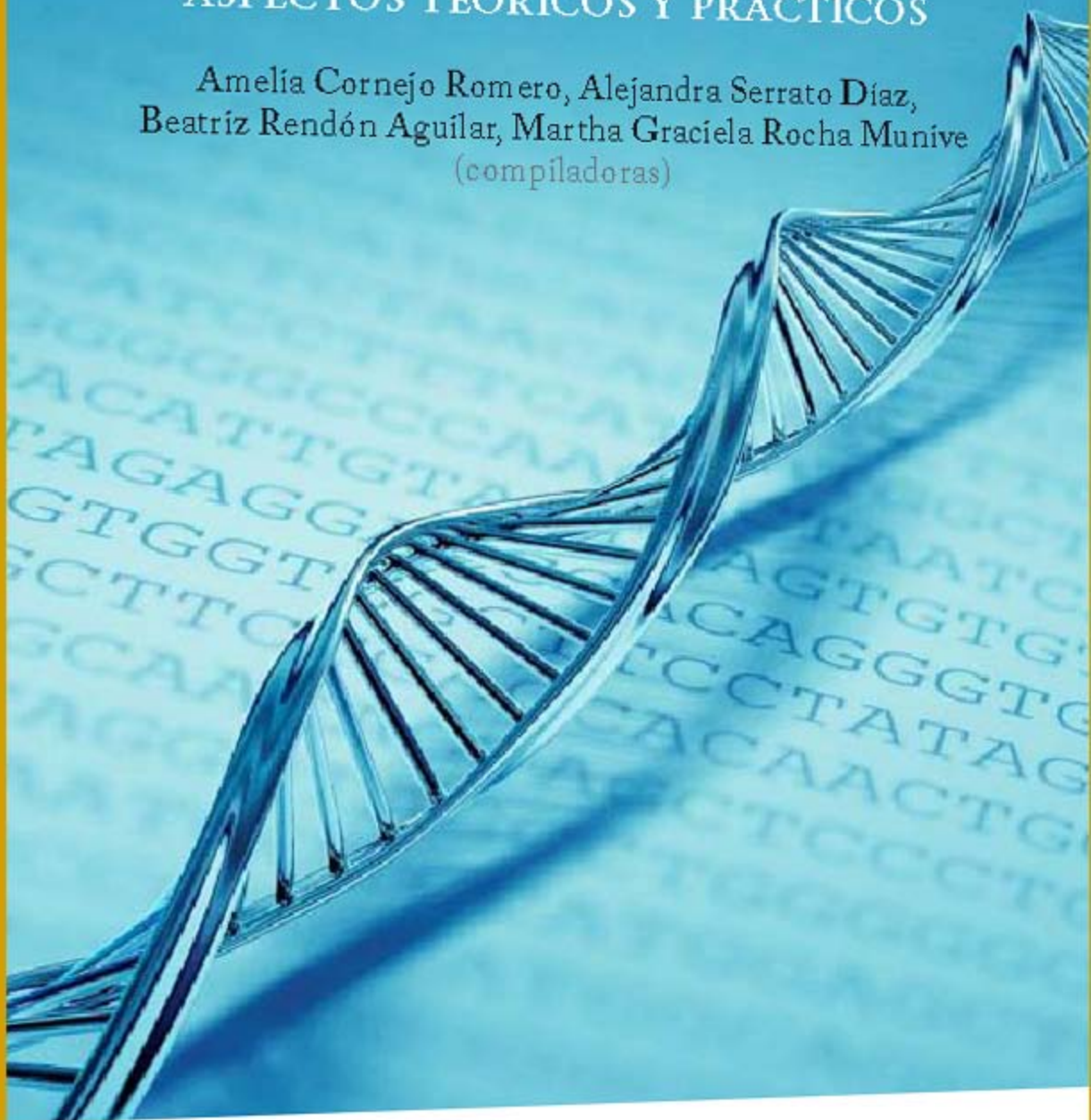


Amelia Cornejo Romero, Alejandra Serrato Díaz,  
Beatriz Rendón Aguilar, Martha Graciela Rocha Munive  
(editoras)

HERRAMIENTAS MOLECULARES APLICADAS EN  
ECOLOGÍA: ASPECTOS TEÓRICOS Y PRÁCTICOS

# HERRAMIENTAS MOLECULARES APLICADAS EN ECOLOGÍA: ASPECTOS TEÓRICOS Y PRÁCTICOS

Amelia Cornejo Romero, Alejandra Serrato Díaz,  
Beatriz Rendón Aguilar, Martha Graciela Rocha Munive  
(compiladoras)





HERRAMIENTAS MOLECULARES  
APLICADAS EN ECOLOGÍA:  
ASPECTOS TEÓRICOS Y PRÁCTICOS



# HERRAMIENTAS MOLECULARES APLICADAS EN ECOLOGÍA: ASPECTOS TEÓRICOS Y PRÁCTICOS

Amelia Cornejo Romero, Alejandra Serrato Díaz,  
Beatriz Rendón Aguilar, Martha Graciela Rocha Munive  
(compiladoras)

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT)  
Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC)  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I)

Primera edición: julio de 2014

D.R. © Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales  
Blvd. Adolfo Ruiz Cortines 4209. Col. Jardines en la Montaña  
C.P. 14210. Delegación Tlalpan, México, D.F.  
[www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx)

Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC-SEMARNAT)  
Periférico Sur 5000. Col. Insurgentes Cuicuilco  
C.P. 04530. Delegación Coyoacán, México, D.F.  
[www.inecc.gob.mx](http://www.inecc.gob.mx)

D.R. © Foto de portada: Bill Frymire

ISBN: 978-607-8246-72-4  
Impreso y hecho en México

# ÍNDICE

<b>Presentación</b>	<b>ix</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>xi</b>
<b>Introducción</b>	<b>xiii</b>
<b>Extracción y purificación de ADN</b>	<b>1</b>
<i>Laura Patricia Alejos Velázquez, María del Consuelo Aragón Martínez y Amelia Cornejo Romero</i>	
<b>Electroforesis de ADN</b>	<b>27</b>
<i>Francisco Fierro Fierro</i>	
<b>PCR: reacción en cadena de la polimerasa</b>	<b>53</b>
<i>Alejandra Serrato Díaz, Lluvia Flores Rentería, Jaime Aportela Cortez y Edgar Sierra Palacios</i>	
<b>Microsatélites</b>	<b>75</b>
<i>Alejandra Vázquez Lobo Yurén y Ariadna E. Morales García</i>	
<b>ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y regiones intermedias entre secuencias simples repetidas (ISSR)</b>	<b>101</b>
<i>Martha Graciela Rocha Munive, Andrea González González y Xítlali Aguirre Dugua</i>	

<b>AFLP: Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados</b>	<b>127</b>
<i>Alejandra Serrato Díaz y Selene Ramos Ortiz</i>	
<b>DGGE: electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante</b>	<b>149</b>
<i>María del Rocío Fernández Suárez y Sylvie Le Borgne</i>	
<b>PCR en tiempo real</b>	<b>175</b>
<i>Penélope Aguilera, Martha Ruiz Tachiquín, Martha Graciela Rocha Munive, Benjamín Pineda Olvera y María Elena Chánez Cárdenas</i>	
<b>Microarreglos de ADN: fabricación, proceso y análisis</b>	<b>203</b>
<i>Jorge Ramírez Salcedo, Lorena Chávez González, José Luis Santillán Torres y Simón Guzmán León</i>	
<b>Secuenciación de fragmentos de ADN</b>	<b>231</b>
<i>Laura Margarita Márquez Valdelamar , Alejandra Serrato Díaz y René Cerritos Flores</i>	
<b>Glosario</b>	<b>251</b>



# PRESENTACIÓN

**M**éxico, junto con el resto de América Latina, presenta una alta diversidad de especies de plantas, animales, hongos y bacterias. Esta riqueza se refleja a nivel de ADN: cada especie mantiene gran cantidad de genes y alelos. El ADN no sólo contiene la información para construir proteínas, sino que constituye un riquísimo archivo de información que nos permite reconstruir la historia evolutiva de los grupos y las relaciones entre los organismos, es decir, nos da la mejor herramienta posible para entender su evolución y su sistemática. Estos genes han sido modelados durante millones de años por la selección natural y otras fuerzas evolutivas, y representan un importante acervo con infinidad de posibles aplicaciones biotecnológicas, que representan una serie de proteínas, enzimas y procesos adaptados para las condiciones climáticas y biológicas de nuestro país. A pesar de ser una riquísima mina de información y de posibles aplicaciones tecnológicas e industriales, podremos tener acceso a ella en la medida en que conozcamos mejor al ADN.

Acceder a la “veta madre” que representa el ADN no es trivial, su sola purificación puede ser muy difícil, especialmente en muchos de los organismos de nuestras floras, ricos en compuestos secundarios. Una vez que tenemos el ADN, tenemos todo un abanico de métodos para analizarlo, con diferentes grados de resolución, costos, ventajas y desventajas ¿cómo decidir cual usar? ¿Cuál será la técnica adecuada para el problema que queremos analizar? Estas

no son preguntas sencillas de responder, y muchas veces nos hemos visto limitados por los métodos disponibles en la actualidad.

En esta obra se presentan, de una manera lúcida y sencilla, las diferentes estrategias que tenemos para procesar el material biológico y obtener los marcadores de ADN que necesitamos para diferentes tipos de preguntas biológicas, con énfasis en tópicos ecológicos, y todo tipo de organismos.

Todos los capítulos están escritos por investigadores jóvenes, que a pesar de su juventud ya han acumulado años de experiencia trabajando con organismos de México, y tal vez lo más importante, con equipo, recursos y condiciones con los que actualmente ya cuenta nuestro país. Los protocolos y consejos que presentan han probado ser útiles y exitosos. Por otra parte, cada capítulo además de exponer cómo obtener los datos crudos, muestra las estrategias y los métodos de análisis de los marcadores de ADN empleados en la actualidad. Estos aspectos se tratan con cuidado a partir de la experiencia de los autores en el uso de estos marcadores; experiencia comprobada en publicaciones internacionales y nacionales y en tesis a diferentes niveles.

Los países de América Latina hemos sufrido de un claro retraso científico y tecnológico que ha limitado, y a veces impedido, el estudio de nuestros recursos biológicos y genéticos. Esta obra, escrita en español, llena un importante vacío que existe para la divulgación de métodos prácticos y eficientes para el análisis de los recursos genéticos en México y en el resto de América Latina.

Estamos a punto de entrar en una época donde los costos de secuenciación masiva van a bajar de manera acelerada, donde vamos a poder obtener genomas de todas las especies de nuestras comunidades (auténticos metagenomas) o aún hacer estudios poblacionales con genomas completos, y necesitamos estar listos para estudiar y aprovecharlos recursos genéticos de nuestros países. Indudablemente, extraer, amplificar y analizar el ADN va a ser siempre el paso fundamental y crítico en diferentes estudios, no solo genéticos y ecológicos, sino también en infinidad de aplicaciones en la medicina, la agronomía, la microbiología y la veterinaria. Considero que este libro será una herramienta valiosa en esta revolución que nos espera.

**Dr. Luis E. Eguiarte Fruns**

Investigador

Instituto de Ecología

Universidad Nacional Autónoma de México

# AGRADECIMIENTOS

Este libro nace del diplomado “Marcadores moleculares aplicados en ecología” que la UAM y el Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) organizaron durante varios años. Agradecemos el apoyo logístico brindado por el Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental (CENICA), a la Jefatura del Departamento de Biología, al Consejo Académico Divisional de CBS, a la Coordinación de Vinculación Académica, la Sala de Informática de la División de Ciencias Sociales y Humanidades, al Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la UAM-I y Laboratorio de Biología Molecular de CENICA. En el diplomado participaron muchas personas brindándonos su tiempo, conocimiento, curiosidad y compromiso, a todas ellas muchas gracias.

A todos los autores de los capítulos agradecemos su entusiasta participación, paciencia y por confiar hasta el final en este proyecto.

Esperanza Córdova nos apoyó, muy pacientemente, en revisar el formato del texto de cada uno de los capítulos. Muchas gracias.

Al Ing. Víctor Gutiérrez Avedoy y a la Biól. Alma Delia Nava de CENICA, por su apoyo en las diferentes etapas del desarrollo de este libro.



# INTRODUCCIÓN

Los marcadores moleculares son una herramienta muy robusta que nos permite estudiar y entender a la naturaleza desde diferentes perspectivas con enfoques novedosos y complementarios a los que se abordan con herramientas tradicionales. Estos marcadores se basan en el análisis de las diferencias en moléculas como proteínas, ARN y ADN. Durante varias décadas, los marcadores más utilizados en ecología fueron las isoenzimas. Sin embargo, en la actualidad, se han desarrollado diversas técnicas basadas en ADN que permiten obtener una gran cantidad de información para analizar patrones y procesos ecológico-evolutivos a diferentes escalas espaciales y temporales, como la diversidad genética, paternidad, conducta animal, adaptación, especiación e interacciones.

La selección del marcador apropiado debe tener en cuenta el alcance de la técnica, los métodos de análisis y otros aspectos prácticos como los tiempos de estandarización y los costos. Este libro surge con la idea de brindar una guía para la aplicación de los marcadores moleculares en estudios ecológicos y evolutivos, se presentan protocolos detallados, recomendaciones prácticas y ejemplos específicos de su aplicación. Los capítulos fueron escritos por especialistas en el uso de los diferentes marcadores, con varios años de experiencia en el área. En cada uno de los temas se aborda una técnica molecular, se hace una breve revisión de su desarrollo, se desglosa cuidadosamente un protocolo y se describen algunos de los principales métodos de

análisis y aplicaciones. A lo largo del libro se muestran ejemplos del uso de los marcadores en diferentes áreas de investigación como la conservación de especies, sistemática filogenética, caracterización génica, filogeografía, estudios de comunidades microbianas, genética de poblaciones, aunque también se mencionan ejemplos de su uso para solucionar problemas agronómicos, médicos, entre otros.

La extracción y purificación de ADN representa la etapa inicial de casi todas las técnicas moleculares, el capítulo uno es una guía para obtener un ADN libre de impurezas e inhibidores, características fundamentales para el éxito en la obtención de datos genéticos confiables. En este apartado se incluyen algunas recomendaciones sobre la colecta y el procesamiento adecuado de muestras que permiten obtener ADN con dichas características. Se presentan, de manera general, los protocolos de extracción tradicional y comercial con la finalidad de que el usuario elija el protocolo de acuerdo con los objetivos de la investigación y los recursos económicos disponibles.

Posteriormente se revisa una de las técnicas principales y a la vez complementarias de la mayoría de marcadores, la electroforesis en gel. Ésta se ha convertido en la principal técnica para separar moléculas de ácidos nucleicos y proteínas. Se describen diferentes protocolos para llevarla a cabo, tales como electroforesis de agarosa, de campo pulsado y de poliacrilamida. Además explica a detalle los métodos de tinción y de visualización más empleados.

En el siguiente capítulo se aborda una de las técnicas que revolucionó a la biología molecular, la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, se expone el fundamento de la síntesis *in vitro* de fragmentos de ADN, se detallan aspectos que ayudan a optimizar las condiciones de la reacción en cada una de las etapas de la técnica como la concentración de ADN molde y el resto de los componentes; características de las ADN polimerasas e iniciadores que se recomienda usar en diferentes situaciones; condiciones del programa del termociclador como *ramping* y temperatura de alineamiento de los iniciadores y el número de ciclos.

A continuación se abordan los microsátélites que en los últimos años se han convertido en los marcadores co-dominantes (que permiten diferenciar a los homocigos y heterocigos) más empleados. Se describe la manera en que se desarrollan y se seleccionan los microsátélites, además se discuten los modelos que explican su evolución. Se explica cómo se aíslan, se seleccionan los loci y se realiza el análisis de polimorfismo ya sea mediante electroforesis en geles de

agarosa, de poliacrilamida, en secuenciador automático o por secuenciación. Se desarrolla el método de visualización de alelos mediante electroforesis en secuenciador automático, que es el método más empleado en la actualidad.

En este libro también se incluyen dos capítulos de marcadores dominantes, éstos son particularmente útiles debido a que permiten obtener información de aquellos grupos de organismos de los que no se tiene información genética previa, primero se abordan a los RAPD e ISSR, se explican las cualidades de ambos marcadores y se desarrolla de manera práctica un protocolo general para uso de ISSR. También, se desarrollan ampliamente los estadísticos utilizados comúnmente con este tipo de datos para llevar a cabo análisis a nivel poblacional, filogenético, etc. Posteriormente, se analiza a los AFLP, los cuales están teniendo un nuevo auge debido a que en la actualidad se busca obtener información a nivel genómico y esta técnica permite analizar al azar regiones de ADN distribuidas en todo el genoma sin tener conocimiento previo de éste. Se describe la manera de analizarlos automáticamente por electroforesis en capilar para obtener un mayor número de caracteres, reproducibilidad y disminuir el tiempo de electroforesis.

En seguida, se desarrolla en detalle una técnica derivada de la electroforesis, la DGGE, esta técnica permite separar fragmentos de ADN del mismo tamaño que solo difieren en la composición de una de sus bases utilizando un gradiente desnaturante a lo largo de una electroforesis. Esta característica permite, entre otras aplicaciones, estudiar la estructura y dinámica de comunidades microbianas complejas lo cual resulta una tarea muy complicada sin esta herramienta.

En el siguiente capítulo se explica una innovación de la técnica de PCR: la PCR en tiempo real, en la cual se realiza la cuantificación de ADN al momento en que se lleva a cabo la amplificación del ácido nucleico. Se analizan y explican los sistemas de detección y se da un ejemplo de cuantificación mediante la química de sondas Taqman. Asimismo, se explica cómo es que se interpretan los resultados y se emplean diferentes métodos como la cuantificación absoluta y relativa.

A continuación, se presentan los microarreglos, una técnica que permite el análisis simultáneo de la expresión de miles de genes. Se describen la forma de fabricarlos y procesarlos, así como el análisis estadístico y bioinformático, éste último basado en la comparación con bases de datos públicas de las rutas metabólicas. Se hacen algunas recomendaciones importantes sobre los cuidados que

deben tenerse en el diseño experimental, interpretación y comprobación de la expresión génica observada.

Finalmente se explica cómo obtener la secuencia de un fragmento de ADN, que es una herramienta muy poderosa y utilizada en muchas líneas de investigación. Se desarrolla ampliamente el protocolo para secuenciación enzimática de manera automática y se hacen recomendaciones para obtener una secuencia de buena calidad.

En este libro se incluyen los marcadores que en la actualidad se usan con mayor frecuencia para responder diferentes preguntas ecológico-evolutivas con la finalidad de ofrecer una guía, en nuestro idioma, a aquellos que se aproximan por primera vez a la ecología molecular.



# EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

Laura Patricia Alejos Velázquez,<sup>1</sup>  
María del Consuelo Aragón Martínez,<sup>2,3</sup>  
Amelia Cornejo Romero<sup>2,4</sup>

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el estudio de la variación genética entre individuos, poblaciones y especies para explicar patrones y procesos ecológico-evolutivos se aborda mediante marcadores moleculares, segmentos de ADN con o sin función conocida que proporcionan información sobre la variación alélica y permiten distinguir individuos (Schlötterer 2004). Estos marcadores se obtienen con técnicas como la PCR (por las siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction*) y secuenciación, que hacen posible analizar la variación en la molécula del ADN con un detalle sin precedentes (Schlötterer 2004; Hudson 2008). Los datos moleculares han permitido estudiar con mayor precisión los patrones de diversidad genética y su distribución; el comportamiento; la selección natural; las interacciones biológicas; la composición, funcionamiento y dinámica de comu-

<sup>1</sup> Unidad de Biotecnología y Prototipos. Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida de los Barrios Número 1, Colonia Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, México C.P. 54090. Correo-e: laura\_alejos@yahoo.com.mx.

<sup>2</sup> Departamento de Biología. Universidad Autónoma Metropolitana, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Delegación Iztapalapa, México D.F., México C.P. 09340. Apartado postal 55532. Teléfono: 5804-6456. Fax: 58044688.

<sup>3</sup> Correo-e: snopyxxi@hotmail.com.

<sup>4</sup> Correo-e: ameli.cornejo@gmail.com.

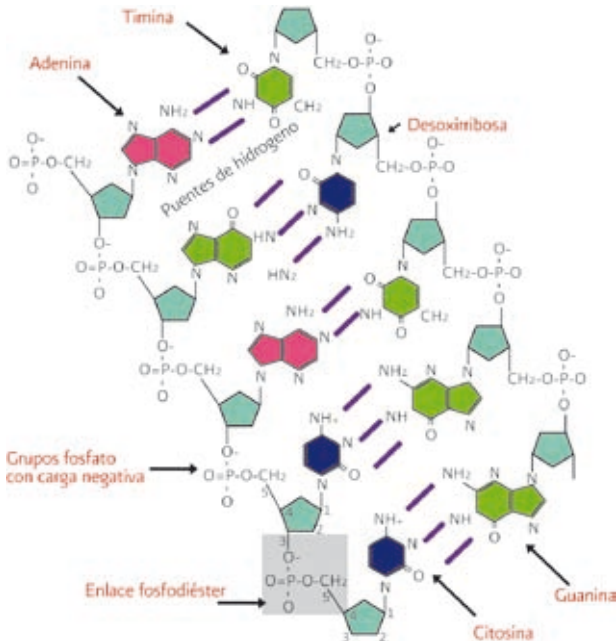
nidades microbianas; las relaciones filogenéticas, entre otros (Sunnucks 2000; Schlötterer 2004; Hudson 2008). La aplicación de técnicas moleculares inicia con la extracción de ADN y la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles depende, en gran medida, de la extracción de ADN íntegro y puro.

La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. El ADN está constituido por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Los nucleótidos están integrados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina). La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrógeno y mantienen estable la estructura helicoidal (Figura 1).

Los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere al ADN una carga neta negativa y lo hace altamente polar, características que son aprovechadas para su extracción. Los grupos fosfato tienen una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa, lo que permite disolver al ADN en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula. Pero, en presencia de etanol, se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos fosfato. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como  $\text{Na}^+$  que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN precipite (Sambrook *et al.* 1989). Por otro lado, la carga neta negativa del ADN le permite unirse a moléculas y matrices inorgánicas cargadas positivamente (Nasón 1965, Travaglini 1973, Sambrook *et al.* 1989, Sinden 1994).

A lo largo del tiempo se han diseñado distintos protocolos con la finalidad de obtener una cantidad y calidad de ADN adecuados, así como garantizar la eliminación de inhibidores potenciales que dificulten el tratamiento posterior de la molécula. Los métodos tradicionales, desarrollados en los años 50, utilizan solventes orgánicos para separar a las proteínas del ADN y, una vez suspendido en la fase acuosa, aislarlo por precipitación con etanol. Estos métodos requieren preparar soluciones y la extracción puede tomar desde unas horas hasta varios días por los numerosos pasos que deben realizarse. En general, los protocolos tradicionales consisten de cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN.

Figura 1. Estructura del ADN. En la estructura helicoidal del ADN, las cadenas se unen por puentes de hidrógeno dos entre adenina y timina, tres entre guanina y citosina. El enlace fosfodiéster que une a cada nucleótido, se forma entre el fosfato ( $H_3PO_4$ ) que se encuentra en el carbono 5 y el grupo hidróxilo ( $-OH$ ) del carbono 3 de la desoxirribosa. Los grupos fosfato son la parte hidrofílica del ADN y tienen carga negativa.

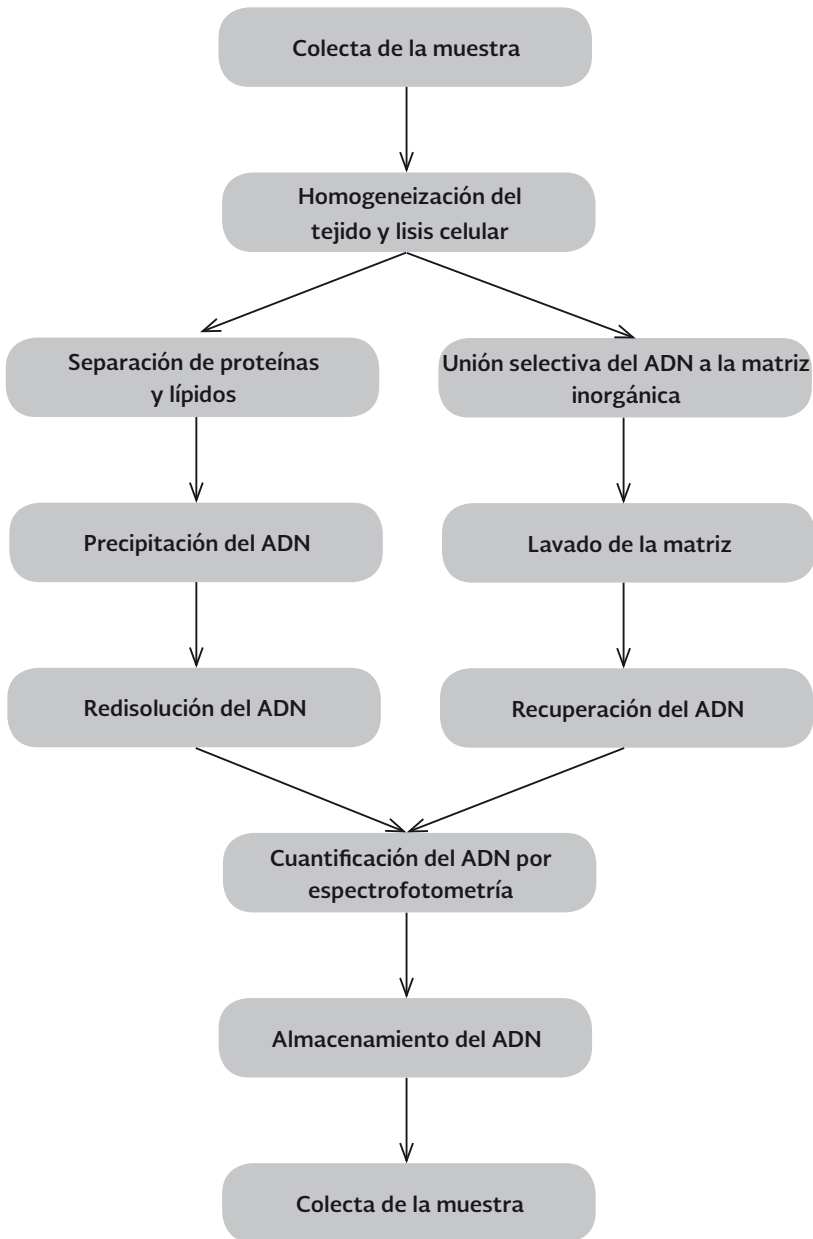


Modificada de [www.eoearth.org/view/article/158858](http://www.eoearth.org/view/article/158858).

A partir de los años 90 se introdujeron al mercado combos o kits de extracción que utilizan matrices inorgánicas compactas cargadas positivamente capaces de retener varios microgramos de ADN y separarlos del resto de las biomoléculas, permitiendo obtener un extracto libre de inhibidores. Los combos se venden en presentación de membranas de sílice o perlas magnéticas, las primeras están formadas por una resina y las segundas consisten de un centro de hierro recubierto por resina (Guinn 1966, Dundass *et al.* 2008). La membrana está insertada dentro de un microtubo de polipropileno y las microesferas se encuentran suspendidas en una solución amortiguadora.

Durante la extracción, el ADN cargado negativamente se adsorbe o une a la matriz selectiva de manera reversible y se mantiene unido a ésta durante la

## Etapas de la técnica



remoción de lípidos, proteínas y metabolitos secundarios, posteriormente la molécula se libera de la matriz.

Los combos también incluyen soluciones de lisis, unión y lavado que no contienen fenol ni cloroformo para extraer proteínas, tampoco requieren etanol para precipitar al ADN (Qiagen 2005, Invitrogen 2005). Los kits comerciales disminuyen la extracción a unas cuantas horas porque reducen el número de pasos del procedimiento y, utilizados bajo las recomendaciones de cada proveedor, garantizan una extracción de alta pureza ya que tanto la recuperación del ADN como la eliminación de contaminantes son muy eficientes (Qiagen 2005, Invitrogen 2005).

La selección del método de extracción es un paso fundamental en las técnicas moleculares y depende del organismo bajo estudio, el tejido disponible y su estado de conservación, la técnica que se aplicará posteriormente, así como la infraestructura de los laboratorios, los recursos económicos y tiempo para obtener resultados. Independientemente del método seleccionado es recomendable encontrar un equilibrio entre pureza y rendimiento de acuerdo a la aplicación posterior.

Con la finalidad de que el usuario conozca las diferentes opciones y elija la más apropiada, de acuerdo con sus objetivos y recursos, en los siguientes párrafos se describen de manera general las etapas de los protocolos tradicionales y comerciales, se explican los métodos de análisis (concentración e integridad de la molécula) y almacenamiento del extracto.

## **PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN TRADICIONAL Y COMERCIAL**

### **Colecta de la muestra**

La colecta de la muestra y su manejo adecuados son indispensables para una extracción del ADN exitosa. En la tabla 1 se dan algunas recomendaciones importantes sobre la colecta y el manejo de tejidos vegetales y animales.

Una colecta y manejo apropiado de la muestra permite obtener ADN integro y sin contaminantes, los cuales afectan la acción de las enzimas durante la reacción de PCR. Cada tejido tiene sus consideraciones propias y siempre será necesario conocerlas o preguntar a los especialistas de cada grupo para llevar a cabo una colecta y extracción exitosas.

**Tabla 1. Recomendaciones sobre la colecta y manejo de algunos tejidos de plantas y animales.**

Organismo	Colecta en campo/ Transporte de la muestra	Almacenamiento de la muestra previo a la extracción
Plantas	<p>En el caso de tejido foliar, se recomienda colectar tejido joven pues contiene más células por unidad de peso que el tejido viejo y posee menos polisacáridos y polifenoles que dificultan la extracción. Una vez colectado, el tejido debe congelarse inmediatamente en nitrógeno líquido para evitar la formación de cristales y que se sinteticen metabolitos secundarios después de la abscisión.<sup>1, 2, 3, 4</sup> Si el tejido es obtenido de invernaderos o cultivo <i>in vitro</i>, no es necesario congelar el material, se puede hacer la extracción directamente.</p>	<p>Almacenar el tejido a -80 °C y evitar ciclos de congelación y descongelación antes de proceder con la extracción. Se recomienda congelar varios paquetes pequeños de la misma muestra con la cantidad de material que será procesada. Alternativamente, el tejido puede ser liofilizado y almacenado a temperatura ambiente entre 15 y 25 °C,<sup>5</sup> aunque esta alternativa no es viable para suculentas.</p>
Animales	<p>Tejido Cortar el tejido en pedazos pequeños (aproximadamente 0.5x0.5 cm o menores) para facilitar su maceración posterior. El tejido se puede deshidratar con etanol al 70 % (aunque esta opción puede degradar el ADN o acarrear contaminantes) o bien, congelarse con nitrógeno líquido. Para transportar la muestra es recomendable utilizar un buffer especializado que inactive las endonucleasas, por ejemplo el RNAlater (Ambion®). Otra opción es homogenizar el tejido en buffer de lisis que contenga sales de guanidina o β-mercaptoetanol que inhiben DNAsas y RNAsas.<sup>6</sup></p>	<p>Las muestras deben almacenarse de acuerdo al método de colecta utilizado, en etanol a 4 °C o si fue congelado con nitrógeno líquido a -80 °C</p>

Tabla 1. Continúa.

Organismo	Colecta en campo/ Transporte de la muestra	Almacenamiento de la muestra previo a la extracción
	Sangre Utilizar agujas de calibre apropiado, respetar la relación muestra/anticoagulante y homogeneizar correctamente la muestra para evitar la hemólisis* y/o coagulación**, y la contaminación bacteriana. Una vez obtenida la muestra es importante evitar movimientos bruscos durante el transporte.	Las muestras pueden mantenerse por unos días a 4 °C después de su colecta. Si se congela la muestra a -20 °C, debe descongelarse a temperatura ambiente y procesarse en su totalidad pues una vez descongelada, inicia la hemólisis, por ello es aconsejable hacer alícuotas.

\* La hemólisis libera hemoglobina, un contaminante e inhibidor de las reacciones enzimáticas.

\*\* Durante la coagulación el fibrinógeno (una proteína soluble de la sangre) se convierte en fibrina insoluble (Robbins y Cotran 2009), la cual tiene la capacidad de entrelazarse y atrapar entre sus fibras proteínas, agua y células impidiendo una lisis apropiada. La coagulación implica distintas reacciones enzimáticas que dependen del calcio. Los buffers contienen reactivos que evitan la coagulación, como el EDTA, la heparina y el citrato de sodio. El EDTA elimina el calcio de la sangre e impide la acción de las enzimas necesarias en la coagulación. Se utiliza en una proporción de 1 mg/ml de sangre (válido para todas las especies). La heparina evita que la protrombina se transforme en trombina, una proteasa que transforma el fibrinogeno en fibrina, se utiliza 0.1 ó 0.2 ml de heparina saturada por cada mililitro de sangre. El citrato de sodio actúa sobre el calcio evitando su ionización, se utiliza a una concentración de 0.106 mol/l.

<sup>1</sup> Blin y Stafford 1976; <sup>2</sup> Eulgen *et al.* 1999; <sup>3</sup> Eulgen *et al.* 2000; <sup>4</sup> Sepúlveda-Jiménez *et al.* 2003; <sup>5</sup> Qiagen 2005; <sup>6</sup> Sambrook *et al.* 1989.

## Homogeneización del tejido

La homogeneización, mecánica o química, consiste en romper las uniones entre las células para facilitar la interacción con las soluciones de lisis que ayudan a liberar el material genético (Figura 2).

a) La homogeneización mecánica incluye el uso de:

#### Nitrógeno líquido

Este procedimiento consiste en macerar la muestra con nitrógeno líquido, en un mortero de porcelana, hasta obtener un polvo muy fino. El nitrógeno líquido, congela de inmediato la muestra y evita que se formen cristales en el interior de la célula que rompen la estructura celular e inicie el proceso de degradación. Este procedimiento, se puede utilizar en tejido fresco o congelado, por ejemplo semillas, plántulas, tejidos fibrosos o viscosos y hongos. Es importante considerar que si la muestra ya está congelada, se deberá disgregar con nitrógeno líquido para evitar la degradación del ADN por acción de las DNAsas.

#### Pistilos u homogeneizadores

Los pistilos disgregan la muestra mediante fricción con la pared del tubo que contiene la muestra, adicionalmente se puede utilizar algún material abrasivo como vidrio pulverizado o resinas. El proceso se realiza manualmente, con pistilos plásticos o con ayuda de dispositivos electrónicos, conocidos como homogeneizadores. Es recomendable adicionar un poco del buffer de lisis antes de iniciar, estas soluciones desnaturalizan a las proteínas y mantienen estable al ADN. Cuando se utilizan dispositivos es necesario colocar el tubo sobre una cama de hielo, lo cual evita que el ADN se fragmente por el calor que genera la fricción. El uso de pistilos u homogeneizadores se recomienda en general para muestras pequeñas y tejidos blandos, aunque también se usa para tejidos no fibrosos como hojas jóvenes o flores. No es recomendable utilizar este método con tejidos congelados, porque las células del interior del tejido se descongelan antes de entrar en contacto con la solución de lisis y el ADN se fragmenta por acción de las DNAsas. En este caso se recomienda que el tejido se disgregue en presencia de nitrógeno líquido. Alternativamente se pueden utilizar el *buffers* comerciales como RNALater® ICE (Ambion®). La muestra se sumerge en el reactivo y se mantiene a -20°C toda la noche, posteriormente se puede descongelar la muestra y macerar sin requerir nitrógeno líquido (<http://www.ambion.com/catalog/CatNum.php?AM7030M>, consultado en octubre del 2010).



## b) Homogeneización química

En la homogeneización mediante agentes químicos, la muestra se mantiene en solución a altas temperaturas en presencia de detergentes, proteasas y agentes caotrópicos que rompen las uniones entre las células o que incluso pueden perforar la membrana celular. La disgregación química es recomendable para bacterias, muestras pequeñas de tejidos frescos o sangre. En tejidos fibrosos es recomendable cortar en fragmentos pequeños para favorecer su disgregación.

Antes de iniciar la homogeneización es necesario contar con información sobre la cantidad apropiada de tejido que debe utilizarse pues una disgregación rápida y completa es esencial para asegurar la obtención de ADN y evitar su degradación. Si se excede la cantidad recomendada se puede sobresaturar el sistema, con lo que se afecta el rendimiento y aumentan las impurezas del extracto, de manera que es aconsejable realizar experimentos preliminares con distintas cantidades de material inicial para determinar cuál es la cantidad apropiada, en particular en los sistemas de extracción tradicionales. Por ejemplo, en el caso de tejido vegetal, el material liofilizado contiene mayor cantidad de células, por lo que se recomienda utilizar solo el 50% de peso fresco. Si el tejido contiene una alta cantidad de polisacáridos o polifenoles, se inicia con el 25% del peso. Sin embargo, si la especie tiene un genoma pequeño es posible incrementar la cantidad hasta un 50%. En el caso de tejido animal, aunque el peso o la cantidad inicial sea la misma el rendimiento puede variar significativamente entre tejidos. En la tabla 2 se muestra la cantidad de tejido recomendada y el rendimiento esperado cuando la extracción se lleva a cabo utilizando combos de extracción comercial.

**Tabla 2. Tipo de tejido, cantidad de muestra y rendimiento esperado de ADN, usando combo de extracción comercial.**

Material	Cantidad	Rendimiento de ADN ( $\mu\text{g}$ )
Células de <i>E. coli</i>	$2 \times 10^9$	10-30
Células HeLa	$5 \times 10^6$	20-40
Células 293F	$5 \times 10^6$	15-30
Sangre de humano	200 $\mu\text{l}$	3-10
Cola de ratón	1 a 1.2 cm	5-25
Cerebro de ratón	25 mg	10-30

Tabla 2. Continúa.

Material	Cantidad	Rendimiento de ADN ( $\mu\text{g}$ )
Hígado de ratón	25 mg	10-30
Vaso de ratón	10 mg	10-40
Espinaca	100 mg	2.0 - 2.5
<i>Arabidopsis thaliana</i>	100 mg	1.8 - 3.1
Alfalfa	100 mg	2.1 - 3.0
Girasol	100 mg	1.6 - 4.0
Hongo	100 mg	1.1 - 1.4
Soya	100 mg	0.3 - 2.0
Trigo	100 mg	9.2 - 14.6
Maíz	100 mg	4.4 - 6.6
Jitomate	100 mg	1.0 - 2.3

El rendimiento de ADN depende del tipo y cantidad de material inicial utilizado así como, de la capacidad de carga de la matriz empleada.

Modificado de: [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/purelink\\_genomic\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_man.pdf) (consultado en agosto de 2010).

### Lisis celular

Durante el proceso de lisis las interacciones entre las moléculas que conforman la pared, la membrana celular y nuclear se modifican o destruyen permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen (Figura 2). Se utilizan soluciones básicas, detergentes o agentes caotrópicos que permiten disolver la membrana celular, así como inhibidores para inactivar las enzimas que degradan el ADN. Muchas soluciones de lisis contienen también EDTA, que forma un complejo con los iones de  $\text{Mg}^{2+}$  e impide el funcionamiento de las DNAsas (Sambrook *et al.* 1989). Los componentes celulares no solubles como el material fibroso y proteínas que permanecen en solución se separan del ADN por centrifugación.

Tanto la homogeneización como la lisis celular son similares en los protocolos tradicionales y comerciales. Las particularidades del resto de las etapas se explican, a continuación, independientemente para cada uno de los protocolos.

## 1. PROTOCOLO TRADICIONAL

### Separación de proteínas y lípidos

En esta etapa se separa el ADN de las proteínas y lípidos mediante solventes orgánicos y ciclos de centrifugación (Figura 2.1A). Se utiliza la fuerte tendencia hidrofílica de los grupos fosfato para separarlos en medios acuosos, mientras que las proteínas y los lípidos se separan en solventes orgánicos (Sambrook *et al.* 1989). La fase acuosa y la orgánica se separan por centrifugación lo que permite aislar al ADN. Los solventes que se usan frecuentemente son el fenol, el cloroformo y el alcohol isoamílico (Stulnig y Amberger 1994). Estos reactivos contaminan fácilmente el ADN, por lo que se debe evitar acarrearlos en el proceso de purificación.

### Precipitación del ADN

Después de que son eliminados los lípidos y las proteínas, se recupera el ADN. Para ello, se adiciona etanol y soluciones con altas concentraciones de iones de sodio o amonio que se unen a los grupos fosfato, esta mezcla reduce las fuerzas repulsivas entre las cadenas y permite que el ADN se pliegue sobre sí mismo haciéndolo insoluble (Figura 2.1B). Un paso de centrifugación permite que el ADN permanezca en el fondo del tubo mientras que el etanol es desechado. Los restos de etanol se eliminan con un lavado con etanol al 70% y el remanente se elimina por evaporación.

### Redisolución del ADN

Una vez que se ha eliminado el etanol, el paso siguiente es hidratar el ADN para mantenerlo en solución (Figura 2.1C). En el caso de emplear agua, el pH debe ser de 7 para permitir la redisolución completa del ADN y evitar una hidrólisis ácida (<http://www.massey.ac.nz/~wwbioch/DNA/hydDNA/framset.htm>, consultado en agosto del 2010). Cuando se utiliza una solución amortiguadora, es preferible utilizar una solución de Tris-HCl a 10mM y EDTA a 0.1M a un pH de 8.0 (low TE) para almacenar el material. Cuando se está disolviendo el ADN es importante evitar el pipeteo y la agitación agresiva pues se pueden fragmentar moléculas de alto peso molecular. Una opción que evita la frag-

mentación consiste en incubar a 55 °C el ADN, 1 a 2 horas con agitación suave. En el anexo 3 se explica paso a paso el protocolo tradicional CTAB.

## 2. PROTOCOLO COMERCIAL

### Unión del ADN a la matriz inorgánica y lavado

En el caso del kit con membrana de sílice, en algunos casos a la mezcla de lisis se le añade la solución de unión que tiene un pH específico. Antes de pasar la solución de lisis a través de la columna, se adiciona etanol a la solución, eliminando la capa hidratante del ADN y exponiendo sus grupos fosfato, facilitando con ello la adsorción de la molécula a la membrana cargada positivamente (Figura 2.2A). Los lípidos y proteínas no son afines a la membrana y se eliminan con ayuda de la solución de lavado y un ciclo de centrifugación, mientras que el material genético permanece unido a la matriz (2B).

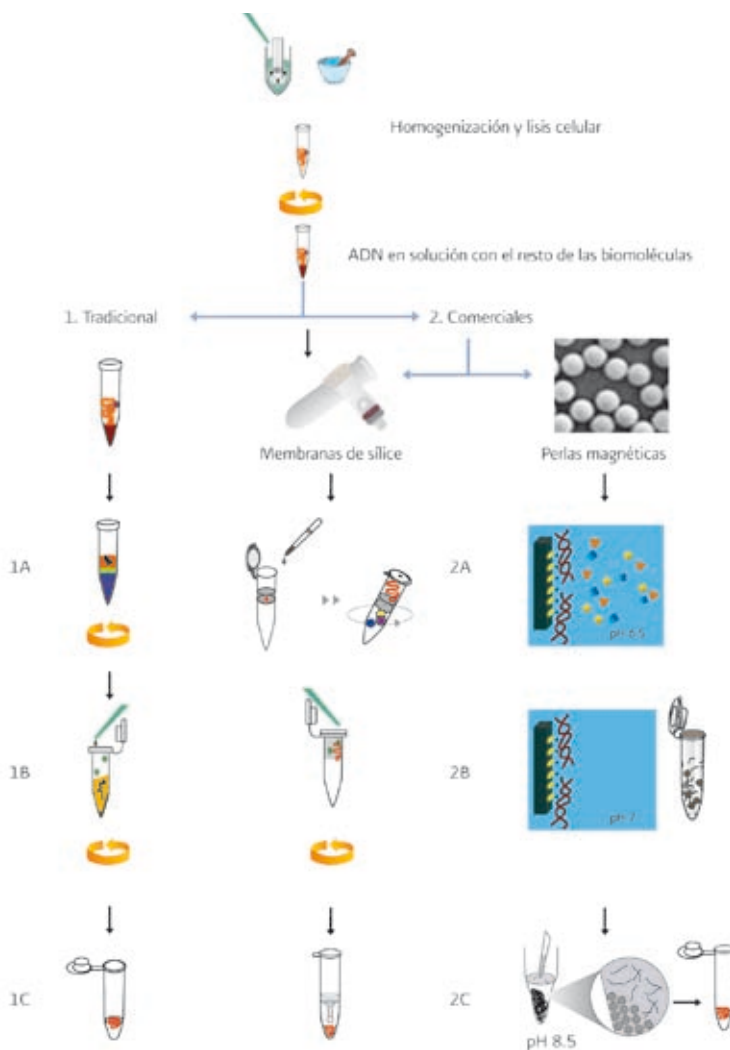
El kit con perlas magnéticas además de utilizar soluciones a pH específicos, utiliza un imán o magneto que atrae a las perlas para separarlas de las soluciones en las que se encuentran suspendidas. En este caso, se añade a la solución de lisis una solución amortiguadora a pH ácido que permite cargar positivamente a las perlas, favoreciendo la unión de ADN (Figura 2.2A). Las proteínas y lípidos tienen baja afinidad por las perlas y son eliminados con soluciones de lavado a pH fisiológico. Las perlas son retenidas en la pared del microtubo con el magneto, mientras que la solución con los contaminantes se eliminan por pipeteo (2B).

### Recuperación del ADN de la matriz

En los kits es necesario liberar al ADN de la matriz,. La membrana y el ADN se deshidratan con soluciones de lavado y ciclos de centrifugación, después se recomienda centrifugar nuevamente la columna para evaporar el etanol y eliminar el exceso de las soluciones. Posteriormente, se adiciona agua o solución amortiguadora al centro de la membrana, se espera a que el ADN se hidrate, se centrifuga para recuperarlo de la matriz y resuspenderlo (Figura 2.2C).

En el protocolo de perlas magnéticas se utiliza una solución básica de Tris-HCl 10 mM a pH 8.5 para neutralizar la carga de las perlas. El ADN se separa de las perlas y transfiere a otro tubo, mientras que las perlas continúan siendo retenidas por el magneto (Figura 2.2C).

Figura 2. Etapas de la extracción del ADN. La homogeneización y lisis celular son similares en ambos protocolos. Protocolo tradicional: separación de proteínas y lípidos con solventes orgánicos (1A); precipitación del ADN mediante etanol y sales (1B) y Redisolución del ADN (1C). 2. Protocolos comerciales (membrana de sílice y perlas magnéticas): unión del ADN a la matriz inorgánica (2A); separación de proteínas y lípidos mediante soluciones a pH básico (2B); recuperación del ADN de la matriz (2C). Las flechas circulares indican ciclos de centrifugación.



Modificado de Invitrogen 2005.

Es necesario saber que la mayoría de los kits tienden a ser generales a la hora de su aplicación, pero se diseñan con un propósito específico. Por ejemplo, un kit para extraer ADN de sangre total, considera la presencia de hemoglobina y eritrocitos durante el proceso. Este método será más agresivo en comparación con un kit diseñado para extraer ADN de células o tejidos animales. En los manuales proporcionados por el fabricante se detallan, además de los pasos a seguir en cada caso, la cantidad de muestra recomendada y el rendimiento esperado de acuerdo al tipo de tejido (Invitrogen 2005). Esta información debe tomarse en cuenta al momento de elegir un kit.

## MÉTODOS DE ANÁLISIS

### Cuantificación del ADN

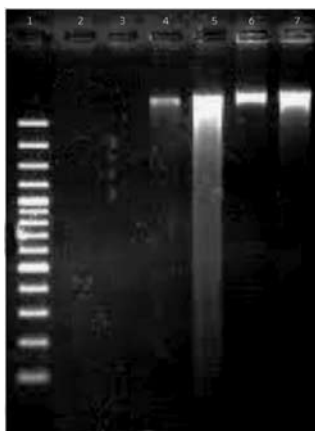
Una vez obtenido el material genético, es importante determinar el rendimiento mediante espectrofotometría. La ley de Beer-Lambert indica que la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas. Una característica del ADN es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría. Cuando la longitud de la celda en que se disuelve el ADN, es de 1 cm, la absorbancia es igual a la densidad óptica (DO). En el caso de ADN genómico o de doble cadena, una densidad óptica equivale a 50 ug/ml (Leninger 1975). Se debe considerar el factor de dilución para obtener la concentración en nanogramos/microlitro (ng/ul). En el caso de algunos equipos como el espectrofotómetro Nanodrop, no es necesario diluir la muestra y el equipo nos proporciona directamente la concentración en ng/ul. Considerando que para una reacción de PCR se requieren de 10 a 200 ng debemos obtener al menos, 5 ng/ul de ADN en cada muestra, si se recuperaron 50 ul, el rendimiento neto de la extracción sería de 0.25 ug. Concentraciones menores dificultan la estandarización de la PCR u otras técnicas.

Para estimar la pureza del ADN se considera la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, si la relación es menor indican la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenol.

## Comprobación de la integridad del ADN por electroforesis

Además de conocer la cantidad y calidad del ADN por espectrofotometría, es importante conocer si el ADN obtenido está íntegro. La integridad del ADN se puede observar mediante electroforesis en gel de agarosa (ver capítulo de electroforesis). Si el ADN está íntegro, se debe observar una banda estrecha cercana al pozo en que se colocó la mezcla de ADN. Si está fragmentado, se observará una banda de más de un cm de ancho o un sendero luminoso en el carril de la muestra (Figura 3). El ADN fragmentado dificulta la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular y afecta la reproducibilidad de las técnicas.

Figura 3. Gel de agarosa para visualizar la integridad del ADN. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 y 3 vacíos, carril 4 y 7 muestras con poca fragmentación, carril 5 muestra fragmentada, carril 6 muestra íntegra.



## Almacenamiento del ADN

Una vez que el ADN ha sido purificado, cuantificado y analizado mediante electroforesis, una parte de la muestra se puede almacenar a 4 °C para los análisis inmediatos y el material restante a -20 °C o -80 °C, para una preservación por varios meses. En este último caso es conveniente que el ADN se conserve en

soluciones con baja concentración de sales (low TE) para inhibir la acción de DNAsas contaminantes.

## VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN TRADICIONALES Y COMERCIALES

La obtención de ADN integro y puro es una parte fundamental para el buen desempeño de las técnicas utilizadas en biología molecular (Tang *et al.* 2005, Wang *et al.* 2005). Una de las ventajas de utilizar métodos tradicionales es su bajo costo, así como un alto rendimiento. Sin embargo, en ocasiones el material obtenido está fragmentado. Estos métodos son susceptibles de contaminación, variación y errores por los múltiples pasos de manipulación (Störmer *et al.* 2007). El rendimiento de los kits depende del tipo de tejido y la cantidad de muestra inicial, así como de la capacidad de unión de la membrana.

En los últimos años ha aumentado el uso de los métodos de extracción comerciales debido a que la matriz permite capturar selectivamente al ADN haciendo posible obtener un extracto de alta pureza con moléculas íntegras; al tiempo que se reduce el número de pasos en la extracción y se disminuye la posibilidad de contaminación con ADN o ARN exógeno (Tabla 3). Extractos con estas características aumentan la sensibilidad y reproducibilidad de las técnicas moleculares, con lo que se garantiza la obtención de resultados confiables. Aunque se sacrifique el rendimiento en algunas ocasiones, las técnicas actuales de biología molecular no requieren de grandes cantidades de material genético. Independientemente del método de extracción que se utilice, lo importante es realizar cada paso con cuidado para obtener ADN integro y puro que permita llevar a cabo las técnicas posteriores.

**Tabla 3. Ventajas y desventajas de los métodos tradicionales y comerciales de extracción y purificación de ADN.**

Condición	Métodos tradicionales	Métodos comerciales
Material inicial	Miligramos o gramos	De 50 a 250 mg como máximo
Uso de sustancias tóxicas	En la mayoría de los protocolos	Se evita utilizarlas
Tiempo de proceso	Hasta varios días debido a los numerosos pasos a desarrollar	Menor a 3 hrs.



**Tabla 3. Continúa.**

<b>Condición</b>	<b>Métodos tradicionales</b>	<b>Métodos comerciales</b>
Integridad (considerando tejido en buen estado de conservación)	Se requiere experiencia para evitar que el ADN se fragmente	Generalmente se obtienen moléculas de ADN de alto peso molecular
Rendimiento	Varios microgramos, aunque puede incluir moléculas de ADN fragmentadas	Varios nanogramos pero en su mayoría con moléculas de ADN integra
Inhibición enzimática	Los reactivos utilizados para la extracción fácilmente se acarrean con la muestra e interfieren con aplicaciones posteriores	Poco frecuente si se siguen los pasos y cantidades recomendadas por el fabricante
Automatización	Poco factible por los múltiples pasos y el uso de solventes corrosivos	Altamente recomendable
Costo	Bajo	Alto

## **PERSPECTIVAS**

Uno de los objetivos principales de los métodos modernos de extracción es automatizar el proceso, mediante el uso de kits y extractores automáticos robotizados con la mínima intervención de operadores, que permitan mejorar la precisión, obtener resultados reproducibles y reducir el tiempo de extracción, en particular cuando se requiere procesar una gran cantidad de muestras. De esta manera se favorece que los investigadores se enfoquen en analizar e interpretar la gran cantidad de datos genómicos obtenidos (Tang *et al.* 2005, Störmer *et al.* 2007, Dundass *et al.* 2008).

La extracción de ADN íntegro y sin contaminantes es esencial para tener éxito en la obtención de datos genéticos, es el primer paso en la lista de técnicas moleculares que nos llevarán a comprender mejor y conservar la diversidad biológica a partir del conocimiento de genes y genomas que anteriormente era inaccesible para la ecología y la evolución.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aras S., A. Duran y G. Yenilmez. 2003. Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf material of some *Hesperis L.* Specimens. *Plant Molecular Biology* 21: 461a–461f.
- Avise J. C. 2004. *Molecular markers, natural history and evolution*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, EE.UU.
- Blin N. y D. W. Stafford. 1976. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Research* 3: 2303–2308.
- Boom R., C. J. Sol, M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M. Wertheim-van Dillen y N. J. Van Der. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 495–503.
- Crespo A., O. Blanco, O. F. Cubero, M. C. Molina y P. Cubas. 1999. Técnicas y métodos para la iniciación en el estudio de la evolución molecular con aplicaciones especiales para el análisis de los hongos liquenizados. *Botanica Complutensis* 23: 13–51.
- Dundass N., N. K. Leos, M. Mitui, P. Revell y B. B. Rogers. 2008. Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. *Journal of Molecular Diagnostics* 10: 311–316.
- Doyle J. J. y J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11–15.
- Eulgen T., P. J. Rushton, E. Schmelzer, K. Hanlbrock y E. I. Somssich. 1999. Early nuclear events in plant defense: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *European Molecular Biology Organization* 18: 4689–4699.
- Eulgen T., P. G. Rushton, S. Robatzek y I. E. Somssich. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science Review* 5: 199–206.
- Fraga J., J. Rodríguez, O. Fuentes, M. Castex y A. Fernández-Calienes. 2004. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 56: 208–13.
- Guinn G. 1966. Extraction of nucleic acids from lyophilized plant material. *Plant Physiology* 41: 689–695.
- Honore´-Bouakline S., J. P. Vincensini, V. Giacuzzo, P. H. Lagrange y J. L. Herrmann. 2003. Rapid diagnosis of extrapulmonary Tuberculosis by PCR: Impact of sample preparation and DNA extraction. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 2323–2329.
- Hudson, M. E. 2008. Sequencing breakthroughs for genomic ecology and evolutionary biology. *Molecular Ecology Resources* 8:3–17.

- Invitrogen. 2005. *Nucleic acid purification and quantification sourcebook*. Invitrogen Industries, EE.UU.
- Leninger A. L. 1975. *Biochemistry*. Worth Publishers, New York, EE.UU.
- Murray M. G. y W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4326.
- Nasón A. 1965. *Biología*. Ed. Limusa, México.
- Qiagen. 2005. BioSprint DNA Plant Handbook. [www.qiagen.com/hb/biosprint-plantdnakit](http://www.qiagen.com/hb/biosprint-plantdnakit). Consultado en agosto de 2010.
- Robbins S. L. y R. S. Cotran. 2009. *Pathologic Basis of Disease*. Saunders, Philadelphia, EE.UU.
- Sambrook J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.
- Schlötterer, C. 2004. The evolution of molecular markers –just a matter of fashion? *Nature Reviews* 5: 63-69.
- Sepúlveda-Jiménez G., H. Porta-Ducoing y M. Rocha-Sosa. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 355-363.
- Shendure J. y Ji H. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 26: 1135-1145.
- Sinden R. R. 1994. *DNA Structure and Function*. Academic Press, EE.UU.
- Störmer M., K. Kleesiek y J. Dreier. 2007. High-Volume Extraction of Nucleic Acids by Magnetic Bead Technology for Ultrasensitive Detection of Bacteria in Blood Components. *Clinical Chemistry* 53: 104-110.
- Stulnig T. M. y A. Amberger. 1994. Exposing contaminating phenol in nucleic acid preparations. *BioTechniques* 16: 402-404.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15:199-201
- Tang Y. W., S.E. Sefers, H. Li, D. J. Kohn y G.W. Procop. 2005. Comparative evaluation of three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 4830-4833.
- Tel-Zuri N., S. Abbo, D. Myslabodski y Y. Mizrahi. 1999. Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Molecular Biology* 17: 249-254.
- Travaglini E. C. 1973. Methods for the extraction and purification of desoribonucleic acid from eukariote cells. En: D. M. Prescott (ed.). *Methods in cell biology*. Academic Press, EE.UU.

- Wagner D. B., G. R. Furnier, M. A. Saghay-Marooif, S. M. Williams, B. P. Dancik y R.W. Allard. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 84: 2097-2100.
- Wang F., Y. Zhu, Y. Huang, S. McAvoy, W. B. Johnson, T. H. Cheung, T.K.H. Chung, K.W. K. Lo, S.F. Yim, M.M.Y. Yu, H. Y. S. Ngan, Y.F. Wong y D.I. Smith. 2005. Transcriptional repression of WEE1 by Kruppel-like factor 2 is involved in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 24: 3875–3885.

## ANEXO 1. PROTOCOLO TRADICIONAL CTAB (BROMURO DE CETIL TRIMETIL AMONIO)

Uno de los métodos que se utilizan para extraer ADN de plantas y alimentos derivados de vegetales utiliza CTAB que es la sustancia adecuada para procesar tejidos con una alta concentración de polisacáridos y polifenoles. Este protocolo fue desarrollado por Murray y Thompson en 1980 y publicado hasta 1987 por Wagner y sus colaboradores (Wagner *et al.* 1987). Se ha utilizado de manera efectiva en diversas especies de plantas (Doyle y Doyle 1987, Tel-Zuri *et al.* 1999, Aras *et al.* 2003) bacterias (Honore´-Bouakline *et al.* 2003), hongos, líquenes (Crespo *et al.* 1999) e insectos (Fraga *et al.* 2004). En la actualidad algunos laboratorios, que procesan un alto número de muestras, se sigue utilizando ya que permite obtener ADN de alta calidad eliminando los inhibidores que afectan la PCR; además de ser un método económico y fácil de estandarizar.

### Miniextracción CTAB, partiendo de 100 mg de tejido

#### Equipo

- Baño de incubación o termoblock
- Microcentrífuga que pueda ser programada a 14,000 rpm
- Vortex
- Balanza analítica
- Potenciómetro
- Agitador termo-magnético
- Campana de extracción
- Ultracongelador
- Concentrador de vacío
- Espectrofotómetro
- Cámara de electroforesis

#### Material

- Termo o cuba para nitrógeno líquido
- Morteros y pistilos
- Espátulas
- Tijeras o bisturí
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml estériles

- Micropipetas de 2, 10, 200 y 1 000 uL
- Puntas para micropipeta de 10, 200 y 1 000 uL con filtro
- Gradilla para tubos de 1.5 o 2 ml
- Espátulas
- Guantes
- Hielo
- Termómetro
- Marcadores para etiquetar tubos
- Bata de laboratorio
- Toallas de papel
- Contenedores de desechos líquidos
- Contenedores de puntas utilizadas

#### Reactivos

- 2-β-Mercaptoethanol (CAS N° 60-24-2)
- Acetato de amonio (CAS N° 631-61-8)
- Ácido bórico (CAS N° 10043-35-3)
- Ácido clorhídrico (CAS N° 7647-01-0)
- Agarosa (CAS N° 9012-36-6)
- Agua destilada estéril libre de DNasas y RNasas
- Alcohol isoamílico (CAS N° 123-51-3)
- Cloroformo (CAS N° 67-66-3)
- Cloruro de sodio (CAS N° 7647-14-5)
- CTAB, Bromuro de hexadecil trimetil amonio (CAS N° 57-09-0)
- EDTA Ácido etileno diamino tetracético di sódico (CAS N° 6381-92-6)
- Etanol grado biología molecular (CAS N° 64-17-5)
- Fenol (CAS N° 108-95-2)
- Marcador de peso molecular de 1 Kb
- Nitrógeno líquido (CAS N° 7727-37-9)
- Proteinasa K (CAS N° 39450-01-6)
- RNAsa A (CAS N° 9001-99-4)
- TBE (Tris base, EDTA, ácido bórico)
- Tris base (CAS N° 77-86-1)
- Tris-Hidrochloride (CAS N° 1185-53-1)

## Soluciones requeridas

### Antes de empezar

Preparar con anticipación todas las soluciones que se utilizarán y mantenerlas a la temperatura solicitada.

Esterilizar morteros y pistilos, tubos para microcentrífuga y puntas para micropipetas.

Rotular los tubos y tener a la mano marcadores de punto fino indelebles.

En lo posible, utilice agua libre de DNasas y RNasas para preparar las soluciones.

Encender el o los termobaños para que se encuentren a la temperatura requerida.

### Buffer Tris-HCl 100 mM pH 8

Dentro de la campana de extracción, disolver en 65 ml de agua desionizada 0.605 g de Tris-HCl. Agregar HCl al 0.1 N, agitando constantemente hasta ajustar el pH a 8. Aforar a un volumen de 100 ml con agua desionizada. Mantener a temperatura ambiente.

### Buffer de extracción CTAB 2X

1.4 M de NaCl (8.181 g) 20 mM de EDTA (0.744 g), 2 % P/V de CTAB (2 g).

Disolver lo anterior en 75 ml de buffer Tris-HCl 100 mM pH 8 en un agitador termomagnético hasta que las sustancias se disuelvan completamente. Agregar 300  $\mu$ l de 2- $\beta$ -mercaptoetanol en la campana de extracción ya que este compuesto es muy volátil y tóxico. Finalmente, aforar a un volumen de 100 ml con la solución de Tris-HCl previamente utilizada. Mantener a temperatura ambiente y antes de iniciar el proceso caliente a 55 °C.

### Solución Fenol: Cloroformo: isoamílico 25:24:1

Mezclar en la campana de extracción 50 ml de fenol, 48 ml de cloroformo y 2 ml de alcohol isoamílico. Mantener almacenado a -20°C.

Acetato de amonio 10 M

Disolver en 5 ml de agua desionizada, 7.71 g de acetato de amonio y aforar a 10 ml con agua desionizada. Mantener a temperatura ambiente.

Etanol al 70 %

Por cada 70 ml de etanol absoluto, agregar 30 ml de agua desionizada y mezclar. Mantener la solución a -20°C.

## Método

Protocolo CTAB

1. Mezclar 100 mg de tejido previamente pulverizado con nitrógeno líquido con 1 ml de CTAB 2X, precalentado a 55 °C, en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml.
2. Mezclar por inversión e incubar 5 min. a temperatura ambiente.
3. Incubar 5 min. en hielo.
4. Agregar 20 µl de RNasa A, mezclar por inversión e incubar por 20 min. a 37 °C. Durante la incubación invertir los tubos dos o tres veces.
5. Agregar 10 µl de proteinasa K, mezclar por inversión e incubar a 60 °C por 20 min. Durante la incubación invertir los tubos dos o tres veces.
6. Incubar 5 min en hielo.
7. Agregar 600 µl de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y agitar por inversión.
8. Centrifugar a 10,000 rpm a 8 °C, por 12 min.
9. Recuperar con cuidado 200 µl del sobrenadante y ponerlo en un tubo para microcentrífuga nuevo de 1.5 ml. Nota: Si el sobrenadante se encuentra turbio, será necesario repetir los pasos del siete al nueve.
10. Agregar 50 µl de acetato de amonio 10 M y mezclar por inversión varias veces.
11. Agregar 500 µl de isopropanol frío (a -20 °C) y mezclar por inversión varias veces.
12. Mantener la mezcla a -20°C durante 2 hrs, para favorecer la precipitación de ADN.
13. Centrifugar a 10,500 rpm a 8 °C, por 5 min.



14. Eliminar cuidadosamente el sobrenadante.
15. Agregar 1 ml de etanol al 70 % frío (a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).
16. Mezclar por inversión hasta observar que el botón se desprende del microtubo.
17. Dejar reposar 5 min. a temperatura ambiente.
18. Centrifugar a 10,000 rpm a  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 5 min.
19. Eliminar el sobrenadante cuidando no desprender el botón de ADN.
20. Colocar los tubos para microcentrífuga de 1.5 ml en el concentrador de vacío a 500 atm a  $55^{\circ}\text{C}$  por 10 min para secar el ADN. Si no se cuenta con un concentrador de vacío se pueden dejar los tubos abiertos hasta que se evapore el etanol; cubrirlos con una toalla de papel para que no se contaminen.
21. Revisar que el botón de ADN se encuentra completamente seco; en caso de no estarlo repetir el paso 20 durante el tiempo que sea necesario
22. Rehidratar el ADN en  $200\text{ }\mu\text{l}$  de buffer TE 1X o agua inyectable. Si el botón de ADN es pequeño se puede hidratar con 50 o  $100\text{ }\mu\text{l}$ .



# ELECTROFORESIS DE ADN

Francisco Fierro Fierro<sup>1</sup>

## INTRODUCCIÓN

La electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es una de las metodologías más utilizadas en el laboratorio en todo lo relacionado con el trabajo con ácidos nucleicos. Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. Podemos además extraer del gel los fragmentos de ADN que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones.

La electroforesis de ADN fue, y sigue siendo, una herramienta de importancia primordial en el desarrollo de las técnicas del ADN recombinante o ingeniería genética. La idea de utilizar la técnica de electroforesis a través de una matriz para analizar muestras de ADN corresponde a Vin Thorne, un bioquímico del Instituto de Virología de Glasgow, quien a mediados de los años 60 del pasado siglo estaba interesado en caracterizar las distintas formas de ADN que se

\* Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco #186, Colonia Vicentina, Delegación Iztapalapa. CP 09340 México D.F. fierrof@xanum.uam.mx.

obtenían de partículas purificadas de polyomavirus. Su razonamiento era que una combinación de fuerzas eléctricas y de fricción permitiría el desplazamiento y separación en función del tamaño o topología de diferentes moléculas de ADN. Éste es exactamente el principio en que se basa la electroforesis de ácidos nucleicos. Sometidos a un campo eléctrico, la carga neta negativa del ADN y el ARN hará que estos se muevan en dirección al ánodo (Figura 1A). Si se fuerza a los ácidos nucleicos a moverse a través de un gel formado por una malla tridimensional de un polímero como la agarosa, la fricción hará que las moléculas de mayor tamaño migren con más lentitud, mientras las de menor tamaño avanzan más en el gel, permitiendo que las diferentes moléculas se separen en función de su tamaño. Del mismo modo, moléculas de ADN o ARN con topologías o estructuras tridimensionales diferentes también se comportarán de forma diferente ante la fricción con la malla del polímero, permitiendo su separación.

Mediante la electroforesis en gel de agarosa, Thorne logró separar y visualizar tres formas topológicas diferentes del ADN del polyomavirus: superenrollada, relajada y lineal, tras haber marcado el ADN con [ $^3\text{H}$ ] timidina (Thorne 1966, 1967). El trabajo de Thorne recibió poca atención hasta principios de los años 70, cuando el empleo de enzimas de restricción permitió el análisis de moléculas de ADN mucho más grandes que los genomas virales. También resultó de gran importancia el desarrollo de métodos no radiactivos de tinción del ADN con suficiente sensibilidad para detectar cantidades de ADN del orden de nanogramos e inferiores. La utilización de bromuro de etidio para la detección de ADN en geles se desarrolló independientemente por dos grupos (Aaij y Borst 1972, Sharp *et al.* 1973), cuyos métodos siguen utilizándose hasta hoy sin apenas variaciones.

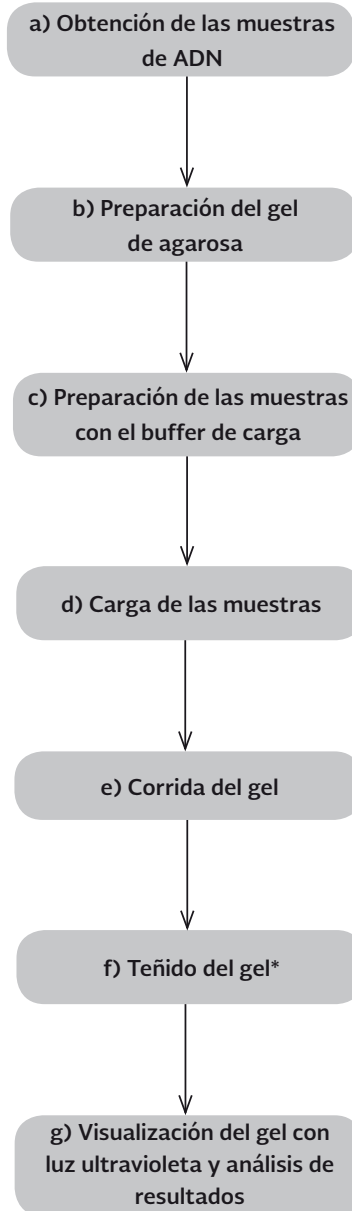
La electroforesis de ADN puede realizarse en geles de agarosa o de poliacrilamida. Ambos tienen características diferentes en cuanto a sus propiedades y modo de preparación, por lo que se utilizará uno u otro en función de la aplicación y objetivos que persigamos. La electroforesis en geles de agarosa es el método estándar para separar y purificar fragmentos de ADN cuando no requerimos un alto poder de resolución. Por su parte, la electroforesis en geles de poliacrilamida, aunque tiene una mayor limitación en cuanto al tamaño de los fragmentos que podemos separar (5–600 pb), posee un poder de resolución mucho mayor, permitiendo la separación de moléculas que difieren en un sólo par de bases. Los geles de poliacrilamida se corren de forma vertical y tienen la desventaja de ser más complicados en su elaboración y manipulación.

Los geles de agarosa tienen un poder de resolución mucho menor que los de poliacrilamida, porque no permiten separar moléculas de ADN que difieren en tamaño menos de unas 50 pb. Sin embargo, el rango de tamaños que pueden separarse es mucho mayor en un gel de agarosa (moléculas desde 50 pb hasta unas 40 kb) dependiendo de la concentración del mismo (0.3-2% p/v); cuanto más baja es la concentración de agarosa mayor es el tamaño de las moléculas que pueden separarse, y viceversa. Este rango de tamaños hace a los geles de agarosa ideales para analizar el producto de digestiones con enzimas de restricción, lo que puede combinarse con otras técnicas como el Southern blot, así como para analizar los productos de una reacción de PCR. Los geles de agarosa convencionales se corren en una cámara de electroforesis horizontal, con un campo eléctrico uniforme y constante.

La electroforesis en gel de agarosa tiene un límite superior de unas 40-50 kb en el tamaño de las moléculas de ADN que puede separar. Por lo tanto, no es posible separar el producto de digestiones con enzimas de restricción de corte infrecuente, como *NotI* o *SfiI*, y menos aún separar cromosomas enteros (los cromosomas de eucariotas inferiores tienen tamaños de entre 0.2 y 12 Mb). Reducir la concentración de agarosa hasta un 0.1 o 0.2% puede incrementar el límite de separación hasta los 750 pb, sin embargo estos geles son extremadamente frágiles y muy difíciles de manipular.

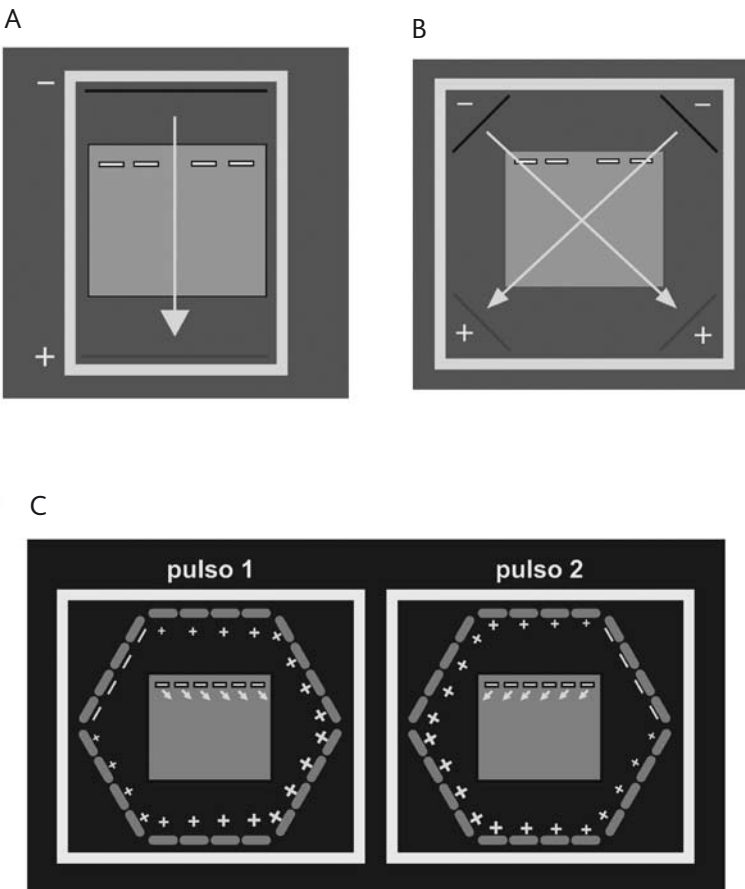
Esta limitación de tamaños se superó con el desarrollo de una técnica denominada electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) (Figura 1B). Esta técnica fue descrita inicialmente por Schwartz y Cantor (1984), quienes construyeron un aparato de electroforesis ortogonal en el cual dos campos eléctricos en ángulo sobre el gel funcionaban de forma alterna. El fundamento de esta técnica es la reorientación de las moléculas cuando cambia la dirección del campo eléctrico; en la electroforesis convencional las moléculas de ADN de gran tamaño quedan “atrapadas” en la malla que forma la agarosa en su avance a través del gel, pero la aplicación de dos campos eléctricos alternantes en ángulo permite una reorientación de las moléculas que de esta forma avanzarán un tramo más, antes de quedar de nuevo atrapadas. Cuanto más grandes son las moléculas mayor debe ser la duración de los campos eléctricos alternos para permitir la reorientación y en última instancia la separación de las mismas. Además de la duración del tiempo de los pulsos, otros parámetros como la

## Etapas de la técnica



\* Sólo en caso de no utilizarse bromuro de etidio en el gel.

Figura 1. A) Esquema del sistema de electroforesis convencional en gel de agarosa. El rectángulo representa la cámara de electroforesis con los electrodos positivo y negativo, y en el centro en gris más claro el gel de agarosa con sus pocillos. La flecha indica la dirección de migración del ADN. B) Esquema del fundamento del sistema de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*), en este sistema dos campos eléctricos en ángulo sobre el gel funcionan de forma alternante. C) Esquema de uno de los sistemas de electroforesis en gel de campo pulsado más utilizados, el CHEF (*Contour-Clamped Homogeneous Electric Field*). Las líneas formando un hexágono representan los electrodos. La distribución de cargas permite que el campo eléctrico sea homogéneo en todo el gel y de esta forma evitar distorsiones en la migración del ADN en los diferentes carriles.



intensidad y el ángulo que forman los campos eléctricos determinan el rango de tamaños que pueden separarse. Desde la invención del primer aparato de PFGE, la técnica se ha mejorado y se ha aumentado el límite superior de tamaños (Fierro *et al.* 2001), desarrollándose otros sistemas como el CHEF (*Contour-Clamped Homogeneous Electric Field*) (Figura 1C), que han permitido la resolución de cromosomas de eucariotas inferiores como los de los hongos *Neurospora crassa* (Orbach *et al.* 1988) y *Penicillium chrysogenum* (Fierro *et al.* 1993) con tamaños de hasta 10-12 Mb.

## PROTOCOLO

### Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La agarosa es un polímero lineal compuesto de residuos alternantes de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa unidos por enlaces glucosídicos  $\alpha(1\rightarrow3)$  y  $\beta(1\rightarrow4)$ . Las cadenas del polímero de agarosa forman fibras helicoidales, que al solidificar forma una malla tridimensional de canales con diámetros entre 50 y  $>200$  nm (Kirkpatrick 1990). Existen diferentes tipos de agarosa que se clasifican en función de la temperatura a la que se disuelven y solidifican. Las agarosas estándar se disuelven en el buffer a una temperatura de 90-95°C y solidifican a 35-45°C. Las agarosas de bajo punto de fusión se disuelven a unos 65°C y solidifican a 30-35°C. Existen además otros tipos, como las agarosas de alta fuerza de gel o las de baja viscosidad, que permiten respectivamente una mejor separación y un rango inferior del tamaño de las moléculas a separar. La concentración (p/v) de la agarosa es un parámetro de gran importancia pues determina el rango de tamaños en los que obtendremos una buena separación de los fragmentos de ADN. En la Tabla 1 se muestran las concentraciones de agarosa que es recomendable utilizar en función del rango de tamaño que pretendamos separar.

### Equipo

- Cámara horizontal de electroforesis con los accesorios correspondientes (molde para hacer el gel, peine, cables para conectar a la fuente de alimentación)
- Fuente de alimentación o de poder



- Transiluminador (fuente de luz ultravioleta)
- Equipo fotográfico que permita tomar fotos del gel

Estos dos últimos aparatos es preferible sustituirlos por un equipo de análisis de geles, el cual incluye la fuente de luz ultravioleta, el equipo fotográfico para la toma y digitalización de imágenes, y un equipo de cómputo con *Software* que permite distintos tipos de análisis, como el densitométrico. Ejemplos de este tipo de equipos son el Molecular Imager ChemiDoc XRS System de Biorad, o el ImageQuant 300 de GE Healthcare.

Además se requerirá de un potenciómetro, una balanza y una autoclave para preparar y esterilizar las soluciones necesarias.

**Tabla 1. Rango de separación de tamaños de ADN en función de la concentración y el tipo de agarosa utilizados.**

Agarosa (%)	Estándar	Alta fuerza de gel ( <i>High gel strength</i> )	Gel de baja temperatura de fusión ( <i>Low gelling/melting temperature</i> )	Gel de baja temperatura de fusión y baja viscosidad ( <i>Low gelling/melting temperature, low viscosity</i> )
0.3	1 kb – 40 kb			
0.5	700 pb – 25 kb			
0.8	500 pb – 15 kb	800 pb – 10 kb	800 pb – 10 kb	
1.0	250 pb – 12 kb	400 pb – 8 kb	400 pb – 8 kb	
1.2	150 pb – 6 kb	300 pb – 7 kb	300 pb – 7 kb	
1.5	80 pb – 4 kb	200 pb – 4 kb	200 pb – 4 kb	
2.0	60 pb – 2.5 kb	100 pb – 3 kb	100 pb – 3 kb	
3.0			50 pb – 1 kb	50 pb – 1 kb
4.0				100 pb – 500 pb
6.0				10 pb – 100 kb

## Material

- Micropipetas
- Puntas para micropipeta
- Tubos tipo *ependorf*

- Un matraz, probetas y vasos de precipitados para la preparación de soluciones
- Espátulas
- Guantes impermeables para el manejo del bromuro de etidio

## Reactivos

- Agarosa (CAS N° 9012-36-6)
- Tris base (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, CAS N° 77-86-1)
- Ácido acético glacial (CAS N° 64-19-7)
- EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, CAS N° 60-00-4)
- Ácido bórico (CAS N° 10043-35-3)
- NaOH (hidróxido de sodio, CAS N° 1310-73-2)
- Sacarosa (CAS N° 57-50-1)
- Glicerol (CAS N° 56-81-5)
- Azul de bromofenol (CAS N° 115-39-9)
- Xileno cianol (CAS N° 2650-17-1)
- Bromuro de etidio (CAS N° 1239-45-8)

## Soluciones y *buffers*

Como *buffer* de electroforesis y para la preparación del gel puede utilizarse opcionalmente TAE (Tris-Acetato EDTA) o TBE (Tris-Borato EDTA). El TAE tiene una menor capacidad de amortiguación que el TBE, y puede resultar en una acidificación del medio si la electroforesis se desarrolla durante un periodo muy prolongado, pero funciona muy bien con tiempos normales de electroforesis, además tiene una mayor capacidad de resolución que el TBE para tamaños grandes de ADN. Ambos suelen prepararse como soluciones concentradas, que pueden almacenarse a temperatura ambiente (previa esterilización en autoclave), éstas se diluyen con agua antes de cada electroforesis para lograr la concentración de uso: 1x para el TAE y 0.5x para el TBE.

*Buffer* TAE (50x) 1 L

Tris base, 242 g; ácido acético glacial, 57.1 ml; 0.5 M EDTA pH 8, 100 ml. Ajustar hasta 1 litro con agua destilada o desionizada.

### *Buffer* TBE (5x) 1 L

Tris base, 54 g; ácido bórico, 27.5 g; 0.5 M EDTA pH 8, 20 ml. Ajustar hasta 1 litro con agua destilada o desionizada.

El EDTA debe estar preparado previamente: Se añade al agua destilada o desionizada (un volumen 20% inferior al volumen final deseado) la cantidad adecuada de EDTA para obtener una concentración final de 0.5 M. Se ajusta el pH con NaOH hasta que el EDTA se disuelva y llegue la solución a un pH de 8. Se ajusta el volumen, se esteriliza y se conserva a temperatura ambiente.

### *Buffer* de carga

El *buffer* de carga debe tener una alta densidad que permita que la muestra se introduzca en el pocillo del gel, además de colorantes que nos indiquen cuando debe detenerse la electroforesis. Existen varios tipos de *buffers* de carga, a continuación se detallan los dos más utilizados (la inclusión de xileno cianol es opcional)

- *Buffer* de carga tipo I (6x): 0.25% azul de bromofenol; 0.25% xileno cianol; 40% sacarosa, en agua. Almacenar a 4°C.
- *Buffer* de carga tipo II (6x): 0.25% azul de bromofenol; 0.25% xileno cianol; 30% glicerol, en agua. Almacenar a 4°C.

### Solución de bromuro de etidio

El bromuro de etidio (BrEt) es un agente intercalante (se intercala entre las bases nitrogenadas) que se usa como colorante fluorescente para la visualización de ácidos nucleicos en geles de agarosa y poliacrilamida. El BrEt absorbe luz ultravioleta de  $\lambda \approx 300$  nm, y emite una luz anaranjada de 590 nm, mediante la cual podemos observar la posición y cantidad relativa del ADN en el gel tras la electroforesis.

La solución stock de BrEt se prepara a una concentración de 10 mg/ml en agua, y se conserva a temperatura ambiente o a 4°C en un tubo envuelto en papel de aluminio. Existen dos formas diferentes de realizar el teñido del ADN:

1. Preparar el gel con BrEt incorporado.
2. Teñir el gel una vez finalizada la electroforesis con una solución de BrEt.

En ambos casos, la concentración final del BrEt en el gel o en la solución de teñido debe ser de 0.5 µg/ml.

Existen alternativas a la tinción con BrEt. El *SYBR Gold* (nombre comercial) es un colorante muy sensible con una elevada afinidad por el ADN, que puede detectar cantidades de tan sólo 20 pg de ADN. Se utiliza en una dilución 1/10 000 en agua para el teñido del gel tras la electroforesis. Su elevado precio hace que sólo sea recomendable su uso para la detección de cantidades muy pequeñas de ADN que no sean detectables mediante tinción con BrEt. Otros colorantes disponibles actualmente son el *SYBR Green*, también de alta sensibilidad, y el *SYBR Safe*, con una sensibilidad similar al BrEt pero menor capacidad mutagénica. Existen además toda una nueva gama de colorantes con diferentes propiedades para la tinción del ADN; compañías como Invitrogen han desarrollado un buen número de estos colorantes, con diferentes niveles de sensibilidad y destinados a diferentes aplicaciones (ver referencia en <http://www.invitrogene.com>).

### Antes de empezar

Para realizar la técnica de electroforesis de ADN en gel de agarosa debe estar preparado el siguiente material antes de comenzar: muestras de ADN, marcador de tamaño o peso molecular, buffer de electroforesis (TAE o TBE), buffer de carga, solución de teñido de bromuro de etidio, además de todo el equipo de laboratorio y material que se indican en las secciones correspondientes.

Marcador de tamaños. La utilización de un marcador de tamaño es fundamental para tener una referencia de los tamaños del ADN en las muestras. Algunos de los más utilizados son: Lambda 1 kb ladder (fermentas), GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Fermentas), y ADN del fago lambda digerido con la enzima de restricción *HindIII*.

## Método

1. Preparación del gel de agarosa
  - 1.1. Pesar la cantidad de agarosa necesaria para obtener la concentración deseada (ver Tabla 1) en función del volumen de gel.
  - 1.2. Añadir la agarosa al *buffer* (TAE 1x o TBE 0.5x) en un matraz.
  - 1.3. Calentar la mezcla en un horno de microondas hasta que se observe que toda la agarosa se ha fundido.
  - 1.4. Dejar enfriar la solución de agarosa hasta una temperatura de unos 50 °C (Nota: si se opta por añadir el BrEt al gel debe realizarse en este momento, a una concentración final de 0.5 µg/ml).
  - 1.5. Mientras la solución de agarosa se enfría, preparar el molde en el que se va a hacer el gel sellando los bordes con cinta masking, o colocándolo en el dispositivo previsto para ello, y colocando el peine en la posición deseada.
  - 1.6. Verter cuidadosamente la solución de agarosa sobre el molde nivelado y dejar que solidifique durante al menos 30 min.
  
2. Preparación de las muestras
  - 2.1. Mezclar tanto las muestras de ADN como el marcador de tamaño con 0.2 volúmenes del *buffer* de carga 6x. El volumen total estará determinado por el tamaño de los pocillos, habitualmente 15-30 µl.
  
3. Carga de las muestras y corrida del gel
  - 3.1. Una vez que el gel ha solidificado retirar el sellado de los bordes y colocar el molde con el gel en la cámara de electroforesis.
  - 3.2. Añadir *buffer* de electroforesis (TAE 1x o TBE 0.5x) hasta que cubra el gel unos 3-5 mm.
  - 3.3. Retirar cuidadosamente el peine para que queden libres los pocillos para las muestras.
  - 3.4. Cargar en los pocillos las muestras que se prepararon en el paso 7. *Nota:* Dependiendo del tipo de muestra y del marcador, frecuentemente es conveniente calentar a 65°C las muestras durante 3-5 min y enfriarlas en hielo antes de cargarlas.
  - 3.5. Conectar los cables a la fuente alimentación y aplicar un voltaje de 20-150 V (1-5 V/cm de acuerdo a la distancia entre los electrodos). El ajuste del voltaje es muy variable dependiendo de la cámara y de los

tamaños que se pretenden separar, se recomienda voltajes no muy altos para tamaños muy grandes del ADN.

*Nota:* Debe tenerse en cuenta que el ADN migra hacia el ánodo, por lo que debe disponerse correctamente la orientación del gel y de los cables.

3.6. Correr el gel hasta que el colorante azul de bromofenol esté a una distancia del borde de aproximadamente un 25% de la longitud total del gel. En ese momento debe detenerse la electroforesis.

#### 4. Tinción del gel y visualización del ADN

4.1. Si no se añadió el BrEt al gel (paso 1.4), éste debe teñirse una vez finalizada la electroforesis. Para ello se saca el gel de su molde y se sumerge en una solución de BrEt (0.5 µg/ml) durante al menos 15 min.

*Nota:* Ambas formas de tinción rinden resultados similares, pero se recomienda la tinción una vez finalizada la electroforesis para mantener el molde, peine y cámara libres de BrEt.

4.2. Colocar el gel sobre un transiluminador y encender la lámpara de luz ultravioleta ( $\lambda \approx 300$  nm), el ADN se visualizará como bandas de color anaranjado.

4.3. (Opcional) Si hay bandas de tamaño pequeño que no se visualizan bien puede hacerse una etapa de desteñido con H<sub>2</sub>O o 1 mM MgSO<sub>4</sub> durante 20 min.

4.4. Fotografiar el gel con el sistema fotográfico disponible.

## Electroforesis en gel de campo pulsado

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE: *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) permite la separación de moléculas de ADN de tamaño muy elevado (ver introducción). Las principales diferencias con la electroforesis convencional se encuentran en la preparación de las muestras, el equipo de electroforesis y la elección de los parámetros (tiempo de pulsos, voltaje, etc.) en función del rango de tamaños que se pretende separar. A continuación se indica cómo afectan diferentes parámetros al rango de separación en la PFGE, tomando como referencia el sistema CHEF (*Contour-Clamped Homogeneous Electric Field*):

*Tiempo de pulsos.* Es el parámetro clave que determinará el rango de tamaños que se puedan separar en una electroforesis PFGE. Cuanto mayor sea el tamaño a separar mayor debe ser el tiempo de pulsos. Las mejores resoluciones se obtienen realizando una rampa de tiempos, es decir, se comienza la electroforesis

con un tiempo de pulsos determinado (por ejemplo, 60 seg) y éste va subiendo gradualmente hasta un valor final (por ejemplo, 150 seg) que se alcanza al finalizar la electroforesis. Los valores que se dan a continuación son aproximados:

Tamaño	Tiempo de pulsos
10 - 800 Kb	6-80 seg
100 Kb - 1 Mb	60-90 seg
0.2 Kb - 2 Mb	60-120 seg
1 - 3 Mb	5-20 min
3 - 6 Mb	20-75 min
5 - 11 Mb	75-220 min

*Intensidad de campo (voltaje).* Moléculas de ADN de hasta 2 Mb de tamaño pueden separarse con voltajes de 4-6 V/cm. Tamaños mayores requieren voltajes más bajos para evitar la rotura del ADN; moléculas de 2 a 5 Mb se separan bien con 1.2 a 3.5 V/cm, mientras que moléculas de muy elevado tamaño (> 6 Mb) requieren voltajes de 1-1.5 V/cm.

*Tiempo total de electroforesis.* Este parámetro está muy relacionado con el anterior. Cuanto más grandes son los tamaños a separar se requieren voltajes más bajos, y como consecuencia tiempos más largos. Tamaños hasta 2 Mb pueden resolverse en 24-48 h. Tamaños entre 2 y 6 Mb necesitarán tiempos de 3-7 días. Y tamaños superiores a 6 Mb necesitarán siempre tiempos no inferiores a 6 días.

*Concentración de agarosa.* Mientras que en la electroforesis convencional este parámetro es crucial para separar distintos rangos de tamaños, en la PFGE su importancia no es tan grande. Tamaños mayores de ADN requerirán concentraciones de agarosa más bajas. Las concentraciones que se utilizan con más asiduidad son de 0.6-1.2% (p/v).

*Ángulo de separación de los campos eléctricos alternantes.* Suele depender del diseño del equipo de electroforesis, a veces puede ser ajustado y a veces no. El ángulo oscila entre 96° y 165°, y los que se usan con más frecuencia son 110-120°. En general un ángulo mayor permite una mejor resolución en tamaños pequeños (10-500 Kb).

*Temperatura.* El *buffer* de electroforesis tiene que estar refrigerado entre 4-15°C, para lo cual los sistemas de PFGE comerciales disponen de un refrigerador. La temperatura baja permite una mejor definición de las bandas en el gel.

## Equipo

- Un equipo completo para electroforesis en gel de campo pulsado (sistemas OFAGE, CHEF, RGE, etc.) (Fierro *et al.* 2001), con su fuente de alimentación, refrigerador del *buffer*, molde para preparación de muestras, charola para preparar el gel y peine.
- Un transiluminador (fuente de luz ultravioleta) y equipo fotográfico. O preferiblemente un equipo integrado de análisis de geles (ChemiDoc system de Biorad o similar).
- Además se requerirá de un potenciómetro, una balanza y una autoclave para preparar y esterilizar las soluciones necesarias.

## Material

El mismo que para la electroforesis convencional en gel de agarosa.

### Reactivos

- Agarosa (CAS N° 9012-36-6) de alto grado de pureza (a veces denominada de grado cromosomal)
- Agarosa de bajo punto de fusión
- Tris base (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, CAS N° 77-86-1)
- EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, CAS N° 60-00-4)
- Ácido bórico (CAS N° 10043-35-3)
- NaOH (hidróxido de sodio, CAS N° 1310-73-2)
- Bromuro de etidio (CAS N° 1239-45-8)

### Soluciones y *buffers*

Como *buffer* de electroforesis y para la preparación del gel se utiliza TBE 0.5x (ver protocolo de la electroforesis convencional en gel de agarosa).

*Solución de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en buffer TBE 0.5x.* Esterilizar y conservar a temperatura ambiente una vez que solidifique.

*Solución de bromuro de etidio* (ver protocolo de la electroforesis convencional en gel de agarosa). El gel se tiñe siempre después de la electroforesis, no se añade el BrEt al gel durante su preparación.



## Método

### 1. Preparación de las muestras

1.1. La obtención de ADN cromosomal intacto o de muy alto peso molecular debe realizarse lisando células que están previamente inmovilizadas en bloques de agarosa de bajo punto de fusión. De esta forma se evitan las roturas de las hebras de ADN que se producirían en una solución líquida. Las células son entonces sometidas a un tratamiento para provocar su lisis y la liberación del ADN, que quedará embebido en el bloque de agarosa, cargándose éste directamente en el gel. Existen diferentes protocolos en función del tipo de células: células animales (Sambrook y Russell 2000a), levaduras y hongos (Sambrook y Russell 2000b). Cuando la PFGE se utiliza para separar los productos de digestión con enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, el proceso de digestión se lleva a cabo con el ADN dentro del bloque de agarosa, hacia el cual las enzimas difunden desde una solución acuosa (ver protocolo descrito por Sambrook y Russell 2000c).

### 2. Preparación del gel de agarosa

2.1. El gel de agarosa se prepara de forma idéntica a como se describió para los geles de la electroforesis convencional, con TBE 0.5x

### 3. Carga de las muestras y corrida del gel

3.1. Una vez que el gel ha solidificado, retirar cuidadosamente el peine para que queden libres los pocillos.

3.2. Con la ayuda de una espátula cargar los bloques de agarosa con la muestra de ADN y el marcador de tamaño en los pocillos.

3.3. Sellar los pocillos con una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en TBE 0.5x (previamente fundida), y dejarla durante al menos 15 min.

3.4. Retirar el sellado de los bordes y sacar gel del molde, para colocarlo en la cámara de electroforesis.

3.5. Añadir buffer de electroforesis (TBE 0.5x) hasta que cubra el gel unos 3-5 mm.

3.6. Ajustar todos los parámetros de electroforesis (tiempo de pulsos, tiempo total, voltaje, temperatura del buffer) en el módulo de control.

3.7. Cerrar la tapa de la cámara, conectando los cables a la fuente alimentación, y comenzar el proceso de electroforesis.

3.8. En los geles de PFGE no tenemos un colorante del tipo de azul de bromofenol como referencia que nos indique cuando debemos de finalizar la electroforesis. El tiempo de corrida debe establecerse de antemano, junto con el resto de parámetros, en función de los tamaños a separar, el voltaje, lo publicado en la literatura y la propia experiencia. Si se van a separar fragmentos de restricción cuyo tamaño oscilará aproximadamente entre 6 y 500 Kb sí puede ser de utilidad cargar un pocillo con una solución de xileno cianol y finalizar la electroforesis después de que éste haya rebasado el borde del gel.

#### 4. Tinción del gel y visualización del ADN

4.1. Sacar el gel de la cámara de electroforesis y sumergirlo en una solución de BrEt (0.5 µg/ml) durante al menos 30 min. Nota: Con frecuencia es conveniente realizar una etapa de desteñido con H<sub>2</sub>O o 1 mM MgSO<sub>4</sub> durante 20 min.

4.2. Colocar el gel sobre un transiluminador y encender la lámpara de luz ultravioleta ( $\lambda \approx 300$  nm), el ADN se visualizará como bandas de color anaranjado.

4.3. Fotografiar el gel con el sistema fotográfico disponible.

### Electroforesis de ADN en gel de poliacrilamida no desnaturalizante

La poliacrilamida es un polímero formado por largas cadenas del monómero acrilamida que se unen transversalmente mediante N,N'-metilenbisacrilamida. La principal ventaja de los geles de acrilamida sobre los de agarosa es su mayor capacidad de resolución, y además, la posibilidad de cargar una mayor cantidad de ADN, mientras que una de las desventajas es la limitación en el tamaño del ADN a separar, alrededor de 500-600 pb. El rango de tamaños que pueden separarse depende de la concentración de acrilamida en el gel (Tabla 2).

Los geles de poliacrilamida desnaturalizantes se usan para separar fragmentos de ADN monocatenario, y se utilizan en técnicas como la secuenciación, DGGE o extensión del primer, mientras que los no desnaturalizantes se usan para separar ADN bicatenario. En este capítulo describiremos únicamente

Tabla 2. Rango de separación de tamaños de ADN (cadena doble) en función de la concentración de acrilamida y migración de los colorantes en equivalencia con tamaño del ADN.

Acrilamida (%)	Rango de separación (pb)	Xileno cianol	Azul de bromofenol
3.5	1 000 – 2 000	460	100
5	80 – 500	260	65
8	60 – 400	160	45
12	40 – 200	70	20
15	25 – 150	60	15
20	6 – 100	45	12

te los geles de poliacrilamida no desnaturalizantes (para los desnaturalizantes véase capítulo de DGGE).

### Equipo

Se requiere el mismo equipo que para la electroforesis en gel de agarosa, a excepción de la cámara de electroforesis, la cual debe ser una cámara vertical para geles de poliacrilamida, con todo su material adicional (cristales, separadores, pinzas, peines, etc.).

### Material

- Micropipetas
- Puntas
- Tubos tipo *ependorf*
- Tubos falcon o similares
- Probetas y vasos de precipitados para la preparación de soluciones
- Guantes impermeables para el manejo del bromuro de etidio y la acrilamida
- Cubrebocas si se va a utilizar acrilamida en polvo

## Reactivos

- Acrilamida (CAS N° 79-06-1)
- N,N'-metilenbisacrilamida (CAS N° 110-26-9)
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina, CAS N° 110-18-9)
- Persulfato de amonio (CAS N° 7727-54-0)
- Tris base (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, CAS N° 77-86-1)
- Ácido bórico (CAS N° 10043-35-3)
- EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, CAS N° 60-00-4)
- NaOH (hidróxido de sodio, CAS N° 1310-73-2)
- Sacarosa (CAS N° 57-50-1)
- Glicerol (CAS N° 56-81-5)
- Azul de bromofenol (CAS N° 115-39-9)
- Xileno cianol (CAS N° 2650-17-1)
- Bromuro de etidio (CAS N° 1239-45-8)

## Soluciones y *buffers*

La solución acrilamida/N,N'-metilenbisacrilamida (29:1) suele adquirirse ya preparada, de casas comerciales como Biorad. Si se va a preparar a partir de acrilamida y N,N'-metilenbisacrilamida sólidas, se pesan ambas (dentro de una campana extractora o usando un cubrebocas) y se disuelven en agua destilada o desionizada a una concentración final del 30% (peso/volumen) manteniendo la proporción 29:1. A continuación se filtra la solución a través de un papel de filtro y se guarda a 4°C protegida de la luz.

Como buffer de electroforesis se utiliza TBE (Tris-Borato EDTA) en concentración 1x o 0.5x (ver protocolo de la electroforesis convencional en gel de agarosa).

*Buffer de carga.* Se utilizan los mismos que en la electroforesis convencional en gel de agarosa.

*Solución de bromuro de etidio* (ver protocolo de la electroforesis convencional en gel de agarosa). El gel se tiñe siempre después de la electroforesis, no se añade el BrEt al gel durante su preparación. El SYBR Gold o la tinción con plata (véase capítulo de DGGE) son una alternativa si se usan concentraciones muy bajas de ADN.

## Método

1. Preparación del gel de poliacrilamida
  - 1.1. Limpiar las superficies de los cristales con un detergente líquido y aclarar con abundante agua, haciendo un último aclarado con agua destilada o desionizada. Aclararlos finalmente con etanol y dejarlos secar.
  - 1.2. Mezclar en un tubo los componentes del gel de poliacrilamida proporcionalmente a las cantidades que se muestran en la Tabla 3, de acuerdo al porcentaje de acrilamida que se vaya a utilizar y al volumen de gel requerido. Añadirlos en el siguiente orden: H<sub>2</sub>O, solución acrilamida/N,N'-metilbisacrilamida, TBE 5x, 10% persulfato de amonio.

**Tabla 3. Volumen de los componentes para geles de poliacrilamida de diferentes porcentajes, en base a un volumen total de 100 ml.**

Acrilamida (%)	Solución Acrilamida/N,N'-Metilbisacrilamida (29:1) (ml)	H <sub>2</sub> O (ml)	TBE 5x (ml)	10% Persulfato de amonio (ml)
3.5	11.6	67.7	20	0.7
5	16.6	62.7	20	0.7
8	26.6	52.7	20	0.7
12	40.0	39.3	20	0.7
20	66.6	12.7	20	0.7

- 1.3. Ensamblar cristales y separadores y sujetarlos fuertemente con pinzas.

Nota: Algunos sistemas de electroforesis incluyen sistemas de ensamblaje que previenen que el gel se filtre y se salga del receptáculo de los cristales cuando está aún líquido. En caso contrario conviene hacer un sellado en la parte inferior colocando los cristales ya ensamblados sobre un pequeño volumen de agarosa 1% fundida, de modo que ésta ascienda por capilaridad unos milímetros dentro del espacio entre los cristales. Una vez solidificada la agarosa impedirá que haya filtraciones del gel por la parte inferior.

- 1.4. A la solución preparada en el punto 1.2, añadirle 50 µl de TEMED por cada 100 ml de solución. Mezclar cuidadosamente invirtiendo el tubo.

- 1.5. Añadir la solución con una pipeta o punta de micropipeta en el espacio entre ambos cristales, de manera que se vaya depositando en el fondo sin formar burbujas, hasta llegar a la parte superior, casi hasta el borde.
  - 1.6. Colocar el peine entre ambos cristales cuidando que no se formen burbujas en el gel.
  - 1.7. Dejar polimerizar el gel durante al menos 30 min a temperatura ambiente. Si el gel se retrae en la parte superior añadir más solución hasta el borde de los cristales.
2. Preparación de las muestras
    - 2.1. Mezclar las muestras de ADN y el marcador de tamaño con 0.2 volúmenes del buffer de carga 6x. El volumen total vendrá determinado por el tamaño de los pocillos, habitualmente 20-30  $\mu$ l.
3. Carga de las muestras y corrida del gel
    - 3.1. Una vez que el gel ha polimerizado retirar el peine y montar los cristales con el gel en la cámara de electroforesis.
    - 3.2. Añadir buffer de electroforesis (TBE 0.5x) en los receptáculos inferior y superior de la cámara.
    - 3.3. Con una punta fina de micropipeta o una jeringa Hamilton limpiar el espacio de los pocillos haciendo entrar con fuerza solución TBE 0.5x.
    - 3.4. Cargar en los pocillos las muestras que se prepararon en el paso 2.1, utilizando una punta fina de micropipeta o una jeringa Hamilton.

Nota: Dependiendo del tipo de muestra y del marcador, frecuentemente es conveniente calentar a 65°C las muestras durante 3-5 min y enfriarlas en hielo antes de cargarlas.
    - 3.5. Conectar los cables a la fuente de alimentación y aplicar el voltaje requerido por la cámara (polo positivo en el reservorio inferior de la cámara).
    - 3.6. Correr el gel hasta que los colorantes estén a la distancia deseada (ver Tabla 2). Apagar la fuente de alimentación, desconectar los cables y desmontar de la cámara los cristales con el gel.
  4. Tinción del gel y visualización del ADN
    - 4.1. Abrir los cristales con una espátula y cuidadosamente despegar el gel, para sumergirlo en una solución de BrEt (0.5  $\mu$ g/ml) durante al menos 30 min. (Alternativamente, si el gel es grande o de muy bajo porcentaje, puede teñirse sin despegarlo del cristal).

4.2. Colocar el gel sobre un transiluminador y encender la lámpara de luz ultravioleta ( $\lambda \approx 300 \text{ nm}$ ), el ADN se visualizará como bandas de color anaranjado. ¡Advertencia!: La piel y sobretodo los ojos deben estar debidamente protegidos de la luz UV por bata, guantes y una pantalla o cubreojos de metacrilato.

4.3. Fotografiar el gel con el sistema fotográfico disponible.

## MÉTODOS DE ANÁLISIS

El análisis de los geles de agarosa y poliacrilamida se realiza preferiblemente en un aparato documentador de geles (por ejemplo el Molecular Imager ChemiDoc XRS System de Biorad), los cuales tienen incorporado un software que permite guardar fotografías del gel en formatos como TIFF, JPG, etc., además de llevar a cabo análisis densitométricos cuando se necesite realizar una cuantificación precisa de la intensidad de las bandas en el gel. Esta cuantificación puede tener distintas aplicaciones, por ejemplo la estimación de la concentración de ADN en una muestra mediante comparación con otra muestra de concentración conocida, y la comparación de las cantidades de ADNc en un experimento de RT-PCR semicuantitativa. Además los programas de análisis pueden realizar una estimación del tamaño de los fragmentos por comparación con los marcadores de peso molecular utilizados.

## APLICACIONES

La aplicación básica de las técnicas de electroforesis de ADN es la separación de fragmentos de ADN en una muestra y su visualización, para comprobar aspectos como el tamaño de los fragmentos, la concentración, la entereza y otros. Los fragmentos que sean de interés pueden purificarse a partir del gel mediante diferentes técnicas de extracción, y utilizarse para diferentes propósitos (clonación, secuenciación, mutagénesis, fusión con otros fragmentos, utilización como sondas, etc.).

De forma particular, cada una de las tres técnicas que se describen en este capítulo tiene aplicaciones específicas que se indican a continuación:

La electroforesis en gel de agarosa es la más utilizada, y se aplica en todos los procedimientos indicados en el párrafo anterior. Se utiliza además muy frecuentemente para la *realización de mapas de restricción*, separándose los

fragmentos que resultan de la digestión con diferentes enzimas de restricción, mediante digestiones individuales y dobles. Con frecuencia la electroforesis en gel de agarosa se utiliza también para separar fragmentos que se transferirán a una membrana (de nailon o nitrocelulosa) para llevar a cabo la técnica de *Southern blot*. También permite la separación de fragmentos de productos de PCR y la asignación de tamaño de los mismos (ver por ejemplo capítulo de ISSRs).

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) tiene como objetivo la separación de fragmentos de ADN de tamaño elevado. Se utiliza para separar fragmentos de restricción y elaborar mapas de restricción cuando se utilizan enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, como *NotI* o *SfiI* (El-Osta et al. 2005). Asimismo ha tenido una gran aplicación en la separación de cromosomas enteros de eucariotas inferiores, principalmente hongos, para elaborar cariotipos (Fierro et al. 1993, 2001). Al igual que la electroforesis convencional, la PFGE puede aplicarse como parte de la técnica de *Southern blot*, para localizar sondas y genes específicos en un determinado cromosoma o fragmento de restricción de elevado tamaño. Una aplicación particular de la PFGE es el estudio de los polimorfismos en la longitud de los cromosomas (CLP: *Chromosome Length Polymorphisms*). Estos estudios tienen diferentes aplicaciones, como son: 1) estudios de tipificación de cepas, como en el caso de *Candida* spp. en estudios epidemiológicos, donde la comparación del cariotipo electrofórico resultó ser un buen marcador para la identificación intra- e inter-específica de cepas de *Candida* (Pittet et al. 1991); 2) análisis de reorganizaciones cromosómicas causadas por procesos de mutagénesis o transformación genética; 3) análisis de la plasticidad y variabilidad genómica en poblaciones silvestres y asignación de cariotipos específicos a fenotipos particulares; 4) estudio de la herencia de los polimorfismos cromosómicos; 5) estudio de cromosomas supernumerarios o minicromosomas.

La electroforesis de ADN en gel de poliacrilamida no desnaturalizante persigue objetivos similares a la electroforesis en gel de agarosa, pero se utiliza para la separación de fragmentos más pequeños y cuando se quiere obtener una mayor resolución. La purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de poliacrilamida es un procedimiento sencillo y permite la obtención de ADN de alta pureza que puede utilizarse para aplicaciones que requieran un ADN totalmente libre de impurezas. La electroforesis de ADN en gel de poliacrilamida no desnaturalizante no se utiliza para la técnica de *Southern blot*. Otra



aplicación frecuente de este tipo de electroforesis es la detección de complejos ADN-proteína en la técnica denominada EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*), también denominada geles de retardo. Esta técnica se basa en el retraso que provoca en la migración de un fragmento de ADN la unión al mismo de una proteína que reconozca alguna secuencia del fragmento y se una a él de forma específica (Carey 1988, Cann 1989).

## VENTAJAS Y DESVENTAJAS

Las técnicas de electroforesis de ADN, en especial la electroforesis en gel de agarosa, es una técnica básica e imprescindible en cualquier laboratorio que utilice técnicas moleculares con ADN incluso en el nivel más básico. A la hora de montar un laboratorio de biología molecular lo primero que debe plantearse es la adquisición de los equipos necesarios para la realización de electroforesis en geles de agarosa. Resulta imprescindible una cámara de electroforesis con sus accesorios y una fuente de alimentación, así como un transiluminador y un sistema de fotodocumentación. Los costos de estos equipos son asequibles y no requieren de grandes inversiones.

Algunos de los componentes utilizados en las técnicas de electroforesis de ADN son tóxicos y deben tomarse precauciones especiales en su manejo:

*Bromuro de etidio.* El bromuro de etidio es tóxico a elevadas concentraciones debido a su capacidad mutagénica. Se debe evitar la inhalación del compuesto en estado sólido (manipularlo en campana de extracción), y se deben manejar las soluciones siempre con guantes.

Las soluciones de tinte de bromuro de etidio pueden descontaminarse de la siguiente forma: agregar agua hasta que su concentración esté por debajo de 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , a esta solución añadirle 0.2 volúmenes de ácido hipofosforoso al 5% recién preparado y 0.2 volúmenes de solución fresca de nitrito de sodio 0.5 M, mezclar con cuidado y checar que el pH sea inferior a 3, dejar incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 24 h y agregar un volumen de bicarbonato de sodio 1 M. En este momento la solución puede desecharse.

*Acrilamida.* La acrilamida en polvo y en solución es tóxica, y tiene la capacidad de penetrar a través de la piel. Se debe evitar la inhalación del compuesto en estado sólido (manipularla en campana de extracción), y se deben manejar las soluciones siempre con guantes. Una vez polimerizada los geles ya no resultan tóxicos, sin embargo se recomienda la utilización de guantes para su manipulación.

*Luz ultravioleta.* Los ojos y la piel deben protegerse adecuadamente mediante el uso de pantallas que filtren las longitudes de onda correspondientes a luz UV.

## PERSPECTIVAS

Las técnicas de electroforesis de ADN son hoy en día básicas e insustituibles para cualquier trabajo en biología molecular con ácidos nucleicos, por lo que seguirán utilizándose previsiblemente durante mucho tiempo. A lo largo de los años se han ido desarrollando avances en este tipo de técnicas, como la PFGE, así como aplicaciones nuevas, como el EMSA. El continuo desarrollo de las técnicas de biología molecular hace prever que se encontrarán nuevas aplicaciones para los diferentes métodos de electroforesis de ácidos nucleicos en gel.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aaij C. y P. Borst. 1972. The gel electrophoresis of DNA. *Biochimica and Biophysica Acta* 269: 192-200.
- Cann J. R. 1989. Phenomenological theory of gel electrophoresis of protein-nucleic acid complexes. *Journal of Biological Chemistry* 264: 17032-17040.
- Carey J. 1988. Gel retardation at low pH resolves trp-repressorDNA complexes for quantitative study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 975-979.
- El-Osta Y. G., A. J. Hillier y M. Dobos. 2005. Construction of a combined physical and genetic map of the chromosome of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 and characterization of the rRNA operons. *Microbiology* 151: 875-892.
- Fierro F., S. Gutiérrez, B. Díez y J. F. Martín. 1993. Resolution of four large chromosomes in penicillin producing filamentous fungi: The penicillin gene cluster is located on chromosome II (9.6 Mb) in *Penicillium notatum* and chromosome I (10.4 Mb) in *Penicillium chrysogenum*. *Molecular and General Genetics* 241: 573-578.
- Fierro F., S. Gutiérrez, J. Casqueiro y J. F. Martín. 2001. Karyotyping of fungi by Pulsed Field Gel Electrophoresis. Págs. 105-125 En: S.G. Pandalai (ed.), *Recent Research Developments in Genetics*, vol. 1. Research Signpost, Trivandrum, India.
- Kirkpatrick E. H. 1990. Overview of agarose gel properties. *Current Communications in Cell Molecular Biology* 1: 9-22.

- Orbach M. J., D. Vollrath, R. W. Davis y C. Yanofsky. 1988. An electrophoretic karyotype of *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology* 8:1469-1473.
- Pittet D., M. Monod, I. Filthuth, E. Frenk, P. M. Suter y R. Auckenthaler. 1991. Contour-clamped homogeneous electric field gel electrophoresis as a powerful epidemiologic tool in yeast infections. *American Journal of Medicine*. 91: 256S-263S.
- Sambrook J. y D. W. Russell. 2001a. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU., pp. 5.61-5.64
- Sambrook J. y D. W. Russell. 2001b. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU., pp. 5.65-5.67
- Sambrook J. y D. W. Russell. 2001c. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU., pp. 5.68-5.70
- Schwartz D. C. y C. R.Cantor. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37: 67-75.
- Sharp E. A., B. Sugden y J. Sambrook. 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12: 3055-3063.
- Thorne H. Y. 1966. Electrophoretic separation of polyoma virus DNA from host cell DNA. *Virology* 29: 234-239.
- Thorne H. Y. 1967. Electrophoretic characterization and fractionation of polyoma virus DNA. *Journal of Molecular Biology* 24: 203-211.



# PCR: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Alejandra Serrato Díaz<sup>1</sup>, Lluvia Flores Rentería<sup>2</sup>,  
Jaime Aportela Cortez<sup>3</sup> y Edgar Sierra Palacios<sup>4</sup>

## INTRODUCCIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) es, sin lugar a dudas, la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular, debido a que permite obtener *in vitro* millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula.

La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde. En procariontes se han encontrado al menos 12 proteínas involucradas

<sup>1</sup> Departamento de Hidrobiología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, colonia Vicentina. C. P. 09340. México, D. F. alej@xanum.uam.mx.

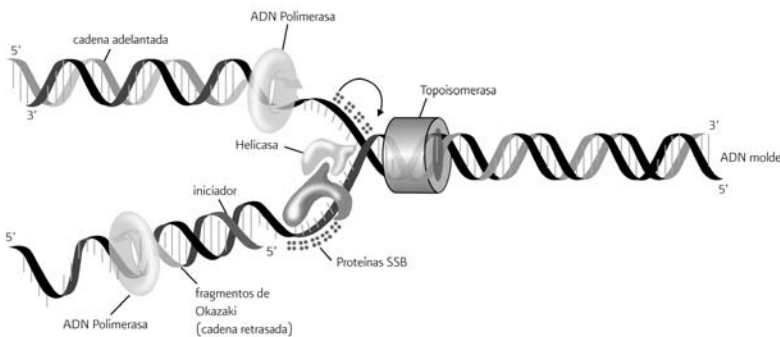
<sup>2</sup> Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, 3er. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, C. P. 04510. México, D. F. lluviafloresr@hotmail.com.

<sup>3</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental, Instituto Nacional de Ecología. Av. San Rafael Atlixco # 186. UAM Iztapalapa Edificio W, Planta baja. Col. Vicentina. C.P. 09349. México, D. F. japortelac@gmail.com.

<sup>4</sup> Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Calzada Ermita Iztapalapa 4163, Colonia Lomas de Zaragoza, Delegación Iztapalapa, C. P. 09620. México, D. F. omealca@yahoo.com.

en la replicación. Estas proteínas actúan en diferentes actividades, como: 1) la identificación del sitio de origen de la replicación; 2) el desenrollamiento de la doble hélice; 3) la estabilización de la estructura desenrollada; 4) la generación de cadenas iniciadoras complementarias con un extremo 3' libre que sirve de iniciador para que la ADN polimerasa comience su actividad catalizadora; 5) el avance de la bifurcación replicadora por desenrollamiento; 6) los pasos finales del ensamblaje de dos cadenas complementarias; 7) la identificación de los sitios de terminación y 8) el superenrollamiento de las dos nuevas moléculas de ADN (Figura 1). Sin embargo, la enzima más importante en la replicación es la *polimerasa del ADN dependiente de ADN*, comúnmente conocida como ADN polimerasa, porque es la encargada de incorporar nucleótidos durante la síntesis de las nuevas cadenas de ADN (Bohinski 1991).

**Figura 1.** Proceso de replicación del ADN a nivel celular. Horquilla de replicación del ADN con algunas de las proteínas más importantes que participan el proceso. La molécula original de ADN sirve de molde para que la ADN polimerasa genere una nueva copia de un fragmento de ADN. La ADN polimerasa celular requiere la presencia de un iniciador para llevar a cabo el proceso de replicación. Modificada de [www.biologia.edu.ar/adn/imagenes/ch8f20.gif](http://www.biologia.edu.ar/adn/imagenes/ch8f20.gif).



En la PCR se simula en un tubo lo que ocurre durante la replicación celular. La síntesis de nuevas cadenas de ADN se lleva a cabo mezclando: el ADN que contiene el o los fragmentos que se van a amplificar; la polimerasa; los iniciadores (fragmento de ADN de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar y que aportan el extremo 3' libre para que inicie la transcripción); desoxinucleótidos (dNTPs); cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) u otro co-factor necesario para que trabaje la polimerasa

y una solución amortiguadora que mantenga el pH apropiado para que se lleve a cabo la síntesis (Espinosa 2007). Esta mezcla se somete a la repetición de varios ciclos a diferentes temperaturas (ciclo de PCR) que sustituye a la mayoría de las proteínas que actúan en la replicación celular.

Generalmente, la PCR inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96 °C para romper los puentes de hidrógeno que las unían, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN. Una vez separadas las cadenas del ADN, se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura entre 40 y 60 °C lo que permite la unión (alineamiento) de los iniciadores. Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72 °C, porque es la temperatura óptima a la cual la ADN polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación. Estas tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión del ADN, se repiten sucesivamente, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias. Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial porque cada nueva copia sirve de molde en los ciclos subsecuentes (Figura 2), dando origen a millones de copias del fragmento seleccionado (Tabla 1) (Espinosa 2007).

## ORIGEN DE LA TÉCNICA DE PCR

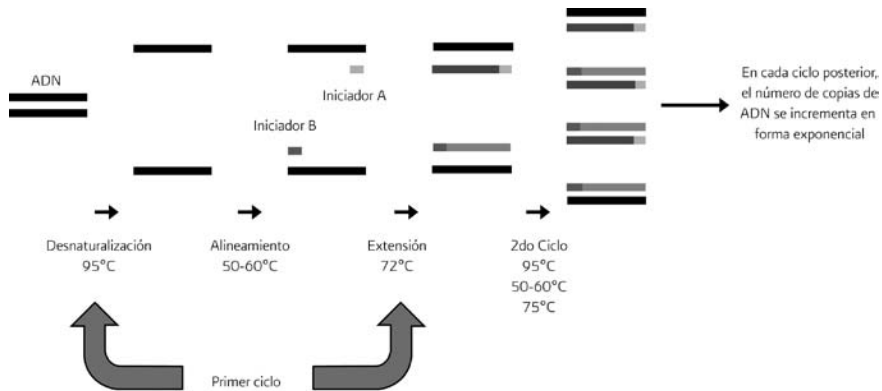
La PCR surgió en 1971 cuando Gobind Khorana describe la técnica al explicar la replicación de un fragmento de ADN usando dos iniciadores (Klepp et al. 1971). Pero fue en 1983 cuando Kary Mullis y sus compañeros de la compañía californiana Cetus Corporation la llevaron a cabo por primera vez mientras trabajaban en la fabricación de oligonucleótidos y en el uso de iniciadores para la secuenciación de ADN. Mullis y colaboradores usaron dos iniciadores que se alineaban con cada una de las hebras del ADN, adicionaron ADN polimerasa I de *Escherichia coli* y nucleótidos trifosfatados. Como resultado obtuvieron la replicación exponencial del fragmento de ADN flanqueado por los iniciadores (Mullis y Faloona 1987). En un principio, para llevar a cabo el ciclo de PCR, se calentaba la mezcla en baño María, pero cuando llegaba a más de 90 °C para

Tabla 1. Copias de ADN generadas por la PCR en cada ciclo (modificada de Martínez y Rincón 2004).

Ciclos	Copias de ADN
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	4,092
12	8,192
13	16,384
14	32,768
15	65,536
16	131,072
17	262,144
18	524,288
19	1,048,576
20	2,097,152
21	4,194,304
22	8,388,608
23	16,777,216
24	33,554,432
25	67,108,864
26	134,217,728
27	268,435,456
28	536,870,912
29	1,073,741,824
30	2,147,483,648



Figura 2. Amplificación de ADN mediante PCR. Un ciclo de amplificación consta de tres etapas: separación de las hebras de ADN (desnaturalización), unión de los iniciadores a una secuencia complementaria del ADN molde (alineamiento) y la síntesis semiconservativa de una nueva cadena por adición de nucleótidos debido a la acción de la ADN polimerasa (extensión). Cada una de las etapas está determinada por una temperatura. Teóricamente el proceso permite generar en 30 ciclos de amplificación más de dos billones de copias de ADN a partir de una sola molécula. Modificada de [https://www.u-cursos.cl/ingenieria/2009/2/BT51A/1/material\\_docente/objeto/244484](https://www.u-cursos.cl/ingenieria/2009/2/BT51A/1/material_docente/objeto/244484).



desnaturalizar la doble hélice, la ADN polimerasa de *E. coli* se inactivaba. Por este motivo, cada que se calentaba a estas temperaturas se tenía que adicionar nueva enzima a la mezcla. El proceso original era poco eficiente, utilizaba grandes cantidades de ADN polimerasa y necesitaba de supervisión durante todo el proceso (Mullis y Faloona 1987).

El elemento que mejoró la técnica fue el descubrimiento de las ADN polimerasas termoestables y termoactivas (que no pierden su actividad con temperaturas altas). En 1976 se aisló la primer polimerasa termoestable conocida como *Taq* polimerasa, a partir de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en ambientes acuáticos con temperaturas cercana a los 100 °C. Esta nueva enzima permitió la simplificación y automatización de la PCR, sin necesidad de adicionar polimerasa en cada uno de los ciclos (Saiki et al. 1988).

La *Taq* polimerasa es la enzima más utilizada en la PCR, pero presenta la desventaja de que no tiene actividad “correctora” (actividad nucleasa 3' → 5'), por lo que existe la probabilidad de introducir errores durante el copiado del ADN. Afortunadamente, se han encontrado ADN polimerasas termoesta-

## Etapas de la técnica

Antes de la PCR

a) Extracción del ADN

Durante la PCR

a) Preparación de la muestra

b) Amplificación

- Desnaturalización inicial
- Ciclos de la PCR: desnaturalización, alineamiento y extensión
- Extensión final

Después de la PCR

a) Electroforesis

bles, termoactivas y de alta fidelidad (con actividad “correctora”) (Tabla 2) provenientes de bacterias del dominio *Archaea*, como la ADN polimerasa *Pfu* de *Pyrococcus furiosus* (Robb et al. 2001).

**Tabla 2. Propiedades y aplicaciones de las ADN-polimerasas termoestables.**

Enzima	Organismo	Temperatura óptima	Actividad de Exonucleasa	Fidelidad	Estabilidad	Productor
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	75-80	5'-3'	Baja	9 min a 97.5 °C	MB, LT, Pro, Strat, P-E, T
<i>Taq</i> stoffel fragment	<i>T. aquaticus</i>	75-80	Ninguna	Baja	21 min a 97.5 °C	P-E
<i>rTth</i>	<i>T. thermophilus</i>	75-80	5'-3'	Baja	20 min a 95 °C	BM, ET, P-E
<i>Tft</i>	<i>T. flavus</i>	70	Ninguna	Baja	120 min a 70 °C	Pro
<i>Hot Tub</i>	<i>T. ubiqutis</i>		Ninguna	Baja		Amr
<i>Tbr</i>	<i>T. brockianus</i>	75-80	5'-3'	Baja	150 min a 96 °C	Amr, Finnz
<i>UITina</i>	<i>Thermotoga maritima</i>	75-80	3'-5'	Baja	50 min a 95 °C	P-E, Roche
<i>rBst</i>	<i>Bacillus stero-thermophilus</i>	60-65	5'-3' (3'-5') <sup>b</sup>			ET
<i>Isotherm-Bst</i>	<i>Bacillus stero-thermophilus</i>	60-65		Baja		ET, Bio-Rad
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>	60-65	3'-5'	Baja	>2 hr a 100 °C	MB
<i>Tli</i>	<i>Thermoco-ccus litoralis</i>	70-80	3'-5'	Baja	100 min a 100 °C	Pro
<i>Deep-Vent</i>	<i>Pyrococcus strain GB-D</i>	70-80	3'-5'	Baja	480 min a 100 °C	NEB
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>	72-78	3'-5'	Baja	240 min a 95 °C	Strat

(BM) Boehriger Mannheim; (ET) Epicenter Technology; (LT) Life Technology; (Pro) Pormega; (NEB) New Englad Biolabs; (E-P) Perkin-Elmer; (T) TaKaRa; (Strat) Stratagene; (Amr) Amresco; (Finnz) Finnzymes OY.

En la actualidad, para llevar a cabo la PCR, únicamente se necesita mezclar en microtubos el ADN molde, la ADN polimerasa; los desoxirribonucleótidos adenina (dATP), guanina (dGTP), citosina (dCTP) y timina (dTTP); una solución amortiguadora; un co-factor de la polimerasa (regularmente se usa magnesio) y los iniciadores (Anexo 1). La reacción se efectúa en equipos conocidos como termocicladores que se programan para que produzcan los ciclos de temperatura a los que se realiza la amplificación (Espinosa 2007).

## **PROTOCOLO**

Este protocolo está diseñado para la amplificación de fragmentos estándar que no sobrepasan las 2 kb (dos mil bases). Es necesario seleccionar previamente la o las regiones a amplificar así como seleccionar o diseñar los iniciadores, de acuerdo con los objetivos de la investigación. Asimismo se deben establecer las condiciones de amplificación de la PCR y las concentraciones de los reactivos.

## **Equipo**

- Termociclador
- Vortex
- Micropipetas de 2, 20, 100 y 200  $\mu$ l,
- Microcentrífuga
- Fotodocumentador

## **Material**

- Guantes desechables de látex, vinil o nitrilo
- Tubos para PCR
- Puntas para micropipetas
- Baño de hielo
- Gradilla

### Antes de empezar

- Esterilizar el material (puntas y tubos) que se va a utilizar.
- Etiquetar todo el material y reactivos con nombre, fecha de preparación, concentración y nombre del usuario.
- Determinar las condiciones de la PCR basados en la ADN polimerasa que se utilice, el tamaño del fragmento y la temperatura de fusión de los iniciadores (también denominado  $T_m$ , por las siglas en inglés de *melting temperature*) (véanse las etapas de la PCR y anexo 1).
- Limpiar el área de trabajo con cloro 10%, hidróxido de sodio (NaOH) 0.5 N o etanol 70%.
- Descongelar todos los reactivos en baño de hielo y mezclarlos perfectamente. Únicamente la enzima se mantiene en el congelador hasta el momento de usarse para prevenir su inactivación, debido a que contienen glicerol no se congela a  $-20^{\circ}\text{C}$  y está lista para usarse inmediatamente.
- Programar el termociclador. Para ello es necesario determinar el ramping (tiempo que tarda el equipo en cambiar de una temperatura a otra). En general es deseable que sea lo más rápido posible ( $3-4^{\circ}\text{C}/\text{seg.}$ ), pero esto dependerá de la capacidad de cada equipo y de las condiciones que se requieran para la amplificación.

### Reactivos

- Muestra de ADN que contenga la región(es) que se desea amplificar
- Buffer o solución amortiguadora
- Cloruro de Magnesio ( $\text{MgCl}_2$ )
- Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs)
- Iniciadores
- *Taq* polimerasa
- Agua destilada o desionizada estéril

### Método

1. Preparación de la muestra. En un tubo para PCR se agregan los siguientes reactivos: el ADN molde, los iniciadores, los nucleótidos o dNTPs, la solu-

ción amortiguadora, el cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), el agua y la ADN polimerasa (Tabla 3), pueden agregarse otros compuestos que ayudan a la estabilidad de la polimerasa (ver Anexo 1).

1.1 Mezclar los componentes de la reacción con un vórtex durante 2-3 segundos o dando unos golpecitos con el dedo o invirtiendo el tubo varias veces (Stirling 2004).

1.2 Centrifugar brevemente para reunir la mezcla en el fondo del tubo.

**Tabla 3. Reactivos, volúmenes y concentraciones finales usadas para una reacción estándar de PCR.**

Reactivo	Volumen (50 $\mu$ L)	Concentración final
ddH <sub>2</sub> O	41.25 $\mu$ L	n/a
BUFFER [10X]	5 $\mu$ L	1X
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	1.5 $\mu$ L	1.5 mM
dNTPs [10 mM]	0.5 $\mu$ L	100 $\mu$ M
Iniciadores [20 $\mu$ M]	0.25 $\mu$ L	0.1 $\mu$ M
ADN	1 $\mu$ L	10 ng
ADN Polimerasa [5 U/ $\mu$ L ]	0.5 $\mu$ L	1-2.5 unidades

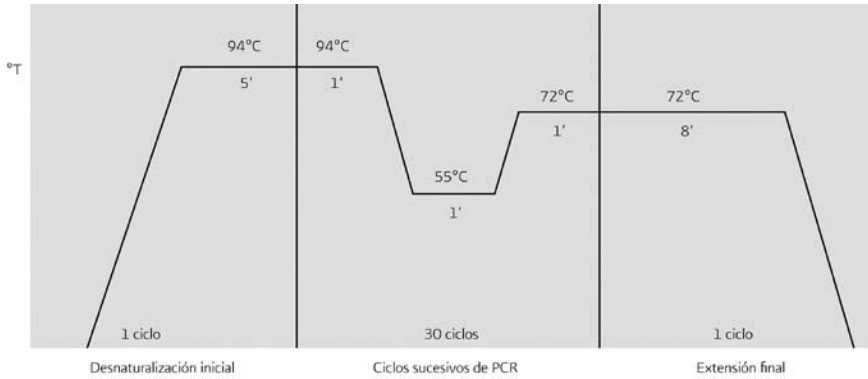
2. Amplificación. Colocar las muestras en el termociclador programado con las condiciones de amplificación establecidas previamente, por lo general se utilizan los siguientes pasos (Figura 3):

2.1 Desnaturalización inicial. Habitualmente la PCR utiliza un ciclo de desnaturalización (separación de la doble hélice porque los puentes de hidrógeno se rompen), la temperatura y el tiempo se determinan de acuerdo a las características del ADN y de la ADN polimerasa utilizada, por lo general es entre 94 y 96 °C durante 5-10 minutos.

2.2 Ciclos de la PCR. Se realizan ciclos sucesivos de desnaturalización, alineamiento y extensión, generalmente estas etapas se repiten entre 25 y 35 veces.

2.2.1 Desnaturalización. En esta etapa es muy importante que el ADN molde se desnaturalice completamente. Para lograrlo de manera adecuada se recomiendan temperaturas de 94 °C durante 30 segundos a 1 minuto. Si el ADN tiene un alto contenido de guaninas y citosinas, se recomienda aumentar el tiempo o la temperatura. La actividad de la en-

Figura 3. Etapas de la PCR. Temperaturas, tiempos y ciclos estándares.



zima decrece muy rápido a partir de los 95 °C, por lo que a estas temperaturas o superiores es aconsejable disminuir el tiempo de incubación.

2.2.2 Alineamiento. Al disminuir la temperatura de incubación los iniciadores se unen al ADN molde en las zonas 3' complementarias. Ambos iniciadores se unen de manera específica al ADN flanqueando el fragmento que se quiere amplificar. En este caso, la temperatura y el tiempo van a depender de 3 factores relacionados con los iniciadores: la concentración, el número de bases y el porcentaje de guaninas-citosinas. En la práctica, la temperatura de alineamiento oscila entre 45 y 65 °C durante un tiempo entre 30 segundos y 1 minuto. Un aumento de temperatura o del tiempo favorece la especificidad porque disminuye las uniones incorrectas de los iniciadores con la hebra molde (ver Anexo 1).

2.2.3 Extensión. Esta etapa, también conocida como elongación, amplificación o polimerización, consiste en la síntesis de la nueva cadena de ADN, a partir del extremo 3' del iniciador por acción de la ADN polimerasa, empleando como sustrato los cuatro dNTPs. En la mayoría de las reacciones, la etapa de extensión se realiza a 72 °C porque es la temperatura a la cual la *Taq* polimerasa (enzima más utilizada) alcanza su mayor actividad. El tiempo de extensión depende de la longitud del fragmento a amplificar, la *Taq* polimerasa añade de 500 a 1000 nucleótidos por minuto.

2.3 Extensión final. Generalmente, al terminar los ciclos, se realiza una última extensión de aproximadamente 5 minutos a 72 °C para permitir que

la polimerasa termine de sintetizar todos los fragmentos que pueden haber quedado incompletos.

3. Realizar electroforesis del producto obtenido (véase capítulo de electroforesis).

## RECOMENDACIONES

En cualquier PCR es muy importante utilizar siempre un control negativo, un tubo que contenga todos los reactivos menos el ADN molde, para poder monitorear posibles contaminaciones.

También es recomendable usar un control positivo, que consiste en una muestra que sabemos amplifica sin problemas bajo las condiciones establecidas. Este control es muy útil para asegurarnos que los reactivos ocupados se encuentran en condiciones apropiadas.

Es importante utilizar siempre materiales consumibles (tubos, puntas, etc.) nuevos y estériles. Para aplicaciones muy sensibles a la contaminación se recomienda emplear puntas con filtro.

Se recomienda usar pipetas exclusivas para PCR y tener áreas exclusivas para extracción de ADN, PCR y electroforesis.

Los reactivos de PCR son sensibles a la temperatura, por lo cual durante su uso se deben mantener en hielo e inmediatamente después de utilizarlos se les debe regresar al congelador.

Es recomendable hacer alícuotas de todos los reactivos, si se tiene alguna contaminación o hidrólisis se puede tomar una nueva alícuota.

Asegurarse de que las concentraciones de cada reactivo sean las que se establecieron para el experimento (ver Tabla 3). La fórmula que permite calcular las concentraciones requeridas a partir de los reactivos en stock es:

$$V_1 = \frac{C_2 * V_2}{C_1}$$

Donde:

$V_1$  es el volumen que se tiene que tomar del reactivo en stock para obtener la concentración deseada

$C_1$  es la concentración a la cual se encuentra el reactivo en stock



$V_2$  es el volumen final de la reacción de PCR

$C_2$  es la concentración que necesitamos en la reacción de PCR

El número de ciclos de la PCR (Figura 3) 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  $2^n$ , 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, no deseables, se forman en mayor proporción cuando el número de ciclos es mayor (Erlich 1989). Después de un número determinado de ciclos, la amplificación deja de producirse de manera exponencial y llega a una fase estacionaria (lo que se conoce como efecto de meseta), generalmente en esta fase, la cantidad de ADN sintetizado es suficiente para cualquier uso (Figura 4).

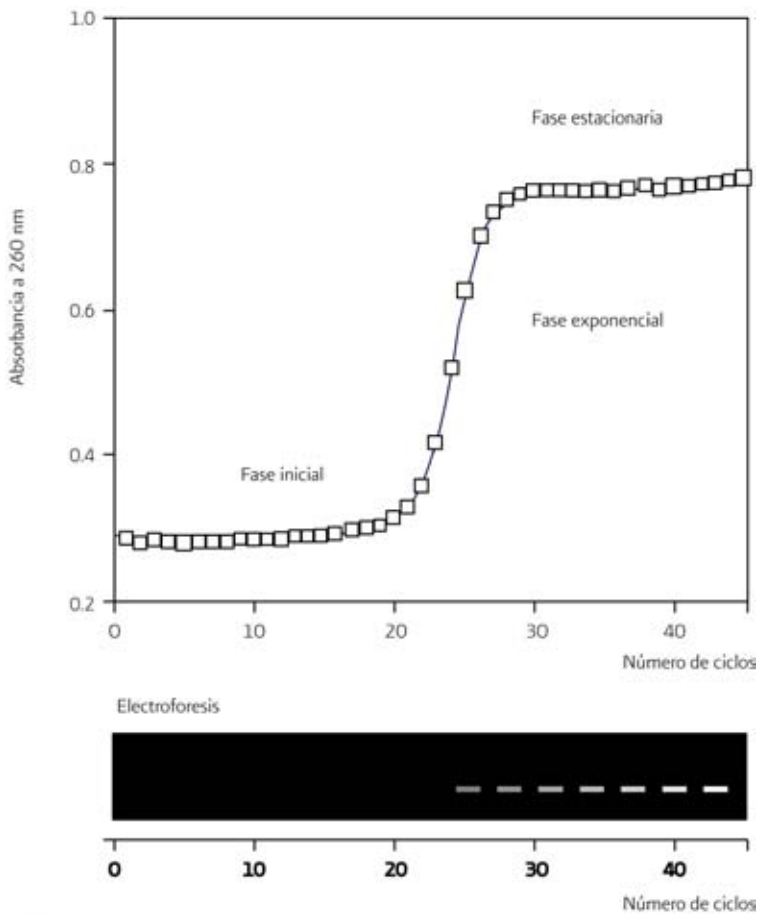
## MÉTODO DE ANÁLISIS

La manera más común de evaluar si se logró una amplificación exitosa es a través de la visualización del fragmento amplificado mediante electroforesis en geles de agarosa o acrilamida (véase capítulo de electroforesis) se recomienda cargar el 50% del volumen del control negativo con el objetivo de visualizar cualquier amplificación que nos pueda dar indicio de una probable contaminación de los reactivos de PCR. En caso de que no haya producto amplificado o que éste tenga un bajo rendimiento, se recomienda cambiar las condiciones de la PCR (temperatura y concentraciones de los reactivos), así como supervisar el correcto funcionamiento del termociclador (ver Anexos 1 y 2).

## APLICACIONES

La PCR es la técnica más importante en la biología molecular porque con ella se ha logrado la simplificación e innovación de muchas técnicas moleculares que permiten abordar nuevas líneas de investigación en diferentes ramas de la ciencia como biotecnología, ecología, evolución, biología de la conservación, arqueología, patología, medicina forense, entre otras (ver capítulos de DGGE, PCR en tiempo real, ISSR, AFLP y secuenciación de ADN).

Figura 4. Cinética de amplificación de la PCR. En los primeros ciclos de la PCR no hay un incremento significativo en la cantidad de ADN sintetizado. El punto donde inicia el incremento de ADN sintetizado (absorbancia) se conoce como fase inicial, posteriormente se presenta la fase logarítmica donde la eficiencia de la amplificación es cercana a  $2^n$ . Finalmente se encuentra la fase estacionaria, cuando la enzima presenta un decaimiento en su actividad y los reactivos se empiezan a agotar. En un gel de agarosa se aprecia como incrementa la concentración de la región que se está amplificando conforme pasan los ciclos. Modificado de Herveg *et al.* 2006.



Antes del desarrollo de la PCR las técnicas de biología molecular eran muy onerosas y sólo eran posibles cuando se obtenían numerosas copias del ADN por clonación. La PCR convirtió en una rutina la aplicación de estas técnicas, como es el caso de la secuenciación genética, permitiendo la lectura completa del genoma humano, así como de muchos organismos que se toman como modelos en la investigación de distintos problemas biológicos.

Hasta noviembre del 2013 existen clasificados en el sistema bibliográfico PubMed 320,953 publicaciones científicas internacionales que mencionan el uso de la técnica PCR.

## **VENTAJAS Y DESVENTAJAS**

La principal ventaja de la PCR es que permite generar millones de copias de la región de interés a partir de una o muy pocas copias del ADN molde (Shibata *et al.* 1988). Es una técnica muy robusta debido, en gran medida, a la gran capacidad de los oligonucleótidos (en este caso de los iniciadores) de unirse firme y específicamente a sus secuencias complementarias de ADN discriminando fácilmente entre centenares de millares de sitios (Mullis 1990).

La principal desventaja es la necesidad de estandarizar la técnica para el organismo o la técnica de interés, lo cual puede ser tardado y costoso.

## **PERSPECTIVAS**

Como hemos comentado, la PCR es la herramienta fundamental en biología molecular y son innumerables las aplicaciones que se derivan de ella. Las técnicas asociadas a la PCR han avanzado de forma vertiginosa en los últimos años (ver siguientes capítulos del manual) y cada vez se encuentran nuevas aplicaciones a la PCR.

El avance tecnológico actual ha proporcionado a la técnica un mayor poder de resolución al lograr la amplificación a partir de una molécula de ácido nucleico empleando técnicas de la nanotecnología (Lagally *et al.* 2001).

Los termocicladores han evolucionado enormemente en cuanto a la velocidad de amplificación, el número de muestras por placa, la capacidad de almacenamiento de datos en la memoria interna, de controlar distintas placas

o bloques de amplificación y de manejar distintas temperatura de las filas o hileras de tubos en una misma placa de amplificación. En los últimos años se ha logrado una reducción importante del tiempo de las pruebas y se espera que los equipos sean cada vez más rápidos y compactos.

Las compañías de reactivos para biología molecular han desarrollado productos que hacen que la técnica sea más rápida o sencilla y para pruebas específicas, como *kits* para trabajar muestras forenses degradadas.

Los costos de los equipos y los reactivos para la PCR han disminuido, en referencia a las décadas pasadas, haciendo que los procedimientos de análisis y diagnósticos de materiales biológicos aumentaran el empleo de esta técnica. Sin embargo, la PCR aún no está reconocida como una metodología estandarizada a nivel mundial. Lo anterior hace que los diagnósticos moleculares no tengan valor legal en la reglamentación oficial en algunos países. Por ejemplo la Organización Mundial de la Salud, no incorpora técnicas moleculares dentro de sus métodos estandarizados debido a que en muchos países de tercer mundo es imposible comprar equipos y reactivos para hacer los diagnósticos con técnicas moleculares, entre ellos la PCR (Kator y Rhodes 2003).

## BIBLIOGRAFÍA

- Aoyaki K. 2001. PCR. En: A. S. Gerstein (ed.). *Molecular biology problems solver: A laboratory guide*. Wiley-Liss, Inc. Electronic, pp. 292-328.
- Bohinski R. 1991. *Bioquímica*. Pearson Education, México.
- Cheng S., C. Fockler, W.M. Barnes y R. Higuchi. 1994. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 5695-5699.
- Cheng S., Y. Chen, A.J. Monforte, R. Higuchi y B. Van Houten. 1995. Template integrity is essential for PCR amplification of 20 to 30 kb sequences from genomic ADN. *PCR Methods and Applications* 4: 294-298.
- Espinosa L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Eguiarte L., V. Souza y X. Aguirre (comps.). *Ecología molecular*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad e Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F., México, pp. 517-526.
- Erllich H. A. 1989. *PCR Technology: Principles and applications for DNA amplification*. Stockton Press, Nueva York, EE.UU.

- Innis M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T.J. White. 1990. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, New York, Estados Unidos de América.
- Herveg J. P., M. Barcia-Macay y B. Lethe. 2006. *Cinética cuantitativa de la PCR*. Cochabamba, Bolivia.
- Kator H. y M. Rhodes. 2003. *Detection, enumeration and identification of environmental microorganisms of public health significance*. Ed Elsevier, Reino Unido.
- Kleppe K., E. Ohtsuka, R. Kleppe, I. Molineux y H.G. Khorana. 1971. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic ADN's as catalyzed by ADN polymerases. *Journal of Molecular Biology* 56: 341–361.
- Landre P. A., D. H. Gelfand y R. H. Watson. 1995. The use of cosolvents to enhance amplification by the polymerase chain reaction. *En: Innis M.A., D.H. Gelfand y J.J. Sninsky, (eds.). PCR Strategies*. Academic Press, EE.UU., pp. 3–16.
- Lagally E. T., I. Medintz y R. A. Mathies. 2001. Single-molecule DNA amplification and analysis in an integrated microfluidic device. *Analytical Chemistry* 73: 565–570.
- Martínez A. y E. Rincón. 2004. *PCR*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Mullis K. y F. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335–350.
- Mullis K. B. 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de Biologie Clinique* 48: 579–82.
- Robb F. T., D. L. Maeder, J. R. Brown, J. DiRuggiero, M. D. Stump, R. K. Yeh, R. B. Weiss y D. M. Dunn. 2001. Genomic sequence of hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*: implications for physiology and enzymology. *Methods in Enzymology* 330: 134–57.
- Saiki R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis y H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–91.
- Shibata D., W. J. Martin y N. Arnheim. 1988. Analysis of DNA Sequences in Forty-Year-Old Paraffin-embedded Thin-Tissue. *Cancer Research* 48: 4564–4566.
- Stirling D. 2004. Quality control in PCR. *En: Bartlett J.M.S. y D. Stirling (eds.). PCR Protocols*. Methods in Molecular Biology, Second Edition. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, EE.UU., pp. 22–24.
- Viljoen J. G., H. L. Nel y J. R. Crowther. 2005. *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Springer Publishers, EE.UU.

## ANEXO 1. REACTIVOS NECESARIOS PARA LA PCR.

*Muestra.* Puede ser ADN de doble o de una sola cadena de cualquier origen (animal, microbiano, plantas, etc.), también las moléculas de ARN pueden servir de molde para generar productos amplificados. En teoría, es suficiente con una sola copia intacta de ácido nucleico para la PCR, pero es recomendable utilizar como mínimo un nanogramo de ADN clonado, un microgramo de ADN genómico ó 10<sup>5</sup> moléculas de ácido nucleico para la técnica de PCR. Por lo general es importante visualizar el ADN en un gel de agarosa para evaluar su integridad. Sin embargo, existen muestras con muy baja concentración que no se pueden observar pero si se pueden amplificar debido a la eficiencia de la técnica.

La pureza del ácido nucleico (ADN o ARN) empleado en la PCR no necesita ser tan alta para algunas aplicaciones, una sola célula, un lisado proveniente de una célula e incluso una pequeña cantidad de muestra de ADN degradada puede ser adecuada para una buena amplificación. Los requerimientos fundamentales deben ser que se tenga un mínimo de copias intactas de una de las hebras ADN que abarque la región a amplificar y que las impurezas asociadas a la muestra estén adecuadamente diluidas a fin de no inhibir la actividad enzimática. Sin embargo, para algunas aplicaciones tales como PCR de fragmentos largos o para la secuenciación, es necesario considerar la calidad y la cantidad de la muestra de ADN (Cheng *et al.* 1994, 1995). En algunas ocasiones, para poder llevar a cabo la amplificación o para optimizarla, es recomendable probar diluciones del ADN 1/10, 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200 en una misma reacción. Esta acción conlleva a la dilución de algún contaminante inhibidor de la PCR o a la optimización de la cantidad de moléculas molde de ADN.

*Buffer o solución amortiguadora.* Provee la fuerza iónica y la capacidad amortiguadora necesaria durante la reacción. Es importante señalar que la concentración de sales afecta la *T<sub>m</sub>* de los iniciadores y por lo tanto la temperatura de alineamiento.

*El ion magnesio.* Es un co-factor esencial para la ADN polimerasa, su concentración debe ser optimizada para cada iniciador. Muchos componentes de la reacción se unen al ión magnesio, incluyendo iniciadores, ADN, productos de la PCR y nucleótidos. El principal aglutinante o secuestrador del ion magnesio es la alta concentración de nucleótidos, por lo que la concentración total del ion magnesio debe exceder la concentración total de dNTPs. Normalmente para iniciar la optimización del proceso de la PCR se comienza con 1.5 mM de magnesio en

la reacción en presencia de 0.8 mM de dNTPs, esto deja alrededor de 0.7 mM de magnesio libre para ser usado por la ADN polimerasa. De forma general se puede mencionar que las concentraciones de magnesio en la reacción pueden ir de 1.5 a 4 mM (Innis *et al.* 1990). El magnesio tiene influencia sobre la temperatura de alineamiento de los iniciadores, la temperatura de disociación de las hebras de las moléculas del ADN, la especificidad de los productos, la fidelidad de la enzima y la formación de dímeros a partir de los iniciadores.

*Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)*. La concentración del stock de dNTPs contiene 10mM de cada uno de los cuatro dNTP a pH 7. La concentración final en la reacción puede ir de 20 a 200  $\mu\text{M}$  de cada uno de los dNTPs, dependiendo del fragmento a amplificar y la concentración de magnesio, la cual resulta en un óptimo balance en rendimiento, especificidad y exactitud. Esta concentración representa un exceso suficiente que permite tener una concentración adecuada durante toda la reacción. Una alta concentración de dNTPs conlleva a un decrecimiento de la especificidad y fidelidad del PCR, por lo que es importante que la concentración de dNTPs usada esté equilibrada, con el objetivo de minimizar la incorporación de errores. En general 200  $\mu\text{M}$  de cada uno de los dNTPs puede usarse para la amplificación de un fragmento de 2kb durante 30 ciclos (Viljoen *et al.* 2005).

*Iniciadores*. La concentración óptima de los iniciadores debe ser de 0.1-0.5  $\mu\text{M}$  en una reacción estándar, una concentración superior a 0.5  $\mu\text{M}$  puede causar la acumulación de productos no específicos debido a uniones inespecíficas en el ADN molde y una concentración menor a 0.1  $\mu\text{M}$  puede generar que se terminen los iniciadores antes finalizar los ciclos de la PCR, lo que generaría un bajo rendimiento de amplificación. De manera general, 5 pmol de cada iniciador es adecuado para 25  $\mu\text{L}$  de reacción. Para la elección de los iniciadores, existen una serie de normas que se deben seguir, afortunadamente existen programas computacionales que nos facilitan esta tarea (ej. PRIMER3 <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

A continuación se mencionan algunas de las características deseables de los iniciadores:

- Generalmente deben tener un tamaño de 18-30 pb.
- El contenido en G + C debe ser aproximadamente del 50-60 %. La relación máxima de purinas/pirimidinas será 60%/40%.
- Deben evitarse zonas con más de tres repeticiones consecutivas de una sola base.

- No seleccionar iniciadores que en su extremo 3' tenga una importante estructura secundaria.
- Se recomienda que en el extremo 3' las últimas bases sean G o C.
- Se debe evitar la complementariedad entre la pareja de iniciadores. Si ésta se da entre los extremos 3', existe la posibilidad de que se formen dímeros de iniciadores.
- Si el iniciador es menor a 20 pb, la temperatura de fusión ( $T_m$ ), se calcula con base en la siguiente fórmula:

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

Siendo G, C, T y A el número de cada una de las bases que forman cada uno de los oligos.

- La temperatura de alineamiento de los dos iniciadores utilizados en una reacción debe ser similar.

**Polimerasa.** La concentración recomendada de enzima ADN polimerasa en PCR es de 1-2.5 unidades por 100  $\mu$ L de volumen de reacción (generalmente la enzima se comercializa a una concentración de 5U/ $\mu$ L). Esto representa en equivalencia molar, un valor bajo en comparación a los otros componentes de la reacción. Una baja concentración de enzima garantiza la fidelidad de la amplificación del ADN, una alta concentración de enzima resulta en la amplificación de productos inespecíficos. Otros factores que pueden modificar la fidelidad de la enzima ADN polimerasa son la presencia de actividad exonucleasa 3'-5', la tendencia natural de la enzima para insertar errores, la facilidad con que los errores pueden ser retirados, la concentración de sales, específicamente la concentración de magnesio.

**Aditivos.** En algunas ocasiones, para optimizar la PCR es recomendable la adición de sustancias adyuvantes que incrementan la especificidad y fidelidad (Landre *et al.* 1995), entre las más usadas están:

- DMSO (dimetilsulfóxido): en una concentración entre 2 y 10% disminuye la estructura secundaria del ADN.
- Glicerol: en una concentración entre 15 y 20% mejora la amplificación de fragmentos con alta proporción de G+C e incrementa la estabilidad térmica de la enzima.
- Detergentes no iónicos: Tritón X-100, Tween 20 o Nonident P-40. Estabilizan a la Taq polimerasa e inhiben la formación estructuras secundarias en el



ADN. Se utilizan en concentraciones entre 0.1 y 1%. Concentraciones mayores pueden generar amplificaciones no específicas.

- BSA (Albúmina de suero bovino): En una concentración final de 0.1 a 0.8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  es particularmente útil para amplificar ADN antiguo o muestras de ADN con inhibidores de PCR como la melanina.
- Betaina: A una concentración final de 1 a 1.7 M, mejora la amplificación de los fragmentos.
- Aditivos comerciales: hay adyuvantes comerciales disponibles que optimizan la reacción de PCR. Sin embargo, no revelan su composición química.

## **ANEXO 2. SUGERENCIAS PARA MEJORAR LA AMPLIFICACIÓN POR PCR (MODIFICADO DE AOYAKI 2001).**

Para mejorar:

### a) Fidelidad y especificidad

- Seleccionar una enzima con actividad 3'-5' exonucleasa.
- Utilizar iniciadores con más de 15 nucleótidos.
- Incrementar la temperatura de alineamiento.
- Reducir el tiempo de desnaturalización y alineamiento en el ciclo.
- Reducir la concentración de iniciadores.
- Reducir el número de ciclos.
- Reducir la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$ .
- Revisar que el termociclador funcione adecuadamente.

### b) Eficiencia de amplificación

- Incrementar la concentración de dNTPs y enzimas.
- Usar en concentración baja algún aditivo (ver Anexo 1).
- Reducir el tamaño del fragmento que se desea amplificar (amplicón).
- Probar con *Pfu* polimerasa.
- Confirmar que los iniciadores no forman dímeros.



# MICROSATÉLITES

Alejandra Vázquez Lobo Yurén<sup>1</sup> y Ariadna E. Morales García<sup>2</sup>

## INTRODUCCIÓN

Los microsatélites son secuencias de ADN constituidas por repeticiones de motivos nucleotídicos de 1 a 6 pares de bases (Hancock 1999). Este tipo de secuencias se han encontrado tanto en genomas eucariontes como procariontes e incluso se han identificado en genomas de mitocondrias y cloroplastos. Los microsatélites se distribuyen en regiones codificantes y no codificantes y se caracterizan por ser altamente polimórficos en cuanto a su longitud, por lo tanto son regiones adecuadas para usarse como marcadores moleculares en el nivel poblacional (Zane *et al.* 2002). Este alto grado de polimorfismo es consecuencia de una elevada tasa de mutación (desde  $10^{-6}$  hasta  $10^{-2}$  mutaciones por sitio por generación; Schlötterer 2000), que se atribuye a eventos de inserción y deleción durante la replicación del ADN. Debido al alto grado de polimorfismo en el tamaño, y a que estos marcadores son codominantes, pueden ser estudiados como electromorfos, lo cual reduce el tiempo y el costo de la técnica en los casos en los que es necesario estudiar numerosas muestras y múltiples loci.

<sup>1</sup> Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, UNAM. AP 70–275, México D.F. CP 04510, México. [eva@ecologia.unam.mx](mailto:eva@ecologia.unam.mx).

<sup>2</sup> Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, UNAM. AP 70–275, México D.F. CP 04510, México. [aemoga@ecologia.unam.mx](mailto:aemoga@ecologia.unam.mx).

Los microsatélites también son llamados secuencias simples repetidas (SSRs por sus siglas en inglés: *simple sequence repeats*). Pueden estar compuestos por repeticiones del mismo nucleótido (mononucleótidos), por dos (dinucleótidos), por tres (trinucleótidos) y así hasta seis nucleótidos (hexanucleótidos). Los microsatélites que están compuestos por un motivo único se consideran puros o perfectos (por ejemplo, AAAAAAAAAA o  $(A)_{11}$ ); aquellos conformados por dos o más motivos se denominan compuestos (por ejemplo, AAAAAATTTTTT o  $(A)_7(T)_7$ ) y se conocen como interrumpidos cuando un nucleótido o más se insertan en alguna parte de la repetición (por ejemplo, AAAAAAGAAAAA o  $(A)_6G(A)_6$ ) (Schlötterer 2000).

Cuando se encuentran fuera de regiones codificantes, los microsatélites suelen considerarse como regiones génicas sin función alguna. Sin embargo, se ha propuesto que en ciertos genes las regiones repetidas del extremo 5' no transcrito tienen una función reguladora y actúan como regiones de unión para factores de transcripción. También se ha propuesto que los microsatélites son regiones con alta frecuencia de recombinación (*hot spots*) (Oliveira *et al.* 2006).

El elevado polimorfismo de los microsatélites se atribuye a dos mecanismos de mutación: el deslizamiento en el apareamiento de las hebras de ADN (*slippage misspairing*) y el entrecruzamiento desigual (*unequal crossing over*). En el proceso de replicación del ADN pueden ocurrir alineamientos erróneos por un deslizamiento en el apareamiento de las dos hebras, ya que durante la síntesis las dos hebras que están separadas temporalmente pueden volver a asociarse en una posición diferente, lo cual genera un apareamiento erróneo durante la extensión de la nueva cadena de ADN (Figura 1). Cuando el deslizamiento en el apareamiento ocurre en la hebra nueva hay un incremento en el número de repeticiones del microsatélite (inserción, Figura 1A). Cuando el alineamiento erróneo ocurre en la hebra parental hay un decremento (delección, Figura 1B) (Li 1997).

Otro mecanismo es el entrecruzamiento desigual durante la recombinación, lo cual da como resultado la pérdida de repeticiones en una cromátida y el incremento en la otra. Sin embargo, la ocurrencia de mutaciones en ausencia de recombinación es una evidencia de que el entrecruzamiento desigual no es el mecanismo predominante en el origen de polimorfismos de los microsatélites. Por ejemplo, las mutaciones en los genomas de cloroplasto y mitocondria pueden ocurrir en ausencia de recombinación (Oliveira *et al.* 2006).

Se ha propuesto que la tasa de sustitución de los microsatélites está influenciada por el número de repeticiones, la composición del microsatélite, la longitud de la unidad repetida, la naturaleza de las regiones flanqueantes, la interrupción del microsatélite, la tasa de recombinación, la tasa de transcripción y por supuesto, la tasa de mutación (Schlötterer 2000). Por ejemplo, se ha mostrado que los microsatélites con mayor número de repeticiones o de tipo mononucleótido tienden a presentar una mayor tasa de mutación, ya que la probabilidad de reasociación errónea aumenta con la longitud y la simplicidad del microsatélite. Por el contrario, en microsatélites interrumpidos la variabilidad de los loci es menor, ya que los nucleótidos que no corresponden al microsatélite funcionan como señal de anclaje en el momento de la reasociación. La ubicación y la tasa de transcripción del microsatélite también pueden afectar la tasa de sustitución ya que ciertas regiones génicas pueden estar bajo selección natural (principalmente en regiones codificantes) o pueden ser reparadas con mayor frecuencia cuando están cercanas a genes que se expresan de manera común.

Para las inferencias ecológicas y evolutivas a partir de loci de microsatélites es necesario contar con un modelo de mutación, es decir, una ecuación que repre-

Figura 1. Modelo de mutación por alineamiento erróneo. En A, la hebra nueva se alinea erróneamente causando una inserción del motivo TA. En B, la hebra parental se alinea erróneamente causando una deleción del motivo TA.

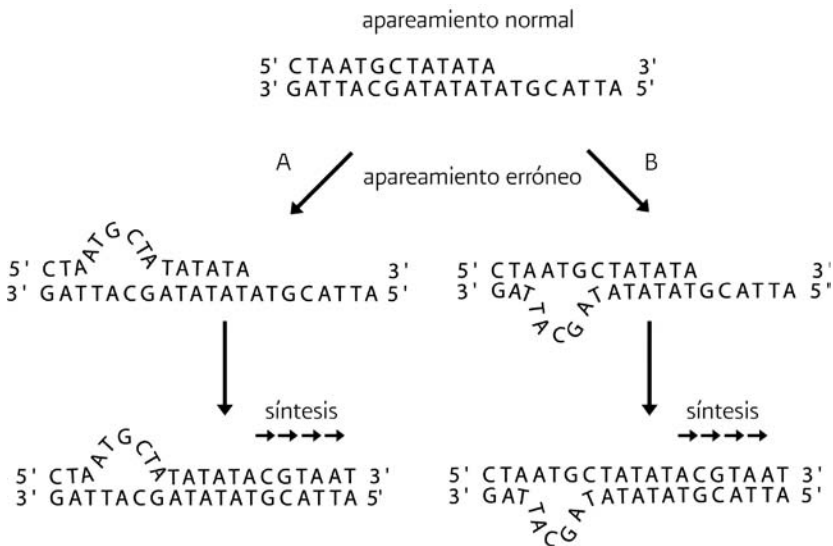


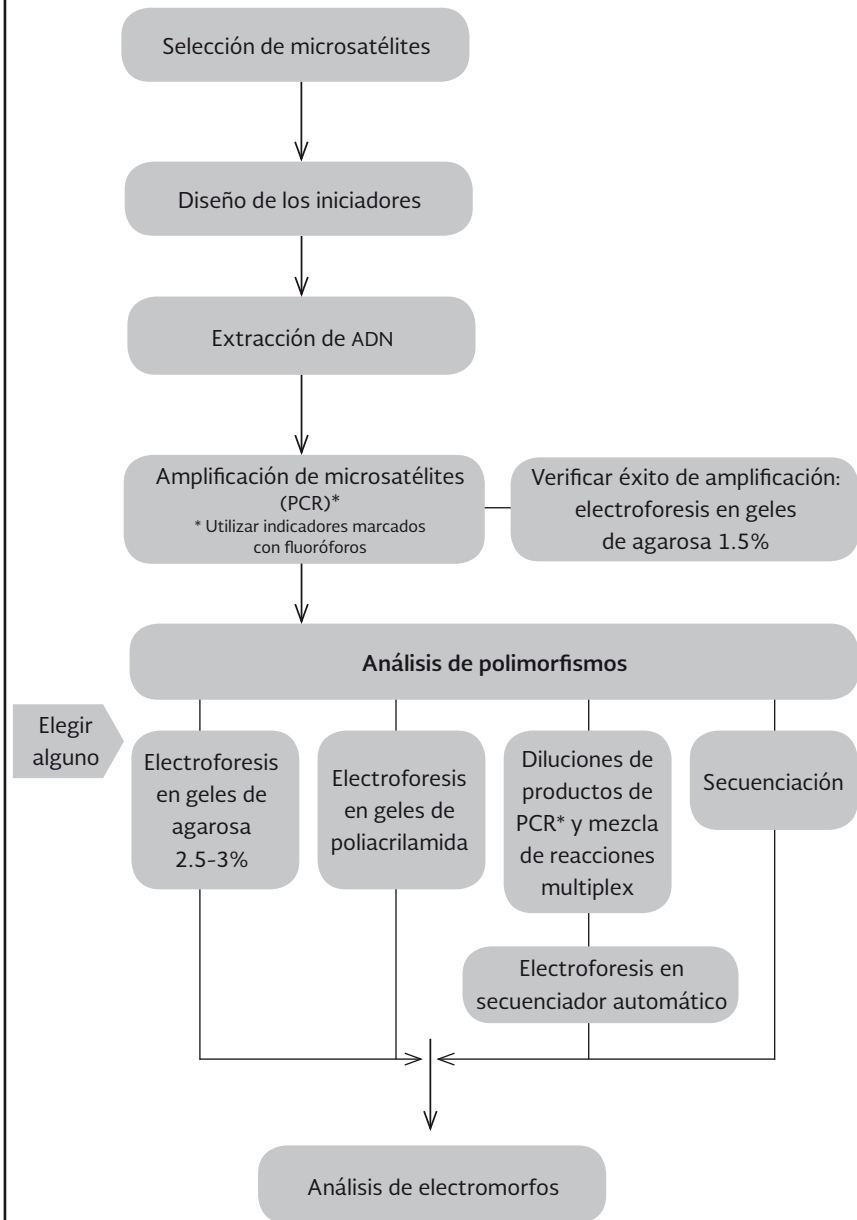
Figura 1.

senta la probabilidad de cambio de una secuencia. En la literatura existen diversos modelos de mutación que parten de diferentes supuestos de la manera en que ocurren las mutaciones en una región de nucleótidos repetidos. De acuerdo con simulaciones computacionales, se ha demostrado que los loci de microsatélites pueden ajustarse al modelo de mutación por pasos (SMM, por sus siglas en inglés: *step mutation model*) (Shriver *et al.* 1993, Valdés *et al.* 1993), en el cual el proceso de mutación depende del estado ancestral, porque el tamaño del nuevo alelo producto de una mutación, depende del alelo original (Slatkin 1995). Por ejemplo, un microsatélite mononucleótido de 8 pares de bases (pb) sólo puede dar origen a través de la mutación a un microsatélite de 7 pb o a uno de 9 pb. No obstante, se han encontrado mutaciones de más de un paso, independientes del estado ancestral, que se ajustan mejor al modelo de alelos infinitos (IAM, por sus siglas en inglés: *infinite alleles model*) (Valdés *et al.* 1993), en el cual todos los alelos diferentes son considerados como nuevas variantes y asume que los procesos de inserción/delección pueden involucrar más de dos nucleótidos. El modelo de mutación de dos fases (TPM, por sus siglas en inglés: *two phase model*) asume que pueden ocurrir mutaciones por pasos y también mutaciones de mayor magnitud (Di Rienzo *et al.* 1994).

Debido a la diversidad de tipos de microsatélites y los diferentes genomas en los que se pueden localizar, estos marcadores pueden brindar información a diferentes niveles. Los microsatélites mononucleótidos y dinucleótidos son más abundantes y tienen una tasa de mutación mayor que los demás, por lo que son apropiados para detectar diferencias entre individuos de una misma población. Mientras que los microsatélites con repeticiones de tres o más nucleótidos muestran menor variabilidad y permiten la determinación de paternidad y el análisis de variación entre poblaciones e incluso entre especies.

En cuanto a los genomas en los cuales se localizan los microsatélites se debe tomar en cuenta que los genomas haploides de cloroplasto y mitocondria, así como los de cromosomas sexuales (v.gr. el cromosoma Y en mamíferos y el W en aves) son heredados uniparentalmente y no recombinan con frecuencia, por lo que permiten realizar inferencias distintas a aquellas que se basan en loci biparentales. Por ejemplo, en algunas gimnospermas el cloroplasto es heredado por vía paterna, por lo tanto los patrones de migración entre poblaciones obtenidos a través de ADN de cloroplasto (ADNcp), reflejan procesos determinados por la migración del polen, mientras que aquellos obtenidos por ADN mitocondrial (ADNmt) por el movimiento de las semillas (Neale

## Etapas de la técnica



y Sederoff 1989, Petit *et al.* 2005). En el caso de los mamíferos donde las mitocondrias son heredadas por la vía materna y el cromosoma Y es heredado por la vía paterna, los patrones de variación y dispersión inferidos a través de ADNmt indican los procesos evolutivos del linaje materno, mientras que los del cromosoma Y del linaje paterno (Boissinot y Boursot 1997).

El análisis de microsatélites para el mapeo de cromosomas y el estudio de la variación genética de poblaciones comenzó desde aproximadamente 1970. Debido al desarrollo de nuevas técnicas de análisis, su uso se ha generalizado permitiendo utilizarlos en una amplia gama de aplicaciones durante la primera década de éste siglo.

## **PROTOCOLO**

Este protocolo se aplica para el análisis de microsatélites en secuenciador automático.

### **Equipo**

- Termociclador
- Micropipetas
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder
- Secuenciador automático de capilares

### **Material**

- Microtubos de 1.5 ml y 0.2 ml
- Placa de 96 microtubos
- Puntas con y sin filtro

### **Reactivos (sólo para las reacciones de PCR y verificación en geles de agarosa)**

- Taq ADN polimerasa
- Buffer de amplificación
- Cloruro de Magnesio ( $MgCl_2$ )



- Mezcla de dNTP's
- Agua destilada ultrapura (ddH<sub>2</sub>O)
- Iniciadores específicos. Uno de los iniciadores debe estar marcado con un fluoróforo.
- Agarosa (CAS N° 9012-36-6)
- Buffer TBE 10X
- Bromuro de Etidio (CAS N° 1239-45-8)

## Método

### Antes de empezar

Se deben elegir cuidadosamente los iniciadores que se utilizarán. Para ahorrar tiempo, dinero y esfuerzo debe planterase bien el trabajo en el laboratorio. Si se utiliza el método de electroforesis en secuenciador automático, la selección de los fluoróforos en los indicadores es el paso más importante.

Las condiciones de amplificación para cada locus de microsatélite son específicas y dependen de la temperatura de alineación del iniciador, la longitud del fragmento a amplificar, la naturaleza de la repetición y la marca de los reactivos de PCR. Cuando el microsatélite es transferido de una especie a otra, es recomendable usar las mismas condiciones de amplificación reportadas previamente. En otro caso, cuando los microsatélites son amplificados por primera vez, deben usarse condiciones estándar de amplificación y optimizarse posteriormente.

### 1. Selección de microsatélites y diseños de los iniciadores

1.1 Antes de empezar un estudio y seleccionar un marcador molecular debemos tener claros los objetivos de la investigación y qué queremos responder. Como se menciona en la introducción, la información que se puede obtener de un microsatélite depende de su composición y del genoma del cual proviene.

1.2 Para amplificar microsatélites mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se deben conocer las regiones flanqueantes para el diseño de los iniciadores. Sin embargo, cuando se trabaja con poblaciones naturales es posible que se desconozca esta información. Algunos iniciadores de microsatélites se alinean en regiones flanqueantes altamente conservadas entre

especies del mismo género, e incluso entre géneros de la misma familia. Por lo que en muchos casos los microsatélites pueden ser “transferidos” de una especie donde ya han sido caracterizados a una especie o un género cercano.

1.3 En la Internet existen bases de datos de microsatélites para algunas especies, de manera que se facilita la selección y la transferencia de loci para el estudio de organismos silvestres. Sin embargo, los microsatélites que son variables en un grupo pueden resultar monomórficos en otro y en muchos casos la utilización de iniciadores caracterizados para géneros diferentes al que se está analizando, conduce a amplificaciones inespecíficas o a bajas concentraciones del producto de la PCR.

1.4 En caso de no contar con información de especies o géneros cercanamente relacionados, los microsatélites pueden caracterizarse por medio del análisis de secuencias de genomas completos (Vendramin *et al.* 1996) o bien, por la exploración de bibliotecas genómicas y bibliotecas enriquecidas, lo cual implica un desarrollo experimental relativamente complejo (Zane *et al.* 2002). En contraste con las primeras, que contienen casi todo el genoma de un organismo, las segundas disponen únicamente de fragmentos que tienen segmentos con microsatélites.

1.5 Existen diferentes metodologías para el enriquecimiento de las bibliotecas, pero la más utilizada es la amplificación de segmentos por PCR a partir de iniciadores que contienen repeticiones de microsatélites. Las nuevas tecnologías de pirosecuenciación han permitido la secuenciación de genomas completos en tiempos muy cortos (ver capítulo de secuenciación). Aunque se desconozca la ubicación de estas secuencias en el genoma, esta aproximación permite encontrar los loci que contienen microsatélites así como sus regiones flanqueantes. La construcción de bibliotecas enriquecidas y la pirosecuenciación de genomas son técnicas complejas y relativamente costosas, por lo que en caso de ser necesario, es recomendable solicitar el análisis a alguna compañía o universidad que cuente con este servicio.

1.6 Una vez que se conocen las regiones flanqueantes, para el diseño de iniciadores se elige una región de aproximadamente 20 pb, que contenga aproximadamente el 50% de GCs y de preferencia sin repeticiones de nucleótidos.

## 2. Aislamiento de ADN

2.1 Existen muchos protocolos para aislar ADN y algunos de ellos han sido detallados en este libro. También pueden utilizarse kits de ciertas

compañías que simplifican el trabajo de laboratorio y optimizan el producto obtenido (ver capítulo de extracción de ADN).

2.2 En este paso es importante considerar el estado de conservación de las muestras, así como el tiempo y las condiciones en que han sido almacenadas; para darle un tratamiento adecuado a los tejidos según lo requieran. Por ejemplo, si las muestras tienen mucho tiempo desde que fueron colectadas y han sido expuestas a sustancias fijadoras (como formol), como es el caso de aquellas que se encuentran en museos o en colecciones científicas, es probable que el ADN extraído esté degradado (fragmentado) y esto influirá directamente en la obtención de productos de PCR porque será difícil amplificar fragmentos grandes (de más de 500 pb).

2.3 En algunos casos, cuando las muestras tienen poco tiempo de colecta, el ADN extraído está muy concentrado, por lo que será necesario cuantificar y hacer diluciones para estandarizar la concentración que será utilizada en las reacciones de PCR.

### 3. Amplificación de microsatélites (PCR)

3.1 Los microsatélites son amplificados a través de la PCR, utilizando iniciadores que se alinean en las regiones flanqueantes de la secuencia repetida. Si el análisis de polimorfismo será a través de la electroforesis en secuenciador automático deberán utilizarse iniciadores marcados con fluorescencia (mediante la adición de un fluoróforo al extremo 5' del iniciador).

3.2 Las condiciones para la amplificación por PCR son variables (tanto las concentraciones de los reactivos como el programa de amplificación), dependen de la calidad del ADN, el locus a amplificar y las condiciones del laboratorio. Sin embargo, para la optimización de la técnica se puede partir de un programa general de amplificación (Tabla 1).

**Tabla 1. Programa de PCR: D=desnaturalización, A=alineación y E=extensión.**

Número de ciclos	1		35		1	
	D	D	A	E	E	E
Temperatura (°C)	95.0	95.0	Dependerá del locus que se desee amplificar		72.0	72.0
Tiempo (min: seg)	15:00	0:30	0:30		0:45	7:00

3.3 En caso de obtener productos inespecíficos pueden modificarse la concentración de  $MgCl_2$  (disminuir) y la temperatura de alineación (aumentar). Se recomienda comprobar siempre el éxito de amplificación de cada reacción de la PCR, mediante una electroforesis horizontal en un gel de agarosa 1.2% en buffer TBE 0.5X, teñido con bromuro de etidio (0.5  $\mu g/ml$ ) (véase capítulo de electroforesis). Es importante comprobar la concentración de los productos, que sean específicos y que se encuentren dentro del rango de tamaño esperado.

4. Análisis de polimorfismos. Para determinar si los microsatélites son polimórficos se pueden emplear dos tipos de análisis: la estimación del tamaño de electromorfos y la secuenciación. Para la estimación del tamaño de electromorfos se pueden emplear la electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida, o bien electroforesis en secuenciador automático. Se debe elegir un método (de los cuatro mencionados en este capítulo) con el cual serán procesadas todas las muestras del estudio, ya que puede haber variaciones en los resultados obtenidos con cada método. El método recomendado en este manual es la electroforesis en secuenciador automático, por ser la técnica más rápida y con mayor resolución que existe en la actualidad. Sin embargo, en algunos casos es posible utilizar métodos menos costosos durante la implementación de la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar la electroforesis en geles de agarosa para estimar la concentración de los productos de PCR y para verificar que éstos se encuentren dentro del rango de tamaño (pb) esperado. Si aún no se tienen los iniciadores marcados con los fluoróforos (necesarios para la amplificación antes de hacer la electroforesis en secuenciador automático) y se quiere estimar si el locus es o no polimórfico, se puede utilizar la electroforesis en geles de poliacrilamida. La secuenciación puede ser utilizada para corroborar que los electromorfos, de los cuales se está estimando el tamaño, correspondan a la misma secuencia de microsatélites.

En genomas diploides, al determinar el tamaño de los electromorfos también se infiere la condición homóciga o heteróciga de los alelos, ya que se pueden observar dos bandas si hay dos alelos diferentes (heterócigos) o sólo una banda si los dos alelos son iguales (homócigos). En genomas haploides sólo se observa una banda o electromorfo que corresponde a un alelo. Generalmente, las regiones que flanquean a los microsatélites tienen una menor tasa de mutación, sin embargo, cuando se presentan mutacio-

nes los iniciadores pueden no alinearse, lo que resulta en una ausencia de productos en la amplificación que se interpretan como un falso homólogo. El alelo no amplificado es un alelo nulo. Hasta la fecha hay pocos reportes del sesgo de los alelos nulos en las estimaciones de estructura genética de poblaciones (Carlsson 2008).

4.1 Electroforesis en geles de agarosa. El análisis de electromorfos o fragmentos en geles de agarosa o MetaPhor es relativamente sencillo. Sin embargo, tiene una baja resolución por lo que se recomienda únicamente para corroborar el éxito de la amplificación o para reconocer las diferencias de tamaño en microsatélites de hexanucleótidos.

Los geles de agarosa deben tener una concentración de 2.5 a 3.5%, dependiendo del tamaño de los fragmentos. En cada gel debe destinarse un pozo para un marcador de peso molecular con la resolución necesaria para el tamaño de los electromorfos que se estimarán, generalmente se utiliza un marcador de peso molecular de 100 pb. Los geles pueden ser teñidos con bromuro de etidio (BrEt) o SYBR green (véase capítulo de electroforesis).

4.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida. La electroforesis en geles de poliacrilamida permite la separación de fragmentos con diferencias de tamaño de hasta un par de bases. Una vez montada es una técnica relativamente barata y con alta resolución para este tipo de marcadores. Sin embargo, es muy laboriosa y la obtención de resultados repetibles puede tomar varios días. Los fragmentos pueden ser evidenciados mediante tinción con nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) o bien mediante autoradiografías, lo cual requiere incluir radiactividad durante la reacción de la PCR. El manejo de radiactividad incrementa la dificultad y el costo de la técnica, por lo que no es recomendable. Por otro lado, la acrilamida es un reactivo tóxico y explosivo que debe ser manejado con precaución, ya que tiene efectos adversos en el sistema nervioso central. Una vez que se polimeriza es aparentemente inocua, aunque se recomienda evitar el contacto directo con la piel o mucosas.

4.3 Electroforesis en secuenciadores automáticos. Cada vez es más frecuente el uso de secuenciadores automáticos en el análisis de fragmentos, porque reducen considerablemente el tiempo de obtención de datos, tienen una alta resolución y sus resultados son altamente repetibles.

Los secuenciadores automáticos son una alternativa al sistema basado en geles de poliacrilamida, la diferencia radica que en lugar de poliacrilamida se

utiliza un polímero que se inyecta de forma automática en un capilar antes de cargar la muestra de secuenciación y las muestras se van analizando una a una. En los secuenciadores automáticos se especifica el voltaje necesario para desarrollar la electroforesis de manera que los electromorfos migren y se separen en función de su tamaño. Estos equipos detectan una señal fluorescente que corresponde a cada alelo. Para que esto ocurra es necesario utilizar en la PCR iniciadores marcados con fluorescencia en alguno de sus extremos, generalmente el 5'. Sólo es necesario marcar uno de los iniciadores para cada locus, el Forward (F) o el Reverse (R).

Los fluoróforos emiten distintas señales (colores) que se detectan a diferente longitud de onda. Por tanto, es posible marcar los iniciadores con distintos fluoróforos y de este modo amplificar y leer varios loci en una sola reacción (multiplex) lo cual reduce el tiempo y el costo en las ampliificaciones y en las electroforesis en el secuenciador automático. Los fluoróforos más comunes emiten señales rojas (PET, dROX), azules (6-FAM, dR110), amarillas (NED, dTAMRA) y verdes (HEX, VIC, dR6G).

Para seleccionar el fluoróforo con el que serán marcados los iniciadores es necesario considerar el rango de tamaño en el que se encuentran los alelos de cada uno de los locus que se amplificarán. Para ejemplificar podemos imaginar un caso de siete loci de microsatélites (A, B, C, D, E, F y G, Figura 2) con diferentes rangos de tamaños reportados: en el locus A de 100 a 250 pb, en el locus B de 300 a 450 pb, en el locus C de 150 a 300 pb, en el locus D de 350 a 500 pb, en el locus E de 100 a 200 pb, en el locus F de 250 a 350 pb y en el locus G de 400 a 700 pb. Los iniciadores de los loci A y B podrían ser marcados con el mismo fluoróforo porque el rango de los alelos no se sobrepone. Mientras que los iniciadores de los loci A y C no deberían ser marcados con el mismo fluoróforo, si se quisieran analizar en la misma reacción de electroforesis porque el rango de los alelos cae dentro del mismo intervalo de tamaño, debido a que los electromorfos emitirían señales de la misma longitud de onda y no se podría diferenciar entre los alelos del locus A y el C. Por otro lado, los loci C y D, y los E, F y G podrían ser marcados con el mismo fluoróforo respectivamente porque el C y el D no se sobrepone en el rango de tamaño de los alelos, ni el E, el F y el G. En este ejemplo, uno de los iniciadores de los loci A y B serían marcados con NED, los iniciadores de los loci C y D serían marcados con 6-FAM, y los iniciadores de los loci E, F y G serían marcados con HEX (Figura 2A). Es recomendable hacer lecturas

multiplex de máximo cuatro loci porque un exceso de señal fluorescente puede complicar las lecturas del secuenciador automático.

Para que una reacción de PCR multiplex sea eficiente, es necesario que los iniciadores tengan temperaturas de alineación y requerimientos de  $MgCl_2$  similares. Basta con agregar los iniciadores correspondientes a cada locus en el mismo volumen total de la reacción (generalmente de 25 $\mu$ L) y no olvidar que no deben amplificarse en la misma reacción de PCR loci que se sobrepongan en el rango de alelos y que hayan sido aquellos marcados con el mismo fluoróforo. Dado que en algunos casos las reacciones multiplex no son eficientes, las reacciones de PCR pueden realizarse por separado y los productos amplificados de un mismo individuo pueden ser combinados en un mismo pozo para su lectura en el capilar de secuenciación.

No existe una concentración óptima de los productos de la PCR para la lectura en secuenciador, dado que las diferentes combinaciones de productos afectan la intensidad de la lectura. Por lo tanto, es recomendable hacer una primera lectura de prueba con diferentes diluciones con base en la intensidad de los productos de la PCR observada en geles de agarosa (al 1.2%). Los productos de la PCR muy concentrados deben ser diluidos con ddH<sub>2</sub>O. Por ejemplo, los electromorfos que se observen muy tenues en los geles de agarosa deben ser diluidos 1:2 (5 $\mu$ L del producto de PCR y 5 $\mu$ L de ddH<sub>2</sub>O); mientras que los electromorfos cuyas bandas brillen más intensamente pueden ser diluidos 1:15 (1 $\mu$ L del producto de PCR y 14 $\mu$ L de ddH<sub>2</sub>O). Si las reacciones de la PCR en cada locus se hicieron por separado, en este paso es donde se deben mezclar los productos, considerando la concentración de cada reacción, el rango esperado de tamaño de los alelos y el fluoróforo usado para cada locus. Si no se utilizan diluciones adecuadas puede haber errores en el marco de lectura del secuenciador. Si los productos están muy concentrados puede saturarse la señal que es captada por el secuenciador y no podrá procesar la reacción. Si los productos están muy diluidos podría no detectarse ninguna señal en el secuenciador.

El tamaño de los fragmentos es determinado con un marcador de peso molecular (*size standard*, véase capítulo de electroforesis). Los marcadores de pares de bases son calibradores en cada muestra porque siempre emiten el mismo patrón de electromorfos y a cada uno se le asigna un valor constante (Figura 2A, picos en color rojo), los más utilizados se denominan LIZ y ROX. El marcador LIZ emite una señal anaranjada y se encuentra co-

mercialmente en tres rangos de lectura de que van de los 50 pb a los 600 pb (LIZ120, LIZ500 y LIZ600). Mientras que el ROX emite una señal roja y también se encuentra en tres rangos de lectura que van de los 50 pb a los 1000 pb (ROX400, ROX500 y ROX1000). Esto debe ser considerado al momento de elegir los fluoróforos con los que serán marcados los iniciadores, para que no se sobrepongan con el marcador. Todas las muestras deben ser leídas con el mismo marcador de pares de bases para evitar diferencias en la lectura de los tamaños de los fragmentos.

Para la corrida en secuenciador automático debe prepararse una reacción de secuenciación con formamida (Hi-Di, *Highly Deionized*), el marcador de pares de bases y la reacción multiplex previamente diluida. Las condiciones estándar de dicha reacción son: 89 % de formamida (8.9  $\mu$ L), 1% (o menos) del marcador de pares de bases (0.1  $\mu$ L) y 10% de la reacción multiplex (1  $\mu$ L). Las reacciones de secuenciación se cargan en el secuenciador automático, siguiendo las especificaciones de cada equipo y se inicia el proceso de electroforesis.

Los electromorfos migran durante la electroforesis hasta alcanzar la zona de lectura, donde el haz del láser que se desplaza horizontalmente de forma continua a lo largo del cristal, excita a los fluoróforos, los cuales emiten fluorescencia en una longitud de onda determinada. La luz emitida se proyecta hacia un espectrógrafo, dotado de una cámara CCD, donde se separan cromáticamente los electromorfos. El software del sistema contiene información sobre los fluoróforos que se están utilizando y sus longitudes de onda. Por lo tanto, proporciona los filtros adecuados para recoger las intensidades de luz que llegan a la cámara CCD. La pantalla de la computadora visualiza la información que se recibe desde el secuenciador. Esta información puede ser almacenada en archivos independientes que serán analizados a futuro.

1.4 Secuenciación de microsátélites. Los fragmentos que incluyen al microsátélite y a las secuencias flanqueantes pueden ser secuenciados directamente para su análisis. En general, los fragmentos son pequeños y por las características de las repeticiones, la secuenciación puede resultar poco eficiente. Sin embargo, este método permite analizar la composición de las secuencias e identificar la homoplasia molecularmente accesible (ver sección de ventajas y desventajas). Por tanto, cuando se analizan electromorfos en geles de agarosa, en geles de poliacrilamida o en electroforesis en secuenciador automático es recomendable secuenciar ciertos alelos para



corroborar los tamaños y para verificar que las bandas analizadas corresponden al mismo microsatélite.

Es probable que durante la PCR ocurran errores en la alineación de las hebras del ADN y se produzcan fragmentos de distinta longitud. Por lo general, los errores de alineación no afectan el resultado final de los electromorfos o en la secuenciación directa. Esto se debe a que el fragmento sin errores tendrá el mayor número de copias, por lo tanto, será el más evidente. Sin embargo, no se recomienda clonar dichos fragmentos para la secuenciación, ya que es probable seleccionar colonias que contengan el fragmento erróneo (Lielpet et al. 2001).

## MÉTODOS DE ANÁLISIS

La lectura de fluorescencia puede llevarse a cabo con programas como GeneMapper o PeakScanner. Cada señal fluorescente se representa como un pico de lectura y corresponde a un alelo, cuyo tamaño es determinado por el programa con base en el marcador de pares de bases. Los programas para obtener datos de microsatélites sólo varían en las funciones que se pueden ejecutar, pero por lo general el valor de lectura de los electromorfos es el mismo.

El primer paso para el análisis de resultados es corroborar el patrón de electromorfos del marcador de pares de bases y que los valores correspondan a los indicados por el proveedor. De este modo se evitarán errores de lectura en los valores de los alelos. Por ejemplo: en la figura 2A y 2B se muestran reacciones multiplex para 7 loci. Cada pico corresponde a un alelo y se sabe a cuál locus corresponde por el color y el rango de tamaño en el que se encuentra. Los valores obtenidos de los alelos estarán en decimales, por lo que deben ser redondeados utilizando siempre el mismo criterio. En ocasiones cada locus presenta un patrón de picos en particular, que puede detectarse después de analizar a muchos individuos.

Las estimaciones de tamaño se registran en una base de datos donde se indica el individuo y los alelos encontrados para cada locus. De este modo es posible obtener los estimadores básicos de la variación poblacional, como la diversidad y la estructura genética. Para la mayoría de los análisis los alelos se registran por el tamaño que los caracteriza, pero en algunos análisis los datos deben traducirse a matrices de presencia/ausencia de los alelos o a matrices de distancia entre los alelos de un locus.

Adelante se muestra una lista de los análisis más frecuentes que se realizan con datos de microsatélites y los programas que se pueden utilizar. Posteriormente en la Tabla 2, se indica la versión más reciente del programa, el sistema operativo para el que fue diseñado, si existe una versión gráfica disponible y las referencias. Antes de empezar a utilizar un programa de análisis es necesario conocer los supuestos (principalmente el modelo de mutación en el que se basan) y estar informados sobre los algoritmos que utiliza.

**Figura 2.** Análisis de electromorfos en secuenciador automático. Este ejemplo corresponde a una reacción multiplex de una especie diploide. Muestra con 7 loci (picos en color negro, azul y verde) cuyos rangos son: A=100-250 pb, B=300-450 pb, C=150-300 pb, D=350-500 pb, E=100-200 pb, F=250-350 pb, G=400-700 pb y el marcador ROX1000 (picos en color rojo). En la parte inferior de cada electromorfo se indica su tamaño. En A, se indican los resultados de los 7 loci para el individuo 1 (I-1) y el rango en el que se encuentra cada locus. En B, se indican los resultados del individuo 2 (I-2).

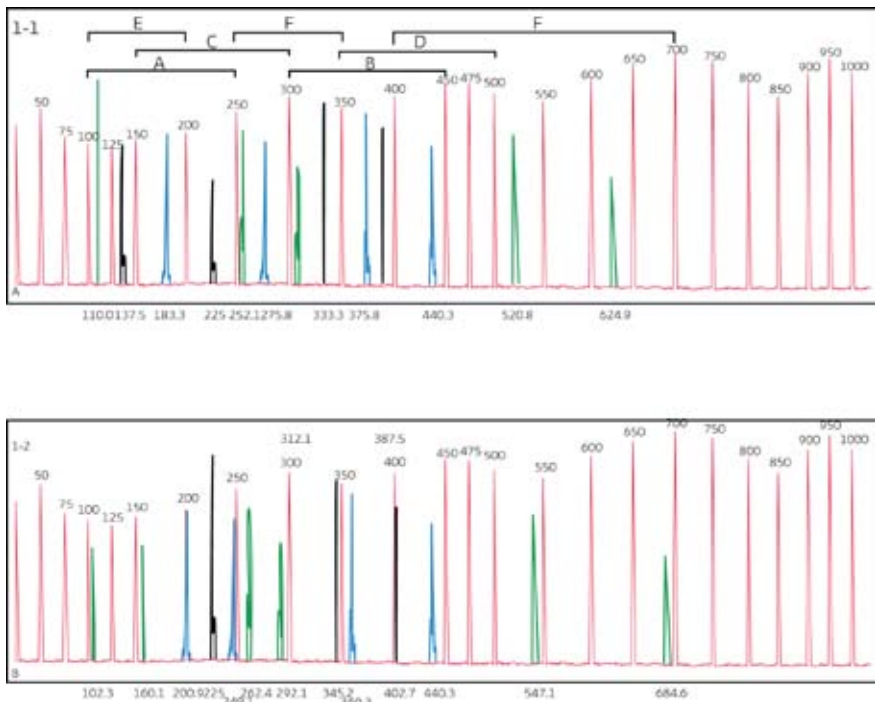


Tabla 2. Programas más comunes para el análisis de datos de microsátélites. C=Conversión de datos, EB=estimadores básicos, DG=diversidad genética, EG-ga=estructura genética con grupos delimitados a priori, EG-gi=estructura genética basada en el genotipo multilocus de cada individuo, O=otros análisis especializados, G=indica si existe plataforma gráfica para la aplicación.

Programa versión más reciente	Tipo de análisis	Plataforma	Referencia
Arlequin 3.11	EB, DG, EG-ga	Win, G	Excoffier <i>et al.</i> 2005
BAPS 5.4	EG-gi	Win, Mac, Linux, G	Corander <i>et al.</i> 2004
BATWING	O	R: Win, Mac, Linux	Wilson <i>et al.</i> 2003
BayesAss+ 1.3	EG-gi	Win, Mac, Linux, G	Wilson y Rannala 2003
Bottleneck 1.2.02	O	Win, G	Cornuet y Luikart 1996
COLONISE 1.0	O	Win, G	Gaggiotti <i>et al.</i> 2004
Convert 1.31	C	Win, G	Glaubitz 2004
FDIST2 2.0	O	Win, G	Beaumont y Nichols 1996
FSTAT 2.9.3	EB, DG, EG-ga	Win, G	Rozas <i>et al.</i> 2003
GDA 1.1	DG, EG-ga	Win, G	Schaffner <i>et al.</i> 2005
GenAlEx 6.1	C, EB	Win, Mac, G	Peakall y Smouse 2006
GeneClass 2g.	EG-gi	Win, G	Piry <i>et al.</i> 2004
Geneland 1.05	EG-gi	R: Win, Mac, Linux	Guillot <i>et al.</i> 2005
Genepop 4.0.10	EB, DG, EG-ga	Win, Mac. Linux	Raymond y Rousset 1995
GENETIX 4.05	DG, EG-ga	Win, G	<a href="http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm">http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm</a>
IM	O	Win, Mac	Hey y Nielsen 2004
LAMARC 2.1.3	O	Win, Mac, Linux	<a href="http://evolution.gs.washington.edu/lamarc/lamarc_prog.html">http://evolution.gs.washington.edu/lamarc/lamarc_prog.html</a>
Micro-Checker 2.2.3	EB	Win, G	Van Oosterhout <i>et al.</i> 2004

Tabla 2. Continúa.

Programa versión más reciente	Tipo de análisis	Plataforma	Referencia
Migrate 3.1.7	O	Win, Mac, Linux	Beerli y Palczewski 2010
MSVAR 1.3	O	Win	Beaumont 1999
NewHybrids 1.1	EG-gi	Win, Mac	Anderson y Thompson 2002
Popgene 1.32	EB, DG	Win, Mac, G	<a href="http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_info.html">http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_info.html</a>
SMOGD 1.2.5	EG-ga	En línea, G	Crawford 2010
SPAGeDi 1.3	DG, EG-ga	Win, Mac, Linux, G	Hardy y Vekemans 2002
Structure 2.3.3	EG-gi	Win, Mac, Linux, G	Pritchard <i>et al.</i> 2000

### Conversión de datos a diferentes formatos (C): Convert, GenAlEx.

Estimadores básicos (EB): Arlequin, FSTAT, Genepop, Micro-Checker, PopGene

- Frecuencias alélicas
- Frecuencia de alelos nulos
- Equilibrio de Hardy-Weinberg
- Desequilibrio de ligamiento

Diversidad genética (DG): Arlequín, FSTAT, GDA, Genepop, GENETIX, PopGene, SPAGeDi.

- Heterocigosis observada y esperada
- Número observado y efectivo de alelos
- Número de alelos privados
- Diversidad genética de Nei

## Estructura genética

a) Grupos determinados a prior : Arlequin, FSTAT, GDA, Genepop, GENETIX, SMOGD, SPAGeDi

- Índices de fijación (FST, FIT, FIS) asumiendo diferentes modelos de mutación (IAM o SMM)
- Distancia genética entre pares de poblaciones
- Prueba de mantel
- AMOVA

b) Análisis basados en el genotipo multilocus de cada individuo: BAPS, BayesAss+, GeneClass, Geneland, NewHybrids, Structure

- Algoritmos bayesianos para identificar grupos genéticamente diferentes (*clusters*)
- Análisis de asignación de genotipos
- Relación entre genotipos y coordenadas geográficas  
Otros análisis especializados (O): BATWING, COLONISE, FDIST2, IM, LAMARC, Migrate, MSVAR
- Parámetros demográficos actuales y del pasado
- Tasa de migración
- Tiempos de divergencia
- Cuellos de botella

## APLICACIONES

A partir de los datos generados con esta técnica es posible estimar parámetros poblacionales básicos para estudios ecológico-evolutivos, como la heterocigosis, el tamaño efectivo, la distancia genética y el nivel de diferenciación de las poblaciones (Hedrick 1999, Selkoe y Toonen 2006). Además, mediante los microsatélites se pueden estimar tiempos de coalescencia y parámetros evolutivos de las poblaciones como el tiempo a la expansión poblacional y theta ( $\theta$ ) que es un estimador histórico de la variación genética (Wilson y Balding 1998). Es por esto que el análisis de microsatélites se ha generalizado para

estudios de genética de poblaciones (Hodgins y Barret 2007, Burgarella et al. 2009), filogeografía (Bucci et al. 2007, Llewellyn et al. 2009) y genética de la conservación (Chassin-Noria et al. 2004, Dionne et al. 2009).

Debido a que los microsatélites se encuentran distribuidos en todo el genoma, su análisis ha facilitado la elaboración de mapas genéticos, principalmente en organismos modelo (Wilkie et al. 1992, Bell y Ecker 1994, Knapik et al. 1998). También, se ha encontrado una estrecha relación entre la presencia de ciertos alelos de microsatélites trinucleótidos con enfermedades humanas, incluyendo ciertos tipos de cáncer y fibrosis, por lo que en la actualidad el análisis de microsatélites se emplea en la medicina para diagnosticar enfermedades (Morral et al. 1993, Halling et al. 1999).

Los altos valores de polimorfismo de los microsatélites permiten identificar genéticamente a los individuos dentro de una población. Debido a que la información de un conjunto de alelos puede ser única para cada individuo y similar entre los miembros de una familia, es posible utilizar a estos marcadores para la caracterización genética de linajes y razas. Por ejemplo, Parker y colaboradores (2004) a través del análisis de 95 loci de microsatélites de *Canis familiaris* lograron la de 85 razas de perros. La posibilidad de caracterizar genotipos ha impulsado el uso de microsatélites en pruebas de paternidad e identificación de individuos para la medicina forense como es el caso de la identificación de cadáveres en fosas comunes a partir de comparaciones con la información de los posibles parientes (Gill et al. 1996, Cerda-Flores et al. 1999).

## VENTAJAS Y DESVENTAJAS

Debido a la alta tasa de mutación en los microsatélites, con frecuencia han sido calificados como altamente homoplásicos, porque es probable que los alelos observados sean idénticos por estado (alelos del mismo tamaño), pero que provengan de diferentes estados ancestrales. La observación directa de secuencias de los microsatélites permite en algunos casos discernir cuando hay homoplasia, particularmente cuando la mutación ocurre en las regiones flanqueantes o cuando se analizan microsatélites compuestos. Por ejemplo, los alelos  $A_7G_8$  son idénticos por estado a los alelos  $A_8G_7$ , pero tienen un origen diferente, es decir son homoplásicos. Este tipo de homoplasia se denomina “moleculamente accesible” ya que puede ser descubierta mediante secuenciación. Sin embargo, la secuenciación no siempre revela la homoplasia, por ejemplo,

para dos individuos que comparten un mismo alelo de microsatélite conformado por 8 adeninas ( $A_8$ ); si el ancestro inmediato de los dos individuos también portaba ese mismo alelo, se dice que los alelos son idénticos por descendencia y por estado. Por el contrario, si el estado ancestral de uno de ellos era  $A_7$ , y por mutación se ganó una repetición, entonces los alelos en el presente son homoplásicos. La posibilidad de encontrar este tipo de homoplasia aumenta cuando se analizan especies diferentes o linajes con tiempos de divergencia profundos. Sin embargo, mediante simulaciones computacionales se ha encontrado que al incluir más loci en los análisis (seis o más), disminuye el porcentaje de homoplasia en estudios poblacionales (Alavez 2008).

Los microsatélites son marcadores con alta variación, accesibles y con diversas aplicaciones en medicina y en análisis evolutivos, ecológicos y de conservación. Las diferentes técnicas de biología molecular con las cuales pueden ser documentados, permiten el análisis de los microsatélites en diferentes tipos de laboratorios, incluso en aquellos con pocos recursos. Estos marcadores codominantes permiten hacer inferencias poblacionales y genealógicas con un gran espectro de aplicaciones, evaluando diferentes loci en poco tiempo y generando un mínimo de residuos peligrosos para el medio ambiente y la salud humana.

## PERSPECTIVAS

Probablemente los microsatélites no han sido aplicados como marcadores moleculares en muchas especies silvestres debido a que no han sido caracterizados, proceso que podría resultar laborioso y relativamente tardado. Sin embargo, hoy en día, con la gran cantidad de genomas que han sido secuenciados o que se encuentran en proceso de secuenciación y la reducción en costos y en tiempos de los métodos de caracterización de microsatélites, las posibilidades de aplicar estos marcadores en una gran diversidad de especies y grupos se han ampliado.

Debido a las diversas aplicaciones de estos marcadores y al alto grado de variación, se han establecido diferentes modelos de mutación para su análisis, como el IAM, el SMM y el TPM. También existen múltiples programas de análisis para establecer grupos de ligamento, para hacer inferencias de parentesco, estudiar la estructura genética de las poblaciones y su historia filogeográfica. El uso y caracterización de estos marcadores en diversos linajes, en un futuro permitirá la generación de bases de datos de poblaciones que puedan ser comparadas entre especies.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alavez V. 2008. Evolución de microsatélites de cloroplasto en *Pinus pseudostrobus* y *Pinus montezumae*: efecto del ligamiento en la estimación de parámetros poblacionales y aplicaciones en genética de poblaciones. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Anderson E.C. y E. A. Thompson. 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160: 1217-1229.
- Beaumont M. A. 1999. Detecting population expansion and decline using microsatellites. *Genetics* 153: 2013-2029.
- Beaumont M. A. y R. A. Nichols. 1996. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society of London* 263: 1619-1626.
- Berli P. y J. Palczewski. 2010. Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. *Genetics* 185: 313-326.
- Bell C. J. y J. R. Ecker. 1994. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* 191: 137-144.
- Boissinot S. y P. Boursot. 1997. Discordant phylogeographic patterns between the Y chromosome and mitochondrial DNA in the house mouse: selection on the Y chromosome? *Genetics* 146:1019-1034.
- Bucci G., S. C. Gonzalez-Martinez, G. Le Provost, C. Plomion, M. M. Ribeiro, F. Sebastiani, R. Alia y G. G. Vendramin. 2007. Range-wide phylogeography and gene zones in *Pinus pinaster* Ait. revealed by chloroplast microsatellite markers. *Molecular Ecology* 16: 2137-2153.
- Burgarella C., Z. Lorenzo, R. Jabbour-Zahab, R. Lumaret, E. Guichoux, R. J. Petit, Á. Soto y L. Gill. 2009. Detection of hybrids in nature: application to oaks (*Quercus suber* and *Q. ilex*). *Heredity* 102: 442-452.
- Carlsson J. 2008. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity* 99:616-623.
- Cerda-Flores R. M., S. A. Barton, L. F. Marty-Gonzalez, F. Rivas y R. Chakraborty. 1999. Estimation of nonpaternity in the Mexican population of Nuevo Leon: a validation study with blood group markers. *American Journal of Physical Anthropology* 109: 281-93.
- Chassin-Noria O., A. Abreu-Grobois, P. H. Dutton y K. Oyama. 2004. Conservation genetics of the east Pacific green turtle (*Chelonia mydas*) in Michoacan, Mexico. *Genetica* 121:195-206.



- Corander J., P. Waldmann, P. Marttinen y M. J. Sillanpaa. 2004. BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. *Bioinformatics* 20:2363–2369.
- Cornuet J. M. y G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001–2014.
- Crawford N. G. 2010. SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. *Molecular Ecology Resources* 10: 556–557.
- Di Rienzo A., A. C. Peterson, J. C. Garza, A. M. Valdes, M. Slatkin y N. B. Freimer. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:3166–3170.
- Dionne M., F. Caron, J. J. Dodson y L. Bernatchez. 2009. Comparative survey of within-river genetic structure in Atlantic salmon; relevance for management and conservation. *Conservation Genetics* 10:123–133.
- Excoffier L., G. Laval y S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47–50.
- Gaggiotti O. E., S. P. Brooks, W. Amos y J. Harwood. 2004. Combining demographic, environmental and genetic data to test hypotheses about colonization events in metapopulations. *Molecular Ecology* 13: 811–825.
- Gill P., A. Urquhart, E. Millican, N. Oldroyd, S. Watson, R. Sparkes y C. P. Kimpton. 1996. A new method of STR interpretation using inferential logic—development of a criminal intelligence database. *International Journal of Legal Medicine* 109: 14–22.
- Glaubitz J. C. 2004. Convert: a user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes* 4:309–310.
- Guillot G., F. Mortier y A. Estoup. 2005. Geneland: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5:712–715.
- Halling K. C., J. Harper, C. A. Moskaluk, S. N. Thibodeau, G. R. Petroni, A. S. Yustein, P. Tosi, C. Minacci, F. Roviello, P. Piva, S. R. Hamilton, C. E. Jackson y S. M. Powell. 1999. Origin of microsatellite instability in gastric cancer. *American Journal of Pathology* 155: 205–211.
- Hancock J. M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. Págs 1–10. *En*: D. B. Goldstein y C. Schlötter-

- rer (eds.). *Microsatellites, evolution and applications*. Oxford University Press. Oxford, Nueva York, Estados Unidos de América.
- Hardy O. J. y X. Vekemans. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2:618-620.
- Hedrick P. W. 1999. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53: 313-318.
- Hey J. y R. Nielsen. 2004. Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* 167:747-760.
- Hodgins K. A. y S. C. Barrett. 2007. Population structure and genetic diversity in tristylous *Narcissus triandrus*: insights from microsatellite and chloroplast DNA variation. *Molecular Ecology* 16: 2317-2332.
- Knapik E. W., A. Goodman, M. Ekker, M. Chevrette, J. Delgado, S. Neuhaus, N. Shimoda, W. Driever, M. C. Fishman y H. J. Jacob. 1998. A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nature Genetics* 18: 338-34.
- Li W.S. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates. Sunderland M.A. Estados Unidos de América.
- Lielpet S., V. Kuhlenkamp, M. Anzidei, G. G. Vendramin y B. Ziegenhagen. 2001. Pitfalls in determining size homoplasy of microsatellite loci. *Molecular Ecology* 1: 332-335.
- Llewellyn M. S., M. D. Lewis, N. Acosta, M. Yeo, H. J. Carrasco, M. Segovia, J. Vargas, F. Torrico, M. A. Miles y M. W. Gaunt. 2009. *Trypanosoma cruzi* Ilc: Phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent chagas disease. *Plos Neglected Tropical Diseases* 3: e510.
- Morrall N., V. Nunes, T. Casals, N. Cobos, O. Asensio, J. Dapena y X. Estivill. 1993. Uniparental inheritance of microsatellite alleles of the cystic fibrosis gene (CFTR): identification of a 50 kilobase deletion. *Human Molecular Genetics* 2: 677-681.
- Neale D. B. y R. R. Sederoff. 1989. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. *Theoretical and Applied Genetics* 77:212-216.
- Oliveira E. J., J. G. Pádua, M. I. Zucchi, R. Vencovsky y M. L. Carneiro-Vieira. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294-307.

- Parker H. G., L. V. Kim, N. B. Sutter, S. Carlson, T. D. Lorentzen, T. B. Malek, G. S. Johnson, H. B. DeFrance, E. A. Ostrander y L. Kruglyak. 2004. Genetic structure of the pure bred domestic dog. *Science* 304: 1160-1163.
- Peakall R. y P. E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288-295.
- Petit R. J., J. Duminil, S. Fineschi, A. Hampe, D. Salvini y G. G. Vendramin. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* 14: 689-701.
- Piry S., A. Alapetite, J. M. Cornuet, D. Paetkau, L. Baudouin y A. Estoup. 2004. GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity* 95:536-539.
- Pritchard J. K., M. Stephens y P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Raymond M. y F. Rousset. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1283-1286.
- Rozas J., J. C. Sanchez-Del Barrio, X. Messeguer y R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Schaffner S., C. Foo, S. Gabriel, D. Reich, M. J. Daly y D. Altshuler. 2005. Calibrating a coalescent simulation of human genome sequence variation. *Genome Research* 15:1576-1583.
- Schlötterer C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365-371.
- Selkoe K.A. y R.J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: A practical guide for using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*: 615-629.
- Shriver M. D., L. Jin, R. Chakraborty y E. Boerwinkle. 1993. VNTR allele frequency distributions under a stepwise mutation model: A computer simulation approach. *Genetics* 134:983-993.
- Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139:457-462.
- Valdés A.M., M. Slatkin y N.B. Freimer. 1993. Allele frequencies at microsatellite loci: The stepwise mutation model revisited. *Genetics* 133:737-749.
- Van Oosterhout C., W.F. Hutchinson, D.P.M. Wills y P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535-538.

- Vendramin G.G., L. Lelli, P. Rossi y M. Morgante. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology* 5(4):595–598.
- Wilkie P. J., D. B. Krizman y J. L. Weber. 1992. Linkage map of human chromosome 9 microsatellite polymorphisms. *Genomics* 12: 607-609.
- Wilson I. J. y D. J. Balding. 1998. Genealogical inference from microsatellite data. *Genetics* 150: 499-510.
- Wilson G. A., M. Weale y D. J. Balding. 2003. Inferences from DNA data: population histories, evolutionary processes and forensic match probabilities. *Journal of the Royal Statistical Society: Series A* 166: 155-188.
- Wilson G.A. y B. Rannala. 2003. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163: 1177-1191.
- Zane L., L. Bargelloni y T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.

# ADN POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AL AZAR (RAPD) Y REGIONES INTERMEDIAS ENTRE SECUENCIAS SIMPLES REPETIDAS

Martha Graciela Rocha Munive,<sup>1</sup> Andrea González González<sup>2</sup> y  
Xitlali Aguirre Dugua<sup>3</sup>

## INTRODUCCIÓN

Como se ha visto en otros capítulos de este libro, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cambió radicalmente los métodos de análisis a nivel molecular. Para estimar la diversidad genética, se pueden amplificar mediante la PCR diferentes regiones del genoma y comparar entre individuos, poblaciones o especies diferentes. En especies para las que no se cuenta con suficientes datos genómicos previamente publicados, o bien para las cuales se quiere obtener información genética de manera rápida y relativamente económica, se pueden emplear marcadores moleculares inespecíficos. Estos marcadores usan iniciadores (también llamados oligonucleótidos o *primers*) que amplifican

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental, Instituto Nacional de Ecología. Av. San Rafael Atlixco # 186. UAM Iztapalapa Edificio W, Planta baja. Col. Vicentina. C.P. 09349. México, D. F. mrocha@ine.gob.mx

<sup>2</sup> Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental. Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-275 Ciudad Universitaria, C.P. 04510 México, D.F. andreagg@gmail.com

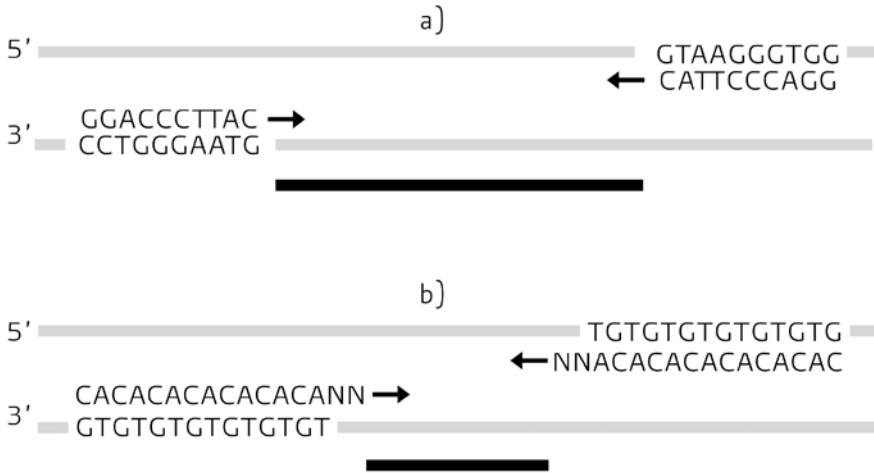
<sup>3</sup> Laboratorio de Ecología y Evolución de Recursos Vegetales. Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México. Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex-Hacienda de San José de La Huerta C.P. 58190. Morelia, Michoacán. spikesadx@hotmail.com.

al azar diferentes regiones en el genoma y generan un patrón de productos de PCR o huella genética (Wolfe y Liston 1998) que se visualizan mediante una electroforesis en geles de agarosa o acrilamida (ver capítulo de electroforesis de ADN). En este capítulo nos referiremos en particular a los marcadores conocidos como RAPDs (del inglés *Random Amplified Polymorphic DNA* o ADN polimórfico amplificado al azar) (Williams *et al.* 1990) y a los ISSRs (de *Inter-Simple Sequence Repeats* o regiones intermedias entre secuencias simples repetidas). Para fines de los estudios de genética de poblaciones, estos marcadores son marcadores dominantes, lo cual significa que bajo el modelo de un locus con dos alelos, la presencia de una banda representa al genotipo dominante (tanto homócigo como heterócigo), mientras que una ausencia de la banda representa al genotipo homócigo recesivo.

Los RAPDs son una técnica que consiste en la amplificación de segmentos de ADN con iniciadores pequeños (generalmente de 10 nucleótidos de longitud) de secuencias aleatorias no-palindrómicas, con un contenido de G + C entre 50 y 80%, (Lynch y Milligan 1994). La secuencia del iniciador es elegida *a priori* de manera arbitraria y sólo se utiliza un iniciador por reacción, que actuará al mismo tiempo como iniciador sentido y antisentido (Figura 1A). Los fragmentos obtenidos se visualizan como un patrón de bandeo característico del individuo y cada banda observada se considera un locus. La presencia o la ausencia de las bandas entre individuos se deben a cambios en la secuencia (o a la pérdida) de los sitios a los que se alinea el iniciador (Navarro 1999). La inserción o eliminación de nucleótidos en la secuencia intermedia entre los dos sitios de acoplamiento, aumentará o disminuirá el tamaño de la molécula amplificada.

Los ISSRs amplifican fragmentos que se ubican entre las repeticiones de secuencias simples (*simple sequence repeats* o SSRs), también llamadas microsatélites (ver capítulo de microsatélites). Los iniciadores de ISSRs suelen ser de 16 a 25 pares de bases (pb) y están conformados por una secuencia repetida de un di- o trinucleótido complementario al microsatélite. Es posible agregar a esta secuencia de 1 a 4 nucleótidos degenerados aleatorios en el extremo 3' o en el 5', que asegurarán que la amplificación inicie siempre en el extremo 5' o en el 3' del microsatélite (Figura 1B). Al igual que en los RAPDs, sólo se utiliza un iniciador por reacción y ocurre la amplificación cuando dos secuencias repetidas (o microsatélites) se encuentran en orientación invertida y a una distancia que permita que la ADN polimerasa amplifique el fragmento completo, ya que si se

Figura 1. Principio básico de los RAPDs (A) e ISSRs (B). Las flechas señalan la dirección de síntesis de la cadena durante la reacción de la PCR; el fragmento amplificado está representado a un lado de las cadenas originales. En (B) se han incluido dos nucleótidos suplementarios arbitrarios en el extremo 5' del iniciador.



encuentran muy alejadas entre sí, no se amplificará la región. Asimismo, se ha observado que al menos el 96% de las bandas de ISSRs segregan de manera mendeliana (Tsumura *et al.* 1996).

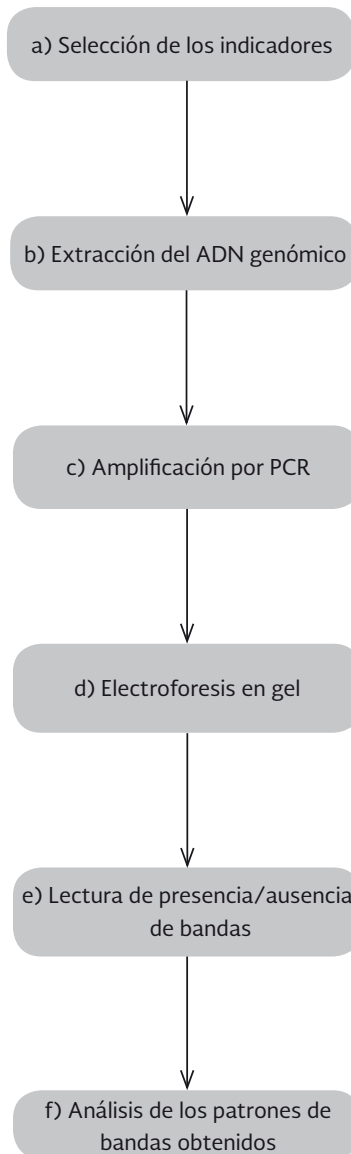
Los RAPDs e ISSRs han sido utilizados para resolver una amplia gama de preguntas relacionadas con distintos ámbitos de la biología, en su gran mayoría en plantas (véase sección de aplicaciones).

## PROTOCOLO

### Equipo

- Termociclador
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder
- Sistema de fotodocumentación de geles
- Micropipetas de 2 µL, 20 µL y 200 µL
- Balanza

## Etapas de la técnica





## Material

- Tubos para PCR de 200  $\mu$ L y microtubos de 1.5 mL
- Puntas nuevas estériles de 10  $\mu$ L y 200  $\mu$ L
- Gradilla para tubos de PCR
- Hielo
- Espátula

## Reactivos

- Buffer 10X para PCR
- Mezcla de deoxinucleótidos dNTPmix 10 mM
- Solución de  $MgCl_2$  25 mM
- Taq DNA polimerasa 5 U/ $\mu$ l
- Agua ultrapura grado biología molecular
- Iniciadores para ISSRs 10 $\mu$ M
- Buffer TBE 1X
- Agarosa (CAS N° 9012-36-6)
- Buffer de carga 6X
- Solución de Bromuro de Etidio 10 mg/ml (CAS N° 1239-45-8)
- Marcador de peso molecular de 100pb *Nota:* en caso de que el rango de tamaños obtenido no se cubra con este marcador se puede seleccionar otro (véase el capítulo de Electroforesis)

## MÉTODO

1. Preparar una mezcla de reacción de acuerdo al número de muestras de ADN que se van a analizar e incluir un blanco (mezcla para PCR sin ADN para que actúe como control negativo) y una muestra que se conoce que amplifica para ese iniciador de manera óptima (control positivo). Agregar las soluciones de acuerdo a los volúmenes de la Tabla 1. Es muy importante mantener estas mezclas de reacción en hielo.
2. A cada tubo de PCR agregar 1  $\mu$ l del ADN problema. Una vez preparados los tubos con mezcla de reacción y ADN molde colocarlos en el termociclador.
3. Correr el programa de amplificación que se encuentra en la Tabla 2.

4. Al final de la amplificación, los productos se corren con electroforesis en un gel de agarosa al 2% en TBE 1X (ver capítulo de electroforesis de ADN).
5. Teñir el gel con solución de bromuro de etidio y visualizar la imagen en un fotodocumentador de geles.
6. Para la lectura de los geles se recomienda emplear algún programa que permita visualizar las bandas y estimar el peso molecular. Se deben identificar todas las bandas existentes en el conjunto de muestras y construir una matriz en la que se ubiquen todas las bandas a manera de columna y cada individuo en los renglones. Para cada individuo asignar un valor de 1 si la banda está presente o de 0 si está ausente.
7. Una vez obtenida la matriz de datos verificar el formato requerido por cada uno de los programas de análisis para poder hacer los cálculos de los parámetros poblacionales.

**Tabla 1. Reacción de PCR estándar**

Reactivo	Ci	Cf	Volumen para una reacción de 20 $\mu$ l
Buffer para PCR	10X	1X	2 $\mu$ l
Solución MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.5 mM	2 $\mu$ l
Mezcla de dNTP	10 mM (2.5mM c/u)	0.5 mM	1 $\mu$ l
Iniciador*	10 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Agua ultrapura	----	----	26.8 $\mu$ l
Taq DNA polimerasa	5U/ $\mu$ l	1 U	0.2 $\mu$ l
ADN molde**	50 ng/ $\mu$ l	50 ng	1 $\mu$ l
Volumen total			20 $\mu$ l

\* Preparar una mezcla de reacción por cada iniciador.

\*\* El ADN no se agrega a la mezcla de reacción, se agrega a cada tubo por separado.  
Ci = concentración inicial en el stock en que se conserva, Cf = concentración final en la mezcla de reacción.

**Tabla 2. Programa de amplificación**

Etapa	Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
1	1	95 °C	0:02:00	1
2	1			
2				
3	94 °C			
54 °C				
72 °C	0:00:40			
0:00:40				
0:01:00	40			
3	1	72 °C	0:05:00	1
	2	4 °C	∞	

## RECOMENDACIONES

Actualmente existe una gran cantidad de iniciadores de RAPDs e ISSRs reportados que se encuentran disponibles para realizar ensayos en nuevas especies de interés. Al iniciar un trabajo de investigación en el que se desee aplicar esta técnica, se recomienda:

- a) Buscar artículos publicados o tesis en los que se haya utilizado el marcador en la especie de interés para identificar los iniciadores que se utilizaron y las condiciones de la PCR aplicadas.
- b) Cuando se desea trabajar con una especie para la cual no existen trabajos publicados con estas técnicas, se recomienda investigar los iniciadores utilizados en el mismo género o la misma familia a la que pertenece la especie de interés. Cuando esto no sea posible, se recomienda utilizar iniciadores universales desarrollados para diversos organismos como por ejemplo la serie No. 9 de la Unidad de Servicios de Proteínas y Ácidos Nucleicos (NAPS) de la Universidad de Columbia Británica, Vancouver, Canadá, para ISSRs; o la serie OP-A y OP-B de Operon Technologies, Estados Unidos, para RAPDs.
- c) Una vez elegidos los iniciadores con los que se ha decidido hacer los ensayos, se sugiere:

- Probar los diferentes iniciadores en una condición estándar de temperatura, número de ciclos y tiempo de alineación. La temperatura de alineación depende del contenido de GC del iniciador y usualmente oscila entre los 45 y 65 °C para ISSRs y alrededor de los 40 °C para RAPDs.
- Elegir los que hayan generado patrones de bandeo, aunque sean débiles.
- Optimizar las condiciones iniciales de la PCR para esos iniciadores que generaron resultados positivos. Esta optimización incluye modificar particularmente la temperatura, el tiempo de alineación y la concentración de MgCl<sub>2</sub>. Se recomienda ensayar tres condiciones diferentes de cada uno de estos elementos, y sus combinaciones.
- Para realizar la electroforesis incluir dos marcadores de tamaño, uno al inicio y otro al final del gel, para evitar una asignación errónea del tamaño de la banda en caso de un corrimiento irregular de la electroforesis.

Para un ejemplo ver Tsumura y colaboradores (1996), quienes montaron los marcadores de ISSRs para *Pseudotsuga menziesii* (Pinaceae) y *Cryptomeria japonica* (Cupressaceae). Para atender problemas prácticos relativos al desarrollo de la PCR es recomendable consultar a Espinosa (2007).

Una vez definidas las condiciones, el desarrollo de los ISSRs sigue el protocolo usual de la PCR (véase capítulo de PCR). Es muy importante incluir controles positivos y negativos en cada una de las corridas, así como realizar todos los experimentos, desde la extracción del ADN hasta la visualización en el fotodocumentador utilizando las mismas condiciones para que todos los resultados sean tanto reproducibles como comparables. La visualización de los productos amplificados, que suelen ir de 200 a 2000 pb, puede realizarse en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio o con geles de acrilamida teñidos con plata. Los geles de agarosa son los más comunes debido a su facilidad de elaboración, bajo costo y facilidad de visualización. Sin embargo, es posible definir un mayor número de bandas por iniciador cuando se utiliza poliacrilamida debido a los altos niveles de resolución que ésta permite (Moreno *et al.* 1998).

## MÉTODOS DE ANÁLISIS

Debido a que cada vez es más sencillo y barato realizar la genotipificación a gran escala de diferentes organismos, se vuelve necesario el uso y conocimiento de

diferentes paquetes computacionales para llevar a cabo el análisis estadístico de los datos.

En esta sección se describirán los programas más comúnmente utilizados para obtener diferentes parámetros de genética de poblaciones a partir de marcadores dominantes, una buena revisión de los programas comúnmente empleados en la actualidad para el análisis de genética de poblaciones puede encontrarse en Excoffier y Heckel (2006). Para este capítulo, se realizó una selección de los programas y la mayoría de estos se puede adquirir de manera gratuita en Internet. Para obtener resultados más sólidos se sugiere utilizar diferentes programas de acuerdo a la información que cada uno puede proveer. Existen paquetes multiusos que producen resultados que describen la diversidad genética al interior y entre poblaciones principalmente; otros están enfocados a un nivel individual y a la historia más reciente de las poblaciones, mientras que los programas más especializados estiman parámetros poblacionales bajo escenarios evolutivos específicos. Estos últimos utilizan estadística bayesiana para la estimación de parámetros, lo cual facilita la incorporación de conocimiento previo para obtener estimados más reales (Excoffier y Heckel 2006).

## Paquetes multiuso

### a) Arlequin

Plataforma: Windows, Mac, Linux

Sitio para descargarlo: <http://lgb.unigecmpg.unibe.ch/arlequinsoftware/arlequin3/>

Autores: Laurent Excoffier, Stephan Schneider y David Roessli, Laboratorio de genética de poblaciones y cómputo del Instituto de Zoología, Universidad de Bern.

Este programa puede llevar a cabo diferentes análisis de genética de poblaciones que incluyen la estimación de frecuencias genéticas, estadísticos F (estructuración genética), desequilibrio de ligamiento, pruebas de neutralidad al interior de las poblaciones, prueba de Mantel y análisis de diversidad genética entre y al interior de poblaciones. Asimismo, una característica relevante de este programa es que permite calcular una variedad de medidas de distancias genéticas las cuales incluyen Jukes y Cantor, el parámetro de distancia de Kimura 2 y la distancia de Tamura-Nei, cada uno de éstos con o sin la corrección gamma a las

tasas de evolución. Otra característica especial es que permite llevar a cabo un análisis jerárquico (correlación de la diversidad haplotípica a diferentes niveles de subdivisión jerárquica) de la estructura genética basado en la aproximación de la AMOVA (*Analysis of Molecular Variance*) (Excoffier *et al.* 1992) para así saber cómo se encuentra repartida la variación genética en distintos niveles jerárquicos (individuo, población, grupos de poblaciones, especie).

#### b) Genetix

Plataforma: Windows 95, Windows NT o versiones posteriores.

Sitio para descargarlo: <http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm>.

Autor: K. Belkhir. Laboratorio de genomas, poblaciones e interacciones, CNRS UMR 5000, Universidad de Montpellier II, Montpellier (Francia).

La parte relevante de este programa es que calcula las distancias genéticas de Nei y de Cavalli-Sforza ambas con o sin corrección de sesgos. Asimismo, calcula los índices básicos de diversidad genética, estadísticos F, prueba de Mantel, de desequilibrio de ligamiento entre loci multialélicos, así como la partición de este desequilibrio para calcular la estructura poblacional. Arroja resultados con intervalos de confianza basados en permutaciones o técnicas de re-muestreo. Es un editor de datos bastante conveniente.

#### c) TFGA (Tools For Population Genetics Analysis)

Plataforma: Windows.

Sitio para descargarlo: <http://bioweb.usu.edu/mpmbio/index.htm>

Autor: Mark P. Miller, Departamento de Biología, Universidad de Utah, Logan, Utah, EE.UU.

Programa básico para el análisis de parámetros de genética de poblaciones.

Calcula distancias genéticas, estadística descriptiva, estadísticos F y pruebas de equilibrio Hardy-Weinberg, de diferenciación genética, prueba de Mantel y análisis de UPGMA. Asimismo, permite el análisis jerárquico de los datos (Miller 1997).

#### d) Popgene

Plataforma: Windows 3.11, 95, 98, 2000, ME y NT, Mac: PowerPc, G3 y G4, con instalación previa de "Virtual PC" o "Soft Windows".

Sitio para descargarlo: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>

Autor: Francis Yeh, Departamento de recursos renovables, Universidad de Alberta, Canadá.

La versión actual (1.32) está diseñada específicamente para el análisis de marcadores codominantes y dominantes utilizando datos haploides y diploides. Realiza cálculos de estadística descriptiva (frecuencias alélicas, diversidad genética, distancias genéticas, estadísticos G y F) así como flujo génico, pruebas de neutralidad, desequilibrio de ligamiento, estructura multilocus y dendrogramas.

#### e) SPAGeDi (Spatial Pattern Analysis of Genetic Diversity)

Plataforma: Windows, Mac (PC virtual), DOS.

Sitio para descargarlo: <http://www.ulb.ac.be/sciences/ecoevol/spagedi.html>.

Autores: Olivier Hardy y Xavier Vekemans, Laboratorio de Eco-etología evolutiva, Universidad Libre de Bruselas, Bélgica.

Originalmente diseñado para caracterizar la estructura genética espacial de las poblaciones e individuos mapeados utilizando datos genotípicos de cualquier nivel de ploidía. Las estimaciones de diferenciación y parentesco entre los individuos y las poblaciones (basados en comparaciones pareadas) se correlacionan con las distancias geográficas vía un análisis de autocorrelación espacial o por regresión lineal. Asimismo, calcula diferentes parámetros de diferenciación genética, parentesco, endogamia, coeficientes de fraternidad, tamaño de vecindarios, dispersión génica a partir de patrones de aislamiento por distancia, patrones filogeográficos. Los resultados están basados en permutaciones y técnicas de re-muestreo (Hardy y Vekemans 2002).

#### f) Genepop

Plataforma: DOS, Windows (ventana de comandos).

Sitio para descargarlo: <http://kimura.univ-montp2.fr/~rousset/Genepop.htm>.

Autores: Michel Raymond y François Rousset, Equipo genético y ambiental del Instituto de Ciencias de la Evolución de la Universidad de Montpellier II, Francia.

Calcula los estimadores básicos de genética de poblaciones (diversidad genética, estadística descriptiva), así como el número de migrantes por generación utilizando el método de alelos raros de Slatkin. Pone a prueba los supuestos de equilibrio de Hardy-Weinberg y equilibrio de ligamiento. Las pruebas y los intervalos de confianza están basados en cadenas de Markov y técnicas de re-muestreo (Raymond y Rousset 1995).

#### g) GelCompar II

Plataforma: Windows.

Sitio de internet (no hay una versión gratuita de este programa): <http://www.applied-maths.com/gc/gc.htm>.

Programa de análisis de geles que permite el agrupamiento de los datos según los patrones de bandeo que definen la huella genética o fingerprint. Implementa algoritmos filogenéticos (matrices de distancia) y lleva a cabo también análisis de parsimonia generalizada. Es un excelente procesador de imágenes ya que tiene una interfase gráfica que permite armar las matrices de presencia/ausencia de bandas con mayor facilidad. No se encuentra disponible de modo gratuito, se requiere comprarlo.

#### h) Fingerprinting II Informatix Software

Plataforma: Windows, Macintosh.

Sitio de internet (no hay una versión gratuita de este programa): <http://www.bio-rad.com>.

BioRad, division de Sadtler, EE.UU.

Permite el análisis de *fingerprints* implementando técnicas de agrupamiento a partir de los patrones obtenidos en los geles. Se requiere comprarlo.



## Programas que realizan análisis de individuos

### Structure

Plataforma: Windows, Mac, Linux, Unix, DOS.

Sitio para descargarlo: <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>.

Autores: Peter Donnelly, Daniel Falush, Matthew Stephens, Jonathan Pritchard, William Wen y Noah Rosenberg, Departamento de Genética Humana, Universidad de Chicago, EE.UU.

Permite la obtención de parámetros de la estructura poblacional de genotipos multilocus. La característica especial de este programa es que detecta la estructura genética entre grupos de individuos así como también la proporción de nuevos inmigrantes cuyos ancestros fueron también inmigrantes (análisis de admixtura). Reporta también las distancias genéticas entre poblaciones inferidas virtualmente y las poblaciones ancestrales, identifica zonas híbridas así como la asignación de los individuos a esas poblaciones virtuales. Asimismo, asume equilibrio de Hardy-Weinberg al interior de los grupos, calcula el equilibrio de ligamiento debido a la admixtura y trabaja con datos diploides y haploides. Finalmente, estima los parámetros utilizando estadística bayesiana y cadenas de Markov (Pritchard *et al.* 2000, Falush *et al.* 2003, 2007).

## Programas especializados

### Hickory

Plataforma: Windows.

Sitio para descargarlo: <http://darwin.eeb.uconn.edu/hickory/hickory.html>

Autores: Kent E. Holsinger y Paul O. Lewis, Departamento de Ecología y Biología Evolutiva, Universidad de Connecticut, EE.UU.

Permite obtener estimadores de los índices  $F$ , utilizando estadística Bayesiana. Se caracteriza por tener poca certeza en los coeficientes de endogamia debido al uso de marcadores dominantes (Holsinger *et al.* 2002).

## Análisis estadístico de marcadores dominantes

Al utilizar marcadores dominantes se obtiene sólo la presencia de las bandas amplificadas o su ausencia, de manera que no se puede discernir entre el heterócigo portador de una copia y el homócigo dominante portador de dos copias. Dado que los heterócigos no pueden ser distinguidos, las frecuencias se estiman a partir de los individuos sin banda, considerados como homócigos recesivos. En un locus, la frecuencia del alelo recesivo ( $q$ ) es simplemente la raíz cuadrada de la frecuencia de las ausencias ( $x$ ), asumiendo que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg:  $x = q^2$  y la frecuencia del alelo dominante es  $p = 1 - q$ . Por ello, al analizar los datos obtenidos con marcadores dominantes se asume que: 1) cada uno de los marcadores representa un locus mendeliano en el cual el marcador visible, el alelo dominante, está en equilibrio de Hardy-Weinberg con un alelo recesivo y 2) los alelos marcados para diferentes loci no migran a la misma posición en el gel (Lynch y Milligan 1994, citado por Rentería 2007).

Para solucionar esta limitante, se han realizado análisis de la progenie o de tejidos haploides (por ejemplo, megagametofitos en pinos) para cada individuo que porta el alelo dominante (Isabel *et al.* 1999), aunque esto requiere de gran cantidad de trabajo, o en el peor de los casos los tejidos haploides no están disponibles para el análisis. En los primeros trabajos con marcadores dominantes, para conocer las frecuencias alélicas se requería de un conocimiento previo del coeficiente de endogamia (Zhivotovsky 1999), o bien tratar al fenotipo multilocus como un haplotipo y usar un índice de similitud o distancia euclidiana, para describir la distancia entre los haplotipos en un análisis de varianza molecular (Excoffier *et al.* 1992).

Se ha estudiado con particular atención la manera en que se pueden obtener resultados más confiables al utilizar estos marcadores y se han llegado a diferentes conclusiones. Por ejemplo, un trabajo definitorio en la manera en que se pueden analizar estos marcadores, fue el publicado por Lynch y Milligan (1994) en donde hacen una serie de recomendaciones para evitar el sesgo en los cálculos de frecuencias alélicas. Por ejemplo, proponen excluir aquellos loci con menos de tres alelos nulos (es decir, aquellos en los que no se observa la presencia de banda) y usar muchos loci para compensar la posibilidad de no estimar de manera correcta los alelos recesivos. Estos mismos autores también sugieren trabajar con tamaños poblacionales grandes (de 100 individuos o de

2 a 10 veces más que cuando se usan marcadores co-dominantes). Usando esta serie de correcciones, los valores obtenidos con marcadores dominantes se asemejan a los obtenidos con marcadores co-dominantes (como las isoenzimas o microsatélites) para la misma especie. Se ha demostrado que cuando se tienen muchos loci polimórficos, y muchos individuos por población los estimadores tradicionales calculan de manera adecuada la heterocigosis (Krauss 2000). Recientemente, Nybom (2004) recomienda analizar como mínimo de 30 a 80 loci, aunque si se usan de 100 a 200 loci se obtienen valores aún más confiables (Marette *et al.* 2002), lo que es plausible usando marcadores como los AFLPs (ver capítulo de AFLPs).

Existen otras alternativas al uso de la suposición de equilibrio de Hardy-Weinberg, por ejemplo el análisis de diversidad usando el índice de Shannon: de acuerdo a Dawson y colaboradores (1995), el índice de Shannon no es sensible a efectos del sesgo causado por la incapacidad de detectar a los heterocigos. Por otro lado, el análisis de varianza molecular (AMOVA) usa distancias euclidianas para determinar las diferencias entre los perfiles de ISSRs o RAPDs (o cualquier otro marcador dominante), que al ser comparados como fenotipos, también evita la suposición de equilibrio.

## APLICACIONES

### Diversidad y estructuración genética de poblaciones

Los datos obtenidos por medio de RAPDs e ISSRs han permitido conocer los patrones de diversidad y estructuración genética presente en las especies de plantas en función de su ciclo de vida, distribución geográfica y estrategias reproductivas. Por ejemplo, se ha visto que las especies con polinización cruzada con un rango de distribución amplio y ciclos de vida largos son genéticamente más diversas y mantienen esta variación dentro de sus poblaciones, en comparación con las especies que cuentan con características ecológicas contrastantes (es decir, plantas anuales, auto-polinizadas y de distribución local; Nybom y Bartish 2000, Nybom 2004). También se han buscado patrones en la diversidad en animales, por ejemplo, en el bivalvo *Gemma gemma* (Veneridae) (Casu *et al.* 2005).

Particularmente, los ISSRs han permitido conocer los patrones de diversidad genética en especies de plantas silvestres como por ejemplo, *Calamagrostis*

*porteri* (Poaceae), (Esselman *et al.* 1999), *Kochia* (Chenopodiaceae) (Mengistu y Messersmith 2002), *Guizotia abyssinica* (Asteraceae) (Petros *et al.* 2007); así como para variedades de especies cultivadas como *Coffea arabica* (Rubiaceae) (Aga *et al.* 2005) entre otros.

En México, los RAPDs se han utilizado para evaluar poblaciones silvestres y domesticadas de chile (*Capsicum annum*, Solanaceae) (Oyama *et al.* 2006). Ambos marcadores se han empleado en estudios del género *Agave* (Navarro 1999, Navarro-Quezada 2003, Aguirre 2004, González 2004, Colín 2006, Trejo 2006, Scheinvar 2008, Rives 2009).

## Discriminación de taxa a nivel específico e infraespecífico

Los ISSRs han sido empleados para discriminar taxa a nivel de especie y por debajo de éste, particularmente para la distinción de cultivares en especies de importancia agrícola, así como para identificar poblaciones o taxa genéticamente únicos con fines de conservación (ver más adelante). Algunos estudios representativos se han hecho con arroz (*Oryza sativa*, Poaceae) (Blair *et al.* 1999, Joshi *et al.* 2000, Nagaraju *et al.* 2002, Saini *et al.* 2004), trigo (Nagaoka y Ogihara 1997, Ammiraju *et al.* 2001, Pujar *et al.* 2002), cebada (Fernández *et al.* 2002), coliflor (Bornet *et al.* 2002a), papa (Bornet *et al.* 2002b), algodón (Liu y Wendel 2001), jitomate (Kochieva *et al.* 2002, Tikunov *et al.* 2003) y líneas híbridas comerciales de maíz (Kantety *et al.* 1995).

Estrechamente ligado a la identificación de cultivares puede mencionarse el uso de los ISSRs en *fingerprinting*, ya que los perfiles únicos identificados para cada cultivar se pueden utilizar posteriormente en su seguimiento y control. Con este fin se ha utilizado esta técnica en el mantenimiento de colecciones *ex situ* de cacao (*Theobroma cacao*, Sterculiaceae; Charters y Wilkinson 2000). Para una revisión sobre el uso de los ISSRs en especies de importancia agrícola véase Pradeep y colaboradores (2002).

## Conservación

Estos marcadores se han utilizado para estimar y comparar la diversidad y la estructura genética de taxa raros o con presiones de conservación (Rocha y Gasca 2007, Smith y Bateman 2002, Ge *et al.* 2003); así como para la evalua-

ción del éxito de estrategias de conservación de la diversidad genética de algunas especies basadas en áreas protegidas o reservas (Ramesha *et al.* 2007).

## Relaciones filogenéticas

Aunque no es el marcador idóneo para examinar la taxonomía y las relaciones genéticas entre especies, los ISSRs se han utilizado para discernir las relaciones de cercanía entre cuatro especies del género *Hyobanche* (Orobanchaceae) y para la identificación de especies dentro del género *Morus* (Moraceae, Wolfe y Randle 2001, Vijayan *et al.* 2004).

## Introgresión e hibridación

Se han utilizado para comprender patrones de especiación híbrida en el género *Penstemon* (Scrophulariaceae, Wolfe *et al.* 1998a, 1998b), así como eventos de hibridación e introgresión en diversas especies (Galaev *et al.* 2003, Natcheva y Cronberg 2007, Ducarme y Wesselingh 2005).

## VENTAJAS Y DESVENTAJAS

Los RAPDs y los ISSRs son técnicas moleculares que han mostrado ser muy útiles en temas muy distintos. Como lo ejemplifican los estudios citados en el presente capítulo, también han podido ser aplicados en una gran variedad de familias de plantas.

Desde el punto de vista técnico, ambos marcadores se encuentran en regiones distintas dentro del genoma, en regiones tanto codificantes como no codificantes del ADN, de manera que producen información útil para el estudio de la diversidad genética (Wolfe 2005). También revelan niveles de variación más altos que los RFLPs e isoenzimas (Williams *et al.* 1990, Lynch y Milligan 1994, Zietkiewicz *et al.* 1994, Otero *et al.* 1997, Russell *et al.* 1997, Parker *et al.* 1998). Se trata en ambos casos de técnicas relativamente fáciles que no necesitan conocer con anticipación la secuencia de ADN del organismo de interés, ni de la construcción o el mantenimiento de una librería genómica, además permiten analizar varios loci en una sola reacción de PCR de manera que se puede obtener información de diferentes regiones del genoma.

Por otra parte, los ISSRs tienen varias ventajas sobre los RAPDs debido a que los iniciadores para su amplificación son más largos y se pueden usar temperaturas de alineación más elevadas (Wolfe y Liston 1998), lo que produce una mayor especificidad en la reacción que evita los artefactos y hace que las bandas sean reproducibles (Nagaoka y Ogihara 1997, Wolfe *et al.* 1998a). Se ha recomendado el uso de ISSRs sobre los RAPDs porque son altamente sensibles, reproducibles y por presentar bajo costo (Nagaoka y Ogihara 1997). Con la evidencia generada en los últimos años en diferentes especies de plantas, y con los estudios comparativos que se han realizado (por ejemplo Nybom 2004), se ha demostrado que son una buena opción para estudios de variación genética con diferentes enfoques (Wolfe 2005).

Sin embargo, estos marcadores, presentan la desventaja de que, al igual que en otros marcadores inespecíficos, fragmentos del mismo tamaño sean originados en regiones no homólogas, lo que puede distorsionar las estimaciones de similitud genética (Sánchez de la Hoz *et al.* 1996). La naturaleza molecular de estos polimorfismos sólo puede ser conocida si las bandas son secuenciadas. En el caso de los RAPDs la corta longitud de los iniciadores demanda que la amplificación por PCR se dé con una temperatura de alineación relativamente baja, lo cual aumenta la probabilidad de un alineamiento no específico y la generación de información ambigua.

Asimismo, ambos tienen la desventaja de ser marcadores dominantes, cuyo uso ha sido cuestionado debido a las suposiciones que se deben hacer para efectuar los análisis de frecuencias alélicas, de diversidad y de estructura genética (Szmidt *et al.* 1996).

## PERSPECTIVAS

En los últimos años, se ha popularizado el uso de estadística bayesiana en los análisis de estos marcadores. Estos métodos permiten incorporar la incertidumbre acerca de diferentes modelos (ya sea que la población esté en equilibrio o que se tenga información previa acerca de la magnitud de la endogamia) y usar esta información para estimar los niveles de diversidad y estructura genética de manera más precisa (Holsinger y Wallace 2004).

Para mayor información sobre la técnica de ISSRs se recomienda visitar el sitio de Andrea G. Wolfe de la Universidad de Ohio (EE.UU): <http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html>.

## AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen al Dr. Luis Eguiarte del Instituto de Ecología de la UNAM, quien fue nuestro tutor y nos introdujo al mundo de los ISSR y los RAPDs, así como al Biól. Aldo Valera quien nos instruyó en todo los aspectos prácticos para implementar los ISSRs en el laboratorio.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aga E., E. Bekele y T. Bryngelsson. 2005. Inter-simple sequence repeat (ISSR) variation in forest coffee trees (*Coffea arabica* L.) populations from Ethiopia. *Genetica* 124: 213-221.
- Aguirre X. 2004. Genética de poblaciones de *Agave cupreata* y *Agave potatorum*: aportaciones para el manejo y la conservación de dos especies mezcaleras. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Ammiraju J. S. S., B. B. Dholakia, D. K. Santra, H. Singh, M. D. Lagu, S. A. Tamhankar, H. S. Dhaliwal, V. S. Rao, V. S. Gupta y P. K. Ranjekar. 2001. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 726-732.
- Belkhir K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste y F. Bonhomme. 1996-2004 GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier, Francia.
- Blair M.W., O. Panaud y S.R. McCouch. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 98: 780-792.
- Bornet B., C. Muller, F. Paulus y M. Branchard. 2002a. Highly informative nature of inter simple sequence repeat (ISSR) sequences amplified using tri- and tetra-nucleotide primers from DNA of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.). *Genome* 45: 890-896.
- Bornet B., F. Goraguer, G. Joly y M. Branchard. 2002b. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome* 45: 481-484.
- Casu M., F. Maltagliati, P. Cossua, T. Lai, M.C. Galletti, A. Castelli y J.A. Commito. 2005. Fine-grained spatial genetic structure in the bivalve *Gemma gemma* from

- Maine and Virginia (USA), as revealed by Inter-Simple Sequence Repeat markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 325:46– 54
- Charters Y.M. y M.J. Wilkinson. 2000. The use of self-pollinated progenies as 'in-groups' for the genetic characterization of cocoa germplasm. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 160–166.
- Colin R. 2006. Análisis de la diversidad genética y estructura poblacional de *Agave xylonacantha* (Agavaceae) utilizando Inter simple sequence repeat (ISSR) como marcador molecular. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Dawson I. K., A. J. Simons, R. Waugh y W. Powell. 1995. Diversity and genetic differentiation among subpopulations of *Gliricidia sepium* revealed by PCR-based assays. *Heredity* 74: 10–18.
- Ducarme V. y R. Wesselingh. 2005. Detecting hybridization in mixed populations *Rhinanthus minor* and *Rhinanthus angustifolius*. *Folia Geobotanica* 40: 151–161.
- Espinosa L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: L.E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (comps.). *Ecología Molecular* 251–278. SEMARNAT, INE, UNAM, CONABIO. México.
- Esselman E.J., L. Jianqiang, D.J. Crawford, J. L. Windus y A.D. Wolfe. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology* 8: 443–451.
- Excoffier L., P. E. Smouse y J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- Excoffier L. y G. Heckel. 2006. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nature Review Genetics* 7: 745–758.
- Falush D., M. Stephens y J. K. Pritchard. 2003. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics* 164: 1567–1587.
- Falush D., M. Stephens y J.K. Pritchard. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7: 574–578.
- Fernández M. E., A. M. Figueiras y C. Benito. 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 845–851.



- Galaev A. V., L. T. Babaiants y M. Sivolap. 2003. Detection of the introgression of genome elements of *Aegilops cylindrica* Host. into *Triticum aestivum* L. genome with ISSR-analysis. *Tsitologia Genetica* 3:3-8.
- Ge X. J., Y. Yu, N. X. Zhao, H. S. Chen y W. Q. Qi. 2003. Genetic variation in the endangered Inner Mongolia endemic shrub *Tetraena mongolica* Maxim. (Zygophyllaceae). *Biological Conservation* 111: 427-434.
- González G. A. 2004. Biología reproductiva y genética de poblaciones del *Agave garciae-mendozae*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.
- Hardy O. J. y X. Vekemans. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2: 618-620.
- Holsinger K. E. y L. E. Wallace. 2004. Bayesian approaches for the analysis of population genetic structure: an example from *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). *Molecular Ecology* 13: 887-894.
- Holsinger K. E., P. O. Lewis y K. Dey. 2002. A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. *Molecular Ecology* 11:1157-1164.
- Isabel N., J. Beaulieu, P. Theriault y J. Bousquet. 1999. Direct evidence for biased gene diversity estimates from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. *Molecular Ecology* 8: 477-483.
- Joshi S.P., V. S. Gupta y R. K. Aggarwal. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1311-1320.
- Kantety R.V., X.P. Zeng, J.L. Bennetzen y B.E. Zehr. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Molecular Breeding* 1:365-373.
- Kochieva E.Z., N.N. Ryzhova, I.A. Khrupalova y V.A. Pukhalskyi. 2002. Genetic diversity and phylogenetic relationships in the genus *Lycopersicon* (Tourn.) Mill. as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. *Russian Journal of Genetics* 38: 958-966.
- Krauss S. L. 2000. Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology* 9: 1241-1245.
- Liu B. y J. F. Wendel. 2001. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes* 1: 205-208.
- Lynch M. y B.G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3:91-99.

- Mariette S., V. Le Corre, F. Austerlitz y A. Kremer. 2002. Sampling within the genome for measuring within-population diversity: trade-offs between markers. *Molecular Ecology* 11: 1145-1156.
- Mengistu L. W. y C. G. Messersmith. 2002. Genetic diversity of *Kochia*. *Weed Science* 50: 498-503.
- Miller M. P. 1997. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.
- Moreno S., J.P. Martin y J.M. Ortiz. 1998. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica* 101: 117-125.
- Nagaoka T. y Y. Ogihara. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 597-602.
- Nagaraju J., M. Kathirvel, R. Ramesh Kumar, E. A. Siddiq-Dagger y S.E. Hasnain. 2002. Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:5836-5841.
- Natcheva R. y N. Cronberg. 2007. Recombination and introgression of nuclear and chloroplast genomes between the peat mosses, *Sphagnum capillifolium* and *Sphagnum quinquefarium*. *Molecular Ecology* 16:811-818.
- Navarro Q. A. 1999. Estructura genética y procesos de especiación de *Agave cerulata* (Trel.) y *Agave subsimplex* (Trel.) en el desierto sonorense a partir de RAPDs. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F. 96 pp.
- Navarro-Quezada A., R. González-Chauvet y F. Molina-Freaner. 2003. Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex of the Sonoran desert. *Heredity* 90: 220-227.
- Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13:1143-1155.
- Nybom H. y V. Bartish. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 3:93-114.
- Otero A. A., M. De la Cruz y K. Oyama. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60:85-117.
- Oyama K., S. Hernández-Verdugo, A. González-Rodríguez, P. Sánchez-Peña, J.A. Garzón-Tiznado y A. Casas. 2006. Genetic structure of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from northwestern Mexico analyzed by RAPDs. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 553-562.

- Parker P.G., A.A. Snow, M.D. Schug, G.C. Booton y P.A. Fuerst. 1998. What molecules can tell us about population: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79:361-382.
- Petros Y., A. Merker y H. Zeleke. 2007. Analysis of genetic diversity of *Guizotia abyssinica* from Ethiopia using inter simple sequence repeat markers. *Hereditas* 144:18-24.
- Pradeep-Reddy M., N. Sarla y E.A. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Pritchard J.K., M. Stephens y P. Donnelly. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155: 945-959.
- Pujar S., S. A. Tamhankar, V. S. Gupta, V. S. Rao y P. K. Ranjekar. 2002. Diversity analysis of Indian tetraploid wheat using intersimple sequence repeat markers reveals their superiority over random amplified polymorphic DNA markers. *Biochemical Genetics* 40: 63-69.
- Ramesha B. T., G. Ravikanth, M.N. Rao, K.N. Ganeshiah y R.U. Shaanker. 2007. Genetic structure of the rattan *Calamus thwaitesii* in core, buffer and peripheral regions of three protected areas in central Western Ghats, India: do protected areas serve as refugia for genetic resources of economically important plants? *Journal of Genetics* 86: 9-18.
- Raymond M. y F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2) population genetic software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Rentería M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. En L.E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (comps.). *Ecología Molecular*. 251-278. SEMARNAT, INE, UNAM, CONABIO. México.
- Rives R. C. 2009. Diversidad clonal y estructura genética espacial en escala fina de *Agave striata* Zucc. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.
- Rocha M. y J. Gasca. 2007. Ecología molecular de la conservación. En: L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (comps.). *Ecología Molecular*. 251-278. SEMARNAT, INE, UNAM, CONABIO. México.
- Russell J.R., J.D. Fuller, M. Macaulay, B.G. Hatz, A. Jahoor, W. Powell y R. Waugh. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theoretical and Applied Genetics* 95:714-722.
- Saini N., S. Jain y R.K. Jain. 2004. Assessment of genetic diversity within and among Basmati and non-Basmati rice varieties using AFLP, ISSR and SSR markers. *Euphytica* 140 (3): 133-146 2004.

- Sánchez de la Hoz M.P., J.A. Dávila, Y. Loarce y E. Ferrer. 1996. Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley. *Genome* 39: 112–117.
- Scheinvar G.E. 2008. Genética de poblaciones silvestres y cultivadas de dos especies mezcaleras: *Agave cupreata* y *Agave potatorum*. Tesis de Maestría. Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Smith J. F. y T. A. Bateman. 2002. Genetic differentiation of rare and common varieties of *Eriogonum shockleyi* (Polygonaceae) in Idaho using ISSR variability. *Western North American Naturalist* 62: 316–326.
- Szmidt A. E., X. R. Wang y M.Z. Lu. 1996. Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L.), using haploid tissue analysis. *Heredity* 76: 412–420.
- Tikunov Y. M., L. I. Khrustaleva y G. I. Karlov. 2003. Application of ISSR markers in the genus *Lycopersicon*. *Euphytica* 131: 71–80.
- Tsumura Y., K. Ohba y S.H. Strauss. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical and Applied Genetics* 92: 40–45.
- Trejo L. 2006. Genética de poblaciones de *Agave striata* Zucc. Tesis de Maestría, Instituto de Ecología, UNAM.
- Vijayan K., P.P. Srivastava y A.K. Awasthi. 2004. Analysis of phylogenetic relationship among five mulberry (*Morus*) species using molecular markers. *Genome* 47:439–448.
- Williams J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski y S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531–6535.
- Wolfe A. D. 2005. ISSR techniques for evolutionary biology. *Methods in Enzymology* 395: 134–144.
- Wolfe A. D. y A. Liston. 1998. Contribution of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. En D. E. Soltis, P. S. Soltis y J. J. Doyle (eds.), *Molecular systematics of plants*, 43–86. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Wolfe A.D. y C.P. Randle. 2001. Relationships within and among species of the holoparasitic genus *Hyobanche* (Orobanchaceae) inferred from ISSR banding patterns and nucleotide sequences. *Systematic Botany* 26: 120–130.
- Wolfe A.D., Q.Y. Xiang y S.R. Kephart. 1998a. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Molecular Ecology* 7:1107–1125.

- Wolfe A.D., Q.Y. Xiang y S.R. Kephart.1998b. Diploid hybrid speciation in *Penstemon* (Scrophulariaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:5112–5115.
- Zhivotovsky L. A. 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant markers. *Molecular Ecology* 8: 907-913.
- Zietkiewicz E., A. Rafalski y D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.



# AFLP: POLIMORFISMOS EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Alejandra Serrato Díaz<sup>1</sup> y Selene Ramos Ortiz<sup>2</sup>

## INTRODUCCIÓN

Los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados, mejor conocidos como AFLP por sus siglas del inglés *Amplified Fragment Length Polymorphism*, pertenecen al grupo de marcadores moleculares multi-locus que permiten analizar al azar regiones de ADN distribuidas en todo el genoma sin tener conocimiento previo de éste (Simpson 1997a, Simpson et al. 1999).

Los AFLP consisten en la digestión completa del ADN genómico total con enzimas de restricción, seguida de la amplificación selectiva de los fragmentos obtenidos para detectar polimorfismos debidos a mutaciones en la secuencia de ADN en, o cerca de, los sitios de restricción. Los polimorfismos se detectan por electroforesis como un patrón de fragmentos de ADN amplificados (bandas) que difieren en número y tamaño, este patrón es altamente específico y debido a las restricciones de la técnica es altamente reproducible (Simpson 1997b, Simpson et al. 1999).

<sup>1</sup> Departamento de Hidrobiología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, colonia Vicentina, 09340 México, D.F. alej@xanum.uam.mx.

<sup>2</sup> Laboratorio de Genética de la Conservación. Centro de Investigaciones en Ecosistemas, UNAM, Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701. Col. Ex-Hacienda de San José de La Huerta C.P. 58190. Morelia Michoacán, México. lunaramos@ceico.unam.mx.

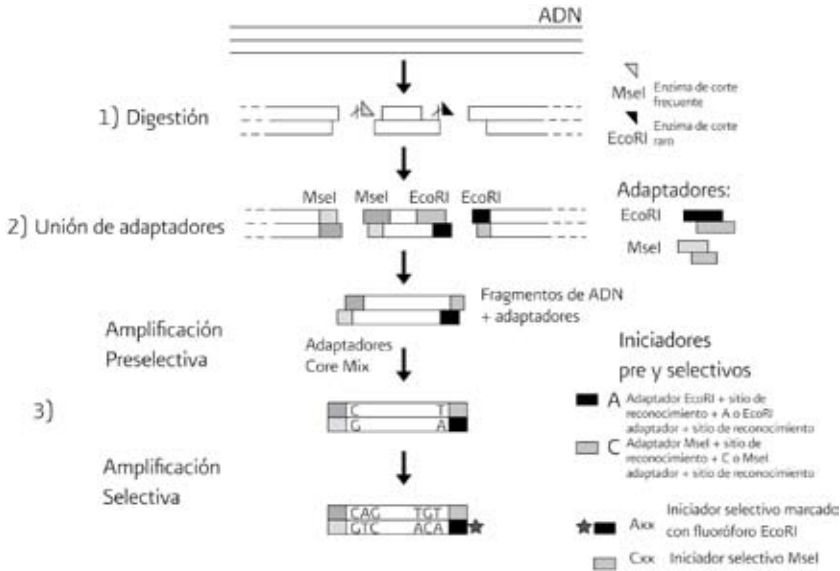
Marc Zabeau, de la compañía Dutch Keygene, desarrolló la técnica, pero Vos *et al.* (1995) la publicaron por primera vez con la finalidad de detectar fragmentos de restricción por medio de la amplificación por PCR y generar huellas génicas. Sin embargo, su uso se amplía a diversas áreas de investigación en 1996, cuando Powell *et al.* sugieren que los AFLP proporcionan altos niveles de resolución y permiten la delimitación de estructuras genéticas complejas.

El desarrollo de la técnica combina tres pasos principales: 1) La digestión del ADN genómico total con dos enzimas de restricción, una de corte raro y una de corte frecuente, generalmente se utilizan *MseI*, que reconoce y corta 4 pares de bases (pb), y *EcoRI*, que reconoce y corta 6 pb dentro de una secuencia. 2) La unión de secuencias específicas (adaptadores) a los bordes de los fragmentos generados por la restricción. En este paso, se generan extremos con una secuencia conocida que permitirá que el fragmento sea amplificado mediante PCR. 3) Dos reacciones de PCR, la primera, conocida como amplificación preselectiva, se lleva a cabo con iniciadores que corresponden a la secuencia específica del adaptador que se unió a los bordes digeridos más un nucleótido extra (A, G, C, o T) en el extremo 3' (Figura 1). Este proceso permite discriminar entre todos los fragmentos de restricción que se forman y amplificar solo aquellos en donde los iniciadores encuentren las secuencias complementarias tanto para el adaptador como para la base adicional. Se asume que el 25% de todos los fragmentos están en igual probabilidad de tener A, C, T o G en cada sitio. Con los productos obtenidos de la amplificación se hace la segunda PCR, conocida como amplificación selectiva. Aquí se utilizan iniciadores con la misma secuencia que los usados en la amplificación preselectiva más dos o tres bases adicionales, dependiendo de la complejidad del genoma, por lo que sólo se amplifica una porción del genoma fragmentado (Vos *et al.* 1995, Wolfe y Liston 1998). Uno de los iniciadores (normalmente el homólogo al sitio de restricción de corte raro) es etiquetado con radioactividad, quimioluminiscencia o con un fluoróforo para que se pueda detectar el fragmento (Simpson 1997a, Simpson *et al.* 1999). Al final de la técnica se tienen fragmentos de diferentes tamaños que se separan fácilmente por electroforesis en geles de acrilamida o en un capilar por medio de un secuenciador automático, en caso de no tener los iniciadores marcados se pueden teñir los geles de acrilamida con plata para visualizar los fragmentos (Lin *et al.* 1997).

Debido a la posibilidad de usar diferentes combinaciones de iniciadores selectivos y diferentes enzimas de restricción, los AFLP constituyen una herramienta poderosa en la detección de polimorfismos a lo largo del genoma (Vos *et al.* 1995).



Figura 1. Diagrama del método de AFLP. Las etapas de la técnica se indican a la izquierda y los componentes a la derecha. Con negro se simbolizan las enzimas de restricción (triángulos), adaptadores e iniciadores para *EcoRI* (enzima de corte raro) y con gris los de *MseI* (enzima de corte frecuente). La estrella representa la marca (fluoróforo o radiactividad) en el extremo 5' (modificado de protocolo, Applied Biosystems, 2005).



## PROTOCOLO

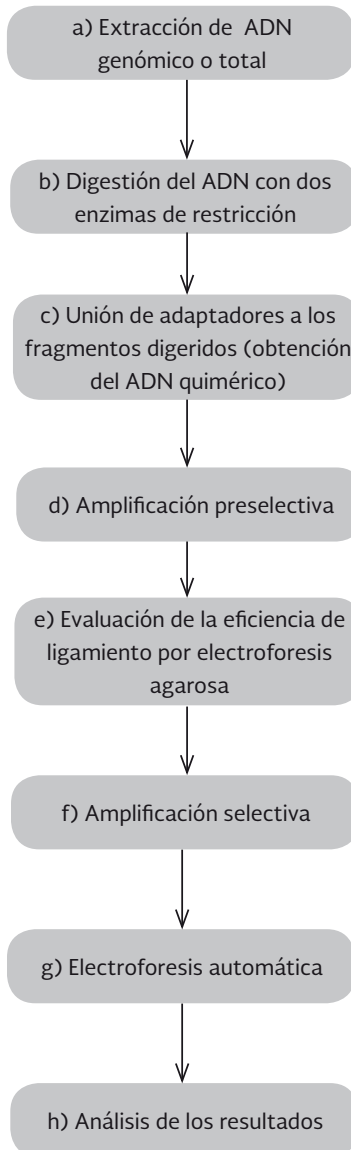
Este protocolo se utiliza para analizar las muestras en un equipo automático (secuenciador) con electroforesis capilar.

### Equipo

- Biofotómetro o espectrofotómetro
- Sistema de fotodocumentación
- Microcentrífuga
- Micropipetas, 2 µl, 20 µl y 200 µl
- Termociclador de gradiente
- Secuenciador automático
- Termobañó

## Etapas de la técnica

Éstas son las etapas básicas que se llevan en cualquier protocolo de AFLP. Sin embargo, en algunos casos se pueden desarrollar pasos adicionales para verificar la calidad del ADN o algunos pasos se combinan y desarrollan en una sola etapa.



## Material

- Tubos de microcentrífuga estériles 0.5 ml
- Tubos de PCR estériles de 0.2 ml.
- Placas para PCR de 96 pozos
- Guantes de látex, vinil o nitrilo
- Gradillas para tubos de 1.5 ml y 0.2 ml
- Puntas para micropipetas de 10 y 200  $\mu$ l
- Baño de hielo

## Reactivos

- ADN
- Agua didestilada estéril (dde)
- $MgCl_2$  (1.5 mM)
- dNTPs (0.2 mM)
- *Taq* ADN polimerasa
- TAE 1X (Tris acetato 40 mM, EDTA (CAS N° 60-00-42) 2 mM, pH 8.3)
- Amortiguador de carga (65% p/v sacarosa (CAS N° 57-50-1), 10 mM Tris HCl pH 7.5, 10 mM EDTA (CAS 60-00-42), 0.3% p/v de azul de bromofenol (CAS N° 115-39-9))
- Marcador de peso molecular 1 kb
- Bromuro de etidio (CAS N° 239-45-8)
- Agarosa (CAS N° 9012-36-6)
- *Eco*RI endonucleasa de restricción, 500 Unidades (grado “alta concentración”)
- *Mse*I endonucleasa de restricción, 100 Unidades (grado “alta concentración”)
- Ligasa T4 ADN, 100 Unidades (grado “alta concentración”)
- Buffer de ligasa T4 ADN con ATP
- NaCl, 0.5 M, libre de nucleasa
- Albúmina sérica bovina (BSA) 10 mg/ml
- Buffer TE 1X (20 mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH 8.0)
- Polímero (matriz para la electroforesis)
- Formamida desionizada (Hi-Di) (CAS N° 75-12-7)
- Marcador de peso molecular Gene-Scan-500 ROX tamaño estándar

- Kit estándar de Primers (iniciadores) Dye
- Matriz estándar NED
- Iniciadores preselectivos (El iniciador *MseI* complementario contiene un 3' C. El iniciador *EcoRI* complementario contiene un 3' A o sin adición de base)
- Iniciador de amplificación selectiva *MseI* (oligo-Cxx), *EcoRI* (Dye-oligo-Axx)
- Core mix (amortiguador, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, BSA, *Taq* polimerasa)

## Método

Este protocolo es para electroforesis automática utilizando las enzimas de digestión *EcoRI* y *MseI*.

### Antes de empezar

- Elegir los iniciadores que se utilizarán en la amplificación selectiva. Es necesario probar el mayor número de combinaciones que sea posible, con el fin de hacer una selección detallada.
- Seleccionar los pares de iniciadores que generen el mayor número de bandas polimórficas (Tabla 1).
- Cuantificar el ADN genómico y realizar una digestión de prueba para asegurarse que no contiene inhibidores de las enzimas de restricción.
- Desnaturalizar los adaptadores *MseI* y *EcoRI* a 95° C por 5 minutos, dejarlos enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos y centrifugar a 4 000 rpm por 10 segundos para que se ligan eficientemente al ADN.

1. Extracción de ADN genómico.
  - 1.1 Extraer el ADN con el método que se elija, siempre y cuando garantice un ADN íntegro y sin inhibidores de enzimas (véase capítulo de extracción de ADN).
2. Digestión de ADN con enzimas de restricción y unión de adaptadores a los fragmentos digeridos (obtención del ADN quimérico).
  - 2.1 Mezclar en un tubo de 1.5 ml los siguientes reactivos: 1 µl de amortiguador de ADN ligasa, 1 µl de NaCl 0.5M, 0.5 µl de albúmina sérica bo-

vina (BSA) 1 mg/ml, 1 µl de adaptador MseI, 1 µl de adaptador EcoRI, 0.2 µl EcoRI, 0.2 µl MseI, 0.5 µl de amortiguador para MseI, 4 µl agua dde, 0.1 µl ligasa del bacteriófago T4 10X que incluye ATP y 0.5 µg de ADN genómico.

2.2 Agitar la mezcla por inversión durante 10 segundos e incubarla a 37°C por 2 horas.

2.3 Agregar 189 µl de buffer TE 1X y mezclar por inversión.

2.4 Almacenar la muestra a 2-6°C hasta que se realice la amplificación preselectiva.

### 3. Amplificación preselectiva.

3.1 Mezclar en un tubo de 0.2 ml: 4 µl de la mezcla del paso anterior (reacción de ligación-restricción diluida), 1 µl de los pares de iniciadores preselectivos AFLP (El iniciador MseI complementario contiene un extremo 3' con C. El iniciador EcoRI complementario contiene un extremo 3' con A o sin adición de base) y 15 µl de la solución Core mix (amortiguador para PCR, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, BSA, Taq polimerasa).

3.2 Llevar la mezcla al termociclador con los siguientes parámetros:

32 ciclos	{	72°C	2 minutos
		94°C	20 segundos
		56°C	30 segundos
		60°C	30 minutos
		4°C	hasta almacenar en un refrigerador

### 4. Evaluación de la eficiencia de ligamiento.

4.1 Correr 10 µl del producto de la reacción en un gel de agarosa al 1.5 % en buffer TBE 1X a 4V/cm durante 3-4 horas para verificar la amplificación.

4.2 Teñir el gel de agarosa con bromuro de etidio.

4.3 Observar el gel en el sistema de fotodocumentación, si la muestra amplificó adecuadamente se observará un barrido (Figura 2).

4.4 Agregar 190 µl de buffer TE 1X a 10 µl del producto de preamplificación

4.5 Almacenar a 2-6°C hasta la amplificación selectiva (Vos *et al.* 1995, Caicedo *et al.* 1999, Simpson *et al.* 1999).

### 5. Amplificación selectiva

5.1 Mezclar en un tubo para PCR: 3 µl del producto diluido de la reacción de

Figura 2. Electroforesis de la amplificación preselectiva de reacciones de AFLP. Carril 1) marcador de tamaño molecular 1kb, carriles 2, 3, 4, 5 y 6) Producto de preamplificación de AFLP en un rango de ~ 100-1500 pb.

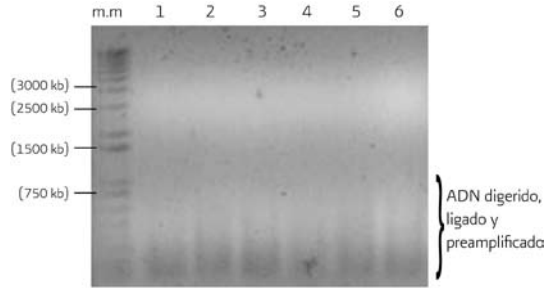


Tabla 1. Ejemplo de una selección de 23 combinaciones de iniciadores para el análisis AFLP. Los cuadros con asteriscos indican las combinaciones probadas, los cuadros con estrellas (CAC/AAG, CAT/AAG, CTG/AAG) son los pares de iniciadores propuestos para un análisis debido a que su amplificación fue exitosa y con polimorfismos.

		<i>MseI</i>							
		CAA	CAC	CAG	CAT	CTA	CTC	CTG	CTT
<i>EcoRI</i>	AAC	*			*				*
	AAG		*		*	*	*		
	ACA	*		*			*		
	ACC				*	*			
	ACG				*	*			
	ACT			*	*		*		
	AGC		*					*	
	AGG	*			*				*

preamplificación, 1  $\mu$ l *MseI* (iniciador-Cxx) 5  $\mu$ M, 1  $\mu$ l *EcoRI* [Dye-iniciador-Axx] 1  $\mu$ M, 15  $\mu$ l AFLP Core Mix.

5.2 Colocar las muestras en un termociclador de gradiente con los siguientes parámetros:

6. Electroforesis automática.

Los productos de las reacciones se separan mediante electroforesis capilar (EC) en un equipo secuenciador.

Hold (mantener)	No. de ciclos			
94 °C 2 min	94 °C 20 s	66 °C 30 s	72 °C 2 min	1
	94 °C 20 s	65 °C 30 s	72 °C 2 min	1
	94 °C 20 s	64 °C 30 s	72 °C 2 min	1
	94 °C 20 s	63 °C 30 s	72 °C 2 min	1
	94 °C 20 s	62 °C 30 s	72 °C 2 min	1
	94 °C 20 s	61 °C 30 s	72 °C 2 min	1
	94 °C 20 s	60 °C 30 s	72 °C 2 min	1
	94 °C 20 s	59 °C 30 s	72 °C 2 min	1
	94 °C 20 s	58 °C 30 s	72 °C 2 min	1
	94 °C 20 s	57 °C 30 s	72 °C 2 min	1
	94 °C 20 s	56 °C 30 s	72 °C 2 min	20
60 °C 30 min	1			
4 °C				

6.1 Para cada muestra mezclar: 4 µl del producto de amplificación selectiva, 0.5 µl del marcador de tamaño molecular GenScan-500 ROX (tamaño Standard) y 15 µl de formamida desionizada y cargarlas en una placa para PCR de 96 pozos.

6.2 Incubar la muestra durante 15 min a 95°C para desnaturalizarla.

6.3 Colocar inmediatamente en hielo durante 15 minutos.

6.4 Llevar al secuenciador y programar la electroforesis: inyección de 5 segundos a 15 (kilo volts) kV, electroforesis durante 30 minutos a 60°C y 15 kV, con el filtro C.

7. Análisis de resultados.

7.1 Analizar las bandas.

## MÉTODOS DE ANÁLISIS

Los tipos de análisis que se pueden realizar con marcadores multilocus dominantes, se pueden separar en dos grupos principales: los poblacionales y los filogenéticos (Meudt y Clarke 2007). Pero, independientemente del análisis que se desee realizar, el primer paso es construir una matriz binaria con los datos obtenidos.

## Construcción de la matriz binaria

Cada uno de los fragmentos es considerado como un caracter y la presencia o ausencia de ellos son los estados de caracter (Figura 3).

Cuando la electroforesis se realiza en capilar, cada uno de los fragmentos amplificados es representado como un pico. Cuando se realiza en geles, se observa como una banda. En la matriz binaria se codifica la presencia del fragmento como 1 y la ausencia como 0 (Figura 3). Para la electroforesis en capilar, el secuenciador proporciona un electroferograma para cada una de las muestras (Figura 4). La información de cada electroforesis se concentra en una matriz general la cual se analiza de acuerdo a los objetivos del estudio.

Figura 3. Codificación de la matriz binaria

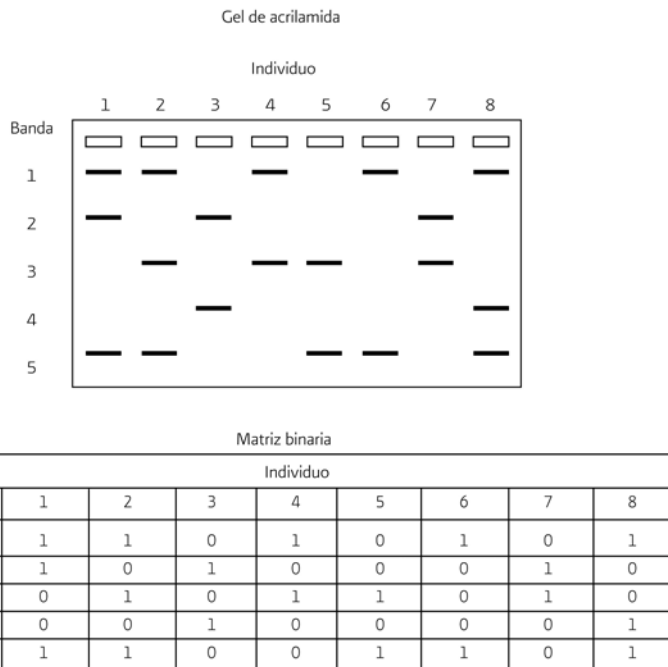
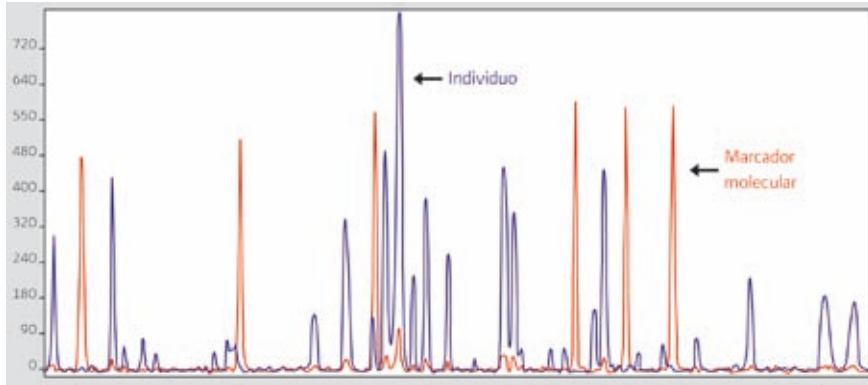




Figura 4. Electroferograma de una corrida de AFLP de un individuo. En esta electroforesis se usó el marcador molecular GeneScan-500 ROX en el secuenciador ABI 3100.



## Análisis poblacional

En este tipo de estudios, se busca principalmente estimar y analizar la diversidad genética dentro y entre poblaciones. Sin embargo, el cálculo de la frecuencia de alelos con marcadores dominantes es limitado debido a que la presencia de una banda o pico indica la condición dominante homociga y heterociga. Sin embargo, existen métodos de análisis que se pueden aplicar en numerosos paquetes computacionales, lo cual permite estimar diferentes parámetros de genética de poblaciones a partir de este tipo de marcadores (ver capítulo de RAPD e ISSR, Meudt y Clarke 2007).

## Métodos de análisis

Entre los principales métodos se encuentran:

- a) *Análisis de varianza molecular (AMOVA)*. Este modelo, estima y compara la variación genética dentro y entre poblaciones directamente de datos moleculares y prueba hipótesis evolutivas acerca de esa diferenciación, de esta manera se puede inferir cómo se encuentra repartida la variación genética dentro de la especie (Excoffier 2001).
- b) *Análisis de coordenadas principales (ACP)*. Este análisis permite encontrar y visualizar los patrones dentro de una matriz de datos multivariados. Grafica

la relación entre los elementos de la matriz de distancia. El propósito general es interpretar las similitudes y las disimilitudes entre los individuos de manera simple.

## Análisis filogenéticos

El uso de AFLP para reconstrucciones filogenéticas se ha vuelto cada vez más frecuente debido a que en diferentes estudios se ha encontrado que las bases de datos generadas con AFLP proporcionan señal filogenética (Meudt y Clarke 2007). Existen varios métodos de análisis que permiten hacer inferencias filogenéticas, a continuación se mencionan algunos de ellos.

### Métodos de análisis

Entre los principales métodos se encuentran:

a) *Métodos basados en distancia*. Las medidas de divergencia pueden usarse para estimar el número de cambios evolutivos y éstos se pueden representar en un árbol filogenético (Martínez 2007). Los análisis se pueden realizar con la matriz binaria directamente o se puede convertir en una matriz de distancia usando medidas de disimilitud, dependiendo del análisis que se realice y del paquete que se utilice.

- UPGMA. El UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*/ método no ponderado de grupos de pares con media aritmética) es el método de reconstrucción filogenética más sencillo, inicialmente se usaba para construir árboles taxonómicos que reflejaban las similitudes fenotípicas entre los pares de unidades taxonómicas operativas (OTUs por sus siglas en inglés), en función del promedio de sus distancias. Sin embargo, puede ser utilizado para construir árboles filogenéticos si las tasas de evolución de los marcadores usados son aproximadamente constantes entre linajes, de tal forma que exista una relación aproximada entre la distancia evolutiva y el tiempo de divergencia (Hedrick 2000, Martínez 2007).
- *Neighbor joining*. Otro criterio de análisis de distancias es el de *neighbor joining* (Saitou y Nei 1987) (“vecino más cercano”). El principio de este

método es encontrar pares de OTUs que reducen al mínimo la longitud total de la rama en cada etapa de agrupamiento. El análisis inicia con un árbol en forma de estrella en el que todos los OTUs están enlazados a un nodo central y se insertan las ramas entre el par de vecinos más cercanos. Por lo tanto, este método permite obtener las longitudes de las ramas y la topología del árbol parsimonioso rápidamente, además permite manejar un gran número de OTUs (Martínez 2007).

b) *Métodos basados en caracteres*. Estos métodos tienen como objetivo encontrar los árboles que optimizan la distribución de los patrones observados para cada carácter (Martínez 2007).

- *Modelo de parsimonia*. Busca postular una historia de ancestría y descendencia al construir el árbol más corto (con el número mínimo de cambios de estados de carácter) que se ajuste a los datos. El problema es que es frecuentemente se encuentra más de un árbol con el mismo número mínimo de pasos (Goloboff 1997, Nixon 1999, Swofford 2002, Martínez 2007).

c) *Modelos probabilísticos*. Examinan qué tan bien un árbol explica los datos. Se pueden llevar a cabo con los métodos de:

- *Máxima verosimilitud (maximum likelihood)*. Es un método eficiente y poderoso que se basa en modelos probabilísticos de evolución de caracteres, estima la probabilidad de que un conjunto de datos represente un proceso que realmente ocurre. Busca el modelo y las longitudes de ramas de un árbol que maximice la probabilidad de observar los datos (De Luna et al. 2005, Lou y Larget 2009).
- *Método bayesiano*. Calcula las probabilidades posteriores de los árboles. Es un método rápido que representa la probabilidad de la hipótesis filogenética dados los datos, es decir, produce probabilidades para las hipótesis de interés (De Luna et al. 2005, Luo y Larget 2009).

## APLICACIONES

En 1995, Vos y colaboradores estaban interesados en generar con los AFLP mapas genéticos de alta densidad. Sin embargo, debido al alto polimorfismo revelado y

por su reproducibilidad, se ha hecho uso de ellos en muchos campos de investigación como:

### **Caracterización genética**

Por la gran cantidad de bandas reproducibles que generan, son una herramienta muy importante en la caracterización molecular de especies de importancia económica y sobre todo, de organismos difíciles de determinar a nivel morfológico (Picardeau *et al.* 1997).

### **Escaneo genómico y expresión de genes**

Son una herramienta importante para evaluar la presencia o expresión de genes bajo ciertas condiciones. En este tipo de estudios es necesario analizar el patrón de bandedo del cDNA en los grupos que se desean comparar (e.g. exposición de algunos individuos a sustancias tóxicas en diferentes tiempos o concentraciones, o en especies con variabilidad en resistencia a alguna plaga, o con diferencias en fecundidad y morfología floral, etc.) las bandas que son exclusivas del sistema de estudio se aíslan y se caracterizan por secuenciación. De esta manera se ha determinado la expresión de genes conocidos, genes de función desconocida y genes nuevos (Chen y Yang 2009, Baldo *et al.* 2010, Piessens *et al.* 2010, Wang *et al.* 2010, Zheng *et al.* 2010).

### **Transferencia horizontal de genes**

Se han utilizado también para analizar el movimiento de los genes incluso entre organismos de especies diferentes, como en la evaluación de transferencia de genes de arroz transgénico hacia microorganismos del suelo (Paoletti *et al.* 2006, Kim *et al.* 2010).

### **Diversidad genética**

Desde sus inicios, la técnica ha sido ocupada principalmente para determinar la diversidad genética de las poblaciones en una amplia variedad de grupos, principalmente en plantas, bacterias y hongos, y en menor grado en algunos invertebrados, en peces, aves y mamíferos (Mueller y Wolfenbarger 1999, Bonin *et*

*al.* 2007, Franklin *et al.* 2010). Este tipo de datos ha sido muy útil en trabajos de agricultura y conservación de la diversidad genética (Zhang *et al.* 2010).

## **Estructura genética**

El objetivo de muchos trabajos en ecología molecular es conocer cuál es la estructura genética de las poblaciones, pues a partir de ésta, se puede estimar la migración, identificar unidades de conservación, estimar patrones filogeográficos e inferir eventos y patrones como la fragmentación del hábitat, restricción de flujo génico, endogamia y aislamiento por distancia (Franklin *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2010). Por lo tanto, los AFLP han sido particularmente útiles para evaluar la estructura poblacional de muchos grupos a pequeñas y grandes escalas (Bonin *et al.* 2007).

## **Introgresión e hibridación**

La identificación de individuos híbridos y de cruzas entre especies diferenciadas es importante en investigaciones que abordan tópicos como especiación, zonas híbridas y biología de la conservación. Los AFLP permiten diferenciar entre especies muy relacionadas como en el caso de híbridos, así como identificar eventos de hibridación e introgresión (González-Rodríguez *et al.* 2004).

## **Estudios filogenéticos**

A pesar de que no son el marcador ideal para inferir filogenias, se han aplicado en diferentes grupos debido a la cantidad de información que proporcionan, sobre todo de grupos de organismos estrechamente relacionados y en especies que han radiado recientemente. Generalmente se utilizan en combinación con otros marcadores moleculares como secuencias de ADN o marcadores morfológicos (Hongtrakul *et al.* 1997, Barret *et al.* 1998, Kardolus *et al.* 1998, Breyne *et al.* 1999, Mace *et al.* 1999, Loh *et al.* 2000, Roldán-Ruiz *et al.* 2000, Xu *et al.* 2000, Ramos-Ortiz 2007, Serrato 2007).

En general, los AFLP son un marcador muy útil en los siguientes casos:

- Cuando no se tiene información sobre el genoma
- Para estudios intra-específicos

- Cuando la variabilidad genética entre los grupos de estudio es baja
- En organismos poliploides
- En eventos de hibridación
- Cuando se necesita generar datos de manera rápida
- Cuando se tiene ADN de alta calidad
- Cuando se tiene acceso al equipo y material requerido

## VENTAJAS Y DESVENTAJAS

Los AFLP proporcionan muchas ventajas, entre las que se pueden mencionar: 1) son un marcador neutral (no están sujetos a presión de selección), 2) proveen información de todo el genoma del organismo, 3) no requieren información previa del genoma que se estudia por lo que se puede aplicar a cualquier especie, 4) producen un gran número de bandas polimórficas, 5) son altamente reproducibles debido a que las amplificaciones se realizan bajo condiciones de alta selectividad (alta astringencia), 6) utilizan pequeñas cantidades de ADN, 7) una vez estandarizados pueden ser generados a gran velocidad, 8) pueden ser usados para análisis genéticos de poblaciones, análisis de genética cuantitativa tipo QTL (*quantitative trait loci*) y filogenéticos, 9) el nivel de resolución es bueno tanto en electroforesis como con métodos automatizados como la electroforesis capilar (Mueller y Wolfenbarger 1999).

El analizar los fragmentos en electroforesis capilar proporciona ventajas adicionales, como el evitar el manejo de radioactividad (que requiere un laboratorio y personal autorizados y monitoreo constante). También se elimina el uso de geles de acrilamida que son tóxicos y difíciles de manipular. Se obtiene una mejor resolución, disminuyen los tiempos de electroforesis, la velocidad de migración del fragmento es más constante que en los geles de acrilamida, por lo tanto proporciona medidas más uniformes de intensidad espectral y resultados con un alto grado de reproducibilidad y se eliminan los tiempos de revelado (Kuhn y Hofstetter-Kuhn 1993).

Las desventajas incluyen: 1) el número de pasos es mayor en comparación con otros marcadores dominantes como ISSR y RFLP, 2) no pueden analizarse en geles de agarosa como otros métodos basados en PCR, 3) el costo es alto, comparada con otras técnicas, 4) son un marcador dominante que no permite distinguir a los heterocigos de los homocigos dominantes, 5) las bandas

pueden ser homoplasias (son iguales en tamaño pero su origen es diferente) (Martínez 1997).

## PERSPECTIVAS

Debido a las amplias ventajas que presentan los AFLP, se pensaba que desplazarían a otras técnicas como los RFLP, al menos en algunas aplicaciones. Pero, a pesar de que en la última década han sido ampliamente utilizados, esta predicción no se ha cumplido y otras técnicas como SNPs y microsatélites han sido más aceptadas y aplicadas en muchas áreas de investigación (ver capítulo de microsatélites). Por otro lado, la era genómica ha generado enormes avances en la obtención habitual y rentable de secuencias completas de genomas de especies de los tres dominios (ver capítulo de secuenciación) lo cual tiene el potencial de sustituir y superar a este tipo de marcadores (Meudt y Clarke 2007).

A pesar de lo mencionado, continuamente surgen nuevas aplicaciones de los AFLP para poner a prueba hipótesis evolutivas, por ejemplo, analizar el papel de la selección natural en la configuración de patrones de divergencia en poblaciones silvestres de animales y plantas, en las que se han encontrado valores de  $F_{ST}$  (diferenciación genética) más altos que los esperados bajo neutralidad. También, se han realizado considerables esfuerzos para extraer datos codominantes de los AFLP debido a que fragmentos del mismo tamaño de los diferentes individuos, muestran una diferencia obvia en la intensidad de las bandas, estas diferencias se correlacionan positivamente con el número de copias alélicas. Los individuos homocigos (AA) deben tener una banda o pico más intenso que los heterocigos que sólo tienen una copia del alelo (Meudt y Clarke 2007).

Finalmente, se puede esperar que esta técnica siga siendo útil para muchos biólogos que trabajan con especies que son de baja prioridad para la secuenciación completa del genoma y en estudios poblacionales, pues la técnica de AFLP ofrece una manera rápida de genotipificar a un gran número de individuos con un alto grado de resolución y sin información genética previa. Por lo tanto, los AFLP son una técnica muy útil y adaptable y de ser favorecida por el desarrollo paralelo de los nuevos métodos de análisis, seguirá vigente para responder a importantes preguntas científicas en una gran variedad de disciplinas (Meudt y Clarke 2007).

## BIBLIOGRAFÍA

- Baldo A., J.L. Norelli, R.E. Farrell Jr, C.L. Bassett, H.S. Aldwinckle y M. Malnoy. 2010. Identification of genes differentially expressed during interaction of resistant and susceptible apple cultivars (*Malus x domestica*) with *Erwinia amylovora*. *BMC Plant Biology* 10: 1.
- Barret B.A., K.K. Kidwell y P.N. Fox. 1998. Comparison of AFLP and pedigree-based genetic diversity assessment methods using wheat cultivars from the Pacific Northwest. *Crop Science* 38: 1271-1278.
- Breyne P., D. Rombaut, A. Van Gysel, M. Van Montagu y T. Gerats. 1999. AFLP analysis of genetic diversity within and between *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Molecular and General Genetics* 261: 627-634.
- Bonin A., D. Ehrich y S. Manel. 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionist. *Molecular Ecology* 16: 3737-3758.
- Caicedo A.L., E. Gaitán, M.C. Duque, O. Toro Chica, D.G. Debouck y J. Tohme. 1999. AFLP fingerprint of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America. *Crop Science* 39: 1497-1507.
- Chen L. y G. Yang. 2009. A genomic scanning using AFLP to detect candidate loci under selection in the finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides*). *Genes & Genetic Systems* 84: 307-313.
- De Luna E., J.A. Guerrero y T.T. Chew. 2005. Sistemática Biológica: avances y direcciones en la teoría y los métodos de reconstrucción filogenética. *Hidrobiológica* 15: 351-370.
- Excoffier L. 2001. Analysis of population subdivision. En: D.J. Balding, M. Bishop y C. Cannings (eds). *Handbook of statistical genetics*. John Wiley & Sons, Chichester, United King.
- Franklin M.T., C.E. Ritland y J.H. Myers. 2010. Spatial and temporal changes in genetic structure of greenhouse and field populations of cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Molecular Ecology* 19: 1122-1133.
- Goloboff P.A. 1997. NONA (NO NAME) ver. 2. Published by the author, Tucumán, Argentina.
- González Rodríguez A., D.M. Arias, S. Valencia y K. Oyama. 2004. Morphological and RAPD analysis of hybridization between *Quercus affinis* and *Quercus laurina* (Fagaceae), two Mexican red oaks. *American Journal of Botany* 91: 401-409.



- Hedrick P. W. 2000. *Genetics of populations*. Segunda edición. Jones y Bartlett Publishers, Nueva York, Estados Unidos de América.
- Hongtrakul V., G.M. Huestis y S.J. Knapp. 1997. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sun-flower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 400-407.
- Kardolus J. P., H. J. Van Eck y R.G. Van den Berg. 1998. The potential of AFLPs in biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy (Solanaceae). *Plant Systematic Evolution* 210: 87-103.
- Kim S.E., J.S. Moon, J.K. Kim, W.S. Choi, S.H. Lee y S.U. Kim. 2010. Investigation of possible horizontal gene transfer from transgenic rice to soil microorganisms in paddy rice field. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20: 187-92.
- Kuhn R. y S. Hoffstetter-Kunh. 1993. *Capillary Electrophoresis: Principles and practice*, Springer-Verlag, Berlin, Alemania.
- Lin J.J.M., J. Ambrose y J. Kuo. 1997. Chemiluminescent detection of AFLP fingerprints. *Focus* 19: 36-38.
- Loh J.P., R. Kiew, O. Set, L.H. Gan y Y.K. Gan. 2000. A study of genetic variation and relationships within the Bamboo subtribe *Bambusinae* using Amplified Fragment Length Polymorphism. *Annals of Botany* 85: 607-612.
- Luo R. y B. Larget. 2009. Modeling substitution and indel processes for AFLP marker evolution and phylogenetic inference. *The Annals of Applied Statistics* 3: 222-248.
- Mace E.S., C. G. Gebhardt y R. N. Lester. 1999. AFLP analysis of genetic relationships in the tribe *Datureae* (Solanaceae). *Theoretical and Applied Genetics* 99: 634-641.
- Martínez M. 1997. Sistemática Molecular: Comparación entre diferentes métodos y sus aplicaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 123-136.
- Martínez C. L. 2007. Reconstrucción de la historia de cambio de los caracteres 87-160. En: L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (comps.). *Ecología Molecular*. Secretaría de Medio ambiente y Recursos Naturales, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. México.
- Meudt H. M. y A. C. Clarke. 2007. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *TRENDS in Plant Science* 12:106-117.
- Mueller G. U y L. L. R. Wolfenbarger .1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Tree* 10: 389-394
- Nixon K.C. 1999. *Winclada, program and documentation*. Published by the author, Ithaca, New York.

- Paoletti M., K. W. Buck y C. M. Brasier. 2006. Selective acquisition of novel mating type and vegetative incompatibility genes via interspecies gene transfer in the globally invading eukaryote *Ophiostoma novo-ulmi*. *Molecular Ecology* 15: 249-62.
- Picardeau M., G. Prod'Hom, L. Raskine, M. P. LePenec y V. Vincent. 1997. Genotypic characterization of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 25-32.
- Piessens V., K. Supré, M. Heyndrickx, F. Haesebrouck, S. De Vlieghe y E. Van Coillie. 2010. Validation of amplified fragment length polymorphism genotyping for species identification of bovine associated coagulase-negative staphylococci. *Journal of Microbiological Methods* 80: 287-294.
- Powell W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey y A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germoplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238.
- Ramos-Ortiz S. 2007. Relaciones filogenéticas del género *Quercus*, marcadores moleculares para la serie *Lanceolatae* (sección *Lobatae*). Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia, Michoacán, México.
- Roldan-Ruiz I., J. Dendauw, E. Van Bockstaele, A. Depicker y M. De Loose. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding*. 6: 125-134.
- Saitou N. y M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution* 14: 406-425.
- Serrato A. 2007. Coevolución a nivel macroevolutivo entre *Ficus* (Moraceae) y sus polinizadoras, las avispas Agaonidae. Tesis de Doctorado, Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia, Michoacán, México.
- Simpson J. 1997a. Amplified fragment length polymorphisms (AFLPs). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 119-122.
- Simpson J. 1997b. Molecular markers. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 73-76.
- Simpson J., O. Martínez, A. Mendoza-Herrera, M. Sánchez, F. Hernández y S. Hernández-Delgado. 1999. AFLP analysis of plant genomic DNA. Págs. 85-97. En: 4º Internacional Course on Analysis and manipulation of plant genome. Irapuato CINVESTAV.
- Swofford D.L. 2002. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) ver. 4. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts, United States of America.

- Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper y M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprint. *Nucleic Acids Resource* 23: 4407-4414.
- Wolfe A. D. y A. Liston. 1998. Contributions of PCR-Based methods to plant systematics and evolutionary biology 43-86. *En: D.E. Soltis, P.M. Soltis y J. J. Doyle (eds.). Molecular systematics of plants II DNA sequencing.* New Cork. Kluwer Academia Publisher.
- Wang X., W. Liu, X. Chen, C. Tang, Y. Dong, J. Ma, X. Huang, G. Wei, Q. Han, L. Huang y Z. Kang. 2010. Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction. *BMC Plant Biology* 10:9.
- Xu R.Q., N.Tommoka y D.A.Vaughan. 2000. AFLP markers for characterizing the azuki bean complex. *Crop Science* 40: 808-815.
- Zhang X. M., J. Wen, Z. L. Dao, T. J. Motley y C. L. Long. 2010. Genetic variation and conservation assessment of Chinese populations of *Magnolia cathcartii* (Magnoliaceae), a rare evergreen tree from the South-Central China hotspot in the Eastern Himalayas. *Journal of Plant Research* 123: 321-331.
- Zheng B. S., H. L. Chu, S. H. Jin, Y. J. Huang, Z. J. Wang, M. Chen y J. Q. Huang. 2010. cDNA-AFLP analysis of gene expression in hickory (*Carya cathayensis*) during graft process. *Tree Physiology* 30: 297-303.



# DGGE: ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE

María del Rocío Fernández Suárez<sup>1</sup> y Sylvie Le Borgne<sup>2</sup>

## INTRODUCCIÓN

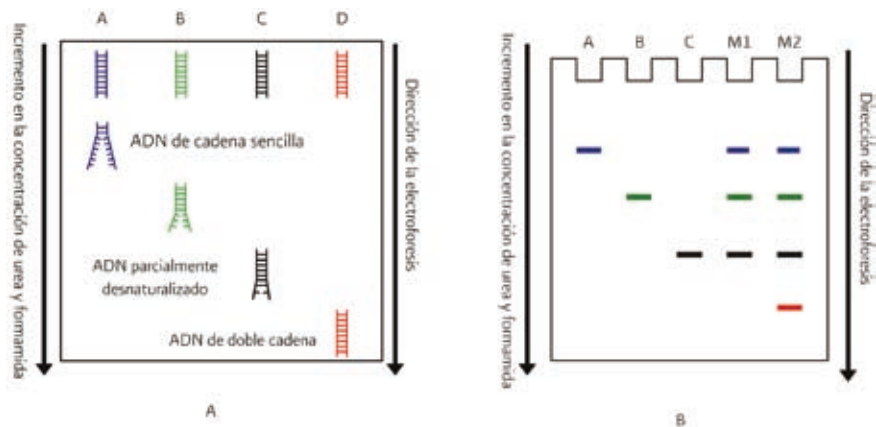
### Definición y origen de la técnica

La DGGE (del inglés: “*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*”) es un tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño pero con diferente secuencia de nucleótidos. Para ello, un gradiente lineal creciente de agentes químicos desnaturizantes del ADN (una mezcla de urea y formamida) se incorpora a lo largo de un gel de poliacrilamida. Durante la electroforesis, se mantiene una temperatura constante de 50-65 °C y los fragmentos de ADN de doble cadena migran por el gel hasta encontrar una determinada concentración de urea y formamida (concentración desnaturizante) a la cual las cadenas se separan localmente y el desplazamiento de las moléculas disminuye o se interrumpe (Figura 1A). La concentración desnaturizante a la cual las cadenas se separan depende de la secuencia de nucleótidos, es decir, del contenido de dobles o triples puentes de hidrogeno dependiendo de si son pares de bases adenina-timina o citosina-guanina (Myers et al. 1987). Así,

<sup>1</sup> Programa Universitario de Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México. fdzrocio@gmail.com.

<sup>2</sup> Universidad Autónoma Metropolitana–Unidad Cuajimalpa. sylvielb@correo.cua.uam.mx.

Figura 1. Principio de la DGGE. A) En la DGGE, fragmentos de ADN del mismo tamaño (fragmentos A, B, C y D) se separan de acuerdo a su secuencia nucleotídica. Aquellos fragmentos de ADN pobres en guanina-citosina (fragmento A) se desnaturalizan a bajas concentraciones de urea y formamida, por lo que su migración en el gel se interrumpe rápidamente y ocupan posiciones superiores. Ocurre lo contrario con los fragmentos de ADN ricos en guanina-citosina (fragmento D), cuya migración por el gel sólo se retarda a altas concentraciones de urea y formamida, ocupando posiciones inferiores. B) M1, mezcla de fragmentos A, B y C; M2, mezcla de fragmentos A, B, C y D.



fragmentos de ADN con secuencias nucleotídicas diferentes tendrán diferentes posiciones en el gel (Figura 1B).

La técnica fue diseñada por Fischer y Lerman (1983), inicialmente para detectar mutaciones puntuales ya que se pueden separar fragmentos de ADN cuyas secuencias de nucleótidos difieren en una sola base nitrogenada (Muyzer y Smalla 1998). Posteriormente, a partir de los trabajos propuestos por Muyzer et al. (1993), los ecólogos microbianos adoptaron la técnica para el análisis de la estructura y dinámica de comunidades microbianas complejas. Así, en la actualidad, la DGGE tiene en la Ecología Microbiana su principal campo de aplicación. Hasta septiembre de 2010, existen clasificados en el sistema bibliográfico PubMed 2,818 publicaciones científicas internacionales con revisión de pares, que mencionan la utilización de la técnica DGGE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>, consultado en octubre de 2010).

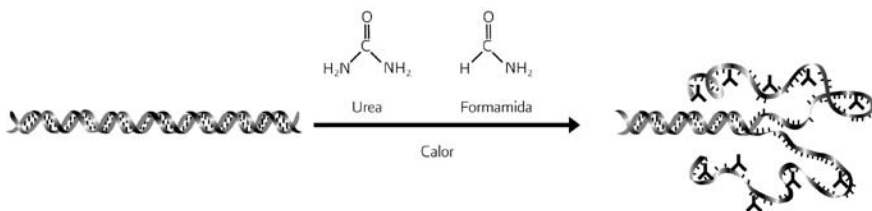
## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

El fundamento teórico de la DGGE radica en las propiedades fisicoquímicas de la molécula de ADN. Dicha molécula contiene dominios con temperaturas de fusión ( $T_m$ ) características, de manera que cuando se alcanza una determinada temperatura (o concentración de un agente químico desnaturizante), la molécula se desnaturaliza total o parcialmente, es decir, se separan las cadenas del ADN al romperse los puentes de hidrógeno que las mantienen unidas (Figura 2). Las temperatura de fusión de esos dominios depende de variaciones en sus secuencias de nucleótidos y, en general, los fragmentos de ADN ricos en guanina-citosina son más estables y sólo se desnaturalizan en cadenas sencillas una vez que alcanzan altas temperaturas o concentraciones de un agente químico desnaturizante (Figura 1A).

El ambiente desnaturizante en la DGGE es asegurado a partir de las siguientes dos condiciones:

- 1) Sometiendo a las moléculas de ADN a una temperatura constante dentro del rango de 50-65 °C. Esta temperatura fue elegida empíricamente para exceder la  $T_m$  de un fragmento de ADN rico en adenina-timina en ausencia de agentes químicos desnaturizantes (Muyzer y Smalla 1998).
- 2) La presencia de urea y formamida que desnaturizan el ADN al formar puentes de hidrógeno con las bases nitrogenadas impidiendo el apareamiento normal de estas (Figura 2).

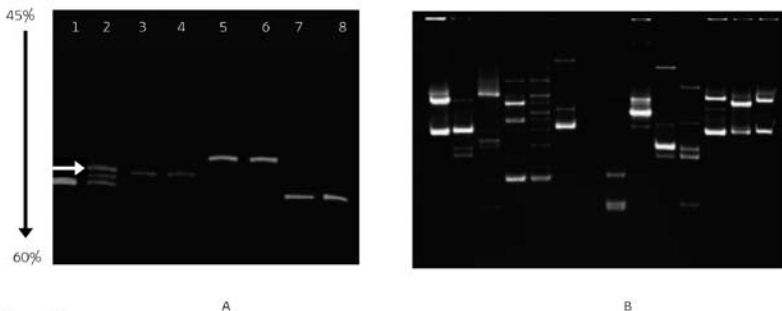
**Figura 2. Desnaturización de la molécula de ADN con urea y formamida.** La urea y la formamida interactúan directamente con las bases nitrogenadas, compitiendo con la formación de puentes de hidrógeno entre bases complementarias, con lo que impiden un apareamiento correcto entre ellas a temperaturas a las que normalmente estarían apareadas.



## ASPECTOS TÉCNICOS

En la práctica, la DGGE consta de varias etapas experimentales cuyo resultado final es la obtención de un patrón de bandas que representa la huella molecular de la muestra analizada (Figura 3). De forma esquemática, el primer paso

Figura 3. Patrones de bandas generados por la DGGE. A) Huella molecular obtenida por DGGE a partir del análisis del gen humano p53. El patrón de bandas generado en el carril 2 evidencia una mutación puntual en el exón 5 al compararse con el patrón de bandas generado en el carril 1. Carril 1, exón 5 “wild-type” (paciente sin cáncer); carril 2, exón 5 muestra (paciente con cáncer de mama); carril 3, exón 6 “wild-type”; carril 4, exón 6 muestra; carril 5, exón 7 “wild-type”; carril 6, exón 7 muestra; carril 7, exón 8 “wild-type”; carril 8, exón 8 muestra. Fotografía tomada de BioRad 1999. B) Huellas moleculares obtenidas por DGGE a partir del análisis de la región V3 del gen ADNr 16S para el estudio de la estructura de comunidades microbianas del tracto gastrointestinal de seres humanos. Cada carril corresponde a la huella molecular de una comunidad microbiana en la que idealmente, cada banda representa a una especie microbiana integrante de dicha comunidad. Fotografía tomada de BioRad 1999.



consiste en la extracción de ADN genómico a partir de la muestra a analizar. En una segunda etapa experimental, este ADN se utiliza como molde para la amplificación por PCR de un fragmento concreto de ADN. Así, se obtiene una mezcla de fragmentos de ADN representativos de todos los alelos presentes en la muestra (Figura 4A), o bien, de todas las especies de microorganismos presentes, cuando se trata del análisis de comunidades microbianas (Figura 4B). Todos estos fragmentos tienen el mismo tamaño, pero diferente secuencia de nucleótidos, por lo que serán separados en una DGGE, originando un patrón de bandas característico. Las bandas pueden ser identificadas mediante purificación de las mismas y secuenciación (Figura 4).



Figura 4. Esquema de la aplicación de DGGE al estudio de mutaciones puntuales y comunidades microbianas. A) Secuencia experimental en la detección de mutaciones puntuales. B) Secuencia experimental en el análisis de la estructura y dinámica de comunidades microbianas en alimentos.

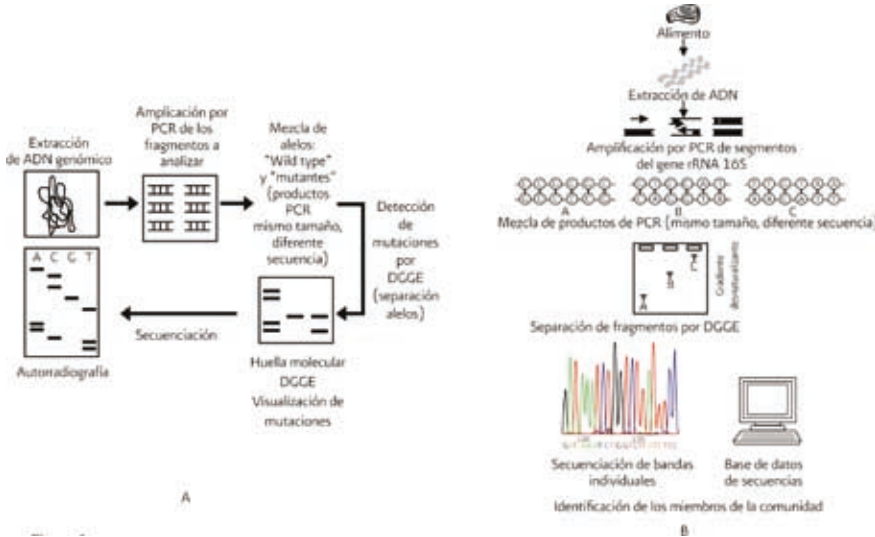


Figura modificada de Díaz-Ruiz y Wachter-Rodarte 2003.

## Introducción de la grapa GC

Ya que en un gel con gradiente desnaturalizante la resolución óptima se consigue cuando las moléculas de ADN no se desnaturalizan por completo, la amplificación por PCR de los fragmentos a analizar por DGGE requiere del uso de iniciadores modificados con la llamada "grapa GC", que evita que las cadenas de ADN se separen por completo. Esta grapa es una secuencia de 30-50 pares de bases de guanina-citosina, que se añade al extremo 5' de uno de los iniciadores, coamplificándose con el segmento de ADN a analizar (Myers *et al.* 1987).

## ¿Qué tipo de moléculas de ADN se pueden analizar por DGGE?

Cualquier análisis que se lleve a cabo por DGGE requiere definir el gen o fragmento de ADN a analizar, lo cual estará en función de los objetivos del estudio y de las limitaciones inherentes a la técnica, ya que sólo se pueden resolver

fragmentos de ADN de hasta 500 pares de bases (Muyzer y Smalla 1998). Para el caso del análisis de comunidades microbianas, comúnmente se utilizan las regiones variables del gen ribosomal de la subunidad 16S (ADNr 16S). Esto se debe a que dicho gen se encuentra distribuido universalmente en los microorganismos y a que contiene tanto regiones conservadas como otras altamente variables y exclusivas de una sola especie bacteriana, lo que permite definir grupos taxonómicos e identificar microorganismos.

## **Optimización de condiciones durante la electroforesis para lograr la mejor resolución**

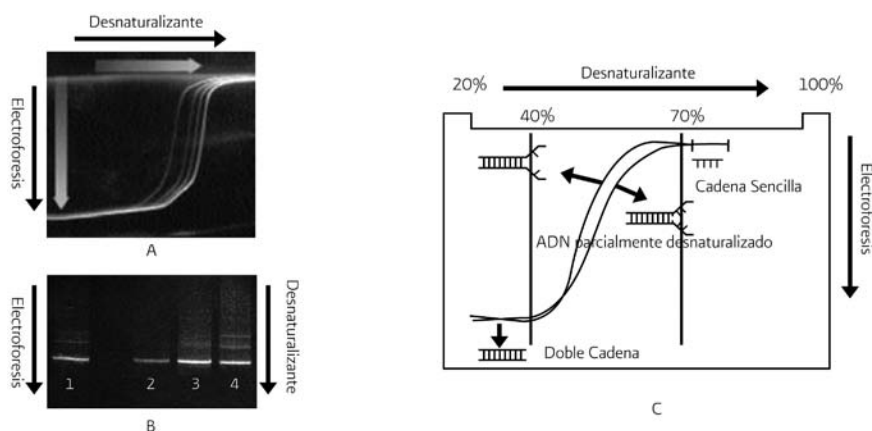
Las propiedades de desnaturalización de los fragmentos de ADN que se someterán a análisis por DGGE se deben determinar previamente, para optimizar el gradiente desnaturalizante y la duración de la electroforesis, de manera que los fragmentos se separen correctamente. Estas propiedades se pueden determinar experimentalmente mediante “geles perpendiculares”, en los que el gradiente desnaturalizante es perpendicular a la dirección de la electroforesis (Figura 5A), a diferencia de lo que ocurre en la DGGE convencional, en la que el gradiente desnaturalizante es paralelo a la dirección de la electroforesis (Figura 5B).

En la DGGE perpendicular, existe un sólo carril en el que se cargan todos los fragmentos de ADN a analizar. Finalizada la electroforesis, se obtiene una curva con forma sigmoidea, en la que a baja concentración de desnaturalizante los fragmentos migran como ADN de doble cadena, mientras que a concentraciones altas migran como cadenas sencillas (Figura 5C). Las condiciones útiles son las intermedias, en las que las moléculas se desnaturalizan parcialmente (Muyzer y Smalla 1998). El tiempo óptimo se determina mediante electroforesis con gradientes paralelos y es el que permite la máxima resolución entre los fragmentos de ADN (Muyzer y Smalla 1998).

## **PROTOCOLO**

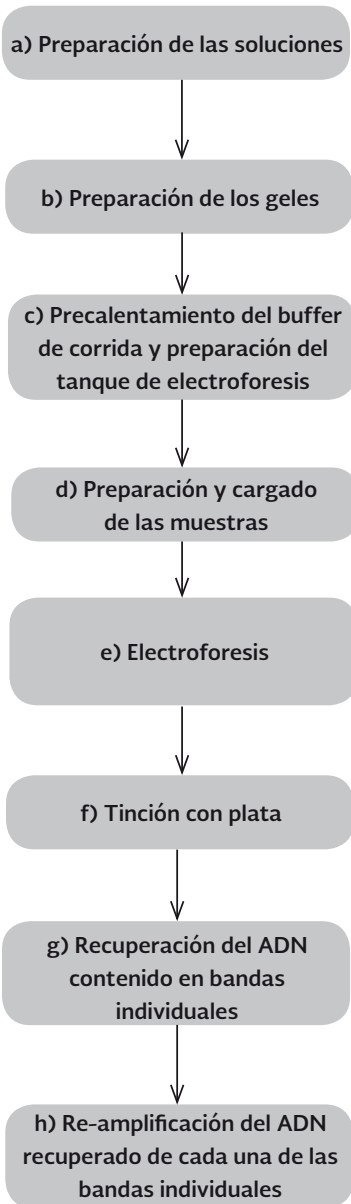
El presente protocolo describe de manera detallada los pasos requeridos para la separación electroforética de una mezcla de fragmentos de ADN, previamente amplificados por PCR, mediante DGGE. Los fragmentos de ADN a analizar son representativos de cada una de las especies microbianas presentes en una muestra ambiental y corresponden a la región V3 del gen ADNr 16S. El gra-

Figura 5. Selección del gradiente desnaturalizante óptimo a partir de geles con gradientes perpendiculares a la dirección de la electroforesis. A) DGGE Perpendicular: Curvas sigmoides resultantes de la electroforesis con gradiente desnaturalizante perpendicular. Cada curva corresponde a un fragmento de ADN con secuencia nucleotídica específica. Fotografía tomada de BioRad 1999. B) DGGE Paralelo: Patrones de bandas resultantes de la electroforesis con gradiente desnaturalizante paralelo. Cada banda corresponde a un fragmento de ADN con secuencia nucleotídica específica. Fotografía tomada de BioRad 1999. C) Curva sigmoide resultante de la electroforesis con un gradiente desnaturalizante perpendicular 20-100%. Ya que las condiciones útiles son aquellas en las que las moléculas de ADN se desnaturalizan parcialmente, para el caso mostrado en el esquema, el gradiente óptimo sería 40-70%.



diente óptimo de desnaturalización fue seleccionado previamente, así como las condiciones de electroforesis (tiempo y voltaje). Para aplicaciones diferentes y otras condiciones, se sugiere consultar las instrucciones del manual de BioRad para el uso de “DCode™ Universal Mutation Detection System” (BioRad 1999). También se puede revisar la guía de ayuda para DGGE de la bitácora de Stefan J. Green (<http://ddgehelp.blogspot.com/>, consultado en octubre de 2010). El método de tinción con plata sugerido en este protocolo corresponde a las instrucciones proporcionadas por el kit de tinción (GE Healthcare 2002). Se recomienda consultar el protocolo descrito por Radojkovic y Kusic (2000).

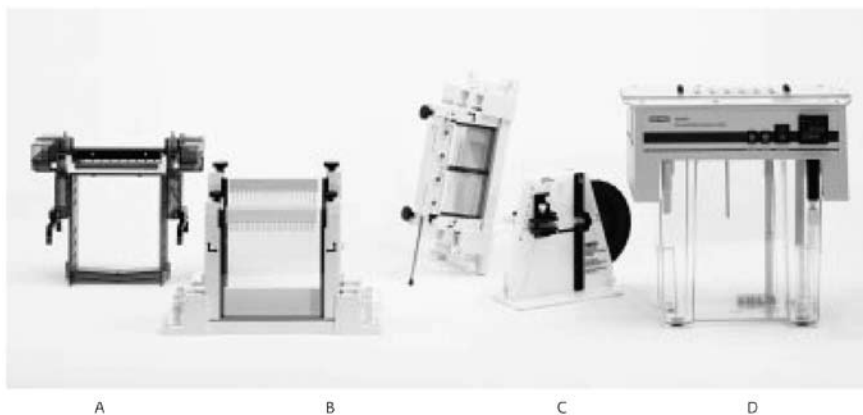
## Etapas de la técnica



## Equipo

- DCode™ Universal Mutation Detection System (BioRad) incluyendo: módulo de electroforesis y control de temperatura, marco sujetador con electrodos, sistema formador de gradiente, fuente de poder, base de ensamblaje para geles, 1 vidrio de 16 x 16 cm, 1 vidrio de 16 x 14 cm, 1 peine de 16 pozos y 1 mm de espesor, 2 espaciadores de 1 mm de espesor, 2 pinzas de sujeción para vidrios, 2 jeringas de 3 ml, juntas de goma, mangueras, conexiones y adaptadores, aguja y tarjeta de alineamiento (Figura 6)
- Fuente de poder
- Bomba de vacío
- Plancha termomagnética

Figura 6. DCode Universal Mutation Detection System (BioRad 1999). A) Marco sujetador con electrodos. B) Base de ensamblaje para geles con cristales ensamblados (se muestran pinzas de sujeción, junta de goma y peine). C) Sistema formador de gradiente. D) Módulo de electroforesis y control de temperatura.



## Material

- Agitador orbital
- Micropipetas automáticas de 1ml, 200  $\mu$ l y 20  $\mu$ l
- Tubos Falcon de 50 ml
- Probeta graduada de 100 ml
- Probeta graduada de 10 ml

- Matraz aforado de 100 ml
- Matraces Erlenmeyer
- Matraces Kitasato
- Vasos de precipitados de 200 ml
- Recipiente de vidrio para tinción del gel (30 x 30 cm)
- Filtros de nitrocelulosa de 0.45  $\mu$ M
- Microtubos de 1 ml
- Microtubos de PCR de 200  $\mu$ l
- Puntas ultradelgadas especiales para cargar muestras en geles de poliacrilamida.

## Reactivos

- Solución de acrilamida (CAS N° 79-06-1)/bis-acrilamida (CAS N° 110-26-9) al 40% (37:5:1) grado Biología Molecular
- Formamida desionizada grado Biología Molecular (CAS N° 75-12-7)
- Urea grado Biología Molecular (CAS N° 57-13-6)
- Buffer TAE 50X pH 8
  - Tris (CAS N° 77-86-1)
  - Ácido acético glacial (CAS N° 64-19-7)
  - EDTA (CAS N° 6381-92-6)
- PSA (Persulfato de amonio) 10% (p/v) grado Biología Molecular (CAS N° 7727-54-0)
- TEMED (N,N,N',N' -tetramethylenediamine) grado Biología Molecular (CAS N° 110-18-9)
- Buffer de carga
  - Azul de bromofenol 0.25 % p/v (CAS N° 115-39-9)
  - Xilen cianol 0.25 % p/v (CAS N° 4463-44-9)
  - Glicerol 30 % v/v (CAS N° 58-81-5)
- Kit Plus One DNA silver staining (General Electric Healthcare)
  - Ácido bencenosulfónico (CAS N° 98-11-3)
  - Etanol (CAS N° 64-17-5)
  - Nitrato de plata (CAS N° 7761-88-8)
  - Carbonato de sodio (CAS N° 497-19-8)
  - Formaldehído (CAS N° 50-00-0)
  - Tiosulfato de sodio (CAS N° 7772-98-7)

- Ácido acético (CAS N° 64-19-7)
- Acetato de sodio (CAS N° 127-09-3)

## Método

### Antes de empezar

#### Preparación de las soluciones

1. Preparar una solución desnaturalizante de “baja densidad” (30%) de acuerdo con lo que se indica en las tablas 1 y 2.
2. Preparar una solución desnaturalizante de “alta densidad” (60%) de acuerdo con lo que se indica en las tablas 1 y 2.
3. Filtrar ambas soluciones desnaturalizantes usando un filtro con diámetro de poro de 0.22-0.45  $\mu\text{m}$ .

Notas: la concentración de acrilamida/bis-acrilamida a utilizar dependerá del tamaño de los fragmentos de ADN que se van a separar (Tabla 3). Una vez preparadas las soluciones desnaturalizantes deberán almacenarse a 4° C, sin contacto con la luz, durante 30 días como máximo. Las soluciones que contienen acrilamida/bis-acrilamida deberán manejarse con suma precaución, ya que se trata de compuestos químicos altamente tóxicos. Se recomienda usar guantes libres de polvo durante todo el procedimiento.

#### Limpieza de accesorios y materiales

1. Lavar los vidrios, los espaciadores y el peine con agua corriente, y posteriormente con agua destilada.
2. Limpiar los vidrios con isopropanol.
3. Enjuagar con agua destilada las jeringas, mangueras, conectores, adaptadores y aguja del sistema formador de gradiente.

**Tabla 1. Proporción de reactivos requeridos para preparar soluciones desnaturalizantes a distintas concentraciones de acrilamida.**

<b>Acrilamida (%)</b>	<b>6%</b>	<b>8%</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>
Acrilamida/Bis 40% (ml)	15	20	25	30
TAE 50X (ml)	2	2	2	2
Formamida (ml)	Véase Tabla 2	Véase Tabla 2	Véase Tabla 2	Véase Tabla 2
Urea (g)	Véase Tabla 2	Véase Tabla 2	Véase Tabla 2	Véase Tabla 2
Agua MilliQ (ml)	c.s.p. 100 ml	c.s.p. 100 ml	c.s.p. 100 ml	c.s.p. 100 ml
Volumen total (ml)	100	100	100	100

**Tabla 2. Cantidades requeridas de agentes desnaturalizantes para preparar soluciones a distintos porcentajes de desnaturalizante.**

<b>Desnatura- lizantes (%)</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>	<b>60</b>	<b>70</b>	<b>80</b>	<b>90</b>	<b>100</b>
Formamida (ml)	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
Urea (g)	0	4.2	8.4	12.6	16.8	21	25.2	29.4	33.6	37.8	42

**Tabla 3. Porcentaje óptimo de acrilamida según el tamaño del fragmento de ADN que se analizará en el gel.**

<b>Acrilamida (%)</b>	<b>Rango de tamaño (pb)</b>
6	300 – 1,000
8	200 – 400
10	100 – 300

### 1. Preparación de los geles

1.1 Alinear los espaciadores a lo largo de los bordes del vidrio más grande, colocar encima el vidrio pequeño y sujetarlos juntos con las pinzas de sujeción, procurar no apretar las tuercas (Figura 7A y 7B).

1.2 Colocar el ensamble en la base para geles, de forma tal que el vidrio con saliente (el más grande) esté situado del lado opuesto a la junta de goma (Figura 7C).



- 1.3 Introducir la tarjeta de alineamiento entre ambos vidrios y verificar que el ensamble esté correcto (Figura 7C). De ser así, apretar las tuercas con las pinzas de sujeción (no apretar demasiado pues se corre el riesgo de romper los vidrios, o bien, impedir la entrada del peine al intentar introducirlo).
- 1.4 Verificar que el ensamble se encuentre nivelado en la superficie con una burbuja niveladora.
- 1.5 Ajustar el sistema formador de gradiente a la graduación 15 para jeringas de 30 ml. Dicho ajuste se selecciona cuando se usan vidrios de 16 x 16 cm.
- 1.6 Montar el sistema formador de gradiente con sus jeringas y mangueras para posteriormente probar el ensamble con agua MilliQ y corroborar que no exista ninguna fuga (Figura 7D).
- 1.7 Si no existen fugas, vaciar el agua e introducir una tira de papel filtro para secar los cristales.
- 1.8 Antes de vaciar las soluciones desnaturizantes en la cavidad de los cristales, será necesario agregar los catalizadores requeridos para la polimerización de la acrilamida/bis-acrilamida: De acuerdo a la Tabla 4, preparar por separado en tubos Falcon de 50 ml las soluciones desnaturizantes con los catalizadores de polimerización (PSA y TEMED). Mezclar por inversión.

**Tabla 4. Preparación de soluciones desnaturizantes para cargarse en jeringas.**

Reactivo	Cantidad
Solución desnaturizante	20 ml
Persulfato de amonio (PSA) 10%	70 $\mu$ l
N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina (TEMED)	10 $\mu$ l

Notas: Las soluciones de PSA se degradan con mucha facilidad, por lo que se recomienda prepararlas justo en el momento previo a su uso. El proceso de polimerización comienza en el instante mismo en el que se agregan los catalizadores, por lo que una vez agregados, las soluciones deben manipularse rápidamente.

- 1.9 Llenar las jeringas con las soluciones de alta y baja densidad, eliminando el aire que pudiera estar presente y ajustar a un volumen de 17 ml.

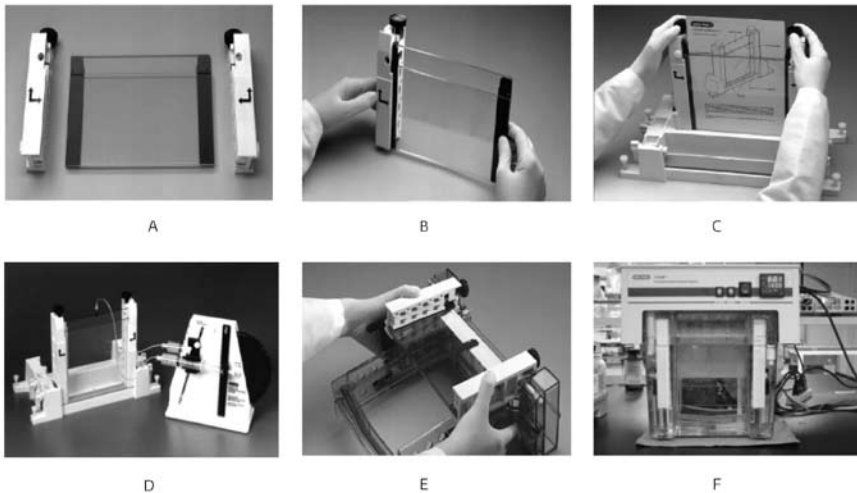
- 1.10 Colocar las jeringas en posición correcta en el sistema formador de gradiente: alta densidad en High density solution (*top filling*) y baja densidad en Low density solution (*top filling*).
  - 1.11 Conectar las mangueras y girar la rueda del sistema formador de gradiente hasta llenar la cavidad de los cristales con las soluciones desnaturalizantes. En este momento, el gradiente lineal de urea y formamida comenzará a formarse.
  - 1.12 Colocar el peine y esperar a que concluya la polimerización. Este proceso se llevará a cabo en 60 minutos aproximadamente, pero se sugiere esperar hasta 90 minutos. Nota: mientras polimeriza el gel, preparar el tanque de electroforesis, precalentar el buffer de corrida y preparar las muestras a analizar (véanse los siguientes apartados).
2. Precalentamiento del buffer de corrida y preparación del tanque de electroforesis
    - 2.1 Enjuagar el tanque con agua destilada.
    - 2.2 Preparar 7 litros de TAE 1X de acuerdo a lo que se indica en la Tabla 5.
    - 2.3 Precalentar el buffer a una temperatura cercana a los 60 °C y verterlo en el tanque de electroforesis.
    - 2.4 Una vez polimerizado el gel, retirar cuidadosamente el peine, enjuagar cada pozo con el buffer de corrida (TAE 1X) y colocar el ensamble con el gel en el marco sujetador (Figura 7E). Nota: Aunque sólo se vaya a correr un gel, preparar otro ensamble de vidrios (vidrio grande y pequeño unidos con las pinzas de sujeción) y colocarlo en el marco sujetador, en el lado opuesto en el que se encuentra el ensamble con el gel polimerizado. Este ensamble permite formar una cavidad superior en el marco sujetador.
    - 2.5 Colocar el marco sujetador (con el gel y el ensamble de vidrios) dentro del tanque de electroforesis en la posición correcta. Nota: Antes de colocar el marco sujetador con el gel dentro del tanque, se recomienda retirar aproximadamente 200 ml del buffer de corrida, con el que posteriormente se llenará la cavidad superior del marco sujetador, de modo tal que los hilos de platino (electrodos) estén totalmente sumergidos y así evitar que quede abierto el circuito de electroforesis.

Tabla 5. Preparación de buffer TAE 1X.

Reactivo	Cantidad
TAE 50X	140 ml
Agua MilliQ	6,860 litros
Volumen final	7 litros

3. Preparación y cargado de las muestras
  - 3.1 En cada pozo se pueden cargar hasta 60  $\mu$ l de muestra.
  - 3.2 Colocar en un microtubo para PCR, 30  $\mu$ l de la muestra a analizar (productos de PCR) y 20  $\mu$ l del buffer de carga. Mezclar con la pipeta automática.
  - 3.3 Con las puntas ultradelgadas especiales, tomar los 50  $\mu$ l de la muestra con el buffer de carga y cargar en el pozo correspondiente.  
Nota: La cantidad de muestra a cargar estará en función de la calidad de los productos de PCR a analizar.
  
4. Electroforesis
  - 4.1 Colocar el módulo de electroforesis y control de temperatura. Verificar que esté funcionando correctamente.
  - 4.2 Programar el equipo para mantener una temperatura constante de 60 °C durante la electroforesis. En caso de que la temperatura del buffer de corrida haya disminuido, esperar a que se alcance la temperatura previamente establecida.
  - 4.3 Tapar el módulo de control y conectar los cables a los electrodos de la fuente de poder. Correr las muestras a analizar a 75 V durante 15 horas (Figura 7F).
  
5. Tinción con plata
  - 5.1 Terminada la electroforesis, apagar la fuente de poder así como el módulo de electroforesis y el control de temperatura.
  - 5.2 Esperar 15 minutos y retirar el marco sujetador con el gel del tanque de electroforesis.
  - 5.3 Retirar el gel del marco sujetador, aflojar los tornillos de los sujetadores de los vidrios y retirarlos.

Figura 7. Secuencia experimental en la preparación y corrida de geles de DGGE (BioRad 1999). A) Se muestran las pinzas de sujeción así como ambos cristales (grande y pequeño) separados por los espaciadores. B) Ensamble de cristales con las pinzas de sujeción. C) Ensamble de cristales en la base con la junta de goma. Se muestra la verificación del ensamblaje a través de la tarjeta de alineamiento. D) Ajuste, montaje de accesorios (jeringas y mangueras) y ensamble del sistema formador de gradiente. E) Ensamble de los cristales en el marco sujetador con electrodos. F) Electroforesis: Se observa el módulo de electroforesis y control de temperatura funcionando correctamente, conectado a la fuente de poder.



- 5.4 Separar ambos cristales teniendo cuidado de no romper el gel. El gel estará adherido a uno de los vidrios. Con ayuda del buffer de corrida, desplazarlo hacia el recipiente de tinción.
- 5.5 Preparar 125 ml de cada una las soluciones de tinción tal y como se indica en la Tabla 6.
- 5.6 Seguir el protocolo de tinción que se describe en la Tabla 7.  
Notas: Debido a que los geles de poliacrilamida son muy delgados, es importante manipularlos con cuidado para evitar que se rompan. Es necesario que el gel permanezca siempre en solución para evitar su deshidratación no controlada. En caso de que no se lleve a cabo la tinción en seguida que el gel se ha retirado de los vidrios, mantenerlo en el recipiente de tinción con el buffer de corrida hasta por 24 horas.
6. Recuperación del ADN contenido en bandas individuales

**Tabla 6. Preparación de soluciones para tinción.**

Solución	Reactivos requeridos del Kit	Disolver en 100 ml de
Solución de fijación	25 ml de solución de fijación 5X	Solución etanol 24% (vv)
Solución de tinción	25 ml de solución de tinción 5X	Agua MilliQ
Solución de desarrollo	25 ml de solución de carbonato 5X 125 µL de tiosulfato de sodio 125 µL de formaldehído	Agua MilliQ
Solución de paro y preservación	25 ml de solución de paro 5X	Agua MilliQ

**Tabla 7. Protocolo de tinción.**

Paso	Procedimiento	Tiempo
1. Fijación	Agitación lenta en solución de fijación	1 hora
2. Tinción	Agitación lenta en solución de tinción	30 minutos
3. Lavado	Agitación lenta en Agua MilliQ (125 ml)	1 minuto
4. Desarrollo	Agitación lenta en solución de desarrollo	10 minutos o hasta que se visualicen las bandas
5. Paro	Agitación lenta en solución de paro y preservación	Al menos 30 minutos o toda la noche.

6.1 A partir de los patrones de bandas visualizados una vez finalizada la tinción, seleccionar y cortar las bandas más representativas con un bisturí estéril.

6.2 Colocar las bandas en microtubos estériles.

6.3 Agregar 50 µl de agua MilliQ estéril.

6.4 Incubar a 37 °C por 1 hora y posteriormente a 4 °C por 24 horas.

7. Re-amplificación del ADN recuperado de cada una de las bandas individuales

7.1 Utilizar 10 µl del ADN recuperado de cada banda en una reacción de PCR de 50 µl. Re-amplificar por PCR utilizando los mismos iniciadores que en la reacción de PCR original (sin grapa GC si es para secuenciar o clonar y con grapa GC si es para volver a someter a DGGE).

7.2 Estos productos se pueden secuenciar (véase capítulo de Secuenciación de ADN para identificar al microorganismo del que se trata).

## MÉTODOS DE ANÁLISIS

En un principio, la información obtenida de los patrones de bandas resultantes de la DGGE (perfiles de DGGE) se había restringido a una simple interpretación visual en la que sólo se detectaba la presencia o ausencia de bandas en una determinada posición, así como los cambios en la intensidad de las mismas. Sin embargo, al aplicar diversos métodos estadísticos en el análisis de los patrones de bandas, la DGGE se ha convertido en una herramienta aún más prometedora (Zhang y Fang 2000, Fromin *et al.* 2002, Wilbur *et al.* 2002).

Actualmente, ciertos programas informáticos hacen posible la digitalización de los perfiles de DGGE obtenidos, de manera que a partir del análisis estadístico de la posición e intensidad de las bandas, pueden construirse matrices de distancias o similitud que permiten la obtención de dendrogramas al aplicar determinados algoritmos. De este modo, es posible hacer un análisis comparativo de todos los patrones de bandas generados por distintas muestras, así como determinar la similitud o distancia existentes entre los distintos perfiles de DGGE. Este tipo de análisis resulta muy conveniente cuando se estudia la estructura y dinámica de las comunidades microbianas.

Existen varios programas informáticos disponibles comercialmente, los cuales pueden ejecutar las tareas ya descritas anteriormente (digitalización de los patrones de bandas y optimización de imágenes, análisis de bandas equivalentes, construcción de dendrogramas a partir de cientos de muestras, determinaciones de abundancia relativa, etc.). Destacan los siguientes tres: GelcomparII (Applied Maths), Quantity One (BioRad) y BioNumerics (Applied Maths).

En general, el software de estos programas hace cálculos de matrices usando el coeficiente de correlación de Pearson, o bien, los coeficientes de Dice o Jaccard. Por su parte, los dendrogramas se construyen a partir de algoritmos como UPGMA o Neighbor Joining.

En cuanto al análisis de los perfiles de DGGE de comunidades microbianas, es posible calcular los índices matemáticos de riqueza, diversidad y dominancia (Simpson 1949, Shannon y Weaver 1963, Nübel *et al.* 1999). Para ello, existen programas estadísticos que se encuentran disponibles para cualquier usuario con acceso a Internet. EstimateS es un software libre que puede resultar de gran utilidad (<http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS>).

Finalmente, es posible identificar a cada uno de microorganismos que integran una comunidad microbiana. El patrón de bandas de DGGE se considera la huella génica de la comunidad microbiana, en el que idealmente, cada banda representa a un miembro de la comunidad. Ya se ha explicado que el ADN de cada banda puede recuperarse y posteriormente ser secuenciado. Las secuencias pueden analizarse y ensamblarse en el software BioEdit. Es importante verificar la posible presencia de secuencias quiméricas, para este fin puede utilizarse el programa Chimera Check ubicado en el portal de GreenGenes ([http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-bel3\\_interface.cgi](http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-bel3_interface.cgi)), siempre que las secuencias a analizar correspondan a genes ribosomales. Posteriormente deberá llevarse a cabo el análisis de similitud de las secuencias. Es decir, utilizando determinadas herramientas bioinformáticas (BLAST, por ejemplo), se alinean las secuencias obtenidas para determinar el porcentaje de identidad con secuencias reportadas en determinadas bases de datos, de manera que puede inferirse la identidad de los microorganismos. Estos análisis de similitud pueden llevarse a cabo en portales como GreenGenes (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>), Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) o National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>).

## APLICACIONES

Existen varios campos de aplicación para la DGGE, destacando los que a continuación se describen:

### Detección de mutaciones puntuales para aplicaciones clínicas

En genética molecular humana, la DGGE ha resultado ser particularmente útil en el análisis de enfermedades causadas por un espectro de mutaciones, por ejemplo, fibrosis quística (Alonso *et al.* 2007), hemofilia (Zhang *et al.* 1999), hipercolesterolemia (Azian *et al.* 2006) y Alzheimer (Aldudo *et al.* 1999). En estos casos la DGGE puede ser empleada para detectar mutaciones en genes susceptibles de degenerar en tumores como *k-ras*, *P53*, *Hmsh2*, *Chk1*, *Chk2*, *Apaf1*, *Rb1* y *BRCA1/2* (Papp *et al.* 2007) y monitorear su acumulación en la progresión del cáncer. En los primeros años de aplicación de la DGGE, los estudios en genética del cáncer fueron abundantes. Actualmente siguen publicán-

dose artículos al respecto, aunque en menor proporción si comparamos con el uso de la DGGE en el campo de la Ecología Microbiana.

## Estudios de comunidades microbianas

En los últimos años se ha incrementado el conocimiento de la diversidad microbiana en comunidades complejas, como consecuencia del uso de métodos moleculares, como la DGGE, que no requieren del cultivo de microorganismos para detectarlos e identificarlos. Ahora se sabe que sólo entre 0.001 y un 1% de los microorganismos en los ambientes naturales pueden ser cultivados (Torsvik *et al.* 2003).

Así, la DGGE ha proporcionado información novedosa en el estudio de comunidades microbianas en ambientes complejos como suelos, lagos, lodos activados, biorreactores, alimentos, tracto gastrointestinal o placa dentobacteriana. El conocimiento en torno a estas complejas comunidades microbianas se refleja en una mejor comprensión de diversos procesos tales como biorremediación, tratamiento de aguas, compostaje, fermentaciones de interés alimentario, etc. Al respecto, se han publicado interesantes trabajos de investigación: Cébron *et al.* (2004) evidenciaron la presencia de bacterias oxidantes de amonio, típicas de aguas tratadas, en el estuario del río Sena en París. MacNaughton *et al.* (1999) evaluaron la estructura de comunidades microbianas degradadoras de aceites bajo distintas condiciones, de manera que pudieron identificar a aquellos miembros de la comunidad responsables de la descontaminación. Dilly *et al.* (2004) mostraron que la diversidad bacteriana en suelos fertilizados con residuos agrícolas de origen vegetal (biofertilizantes), depende tanto del tipo de residuo como del tipo de suelo, clima, vegetación y microflora autóctona presente. Kowalchuk *et al.* (1999) demostraron que cuando se utilizan residuos agrícolas de origen animal en compostaje, aumenta el crecimiento de bacterias oxidantes de amonio, lo cual es indeseable. Ampe *et al.* (1999) investigaron la distribución espacial de la microbiota de una bola de pozol durante el proceso de fermentación, con lo que demostraron la presencia predominante de bacterias del género *Streptococcus*, no detectadas por métodos tradicionales dependientes del cultivo. Finalmente, Zijngé *et al.* (2006) demostraron el potencial de la DGGE como una herramienta para el estudio de las comunidades bacterianas involucradas en el desarrollo de enfermedades periodontales.



## Estudios en genética de poblaciones y evolución

Aunque el potencial de la DGGE en este campo de investigación es evidente, tal y como lo describen Miller *et al.* (1999), son pocos los estudios publicados hasta el momento. Se han reportado algunas investigaciones en simios, tortugas y salmones (Miller *et al.* 1999, Blancher *et al.* 2006). Cabe destacar el trabajo de Miller *et al.* (1999), quienes describen el uso de la DGGE para el análisis de marcadores genéticos altamente variables en poblaciones de salmón, con lo que se logró hacer el seguimiento de las poblaciones en diferentes regiones.

## VENTAJAS Y DESVENTAJAS

### Ventajas

(1) La DGGE es un método altamente sensible y relativamente reproducible. (2) Permite analizar simultáneamente numerosas muestras así como evaluar las diferencias y similitudes que pudieran existir entre ellas. (3) Es ideal para realizar estudios preliminares de diversidad microbiana, como el antecedente para un estudio posterior más detallado. (4) Permite comparar rápidamente las comunidades microbianas presentes en muestras tomadas en diferentes sitios en ecosistemas similares (biogeografía). (5) Permite comparar una misma comunidad a lo largo del tiempo o en presencia de diferentes condiciones ambientales (dinámica). (6) Hace posible la detección e identificación de microorganismos no cultivables. (7) Permite comparar la variabilidad genética de genes diana en diferentes poblaciones (genética de poblaciones). (8) Ya que el ADN contenido en cada una de las bandas de los perfiles de DGGE puede ser recuperado para posteriormente ser manipulado y/o secuenciado, es posible combinar la técnica con otros métodos moleculares que proporcionen mayor información.

### Desventajas y limitaciones

(1) El equipo requerido es costoso y de uso relativamente complejo. (2) Los iniciadores son más costosos pues llevan la grapa GC. (3) Algunos de los reactivos químicos requeridos en el protocolo experimental (acrilamida/bis-acrilamida, formaldehído, TEMED, etc.) son altamente tóxicos. (3) Se requieren varios es-

tudios preliminares antes de obtener la huella génica óptima de una comunidad (experimentos preliminares). (4) Ya que sólo pueden separarse por DGGE fragmentos pequeños (de hasta 500 pares de bases), las inferencias filogenéticas se ven limitadas. (5) Aunque existen reportes sobre la posibilidad de separar secuencias que difieren en una sola base, también se ha destacado la dificultad de separar fragmentos que difieren en 2 o 3 bases (Vallaeyts *et al.* 1997, citado en Muyzer y Smalla, 1998). (6) Existe un límite en el número máximo de bandas de ADN que puedan separarse, por lo que en el caso del análisis de perfiles de DGGE de comunidades microbianas, no podrán detectarse a aquellos microorganismos que constituyan menos del 1% de la comunidad (Muyzer *et al.* 1993). (7) Debido a la microheterogeneidad en las secuencias de algunos genes, como ocurre con la secuencias ribosomales (Clayton *et al.* 1995, Nubel *et al.* 1996), es posible que un microorganismo esté representado por varias bandas, de manera que al interpretarse los perfiles de DGGE, puede sobreestimarse la diversidad. (8) También es posible que ocurra la co-migración de fragmentos de ADN, es decir, que dos secuencias diferentes de ADN compartan una misma posición en el gel. Esto puede provocar la subestimación de diversidad, del mismo modo que se dificulta la secuenciación del ADN recuperado de aquellas bandas en las que existe co-migración (Nikolausz *et al.* 2005). (8) Pueden presentarse “bandas dobles” provenientes de la formación de moléculas heteroduplex durante la PCR, con lo que se dificulta la interpretación de los perfiles de DGGE (Janse *et al.* 2004). (9) Los métodos de extracción de ácidos nucleicos no aseguran la lisis de todos los microorganismos presentes en una comunidad, lo que puede conducir a errores en los cálculos de abundancia relativa (Von Wintzingerode *et al.* 1997). (10) La reacción de PCR también puede introducir errores en la interpretación de los perfiles de DGGE tales como amplificaciones preferenciales (Von Wintzingerode *et al.* 1997), formación de moléculas quiméricas (Von Wintzingerode *et al.* 1997, Wang y Wang 1997) y moléculas heteroduplex (Thompson *et al.* 2002).

## PERSPECTIVAS

Recientemente se ha incorporado el uso del gen *rpoB* como marcador molecular para el análisis de comunidades microbianas mediante DGGE (Dahllöf 2000). A diferencia de lo que ocurre con los genes ribosomales, el gen *rpoB* se presenta en única copia en el genoma bacteriano, por lo que el fenómeno de microhete-

rogeneidad estaría descartado y se facilitaría el análisis e interpretación de los patrones de bandas de comunidades microbianas altamente complejas.

Se ha sugerido el uso de genes funcionales como marcadores moleculares (Muyzer y Smalla 1998), de tal manera que se pueda extender la aplicación de la DGGE no sólo al estudio de la estructura y dinámica de comunidades microbianas, sino también a la descripción de nichos ecológicos y la actividad metabólica de las poblaciones integrantes de una comunidad.

Con la finalidad de lograr una optimización y normalización en los perfiles de DGGE así como una mejor interpretación de los mismos, Neufeld y Mohn (2005) han incorporado el uso de “estándares de DGGE” marcados con fluorescencia que se cargan junto con las muestras a analizar.

Finalmente, para lograr una interpretación objetiva y completa de la estructura y dinámica de comunidades microbianas altamente complejas, se sugiere complementar el análisis mediante DGGE con otras técnicas moleculares (SSCP, ARDRA o RAPD) así como con métodos tradicionales que impliquen el cultivo de microorganismos y su identificación a partir de rasgos morfológicos y fenotípicos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aldudo J., M.J. Bullido y F. Valdivieso. 1999. DGGE method for the mutational analysis of the coding and proximal promoter regions of the Alzheimer's disease pre-senilin-1 gene: two novel mutations. *Human Mutation* 14: 433-439.
- Alonso M.J., D. Heine-Suñer, M. Calvo, J. Rosell, J.Giménez, M.D. Ramos, J.J. Telleria, A. Palacio, X. Estivill y T. Casals. 2007. Spectrum of mutations in the CFTR gene in cystic fibrosis patients of spanish ancestry. *Annals of Human Genetics* 71: 194-201.
- Ampe F., N. Ben Omar, C. Moizan, C. Wachter y J.P. Guyot. 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrate the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5464-5473.
- Azian M., M.N. Hapizah, B.A. Khalid, Y. Khalid, A. Rosli y R. Jamal. 2006. Use of the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) method for mutational screening of patients with familial hypercholesterolaemia (FH) and familial defective apolipoprotein B100 (FDB). *Malaysian Journal of Pathology* 28: 7-15.

- BioRad. 1999. The DCode™ Universal Mutation Detection System.
- Blancher A., P. Tisseyre, M. Dutaur, P.A. Apoil, C. Maurer, V. Quesniaux, F. Raulf, M. Bigaud y M. Abbal. 2006. Study of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) MhcDRB (Mafa-DRB) polymorphism in two populations. *Immunogenetics* 58: 269-282.
- Cébron A., M. Coci, J. Garnier y H.J. Laanbroek. 2004. Denaturing gradient gel electrophoretic analysis of ammonia-oxidizing bacterial community structure in the lower Seine river: Impact of Paris wastewater effluents. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 6726-6737.
- Clayton R.A., G. Sutton, P.S. Hinkle, C. Bult y C. Fields. 1995. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: Why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 595-599.
- Dahllöf I. 2000. rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3376-3380.
- Díaz-Ruiz G. y C. Wachter-Rodarte. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 45: 30-40.
- Dilly O., J. Bloem, A. Vos y J.C. Munch. 2004. Bacterial diversity in agricultural soils during litter decomposition. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 468-474.
- Fischer S.G. y L.S. Lerman. 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 1579-1583.
- Fromin N., J. Hamelin, S. Tarnawski, D. Roesti, K. Jourdain-Miserez, N. Forestier, S. Teyssier-Cuvellé, F. Gillet, M. Aragno y P. Rossi. 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* 4: 634-643.
- GE Healthcare. 2002. DNA Silver Staining kit.
- Janse I., J. Bok y G. Zwart. 2004. A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 57: 279-281.
- Kowalchuk G.A., Z.S. Naoumenko, P.J. Derikx, A. Felske, J.R. Stephen y I.A. Arkhipchenko. 1999. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in compost and composted materials. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 396-403.

- MacNaughton S.J., J.R. Stephen, A.D. Venosa, G.A. Davis, Y.J. Chang y D.C. White. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3566-3574.
- Miller K.M., T.J. Ming, A.D. Schulze y R.E. Withler. 1999. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE): A rapid and sensitive technique to screen nucleotide sequence variation in populations. *Biotechniques* 27: 1016-8-1020-2.
- Muyzer G., E.C. De Waal y A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- Muyzer G. y K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Myers R.M., T. Maniatis y L.S. Lerman. 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel-electrophoresis. *Methods in Enzymology* 155: 501-527.
- Neufeld J.D. y W.W. Mohn. 2005. Fluorophore-labeled primers improve the sensitivity, versatility, and normalization of denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4893-4896.
- Nikolausz M., R. Sipos, S. Révész, A. Székely y K. Márialigeti. 2005. Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. *FEMS Microbiology Letters* 244: 385-390.
- Nübel U., B. Engelen, A. Felske, J. Snaidr, A. Wieshuber, R.I. Amann, L. Wolfgang y H. Backhaus. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* 178: 5636-5643.
- Nübel U., F. Garcia-Pichel, M. Kuhl y G. Muyzer. 1999. Quantifying microbial diversity: Morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in Microbial Mats. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 422-430
- Papp T., A. Niemetz, N. Dosdahl, K. Kumar y D. Schiffmann. 2007. Mutational analysis of Chk1, Chk2, Apaf1 and Rb1 in human malignant melanoma cell lines. *Oncology Reports* 17: 135-140.
- Rodjokovic D. y E. Kusic. 2000. Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels. *Clinical Chemistry* 46: 883-884.
- Shannon C.E. y W. Weaver. 1963. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Illinois, Estados Unidos de América.

- Simpson E. H. 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163: 688.
- Thompson J.R., L.A. Marcelino y M. F. Polz. 2002. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by reconditioning PCR. *Nucleic Acids Research* 30: 2083-2088.
- Torsvik V., L. Ovreas y T. F. Thingstad. 2003. Prokaryotic Diversity-Magnitude, Dynamics and Controlling Factors. *Science* 296: 1064-1066.
- Von Wintzingerode F., U.B. Göbel y E. Stackebrandt. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 21: 213-229.
- Wang G. C. y Y. Wang. 1997. Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4645-4650.
- Wilbur J., J.K. Ghosh, C.H. Nakatsu, S.M. Brouder y R.W. Doerge. 2002. Variable selection in high-dimensional multivariate binary data with application to the analysis of microbial community DNA fingerprints. *Biometrics* 58: 378-386.
- Zhang T. y H.P. Fang. 2000. Digitization of DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) profile and cluster analysis of microbial communities. *Biotechnology Letters* 22: 399-405.
- Zhang Y.Z., J.X. Liu, H.Z. Shao, Z.W. Chi, H.L. Wang, S.J. Chen, Z. Chen, Z.Y. Wang y W. Huang. 1999. Characterization of genetic defects of hemophilia: A in mainland China. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 15: 205-207.
- Zijngje V., G.W. Welling, J.E. Degener, A.J. van Winkelhoff, F. Abbas y H.J.M. Harmen. 2006. Denaturing gradient gel electrophoresis as a diagnostic tool in periodontal microbiology. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 3628-3633.

# PCR EN TIEMPO REAL

Penélope Aguilera<sup>1</sup>, Martha Ruiz Tachiquín<sup>2</sup>,  
Martha Graciela Rocha Munive<sup>4</sup>, Benjamín Pineda Olvera<sup>3</sup>  
y María Elena Chánez Cárdenas<sup>1</sup>

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction* por sus siglas en inglés) en tiempo real es la técnica más sensible para la detección de ácidos nucleicos (ADN y ARN). La PCR en tiempo real se basa en el principio del método de la PCR desarrollado por Kary Mullis en la década de los 80, que permite detectar ADN a partir de pequeñas

<sup>1</sup> Laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Insurgentes Sur 3877, Col. La Fama, C.P. 14269, Tlalpan México. penelope.aguilera@gmail.com.

<sup>2</sup> Unidad de Investigación Médica en Genética Humana. Instituto Nacional del Seguro Social. Av. Cuauhtémoc 330. Col. Doctores, C.P. 06720, Cuauhtémoc México. mer-tachiquin@yahoo.com.mx.

<sup>3</sup> Laboratorio de Neuroinmunología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Insurgentes Sur 3877, Col. La Fama, C.P. 14269, Tlalpan México. benpio76@hotmail.com.

<sup>4</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental, Instituto Nacional de Ecología. Av. San Rafael Atlixco # 186. UAM Izta-palapa Edificio W, Planta baja. Col. Vicentina. C.P. 09349. México, D. F. mrocha@ine.gob.mx.

cantidades, amplificándolas hasta más de un billón de veces (Mullis 1990) (véase capítulo de PCR).

La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección (de 1 a  $10^7$  equivalentes genómicos de la secuencia blanco) (Brechtbuehl *et al.* 2001) y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior. Los ensayos de la PCR en tiempo real son entre 10,000 y 100,000 veces más sensibles que las pruebas de protección por ARNasa,<sup>1</sup> 1,000 veces más sensibles que la hibridación por *Dot blot*<sup>2</sup> y pueden detectar diferencias de una sola copia del ADN (Wong y Medrano 2005). Además, se ha reportado que para la PCR convencional (punto final), la cantidad final de producto amplificado puede verse afectada por inhibidores, saturación de la reacción o bien por falta de una estandarización adecuada. Entonces, los resultados de la PCR punto final pueden no tener relación entre la cantidad de ácidos nucleicos que había al inicio de la reacción y la concentración final del producto amplificado.

Debido a la enorme proyección que tienen los ensayos de la PCR en tiempo real como herramienta útil y extremadamente sensible en investigación clínica, industrial, biológica y biomédica, en este capítulo se revisan las bases teóricas de esta técnica, sus aplicaciones, el análisis de resultados y se da un ejemplo específico para realizar un ensayo de cuantificación.

---

<sup>1</sup> Las pruebas de protección de la ARNasa se emplean para detectar y cuantificar moléculas de ARN, así como para analizar la estructura de ARNm. Se basan en la hibridación de una sonda de ARN en solución (antisentido) marcada con radioactividad, contra el conjunto de moléculas de ARN que se requieren analizar. Se hibridizan y después se separan en un gel de poliacrilamida desnaturalizante, en el que se observa el ARN "protegido". La ARNasa destruye los segmentos de cadena sencilla y se mantienen los dobles. Con esta técnica se pueden identificar moléculas incluso si se encuentran en concentraciones muy bajas. Los resultados cuantitativos tomando en cuenta la cantidad original de ARN blanco empleada.

<sup>2</sup> Esta técnica permite identificar moléculas de ARN al aplicarlas como puntos en una membrana a través de succión con vacío, para su posterior hibridación con una sonda marcada.



## BASES TEÓRICAS DE LA PCR EN TIEMPO REAL

Para la amplificación por PCR en tiempo real además de los reactivos que se emplean en la PCR punto final, es necesario emplear un fluoróforo. En algunos ensayos cuantitativos se requiere determinar el número de moléculas ARNm (ver más adelante), por lo que es necesario llevar a cabo una reacción de transcripción reversa (RT) del ARNm a ADNc antes de que se aplique la PCR en tiempo real. En este caso, el ensayo se conoce como *retrotranscripción o RT* acoplada a la PCR (RT-PCR), la que puede realizarse en uno o dos pasos. Finalmente, se realiza la amplificación (síntesis) del ADN o ADNc en un termociclador acoplado a un sistema óptico, que monitorea la señal de los fluoróforos usados para detectar el producto amplificado (ver más adelante sistemas de detección). Debido a que la fluorescencia de éstos aumenta conforme el producto se amplifica, se combinan los procesos de amplificación y detección en una sola etapa.

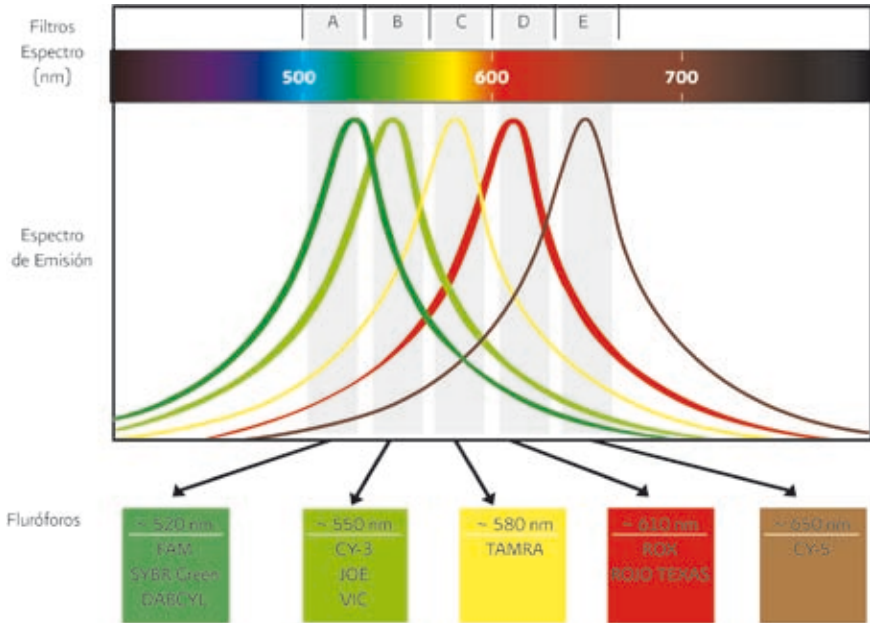
## EQUIPOS PARA REALIZAR LA PCR EN TIEMPO REAL

Los equipos para llevar a cabo la PCR en tiempo real incluyen un termociclador y una unidad capaz de detectar señales fluorescentes (fluorómetro) para monitorear el progreso de la reacción de amplificación, así como un *Hardware* y un *Software* para la captura y el análisis de los datos, respectivamente.

El termociclador del equipo debe ser capaz de mantener una temperatura uniforme para todas las muestras y ser lo suficientemente rápido en la transición de temperaturas de una etapa a otra (desnaturalización del ADN molde, alineamiento de los oligonucleótidos y síntesis). El sistema fluorométrico consiste en una fuente de energía para excitar a los fluoróforos (a una determinada longitud de onda de excitación) y un sistema de detección, que permita monitorear la señal emitida (a una longitud de onda de emisión) (Figura 1). La fuente de energía que proporciona la luz de excitación para los fluoróforos puede provenir de una lámpara (tungsteno), una resistencia (diodo emisor de luz) o un láser. Las diferentes longitudes de onda de emisión se detectan con dispositivos que incluyen filtros, multiplicadores y fotodetectores.

Entre los equipos que utilizan una lámpara como fuente de excitación, se encuentran los equipos ABI Prism 7000 o el modelo 7500 de Applied Biosystem, los modelos Mx4000 y Mx3000P de Stratagene y el modelo iCycler iQ de

Figura 1. Espectro de emisión de los fluoróforos comúnmente usados en la PCR en tiempo real. En la figura se observan los espectros de emisión de diversos fluoróforos a diferentes longitudes de onda. Las letras A a la E representan las longitudes de onda empleadas por diferentes filtros para detectar el grupo de fluoróforos listados en la parte inferior (Modificado de [https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms\\_077749.pdf](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_077749.pdf)).



Bio-Rad. Los equipos que utilizan una resistencia son el LightCycler de Roche, SmartCycler de Cepheid, Rotor-Gene de Corbett y el DNA Engine Opticon de MJ Research. El modelo 7900HT ABI Prism de Applied Biosystems utiliza láser (Wong y Medrano 2005).

## Sistemas de detección usados en la PCR en tiempo real

Los fluoróforos utilizados para seguir la amplificación del ADN durante la PCR en tiempo real pueden ser de dos tipos: a) fluoróforos con afinidad por el ADN y b) sondas específicas para fragmentos del ADN, es decir, que sólo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado un fragmento del ADN de interés (blanco).

a) Fluoróforos con afinidad por el ADN

Estos fluoróforos emiten fluorescencia cuando se unen al ADN. La intensidad de la fluorescencia se incrementa proporcionalmente a la concentración del ADN de doble cadena. Inicialmente, se utilizaba bromuro de etidio, pero su uso no es recomendable porque no discrimina de manera eficiente entre ADN de cadena doble o sencilla. Por otro lado, al ser un agente que se intercala en el ADN, se ha reportado que interfiere con la polimerización. También, existen otros como BEBO, YOYO-1 y TOTO-1 pero no son usados cotidianamente. El compuesto más utilizado es SYBR Green, el cual se une al surco menor del ADN de doble cadena. Mientras más ADN de doble cadena haya en el tubo de reacción, mayores serán la unión y la señal de fluorescencia del SYBR Green (Figura 2A). Este sistema es muy económico y permite el empleo de un solo fluoróforo en diferentes ensayos. Sin embargo, presenta varias desventajas, ya que no es posible hacer reacciones múltiples o *multiplex* (en donde se amplifican varios genes en la misma reacción), además de que la señal emitida no es específica, porque el fluoróforo se une a cualquier amplicón del ADN. Por lo anterior, para un uso correcto del SYBR Green en la PCR cuantitativa es obligatorio verificar la especificidad de la señal, analizar la curva de disociación<sup>3</sup> y comprobar que la señal de fluorescencia obtenida se debe sólo a la amplificación del blanco (Figura 2B). La estandarización para obtener un solo producto de amplificación, en algunos casos, consume mucho tiempo y reactivos (Lutfalla y Uze 2006).

b) Sondas específicas

Los sistemas de detección específicos para una secuencia de interés se pueden dividir en tres tipos: a) sondas de hidrólisis, b) sondas de hibridación y c) sondas de horquilla (Figura 3). Todas se basan en el principio FRET (*Flourescence Resonance Energy Transfer* por sus siglas en inglés), que consiste en la transferencia de energía entre dos fluoróforos: un donador (reportero) y un aceptor (apagador o *quencher*), los cuales emiten fluores-

---

<sup>3</sup> Procedimiento que se utiliza para verificar la presencia de un solo producto de amplificación, basado en la temperatura de disociación de dicho producto. En este ensayo al aumentar la temperatura, la señal de fluorescencia observada muestra un punto de inflexión donde el 50 % del producto se ha desnaturalizado. Al graficar la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura, se obtiene un pico que indica la temperatura de desnaturalización del producto. La presencia de más de un pico indica que hay más de un producto de amplificación.

Figura 2. Fluoróforos con afinidad por el ADN: SYBR Green. A) Mecanismo de incorporación del SYBR Green. Durante la alineación del iniciador, el SYBR Green se incorpora en la doble cadena. La señal de fluorescencia incrementa de manera proporcional a las moléculas de doble cadena producidas en la amplificación (modificado de <http://www.b2b.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html>). B) y C) Ejemplo del uso de una curva de disociación para comprobar la especificidad del ensayo. En el ejemplo, se presenta la fluorescencia emitida en función de la temperatura cuando hay un solo producto (1, línea continua) o cuando hay dos productos amplificados (2, línea punteada). En 2c se grafica la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura, para el caso en que hay un solo producto de amplificación se observa un solo pico que indica la temperatura de desnaturalización del producto ( $T_m=89^\circ\text{C}$ ), mientras que cuando hay dos productos se observan dos picos ( $T_m=79^\circ\text{C}$  y  $T_m=89^\circ\text{C}$ ) (Lutfalla y Uze, 2006).

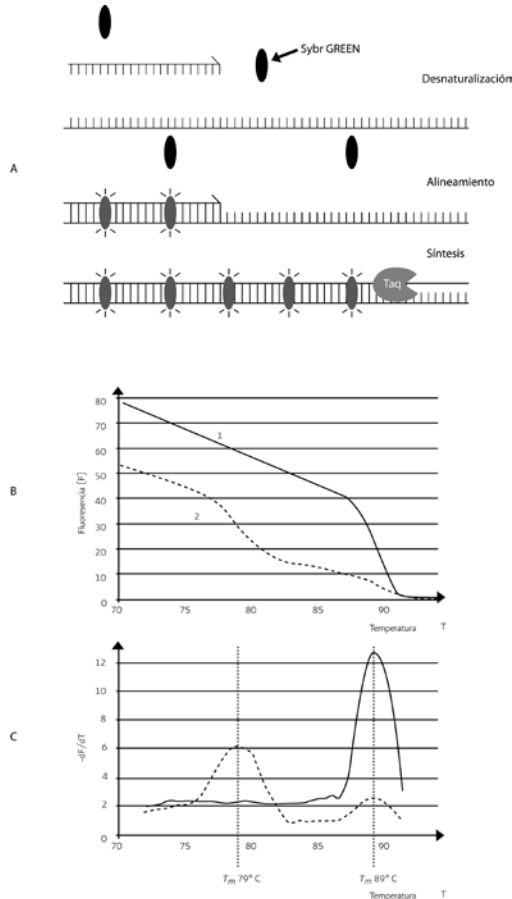
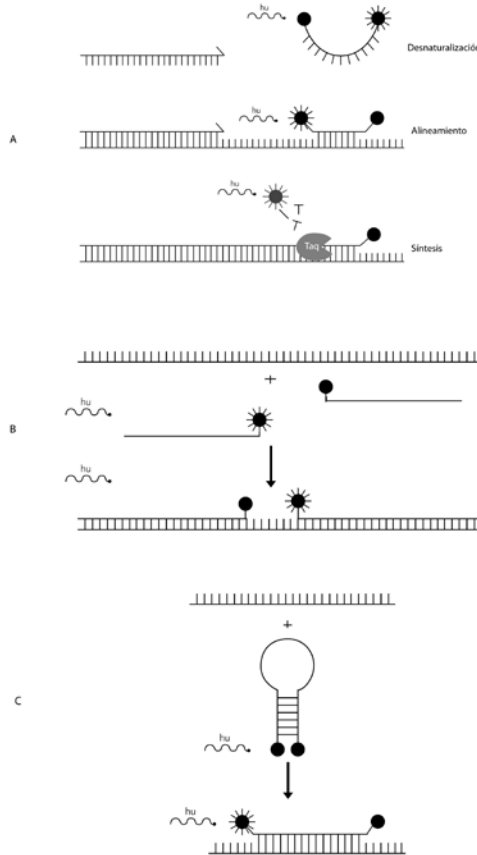


Figura 3. Sondas específicas. A) Sondas de hidrólisis. Representación gráfica de la fluorescencia emitida por las sondas Taqman®. Cuando el reportero en el extremo 5' y su apagador se encuentran en vecindad (10 nucleótidos) el equipo no detecta la señal emitida por el reportero. Sin embargo, cuando la ADN polimerasa progresa sobre la cadena, ésta desplaza y posteriormente hidroliza la sonda vía su actividad 5'→3' exonucleasa. Al separarse el apagador y el reportero se emite la señal de fluorescencia. B) Sondas de hibridación. Se observa el uso de dos sondas que hibridan al ADN en forma adyacente y donde uno de ellos se encuentra acoplado a un fluoróforo donador y el otro a un fluoróforo aceptor. Este sistema monitorea la fluorescencia emitida por el fluoróforo aceptor de manera opuesta al sistema usado en las sondas de hidrólisis. C) Sondas de horquilla. La hibridación de la sonda con el ADN permite que el fluoróforo se separe suficientemente del apagador de manera que permita la emisión del fluoróforo excitado cuya emisión será detectada por el equipo (modificado de <http://www.b2b.in-vitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html>).



cencia a diferente longitud de onda. Cuando el reportero y el apagador se encuentran próximos, el apagador absorbe toda la fluorescencia del reportero. Cuando este par de moléculas se separa, la fluorescencia del reportero no puede ser absorbida por el apagador y en consecuencia puede ser detectada por el fotodetector (revisado en Valasek y Repa 2005, Kubista *et al.* 2006).

### Sondas de hidrólisis

Entre las más utilizadas se encuentran las sondas *TaqMan*® que se conocen también como sondas 5' nucleasas (ya que utilizan la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa) (Figura 3A). En este sistema se utiliza una sonda, es decir, un oligonucleótido específico (~20 bases) para la secuencia del gen de interés marcado con dos fluoróforos, un reportero unido al extremo 5' y un apagador en el extremo 3'. La longitud de la sonda es la distancia entre los dos fluoróforos, de manera que la fluorescencia del reportero está apagada por el fenómeno FRET. La actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa corta los nucleótidos de la sonda durante la amplificación, los fluoróforos se separan y se observa la señal de fluorescencia. Es decir, la hidrólisis de la sonda provoca un incremento en la señal del reportero y ésta aumenta proporcionalmente al incremento del amplicón. Algunos ejemplos de fluoróforos reporteros son FAM, VIC y NED, entre los apagadores se encuentran TAMRA, DABCYL y BHQ (Figura 1).

### Sondas de hibridación

En este caso se utilizan dos sondas específicas que hibridan con la secuencia del ADN de interés (Figura 3B). Una de ellas está marcada con un donador y la otra con un aceptor. La señal del fluoróforo aceptor es monitoreada por el sistema de detección conforme se da la amplificación del ADN, así la cantidad de oligonucleótidos unidos será mayor por lo que se incrementará la intensidad de la fluorescencia. Este sistema sigue la señal del fluoróforo aceptor de forma opuesta a la sondas de hidrólisis, que siguen la señal del reportero o donador.

## Sondas de horquilla

En estas sondas, un oligonucleótido marcado en su extremo 5' con un reportero y el 3' con un apagador, se encuentran formando una horquilla, estructura que los mantiene cercanos para poder llevar a cabo la transferencia de energía y mantener al reportero apagado (Figura 3C). Al unirse a la secuencia de interés, la horquilla se extiende, aumentando la distancia entre el apagador y el reportero, permitiendo detectar la fluorescencia de este último. Estas sondas de horquilla son altamente específicas. Existen varias que utilizan este principio como los *molecular beacons*, los *scorpions*, los *sunrise primers* así como los *LUX primers*.

## PROTOCOLO

Este protocolo se utiliza para cuantificar el porcentaje de copias de transgen en maíz genéticamente modificado a partir del ADN genómico. Se emplean sondas Taqman® y se amplifica un gen endógeno de maíz y una región del promotor 35s, comúnmente usado en las construcciones genéticas insertadas en organismos genéticamente modificados (OGM).

## Equipo

- PCR en tiempo real
- Regulador de voltaje con *no-break*
- Computadora con el programa de análisis instalado

## Material

- Guantes de nitrilo libres de polvo
- Tubos o placas PCR de 200 µl de calidad óptica
- Puntas nuevas estériles de 10 y 100 µl
- Micropipetas de alta precisión de 20 µl y 200 µl
- Gradilla para tubos PCR
- Charola para hielo

## Reactivos

- TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- Agua grado biología molecular (ultrapura)
- Sonda TaqMan® e iniciadores para el marcador p35s:
  - Sonda: 35s 6FAM- TCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCA-TAMRA
  - sF: CGTCTTCAAAGCAAGTGGATTG
  - sR: TCTTGCGAAGGATAGTGGGATT
- Sonda TaqMan® e iniciadores para el marcador endógeno HMG (High Mobility Group):
  - Sonda-Mhmg: 6FAM- CAATCCACACAAACGCACGCGTA-TAMRA
  - MaiJ-F2: TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA
  - mhmg-Rev; GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT
- Muestras del ADN:
- ADN extraído de harina de maíz de material de referencia certificado. Para una lista de los materiales disponibles ver: ([http://irmm.jrc.ec.europa.eu/html/reference\\_materials\\_catalogue/catalogue/RM\\_Catalogue.pdf](http://irmm.jrc.ec.europa.eu/html/reference_materials_catalogue/catalogue/RM_Catalogue.pdf)). Por ejemplo, Maize GMO Standard 1507 BioChemika, Set con 0%, 0.1%, 1% y 10% 1507, ERM.
- ADN extraído de harina de maíz problema.

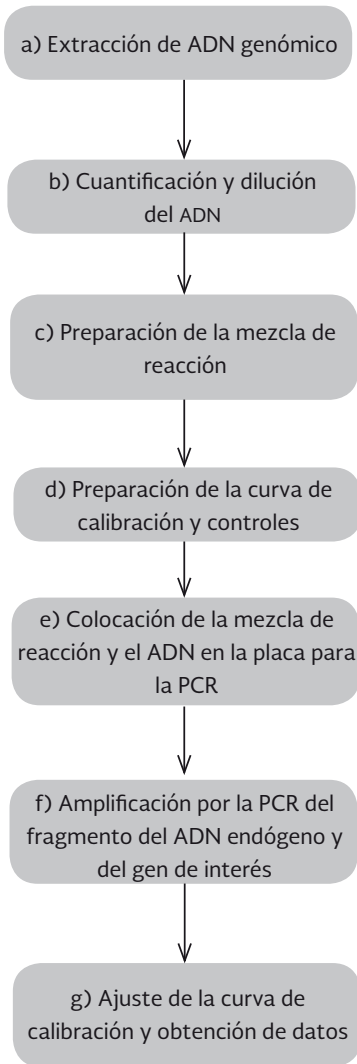
## Método

### Antes de empezar

Verificar que el fluoróforo para el ensayo sea el apropiado de acuerdo con el equipo que se usará. El equipo debe estar calibrado; en caso necesario realizar las calibraciones pertinentes. El equipo y el *software* deben estar conectados a un *no break* para evitar que se interrumpa el ensayo o se pierdan datos por falla o por cambios repentinos en el suministro eléctrico. Las superficies de trabajo deben estar limpias para evitar la contaminación. Es muy importante trabajar con guantes sin polvo, limpiar las superficies con papel sin pelusa y detergentes que degraden el ADN o bien con una solución de hipoclorito de sodio al 10%.



## Etapas de la técnica



1. Preparar una curva de calibración (ADN) con estándares certificados a diferentes concentraciones.
  - 1.1. Se emplean los puntos 10%, 1%, 0.1% y 0% de concentración por cuadruplicado.
2. Reacciones de amplificación. Preparar por duplicado la mezcla de reacción, una para el marcador endógeno y otra para p35s, de acuerdo a las cantidades de la Tabla 1.

**Tabla 1. Mezcla de reacción para el ensayo de amplificación para la cuantificación de transgénicos en maíz.**

Reactivo	Ci	Cf	Vol. para una reacción de 25 $\mu$ l
Agua grado biología molecular	----	----	9.5 $\mu$ l
TaqMan® Universal PCR Master Mix	2X	1X	12.5 $\mu$ l
Iniciador sentido	10 $\mu$ M	150 nM	0.375 $\mu$ l
Iniciador antisentido	10 $\mu$ M	150 nM	0.375 $\mu$ l
Sonda	5 $\mu$ M	50 nM	0.25 $\mu$ l
ADN molde	50 ng/ $\mu$ L	100 ng	2 $\mu$ l
Volumen total	----	----	25 $\mu$ l

Ci = concentración inicial; Cf = concentración final.

3. Las muestras del ADN que van a ser analizadas deben mantenerse en hielo hasta que se coloquen en la placa o en los tubos PCR. Procesar cada muestra por duplicado.
4. Todos los reactivos para la PCR deberán descongelarse y homogeneizarse, cuidadosamente. Mantenerse sobre hielo y tapados para evitar que reciban la luz directa.
5. Colocar 23  $\mu$ L de la mezcla de reacción en cada tubo.
6. Agregar 2.0  $\mu$ L del ADN problema a cada tubo.
7. Una vez preparadas las mezclas, centrifugar los tubos para eliminar burbujas que pudieran interferir con la lectura de la fluorescencia y la solución quede en el fondo de los tubos.
8. Preparar el equipo y programar las condiciones para la amplificación (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción del programa de amplificación.

Etapa	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (h:min:s)	Número de ciclos
1	1	50	0:02:00	1
2	1	95	0:10:00	1
3	1	95	0:00:15	45
	2	60	0:01:00	

9. Ejecutar el programa.

10. Obtención de datos.

10.1 Establecer el umbral. En el *software* del equipo desplegar las curvas de amplificación en escala logarítmica. Primero, el gen endógeno, después p35s. Localizar la línea umbral en el área donde las curvas sean paralelas. Analizar los datos. Ver la curva en modo lineal y verificar que el umbral seleccionado quede dentro de la fase geométrica de ésta.

10.2 Establecer la línea base. Determinar el número de ciclo en el que la primera curva de amplificación cruza el umbral y establecer la línea base tres ciclos antes de este punto.

10.3 Analizar los datos y exportarlos a una hoja de cálculo. De acuerdo al equipo y *Software* empleado, lo anterior puede hacerse de manera automática o manual, algunos programas permiten hacer todo el análisis sin necesidad de exportar a una hoja de cálculo. Después de seleccionar el umbral y la línea base, el programa generará de manera automática la curva de calibración y realizará una regresión lineal con los puntos de la curva. A partir de la regresión calculará los valores de ciclo umbral o Ct (véase más adelante) para las muestras problema y de estos últimos se calcula la concentración en porcentaje.

## RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

- Verificar que los genes a analizar tengan una sola copia. Existen OGM con más de una copia del promotor 35s, que no pueden ser utilizados porque sobreestimarían el contenido real de material genéticamente modificado en la muestra.
- Para realizar el ensayo de la PCR en tiempo real es muy importante contar

con ADN de buena calidad y eliminar la presencia de inhibidores de la PCR que pudieran interferir en ella y producir resultados erróneos.

- Con la finalidad de prevenir la contaminación de las muestras, es recomendable emplear puntas con filtro y micropipetas de presión positiva para preparar la mezcla de reacción y para adicionar el ADN de las muestras a cuantificar.
- Es muy importante trabajar con pipetas calibradas.
- Preparar alícuotas de los reactivos para no descongelarlos repetidamente. Las alícuotas de sondas e iniciadores pueden estar en el refrigerador por varias semanas.
- Preparar una mezcla de reacción para cada punto de la curva de calibración y adicionar el ADN a toda la mezcla, posteriormente dividirla según corresponda. Esto es particularmente útil para los puntos de la curva de menores concentraciones, ya que en ellos el número de copias presente en la solución es menor y se incrementa el error de muestreo, disminuyendo la probabilidad de que se tome el mismo número de copias en las diferentes repeticiones.

## MÉTODOS DE ANÁLISIS

Durante la amplificación por la PCR-TR, la sonda adicionada genera una señal de fluorescencia que refleja la cantidad de producto amplificado. La cinética de amplificación por la PCR se puede dividir en cuatro fases: 1) inicial o basal, 2) geométrica (conocida como logarítmica o exponencial), 3) lineal y 4) *plateau* o estacionaria (Figura 4, ver también capítulo de PCR).

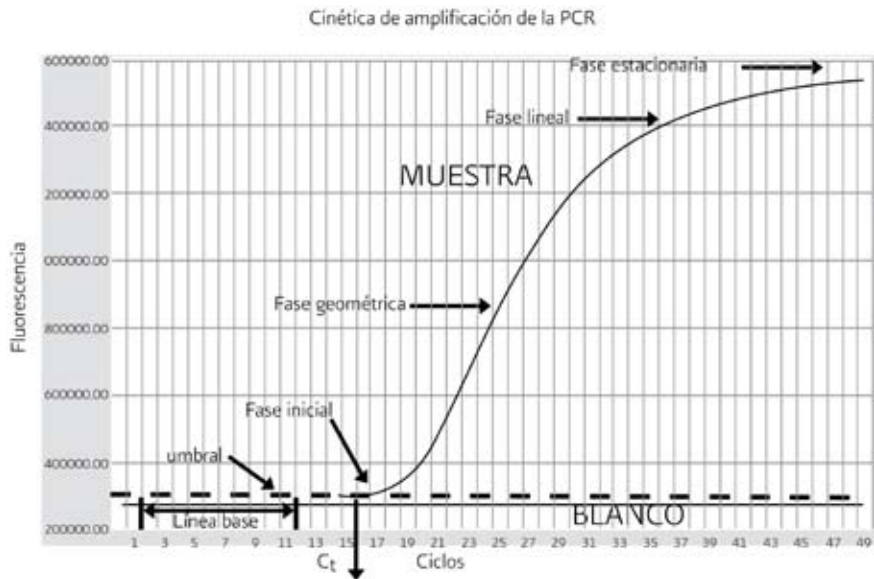
Durante la fase inicial, entre los primeros 10-15 ciclos, la fluorescencia es insuficiente para lograr discriminar el ruido basal. Sin embargo, como se muestra en la Figura 4, esta fase sirve para delimitar la línea base (ver más adelante). En la fase geométrica, los reactivos de la reacción se encuentran de forma abundante por lo que la amplificación por la PCR tiene una eficiencia cercana al 100%. En esta fase de la cinética de amplificación, el comportamiento del ADN es  $2^n$ , es decir, a partir de cada molécula del ADN se generan dos, por lo que el producto de la PCR se duplica después de cada uno de los ciclos. La fase lineal comprende el momento en que los reactivos empiezan a ser limitantes en la reacción y se presenta un decaimiento de la actividad enzimática. La eficiencia de la amplificación es inconstante durante esta fase. Por último, la fase estacionaria muestra una señal saturada. La amplificación se detiene debido a que los componentes

de la reacción se agotaron. En ésta, la cantidad de producto obtenida es constante aunque se incremente el número de ciclos. En la Figura 4 también se muestran dos componentes importantes de la cinética de amplificación: la línea base, la cual sirve para corregir las curvas que se obtienen de un experimento, restándose a las curvas de amplificación, y el  $C_t$  que se explica a continuación.

## Valor de $C_t$

El  $C_t$ , del inglés *cycle threshold*, equivale al número de ciclos necesarios para que cada curva alcance un umbral en la señal de fluorescencia. La comparación

Figura 4. Cinética de amplificación de la PCR. Durante los ciclos iniciales de la PCR no hay cambios significativos en la intensidad de la fluorescencia emitida, por lo que es indistinguible el ADN amplificado y el ruido basal, pero permiten fijar la línea base. En la siguiente etapa, aumenta la cantidad del ADN amplificado y la señal fluorescente. El punto donde se observa un sensible incremento en la fluorescencia se conoce como fase inicial, la cual es el origen de la fase logarítmica o geométrica. Posteriormente, inicia la fase lineal en la cual la eficiencia de amplificación no es constante. Finalmente, se llega a la fase estacionaria donde el producto obtenido permanecerá constante aunque se aumente el número de ciclos.



de los Ct entre las muestras permite calcular la diferencia en la cantidad inicial de las moléculas del ADN o ADNc específico que se desea evaluar, ya que mientras mayor cantidad del ADN blanco haya en una muestra, menor el número de ciclos (Ct) que se requiere para alcanzar este umbral. Entonces, el Ct es un valor directamente proporcional a la cantidad inicial del ADN blanco y a partir de este valor se puede calcular la cantidad del ARNm o del ADN. El valor de Ct puede ser asignado de manera automática por el *Software* del equipo mediante diferentes algoritmos o bien se puede asignar de forma manual. Como todo valor de fluorescencia, el Ct es un valor que puede ser afectado por características propias del equipo detector, como los filtros utilizados, la ganancia, el tiempo de vida de la lámpara, etc., por lo que no es posible comparar valores de Ct entre diferentes experimentos y/o equipos.

Para evaluar la cantidad del ADN de interés en cada una de las muestras, se toma en cuenta la eficiencia de la amplificación (ver siguiente apartado). En el caso más sencillo, la eficiencia de la amplificación es 100%, es decir, el Ct se asigna sólo durante la fase geométrica de la amplificación donde ésta es 100% eficiente. Si se asume esta eficiencia, la proporción entre la cantidad inicial de copias del ADN blanco entre dos muestras diferentes se calcula como:

$$[No]_A/[No]_B = 2^{(\Delta Ct)} \quad (1)$$

Donde:

$[No]_A$  = número inicial de moléculas del ADN en la muestra A

$[No]_B$  = número inicial de moléculas del ADN en la muestra B

$\Delta Ct$  = la diferencia entre  $Ct_B - Ct_A$

Si el Ct de la muestra A es tres veces mayor que el de la muestra B, es decir, B requiere de tres ciclos más para alcanzar el mismo umbral de fluorescencia que A, eso significa que hay 8 ( $2 \times 2 \times 2$ ) veces más ADN blanco en la muestra A que en la B.

La fórmula 1 sólo se puede utilizar en la fase geométrica cuando la eficiencia es 100%. Sin embargo, en la mayoría de los casos experimentales, la eficiencia no es 100%, por lo que es necesario incluir la eficiencia de la reacción en la fórmula:

$$[No]_A/[No]_B = (1+E)^{(\Delta Ct)} \quad (2)$$

Donde  $E$  es la eficiencia de la reacción

## Eficiencia de la amplificación (validación de los ensayos de la PCR en tiempo real)

La eficiencia de la amplificación debe considerarse para tener una cuantificación confiable. Inicialmente, se asumía que era suficiente elegir valores de Ct en la fase geométrica para tener una eficiencia total. Sin embargo, ya que la mayor parte de los casos experimentales no la presentan, es necesario calcularla para obtener un factor de corrección que evite una sobreestimación de la concentración del ADN inicial.

La eficiencia de la reacción de la PCR se calcula utilizando una “curva” proveniente de la amplificación de una dilución serial de un estándar (de un producto de la PCR o un plásmido puro que contenga el ADN blanco, o como en el caso del ejemplo del protocolo, de un estándar certificado del que se extrae el ADN) (Figura 5A). Los valores de Ct de las curvas obtenidas se grafican contra el logaritmo del factor de dilución del número de copias del molde o de la concentración de la muestra (Figura 5B). Deben hacerse triplicados o cuadruplicados de cada dilución y la desviación estándar entre los diferentes puntos debe tener un valor de Ct menor a 0.2.

La recta (Figura 5B) está descrita por la siguiente ecuación:

$$Ct = k \log(N_0) + Ct(1) \quad (3)$$

Donde Ct (1), que es la ordenada al origen, corresponde a una dilución del estándar que contiene una sola molécula del ADN blanco (Figura 5B).

La eficiencia de la reacción se calcula con la siguiente fórmula:

$$E = 10^{-1/k} - 1 \quad (4)$$

Cuando la pendiente (k) de la recta obtenida es cercana o igual a -3.32, la eficiencia de la amplificación es igual a 100%. El valor calculado de E debe sustituirse en la ecuación (2).

El método descrito se utiliza comúnmente para cuantificar la eficiencia de la reacción de la PCR. Sin embargo, existen muchos autores que opinan que puede sobreestimar el valor de E. Actualmente, además de la curva estándar se sugiere involucrar algún método alternativo para determinar la eficiencia con el fin de ratificarla (especialmente en los ensayos de cuantificación relativa, ver más adelante) (Wong y Medrano 2005).

## Ensayos de cuantificación

En la PCR en tiempo real existen dos tipos de cuantificación, la absoluta y la relativa. En ambos tipos se utiliza el valor de Ct para determinar la cantidad del ADN o ARN.

### a) Cuantificación absoluta

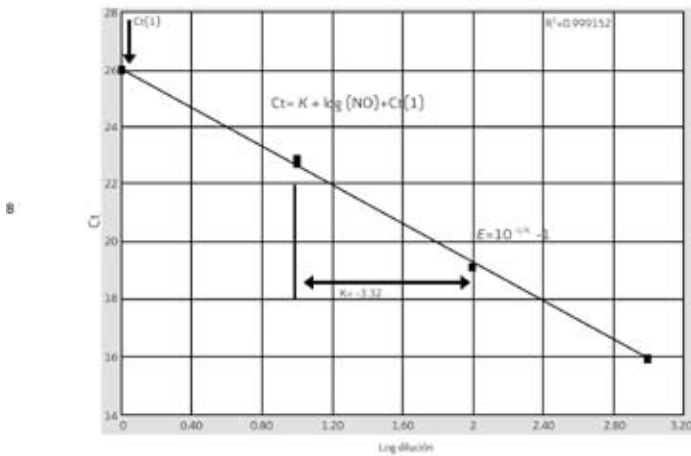
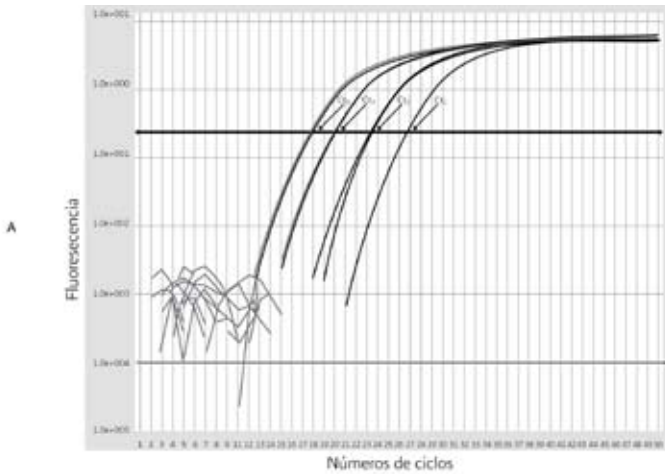
La cuantificación absoluta se utiliza para determinar cargas virales, la presencia de agentes patógenos y transgénicos (ver más adelante en la sección de aplicaciones). Este tipo de ensayo permite determinar el número exacto de moléculas del ADN o ARN en una muestra. Para llevarla a cabo, se requiere una muestra con una cantidad exacta en ng/ $\mu$ L,  $\mu$ mol/ $\mu$ L, número de copias o equivalentes genómicos, como estándar absoluto externo. Este estándar puede ser un fragmento del ADN de doble cadena o de cadena sencilla, un ADNc, un producto amplificado por la PCR de la secuencia del ADN de interés clonado en un plásmido, un producto de la PCR convencional o la síntesis directa de la secuencia del ADN blanco. Este estándar externo se usa para hacer diluciones seriadas y generar una curva, a partir de los valores de Ct obtenidos para cada concentración y el logaritmo de la concentración correspondiente. Esta curva de calibración permite interpolar directamente los valores de Ct de las muestras problema y obtener su concentración.

### b) Cuantificación relativa

La cuantificación relativa se utiliza en ensayos de expresión génica, principalmente. En este caso se parte de los niveles del transcrito o ARNm de las muestras, por lo que es necesario realizar la transcripción reversa (RT) y los ensayos se conocen como RT-PCR en tiempo real. Este tipo de cuantificación mide los cambios en el estado basal de un gen de interés *versus* un gen de expresión constante que actúa como control. La diferencia con la cuantificación absoluta radica en que no se parte de una cantidad conocida del ADN, sino de un control endógeno o gen constitutivo. Debido a que no se conoce la cantidad absoluta del estándar interno, sólo se pueden determinar los cambios relativos del gen de interés con referencia al gen endógeno. Es necesario normalizar los datos entre el valor que se obtiene para el gen blanco y el del gen endógeno, de tal manera que los valores resultantes



Figura 5. Curva estándar. A) Curva estándar de amplificación. Esta curva se genera al realizar amplificaciones a partir de diluciones seriadas del ADN de una muestra con concentración conocida. La curva se produce al graficar el promedio de los Ct obtenidos  $\pm$  la desviación estándar de cada uno de los triplicados o cuadruplicados. B) Curva estándar. La recta obtenida permite calcular las concentraciones desconocidas de las muestras usando la ecuación:  $Ct = k + \log(N_0) + Ct(1)$ . También, permitirá calcular la eficiencia de la reacción ( $E = 10^{-1/k} - 1$ ). La figura muestra el log de la dilución contra el valor de Ct, en este caso la pendiente es de -3.32.



sean reflejo de los cambios de expresión del gen y no de las diferencias en la cantidad de muestra añadida.

Para normalizar la expresión génica, a partir de ensayos de cuantificación relativa, existen algunos métodos y modelos que consideran la eficiencia de la amplificación para determinar la cantidad del ADN, por ejemplo el método comparativo de Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (Livak y Schmittgen 2001), el Q gene (Muller et al. 2002) y el de la curva de amplificación (Peirson et al., 2003); así como, los modelos de Pfaffl (Pfaffl 2001) y el modelo de Liu y Saint (Liu y Saint 2002). Uno de los más utilizados es el de método comparativo de Ct, que se explica a continuación. *Nota:* cada usuario puede elegir dentro de los métodos disponibles de acuerdo a sus ventajas y desventajas (Wong y Medrano 2005).

c) Método comparativo de Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

Este método es un modelo matemático que calcula los cambios de expresión génica como un cambio relativo en ésta (número de veces) entre una muestra experimental o gen de interés y un calibrador o gen endógeno. Se lleva a cabo un ensayo de validación usando diluciones seriadas tanto para el gen problema como para el gen endógeno. Se obtienen los valores de  $\Delta Ct$  ( $Ct_{\text{gen}} - Ct_{\text{endógeno}}$ ). Éstos se grafican en el eje y versus el logaritmo de la concentración en cada una de las diluciones en el eje x. La pendiente de la recta debe ser menor o igual a 0.1 para que el método sea válido. Este método requiere que la eficiencia de amplificación (E) sea la misma para el gen blanco y el gen endógeno, y productos de la PCR pequeños (150 pb aproximadamente).

## Normalización y controles endógenos

En el caso de los ensayos de RT-PCR en tiempo real para medir expresión génica, es necesario corregir la variación entre muestras. En este proceso se compara la cantidad del ARNm en dos muestras diferentes. En cada una de las muestras se mide la cantidad del ARNm de interés en relación con la cantidad del ARNm de referencia, el cual teóricamente, es constante en las dos muestras. La proporción  $ARNm_{\text{blanco}}/ARNm_{\text{referencia}}$  se usa para comparar la cantidad del ARNm blanco en las muestras.

Los resultados obtenidos se normalizan con ayuda de un control, el  $ARNm_{\text{referencia}}$ . Generalmente, este control es un gen que de manera ideal debe expresarse cons-

tante e independientemente de las condiciones experimentales, del tratamiento de las muestras, así como en los diferentes tejidos o tipos celulares.

Existen varios tipos de controles endógenos:

a) Genes constitutivos

Tales como los genes de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) y de la  $\beta$ -actina. Estos son los más usados. Sin embargo, gracias a la sensibilidad de la PCR en tiempo real, se ha observado que en realidad, algunos procesos biológicos o el uso de diferentes tipos celulares afectan su expresión. Por lo tanto, es necesario validar la estabilidad de la expresión del gen control en las condiciones de un experimento a realizar antes de usarlo para llevar a cabo la normalización.

b) Genes del ARN ribosomal (ARNr)

Generalmente, se utiliza el 18S. Estos ARNr son sintetizados por una polimerasa distinta a la que sintetiza los ARNm, por lo tanto la expresión del ARNr está afectada mucho menos por el tratamiento a que se hayan sometido las muestras (Spanakis 1993).

c) ARN total

La concentración del ARN total se usa también para normalizar la expresión de genes. Esta normalización tiene dos inconvenientes. Uno, la cuantificación del ARN tiene que ser muy precisa, por lo que los métodos espectrofotométricos que se utilizan rutinariamente no pueden ser empleados y el proceso de normalización depende directamente de la cuantificación del ARN. Dos, la concentración del ARN total está afectada por distintos procesos celulares (Bustin 2000).

d) ARNm múltiples

Se utilizan varios genes constitutivos y se obtiene un factor de normalización proveniente de la media de los niveles de expresión. El uso de varios ARNm constitutivos es el método más aceptado en la actualidad para normalizar los datos en la expresión génica, minimiza los problemas mencionados con los otros métodos (Pfaffl *et al.* 2004).

## APLICACIONES

La PCR en tiempo real se ha convertido en una herramienta común en la investigación básica, la industria, la agricultura, la medicina forense y la clínica, mismas que se han visto beneficiadas por la sensibilidad, velocidad y especificidad de éste método.

### Investigación básica

La determinación del nivel de expresión de los genes ha permitido asociar cambios de ciertas moléculas en una diversidad de procesos fisiológicos como en la inflamación (Rodríguez *et al.* 2007) o para predecir recurrencia del cáncer (Katsuragi *et al.* 2007). Ayuda en la genotipificación de animales *knock out*, *knock in* y modelos transgénicos, así como en la determinación de la eficacia del *knock down*. En el genoma humano, el reconocimiento de polimorfismos de un solo nucleótido, SNPs (del inglés *single nucleotide polymorphisms*) intenta comprender la complejidad de la respuesta ante las enfermedades más comunes (Schirmer *et al.* 2007), el entender el papel de éstos ayudará a disminuir los efectos adversos que se presentan en ciertos individuos y permitirá diseñar regímenes de tratamientos con dosis personalizadas (Kleyn y Vesell 1998).

### Diagnóstico molecular

El análisis por (RT) PCR en tiempo real puede realizarse a partir de una amplia variedad de muestras clínicas como tejidos frescos y fijados en parafina, secreciones corporales, líquido cefalorraquídeo, sangre total, plasma, leucocitos, material fecal, exudados de garganta, vaginales o anales, etc. Se pueden detectar diversos microorganismos como virus (Espy *et al.* 2006) y bacterias (Murdoch 2004) a nivel cualitativo (presencia o ausencia) y cuantitativo (carga viral). La velocidad de estas pruebas y el apoyo que dan al diagnóstico oportuno y certero le otorgan un valor agregado. Esta técnica se puede utilizar de guía en la elección del tratamiento apropiado, al determinar mutaciones que confieren resistencia a medicamentos, como la rifampicina y la isoniazida (Rolain *et al.* 2004), y a los antivirales como ocurre en el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) (Johnson *et al.* 2007), evitando los efectos adversos por el uso

de medicamentos innecesarios por su falta de efectividad, reduciendo costos y previniendo la hospitalización (Espy et al. 2006). Además, esta metodología permite el manejo de muestras potencialmente infecciosas. En el caso de virus “peligrosos”, la detección por (RT) PCR en tiempo real puede realizarse en muestras inactivadas por esterilización, previniendo la infección del personal ocupacionalmente expuesto (Espy et al. 2002).

## Monitoreo de patógenos

En aguas residuales pueden detectarse bacterias como *Escherichia coli* O157 (Ibekwe et al. 2002) y otros organismos como *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, etc. (Shannon et al. 2007). También pueden detectarse patógenos en plantas y alimentos. Las leyes de control de alimentos aceptan un nivel tolerable de contaminación por patógenos; por lo tanto, una cuantificación precisa es muy importante para no sobrepasar los niveles máximos autorizados y para evitar la pérdida de lotes marcados falsamente como contaminados (Weller et al. 2000, Agindotan et al. 2007, Gachon et al. 2004).

## Monitoreo de OGM

Los organismos genéticamente modificados se encuentran regulados a nivel internacional y es importante conocer los niveles de presencia en alimentos y en la cadena de consumo. Para esto, es necesario contar con métodos de detección y cuantificación adecuados y eficaces, así como garantizar que durante su comercio no se sobrepasen los umbrales permitidos por algunos países, de modo tal que la herramienta idónea para su control ha sido la cuantificación mediante PCR en tiempo real (Holst-Jensen 2009).

## PERSPECTIVAS

La (RT) PCR en tiempo real es una técnica para determinar cantidades del ADN o ARN en una gran variedad de ensayos que involucran la expresión de genes, la detección de patógenos y transgénicos, la genotipificación, la determinación de la carga viral, entre otros. En el futuro, esta técnica se vinculará totalmente en el diagnóstico de enfermedades, estudios epidemiológicos, estudios foren-

ses, determinaciones de la calidad de agua y/o aire, alimentos, en los estudios genéticos y, por supuesto, en la investigación básica.

Al ser una herramienta poderosa para el análisis de abundancia o presencia de los ADN específicos, es necesario contar con un diseño experimental adecuado que optimice la generación de datos y análisis de los resultados, ya que por su sensibilidad es una técnica que puede dar lugar a resultados erróneos y sobreestimaciones. En la planeación de estos ensayos hay que incorporar todos los controles necesarios, así como asegurarse de la especificidad de los productos de amplificación, del rendimiento, del rango de detección y llevar a cabo tanto triplicados intraensayos como ensayos de reproducibilidad entre experimentos. De especial cuidado debe ser el proceso de RT, el uso de controles endógenos en el caso de los ensayos de expresión génica, así como los métodos de normalización de los datos.

Para obtener resultados certeros utilizando esta técnica, es necesario tener en cuenta que una estrategia no es aplicable para cualquier situación experimental y que es necesario validar cada método que se realiza en la condición experimental particular.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agindotan B. O., P. J. Shiel y P. H. Berger. 2007. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 142: 1-9.
- Brechtbuehl K., S. A. Whalley, G. M. Dusheiko y N. A. Saunders. 2001. A rapid real-time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus. *Journal of Virological Methods* 93: 105-113.
- Bustin S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25:169-193.
- Espy M. J., J. R. Uhl, L. M. Sloan, J. E. Rosenblatt, F. R. 3rd Cockerill y T. F. Smith. 2002. Detection of vaccinia virus, herpes simplex virus, varicella-zoster virus, and Bacillus anthracis DNA by LightCycler polymerase chain reaction after autoclaving: implications for biosafety of bioterrorism agents. *Clinical Proceedings* 77: 624-628.
- Espy M. J., J. R. Uhl, L. M. Sloan, S. P. Buckwalter, M. F. Jones, E. A. Vetter, J. D. Yao, N. L. Wengenack, J. E. Rosenblatt, F. R. 3rd Cockerill y T. F. Smith. 2006. Real-time

- PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews* 19: 165-256.
- Gachon C., A. Mingam y B. Charrier. 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany* 55: 1445-1454.
- Holst-Jensen A. 2009. Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives. *Biotechnology Advances* 27: 1071-1082.
- Ibekwe A. M., P. M. Watt, C. M. Grieve, V. K. Sharma y S. R. Lyons. 2002. Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy wastewater wetlands. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4853-4862.
- Johnson J. A., J. F. Li, X. Wei, J. Lipscomb, D. Bennett, A. Brant, M. E. Cong, T. Spira, R. W. Shafer y W. Heneine. 2007. Simple PCR assays improve the sensitivity of HIV-1 subtype B drug resistance testing and allow linking of resistance mutations. *PLoS ONE* 2: e638.
- Katsuragi K., M. Yashiro, T. Sawada, H. Osaka, M. Ohira y K. Hirakawa. 2007. Prognostic impact of PCR-based identification of isolated tumour cells in the peritoneal lavage fluid of gastric cancer patients who underwent a curative R0 resection. *British Journal of Cancer* 97: 550-6
- Kleyn P. W. y E. S. Vesell. 1998. Genetic variation as a guide to drug development. *Science* 281: 1820-1821.
- Kubista M., J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonák, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjobak, B. Sjogreen, L. Strombom, R. Stahlberg y N. Zoric. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 95-125.
- Liu W. y D. A. Saint. 2002. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Analytical Biochemistry* 302: 52-59.
- Livak K. J. y T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402-408.
- Lutfalla G. y G. Uze. 2006. Performing Quantitative Reverse-Transcribed Polymerase Chain Reaction Experiments. *Methods in Enzymology* 410: 386-400.
- Mladek C., K. Guger y M. T. Hauser. 2003. Identification and characterization of the ARIADNE gene family in Arabidopsis. A group of putative E3 ligases. *Plant Physiology* 131: 27-40.

- Muller P. Y., H. Janovjak, A. R. Miserez y Z. Dobbie. 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* 32: 1372-1379.
- Mullis K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262: 56-61.
- Murdoch D. R. 2004. Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 112: 713-727.
- Peirson S. N., J. N. Butler y R. G. Foster. 2003. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Research* 31: e73.
- Pfaffl M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: e45.
- Pfaffl M. W., A. Tichopad, C. Prgomet y T.P. Neuvians. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26: 509-515.
- Rodriguez C., J. F. Alcludia, J. Martinez-Gonzalez, B. Raposo, M. A. Navarro y L. Badimon. 2007. Lysyl oxidase (LOX) down-regulation by TNF alpha: A new mechanism underlying TNF alpha-induced endothelial dysfunction. *Atherosclerosis* 196: 558-64.
- Rolain J. M., M. N. Mallet, P. E. Fournier y D. Raoult. 2004. Real-time PCR for universal antibiotic susceptibility testing. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54: 538-541.
- Schirmer M., M. Hoffmann, E. Kaya, M. Tzvetkov y J. Brockmoller. 2007. Genetic polymorphisms of NAD(P)H oxidase: variation in subunit expression and enzyme activity. *Pharmacogenomics Journal* 84: 297-304.
- Shannon K. E., D. Y. Lee, J. T. Trevors y L. A. Beaudette. 2007. Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. *The Science of the Total Environment* 382: 121-129.
- Spanakis E. 1993. Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. *Nucleic Acids Research* 21: 3809-3819.
- Valasek M. A. y J. J. Repa. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiological Education* 29: 151-159.



Weller S. A., J. G. Elphinstone, N. C. Smith, N. Boonham y D. E. Stead. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2853-2858.

Wong M. L. y J. F. Medrano. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39: 75-85.

[https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms\\_077749.pdf](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_077749.pdf).

<http://www.b2b.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html>.



# MICROARREGLOS DE ADN: FABRICACIÓN, PROCESO Y ANÁLISIS

Jorge Ramírez Salcedo<sup>1</sup>, Lorena Chávez González<sup>2</sup>, José Luis Santillán Torres<sup>3</sup> y Simón Guzmán León<sup>4</sup>

## INTRODUCCIÓN

Con el desarrollo de la secuenciación automatizada de los genomas completos de un sin número de organismos, se dio un paso adelante en el entendimiento de la genómica funcional. Sin embargo, no es hasta que se desarrolla la técnica de microarreglos de ADN (conjunto ordenado de genes en una pequeña superficie (10,000 individuos por cm<sup>2</sup>)) que esta información puede ser utilizada de forma práctica, permitiendo determinar simultáneamente si todos los genes de un organismo se están expresando o no en una condición determinada. No hace mucho tiempo, la observación y estudio del comportamiento de los genes bajo diferentes condiciones, se tenía que hacer uno por uno. Actualmente, con la tecnología de los microarreglos diseñada por Michael Eisen y Patrick Brown (1999) es posible determinar la actividad transcripcional de todos los genes de un organismo, en una condición determinada en un solo experimento.

\* Unidad de Microarreglos de DNA, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, A.P. 70-242; México D.F. 04360 México, Tel: 56225753. <http://microarrays.ifc.unam.mx/> Correos electrónicos: <sup>1</sup>jramirez@ifc.unam.mx, <sup>2</sup>lchavez@ifc.unam.mx, <sup>3</sup>jsanti@ifc.unam.mx, <sup>4</sup>sguzman@ifc.unam.mx.

En este capítulo explicaremos la técnica conocida como microarreglos de ADN de dos canales, cómo se fabrican, cómo se procesan en el laboratorio, cómo se obtienen los resultados, cómo se analizan, algunas consideraciones para un buen diseño experimental y finalmente los usos y aplicaciones de esta tecnología.

## **FABRICACIÓN DE MICROARREGLOS DE ADN**

Los microarreglos de ADN pueden ser fabricados en cualquier laboratorio, sin embargo se requiere una gran inversión de recursos para lograr este objetivo, por lo que es recomendable adquirirlos directamente de un fabricante especializado. En esta sección veremos de forma resumida el proceso para diseñar y fabricar un microarreglo de ADN. Para lo cual se deben considerar los siguientes aspectos: La construcción o adquisición de la biblioteca genómica, conformada por alícuotas de ADN de cada uno de los genes del modelo de interés, ya sea como productos de PCR u oligonucleótidos sintéticos. El diseño y construcción de la base de datos del microarreglo; en donde se describirá la localización física y la descripción de cada uno de los genes para su plena identificación en el microarreglo (esta información es fundamental ya que será utilizada para el análisis e interpretación de los datos de expresión génica obtenidos con los experimentos).

### **a) Bibliotecas genómicas**

Las bibliotecas genómicas se pueden construir, haciendo una reacción de PCR para cada gen de interés o se pueden adquirir directamente de un fabricante, ya sea como productos de PCR o como oligonucleótidos sintéticos (se debe tomar en cuenta el costo promedio de cada gen que puede ser de entre 3 y hasta 10 dólares americanos). Las bibliotecas deben ser adquiridas de preferencia en microplacas de 384 pozos, esto reduce el espacio necesario para almacenarlas y es el formato comúnmente utilizado por los robots de impresión.

Si se cuenta con la biblioteca y el equipo de impresión, el siguiente aspecto a considerar son los sustratos donde serán impresos los microarreglos. Los sustratos comúnmente empleados son los de vidrio de 25 X 75 mm recubiertos con: grupos amino, aldehído o epóxico (<http://arrayit.com/>, consultado en junio de 2010), que nos permitan fijar de forma covalente el ADN a la superficie del vidrio.

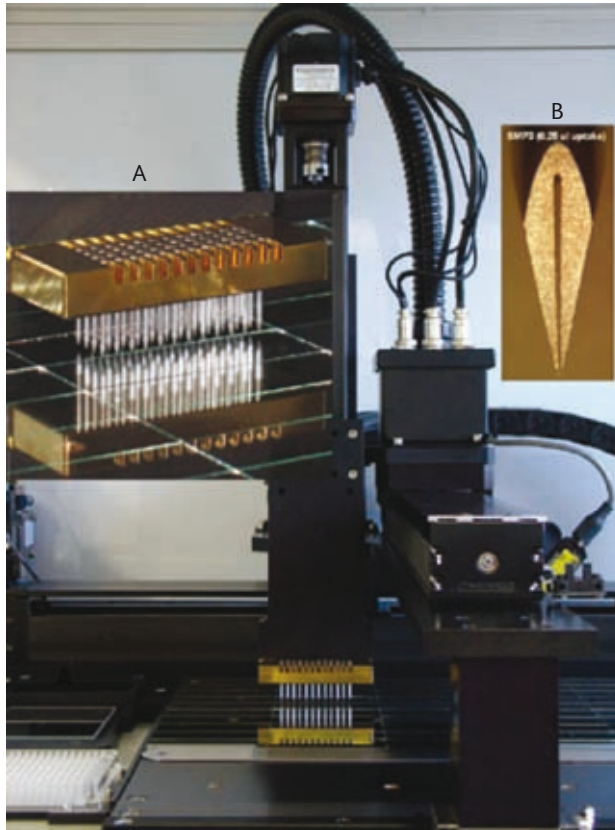
Otro aspecto fundamental para la fabricación de microarreglos es el espacio para trabajar y las características ambientales del mismo. Se requiere de un espacio no muy grande, con un ambiente libre de polvo y donde se puedan controlar perfectamente las condiciones de temperatura y humedad.

## **b) Diseño y construcción de la base de datos del microarreglo de ADN**

Existen varias herramientas de cómputo para el diseño y construcción de las bases de datos de un microarreglo de ADN e independientemente del software de elección se deben tomar en consideración los puntos que se describen a continuación, así como los lineamientos descritos en el software. En primer lugar se definen el soporte (sustrato o laminilla) sobre el cual se va a construir el microarreglo y el área de impresión. Por lo general para la impresión del microarreglo se utiliza un vidrio de 25 x 75 mm (como los portaobjetos utilizados comúnmente en microscopía). La definición del área de impresión, debe tomar en cuenta los pasos siguientes en el proceso (hibridización y lectura), en los que se podría dañar físicamente la zona de hibridización, en general se deben dejar al menos 3 mm entre el borde del sustrato y el área donde se imprimió el arreglo. De igual forma, el número de aplicadores que se utilicen dependerá del área de impresión, del número de genes a imprimir y del porta aplicadores del brazo robótico con que se cuente. En la Figura 1 se muestra la imagen de un brazo robótico empleado comúnmente.

El proceso de impresión de microarreglos de ADN implica controlar en su conjunto varios factores técnicos y ambientales: Los clones de ADN deberán estar ordenados en placas de 384 pozos, de preferencia de fondo cónico, a una concentración de 25 a 30  $\mu\text{M}$  y en un volumen de 15 a 20  $\mu\text{L}$  de solución de impresión (constituida por un amortiguador, sales higroscópicas y algún detergente). Como ya se mencionó, el lugar en donde se encuentra el impresor deberá estar completamente limpio, aislado de cualquier fuente de polvo, donde se puedan controlar la temperatura en un rango de 20 a 22°C y la humedad relativa entre 50 y 55%. Estas condiciones deben permanecer estables a lo largo de todo el proceso de impresión, con el propósito de evitar la evaporación de las alícuotas de solución de ADN y la hidratación excesiva de cada punto ya impreso (Eisen y Brown 1999).

Figura 1. Brazo robótico con 48 aplicadores y capacidad para 75 laminillas de 25 x 75 mm. Con este robot es posible aplicar hasta 40,000 muestras individuales en una superficie de 20 X 60 mm bajo condiciones controladas de temperatura y humedad. A) Porta aplicadores. B) Acercamiento a la punta de un aplicador.

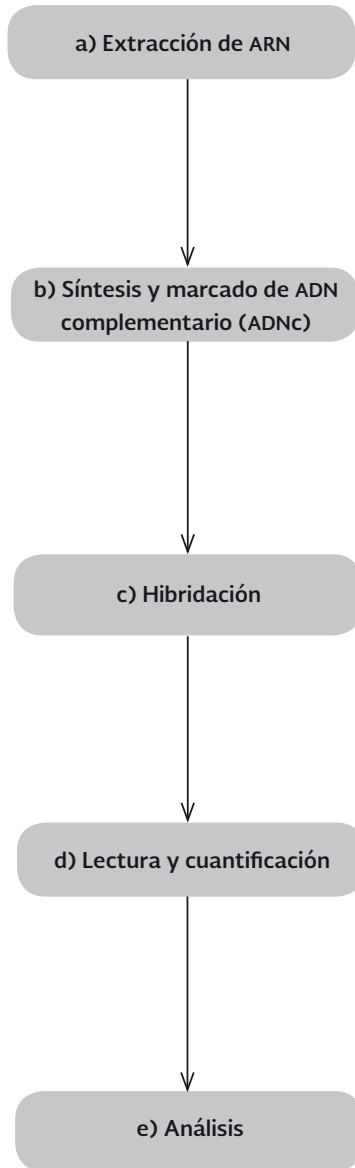


## PROTOCOLO

### Proceso de microarreglos

Con el propósito de ilustrar el método empleado en el proceso de un microarreglo, utilizaremos un experimento clásico “*La represión catabólica por la fuente de carbono en levaduras*”. Para este experimento se prepara un cultivo de levaduras en un medio que contiene glucosa como fuente de carbono. Una vez

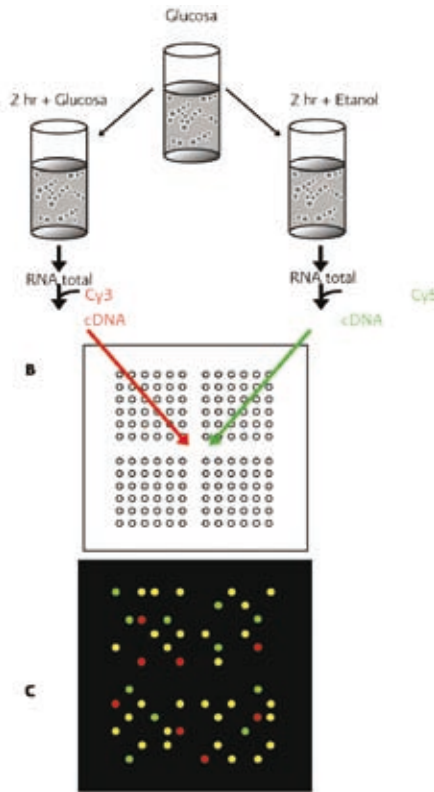
## Etapas de la técnica



que el cultivo alcanza la fase logarítmica de crecimiento, se divide en dos; una parte se coloca en el mismo medio y la otra en un medio donde la fuente de carbono es etanol y se permite que ambos cultivos alcancen la fase logarítmica nuevamente (Figura 2).

Cuando las células alcanzan la densidad óptica deseada, se extrae el ARN y se comienza el experimento, que consta de las siguientes etapas:

Figura 2. A) Representación esquemática del experimento de la represión catabólica por la fuente de carbono en levadura. B) Proceso de síntesis y marcado de cDNA y hibridización del microarreglo. C) Representación del resultado obtenido. Los puntos amarillos representan los genes expresados en igual proporción en ambas condiciones. Los puntos verdes a los genes requeridos por la célula para poder crecer en un medio con etanol como fuente de carbono. Los puntos rojos los genes requeridos para crecer con glucosa como fuente de carbono.





## Equipo

- Termociclador
- Centrífuga para micro-placas
- Vórtex
- Entrecruzador de luz UV
- Incubadora con agitación
- Centrífuga con vacío
- Microfuga
- Incubadora sin agitación
- Lector de microarreglos
- Espectrofotómetro
- Termoblock
- Equipo de cómputo con conexión a internet

## Material

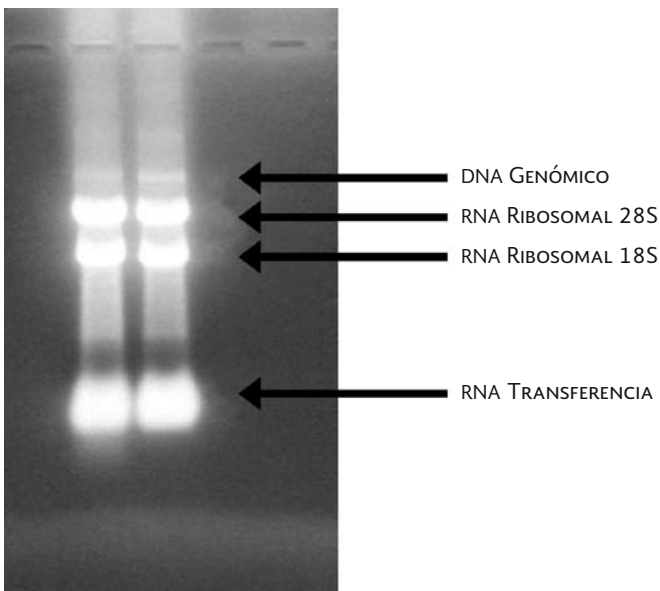
- Laminilla impresa (Microarreglos)
- Cámara de hibridización
- Pipetas automáticas
- Cubreobjetos
- Tubos para microcentrífuga de 1.5, 0.6 y 0.2 ml
- Guantes libres de talco
- Pinzas

## Reactivos

- Deoxinucleótido poli T
- Hexámeros al azar
- Transcriptasa inversa (Invitrogen)
- 5-(3-aminoalil-2' deoxiuridín 5' trifosfato) Aminoalil-dUTP (CAS N° 936327-10-5)
- 5-(3-alexa555-2' deoxiuridín 5' trifosfato) dUTP-Alexa555
- 5-(3-alexa647-2' deoxiuridín 5' trifosfato) dUTP-Alexa647
- Hidróxido de sodio (NaOH) 1N (CAS N° 1310-73-2)
- Ácido etilen diamino tetracético (EDTA) 0.5M, pH 8.0 (CAS N° 139-33-3)

- Ácido hidroxietil piperazin etanosulfónico (HEPES) 1M, pH 7.5 (CAS N° 7365-45-9)
- Acetato de sodio ( $\text{NaCH}_3\text{COOH}$ ) 3M, pH 5.2 (CAS: 127-09-3)
- TE, pH 8.0 (Tris-HCl 100 mM, EDTA 1 mM) (CAS N° 77-86-1)
- Cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) 25 mM (CAS N° 7786-30-3)
- Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) 100 mM, pH 9.0 (CAS N° 144-55-8)
- Sistema de purificación de ácidos nucleicos
- Etanol 80%; (CAS N° 64-17-5)
- Dimetil sulfóxido (DMSO) (CAS N° 67-68-5)
- Agua desionizada, estéril, filtrada y tratada con Dietilpirocarbonato
- Dodecyl sulfato de sodio (SDS) 10% (CAS N° 151-21-3)
- SSC 20X (Citrato de sodio 0.3 M + NaCl 3.0 M) (CAS N° 6132-04-03)
- Albúmina de suero bovino (BSA) 10% (CAS N° 9048-46-8)

Figura 3. Imagen digital de muestras de ARN total aislado a partir de células de levadura del experimento de la represión catabólica por la fuente de carbono, corrido en un gel desnaturante de agarosa 1% y teñido con bromuro de etidio. Es importante resaltar que la banda ribosomal 28S (grande) es al menos dos o más veces más intensa que la 18S (indicativo de la integridad del ARN mensajero presente en la muestra).



## Método

1. Extracción de ARN. Existe una gran variedad de métodos para aislar ARN y su elección depende del origen de la muestra. Lo más importante es obtener un material de la más alta calidad, para esto se deben considerar los siguientes aspectos: obtenerlo lo más concentrado posible, se requiere al menos 10 µg de ARN total para un experimento; en un gel de agarosa, la banda ribosomal grande debe ser al menos dos veces más intensa que la pequeña (esto nos permite tener una idea de la integridad del ARN mensajero (ARNm) contenido en la muestra), no es necesario aislar ARNm para realizar el experimento; la contaminación con fenol u otro reactivo proveniente del proceso de extracción puede inhibir la síntesis de ADNc; es recomendable la degradación del ADN genómico contaminante (Eisen y Brown 1999, Gasch *et al.* 2000). En la Figura 3 se muestra el ARN total con las características descritas, obtenido de las levaduras del experimento antes mencionado.
2. Síntesis y marcaje de ADNc. Para marcar el ARN se utiliza una reacción de síntesis enzimática de ADNc de cadena sencilla. El proceso más utilizado considera que el ARN total se mezcle con un deoxinucleótido poli T y un conjunto de hexámeros al azar, permitiendo que reconozcan sus sitios en el ARN mensajero. Posteriormente, se agregan los deoxinucleótidos A, C, G, T y una porción de deoxinucleótido U, este último marcado con una molécula fluorescente (dUTP-Cy3, dUTP-Cy5, dUTP-alexa 555 y dUTP-alexa 647) y se espera que la transcriptasa inversa incorpore los deoxinucleótidos marcados a la cadena naciente de ADNc. Finalmente, se purifica para eliminar los deoxinucleótidos fluorescentes no incorporados. Este procedimiento se conoce como incorporación directa de la molécula fluorescente (Ramírez *et al.* 2003, [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/superscript\\_onestepRTPCR\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/superscript_onestepRTPCR_man.pdf), consultado en junio de 2010, <http://www.promega.com/tbs/tm287/tm287.pdf>, consultado en junio de 2010). Actualmente, es más utilizada la incorporación indirecta que difiere de la anterior en que el deoxinucleótido U está modificado con un grupo aminoalil (dUTP-NH<sub>2</sub>), que se incorpora a la cadena de ADNc y posteriormente por reacción química la molécula fluorescente se acopla a éste.
  - 2.1 Síntesis enzimática de ADNc. Preparar una mezcla con 10 µg de ARN total, deoxinucleótido poli T (2µg), hexámeros al azar (3 µg), ajustar a un volumen de 19 µL con agua desionizada en tubos para microcentrífuga

de 0.2 ml. Incubar a 70 °C por 10 minutos, para desnaturalizar el ARN. Inmediatamente después incubar la mezcla en hielo por al menos un minuto. Mezclar con 8 µL de 5X RT amortiguador de reacción, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 4 µL de la mezcla aminoalil-dNTP (dATP, dCTP, dGTP 5mM; dTTP 1.5mM; aminoalil-dUTP 3mM), 4 µL de DTT 0.1M y 3 µL de Superscript II Transcriptasa inversa 600 U. Incubar la mezcla a 25°C por 10 minutos a 42 °C por 2 horas. Para detener la reacción agregar 1 µL de EDTA 0.5M y 5µL de NaOH 1N para degradar el ARN molde, incubar a 65°C por 10 minutos. Inmediatamente agregar 25 µL de HEPES (1M, pH 7.5) para neutralizar la reacción.

2.2 Purificación del ADNc-aminoalil e incorporación del fluoróforo. Para purificar, agregar 7 µL de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 400 µL del amortiguador de unión a la columna (<http://www.qiagen.com/literature/>, consultado en junio de 2010), dejar en reposo 5 minutos y centrifugar a 14 000 rpm por 1 minuto, lavar tres veces con 500 µL de etanol al 80%, y centrifugar a 14 000 rpm por 1 minuto cada vez. Para eliminar el exceso de etanol, centrifugar los tubos una vez más y extraer el ADNc-aminoalil con 30 µL de agua desionizada dos veces. Secar por vacío y resuspender en 4.5 µL de bicarbonato de sodio 100 mM (pH 9.0). Para incorporar los colorantes, disolver el fluoróforo con 4.5 µL de dimetil sulfóxido, mezclar con el ADNc-aminoalil e incubar a temperatura ambiente en la oscuridad durante al menos 1 hora.

2.3 Purificación del ADNc marcado. Ajustar el volumen a 80 µL con agua desionizada y agregar 8 µL de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y 400 µL de solución de pegado, proseguir como en la purificación anterior, extraer 2 veces con 50 µL de agua desionizada. Cuantificar la muestra en el espectrofotómetro y almacenarla a -20 °C hasta su uso (<http://www.promega.com/tbs/tm287/tm287.pdf>, consultado en junio de 2010, [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/superscript\\_onestepRTPCR\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/superscript_onestepRTPCR_man.pdf), consultado en junio de 2010, <http://www.qiagen.com/literature/>, consultado en junio de 2010).

3. Hibridación. Esta parte del proceso consta de tres pasos: Tratamiento de la laminilla, Preparación de las sondas marcadas e hibridización.

3.1 Tratamiento de la laminilla. Durante el proceso de impresión, las sondas se secan rápidamente sobre la superficie de la laminilla lo que ocasiona irregularidades en el spot. Para conseguir una mayor homogeneidad de los

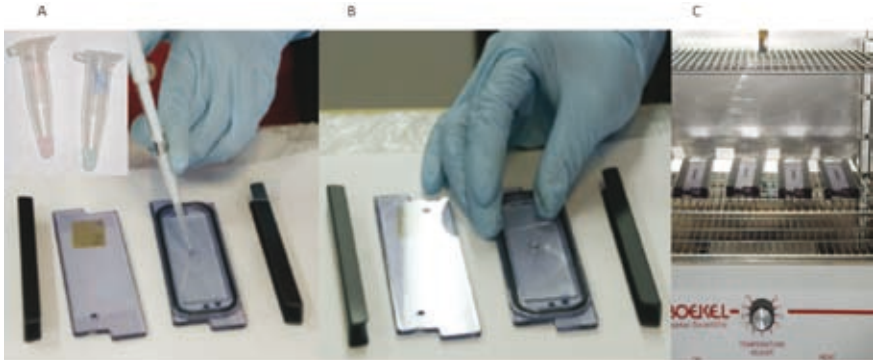
spots, se debe exponer el lado impreso del microarreglo durante 10 segundos al vapor de agua de no más de 60 °C un máximo de 3 veces; entrecruzar el ADN de las sondas con dos ciclos de luz UV (1200 j c/u); eliminar el exceso de sales, así como el ADN que no se fijó, lavando con una solución de SDS 0.1% y dos lavados más con agua desionizada; pasar inmediatamente la laminilla a la solución de prehibridización (SSC 5X, SDS 0.1%, BSA 1%) e incubar por 1 hora a 42 °C, este es un paso crítico para evitar una alta señal de fondo. Finalmente se debe lavar 5 veces con agua desionizada y secar por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos (la laminilla procesada de esta manera debe hibridizarse enseguida).

3.2 Preparación de las sondas marcadas. Para este paso, se deben tomar 15 picomolas de cada uno de los ADNc previamente marcados y mezclarlos (en un microarreglo de dos canales, se co-hibridizan dos muestras marcadas con fluoróforos diferentes), agregar la solución de hibridización (SSC 5X, SDS 0.1%), ajustar el volumen con TE dependiendo del tamaño del microarreglo, mezclar perfectamente y desnaturalizar a 94 °C durante 5 minutos.

3.3 Hibridación. Aplicar la mezcla al microarreglo, cubriendo la superficie con un cubreobjetos, colocar en la cámara de hibridización (Figura 4) e incubar a 42 °C por 18 horas. Después de este tiempo, lavar la laminilla a temperatura ambiente en una solución de SSC 1X, SDS 0.05% hasta desprender el cubre objetos y hacer dos lavados más en una solución de SSC 0.06X, para eliminar el ADNc marcado que no hibridizó. Finalmente secar la laminilla por centrifugación a 1500 rpm por 5 minutos (<http://arrayit.com/>, consultado en junio de 2010).

4. Lectura y cuantificación. Una vez que las sondas de ADNc son co-hibridizadas sobre el microarreglo y que la laminilla se lava y seca, es necesario obtener la imagen producida por la fluorescencia de los spots que fueron reconocidos por el ADNc marcado. Para detectar dicha fluorescencia se necesita contar con un lector para microarreglos de preferencia con tecnología confocal (Figura 5). Este instrumento cuenta con dos láseres manipulables que nos permiten extraer la señal fluorescente a las longitudes de excitación apropiadas, por lo general 555 nm para la cianina Cy3 o Alexa555 y 647 nm para la cianina Cy5 o Alexa647. En este instrumento el haz de láser pasa por una lente objetivo (de alta apertura numérica), como el de un microscopio común e incide sobre un punto en la laminilla del microarreglo. La luz emiti-

Figura 4. A) Imagen de las sondas marcadas, cámara de hibridización y aplicación de la mezcla de hibridización, que contiene cantidades equivalentes ADNc marcado de ambas condiciones. B) Aplicación del cubreobjetos para lograr una distribución homogénea de la solución de hibridización sobre la superficie del microarreglo. C) Cámaras de hibridización y horno de incubación.



da concentrada por el objetivo pasa a través de una serie de filtros ópticos, lentes colimadas y por un orificio con la finalidad de minimizar la reflexión-dispersión debido al haz de luz y a la radiación de la excitación y finalmente es colectada por un detector denominado tubo fotomultiplicador (también manipulable), que detecta la radiación emitida y la convierte en voltaje, el cual es amplificado, filtrado, digitalizado y almacenado. De esta forma al desplazarse la laminilla por el haz de láser se va generando la imagen digital del microarreglo. Comúnmente el microarreglo es leído a una resolución de 5 a 10  $\mu\text{m}$  por pixel. Es importante resaltar que la lectura del microarreglo se debe iniciar con una intensidad de láser baja, así como un bajo poder del fotomultiplicador, tratando de evitar el “*blanqueamiento*” (foto bleaching o destrucción de la fluorescencia). Es recomendable que la intensidad de los spots sea relativamente baja y hacer incrementos del 10% en el poder del fotomultiplicador, de esta forma se obtendrán imágenes con intensidades de fluorescencia no saturantes, que incluso pueden no ser visibles al ojo humano, pero lo suficientemente distinta comparada con la señal de fondo. Al ser un microarreglo de dos canales, se obtendrán dos imágenes por separado, una imagen para cada uno de los fluoróforos empleados. Estas imágenes son mapas de bits (Figura 6) que deben ser cuantificados; convertidos en

valores numéricos y asociados a cada uno de los genes correspondientes, empleando diferentes herramientas de cómputo, las cuales se pueden conseguir como software libre o comercial. El software que se seleccione debe ser capaz de realizar las siguientes operaciones con la imagen: construir una retícula (asociada a la base de datos del chip correspondiente) (Figura 7); determinar la intensidad de la señal del spot y del fondo alrededor del mismo (Figura 8) y de ser posible hacer algún tipo de normalización con los datos obtenidos (Tabla 1).

## MÉTODOS DE ANÁLISIS

El análisis de los resultados de la hibridización de un microarreglo se puede dividir en dos: análisis estadístico, para identificar los genes expresados diferen-

Figura 5. Esquema del funcionamiento del lector de microarreglos con óptica confocal. En el recuadro se observa la imagen exterior de un lector, la inserción del chip en el CPU y la imagen digital obtenida de la lectura.

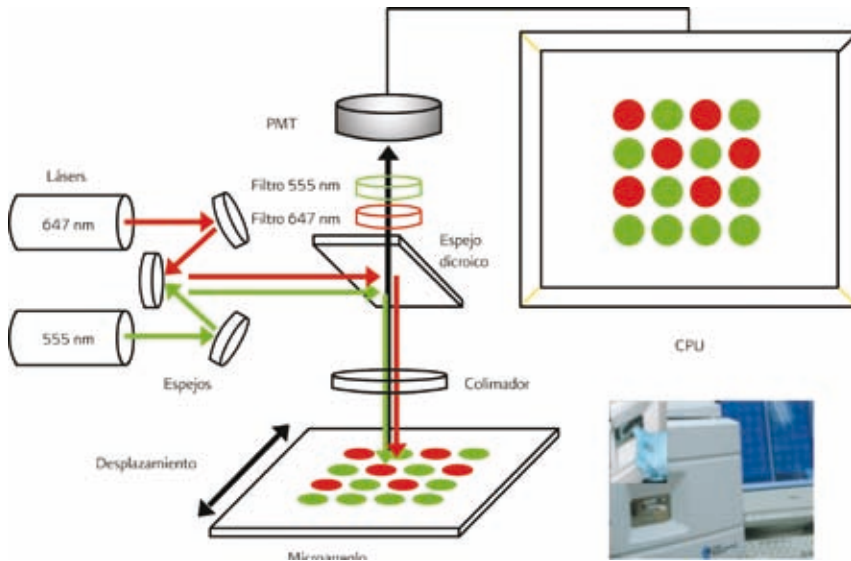


Figura 6. Imagen digital de la lectura de un microarreglo, las imágenes están coloreadas artificialmente con software para análisis de imágenes.



Figura 7. A) Amplificación de la imagen digital (mapa de bits) generada por el lector. B) Cuadrícula de localización de las áreas con píxeles de mayor intensidad. C) Retícula de localización de las áreas a ser evaluadas. D) Parámetros que deben ser considerados y evaluados para cada spot en la imagen.

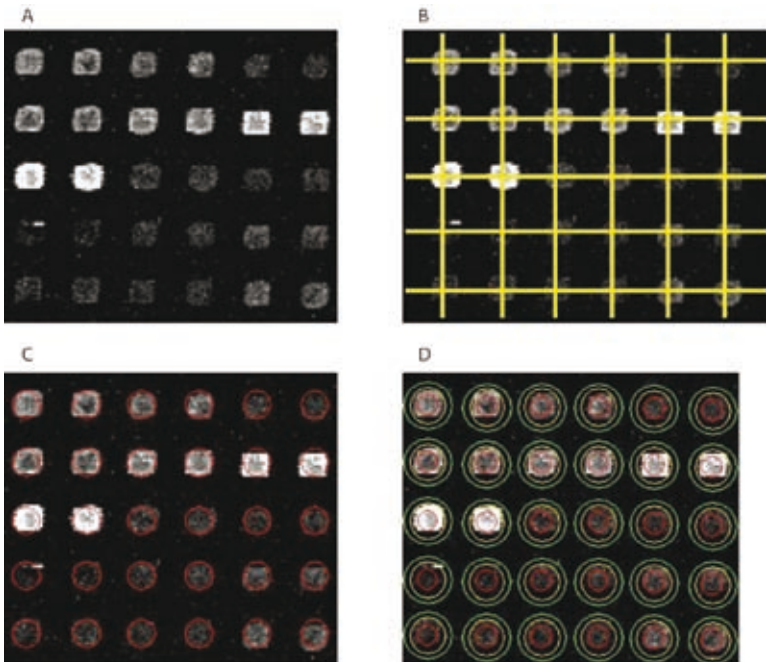
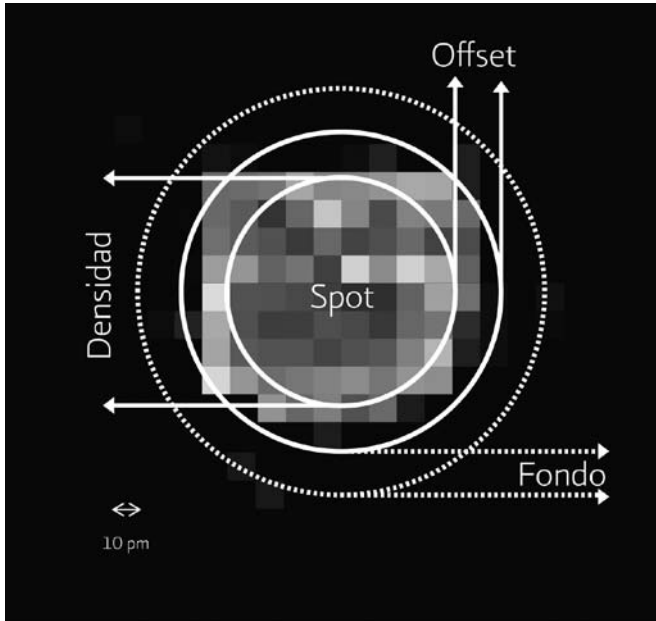




Figura 8. Representación esquemática de los parámetros que deben ser evaluados para cada spot en la imagen. La DENSIDAD está dada por el área que ocupan los píxeles con mayor intensidad, el área que se considera para la cuantificación del spot siempre es más pequeña. El área definida como OFFSET evita considerar posibles imperfecciones alrededor del spot que pudieran modificar el valor de la densidad o de la señal de FONDO. Finalmente, la señal de FONDO se obtiene de un área lo más alejada posible sin que ésta se sobreponga con la de los spots vecinos.



cialmente en el experimento y análisis bioinformático, donde los genes identificados se asocian con algún proceso biológico o función molecular.

## Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, al igual que para el análisis de imágenes se puede conseguir software libre o comercial e incluso diseñar una herramienta computacional adecuada al experimento específico. El común de estas herramientas es que utilizan los valores numéricos de intensidad y fondo para cada spot y con operaciones relativamente sencillas deben ser capaces de identificar aquellos individuos expresados diferencialmente entre las condiciones que se

**Tabla 1.** Ejemplo de los datos obtenidos de la cuantificación de una imagen de microarreglos, asociada a la base de datos de los genes correspondientes en el arreglo.

Núm.	ORF	Gen	Descripción del Gen	D-Cy3	D-Cy5	F-Cy3	F-Cy5	S-Cy3	S-Cy5
1	ybr012c		Proteína hipotética	620	484	227	196	393	288
2	ybr006w	UGA2	Similar a la succinato semialdehído deshidrogenasa de <i>E. coli</i>	4517	3118	250	212	4267	2906
3	ybr002c	RER2	cis-preniltransferasa, enzima llave en la síntesis de dolicol	513	473	231	196	282	277
4	ybl107c		Proteína hipotética	4041	2296	236	210	3805	2086
5	ybl040c	ERD2	Proteína receptor del lumen del RE	654	515	230	198	424	317
6	ybl034c	STU1	Proteína mitótica	579	453	237	189	342	264
7	ybl028c		Involucrado en el apareamiento en levaduras	878	1088	238	191	640	897
8	ybl022c	PIM1	Proteasa dependiente de ATP de mitocondria	862	749	230	197	632	552
9	yal056w	GPE2	Similar a la proteína hipotética YOR371c	1421	613	235	192	1186	421
10	yal048c		Proteasa vacuolar de aspártico	1832	1389	229	199	1603	1190
11	yal043c	PTA1	Proteína procesadora de tRNA/PF	737	838	231	187	506	651
12	yal037w		Similar a proteínas que unen GTP	5103	3942	224	207	4879	3735
13	ybr292c		Proteína hipotética	3760	4580	244	207	3516	4373
14	ybr286w	APE3	Aminopeptidasa Y de vacuola	3414	3561	251	204	3163	3357

Tabla 1. Continúa.

Núm.	ORF	Gen	Descripción del Gen	D-Cy3	D-Cy5	F-Cy3	F-Cy5	S-Cy3	S-Cy5
15	ybr280c		Proteína hipotética	1218	608	235	204	983	404
16	ybr274w	CHK1	Regulador negativo de la fosforilación de Cdk por PDS1	635	475	246	203	389	272
17	ybr197c		Similar a la proteína hipotética YPL077c	4399	2745	226	193	4173	2552
18	ybr191w	RPL21A	Proteína ribosomal L21.e	1972	10413	243	208	1729	10205
19	ybr185c	MBA1	Proteína de ensamble de la cadena respiratoria	1082	862	240	201	842	661
20	ybr179c	FZO1	Proteína requerida para la biogénesis mitocondrial	542	428	235	191	307	237
21	ybr102c	EXO84	Proteína esencial para la secreción	4954	5381	233	219	4721	5162
22	ybr005w		Similar a la proteína hipotética YDR003w	2208	3298	231	199	1977	3099
23	ybr090c		Cuestionable ORF	2201	1188	245	193	1956	995
24	ybr085w	AAC3	Intercambiador ADP/ATP	1225	685	229	197	996	488
25	ydl104c	QR17	Similar a la sialoglicoproteasa (gcp) de H. influenzae	397	340	212	197	185	143

están comparando (Quackenbush 2002). Básicamente se sustrae del valor de señal, el valor de fondo, se fija el canal donde se encuentra la muestra control y se normalizan los valores obtenidos para la muestra experimental (para esta normalización se utilizan funciones complejas como Loess y o Lowess (Quackenbush 2002)). Una vez que los valores están normalizados se debe emplear una prueba rasero que identifique aquellos genes que se alejan de la normalización. Una prueba simple y funcional es el valor de Z (Cheadle *et al.* 2003) que utiliza el valor de la desviación estándar de la intensidad de señal calculado para cada individuo con relación a la de sus vecinos.

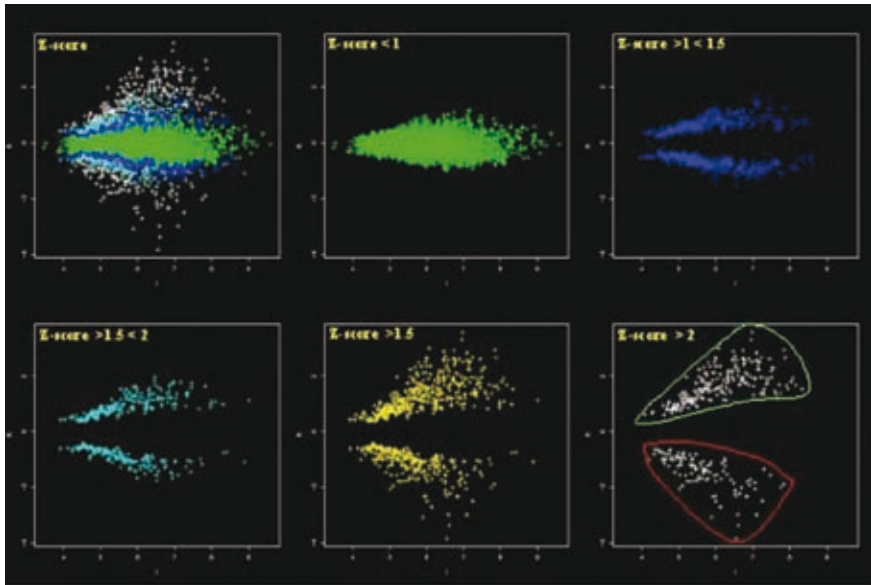
$$z_i = (R_i - \text{media}(R)) / ds(R)$$

Donde  $z_i$  es el valor de Z para cada individuo,  $R_i$  es el logaritmo de la relación del valor de intensidad de señal obtenido para el experimento entre el valor del control y  $ds(R)$  es la desviación estándar del logaritmo de esa relación. Con esta función, para aquellos genes con el valor de Z mayor a 2 se considera que existe un cambio estadísticamente significativo entre la condición experimental y el control (genes con mayor expresión) y para valores menores que  $-2$  (genes con menor expresión). En la Figura 9 se muestra un ejemplo del resultado obtenido al utilizar esta prueba.

## **Análisis bioinformático**

Es importante resaltar que este tipo de experimentos, generan resultados para cientos e incluso miles de genes que modifican sus niveles de expresión en una condición determinada. Por lo que la interpretación del resultado de un experimento requiere del “Análisis Bioinformático”, que puede ser definido como la anotación de conjuntos de genes en bases de datos para vías metabólicas, procesos biológicos, función molecular, componente celular, ortología, etc. La mayoría de estas bases de datos son de acceso gratuito vía internet y describirlas una a una resulta casi imposible por lo que solo veremos una de ellas “Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto” (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>, consultado en junio de 2010). Esta base de datos permite anotar conjuntos de genes en sus correspondientes vías metabólicas. Es una herramienta realmente simple, requiere del conjunto de genes de interés y del organismo en el que se hizo el experimento (Figura 10). En este caso se

Figura 9. Gráficos resultados de la evaluación del Z-score. Para aquellos genes cuyo valor de z-score es mayor a 2 se enmarcan con rojo los genes regulados de forma negativa y en verde los regulados positivamente. En términos del experimento de la represión catabólica, los genes en rojo son los requeridos para que la célula pueda vivir en un medio con glucosa como fuente de carbono y en verde los que se requieren para que la célula viva en un medio con etanol.



proporcionó la información del experimento de la represión catabólica por la fuente de carbono. Como resultado de la anotación de los genes identificados nos regresa un mapa metabólico completo de levadura, en el que se indica con líneas rojas los genes reprimidos y con líneas verdes los genes sobre expresados (Figura 11). Adicionalmente nos puede mostrar con detalle cada uno de los procesos biológicos (Figura 12).

## Diseño experimental

Como hemos visto, los resultados obtenidos con esta tecnología nos permiten observar un panorama general de lo que está sucediendo con la célula en

Figura 10. Ventana de diálogo de la base de datos de KEGG (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto; [http://www.genome.jp/kegg/tool/color\\_pathway.html](http://www.genome.jp/kegg/tool/color_pathway.html), consultado en junio de 2010).

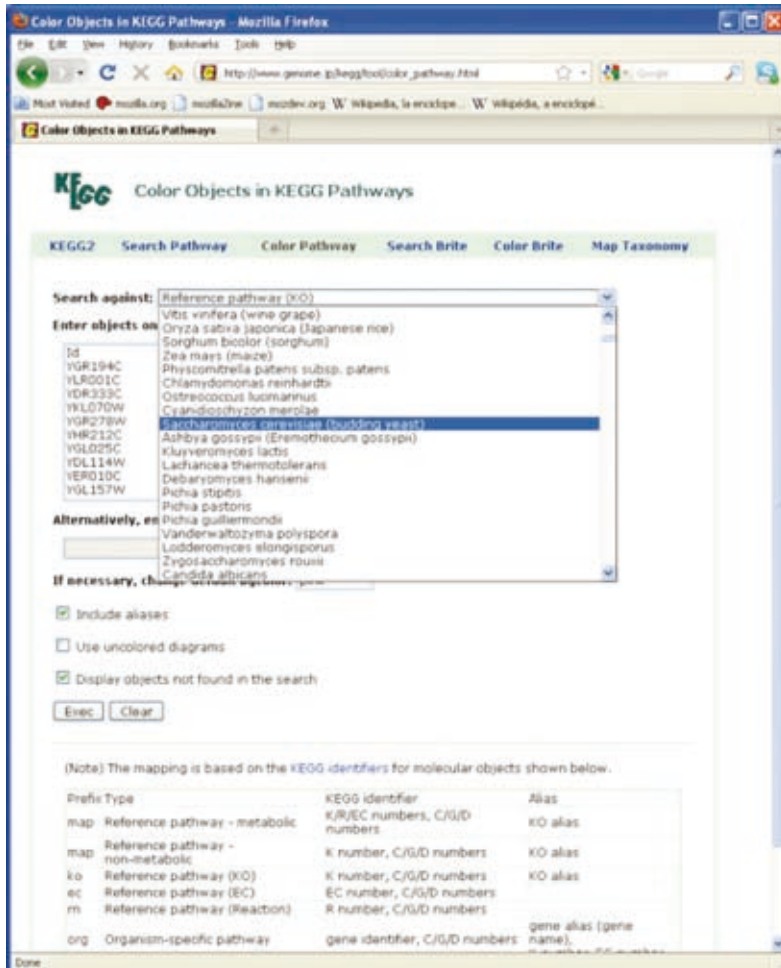


Figura 11. A) Mapa para todas las vías metabólicas conocidas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. B) Mapa de las vías metabólicas que se modifican en el experimento de la represión catabólica por la fuente carbono. Las líneas rojas corresponden a los procesos requeridos para el crecimiento en glucosa y las verdes para el crecimiento en etanol. Diagramas obtenidos de KEGG.







una condición determinada. Sin embargo, en muy pocos casos los microarreglos son o pueden servir como experimentos comprobatorios o concluyentes. Por lo que un buen diseño experimental, así como una estrategia para la comprobación de los resultados son indispensables en el análisis, interpretación y comprobación del resultado obtenido.

Para lograr un buen diseño experimental se deben tomar en cuenta:

#### a) El origen de la muestra

Cuando se trabaja con organismos unicelulares (bacterias, levaduras, células en cultivo, etc.) se tienen millones de individuos por mililitro de muestra, lo que reduce las posibilidades de obtener como parte de los resultados, la variabilidad genética entre individuos. Sin embargo, en el caso de utilizar organismos más complejos o partes de ellos, la variabilidad genética puede ser un factor que interfiere con las observaciones. Por tal motivo es recomendable hacer conjuntos de muestras de diferentes individuos. Aunque no existe un número mínimo de muestras a considerar para cada modelo y condición, se debe tratar de incluir el mayor número de casos en la muestra, de forma tal que se reduzca al mínimo la variabilidad genética y se hagan evidentes las diferencias por el tratamiento o condición experimental que se desea estudiar.

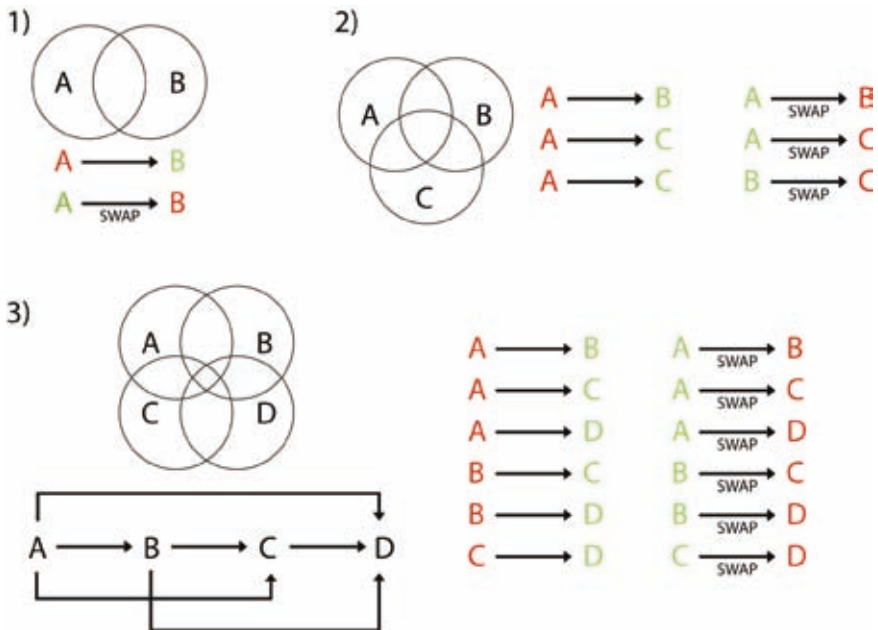
#### b) Comparación entre muestras

Tomando en cuenta que la técnica que se describe es la de microarreglos de dos canales, el siguiente punto a considerar es como se deben comparar las muestras entre sí. Para el caso de un experimento con una condición control y un problema, simplemente una de las muestras se marcará con un color y la otra con un color diferente para hibridizar el microarreglo y poder observar las diferencias entre ellas. Si se tienen dos o más condiciones problema y un control, digamos A, B y C se debe establecer un circuito donde todas las muestras se comparen contra todas. En ningún caso se debe inferir que al comparar una condición con otra el resultado se pueda extrapolar a una tercera condición, en la Figura 13 se muestran algunos ejemplos de diseños experimentales utilizados comúnmente.

### c) Confiabilidad de los resultados

Existe una gran controversia en cuanto a este punto y aunque no se han hecho estudios serios, se puede decir que en un experimento simple, la confiabilidad es alrededor del 70 a 75 %; esto quiere decir que de un 25 a 30 % de los datos obtenidos son falsos positivos. Esto se debe a las manipulaciones de la muestra (extracción de ARN, síntesis *in vitro* de ADNc, incorporación de fluoróforos, hibridación, etc.). Una forma de reducir la cantidad de falsos positivos es realizar un experimento complementario donde se inviertan los colores para cada una de las muestras, a este experimento se le conoce como *swap*. Con

Figura 13. Diseños experimentales comúnmente empleados en microarreglos. 1) En este caso se comparan únicamente dos condiciones y la confiabilidad de los resultados se puede incrementar si se hace la inversión de los fluoróforos (SWAP). 2) Para el caso donde se comparan tres o más condiciones, es indispensable que se comparen todas contra todas y de ser posible hacer el swap de los experimentos. 3) Ejemplo de circuito para cuatro condiciones, donde cada condición se está comparando con cada una de las otras condiciones. Al igual que en el caso anterior se debe tratar de hacer los *swaps* correspondientes.



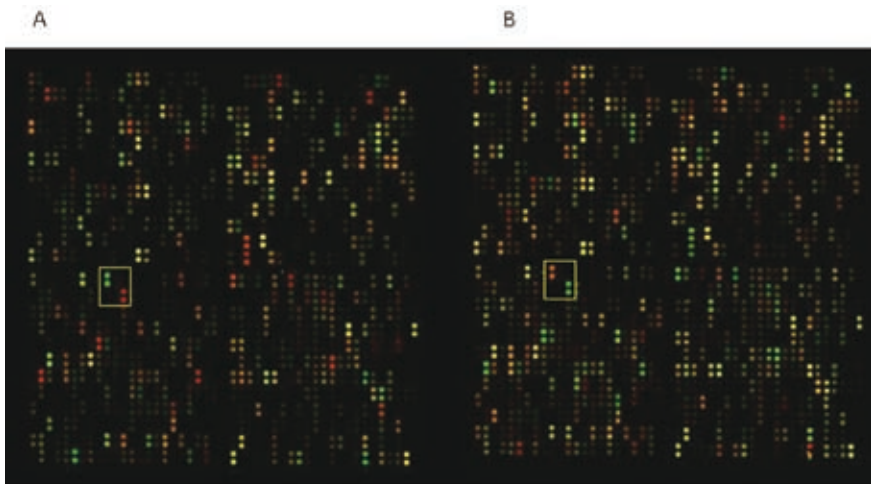
esta alternativa se puede reducir el número de falsos positivos hasta un 10% o menos, sin embargo el costo del experimento se duplica (Figura 14).

Es importante recalcar el hecho que los experimentos en microarreglos, permiten explorar el fenómeno a gran escala, en ningún caso los resultados obtenidos son definitivos y deben ser corroborados por otros métodos como: la técnica de northern blot, la PCR en tiempo real, la actividad enzimática, la presencia de la proteína, *western blot*, etc.

## APLICACIONES

Por lo general, esta herramienta se utiliza para observar los cambios en la expresión de los genes ocurridos en las células en una condición determinada en un

Figura 14. Fragmentos de imágenes obtenidas de la lectura de los chips donde se hibridizaron los ADNc del experimento de la represión catabólica por la fuente de carbono. A) Imagen obtenida cuando la condición de glucosa se marco con rojo y etanol con verde. B) Imagen obtenida del mismo experimento pero marcando en forma inversa (SWAP) glucosa con verde y etanol con rojo. En los recuadros amarillos se puede observar el efecto de la inversión de los colorantes en el resultado obtenido. El cambio de color en los spots indicados, no deja lugar a duda, que para esos genes los niveles de expresión son diferentes entre ambas condiciones. En la imagen también se observa el mismo resultado para otros spots.



instante preciso, es decir la “*genómica funcional*”. Estos estudios han permitido identificar firmas genéticas para algunas enfermedades (Zanders *et al.* 2000, Sørli *et al.* 2001). Caracterizar de forma global un sin número de condiciones biológicas como pueden ser: el estrés producido por diversos factores (calor, pH, osmolaridad, etc) (Gasch *et al.* 2000), la presencia o ausencia de algún sustrato, los efectos de diversas sustancias, la temporalidad de una enfermedad, la relación huésped parásito. También es posible utilizar esta técnica para identificar nuevas especies o especies relacionadas entre sí (Pariset *et al.* 2009). En tiempos recientes la tecnología también ha sido empleada para caracterizar y hacer estudios de genómica funcional en organismos para los que no se ha secuenciado su genoma o no existen microarreglos específicos para ellos, a esto se le denomina microarreglos heterólogos (Boutanaev *et al.* 2009, Davey *et al.* 2009).

## BIBLIOGRAFÍA

- ArrayIt, (<http://arrayit.com/>, consultado en junio de 2010).
- Boutanaev A.M., O.A. Postnikova y L.G. Nemchinov. 2009. Mapping of heterologous expressed sequence tags as an alternative to microarrays for study of defense responses in plants. *BMC Genomics* 10:273.
- Cheadle C., M.P. Vawter, W.J. Freed y K.G. Becker. 2003. Analysis of microarray data using Z score transformation. *Journal of Molecular Diagnostics* 2:73-81.
- Davey M.W., N.S. Graham, B. Vanholme, R. Swennen, S.T. May y J. Keulemans. 2009. Heterologous oligonucleotide microarrays for transcriptomics in a non-model species; a proof-of-concept study of drought stress in *Musa*. *BMC Genomics* 10:436.
- Eisen M.B. y P.O. Brown. 1999. DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods in Enzymology* 303:179-205.
- Gasch A.P., P.T. Spellman, C.M. Kao, O. Carmel-Harel, M.B. Eisen, G. Storz, D. Botstein y P.O. Brown. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell* 11:4241-4257.
- Invitrogen, ([http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/superscript\\_on-estepRTPCR\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/superscript_on-estepRTPCR_man.pdf) consultado en junio de 2010).
- KEGG, (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>, consultado en junio de 2010).
- Pariset L., G. Chillemi, S. Bongiorno, V.R. Spica y A. Valentini. 2009. Microarrays and high-throughput transcriptomic analysis in species with incomplete availability of genomic sequences. *New Biotechnology* 25:272-279.

- Promega, (<http://www.promega.com/tbs/tm287/tm287.pdf>, consultado en junio de 2010).
- Qiagen, (<http://www.qiagen.com/literature/>, consultado en junio de 2010).
- Quackenbush J. 2002. Microarray data normalization and transformation. *Nature Genetics* 32:496-501.
- Ramírez J., L. Chávez, J.L. Santillán y S. Guzmán. 2003. Microarreglos de DNA. Pp. 97-120. En: O. Flores, H. Rivero, A. Sosa y E. Vázquez (eds.). *Mensaje Bioquímico*, Vol XXVII. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México.
- Sørlie T., C.M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, T. Thorsen, H. Quist, J.C. Matese, P.O. Brown, D. Botstein, P. Eystein Lønning y A.L. Børresen-Dale. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:10869-10874.
- Zanders E.D., M.G. Goulden, T.C. Kennedy y K.E. Kempzell. 2000. Analysis of immune system gene expression in small rheumatoid arthritis biopsies using a combination of subtractive hybridization and high-density cDNA arrays. *Journal of Immunological Methods* 233:131-140.



# SECUENCIACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

Laura Margarita Márquez Valdelamar <sup>1</sup>,  
Alejandra Serrato Díaz <sup>2</sup> y René Cerritos Flores<sup>3</sup>

## INTRODUCCIÓN

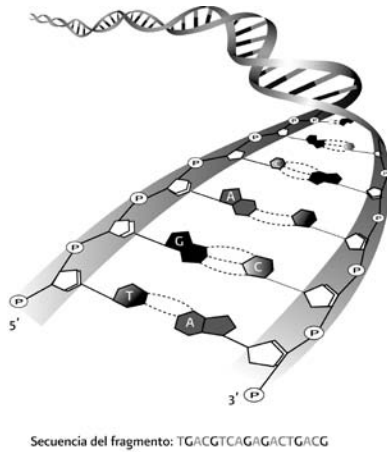
El ADN es una de las moléculas más importantes para la vida. Consiste de una doble hélice donde cada una de las cadenas es un polímero integrado por miles o incluso millones de nucleótidos (Stansfield 1992). Cada nucleótido, está formado por un azúcar (desoxirribosa), una base nitrogenada que puede ser adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G) y un grupo fosfato (Stansfield 1992). El orden que tienen los nucleótidos en el ADN es lo que se denomina secuencia (Figura 1) y las técnicas y métodos que se utilizan para conocer esa secuencia son llamados de secuenciación (de Necochea y Canul 2004). Conocer el orden de los nucleótidos es una herramienta con infinidad de aplicaciones porque la diferencia fundamental entre todas las moléculas de ADN que forman el material genético de los seres vivos es la secuencia de estas cuatro bases nitrogenadas (de Necochea y Canul 2004).

<sup>1</sup> Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, Instituto de Biología, UNAM, 3er Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, D.F., 04510.

<sup>2</sup> Departamento de Hidrobiología, Edif. S 032, UAM-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, 09340 México, D.F. A.P.55-535. alej@xanum.uam.mx.

<sup>3</sup> Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias, UNAM, Dr. Balmis 148, Col. Doctores, Cuauhtémoc 05726, México D.F. cerritos@miranda.ecologia.unam.mx.

Figura 1. Secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN. Modificado de <http://www.brasilecola.com/biologia/vida-ou-nao-vida.htm>, consultado el 31 de enero 2011.

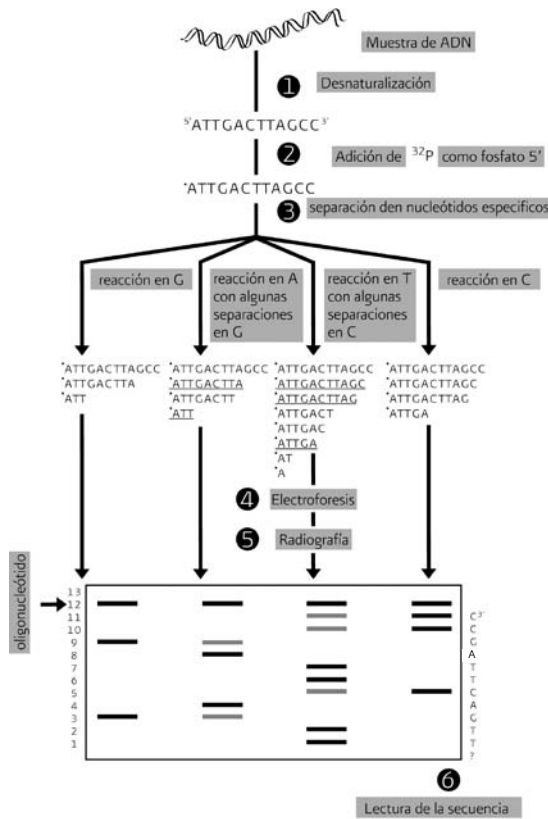


A partir del descubrimiento de la estructura de la molécula de ADN (Watson y Crick 1953), hace poco más de 50 años, se han producido millones de secuencias de especies de arqueas, bacterias y eucariontes. En los inicios de la secuenciación, obtener la secuencia de un fragmento de 5 o 10 nucleótidos resultaba un proceso muy costoso y complicado. Sin embargo, los avances científicos y tecnológicos han permitido tener hoy en día una gran cantidad de secuencias de ADN con información de importancia médica, ecológica, fisiológica y evolutiva. En 1976, Walter Fiers y colaboradores, secuenciaron el genoma completo del bacteriófago Ms2 de aproximadamente unas 3 500 pares de bases (pb). Pero es en 1977 cuando surgen dos técnicas modernas de secuenciación de ADN: la secuenciación química de Maxam y Gilbert (1977) (Figura 2) y el método que revolucionó a la biología molecular, la secuenciación enzimática de Sanger (Sanger *et al.* 1977a).

La técnica enzimática se basa en la interrupción controlada de la replicación del ADN *in vitro*. Se realiza una PCR del fragmento que se va a secuenciar pero, a diferencia de una PCR convencional (ver capítulo de PCR), se utiliza un solo iniciador y se agregan dideoxinucleótidos (ddNTPs) que carecen del grupo hidroxilo en el extremo 3' (Figura 3) y están marcados con radiactividad o con fluoróforos. Cuando se incorpora un dideoxinucleótido a la cadena en elongación, se termina su amplificación, de tal manera que al final, se tienen



Figura 2. Secuenciación química de Maxam-Gilbert. El fragmento de ADN que se desea secuenciar se desnaturaliza (1), se marca el extremo 5' con radiactividad (2), la muestra se divide en cuatro alícuotas que son tratadas con diferentes reactivos químicos que cortan al ADN en bases específicas (A, T, C, G) (3), en cada alícuota, queda una colección de fragmentos de ADN de diferente tamaño que termina en una base específica. Los fragmentos se separan electroforéticamente en un gel de poliacrilamida (4) y se visualizan y analizan por medio de una radiografía (5). Modificada de <http://www.nd.edu/~aseriann/maxam.html>, consultado en enero 2011.



fragmentos de diferente longitud, cada uno terminando en un ddNTPs (Figura 4). Los fragmentos obtenidos, se separan y analizan electroforéticamente de manera manual o automática (Figura 5).

Con esta técnica Fred Sanger y colaboradores (1977b) secuenciaron el primer genoma viral de ADN llamado PhiX174, de aproximadamente 5 500 pb y

Figura 3. Dideoxinucleótido. Al carecer del grupo hidroxilo en el extremo 3' no permite que la polimerasa incorpore un nucleótido más. Modificada de [http://personales.ya.com/geopal/biologia\\_2b/unidades/ejercicios/act13biointema6.htm](http://personales.ya.com/geopal/biologia_2b/unidades/ejercicios/act13biointema6.htm), consultado en enero 2011.

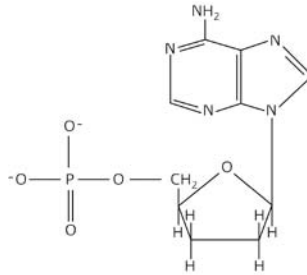


Figura 4. Fragmentos de ADN obtenidos después de la PCR de secuenciación, son de diferentes tamaños y cada una termina en una de las bases marcadas con un fluoróforo distinto. Modificada de [http://perso.wanadoo.es/mcs955/adn\\_en\\_esto\\_proyecto.htm](http://perso.wanadoo.es/mcs955/adn_en_esto_proyecto.htm), consultado en enero 2011.

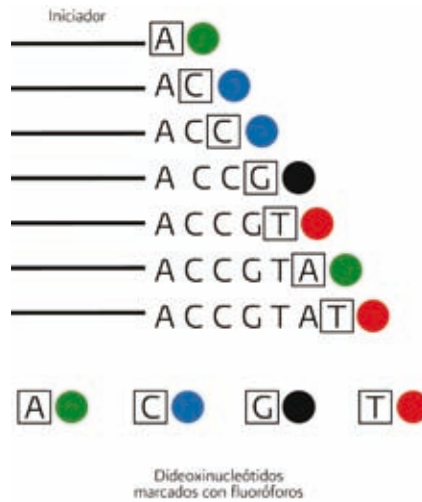
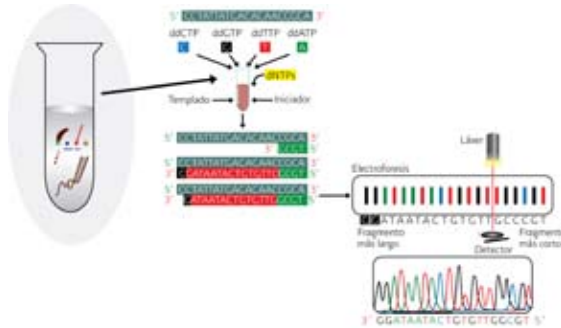


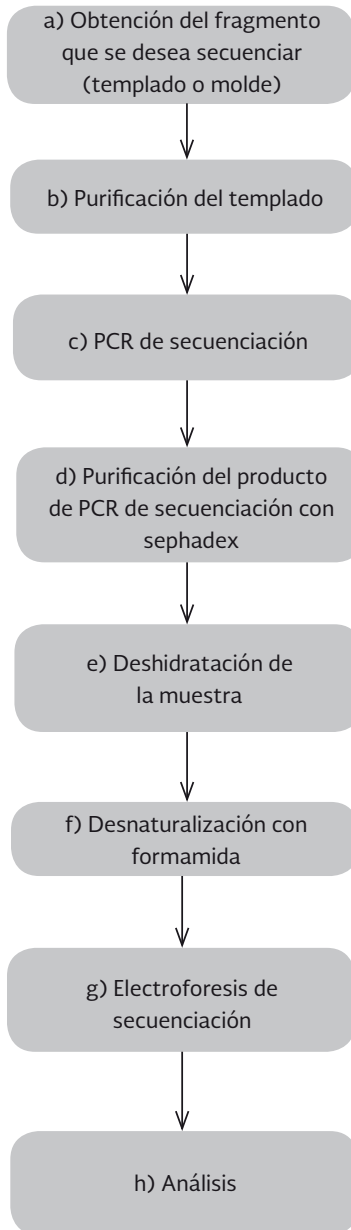
Figura 5. Secuenciación automática de ADN. Se realiza una electroforesis del producto de PCR de secuenciación (Figura 4), los fragmentos migran de acuerdo a su tamaño (los pequeños migran más rápido), el fluoróforo con el que van marcados es detectado por un láser, éste envía una señal que es interpretada por el equipo en forma de un pico en un electroferograma. (Modificada de Pierce 2003).



11 genes. Desde entonces, este método ha sido utilizado ampliamente en muchas líneas de investigación, generando tal cantidad de secuencias que a principios de los ochenta fue necesario crear bases de datos universales para resguardar la información y hacerla accesible a los usuarios. En 1982, año en que se crea el Gen Bank a través del National Center for Biotechnology Information (NCBI), existían más de 2 000 secuencias y para principios del 2011 esta base de datos estaba integrada por más de 100 000 000 secuencias. En cuanto a genomas completos, en total se tienen registrados y en proceso de ser secuenciados cerca de 6 000 distintos, siendo los virus los que mayor número de variantes secuenciadas presenta (NCBI 2011). Se cuenta con las siguientes secuencias: 1 548 bacterias, 83 arqueas, 281 eucariotes y 281 genomas.

En 1995, año que representa un parteaguas en las ciencias genómicas, se secuencia el primer genoma completo de un organismo, de la bacteria oportunista *Haemophilus influenzae*, que causa múltiples infecciones en humano como meningitis, otitis, conjuntivitis y sinusitis (Fleischmann *et al.* 1995). El genoma de esta especie es de alrededor de 1, 800, 000 pb con más de 100 genes asociados con el proceso de infección (Fleischmann *et al.* 1995). A partir de ese año se comenzó la secuenciación de genomas, principalmente de microorganismos de importancia médica. Es hasta 2001 (International Human Genome Sequencing Consortium) que se publica parcialmente el genoma de la

## Etapas de la técnica



especie humana como resultado de trece años de trabajo con la colaboración de universidades y centros de investigación de los Estados Unidos de América, Canadá, Nueva Zelanda y Gran Bretaña (Hutchinson III 2007). Este genoma está compuesto por 3 080 millones de pares de bases y entre 20 000 y 25 000 genes codificantes para proteínas y el 90%, son secuencias no codificantes.

Gracias al continuo desarrollo de las técnicas, equipos y herramientas de análisis, actualmente nos encontramos en la época de “secuenciación de la siguiente generación”, que consiste en métodos de secuenciación en paralelo, a gran escala, aplicables a genomas completos. Con estas técnicas se puede secuenciar un genoma humano en pocos días y en un solo laboratorio sin necesidad de clonar ningún fragmento (Shendure y Ji 2008).

A pesar de los grandes avances en secuenciación, en este capítulo desarrollamos el protocolo para el método de secuenciación de Sanger, para fragmentos de no más de 1 500 pb en un equipo de secuenciación automático ABI Prism, porque esta técnica se sigue utilizando en la mayoría de laboratorios y es una herramienta muy robusta en muchas áreas de investigación.

## PROTOCOLO

### Equipo

- Espectrofotómetro
- Termocicladora (PCR)
- Vortex
- Refrigerador 4 °C
- Centrífuga para microtubos de 1.5 ml
- Concentrador de vacío
- Secuenciador automatizado ABI PRISM 3100

### Material

- Juego de micropipetas de 2, 10, 20, 100, 200 y 1000 µl
- Gradillas para microtubos de 1.5 ml y para placas de 96 pozos
- Microtubos de 1.5 ml.
- Microtubos para PCR (el tamaño depende del termociclador que se ocupará)

- Puntas para micropipetas de 10, 200 y 1000  $\mu\text{l}$
- Columnas Centrisep con Sephadex Applied Biosystems
- Placas de 96 pozos para secuenciador 3100 AB
- Tapas para placas de 96 pozos
- Base para placas de 96 pozos
- Juego de 4 capilares para secuenciador 3100
- Papel kimwipe
- Plumones indelebles

## Reactivos

- Big dye terminator V3.0 Applied Biosystems
- Buffer 2.5 X para big dye V3.0 Applied Biosystems
- Agua grado biología molecular
- Templado de DNA
- Iniciadores para la región a secuenciar 10 pmol/ $\mu\text{l}$
- Formamida Hi Di (CAS N°75-12-7)
- Buffer EDTA 10X AB
- Polímero para secuenciador AB 3100 POP6

## Método

1. Obtención del fragmento que se desea secuenciar (templado)
  - 1.1 El fragmento de ADN que se secuenciará depende completamente del objetivo del estudio. Se puede obtener mediante PCR o por clonación en algún vector.
  - 1.2 Cerciorarse de tener en condiciones óptimas el templado, la calidad de la secuencia depende completamente de la calidad y cantidad del templado. En caso de que el fragmento a secuenciar sea un producto de PCR asegurarse de tener un solo producto.
2. Purificación del templado
  - 2.2 Purificar el templado con el método que se elija, puede ser convencional o con kits comerciales.
  - 2.3 Cuantificar el templado purificado en un espectrofotómetro para asegurarse de tener la cantidad necesaria para la reacción (5 a 10 nanogramos por cada 100 pb).

### 3. PCR de secuenciación

3.1 Preparar la reacción de secuenciación con: 2  $\mu$ l de big dye, 2  $\mu$ l de buffer 2.5X, la cantidad de templado determinada, 1  $\mu$ l del iniciador y se completa la reacción a 10 $\mu$ l con agua bidestilada esterilizada o inyectable.

3.2 Colocar los microtubos en la termocicladora usando el siguiente programa:

96° C x 10 segundos

50° C x 5 segundos

60° C x 4 minutos

Por 25 ciclos

4° C

### 4. Purificación del producto de PCR de secuenciación con sephadex

4.1 Dar golpes suaves a la tapa superior de las columnas Centrisep para que el sephadex (polvo blanco) se asiente en la parte inferior de la misma.

4.2 Quitar la tapa superior y agregar 0.8 ml de agua bidestilada esterilizada o inyectable.

4.3 Volver a poner la tapa superior y mezclar perfectamente en el vortex o por inversión de la columna. Es importante eliminar todas las burbujas que se forman golpeando suavemente la columna o con ayuda de una pipeta.

4.4 Colocar las columnas en una gradilla y dejar que el gel se hidrate a temperatura ambiente por al menos dos horas. Las columnas hidratadas pueden almacenarse hasta por 2 semanas a 4° C. Las columnas que se encuentran a 4° C deben alcanzar la temperatura ambiente antes de usarlas.

4.5 Agregar 10  $\mu$ l de agua bidestilada esterilizada o inyectable a cada muestra que se va a purificar.

4.6 Quitar la tapa superior de las columnas Centrisep y después la tapa inferior.

4.7 Colocar inmediatamente cada columna en un tubo colector y esperar a que decante el agua excedente por gravedad.

4.8 Desechar el agua que se acumuló en el tubo colector.

4.9 Centrifugar la columna en una microcentrifuga a 730 x g (3 000 rpm) por dos minutos.

4.10 Colocar la columna (sin el tubo colector) en un tubo de 1.5 ml con el nombre de la muestra que se purificará en esa columna.

4.11 Tomar con una micropipeta la muestra (20  $\mu$ l) y colocarla con cuidado en el centro de la columna de sephadex sin tocarla.

- 4.12 Colocar la columna junto con el microtubo en una microcentrífuga a 730 x g por dos minutos.
- 4.13 Desechar la columna.
5. Deshidratación de la muestra
  - 5.1 Secar las muestras en un concentrador de vacío o dejando destapados los tubos en un lugar completamente oscuro hasta que no quede nada de agua (una vez que las muestras estén secas, se pueden almacenar envueltas en papel aluminio a 4 °C o a -70 °C hasta por 6 semanas).
6. Desnaturalización con formamida
  - 6.1 Agregar a cada microtubo, con la muestra seca, 15 µl de formamida.
  - 6.2 Centrifugar por 5 minutos a 13 000 rpm (después de este paso las muestras se pueden almacenar de 2 a 3 semanas a menos 20 °C y cubiertas con papel aluminio).
7. Electroforesis de secuenciación
  - 7.1 Cargar las muestras en una placa de 96 pozos.
  - 7.2 Tapar la placa y colocarla en la base.
  - 7.3 Oprimir la tecla *Tray* del equipo para que la charola se mueva hacia el frente.
  - 7.4 Verificar que: las jeringas tengan polímero (POP6), los compartimentos de amortiguador tengan los niveles apropiados de buffer EDTA 1X y agua inyectable o bidestilada esterilizada en el resto de los compartimentos.
  - 7.5 Colocar la placa en la charola y cerrar las puertas del secuenciador con cuidado.
  - 7.6 Abrir, en la computadora, el programa 3100 Data Collection y capturar los datos de las muestras.
  - 7.7 Iniciar la electroforesis.
8. Análisis
  - 8.1 Al terminar la electroforesis analizar los resultados en el programa *Sequencing Analysis*.

## MÉTODOS DE ANÁLISIS

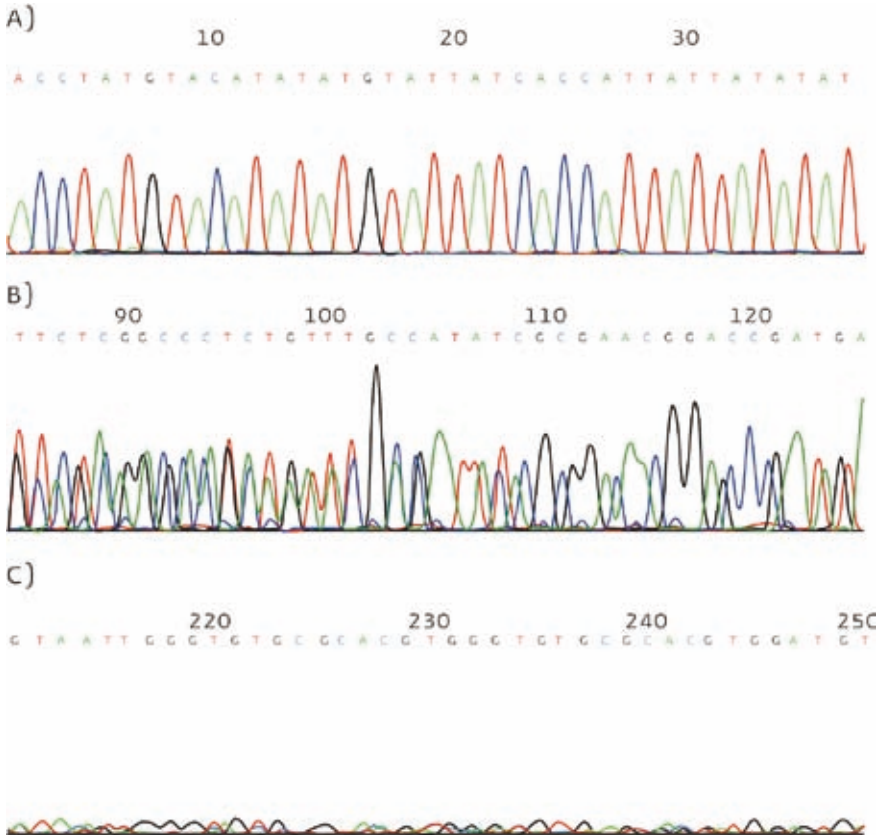
### Interpretación de electroferogramas

Un electroferograma es el gráfico que arroja el secuenciador después de analizar la electroforesis. Éste, muestra el orden de las bases a partir de curvas de



fluorescencia, una por cada base, y se puede visualizar en programas como Chromas y BioEdit que se obtienen de manera gratuita en internet. Es importante revisar los electroferogramas antes de continuar con los análisis de la muestra debido a que nos dan mucha información, incluyendo la calidad de la PCR y por ende la confiabilidad de los datos obtenidos (Figura 6).

Figura 6. Interpretación de electroferogramas, a cada una de las bases le corresponde un color que el equipo interpreta como un pico y en la parte superior le asigna la base correspondiente. A) Secuencia correcta, a cada base corresponde un pico bien definido. B) Existe una contaminación de otra secuencia de ADN, por eso se ven los picos (secuencias) encimados, para solucionar este problema se debe hacer más específica la amplificación por PCR o clonar el fragmento. C) Cuando el producto no está bien purificado el templado o la concentración es menor a la recomendada, se termina la señal antes de que se lea todo el fragmento.



## Comparación de la secuencia

Una vez obtenida la secuencia de interés, independientemente del objetivo, es indispensable compararla con las secuencias disponibles en las diferentes bases de datos ubicadas en Internet. Este tipo de análisis se pueden llevar a cabo mediante programas de cómputo, los cuales usan distintos algoritmos de búsqueda, siendo el más usado el BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). De esta manera se verifica si se logró secuenciar el fragmento que se esperaba.

## Consenso

Se debe obtener la secuencia consenso al comparar el sentido *Forward* (5'-3') y el sentido *Reverse* (3'-5'). Este paso es muy importante porque las polimerasas tienen diferentes porcentajes de fidelidad o en ocasiones existen problemas en la electroforesis de secuenciación y esto nos puede generar falsos polimorfismos. También es útil el consenso cuando el fragmento que se está analizando es mayor a 700 pb debido a que permite obtener un tamaño mayor de secuencia al complementar ambas cadenas (Figura 7).

**Figura 7. Secuencia consenso. Para poder comparar las dos hebras, se debe obtener el complemento de la secuencia reverse, se alinea con la forward y se obtiene un consenso al analizar los electroferogramas en los sitios que exista conflicto.**

Forward:	ACGTAGCGATCCGATGAGCGATGGATCAGTGAGCAGTG
Reverse complement:	ACCGATCCGATGAGCGATGGATCAGTGAGCAGTGTCACCTCGTCACC
Consenso:	ACGTAGCGATCCGATGAGCGATGGATCAGTGAGCAGTGTCACCTCGTCACC

## Traducción

Si se está trabajando con una región codificante es indispensable obtener la secuencia de la proteína para la que codifica la secuencia de ADN obtenida, ubicar los codones y poder, entre otras cosas, analizar tasas de mutación por posición de nucleótido. Este paso también permite evaluar si la secuencia consenso se obtuvo de manera apropiada. Con los distintos programas de cómputo, muchos de ellos disponibles dentro de la misma página del

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), es posible conocer cuál es el marco de lectura correcto para esa secuencia de ADN codificante.

## **Alineamiento**

Dependiendo del propósito del estudio, lo siguiente es generar hipótesis de homología de las bases al comparar y alinear las secuencias entre los organismos secuenciados. En un proceso de alineación de secuencias, el mecanismo básico es simplemente colocar en la misma posición a todas las bases. Para esto se utilizan programas de cómputo como CLUSTAL X que es el más usado. Esta herramienta se incluye en los diversos programas de edición de secuencias como BioEdit.

## **APLICACIONES**

El avance en la secuenciación de los ácidos nucleicos ha generado un amplio conocimiento en el campo de la genómica. Actualmente se tiene una gran cantidad de información con aplicaciones innumerables. Entre otras cosas, la secuenciación ha permitido entender la asociación de enfermedades con la variabilidad genética, la función de genes, el patrón de expresión de genes nuevos, la similitud o variación genética entre especies diferentes, la organización de la información genética, el origen de algunos genes, etc. (Hutchinson III 2007, Shendure y Ji 2008). Al parecer, no hay un límite en las aplicaciones de la información que se obtiene de la secuenciación, incluso han surgido nuevas disciplinas como la filogeografía, filogenómica, metagenómica y genómica. A continuación mencionamos algunas de las áreas en las que las secuencias son frecuentemente utilizadas.

### **Sistemática filogenética**

Actualmente, la sistemática filogenética es una de las disciplinas más integrales en biología. Tiene como objetivo detectar, describir y explicar la organización y el origen de la diversidad biológica (Moritz y Hillis 1996). Se ha convertido en la base de análisis de patrones biogeográficos, conductuales y ecológicos dentro de un marco evolutivo (Espinosa de los Monteros 2003). El éxito del uso de las secuencias de ADN en sistemática se debe a varias razones, entre las que se

pueden resaltar: el número de caracteres que se pueden obtener está limitado solo por el tamaño del genoma debido a que cada base se considera un carácter, estos caracteres son independientes a la influencia del ambiente (a diferencia de los cambios morfológicos generados por la plasticidad fenotípica), el genoma tiene regiones con diferentes tasas de evolución, todos los seres vivos comparten algunas regiones de ADN por lo que se puede incluir en un estudio a organismos de diferentes dominios (Woese 1977), se puede inferir la edad de los eventos de interés al calibrar el reloj molecular (Page y Holmes 1998, Moreau *et al.* 2004) y una secuencia de ADN se puede obtener a partir de una o pocas células (Martínez 1997).

## **Biodiversidad**

El uso de secuencias ha sido útil para expandir la descripción de la biodiversidad y clarificar si algunas formas más o menos distintas en su fenotipo o aisladas geográficamente son especies diferentes o no (García-Moreno 2003).

Por otro lado, solo hasta que se incluyeron secuencias de ADN en la determinación de especies, se ha podido identificar nuevas especies que fenotípicamente son idénticas a otras (Molbo *et al.* 2003).

## **Filogeografía**

La filogeografía surge con la introducción de análisis de secuencias de ADN mitocondrial (ADNm) en estudios de poblaciones. Esta disciplina revolucionó las perspectivas históricas y filogenéticas de la estructura intraespecífica de las poblaciones y proporcionó un puente entre los estudios micro y macroevolutivos. Como el ADNm no se recombina, se hereda maternamente (en animales) y presenta una rápida tasa de evolución, se puede inferir la historia evolutiva de las poblaciones por medio de hipótesis genealógicas (Avice 1994), es recomendable también incorporar en el análisis marcadores nucleares para tener la historia biparental.

## **Conservación de la biodiversidad**

Una de las aplicaciones más importantes de la secuenciación de ADN es la que se le ha dado en el área de conservación de la biodiversidad. Debido al

deterioro ambiental y a las altas tasa de extinción que se presentan en la actualidad, es fundamental describir lo más completo posible la biodiversidad y conocer los procesos evolutivos que están ocurriendo en las poblaciones para establecer prioridades de conservación (Moritz 1994, Frankham et al. 2002).

El uso de secuencias de ADN también ha permitido el estudio de poblaciones de especies de difícil manejo o acceso como las ballenas, gracias a que el ADN se puede obtener de pequeñas cantidades de muestra, se utilizan dardos especiales para tomar una pequeña biopsia del animal sin causarle un daño significativo (Baker y Palumbi 1996) o se pueden hacer análisis a partir de excretas o pelo.

## **Epidemiología**

Con las secuencias de regiones con tasas altas de mutación se puede inferir el origen y evolución de las enfermedades infecciosas así como conocer qué factores son los que permiten que éstas se propaguen (Page y Holmes 1998, Brown 1999).

## **Código de Barras de la Vida**

El código de barras de la vida (*The Barcode of Life*, <http://www.barcoding.si.edu>), es un proyecto mundial en el que se planea secuenciar una región específica de cada una de las especies para poder identificarlos con precisión, rapidez y a partir de poco material. Entre sus principales aplicaciones está la determinación de especies que tienen complicados ciclos de vida con diferentes estadíos (Reséndiz 2004), conocimiento de comunidades biológicas y control de tráfico de especies.

## **VENTAJAS Y DESVENTAJAS**

Una de las grandes ventajas al trabajar con secuencias es que el ADN se encuentra en todas las células de los organismos y se puede recuperar de tejido vivo o muerto. La mayoría de tejidos o fuentes de los que es posible extraer ADN se colectan fácilmente en el campo y en muchas ocasiones es suficiente menos de un gramo para extraerlo (véase capítulo de extracción de ADN). La

molécula de ADN es tan estable que puede permanecer intacta por cientos de años (Cano *et al.* 1993).

Otra ventaja es que las diferentes regiones del genoma experimentan diferentes tasas de evolución. Por ejemplo, las regiones que codifican para genes están sujetas a selección natural, la cual previene la acumulación de mutaciones, en cambio, las regiones no codificantes son más variables porque pueden acumular cambios mutacionales de manera neutral (Parker *et al.* 1998). Esta tasa evolutiva diferencial permite realizar estudios a amplias escalas como la evolución del virus VIH en un solo paciente a lo largo de un mes o el árbol de la vida en la Tierra con seleccionar el fragmento adecuado para nuestro estudio (Page y Holmes 1998). También, se puede trabajar con secuencias de regiones mitocondriales o de cloroplasto que generalmente son heredadas de manera uniparental para desarrollar estudios de efecto fundador, hibridación y relaciones matrilineales (Lewin 2001).

La principal desventaja de esta técnica es el costo. Sin embargo, los avances tecnológicos la hacen cada vez más barata, por ejemplo los secuenciadores son cada vez más precisos y solo requieren de cantidades mínimas de reactivos para obtener un buen resultado.

## PERSPECTIVAS

La técnica de secuenciación de Sanger se continúa utilizando en un gran número de laboratorios e incluso se siguen produciendo equipos con gran capacidad de análisis de muestras, hoy en día es posible procesar 96 muestras en menos de una hora y media lo que hace más eficiente la obtención del resultado. Sin embargo, en los últimos años han surgido nuevos métodos que superan al método dideoxi. Estos métodos son “masivamente paralelos” y el número de secuencias que leen en un solo experimento es muy superior al logrado por la electroforesis capilar desarrollada en este capítulo. Estos métodos junto con los nuevos equipos de secuenciación hacen que un solo investigador en una sola corrida, obtenga lo que hace una década se lograba en varios años y con la colaboración de varios laboratorios (Hutchinson III 2007, Shendure y Ji 2008).

La secuenciación es una de las técnicas moleculares que más ha crecido en los últimos años, por lo cual las perspectivas son muy amplias. En los últimos años, las plataformas de secuenciación de ADN de forma masiva en paralelo (Ronaghi *et al.* 1998, Ronaghi 2000) están disponibles en laboratorios de va-

rios países (incluido México) reduciendo el costo de la secuenciación del ADN en más de dos órdenes de magnitud. La gran cantidad de información que se genera impone retos al desarrollo de protocolos robustos para la generación de bibliotecas de secuenciación, la creación de nuevos enfoques y métodos de análisis de datos, y un replanteamiento del diseño experimental. La próxima generación de la secuenciación del ADN permite el análisis exhaustivo de genomas, transcriptomas e interactomas que tiene el potencial de acelerar la investigación biológica y biomédica (Hutchinson III 2007, Shendure y Ji 2008). Se espera el surgimiento de nuevas líneas de investigación, así como surgieron hace algunos años, la filogenómica que tiene como objetivo generar propuestas filogenéticas con multigenes para explicar de una manera robusta la historia evolutiva y las relaciones entre grupos; o la metagenómica que busca secuenciar ADN del ambiente y con ello caracterizar a las especies que componen una comunidad y descubrir los genes de estas especies aun en organismos de difícil aislamiento y cultivo, como bacterias, arqueas, hongos, protozoarios (Vogel y Nalin 2003, Hutchinson III 2007, Shendure y Ji 2008).

## BIBLIOGRAFÍA

- Avise J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman y Hall. New York, Estados Unidos de América.
- Baker C. S. y S.R. Palumbi. 1996. Population structure, molecular systematics, and forensic identification of whales and dolphins. *En: J.C Avise y J.L Hamrick (eds.). Conservation Genetics Case histories from nature*. Chapman & Hall, New York, Estados Unidos de América.
- Brown T. A. 1999. *Genomes*. Wiley-Liss, United Kingdom.
- Cano R.J., H.N. Poinar, N.J. Pieniasek, A. Acra y D.R. Talbott. 1993. Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature* 363:536-538.
- De Necochea R. y J. C. Canul. 2004. Métodos fisicoquímicos en biotecnología: Secuenciación de ácidos nucleicos. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Espinosa de los Monteros A. 2003. Sistemática y evolución molecular: su importancia en la conservación de aves. *En: H. Gómez de Silva y A. Oliveras de Ita (eds.). Conservación de aves experiencias en México*. Editorial CIPAMEX. México.
- Fiers W., R. Contreras, F. Duerinck, G. Haegeman , D. Iserentant, J. Merregaert, W. Min Jou, F. Molemans, A. Raeymaekers, A. Van den Berghe, G. Volckaert y M.

- Ysebaert. 1976. Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature* 8:500-507.
- Fleischmann R.D., M.D. Adams , O. White, R.A. Clayton, E.F. Kirkness, A.R. Kerlavage, C.J. Bult , J. Tomb, B.A. Dougherty y otros autores. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269: 496-512.
- Frankham R., J.D. Ballou y D.A. Briscoe. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, United Kingdom.
- García-Moreno J. 2003. Conservación a largo plazo. En: H. Gómez de Silva y A. Oliveras de Ita (eds.). *Conservación de aves experiencias en México*. Editorial CIPAMEX. México.
- Hutchinson III C.A. 2007. DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Research* 35: 6227-6237.
- International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
- Lewin B. 2001. *Genes VII*. Marbán Libros, S. L. Madrid, España.
- Martínez M. 1997. Sistemática molecular: Comparación entre diferentes métodos y sus aplicaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60:123-136.
- Maxam A.M. y W. Gilbert. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 560-564.
- Molbo D., C. Machado, J. Sevidter, L. Keller y E. Herre. 2003. Cryptic species of fig-pollinating wasps: implications for the evolution of the fig-wasp mutualism, sex, allocation, and precision of adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:5867-5872.
- Moreau C.S., C.D. Bell, R. Vila, S.B. Archibald y N.E. Pierce. 2004. Phylogeny of the ants: diversification in the age of angiosperms. *Science* 5770:101-104.
- Moritz C. 1994. Defining evolutionary significant units for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9:373-375.
- Moritz C. y D.M. Hillis. 1996. Molecular systematics: context and controversies Págs. 1-12 En: D. M. Hillis, C. Moritz y B. K. Mable (eds.). *Molecular Systematics*. Sinauer Associates Inc. Massachusetts.
- Page R.D.M. y E.C. Holmes.1998. *Molecular Evolution*. Blackwell Science, Estados Unidos de América.
- Parker P.G., A.A. Snow, M.D. Schug, G.C. Booton y P.A. Fuerst. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79:361-382.



- QIAGEN. 1998. *The Qiagen Guide to Template Purification and DNA Sequencing*. Segunda edición, Estados Unidos de América.
- Pierce, B.A. 2003 *Genetics. A conceptual approach*. W.H. Freeman and Company, Estados Unidos de América.
- Reséndiz A.N. 2004. Descripción morfológica y caracterización molecular de la cercaria *Glypthelmins quieta* (Stafford, 1900) Stafford, 1905 (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Ronaghi M., M. Uhlen y P. Nyren. 1998. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281: 363-365.
- Ronaghi M. 2000. Improved performance of pyrosequencing using single-stranded DNA-binding protein. *Analytical Biochemistry* 286: 282-288.
- Sanger F., S. Nicklen y A.R. Coulson. 1977a. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467.
- Sanger F., G.M. Air, B.G. Barrell, N.L. Brown, A.R. Coulson, C.A. Fiddes, C.A. Hutchinson, P.M. Slocombe y M. Smith. 1977b. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265: 687-695.
- Shendure J. y H. Ji. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*. 26: 1135-1145.
- Stansfield W.D. 1992. *Genética*. Mc Graw Hill. México.
- Vogel T.M. y R. Nalin. 2003. Sequencing the metagenome. *ASM News* 69(3):107.
- Watson J.D. y F.H.C. Crick. 1953. A structure for DNA. *Nature* 171: 737-738.
- Woese C.R. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:5088-5090.



# GLOSARIO

**admixtura:** se refiere al estado de estar mezclado (del inglés *admixture*).

Ocurre cuando se entrecruzan individuos de dos o más poblaciones que se encontraban previamente separadas y el resultado es la introducción de nuevos genotipos en una población.

**ADN genómico:** es el término que se usa para distinguir al ADN cromosómico (aislado directamente de células o tejidos) de otros tipos de ADN, como el ADN contenido en un plásmido o una mitocondria.

**ADN heteroduplex:** resulta de la hibridación de cadenas sencillas de ADN provenientes de moléculas diferentes durante la reacción en cadena de la polimerasa.

**ADN complementario (ADNc):** ADN sintetizado a partir de un molde de ARN empleando las enzimas transcriptasa reversa y ADN polimerasa.

**agente desnaturizante de ADN:** agente que provoca la desnaturalización del ADN, es decir, la pérdida de la estructura nativa de la molécula al romperse los puentes de hidrógenos que mantienen unidas a las dos cadenas que conforman al ADN. Se distinguen agentes físicos (calor) y químicos (pH, urea o formamida).

**algoritmo:** conjunto ordenado y finito de operaciones e instrucciones que permite hallar la solución de un problema. Dados un estado inicial y una entrada, siguiendo los pasos sucesivos, se llega a un estado final y se obtiene una solución.

**amplión:** fragmento de ADN formado mediante una amplificación, se suele referir a los productos amplificados en una PCR.

**amplificación preferencial:** fenómeno que se presenta cuando en una reacción en cadena de la polimerasa se amplifican preferentemente ciertas secuencias de ADN. Pueden influir varios factores tales como concentración de ADN, contenido de guanina-citosina, eficiencia de la ADN polimerasa, concentración de los iniciadores, temperatura de hibridación, etc.

**anotación:** en biología molecular se dice de la información asociada a un gen determinado.

**base nitrogenada:** compuesto orgánico cíclico que incluye dos o más átomos de nitrógeno. Son parte de la estructura de los nucleótidos que conforman a los ácidos nucleicos y se clasifican en dos grupos principales: bases púricas o purínicas (derivadas de la estructura de la purina) y bases pirimidínicas (derivadas de la estructura de la pirimidina).

**biblioteca genómica:** colección de fragmentos de ADN que han sido clonados en un vector y que pueden ser almacenados y propagados en una población de microorganismos.

**comunidad microbiana:** conjunto integrado de poblaciones microbianas que están presentes e interactúan dentro de un determinado lugar o hábitat.

**dendrograma:** diagrama o representación gráfica en forma de árbol que organiza y agrupa datos en subcategorías que se van dividiendo a su vez en otras. Se utilizan para representar las relaciones entre organismos; dependiendo de sus aplicaciones y características reciben distintos nombres: fenogramas, filogramas o árboles filogenéticos.

**digestión completa del ADN:** tratamiento del ADN con una enzima de restricción durante el tiempo suficiente para que en todos los sitios diana potenciales se produzca el corte.

**dominio:** fragmento, área o región de ADN de tamaño concreto en el genoma de un organismo.

**electromorfo:** variante molecular de un segmento de ADN o proteínas que se distinguen entre sí fenotípicamente por su movilidad en una electroforesis.

**enzima de restricción:** endonucleasa que reconoce y corta una secuencia característica de nucleótidos (entre 4 y 12) dentro de una molécula de ADN, el punto de reconocimiento se llama sitio o diana de restricción.

**extremo 3' y 5':** se refiere a la numeración de los átomos de carbón en la desoxirribosa que es el azúcar que forma parte de la molécula de ADN.

**fingerprinting:** fragmentos característicos del material genético que diferencian a un individuo de otro. Conocido también como huella molecular.

**fluoróforo:** componente de una molécula que le confiere la cualidad de ser fluorescente. Puede tratarse de un grupo funcional que absorbe energía a una determinada longitud de onda y después la emite a una longitud de onda diferente.

**formamida:** también conocida como metanamida, es una amida derivada del ácido fórmico. Es un líquido incoloro, higroscópico, viscoso, soluble en agua, de fórmula molecular  $\text{CH}_3\text{NO}$ , que actúa como agente desnaturalizante.

**gen funcional:** la secuencia de ADN o de ARN que codifica uno o varios productos capaces de desempeñar una función específica, generalmente fuera de su lugar de síntesis. Sus productos pueden ser polipéptidos (es el caso de la mayoría de los genes) o ARN (ARNt, ARNr).

**huella molecular:** representación gráfica de determinadas secuencias del genoma que funcionan como un código de barras de la identidad de un individuo. El término también se aplica al patrón de bandas que en condiciones determinadas puede generar una muestra integrada por más de un individuo.

**índices de diversidad:** son índices matemáticos que permiten definir y medir la diversidad de especies a partir de conceptos ecológicos como variedad, riqueza, abundancia, dominancia, distribución de especies, etc. Algunos de los más utilizados actualmente son el índice de diversidad de Shannon-Weaver y el índice de dominancia de Simpson, los cuales fueron introducidos a mediados del siglo pasado.

**inferencia filogenética:** proceso de estimación que permite inferir la historia de relaciones evolutivas o de ancestría entre varias especies. Se sustenta en el concepto darviniano de “descendencia con modificación”, de forma que los caracteres que se observan en las distintas especies, heredados a partir de un ancestro común, son indicativos de una relación genealógica.

**iniciadores:** también denominados cebadores o *primers*, son oligonucleótidos sintéticos (utilizados en la PCR) que hibridan con la región complementaria al ADN molde que se desea amplificar y propician el inicio de la reacción de elongación por la ADN polimerasa.

**iniciadores modificados:** iniciadores de PCR que contienen “extensiones” o secuencias adicionales en el extremo 5', de manera que los productos amplificados en la reacción también incorporan las “extensiones” añadidas a los

iniciadores. Los iniciadores se modifican para incorporar sitios de enzimas de restricción, un codón de inicio, secuencias promotoras o bien, para proporcionar mayor estabilidad al producto amplificado.

**marcador molecular:** un marcador genético o marcador molecular es un segmento de ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma y cuya herencia se puede rastrear. Un marcador puede ser un gen, o puede ser alguna sección del ADN sin función conocida.

**marcador codominante:** en genética de poblaciones se trata de marcadores moleculares en los que pueden distinguirse todos los genotipos (tanto los homocigos como los heterocigos).

**marcador dominante:** en genética de poblaciones se trata de marcadores moleculares en los que pueden observarse sólo dos clases genotípicas: AA + Aa y aa; es decir, una de las clases homocigas se confunde con el heterocigo.

**matriz de distancias:** es un tipo de medida de similitud. Matemáticamente se define como una matriz cuyos elementos representan las distancias entre los puntos, tomados por pares, de un conjunto.

**moléculas quiméricas:** moléculas de ADN híbridas que se forman cuando una molécula de ADN parcialmente elongada sirve como iniciador en el siguiente ciclo de una reacción en cadena de la polimerasa. Las secuencias quiméricas pueden detectarse fácilmente con ciertos programas informáticos.

**multiplex:** análisis simultáneo de más de una molécula blanco, que puede llevarse a cabo usando iniciadores o sondas marcadas con diferentes fluoróforos en una misma reacción.

**mutaciones puntuales:** son cambios que afectan a pares de bases únicos.

**nucleótido:** monómero de los ácidos nucleicos, integrado por la combinación de una base nitrogenada (purina o pirimidina), un azúcar (ribosa o desoxirribosa) y un grupo fosfato. Se obtiene como producto de la hidrólisis de ácidos nucleicos por acción de nucleasas.

**oligonucleótidos firma:** marcadores moleculares frecuentemente utilizados en Ecología Microbiana, pues consisten en secuencias cortas de ADN que aparecen en todos (o en la mayor parte de) los miembros de un determinado grupo filogenético y nunca (o sólo raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos.

**poliacrilamida:** soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado

de forma rápida y reproducible. Forma geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Los geles de poliacrilamida resultan de la polimerización vinílica del monómero acrilamida y del monómero entrecruzador N, N'-metilen-bis-acrilamida.

**pozol:** bebida refrescante y nutritiva, de origen mesoamericano, que resulta de la fermentación de maíz molido que posteriormente es diluido con agua para producir una suspensión blanca. Se puede agregar a la bebida sal y Chile molido, azúcar, cacao o miel, según el gusto o los fines a que se destine.

**punto de hidrógeno:** fuerza intermolecular relativamente débil que actúa entre moléculas polares. Se forma entre un átomo pequeño altamente electronegativo (como flúor, nitrógeno u oxígeno) y un átomo de hidrógeno unido covalentemente a otro átomo electronegativo. Atracción dipolo-dipolo entre moléculas polares que contienen las uniones F-H, O-H y N-H.

**rampa de tiempo:** durante la PCR, es el tiempo necesario para que el bloque del termociclador vaya de una temperatura a la siguiente. Esta temperatura dependerá del modelo del termociclador y de si el bloque es calentado por lámpara o sistema peltier.

**rasero:** medida arbitraria, que se utiliza para determinar que dos o más cosas tienen el mismo tamaño, intensidad, cantidad, etc.

**reloj molecular:** es una técnica que deduce el tiempo de divergencia de dos taxa a partir del número de diferencias entre dos secuencias de ADN.

**ruido basal:** fluorescencia intrínseca emitida por los componentes de la mezcla de reacción al incidir en ellos fotones derivados de una fuente de luz externa.

**solución desnaturalizante de "alta densidad":** en DGGE es la solución con mayor concentración de urea y formamida y que determina el límite de mayor concentración en el gradiente desnaturalizante formado a lo largo del gel de poliacrilamida.

**solución desnaturalizante de "baja densidad":** en DGGE es la solución con menor concentración de urea y formamida y que determina el límite de menor concentración en el gradiente desnaturalizante formado a lo largo del gel de poliacrilamida.

**spot:** del inglés, punto o mancha de interés geoméricamente localizada en un espacio.

**swap:** del inglés, invertir o intercambiar, en microarreglos se refiere al cambio de un fluoróforo de la muestra control por el de la muestra experimental y viceversa.

**temperatura de fusión (T<sub>m</sub>):** se define como la temperatura a la cual se ha desnaturalizado la mitad de ADN de doble hélice de una mezcla desconocida que se ha sometido a calentamiento. Cuanto mayor es el contenido en GC, mayor cantidad de calor se deberá suministrar para desnaturalizar al ADN.

**transcripción reversa:** síntesis de una molécula de ADN catalizada por la enzima retrotranscriptasa a partir de un molde de ARN.

**urea:** la urea, también conocida como carbamida, carbonildiamida o ácido carbámico, es el nombre del ácido carbónico de la diamida. Es un compuesto orgánico cristalino, blanco, higroscópico, soluble en agua, de fórmula molecular CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>. Es el principal producto del metabolismo de proteínas en el hombre y en los demás mamíferos.



*Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, compilado por Amelia Cornejo Romero, Alejandra Serrato Díaz, Beatriz Rendón Aguilar, Martha Graciela Rocha Munive, se terminó de producir en su versión digital en el Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), en la Ciudad de México, D.F., durante el mes de julio de 2014.

