



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Secuenciación de Sanger

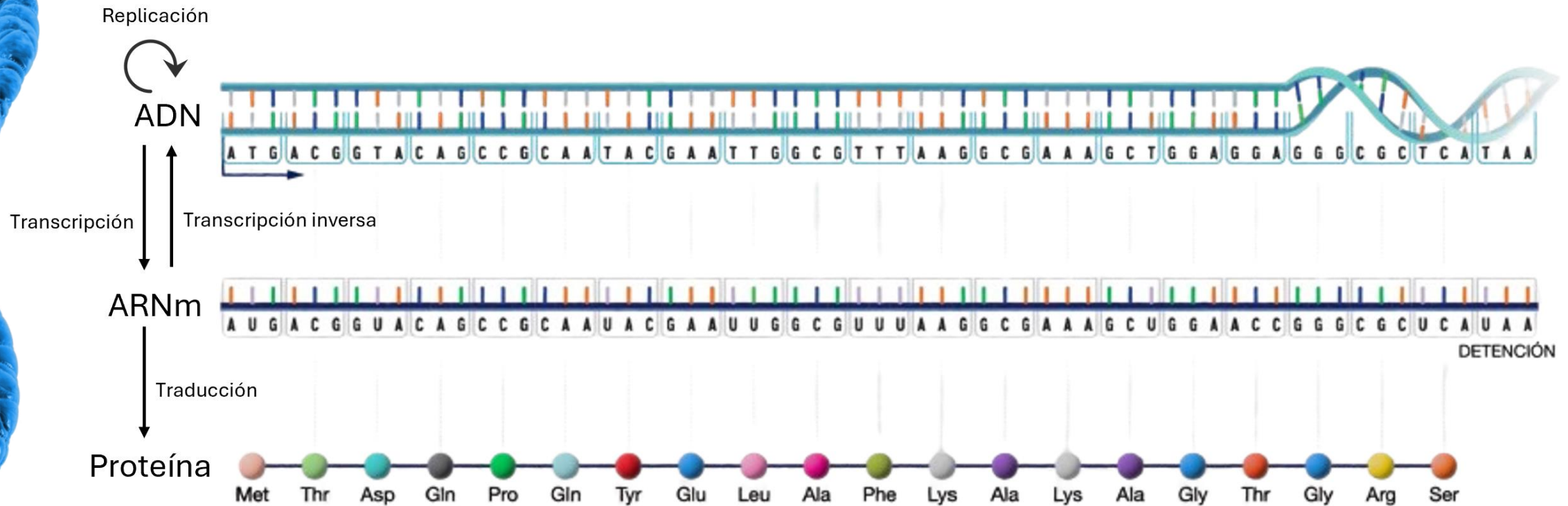
Francisco Manuel Peinado Rodríguez
(peinadofm@uma.es)

Daniel Castellano Castillo
(dcastellano@uma.es)

ASISTENCIA

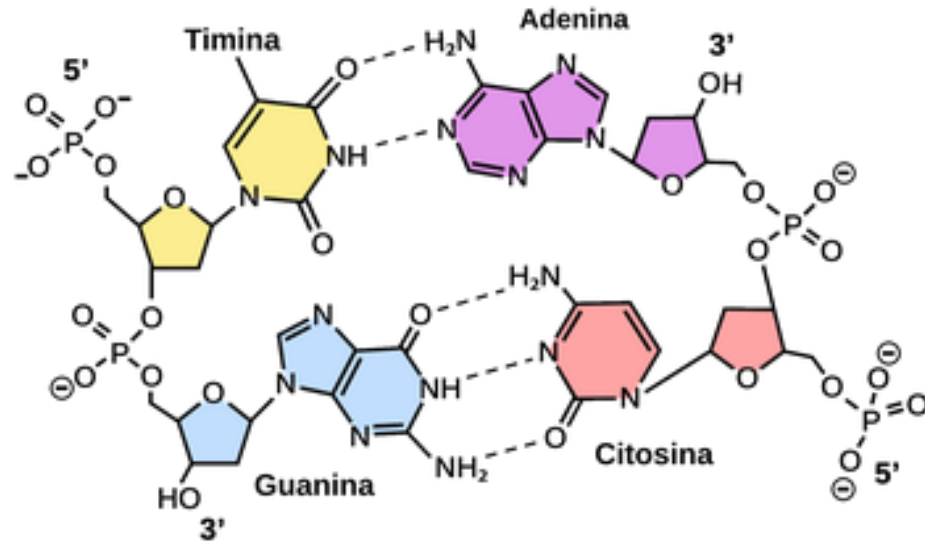
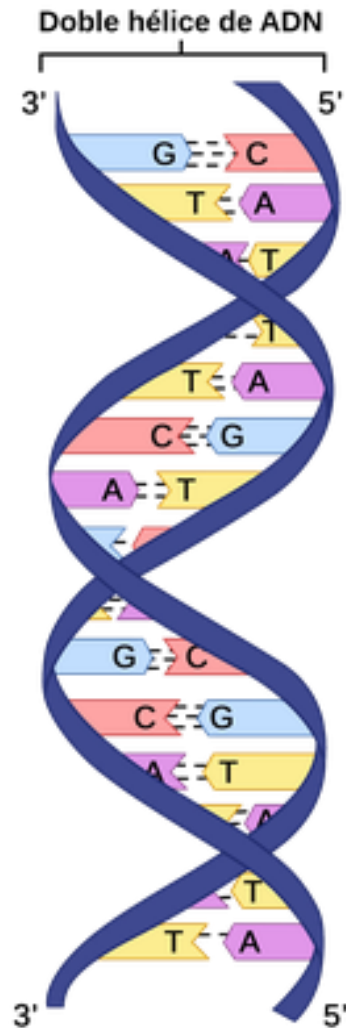


Dogma central de la biología molecular





Estructura del ADN de doble hélice



Modelo de Watson y Crick (1953)

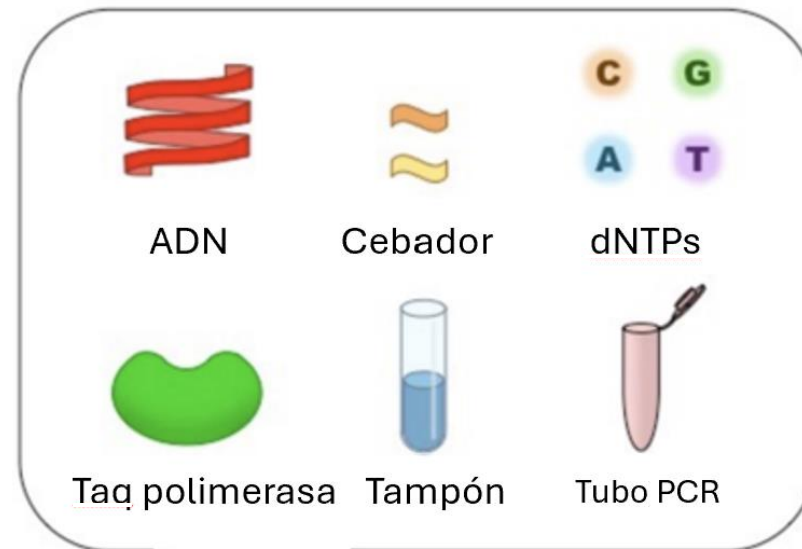


Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

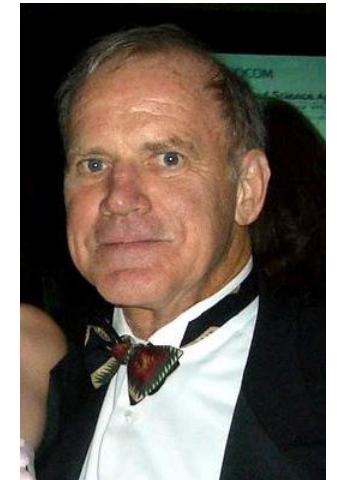
CONCEPTO

Técnica de biología molecular basada en una reacción química que amplifica fragmentos de ADN.

COMPONENTES



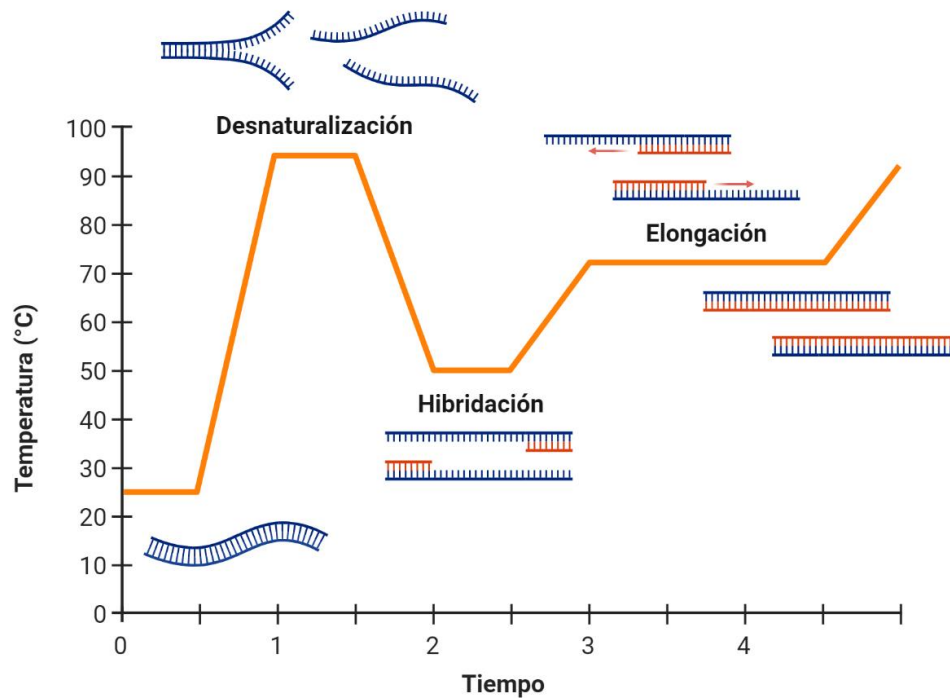
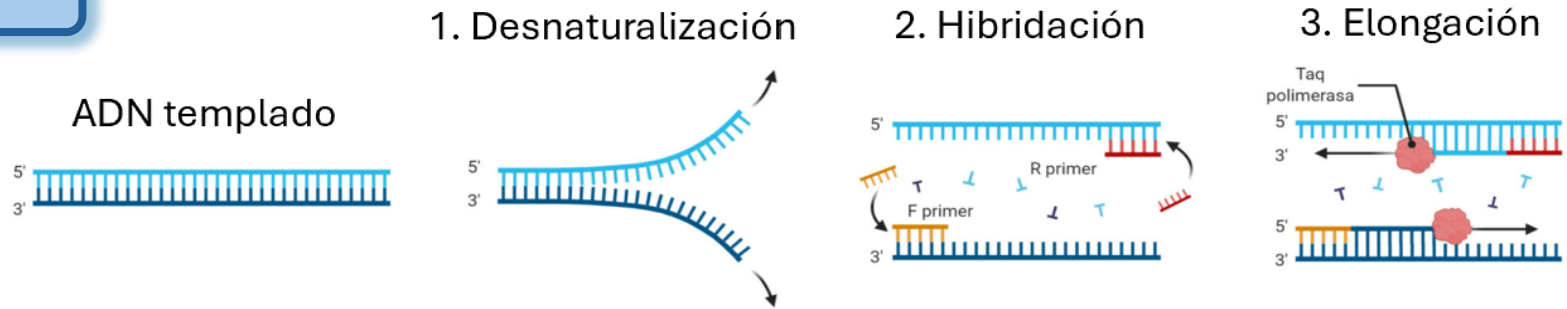
Termociclador



Kary B. Mullis (1983)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

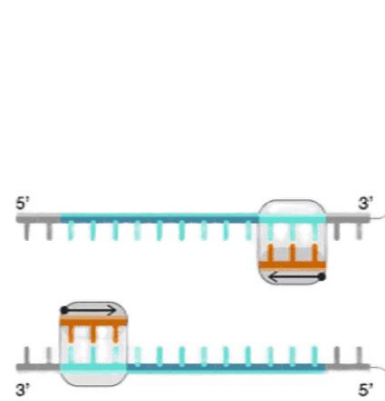
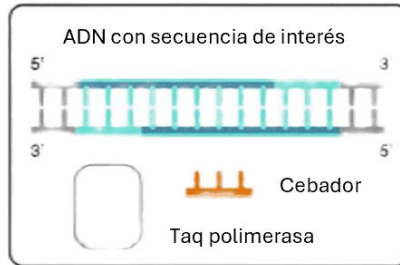
ETAPAS





Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

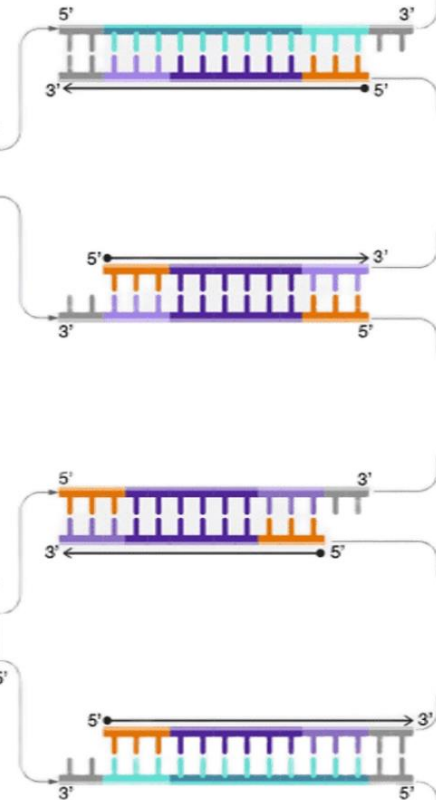
AMPLIFICACIÓN



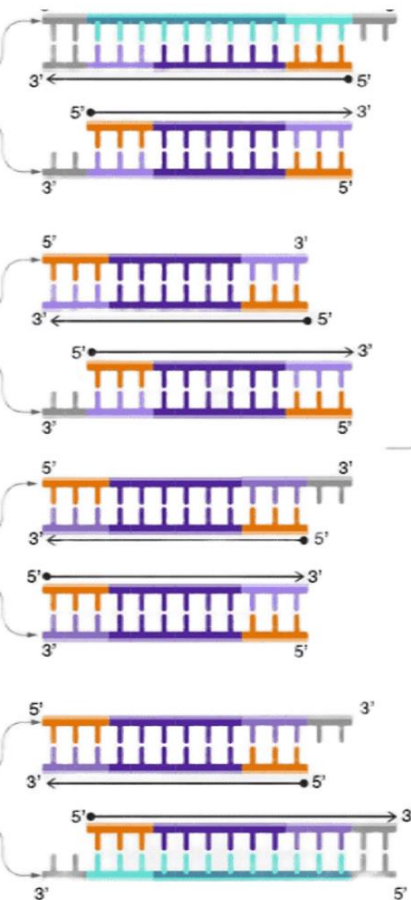
PRIMER CICLO



SEGUNDO CICLO



TERCER CICLO

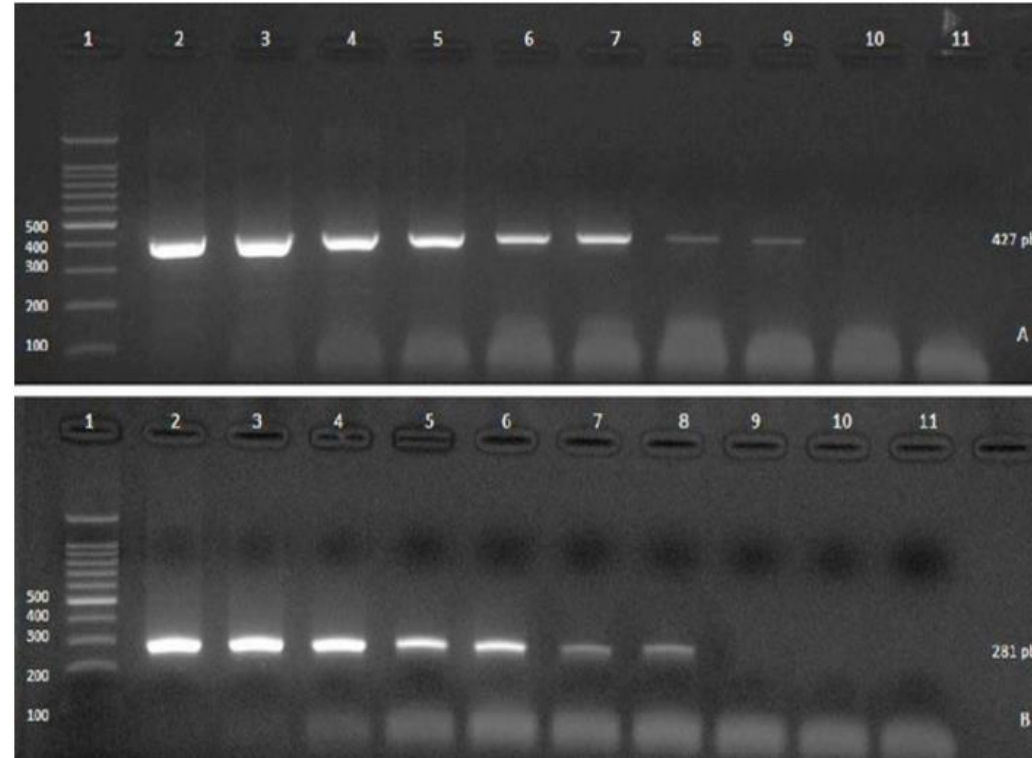


20 o 30 ciclos

Millones de copias

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

RESULTADOS

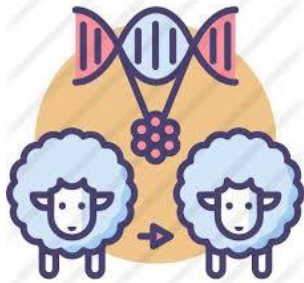


Electroforesis en gel de agarosa

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

APLICACIONES

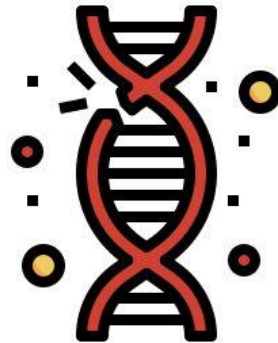
Clonación



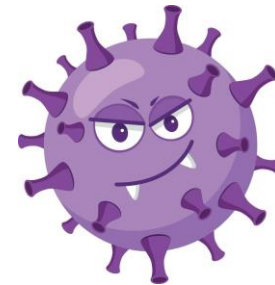
Secuenciación



Estudios de mutagénesis



Detección de patógenos

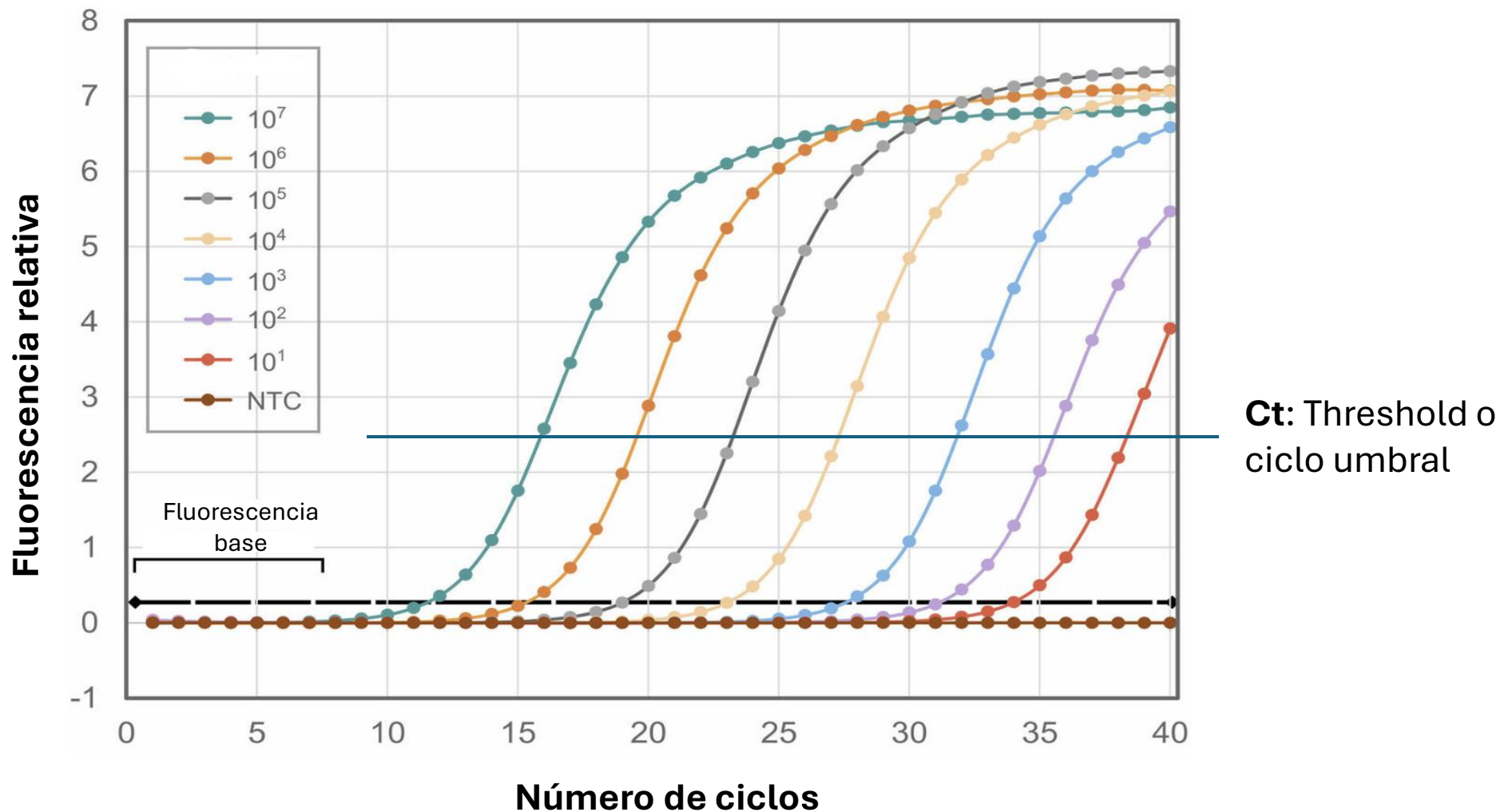


Análisis forense



PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR)

La PCR en tiempo real combina la amplificación y la detección de la PCR en un solo paso

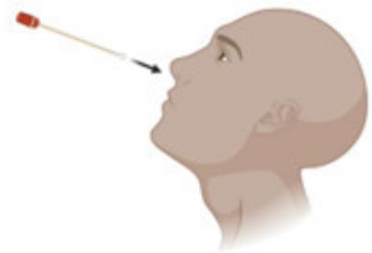




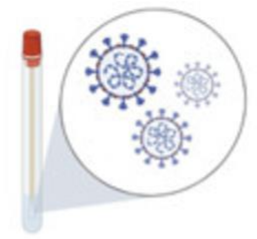
PCR a tiempo real (qPCR)

APLICACIONES EN COVID-19

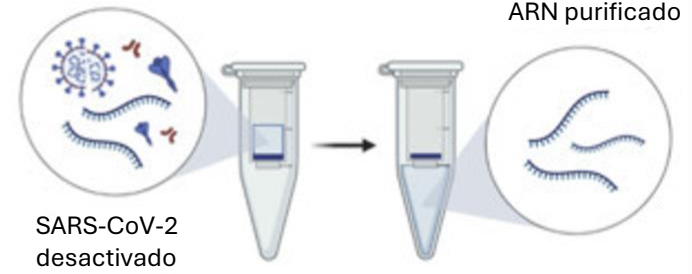
1 Hisopo nasofaríngeo < 15min



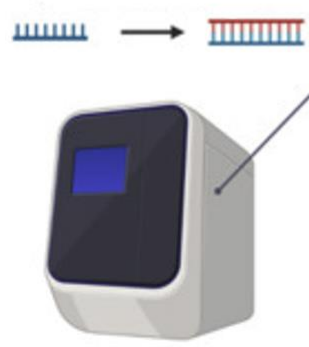
2 Muestra recolectada 0-72h



3 Extracción de ARN 45min



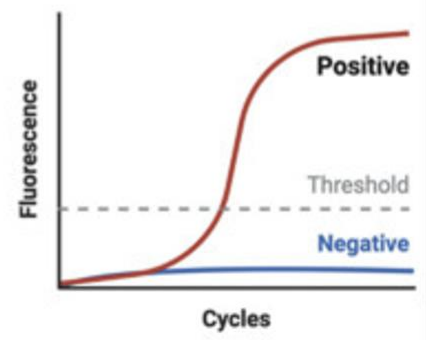
4 RT- qPCR 1h



Primers and probes for screening

E_Forward: ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	E gene First-line screening tool
E_Probe1: FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	
E_Reverse: ATATTGCAGCAGTACGCACACA	
ORF1a_Forward: CCCTGTGGGTTTACACTTAA	ORF1a gene First-line screening tool
ORF1a_Probe1: FAM-GTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG-BHQ1	
ORF1a_Reverse: ACGATTGTGCATCAGCTGA	
RdRp_Forward: GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	RdRp gene Confirmatory testing
RdRp_Probe1: FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ	
RdRp_Probe2: FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	
RdRp_Reverse: CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	

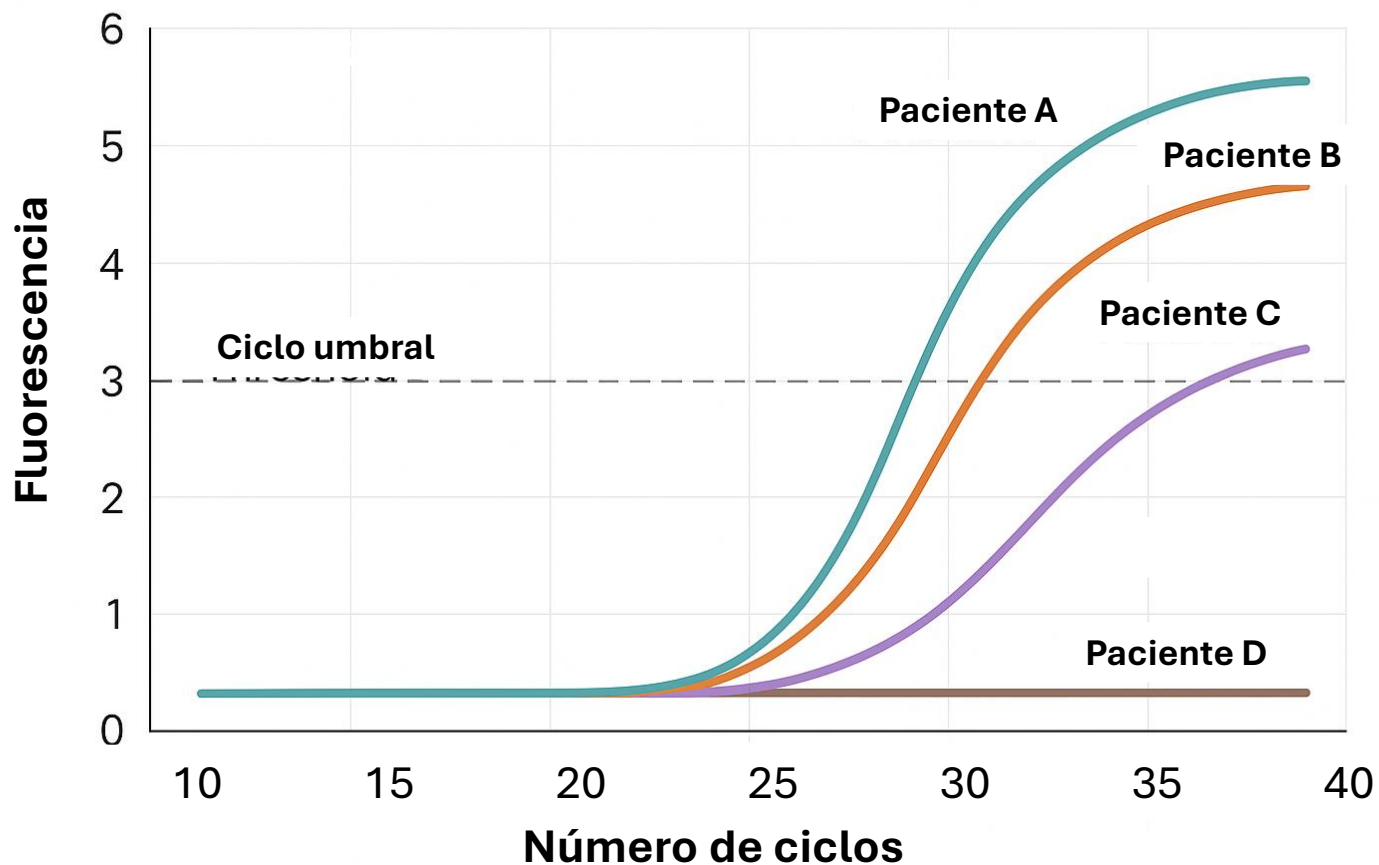
5 Resultados a tiempo real





PCR a tiempo real (qPCR)

Curvas de amplificación para PCR



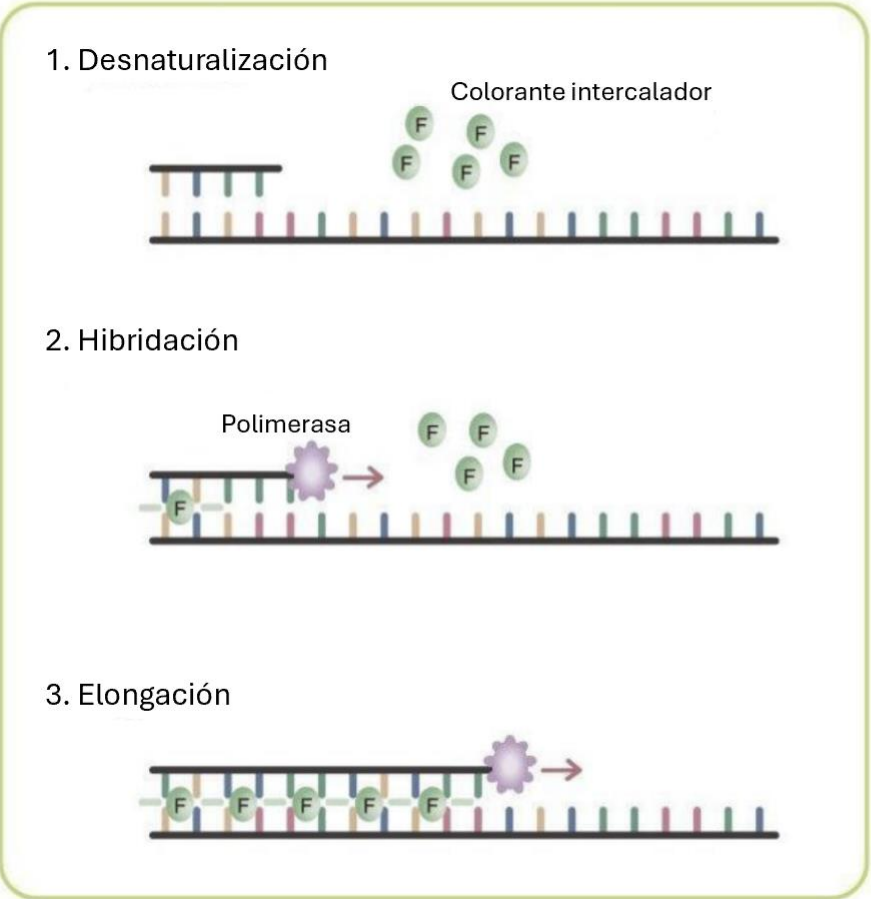
Valor de Ct	Interpretación
Ct bajo Ct < 20	Mucho ADN, muestra positiva con carga alta
Ct medio 20-29	ADN moderado, muestra positiva con carga media
Ct alto 30-35	Poco ADN, muestra positiva con carga baja o falso positivo
Sin Ct Ct > 40 o no detectado	No se detecta ADN, resultado negativo



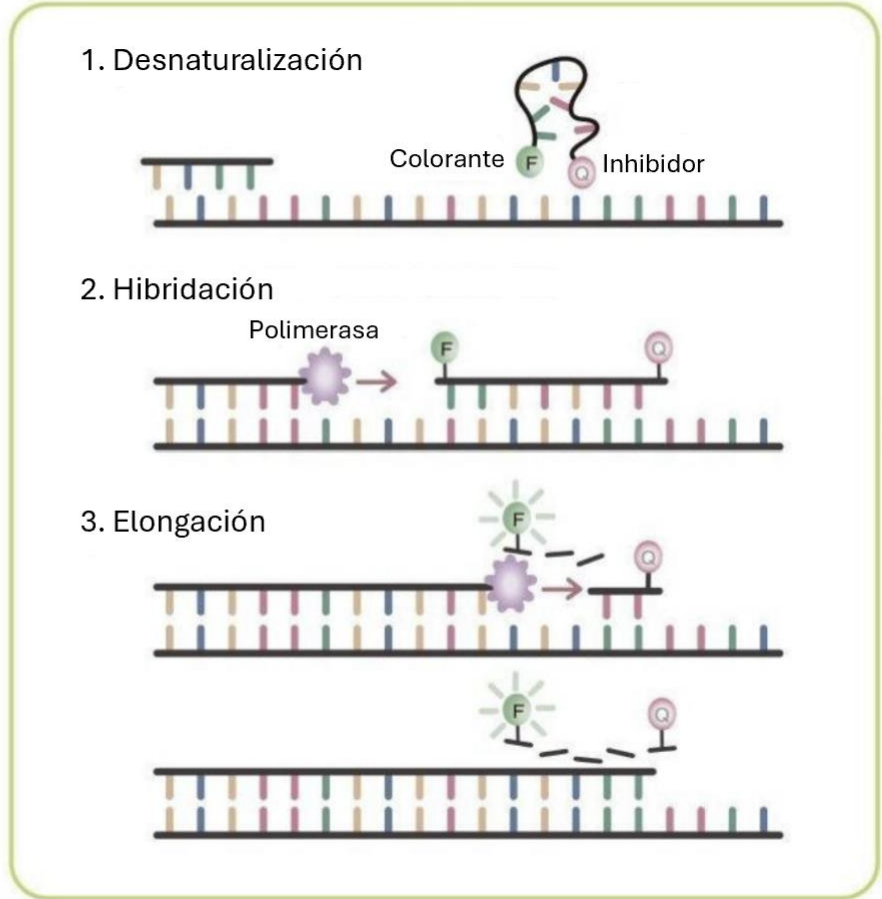
PCR a tiempo real (qPCR)

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

SYBR-GREEN

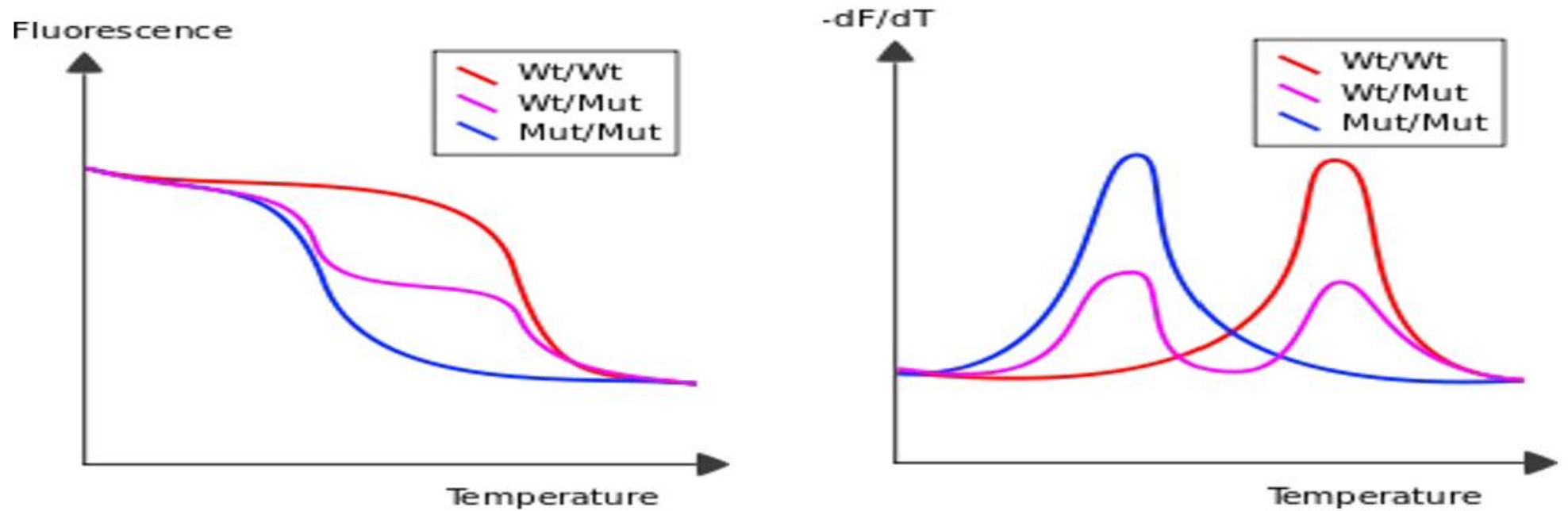


TAQMAN



Análisis de alta resolución de fusión (HRM)

Analiza las curvas de fusión de las cadenas de ADN para detectar variaciones genéticas.



Secuenciación de ácidos nucleicos (método de Sanger)

CONCEPTO

Técnica que determina la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN

COMPONENTES



ADN



Cebador



dNTPs



Taq polimerasa



ddTTP



ddATP



ddGTP



ddCTP

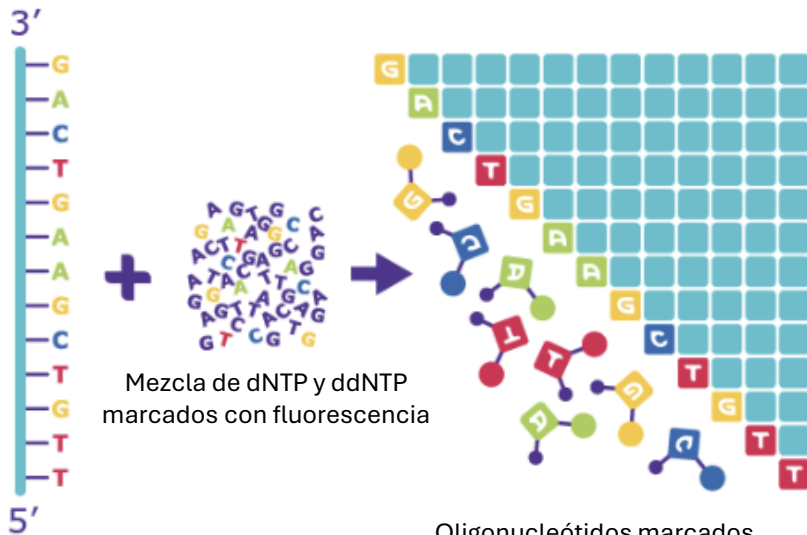


Frederick Sanger

Secuenciación de ácidos nucleicos (método de Sanger)

ETAPAS

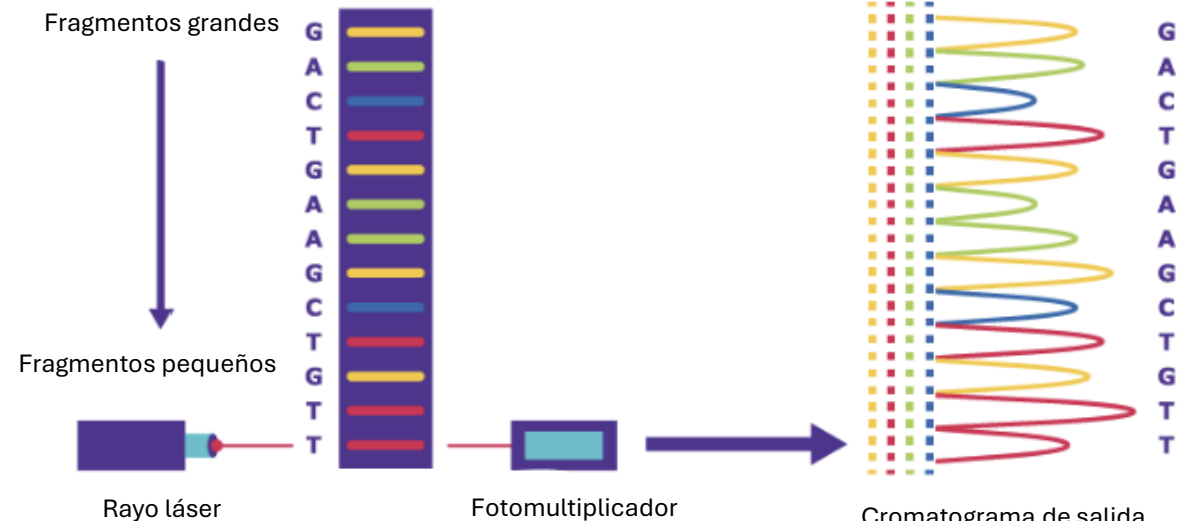
1 PCR con ddNTP fluorescentes de terminación en cadena



Secuencia de ADN original, amplificada por PCR y desnaturizada

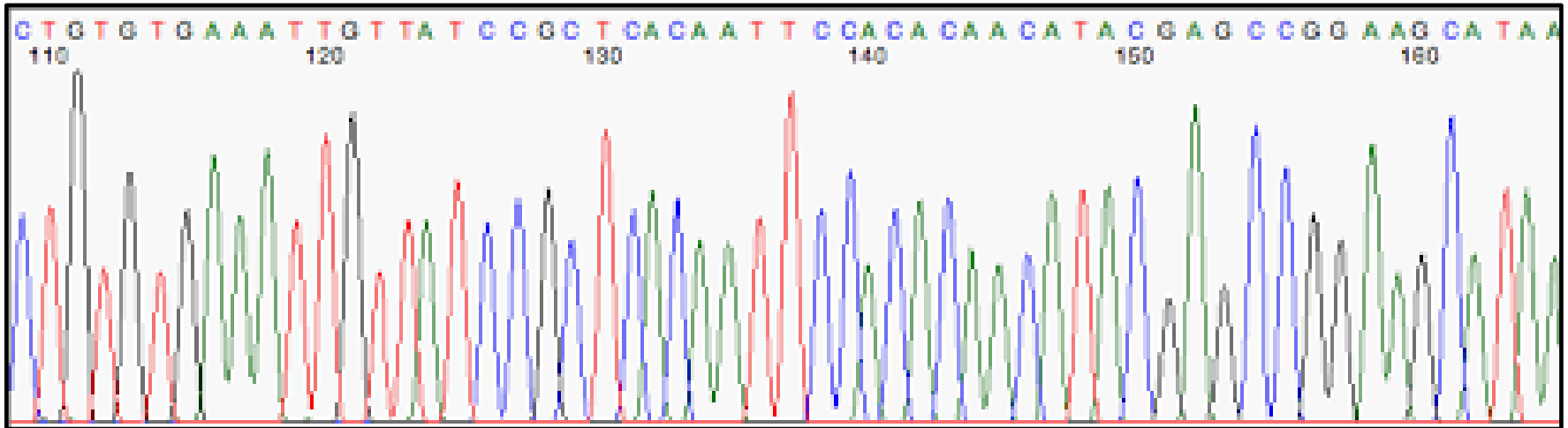
Oligonucleótidos marcados con fluorescencia

2 Separación por tamaño mediante electroforesis capilar en gel



3 Excitación láser y detección mediante secuenciador

Secuenciación de ácidos nucleicos (método de Sanger)





Conclusión y visión global

PCR y Secuenciación Sanger: conectando genotipo y fenotipo

Permiten acceder directamente al genotipo



- Mutaciones
- Inserciones o deleciones
- Cambios expresión o función de proteínas

Herramientas clave del diagnóstico molecular

Diagnóstico de enfermedades genéticas

Diagnóstico de infecciones

Tipificación tumoral

Medicina personalizada

¿Cómo las usarás tú como futuro/a médico/a?

Solicitar pruebas genéticas o moleculares



Información al paciente

Interpretar informes de laboratorio



Decisiones clínicas