



## PCR (Polymerase Chain Replication)

En los laboratorios de química y bioquímica se acostumbra a trabajar con concentraciones de moléculas que se miden en moles, décimas de moles o centésimas, etc. para que las reacciones sean significativas.

1 mol contiene  $6,02 \times 10^{23}$  moléculas = 602.000.000.000.000.000.000 (602 mil trillones de moléculas iguales)

0,1 moles = 60 mil doscientos trillones de moléculas iguales

0,01 mol = 6,02 seis mil veinte trillones de moléculas iguales

0,001 mol = 1 milimol (mmol) = 602 trillones de moléculas iguales

0,000001 mol = 1 micromol ( $\mu\text{mol}$ ) = 0,602 trillones de moléculas iguales

0,000000001 mol = 1 nanomol (nmol) = 602 billones de moléculas iguales

Para hacerte una idea de lo que te estoy hablando una gotita de agua pulverizada con un spray contiene aproximadamente 334.000.000.000.000.000 moléculas de agua. 334.000 billones de moléculas de agua.

Sin embargo **el ADN celular es UNA sola molécula**. Con una sola molécula, cualquier reacción química que le afecte, o que ella realice, pasa totalmente desapercibida; ni se detecta, ni se puede cuantificar, ni nada de nada, a efectos químicos (salvo que el “laboratorio” sea muy pequeño, como ocurre en su medio natural que es el núcleo de la célula).

Para conocer cómo trabaja el ADN, necesitamos hacer pruebas con él en los laboratorios, y no podemos hacerlo, de modo significativo, si no obtenemos muchas moléculas del mismo ADN. Ahí es donde interviene la PCR; una técnica que nos va a permitir obtener múltiples copias de ADN. Y aún así, aunque copiemos el ADN cientos de millones de veces, trabajaremos con cantidades del orden de los micro o milimoles.

No es extraño que la biotecnología se desarrollara con rapidez con esta técnica y que no existan ensayos con el ADN que no tengan que recurrir a esta técnica en alguno de sus pasos. Es una técnica básica y, a su descubridor, se le concedió el premio Nobel casi inmediatamente.

Se trata de una técnica biotecnológica de ingeniería genética que permite obtener cientos de millones de copias exactas de un fragmento de ADN determinado.

Consiste en realizar ciclos continuados de replicación del ADN (**ver figura a continuación**) en las condiciones y con los ingredientes adecuados para que el proceso de copia se lleve a cabo.

Además de la cadena de ADN a replicar, es necesario la presencia de **muchísimos nucleótidos libres (suelos) de los 4 tipos que componen el ADN**, un **enzima** que los coloque en el orden correcto, unas **condiciones ambientales específicas**, sobre todo de control de temperatura y unos oligonucleótidos concretos (**cebadores**) que inicien el proceso de copiado.

El proceso es el siguiente:

1.- Introducir en un pocillo los elementos necesarios citados y aumentar la temperatura para que los enlaces de puentes de hidrógeno que mantienen unidas las dos cadenas del ADN se separen. **Separamos las 2 hebras del ADN**. Fase de **desnaturalización** o fase D

2.- Bajar la temperatura un cierto tramo, lo suficiente para que las 2 cadenas sigan independientes, y para que los oligonucleótidos iniciadores (cebadores) (al ser cortos, son más rápidos a hibridarse) **se hibriden por complementariedad** a las dos hebras de ADN en los extremos de cada una de las hebras. Fase de **Templado** o Fase T

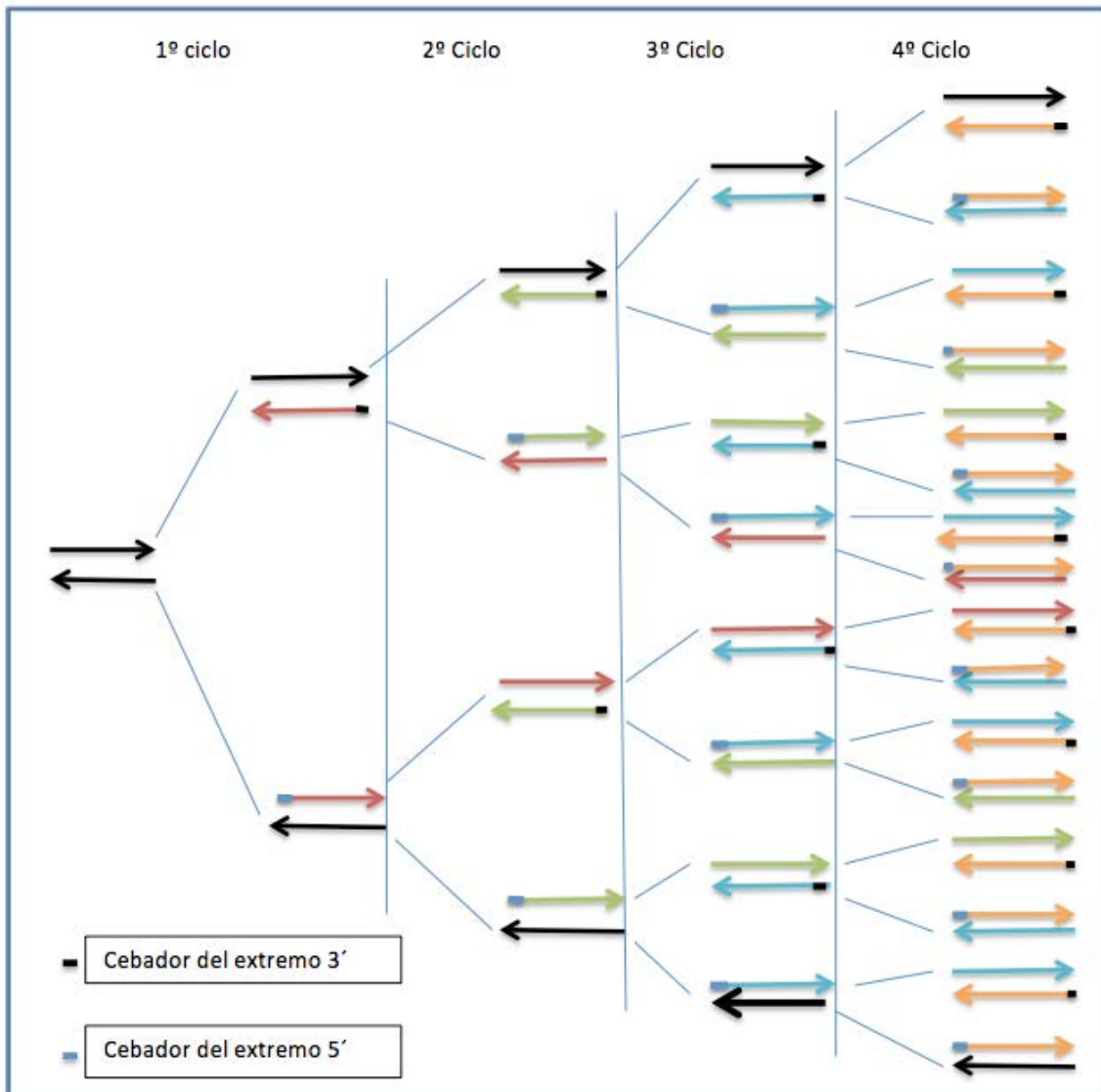
3.- Se sube un poco la temperatura hasta alcanzar la temperatura óptima de trabajo de la Taq-polimerasa. En ese punto, **la enzima colocadora** (Taq-polimerasa: ver nota a continuación) continúa la colocación de nucleótidos a continuación de los oligonucleótidos iniciadores en dirección 5'-3' en cada una de las cadenas y hasta el final de las mismas. Donde teníamos un fragmento de ADN, ahora tenemos 2 iguales. Se ha completado el primer ciclo. Fase de **elongación** o Fase E

*Nota: la Taq-polimerasa es un enzima del tipo ADN-polimerasas, extraído de la bacteria "Termophilus aquaticus" cuyo medio natural son las fuentes termales. Es, por tanto, un organismo extremófilo (habita en ambientes extremos) y sus enzimas están adaptados a funcionar en esas condiciones. El resto de ADN-polimerasas pertenecientes al resto de organismos, se desnaturalizarían a esas temperaturas tan altas y dejarían de funcionar.*

Repetimos los puntos 1, 2, 3 a continuación y completaríamos el 2º ciclo: ahora tendremos 4 fragmentos de ADN entre sí y con la misma secuencia del ADN original.

Repetimos " n " veces los puntos 1 (D), 2 (T), 3 (E)) de cada ciclo ( y mientras queden en el tubo de ensayo moléculas de los oligonucleótidos iniciadores y moléculas de los 4 tipos de nucleótidos suficientes, el número de copias de ADN iguales al original será de  $2^n$ ).

Este proceso, hoy en día, está automatizado. Lo realizan unas máquinas –termorrecladoras-programables (en función de ciertas condiciones establecidas por el investigador) que acaban produciendo la cantidad de copias de ADN deseada.



Y así, sucesivamente, hasta centenares o miles de ciclos hasta obtener un número significativo de copias del mismo ADN.

Existen diferentes modalidades de PCR cuyo fundamento funcional es el mismo y que sirven para diferentes propósitos de investigación: PCR larga, PCR anidada, PCR inversa, PCR con adaptadores, PCR asimétrica, RT-PCR (*PCR con transcriptasa inversa*, para obtención de ADNc). Todas estas modalidades introducen variantes, pero basadas en el mismo mecanismo.

Como anécdota del método PCR indicaré otra variante de extraordinaria importancia para la **biología sintética** que consiste en provocar- a propósito- que las copias de la secuencia de ADN contengan errores (*error prone PCR= RCP*). Esto se consigue, o bien cambiando las condiciones específicas de la mezcla que impiden un correcto funcionamiento de la polimerasa o introduciendo una polimerasa deficiente en su trabajo. Esos errores, normalmente azarosos, provocan variabilidad en las copias de las secuencias del ADN que posteriormente, si son traducidas a proteínas, proporcionan una variabilidad en las mismas, para encontrar, entre ellas, alguna que tenga funcionalidad distinta (mejorando la funcionalidad de la proteína

natural, siendo más estable que ella, adquiriendo nuevas funcionalidades,...). Así se enriquece de posibilidades de la vida posibilitando, de un modo rápido, la aparición de nueva variabilidad para conseguir un mejor control y desarrollo de procesos vitales o introducir nuevas variantes en los mismos. (Véase artículo sobre Biología sintética).

**TABLA 1.** Reacción en cadena de la polimerasa. Cebadores empleados para la amplificación de los genes de virulencia. / *Polymerase Chain Reaction. Primers used for the amplification of the virulence genes*

Gen	Cebadores	Secuencia oligonucleotídica (5'-3')	Tamaño fragmento (bp)	TA <sup>a</sup>	Referencia
LT-I	LT-Ia LT-Ib	GGCGACAGATTATACCGTGC CCGAATTCTGTTATATATGTC	708	55°C	(16)
LT-II	LT-II-1 LT-II-2	AGATATAATGATGGATAGTATC TAACCCTCGAAATAAATCTC	300	52°C	(19)
STa	STA-1 STA-2	ATTTTATTTCGTATTGTCTTT GGATTACAACACAGTTCACAGCAGT	176	48°C	(19)
STb	STb-1 STb-2	ATCGCATTTCTTCTTGTCATC GGGCGCCAAA GCATGCTCC	175	55°C	(16)
VT1	VT1-A VT1-B	CGCTGAATGTCATTCGCTCTGC CGTGGTATAGCTACTGTCACC	302	55°C	(20)
VT2	VT2-A VT2-B	CTTCGGTATCCTATTCCTGG CTGCTGTGACAGTGACAAAACGC	516	55°C	(20)
VT2e =VT2v	VT2e-A VT2e-B	CCTTAACTAAAAGGAATATA CTGGTGGTGTATGATTAATA	230	55°C	(20)
K88	AM005 AM006	GGTGATTCAATGGTTCGGTC ATTGCTACGTTACGCGGAGCCG	772	60°C	(14)
P987	P987-A P987-B	GCGCCCGCTGAAAACAACACCAGC GTACCGGCCGTAACCTCCACCG	467	60°C	(21)
K99	K99-A K99-B	CCAGCGCCCGGCAGTAATGACTGC CCACCATTAGACGGAGCGCGG	278	60°C	(21)
F41	F41-A F41-B	GGCTATGGAAGACTGGAGAGGG GGGGTGACTGAGGTCATCCC	551	60°C	(21)
F18 =F107	FedA1 FedA2	GTGAAAAGACTAGTGTTATTTC CTTGTAAGTAACCGCGTAAGC	510	55°C	(21)
<i>ea e<sup>p</sup></i>	EAE-1 EAE-2	GGAACGGCAGAGGTTAATCTGCAG GGCGCTCATCATAGTCTTTC	775	55°C	(20)

<sup>a</sup> Temperatura alineamiento. <sup>b</sup> Oligonucleótidos universales con homología de la región conservada 5' del gen *ea*e (detecta todas las variedades conocidas del gen *ea*e).