

Principios teórico-prácticos de análisis de biología molecular:

desde el aislamiento del ADN
al análisis de secuencias



Principios
teórico-prácticos
de análisis de biología molecular:

desde el aislamiento del ADN
al análisis de secuencias



Tecnológico
de Antioquia
Institución Universitaria
VIGILADA MINEDUCACIÓN



Principios teórico-prácticos de análisis de biología molecular: desde el aislamiento del ADN al análisis de secuencias.

Primera edición. Medellín: Sello Editorial Tecnológico de Antioquia Institución Universitaria, 2021
150 páginas

ISBN: versión impresa: 978-958-8628-67-7

ISBN: versión digital: 978-958-8628-68-4

Biología molecular. Citología. Fisiología. Genética molecular. Ácidos nucleicos. Reacción en cadena de polimerasa. PCR (Bioquímica). Electroforesis. ADN.

CDD: 572.8

Principios teórico-prácticos de análisis de biología molecular: desde el aislamiento del ADN al análisis de secuencias.

Tecnológico de Antioquia Institución Universitaria
Calle 78B 72A - 220, Medellín, Colombia, Suramérica
PBX: (+604) 444 3700 ext.: 2139

Corrección de estilo, diseño, diagramación e impresión:
Divegráficas S. A. S.

Este libro incorpora contenidos derivados de procesos académicos y estos no representan, necesariamente, los criterios institucionales del Tecnológico de Antioquia. Los contenidos son responsabilidad exclusiva de sus autores. Obra protegida por el derecho de autor. Queda estrictamente prohibida su reproducción, comunicación, divulgación, copia, distribución, comercialización, transformación, puesta a disposición o transferencia en cualquier forma y por cualquier medio, sin la autorización previa, expresa y por escrito de su titular. El incumplimiento de la mencionada restricción podrá dar lugar a las acciones civiles y penales correspondientes.

© 2021 Todos los derechos de autor reservados.

Contenido

Presentación	5
Capítulo 1	7
Extracción de ácidos nucleicos <i>Giovan F. Gómez</i>	
Capítulo 2	23
Cuantificación de ácidos nucleicos: concentración y pureza de las muestras y protocolo de cuantificación mediante fluorometría con Qubit® 3.0 Fluorometer <i>Andrés Felipe Maya Duque</i> <i>Luz Miryam Gómez Piñerez</i> <i>Isabel Cristina Cadavid Sánchez</i>	
Capítulo 3	49
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y visualización de sus productos en gel <i>Fernanda Lazarroto</i> <i>Isabel Cristina Cadavid Sánchez</i>	
Capítulo 4	65
PCR cuantitativa: qPCR, RT-qPCR y protocolo de uso de Rotor Gene Q [Qiagen] <i>Isabel Cristina Cadavid Sánchez</i>	
Capítulo 5	115
Secuenciación con didesoxinucleótidos (tipo Sanger) <i>Isabel Cristina Cadavid Sánchez</i>	
Capítulo 6	124
Edición de secuencias de ADN, un paso a paso para su análisis <i>Andrés López Rubio</i> <i>Luz Miryam Gómez Piñerez</i>	

Presentación

La biología molecular es un área en constante desarrollo y con la aplicación de sus técnicas se han podido explicar procesos biológicos fundamentales en diferentes organismos. La detección y cuantificación específica de material genético y de su expresión génica han mostrado una significativa utilidad en áreas de la salud, de ciencias forenses, ciencias agrícolas, etc. La biología molecular permite abordar el conocimiento de la biodiversidad, la evolución, la taxonomía y la conservación de especies, también, estudiar especímenes de museo, por tanto, facilita la comparación y recuperación de información de diferentes escalas temporales, lo cual tiene aplicación en biología y arqueología.

En este libro se ofrece un esbozo de herramientas básicas de la biología molecular, así como principios teóricos y protocolos de funcionamiento. Estas herramientas hacen parte de la rutina constante de las investigaciones biológicas, es así como se aborda la extracción de ácidos nucleicos y su cuantificación, la amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa, la PCR en tiempo real y el análisis de secuencias de ADN.

Este texto nace como una iniciativa de proveer una segunda entrega relacionada con la experiencia de trabajo del grupo de Investigación Bioforense del Tecnológico de Antioquia I. U., con el fin de suministrar información básica en español para el entendimiento de los principios y/o protocolos de uso de equipos y herramientas empleados para el análisis de biología molecular, que se han estandarizado para el trabajo de investigación del grupo.

Este trabajo está dirigido a aprendices de áreas biológicas y de la salud e investigadores que se inicien en este campo y requieran utilizar técnicas de biología molecular y bioinformática para estudios de identificación molecular, variabilidad genética, ensayos clínicos o expresión génica.



Capítulo

1

Extracción de ácidos nucleicos

.....
Giovan F. Gómez

Microbiólogo y Bioanalista
Doctor en Ciencias Básicas Biomédicas
Profesor Asociado
Universidad Nacional de Colombia
Sede de La Paz

Introducción

Los ácidos nucleicos son grandes polímeros formados por nucleótidos, como el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). La extracción de estas moléculas de las células, es un paso esencial para su utilización efectiva en las diversas técnicas moleculares. El objetivo principal es aislar el ADN o ARN del resto de los componentes celulares, como carbohidratos, lípidos y proteínas, que son más abundantes que los ácidos nucleicos en las células. La selección de la molécula para trabajar, ADN o ARN, depende del objeto de estudio; por ejemplo, para estudios de búsqueda de genes, expresión de genes o transcriptómica se elige el ARN, mientras que el ADN se selecciona con propósitos de identificación genética y búsqueda de mutaciones, entre otros.

La optimización del protocolo de extracción, de acuerdo con la naturaleza de la muestra biológica de partida y la molécula de interés (ADN o ARN), es relevante para garantizar los mejores resultados. El avance hacia



la secuenciación de nueva generación [NGS] ha permitido acceder a gran cantidad de datos genómicos [ADN] y transcriptómicos [ARN] de una muestra biológica, con objetivos de diagnóstico o investigación científica. En este sentido, la capacidad de aislar ADN y ARN de alta calidad es cada vez más importante.

El ADN es una doble hélice físicamente frágil dado su alto peso molecular. En solución, el ADN de doble cadena forma una estructura rígida enrollada aleatoriamente, en donde las dos hebras permanecen unidas principalmente mediante puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas que generan la estructura helicoidal, y los nucleótidos de cada hebra se encuentran unidos por enlaces fosfodiéster cargados negativamente [Watson y Crick, 1953]. Por su parte, el ARN generalmente se encuentra en forma de cadena sencilla, aunque suele formar estructuras secundarias de doble hélice por autoapareamiento de regiones complementarias [Elliott y Ladomery, 2017]. En comparación con el ADN, el ARN es una molécula frágil y susceptible a degradación por enzimas como las ARNasas.

Se han descrito diversos métodos de extracción cuya selección dependerá de variables como: 1) el ácido nucleico de interés: ADN de doble cadena [ADNds], ADN de cadena sencilla [ADNss], ARN total, ARN mensajero [ARNm], ARN ribosomal [ARNr], ARN de transferencia o ARN no codificante [ARNnc]; 2) el tipo de organismo [insectos, plantas, bacterias, virus, humanos, etc.]; 3) la fuente de ácido nucleico [hueso, patas, abdomen, un fluido biológico, etc.]; 4) las condiciones especiales, de acuerdo con las técnicas moleculares que utilizarán el ácido nucleico y 5) el estado de preservación de la muestra.

Extracción de ADN

Se han desarrollado diversos protocolos, comerciales y no comerciales, con la finalidad principal de obtener ADN de calidad y en una cantidad aceptable para trabajos subsecuentes, libre de inhibidores potenciales que puedan afectar otras técnicas moleculares. Estos métodos se basan en estrategias que aprovechan el conocimiento molecular del ADN. Por ejemplo,



dada la carga negativa de la molécula del ADN conferida por los grupos fosfato en cada nucleótido que se repelen en la doble hélice, la molécula del ADN puede disolverse en soluciones acuosas donde las moléculas de agua forman una capa hidratante alrededor del ADN. En contraste, en presencia de etanol se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos fosfato, lo cual favorece la unión de cationes, como el Na^+ , que reducen las fuerzas repulsivas entre los nucleótidos y permiten que el ADN se precipite. A su vez, la carga negativa del ADN permite que se pueda unir a moléculas y matrices inorgánicas cargadas positivamente.

Los métodos no comerciales, introducidos en la década de 1950, utilizan solventes orgánicos para separar las proteínas del ADN y, una vez suspendido en fase acuosa, aislarlo por precipitación con etanol. Aunque son más económicos que los métodos comerciales, generalmente requieren mayor tiempo y no logran obtener un ADN tan puro. En laboratorios de recursos limitados, los métodos no comerciales se convierten así en una alternativa interesante para poder aislar la molécula.

Los métodos comerciales, por su parte, se introdujeron en la década de 1990, y se caracterizan por obtener un ADN de alta concentración y calidad. Estos métodos emplean matrices inorgánicas compactas cargadas positivamente con capacidad de retener el ADN y separarlo del resto de los componentes celulares, y posibles inhibidores. Algunos de estos métodos emplean membranas de sílice y otros, perlas magnéticas. Estos soportes absorben el ADN mientras se llevan a cabo otros pasos que permiten la eliminación de proteínas, lípidos, entre otras biomoléculas. Generalmente, entre los componentes de los kits comerciales se encuentran soluciones de lisis, de lavado y de elución del ADN.

De acuerdo con el modelo de estudio, es recomendable conocer los métodos de extracción para seleccionar el que mejor se adapte a las necesidades y los recursos disponibles. Por ejemplo, en el caso de la extracción de ADN de insectos, se han reportado más de diez opciones (Asghar et al., 2015). En general, los métodos de extracción de ADN comerciales y no comerciales se componen de fases similares, que se describen a continuación:



Homogenización

Durante esta fase, se busca romper las uniones celulares para facilitar la interacción con las soluciones que se utilicen en el proceso de extracción. Esta fase puede darse mediante el uso de métodos físicos (mecánicos), químicos o enzimáticos.

En el caso de la homogenización mecánica, las muestras frescas, no congeladas, pequeñas y de tejidos blandos se pueden someter a la maceración con ayuda de homogenizadores electrónicos, con pistilos de plástico, y un poco de solución amortiguadora de lisis que disgrega la muestra mediante fricción con la pared del tubo que la contiene. A causa de la fricción se libera calor que puede fragmentar el ADN, por lo que se recomienda el uso de camas de hielo durante el proceso.

Los homogenizadores de tejidos utilizan altas velocidades para agitar los tubos que contienen las muestras y pueden o no emplear perlas de vidrio para potencializar el proceso. Algunos homogenizadores permiten procesar al tiempo uno o más platos de 96 muestras cada uno, lo que disminuye significativamente el tiempo de procesamiento. En el caso de tejidos congelados, se recomienda que el tejido se macere en presencia de nitrógeno líquido para evitar la formación de cristales en el interior celular y la acción de ADNasas, que degradarían el ADN en cuanto la muestra se descongele y entre en contacto con la solución de lisis. La muestra es entonces macerada contra un mortero de porcelana o se somete a homogenizadores de tejidos hasta obtener un material pulverizado. El nitrógeno líquido también puede ser utilizado en muestras frescas para facilitar la fase de homogenización, por ejemplo, en tejidos con pared celular como los vegetales, o con quitina como los artrópodos, que pueden ser más difíciles de macerar.

Por su parte, la homogenización química consiste en utilizar reactivos químicos como detergentes [p. ej. SDS], proteasas y agentes caotrópicos [p. ej. sales de guanidina] que rompen las uniones celulares e incluso alcanzan a romper la membrana celular. Este método puede ser útil cuando se trabaja



con muestras pequeñas de tejidos frescos, fluidos como la sangre o bacterias. La cantidad de muestra de partida es crítica en la homogenización química, dado que el sistema puede sobresaturarse y, como resultado, generar un rendimiento bajo durante la extracción. Por lo anterior, es ideal estandarizar la cantidad de muestra de partida que garantice mayor eficiencia en concentración y calidad del ADN.

En la homogenización enzimática se utilizan tratamientos que pueden incluir lisozima, zimolasa, liticasa, proteinasa K, colagenasa, lipasa, entre otras. Generalmente, estos métodos se combinan con la homogenización mecánica o química para potenciar el proceso. Los tratamientos enzimáticos pueden ser adecuados para un procesamiento de alto rendimiento, pero pueden tener un costo por muestra más alto en comparación con otros métodos de homogenización.

Lisis celular

En este paso se utilizan detergentes, soluciones básicas, agentes caotrópicos, al igual que incubaciones a temperaturas ambientes o altas (56-95 centígrados) en baño María o seco, que rompen la pared, la membrana celular y nuclear para liberar el material genético. Uno de los componentes de las soluciones de lisis, sean comerciales o no, es el ácido etilendiaminotetraacético, también denominado EDTA, un agente quelante que se une a iones de Mg^{2+} e inhibe la actividad de ADNasas y otras enzimas.

Separación del ADN de proteínas y lípidos

En el caso de los métodos no comerciales, después de un tiempo de incubación en la solución de lisis, los componentes celulares como proteínas y lípidos se separan del ADN mediante centrifugación y solventes orgánicos. Mientras que los lípidos y proteínas se separan en solventes orgánicos (alcohol isoamílico, cloroformo, fenol y otros), el ADN, gracias a sus grupos fosfato, se separa en medios acuosos.



En los métodos comerciales, la solución de lisis se mezcla con una solución de unión que estabiliza el pH requerido y las condiciones químicas necesarias para el funcionamiento óptimo de la matriz, según la tipología; además, se adiciona etanol a la solución de unión para eliminar la capa hidratante del ADN y exponer los grupos fosfato que facilitan la adsorción del ADN a la membrana cargada positivamente; esta membrana, que constituye la base para la unión del ADN, puede ser de sílice, celulosa o de intercambio iónico, según el kit comercial.

Cada tipo de membrana y kit comercial tienen características químicas que pueden influenciar la eficiencia y pureza durante el aislamiento del ADN, por lo que se recomienda leer cuidadosamente el inserto de cada kit comercial para incrementar la eficiencia de este paso bajo las condiciones señaladas por los fabricantes. Por su parte, proteínas y lípidos se eliminan por ciclos sucesivos de lavado y centrifugación, mientras el ADN sigue unido a la matriz. Algunos métodos comerciales utilizan, en vez de membranas de sílice, perlas magnéticas cargadas positivamente (mediante su inmersión en una solución amortiguadora ácida) que atraen el ADN y lo retienen en la pared del microtubo, lo que permite separarlo de proteínas y lípidos (con baja afinidad por las perlas) que se eliminan en los lavados sucesivos.

Obtención del ADN

En los métodos no comerciales, el ADN es recuperado después de la eliminación de proteínas y lípidos. La adición de etanol y de soluciones con altas concentraciones de iones de sodio y amonio, que se unen a los grupos fosfato, reduce las fuerzas repulsivas entre las cadenas de ADN y permite que se pliegue sobre sí mismo haciéndolo insoluble. Así, mediante centrifugación, el ADN se precipita y puede ser lavado con isopropanol o etanol al 70 %, que luego se elimina por evaporación para prevenir la inhibición enzimática en técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa, también conocida como PCR. Finalmente, el ADN es resuspendido mediante hidratación con una solución amortiguadora como el Tris-HCl a 10 mM y EDTA a 0,1 M (TE) a un pH de 8,0, en el cual puede ser almacenado. Es importante



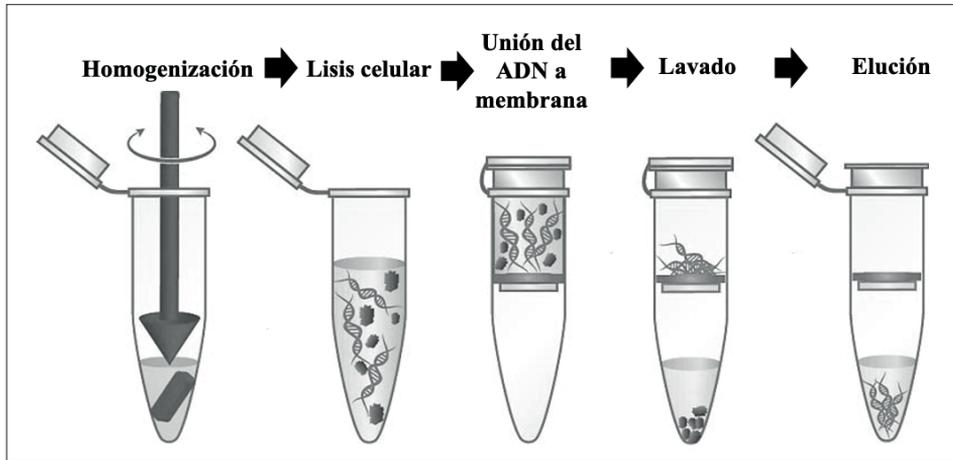
considerar la selección de la solución amortiguadora de elución, de acuerdo con el trabajo que se desee realizar posteriormente en cuanto a técnicas moleculares: la solución amortiguadora TE, al contener EDTA, puede inhibir la actividad de potenciales nucleasas contaminantes que degraden el ADN y, a su vez, no tiene un gran impacto en el resultado de otras técnicas moleculares, por lo cual es altamente recomendable. El almacenamiento en agua libre de nucleasas puede conducir con el tiempo a degradación del ADN, ya que por la naturaleza ácida de la molécula se produce autohidrólisis. Se debe evitar el pipeteo o una agitación agresiva para no fragmentar el ADN de alto peso molecular. Se recomienda entonces incubar a 55 centígrados con agitación suave para lograr la resuspensión.

En los métodos comerciales basados en membrana, una vez el ADN se ha unido a esta, se deshidrata con soluciones de lavado y ciclos de centrifugación. Las soluciones amortiguadoras de lavado generalmente contienen alcoholes que remueven proteínas, sales y otros contaminantes de la muestra y, además, promueven la interacción del ADN con la membrana. Luego, se agrega una solución de elución que disminuye la fuerza iónica, cambia el pH de la membrana y libera el ADN de la membrana. Finalmente, el ADN es incubado por un tiempo corto para su hidratación, y se realiza una centrifugación para resuspensión [Figura 1].

En los métodos comerciales basados en perlas magnéticas, se utiliza una solución de Tris-HCl 10 mM a pH 8,5 para neutralizar la carga de las perlas; así, el ADN se separa de las perlas y se transfiere a un tubo.

Figura 1

Fases de la extracción de ADN con un método comercial basado en membrana



Fuente: EPRUI Biotech Co. Ltd. [2018].

Extracción de ARN

Existen diferentes subpoblaciones de ARN identificadas en la actualidad, entre las que encontramos el ARN ribosomal, el ARN mensajero [ARNm], el ARN de transferencia [ARNt], los no codificantes como los microARN, los snRNA y snoRNA, etc. Por su alta susceptibilidad a la degradación por ribonucleasas, ARNasas, es uno de los aspectos más importantes por controlar durante y después del proceso de extracción de este ácido nucleico. Las ARNasas tienen características como su gran actividad catalítica, resistencia al calor, actividad dentro de un amplio rango de pH, entre otras. Otro de los retos durante la extracción de ARN es su cantidad en la célula. El contenido de ARN total en una célula es muy bajo, con aproximadamente 10-30 pg, de los cuales menos del 5 % corresponde a ARNm [Sambrook et al., 2001]. Por lo tanto, una pequeña contaminación con ARNasas puede representar un problema grave en el proceso.

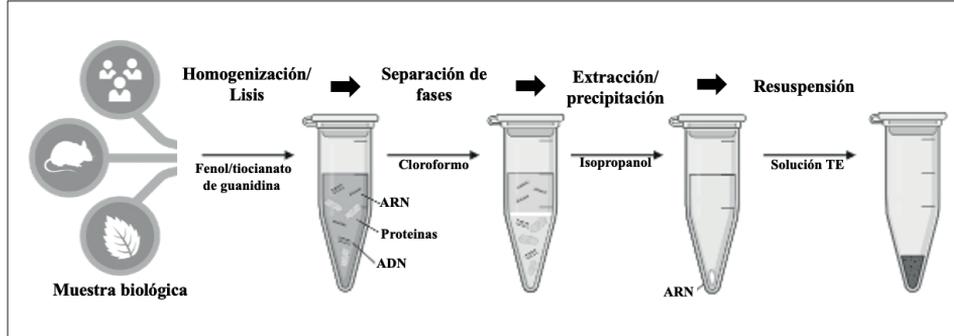


El tipo de muestra, el proceso de recolección, la cantidad de células, el volumen de muestra que se extrae y la conservación óptima (que requiere mantener la cadena de frío) influyen en las características del ARN extraído. Se han desarrollado diversas metodologías para extraer ARN que recuperan el ARN total (Farrell, 2017). Con métodos no comerciales el rendimiento se puede ver afectado por la alta manipulación durante los diferentes pasos, e incluyen el uso de solventes orgánicos como tiocianato de guanidinio, fenol y cloroformo. La extracción con solventes orgánicos incluye la degradación de las proteínas del homogenizado celular y la eliminación de componentes no hidrosolubles mediante una separación de fases con distinta solubilidad; una fase orgánica y una acuosa, en esta última se espera encontrar el ARN. Otra alternativa es la separación del ARN mediante ultracentrifugación en un gradiente de cloruro de cesio (CICs), que provoca la precipitación del ARN debido a su densidad, luego, el ARN se retira cuidadosamente con pipeta Pasteur y se purifica mediante pasos de precipitación con etanol y centrifugación.

En la actualidad existen métodos no comerciales (Figura 2) que requieren una marcada manipulación de las muestras (Hung y Stumph, 2011). Los métodos comerciales agilizan el procedimiento con reactivos y métodos físicos novedosos que, aunados, reducen los riesgos de obtener un ARN de mala calidad e incrementan la reproducibilidad y calidad de los resultados (De Wever et al., 2020). También se cuenta con la extracción robotizada de ARN, basada en equipos que automatizan el proceso (Al-Saud et al., 2020), como el QIAcube de la empresa QIAGEN. Es de resaltar que en la literatura se encuentran métodos no comerciales de extracción de ARN para algunas muestras biológicas que han rendido resultados similares a los métodos comerciales (Goyal et al., 2020; Hazman et al., 2020; Steinmetz et al., 2020; Sullivan et al., 2020).

Figura 2

Fases de la extracción de ARN con un método no comercial



Fuente: Adaptado de Schwiesow [2020]

Las metodologías de extracción de ARN siguen fases similares a los métodos de extracción de ADN; sin embargo, dadas las características químicas de esta molécula se recomienda:

- Mantener la cadena de frío a la hora de transportar la muestra, de preferencia usar nitrógeno líquido.
- Utilizar recipientes de plásticos, estériles y libres de ARNasas.
- Utilizar soluciones libres de ARNasas. Se recomienda el tratamiento de las soluciones con dietil pirocarbonato (DEPC), un agente alquilante que inactiva las ARNasas. Otra alternativa es usar agentes caotrópicos potentes, como las sales de guanidinio [tiocianato de guanidinio 4M], que desnaturalizan las proteínas durante el proceso de extracción.
- Seleccionar adecuadamente un método de homogenización de acuerdo con la muestra biológica, por lo que se recomienda revisar la literatura específica de su modelo de estudio para la toma de decisiones.
- Asegurar en todo el proceso la inhibición de las ARNasas con enzimas que demuestren compatibilidad con las soluciones amortiguadoras en todas las fases de extracción.

- Seleccionar un método adecuado para la remoción de proteínas.
- Seleccionar un método para concentrar el ARN. Entre estos métodos se puede utilizar la precipitación con combinaciones de sal y alcohol. A diferencia del ADN, la precipitación del ARN es más lenta, por lo que requiere periodos de incubación largos a -20°C .
- Tratar la muestra con enzimas de degradación de ADN (ADNasa) para eliminar excesos de esta molécula.
- Seleccionar un método apropiado para almacenar las muestras de ARN, preferiblemente a bajas temperaturas (-20°C o -80°C). Un almacenamiento inadecuado resultará en una degradación rápida del ARN.

Una vez aislado, se espera obtener ARN no degradado y en cantidad suficiente para ser analizado mediante otras técnicas moleculares de acuerdo con los objetivos de estudio o diagnóstico. Típicamente, el ARN es transformado a ADN mediante una PCR con transcripción inversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés), una variante de la PCR convencional donde se lleva a cabo una transcripción inversa con una retrotranscriptasa que, a partir de ácido ribonucleico (ARN), sintetiza ADN complementario (ADNc), con el cual se realiza(n) posteriormente la(s) PCR(s) correspondiente(s). De esta forma, se pueden amplificar las moléculas de ARN de interés que se encontraban en la muestra biológica.

Verificación de los ácidos nucleicos extraídos

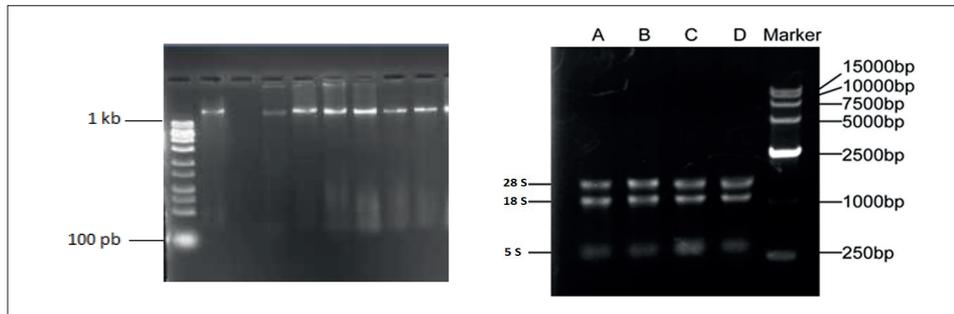
Independientemente del método de extracción empleado, es importante conocer la cantidad, calidad e integridad de los ácidos nucleicos antes de proceder a utilizarlo en otras técnicas moleculares. Para verificar la cantidad y calidad del ADN o ARN, existen métodos indirectos como la espectrofotometría y fluorometría (ver capítulo 2), lo cuales cuantifican la absorbancia de la muestra a 260 nm y 280 nm y como referencia, la relación 260/280 aceptada para ADN será de 1.8 y para ARN de 2. Por otro lado, la integridad del ADN se puede verificar mediante la visualización de la(s) muestra(s) en una electroforesis en gel de agarosa (Figura 3). Un ADN íntegro se observará como una banda cerca



al pozo en el que se sembró la muestra. Típicamente, las muestras degradadas de ADN exhiben una banda larga con un sendero luminoso en el carril. Por su parte, la presencia y calidad del ARN total puede chequearse también por medio de una electroforesis en gel, en donde el ARN ribosomal, por ser más abundante será visualizado. La integridad del ARN puede evaluarse también en equipos como el Bioanalyzer 2100 de Agilent Technologies, el cual, con base en los patrones de movilidad electroforética de las muestras, estima el valor del número de integridad del RNA [RIN], valor que va desde 1 a 10, donde 1 es el valor para una muestra de RNA totalmente degradada y 10 el valor obtenido para una muestra intacta. Por otro lado, el sistema permite analizar el grado de contaminación de ADN genómico de las muestras de RNA.

Figura 3

Geles de electroforesis de productos de extracción de ADN y ARN



Nota. Geles de ADN [a la izquierda] y ARN [a la derecha] a partir de células eucariotas. En el primer o último carril se encuentra el marcado de peso molecular. Se indica los ARN ribosomales 28 S, 18 S y 5 S. Fuente: Ma et al., [2015]

Almacenamiento de ADN y ARN

La selección del método de almacenamiento dependerá tanto de los recursos físicos, como del objeto del estudio. Entre los métodos encontramos la refrigeración, la congelación o la utilización de papeles de filtro (Prendini et al., 2002). La refrigeración (4 °C) se recomienda para análisis inmediatos de ADN, mientras que la congelación a -20° C o -80° C para una conservación a

largo plazo. Por su parte, la preservación en papel filtro presenta varias ventajas sobre los anteriores, dado que permite guardar un gran número de muestras sin requerir gran espacio o un gasto energético [Dash et al., 2020] que sí los requiere la refrigeración o congelación. Dos reglas generales para prevenir la degradación del ADN durante el almacenamiento son: baja temperatura y “tan seco como sea posible”. Por lo tanto, se recomienda realizar alícuotas de muestras de ADN liofilizadas para prevenir los ciclos de congelamiento y descongelamiento, así como para reducir la contaminación con nucleasas.

En el caso del ARN, puede almacenarse a corto plazo en agua libre de RNAsas (con 0,1 mM EDTA) o solución amortiguadora TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA). Esta molécula es generalmente estable a -80°C por hasta un año sin degradación. La adición de EDTA a la solución de almacenamiento inhibe la acción de nucleasas. A largo plazo, las muestras de ARN se pueden almacenar a -20°C como precipitados en etanol. Sin embargo, al precipitarse, la concentración de ARN debe chequearse luego de la resuspensión, en especial si se requiere una concentración precisa. El ARN no se dispersa de manera uniforme en el etanol, probablemente porque forma agregados, por lo tanto, la suspensión no uniforme conduce a inconsistencias en la cantidad de ARN, incluso cuando se pipeteen volúmenes iguales.

El mundo enfrenta un gran reto tecnológico en la capacidad de almacenar los datos generados de la secuenciación de ácidos nucleicos, en especial con el uso de tecnologías de NGS que requieren una gran capacidad de almacenamiento computacional. En la actualidad, se avanza hacia el desarrollo de nuevas tecnologías que ofrezcan estabilidad, uso eficiente de la energía y sean amigables con el medio ambiente, como el almacenamiento en polímeros orgánicos [Dong et al., 2020].

Conclusión y perspectivas

La extracción de ácidos nucleicos (ADN o ARN) constituye un paso crucial para el funcionamiento adecuado de otras técnicas moleculares. Aunque existen métodos no comerciales, más económicos, demandan mayor inversión de tiempo por parte de los operadores, y en general, resulta un



ADN de menor calidad e integralidad. Sin embargo, según los recursos del laboratorio y el objetivo del estudio, las metodologías no comerciales permitirían extraer ácidos nucleicos aceptables. En contraste, los métodos comerciales ofrecen mayores ventajas en tiempo y producto final, pero a un mayor costo. Las tecnologías basadas en NGS requieren un ácido nucleico altamente puro, por lo que el uso de estos métodos es ideal para lograr resultados óptimos.

La automatización del proceso de extracción, actualmente disponible a través del uso de sistemas robotizados, permite optimizar el proceso; sin embargo, los costos elevados del equipo son una limitante para que su uso se extienda tanto en el ámbito de la investigación como del diagnóstico. Aun así, su utilidad y aplicabilidad son evidentes ante pandemias como la del COVID-19, en las que se requiere la extracción de ARN de un gran número de muestras en un tiempo corto para ofrecer un diagnóstico rápido [Mayer et al., 2020]. En los últimos años, se han propuesto algunos métodos no comerciales que rinden resultados muy similares a los comerciales para algunas muestras biológicas, por lo cual, se recomienda su revisión para valorar su aplicabilidad en investigación o en diagnóstico.

Referencias

- Al-Saud, H., Al-Romaih, K., Bakheet, R., Mahmoud, L., Al-Harbi, N., Alshareef, I., Judia, S. Bin, Aharbi, L., Alzayed, A., Jabaan, A., Alhadrami, H., Albarrag, A., Azhar, E. I., y Al-Mozaini, M. A. [2020]. Automated SARS-COV-2 RNA extraction from patient nasopharyngeal samples using a modified DNA extraction kit for high throughput testing. *Annals of Saudi Medicine*, 373-381. <https://doi.org/10.5144/0256-4947.2020.373>
- Asghar, U., Malik, M. F., Anwar, F., Javed, A., y Raza, A. [2015]. DNA extraction from insects by using different techniques: a review. *Advances in Entomology*, 3, 132-138.
- Dash, H. R., Shrivastava, P., y Das, S. [2020]. Reliable Use of Whatman™ FTA™ Cards for One-Step Collection and Isolation of DNA. In: H. R. Dash, P.



Shrivastava, y S. Das [Eds.], *Principles and Practices of DNA Analysis: A Laboratory Manual for Forensic DNA Typing* (pp. 109-115). Springer US. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0274-4_14

De Wever, J., Tulkens, D., Verwaeren, J., Everaert, H., Rottiers, H., Dewettinck, K., Lefever, S., y Messens, K. [2020]. A combined RNA preservation and extraction protocol for gene expression studies in cacao beans. *Frontiers in Plant Science*, 11, 992. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00992>

Dong, Y., Sun, F., Ping, Z., Ouyang, Q., y Qian, L. [2020]. DNA storage: research landscape and future prospects. *National Science Review*, 7(6), 1092-1107. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa007>

Elliott, D., y Lodomery, M. [2017]. *Molecular biology of RNA*. Oxford University Press.

EPRUI Biotech. [2018]. Nucleic acid extraction method: The Rise of Magnetic Bead Extraction. EPRUI Biotech Co. Ltd. <https://www.epruibiotech.com/nano-wiki/nucleic-acid-extraction-method-the-rise-of-magnetic-bead-extraction/>

Farrell, R. E. [2017]. *RNA methodologies: Laboratory guide for isolation and characterization* [5th ed.]. Academic Press.

Goyal, M., Dhillon, S., y Kumar, P. [2020]. An improved method for isolation of high-quality RNA from starch-rich wheat grains. *Journal of Environmental Biology*, 41(3), 586–591. <https://doi.org/10.22438/JEB/41/3/MRN-1137>

Hazman, M., Kabil, F., Abd Elhamid, S., y Nick, P. [2020]. Double lysis: an integrative time-saving method yielding high-quality RNA from strawberry. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00039-5>

Hung, K. H., y Stumph, W. E. [2011]. Regulation of snRNA gene expression by the *Drosophila melanogaster* small nuclear RNA activating protein complex [DmSNAPc]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 46(1), 11-26. <https://doi.org/10.3109/10409238.2010.518136>



- Ma, Z., Huang, B., Xu, S., Chen, Y., Li, S., & Lin, S. [2015]. Isolation of High-Quality Total RNA from Chinese Fir [*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook]. *PLoS One*, *10*, e0130234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130234>
- Mayer, F. J., Ratzinger, F., Schmidt, R. L. J., Greiner, G., Landt, O., Am Ende, A., Corman, V. M., Perkmann-Nagele, N., Watkins-Riedel, T., Petermann, D., Abadir, K., Zweimüller-Mayer, J., y Strassl, R. [2020]. Development of a fully automated high throughput PCR for the detection of SARS-CoV-2: The need for speed. *Virulence*, *11*(1), 964-967. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1798041>
- Prendini, L., Hanner, R., y De Salle, R. [2002]. Obtaining, storing and archiving specimens and tissue samples for use in molecular studies. In R. DeSalle, G. Giribet, y W. Wheeler [Eds.], *Methods and tools in biosciences and medicine* [pp. 176–248]. Springer Basel AG. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8125-8_11
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. [2001]. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. [3rd ed.]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/574.873224> 1/1989
- Schwiesow, L. [2020]. An outline of the different steps in RNA extraction. <https://blog.addgene.org/rna-extraction-without-a-kit>
- Steinmetz, N., Michl, G., Maixner, M., y Hoffmann, C. [2020]. A rapid and inexpensive RNA-extraction method for high-throughput virus detection in grapevine. *Vitis*, *39*, 35-39. <https://doi.org/10.5073/vitis.2020.59.35-39>
- Sullivan, R., Heavey, S., Graham, D. G., Wellman, R., Khan, S., Thrumurthy, S., Simpson, B. S., Baker, T., Jevons, S., Ariza, J., Eneh, V., Pye, H., Luxton, H., Hamoudi, R., Whitaker, H., y Lovat, L. B. [2020]. An optimized saliva collection method to produce high-yield, high-quality RNA for translational research. *PLoS ONE*, *15*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229791>
- Watson, J. D., y Crick, F. H. C. [1953]. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, *171*, 737-738. <https://doi.org/10.1038/171737a0>



Capítulo

2

Cuantificación de ácidos nucleicos: concentración y pureza de las muestras y protocolo de cuantificación mediante fluorometría con Qubit® 3.0 Fluorometer

.....
Andrés Felipe Maya Duque

Profesional en Criminalística
Estudiante de Maestría en Ciencias Forenses y Criminalística
Grupo de Investigación Bioforense
Tecnológico de Antioquia – I. U.

Luz Miryam Gómez Piñerez

Bacterióloga y laboratorista clínica
Msc. en Entomología, PhD. en Ciencias Agrarias
Docente Tecnológico de Antioquia – I. U.
Grupo de Investigación Bioforense

Isabel Cristina Cadavid Sánchez

Ingeniera biológica
Msc. en Biotecnología, PhD. Biología celular y molecular
Investigadora, Grupo de Investigación Bioforense
Tecnológico de Antioquia – I. U.
Centro de Biotecnología
Universidad Federal de Rio Grande do Sul

Introducción

Después de realizar la extracción del material genético de una muestra, es necesario cuantificar la cantidad de ADN [ácido desoxirribonucleico] o ARN [ácido ribonucleico] extraído, así como determinar su pureza; estos parámetros



son importantes para los ensayos subsecuentes, como los basados en la PCR [reacción en cadena de la polimerasa], clonación, enzimas de restricción, secuenciación de muestras de ADN, etc.

La calidad y cantidad de ácidos nucleicos son factores que van a condicionar los tipos de aplicaciones que se puedan desarrollar tanto en diagnóstico como en investigación. La disponibilidad de ADN genómico puro, no contaminado, es clave para el éxito en la mayoría de los experimentos de biología molecular. Por ejemplo, existen casos en los que altas concentraciones de ADN pueden inhibir la reacción de amplificación por PCR, lo cual está relacionado principalmente con el co-aislamiento de polisacáridos, fenoles y otros metabolitos secundarios durante la extracción de ADN [Molinari y Crochemore, 2001]. La inhibición se puede prevenir al realizar diluciones de la muestra, luego de haber cuantificado la concentración de ADN. Por el contrario, en casos donde se determinan bajas concentraciones, es posible agregar mayor cantidad de muestra a la reacción [Hedman & Rådström, 2013], por estas razones es importante cuantificar el producto de la extracción de ácidos nucleicos antes de comenzar un análisis.

En el caso de técnicas moleculares basadas en la PCR, se ha demostrado que la calidad del ADN afecta los perfiles de amplificación, lo cual se manifiesta principalmente en la presencia de falsos positivos y en la poca reproducibilidad del ensayo [Atienzar et al., 2000]. La calidad del material genético depende del tipo de tejido de donde se extrae, su tiempo y tipo de preservación [Gómez, 2007] y el método de elección para la extracción, como se menciona en el capítulo 1 de este texto.

Son diversas las técnicas que permiten cuantificar la integridad [cantidad y calidad] del ADN o ARN producto de una extracción, a continuación, se describe de forma breve el concepto metodológico.

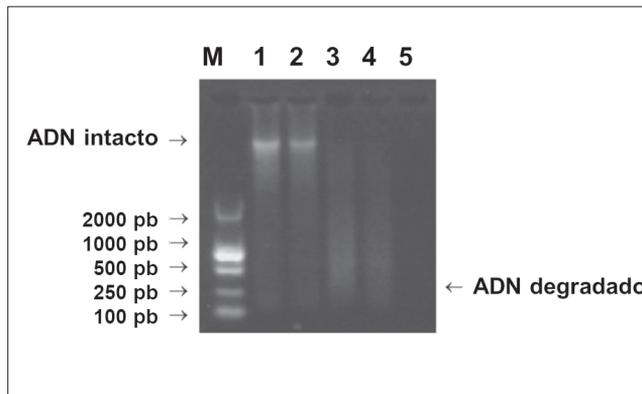


Electroforesis en gel de agarosa

Una de las técnicas empleadas inicialmente para evaluar la calidad y cantidad de ácidos nucleicos es la electroforesis. En ésta, la muestra se deposita en un gel de agarosa, que luego es expuesto a un campo eléctrico para facilitar la separación del material genético y la migración hacia el polo positivo, debido a la carga negativa de los ácidos nucleicos. Para la visualización del material, se agrega un tinte fluorescente [como bromuro de etidio] que se liga a los ácidos nucleicos y fluoresce bajo el efecto de luz UV. En el gel se podrá ver si el material está íntegro o degradado: bandas bien definidas corresponden a material íntegro del mismo peso molecular y un barrido, a material degradado [Liao et al., 2018] [Figura 4]. La cantidad de ADN se mide por medio del uso de una escala [*ladder*] sembrada en el gel, paralela a las muestras. Esta escala está compuesta por fragmentos de ADN de tamaños y cantidades conocidas [Figura 5] con los cuales se podrá comparar la intensidad de la fluorescencia de la muestra de interés y tener una aproximación de los nanogramos (ng) de ácido nucleico presente [Stephenson, 2016].

Figura 4

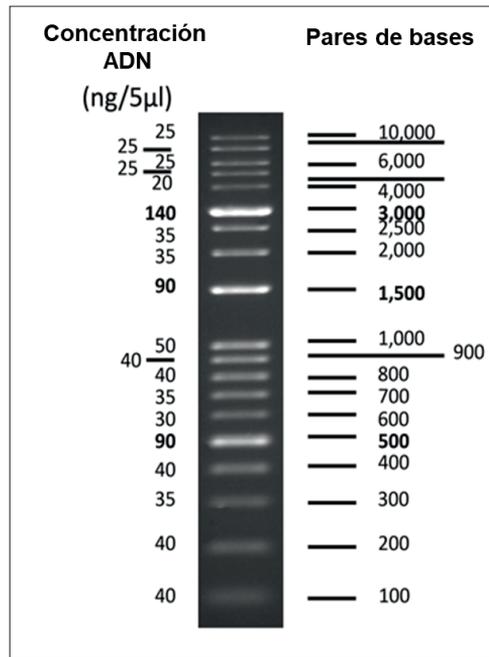
Gel de electroforesis de ADN de producto de extracción



Nota. M: marcador de peso molecular de 2000 pb. Carriles 1 y 2: ADN intacto. Carriles 3 - 5: ADN degradado. Fuente: Tomado de Liao et al., 2018.

Figura 5

Escala de ADN (ladder) o marcador de peso molecular



Nota. Mezcla de fragmentos de ADN de diferentes tamaños (en pares de bases y cantidades [ng/μl]). Cuanto mayor es la intensidad de la banda, mayor será la cantidad de ADN y entre más alta es la posición de la banda, mayor es la longitud del fragmento. Fuente: Tomado de Enzo Life Sciences, s. f.

Esta técnica sigue en uso, principalmente en laboratorios que no disponen de equipos para cuantificación automatizada, sin embargo es una técnica que consume tiempo, debido a que se hace necesario preparar el gel y realizar el proceso de electroforesis, que en promedio puede tomar 45 minutos aproximadamente.

Electroforesis capilar en gel

La cuantificación de ADN mediante electroforesis capilar en gel es similar a la cuantificación de ADN por electroforesis en gel, excepto que la cantidad de muestra que se necesita es menor (1-2 μ l). Por tratarse de un proceso automatizado toma menos tiempo (entre 3 - 30 min.), además tiene una mayor resolución al separar moléculas más próximas en tamaño (Lian y Zhao, 2016).

La electroforesis capilar se lleva a cabo en un tubo capilar con un diámetro entre 50 a 100 μ m y una longitud que varía de 20 a 50 cm. Cada terminación del capilar se sumerge en un reservorio con un electrodo y un electrólito. El capilar se puede llenar con un gel de poliacrilamida fijo o un gel líquido bombeable, una punta se sumerge en una solución de la muestra (Figura 6). Para introducir la muestra dentro del capilar se aplica un campo eléctrico o presión. La migración de la muestra a través del capilar es conducida por la aplicación de una corriente de alto voltaje (10 - 30 kW).

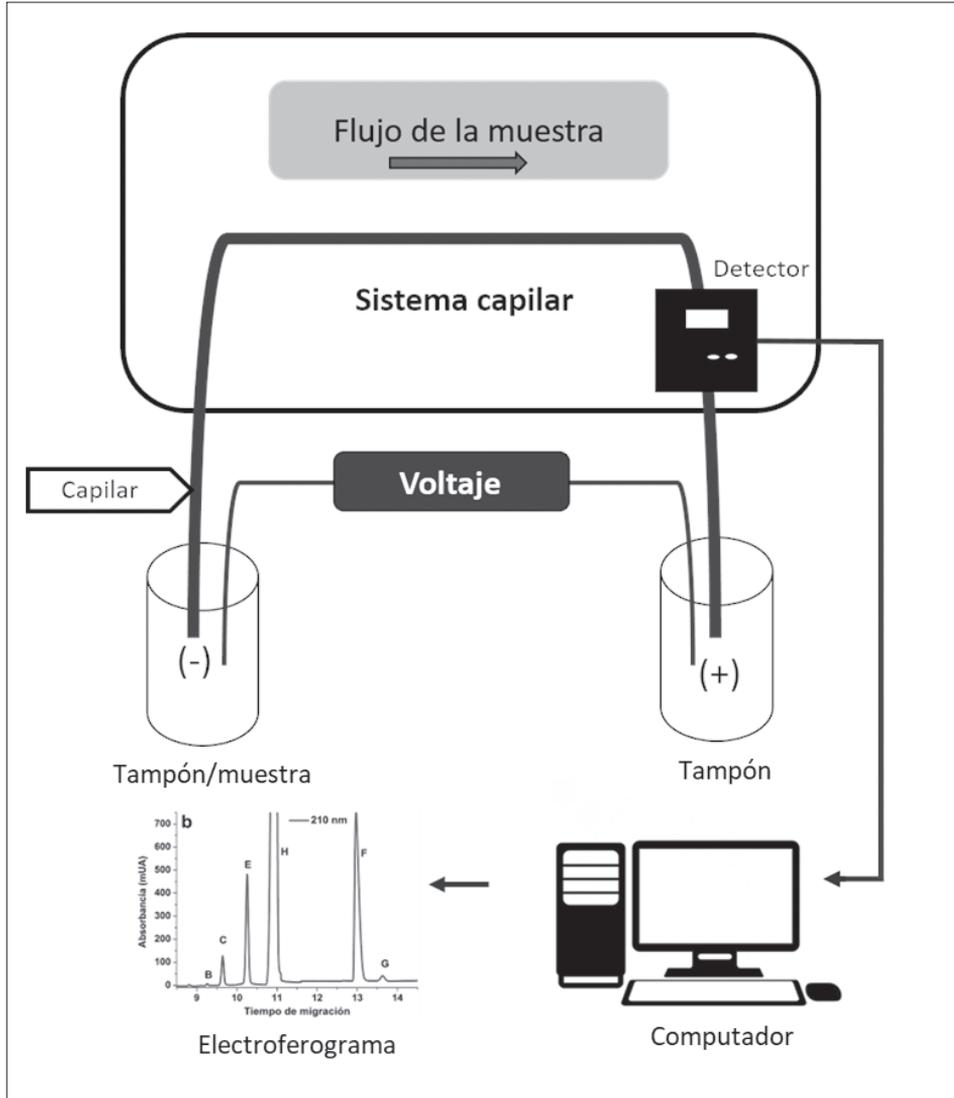
Las moléculas son detectadas cuando pasan a través del lado opuesto del capilar. Las moléculas más pequeñas migrarán más rápido y, por lo tanto, serán las primeras en ser detectadas, las más grandes, por el contrario, serán las últimas.

El método de detección de mayor uso es a través de fluorescencia inducida por un láser, el cual detecta fluorocromos ligados al ADN. Otras alternativas de detección pueden ser por absorbancia de luz UV y fluorescencia. La técnica requiere una cámara Charge-coupled device y un computador para recolectar y registrar el tiempo de cada detección. Finalmente, se genera un electroferograma, el cual es un gráfico que muestra el tiempo de detección y el pico de fluorescencia de una molécula. El área del pico será proporcional a la concentración del ADN (Lian y Zhao, 2016) (Figura 7).



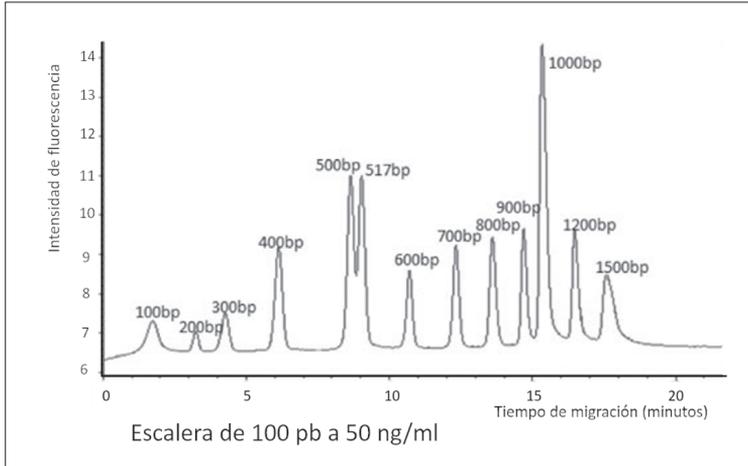
Figura 6

Componentes de electroforesis en capilar



Fuente: Adaptado a partir de Lian y Zhao [2016].

Figura 7
Electroferograma



Nota. Resultado de la electroforesis de un marcador de peso molecular de 100 pb En el eje x el tiempo de detección en minutos y en el eje y la fluorescencia detectada. Cada pico corresponde a moléculas de tamaños diferentes. Los picos detectados en los primeros minutos corresponden a moléculas de menor tamaño.

Fuente: Adaptado de Adelis [s. f.].

Cuantificación por absorbancia

La cantidad de ácidos nucleicos extraídos de una muestra y su pureza se pueden medir a través de la absorbancia de luz. Uno de los métodos más comunes es la medición de la absorbancia de la solución a 260 nm (A₂₆₀), debido a que los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción en esta longitud de onda [correspondiente a la luz ultravioleta –UV–], lo cual se debe a la presencia de bases púricas y pirimídicas en su estructura.

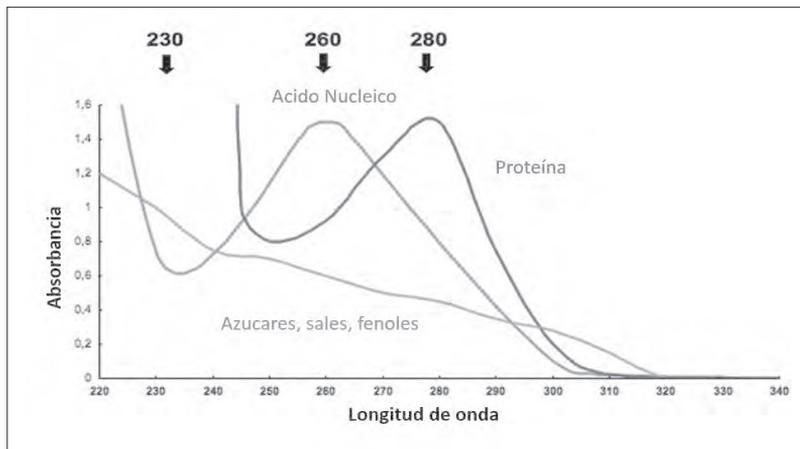
Aunque es una técnica relativamente simple y tradicional, la absorbancia a 260 nm tiene baja sensibilidad e interferencia de nucleótidos y ácidos nucleicos monocatenarios. Además, los compuestos comúnmente utilizados en la preparación de ácidos nucleicos y contaminantes de la extracción

absorben a 260 nm (sales, compuestos orgánicos, proteínas y carbohidratos), lo que conduce a niveles de cuantificación anormalmente altos. Sin embargo, estos compuestos de interferencia también absorben a 280 nm, por lo que se realiza el cálculo de la pureza del ADN al realizar mediciones de absorbancia con la razón A_{260} / A_{280} (Figura 8). Por lo tanto, la construcción de una relación de absorbancia entre estas dos longitudes de onda de absorbancia puede proporcionar una estimación de la pureza de la muestra. Como regla general, se denomina “pura” cualquier preparación con un A_{260} / A_{280} superior a 1,8.

Las proteínas absorben luz UV a 280 nm, en gran parte debido al anillo aromático del triptófano, la fenilalanina y la tirosina. Si hay proteínas presentes en la solución, el valor de A_{260} / A_{280} será menor de 1,8 y si hay ARN, la relación será mayor a 2,0 [Gallagher y Desjardins, 2011]. Medidas adicionales a 230 nm también permiten evaluar la pureza, si la proporción entre la absorbancia a 260 nm y 230 nm es menor a 2,0; existe contaminación por carbohidratos en el extracto [Gallagher y Desjardins, 2011].

Figura 8

Picos de absorbancia para diferentes moléculas



Fuente: Tomado de Armbrecht et al. [2013].

El ADN bicatenario presenta una absorción menor que el monocatenario, porque el emparejamiento de las bases (por enlaces de puentes de hidrógeno) reduce la absorción de la luz ultravioleta [Gallagher y Desjardins, 2011].

Para medir la absorbancia se utilizan los espectrofotómetros, que miden la concentración promedio de ácidos nucleicos y su pureza en una solución. La muestra es expuesta a un haz de luz UV y un fotodetector mide la luz que pasa a través de ella. Parte de la luz ultravioleta pasará y parte será absorbida por el ADN / ARN. Mientras más luz absorbe la muestra, mayor es la concentración de ácido nucleico. El efecto resultante es que llega menos luz al fotodetector y esto produce una mayor densidad óptica [OD].

La densidad óptica se genera a partir de la ecuación 1:

(1) Densidad óptica = $\text{Log} [\text{Intensidad de luz incidente} / \text{Intensidad de luz transmitida}]$

En términos prácticos, una muestra que no contiene ADN o ARN no debe absorber la luz ultravioleta y por lo tanto produce una DO de 0.

Densidad óptica = $\text{Log} [100/100] = 0$

La medición de la absorbancia se rige por la ley de Beer-Lambert:

$$(2) A = \epsilon b c.$$

Donde:

A = absorbancia;

ϵ = coeficiente de extinción molar;

b = longitud del camino, y

c = concentración de analito.

Cuando el coeficiente de extinción molar y la longitud de la trayectoria son constantes, la absorbancia es proporcional a la concentración. Para un lector de cubetas estándar, la longitud del camino se define generalmente como 1 centímetro.



Al usar la ley de Beer-Lambert, es posible relacionar la cantidad de luz absorbida con la concentración de la molécula absorbente. A una longitud de onda de 260 nm, el coeficiente de extinción promedio para el ADN bicatenario es 0,020 [$\mu\text{g} / \text{ml}$] $-1/\text{cm}$, para el ADN monocatenario es 0,027 [$\mu\text{g}/\text{ml}$] $-1/\text{cm}$, para el ARN de hebra simple es 0,025 [$\mu\text{g}/\text{ml}$] $-1/\text{cm}$, y para oligonucleótidos monocatenarios cortos depende de la composición de la longitud y la base. Por lo tanto, una absorbancia [A] de 1 corresponde a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para el ADN bicatenario. Este método de cálculo es válido hasta una A de al menos 2.

La “unidad A260” se utiliza como medida de la cantidad de ácidos nucleicos. Una unidad A260 es la cantidad de ácido nucleico contenida en 1 mL y que produce una OD de 1. Por lo tanto:

1 unidad A260 dsDNA = 50 μg

1 unidad A260 ssDNA = 33 μg

1 unidad A260 ssRNA = 40 μg

Los espectrofotómetros más convencionales utilizan volúmenes entre 200 μL a 1 mL, y existen algunos que cuantifican directamente pequeños volúmenes de muestra que pueden llegar a ser hasta de 1 μL . Aunque es un método comúnmente usado, puede ser poco confiable e inexacto, ya que las mediciones de absorbancia no son muy específicas, no pueden distinguir entre ADN y ARN, nucleótidos libres, proteína o sales, que absorben a 260 nm [Ruíz et al., 2010].

Otro método basado en la absorbancia para cuantificar el ADN utiliza difenilamina. La difenilamina reacciona con los azúcares desoxirribosa en condiciones ácidas y forma un complejo azul que puede cuantificarse a 595 nm. La desventaja de este método es el alto tiempo que requiere para su procesamiento y la baja sensibilidad [Berthold Technologies, 2020]; sin embargo, las mediciones se realizan en el rango visible y se pueden leer con un lector ELISA estándar, si no hay otros instrumentos disponibles.



La espectrometría de fluorescencia

También llamada fluorimetría o espectrofluorimetría, es un método alternativo para cuantificar la absorbancia de ácidos nucleicos y se basa en el uso de moléculas fluorescentes que marcan la molécula de interés. Estas son mucho más sensibles y específicas al ADN, debido a que los fluoróforos usados emiten fluorescencia cuando se unen al ADN. Algunos de ellos son específicos para la detección de ADN de doble cadena, como el PicoGreen y el SYBRGreen. Es esta característica lo que lo hace más específico en comparación con los métodos espectrofotométricos que miden todos los tipos de ácidos nucleicos (dsADN y sADN). Además, pueden ser más sensibles para detectar concentraciones bajas en las muestras. Este método requiere una curva estándar que se construye con diferentes muestras de cantidad conocida de ADN y su correspondiente fluorescencia. De esa manera, se puede comparar la fluorescencia de la muestra de interés con los valores de la curva y calcular su concentración.

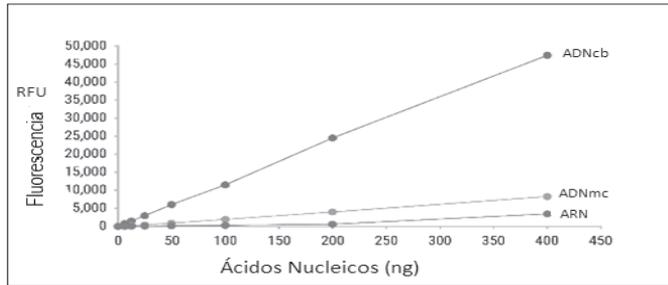
También es posible cuantificar diferentes macromoléculas mediante el uso de fluoróforos que se unen específicamente a un tipo de molécula, por ejemplo, a ADN de cadena doble o sencilla, ARN o proteínas. Los fluoróforos tienen una fluorescencia muy baja que aumenta al unirse a su molécula blanco; la intensidad de fluorescencia resultante depende directamente de la cantidad de molécula objetivo en la muestra. Los dispositivos que miden esta fluorescencia se llaman fluorómetros o fluorímetros [Life Technologies, 2014].

El uso de métodos fluorescentes permite cuantificar ADN a una sensibilidad mayor a otros métodos. Además, por el hecho de utilizar colorantes es posible seleccionar el tipo de molécula que se quiere cuantificar, debido a que se usan colorantes específicos para teñir ADN o ARN, entre otros. Este aspecto de la técnica de cuantificación de fluorescencia, junto con el colorante preferencial, da como resultado una señal de fondo baja, alta precisión y especificidad, por lo que es ideal para cuantificar muestras de ácido nucleico de baja concentración. En la Figura 9 se ejemplifican los rangos de cuantificación y las detecciones específicas para cada tipo de molécula [Berthold Technologies, 2020].



Figura 9

Rango de cuantificación y tipo de muestra.



Nota. ADNcb corresponde a ADN bicatenario y ADNmc a monocaterio.

Fuente: Tomado de Blater [2018].

Tabla 1

Comparación de los métodos de cuantificación tratados en este capítulo

Métodos	Ventajas	Limitaciones
Electroforesis	- Alta especificidad (banda de un peso molecular específico)	- Alto consumo de tiempo - Baja exactitud
Difenilamina	- Se puede medir con colorimetría o lector de ELISA	- Laborioso - Alto consumo de tiempo - Baja sensibilidad
Espectrofotometría	- Rápida - Protocolo sencillo - No requiere reactivos	- Baja especificidad - Sensible a contaminantes - No diferencia tipo de molécula
Fluorescencia	- Rápido, simple - Altamente sensible - Los contaminantes no tienen efecto - Diferencia entre tipos de moléculas	- Requiere una calibración previa con estándares - Química cerrada

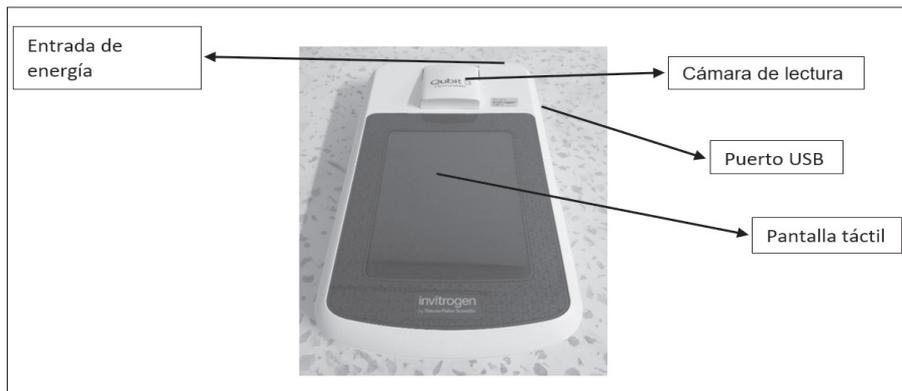
Fuente: Berthold Technologies [2020].

Cuantificación mediante el método fluorimétrico con Qubit® 3.0 Fluorometer

Uno de los equipos empleados para cuantificación por fluorimetría es el Qubit® 3.0 Fluorometer (Figura 10) que permite la cuantificación de cadena doble o sencilla de ADN, además de ARN, microRNA y proteínas, lo cual produce una medida más precisa. El fluorómetro Qubit® 3.0 detecta tintes fluorescentes específicos para el tipo de muestra, cuya fluorescencia aumenta cuando se unen a las moléculas objetivo, incluso a bajas concentraciones de estas (Thermo Fisher Scientific, s. f.).

Figura 10

Equipo Qubit® 3.0 Fluorometer



Fuente: Elaboración propia de los autores.

Las medidas en el Qubit® 3.0 Fluorometer necesitan una preparación previa de la muestra y la elaboración de una curva estándar. Los *kits* disponibles disponibilizan todos los componentes necesarios (Invitrogen, 2017; Thermo Fisher Scientific, s. f.).

A continuación, se presenta el protocolo para la cuantificación de ácidos nucleicos mediante fluorimetría con Qubit® 3.0 Fluorometer:

Materiales:

- Viales estériles de 2 mL.
- Viales estériles de 1,5 mL [se incluyen en el *kit*].
- Micropipetas 10, 100 y 200 μ l.
- Puntas estériles para micropipetas de 10, 100 y 200 μ l.
- Gradilla para viales.
- Guantes de nitrilo.

Reactivos:

- Qubit[®] *Buffer* [tampón].
- Qubit[®] *Reagent* [reactivo].
- Estándar # 1.
- Estándar # 2.
- Solución de trabajo compuesta por el Qubit[®] *Buffer* y el Qubit[®] *Reagent*.

El reactivo Qubit[®] es un fluoróforo que se une a la molécula que se quiere cuantificar, y el estándar # 1 y # 2 son ácidos nucleicos a una concentración determinada para la calibración del equipo.

Recomendación: los estándares de ADN Qubit[®] 3.0 Fluorometer se deben almacenar a 4° C, y el colorante y tampón a temperatura ambiente protegidos de la luz. Se debe asegurar que todos los reactivos del Qubit[®] 3.0 Fluorometer estén a temperatura ambiente antes de empezar la cuantificación de ADN [Life Technologies, 2014].

Procedimiento

El proceso de cuantificación por medio del Qubit[®] 3.0 Fluorometer está dividido en cuatro partes: la primera es la preparación de los reactivos y muestras, la segunda es la calibración del equipo por medio del estándar, la tercera es la cuantificación de las muestras y, por último, la lectura de los resultados.

a. Preparación de reactivos y muestras:

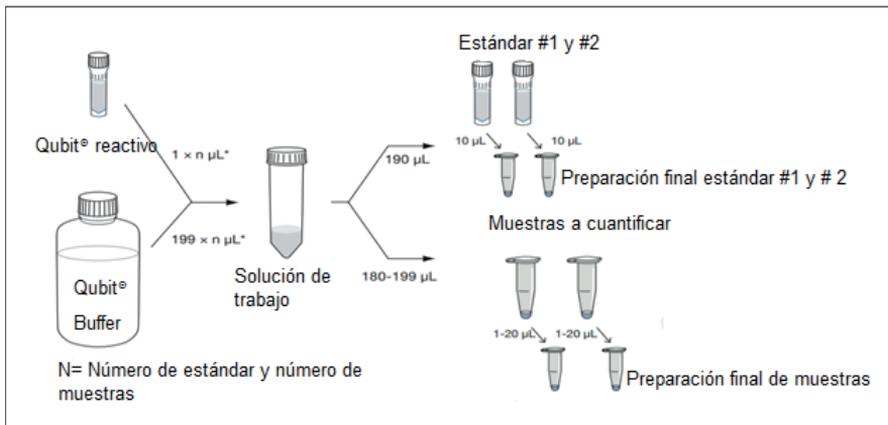
- Preparación de solución de trabajo: agregar en un vial de 2 ml, 199 μ l del Qubit[®] *buffer*, más 1 μ l del reactivo Qubit[®], preparar 200 μ l de solución de trabajo para cada muestra y estándar. [Figura 11].



- Preparación de estándar: agregar en dos viales, 190 μl de la solución de trabajo, y agregar 10 μl de los estándares #1 y #2 respectivamente, para una solución final de 200 μl [Figura 11].
- Preparación de muestras: tomar 1 μl de cada muestra [ADN] y agregarlo a un vial, después tomar 199 μl de la solución de trabajo y agregarlo a cada muestra para su cuantificación mediante el siguiente procedimiento.

Figura 11

Flujograma del procedimiento para la preparación de reactivos y muestras para cuantificación en Qubit® 3.0 Fluorometer



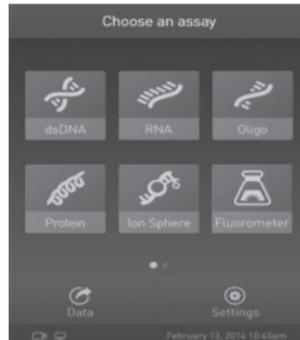
Fuente: Adaptado de Life Technologies (2014)

b. Lectura de estándares para calibración del equipo:

En la pantalla de inicio presione el ensayo para el cual quiere hacer la lectura, el equipo muestra 6 opciones [Figura 12], seleccione la opción según el tipo de muestra que se quiere cuantificar; para efectos de ejemplo seguiremos el protocolo de dsDNA.

Figura 12

Pantalla del menú de inicio del equipo para seleccionar el tipo de ensayo que se va a realizar

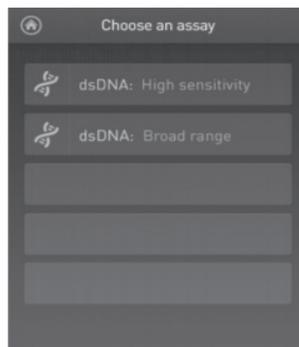


Fuente: Life Technologies (2014).

Al seleccionar el protocolo de dsDNA, se despliega una nueva pantalla con dos opciones [Figura 13]: una para lectura de alta sensibilidad y otra de amplio rango, en este caso seleccionamos la de alta sensibilidad.

Figura 13

Pantalla para selección de opciones de ensayo para lectura dsDNA, de acuerdo con el kit que se va a utilizar

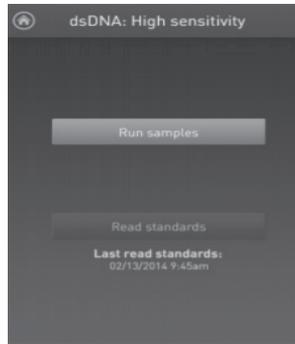


Fuente: Life Technologies (2014).

Al seleccionar la opción de alta sensibilidad, el equipo solicita elegir entre leer nuevos estándares y ejecutar las muestras con la calibración previa. Presione *Read standards* [Leer estándares] (Figura 14).

Figura 14

Pantalla de selección para la opción de Read standards [Leer estándares]



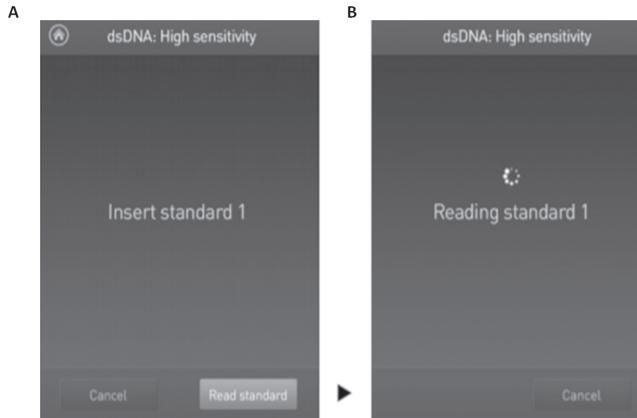
Fuente: Life Technologies (2014).

En la pantalla se va a desplegar una pregunta que pide primero el estándar de baja concentración (estándar # 1) y luego el de alta concentración (estándar # 2). El equipo utiliza estas dos medidas para producir una curva estándar que servirá para calcular la concentración de las muestras.

Cuando el equipo le pida insertar el estándar # 1, introduzca este en la cámara de lectura del equipo y presione *Read standards* (Leer estándares) (Figuras 15A y 15B). Asegúrese de utilizar el estándar adecuado, la lectura tarda 3 segundos.

Figura 15

A. Pantalla con la opción de selección para introducir estándar. B. Pantalla que indica lectura del estándar



Fuente: Life Technologies (2014).

Cuando termine de leer el estándar # 1, el equipo pedirá leer el estándar # 2, introduzca este en la cámara de lectura y presione *Read standards* [Leer estándares] (Figura 16).

Figura 16

Pantalla con la opción de insertar y leer el estándar # 2



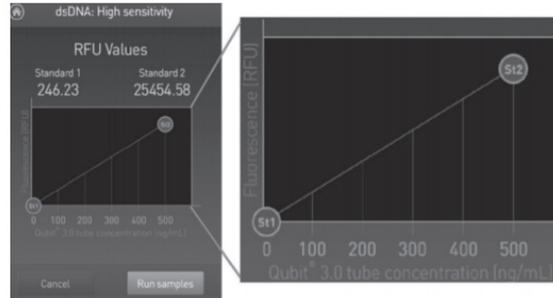
Fuente: Life Technologies (2014).

La calibración se completa después de leer el estándar # 2, el equipo muestra el resultado en pantalla.

Resultados de la calibración: si la calibración es correcta, el equipo mostrará en pantalla un gráfico donde se ve un rango fluorescencia vs. concentración, el estándar # 1 de baja concentración y estándar # 2 de alta concentración. El equipo utiliza estas dos medidas para ajustarse a una curva estándar. Los parámetros de esta curva se usan para estimar la cantidad de las muestras mediante la fluorescencia (Figuras 17).

Figura 17

Pantalla el equipo que ilustra el gráfico de fluorescencia vs concentración

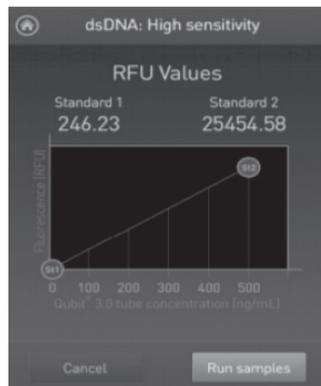


Nota. Ampliación del gráfico de fluorescencia vs concentración. St1 corresponde al estándar # 1, con concentración baja y por tanto una fluorescencia baja. St2 corresponde al estándar # 2, con una fluorescencia más alta debido a su concentración. Fuente: Life Technologies [2014].

c. *Cuantificación de las muestras:* una vez calibrado el equipo, se observa en la pantalla la opción de seleccionar el corrido de las muestras (Figura 18). Presione Run samples [correr muestra].

Figura 18

Pantalla con la opción de selección para lectura de Run samples [correr muestras]

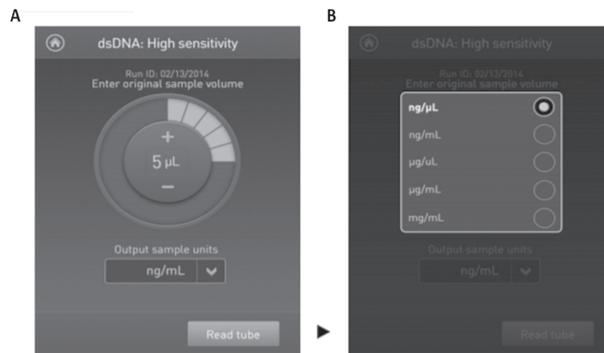


Fuente: Life Technologies [2014].

Al seleccionar el corrido de muestras, se despliega una pantalla que nos permite elegir el volumen y las unidades de concentración a las que se requieren los resultados de la muestra [Figura 19A]. Escoja el volumen de la muestra mediante la presión de los símbolos + o -, según el caso. El volumen es el utilizado para hacer la dilución con la solución de trabajo. Para ver las unidades de concentración en la ventana *Output sample unit*, presione la flecha [v] para desplegar las opciones de las unidades de la concentración [Figura 19B]. Seleccione las unidades de salida, según lo requiera.

Figura 19

A. Pantalla para selección de volumen y unidades B. Opciones para selección de unidades

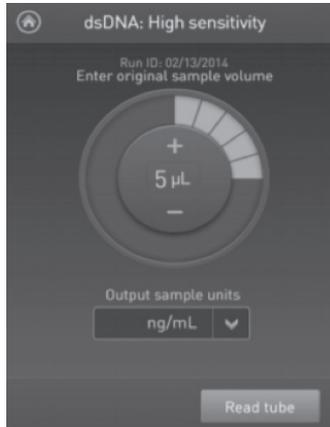


Fuente: Life Technologies [2014].

Introduzca el tubo con la muestra en la cámara de lectura del equipo. Presione *Read tube* (Leer tubo) (Figura 20 A, B). La lectura tarda aproximadamente 3 segundos.

Figura 20A

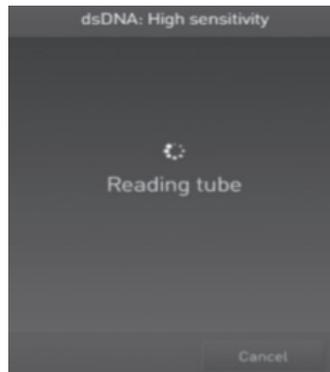
Pantalla con la opción de selección para leer muestra (Read tube)



Fuente: Life Technologies (2014).

Figura 20B

Pantalla que indica lectura de la muestra



Fuente: Life Technologies (2014).

Después de ingresar la muestra en la cámara de lectura, el equipo muestra en pantalla los resultados de la cuantificación (Figura 21).

Figura 21

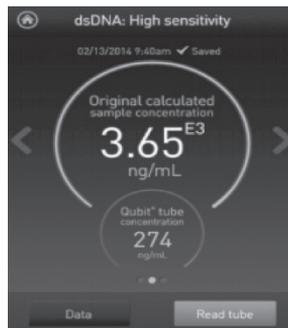
Pantalla con resultados de cuantificación



Fuente: Life Technologies (2014).

d. *Lectura de resultados:* si los resultados están dentro del rango del ensayo (determinados mediante las lecturas de los estándares # 1 y # 2) se mostrarán los valores de concentración. El valor superior (en letra grande) es la concentración de la muestra original. El valor inferior es la concentración de dilución (Figura 22). Si los resultados se encuentran fuera del rango del ensayo, aparecerá el mensaje “out of range” (fuera de rango).

Figura 22. *Pantalla que indica la concentración de la muestra y la concentración de la dilución realizada para el ensayo*



Fuente: Life Technologies (2014).

Para continuar con la siguiente muestra, depositela en la cámara de lectura, seleccione la opción *Read tube*, y repita el procedimiento a partir de la parte tres del protocolo [c. Cuantificación de las muestras] para el número de muestras que se quiera procesar.

Referencias

- Adelis. [s. f.]. BIABooster system. <https://www.adelis-tech.com/product/biabooster/> [Consultado: 5 de octubre de 2020].
- Ambrecht, M. [2013]. Detection of contamination in DNA and protein samples by photometric measurements. *Eppendorf*, Application Note, 279. https://www.eppendorf.com/product-media/doc/en/59828/Eppendorf_Detection_Application-Note_279_BioPhotometer-D30_Detection-contamination-DNA-protein-samples-photometric-measurements.pdf
- Atienzar, F., Evenden, A., Jha, A., Savva, D., y Depledge, M. [2000]. Optimized RAPD analysis generates high-quality genomic DNA profiles at high annealing temperature. *BioTechniques*, 28(1), 52-54. <https://doi.org/10.2144/00281bm09>
- Berthold Technologies [2020]. *DNA quantification methods*. Berthold Technologies GmbH y Co.KG. <https://www.berthold.com/en/bioanalytic/applications/dna-quantification/methods/>
- Blater, A. [2018]. Choosing the Right Method for Nucleic Acid Quantitation. Promega Corporation. <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/choosing-the-right-method-for-nucleic-acid-quantitation/>
- Enzo Life Sciences [s. f.]. AMPIGENE® DNA Ladder 250-10,000 bp—ENZ-GEN103. *Enzo Life Sciences*. <https://www.enzolifesciences.com/ENZ-GEN103/ampigene-dna-ladder-250-10-000-bp/> [Consultado: 5 de octubre de 2020].



- Gallagher, S. R., y Desjardins, P. [2011]. Quantitation of Nucleic Acids and Proteins. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 5(1), 221-236. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0202s5>
- Gómez P., L. M. [2007]. Obtención de ADN de insectos con calidad para la secuenciación. En: G. Amat (Ed.), *Fundamentos y métodos para el estudio de los insectos* (pp. 140-151). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Hedman, J., & Rådström, P. [2013]. Overcoming Inhibition in Real-Time Diagnostic PCR. In M. Wilks (Ed.), *PCR Detection of Microbial Pathogens* (pp. 17–48). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-353-4_2
- Lian, D. S., y Zhao, S. J. [2016]. Capillary electrophoresis based on nucleic acid detection for diagnosing human infectious disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine [CCLM]*, 54(5), 707-738. <https://doi.org/10.1515/cclm-2015-0096>
- Liao, J., Yang, L., Sheppard, A. M., y Liu, Y. F. [2018]. Comparison of DNA quality in raw and reconstituted milk during sterilization. *Journal of Dairy Science*, 101(1), 147-153. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13461>
- Life Technologies [2014]. Assays Quick Reference. Fluorometer Qubit™ 3 Fluorometer. http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/qubit_assays_qrc.pdf
- Molinari, H. B., y Crochemore, M. L. [2001]. Extração de DNA genômico de *Passiflora* spp. para análises PCR-RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23(2), 447-450. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452001000200051>
- Ruíz S., B., Rojas M., R. I., Ruíz H., H., Mendoza N., P., Oliva Ll., M. Á., Ibarra M., C. E., Aguilar T., G., Herrera H., J. G., Hernández G., A., Sanzon G., D., Bautista T., G. U., Ruíz M., A. de J., y Medina S., L. M. [2010]. Extracción y cuantificación de ADN de pajillas de semen bovino criopreservado. *Revista Científica UDO Agrícola*, 10(1), 103-108.

Stephenson, F. H. [2016]. Nucleic Acid Quantification. In F. H. Stephenson (Org.), *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology* (3rd edition) [pp. 97-129]. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802211-5.00005-9>

Thermo Fisher Scientific. [s. f.]. *Qubit Fluorometric Quantification*. www.thermofisher.com/br/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit.html/ [Consultado: 5 de octubre de 2020].



Capítulo

3

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y visualización de sus productos en gel

.....
Fernanda Lazarroto

Biomédica

Msc y PhD en Genética y Biología Molecular

Investigadora de posdoctorado

Centro de Biotecnología

Universidad Federal de Rio Grande do Sul

Isabel Cristina Cadavid Sánchez

Ingeniera biológica

Msc. en Biotecnología, PhD. Biología celular y molecular

Investigadora, Grupo de Investigación Bioforense

Tecnológico de Antioquia – I. U.

Centro de Biotecnología

Universidad Federal de Rio Grande do Sul

Introducción

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polimerase Chain Reaction*) es una técnica rápida, sensible, versátil y robusta que permite la amplificación *in vitro* por medio de enzimas, de una secuencia específica de ácido desoxirribonucleico [ADN] (Mullis, 1990). Por medio de este procedimiento es posible detectar una única molécula de ADN en medio de una mezcla compleja y manipularla para producir hasta millones de copias, así se posibilita



la obtención de material genético en cantidades suficientes para su empleo en protocolos de ingeniería genética, medicina forense, terapia génica, análisis ambientales, entre otros [Koshland, 1992]. La dificultad o imposibilidad de manipular moléculas de ADN en bajas concentraciones hizo que este método de amplificación se convirtiera en una verdadera revolución científica en el área del ADN recombinante [Koshland, 1992].

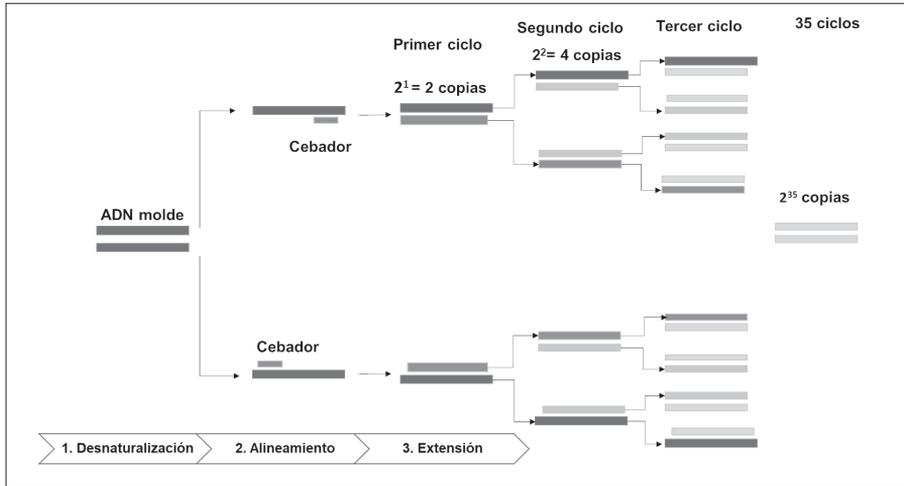
Para una reacción de PCR es necesario contar con un ADN molde de interés, cebadores [*primers*, secuencia corta de ADN de 15-35 pb aproximadamente] específicos para el ADN molde, una enzima Taq polimerasa, cloruro de magnesio [MgCl₂], que actúa como cofactor de la enzima, una solución tampón [para mantener un pH estable] y desoxinucleótidos [dNTPs]. Además, será necesario tener un termociclador, equipo que permite mediante su programación que la muestra pase por diferentes temperaturas durante tiempos determinados y de una manera cíclica [Koshland, 1992].

Cada ciclo de la PCR está conformado por tres pasos básicos: 1) desnaturalización del ADN, 2) alineamiento de los cebadores a la secuencia blanco y 3) síntesis de nuevas moléculas de ADN por la acción de la enzima ADN polimerasa [Figura 23]. Estos pasos son repetidos de forma cíclica de 25 a 35 veces, de forma que cada molécula de ADN producida en un ciclo se convierte en un molde para generar nuevas moléculas en el ciclo siguiente. Este proceso genera un crecimiento exponencial de la concentración de la secuencia de interés a través de una reacción en cadena, como el propio nombre de la técnica lo indica [Templeton, 1992].



Figura 23

Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)



Nota. [1] Etapa de desnaturalización del ADN; [2] etapa de alineamiento de los cebadores al ADN molde, y [3] etapa de extensión, donde se forma una nueva molécula. En los siguientes ciclos, estas etapas se repiten hasta tener una amplificación exponencial de la molécula de interés. Fuente: Elaboración propia de las autoras.

Los cambios en la temperatura son los que permiten que cada uno de estos procesos suceda (desnaturalización, alineamiento y extensión). Para que el ADN sea desnaturalizado, debe ser sometido a temperaturas por encima de los 90° C. Mientras que el alineamiento de los cebadores y la síntesis de nuevas moléculas de ADN ocurren a temperaturas más bajas, aproximadamente a 60° C y 70° C, respectivamente. Cada etapa debe pasar en un tiempo determinado, que varía en las reacciones de acuerdo con el tipo de muestra, el tamaño del ADN, la composición de los nucleótidos de la secuencia de interés y las particularidades del ADN polimerasa utilizado.

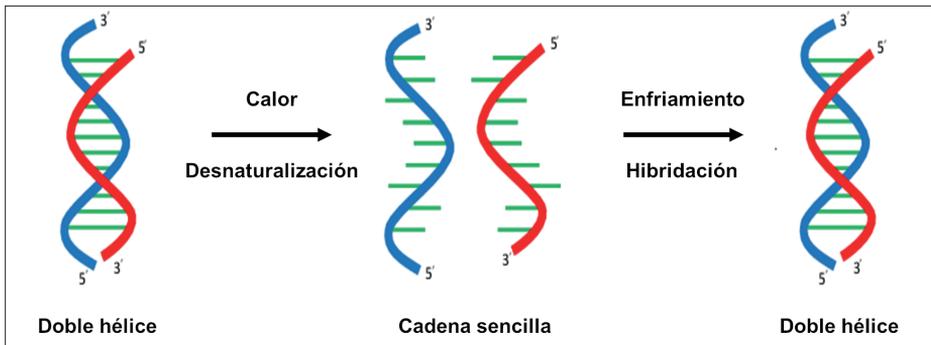
Etapas de la reacción

La desnaturalización

Es la primera etapa de los ciclos que componen la PCR. En esta fase, la muestra es sometida a temperaturas entre 94° y 98° C, con el fin de suministrar energía suficiente para provocar el rompimiento de los enlaces de hidrógeno que mantienen unidas a las dos cadenas de la molécula de ADN (Figura 24).

Figura 24

Desnaturalización del ADN por el efecto de la alta temperatura



Nota. Con la aplicación de temperatura cerca a los 90° C, la doble hélice de ADN se desnaturaliza, como consecuencia de la disociación de los puentes de hidrógeno, y las cadenas se separan en cadenas sencillas.

Fuente: Adaptado de Yazdi et al. [2015].

Antes de comenzar los ciclos, se programa una desnaturalización inicial significativamente más larga que las demás etapas que ocurrirán a lo largo de la PCR, la cual toma entre 30 segundos y 3 minutos [Koshland, 1992]. Esta incubación prolongada tiene como objetivo permitir la desnaturalización total del ADN blanco (ADN proveniente de previa extracción de la muestra) e inactivar eventuales nucleasas y proteasas contaminantes que sean sensibles a la temperatura y, así, propiciar el aumento de la eficiencia de la reacción. Reacciones realizadas con polimerasas del tipo *hot start* (arranque en caliente) requieren una etapa de desnaturalización inicial prolongada, con la finalidad

de activar la enzima y como consecuencia dar inicio a la PCR (van Pelt-Verkuil et al., 2008).

El tiempo y la temperatura de desnaturalización varían con la complejidad de la muestra y con la composición del tampón (*buffer*) en el cual se dá la reacción. Así, la muestra de ADN genómico de plantas y mamíferos requiere mayor tiempo de desnaturalización que la de plasmídeos o genomas de bacterias. De manera similar, los tapones de reacción con altas concentraciones de sales generalmente deben ser elevados a temperaturas más altas para que el ADN se desnaturalice completamente. Terminada la etapa de desnaturalización inicial, la PCR entra en la fase cíclica, en la que las etapas siguientes de desnaturalización van a ocurrir a la misma temperatura de la fase inicial, pero en un tiempo menor, entre 10 segundos y 1 minuto en promedio (van Pelt-Verkuil et al., 2008).

Alineamiento de los cebadores: donde, cómo ocurre y programas para su selección

En esta etapa del ciclo, la temperatura de la reacción se reduce a una temperatura que permita la fusión de los cebadores a la cadena molde, el lapso puede durar entre 10 segundos y 2 minutos. La selección de la temperatura de alineamiento de la PCR se basa en la temperatura de *melting* (T_m) o de fusión de los cebadores (Dieffenbach et al., 1993), la cual se puede calcular con programas de bioinformática. En la condición de *melting* hay un equilibrio entre la formación y la disociación de la cadena dupla que se forma por el apareamiento del cebador con el ADN de cadena sencilla. La T_m es un aspecto clave para tener en cuenta en la selección de las secuencias que compondrán los cebadores de la reacción.

La T_m se define por el tamaño y secuencia de los cebadores, y por la composición del tampón donde ocurrirá la reacción (Markoulatos et al., 2002). El número de enlaces de hidrógeno entre el cebador y el ADN está directamente relacionado con su T_m ; así, moléculas largas y con alto contenido de guanina y citosina tienen mayor temperatura de *melting*. Las altas concentraciones de



sal que se encuentran en algunos tampones aumentan la T_m de los cebadores en la reacción [Markoulatos et al., 2002].

En cuanto a los otros constituyentes de la reacción, si se adicionan agentes desnaturalizantes, como DMSO y formamida, se reduce la T_m . La temperatura de alineamiento utilizada en la reacción es de 3° a 5° C, inferior a la menor temperatura de *melting* de los cebadores, la cual debe, idealmente, quedar en el rango de 55° C a 60° C. De esta forma, se garantiza que haya un balance entre la estabilidad de la cadena dupla, favorecida a temperaturas más bajas, y la astringencia de ese apareamiento, favorecida a temperaturas más altas [Markoulatos et al., 2002].

Para el diseño de un par de cebadores eficaces para una reacción de PCR, se deben considerar los siguientes factores generales [Bustin et al., 2020]:

a) **La temperatura de *melting*:** debe estar lo más cercano posible del rango de la temperatura indicada, y también debe ser próxima entre ambos cebadores [*forward* y *reverse*], sin sobrepasar la diferencia de 5° C.

b) **El tamaño de los cebadores:** debe ser entre 15 y 30 pares de bases, lo suficientemente largos para alinear de forma específica en la secuencia blanco, y lo adecuadamente cortos para mantener la T_m dentro de un rango deseable de temperatura.

c) **Las secuencias de los cebadores:** deben ser analizadas con programas de bioinformática [algunos de ellos se encuentran en la web de forma libre, p. ej., primer 3 web [<https://bioinfo.ut.ee/primer3/>]] para conocer la probabilidad de que estos formen dímeros o estructuras secundarias por complementariedades, lo cual es indeseado, sea dentro de un mismo cebador o entre ambos.

En función de la complejidad del estudio que se llevará a cabo, la mejor estrategia es utilizar programas de bioinformática para la selección e inspección de la secuencia de los cebadores que se van a sintetizar. Cada programa emplea diferentes algoritmos y parámetros en su análisis; por esta razón, los resultados son distintos en cada programa. Sin embargo, todos los



programas examinan la formación de dímeros y de estructuras secundarias en los cebadores, verifican el mejor tamaño del sitio de alineamiento, y también estiman una T_m específica para cada cebador. A continuación, se comparten algunas herramientas en línea que permiten el diseño de cebadores:

- Primer3 [<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>]
- Primer3Plus [<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>]
- Primer Station [<http://ps.cb.k.u-tokyo.ac.jp/index.html>]
- AMUSER [<http://www.cbs.dtu.dk/services/AMUSER/>]
- Oligo Calc [<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>]
- Primer-BLAST NCBI [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>]

A la hora de diseñar los cebadores, se debe considerar la **composición del tampón de la reacción**, ya que puede influir en su T_m . Esa composición se define con más precisión por medio del uso de programas que los vendedores comerciales de las ADN polimerasas ponen a disposición, los cuales tienen en cuenta la composición del tampón de la enzima ofrecida. Las temperaturas de alineamiento sugeridas por estos programas sirven como punto de partida para optimizar la reacción en el laboratorio, que puede variar en función de la muestra [su grado de pureza, presencia de secuencias similares, etc.].

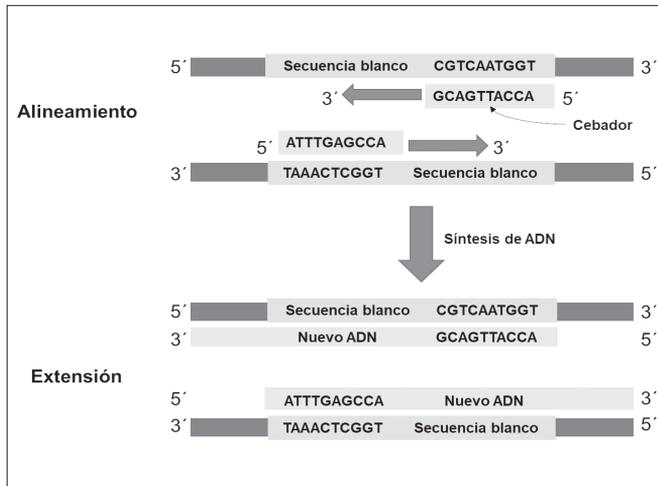
La extensión

Con los cebadores alineados en las secuencias blanco, la reacción es sometida a un nuevo aumento de la temperatura que permite que el ADN polimerasa realice la síntesis de nuevas moléculas de ADN con su máxima eficiencia. En esta fase, desoxirribonucleótidos [dNTPs] complementarios a la cadena molde son incorporados a los extremos 3' de las cadenas nacientes de ADN que se inician con el alineamiento de los cebadores (Figura 25).



Figura 25

Alineamiento de los cebadores a la secuencia blanco y extensión de la nueva secuencia de ADN a través de la enzima



Nota. La ADN polimerasa usa como materia prima los dNTPs.
Fuente: Elaboración propia de las autoras.

La temperatura de la fase de extensión varía entre 68° C y 75° C, según la enzima que se emplea en la reacción. La principal variable de esta etapa es el tiempo, el cual se define con base en el tamaño de las moléculas que serán sintetizadas y en la *procesividad* de la enzima. La procesividad se define como la capacidad de síntesis de una polimerasa antes de que se disocie del ADN molde. Así, cada ADN polimerasa posee una velocidad de síntesis preestablecida que se debe considerar para determinar el tiempo necesario para la producción de nuevas moléculas [Kramer y Coen, 2001]. Terminados los ciclos de la PCR, la reacción es incubada a la temperatura de extensión por un lapso único de 5 a 15 minutos, llamado extensión final. En esta etapa, la ADN polimerasa actúa llenando eventuales terminaciones incompletas en las moléculas sintetizadas, lo cual es más frecuente en reacciones en las que los productos de PCR son moléculas largas y/o con alto contenido de guanina y citosina [van Pelt-Verkuil et al., 2008].

El número de ciclos¹

La reacción de PCR se compone de 25 a 35 ciclos de amplificación, cada uno formado por una etapa de desnaturalización, seguida del alineamiento de los cebadores y la extensión de nuevas cadenas de ADN (Figura 24). De esta forma, las moléculas de ADN producidas en un ciclo sirven como molde para la síntesis de nuevas cadenas en el siguiente ciclo, lo cual permite la amplificación exponencial de la secuencia de ADN deseada.

Básicamente, en un gráfico de productos de cantidad de productos vs. ciclos se visualizarán dos fases: una exponencial, en la que la cantidad de producto aumenta exponencialmente y una fase estacionaria en la que no habrá aumento de la concentración de producto y su valor será estable (Figuras 26).

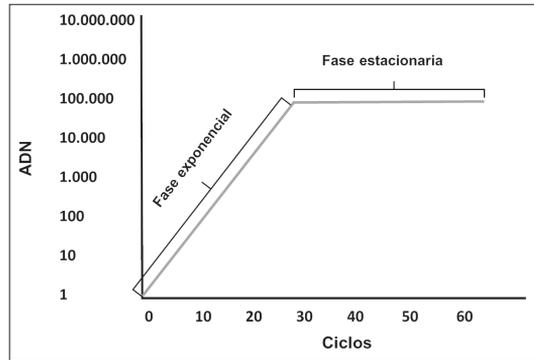
El número de ciclos de la reacción se determina con base en la cantidad de la secuencia blanco dentro de la muestra que se emplee y en la cantidad de ADN deseado al final de la reacción. Así, para poder amplificar secuencias de ocurrencia rara, se puede aumentar el número de ciclos hasta 45. Sin embargo, la acumulación exponencial de los productos de la PCR continúa hasta que se alcance la fase estacionaria, de esta forma, el aumento del número de ciclos no siempre va a permitir obtener mayores cantidades de ADN [Kainz, 2000; Najafov y Hoxhaj, 2017].

¹Para conocer más detalles sobre el protocolo de la técnica, sus materiales, reactivos y concentraciones, ver capítulo "Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa clásica, del libro *Del campo al laboratorio: integración de procedimientos para el estudio de moscas* [Varela y Cadavid, 2018]. Para conocer cómo operar un termociclador, ver el capítulo "Uso del termociclador piko 96 Thermo Scientific" del mismo libro [Cadavid, 2018].



Figura 26

Cantidad de moléculas de ADN como producto de la PCR vs. ciclos



Nota. La fase exponencial, en el gráfico de 0 a 30 ciclos, corresponde a la etapa en la que la concentración de moléculas de ADN de interés crece exponencialmente. En la fase estacionaria, el número de ciclos no influye en el aumento de producto de PCR.

Fuente: Elaboración propia de las autoras.

Entre las principales hipótesis formuladas para explicar la ocurrencia de una fase estacionaria en los ciclos finales de la PCR, se destacan:

- Agotamiento de desoxirribonucleótidos y cebadores.
- Inhibición de la actividad polimerasa por exceso de pirofosfato, el cual es un subproducto de las ligaciones fosfodiéster formadas entre los nucleótidos que componen cada una de las cadenas de ADN.
- Inactivación térmica de la polimerasa después de los repetidos ciclos de desnaturalización de la reacción.
- Alineamiento preferencial entre las cadenas de ADN sintetizadas, presentes en gran cantidad, y disminución del apareamiento de las cadenas con las cadenas de cebadores.
- Secuestro del ADN polimerasa por las cadenas de ADN sintetizadas que se encuentran alineadas entre sí y reducen la concentración de enzima libre para la síntesis de nuevas moléculas.

Análisis de los productos de PCR en gel²

Uno de los métodos más empleados para el análisis de los productos de PCR es la electroforesis en gel de agarosa. Esta metodología permite separar las moléculas de ADN por tamaño a través de la aplicación de una corriente eléctrica a una solución acuosa estabilizada en la forma de una matriz porosa. El principio de la electroforesis usado para la separación del ADN se basa en la carga negativa global de estas moléculas, debido a los grupos fosfato presentes en los ácidos nucleicos. Así, la aplicación de la corriente eléctrica hace que las moléculas migren hacia el polo positivo [Raynie, 2000].

En la electroforesis, las muestras de ADN son depositadas en un gel que forma una red por donde se desplazan las moléculas. Este gel, que puede ser de agarosa o poliacrilamida, queda sumergido en un tampón que ayuda a la conducción de la electricidad por el sistema. Las moléculas adoptan una estructura conformacional sencilla en las condiciones de pH y fuerza iónica utilizadas, y así ellas migran por el gel en una velocidad proporcional a su tamaño, es decir, en función del número de bases que las componen [Raynie, 2000]. En el caso de moléculas circulares, como plásmidos, la velocidad de migración en el gel está menos relacionada con el tamaño de la molécula y más con su grado de doblamiento en la solución. En una muestra, las moléculas de ADN circular generalmente se encuentran en su forma relajada, torcida y super-torcida, y migran con diferentes velocidades en una electroforesis en gel. Para que sea posible analizarlas con precisión, se pueden linealizar previamente por medio de la acción de enzimas de restricción que, de este modo, posibilitan la verificación inequívoca del tamaño (en pares de base) de estas moléculas [Raynie, 2000].

La composición del gel también influye en la velocidad de desplazamiento de las moléculas de ADN: mientras que en redes más cerradas se dificulta el

² Para conocer más detalles sobre el protocolo de la técnica, sus materiales, reactivos y concentraciones, ver capítulo "Electroforesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) en gel de agarosa", del libro *Del campo al laboratorio: integración de procedimientos para el estudio de moscas* [Pérez y Gómez, 2018].



paso de moléculas más grandes, redes más abiertas permiten la migración con mayor velocidad, pero con un menor poder de separación de moléculas con tamaño cercano [Lee et al., 2012]. Así, la selección de la matriz utilizada y su concentración se harán con base en el tamaño de las moléculas que se desea examinar. En general, se usa agarosa para separar fragmentos que tienen entre 50 y 20.000 pares de base [pb] de tamaño, mientras que la poliacrilamida es la matriz que se escoge para análisis de fragmentos más pequeños, que tienen entre 5 y 1.000 pares de base [Chrumbach y Rodbard, 1971; Lee et al., 2012]. Por su mayor capacidad de resolución, la poliacrilamida es capaz de separar fragmentos que difieren por apenas algunos pares de bases, lo cual no es posible en geles de agarosa [Chrumbach y Rodbard, 1971].

Dentro de los rangos de resolución, la concentración de ambas matrices en el gel también se define con base en el tamaño de las moléculas de ADN que se analicen. Para geles de agarosa, la concentración de este polímero puede variar de 0,3 % a 2,5 %; la concentración de poliacrilamida en los geles puede variar entre 3,5 % a 20 %. De forma general, mientras más concentrado es el gel, mayor es la capacidad de separación de moléculas con tamaños cercanos. Por ejemplo, un gel de agarosa de 0,5 % ayuda a separar moléculas de 1.000-30.000 pb, mientras que uno de 2 %, moléculas de 50-2.000 bp.

Los tampones más usados para electroforesis de ADN son el TAE, compuesto por Tris, acetato y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y el TBE [Tris, borato y EDTA]. El Tris es responsable del mantenimiento del pH de la solución, el acetato y el borato, de la determinación del pH y el mantenimiento de la corriente eléctrica, y el EDTA, de quelar iones que puedan actuar como cofactores de eventuales nucleasas contaminantes. A pesar de presentar mayor capacidad tamponante, el TBE se debe evitar cuando se quiera recuperar el ADN del gel para utilizarlo en protocolos que involucran el uso de enzimas, dado que el borato puede llevar a la inhibición de la reacción. El voltaje usado en la corrida se determina por la distancia entre los electrodos en la cubeta de electroforesis, la cual debe ser de 1 a 5 voltios por centímetro de distancia [Lee et al., 2012].

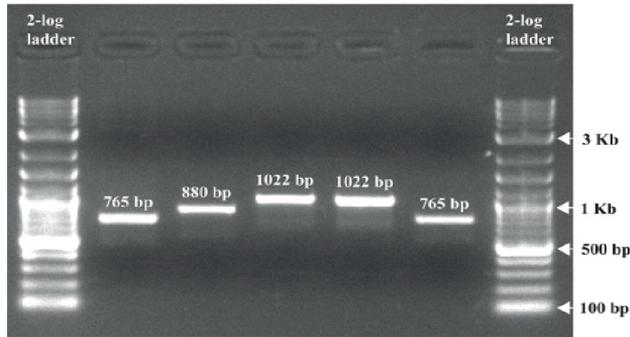


Las moléculas de ADN del mismo tamaño migran juntas por el gel, lo que genera formación de bandas (Figura 27). Para que sea posible establecer el tamaño de las moléculas que forman una determinada banda, la muestra debe migrar paralelamente a un marcador de peso molecular (*ladder*). Estos marcadores generalmente se adquieren por medio de una mezcla de fragmentos de PCR de tamaños conocidos o mediante la digestión enzimática de una molécula de ADN, que produce fragmentos con tamaños crecientes y que se pueden conseguir comercialmente. Al comparar la velocidad de migración de la banda obtenida con los patrones producidos por los marcadores moleculares, es posible hallar el tamaño de la molécula que se analiza. Para visualizar estas moléculas, el gel, el tampón de corrida o las muestras se deben mezclar con un colorante fluorescente que tenga afinidad por los ácidos nucleicos. La visualización de las bandas de ADN se posibilita a través de la fluorescencia que emite el colorante cuando es expuesto a la luz ultravioleta.

Entre los colorantes utilizados, el bromuro de etidio es usado ampliamente por la buena calidad de las visualizaciones, sin embargo, también se conoce por producir daños en el ADN y, por tanto, en la salud de las personas que lo manipulan (Cariello et al., 1988). Se han desarrollado otros agentes, pensados para ser más seguros para la salud y el medio ambiente, y también se emplean con buenos resultados, como el Syber® Green, GelGreen™, SYBR™ safe, SafeView, GelRed™, Ez-vision®, entre otros (Dragan et al., 2012; Hall, 2019; Singer et al., 1999).

Figura 27

Gel de electroforesis



Nota. Gel de agarosa al 1,5 % con bromuro de etidio visualizado después de correr a 100 V por una hora y exponer a luz UV. Las bandas formadas son producto de la fluorescencia del bromuro de etidio ligado a las moléculas de ADN. Los carriles 1 y 7 poseen el marcador de peso molecular *2 log DNA ladder* (0,1 - 10 kb), 2 a 6 corresponden a ADN con diferente peso molecular. Fuente: Tomado de Lee et al. [2012].

Referencias

- Bustin, S. A., Mueller, R., y Nolan, T. [2020]. Parameters for Successful PCR Primer Design. In: R. Biassoni y A. Raso [Eds.], *Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols* [pp. 5-22]. Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_2
- Cadavid, I. [2018]. Uso del termociclador piko 96 Thermo Scientific. En: *Del campo al laboratorio: Integración de procedimientos para el estudio de moscas* [pp. 117-125]. Medellín: Sello Editorial Publicar-T. Tecnológico de Antioquia.
- Cariello, N. F., Keohavong, P., Sanderson, B. J., y Thilly, W. G. [1988]. DNA damage produced by ethidium bromide staining and exposure to ultraviolet light. *Nucleic Acids Research*, 16(9), 4157.

- Chrambach, A., y Rodbard, D. [1971]. Polyacrylamide gel electrophoresis. *Science [New York, N.Y.]*, 172(3982), 440-451. <https://doi.org/10.1126/science.172.3982.440>
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., y Dveksler, G. S. [1993]. General concepts for PCR primer design. *Genome Research*, 3(3), S30-S37.
- Dragan, A. I., Pavlovic, R., McGivney, J. B., Casas-Finet, J. R., Bishop, E. S., Strouse, R. J., Schenerman, M. A., y Geddes, C. D. [2012]. SYBR Green I: Fluorescence properties and interaction with DNA. *Journal of Fluorescence*, 22(4), 1189-1199. <https://doi.org/10.1007/s10895-012-1059-8>
- Hall, A. C. [2019]. A comparison of DNA stains and staining methods for Agarose Gel Electrophoresis. *BioRxiv*, 568253. <https://doi.org/10.1101/568253>
- Kainz, P. [2000]. The PCR plateau phase: towards an understanding of its limitations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1494(1), 23-27. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00200-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00200-1)
- Koshland, D. E. [1992]. The molecule of the year [Editorial]. *Science*, 258(5090), 1861. <https://doi.org/10.1126/science.1470903>
- Kramer, M. F., y Coen, D. M. [2001]. Enzymatic amplification of DNA by PCR: Standard procedures and optimization. In: *Current Protocols in Immunology, Chapter 10*, Unit 10.20. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1020s24>
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., y Kim, Y. H. [2012]. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 62. <https://doi.org/10.3791/3923>
- Markoulatos, P., Siafakas, N., y Moncany, M. [2002]. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(1), 47-51. <https://doi.org/10.1002/jcla.2058>
- Mullis, K. B. [1990]. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-61, 64-65. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>

- Najafov, A., y Hoxhaj, G. [2017]. *PCR guru: An ultimate benchtop reference for molecular biologists*. Academic Press. <http://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=4749913>
- Pérez, A., y Gómez, L. M. [2018]. Electroforesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) en gel de agarosa. En: *Del campo al laboratorio: Integración de procedimientos para el estudio de moscas* [pp. 163-169]. Medellín: Sello Editorial Publicar-T. Tecnológico de Antioquia.
- Raynie, D. E. [2000]. Andrews AT [1986] *Electrophoresis Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications*, 2nd edn Oxford: Oxford University Press.
- Camilleri P [1997]. *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, 2nd edn. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Singer, V. L., Lawlor, T. E., y Yue, S. [1999]. Comparison of SYBR® Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 439(1), 37-47. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00172-7](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00172-7)
- Templeton, N. S. [1992]. The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. *Diagnostic Molecular Pathology: The American Journal of Surgical Pathology, Part B*, 1(1), 58-72. <https://doi.org/10.1097/00019606-199203000-00008>
- Van Pelt-Verkuil, E., van Belkum, A., y Hays, J. P. [Eds.]. [2008]. The PCR in Practice. In: *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification* [pp. 17-23], Springer, Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6241-4_3
- Varela, A., y Cadavid, I. [2018]. Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa clásica. En: *Del campo al laboratorio: Integración de procedimientos para el estudio de moscas* [pp. 105-116]. Medellín: Sello Editorial Publicar-T. Tecnológico de Antioquia.
- Yazdi, S. M. H. T., Kiah, H. M., Garcia-Ruiz, E., Ma, J., Zhao, H., y Milenkovic, O. [2015]. DNA-Based Storage: Trends and Methods. *IEEE Transactions on Molecular, Biological and Multi-Scale Communications*, 1(3), 230-248. <https://doi.org/10.1109/TMBMC.2016.2537305>

Capítulo

4

PCR cuantitativa: qPCR, RT-qPCR y protocolo de uso de Rotor Gene Q (QIAGEN)

.....
Isabel Cristina Cadavid Sánchez

Ingeniera biológica

Msc. en Biotecnología, PhD. Biología celular y molecular

Investigadora, Grupo de Investigación Bioforense

Tecnológico de Antioquia – I. U.

Centro de Biotecnología

Universidad Federal de Rio Grande do Sul

Introducción

La metodología de PCR cuantitativa o en tiempo real [qPCR] fue propuesta en 1996 por Heid y sus colaboradores [Heid et al., 1996]. Esta técnica permite la detección confiable y la medición de productos generados durante cada ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa [PCR]; la concentración final de estos productos será directamente proporcional a la cantidad de molde antes de comenzar el proceso de PCR [Adams, 2020].

Con la qPCR es posible estudiar ADN [ácido desoxirribonucleico] o ARN [ácido ribonucleico]. Para analizar el ARN, primero se debe copiar en una molécula de ADN o ADNc [ADN copia], por medio de una retro-transcriptasa [RT] que utiliza la molécula de ARN como molde para producir una copia de la secuencia en una molécula de ADN. Por lo tanto, cuando se comienza con ARN, el proceso se conoce como RT-qPCR: primero se realiza una retrotranscripción y luego una PCR cuantitativa.



La qPCR tiene los mismos principios básicos de la PCR convencional, la diferencia entre las dos es que en la qPCR es posible monitorear la amplificación de ADN en tiempo real gracias a la detección constante de la fluorescencia emitida a lo largo de la reacción. La fluorescencia es emitida por moléculas que se agregan en la reacción y tienen afinidad por el ADN de la muestra evaluada. Estas moléculas incluyen colorantes que se unen específicamente al ADN de doble cadena [dsDNA], o moléculas de colorante unidas a cebadores o sondas de PCR que se hibridan con productos de PCR durante la amplificación [Ginzinger, 2002].

Los dispositivos de qPCR detectan la fluorescencia de cada ciclo de la reacción y esta se convierte en valores numéricos que se correlacionan con la cantidad de ADN en la muestra. Los equipos de qPCR cuentan con un *software* que construye un gráfico con esta información, el cual traza la fluorescencia en el eje y contra el número de ciclo en el eje x, y representa la acumulación del producto durante la reacción de PCR. Por lo tanto, medir la cantidad de producto en cada ciclo permite calcular con alta precisión la cantidad de ADN inicial en la muestra. En la qPCR, la amplificación y la detección tienen lugar en un solo tubo, sin necesidad de manipular la muestra después de la PCR. Este método es muy útil para cuantificar ARN mensajero expresado a niveles muy bajos [Giulietti et al., 2001].

La cuantificación de los ácidos nucleicos por qPCR tiene muchas aplicaciones en el área de las investigaciones biológicas. Por ejemplo, para medir la expresión génica [cantidad de ARN transcritos a partir de un gen] y monitorear las respuestas biológicas a varios estímulos, como el efecto de tratamientos médicos y detección de enfermedades [al comparar células de paciente con cáncer y otro sano]. En agronomía, es útil para evaluar el efecto de estrés biótico o abiótico en las plantas, como presencia de un patógeno, falta de agua, exceso de luz o baja temperatura [Gao et al., 2019; Lim et al., 2020; Lynch y Fleming, 2019; Zare et al., 2019; Zeng, A. et al., 2020]. En el área de la salud, el análisis cuantitativo de genes [ADN] se ha utilizado para determinar la cantidad en el genoma de un gen marcador de una enfermedad, como en el caso del gen HER2 [receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico

humano), que se amplifica en cerca del 30 % de los tumores de mama [Gheni y Westenberg, 2020]. También se ha utilizado para detección de virus, como el virus de la inmunodeficiencia humana [VIH] y el SARS-CoV-2 causante del coronavirus [Désiré et al., 2001; Lim et al., 2020]. En ciencias forenses, la qPCR ha permitido determinar la edad biológica de una persona [Castagnetta et al., 2020; Ward et al., 2004] y calcular la edad de moscas en su estado larval, como evidencia del intervalo postmórtem [Zajac et al., 2018].

Se han descrito muchos métodos para el análisis cuantitativo de ácidos nucleicos, a saber: *Northernblot*, hibridación *in situ*, ensayos de protección de RNasa, y matrices de ADNc; pero la qPCR ha demostrado ser una herramienta poderosa para este análisis y permite el estudio de cantidades iniciales muy pequeñas, lo cual ha hecho posible llevar a cabo experimentos que no se podrían hacer con métodos tradicionales de cuantificación [Ginzinger, 2002; Udvardi et al., 2008].

Instrumentos de PCR en tiempo real

Hay muchos modelos diferentes de instrumentos de PCR en tiempo real accesibles (p. ej., Applied Biosystems, Bio-Rad y Rotor gene de Qiagen), aunque tienen características básicas similares que incluyen: un termociclador, una fuente de excitación que activa los colorantes fluorescentes, un detector de las emisiones fluorescentes y un computador con un *software*.

La fuente de excitación puede ser una lámpara halógena, láser o LED, y cada una emite a diferentes longitudes de onda. Por lo tanto, la elección de esta fuente va a determinar el tipo de agente fluorescente que se puede usar en la reacción. El láser, por ejemplo, es el más restringido y emite a una sola longitud de onda. La lámpara halógena tiene un amplio espectro de emisión, por lo que es la más usada entre los instrumentos qPCR. Los LED tienen espectros reducidos, pero los instrumentos que los usan emplean múltiples tipos de LED con excitación a diferentes longitudes de onda. Entonces, cuando el dispositivo tiene una fuente de amplio espectro debe combinar el uso de filtros para limitar la emisión a una longitud de onda específica. Luego, una vez que la fuente emite luz, esta pasará a través de un filtro, excitará un fluoróforo



específico [dentro de la reacción], y este último emitirá una fluorescencia que se identificará en el detector [Alaruri, 2014; Josefsen, 2012].

Los detectores pueden ser de varios tipos, como fotodiodos y fotomultiplicadores, que son sensores que convierten la luz emitida en una carga eléctrica. También existen cámaras CCD que convierten la luz en datos digitales, que son las más empleadas en los dispositivos de qPCR [Alaruri, 2014; Josefsen, 2012].

Además, cada equipo debe tener un termociclador para controlar la temperatura en las etapas de desnaturalización [90° C], alineamiento del cebador [55 a 65° C] y extensión [72° C], y construir una curva de disociación [aumento gradual de 50 a 95° C]. El bloque térmico [estructura donde las muestras son colocadas y que sufre cambios de temperatura] puede ser fijo o intercambiable. Los bloques están disponibles para aceptar una variedad de placas de reacción de PCR: placas de 48, 96, 384 o 3.072 pozos, y de 384 micropocillos. Los instrumentos de PCR en tiempo real también tienen un software para la recolección y análisis de datos [Giulietti et al., 2001; Schmittgen y Livak, 2008].

Al realizar un experimento de qPCR se deben considerar los siguientes puntos:

La selección de los fluoróforos (intercalantes o sondas)

Agentes intercalantes

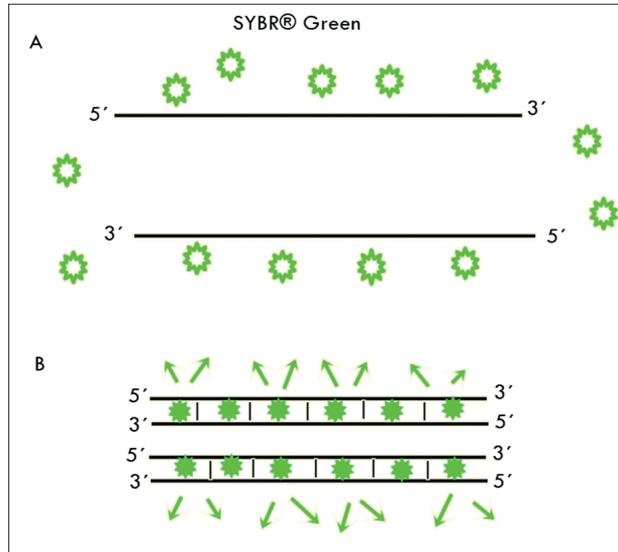
Hay colorantes fluorescentes que se unen a la doble cadena de ADN [dsDNA], como el SYBR® Green I, el cual, después de ser excitado con longitudes de onda de 494 nm, emite luz a 521 nm. Los agentes intercalantes son los más utilizados por su facilidad de uso, costo, eficiencia y detección genérica. Su desventaja es que se unen a cualquier dsDNA, y al unirse a productos de reacción no específicos pueden dar lugar a una sobreestimación de la concentración de la molécula de interés. El colorante SYBR® Green I se une al surco menor de cualquier ADN de doble cadena. La excitación del



SYBR® Green, que se encuentra ligado al ADN, produce una señal fluorescente mucho más fuerte en comparación con el colorante que no está unido al ADN [Figura 28] [Giulietti et al., 2001].

Figura 28

PCR con el colorante SYBR® Green



Nota. A. Cuando el ADN está desnaturalizado, las moléculas de SYBR® Green no se ligan a este y la fluorescencia será baja. **B.** En la presencia de ADN de cadena dupla el SYBR® Green se liga y su fluorescencia aumenta unas 1000 veces. Fuente: Elaboración propia de la autora.

Un experimento con colorantes SYBR® Green generalmente incluye los reactivos de una PCR convencional con dos cebadores específicos a la molécula de interés y el colorante. En los primeros ciclos de PCR se observa una línea de base horizontal que corresponde a la fluorescencia base del colorante [Figura 31]. Si el ADN de interés está presente en la muestra, cuando el producto de PCR se acumula la señal de amplificación se hará visible, y el gráfico pasará a formar una línea exponencial [Ponchel et al., 2003; Potoczniak et al., 2020].

Sistema de sondas

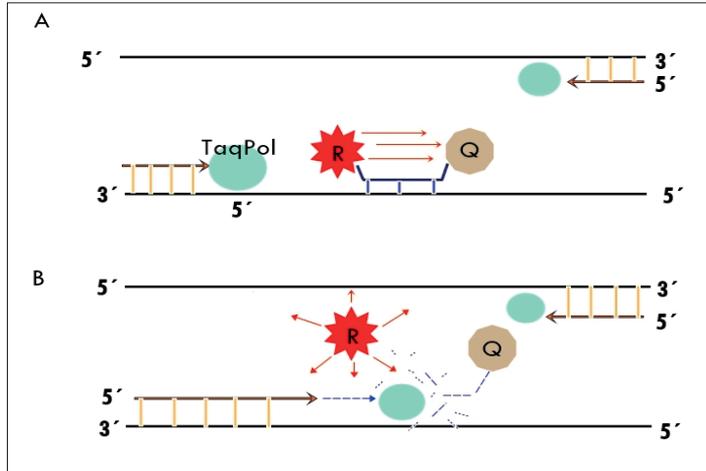
Sondas *Taqman*

Una de las técnicas que se puede usar para detectar y cuantificar el producto de PCR se basa en el fenómeno llamado transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET, por sus siglas en inglés). En FRET, la emisión de un colorante fluorescente puede reducirse, en gran medida, por la presencia de otro colorante llamado inhibidor (*quencher*), para ello, ambos deben estar muy cerca. Las sondas se diseñan complementarias a la secuencia blanco, con un colorante FAM [carboxifluoresceína] denominado reportero, en el extremo 5' de la secuencia, y un TAMRA (tetrametilrodamina), *quencher*, en el extremo 3' [Liu et al., 2006] [Figura 29].

Cuando la sonda está intacta, se produce transferencia de energía fluorescente, porque la emisión de fluorescencia del reportero [R] es absorbida por el *quencher* [Q] [Giulietti et al., 2001] [Figura 29A]. Durante la PCR, los cebadores y la sonda de hibridación fluorescente se alinean a la secuencia blanco y, en la fase de extensión, la polimerasa extiende el cebador en la región aguas arriba (*upstream*) de la sonda [Figura 29A]. Si la sonda está directamente hibridada al ADN, la actividad nucleolítica 5'-3' de la polimerasa escinde la sonda, la cual libera un fragmento que contiene el colorante reportero. Cuando la sonda se escinde, la emisión del reportero ya no se transfiere eficientemente al *quencher*, lo que resulta en un aumento en la emisión de fluorescencia del reportero y la detección por parte del equipo [Navarro et al., 2015] [Figura 29B].

Figura 29

Técnica basada en sondas Taqman



Nota. A. La sonda que es complementaria al ADN de interés posee una molécula reportera [R] y una inhibidora o *quencher* [Q]. Mientras la sonda se encuentre intacta, la fluorescencia del reportero será absorbida por el *quencher* y no será detectada. En rosa, el cebador que será usado para sintetizar una nueva molécula de ADN. **B.** En turquesa, la Taq polimerasa que sintetiza una nueva cadena de ADN y con su actividad nucleasa cortará la sonda y liberará la molécula reportera. La fluorescencia del reportero será emitida y detectada por el equipo. Fuente: Elaboración propia de la autora.

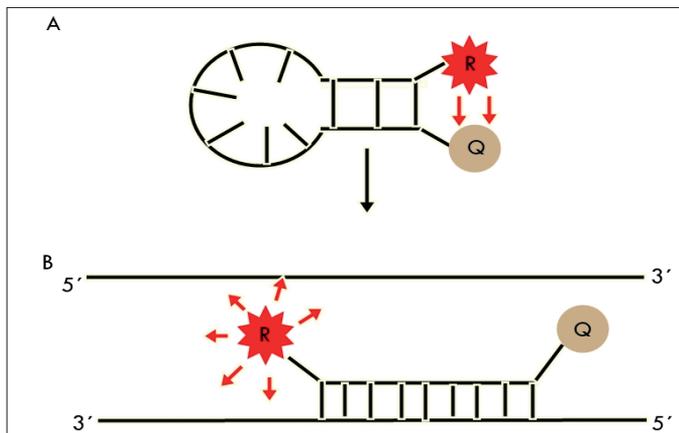
En los primeros ciclos de PCR solo se detecta una señal baja del reportero. Esta señal se denomina línea de base (*baseline*), se resta automáticamente en el *software* de PCR y se convierte en cero. Si la muestra contiene la secuencia de interés, la cantidad de sonda escindida aumenta y la señal de fluorescencia se amplificará y, por lo tanto, dejará la línea de base y pasará a una fase exponencial (Figura 31). El punto en el que la señal amplificada se hace visible está inversamente relacionado con la cantidad inicial de la muestra de interés [Castagnetta et al., 2020; Nagy et al., 2017].

Sondas moleculares del tipo Beacons

También son oligonucleótidos de cadena sencilla que, por su estructura, tienen una zona de apareamiento interno y, por lo tanto, forman una especie de pinza. En presencia del amplicón, la sonda se abre y se une preferencialmente a este y produce una emisión de fluorescencia. Una sonda *molecular beacons* tiene la siguiente estructura: una región complementaria al amplicón (en su rotación), una complementariedad interna en el cuello (que la mantiene cerrada) y los fluoróforos en sus extremos, el donante [R] en el 5' y el aceptor en el [Q] 3' [Figura 30A]. Cuando la sonda se encuentra cerrada, el fluoróforo del 3' evita la emisión de fluorescencia por el 5', lo que no ocurre cuando se une al amplicón [Giulietti et al., 2001; Kim et al., 2008; Navarro et al., 2015] [Figura 30B].

Figura 30

Estructura sondas tipo molecular beacons



Nota. A. Sonda cerrada. En este estado, la proximidad entre las moléculas reportera y *quencher* hace que la fluorescencia sea absorbida y no sea detectada por el equipo. **B.** Sonda alineada al ADN de interés y por lo tanto abierta. De esta forma, la fluorescencia que emite el reportero no es absorbida por el *quencher* y puede ser detectada por el equipo. Fuente: Figura propia de la autora.

Colorantes de referencia

Los colorantes de referencia pasivos se usan con frecuencia en qPCR para normalizar la señal de fluorescencia de los colorantes reporteros y corregir las fluctuaciones de la fluorescencia que no son causadas por la PCR. Estas fluctuaciones están presentes de un pozo a otro de la placa de PCR, debido a que al pipetear la muestra de ADN y/o los reactivos, pozo por pozo, habrá cambios en su concentración o en su volumen. También se emplean para corregir variaciones en el escaneo del instrumento (ruido del dispositivo, variaciones en la excitación y detección).

La mayoría de los instrumentos usan el colorante ROX™ como referencia pasiva, porque ROX™ no afecta la reacción qPCR y tiene una señal de fluorescencia que se puede distinguir de la del reportero o *quencher* utilizado. Una excepción es el sistema de instrumentos Bio-Rad iCycler iQ®, que utiliza *Fluorescein* como colorante de referencia [Wang, 2016].

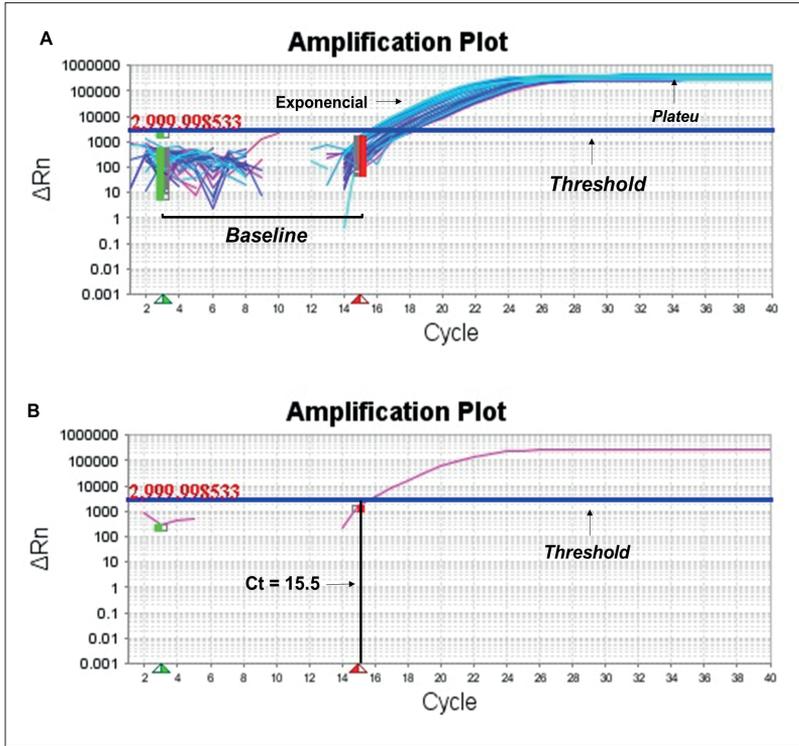
Términos claves para entender un análisis de qPCR

Para el análisis de los resultados se deben tener en cuenta los siguientes parámetros: *Baseline*, *threshold*, Ct o ciclo de cuantificación, Delta R (ΔR_n), temperatura de disociación y eficiencia [E] (Figura 31).



Figura 31

Gráfico del resultado de la amplificación por qPCR



Nota. En el eje x, los ciclos de PCR, en el eje y la fluorescencia. **A.** La figura identifica los conceptos de *baseline* [fase entre los ciclos 3 a 15], *threshold* [línea horizontal azul] de fase exponencial [fase posterior al ciclo 15 en el gráfico, en la que se puede calcular la pendiente de la curva y eficiencia de la reacción] y estacionaria [fase donde no hay más aumento de moléculas de ADN, en inglés *Plateu*]. **B.** ΔRn que corresponde a la fluorescencia detectada en cada ciclo; Ct, ciclo en donde la fluorescencia tiene un cambio significativo, que se considera en los cálculos de cuantificación. Fuente: Elaboración propia del autor.

Establecimiento de la línea base o *Baseline*

La línea de base [*baseline*] se refiere al nivel de señal de fluorescencia en la fase inicial de las reacciones de qPCR, generalmente entre los ciclos tres y quince (Figura 31). En estos primeros ciclos habrá una fluorescencia de fondo causada por los fluoróforos que no están unidos al ADN, más una fluorescencia del producto amplificado. Como este producto aún es muy pequeño, la intensidad de la señal que emite será muy baja, por lo tanto, la emisión de las muestras no va a exceder la fluorescencia de la solución y no será posible distinguirla (Bregu et al., 2013). La línea de base se determina empíricamente en el gráfico de amplificación para cada reacción, por el usuario o automáticamente por el *software* del equipo. Esto se debe ajustar cuidadosamente para precisar el ciclo umbral (Ct). Para determinar el Ct se deben tener en cuenta suficientes ciclos de amplificación, de modo que se pueda eliminar la fluorescencia de fondo de los primeros ciclos, pero no se deben incluir los ciclos en los que la señal de amplificación comienza a aumentar por encima del fondo. Para comparar diferentes reacciones o experimentos, la línea de base debe ser igual para todas las reacciones (Dash et al., 2020; Giulietti et al., 2001).

El significado y la determinación del punto de corte o *threshold*

Cuando la amplificación continúa, el número de moléculas de ADN detectables aumenta y la reacción llegará a una fase exponencial. El umbral [*threshold*] (Figura 31) es el nivel de la señal de fluorescencia que refleja un aumento estadísticamente significativo por encima de la señal de base [*baseline*] calculada. Se ajusta para distinguir la señal de amplificación relevante de la señal de fondo. Por lo general, el *software* del instrumento de qPCR ajusta automáticamente el *threshold* a 10 veces la desviación estándar del valor de fluorescencia de la *baseline*, aunque el usuario puede ajustar la posición del *threshold* en cualquier punto de la fase exponencial de la PCR. Estos valores se definen de manera diferente en el software del fabricante, por lo que es importante realizar todos los experimentos en el mismo dispositivo para tener mejores comparaciones (Dash et al., 2020; Giulietti et al., 2001).



Definición de Ct y su importancia en la qPCR

Dentro de la fase exponencial (Figura 31B), hay un punto donde se realiza la cuantificación del ADN, de allí obtiene el nombre de ciclo de cuantificación. Este punto se conoce como Cq (*quantification cycle*) o también como Ct (*threshold cycle*) por ciclo umbral, debido a que Ct es el número del ciclo en el que la señal de fluorescencia de la reacción cruza el umbral (Figura 31). Ct se usa para calcular el número de copias iniciales de ADN, y este valor siempre será inversamente proporcional a la cantidad de ADN en la muestra. Por lo tanto, cuanto mayor es el número inicial de moléculas de ADN específicas en la muestra, más rápido aumentará la fluorescencia durante los ciclos y menores serán los valores de Ct. Por ejemplo, al comparar los resultados de qPCR de dos muestras que contienen diferentes cantidades de ADN de interés, si una muestra tiene el doble de la cantidad inicial de la otra, ésta producirá un Ct un ciclo antes, si se supone que la PCR opera al 100 % de eficiencia [la cantidad de producto se duplica perfectamente durante cada ciclo] en ambas reacciones [Giulietti et al., 2001; Schmittgen y Livak, 2008].

El valor Delta Rn (ΔR_n) y la fluorescencia detectada

El valor Rn [reportero normalizado] es la señal de fluorescencia detectada durante los ciclos de PCR, producida por el fluoróforo reportero y normalizada con la señal del colorante de referencia pasiva [Ecuación 3]. Es un valor que se calcula en cada ciclo de la PCR y para cada una de las muestras. Por ejemplo, si el colorante es el SYBR® Green, el valor de su fluorescencia en una muestra se divide por la señal del colorante de referencia pasiva [ROX]. El valor Delta Rn (ΔR_n) es igual al valor Rn de una reacción experimental menos el valor Rn de la señal de línea de base generada por el instrumento. Así, en una gráfica de amplificación, el valor Delta Rn se representa en el eje y con los ciclos en el eje x (Figura 31). Este parámetro calcula de manera confiable la magnitud de la señal específica generada a partir de un conjunto de condiciones de PCR [Giulietti et al., 2001].

(3) Rn muestra = Fluorescencia de la muestra / Fluorescencia de la referencia pasiva

(4) ΔRn = Rn muestra – Rn *baseline*

Análisis de la curva de *melting* (curva de disociación): una metodología que permite detectar productos inespecíficos

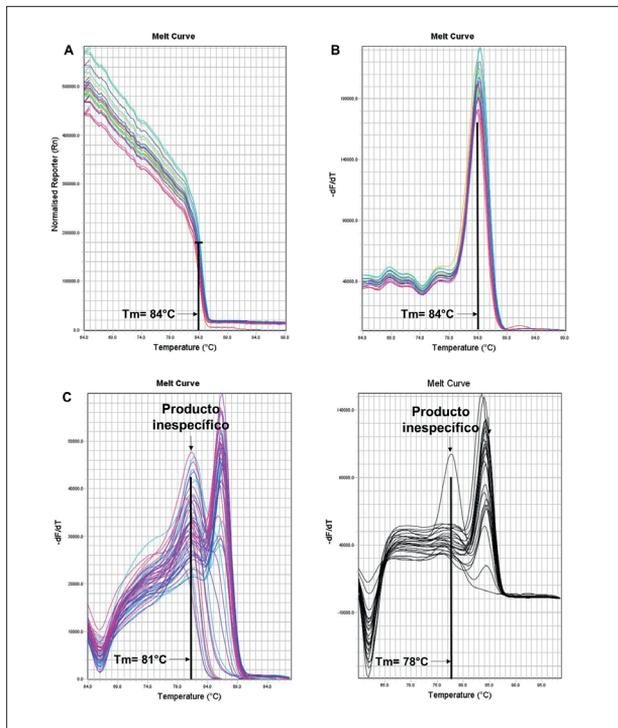
En un análisis de la curva de *melting*, se evalúan las características de disociación del ADN de doble cadena durante el calentamiento. El objetivo principal es inspeccionar la presencia de fragmentos inespecíficos en la reacción (Figura 32C). Cuando la temperatura aumenta, el ADN comienza a disociarse, y la temperatura a la cual el 50 % del ADN se encuentra desnaturalizado se conoce como temperatura de fusión o T_m , lo cual puede variar de una molécula de ADN a otra, dado que se ve afectada por la longitud de la molécula, su complementariedad y el contenido de guanina y citosina. Esto se debe a que el apareamiento de las bases guanina y citosina tiene tres enlaces de hidrógeno, mientras que los pares de las bases adenina y timina tienen solo dos. Así, el ADN con un mayor contenido de guanina y citosina tendrá una temperatura de fusión más alta y necesitará más energía para su separación que el ADN con un mayor contenido de adenina y timina [Lalonde et al., 2013; Pryor y Wittwer, 2006].

La disociación de dos cadenas de ADN, dependiente de la temperatura, se puede evaluar por medio de un fluoróforo intercalante de ADN. En el caso de SYBR[®] Green, la disociación de las cadenas de ADN lleva a la liberación del colorante y, por lo tanto, a la reducción de la fluorescencia (ver ítem sobre agentes intercalantes). Así, una curva de fusión representa el cambio observado en la fluorescencia [Lalonde et al., 2013; Pryor y Wittwer, 2006].

La fluorescencia se grafica contra la temperatura (Figura 32A) y, después, la mudanza en la fluorescencia sobre el cambio de temperatura [$-\Delta F / \Delta T$] se grafica contra la temperatura (Figura 32B), para obtener una visión clara de la dinámica de fusión. La T_m será equivalente a la temperatura máxima, es decir, a la del pico que se forma. El examen de la curva de fusión después de la amplificación es una forma simple de verificar los dímeros de

primer y garantizar la especificidad de la reacción de PCR en tiempo real. La caracterización de los productos de reacción [por ejemplo, dímeros vs. amplicones] a través del análisis de la curva de fusión reduce la necesidad de electroforesis en gel [Lalonde et al., 2013; Pryor y Wittwer, 2006].

Figura 32
Curva de melting



Nota. A. Gráfico de la fluorescencia [Rn] contra la temperatura. Disminución de la fluorescencia con relación al aumento de temperatura. El punto de inflexión de la curva [en este ejemplo, es el punto donde la temperatura alcanzó 84° C] representa el valor de la temperatura de *melting* [Tm]. **B.** Gráfico del cambio en la fluorescencia sobre el cambio de temperatura [- $\Delta F/\Delta T$] contra la temperatura. La Tm se calcula identificando el pico de la curva **C.** Ejemplos de dos curvas de *melting* de PCR con productos inespecíficos. Los picos formados a 81° C [gráfico a la izquierda] y 78° C [gráfico a la derecha] se deben a la presencia de productos con un Tm diferente al Tm de la muestra de interés con pico a 85° C. Fuente: Elaboración propia de la autora.

Para realizar el cálculo de la curva de fusión, el instrumento de PCR en tiempo real se puede programar para incluir un perfil de calentamiento inmediatamente después del protocolo del ciclo de amplificación. Una vez completada la amplificación, el dispositivo vuelve a calentar los productos amplificados (aumento gradual de 50 a 95° C) para obtener los datos de la curva de fusión. La mayoría de las plataformas de instrumentos de PCR en tiempo real incorporan esta característica en sus paquetes de análisis.

La eficiencia de la reacción de PCR

La eficiencia (E) de amplificación se expresa como un valor entre 1-2, por lo tanto, se define como “la duplicación del producto de PCR en cada ciclo”. Esta se calcula a partir de la pendiente (*slope*) de la curva de amplificación, en la fase exponencial. Idealmente, la eficiencia de la PCR es 2, lo que significa que en cada ciclo térmico la cantidad del molde se duplica, esto también se llama PCR 100 % eficiente. Cuando el valor es de 1, significa que no hay amplificación. En la práctica, el rango aceptable de eficiencia es de 90 - 110 % para la validación del ensayo [Ruijter et al., 2009; Schefe et al., 2006; Svec et al., 2015].

La eficiencia global de una PCR en tiempo real depende de las eficiencias individuales de la reacción de la retro-transcriptasa reversa (RT) y la reacción de amplificación por PCR. La eficiencia de la RT está determinada por el porcentaje de ARN que se convierte en ADNc. Las bajas tasas de conversión pueden afectar la sensibilidad de la PCR, y la variación en el porcentaje de conversión entre las muestras es lo que más puede perjudicar el análisis [Ruijter et al., 2009; Schefe et al., 2006; Svec et al., 2015].

Los factores experimentales que pueden intervenir en la eficiencia de la PCR son la longitud del producto de PCR (los fragmentos más pequeños pueden tener una mejor eficiencia), el contenido de guanina y citosina, la estructura secundaria de los cebadores, como dímeros y *loops*, o temperaturas de fusión inadecuadas que pueden afectar el reconocimiento del cebador por el molde, lo que resulta en una amplificación deficiente. Otras condiciones que pueden influir son la dinámica de la reacción, el uso de concentraciones no óptimas de reactivos y la calidad de la enzima, que pueden resultar en

eficiencias por debajo del 90 % [Ruijter et al., 2009; Schefe et al., 2006; Svec et al., 2015].

La presencia de inhibidores de PCR en uno o más de los reactivos puede producir eficiencias de más del 110 %. La razón principal para que la eficiencia exceda el 100 % es la inhibición de la polimerasa. A veces sucede que, al agregar más cantidad de muestra, se aumenta la cantidad de inhibidores. Incluso después de adicionar más molde de ADN a la mezcla de reactivos, los valores de Ct pueden no cambiar para los ciclos anteriores. Esto aplana la curva de la amplificación, lo que resulta en una pendiente más baja y una eficiencia de amplificación de más del 100 %. Los inhibidores de la enzima polimerasa incluyen cantidades excesivas de ADN/ARN o material residual en la muestra. Los contaminantes comunes incluyen heparina, hemoglobina, polisacáridos, clorofilas, proteinasa K y acetato de sodio. Otros, como etanol, fenol y SDS, pueden transferirse desde la etapa de extracción del ADN o ARN. Es más probable que se produzca inhibición en muestras más concentradas, y una forma de mejorar la pendiente de la curva es diluir la muestra [Tichopad et al., 2003].

El cálculo de la eficiencia de la PCR debe hacerse en la fase exponencial. La cinética de la PCR en esta fase se puede describir con la siguiente ecuación de Rutledge y Côté [2003]:

$$(5) R_n = R_0 \cdot (1+E)^n$$

Donde:

R₀: Cantidad de señal de fluorescencia en el ciclo 0

R_n: Cantidad de señal de fluorescencia en el ciclo n

E: Eficiencia

¿Cómo calcular la eficiencia de una reacción de PCR?

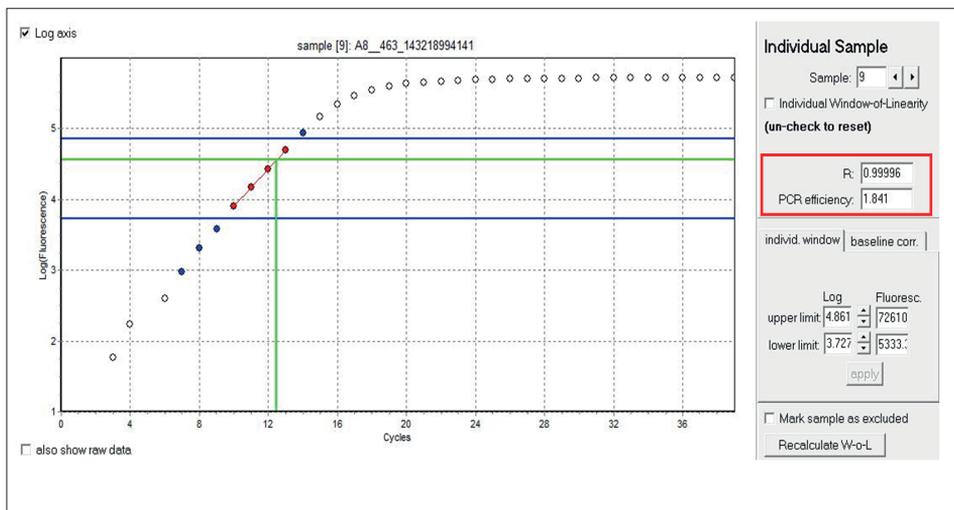
Los resultados de delta Rn para cada ciclo, obtenidos en el equipo de PCR, se pueden usar para calcular la eficiencia con el programa *LinRegPCR* (Figura 33). Específicamente, el proceso para calcular la eficiencia consiste en linealizar los datos de la fase exponencial de la PCR y determinar la mejor



regresión lineal. Este proceso se realiza para cada uno de los genes y cada muestra, y se obtiene un resultado específico para cada caso. Los valores finales de eficiencia para cada gen son adquiridos del promedio de los diferentes valores de cada muestra [Ramakers et al., 2003].

Figura 33

Resultado del análisis de eficiencia de una reacción de PCR en tiempo real a través de LinRegPCR



Nota. Figura de amplificación por PCR (ΔR_n en el eje y y ciclos en el eje x). El programa usa los datos de la fase exponencial (puntos rojos) para ajustarlos a una línea recta, y a partir de la ecuación de la recta, se calcula el valor de la pendiente. El programa reporta un valor de R [coeficiente de regresión lineal] que en el ejemplo es igual a 0,99, lo que indica la probabilidad de que los datos se ajusten a una recta [R tiene valores de 0-1, donde 1 es una probabilidad del 100 %]. También se reporta la eficiencia de la PCR que en el caso es igual a 1.841. Fuente: Elaboración propia de la autora



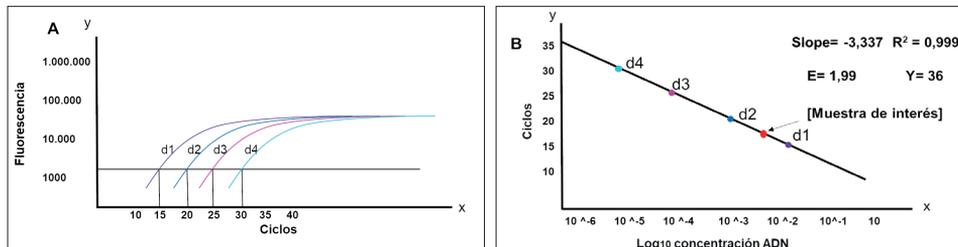
Durante el proceso de estandarizar un protocolo de PCR en el que se quiera conocer la eficiencia de amplificación de un gen, es posible emplear una curva estándar. Esta curva se genera a partir de una dilución en serie de una muestra de ácido nucleico para realizar una PCR en tiempo real de las diferentes concentraciones y obtener una curva de amplificación para cada dilución [Figura 34A]. Una curva estándar se puede construir mediante el uso de los valores de Ct para cada dilución en el eje y, y la cantidad de ácido nucleico de entrada en el eje x. Al aplicar el logaritmo (en base 10) de la concentración de ADN, se obtendrá una función lineal [Figura 34B]. Este gráfico podrá ser fácilmente construido en Microsoft Excel al usar los datos de Ct y del log₁₀ ADN.

La pendiente (*slope*) de la fase logarítmica lineal será una medida de la eficiencia de la reacción. Así, el cálculo de la eficiencia para un gen específico se realiza con la ecuación 6 [Rutledge y Côté, 2003]:

$$(6) E = 10^{-slope-1}$$

Figura 34

Construcción de curva estándar de diluciones de ADN para cálculos de eficiencia de la PCR



Nota. A. Curvas de amplificación por PCR de 4 diluciones seriadas [d1, d2, d3 y d4] de una muestra de ADN, donde d1 está más concentrada y d4 más diluida. **B.** Curva estándar de PCR. El eje x corresponde al logaritmo en base 10 de la concentración de las diluciones de ADN. Eje y son los valores de Ct calculados para las diluciones. Se muestran valores de *slope*, R², eficiencia [E] y el intercepto Y. Fuente: Elaboración propia de la autora

Para obtener resultados precisos y reproducibles, las reacciones deben tener una eficiencia cercana al 100 %, equivalente a una pendiente de $-3,32$. Se recomiendan aceptables los valores de eficiencia de 90 % y 110 %, que corresponde a una pendiente entre $-3,58$ y $-3,10$.

Las muestras usadas para generar la curva estándar deben corresponder (lo más cerca posible) a las mismas del experimento (por ejemplo, el mismo ARN o ADN total). El intervalo de dilución debe cubrir el rango de concentración esperado de las muestras experimentales [Rutledge y Stewart, 2008].

La eficiencia calculada a partir de esta curva indica si su PCR está bien estandarizada, es decir, si todos los componentes empleados están en las concentraciones correctas (concentraciones de cebadores y ADN molde). Además, con la ayuda de la curva estándar se puede calcular la eficiencia de su cebador (qué tan bien diseñado está), lo cual es un factor importante para las reacciones de PCR en tiempo real. También, cuando no se conoce la concentración de su molde, con una dilución en serie de concentraciones conocidas de un control positivo se puede extrapolar la concentración de la muestra de interés [Figura 34B].

A partir de esta curva estándar, se puede extraer información sobre el rendimiento de la reacción y otros parámetros. El **coeficiente de correlación** (R^2) es una medida con la cual es posible saber qué tanto se ajustan los datos a la curva estándar y refleja la linealidad [Figura 34B]. Idealmente, R^2 debería ser igual a 1, aunque 0,999 generalmente es el valor máximo. R^2 también es una medida de la reproducibilidad del experimento. Las curvas estándar se pueden repetir a lo largo del tiempo para evaluar si se mantiene la consistencia y, por lo tanto, la precisión de los datos para las muestras.

El valor del intercepto **Y** del gráfico, es el límite teórico de la detección de la reacción, es decir, al valor de C_t esperado que corresponde al número de copias más bajo de las moléculas de interés que dio el aumento de la amplificación estadísticamente significativa, o sea, la concentración más baja de ADN que será detectable [Figura 34B].

Aunque teóricamente la PCR es capaz de detectar una sola copia de un objetivo, un número de copias de 2-10 es comúnmente el nivel más bajo de moléculas de interés que se pueden cuantificar de manera confiable en reacciones de PCR en tiempo real. Esto limita la utilidad del valor de intersección con el eje y como medida directa de la sensibilidad. Sin embargo, el valor de intersección en el eje y puede ser útil para comparar diferentes sistemas de amplificación y muestras. Es importante cuantificar en la parte inicial de la fase exponencial, y no en los últimos ciclos o cuando la reacción alcanza la fase estacionaria, porque al comienzo de la fase exponencial todos los reactivos permanecen en exceso, el ADN polimerasa es altamente eficiente y el producto de amplificación, que está presente en una cantidad baja, no competirá con la capacidad de unión de los cebadores [Alvares et al., 2003; Rutledge y Côté, 2003; Svec et al., 2015].

¿Cómo aplicar esos parámetros en la cuantificación?

La cuantificación de ácidos nucleicos por qPCR se puede realizar de manera absoluta o relativa, según el objetivo del análisis.

Cuantificación absoluta

La cuantificación absoluta se usa para determinar el número exacto de moléculas de un ADN de interés en una muestra, en comparación con un ADN estándar. El objetivo es poder detectar y cuantificar el ADN de organismos infecciosos, lo cual es importante en el diagnóstico de enfermedades y en el control de la calidad del agua o de alimentos contaminados. También, para el control de fitopatógenos [bacterias, hongos o virus que atacan los cultivos] y la detección de organismos genéticamente modificados [OGM] [Demeke et al., 2014; Kamau et al., 2013; Rački et al., 2014; Schena et al., 2004; Shanks et al., 2009].

¿Cómo calcular la cantidad “absoluta”? Construcción de una curva estándar:

En este análisis, las muestras que contienen un número conocido de copias del mismo ADN de interés se deben diluir en serie, luego se amplifican para generar una curva estándar y, posteriormente, poder determinar la cantidad inicial de una muestra de interés. El logaritmo [Log] de cada concentración

conocida en la dilución seriada [eje x] se traza contra el valor de Ct para esa concentración [eje y] [Figura 34B]. Se produce una relación lineal entre Ct y el logaritmo de la cantidad inicial de ADN del molde total. Así, las muestras desconocidas se amplifican y cuantifican al comparar el valor de Ct con esta curva. La confiabilidad del método de cuantificación absoluta depende de las eficiencias de amplificación del objetivo y la curva de calibración [Whelan et al., 2003].

Aplicaciones prácticas de la cuantificación absoluta

En microbiología clínica, la cuantificación absoluta es útil para el análisis de la carga viral de, por ejemplo, VIH [virus de inmunodeficiencia humana], VHC [virus de hepatitis C], VHB [virus de hepatitis B], coronavirus, HPV [virus de papiloma humano] e influenza A [Gravitt et al., 2003; Mozayani et al., 2020; Ward et al., 2004]. También, para la carga bacteriana, como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Mycobacterium*, y la carga fúngica como *Candida*, *Cryptococcus* y *Aspergillus*. En microbiología alimentaria, permite evaluar la carga bacteriana patógena [*Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter*] de los alimentos [Busser et al., 2020; Castañeda-Gulla et al., 2019; Fan et al., 2020]. En microbiología veterinaria, es importante para la detección de agentes zoonóticos, por ejemplo, de los virus FIV [virus de inmunodeficiencia felina], CSFV [virus de la fiebre clásica suina] y FCV [calicivirus felino] [Lévêque et al., 2020; Song et al., 2020]. En oncología clínica, para evaluar enfermedades residuales mínimas y translocaciones cromosómicas, polimorfismos de un solo nucleótido [SNP], terapia génica, estimación de transferencia génica, biodistribución de expresión vectorial y receptores [Zeng, Y. et al., 2020].

Ejemplo práctico de cuantificación absoluta: caso coronavirus

En la pandemia de COVID-19, la qPCR se ha presentado como una herramienta clave para el control de la enfermedad puesto que permite la detección del virus en individuos con síntomas o que estuvieron expuestos a áreas contaminadas. Para esto, los laboratorios usaron el análisis de genes específicos del virus SARS-CoV-2, los cuales no se encuentran en el genoma humano. La amplificación de estos genes por qPCR es posible mediante el uso de cebadores diseñados para hibridar los genes virales. Si el gen amplifica, se detecta una curva de fluorescencia y el paciente será positivo, si no amplifica

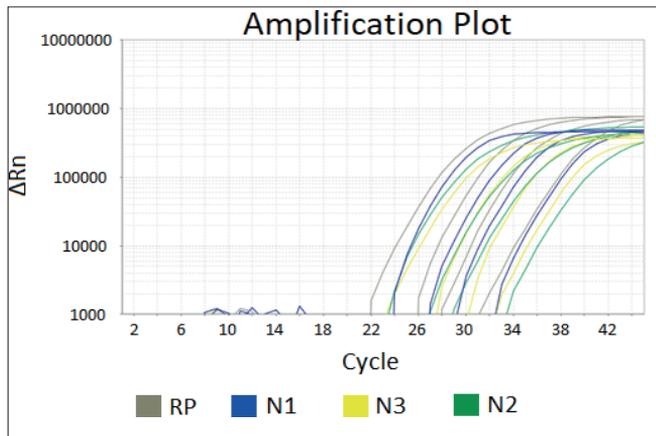


el paciente será negativo. En la Figura 35 se muestra un valor de Ct para cada paciente (número de ciclo en donde la fluorescencia comenzó a crecer exponencialmente).

Sin embargo, para conocer la carga viral del paciente, es necesario construir una curva estándar. Para ello, se requiere hacer una dilución seriada de una muestra de ARN de SARS-CoV-2 con cantidad conocida, después, efectuar una RT-qPCR con las diferentes diluciones como muestras de partida, y así obtener valores de Ct para cada dilución. Para obtener la curva estándar, se grafica el Log10 de la concentración [Log10 [viral]] de las muestras contra los respectivos valores de Ct (Figura 36). Finalmente, para establecer la carga de ARN viral del paciente, se debe realizar una interpolación (Figura 34), es decir, calcular el valor de Llog10 [viral] que produce el Ct del paciente.

Figura 35

Curvas de amplificación por RT-qPCR para detección del gen de SARS-CoV-2 en cuatro pacientes diferentes

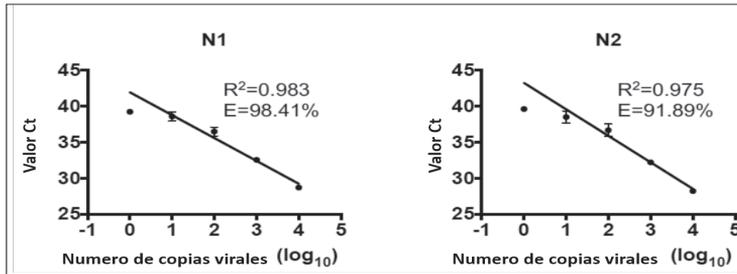


Nota. Amplificación positiva para Coronavirus. RP: gen control, que codifica para la ARNasa P humana. N1, N2, N3: diferentes regiones del gen de la nucleocapside de SARS-CoV-2. Cuando solo amplifica el gen RP, y no los genes virales, el diagnóstico es negativo.

Fuente: Tomado de Raybiotech [s. f.].

Figura 36

Curva estándar generada para las regiones N1 y N2 de SARS-CoV-2



Nota. Gráfico obtenido con los valores de Ct de diferentes diluciones seriadas de ARN viral de muestras de hisopos nasofaríngeos. Con este gráfico es posible calcular la carga viral de un paciente por interpolación. R²: valor del coeficiente de regresión; E: eficiencia de la amplificación. Fuente: Tomado de Kudo et al. [2020].

Cuantificación relativa

La cuantificación relativa tiene como objetivo comparar la cantidad de un gen en una muestra de interés, en relación con una muestra de referencia. La cuantificación relativa se usa a menudo para analizar la expresión génica [cantidad de mRNA producido por un gen] en muestras sometidas a un tratamiento. Por ejemplo, comparar la expresión génica entre una planta sometida a un estrés [muestra de interés] con una planta sin estrés [control], o un tejido de un paciente sano [control] con el de otro paciente con una enfermedad [muestra de interés]. En entomología forense permite también calcular la edad larval, a través de la detección de genes que se expresan en cada etapa de desarrollo [un gen se expresará más en una etapa que en otra].

Los resultados se presentan como un aumento o una disminución de la expresión génica, o *fold change*, en la muestra de interés en relación con la muestra de referencia o control. Además, se utiliza un gen de normalización como control de la variación experimental [cantidad de tejido, variación en el pipeteo, etc.]. En este tipo de cuantificación, no es necesario utilizar una

curva estándar, debido a que la cantidad del gen estudiado se compara con la cantidad del gen de referencia. La curva estándar solo se usa para prever la eficiencia de la reacción.

Existen varios modelos matemáticos para examinar la expresión de un gen objetivo en relación con un gen de referencia. Según el método, la normalización se puede llevar a cabo mediante el uso de uno o varios genes de referencia, e incluyendo o no la eficiencia de la PCR. El nivel final de expresión relativa calculada relaciona el gen de interés en una muestra con el gen normalizador. Las cantidades relativas que se generen se pueden comparar entre varios experimentos de qPCR (Pfaffl, 2001; Taylor et al., 2019).

Genes de referencia: definición y aspectos de la búsqueda

Al comparar perfiles de expresión por qPCR es necesario normalizar, por medio del uso de genes de referencia, para obtener resultados precisos y reproducibles. Esto se debe a que, en qPCR, hay variables técnicas que se deben controlar, como la cantidad y calidad del material de partida, la eficiencia enzimática [Taq polimerasa y transcriptasa reversa], las diferencias en la actividad transcripcional y la presencia de inhibidores en diferentes materiales de la muestra. Para controlar estas variables, que no son resultado del diseño experimental, se utiliza de forma rutinaria la normalización con genes de referencia, que son el control interno de la reacción (Kozera y Rapacz, 2013; Schmittgen y Zakrajsek, 2000).

El uso de genes de referencia permite normalizar las diferencias, entre muestras individuales, de la cantidad de ADNc sintetizado. Cuando se prepara el ARN y se realiza la síntesis de ADNc, pueden aparecer variaciones entre las muestras, pero como el gen de referencia también está expuesto a los mismos pasos de preparación que el gen de interés, se puede usar para corregir estas variaciones. Para esto, es necesario hacer una elección precisa y una cuantificación de los genes de referencia que se debe probar en todas las condiciones experimentales con el fin de garantizar que haya una expresión consistente del gen de interés en todas ellas (Kozera y Rapacz, 2013).



En general, para elegir genes de referencia se deben tener en cuenta los siguientes criterios [Kozera y Rapacz, 2013]:

- El gen elegido debe expresarse aproximadamente al mismo nivel que el gen del experimento.
- Las comparaciones de la expresión genética relativa funcionan mejor cuando el nivel de expresión del gen elegido permanece constante.
- Idealmente, el nivel de expresión del gen de referencia se debe validar para cada tipo de célula o tejido objetivo, para confirmar que permanece constante en todos los puntos del experimento.
- El nivel de expresión no se puede ver afectado por factores experimentales. Además, debe mostrar una variabilidad mínima en su expresión entre tejidos y estados fisiológicos del organismo.
- Es deseable elegir una referencia que muestre un Ct similar con el gen de interés.

Los genes básicos del metabolismo (llamados *housekeeping genes* –HKG–) cumplen estas condiciones, porque, por definición, están involucrados en procesos esenciales para la supervivencia de las células y, por lo tanto, deben expresarse de manera estable y no regulada. Es importante evaluar los genes para cada organismo, cada tejido y cada condición antes de usarlos en los cálculos de cuantificación. Aunque los *housekeepings* son los más utilizados y los primeros en ser examinados como genes de referencia, algunos estudios informan que su uso puede variar considerablemente [De Jonge et al., 2007; Olsvik et al., 2005; Thellin et al., 1999].

Los genes de referencia más utilizados para normalizar en eucariotas son [Rebouças et al., 2013]:

- β -actina (ACTB): gen del citoesqueleto
- RNA ribosómico 18S (rRNA): subunidad ribosómica
- Ciclofilina A (PPIA): inhibidor de la fosfatasa de serina-treonina
- Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH): de la glicólisis
- β -2-microglobulina (B2M): complejo principal de histocompatibilidad



- β -glucuronidasa [GUSB]: exoglicosidasa en lisosomas
- Hipoxantina ribosiltransferasa [HPRT1]: ruta de salvamento de purina
- Proteína de ligación TATA-Box [TBP]: transcripción de RNA

Para procariotas [Bai et al., 2020]:

- Recombinasa A [recA]
- ARN polimerasa factor sigma [rpoD]
- Pirrolina-5-carboxilato reductasa [proC]
- Guanilato quinasa [gmk]
- Factor terminador Rho [rho]
- ARN ribosomal 16S
- Proteína de división celular FtsZ [ftsZ]
- ADN girasa A [gyrA]

Métodos de identificación de genes de referencia

La tarea de identificación de estos genes se compone de dos etapas: primero, es necesario identificar cuáles genes son probables candidatos y, segundo, verificar la estabilidad de estos candidatos. En el primer paso, se recomienda buscar en la literatura cuáles genes se han utilizado como normalizadores para el organismo, tejido o enfermedad que se quiere probar en el experimento, o evaluar cuáles genes tienen una expresión estable en los datos del perfil de expresión, como las bibliotecas RNA-Seq o micro-arreglos, disponibles para su condición experimental. En la segunda etapa, una vez que los genes candidatos han sido amplificados por qPCR, se debe evaluar su estabilidad, por medio de programas diseñados para esto [Borah et al., 2020; Muñoz et al., 2020].

Diferentes enfoques y algoritmos estadísticos han sido propuestos para la elección ideal de un par o más de genes de referencia. Con ellos se clasifica el conjunto de genes candidatos para la normalización, de acuerdo con la estabilidad de su expresión, por medio de un conjunto de datos de muestras y una condición experimental dada. Ejemplos de estos algoritmos son los siguientes:



GeNorm: es parte del *software* qbase + de Biogazelle para el análisis cuantitativo de datos de PCR [está disponible en <https://genorm.cmgg.be/>] [St-Pierre et al., 2017]. Vandesompele et al. [2002] detallaron el algoritmo propuesto para determinar una medida de la estabilidad de la expresión de los genes.

NormFinder: es un complemento de Microsoft Excel que agrega la funcionalidad NormFinder directamente al paquete de *software*. Este calcula automáticamente el valor de estabilidad para todos los genes candidatos probados en un conjunto de muestras organizadas. Andersen et al. [2004] describen en detalle el algoritmo.³

¿Cómo calcular la expresión relativa?

El primer modelo descrito para calcular la expresión relativa es el modelo 2 a la menos delta-delta Ct [$2^{-\Delta\Delta Ct}$] de Livak y Schmittgen, [2001]. Además de este modelo, existen otros modelos matemáticos con los que se intenta obtener resultados más precisos y que corrigen algunas variables y supuestos del modelo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Los cálculos en la cuantificación relativa de la expresión génica se basan en la comparación de los valores de Ct, para lo cual se utiliza la eficiencia de la reacción de PCR como factor de corrección. Sin embargo, el modelo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ no requiere de esta para acceder a un factor de corrección. Este modelo implica una eficiencia óptima e idéntica [correspondiente al 100 %] en la reacción de qPCR, tanto del gen del estudio como del gen de referencia. El método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores de Ct de la muestra y los valores de Ct del control, como se enuncia en la siguiente ecuación:

³ NormFinder está disponible de forma gratuita cuando se solicita a los autores. Para obtener más información sobre cómo instalar y cómo organizar los datos que analizará el programa, consulte el manual del usuario en: <https://theaddictivebrain.files.wordpress.com/2016/08/normfinder-documentation.pdf>



$$[7] \text{ Expresión relativa (R)} = \frac{E_{\text{obj}}^{\Delta C_{t \text{ obj}}} / E_{\text{ref}}^{\Delta C_{t \text{ ref}}}}{E}$$

E= Eficiencia

$$\Delta C_{t \text{ obj}} = C_{t \text{ control}} - C_{t \text{ experimental}} \text{ [gen de interés]}$$

$$\Delta C_{t \text{ ref}} = C_{t \text{ control}} - C_{t \text{ experimental}} \text{ [gen de referencia]}$$

Si la eficiencia **E_{obj} = E_{ref} = E** entonces la **R = E^{ΔC_{t obj} - ΔC_{t ref}}**

Con eficiencia de 100 % o igual a 2, entonces **R = 2^{ΔC_{t obj} - ΔC_{t ref}}**

$$R = 2^{[C_{t \text{ control}} - C_{t \text{ experimental}} (\text{obj})] - [C_{t \text{ control}} - C_{t \text{ experimental}} (\text{ref})]}$$

$$R = 2^{-[C_{t \text{ experimental}} - C_{t \text{ control}} (\text{obj})] - [C_{t \text{ experimental}} - C_{t \text{ control}} (\text{ref})]}$$

$$R = 2^{-\Delta \Delta C_t}$$

Pfaffl [2001] publicó otro modelo de cuantificación en el cual se tienen en cuenta las diferentes eficiencias de PCR, tanto para los genes en estudio como para los genes de referencia.

Ejemplo práctico de cuantificación de expresión génica relativa basado en el modelo 2^{-ΔΔC_t}: Caso de entomología forense

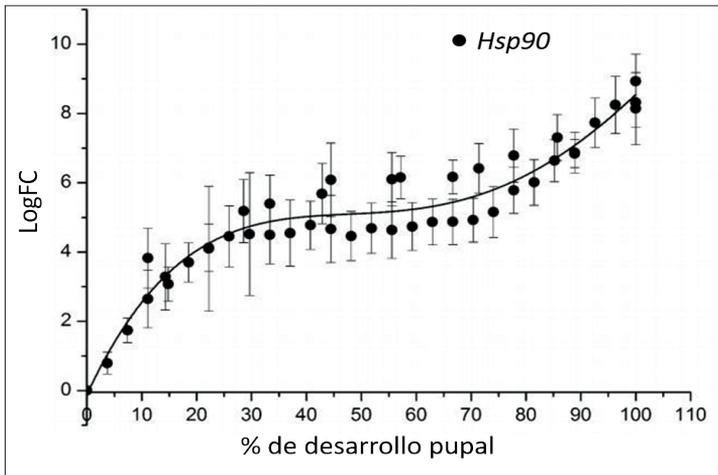
Los entomólogos forenses utilizan los insectos necrófagos que se encuentran en los cuerpos humanos para estimar el intervalo postmórtem mínimo (PMI_{min}) durante las investigaciones de muerte. *Sarcophaga peregrina* es una especie de mosca de la carne, importante para calcular el PMI_{min}, por ser una colonizadora en los primeros estados de descomposición del cuerpo. Sin embargo, dicha estimación requiere fijar con precisión la edad de la mosca. Durante el desarrollo larvario, la determinación de la edad es sencilla por los cambios morfológicos y la variación de longitud, peso y anchura; sin embargo, la evaluación de la edad del sarcófago intrapuparial es más difícil dado que los cambios anatómicos y morfológicos no son visibles. El estudio de genes expresados diferencialmente (DEG, por sus siglas en inglés) durante la metamorfosis del sarcófago es un método potencial para conocer la edad intrapuparial, debido a que hay genes que se activan o inactivan en diferentes etapas del desarrollo. Así, el análisis de esta actividad [llamada expresión génica] sirve como un marcador de la edad del insecto. En un estudio se



utilizó la técnica de RT-qPCR para observar el nivel de expresión genética de *S. peregrina* intrapuparial en diferentes días de desarrollo y temperaturas (35° C, 25° C y 15° C). Además, se seleccionaron los genes de referencia apropiados de *S. peregrina* en el estado intrapuparial y a temperaturas diversas para obtener perfiles de expresión génica fiables y válidos. Los resultados indicaron que dos genes, ARNr 18S y ARNr 28S, eran los genes de referencia más confiables, y que cuatro DEG [Hsp90, A-alfa, AFP, AFBP] tenían el potencial de usarse para estimar con mayor precisión la edad de *S. peregrina* intrapuparial (Shang et al., 2020).

Figura 37

Expresión relativa del gen *Hsp90* en diferentes estados de desarrollo pupal



Nota. El gráfico muestra que la expresión del gen *Hsp90* [expresada como logFC] aumenta con el desarrollo de la larva [en porcentaje de desarrollo]. Se presentan valores de promedios de logFC y las desviaciones estándar.

Fuente: Tomado de Shang et al. [2020].

En este tipo de experimento fue necesario extraer ARN de pupas de diferentes estados de desarrollo [% dp] para sintetizar un ADNc por retrotranscripción, a partir del cual se realizó una qPCR con cebadores de los genes de interés. Los valores de Ct [Ciclo de cuantificación] proporcionados por el instrumento de PCR en tiempo real pueden importarse a una hoja de cálculo de Microsoft Excel [datos hipotéticos para el gen Hsp90, ver Tabla 2]. En todo experimento se deben usar réplicas biológicas [tres pupas para cada estado de desarrollo], y el promedio de los valores de Ct entre ellas se usará en los análisis posteriores. En seguida se deberán realizar los siguientes cálculos, que consideren el uso de un gen de referencia [en este caso el gen que codifica para la proteína ARNr 18S] y los valores de una condición control [en este caso 0 % de desarrollo]:

Para calcular la expresión [*Fold change*, FC] del gen Hsp90 en una pupa con 10 % de desarrollo, se pueden seguir los siguientes pasos:

1. Normalizar los valores de Ct con el gen de referencia [ARNr 18S]:
 $\Delta Ct\ 0\% = [Ct\ \text{gen Hsp90} - Ct\ \text{ARNr 18S}]$ en el día cero
 $\Delta Ct\ 10\% = [Ct\ \text{gen Hsp90} - Ct\ \text{ARNr 18S}]$ con desarrollo de 10 %.
2. Normalizar con la condición control:
 $\Delta\Delta Ct = [Ct\ \text{gen Hsp90} - Ct\ \text{ARNr 18S}]$ al 10 % - [Ct gen Hsp90 - Ct ARNr 18S] al 0 %.
3. Transformar a una expresión exponencial: $2^{-\Delta\Delta Ct}$
4. Calcular los promedios de los valores $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de las réplicas biológicas y las respectivas desviaciones estándar.
5. Hacer análisis estadísticos y evaluar si existen diferencias significativas entre la condición experimental y el control: Test Anova

El resultado final se expresa como un *Fold change* que representa cuántas veces varió la expresión del gen Hsp90 durante el desarrollo pupal en relación con el control o desarrollo 0 %. Este valor se puede graficar [Figura 37].

Las Tablas 2 - 5 muestran datos hipotéticos y los cálculos para encontrar el cambio en la expresión de Hsp90 a 10% de desarrollo pupal con base en el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.



Como fue presentado en la Tabla # 5, los cálculos esperados de *Fold change* para la condición control siempre deben estar cerca de 1, lo cual indica poca variación entre las réplicas. En el ejemplo la expresión de Hsp90 aumentó cerca de 30 veces [Tabla 5], lo que indica que la activada del gen estuvo incrementada a lo largo del tiempo.

Tabla 2

Datos hipotéticos de Ct [ciclo de cuantificación] obtenidos al amplificar el gen Hsp90 y el gen de referencia ARNr 18S en condición 0 % [control] y 10 % de desarrollo pupal

Réplicas biológicas (tres pupas)	Control Hsp90	Control ARNr 18S	10 % Hsp90	10 % ARNr 18S
Ct1	20,84	21,49	15,5	21,45
Ct2	20,87	21,87	15,79	21,62
Ct3	20,85	21,88	15,65	21,46

Tabla 3

Normalización de los datos con el gen de referencia [ARNr 18S]:

Ct Hsp90 – Ct ARNr 18S (ΔCt)	ΔCt control	ΔCt 10 %
Δ Ct1	-0,65	-5,95
Δ Ct2	-1	-5,83
Δ Ct3	-1,03	-5,81
Promedio réplicas	-0,8933333333	-5,86333



Tabla 4

Normalización con la condición control

$\Delta Ct -$ ΔCt Control promedio ($\Delta\Delta Ct$)	$\Delta\Delta Ct$ control	$\Delta\Delta Ct$ 10 %
$\Delta\Delta Ct1$	0,243333333	-5,05667
$\Delta\Delta Ct2$	-0,106666667	-4,93667
$\Delta\Delta Ct3$	-0,136666667	-4,91667

Tabla 5

Transformación a una función exponencial y cálculo del Fold change

$2^{-[\Delta Ct 10\% - \Delta Ct control]}$	$2^{-\Delta\Delta Ct Control}$	$2^{-\Delta\Delta Ct 10\%}$ Fold change
$2^{-\Delta\Delta Ct1}$	0,84	33,2
$2^{-\Delta\Delta Ct2}$	1,07	30,6
$2^{-\Delta\Delta Ct2}$	1,09	30,2
Promedio réplicas	1,0	31,33*

* Este valor puede ser graficado junto con los valores de las otras etapas de desarrollo, no calculados en el ejemplo, en un gráfico *Fold chage* vs. % desarrollo.

Protocolo de PCR cuantitativa: caso Rotor-Gene® Q de QIAGEN

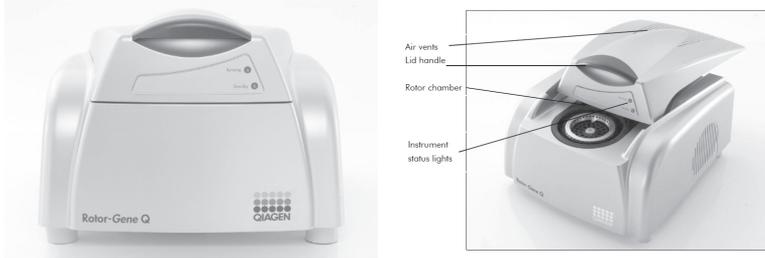
Equipos

- Un equipo de qPCR. En este caso se usará el equipo Rotor-Gene® Q de QIAGEN como ejemplo [Figura 38]. Consultar el manual de su equipo para conocer detalles de su funcionamiento.
- Un computador con el *software* del equipo instalado [Figura 38]. Consultar detalles de la instalación en el manual del equipo.



Figura 38

Equipo de qPCR marca Rotor-Gene® Q de QIAGEN



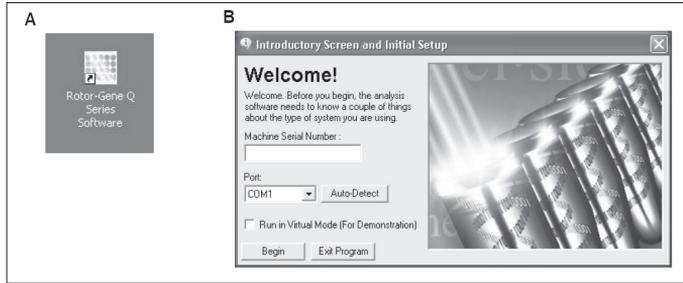
Fuente: Manual del equipo *Rotor-Gene® Q* de QIAGEN

Instrucciones sobre el software

Use el CD entregado con el equipo de qPCR para instalar el *software* en el computador y siga las instrucciones del manual del equipo. Una vez instalado, un icono del *software* (Figura 39A) será creado automáticamente en el escritorio. Para iniciar se debe prender el equipo de PCR y dar doble clic en el icono. Una ventana de bienvenida será abierta, en la que se debe introducir el número de serie del equipo. Todos los equipos poseen un número de serie único (siete dígitos en el caso de Rotor-Gene® Q) en su parte posterior, que será solicitado solamente la primera vez que se use el *software* (Figura 39B).

Figura 39

Icono y ventana de inicio del software



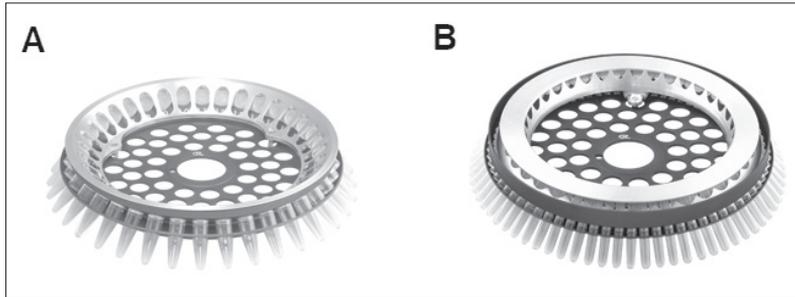
Nota. A. Icono del software del equipo Rotor-Gene® Q en el escritorio del computador. **B.** Ventana de bienvenida donde se debe introducir el número de serie del equipo. Fuente: Manual del equipo *Rotor-Gene® Q* de QIAGEN

Materiales

- Guantes de nitrilo libres de polvo.
- Tubos de 0,2 ml o 0,1 ml de calidad óptica autoclavados marca QIAGEN [Figura 40] o placas de PCR de calidad óptica [en caso que trabaje con otro equipo de PCR] [Figura 41].
- Tubos de 1,5 ml autoclavados.
- Gradilla para tubos de 0,2 ml y de 1,5 ml.
- Micropipetas de 2 μ l, 100 μ l, 200 μ l y 1000 μ l.
- Puntas nuevas estériles para micropipetas.
- Nevera de icopor con hielo.

Figura 40

Tubos de 0,2 ml o 0,1 ml de calidad óptica



Nota. Rotor y tubos de PCR para el equipo Rotor-Gene® Q. **A.** Rotor de 36 tubos de 0,2 ml. **B.** Rotor de 72 tubos de 0,1 ml. Fuente: Manual del equipo *Rotor-Gene® Q* de QIAGEN.

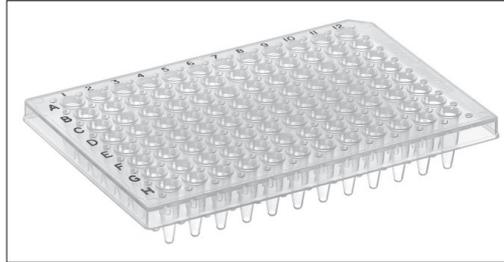
Recomendación sobre los tubos Rotor-Gene® Q

Con respecto a la cantidad de tubos, depende del tipo de rotor que se use. Hay cuatro rotores disponibles para acomodar diferentes tipos de tubos [ver detalles en el manual de este equipo]. Con el instrumento se entregan el rotor de 36 tubos y el rotor de 72 tubos [Figura 40].

Es importante que en un experimento se empleen tubos idénticos, no se deben mezclar diferentes tipos de tubos o fabricantes debido a que esto afectará la uniformidad óptica. QIAGEN recomienda el empleo de tubos de su marca que están especialmente diseñados para usar con el Rotor-Gene Q. Tubos de fabricantes alternativos pueden autofluorescer, lo que podría interferir en la fiabilidad de los resultados. Además, tubos de fabricantes alternativos pueden variar en longitud y grosor, lo que resultaría en desalineación de la ruta óptica del Rotor-Gene Q y la reacción en el tubo.

Figura 41

Placa de PCR de 96 pozos diseñados para equipo de PCR de marcas como Bio-Rad y Applied Biosystem



Fuente: Tomado de Thermo Fisher Scientific™

Reactivos

- Enzima DNA polimerasa
- Tampón de la enzima
- $MgCl_2$ [cofactor de la enzima]
- dNTPs
- Un par de cebadores (Forward y Reverse)
- Fluoróforo [Syber Green®] o sondas
- Agua grado biología molecular ultra pura
- Muestra de ADN o cADN

Procedimiento

Antes de comenzar

Verificar que el fluoróforo para el ensayo sea el apropiado de acuerdo con el equipo que se usará [ver fluoróforos en el manual del Rotor Gene Q]. El equipo debe estar calibrado; en caso de ser necesario, realizar las calibraciones pertinentes. El equipo y el *software* deben estar conectados a un *no break* para evitar que se interrumpa el ensayo o se pierdan datos por falla o por cambios repentinos en el suministro eléctrico. Las superficies de

trabajo deben estar limpias para evitar la contaminación. Es muy importante trabajar con guantes sin polvo, limpiar las superficies con papel sin pelusa y detergentes que degradan el ADN o bien con una solución de hipoclorito de sodio al 10 %.

1. Extracción de ADN genómico⁴

2. Síntesis de ADNc

Cuando se requiere analizar la expresión génica, el ARN extraído de una muestra es convertido a ADN a través de una reacción de retrotranscriptasa (RT) inversa. Para eso se requiere tener la muestra de ARN (preferiblemente conservada a -80°C), enzima RT, dNTPs y un cebador oligo dT (oligonucleótido compuesto por timinas, que hibrida la terminación poli Adenina 3 de los ARN mensajeros). Si se quiere analizar otro tipo de ARN (ARN no codificantes), se deben consultar protocolos para escoger otro tipo de cebador. Como el objetivo de este protocolo es explicar la qPCR, se debe consultar otro protocolo para conocer detalles de extracción de ARN y síntesis de cADN.

3. Cuantificación y dilución de ADN o ADNc

Después de estandarizar la cantidad de ADN óptima para la reacción (la cual se logra a través de la construcción de una curva estándar), preparar el ADN de acuerdo con la cantidad calculada (ver capítulo de cuantificación de ADN para más detalles de este procedimiento).

4. Preparación de la mezcla de la reacción (Mix)

- Las muestras del ADN que van a ser analizadas se deben mantener en hielo hasta que se coloquen en la placa o en los tubos PCR.

⁴ Para conocer más detalles sobre el protocolo de la técnica, sus materiales, reactivos y concentraciones, ver capítulo sobre Extracción de ADN a partir de insectos con buffer de macerado [Cadavid, 2018] o el capítulo de Extracción de ADN con DNeasy Blood y Tissue kit [QIAGEN], modificado para insectos [Pérez, 2018] del libro “Del campo al laboratorio: integración de procedimientos para el estudio de moscas”.



- Todos los reactivos para la PCR se deberán descongelar y homogeneizar con cuidado. Se deben mantener sobre hielo y tapados para evitar que reciban la luz directa.
- Agregar todos los componentes descritos en la Tabla 6 en un tubo de 1,5 ml. El volumen de cada reactivo se debe calcular basado en el número de muestras que se van a analizar y teniendo en cuenta que haya mínimo tres repeticiones para cada muestra. Como los volúmenes individuales de los reactivos son pequeños y difíciles de pipetear, se acostumbra preparar una mezcla [mix] de todos los reactivos para el total de las muestras, y luego esta se reparte en cada uno de los tubos de reacción (ver Tabla 6 para detalles de concentraciones, volúmenes y cálculos). Verificar las concentraciones de sus reactivos a la hora de hacer los cálculos de su propio experimento.
- El volumen final de la reacción depende del tubo que se use, se recomienda trabajar con un volumen entre 20 - 50 μ l, tanto para tubos de 0,2 ml como de 0,1 ml.

Recomendaciones: colocar la enzima Taq polimerasa y el fluoróforo en último lugar. La Taq polimerasa, que debe estar almacenada a una temperatura de -20° C, se debe sacar de la nevera en el momento en que se vaya a utilizar y guardarla inmediatamente después. El fluoróforo debe estar protegido de la luz, para esto se puede envolver el tubo donde se encuentra con papel aluminio.

Tabla 6

Volumen y concentraciones de reactivos para PCR

Reactivo	Concentración inicial	Volumen inicial (una muestra)	Concentración final (Volumen final de 20 μ l)	Volumen para 36 muestras	Volumen para 72 muestras
Primer (F)	10 μ M	0,4 μ l	0,2 μ M	14,4 μ l	28,8 μ l
Primer (R)	10 μ M	0,4 μ l	0,2 μ M	14,4 μ l	28,8 μ l
dNTPs	5 mM cada uno	0,4 μ l	0,1 mM	14,4 μ l	28,8 μ l



Tampón	10X	2 µl	1X	72 µl	144
MgCl₂	50 mM	1,2 µl	3 mM	43,2 µl	86,4 µl
Taq pol	5 Unidades	0,04 µl	0,01 U	1,44 µl	2,88 µl
Sybr	100X	0,03 µl	0,3X	1,08 µl	2,16 µl
Agua		5,53 µl		199,08 µl	398,16 µl
ADN		10 µl		-----	-----
Volumen final		20 µl		-----	-----

Fuente: Tomado de Cadavid et al. [2020].

- Colocar 10 µL de la mezcla de reacción en cada tubo.
- Agregar 10 µL de ADN problema a cada tubo.
- Una vez preparadas las mezclas, centrifugar los tubos para eliminar burbujas que podrían interferir con la lectura de la fluorescencia y para que la solución quede en el fondo de los tubos.
- Preparar el equipo y programar las condiciones para la amplificación [Tabla 7].

5. Amplificación por PCR

- Colocar los tubos en el equipo en el perfil de amplificación deseado [Tabla 7]. Ver el protocolo de su kit de reactivos de PCR para los tiempos y temperaturas específicos a la marca de su kit, ya que cada marca posee concentraciones de reactivos específicos, propiedades de la enzima DNA polimerasa y temperaturas de alineamiento que pueden variar. Si la enzima es *Hotstart*, esta puede requerir un paso de calentamiento para su activación.
- Indicar el punto de colecta de datos: en general, los datos se colectan a 60° C al final de la etapa de alineamiento. Se debe indicar este punto de colecta durante la configuración del equipo.
- Solicitar la generación de una curva de Melting: indicar al equipo que genere esta curva al final de la reacción, este calentará las muestras gradualmente (p. ej., de 60 a 95° C), y recolectará la fluorescencia en cada temperatura para construir una curva.



- Correr la PCR, esta reacción podría demorar alrededor de tres horas, según el equipo y la cantidad de muestras que se procesen.
- Consultar la configuración del equipo en el manual.

Tabla 7

Perfil térmico de amplificación por PCR

Paso	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Activación de taq polimerasa	2 min	95°C	1
Desnaturalización	15 segundos	95°C	
Alineamiento	1 minuto	60°C	40
Extensión	1 minuto	72°C	
Extensión final	10 minutos	72°C	1
Curva de melting	3 minutos	60°C - 95°C	1

Fuente: Tomado de Cadavid et al. [2020]

6. Obtención de datos

- Antes de exportar los datos, se debe establecer el umbral (threshold) y la línea base (baseline). En el *software* del equipo se podrán visualizar las curvas de amplificación en escala logarítmica, en este automáticamente se mostrará la línea umbral y la línea base, el usuario podrá localizar de forma manual la mejor línea umbral en el área donde las curvas sean paralelas. La línea base se recomienda establecerla entre los ciclos 3 y 15. Una vez finalizado, exportar los datos a una hoja de cálculo.
- Analizar los datos. Después de seleccionar el umbral y la línea base, el programa generará de manera automática la curva de calibración y realizará una regresión lineal con los puntos de la curva. A partir de la regresión calculará los valores de ciclo umbral o Ct para las muestras problema. Esta lista de valores Ct es la que el usuario deberá usar para llevar a cabo las comparaciones y los análisis estadísticos deseados [ANOVA o test-t student], mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Referencias

- Alvares, L. E., Mantoani, A., Corrente, J. E., y Coutinho, L. L. [2003]. Standard-curve competitive RT-PCR quantification of myogenic regulatory factors in chicken embryos. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36(12), 1629-1641. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2003001200004>
- Alaruri, S. D. [2014]. High-power white LED-based system incorporating a CCD Offner imaging spectrometer for real-time fluorescence qPCR measurements. *Measurement Science and Technology*, 25(12), 125502. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/25/12/125502>
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., y Ørntoft, T. F. [2004]. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, 64(15), 5245-5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
- Bai, B., Ren, J., Bai, F., y Hao, L. [2020]. Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Pseudomonas brassicacearum* GS20 using real-time quantitative reverse transcription PCR. *PLOS ONE*, 15(1), e0227927. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227927>
- Borah, B., Hussain, M., Wann, S. B., y Bhau, B. S. [2020]. Selection and validation of suitable reference genes for quantitative real time PCR analysis of gene expression studies in patchouli under *Meloidogyne incognita* attack and PGPR treatment. *Gene Reports*, 19, 100625. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100625>
- Bregu, J., Conklin, D., Coronado, E., Terrill, M., Cotton, R. W., y Grgicak, C. M. [2013]. Analytical Thresholds and Sensitivity: Establishing RFU Thresholds for Forensic DNA Analysis. *Journal of Forensic Sciences*, 58(1), 120-129. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12008>



- Busser, F. D., Coelho, V. C., Fonseca, C. de A., Del Negro, G. M. B., Shikanai-Yasuda, M. A., Lopes, M. H., Magri, M. M. C., y Freitas, V. L. T. de. [2020]. A Real Time PCR strategy for the detection and quantification of *Candida albicans* in human blood. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 62. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946202062009>
- Cadavid, I. C., Guzmán, F., de Oliveira-Busatto, L., de Almeida, R. M. C., y Margis, R. [2020]. Transcriptional analyses of two soybean cultivars under salt stress. *Molecular Biology Reports*, 47(4), 2871-2888. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05398-3>
- Castagnetta, M., Pfeffer, U., Chiesa, A., Gennaro, E., Cecconi, M., Coviello, D., y Sacchi, N. [2020]. QPCR Applications for the Determination of the Biological Age. In: R. Biassoni y A. Raso [Eds.], *Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols* [pp. 191-197]. Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_14
- Castañeda-Gulla, K., Sattlegger, E., y Mutukumira, A. N. [2019]. Persistent contamination of Salmonella, Campylobacter, Escherichia coli, and Staphylococcus aureus at a broiler farm in New Zealand. *Canadian Journal of Microbiology*, 66(3), 171-185. <https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0280>
- Dash, H. R., Shrivastava, P., y Das, S. [2020]. Quantification of DNA by Using qRT-PCR. In: H. R. Dash, P. Shrivastava, y S. Das [Eds.], *Principles and Practices of DNA Analysis: A Laboratory Manual for Forensic DNA Typing* [pp. 133-147]. Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0274-4_17
- De Jonge, H. J. M., Fehrmann, R. S. N., de Bont, E. S. J. M., Hofstra, R. M. W., Gerbens, F., Kamps, W. A., de Vries, E. G. E., van der Zee, A. G. J., te Meerman, G. J., y ter Elst, A. [2007]. Evidence Based Selection of Housekeeping Genes. *PLoS ONE*, 2(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000898>
- Demeke, T., Gräfenhan, T., Holigroski, M., Fernando, U., Bamforth, J., y Lee, S.-J. [2014]. Assessment of droplet digital PCR for absolute quantification of genetically engineered OXY235 canola and DP305423 soybean samples. *Food Control*, 46, 470-474. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.018>

- Désiré, N., Dehée, A., Schneider, V., Jacomet, C., Goujon, C., Girard, P.-M., Rozenbaum, W., y Nicolas, J.-C. [2001]. Quantification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proviral Load by a TaqMan Real-Time PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 39[4], 1303-1310. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1303-1310.2001>
- Fan, L., Zhang, X., Zeng, R., Wang, S., Jin, C., He, Y., y Shuai, J. [2020]. Verification of Bacteroidales 16S rRNA markers as a complementary tool for detecting swine fecal pollution in the Yangtze Delta. *Journal of Environmental Sciences*, 90, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2019.11.016>
- Gao, W., Wu, J., Chen, X., Lin, L., Fei, X., Shen, K., y Huang, O. [2019]. Clinical validation of Ki67 by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction [RT-PCR] in HR+/HER2- early breast cancer. *Journal of Cancer*, 10[5], 1110-1116. <https://doi.org/10.7150/jca.29337>
- Gheni, N., y Westenberg, D. [2020]. Quantitative real-time PCR assay with immunohistochemical evaluation of HER2/neu oncogene in breast cancer patients and its correlation with clinicopathological findings. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 63[5], 123. https://doi.org/10.4103/IJPM.IJPM_136_19
- Ginzinger, D. G. [2002]. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30[6], 503-512. [https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(02\)00806-8](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(02)00806-8)
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., y Mathieu, C. [2001]. An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. *Methods [San Diego, Calif.]*, 25[4], 386-401. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1261>
- Gravitt, P. E., Peyton, C., Wheeler, C., Apple, R., Higuchi, R., y Shah, K. V. [2003]. Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *Journal of Virological Methods*, 112[1], 23-33. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(03\)00186-1](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(03)00186-1)



- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., y Williams, P. M. [1996]. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6 [10], 986-994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Josefsen, M. H. [2012]. Instrumentation and Fluorescent Chemistries Used in qPCR. In: M. Filion (ed.), *Quantitative Real-Time Pcr in Applied Microbiology* [pp. 27-52]. Caister Academic Press.
- Kamau, E., Alemayehu, S., Feghali, K. C., Saunders, D., y Ockenhouse, C. F. [2013]. Multiplex qPCR for Detection and Absolute Quantification of Malaria. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071539>
- Kim, Y., Sohn, D., y Tan, W. [2008]. Molecular Beacons in Biomedical Detection and Clinical Diagnosis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 1(2), 105-116.
- Kozera, B., y Rapacz, M. [2013]. Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, 54(4), 391-406. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>
- Lalonde, L. F., Reyes, J., y Gajadhar, A. A. [2013]. Application of a qPCR Assay with Melting Curve Analysis for Detection and Differentiation of Protozoan Oocysts in Human Fecal Samples from Dominican Republic. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(5), 892-898. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0106>
- Lévêque, M. F., Lachaud, L., Simon, L., Battery, E., Marty, P., y Pomares, C. [2020]. Place of Serology in the Diagnosis of Zoonotic Leishmaniasis With a Focus on Visceral Leishmaniasis Due to *Leishmania infantum*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00067>
- Lim, J., Jeon, S., Shin, H.-Y., Kim, M. J., Seong, Y. M., Lee, W. J., Choe, K.-W., Kang, Y. M., Lee, B., y Park, S.-J. [2020]. Case of the Index Patient Who Caused Tertiary Transmission of Coronavirus Disease 2019 in Korea: The Application of Lopinavir/Ritonavir for the Treatment of COVID-19 Pneumonia Monitored by Quantitative RT-PCR. *Journal of Korean Medical Science*, 35(6). <https://doi.org/10.3346/jkms.2020.35.e79>

- Liu, H., Wang, H., Shi, Z., Wang, H., Yang, C., Silke, S., Tan, W., y Lu, Z. [2006]. TaqMan probe array for quantitative detection of DNA targets. *Nucleic Acids Research*, 34(1), e4. <https://doi.org/10.1093/nar/gnj006>
- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. [2001]. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods [San Diego, Calif.]*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lynch, C., y Fleming, R. [2019]. A review of direct polymerase chain reaction of DNA and RNA for forensic purposes. *WIREs Forensic Science*, 1(4), e1335. <https://doi.org/10.1002/wfs2.1335>
- Mozayeni, F., Rezaee, S. A., Jabbari Azad, F., Shabestari, M., Faridhosseini, R., Rafatpanah, H., Yousefzadeh, H., Garivani, Y. A., Jarahi, L., Valizadeh, N., Sabet, F., Moshirahmadi, S., Mohammadi, F. S., y Shabestari, M. [2020]. High proviral load of human T cell lymphotropic virus type-1 facilitates coronary artery diseases. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(4), 500-506. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2020.36317.8649>
- Muñoz, J. J., Anauate, A. C., Amaral, A. G., Ferreira, F. M., Meca, R., Ormanji, M. S., Boim, M. A., Onuchic, L. F., y Heilberg, I. P. [2020]. Identification of housekeeping genes for microRNA expression analysis in kidney tissues of Pkd1 deficient mouse models. *Scientific Reports*, 10(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57112-4>
- Nagy, A., Vitásková, E., Černíková, L., Křivda, V., Jiřincová, H., Sedlák, K., Horníčková, J., y Havlíčková, M. [2017]. Evaluation of TaqMan qPCR System Integrating Two Identically Labelled Hydrolysis Probes in Single Assay. *Scientific Reports*, 7(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/srep41392>
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., y Solera, J. [2015]. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 439, 231-250. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>



- Olsvik, P. A., Lie, K. K., Jordal, A.-E. O., Nilsen, T. O., y Hordvik, I. [2005]. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology*, 6[1], 21. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-6-21>
- Pfaffl, M. W. [2001]. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29[9], e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F. T., Douglas, S. H., Field, S. L., Bell, S. M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A. J., Robinson, P. A., Inglehearn, C. F., Isaacs, J. D., y Markham, A. F. [2003]. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology*, 3, 18. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-3-18>
- Potoczniak, M. J., Chermak, M., Quarino, L., Tobe, S. S., y Conte, J. [2020]. Development of a multiplex, PCR-based genotyping assay for African and Asian elephants for forensic purposes. *International Journal of Legal Medicine*, 134[1], 55-62. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02097-y>
- Pryor, R. J., y Wittwer, C. T. [2006]. Real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N. J.)*, 336, 19-32. <https://doi.org/10.1385/1-59745-074-X:19>
- Rački, N., Morisset, D., Gutierrez-Aguirre, I., y Ravnikar, M. [2014]. One-step RT-droplet digital PCR: A breakthrough in the quantification of waterborne RNA viruses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406[3], 661-667. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7476-y>
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. L., y Moorman, A. F. M. [2003]. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction [PCR] data. *Neuroscience Letters*, 339[1], 62-66. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)01423-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01423-4)

- RayBiotech [s. f.]. COVID-19 1-Step High Throughput PCR Kit. RayBiotech.com. <https://www.raybiotech.com/covid19-high-throughput-real-time-rt-pcr-nucleic-acid-detection-kit/>
- Rebouças, E. de L., Costa, J. J. do N., Passos, M. J., Passos, J. R. de S., Hurk, R. van den, y Silva, J. R. V. [2013]. Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(1), 143-154. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000100019>
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B., y Moorman, A. F. M. [2009]. Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 37(6), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp045>
- Rutledge, R. G., y Côté, C. [2003]. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research*, 31(16), e93. <https://doi.org/10.1093/nar/gng093>
- Rutledge, R. G., y Stewart, D. [2008]. Critical evaluation of methods used to determine amplification efficiency refutes the exponential character of real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 9, 96. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-96>
- Schefe, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., Unger, T., y Funke-Kaiser, H. [2006]. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: Current concepts and the novel «gene expression's CT difference» formula. *Journal of Molecular Medicine [Berlin, Germany]*, 84(11), 901-910. <https://doi.org/10.1007/s00109-006-0097-6>
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A., y Gallitelli, D. [2004]. Real-time quantitative PCR: A new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 110(9), 893-908. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-4842-9>



- Schmittgen, T. D., y Zakrajsek, B. A. [2000]. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: Validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 46[1-2], 69-81. [https://doi.org/10.1016/s0165-022x\[00\]00129-9](https://doi.org/10.1016/s0165-022x[00]00129-9)
- Schmittgen, T. D., y Livak, K. J. [2008]. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3[6], 1101-1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Shang, Y., Ren, L., Yang, L., Wang, S., Chen, W., Dong, J., Ma, H., Qi, X., y Guo, Y. [2020]. Differential Gene Expression for Age Estimation of Forensically Important *Sarcophaga peregrina* (Diptera: Sarcophagidae) Intrapuparial. *Journal of Medical Entomology*, 57[1], 65-77. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz137>
- Shanks, O. C., Kelty, C. A., Sivaganesan, M., Varma, M., y Haugland, R. A. [2009]. Quantitative PCR for Genetic Markers of Human Fecal Pollution. *Applied and Environmental Microbiology*, 75[17], 5507-5513. <https://doi.org/10.1128/AEM.00305-09>
- Song, J., Zhao, S., Li, Y., Wang, H., Zhang, L., Wang, J., Ning, C., y Peng, Y. [2020]. Duplex TaqMan real-time PCR assay for simultaneous detection and quantification of *Anaplasma capra* and *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Molecular and Cellular Probes*, 49, 101487. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.101487>
- St-Pierre, J., Grégoire, J.-C., y Vaillancourt, C. [2017]. A simple method to assess group difference in RT-qPCR reference gene selection using GeNorm: The case of the placental sex. *Scientific Reports*, 7[1], 1-7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16916-y>
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., y Kubista, M. [2015]. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*, 3, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>

- Taylor, S. C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M., y Fenrich, J. [2019]. The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends in Biotechnology*, 37(7), 761-774. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., y Heinen, E. [1999]. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits. *Journal of Biotechnology*, 75(2), 291-295. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00163-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00163-7)
- Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., y Pfaffl, M. W. [2003]. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Research*, 31(20), e122. <https://doi.org/10.1093/nar/gng122>
- Udvardi, M. K., Czechowski, T., y Scheible, W.-R. [2008]. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *The Plant Cell*, 20(7), 1736-1737. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.061143>
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., y Speleman, F. [2002]. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), RESEARCH0034. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Wang, Y. [2016]. *Universal reference dye for quantitative amplification* [United States Patent N.º US9493824B2]. <https://patents.google.com/patent/US9493824B2/en>
- Ward, C. L., Dempsey, M. H., Ring, C. J. A., Kempson, R. E., Zhang, L., Gor, D., Snowden, B. W., y Tisdale, M. [2004]. Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 29(3), 179-188. [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(03\)00122-7](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(03)00122-7)

- Whelan, J. A., Russell, N. B., y Whelan, M. A. [2003]. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*, 278[1-2], 261-269. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(03\)00223-0](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(03)00223-0)
- Zajac, B. K., Amendt, J., Verhoff, M. A., y Zehner, R. [2018]. Dating Pupae of the Blow Fly *Calliphora vicina* Robineau–Desvoidy 1830 (Diptera: Calliphoridae) for Post Mortem Interval—Estimation: Validation of Molecular Age Markers. *Genes*, 9[3], 153. <https://doi.org/10.3390/genes9030153>
- Zare, S., Nazarian-Firouzabadi, F., Ismaili, A., y Pakniyat, H. [2019]. Identification of miRNAs and evaluation of candidate genes expression profile associated with drought stress in barley. *Plant Gene*, 20, 100205. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2019.100205>
- Zeng, A., Xu, Y., Song, L., Li, J., y Yan, J. [2020]. Validation of suitable reference genes for qRT-PCR in cabbage [*Brassica oleracea* L.] under different abiotic stress experimental conditions. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s13562-020-00556-x>
- Zeng, Y., Guo, Z., Hu, Z., Liu, M., Chen, Y., Chen, S., Peng, B., Zhang, P., Wu, Z., Luo, H., Zhong, F., Jiang, K., Lu, Y., Yuan, G., y He, S. [2020]. FGD1 exhibits oncogenic properties in hepatocellular carcinoma through regulating cell morphology, autophagy and mitochondrial function. *Biomedicine y Pharmacotherapy*, 125, 110029. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110029>

Capítulo

5

Secuenciación con didesoxinucleótidos (tipo sanger)

.....
Isabel Cristina Cadavid Sánchez

Ingeniera biológica

Msc. en Biotecnología, PhD. Biología celular y molecular

Investigadora, Grupo de Investigación Bioforense

Tecnológico de Antioquia – I. U.

Centro de Biotecnología

Universidad Federal de Rio Grande do Sul

Introducción

La secuenciación de ADN es un método de laboratorio utilizado para determinar la secuencia de nucleótidos (adenina, timina, guanina y citosina) que componen esta molécula. El método fue desarrollado por Frederick Sanger en 1975 (Sanger et al., 1977), quien luego recibió el Premio Nobel de química en 1980 por sus contribuciones a la comprensión de las secuencias de ADN; esta secuenciación se conoce como se conoce como didesoxinucleótidos o de electroforesis capilar; sin embargo, el proceso se reconoce a menudo como secuenciación de Sanger, en referencia a su autor.

Los componentes para una secuenciación son similares a los que se emplean para la reacción en cadena de la polimerasa (ver capítulo de PCR convencional):



- Una enzima ADN polimerasa.
- Un par de cebadores, fragmentos pequeños de ADN monocatenario que se unen al molde de ADN y actúan como un “iniciador” para la polimerasa.
- Los cuatro nucleótidos del ADN [dATP, dTTP, dCTP, dGTP].
- El molde de ADN que será secuenciado.
- Versiones didesoxi de los cuatro nucleótidos [ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP], cada uno marcado con pigmentos de color diferente [Figura 42].
- Un gel de electroforesis o capilar.

Este método de secuenciación, comercializado inicialmente por Applied Biosystems en 1986, fue el más utilizado durante aproximadamente 40 años. Más recientemente, la secuenciación de Sanger de mayor volumen ha sido reemplazada por métodos de secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*, NGS), especialmente para análisis genómicos automatizados a gran escala. Sin embargo, el método Sanger sigue siendo de amplio uso para proyectos de menor escala y para validar los resultados de NGS. Incluso, aún conserva ventajas sobre las tecnologías de secuenciación de lectura corta (como Illumina), de producir lecturas de secuencia de ADN de más de 500 nucleótidos.

En principio, los conceptos detrás de las tecnologías de secuenciación Sanger vs. nueva generación son similares. Tanto en la secuenciación de NGS como en la de Sanger, la ADN polimerasa agrega nucleótidos fluorescentes uno por uno en una cadena de ADN en crecimiento. Cada nucleótido incorporado se identifica por su etiqueta fluorescente. La diferencia crítica entre la secuenciación de Sanger y NGS es el volumen de secuenciación. Mientras que el método Sanger secuencia un solo fragmento de ADN a la vez, NGS es masivamente paralelo y secuencia millones de fragmentos simultáneamente por ejecución. Este proceso de alto rendimiento se traduce en la secuenciación de cientos a miles de genes a la vez. NGS también ofrece un mayor poder de descubrimiento para detectar variantes novedosas o raras con una secuenciación profunda (Illumina, 2020).

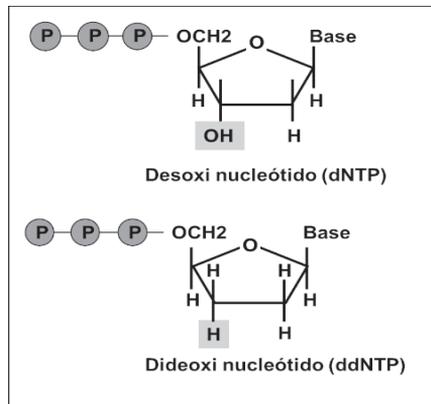


Cómo funciona la secuenciación Sanger

En la secuenciación de Sanger, se parte de la síntesis de una nueva cadena de ADN que usa como molde el ADN del cual se quiere conocer su secuencia nucleotídica. Para esto es necesario usar un par de cebadores, diseñados para hibridizar el ADN de interés y para que sean el punto de partida de la síntesis de ADN, en la cual se realizan cuatro reacciones individuales. Estas reacciones incluyen el ADN molde, cebadores, Taq polimerasa, los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos [dNTPs], A [Adenina], G [Guanina], C [Citosina] y T [Timina], y una baja cantidad de solo uno de los cuatro dideoxinucleótidos trifosfatos [ddNTP]: ddATP, ddGTP, ddCTP o ddTTP. Las cuatro reacciones se pueden denominar A, G, C y T, de acuerdo con cual de los cuatro ddNTP se incluya en la reacción. La característica que diferencia a los ddNTP de los dNTPs es que los primeros carecen de un grupo hidroxilo en el carbono 3' del anillo de azúcar [Figura 42], que se requiere para formar enlaces entre nucleótidos.

Figura 42

Estructura de dideoxinucleótidos [ddNTP] y desoxinucleótidos [dNTP].



Nota. El dNTP posee un OH en la ribosa y el ddNTP carece de él.

Fuente: Elaboración propia de la autora.

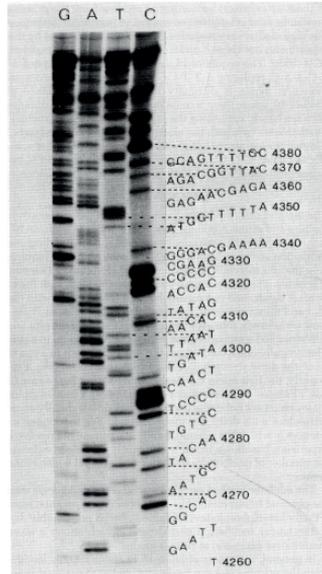
En un nucleótido normal, el grupo hidroxilo [-OH] 3' sirve para formar el enlace con el próximo nucleótido que entra en la cadena de ADN. Este enlace se da entre el OH del extremo 3' del ADN y el grupo fosfato 5' del nuevo nucleótido. Pero si la ADN polimerasa agrega un ddNTP a la cadena, ya no habrá un hidroxilo sobre el que se puedan agregar más nucleótidos. La síntesis de la cadena, termina con el nucleótido didesoxi, marcado con un pigmento de un color particular, según la base nucleotídica [A, T, C o G] que esté en la reacción. Como los ddNTP se incorporan al azar, la síntesis termina en muchas posiciones diferentes para cada reacción, y como resultado lleva a la formación de fragmentos de diferentes tamaños con cromóforos diferentes.

Después de la síntesis, los productos de las reacciones A, G, C y T se cargan individualmente en carriles de un gel y se separan mediante electroforesis, un método que separa los fragmentos de ADN según sus tamaños, así, los de menor tamaño son los que primero migrarán en el gel. Las bandas se detectan por medio de radioactividad [en el pasado] o un colorante fluorescente [en la actualidad], y luego la secuencia se lee desde el fondo del gel hasta la parte superior, incluyendo las bandas de los cuatro carriles. Por ejemplo, si la banda ubicada en el extremo más bajo del gel aparece en el carril de reacción A, entonces el primer nucleótido en la secuencia es A. Luego, si la siguiente banda de abajo hacia arriba aparece en el carril T, el segundo nucleótido en la secuencia es T, y así sucesivamente [Figura 43].



Figura 43

Autorradiografía de un gel de electroforesis de productos de PCR de secuenciación tipo Sanger



Nota. El primer carril posee productos de una reacción que contiene ddGTP, por lo cual las bandas representan productos que terminaron de ser sintetizados en el nucleótido de guanina [G]. El segundo carril representa reacciones con ddATP, el tercero, con ddTTP y el cuarto, con ddCTP. Fuente: Tomado de Sanger et al. (1977).

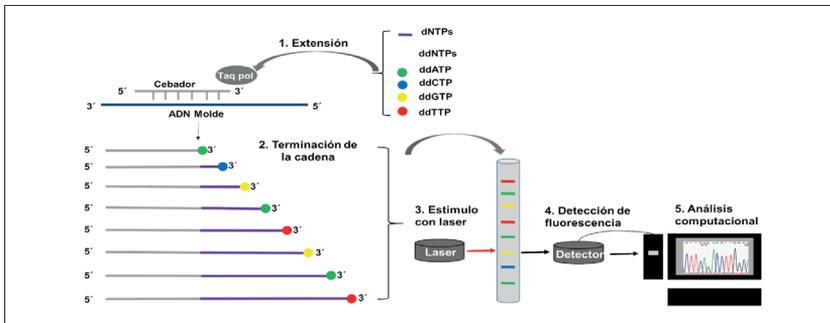
Inicialmente, esta lectura se realizaba de forma manual, hoy en día existen métodos de secuenciación capilar que emplean un equipo encargado de leer la fluorescencia. En la secuenciación capilar, los fragmentos de ADN se separan por tamaño a través de un capilar largo y delgado de fibra acrílica [en lugar de un gel de electroforesis]. La muestra que contiene fragmentos de ADN se inyecta en el capilar, esto se hace al sumergir el capilar y un electrodo en una solución de la muestra, y al aplicar brevemente una corriente eléctrica, los fragmentos de ADN migran hacia el final del capilar [Dovichi, 1997].

Una vez que se ha inyectado la muestra, se vuelve a aplicar el campo eléctrico para conducir los fragmentos de ADN a través del capilar. Cada última base de la cadena [del ddNTP] estará etiquetada con un color diferente: A = Verde, C = Azul, G = Amarillo y T = Rojo. Así, cuando un láser, incorporado en el equipo, es disparado a través de la fibra capilar, hace que las etiquetas coloreadas en los fragmentos de ADN produzcan fluorescencia. El color de las bases fluorescentes es detectado por una cámara y registrado por el equipo de secuenciación [Figura 44]. Los colores de las bases se muestran en una computadora como un gráfico de picos de diferentes colores conocido como cromatograma [Zhang et al., 2001] [Figura 45].

El cromatograma es “procesado” o “resuelto” a través de un método matemático que corrige la posición de los picos del cromatograma “en bruto”, ajustándolos a una imagen más limpia y clara [Figura 45]. El método matemático calcula la posición ideal de los picos y tiene en cuenta la masa de los fluoróforos incorporados en las cadenas de ADN y otros factores inherentes a la electroforesis capilar [Haan y Godsill, 2000].

Figura 44

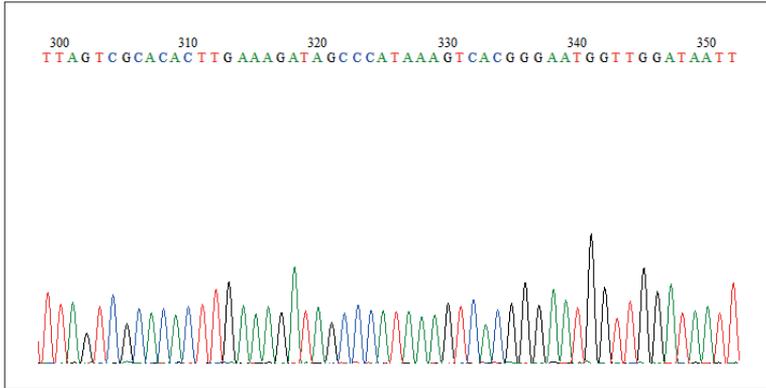
Flujograma del proceso de secuenciación



Nota. 1. Extensión: Se realiza una PCR con nucleótidos dNTP y otros ddNTP, estos últimos marcados con colorantes fluorescentes. La Taq polimerasa va a integrar cualquiera de estos dos a la cadena. 2. Terminación de cadena: al integrar un ddNTP, la extensión de la cadena termina. 3. Estimulación con láser: la electroforesis capilar permite separar los fragmentos por tamaño, en donde los más pequeños serán los primeros en ser detectados y estimulados por un láser. 4. Detección de fluorescencia 5. Análisis computacional: se registra la detección de fluorescencia para producir un cromatograma, el cual representa la secuencia de letras que componen la muestra de ADN. Fuente: Elaboración propia de la autora.

Figura 45

Cromatograma de una secuencia de ADN



Nota. Representa el flujo de emisión de luz [eje “y” en el gráfico] a lo largo del tiempo [eje “x”]. Fuente: Elaboración propia de la autora

Dificultades en la lectura de las secuencias

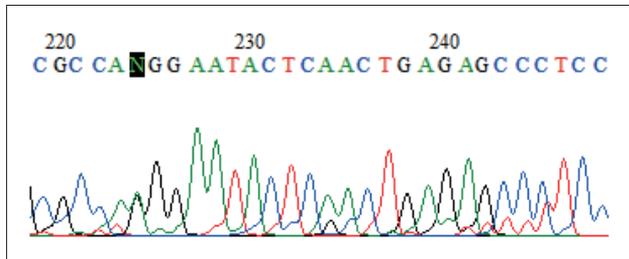
La visualización e interpretación del cromatograma son pasos fundamentales en el proceso de análisis de resultados, y requieren un examen manual a través de programas de bioinformática de edición de secuencias (por ejemplo, Bioedit, ver capítulo 6). Esto ayudará a definir mejor los nucleótidos presentes en regiones de resolución más difícil debido a la contaminación o variaciones en las secuencias del molde de ADN (Elyazghi et al., 2017).

En los resultados de secuenciación se pueden encontrar letras diferentes de las esperadas A, T, C y G debido principalmente a la contaminación de la muestra, la línea de base puede mostrar picos más altos. Cuando estos picos superan el 20 % de la altura de los picos principales, el programa del computador no puede interpretar (“llamar”) el nucleótido representado, e indica las llamadas “bases mixtas” en lugar de A, C, G o T. Las bases mixtas son el resultado de la interpretación de las señales de fluorescencia superpuestas (Figura 46). Esto significa que cuando haya una superposición

de fluorescencia entre una citosina y una timina, el *software* ubicará la letra N [Elyazghi et al., 2017]. También, las muestras con resultados de alta calidad pueden tener picos superpuestos, esto ocurre principalmente en casos de alelos heterocigotos, SNP [polimorfismos de un solo nucleótido] o regiones más amplias de nucleótidos variables [Wu et al., 1996].

Figura 46

Cromatograma visualizado con Bioedit



Nota. “ Se observa la señal de fluorescencia detectada por el equipo, y la base correspondiente a cada lectura” la base N se relaciona con señales diferentes detectadas. Fuente: Elaboración propia de la autora.

Referencias

- Dovichi, N. J. (1997). DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 18(12-13), 2393-2399. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181229>
- Elyazghi, Z., Yazouli, L. E., Sadki, K., y Radouani, F. (2017). ABI Base Recall: Automatic Correction and Ends Trimming of DNA Sequences. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 16(8), 682-686. <https://doi.org/10.1109/TNB.2017.2755004>
- Haan, N. M., y Godsill, S. J. (2000). Modelling electropherogram data for DNA sequencing using variable dimension MCMC. *2000 IEEE International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing. Proceedings [Cat. No. 00CH37100]*, 6, 3542-3545. <https://doi.org/10.1109/ICASSP.2000.860166>
- Illumina*. (2020). NGS vs. Sanger Sequencing. <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/ngs-vs-sanger-sequencing.html>
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Wu, J., Griffith, B., Bassinger, S., Moehlenkamp, C., Brodie, S., Wu, Y., Gribble, G., Troup, G., y Williams, T. (1996). Strategies for unambiguous detection of allelic heterozygosity via direct dna sequencing of PCR products: Application to the hla drb1 locus. *Molecular Diagnosis*, 1(2), 89-98. [https://doi.org/10.1016/S1084-8592\(96\)70024-3](https://doi.org/10.1016/S1084-8592(96)70024-3)
- Zhang, J., Yang, M., Puyang, X., Fang, Y., Cook, L. M., y Dovichi, N. J. (2001). Two-Dimensional Direct-Reading Fluorescence Spectrograph for DNA Sequencing by Capillary Array Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 73(6), 1234-1239. <https://doi.org/10.1021/ac001001c>

Capítulo

6

Edición de secuencias de ADN: un paso a paso para su análisis

.....
Andrés López Rubio

Biólogo, PhD en Biología
Docente del Tecnológico de Antioquia - I. U.
Grupo de Investigación Bioforense

Luz Miryam Gómez Piñerez

Bacterióloga y laboratorista clínica
Msc. en Entomología, PhD. en Ciencias Agrarias
Docente Tecnológico de Antioquia – I. U.
Grupo de Investigación Bioforense

Introducción

Las secuencias de ADN son una gran fuente de información sobre los organismos; su análisis tiene un sinnúmero de aplicaciones en campos como la genética, la biología molecular, la evolución, la sistemática, las ciencias ambientales y de la salud; ha permitido acceder a la variación intraespecífica y diversidad genética, y se ha usado para identificación genética, determinación de especies crípticas, variación geográfica, establecer relaciones filogenéticas, conocer la estructura poblacional, etc.

En los trabajos de investigación de biología molecular, con frecuencia se producen nuevas secuencias de ADN de diferentes organismos, que se analizan a través de métodos de bioinformática. Además, muchas veces estos análisis se pueden completar con secuencias previamente publicadas en otros estudios y que se encuentran depositadas en bases de datos genéticos.



El acceso a secuencias de ADN depositadas en bases de datos públicas facilita la conectividad entre ellas, permite realizar estudios comparativos, lo cual ha llevado a generalizar su uso y a que se comparta información entre investigadores de todo el mundo.

En su análisis se pueden seleccionar regiones específicas del genoma, según la pregunta de investigación que se quiera resolver. Para proceder a dar uso a estas secuencias se requiere que la información esté organizada y pase por un proceso de evaluación de la calidad, ensamblaje, edición y elaboración de matrices a través de programas de bioinformática.

A continuación, se describe de manera sucinta la utilidad de algunos programas, así como de sus opciones para procesar las secuencias de ADN con el fin de facilitarle al investigador la estandarización de su metodología de trabajo.

Evaluación de la calidad de los cromatogramas

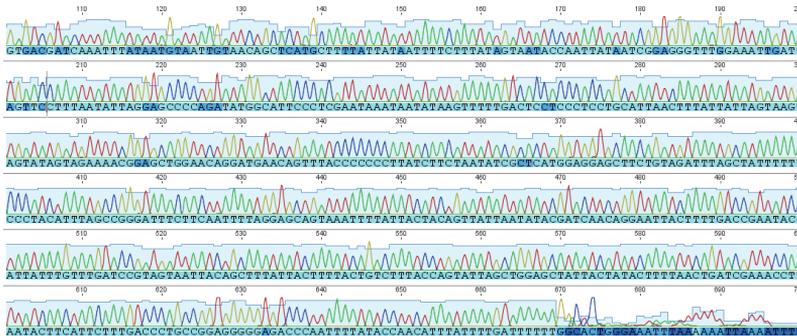
Las secuencias de ADN [Ácido desoxirribonucleico] se obtienen a partir de los productos de PCR [reacción en cadena de la polimerasa]. Para obtener el orden y composición de estas secuencias, el producto de PCR es sometido a una reacción de secuenciación que da como resultado una serie de lecturas, donde cada una de las bases nucleotídicas se representa con un color específico y se muestran curvas, de acuerdo con su intensidad lumínica. Esta información se almacena en archivos que se conocen como electroferogramas o cromatogramas de secuencias de ADN⁵ (Figura 47).

⁵ Estos formatos de archivo pueden ser ABI, ABI o SCF.



Figura 47

Vista general de un cromatograma desde el programa Geneious R 9.0

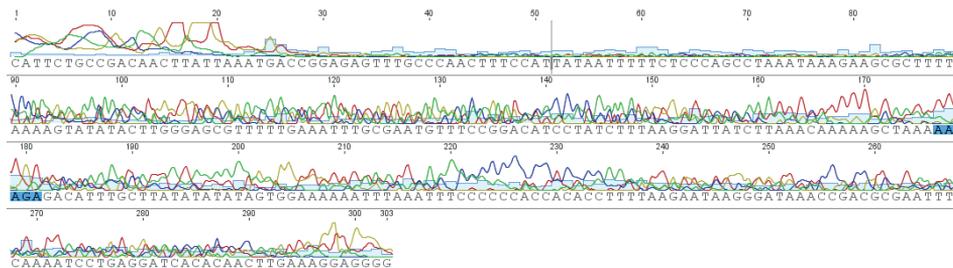


Fuente: Elaboración propia de los autores.

Existen algunos factores que dificultan la reacción de secuenciación y calidad del resultado. Estos factores pueden ser: exceso de nucleótidos y de cebadores, estado de preservación de los reactivos que se usan en la reacción de secuenciación y cambios en el voltaje durante este proceso. Como consecuencia, se generan lecturas con poca claridad visual, y se disminuye el rango de lectura óptimo para la secuencia de ADN con relación al tamaño del fragmento amplificado [Figura 48].

Figura 48

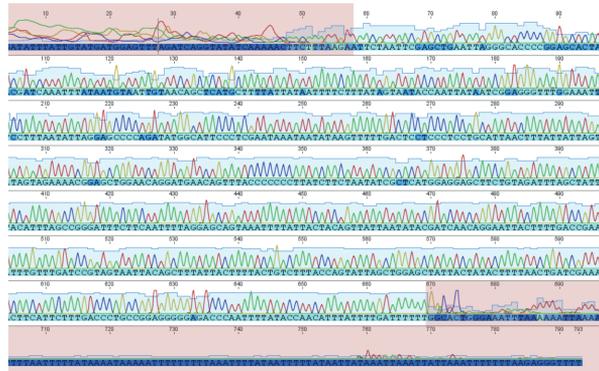
Vista general de un cromatograma con un rango de lectura de baja calidad desde el programa Geneious R 9.0



Fuente: Elaboración propia de los autores.

Generalmente, en la lectura de las primeras regiones [50 - 100 pares de bases] del cromatograma se observa poca resolución. De igual forma sucede con la porción terminal, en la que el espaciamiento y la intensidad de la señal de lectura se degradan [Figura 49].

Figura 49
Región de inicio y finalización de un cromatograma



Nota. La zona sombreada corresponde a lecturas de baja calidad.

Fuente: Elaboración propia de los autores.

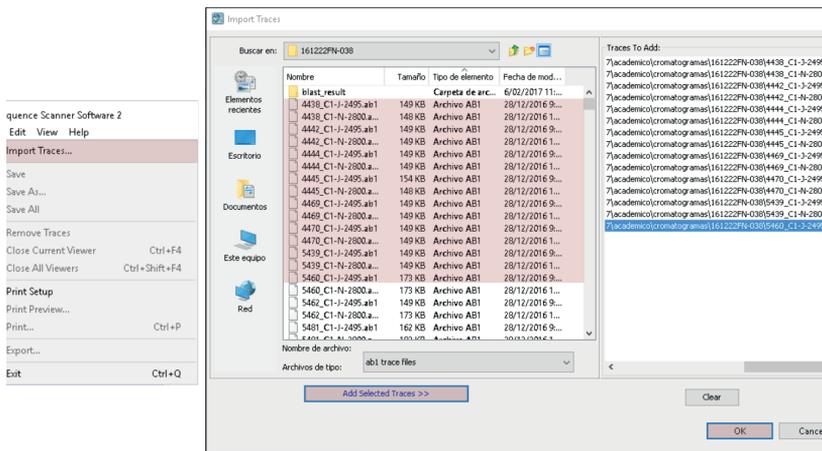
Es deseable analizar las secuencias con base en las regiones óptimas que permitan verificar de forma confiable la información y orden de nucleótidos presentes. Para examinar la calidad de las secuencias existen varios programas, uno de ellos es el programa *Sequence Scanner*⁶ [Applied Biosystems, 2011], el cual se descarga de forma gratuita [ver Anexo A1]. Este programa permite evaluar los cromatogramas en términos de la calidad de la lectura y confianza de cada una de las posiciones nucleotídicas, con lo cual la edición de cromatogramas y la construcción de secuencias consenso⁶ se realiza con base en un estimador [QV⁷].

⁶ Secuencia consenso: Secuencia de ADN producto de usar la información contenida en la lectura de dos cromatogramas de una misma muestra: uno en el sentido 5'-3' y otro en sentido 3'-5'.

⁷ Estimador QV: valor de confianza producto de una estimación y expresado en una escala de 1 a 100 para cada base nucleotídica en una secuencia de ADN. Un valor de cero corresponde a una asignación de base poco confiable [Bonfield y Staden, 1995].

El programa puede usar para evaluar la calidad de un conjunto de cromatogramas, de forma que se pueda diagnosticar cuáles tienen el grado de calidad que permita construir una secuencia consenso e identificar cuáles muestras deben ser secuenciadas nuevamente. Después de abrir el programa, para cargar los cromatogramas se selecciona la opción *Import Traces* en el menú *File*. A continuación, se despliega una ventana de diálogo donde se deberán elegir, mediante el botón *Add Selected Files*, los archivos correspondientes a los cromatogramas que se van a analizar (en formato ABI o ABI), los cuales se deben buscar en la carpeta que se haya escogido para almacenarlos, una vez seleccionados se debe realizar haga clic en el botón *Ok* (Figura 50).

Figura 50
Selección de cromatogramas para ser analizados

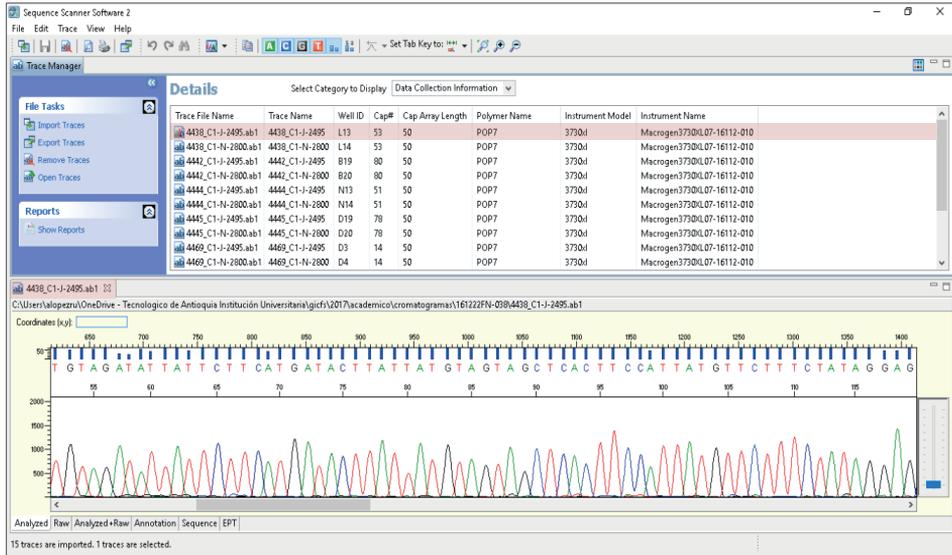


Fuente: Elaboración propia de los autores.

Luego de dar clic en *OK*, los archivos importados se mostrarán en la ventana principal del programa. Al seleccionar un archivo en particular, se visualiza el cromatograma asociado a este en una nueva ventana, que se observa en el panel inferior de la pantalla (Figura 50).

Figura 51

Vista de los archivos importados y visualización de cromatograma

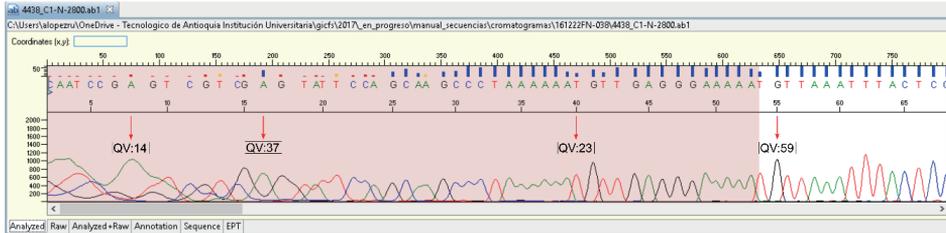


Fuente: Elaboración propia de los autores.

Se aconseja realizar una inspección visual de cada cromatograma para conocer las posiciones a partir de las cuales se realizará la construcción de las secuencias consenso [ver más abajo: “Ensamblaje manual y edición de secuencias”], para lo cual se usa el estimador QV; se recomienda, además, seleccionar las regiones de lectura de un cromatograma cuando el valor QV se encuentre por encima de 50 y se mantenga para las posiciones siguientes (Figura 52).

Figura 52

Vista de calidades de lectura en un cronograma



Fuente: Elaboración propia de los autores.

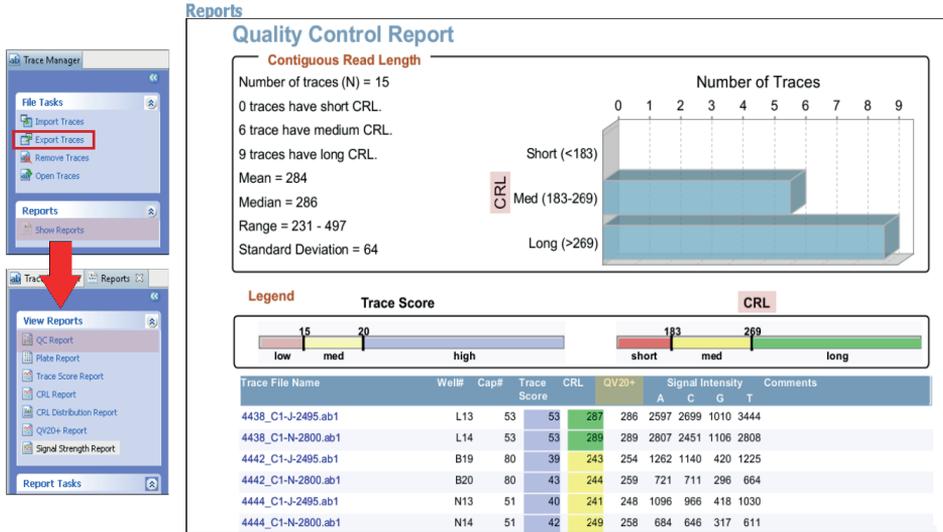
Para obtener un informe general de la calidad de las secuencias [Figura 53], se escogen todos los archivos. Luego, en el panel de la izquierda, se selecciona el menú *Report* y la opción *QC Report*.

La primera parte del informe contiene un reporte denominado *Contiguous Read Length* (CRL), en el que se muestra la longitud de zona de calidad para el conjunto de secuencias [Figura 53], la cual hace referencia a la porción del cromatograma que puede ser leída de forma continua sin encontrar ambigüedades o baja calidad en la asignación de bases nucleotídicas.

En la parte inferior del reporte [Figura 53] se muestra la leyenda de la escala de colores para las variables: *trace score* y *CRL*. Luego se encuentra la información para cada secuencia, donde se indica la posición de la muestra en el plato de secuenciación (*Well*), el capilar en el que fue procesada la muestra (*Cap#*) y la información relacionada con la calidad de la muestra.

Figura 53

Reporte de control de calidad de las secuencias



Fuente: Elaboración propia de los autores.

El parámetro *Trace score* es un puntaje que asigna el programa a la calidad de la secuencia y se relaciona con un indicador de puntaje y con una escala de colores. Se sugiere seleccionar cromatogramas con un indicador entre los rangos medio (color amarillo) y alto (color lila).

El parámetro *CRL* hace referencia a la región en la que se puede hacer una lectura continua del cromatograma. Este corresponde con un indicador de puntaje y con la escala de colores. Es aconsejable para el análisis usar cromatogramas que tengan un los rangos medio (color amarillo) y alto (color verde).

El parámetro *QV (Quality value)* tiene que ver con el puntaje de calidad de una secuencia de ADN. Se considera que valores entre cero y nueve indican la presencia de lecturas de bases con poca definición. Valores entre diez y

veinte sugieren que, aunque hay lecturas de bases de mayor calidad, estas se encuentran mezcladas en varias posiciones del cromatograma. Finalmente, cuando este parámetro es superior a 20 [QV20+], se considera que existe lectura de bases nucleotídicas de calidad y sin ambigüedades.

El cálculo de este parámetro está dado por la siguiente fórmula:

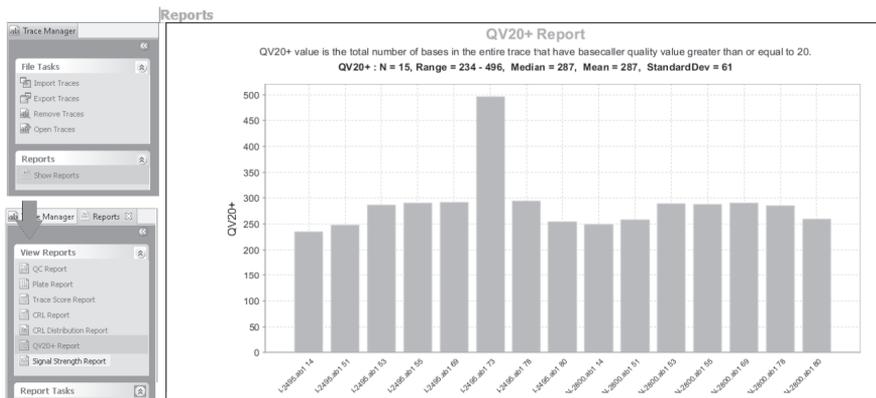
$$(8) QV = -10 \log \log_{10} (Pe)$$

Donde Pe hace referencia a la probabilidad de error (Ewing y Green, 1998).

El parámetro QV20+ lo utilizan los programas para el ensamblaje automatizado de genomas y secuencias consenso, el cual se puede visualizar de forma numérica, así como en forma de un diagrama de barras (Figura 54).

Figura 54

Gráfico de barras de calidad de las secuencias con base en el parámetro QV20+

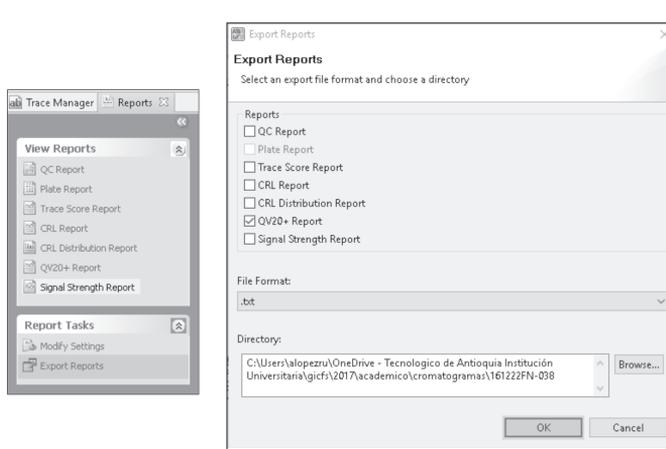


Fuente: Elaboración propia de los autores.

Para hacer un seguimiento de las muestras que se deben re-secuenciar por su baja calidad, se recomienda exportar este informe y guardarlo en formato PDF. Para esto, seleccione la opción *Export Reports*, ubicada en el panel *Report tasks*, en la parte izquierda de la aplicación (Figura 55).

Figura 55

Diálogo de exportación de informes



Fuente: Elaboración propia de los autores.

También existe la opción de exportar estos valores de calidad para que puedan ser usados en hojas de cálculo, esto se puede llevar a cabo cuando se escoge un formato de archivo tipo CSV o XML.

Una vez evaluadas y seleccionadas las secuencias óptimas para el análisis, se procede a utilizar programas para obtener las secuencias consenso y realizar alineamiento.

Ensamblaje manual y edición de secuencias

En muchos casos, una vez evaluada la calidad de las secuencias, es necesario realizar ediciones manuales de ellas. Para esto los cromatogramas deben ser inspeccionados para confirmar si los picos corresponden con la secuencia de nucleótidos, además la comparación de la secuencia *forward* y *reverse* permitirá construir una secuencia consenso. También, las regiones iniciales y terminales, con baja calidad, podrán ser recortadas.

Para llevar a cabo estos procedimientos existen varios programas, algunos de ellos son licenciados y se debe pagar un valor por su uso, otros se pueden encontrar en la web y su uso es libre. Dentro de los más fáciles de usar, de uso libre, multiplataforma y con amplias funcionalidades, se encuentra el Bioedit (Hall, 1999), el cual tomamos como programa de referencia. Bioedit permite alinear y editar secuencias de ADN e incluye la visualización de cromatogramas y secuencias de nucleótidos en ventanas simultáneas, lo que facilita hacer una comparación de las secuencias al momento de editarlas. Adicionalmente, se integra con otros programas como CLUSTAL 2 (Larkin et al., 2007) y Phylip (Felsenstein, 2005) para desarrollar el análisis de alineamiento y reconstrucción filogenética.

Este programa posee varios menús dentro de los cuales encontramos:

- El menú *File*: Para abrir y guardar los datos en diferentes formatos (Fasta, Genbank, ABI), así como exportar y ver las secuencias en formato gráfico.
- El menú *Edit*: Para manipular (reversar, complementar) y buscar los patrones de caracteres dentro de una secuencia.
- El menú *Sequence*: Para manipular la secuencia y seleccionarla, extraer posiciones, editar la información relativa a ella, alinear pares, bloquear contra ediciones, ver sitios conservados, ubicar los cebadores⁸ al interior de la secuencia, etc.
- El menú *Alignment*: Contiene las opciones para crear alineamientos de pares, buscar posibles sitios afines para el alineamiento, mostrar de forma resumida las frecuencias y cambios nucleotídicos a lo largo de las secuencias, hallar regiones conservadas y definir la matriz de similitud.
- El menú *View*: Permite ver y/o ocultar columnas dentro de las secuencias, bloques conservados, cambiar el formato (color, blanco y negro, resaltadas, etc.), dividir la ventana de las secuencias y crear métodos de acceso por el teclado a las opciones de los menús.

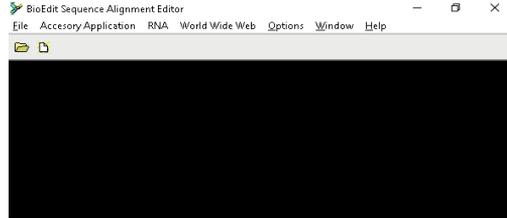
⁸ Secuencia corta de ADN con longitud entre 18-22 pares de bases, que se usa como punto de inicio para la síntesis de ADN de un fragmento de interés.

- El menú *Accesory Application*: Contiene las opciones para ejecutar las aplicaciones por programas integrados a BIOEDIT, entre las cuales se encuentra el alineamiento óptimo por CLUSTALW. Las opciones que se pueden hallar en este menú son: alineamiento múltiple, herramienta de alineamiento básico local (BLAST), y algunos programas integrados del paquete Phylip que, aunque no son para ensamblar secuencias, sirven para análisis subsecuentes como: la obtención de matrices de distancias, generación de dendrogramas por el método Neighbor Joining, y análisis de parsimonia y máxima verosimilitud.
- El menú *RNA*: Posibilita llevar a cabo análisis para secuencias de ARN; se puede hallar la covariación y sitios potenciales de apareamiento de la molécula.
- El menú *World Wide Web*: Incluye páginas de recursos web, algunas de las cuales permiten generar mapas de restricción, diseño de cebadores, y acceso a herramientas en el NCBI, como BLAST y Pubmed.
- El menú *Options*: Posibilita configurar las preferencias del usuario y el programa.
- El menú *Window*: Permite organizar las ventanas de varios documentos con fines de análisis y comparación.
- El menú *Help*: Ofrece la ayuda básica del uso de comandos y opciones, así como una descripción de la versión, citación y derechos de autor del programa.

En esta guía ilustraremos el uso de los menús *File*, *Sequence*, *Edit* y *Alignment*. Al abrir el programa, se despliega la interfaz en cuya barra de herramientas aparecen los diferentes menús [Figura 56].

Figura 56

Ventana principal del programa Bioedit

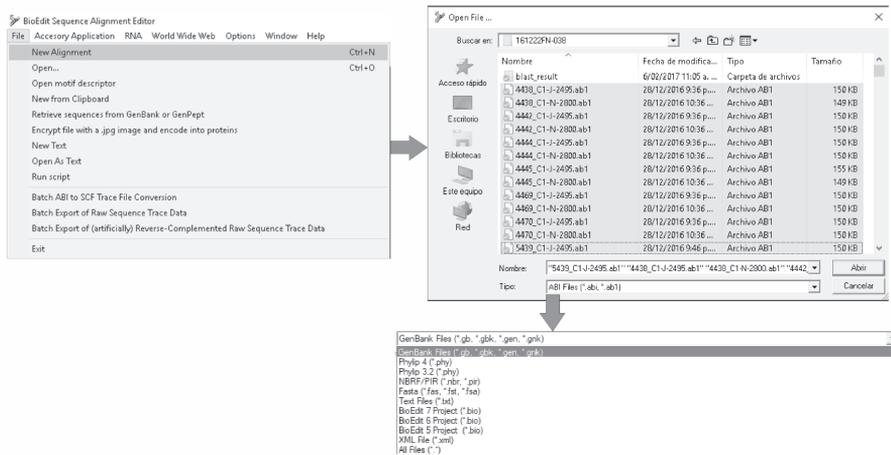


Fuente: Elaboración propia de los autores.

Para abrir el archivo o la secuencia que se va a editar, se señala en el menú *File* la opción *Open* (Figura 57). Aparecerá una ventana de diálogo que permite elegir el archivo, en formato ABI, también se pueden seleccionar varios archivos mediante el uso de la tecla control (CTRL) y el botón del mouse. Escoga el botón *Abrir*.

Figura 57

Visualización para abrir y cargar cromatogramas para análisis



Fuente: Elaboración propia de los autores.

A continuación, se visualizan en la interfaz del programa dos ventanas: una corresponde a la secuencia en formato FASTA y otra, al cromatograma (Figura 58).

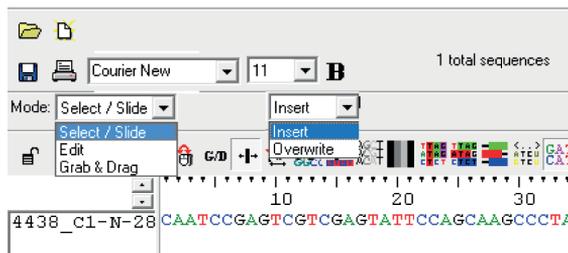
Figura 58
Visualización de cromatogramas y secuencias



Nota. a. ventana de visualización de secuencia en texto; **b.** ventana de visualización de cromatograma. Fuente: Elaboración propia de los autores.

Se debe realizar la edición en la ventana de texto, dirjirse a esta ventana, y en la sección *Mode*, seleccione la opción *Edit* y a continuación, seleccione la opción *Overwrite* (Figura 59).

Figura 59
Ventana de modo de edición de secuencias



Fuente: Elaboración propia.

La otra alternativa es un poco más sencilla y permite trabajar directamente sobre el cromatograma. En primer lugar, se va al menú *View* y se selecciona la opción *Editable sequence*. Con el cursor puede visualizar y ubicar la posición que se desee editar [Figura 60]. La escala de la ventana de visualización del cromatograma se puede modificar mediante las ventanas ubicadas en el margen izquierdo [escala horizontal y escala vertical] [Figura 60].

Figura 60

Procedimiento para activar la edición de cromatogramas y ubicación de las escalas

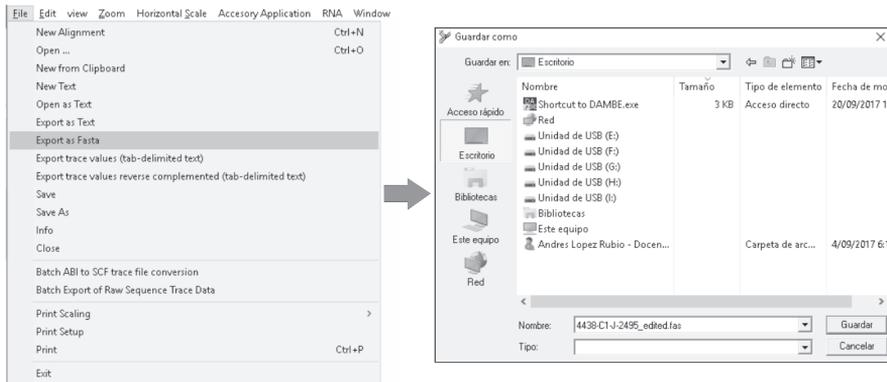


Fuente: Elaboración propia de los autores.

Desplácese a lo largo del cromatograma, revise la información de cada lectura y el nucleótido asignado, en caso de que estas no coincidan, realice los cambios en la secuencia. Al finalizar la edición del cromatograma, este puede guardarse en formato *ABI* al desplegar el menú *File*, en donde se selecciona la opción *Export as FASTA*. A continuación, se despliega una ventana donde deberá elegir el nombre del archivo y la extensión [.fas]. Es recomendable conservar el código asignado a la muestra y usar un literal que indique que se trata de la versión editada de la secuencia (Figura 61).

Figura 61

Exportación de edición de cromatograma en formato FASTA



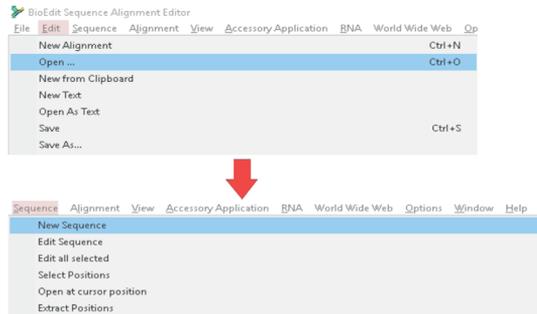
Fuente: Elaboración propia de los autores.

La edición de secuencias se debe hacer acorde con el número de *primers* secuenciados. Para estudios de filogenia y evolución es deseable que la región de interés sea secuenciada en ambos sentidos. Por lo tanto, se tienen dos secuencias para un mismo ejemplar (una en sentido 5'-3' forward y otra en sentido 3'-5' reverse), se debe proceder, entonces, a construir una secuencia consenso entre ambas.

Para realizar este procedimiento, debemos cargar los dos archivos *Fasta* que acabamos de exportar mediante la selección del menú *File* y la opción

open. Luego, proceda a crear un archivo nuevo de alineamiento haciendo clic en la opción *New sequence* (Figura 62).

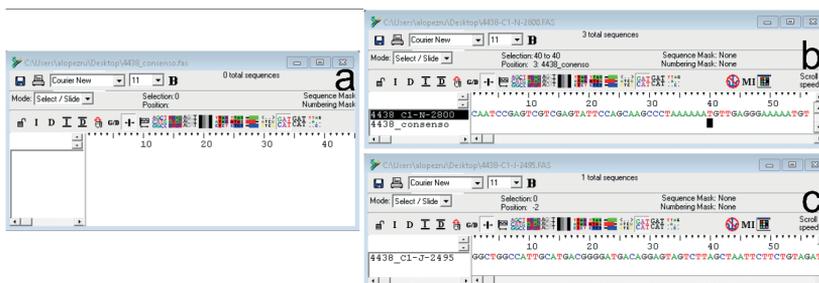
Figura 62
Creación de una secuencia consenso



Fuente: Elaboración propia de los autores.

Después de este proceso, en la interfaz se visualizarán tres ventanas: secuencia consenso, secuencia de primer *forward* y secuencia de primer *reverse* (Figura 63).

Figura 63
Ensamblaje de secuencia consenso



Nota. **a.** ventana para secuencia consenso; **b.** ventana de secuencia consenso forward; **c.** ventana de secuencia consenso reverse.

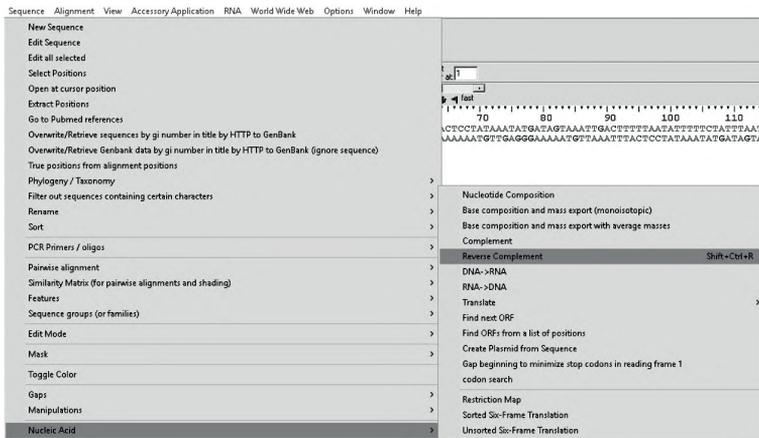
Fuente: Elaboración propia de los autores.



Se debe reversar y complementar la secuencia que corresponde al *primer reverse*. Para esto, seleccione la etiqueta de dicha secuencia, haga clic en la opción del menú *Sequence*, seguidamente, en el submenú *Nucleic Acid*, seleccione la opción *Reverse/Complement* [Figura 64].

Figura 64

Transformación [Reverse/Complement] de una secuencia de ADN

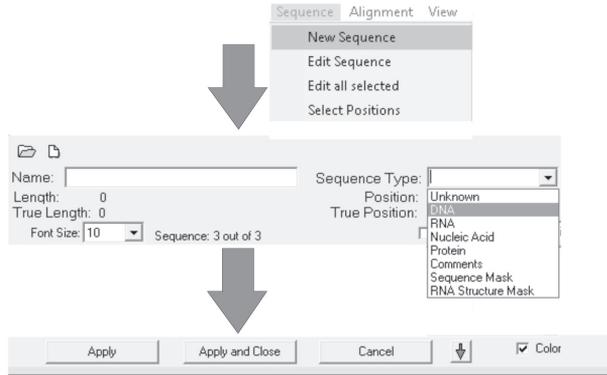


Fuente: Elaboración propia de los autores.

Después de este último paso, las secuencias *forward* y *reverse* quedan en el mismo sentido, aquí se debe proceder a construir una secuencia consenso. Para esto, haga clic en la opción *New Sequence* del menú *Sequence*, a continuación, se abre otra ventana en la cual debe nombrar la nueva secuencia e indicar a qué tipo de secuencia corresponde, para finalizar, haga clic en el botón *Apply and Close* [Figura 65]. Pegue las secuencias *forward* y *reverse* en la ventana de la secuencia consenso.

Figura 65

Creación de una nueva secuencia

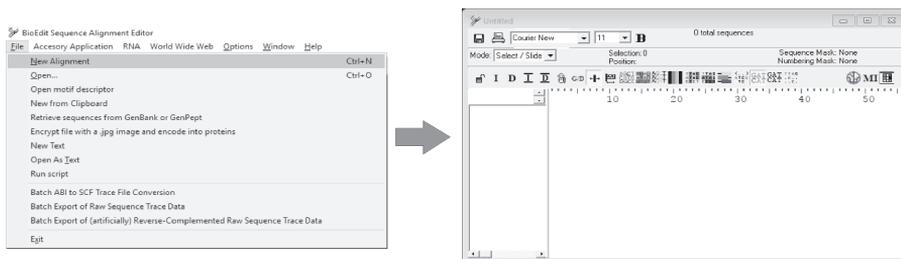


Fuente: Elaboración propia de los autores.

Este procedimiento se realiza para cada una de las secuencias que se van a analizar, una vez tenga el conjunto de secuencias consenso puede proceder a construir un alineamiento múltiple, para lo cual se selecciona en el menú *File*, la opción *New alignment* (Figura 65). Seguidamente, se despliega una ventana en blanco (no titulada), sobre la cual se construirá la matriz de datos (alineamiento de secuencias) (Figura 66).

Figura 66

Despliegue del menú *File* para abrir nuevo alineamiento

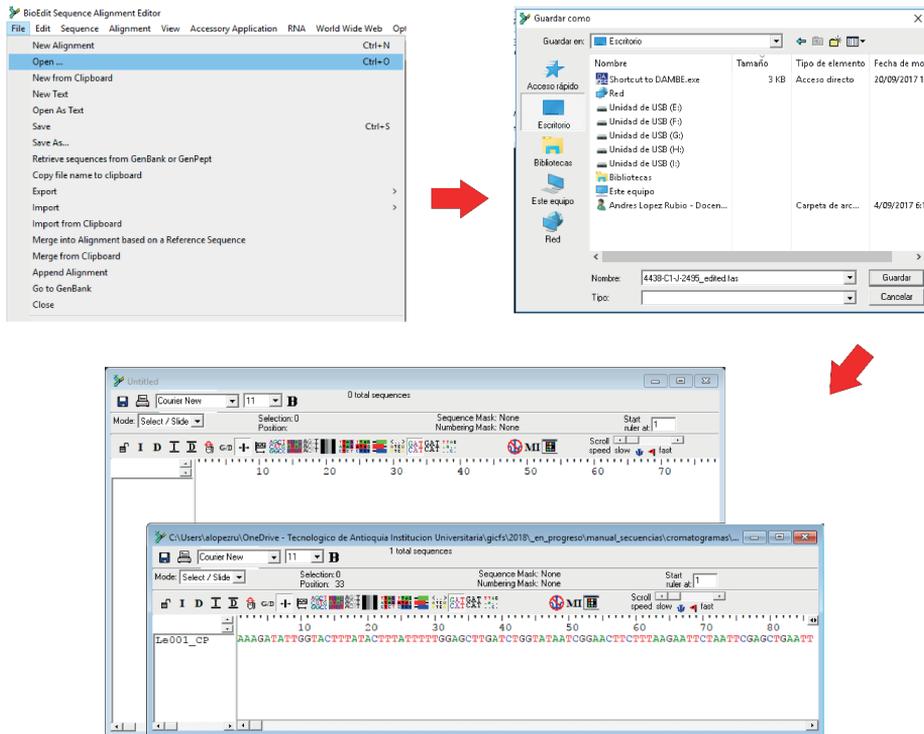


Fuente: Elaboración propia de los autores.

Para escoger las secuencias consenso que irán en la nueva ventana, en el menú *File* se hace clic en la opción *Open* (Figura 67), luego, en la ventana de diálogo que se despliega se puede seleccionar el archivo correspondiente a la secuencia (formato *Fasta*). Se escoge la secuencia que se va a analizar y se da clic en la opción *Open*, una vez haya elegido esta opción, en la interfaz se visualizarán dos ventanas simultáneas: una corresponde al nuevo alineamiento y la otra, a la secuencia seleccionada.

Figura 67

Vista de ventanas simultáneas para construcción de archivo de alineamiento

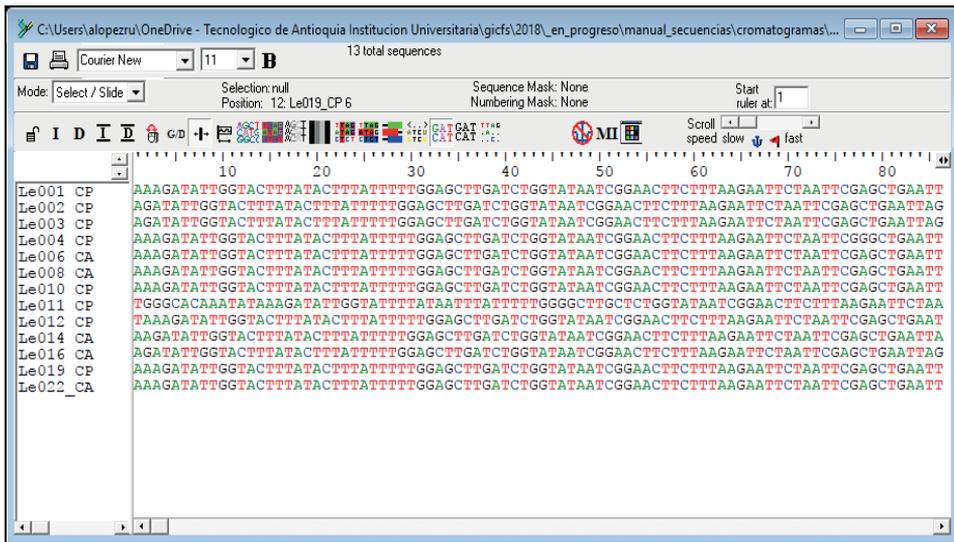


Fuente: Elaboración propia de los autores.

A continuación, se hace clic sobre la etiqueta de la secuencia editada y se despliega el menú *Edit*, se selecciona la opción *Copy*, se dispone el cursor sobre la ventana en blanco [no titulada], se selecciona de nuevo el menú *Edit* y se señala la opción *Paste*. Se realiza este mismo procedimiento para el número de secuencias que se quieran incluir en el análisis. En la Figura 68 se puede observar la matriz para 13 secuencias. En la ventana ubicada a la izquierda de la pantalla, se observan las etiquetas (nombre) de la secuencia y en la ventana derecha, la secuencia de nucleótidos para cada ejemplar [Figura 68].

Figura 68

Archivo con matriz de datos para alineamiento



Fuente: Elaboración propia de los autores.

Una vez terminado este proceso, se tendrá la matriz completa para proceder a realizar los análisis que el investigador requiera.

Referencias

- Applied Biosystems. [2011]. Sequence Scanner Software v1.0 Sequence Trace Viewer and Editor. Product Bulletin website. <https://www.thermofisher.com/co/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger-dna-sequencing/sanger-sequencing-data-analysis.html> [Consultado: 13 de octubre de 2021].
- Bonfield, J. K., y Staden, R. [1995]. The application of numerical estimates of base calling accuracy to DNA sequencing projects. *Nucleic Acids Research*, 23{8}, 1406-1410. <https://doi.org/10.1093/nar/23.8.1406>
- Ewing, B., y Green, P. [1998]. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Research*, 8{3}, 186-194. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.186>
- Felsenstein, J. [2005]. *PHYLIP [Phylogeny Inference Package] version 3.6*. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>
- Hall, T. A. [1999]. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98. <http://www.mbio.ncsu.edu/jwb/papers/1999Hall1.pdf>
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., Higgins, D. G. [2007]. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23{21}, 2947-2948. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>



Anexo

Tabla de programas de edición y de análisis de secuencias

Programa	Uso	Disponibilidad	Enlace
LaserGene-DNA STAR	Edición de secuencias	Licencia	http://www.dnastar.com/t-all-products.aspx
Geneious	Edición de secuencias, alineamiento, mapeo, anotación de secuencias	Licencia	http://www.geneious.com/
Sequence Scanner	Evaluación de calidad de secuencias de ADN	Libre acceso	https://www.thermofisher.com/co/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger-dna-sequencing/sanger-sequencing-data-analysis.html
Cap3	Edición de secuencias de ADN	Libre acceso	http://seq.cs.iastate.edu/cap3.html
Staden	Edición de secuencias de ADN	Libre acceso	http://staden.sourceforge.net/
Bioedit	Edición de secuencias de ADN	Libre acceso	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html
Ugene	Edición de secuencias de ADN	Libre acceso	http://ugene.net/



Este libro se terminó de imprimir en los talleres
de Divegráficas S. A. S., Medellín, en el mes
de diciembre del 2021



When cells divide, DNA is replicated and passed on to the next generation. This process is called DNA replication. It involves the synthesis of a new DNA molecule using the original DNA molecule as a template. The process is semi-conservative, meaning that each new DNA molecule consists of one original strand and one newly synthesized strand.

Chemically, DNA consists of a sugar-phosphate backbone and nitrogenous bases. The sugar-phosphate backbone is formed by alternating deoxyribose sugar and phosphate groups. The nitrogenous bases are attached to the sugar groups and are the key to the genetic code. They pair up with each other to form the rungs of the DNA ladder.

There are two main types of DNA replication: prokaryotic and eukaryotic. Prokaryotic DNA replication is simpler and occurs in a single circular chromosome. Eukaryotic DNA replication is more complex and occurs in multiple linear chromosomes. It involves the formation of a replication fork and the use of various enzymes to synthesize the new DNA strands.

The process of DNA replication is essential for life. It ensures that genetic information is passed on accurately from one generation to the next. Errors in the replication process can lead to mutations, which can have various effects on an organism, including causing genetic diseases and cancer.



**Tecnológico
de Antioquia**
Institución Universitaria
VIGILADA MINEDUCACIÓN

