

Reacción en cadena de la polimerasa. Revisión bibliográfica

Chain reaction of Polymerase

Dr. Andrés Pedrosa Amado

Instituto Superior de Ciencias Médicas de Camagüey. Dpto. de Bioquímica.
Camagüey, Cuba.

RESUMEN

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una novedad técnica que permite la síntesis in vitro de millones de copias de un segmento específico del ADN. Su alta especificidad y sensibilidad han hecho de esta sencilla, pero ingeniosa metodología una herramienta que ha evolucionado el análisis y la manipulación del material genético. Actualmente la aplicación de artículos científicos donde se refiere la utilización de esta técnica es exponencial, por ello se hace esta revisión con el objetivo de informar al lector sobre los principios de este procedimiento, los requerimientos de laboratorio para su realización, sus posibles aplicaciones y sus ventajas. Para ello se revisaron 46 documentos. Una poderosa herramienta de investigación ha surgido, su aplicación en diferentes campos del conocimiento científico sitúan a la Reacción en Cadenas de la Polimerasa como el factor fundamental que explica el actual desarrollo alcanzado en el análisis y manipulación del material genético en animales y plantas.

DeCS: REACCIÓN EN CADENA POR POLIMERASA; LITERATURA DE REVISIÓN.

ABSTRACT

The chain reaction of polymerase is a new technique which allows the in vitro synthesis of million of copies of one specific segment of DNA. Its high specificity and sensitivity have made of this simple but ingenious methodology a tool that has improved the analysis and handling of the genetic material. At present, the emergence of scientific works has increased; they refer to the use of this technique, that's why this review is made with the objective of informing the reader about the principles of this procedure, laboratory requirements for its use, its possible applications and its advantages. For this, 46 bibliographic citations were reviewed. A powerful research tool has been created, its use in different fields of the scientific knowledge places the chain reaction of polymerase as the main factor that explains the current development reached in the analysis and handling of the genetic material in animals and plants.

DeCS: POLYMERASE CHAIN REACTION, REVIEW LITERATURE

INTRODUCCIÓN

Desde la aparición de la técnica de Southern Blot en 1975 (1) se han experimentado notables progresos en la detección de fragmentos específicos de ácidos nucleicos. La identificación y caracterización de estos fragmentos constituyen un procedimiento central en una gran cantidad de experimentos relacionados con la biología molecular (2, 3). Sin embargo; estas técnicas, utilizadas hasta el momento, carecían de la especificidad y la sensibilidad que requieren estos procesos de identificación y caracterización, haciéndose difícil la detección de copias únicas de genes presentes en una muestra o la discriminación entre un gen salvaje y uno mutante.

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Polymerase Chain Reaction), creada y desarrollada por Millis y col. de la Cetus Corporation (4), ha devenido una poderosa herramienta que cumple con los requisitos de especificidad y sensibilidad que exigen la caracterización de los ácidos nucleicos, pudiendo detectar con ella de forma fácil la presencia de estas biomoléculas en una muestra, aún cuando sus cantidades se enmarcan en el orden de los picogramos (5, 6).

La PCR es un método enzimático in vitro que permite la amplificación de una secuencia específica del ADN. Esta técnica se basa en el uso de dos oligonucleótidos que luego de reconocer la secuencia complementaria en la molécula de ADN, son alargados cíclicamente mediado por la acción de la ADN Polimerasa. Cada ciclo de

la técnica generalmente 20 ó 30 en total, implica la desnaturalización del ADN, el apareamiento de los oligonucleóticos y la síntesis del nuevo fragmento de ADN a partir del oligonucleótido, lo que resulta en un crecimiento exponencial de millones de copias del fragmento seleccionado (7). La reacción de síntesis es catalizada por una ADN Polimerasa termoestable, obtenida del *Thermus aquaticus* (8). En menos de una hora de actividades enzimáticas se generan microgramos del fragmento de ADN de interés, a partir de una copia única existente en la muestra. La especificidad de esta reacción se mantiene aún cuando en la muestra original existe una mezcla compleja de ácidos nucleicos, permitiendo así manipular en el laboratorio cantidades muy limitadas de material genético.

Esta técnica ha disminuido el tiempo de trabajo requerido para producir suficiente material de experimentación, comparado con el tiempo empleado cuando se utilizan los métodos tradicionales de amplificación biológica. En todos aquellos procedimientos donde se necesita el aislamiento y purificación del ácido nucleico, se hace más fácil el trabajo cuando aplicamos la técnica de PCR, ya que el fragmento de interés es el que prevalece en la muestra.

La existencia del Proyecto Genoma 2000 permitirá al mundo científico del nuevo siglo tener un mapa genético del hombre. Tanto en la ejecución de este proyecto como en su aplicación práctica es fundamental la técnica de PCR.

La aparición de un número cada vez mayor de artículos científicos donde se refiere la técnica de PCR motivó la realización de esta revisión con el objetivo de informar al lector sobre los principios de la misma, sus múltiples aplicaciones en diferentes campos del conocimiento científico, así como informar sobre otros aspectos que permiten comprender y aplicar este procedimiento con mayor facilidad.

ORIGEN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Este novedoso y revolucionario proceso fue ideado en 1985 por Karry B. Mullis, un investigador de la Cetus Corporation, en Emerville, California. Ese mismo año otros investigadores del grupo de Mullis perfeccionaron la técnica y la aplicaron al diagnóstico clínico de la anemia de células falciformes (9). Desde entonces la aparición de artículos que tratan sobre aplicaciones de esta metodología en diferentes áreas de la biomedicina ha sido exponencial, también la nueva tecnología ha tenido su efecto en bola de nieve sobre el avance del conocimiento científico de otras disciplinas como la criminalística y la paleontología, así como en el estudio de la evolución y de las plantas. (10-15).

Los primeros ensayos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa se realizaron en forma manual, utilizando para la amplificación al fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de la bacteria *E. coli*, los cambios de temperatura que exigen cada paso en los diferentes ciclos se lograban utilizando varios baños de agua a la

temperatura deseada. Luego de cada paso de desnaturalización era necesario añadir nueva cantidad de enzimas que reemplazara a la incluida inicialmente, ya que la alta temperatura requerida en este paso la inactivaba, con la nueva adición de enzimas. También se incluían en la muestra otras sustancias que acompañaban a la preparación enzimática (Glicerol) y que al final terminaban inhibiendo la enzima lo que limitaba la eficiencia catalítica de la ADN polimerasa I. (4, 16, 17). Todo esto hacía el proceso costoso, muy laborioso y complejo además de ser poco eficiente.

INTRODUCCIÓN DE LA Taq POLIMERASA

Los problemas que se presentan con el uso del fragemento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, se superaron cuando aparece la ADN polimerasa termoestable Taq. Esta enzima fue aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*, que habita en aguas termales y que tienen una temperatura óptima alrededor de los 90°C. (16, 18). Esta enzima al igual que la ADN polimerasa de *E. coli*, tiene tres centros activos en su cadena polipeptídica única, cada uno claramente separado del otro. Existe un centro con actividad ADN Polimerasa 5' a 3', otro con actividad exonucleasa (correctora de prueba) 3' a 5' y que desempeña una importante función en la polimerización al eliminar bases no complementarias.

Por último muestra actividad exonucleasa 5' a 3' que completa la actividad 3' a 5' exonucleasa, pero que es totalmente diferente a ésta y se produce por ruptura de un enlace fosfodiéster terminal o en un enlace alejado del extremo 5' que se encuentre o no en una zona de doble hélices. Su índice de error de incorporación es de 1 en 4 x 10 bases y amplifica segmentos de hasta 3000 pb (16, 18-21).

PROTOCOLO DE REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

No podemos referir un protocolo único que permita el montaje de esta técnica en el laboratorio, ya que diferentes compañías anuncian en sus revistas especializadas estuches comerciales de aplicación en el diagnóstico o la investigación, donde se describe la técnica con especificaciones de tiempo, temperatura y número de ciclos. Como puede verse todos los parámetros cambian según el fabricante, pero de forma general todos los protocolos descritos cumplen con un procedimiento de tres pasos en cada ciclo, estos son: Desnaturalización, Alineamiento y extensión.

A continuación se describe en qué consiste cada uno de ellos.

Desnaturalización: Aquí se separan o desnaturalizan las dos cadenas complementarias del ADN blanco, esto se logra aumentando la temperatura de la reacción 92-98°C durante un tiempo que va de 30 a 90 segundos.

Alineamiento: Consiste en el apareamiento específico entre los fragmentos iniciadores (oligonucleótidos) y las cadenas simples del ADN desnaturalizado, para

ello se disminuye la temperatura de la reacción hasta 50 ó 60°C. Este paso tiene una duración de 30 a 60 segundos.

Extensión: En este paso la ADN polimerasa extiende la longitud de los fragmentos iniciadores que se encuentran unidos al ADN blanco, originando nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas del ADN desnaturalizado presente al inicio de la reacción debe aumentarse hasta 70 ó 74°C. Esta etapa tiene una duración promedio de 30 a 90 segundos. (21, 22)

El próximo ciclo se inicia en el mismo tubo, con los mismos componentes de la mezcla de reacción que se han puesto en cantidad suficiente desde el primer ciclo, solo que ahora existe el doble de cadenas sencillas de ADN blanco a copiar. (ANEXO II).

REQUERIMIENTOS PARA EL MONTAJE DE LA TÉCNICA.

Si se desea poner en marcha esta tecnología, el laboratorio debe contar con los equipos que se relacionan en el ANEXO III, donde no solo se incluyen los equipos y materiales necesarios para realizar la PCR, sino también los necesarios para el análisis del producto amplificado. En el ANEXO IV, se relacionan los reactivos a utilizar, los que deben ser de la mejor calidad.

Generalmente estos equipos, materiales y reactivos que se citan, se encuentran disponibles en la mayoría de los laboratorios de biología molecular. Algunos son específicos para la PCR, como lo es el termociclador (23). Este equipo se introduce luego que aparece la ADN polimerasa Taq; que es un equipo automatizado, programable donde se ajusta la temperatura y el tiempo que exige el protocolo para cada ciclo. Esto permite realizar el proceso en un solo tubo al que no hay que adicionar ningún reactivo durante el tiempo que dure la PCR. Su introducción ha significado la técnica que en sus inicios requería de la utilización de diferentes baños de agua a diferentes temperaturas, se ha acortado el tiempo a utilizar en la misma y se logra una alta especificidad.

ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE LA PCR

La PCR es altamente específica. Solo las secuencias de ADN que se amplifican son aquellas que se encuentran entre los dos fragmentos iniciadores que han hibridizado. Un gen presente en una muestra donde el mismo constituya una parte de millón del total del material genético que se analiza, es accesible por PCR. La PCR es exquisitamente sensitiva. Una única molécula de ADN en una muestra puede ser detectada y amplificada. (4, 5, 6, 7, 1)

APLICACIONES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

La secuenciación y clonaje del ADN han sido grandemente simplificados con la introducción de esta técnica, lo que a su vez ha favorecido la tecnología del ADN recombinante. (24-31)

En medicina su valor diagnóstico es amplio (32-36).

La detección de bacterias y virus es posible si se utilizan los segmentos iniciadores necesarios. Mediante PCR se puede revelar la presencia del HIV-1 en individuos que no muestran una respuesta inmunológica eficiente ante este agente (37) y que pueden pasar como no infectados cuando se utilizan las técnicas de inmunodiagnóstico rutinarias. La búsqueda del Mycobacterium tuberculosis en tejidos es lenta y laboriosa, con la PCR la presencia de tan solo 10 bacilos por millón de células humanas, puede ser detectada.

El PCR constituye un método promisorio en el diagnóstico precoz de determinados tipos de cáncer (38). Esta técnica permite determinar la mutación de determinado gen controlador del crecimiento

celular, (39) por ejemplo los RAS, genes involucrados en la transformación cancerosa. Monitorear la quimioterapia del cáncer es otra posibilidad que nos da la técnica, resultando ideal detener el tratamiento cuando las células cancerosas han desaparecido o reiniciarlo cuando aparecen las recidivas. (40)

En el diagnóstico prenatal, la aparición de nuevos métodos diagnósticos que utilizan la PCR permiten identificar individuos enfermos. (41, 42) El transplante de órganos se facilita cuando por la PCR se hace un estudio del HLA (Human Leucocit Antigen) del donante y del receptor. (43)

En medicina legal su aplicación es amplia. El repertorio genético de un individuo es altamente distintivo. La amplificación de múltiples genes puede esclarecer el grado de parentesco entre dos individuos o su procedencia racial.

El análisis de la sangre o semen de un individuo por PCR puede ser valioso en caso de asaltos y violaciones. Los restos celulares presentes en una colilla o un cabello presente en la escena del crimen, pueden donar suficiente material genético como para llegar al autor. (44)

La técnica ha tenido gran impacto en la reconstrucción del material genético fósil (45). Se ha podido amplificar material genético proveniente de momias con más de 2 400 años, así como otros restos fósiles de hasta 7 500 años. El más antiguo de los ADN analizados por PCR es el correspondiente a una termita fósil, embalsamada en ámbar que tiene una edad entre 25 y 30 millones de años (46). El estudio de plantas fósiles también es posible con esta técnica.

CONCLUSIONES

La Reacción en Cadenas de la Polimerasa, como nueva tecnología, ha revolucionado el avance del conocimiento científico en los últimos años. Su efecto "bola de nieve" se hace notar en diferentes áreas de la biología, la medicina, la criminalística, la

paleontología, la botánica, el estudio de la evolución, entre otras. En todas estas, la manipulación del material genético ha permitido notables avances en la obtención de nuevos conocimientos y el surgimiento de métodos investigativos y de diagnóstico sin precedentes por su especificidad y sensibilidad que han permitido al hombre conocer y explicar de forma más precisa el funcionamiento celular y por tanto conocer y controlar las causas de los trastornos que a este nivel se experimentan.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 1975; 98:503-517.
2. Maxam AM and Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74:560-564.
3. Granner DK. Recombinant DNA technology. In Harper's *Biochemistry*. 23 edit. Appleton & Lange. Norwalk Connecticut; 1993:458-459.
4. Mullis KB and Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 1987; 155:355-350.
5. Erlich H. Recent advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science* 1991; 252:1643-1650.
6. Harris S. Optimisation of the polymerase chain reaction. *Br J Biomed Sci.* 1997; 54(3): 166-173.
7. Arnheim N and Erlich H. Polymerase Chain Reaction strategy. *Ann. Rev. Biochem.* 1992; 61:131-156.
8. Saiki R. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988; 239:487-491.
9. Saiki RK. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequence and restriction site analysis for sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350-1354.
10. Eisenstein BI. The Polymerase Chain Reaction. A new method for using molecular genetics for medical diagnosis. *New Engl Med* 1990; 322:178-183.
11. Lie YS. Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Curr Opin Biotechnol.* 1998; 9 (1): 43-48.
12. Meldgaard M. Detection and quantitative characterization of artificial extra peaks following polymerase chain reaction amplification of 14 tandem repeat systems used in forensic investigations. *Electrophoresis.* 1997; 18 (11):1928-35.
13. Gill P. Development of guidelines to designate alleles using an STR multiplex system. *Forensic Sci Int.* 1998; 89(3):1855-197.
14. Paabo S. Ancient DNA *Sci. Amer.* 1993; 269 (5): 86-92.

15. Blanco-Urgoiti B. A strain-type clustering of potato virus Y based on the genetic distance between isolates 2425-2442. Calculated by RFLP analysis of the amplified coat protein gene. *Arch Virology*. 1996; 141 (12):2425-2442.
16. Eckert K. and Kunkel T. DNA polymerase fidelity and the Polymerase Chain Reaction. *PCR: Methods and application* 1991; 1 (1):17-24.
17. Nagai M. Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR. *Biochem Mol Biol Int*. 1998; 44 (1):157-163.
18. Kebelemann-Betzing C. Advances of a new Taq DNA polymerase in multiplex PCR and time-release PCR. *Biotechniques*. 1998; 24 (1):154-158.
19. Leelayuwat C. Srisuk T, Paechaiyaphum R, Limpaboon T, Romphruk A, Romphruk A. Production and evaluation of Taq DNA polymerase. *J Med Assoc Thai*. 1997; 80(1): 129-137.
20. Yu D, Mukai M, Liu Q, Steinman CR. Specific inhibition of PCR by non-extendable oligonucleotides using a 5' to 3' exonuclease-deficient DNA polymerase. *Biotechniques*. 1997; 23(4):714-716.
21. Strayer LB. *Biochemistry*. 4th ed. W.H. Freeman and Company. 1995.
22. Yamashita M. Study of the PCR conditions on a slide for in situ PCR. *Rinsho Byori*. 1998; 46 (1):83-87.
23. Haun RS, Serventi IM, Moss J. Rapid, reliable ligation independent cloning of PCR products. *Biotechniques*. 1992; 13(14):515-518.
24. Ghebremedhin E. Improved method facilitates reliable APOE genotyping of genomic DNA extracted from formaldehyde-fixed pathology specimens. *Neurosci Methods*. 1998; 79(2):229-231.
25. Lyaruu DM. Derived protein and cDNA sequences of hamster amelogenin. *Eur J. Oral Sci*. 1998; 106(1): 299-307.
26. Schoming E. Molecular cloning and characterization of two novel transport proteins from rat kidney. *FEBS Lett*. 1998; 425(1): 79-86.
27. Kunita R. Molecular cloning of acid alpha-glucosidase cDNA of Japanese quail (*Coturnix japonica*) and the lack of its mRNA in acid maltase deficient quails. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1362(2-3): 269-278.
28. Judo MSB. Stimulation and suppression of PCR-mediated recombination. *Nucleic Acids Res*. 1998; 26(7): 1819-1825.
29. Ianniciello G. Expression in *Escherichia coli* of the elongation factor β gene and its nucleotide T160C mutant from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Protein Expr Purif*. 1998; 12(1):1-6.
30. Bielefeldt-Ohmann H. High-efficiency T-vector cloning of PCR products by forced A tagging and post-ligation restriction enzyme digestion. *Biotechniques*. 1997; 23 (5):822-824.

31. Van den Boom D, Ruppert A, Jurinke C, Koster H. Combined amplification and sequencing in a single reaction using two DNA polymerases with differential incorporation dideoxynucleotides. *J Biochem Biophys Methods* 1997; 35 (2):69-79.
32. Chadwick N. A sensitive and robust method for measles RNA detection. *J Virol Methods* 1998; (1):59-70.
33. Gunther S. Amplification of full-length hepatitis B virus genomes from samples from patients with low levels of viremia: frequency and functional consequences of PCR-introduced mutations. *J Clin Microbiol.* 1998; 36 (2):531-538
34. Figueiredo LT. Detection and identification of dengue virus isolates from Brazil by a simplified reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. *Rev Inst Med Trop Sao paulo.* 1997; 39 (2): 79-83.
35. Moolman-Smook JC. Identification of a new missense mutation in MyBP-C associated with hypertrophic cardiomyopathy. *J Med Genet.* 1998; 35 (3):253-254.
36. Meggouh F. The first de novo mutation of the connexin 32 gene associated with X linked Charcot-Marie Tooth disease. *J Med Genet.* 1998; 35 (3):251-152.
37. Palefsky JM, High incidence of anal high-grade squamous intra-epithelial lesions among HIV-positive and HIV-negative homosexual and bisexual men. *AIDS.* 1998 12 (5): 495-503.
38. Oishi T. Alteration of telomerase activity associated with development and extension of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol.* 1998; 91(4):568-571.
39. Mahima Y. Multiple endocrine neoplasia 2B with glaucoma associated with codon 918 mutation of the RET protooncogene. *Acta Ophthalmol Scand.* 1998 Feb; 76 (1): 114-116.
40. Berns EM, Predictive value of SRC-1 for tamoxifen response of recurrent breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1998; 48 (1):87-92.
41. Guicheney P. PCR based mutation screening of the laminin alpha2 chain gene (LAMA2): application to prenatal diagnosis and search for founder effects in congenital muscular dystrophy. *J. Med Genet.* 1998; 35 (3): 211-217.
42. Geifman-Holtzman O. Prenatal diagnosis of the fetal Rbc genotype from peripheral maternal blood. *Obstet Gynecol.* 1998; 91 (4):506-510.
43. Luedeck H, Fluorotyping of HLA-C: differential detection of amplicons by sequence-specific priming and fluorogenic probing. *Tissue Antigens.* 1997; 50 (6):627-638
44. Higuchi, R DNA typing from single hair. *Nature* 1988; 332:543-546.
45. Lawlor DA Ancient HLA genes from 7 500 years-old archaeological remains. *Nature.* 1991; 349:785-788.
46. De Sall R. RNA sequences from a fossil termite in oligomiocene amber and their phylogenetic implications. *Science* 1992; 257:1933-1936.

Dr. Andrés Pedrosa Amado. Lic en Bioquímica Clínica. Profesor Asistente del Dpto de Bioquímica. ISCM-C. Instituto Superior de Ciencias Médicas de Camagüey. Dpto. de Bioquímica. Camagüey, Cuba.