



Programa de la asignatura:

Biología molecular II

U1

Biología molecular de ácidos nucleicos



DCSBA



BIOTECNOLOGÍA



Índice

Presentación de la unidad.....	2
Propósitos.....	3
Competencia específica.....	3
Ruta de aprendizaje.....	4
1.1. Obtención de ácidos nucleicos.....	5
1.1.1. Material empleado en técnicas de biología molecular.....	5
1.1.2. Extracción de ácidos nucleicos.....	9
1.1.3. Extracción de RNA.....	17
1.2. Reacción en cadena de la polimerasa.....	19
1.2.1. Componentes que intervienen en la PCR.....	19
1.2.2. Etapas de la PCR.....	23
1.2.3. Variantes de la PCR.....	26
1.3. Análisis de ácidos nucleicos.....	33
1.3.1. Electroforesis.....	34
1.3.2. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	40
1.3.3. Secuenciación de ácidos nucleicos.....	42
1.3.4. Genómica.....	45
Actividades.....	48
Autorreflexiones.....	49
Cierre de la unidad.....	49
Para saber más.....	50
Fuentes de consulta.....	51



Presentación de la unidad

La Biología molecular es un área de oportunidad para el biotecnólogo, la cual sirve como herramienta, junto con otras ciencias como la bioinformática, para el desarrollo de tecnologías, bienes y servicios que mejoren la calidad de vida de la sociedad.

Para poder desarrollar estas herramientas se requiere de un conocimiento previo sobre las bases de la replicación, transcripción, traducción, regulación, el código genético, entre otros conceptos, lo cual se ha revisado previamente en la asignatura de *Biología molecular I*. En esta asignatura encontrarás en distintas técnicas de manipulación de ácidos nucleicos y proteínas, sin embargo, es importante recalcar que existe un gran número de ellas y sería imposible describirlas todas, además de que todos los días se siguen desarrollando nuevas tecnologías.

En esta primera unidad estudiarás distintas técnicas que nos permiten analizar los ácidos nucleicos, comenzando con su extracción, purificación, amplificación, cuantificación y hasta su secuenciación y análisis.

Anteriormente las técnicas moleculares eran complejas a causa de las limitantes tecnológicas, pero hoy en día el extraer un gen e introducirlo en el genoma de otro organismo es cosa de todos los días en los laboratorios de biología molecular, esto es posible gracias a los grandes avances en el área del conocimiento de la genómica, así como al desarrollo de nuevos equipos y técnicas.



Propósitos



Los propósitos de esta unidad son:

- Identificar el material empleado en las técnicas de biología molecular.
- Aplicar los principios de estructura celular y las propiedades de los ácidos nucleicos en técnicas de extracción y purificación de ácidos nucleicos.
- Diferenciar entre las distintas variantes de la PCR.
- Asociar las técnicas moleculares con el análisis de ácidos nucleicos.

Competencia específica

Asociar los procesos genéticos con la manipulación de los ácidos nucleicos a través del estudio de técnicas de biología molecular para identificar sus aplicaciones en el campo de la biotecnología.



¿Qué debo aprender en esta unidad?

Unidad 1. Biología molecular de ácidos nucleicos

1

Identificar el material empleado en las técnicas de biología molecular.

2

Describir los pasos y fundamentos de la extracción de ácidos nucleicos.

3

Explicar los métodos de análisis de ácidos nucleicos.

4

Diferenciar entre las distintas variantes de PCR

5

Describir el fundamento de secuenciación de ácidos nucleicos.

6

Conocer los principios de la genómica.





1.1. Obtención de ácidos nucleicos

Aunque los seres humanos han alterado el patrimonio genético de los organismos durante siglos mediante la cría selectiva, sólo recientemente ha sido posible la manipulación directa del DNA. Hoy en día existen muchos protocolos que nos permiten realizar estos procedimientos de una forma más sencilla y específica, para lo cual se requiere de material y equipo especializado, es por ello que a continuación vas a identificar algunos de los materiales más empleados en las técnicas de manipulación del DNA.

1.1.1. Material empleado en técnicas de biología molecular

Mucho del material que se emplea dentro de un laboratorio de biología molecular se comparte con el de otros laboratorios, como los matraces, probetas, vasos de precipitados, pipetas, etc., sin embargo hay instrumentos y material más específico y que es básico que conozcas:

- **Micropipetas.** Son instrumentos de alta precisión que permiten medir y manejar volúmenes desde 1 hasta 1000 μL de una manera muy precisa y práctica. Para su manejo se emplean puntas desechables hechas con un plástico especial libre de nucleasas y DNA. Antes de utilizarlas, deberás seleccionar la micropipeta más adecuada para el volumen que vas a medir, es decir, si se necesitan 50 μL se utiliza la micropipeta que tiene el rango de 10-100 μL .

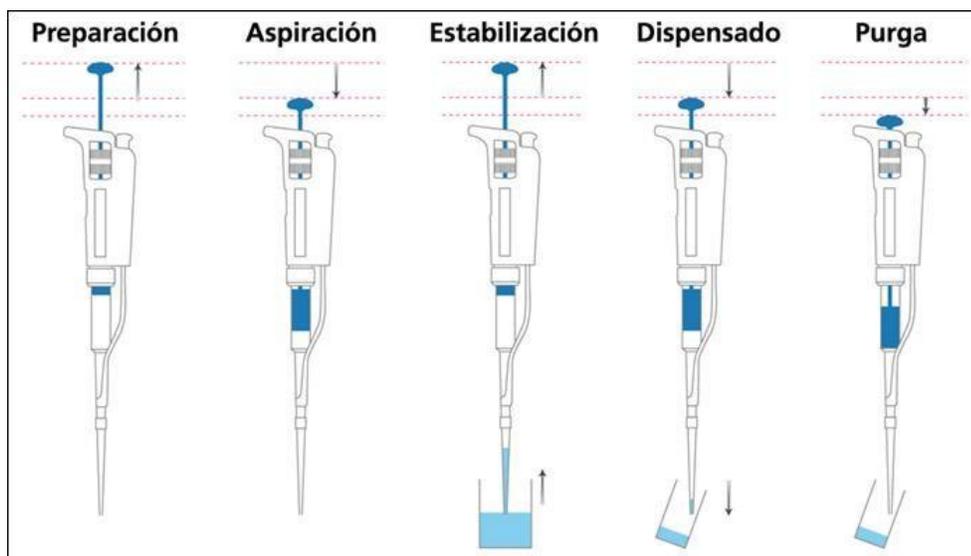


Figura 1. Uso de la micropipeta. Se muestra el mecanismo de uso de una micropipeta para la aspiración y purga de muestras.

Tomado de http://www.catlab.com.ar/images/notas_tecnicas/29061109_xl.jpg



- **Tubos Eppendorf.** Son tubos de un polímero especial que puede contener volúmenes muy pequeños, desde 200 μ L hasta 1.5 ml. Son capaces de resistir temperaturas superiores a los 100°C y cercanas a los -80°C sin sufrir daño. Además, algunos de ellos son libres de nucleasas y endotoxinas bacterianas, lo cual es una característica muy importante para mantener el DNA sin alteraciones.



Figura 2. Tubos Eppendorf.
Se muestran tubos eppendorf de diferentes volúmenes y modelos.

Tomado de <https://online-shop.eppendorf.es/ES-es/Puntas-tubos-y-placas-44512/Tubos-44515/Eppendorf-Safe-Lock-Tubes-PF-8863.html>

- **Guantes de nitrilo.** Son guantes fabricados de un material especial, que ofrece protección moderada contra algunos de los solventes y ácidos utilizados en biología molecular protegiendo las manos, pero sobre todo impiden que las muestras se contaminen con el DNA del investigador y que las enzimas degradadoras de ácidos nucleicos presentes en las manos ingresen a la muestra, destruyéndola. Adicionalmente, algunos de ellos son de bajo contenido de polvos, como el talco, que comúnmente se usa en otro tipo de guantes, esto debido a que éstos pueden causar inhibición de algunas reacciones.
- **Campana de flujo laminar.** Son gabinetes que permiten controlar el flujo y la pureza del aire que está en contacto con las muestras, para evitar contaminaciones durante el desarrollo de las técnicas de biología molecular. El flujo de aire procede de un ventilador que pasa a través de un filtro de alta eficiencia HEPA, capaz de retener partículas mayores de 0,3 micrómetros con una eficiencia del 99.97%; este ventilador también regula la velocidad del aire generando una presión necesaria para que el flujo de aire en el área de trabajo sea laminar. También tiene incorporada una lámpara de luz UV que se enciende antes y después del trabajo para mantener las condiciones asépticas.

Existen dos tipos de campanas de flujo laminar: horizontal y vertical. En los modelos de flujo horizontal el aire filtrado atraviesa la cámara principal de la cabina en una corriente de aire laminar horizontal unidireccional y se expulsa por la



abertura frontal de la cabina. En los modelos de flujo vertical, el aire filtrado atraviesa la cámara principal de la cabina en una corriente de aire laminar vertical unidireccional antes de ser expulsado por la abertura frontal de la cabina. En las cabinas de flujo laminar horizontal hay un grado de turbulencias ligeramente menor que en las cabinas de flujo vertical debido a que el flujo de aire no golpea la superficie de trabajo. Sin embargo, las cabinas de flujo laminar vertical generan menos turbulencias alrededor de las piezas grandes del equipo.



Figura 3. Campana de flujo laminar. Se muestra una campana de flujo laminar que permite el trabajo en condiciones asépticas.

Tomado de <http://www.directindustry.es/prod/erlab/campanas-de-flujo-laminar-18111-139478.html>

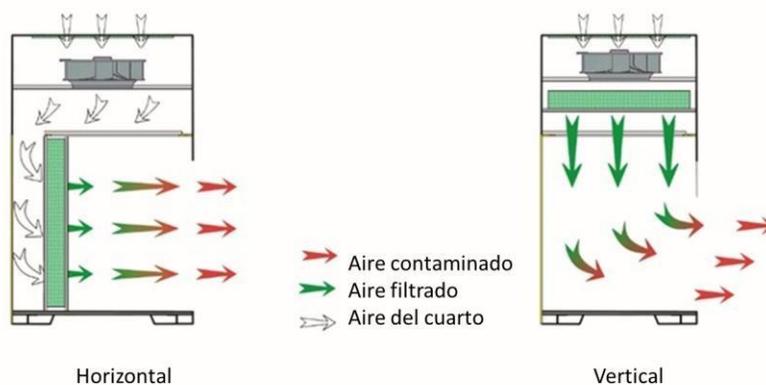


Figura 4. Tipos de campanas de flujo laminar. Se muestra cómo es el flujo del aire dentro de una campana de flujo horizontal (izquierda) vertical (derecho).

Modificado de http://es.made-in-china.com/co_biobase/product_Laminar-Flow-Cabinet-Bsc-V680_esgeehoe.html



- **Microcentrífuga.** Es un instrumento que permiten someter a muestras pequeñas a intensas fuerzas que producen la sedimentación en poco tiempo de las partículas que tienen una densidad mayor que la del medio que las rodea. Una de las variables clave durante el proceso de centrifugación es la velocidad, la cual se expresa en rpm (revoluciones por minuto) o $x g$ (por gravedades), ésta última es la más utilizada y representa la fuerza centrífuga relativa (FCR). Estos valores tienen que ajustarse al tipo de centrifuga conociendo el radio del rotor en centímetros:

$$x g = 1.12 \times \text{radio del rotor} \times (\text{RPM}/1000)^2$$

Estos son los materiales básicos de un laboratorio de biología molecular, sin embargo existen muchos instrumentos y equipos más que vas a ir describiendo a lo largo de esta asignatura, ya que son específicos para cada una de las técnicas empleadas.



Figura 5. Microcentrífuga. Se muestra una microcentrífuga para tubos eppendorf de 1.5 mL.

Tomado de: <http://nitsac.com/wp/?p=522>

- **Ultracentrífuga.** Es una centrifuga que se emplea para separar células en grandes cantidades, se emplean con botellas especiales, las cuales son de un plástico muy resistente.



Figura 6. Botellas y ultracentrífuga. Se muestra de lado izquierdo botellas para ultracentrífuga con una graduación que permite el manejo exacto de volúmenes y del lado derecho se muestra una ultracentrífuga que puede alcanzar velocidades de hasta 14000 rpm.

Tomado de: <http://www.denvillescientific.com/catalog/23>.

1.1.2. Extracción de ácidos nucleicos

El primer paso en el análisis de los ácidos nucleicos es su extracción y purificación, actualmente existen muchos protocolos descritos para este fin, así como también kits comerciales que nos facilitan la metodología y reducen el tiempo invertido.

En primera instancia debes identificar qué tipo de ácido nucleico vas a extraer, ya que sus propiedades son distintas, por ejemplo: el RNA es muy lábil y puede degradarse muy fácilmente, a diferencia del pDNA que tiene mayores capacidades de resistir al proceso, además de que sus características bioquímicas nos facilitan su aislamiento. Es importante considerar también las características de la muestra de la que vas a obtener los ácidos nucleicos, por ejemplo: no es lo mismo obtener DNA de una muestra de cultivo celular de células eucariotas, que de una muestra de heces, o de un cultivo de mycobacterias.

Independientemente del tipo de DNA y de la muestra que vayas a emplear, la técnica de extracción de ácidos nucleicos debe incluir las siguientes fases:

1. **Lisis celular.** Para la etapa de lisis celular es muy importante elegir el proceso adecuado, ya que debe ser lo suficientemente fuerte para romper las células del tejido con el que se esté trabajando (sangre, tejido muscular, hueso, tejidos vegetales como raíz, tallos, hojas, etc.) y a su vez lo suficientemente gentil para asegurar la preservación del ácido nucleico que se va a analizar.



Entre los procedimientos de lisis celular más utilizados se encuentra:

- **Disrupción Mecánica.** Se lleva a cabo por medio de la molienda, machacado o licuado del tejido que pretende analizarse; este proceso puede llevarse a cabo por medio de un mortero y un pistilo o con disruptores celulares que son una especie de micro licuadora, cuyas aspas muelen finamente el tejido. También es común el uso de sonicadores que rompen el tejido utilizando ondas de alta frecuencia.



Figura 7. Instrumentos para disrupción mecánica. De izquierda a derecha se muestra un mortero, disruptor celular y un sonicador, empleados para romper de forma mecánica la célula.

Tomado de <http://mercalab.com/-porcelana/471-mortero-con-mano-de-porcelana-economico-.html>

- **Lisis hipotónica.** Las soluciones hipotónicas inducen la entrada masiva de agua hacia los tejidos, el exceso de agua incrementa la presión osmótica de la célula, lo que origina que la membrana celular se rompa, dejando libre el contenido celular.
- **Congelación y descongelación:** En este proceso; la muestra se congela ya sea con nitrógeno líquido o hielo seco, cuando la muestra se ha congelado totalmente se calienta en baño de agua. Este proceso también llamado de choque térmico, se repite entre tres y cinco veces liberando el material de interés de una forma rápida y económica.
- **Lisis química:** Se lleva a cabo mediante detergentes, estas sustancias tienen la capacidad de disolver la membrana plasmática de las células liberando su contenido, existen soluciones específicas para este fin conocidas como buffer de lisis; su composición puede variar. A continuación se presenta la composición de un buffer de lisis utilizado con frecuencia:

EDTA 100mM, pH 8.0



Tris - Cl 10 mM. pH 8.0

N- lauroylsarcosin de sodio al 1% (peso/volumen)

Proteinasa K 100 µg/ml. Para evitar que la proteinasa pierda efecto, debe agregarse justo antes de usarse (Lodish *et al.*, 2006).

2. **Inactivación de nucleasas.** Una vez que se ha descompuesto la estructura de la célula y se han liberado los ácidos nucleicos, es importante realizar una inactivación de las enzimas (nucleasas), ya que éstas pueden ocasionar la pérdida del material genético.

El DNA libre es muy susceptible de ser degradado por enzimas llamadas DNAsas, mientras que las que degradan el RNA se les conoce como RNAsas. Estas enzimas están por todos lados; en las manos, en secreciones como saliva y sudor, en el aire; es por eso que para garantizar que la integridad de los ácidos nucleicos que se están extrayendo se mantenga intacta, se realiza una inhibición de su actividad degradadora, Para tal efecto se utilizan comúnmente:

- β -mercaptoetanol; un agente reductor que inactiva a las nucleasas.
 - SDS (dodecilsulfato de sodio); un agente quelante que secuestra iones como el magnesio y calcio, necesarios para la actividad catalítica de la enzima.
 - Proteasas. Son enzimas que degradan proteínas, dentro de las cuales se encuentran algunas enzimas.
3. **Separación y purificación.** Hasta este momento, en nuestra mezcla tenemos todo el contenido de la célula, incluidas proteínas, carbohidratos y lípidos junto con los ácidos nucleicos, es por ello que se requiere realizar una separación y purificación para poder obtener una muestra pura con la que podamos trabajar.

Para la purificación del DNA generalmente se mezcla éter, buffer TE pH 8.0 y agua en proporción 1:1, esta mezcla se agrega en proporción 1:1 a la mezcla de DNA que deseamos purificar, utilizando un vórtex para homogenizarla y se centrifuga a máxima potencia por cinco segundos descartando la fase superior; este proceso de lavado se realiza tres veces. Al terminar el lavado, el pellet se deja secar en una campana o al vacío por 15 minutos.

Como ya se comentó, el proceso de extracción debe ajustarse dependiendo del tipo de células del que queramos obtener el DNA, es por ello que a continuación se analizarán algunos procedimientos que se emplean para la extracción de DNA de distintas muestras.

Antes de que revise estos procedimientos es importante que aclarar dos términos que se emplean con frecuencia en estas técnicas: **pastilla** y **sobrenadante**. Después de una



centrifugación, el contenido que se adhiere al fondo del tubo se denomina pastilla, pellet o paquete celular; mientras que el resto del líquido o materia que queda en la parte superior de la pastilla y que normalmente no se adhiere al tubo, es el sobrenadante. Cuando únicamente nos interesa el contenido en la pastilla y queremos desechar el sobrenadante, lo podemos realizar mediante decantación; por el contrario, cuando lo que necesitamos es el contenido dentro del sobrenadante, se debe emplear una micropipeta para retirar con sumo cuidado el líquido del tubo, inclinándolo ligeramente.



Figura 8. Producto de la centrifugación. Del lado izquierdo se muestra la pastilla separada del sobrenadante después de la centrifugación, del lado derecho se esquematiza la forma correcta de extraer el sobrenadante, inclinando el tubo del lado opuesto a donde está adherida la mayor cantidad de la pastilla.

Tomado de <http://metablogismo.blogspot.mx/2012/10/uno-de-los-mayores-problemas-a-los-que.html> y <http://ocw.mit.edu/courses/biological-engineering/20-109-laboratory-fundamentals-in-biological-engineering-spring-2010/labs/module-2-day-4-prepare-expression-system/>.



Extracción de DNA de células animales

En el caso de que sean células adherentes, como los fibroblastos (Lodish *et al.*, 2006):

1. Tratar con tripsina, una enzima que rompe las uniones celulares que las mantienen adheridas, liberando a las células para que puedan colectarse,
2. Centrifugar por cinco minutos a 500 X g a 4°C, desechando el sobrenadante.
3. Lavar dos veces el paquete celular obtenido, resuspendiéndolo en 1 ó 10 ml de buffer PBS enfriado con hielo.
4. Centrifugar y disolver la pastilla en un mililitro de buffer de digestión por cada 10⁸ células.
5. Almacenar en tubos perfectamente tapados por un lapso de entre 12 a 18 horas en agitación constante a 50°C.
6. Extraer el DNA con una mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en un volumen equivalente al volumen de la muestra (1:1).
7. Centrifugar para separar las fases de la mezcla.
8. Transferir la fase superior a un tubo en presencia de acetato de amonio y etanol absoluto por 24 hr para evitar la fragmentación del DNA.
9. Retirar el etanol y cambiarlo por buffer Tris EDTA (ambas sustancias son quelantes de iones).
10. Almacenar a 4°C por tiempo indefinido.

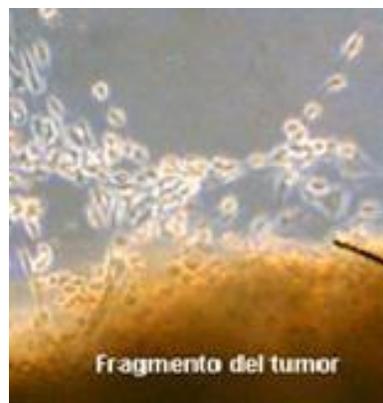


Figura 9. Fragmento de un tumor tratado con tripsina. Se aprecia cómo se desprenden algunas células individuales de la masa celular a causa del tratamiento con tripsina.

Tomado de

http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012202682012000200003&script=sci_arttext.



Extracción de DNA de células vegetales

1. Obtener una muestra de 50-100 g de tejido vegetal fresco.
2. Lavar con agua desionizada.
3. Pulverizar la muestra.
4. Transferir el producto de la pulverización a una botella para centrifuga de 250 ml.
5. Agregar entre 5 y 10 ml de buffer de extracción (100 mM Tris-Cl, pH 8.0, 100 mM EDTA, pH 8.0, 250 mM NaCl, 100 µg/ml proteinasa K) por gramo de muestra, agitando suavemente.
6. Centrifugar y recuperar el sobrenadante.
7. Agregar seis volúmenes de isopropanol mezclando suavemente.
8. Agregar 9.7 g de cloruro de cesio, útil para separar ácidos nucleicos por gradiente de densidad.
9. Incubar por 30 minutos en hielo.
10. Centrifugar por 10 minutos a 7500 X g, a 4°C y recuperar el sobrenadante.
11. Extraer el DNA con una mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en un volumen equivalente al volumen de la muestra (1:1).
12. Centrifugar para separar las fases de la mezcla.
13. Transferir la fase superior a un tubo en presencia de acetato de amonio y etanol absoluto por 24 hr para evitar la fragmentación del DNA.
14. Retirar el etanol y cambiarlo por buffer Tris EDTA (ambas sustancias son quelantes de iones).
15. Almacenar a 4°C por tiempo indefinido.



Extracción de DNA bacteriano

1. Crecer las bacterias en medio líquido, en tubos de ensayo con tapa de rosca. Las condiciones de cultivo y el medio dependerán de la bacteria a crecer.
2. Centrifugar 1.5 mL del cultivo inicial a 3000 x g por 3 min.
3. Resuspender el paquete celular en 567 μ L de buffer TE.
4. Agregar 300 μ L de SDS al 10% más 3 μ L de proteinasa K mezclando vigorosamente.
5. Incubar por una hora a 37°C.
6. Agregar 100 μ L de cloruro de sodio 5M, para evitar que los ácidos nucleicos se precipiten en este momento.
7. Lavar con cloroformo, alcohol isoamílico y fenol.
8. Centrifugar la mezcla de alcoholes y recuperar la fase acuosa.
9. Agregar 400 μ L de etanol absoluto y dejar reposar a 4°C por lo menos 1 h, de preferencia toda la noche.
10. Centrifugar a 3000 x g por 3 min.
11. Eliminar el sobrenadante y agregar 200 μ L de etanol al 70%.
12. Centrifugar a 3000 x g por 3 min.
13. Eliminar el sobrenadante y dejar secar al aire el botón celular.
14. Resuspender en 100 μ L de buffer TE o de agua ultrapura (Lodish *et al.*, 2006).



Figura 10. Científica mostrando DNA recién extraído suspendido en buffer. El material genético se aprecia como una masa blanquecina lechosa suspendida en el líquido transparente.

Tomado de www.sciencephotolibrary.com.



Como se mencionó, existe otro método muy rápido, para purificar DNA que implica el uso de kits comerciales, que si bien son caros, son altamente efectivos. Por lo general estos kits contienen todo lo necesario para llevar a cabo el proceso completo y sólo es cuestión de seguir el protocolo incluido.

El fundamento de estos kit se basa en la adsorción y desorción de los ácidos nucleicos en presencia de sales caotrópicas. Bajo condiciones normales, los ácidos nucleicos están recubiertos de una capa hidratante de moléculas de agua que mantienen la solubilidad del DNA en soluciones acuosas. Con la adición de iones caotrópicos a los ácidos nucleicos, se destruye esta ordenada estructura de moléculas de agua de la capa hidratante, por lo que las sales caotrópicas crean un entorno hidrofóbico alrededor del DNA. Bajo estas condiciones hidrofóbicas, los ácidos nucleicos se unen perfectamente a la membrana de sílica de las columnas, mientras que las proteínas, los metabolitos y otros contaminantes no se unen y, por lo tanto, son eliminados de la muestra durante los pasos de lavado. Posteriormente, los ácidos nucleicos se eluyen de la membrana de sílica mediante tampones de elución con baja concentración de sales (ligeramente alcalinos) o simplemente agua, ya que permiten recuperar la capa hidratante de los ácidos nucleicos, liberándolos así de la membrana.



Figura 11. Columna de sílica para purificar DNA. El sistema se compone de un tubo eppendorf con fondo redondo y una columna que contiene un filtro de sílica en la que se introduce la muestra a purificar.

Tomado de
http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_AN_Purificacion&opc=productosdesacados&idap=236

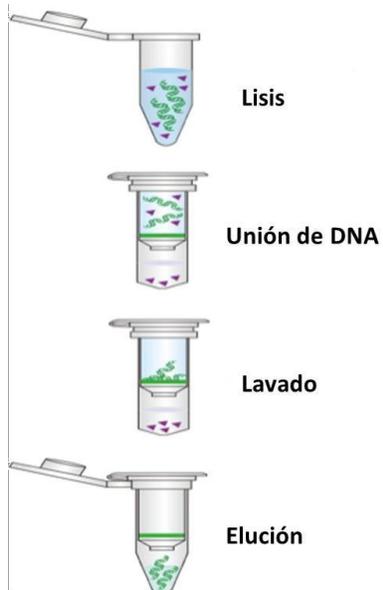


Figura 12. Fundamento de la extracción con kit. Primero se lisan las células y se coloca en la columna a la que se une el DNA, posteriormente se hacen lavados para eliminar impurezas para finalmente eluir el DNA.

Modificado de

<https://www.google.com.mx/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiF24HDiM3JAhWCNSYKHbEECcQQjxwIAw&url=http%3A%2F%2Fwww.danagen.es%2Fproductos%2Fnucleic-acid-purification%2Fgenomic-dna%2F&psig=AFQjCNFI344dE5g58hPeMxz1PK6GQ3lnPg&ust=1449691102730769>

1.1.3. Extracción de RNA

A diferencia del DNA, el RNA es un ácido nucleico muy lábil, debido a las características de su estructura y a que puede ser sujeto de degradación más fácilmente, es por ello que para poder extraerlo no se emplea la misma técnica que para el DNA.

Para relizar la extracción de RNA intacto se requiere de la inactivación de RNAsas y para ello se utilizan fuertes agentes desnaturizantes como el tiocionato de guanidina que permitan lisan las células, solubilizar sus componentes y desnaturizar simultáneamente RNAsas endógenas.

Existen distintas técnicas empleadas pero la más utilizada fue descrita por Chomczynski y Sacchi en 1987, en la cual el tiocianato de guanidina es extraído utilizando solventes como fenol cloroformo. Lo cual genera una segunda fase orgánica en la cual el DNA y las



proteínas son extraídas liberando el RNA en el sobrenadante. El RNA puede ser precipitado utilizando isopropanol y purificado por cromatografía.

El trizol es un reactivo listo para utilizarse en el aislamiento de RNA de células y tejidos, es una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina que durante la homogenización o lisis de la muestra mantiene la integridad del RNA, al mismo tiempo que altera la estabilidad de las células y disuelve los componentes celulares. Ha demostrado estabilidad hasta por 12 meses a temperatura ambiente sin embargo se recomienda almacenarlo a temperatura de 2-8°C para un óptimo rendimiento.

Extracción de RNA

1. Extraer cuidadosamente con ayuda de un equipo de disección, el tejido a utilizar, no contaminar con otro tejido, y de ser posible enjuagar con agua DEPC.
2. Fragmentar el tejido, pesar y colocarlo en un tubo.
3. Mezclar 10 mg de tejido con 0.75 mL de trizol.
4. Homogenizar la muestra.
5. Incubar el homogenizado por 5 min a temperatura ambiente (En este paso la muestra puede ser almacenada a -80 °C).
6. Adicionar 0.2 mL de cloroformo por cada 0.75 mL de Trizol.
7. Mezclar vigorosamente con la mano por 15 seg e incubar a temperatura ambiente por 2-15 min.
8. Centrifugar la muestra a no más de 12,000 x g por 15 min a 4 °C.
9. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio, libre de RNAsas.
10. Precipitar el RNA por adición de 0.5 mL de isopropanol por cada 0.75 mL de Trizol.
11. Incubar a 4 °C por 10 min.
12. Centrifugar a 12,000 x g, por 10 min a 4 °C. El RNA precipitara formando una especie de gel, en la parte inferior del tubo.
13. Remover el sobrenadante. Lavar el pellet con 1 mL de EtOH al 75%.

Las muestras de RNA se pueden emplear para distintos análisis como la hibridación tipo Northern Blot o la transcripción reversa.



1.2. Reacción en cadena de la polimerasa

Hace algunos años, uno de los factores limitantes en el estudio de los genes era la falta de material en cantidades suficientes para estudiarlo, se necesitaba extraer una cantidad considerable de DNA en repetidas ocasiones para poder llevar a cabo una investigación. Los científicos soñaban con la posibilidad de duplicar o producir en masa aquellas secuencias de DNA que estaban estudiando (Lodish *et al.*, 2006). Este sueño fue hecho realidad en 1993 por el científico estadounidense Kary Mullis, quien ganó el premio nobel por esta contribución a la biología molecular. La técnica se conoce como PCR del inglés *Polimerase Chain Reaction*, o reacción en cadena de la polimerasa. Mullis tuvo la visión de reproducir en un tubo de plástico un proceso que llevan a cabo las células desde que aparecieron sobre la tierra, la replicación; de este modo, la ciencia ahora cuenta con una técnica que la hace de fotocopiadora molecular, permitiendo sintetizar millones de copias de una secuencia en particular para poder estudiarla (Curtis *et al.*, 2007).

1.2.1. Componentes que intervienen en la PCR

La técnica de PCR asemeja muchos de los procesos que la célula lleva a cabo para replicar el material genético, sin embargo, en este caso sin la presencia de muchas de las enzimas y el ambiente necesarios, por lo que reproducir este proceso en un tubo no es tan sencillo, de tal manera que vamos a estudiar primero todos los componentes y el equipo que intervienen en el proceso y que permiten que éste se lleve a cabo de forma artificial o *in vitro*.

Enlace

Recuerda que en la asignatura Biología molecular I estudiaste el proceso de replicación del DNA, por lo que ahora podemos reproducir este proceso *in vitro*, de forma artificial en la técnica de PCR.

- **Termociclador.** Es un aparato que tiene una cámara en la que se llevan a cabo cambios muy rápidos de temperatura entre los 4 y 90 °C. La fluctuación entre las temperaturas es un factor crucial para que la PCR se lleve a cabo ya que en primera instancia suple la función de la helicasa: desnaturaliza las dos hebras de DNA, rompiendo los enlaces por puentes de hidrógeno por acción de la



temperatura; Posteriormente, una vez abierta la hebra, la temperatura se reduce para permitir que los cebadores se unan a su secuencia complementaria en el DNA, finalmente. Finalmente la temperatura debe permitir que la enzima que va a polimerizar las nuevas copias de DNA sea capaz de acoplarse al DNA, mantenerse en su sitio y que la reacción de polimerización de nucleótidos se lleve a cabo (Alberts *et al.*, 2008).



Figura 13. Termociclador. Existen muchas marcas y tamaños, sin embargo todos cuentan con una cámara donde se acoplan los tubos para PCR y una tapa que es la que lleva a cabo las fluctuaciones de temperatura, y una pantalla donde uno puede ingresar los ciclos de temperatura y observar el desarrollo de la reacción.

Tomado de: Laboratorio de investigación, recuperado en abril de 2013, <http://biotecnologia.espe.edu.ec/laboratorios-investigacion/laboratorio-de-biotecnologia-humana/termociclador-para-pcr/>.

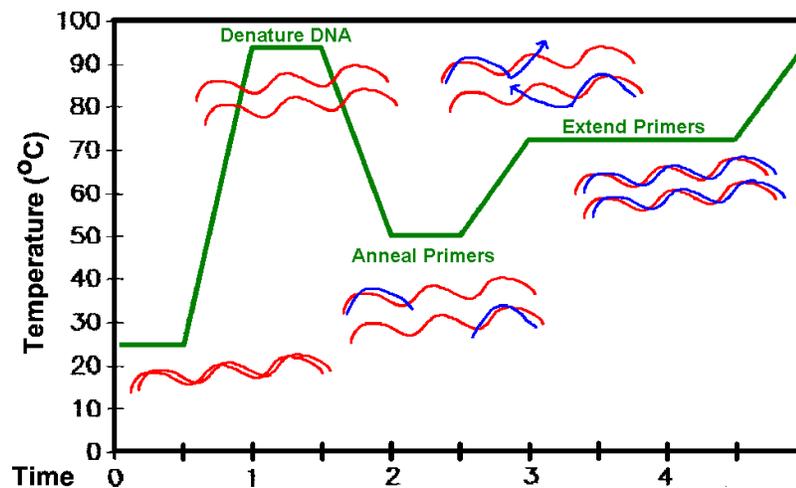


Figura 14. Alternancia de temperaturas en una PCR estándar. Puede observarse las temperaturas de desnaturalización, alineamiento de cebadores y amplificación, este proceso se repite entre 25 y 40 ciclos.

Tomado de: http://www.mun.ca/biology/scarr/PCR_simplified.html



- **Taq polimerasa.** Para suplir la acción de la DNA polimerasa dentro de la célula se requiere de una enzima que tenga la misma acción pero que resista las altas temperaturas dentro del termociclador. La taq polimerasa es una de las enzimas más empleadas y se extrae de la bacteria *Thermus aquaticus*, la cual es extremófila y vive en los geiseres donde el agua alcanza temperaturas superiores a los 100°C. Esta enzima está perfectamente adaptada para trabajar en condiciones de alta temperatura, sin comprometer su integridad molecular y manteniendo un margen de error extremadamente bajo al momento de sintetizar las cadenas. Otras enzimas no son capaces de trabajar bajo las condiciones de temperatura del termociclador ya que se desnaturalizan. Esta enzima debe trabajar en condiciones de pH especiales, es por ello que siempre la venden acompañada de un Buffer o regulador específico para cada una de ellas.
- **Iniciadores.** Para asemejar la acción de los cebadores de RNA que permiten el inicio de la replicación, se emplean los iniciadores u oligos, los cuales son secuencias pequeñas de DNA complementarias a la región que se desea amplificar. Estos iniciadores son los que permiten que la reacción sea específica y amplifique el fragmento de DNA que nosotros deseamos.

Estos cebadores se sintetizan en pares, la secuencia de nucleótidos de uno de ellos es complementaria al extremo 5' del segmento de DNA que se desea amplificar y el otro es complementario al extremo 3'.

La temperatura ideal para la hibridación de los cebadores se conoce como Tm (del inglés *Melting Temperature*).

Tm

Se define como la temperatura a la cual el 50% de las pares de bases del iniciador se encuentran desapareados.

Para calcular la Tm se ocupa la siguiente fórmula:

$$Tm = 2(A+T) + 4(C+G)$$

Ejemplo:

Si se tiene la secuencia: 5'-ATTCTAGATACCGTGACTG-3'



Título de cuadro de texto

1. Contar las adeninas, timinas, citosinas y guaninas.

$$A=6$$

$$T=6$$

$$C=4$$

$$G=4$$

2. Sustituir los valores en la fórmula.

$$T_m = 2(6+6) + 4(4+4)$$

3. Resolver la ecuación.

$$T_m = = 56^{\circ}\text{C}$$

Existen algunas recomendaciones para el diseño de los iniciadores, con el fin de aumentar la eficiencia y especificidad de la reacción:

- Longitud entre 16 y 24 nucleótidos.
 - T_m entre 52 y 58 °C.
 - Contenido de Guaninas y Citocinas entre 40-60%.
 - Evitar la presencia de 3 Guaninas o Citocinas seguidas en las últimas 5 bases del extremo 3' del iniciador.
 - Evitar que formen estructuras secundarias inter o intramoleculares.
 - Evitar la presencia de secuencias repetidas.
 - Evitar inespecificidad del iniciador, es decir, que se una a otras regiones del DNA.
-
- **DNA.** Éste puede provenir de distintas fuentes, incluyendo DNA plasmídico o DNA genómico obtenido de restos momificados, fósiles, muestras forenses como sangre seca o semen, cabello, bacteriano, etc. Sin embargo, es importante que el DNA tenga cierto grado de pureza para evitar interferencias en la reacción. La PCR es muy sensible, y amplifica secuencias específicas de DNA a partir de pequeñas muestras de DNA prácticamente indetectables, incluyendo el DNA de una sola célula. Esta característica de la PCR tiene un valor incalculable en diversa áreas, incluyendo las pruebas genéticas, la medicina forense y la paleontología molecular. También pueden usarse muestras de DNA que están parcialmente degradadas, que se encuentran mezcladas con otros materiales, o que están incluidas (Ej. Inclusión en parafina), lo que sería difícil o imposible con las técnicas de clonación convencionales.



- **Desoxirribonucleótidos.** Es necesario que se incluyan en la PCR los cuatro tipos diferentes de desoxirribonucleótidos trifosforilados: ATP, GTP, CTP y TTP, los cuales se irán agregando al cebador para alargar la cadena de DNA, copiando la secuencia de la hebra original.
- **Cloruro de magnesio.** Este ion necesario para que la enzima polimerasa pueda llevar a cabo su reacción.

Todos los reactivos que se mencionaron deben mezclarse con sumo cuidado, ya que se están manipulando volúmenes muy pequeños y no debemos contaminarlos debido a que la técnica de PCR es muy sensible y puede amplificar cantidades muy pequeñas de DNA.

En la siguiente tabla se muestran las cantidades y el orden en que se deben de mezclar todos los reactivos, pero su concentración se puede ver modificada dependiendo del tipo de PCR, del tamaño y características del fragmento que se desea amplificar y del tipo de DNA molde que se emplea.

Mezcla de reacción para PCR

Reactivo	Volumen a agregar por reacción
Regulador 10X	10 μ L
Mezcla de dNTP's (1.25 mM c/u)	16 μ L
Iniciador 1	100 pmol
Iniciador 2	100 pmol
DNA molde	\approx 2 μ g
Agua estéril grado biología molecular	Ajustar a un volumen final de 100 μ L

Tomado de Sambrook, 1989.

1.2.2. Etapas de la PCR

Ahora que conocemos todos los elementos que participan en el proceso de PCR podemos estudiar cada uno de los pasos involucrados en la técnica. En la práctica, la



PCR implica tres pasos, los cuales constituyen un ciclo de amplificación, y dependiendo del número de ciclos es la cantidad de moléculas de DNA que se obtienen.

Etapas de la PCR

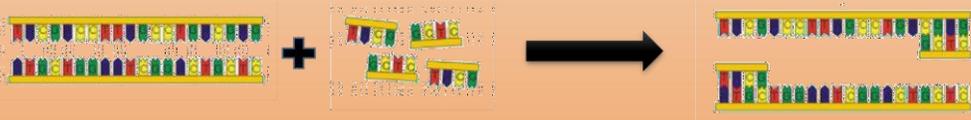
Desnaturalización inicial

El DNA de doble cadena es separado, para lo cual se requiere de una temperatura de entre 90 y 94°C por al menos 5 minutos.



Alineamiento

Los iniciadores se unen a la cadena de DNA molde a una temperatura específica para cada reacción, (aproximadamente 5°C debajo de su Tm).



Alargamiento

La Taq polimerasa agrega los nucleótidos complementarios a la cadena molde en la dirección 5'-3', para ello se requiere de una temperatura óptima para la enzima, de aproximadamente 70 a 75°C. La duración de esta etapa depende del tamaño del fragmento que se desea amplificar (60 segundos/kilobase).



De tal manera que al finalizar el ciclo tendremos dos moléculas o fragmentos de DNA idénticos al original, lo cual actuará como sustrato del siguiente ciclo.





La amplificación de las secuencias en la PCR es exponencial, esto permite que en un lapso de tiempo muy corto y con poca cantidad de muestra inicial se obtengan grandes cantidades de material genético amplificado. Como el procedimiento se lleva a cabo una y otra vez, los fragmentos recién sintetizados sirven como plantillas para los ciclos siguientes, y al cabo de unos pocos ciclos, la secuencia predominante es idéntica a la secuencia delimitada por los cebadores en la secuencia original, incluyendo los dos cebadores de la cadena original. Es decir, solo se amplifican las secuencias delimitadas por los cebadores, ya que el resto del DNA, sin importar su longitud no se amplifica ya que no está flanqueada por cebadores. (Watson *et al.*, 2008; Alberts *et al.*, 2008).

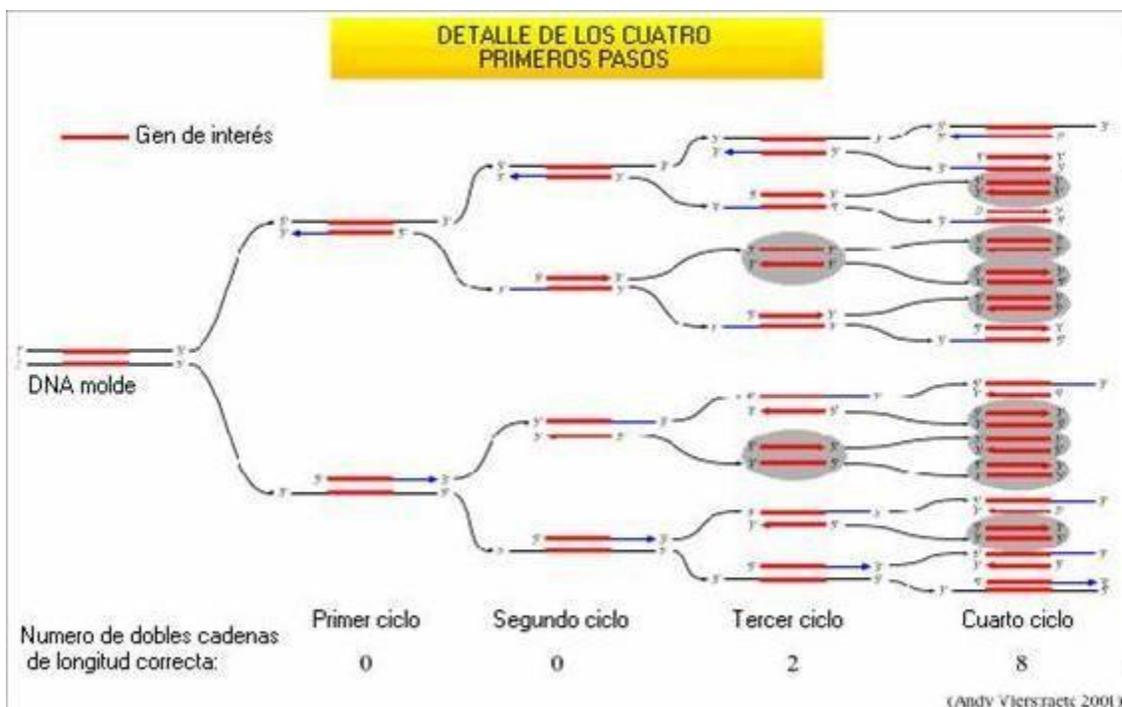


Figura 15. Diagrama de una PCR. Se observa que después de ocho ciclos, en número de cadenas de DNA aumenta amplificando el fragmento de interés.

Tomado de: <http://cmapspublic2.ihmc.us/rid=1HZ6CDY56-1J059V-QF5/PCR.jpg>

A este tipo de PCR también se le conoce como PCR de punto final, pero no es la única que existe, ya que se han diseñado variaciones de ésta técnica que son empleadas para diferentes fines y que vamos a estudiar a continuación. Ahora que ya se obtuvieron grandes concentraciones de un fragmento de DNA, es necesario visualizarlos y/o cuantificarlos siguiendo técnicas como la electroforesis en gel de agarosa o espectrometría, los cuales analizaremos más adelante.



1.2.3. Variantes de la PCR

La técnica de PCR tradicional o también llamada de punto final, puede ser modificada para dar lugar a muchas variantes, a continuación vamos a analizar algunas de las más importantes:

- **qPCR**

La PCR de tiempo real o cuantitativa, es una variante que se utiliza para cuantificar la amplificación de una secuencia de DNA o mRNA de una muestra.

En ésta técnica se pueden emplear distintos tipos de iniciadores o mecanismos de detección de las moléculas amplificadas, sin embargo, las más empleadas son las llamadas sondas Taqman, las cuales son un oligonucleótido cuya secuencia es complementaria a la región central del fragmento a amplificar. Las sondas Taqman presentan en su extremo 5´ una marca fluorescente (reportero) y en el 3´ un apagador (quencher). Cuando estas dos moléculas se encuentran unidas por la sonda, toda la fluorescencia emitida por el reportero, es absorbida por el apagador, por lo que la fluorescencia global observada es igual a cero, a este fenómeno se le conoce como de Förster (o Fluorescent) Resonant Energy Transfer (FRET).

Las sondas TaqMan tienen una T_m mayor que los iniciadores por lo que, durante la etapa de alineación, la sonda se une a su secuencia blanco específica antes que los iniciadores. De esta forma cuando la DNA polimerasa se une al extremo 3´ del primer e inicia la elongación, en su paso se encuentra con la sonda y la degrada dada su actividad exonucleasa 5´ - 3´. Al ser degradada, libera al reportero del apagador lo que suprime el fenómeno FRET y la fluorescencia emitida puede ser determinada por el sistema de detección del instrumento.

Al observar el proceso de amplificación, se distinguen en la cinética de amplificación tres fases:

- **Geométrica:** Durante esta fase todos los reactivos de la reacción se encuentran en abundancia; en esta etapa la eficiencia de amplificación bajo las condiciones experimentales es muy cercana al 100%, en esta fase la cinética de amplificación tiene un comportamiento 2^n en donde a partir de una molécula de DNA se generan 2 moléculas de DNA.
- **Lineal:** Los iniciadores, dNTP´s y/o las enzimas comienzan a ser factores limitantes además de que se generan moléculas de pirofosfato y ocurre el decaimiento de la actividad enzimática que afectan la eficiencia de amplificación de manera constante, por lo que no es posible llevar a cabo un ensayo cuantitativo en esta parte.



- **Estacionara:** En este punto se detiene la amplificación, la cantidad de producto obtenida es constante sin importar cuantos ciclos mas se prolongue la reacción.

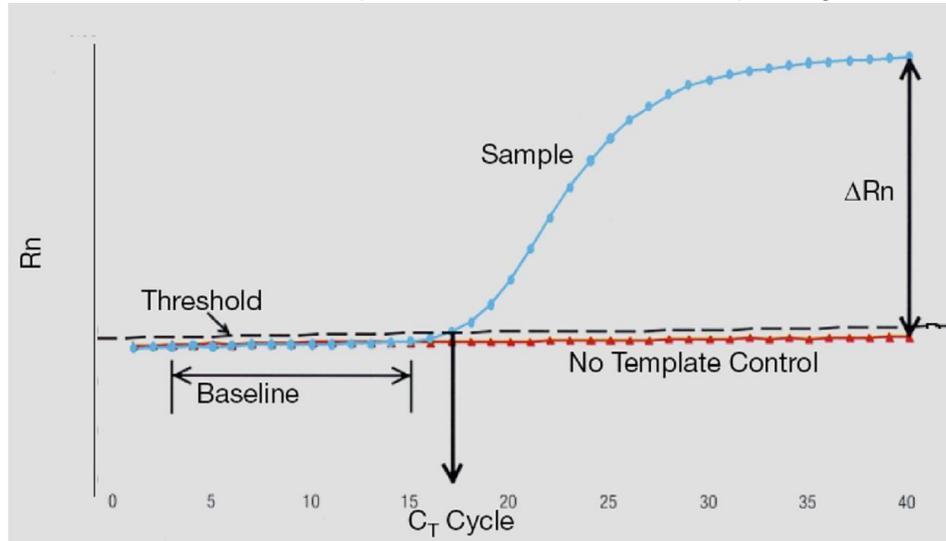


Figura 16. Gráfica de una qPCR. En el eje de x se observan los ciclos, mientras que en y los valores de fluorescencia. En azul se observa la fluorescencia obtenida únicamente por el producto de amplificación. En rojo se denota la señal de los controles sin templado. La línea basal (baseline) abarca típicamente de los ciclos 5 al 15 (flecha \leftrightarrow). El umbral (threshold) se fija con base en los valores de la línea basal, aquí se ve como línea punteada.

Tomado de: Applied Biosystems.

Para efectuar los ensayos de cuantificación, dentro de la fase geométrica es necesario definir un punto de intensidad de fluorescencia o umbral de detección, en el cual todas las muestras puedan ser comparadas entre sí. Este umbral de detección se establece basándose en la fluorescencia del background y equivale a 10 veces la desviación estándar de la media de emisión de la línea basal. Al ciclo en el cual cada muestra consigue llegar a este umbral de detección, se le conoce como C_t (del inglés *threshold cycle*, ciclo de umbral de detección). De esta forma, el C_t es un número fraccional que indica cuántos ciclos le tomó a cada muestra generar la cantidad suficiente de fluorescencia para llegar al umbral de detección. El valor de C_t es directamente proporcional a la cantidad inicial de muestra y es el fundamento para calcular la cantidad de mRNA o DNA. Mientras mayor cantidad de DNA se encuentre en una muestra, menor número de ciclos requerirá para alcanzar el umbral de detección, diferencias en un C_t indican el doble o la mitad de cantidad de templado inicial.

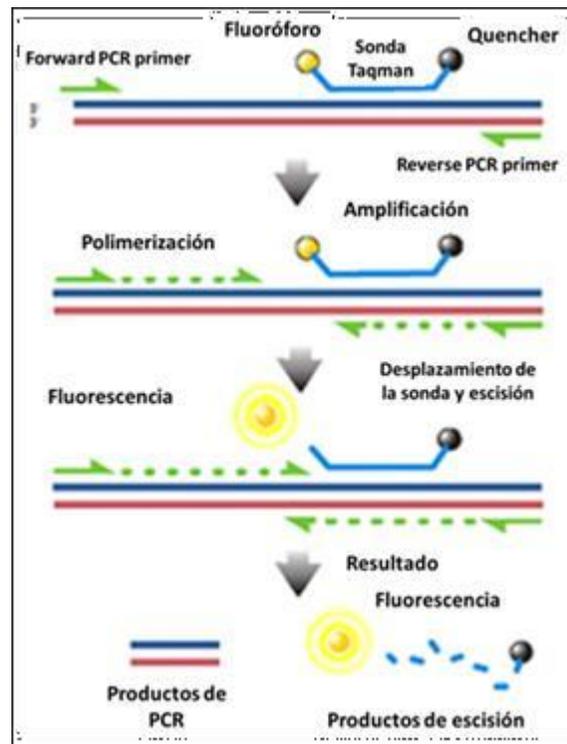


Figura 17. Sistema Taqman para PCR de tiempo real. Se observa como la sonda se alinea con su región complementaria, sin generación de fluorescencia, posteriormente cuando se escinde una porción de ella por acción de la DNA polimerasa, se emite la fluorescencia.

Tomado de <http://epidemiologiamolecular.com/estudio-virolgico-virus-gripe/>

Esta revolucionaria técnica tiene muchas ventajas y aplicaciones; a continuación se resumen en la siguiente tabla:



Ventajas y aplicaciones de la qPCR

Ventajas	Aplicaciones
Simple y rápida	Identificación de genes de virulencia o resistencia
Sin manipulación post PCR	Genotipificación
Cuantificación precisa	Identificación de patógenos
Alta sensibilidad y especificidad	Detección de mutaciones
Resolución de más de un producto	Estudio de polimorfismos
	Detección de la expresión génica

- **PCR múltiplex**

Es una variante de la PCR donde se amplifican de forma simultánea en el mismo tubo, distintas secuencias específicas.

Para ello se requiere que los reactivos mezclados y el programa utilizado sean suficientes y adecuados para permitir la detección de cada diana y no inhibir la de las demás. Con este fin, algunos parámetros, como la concentración de magnesio y de cebadores, y el tipo y la cantidad de DNA polimerasa, pueden ajustarse experimentalmente. Para otros, en cambio, debe realizarse un diseño exhaustivo previo.

En el caso de los iniciadores y el programa de temperaturas utilizado, es necesario tener en cuenta varias consideraciones sobre los iniciadores:

- Que no interaccionen entre sí.
- Que tengan temperaturas de alineamiento similares.
- Que cada pareja amplifique una única secuencia diana
- Que generen amplicones de tamaño suficientemente diferente como para poder ser separados y diferenciados tras la amplificación.

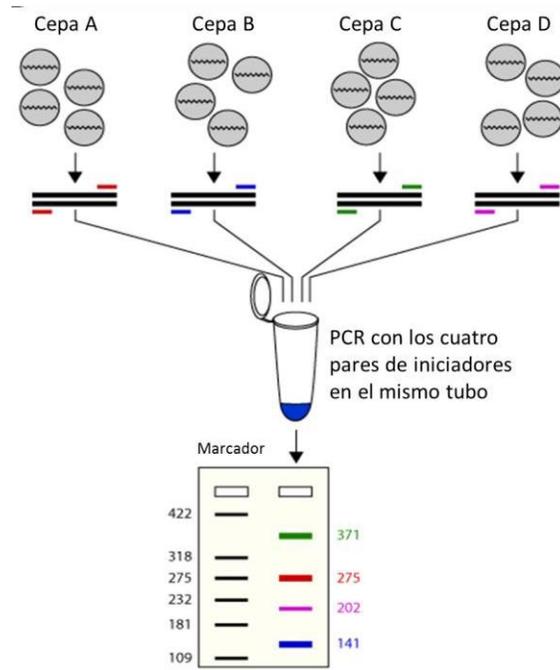


Figura 18. PCR múltiplex. Se muestra el fundamento de la técnica con el uso de varios pares de iniciadores que amplificarán distintos blancos, además se puede utilizar el mismo o diferente DNA molde.

Modificado de: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/multiplex-pcr.html



Ventajas y aplicaciones de la PCR múltiplex

Ventajas	Aplicaciones
Cada amplificación individual es un control interno de la reacción.	Identificación de patógenos
Menos reactivos y tiempo invertido	Genotipificación
La calidad de la muestra se puede determinar de forma más efectiva	Análisis de deleciones genéticas
	Detección de mutaciones
	Detección de RNA
	Estudios forenses

- **RT-PCR**

La PCR con retrotranscriptasa es una variante de la PCR diseñada para detectar y amplificar muestras de RNA. Esta técnica se emplea debido a que varios virus contienen RNA como material genético, además de que se pueden realizar análisis de expresión de genes, detectando mRNA.

Esta técnica se basa en tomar el RNA y convertirlo a DNA mediante el uso de la enzima transcriptasa reversa, posteriormente se realiza la amplificación como una PCR de punto final, para ello se llevan a cabo las siguientes etapas:



RT-PCR

1. Se purifica el RNA y se convierte a DNA complementario (cDNA) con la enzima retrotranscriptasa.
2. Se desnaturalizan las hebras formadas.
3. Los iniciadores se alinean a su región complementaria.
4. La DNA polimerasa sintetiza una nueva cadena
5. Se agrega un segundo par de iniciadores que sintetizarán cadenas de DNA como en la PCR en punto final.

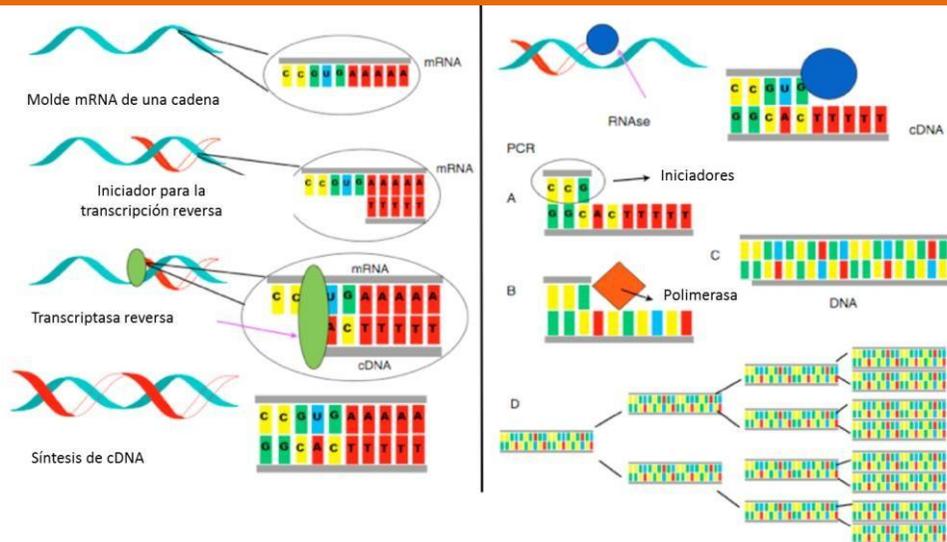


Figura 19. RT-PCR. Se muestra del lado izquierdo la síntesis de la cDNA y del lado derecho la amplificación de las cadenas de DNA.

Modificado de:

https://lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=reverse%20transcriptase%20polimeras e%20chain%20reaction&lang=1



Ventajas y aplicaciones de la RT-PCR

Ventajas	Aplicaciones
Detecta transcritos de cualquier gen.	Medición de la expresión genética.
Incrementa la cantidad de material para análisis por northern blot.	En la inserción de genes eucarióticos en procarióticos.
Evita la degradación del RNA.	Diagnóstico de enfermedades virales.
Sensible.	Detección de cáncer.
	Análisis de intrones.

Existen otras variantes de la técnica de PCR como la PCR anidada o la PCR-RFLP, por lo que es recomendable antes de estandarizar una técnica analizar el objetivo de la misma, el tipo de muestra con la que se parte, así como las ventajas y desventajas.

1.3. Análisis de ácidos nucleicos

Una parte importante del trabajo con ácidos nucleicos, es su análisis, el cual incluye numerosas técnicas que nos van a permitir cumplir con una gran variedad de objetivos, a continuación se enumeran sólo algunos de ellos:

- A) Verificar que el DNA que se ha extraído y purificado tenga la calidad, pureza y concentración suficientes para emplearlo en otros análisis y técnicas, incluida la de PCR.
- B) Corroborar que el fragmento de DNA deseado ha sido amplificado.
- C) Comprobar procesos de clonación.
- D) Identificar microorganismos en distintas muestras, así como si presentan genes de resistencia.
- E) Hacer relaciones epidemiológicas y filogenéticas.
- F) Identificar secuencias y mutaciones en genes.

Toda esta información surgida del análisis de los ácidos nucleicos constituye en la mayoría de los casos, sólo el punto de partida para cualquier investigación en el campo de la biología molecular y es vital para la obtención de resultados confiables.



A continuación vamos a estudiar algunos de estos procedimientos, pero hay que tener en cuenta que no son los únicos que existen, actualmente se continúan mejorando y desarrollando nuevas técnicas, sin embargo sí son las más utilizadas, además de que sus fundamentos se pueden aplicar en varias de ellas.

1.3.1. Electroforesis

En el análisis de DNA es importante determinar la longitud y la pureza de los fragmentos de DNA que se han amplificado, ya que estas características nos darán indicio si estamos trabajando con la secuencia que en verdad nos interesa.

El tamaño de la muestra amplificada puede determinarse utilizando una técnica conocida como electroforesis, la cual se basa en dos principios:

- El primero está relacionado con la carga eléctrica del DNA, la cual es negativa, por lo que al colocarla dentro de un campo eléctrico ésta migrará hacia el polo positivo.
- El segundo considera el tamaño de las moléculas, ya sin una superficie que ofrezca resistencia, las moléculas de ácidos nucleicos migrarían sin restricción hacia el polo positivo; por lo que se colocan en un gel que presenta una red con poros uniformes en tamaño y distribución. Cuando los ácidos nucleicos se cargan dentro del gel, estos migran a través de los poros del gel atraídos hacia el polo positivo. Debido a que los poros del gel son de un solo tamaño ofrecen una resistencia perfecta al avance de las moléculas, de tal suerte que las moléculas más grandes o de mayor peso tardan más tiempo en migrar y quedan en la parte superior del gel, mientras que las más pequeñas avanzan con menos resistencia hacia la parte inferior del gel (Watson *et al.*, 2008; Solomon *et al.*, 2008).

Otro factor que hay que considerar, es que el DNA tiene diferentes migraciones en la electroforesis dependiendo de la conformación en la que se presente, es decir, el DNA circular superenrollado migra más rápido que la forma circular relajada y la forma lineal es la que migra con mayor lentitud de las tres conformaciones.

Existen distintos tipos de electroforesis, el que se emplea para el análisis de ácidos nucleicos emplea agarosa, el cual es un polímero de azúcares que se extrae de algas marinas (Alberts *et al.*, 2008). Este polímero se puede hacer fluido en presencia de calor y una vez que se enfría se gelifica. La agarosa se prepara haciendo una solución en un regulador o buffer y a mayor concentración de la agarosa en la solución, el gel será más duro y presentará un menor tamaño y número de poros, en cambio, si la solución presenta una concentración baja de agarosa, el gel será menos duro y presentará un mayor número de poros y de un mayor tamaño. Es común que se empleen geles de



agarosa en concentraciones más altas para fragmentos que son muy pequeños, para que puedan separarse entre sí con mayor facilidad, mientras que los geles con concentraciones más bajas se emplean para separar fragmentos de DNA grandes.

El circuito dentro de la cámara de electroforesis lo cierra el buffer de corrida (TBE: Tris, boratos, EDTA; TAE: Tris, acetatos, EDTA, que al contener iones disueltos, cierran el circuito entre los dos polos permitiendo que la corriente se distribuya por toda la cámara. La corriente es administrada por una fuente de poder que permite regular el voltaje y el amperaje de la corriente a administrar.

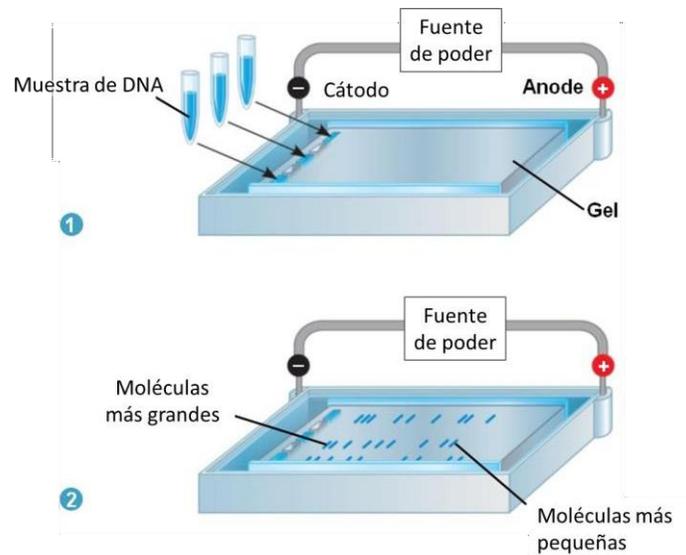


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa. El gel que contiene las muestras se encuentra dentro de la cámara, que en presencia de regulador forma un circuito, teniendo un polo positivo y uno negativo. Las muestras dentro del gel migrarán en función de su carga y de su tamaño molecular.

Modificado de <http://lifetech.wiki.hci.edu.sg/DNA+Electrophoresis>

La tasa de migración es determinada por diferentes parámetros, como son la concentración de agarosa, el voltaje aplicado, el buffer y la conformación del ácido nucleico.



Existe una relación directa entre el logaritmo de la movilidad electroforética del DNA (μ) y la concentración del gel (i), la cual se describe con la siguiente ecuación (Ramírez *et al.*, 2014):

$$\log \mu = \log \mu_0 - K_r i$$

Donde:

μ = movilidad electroforética libre del DNA

K_r = coeficiente de retardo, una constante relacionada con las propiedades del gel y el tamaño y forma de la molécula migrante.

Rango de separación de DNA en relación con la concentración de agarosa

Porcentaje de agarosa (%)	DNA lineal (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

La técnica para realizar la electroforesis en gel de agarosa se describe a continuación:



Electroforesis en gel de agarosa

1. Se pesa la agarosa que se va a emplear de acuerdo a la concentración del gel deseada.
2. Se disuelve la agarosa en el regulador, calentando la mezcla hasta que se vea completamente transparente.
3. Se vierte la solución en el molde para el gel que viene con la cámara de electroforesis.
4. Se coloca el peine adecuado dependiendo del número y tamaño de los pozos deseado.
5. Se deja solidificar el gel a temperatura ambiente.
6. Se retira el peine con cuidado de no romper el gel.
7. Se llena la cámara de electroforesis con el mismo regulado empleado para preparar la agarosa.
8. Se introduce el gel a la cámara de electroforesis, cuidando que el extremo del gel que tiene los pozos esté cercano al polo negativo de la cámara.
9. Se preparan mezclas del DNA a analizar con un densificante que contiene: glicerol que permite que las muestras vayan al fondo del pozo y no se salgan, además de un colorante (generalmente azul de bromofenol) que nos permita visualizar el avance de la muestra en el gel.
10. Se introduce cada una de las muestras con el densificante en los pozos con ayuda de una micropipeta, teniendo cuidado de no formar burbujas en el pozo, no sobrepasar el límite del volumen del pozo y anotar el orden en el que fueron colocadas cada una de las muestras.
11. Dejar uno de los pozos sin muestra para colocar un marcador de talla molecular adecuado.
12. Cerrar la cámara y conectarla a la fuente de poder, teniendo cuidado de que las cargas estén conectadas a su respectivo, es decir, el positivo con el positivo y el negativo con el negativo.
13. Encender la cámara, ajustar la potencia y dejar correr las muestras.
14. Cuando se observe que las muestras ya casi han alcanzado la última cuarta parte del gel, apagarlo para que éstas no se salgan.

Para poder visualizar el DNA es necesario “revelarlo” o teñirlo, para esto el reactivo más empleado es el bromuro de etidio, el cual es un agente que presenta un grupo planar que se intercala entre las bases del DNA, en éste estado se incrementa su actividad como colorante; El DNA absorbe la radiación ultravioleta a 254 nm y es transmitida, pudiéndose



visualizar. Es importante que recuerdes que la naturaleza de este reactivo lo hace mutagénico, por lo que es indispensable manejarlo con guantes de protección; dada esta desventaja es que en los últimos años se han diseñado nuevos reactivos que permiten visualizar el DNA en el gel de electroforesis sin el riesgo que presenta el bromuro de etidio.

Para revelar el gel de agarosa se pueden seguir diferentes protocolos:

- A) Se agrega el agente intercalante a la solución de agarosa antes de verterla en el molde.
- B) Una vez concluida la electroforesis, se retira el gel de la cámara y se sumerge en una solución con el agente intercalante.

Ahora que el gel contiene el agente intercalante, se coloca en un transiluminador o en un fotodocumentador, los cuales son equipos que nos permiten emplear diferentes filtros de luz, dependiendo del agente intercalante empleado (UV para el bromuro de etidio) y visualizar el DNA; en el caso del fotodocumentador, éste ya permiten tomar fotografías del gel y analizarlo con software especial, dependiendo del análisis que se está realizando.

Una vez que ya se ha visualizado el gel debemos analizarlo, para lo cual comparamos cada una de las bandas obtenidas en cada muestra con el marcador de talla molecular que corrimos en el mismo gel. El marcador de talla molecular está compuesto por fragmentos de DNA de concentración y tamaño conocidos, que migran a la par de las muestras y permiten establecer un punto de referencia entre las muestras y el peso molecular.

Para poder realizar un mejor análisis debes identificar qué tipo de marcador es el más apropiado para tu electroforesis, ya que existen de diferentes tipos y tamaños, por lo que antes de hacer el corrimiento es necesario identificar el posible tamaño que tendrán las moléculas de DNA para que el marcador de talla molecular nos dé un rango entre esos posibles tamaños.

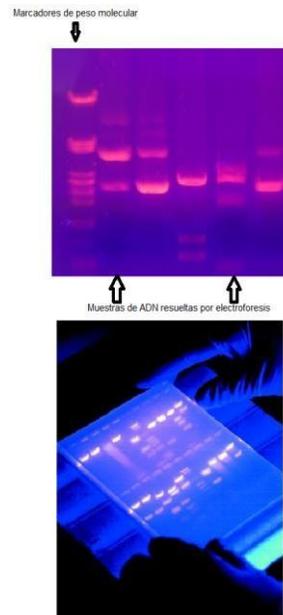


Figura 21. Gel de agarosa visto a la luz de un transiluminador UV. Arriba; el carril de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular, el resto de los carriles corresponden a las muestras. El color naranja-amarillo de las bandas se debe a la interacción del bromuro de etidio con la luz UV.

Tomado de
<http://donjjtoro08.blogspot.mx/2010/07/blog-post.html>.

Además de identificar el tamaño de cada banda, en una electroforesis también podemos analizar si el DNA está íntegro, se ha degradado, o presenta alguna contaminación por proteínas. Cuando se observa una banda bien definida, quiere decir que el DNA está íntegro y puro; en el caso de que observemos una banda borrosa, el DNA probablemente se encuentra muy contaminado por proteínas; y si se observa un barrido de la banda, entonces el DNA se encuentra desnaturalizado.

La conformación del DNA es un parámetro determinante para la migración del mismo. El DNA circular cerrado, roto o lineal del mismo peso molecular, migran a tasas diferentes en geles de agarosa. El DNA superenrollado circular cerrado (como los plásmidos superenrollados) migra más rápido que el DNA lineal, ya que el superenrollamiento le proporciona a la molécula un radio hidrodinámico más pequeño, permitiéndole pasar más rápidamente a través de la matriz del gel. Moléculas rotas o circulares relajadas que han perdido su superenrollamiento migran mucho menos que las moléculas superenrolladas o lineales. Además, la tinción del DNA con bromuro de etidio también altera su movilidad electroforética ya que afecta su masa y rigidez. (Ramírez *et al.*, 2014)

Todas las moléculas de DNA lineales de doble cadena que tienen un tamaño mayor a 750 kb, migran a través del gel de agarosa a la misma velocidad, por lo que no pueden ser diferenciadas entre sí. Es por ello que se diseñó una variante de la técnica de electroforesis llamada de **campos pulsados**, ya que se aplican pulsos eléctricos alternados y ortogonales al gel. Las moléculas largas de DNA son atrapadas en los poros del gel cada vez que la dirección del campo eléctrico es cambiada hasta que se reorienta



ella sola y sigue la dirección del nuevo campo eléctrico. Mientras mayor sea el tamaño de la molécula de DNA, se requiere mayor tiempo para su realineamiento y por lo tanto para su separación.

El límite de resolución de esta técnica depende de varios factores:

- El grado de uniformidad de los dos campos eléctricos.
- La longitud absoluta del pulso eléctrico.
- El radio de la longitud del pulso eléctrico empleado para generar los dos campos.
- El ángulo de los dos campos eléctricos en el gel.
- La fuerza relativa de los dos campos eléctricos.

De forma típica los electrodos se acomodan con un ángulo de 90° y se emplean pulsos de 10 s para separar moléculas entre 50 y 450 kb de longitud; pulsos de 50 a 60 s se utilizan para fraccionar moléculas más grandes a las 1000 kb. El límite superior de resolución de este sistema puede llegar a ser de hasta 9000 kb (Sambrook, 1989). Sin embargo no existe unas condiciones estándar, sino que cada equipo que se ha desarrollado tiene un diseño distinto, por lo que se tiene que seleccionar aquel que sea más adecuado para el propósito que se requiere.

En el caso de que se requiera realizar **electroforesis de RNA** se debe considerar que éste presenta únicamente una cadena de nucleótidos, por lo que las condiciones de la técnica deben ser desnaturizantes para evitar la formación de estructuras secundarias, las cuales impiden la migración del RNA en el gel.

Las condiciones desnaturizantes rompen los puentes de hidrógeno para que el RNA pueda migrar, existen distintos agentes desnaturizantes disponibles en el mercado como la formamida, el glioxal o el metil mercurio, sin embargo, estos compuestos son tóxicos por lo que deben ser empleados con precaución. El agente más empleado es el formaldehído pero debe tenerse cuidado ya que el gel que lo contiene es mucho más suave que el normal por lo que tiende a romperse con facilidad. También se debe cuidar que todas las soluciones empleadas estén libres de RNAsas.

1.3.2. Cuantificación de ácidos nucleicos

Existen dos tipos de métodos que se utilizan para medir la cantidad de ácidos nucleicos en una preparación. Si la muestra es pura, es decir, si no presenta cantidades significativas de contaminantes como proteínas, fenol, agarosa u otros ácidos nucleicos, se emplea la espectrometría, ya que es sencilla y precisa. Si la muestra tiene cantidades de DNA o RNA muy pequeñas o si la muestra contiene gran cantidad de impurezas, la



cuantificación se puede realizar por la intensidad de fluorescencia emitida por el bromuro de etidio.

En el caso de la espectrometría, se emplea una longitud de onda de 260 y 280 nm, la de 260 permite calcular la concentración de ácidos nucleicos en la muestra y la de 280 la cantidad de proteínas. Una OD (densidad óptica) de 1 corresponde a aproximadamente 50 $\mu\text{g/mL}$ de DNA de doble cadena, 40 $\mu\text{g/mL}$ de DNA y RNA de una sola cadena y aproximadamente 20 $\mu\text{g/mL}$ de oligonucleótidos de una cadena. La relación entre las lecturas a 260 y 280 nm ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) provee un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos.

Preparaciones puras de DNA y RNA tienen un valor de relación de 1.8 y 2.0 respectivamente. Si existen contaminantes como proteínas o fenol, la relación entre estas densidades ópticas puede disminuir significativamente, lo que no permite la cuantificación de los ácidos nucleicos.

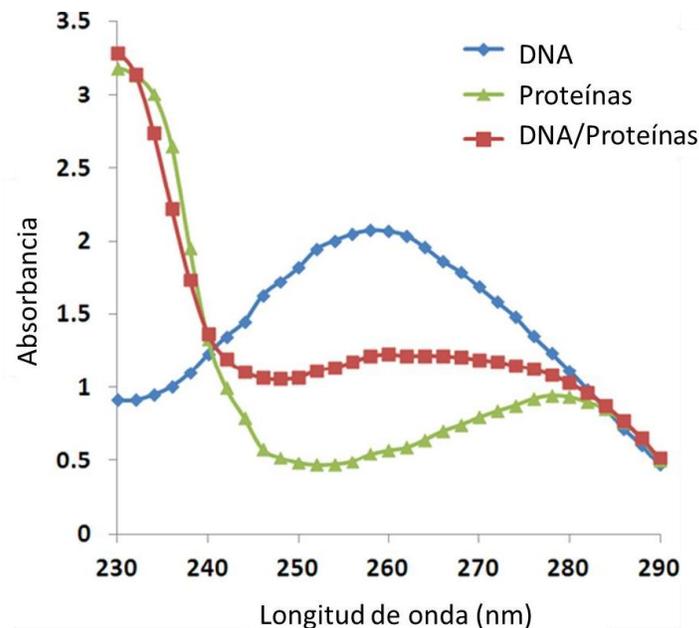


Figura 22. Espectro de absorción del DNA. Se muestra que a 260 nm está el pico máximo de absorción del DNA, mientras que a 289 nm se presenta el de las proteínas.

Modificado de: <http://www.biotek.com/resources/articles/micro-volume-purity-assessment-nucleid-acids.html>

Algunas veces no hay suficiente DNA para realizar el método espectrométrico, o el DNA está muy contaminado con otras sustancias que también absorben radiación ultravioleta.



Una forma rápida de estimar la cantidad de DNA en esas muestras es utilizar el bromuro de etidio, debido a que la cantidad de fluorescencia es proporcional a la masa total de DNA, la cantidad de DNA en la muestra se puede calcular comparando la intensidad de fluorescencia de la muestra con la de un estándar. Con éste método se pueden detectar cantidades muy pequeñas que van desde 1 a 5 ng de DNA (Sambrook, 1989).

Enlace

Recuerda que en la asignatura de Química analítica vimos el fundamento de la espectrometría, además de que en Bioquímica estudiaste la estructura y propiedades de los ácidos nucleicos.

1.3.3. Secuenciación de ácidos nucleicos

La secuenciación del DNA ha sido uno de los grandes desarrollos científicos de los últimos años, ya que se ha podido aplicar en muchos análisis y experimentos de DNA, por ejemplo:

- Para el caso de un gen, conocer su secuencia permite identificar sus sitios de inicio y término de transcripción, así como predecir la secuencia de aminoácidos que podría tener la proteína producto de su traducción
- Cuando se construye un organismo genéticamente modificado, su secuencia nos permite elegir las enzimas de restricción más apropiadas para manipular el gen en función de su secuencia.
- Para estudios del genoma, el conocer la secuencia nos permite encontrar y analizar mutaciones, genes de patogenicidad, genes de resistencia, etc. (Solomon *et al.*, 2008; Alberts *et al.*, 2008; Watson *et al.*, 2008).
- Para estudios epidemiológicos y genéticos, la secuencia nos permite identificar relaciones entre las secuencias originados por cambios evolutivos o dispersión de bacterias patógenas.

El primer método de secuenciación fue propuesto por el bioquímico británico Frederik Sanger, en 1975, el cual obtuvo su segundo premio Nobel gracias al descubrimiento de ésta técnica. Está basada en dos métodos que ya conoces; la PCR y la electroforesis. En la PCR se explota la capacidad de la polimerasa para enlazar los nucleótidos por medio de un enlace fosfodiéster entre el grupo OH del extremo 3' de la desoxirribosa de un nucleótido y el grupo fosfato del carbono 5' del nucleótido siguiente, como sucede en la



naturaleza. En el método de Sanger se emplean nucleótidos modificados, esto es, un nucleótido dideoxi, que tiene los mismos componentes de un nucleótido normal, con una modificación en el sustituyente del carbono 3' de la desoxirribosa, además de que tiene sólo un hidrógeno, lo que impide que se forme el enlace fosfodiéster con el siguiente nucleótido, lo que detiene la PCR.

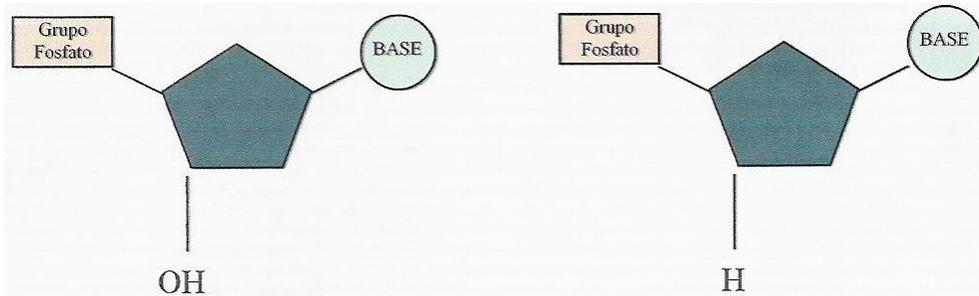


Figura 23. Nucleótidos para secuenciación. Del lado izquierdo se muestra la estructura de un nucleótido tradicional, del lado derecho un dideoxinucleótido donde se observa la ausencia del oxígeno en el grupo funcional.

Tomado de: http://perso.wanadoo.es/mcs955/adn_en_este_proyecto.htm

Para secuenciar un gen con este método se monta una PCR normal en cuatro tubos Eppendorf. En cada uno se adiciona el segmento de DNA a secuenciar, cebadores, polimerasa, ATP, nucleótidos normales y uno modificado (Adenina dideoxi en el tubo 1, timina dideoxi en el dos, citocina dideoxi en el tres y guanina dideoxi en el cuatro).

El fundamento de esta técnica se basa en que se lleva a cabo la reacción de polimerización como en el caso de la PCR, pero en el punto donde se adicione uno de los nucleótidos modificados, la reacción se detendrá.

Ejemplo:

Si secuenciamos un fragmento de DNA cuya cadena líder tiene la secuencia: 3'CTAGATCCGATAACG5'. En el tubo 1, se incorporarán nucleótidos normales y donde se haya agregado una adenina modificada (A*) la reacción se detendrá, teniendo la posibilidad de generar los siguientes fragmentos:

3'CTAGATCCGATAACG5' = CADENA MOLDE
GA*
GATCTA*
GATCTAGGCTA*



Este fenómeno se repite para cada uno de los cuatro tubos de reacción, obteniéndose todas estas posibilidades de fragmentos:

Tubo 2 con T*	Tubo 3 con G*	Tubo 4 con C*
GAT*	GATC*	G*
GATCT*	GATCTAGGC*	GATCTAG*
GATCTAGGCT*	GATCTAGGCTATTGC*	GATCTAGG*
GATCTAGGCTAT*		GATCTAGGCTATTG*
GATCTAGGCTATT*		

Al término de la PCR. Los fragmentos amplificados se corren en un gel de agarosa cargando en carriles separados cada uno de los tubos de reacción, obteniendo el siguiente resultado:

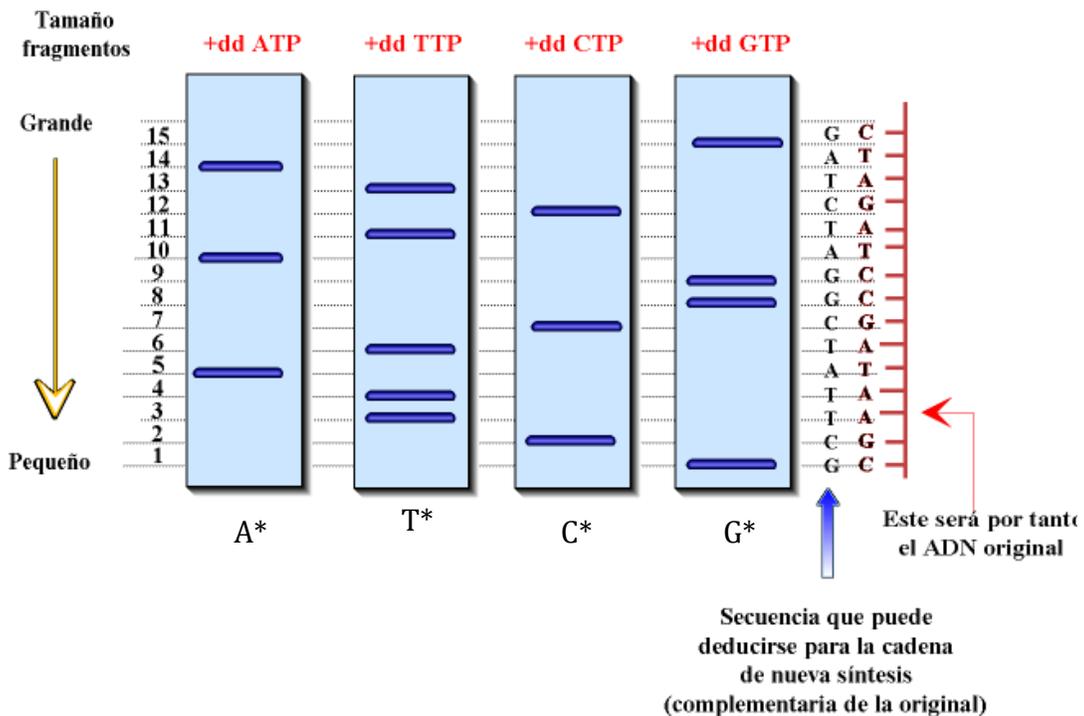


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa de secuencias amplificadas con el método de Sanges. Los fragmentos migran de acuerdo a su peso molecular, en la base del gel se encuentran los fragmentos más ligeros y en la parte superior los más pesados, para identificar la secuencia, los segmentos se leen en orden ascendente.

Tomado de: <http://www.arrakis.es/~ibrabida/vigdidesoxi.html>

Al término de la electroforesis tendremos separados, de acuerdo a su tamaño, cada uno de los amplificados; y podemos reconstruir la secuencia. Recordemos que la secuencia



original es: 3´CTAGATCCGATAAGC5´. El segmento amplificado más ligero, que migró más abajo en el gel corresponde a una G* que es la base complementaria del último nucleótido de la secuencia original. El segundo segmento más ligero corresponde a una C* que es la base complementaria del penúltimo nucleótido de la secuencia original, de esta manera podemos construir en sentido inverso la secuencia complementaria de la cadena original, y por ende inferir después, la secuencia original (Alberts *et al.*, 2008, Wattson, 2008).

De este modo se pueden secuenciar genomas enteros; como dato histórico; Sanger probó la efectividad de su método al secuenciar completamente el genoma del bacteriófago Phi-X174.

Esta técnica fue mejorada para obtener una más rápida detección de cada uno de los fragmentos, agregando un colorante fluorescente diferente a cada uno de los nucleótidos modificados, de tal manera que con un equipo de detección podemos ir identificando cada uno de los fragmentos adicionados a la cadena sintetizada en tiempo real. Actualmente este proceso está automatizado, y las máquinas robotizadas como las usadas en el Proyecto Genoma Humano, secuencian varios centenares de miles de nucleótidos en un periodo de 24 horas, y después almacenan y analizan los datos de forma automática.

1.3.4. Genómica

Para poder comprender su funcionamiento dentro de un organismo, la genética y la biología molecular estudian a los genes de manera individual, sin embargo esta estrategia con frecuencia no brinda una panorámica clara sobre la relación estructura-función de un gen, o de las proteínas que éste codifica, dentro del genoma. Esto se debe a que en realidad, un gen no funciona como una entidad, sino como parte de una red perfectamente coordinada y dinámica que responde de manera inmediata ante las necesidades de una célula, y en suma, de un individuo. Aunado a esto, debemos tener en cuenta que dentro de una especie o una población puede existir una o varias variantes de un gen producto de mutaciones selectivas. Estas variantes evidentemente responden de manera diferente y su efecto sobre el organismo lo es también. Es precisamente por esta situación que para entender el funcionamiento de un gen dentro de un sistema biológico es necesario analizarlo en conjunto, de esto se encarga la genómica.



Genómica

Es el conjunto de ciencias y técnicas dedicadas al estudio integral del funcionamiento, el contenido, la evolución y el origen de los genomas.

En la actualidad se han completado la secuenciación genómica de más de 80 especies bacterianas, protozoarios y animales. Los métodos genómicos permiten comparar los genomas de cientos de especies, o individuos entre sí para determinar el curso evolutivo de un gen en particular o para detectar diferencias o mutaciones entre las secuencias genéticas que pueden reflejarse en deficiencias metabólicas o de desarrollo o alteraciones congénitas de los individuos afectados, por mencionar algunos ejemplos.

El mejoramiento de las técnicas de DNA recombinante ha permitido concentrar la secuencias de cientos de genomas en mega bases de datos genéticos, la base de datos más grande y ampliamente usada es el GeneBank del NCBI (del inglés *National Center of Biotechnology Information*) en Estados Unidos. La información contenida en esta y otras bases de datos a nivel internacional permiten acceder libremente a la información que resguardan.

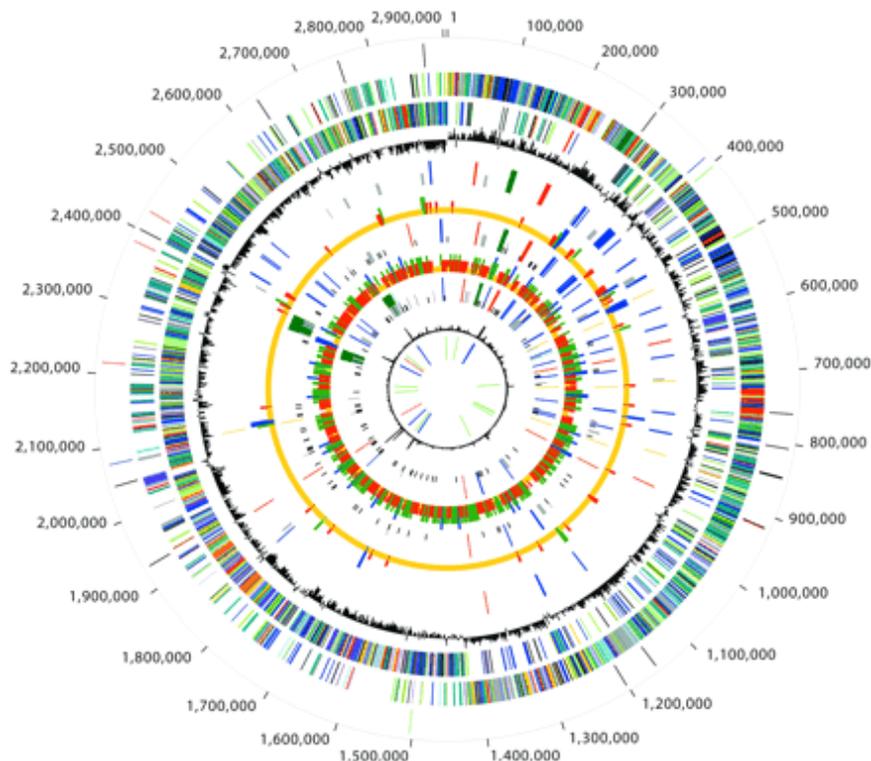




Figura 25. Análisis genómico. Se muestra una representación del análisis del genoma completo de tres cepas de *Listeria monocytogenes*.

Tomado de: <http://nar.oxfordjournals.org/content/32/8/2386/F1.expansion>

En los análisis genómicos se aplican distintas técnicas y con diferentes fines como:

- Secuenciación de genomas completos.
- Caracterización estructural de todos los genes de un organismo.
- Análisis de variación genética a nivel global, abarcando todo el genoma.
- Análisis de datos de expresión génica de todos los genes de un organismo.

Una de las técnicas más empleadas para realizar análisis genómicos son los microarreglos, los cuales permiten el análisis simultáneo de miles de genes que son regulados transcripcionalmente, y que son usados para estudiar cambios en la expresión genética. Los microarreglos de DNA usan cientos o millones de sondas altamente organizadas sobre una superficie sólida delimitada, que sirven para analizar simultáneamente diferentes moléculas de DNA o RNA, definidas como blancos e identificar su similitud o su expresión dentro de muestras individuales.

Existen muchos protocolos, sin embargo la técnica básica involucra la extracción de mRNA de dos muestras biológicas, una muestra control y otra experimental. Los RNA aislados son convertidos a cDNA por RT-PCR. Cada una de las muestras se marca con diferentes fluorocromos, se mezclan y se hibridan por un periodo de tiempo contra un gran número de secuencias genéticas que fueron colocadas como sondas individuales en un chip de microarreglos. Después de la hibridación, el exceso de cDNA se lava y los resultados de la hibridación son analizados determinando la intensidad relativa de la fluorescencia de cada gene. La intensidad de la señal detectada representa la abundancia de la secuencia blanco o la similitud de las secuencias entre las sondas y los blancos.

Existen dos tipos básicos de microarreglos; arreglos de cDNA y microarreglos de oligonucleótidos. En los microarreglos de cDNA, los arreglos (spotted arrays) son creados al fijar una solución concentrada de DNA de cadena doble sobre un soporte sólido, usando un robot. En los microarreglos de oligonucleótidos, éstos se sintetizan en una orientación espacial predeterminada sobre una superficie sólida, utilizando una técnica llamada fotolitografía.

Desde su aparición hace dos décadas, los microarreglos de DNA han revolucionado la biología molecular, se han empleado para identificar genes nuevos, sitios de unión a factores de transcripción, cambios en el número de copias de DNA y variaciones de una



secuencia, tal como una cepa emergente de patógenos o mutaciones complejas en genes humanos responsables de enfermedades.

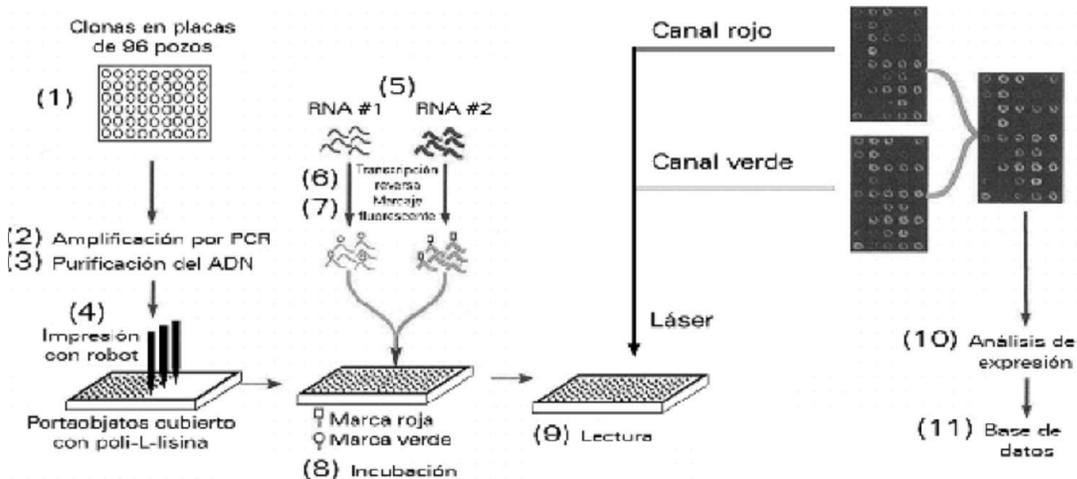


Figura 26. Técnica de microarreglos. Se muestra el diagrama general de trabajo donde el DNA o RNA se hibrida con distintas sondas marcadas con agentes fluorescentes, en el caso de que exista complementariedad se detectará una señal.

Actividades

La elaboración de las actividades estará guiada por tu figura académica, mismo que te indicará, a través de la *Planificación de actividades de la figura académica*, la dinámica que tú y tus compañeros (as) llevarán a cabo, así como los envíos que tendrán que realizar.

Para el envío de tus trabajos usarás la siguiente nomenclatura: **BBM2_U1_A1_XXYZ**, donde BB2 corresponde a las siglas de la asignatura, U1 es la unidad temática, A1 es el número de actividad, el cual debes sustituir considerando la actividad que se realices, XX son las primeras letras de tu nombre, Y la primera letra de tu apellido paterno y Z la primera letra de tu apellido materno.



Autorreflexiones

Para la parte de **autorreflexiones** debes responder las *Preguntas de Autorreflexión* indicadas por tu figura académica y enviar tu archivo. Cabe recordar que esta actividad tiene una ponderación del 10% de tu evaluación.

Para el envío de tu autorreflexión utiliza la siguiente nomenclatura: `BBM2_U1_ATR_XXYZ`, donde `BBM2` corresponde a las siglas de la asignatura, `U1` es la unidad de conocimiento, `XX` son las primeras letras de tu nombre, y la primera letra de tu apellido paterno y `Z` la primera letra de tu apellido materno

Cierre de la unidad

En esta unidad iniciamos con el viaje por las distintas técnicas desarrolladas por la biología molecular para el estudio de los ácidos nucleicos, empezando por su extracción y purificación. Como pudiste observar, se aplican muchos de los principios que ya estudiaste sobre cómo está constituido el DNA y las distintas células eucariotas y procariontas.

Aprendiste la técnica que revolucionó la biología molecular: la PCR, con la que puedes amplificar de forma logarítmica secuencias del DNA de interés. Existen muchas variantes de estas técnicas, las cuales se utilizan para diferentes fines, ya sea para una posterior clonación, para su cuantificación o únicamente su identificación, es por ello que es importante que conozcas sus fundamentos para que los puedas aplicar de forma satisfactoria.

También describimos uno de los conceptos más novedosos en esta área, la genómica, la cual involucra toda la información genética de un organismo, lo cual nos puede arrojar información muy valiosa sobre él, como en el caso del proyecto genoma humano, donde hemos aprendido sobre nuevas patologías, sobre el papel de nuevas secuencias, e incluso sobre el papel de los genes en el tratamiento de enfermedades.

Todos estos conocimientos te proporcionan las bases para aplicar estas metodologías con distintos propósitos y en diferentes áreas, por lo que te invitamos a seguir profundizando en el tema y actualizándote sobre las nuevas aplicaciones y técnicas.



Para saber más



Para ahondar más en tus conocimientos sobre la biología molecular de los ácidos nucleicos se te recomiendan las siguientes lecturas de libre acceso para que identifiques las posibles aplicaciones de lo que has aprendido en esta unidad.

- Campuzano, V., González, A., Hernández, R., Suárez, F., Trigo, F. y Jaramillo, C. “Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de exudado nasal de bovinos, en dos cuencas lecheras de México”. *Veterinaria México*. 2011: 42 (1). En este artículo se aborda un problema de salud veterinaria mediante una variante de PCR con fines diagnósticos y de caracterización de elementos virales. Conocer las posibles aplicaciones de las técnicas que acabas de aprender te abrirá el panorama sobre los alcances de la biología molecular en la ciencia. Lo puedes consultar en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0301-50922011000100001&script=sci_arttext
- González, U., Delfín, H., De la Cruz, M., Rojas, R. y Zamudio, M. “Protocolo para la extracción de ADN metagenómico bacteriano del langostino *Macrobrachium carcinus* L”. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 2011: 14. 875-883. En esta publicación se presenta una forma alternativa para la extracción de ADN con fines comerciales y de diagnóstico. Lo puedes consultar en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93921493015>
- López, A., Maya, Y. y García, J. “Diversidad filogenética de especies de *Microcoleus* de costras biológicas de suelo de la península de Baja California, México”. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 2010: 81 (1). 1-7. Las técnicas de biología molecular son ampliamente utilizadas en el campo de la evolución y la



filogenia, esta publicación es un ejemplo interesante de ello. Lo puedes consultar en: <http://www.ejournal.unam.mx/bio/BIO81-01/BIO081000120.pdf>

- Este video te ayudará a comprender mejor el proceso: Electroforesis (2008): <https://www.youtube.com/watch?v=6vKLT5mQoBM?v=6vKLT5mQoBM>

Fuentes de consulta



- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K y Walter, P. (2008). *Biología Molecular de la Célula*. 5ª edición. España: Omega. ISBN: 9788428215077.
- Applied Biosystemas. *Manual de Introducción al PCR en tiempo real Sistema 7300, 7500 y 7500 Fast*.
- Curtis S., Barnes M. 2007. *Biología*. 7ª edición. México: Panamericana. ISBN: 978-950-06-0447-5.
- Lodish, H. Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky y Darnell, J. (2006). *Biología Celular y Molecular*. 5ª edición. México: Panamericana. ISBN: 10:950-06-1374-3.
- Méndez-Álvarez S y Pérez-Roth E. 2004. *La PCR múltiple en microbiología clínica*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22(3):183-92.
- Ramírez Moreno M.E., de Nova Ocampo M.A., Náder García E., Monsalvo Reyes A. 2014. México. *Manual de Prácticas de Biología Molecular*. Instituto Politécnico Nacional.
- Solomon, E., Berg, L.R. y Martin, D.W. (2008). *Biología*. 8ª Edición. México: McGraw-Hill. ISBN: 978-84-282-1507-7.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. y Losick, R. (2008). *Molecular biology of the gene*. 7ª edition. USA: Pearson. ISBN: 0-321-22368-3.