

UF6

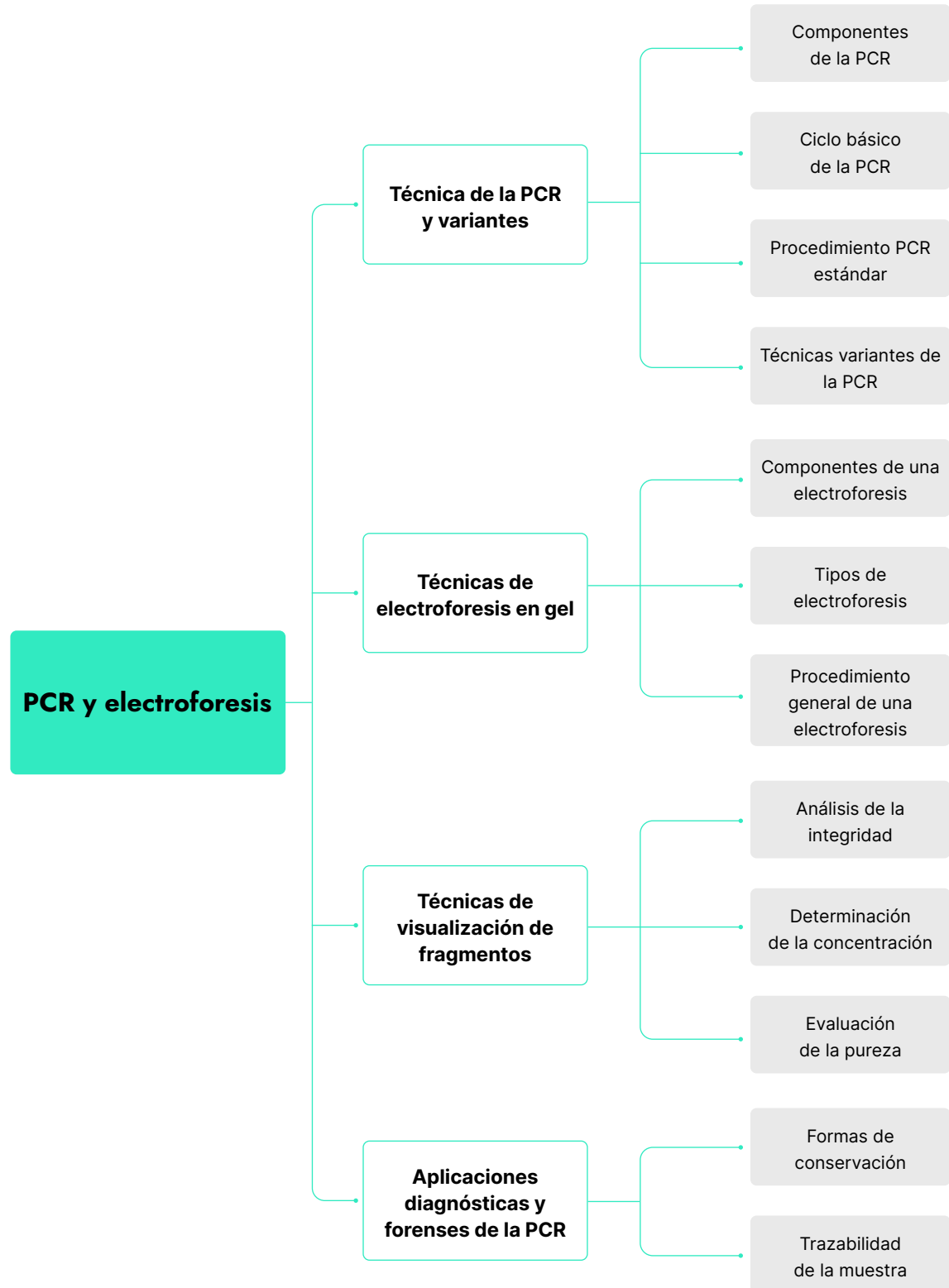
PCR y electroforesis

Biología molecular y citogenética

ÍNDICE

Mapa conceptual	03
1. Técnica de PCR y variantes	04
1.1. Componentes de la PCR.....	04
1.2. Etapas de un ciclo básico de PCR	05
A. Desnaturalización.....	06
B. Hibridación (<i>Annealing</i>).....	06
C. Elongación o extensión.....	06
1.3. Procedimiento PCR estándar	07
1.4. Técnicas variantes de la PCR.....	08
2. Técnicas de electroforesis en gel.....	11
2.1. Componentes de una electroforesis.....	12
A. Geles de agarosa.....	13
B. Geles de poliacrilamida (Page).....	14
2.2. Tipos de electroforesis.....	15
2.3. Procedimiento general de una electroforesis	16
3. Técnicas de visualización de fragmentos e interpretación de resultados	18
3.1. Tinción de geles de agarosa.....	18
3.2. Documentador de geles.....	19
3.3. Procedimiento de visualización e interpretación de resultados	20
4. Aplicaciones diagnósticas y forenses de la PCR	22
4.1. Aplicaciones de la PCR en el diagnóstico clínico	22
4.2. Aplicaciones de la PCR en genética forense	22
A. Huella o mapa genético	23
B. Prueba de paternidad	24

Mapa conceptual



01 Técnica de PCR y variantes

DEFINICIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés: *polymerase chain reaction*) es una reacción enzimática *in vitro* de **segmentos específicos de ADN** que consiste en un proceso de desnaturalización, unión de cebadores específicos y síntesis de ADN.

Esta técnica aprovecha las características de **replicación del ADN** y amplifica *in vitro* un fragmento de ADN de una forma muy similar al proceso de replicación que ocurre en las células.

La PCR es una técnica muy **específica, rápida y sensible** para detectar cantidades ínfimas de ADN y permitir su identificación.

1.1. Componentes de la PCR

Los componentes **necesarios** para la realización de la PCR se muestran en la Tabla 1:

COMPONENTES	CARACTERÍSTICAS
ADN molde	• Donde se encuentra el fragmento de interés que queremos amplificar. • Debe tener un alto grado de integridad y estar libre de contaminantes. • Aproximadamente, la cantidad idónea para el caso de los humanos, suele ser entre 100 y 300 ng.
ADN polimerasa termoestable	• Enzima que con una temperatura y buffer apropiado es capaz de generar copias de ADN a partir de un ADN molde. • La más utilizada se aisló de la bacteria <i>Thermus aquaticus</i>. La temperatura óptima de la enzima es 72°C y actúa en presencia de iones de magnesio.
Cebadores, primers, oligonucleótidos o iniciadores	• Son secuencias cortas (10-30 bases) de nucleótidos de cadena sencilla necesarias para que se produzca la amplificación, ya que la ADN polimerasa únicamente es capaz de añadir nucleótidos al extremo 3' de una cadena de ADN. • Se diseñan específicamente para que sean complementarios de secuencias del ADN molde y sirven para delimitar el fragmento que se quiere amplificar. • Son necesarios cebadores de dos tipos: <i>forward</i> (F) y <i>reverse</i> (R). Se unen al extremo 5' de una cadena y al extremo 3' de la otra, respectivamente. • La concentración aproximada de cada cebador suele ser de entre 200 y 400 nM.

Desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP)	• Son el sustrato que utiliza la enzima ADN polimerasa para incorporarlo a las cadenas en crecimiento. • En la mezcla, los dATP, dCTP, dGTP y dTTP deben estar en la misma concentración, que suele ser de entre 50 y 200 μM.
Cloruro de magnesio (MgCl_2)	• Cofactor enzimático importante para que la ADN polimerasa desarrolle su actividad. • Como referencia, la concentración de cloruro de magnesio en la mezcla de reacción suele ser de 1,5 mM.
Agua	• Se utiliza agua estéril en grado de biología molecular (libre de ADNasas y ARNasas).
Buffer o tampón	• Suele contener KCl y Tris y es importante para mantener el pH de la mezcla durante la reacción.
Aditivos o potenciadores	• Sustancias que actúan como potenciadores de la PCR aumentando su rendimiento o disminuyendo la aparición de productos no deseados. Su uso se debe limitar a los casos problemáticos. • Son aditivos: gelatina, glicerol, sulfato amónico, formamida...

Tabla 1. Componentes para la realización de una PCR.

El conjunto de estos componentes (excepto el ADN molde y la ADN polimerasa) para llevar a cabo la PCR se conoce como «master mix». La enzima polimerasa **comercial** viene acompañada de un buffer, el cual puede contener MgCl_2 . Otra posibilidad es que el MgCl_2 venga en un tubo aparte.

1.2. Etapas de un ciclo básico de PCR

La PCR se lleva a cabo en un **termociclador** que permite programar ciclos repetidos con distintas temperaturas y tiempos de incubación.



Fig. 1. Termociclador: aparato en el que se lleva a cabo la PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa se desarrolla en **tres etapas** principales, que exponemos a continuación.

A. Desnaturalización

Se realiza a 94-96°C para que se produzca la rotura de los puentes de hidrógeno entre ambas cadenas y estas se separen. La duración de esta etapa es de unos minutos (entre uno y cinco) dependiendo del tamaño del ADN que amplificar.

B. Hibridación (*Annealing*)

Fase en la que los primers o cebadores se acoplan con cada una de las cadenas separadas de ADN molde delimitando el fragmento que se va a amplificar.

La temperatura (temperatura de *annealing*) tiene que ser precisa para que los cebadores se unan al ADN en la posición correcta. Aunque depende del número y tipo de nucleótidos que constituyen el cebador, habitualmente se realiza a una temperatura de entre 55 y 57°C, durante 15 segundos.

C. Elongación o extensión

La enzima ADN polimerasa (Taq-polimerasa) añade nucleótidos (dNTP) en el extremo 3' de cada una de las cadenas. La temperatura óptima de la enzima es de 72°C y el tiempo de la fase de extensión va a depender de la velocidad de polimerización de la enzima y la longitud del fragmento que se va a utilizar, aunque este proceso está bastante estandarizado y suele durar unos 5 minutos.

Después del primer ciclo (desnaturalización, hibridación y elongación), el fragmento de ADN se duplica y se encuentra disponible para volverse a replicar en el segundo ciclo. Al final de cada ciclo siempre resulta el doble de secuencias diana que al inicio, de modo que la amplificación es exponencial, ya que el número de copias aumenta a razón de 2^n , donde n es el número de ciclo.

Sigue la fórmula:

$$\text{n.º de copias} = 2^n \text{ (donde } n \text{ es el número de ciclos realizados)}$$

Puedes ver el **proceso general** de la PCR en la Figura 2.

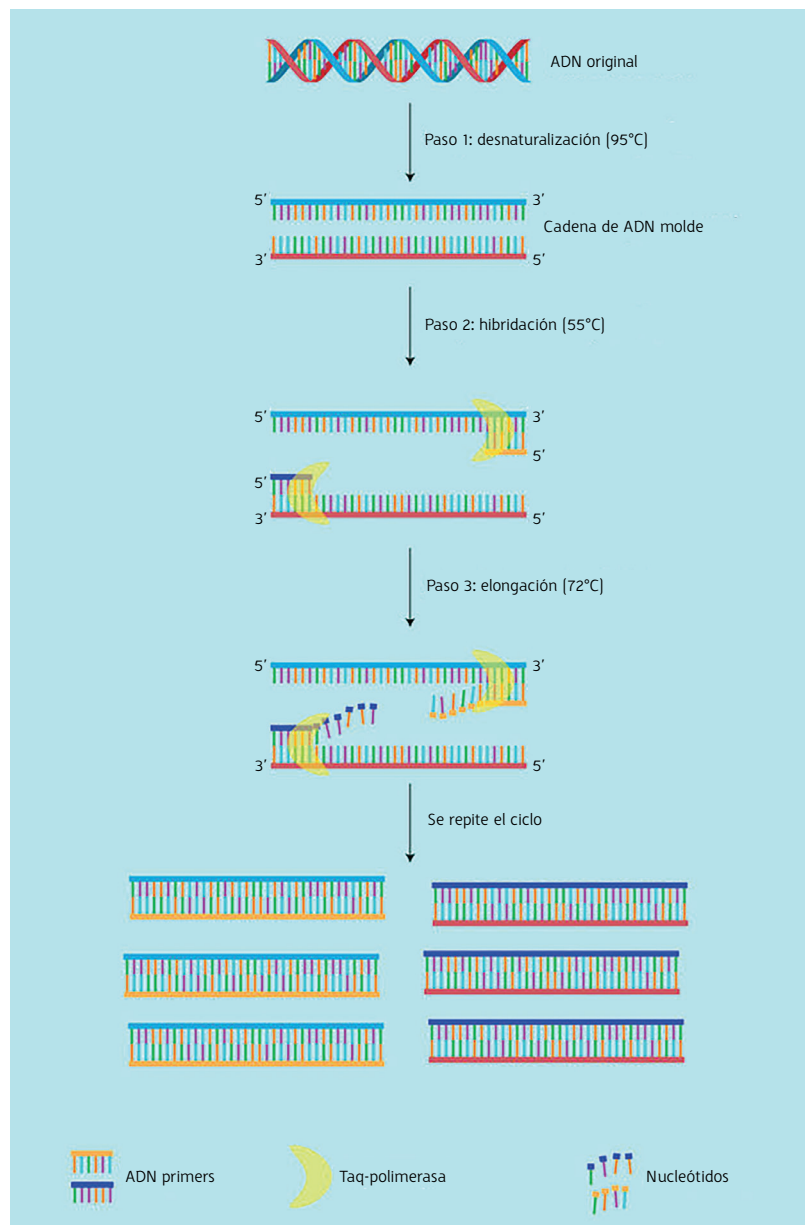


Fig. 2. Ciclo de amplificación de la PCR.

1.3. Procedimiento PCR estándar

Para llevar a cabo una PCR estándar o convencional, los **pasos** que seguir son los siguientes:

1. Elaborar el diseño de la PCR decidiendo el volumen final de mezcla en el que se llevará a cabo la reacción. (Por lo general, es de 25 a 50 μL .)
2. Calcular los volúmenes de cada reactivo teniendo en cuenta la concentración final a la que irán en la mezcla.
3. Preparar la mezcla de reacción con todos los reactivos excepto la ADN polimerasa y el ADN molde.

4. Repartir la cantidad de mezcla adecuada en cada tubo de reacción y añadir el ADN molde.
5. Preparar un control positivo (con ADN que contiene el fragmento a amplificar) y un control negativo (con ADN que no contiene el fragmento a amplificar). Se puede utilizar también un control blanco (sin ADN molde).
6. Añadir la cantidad adecuada de enzima Taq-polimerasa en cada tubo de reacción.
7. Programar el termociclador e introducir las muestras para iniciar la PCR.
8. Analizar los productos de reacción mediante electroforesis (ver epígrafe 2).

1.4. Técnicas variantes de la PCR

A partir de la PCR convencional se desarrollaron otras técnicas de PCR que permitieron ampliar el **campo de aplicación** de la biología molecular. Puedes ver algunas de estas variantes en la Tabla 2.

TÉCNICAS VARIANTES DE LA PCR	CARACTERÍSTICAS
<i>Nested PCR</i> o PCR anidada	• Consiste en realizar una segunda amplificación empleando el primer producto de amplificación como molde. Se utiliza cuando hay muy poco ADN en la muestra que analizar y con esto se consigue mejorar la especificidad y el rendimiento. • Se emplean dos parejas de <i>primers</i>: una externa, en la primera PCR para amplificar el ADN molde original, y otra pareja interna, en la segunda para amplificar el producto obtenido de la primera PCR. • Se necesita más manipulación, con lo que hay mayor riesgo de contaminación.
RT-PCR	• Como la técnica de PCR solo amplifica ADN si tenemos ARN, es necesario sintetizar una molécula de ADN complementario que sirva de ADN de partida para la PCR convencional. Se emplea transcriptasa inversa (enzima polimerasa recombinante derivada de <i>Thermus Thermophilus</i>) que sintetiza ADN a partir de ARN.
Multiplex PCR	• Permite la amplificación simultánea de varios fragmentos de ADN en la misma PCR. Se introducen en la mezcla de reacción varios pares de primers (hasta ocho), lo que equivale a realizar a la vez varias PCR. • Permite reducir tiempo y costes en el análisis de ácidos nucleicos.

**PCR a tiempo real
o PCR
cuantitativa**

- La PCR a tiempo real (qPCR) se diferencia de la PCR convencional en que es posible monitorizar la amplificación de la molécula de ADN molde durante cada ciclo de amplificación y no al final.
- Esto es posible porque se añaden a la mezcla reactivos fluorescentes llamados fluorocromos (agentes intercalantes o sondas de hibridación específicas).
- Los termocicladores para llevar a cabo la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y pueden medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los tubos de reacción en los que se realiza la amplificación.
- La principal ventaja es su rapidez, ya que no necesita proceso adicional de detección y, al ser un sistema cerrado, disminuye también el riesgo de contaminación.
- Las diferencias que presenta la PCR a tiempo real frente a la PCR convencional puedes verlas en el Esquema 1.

Tabla 2. Variantes de la PCR convencional.

PCR a tiempo real	PCR convencional
• Longitud de amplicón de 50-150 pb. • Necesidad de dos cebadores más una sonda. • Aparato de PCR a tiempo real. • Coste mayor (sonda y reactivos). • Mayor sensibilidad. • Posibilidad de cuantificación. • Mayor rapidez.	• Longitud de amplicón de 5 kb (con enzimas de hasta 20 Kb). • Solo dos cebadores. • Termociclador convencional. • Coste inferior. • Sensibilidad adecuada en la mayoría de los casos. • Sin posibilidad de cuantificación. • Necesidad de electroforesis posterior.

Esquema 1. Principales diferencias de la PCR a tiempo real frente a la PCR convencional.

¿SABÍAS QUE...?

Una aplicación en PCR es la secuencia de ADN específica que se amplifica durante el proceso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es una copia duplicada exponencialmente de la región de interés del ADN original.



Fig. 3. Proceso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el ADN.



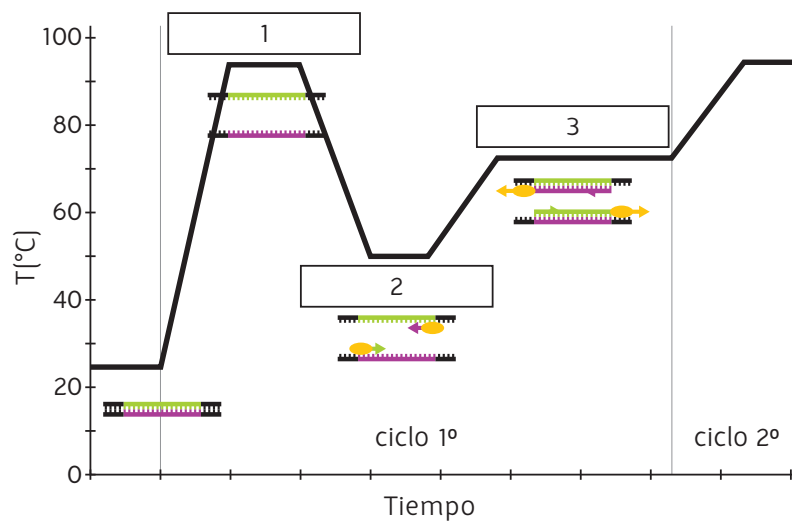
1

CASO PRÁCTICO



MANEJO DEL TERMOCICLADOR

La imagen siguiente muestra, en el programa del termociclador, uno de los ciclos de replicación. Identifica cada etapa e indica a continuación qué parámetros se pueden programar en un termociclador.



SOLUCIÓN

- » Las etapas son: 1. Desnaturalización; 2. Hibridación; 3. Elongación.
- » En el termociclador se programa temperatura y tiempo de incubación para cada fase del ciclo de PCR y el número de veces que se va a repetir el ciclo, es decir, el número de ciclos de repetición.

02 Técnicas de electroforesis en gel

DEFINICIÓN

La **electroforesis** es una técnica de separación, que se puede emplear en moléculas como moléculas el ADN, el ARN o las proteínas. Esta separación se produce en función de su tamaño y carga eléctrica, gracias a una corriente eléctrica.

Se usa la **corriente eléctrica** para mover las moléculas a través de un gel o de otro tipo de matriz. Las moléculas con carga eléctrica positiva (cationes) irán hacia el cátodo, mientras que las moléculas con carga negativa (aniones) migrarán hacia el ánodo.

Los poros del gel permitirán que las moléculas más pequeñas se muevan más rápido que las moléculas más grandes y el uso de estándares de tamaño conocido en el mismo gel permitirá **determinar el tamaño** de las moléculas por comparación.

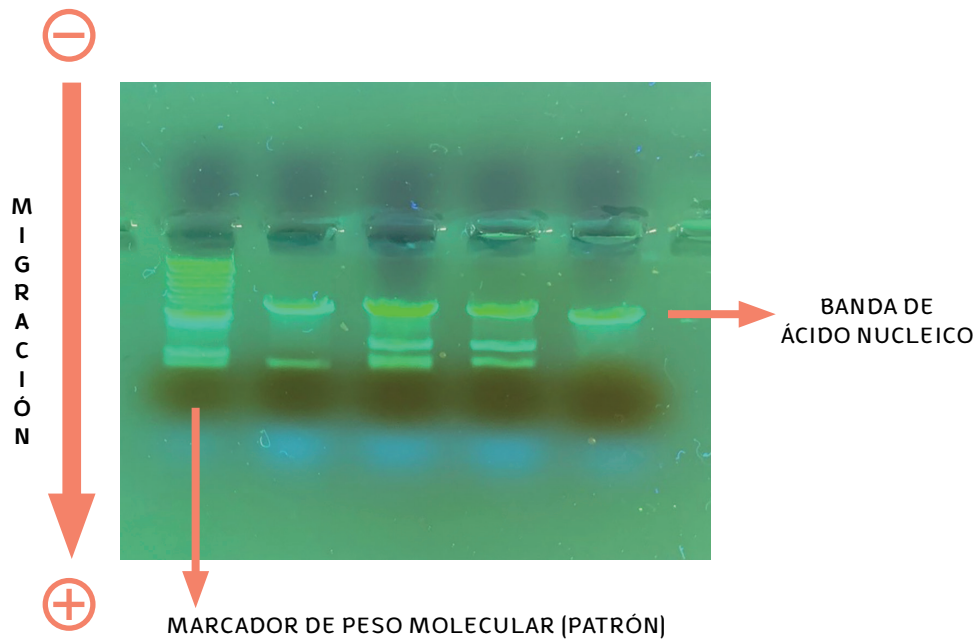


Fig. 4. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa.

2.1. Componentes de una electroforesis

Para llevar a cabo una electroforesis se necesitan los elementos que se enumeran en la Tabla 3.

ELEMENTOS	CARACTERÍSTICAS
Cubeta de electroforesis	Dispositivo que permite generar un campo eléctrico alrededor de un soporte en el que se depositan las muestras que se quieren separar. La cámara en sus extremos tiene dos electrodos que se conectan a una fuente de energía: ánodo (+) y cátodo (-). Según la forma en la que se disponga el soporte en la cámara, hay cubetas de electroforesis horizontal o vertical.
Soporte electroforético	Medio de soporte donde se sitúa la muestra durante la separación. Se pueden utilizar diferentes tipos de soporte: papel, acetato de celulosa, gel de agarosa, gel de acrilamida... En el papel o similares (acetato de celulosa), el mecanismo de separación es fundamentalmente la carga, ya que la muestra queda sobre la superficie y avanza a lo largo de ella con escasa fricción. En un medio semisólido o gelatinoso, como son los geles, la muestra queda embebida en el medio y debe avanzar a través de la malla o matriz tridimensional que forman los polímeros. En este caso, como la fricción de la muestra en el medio es notable, la separación se produce en función de la carga, el tamaño y la forma. La electroforesis de ácidos nucleicos se realiza en geles formados por polímeros de agarosa o poliacrilamida.
Fuente de alimentación	Proporciona el campo eléctrico mediante dos electrodos entre los que se establece una diferencia de potencial.
Buffer/ tampón de electroforesis	El buffer de corrimiento proporciona el medio idóneo para la transmisión de la corriente eléctrica y mantiene el pH sin variaciones mientras se realiza la electroforesis. Es también el medio usado para preparar el gel. Tienen una composición y fuerza iónica determinada, ya que, si la fuerza iónica es elevada, se genera calor, el gel se funde y el ácido nucleico se degrada. En el caso de que la presencia de iones sea escasa, no hay conductancia eléctrica y los ácidos nucleicos no se desplazan. Los tampones de electroforesis más utilizados para geles de agarosa y poliacrilamida son: TAE (que contiene Tris-acetato y EDTA) y TBE (que contiene Tris-borato y EDTA). Suelen prepararse u obtenerse preparadas en soluciones concentradas (10 X) y se diluyen con agua hasta la concentración de uso, que es habitualmente de 0,5 X o 1 X.

Marcador de peso molecular	Son moléculas de ácidos nucleicos o proteínas de tamaño conocido que permiten determinar por comparación el tamaño de las moléculas contenidas en las muestras sometidas a electroforesis.
Buffer de carga de la muestra	Se añade a la muestra que se quiere separar para darle peso, densidad y color, de modo que permite que se deposite con mayor facilidad en el pocillo, evitando su salida de este y permitiendo monitorizar el corrimiento.

Tabla 3. Componentes necesarios para realizar una electroforesis.

IMPORTANTE

La muestra que se va a analizar por electroforesis se dispone sobre un soporte (en general, polímeros que restringen el movimiento de las moléculas a través del medio). El **soporte idóneo** para muestras de ácidos nucleicos es un gel semisólido o gelatinoso que puede ser de agarosa o de poliacrilamida.

A. Geles de agarosa

La agarosa es un polisacárido extraído de algas marinas que no presenta toxicidad. Tiene la propiedad de que a temperaturas superiores a 50-60°C es líquida y cuando enfría se solidifica, formando un gel altamente poroso.

El gel se obtiene disolviendo la agarosa en un tampón de electroforesis (TAE o TBE) y se funde con calor hasta obtener una solución homogénea y transparente. La solución se vierte en un molde y se coloca un peine que forma los «pocillos» donde se depositan las muestras. Al enfriarse, la agarosa polimeriza para formar una matriz porosa que, según la concentración de agarosa en la solución, variará el tamaño del poro.

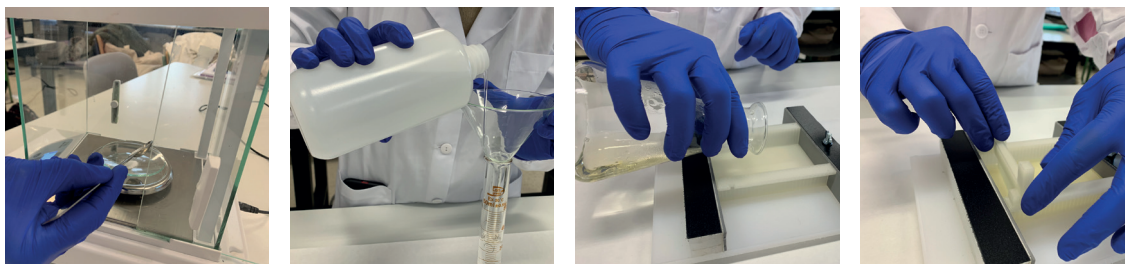


Fig. 5. Proceso de obtención de un gel de agarosa: pesar la agarosa, mezclar con tampón de electroforesis y calentar, verter en el molde y colocar un peine para los pozos o ranuras donde se depositarán las muestras.

La agarosa presenta **ventajas** respecto a la poliacrilamida, ya que no tiene toxicidad y, según la concentración de agarosa que se emplea, permite realizar el análisis de ácidos nucleicos con pesos moleculares variados. Sin embargo, el poder de resolución de la agarosa es menor que el de los geles de poliacrilamida.

Una vez realizada la electroforesis, se pueden visualizar los fragmentos mediante la **tinción del ADN**. Esta tinción puede realizarse de dos formas diferentes (puedes verlo en el epígrafe 3):

- » Añadir una sustancia durante la preparación del gel que se intercala entre las bases del ADN y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta.
- » Teñir el gel una vez finalizada la electroforesis.



VÍDEOLAB

Para consultar el siguiente vídeo de cómo crear tu propio gel de agarosa, escanea el código QR o [pulsa aquí](#).

B. Geles de poliacrilamida (Page)

La **acrilamida** es un polímero sintético, termostable e incoloro con el que se pueden elaborar geles con un amplio intervalo de tamaño de poro. No es un compuesto con mucha toxicidad aguda, pero tiene efecto acumulativo en exposiciones continuas. Es cancerígena y teratógena, y además tiene neurotoxicidad, por lo que debe manejarse con precaución. Una vez polimerizada, la poliacrilamida resulta inocua.

El gel de acrilamida es el resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida (agente entrecruzador que permite la polimerización). En función de la cantidad de bisacrilamida añadida, se modifica el **entrecruzamiento**. Utilizamos mayor o menor entrecruzamiento (más o menos bisacrilamida) en función de las moléculas que separar.

El gel de acrilamida soporta **mayores voltajes** que la agarosa, puede teñirse o incluso desteñirse por varios procedimientos y permite separar moléculas de menor tamaño con mayor poder de resolución.

Para visualizar los fragmentos es necesario hacer una **tinción del ADN**, mediante la adición de una sustancia fluorescente que se intercala entre las bases del ADN. Esta tinción puede realizarse de formas diferentes (puedes verlo en el epígrafe 3):

- » Añadir la sustancia fluorescente durante la preparación del gel.
- » Teñir el gel una vez finalizada la electroforesis.



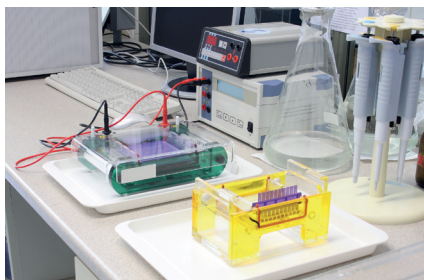
Fig. 6. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida. Bandas de proteínas con diferentes pesos moleculares en función de su posición.

2.2. Tipos de electroforesis

Según el modo de disposición del soporte electroforético en la cámara existen dos tipos de electroforesis: **horizontal** y **vertical** (Esquema 2).

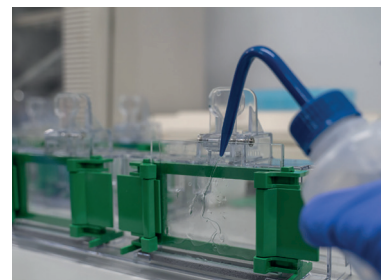
Electroforesis horizontal

- Se utiliza fundamentalmente con gel de agarosa para ácidos nucleicos.
- El tampón de electroforesis debe cubrir totalmente el gel para evitar que se seque por el calentamiento que se produce como consecuencia del paso de la corriente eléctrica.
- Las muestras se depositan con micropipeta llenando un «pocillo» creado al polimerizar el gel. Se puede realizar de dos maneras:
 - **En seco.** Llenar parcialmente la cubeta con tampón de electroforesis de forma que la parte superior del gel no quede cubierta. Se depositan las muestras en los pocillos secos para que el líquido no genere interferencias. Con las muestras cargadas, se corre unos minutos a poco voltaje y luego se cubre por completo el gel con el tampón de electroforesis.
 - **Submarina.** Las muestras se colocan con el gel sumergido totalmente en buffer.



Electroforesis vertical

- Se utiliza con geles de acrilamida para proteínas o ácidos nucleicos de pequeño tamaño.
- El gel está entre dos placas rectangulares y la corriente eléctrica se genera gracias al tampón de electroforesis que embebe el gel y llena las cubetas o compartimentos del ánodo y el cátodo.
- Las muestras se depositan con micropipeta llenando un «pocillo» creado al polimerizar el gel.



Esquema 2. Tipos de electroforesis: horizontal y vertical.

2.3. Procedimiento general de una electroforesis

El procedimiento básico para realizar una electroforesis incluye los siguientes **pasos**:

1. Preparar un gel de agarosa a poliacrilamida a la concentración requerida.
2. Preparar las muestras que analizar mezclándolas con el buffer de carga adecuado.
3. Cargar las muestras en el gel.
4. Realizar la electroforesis al voltaje pertinente.
5. Visualizar los resultados.

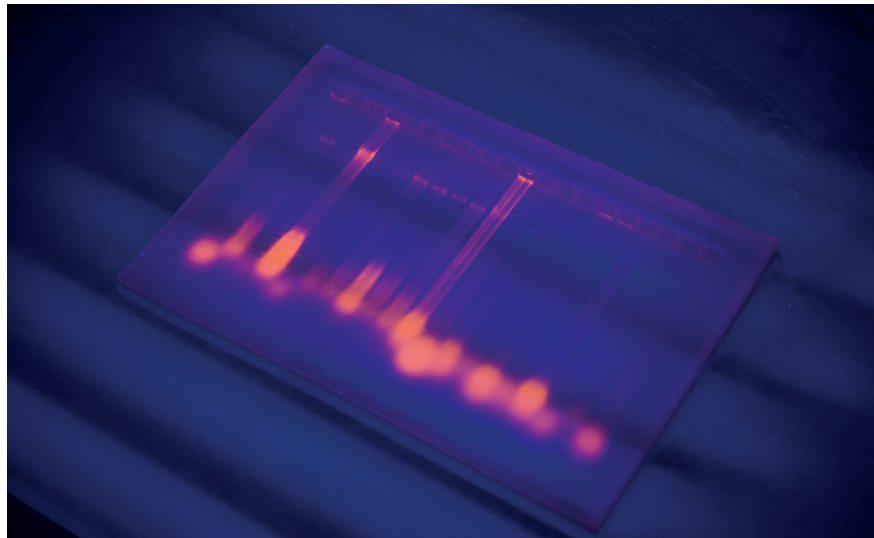


Fig. 7. Resultados de la electroforesis después de la PCR.

Características de la electroforesis de ácidos nucleicos

- » La electroforesis horizontal en gel de agarosa con una concentración de 0,5 a 2% es el método estándar para separar y purificar fragmentos de ADN cuando no se requiere un alto poder de resolución.
- » La carga eléctrica negativa de los fragmentos de ADN la otorgan sus grupos fosfatos. Al someterse durante la electroforesis a un campo eléctrico, las moléculas de ácidos nucleicos se desplazan al polo positivo (ánodo).
- » Como la forma de la molécula de ADN siempre es la misma, la movilidad de la electroforesis dependerá únicamente de la longitud (pb) y se representa en bandas. Se produce un patrón de bandas en el que cada banda corresponde a un fragmento de un tamaño concreto. La utilización de marcadores permite calcular los pesos moleculares de los fragmentos de ADN de la muestra problema.
- » El corrimiento electroforético se produce entre 25 y 150 v. A mayor voltaje, mayor velocidad de corrimiento; y a mayor velocidad, bandas menos nítidas e irregulares.

El ADN migrará hacia el ánodo (polo positivo) y se puede observar un pequeño burbujeo en el ánodo y en el cátodo como señal de desarrollo de la electroforesis, así como el avance de las muestras a través de la visualización de los colorantes contenidos en el buffer de carga.

» Múltiples factores pueden afectar a la migración de ADN en una electroforesis: concentración del gel utilizado, tamaño de la molécula de ADN de la muestra, temperatura y composición del buffer de electroforesis, contaminación de la muestra...

2

CASO PRÁCTICO



PREPARACIÓN DE GEL DE AGAROSA

Para visualizar los resultados de una PCR, debes preparar un gel de agarosa. El fragmento de ADN que has amplificado es de 800 pares de bases (pb). ¿Cuál es el porcentaje de agarosa que debes utilizar en el gel?

SOLUCIÓN

Los geles de agarosa pueden prepararse a distintas concentraciones. Según el tamaño del fragmento que separar, la concentración de agarosa es diferente. Para fragmentos pequeños, están indicados geles concentrados; y para fragmentos grandes, geles menos concentrados. (A mayor concentración de agarosa, mayor poder de resolución).

El porcentaje de agarosa recomendado en el gel según el tamaño del ADN que separar es:

PORCENTAJE DE AGAROSA RECOMENDADO	RESOLUCIÓN ÓPTIMA PARA ADN (PB)
0,5	1.000-30.000
0,7	800-12.000
1	500-1.000
1,2	400-7.000
1,5	200-3.000
2	50-2.000

03 Técnicas de visualización de fragmentos e interpretación de resultados

Una vez terminada la electroforesis, podemos **examinar el gel** y saber el tamaño de los fragmentos de ADN que se encuentran en él. Para visualizar los fragmentos, es necesario realizar la tinción del ácido nucleico con bromuro de etidio u otros reactivos con menor capacidad mutagénica como *SYBR Green*, *SYBR Safe*, *SYBR Gold*, *GelRed*, *Realsafe*, azul de metileno...

IMPORTANTE

El bromuro de etidio es un reactivo muy tóxico y mutagénico, por lo que su uso debe sustituirse por alternativas actuales menos tóxicas.

En el siguiente enlace puedes consultar los principales daños para la salud derivados de la exposición a bromuro de etidio y las medidas de prevención en caso de usarlo: <https://bit.ly/3HZBUS0>.

3.1. Tinción de geles de agarosa

Los ácidos nucleicos separados por electroforesis en gel pueden visualizarse mediante tinción con **colorantes fluorescentes**, lo que va a permitir evaluar su integridad y estimar la concentración mediante análisis comparativo con patrones de concentración conocida. Estos colorantes fluorescentes (bromuro de etidio o similares no tóxicos) se intercalan entre las bases nitrogenadas del ADN y emiten fluorescencia cuando se iluminan con luz ultravioleta.

Existen **dos formas** diferentes de realizar el teñido del ADN (Esquema 3):

- Preparar el gel con el agente intercalante incorporado (bromuro de etidio o similar).
- Una vez finalizada la electroforesis, teñir el gel con una solución de bromuro de etidio o similar.

1. Obtención de las muestras de ADN.
2. Separación del gel de agarosa.
3. Preparación de las muestras con el buffer de carga.
4. Carga de las muestras.
5. Corrimiento del gel.
6. Teñido del gel.
7. Visualización del gel con luz ultravioleta y análisis de resultados.

Cuando la agarosa está aproximadamente a 60°, antes de verterla sobre el molde se añade el colorante fluorescente y, de esta forma, cuando termina la corrida del gel, puede visualizarse. (Se eliminaría el paso 6.)

Este paso se realizará solo en el caso de no incorporar el colorante fluorescente al gel.

Esquema 3. Procedimiento de electroforesis en gel de agarosa con tinción.

3.2. Documentador de geles

El documentador de geles es el equipo que permite visualizar los fragmentos de ácido nucleico en el gel **después de la electroforesis** y obtener una fotografía de él para su análisis después de la electroforesis y obtener una fotografía de él para su análisis.

Un **equipo de análisis de geles** consta de un transiluminador de luz ultravioleta y un equipo de fotografía.

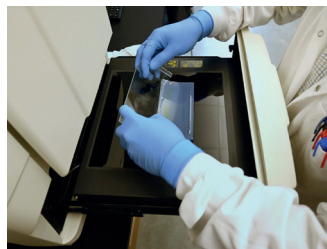
COMPONENTES	CARACTERÍSTICAS	IMAGEN
Transiluminador	Está formado por una fuente de luz ultravioleta situada bajo una superficie transparente en la que se coloca el gel. El agente intercalante emite fluorescencia al ser excitado por la luz ultravioleta, de modo que se visualizan las bandas con los diferentes fragmentos de ácido nucleico.	
Equipo de fotografía	Es un sistema de captación de imágenes que trabaja con luz ultravioleta y un software específico para imágenes de gel. Permite visualizar el gel en un monitor y, por lo tanto, mejorar condiciones de la imagen, guardar copias o realizar mediciones. Si no se dispone de un analizador de imágenes, se puede tomar una fotografía del gel con una cámara instantánea.	

Tabla 5. Elementos de un documentador de geles: transiluminador y equipo de fotografía.

3.3. Procedimiento de visualización e interpretación de resultados

Los resultados de una reacción de PCR convencional se visualizan al usar electroforesis en un gel en el que se incluye un estándar o **marcador de peso molecular** para determinar el tamaño de los fragmentos en la muestra de PCR.

El **procedimiento** que seguir será el siguiente:

1. Desconectar los cables y retirar la tapa de la cubeta una vez acabada la electroforesis.
2. Teñir el gel en caso de que no se haya incorporado previamente el colorante fluorescente.
3. Introducir el gel en el transiluminador y encender la luz ultravioleta.
4. Tomar una fotografía del gel.
5. Registrar los resultados mediante un sistema computarizado de análisis de imágenes, con un lector de geles de agarosa o un *software* de imágenes de geles.

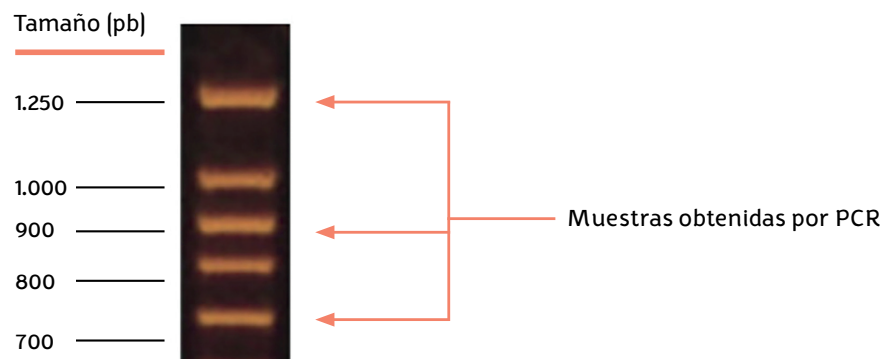


Fig. 8. Gel de agarosa de tres muestras obtenidas por PCR. Fragmentos de 1.250, 900 y 700 pares de bases (pb), respectivamente.

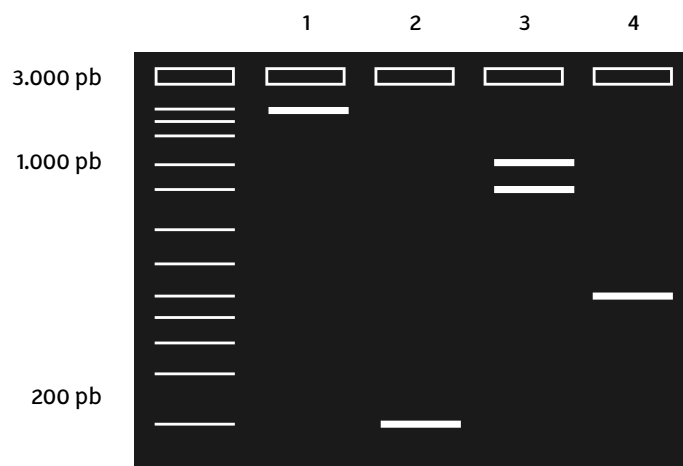
3

CASO PRÁCTICO



INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE UNA PCR OBTENIDOS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Realizas una PCR de cuatro muestras de ADN donde amplificas un fragmento de un gen con un tamaño de 200 pares de bases (pb). ¿Cuál de las cuatro muestras de la imagen contiene el fragmento del gen que buscas?



SOLUCIÓN

- » Cada una de las líneas definidas en un gel se llaman «bandas».
- » Puedes determinar el tamaño aproximado de una banda al compararla con el marcador de peso molecular.
- » La banda de la muestra 1 tiene un tamaño aproximado de 3.000 pb.

04 Aplicaciones diagnósticas y forenses de la PCR

La PCR tiene gran variedad de aplicaciones en muchos ámbitos, entre los que destacan su uso en el diagnóstico clínico y en el análisis genético forense.

4.1. Aplicaciones de la PCR en el diagnóstico clínico

Entre las múltiples aplicaciones de la PCR, se encuentra el diagnóstico y valoración de enfermedades infecciosas, genéticas y oncológicas.

- » **Enfermedades infecciosas.** La PCR ha adquirido un gran valor diagnóstico en los laboratorios de microbiología, ya que permite detectar con gran sensibilidad y rapidez agentes etiológicos, genotipos de virulencia y resistencia. Este método molecular no sustituye, sino que complementa a los métodos microbiológicos tradicionales.
- » **Enfermedades genéticas.** La PCR permite detectar alteraciones o variaciones en la constitución genética de un individuo que están directa o indirectamente relacionadas con determinados estados patológicos. En la actualidad, el análisis de numerosas enfermedades genéticas puede llevarse a cabo en los laboratorios gracias a la PCR y con fines tanto clínicos como de investigación.
- » **Enfermedades oncológicas.** La PCR permite el análisis de mutaciones en genes supresores y oncogenes, muy útil en el diagnóstico del cáncer e incluso para predecir la respuesta de las células tumorales a los fármacos antineoplásicos.

4.2. Aplicaciones de la PCR en genética forense

La **genética forense** es una especialidad de la medicina legal donde la biología molecular ha tenido mucho impacto. Utiliza el análisis genético de la diversidad humana para solucionar problemas judiciales.

El desarrollo de las técnicas de biología molecular permitió el análisis directo del ADN y permitió que la genética forense evolucionara rápidamente hacia el análisis de regiones polimórficas del ADN. Un **polimorfismo** es la presencia de dos o más formas variantes de una secuencia específica de ADN que puede producirse entre diferentes personas.

Los tipos de **problemas más comunes** que se suelen resolver en un laboratorio de genética forense son:

- » Investigaciones biológicas de paternidad.
- » Análisis de muestras biológicas de interés criminal: sangre, espermatozoides, saliva, pelos...
- » Identificación de restos cadavéricos, de individuos o de fragmentos corporales en catástrofes.

Entre las **muchas aplicaciones** de la PCR en este campo, se encuentran la huella o mapa genético y la prueba de paternidad.

A. Huella o mapa genético

Técnica forense que permite **identificar a una persona** comparando su ADN con una muestra obtenida. Por lo general, las muestras obtenidas son muy escasas y la PCR permite aumentar la cantidad de ADN, así como la amplificación de determinados segmentos polimórficos que son variables en la población.

Los **individuos de la misma especie** comparten gran parte de la secuencia de ADN y, dependiendo de su función, podemos distinguir dos tipos:

TIPOS	CARACTERÍSTICAS
ADN expresivo o codificante	Corresponde a regiones (genes) que son responsables de determinadas características físicas o mentales y de la presencia de enfermedades. Es el más interesante desde el punto de vista médico, pero posee, en general, poca variabilidad.
ADN no codificante	No es transcrito a ARN y representa, cuantitativamente, la mayor parte del genoma humano. En torno a la mitad del ADN no codificante es ADN repetitivo. El ADN repetitivo en tándem es el más utilizado con fines forenses; y, dentro de él, los minisatélites y los microsatélites de ADN. Consisten en repeticiones de fragmentos de ADN de número variable (VNTR: Variable Number of Tandem Repeats): • Microsatélites. Repeticiones de ADN de pequeño tamaño (de dos a cinco pares de bases) que se denominan STR (Short Tandem Repeats). • Minisatélites. Repeticiones de ADN de tamaño medio de alrededor de 30 pares de bases.

Tabla 6. Tipos de secuencia de ADN según su función.

Los **minisatélites** y **microsatélites**, además de ser extraordinariamente polimórficos (variables entre los individuos), poseen una herencia mendeliana simple.

Los individuos se diferencian por el número de repeticiones de esas secuencias, y es poco probable que dos individuos no relacionados tengan en común los mismos polimorfismos. Cada individuo presenta dos valores para cada minisatélite o microsatélite. Estos valores pueden ser iguales o distintos y uno va a proceder de la madre y otro del padre.

¿SABÍAS QUE...?

Se denomina **perfil genético** al conjunto de polimorfismos específicos de cada individuo. Caracteriza a cualquier individuo y se denomina también **huella genética**.

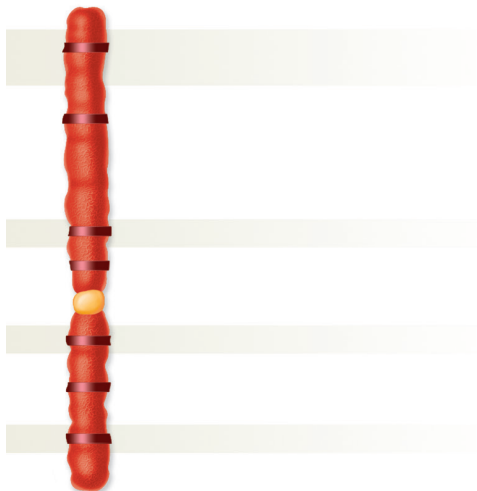


Fig. 9. Mapa genético simplificado.

B. Prueba de paternidad

Al poseer una tasa de mutación muy baja, las características de los **microsatélites (STR)** son las idóneas para las pruebas de paternidad. La PCR permite amplificar estos segmentos polimórficos del ADN de la madre, padre y niño/a.

Se **comparan los alelos** que presenta el hijo/a para una serie de microsatélites (aproximadamente quince) con los de los supuestos padre y madre y se comprueba su compatibilidad. Según el principio mendeliano, un alelo proviene del padre y el otro alelo proviene del hijo.

4

CASO PRÁCTICO



SÍNDROME DE LI-FRAUMENI (LFS)

El síndrome de Li-Fraumeni (LFS) es una enfermedad rara autosómica dominante que afecta a pacientes jóvenes y consiste en una predisposición a desarrollar un amplio rango de tumores. Busca información sobre esta enfermedad en el siguiente artículo y determina si la técnica de PCR podría ayudar al diagnóstico de un posible síndrome de Li-Fraumeni: <https://bit.ly/3pqsS9Y>.

SOLUCIÓN

- » Sí, ya que se trata de una mutación germinal del gen p53 en el 70% de las familias con LFS.
- » Es posible detectar por PCR esta mutación.

X T A R T
FP SALUD