



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

Incorporación de la Técnica de PCR  
en la Actualización del Manual de  
Bioquímica Celular y de los Tejidos I.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A:

Manuel Alejandro González García

Directora: M. en C. Araceli García del  
Valle

Asesora: Mtra. Leonor Aguilar Santelises



Mexico D.F., 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

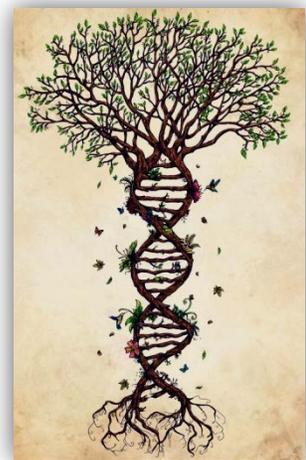
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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.

Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las  
estrellas. Ahora sabemos que está en nuestros  
genes.

James Watson



Agradecimiento a la **DGAPA** en el programa **PAPIME** por haber proporcionado los recursos para hacer posible el proyecto **PE206913**.

# Agradecimientos

A Dios porque nunca me abandona, me da fuerzas y me da sabiduría en mis decisiones, gracias porque con tu apoyo soy una mejor persona.

A la Universidad Nacional Autónoma de México que a lo largo de mi formación profesional fue y será un segundo hogar.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por darme los recursos para adquirir los conocimientos necesarios durante mi formación profesional y que me ayudaron a realizar mi tesis.

A mi directora de tesis M. en C. Araceli García y a mi asesora Mtra. Leonor Aguilar, por compartirme su amistad, conocimiento y compromiso, gracias por ser parte de mi aprendizaje y desarrollo.

A la Maestra Margarita Cruz, por apoyarme y hacer más agradable mi estancia durante el desarrollo de mi tesis, gracias por darme su amistad.

A mis sinodales: Dra. Ma. Teresa Corona, M. en C. Claudia Fabiola Martínez, Q.F.B Francisco Javier Parada, les agradezco los comentarios al revisar mi trabajo, que hizo mi trabajo más enriquecedor.

A mis amigos que por obra del destino los puso en mi camino, gracias por hacer de mi estancia en la universidad algo muy agradable y a mis compañeros por compartir sus conocimientos y hacer de las clases algo enriquecedor, ya que junto a ustedes aprendí a trabajar en equipo y a competir de manera agradable.

A los profesores de la carrera por permitir aprender con ellos y darme las herramientas para obtener logros, admiro su labor, gracias por sus consejos que motivan y me fortalece.

# Dedicatorias

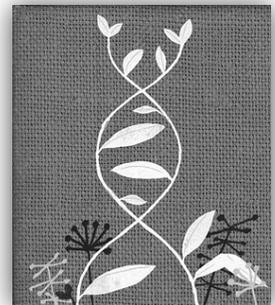
A mi papá, mi guía que ha apoyado mis decisiones y me alienta a ser mejor cada día e infundiéndome el valor a seguir preparándome, gracias por tu apoyo soy una persona preparada, responsable, honesta y trabajadora.

A mi mamá por su amor y sus cuidados que me brinda, sus palabras son aliento que me ayudan a perseguir mis sueños e ilusiones, gracias por estar a mi lado cuando más lo necesito, te quiero mucho, gracias por darme tu confianza.

A mis hermanos Claudia y Gustavo mis amigos de toda la vida, los quiero mucho porque sé que cuento con su apoyo en mis decisiones, gracias por ser mi ejemplo a seguir.

A Miriam, mi novia, amiga, compañera y cómplice de mis decisiones; gracias por tu compañía y tus consejos cuando más lo necesito, soy muy feliz a tu lado porque haces de mí una excelente persona, te amo y respeto, sé que estarás tras mis pasos para ayudarme a tomar las mejores decisiones.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”



## Contenido

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	3
2.1 Estructura de ADN.....	3
2.1.1 Propiedades funcionales del ADN.....	4
2.2 Genoma Humano.....	5
2.3 Proceso de transmisión de información genética.....	6
2.3.1 Dogma Central de la Biología Molecular.....	6
2.3.2 Replicación del ADN.....	7
2.3.3 Transcripción y traducción del ADN.....	9
2.4 Obtención y purificación de ADN.....	11
2.5 Cuantificación de ADN.....	12
2.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	13
2.6.1 Reactivos que influyen en la PCR.....	13
2.6.1.1 ADN polimerasas.....	13
2.6.1.2 dNTPs.....	14
2.6.1.3 Iones divalentes y monovalentes.....	14
2.6.1.4 Solución tampón (buffer).....	15
2.6.1.5 ADN molde (Plantilla).....	15
2.6.1.6 Agua.....	16
2.6.1.7 Los cebadores o primers.....	16
2.6.2 Termociclador.....	18
2.6.3 Esquema de la PCR.....	19
2.7 Electroforesis.....	21
2.7.1 Equipo para electroforesis.....	22
2.7.2 Electroforesis en ácidos nucleicos.....	22
2.8 Variantes de técnica de PCR.....	23
2.9 Aplicaciones.....	24
2.10 Polimorfismos genéticos.....	25
2.11 El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).....	26
2.11.1 Tipos de moléculas de CMH.....	27
2.11.2 Gen MICA.....	29

3. Problema de investigación.....	32
4. Objetivo general. ....	33
4.1 Objetivos particulares .....	33
5. Hipótesis .....	34
6. Metodología .....	35
7. Resultados.....	39
8. Discusión de resultados.....	55
9. Conclusiones.....	63
10. Propuestas .....	64
11. Referencias.....	65
12. Anexos.....	70

# 1. Introducción

Los avances en biología molecular han permitido el análisis y descripción de mecanismos fundamentales que sustentan el funcionamiento de la célula y sus macromoléculas. Uno de los descubrimientos más importantes de la historia que marcó el inicio de una nueva era en el estudio y conocimiento de los ácidos nucleicos fue el de Watson y Crick, al descifrar la estructura del ADN, además de que los métodos como: electroforesis, secuenciación, clonación, hibridación y reacción en cadena de la polimerasa han sido los cimientos en el desarrollo de la biología molecular; lo que ha permitido avances en la secuenciación del genoma humano, la posibilidad de las terapias génicas, el diagnóstico molecular de enfermedades y la clonación de genes que han sido de gran ayuda para distintos campos de estudio como la medicina, la biología celular y la biotecnología que son ramificaciones de la biología molecular.

Desde el descubrimiento de la estructura de ADN el estudio de los Ácidos Nucleicos ha mostrado por años interés por métodos sensibles y estandarizados de técnicas para su estudio. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), desarrollada por Kary Mullis en 1985, revolucionó la forma en que se estudiaban estas moléculas, debido a dos descubrimientos que hicieron esta técnica tan popular: uno de ellos fue la invención de los termocicladores que hacen que la amplificación se realice con una eficacia y eficiencia mayor, ya que realizan automáticamente los pasos de incremento y decremento de la temperatura indispensables en la PCR y el segundo fue la aplicación de las enzimas polimerasas termoestables como la taq polimerasa que proviene de *Thermus aquaticus* entre otras que actualmente se utilizan; estas polimerasas toleran las temperaturas a las que se lleva a cabo la técnica de PCR.

El módulo de Bioquímica Celular y de los Tejidos I, tiene dos componentes teoría y laboratorio, este último es de suma importancia para que los alumnos obtengan la capacidad y habilidades para trabajar dentro de un laboratorio, tanto en el trabajo diario como en el manejo adecuado de los datos obtenidos en el desarrollo de la práctica, analizar e interpretar los resultados y concluir a partir de éstos, incluso el adquirir la capacidad para modificar los métodos ya existentes según las circunstancias o bien



desarrollar métodos originales, adaptándose a los requerimientos y necesidades de su campo profesional.

Como la Biología Molecular ha ido en auge en los últimos años, es de suma importancia que tanto el profesional de la salud como el estudiante de estas áreas, pongan en práctica algunas de las técnicas más utilizadas, asimismo en este momento se realiza la actualización del contenido del manual de prácticas del laboratorio de Bioquímica celular y de los Tejidos I (BCT-I), por lo que con base en lo anterior se propone como objetivo de este trabajo incorporar la técnica PCR al manual del laboratorio, con la finalidad de que los alumnos además de revisar el fundamento y la aplicación de la misma, aprendan a realizar la técnica, respetando la forma en la que se trabaja y adecuándolo a las condiciones del laboratorio, como por ejemplo el número de alumnos, equipos, material, reactivos, tiempo de las sesiones de laboratorio.

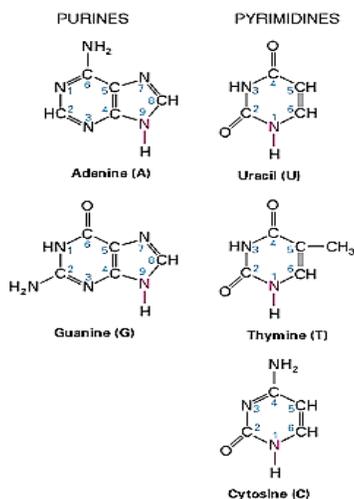


## 2. Marco teórico

### 2.1 Estructura de ADN

Los comienzos de la biología molecular moderna surgieron en 1953, cuando James D. Watson y Francis H. C. Crick realizaron un análisis de difracción de rayos X y la construcción de un modelo, que demostró que la estructura de ADN es de una doble hélice; desde ese momento se pudo conocer la forma funcional del ADN como material genético<sup>1</sup>.

El ácido desoxirribonucleico (ADN) consta de dos hebras de polinucleótidos que se entrelazan para formar la doble hélice cuya misión es conservar la información genética, especificando la secuencia de aminoácidos de todas y cada una de las proteínas celulares<sup>1</sup>. Cada molécula de ADN está compuesto por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada llamadas púricas (adenina y guanina) y pirimidicas (citosina y timina), por lo que solo existen dos combinaciones de bases; la adenina siempre forma pareja con la timina y la citosina con la guanina, y esta característica se le conoce como emparejamiento de bases complementarias. Además la presencia de grupos fosfatos le confiere la carga negativa, y son responsables del carácter ácido de la molécula<sup>2</sup>.



Figuran 1 Las estructuras químicas de las principales bases en los ácidos nucleicos. En los ácidos nucleicos, nitrógeno 9 de purinas y de nitrógeno 1 de pirimidicas (rojo) están unidos al carbono 1 'de la ribosa o desoxirribosa. Tomado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pbdi.unam.mx:8080/books/NBK21514/figure/A805/?report=objectonly>

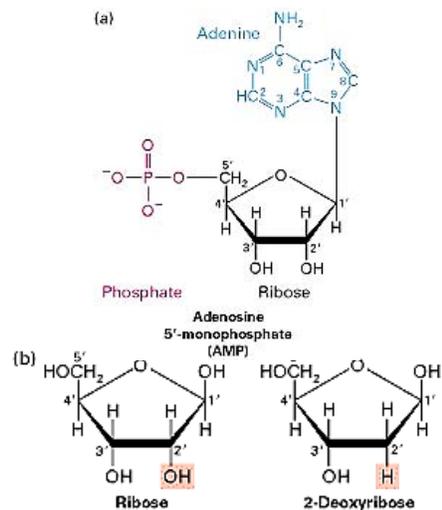


Figura 2. Todos los nucleótidos tienen una estructura en común. Tomado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pbdi.unam.mx:8080/books/NBK21514/figure/A804/?report=objectonly>



La estructura primaria del ADN es resultado del encadenamiento entre nucleótidos mediante enlaces covalentes con el ácido fosfórico que produce un éster doble con la posición 5' de uno y 3' de otro, lo que conduce a un esqueleto covalente donde las bases nitrogenadas quedarían perpendiculares unidas en la posición 1' de la desoxirribosa<sup>2</sup>.

La estructura secundaria propuesta por Watson y Crick consiste en una doble cadena nucleotídica en forma de hélice dextrógira enrollada alrededor de un eje común. El esqueleto covalente, constituido por la secuencia de fosfatos y pentosas, permanece hacia el exterior, como una cubierta hidrofílica, mientras que hacia el interior están orientadas las bases nitrogenadas. Esta configuración corresponde a la forma en doble cadena conocida como ADN tipo B, predominante en el ADN celular<sup>1,2</sup>. En la forma A, los pares de bases se disponen con una inclinación distinta, ligeramente desplazado hacia el exterior, en relación al eje de la hélice, con un mayor grado de empaquetamiento, el cual la separación de surcos es similar. La estructura denominada Z donde ciertas secuencias de ADN caracterizadas por la alternancia de bases púricas y pirimídicas, surge el empaquetamiento levógiro (giro hacia la izquierda), donde el esqueleto covalente sigue un diseño más irregular. La modificación en el tipo de empaquetamiento guarda relación con mecanismos de reconocimiento, para la protección de información genética y control de su expresión<sup>2</sup>.

### **2.1.1 Propiedades funcionales del ADN**

Un comportamiento característico observado en las disoluciones de ADN, cuando son calentadas a partir de 80 °C o sometidos a pH ácido o alcalino, soluciones concentradas de urea o formamida, es una repentina pérdida de viscosidad, acompañada de un aumento de la absorbancia a 260nm. Este fenómeno se denomina desnaturalización o fusión donde se produce una alteración drástica en el ácido nucleico debido a la interrupción de varios enlaces no covalentes (puentes de hidrógeno que mantiene apareadas a las bases nitrogenadas), lo que conduce a la separación total o parcial de los filamentos de ADN, obteniéndose hebras separadas en toda su extensión, sin alterar el esqueleto covalente formado por enlaces entre ácido fosfórico y de desoxirribosa; por lo general resulta en la pérdida de la función biológica<sup>1,2</sup>.



La temperatura de fusión ( $T_m$ ), en la que las hebras de ADN se separarán depende del contenido G-C, las moléculas que contienen una mayor proporción de pares G-C requieren temperaturas más elevadas para desnaturalizar porque conserva tres enlaces de hidrógeno que los hacen más estables que la unión A-T con dos enlaces de hidrógeno. De hecho, el porcentaje de pares de bases de G-C en una muestra de ADN se puede estimar a partir de su  $T_m$ . Cuando se alcanza la  $T_m$  hay un promedio un 50% de uniones hidrógeno rotas en una molécula o fragmento de ADN en una disolución.<sup>1</sup>

La **renaturalización** es el proceso inverso a la desnaturalización donde la reducción de la temperatura o el aumento de la concentración de iones hacen que las dos cadenas complementarias se vuelvan a asociar en una doble hélice perfecta. El alcance de dicha renaturalización depende del tiempo, la concentración de ADN, y el contenido iónico de la solución. Dos cadenas de ADN no relacionadas en secuencia permanecerán como bobinas al azar y no renaturalizan, y lo más importante, no inhibirá las hebras de ADN complementarias asociadas<sup>1,3</sup>.

## 2.2 Genoma Humano

El genoma humano (el contenido completo de material genético en una célula) está enrollado y plegado entre proteínas nucleares (histonas y no histonas) formando nucleosomas (estructura básica de la cromatina) y estructuras secundarias (solenoides) las cuales se empaquetan a su vez en asa o dominios entre las proteínas quedando de esta forma empaquetado el ADN en el cromosoma, que vemos en la metafase<sup>4</sup>. El lugar que ocupa un gen en el cromosoma se denomina "locus" ("loci" en plural), es contante y el mismo en el cromosoma de ambos progenitores<sup>5</sup>; por lo que un gen es un segmento específico de parejas de bases en un cromosoma. Aunque los tipos de parejas de bases son los mismos en todos los cromosomas, difieren en el orden o secuencia de los mismos. Este hecho tiene una enorme importancia funcional, puesto que la secuencia de parejas de bases de cada gen de cada cromosoma es la que determina la herencia. Cada gen dirige la síntesis de una clase de proteína, que puede funcionar, por ejemplo como una enzima, un componente estructural de una célula o una hormona específica<sup>3</sup>. Los humanos poseen 46 cromosomas (44 autosómicos homólogos y dos cromosomas



sexuales X y Y) en cada célula y el ADN nuclear representa un paquete de información genética total de unos 3000 millones de parejas de bases en unos 25,000 genes que codifican proteínas; esto implica que cada progenitor aporta muchos más de mil millones de fragmentos de información genética en los 23 cromosomas que aporta a cada descendiente<sup>5</sup>.

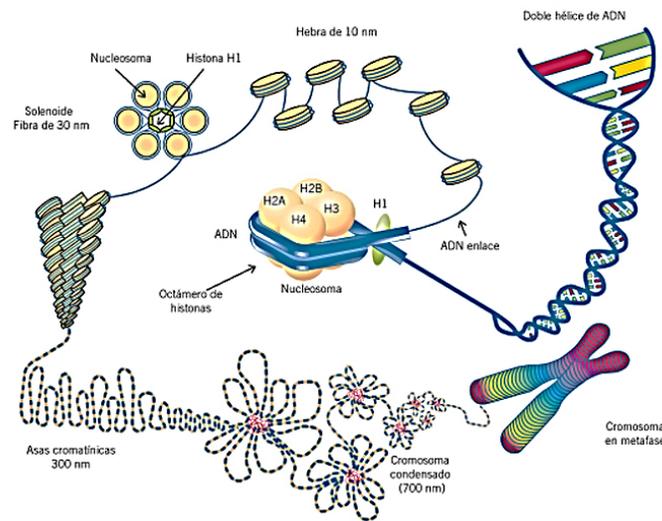


Figura 3. Niveles de empaquetamiento del ADN. Tomado de Gary A.<sup>5</sup>

## 2.3 Proceso de transmisión de información genética

### 2.3.1 Dogma Central de la Biología Molecular

La expresión de los genes es la base del metabolismo celular, por lo cual el ADN se transcribe en ARN, que a su vez se traduce en proteínas. La transmisión de información entre diversas generaciones de células es un requisito la duplicación del material genético por medio del proceso de copiado o replicación del ADN, por lo tanto secuencia ADN-ARN-proteínas constituye el dogma central de la biología molecular para garantizar el flujo de la información genética. El conocimiento de los procesos de transmisión de la información genética obligo a la ampliación del esquema básico original para acomodar otros procesos que también ocurren, al menos en unos organismos particulares como es el caso de algunos virus (retrovirus) que sintetizan ADN a partir de ARN, y hasta el momento no se conoce algún sistema biológico en que la información almacenada en una proteína sirva para la síntesis de ácidos nucleicos.<sup>6</sup>



## DOGMA CENTRAL DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR

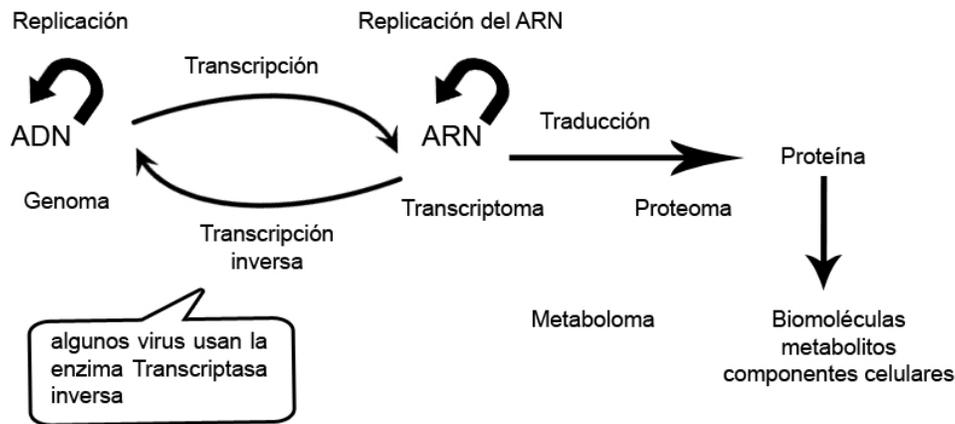


Figura 4. Ampliación del "dogma Central de la biología molecular. Tomado de Herráez A <sup>6</sup>.

### 2.3.2 Replicación del ADN

El proceso de multiplicación celular es un proceso que implica la división del núcleo (mitosis) y el citoplasma. Una vez completado, se producen dos células hijas genéticamente idénticas a la célula predecesora. El ADN de cada cromosoma se replica durante la interfase y justo antes de comenzar la mitosis. La replicación del ADN es un proceso complejo, porque depende de la duplicación precisa de la enorme cantidad de información genética transportada en su ADN<sup>5</sup>.

La replicación del ADN ocurre de manera conservativa, es decir, las dos cadenas de nucleótidos se desenrollan y cada cadena sirve de molde para formar una molécula de ADN nueva<sup>2</sup>. La posición en las que el ADN es primero abierto se denomina origen de replicación y está marcada habitualmente por una secuencia de particular de nucleótidos. El punto de desenrollamiento se denomina horquilla de replicación, esto se logra debido a que la enzima ADN helicasa rompe las uniones de hidrógeno. Después de la separación la cadena sencilla se estabiliza con proteínas de unión a cadena simple (SSB). Otra proteína esencial para este proceso es la enzima ADN girasa, una topoisomerasa, que es la encargada de liberar la tensión torsional generado por el desenrollamiento<sup>4,7</sup>.



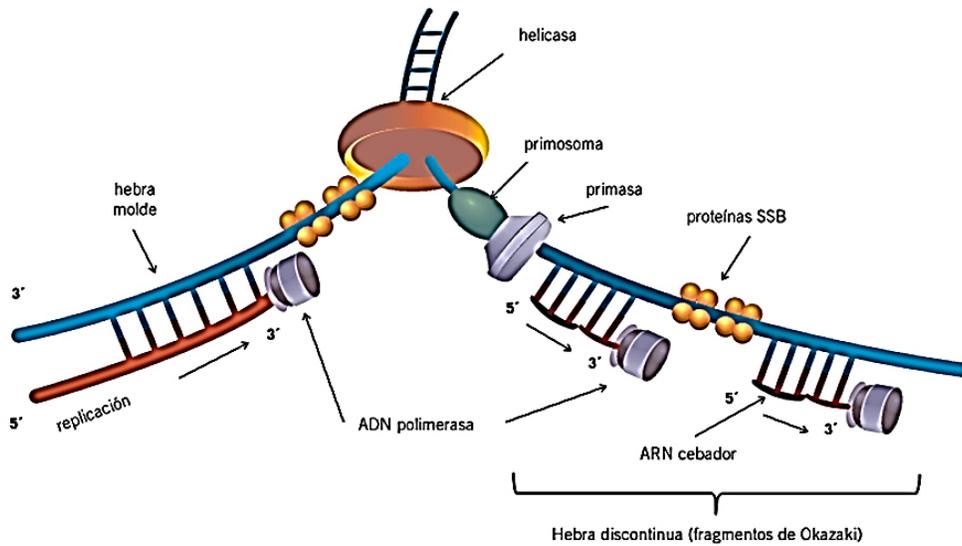


Figura 5. Inicio de la replicación del ADN. Se observan las cadenas continua y discontinua; ambas se replican en dirección de 5' a 3'. Tomado de Salazar-Montes A.<sup>4</sup>.

La materia prima para la generación de una nueva cadena de ADN son los desoxirribonucleótidostrifosfatos (dNTP), cada uno de estos contiene un azúcar desoxirribosa y una base (un nucleósido) unido a tres grupos fosfatos. Durante la síntesis de ADN los nucleótidos se unen al grupo 3'-OH de la cadena nucleotídica en crecimiento. El grupo 3'-OH del último nucleótido de la cadena ataca al grupo 5'fosfato del dNTP que entra en el proceso. Dos fosfatos se separa del dNTP, y se forma una unión fosfodiéster entre los dos nucleótidos. Por lo que antes de comenzar a sintetizar una nueva cadena se necesita de un cebador (sintetizada por la enzima primasa) que contiene un grupo 3'-OH libre, para permitir el ADN polimerasa de inicio de la replicación de ADN. Las ADN polimerasas (enzimas que sintetizan el ADN), sólo pueden agregar nucleótidos al extremo 3' de la cadena proliferativa y esto implica que las cadenas de ADN nuevas siempre se alargan en la misma dirección de 5' a 3'. La cadena de ADN que se genera contiene cebadores de ARN cortos unidos a la cadena que después son eliminados y sustituidos por nucleótidos de ADN. Un análisis más detallado revela que una hebra se sintetiza de una manera continua (cadena líder), mientras que la cadena opuesta se sintetiza en fragmentos de una manera discontinua (cadena retrasada)<sup>4, 6, 8</sup>.



### 2.3.3 Transcripción y traducción del ADN

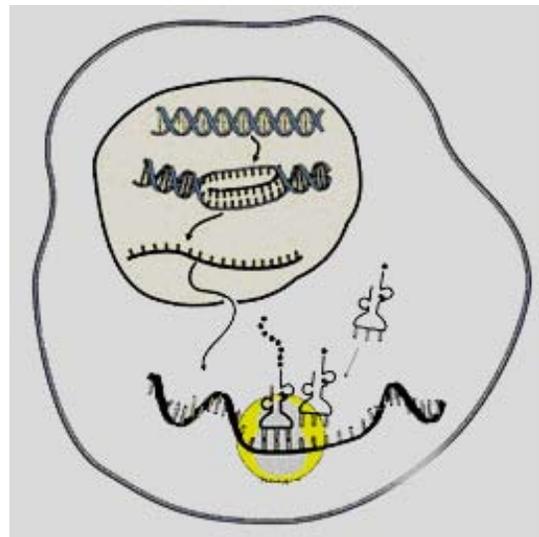
El proceso de transferencia de información genética se da desde el núcleo hasta el citoplasma donde se produce las proteínas; por lo que se requiere de dos pasos especializados, conocidos como transcripción y traducción<sup>5</sup>. El proceso de la transcripción, comienza con la apertura y el desenrollado de una pequeña porción del ADN para exponer las bases de cada cadena. Una de las dos hebras actúa entonces como una plantilla para la síntesis de una molécula ARNm. La cadena de ARN producida por la transcripción tiene una secuencia de nucleótidos que es exactamente complementaria a la hebra de ADN utilizado como molde<sup>1, 6, 7</sup>.

Figura 6. En el proceso de la transcripción, se realiza la síntesis de una cadena complementaria de ARN a partir de un molde de ADN. Cada cadena de ARNm es un duplicado o copia de una secuencia particular de genes a lo largo de una de las espirales de ADN.

En el proceso de traducción la información del ARNm se lleva en los ribosomas que se interpreta por un segundo ARN llamado ARN de transferencia (ARNt) y un tercero conocido como ARN ribosomal (ARNr) para dirigir la elección y secuenciación de los bloques de componentes químicos adecuados, llamados aminoácidos, formando así una cadena proteica<sup>5, 8</sup>.

Tomado de:

<http://porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1&note=3>



La enzima que realiza la transcripción se denomina ARN polimerasa que permanece junto a un promotor donde se indicara dónde va a empezar a copiar y comenzará a moverse a lo largo de la plantilla de ADN, copiando la información en dirección de 5' a 3', a medida que avanza la polimerasa añade nucleótidos, para finalizar esta etapa las moléculas de ARNm se liberan de la plantilla de ADN como cadenas simples (debido a que sólo se copian desde una región limitada del ADN )<sup>2, 4, 5, 7</sup>. En el caso de las bacterias, todas las moléculas de ARN se sintetizan por un único tipo de ARN polimerasa por tanto, se aplica a la producción de ARNm, mientras en los eucariontes existen tres ARN polimerasa; ARN polimerasa I, ARN polimerasa II, y la ARN polimerasa III. Las tres polimerasas son estructuralmente similares entre sí y a la ARN polimerasa bacteriana. La polimerasa



bacteriana es capaz de iniciar la transcripción del ADN plantilla in vitro sin la ayuda de proteínas adicionales, mientras que el ARN polimerasas eucarionte no puede, por lo que se requieren la ayuda de un gran conjunto de proteínas que se designan como TFII (factor de transcripción para la polimerasa II), y se enumeran como TFIIA, TFIIIB, y así sucesivamente, que debe acoplar en el promotor (una secuencia de nucleótidos en el ADN) antes de que la polimerasa pueda iniciar la transcripción<sup>1,8</sup>.

Como se conoce, las proteína se codifican a partir de secuencias de genes, estos se dividen en pequeños trozos de secuencia llamados exones (segmento de un gen que consiste en una secuencia de nucleótidos que se representa en el ARNm o ARN de transferencia final, codificando aminoácidos en la proteína) e intrones (región no codificante de un gen que se transcribe en un molécula ARNm que durante su maduración son eliminados); así, la porción codificante de un gen eucarionte es a menudo sólo una pequeña fracción de la longitud del gen<sup>7</sup>.

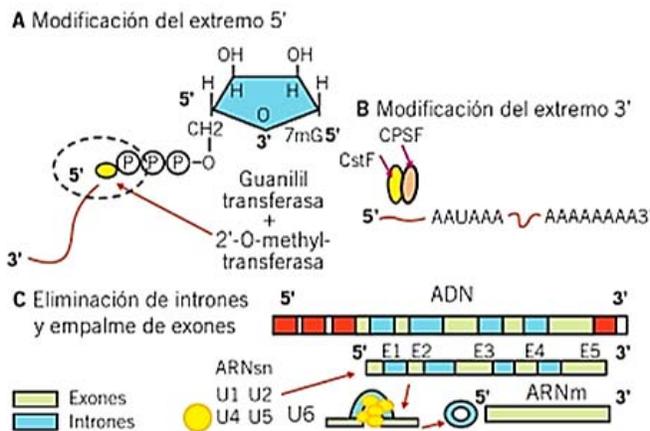


Figura 7. Los pre-ARNm en eucariontes son procesados en los extremos 5' y 3'. A) Un cap, que consiste en un nucleótido modificado y varios grupos metilos, es adicionado en el extremo 5'. El casquete 5' facilita la unión al ribosoma, aumentando la estabilidad del ARNm. B) En el extremo 3' se adiciona una cola poli A, C) Eliminación de intrones y empalme de exones (*splicing*), con una reacción de doble transesterificación. Tomado de Salazar-Montes A<sup>4</sup>.

Una vez que el ARNm este maduro (los intrones ya han sido eliminados y solo queden las secuencias de nucleótidos a utilizar para producir proteínas) se alcanza el proceso de traducción<sup>5-7</sup>. La cadena de ARNm llevada en los ribosomas que se interpreta por un segundo ARN llamado ARN de transferencia (ARNt); la iniciación de la traducción requieren de subunidades menores y mayores de ARNr, y el codón de iniciación AUG o GUG<sup>6, 8</sup>.



La adición de un nuevo aminoácido se lleva a cabo en tres pasos: a) unión del aa-ARNt al codón correspondiente: este aa-ARNt ocupa el sitio ribosomal A (aminoacil); b) formación de la unión peptídica en el sitio A; c) translocación al sitio P. La terminación de la traducción es dada por señales; los codones UAA, UGA, UAG y por proteínas o factores de terminación<sup>6,8</sup>.

En los procariontes la transcripción y la traducción están acopladas; es decir, el ARNm empieza a traducir conforme se transcribe. En los eucariontes la transcripción se realiza en el núcleo y la traducción en el citoplasma para dirigir la síntesis de proteínas en los ribosomas y el retículo endoplasmático (RE)<sup>2,6</sup>.

## 2.4 Obtención y purificación de ADN

La obtención de ADN a partir de muestras de distinta naturaleza, constituyen la etapa previa a todo análisis genético. La obtención y purificación del material genético tiene como propósito recuperar el máximo producto de ADN libre de proteína, fenol e inhibidores de enzimas de restricción y de la Taq polimerasa; dicho proceso es de importancia para el uso de distintas técnicas como: la electroforesis, secuenciación, clonación, hibridación y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que han sido los cimientos en el desarrollo de la biología molecular, además de la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles que han permitido estudiar con mayor precisión los patrones de diversidad genética y su distribución, el comportamiento, la selección natural, las interacciones biológicas, entre otros<sup>9,10</sup>.

Los métodos de obtención y purificación de ADN, en general tienen una serie de pasos básicos, que se cumplen independientemente del origen de la muestra (sangre, tejidos, huesos, bacterias, levaduras), que están basados en las características fisicoquímicas de la molécula. En los últimos años el uso de kits comerciales está aumentando su popularidad porque tienen la ventaja de acortar el tiempo en la extracción y además de obtener una alta pureza y eficacia de la eliminación de contaminantes; pero el fundamento se conserva y se pueden resumir en 5 pasos principales<sup>11-15</sup>:

1. Ruptura celular. Rompimiento de la bicapa lipídica de las membranas celulares por



tratamiento con detergentes (como dodecilo sulfato de sodio "SDS" o TritonX), agentes quelantes (p. ej. EDTA, que tiene cuatro grupos carboxilo y dos grupos amino, cuya forma completamente desprotonizada puede unirse a cualquier complejo metálico en solución), que secuestran a los cationes de la solución para desestabilizar la membrana celular e inhibir a las ADNasas, sales (p.ej. NaCl al 20mM), que forman una capa iónica suave que recubre al ADN protegiéndolo y ayudando a evitar su degradación y solución de Tris-HCl 20mM con pH entre 7.5 y 8.2 para mantener el pH de la solución estable.

2. Eliminación de las proteínas. Constituyen los principales contaminantes del extracto y se eliminan con enzimas proteolíticas, como la Pronasa o Proteinasa K.

3. Concentración del DNA. Se emplea el uso de alcoholes (p.ej. etanol absoluto o Isopropanol) que favorecen la precipitación. Por otra parte, con la adición de sales (p.ej. acetato de sodio, cloruro de sodio, acetato de amonio o cloruro de litio) permite que el ADN se pliegue sobre sí mismo haciéndolo insoluble, porque se obtiene una capa iónica positiva que permite su precipitación.

4. Lavado. Para eliminar restos de reactivos y disolventes, en el caso de utilizar PCR puede llegar a inhibir la Taq polimerasa. La pastilla de ADN se lava con etanol al 70% para eliminar todas las sales que permanezcan en la solución. Las muestras se vuelven a centrifugar, se elimina el etanol y se deja secar el ADN hasta que no haya más trazas de éste.

5. Resuspensión. Solución de hidratación para mantener en solución el ADN.

## 2.5 Cuantificación de ADN

Una vez obtenido el material genético, la cuantificación de ADN en solución se determina mediante espectrofotometría. La absorción de la muestra se mide a varias longitudes de onda para evaluar la pureza y la concentración de los ácidos nucleicos. Una absorbancia ( $A_b$ ) a 260nm es una medición cuantitativa para las preparaciones de ácido nucleico relativamente puros en cantidades de microgramos. Las lecturas de absorbancia no pueden discriminar entre ADN y ARN; sin embargo, la relación de 260/280nm se puede utilizar como un indicador de la pureza del ADN (una proporción de 1.8 es aceptada



como puro). Las proteínas, por ejemplo, tienen un pico de absorción a 280 nm que reducirá la relación 260/280. La absorbancia a 325 nm indica partículas en la solución o celdas sucias; mientras que los contaminantes que contienen restos de enlaces aromáticos tal como el fenol absorbe a 230nm; por lo que la proporción 260/230 con valores menores de 2 a 2,2 indicarían su presencia como contaminante<sup>10,16</sup>.

## 2.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las técnicas de biología molecular están basadas en la manipulación y detección de gran número de moléculas, desde el descubrimiento del ADN se ha tenido interés por desarrollar métodos sensibles y reproducibles que les permitan estandarizar protocolos experimentales para su estudio; probablemente, la más importante sea *Polymerase Chain Reaction* o Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), desarrollada por Kary Mullis, y que le hizo merecedor del Premio Nobel de Química<sup>17-19</sup>.

Ahora, la PCR es una técnica fundamental en la biología molecular, debido a su rapidez, especificidad, flexibilidad y un número extremadamente grande de aplicaciones; ya que es una técnica in vitro de gran alcance que permite la amplificación y el copiado masivo de un fragmento específico de ADN, además, permite mutagenizar fragmentos específicos de ADN y alterar una variedad de secuencias para estudiar la expresión génica<sup>16</sup>. Estos métodos dependen directamente de la eficiencia de la reacción, que se basa en el ajuste exacto de sus componentes: plantilla de ADN, dNTPs (adenina, timina, citosina y guanina), tampón de reacción (con MgCl<sub>2</sub>), y un conjunto de cebadores que flanquean la secuencia diana y se extienden por la Taq polimerasa.<sup>17-20</sup>

### 2.6.1 Reactivos que influyen en la PCR

#### 2.6.1.1 ADN polimerasas

Al desarrollarse por primera vez la técnica de PCR se utilizó el fragmento Klenow de *Escherichia coli* que es una ADN polimerasa I con la finalidad de producir copias de ADN diana. Debido a que el fragmento Klenow era termosensible, la enzima tenía que ser adicionada en cada ciclo, haciendo que la PCR fuera un procedimiento tedioso<sup>17</sup>.

La eficiencia de la PCR se mejoró drásticamente mediante el uso de una polimerasa



resistente al calor de manera que el procedimiento podría llevarse a cabo a altas temperaturas sin tener que añadir más enzima antes de cada ciclo. Dicha polimerasa fue aislado de la bacteria *Thermus aquaticus* que se obtiene de una fuente termal de ahí su nombre comercial más conocido como Taq polimerasa que puede soportar repetidas exposiciones a temperatura de hasta 94°C<sup>13, 17-19</sup>.

La Taq polimerasa es una proteína de 94 kDa con una temperatura óptima de 75 a 80°C. Se puede extender entre 60 a 100 nucleótidos por segundo a 70 °C con un cebador 30 mer rico en GC. En una mezcla de PCR, la Taq retiene el 50% de su actividad después de 40 minutos a 94 °C<sup>17, 19</sup>, utilizando 1U a partir de una concentración de 5U/μL<sup>20</sup>.

Otras enzimas termoestables se han aislado de las eubacterias (*Thermus* y *Bacillus*) y Archaea (*Thermococcus*, *Pyrococcus*, y *Sulfolobus*)<sup>17</sup> y se pueden seleccionar por velocidad de síntesis, precisión del copiado, capacidad de sintetizar moléculas largas, tolerancia a inhibidores de reacción<sup>19</sup>.

### 2.6.1.2 dNTPs

Los cuatro dNTPs son los cimientos para construir las nuevas cadenas de ADN. Las variaciones desbalanceadas en sus concentraciones apropiadas (es decir, [A]= [T] = [C] = [G]) y/o debido a su inestabilidad de los ciclos de congelación y descongelación, afecta la especificidad. Concentraciones altas hacen disminuir la actividad de la Taq polimerasa e incluso pueden llegar a inhibirla<sup>19,21,22</sup>. Las concentraciones utilizadas en la mayoría de los casos son entre 0,2 a 1mM para cada uno de los nucleótidos, pero hay protocolos que reportan de 20 a 200μM<sup>13, 19, 21, 22, 23</sup>. Los dNTPs pueden captar iones de magnesio (Mg<sup>2+</sup>) para formar un complejo soluble, por lo tanto las concentraciones de ambos deben guardar siempre la misma relación<sup>18, 20</sup>.

### 2.6.1.3 Iones divalentes y monovalentes

Los iones divalentes actúan como cofactores en la actividad de la Taq polimerasa por lo que tienen una función crítica en la reacción. Comúnmente es usado el Mg<sup>2+</sup>, agregado como MgCl<sub>2</sub>, reportando concentraciones que oscila regularmente entre 0,5 a 5 mM<sup>19-21, 23</sup>. En muchos casos la concentración debe optimizarse para cada ensayo. En general,



concentraciones insuficientes dan lugar a bajo rendimiento (p, ej. la presencia de EDTA u otros quelantes puede reducir la disponibilidad de  $Mg^{2+}$ ) mientras que el exceso tiende a producir amplificaciones inespecíficas e inhibir a la enzima<sup>16</sup>. Entre los iones monovalentes más empleado es el potasio, generalmente como KCl en una solución tampón con una concentración final de reacción de 35 a 100 mM<sup>18, 20</sup>.

#### 2.6.1.4 Solución tampón (buffer)

Su función es mantener el pH adecuado para el funcionamiento de la Taq polimerasa. Por lo general es un buffer 10X estándar con 500 mM de KCl y 100 mM de Tris-HCl, pH 8.3. Algunos buffer incluyen el magnesio necesario para la reacción, y puede suceder que al no notarlo se esté agregando magnesio extra; por lo que se estará trabajando en concentraciones mayores a las adecuadas<sup>13, 19</sup>. Hay protocolos que recomiendan el uso de adyuvantes en la práctica para aumentar el rendimiento. Entre los adyuvantes más empleados es el dimetilsulfóxido (DMSO), añadido para disminuir las estructuras secundarias del ADN; detergentes como el Tween 20 o el Tritón X-100 que ayudan a estabilizar la enzima (eliminando restos de SDS usados en la extracción de ADN), polietilenglicol (PEG), glicerol, formamida y seroalbúmina bovina. Se ha determinado que otros solventes como la betaína pueden actuar como agentes desestabilizadores (solutos compatibles que ayudan a sobrevivir al estrés osmótico), reduciendo la temperatura de fusión de secuencias ricas en GC y aumentando la resistencia de la polimerasa a la desnaturalización<sup>13, 19, 23</sup>.

#### 2.6.1.5 ADN molde (Plantilla)

La plantilla de ADN utilizado en la PCR generalmente debe estar libre de nucleasas que podrían degradar el ADN, proteínas de unión o altos niveles de proteínas precipitables al calor que inhibirían la amplificación. Idealmente, de  $10^5$  a  $10^6$  moléculas de ADN deben de estar disponibles. Habitualmente en protocolos se ha reportado cantidades desde 100 a 500 ng cuando se utiliza ADN genómico; en bacteria de 1 a 10 ng y si es plásmido de 0.1 a 1 ng<sup>17, 19, 20, 23</sup>. No es necesario purificarlo, sin embargo el exceso de plantilla puede disminuir la eficiencia de la polimerasa debido a los contaminantes en la extracción de



ADN, como la heparina, el formol, los agentes quelantes, para evitar que se inhiba el proceso de amplificación<sup>17,19</sup>.

### 2.6.1.6 Agua

El agua que se utiliza en una reacción de PCR debe contener muy pocas sales (agua bidestilada), no es recomendable la variación en la cantidad de iones entre una reacción y otra, es recomendable utilizar agua desionizada (18m-chms) o milli-Q grado molecular libre de DNAsas y RNAsas, además se aconseja sea purificada por luz ultravioleta, ozono o el uso del dietil-pirocarbonato al 0,1% (este último inactiva las RNAsas)<sup>19, 20, 23</sup>.

### 2.6.1.7 Los cebadores o primers

Aunque todos los componentes de una PCR son importantes, los cebadores (llamados también primers, iniciadores, oligonucleótidos, "oligos", etc.) son una pieza fundamental en el esquema del PCR porque de ellos depende el fragmento a copiar. Muchas de las modificaciones de la PCR han implicado la modificación del número, tamaño, y la especificidad de los cebadores utilizados. A continuación se muestra una lista de características que deben ser consideradas al diseñar o elegir cebadores.

- Un conjunto de cebadores óptimos deben hibridar de manera eficiente a la secuencia de interés con la hibridación insignificante a otras secuencias presentes en la muestra<sup>23-25</sup>.
- Normalmente tienen una longitud de 15 a 30 pares de bases<sup>17, 18, 20, 25</sup>. Cuanto más corto sea el cebador (<18 nucleótidos), más rápido el recocido con la plantilla, pero la especificidad disminuye con plantillas complejas (por ejemplo, ADN genómico)<sup>26</sup>.
- Demostrar una proporción de 40% a 75% de guanina y citosina (G + C) en la secuencia<sup>17-20</sup>, la óptima será de 50%<sup>25</sup>. Esto proporciona una ventaja térmica suficiente para el recocido eficiente. Dentro de un par de cebadores, el contenido de G-C y el Tm deben estar bien igualados. Está Tm es la temperatura a la que se hibridan o se pegan los oligonucleótidos en los sitios que son complementarios y, por eso la secuencia de cada oligo se debe tomar en cuenta para conocer cuál es la temperatura óptima para su alineamiento, esta oscilan entre 52 a 58 °C, aunque el rango se puede ampliar de 45



a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>21, 25, 26</sup> y debe diferir en no más de  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>20, 25</sup>. Conocer la  $T_m$  proporciona una idea de la temperatura que se utilizara en el termociclador en la etapa de alineación, ya que también los iones y otras sustancias que se haya en la reacción pueden influir en la forma en que se unen los oligos<sup>21, 26</sup>.

- Las secuencias diferentes que se utilizan en la PCR, son denominadas sentido (forward) y antisentido (reward); ambas deben estar diseñadas para que hibriden con la plantilla de ADN y así, ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5' a 3'. Estos cebadores no deben ser complementarias una de otra, y por lo tanto tampoco ser complementaria a otras secuencias en la platilla; ya que si existe complementariedad en el extremo 3' se induce a que ambos iniciadores se traslapen en dicho extremo y sirvan de plantilla. La polimerasa los reconocerá y los empezará a replicar generando así pequeños amplicones (fragmentos cortos de ADN amplificados), como resultado la formación de dímeros de cebadores y las estructuras de bucle en horquilla; reduciendo la cantidad de oligos disponibles en la reacción y provocando un menor rendimiento del amplicón de interés<sup>4, 19, 20, 26</sup>.
- En la actualidad el diseño de los cebadores se realiza a través de software por ejemplo, Primer3, Primer3Plus, Pitia, Visual OMP™, Vector NTI®, etc, permiten el diseño automatizado, tomando los parámetros mencionados<sup>4, 26, 27</sup>.
- La concentración habitual es de  $1\mu\text{M}$  pero se puede probar en un intervalo de 0.02 a  $0,1\mu\text{M}$  (20 a 100pM); si es baja puede ocasionar un pobre rendimiento de la reacción y si es demasiado alta puede ocasionar una disminución de la especificidad que se manifiesta por un incremento en los productos de amplificación inespecíficos; además, puede favorecer la formación de dímeros<sup>13, 17, 21</sup>.
- Se recomienda guardar los oligos disueltos en agua destilada estéril grado milli-Q y congelados (solución de trabajo) o bien secos a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  (solución stock)<sup>21</sup>.



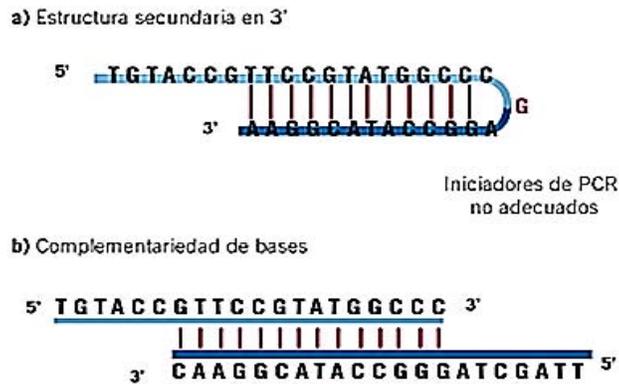


Figura 8. Posible secuestro del extremo 3' en los iniciadores de PCR, a) Estructura secundaria en 3': generada por complementariedad intrainiciador, generando una estructura plegada de doble cadena que interfiere con el correcto alineamiento del iniciador. b) Complementariedad de bases, producida por complementariedad intrainiciadores, generando dímeros que afectan la disponibilidad de los mismos en PCR. Tomado de Salazar-Montes A.<sup>4</sup>.

## 2.6.2 Termociclador

Es un equipo que facilita realizar la PCR, porque cambia la temperatura de la muestra en cuestión de segundos y son controlados por microprocesadores que permiten el calentamiento y enfriamiento por resistencia eléctrica de una placa metálica donde se encuentran los pocillos para los microtubos, donde se disminuye o aumenta las temperaturas (de 4 a 96°C) de manera uniforme durante tiempos programados en un rango de segundos a minutos. Dado que las PCR que se incuban son soluciones acuosas, estos equipos cuentan con una placa metálica a manera de tapa, la cual mantiene a 103 °C para evitar la condensación del agua en las tapas del tubo donde ocurre la reacción. De esta manera evita que la concentración de solutos se modifique, lo que alteraría las condiciones óptimas para la ADN polimerasa y la termodinámica de la hibridación de primers. Para el enfriamiento se generan flujos de aire frío, lo que permite el descenso de la temperatura relativamente rápida<sup>4, 17, 28</sup>.



## 2.6.3 Esquema de la PCR

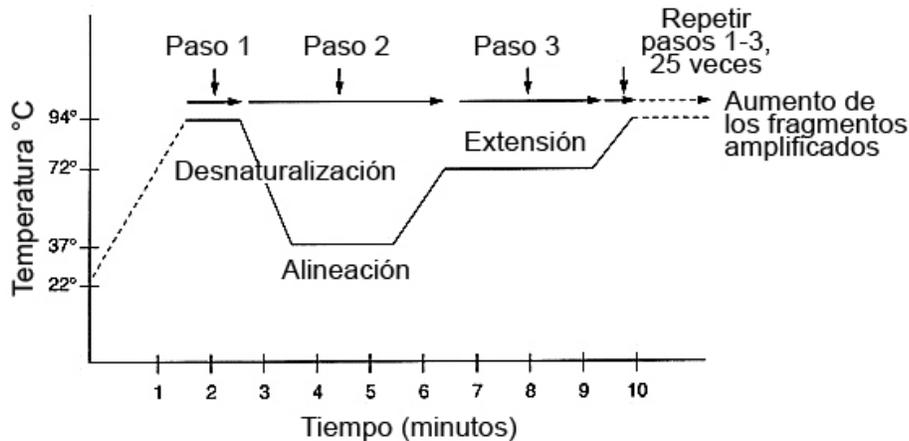


Figura 9. Ejemplo de un protocolo PCR típico. Paso 1 implica desnaturalizar la plantilla de ADN de doble cadena a 94 °C. Paso 2 implica el recido del cebador al ADN diana monocatenario por apareamiento de bases. Paso 3 implica la síntesis de nuevo ADN a partir del extremo 3' del cebador (= extensión del cebador) por la ADN polimerasa utilizando dNTPs en una secuencia determinada por la plantilla de ADN. Los pasos 1-3 son un ciclo, y aproximadamente 25 ciclos producirán un aumento en el contenido de ADN por un factor de  $\approx 1$  millones ( $2^{25}$ ). Tomado de Marjorie A<sup>17</sup>.

### 1. Inicio de la desnaturalización

Las reacciones de PCR requieren de una desnaturalización prolongada para asegurar que la desnaturalización del ADN se lleve a cabo a lo largo de toda la molécula y que la ADN polimerasa utilizada se active. La mezcla de reacción se mantiene por lo general entre 94 y 96°C durante 5 a 10 minutos<sup>10,29</sup>. Este paso lleva directamente a la etapa de desnaturalización.

### 2. Ciclos de amplificación (principales etapas de la técnica)

- Desnaturalización. Es muy importante que el ADN molde se desnaturalice completamente y así pueda iniciar la síntesis de su nueva cadena complementaria. En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C durante 30 segundos a 1 minuto; el tiempo depende de la secuencia de la plantilla, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus puentes de hidrógeno debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas (forma de cadenas sencillas) que servirán como molde para el siguiente paso<sup>4, 10, 17, 18, 19, 21, 29</sup>.



- Alineamiento, hibridación o recocido. La temperatura se ajusta en un intervalo entre 40°C y 60°C (temperatura que depende la Tm de los cebadores y su % G-C), a esta temperatura se forman y se rompen constantemente los puentes de hidrógeno entre los oligonucleótidos y el ADN, quedando los oligonucleótidos “alineados” para formar una pequeña región de doble cadena<sup>10, 21, 29</sup>. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente<sup>18</sup>. La polimerasa se une a este pequeño pedazo de ADN de doble cadena y comienza a copiar en sentido 5' a 3' ; al agregar unas bases más, los puentes de hidrógeno que se forman entre las bases estabilizan la unión y el oligonucleótido permanece en este sitio para el siguiente paso<sup>23</sup>.
- Extensión (también conocida como la etapa de elongación). En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo ADN molde-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agregando dNTP' s complementarios para extenderlas cadenas completas de ADN en dirección de 5' a 3' . La temperatura óptima para la reacción es de 72°C, a esta temperatura la Taq polimerasa es funcional y alcanza su máxima actividad para evitar alineamientos inespecíficos <sup>18, 19, 21</sup>. La duración de la extensión depende principalmente en la longitud de la secuencia a amplificar, la Taq polimerasa es capaz de añadir de 500 a 1000 nucleótidos por minuto<sup>10, 29</sup>.

### 3. Repetición de los pasos de desnaturalización / hibridación / extensión.(ciclo de reacción)

En el primer ciclo, con estas tres temperaturas de desnaturalización, hibridación y extensión, se sintetizarán los primeros fragmentos a partir del ADN genómico, de plásmido o de bacterias. Estos primeros fragmentos no tendrán el tamaño esperado, serán un poco más grandes ya que la taq copiará hasta donde le sea posible; después se repiten una vez más las tres temperaturas, pero en este segundo ciclo, los oligonucleótidos, además de unirse al ADN que se adiciono al inicio, también se unirán a los fragmentos recién sintetizados del primer ciclo, por lo tanto en este segundo ciclo la polimerasa sintetizará 2 fragmentos largos copiados directamente del ADN y 2



fragmentos del tamaño esperado, que es el tamaño que hay entre los dos oligonucleótidos que se ha usado. De esta forma con cada ciclo aumentará el número de fragmentos del tamaño que queremos (aproximadamente se repiten 22-44 veces), al final se obtendrán en cantidades tan pequeñas que no podremos detectarlos<sup>17, 21, 29</sup>.

El número de ciclos de la PCR puede ser optimizado con respecto al número de copias de ADN inicial. En una PCR óptima, se duplica la cantidad de copias de ADN en cada ciclo, bajo la ecuación  $2^n$  (amplificación de forma exponencial), donde n es el número de ciclos. Pero en la práctica se alcanzan eficiencias de 80-95%, por lo que el factor de amplificación está más cercano a  $(1.9^n)$ . No es aconsejable realizar más de 40 ciclos porque los productos inespecíficos se forman en mayor proporción. Después de un número determinado de ciclos, la amplificación deja de producirse de manera exponencial y llega a una fase estacionaria (efecto de meseta), generalmente en esta fase, la cantidad de ADN sintetizado es suficiente para cualquier uso<sup>10</sup>.

#### 4. Extensión final.

Generalmente, al terminar los ciclos, se realiza una última extensión de aproximadamente 5 a 10 minutos a 72°C para permitir que la polimerasa termine de sintetizar todos los fragmentos que pueden haber quedado incompletos<sup>10, 20, 21</sup>.

#### 5. Almacenamiento temporal

La mayoría de los programas de termociclador de PCR incluyen una etapa de espera, en el que se mantiene la muestra a aproximadamente 4°C indefinidamente, como una forma de almacenamiento hasta que se retira la muestra del bloque termociclador<sup>29</sup>.

## 2.7 Electroforesis

Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió adecuadamente, los amplicones son evaluados a través de la electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida que permite separar estos fragmentos de acuerdo al tamaño molecular de cada uno<sup>10, 20, 21, 28</sup>.

La electroforesis es un método de separación que se basa en la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico. Muchas moléculas importantes



biológicamente (aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos) poseen grupos ionizables y existen en solución como especies cargadas, como cationes, o bien como aniones<sup>30, 31</sup>. Las moléculas que posean carga negativa migrarán hacia el polo positivo (ánodo) de un aparato electroforético y viceversa, esto depende de su carga, peso molecular y estructura tridimensional<sup>10, 31</sup>. La carga neta de estas biomoléculas está dada por el pH del medio y puede ser modificada por ejemplo por la interacción con pequeñas moléculas de iones<sup>30</sup>.

La velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga/peso), pH del medio, voltaje aplicado y concentración del gel en la electroforesis. Un voltaje muy alto crea un exceso de calor por lo tanto aumenta la temperatura del buffer generando el efecto "sonrisa" o smiling. En contraste al aplicar bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación en la corrida electroforética<sup>30, 32</sup>. Para el caso de productos de PCR (entre 100 pb a 1,5 kb), se recomienda usar voltajes comprendidos entre 75 a 100 voltios<sup>31</sup>.

### **2.7.1 Equipo para electroforesis**

El equipo para electroforesis tiene los siguientes componentes: un contenedor que evita la contaminación y derramamiento, dos polos que atraerán a las biomoléculas, una fuente de poder generadora de campo eléctrico regulable, una matriz que permite un segundo punto de resolución y una solución amortiguadora de pH que mantenga la integridad de las biomoléculas<sup>22</sup>.

### **2.7.2 Electroforesis en ácidos nucleicos**

La electroforesis en gel de agarosa es el método normalizado que se utiliza para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN cuando no requerimos un alto poder de resolución<sup>33</sup>, en el caso de la separación de moléculas menores o iguales 50 pb se usa poliacrilamida<sup>10</sup>.

Los fragmentos de ADN, se analizan a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar los amplicones en un campo eléctrico. La separación se hace bajo un buffer, el más común es el TBE (Tris Boratos EDTA), que es muy estable y que se puede



reutilizarse varias veces. También se utiliza con frecuencia el buffer TAE (Tris Acetatos EDTA), que es menos estable que el TBE y tiende a ionizarse más rápido, pero permite obtener mejor separación de bandas, sobre todo si son de gran tamaño (1 kb o más); ambos contiene EDTA a  $\text{pH}=8$ <sup>10, 21, 31</sup>.

Generalmente el porcentaje al que se prepara el gel es al 1.2 a 2% dependiendo del tamaño del fragmento amplificado, se le adiciona bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del fragmento de ADN y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta a una longitud de onda determinada (264-366 nm). Se verán las bandas correspondientes a las muestras de ADN aplicado y los marcadores de peso molecular que tiene un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo que facilita la identificación de los amplicones y su tamaño corresponde con el esperado<sup>21, 31, 34</sup>.

Es importante mencionar que las muestras de ADN que se cargan en el gel de agarosa se mezclan en primer lugar con un tampón de carga (buffer de carga) que por lo general contiene agua, sacarosa y un colorante (por ejemplo, cianol de xileno, azul de bromofenol, verde de bromocresol, etc.)<sup>36</sup>, que permiten monitorear la corrida electroforética.

## 2.8 Variantes de técnica de PCR

PCR en tiempo real. Su fundamento consiste en medir no la cantidad del producto formado al final, sino en la velocidad en la que se está formando en momentos moderadamente tempranas a la reacción<sup>18, 21, 26, 35</sup>.

PCR por transcripción inversa (RT-PCR). Se emplea una enzima denominada retrotranscriptasa que posee la capacidad catalítica de sintetizar ADN a partir de ARN produciendo ADN complementario (cADN)<sup>35</sup>.

Hot PCR inicio. Es una técnica que reduce los productos no amplificados durante el arreglo inicial en las etapas de la PCR. Se puede realizar manualmente mediante el calentamiento de los componentes de reacción a la temperatura de desnaturalización (por ejemplo, 95 °C) antes de la adición de la enzima polimerasa. Ya que se ha comprobado la existencia a temperatura ambiente de unión de un anticuerpo con la



enzima. Esta variante en la actualidad se usa polimerasas inactivadas a temperatura ambiente y que se activan instantáneamente a temperatura de elongación<sup>35</sup>.

PCR Multiplex. El propósito es amplificar varios objetivos en el mismo tubo. Ha tenido muchas aplicaciones y se suele utilizar para la genotipificación, donde se requiere el análisis simultáneo de múltiples marcadores, para la detección de patógenos o los organismos modificados genéticamente, o para los análisis de microsatélites. Ensayos multiplex son difíciles de establecer, por lo que vale la pena sólo para los análisis que se repetirán muchas veces, ya que al final, ahorran espacio, dinero y tiempo<sup>26, 36</sup>.

Existen muchas modificaciones de la PCR convencional, a partir del momento en que fue desarrollada por Kary Mullis, han surgido modificaciones a la técnica, por lo que las variantes mencionadas no son las únicas en existencia y hasta el momento hay mucha información sobre otros tipos de PCR que han utilizado y modificado la técnica, para fines de investigación<sup>17, 19, 26, 28, 29, 37</sup>.

## 2.9 Aplicaciones

PCR es una herramienta de manipulación y producción genética que ha facilitado la inclusión de la biología molecular en tantas áreas de investigación que ha logrado impulsar el conocimiento humano. En la actualidad, la PCR se aplica en diferentes áreas de las ciencias biológicas y de la salud, formando parte del quehacer científico de muchos laboratorios de investigación que la utilizan principalmente para expresión génica, genotipificación, detección de patógenos y análisis de mutaciones<sup>18</sup>. A continuación se discuten algunos ejemplos.

Biología Molecular. Para amplificar secuencias de DNA que luego son fácilmente clonadas y/o secuenciadas. Asimismo, para generar mutaciones aleatorias o dirigidas; identificar genes expresados de forma diferencial; rastrear rápida y eficientemente bibliotecas génicas; secuenciar mediante secuenciación cíclica; etc<sup>38</sup>.

Medicina. Ha permitido comprender la interacción de módulos de genes que coordinadamente realizan las funciones celulares integradas, como el mecanismo molecular de la expresión fenotípica del genotipo, también ha conducido al concepto de



diagnóstico personalizado, para correlacionarlo con el tratamiento adecuado para disminución de reacciones adversas (farmacogenómica), además resulta muy valiosa para el diagnóstico la posible existencia de enfermedades hereditarias en el embrión o adultos<sup>39</sup>. En el uso en pacientes con cáncer ha hecho posible detectar una molécula haciendo posible el diagnóstico con menor cantidad de materiales biológicos complejos<sup>40</sup>.

Virología. La técnica de PCR ha servido para la detección o cuantificación de virus en humanos infectados, además se han empleado para diferenciación de genotipos virales<sup>41</sup>.

Bacteriología y micología. La terapia con antibióticos y antifúngicos está basada en la identificación por tinciones y cultivos, la alta variabilidad en la identificación de patógenos en observación ha sido corregida por el uso de PCR especialmente en aquellos microorganismos difíciles de cultivar o de lento crecimiento, una detección más profunda del patógeno puede agilizar la prescripción de antibióticos apropiados<sup>42,43</sup>.

Parasitología. Las técnicas de biología molecular y particularmente PCR han sido utilizadas ampliamente para el diagnóstico de parásitos de interés médico, ya que permite una cuantificación precisa y un uso rutinario para el diagnóstico, facilitando el estudio de poblaciones parasitarias, aunque el uso para la malaria permanece limitado y a un alto precio<sup>44</sup>.

Ciencia forense. Permite la obtención de información exacta sobre el genotipo de una muestra, que constituye una gran parte de la evidencia física en la investigación criminal, a menudo siendo decisiva para el esclarecimiento del crimen<sup>45</sup>.

## 2.10 Polimorfismos genéticos

La variabilidad fenotípica de cada individuo, así como la susceptibilidad o la resistencia individual a distintas enfermedades radica principalmente en los SNP's, debido a que el genoma humano no es una estructura pasiva; al contrario, el ADN está expuesto a un sin número de alteraciones o modificaciones que son llevadas a cabo en uno o en pocos nucleótidos que pueden dar como resultado la aparición de enfermedades. Estos cambios pueden ser originados por errores en los mecanismos de replicación y reparación del ADN. Así, estos cambios pueden ser benéficos o mortales, los que se



conoce como polimorfismos, son considerados como tal cuando la frecuencia de uno de sus alelos en la población es superior al 1%. Hay varios tipos de polimorfismos, pero los más frecuentes son los SNP<sup>46,47</sup>.

El estudio de los polimorfismos, tienen gran aplicación en campos como la medicina forense y en el estudio de las enfermedades comunes como la HTA, síndrome metabólico, obesidad, diabetes mellitus tipo 2, asma y las enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso generalizado, artritis reumatoide (AR), entre otras, tienen un origen multifactorial, es decir, que para que se desarrollen se requiere de la participación e interacción de múltiples genes de baja penetración y factores ambientales encontrados en cada población. Se sabe que el componente genético y variantes comunes tipo SNP desempeñan un papel determinante en el desarrollo de estas patologías multifactoriales<sup>47</sup>. Su estudio ha servido de pauta para la creación de nuevas disciplinas como la ecogenética y la farmacogenética<sup>46</sup>.

Una manera de identificar los polimorfismos es aplicando PCR en tiempo real que es un método basado en la aplicación de la técnica de PCR convencional y en la creación de dos sondas alelo-específicas, las cuales emiten una señal fluorescente al unirse al templado. Además existen sondas prediseñadas para un sinnúmero de polimorfismos<sup>46</sup>.

## 2.11 El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)

El complejo mayor de histocompatibilidad posee muchas variaciones genéticas entre individuos, este polimorfismo es el causante del rechazo que puede presentarse durante de los trasplantes de tejidos. A este hallazgo se llegó cuando por primera vez se utilizaron técnicas de trasplante de tumores y de tejidos entre diferentes cepas de ratones identificando el primer complejo principal de histocompatibilidad llamado H-2, gracias al avance de nuevas tecnologías para la transfusión y trasplantes de tejidos en persona, fue posible descubrir la activación de anticuerpos contra linfocitos de los donantes y células de otras personas, produciendo el rechazo del trasplante de órganos<sup>48-50</sup>.

El CMH humano abarca 3,6 megabases de ADN en el brazo corto del cromosoma 6 donde se encuentran aproximadamente 224 genes Figura 10 , de los cuales 128 (57,1%)



fueron consideradas para ser expresados, y los productos de las proteínas de 51 (39,8%) de los genes expresados se conoce que se involucran directamente en el sistema inmune 51, 52 .

La región del MHC en el cromosoma 6 contiene numerosos genes polimórficos que desempeñan papeles importantes en el sistema inmunológico porque proporcionan protección contra patógenos y formación de tumores. Los primeros moléculas de CMH fueron descubiertos en la superficie de leucocitos y en humanos fue referido como el complejo de antígeno leucocitario humano (HLA). La familia de genes MHC se divide en tres subgrupos: MHC de clase I, II y III. El CMH de clase I (HLA-A , -B y -C ) y clase II ( HLA-DR , -DQ y -DP genes) codifican la superficie celular moléculas presentadoras de antígeno que se unen a péptidos cortos derivados de proteínas no propios y autónomos, incluyendo infecciones y autoantígenos. La presentación de estos péptidos HLA-anclado a los linfocitos T desencadena una cascada de respuestas en genes asociados al sistema inmune que conduce a la inmunidad adaptativa. CMH de clase III genes codifican diverso grupo de moléculas que realizan varias funciones inmunes en el cuerpo, tales como proteínas del complemento implicadas en la respuesta de anticuerpos y citoquinas inflamatorias 48, 51, 52 .

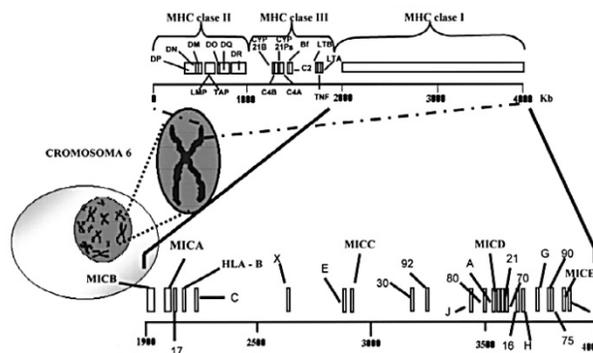


Figura 10. Localización genómica de los genes MIC con respecto a los genes MHC clase I. Tomado de Rabinovich<sup>54</sup>.



## 2.11.1 Tipos de moléculas de CMH

Clase I (CMH-I). Presentan antígenos peptídicos derivados de los patógenos que se replican dentro de la célula (p. ej. los de origen viral, bacteriano o tumoral cuyas proteínas se encuentran en el citosol de la célula infectada), que son mostrados a las células Tc-CD8+ (citotóxicas), cuya función es destruir estas células y que se caracterizan por la presencia de la glucoproteína CD8 en su superficie. Las moléculas de CMH clase I están presente en la mayoría de las células nucleadas por su facilidad para infectarse por virus <sup>48, 50, 52</sup>.

Clase I clásicas: se encuentran HLA -A, -B, -C, -DR, -DQ y -DP son probablemente el más conocido de todos los genes de CMH, dada sus respectivas funciones en el transporte de péptidos y presentación antígeno específico a las células T CD8+ y CD4+. Dichos genes se caracterizan por su extraordinario polimorfismo, que se manifiesta en la considerable variación en las frecuencias de alelos y haplotipos individuales (combinaciones de alelos en desequilibrio de ligamiento), tanto dentro como entre las diferentes poblaciones o grupos étnicos <sup>48, 50, 52</sup>.

Clase I no clásicas: se encuentran HLA E, -F, -G y los 7 genes MIC o PERB11, de los cuales sólo MICA y MICB codifican transcripciones (estos genes son altamente polimórficos), mientras MICC, MICD, MICE, MICE y GICM son pseudogenes <sup>50, 52, 53</sup>.

Clase II (CMH-II). Presentan antígenos peptídicos obtenidos de los patógenos y sus productos y que son sintetizados extracelularmente y son capturados por las células fagocíticas. Estas moléculas de clase II presentan péptidos a los linfocitos T helper que se caracterizan por la presencia de glucoproteína CD4 en su superficie y se especializan en la captación y procesamiento de patógenos, por ende dirigen la activación de macrófagos o células B <sup>50, 52</sup>.

### Estructura del CMH Clase I y II

CMH-Clase I: Molécula constituida por una cadena polipeptídica  $\alpha$ , con tres plegamientos o dominios ( $\alpha$ : 1, 2 y 3) y la subunidad  $\beta$ 2microglobulina que se asocian de manera no covalentemente. En la hendidura que se forma entre  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2, se aloja el péptido



antigénico que va a presentar<sup>50, 52</sup>.

CMH-Clase II: Está integrada por dos cadenas polipeptídicas:  $\alpha$  y  $\beta$ , ambas con dos dominios. El sitio de unión del péptido antigénico que presenta, se localiza entre  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ <sup>48, 50, 52</sup>.

### 2.11.2 Gen MICA

En 1994, se descubrió un grupo de genes relacionado con los genes MHC de clase I llamado MIC (MHC class I chain-related genes) o PERB11 (Perth bloque beta transcripción 11). Se ha encontrado que un miembro de esta familia, MICA, es el gen de clase I no clásica mas polimórfico.

Características del Gen MICA:

- Se encuentra al final de la región centromérica aproximadamente 46,4 Kb de HLA-B, presentado alrededor de 65 alelos para MICA identificados hasta el momento<sup>53, 54</sup>.
- MICA (11,7 Kb) se transcribe en un ARNm de 1382 pb, dando lugar a un polipéptido de 383 aminoácidos y aproximadamente una masa molecular de 65 kDa<sup>52, 54</sup>.
- Su estructura es similar a las de moléculas clase I clásica (Ver figura 11), se compone de tres dominios extracelulares,  $\alpha 1$  (codificados por el exón 2),  $\alpha 2$  (codificada por el exón 3) y  $\alpha 3$  (codificado por el exón 4), un segmento transmembrana (codificada por el exón 5) y una cola carboxil terminal citoplasmática (codificado por el exón 6) figura 11<sup>53, 54</sup>.
- Los exones 2-4 que codifica los tres dominios extracelulares de la molécula, presentan numerosos polimorfismos, principalmente resultantes en un sólo aminoácido sustituciones que generan posiciones dimórficos, de los cuales muchos son cambios no conservativos<sup>52</sup>.
- MICA no es evidentemente una molécula presentadora de antígeno peptídico<sup>53</sup>.
- Se ha observado que otros mamíferos como chimpancé, cebra, cerdo, vaca, perro y hámster, estos poseen un gen homólogo a MICA.



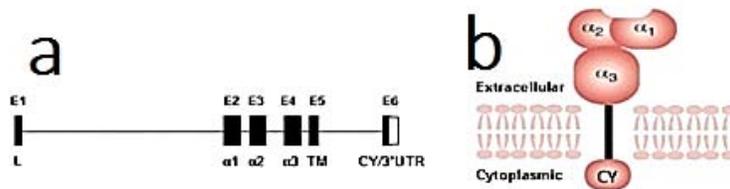


Figura 11. (a) la organización exón-intrón del MICA. (b) la estructura de proteínas esquemática de MICA. E, el exón; L, secuencia líder;  $\alpha 1$ - $\alpha 3$ , dominio externo; TM, dominio transmembranal; 3'UTR, región 3 'sin traducir; CY, cola citoplasmática. Tomado de Chen D<sup>51</sup>.

<http://carcin.oxfordjournals.org.pbi.unam.mx:8080/content/35/12/2633/F1.expansion.html>  
<http://carcin.oxfordjournals.org.pbi.unam.mx:8080/content/35/12/2633/F1.expansion.html>

- El polimorfismo MICA está asociado con un número de enfermedades relacionadas con la actividad células NK, tales como la infección viral, el cáncer y el rechazo de aloinjerto (renales y pancreáticos con evidencia tanto de rechazo agudo y crónico)<sup>53, 54</sup>.
- Las proteínas MICA pueden afectar la supervivencia de los trasplantes de riñón, corazón o pulmón a través de la activación del sistema del complemento debido a que los anticuerpos anti-MICA pueden matar a las células en presencia de complemento<sup>53, 54</sup>.
- Diferentes afinidades de los alelos de MICA para NKG2D pueden afectar umbrales de activación de las células NK y la modulación de células T<sup>51</sup>.
- A diferencia de la clase I moléculas clásica, MICA no se une a  $\beta 2$ -microglobulina. En lugar de ello, codifica una proteína unida a la membrana que actúa como un ligando para estimular un receptor de activación, NKG2D, expresada en la superficie de esencialmente células (NK),  $\gamma \delta$  T y CD8 + células T  $\alpha \beta$ ; las células NK se sabe que juegan un papel crucial en el tumor y la vigilancia del virus, la hematopoyesis y inmunoregulación<sup>51, 53, 54</sup>.
- Se expresa constitutivamente en niveles bajos en las células epiteliales en el intestino y el timo, células endoteliales, fibroblastos y monocitos<sup>51</sup>. Una alta expresión en condiciones de estrés, tales como durante las infecciones virales y bacterianas, de choque térmico, de respuesta de daño en el DNA, la transformación oncogénica y en condiciones autoinmunes. MICA sirve como señal de estrés



celular, y el compromiso de NKG2D por MICA activa las células NK, y coestimula algunas células  $\gamma\delta$  T y específicos de antígeno CD8 + células T  $\alpha\beta$ , resultando en una gama de funciones efectoras inmunes, tales como la citotoxicidad y la producción de citoquinas <sup>53</sup>.

- El reconocimiento de la molécula de MICA por el receptor NKG2D permite a las células inmunes identificar y atacar células infectadas o transformadas sin la necesidad de la expresión de MHC de clase I o de reconocimiento de antígeno. Por lo tanto, la interacción MICA / NKG2D es un mecanismo eficaz para inmunovigilancia (figura 12). Sin embargo, las células tumorales han desarrollado mecanismos para minimizar o evitar la respuesta mediada por NKG2D por la presencia de MICA en la superficie celular <sup>51, 54</sup>.
- Los primeros estudios realizados al gen MICA en humanos fue la asociación a enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide, enfermedad celíaca y la diabetes tipo 1. Además se ha encontrado también relación con la enfermedad de Behçet, enfermedad de Crohn, espondilitis anquilosante, progresión de la hepatitis C crónica para HCC, riesgo de cáncer de mama, carcinoma nasofaríngeo, artritis psoriásica, cáncer gástrico, melanomas, Enfermedad de Addison, la enfermedad de Kawasaki, etc <sup>51-54</sup>.

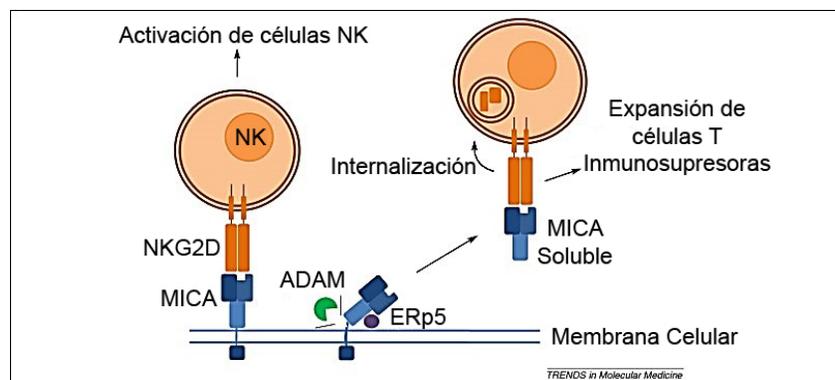


Figura 12. Mecanismo de expresión MICA. MICA, el ligando de células NK son los receptores NKG2D, este forma un complejo con un disulfuroisomerasa, ERP5, para inducir un cambio conformacional que permite la escisión proteolítica de MICA por proteasas ADAM. El MICA entonces interactúa con NKG2D, que, a su vez, induce la internalización y degradación del receptor y estimula la expansión de la población de células T inmunosupresoras. Mun-Kit C <sup>53</sup>. <http://www.sciencedirect.com/bsdi.unam.mx:8080/science/article/pii/S147149141000080>.



### 3. Problema de investigación.

Actualmente se dispone de nuevas técnicas de investigación de biología molecular, muy reproducibles, sensibles, específicas y rápidas, que nos aportan datos sumamente confiables y que permiten explorar los procesos más intrincados que se dan en las células vivas, de tal forma que han dado lugar a aplicaciones prácticas muy importantes en los campos de la medicina, la farmacia, la genética y otros relacionados, por ejemplo las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa y retrotranscripción (PCR y RT-PCR).

Específicamente la técnica de PCR es una herramienta de manipulación y producción genética de gran importancia que ha facilitado la inclusión de la tecnología de biología molecular en muchas áreas de investigación como en la medicina para detección de diagnósticos y la farmacia para evaluación de tratamiento farmacológico, en microbiología para la detección, análisis de mutaciones y cuantificación de virus, bacterias, hongos y parásitos de importancia clínica, en la ciencia forense para la detección de muestras genómicas a través de fluidos biológicos u objetos que hayan tenido contacto con el individuo, entre otras aplicaciones.

Con base en lo anterior y considerando que las actividades del laboratorio de BCT I se encuentran en proceso de actualización se propone la incorporación de la técnica de PCR en su manual de prácticas, considerando las condiciones y recursos del laboratorio. Lo anterior permitirá que los alumnos adquieran los conocimientos teóricos y prácticos para realizar la técnica y analizarla a través del análisis fotográfico del gel de agarosa para poder identificar los problemas técnicos que se presenten y plantear soluciones. De esta manera se promoverá la noción de la utilidad de la técnica para su posterior uso en su vida profesional.

La actualización de este material es de gran importancia ya que el estudiante se mantendrá a la vanguardia en las técnicas de biología molecular que se están aplicando en escenarios reales y le proporcionará fundamentos y bases para que se enfrente de una manera más hábil a las materias siguientes en el plan de estudio y en el área terminal que elijan. También se fortalecerán las habilidades técnicas de los alumnos lo que les permitirá contar con mejores herramientas para su futuro desempeño laboral y profesional.



## 4. Objetivo general.

Incorporar la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en la actualización del manual de Bioquímica Celular y de los Tejidos I, , con la finalidad de que los alumnos además de revisar el fundamento y la aplicación de la misma, aprendan a realizar la técnica, respetando la forma en la que se trabaja y adecuándolo a las condiciones del laboratorio, como por ejemplo el número de alumnos, equipos e instrumentos, material, reactivos, tiempo de las sesiones de laboratorio.

### 4.1 Objetivos particulares

- ❖ Obtener muestras de ADN a partir de sangre humana, utilizando el Kit comercial "WizardGenomic DNA Purification" para utilizarlo como ADN molde en la técnica de PCR.
- ❖ Cuantificar la concentración y pureza del ADN recolectado en el laboratorio de BCT I por el método espectrofotométrico usando el equipo BioPhotometry, para utilizarlo como ADN molde en la técnica de PCR.
- ❖ Establecer las condiciones de concentración y cantidad de Buffer ( $MgCl_2$ ), dNTP's, Primers, ADN Polimerasa y ADN molde para realizar la técnica de PCR de acuerdo a los recursos del laboratorio de BCT I.
- ❖ Establecer las condiciones de temperatura y tiempo para las etapas de desnaturalización, alineación y extensión para programar el Termociclador (MASTERCYCLER PERSONAL) y así amplificar el Gen  $\beta$ -Actina humana como gen de referencia y exón 2 y 3 de gen MICA.
- ❖ Analizar la amplificación del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y analizar las bandas obtenidas.
- ❖ Probar la técnica estandarizada de PCR con los alumnos del laboratorio de BCT I.
- ❖ Redactar la práctica de la técnica de PCR de manera legible para los alumnos de BCT I para anexarla al manual de BCT I.



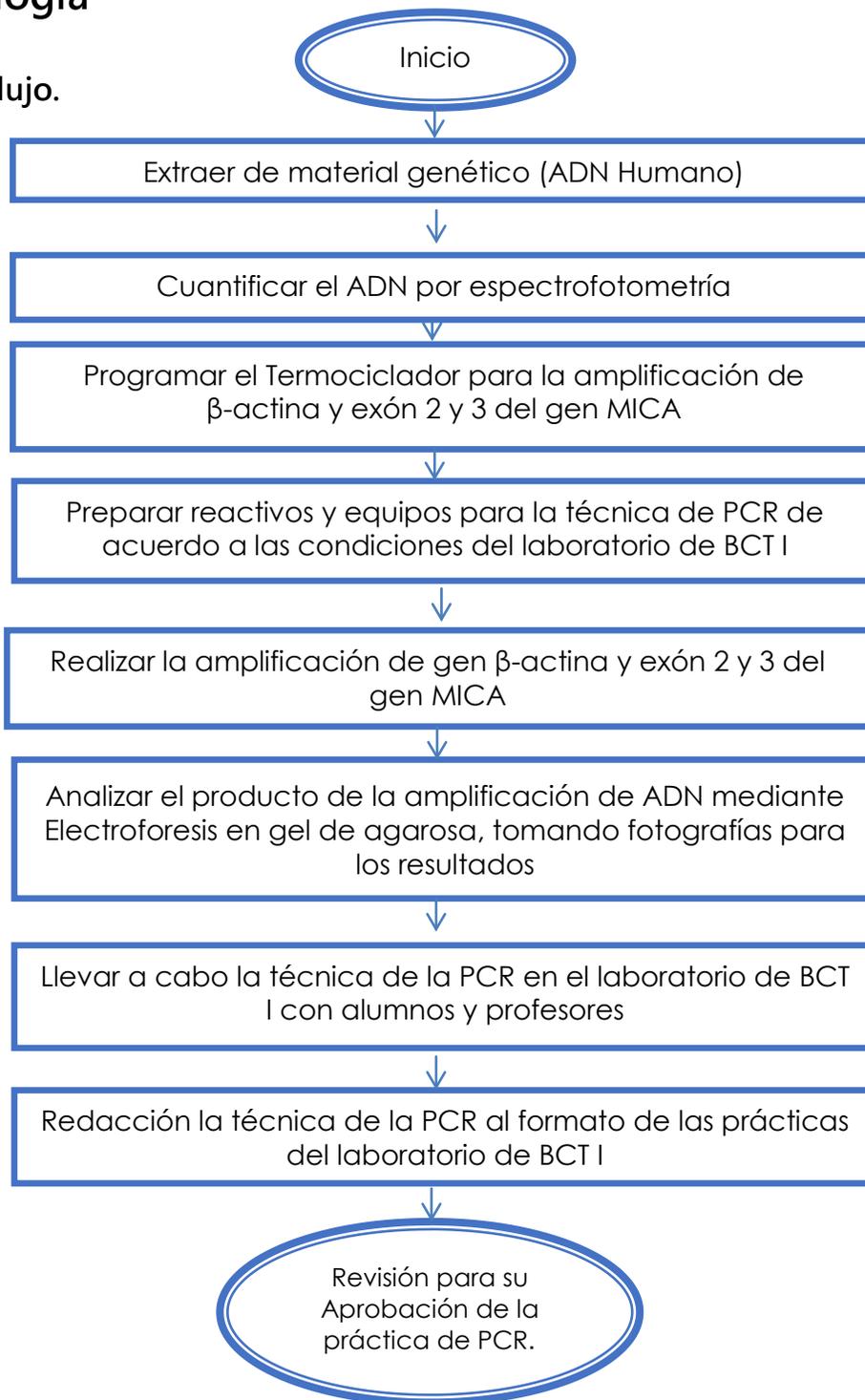
## 5. Hipótesis

PCR es una técnica in vitro que permite la amplificación y el copiado masivo de un fragmento específico de ADN con diversas aplicaciones. Al estandarizarla técnica de PCR de acuerdo a las condiciones y recursos del laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (BCT I), ésta técnica podrá ser incluida dentro del manual de BCT I como parte de la actualización de sus actividades. Por lo anterior, la práctica podrá ser ejecutada por los alumnos y así, adquieran los conocimientos y destrezas necesarias acerca de esta técnica para ser aplicados en los semestres posteriores y en su vida profesional.



## 6. Metodología

Diagrama de flujo.



## Extracción del ADN genómico utilizando el Kit Wizard de Promega®.

- Extraer sangre venosa con tubo Vacutainer que contenga EDTA como anticoagulante.
- Utilizar un volumen de 3mL de la sangre previamente mezclada y añadirla a un tubo de 15mL que contiene 9mL de solución de *Cell Lysis®* y mezclar 6 veces.
- Incubar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente (invertir de 2-3 veces durante la incubación) para lisar los eritrocitos y centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos.
- Retirar el sobrenadante sin alterar el sedimento visible blanco. Añadir un 1mL adicional de solución de *Cell Lysis®*. Mezclar y centrifugar como el paso anterior.
- Retirar el sobrenadante y agitar el tubo vigorosamente hasta que las células blancas de la sangre se vuelven a suspender.
- Agregar 3mL de solución de *Nuclei Lysis®* al tubo que contiene las células resuspendidas. Mezclar para lisar las células blancas.
- Añadir 1mL de la solución de *Protein Precipitation®* al lisado nuclear y agitar durante 10 a 20 segundos. Centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos. Al terminar se observara un botón de proteínas color marrón oscuro.
- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 15mL que contiene 3mL de Isopropanol.
- Centrifugar a 3500 rpm durante 1 minuto. El ADN será visible como un pequeño precipitado blanco.
- Decantar el sobrenadante, y añadir 3mL de etanol al 70% y centrifugar como en el paso anterior.
- Aspirar cuidadosamente el etanol utilizando una pipeta Pasteur y dejar secar al aire durante 10 minutos.
- Añadir 250µL de la solución de *Rhehydrataion®* de ADN al tubo. Almacenar el ADN a 2-8 °C hasta su uso



## Cuantificación y pureza del ADN Humano

- Mezclar la muestra de ADN y realizar una dilución 1:20 de la muestra concentrada con agua Milli Q en un volumen final de 100µL
- Encender el equipo BioPhotometer y seleccionar la función No. 7 que permite la medición de la concentración de ADN y de su pureza.
- Utilizar como blanco 50µL de agua Milli Q en una celda de plástico para ajustar el equipo, presionando el botón "blank" (observar cero en la pantalla digital).
- Después de ajustar con el blanco, mezclar y colocar 50µL de la muestra en la celda, oprimir el botón "Sample" y anotar los datos que se obtienen: concentración, absorbancia a 260nm y el cociente de la relación de las absorbancias 260/280.



## Electroforesis para verificar la presencia de amplicones.

Técnica para la electroforesis en gel de agarosa

- ❖ Preparar la agarosa al 1% en amortiguador TBE 0.5 % en un matraz y calentar la solución para disolver por completo la agarosa, hasta que se observe transparente.
- ❖ Enfriar un poco la solución y adicionar 8  $\mu$ L de Midori Green (reactivo empleado para darle fluorescencia a las muestras con la exposición de luz UV) y homogeneizar.
- ❖ Verter en el soporte del gel y colocar los peines para formar los pozos en número y tamaño deseado. Dejar que solidifique el agar por 30min.
- ❖ Una vez solidificado retirar los peines. Colocar el agar dentro de la cámara y adicionar TBE 0.5% hasta cubrir por completo el gel.
- ❖ Colocar en el primer pozo 5 $\mu$ L de marcador de peso molecular y a partir del pozo dos colocar 5 $\mu$ L de las muestras amplificadas, mezclando con 5 $\mu$ L de buffer de carga para cada muestra.
- ❖ Conectar los electrodos de la cámara a la fuente de poder, seleccionar el voltaje de 85 Voltios y correr la electroforesis durante 1 hora y 10 minutos.
- ❖ Observar la presencia de bandas separadas en el Transiluminador.
- ❖ Tomar las fotografías necesarias para analizar las bandas.



## 7. Resultados

### Extracción Purificación de ADN Humano

Se realizó la extracción y purificación de ADN con el protocolo del Laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I, usando el Kit Wizard de Promega®, donde se obtuvo una buena cantidad de ADN (ver Tabla 1). La extracción se realizó con los alumnos del Semestre 2015-2 de la asignatura de BCT I en el horario de Laboratorio.

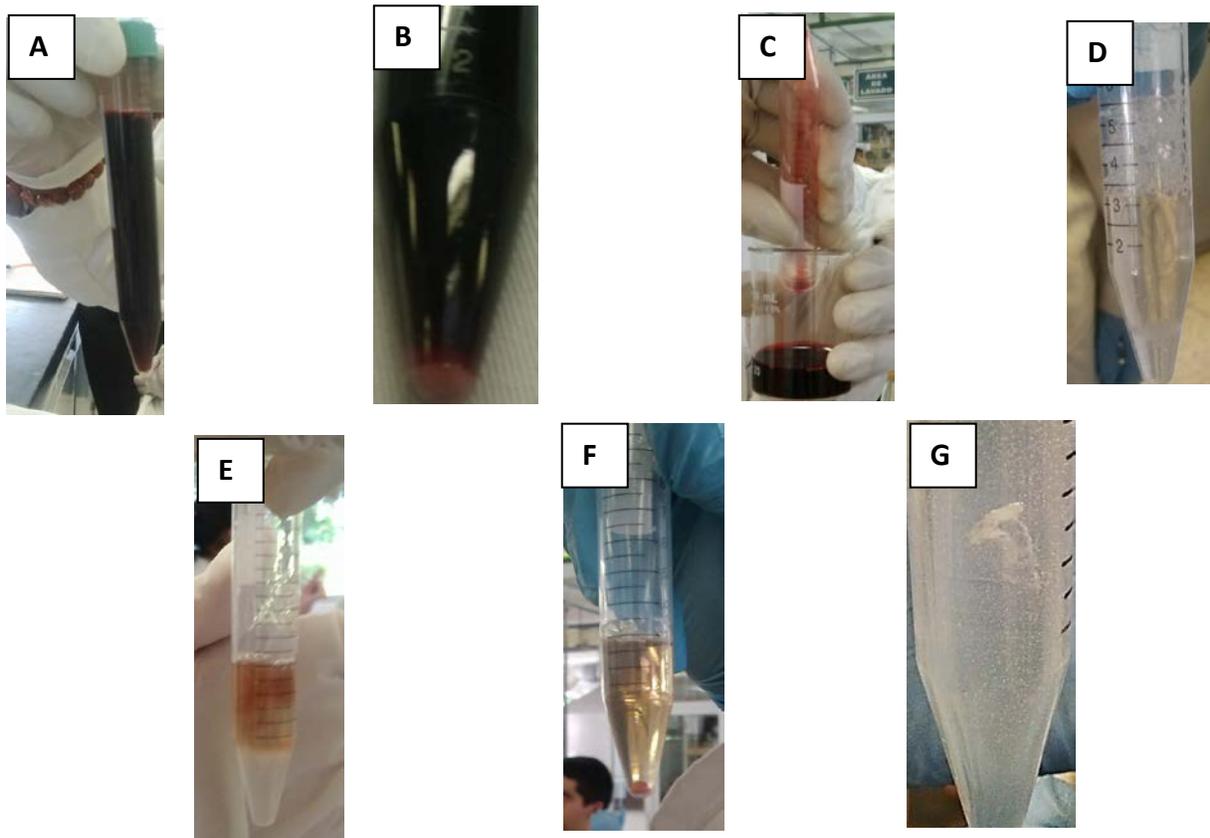


Figura 13. A) Lisis de eritrocitos con solución lisis celular. B) Sobrenadante con el botón de células Blancas. C) Sedimento de células blancas. D) Solución lisis de núcleos a las células blancas. E) Solución de precipitación de proteínas. F) Precipitación de proteínas (color marrón). G) Hebras de ADN color blanco en Isopropanol.



## Cuantificación y purificación de ADN Humano

El ADN recolectado en el laboratorio se cuantificó en el Biofotómetro, obteniendo la concentración a 260nm y la pureza utilizando la relación 260/280 de cada una de las muestras de ADN extraídas (se utilizó una dilución 1:20), ver Tabla 1.

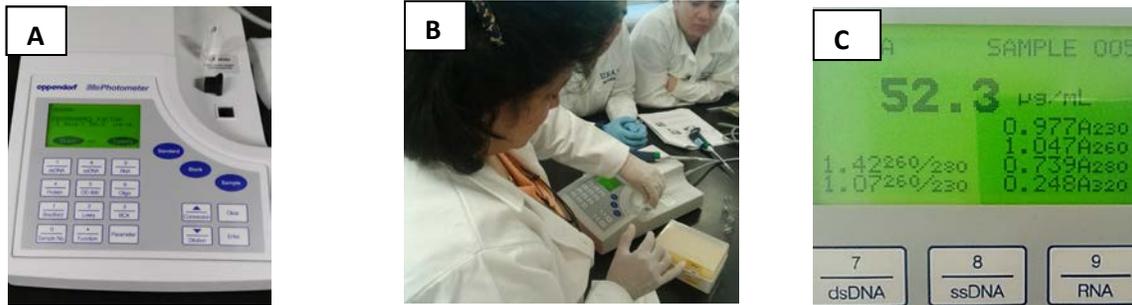


Figura 14. A) Equipo Biofotómetro. B) Cuantificación del ADN genómico dilución 1:20 en el Equipo Biofotómetro. C) Lectura de las absorbancias 260, 280 y la relación 260/280.

## Electroforesis de ADN genómico dilución 1:20

Resultado de la electroforesis de ADN genómico en gel de agarosa al 0.7%: para analizar la pureza y el tamaño del ADN genómico extraído, se observa que las muestras 1 a 9 presentan una buena señal, la muestra 10 presentó una señal débil, en las diez muestras seleccionadas se detectaron bandas mayores a 10,000 pares de bases. Figura 15.

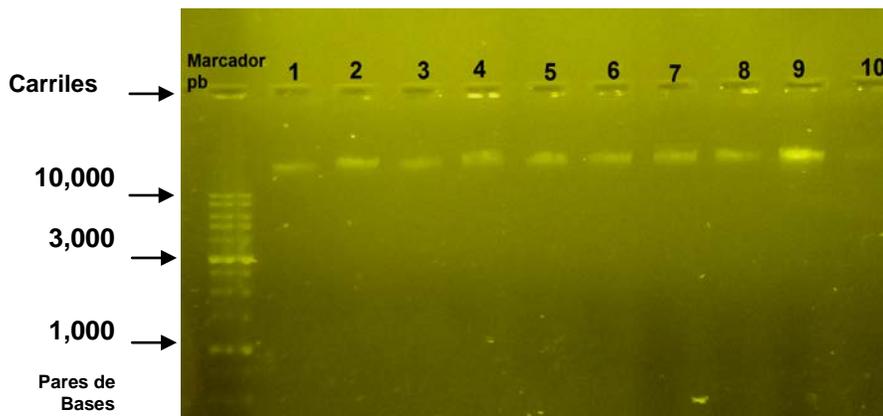


Figura 15. Gel de agarosa al 0.7%, corrido durante una hora y 20 minutos (muestra con dilución 1:20)



Tabla 1 Resultados de la cuantificación y pureza de las muestra de ADN dilución 1:20 usadas como plantilla en la mezcla de reacción de PCR.

Muestra	µg/mL dln 1:20	µg/mL	260	260/280
1	54.9	1098	1.498	1.72
2	43.6	872	0.872	1.85
3	52.3	1046	1.047	1.81
4	41.8	836	0.837	1.83
5	32.2	644	0.644	1.64
6	36.8	736	0.735	1.83
7	34.0	680	0.821	1.69
8	46.0	920	1.278	1.57
9	30.4	608	0.607	1.50
10	31.2	624	0.550	1.54

## Estandarización de la técnica de PCR

- Se eligieron las muestras con una concentración entre 600 y 1100 µg/mL y cuya relación de pureza 260/280 estuviera entre 1.5-2.0.
- Los iniciadores específicos para el gen  $\beta$ -actina humana fueron adquiridos de acuerdo a lo reportado de la base de datos PubMed – NCBI<sup>57</sup> (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencia de los primers para  $\beta$ -actina humana.

Primer	Longitud	Secuencia	Tm °C	% G + C
$\beta$ -actina 5' Sen	20	5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3'	53.1	50
$\beta$ -actina 3' Anti	20	5'-GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG-3'	52.1	50



Tabla 3. Condiciones de concentración y cantidad para la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) ajustadas para un volumen de 25  $\mu\text{L}$  por tubo para amplificar  $\beta$ -actina humana.

Reactivo	$\mu\text{L}$ por tubo	Concentración final
5X Buffer/ $\text{MgCl}_2$	5	1.5 mM $\text{MgCl}_2$
dNTP's (2mM)	2.5	0,2 mM de cada dNTP
Primer Sen	0.5	25 pmol/ $\mu\text{L}$
Primer Anti	0.5	25 pmol/ $\mu\text{L}$
Agua Milli Q cbp	13.85	
Gotaq polimerasa 5U/ $\mu\text{L}$	0.15	0.75 U(0.03 U/ $\mu\text{L}$ )
ADN	2.5	1-3 $\mu\text{g}/25\mu\text{L}$
Total	25	

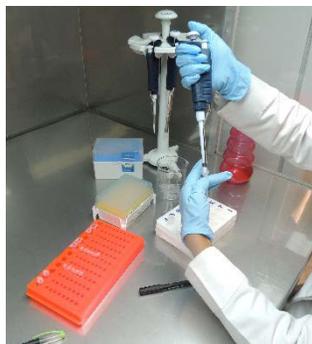
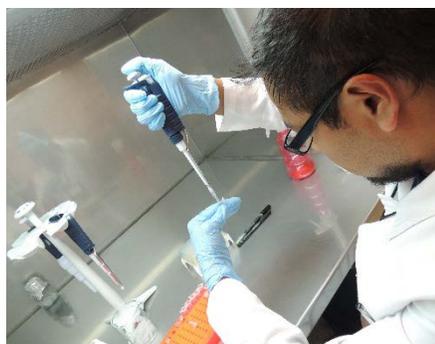


Figura 16. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR.



Tabla 4. Programación del termociclador (MASTERCYCLER PERSONAL) para el gen  $\beta$ -actina humana.

Paso	Temperatura °C	Tiempo
1( Desnaturalización)	95	4 min
2 (Desnaturalización)	95	30 s
3 (Alineamiento)	53	50s
4 (Duplicación)	72	30s
5	Repetir pasos 2-4, 32 veces	
6 (Extensión)	72	8 min
7	15	Por siempre



Figura 17. Programación del Termociclador y colocación de las muestras.

Tabla 5. Condiciones para la electroforesis en gel de agarosa para la separación de los fragmentos amplificados.

Parámetro	Condición
Voltaje	85 Volts
Tiempo	1 hora con 20 minutos
Midori Green	5 $\mu$ L



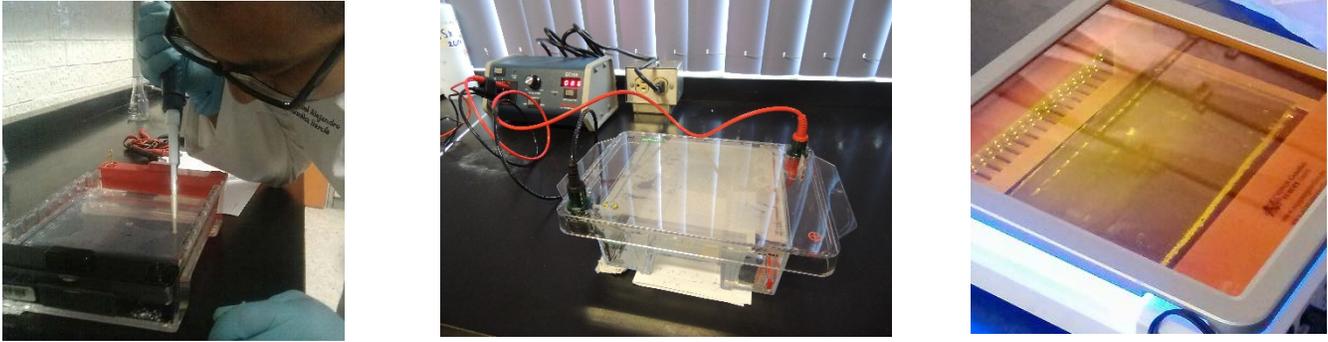


Figura 18. Electroforesis de los fragmentos amplificados.

Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras amplificadas del gen  $\beta$ -actina humana, se observan bandas entre 200 y 300 pb con una señal débil que corresponden a la  $\beta$ -actina usando un marcado de 100 a 3000pb.

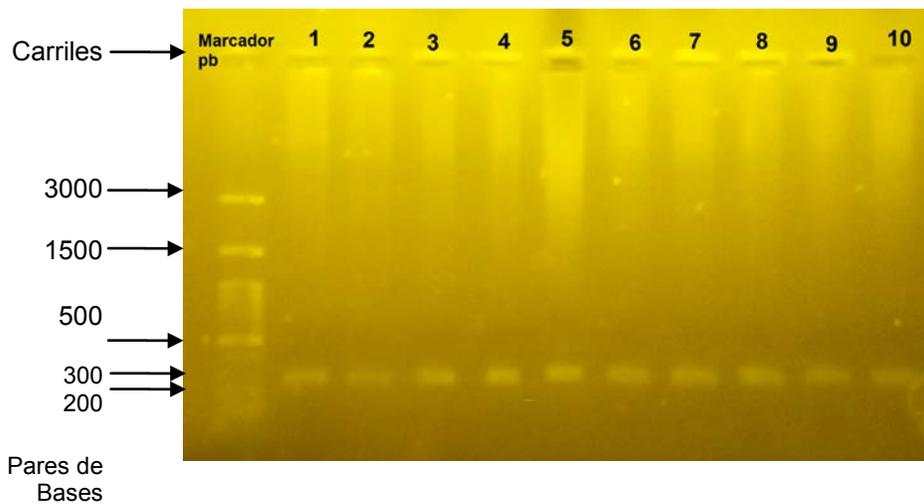


Figura 19. Gel de agarosa al 1% corrido durante una hora y 20 minutos a 85 Volts.

## Amplificación de gen $\beta$ -actina

- Se realizó la amplificación del gen  $\beta$ -actina humana en el curso de actualización de profesores de la carrera de Q.F.B, con las condiciones para la técnica de PCR previamente establecidas (Tabla 3).





Figura 20. Preparación de la mezcla de reacción en el curso Aspectos Experimentales de Biología Molecular III para profesores y alumnos.

- Se realizó la programación del termociclador (MASTERCYCLER PERSONAL) con las temperaturas que se encuentran en la tabla 4, con una temperatura de alineación de 53 °C que corresponde al gen  $\beta$ -actina humana.

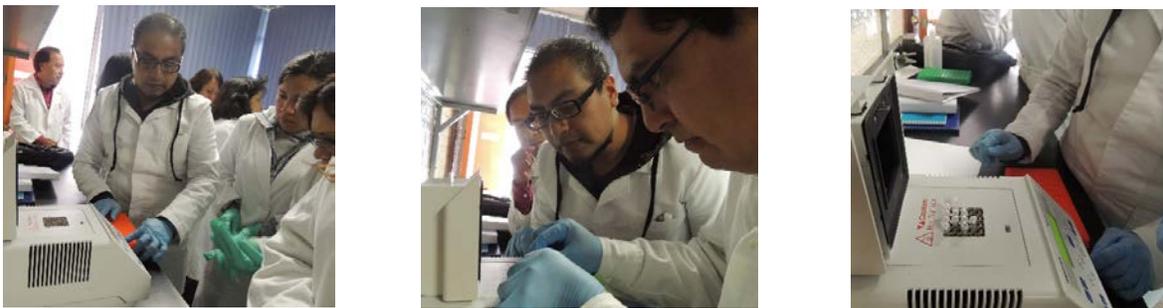


Figura 21. Explicación del Uso y manejo del termociclador para llevar a cabo la técnica de la PCR.

- Se realizó la electroforesis de los productos amplificados en gel de agarosa al 1% para verificar si la amplificación se llevó adecuadamente.

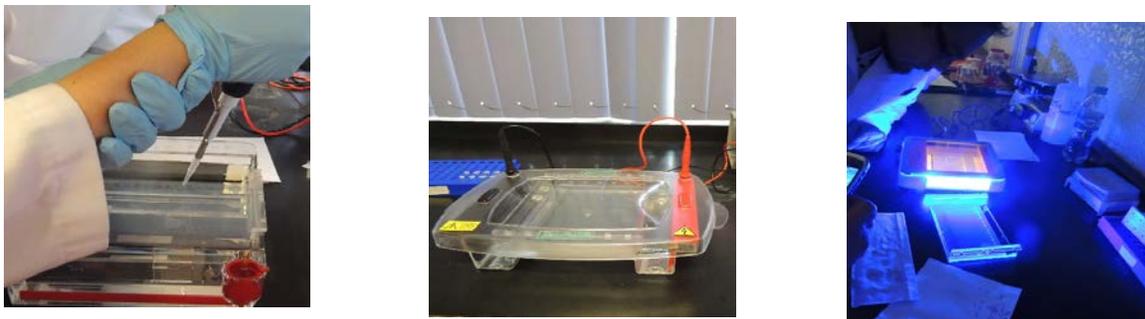


Figura 22. Electroforesis de los amplicones de  $\beta$ -actina. A) carga de muestra, B) cámara de electroforesis con gel de agarosa, C) observación del gel de agarosa con el Transiluminador para observar las bandas obtenidas.



Resultados de las bandas obtenidas en las electroforesis en gel de agarosa al 1%, las muestras amplificadas del gen  $\beta$ -actina humana, se observan bandas con una señal débil, excepto en las muestras 2 y 6 (Figura 23), mientras que en la figura 24 se notan impurezas en la muestra y que el tiempo de corrimiento no fue el adecuado debido a que fue mayor a 1h 20 min.

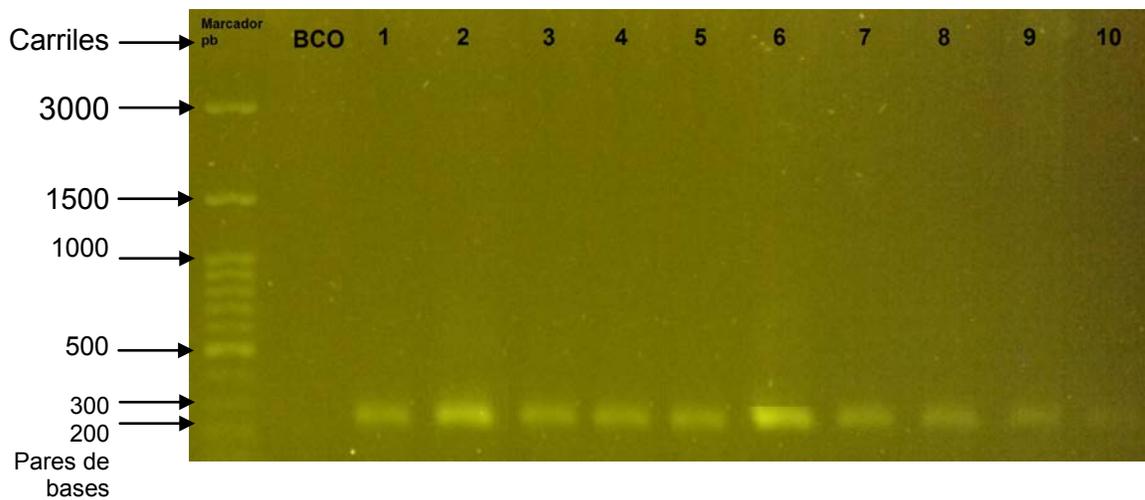


Figura 23. Fragmentos amplificados del gen  $\beta$ -actina observados en gel de agarosa al 1% corrido durante una hora y 20 minutos a 85Volts, donde se observan bandas de 200-300 pb.

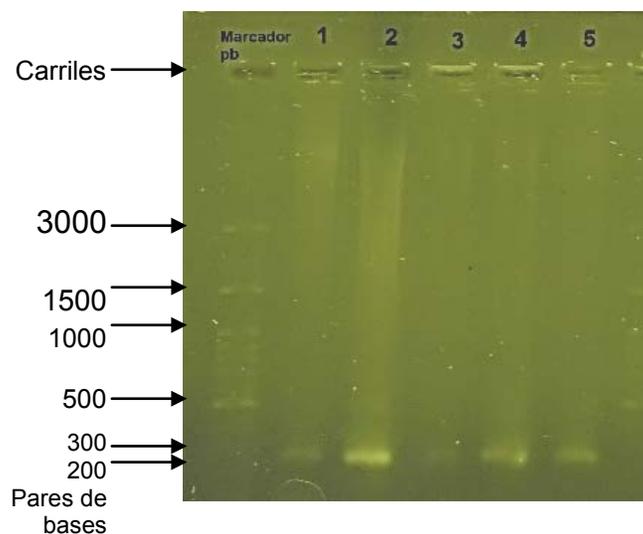


Figura 24. Fragmentos amplificados del gen  $\beta$ -actina observados en gel de agarosa al 1% corrido durante una hora y 35 minutos a 85Volts, donde se observan bandas de 200-300 pb.



Con los resultados obtenidos durante el curso de profesores y alumnos se decidió emplear una concentración mayor para los primers, dejando la concentración de los otros reactivos igual (Tabla 6), y se realizó la electroforesis para observar la separación de los productos amplificados.

Tabla 6. Condiciones para amplificar el gen  $\beta$ -actina humana modificando la concentración de Primers.

Reactivo	$\mu\text{L}$ por tubo	Concentración final
5X Buffer/ $\text{MgCl}_2$	5	1.5 mM $\text{MgCl}_2$ .
dNTP's (10 mM)	0.5	0,2 mM de cada dNTP
Primer Sen	0.5	120-180 pmol/ $\mu\text{L}$
Primer Anti	0.5	120-180 pmol/ $\mu\text{L}$
Agua Milli Q cbp	15.85	
Gotaq polimerasa 5U/ $\mu\text{L}$	0.15	0.75 U(0.03 U/ $\mu\text{L}$ )
ADN	2.5	1-3 $\mu\text{g}/25\mu\text{L}$
Total	25	

Con las pruebas realizadas se decidió establecer nuevas condiciones para la electroforesis en gel de agarosa.

Tabla 8. Condiciones para la electroforesis en gel de agarosa para la separación de los fragmentos amplificados.

Parámetro	Condición
Voltaje	85 Volts
Tiempo	1 hora
Midori Green	8 $\mu\text{L}$



Resultado de la amplificación de gen  $\beta$ -actina en gel de agarosa al 1%, en donde se mantuvo el voltaje de 85 Volts y se disminuyó el tiempo de corrimiento a una hora, además se aumentó la concentración de los primers, se observaron bandas con buena señal que se encuentran entre 200 y 300 pb correspondientes al gen  $\beta$ -actina humana, se utilizó un marcador de 100 a 3000pb.

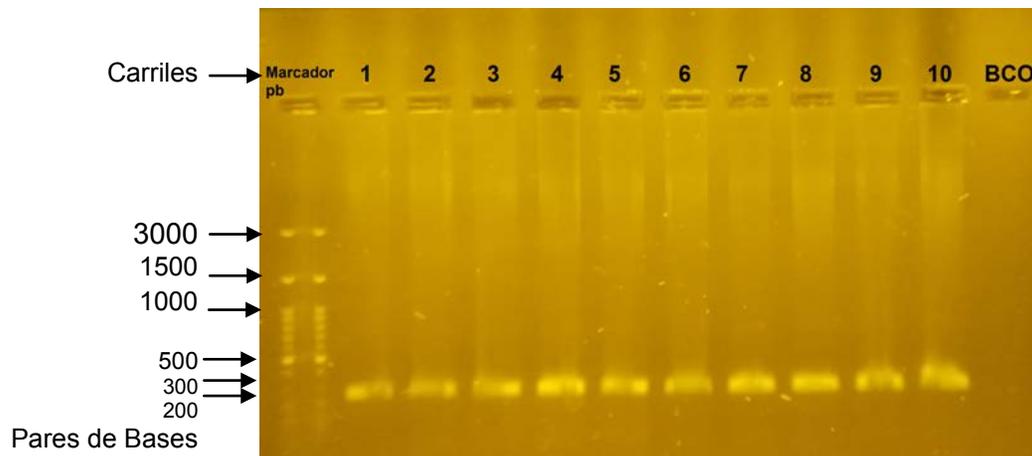


Figura 25. Amplificación de gen  $\beta$ -actina humana, en gel de agarosa al 1% usando un marcado de 100 a 3000pb.

### Amplificación del exón 2 y 3 del gen MICA.

- La localización de los iniciadores se obtuvo con base a la secuencia del cADN de MICA reportado por Bahram *et al.* Bajo el número de acceso X92841<sup>58</sup>.
- Los primers seleccionados fueron de 24 nucleótidos.

Tabla 8. Secuencia de los primers para exón 2 y 3 del gen MICA

Primer	Longitud	Secuencia	Tm °C	% G + C
MICA 5'EX2 sen	24	5'-TCTTGTCCCTTTGCCCGTGTGCAT-3'	75	54
MICA 3'EX2 anti	24	5'-CCCCATTCTCACCCCCAGCCTG-3'	80	70
MICA 5'EX3 sen	24	5'-TGGGGGAGGGCCAGGGAGGCGTAC-3'	73	75
MICA 3'EX3 anti	24	5'-CGATGTGCCAACAGGAAATGCCTT-3'	81	50



Tabla 9. Condiciones para la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) ajustadas para un volumen de 25  $\mu\text{L}$  por tubo para amplificar exón 2 y 3 del gen MICA.

Reactivo	$\mu\text{L}$ por tubo	Concentración final
5X Buffer/MgCl <sub>2</sub>	5	1.5 mM MgCl <sub>2</sub> .
dNTP's (10 mM)	0.5	0,2 mM de cada dNTP
Primer Sen	0.5	190-250 pmol/ $\mu\text{L}$
Primer Anti	0.5	190-250 pmol/ $\mu\text{L}$ .
Agua Milli Q cbp	15.85	
Gotaq polimerasa 5U/ $\mu\text{L}$	0.15	0.75 U(0.03 U/ $\mu\text{L}$ )
ADN	2.5	1-3 $\mu\text{g}/25\mu\text{L}$ .
Total	25	

Tabla 10. Condiciones de amplificación para la programación del termociclador (MASTERCYCLER PERSONAL) para amplificar exón 2 y 3 del gen MICA.

Paso	Temperatura °C	Tiempo
1( Desnaturalización)	95	4 min
2 (Desnaturalización)	95	30 s
3 (Alineamiento)	65	50s
4 (Duplicación)	72	30s
5	Repetir pasos 2-4, 32 veces	
6 (Extensión)	72	8 min
7	15	Por siempre



Resultado de la amplificación del exón 2 del gen MICA en gel de agarosa al 1% corrido durante una hora a 85 Volts, se observan bandas de 500pb en las muestras 3 a 10 (Figura 26).

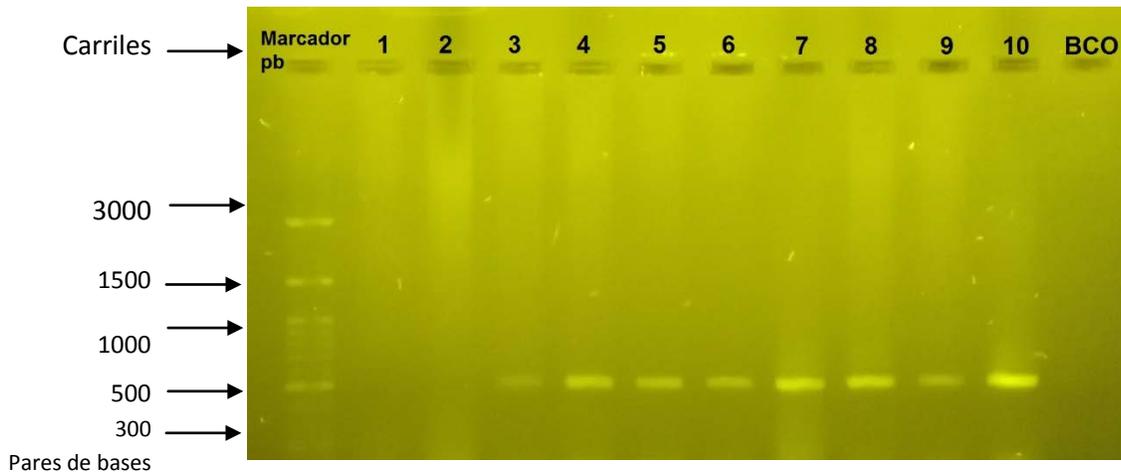


Figura 26. Bandas de 500pb que corresponden a los exón 2. Muestras 3 a 10

Resultado de la amplificación del exón 3 del gen MICA en gel de agarosa al 1% corrido durante una hora a 85 Volts, donde se observan bandas de 500pb; en las muestras 2 y 7 no se logró la amplificación. Figura 27.

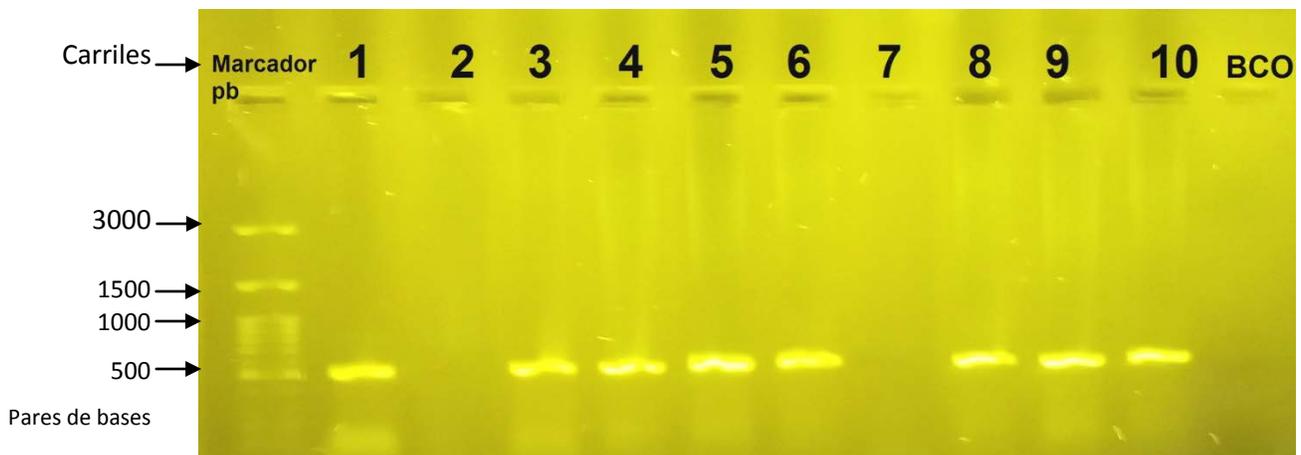


Figura 27. Bandas de 500pb que corresponden a los exón 3



## Amplificación del exón 2 y 3 del gen MICA

Se realizó la amplificación del exón 2 y 3 del gen MICA en el curso Antecedentes del Módulo de Bioquímica Celular y de los Tejidos I de la carrera de Q.F.B, se realizó la técnica con las condiciones estandarizadas para la reacción de PCR previamente establecidas (Tabla 8).



Figura 28. Preparación de la mezcla de reacción para la técnica PCR usando Primers de Exón 2 y 3 del gen MICA en el curso Antecedentes del Módulo de BCT para alumnos, Junio 2015-2

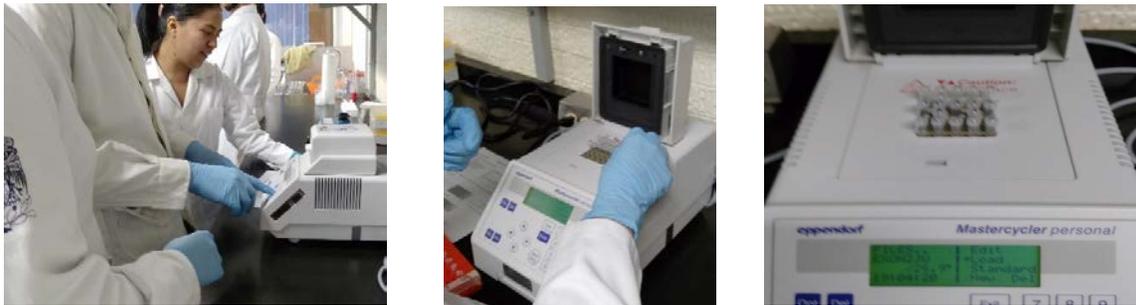


Figura 29. Explicación del uso y programación del termociclador para la amplificación del Exón 2 y 3 del gen MICA en el curso Antecedentes del Módulo de BCT para alumnos, Junio 2015-2

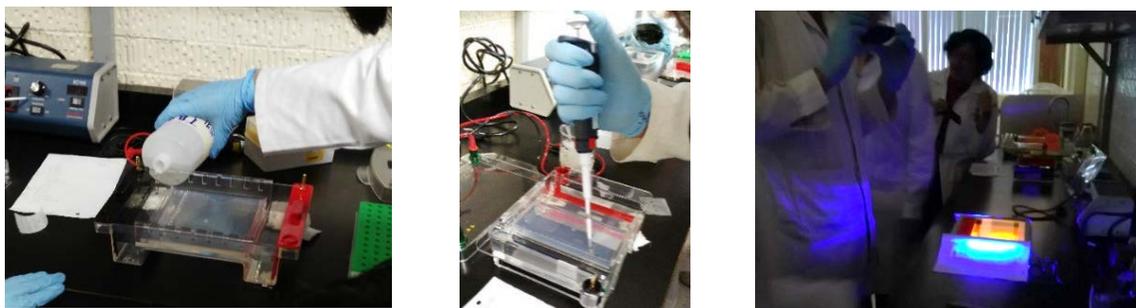


Figura 30. Electroforesis de los amplicones de Exón 2 y 3 del gen MICA en el curso Antecedentes del Módulo de BCT para alumnos, Junio 2015-2



Resultados de las bandas obtenidas de las electroforesis en gel de agarosa 1% corrido durante una hora a 85 Volts, se observan bandas entre 200 y 300 pb que corresponden a la  $\beta$ -actina usando un marcado de 100 a 3000pb.

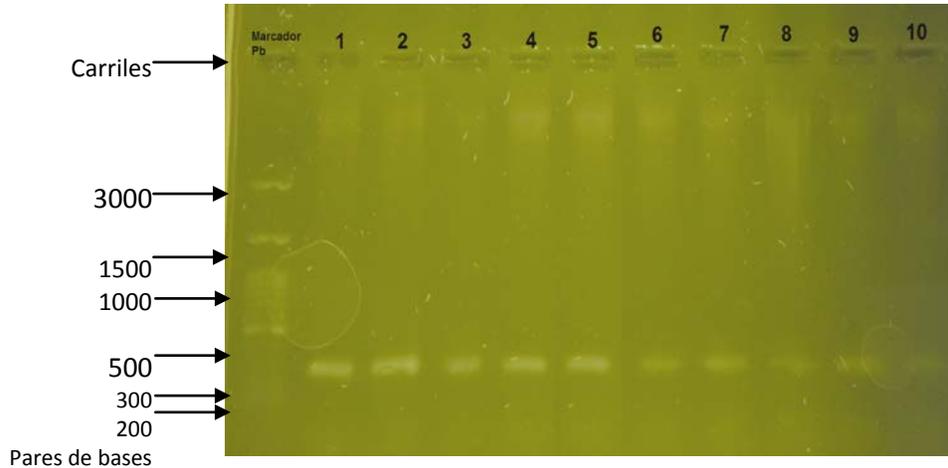


Figura 31. Bandas entre 200 y 300 pb que corresponden a la  $\beta$ -actina usando un marcado de 100 a 3000pb.

Resultado de la amplificación del exón 2 del gen MICA en gel de agarosa al 1% corrido durante una hora a 85 Volts, donde se observan bandas en 500 pb de la muestra 3 a la 10 (Figura 32) y muestras de la 3 a la 6 (Figura 34).

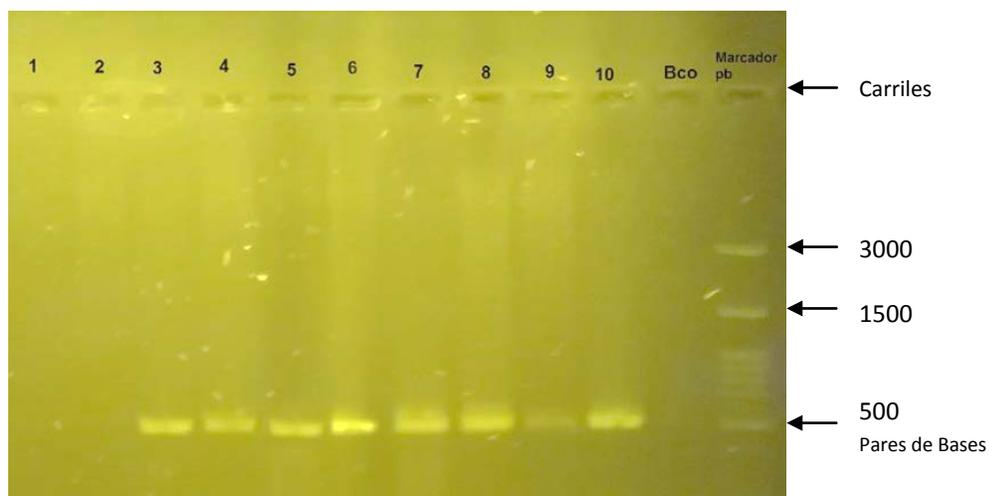


Figura 32. Bandas en 500pb que corresponden a los exón 2, muestras del 1-10.



Resultado de la amplificación del exón 3 del gen MICA en gel de agarosa al 1% corrido durante una hora a 85 Volts, donde se observan bandas en 500 pb de la muestra 1, 3 a la 6, 8 a la 10 (Figura 33).

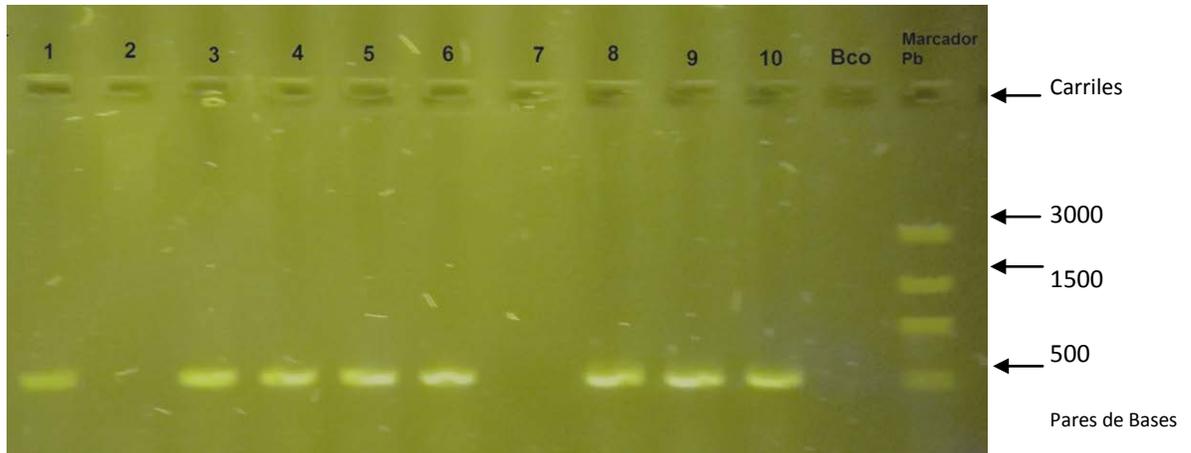


Figura 33. Bandas en 500pb que corresponden a los exón 3, muestras 1 al 10.

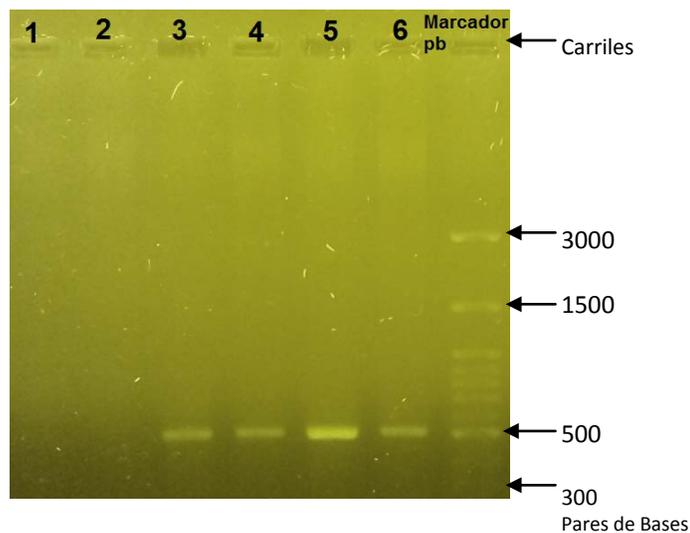


Figura 34. Bandas en 500pb que corresponden a los exón 2. Muestras del 1-6



Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1% corrido durante una hora a 85 Volts del exón 3 del gen MICA, se observan bandas en 500 pb de las muestras del 3 al 5 y bandas entre 200 y 300 pb que corresponden a la  $\beta$ -actina usando el ADN correspondiente a cada muestra. Se empleó un marcado de 100 a 3000 pb.

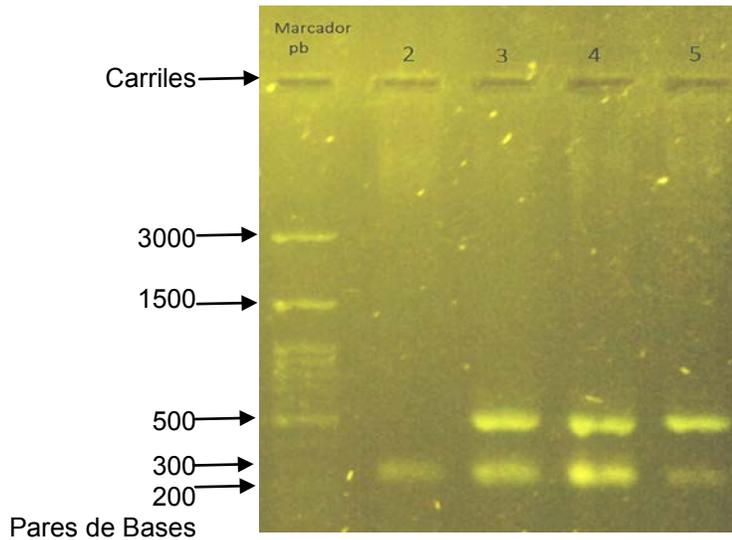


Figura 35. Exón 3, bandas en 500pb en la muestras 3, 4 y 5 y bandas entre 200 y 300 pb que corresponden a la  $\beta$ -actina, usando un marcado de 100 a 3000pb.



## 8. Discusión de resultados

La biología molecular ha permitido entender los procesos vitales de los seres vivos en función de las características de su estructura molecular, con su estudio se han desarrollado técnicas muy específicas como la extracción de ADN, la electroforesis, la PCR, etc.; formando parte de las técnicas básicas para fines de investigación o diagnóstico; por ese motivo estas técnicas requieren de métodos estandarizados a las condiciones de los laboratorios donde se realicen.

Uno de los objetivos de la actualización de los planes y programas de la carrera de QFB es mantener los manuales de laboratorio de los diferentes módulos acorde con las técnicas y procedimientos que son empleados en los campos profesionales y laboratorios de investigación, por lo que era muy importante que el Manual de prácticas del laboratorio de BCT I contará con una técnica básica de la biología molecular como lo es la PCR, de tal forma que los alumnos y profesores adquieran los conocimientos de esta metodología; además es significativo considerar que el módulo de BCT I es el primer contacto dentro de la carrera del QFB en el que los estudiantes tienen contacto con la línea curricular bioquímica, por lo que resulta substancial que las prácticas que se realicen tengan como propósito comprender los procesos bioquímicos mediante experimentos y les proporcionen las bases necesarias para sus siguientes asignaturas.

Al actualizar el manual con el presente trabajo se incorporará la práctica “Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)” con una metodología clara para que los alumnos que cursan la asignatura de BCT I, puedan realizarla en el laboratorio.

La incorporación de la técnica de PCR se logró al establecer las condiciones del laboratorio tomando en cuenta las horas y número de sesiones en el laboratorio, materiales, equipos e instrumentos; teniendo como antecedentes las prácticas de extracción de ADN humano, cuantificación y pureza de ADN humano y electroforesis de ADN, ya que son técnicas que el alumno requiere conocer para aplicar la técnica de la PCR. Estas técnicas son importantes ya que contar con una muestra de ADN molde con características de pureza y concentración adecuadas facilitan el desarrollo de la PCR.



Actualmente para obtener el ADN con los grupos de BCT I se utiliza el kit Wizard® Genomic DNA Purification, lo que nos ha dado buenos resultados de concentración y pureza, por lo que las muestras para emplear en la estandarización de la PCR se obtuvieron con los alumnos durante el semestre 2015-2. Para la cuantificación se empleó una dilución 1:20, utilizando el biofotómetro anotando las lecturas de la concentración, las absorbancias a 260nm y la relación 260/280 para verificar la pureza de la muestra, las lecturas se reportan en la Tabla 1, se seleccionaron diez muestras porque tenían un valor de 1.5-2.0 de la relación 260/280 y una concentración entre 600-1100 µg/mL. También se realizó la electroforesis de las diez muestras seleccionadas, con una dilución de 1:20 usando gel de agarosa al 0.7% y usando como agente revelador Midori Green 5µL, se observaron bandas mayores a 10,000 pares de bases (Figura 15). Es importante considerar que para obtener un buen desplazamiento del ADN genómico se empleó una concentración baja de agarosa (0.7%).

Una vez obtenido el ADN genómico, se procedió a realizar varias pruebas para ajustar la concentración y cantidad de los reactivos con respecto a un volumen final de 25µL por tubo, la concentración calculada fue de 1.25 mM para el MgCl<sub>2</sub>, esta concentración es fundamental porque el magnesio es cofactor de la Taq polimerasa y una concentración mayor inhibiría su función y una menor no la activaría para poder realizar la función de promover el copiado de fragmentos de ADN, es importante considerar que en el Kit de la Taq polimerasa empleado (Go Taq®) el MgCl<sub>2</sub> se encuentra mezclado con el buffer 5X, así que no se adicionó de manera separada; para los dNTP's se determinó una concentración de 0,2 mM por cada dNTP (A, G, C y T), este reactivo es necesario para que la enzima los ensamble de forma complementaria a la secuencia a flanquear; 0.75 UI para la enzima Taq polimerasa, 1-3 µg ADN molde necesario para poder realizar la amplificación ya que de éste se flanquea la secuencia a copiar y finalmente para cada primer la concentración de 25 pmol/µL resultó la indicada para amplificar β-actina humana (ver tabla 3). La programación del termociclador se realizó siguiendo el esquema de la tabla 4, en la que la temperatura de alineación fue de 53 °C, esta temperatura está cercana a la T<sub>m</sub> de cada uno de los primers, al realizar la electroforesis de los productos amplificados en gel de agarosa al 1%, se pudo ver que la señal que daban las bandas eran



tenues y perdieron su intensidad rápido, pero si se encontraron entre 200 y 300 pares de bases que corresponden a los productos amplificados del gen  $\beta$ -actina humana.

Una vez establecidas las condiciones antes mencionadas, se realizó una prueba piloto en el curso de profesores y alumnos de la asignatura de BCT I, amplificando gen  $\beta$ -actina humana con las condiciones que se encuentran en la tabla 3 y 4, figuras 20-22, este curso fue de gran utilidad porque se logró ver algunas fallas técnicas, por ejemplo al analizar el gel de agarosa, se notó que las bandas obtenidas tenían una señal baja y que se perdía muy rápido al observarlas en el Transiluminador (aparato que sirve para ver la separación de las bandas en el gel por efecto de la luz UV al interactuar con el Midori Green) figura 23, sin embargo las bandas correspondían a un tamaño entre 300 y 200 pares de base que pertenecen al gen amplificado ( $\beta$ -actina humana), además en algunos geles se observó que había impurezas por la forma en que se ve las bandas (ver figura 24), esto pudo deberse a que no se manipularon de manera correcta los reactivos o al depositar la muestra en el gel de agarosa se presentó una contaminación cruzada.

Con el resultado de la primera prueba piloto se modificó la concentración de los primers, ahora se utilizaría una concentración mayor en un intervalo de 120-180 pmol/ $\mu$ L para cada primers, dejando la cantidad y concentración igual para los reactivos restantes (ver tabla 6), en la programación del termociclador no se realizaron cambios. Para la electroforesis se disminuyó el tiempo de corrimiento a una hora, se aumentó la cantidad de Midori Green de 5 $\mu$ L a 8 $\mu$ L para poder observar mejor las bandas y que la señal no se perdiera tan rápido al momento de ver el gel en el Transiluminador. Para los reactivos se realizaron las diluciones con agua libre de nucleasas, además se conservaron a -20 °C cuando no se utilizaban, en el caso de los buffer, dNTP's, los primers y el ADN se realizaron alícuotas para probar la técnica con las nuevas condiciones y si por algún motivo se notara contaminación desechar estas diluciones y no las muestras originales, se realizó la limpieza de la campana de extracción con etanol al 70% puesto que al manipular el material y los reactivos se puede generar contaminación cruzada al momento de realizar la mezcla de reacción, también antes de hacer la mezcla se homogeneizó los reactivos y las muestras de ADN con vortex para no variar la concentración por efecto del proceso de congelación y descongelación. Como



resultado las nuevas amplificaciones para el gen  $\beta$ -actina humana se obtuvieron bandas que se conservaron por más tiempo, consiguiendo una mejor señal en el gel de agarosa, sin presencia de impurezas, y un mejor corrimiento del marcador de pares de base utilizado para verificar que los productos amplificados correspondían a la  $\beta$ -actina.

La amplificación del gen  $\beta$ -actina humana (un gen constitutivo), permitió comprobar que las muestras de ADN recolectadas en el laboratorio de BCT I fueran apropiadas con respecto a la concentración y la relación 260/280, además se usó como control para la técnica de PCR para probar el sistema, asegurando que en la reacción no hubiera algún reactivo utilizado en la extracción de ADN que inhibiera la Taq polimerasa, además de ver que la concentración a la que estaban cada uno de los reactivos era adecuada para realizar PCR.

Con los buenos resultados obtenidos al realizar la amplificación de  $\beta$ -actina humana, se procedió a realizar la amplificación del exón 2 y 3 del gen MICA (la secuencia de los primers fue de 24 oligonucleótidos, ver tabla 7) utilizando las condiciones que se encuentran en la tabla 8 donde se consideró usar la misma cantidad y concentración de los reactivos que se empleó para amplificar  $\beta$ -actina, modificando solamente la concentración de los primers para cada exón y la temperatura de alineación a 65 °C para amplificación de ambos exones, ver tabla 9. Se eligió amplificar el gen MICA porque se caracteriza por ser muy polimórfico (que son considerados como tal, cuando la frecuencia de uno de sus alelos en la población es superior al 1% <sup>46, 47</sup>) y que servirá de ejemplo para comprender que en algunos sujetos no está dentro de su información genética algunos genes de importancia biológica o que este gen no puede codificar una proteína funcional que regule una función vital, así como entender el proceso de maduración del ARN mensajero (splicing). Durante el proyecto sólo se pudo identificar las muestras que tenían el exón 2 y 3 mediante PCR punto final y no su polimorfismo con respecto a los alelos reportados en la literatura para el gen MICA <sup>53, 54</sup> de las 10 muestras que cumplieron con el intervalo de concentración y de la relación 260/280. En la electroforesis de agarosa al 1% se obtuvieron bandas con 500 pb para ambos exones usando un marcador de 3000 a 100 pares de bases, además se pudieron identificar muestras en las cuales se logró



amplificar el exón 2 y 3 ver figura 25 y 26.

Es importante analizar los productos amplificados, por ejemplo, al no amplificar el exón 2 ó 3 del gen MICA en todas las muestras de ADN, esto podría traer consecuencia al momento de codificar la proteína que conforma MICA, porque al carecer del exón 2 o 3 según sea el caso se podrían presentar algunas complicaciones al momento de requerir su función, debido a que la proteína estaría incompleta y no sería funcional, ya que se sabe que el reconocimiento de la molécula de MICA por el receptor NKG2D permite a las células inmunes identificar y atacar células infectadas o transformadas sin la necesidad de la expresión de MHC de clase I o de reconocimiento de antígeno. Por lo tanto, la interacción MICA / NKG2D es un mecanismo eficaz para la inmunovigilancia<sup>51, 54</sup>; sin embargo este gen está asociado con un número de enfermedades relacionadas con la actividad en células NK, tales como la infección viral, el cáncer y el rechazo de aloinjerto (renales y pancreáticos con evidencia tanto de rechazo agudo y crónico)<sup>53, 54</sup>, además en las muestras que se logró amplificar estos exones no quiere decir que no tengan polimorfismo, sino solo logramos detectar la presencia de estos dos exones mediante la técnica de PCR punto final y, para que se puede detectar estos polimorfismos se aplican otras técnicas como D/TGGE (geles de electroforesis en gradiente desnaturizante/térmico), SSPC (Polimorfismo de conformaciones de cadena sencilla), DHPLC (Cromatografía líquida de alta resolución), secuenciación por hibridación, PCR en tiempo real, etc, para ver si en la secuencia del exón no hay un cambio de pares de base que modifique los aminoácidos que conforman a la molécula MICA.

Una vez amplificados  $\beta$ -actina y los exones 2 y 3 del gen MICA se realizó una segunda prueba piloto, ahora sólo con alumnos de la asignatura de BCT I, esta prueba se llevó a cabo con el propósito de dar a conocer todo el fundamento de la técnica de PCR, por lo que se explicaron los conceptos teóricos del proceso de replicación, traducción y transcripción, extracción, cuantificación del ADN, además de expresar el fundamento de la técnica de PCR que se basa en el proceso de replicación de ADN, las etapas de desnaturización, alineación y extensión para poder tener una concentración óptima de los productos amplificados, los componentes y las condiciones necesarias para realizarla la técnica. En la parte experimental se expuso la importancia del manejo y



cuidados de las micropipetas para realizar la mezcla de reacción, la limpieza que se le da al lugar de trabajo para evitar la contaminación de los componentes que van en la mezcla, se explicó cómo calcular las concentraciones de cada uno de los reactivos con respecto al volumen final de 25  $\mu\text{L}$ , como seleccionar el ADN con respecto a su concentración y su pureza, y la programación de termociclador en relación al gen que va a amplificar, debido a que se utilizan diferentes primers se debe de considerar la  $T_m$  de cada uno de estos para darnos ideas de cual va hacer la temperatura de alineación y así poder programar el aparato y llevar a cabo la amplificación.

Esta segunda prueba piloto sirvió para estimar los tiempos de las sesiones de laboratorio en la que se puede llevar a cabo la técnica de PCR con los alumnos de BCT I, evaluando que en la primera sección se realizaría la explicación del uso y programación del termociclador que va de acuerdo al gen que se desee amplificar, en la segunda sección se realizaría la mezcla de reacción de los reactivos para poder amplificar la secuencia de interés dando un tiempo de 20 minutos aproximadamente por cada equipo y la amplificación que se lleva en el termociclador tarda una hora con 40 minutos y terminado los 32 ciclos de reacción las muestras se congelaban a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  para continuar con la electroforesis de los fragmentos amplificados, en la tercera sección se realizaría la electroforesis de los productos amplificados haciendo un gel de agarosa a 1% para contrastar que la amplificación se llevó de manera adecuada, el alumno tomaría una fotografía del gel de agarosa en el transiluminador para que en su reporte analice las posibles fuentes de error y explique a que se debe que algunas muestras no se amplifiquen, porque es importante realizar buenas prácticas de laboratorio y por ultimo porque se emplea cada uno de los reactivos para realizar PCR. Una sugerencia que se manifestó durante el curso fue la necesidad de elaborar un manual que detalle la programación del termociclador en donde se expliquen de manera breve los pasos a seguir para su programación con el fin de hacer el procedimiento más rápido (ver anexos) y por último se redactó la práctica de la técnica de PCR usando los formatos corregidos empleados en las dos pruebas piloto (ver anexos).

Es importante mencionar que se pueden realizar algunas variaciones a la técnica de PCR como por ejemplo la RT-PCR; este tipo de PCR puede amplificar cADN usando



una enzima transcriptasa inversa, asimismo la Multiplex-PCR permite la amplificación de varios objetivos usando solo una reacción, así como la PCR en tiempo real ya que con esta técnica se puede medir la cantidad de producto amplificado en momentos tempranos.

Al efectuar la técnica de PCR en el laboratorio los alumnos podrán tener los fundamentos básicos para poder realizar sus variantes aplicables en las ciencias biológicas y de la salud, por ejemplo: en medicina en el diagnóstico la posible existencia de enfermedades hereditarias en el embrión o adultos <sup>39</sup>, en la virología en la diferenciación de genotipos virales <sup>41</sup>, en las ciencias forenses que permite la obtención de información exacta sobre el genotipo de una muestra, que constituye una gran parte de la evidencia física en la investigación criminal, a menudo siendo decisiva para el esclarecimiento del crimen <sup>45</sup>.



## Recomendaciones para realizar la técnica de PCR

- Realizar alícuotas de todos los reactivos a utilizar para evitar desechar todo en caso de su contaminación.
- Homogeneizar cada uno de los reactivos a utilizar, para evitar variaciones en la concentración de estos por efecto de la congelación y descongelación.
- En caso de utilizar nuevo ADN genómico, realizar primero la amplificación de gen  $\beta$ -actina humana para probar el sistema, con el propósito de que la variable que se cambie no modifique las condiciones de la técnica.
- Siempre que se pruebe la técnica se sugiere meter un control negativo para visualizar posible contaminación de los reactivos y un control positivo con muestras de ADN que han sido implicado.
- Siempre utilizar tubos Eppendorf, puntas y guantes nuevos para manipular los reactivos.
- Realizar la técnica en una campana de flujo laminar que evitar la contaminación de un tubo a otro.
- Limpiar antes y después el lugar de trabajo de preparación (campana) y de amplificación con alcohol al 70% para evitar la contaminación cruzada.
- Para realizar la electroforesis se sugiere usar muestras amplificadas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  como control positivo para saber el tamaño de los pares de base de la banda a observar.
- Monitorear en todo momento el corrimiento del gel, con un corrimiento de 50min a 85 Volts.



## 9. Conclusiones

- Se incorporó la técnica de PCR en la actualización del manual de Bioquímica Celular y de los Tejidos I de acuerdo a las condiciones del laboratorio; tomando en cuenta para su realización, el material, reactivos, equipo e instrumentos disponibles, horas y forma de trabajo en el laboratorio de BCT I.
- Al realizar la práctica en el curso con alumnos, no se presentó ninguna complicación en los diferentes pasos como preparar la mezcla de reacción, la programación del termociclador de acuerdo al gen a amplificar y la electroforesis de los productos amplificados, reafirmando sus conocimientos y habilidades técnicas.
- Se considera que la incorporación de la técnica de PCR en el módulo de BCT I tendrá un impacto favorable en la formación de los alumnos de la asignatura, ya que fortalecerán sus habilidades en técnicas básicas de biología molecular, las cuales les permitirá contar con mejores herramientas y competencias que podrán utilizar e implementar al realizar la técnica de manera adecuada para el diagnóstico de enfermedades, ciencias forenses e investigación para su futuro desempeño laboral y profesional.



## 10. Propuestas

- Disponer del material necesario para que se realice la práctica con las condiciones en las que fueron probadas.
- Gestionar y conservar los materiales con el fin de que todos los alumnos puedan realizar la técnica.
- Disponer de los Procedimientos Normalizados de Operación donde se dispongan los PNO's de termociclador, vortex, microcentrífuga, micropipetas, biofotómetro, balanza analítica, cámara de electroforesis.



## 11. Referencias

1. Lodish H, Berk A, Zipursky S, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M et al. *Biología Celular y Molecular*. 5nd ed. Estados Unidos: Médica Panamericana; 2006.
2. Garrido A, Teijón J, Villaverde C, Mendoza C, Ramírez J. *Fundamentos de Bioquímica Estructural*. 2nd ed. Madrid: Tébar; 2006.
3. Solari. *Genética Humana fundamentos y aplicaciones en Medicina*. 3nd ed. Buenos Aires Médica Panamericana; 2004.
4. Salazar Montes A, Sandoval-Rodríguez, Armendáriz-Borunda J. *Biología Molecular Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. México D.F.: McGraw Hill Interamericana; 2013.
5. Gary A, Thubodeau, Kevin Y, Patton. *Estructura y Función del Cuerpo Humano*. 13nd ed. España: Elseveir; 2008.
6. Herráez Sánchez A. *Texto ilustrado e interactivo de Biología molecular e ingeniería genética*. Barcelona, España: Elsevier; 2012.
7. "Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *introducción a la Biología Celular*. 2nd ed. España: Médica Panamericana; 2006.
8. Pierce. *Genética un enfoque conceptual*. 3nd ed. España: Médica Panamericana: 2010.
9. Rada A, Taboada G. *Métodos de obtención y purificación de ADN humano para la aplicación en Genética Molecular*. BIOFABO. 1998; VI: 64-67.
10. Cornejo-Romero A, Serrato Díaz A, Rendón Aguilar B, Rocha Munive M. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. México D.F.: Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales; 2014.
11. Riera M, Rojas M, Zapata P. *Protocolo de extracción de DNA por salting-out para pequeños volúmenes de sangre*. *Rev. cienc. tecnol.*2010 ;( 14).
12. Falcón L, Valera A. *Extracción de ácidos nucleicos*. En: Eguarte L, Souza V, Aguirre X, ed. *Por. Ecología molecular*. 1nd ed. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología Universidad Nacional Autónoma de México Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad; 2007. p. 499-517.
13. Bartlett J, Stirling D. "A Short History of the Polymerase Chain Reaction". *PCR Protocols*. 2003; 226: 3-6.
14. Moore D, Dowhan D. *Purification and Concentration of DNA from Aqueous Solutions*. *Current Protocols in Molecular Biolog.*2002; 2(1): 10.
15. Gipsy M, Santiago V, Marshall B, Rajendra R. *A streamlined protocol for extracting RNA and*



- genomic DNA from archived human blood and muscle. *Analytical Biochemistry*. 2014; 12(021).
16. Gallagher S. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *CurrProtocNeurosci Sci*.2011; 1(14).
  17. Marjorie A. Hoy. Chapter 8 DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction *Molecular Biology Made Accessible*. In: *Insect Molecular Genetics, Third Edition: An Introduction to Principles and Applications*. Academic Press; 2013.
  18. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*. 2013; 2 (2):70-79.
  19. Bolivar A, Rojas A, Garcia Lugo P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *AvanBiomed* 2014; 3(1): 25-33
  20. Lorenz T. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies [Internet]. [Ncbi.nlm.nih.gov.pbidi.unam.mx](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pbidi.unam.mx). 2012 [citado 1 Febrero 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pbidi.unam.mx:8080/pubmed/?term=Polymerase+Chain+Reaction%3A+Basic+Protocol+Plus+Troubleshooting+and+Optimization+Strategies>.
  21. Asuar, L. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Eguiarte L, Souza V, Aguirre X, ed. *Por. Ecología molecular*. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología Universidad Nacional Autónoma de México Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad; 2007. p. 517-539.
  22. Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C. Pre-PCR Processing Strategies to Generate PCR-Compatible Samples. *Molecular Biotechnology*.2004; 26: 133-146.
  23. Kramer M, Coen D. The Polymerase Chain Reaction Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization. *Current Protocols in Immunology*.1997; 10(20):1-10.
  24. Mann T, Humbert R, Dorschner M, Stamatoyannopoulos J, Stafford W. A thermodynamic approach to PCR primer design. *Nucleic Acids Research*. 2009; 37(13):1-9.
  25. Dieffenbach C, Lowe T, Dveksler G. General Concepts for PCR Primer Design. *PCR Methods and Applications*.1993; 3(3); 30-7.
  26. Álvarez Fernández R. Chapter one Explanatory Chapter: PCR Primer Design. *Methods in Enzymology*, 2013; 529; 1-21.
  27. Boyce R, Chilana P, Rose T. iCODEHOP: a new interactive program for



- designing Consensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers from multiply aligned protein sequences. *Nucleic Acids Research*. 2009: 1–7.
28. Peña Castro J, Gregorio Ramírez O, Barrera Figueroa B. Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educ. quím.* 2013; 24(2): 237-246.
  29. D Caetano Anollés. Polymerase Chain Reaction. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 2nd edition. 2001; 5: 392-395.
  30. García Pérez H. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *UNIV DIAG* 2000; 1(2):31-41.
  31. Lee P, Costumbrado J, Hsu C, Kim Y. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Exp Vis.* 2012; 62
  32. Yábar-Varas C. Manual de Procedimientos de Electroforesis Para Proteínas y ADN, Norma técnica 38. Lima; Instituto Nacional de Salud: 2003.
  33. Organización Mundial de la Salud Oficina Regional para Europa. Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. Sesión nº 5 Electroforesis en gel de agarosa. JRC.
  34. Padilla Peña C, Diez Dapena J, Martínez Galisteo E, Bárcena Ruiz J, García Alfonso C. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
  35. Rahman M, Uddin M, Sultana R, Moue A, Setu M. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *AKMMC J.* 2013; 4(1): 30-36.
  36. Das B, Swain S, Patra A, Das M, Tripathy HK, Mohapatra N, Kar SK, Hazra RK. Development and evaluation of a single-step multiplex PCR to differentiate the aquatic stages of morphologically similar *Aedes* (subgenus: *Stegomyia*) species. *TropMedIntHealth.* 2012; 17:235-43.
  37. Mülhardt C, Beese E. The Polymerase Chain Reaction - Molecular Biology and Genomics - 4 [Internet]. [Dx.doi.org](http://dx.doi.org). 2007 [citado 10 Mar 2015]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-012088546-6/50006-3>.
  38. Jacobus A, Gross J. Optimal Cloning of PCR Fragments by Homologous Recombination in *Escherichia coli*. *PLOS ONE*. 2015:1-17.
  39. DelloR C, Lisi L, Lofaro A., et al. Novel sensitive, specific and rapid pharmacogenomic test for the prediction of abacavir hypersensitivity reaction: HLA-B\*57:01 detection by real-time PCR. *Pharmacogenomics*. 2010; 12:567–576.



40. Karim S, Ali A. Correlation of p53 over-expression and alteration in p53 gene detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism in adenocarcinoma of gastric cancer patients from India. *World J Gastroenterol* 2009; 15(11): 1381-1387.
41. Lévêque N, Legoff J, Mengelle C, Mercier-Delarue S, N' guyen Y, Renois F, et al. Virological Diagnosis of Central Nervous System Infections by Use of PCR Coupled with Mass Spectrometry Analysis of Cerebrospinal Fluid Samples. *JCM*. 2014; 52(1): 212-217.
42. Frye A, Baker C, Rustvold D, Heath K, Hunt J, Leggett J, et al. Clinical Impact of a Real-Time PCR Assay for Rapid Identification of Staphylococcal Bacteremia. *JCM*. 2011; 50(1) : 127-133
43. Khot D, Fredricks D. PCR-based diagnosis of human fungal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009; 7(10): 1201–1221.
44. Zebardast N, Haghighi A , Yeganeh F, Seyyed S , Gharavi M, Fallahi S. Application of Multiplex PCR for Detection and Differentiation of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii*. *Iranian J Parasitol*.2014; 9(4):466-473.
45. Civit L, Fragoso A, O' Sullivan C. Evaluation of techniques for generation of single-stranded DNA for quantitative detection. *Analytical Biochemistry*. 2012; 431:132–138.
46. Checa Caratachea M. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *RevInstNal e NF Resp Mex*.2007; 20 (3): 213-221.
47. Ramírez-Bello J, Vargas-Alarcón G, Tovilla-Zárate C, Fragoso J. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta Médica de México*. 2013; 149: 220-8.
48. Parham. *Inmunología*. 2nd ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2006.
49. Vega-Robledo G. Complejo mayor de histocompatibilidad. *Inmunología para el médico general*. 2009; 52(2): 86-89.
50. López Martínez A, Chávez Muñoz C, Granados J. Función biológica del complejo principal de histocompatibilidad. *Rev. invest. Clín*. 2005; 57(2): 132-141.
51. Chen D, Gyllensten U. MICA polymorphism: biology and importance in cancer. *Oxford Journals*. 2014; 35 (12): 2633-2642.
52. Stephensa H. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved?. *Trends in Moleluclar Medicine*. 2001; 22(1):378–385.
53. Mun Kit C , Maude E. MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. *Trends in Moleluclar Medicine*. 2010; 16(13): 97–106.
54. Rabinovich G. *Inmunopatología molecular*. Argentina: Panamericana; 2004.



55. Mendoza Rincón J. Los genes MICA Y MICB: su polimorfismo e importancia biológica. VERTIENTES. 2007; 10(1-2):3-7.
56. Zhang Y, Lazaro A, Lavingia B, Stastny P. Typing for All Known MICA Alleles by Group-Specific PCR and SSOP. Human Immunology 2001 March 2; 62: 620-631
57. Bahram S and Spies T. 1996a. The MIC gene family. Non-polimorphic antigen presentation molecules. Res Immunol. 147:328-332.
58. García del Valle A. Análisis molecular del exón 2 del gene MICA en una población mestiza mexicana" [Maestra en Ciencias Biológicas]. FES Zaragoza. UNAM; 2006.
59. Ocotitla Jiménez R. "Amplificación de los Exones 2, 3 y 4 del Gene MICA en una Población Mestiza Mexicana" [Tesis Licenciatura]. FES Zaragoza. UNAM; 2005.



## 12. Anexos.

# Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)



## Objetivo

- Analizar los componentes necesarios para llevar a cabo la amplificación de un fragmento de ADN.
- Entender las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión que comprenden la técnica de la PCR.
- Programar el termociclador (MASTERCYCLER PERSONAL) y realizar la amplificación de un fragmento de ADN.
- Discutir las aplicaciones que tiene el uso de la técnica.

## Antecedentes Académicos

- Dogma central de la Biología Molecular
- Replicación, transcripción y traducción del ADN
- Extracción y electroforesis del ADN.

## Introducción

La replicación del ADN ocurre de manera conservativa, es decir, las dos cadenas de nucleótidos se desenrollan y cada cadena sirve de molde para formar una molécula de ADN nueva<sup>2</sup>. La posición en las que el ADN es primero abierto se denomina origen de replicación, y está marcada habitualmente por una secuencia de particular de nucleótidos. El punto de desenrollamiento se denomina horquilla de replicación, esto se logra debido a la enzima ADN helicasa rompe las uniones de hidrógeno. Después de la separación la cadena sencilla se estabilizan con proteínas de unión a cadena simple (SSB). Otra proteína esencial para este proceso es la enzima ADN girasa, una topoisomerasa, que es la encargada de liberar la tensión torsional generado por el desenrollamiento<sup>3, 5</sup>.

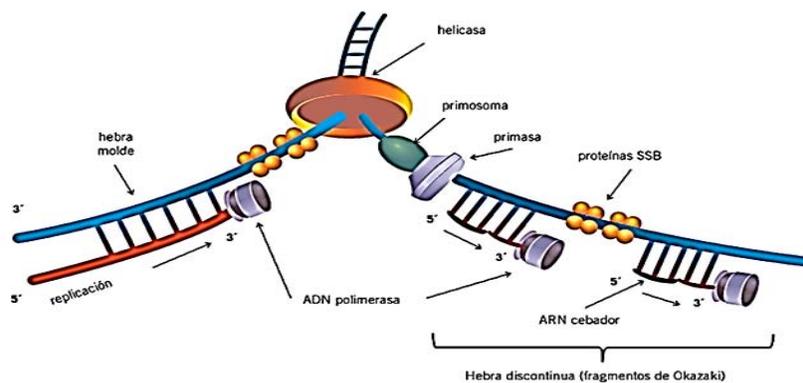


Figura 1. Replicación del ADN.



La materia prima para la generación de una nueva cadena de ADN son los desoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTP), cada uno de los cuales contiene un azúcar desoxirribosa y una base unido a tres grupos fosfatos. El grupo 3'-OH del último nucleótido de la cadena ataca al grupo 5'fosfato del dNTP que entra en el proceso. Dos fosfatos se separan del dNTP, y se forma una unión fosfodiéster entre los dos nucleótidos. Por lo que antes de comenzar a sintetizar una nueva cadena se necesita de un cebador que contiene un grupo 3'-OH libre, para permitir el ADN polimerasa de inicio de la replicación de ADN. Las ADN polimerasas sólo pueden agregar nucleótidos al extremo 3' de la cadena proliferativa y esto implica que las cadenas de ADN nuevas siempre se alargan en la misma dirección de 5' a 3'. La cadena de ADN que se genera contiene cebadores de ARN cortos unidos a la cadena que después son eliminados y sustituidos por nucleótidos de ADN. Un análisis más detallado revela que una hebra se sintetiza de una manera continua (cadena líder), mientras que la cadena opuesta se sintetiza en fragmentos de una manera discontinua (cadena retrasada) <sup>1, 3, 5</sup>.

El proceso de transferencia de información genética se da desde el núcleo hasta el citoplasma, donde se produce las proteínas por lo que se requiere de dos pasos especializados, conocidos como transcripción y traducción <sup>5</sup>. En el proceso de la transcripción, comienza con la apertura y el desenrollado de una pequeña porción del ADN para exponer las bases de cada cadena. Una de las dos hebras actúa entonces como una plantilla para la síntesis de una molécula ARNm. La cadena de ARN producida por la transcripción tiene una secuencia de nucleótidos que es exactamente complementaria a la hebra de ADN utilizado como molde <sup>1, 4</sup>.

Una vez que el ARNm este maduro (los intrones ya han sido eliminados se alcanza el proceso de traducción, donde la cadena de ARNm llevada en los ribosomas que se interpreta por ARN de transferencia (ARNt) y sólo pueden las secuencias de nucleótidos a utilizar para producir proteínas<sup>5-7</sup>. <sup>1, 5</sup>.

### **La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La PCR desarrollada por Kary Mullis en 1985, es una técnica fundamental en la biología molecular, debido a su rapidez, especificidad, flexibilidad y un número extremadamente grande de aplicaciones; ya que es una técnica in vitro de gran alcance que permite la amplificación y el clonado masivo de un fragmento específico de ADN, además, permite mutagenizar fragmentos específicos de ADN y alterar una variedad de secuencias para estudiar la expresión génica<sup>16</sup>. Estos métodos dependen directamente de la eficiencia de la reacción, que se basa en el ajuste exacto de sus componentes: plantilla de ADN, dNTPs (adenina, timina, citosina y guanina), tampón de reacción (con MgCl<sub>2</sub>), y un conjunto de cebadores que flanquean la secuencia diana y se extienden por la Taq polimerasa.<sup>6-9</sup>.

Etapas de la técnica de la PCR.



1. **Desnaturalización.** En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 30 segundos a 1 minuto; el tiempo depende de la secuencia de la plantilla, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus puentes de hidrógeno debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, u no más que las bases de A-T. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas (forma de cadenas sencillas) que servirán como molde para el siguiente paso <sup>3, 6, 7, 8, 10, 11, 12</sup>.
2. **Alineamiento, hibridación o recocido.** La temperatura se ajusta en un intervalo entre 40°C y 60°C (temperatura que depende la T<sub>m</sub> de los cebadores y su % G-C), a esta temperatura se forman y se rompen constantemente los puentes de hidrógeno entre los oligonucleótidos y el ADN, quedando los oligonucleótidos "alineados" para formar una pequeña región de doble cadena <sup>10, 21, 29</sup>. La polimerasa se une a este pequeño pedazo de ADN de doble cadena y comienza a copiar en sentido 5' a 3'; al agregar unas bases más, los puentes de hidrógeno que se forman entre las bases estabilizan la unión y el oligonucleótido permanece en este sitio para el siguiente paso <sup>13</sup>.
3. **Extensión (también conocida como la etapa de elongación).** En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo ADN molde-primers y empuja su función catalítica a una velocidad muy rápida; agregando dNTP's complementarios para extenderlas cadenas completas de ADN en dirección de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C <sup>18, 19, 21</sup>. La duración de la extensión depende principalmente en la longitud de la secuencia a amplificar, la Taq polimerasa es capaz de añadir de 500 a 1000 nucleótidos por minuto <sup>11, 12</sup>.

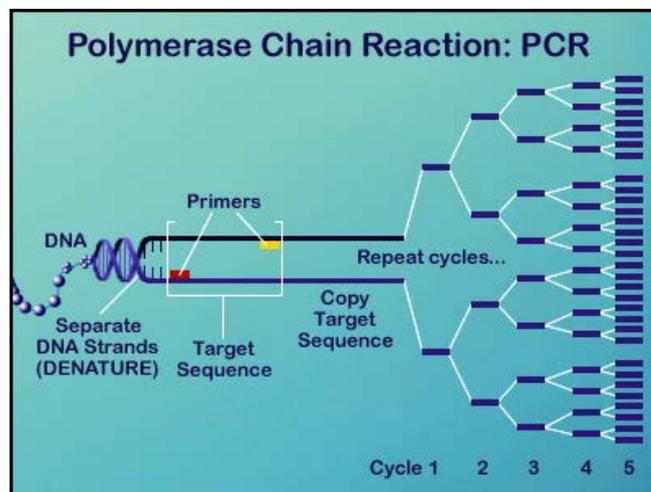


Figura 2. Etapas de la PCR, desnaturalización, alineación, extensión.



## Material

- ✓ 1 tubo Eppendorf de 500 $\mu$ L estéril (etiquetado como MIX)
- ✓ 6 tubos Eppendorf de 200  $\mu$ L (etiquetados del 1 al 6)
- ✓ 1 Micropipeta de 200  $\mu$ L
- ✓ 1 Micropipeta de 20  $\mu$ L
- ✓ 1 Gradilla para tubos Eppendorf
- ✓ Guantes de Nitrilo
- ✓ Puntas nuevas correspondientes a las micropipetas.
- ✓ Vortex
- ✓ Equipo Termociclador (MASTERCYCLER PERSONAL)
- ✓ Cámara de electroforesis Bio-Rad y Lab-net
- ✓ Transiluminador
  
- ✓ Reactivos
- ✓ 5X Buffer/MgCl<sub>2</sub>
- ✓ dNTP's (0.2 mM)
- ✓ Primer: Sen
- ✓ Primer: Anti
- ✓ Agua grado Milli Q
- ✓ Gotaq® polimerasa 5 $\mu$ / $\mu$ L
- ✓ 5 Muestras de ADN ( numeradas del 1 al 5) con una pureza de 1.7-2.0 y con una concentración de 600-1000 $\mu$ g/mL



# Procedimiento

## A) Programación del Termociclador.

1. Realizar la programación del Termociclador de acuerdo a la tabla 1 usando el manual de programación del Termociclador (MASTERCYCLER PERSONAL), de acuerdo al par de Primers a trabajar en el equipo.



Figura 3. Programación del termociclador

2. Verificar la temperatura de alineación, porque de ella depende la amplificación de los fragmentos de ADN.

Tabla 1. condiciones en el termociclador (MASTERCYCLER PERSONAL)

Paso	Temperatura °C	Tiempo
1 (Desnaturalización)	95	4 min.
2 (Desnaturalización)	95	30 s
3 (Alineamiento)	53 (gen $\beta$ -actina) 65 (Exón 2 y 3 del gen MICA)	50s
4 (Duplicación)	72	30s
5	Repetir pasos 2-4. 32 veces	
6 (Extensión)	72	8 min.
7	15	Por siempre



## B) Preparación de la mezcla de reactivos

1. Colocarse guantes antes de realizar el procedimiento.
2. Trabajar en la campana de extracción limpia con alcohol al 70%, encendida 15min antes de empezar.

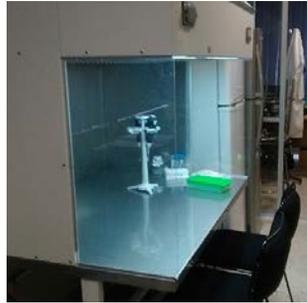


Figura 4. Campana de flujo lamina, donde se realiza la mezcla y fraccionado de los reactivos

3. Homogeneizar con vortex las muestras de ADN recolectado en la práctica de extracción de ADN.



Figura 5. Homogeneización de los reactivos usando Vortex.

4. En el tubo Eppendorf de 500 $\mu$ L estéril etiquetado como MIX, realizar la mezcla de reactivos para 6 tubos de acuerdo al orden que se muestra en el Tabla 1.



Figura 6. Mezcla de reactivos para realizar la PCR.

5. Al adicionar como último reactivo la enzima GoTaq debe de estar en refrigeración (no a temperatura ambiente)



- Adicionar 22.5  $\mu\text{L}$  del MIX, a los 6 tubos de 200  $\mu\text{L}$ .

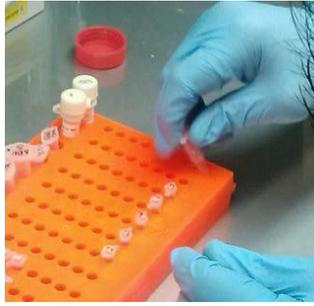


Figura 7. División de la mezcla de reactivos a los 6 tubos de 200 $\mu\text{L}$

- Posteriormente a cada tubo adicionar 2.5 $\mu\text{L}$  de ADN-1 al tubo 1, 2.5 $\mu\text{L}$  de ADN-2 al tubo 2 y así sucesivamente hasta llegar ADN-5 al tubo 5.



Figura 8. ADN genómico a utilizar como molde para la reacción de la PCR

- Como las mezcla de reacción fue calculado para realizar 6 tubo, al remanente pasarlo a un tubo de 200 $\mu\text{L}$ , para que este se sado como un blanco en nuestra reacción.
- Al final cada tubo tendrá un volumen total de 25 $\mu\text{L}$ , colocar en el Termociclador (previamente programado) para la amplificación.



Figura 9. Colocación de los tubos de 0.2mL en el Termociclador.

- Cerrar bien los 6 tubos de 200 $\mu\text{L}$  y colocarlos en la placa del termociclador.
- Seleccionar el programa previamente elaborado y ejecutarlo.
- Esperar a q ue pasen los 32 ciclos y esperar a q ue la temperatura final sea de 15 $^{\circ}\text{C}$  para retirar los tubos.
- Guardar los tubos en congelación (-20  $^{\circ}\text{C}$ ).



Tabla 2. Orden de adición de MIX

Reactivo	$\mu\text{L}$ por tubo	$\mu\text{L}$ para 6 tubos
5X Buffer/MgCl <sub>2</sub>	5	30
dNTP's (0.2 mM)	0.5	3
Primers		
1-Sen	0.5	3
2-Anti	0.5	3
Agua Milli Q	15.85	95.1
Gotaq polimerasa 5 $\mu\text{L}$	0.15	0.9

**C) Electroforesis de los fragmentos amplificados.**

1. Preparar 1L de amortiguador TBE 0.5X a partir de TBE 10X
2. Pesar 100mL de un agarosa al 1.0% pesando 1g de agarosa y disolviendo en TBE al 0.5X un matraz Erlenmeyer.
3. Calentar la solución con el fin de disolver por completo la agarosa en el microondas durante aproximadamente un minuto hasta que se observe transparente.
4. Enfriar un poco y agregar 8 $\mu\text{L}$  de Midori green, continuar enfriando y antes que solidifique, servir en el soporte del gel y colocar los peines para formar los pozos en número y tamaño deseados.
5. Esperar de 20 a 30 minutos para la gelificación de la agarosa, colocar en la posición correcta la cámara de electroforesis y llenar la misma poco antes del borde máximo marcado con el amortiguador 0.5X.
6. Colocar en el primer pozo 6 $\mu\text{L}$  del marcador de 3000-100 pares de bases y después las muestras utilizando 5 $\mu\text{L}$  de cada una, mezclado con 5 $\mu\text{L}$  de buffer de carga y colocándolas a partir del pozo siguientes en donde se agregó el marcador de peso molecular.
7. Conectar los electrodos y correr a 80 voltios durante 1 hora 10 minutos.
8. Observar la presencia de las bandas de las bandas separadas de los fragmentos amplificados en el Transiluminador (observando el gen $\beta$ -actina que corresponden a 289pb y para el Exón 2 y 3 del gen MICA con 500pb).



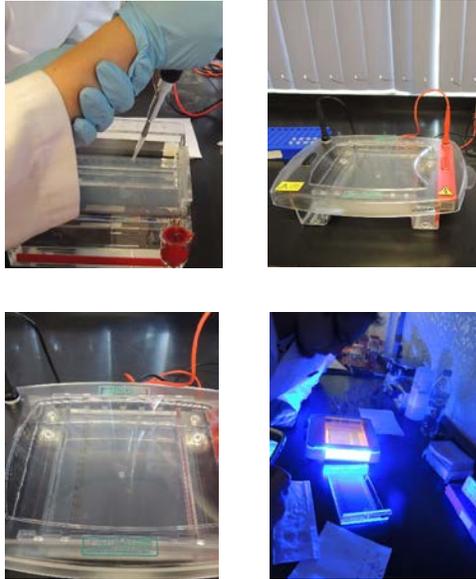


Figura 10. Electroforesis de los amplicones de  $\beta$ -actina. Carga de muestra, cámara de electroforesis con gel de agarosa, corrimiento de las bandas a los 10min, observación del gel de agarosa con el Transiluminador para observar las bandas

## Resultados

- Tomar la fotografía del gel para el informe y discutir los resultados.
- Calcular las concentraciones de los Primers,  $MgCl_2$ , de la enzima GoTaq usados en la técnica.

## Cuestionario

- ¿Cuál es el fundamento de la PCR?
- ¿Cuáles son los factores que interviene en la PCR?
- ¿Qué es un exón y un intrón?
- ¿cuáles son las aplicaciones en la que se usa la técnica?
- Menciones algunas variantes de la PCR.

## Referencias

- 1 Herráez Sánchez A. Texto ilustrado e interactivo de Biología molecular e ingeniería genética. Barcelona, España: Elsevier; 2012
- 2 Garrido A, Teijón J, Villaverde C, Mendoza C, Ramírez J. Fundamentos de Bioquímica Estructural. 2nd ed. Madrid: Tébar; 2006.
- 3 Salazar-Montes A, Sandoval-Rodríguez, Armendáriz-Borunda J. Biología Molecular Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. México D.F.: McGraw Hill Interamericana; 2013.
- 4 "Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Introducción a la Biología Celular. 2nd ed. España: Médica Panamericana; 2006.
- 5 Pierce. Genética un enfoque conceptual. 3rd ed. España: Médica Panamericana: 2010.
- 6 Marjorie A. Hoy. Chapter 8 DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction Molecular Biology



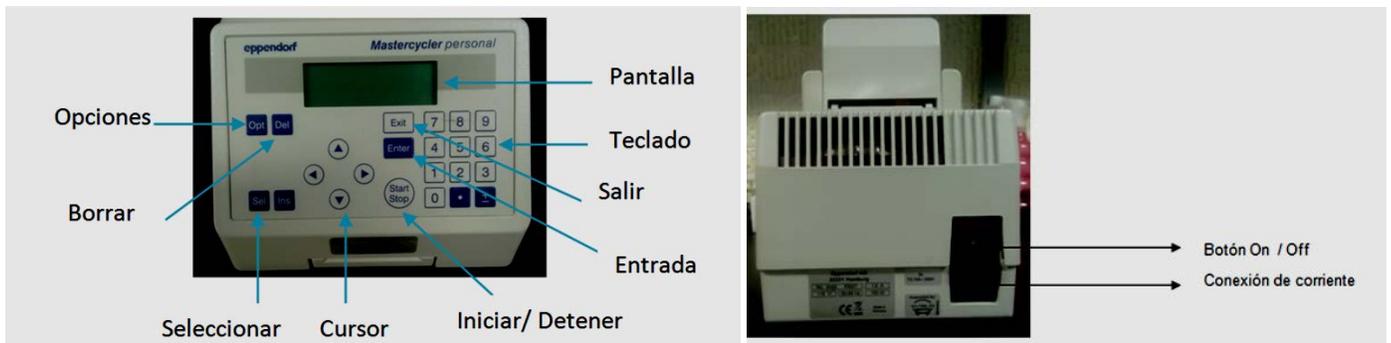
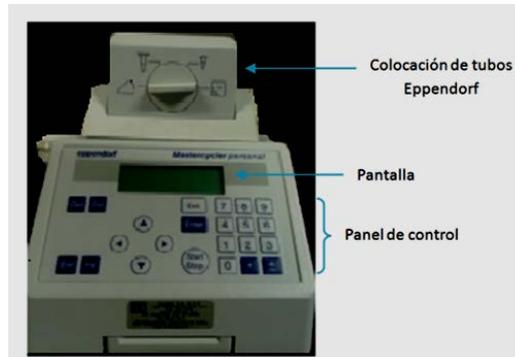
Made Accessible. In: Insect Molecular Genetics, Third Edition: An Introduction to Principles and Applications. Academic Press; 2013.

- 7 Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*. 2013; 2 (2):70-79.
- 8 Bolívar A, Rojas A, García Lugo P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *AvanBiomed* 2014; 3(1): 25-33
- 9 Lorenz T. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov.pbidi.unam.mx. 2012 [citado 1 Febrero 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.pbidi.unam.mx:8080/pubmed/?term=Polymerase+Chain+Reaction%3A+Basic+Protocol+Plus+Troubleshooting+and+Optimization+Strategies>.
- 10 Asuar, L. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Eguiarte L, Souza V, Aguirre X, ed. *Por. Ecología molecular*. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología Universidad Nacional Autónoma de México Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad; 2007. p. 517-539.
- 11 DeCaetano Anollés. Polymerase Chain Reaction. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 2nd edition. 2001; 5: 392-395.
- 12 Cornejo-Romero A, Serrato Díaz A, Rendón Aguilar B, Rocha Munive M. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. México D.F.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales; 2014.
- 13 Kramer M, Coen D. The Polymerase Chain Reaction Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization. *Current Protocols in Immunology*. 1997; 10(20):1-10.



# PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR (MASTERCYCLER PERSONAL)

## 1. DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO.



Ejemplo para programar la secuencia:

Línea	Temperatura °C	Tiempo
1 (Desnaturalización)	95	4 minutos
2 (Desnaturalización)	95	30 s
3 (Alineamiento)	53	50 s
4 (Duplicación)	72	30 s
5	Repetir pasos 2-4, 32 veces	
6 (Extensión)	72	8 min
7	15	Por siempre



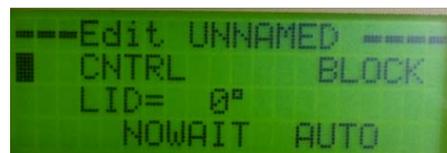
- Conectar y encender el Termociclador. En seguida aparecerá la siguiente ventana de opciones:

Nombre de menú _____		_____ Iniciar un programa cualquiera
Programa en procesamiento _____		_____ Programación
Temperatura de bloque teórica/real _____		_____ Ajustes del sistema
Hora _____		Temperado de la tapa calefactora y del bloque
		_____ Temperado de la tapa calefactora

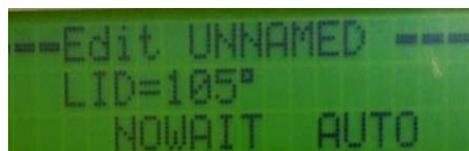
- Seleccionar con el cursor el menú Files.



- Seleccionar la opción de New y en seguida indicará las siguientes opciones:



- Con el cursor posicionarse en LID (Temperatura de la tapa) con el teclado numérico editar a 105°C. Mantener las opciones de NOWAIT y AUTO y oprimir "enter".



- Oprimir el número 1 para programar la primera línea, mover con el cursor para editar la temperatura y el tiempo a 95°C con 4 minutos, al terminar oprimir "enter".



- b. En la línea de “end” oprimir el número 2 para poder programar esa línea, con el cursor editar la temperatura y el tiempo de 95°C y 30 segundos, al terminar oprimir “enter”.

```

---Edit UNNAMED ---
NOWAIT AUTO
1 T=95.0° 0:04:00
2 T=****° **:***:***

```

- c. Realizar lo mismo para programar la tercera y la cuarta línea.  
d. Para la programación de la quinta línea, oprimir el número 5 seguido de “Select” hasta la opción de GOTO y REP. Editar las opciones moviéndose con los cursores; GOTO es la opción que permite repetir las partes del programa (en este ejemplo se requiere repetir a partir de la línea 2) y REP los números de ciclo que se requieren más uno (en este caso se colocará 32 para tener un total de 33 ciclos). Al terminar dar “enter”

```

4 T=72.0° 0:00:30
  GOTO *** REP ***

```

➔

```

4 T=72.0° 0:00:30
  GOTO 2 REP 32

```

- e. Para la programación de la línea 6 oprimir el número 6 y mover con el cursor para editar la temperatura y el tiempo a 72°C y 8 minutos, dar enter.  
f. La línea 7 el tiempo es indefinido, en este caso oprimir el número 7 y después “Select” hasta la opción de HOLD y ENTER. Editar la opción HOLD colocando la temperatura constante (en este caso 15 °C), al terminar oprimir “enter”.

```

---Edit UNNAMED ---
6 T=72.0° 0:08:00
  HOLD 15.0° ENTER
end

```

- g. Para guardar el programa oprimir “Exit” y aparecerá las siguientes opciones:

```

---Edit UNNAMED ---
UNNAMED not saved
Save: YES
ProgName: UNNAMED

```



- h. En la opción Save editar con “Select” a YES y oprimir “enter”, en ProgName se edita el nombre del programa, los números se edita con el teclado numérico y las letras con “ Select” hasta llegar a la letra deseada, al terminar oprimir “ enter” y en automatico se guardaran.
- i. Para salir oprimir el botón “exit” y regresará al menú de inicio.
- j. Para iniciar el programa colocar los tubos en la placa, cerrar con la tapa.
- k. Oprimir Start del menú principal, en seguida seleccionar el programa deseado y oprimir “enter” en automatico se iniciará.

