PCR EN TEMPO REAL CON SONDA TAQMAN

GIANZO QUINTELA, CRISTINA[1]; REIJA OTERO, BELÉN[2]; RODRÍGUEZ GARCÍA, X. CARLOS[2]

[1]CIMUS, Campus Vida, Avda. Barcelona s/n, 15782, Santiago de Compostela
[2]IES Lucus Augusti, Avda. Rodríguez Mourelo s/n, 27001, Lugo

1. Introdución

A PCR en tempo real ou cuantitativa (q-PCR) é unha técnica molecular que permite amplificar e simultaneamente cuantificar unha secuencia específica de ADN (ou ARN despois dunha retrotranscrición previa). A diferencia da PCR convencional (descrita en Vera Rodríguez, Reija Otero e Rodríguez García (2020).), a PCR en tempo real mide o sinal de fluorescencia durante cada ciclo de amplificación, o que permite coñecer a cantidade de material xenético presente na mostra en tempo real.

2. Fundamento

O método da sonda TaqMan baséase no emprego dunha sonda de ADN específica e fluoroxénica que contén dous elementos:

-Un "reporter" (un colorante fluorescente) no extremo 5'.

-Un supresor ou "quencher" non fluorescente no extremo 3'.

Durante o proceso da reacción en cadea da polimerasa (PCR), a sonda únese á secuencia do ADN de interese. A medida que o enzima ADN polimerasa Taq (de aquí o nome TaqMan) sintetiza unha nova cadea de ADN, a súa actividade nucleasa fragmenta a sonda. e produce fluorescencia. Se non se amplifica a secuencia, a sonda permanece intacta e non se detecta sinal de fluorescencia.

A alternativa ó enfoque para a detección da amplificación do ADN con sonda Taqman é o SYBr Green. , fluoróforo intercalante da cadea de ADN non específico. As vantaxas do SYBr Green son que é máis económico e é máis sinxelo de usar. Ademais, no mesmo proceso permite a análise de curvas de disociación ("melting") para verificar que o produto amplificado (amplicón) sexa o correcto. Pola contra, a sonda Taqman ten unha alta especifidade e permite multiplexing (identificar máis dun tipo de amplicóns).

3. Desenvolvemento

Para a realización desta práctica empregouse como fonte de ADN a saliva do alumnado, ó ser unha fonte doada de obter e sen risco, a diferenza da extracción de sangue. Para iso utilizouse o DANAGENE SALIVA KIT (https://www.danagen.es/wp-content/uploads/2018/11/SALIVA-DNA-KIT-castellano.pdf), que permitiu illar ADN xenómico a partir dunha mostra de saliva ou dun frotis bucal.

O procedemento de extracción de ADN consistiu nunha centrifugación inicial da saliva para concentrar as células, seguida da súa lise con tampón, proteinasa K e RNasa. Despois realízouse unha precipitación das proteínas, mediante incubación en frío, engadindo un tampón específico e nova centrifugación. O sobrenadante resultante, que contén o ADN, transferiuse a un tubo con

isopropanol para precipitar o ADN en forma de “pellet” branco. Finalmente, este “pellet” lavouse con etanol ao 70%, elimínando o exceso de disolvente e deixouse secar, obténdose así o ADN xenómico purificado.

A continuación preparouse a serie de dilucións para a curva patrón ata a millonésima parte da concentración orixinal facendo unha dilución seriada a partir do patrón estándar previamente hidratado coa disolución tampón do kit. Preparáronse as mostras a partir do ADN obtido da saliva do alumnado. Ademais, fíxose un control negativo.

O experimento deseñouse e programáronse os ciclos de temperatura no termociclador LineGene Mini S. Definíronse parámetros clave como a localización das mostras e patróns na placa, e o tipo de fluoróforo. Tras a execución, e como é característico da PCR en tempo real, os resultados iniciais comezan a ser visibles xa nos primeiros ciclos de amplificación. Finalmente, procedeuse á análise dos resultados (ver figura 1).

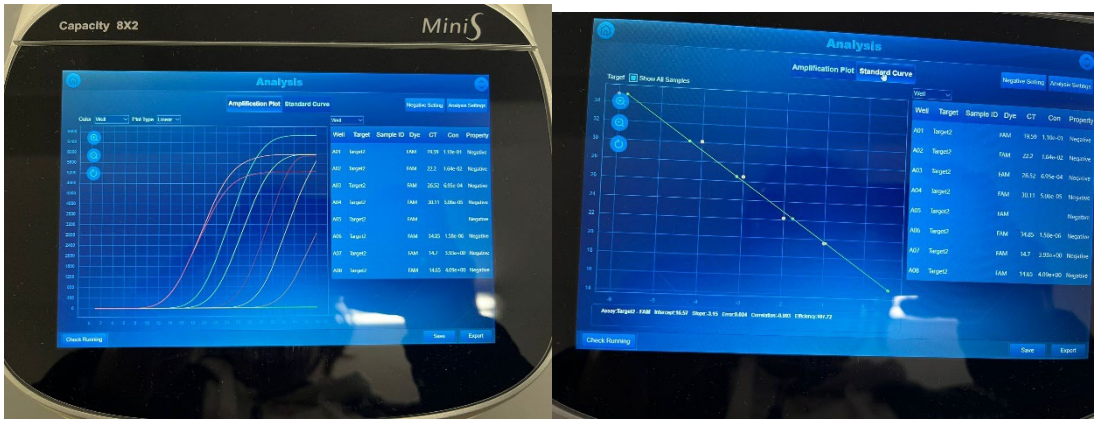

Figura 1. *(esquerda) Curvas de fluorescencia de q-PCR; (dereita) Recta de medida de CT fronte ó factor de dilución.*

4. Conclusións

Para levar a cabo esta análise empregáronse dous kits sinxelos, un para a extracción e purificación do ADN xenómico obtido a partires da saliva do propio alumnado, e outro para realizar unha PCR “semicuantitativa”.

A presenza dos ciclos de FP da Familia Química no IES Lucus Augusti permite o uso de instrumental sofisticado para realizar análises por q-PCR a alumnado de segundo de BAC e de bacharelato STEMbach.

5. Referencias

Vera Rodríguez, M., Reija Otero, B. e Rodríguez García, X. C. (2020). O kit DNA-MEAT para Stem. Boletín das Ciencias, Ano 33, Nº 91.