

BIOLOGIA MOLECULAR EN NEFROLOGIA

Análisis del DNA. II: Clonar, secuenciar y PCR

J. T. Avila, A. M. de Vera, C. Hernández y P. Martín Vasallo

Laboratorio de Biología del Desarrollo. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de La Laguna. Tenerife.

Clonar

Un clon se define como un grupo de células o macromoléculas todas idénticas a una célula o macromolécula original ancestral. El clonaje o clonación es el proceso mediante el cual obtenemos un clon. En este trabajo revisamos las técnicas de obtención y secuenciación de clones de DNA y veremos cómo, una vez conocida la secuencia, podemos obtener in vitro un gran número de copias totales o parciales de un clon mediante la PCR, reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction) y algunas aplicaciones médicas de esta técnica.

En la actualidad, la manipulación del DNA se basa en una serie de métodos rutinarios que permiten aislar e identificar el DNA que corresponde a un gen en particular. Para llevar a cabo su estudio y caracterización es necesario disponer de cantidades de este material. El clonado de fragmentos de DNA permite tener cantidades indefinidas de éste a partir de una sola molécula. La clonación es un paso previo necesario en la mayoría de los procesos en biología molecular. Una vez un segmento de DNA ha sido clonado, su secuencia nos revela si codifica una proteína o si, por ejemplo, posee lugares a los que se puedan unir proteínas reguladoras. Además, la tecnología empleada en el clonaje nos permite la construcción de nuevas moléculas de DNA, mediante la unión de secuencias de distinta procedencia. Al producto así obtenido se le conoce como DNA recombinado, y a la técnica, ingeniería genética.

La posibilidad de clonar se debe a la capacidad que poseen plásmidos y fagos de seguir su desarrollo normal después de que secuencias adicionales de DNA hayan sido incorporadas en su material genético. Un plásmido es un DNA circular extracromosómico y autorreplicante que existe en las bacterias; un fago o bacteriófago es un virus bacteriano. Ambos tienen la capacidad de replicarse miles de veces utilizando para ello el material que posee la bacteria para sus propios procesos. La inserción de secuencias foráneas genera un plásmido o fago quimérico o híbrido que se replica en bacterias como si fuera el plásmido o fago original. Tanto a los plásmidos como a los fagos que se utilizan para transportar DNA foráneo como

parte de su genoma se les denomina vectores. Las copias del original y del fragmento foráneo pueden extraerse de la bacteria hospedadora, obteniéndose un gran número de copias de material genético que contiene también replicado el fragmento foráneo. La cantidad de DNA obtenido depende del volumen de cultivo de la bacteria, de unos mililitros de cultivo obtenemos microgramos de DNA, y de un litro, por ejemplo, unos pocos miligramos.

Clonado de una secuencia de DNA en un vector

Los vectores de clonaje poseen un lugar en el cual el DNA foráneo se puede insertar sin interrumpir ninguna función esencial del vector; es el denominado sitio de clonaje múltiple. El genoma de un plásmido es circular; así pues, el corte con una enzima de restricción dará lugar a una molécula lineal. Los dos extremos se pueden unir con el DNA lineal foráneo, obteniéndose así un plásmido quimérico circular. La limitación del DNA foráneo es su longitud, a que las moléculas de DNA largas son muy susceptibles de romperse con la manipulación. El plásmido quimérico puede perpetuarse indefinidamente en una bacteria.

Los plásmidos contienen genes que le dan resistencia específica a antibióticos. El procedimiento habitual consiste en la utilización de un plásmido que contenga dos genes que le confieren resistencia frente a dos antibióticos y que uno de ellos posea un lugar de restricción. Al ser insertado el DNA foráneo, el gen queda interrumpido y la resistencia frente al antibiótico anulada. Uno de los genes se utiliza para saber si el plásmido lleva el inserto y el otro para seleccionar la bacteria que contiene el plásmido mediante el crecimiento de ésta en un medio que contenga el antibiótico contra el que se le supone presenta resistencia conferida por el plásmido que hospeda¹.

Se han construido plásmidos a partir de los naturales, produciéndoles cambios para mejorarlos. Estas manipulaciones han introducido cambios en el sistema de control de la replicación o de genes que confieren resistencia a un antibiótico en particular. Uno de los plásmidos más utilizados es el pBR322 (plásmido Bolívar y Rodríguez 322), que deriva de alteraciones sucesivas de un plásmido original anterior y que contiene lugares de restricción útiles para introducir insertos, así como genes que confieren a su bacteria portadora resistencia a tetraciclina y ampicilina.

Los fagos poseen una molécula de DNA lineal, de forma que un corte enzimático producirá dos fragmentos

Correspondencia: Dr. P. Martín Vasallo.
LBD, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de La Laguna.
Avda. Astrofísico Sánchez, s/n.
38206 La Laguna. Tenerife.

que pueden ser unidos de nuevo intercalando o insertando un DNA foráneo. El DNA quimérico se puede obtener fácilmente dejando que el fago proceda a través de su ciclo lítico para producir nuevas partículas de fago. La limitación de esta estrategia reside en el tamaño del DNA foráneo, pues la capacidad de empaquetamiento del material genético en la cabeza del fago es limitada. Para resolver este problema se han modificado fagos suprimiendo todo aquel material genético no esencial, dándole mayor cabida para introducir DNA foráneo. En el caso del fago lambda se ha producido un genoma que es demasiado corto para ser empaquetado en la cabeza del virus; así que es necesaria la presencia de un DNA foráneo. La utilidad de este tipo de vector ha mejorado al desarrollarse sistemas de empaquetamiento in vitro que permiten el ensamblaje de fagos completos a partir de precursores.

En la actualidad existen otros fagos lambda, como el Charon BS, al que se le ha introducido la secuencia de un plásmido, que a su vez lleva intercalada una con varios lugares de restricción. Una vez insertada la secuencia a clonar en uno de estos lugares y multiplicado el fago, se extrae su DNA. Cortando con las enzimas de restricción adecuadas, se libera el plásmido que lleva la secuencia insertada. A este proceso, por el cual pasamos de una clonación en un fago a una en un plásmido, se denomina subclonación. Esta operación permite tener la secuencia en un plásmido con las ventajas que esto supone¹.

Los cósmidos son otro tipo de vectores que reúnen las ventajas de los plásmidos y de los fagos. Estos son plásmidos a los que se les ha insertado una secuencia particular (extremos cos) necesaria para empaquetar DNA en su partícula. Estos vectores pueden ser introducidos en bacterias como fagos, pero mantenidos en las mismas en forma de plásmidos¹.

El tamaño de los vectores varía; un plásmido y un cósmido tienen aproximadamente de 3 a 5 kb, mientras que un fago tiene alrededor de 45 kb; También se diferencian en el tamaño del inserto que pueden incluir. Un plásmido acepta insertos entre 0,5 y 5 kb; los fagos aceptan insertos hasta 20 kb y los cósmidos hasta aproximadamente 40 kb.

El DNA recombinado se construye utilizando enzimas de restricción. El método más común consiste en cortar con una enzima de restricción que produzca en los extremos secuencias monocatenarias complementarias, denominados extremos cohesivos. Al cortar tanto el vector como el DNA diana con la misma enzima, se obtendrán extremos cohesivos que son complementarios, lo que permite la unión de los dos fragmentos. El restablecimiento de enlaces covalentes entre vector y fragmento se hace mediante DNA ligasa in vitro, obteniéndose un DNA recombinado (fig 1) La presencia de los mismos lugares de restricción a ambos extremos del fragmento nos permite su liberación en el momento adecuado utilizando la misma enzima de restricción. Para el clonado también se pueden utilizar enzimas de restricción que produzcan cortes romos, es decir, que no posean DNA monocatenario en

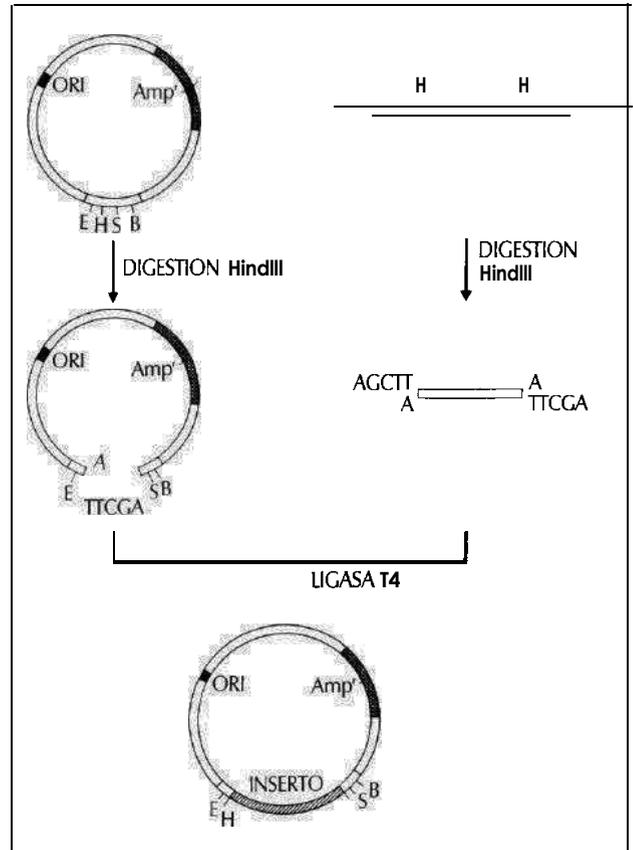


Fig 1.-Proceso de clonaje de un inserto de DNA en un plásmido mediante el uso de enzimas de restricción. ORI, origen de replicación; Amp^r, gen de resistencia a ampicilina; E (EcoRI), H (HindIII), S (Sall) y B (BamHI) representan puntos de corte de enzimas de restricción.

sus extremos. La DNA ligasa del fago T₄ de E. coli (ligasa T₄) une fragmentos de DNA con extremos romos; se utilizará para el ligado de fragmentos así obtenidos, lo que permite el clonado de DNA foráneo en cualquier lugar de un vector cualquiera que sea su secuencia.

Transformación

La transformación es el fenómeno por el cual las células bacterianas adquieren nuevos marcadores genéticos por incorporación de DNA. Cuando el fenómeno tiene lugar en células eucarióticas se denomina transfección.

Una vez construido el plásmido que contiene determinado inserto de DNA, se procede a transformar bacterias. Previamente las incubamos en CaCl₂ para hacerlas permeables al DNA. La introducción de este DNA se facilita mediante un breve choque térmico. Sólo aquellas que contienen un plásmido formarán colonias en las placas de agar adicionadas con el antibiótico adecuado. Posterior-

mente cultivamos en medio líquido una colonia y así obtendremos grandes cantidades de bacterias que contengan nuestro plásmido en su interior ².

Clonaje de los genes que codifican las proteínas que expresan un grupo de células o un tejido

En primer lugar debemos aislar su mRNA, que en definitiva es el codificador de estas proteínas. A partir de este mRNA, y utilizando la transcriptasa inversa, se obtienen los correspondientes cDNAs. Para ello se une al poly(a) del mensajero un cebador, que es una secuencia corta de poly(dT) y cuyo extremo 3' libre sirve para que la transcriptasa inversa añada deoxinucleótidos uno a uno. Estos, dirigidos por la complementariedad del apareamiento de bases con el molde de mRNA, producen una elongación del cebador. El producto de la reacción es una molécula bicatenaria formada por una hebra de mRNA y otra hebra de DNA complementaria de la anterior. In vitro, la transcriptasa inversa tiene propensión a pararse antes de llegar al extremo 5' del mRNA, lo que da lugar a un transcrito corto al que le falta el extremo 5'.

Cuando la reacción llega al extremo del mensajero continúa la extensión utilizando las últimas bases del transcrito como molde, produciendo una hebra de secuencia corta, de unas 10 bases, en forma de horquilla y que es idéntica a la secuencia del mRNA, el cual es desplazado.

En este punto el mRNA es degradado mediante un tratamiento alcalino. El producto es una hebra de DNA complementaria al mRNA, por lo que se denomina cDNA. La horquilla del extremo 3' da lugar a un cebador natural que se utiliza en el siguiente paso y que consiste en la utilización de la DNA polimerasa para convertir la monocadena de DNA en una cadena doble, mediante la síntesis de una cadena complementaria. El producto es una doble cadena de DNA con una horquilla en uno de sus extremos. La horquilla se corta con una nucleasa, la nucleasa S1 (que específicamente corta el DNA monocatenario), para generar DNA de doble cadena (fig. 2). El cDNA generado puede clonarse para producir grandes cantidades de gen sintético complementario a la secuencia de mRNA. A éstos se les denomina clones de cDNA³.

A la colección de clones de cDNA provenientes de un tejido específico se le denomina genoteca complementaria o librería complementaria.

Aislamiento de genes individuales a partir de un genoma

Una de las aplicaciones de la clonación es la obtención de genes específicos aislados directamente del genoma. El tamaño de un gen es muy pequeño con relación al genoma, por lo que se necesita una sonda que sólo reaccione con una secuencia específica perteneciente a un gen en particular. La técnica usual es utilizar como

sondas fragmentos de DNA o RNA marcados con isótopos radiactivos que hibriden con un gen en particular y que se detecten por autorradiografía.

Cuando se conoce una pequeña parte de la secuencia de una proteína se pueden sintetizar pequeños oligonucleótidos que correspondan al DNA que codificaría esta secuencia y que cubran todos los posibles codones alternativos y específicamente las bases en la tercera posición. Estos oligonucleótidos se pueden utilizar como sondas para aislar cDNA o DNA genómico que incluyen las secuencias del gen correspondiente.

El primer paso para la identificación de un gen que corresponda a una secuencia específica es romper el DNA genómico en fragmentos de tamaño manejable, aunque a veces los lugares de restricción pueden estar situados en lugares no adecuados, como por ejemplo en medio de un gen. El gen debe encontrarse en el número menor de fragmentos posibles. Cuando no puede ser en sólo uno, la estructura se determina uniendo la información que nos da cada uno de los fragmentos.

La fragmentación del DNA genómico se puede realizar mediante cortes con enzimas de restricción, con lo que cada fragmento tendrá unos extremos bien definidos, posibilitan o su inserción en un vector. A la colección de fragmentos es a lo que se le denomina genoteca o librería genómica. Cuando se conocen secuencias de un gen o de otro gen con alta homología es posible obtener *in vitro* fragmentos de DNA comprendido entre secuencias conocidas. Utilizando la reacción en cadena de la polimerasa se puede amplificar DNA, utilizando como molde el genoma completo, o librerías tanto complementaria como genómica. Como cebadores se pueden utilizar secuencias conocidas del DNA a amplificar o secuencias degeneradoras (secuencias similares, pero no idénticas) para amplificar DNA homólogos⁴.

Una vez clonados en vectores todos los fragmentos de DNA que componen un genoma o un DNA complementario, el siguiente paso es aislar los clones que contengan el DNA que buscamos. Para ello se procede al muestreo de la librería (fig. 2). Si se trata de fagos se infectan bacterias con los fagos quiméricos y se hacen crecer en placas petri en un medio de cultivo adecuado. Los fagos producirán lisis en las bacterias infectadas que aparecerán como *calvas* líticas en la placa. Para determinar qué fagos contienen el DNA adecuado, se traspara parte del material de la placa a discos de nitrocelulosa, con lo cual el DNA presente en la nitrocelulosa se hibrida en las condiciones adecuadas con una sonda marcada radiactivamente y que reconozca la secuencia de interés, con objeto de conocer qué *calva* de la placa contiene los fagos quiméricos que transportan los fragmentos del gen a aislar. Estos fagos obtenidos de la placa pueden purificarse y multiplicarse en la bacteria adecuada y así ser una fuente inagotable del DNA que contiene el fragmento de DNA de interés (fig. 2). Una vez extraído el DNA quimérico se procede a su secuenciación¹.

El muestreo de una librería se puede realizar también

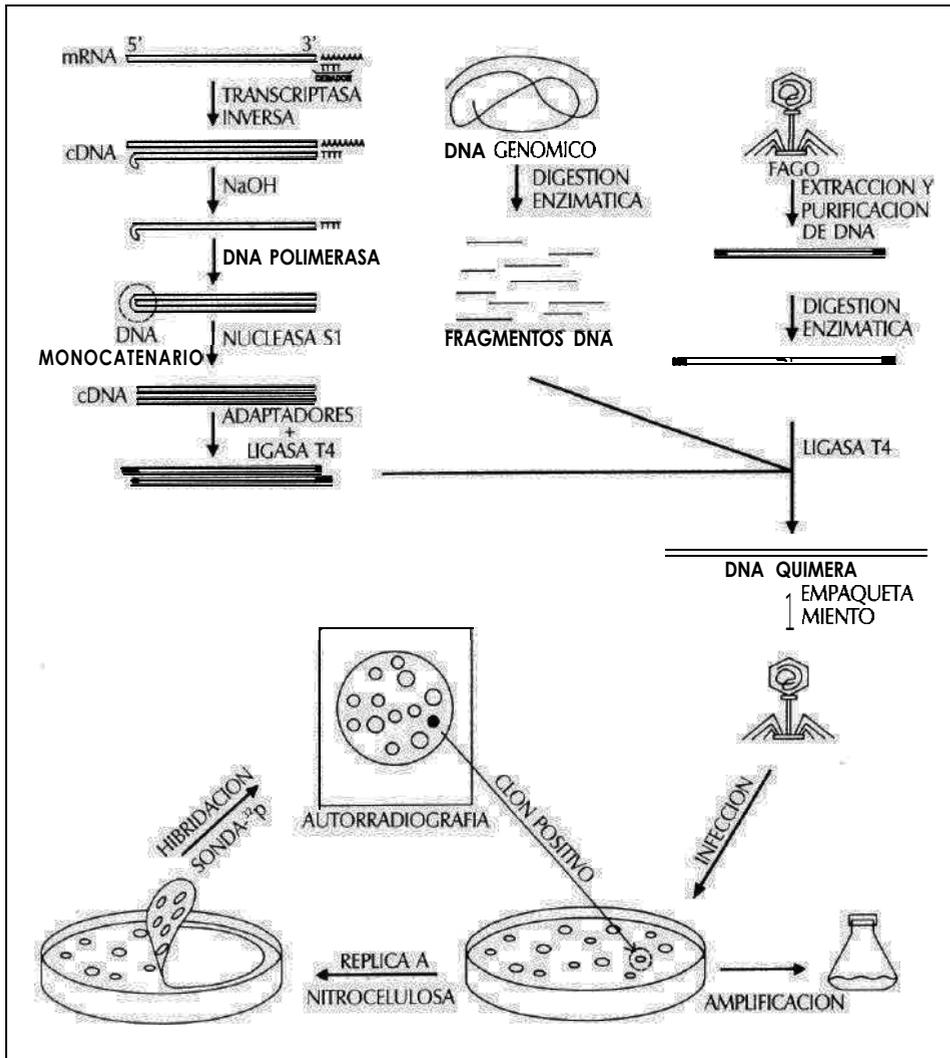


Fig. 2.-Estrategia de clonaje de un gen a partir de una librería de cDNA o genómica .

utilizando como sonda un anticuerpo específico contra la proteína cuyo gen queremos obtener. La librería debe estar construida en vectores de expresión. El anticuerpo se unirá a las proteínas producto de la expresión del vector que contenga la secuencia codificadora que se busca.

Secuenciación

En 1953, J. D. Watson y F. H. C. Crick postularon un modelo preciso para explicar la estructura tridimensional del DNA y pusieron de manifiesto que la secuencia lineal de los nucleótidos que forman la molécula constituye la herencia genética que se transmite de padres a hijos. En ese momento, varios laboratorios centraron sus esfuerzos en desarrollar un método preciso para determinar el orden o secuencia en que se encuentran dispuestos los nucleótidos en una cadena de DNA.

Aunque en los años sesenta se describieron métodos para secuenciar ácidos nucleicos, en general resultaron ser demasiado laboriosos y complicados como para poder determinar cualquier secuencia de DNA presente en un organismo vivo. El desarrollo de métodos más poderosos tuvo que esperar la aparición de las nuevas técnicas de ingeniería genética. En 1977, F. Sanger (Cambridge)⁵ y W. Gilbert Massachusetts⁶ publicaban de forma simultánea un método eficaz de secuenciación conocido actualmente como método enzimático y método químico respectivamente. La repercusión de estos trabajos fue tan importante que se les otorgó de forma compartida el premio Nobel de Química en 1980.

Aunque ambos métodos se basan en la obtención de una colección de moléculas de DNA de distinto tamaño y con un extremo 3' específico, se diferencian en la forma en que se obtienen estos extremos. En este trabajo nos centraremos en la descripción de los principios básicos

cos del método de secuenciación enzimático descrito por Sanger y cols. ya que actualmente es el que se emplea en la mayoría de los laboratorios.

Principios básicos

El principio fundamental del método consiste en la síntesis *in vitro* de una cadena complementaria al DNA que se pretende secuenciar en unas condiciones tales que se pueda detener el crecimiento de modo controlado en posiciones específicas. Esto requiere la hibridación de un oligonucleótido cebador a una cadena sencilla del DNA que se quiere secuenciar, DNA molde. El iniciador se sintetiza de forma que presente una secuencia complementaria a una región adyacente al extremo 3' del DNA que queremos determinar, normalmente cerca del sitio de clonaje del vector, por lo que es posible usar un único iniciador para todos los fragmentos de DNA que se desee secuenciar. El DNA de cadena sencilla puede obtenerse desnaturizando con álcali el plásmido que lleva clonado el DNA de interés o bien introduciendo este DNA en un fago filamentoso como el bacteriófago M13, el cual produce partículas víricas con DNA monocatenario.

El complejo formado por el iniciador y el molde sirve de sustrato para el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, aunque también puede utilizarse cualquier enzima con actividad DNA-polimerasa, tal como transcriptasa inversa, TAQ polimerasa o DNA polimerasa del bacteriófago 17. En presencia de los cuatro desoxinucleótidos (dNTPs), la enzima inicia la síntesis de una cadena complementaria al molde, que puede ser detectada fácilmente por autorradiografía si se introduce uno de los dNTP marcado radiativamente en la posición alfa.

La segunda condición del método es poder controlar la posición en la que finaliza dicha síntesis. Esto se consigue introduciendo una relación adecuada de dideoxinucleótido en la reacción. Los dideoxinucleótidos (ddNTPs) son componentes análogos a los dNTPs, pero que carecen del grupo hidroxilo en la posición 3' (fig. 3), el cual es imprescindible para la formación del enlace fosfodiéster con otro nucleótido.

Para secuenciar un fragmento de DNA necesitamos realizar cuatro reacciones independientes, cada una de las cuales tendrá una pequeña proporción de un ddNTP específico. La incorporación de este análogo dará como resultado una mezcla de fragmentos de DNA que tendrán un extremo 5' común (el iniciador) y un extremo 3' diferente, que coincidirá con todas las posibles posiciones en las que se localiza ese nucleótido en la cadena de DNA. De esta forma, cada reacción nos revela la posición ocupada a lo largo de la cadena de DNA por cada uno de los cuatro nucleótidos. El éxito del método radica en gran parte en ajustar de forma adecuada la proporción de ddNTP/dNTP en la reacción. Aumentando la concentración relativa de ddNTP provocamos la incorporación del dideoxinucleótido con una mayor frecuencia y, por tanto,

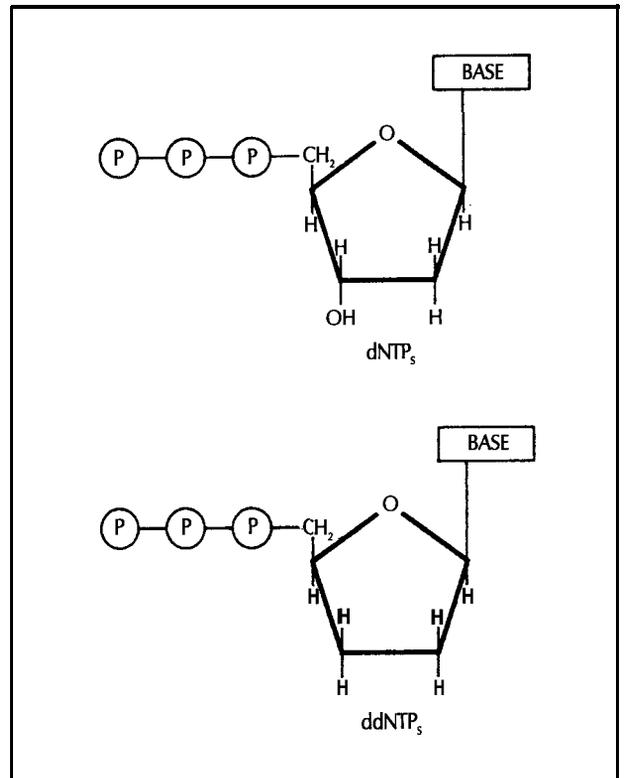


Fig. 3.-Estructura química de un desoxinucleótido (dNTP) y de un dideoxinucleótido (ddNTP). La falta del grupo -OH impide que continúe la elongación de la cadena que se sintetiza.

la longitud media de las cadenas sintetizadas será menor, limitando el número de nucleótidos que podemos determinar o secuenciar en cada reacción.

Por último, con objeto de asegurarnos de que todas las moléculas sintetizadas terminan en un ddNTP, tras un tiempo de incubación determinado se añade a la reacción un exceso de dNTPs, lo cual provoca que se extiendan rápidamente las cadenas que aún no han incorporado el ddNTP específico.

Para visualizar el resultado de la reacción, el conjunto de fragmentos obtenidos se separa en electroforesis de acrilamida en condiciones desnaturizantes⁷. Esta técnica de alta resolución nos permite separar fragmentos de DNA de cadena sencilla que se diferencian en un único nucleótido de longitud. Al colocar en el gel las cuatro reacciones de forma adyacente se obtiene una figura de bandas que, al seguirlas de forma escalonada, nos indica la secuencia del fragmento de DNA que se está analizando (fig. 4). La resolución del gel de acrilamida depende de la longitud de la cadena de DNA, por lo que a partir de un determinado tamaño de molécula, las diferencias de movilidad entre cadenas que se diferencian en un nucleótido no son lo suficientemente grandes como para poder determinar inequívocamente cuál es la más gran-

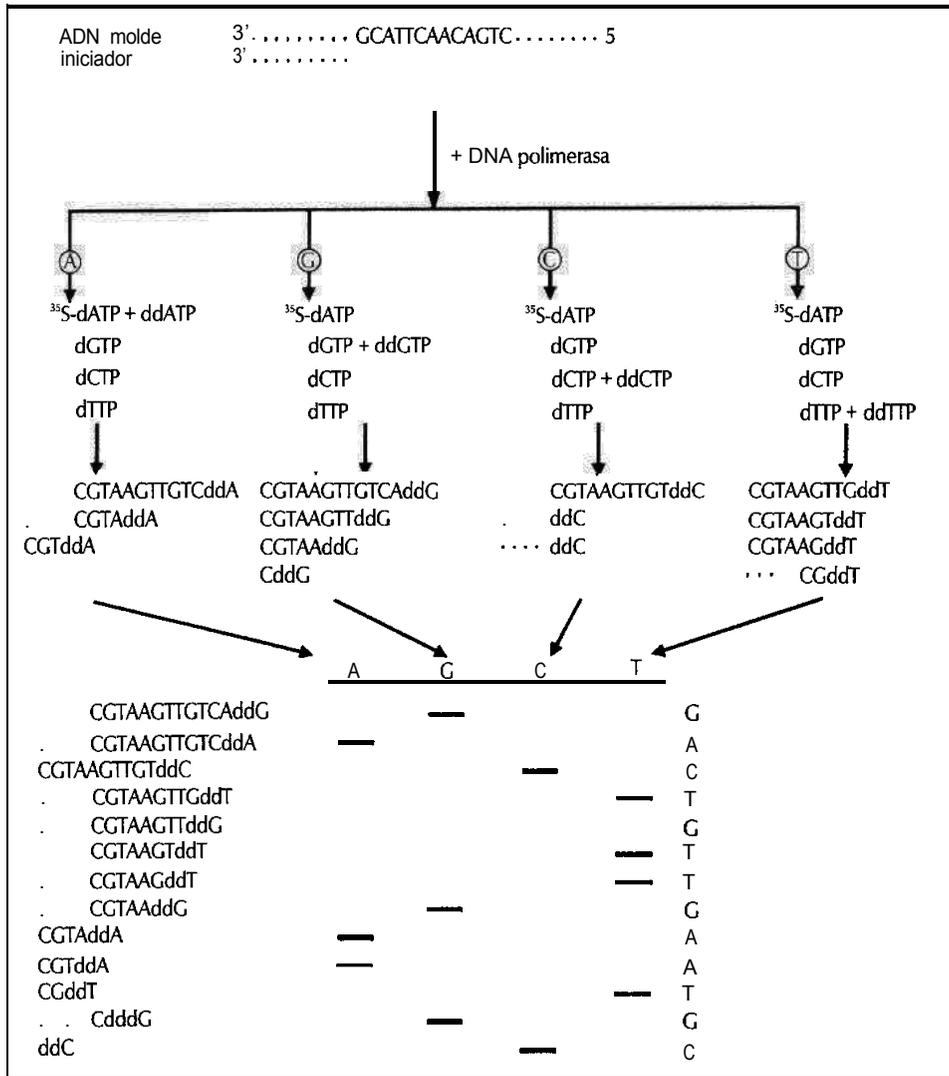


Fig. 4.-Secuenciación por el método enzimático (Sanger).

de. Por tanto, el número de nucleótidos que se puede determinar en una reacción depende principalmente del grado de reticulación del gel de su longitud. Así, un gel estándar del 6 % de reticulación y aproximadamente 40-50 cm de largo nos puede determinar de forma fiable unas 300-400 posiciones del DNA que se está analizando.

Estrategias de secuenciación

Si el fragmento de DNA que queremos secuenciar posee una longitud mayor que la resolución que nos proporciona un gel, deberemos diseñar una estrategia que nos permita determinar la secuencia completa a partir de varias reacciones. La estrategia a seguir dependerá del tamaño del DNA que se pretende secuenciar, así como del

equipo especializado que se posea. A continuación se describen brevemente las estrategias que se utilizan con más frecuencia, aunque en muchas ocasiones el método más eficaz es una combinación de al menos dos de ellos.

- Secuenciación de fragmentos generados al azar

El fragmento de DNA a secuenciar es fraccionado al azar mediante sonicación o digestión controlada con la endonucleasa DNAsal. Los fragmentos obtenidos son clonados y secuenciados al azar hasta que se completa la secuencia entera que deseamos determinar (fig. 5)⁸.

La ventaja de este método radica en que no existe restricción en cuanto al tamaño de DNA y, además, no es necesario un conocimiento previo del mapa de enzimas de restricción del mismo. Debido a que los fragmentos de DNA se generan y secuencian al azar, cada región es

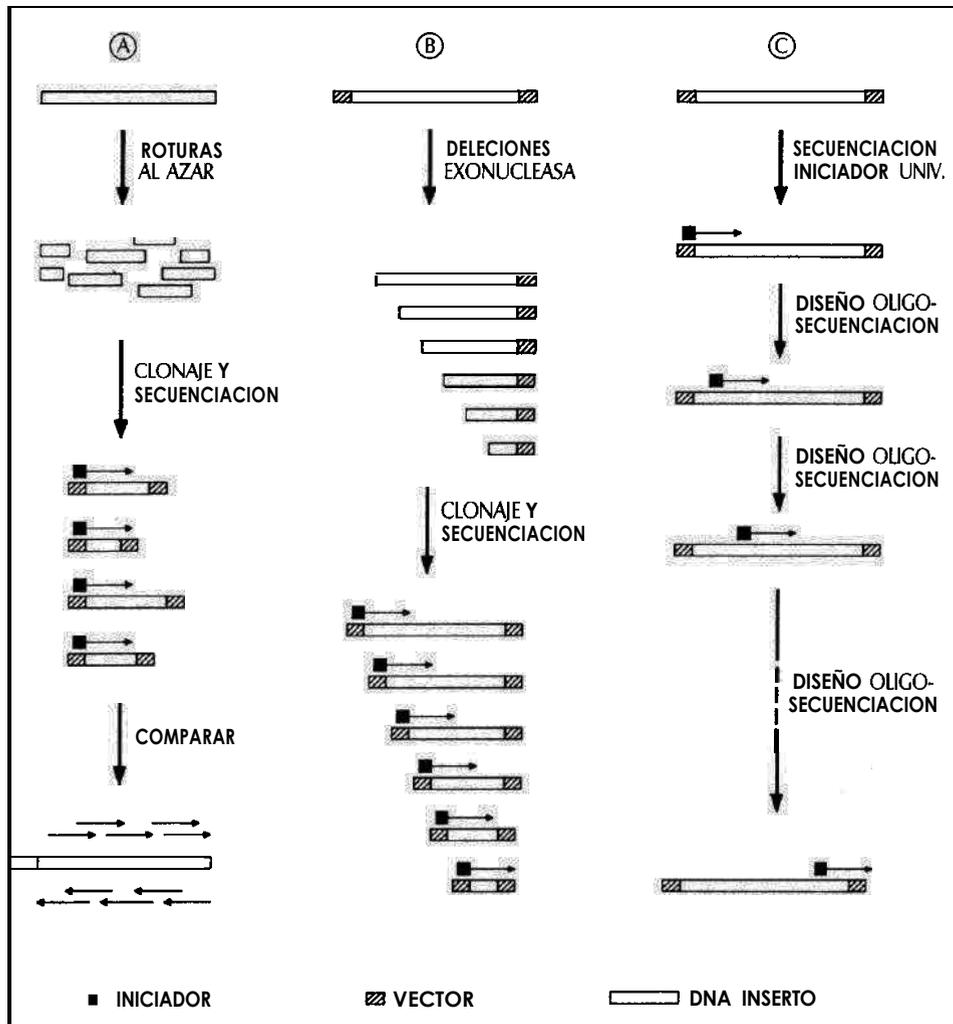


Fig. 5.-Estrategias de secuenciación. A, secuenciación mediante roturas al azar del DNA. B, secuenciación mediante deleciones parciales del DNA. C, secuenciación dirigida mediante la síntesis de oligonucleótidos específicos.

determinada por la secuenciación de varios clones distintos. Esta redundancia de información asegura una fiabilidad muy alta de la secuencia definitiva.

Sin embargo, posee la desventaja de que la acumulación de datos es muy rápida al principio, pero a medida que aumenta la redundancia la obtención de secuencias nuevas se hace más lenta. Esto significa que para poder determinar la secuencia entera es necesario secuenciar aproximadamente el equivalente a unas ocho veces la longitud del DNA que se estudia.

- Subclonaje mediante el uso de enzimas de restricción

Este método requiere un conocimiento previo del mapa de restricción del DNA que se quiere secuenciar. La digestión del DNA con enzimas seleccionadas nos genera fragmentos que pueden ser clonados y secuenciados. La secuencia que se va obteniendo nos proporciona más información acerca de otros posibles sitios de restric-

ción que se desconocían, los cuales pueden ser utilizados para la obtención de nuevos subfragmentos.

Esta estrategia requiere múltiples pasos de subclonaje y presenta el inconveniente de que la digestión con enzimas puede generar, por un lado, fragmentos aún demasiado grandes para ser secuenciados en un solo gel, y por otro, fragmentos demasiado pequeños que no permiten aprovechar toda la longitud útil del gel de secuenciación.

- Deleción secuencial del fragmento de DNA

Esta estrategia se basa en la obtención de deleciones secuenciales a partir de un extremo del fragmento que queremos secuenciar. Generalmente estas deleciones son generadas enzimáticamente mediante la recogida de muestras a diferentes tiempos de la digestión⁹. Los parámetros de la digestión deben ajustarse con objeto de obtener fragmentos delecionados que se diferencien en aproximadamente 250 nucleótidos. Los productos de la reacción son clonados con el extremo delecionado cerca

del sitio de hibridación del iniciador universal; por lo que se puede obtener la secuencia entera usando un único oligonucleótido (fig. 5).

Con este método la secuencia es determinada de forma rápida, aunque presenta el inconveniente de que es necesario clonar el fragmento entero que se desea secuenciar. En el caso de que la secuencia sea mayor de 2 kb, las muestras que se recogen a medida que avanza la digestión presentan una mayor dispersión en cuanto al grado de delección, por lo que es más laboriosa la selección de fragmentos adecuados. Además, antes de iniciar la reacción de delección es necesario preparar el plásmido con nuestro inserto cortando con dos enzimas de restricción que no deben cortar el fragmento que queremos secuenciar, lo cual no siempre es posible.

- Secuenciación mediante síntesis de varios iniciadores

Si el DNA que queremos secuenciar puede ser clonado entero en el vector, la secuencia entera del mismo puede ser determinada mediante el uso de varios iniciadores específicos para ese DNA. La primera secuencia obtenida con el iniciador universal es usada para diseñar un oligonucleótido cerca del límite de la secuencia que hemos obtenido y que no posea homología con el vector. Este nuevo iniciador nos permitirá conocer unos 250-300 nucleótidos más, con lo que podremos diseñar un nuevo oligonucleótido. Este ciclo de secuenciación y diseño de un nuevo iniciador puede repetirse hasta la determinación de la secuencia completa (fig. 5).

Este es el método más eficiente, ya que la información redundante que se obtiene es mínima. Sin embargo, la secuenciación de la primera cadena es relativamente lenta debido a que sólo se puede hacer una reacción con cada iniciador. La determinación de nucleótidos de la segunda cadena es mucho más rápida, ya que la información de la primera cadena puede utilizarse para el diseño de todos los iniciadores necesarios para obtener la secuencia completa.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En 1983, Kary Mullis, investigador de la compañía Cetus, diseñó y patentó un método para la amplificación de secuencias específicas de DNA, al que se ha denominado PCR, siglas de reacción en cadena de la polimerasa en inglés¹⁰⁻¹². Esta técnica, desarrollada en los últimos años, ha tenido un impacto revolucionario en los estudios y el diagnóstico molecular. Prueba de ello son las múltiples publicaciones aparecidas desde su descripción, así como las cada vez mayores aplicaciones de la misma, tanto en el área de la medicina como de la biología.

La PCR es una técnica enzimática que nos permite fabricar in vitro un número teóricamente ilimitado de copias de una secuencia de DNA conocida, gracias a la repetición cíclica de tres pasos o reacciones simples en las

que sólo varía la temperatura de incubación¹³. Esto supone disponer de forma rápida y eficaz de cantidades suficientes de una determinada secuencia de DNA para su posterior estudio molecular.

Algunos aspectos técnicos

Conceptualmente, la PCR es un método simple de síntesis de ácidos nucleicos in vitro, en el que el número de moléculas generadas se duplica tras cada ciclo del proceso, de tal forma que si se empieza con una sola doble cadena de DNA, después de 20 ciclos tendríamos de un millón de copias del fragmento amplificado. Para su realización se requieren unos reactivos básicos, que se someten a diferentes cambios cíclicos de temperatura. Estos son: la muestra o molde de DNA a amplificar, dos oligonucleótidos, llamados cebadores o primers, cada uno de ellos complementario a cada una de las hebras del DNA molde al que flanquean, con una corta distancia entre ellos; una cantidad abundante de los cuatro deoxinucleótidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y una enzima, una DNA polimerasa, que se encargará del proceso de síntesis de las nuevas copias de DNA a partir del DNA molde. Básicamente, el proceso se realiza mezclando los productos descritos en un tubo Eppendorf de 0,5 ml, al que sometemos a una serie de ciclos en los que varía la temperatura de incubación^{13,14}. Cada ciclo consta de tres pasos o reacciones:

1. Desnaturalización del DNA muestra bicatenario en los que se separan las dos hebras complementarias por calentamiento de las mismas a 95° C.
2. Renaturalización o unión de los cebadores a las secuencias complementarias del DNA muestra por descenso de la temperatura (entre 37° C y 60° C).
3. Polimerización, síntesis o extensión, en el que la temperatura (72° C) se adecua para que pueda actuar la enzima y copiar la hebra de DNA molde mediante la adición al extremo 3' del cebador de los distintos deoxinucleótidos según las reglas de la complementariedad, sintetizándose el nuevo DNA en la dirección 5' a 3'.

Estos pasos se repetirán cíclicamente, de tal manera que después de cada ciclo habrá un crecimiento exponencial de las copias de DNA. Un incremento final de 2^n , donde n es el número de ciclos (fig. 6)^{14,15}.

Todo este proceso está automatizado, requiriendo sólo unas pocas horas desde el comienzo de los ciclos hasta el análisis del producto resultante.

Los reactivos

- La enzima

Inicialmente, la enzima utilizada en la PCR era un fragmento de DNA polimerasa de *E. coli*, denominado fragmento de Klenow, cuya temperatura óptima de reacción es de 37° C. Esto obligaba a añadir una alícuota de enzi-

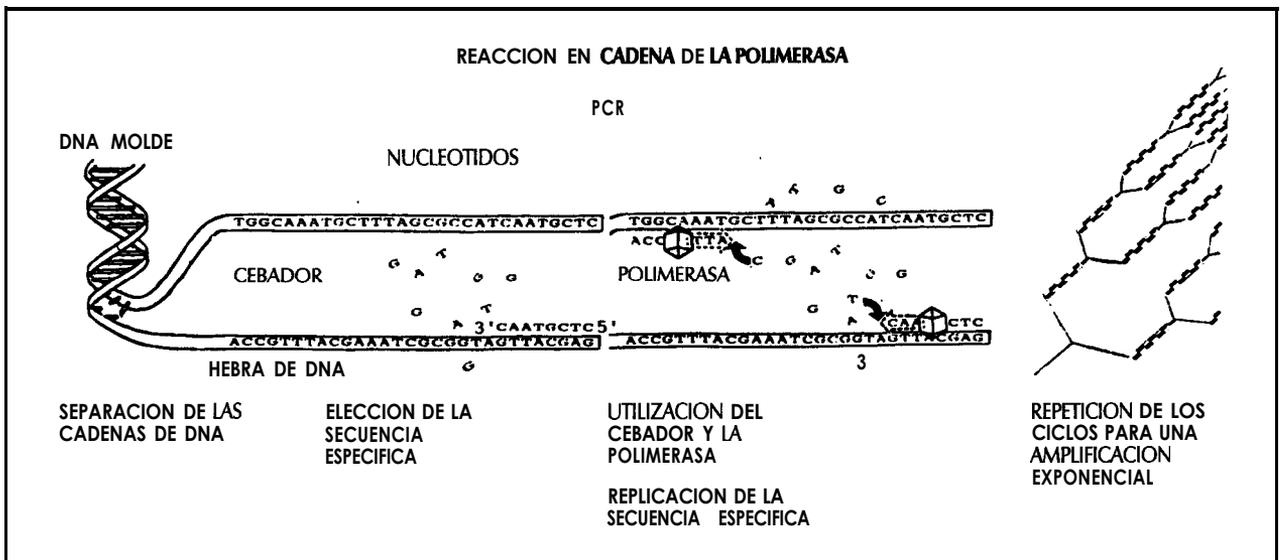


Fig. 6.-Amplificación de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En un primer paso el segmento de DNA a amplificar se desnaturaliza por calor, después los cebadores elegidos hibridan con sus regiones complementarias comienza la síntesis de nuevas cadenas por la Taq polimerasa. De esta forma se incrementa de forma exponencial el número de copias de a secuencia enmarcada por los dos cebadores.

ma fresca tras cada desnaturalización, pues durante ésta la temperatura se eleva a unos 94° C durante casi un minuto y la enzima pierde su actividad. Este problema se solucionó en 1988 con la comercialización de una DNA polimerasa procedente de una bacteria termófila, *Thermus aquaticus*, que vive a temperaturas de 70-75° C en fuentes termales. La Taq polimerasa, como se la denomina, presenta una temperatura óptima de actuación entre 75-80° C, siendo más resistente al calor, de forma que tras 50 ciclos a las condiciones citadas conserva el 65 % de su actividad ¹².

- Los oligonucleótidos cebadores

Como hemos visto, para poder sintetizar copias de un determinado fragmento de DNA debemos previamente conocer al menos la secuencia de los dos extremos del fragmento. Conocidas estas secuencias, se sintetizan los dos oligonucleótidos, cebadores o primers, que serán complementarios a cada flanco de cada una de las hebras del DNA a amplificar, de tal manera que uno de ellos hibridará con la hebra en sentido 5'-3' y el otro con la complementaria 3'-5' o antisentido. A partir de aquí, la enzima podrá llevar a cabo su actividad de síntesis, siempre desde el extremo 3' término del cebador y en la dirección 5'-3' (fig. 6) ¹³⁻¹⁵.

El tamaño del cebador puede variar. Se ha visto que con un tamaño de 15-20 bases un cebador tiene una elevada posibilidad de unirse a un solo lugar del genoma humano; si el cebador es más largo, la especificidad será mayor, y viceversa.

Para el diseño de los cebadores se suele contemplar una serie de reglas que ayudan al rendimiento y especificidad de la técnica. Entre ellas: 1) Seleccionar secuencias en las que no abunden repeticiones de bases (poliuridinas o polipirimidinas), ya que contribuyen a la inespecificidad de la reacción. 2) Evitar secuencias que puedan formar estructuras secundarias por sí mismas, pues esto dificultaría la unión de los cebadores al DNA muestra y podría haber autoamplificación. 3) Comprobar en bancos de datos que las secuencias de oligonucleótidos elegidas no estén en otro lugar del genoma, lo que podría llevarnos a amplificar regiones no deseadas. 4) Comprobar que los cebadores, si no pueden ser 100 % complementarios al DNA molde en toda su extensión, sí lo sean al extremo 3' término por ser éste el lugar de unión de la Taq polimerasa ¹⁵.

Los cebadores se añaden a la reacción en un exceso molar sobre el DNA molde, de manera que la formación del complejo cebador-DNA molde se vea favorecida sobre la reasociación de las dos hebras del DNA molde en el segundo paso del ciclo cuando desciende la temperatura.

- Otros reactivos

Aparte de los ya citados, cebadores y enzima, debemos incluir en el tubo de reacción los cuatro deoxinucleótidos trifosfatos y MgCl₂, en un tampón adecuado, normalmente Tris-HCl, pH 8,4, a temperatura ambiente y, por supuesto, la muestra del DNA que queremos amplificar.

La eficacia y especificidad de la reacción va a depender principalmente de las concentraciones de Mg^{2+} , los dNTPs y los cebadores; todas ellas deben ser adecuadamente calculadas para optimizar cada reacción por separado.

Los ciclos

La utilización de la Taq polimerasa favoreció enormemente la automatización del proceso de la PCR y actualmente existen en el mercado aparatos termocicladores, que permiten realizar de forma cómoda todo el proceso. Los termocicladores combinan un calefactor con un refrigerador controlados por un microprocesador, de tal manera que podemos programarle los tiempos y temperaturas que deseamos en cada paso de un ciclo, así como el número de ciclos que queremos que se repitan. El aparato puede programarse según las necesidades de cada caso, pero en general los tiempos y temperaturas utilizados en cada paso suelen ser: 1) Desnaturalización, 94-98° C, durante 20-30 segundos. 2) Unión de los cebadores al DNA muestra a 55-65° C, durante 20-40 segundos; es el más variable, pues depende de la homología entre los cebadores y el DNA muestra, la longitud de los cebadores, el contenido de G-C, etc. 3) Síntesis del fragmento del DNA a 72-76° C durante 30-120 segundos, dependiendo de la longitud del fragmento que se amplifica; la temperatura de 72° C es la óptima para la acción de la enzima (fig. 7).

El número de ciclos puede variar de 20 a 40, dependiendo de la cantidad de muestra de la que se parte, aunque a partir de unos 40 ciclos o de un exceso de muestra el proceso llega a un nivel a partir del cual no aumenta el rendimiento.

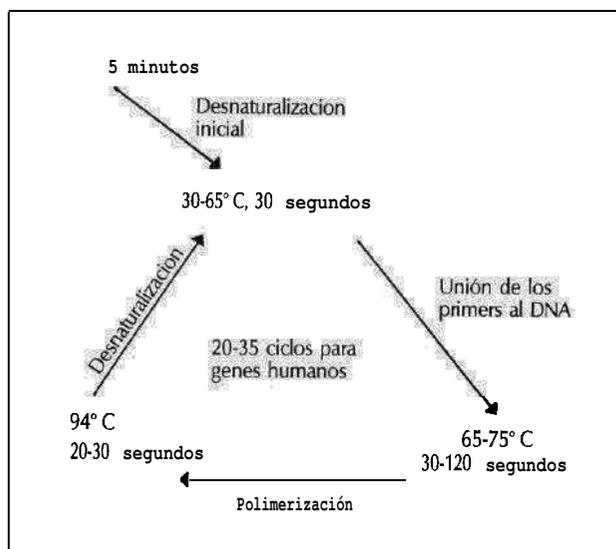


fig. 7.-Esquema de temperaturas y tiempos para cada paso de un ciclo de PCR.

La muestra y su preparación

La muestra para PCR puede ser DNA de cadena simple o doble o RNA. Si se trata de RNA, previamente tenemos que transformarlo en DNA complementario (cDNA), mediante la utilización de la enzima transcriptasa inversa.

Se puede hacer PCR directamente de una suspensión de células, de una muestra tisular, células espermáticas, raíces capilares, lavado o raspado bucal, sangre, etc. Pero normalmente se realiza una lisis celular por choque osmótico que se consigue utilizando una concentración salina hipotónica ayudada por un detergente celular (p. ej., tritón X-100). Posteriormente se separan las histonas y demás proteínas del DNA mediante proteinasa K.

Cuando se utilizan muestras de sangre total hay que tener en cuenta que los compuestos porfirínicos, procedentes de la hemoglobina, son inhibidores de la Taq polimerasa, por lo que deben hacerse varios lavados para su total eliminación.

Variantes de la PCR

Por lo dicho hasta ahora podríamos pensar que la PCR es una técnica que sólo nos sirve para aquellos casos en los que conocemos las secuencias que flanquean la región de interés, y que sería de poca utilidad para la amplificación de secuencias de DNA y RNA con extremos variables o para aquellas de RNA cuya porción 5' desconocemos. Sin embargo, hay variantes de la técnica que nos permiten ir más lejos todavía; de ahí el gran potencial de la misma. Vamos a describir someramente alguna de estas variantes.

- PCR anclada

Es un método desarrollado para salvar el obstáculo de las secuencias desconocidas. Si, por ejemplo, tenemos un mRNA de interés, podemos transcribirlo a cDNA usando transcriptasa inversa, luego añadirle a su extremo 3' una cadena de poli-dG, mediante una deoxinucleotidil transferasa, y cebarla con un primer, denominado anclado, que consiste en una cadena de poli-dC a la que se ha unido una secuencia que incorpora un sitio de restricción de nuestro interés. Luego este cDNA así construido puede amplificarse mediante una PCR clásica usando un cebador 3' específico y el cebador anclado (fig. 8).

- PCR inversa

Esta técnica nos sirve para amplificar secuencias de DNA conocidas, pero flanqueadas por regiones de secuencia desconocida, cada una de las cuales incluye un sitio de reconocimiento para la misma enzima de restricción. De tal manera que podemos cortar el DNA por estos sitios y ligar los extremos resultantes para formar un monómero circular. Los cebadores para la PCR son homólogos a los extremos de la región de DNA conocida,

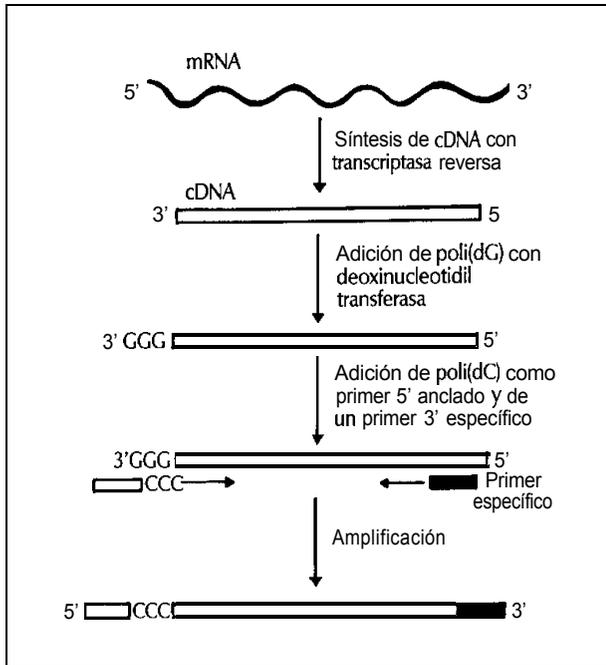


Fig 8.-PCR *anclada*. Se utiliza para la amplificación de DNA o RNA con terminaciones variables o porciones 5' desconocidas.

con sus extremos 3' en direcciones opuestas, de tal forma que la PCR amplificaría a través de la región de DNA cuya secuencia no conocemos (fig. 9). Este procedimiento ha sido utilizado para proseguir la identificación de algunos genes, así como para identificar y amplificar elementos transponibles o secuenciar DNA flanqueado por sitios de integración viral.

• PCR con cebadores modificados

En la PCR clásica, la secuencia de DNA se sintetiza a partir de cebadores o cebadores específicos, que son físicamente incorporados a la misma. Como puede haber pequeñas diferencias entre los cebadores y el DNA molde en su extremo 5', sin que ello reduzca significativamente la eficacia de la amplificación, es relativamente sencillo modificar la secuencia del cebador para producir un producto de amplificación alterado con respecto a la secuencia de DNA molde. Esto puede ser usado para insertar sitios de restricción o secuencias de regiones promotoras en el DNA amplificado, así como generar mutaciones por adición o delección de la secuencia de DNA ya sea con fines diagnósticos o de investigación.

• PCR asimétrica

La PCR clásica produce copias de DNA de doble cadena de la secuencia molde. Gylestensten y Erlich modificaron la técnica para producir DNA de una sola hebra. Para ello utilizaron cebadores en distinta concentración molar; las proporciones podían ser 50:1 ó 100:1. Cuando reali-

zamos la reacción con estas proporciones de cebadores, obtenemos DNA de doble cadena durante los 10-15 primeros ciclos. Después de que el cebador en menor concentración se haya agotado, se originará sólo DNA de cadena simple a partir del cebador en exceso y de forma lineal con cada ciclo. El producto de la PCR asimétrica puede servirnos como excelente molde para sucesivas reacciones y posterior secuenciación (figura 10).

• PCR anidada

Este protocolo se utiliza para amplificar secuencias raras, donde necesitamos mayor rendimiento y especificidad. Se emplean dos parejas de cebadores o más y la reacción tiene lugar en dos escalones: una primera reacción, donde utilizamos los cebadores más extrínsecos a la región de interés, seguida de una segunda reacción, donde los cebadores se unirán al producto de amplificación de la primera reacción en un lugar más interno. La menor complejidad del molde para la segunda reacción asegura una mayor homogeneidad del producto final.

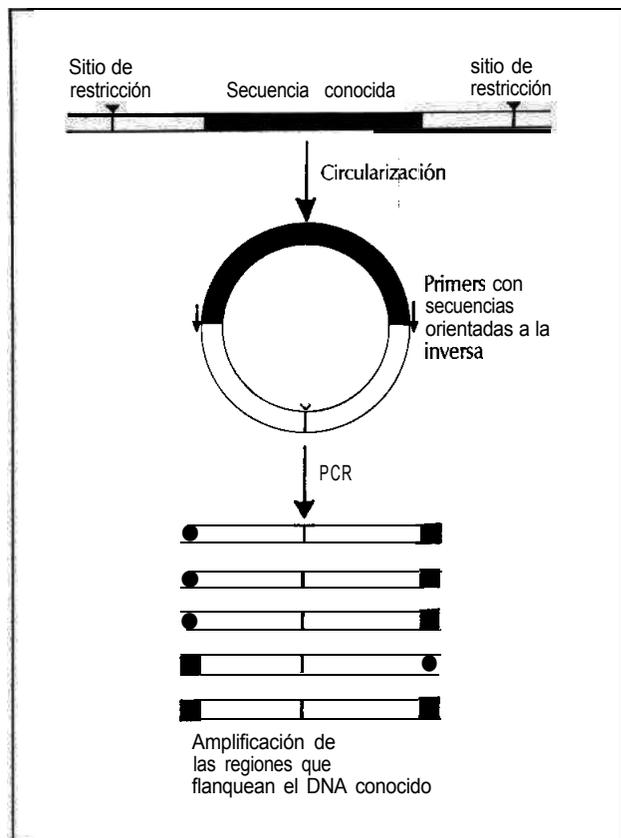


Fig 9.-PCR inversa. Permite la amplificación de secuencias de DNA que desconocemos y que flanquean una región de secuencia conocida.

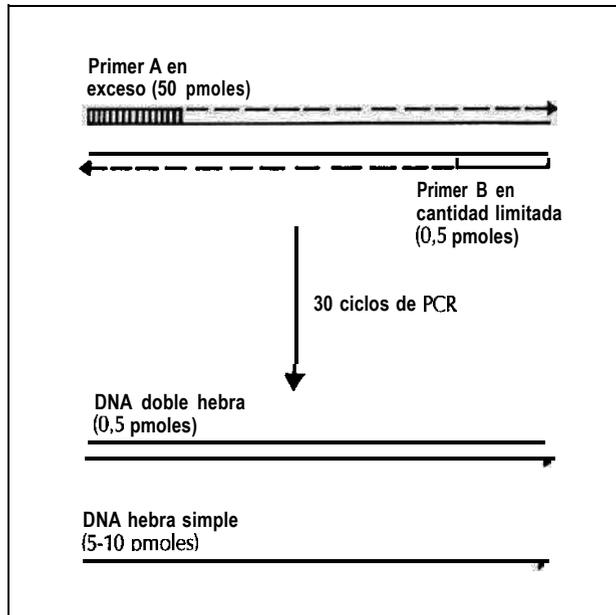


Fig. 10.—PCR asimétrica para obtener DNA de una sola hebra.

- PCR múltiple y detección de deleciones

Consiste en amplificar en una sola reacción varias regiones o secuencias de DNA, utilizando para ello varios pares de cebadores. Esta variante de PCR está siendo utilizada en el diagnóstico de deleciones, ya que si un determinado fragmento de DNA del genoma humano está presente, podrá ser amplificado y detectado en el producto de PCR. Si la secuencia está ausente no podrá ser amplificada. Esta técnica es la utilizada en la detección de deleciones de la distrofia muscular de Duchenne (DMD). La DMD es una de las enfermedades genéticas humanas más frecuentes y cualquiera de sus variantes es el resultado de mutaciones en el gen de la distrofina que se localiza en el cromosoma X. Este gen es uno de los más grandes descubiertos hasta ahora en el hombre, 2Mb. Aproximadamente la mitad de los casos de DMD se deben a deleciones parciales del gen; por ello, con una serie de cebadores específicos para nueve regiones del mismo, frecuentemente delecionadas, podemos hacer el diagnóstico de las deleciones en estas regiones por la ausencia de las mismas en el producto de amplificación. Una electroforesis en gel de agarosa de una PCR múltiple de un individuo sano mostraría las nueve bandas correspondientes a las nueve regiones amplificadas.

Aplicaciones de la PCR

La PCR nos permite estudiar con gran rapidez y con muy poca cantidad de muestra un determinado fragmento de DNA, ya sea un gen completo, su región promo-

ra, su región activadora, un intrón, etc. Esto ha hecho que sus aplicaciones sean múltiples tanto en el terreno de la investigación como en el del diagnóstico^{16,17}.

- Diagnóstico de enfermedades genéticas

Como hemos visto, podemos estudiar las alteraciones de un gen buscando deleciones totales o parciales utilizando cebadores que amplifiquen sólo esas regiones (generalmente exones) y mediante electroforesis en geles de agarosa o acrilamida, evidenciando si están presentes o ausentes en el producto amplificado. Los fragmentos tienen un tamaño conocido y que evidenciamos cuando los comparamos con fragmentos estándar. Los cambios de pocas bases también se pueden detectar cuando éstas forman parte de una determinada diana de restricción y al someter al producto de amplificación al corte con la enzima de restricción correspondiente no se obtienen los fragmentos esperados. Otra forma de diagnóstico consiste en amplificar el segmento en el cual se cree que hay un cambio y proceder a su secuenciación. Si se detecta la alteración (un cambio de una base, p. ej.), se fabrican dos sondas de unos 20 nucleótidos, idénticas excepto en el nucleótido variable; una lleva la secuencia normal y la otra la modificada. A estas sondas se las denomina ASO (Allelic Specific Oligomer). Se marcan con radiactividad y se hibridan al DNA en estudio. Las condiciones de esta operación (temperatura y lavados) se realizan de tal forma que sólo se una la secuencia que tiene el 100 % de complementariedad, con lo cual podremos detectar fácilmente si el nucleótido estudiado está o no presente en el DNA estudiado.

El número de enfermedades que pueden diagnosticarse utilizando PCR es cada vez mayor; entre las más frecuentes están la anemia falciforme, la DMD, la hemofilia A, la fibrosis quística, las talasemias y la enfermedad de Huntington.

- Diagnóstico de enfermedades infecciosas

Otra aplicación muy extendida de esta metodología es la detección de infecciones, ya sean fúngicas, bacterianas o víricas. La gran ventaja frente a las técnicas clásicas es que permite la detección vírica aunque haya sólo una célula infectada en la muestra de sangre. Lo que detectamos es el genoma vírico, ya sea DNA o RNA. En la actualidad se detectan por esta forma HIV, HTLV, CMV, HBV, HCV, virus herpes, HPV, etc.

- Estudio de polimorfismos genéticos del sistema HLA

La técnica de PCR es también útil para el estudio de estos polimorfismos genéticos y su asociación a la predisposición de algunas enfermedades (p. ej., la diabetes tipo 1). Además puede usarse para la tipificación alélica en los trasplantes de órganos o para la identificación genética de cada individuo, lo que ha supuesto un gran avance para la medicina legal y forense.

- Estudio de oncogenes

Los oncogenes son genes que se encargan de regular la división celular; de ahí que cuando sufren algún cam-

bio, como la mutación de una sola base, podrían inducir una división celular incontrolada provocando una neoplasia. La aplicación de la PCR en este campo va encaminada a la caracterización de mutaciones en estos oncogenes. En el caso del oncogen humano ras, alteraciones en su secuencia se han relacionado con cierto tipo de tumores.

- Aplicaciones a la investigación

Predeciblemente la PCR será útil en cualquier situación que requiera el examen de **DNA** y, como ya hemos descrito, en cualquier investigación que envuelva análisis genético, ya sea en arqueología como en medicina forense. Desde el comienzo de la aplicación de la PCR al diagnóstico, el desarrollo de sus aplicaciones a la investigación en biología molecular ha ido paralelo, siendo varias las metodologías que han mejorado gracias a su uso. Por un lado tenemos la secuenciación, que ha ganado en facilidad y rapidez, pues al utilizar la PCR podemos obtener la cantidad necesaria de material para su estudio sin necesidad de utilizar organismos como bacterias, pudiendo partir de cantidades mucho más pequeñas de muestra. Por otro lado, tenemos el estudio de la expresión génica, es decir, el estudio del mRNA producto de un gen, que, como ya hemos visto, convertimos en cDNA mediante transcriptasa inversa para su posterior procesamiento mediante PCR. En este caso la gran ventaja de esta técnica no es tan sólo su rapidez, sino también su sensibilidad de detección, capaz de detectar una sola copia de RNA.

Para acabar podemos concluir que la PCR está claramente establecida como un importante método de análisis y manipulación de DNA y que las aplicaciones aquí descritas no son exhaustivas. Muchas nuevas aplicaciones y variaciones del método ya están siendo probadas en los laboratorios y supondrán grandes avances en el estudio y conocimiento de la genética.

Agradecimientos

Damos las gracias al Dr. A. Torres, del Servicio de Nefrología del Hospital Universitario de Canarias, por la orientación y atenta co-

rrección del manuscrito. P. M. V. y C. H. C. reciben financiación del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Ministerio Sanidad y Consumo, proyecto 90/0046, y de la Consejería de Educación, Cultura y Deportes del Gobierno de Canarias, proyecto 92/08.03.90.

Bibliografía

1. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *En Molecular Cloning*. Edt. CSH Laboratory Press, 1989.
2. Davis LG, Dibner MD, Battey JF: *En Basic Methods in Molecular Biology*. Edt. Elsevier, 1986.
3. Okayama H, Berg P: High efficiency cloning of full length complementary DNA. *Mol Cell Biol*, 2:161-170, 1982.
4. Kaiser K, Murray NE: The use of phage lambda replacement vectors in the construction of representative genomic DNA libraries in DNA cloning. Edt DM Glover. IRL Press, 1-48, 1986.
5. Sanger F, Miklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:5463-5467, 1977.
6. Maxam AM, Gilbert W: A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74:560-564, 1977.
7. Biggin MD, Gibson TJ, Hong GF: Buffer gradient gels and ³⁵S label as an aid to rapid DNA sequence determination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80:3963, 1977.
8. Sanger F, Coulson AR, Hong GF, Hill DF, Petersen GB: Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *J Mol Biol*, 162:729, 1982.
9. Henikoff S: Unidirectional digestion with exonuclease creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene*, 28:351, 1984.
10. Mullis KB: The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 56-65, 1990.
11. Graul AI: Automated gene amplification based on PCR technique. *DN & P*, 2:94-98, 1989.
12. Saiki RK, Gelfand DH y cols.: Primer-Directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491, 1988.
13. Eisenstein Barry I: The polimerasa chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med*, 18:178-183, 1990.
14. Gibbs Richard A: DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Anal Chem*, 62:1202-1214, 1990.
15. Oriola J: Metodología de la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Diag Biol*, 40:31-34, 1991.
16. Wright PA: The polymerase chain reaction: mirade or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. *J Pathol*, 162:99-117, 1990.
17. Orita M, Suzuki Y y cols.: Rapid and Sensitive Detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5:874-879, 1989.