

PCR

(POLIMERASA CHAIN REACTION)

**Ioritz Arburua**  
**Ainhoa Erquicia**  
**Maider Cambra**

# AURKIBIDEA:

1. Zer da PCR-a?
2. Behar den materiala
3. Prozesuaren pausoak
4. PCR motak
5. PCR-aren erabilpenak
6. Kontzeptuak
7. Optimizazioa
8. Bibliografia
9. Galderen txanda

# 0. NAHI IZANEZ GERO GALDERAK EGITEKO BALIABIDEA

Nahi izanez gero, Google Presentazioen “galderak” baliabidea erabil daiteke zeinari esker uneoro galderak jartzen ahal dituzuen zuen izenpean edo anonimoki.



# 1. ZER DA PCR-A?

PCR (Polimerasa Chain Reaction ingeleraz) Polimerasaren kate-erreakzioa, DNA sekuentzia bat edo gehiago esponentzialki kopiatzeko metodo bat da. Metodo honen bidez, ordu gutxitan gene baten milioika kopia lor daitezke. Hau dela eta, oso erabilia da eta ezinbestekoa da osasun-laboregietan bai eta laboregi klinikoetan ere.

Teknika hau Kary Mullis zientzialari estatubatuarrak garatu zuen 1985an oligonukleotidoekin lan egiten zuen bitartean eta aurkikuntza honengatik 1993an Kimikako Nobel saria lortu zuen.

Kary Mullis zientzialari “xelebrea” da, hainbat elkarrizketetan halaxe definitu da bere buruari [Artikulu bat hemen](#)

“What if I had not taken LSD ever; would I have still invented PCR?”

I don't know. I doubt it. I seriously doubt it.”

- Kary Mullis  
(Winner of the 1993 Nobel Prize in Chemistry for his discovery of the polymerase chain reaction, or PCR)



## 2. BEHAR DEN MATERIALA:

PCRak 8 gauza behar ditu erreaktibo gisa:

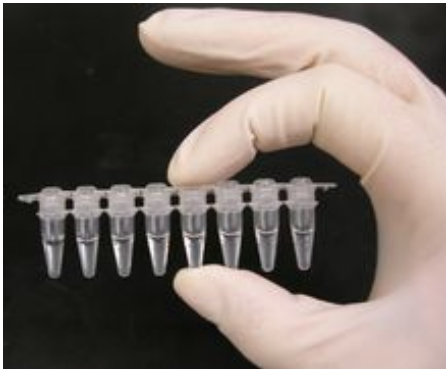
1. dNTP (desoxorribonukleotido-trifosfato), DNA berria polimeratzeko sustratoak (nukleotido askeak).
2. Bi *primer*: oligonukleotidoak zeinek bakoitza DNA katearen osagarriak diren. Anplifikatu beharreko DNA zatia mugatzen laguntzen dute.
3. Ioi dibalenteak: orokorrean  $Mg^{2+}$  ( $MgCl_2$  eran) edota  $Mn^{2+}$ . Entzimaren kofaktoreak izango dira
4. Ioi monobalenteak:  $K^+$ ,  $Cl^-$  bezalakoak
5. Buffer soluzio bat zeinek pHa alda ez dadin laguntzen duen.  $KCl$ ,  $Cl^-$  eta  $MgCl_2$ -z osatua egoten da eta honi esker giro tenperaturan 8,3pH egongo da.

## 2. BEHAR DEN MATERIALA:

6. DNA polimerasa bat edo polimerasa nahaste bat. Polimerasa bat entzima mota bat da azido nukleikoen transkripzioa eta erreplikazioa gauzaten dituen.

7. DNA molde bat, nahi dugun DNA zatia edukiko duena.

8. Termozikladore bat. Prozedurarako tenperatura egokia mantentzen duen aparailu bat.



PCR hodiak. Hauen barruan laginak sartzen dira 100 $\mu$ L-koak



Termozikladore bat

### 3. PROZESUAREN PAUSOAK:

#### PCR prozesuaren bideo labur bat

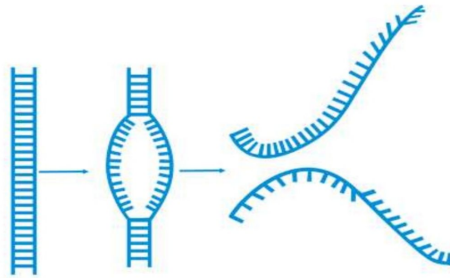
PCR-aren prozesuan zehar 6 fase desberdintzen dira:

1. Hasiera: Laginak termozikladorean sartu ondoren 94-96°C-tara berotzen dira (98°C muturreko beroak jasaten dituzten polimerasak erabiliz gero) eta 1-9 minutuz mantentzen da polimerasaren arabera. Azkeneko hau ez da beti beharrezkoa, soilik aktibazio beroa behar duten polimerasak erabiltzen baditugu gauzatzen da.

### 3. PROZESUAREN PAUSOAK:

2. Desnaturalizazioa: Lehenik, ADN-a desnaturalizatzen da, hau da, ADNaren bi kateak banandu egiten dira. Pausu hau hainbat modutan egin daiteke, formarik ohikoena laginaren beroketa (94-95°C-koa) izaten da.

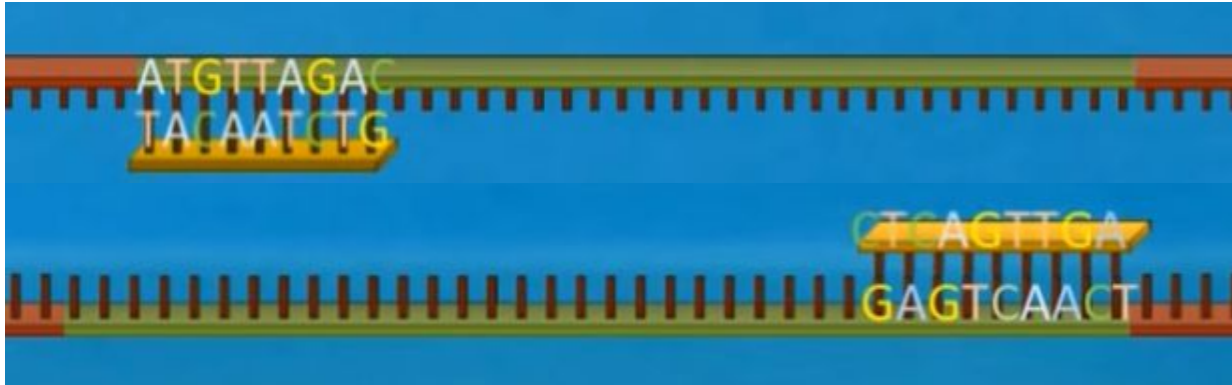
*Desnaturalización del ADN. Una doble hebra de ADN se calienta, y los pares de bases comienzan a separarse de forma cooperativa. Al final, las dos hebras están totalmente separadas.*





### 3. PROZESUAREN PAUSOAK:

3. Hibridazioa: *primer*-a ADN basearekin elkartzen da. Pauso hau gauzatzeko tenperatura 40-68°C bitartera jaitsi behar da 20-40 segunduz. *Primer*aren eta ADNaren baseak hain antzekoak direnez Hidrogeno zubiak sortzea lortzen da. Honen ostean, polimerasa ADN-a sintetizatzen dago.



### 3. PROZESUAREN PAUSOAK:

4. Katearen elongazioa: polimerasa martxan jartzen hasten da. ADN basetik abiatuz kate osagarria eratzen hasten da  $5' \rightarrow 3'$  zentzuan. Pauso honen tenperatura eta elongazioaren abiadura erabiltzen den ADN polimerasaren araberakoa da. Esan ohi da tenperatura egokian 1000 base minutuko polimeratzen direla.

### 3. PROZESUAREN PAUSOAK:

5. Elongazio finala: Etapa hau PCR.aren azkeneko zikloan gertatu ohi da, temperatura 70-74°Ctan egonik 5-15 minutuz. Harekin, gainerako ADN kate sinpleak guztiz sakabanatuta egotea ziurtatzen da.

Honen ondoren zikloak osatzen dira desnaturalizazioa, hibridazioa, katearen elongazioa eta elongazio finala pausoekin, ohikoena 20-35 ziklo inguru gauzatzea da eta modu horretan nahi dugun genearen  $2^n-2n$  kopia lor daitezke.

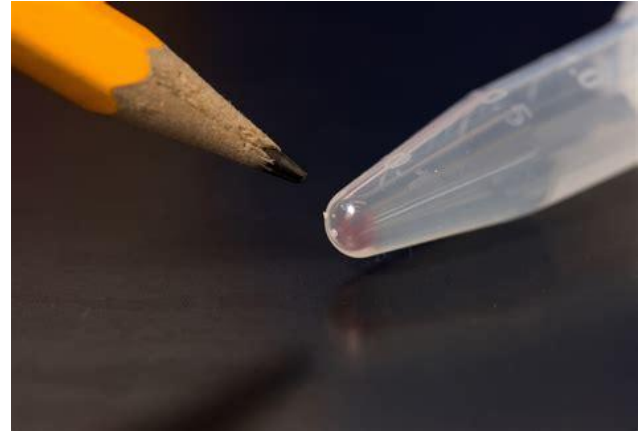
Adibidez, 30 ziklotan 1,073,741,764 kopia lortuko genituzke.

Ziklo kop.	1	5	10	15	20	25	30	35
Kopia kop.	0	22	1004	32738	1048536	33554382	1073741764	3,436E+10

### 3. PROZESUAREN PAUSOAK:

6. Kontserbazioa: Pausu hau 4-15°C bitartean gertatu ohi da denbora mugagabe batean, erreakzioa denbora batez kontserbatzeko. PCR-a normalean 15-100mikrolitrotan burutzen da, 0.2-0.5ml-ko hodi txiki batean.

PCR-ak ADN fragmentua sortu duela egiaztatzeko, elektroforesi teknikak erabiltzen dira.



## 4. PCR MOTAK

- Helize formako PCR-a: ADN lagin zati txikiak milaka eta milioika zatiko ADN handiagotan bihurtzen ditu.
- PCR in situ: laborategian prozesatu behar izan gabe ADN zatiak identifikatzen ditu. Biopsiak eta zelula arraspaztetarako erabiltzen dira.
- PCR anizkoitza: PCR mota honekin lagin bakar baten hainbat zati bilatzen ditu.
- PCR transcriptasa alderantzizkoa: ARN kateak erabiltzen ditu ADN moldeak identifikatzeko.
- PCR kuantitaboa: konponente fluoreszente bat gehitzen da eta horrekin batera ADN kantitatea argitu eta ikusten da.

## 5. PCR-AREN ERABILPENAK

- Aztarna digital genetikoa: teknika forentse bat da non pertsona bat identifikatzea baimentzen duen, bere DNA-a lortutako lagin batekin konparatuz. Lagina oso urria izan daiteke, hortaz PCR-ak DNA kopurua handitu dezake.



HUELLA DIGITAL

# 5. PCR-AREN ERABILPENAK

Medikuntzan hainbat aplikazio dauzka:

- Batetik, proba genetikoak egitea da, modu honetan ADN-an gaixotasunak sor ditzakaten mutazioak antzemateko.
- Bestetik, kuadro infekzioso jakin bat sortzen duten espezieak genotipatzea ahalbidetzen du.
- PCR-a ere, eguneroko mediku berrikustetan erabili daiteke; odol emaile zerbitzuetan bezala.
- Ehunen transplante bat egiten denean, PCR-a erabili daiteke egindako frogen zati bezala.

## 6. PCR-AREN KONTZEPTUAK

- Sentikortasuna: anplifikazioa burutzeko behar den ADN kantitate minimoa. Kantitate hori txikiagoa izango balitz faltsua bezala hartuko zen eta ez legoke anplifikaziorik egongo.
- Espezifikotasuna: anplifikatutako produktu bakarra lortzen saiatzen da. Era horretan negatiboak diren, baina positibo izango balira bezala hartutako ADN zatiak baztertzen dira.



## 6. PCR-AREN KONTZEPTUAK

- Eraginkortasuna: ziklo kopuru zehatz batetik lor daitekeen anplifikazio maximoa lortzen da.
- Leialtasuna: anplifikazioan zehar ADN polimerasak egindako akatsei buruz dio. Sekuentziazioan oso garrantzitsua da, lehiakortasun ona izanez gero positibo faltsuak ekiditzen ditu.

# 7. PCR-AREN OPTIMIZAZIOA

- Akatsak sortzen dira baldintza txarretan burutuz gero. Beste ADN arrotz batekin kutsadura saihesteko neurri batzuk hartu behar dira. Hona hemen neurri batzuk:
  - Anplifikazioa baino lehenagoko prozesuetan kontu handiz ibili behar da: bilketa, bidalketa, zainketa eta laginen prozesatzea.
  - PCR-a erabiliko den gainazalaren garbiketa sakona eta esterilizazioa.
  - Genetika-diagnostikoetako laborategietan lanerako toki desberdinak egoten dira.
  - Gaixotasunak sor ditzaketen gas edo baporeekin lan egiteko gas kanpaiak erabiltzea.
  - Laginak manipulatu dituztenek beharrezko babesa eramatea: eskularruak, bata, zapata itxiak, betaurrekoak, ilea ondo jasota...
  - Kontrol positibo eta negatiboak.



# 7. PCR-AREN OPTIMIZAZIOA

- PCR-aren produktuak lortzeko eta produktu faltsuen eraketa ekiditeko primer-en diseinua garrantzitsua da. Hona hemen kontuan hartzeko puntu batzuk:
  - 15 nukleotido baino gehiagoko primer-ak rabiltea gomendatzen da.. Normalean, 20 nukleotidozkoak diseinatzen dira.
  - Primer-ak ezin dute 3 base baino gehiagorekin bat etorri.
  - base puriko eta pirimidikoen arteko proportzioa 1:1 izan behar da eta 1 edo 2 base purikorekin hasi eta amaitu behar dira.
  - Sekuentzian lau nukleotidoen arteko banaketa homogeneoa izatea hobea da, poli T/A/G/C-ak saihestuz.

# 7. PCR-AREN OPTIMIZAZIOA

- Polimerasa mota asko existitzen dira, hortaz proba bakoitzaren beharretara hobeto moldatzen dena aukera daiteke.
- Erreakzio tanpoiaren osagaiak entzimen beharretara moldatu behar dira.



Erreakzio  
tanpoia

# 7. PCR-AREN OPTIMIZAZIOA

Beste arazo batzuk:

- ADN-aren degradazioa: baldintza txarretan manipulaturuz gero edo autopsia batetik ateratako ADN-aren kasuetan, amplifikaziorik eza ikusten da.
- PCR-aren inhibizioa: PCR-aren iragotzean oztopoak egon daitezke. Oztopo horiek kentzeko, lehenagotik prozesu gehigarri bat egin behar da.
- ADN-aren modifikazioa: formola eta izpi ultramoreek ADN modifikatzen dute, amplifikazioaren emaitzak aldatuz.

# 7. PCR-AREN OPTIMIZAZIOA

- Tresnak: “stutter” bandak edo “shadow” egoerak eman daitezke, hau da, polimerasak mikrosateliteen errepikapenak handitzen dituzte.
- Patroi batetik kanpoko aleloa: Erreferentziako puntuekin kointziditzen ez duen alelo handitu bat. PCR-an zerbait gaizki egon dela deritzo.
- Nahasteak: bi laginen arteko nahasteak egotea posible da eta emaitza patroi bakoitzaren anplifikazioa banandua izatea dakar horrek.



# 8. BIBLIOGRAFIA

Erabilিতako web guneak eta dokumentuak honakoak izan dira:

<https://www.unioviedo.es/esr/pp/tad1.pdf>

<https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>

<http://rolandocoagulacionsanguinea.blogspot.com/2011/07/tecnica-pcr.html>

<https://es.m.wikipedia.org/wiki/PCR> (gaztelera, ingelera eta frantzesera)

<https://youtu.be/TaHTjA5gKU>

9.

GALDEREN

TXANDA



ESKERRIK ASKO ZUEN

ATENTZIOARENGATIK

<https://www.unioviado.es/esr/pp/tad1.pdf>

<https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>