

# TP Diseño de cebadores para PCR *in silico*

## Introducción

La reacción en cadena de la polimerasa o **PCR** (por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*) es una técnica que permite la amplificación *in vitro* de un fragmento de ADN. Es decir, a partir de unas pocas moléculas de ADN molde (pueden ser 10 moléculas o en algunos casos incluso menos), pueden obtenerse millones de copias de un fragmento de ADN específico cuya secuencia está presente en las originales. La especificidad del ensayo está dada por el largo y la secuencia del par de oligonucleótidos que se emplea como **cebadores** o **primers** que flanquean al producto de tamaño definido, también conocido como **amplicón**. Además, esta técnica lleva muy pocas horas de trabajo, por lo que resulta ideal para ensayos diagnósticos. Estas características han promovido el desarrollo de una gran variedad de adaptaciones y variantes.

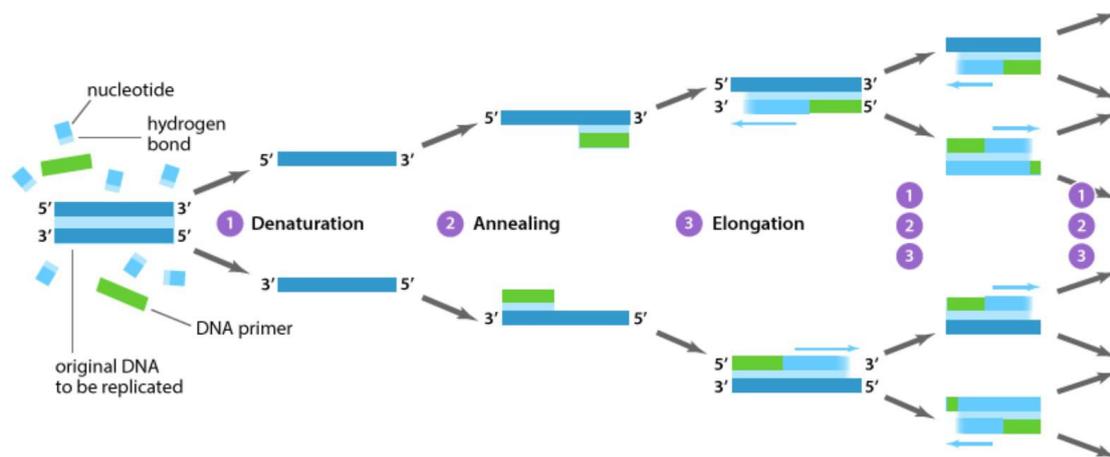
Para llevar a cabo una reacción de PCR se requiere de los siguientes componentes en la mezcla de reacción: **a)** ADN molde; **b)** dos oligonucleótidos de hebra simple que funcionen como cebadores al hibridar en los extremos, sobre hebras opuestas de la secuencia blanco que se desea amplificar y con los oxhidrilos 3' mirando uno hacia el otro; **c)** una enzima ADN polimerasa termoestable (Taq, Pfu o Pfx polimerasas); **d)** mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs): dATP, cCTP, dGTP y dTTP; **e)** buffer de reacción; y, generalmente, **f)** una sal de magnesio cuya concentración final suele tener que optimizarse. Para llevar adelante la amplificación del amplicón se emplea un equipo denominado termociclador que permite controlar los cambios de temperatura de las muestras durante cada ciclo de reacción en forma rápida y reproducible. Cada ciclo consiste en tres etapas:

**1) Desnaturalización:** Durante esta etapa la mezcla de reacción es calentada a temperaturas entre los 90 y 100 °C (generalmente a 94 °C). A esta temperatura se produce la desnaturalización del ADN en menos de un minuto.

**2) Hibridación o *annealing*:** Después de separar las hebras, la mezcla de reacción es enfriada rápidamente a temperaturas que usualmente van desde los 40 a 70 °C, según el largo y la secuencia de los cebadores. La reacción se mantiene a esa temperatura durante tiempos menores a 30 segundos. En estas condiciones los primers se hibridan con su secuencia complementaria en el ADN molde desnaturalizado.

**3) Extensión o *polimerización*:** En esta última etapa del ciclo, la muestra es calentada nuevamente a una temperatura que generalmente varía entre los 60 y 75 °C durante tiempos que usualmente van desde 10 segundos a varios minutos. El tiempo de cada ensayo se define en base a la actividad de la DNA polimerasa empleada y al tamaño del amplicón. En estas condiciones la enzima ADN polimerasa sintetizará una nueva hebra de ADN agregando nucleótidos desde el extremo 3' libre del primer.

En los ensayos clásicos de PCR, este ciclo de tres etapas se repite entre 20-40 veces logrando de esta manera que el proceso de amplificación guiado por los primers se repita ciclo a ciclo de forma de incrementar de manera exponencial el producto amplicón delimitado por los primers (Figura 1). El producto final de esta reacción es entonces un segmento de ADN bicatenario cuyos extremos están definidos por el extremo 5' de los cebadores o primers, por lo que tienen un tamaño definido. Las reacciones de PCR se analizan corriendo la mezcla de reacción luego del último ciclo en un gel de agarosa para evaluar la presencia o no del amplicón del tamaño buscado. Así, la combinación de dos primers de secuencia específica (>15 bases) y la obtención de un producto del tamaño esperado resulta en la detección de la secuencia blanco con un grado de certeza muy alto.



**Figura 1. Esquema de ciclos de reacción de PCR.** 1) Desnaturalización de molde de ADN. 2) Hibridación de cebadores. 3) Elongación de cebadores.

### Primers para PCR

Los primers (o cebadores) son oligonucleótidos de simple hebra de ADN que determinan la especificidad de la secuencia a amplificarse. Al diseñar primers para PCR se recomienda tener en consideración los siguientes criterios:

- Deben ser oligonucleótidos mayores de 18 nucleótidos
- Es deseable que tengan un contenido de G/C (40 a 60%) o ligeramente superior, sobre todo hacia el extremo 3', pero evitando largas repeticiones de G (>4).
- Deben tener una temperatura de desnaturalización (o *melting*) de entre 50 y 70 °C, y no debe diferir entre ambos en más de 5 °C
- Deben ser específicos de un solo sitio, evitando regiones con secuencias altamente repetitivas.
- No deben formar estructuras secundarias internas (*hairpin*) o dímeros entre ellos.

### Aplicaciones de la PCR

La PCR es una técnica increíblemente versátil con innumerables aplicaciones prácticas. Una vez que se completaron los ciclos de PCR, las moléculas de ADN generadas pueden ser utilizadas para clonar, secuenciar o mapear mutaciones, entre otras posibilidades. Además, al ser una técnica altamente específica y sensible, la PCR permite evidenciar la presencia de un determinado fragmento de ADN en muestras complejas. Esta potencialidad ha convertido a la PCR (y sus múltiples variantes) en una técnica de rutina en todos los laboratorios de biología molecular y diagnóstico. Así, por ejemplo, las técnicas de PCR se emplean en estudios de filiación, identificación de víctimas y criminales, diagnóstico diferencial de enfermedades infecciosas y su monitoreo, consejo genético para parejas con dificultades para concebir, etc. En investigación y biotecnología son usadas en la generación de variantes de proteínas y modelos de estudio, para cuantificar la expresión de genes, y para desarrollar especies transgénicas que mejoren la producción agro-ganadera o biosimilares para la industria farmacéutica.

### Videos sugeridos

Los siguientes videos resumen las diferentes etapas que ocurren en una mezcla de reacción de PCR:

- <https://youtu.be/2KoLnIwoZKU>
- <https://youtu.be/iQsu3Kz9NYo>

## Diseño de primers

El corazón de lo que uno tiene que planificar en una PCR es el diseño de los primers. Por lo tanto, vamos a hacer un pequeño ejercicio de ello. Volvamos a la secuencia problema que hemos visto en el TP de Bioinformática e intentemos diseñar primers con distintos objetivos.

- 1) Necesitamos tener un fragmento que nos permita decir si en una colección de variedades este gen está presente.
- 2) Necesitamos obtener toda la secuencia codificante para clonarla en un plásmido que nos permita, mediante ingeniería genética, introducir este gen en una variedad sensible a enfermedades y transformarla en resistente.
- 3) Queremos comparar la evolución de variedades ancestrales de maíz obtenidas de México y Perú con el fin de responder a la pregunta de si la domesticación de este cultivo ocurrió una sola vez y luego se diseminó a ambas regiones, o si las culturas mesoamericana y andina realizaron la domesticación por separado en forma independiente una de otra.

Para ambos casos: ¿Qué parte de la secuencia elegirías? ¿Toda la secuencia? ¿Parte de ella? ¿Una parte muy conservada por homología con otras especies? ¿Una parte poco conservada? ¿Qué resultados esperarías en cada uno de estos casos?

Respondé estas preguntas, y en el caso que necesites hacer comparaciones de secuencias, utilizá la herramienta BLAST, estudiada previamente. A continuación, cuando hayas elegido la secuencia que quieras amplificar, andá al programa Primer3Plus <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> e introducí tu secuencia en la ventana principal.

The screenshot shows the Primer3Plus web interface. The browser address bar displays the URL: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>. The page title is "Primer3Plus pick primers from a DNA sequence". There are navigation links for "Primer3Manager", "Help", "About", and "Source Code". The "Task" dropdown menu is set to "Detection". Below the task, there are tabs for "Main", "General Settings", "Advanced Settings", "Internal Oligo", "Penalty Weights", and "Sequence Quality". The "Main" tab is active, showing a "Sequence Id" field, a "Paste source sequence below" text area, and an "Upload File" button. Below the text area, there are "Mark selected region" buttons and a "Save Sequence" button. At the bottom, there are input fields for "Excluded Regions", "Targets", and "Included Region". Checkboxes at the bottom allow selecting "Pick left primer or use left primer below", "Pick hybridization probe (internal oligo) or use oligo below", and "Pick right primer or use right primer below (5' to 3' on opposite strand)".

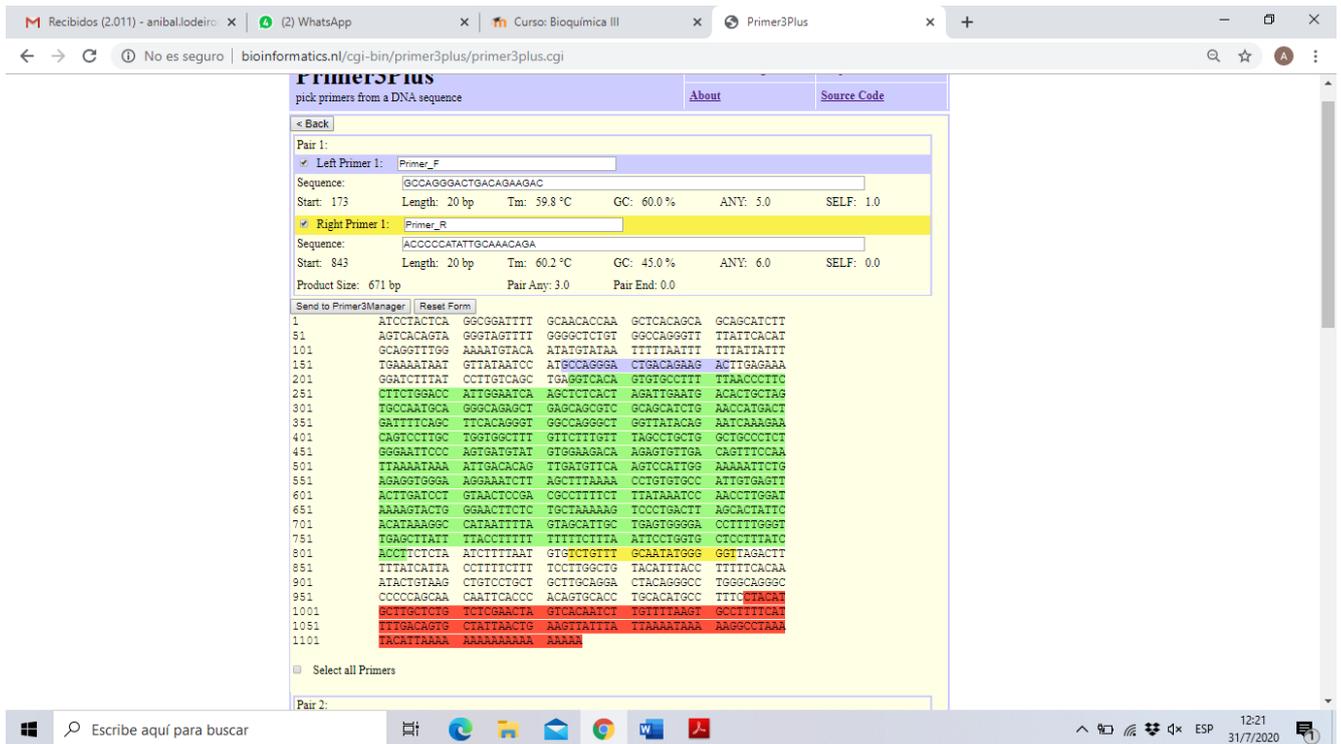
Una vez que hayas introducido tu secuencia, podés seleccionar en las opciones de abajo las zonas que quieras excluir ("Excluded Regions"), zonas que quieras obtener en el amplicón ("Targets") y/o zonas que quieras incluir ("Included Region"), las cuales pueden o no coincidir enteramente con el "target". Para ello, seleccioná la zona

que te interese y luego clickeá en los símbolos <>, [] o {} que aparecen al pie de la ventana. Luego, si no querés los seteos que el programa te da por default, podés ir a la pestaña “General Settings” o “Advanced Settings” en la parte superior. Allí podés elegir propiedades que te interesen en tus primers. Por ejemplo, el rango de tamaño de los productos de PCR que deseás, el cual se encuentra en la ventana superior “Product Size Ranges”. El programa va a elegir el primer rango, luego el segundo y así sucesivamente. Por ejemplo, en el default que se muestra en la pantalla, el programa va a dar prioridad a primers que amplifiquen fragmentos de 150-250 pares de bases (pb), si borrás esa opción y dejás de 301-400 en adelante, va a dar prioridad a este tamaño de amplicón, y así sucesivamente. Del mismo modo, podés elegir el tamaño de los primers (“Primer Size”), la Tm, el contenido de GC, etc. Entrando en los links de cada opción vas a la ayuda donde te explica qué es cada cosa.

Una vez que hayas introducido tu secuencia y elegido los seteos para los primers, apretá el botón verde “Pick Primers” arriba a la derecha, y ahí te va a dar los mejores primers que haya podido encontrar en una pantalla como la de la página siguiente (la secuencia que se muestra **NO ES** la que tenemos que usar).

Se eligió una región “target”, que el programa te señala en verde, y una región excluida, que te señala en rojo. El tamaño del amplicón se eligió en el siguiente rango: 401-500 501-600 601-700 701-850 851-1000 y el resto se dejó como estaba por default. En la captura de pantalla vas a ver que el primer directo se muestra en celeste y el reverso se muestra en amarillo. Compará las secuencias coloreadas con las que da en la parte de arriba, donde dice “Left Primer 1” y “Right Primer 1” y fijate cuál es igual en los dos casos y cuál difiere. ¿Por qué una de las dos secuencias de los primers es igual en las dos ventanas mientras que otra es diferente?

A continuación, mirá la parte superior de la pantalla, donde te da las características de los primers elegidos: nucleótido donde comienza (siendo el Nro. 1 el primero de la secuencia que vos introdujiste) (“Start”), el tamaño (“Length”), la Tm, el contenido de GC y unos parámetros que indican si hay regiones de complementariedad entre los primers y cuántos nucleótidos intervendrían (“ANY”) y si el primer tiene autocomplementariedad (“SELF”). En este caso, ambos valores son aceptables. Te recomendamos leer la ayuda del programa (“Help” en la parte superior derecha) para conocer más acerca del diseño de los primers.



Cuando hagas el ejercicio, también mirá más abajo a continuación de la parte de pantalla que mostramos, donde están los juegos de primers alternativos que el programa encontró.

## Condiciones de la reacción de PCR

El ciclado de cada PCR depende del tamaño de los productos de amplificación (para calcular el tiempo de polimerización, para la Taq polimerasa se considera una velocidad de 1000 nucleótidos cada 60 segundos) como así de las temperaturas de melting de los primers (para calcular la temperatura de hibridación de los primers, annealing). Utilizando una herramienta bioinformática se simulará una reacción de PCR en las siguientes condiciones:

Reactivo	Volumen (µL)	Condición de uso
dNTPs (2,5 mM cada uno)	2 (0,5 cada dNTP)	0,25 mM cada uno
Primer 1 (10 µM)	1	0,5 µM
Primer 2 (10 µM)	1	0,5 µM
ADN molde (100 ng/µL)	0,5	50 ng
Taq polimerasa (5 U/µL)	0,2	1 U
Buffer 10X	2	
Agua	13,3	
<b>Volumen final</b>	<b>20</b>	

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclado (x n veces)
Desnaturalización inicial	94°C	5 min	
Desnaturalización	94°C	30 s	
Annealing (hibridación)	57°C	30 s	
Polimerización	72°C	60s	
Polimerización final	72°C	5 min	

Para familiarizarte con la práctica de esta técnica en la mesada, podés recorrer la simulación disponible en el este link: <http://www.bch.cuhk.edu.hk/vlab/hd/vl.html>.<sup>1</sup> Puede ayudarte a reforzar los fundamentos de la técnica.

Utilizando el software “Virtual PCR simulator” (<http://virtual-pcr.ico2s.org/pcr/>) realizá las siguientes actividades:

a) Completá la siguiente tabla y graficá la concentración de ADN en función del número de ciclos, ¿Qué conclusiones podés sacar?:

Ciclo	Rendimiento ( <i>yield</i> , ng/μL)
5	
10	
15	
20	
25	
30	
35	
40	
45	
50	

b) Manteniendo el número de ciclos en 30, ¿Qué ocurre si bajás el tiempo de elongación a 30 segundos? ¿Y si lo bajás a 10 segundos?

c) Volviendo a la configuración original del termociclador, ¿qué ocurre si aumentás la temperatura de *annealing* a 70 °C?

d) ¿Qué ocurre si aumentás la temperatura de elongación a 92 °C? ¿Y si la bajás a 37 °C?

e) ¿Qué otras variables del experimento es necesario estandarizar?

---

<sup>1</sup> En el programa solo podás programar la desnaturalización, *annealing* y polimerización.