



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

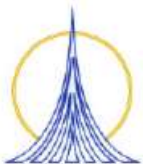
*FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA*

**“PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN DE MUTACIONES  
EN EL GEN KRAS ASOCIADO CON CÁNCER  
CÉRVICO-UTERINO.”**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A

**MARISOL MOLINA SIGALA**

Director de tesis: Dra. Martha Legorreta Herrera  
Asesor de tesis: Mtra. Esmeralda Bellido Castaños



México, 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

- Inicialmente quiero agradecer de una manera muy especial a la **Dra. Martha Legorreta Herrera**, por toda la confianza que deposito en mí para la realización de este proyecto.
- A mis padres, **Arturo Molina** y **Carmen Sigala** que en todo momento me apoyaron y brindaron palabras de aliento cada vez que sentía que no era capaz de lograr mis objetivos.
- A mi hermana **Beatriz Molina**, por tenerme paciencia cuando la hacia enojar mucho.
- A **Joel Hernández** por enseñarme que cuando anhelas algo en la vida, es posible obtenerlo si nos esforzamos un poco y tenemos fe en nosotros mismos.
- A mis mejores amigas **Rebeca Rodríguez**, **María Juana Martínez** y **Adriana Ramos** que estuvieron conmigo en todo momento y se preocuparon por todo lo que me pasaba.
- A cada uno de mis sinodales, **Mtra. Leonor Aguilar**, **Mtra. Ma. Esmeralda Bellido**, **Q.F.B. Ma. De las Mercedes Zamudio**, **Dra. Isabel Soto** y **Dra. Martha Legorreta** por el tiempo que brindaron para la revisión de la tesis y por todas sus sugerencias.
- Este trabajo recibió apoyo del proyecto PAPIIME PE204105, DGAPA, UNAM

<b>1. <u>RESUMEN</u></b>	<b>5</b>
<b>2. <u>INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>6</b>
<b>3. <u>FUNDAMENTO TEÓRICO</u></b>	<b>7</b>
3.1. CICLO CELULAR	7
3.2. GENES RESPONSABLES DEL CÁNCER.	9
3.2.1. <i>Genes supresores de tumor y oncogenes.</i>	10
3.2.1.1. <i>Tipos de genes supresores.</i>	10
3.2.1.2. <i>Características de la expresión de los genes oncosupresores.</i>	11
3.2.1.3. <i>Tipos de oncogenes.</i>	12
3.2.1.4. <i>Características de la expresión de los oncogenes.</i>	14
3.3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR BÁSICAS PARA EL ESTUDIO DE GENES RELACIONADOS CON CÁNCER.	15
3.3.1. <i>Extracción de DNA.</i>	15
3.3.2. <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	17
3.3.3. <i>Electroforesis.</i>	19
3.3.4. <i>Secuenciación (Método enzimático o de Didesóxidos).</i>	20
<b>4. <u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u></b>	<b>22</b>
<b>5. <u>OBJETIVOS</u></b>	<b>24</b>
5.1. <i>Objetivo general</i>	24
5.2. <i>Objetivos particulares</i>	24
<b>6. <u>HIPÓTESIS</u></b>	<b>25</b>
<b>7. <u>MATERIAL</u></b>	<b>26</b>
7.1. <i>Material Biológico</i>	26
7.2. <i>Material de laboratorio y Equipo.</i>	26
7.3. <i>Reactivos.</i>	26
<b>8. <u>METODOLOGÍA</u></b>	<b>28</b>
8.1. <i>Extracción de DNA.</i>	28
8.2. <i>Hidratación y cuantificación de DNA.</i>	30
8.3. <i>Amplificación del gen Kras.</i>	31

<b>8.4. Electroforesis de productos de PCR.</b>	<b>33</b>
<b>8.5. Extracción de DNA a partir de bandas de gel de acrilamida (Método de difusión).</b>	<b>34</b>
<b>9. <u>RESULTADOS</u></b>	<b>36</b>
<b>10. <u>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</u></b>	<b>40</b>
<b>11. <u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>44</b>
<b>12. <u>PROPUESTAS</u></b>	<b>45</b>
<b>13. <u>ANEXOS</u></b>	<b>46</b>
<b>13.1. <i>Abreviaturas.</i></b>	<b>46</b>
<b>13.2. <i>Preparación de reactivos.</i></b>	<b>47</b>
<b>13.3. <i>Cuestionario.</i></b>	<b>49</b>
<b>13.4. <i>Glosario.</i></b>	<b>51</b>
<b>14. <u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>56</b>

## 1. RESUMEN

El gen **K-ras** que codifica para una proteína de 189 aminoácidos implicada en la transducción de señales a través de la membrana plasmática, ilustra de que manera los cambios en un solo nucleótido pueden convertir una secuencia “normal” en la versión oncogénica del gen.

En el presente trabajo se estandarizó un protocolo que permitirá detectar una mutación en el gen **K-ras** asociado con la predisposición genética para desarrollar cáncer; para lo anterior se utilizó la base de datos PubMed con el fin de obtener las secuencias de las mutaciones ya publicadas en el gen **K-ras**. Se realizó la extracción de DNA de líneas celulares de cáncer humano (T47D, MDA231, 293T, CALO e INBL) como controles positivos y muestras de personas sanas como problema. A cada una de las muestras se le extrajo DNA, se cuantificó y se amplificó utilizando la reacción de PCR con 30 ciclos a una temperatura de alineación de 58°C. Posteriormente se prepararon geles de acrilamida al 5% y se realizó la electroforesis a 180 volts por 1.5 hrs., para analizar los productos obtenidos a partir de la amplificación. Finalmente se cortó la banda y se llevo acabo la extracción de DNA por un método de difusión; el producto resultante se cuantificó y se corrió nuevamente en gel de acrilamida para verificar su pureza, este producto se secuenció para detectar la presencia o no de la mutación en dicho gen. Esta tecnología se escalará al laboratorio de Genética Clínica de la FES Zaragoza para que los alumnos de la carrera de QFB puedan detectar un aspecto asociado con la predisposición a desarrollar Cáncer por medio de la detección de mutaciones en el gen **K-ras**.

Este trabajo recibió apoyo del proyecto PAPIME PE204105, DGAPA, UNAM

## **2. INTRODUCCIÓN**

La ocurrencia de tumores malignos constituye uno de los principales problemas de salud en el mundo. En México, han ocupado uno de los cinco primeros lugares como causa de muerte durante los últimos años. La primera conexión entre el cáncer y la genética se propuso a principios del siglo XX, y esta idea ha servido como una de las bases de la investigación sobre el cáncer.

El cáncer, neoplasia o tumor, puede considerarse una enfermedad genética que se desarrolla en organismos superiores, en la mayoría de los tejidos y en todo tipo de células somáticas. Bajo el nombre genérico de cáncer se engloba un conjunto de enfermedades que tienen en común un crecimiento celular desordenado (tumor) y una colonización tisular (metástasis), todo ello determinado por una mutación inicial seguida de la acumulación de otras mutaciones sucesivas.

El cáncer probablemente es la enfermedad más intensamente estudiada desde varios puntos de vista, pasando en los últimos años de un conocimiento casi nulo a un gran avance en diversos aspectos moleculares, desde aquellos que explican la proliferación excesiva y la pérdida de células por apoptosis, hasta los mecanismos por los que se generan las metástasis.

Con el presente trabajo se pretende iniciar el estudio sobre la detección de mutaciones en los genes asociados con la predisposición a desarrollar cáncer cérvico-uterino, utilizando técnicas de Biología Molecular Básica, que puedan realizarse en el Laboratorio de Genética Clínica.

### **3. FUNDAMENTO TEÓRICO**

#### **3.1 CICLO CELULAR**

Las células que conforman el tejido normal responden a estímulos y señales tanto externas como internas que les indican si deben proliferar o detener su división. Cuando este control se pierde, se establece el cáncer debido a la expresión errónea de genes que codifican proteínas reguladoras de este proceso, ya sea por alteraciones genéticas o epigenéticas. En la actualidad, se han asociado al menos 90 genes con transformaciones malignas de células y se clasifican como **oncogenes y genes supresores de tumores**, los cuales tienen como denominador común la participación directa en la regulación del ciclo celular y, por lo tanto, se encuentran involucrados en la proliferación celular<sup>2</sup>.

**El ciclo celular** es un proceso fundamental en todos los organismos, eucariontes y procariontes. Un ciclo celular es la rutina metabólica que realiza una célula para multiplicarse por medio de una red de eventos bioquímicos y moleculares. La importancia del ciclo celular se manifiesta a través de la evolución, ya que los procesos bioquímicos involucrados en este fenómeno persisten desde las levaduras hasta el ser humano.

El ciclo celular lo forman las fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y M y está acoplado al ciclo de control del crecimiento en el que existen señales de diferenciación celular y factores de crecimiento. Una célula que se encuentra diferenciada en la fase G<sub>0</sub> pasa a la fase G<sub>1</sub>, mediante un estímulo dado por un factor de crecimiento<sup>1,10</sup>.

En la fase G<sub>1</sub> se ubica un sitio de control llamado punto de restricción en el que actúan los genes supresores de tumor; cuando este nivel se alcanza la célula pasa a la fase S, donde se sintetiza el DNA, que a su vez se analizará y si es necesario se reparará en la fase de G<sub>2</sub> antes de entrar a la mitosis. Terminada la mitosis, el estímulo proliferativo puede seguir originando varias divisiones celulares. Al cesar



el estímulo de un factor de crecimiento o recibir una señal de diferenciación, la célula pasa del punto de restricción de la fase  $G_1$  a la fase  $G_0^3$ .

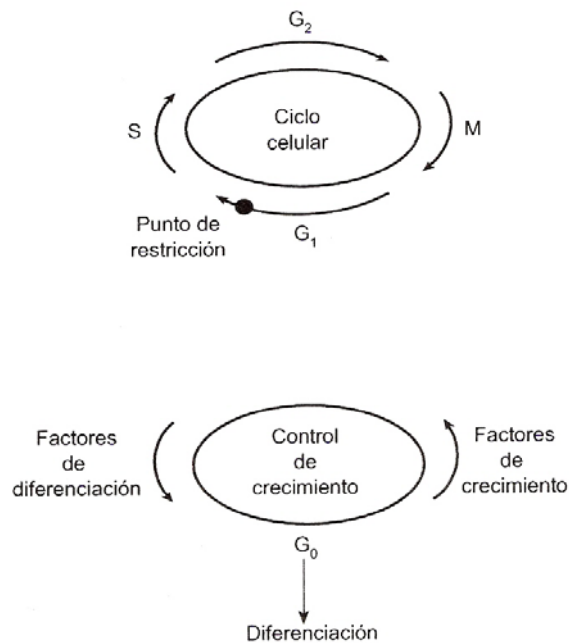


Fig. 1. Ciclo celular y control del crecimiento. Cuando la célula es estimulada en la fase  $G_0$  por factores de crecimiento pasa a la fase  $G_1$ , S,  $G_2$  y M para tener una división completa. Una vez que el estímulo del factor de crecimiento desaparece o por medio de factores de diferenciación, la célula regresa a la fase  $G_0$ .

El camino que sigue un estímulo está dado por un factor de crecimiento, desde el espacio extracelular hasta el núcleo de la célula, involucra una serie de proteínas con diferentes ubicaciones celulares y funciones. Un factor de crecimiento es una señal extracelular (ligando) que se une a su receptor específico anclado en la membrana citoplásmica, el cual lleva la señal hacia el interior de la célula de tres formas<sup>1,2</sup>:

1. El receptor se une a su ligando y la parte citoplásmica del receptor tiene actividad enzimática de cinasa de tirosina o de cinasa de serina-treonina.
2. El receptor se une a su ligando y la parte intracitoplásmica del receptor se acopla a proteínas con actividad de cinasa de tirosina.
3. El receptor se une a su ligando y la parte citoplásmica activa proteínas con actividad de GTPasa (proteína G).

Una vez que el receptor fosforila la primera proteína citoplásmica, ésta a su vez fosforila a otra, iniciándose una serie de fosforilaciones a través de proteínas citoplásmicas cuyo blanco final es un factor transcripcional. Dichos factores transcripcionales son proteínas que pueden transportarse del citoplasma hacia el núcleo y unirse en regiones reguladoras de genes para activar la transcripción de las ciclinas que van a participar en el ciclo celular<sup>3,14</sup>.

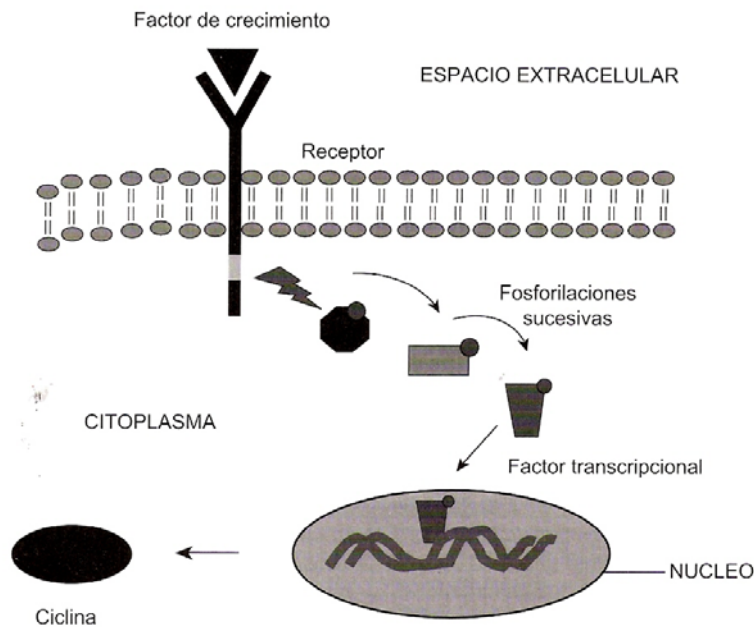


Fig. 2. El estímulo que recibe la célula para proliferar, llega hasta el núcleo mediante proteínas que tienen función como factor de crecimiento, receptores, cinasas citoplásmicas y factores transcripcionales. Estas proteínas codificadas por protooncogenes pueden sufrir mutaciones y originar un oncogen.

### 3.2 GENES RESPONSABLES DEL CÁNCER.

Las mutaciones, presentes en las células cancerosas, que provocan la aparición de las características tumorales afectan genes cuyos productos proteicos regulan la proliferación celular, la apoptosis (muerte celular programada) o la senescencia celular (envejecimiento), por lo tanto debemos definir la existencia de dos tipos de genes cuya alteración se relaciona con el proceso canceroso: oncogenes y genes supresores de tumores u oncosupresores.

### **3.2.1 Genes supresores de tumor y oncogenes.**

En general, la mitosis se puede regular de dos formas<sup>10</sup>:

1. Por genes que actúan normalmente deteniendo la división celular y
2. Por genes que normalmente funcionan promoviendo la división celular.

La primera clase llamados **genes supresores de tumores (oncosupresores)**, codifican proteínas que actúan deteniendo la proliferación o bien induciendo la apoptosis. Cuando una mutación del gen genera una proteína no funcional o impide su síntesis, la proliferación pierde su control o bien la apoptosis nunca tiene lugar, por lo que la proliferación es excesiva y da lugar al cáncer<sup>3,10</sup>.

#### **3.2.1.1 Tipos de genes supresores.**

Los genes oncosupresores codifican proteínas que actúan en distintos puntos de las rutas de señalización, del control del ciclo celular y de la apoptosis<sup>1,2</sup>:

- **Los factores inhibidores del crecimiento celular.** La mutación del gen oncosupresor correspondiente anula la funcionalidad de la proteína sintetizada. Ejemplo: el gen oncosupresor **dcc** codifica una proteína de adhesión celular, ausente en el carcinoma de colon.
- **Los receptores de estos factores inhibidores o de hormonas que frenan el crecimiento celular.** La forma mutada del gen oncosupresor codifica un receptor insensible a su ligando o que no transmite la señal al interior de la célula. Ejemplo: el gen oncosupresor que codifica el receptor de membrana para el factor  $\beta$  de crecimiento transformante (**TGF- $\beta$** ).
- **Las proteínas citoplasmáticas que intervienen en los sistemas de transducción de señales acoplados a los receptores anteriores.** La

situación varía según sea la función concreta de la proteína. Ejemplo: el gen oncosupresor *nf1* codifica para la neurofibromina, una proteína que estimula la actividad GTPasa de Ras, en consecuencia la inactiva. En la enfermedad de Recklinghausen, el gen *nf1* está mutado, por lo que la neurofibromina es defectuosa, la proteína Ras no hidroliza GTP y queda en forma activa más tiempo del normal, lo que aumenta la proliferación.

- **Los factores de transcripción que dirigen la expresión de genes cuyos productos proteicos frenan el ciclo celular o producen apoptosis.** Ejemplos: los genes oncosupresores *Rb* y *p53*.
- **Las proteínas que frenan el ciclo celular o producen apoptosis.** El gen mutado no expresa la proteína o da lugar a una forma no funcional. Un ejemplo es el gen oncosupresor *p53*.

### **3.2.1.2 Características de la expresión de los genes oncosupresores.**

La pérdida de la función de un gen oncosupresor sólo se produce cuando han mutado los dos alelos (individuos homocigóticos). Es decir, la forma mutada de un gen oncosupresor se expresa con carácter recesivo. Esto es así puesto que la mutación produce pérdida de función en la proteína, pero las moléculas de proteína sintetizadas a partir del alelo normal pueden suplir esa carencia, al menos parcialmente <sup>1, 2, 10</sup>.

La herencia de los genes oncosupresores mutados es la que corresponde a su carácter recesivo, pero sólo tiene lugar cuando la mutación ha afectado a células germinales. La probabilidad de que ocurra una mutación somática en los alelos de una misma célula es baja, por lo que la homocigosis generada de *novo* es poco frecuente; sin embargo, los individuos heterocigóticos en un gen oncosupresor tienen predisposición a la aparición de cáncer, ya que sólo necesitan una mutación

somática en el otro alelo para perder totalmente la función de la proteína oncosupresora. A continuación se muestra un cuadro de correlación de genes supresores de tumores con algunos tipos de cáncer<sup>2</sup>:

<i>Gen supresor de tumor</i>	<i>Correlación con neoplasias</i>
Rb	Implicado en neoplasias de retina, hueso, pulmón, vejiga y mama
p53	La pérdida de la función de p53 se vincula con más de 50 tipos de cáncer en seres humanos
FHIT	Implicado en el cáncer de mama y pulmón
BRCA1	Asociado a tumores de mama y ovario
BRCA2	Relacionado con el cáncer de mama
VHL	Implicado en tumores malignos de riñón
NF-1	Relacionados con los neurofibromas
APC	Asociado a tumores de colon y estómago

Cuadro 1. Correlación de genes supresores con algún tipo de proceso canceroso.

Los genes de la segunda clase, llamados **protooncogenes**, funcionan normalmente promoviendo la división celular. Estos genes pueden activarse o desactivarse, cuando están activados, promueven la división celular. Para detener la división celular, estos genes y/o sus productos génicos, tienen que inactivarse. Si los protooncogenes quedan permanentemente activados, entonces se da una división celular incontrolada, lo que origina la formación de un tumor. Las formas mutantes de los protooncogenes se conocen con el nombre de **oncogenes**<sup>2</sup>.

### **3.2.1.3 Tipos de oncogenes.**

Se han identificado oncogenes que codifican proteínas muy diversas<sup>1,2</sup>.

- Los factores estimuladores del crecimiento celular. La mutación oncogénica origina una producción excesiva del factor proteico o una mayor actividad

de éste. Ejemplo: el oncogen **sis** que codifica para la cadena B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

- Los receptores de factores de crecimiento o de hormonas, presentes en la membrana o dentro de la célula. Para el caso de un factor de crecimiento u hormona estimuladores de la proliferación, la forma oncoproteica del receptor puede ser aquella con una conformación que la mantiene activa aunque no se le una el ligando. Si se trata del receptor de un factor u hormona inhibidores del crecimiento, la oncoproteína es aquella que no responde a la unión del ligando. Ejemplo: el oncogén **erbB** codifica el receptor de membrana para el factor de crecimiento epidérmico EGF.
- Las proteínas citoplasmáticas que intervienen en los sistemas de transducción de señales. La mutación hace que el oncogén exprese una proteína que se mantiene activa sin necesidad de que le llegue la señal. Ejemplo: el oncogen **ras** que codifica una proteína G monomérica.
- Los factores de transcripción que controlan la expresión de genes que codifican a su vez proteínas implicadas en la señalización, el control del ciclo celular o la apoptosis. Ejemplos: los protooncogenes **fos**, **jun** y **myc**. El oncogén **erbA** codifica el receptor intracelular para hormonas tiroideas, que es un factor de transcripción.
- Las proteínas responsables de la activación directa del ciclo celular (tales como las ciclinas o las cinasas y las fosfatasas activadoras de las Cdk) o de la inhibición de la apoptosis. Los oncogenes respectivos expresan proteínas en mayor cantidad o con la función aumentada. Ejemplos: el oncogén **bcl-1** codifica la ciclina D1, **cdk1** modifica la cinasa dependiente de ciclina Cdk1, **mdm-2** codifica un antagonista de la proteína p53, **bcl-2** codifica una proteína mitocondrial que bloquea la apoptosis al inhibir a las caspasas<sup>2</sup>.

### 3.2.1.4 Características de la expresión de los oncogenes.

Puesto que existe ganancia de función en la oncoproteína, basta con que esté mutado uno de los dos alelos del protooncogen para que se exprese el efecto de la oncoproteína anormal. En consecuencia los oncogenes se expresan con carácter dominante, y los individuos heterocigotos para un oncogen sufren sus efectos de forma similar a los homocigóticos<sup>1, 2, 10</sup>. La herencia del oncogén será acorde con este carácter, pero sólo si la mutación del protooncogen afecta a las células germinales. A continuación se muestra una tabla donde se mencionan algunos oncogenes y tumores humanos relacionados<sup>1,2</sup>:

<i>oncogenes</i>	<i>Neoplasia (s)</i>	<i>Lesión</i>
<b><i>Abl</i></b>	Leucemia mielógena crónica	Translocación
<b><i>erbB</i></b>	Carcinoma de células escamosas; astrocitoma	Amplificación
<b><i>Neu</i></b>	Adenocarcinoma mamario, ovárico y gástrico	Amplificación
<b><i>Gip</i></b>	Carcinoma de ovario y de glándula suprarrenal	Mutaciones puntuales
<b><i>Gsp</i></b>	Adenoma hipofisario, carcinoma tiroideo	Mutaciones puntuales
<b><i>Mic</i></b>	Linfoma de Burkitt, Carcinoma de pulmón, glándula mamaria y cuello uterino	Translocación, Amplificación
<b><i>L-mic</i></b>	Carcinoma de pulmón	Amplificación
<b><i>N-mic</i></b>	Neuroblastoma, carcinoma pulmonar de células pequeñas	Amplificación
<b><i>H-ras</i></b>	Carcinoma de colon, pulmón y páncreas; melanoma	Mutaciones puntuales

<b>K-ras</b>	Leucemia aguda mielógena y linfoblástica; carcinoma de tiroides, melanoma	Mutaciones puntuales
<b>N-ras</b>	Carcinoma genitourinario y tiroideo; melanoma	Mutaciones puntuales
<b>Ret</b>	Carcinoma tiroideo	Redisposición
<b>K-sam</b>	Carcinoma de estómago	Amplificación

Cuadro 2. Oncogenes y tumores humanos relacionados.

Dentro del laboratorio se ha iniciado el estudio tanto de genes oncosupresores, como de oncogenes utilizando técnicas de Biología Molecular Básicas como el aislamiento de DNA y RNA, así como la amplificación de secuencias específicas del material genético realizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Dichas técnicas se mencionan a continuación.

### **3.3 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR BÁSICAS PARA EL ESTUDIO DE GENES RELACIONADOS CON EL DESARROLLO DE CÁNCER.**

#### **3.3.1 Extracción de DNA**

La estructura básica del DNA es idéntica en todos los organismos; está compuesto por cadenas de nucleótidos unidas por la complementariedad de las bases a través de puentes de hidrógeno entre A y T (Adenina y Timina), C y G (Citosina y Guanina) en forma de doble hélice. El DNA está localizado dentro del núcleo de las células eucarióticas, rodeado de proteínas, histonas y organizado en cromosomas<sup>4</sup>.

El aislamiento del DNA, es el primer paso en cualquier análisis genético. Dada la complejidad de esta molécula, los ácidos nucleicos son difíciles de separar de los componentes de membrana (lípidos, proteínas, carbohidratos) y de otras moléculas solubles (polisacáridos)<sup>2, 4</sup>. Generalmente, se lleva a cabo el **método de extracción de DNA con fenol/ cloroformo/ alcohol isoamílico**.



En este método, la primera etapa en la extracción de DNA es la lisis de las membranas externa y nuclear de las células; se realiza en un medio alcalino, por la acción de detergentes y enzimas proteolíticas, como la proteinasa K para liberar el material genético.

Durante la segunda etapa, se lleva a cabo la extracción orgánica, las proteínas contaminantes se desnaturalizan y se depositan en la interfase entre la fase acuosa y la fase orgánica. Los ácidos nucleicos permanecen en la fase acuosa. El fenol se utiliza a pH 8 para evitar la formación de productos oxidativos que dañan los ácidos nucleicos<sup>2</sup>. La mezcla fenol/ cloroformo se utiliza para las extracciones, ya que facilita la desnaturalización de proteínas y la precipitación de éstas en la interfase.

Por último, en la precipitación con etanol absoluto, las sales permanecen en solución, mientras que los ácidos nucleicos forman un precipitado blanco en forma de malla que se puede separar por centrifugación<sup>6, 12</sup>.

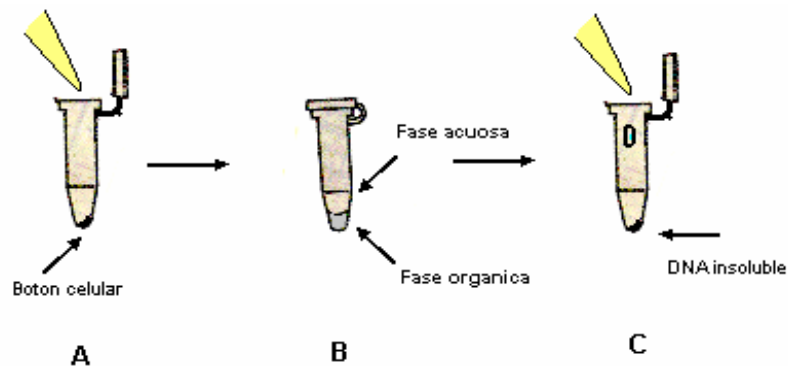


Fig. 3. A) Primer etapa: lisis celular por acción de algunos detergentes. B) Segunda etapa: extracción orgánica (desnaturalización de las proteínas). C) Tercera etapa: precipitación con alcohol absoluto.

### **3.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

En 1986, se desarrolló una nueva técnica denominada reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que ha ampliado enormemente el poder de la investigación del DNA recombinante<sup>5</sup>. La PCR permite la amplificación directa de segmentos específicos, y puede utilizarse en fragmentos de DNA que estén presentes, inicialmente, en cantidades infinitesimalmente pequeñas.

Se basa en la amplificación de un segmento de DNA utilizando DNA polimerasa y cebadores, oligonucleótidos que hibridan con la cadena complementaria a la secuencia a amplificar. Hay tres pasos fundamentales en la reacción de PCR, y la cantidad de DNA que se amplifica sólo se limita, en teoría, por el número de veces que se repiten estos pasos<sup>2, 4, 14</sup>.

1. Primero, el DNA que se quiere amplificar se desnaturaliza en cadenas sencillas. Este DNA no necesita estar ni purificado ni clonado, y puede provenir de distintas fuentes, incluyendo DNA genómico, muestras forenses como sangre seca o semen, muestras almacenadas en registros médicos, pelos, restos momificados, y fósiles. El DNA de doble cadena se desnaturaliza por calor (a unos 90°C) hasta que se disocia en cadenas sencillas (normalmente 5 minutos).
2. Los cebadores hibridan al DNA de cadena sencilla. Estos cebadores son oligonucleótidos sintéticos que hibridan con las secuencias flanqueantes del segmento a amplificar. Generalmente se utilizan dos cebadores diferentes. Cada uno de ellos tiene la secuencia complementaria a una de las dos cadenas del DNA. Los cebadores se alinean con sus extremos 3' encarados ya que hibridan a cadenas opuestas. La utilización de cebadores sintéticos significa que se debe tener alguna información de la secuencia de DNA que se quiere amplificar.

3. A la mezcla de reacción se le añade una DNA polimerasa resistente al calor (polimerasa **Taq**). La polimerasa extiende los cebadores en dirección 5'-3', utilizando como molde al DNA de cadena sencilla unido al cebador. El producto es una molécula de DNA de doble cadena con los cebadores incorporados en el producto final.

Cada grupo de tres pasos (desnaturalización del producto de doble cadena, hibridación de los cebadores, y extensión por la polimerasa) se denomina ciclo. Generalmente, cada paso del ciclo se realiza a una temperatura diferente<sup>2, 4, 5</sup>.

El ciclo puede repetirse llevando a cabo otra vez todos los pasos. Empezando con una molécula de DNA, el primer ciclo produce dos moléculas de dos ciclos producen cuatro, tres ciclos producen ocho, etcétera. Veinticinco ciclos amplifican varios millones de veces el DNA en cuestión.

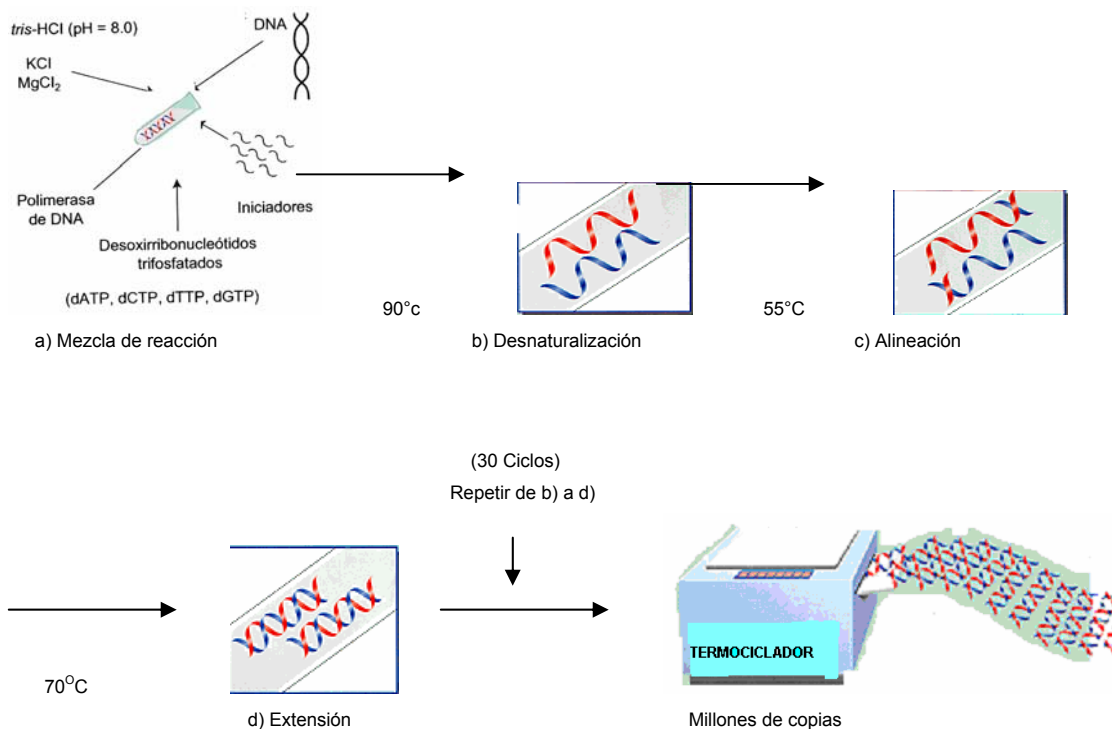


Fig.4. Pasos a llevar a cabo en la realización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

### 3.3.3 Electroforesis

Se basa en la capacidad de las macromoléculas cargadas para desplazarse en un campo eléctrico, con velocidad proporcional a su carga e inversamente proporcional a su tamaño. Las moléculas de DNA poseen una carga negativa uniforme por unidad de masa cuando el pH es alcalino, lo cual permite que su movilidad hacia el ánodo (+) sólo esté determinada por el tamaño de la molécula<sup>2,12</sup>. La separación de los fragmentos de DNA de doble cadena se realiza en geles de agarosa o de poliacrilamida; en ambos casos el gel se prepara con distintas concentraciones en función al tamaño de los fragmentos de DNA que se requiere separar.

Una vez separadas las moléculas de DNA se visualizan normalmente por la fluorescencia de algunos compuestos que se unen a ellas. El más utilizado es el bromuro de etidio cuya fluorescencia aumenta cuando se encuentra unido al DNA<sup>2,3,4</sup>.

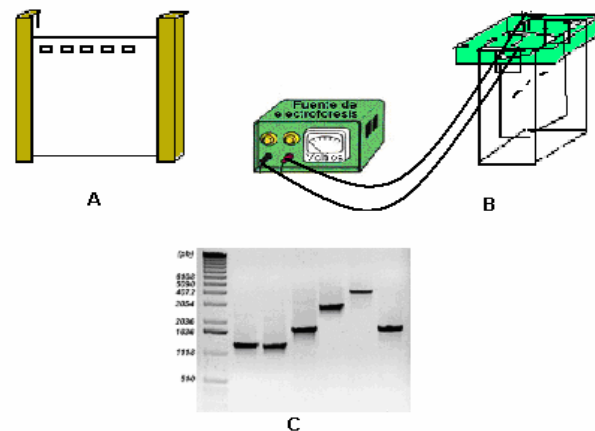


Fig. 5. A) Gel de acrilamida, B) Cámara de electroforesis conectada a una fuente de poder, C) Fotografía de un gel de acrilamida una vez teñido con bromuro de etidio.

### **3. 3. 4 Secuenciación (Método enzimático o de Didesóxidos)**

No resulta sencillo conocer la secuencia del genoma humano, sin embargo en la actualidad se conocen las secuencias de una considerable cantidad de genes y varias alteraciones estructurales como mutaciones, inserciones, deleciones, etc., que conducen a trastornos funcionales, y por lo tanto, a enfermedades específicas.

Para llevar a cabo el método de didesóxidos, se requiere del molde de DNA, un iniciador (Cebador), desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), didesoxirribonucleótidos (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) y la enzima polimerasa de DNA (*Taq* Polimerasa de DNA), en un amortiguador que contenga cloruros de Magnesio y de Potasio ( $MgCl_2$ , KCl)<sup>2, 4</sup>.

Para que la polimerasa de DNA pueda iniciar su síntesis, es necesario que los cebadores se fijen de forma específica al molde de DNA, así, la enzima comienza a añadir dNTP a la cadena en crecimiento por complementariedad de bases (se forma un enlace fosfodiéster entre el extremo 3'OH terminal de la cadena y el grupo 5'PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> del dNTP añadido)<sup>1</sup>.

Un requisito para este método, es que, uno de los dNTP añadido debe encontrarse marcado de forma radioactiva (<sup>32</sup>PdATP). La reacción se lleva a cabo en 4 tubos donde se adiciona un ddNTP diferente; así cuando el ddNTP equivalente se incorpora en la cadena en crecimiento, se detiene la elongación de la misma (debido a que ddNTP carece de grupo OH y por lo tanto no puede formarse otro enlace fosfodiéster). A partir del tubo que contiene ddATP, se obtendrán cadenas que terminan con la base A y así sucesivamente para las cadenas que se sintetizan en los tubos ddCTP, ddGTP, ddTTP<sup>1,3</sup>.

Después de efectuarse las cuatro reacciones, se separan las cadenas de cada tubo en un gel de acrilamida, es importante señalar, que cada producto obtenido

se coloca en un carril diferente en la electroforesis y se debe identificar correctamente. Posteriormente se realiza una autorradiografía y por último se lee la secuencia de DNA.

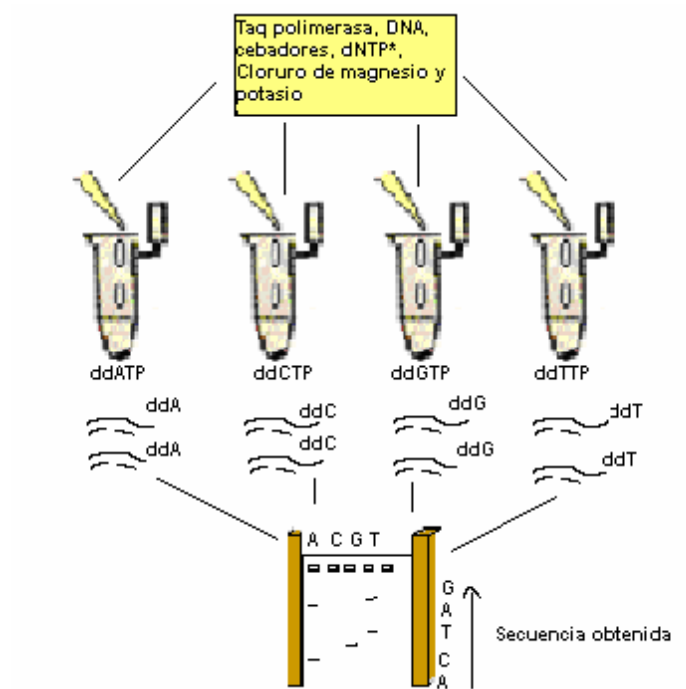


FIG. 6. Secuenciación de DNA. Método enzimático de cadena terminal o didesóxido.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La Genética en las últimas décadas ha avanzado de forma vertiginosa. El desarrollo de megaproyectos como el Proyecto Genoma Humano ha permitido secuenciar todo el material genético que constituye a las células humanas y también a otros organismos, incluidos diversos microorganismos, vegetales, mamíferos, etc. El avance en este conocimiento tiene impacto en el desarrollo de tecnologías que permiten un mejor diagnóstico y tratamiento de todas las enfermedades que afectan a los seres vivos incluyendo al humano. Por lo anterior, es sumamente importante actualizar el programa de estudios del módulo de Genética Clínica, para lo cual proponemos modificar los protocolos de prácticas ya existentes, además de incluir nuevos protocolos, que permitan a los profesores y alumnos manejar la información que se genera para conocer y utilizar los métodos de diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las enfermedades que afectan al ser humano.

En el presente proyecto diseñamos y calibramos un protocolo de prácticas que permite detectar la presencia de mutaciones en el gen **K-ras** con el fin de detectar la predisposición genética a cáncer. Para lo anterior fue necesario aprender a utilizar las bases de datos descritas en PubMed para emplear las secuencias de las mutaciones ya publicadas en el gen **K-ras** y montar un protocolo de PCR que permitió detectar la presencia de dichas mutaciones.

Para calibrar las técnicas, utilizamos líneas celulares de cáncer cérvico uterino obtenidas en la Unidad de Diferenciación Celular y Cáncer de la FES Zaragoza y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, que sirvieron como controles positivos. Con ese material biológico se calibraron las técnicas de: extracción y cuantificación de DNA utilizando microtécnicas, PCR, electroforesis y purificación del producto de PCR a partir de las bandas obtenidas después de la electroforesis en poliacrilamida, ese DNA purificado se utilizó para su secuenciación. Todos los protocolos se desarrollaron y probaron en el Laboratorio

de Inmununología Molecular con el fin de escalarlos al laboratorio de docencia de Genética Clínica.

Lo anterior será de utilidad para que los estudiantes de la carrera de QFB que cursan el 8° semestre manejen la metodología y las bases teóricas que se soportan las técnicas para el diagnóstico de enfermedades de origen genético como el cáncer cérvico-uterino y de esta manera en un futuro los estudiantes posean los conocimientos para ayudar en la prevención y diagnóstico oportuno de dicho padecimiento.



## 5. OBJETIVOS

### 5.1 *Objetivo general*

Estandarizar el protocolo para la detección de la mutación en el gen **K-ras** que se asocia con la predisposición genética al desarrollo de cáncer.

### 5.2 *Objetivos particulares*

- Realizar la fundamentación teórico-metodológica de las siguientes técnicas:  
a) extracción de ácidos nucleicos (DNA); b) cuantificación de ácidos nucleicos, c) PCR; d) electroforesis en acrilamida; f) tinción con bromuro de etidio y g) purificación del producto de PCR a partir de las bandas de la electroforesis, para su secuenciación.
- Utilizar y calibrar los protocolos ya descritos en el laboratorio de Inmunología molecular para: a) extracción de DNA, b) purificación y cuantificación de DNA, c) amplificación por PCR del gen **K-ras**, d) electroforesis en acrilamida de los productos de PCR, f) tinción con bromuro de etidio, g) Extracción de DNA a partir de las bandas de productos de PCR.
- Elaborar el protocolo para la evaluación de las mutaciones en el gen **K-ras** en líneas celulares de cáncer cérvico uterino

## 6. HIPOTESIS DE TRABAJO

La amplificación por PCR de un segmento de DNA genómico que corresponda a las regiones que con mayor frecuencia mutan en la proteína Kras nos permitirá generar la suficiente cantidad de amplicón de PCR, para que posteriormente con la secuenciación de esa región se pueda detectar la presencia de mutaciones en el gen **K-ras** asociadas con mayor susceptibilidad de desarrollo de cáncer.

## **7. MATERIAL**

### **7.1 Material Biológico**

- DNA de las siguientes líneas celulares:
  1. T47D
  2. MDA231
  3. 293T
  4. CALO
  5. INBL
  6. DNA PROBLEMA
  7. DNA PROBLEMA

### **7.2 Material de laboratorio y Equipo**

- Microcentrífuga (Eppendorf 5415C)
- Termociclador (MJ Research)
- Vórtex (Daigeeer)
- Micropipetas (Eppendorf): 1.5µl, 2.5µl, 10µl, 200µl, 1000µl
- Espectrofotómetro (WPA)
- Refrigerador (Revco)
- Campana de flujo laminar (Veco)
- Cámara de electroforesis vertical (BIO-RAD)
- Equipo analizador de geles (Gel Doc 1000, BIO-RAD)
- Tubos Falcon: 15mL, 50mL, nuevos y estériles
- Tubos Eppendorf: 1.5mL, 2.0mL, nuevos y estériles
- Caja de Petri

### **7.3 Reactivos**

- Amortiguador de lisis
- Acetato de Sodio (Sigma) 375mM p H 5.5

- Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico (50:48:2) (Sigma)
- Isopropanol (Sigma)
- Alcohol etílico absoluto (Merck)
- Etanol 80% (Merck)
- TE (Tris 10mM, EDTA 1mM pH 8.0)
- Amortiguador PCR 10x
- MgCl<sub>2</sub> 25mM (Sigma)
- dNTP's 25mM (Pharmacia)
- oligo **K-ras** 20 µM
- Taq polimerasa 5 U/ µl (Perkin Elmer)
- Agua para PCR
- Aceite mineral (Sigma)
- Acrilamida (USB/Amersham)
- Bis acrilamida (Sigma)
- Acrilamida/bisacrilamida 29:1
- TBE 10X (tris- ácido bórico- EDTA)
- Tris base (Sigma)
- EDTA (Sigma)
- Amortiguador de carga
- Bromuro de etidio (Sigma)
- Agua destilada (Hidropura)
- TEMED (Sigma)
- Persulfato de amonio al 10% (Sigma)
- Acetato de sodio 3M (Sigma)
- Oligos Kras

5' CCTTATGTGTGACATGTTCT 3' Forward  
 5' TCTGAATTAGCTGTATCGTC 3' Reverse <sup>16,26</sup>

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1 *Extracción de DNA*

#### Procedimiento

- Se resuspendió el botón celular de cada una de las líneas con 80 µl de amortiguador de lisis y se incubó durante 1 hora a 37°C.
- Se ajustó el volumen a 400 µl adicionando 320 µl de acetato de sodio.
- Se mezcló lo mejor posible y se incubó durante 1 hora a 37°C.
- Se adicionó 480 µl de la mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico.
- Se agitó en vórtex durante 5 minutos.
- Se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se separó la fase acuosa y se adicionó el mismo volumen de isopropanol previamente enfriado a -20°C.
- Se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos a -4°C.
- Se eliminó el sobrenadante con ayuda de una micropipeta
- Se adicionó un volumen de 980 µl de alcohol etílico absoluto.
- Se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos.
- Se desechó el sobrenadante y se adicionaron 500 µl de etanol al 80% (frío).
- Centrifugar nuevamente a las mismas revoluciones y por el mismo tiempo.
- Se eliminó el sobrenadante y se colocaron los tubos en el termociclador a 60°C por 5 minutos o se dejan secar durante 24 horas en un lugar limpio a temperatura ambiente.
- El botón es estable a -20°C o bien se puede resuspender en 50 µl de TE y se almacena a -20°C.

= Extracción de DNA =

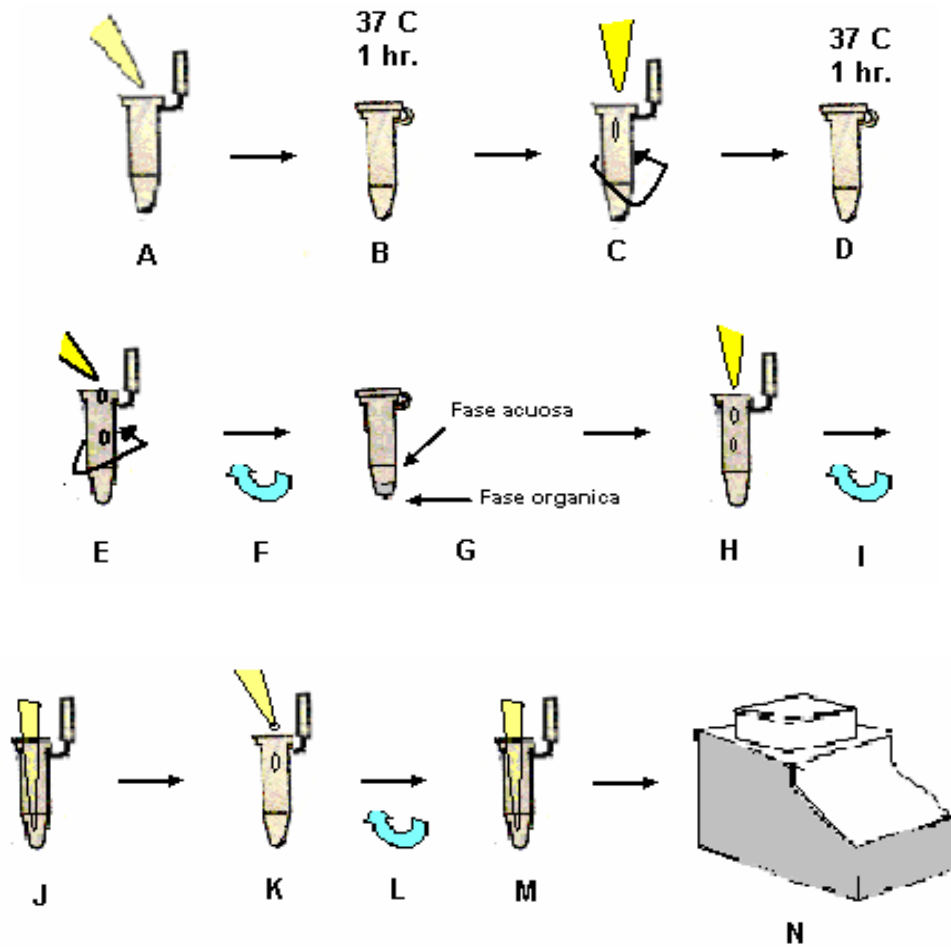


Fig. 1. A) Resuspender la línea celular con amortiguador de lisis + pronasa. B) Incubar a 37°C por una hora. C) Adicionar acetato de sodio y mezclar lo mejor posible. D) Incubar nuevamente a 37°C una hora. E) Adicionar la mezcla Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico y agitar. F) Centrifugar. G) Separar la fase acuosa. H) Adicionar un volumen de Isopropanol. I) Centrifugar. J) Eliminar el sobrenadante. K) Adicionar alcohol etílico frío. L) Centrifugar. M) Eliminar el sobrenadante. N) Colocar el tubo en el termociclador para secar o dejar a temperatura ambiente 24hrs.

## 8.2 Hidratación y Cuantificación del DNA

### Procedimiento

- Se hidrató la muestra con 20 µl de agua DEPC al 1% estéril.
- Se agitó durante 5 minutos y se mantuvieron las muestras en refrigeración (4°C) de 1-2 horas agitando con vórtex cada 30 minutos.
- Se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 segundos.
- Se adicionó 1 µl de DNA a un tubo eppendorf y se agregaron 199 µl de agua millipore, lo que generó una dilución (1:200).
- Se determinó la absorbancia de las muestras a 260 nm.
- Se evaluó la concentración de DNA con la siguiente fórmula

$$\text{DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{\text{Absorbancia}_{260\text{nm}} \times 50 \mu\text{g} \times \text{factor de dilución}}{1000 \mu\text{l}}$$

= Hidratación y Cuantificación de DNA=

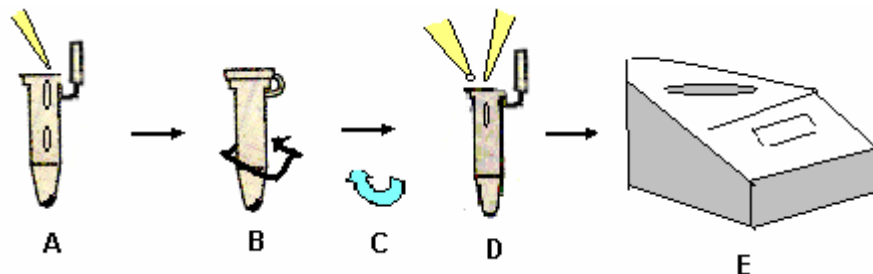


Fig. 2. A) Hidratar la muestra. B) Agitar la muestra ya hidratada. C) Centrifugar. D) Realizar dilución. E) Leer absorbancia a 260nm y determinar la concentración de DNA presente.

### 8.3 Amplificación del gen K-ras

#### Procedimiento

- Se etiquetaron 8 tubos eppendorf con base en la numeración proporcionada a cada línea celular (Número 8 corresponde al control negativo).

Se utilizó el DNA de las siguientes líneas celulares:

1. T47D
  2. MDA231
  3. 293T
  4. CALO
  5. INBL
  6. DNA PROBLEMA
  7. DNA PROBLEMA
- Se preparó la mezcla de reacción considerando que el volumen final en un tubo de reacción es de 20  $\mu$ l durante la adición de todos los reactivos, los tubos se mantuvieron en hielo y la mezcla se preparó en la campana de flujo laminar.

Reactivo	Concentración/Reacción	$\mu$ l/Rxn	$\mu$ l/8.5 Rxn
Amortiguador PCR 10x	1x	2.0 $\mu$ l	17.0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2 mM	1.6 $\mu$ l	13.6 $\mu$ l
dNTP's 5mM	0.2 mM	0.8 $\mu$ l	6.8 $\mu$ l
Taq polimerasa 5 U/ $\mu$ l	0.5U	0.1 $\mu$ l	0.85 $\mu$ l
Agua Para PCR		14.4 $\mu$ l	122.4 $\mu$ l
<b>Volumen final</b>		18.9 $\mu$ l	160.65 $\mu$ l



- La mezcla de reacción se preparó en el tubo etiquetado como número 8, se agitó, se adicionaron 0.8  $\mu\text{l}$  del oligo Kras y se adicionaron 19  $\mu\text{l}$  de la mezcla en cada tubo.
- A cada tubo se adicionó 50  $\mu\text{l}$  de aceite mineral.
- Fuera de la campana de flujo laminar se depositaron los siguientes volúmenes de DNA en el tubo correspondiente:

Línea celular	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
1. T47D	0.34
2. MDA231	0.48
3. 293T	0.20
4. CALO	1.40
5. INBL	2.00
6. DNA PROBLEMA	1.00
7. DNA PROBLEMA	0.20
8. CONTROL (-)	0.00

- Colocar los tubos en el termociclador a 95°C y seguir el programa.
  1. 95°C por 5 minutos
  2. 58°C por 1 minutos
  3. 72°C por 1 minutos
  4. 95°C por 1 minutos
  5. Repetir de punto 2-4, 29 veces
  6. 58°C por 2 minutos
  7. 72°C por 7 minutos
  8. 20°C por 1 hora

### = Amplificación del gen **K-ras** =

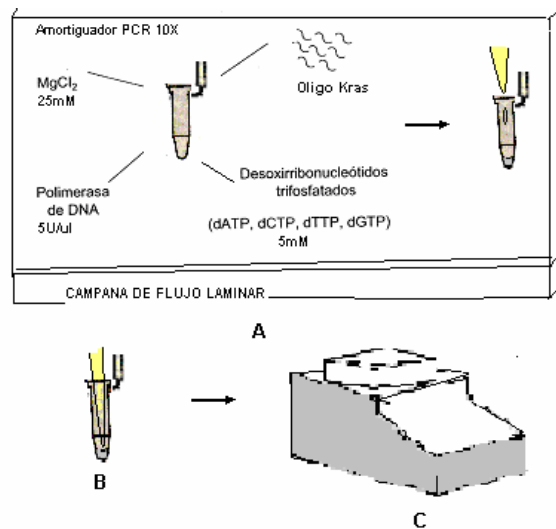


Fig.3. A) Se preparó la mezcla de reacción y se adicionaron 19  $\mu$ l a cada tubo, posteriormente se adicionó aceite mineral B) Depositar las muestras DNA de las diferentes líneas celulares (fuera de la campana de flujo laminar). C) se colocaron los tubos en el termociclador y se siguió el programa de amplificación.

## 8.4 *Electroforesis de Productos de PCR*

### Procedimiento

- Se preparó un gel de acrilamida al 4% en TBE 1x.
- Se adicionó 10 $\mu$ l de amortiguador de carga a cada tubo con el producto de PCR y se mezcló con la fase acuosa evitando formar una emulsión con el aceite.
- Se depositó 10  $\mu$ l de la muestra con amortiguador en cada pozo (se utilizó un pozo por muestra).
- En un pozo de los extremos se adicionó 10  $\mu$ l del marcador de peso molecular de 100 pares de bases diluído (1:10).
- Se corrió la electroforesis a 180 volts por 1.5 horas en TBE 1x.
- Se tiñó el gel con bromuro de etidio (20  $\mu$ l de una solución 100mg/ml en 200ml de TBE 1x agitando suavemente durante 5 min).
- El gel se lavó con agua destilada por 5 minutos.

- Se colocó el gel en el equipo analizador de geles.
- Para realizar el análisis de los productos de PCR, se utilizó el software del equipo.

= Electroforesis de Productos de PCR =

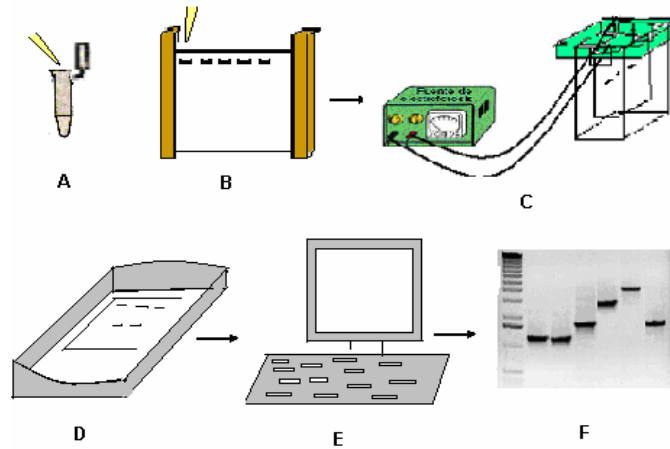


Fig. 4. A) Se adicionó a cada muestra amortiguador de carga mezclando la fase acuosa sin hacer emulsión. B) Se depositó una muestra por pozo procurando dejar el marcador de peso molecular en uno de los extremos. C) Se corrió la electroforesis. D) El gel se tiñó con Bromuro de Etidio. E) El gel se colocó en el equipo analizador de geles. F) Se tomó la fotografía del gel.

### 8.5 Extracción de DNA a partir de bandas de gel de acrilamida (Método de Difusión)

#### Procedimiento

- Se cortaron las bandas del gel de acrilamida con ayuda del transiluminador, un bisturí y caretas para protección contra la luz UV.
- Las bandas se colocaron en un tubo eppendorf limpio y etiquetado y se cubrieron con un volumen suficiente de agua millipore .
- Se refrigeró durante 3 días.
- Se centrifugó a 13,000rpm durante 10 minutos.
- La fase acuosa se separó y se colocó en un tubo nuevo.
- Al tubo donde se encuentra la banda se le adicionó 40 µl de acetato de sodio 3M y 60 µl de agua estéril
- Se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos.

- La fase acuosa se recuperó y se colocó en el tubo junto con la primera.
- Se adicionó dos volúmenes de etanol absoluto frío. Se refrigeró durante 45 minutos.
- Se centrifugó nuevamente a 13,000rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- El tubo se cubrió con papel parafilm realizando algunas perforaciones con una aguja limpia y estéril, se dejó secar por 24 horas a temperatura ambiente.
- El botón se hidrató con 20  $\mu$ l de agua calidad millipore y se cuantificó.
- Se tomó 1  $\mu$ l y se realizó el corrimiento electroforético de la muestra para evaluar la pureza del material obtenido.

= Extracción de DNA por el método de difusión =

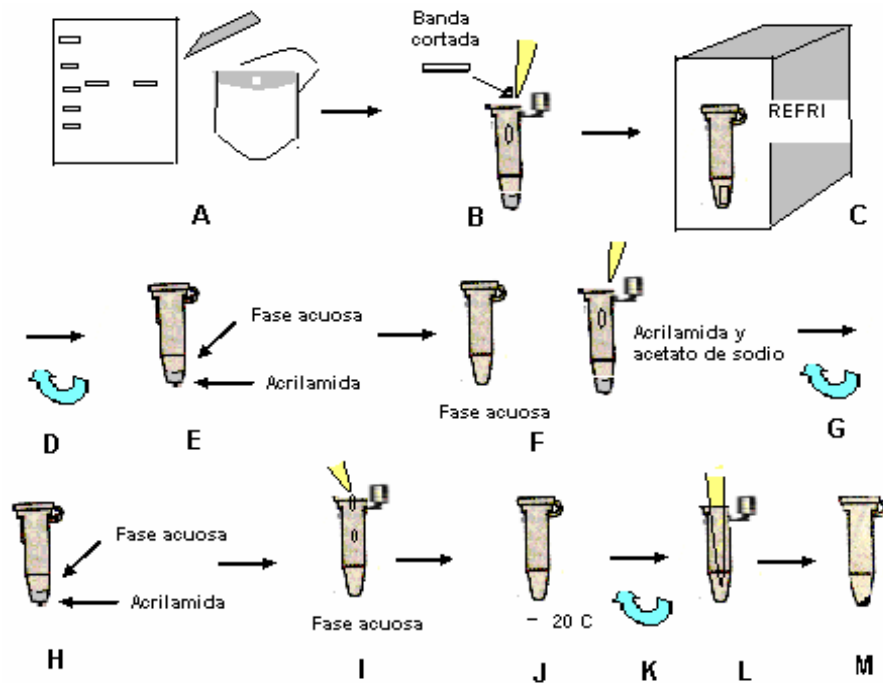


Fig. 5. A) Se visualizó la banda y se realizó su corte. B) Se colocó en un tubo limpio y se hidrató con agua estéril. C). Se refrigeró por tres días. D). Se centrifugó. E) Se separó la fase acuosa. F) Se lavó la banda con acetato de sodio. G) Se centrifugó. H) Se separó la fase acuosa y se colocó junto con la primera. I) Se adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto frío. J) Se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 45 minutos. K) Se centrifugó. L) Se eliminó el sobrenadante. M) Se hidrató el botón.

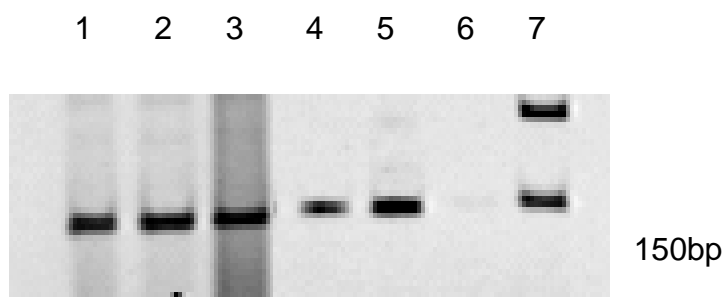
Este producto se llevó a secuenciar para determinar si existe o no mutación en el gen Kras.

## 9. RESULTADOS

- *CONTROLES POSITIVOS*

Orden de las muestras en gel de acrilamida al 5%.

1. T47D-Kras
2. MDA231-Kras
3. 293T-Kras
4. CALO-Kras
5. INBL-Kras
6. CONTROL NEGATIVO
7. MM 50bp



Fotografía 1. Electroforesis en gel de acrilamida al 5% de las líneas celulares utilizadas como control positivo utilizando un marcador de Peso Molecular de 50 pares de bases.

- *CUANTIFICACIÓN DE DNA DE LAS LÍNEAS CELULARES*

	260nm	280nm	260/280
T47D	0.085	0.047	1.810
MDA231	0.082	0.041	2.007
293T	0.421	0.224	1.883
CALO	0.023	0.006	3.972
INBL	0.011	0.007	1.588
DNA PROBLEMA 1	0.037	0.022	1.705
DNA PROBLEMA 2	0.222	0.117	1.890

Tabla 1. Absorbancias obtenidas a 260nm y 280nm para cada una de las muestra control positivo y muestras problema

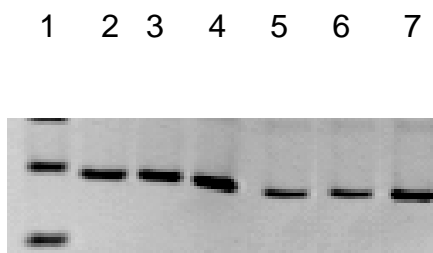
	Concentración de DNA ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	$\mu\text{l}$ utilizados para la PCR	Correcciones ( $\mu\text{l}$ utilizados)	$\mu\text{g}$ de DNA utilizados para la PCR	Correcciones ( $\mu\text{g}$ de DNA utilizados)
T47D	0.85	0.34		0.4	
MDA231	0.82	0.48		0.4	
293T	4.21	0.09*	0.2	0.4*	0.842
CALO	0.23	1.47		0.4	
INBL	0.11	3.63*	2.0	0.4*	0.22
DNA 1 PROBLEMA	0.37	1.08		0.4	
DNA 2 PROBLEMA	2.22	0.18*	0.2	0.4*	0.44

Tabla 2. Concentraciones obtenidas para cada una de las muestras así como los  $\mu\text{l}$  y  $\mu\text{g}$  utilizados para realizar la PCR

- *PURIFICACIÓN DEL SISTEMA*

Orden de las muestras en gel de acrilamida al 5%.

1. MM 50bp
2. T47D-Kras
3. MDA231-Kras
4. 293T-Kras
5. CALO-Kras
6. INBL-Kras
7. DNA PROBLEMA
8. DNA PROBLEMA

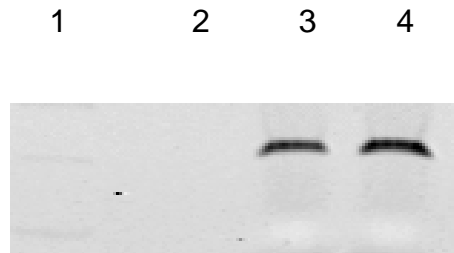


Fotografía 2. Electroforesis en gel de acrilamida al 5% una vez realizada la cuantificación de cada una las muestras y la determinación de los  $\mu\text{g}$  a utilizar para la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

- *SELECCIÓN DE LA LÍNEA CELULAR A UTILIZAR PARA SECUENCIAR*

Orden de las muestras en gel de acrilamida al 4%.

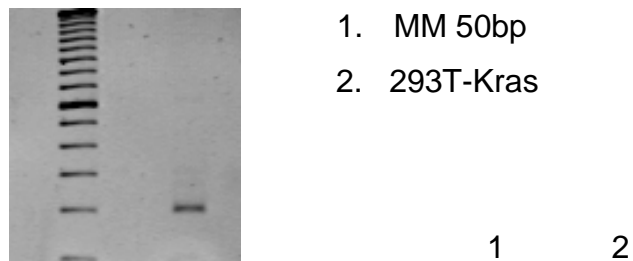
1. MM 50bp
2. Control NEGATIVO Kras
3. 293T-Kras
4. 293T-Kras



Fotografía 3. Amplificación 293T-Kras en acrilamida al 4%

- *EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE BANDAS CORTADAS DE GEL DE ACRILAMIDA.*

Orden de las muestras en gel de acrilamida al 5%.



1. MM 50bp
2. 293T-Kras

Fotografía 4. Electroforesis en gel de acrilamida al 5% del producto de PCR obtenido a partir de las bandas cortadas de la amplificación de la línea celular 293T-Kras en gel de acrilamida al 4%

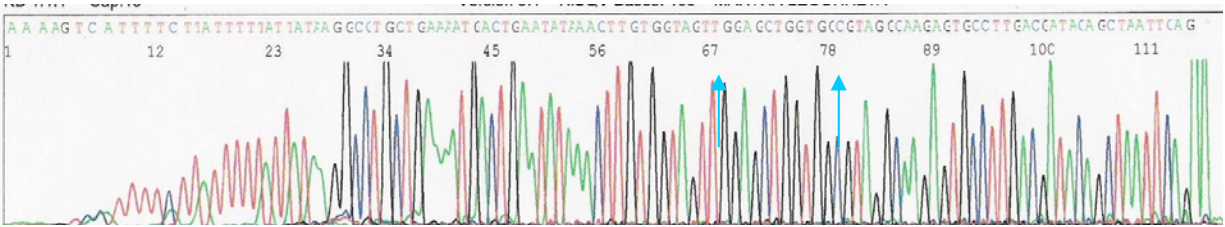


FIG.5. Secuencia del producto de la figura 3 con el primer Kras Forward. Las flechas indican los sitios donde debe encontrarse la mutación GGT (Gly) por GAT (Asp) o por GTT (Val) presente en cáncer cérvico uterino

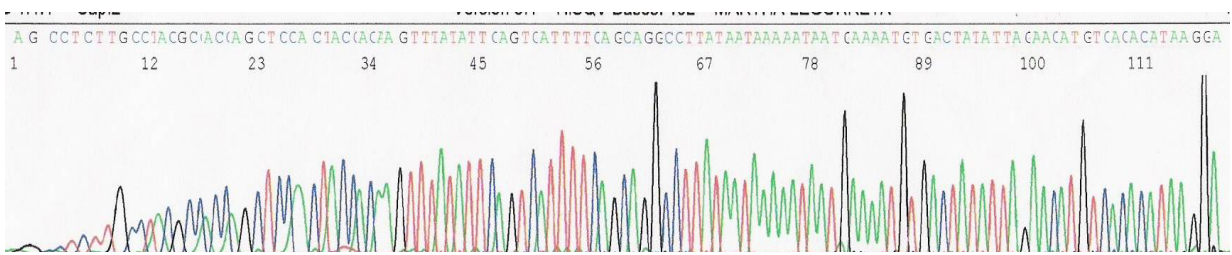


FIG. 6. Secuencia del producto de la figura 3 con el primer Kras reverse.



## **10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

La técnica estándar utilizada dentro del laboratorio de Inmunología Molecular, nos indicaba colocar, 3µl de la muestra (DNA de las líneas celulares y problema), sin embargo, debido a que inicialmente las bandas no se encontraban dentro de los parámetros de peso molecular esperado, se decidió probar con sólo 1µl de la muestra así como modificar la temperatura de alineación propuesta en un inicio de 55°C a 58°C para conseguir una mayor especificidad. Una vez realizadas estas modificaciones, se montó nuevamente la reacción de PCR; como puede observarse en la fotografía 1, las muestras utilizadas como controles positivos muestran de forma muy clara el fragmento amplificado para el gen **K-ras**, dicho fragmento se estima en un peso molecular de 141bp aproximadamente si se compara contra el marcador de peso molecular utilizado de 50 bp. Aún con la reducción del volumen de muestra utilizado el corrimiento electroforético se observó demasiado sucio, por lo tanto, fue necesario realizar la cuantificación de los controles y los problemas para determinar la concentración de DNA presente en dichas muestras así como su pureza.

En la tabla 1 se observa la relación 260/280; para todas las muestras se observan valores numéricos cercanos a 2 por lo tanto se estima que se encuentran lo suficientemente puras para seguir con el protocolo para las siguientes reacciones. Considerando las bandas de la fotografía 1, se tomó la decisión de adicionar un volumen de DNA de cada una de las muestras que fuera equivalente a 0.4µg debido a que la cuantificación de las dos mejores bandas, correspondientes a las líneas celulares MDA231 y CALO se sitúa en los extremos, MDA231 con una concentración de 0.82µg/µl y CALO 0.23µg/µl; sin embargo, existía el problema de que para la líneas celulares que tuvieron mayor concentración de DNA “293T y DNA 2 Problema” se requería medir un volumen de 0.09µl y 0.18µl respectivamente, volumen que las micropipetas utilizadas no alcanzan a medir.

En la tabla 2 se observan las correcciones realizadas, para ambas líneas; se midió un volumen de 0.2µl por lo tanto los µg de DNA “293T” utilizados se incrementaron aproximadamente el doble, el caso contrario se observó en la línea celular INBL, el volumen a medir con respecto a las demás muestras se consideró excesivo (3.63µl por ser la menos concentrada) por lo que se redujo a 2µl y los µg de DNA utilizados disminuyeron a la mitad.

Después de establecer el volumen (µl) y concentración (µg) a utilizar, se realizó nuevamente un PCR para verificar que el sistema se encontraba limpio y que la amplificación del gen no había disminuido, en la fotografía 2 se pueden visualizar estos resultados y se comprueba que los µg de DNA que se utilizaron fueron suficientes para llevar a cabo la reacción. En la fotografía 2 se observa que una de las mejores bandas corresponde a la línea 293T aún cuando el volumen adicionado de la muestra es muy pequeño, por lo cual, se consideró que era la muestra más viable para realizar su amplificación (Fotografía 3) y una vez realizada la electroforesis el corte de la banda para obtener el producto que se llevaría a secuenciar. Realizado este procedimiento, se seleccionó el método a utilizar para la extracción del DNA a partir de la banda; el método elegido fue el de difusión ya que no fractura ni maltrata al DNA, es rápido y es el que nos brindó mayor rendimiento y pureza del producto como lo muestra la Fotografía 4.

Este amplicón se envió a secuenciar (Figuras 5 y 6) y se encontró que en una de las líneas celulares que se pensaba presentaría una mutación de tipo puntual, no se presentaba cambio alguno; sin embargo los sitios donde debe encontrarse la mutación si se encuentran localizados como lo indican las flechas de color azul y debe encontrarse la mutación GGT (Gly) por GAT (Asp) o por GTT (Val) presente en cáncer cérvico uterino.

En cuanto a la redacción y organización del protocolo de prácticas a utilizar en el Laboratorio de Genética Clínica de la FES Zaragoza, UNAM, he de mencionar, que los avances en la tecnología genética han tenido en la actualidad gran

impacto sobre nuestro conocimiento en la genética humana. Con el comienzo del proyecto genoma humano en 1990, adquirimos un compromiso con la búsqueda del tal conocimiento y aunque esta era se llenará de descubrimientos científicos de gran interés, también nos tendremos que enfrentar con los problemas y controversias que se generen a partir de dichos descubrimientos. De éstos, el más importante promete ser cómo utilizar nuestro conocimiento sobre la secuencia nucleotídica del genoma humano. Como estudiantes, la emoción de formar parte de estos descubrimientos debe equilibrarse con un gran sentido de responsabilidad para dedicar la mayor atención posible a los temas relacionados que sin lugar a duda surgirán.

En el diseño del **Protocolo para la detección de mutaciones en el gen Kras asociado con cáncer cérvico uterino**, se establece un armazón conceptual adecuado para el aprendizaje, útil que facilita la comprensión de la información mínima y necesaria con la cual como futuros QFBs debemos contar para poder desarrollar adecuadamente las actividades propuestas dentro del Laboratorio de Genética Clínica, además de presentar un formato organizado, limpio e integrado de las microtécnicas (extracción DNA, PCR, electroforesis, secuenciación) que hasta el momento no se llevan a cabo dentro del laboratorio, pero que sin embargo, constituyen la base de lo que hoy en día es la Biología Molecular. También se presentan figuras que muestran y apoyan las explicaciones de experimentos que aparentemente parecen complejos, pero, con el avance del conocimiento y la tecnología resultan fáciles, sin olvidar que ya están a nuestro alcance.

Se tiene conciencia que habrá cosas que se hayan escapado al desarrollar este protocolo; pero, si algo nos queda claro, es que se realizó con el objetivo de incorporar nuevas prácticas dentro del Laboratorio de Genética Clínica. El cáncer, es una enfermedad que si se detecta a tiempo es curable, y si se determina que un individuo es susceptible a padecerla, puede brindarse información acerca de cómo se puede prevenir la enfermedad. Con este material se pretende, que los

estudiantes del 8° semestre de la carrera QFB en el área Bioquímica Clínica comiencen a manejar, desarrollar e innovar técnicas que en el futuro les permitan participar en el diagnóstico y prevención no sólo del cáncer, sino de otras enfermedades de origen genético siguiendo procedimientos adecuados de laboratorio como se indica en el **Plan de Estudios de la Carrera QFB, aprobado el 10 de Junio de 2003 por el Consejo Académico del Área de las Ciencias Biológicas y de la Salud** para la Unidad académica **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.**

## 11. CONCLUSIONES

- La temperatura de alineación de 58°C resultó ser la temperatura óptima para llevar a cabo la reacción de PCR con el oligo **K-ras**.
- Es necesario llevar a cabo la cuantificación correspondiente de cada una de las muestras para determinar los µg de DNA ideales de cada una de las muestras a utilizar durante el proceso de amplificación por PCR y de esta manera obtener productos que no se encuentren contaminados y se puedan extraer para su posterior secuenciación. Dentro de este protocolo, los 0.4 µg de DNA son suficientes para obtener productos puros.
- El mejor método para aislar el amplicón a partir de un gel de acrilamida es el método de difusión ya que es sencillo y rápido, brinda el mejor rendimiento y no se manipula tanto al DNA.
- En la secuencia del producto obtenido no se observa la mutación GGT (Gly) por GAT (Asp) o por GTT (Val) presente en cáncer cérvico uterino, sin embargo cada una de las técnicas estandarizadas resultan fácilmente reproducibles y eficientes para detectar la presencia de mutaciones en el gen **K-ras** asociadas a la mayor susceptibilidad de desarrollar cáncer cérvico uterino.
- Dentro del perfil profesional, del Químico Farmacéutico Biólogo es importante, estar capacitado para desempeñarse en el sector salud en diferentes áreas, incluidas: el análisis clínico, la investigación y la innovación tecnológica; cada una de las técnicas estandarizadas le serán de gran utilidad para la comprensión de nuevos conocimientos, haciendo uso del método científico y siguiendo los procedimientos adecuados del laboratorio.

## 12. PROPUESTA

- Estandarizar protocolos para la amplificación del gen **K-ras** y otros genes utilizando PCR en tiempo real.
- Montar la técnica, utilizando RNA, para anexar al protocolo una práctica de extracción de RNA, retrotranscripción o RT-PCR.

## 13. ANEXOS

### 13.1 *Abreviaturas*

**A:** Adenina

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**bp:** Pares de bases

**C:** Citosina

**°C:** Grados Centígrados

**c.b.p:** Cuanto baste para

**dNTP's:** Desoxirribonucleótidos trifosfatados

**dATP:** Desoxiadenosina trifosfato

**dCTP:** Desoxicitosina trifosfato

**dTTP:** Desoxitimina trifosfato

**dGTP:** Desoxiguanidina trifosfato

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetracético

**G:** Guanina

**M:** Molaridad

**mM:** Milimolar

**µg:** Microgramo

**µl:** Microlitro

**rpm:** Revoluciones por minuto

**T:** Timina

**TBE:** Tris- Ácido Bórico- EDTA

**TE:** Tris-EDTA

**UV:** Luz ultravioleta

**U/µl:** Unidad por microlitro

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

### 13.2 Preparación de reactivos

- Preparación de Amortiguador de lisis

EDTA 0.1M	37.224g
NaCl 0.15M	8.766g
Agua Bidestilada cbp	1000ml

- Preparación de SDS 10%

Duodecilsulfato de Sodio	10g
Agua Bidestilada	100ml

- Preparación de Acetato de Sodio 3M

Acetato de Sodio	246.09g
Agua Bidestilada cbp	1000ml

- Preparación de Amortiguador de Carga 5X

Tris 50mM pH 8
EDTA 75mM pH 8
SDS 0.5%
Ficoll 10%
Sacarosa 30%
Naranja G, Xilen Cianol y Azul de Bromofenol al 0.2%
Agua bidestilada cbp 100ml

- Preparación de Marcador de Peso Molecular

Marcador de 50bp	1µl
Agua	9µl
Solución de carga	5µl



- Preparación de Acrilamida/Bisacrilamida al 30%

Acrilamida	29.0g
Bisacrilamida	1.0g
Agua bidestilada cbp	100ml

- Preparación de TBE 10X (Tris- Ácido Bórico- EDTA)

Tris 1M	121.10g
Ácido Bórico 1M	61.38g
EDTA 50mM	14.61g
Agua bidestilada cbp	1000m

- Preparación de Gel de Acrilamida al 5%

	50ml (1 gel)
Agua bidestilada	36.1ml
TBE 10X	5.0ml
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	8.4ml
APS 10%	475µl
TEMED	50µl

- Preparación de Gel de Acrilamida al 4%

	50ml (1 gel)
Agua bidestilada	37.78ml
TBE 10X	5.0ml
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	6.72ml
APS 10%	475µl
TEMED	50µl

### **13.3 Cuestionario**

1. ¿Qué es el cáncer?
2. ¿Qué es Kras y cómo interviene en el cáncer?
3. ¿Qué es una mutación?
4. ¿En qué consisten las siguientes técnicas: PCR, Electroforesis, secuenciación?
5. ¿Para qué se utilizan las técnicas anteriores?
6. Explique la diferencia que existe entre un protooncogen y un oncogen?
7. ¿Qué es un gen supresor de tumor; mencione tres ejemplos?
8. ¿Qué función tiene la pronasa durante la extracción de DNA?
9. ¿Para qué se utiliza la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamilico?
10. Mencione algunos procesos alternativos para la extracción de DNA
11. ¿En qué ocasiones es conveniente utilizar geles de acrilamida y en cuáles geles de agarosa?
12. Mencione la función del bromuro de etidio y las precauciones que deben seguirse al utilizarlo.
13. ¿Qué ventajas tiene el uso de la polimerasa Taq?
14. Mencione la diferencia que existe entre la estructura molecular de dNTP y ddNTP.

15. Mencione el intervalo de concentración óptimo de los dNTP's en la reacción.

16. ¿Cómo eliminaría la presencia de bandas inespecíficas durante la reacción PCR?

17. Mencione el fundamento de dos métodos alternativos para extraer y purificar el producto obtenido a partir de la banda en gel de acrilamida.

## 13.4 Glosario

### A

**Ácido desoxirribonucleico (DNA).** Molécula que contiene la información genética en los seres vivos. Está formada por dos cadenas de nucleótidos unidas por puentes fosfodiéster. Los nucleótidos participantes son adenina, citosina, guanina y timina.

**Adenina.** Es una base nitrogenada con estructura purínica, componente de los ácidos nucleicos.

**Alineación.** En el caso de la PCR, se refiere a la etapa en la que los iniciadores se unen por complementariedad al DNA molde. Por lo general esto se lleva a cabo a una temperatura de 50 a 60°C.

**Amplificación.** Se refiere a la producción de copias adicionales de una secuencia de DNA determinado.

### B

**Base.** Corresponde a cada una de las cuatro unidades químicas que forman la doble hélice del DNA: adenina, guanina (purinas), citosina y timina (pirimidinas).

### C

**Cadena molde de DNA.** Secuencia de DNA que sirve para obtener cadenas complementarias de la misma.

**Ciclo de amplificación.** Período en la PCR que comprende tres cambios de temperatura: la de desnaturalización (92 a 96°C) del DNA, la de alineamiento de

iniciadores (50 a 60°C) y la de amplificación o polimerización (70 a 74°C). Generalmente se emplean de 25 a 40 ciclos de amplificación de cada reacción de PCR.

**Ciclo celular.** Ciclo reproductivo de la célula, secuencia ordenada de eventos en la cual la célula duplica todos sus elementos para finalmente dar lugar a dos células idénticas.

**Citosina.** Base nitrogenada con estructura pirimidínica componente de los ácidos nucleicos.

**Complementariedad de bases.** Es la característica del DNA de que las bases nitrogenadas de cada cadena no se unen al azar, sino que siempre los puentes de hidrógeno entre ambas cadenas de la doble hélice se forman entre adenina y timina o entre guanina y citosina, nunca en otro orden.

## D

**Desnaturalización del DNA.** Separación de las moléculas de doble cadena de ácidos nucleicos en hebras sencillas; por lo general, como consecuencia de un aumento de temperatura. Renaturalización significa la unión por complementariedad nuevamente de las cadenas sencillas.

**Desoxirribonucleótidos.** Son moléculas formadas por una base nitrogenada (purínica o pirimidínica), una pentosa (desoxirribosa) y un grupo fosfato.

**Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP).** Bases nitrogenadas unidas a una molécula de desoxirribosa y tres moléculas de fosfato. Es la forma como la polimerasa de DNA puede reconocer a los nucleótidos para formar nuevas cadenas de DNA en el proceso de replicación o en la técnica de PCR.

**Didesóxido.** Desoxirribosa carente del grupo OH<sup>-</sup> libre de la posición 3'. Son los nucleótidos que se utilizan para realizar la secuenciación, ya que al introducir un didesóxido en la cadena creciente de DNA, se interrumpe la polimerización y de esta manera se obtienen cadenas de diferente longitud de DNA.

**DNA molde.** Es el DNA que servirá para fabricar nuevas cadenas de DNA *in vitro* (PCR).

## E

**Electroforesis.** Técnica que se emplea para separar moléculas cargadas eléctricamente con base en su velocidad de migración al someterse a un campo eléctrico. Las moléculas sometidas a electroforesis también se separan según su tamaño, de tal manera que las moléculas pequeñas tendrán mayor velocidad de migración que las moléculas más grandes.

## G

**Gen.** Segmento de DNA que contiene la información necesaria para codificar una cadena polipeptídica.

**Guanina.** Base nitrogenada purínica, componente estructural de los ácidos nucleicos.

## I

**Iniciador.** Secuencia de nucleótidos necesaria para que la polimerasa de DNA empiece a llevar a cabo la replicación.

**Iniciadores externos.** Son las secuencias de nucleótidos empleados para lograr la primera amplificación de una secuencia específica de DNA mediante PCR.

## L

**Línea celular.** Células que crecen y se replican indefinidamente *in vitro* (fuera del organismo).

## M

**Mutación.** Cambio en la secuencia del DNA genómico que lo altera de manera permanente y provoca un cambio hereditario.

## N

**Nucleótido.** Unidad elemental de las cadenas de ácidos nucleicos. Está formada por una base nitrogenada (purínica o pirimidínica), una pentosa (ribosa o desoxirribosa) y un grupo fosfato.

## O

**Oligonucleótido.** Secuencia corta de nucleótidos.

## P

**Polimerasa de DNA.** Es una de las enzimas que participan en la replicación celular llevando a cabo la unión de los nuevos desoxirribonucleótidos trifosfatos a la cadena de DNA creciente.

**Polimerasa Taq.** Abreviatura de la polimerasa de DNA proveniente de la bacteria *Thermophylus aquaticus*, comúnmente utilizada en la PCR. Esta enzima presenta la característica de que su actividad óptima se observa a 72°C, por lo cual es ideal para ser utilizada en la reacción de PCR.

**Producto amplificado.** Millones de copias de un fragmento de DNA obtenidas a partir de un fragmento específico de DNA inicial mediante PCR.

## R

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Método de Biología Molecular mediante el cual es posible obtener millones de copias idénticas de una secuencia determinada de DNA, a partir de un molde inicial de DNA.

## S

**Secuenciación enzimática.** Sirve para conocer el orden en que se encuentran los nucleótidos en un segmento de DNA determinado.

## T

**Temperatura de desnaturalización (T<sub>m</sub>).** Es la temperatura a la cual 50% del DNA se encuentra en forma de doble cadena y el otro 50%, en forma libre o cadena sencilla. Este parámetro se usa en la PCR para el cálculo de la temperatura de alineamiento de los iniciadores.

**Termociclador.** Instrumento en el que se realiza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Su función es llevar a cabo cambios rápidos y precisos de temperatura de una manera cíclica.

**Timina.** Base nitrogenada pirimidínica constituyente del DNA.



## 14. BIBLIOGRAFÍA

1. Panduro A. Biología molecular en la clínica, Mc Graw-Hill Interamericana, México, 2000: 420-450.
2. Luque J. Herráez A. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética, conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud, Harcourt, Barcelona, 2001:116-139, 187-196.
3. Cox M.T. Sinclair J. Biología molecular en medicina, Médica Panamericana, Buenos Aires, 1998.
4. Jiménez C.E. Manual de técnicas de biología molecular básica. Prado, México, 2004: 1-6, 27-28.
5. Zyskind W.J. Berstein I. S. Recombinant DNA laboratory manual. Academic Press INC. 1992: 151-161.
6. Clark M.J. Bioquímica experimental, Acribia Zaragoza, España: 152-173.
7. Adams R.L.P. Burdan R.H. Bioquímica de los ácidos nucleicos, Reverté, Barcelona, 1980: 48-130.
8. Rendina G. Técnicas de bioquímica aplicada, interamericana, 1974: 89-94.
9. Rojas E. Inmunología de memoria, 2ª ed. Médica Panamericana, México, 2001: 289-306.
10. Klug S.W., Cummings R.M. Conceptos de genética, 5ª ed. Prentice Hall, Madrid, 1999: 626-643, 743-751.
11. Bartlett M.S., Stirling D. Methods in molecular biology. PCR protocols, Volumen II, 2ª ed. Press Humana, New Jersey, 2003:77-78.
12. Minch J.M., Experiments in biochemistry. Projects and procedures, Prentice Hall, U.S.A, 1989: 207-214.
13. Micklos A.D., Freyer A.G., DNA science a first course, 2ª ed. CSHL Press, U.S.A, 2003: 221-224.
14. Strachan T., Human molecular genetics 3. Garland Science, India, 2004: 123-128, 182-184.
15. Rendina G. Técnicas de bioquímica aplicada, Interamericana, México, 1974,: 89-92.

16. Gemignani LM, Schlaerth CA, Bogomolny F, Barakat RR, et al. Role of *KRAS* and *BRAF* gene mutations in mucinous ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology* 2003; 90: 378-381.
17. Wannapa SI, Nipa K, Churalrat K. Human papillomavirus genotypes and the p53 codon 72 polymorphism in cervical cancer of Northeastern Thailand. *Microbiol Immunol* 2005; 49(5): 417-421.
18. Kalliopi IP, Choleza M, Markaki S, Giannikaki E, Kyroudi A, et al. Consistent absence of BRAF mutations in cervical and endometrial cancer despite KRAS mutation status. *Gynecologic Oncology* 2006; 100: 596-600.
19. Fuessel HA, Woeber S, Gomez M, Garza N, Gomez Y, Rady P, He Q, et al. Human papillomavirus infection and p53 codon 72 genotypes in a hispanic population at high-risk for cervical cancer. *J Med Virology* 2005; 77: 265-272.
20. Chakrabarti R, Schtt CE, The enhancement of OCR amplification by low molecular weight amides. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(11): 2377-2381.
21. Danenberg PV, Horikoshi T, Vokenandt M, Danenberg K. Detection of point mutations in human DNA by analysis of RNA conformation polymorphism (s). *Nucleic Acids RES* 1992 ; 20: 573-579.
22. Pusztai L, Ayers M, Stec J, Hortobagyi CN. Clinical application of cDNA microarrays in oncology. *Oncologist* 2003; 8(3): 252-8.
23. Kochl S, Niederstatter H, Parson W. DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol- chloroform method and real-time PCR. *Methods Mol Biol* 2005; 297: 13-30.
24. Hembruff SL, Villeneuve DJ, Parissont AM. The optimization of quantitative reverse transcription PCR for verification of cDNA microarray data. *Anal Biochem* 2005; 345(2):237-49.
25. Brinkman JA, Rahmani MZ, Jones WE. Optimization of PCR based detection of human papillomavirus DNA from urine specimens. *J Clin Virol.* 2004; 29(4): 230-40.
26. White A.B., PCR cloning protocols: From molecular cloning to genetic engineering, Human press Inc., New Jersey, 1997:3-14.

27. Perbal B. A., A practical guide to molecular cloning, 2 ed, Wiley interscience publication, New York, 1998: 11-15, 73-77, 340-355.
28. Brown A. T., Molecular biology, Bios scientific publishers, CA, 1991: 255-264.
29. Sambrook J, Russell W. D., Molecular cloning. A laboratory manual Vol I y II, 3ra ed., CSHL press, 2001: 8.4 - 8.26, 5.1 – 5.15, 5.29 -5.35.
30. Locotte G. Baneyx F. Introduction to molecular cloning techniques, VCH publishers, Francia, 1993: 107-110.
31. Mathew G. C. Methods in molecular biology Vol 9. Protocols in human molecular genetics, Human press, New Jersey, 1991: 1-8, 327-340.
32. Griffiths A., Gelbart W., Miller J. Modern genetic analysis, W.H Freeman and company, New York, 1999: 323-326.
33. Mertens R. T., Hammersmith L. R. Genetics laboratory investigations, Macmillan publishing company, New York, 1991: 156-162.
34. Amberg C. D., Burke J.D. Methods in yeast genetics, CHSL press, New York, 2005: 155-161.
35. Snustad P. D., Simmons J. M. Principles of genetics, John Wiley and Sons Inc, New York, 2003: 503-510, 711-713.
36. Watson D. J., Baker A. T., Bell P. S. Molecular biology of the gene, CSHL press, CA, 2004: 648-671.
37. Lewin B. Genes VIII, Person prentice hall, New York, 2004: 899-901.
38. Pierce A. B. Genetics a conceptual approach, W.H Freeman and company, New York, 2003: 528-529, 553-556.
39. Clark P. D. Molecular biology. Understanding the genetic revolution, Elsevier, CA, 2005: 635-640, 663-668.
40. [www.MolecularClonind.com](http://www.MolecularClonind.com)
41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?view=gb&val=L00045.1>
42. <http://www.cbm.uam.es/SMD/servicio/prots/RNAextract.htm>