

PROBLEMA BIOQUÍMICO

INTRODUCCIÓN AL DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA PCR EN TIEMPO REAL

Biól. Daniel Hurtado González y Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega

Laboratorio 3. Departamento de Bioquímica

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional CDMX, México

Email: rueda@cinvestav.mx; daniel.hurtado@cinvestav.mx.

INTRODUCCIÓN

PCR son las siglas por las que se conoce a la reacción en cadena de la polimerasa (en inglés *Polymerase Chain Reaction*), un método experimental establecido por el bioquímico estadounidense Kary Mullis en 1985, que lo hizo acreedor al Premio Nobel de Medicina en 1993 (1). Este método se basa en el uso de la enzima DNA polimerasa para sintetizar una nueva hebra de DNA a partir de un DNA patrón que funciona como molde, permitiendo amplificar pequeñas regiones específicas de dicho DNA. De esta forma, un segmento de DNA se multiplica *n* veces, facilitando su detección. Debido a que la DNA polimerasa puede agregar un nucleótido solo a un grupo 3'-OH preexistente, necesita un cebador, también conocido como *primer*, al que pueda agregar el primer nucleótido (2). Un cebador es una secuencia sintética de nucleótidos que se usa para reconocer, por apareamiento complementario, secuencias blanco en una muestra de DNA, el cual consiste generalmente de DNA genómico. En una reacción típica de PCR se usan un par de cebadores para definir los extremos del producto que va a amplificarse, y a partir de ellos la

DNA polimerasa inicia la adición de nucleótidos en dirección 5'-3'. Estos cebadores son denominados *forward* (iniciador hacia adelante) y *reverse* (iniciador reverso) según los extremos con que hibridan en la secuencia molde.

La PCR consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos. La PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos a diferentes temperaturas: el primero es la desnaturalización (en el cual se separan las dos cadenas del DNA a amplificar) a 95°C; el segundo es el alineamiento (en donde el cebador se une a su secuencia complementaria en el DNA molde) a 40–55°C, y el tercero es la extensión (en el cual actúa la polimerasa tomando el DNA molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial) a 75–80°C (3).

De los diferentes tipos de PCR, la PCR cuantitativa en tiempo real (o *real-time qPCR*) es una variante utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación del DNA. En muchos casos, el molde empleado puede ser DNA complementario (cDNA) obtenido mediante retro-

transcripción, y permite determinar indirectamente los niveles de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de una proteína de interés. Esta cuantificación es posible gracias a la adición de una molécula fluorescente que permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos en un termociclador provisto de detectores para fluorescencia (4). Las mediciones de la fluorescencia se realizan después de cada ciclo de amplificación, y por esto se le denomina PCR en tiempo real; mientras que la parte cuantitativa o semicuantitativa depende de medir simultáneamente el mRNA de un gen de referencia que servirá para reportar la cantidad del mRNA de la proteína de interés, con respecto al mRNA de la proteína de referencia.

El diseño de los cebadores es la variable más importante en la qPCR en tiempo real, ya que determinan su especificidad y eficiencia. (5).

Se pueden usar secuencias de cebadores publicadas para el mRNA de la proteína de interés, ya que han sido probadas previamente por otros investigadores, garantizando su fiabilidad. Sin embargo, es posible que algún par

de cebadores reportados no permita detectar o amplificar una región en particular de un mRNA de interés, debido a un procesamiento y edición diferencial del mismo (*alternative splicing*) que puede ser tejido-específico, o bien a las diferentes isoformas que se puedan presentar, por lo que es de suma importancia conocer herramientas básicas para el diseño de cebadores específicos.

La forma más práctica para diseñar cebadores es usar un programa (*software*) que tenga en cuenta diferentes parámetros fundamentales como el contenido de GC y la temperatura de fusión (T_m , por *melting temperature*). La T_m de los cebadores es uno de los factores determinantes de la reacción, ya que establece el límite de temperatura a la cual los cebadores se pueden hibridar con la hebra molde. A continuación, se enlistan los parámetros más importantes a tomar en cuenta en el diseño de cebadores para la qPCR:

1. Deben alinear solo con una secuencia en la hebra molde.
2. La longitud de cada cebador debe ser de 18 a 30 nucleótidos (óptimo 20 – 25) para reducir al mínimo la posibilidad de hibridación en sitios no específicos.
3. El contenido de GC debe ser del 40 al 60%.
4. Los pares de cebadores deben tener valores de T_m similares ($\pm 5^\circ\text{C}$).
5. Los valores de T_m deben estar entre 50 y 80°C , de forma que sean superiores a la temperatura de alineamiento.
6. No deben presentar estructuras secundarias (*hairpins* o *loops*).
7. Los extremos 3' deben terminar con G o C, o CG o GC.

8. No deben formar pares de bases entre sí, especialmente en el extremo 3' (dímeros de cebadores).

9. Por último, es importante diseñar cebadores que amplifiquen regiones inter-exónicas, lo que permite cuantificar mRNAs que ya no contengan intrones.

Hay muchos programas comerciales para hacer esto; sin embargo, existen varias herramientas gratuitas en línea que también sirven para el mismo propósito. Éstas se basan en algoritmos que brindan varias opciones de pares de cebadores para el objetivo del investigador. Estas herramientas generan varios pares de cebadores específicos para la secuencia objetivo. En la mayoría de los casos, se debe corroborar que estos pares de cebadores sugeridos sean óptimos para la qPCR en tiempo real, por lo que es prudente verificar su fiabilidad empleando programas alternativos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA BIOQUÍMICO

Para este problema utilizaremos el mRNA de la proteína sorcina, la cual regula la actividad de bombas y canales de Ca^{2+} , entre ellos al receptor de rianodina de las células cardíacas y de músculo liso vascular (5,6). Adicionalmente, la sorcina regula el ciclo celular y el tráfico de vesículas en órganos y tejidos como el cerebro, el corazón, los linfocitos, los riñones, las glándulas mamarias y la piel. Investigaciones recientes han demostrado que la sorcina se sobreexpresa en las células de varios tipos de cáncer, particularmente en el caso de los cánceres resistentes a múltiples fármacos (6). Es importante mencionar que el procedimiento descrito a continuación se puede utilizar para el diseño de cebadores para cualquier otra proteína de interés.

PREGUNTAS

Utilizando la secuencia más estudiada de mRNA de la sorcina humana, identificada como variante 1, realice las siguientes actividades relacionadas con el diseño de cebadores específicos:

1. En el sitio WEB del *National Center of Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) encuentre:

1.1. La secuencia de la variante 1 del transcrito (mRNA) para la sorcina en humanos y el número de exones que lo componen.

1.2. El número de acceso de la variante 1 del transcrito de la sorcina humana.

1.3. La secuencia codificante de la variante 1 del transcrito de la sorcina humana.

1.4. La secuencia aminoacídica de la variante 1 de la sorcina humana.

2. Usando la herramienta Primer Blast ([Primer designing tool \(nih.gov\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/PrimerBlast/)) del NCBI obtenga un par de cebadores para la variante 1 que cumplan con los siguientes parámetros:

2.1 T_m superior a 55°C .

2.2 Porcentaje de GC inferior a 55%.

2.3 Amplicón generado inferior 200 pares de base.

2.4 Amplicón generado que posea una secuencia inter-exónica.

3. Se conoce que existen numerosas mutaciones en el primer exón de la variante 1. Entonces ¿sería buena idea utilizar cebadores para la PCR que hibriden en alguna región de este exón? Justifique su respuesta mediante un esquema.

4. Diseñe un par de cebadores, cumpliendo con los parámetros necesarios, que solo amplifiquen una secuencia del quinto exón de la variante 1.

