

3.2 De unas pocas copias a cientos de miles

Bienvenidos a una nueva entrega de este apasionante tema. Recuerda que en el último video vimos cómo extraer el ADN a partir de células. Una de las aplicaciones más habituales de ese ADN es el diagnóstico, mediante una técnica que se llama, Reacción en Cadena de la Polimerasa, Polymerase Chain Reaction o PCR.

Esta es una técnica muy sensible. Con ella seríamos capaces de detectar la proverbial “aguja en un pajar”, y, parafraseando a algunos científicos “hacer un pajar con una aguja”. Esto es porque unas pocas moléculas de ADN, como verás, se van a multiplicar millones de veces. Es una técnica versátil, que se presta a muchas aplicaciones diferentes; y rápida, obteniendo resultados en unas pocas horas.

No todo son ventajas. El principal inconveniente probablemente es la posibilidad de contaminación con otros ADNs, dando resultados falsos positivos.

Vamos a hacer una PCR en nuestro laboratorio virtual para amplificar nuestro ADN. Primero prepararemos los reactivos. A ver qué necesitamos. Ah, sí, necesitamos unas secuencias de 18-25 nucleótidos de longitud denominados *primers*, cebadores u oligonucleótidos. Estas secuencias son específicas para el ADN que queremos amplificar. Necesitamos dos: uno sentido y otro antisentido, y cada uno hibrida con una de las hebras del ADN molde en regiones separadas entre 200 y 1500 nucleótidos.

¿Qué más necesitamos? Ah, necesitamos dNTPs, es decir, los deoxi-ribonucleótidos ATP, CTP, GTP y TTP, que constituyen el ADN.

También, ah, sí, necesitamos una enzima ADN polimerasa que se llama Taq, procedente de una bacteria muy termorresistente denominada *Thermus aquaticus*. La Taq forma una cadena complementaria al ADN.

Finalmente, necesitamos un tampón con la concentración adecuada de magnesio; y que no se nos olvide incluir controles positivos y negativos.

Juntamos las cantidades precisas en unos tubos Eppendorf pequeños o en placas multipocillos, dependiendo del número de muestras. Utilizaremos un aparato llamado termociclador, al que podemos programar para que vaya cambiando las temperaturas siguiendo series de tres fases, que se repiten unas 25 a 30 veces o ciclos.

La primera fase se llama desnaturalización y consiste en someter la muestra de ADN a 94° o 95°C para que se separen las dos cadenas o hebras.

Una vez separadas se pasa a la siguiente fase, llamada de hibridación, que se produce a una temperatura entre 50 y 65°C, dependiendo de la secuencia de los primers. En esta fase los primers van a reconocer a la secuencia específica en el ADN, si es que existe, y van a hibridar con ellas. Recuerda que hay uno para la hebra positiva y otro, el antisentido, para la negativa.

En la última fase, de extensión a 72°C, la Taq polimerasa va a añadir los dNTPs a continuación de donde hayan hibridado los primers, extendiendo la hebra de ADN hasta el final. Así se vuelve a formar una doble cadena de ADN. Tras esto, se volvería a empezar a 94°C o 95°C para desnaturalizar el producto amplificado, que como te habrás dado cuenta, se ha duplicado. La mayoría de las enzimas se desnaturalizarían a esta temperatura, pero como la Taq se obtiene de una bacteria termorresistente, no se estropea con la temperatura y no hay que añadirla en cada ciclo.

En cada ciclo el número de moléculas de ADN se duplica, por lo que en teoría, tras 20 ciclos se obtendrían más de un millón de copias del fragmento original delimitado por los primers. ¿Entiendes ahora por qué los científicos dicen que se puede hacer un pajar a partir de una aguja? Impresionante. Ahora sólo nos queda visualizar la amplificación, generalmente separando el resultado mediante electroforesis en un gel de agarosa, u otras técnicas.

En el siguiente video veremos diferentes versiones de la PCR y cómo cuantificar la cantidad de ácido nucleico presente. Muchas gracias por tu atención.