

Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real

Tamay de Dios L,* Ibarra C,** Velasquillo C*

- * Laboratorio de Biotecnología, Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados. Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), México, D.F.
 ** Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa. INR.

Dirección para correspondencia:
 M. en C. Lenin Tamay de Dios.
 Avenida México-Xochimilco Núm.
 289 Col. Arenal de Guadalupe,
 14389, Tlalpan, México DF.
 E-mail: biotamay@yahoo.com.mx

Este artículo puede ser consultado
 en versión completa en:
<http://www.medigraphic.com/rid>

Palabras clave: PCR, Taq ADN
 Polimerasa, PCR en tiempo
 real, SYBR Green, Taqman.

Key words: PCR, Taq DNA
 Polymerase, Real Time PCR,
 SYBR Green, Taqman.

Resumen

A tres décadas de su aparición, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una de las herramientas tecnológicas más innovadoras para el estudio de los ácidos nucleicos. Se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, que genera resultados confiables en poco tiempo y fáciles de analizar. Por ello, se ha convertido en el método de elección de muchos investigadores para los estudios genéticos y de biología molecular. En esta revisión nuestro objetivo es introducir al lector a los fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa, así como a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; dos técnicas que parten de un principio similar, pero que son metodológicamente diferentes; la primera genera resultados cualitativos mientras la segunda cuantitativos.

Abstract

After three decades of discovering utility of polymerase chain reaction, its methodology has become one of the most employed tools for the study of nucleic acids. This is a top sensitive, highly reproducible, very efficient and short time consuming technology that allows to obtain reliable and easy to evaluate results. Objectives of this paper deal with fundamentals of both techniques standard polymerase chain reaction as well as the polymerase chain reaction on real time. Results produced by standard polymerase chain reaction are qualitative, while those produced by polymerase chain reaction on real time are quantitative.

Introducción

La gran complejidad de los procesos biológicos en los seres vivos ha sido por años la razón por la que los investigadores han centrado su atención en descifrar los mecanismos que se esconden detrás de esos procesos. Desde las primeras observaciones de Gregorio Mendel hasta la actualidad, se tiene la noción de que parte de la explicación de los diferentes fenómenos biológicos se encuentra escondida en lo más recóndito del genoma celular y que una de las claves para entender dichos fenómenos es el estudio de los genes. Uno de los descubrimientos más importantes de la historia que marcó el inicio de una nueva era en el estudio y conocimiento de los ácidos nucleicos fue el de Watson y Crick, al descifrar la estructura del ADN¹ (ácido desoxirribonucleico). Desde entonces, varios grupos han mostrado un gran interés por desarrollar

métodos sensibles y reproducibles que les permitan estandarizar protocolos experimentales para estudiar los ácidos nucleicos. Es así como han ido apareciendo diferentes tecnologías cuyos protocolos están dirigidos al estudio del ADN; probablemente, la más importante sea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), desarrollada por Kary Mullis¹ y que revolucionó la biología molecular y la forma en cómo se estudiaban los ácidos nucleicos en ese momento.

Actualmente sabemos que la misión de la PCR es copiar millones de veces una secuencia específica de ADN blanco mediante una poderosa catálisis llevada a cabo por una enzima conocida como ADN polimerasa, de tal manera que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas fielmente para analizarse con diferentes fines. El desarrollo de esta técnica permitió estudiar y manipular mejor al ADN, facilitando el establecimiento de protocolos

experimentales en biología molecular. El progreso de esta técnica ha sido muy notable y ha ido en paralelo con los nuevos retos para estudiar y comprender mejor el rol de los genes, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Es por ello que una de las formas recientes para detectar y cuantificar a los ácidos nucleicos es a través de la PCR en tiempo real, la cual es una modalidad de la PCR considerada como una técnica cuantitativa.

Hoy en día, la PCR se aplica en diferentes áreas de las ciencias biológicas y de la salud, formando parte del quehacer científico de muchos laboratorios de investigación que la utilizan principalmente para expresión génica, genotificación, detección de patógenos y análisis de mutaciones. En esta revisión se hace una descripción de los fundamentos de la PCR convencional o también conocida como punto final; además se explica qué se necesita para que la reacción sea exitosa, cómo se lleva a cabo y cómo se analizan los resultados. Finalmente, introducimos al lector a la PCR en tiempo real con la finalidad de que comprenda las diferencias básicas con la PCR punto final.

Fundamentos

¿Qué es la PCR?

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la reacción, si usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si usamos ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR (*Reverse Transcription-PCR*, por sus siglas en inglés). Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc. Este método fue copiado de los retro virus que usan una transcriptasa reversa para convertir su genoma de ARN en ADN duplicarse en millones de partículas virales.² El ADNc se utiliza cuando analizamos la expresión del ARNm de algún gen de interés.

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina),

el ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y H₂O. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa. A continuación se explicarán cada uno de los puntos mencionados.

¿Qué elementos químicos se necesitan?

El elemento principal en la PCR es el ADN, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación. Para entrar en contexto, es importante recordar que la molécula de ADN está formada por tres componentes: un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, timina, guanina o citosina) que es complementaria con la base de otra cadena (*Figura 1*), de tal forma, que el ADN se estructura en una doble hélice.³ La complementariedad entre las bases está dada por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, generando estabilidad a la doble hélice, la carga eléctrica del ADN es negativa y está dada por los grupos fosfatos. En la PCR, el templado son las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés. Por su parte, la ADN polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco. La enzima más usada con frecuencia se llama Taq ADN polimerasa,⁴ que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su ADN polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperaturas. El rasgo que distingue a esta enzima bacteriana de otras ADN polimerasas de otros organismos es su capacidad para mantener su funcionalidad a temperaturas altas, por lo que se le considera una enzima termoestable. También hay otras enzimas que se utilizan como la Vent, obtenida de la bacteria *Thermococcus litoralis*.⁵ Normalmente, casi todas las enzimas que se venden comercialmente son eficientes y generalmente cuando fallan lo hacen por una manipulación incorrecta del usuario. Para que la enzima funcione con alta especificidad y la reacción transcurra exitosamente, también se necesita de los

elementos ya mencionados como primers, dNTPs, Mg⁺, buffer y H₂O.

Los primers son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Generalmente su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia. Si no se respetan estas reglas, existe la posibilidad de la formación de dímeros de primers, es decir, de productos inespecíficos. Esto repercutiría en el rendimiento de la reacción, así como en la especificidad del producto esperado. Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una denominada «forward» o sentido y otra «reward» o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5'-3' (como sucede endógenamente). Con la finalidad de garantizar la formación de un complejo estable entre el templado y los primers, hoy en día existen programas informáticos para diseñar primers con alta especificidad, por lo que se evita la formación de productos inesperados. Incluso, hay laboratorios de biología molecular que se dedican a diseñarlos, sintetizarlos y validarlos para garantizar su especificidad, facilitándole el trabajo al usuario que sólo elige el de su interés y los manda a comprar. Por su parte, los dNTP's son los ladrillos o bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN. Son factores importantes que contribuyen a la especificidad de la reacción, por ello es importante que su concentración sea la adecuada ya que de lo contrario pueden afectar la función de la Taq polimerasa. Normalmente, se utilizan a una concentración que oscila entre 0.2 a 1.0 mM. El buffer es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8) cuya concentración final de trabajo debe ser

1X. También se usan otros buffers de composición distinta que son fácilmente comprados en el mercado. El magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, por eso se debe tener una concentración adecuada para que no afecte el rendimiento de la Taq polimerasa; regularmente su concentración oscila entre 0.5 y 2.5 mM. En ocasiones ya viene incluido en el buffer, pero en otras se le tiene que agregar. El agua es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleicos.

¿Cómo funciona la reacción?

Recordemos que cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión (Figura 2). A continuación explicaremos qué sucede en cada una.

Desnaturalización. En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso.

Hibridación. En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los primers es el co-

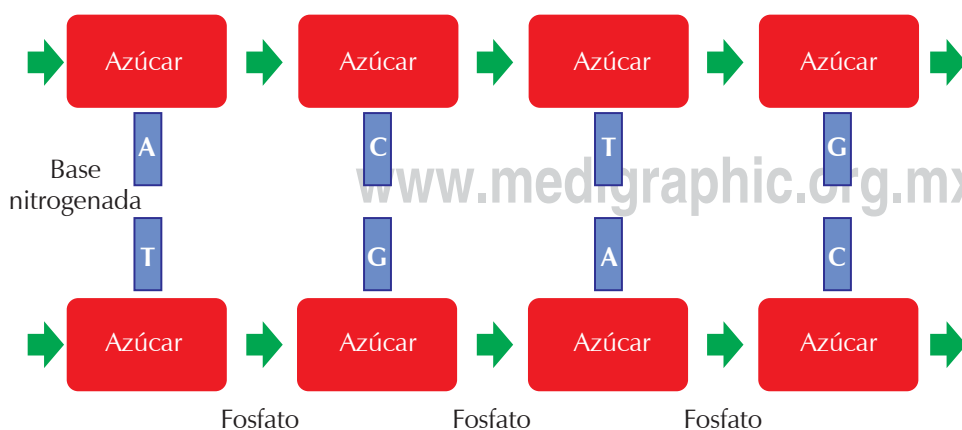


Figura 1.

Molécula de ADN de doble cadena. Cada cadena está formada por un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada que es complementaria con otra cadena: A = adenina, T = timina, C = citosina y G = guanina.

recto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.

Extensión. En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador.

¿Cómo se analiza el producto de amplificación?

Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa.⁶ La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo un buffer o tampón que puede ser TAE o TBE. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo. Para ello, se prepara un gel diluyendo una cantidad de agarosa en el buffer, se calienta hasta que la agarosa hierva lo suficiente y posteriormente se vacía a un recipiente que sirve de base para que solidifique. Generalmente el porcentaje al que se prepara el gel es al 1.2% aunque, dependiendo del tamaño de las moléculas, puede ser de hasta el 2%. Otro ingrediente que se agrega al gel es un compuesto conocido como bromuro de etidio, una molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena. Cuando es excitado con luz UV emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas. Es importante manipular con mucho cuidado este compuesto porque se sabe que es mutagénico y teratógeno.

Cuando los amplicones son corridos en el gel, éstos deben ser cargados junto con un marcador molecular que contenga un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo que facilita la identificación de los amplicones y si su tamaño corresponde con el esperado. El tamaño está dado por el número de pares de bases del amplicón. El marcador de peso molecular es fácilmente adquirido en el mercado, ya que se ofrece una gama de marcadores con distintos

pesos moleculares para elegir el de nuestro interés. Finalmente, la visualización de los amplicones se lleva a cabo tomando una foto digital al gel de agarosa expuesto a luz UV (Figura 3); adicionalmente un procesador de imágenes se encarga de analizar las bandas observadas.

La combinación adecuada de todos los elementos químicos mencionados hacen posible la síntesis *in vitro* del ADN utilizando la PCR. Los cambios que ha sufrido la PCR como plataforma tecnológica han sido muy notables; conforme los paradigmas de estudio de los ácidos nucleicos han ido cambiando, la necesidad de ir mejorando la técnica se convirtió en una prioridad para los investigadores; es por ello que la PCR ha sufrido modificaciones para ofrecer una tecnología más innovadora apegada a los retos inherentes que implica el estudio del ADN. Actualmente, el panorama de la PCR promete estar a la altura de los objetivos de los investigadores, tan es así que ahora la modalidad de la PCR en tiempo real ofrece la gran ventaja de usar un sistema cuantitativo.

PCR en tiempo real: fundamentos

Los primeros que sentaron las bases para desarrollar la PCR en tiempo real fueron Higuchi y colaboradores, en 1992, al videograbar en tiempo real la incorporación de bromuro de etidio al ADN durante cada ciclo de la PCR realizada bajo luz UV.⁷ Desde entonces, el

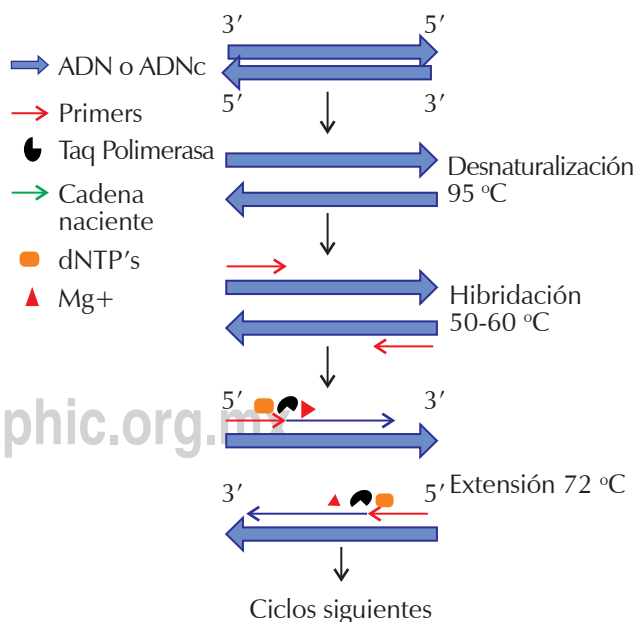


Figura 2. Pasos de un ciclo de la PCR.

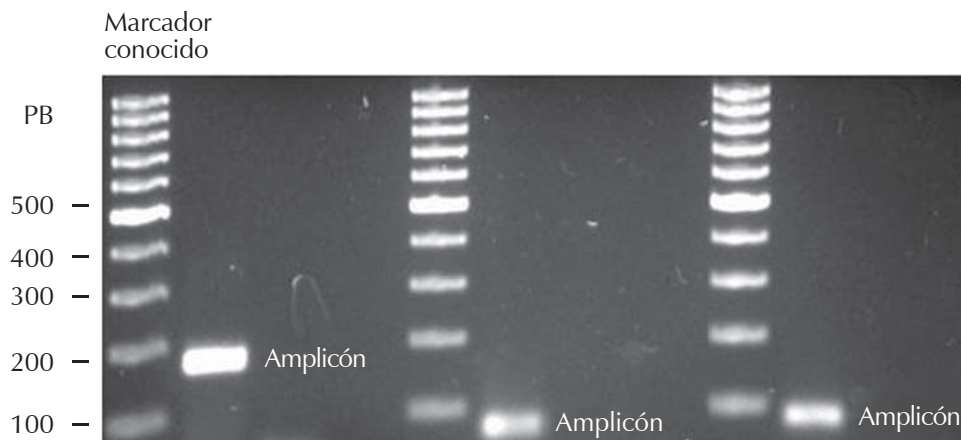


Figura 3.

Gel de agarosa. Los productos de la PCR o amplicones están representados mediante bandas de un tamaño específico y se comparan con un marcador de peso molecular conocido para determinar la especificidad de la reacción. PB = número de pares de bases.

objetivo de la PCR en tiempo real ha sido detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción.

El principio de la técnica se basa en la PCR punto final, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de la PCR punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco. Precisamente, estas últimas dos características representan grandes ventajas de la PCR en tiempo real, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción⁸ sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final. La nomenclatura que se usa también es diferente, si utilizamos ADN genómico entonces hablamos de una qPCR (*quantitative* PCR), si por lo contrario, primero obtenemos ADNc y luego hacemos la PCR, nos referimos a una RT-qPCR.⁹

Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Una de sus aplicaciones más usadas es para cuantificar cambios muy pequeños en la expresión génica mediante la detección de los niveles del ARNm procedente de células o tejidos. La cantidad de ARNm que puede detectar la reacción puede ser a partir de concentraciones bajas a diferencia de la PCR, punto final que necesita una mayor concentración.

Los ingredientes químicos en la PCR en tiempo real, son los mismos utilizados en la PCR punto final, sólo que generalmente la enzima, dNTP's, Mg +, el buffer y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados se venden juntos en una solución conocida como «Master mix», el agua es proporcionada por separado y también es libre de nucleasas. Los primers deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad y para que generen amplicones de un tamaño que oscile entre 100-150 pb; si éstos son más grandes, la eficiencia de la reacción disminuye considerablemente. Para evitar estos problemas, una alternativa es diseñar los primers, utilizando programas informáticos disponibles, o comprarlos ya validados de las compañías de biología molecular, quienes garantizan resultados altamente eficientes y satisfactorios para los usuarios.

¿Cuáles son los métodos para detectar los productos amplificados?

El monitoreo de los productos amplificados conforme transcurre la reacción es un paso importante en la PCR en tiempo real, para ello la estrategia tecnológica que ha dado buenos resultados es los sistemas basados en reporteros fluorescentes. En general, estos sistemas pueden ser clasificados en dos métodos diferentes: específicos y no específicos.¹⁰

Los métodos no específicos se basan en el uso de moléculas intercalantes que tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente. La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. El reportero más usado para estos fines se llama SYBR Green,¹¹

la cual es una molécula cargada positivamente que, mientras esté en solución sin unirse al ADN de doble cadena, prácticamente no emite fluorescencia; sin embargo, cuando se une al surco menor del ADN incrementa hasta 1,000 veces su fluorescencia (Figura 4). Aunque el SYBR Green es uno de los reporteros fluorescentes más utilizados por los investigadores debido a su bajo costo, la principal desventaja es que puede unirse a cualquier molécula de ADN de doble cadena, incluyendo dímeros de primers. Muchos laboratorios, para evitar esta situación, optimizan sus reacciones realizando una «curva melting» o «curva de disociación» al final de la reacción, cuya función es la de evaluar si se formó un producto único o si hay presencia de dímeros de primers. Hoy en día la mayoría de los software de los termocicladores ofrecen esta función que es fácil de aplicar y analizar.

Los métodos específicos parten de principios distintos a diferencia de los no específicos y tienen en común la señal de fluorescencia emitida para detectar los productos amplificados. Estos métodos siguen el principio conocido como «transferencia de energía de resonancia fluorescente» (FRET, por sus siglas en inglés) para generar la señal; este método consiste en transferir energía desde un donador o reportero fluorescente a un aceptor o «quencher». Para ello, existen dos métodos específicos, éstos son: pruebas basadas en hidrólisis y por hibridación. Los primeros se basan en sondas fluorescentes de oligonucleótidos etiquetados con un reportero fluorescente y un «quencher», ambos se encuentran en estrecha unión

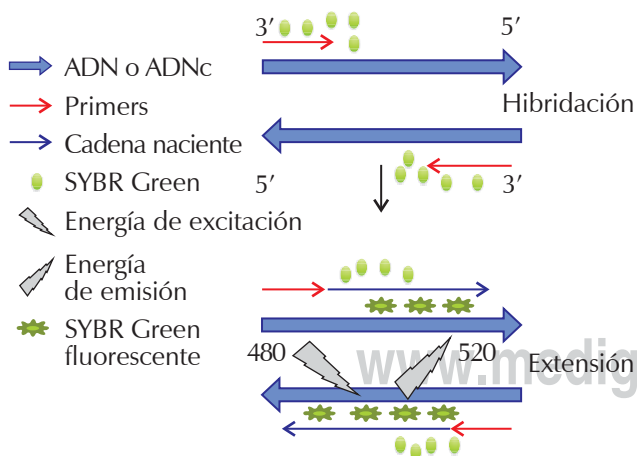


Figura 4. Método no específico. Cuando el SYBR Green está unido al ADN de doble cadena, es excitado a una longitud de onda de 480 nm, mientras que la longitud de onda de emisión corresponde a 520 nm.

mientras la sonda no hibride a su secuencia blanco. Cuando hibrida, ocurren cambios conformacionales en el reportero y el *quencher*, lo cual permite que la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa rompa esta unión, logrando que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y capturada por el equipo. Estos métodos son muy seguros, ya que mientras no haya unión de la sonda a su blanco, no habrá amplificación y tampoco señal de fluorescencia; es por eso que la especificidad es muy alta. Un ejemplo de estos sistemas son las sondas comerciales conocidas como TaqMan¹² (Figura 5), aunque existen otras en el mercado.

Los métodos por hibridación consisten en una sonda unida a un reportero fluorescente que está en estrecha proximidad con un aceptor fluorescente unido a otra sonda. Tanto el reportero como el aceptor presentan un espectro de excitación y de emisión similar, de tal forma que cuando las dos sondas hibriden a su templado blanco, el reportero es excitado y la señal emitida es transferida al aceptor, generando un incremento en la cantidad de fluorescencia. Un ejemplo de este método son las sondas *molecular Beacons*¹³ que también son comerciales.

Los métodos específicos son más costosos que los no específicos, pero son más eficientes al garantizar la especificidad de la reacción, evitando la formación de productos inespecíficos. Cualquiera que sea el método que se aplique, se pueden adquirir fácilmente, ya que la gama de sondas para desarrollar, tanto los métodos específicos como los no específicos, es amplia.

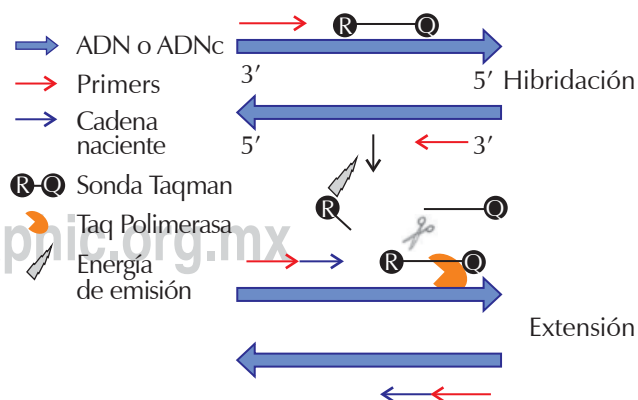


Figura 5. Método específico mediante la utilización de las sondas Taqman.

¿Cómo se captura la señal de fluorescencia?

Cualquiera de los métodos que se utilicen para detectar los productos amplificados en cada ciclo de la reacción necesita de la tecnología incluida en los termocicladores de PCR en tiempo real para: a) excitar al reportero, b) capturar la señal de emisión del mismo y c) realizar el análisis cuantitativo. En el mercado existen diferentes tipos de termocicladores para esta finalidad, cuyas diferencias principales son la fuente de energía que utilizan para la excitación. En general son tres las fuentes: las lámparas de luz, diodos de emisión de luz (LED, por sus siglas en inglés) y láseres. Cualquiera que sea la fuente, primero el reportero es excitado y su señal de emisión colectada a través de un filtro que permite el paso de la longitud de onda correspondiente que llega hasta un fotodetector que captura la información proveniente de la muestra para su análisis en el software del equipo. Otros rasgos característicos son las velocidades para incrementar o disminuir las temperaturas en cada etapa de la reacción, el número de muestras que puede soportar, los consumibles para la reacción y los kits que se utilizan para la amplificación; en algunos casos sólo se usan reactivos del proveedor del termociclador, es decir, son sistemas cerrados y en otros casos, se pueden utilizar reactivos de diferentes proveedores, es decir, son sistemas abiertos.

¿Cómo se analizan los resultados?

No es suficiente con detectar la amplificación en tiempo real y capturar la fluorescencia de cada muestra, el análisis de la reacción es el paso final para determinar la cuantificación génica. Para ello, los termocicladores están proveídos de una PC con un software que generalmente son fáciles de usar. Este software genera una serie de gráficas en donde se muestran todos los datos necesarios para conocer si la reacción fue exitosa. Una de estas gráficas es la de amplificación (*Figura 6*) que muestra el curso y el progreso de la reacción, otra gráfica es la curva de disociación o curva melting (*Figura 7*) que muestra información sobre la especificidad de la reacción. Otro paso importante del análisis es elegir el tipo de cuantificación que se usará para determinar la amplificación precisa del blanco génico; este procedimiento depende de los intereses del investigador. Para ello existen dos tipos de cuantificación: la absoluta y la relativa. La primera generalmente se utiliza para conocer el número exacto de copias amplificadas del blanco o la concentración precisa de ácidos nucleicos en una muestra. En la práctica, este tipo de cuantificación se usa para medir la carga viral o bacteriana en diferentes tejidos. La segunda se aplica cuando se desean evaluar los cambios en la expresión de genes en distintos estados fisiológicos. Estos cambios se basan en los niveles del ARNm del

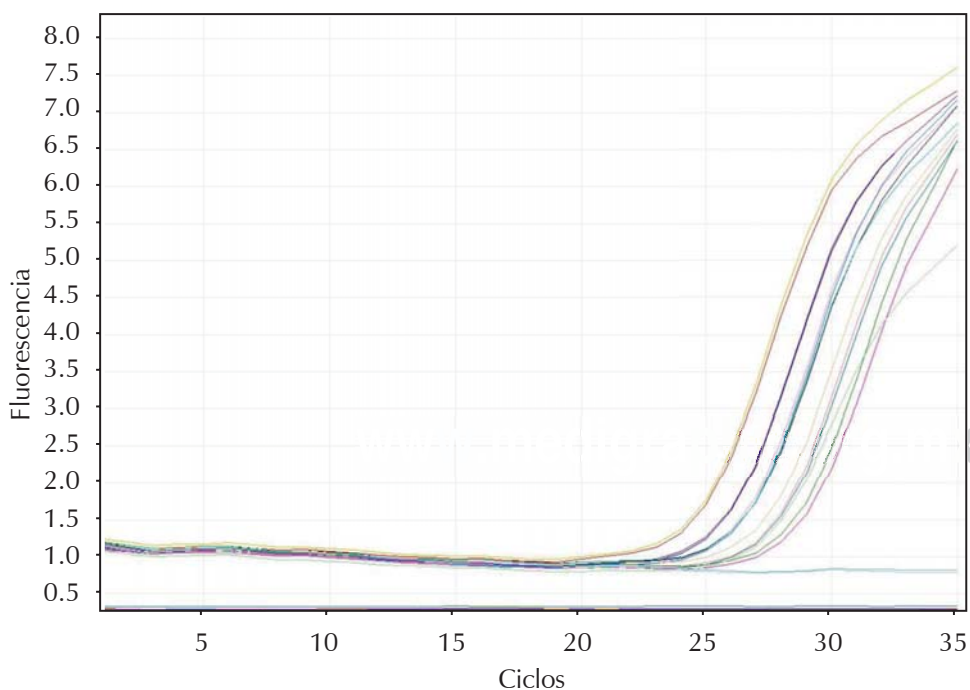


Figura 6.

Curva de amplificación. En el eje «Y» se muestra la cantidad de fluorescencia y en el eje «X» los ciclos de la reacción. La amplificación se detecta en cada ciclo de la reacción, midiendo el incremento de la fluorescencia que es proporcional al aumento de ADN.

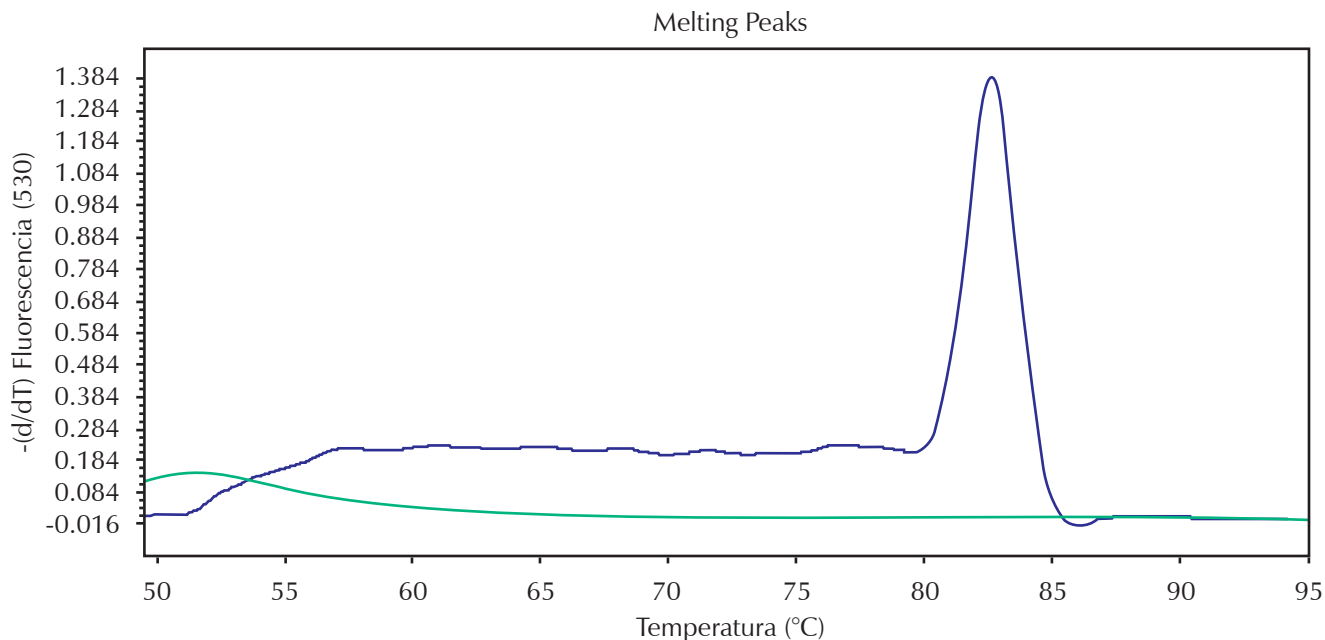


Figura 7. Se puede observar un único pico de amplificación que corresponde a la curva de disociación o curva melting que indica la especificidad de la reacción, es decir, que los amplicones que se formaron son del tamaño esperado. La línea de abajo corresponde al control negativo, el cual no amplificó.

gen blanco comparados con un gen de referencia (gen housekeeping) que no cambia su expresión a pesar de que los estados fisiológicos se modifiquen por diversas causas. Los datos son expresados como relativos al gen de referencia y generalmente son referidos como el número de veces en el que aumentaron o decrementaron los niveles de ARNm o en su caso, si no hubo cambios. Cualquiera que sea el tipo de cuantificación que se elija, casi todos los software de los equipos están posibilitados para llevar a cabo los análisis matemáticos y estadísticos que se requieren en cada tipo de cuantificación.

Conclusiones

Los retos que se presentan día a día en la investigación biomédica nos abren la posibilidad de conocer nuevas herramientas tecnológicas para afrontarlos experimentalmente. Es por eso que la PCR es una de esas herramientas que se ha desarrollado para ofrecer una alternativa para el estudio de los ácidos nucleicos. Tal fue su impacto en la comunidad científica que hoy en día es una técnica que se usa a diario en muchos laboratorios y que se incrementó cuando apareció la modalidad de PCR en tiempo real, permitiendo el establecimiento y la aplicación de nuevos protocolos experimentales más precisos que generan resultados

confiables y reproducibles. Por todo ello, difundir los fundamentos de la PCR es un primer paso para conocer una de varias herramientas tecnológicas con las que se cuenta para el estudio de los ácidos nucleicos.

Bibliografía

1. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* 1990; 262: 56-61.
2. Herschhorn A, Hizi A. Retroviral reverse transcriptases. *Cell Mol Life Sc.* 2010; 67: 2717-2747.
3. Watson JD, Crick FH. A structure for desoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953; 421: 397-378.
4. Saiki RK et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988; 239: 487-491.
5. Cariello NF, Swenberg JA, Skopek TR. Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (Vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 4193-4198.
6. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp.* 2012; 62: 3923.
7. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology.* 1992; 10: 413-417.
8. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology.* 1993; 11: 1026-1030.

9. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR-a perspective. *J Mol Endocrinol.* 2005; 34: 597-601.
10. Foy CA, Parkes HC. Emerging homogeneous DNA-based technologies in the clinical laboratory. *Clin Chem.* 2001; 47: 990-1000.
11. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: 103.
12. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995; 4: 357-362.
13. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol.* 1996; 14: 303-308.