

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

RESUM: *La reacció en cadena de la polimerasa —coneguda com a PCR per les seves sigles en anglès, polymerase chain reaction— és un mètode d'anàlisi d'àcids nucleics desenvolupat per Kary Mullis a mitjan anys vuitanta per produir grans quantitats d'un fragment específic d'ADN de seqüència i longitud definides a partir d'una petita quantitat de material inicial.*

La tècnica permet amplificar selectivament una molècula d'ADN o ARN diversos milions de vegades en poques hores. Mitjançant la PCR, podem realitzar la detecció i l'anàlisi de seqüències específiques d'un gen sense la necessitat d'aïllar-lo prèviament per tècniques de clonació d'ADN. Les anàlisis poden realitzar-se a partir d'unes poques cèl·lules o d'una mínima quantitat de mostra biològica sense la necessitat d'aïllar prèviament grans quantitats d'àcids nucleics.

La PCR ha revolucionat el camp del diagnòstic molecular i s'ha convertit en una tècnica de rutina en l'àmbit de la genètica, la microbiologia i la biotecnologia.

PARAULES CLAU: *PCR, diagnosi molecular, amplificació enzimàtica.*

Polymerase chain reaction (PCR)

ABSTRACT: *The chain reaction of polymerase-PCR as known for their singles in English, Polymerase chain reaction is a method of analysis of nucleic acids developed by Kary Mullis in the mid eighties to produce large quantities of a specific DNA fragment of defined sequence and length from a small amount of starting material.*

The technique allows a molecule selectively amplifies DNA or RNA various million times more. By PCR, we performed the detection and analysis of specific sequences of a gene without the need to insulate it from previous techniques for DNA cloning. The analysis can be performed from a few stem cells or minimum amount of biological sample without the need for pre-Amentia isolate large quantities of nucleic acids.

The PCR has revolutionized the field of molecular diagnostics and has become a routine technique in the field of genetics, microbiology and biotechnology.

KEYWORDS: *PCR, molecular diagnostics, enzymatic amplification.*

DR. ARMAND SÁNCHEZ BONASTRE
Universitat Autònoma de Barcelona.
Facultat de Veterinària. Departament
de Ciència Animal i dels Aliments
A.e.armand.sanchez@uab.cat

PRINCIPIS BÀSICS DE LA PCR

La PCR es fonamenta en l'amplificació enzimàtica d'un fragment d'ADN flanquejat per dues seqüències d'oligonucleòtids que hibriden en la cadena complementària de la molècula motlle que cal amplificar —encebadors o *primers*— i que són utilitzats per una ADN polimerasa termoresistent —generalment s'empra la del bacteri termòfil *Thermus aquaticus*, capaç de créixer a elevades temperatures— per copiar-ne la seqüència.

La reacció és un procés que consta de tres etapes —repetides unes trenta o trenta-cinc vegades: desnaturalització, hibridació dels encebadors i extensió dels mateixos.

Desnaturalització. Perquè es pugui iniciar la reacció, cal que les molècules d'ADN motlle es trobin en forma de cadena simple. Això s'aconsegueix escalfant-les a temperatures de 90° C a 95° C perquè es produeixi el trencament dels enllaços pont d'hidrogen intercatenaris i la separació d'ambdues cadenes. Per tal d'assegurar la completa separació de la doble cadena de l'ADN, aquesta temperatura s'ha de mantenir uns minuts. Si l'ADN solament es desnatura parcialment, tendirà a renaturalitzar-se molt ràpidament, tot dificultant una eficient hibridació dels primers i la seva posterior extensió.

Hibridació. Una vegada l'ADN està desnaturalitzat, es disminueix la temperatura de la reacció fins a un rang comprès entre els 40° C i els 60° C perquè es pugui produir la hibridació específica dels encebadors a les seqüències flanquejades del fragment que es vol amplificar. Aquesta etapa es denomina també *fase d'«annealing»* i la temperatura a la qual es realitza s'ha d'establir per a cada reacció en funció de la longitud dels encebadors i la seva seqüència —temperatures inferiors a l'òptima produiran hibridacions inespecífiques dels encebadors i temperatures superiors en dificultaran l'eficiència.

Extensió. Durant aquesta etapa, l'ADN polimerasa termoresistent incorpora nucleòtids en l'extrem 3'

de l'encebador, tot utilitzant com a motlle la cadena d'ADN prèviament desnaturalitzada. La temperatura a la qual es realitza aquesta etapa de la reacció sol ser de 72° C, ja que és la temperatura a la qual la Taq polimerasa arriba a la màxima activitat. Normalment, una extensió de vint segons és suficient per a fragments menors de cinc-cents parells de bases, i quaranta segons, per a fragments per sobre d'1,2 Kb.

En finalitzar cadascun dels cicles, el nombre de còpies obtingudes es duplica, i després de vint cicles, ja tenim aproximadament un milió de còpies de cadascuna de les molècules motlle inicials d'ADN.

La tècnica es pot utilitzar per a l'amplificació de molècules d'ARN si prèviament se'n realitza una còpia mitjançant l'enzim *transcriptasa reversa*. D'aquesta manera, podem realitzar estudis sobre molècules d'ARNm o bé la podem aplicar per a la detecció de virus ARN.

L'elecció dels encebadors i la grandària del fragment amplificat són d'una gran importància per al resultat final. En proves de diagnòstic, la grandària del fragment amplificat no ha de superar els cent o cent cinquanta parells de bases d'ADN, si partim de mostres que puguin haver sofert una degradació dels àcids nucleics, i l'elecció dels encebadors s'ha de realitzar per a fragments específics de la diana que vulguem amplificar per tal d'evitar falsos positius.

Una vegada realitzada l'amplificació, es procedeix a la identificació de la seqüència obtinguda mitjançant electroforesi, hibridació amb sondes complementàries o tècniques d'anàlisi de polimorfismes.

L'anàlisi per PCR pot ser de dos tipus: qualitativa —detecció de la presència o de l'absència d'un fragment d'ADN determinat— o quantitativa —detecció de la quantitat d'un fragment d'ADN determinat.

ANÀLISI QUALITATIVA D'ADN MITJANÇANT LA PCR

Aquest tipus d'anàlisi se sol realitzar quan tan sols és necessari conèixer

la presència o l'absència d'alguna seqüència específica d'ADN o ARN, com, per exemple, la detecció de la presència d'un patògen en una mostra. L'anàlisi del producte amplificat se sol realitzar mitjançant electroforesi en gel o capil·lar; la seva visualització se sol fer per tinció en bromur d'etilè o per detecció fluorescent, si prèviament hem utilitzat un dels encebadors marcat amb algun tipus de fluorescència.

En algunes anàlisis, és necessari identificar la seqüència del producte amplificat i el producte de la PCR ha de ser sotmès a una anàlisi específica —seqüenciació, digestió amb enzims de restricció, etc.

ANÀLISI QUANTITATIVA D'ADN MITJANÇANT LA PCR

La PCR convencional no és una tècnica quantitativa, ja que l'amplificació exponencial de l'ADN motlle no es manté constant especialment en els últims cicles de la reacció.

Per poder realitzar estimes quantitatives, s'han desenvolupat tècniques de PCR en «temps real» —PCR quantitativa—, amb les quals és possible determinar la fase exponencial de l'amplificació i també és possible extrapolar de manera quantitativa la quantitat de motlle inicial que s'està amplificant.

La metodologia de la PCR quantitativa facilita, a més, l'automatització i no sol requerir el processament ulterior del producte amplificat, la qual cosa redueix el risc de contaminació.

En l'actualitat, existeixen en el mercat diversos equips i protocols per a la realització d'aquesta tècnica. Des del punt de vista de la detecció del producte amplificat en cada cicle, existeixen tres mètodes principals d'anàlisi de la PCR quantitativa basats en tècniques de fluorescència i que es diferencien en el tipus de detecció dels productes de la PCR. Aquests mètodes són els següents: el que empra una sonda amb doble marcat fluorescent —TaqMan®— específica de la seqüència amplificada; els basats en l'ús de dues son-

des que hibriden de manera adjacent en el fragment que amplifiquem, i, finalment, el denominat SYBR Green I, que utilitza una substància intercalant que s'uneix a la doble cadena d'ADN i produeix una emissió de fluorescència.

El mètode més difós és el que emprava sondes TaqMan®. Aquest mètode es basa en l'activitat 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa i en l'amplificació mitjançant la PCR d'una determinada seqüència diana en presència d'una sonda fluorescent específica —sonda TaqMan®— que hibrida amb la seqüència diana que estem amplificant. La sonda TaqMan®, d'una grandària aproximada de vint a trenta bases, té unit un fluorocrom en posició 5' i un segon fluorocrom que actua per interferència amb el primer com a amortidor de fluorescència en posició 3'. A més, aquesta sonda està fosforilada en 3' per evitar la seva extensió durant la reacció de la PCR. Si la seqüència diana està present en la mostra, la sonda TaqMan® hibridarà específicament amb ella, tot situant-se entre els dos encebadors. Quan es produeix l'etapa d'extensió en la reacció de la PCR, l'activitat 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa degrada la sonda TaqMan® alliberant el fluorocrom, que, en quedar separat de l'amortidor, emetrà un senyal que pot ser captat pel sistema òptic de l'equip. Aquest procés de degradació de la sonda té lloc en cadascun dels cicles i és directament proporcional al nombre de molècules que estan sent esteses en cadascun d'ells i que podem visualitzar per l'increment del senyal de fluorescència.

A més, la Taq polimerasa no digereix la sonda lliure, sinó únicament la hibridada, per la qual cosa la quantitat de senyal fluorescent emès és proporcional a la quantitat de producte acumulat. El mesurament de la intensitat de fluorescència es realitza de manera contínua, la qual cosa proporciona una informació dinàmica a temps real del procés. El sistema de detecció permet establir el cicle llindar —*Ct-cycle threshold*—, el cicle de la PCR a partir del

qual la quantitat de fluorescència emesa arriba al nivell de detecció que hàgim fixat, la qual cosa, al seu torn, es correlaciona directament amb la quantitat d'ADN motlle de la mostra analitzada. La quantificació del nombre de còpies d'una mostra es realitza mitjançant la comparança de la *Ct* de la mostra —problema amb la *Ct* d'una sèrie de dilucions d'una mostra —control positiva. La quantificació de la mostra —control positiva permet establir una corba estàndard que reflecteix el nombre de còpies i el nombre de cicle en el qual ha estat realitzada la detecció de manera objectiva i reproducible.

Quan es realitza la quantificació d'una mostra —problema, el cicle llindar de la seva detecció es duu a la corba estàndard, la qual cosa permet conèixer el nombre de còpies de la seqüència diana existent en la mostra analitzada.

El mètode de la PCR quantitativa basat en la química per hibridació de sondes emprava dues sondes —seqüència específiques que hibriden en regions adjacents espaiades entre un i cinc nucleòtids. Una sonda està marcada amb un fluorocrom emissor en posició 3' i l'altra sonda està marcada amb un fluorocrom acceptor en l'extrem 5'. Aquesta sonda, a més, té bloquejat l'extrem 3' amb un grup fosfat per evitar-ne l'extensió. Només quan les dues sondes han hibridat i estan pròximes s'origina una emissió de fluorescència pel fluorocrom acceptor, la intensitat del qual augmenta proporcionalment a la quantitat de seqüència diana formada en la reacció de la PCR. Aquesta metodologia es diferencia de la química de sondes TaqMan® en el fet que no es requereix la hidròlisi de sonda per a l'emissió de fluorescència.

El tercer tipus de detecció dels productes específics de la PCR de la seqüència motlle consisteix en la utilització de l'agent intercalant SYBR Green I. Aquesta substància s'uneix específicament a la doble hèlix de les molècules d'ADN formades en cada cicle de la reacció de la PCR produint l'emissió de fluorescència. D'aquesta manera, el senyal fluorescent s'incrementa en funció de la quantitat de

producte amplificat. L'avantatge d'aquesta opció és que no es requereix la síntesi de sondes fluorescentes específiques per a cada tipus de detecció, encara que el seu inconvenient resideix en la seva inespecificitat, ja que es detecta fluorescència per a tots els productes d'ADN de doble cadena presents en la reacció —incloent-hi els dímers d'encebador que se solen produir en la major part de les reaccions de la PCR.

La realització d'aquestes tècniques de la PCR a temps real requereix el fet de disposar d'un equip que compti amb un sistema de detecció de fluorescència. Existeixen actualment al mercat diverses alternatives el cost de les quals sol estar relacionat amb els nivells de sensibilitat i de capacitat d'anàlisi de mostres.

BIBLIOGRAFIA

- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (2005). *Current protocols in molecular biology*. Hoboken: Wiley.
- BELL, A. S.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. C. (2002). «Real-time quantitative PCR in parasitology». *Trends in Parasitology*, 18 (8): 338-342.
- BOHAYCHUK, V. M.; GENSLE, G. E.; MCFALL, M. E.; KING, R. K.; RENTER, D. G. (2007). «A real-time PCR assay for the detection of Salmonella in a wide variety of food and food-animal matrices». *J. Food Prot.*, 70 (5): 1080-1087.
- BUSTIN, S. A. (1998). «A PCR guide for clinical scientists». A: LO, Y. M. D. *Clinical applications of PCR*. Nueva York: Humana Press.
- BUSTIN, S. A.; NOLAN, T. (2004). «Pitfalls of quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction». *J. Biomol. Tech.*, 15: 155-166.
- CAI, H. Y.; ARCHAMBAULT, M.; GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F. (2003). «Molecular genetic methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: current usage and future applications». *Anim. Health Res. Rev.*, 4 (2): 73-93.
- EDWARDS, K.; LOGAN, J.; SAUNDERS, N. (2004). *Real-time PCR: An essential guide*. Norfolk: Horizon Bioscience.
- JOHNSON, J. R. (2000). «Development of polymerase chain reaction-based assays for bacterial gene detection».

- Journal of Microbiological Methods*, 41 (3): 201-209.
- JORDAN, J. (2000). «Real-time detection of PCR products and microbiology. New technologies for life sciences». *A Trends Guide*, 6: 61-66.
- JUSTÉ, A.; THOMMA, B. P.; LIEVENS, B. (2008). «Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes». *Food Microbiol.*, 25 (6): 745-61.
- KLEIN, D. (2002). «Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations». *Trends in Molecular Medicine*, 8 (6): 257-260.
- LAMBERTZ, S. T.; NILSSON, C.; HALLANVUO, S.; LINDBLAD, M. (2008). «Real-time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food». *Appl. Environ. Microbiol.*, 74 (19): 6060-6067.
- LIE, Y. S.; CHRISTOS, J. P. (1998). «Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays». *Current Opinion in Biotechnology*, 9: 43-48.
- LIU, D. (2008). «Preparation of *Listeria monocytogenes* specimens for molecular detection and identification». *Int. J. Food Microbiol.*, 122 (3): 229-242.
- LUDWIG, W. (2007). «Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification». *Int. J. Food Microbiol.*, 120 (3): 225-236.
- MACKAY, I. M. (2004). «Real-time PCR in the microbiology laboratory». *Clin. Microbiol. Infect.*, 10 (3): 190-212.
- (2007a). *Real-time PCR in microbiology: From diagnosis to characterization*. Norfolk: Caister Academic Press.
- (2007b). «Introduction to kinetic (real-time) PCR». *Methods Mol. Biol.*, 353: 167-176.
- MACKAY, J.; LANDT, O. (2007). «Real-time fluorescent chemistries». *Methods Mol. Biol.*, 353: 237-261.
- MALORNY, B.; LÖFSTRÖM, C.; WAGNER, M.; KRÄMER, N.; HOORFAR, J. (2008). «Enumeration of salmonella bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment». *Appl. Environ. Microbiol.*, 74 (5): 1299-304.
- MALORNY, B.; TASSIOS, P. T.; RADSTROM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. (2003). «Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens». *Anim. Health Res. Rev.*, 83 (1): 39-48.
- MAURER, J. [ed.] (2006). *Food microbiology and food safety*. Vol. VIII: *PCR methods in foods*. S. l.: Springer.
- MCKILLIP, J. L.; DRAKE, M. (2004). «Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food». *J. Food Prot.*, 67 (4): 823-32.
- NIESSEN, L. (2007). «PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi». *Int. J. Food Microbiol.*, 119 (1-2): 38-46.
- PEIRSON, S. N.; BUTLER, J. N. (2003). «Quantitative polymerase chain reaction». *Methods Mol. Biol.*, 362: 349-362.
- PETERS, I. R.; HELPS, C. R.; DAY, M. J. (2004). «Real-time RT-PCR: Considerations for efficient and sensitive assay design». *J. Immunol. Methods*, 286 (1-2): 203-17.
- RASOOLY, A.; HEROLD, K. E. (2008). «Food microbial pathogen detection and analysis using DNA microarray technologies». *Foodborne Pathog. Dis.*, 5 (4): 531-550.
- SANDHYA, S.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. (2008). «Molecular beacons: A real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Escherichia coli* from fresh produce and water». *Anal. Chim. Acta.*, 614 (2): 208-212.
- SETTANNI, L.; CORSETTI, A. (2007). «The use of multiplex PCR to detect and differentiate food and beverage-associated microorganisms: A review». *J. Microbiol. Methods.*, 69 (1): 1-22.