberación del oxígeno de los β-, γ-fosfatos (Steitz, 1999).

4. Actividad exonucleasa

Las polimerasas poseen diferentes actividades contenidas en dominios diferentes y pueden intercambiarlos para realizar diferentes actividades bajo ciertas estimulaciones (Lyamichev, 1999). La polimerasa es básicamente tres enzimas en una: polimerasa, exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ y exonucleasa $5' \rightarrow 3'$ (Karp, 2010). Estas actividades varían de enzima a enzima (Goodsell, 2000; Lyamichev, 1999; Thor, 2007; Steitz, 1999).

La actividad exonucleasa $5' \rightarrow 3'$ puede degradar cualquier tipo de ácido nucleico. Durante la replicación de la cadena retardada, en la iniciación de los fragmentos de Okazaki, hay una extensión de RNA en el extremo $5'$ de cada fragmento, el cual se remueve con la actividad $5' \rightarrow 3'$ exonucleasa de la DNA polimerasa. Conforme la enzima elimina los nucleótidos del *primer* de RNA, su capacidad polimerizadora simultáneamente rellena los huecos resultantes con dNTPs. El último dNTP incorporado es subsecuentemente unido covalentemente al extremo $5'$ del DNA sintetizado por la DNA ligasa (Karp, 2010) (figura 13). Cabe mencionar que la eliminación del *primer* no se lleva a cabo en la PCR, dado que la síntesis es lineal y no doble (cadena líder y retrasada) como en la replicación normal, donde la síntesis de la cadena retrasada es discontinua y se forman los fragmentos de Okazaki que más adelante deben ser unidos.

La DNA polimerasa posee la capacidad de corrección de pruebas o actividad $3' \rightarrow 5'$ exonucleasa. Después de copiar una base, si es incorrecta, la corta y extrae de la secuencia para corregirla (Goodsell, 2000; Steitz, 1999). Ésta actividad se revisará a más detalle en la sección de fidelidad en polimerasas para PCR.

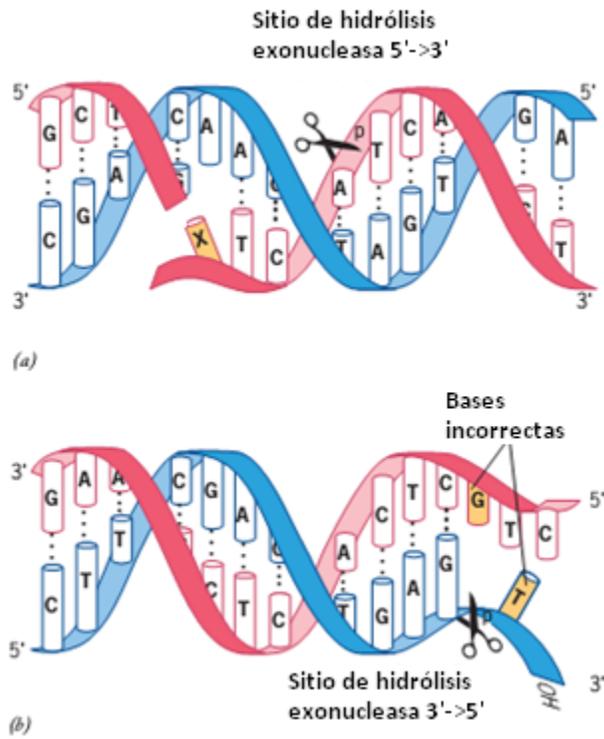


Figura 13. Actividad exonucleasa de la DNA polimerasa. a) La actividad $5' \rightarrow 3'$ exonucleasa remueve los nucleótidos del extremo $5'$ de una muesca de una sola cadena. Esta actividad tiene el papel de remover los primers de RNA. b) La actividad $3' \rightarrow 5'$ exonucleasa remueve nucleótidos mal colocados en el extremo $3'$ de la cadena en crecimiento. Esta actividad tiene importancia en la síntesis de DNA (Karp, 2010).

5. Clasificación de las DNA polimerasas por familias

Esta clasificación se realizó en base a las secuencia de aminoácidos de las polimerasas, así como análisis de cristalografía. Las DNA polimerasas se dividen en al menos cinco familias diferentes, y se conocen estructuras cristalinas representativas en cuatro de estas familias. Probablemente la familia más estudiada es la DNA polimerasa I (Pol I) o familia A, en la que se incluyen los fragmentos Klenow de *E. coli*, DNA polimerasa I de *Bacillus*, *Taq* polimerasa y la T7 RNA y DNA polimerasas, de las cuales todas las estructuras cristalinas son conocidas. La segunda familia de DNA polimerasas dependientes de DNA, es la DNA polimerasa α (pol α) o familia B. Todas las polimerasas de replicación eucarionte y las polimerasas de los bacteriófagos T4 y RB69 pertenecen a esta familia, y la estructura cristalina de la polimerasa RB69 muestra cierta similitud a las enzimas de la familia pol I y numerosas diferencias.

Las transcriptasas reversas (RT), RNA polimerasas dependientes de RNA y la telomerasa muestran ciertas similitudes estructurales, mientras que la DNA polimerasa β no muestra relación estructural a ninguna de estas familias. Las DNA polimerasas III bacterianas también forman una familia que no se relaciona con las polimerasas mencionadas anteriormente (Steitz, 1999).

Todas las polimerasas de estructura conocida comparten una arquitectura común. Poseen una forma comparable a una mano derecha y ha sido descrito que contienen dominios de “pulgar”, “palma” y “dedos” (Steitz, 1999).

6. DNA polimerasa de *E. coli* y el fragmento de Klenow

La DNA polimerasa I puede separarse en dos fragmentos por acción de la proteasa subtilisina. Se obtienen dos fragmentos, entre ellos, el fragmento de Klenow, que posee actividad polimerasa $5' \rightarrow 3'$ y actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ para la corrección de pruebas, pero pierde la actividad exonucleasa $5' \rightarrow 3'$, la cual solamente posee el otro fragmento (Klenow, 1970).

El fragmento de Klenow tiene la ventaja de mantener la fidelidad polimerizadora de la holoenzima, sin la actividad de degradación de los extremos $5'$ (actividad $5'$ -exonucleasa). Por ello, tiene gran utilidad en el laboratorio y aún se utiliza para algunos protocolos como la síntesis de DNA de doble cadena, relleno de extremos $3'$ de fragmentos de DNA y dirección de extremos $3'$ protuberantes. Este fragmento fue la primera enzima utilizada para PCR, mas tarde reemplazada por la *Taq* polimerasa (Evans, 2008; Klenow, 1970).

7. *Taq* polimerasa

Esta enzima proviene del microorganismo *Thermus aquaticus*, también conocido como *Thermophilus aquaticus*. Posee una gran termoestabilidad y es la única enzima que puede resistir los parámetros del termociclador requeridos para PCR, por lo que sustituyó al fragmento de Klenow en PCR. La *Taq* polimerasa es homóloga a la DNA polimerasa I de *E. coli*. Estructuralmente, está constituida de tres dominios específicos (figura 14); el dominio polimerasa, el 3' exonucleasa, y el 5' nucleasa (Thor, 2007; Eom, 1996). La *Taq* polimerasa no se inactiva rápidamente a temperaturas altas y funciona óptimamente a 72 °C, permite la síntesis de DNA a temperaturas mayores que la enzima de *E. coli* y asegura que la cadena molde de DNA sea copiada con mayor fidelidad, como resultado de un acoplamiento más intenso de los *primers*. Después de su aislamiento, CETUS y Perkin-Elmer introdujeron los termocicladores cerrados, utilizados actualmente, especiales para el uso de la *Taq* polimerasa (Bartlett, 2003).

Las estructuras de los dominios polimerasa de *Taq* polimerasa y del fragmento de Klenow (KF) de la *Pol I* son casi idénticos, mientras que la estructura de un dominio vestigial de edición exonucleasa 3' → 5' de *Taq* polimerasa que se encuentra entre otros dos dominios está dramáticamente alterado, resultando en la ausencia de esta actividad en la enzima termoestable (Eom, 1996). Este fragmento alterado es conocido como fragmento *Klentaq* (Thor, 2007).

Se conocen dos conformaciones diferentes de esta enzima; una estructura en la cual el dominio 5' exonucleasa se extiende directamente, y otra en la que el dominio se dobla hacia el dominio *Klentaq* (figura 15). En la conformación elongada, los sitios activos de polimerización y 5' exonucleasa, están separados aproximadamente por 70 Å. Esta es la conformación observada en la ausencia de DNA. Cuando el DNA se une a la enzima, esta adopta la conformación compacta, aunque dicha conformación pone a los dos sitios activos a mayor proximidad (40 Å), no es suficiente para explicar la actividad *Taq* polimerasa en una sola cadena de DNA. Hay evidencia de un acomplejamiento de DNA con la enzima, doblándose 120°, un ángulo que podría permitir al DNA, como sustrato, tener acceso a ambos sitios activos y tener una actividad catalítica simultánea (Thor, 2007).

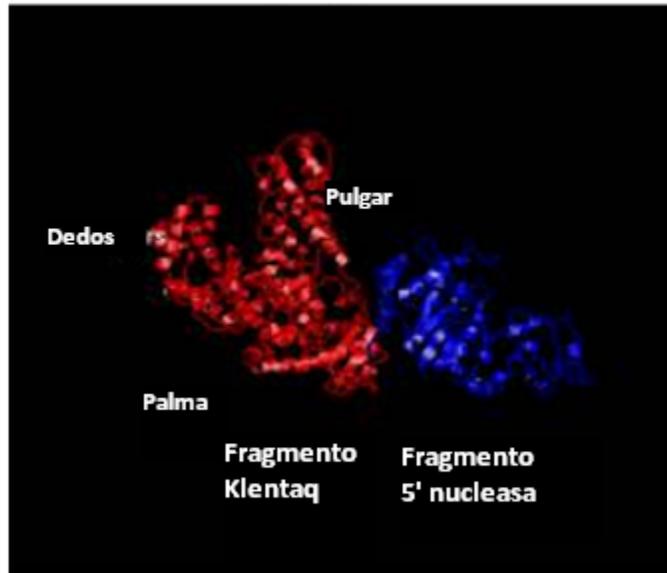


Figura 14. Dominios de la *Taq* polimerasa (Thor, 2007).

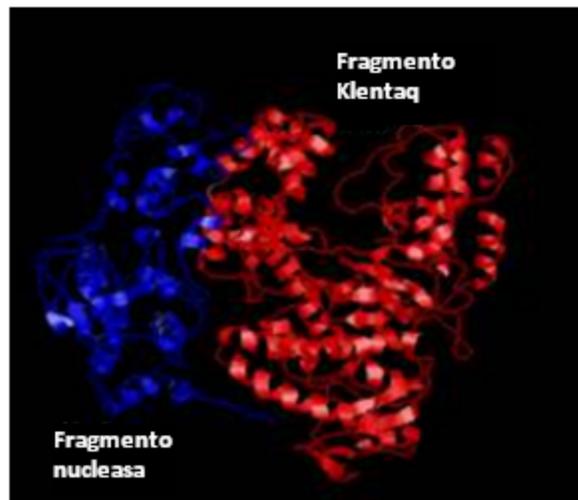


Figura 15. *Taq* polimerasa en la conformación compacta. El fragmento *Klentaq* que contiene el sitio activo polimerasa está en rojo, y el fragmento de la enzima conteniendo el sitio activo nucleasa está en azul. Figura creada en *RasMol* (Thor, 2007).

8. Termoestabilidad de *Taq* polimerasa

La vida media de la *Taq* polimerasa es 9 minutos en 97.5 °C. El origen estructural de dicha termoestabilidad probablemente proviene de la reorganización evolutiva del fragmento *Klentaq*. Esta sección de la enzima contiene el dominio 3' exonucleasa. Las comparaciones entre este dominio y el fragmento Klenow muestran que la *Taq* polimerasa tiene una estructura marcadamente diferente. Residuos ácidos, esenciales para unión catiónica (ácido glutámico) están reemplazados en *Taq* polimerasa por residuos incapaces de unir metales. El fragmento *Klentaq* es mucho más compacto y posee cambios en residuos que contribuyen a la estabilización de la enzima (Thor, 2007).

9. Tasa de mutación de la *Taq* polimerasa

Se ha determinado la fidelidad de la *Taq* polimerasa, la cual produce errores de sustitución de base a la tasa de 1 base cada 9000 nucleótidos polimerizados. Los errores de cambio de marco de lectura tienen menor frecuencia, a un error por cada 41 000 nucleótidos polimerizados, esta tasa de mutación fue determinada a 70 °C (Thor, 2007).

Esta frecuencia de mutación puede tener implicaciones en PCR. Dado que es la probabilidad de mutación por cada ciclo térmico (ciclos de desnaturalización). Por cada ciclo, la probabilidad de mutaciones ocurridas podría incrementar. Por el aumento exponencial de la secuencia amplificada, algunas secuencias individuales del producto de PCR pueden contener mutaciones. Para evitar este efecto, se han diseñado protocolos que dan las condiciones experimentales para minimizar los efectos de la *Taq* polimerasa (Thor, 2007).

4. DNA polimerasas para PCR

Las DNA polimerasas utilizadas para PCR requieren permanecer estables a 95 °C, durante la desnaturalización del DNA. En ésta sección se hará un recorrido por las características importantes a considerar cuando se elige una enzima para PCR. Además de la *Taq* polimerasa, existen otras enzimas útiles para PCR, también revisadas en éste apartado.

1. Precisión o fidelidad

La fidelidad de una polimerasa se refiere a la tendencia a incorporar los nucleótidos correctos como se especifica en la cadena molde (Evans, 2008). La fidelidad proviene tanto de limitaciones impuestas en el apareo de bases en el sitio activo de la polimerasa, así como a la actividad 3' → 5' exonucleasa o de corrección de pruebas, que puede editar las bases mal apareadas, característica que será revisada en secciones posteriores. El fragmento de Klenow posee ambas capacidades (Steitz, 1999).

La fidelidad de la amplificación depende del error de la DNA polimerasa, pero también en el número inicial de copias de DNA. La fracción final del producto con cualquier error específico será inversamente proporcional al número inicial de moléculas de DNA en la muestra (McPherson, 1991).

La actividad polimerasa se relaciona a fidelidad en el sentido del apareamiento de bases. La unión de dNTP a las polimerasas RT, pol β y T7 acomplejadas con el *primer* y el DNA molde, resulta en una rotación significativa del dominio de los “dedos”. Se ha propuesto que los dNTPs primero se unen a un completo *primer*-cadena patrón con la polimerasa en un modo independiente de la secuencia patrón, pero después de un cambio conformacional limitado a tiempo (rotación de “dedos”), la unión ajustada de dNTPs se realiza específicamente a la secuencia del DNA molde. Sólo con el apareo Watson-Crick correcto entre la cadena patrón y los dNTPs, se logra la rotación de los “dedos”, esencial para que suceda la catálisis. Esto es, la fidelidad para la incorporación del nucleótido correcto en el paso de polimerización

aumenta debido a este cambio conformacional esencial inducido catalíticamente, el cual detecta la presencia de un par de bases correcto (Steitz, 1999).

2. Selección geométrica

Un método razonable para discriminar entre nucleótidos correctos e incorrectos, como ya se ha mencionado, se basa en la formación correcta de los puentes de hidrógeno o complementariedad de bases. Sin embargo, esta complementariedad no es suficiente para explicar la gran fidelidad de las DNA polimerasas. Se ha demostrado la importancia del tamaño y forma del par de bases, como opuesta a la formación de puentes de hidrógeno durante la incorporación, en un experimento utilizando dNTPs con una base no estándar de difluorotolueno (dF). El alineamiento de pirimidina de difluorotolueno es sucedido con timina, pero cuando los oxígenos son reemplazados por átomos de fluoruro, dF no puede formar puentes de hidrógeno efectivos con el agua. En oligonucleótidos sintéticos, dF se encontró formando con igual pobreza enlaces con los cuatro tipos de base estándar. Si los puentes de hidrógeno fueran un parámetro crítico que marcara la fidelidad de incorporación, entonces se esperaría que dF se incorporara muy poco y con muy baja fidelidad. Sin embargo, el dF se incorpora sólo 40 veces menos eficientemente que dT. Este resultado podría ser explicado si el sitio activo de la polimerasa acomodara únicamente pares de bases adecuados, de acuerdo al tamaño y forma. El mecanismo de “selección geométrica” es un método elegante para asegurar la incorporación precisa y es extremadamente efectivo, pero también existen otros modos de asegurar la alta fidelidad de replicación (Evans, 2008).

3. Corrección de pruebas: Actividad $3' \rightarrow 5'$ exonucleasa

La actividad $3' \rightarrow 5'$ exonucleasa puede incrementar la fidelidad. *Taq* polimerasa carece de esta actividad. Consiste en la revisión de las adiciones de los nucleótidos. Si se detecta un error, el DNA se transfiere del dominio polimerasa a un dominio N-terminal $3' \rightarrow 5'$ exonucleasa de la enzima. El nucleótido incorporado erróneamente es cortado y el DNA se regresa al dominio de polimerización, permitiendo al mecanismo de copiado reiniciarse (figura 16) (Evans, 2008).

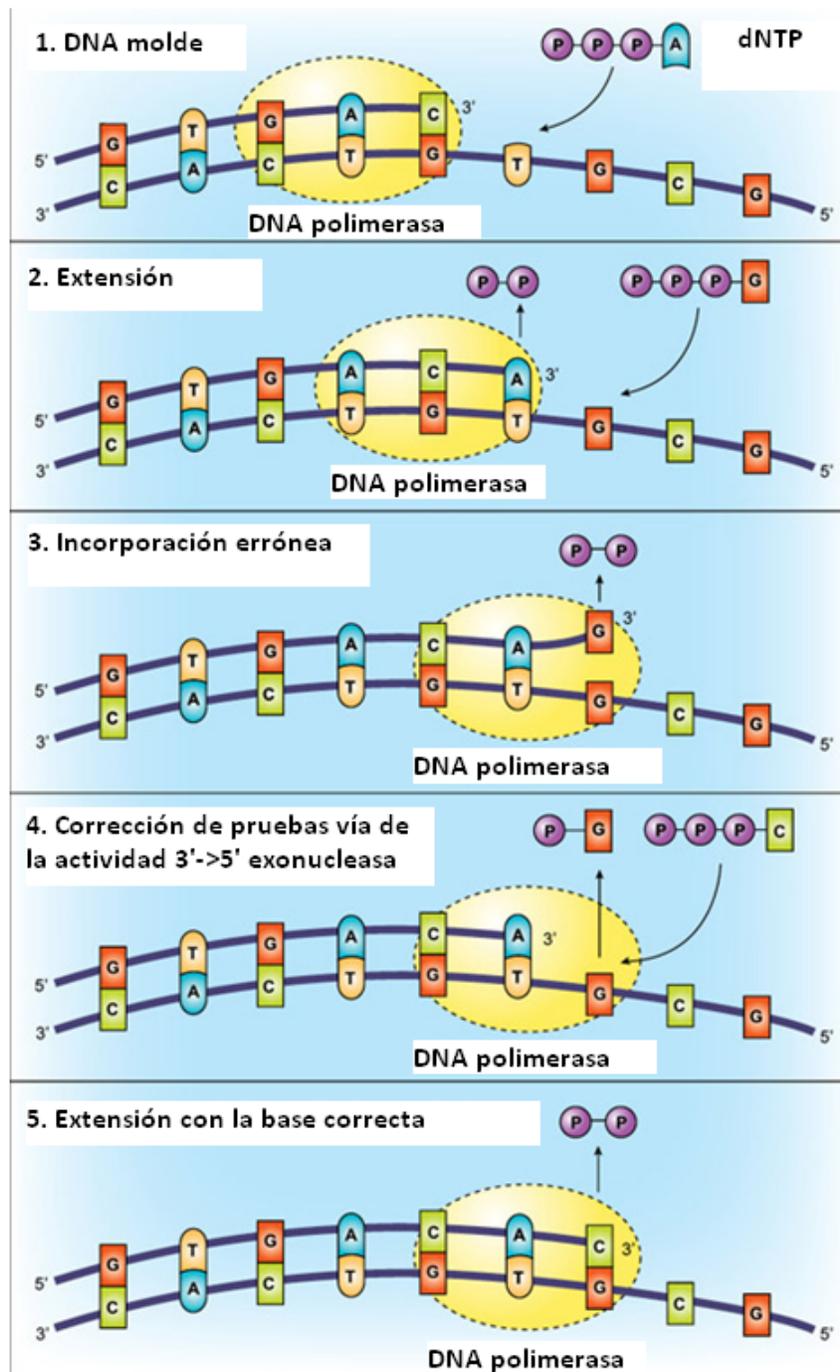


Figura 16. Exonucleasas 3' → 5' o de corrección de pruebas (Evans, 2008).

El mecanismo propuesto por el cual el dominio exonucleasa ejerce la función de edición, consiste en una competición entre los dos sitios activos por el extremo 3' de la cadena creciente y un rápido “ir y venir” del extremo entre ellos (figura 17). El sitio activo 3' → 5' exonucleasa se une a la cadena simple de DNA, mientras que el sitio polimerasa se une a la doble cadena con una relación aproximada de 1 a 10 para el apareamiento correcto de bases en el DNA dúplex. Las bases mal acopladas desestabilizan el dúplex de DNA y por ello se promueve la unión de la cadena simple al sitio activo exonucleasa. Además, la polimerización se estanca después de la incorporación del par de bases erróneo debido a la orientación inadecuada del hidroxilo del extremo 3' de la cadena creciente, en el cual el siguiente nucleótido debe ser añadido. El estancamiento de la reacción sirve para aumentar la probabilidad de escisión por la actividad exonucleasa (Steitz, 1999).

La ausencia de actividad 3' → 5' exonucleasa puede tener otras consecuencias. Se ha propuesto que porque la *Taq* polimerasa carece de dicha actividad, se limita el tamaño del amplicón o producto de la PCR. Como una generalidad, la *Taq* polimerasa funciona mejor al amplificar fragmentos de menos de 2 kb, y de manera aceptable en 3-4 kb. Si se mantienen estas condiciones, la enzima se puede optimizar fácilmente. Sin embargo, arriba de 3 kb, rápidamente pierde efectividad. Durante la PCR, se añadirían nucleótidos erróneos a una tasa particular, llamada “tasa de error”. Las polimerasas en general posicionan bases erróneamente (figura 18) y más probablemente se disociarán antes de extender o terminar correctamente los extremos 3'. Por ello, a un tamaño de producto específico, la tasa de error puede acumularse hasta inhibir efectivamente el proceso de PCR. Estos errores en los extremos 3' son especialmente problemáticos para la *Taq* polimerasa porque ésta no posee 3' → 5' actividad exonucleasa para corregirlos. Se puede añadir una pequeña cantidad de enzima con capacidad de corrección de errores para lograr productos de más de 20 kb. La *Taq* polimerasa está en mayor proporción en estas mezclas y es la que realiza la mayoría de la extensión, mientras que la enzima con corrección de errores es la que remueve los errores 3' capaces de inhibir a la enzima *Taq* polimerasa (Evans, 2008).

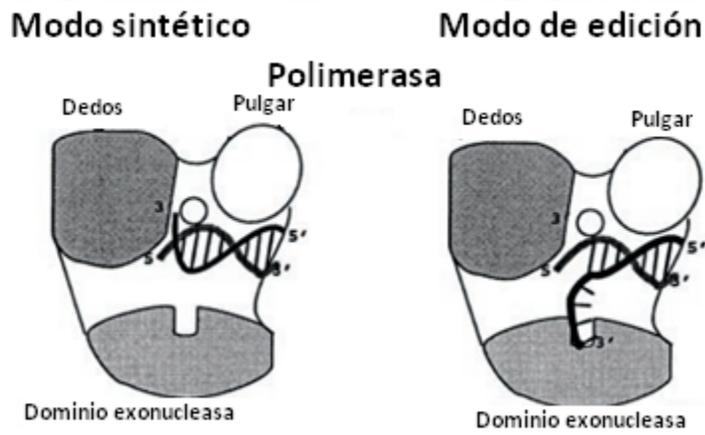


Figura 17. Mecanismo de intercambio de sitios activos o de “ir y venir” de la cadena de DNA entre los sitios activos (Steitz, 1999).

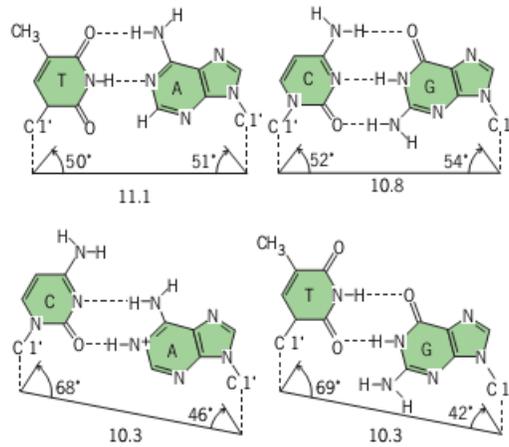


Figura 18. Geometría de las pares de bases correctas y erróneas (Karp, 2010).

4. Procesividad

Es un término que se refiere al número de nucleótidos incorporados por una polimerasa antes de que se disocie, por ejemplo, *Taq* polimerasa añade aproximadamente 50 nucleótidos por evento. Existen diferentes tipos de enzimas, las distributivas y las procesivas. Una polimerasa distributiva se une a la cadena molde, añade un par de nucleótidos y se disocia, dejando una población de cadenas en síntesis que pueden ser extendidas igualmente en tiempo. La enzima procesiva se une al molde y lo extiende hasta el final. Por lo tanto, es una extensión de “todo o nada”, donde existe una fracción de cadenas completamente copiadas y otras sin extensión alguna. Dado el tiempo suficiente, el producto tanto de la enzima procesiva como el de la distributiva, será una población de cadenas copiadas. Sin embargo, es posible que la polimerasa procesiva tenga mayor desempeño (Evans, 2008).

El término “procesividad efectiva” se utiliza porque existe evidencia de que la polimerasa puede cambiarse dentro del replisoma, sin embargo el replisoma en su conjunto mantiene una replicación de DNA rápida (Evans, 2008).

5. Enzimas de alta fidelidad

Las enzimas estándar para PCR dependen de las condiciones de reacción y a pesar de su precisión natural, aún cometen errores. Las enzimas de alta fidelidad con actividad 3' → 5' exonucleasa, pueden apoyar a la optimización de PCR, junto con la selección del buffer correcto (Evans, 2008).

Hay un número de factores que se creen contribuyen a la fidelidad total de una polimerasa. Estos parámetros incluyen la tendencia de la polimerasa a incorporar nucleótidos incorrectos y la presencia de una actividad integral 3' → 5' exonucleasa que puede remover los pares de bases mal apareados. La contribución de esta actividad a la fidelidad se evidencia especialmente cuando las tasas de error de enzimas sin actividad exonucleasa (*Taq* polimerasa) son comparadas con enzimas que sí poseen dicha actividad. Las tasas de error de enzimas sin corrección de pruebas oscilan entre 10^{-2} a $\geq 10^{-6}$, mientras que en enzimas con corrección de pruebas van de 10^{-6} a 10^{-7} . Sin embargo, la presencia de actividad 3' → 5' exonucleasa no necesariamente provee alta fidelidad en la síntesis de DNA, como en el caso de la DNA polimerasa *UITma*, la cual tiene una baja fidelidad que podría estar relacionada a un nivel relativamente bajo de actividad exonucleasa. *UITma* es una versión de la DNA polimerasa de *Thermatoga marítima*, con el N-terminal eliminado y exhibe un error siete veces mayor que *Taq* polimerasa, la cual no tiene actividad de corrección de pruebas. Los parámetros que contribuyen a variaciones en las tasas de error de enzimas con corrección de pruebas pueden reflejar diferencias inherentes en la actividad 3' → 5' exonucleasa, la tendencia a discriminar pares de bases correctos e incorrectos y la eficiencia de intercambio entre los modos de polimerización y corrección de pruebas. Las tasas de error varían de acuerdo a la composición del Buffer, incluyendo pH, concentración de Mg^{2+} y dNTPs (Cline, 1996).

En la ausencia de actividad de corrección de pruebas, durante la síntesis de DNA, la *Taq* polimerasa discrimina las bases inadecuadas, y si las incorpora, lo hace de manera ineficiente, así como con una tendencia reducida a extender a partir del extremo 3' mal acoplado del *primer*. Sin embargo, la tasa ineficiente a la que una DNA polimerasa extiende desde un extremo así, no contribuye a la verdadera fidelidad de las enzimas sin corrección de pruebas. La extensión a partir de un par mal acoplado contribuye a la fidelidad en el sen-

tido en que si el par mal acoplado es extendido ineficientemente, el DNA no será replicado completamente y la mutación no será agregada. Entonces, la tasa de extensión a partir de una base mal acoplada tiene influencia en el número de mutantes detectados y no en la fidelidad inherente de la enzima sin corrección de pruebas (Cline, 1996).

La fidelidad de incorporación de dNTPs es significativamente influenciado por el pH. La baja fidelidad a un alto pH se atribuye a un incremento en la inserción inadecuada de nucleótidos y la extensión inapropiada. Las variaciones observadas en las tasas de error dependientes del pH sugieren que un residuo de histidina en el sitio activo podría tener un papel importante en la fidelidad, posiblemente en la discriminación del extremo 3' mal acoplado del *primer*. Alternativamente, la protonación del *primer*, DNA molde o los dNTPs, podría aumentar los errores de discriminación. Las bajas tasas de error a pH bajo suelen estar acompañadas de un incremento en la procesividad de la polimerasa (Cline, 1996).

La actividad de transferasa terminal de la DNA polimerasa es la adición de bases no dirigidas por el DNA molde en el extremo 3' de un fragmento de DNA, y es paralela a los errores relativos de *Pfu*, *Vent* y *Taq*. La ausencia de actividad transferasa terminal parece correlacionar con alta fidelidad (Cline, 1996).

1. DNA polimerasa *Pfu*

Esta enzima es útil para amplificaciones de alta fidelidad de fragmentos de DNA de más de 25 kb. En comparación con las polimerasas *Taq*, *Vent*, *Deep Vent* y *UITma*, Cline J y colegas encontraron que la polimerasa *Pfu* exhibió la mayor fidelidad de PCR (tabla 2).

La baja tasa de error y la ausencia de actividad transferasa terminal de *Pfu* (comparable con *Vent*), puede ser el resultado de una baja tendencia de *Pfu* a incorporar pares mal acoplados u opuestos. Alternativamente, *Pfu* puede escindir bases erróneas más fácilmente o cambiar entre los sitios activos de exonucleasa y polimerasa con mayor eficiencia (Cline, 1996).

Tabla 2. Tasas de error promedio de DNA polimerasas termoestables durante PCR.

DNA polimerasa	No. de ensayos de PCR	Tasa de error ($10^{-6} \pm SD$)
<i>Pfu</i>	10	1.3 ± 0.2
	2	0.7 ± 0.1
	2	0.8 ± 0.02
	2	1.0 ± 0.04
<i>Deep Vent</i>	4	2.7 ± 0.2
<i>Vent</i>	6	2.8 ± 0.9
<i>Taq</i>	11	8.0 ± 3.9
<i>UITma</i>	2	55 ± 2

(Cline, 1996)

2. Mezclas de enzimas

Si se utilizan mezclas de enzimas con y sin corrección de pruebas, se ha reportado que sintetizan una mayor cantidad de producto y permiten amplificación de secuencias más

largas (PCR larga). La adición de una baja cantidad de enzima con corrección de pruebas mejora el desempeño de PCR. La tasa de error de las mezclas parece ser intermedio entre el de *Pfu* y el de una polimerasa sin corrección de pruebas. La tasa de error baja de una mezcla *Taq/Pfu*, comparada con *Taq* sola, sugiere que *Pfu* se encarga de editar un cierto porcentaje de errores introducidos por *Taq* durante la amplificación. La edición puede ocurrir en el extremo 3' después de que *Taq* ha colocado una base errónea y se ha disociado del producto de PCR incompleto. Puede ser también que *Pfu* reduzca la tasa de error total de *Taq* al degradar el dúplex de DNA generado por *Taq* que contenga errores y volviendo a sintetizar la secuencia correcta (Cline, 1996).

La mezcla de *Klentaq* y *Pfu* (KTLA) también muestra errores significativamente mayores que el de *Pfu* (tabla 3). Las diferencias en las condiciones de amplificación de PCR no pueden contribuir a las diferencias en errores relativos observados en las mezclas de enzimas (Cline, 1996).

Tabla 3. Comparaciones de tasas de error de DNA polimerasas y mezclas de DNA polimerasas para “PCR larga” a diferentes condiciones.

Condición de PCR	DNA polimerasa	No. de PCRs	Tasa de error ($10^{-6} \pm SD$)
1	<i>Pfu</i>	10	1.3 ± 0.2
	<i>Taq</i>	11	8.0 ± 3.9
	<i>Taq/Pfu</i> (16:1)		
	<i>Taq</i> Buffer	8	5.7 ± 1.6
	<i>Pfu</i> Buffer	11	7.6 ± 1.2
2	<i>KTLA</i>	2	3.9 ± 0.1
	<i>Pfu</i>	2	2.3 ± 0.2
	<i>KTLA</i>	2	9.4 ± 0.9

(Cline, 1996)

6. Muestra de DNA

En general, los métodos de extracción de DNA incluyen la disrupción del material biológico de origen, seguida por la remoción de proteínas y otros contaminantes, para finalmente recuperar el DNA. La remoción de proteínas se logra con ayuda de la Proteinasa K (PK). Luego la extracción del DNA se lleva a cabo con solventes orgánicos, por cambio de fuerza iónica con sales (*salting in-out*), por unión a fases sólidas de intercambio iónico o con tecnología de sílica. El DNA usualmente se recupera por precipitación con etanol o isopropanol (Murray, 2009). Ésta sección se dedicará a revisar las características de la muestra y cómo se obtiene el DNA apropiado para una PCR.

1. Tejido

Una manera sencilla de preparar el lisado de tejido o células, es una incubación a 90 °C por 20 min, o realizar una digestión con PK, y luego utilizar el lisado directamente en los siguientes procedimientos de extracción. El producto aún contiene contaminantes inhibidores de enzimas, capaces de degradar el DNA, por lo que no es recomendable almacenarlo en esta etapa. El protocolo de aislamiento debe ser adaptado al tipo de tejido para obtener mejores resultados (Murray, 2009).

2. Plasma y suero

En estas muestras, la cantidad de DNA es muy baja, pero es suficiente para funcionar como DNA molde en PCR. En varios desórdenes se han encontrado cantidades circulantes de DNA aumentadas, incluyendo cáncer, enfermedades autoinmunes e infecciones. Además, se han encontrado pequeñas cantidades de DNA fetal en plasma materno durante la gestación. El procedimiento es muy similar y las especificaciones pueden encontrarse en Bartlett (2003).

3. Microdissección de preparaciones histológicas

PCR puede ser aplicada al análisis de pequeñas cantidades de tejido o de una sola célula, así como de una sola molécula de DNA, como en el caso de gametos (haploides). La obtención de muestra se realiza mediante una microdissección con microagujas de tungsteno (también utilizadas en microscopía electrónica) en preparaciones histológicas en parafina o secciones congeladas de tejidos animales. Con tejidos humanos, es recomendable trabajar con aquellos fijados en formalina o incrustados en parafina. Sin embargo, los ácidos nucleicos sufren una degradación después de la fijación, y esto afecta la calidad de la PCR. El secado tiene influencia sobre la firmeza de las secciones y así la facilidad de disección. Para microdissección histológica, secciones más gruesas (6-8 μm) contienen más ácidos nucleicos por unidad de área y su aumento de grosor no afecta la interpretación. Las secciones de 10 μm tienen una visualización más pobre. Bartlett (2003), tiene protocolos para el trabajo con microdissecciones.

4. PCR directa en sangre completa sin extracción de DNA

Se puede realizar PCR en sangre fresca o almacenada por varios meses a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Un pequeño volumen de sangre (1-2 μL) es suficiente para añadir directamente a la reacción de PCR. La hemoglobina, contenida en la sangre completa, puede inhibir a la *Taq* polimerasa, por lo que volúmenes mayores de sangre por ejemplo, 3 μL , afectan negativamente la reacción. La amplificación puede realizarse de igual manera que en DNA purificado, con la única modificación en la desnaturalización inicial. La eficiencia de la PCR en sangre completa depende de los pasos de calentamiento y enfriamiento alternados. La capacidad de éste método es tan buena como la PCR con DNA purificado, sin embargo podría no ser adecuada para otros estudios de PCR, como la detección de DNA viral (Mercier, 1990).

5. DNA/RNA

Algunas veces es necesario extraer DNA y RNA de la misma muestra. Esto puede lograrse al aislar una fracción de ácidos nucleicos totales, que luego puede ser dividida en dos partes, las cuales son tratadas de manera diferente o con Dnasa I (para remover DNA y recuperar RNA) o con Rnasa A (para selectivamente recuperar el DNA); sin embargo esto representa un gasto de la mitad de la cantidad de DNA y RNA. Una solución alternativa es el aislamiento secuencial de las fracciones de RNA y DNA de la misma muestra. El protocolo de Chevillard, inicia con la extracción de RNA, y luego reextrae el DNA de las fases orgánicas recolectadas. El método descrito puede encontrarse en Bartlett (2003).

7. Purificación de DNA

Después de la digestión con PK, la muestra (25-50 μL) contiene una pequeña cantidad de ácidos nucleicos (DNA, RNA). Mil células contienen alrededor de 6 ng de DNA. El intento de purificar tales cantidades de DNA o RNA representa un riesgo de perder la muestra. Se requiere una optimización cuidadosa de la PCR y la purificación es esencial. La PCR anidada y en tiempo real pueden ayudar a obtener un mejor resultado, al reducir la amplificación inespecífica. Además existen técnicas de amplificación del genoma completo para pequeñas muestras para aumentar la cantidad de DNA molde (Bartlett, 2003). A continuación, se revisarán algunas técnicas utilizadas en la purificación de DNA para PCR.

1. *Salting in-out*

Esta técnica convencional se utiliza para precipitar proteínas y otros contaminantes del lisado o muestra después de la digestión. Se utilizan altas concentraciones de sales como el acetato de potasio o de amonio. Los precipitados se retiran por centrifugación, y el DNA se recupera por precipitación con alcohol. Éste método puede ser ineficiente, y el tratamiento con RNasa, diálisis o con repetidas precipitaciones con alcohol son generalmente necesarias antes de que el DNA pueda ser utilizado en otras aplicaciones. La purificación de DNA es muy variable en este método (Murray, 2009).

2. Solventes orgánicos

El uso de solventes orgánicos facilita la extracción de contaminantes de los lisados celulares. Las células son lisadas utilizando un detergente, luego se mezclan con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico. La concentración de sales y pH correctos deben ser mantenidos durante la extracción para asegurar que los contaminantes se separen en la fase orgánica y que

el DNA permanezca en la fase acuosa. El DNA usualmente se recupera de la fase acuosa por precipitación de alcohol. El producto de DNA puede contener fenol y cloroformo residuales que pueden inhibir reacciones enzimáticas (PCR). El proceso además genera residuos tóxicos que deben ser tratados antes de su desecho, además, es una técnica difícil de automatizar (Murray, 2009).

3. Gradientes de densidad con cloruro de cesio

El DNA genómico se puede purificar por centrifugación a través de un gradiente de densidad con cloruro de cesio (CsCl). Las células deben lisarse con un detergente y luego se lleva a cabo una precipitación con alcohol. El DNA resuspendido se mezcla con CsCl y bromuro de etidio, y centrifugado por varias horas. Del tubo de la centrifuga, se recolecta la banda de DNA, extraída con isopropanol para remover el bromuro de etidio, y luego precipitado con etanol para recuperar el DNA. Este método permite el aislamiento de DNA de alta calidad, pero es caro y difícil. Este método utiliza químicos tóxicos, por lo tanto es imposible de automatizar (Murray, 2009).

4. Intercambio iónico

La cromatografía de fase sólida e intercambio iónico se basa en la interacción entre fosfatos cargados negativamente de los ácidos nucleicos y moléculas cargadas positivamente en el sustrato. El DNA se une al sustrato en condiciones bajas en sales, las impurezas como el RNA, proteínas celulares, y metabolitos son lavados utilizando amortiguadores de concentraciones medianas de sales, y un DNA de alta calidad se eluye utilizando un amortiguador de alto contenido en sales. El DNA eluido se recupera por precipitación con alcohol, y es adecuado para otras aplicaciones como PCR.

La tecnología de intercambio iónico evita completamente el uso de sustancias tóxicas, y puede ser utilizado para requerimientos de diferente rendimiento, así como para diferentes escalas de purificación. El DNA aislado suele tener el tamaño de 150 kb, con un promedio de 50-100 kb (Murray, 2009).

5. Sílica

La tecnología en sílica se basa en la absorción selectiva de ácidos nucleicos en una membrana de sílica-gel, en la presencia de sales. El uso de buffers optimizados en el procedimiento

de lisis asegura que sólo el DNA es absorbido, mientras que las proteínas y metabolitos celulares permanecen en solución y son lavados. Éste método es más simple y efectivo que otros, donde la precipitación y extracción son requeridas. Un DNA listo para utilizarse en otros procedimientos se eluye de la membrana de sílica gel, utilizando un buffer bajo en sales. No se requiere precipitación con alcohol ni resuspensión de DNA. En el mercado existen kits especializados que permiten obtener un purificado de DNA libre de inhibidores de enzimas, altamente adecuado para aplicaciones como Southern blot, PCR, RT-PCR y RAPD (Murray, 2009).

6. Valoración de la pureza de DNA

Los ácidos nucleicos y las proteínas tienen una absorbancia máxima a 260 y 280 nm, respectivamente. El cociente de las absorbancias a estas longitudes de onda se utiliza como una medida de la pureza en extractos de ácidos nucleicos y proteínas. Un cociente aproximado a 1.8 es generalmente aceptado como indicativo de pureza para DNA, y un cociente de 2.0, para RNA. De manera similar, la absorbancia a 230 nm es considerada como el resultado de alguna contaminación, por lo tanto un cociente de A_{260}/A_{230} es calculado frecuentemente. Los valores de $260/230$ para ácidos nucleicos puros, son usualmente más altos que los valores $260/280$ correspondientes. Los valores de $260/230$ esperados están en el rango de 2.0-2.2. La contaminación química residual en extractos de ácidos nucleicos puede ocasionar una sobreestimación en la concentración de ácidos nucleicos y afectar todo el análisis procedente (Wilfinger, 1997).

8. Diseño de *primers*

Los *primers* son oligonucleótidos que se utilizan para enmarcar la sección de DNA a amplificar. El diseño de oligonucleótidos es importante para la aplicación de PCR que se requiera. Existe software para facilitar el diseño y la mayoría poseen menús predeterminados. En éste capítulo se revisarán las características de un *primer* que son importantes a considerar, así como variables y recomendaciones para el diseño de *primers*. Usualmente un *primer* de 20-24 nucleótidos tiene un buen desempeño (Judelson, 2006). Para elegir el *primer* adecuado, se deben considerar factores como la temperatura de fusión y alineamiento, entre otros figura 19 (Dorak, 2007).

Un *primer* ideal tiene las siguientes características:

- Los *primers* generalmente deben tener un T_m de 55-65 °C (que corresponde a 45-55 % GC). Para secuenciación automatizada, los *primers* con T_m de 65-70 °C suelen ocasionar artefactos secundarios como los dímeros de *primers* y secuencias ruido (Judelson, 2006).
- La temperatura de disociación de un par de *primer* debe ser aproximadamente la misma (McPherson, 1991).
- Ausencia de capacidad de dimerización y de formación significativa de horquillas por interacciones entre las bases (Judelson, 2006).
- Falta de sitios secundarios de acoplamiento en el DNA molde (Judelson, 2006).
- Baja unión específica en el extremo 3' para evitar mal acoplamiento. Esta baja especificidad en el extremo 3' es crítica, pues cualquier complementariedad puede llevar a la formación de dímeros. Un extremo pegajoso (*sticky ends*) sería uno con un alto contenido de GC (T_m alta) (Judelson, 2006).
- Ninguno de los *primers* debe tener T en el extremo 3', dado que T es el nucleótido menos exigente y los *primers* con T 3' tienden a más error (McPherson, 1991).

- Es recomendable que en el extremo 3', cada *primer* cuente con una A o T en el triplete para prevenir tolerancia de desajuste en secuencias con Gs o Cs consecutivas (McPherson, 1991).
- Ya sea el medio del *primer* o el extremo 5' deben ser más “pegajosos” (*sticky*) (Judelson, 2006).
- Es deseable tener G o C en el extremo 3', pues reducirá el desacoplamiento del complejo *primer*-molde (*breathing*), sin embargo, si estas influyen la especificidad total del *primer*, no deben añadirse (Judelson, 2006).
- Los *primers* deben alinearse al DNA molde antes de que el DNA molde tenga un alineamiento consigo mismo. Una manera en que el diseño de *primers* pueda entrar en conflicto es si se utilizan composiciones altas en AT que puedan flanquear a una región rica en GC del DNA en la PCR (McPherson, 1991).

Un punto importante en el diseño de *primers* es cuando se necesitan añadir pares de bases adicionales al *primer*, por ejemplo un sitio de restricción. Típicamente, se recomienda diseñar un *primer* de 18 bases que posea un perfecto acoplamiento con el DNA molde, con 6 bases extra que representen el sitio de restricción, y luego 2 bases más para asistir en la digestión de restricción (algunas enzimas requieren apoyarse en una secuencia más larga que la del sitio mismo de restricción). Este tipo de *primer* tiene esencialmente dos T_m diferentes. Inicialmente, la región de 18 nucleótidos que coincide con el DNA molde, es la que define T_m . Después de varios ciclos de PCR, la mayoría del molde tendrá incorporado el sitio del *primer*, entonces toda la longitud del *primer* definirá T_m . Los desajustes ocasionados por errores de secuencia afectan significativamente la estabilidad de unión, y en ocasiones un solo desajuste es suficiente para desestabilizar el dúplex. BLAST es un paquete de software que asigna un puntaje de acuerdo a la calidad de ajuste (Dorak, 2007). Ésta característica será revisada en la sección de software para el diseño de *primers*.

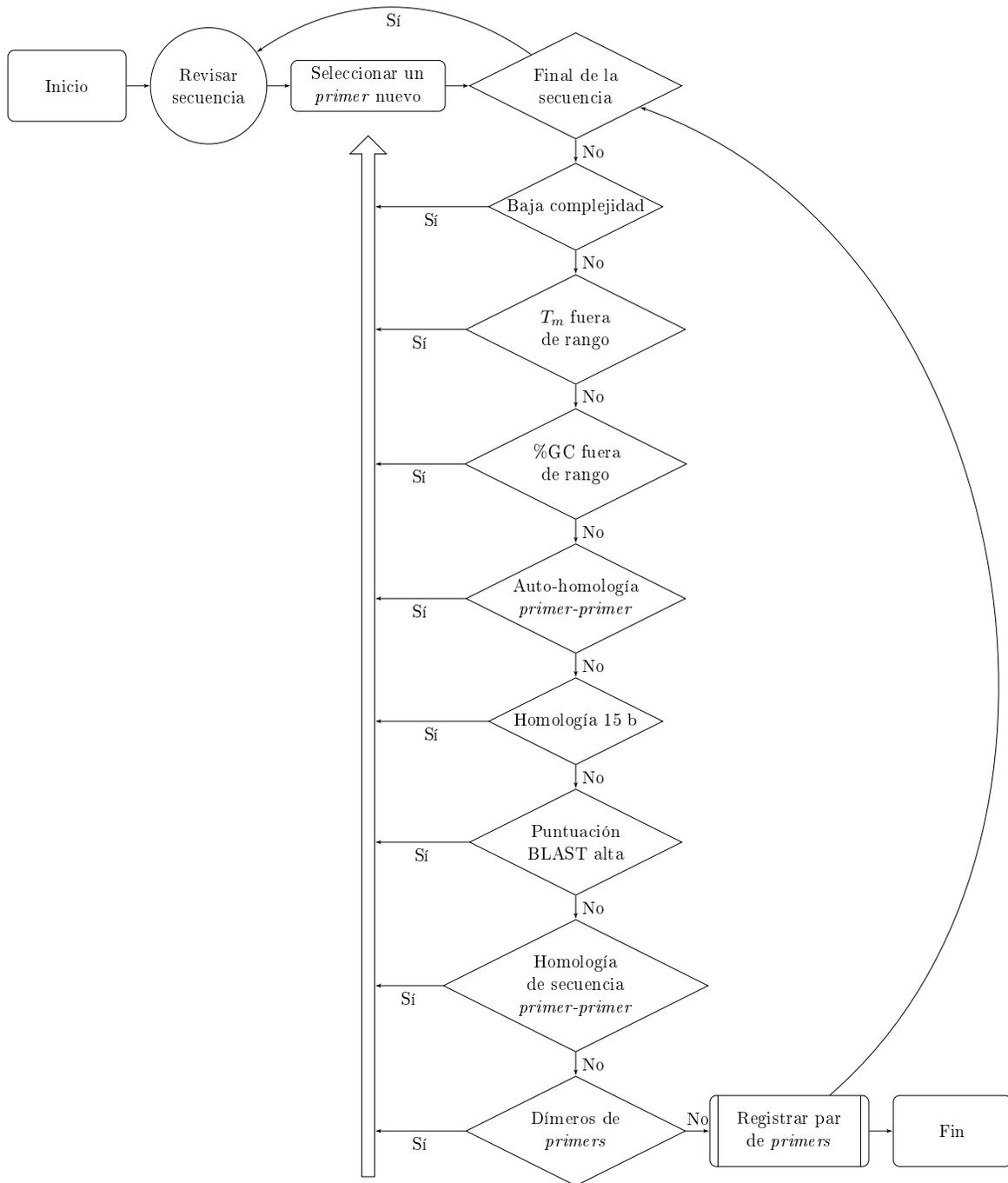


Figura 19. Diagrama de flujo simplificado que describe un algoritmo para el diseño de *primers* (Dorak, 2007).

1. *Primers Forward y Reverse*

Hay una convención para nombrar a los dos *primers* diferentes utilizados durante la PCR. Cuando la dirección polimerización es $5' \rightarrow 3'$, el *forward primer* (*left primer* o primer sentido) tiene una secuencia idéntica a dicha cadena referencia y, por lo tanto, se une a la cadena complementaria (Cadena superior en la figura 20). El *reverse primer* o de secuenciación (*right primer* o antisentido) tiene una secuencia idéntica a la cadena complementaria y por ello se alinea con la cadena de referencia (cadena en la parte inferior de la figura 20). Durante la PCR, los *primers* serán extendidos desde el extremo $3'$. El *primer forward* será extendido en una dirección $5' \rightarrow 3'$ siguiendo la dirección de la cadena de referencia (figura 20, a la derecha), para producir una copia de la cadena de referencia. El *primer reverse* o de secuenciación será extendido en dirección $5' \rightarrow 3'$ de la cadena complementaria (figura 20, a la izquierda), generando una copia de la cadena complementaria (*LSCE Labs*, 2013).

```
5' -TGTAAACCGGAGATGAAAACCTTTTTCCAAGGACAAATCAGAGAAAAAGTCTTTAACTCCACCATTAGCACCCAAAGCTAAGATTCTAATTTAACTATTCTCTGTCTTTC-3'
3' -ACATTTGGCCTCTACTTTTGGAAAAAGGTTCTCTGTTTAGTCTCTTTTCAGAAATGAGGTGGTAATCGTGGGTTTCGATTCTAAGATTAATTTGATAAGAGACAAAGAAAG-5'
      Forward primer (primer sentido)  5' -TAACTCCACCATTAGCACCC-3' -->

      <--3' -GTGGTAGGAGGCACCTTAG-5' Reverse primer (primer antisentido)

5' -AAATCCCTTCTCGTCCCCATGGATGACCCCCCTCAGATAGGGGTCCTTGACCACCATCCTCCGTGAAATCAATATCCCGCACAGAGTGCTACTCTCCTCGTCCGGGGCC-3'
3' -TTTAGGGAAGAGCAGGGGTACCTACTGGGGGAGTCTATCCCAGGGAAGTGGTGGTAGGAGGCACCTTAGTTATAGGGCGTGTCTCACGATGAGAGGAGCGAGGCCCGGG-5'
```

Figura 20. Secuencia de referencia (Línea superior $5' \rightarrow 3'$), su cadena complementaria (línea al final $3' \rightarrow 5'$) y dos *primers* alineados (*forward* y *reverse*) (*LSCE Labs*, 2013).

2. Cociente *Primer*-DNA molde

Uno de los conceptos más importantes en PCR es el cociente *primer*-molde. Si éste es muy alto, existe la formación de dímeros de *primers*, como ocurriría con una fracción muy diluida de DNA molde o exceso de *primer*. Si el cociente es muy bajo, el producto no se acumulará exponencialmente, dado que las cadenas recién sintetizadas sufrirán una renaturalización después de la desnaturalización (McPherson, 1991).

3. Temperatura de alineamiento

La temperatura de alineamiento (T_a) de un par de *primers* se calcula generalmente a 5 °C menos que la temperatura de fusión estimada (Judelson, 2006). Esta representa la temperatura a la que la mitad de los *primers* se han alineado con su secuencia complementaria, es calculada aproximadamente para secuencias de 20 bases o menos de largo, de acuerdo a:

$$T_a = 4(G + C) + 2(A + T)$$

donde A , T , G , y C son la cantidad de bases presentes en el *primer* (McPherson, 1991).

Para calcular T_a óptima para un procedimiento de PCR determinado, se puede utilizar la siguiente ecuación (Rychlik, 1990).

$$T_a(OPT) = 0.3T_m(\text{primer}) + 0.7T_m(\text{producto}) - 14.9 \quad (8.1)$$

en la cual $T_m(\text{primer})$ es la T_m calculada del par primer-molde más inestable y $T_m(\text{producto})$ es la T_m del producto de PCR. Para calcular $T_m(\text{primer})$, Rychlik (1990), consideró varios modelos en otra fórmula para calcular T_m a partir de secuencias de nucleótidos que consideran la influencia del ambiente iónico de la mezcla de reacción (KCl 1M).

$$T_m(\text{primer}) = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \times \ln(c/4)} - 273.15 + 16.6 \log[K^+] \quad (8.2)$$

ΔH y ΔS son la entalpía y entropía para la formación de la hélice, respectivamente, R es la constante de gases molar (1.987 cal/°Cmol), y c es la concentración molar total de los *primers* cuando no son auto-homólogos. Sin embargo, dado que la concentración para c en un procedimiento de PCR es problemático porque cambia durante el curso de la PCR

(por ejemplo, 260,000 veces en 25 ciclos). Rychlik (1990) determinó empíricamente que, utilizando $c = 250\text{pM}$ en la ecuación ya mencionada, se obtiene una aproximación adecuada con resultados experimentales para todas las combinaciones de *primer*-molde probadas.

La segunda variable de la ecuación 8.1, $T_m(\text{producto})$ no puede calcularse a partir de la ecuación 8.2, pues no puede aplicarse a moléculas largas de DNA. La siguiente ecuación es recomendada por Rychlik (1990).

$$T_m(\text{producto}) = 0.41(\%G + \%C) + 16.6 \log[K^+] - 675/l \quad (8.3)$$

l es la longitud del producto en residuos de nucleótidos. La K^+ es la concentración usada en ambas ecuaciones 8.2 y 8.3 (Rychlik, 1990).

Es importante recordar que se utilizan dos *primers* diferentes. Sus T_m deben encontrarse a 5°C de diferencia entre cada uno de ellos. Mientras más cercanos, mejor. Si ΔT_m es grande, la amplificación perderá eficiencia. El *primer* con T_m más alta, no se alineará a temperaturas más bajas, mientras que el *primer* con T_m más baja no podrá trabajar a temperaturas más altas. Si ΔT_m es grande, se deben añadir o quitar bases del *primer* (Judelson, 2006).

4. Regla de los extremos

Ésta regla, en diseño de *primers*, se refiere a ciertas características extremas que deben evitarse.

- Evitar *primers* con cadenas largas de poliG o poliC que puedan promover alineamiento inespecífico (Judelson, 2006).
- Evitar también cadenas de poliA y poliT, pues su inespecificidad pueden abrir el complejo *primer*-molde (“Breathing”) (Judelson, 2006).
- Evitar cadenas de polipirimidina (T , C) y polipurinas (A , G), los cuales llevan a una forma extraña de la doble hélice (Judelson, 2006).
- Idealmente, el *primer* debe tener una mezcla de nucleótidos casi arbitraria (Judelson, 2006).

5. Interacciones no deseadas

Cuando se diseñan *primers*, es importante tener una mínima homología intramolecular o intermolecular. Si la hay entre *primers*, podrían resultar horquillas o dimerización de *primers*. Si un *primer* tiene una región con auto-homología, pueden formarse estructuras de doble cadena, las cuales interfieren con el alineamiento en el molde. Usualmente las homologías intra-*primer* de 3 bp o más deben ser evitadas (figura 21) (Judelson, 2006).



Figura 21. Horquilla o “Hairpin” (Judelson, 2006).

Los *primers* tampoco deben contener secuencias de nucleótidos que pudieran permitir el alineamiento entre *primers* (figura 22). Las interacciones *primer-primer* son más fuertes a temperaturas más bajas; un grado muy bajo de complementariedad se hace menos significativo conforme las temperaturas de reacción aumentan. Una situación grave es cuando los extremos 3' de los *primers* se alinean, llevando a la formación de dímeros de *primers* (figura 23) (Judelson, 2006).

Las interacciones moleculares internas deben ser minimizadas. La ΔG debe calcularse, y debe ser, idealmente pequeña, pero se debe evitar el valor de -7 kcal/mol o mayor. Si se tiene una secuencia TA complementaria a los extremos 3' de los *primers*, usualmente no causa problemas, pues es inestable. En contraste, una secuencia GC puede causar problemas con T_m menor a 65 °C (figura 24) (Judelson, 2006).



Figura 22. Otros ejemplos de interacciones entre *primers*. (a) $\Delta G = -5$ kcal/mol, adecuado, pero no excelente, (b) $\Delta G = -9.3$ kcal/mol, muy inadecuado, (c) $\Delta G = -1.6$ kcal/mol, excelente (Judelson, 2006).

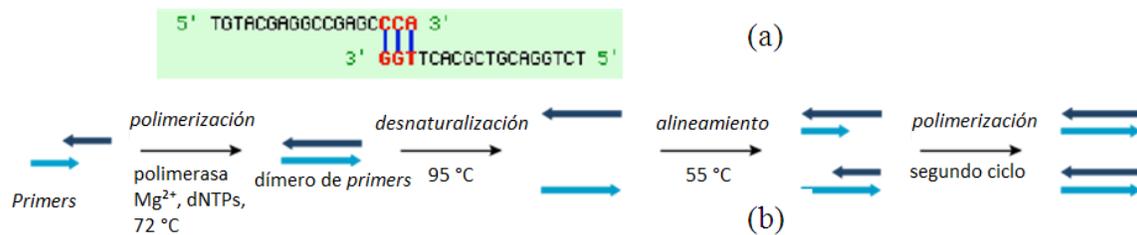


Figura 23. (a) Formación de dímeros de *primers*. (b) El alineamiento de ambos *primers* en su extremo 3' puede llevar a su amplificación y a formar dímeros que en futuros ciclos tendrán gran afinidad y serán amplificados exponencialmente (Brown, 2013).



Figura 24. El *primer* mostrado tiene una T_m de 50 °C y su homología GC en el extremo 3' ($\Delta G = -3.1$ kcal/mol) puede ser un problema. Si la T_m fuera 600 °C, entonces el *primer* podría ser útil (Judelson, 2006).

9. Software para diseño de *primers*

Aunque se considera un diseño elegante aquél realizado con el puro intelecto humano, el trabajo para seleccionar el par de *primers* ideal es arduo y consume tiempo. La tarea del diseño de *primers* es compleja, y suele llevarse a cabo por ensayo y error. Gracias a la computación, este tipo de tareas, como la consideración de las múltiples variables necesarias, pueden realizarse en menor tiempo y esfuerzo. Actualmente, el diseño de software para *primers* es parte importante del área de investigación de PCR. Éste capítulo está dedicado a describir el software para diseño de *primers*, los paquetes más comunes, así como sus funciones básicas, sus comparaciones y deficiencias. En el anexo pueden encontrarse las direcciones de internet para varios recursos de software en línea.

1. Retos en el desarrollo de software para diseño de *primers*

Los programas de diseño de *primers* se deben basar en considerar todas las variables utilizadas para diseñar el *primer* ideal. El genoma humano tiene tres mil millones de pares de bases ó 3000 Mb (3×10^9 pb), dentro de los cuales 1000 Mb son genes (Passarge, 2009). Si consideramos que un *primer* debe ser de alrededor de 20 pb, la probabilidad de encontrar más de una secuencia en el genoma, aparte del DNA molde, con la que el *primer* de elección pueda alinearse, es muy alta. La solución a primera vista es comparar exhaustivamente todo el genoma con el par de *primers* deseados, probando todas las combinaciones posibles. Sin embargo, dada la extensión que un genoma puede tener, esto tomaría mucho tiempo. Los programas de software actuales utilizan atajos, por ejemplo *primer-BLAST* se apoya en megaBLAST para una búsqueda rápida para identificar regiones altamente similares a secuencias no deseadas. No obstante, debido a los atajos mismos, el software puede no considerar todos los parámetros, y actualmente la mayoría de los paquetes de diseño de *primers* sufren carencias de especificidad, a pesar de tener herramientas relacionadas a la optimización de este aspecto (Ye, 2012).

Además, los experimentos con PCR varían mucho de uno a otro, y es aún más difícil

encontrar el *primer* ideal. Una variable que logra ejemplificar esta situación es cómo los desajustes de imprimación pueden dar resultados en PCR. En general, los desajustes en el extremo 3' afectan la amplificación aún más que aquellos encontrados en el extremo 5'. Un desajuste de dos bases en el extremo 3' generalmente evita la amplificación, aunque un desajuste de una sola base (aún exactamente en el extremo 3'), así como algunos desajustes en medio del *primer* o hacia su extremo 5', aún permiten la amplificación, pero con baja eficiencia para algunos casos. Como los efectos de los desajustes pueden ser tan variables, junto con la probabilidad de que los usuarios tengan diferentes criterios basados en sus propias condiciones experimentales, es importante que una herramienta de software deba ofrecer la capacidad de detectar un mínimo de desajustes en todo el *primer*, y tener la flexibilidad de cambiar las opciones de especificidad.

De hecho, BLAST, no es la herramienta ideal para éste propósito, pues utiliza un algoritmo de alineamiento local y no necesariamente provee de información completa acerca del alineamiento entre el *primer* y el DNA molde, particularmente cuando el alineamiento no es perfecto hacia los extremos del *primer*.

Se han desarrollado un número de herramientas de software públicas para apoyar el proceso de diseño de *primers*. *Primer3* diseña *primers* basándose en una variedad de parámetros. Los usuarios requieren probar la especificidad del *primer*, utilizando otras herramientas, pues *Primer3* no realiza análisis del DNA molde. Este proceso es tardado y en ocasiones impráctico si los *primers* diseñados tienen demasiadas coincidencias en las bases de datos, como en una búsqueda con BLAST (Ye, 2012).

Muchos programas como PCR *in-silico* y *ePCR* reversa, no diseñan *primers*, pero determinan el producto de la amplificación con los *primers* que el usuario introduce. Aún con la ayuda de estas herramientas, encontrar *primers* específicos puede ser todavía un proceso difícil, pues los usuarios generalmente requieren revisar manualmente muchos *primers* candidatos. Además, dado que estas herramientas de software usan una estrategia basada en índices, la cual requiere un pre-procesamiento computacional intensivo de la búsqueda en bases de datos, están limitados por la disponibilidad de acceso a dichas bases, y tampoco son suficientemente sensibles para detectar secuencias objetivo con un número significativo de desajustes con los *primers*, aún potencialmente amplificables (Ye, 2012).

Es deseable combinar varios elementos de los requerimientos del diseño de *primers* en un solo proceso que los usuarios puedan usar para simplemente introducir el DNA molde y obtener los *primers* específicos deseados. Hay varios programas existentes que se han dirigido a ésta situación. Autoprime diseña *primers* para mRNA, sin embargo, esto no corrige el problema de especificidad. QuantiPrime es una herramienta especializada para diseñar *primers* específicos para detectar mRNA en PCR en tiempo real. De la misma manera, la herramienta de diseño de *primers* PRIMEGENS puede también usarse para un diseño específico de *primers* para un número limitado de organismos. Aún con estas

capacidades, estos paquetes de software no garantizan una cuenta exacta de los ajustes entre el *primer* y el DNA molde porque utilizan un algoritmo de alineamiento local como BLAST, únicamente para la búsqueda de similitudes y, por lo tanto, puede perder parte del alineamiento entre el *primer* y el DNA molde. Otras limitaciones en éstas herramientas incluyen baja sensibilidad en la detección del DNA objetivo (molde), limitaciones en las opciones del rigor en la especificidad, apoyo limitado o nulo para el diseño de *primers* basado en los requerimientos para las fronteras exón/intron y limitada cobertura de organismos en la búsqueda de bases de datos (Ye, 2012).

En general, los programas de diseño de *primers* aún son incompletos y requieren un mayor enfoque en la especificidad. Desafortunadamente, el diseño de *primers* aún requiere intervención humana.

A continuación, se hará una breve revisión de las principales herramientas de software para el diseño de *primers*.

2. *Primer3*

Primer3 es un programa de computadora que sugiere *primers* para una variedad de aplicaciones, y también es capaz de seleccionar *primers* individuales para reacciones de secuenciación y diseñar sondas de DNA para hibridación (Misener, 1999).

En la selección de oligonucleótidos para *primers* o sondas de hibridación, *Primer3* puede considerar varios factores, incluyendo T_m , longitud, contenido de GC, estabilidad en el extremo 3', estructuras secundarias estimadas, probabilidad de alineamiento inespecífico (repeticiones intercaladas), probabilidad de formación de dímeros de *primers*, la diferencia entre T_m de los *primers*, y localización relativa a regiones particulares de interés o para ser evitadas. *Primer3* puede utilizarse a través de la interfaz de internet o como software. Sin embargo, este programa no ofrece ayuda para el diseño de *primers* para PCR multiplex (Misener, 1999).

Quien requiera seleccionar *primers* a partir de una lista de cientos o miles de secuencias, ha de preferir usar *Primer3* (específicamente el programa *primer3_core*) como software. Éste programa acepta la introducción (*input*) de un formato conveniente de otros programas para generar una respuesta (*output*) en un formato también conveniente para otros programas (Misener, 1999).

Las necesidades del diseño de *primers* son muy amplias, por lo que sólo se considerarán aquellas que son básicas. Una guía completa de uso de *Primer3* puede encontrarse en la referencia, y en el menú *readme* (“léame”) se documentan hasta las posibilidades más complejas (Misener, 1999).

Las condiciones de tamaño, T_m , %GC, auto-complementariedad máxima, así como otras características especiales como la cantidad de sales y/o cationes, tienen un valor predeterminado recomendado, sin embargo se ofrece la posibilidad de modificarlos para aplicaciones especiales (Misener, 1999).

Cada uno de los parámetros, tanto en la ventana de entrada *input* como de salida *output*, si están resaltados en azul, tiene una dirección hacia la página de ayuda, en la cual todos los términos son definidos (figuras 25 y 26) (Untergasser, 2012).

En la ventana de *output* (“resultados”) (figura 26), el parámetro de *any* (“cualquier”) se refiere a la magnitud calculada de la tendencia del *primer* a alinearse consigo mismo. Debe aspirarse a obtener un valor bajo para evitar interacciones indeseadas como la formación de horquillas. El parámetro “**3**” es un parámetro similar que se refiere a la auto-complementariedad en el extremo 3’, su evaluación debe considerarse para evitar la formación de dímeros de *primers* (Untergasser, 2012).

Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.	Checks for mispriming in template.	disclaimer	Primer3 Home
	Primer3plus interface	cautions	FAQ/WIKI

There is a newer version of Primer3 available at <http://primer3.wi.mit.edu/>

Paste source sequence below (5'->3', string of ACGTnacgn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored).

FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINEs, etc.) or use a [Mispriming Library \(repeat library\)](#):

NONE

```
AACCCTAAGTGACCAGCTACAATCATAGACCATCAGCAAGCAGGTCATTGTTCCAACATGGCCC GTGGA
TGCCTTCCTGCCCTGCTGGCCCTGCTCGTCCTCTGGGAGCCCAGCCTGCCAGGCTTTGTCAAACA
GCACCTTTGTGGTCCCTCACCTGGTGGAGGCTCTGTACCTGGTGTGGGGAACGTGGTTCTTCTACACA
CCCAAGTCCCGTCGTGAAGTGGAGGACC CGCAAGTGC CACA ACTGGAGCTGGGTGGAGGCCGGAGGCCG
GGGATCTTCAGACCTTGGCAC TGGAGGTGCGCCGAGCAGCCTGGCATTGTGGATCAGTGTGCACCAG
CATCTGCTCCCTCTACCAACTGGAGA ACTACTGCAACTGAGTCCACCCTCCCGCCCA CCGCTCTGCAA
```

<input checked="" type="checkbox"/> Pick left primer, or use left primer below:	<input type="checkbox"/> Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below:	<input checked="" type="checkbox"/> Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand):
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Pick Primers Reset Form

[Sequence Id:](#) A string to identify your output.

[Targets:](#) E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the [source sequence](#) with [and]: e.g. ...ATCT[CCCC]TCAT.. means that primers must flank the central CCCC.

[Excluded Regions:](#) E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the [source sequence](#) with < and >: e.g. ...ATCT<CCCC>TCAT.. forbids primers in the central CCCC.

[Product Size Ranges:](#) 150-250 100-300 301-400 401-500 501-600 601-700 701-850 851-1000

[Number To Return:](#) 5 [Max 3' Stability:](#) 9.0

[Max Repeat Mispriming:](#) 12.00 [Pair Max Repeat Mispriming:](#) 24.00

[Max Template Mispriming:](#) 12.00 [Pair Max Template Mispriming:](#) 24.00

Pick Primers Reset Form

General Primer Picking Conditions

[Primer Size:](#) Min: 18 Opt: 20 Max: 27

[Primer Tm:](#) Min: 57.0 Opt: 60.0 Max: 63.0 [Max Tm Difference:](#) 100.0 [Table of thermodynamic parameters:](#) Breslauer et al. 1986

[Product:](#) Min: Opt: Max:

Figura 25. Ventana de *Primer3* después de escribir una secuencia en el cuadro de entrada. La secuencia es para Insulina en *Rattus norvegicus* (Untergasser, 2012).

3. *Primer-BLAST*

El programa *Primer-BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool* ó “herramienta de búsqueda de alineamiento básico local”) consiste en un módulo que genera pares de *primers* y otro para revisión de especificidad de los *primers* generados. *Primer3* se utiliza para generar el par de *primers* candidato para una secuencia dada. El módulo de revisión de especificidad utiliza *Primer-BLAST* junto con el algoritmo Needleman-Wunsch (NW) de alineamiento global para buscar coincidencias entre los *primers* y el DNA objetivo. *Primer-BLAST* se implementó utilizando el lenguaje C++ de NCBI y la interfaz de programación de *Primer3* C que recientemente añadió la capacidad de obtener *primers* para una o más regiones especificadas (Ye, 2012).

Primer-BLAST se estableció en los servidores de NCBI para proveer un servicio más rápido y confiable a los usuarios. Sin embargo, *Primer-BLAST* no es la herramienta ideal para el propósito de búsqueda de *primers* específicos, pues el algoritmo local de alineamiento que utiliza no necesariamente provee una información completa acerca de las coincidencias entre el *primer* y el DNA molde, particularmente cuando no son perfectas en los extremos del *primer* (Ye, 2012).

Una manera en que se puede aumentar la probabilidad de encontrar el par de *primers* específico consiste en colocar al menos un solo *primer* (de un par) en regiones donde el DNA molde no comparte alta similitud con otras regiones no deseadas, de ser posible. Para lograr esto, *Primer-BLAST* introduce la secuencia a *MegaBLAST*, para una identificación de regiones que son altamente similares a secuencias no deseadas en una base de datos especificada por el usuario. Entonces se manda la instrucción a *Primer3* para colocar al menos un *primer* de un par dado, si es posible, fuera de dichas regiones similares. Si el usuario tiene una secuencia con una entrada en la base de datos *RefSeq* o *NCBI-gi*, *Primer-BLAST* puede proporcionar fronteras exón/intrón, así como localizaciones de SNP asociadas (Ye, 2012).

Cuando un usuario coloca una secuencia de DNA molde para diseñar *primers* nuevos, *Primer-BLAST* busca una sola vez, lo que reduce tiempo. Si el usuario coloca un par pre-existente de *primers* para confirmar la especificidad, se genera un DNA molde artificial para la búsqueda de *Primer-BLAST*, conectando los dos *primers* con una región espaciadora de 20 bases (Ns). Esto asegura que cada *primer* será tratado por separado en la búsqueda de *Primer-BLAST* y, por lo tanto, lograr una búsqueda independiente para cada *primer* (Ye, 2012).

La interfaz de *Primer-BLAST* consiste en varias secciones donde los usuarios pueden introducir el DNA molde o *primers* pre-existentes, así como otros parámetros ajustables por el usuario (figura 27) (Ye, 2012).

[Reset page](#) [Save search parameters](#) [Retrieve recent results](#)

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) [Clear](#)

Range

Forward primer From To [Clear](#)

Reverse primer

Or, upload FASTA file [Browse...](#)

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand) [Clear](#)

Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand) [Clear](#)

PCR product size Min Max

of primers to return

Primer melting temperatures (T_m) Min Opt Max Max T_m difference [Clear](#)

Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section [Clear](#)

Exon junction span [Clear](#)

Exon junction match Exon at 5' side Exon at 3' side

Minimal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction [Clear](#)

Intron inclusion Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA [Clear](#)

Intron length range Min Max [Clear](#)

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template [Clear](#)

Database [Clear](#)

Organism

Enter an organism name, taxonomy id or select from the suggestion list as you type. [Clear](#)

[Add more organisms](#)

Exclusion (optional) Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) Exclude uncultured/environmental sample sequences [Clear](#)

Entrez query (optional) [Clear](#)

Primer specificity stringency Primer must have at least total mismatches to unintended targets, including at least mismatches within the last bps at the 3' end. [Clear](#)

Ignore targets that have or more mismatches to the primer. [Clear](#)

Misprimed product size deviation [Clear](#)

Splice variant handling Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input) [Clear](#)

[Get Primers](#) Show results in a new window Use new graphic view [Clear](#)

[Advanced parameters](#)

Figura 27. Interfaz gráfica de *Primer-BLAST* (Altschul, 1990).

Con *Primer-BLAST* se pueden diseñar nuevos pares a partir de la secuencia del DNA molde, o con ésta misma junto con un *primer* pre-existente. *Primer-BLAST* puede revisar la especificidad de *primers* pre-existentes con o sin el DNA molde. El DNA molde puede ser una secuencia en formato FASTA o en un acceso de NCBI. Se recomienda utilizar *RefSeq*, si está disponible, pues contiene más información acerca de la secuencia (Ye, 2012).

Primer-BLAST también puede realizar un chequeo rápido en cualquier secuencia insertada, para determinar si es una coincidencia exacta para una secuencia de *RefSeq*, caso que *Primer-BLAST* dirigirá al uso del acceso de *RefSeq* como DNA molde. La longitud del DNA molde está limitado a 50,000 bases. Para fragmentos más largos, el rango del *primer* deberá ser utilizado para limitar la longitud (Ye, 2012).

Primer-BLAST tiene flexibilidad en cuanto a las opciones de tirantez en la especificidad. Los usuarios pueden especificar el número de desajustes que un par de *primers* debe tener para secuencias no deseadas, así como una región en el extremo 3' donde éstos desajustes deben estar presentes. Además, se puede especificar el límite de desajustes sobre el que cualquier par candidato de *primers* deba ser ignorado por ejemplo, un filtro para *primers* con demasiados desajustes, para evitar amplificaciones no específicas. La configuración pre-determinada de especificidad consisten en que al menos un *primer* de un par dado debe tener dos o más desajustes para secuencias no deseadas en las últimas cinco bases en el extremo 3', y que cualquier DNA molde con más de seis desajustes para al menos un *primer* de un par dado, debe ser ignorado (Ye, 2012).

Los resultados en *Primer-BLAST* reportan la especificidad de los *primers* generados, un resumen gráfico del par de *primers* en relación con el DNA molde y ciertas características como exones, así como información detallada de cada par de *primers*; junto a los *primers* específicos para el DNA molde, también mostrará todos los *primers* relacionados (figura 30) (Ye, 2012).

Como ejemplo, se han diseñado dos *primers* utilizando la proteína humana de dedos de zinc 419 (ZNF419) variante 5 para mRNA (figura 28). A partir de esta secuencia, se obtienen cinco pares de *primers*, mostrados en el resumen gráfico. La figura sólo muestra los detalles del par de *primers* inicial, por falta de espacio. La liga de *Search Summary* (“resumen de búsqueda”) muestra los parámetros de búsqueda usados, así como el número total de resultados (entradas) en *Primer-BLAST* encontradas. El número en alineamientos indica que las posiciones al inicio y al final para el *primer* y el DNA molde (Ye, 2012). Además *Primer-BLAST* posee otra vista gráfica de alineamiento entre *primers* y la secuencia deseada (figura 29) (Altschul, 1990).

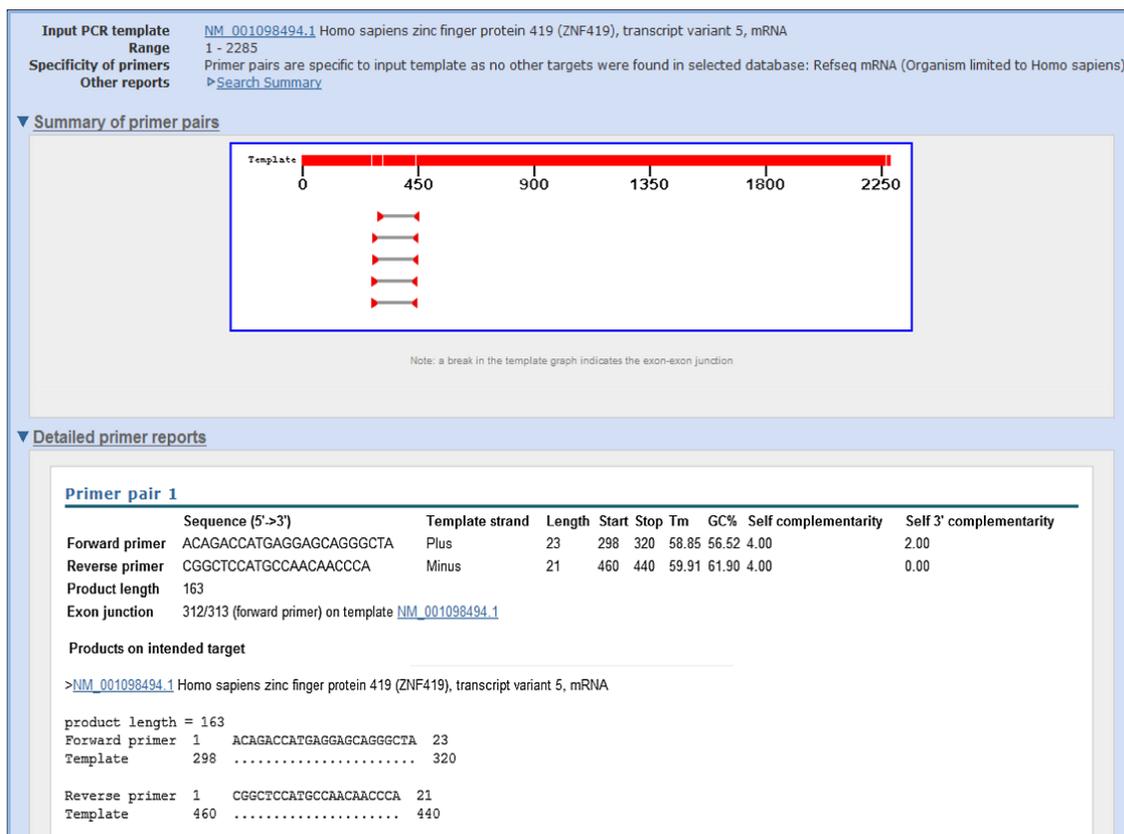


Figura 28. Resultados del diseño de *primers* para la proteína humana de dedos de zinc 419 (ZNF419) variante 5 para mRNA (Ye, 2012).

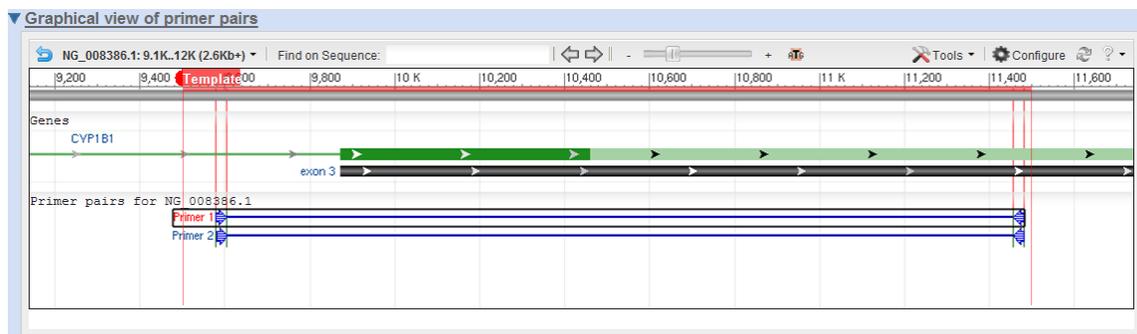


Figura 29. *Primer-BLAST* provee de una vista gráfica del alineamiento de los *primers* con la secuencia deseada. En la imagen, la secuencia corresponde a CYP1B1. Es recomendable iniciar el alineamiento del *primer* (secuencia) antes de que la secuencia deseada a estudiar inicie, esto por fines prácticos y mayor facilidad de manejo del producto en procesos posteriores (Altschul, 1990).

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementari
Forward primer	GTAGGACTGCTCAGTTCAAACAT	23	52.81	43.48	6.00	2.00
Reverse primer	ACAGTTACTACACCCGTAAGGC	22	53.90	50.00	5.00	2.00

Products on target templates

>[NM_001098494.1](#) Homo sapiens zinc finger protein 419 (ZNF419), transcript variant 5, mRNA

```
product length = 444
Forward primer 1 GTAGGACTGCTCAGTTCAAACAT 23
Template 493 ..... 515

Reverse primer 1 ACAGTTACTACACCCGTAAGGC 22
Template 936 ..... 915
```

```
product length = 780
Forward primer 1 GTAGGACTGCTCAGTTCAAACAT 23
Template 493 ..... 515

Reverse primer 1 ACAGTTACTACACCCGTAAGGC 22
Template 1272 .....CG..G...TT..... 1251
```

>[NM_001098491.1](#) Homo sapiens zinc finger protein 419 (ZNF419), transcript variant 1, mRNA

```
product length = 444
Forward primer 1 GTAGGACTGCTCAGTTCAAACAT 23
Template 592 ..... 614

Reverse primer 1 ACAGTTACTACACCCGTAAGGC 22
Template 1035 ..... 1014
```

```
product length = 780
Forward primer 1 GTAGGACTGCTCAGTTCAAACAT 23
Template 592 ..... 614

Reverse primer 1 ACAGTTACTACACCCGTAAGGC 22
Template 1371 .....CG..G...TT..... 1350
```

>[NM_198542.1](#) Homo sapiens zinc finger protein 773 (ZNF773), mRNA

```
product length = 444
Forward primer 1 GTAGGACTGCTCAGTTCAAACAT 23
Template 453 ....A.G...CA.....G. 475

Reverse primer 1 ACAGTTACTACACCCGTAAGGC 22
Template 896 .....C.....A..... 875
```

Figura 30. Revisión de especificidad. Ésta se realizó al introducir los *primers forward* y *reverse* sin agregar ninguna secuencia de DNA molde. Los *primers* fueron obtenidos de *PrimerBank*, utilizando el transcrito ZNF419, variante 5. Mientras que los resultados indicaron que 7 variantes de transcritos del gen ZNF419 tienen los mismos productos, esta figura muestra los detalles sólo para las variantes 1 y 5 debido al espacio limitado (Ye, 2012).

4. Oligo

El software *Oligo* de análisis de *primers*, es una herramienta esencial para el diseño, análisis y secuenciación de *primers* para PCR, genes sintéticos y varios tipos de sondas, incluyendo siRNA. Se encuentra basado en información termodinámica, sus algoritmos buscan *primers* óptimos para PCR, incluyendo *multiplex*. Sin embargo, este programa no es de acceso libre (Judelson, 2006).

Muchos programas utilizan el valor de Delta G (ΔG), el cual está relacionado a la magnitud del alineamiento entre secuencias, donde un mayor rigor de interacción representa una mejor estabilidad termodinámica de la estructura (figura 31). Sin embargo, T_m indica más adecuadamente las características de los oligonucleótidos. Lo que puede representar ΔG es el rango de temperatura en el cual se da lugar la transformación de una estructura en dúplex a un arreglo aleatorio. En otras palabras, cuántos grados Celsius son necesarios para cambiar de una estructura a otra (Manthey, 2005).

En Oligo, una manera de empezar el diseño de *primers* con T_m similares, es utilizar las ventanas de T_m y ΔG (figura 32) como guía para seleccionar *primers* candidatos (Judelson, 2006).

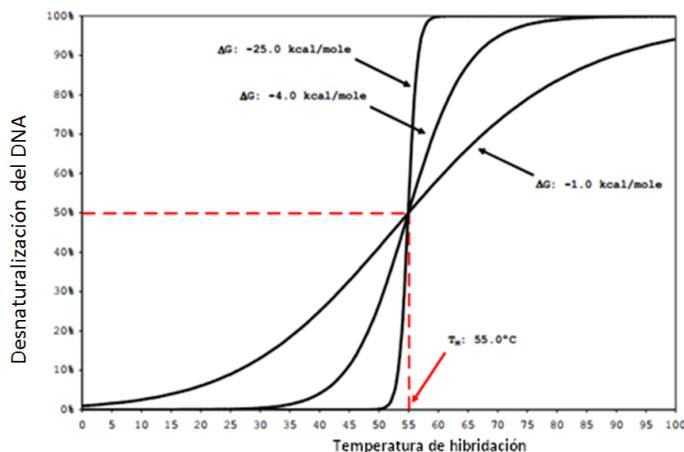


Figura 31. Temperatura y cambio de transición de forma en dúplex a cadena sencilla (Manthey, 2005).

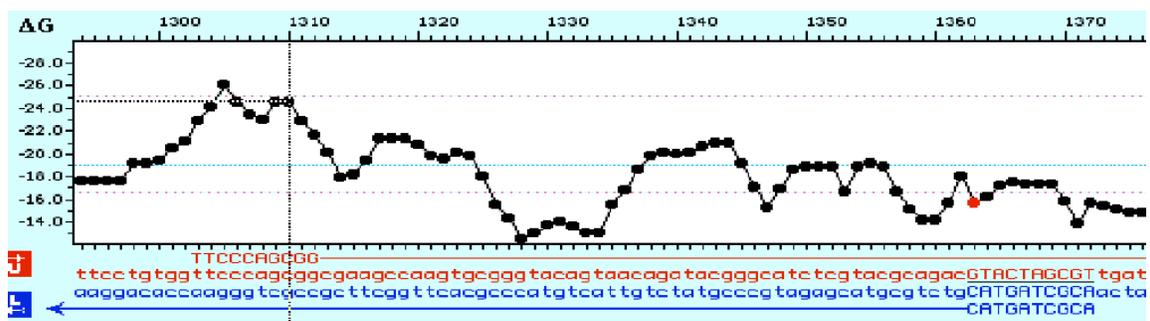


Figura 32. Ventana de T_m y ΔG . La escala de la izquierda indica la ΔG de hibridación (puede cambiarse a T_m), basada en el tamaño del *primer* seleccionado (al presionar “L” se puede ver el tamaño) (Judelson, 2006).

```

Optimal Annealing Temperature: 56.6°
Product length, GC content & Tm: 84 bp, 58.3% GC, 75.8°
Product Tm - Upper Primer Tm: 14.2°
Primers Tm difference: 2.8°
Upper Primer: 22-mer, 5' pos. 1241, Tm = 61.6°, 3'-pentamer  $\Delta G$  = -6.4 kcal/mol
Lower Primer: 28-mer, 3' pos. 1305, Tm = 64.4°, 3'-pentamer  $\Delta G$  = -9.7 kcal/mol
Salt & DNA Concentrations (fixed in this option): 50 mM and 250 pM, respectively

```

Figura 33. Características calculadas de un *primer* en Oligo. En el menú desplegable “Analyze”, en la opción “Composition and T_m ” (Judelson, 2006).

Oligo puede calcular las diferentes características, así como las concentraciones de sales y adyuvantes (figura 33). Con la función *Internal Stability* (“estabilidad interna”) (figura 34) de *Oligo*, es posible elegir *primers* con buena especificidad. Por ejemplo, el *primer* (5'-CAGTAACAGA TACGGGCA) debería mostrar una especificidad pobre, dado que su extremo 3' es rica en GC, de manera relativa al resto del *primer*. Es importante notar que el problema de especificidad se encuentra en la región del extremo 3', no en la base 3' (figura 35), (figura 36) (Judelson, 2006).

Con el comando del *Analyze>Duplex* (“analizar>dúplex”) se pueden identificar secuencias que lleven a dimerización de *primers*. Es importante revisar tanto el *primer* individual como las combinaciones de *primers* (Judelson, 2006).

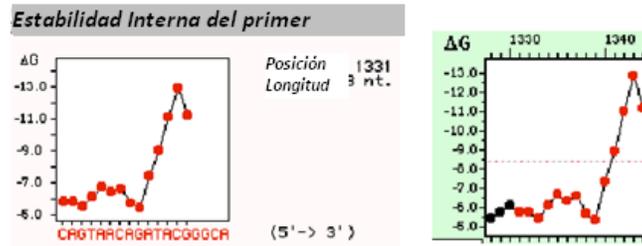


Figura 34. Estabilidad interna. La región del extremo 3' es rica en GC, por lo tanto tiene una T_m mayor (ΔG menor, mayor estabilidad). Es un *primer* inapropiado (Judelson, 2006).

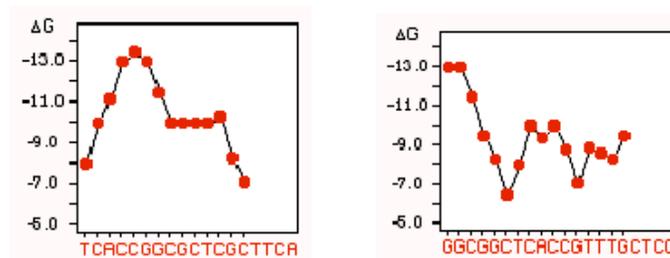


Figura 35. Perfiles adecuados para especificidad, mostrados en dirección 5' → 3'. El extremo 3' se encuentra más bajo (en su perfil ΔG , menor estabilidad) que el extremo 5' o la parte media de los *primers* (Judelson, 2006).

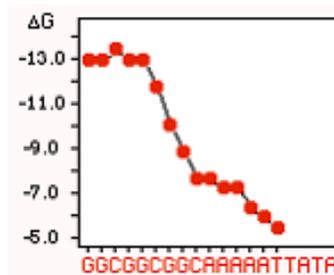


Figura 36. Perfil con buena especificidad aparente, de acuerdo a los parámetros mencionados anteriormente. Sin embargo, T_m es tan pobre que no se alinearía bien al DNA molde (Judelson, 2006).

Oligo provee un valor de ΔG para los dímeros de *primers*. De manera ideal, mientras ΔG sea de baja magnitud, se tendrán mejores resultados. Sin embargo, es recomendable evitar *primers* con ΔG de -7 kcal/mol o más (Judelson, 2006).

5. Oligo Analyzer

Otra herramienta en línea es *Oligo Analyzer*. Está soportada por el servidor de IDT (*Integrated DNA Technologies*). Éste permite analizar una secuencia de *primers* en cuanto a varias características (figura 37) como aquellas básicas (función Analyze): T_m , longitud, %GC; (figura 38), o aquellas más específicas (Self-Dimer, por ejemplo), (figura 39) figura 40 (*Integrated DNA Technologies*, 2013).

OligoAnalyzer 3.1

Instructions | Definitions | Feedback

Sequence # Bases 252

5'-AAC CCT AAG TGA CCA GCT ACA ATC ATA GAC CAT CAG CAA GCA GGT
CAT TGT TCC AAC ATG GCC CTG TGG ATG CGC TTC CTG CCC CTG CTG
GCC CTG CTC GTC CTC TGG GAG CCC AAG CCT GCC CAG GCT TTT GTC
AAA CAG CAC CTT TGT GGT CCT CAC CTG GTG GAG GCT CTG TAC CTG
GTG TGT GGG GAA CGT GGT TTC TTC TAC ACA CCC AAG TCC CGT CGT
GAA GTG GAG GAC CCG CAA GTG CCA CAA

3'

Target Type DNA

Oligo Conc μM

Na⁺ Conc mM

Mg⁺⁺ Conc mM

dNTPs Conc mM

Please Wait ...

Analyze

Hairpin

Self-Dimer

Hetero-Dimer

NCBI Blast

TM Mismatch

Figura 37. Diferentes análisis de una secuencia en *Oligo Analyzer*. La secuencia elegida no es la apropiada para el programa, pues no cumple las características de un *primer*, pero se utilizó a modo de ejemplo (*Integrated DNA Technologies*, 2013).



Home» »
 Products» »
 Order» »
 Support» »
 Services» »
 SciTools» »

OligoAnalyzer 3.1

[Instructions](#) | [Definitions](#) | [Feedback](#)

<p>Sequence # Bases 0</p> <div style="border: 1px solid black; height: 60px; width: 100%;"></div> <p style="text-align: right;">5'- -3'</p> <p style="text-align: center;"> <input type="button" value="Clear Sequence"/> <input type="button" value="Add To Order"/> </p>	<p>Target Type <input type="text" value="DNA"/></p> <p>Oligo Conc <input type="text" value="0.25"/> μM</p> <p>Na⁺ Conc <input type="text" value="50"/> mM</p> <p>Mg⁺⁺ Conc <input type="text" value="0"/> mM</p> <p>dNTPs Conc <input type="text" value="0"/> mM</p> <p style="text-align: center;"><input type="button" value="Default Settings"/></p>	<p style="text-align: center;"><input type="button" value="Analyze"/></p> <p style="text-align: center;"><input type="button" value="Hairpin"/></p> <p style="text-align: center;"><input type="button" value="Self-Dimer"/></p> <p style="text-align: center;"><input type="button" value="Hetero-Dimer"/></p> <p style="text-align: center;"><input type="button" value="NCBI Blast"/></p> <p style="text-align: center;"><input type="button" value="TM Mismatch"/></p>
---	--	--

Results | 5' mods | Internal Mods | 3' mods | **Mixed Bases**

Standard Mixed Base Instructions

To use a Standard Mixed Base, simply type in the IUB symbol (from the table below) which represents the desired mix.

R	A,G
Y	C,T
M	A,C
K	G,T
S	C,G
W	A,T
H	A,C,T
B	C,G,T
V	A,C,G
D	A,G,T
N	A,C,G,T

Custom Mixed Base Instructions

To use Custom Mixed Bases
 Enter the desired percentage of each base (Integers Only, Totaling 100%).
 Press "Use Mix Base" button to add your custom mixed base.

Please note: An additional charge is applied for hand mixing these custom bases.

%A %C %G %T

Base Notations

DNA = A, C, G, T and U, I
 Mixed Bases = Please enter bases in UPPERCASE
 Phosphorothioated DNA = A*, G*, C*, T*
 RNA = rA, rG, rC, rU
 Phosphorothioated RNA = rA*, rG*, rC*, rU*
 2'-O-Methyl RNA = mA, mG, mC, mU
 Phosphorothioated 2'-O-Methyl RNA = mA*, mG*, mC*, mU*
 Locked Nucleic Acid (LNA) = +A, +G, +C, +T

Join the IDT Customer Experience Team

Be the first to know about website updates and enhancements. Give us your feedback on new products and website features. Help us create better scientific design tools. We can't do it without you.

Figura 38. Pantalla completa de *input* de *Oligo Analyzer* (Integrated DNA Technologies, 2013).



OligoAnalyzer 3.1

[Instructions](#) | [Definitions](#) | [Feedback](#)

<p>Sequence # Bases 252</p> <p>5'-AAC CCT AAG TGA CCA GCT ACA ATC ATA GAC CAT CAG CAA GCA GGT CAT TGT TCC AAC ATG GCC CTG TGG ATG CGC TTC CTG CCC CTG CTG GCC CTG CTC CTC TGG GAG CCC AAG CCT GCC CAG GCT TTT GTC AAA CAG CAC CTT TGT GGT CCT CAC CTG GTG GAG GCT CTG TAC CTG GTG TGT GGG GAA CGT GGT TTC TAC ACA CCC AAG TCC CGT CGT GAA GTG GAG CCG CAA GTG CCA CAA</p> <p style="text-align: right;">3'</p> <p><input type="button" value="Clear Sequence"/> <input type="button" value="Add To Order"/> <input type="button" value="Default Settings"/></p>	<p>Target Type <input type="text" value="DNA"/></p> <p>Oligo Conc <input type="text" value="0.25"/> μM</p> <p>Na⁺ Conc <input type="text" value="50"/> mM</p> <p>Mg⁺⁺ Conc <input type="text" value="0"/> mM</p> <p>dNTPs Conc <input type="text" value="0"/> mM</p>	<p><input type="button" value="Analyze"/></p> <p><input type="button" value="Hairpin"/></p> <p><input type="button" value="Self-Dimer"/></p> <p><input type="button" value="Hetero-Dimer"/></p> <p><input type="button" value="NCBI Blast"/></p> <p><input type="button" value="TM Mismatch"/></p>
---	--	--

Results	5' mods	Internal Mods	3' mods	Mixed Bases
<p>RESULTS</p> <p>SEQUENCE:</p> <p>5'- AAC CCT AAG TGA CCA GCT ACA ATC ATA GAC CAT CAG CAA GCA GGT CAT TGT TCC AAC ATG GCC CTG TGG ATG CGC TTC CTG CCC CTG CTG GCC CTG CTC CTC TGG GAG CCC AAG CCT GCC CAG GCT TTT GTC AAA CAG CAC CTT TGT GGT CCT CAC CTG GTG GAG GCT CTG TAC CTG GTG TGT GGG GAA CGT GGT TTC TTC TAC ACA CCC AAG TCC CGT CGT GAA GTG GAG CCG CCA GTG CCA CAA -3'</p> <p>COMPLEMENT:</p> <p>5'- TTG TGG CAC TTG CGG GTC CTC CAC TTC ACG ACG GGA CTT GGG TGT GTA GAA GAA ACC ACG TTC CCC ACA CAC CAG GTA CAG AGC CTC CAC CAG GTG AGG ACC ACA AAG GTG CTG TTT GAC AAA AGC CTG GGC AGG CTT GGG CTC CCA GAG GAC GAG CAG GGC CAG CAG GGG CAG GAA GCG CAT CCA CAG GGC CAT GTT GGA ACA ATG ACC TGC TTG CTG ATG GTC TAT GAT TGT AGC TGG TCA CTT AGG GTT -3'</p> <p>LENGTH: 252</p> <p>GC CONTENT: 57.1 %</p> <p>MELTTEMP: 66.6 °C</p> <p>MOLECULAR WEIGHT: 77485.9 g/mole</p> <p>EXTINCTION COEFFICIENT: 2329100 L/(mole·cm)</p> <p>n mole/OD₂₆₀: .43</p> <p>μg/OD₂₆₀: 33.27</p> <p>MELTING TEMPERATURE SETTINGS</p> <p>TARGETTYPE: DNA</p> <p>OLIGO CONC: 0.25 μM</p> <p>Na⁺ CONC: 50 mM monovalent salt</p> <p>Mg⁺⁺ CONC: 0 mM divalent salt</p> <p>dNTPs CONC: 0 mM nucleotide triphosphate</p> <p>MELTING TEMPERATURE ASSUMPTIONS AND LIMITATIONS</p> <ul style="list-style-type: none"> Predictions are accurate for oligos from 8 to 60 bases in length, in neutral buffered solutions (pH 7 - 8) with monovalent cation (Na⁺) concentrations from 1.2 M down to 1.5mM, divalent cation (Mg⁺⁺) concentrations from 600 mM down to 0.01 mM, and triphosphates (dNTPs) concentration up to 120% of the divalent cation concentration. Oligo concentration is assumed to be significantly larger (at least 6x) than concentration of the complementary target, which is true in majority of molecular biology experiments. If this is not a case, concentration of the target cannot be ignored and you should enter in the box, $\text{Oligo Conc} = \frac{[\text{strand1}] - [\text{strand2}]}{2} \text{ when } [\text{strand1}] \geq [\text{strand2}]$ $\text{Oligo Conc} = \frac{([\text{strand1}] + [\text{strand2}])}{4} \text{ when } [\text{strand1}] = [\text{strand2}]$ Melting temperature accuracy and models: (Oligo/Template) <ul style="list-style-type: none"> DNA/DNA: +/- 1.4°C (Allawi '97) LNA/DNA: +/- 2.0°C (McTigue '04, Owczarzy, 2011) RNA/DNA: +/- 2.7°C (Sugimoto '95) DNA/RNA: +/- 2.7°C (Sugimoto '95) RNA/RNA: +/- 1.3°C (Xie '98) Divalent cation correction +/- 0.5°C (Owczarzy '08) Triphosphate correction +/- 0.0°C (Owczarzy '08) Monovalent cation correction +/- 2.0°C (Owczarzy '04) Consecutive LNA bases hybridized to a DNA template use a model from Owczarzy '11. In the absence of empirical data, LNA bases on an RNA template assume 				

Figura 39. Output (resultados) del análisis (primera elección), de *Oligo Analyzer*. Se utilizó una secuencia que no es un *primer*, sin embargo sólo con el fin de ejemplificar (*Integrated DNA Technologies*, 2013).

6. *Primer Bank*

A esta base de datos se puede acceder a través de internet desde la página (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>). Tiene varias maneras de búsqueda para *primers*: Accesos de *GenBank*, *NCBI protein*, *gene ID*, *PrimerBank ID* o palabra clave (*keyword*). Cuenta con alrededor de 300 000 *primers* diseñados para la mayoría de los genes conocidos de humanos y ratones. El sitio web además presenta un protocolo experimental para RT-PCR con *SYBR Green*, así como problemas comunes relacionados (Dorak, 2007).

10. PCR *multiplex*

Muchos experimentos requieren el análisis de una variedad de secuencias de DNA, requiriendo múltiples reacciones de PCR al mismo tiempo en el mismo DNA molde, o en secuencias emparentadas. Con la PCR *multiplex*, se puede tener un ahorro considerable en tiempo, esfuerzo y reactivos, pues está diseñada para la amplificación simultánea de múltiples secuencias en una sola reacción. Mientras que no hay límite teórico para el número de locus amplificables simultáneamente, hay varias desventajas prácticas a considerar que restringe a la técnica (Saunders, 1999).

Conforme el número de locus se incrementa, se dificulta más la posibilidad de balancear las condiciones de reacción óptimas de PCR para todos los locus. Incluso las variaciones más pequeñas en la eficiencia de amplificación entre varios locus, pueden llevar a una marcada diferencia en el rendimiento, y esto podría dificultar también la detección e interpretación de los locus. Otra limitación es el aumento de la posibilidad de amplificación inespecífica entre *primers* no emparejados. Conforme el número de *primers* en la reacción aumentan, las permutaciones entre pares aumentan. La amplificación inespecífica en cantidades significativas, puede minar la interpretación de resultados para algunos o todos los locus (Saunders, 1999).

Existen dos tipos de PCR *multiplex* (mPCR): mPCR ligada, donde se amplifican diferentes regiones del mismo gen o genoma; y mPCR no ligada, donde secuencias no relacionadas, pero extraídas en conjunto, o genomas mezclados, se amplifican (Saunders, 1999).

La mPCR es una técnica muy flexible y posee muchas aplicaciones, tales como identificación de patógenos, determinación de género, análisis de ligamiento, estudios forenses y diagnóstico de enfermedades genéticas; mPCR puede ser el último paso de un análisis, así como una etapa preliminar, previa a técnicas como secuenciación, hibridización y análisis de restricción (Saunders, 1999).

La mayor desventaja de mPCR es el gran esfuerzo inicial requerido para el diseño teórico y práctico. Es recomendable considerar durante el diseño temprano de una mPCR, el beneficio

analítico contra el tiempo y costo de desarrollo. Mientras más pares de *primers* se añaden a la reacción, es más difícil asegurar una amplificación efectiva así como la diferenciación de todos los fragmentos de DNA. Con reacciones sencillas pueden obtenerse mejores resultados; por ejemplo, el desarrollo de dos reacciones triples, en lugar de una sola reacción séxtuple, podría dar una mejor solución (Saunders, 1999).

1. Diseño de *primers* para mPCR

La posición de los *primers* es muy importante para el diseño de una mPCR. La secuencia de las regiones que enmarcan la secuencia a amplificar podría imponer limitaciones. Puede haber una región insuficiente para dar flexibilidad a la posición del *primer*, o contener secuencias no aptas para ser sitio de *primers*, tal como secuencias no únicas o repetitivas (Saunders, 1999).

La detección de productos debe ser considerada también, si la electroforesis en gel será el último punto del sistema de detección, es importante posicionar a los *primers* de tal modo que los fragmentos podrían ser separados fácilmente por tamaño, aunque el rango de tamaños no debe ser tan grande que los fragmentos deban ser separados en diferentes geles. Otros sistemas de detección no dependen de la diferencia de tamaños para distinguir los productos, permitiendo tamaños idénticos o muy cercanos. Por ejemplo, el uso de sistemas de detección basados en fluorescencia, aún si son basados en electroforesis, pueden permitir dos o más productos migrando juntos para ser analizados, dado que se encuentran marcados con diferentes colorantes fluorescentes. Los sistemas de captura en fase sólida pueden tener restricciones no significativas y pueden ofrecer una mayor libertad en la elección de *primers* y sus posiciones (Saunders, 1999).

El diseño de *primers* para mPCR sigue las mismas reglas para amplificaciones simples, pero deben considerarse factores adicionales para asegurar la obtención de un par de *primers* compatibles. El paso inicial en el diseño de una reacción *multiplex* es asegurar que las temperaturas de fusión (T_m), para cada par de *primers*, son similares. Cada *primer*, en cada par, debe tener T_m similar. Además, la distribución de GC a lo largo de los fragmentos debe ser uniforme, con regiones de T_m no tan altas (Saunders, 1999).

Si en una reacción *multiplex*, un locus resulta con bajo rendimiento en sus productos, o se identifica como fuente de artefactos, podría ser que su verdadera T_m es significativamente diferente a la calculada y será necesario rediseñar uno o más *primers* para solucionar esto. Los *primers* deben ser revisados para asegurar baja homología, particularmente en el extremo 3', tanto entre el mismo par y con otros pares, para limitar la generación de dímeros de *primers* y otras interacciones indeseadas (Saunders, 1999).

11. PCR y secuenciación

La secuenciación de DNA (Sanger, 1977) es el método estándar para determinar la secuencia de un fragmento de DNA, lo que permite la detección y caracterización de mutaciones (Murphy, 2005). El método depende de la replicación de secuencias específicas en condiciones controladas. La adición enzimática de un dideoxirribonucleótido (ddNTP) a la cadena en construcción, detiene la actividad (Sanger, 1977). Esta técnica también requiere de diseño de *primers*, sin embargo los criterios para su diseño son aún más estrictos que aquellos para *primers* de PCR. Los criterios pueden encontrarse en la referencia de Lyons (2013). De acuerdo a Lyons, no es recomendable usar los mismos *primers* que funcionaron para una amplificación de PCR, en una secuenciación.

Los *primers* ineficientes aún pueden funcionar para PCR. En el caso de secuenciación, los *primers* ineficientes darán una señal muy débil. Se pueden ajustar las condiciones de la PCR para mejorar el rendimiento y la especificidad. Sin embargo, eso no es suficiente en una reacción de secuenciación, en las que se exigen consensos de condiciones. Además, un *primer* en PCR puede iniciar mal alineado, pero aún si un *primer* logra alinearse, aunque sea brevemente, el producto de la extensión podrá coincidir perfectamente y será amplificado correctamente en los siguientes ciclos. En contraparte, las reacciones de secuenciación no son tan flexibles. Poseen sólo un *primer* que copia una sola cadena, y la reacción será siempre menos eficiente si el *primer* no coincide correctamente (Lyons, 2013).

La secuenciación en ciclos (Murray, 1989) es similar a la amplificación con PCR, utiliza ciclos repetidos de desnaturalización, alineamiento y extensión, con una polimerasa termoestable. Dado que se utilizan múltiples rondas de síntesis y terminación; se generan señales más fuertes de secuenciación con menor cantidad de DNA molde. Sin embargo, las técnicas de secuenciación aún requieren amplificación previa del DNA molde (Murphy, 2005).

Aún cuando la amplificación por PCR y la secuenciación en ciclos comparten muchas características, ambas reacciones usualmente se llevan a cabo de manera separada por varias razones. Una es que la PCR requiere dos *primers* para la amplificación del DNA molde. Bajo condiciones normales, en la reacción de secuenciación, el uso simultáneo de dos

primers lleva a dos secuencias superpuestas (*forward* y *reverse*), que imposibilita la interpretación (Murphy, 2005). Por esto mismo, una vez que se ha amplificado un fragmento, debe purificarse para evitar secuenciación de fondo (Lyons, 2013). Otra razón es que las reacciones de PCR y secuenciación en ciclo, tradicionalmente han sido hechas con diferentes polimerasas. Mientras que PCR se realiza con *Taq* polimerasa estándar, la reacción de secuenciación por ciclos utiliza una *Taq* polimerasa que contiene una mutación puntual, usualmente Phe-Tyr en la posición 667, en el sitio activo de la enzima. Esta mutación permite la incorporación eficiente de ddNTPs, que usualmente son altamente discriminados por la *Taq* polimerasa silvestre (Murphy, 2005).

La mayoría de los protocolos actuales de secuenciación requieren al menos tres pasos para generar productos de secuenciación a partir de un DNA molde: (a) amplificación del DNA molde; (b) purificación de los productos de PCR, para retirar dNTPs no incorporados y *primers*; y (c) una reacción de secuenciación para generar productos de secuenciación. Murphy (2005) describe un método de secuenciación directa de productos de PCR, en el cual reduce los tres pasos separados a una sola reacción. Este método utiliza *primers forward* y *reverse* complementarios a la región de DNA deseada para permitir la amplificación. Los dos *primers* deben encontrarse en una proporción molar desigual, de tal modo que la información de la secuenciación será generada únicamente a partir del *primer* en exceso. La reacción también requiere un exceso de dNTP inicial, en comparación a los ddNTPs, para permitir una extensión completa de los productos de PCR por la DNA polimerasa (amplificación) durante las primeras rondas de ciclos térmicos, en lugar de terminación de la reacción con ddNTPs (secuenciación). Bajo estas condiciones, la PCR predomina durante los ciclos tempranos porque la reacción contiene suficientes cantidades de ambos *primers*, y una concentración relativamente alta de dNTPs. En los ciclos tardíos, el *primer* limitante estará empobrecido y la proporción dNTPs a ddNTPs habrá aumentado debido al consumo de dNTPs en productos de PCR durante los primeros ciclos. El cambio en concentraciones relativas de reactivos en los ciclos tardíos, entonces, favorecen la reacción de secuenciación sobre los de amplificación, eliminando la necesidad de añadir más reactivos o realizar manipulaciones posteriores (Murphy, 2005).

12. Variantes de PCR

La PCR en tiempo real (RT-qPCR) puede confundirse con la PCR de transcripción inversa. No son la misma técnica. La PCR de tiempo real utiliza tinciones fluorescentes y sondas para medir la cantidad de producto amplificado en tiempo real (Rahman, 2013). Esta medición se efectúa después de cada ciclo de amplificación. La PCR en tiempo real (RT PCR) es la colección continua de señales fluorescentes de una o más reacciones de PCR a través de varios ciclos y la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) es la conversión de las señales fluorescentes de cada reacción en un valor numérico para cada muestra (Dorak, 2007).

En ocasiones, el DNA molde de la PCR en tiempo real, es DNA complementario (DNAc) obtenido por retro-transcripción de RNA, sin embargo ésta técnica no debe confundirse con PCR de retro-transcripción, en la cual se obtiene DNAc a partir de RNA, pero no existe una cuantificación obligada. Cuando se combina la reacción de retro-transcripción (RT) con la PCR, la identificación de un transcrito de RNA específico, a partir de una muestra con muy baja concentración, es posible (Dorak, 2007). Esta técnica permite el mapeo de expresión, determinando cuándo y dónde se expresan ciertos genes (Rahman, 2013).

La cuantificación de RNA se inicia al producir cDNA (DNA complementario) por retro-transcripción. Existen dos tipos de retro-transcriptasas (RT) para PCR: AMV y MMLV. AMV es una proteína dimérica del virus de la mieloblastosis aviar, mientras que MMLV se deriva del virus de la leucemia murina de Moloney y es una proteína monomérica. Ambas enzimas tienen una actividad de RNasa H (hidrolítica), que es la habilidad de degradar RNA en un híbrido RNA-DNA. AMV tiene una actividad RNasa H más alta en comparación con MMLV. Ambas enzimas tienen un efecto inhibitorio de PCR dependiente de concentración. Por esta razón, es importante mantener la cantidad de retro-transcriptasa, tan baja como sea posible mientras aún se logre una síntesis óptima de cDNA (Dorak, 2007).

Un control para la cuantificación de RNA por qPCR es la amplificación de una muestra con una secuencia conocida. Los genes *housekeeping* o de mantenimiento, son llamados así porque su síntesis ocurre en todas las células nucleadas, pues son necesarios para la supervivencia de la célula. La síntesis de sus moléculas de RNA es generalmente considerada poco

variable en comparación con otros genes y, por su uso común, son considerados por muchos laboratorios como constantes y seguros en su cuantificación. Sin embargo, estos genes pueden causar variaciones en algunas situaciones. Los genes más comunes son albúmina, β - y γ -actina, ciclofilina, G3PDH, α - y β -tubulina, hipoxantina fosforibosiltransferasa (HRPT), L32 para otros tipos de células; y rRNA 18S y 28S. Su detección se utiliza como control de calidad interno, sin embargo debe analizarse cuidadosamente en relación al tipo celular y su metabolismo para tener en cuenta las posibles variaciones (Thellin, 1999).

Todos los instrumentos de detección en tiempo real están basados en señales fluorescentes. El incremento de fluorescencia es directamente proporcional al incremento de producto amplificado durante la PCR. Una señal baja de fluorescencia aumenta proporcionalmente conforme cada ciclo de reacción, con el producto formado. El tinte utilizado en el protocolo más sencillo es *SYBR Green I* (Sondas moleculares/*Invitrogen*). La fluorescencia de fondo de *SYBR Green I* es muy baja en solución como molécula libre y estimulada por la luz de longitud de onda apropiada. Conforme el producto de doble cadena se forma, *SYBR Green I* se une a la curva menor del DNA de doble cadena. El complejo DNA-colorante resulta en un dramático incremento de fluorescencia, aproximadamente 2,000 veces más que la fluorescencia inicial (Dorak, 2007).

Los sistemas de detección basados en fluorescencia siguen el principio de absorción y excitación de moléculas que producen fluorescencia. Las moléculas fluorescentes absorben luz en forma de fotones en un rango estrecho de longitud de onda. Dicha longitud de onda, a la que el colorante absorbe luz al máximo, es llamada longitud de onda de excitación para esa molécula. Después de la excitación, la molécula llega a un estado de energía superior, que es transitorio y de corta duración. La molécula excitada pronto decae y regresa al estado basal. Cuando esto ocurre, un fotón de energía es emitido a una longitud de onda más larga. La luz es liberada a una longitud de onda de emisión. Éste cambio entre longitudes de onda de excitación a emisión es llamado desplazamiento de Stokes. Para cada tinte fluorescente, existen longitudes de onda de excitación y emisión óptimas. Una molécula fluorescente puede ser excitada o detectada en un rango estrecho de longitud de onda, alrededor de éstos óptimos. Las moléculas fluorescentes con un mayor desplazamiento de Stokes son las más adecuadas, pues permiten la separación más clara de las longitudes de onda de excitación con las de emisión (Dorak, 2007).

Otro requisito para cualquier detección fluorescente es que exista una gran diferencia o delta entre la intensidad de la señal al inicio y al fin. Todos los ensayos fluorescentes utilizados en PCR de tiempo real logran ésta delta al utilizar FRET (Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia). FRET requiere dos moléculas que puedan interactuar entre ellas, al menos una capaz de mostrar fluorescencia. El componente fluorescente es llamado donador, y la segunda molécula es la aceptora. Durante FRET, el colorante donador es excitado por una fuente externa de luz a una longitud de onda igual o cercana a la longitud de onda de excitación óptima, y luego emite luz a una longitud de onda más larga debido al

desplazamiento de Stokes. En lugar de ser detectada por el instrumento, la luz emitida se utiliza para excitar a la molécula aceptora, la cual se encuentra físicamente cercana. La molécula aceptora absorbe la energía de la luz emitida por el colorante donador, efectivamente cancelando la señal del donador. La longitud de onda emitida por la molécula donadora debe encontrarse cerca de la absorción máxima de la molécula aceptora. La molécula aceptora puede o no emitir la luz. Si la luz es emitida por la molécula aceptora, será desplazada aún más y tendrá una longitud de onda aún más larga que la emitida inicialmente por el donador. La señal del aceptor será detectada por el instrumento en tiempo real, pero no será considerada una señal reportera por el software. FRET depende de la proximidad de las moléculas donadoras yceptoras (10-100 Å) (Dorak, 2007).

Hay tres clases de moléculas fluorescentes utilizadas en PCR de tiempo real. Los tres tipos se definen por su función en el experimento. El primero es el colorante donador y es usualmente llamado reportero. La señal fluorescente del reportero es el que se monitorea durante el curso del experimento. El segundo es el aceptor o molécula de cancelación, y es el responsable de la cancelación de la señal inicial del colorante reportero. El último es el colorante de referencia, el cual es común en todas las reacciones, no interactúa con los reactivos y se utiliza para normalizar la señal de cada pocillo para el software (Dorak, 2007).

Gracias a la posibilidad de medir la cantidad de producto en tiempo real, ha sido posible explorar las características de la reacción mientras sucede. Como resultado, se obtuvo mucho conocimiento acerca de cómo los reactivos, DNA molde y los *primers* afectan los resultados. Las fases de PCR han podido determinarse gracias a ésta técnica.

1. PCR anidada

En ésta variante de PCR, dos pares de *primers* se utilizan para un solo DNA molde (figuras 41 a 44). El par inicial amplifica el DNA molde como en cualquier PCR. El segundo par (*primers* anidados) se unen al producto inicial de la PCR (figura 44) y producen un segundo producto de PCR que será más corto que el producto inicial (figura 45). La lógica de ésta estrategia es que si hubo una amplificación de una secuencia no deseada por error, la probabilidad de que sea amplificada por segunda vez, por el otro par de *primers*, es muy baja (Davidson College, 2002).

2. Amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPD)

RAPD es una aplicación de PCR estándar utilizada para detectar las diferencias de DNA polimórfico que existen entre individuos y especies. La característica especial de ésta técnica



Figura 41. Segmento de DNA con puntos que representa una secuencia no descrita en una longitud no especificada. Las dobles líneas representan una distancia entre las dos porciones de DNA. La secuencia mostrada representan los sitios de alineamiento con los *primers*, aunque los *primers* reales serían más largos (*Davidson College, 2002*).

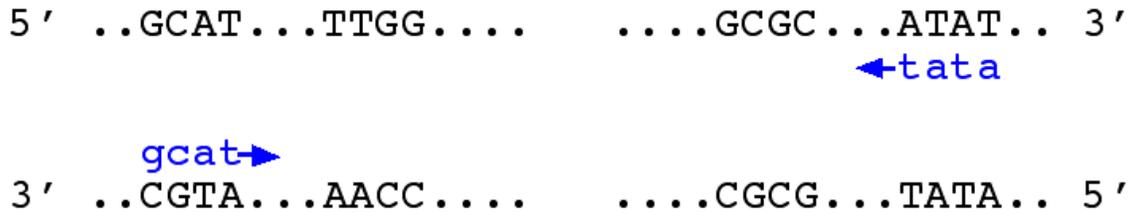


Figura 42. El primer par de *primers* (en azul) se alinean y amplifican todo el DNA entre ellos (*Davidson College, 2002*).



Figura 43. Producto de PCR después de la primera ronda de amplificación. Nótese que las bases fuera del par de primers no está presente en el producto (*Davidson College, 2002*).

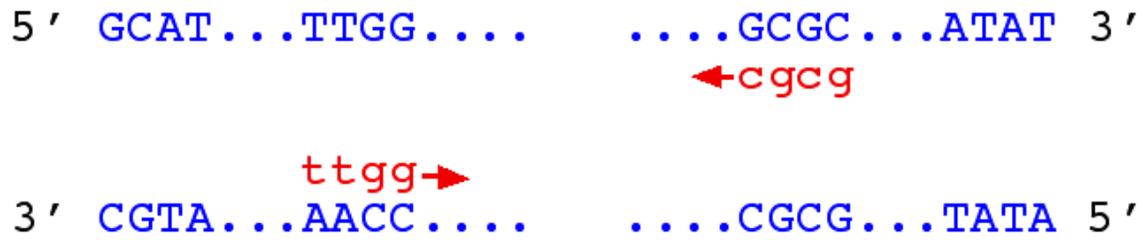


Figura 44. El segundo par de *primers* anidados (rojo) se unen al primer producto de PCR. Los sitios de alineamiento son algunas bases “internas”, con respecto a los previos sitios de alineamiento (*primers* de la anterior ronda de amplificación) (*Davidson College*, 2002).



Figura 45. Producto final de PCR después de la segunda ronda. La longitud del producto está definido por la localización de los sitios de alineamiento de los *primers* “internos” (*Davidson College*, 2002).

es el uso de un *primer* de 10 bp de secuencia arbitraria para amplificar fragmentos de DNA de un molde genómico. Ésta técnica tiene ventaja para la obtención de perfiles, pues no se requiere conocimiento previo acerca de la secuencia del genoma en la muestra, dada la naturaleza arbitraria de la técnica. Cada producto de PCR es de secuencia desconocida y es amplificado cuando el *primer* se alinea al DNA, cumpliendo tres criterios: a) Dos *primers* deben alinearse en cadenas complementarias, b) Deben encontrarse en direcciones opuestas (con los extremos 3' flanqueando la secuencia intermedia); y c) deben alinearse con una distancia determinada (no más de alrededor de 3 kbp). El último criterio tiene como finalidad asegurar que la DNA polimerasa pueda completar la síntesis de acuerdo a sus posibilidades. El producto amplificado, después de una electroforesis en agarosa o gel de acrilamida, y teñido con bromuro de etidio o plata, produce un perfil RAPD característico (Saunders, 1999).

3. PCR inversa

Es un método usado para permitir la PCR cuando sólo una secuencia interna es conocida. Esta es especialmente útil en la identificación de secuencias que flanqueen varios insertos genómicos (insertos virales, por ejemplo). Incluye una serie de digestiones y ligación antes del corte con una endonucleasa, resultando en secuencias conocidas a el inicio o el final de la secuencia desconocida (Rahman, 2013).

4. PCR asimétrica

Permite la amplificación preferencial de una cadena del DNA original, más que de la otra. Encuentra su utilidad en algunos tipos de secuenciación y sondeo de hibridización, donde el tener sólo una de las dos cadenas complementarias es lo ideal. Se lleva a cabo PCR de una manera habitual, pero con un gran exceso de *primers* para la cadena elegida. La amplificación es lenta (asimétrica), debido a la cantidad limitante de *primers* y se requieren más ciclos de PCR posteriores. Una modificación reciente en este proceso, conocido como *Linear-After-The-Exponential-PCR* (LATE-PCR), utiliza el *primer* limitante con T_m más elevado que la del *primer* en exceso para mantener la reacción eficientemente (Rahman, 2013).

5. PCR de colonia

Se pueden escanear clonas bacterianas por los productos correctos de ligación. Las colonias seleccionadas son tomadas de una placa de agarosa y colocadas en la mezcla de reacción (Rahman, 2013).

6. PCR de alelo específico

Es una técnica de diagnóstico o clonación basada en polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Requiere conocimiento previo de la secuencia de DNA, incluyendo diferencias entre alelos, y utiliza *primers* cuyos extremos 3' abarcan el SNP. La amplificación bajo condiciones rigurosas es menos eficiente en la presencia de un desajuste entre el DNA molde y el *primer*, entonces la amplificación exitosa con un *primer* específico para el SNP, indica la presencia de dicha variación alélica en una secuencia (Rahman, 2013).

7. *Dial-out* PCR

Es un método para la recuperación de moléculas de DNA de alta precisión, para la síntesis de genes. Una librería compleja de DNA se modifica con etiquetas específicas antes de una secuenciación paralela masiva. Con *primers* dirigidos a las etiquetas, se pueden recuperar las secuencias deseadas por medio de PCR (Rahman, 2013).

8. Amplificación dependiente de helicasa

Similar a la PCR tradicional, utiliza una temperatura constante en lugar de ciclos. Con ayuda de la helicasa, una enzima que desenrolla en DNA, se logra la desnaturalización sin temperatura (Rahman, 2013).

9. PCR específica de inter-secuencias (ISSR)

Utilizado para caracterización, amplifica regiones entre repeticiones simples para producir una “huella” característica y única de productos de diferente longitud (Rahman, 2013).

13. Aplicaciones de PCR

PCR también ha sido utilizada en áreas prácticas. Es una herramienta de manipulación y producción genética de gran poyo en biotecnología. PCR ha facilitado la inclusión de la tecnología de biología molecular en tantas áreas de investigación que ha logrado impulsar el conocimiento humano. Las necesidades en la aplicación de métodos moleculares iniciaron desarrollos importantes en diagnóstico, estimulando el progreso en diferentes estudios de la ciencia. La introducción de nuevos métodos en otras áreas de la práctica humana ha inducido una rápida expansión en las soluciones moleculares. En éste capítulo revisaremos varias áreas del conocimiento que han sido beneficiadas por PCR, permitiendo avances científicos y prácticos.

1. Medicina

Los avances en las ciencias biológicas han ayudado a comprender la manera en que las redes de interacción de módulos de genes que coordinadamente realizan las funciones celulares integradas, como el mecanismo molecular de la expresión fenotípica del genotipo. La función de la mayoría del genoma aún es desconocida y el conocimiento sobre la relación entre enzimas y moléculas de señalización aún es limitado. Para poder conocer completamente la regulación del metabolismo y para alterarlo exitosamente, se requiere más información acerca de la expresión génica, reconocimiento del DNA por proteínas, factores de transcripción, fármacos y otras moléculas (Deepak, 2007).

El perfil de expresión génica ha sido utilizado ampliamente para entender la relación entre fenotipos ecológicamente influenciados o de enfermedades, así como los patrones de expresión celulares. Las tecnologías de detección basadas en PCR, que utilizan *primers* por especie han aportado información avanzada sobre biología en éstos aspectos (Deepak, 2007).

La PCR también ha conducido al concepto de diagnóstico personalizado, en el cual se podrían obtener mejores probabilidades de elegir el tratamiento correcto para un paciente al

incluirlo en una categoría genéticamente definida según el efecto de ciertos fármacos. Las reacciones adversas debidas a fármacos son una causa significativa de mortalidad y morbilidad. La mayoría de estos casos pueden estar relacionados a alteraciones en la expresión de fenotipos clínicos que están fuertemente afectados por variables ambientales. La aplicación de PCR puede hacer posible el monitoreo de la intervención terapéutica y las respuestas individuales al fármaco (Deepak, 2007).

2. Cáncer

El cáncer es una enfermedad que actualmente centra la atención de muchos investigadores. Ésta ocurre a partir de la acumulación de polimorfismos heredados (SNPs), mutación y/o formación esporádica de polimorfismos somáticos (polimorfismo no germinal) en el ciclo celular, reparación del DNA y genes de señalización del crecimiento. A pesar de los avances en la tecnología de imagenología diagnóstica, manejo quirúrgico, y modalidades terapéuticas, el cáncer aún permanece como la mayor causa de mortalidad alrededor del mundo. La detección temprana de cáncer y su progreso es difícil debido a su complejo origen multifactorial y heterogeneidad. Con el uso de PCR, actualmente el método más sensible para cuantificar DNA específico, es posible detectar incluso una sola molécula, haciendo posible el diagnóstico con menor cantidad de materiales biológicos complejos. Gran parte de los cánceres más comunes han sido detectados al medir la expresión de genes marcadores o por medio del uso de sondas. La sensibilidad de ensayos de un solo marcador no es lo suficientemente alta para aplicaciones clínicas. Al adoptar un panel poligénico para la mayoría de las enfermedades como carcinoma de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorectal, carcinoma endometrial, se ha obtenido un aumento significativo en la precisión del diagnóstico que resulta extremadamente importante para la prognosis en etapas tempranas (Deepak, 2007).

3. Virología

La mayoría de la investigación hecha con RT-PCR ha sido dirigida a virología, para la detección o cuantificación de virus en humanos infectados. Varios estudios han proveído de protocolos para la detección y cuantificación especialmente relacionados a enfermedades humanas. El estudio de las interacciones entre el virus y el hospedero se utiliza para evaluar la eficacia de compuestos antivirales y determinar condiciones crónicas, o multi-infecciones en pacientes inmunodeprimidos. Por ello, la detección de múltiples patógenos es esencial para terapia de pacientes especiales. En estos casos, se han desarrollado protocolos de RT-PCR para la diferenciación de genotipos virales (Deepak, 2007).

4. Bacteriología

Tradicionalmente, la terapia con antibióticos estaba basada en la identificación por la clasificación de la tinción de Gram. La alta variabilidad en la identificación de patógenos basada en la mera observación, ha sido corregida por el uso de métodos convencionales basados en PCR; más tarde acelerados por el uso de RT-PCR. Las sondas fluorescentes de hibridación permitieron una detección más rápida de cantidades bajas de DNA bacteriano y una clasificación correcta de la tinción de Gram. RT-PCR ha mostrado una gran ventaja sobre otras técnicas (inmunoensayo y cultivos) para la detección de bacterias sin importar el tipo de espécimen clínico y, especialmente, aquellos organismos difíciles de cultivar o de lento crecimiento. Una detección más pronta del patógeno puede agilizar la prescripción de antibióticos apropiados (Deepak, 2007).

En cuanto a la detección de infecciones por micobacterias, se solía carecer de especificidad y sensibilidad mientras se utilizaran métodos convencionales. Actualmente existen protocolos de RT-PCR para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. ulcerans*. Además, la detección de cepas resistentes que eran usualmente detectadas por dilución de medio de cultivo, ahora se realiza por RT-PCR con la amplificación de los genes mutantes isoniazid (*katG*), rifampin (*rpoB*) y ethambutol (*embB*) a partir de especímenes de cultivos clínicos (Deepak, 2007).

5. Micología

Las afecciones micológicas humanas son comúnmente causadas por las especies de *Aspergillus* (*A. flavis*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. versicolor*), especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. dubliniensis*), y *Pneumocystis jiroveei*. Los métodos convencionales desarrollados para la detección de estas infecciones son el cultivo, ensayos fenotípicos por histopatología y microscopía bioquímica, PCR convencional, sondas de DNA, cuantificación de UFC, dilución de medio de cultivo y tinción seguida de la observación en el microscopio. Sin embargo, la eficacia de estos métodos es lenta en ciertas ocasiones. El uso de RT-PCR para la detección y medición, ha probado ser más rápida en varias instancias sin importar el espécimen clínico (Deepak, 2007).

6. Parasitología

Las técnicas de biología molecular y particularmente la PCR han sido utilizadas ampliamente para el diagnóstico de protozoarios parasíticos de interés médico. Los protozoarios pueden causar varias enfermedades, algunas endémicas en varias partes del planeta. RT-PCR permite una cuantificación precisa y un uso rutinario para el diagnóstico, facilitando el estudio de poblaciones parasitarias, aunque el uso de éste método para malaria permanece limitado y a un alto precio. Existen protocolos descritos para detectar disentería amebiana, enfermedad de Chagas, leishmaniasis cutánea y visceral, giardiasis, *Cyclospora caytanensis* causante de gastroenteritis prolongada, toxoplasmosis en el fluido amniótico de mujeres embarazadas y en pacientes inmunodeprimidos. Se requiere un mayor trabajo en la secuenciación de genomas, pues los parasitólogos suelen trabajar con organismos con genomas que han sido sólo parcialmente secuenciados y cuyas publicaciones están apenas disponibles (Deepak, 2007).

7. Microbiología y seguridad alimentaria

Las micotoxinas son parte de los contaminantes más comunes en los alimentos y han captado gran preocupación debido a sus efectos nocivos. Un grupo internacional de expertos del Comité de Estandarización Europeo ha establecido ya protocolos para el diagnóstico en sangre de patógenos por PCR. Se han logrado identificar organismos como *Fusarium*, *Salmonella*, las variantes patológicas de *E. coli* (enteropatógena, enterohemorrágica, enterotoxigénica, enteroagregativa), *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Aeromonas spp*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Plesiomonas shigelloides* y *Providencia alcalifacies* (Deepak, 2007).

Las enfermedades virales transmitidas por alimentos son un agente muy importante en la salud humana. Actualmente, alrededor de dos mil millones de personas han tenido evidencia de una infección previa con el virus de Hepatitis B y 350 millones se han convertido en portadores crónicos del virus. Para enfrentar esto, se ha desarrollado una detección por PCR en suero y plasma, un método útil para monitorear la eficacia de la terapia contra el virus Hepatitis B y para escanear a la población humana en zonas endémicas. Otros virus transmisibles por alimentos que son importantes y cuantificables por éste método son *rotavirus* y el virus de la gastroenteritis. Sin embargo, la detección o cuantificación de virus, directamente de varios tipos de muestras de alimentos aún es una tarea difícil (Deepak, 2007).

8. Ciencia forense

Las tecnologías avanzadas de análisis de DNA, que utilizan secuencias de repeticiones cortas en tándem (STRs) han significado una revolución para las investigaciones forenses. Uno de los métodos más comunes es PCR, el cual permite la obtención de información exacta sobre el genotipo de una muestra. RT-PCR se ha convertido en el siguiente paso para las investigaciones forenses. La amplificación y cuantificación de mtDNA humano se realiza por medio del monitoreo de la región hipervariable (HV1) utilizando sondas fluorescentes, y el mismo estudio ha sido extendido para discriminar sexo. Existen ensayos de RT-qPCR para cuantificar DNA nuclear y mitocondrial en muestras forenses que también son eficientes en muestras altamente degradadas. Sin embargo, las muestras forenses suelen estar contaminadas por inhibidores de PCR y los métodos de extracción de DNA fallan en excluir a dichos contaminantes. Por ello se han desarrollado también métodos computacionales que permiten el análisis e identificación de muestras estadísticamente confiables, utilizando comparaciones de eficiencias de amplificación de DNA desconocido con moldes estandarizados (Deepak, 2007).

9. Ecología

PCR es un método convencional para la detección de la movilidad de elementos genéticos (Deepak, 2007), útil en el manejo de especies invasivas (Louda, 2004). Además, para resolver la contaminación del medio ambiente, existe una búsqueda por nuevos métodos para la eliminación de químicos indeseables. El aislamiento de nuevas cepas o la adaptación de cepas existentes, capaces de la descomposición de xenobióticos, probablemente ayudará a mejorar la eficacia de la degradación microbiológica de contaminantes en el futuro cercano. Por medio de PCR, se pueden identificar a éstas cepas, así como manejar el material genético para la producción de cepas transgénicas con el mismo fin (Deepak, 2007).

10. Validación de resultados en microarreglos

RT-PCR ha sido empleada para el estudio de patrones de expresión génica durante diferentes tipos de estrés que lleva a la activación de genes relacionados a transducción de señales, biosíntesis y metabolismo. Más tarde, por medio de software, se pueden identificar cambios sistémicos coordinados en el metabolismo y otros procesos celulares. Los análisis en microarreglos han sido cuestionados en algunas instancias y la confirmación es lograda por PCR y RT-PCR. Los niveles de expresión observados en microarreglos son generalmente más

altos en comparación con los resultados obtenidos en la medición por RT-PCR (Deepak, 2007).

Plantas y animales utilizan pequeñas secuencias de RNA (microRNAs y siRNAs) como guías para post-transcripción y regulación epigenética. Los miRNAs son una parte considerable de la expresión transcripcional de los genomas de animales y plantas. Por ello, los miRNAs tienen un papel fundamental en las funciones regulatorias en diversas actividades biológicas. Actualmente, los miRNA son reconocidos como un nivel adicional en el control post-transcripcional. El repertorio de miRNA en plantas es complejo y apenas conocido. Algunas de las metas fundamentales en las investigaciones sobre la función del genoma es comprender cómo es que el genoma permite la diferenciación celular, así como la manera en que las células interactúan con su medio ambiente. RT-PCR puede aplicarse capaz de clarificar estas situaciones (Deepak, 2007).

14. Desafíos actuales en la aplicación de PCR

Una de las deficiencias prácticas de PCR es el rigor necesario para su aplicación. Aún cuando los *primers* y las condiciones de reacción ya se encuentren estandarizadas, se requiere tiempo y esfuerzo en un laboratorio establecido y controlado para producir resultados confiables, incluyendo el riesgo de contaminación en una cantidad de muestra muy limitada. Éste capítulo se centrará en los nuevos enfoques de PCR que buscan asistir los límites de PCR.

La posibilidad de ejecutar una amplificación de ácidos nucleicos y su análisis de manera rápida y con una muestra de volumen pequeño en un dispositivo integrado, ha atraído bastante interés de los investigadores de nanotecnología y materiales. El concepto de “laboratorio en un chip” (*Lab on a Chip*), referido a micro-análisis total o análisis de micro-fluidos, plantea la posibilidad de diseñar un sistema cerrado capaz de realizar cualquier análisis, el cual podría reducir trabajo y tiempo invertidos por muestra, permitiendo trasladar el laboratorio al área de toma de muestra (ejemplo, en el punto de atención al paciente), para obtener resultados inmediatos (Zhang, 2007). A continuación revisaremos algunas de las corrientes actuales en diseño de nuevas estructuras basadas en PCR.

PCR puede agilizarse al aumentar la velocidad de transferencia de calor o al reducir la masa térmica. Con el advenimiento de los sistemas micro-electro-mecánicos (MEMS), el desarrollo de sistemas miniaturizados de PCR es posible, el cual ofrece varias ventajas como un procesamiento corto, menor consumo de reactivos y velocidades rápidas de calentamiento y enfriamiento, así como un gran potencial de integrar múltiples módulos de procesamiento para reducir tamaño y consumo de energía. Existe una vasta investigación para el desarrollo de los microsistemas para PCR (Zhang, 2007).

La mayoría de las microcámaras o microcanales desarrollados para PCR, son fabricados con silicio, vidrio o polímeros como polidimetilsiloxano (PDMS), policarbonato (PC) y polimetilmetacrilato (PMMA). Cada material ofrece ventajas y desventajas. Por ejemplo, el silicio posee una conductividad térmica superior que permite realizar los ciclos térmicos de

PCR, aunque requiere aislamiento térmico y un diseño de mayor complejidad estructural. Además, su opacidad óptica limita la detección; y su conductividad eléctrica hace difícil combinar PCR con electroforesis capilar (EC). Por otra parte, el vidrio permite la detección óptica y la integración de EC en el dispositivo. El problema de los dispositivos de PCR hechos con silicio o vidrio no pueden ser desechados debido al alto costo de fabricación. Dada la naturaleza extremadamente sensible de la PCR, cantidades diminutas de ácidos nucleicos contaminantes son suficientes para dar falsos positivos. Para eliminar la contaminación cruzada entre muestras y corridas, la solución más sencilla es utilizar dispositivos desechables. El uso de polímeros como sustratos podría superar la situación. PDMS es un polímero económico que posee gran flexibilidad, transparencia óptica, bajo costo de fabricación y mejor biocompatibilidad que el silicio, y podría ser la elección ideal (Zhang, 2007).

En cuanto a la arquitectura de los dispositivos, se han planteado varias opciones. Un formato mantiene la solución de PCR en una cámara estacionaria, mientras que la temperatura en la cámara de reacción varía según los ciclos. El dispositivo puede consistir en una sola cámara o varias cámaras, aunque el último corre riesgo de contaminación y no puede realizar análisis de alto rendimiento, pero permite la generación de curvas estándar, uso de juegos múltiples de *primers* y la optimización de la PCR microfluídica (figura 46, A y B). Uno de los retos principales en la miniaturización de PCR es la integración de componentes funcionales para realizar diversas operaciones sin la necesidad de macro-aparatos externos o la operación manual. A la fecha, ya se han reportado varios dispositivos con capacidades integradas, desde carga de la muestra, lisis celular, hasta PCR (Zhang, 2007).

Un diseño muy prometedor que utiliza gotas de aceite (figura 46 - C), busca solucionar el problema de manejo de la muestra desde otro enfoque. Un volumen pequeño de muestra es localizado en una superficie hidrofóbica para proveer de un confinamiento virtual. El concepto de cámara de reacción virtual (VCR) fue aplicado por primera vez en 2005, donde la muestra de PCR se encontraba recubierta por una gota de aceite mineral. La posibilidad de encapsular varias muestras y efectuar la reacción en éste sistema, podría acercar la posibilidad de un mejor manejo de muestras en serie, en menor tiempo, esfuerzo y espacio (Zhang, 2007). La capacidad de tener una mezcla de reacción tan pequeña y aislada en una gota de aceite mineral puede aplicarse en el análisis de células individuales, lo que permite la investigación sobre las variaciones genéticas en poblaciones celulares (Shi, 2011).

Los tejidos vivos están compuestos por diversas poblaciones celulares que definen el microambiente local. El combinar las múltiples poblaciones celulares en un solo proceso de medición, oculta una gran cantidad de información. Para lograr un enfoque más completo, la variabilidad genética en una muestra de tejido debe correlacionar con el tipo de célula de la cual es originada por ejemplo, estroma vs epitelio, la localización física en la sección de tejido y las características histopatológicas como el tipo de lesión de una enfermedad en específico. Las técnicas como PCR *in situ* y la microdissección por captura de láser (LCM), se dedican a ésta necesidad. La mayoría de los estudios biológicos que extraen, purifican y am-

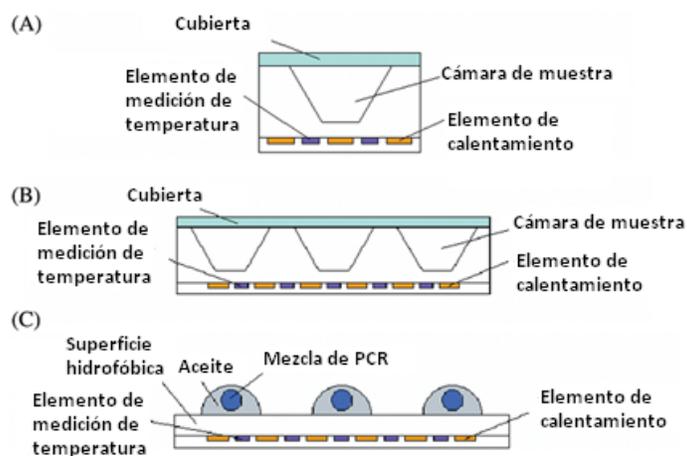


Figura 46. Arquitecturas de dispositivos de PCR estacionarios (Zhang, 2007).

plifican genes o sus productos de tejido homogeneizado para detectarlos, utilizan métodos como PCR, RT-PCR, qPCR, PCR de retrotranscripción, y microarreglos. Éstas técnicas son capaces de una gran sensibilidad y alto rendimiento, mientras que son altamente confiables y consistentes en varios laboratorios, aunque no preservan la correlación histológica de dos dimensiones (2D) entre las localizaciones de diferentes tipos celulares y su información molecular (Armani, 2009).

La miniaturización puede permitir el acoplamiento de la microdissección con PCR. Armani, en 2009, presenta por primera vez un dispositivo diseñado para realizar PCR en un tejido (figura 48), preservando su configuración en dos dimensiones, lo que abre las puertas al mapeo genético en tejidos (figura 47) (Armani, 2009).

La agilización de la PCR es una de las mayores motivaciones del diseño de dispositivos miniaturizados. Los dispositivos basados en cámaras estacionarias carecen de la flexibilidad para cambiar la velocidad de la PCR. El formato dinámico de PCR en flujo continuo (figura 49) es una alternativa que utiliza el concepto de conversión tiempo-espacio. La amplificación ocurre conforme la muestra es continuamente bombeada a través de un canal microfluídico durante cada ciclo de temperatura. El formato admite la integración en flujo de varios procesos en el dispositivo, mientras que los tiempos de transición de temperatura depende sólo de la velocidad de flujo de la muestra y el tiempo necesitado para que la muestra alcance el equilibrio térmico. Además, la inercia térmica del sistema de PCR se reduce al mínimo porque sólo la masa térmica de la muestra debe ser considerada.

La adquisición de altas velocidades depende de la reducción de la masa térmica del sistema

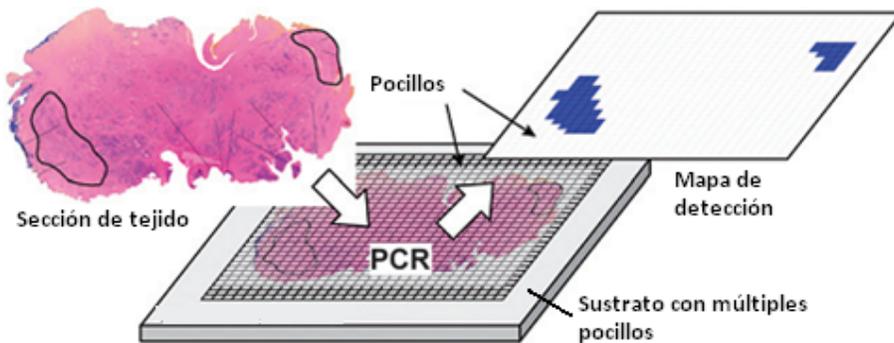


Figura 47. Transferencia de tejido sobre un arreglo con múltiples pocillos que permite aislar subregiones del tejido. El DNA es luego extraído y amplificado por PCR. El mapa de detección se realiza por medio de tinciones intercalante (Armani, 2009).

de PCR completo. Se requiere elegir un mejor sistema de calentamiento y encontrar un formato adecuado, pero a la fecha, la desventaja más grande de los microsistemas de PCR aún permanece en el diseño mismo. La generación de burbujas de aire causa una gran diferencia de temperatura en la muestra y expelen la muestra de la cámara de PCR (Zhang, 2007).

Wheeler, en 2011, planteó la posibilidad de optimizar PCR sin la necesidad de la miniaturización. Con una muestra de 5 μL , realizaron calentamientos y enfriamientos casi instantáneos por medio de transferencia de calor por convección de un fluido térmico a través de un medio poroso combinado con un calentador eléctrico integrado. Éste método de transferencia de calor permitió 30 ciclos de PCR en menos de tres minutos. Múltiples enzimas han mostrado funcionar correctamente en su sistema (Wheeler, 2011).

Los sistemas miniaturizados experimentales prometen un paso adelantado a los protocolos presentes en laboratorios y hospitales para cualquier análisis. PCR es un método con una sorprendente flexibilidad que da pie a una gran variedad de aplicaciones. Junto con el concepto de laboratorio en un chip, PCR podría impulsar enormemente el trabajo de laboratorio en investigación y salud.

PCR ha facilitado el desarrollo de una variedad de sistemas de detección de ácidos nucleicos. Un número de métodos de amplificación de DNA, diferentes a PCR, han sido desarrollados para complementar o como alternativas a PCR, incluyendo replicación auto-sustentada (3SR) o amplificación basada en la secuencia de los ácidos nucleicos (NASBA), Q-beta replicasa (QB), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Wiedmann, 1994), y la amplificación mediada por transcripción (TMA) (Hofmann, 2005).

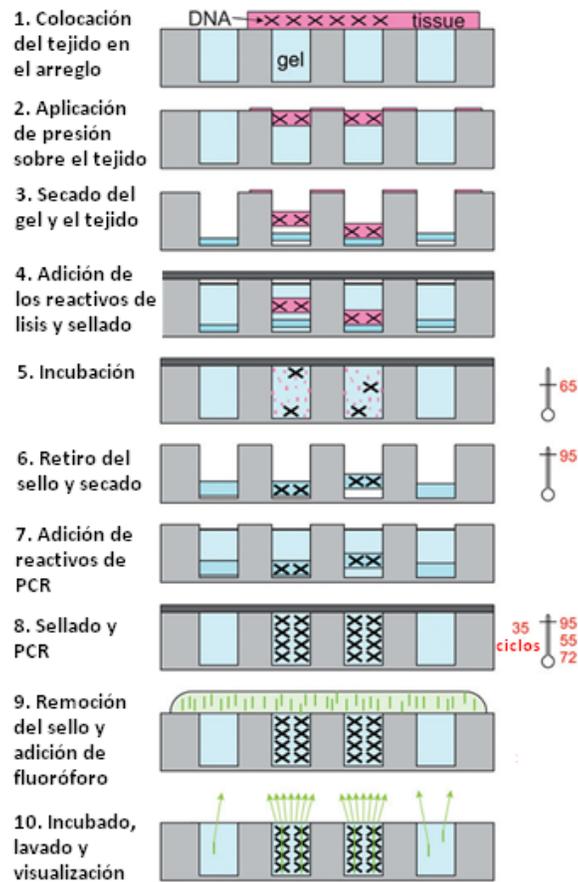


Figura 48. Protocolo experimental del concepto de 2D-PCR (Armani, 2009).

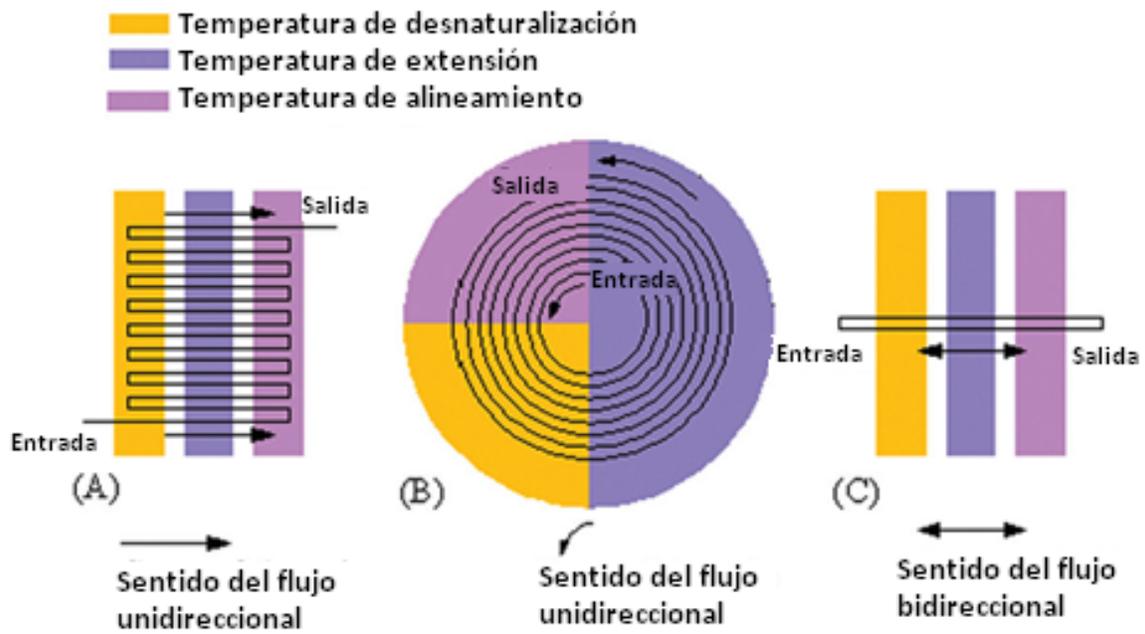


Figura 49. Arquitectura de PCR de flujo continuo (Zhang, 2007).

NASBA lleva a cabo su reacción de amplificación completa a una temperatura predefinida de 41 °C. Utiliza tres enzimas (RT, RNasa H y T7 RNA polimerasa dependiente de DNA-DdRp) en una reacción isotérmica homogénea, y es más adecuada para análisis de RNA (Deiman, 2002). LCR emplea una ligasa termoestable y permite la discriminación de secuencias de DNA que difieran en una sola base. El poder de LCR es su compatibilidad con otros métodos de amplificación basados en replicación (Wiedmann, 1994). TMA es otra técnica que también utiliza varias enzimas para la retrotranscripción de RNA, y su función principal ayuda en el estudio de RNA (Hofmann, 2005).

A pesar de la alta fidelidad que estos métodos pueden ofrecer, así como la característica isotérmica (NASBA); PCR aún posee el potencial suficiente para el diseño de nuevos protocolos, y seguirá siendo utilizada bajo nuevos conceptos que logren facilitar su acceso.

15. Anexos

Recursos en línea:

- Bases de datos de primers y sondas para RT-PCR.
 - PrimerBank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>).
 - RTPrimerDB (<http://medgen.ugent.be/rtpprimerdb>).
 - Real-Time PCR primer set (<http://www.realtimeprimers.org/>).
 - QPPD (<http://web.ncifcrf.gov/rtp/gel/primerdb/default.asp>).
 - Primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)
- Herramientas de diseño de *primers* y sondas
 - Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>).
 - Primer Express (<http://www.appliedbiosystems.com/>). Programa de computadora comercial.
 - Premier Biosoft International (<http://www.premierbiosoft.com/>). Sitio de internet comercial para diseño de primers de RT-PCR y sondas.
- Otros sitios de interés
 - Protocol Online (<http://www.protocol-online.org/>). Sitio web con una gran colección de protocolos. (Dorak, 2007).

16. Referencias bibliográficas

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*. **215**(3):403–410.
- Armani, M., Rodriguez-Canales, J., Gillespie, J., Tangrea, M., Erickson, H., Emmert-Buck, M. R., Shapiro, B., y Smela, E. (2009). 2D-PCR: a method of mapping DNA in tissue sections. *Lab on a chip*. **9**(24):3526–3534.
- Bartlett, J. M. S. y Stirling, D. (2003). “PCR Protocols”. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, USA. Capítulos 1, 3, 16 y 12.
- Cline, J., Braman, J. C., y Hogrefe, H. H. (1996). PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*. **24**(18):3546–3551.
- Deepak, S., Kottapalli, K., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, K., Iwahashi, H., Masuo, Y., y Agrawal, G. (2007). Real-time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Current genomics*. **8**(4):234.
- Deiman, B., van Aarle, P., y Sillekens, P. (2002). Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Molecular biotechnology*. **20**(2):163–179.
- Dorak, M. T. (2007). “Real-time PCR”. *Advanced Methods*. Taylor y Francis, New York, USA. Capítulos 1 y 8.
- Eom, S. H., Wang, J., y Steitz, T. A. (1996). Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. *Nature*. **382**:278–281.
- Hofmann, W. P., Dries, V., Herrmann, E., Gärtner, B., Zeuzem, S., y Sarrazin, C. (2005). Comparison of transcription mediated amplification (TMA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for detection of hepatitis C virus RNA in liver tissue. *Journal of clinical virology*. **32**(4):289–293.
- Karp, G. (2010). “Cell Biology”. John Wiley y Sons Incorporated, New York, USA. Capítulo 13.

- Karuppiyah, V., Aarthi, C., y Sivakumar, K. (2011). Enhancement of PCR amplification of actinobacterial 16S rRNA gene using an adjuvant, dimethyl sulphoxide. *Current Science*. **101**:22–23.
- Kitade, Y., Ootsuka, S., Iitsuka, O., y Saga, N. (2003). Effect of DMSO on PCR of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) gene. *Journal of applied phycology*. **15**(6):555–557.
- Klenow, H. y Henningsen, I. (1970). Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **65**(1):168–175.
- Louda, S. M. y Stiling, P. (2004). The Double-Edged Sword of Biological Control in Conservation and Restoration. *Conservation Biology*. **18**(1):50–53.
- Lyamichev, V., Brow, M. A. D., Varvel, V. E., y Dahlberg, J. E. (1999). Comparison of the 5' nuclease activities of Taq DNA polymerase and its isolated nuclease domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **96**(11):6143–6148.
- McPherson, J., Taylor, G., y Quirke, P. (1991). "PCR: A Practical Approach". Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK. Capítulos 1, 8 y 14.
- McPherson, M. y Møller, S. (2007). "PCR". THE BASICS (Garland Science). Taylor y Francis, UK. Capítulo 1.
- Mercier, B., Gaucher, C., Feugeas, O., y Mazurier, C. (1990). Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. *Nucleic acids research*. **18**(19):5908.
- Misener, S. y Krawetz, S. (1999). "Bioinformatics Methods and Protocols". Biomed Protocols. Humana Press, New York, USA. Capítulo 23.
- Murphy, K. M., Berg, K. D., y Eshleman, J. R. (2005). Sequencing of genomic DNA by combined amplification and cycle sequencing reaction. *Clinical chemistry*. **51**(1):35–39.
- Murray, V. (1989). Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*. **17**(21):8889.
- Nelson, D. L. y Cox, M. M. (2008). "Lehninger Principles of Biochemistry". W H Freeman y Company, New York, USA. Capítulo 25.
- Passarge, E. (2009). "Genetica texto y atlas". Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. Capítulo 2.
- Rabinow, P. (1996). "Making PCR: A Story of Biotechnology". University of Chicago Press, Chicago, USA. Capítulo 1.

- Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A., y Setu, M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*. **4**(1):30–36.
- Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., y Rasmussen, O. F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International journal of food microbiology*. **17**(1):37–45.
- Rychlik, W., Spencer, W., y Rhoads, R. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research*. **18**(21):6409–6412.
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **74**(12):5463–5467.
- Saunders, G. y Parkes, H. (1999). “Analytical Molecular Biology: Quality and Validation”. Valid Analytical Measurement Series. Royal Society of Chemistry, London, USA. Capítulos 6, 7 y 8.
- Shi, X., Lin, L., Chen, S., Chao, S., Zhang, W., y Meldrum, D. R. (2011). Real-time PCR of single bacterial cells on an array of adhering droplets. *Lab on a Chip*. **11**(13):2276–2281.
- Shi, Y., Liu, Y., Lai, P., Tseng, M., Tseng, M., Li, Y., y Chu, Y. (2012). Ionic liquids promote PCR amplification of DNA. *Chemical Communications*. **48**(43):5325–5327.
- Steitz, T. A. (1999). DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. **274**(25):17395–17398.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., y Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of biotechnology*. **75**(2):291–295.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., y Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*. **40**(15):e115–e115.
- Wheeler, E., Hara, C., Frank, J., Deotte, J., Hall, S., Benett, W., Spadaccini, C., y Beer, N. (2011). Under-three minute PCR: probing the limits of fast amplification. *Analyst*. **136**(18):3707–3712.
- Wiedmann, M., Wilson, W., Czajka, J., Luo, J., Barany, F., y Batt, C. (1994). Ligase chain reaction (LCR)—overview and applications. *PCR Methods Appl*. **3**(4):S51–64.
- Wilfinger, W., Mackey, K., y Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*. **22**(3):474–481.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., y Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*. **13**(1):134.

Zhang, C. y Xing, D. (2007). Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends. *Nucleic Acids Research*. **35**(13):4223–4237.

17. Referencias electrónicas

- Abbot Molecular* (2013). Max Ratio. <https://www.abbottmolecular.com/us/technologies/real-time-pcr/maxratio-data-analysis.html>. Consultado: 11-06-2013.
- Brown, T. (2013). Sequencing, forensic analysis and genetic analysis. *atdbio*. <http://www.atdbio.com/content/20/Sequencing-forensic-analysis-and-genetic-analysis>. Consultado: 11-06-2013.
- Davidson College* (2002). Nested PCR. *Davidson College. Genomics*. <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/nestedpcr.html>. Consultado: 05-09-2013.
- Evans, T. C. (2008). Anatomy of a Polymerase – How Structure Effects Function. *New England BioLabs*. <https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/anatomy-of-a-polymerase-how-structure-effects-function>. Consultado: 22-04-2013.
- Goodsell, D. (2000). DNA Polymerase: Molecule of the Month. *Protein Data Bank*. <http://www.rcsb.org/>. Consultado: 19-04-2013.
- Integrated DNA Technologies* (2013). OligoAnalyzer 3.1. <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>. Consultado: 17-06-2013.
- Judelson, H. (2006). Guidelines for Designing Primers. *Department of Plant Pathology, University of California–Riverside. The Judelson Lab*. <http://oomyceteworld.net/protocols/primer%20designing2.pdf>. Consultado: 03-10-2013.
- LSCE Labs* (2013). Primer design for PCR amplification and Sequencing Reaction. *Life Sciences Core Education (LSCE Labs), University of California* <http://lslab.lscore.ucla.edu/MTDNA/primer.htm>. Consultado: 10-06-2013.
- Lyons, R. (2013). Direct Sequencing of PCR Products. *DNA Sequencing Core. University of Michigan*. <http://seqcore.brcf.med.umich.edu/doc/dnaseq/pcr.html>. Consultado: 31-08-2013.

- Manthey, J. (2005). mFold, Delta G, and Melting Temperature, What Does it Mean? *Integrated DNA Technologies. Bioinformatics Group*. http://cdn.idtdna.com/Support/Technical/TechnicalBulletinPDF/mFold_Delta_G_and_melting_temperature_explained.pdf. Consultado: 12-06-2013.
- Murray, E. (2009). DNA isolation methods. *Biotechnology Pages. Marshall University*. <http://science.marshall.edu/murraye/links%20for%20students/samantha%20qiagin%20method.pdf>. Consultado: 05-06-2013.
- Thor, S. (2007). Taq DNA polymerase, The DNA directed DNA polymerase that has changed biotechnology. *University of Georgia*. <http://sthor.myweb.uga.edu/bcmb8010/report.pdf>. Consultado: 20-04-2013.