

ARN mensajero (ARNm)

Es la copia de un gen. Actúa teniendo una secuencia de nucleótidos complementaria a una cadena de ADN, que es idéntica a la otra cadena. El mRNA acarrea la información almacenada en el ADN nuclear al citoplasma, donde los ribosomas pueden convertirla en proteínas. Constituye el 5% del ARN.

ARN ribosomal (ARNr)

Es uno de los compuestos estructurales del ribosoma. Tiene una secuencia complementaria a regiones del mRNA que permiten a éste reconocer donde ligarse al ribosoma para comenzar la síntesis de una proteína. Constituye el 80% del ARN.

una serie de codones que especifican los aminoácidos necesarios para sintetizar proteínas específicas.

8. Genes y Genoma

Un gen o un cistron (unidad más pequeña que el gen), es la secuencia consecutiva y organizada de nucleótidos en una molécula de ADN o de ARN, en el caso de los retrovirus, y que contiene la información genética para la síntesis de polipéptidos. Dichos polipéptidos se especializan en el aparato de Golgi tomando la estructura y función de proteínas. Por esto, el gen es la unidad básica de la herencia porque transmite la información genética a la descendencia, es la unidad funcional del ADN y un gen

Cuadro 1. Código genético para la síntesis de aminoácidos a partir de secuencias de nucleótidos en el ADN.

		Segunda Posición						
		U	C	A	G			
Primera Posición	U	Fenilalanina	Serina	Triosina	Cisteína	U	Tercera Posición	
		Leucina		Alto ²	Alto ²	A		
		C	Leucina	Prolina	Histidina	Arginina		U
					Glutamina			A
	A	Isoleucina	Treonina	Asparagina	Serina	U		
		Metionina ¹		Lisina	Arginina	C		
	G	Valina	Alanina	Ácido Aspártico	Glicina	G		
				Ácido Glutámico		A		
								U
						G		
						A		

¹ Todas las proteínas empiezan con metionina

² Señal para terminar de sintetizar una proteína

ARN de transferencia (ARNt)

Es un pequeño ARN con estructuras secundarias y terciarias específicas para cada aminoácido. Funciona como un adaptador para acarrear los aminoácidos al lugar apropiado en la síntesis de proteínas, siguiendo la codificación en el mRNA. Constituye el 15% del ARN.

7. Código Genético

El mRNA especifica las secuencias de aminoácidos que conforman una proteína mediante el código genético. Sería imposible que cada nucleótido individual codificara para un aminoácido, debido a su desproporción (cuatro nucleótidos y 20 aminoácidos). De manera similar, la combinación de dos nucleótidos únicamente puede especificar para 16 aminoácidos. La respuesta es que cada aminoácido es especificado por una combinación particular de tres nucleótidos, llamada codón, los que adicionalmente codifican para señalar el inicio y fin de la síntesis de proteínas (Cuadro 1). El código genético es

puede estar formado por varios cistrones. Los genes forman parte de una cadena de ADN que está organizada en una unidad estructural y genética mucho más grande y compleja conocida como cromosoma. La función de la transmisión de la información está vinculada al desarrollo y a la expresión de una determinada función fisiológica. Los genes se disponen, a lo largo de ambas cromátidas hermanas de los cromosomas ocupando una posición determinada a lo que se denomina locus. El conjunto de varios locus que interactúan entre sí se denomina loci y el conjunto de todos los genes de una especie más todo el ADN que componen los cromosomas, se denomina genoma.

El genoma contiene la información necesaria para la construcción y organización de todas las estructuras celulares y la ejecución de las funciones de un organismo. El tamaño del genoma corresponde al número total de pares de bases en su ADN y es proporcional a la complejidad fenotípica del organismo. Se ha estimado que las

plantas poseen entre 10,000 y 100,000 genes, según la complejidad de la planta y que aunque estos tienen diferente longitud, la mayoría posee varios miles de pares de bases. Sin embargo, menos del 15% del genoma contiene secuencias que codifican para la síntesis de proteínas. Estas secuencias son llamadas exones, y entre ellos se encuentran secuencias que no contienen regiones codificantes, llamadas intrones. Algunas de estas secuencias son reguladoras, necesarias para llevar a cabo la expresión de la información genética.

A nivel de organismos, la expresión de los genes confiere sus características fenotípicas. A nivel bioquímico, cuando un gen es expresado dirige la síntesis de una molécula de ARNm que actúa como horma o molde en la que un polipéptido es sintetizado, en una función estricta y finamente regulada. Generalmente, cada gen dirige la síntesis de una proteína. Los organismos despliegan elaborados mecanismos para detener la expresión de genes cuando sus productos no son necesarios, para encenderlos o activarlos cuando sus productos son necesarios bajo condiciones específicas. Uno de los elementos claves involucrados en la expresión de genes es el promotor, una pequeña secuencia de ADN que está frente a los genes que debe ser reconocida para la síntesis de proteínas.

9. Práctica # 1. Regulaciones en los procesos para el diagnóstico molecular.

A continuación se detallan las medidas y cuidados a seguir durante los procesos de diagnóstico molecular.

Regulaciones de seguridad para el trabajo durante la extracción de ADN.

Durante el proceso de extracción de ADN se utilizan reactivos y equipos que requieren un cuidado y manejo especial, es necesario contar con todo el EPP como: Gabacha, mascarilla, guantes y lentes claros.

- Recolectar las muestras en microtubos de 2 ml, rotularlos y tener dos repeticiones de tubos limpios con las mismas denominaciones o códigos.
- Al agregar el buffer de extracción tener el cuidado de medir la cantidad requerida y no derramar.
- No inclinar los tubos al momento de macerar el tejido para evitar derrames.
- Equilibrar los pesos en la balanza para que haya un buen centrifugado.
- Evitar derramar el contenido de los microtubos dentro de la centrifuga o fuera de ella.
- Calentar el baño maría 30 minutos antes de colocar las muestras y verificar la temperatura deseada.
- Cronometrar el tiempo y rotular las gradillas para evitar confusiones.
- Evitar derramar las soluciones de alcohol sobre los rótulos de los microtubos.
- Una vez terminada la extracción dejar todos los aparatos e instrumentos limpios y en su lugar.

Para manipular micropipetas y realizar un adecuado cargado de volumen con las puntas o boquillas de pipeta se debe proceder de la siguiente manera.

Ajuste de volumen:

Al girar el anillo de ajuste, el volumen asciende o desciende de manera continua. Las cifras de indicación digital indican la escala y el volumen y se leen de arriba hacia abajo.

Puntas, boquillas o tips de micropipeta:

Las micropipetas sólo funcionan con una boquilla insertada, en la cual se aspira el líquido.

Aspiración del líquido:

Para aspirar el líquido se debe de colocar en un vaso de precipitados, no hacerlo directamente del frasco donde éste se almacena.

Insertar la boquilla adecuada en la micropipeta.

En las micropipetas de 10 a 1000 μ l se recomienda usar boquillas con filtro incorporado para evitar la entrada del líquido al interior de las mismas.

Apretar el botón de mando hasta el primer tope, a este paso se le llama carrera de medición.

Sumergir la boquilla de pipeta de manera vertical lo suficiente como para absorber el líquido y no dejar entrar aire (3-5 mm).

Soltar despacio el botón de mando (con volúmenes entre 500 a 5 000 μ l esperar tres segundos para retirar la punta).

Retirar con cuidado la punta del líquido.

Secar las gotas que posiblemente de adhieran por fuera de la punta con paños para tareas delicadas Kimwipe® no deshilachante y sin tocar el extremo de la boquilla para evitar absorber líquido con el papel.

Expulsión del líquido:

Debe hacerse sin tocar la superficie del sustrato o solución a la cual se va agregar.

Presionar lentamente el botón de mando hasta el primer tope (carrera de medición) y seguido hasta el segundo tope (carrera adicional) para garantizar una total expulsión del líquido.

Mantener el botón de mando presionado y retirarlo lentamente y una vez fuera soltarlo lentamente.

Dirigir la boquilla hacia un depósito de desecho y presionar el botón de expulsión para eliminar la punta.

En caso de pipeteo hacer el proceso anterior con la punta sumergida en el líquido y sin llegar al segundo tope.

Aviso de seguridad: No dejar las micropipetas con las puntas o boquillas llenas o inclinarlas durante la manipulación, ya que el líquido puede penetrar a la misma.

10. Práctica # 2. Extracción de ADN. Protocolo de Extracción de ADN, adaptado al LBA, Skroch *et al.* (1998)

Cosechar tejido fresco de plantas (6-8 mitades de hojas jóvenes).

Agregar 50 µl del buffer de extracción (PEX) en un tubo para microcentrífuga eppendorf de 1.5 ml. Macerar el tejido en el tubo usando una barra (pestle) de plexiglass de laboratorio. Agregar 450 µl adicionales de buffer PEX y agitar el tubo en el vortex.

Antes de 1 hora, colocar los tubos con las muestras de tejido en baño maría a 65 °C durante 30-60 min.

Centrifugar la muestra durante 10 min a 14,000 RPM (alta velocidad) usando una microcentrífuga, para concentrar los residuos de tejido (pellet).

Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml limpio. Precipitar los ácidos nucleicos llenando los tubos con una mezcla 6:1 de etanol:acetato de amonio 7.5 M. Mezclar invirtiendo los tubos y dejar precipitar por 30 min a temperatura ambiente.

Agitar los tubos manualmente para romper el precipitado.

Peletar los ácidos nucleicos precipitados, centrifugando las muestras a 3,000 RPM (baja velocidad) durante 10 min en una microcentrífuga.

Eliminar el sobrenadante.

Agregar a los tubos con los pellets 300 µl de RNAasa A (concentración de 100 µg/ml) + buffer TEa 0.1X (juntas).

Agitar los tubos manualmente y colocarlos a incubar en baño maría a 37 °C por 1 hora.

Centrifugar las muestras a 14,000 RPM por 1 min (3 min si se desean muestras más limpias), para peletizar los residuos de tejidos remanentes.

Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 ml.

Precipitar el ADN llenando los tubos con una mezcla 10:1 de etanol:acetato de sodio 3 M.

Mezclar invirtiendo los tubos y permitir que se precipiten a temperatura ambiente por un tiempo no mayor a 30 min.

Agitar bien los tubos manualmente para romper el precipitado, antes de proceder a peletarlo.

Centrifugar las muestras por 5 min a 3,000 RPM para peletizar el ADN.

Vaciar el etanol/acetato de sodio y lavar los pellets llenando los tubos con 70% etanol; agitar manualmente.

Colectar los pellets centrifugando por 15 segundos a 14,000 RPM.

Vaciar el etanol y secar los pellets invirtiendo los tubos sobre papel toalla (2-3 horas o de un día para el otro).

Rehidratar los pellets agregando 100-200 µl de buffer TE 0.1X (dependiendo de su tamaño). Ayudar a disolverlos colocando los tubos en baño maría a 65 °C durante 15 minutos.

Almacenar las muestras de ADN en un congelador a -20 °C. A partir de este paso es necesario medir la concentración de ADN (ng/ml), con el fin de preparar las diluciones necesarias para efectuar las reacciones para su amplificación.

IV.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Objetivos específicos:

- Aprender los principios básicos del uso de la técnica molecular de PCR.
- Conocer los requerimientos de equipo y reactivos necesarios para llevar a cabo la PCR.
- Conocer las diferentes aplicaciones de la técnica de PCR.
- Aprender a cuantificar y diluir ADN antes de someter las muestras a la reacción de PCR.
- Desarrollar destrezas y habilidades en el manejo de instrumentos y reactivos en laboratorio.

1. Introducción

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) es uno de los descubrimientos revolucionarios de la biología molecular. Esta reacción fue descubierta por Kary Mullis 1983, y consiste en obtener grandes cantidades de ADN sin realizar una clonación, y como el mismo autor lo describe como "Un método de sorprendente sencillez para fabricar copias de fragmentos de ADN sin límite, concebido en circunstancias inverosímiles, durante un viaje a la luz de la luna a través de las montañas septentrionales de California". Con esta técnica es posible obtener millones de copias de ADN de una sección predeterminada, en un par de horas, de una mezcla compleja de ADN.

Es una técnica muy sensible, útil y versátil. La muestra de ADN que se desea copiar no debe ser necesariamente pura, basta una mínima parte del ADN objetivo. La muestra de ADN puede tener diferentes fuentes y orígenes e incluso estar contaminado con ADN que no interesa ya que solamente se copiará la secuencia predeterminada.

El profesor Ravinow de la universidad de Chicago, atribuye que "La reacción en cadena de la polimerasa ha transformado la biología molecular extendiendo su capacidad de identificar, manipular y reproducir el ADN. Hace abundante lo que una vez fue escaso – el material genético requerido para la investigación". Al tener la materia prima para la investigación se abren nuevos retos en búsqueda e interpretación del material de la vida, el ADN.

Las aplicaciones desarrolladas a partir de su manejo público son innumerables, y su contribución a los avances en las ciencias biológicas es invaluable. Una técnica derivada de este procedimiento es el polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA), en la que la separación y visualización de segmentos de ADN hacen posible la caracterización molecular de genomas individuales, y en consecuencia de grupos de individuos formando poblaciones. Esta técnica ha servido de base para nuevas técnicas cuya principal característica es una mayor precisión, entre ellas el uso de regiones amplificadas de secuencia caracterizada (SCAR, Sequence Characterized Amplified Regions).

Definición: La Reacción en Cadena de la Polimerasa es un proceso termocíclico (combina ciclos de tiempo y temperatura) de replicación bajo condiciones controladas (*in vitro*), que permite el incremento exponencial de un fragmento específico de ADN determinado por dos regiones de secuencia conocida.

La PCR permite realizar de manera sintética y dirigida, algo que se da de manera normal y cotidiana en las células de cualquier organismo vivo. La PCR combina medios bioquímicos y físicos para su propósito y esto limita su aplicación. En un inicio, Kary Mullis enfrentó muchos problemas como el añadir ADN polimerasa en cada nuevo ciclo, ya que ésta se desnaturizaba e inactivaba al subir la temperatura para lograr la desnaturización del ADN. Otro inconveniente fue el manejo de tres baños maría a diferentes temperaturas, tiempos cronometrados y demanda completa de personal.

El microbiólogo Thomas Brock, en 1969, descubre en el parque nacional Yellowstone una bacteria termófila, Gram negativa (G-), aeróbica y heterótrofa a la cual al denominó *Thermus aquaticus*, que puede vivir en ambientes con temperaturas superiores a los 80°C. Esta bacteria posee una enzima de tipo ADN polimerasa termoestable llamada Taq. polimerasa. Este descubrimiento permitió mejorar la técnica de PCR, ya que la Taq. polimerasa, es una enzima termoestable que funciona a 72°C y no se inactiva a más de 94°C. Otro avance importante fue el diseño de aparatos capaces de manejar los ciclos de temperaturas de PCR, denominados termocicladores y que son bloques de metales sensibles a la temperatura que pueden ser programados para calentarse o enfriarse rápidamente en tiempos determinados. Estos dos avances hicieron que el proceso sea hoy totalmente automatizado. Avances en la termodinámica, espectrofotometría y la electrónica han contribuido al desarrollo de nuevas técnicas como la PCR en tiempo real, la cual mediante el uso de termocicladores de última tecnología permiten ver la amplificación de ADN objetivo en tiempo real.

2. Reactivos para llevar a cabo una PCR

Al conjunto de reactivos necesarios para lograr una PCR se le denomina mezcla maestra (master mix), y cada uno contribuye y es esencial para que el proceso se lleve a cabo. El ADN usado de molde o de template no forma parte de la mezcla maestra ya que si es un estudio de diagnóstico molecular preciso, cada una de las muestras de ADN debe ser analizada de forma independiente.

2.1. Agua desionizada y destilada (ddH₂O): es el medio o solvente de los demás reactivos, en el cual se lleva a cabo la reacción de PCR, ya que se trata de simular un proceso biológico que se da en medio acuoso. El agua pura es ligeramente ácida, con un pH de 5.8, el agua destilada tiende a disolver el dióxido de carbono (CO₂) del aire hasta que se encuentra en equilibrio, por eso se recomienda mantenerla *in vitro*. Hay que tener presente que el pH del agua pura es difícil de medir ya que contaminantes como el CO₂ y otros compuestos presentes en el medio pueden adulterar el valor del mismo. Para su uso en PCR se recomienda dar un buen mantenimiento al equipo de desionización y de destilado, o comprarla de casas biotecnológicas que garanticen su pureza.

2.2. Solución amortiguadora de pH o Buffer: su función principal es mantener el pH estable, de 6.5 a 7, simulando el pH del medio celular. De esta manera permite el funcionamiento de los demás reactivos. Se utiliza por lo usual diez veces concentrada (10X) y por lo general contiene Tris HCl, KCl y MgCl₂, dependiendo de la casa comercial. Se recomienda el uso de adyuvantes para aumentar la especificidad de la reacción, así como el DMSO (dimetilsulfóxido), el cual ayuda a mermar la estructura secundaria del ADN. Otros compuestos como el Tween 20 (polisorbato 20) que es un detergente no iónico y no desnaturizante, un emulsificante como el tritón X-100, ayudan a estabilizar a la enzima. Otros adyuvantes usados son: formamida, seroalbúmina, PEG (polietilenglicol), glicerol, aunque ellos no son imprescindibles para llevar a cabo la PCR. Muchas veces el ADN extraído tiene residuos como por ejemplo compuestos fenólicos y la ayuda de estabilizadores ayuda a que la PCR amplifique ADN.

2.3. Ión magnesio (MgCl₂): El ion del magnesio es un catión divalente imprescindible en la reacción, ya que es un activador enzimático o cofactor de tipo inorgánico. Regularmente se requieren concentraciones que van de 0.5 a 2.5 mM, en incrementos de 0.5 mM, aunque la concentración ideal se alcanza en un proceso de optimización para cada marcador en particular. Concentraciones bajas causan un rendimiento deficiente, mientras concentraciones altas generan amplificaciones inespecíficas (fragmentos de ADN de tamaño no deseado).

2.4. Desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP's): son nucleótidos con tres grupos de fosfatos y se distinguen por su base nitrogenada, es decir: deoxiadenina trifosfatos (dATP), deoxiguanina trifosfato (dGTP), deoxicitocina trifosfato (dCTP) y deoxitimina trifosfato (dTTP). Son los monómeros del polímero de ADN, es decir son los ladrillos o la materia prima de la cual está hecho el ADN. La variación en su concentración va a afectar directamente al producto amplificado. Se usan por lo general de 0.2 a 1.0 mM. Si se añade en altas o bajas concentraciones, afecta el funcionamiento de la polimerasa que es afectada por la concentración del sustrato. Los dNTP's suelen captar iones de magnesio y es por esta razón que se debe mantener la misma relación entre estos dos componentes. Los dNTP's al formar parte de la nueva cadena de ADN lo hacen a manera de monofosfatos, es decir eliminan sus dos grupos fosfatos liberando energía la cual usa la enzima para ir uniendo la nueva cadena de ADN.

2.5 Cebadores, iniciadores, imprimadores o primers: son cadenas complementarias de ADN (ADN monocatenario) y el componente más sensible de la PCR, ya que de ellos depende la especificidad de la reacción. Los primers son los encargados de señalar el sitio desde donde se realizará la amplificación de la nueva cadena, y son diseñados de acuerdo al ADN molde o template a copiar. Son de longitud y contenido de G y C variable, dependiendo del tipo de marcador molecular que se use. Se usa en concentraciones que van de 0.1 a 0.5 μM. Idealmente, los cebadores deben carecer de estructura secundaria de mutua complementariedad, sobre todo en los extremos 3', ya que se pueden pegar entre sí como autotemplates y la polimerasa los amplifica fácilmente, generando así pequeños amplicones conocidos como dímeros de primers. Cuando se producen dímeros en la PCR disminu-

ye la cantidad de la amplificación del fragmento de ADN de interés. En el caso de los marcadores tipo RAPD se necesita solo de un cebador de 6 a 10 pares de base, ricos en G y C (50-80%). Si se trata de un SCAR se utilizan dos cebadores que indican el inicio y el fin del fragmento de ADN a copiar. Si se usan dos primers, ambos deben tener la misma temperatura de fusión o Tm (temperatura Melting) y por lo tanto una misma concentración de G + C. La temperatura de fusión puede ser calculada por medio de la siguiente fórmula:

$$T_m = (2^\circ\text{C})(\# \text{de A+T}) + (4^\circ\text{C})(\# \text{de G y C})$$

2.6. ADN polimerasa, Taq polimerasa: en 1995 un grupo de investigadores de la Universidad de Stanford, liderado por Arthur Kornberg, descubren las ADN polimerasas, las cuales son enzimas celulares con varias funciones, entre ellas, la replicación y la reparación del ADN. Estas enzimas realizan los procesos de replicación, *in vivo*, bajo condiciones celulares y a la temperatura del organismo en el cual está actuando. La ADN polimerasa realiza la amplificación o síntesis de una nueva cadena de ADN, guiada por un cebador que se hibrida en una secuencia complementaria. En PCR se utilizan polimerasas que son termoestables para que resistan los cambios de temperatura durante el proceso de amplificación. Las temperaturas de catálisis de estas enzimas se encuentran alrededor de los 72°C, se estima que a esa temperatura son capaces de añadir entre 100 nucleótidos por segundo. Actualmente la mayoría de ADN polimerasas comerciales son versiones recombinantes e incluso mejoradas gracias a los avances de la ingeniería genética. Las enzimas son extraídas principalmente de dos especies, la *Thermus aquaticus* (Taq) y la *Thermococcus litoralis* (Vent), pero existen otras como la *Pyrococcus furiosus* (Pfu) y la *Thermotoga maritima* (ULTma). La más reconocida es la Taq polimerasa, la cual es una proteína de una larga cadena de aminoácidos, su actividad exonucleasa va de 5' a 3'.

2.7. ADN template o molde: no forma parte de la mezcla maestra, es el sustrato de la PCR. La concentración a la cual se utiliza en PCR varía desde 1 ng/μl (en el caso de virus o plásmidos clonados) o de 5 - 50 ng/μl cuando se trata de organismos eucariotas. Hay que tener presente que si se excede con la concentración de ADN, éste puede bloquear la actividad enzimática de la polimerasa, por la relación alta de sustrato en el medio; aunque a veces, altas concentraciones de ADN molde producen resultados favorables. Dependiendo del marcador molecular a usar, también varían las cantidades de ADN.

3. Fases de la PCR

La PCR es un proceso termocíclico, que son ciclos que combinan tiempo y temperatura. cada ciclo comprende las siguientes fases o etapas:

3.1. Desnaturalización del ADN: en un proceso de replicación *in vivo* hay sistemas enzimáticos especializados en realizar la ruptura de la doble cadena, pero el usar enzimas (ADN-helicadas) resulta en un costo elevado y en un manejo especializado. En esta fase la mezcla maestra y el ADN molde son llevados a altas temperaturas, entre 90-98°C. El objetivo es desnaturar el ADN, es decir

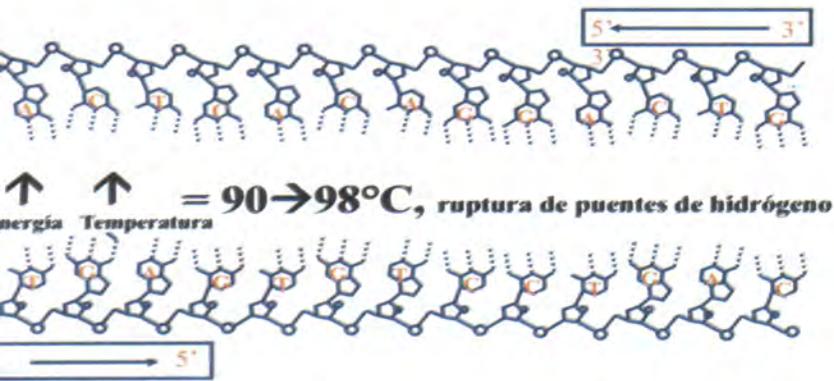


Figura 33. Desnaturalización del ADN, ruptura de los puentes de hidrógeno.

romper los puentes de hidrógeno (Fig. 33) para que la doble hélice estructural se abra en sus cadenas antiparalelas. La energía proporcionada compensa la fuerza de unión de los puentes de hidrógeno permitiendo que las cadenas base se separen, en un proceso que demora de un minuto a tres. Si la muestra de ADN a analizar tiene un alto contenido de G y C, el tiempo se debe incrementar ya que estas bases se unen por tres puentes de hidrógeno. Se sugiere que previo a iniciar la PCR se realice un paso conocido como desnaturalización inicial (4-8 min a 95°C), que garantiza una desnaturalización de toda la cadena de ADN template. Hay que tener presente que entre más alta sea la temperatura utilizada en la desnaturalización, la vida promedio de la enzima disminuye, por ejemplo: a 92.5°C la enzima dura 2 horas, a 95°C dura 40 min y a más de 97.5°C dura 5 minutos.

3.2. Acoplamiento o apareamiento de los primers, annealing: en esta etapa la temperatura disminuye dependiendo de la longitud y del contenido de bases nitrogenadas de los primers. La temperatura puede oscilar de 40 a 72°C. Al descender la temperatura permite que los cebadores se peguen con sus complementos de la cadena molde. La Taq. polimerasa para iniciar la síntesis necesita de un grupo OH- en el extremo 3' del primer apareado, es desde ese sitio donde la enzima empieza a copiar, reconociendo la doble cadena formada por el

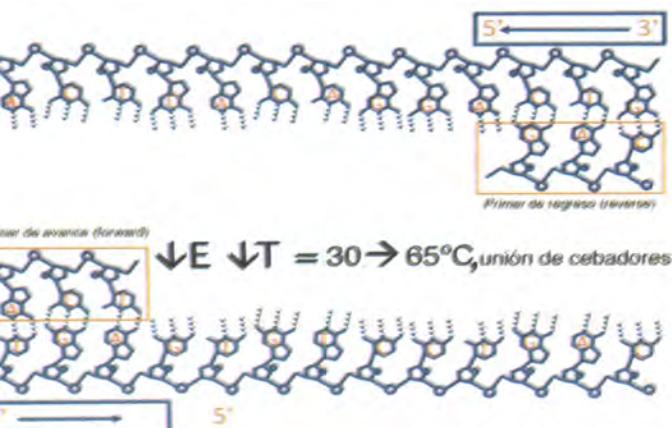


Figura 34. Acoplamiento de los primers según la complementariedad de bases.

primer y la cadena de ADN template (Fig. 34). El tiempo del apareamiento (20 a 80 s) va a estar en función del tamaño del primer, entre más grande sea, mayor es el tiempo.

Una forma de mejorar la especificidad de pegue de los primers y evitar pegas inespecíficas que dan como resultado bandas borrosas, es incrementar levemente la temperatura, hasta que se obtengan bandas claras (Fig. 35).

3.3. Síntesis, extensión o elongación: El ADN molde, en su mayoría, se encuentra en cadena sencilla, a excepción de las pegas con los primers quienes flaquean la zona a copiar. La enzima empieza a unir los nucleósidos monofosfatos complementarios,



Figura 35. Electroforesis con bandas definidas de ADN amplificado en PCR.

según la secuencia de la cadena en dirección 5' → 3' (Fig. 36). Los dNTP's al inicio de la reacción están en forma de trifosfatos, pero al momento de formar parte de la nueva cadena de ADN, lo hacen en forma de nucleósidos monofosfatos.

La energía liberada por los trifosfatos es necesaria para formar los nuevos enlaces fosfodiéster de la cadena en formación. La temperatura óptima de trabajo de la Taq polimerasa es de 72°C. El tiempo necesario en esta fase va a depender del tamaño del fragmento a amplificar; se estima que la enzima une aproximadamente 1,000 nucleótidos por minuto.

Al final de todos los ciclos de la PCR es recomendable dejar entre 4-8 minutos de una fase extra de síntesis, para de esta manera garantizar que todos los fragmentos amplificados estén completos y que tengan el mismo tamaño. Una vez terminada esta fase se debe programar la fase final de enfriamiento y preservación entre 4 y 15°C.

Es recomendable que las muestras sean sembradas inmediatamente en el gel para electroforesis para obtener buenos resultados. Si hay que guardarla de un día para otro se debe preservarla a 4 °C sin que haya fluctuaciones de temperatura que desnaturalicen los fragmentos de ADN amplificados.

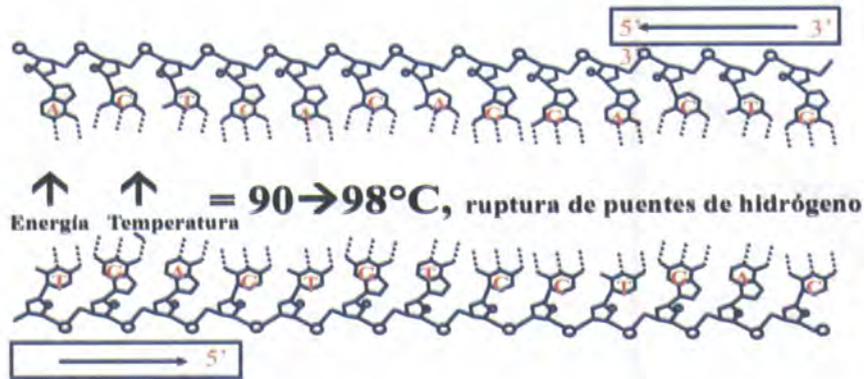


Figura 36. Síntesis de ADN, unión de nucleótidos según la complementariedad de bases.

4. Práctica #1. Cuantificación y Dilución de ADN.

Para cuantificar las muestras de ADN se utilizará el método de fluorometría, utilizando un fluorómetro Hoefer DyNA Quant TM 200.

Protocolo de cuantificación de ADN

Sacar los reactivos del refrigerador 30 minutos antes de realizar la cuantificación para que se estabilicen a temperatura ambiente.

Calibrar el fluorómetro usando ADN estándar extraído de timo de bovino a 100 ng/ml. El buffer a usar es TNE (100 ml TNE 1X y 10 µl de solución de tintura Dye), pH = 7.4.

Encender el fluorómetro y esperar que los lectores se regulen y estén listos para realizar las lecturas. Lavar tres veces la cubeta de cuarzo con agua destilada estéril y secarla con paños para tareas delicadas Kimwipes®.

Agregar 2 ml de buffer de cuantificación en la cubeta, colocarla en la celda del fluorómetro, cerrar la tapa de seguridad y presionar la tecla Enter.

Presionar el botón de Zero.

Presionar el botón Calibración.

Agregar 2 µl de ADN estándar, mezclar bien y cerrar la tapa de seguridad.

Presionar el botón Enter y digitar 100 (concentración del ADN estándar).

Remover y lavar la cubeta de cuarzo.

Cuantificación de las muestras desconocidas.

Lavar tres veces la cubeta de cuarzo con agua destilada estéril y secarla con paños para tareas delicadas Kimwipes®.

Colocar 2 ml de buffer de cuantificación en la cubeta limpia y colocar en la celda del fluorómetro y cerrar la tapa de seguridad.

Presionar dos veces el botón Enter.

Presionar el botón Zero.

Agregar 2 µl de muestra de ADN desconocida, mezclar bien y cerrar la tapa de seguridad.

Presionar Enter y el cuantificador mostrará en la pantalla la concentración de ADN en ng/µl.

Vaciar la cubeta de cuarzo, enjuagarlo tres veces con agua destilada, y airearlo un poco, antes de colocar la siguiente muestra.

Una vez obtenido el dato de cuantificación, se debe diluir las muestras que presentan altas concentraciones, en 100 µl de buffer TE, hasta obtener una solución de ADN a la concentración deseada, usando la fórmula:

$$V_i = \frac{(C_f \times V_b)}{(C_i - V_f)}$$

Donde:

V_i = Volumen inicial.

C_f = Concentración final.

V_b = Volumen del buffer de dilución TE a 0.1 X.

C_i = Concentración inicial.

5. Regulaciones de bioseguridad durante el proceso de cuantificación de ADN.

Los aparatos que se utilizan durante la cuantificación de ADN son sensibles y delicados, es necesario tomar todas las medidas de seguridad y manejo para que este proceso tenga éxito.

No mover el cuantificador cuando esté encendido.

Usar paños para tareas delicadas Kimwipes®, para limpiar la cisterna de cuantificación y evitar rayados en la superficie.

Usar agua destilada y desionizada estéril tres veces para enjuagar la cisterna de cuantificación.

Aviso de seguridad: No dejar la cisterna de cuantificación llena dentro del cuantificador, ya que el lector se puede dañar.

6. Práctica # 3. Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Descongelar las muestras ADN diluidas y esperar 30 minutos hasta que estén a temperatura ambiente.

Realizar los cálculos de la mezcla maestra de acuerdo al protocolo del marcador que se va a usar, se debe utilizar la tabla establecida para el control de las reacciones de PCR.

Preparar la mezcla maestra de acuerdo a los cálculos realizados.

Mezclar bien todos los reactivos de la mezcla maestra.

Colocar el volumen (μl) de la mezcla maestra para cada muestra en las celdas del plato de PCR, ABgene® PCR Plates.

Agregar el ADN (μl) en cada una de las celdas del plato de PCR que contiene la mezcla maestra.

Agregar una gota de aceite mineral estéril sobre cada muestra para evitar evaporación.

Colocar el plato de PCR en las celdas del termociclador y sellarlo con film de aluminio, papel y plástico (AlumaSeal 96TM) antes de cerrar la tapa del termociclador.

Realizar la amplificación del ADN, dependiendo del perfil térmico optimizado para el marcador a utilizar.

Una vez finalizada la reacción de PCR, guardar los platos con las muestras en el refrigerador hasta proceder con la electroforesis.

7. Regulaciones para el trabajo dentro de la cámara de flujo laminar.

Para realizar cualquier trabajo en la cámara de flujo laminar se debe seguir las siguientes regulaciones.

Retirar de su cuerpo todo tipo de pulseras, relojes y anillos.

Antes de ingresar debe lavarse bien las manos, uñas (cortas) y brazos con abundante agua y jabón.

Toda persona antes de ingresar debe llevar puesto: gabacha, cobertores de cabello y mascarilla.

Deben usarse guantes de látex o de nitrilo para trabajar en la cámara.

Antes de realizar cualquier labor dentro del cuarto limpio los estudiantes deberán esperar que el instructor o el ayudante realice la demostración del cultivo que se va a trabajar.

Una vez terminado el trabajo los mecheros deben apagarse cubriéndolos con la tapa de vidrio provista para cada uno.

Si se produce un derrame de alcohol dentro de la cámara se deberá apagar inmediatamente el mechero y retirarse del área a una distancia prudente y usar el extintor más cercano.

8. Riesgos.

El trabajo que se realiza en la cámara de flujo laminar, es una labor que requiere paciencia y destreza para que sea eficiente y productivo, pero pueden ocurrir los siguientes riesgos:

Que el estudiante y/o empleado sea alérgico al alcohol.

Al momento de realizar la esterilización de herramientas utilizando el mechero.

Puede ocurrir algún tipo de quemadura.

Al momento de retirar las herramientas del alcohol este puede derramarse sobre la mesa y al hacer contacto con el mechero pudiendo producir un incendio.

Si se manipula de forma incorrecta los cilindros de los platos petri, éstos pueden caerse y romperse, donde el usuario corre el riesgo de sufrir algún tipo de cortadura.

V.- ELECTROFORESIS

Objetivos específicos:

Conocer los principios básicos de técnica de electroforesis.

Aprender a elaborar geles de agarosa para separar fragmentos de ADN amplificados en PCR.

Interpretar los resultados de una PCR de punto final, los cuales se obtienen después de una corrida electroforética.

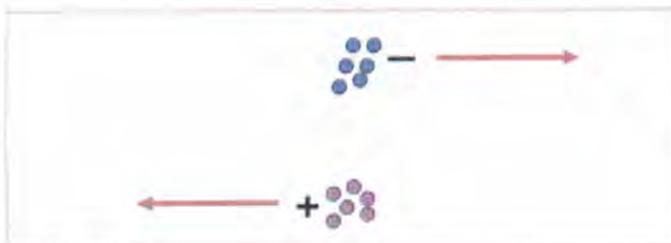
1. Introducción

La electroforesis es una técnica muy usada en biología molecular y consiste en separar moléculas de proteínas o de ADN basadas en su tamaño, peso y carga, en un campo eléctrico. La separación se hace en una matriz sólida como en papel o en acetato de celulosa, o en una matriz que genere poros de tamaño uniforme como la agarosa o la poliacrilamida. Es usada también la electroforesis libre o en dilución, la cual usa un fluido en vez de una matriz. Las moléculas van a ser atraídas al polo opuesto, es decir las moléculas de carga negativa van hacia el polo positivo, mientras que las moléculas de carga positiva hacia el polo negativo (Fig. 37).

La velocidad con la que las moléculas son atraídas depende del tamaño de la molécula, de la cantidad y densidad de poros de la matriz y de la cantidad e intensidad de la corriente eléctrica aplicada. Por lo general, se recomienda 70-110 voltios dependiendo del tamaño del gel usado. Para que el fluido eléctrico sea uniforme necesita un buffer de corrido que permita el paso de la corriente eléctrica.

2. Tipos de electroforesis

Existen dos tipos de electroforesis basados en su disposición: electroforesis horizontal y electroforesis vertical. La vertical usa como matriz, poliacrilamida, la cual por su polimerización tridimensional muy reducida y uniforme, permite separar moléculas muy pequeñas y permite distinguir fragmentos de ADN de hasta un par de base de diferencia. La electroforesis horizontal usa como matriz la agarosa, que es un disacárido compuesto de B-D-Galactosa y 3,6 anhidro- α -L-Galactosa. La ventaja de usar



Cátodo

**+
Ánodo**

Figura 37. Migración de las moléculas basado en su peso y carga.

agarosa o poliacrilamida es que, una vez polimerizadas, son químicamente inertes, transparentes (dependiendo de su pureza) y muy estables en un amplio rango de pH, temperatura y electricidad. La polimerización de la agarosa permite que se formen poros de tamaño uniforme, por donde migrarán las moléculas. La agarosa se polimeriza por la acción del calor, que expande las moléculas y permite su fusión a menos de 42°C, a la cual permanece en estado de gel. Para la preparación del gel se debe usar como medio líquido buffer de corrido para que el flujo eléctrico sea uniforme a través de la matriz.

La concentración a la cual se debe usar la agarosa depende del tamaño del fragmento de ADN a identificar. Si el fragmento es pequeño, entre 100 a 500 pares de base, la concentración de agarosa va a ser entre 2-3%. Si el tamaño de la molécula de ADN está entre 1000 pb a 50 kb el porcentaje de agarosa debe estar entre 0.2-0.6%. En el cuadro 2 se muestra una referencia sobre el porcentaje de agarosa a utilizar.

Cuadro 2. Relación de porcentaje de agarosa con respecto al tamaño del fragmento de ADN a separar en electroforesis.

Porcentaje de agarosa	Rango del tamaño de los fragmentos de ADN a separar (pb)
0.2	5,000 - 6,0000
0.6	1,000 - 30,000
0.9	700 - 20,000
1.0	600 - 15,000
1.1	500 - 10,000
1.2	400 - 6,000
1.3	300 - 5,000
1.5	200 - 1,000
2.0	100 - 1,000
2.5	50 - 500

La agarosa se funde con el buffer entre 90-100°C, esta fusión se puede hacer en un plato agitador caliente o en un microondas. Una vez fusionada la agarosa con el buffer, hay que dejarlo enfriar hasta que llegue a 55°C y luego colocarla, antes de que se gelifique, en el molde a usar y poner el o los peines en la parte superior del molde, procurando que no tomen contacto con la base del molde ya que al momento de retirarlos pueden romper el gel y dejar escapar el producto de PCR.

3. Siembra o cargado del producto de PCR.

Este procedimiento debe ser ordenado para evitar errores en el diagnóstico. Se debe sembrar primero la escalera molecular (EM), seguido del control positivo (C+), del control negativo (C-) y las muestras en orden, si se trata de un SCAR; en un RAPD no se colocan los controles, solamente la EM seguido de las muestras en orden (Fig.38).



Figura 38. Formas de cargado del gel (siembra de ADN) dependiendo del marcador molecular.

3.1 La **escalera molecular** es una mezcla de ADN de varios tamaños y pesos moleculares ya conocidos. Las casas biotecnológicas comerciales tienen la capacidad de fabricar escaleras de acuerdo a las requerimientos del laboratorio y del tamaño de los marcadores usados. La EM sirve para estimar el fragmento de ADN amplificado en

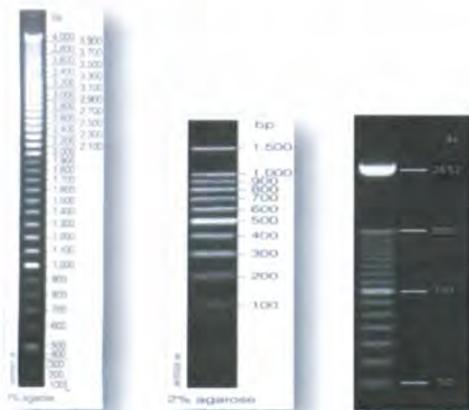


Figura 39. Escaleras moleculares de 100 y 50 pb (Invitrogen 2010).

PCR. Se pueden obtener escaleras de varias separaciones, de 50 en 50 pb, 100 en 100 pares de base o más (Fig. 39).

3.2. El **control positivo** es el producto de una reacción de PCR que contiene el ADN amplificado del patógeno en estudio; al momento de realizar la electroforesis habrá migración de una banda en la gel a una altura determinada, dependiendo del tamaño del segmento de ADN. Esta banda sirve de patrón de comparación para determinar si las demás muestras son positivas para el patógeno en estudio, que se muestra cuando aparece una banda a la misma altura donde aparece en el control positivo.

3.3. El **control negativo** es el producto de una reacción de PCR que no contiene ADN amplificado del patógeno en

estudio; al momento de realizar la electroforesis no habrá migración de ADN, ni se observará una banda. Este control sirve para verificar que en el proceso de preparación de la reacción de PCR no haya contaminación y que la prueba está correctamente realizada.

Para el sembrado se puede usar un buffer de carga (sucrosa, azul de bromofenol, xilen cianol FF o glicerol), el cual es una molécula pesada que permite mantener el producto de PCR en el fondo y disminuye la difusión. El buffer de PCR ya viene con este tipo de buffer de cargas el cual está compuesto de dos tintes, un amarillo y un azul, los cuales se separan durante el corrido electroforético. El tinte azul es una molécula más pesada que el

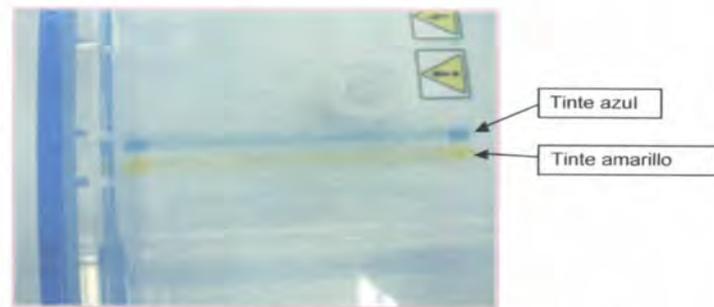


Figura 40. Separación de los tintes al momento del corrido electroforético.

tinte amarillo y por ende demora o se retrasa en el corrido del gel, mientras que el tinte amarillo es una molécula más pequeña, por lo tanto viaja rápidamente. El tinte amarillo sirve de indicador en el corrido del gel ya que permite estimar la ubicación y fin de la electroforesis. Cuando el tinte amarillo se ubica en la base del gel, es momento de parar la electroforesis (Fig. 40).

Una vez terminado el proceso, se debe retirar el gel de la cisterna de corrido y llevarlo al siguiente paso conocido como tñido. En este proceso es necesario tener presente las normas de bioseguridad de los tintes para ADN: el más usado es el bromuro de etidio, pero posee un riesgo alto de intoxicación ya que al tomar contacto con la piel se absorbe fácilmente y puede ocasionar mutaciones que durante una larga exposición resultan en cáncer. Podemos encontrar tintes menos nocivos que permiten una manipulación más segura de los geles. El bromuro de etidio se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN y cuando se le aplica luz ultravioleta de onda corta (254 nm), fluoresce, es decir emite una luz rojiza anaranjada. Esta propiedad permite detectar los fragmentos de ADN obtenidos en la PCR y tomar una fotografía para poder realizar una correcta lectura de resultados en el diagnóstico (Fig. 41).

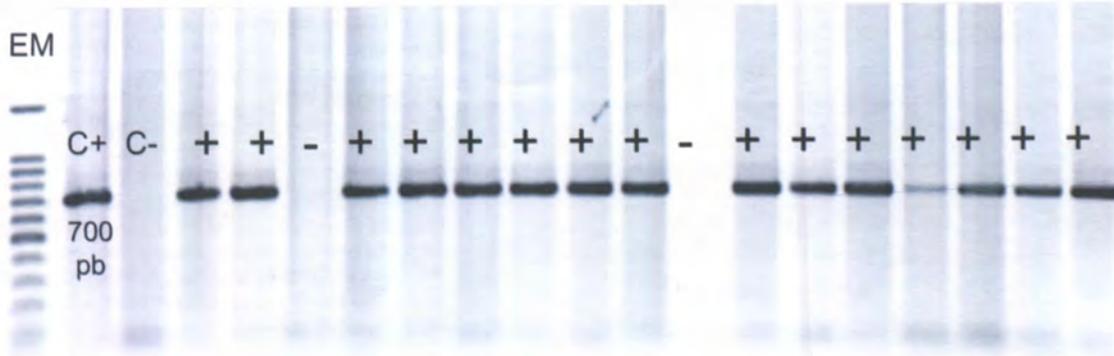
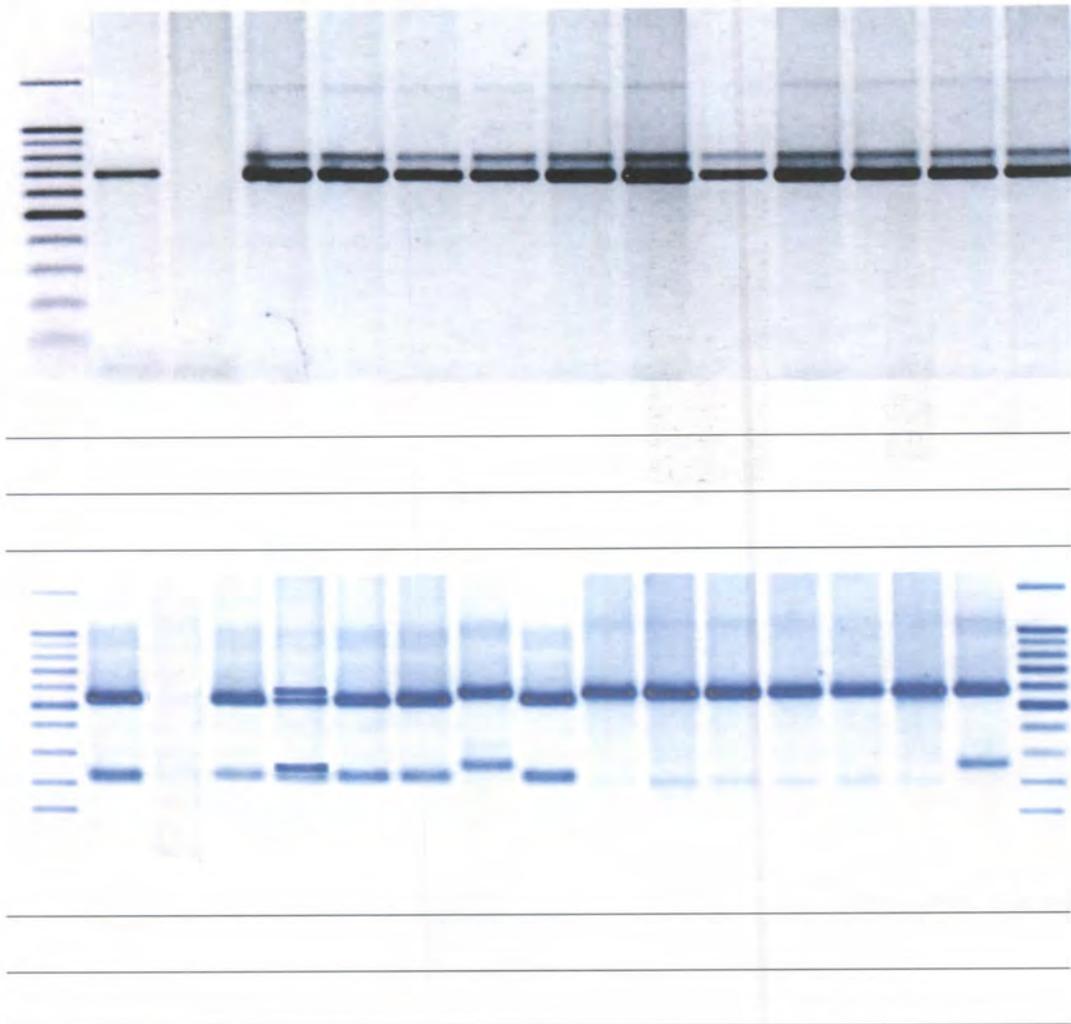


Figura 41. Fluorescencia del bromuro de etidio en un gel de agarosa. En la figura se puede distinguir claramente: la escalera molecular (EM), el control positivo (C+), el control negativo (C-) y las muestras positivas y negativas (+, -).

4. Ejercicios. Fotos de geles de electroforesis para práctica.



5. Práctica # 1. Electroforesis. Protocolo para elaboración de geles de agarosa al 1.2% utilizados en electroforesis.

Pesar 1.68 g de agarosa utilizando una balanza analítica.
Aforar 140 ml de buffer TBE (Trisborate) 0.5X utilizando una probeta de 200 ml.
Añadir la agarosa pesada a un frasco erlenmeyer de 500 ml y mezclarlo con el buffer TB 0.5X aforado, dejar reposar por 5 minutos para que haya una buena hidratación.
Calentar en un horno microondas durante 4 minutos y con una agitación constante.
Retirar la solución de agarosa caliente y ponerla sobre agua fría para bajar la temperatura hasta 55-60°C, utilizar un termómetro para altas temperaturas.
Sellar un molde para geles de agarosa utilizando una cinta adhesiva.
Colocar la solución de agarosa a 55-60°C sobre el molde sellado.
Colocar un peine en la parte superior del molde del gel, evitando que roce la parte inferior del molde, dejar un espacio de 0.5 a 1.0 mm.
Dejar polimerizar el gel durante 30 minutos a temperatura ambiente.
Retirar los peines y la cinta de adhesiva con cuidado de no romper el gel.
Colocar el molde con el gel de agarosa, dentro de la cisterna para electroforesis.
Sembrar el producto de PCR en las celdas del gel, de acuerdo al tipo de marcador que se esté utilizando.
Una vez sembrada la escalera, los controles y las muestras, se debe tapar la cisterna y conectar los electrodos a la fuente de poder.
Encender la fuente de poder y regular el voltaje a 110 V durante una hora o hasta que la banda de color amarillo esté al borde del gel.
Una vez terminada la corrida electroforética se deben desconectar los cables, retirar la tapa y sacar el gel.
Colocar el gel dentro del recipiente con la solución de bromuro de etidio y dejarlo durante 30 minutos con agitación constante.
Retirar el gel y colocarlo en el recipiente con agua destilada y dejarlo durante 15 minutos a agitación constante.
Retirar el gel del agua destilada y colocar sobre el transiluminador para observar y fotografiar el gel.
Tomar la fotografía para respaldo del diagnóstico.

6. Regulaciones para el trabajo en las cisternas de electroforesis.

Previo a realizar las siembras del producto de PCR es necesario revisar que la fuente de poder y los cables de la cisterna estén en óptimas condiciones, esto permite que haya una buena migración de ADN.

Preparar gel de agarosa a la concentración requerida usando buffer TBE 5X.
Llenar la cisterna con buffer TBE 5X.
Colocar el molde con el gel de tal manera que el buffer TBE 5X lo cubra por completo.
Sembrar el producto de PCR: escalera molecular, control positivo, control negativo seguido de las muestras.
Cubrir la cisterna y conectar los electrodos a la fuente de poder.
Regular el voltaje y el tiempo, dependiendo del análisis.
Desconectar los electrodos, quitar la tapa, retirar el molde con el gel.

Aviso de seguridad: No tocar los electrodos o el buffer de corrido de las cisternas, durante el proceso de electroforesis, para evitar un choque eléctrico.

7. Regulaciones para el teñido de geles de agarosa y el uso del transiluminador UV.

Para observar las bandas de ADN hay que teñirlas con bromuro de etidio (carcinogénico).

Colocar el gel de agarosa en el recipiente donde se encuentra la solución de bromuro de etidio y agitar durante 10-15 minutos.
Retirar el gel y colocarlo sobre el transiluminador.
Usar lentes con filtro UV antes de encender el transiluminador, colocar la caja de sombra y tomar la fotografía.
Retirar el gel y ponerlo en el basurero de geles.
Limpiar el vidrio del transiluminador usando paños para tareas delicadas Kimwipes® y evitar rayados.

Aviso de seguridad: Es necesario tener guantes de protección para sustancias tóxicas y gabacha puestos durante la manipulación del bromuro de etidio.

212880

VI.- MARCADORES

Objetivos específicos:

- Aprender los conceptos básicos sobre los tipos de marcadores.
- Conocer las aplicaciones y la utilidad de los tipos de marcadores utilizados en diagnóstico.
- Conocer las bases y fundamentos de los marcadores moleculares de ADN.
- Entender el rol de los marcadores moleculares de ADN en el diagnóstico molecular.

1. Introducción

Para poder realizar un diagnóstico molecular se necesitan los marcadores moleculares de ADN. Un marcador como tal, es un indicador que muestra o indica la presencia de otro carácter que sirve para reconocerlo de manera indirecta. Existen tres tipos de marcadores: morfológicos, bioquímicos y moleculares.

2. Marcadores Morfológicos

Los marcadores morfológicos indican la presencia o ausencia de una característica fenotípica. Un marcador usado, por ejemplo, para identificar el color del frijol de grano negro, es la flor morada: una planta de frijol que posee una flor morada nos indica que el grano va a ser de color negro. El caso es sólo para grano negro, para los demás colores no hay un marcador morfológico identificado. Otro ejemplo puede ser el fenotipo de las razas de vacas como el de la raza Holstein, su patrón morfológico indica que son altas productoras de leche. Si hablamos de caninos, la raza Pastor Alemán, es un marcador morfológico de perros con buenas características de adiestramiento y fidelidad.

Los marcadores morfológicos no están controlados por un solo gen, sino por uno o varios loci, el cual se manifiesta y hace posible la manifestación del marcador. Además los marcadores morfológicos no suelen tener herencia dominante y están influenciados por el ambiente sobre el cual se desarrollan. Por ejemplo, si mi marcador es Holstein y la vaca es llevada a un clima tropical, el marcador no es confiable ya que la vaca no va a tener el mismo potencial de rendimiento que en un clima templado. Un marcador morfológico para determinar el color de la semilla de frijol, es la flor morada, ya que las plantas de frijol que tienen flores de color morado van a tener la semilla de color negro, porque el color morado, marca el color negro de la semilla (Fig. 42).



Figura 42. Identificación de plantas de frijol, usando como marcador morfológico la flor morada.

Usar marcadores morfológicos limita el diagnóstico, ya que: son escasos, son específicos en ciertas etapas del desarrollo de un cultivo, identificables solo en plantas u organismos adultos, no se aplican a caracteres cuantitativos, no se puede distinguir individuos heterocigotos y sólo se distinguen los dominantes y recesivos; no se aplican a caracteres cuantitativos. La ventaja de estos marcadores es que son baratos y fáciles de identificar, pero son muy subjetivos.

3. Marcadores Bioquímicos

Los marcadores bioquímicos se refieren a proteínas de reserva e isoenzimas que se pueden usar como indicadores de caracteres. Es decir, basado en el estudio de estas proteínas se puede establecer un diagnóstico más acertado comparado al uso de marcadores morfológicos, ya que el diagnóstico basado en marcadores bioquímicos indica el producto más cercano de la expresión de los genes, como lo son las proteínas.

Si tomamos como ejemplo el análisis del patrón de phaseolina del frijol (Cuadro 3), la cual es la proteína de reserva en el grano, podemos establecer el origen de un genotipo desconocido. Es decir, si desconozco el origen de un determinado grano de frijol o quiero compararlo con uno nuevo, debo extraer y analizar el patrón de phaseolina presente en el grano para llegar a una conclusión. Por ejemplo, si el grano de un frijol que desconozco su origen, presenta un patrón de phaseolina tipo S, el diagnóstico sería: frijol de raza Jalisco y del acervo Mesoamericano.

Existen muchos marcadores bioquímicos muy comunes sobre todo en el diagnóstico laboratorial usado por los médicos. Los valores enzimáticos del suero sanguíneo, por ejemplo, pueden alterarse de forma bioquímica convirtiéndose en claros marcadores bioquímicos. La Aspartato aminotransferasa y la Alanina aminotransferasa, son isoenzimas que se encuentran en altas cantidades en los músculos del corazón, hígado y del esquelético, pero estos niveles pueden incrementarse cuando una persona padece de hepatitis alcohólica; ahora, si detectamos altos niveles de estas isoenzimas en la sangre de un paciente, el diagnóstico sería: persona que padece de alto grado de alcoholismo, ya que estas enzimas aparecen cuando una persona ingiere grandes cantidades de alcohol y el grado de la patología está avanzado.

Entre las aplicaciones de estos marcadores en mejoramiento podemos nombrar el mapeo de mapas de proteínas, basado en la evaluación de la calidad de la manifestación de un carácter, es decir evaluar la calidad de la isoenzima o proteína en un determinado organismo. Se usan también en la identificación de líneas o variedades, poder caracterizar una generación (F1) o en evaluaciones de semillas.

Usar marcadores bioquímicos tiene ventajas ya que son relativamente fáciles de detectar, no son muy costosos, son sencillos y rápidos en su aplicación; son poco afectados por el ambiente ya que son el producto de la expresión del ADN, y con resultados consistentes. Se debe

Cuadro 3. Patrón de phaseolina en las razas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*).

Acervo	Raza	Phaseolina (patrón)
Andino	Nueva Granada	T
	Chile	H, C
	Perú	T, H, C
Mesoamericano	Mesoamérica	S, Sb, B
	Durango	S, Sd
	Jalisco	S

tener en cuenta que puede existir una variación entre individuos o poblaciones y poseen variación tisular y ontogénica, razón por la cual, para realizar un diagnóstico, se debe tener presente el estado del individuo y tipo de tejido al momento de tomar la muestra. Estos marcadores permiten distinguir individuos heterocigotas, dependiendo de la expresión de los mismos.

El inconveniente de usar estos marcadores es que son escasos, es decir no todos los caracteres pueden ser identificados mediante el uso de proteínas o isoenzimas específicas. La aplicación en análisis genéticos son pocas ya que no analizan al ADN, sino a su producto.

4. Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares de ADN son fragmentos de ADN que marcan o indican uno o varios genes. Son caracteres que pueden usarse de manera directa o indirecta para obtener información genética de todo ente que posea ADN o ARN. Los marcadores moleculares se basan en dos fundamentos, uno morfológico denominado polimorfismo y dos genéticos que son la pleiotropía y el ligamiento genético.

Hay que tener presente que la mayoría, 85-90%, del ADN está en forma de intrones y sólo un 10-15% son exones, es decir regiones codificantes. La combinación y organización de los nucleótidos dentro de una cadena de ADN generan un sinnúmero de repeticiones, que incluso pueden encontrarse en varias regiones del genoma generando los polimorfismos. Mediante PCR o reacciones de restricción se pueden observar varios fragmentos de ADN que se diferencian en su longitud (polimorfismos).

La Pleiotropía se refiere a la capacidad que tiene el gen de influir sobre su marcador y sobre su carácter de interés, es el efecto, donde un fragmento de ADN (gen) influye de manera simultánea en varias características en el fenotipo de un organismo.

El Ligamiento Genético se refiere a la relación o asociación física que existe entre un gen y el marcador. El gen y el marcador se encuentran en el mismo cromosoma y por ende se heredan juntos; entre más cercanos estén mayor es la precisión del marcador, y hay un mayor ligamiento y más difícil es romper su relación (no hay quiasma).

Los marcadores moleculares pueden ser usados por diferentes técnicas de biología molecular como reacciones con enzimas de restricción, PCR, Southern blot, entre otras. En el presente manual nos enfocaremos en el diagnóstico molecular basado en dos marcadores moleculares de PCR, los RAPD's y los SCAR's.

4.1. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Polimorfismos de ADN amplificados al azar.

Estos marcadores son fragmentos de ADN genómico amplificados al azar por la PCR usando un solo primer elegido de manera arbitraria. Estos marcadores tienen su fortaleza en la identificación de polimorfismos, los cuales se identifican y amplifican en una reacción de PCR usando un primer de entre 6 a 10 pares de base y con un alto contenido de guanina y citosina. El polimorfismo es de naturaleza binaria (presencia o ausencia) y su expresión genética es dominante, no se pueden distinguir heterocigotos. Un análisis con marcadores RAPD no demanda un conocimiento previo de la secuencia del ADN de organismo en estudio, el segmento de ADN (polimorfismo) amplificado en PCR depende de la posición en donde los primers se acoplaron, y para que se amplifique un polimorfismo se necesita que el primer se peguen en ambas direcciones (avance y reversa, forward and reverse) (Fig. 43), caso contrario la PCR no amplifica ninguna región. El o los polimorfismos identificados en una PCR con un RAPD poseen el mismo inicio y el mismo fin ya que está definido por la secuencia del primer utilizado, y la región intermedia, varía entre los polimorfismos.

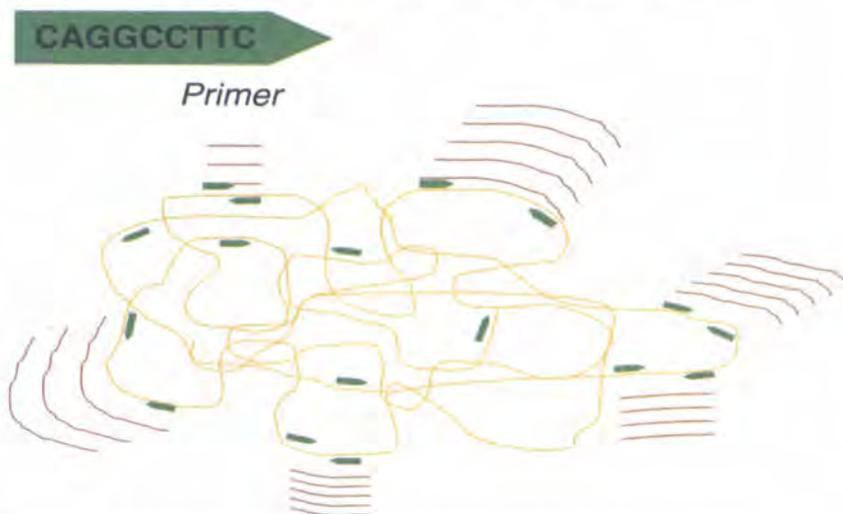


Figura 43. Amplificaciones generadas por un primer para marcador tipo RAPD, se presentan seis polimorfismos amplificados en PCR usando el primer CAGGCCTTC.

La PCR es una reacción enzimática y la calidad, la concentración de ADN template, los componentes de la mezcla maestra, el perfil térmico y los ciclos utilizados van a tener una gran influencia en el resultado final. La técnica RAPD va a estar condicionada a las condiciones del laboratorio, los protocolos y el personal. Es por eso que necesita de un desarrollo cuidadoso para que pueda ser reproducible. Al usar un primer pequeño se pueden generar acoples inespecíficos y como consecuencia se pueden observar bandas borrosas cuando se analiza el gel. Por lo tanto, hay que tener un criterio al momento de realizar la lectura y tomar en cuenta sólo las bandas bien definidas.

Un marcador RAPD es más efectivo entre más polimorfismos identifique, lo cual permite encontrar diferencias entre los organismos en estudio. Por ejemplo, si se estudian dos organismos buscando diferencias en el ADN genómico y se usa un primer RAPD y el gel presenta seis polimorfismos para el primer organismo y cinco polimorfismos para el segundo, se puede decir que los organismos difieren en un polimorfismo y no son idénticos, pero si son cercanos (Fig. 44). Hay que tener presente que un solo cebador no es suficiente para establecer un diagnóstico y se recomiendan de 20-100 primers tipo RAPD, para lograr establecer una semejanza o diferencia en el ADN genómico.

4.2. Sequence Characterized Amplified Region (SCAR), regiones amplificadas y caracterizadas por secuencia.

Los marcadores tipo SCAR son más específicos ya que están basados en una secuencia previa ya conocida. Su fortaleza son los monomorfismos, ya que los primers usados poseen una secuencia amplia de entre 25 – 30 o más pares de bases. Los primers identifican las regiones de avance y reversa (forward, reverse) del fragmento de ADN a identificar. Estos marcadores pueden ser generados a partir de un análisis RAPD. Su expresión genética es codominante, es decir se pueden identificar heterocigotas.

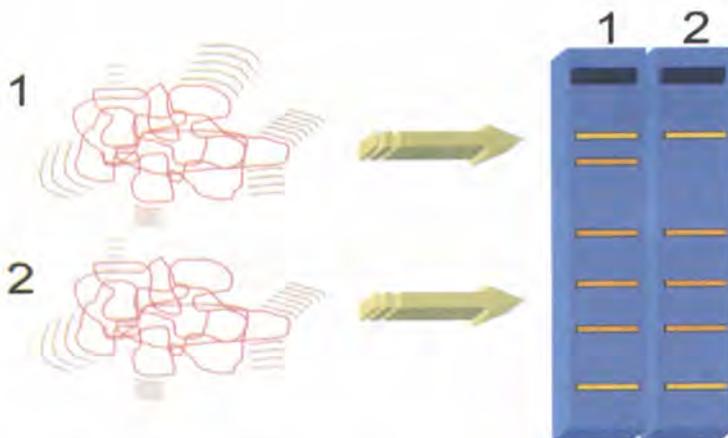


Figura 44. Polimorfismos amplificados en una reacción de PCR usando un primer para marcador tipo RAPD. 1, 2: organismos en estudio.

4.2.1. Generación de marcadores tipo SCAR.

Los marcadores SCAR's pueden ser generados a partir de un estudio y análisis tipo RAPD complementario con una secuenciación del polimorfismo de interés. El primer paso es establecer el carácter a estudiar, seguido de un análisis RAPD, con una secuenciación o clonación en bacterias del polimorfismo de interés, después un diseño de los cebadores para establecer su especificidad y su amplificación específica final en PCR (Fig. 45).

Obtención de los marcadores SCARs



Figura 45. Proceso para la obtención de un marcador tipo SCAR a partir de un análisis RAPD.

Si se realiza un estudio en búsqueda de un carácter de resistencia a alguna enfermedad, es necesario identificar los individuos en estudio y analizar los polimorfismos obtenidos. Así por ejemplo, si tengo 10 individuos, los cuales de manera natural o artificial son afectados o inoculados con una enfermedad, como por ejemplo el retrovirus de la influenza A H1N1, van a haber ciertos individuos resistentes y otros susceptibles al retrovirus de la influenza. El siguiente paso es identificar los individuos resistentes y susceptibles y extraer su ADN genómico y realizar una PCR usando un marcador tipo RAPD.

Al realizar la electroforesis del marcador RAPD se van a observar los polimorfismos generados en cada uno de los individuos. Una vez identificados los polimorfismos hay que analizarlos de acuerdo al tamaño, lugar y en los individuos que lo posean. En la figura 43 se observan los 10 individuos con sus respectivos polimorfismos, se observa que los polimorfismos de 1200, 1000, 800 y 200 pares de bases están presentes en individuos resistentes y en individuos susceptibles. Pero los polimorfismos de 600 pb se presentan únicamente en los individuos resistentes y que los fragmentos de 400 pares de base, sólo se encuentran en los individuos susceptibles. De alguna manera el fragmento de ADN de 600 pares de base identifica o marca a los individuos resistentes y el polimorfismo de 400 pares de

base marca solo a los susceptibles. El siguiente paso es cortar el gel con el fragmento de interés, en este caso el de 600 pares de base y el de 400 pares de base, clonarlos o directamente secuenciarlos para conocer la región identificada. Una vez obtenida la secuencia de la región se

diseñan los primers más grandes que identifiquen solamente esa región específica. En una nueva PCR usando los primers generados será posible diagnosticar individuos resistentes o susceptibles para esta enfermedad (Fig. 46).

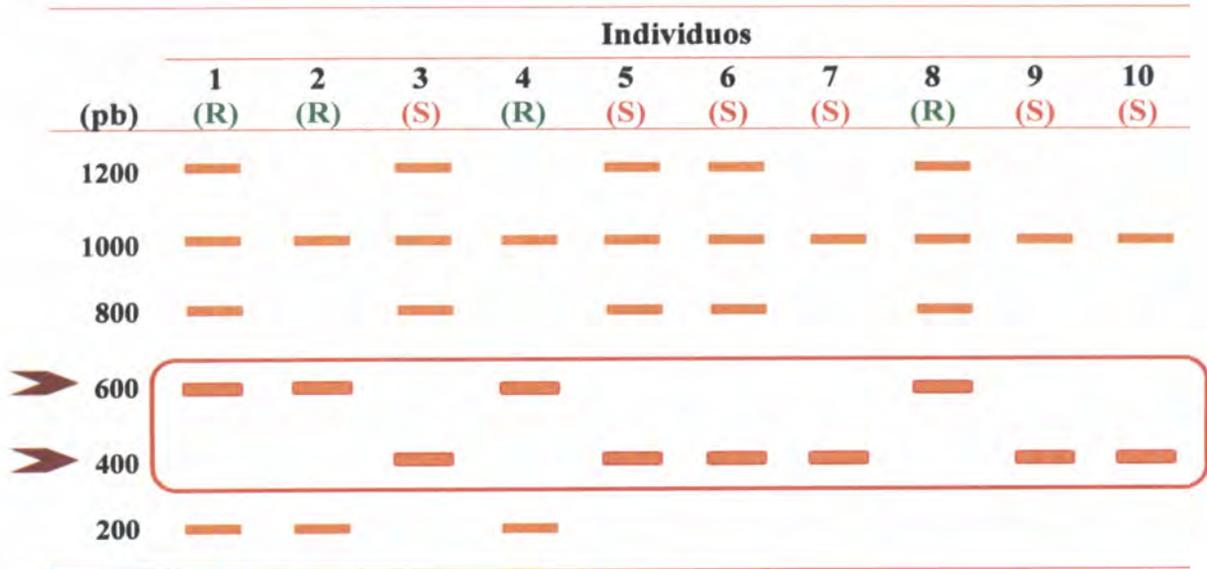


Figura 46. Polimorfismos identificados en 10 individuos, los cuales presentan resistencia (R) y susceptibilidad (S) para una enfermedad determinada.

VII.- GLOSARIO

Accesión:

Es una muestra de un organismo o población que se mantiene en un banco de germoplasma, que se usa o conserva en un programa de mejoramiento genético o por una nación.

Ácidos nucleicos:

Polímeros de nucleótidos que poseen la información genética (herencia biológica) de un organismo o ente biológico.

Acoplamiento annealing:

Hibridación de sondas nucleotídicas a una cadena desnaturalizada de ADN. Apareamiento de un fragmento pequeño monocatenario (oligonucleótido) a una cadena desnaturalizada de ADN (molde o template).

ADN:

Ácido Desoxiribonucleico, polinucleótido de carácter ácido compuesto de dos cadenas antiparalelas que se unen por medio de puentes de hidrógeno por complementariedad de cuatro pares de bases. Adenina se une a Timina con dos puentes de hidrógeno y Guanina se une a Citocina con tres puentes de hidrógeno.

ADN circular:

Molécula de ADN bicatenario que no posee principio ni fin.

ADN lineal:

Molécula de ADN bicatenario que posee principio y fin.

AFLP-PCR:

Amplified Fragment Length Polymorphism-PCR. Polimorfismos de la Longitud Del Fragmento Amplificado en PCR. Marcadores derivados de la PCR. Se refiere a un método de alta sensibilidad para detectar polimorfismos en el ADN.

Agar (agar – agar):

Polisacárido de naturaleza compleja (galactano) que se extrae de determinadas algas rojas (Rodoficeas). Está compuesta de dos polímeros: la agarosa y la agarpectina.

Agarosa:

Polisacárido neutro que es capaz de producir gelificación cuando se polimeriza por medio de calor. Está compuesto de la unión de disacáridos denominados agarobiosas, los cuales a su vez se componen de β -D-galactosa y 3, 6 anhidro- α -L-galactosa.

Alelo:

Es una de las manifestaciones (forma alternativa) de un gen que pueden existir en un sólo locus.

Amplificación:

Incremento en número de copias. Se puede atribuir a: 1) incremento de copias de un plásmido (por ejemplo por acción de químicos como el cloranfenicol). 2) aumento del número de copias de

un fragmento de ADN (inserto) por medio de la replicación de un vector en el que se ha clonado. 3) incremento de un fragmento de ADN específico o no en el proceso de PCR.

Amplificación génica:

Término usado de dos formas: 1) replicación de un mismo gen en un locus determinado. 2) multiplicación de fragmentos de ADN por PCR.

Antiparalelo:

Término que se usa para describir las orientaciones opuestas de las dos cadenas de una molécula de ADN, las cuales en el extremo 3' se alinea con el extremo 5' y de la cadena complementaria.

Anticuerpo:

Molécula de origen proteico que se produce en sistema inmunológico de un organismo, como mecanismo de defensa en contra de un antígeno extraño. Inmunoglobulinas secretadas por plasmocitos. De manera usual, los anticuerpos poseen dos sitios iguales de unión llamados paratopos, los cuales se unen y reconocen a los antígenos. La suma entre las fuerzas de unión de los paratopos con los epítomos definen la afinidad de los anticuerpos para los antígenos.

Antígeno:

Molécula de origen proteico o parte de un patógeno que induce la producción de anticuerpos. Es una molécula capaz de ser identificada de manera específica por los anticuerpos. Los antígenos más comunes son proteínas o polisacáridos. Los antígenos poseen un sitio de acople para los anticuerpos denominado epítomo o determinante antigénico.

Antitoxina:

Substancia que se une a la toxina y la neutraliza o la destruye.

ARN:

Ácido Ribonucleico, polinucleótido de carácter ácido monocatenario, cuyo azúcar es la ribosa y posee uracilo en lugar de adenina.

Asepsia:

Eliminación de microbios infecciosos o contaminantes de un tejido, ser vivo o de un objeto.

Bacterias:

Microorganismos unicelulares, sin núcleo definido o de cualquier otro compartimento interno que se delimita por una membrana. El ADN bacteriano se encuentra condensado formando una estructura observable denominada nucleoide. El ADN bacteriano es bicatenario circular rara vez lineal, organizado y compactado en uno, dos o tres cromosomas. Las bacterias pueden tener ADN extra cromosomal en forma de plásmidos.

Banco de germoplasma:

Entidad que se constituye con el objetivo de preservar y conservar los recursos genéticos de una región o nación. Almacena muestras representativas de genotipos silvestres, criollos y mejorados de una o varias especies.

Biodiversidad:

Bio = vida, Diversitas = diversidad. Es la totalidad de genes, especies y ecosistemas que posee una región determinada. Se denomina también diversidad biológica.

Biótico - bancos de genes:

Son bancos que conservan genes o fragmentos de ellos. Son colecciones de moléculas de ADN recombinante en donde hay inserciones que representan un genoma completo de un organismo.

Carácter (caracteres), característica (características):

Es un atributo fenotípico estructural o funcional de un organismo, que es producto de la interacción de uno o varios genes con el ambiente en el cual éste se desarrolla.

Característica cualitativa:

Carácter de variación discontinua, que se muestra en varios estados, generalmente es controlada por más de un gen y que es poco o nada afectada por el ambiente.

Característica cuantitativa:

Carácter de variación continua, cuya expresión es controlada por varios genes y es afectada por el ambiente.

Caracterización:

Medidas o evaluaciones de la presencia/ausencia o grado de especificidad de los genes, polimorfismos o caracteres, cuya expresión no es afectada por el ambiente.

Caracterización fenotípica:

Evaluaciones dirigidas a uno o varios caracteres, de un organismo, que son de alta heredabilidad, que se pueden observar y medir, que se expresan de igual manera bajo cualquier condición ambiental y que permiten distinguir a los individuos de manera fenotípica.

Caracterización molecular:

Evaluaciones dirigidas a uno o varios genes específicos, o a polimorfismos de ADN, que se encuentran en un organismo, por medio del uso de marcadores moleculares de ADN, ARN o proteínas.

Cistrón:

es la unidad mínima de la información genética. Son fragmentos de ADN codificante (exones) presentes en un gen. Un gen puede tener uno o varios cistrones.

Clon - clones:

Poblaciones de moléculas de ADN recombinante que poseen la misma secuencia. Se atribuye el término a células u organismos que poseen exactamente el mismo genotipo.

Coevolución:

Es la evolución simultánea o conjunta de dos o más organismos que se interrelacionan de manera positiva o negativa. Situación en la cual dos o más organismos actúan como agentes selectivos entre ellos. Ejemplo: *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium leguminosarum*.

Colección activa:

Es el total de accesiones o muestras de un germoplasma que se almacenan a corto, mediano o largo plazo y que son mantenidas por fines de estudio o investigaciones.

Colección base:

Colección más amplia y completa de accesiones de germoplasma almacenada durante uno o varios periodos largos, con fines de conservación. Es usada para suplir vacíos en la colección activa.

Colección núcleo:

Colección céntrica que agrupa dentro de un número mínimo de accesiones la mayor variabilidad existente en una colección base.

Colonia bacteriana:

Se refiere a la agrupación masal de células microbianas que provienen de una sola célula progenitora.

Contaminación:

Ingreso de microorganismos no deseables en un ser vivo, medio de cultivo u objeto.

Cromosoma o en inglés Chromosome:

Es la subunidad del cromosoma que está formada de 166 pares de bases enrolladas al octámero de histonas y mantiene su posición por medio de un conector que es la Histona Uno H1. $\text{chr}(\text{at})\text{-}\chi\rho\omega\text{-}\mu\alpha\text{-}\mu\alpha\tau\omicron\varsigma$ gr. 'color' + -o- gr. + $\text{s}\omicron\text{m}(\text{a})\ \sigma\omega\text{-}\mu\alpha\text{-}\mu\alpha\tau\omicron\varsigma$ gr. cient. corpúsculo celular, cromosoma.

Cromosomas artificiales de bacterias:

Plásmidos modificados, de una sola copia, que se usan para clonar un mayor número de pares de bases en comparación a otros métodos. Contienen genes con resistencia a antibióticos.

Cultivo:

Es el crecimiento de microorganismos o entes biológicos bajo condiciones controladas.

Cultivo mixto:

Contiene más de un tipo de microorganismo o ente biológico.

Cultivo puro:

Contiene sólo un tipo de microorganismo o ente biológico.

Descriptorios:

Son las características cualitativas o cuantitativas que se usan para identificar a un organismo a diferentes niveles taxonómicos, mediante caracteres morfológicos (marcadores morfológicos), agronómicos y ecogeográficos.

Distancia genética:

Es el grado de relación o parentesco entre organismos, subgrupos o poblaciones que fueron medidas por variables estadísticas.

Diversidad genética:

Se refiere a la variación en la composición genética (pool genético) entre individuos, de la misma especie o fuera de ella.

Diploide:

Se refiere al juego completo del material genético de un organismo, el cual consiste de un par de cromosomas, uno proveniente del padre y el otro de la madre. Las células somáticas poseen número diploide de cromosomas, mientras que las células de reproducción o gametos son haploides.

Enzima de restricción:

Enzimas de tipo nucleasas que cortan al ADN en regiones de secuencia específica.

Entrada:

Es una muestra de un germoplasma que representa la variación genética de una determinada población.

Espora:

Es una unidad simple de propagación, carece de embrión (reproducción sexual), tiene la capacidad de germinar cuando las condiciones son adecuadas y generar un organismo de la misma especie de la cual fue generada.

Esterilización:

Es la eliminación total de toda forma de vida de un objeto o medio de cultivo.

Fago:

Proviene del griego phagein, que significa comer.

Fenotipo:

Es la apariencia física de un individuo la cual resulta de la interacción de su genotipo con un ambiente determinado. Se atribuye el término también a las características medibles u observables de un organismo.

Flujo genético:

Es el intercambio de material genético entre poblaciones.

Gen:

Es la unidad física y funcional de la herencia. Pasa la información genética de generación en generación. Es un fragmento de una molécula de ADN que posee regiones de transcripción (exones), regiones que no transcriben (intrones) y un elemento regulatorio, las regiones de transcripción codifican para la síntesis de polipéptidos, los cuales se especializan en el aparato de Golgi para formar proteínas con función específicas y ayudan a la expresión de un carácter determinado.

Gen clonado:

Gen copiado o multiplicado a partir de uno inicial, que se inserta en una molécula vector mediante técnicas de recombinación *in vitro*.

Genotipo:

Es la constitución genética total de un organismo. Es el conjunto de todos los factores hereditarios que dirigen las formas de irritabilidad de un organismo hacia estímulos externos.

Heterocigoto:

Es una condición genética en la cual un individuo presenta dos alelos diferentes para el mismo locus.

Híbrido:

Individuo heterocigoto que es el resultado de la cruce de dos progenitores que se diferencian en una o más características.

Hifa:

Filamento tubular, órgano de propagación asexual de los hongos.

Infección:

Es una condición patológica de un organismo, provocada por el ingreso, de otro organismo o ente biológico indeseable (patógeno o parásito) en él.

Inmunidad:

Es la resistencia natural o adquirida a una enfermedad o síndrome.

Inmunización artificial = Vacunación:

Acto de administrar vacuna a un individuo.

Inoculación:

Término que se usa cuando de manera artificial se introduce microbios en un ser vivo o medio de cultivo.

Inóculo:

Material o medio en el cual se encuentran los microbios que serán usados en la inoculación.

Intrón - gen silencioso:

Es la secuencia de ADN que se encuentra dentro de un gen eucariótico que no se expresa en el producto proteínico de ese gen. Las secuencias de los genes silenciosos se transcriben a ARN, pero se eliminan en el proceso de especialización de ARN mensajero, antes de ser traducido a polipéptido.

In vitro:

Término latino que significa en vidrio, aplicado a laboratorio se refiere a bajo condiciones controladas.

Isoenzima:

Son formas múltiples de una enzima que se sintetizan y que son controladas por más de un gen.

Ligamiento genético:

Grado de relación entre gen y marcador. El gen y el marcador están en el mismo cromosoma, los dos se heredan juntos y si mayor es su cercanía física, mayor es la precisión del marcador.

Loci:

Plural de locus. Varios lugares específicos de varios genes, conjunto de genes o segmentos de ADN.

Locus:

Del latín locus. Es la posición física que ocupa un gen o fragmentos de ADN, en un cromosoma determinado.

Marcador:

Indicador de una característica, marca o señala de manera directa o indirecta.

Marcadores bioquímicos o enzimáticos:

Distintas manifestaciones moleculares de una enzima (isoenzimas) que catalizan el mismo sustrato y que se utilizan para evaluaciones de heterogeneidad de las isoenzimas entre los organismos. Miden la variabilidad genética basado en el producto de los genes, es decir, evalúan indirectamente el genoma, y los marcadores bioquímicos son poco o muy susceptibles a la interacción del ambiente.

Marcador molecular:

Molécula que marca o indica un carácter.

Marcador molecular de ADN:

Fragmento de ADN que marca la presencia de uno o varios genes. Caracteres que pueden usarse directa o indirectamente, para obtener información sobre la genética de un organismo. Evalúan un segmento específico del genoma sin que sea afectado por el ambiente, lo cual les confiere mayor exactitud y precisión.

Marcador molecular genético:

Fragmento de ADN que es parte del gen y lo marca.

Marcadores polimórficos:

Se presentan como variaciones en la secuencia de ADN y que se transmiten a la progenie de manera mendeliana. Estos marcadores permiten diferenciar alelos en un locus determinado de cromosomas homólogos. Son usados en estudios de modelos de transmisión de los diferentes genes por medio del método indirecto del análisis de ligamiento genético. Cada organismo posee millones de polimorfismos en su genoma.

Mapa físico:

Total de cromosomas expuestos en mayor resolución, muestra la secuencia de nucleótidos de las moléculas de ADN de cada cromosoma.

Mapa genético:

Posee menor resolución ya que muestra la secuencia y locus de los genes a lo largo de cada cromosoma. La localización es relativa y se establece según los patrones de la herencia de los diferentes genes o marcadores en cada cromosoma.

Medio de cultivo:

Es cualquier sustancia, mezcla de sustancias u organismo, que ayudan al crecimiento óptimo de otro organismo o ente biológico. Los medios de cultivo para microbiología son soluciones de macro y micronutrientes suspendidas o no en un sustrato (agar), que ayudan al desarrollo óptimo de un microbio.

Mejoramiento genético:

Es la propagación, multiplicación y la manipulación genética por medio de hibridación o autocruzamiento de un organismo.

Metabolitos secundarios:

Son compuestos químicos que no son sintetizados para uso en el metabolismo primario de un organismo, sino para rutas alternas (no primarias) como la defensa química.

Muestra representativa:

Muestra que contiene al menos el 95% de los alelos (alta variabilidad genética) de una población muestreada. Si se trata de una muestra representativa para diagnóstico de enfermedades, se refiere a una muestra que garantice el muestreo del agente causal de la enfermedad.

Mutación:

Alteración natural o inducida, repentina en un organismo y que es heredable a la progenie.

Mutación genética:

Cambios en el ADN (genes).

Mutación cromosómica:

Cambios parciales o totales en cromosomas.

Parásito:

Organismo que vive a expensas de otro (hospedero), se alimenta de células, tejidos o fluidos celulares del hospedero, causándole daño.

Patogenicidad:

Se refiere a la capacidad que tiene un patógeno para producir una enfermedad.

Patógeno:

Organismo que causa enfermedad y muerte. Un parásito puede llegar a convertirse en patógeno si no es controlado.

Patrón de herencia:

Es el estudio de una secuencia concreta de nucleótidos (gen o marcador) en función de cómo se separan y se combinan en las progenies venideras. Se usa para identificar una enfermedad hereditaria desconociendo la base molecular, el gen o genes responsables, por medio de un seguimiento de la herencia del marcador presente en los individuos afectados y que no se presenta en los individuos sanos.

Plásmido:

Fragmento de ADN circular extra cromosomal autorreplicable, que confiere características especiales a las bacterias y que son herencia independiente.

Pleitropía:

Es la acción que tiene el gen de influir sobre su marcador y sobre su carácter de interés.

Polimorfismo:

Son las apariencias o manifestaciones de diferentes formas de organización del ADN, asociadas con varios alelos de un gen o de su homólogo, dando como resultado una diferencia en longitud de los fragmentos de ADN.

QTL *Quantitative Trait Loci* – Loci de Caracteres Cuantitativos:

Carácter cuantitativo cuya expresión depende de la interacción epistática de varios locus.

RAPD-PCR:

Random Amplified Polymorphic DNA. Es una técnica de amplificación por PCR, de fragmentos de ADN (polimorfismos), usando primers elegidos de manera arbitraria.

Retrovirus:

Virus constituido por ARN y proteína. En estos virus el ARN es el template que se usa para sintetizar una nueva molécula de ADN, utilizando una enzima de transcripción reversa (retrotranscriptasa). Una vez hecha la copia de ADN, éste se inserta en el genoma del hospedero y realiza el mismo proceso del virus de ADN.

Recombinación genética:

Es la combinación de los alelos que provienen de los progenitores para generar un individuo o progenie recombinante. La progenie o individuo puede resultar del entrecruzamiento (quiasma) o de una reorganización independiente de los cromosomas que se puede dar en el proceso de meiosis. En genética hace referencia a diferentes combinaciones de secuencias de ADN que resultan de la interacción física entre dos fragmentos de ADN.

Reproducción asexual:

Multiplicación o formación de un nuevo individuo a partir de una célula o tejido (órgano de propagación) de un progenitor. No implica recombinación genética, la descendencia está compuesta de clones.

RFLP:

Restriction Fragment Length Polymorphism. Es una técnica que usa enzimas de restricción para obtener polimorfismos de diferente tamaño y que sirve para diferenciar el ADN genómico entre organismos.

Secuenciación:

Proceso que identifica el orden en el que se encuentran situados los nucleótidos en una cadena de ADN.

Secuencias de ADN expresadas:

Son fragmentos de ADN que contienen información y que codifican para la síntesis de un polipéptido.

SSR:

Short Sequence Repeat. Secuencias de repetición corta. Es un tipo de microsatélites.

STR:

Short Tandem Repeat. Repeticiones pequeñas en tándem. Tipo de microsatélite.

Talo:

Se refiere al cuerpo completo del hongo y que incluye todas sus partes vegetativas (no sexuales) y todas sus partes reproductivas (sexuales).

Toxina:

Es una sustancia química de alto peso molecular, que es producida por un patógeno y que genera daño, atrofia o muerte a los tejidos o al hospedero.

Vacuna:

Es una suspensión o mezcla de patógenos muertos o atenuados, o parte de ellos; que no son capaces de producir la enfermedad, pero inducen la producción de anticuerpos del hospedero, generando inmunidad.

Virulencia:

Es el grado de patogenicidad que tiene una raza de un patógeno. La virulencia puede aumentar o disminuir de acuerdo a las condiciones ambientales al genotipo infectado (hospedero).

Virus:

Ente biológico que está compuesto de ácido nucleico (ADN y ARN) envuelto en una capa proteica denominada cápside. Necesita de un hospedero para poder replicarse, ya que no tiene la maquinaria biosintética para hacerlo por sí mismo.

Virus de ADN:

Entes constituidos por ADN y proteínas. El virus inserta el ADN dentro del genoma del hospedero y usa los sistemas enzimáticos de replicación (maquinaria biosintética) para copiar su genoma viral y codificar para la síntesis de proteínas que formarán nuevas cápsides.

VIII.- ANEXOS

1. Anexo 1. Materiales y equipo básico.

Agitador: Aparato que mantiene soluciones en constante agitación.

Autoclave: Aparato que combina: temperatura, presión y tiempo para esterilizar líquidos o sólidos.

Balanza de precisión: Equipo sensible que mide hasta milésimas de gramo, utilizado para pesar reactivos o muestras con alta exactitud.

Cámara de flujo laminar: Compartimento en donde se puede trabajar en condiciones estériles para realizar las siembras o transferencias. Las cámaras poseen un filtro denominado HEPA (high efficiency particulate air) que retiene un 99.9% del polvo, esporas de hongos y todas aquellas partículas de tamaño mayor a 0.3 micrómetros.

Centrífuga: Sirve para separar los componentes de mezclas por densidad y peso, usando fuerzas centrífuga y centrípeta.

Fuente de poder para cisternas de electroforesis: Provee de corriente eléctrica a los electrodos de la cisterna.

Incubador: Aparato que mantiene las condiciones necesarias (temperatura, humedad) para que se de un óptimo crecimiento de microorganismos.

Mecheros: Contenedor de vidrio que en su interior contiene alcohol etílico al 95%, este instrumento nos permite esterilizar las herramientas, no es aconsejable flamear las herramientas por mucho tiempo ya que van perdiendo su temple y se oxidan fácilmente. Una vez flameadas las herramientas pasan por agua destilada y desionizada estéril para ser enfriadas o enfriadas al ambiente.

Microcentrífuga: Es un aparato que se usa para centrifugar volúmenes pequeños (microtubos).

Microscopios: Aparato que combina sistema de lentes y luz para la identificación de estructuras pequeñas no visibles.

Potenciómetro: Aparato para medir el pH de las soluciones madres.

Refrigeradores y congeladores: Aparatos que tienen un sistema de enfriamiento y mantienen la temperatura constante (10°C, 4°C, -20°C y -40°C).

Termociclador: Aparato que permite que se realice la PCR combinando temperatura y tiempo.

Transiluminador: Genera rayos ultravioletas que permiten visualizar las bandas de ADN en el gel de agarosa.

2. Anexo 2. Medidas generales de Primeros Auxilios Básicos (PAB).

Estas medidas refieren a la ayuda inmediata, temporal y necesaria hacia una persona que ha sufrido un accidente hasta que sea atendida por un médico o profesional paramédico.

Contacto ocular: Lavar inmediatamente los ojos de la persona con suero fisiológico o agua destilada estéril sin restregarse con las manos, el lavado debe ser en forma de chorro-frecuente durante 15 min.

Contacto dermal: Quitar la ropa en la cual se regó el producto, o si el producto tocó directamente la piel, lavar con abundante agua y NO utilizar jabón ya que el mismo hace que los poros se abran por lo cual haremos que el producto penetre de forma más rápida.

Inhalación: Si la persona tiene algún tipo de problemas respiratorios o mareos por el uso de alcohol, se debe retirar a la persona a un lugar ventilado y fresco.

Quemadura: Existen dos tipos de quemaduras: las físicas (por contacto directo al fuego o superficies calientes) y las químicas (por sustancias químico-sintéticas o de origen orgánico). Al momento de presentarse una quemadura de cualquier grado (primero, segundo o tercer), hay que llevar a la víctima a un lugar fresco. Después se debe lavar el área afectada con abundante agua limpia para refrescarla, si se tiene en el botiquín gazas especiales para quemaduras se puede utilizar una de ellas siempre humedeciéndola con agua o suero fisiológico, una vez colocada esta gaza NO se la debe retirar por ningún motivo, después de esto se puede trasladar a la persona a que reciba atención médica inmediata, NUNCA colocar ningún tipo de ungüento en el área afectada sin orden médica.

Cortaduras: Si ocurre algún tipo de corte, se debe evaluar el área afectada para evitar que astillas hayan quedado en la piel, después se debe lavar el área afectada con agua, a continuación se debe controlar la hemorragia realizando una leve presión en el área afectada y colocando algún tipo de paño o gasa, la cual no se la debe retirar si ya se logra controlar la hemorragia, NO se debe utilizar alcohol ya que la sangre no se coagulará en presencia del mismo.

LITERATURA CONSULTADA

- Alvarado, P. 2009. Optimización del protocolo para el marcador molecular SR21 del gen bgm-1 de resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol común. Proyecto Especial de Ingeniero Agrónomo. Zamorano, Honduras.
- Aranda, L. 2000. Uso de marcadores moleculares SCAR para el mejoramiento de la resistencia al virus del mosaico amarillo en frijol común. Tesis Ing. Agr. Valle del Yeguaré, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 24 p.
- Aznar, R.; Alarcón B. 2001. On the specificity of PCR detection of *Listeria monocytogenes* in food: a comparison of published primers (en línea). Systematic and Applied Microbiology. Consultado 26 set. 2008. Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B7GVX-4DS35XW-62&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=ca0a442900c7c61251030f3f27264f15
- Banks, S; Horsup, A; Wilton, A; Taylor, A. 2003. Genetic marker investigation of the source and impact of predation on a highly endangered species. *Molecular Ecology* 12: 1663-1667.
- Basha, S. Sujatha, M. 2007. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. *Euphytica* 156: 375-386.
- Blair, MW; Muñoz, C; Garza, R; Cardona, C. 2006. Molecular mapping of genes for resistance to the bean pod weevil (*Apion godmani* Wagner) in common bean. *Theor Appl Genet* 112:913-923.
- Blair, M.; Rodríguez, L. 2007. Genetic mapping of the bean golden yellow mosaic geminivirus resistance gene bgm-1 and linkage with potyvirus resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 114:261-271.
- Beebe, S; Pedraza, F. 1998. Perspectivas para el uso de marcadores moleculares en el mejoramiento del frijol. In: R. Lépiz (Comp.). Taller Internacional de Mejoramiento Genético de Frijol Negro Mesoamericano. PROFRIJOL, Veracruz, México. p. 132-139.
- Bellis, C; ASHTON, L; Freny, B. Griffiths, L. 2003. A molecular genetic approach for forensic animal species identification. *Forensic Science International.* 134: 99-108.
- Border, PM.; Howard, JJ.; Plastow, GS.; Siggins, KW. 1990. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction (en línea). Letters in Applied Microbiology. Consultado 26 set. 2008. Disponible en: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/119377617/abstract>
- Burge, S; Parkinson, G; Hazel, P; Todd, A; Neidle, S. 2006. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res.* 34(19): 5402-5415.
- Calladine, C; Horace, R; Luisi, F; Travers, A. 2003. Understanding DNA, Elsevier Academic Press.
- CIAT. 1999. Genética molecular para el mejoramiento y caracterización de la biodiversidad. 37 p.
- Dahm, R. 2005. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev Biol.* 278 (2): 274-88.
- Franklin, R. 1953. Molecular Configuration in Sodium Thyminonucleate. Franklin R. and Gosling R.G. *Nature.* 171:740-741.
- Greider, C; Blackburn, E. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell.* 43 (2):405-13.
- Guachambala Cando M. 2007. Identificación de biotipos A, B y Q de *Bemisia tabaci* y la especie *Trialetrodes vaporariorum*, en zonas de producción hortícola de Honduras. Proyecto especial de graduación para el programa de Ingeniería en Ciencia y Producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras. 17 p.
- Guimaraes, E; Ruane, J; Scherf, B; Sonnino, A; Dargie, J. 2007. Marker-assisted selection, current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. Food and Agricultural Organization of the United Nations, FAO. Roma, Italia. 471 p.
- Handelsman, J; Houser, B; Kriegel, H. 1998. Biology brought to life: a guide to teaching students to think like scientists. Univ. of Wisconsin - Madison. 259 p.
- Handresen, H. 2008. Fisiopatología Veterinaria (en línea). Consultado 10 set. 2009. Disponible en: <http://handresen.perulactea.com/2008/08/05/capitulo-3-mastitis-addendum/>
- Hershey, A; Chase, M. 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol.* 36(1):39-56.
- Hib, J; De Robertis, E. 1998. Fundamentos De Biología Celular Y Molecular. El Ateneo, 3ª ed. 416 p. ISBN: 950-02-0372-3.
- Hogg, S. 2005. Microbiología Esencial. John Wiley & Sons Ltd. Inglaterra. 468p.
- Holt, J; Krieg, N; Sneath, P; Staley, J; Williams, S. 2000. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 ed. Baltimore, Maryland, US. Lippincott Williams & Wilkins. 787 p.
- Invitrogen, 2008. Certificate Analysis. s.n.t. 3 p.
- Job, D. 2002. Plant biotechnology in agriculture. *Biochimie.* 84(11):1105-10.
- Karp, G. 2006. Biología celular y molecular: conceptos y experimentos. Trad. por M.E. Martínez, I. Vásquez. 4 ed. México, DF, McGraw Hill Interamericana. 897 p.

- Kelly, JD. 1995. Use of random amplified polymorphic DNA marker in breeding for major gene resistance to plant pathogens. *Hort Science* 39(3):461-465.
- Kelly, JD; Miklas, PN. 1998. The role of RAPD marker in breeding for disease resistance in common bean. *Molecular Breeding* 4:1-11.
- Kelly, JD; Miklas, PN. 1999. Marker-Assisted Selection. p. 93-123. En: Singh, S.P. *Common Bean Improvement in the Twenty-First Century*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London. 450 p.
- LadyoHats. 2008. DNA replication or DNA synthesis is the process of copying a double-stranded DNA molecule. This process is paramount all life as we know it (en línea). Consultado 20 set. 2008. Disponible en: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_replication_es.svg?uselang=es
- Latorre, P. 2008. Optimización de dos protocolos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *Listeria monocytogenes*. Proyecto de graduación del programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano. 27p.
- Levene, P. 1919. The structure of yeast nucleic acid. *J Biol Chem*, 40 (2): 415–24.
- Maddox, B. 2003. The double helix and the 'wronged heroine'. *Nature*. 421: 407–408.
- Morales, F. 1999. Situación actual de las enfermedades virales del frijol común en América Central, México y El Caribe. Hojas de PROFRIJOL (Guatemala), No. 6:2-3.
- Mendez, S; Perez, E. 2004. PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22 (3): 183 – 192.
- Mullis, K. 1982. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262(4): 21-28p.
- Mullis, K; Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.
- Mullis, K; Faloona, F; Scharf, S; Saiki, R; Horn, G; Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51 (1): 263-273.
- Pedraza, F; Gallego, G; Beebey, S; Tohme, J. 1997. Marcadores SCAR y RAPD para la resistencia a la bacteriosis común (CBB). Eds. Singh, SP; Voysest, O. Taller de mejoramiento de frijol para el Siglo XXI: Bases para una estrategia para América Latina. CIAT, Cali, Colombia. 559 p.
- Pierce, B. 2002. *Genetics. A Conceptual Approach*. W. H. Freeman. 736p.
- Pino, M. 2008. Detección e Identificación de *Escherichia coli* Verotoxigenica serotipo O157 y NO O157 utilizando una reacción de inmunoensayo tipo sándwich y PCR
- Múltiple en muestras de heces y canales bovina. Chillán – Chile. 22p.
- Prescott L., Harley, J; Klein, D. 2002. *Microbiología*. Traducido por C. de la Rasilla e í. Uzcudum. Quinta edición. Madrid, Buenos Aires. Editora Mc Graw Hill. 1240 p.
- Promega. 2005. Usage information. Madison, US. Promega Corporation. 2 p.
- Purves, W; Sandava, D; Orians, G; Heller, H. 2003. *Life. The Science of Biology*. W. H. Freeman & Co Ltd. Ed: 7. 1121 p.
- Rosas, J.C. 1999. *Conceptos básicos de genética y biología molecular de plantas*. EAP/Zamorano. 29 p.
- Rodríguez, I; Barrera, H. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. 6 p.
- Rothenburg, S; Koch-Nolte, F; Haag, F. 2001. DNA methylation and Z-DNA formation as mediators of quantitative differences in the expression of alleles. *Immunol. Rev.* 184:286–98.
- Sambrook, J, Fritsch, D, Maniatis, T. 2002. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Tomo Uno. 2 Ed. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Splettstoesser, T. 2007. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. The DNA strand (blue) circles the bases that stack together in the center around three co-ordinated metal ions (green). Produced from NDB ID: UD0017. Consultado 10 jul. 2010. Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Parallel_telomere_quadruple.png
- Stansfield, W. 1992. *Genética*. Trad. por P Ramos. 3ed. México, DF, Editora Latinoamericana. 574 p.
- Singh, S; Gepts, P; Debouk, D. 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany* 45:379-396.
- Skröck, P; Tivang, J; Nienhuis, J. 1992. Analysis of genetics relationships using RAPD marker data. Joint Plant Breeding Symposium Series. Minneapolis, Minnesota, USA. 26-30.
- Skröck, P; Nienhuis, J; Beebe, S; Tohme, J; Pedraza, F. 1998. Comparison of Mexican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) core and reserve germplasm collection. *Crop Science* 38(2):488-496.
- Skröck, PW; Nienhuis, J; Beebe, S; Tohne, J; Pedraza, F. 1998. Comparison of Mexican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) core and reserve germplasm collections. *Crop Sci.* 38(2):488-496.
- Southern, E. M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503.

Tarrago-Litvak, L; Andréola, M; Nevinsky, G; Sarih-Cottin, L; Litvak, S. 1994. The reverse transcriptase of HIV-1: from enzymology to therapeutic intervention. *FASEB J.* 8 (8):497–503.

Urrea, CA; Miklas, PN; Beavery, JS; Riley, RH. 1996. A codominant randomly amplified DNA (RAPD) marker useful for in direct selection of bean golden mosaic virus resistance in common bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121:1035-1039.

Valadez, E.; Kahl, G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas: teoría y protocolos de laboratorio. México, DF, Mundi-Prensa. 147 p.

Viklund, A. 2007. El ADN mitocondrial. (en línea). Consultado 21 oct. 2008. Disponible en: http://www.evolutionibus.info/adn_mit.html

Villaencantada. 2009. Inseguridad o seguridad ciudadana (en línea). Consultado 15 de oct. 2009. Disponible en: http://villaencantada.blogspot.com/2009_05_01_archive.html

Voyses, O. 1983. Variedades de frijol en América Latina y su origen. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 87 p.

Voyses, O. 2000. Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.); Legado de variedades de América Latina 1930-1999. CIAT, Cali, Colombia. 195 p.

Watson, J; Crick, F. 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids: A structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171 (4356): 737-738.

Watson, J; Crick, F. 1953. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. Cambridgeshire, Londres, Inglaterra. 171 (4361):964-967.

Watson, J; Baker, T; Bell, S; Gann, A; Levine, M; Losick, R. 2004. *Molecular Biology of the Gene*, Quinta edición, San Francisco: Benjamin Cummings.

Wheeler, R. 2007. From left to right, the structures of A, B and Z DNA. Consultado 12 jul. 2010. Disponible en: http://en.wikipedia.org/wiki/File:A-DNA,_B-DNA_and_Z-DNA.png

Wilkins, A; Stokes, A; Wilson, H. 1953. Molecular Structure of Deoxyntose Nucleic Acids. *Nature* 171: 738–740.



BIBLIOTECA WILSON POPENOE



212880