



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

# Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)

<b>Apellidos, nombre</b>	Pérez de Castro, Ana María
<b>Departamento</b>	Biotechnología
<b>Centro</b>	ETSIAMN



## 1 Resumen

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (siglas de su nombre en inglés *Polymerase Chain Reaction*) permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de DNA (ácido desoxirribonucleico). El requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de DNA de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos servirán como cebadores para que una enzima polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde. Una vez completada la reacción la cantidad de fragmento amplificado se puede visualizar mediante técnicas sencillas de separación de fragmentos de DNA.

## 2 Introducción

Tras la extracción del DNA a partir de un tejido se obtiene el DNA total contenido en el conjunto de células del tejido utilizado. Este DNA se puede observar como un precipitado, que es posible resuspender en agua o en un tampón apropiado. Si se separa mediante electroforesis en gel de agarosa se observa como una única banda de elevado peso molecular (figura 1).

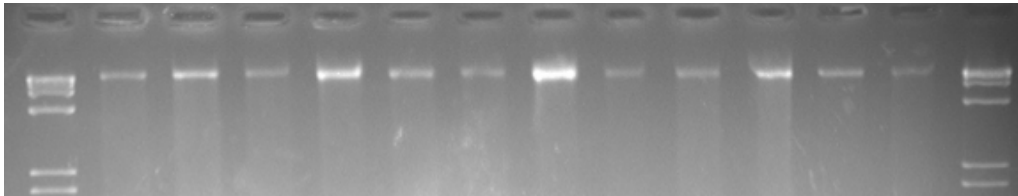


Figura 1. Visualización mediante electroforesis en gel de agarosa del DNA total extraído de plantas de tomate. En ambos extremos del gel se muestra un patrón de pesos moleculares (DNA Lambda digerido con HindIII, de Fermentas [1]).

Frecuentemente el objetivo de un experimento es analizar un fragmento concreto, que puede ser o no conocido, del DNA extraído. ¿Cómo podemos aislarlo a partir de ese DNA total? Una de las posibilidades es obtener una gran cantidad de copias del fragmento de interés mediante la técnica de **reacción en cadena de la polimerasa** o **PCR** (*Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica resulta fundamental para muchas de las aplicaciones de la biología molecular.

## 3 Objetivos

El presente artículo docente tiene como objetivo proporcionar al alumno las bases para que sea capaz de:

- Describir el proceso de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR.
- Detallar los componentes necesarios para llevar a cabo una PCR.
- Predecir cómo afecta al resultado de la PCR la modificación de factores como la temperatura o la concentración de alguno de los componentes de la reacción.
- Preparar una PCR.



## 4 Desarrollo

La reacción en cadena de la polimerasa fue desarrollada en 1983 por el Doctor Kary Mullis. El Dr. Mullis recibió en 1993 el Premio Nobel de Química por este descubrimiento. Resulta muy interesante leer el discurso pronunciado por este investigador con motivo de la recepción del premio [2]. Se percibe la impresión de que, como en muchos otros casos, fueron pocos los que inicialmente percibieron la importancia de lo que el Dr. Mullis había descubierto. Sin embargo, bien por el tiempo transcurrido entre el descubrimiento y el discurso, bien por el tiempo dedicado a pensar en ello, K. Mullis sí que trasmite un entusiasmo acorde a la importancia de su invención y al cambio que supuso en el campo de la biología molecular. En palabras suyas: "Antes del la PCR, el DNA era largo y fibroso, en absoluto molecular... Yo había resuelto uno de los principales problemas de la química del DNA en un solo paso: abundancia y distinción" [2].

Como en el caso de muchas invenciones, el descubrimiento de la PCR tuvo lugar buscando la solución a otro problema. De hecho, antes de la PCR existían métodos para aislar fragmentos de DNA basados en la clonación, pero estos métodos resultaban mucho más costosos en tiempo y en dinero.

Ya podemos intuir, aun sin conocer los detalles, la importancia del descubrimiento de la PCR: mediante esta técnica es posible generar muchas copias de un fragmento de DNA y distinguirlo del resto del DNA total extraído. A continuación se detallarán los componentes, necesarios para completar la reacción, así como la base teórica de la misma. En este punto se proporcionará información acerca de fuentes electrónicas útiles para la visualización de simulaciones del proceso. Por último, se explicará cómo se prepara una PCR a nivel práctico.

### 4.1 Componentes de la PCR

Sabemos que el objetivo de la reacción en cadena de la polimerasa es obtener muchas copias de un fragmento de DNA, para después poder visualizar este fragmento y utilizarlo en otras aplicaciones si es necesario. Para alcanzar este resultado, ¿qué es necesario añadir a la reacción?

- El DNA a partir del cual queremos obtener una copia de un fragmento, es decir, el DNA que queremos amplificar. Este DNA se conoce como **DNA molde**.
- Una enzima capaz de generar una copia de DNA a partir del DNA molde: una **DNA polimerasa**. La reacción se lleva a cabo en un tampón apropiado para el funcionamiento de la enzima polimerasa. Además, como cofactores de la polimerasa se añaden cationes divalentes, generalmente en forma de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ).
- Iniciadores de la reacción: Las enzimas DNA polimerasas únicamente son capaces de añadir nucleótidos al extremo 3' libre de una doble cadena de DNA. Son necesarios por tanto moléculas cortas (entre 10 y 30 bases) de DNA de cadena sencilla. Estas moléculas son los **cebadores o primers** de la reacción. Como se explicará más adelante (apartado 4.2) son los cebadores los que van a delimitar el fragmento a amplificar.
- Nucleótidos libres: las enzimas DNA polimerasas van a crear una cadena complementaria a la cadena molde mediante la incorporación de **nucleótidos** al extremo 3' libre del cebador que se ha unido a la cadena



molde. Los nucleótidos se añaden en forma de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs).

Estos cuatro componentes son los elementos básicos que es necesario incorporar a la reacción para que se complete una PCR.

## 4.2 Base teórica de la PCR

El proceso que tiene lugar durante la PCR se puede resumir de la siguiente forma: partiendo de un DNA molde, una enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir de la zona de doble cadena originada por la unión de los cebadores al molde. Ahora bien, ¿cómo tiene lugar esta reacción? Como veremos a continuación los cambios de temperatura constituyen la base para que se completen los pasos necesarios. El proceso se lleva a cabo en tres fases: desnaturalización, hibridación y elongación (figura 2).

En primer lugar es necesario que el DNA se desnaturalice, es decir, que las dos cadenas de DNA se separen. Esta primera fase se conoce como **desnaturalización** y se lleva a cabo elevando la temperatura a alrededor de 94°C.

El siguiente paso consiste en un descenso de la temperatura para permitir que los cebadores se unan por complementariedad al DNA molde. Esta segunda fase se conoce como **hibridación**. Temperaturas habituales en esta fase oscilan entre 35 y 60°C (ver cuadro 1).

Por último, en la fase de **elongación o extensión**, la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores. La temperatura a la que se lleva a cabo esta fase depende de la enzima polimerasa empleada; si se utiliza *Taq* polimerasa la temperatura de elongación suele ser de 72°C.

Estas tres fases constituyen un ciclo de la PCR. ¿Qué se ha obtenido tras un ciclo de PCR? Únicamente una copia de un pequeño fragmento del DNA molde. En este primer ciclo, los fragmentos generados no tienen el mismo tamaño: la copia de cada una de las cadenas se inicia, a partir del extremo 3', en el punto en el que el cebador hibrida con el DNA molde y termina en el momento en el que la enzima polimerasa no es capaz de añadir más nucleótidos (es decir, que la nueva cadena formada no tiene un tamaño definido).

### Cuadro 1. Especificidad de la reacción de PCR.

La especificidad de la PCR depende, fundamentalmente, de la temperatura empleada en la fase de hibridación y de la cantidad de iones divalentes que se incorporan a la reacción (además de depender de la secuencia de los cebadores). Por una parte, cuanto mayor sea la temperatura utilizada en la fase de hibridación, más específica es la reacción. Esto se debe a que a mayor temperatura más dificultada se ve la unión entre el cebador y la cadena molde; en condiciones de temperaturas de hibridación elevadas el cebador sólo se unirá a la cadena molde si son complementarios en todos sus nucleótidos. Por otra parte, en un determinado rango, incrementos en la concentración de  $MgCl_2$  hacen disminuir la especificidad de la reacción; los iones facilitan la unión del cebador a la cadena molde y permiten la incorporación de los nucleótidos a la cadena creciente.

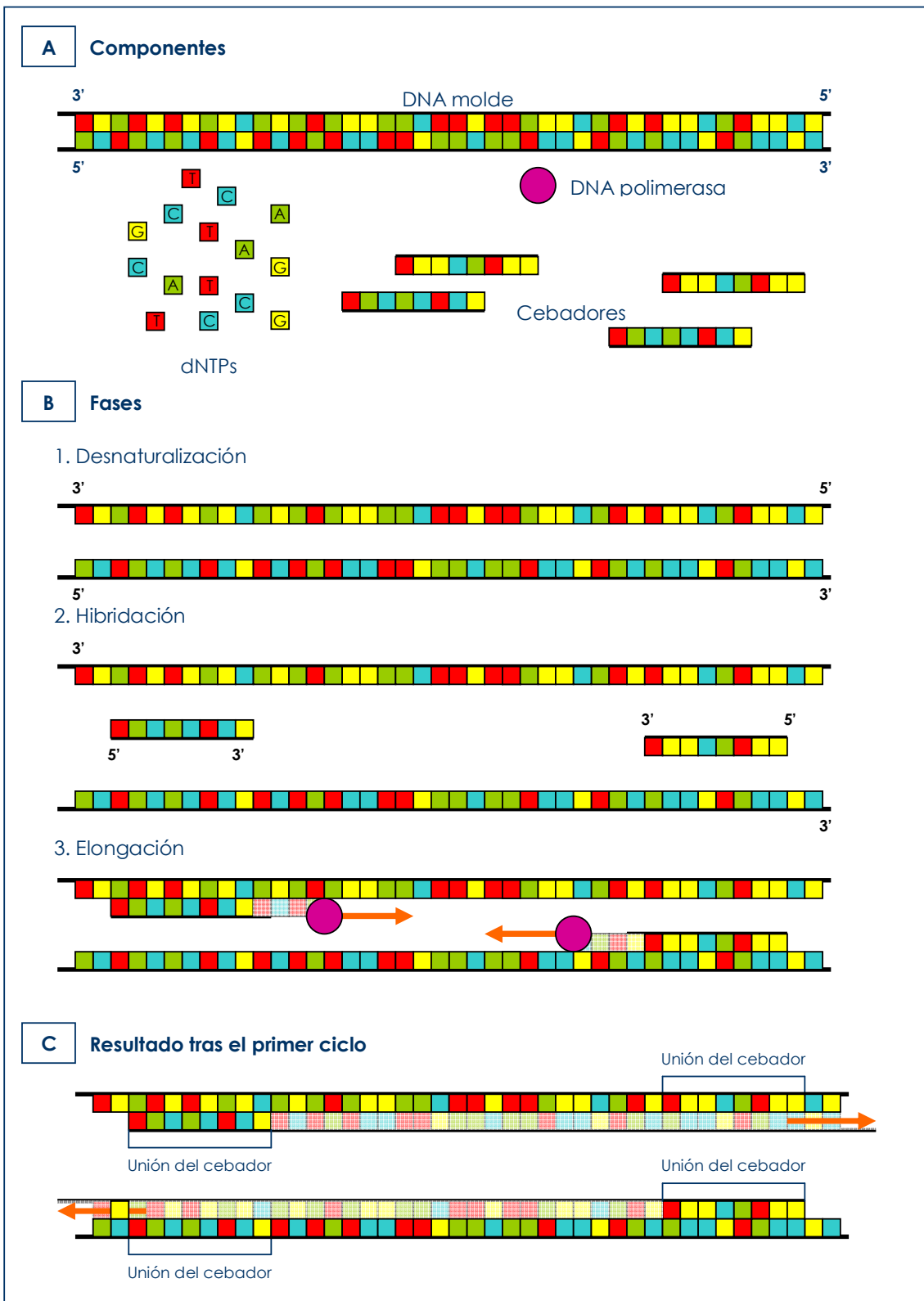


Figura 2. Representación esquemática de: A. Componentes básicos para llevar a cabo una PCR. B. Fases de la PCR. C. Resultado obtenido tras el primer ciclo de amplificación (la cadena recién formada se representa de color más claro).



Entonces, ¿cómo se limita el tamaño de los fragmentos generados? La PCR se completa repitiendo entre 25 y 35 veces las tres fases descritas previamente, es decir, realizando entre 25 y 35 ciclos. Si se analiza lo que sucede a partir del primer ciclo se comprueba que tras varios ciclos se forman fragmentos cuyo tamaño está limitado por los puntos en los que hayan hibridado los cebadores (figura 3). De hecho, transcurridos varios ciclos más, los fragmentos mayoritarios serán aquellos limitados en sus extremos por los cebadores.

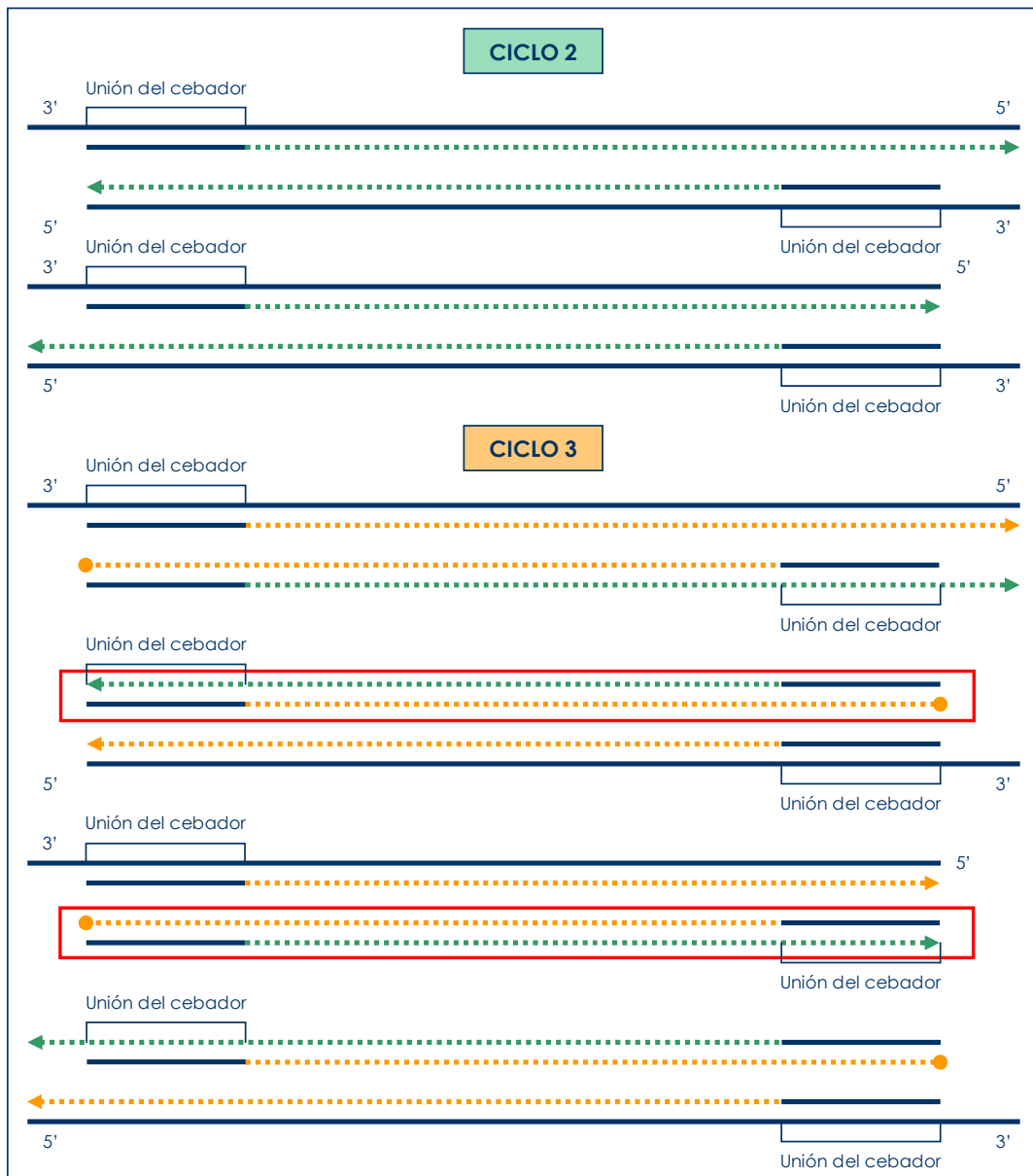


Figura 3. Representación esquemática de los productos de amplificación obtenidos en el segundo y tercer ciclo de una reacción en cadena de la polimerasa, a partir de un DNA molde inicial. En azul se representan las cadenas presentes al final del ciclo 1, en verde las creadas durante el ciclo 2 y en naranja las generadas en el ciclo 3. Se indican los extremos 3' y 5' de algunas de las originales. Enmarcadas en rojo se presentan los fragmentos para los que ambos extremos están limitados por los cebadores.

¿Cuántos fragmentos se generan durante la reacción de PCR? Si no tenemos en cuenta el hecho de que hacen falta algunos ciclos para que la mayor parte de los fragmentos estén limitados por los cebadores, podemos considerar que por cada ciclo que se completa se duplica la cantidad de fragmento a amplificar. Es decir, que al final del proceso se obtiene aproximadamente una cantidad de fragmento igual al producto de la cantidad inicial de DNA molde por  $2^n$ , siendo  $n$  el número de ciclos. Como dato para apreciar la cantidad de copias que se generan, en el ciclo 20 se ha multiplicado por más de un millón la cantidad inicial de DNA molde.

Existen disponibles en Internet gran cantidad de animaciones de la reacción de PCR que permiten visualizar de forma muy gráfica el proceso. Se proporcionan los enlaces para algunas de ellas: una sencilla [3], otra en la que se hace énfasis en la cantidad de copias que se generan [4] y otras en la que se justifica el tamaño final de las copias generadas [5].

### 4.3 Cómo preparar una PCR

Se han detallado previamente los componentes básicos que es necesario incorporar a la reacción para completar una PCR (apartado 4.1.). El equipo en el que se lleva a cabo la reacción es el termociclador (figura 4). ¿Qué otros materiales necesitamos a nivel práctico para preparar la reacción? Pues necesitaremos utilizar microtubos, placas de PCR, un juego de micropipetas y puntas para las micropipetas (figura 4), además de hielo para mantener los reactivos a baja temperatura.



Figura 4. Equipo y materiales para llevar a cabo una PCR: A. Termociclador. B. Puntas, placa de PCR, microtubos y juego de micropipetas.

Es frecuente que una PCR se prepare para obtener producto de amplificación a partir de más de una muestra, es decir, que se prepare más de una reacción. ¿Cómo se suele trabajar en este caso? La forma habitual de trabajar consiste en preparar la mezcla de reacción (en cantidad suficiente para todas las muestras) que contenga todos los componentes de la PCR, a excepción del DNA molde. Esta mezcla se distribuye en los microtubos o en la placa de PCR y a continuación se añade a cada reacción el DNA molde.



Se detalla un ejemplo de preparación de PCR; los volúmenes y concentraciones son orientativos, siendo valores frecuentemente empleados en la práctica.

Supongamos que los reactivos de la PCR se conservan a las concentraciones que se indican en la tabla 1. Supongamos también que la mezcla de reacción debe contener cada uno de los componentes a las concentraciones que se recogen en la misma tabla. ¿Cómo determinamos el volumen a añadir a la reacción de cada uno de los componentes? Se trata simplemente de saber que se debe cumplir la siguiente igualdad (ecuación 1):

$$V_{inicial} \times C_{inicial} = V_{final} \times C_{final}$$

Ecuación 1. *V* representa el volumen y *C* la concentración.

Como ejemplo, si los cebadores se conservan a una concentración (concentración inicial) de 10  $\mu\text{M}$  y los queremos a una concentración 0,4 $\mu\text{M}$  (concentración final), sabiendo que el volumen total de la reacción de 25  $\mu\text{l}$  (volumen final), podremos aplicar la ecuación 1 para determinar el volumen que es necesario tomar del tubo original (volumen inicial). Trabajando de esta forma se calculan los volúmenes a añadir de cada uno de los componentes (tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones de almacenamiento, concentraciones empleadas en la reacción y volumen a añadir de los principales componentes de una PCR considerando un volumen total de 25  $\mu\text{l}$ .

Componente	Concentración a la que se conserva	Concentración final en la reacción	Volumen a añadir ( $\mu\text{l}$ )
Tampón	10X	1X	2,5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1 mM	1
Cebador	10 $\mu\text{M}$	0,4 $\mu\text{M}$	1
dNTPS	10 mM	0,4 mM	1
Taq	5 unidades/ $\mu\text{l}$	1 unidad/25 $\mu\text{l}$	0,2

Hasta completar el volumen final de 25  $\mu\text{l}$  falta considerar la cantidad de DNA a añadir. Entre 40 y 100 ng de DNA (cuando se trata de DNA total de planta) son valores habituales. Es frecuente preparar el DNA de forma que se incorpore todo el DNA necesario añadiendo 1  $\mu\text{l}$  a la reacción. El resto hasta el volumen total se completaría con agua destilada.

En cualquier caso, como se ha dicho previamente, se prepara en primer lugar la mezcla, sin el DNA, en cantidad suficiente para todas las muestras a incluir en el análisis. Por tanto, se multiplicarían los valores obtenidos en la tabla 1 para cada componente (además del agua destilada) por el número total de muestras a analizar (incluyendo el control negativo, ver cuadro 2). Un vez preparada esta mezcla, se distribuye en microtubos o en placa de PCR: si de DNA se va a añadir 1  $\mu\text{l}$  por reacción, se distribuirán 24  $\mu\text{l}$  de mezcla por reacción. A continuación se añade el DNA a cada muestra, y el mismo volumen de agua en el control negativo. Los componentes y la mezcla de reacción se mantendrán en hielo durante el proceso, con el fin de evitar su degradación.





## Cuadro 2. El control negativo de una PCR.

¿En qué consiste el control negativo en una PCR? Se trata de una muestra en la que se incluyen todos los componentes de la reacción, excepto el DNA.

¿Qué utilidad tiene el control negativo en una PCR? Los componentes de la PCR se almacenan a  $-20^{\circ}\text{C}$  a una concentración superior a la que luego se utilizan en la reacción. Del producto almacenado se utiliza una cantidad determinada cada vez que se prepara una PCR, de manera que si un componente no se agota, el remanente se utiliza para otra reacción. En consecuencia, es posible que al tomar una alícuota del original se produzcan contaminaciones con DNA procedente de alguna muestra. También es posible que durante el proceso de preparación de la reacción, por un error de manejo, se produzca contaminación cruzada entre muestras. El control negativo se utiliza para comprobar que ninguno de los componentes de la reacción está contaminado con DNA de otra procedencia y que no se han producido errores de manejo que hayan provocado la contaminación cruzada entre muestras.

¿Se detectará la contaminación aunque haya sido producida por poco DNA? En principio, con poca cantidad de DNA molde se obtendrá producto de amplificación, ya que la PCR es muy sensible; dado que en cada ciclo se duplica la cantidad de DNA correspondiente al fragmento a amplificar, aunque exista poco molde inicial se generará la cantidad suficiente para ser visualizada.

Una vez preparados los tubos de reacción se introducen en el termociclador. Como ya sabemos, la PCR se completa gracias a la repetición de 25-35 ciclos en los que se suceden las tres fases en que se modifica la temperatura. Previamente a los ciclos de la PCR se lleva a cabo una desnaturalización inicial de alrededor de cinco minutos; además, la reacción se completa con una elongación final de aproximadamente 10 minutos (figura 5).

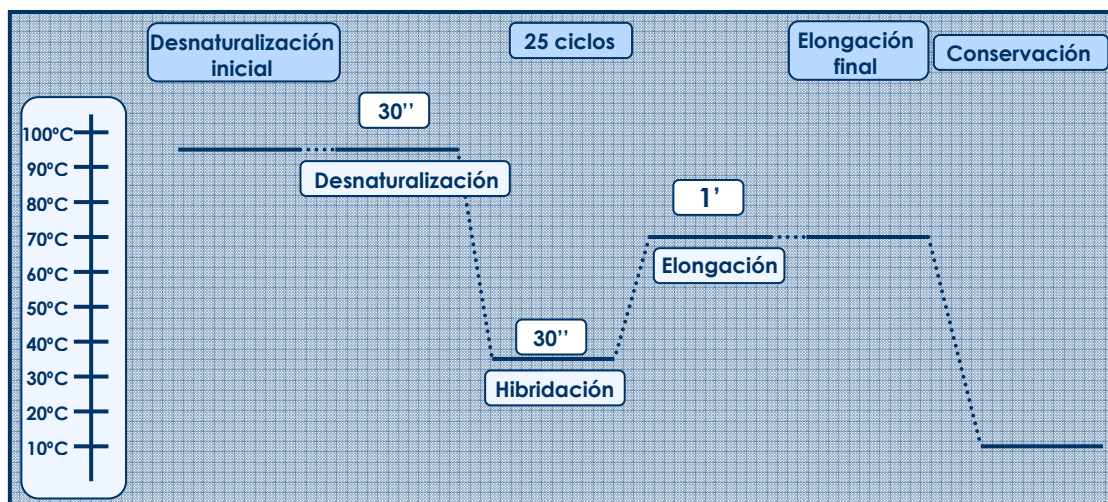


Figura 5. Perfil térmico típico de una PCR. Los tiempos de cada fase son orientativos. La temperatura de hibridación puede variar en función de la especificidad de la reacción.



## 5 Cierre

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es una técnica fundamental para la mayor parte de las aplicaciones de la biología molecular. Se ha presentado la base teórica y práctica de la PCR. Existen muchas variantes de la PCR convencional, como son la PCR en tiempo real o PCR cuantitativa [6] (que permite cuantificar la cantidad de producto amplificado) o la PCR por transcripción inversa [7] (mediante la cual se obtiene una copia de DNA complementario, DNAc, utilizando como molde ácido ribonucleico, RNA). Existe gran cantidad de información referida tanto a la PCR convencional como a sus variantes [8,9].

## 6 Bibliografía

- [1] Fermentas. Catálogo de marcadores de pesos moleculares para electroforesis de DNA: Lambda DNA markers. Disponible en: <http://www.fermentas.com/en/products/all/dna-electrophoresis/lambda-dna-markers/sm010-lambda-dna-hindiii>
- [2] Mullis, K.B. 1993. Conferencia con motivo de la recepción del Premio Nobel. Disponible en: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html)
- [3] McGraw Hill. Animación del proceso de PCR. Disponible en: <http://highered.mcgraw-hill.com/olc/dl/120078/micro15.swf>
- [4] Scanelis. Animación del proceso de PCR. Disponible en: <http://www.scanelis.com/webpages.aspx?rID=679>
- [5] The Health News. Animación del proceso de PCR. Disponible en: <http://www.thehealthnews.org/news/06/08/02/pcr.html>
- [6] Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* 11: 1026-1030.
- [7] Simpson, C.G.; Sinibaldi, R.; Brown, J.W.S. 1992. Rapid analysis of plant gene expression by a novel reverse transcriptase-PCR method. *Plant Journal* 2: 835-836.
- [8] The PCR Encyclopedia. Disponible en: <http://www.pcr-encyclopedia.com/>
- [9] McPherson, M.J.; Quirke, P.; Taylor G.R. 1991. PCR: A practical approach. Oxford University Press, Estados Unidos.