

3.3 Variations on a theme of PCR

3.3 Variaciones sobre el tema de PCR

¡Hola! En el último video vimos cómo se realiza la PCR, una técnica muy útil para amplificar los fragmentos de ADN deseados. Tras ser inventada, se han desarrollado variantes de la técnica que multiplican sus aplicaciones. Eso es lo que vamos a ver en este video.

RT-PCR

Recordarás que la PCR es una técnica para amplificar ADN. Pero hay muchos virus que tienen genoma de ARN. ¿Quiere esto decir que la técnica no vale para ellos? Sí, sí que vale, si se introduce un pequeño paso. Tras aislar y purificar el ARN, se emplea transcriptasa inversa o RT para sintetizar una molécula de ADN complementario que sirve de ADN de partida para la PCR convencional. En la actualidad se dispone de una enzima polimerasa recombinante derivada de *Thermus thermophilus*, que tiene doble función: sintetiza ADN a partir de ARN, actuando como RT, y sintetiza ADN a partir de ADN como en la PCR convencional. Es termorresistente, por lo que todas las reacciones pueden realizarse a temperatura elevada, evitando los problemas de las temperaturas inferiores a 42°C. Esta técnica se llama RT-PCR.

PCR-anidada

Aunque la PCR es muy sensible, en ocasiones hay muy poco ADN específico (el que queremos detectar) en la muestra a analizar, y hay que hacer una segunda amplificación empleando el primer producto de amplificación como molde. Esta técnica se llama **PCR anidada** y emplea dos parejas de primers, una externa y otra interna a la primera. Una característica de esta técnica es que tras la primera amplificación (20 ciclos), el producto se diluye, pudiendo eliminar así inhibidores presentes en la muestra original. Por otra parte, tiene el inconveniente de que, al necesitar mayor manipulación, hay mayor riesgo de contaminación con ADN extraño.

PCR Multiplex

Otra variante de la PCR se llama Multiplex. Consiste en emplear diversas parejas de primers, cada una de ellas específica para un virus distinto. Así se pueden detectar en la misma reacción varios patógenos diferentes, por ejemplo, distintos virus respiratorios.

qPCR o real time (rt)PCR

Una última técnica que vamos a ver es la PCR cuantitativa o a tiempo real. Se abrevia como qPCR o rtPCR, pero no te confundas con la RT-PCR que ya hemos visto. A diferencia de las PCR convencionales, monitoriza la amplificación de la molécula de ADN problema durante cada ciclo de amplificación y no al final. Esto se consigue mediante reactivos fluorescentes, llamados fluorocromos, que hay de dos tipos. Ah, y también porque hay termocicladores que tienen un sensor para medir la fluorescencia durante unos breves segundos en un momento concreto de cada ciclo.

El primer tipo de fluorocromo se intercala entre el ADN de doble cadena. El más utilizado es uno llamado SYBR Green. El problema es que puede intercalarse también entre estructuras inespecíficas formadas por los primers, interfiriendo con la medición. Tiene la ventaja de que el mismo reactivo, el fluorocromo, se puede emplear con todas las parejas de primers (y así abarata costes), pero sólo se puede detectar una secuencia diana por tubo.

El segundo tipo de fluorocromo está incorporado en el extremo de una secuencia corta de ADN u oligonucleótido que hibrida específicamente con la secuencia a amplificar, a la que denominaremos “sonda”. En el otro extremo, la sonda tiene una molécula llamada “quencher”, que es un inhibidor de la fluorescencia. Cuando la sonda está libre o suelta no emite fluorescencia, pero cuando hibrida con el ADN diana, al progresar la Taq polimerasa corta la sonda (porque Taq tiene actividad exonucleasa), separa el quencher del fluorocromo, y este último emite fluorescencia al ser incidido por un rayo láser. A medida que la PCR va amplificando el número de moléculas de ADN, incrementan los moldes para que se unan las sondas. Este sistema es más específico que el otro, puesto que la sonda es específica y además, se pueden marcar sondas con distintos colores, lo que permite detectar varias dianas en el mismo tubo y convertirlo en multiplex.

Se suelen incluir diferentes diluciones de un control positivo, para poder determinar por comparación con ellas la concentración de ADN en las muestras problema. Los valores registrados se suelen representar en un gráfico logarítmico como fluorescencia en cada ciclo. El número del ciclo en el que la fluorescencia supera al umbral se llama ciclo umbral o Ct. A mayor Ct significa que la muestra tarda más en alcanzar ese umbral y por lo tanto, tiene menos concentración de ADN inicial.

En este video hemos visto las variantes más empleadas de la PCR: la RT-PCR, la anidada, la multiplex y la PCR cuantitativa. La PCR y todas las variantes se emplean muchísimo. Asegúrate de que lo has entendido todo bien antes de continuar. ¡Nos vemos en el siguiente video! Gracias por tu atención.