

Manual de herramientas moleculares

Colección **PA SATExTOS**

Conceptos básicos
y técnicas empleadas
en el estudio de la
genética microbiana



UniRío
editora

Elina Reinoso, Silvana Dieser y Melina Moliva

ISBN 978-987-688-715-4

e-book

Reynoso, Elina

Manual de herramientas moleculares : conceptos básicos y técnicas empleadas en el estudio de la genética microbiana / Elina Reynoso ; Silvana Dieser ; Melina Moliva. - 1a ed. - Río Cuarto : Universidad Nacional de Río Cuarto, 2022.

Libro digital, PDF - (Pasatextos)

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-950-665-715-4

1. Biología Molecular. 2. ADN. 3. Genética. I. Dieser, Silvana. II. Moliva, Melina. III. Título. CDD 572.8

Manual de herramientas moleculares. Conceptos básicos y técnicas empleadas en el estudio de la genética microbiana

Elina Reynoso, Silvana Dieser y Melina Moliva

Ilustración de portada: *Sofía Castillo*

2022 © *UniRío editora*. Universidad Nacional de Río Cuarto
Ruta Nacional 36 km 601 – (X5804) Río Cuarto – Argentina
Tel.: 54 (358) 467 6309
editorial@rec.unrc.edu.ar
www.unirioeditora.com.ar



Este obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución 2.5 Argentina.
http://creativecommons.org/licenses/by/2.5/ar/deed.es_AR



Consejo Editorial

Facultad de Agronomía y Veterinaria
Prof. Mercedes Ibañez y Prof. Alicia Carranza

Facultad de Ciencias Humanas
Prof. Graciana Pérez Zavala

Facultad de Ciencias Económicas
Prof. Clara Sorondo

Facultad de Ingeniería
Prof. Marcelo Alcoba

Facultad de Ciencias Exactas, Físico–
Químicas y Naturales
Prof. Sandra Miskoski

Biblioteca Central Juan Filloy
Bibl. Claudia Rodríguez y Bibl. Mónica Torreta

Secretaría Académica
Prof. Sergio González y Prof. José Di Marco

Índice

Introducción	5
1. MÉTODOS FENOTÍPICOS Y GENOTÍPICOS	6
1.1. <i>Métodos Fenotípicos</i>	6
1.2. <i>Métodos Genotípicos</i>	6
2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA – PCR.....	8
2.1. <i>Generalidades del ADN</i>	8
2.2. <i>Ciclo de amplificación</i>	9
2.3. <i>Parámetros que afectan la PCR</i>	10
2.4. <i>Infraestructura y contaminaciones</i>	11
2.5. <i>Cebadores o primers universales y específicos</i>	12
2.6. <i>Electroforesis y geles de agarosa</i>	13
3. VARIANTES DE PCR	16
3.1. <i>PCR Múltiple</i>	16
3.2. <i>RAPD-PCR</i>	16
3.3. <i>REP-PCR</i>	16
3.4. <i>PCR anidada</i>	17
3.5. <i>PCR - In situ</i>	17
3.6. <i>PCR digital</i>	17
3.7. <i>LAMP - PCR</i>	18
3.8. <i>Real Time PCR</i>	18
3.8.1. <i>Etapas en Real Time PCR</i>	20
4. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	21
4.2. <i>Nomenclatura</i>	22
4.3. <i>Componentes de una reacción de restricción</i>	22
4.4. <i>Condiciones a tener en cuenta al trabajar con enzimas de restricción</i>	23
4.5. <i>Cómo seleccionar la enzima de restricción correcta</i>	23
5. EPIDEMIOLOGÍA: ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSANTE (PFGE).....	24
5.1. <i>Etapas de la electroforesis en campo pulsante (PFGE)</i>	24
5.2. <i>Componentes de un sistema de PFGE</i>	25
5.3. <i>Patrón de PM</i>	26

5.4. Variables que afectan a la resolución de PFGE.....	26
5.5. Inconvenientes de la técnica.....	27
5.6. Interpretación de los resultados	27
6. TRANSFERENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS A SOPORTES SÓLIDOS	29
6.1. Tipos de marcación.....	29
6.2. Southern Blot.....	30
6.3. Northern Blot	31
6.4. Western Blot.....	32
7. SECUENCIACIÓN.....	33
7.1. Primeros métodos de secuenciación.....	33
7.2. Tecnologías de segunda generación.....	33
7.3. Ion Torrent.....	34
7.4. Pirosecuenciación	35
7.5. Flujo de trabajo de NGS.....	36
7.5.1. Preparación de bibliotecas genómicas	36
7.5.2. Enriquecimiento del blanco.....	36
7.5.3. Amplificación del templado y secuenciación masiva paralela.....	37
7.5.4. Procesamiento de datos	37
7.6. Tecnologías de tercera generación.....	37
7.7. PacBio.....	38
7.8. Nanopore.....	38
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
ANEXO I: PROTOCOLOS DE TRABAJO	43
I. EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSOMAL A PARTIR DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS.....	43
II. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL CON TRIZOL	44
III. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS A PARTIR DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.....	45
IV. REACCIÓN CONVENCIONAL DE PCR DE PUNTO FINAL.....	46
V. REACCIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL	47
VI. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	48
VII. REACCIÓN DE DIGESTIÓN ENZIMÁTICA	49
VIII. ELECTROFORESIS EN CAMPOS PULSANTES	50
ANEXO II: SOLUCIONES DE TRABAJO.....	52

Introducción

La Biología Molecular es un área de la Biología que se encarga de estudiar los procesos que se llevan a cabo en los seres vivos desde un punto de vista molecular. Se nutre de los aportes de la bioquímica, la biología celular y la genética. Los ácidos nucleicos y las proteínas son principalmente su objeto de estudio. El descubrimiento de la doble hélice de ADN, el conocimiento de la actividad de ciertas enzimas sobre el ADN, el uso de la PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) y sus variantes, el desarrollo del ADN recombinante y la ingeniería genética han revolucionado por completo la biología. El estudio molecular ha sido fundamental para múltiples adelantos científicos aplicados a la industria, la agricultura, la medicina humana y animal. El objetivo de este **Manual de Herramientas Moleculares** es realizar una síntesis de los conceptos básicos necesarios para desarrollar las principales técnicas moleculares empleadas en el estudio de la genética bacteriana.

1. MÉTODOS FENOTÍPICOS Y GENOTÍPICOS

1.1. Métodos Fenotípicos

Tradicionalmente, la identificación bacteriana se lleva a cabo mediante métodos convencionales, basados en las características fenotípicas.

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. El cultivo, cuando es factible, continúa siendo el método diagnóstico de elección ya que a través de él se permite el aislamiento del microorganismo, su identificación y el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos. En el cultivo es esencial una adecuada elección del medio de crecimiento y las condiciones de incubación.

La identificación fenotípica bacteriana se basa fundamentalmente en la comparación de las características fenotípicas de bacterias desconocidas con aquellas de cultivos tipo. Existen en el mercado numerosos sistemas multipuebas con el fin de conseguir una mayor rapidez en la identificación bacteriana. Estos sistemas pueden ser: **1) Sistemas comerciales manuales:** se trata de celdillas aisladas con sustrato liofilizado que se inoculan individualmente y que permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas. Algunos de los sistemas disponibles en el mercado son: API (bioMérieux), Enterotube (BBL), Oxi/Ferm Tube (BD), RapID systems y MicroID (Remel), Biochemical ID systems (Microgen), entre otros. **2) Sistemas comerciales automatizados:** son galerías multipuebas, como las descritas anteriormente, cuya inoculación, incubación y lectura se efectúan de modo automatizado. Algunos de los sistemas comerciales disponibles en el mercado son: MicroScan, Vitek, ATB, Pasco, Wider, Phoenix, entre otros (Bou y col., 2011).

Por otro lado, una variedad de métodos fenotípicos tales como fagotipificación, sensibilidad a antibióticos, biotipificación, electroforesis con enzimas multilocus y ecotipo, entre otros, han sido ampliamente usados para estudiar diversidad en investigaciones epidemiológicas en infecciones humanas y animales (Nelson y col., 2008).

1.2. Métodos Genotípicos

La elevada variabilidad fenotípica de las cepas bacterianas ha dificultado la adopción de los sistemas convencionales. Ninguno de los sistemas utilizados ha provisto de información clara y definitiva. Además, se ha informado que los resultados de estas técnicas están sujetos a cambios a lo largo del tiempo (Tenover y col., 1994). Estos inconvenientes han conducido al desarrollo de nuevas técnicas, más rápidas y confiables, basadas en la tecnología del ADN. La mayoría de las técnicas moleculares actualmente usadas para tipificación, se basan en la separación electroforética en geles de agarosa de fragmentos de ADN de distinto peso molecular. Este resultado está representado mediante un perfil de bandas en un gel donde cada banda es un marcador molecular (Dieffenbach y col., 1995). Entonces los aislados epidemiológicos relacionados tendrán un perfil genómico indistinguible de los aislados no relacionados o al azar de la misma especie. La epidemiología molecular en el campo de las

enfermedades infecciosas apunta a la detección de polimorfismos genéticos entre cepas de microorganismos de importancia clínica. Las relaciones genéticas pueden ser establecidas entre cepas sobre la base de medidas de heterogeneidad genética. El conocimiento de estas relaciones es de gran utilidad en el área de la epidemiología.

Un significativo avance en la tecnología del ADN se produjo cuando Kary Mullis y sus colaboradores, lograron amplificar genes de copia simple en condiciones *in vitro*, empleando el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I de *Escherichia coli* (Mullis y col., 1986). En 1993 K. Mullis ganó el Premio Nobel de Química debido a la invención de esta técnica denominada PCR (*Polymerase Chain Reaction*), la cual, se caracteriza porque puede realizarse con muy poca cantidad de ADN y en pocas horas. Las muestras de ADN pueden obtenerse de distintos materiales como hueso, tejido, sangre, piel, cabello, entre otros o bien de cultivo celular. Es empleada para hacer identidad genética, diagnóstico, medicina forense, secuenciación, estudios evolutivos, entre otras (van Pelt-Verkuil y col., 2008).

En la actualidad existe una gran variedad de métodos moleculares que se utilizan para la tipificación de las cepas bacterianas con diferentes grados de discriminación, entre ellas la ribotipificación, amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD), amplificación por PCR de elementos repetitivos de ADN (rep-PCR), polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), electroforesis de campos pulsantes (PFGE), electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), análisis de locus múltiples de número variable de repeticiones en tándem (MLVA) y la tipificación por secuencia de multilocus (MLST) (Gilbert y col., 2006; Herron-Olson y col., 2007).

2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA – PCR

La técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) es uno de los pilares de la Biología Molecular moderna ya que es una de las más versátiles y ampliamente aplicadas en los laboratorios biológicos. Es una técnica muy simple, en la cual el ADN es amplificado millones de veces.

La PCR es una potente herramienta de Biología Molecular, que puede ser usada para la identificación de especies y cepas de diversos microorganismos. Esta técnica, conceptualmente simple, tiene por **objetivo** generar una gran cantidad de un ADN de interés, es decir **amplificar una secuencia de ADN particular** a partir de una pequeña cantidad de ADN molde. Además de ser simple, la técnica es robusta, rápida y, sobre todo, flexible (Asuar, 2007).

2.1. Generalidades del ADN

El ADN es un polímero formado por nucleótidos, con un esqueleto de pentosas y grupos fosfatos unidos por enlaces éster. Unido a cada azúcar hay una base nitrogenada (que puede ser Adenina, Timina, Citosina y Guanidina). En los seres vivos, el ADN se presenta como una doble cadena de nucleótidos, en las que las dos hebras están unidas entre sí por enlaces de hidrógeno. El enlace fosfodiéster que une un nucleótido a otro es asimétrico: une dos pentosas contiguas por el tercer y el quinto C del anillo. Una consecuencia de esto es que una hebra de ADN va a tener dos “extremos”, uno llamado 5’ (con un grupo fosfato terminal) y otro llamado 3’ (con un grupo hidroxilo terminal). De esta forma, cada hebra de ADN tiene una dirección (Travers y Muskhelishvili, 2015). Las dos hebras corren en direcciones opuestas: la doble cadena de ADN es antiparalela (Figura 1).

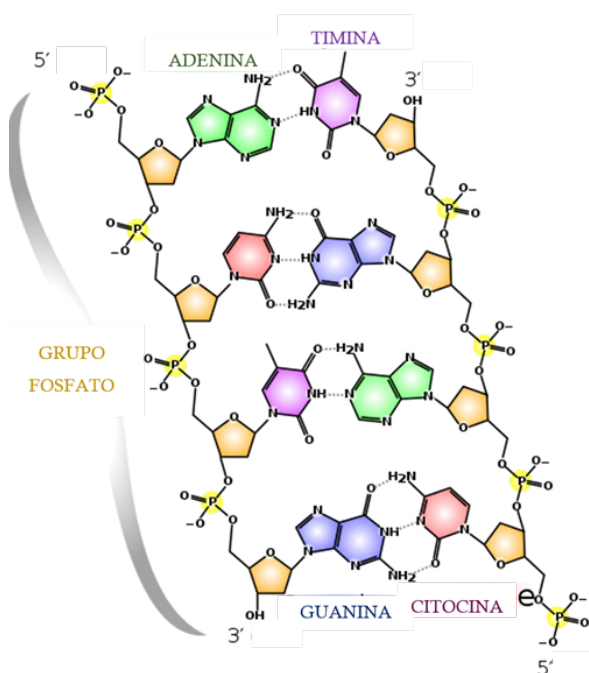


Figura 1. Estructura del ADN. La doble hélice de ADN es antiparalela y complementaria, las cadenas se unen por puentes de hidrógeno, dos entre adenina y timina, tres entre guanina y citosina. El enlace fosfodiéster que une a cada nucleótido, se forma entre el grupo fosfato que se encuentra en el carbono 5 y el grupo hidroxilo (–OH) del carbono 3 de la desoxirribosa. Los grupos fosfato son la parte hidrofílica del ADN y tienen carga negativa.

Imagen extraída y modificada de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_chemical_structure.svg

2.2. Ciclo de amplificación

En el proceso de **replicación**, la enzima ADN polimerasa sintetiza una hebra de ADN a partir de un molde de ADN simple hebra y una pequeña secuencia complementaria (*primer* o cebador) al molde. El proceso ocurre en dirección 5' - 3', ya que la polimerasa necesita un grupo 3' -OH libre para catalizar la incorporación de un nuevo dNTP. Ese extremo 3' -OH libre lo provee el cebador.

La técnica de PCR imita lo que ocurre naturalmente en la célula durante el proceso de replicación. Lo logra mediante un proceso iterativo que consiste de tres etapas: desnaturalización del molde por calor, hibridación de los cebadores al ADN molde simple cadena (*annealing*) y extensión de los cebadores mediante una ADN polimerasa termoestable (Figura 2).

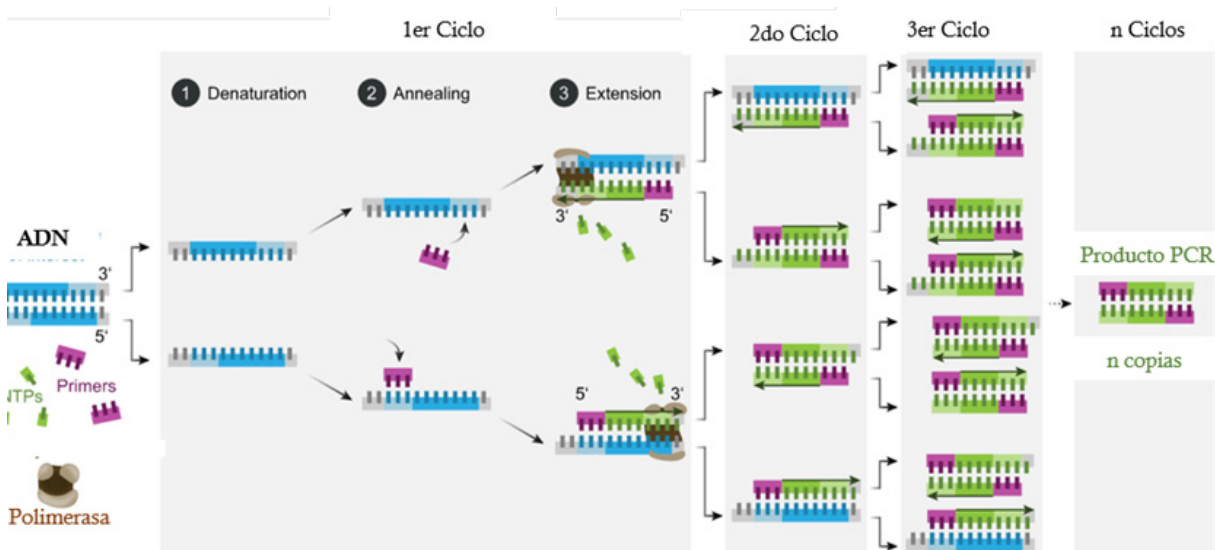


Figura 2. Ciclo de una Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR.

Imagen extraída y modificada de https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ab/Polymerase_chain_reaction-en.svg Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0

- **Desnaturalización:** El ADN doble cadena se desnaturaliza (separación de la doble hebra) a una temperatura que está determinada principalmente por su contenido G + C, longitud de la cadena, fuerza iónica, entre otros factores. Cuanto mayor sea la proporción GC, mayor es la temperatura necesaria para separar las hebras del molde de ADN. El tiempo necesario para desnaturalizar al molde es proporcional al largo de la molécula de ADN. En general, la desnaturalización se lleva a cabo a 94 – 95°C, que es la temperatura más alta que puede resistir la enzima *Taq* ADN polimerasa por 30 o más ciclos. Esta polimerasa se extrae de la bacteria *Thermus aquaticus* y se emplea para hacer la reacción de PCR porque es estable a altas temperaturas. En el primer ciclo de PCR, la desnaturalización se suele llevar a cabo por 5 -10 minutos para aumentar la probabilidad de que las largas moléculas de ADN se desnaturalicen por completo.
- **Annealing de los cebadores o primers:** La temperatura usada para el annealing es crítica. Si la temperatura de annealing es muy alta, los cebadores hibridan mal con el molde o no hibridan y el rendimiento de la amplificación es muy bajo. Si por el contra-

rio la temperatura de annealing es muy baja, el cebador puede hibridar en forma inespecífica, dando lugar a la amplificación de fragmentos no deseados de ADN.

- **Extensión de los cebadores o primers:** Se lleva a cabo a la temperatura óptima para la síntesis de ADN de *Taq* polimerasa, que está en el rango 72 – 78°C. En los primeros dos ciclos, la extensión se hace sobre la muestra de ADN que incorporamos en la mezcla de reacción. En el tercer ciclo ya se producen moléculas de ADN del cuyo tamaño es igual a la secuencia delimitada por los dos cebadores. De aquí en más, este segmento de ADN aumenta en forma exponencial.

En el último ciclo de la extensión se suele hacer la extensión durante un tiempo mayor, para favorecer que se complete la extensión de todos los productos de amplificación.

- **Número de ciclos:** La reacción de amplificación va a generar productos de amplificación hasta que alguno de los reactivos se agote. Se espera que para ese punto el rendimiento de la amplificación haya llegado a su punto máximo. En general son suficientes entre 30 - 35 ciclos de amplificación.

2.3. Parámetros que afectan la PCR

La reacción de PCR tiene 7 componentes principales:

- **ADN polimerasa termoestable:** En la actualidad existen una amplia variedad de enzimas disponibles comercialmente que varían en su fidelidad, eficiencia y habilidad de sintetizar largos productos de ADN. En la rutina de los ensayos de laboratorio se emplea *Taq* polimerasa (0,5 – 2,5 unidades para reacciones de 25 – 50 µl)
- **Cebadores o primers:** Son oligonucleótidos dirigidos a secuencias específicas del genoma de las cuales son complementarios. De todos los parámetros, el que más influencia la eficiencia y especificidad de la reacción son los cebadores. Es importante diseñarlos cuidadosamente para obtener el producto de interés con alto rendimiento y evitar la amplificación de secuencias no deseadas y facilitar la manipulación posterior del producto. Los cebadores deben tener una longitud adecuada de 10 - 15 pb, no deben ser complementarios entre ellos y deben tener una temperatura de fusión similar. Siempre deben estar en exceso porque es necesario que compitan con el ADN en la etapa de hibridación.
- **Desoxinucleótidos trifosfato dNTPs:** La PCR estándar contiene cantidades equimolares de dATP, dTTP, dCTP y dGTP. Se recomienda usar una concentración de 200 – 250 µM de cada dNTP en una mezcla de reacción de 50 µl. Altas concentraciones de dNTPs inhiben la reacción, posiblemente porque secuestran Mg^{2+} . Varias empresas venden dNTPs para PCR que están libres de pirofosfatos que pueden inhibir la PCR.
- **Cationes divalentes:** Todas las ADN polimerasas termoestables necesitan cationes divalentes libres (en general Mg^{2+} , comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$)). Como los dNTPs y los cebadores atrapan Mg^{2+} , la concentración de este catión debe exceder la concentración de los cebadores y los dNTPs. Aunque la concentración de Mg^{2+} debería ser determinada empíricamente para cada combinación de cebadores, en general se usa una concentración de 2 - 3,5 mM de Mg^{2+} por reacción.

- **Buffer de reacción:** Es provisto por la empresa comercial y contiene Tris – Cl 10 mM; pH = 8,3 - 8,8. Cuando se incuba a 72°C, el pH baja a 7 y mantiene el pH de la reacción.
- **Cationes monovalentes:** El *buffer* de reacción suele contener 50 mM de KCl y favorece las reacciones de productos mayores a 500 pb. Aumentar la concentración de KCl 70 – 100 mM suele mejorar el rendimiento de fragmentos cortos de ADN.
- **Molde de ADN:** El molde de ADN que contiene secuencias de interés puede ser simple o doble hebra. También se puede usar ADN plasmídico, aunque el ADN cerrado circular se amplifica menos eficientemente que el ADN lineal. Aunque la PCR necesita una única copia de la secuencia de interés, en general se requiere hasta 10 ng de ADN bacteriano. Es importante que el ADN molde esté limpio y sin contaminaciones. Resulta necesario realizar una cuantificación del mismo midiendo la absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro, ya que a esta longitud de onda los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción. Mediante la relación de absorbancia de la cantidad de ADN medida a 260 nm sobre la cantidad de proteína medida a 280 nm, se puede evaluar la pureza en un extracto de ADN. Un ADN de pureza óptima tiene una relación A260/280 entre 1,8 - 2. Un ADN de pureza aceptable debe tener una relación A260/280 > 1,6. Un valor A260/280 < 1,6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. A través de una corrida electroforética en gel de agarosa se puede confirmar la integridad del ADN.

2.4. Infraestructura y contaminaciones

Un problema habitual es la contaminación de la reacción con ADN exógeno que podría ser amplificado con los cebadores. La alta sensibilidad de la PCR puede ser un problema, ya que la presencia de un contaminante, aun en muy baja concentración, puede dar lugar a falsos positivos. Siempre debe usarse un control negativo sin ADN molde. Si amplifica el control negativo, los productos de amplificación obtenidos en esa corrida pasan a ser “sospechosos” y la corrida se invalida. Se recomienda reemplazar los reactivos por reactivos nuevos y descontaminar los instrumentos. Asimismo, se recomienda fraccionar los distintos reactivos a usar en la reacción.

La separación física de los lugares en los que se prepara la reacción de PCR y donde se visualiza el resultado ayuda a minimizar contaminaciones.

Idealmente se debería trabajar en tres áreas separadas: Un área para extracción de ADN y manipulación de las muestras, otra para la reacción de PCR y una tercera para la visualización de los productos amplificados de la PCR.

En la práctica del laboratorio es difícil llevar a cabo esta separación espacial, por lo cual se separan distintos lugares para llevar a cabo cada una de estas etapas. De ser posible, la mezcla de reacción de PCR se debe llevar a cabo en una cámara con luz UV, para poder descontaminar las superficies de trabajo. Si bien es necesario tomar ciertas precauciones, el laboratorio de PCR demanda poco espacio y equipamiento actualmente accesible (termociclador y cubas de electroforesis).

Otras recomendaciones que ayudan a minimizar las contaminaciones son:

- Usar siempre guantes descartables al realizar la mezcla de reacción
- Poseer un set de micropipetas sólo para el uso de los reactivos de la PCR y que NO deben ser usadas con ADN
- Reactivos y material descartable estéril (tubos de PCR, tips) exclusivos para la reacción de PCR
- No cargar la muestra de ADN en el mismo lugar en el que se prepara la mezcla de reacción. Usar ADN diluido previamente.
- Antes de abrir los tubos de PCR para visualizar el resultado, centrifugar por 10 segundos para que todo el líquido quede en la base del tubo y evitar contaminaciones en los guantes o las micropipetas.
- No abrir los tubos con ADN amplificado en la zona en la que se preparan las PCR.

2.5. Cebadores o *primers* universales y específicos

Los cebadores universales son aquellos que hibridan al gen del ARN ribosómico 16S de cualquier bacteria. Los genes ribosomales bacterianos poseen secuencias nucleotídicas conservadas que son comunes a todas las bacterias. Los métodos de cultivos tradicionales consumen mucho tiempo y pueden ser laboriosos, entonces la amplificación y secuenciado de este gen permite en forma rápida poseer la información sobre la identidad (al menos el género) de una bacteria. También ha sido muy útil en otros casos como son la detección de bacterias no cultivables o la detección cuando el número de bacterias es muy bajo (Briddon y col., 2002; Baker y col., 2003).

Los cebadores específicos se dirigen a secuencias en genes característicos de alguna especie o grupo particular de bacterias, como pueden ser los genes de patogenicidad, de alguna toxina, de pili, entre otros. Existen distintos programas *on-line* destinados al diseño de cebadores específicos, por ejemplo, *Primers 3*, *Primer 3 Plus* o *Primer-BLAST* (Untergasser y col., 2012; Ye y col., 2012). Además, varias empresas tienen sus propios *softwares* para el diseño de cebadores. Estos programas están disponibles en forma gratuita y son sencillos de utilizar. Los consejos generales a la hora de diseñar cebadores son:

- Los cebadores deben tener una longitud de 17 - 22 bases.
- El contenido de G + C debe estar alrededor del 40 - 60%.
- La temperatura de *annealing* deseable debe estar entre 50 - 65°C.
- Se deben evitar secuencias de 3 o más C o G en las regiones terminales 3'.
- Las terminaciones 3' no deben ser complementarias, ya que esto puede llevar a la formación de dímeros.
- Debe evitarse que los cebadores formen secuencias auto-complementarias (habilidad para formar estructuras secundarias).

2.6. Electroforesis y geles de agarosa

La electroforesis en gel se emplea para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN a fin de visualizarlos. Es una técnica simple, rápida y capaz de separar fragmentos de ADN. La separación se basa tanto en la carga eléctrica como en la masa de las moléculas de ADN. Se realiza en una matriz porosa (gel) (Voytas y col., 2000). Habitualmente los geles que se emplean para visualizar bandas de ADN son de agarosa, aunque también se pueden usar de poliacrilamida cuando se quieren observar fragmentos de bajo peso molecular (Figura 3).

La agarosa es un polímero lineal compuesto por residuos alternados de D- y L- galactosa unidos por enlaces α - (1 \rightarrow 3) y β - (1 \rightarrow 4) glicosídicos. Cuando se solidifica, forma una malla tridimensional de poros cuyo diámetro van de 50 nm hasta más de 200 nm. Los polímeros de agarosa comerciales tienen unos 800 residuos de galactosa por cadena. Si la agarosa está contaminada con polisacáridos, sales o proteínas puede afectar la temperatura de solidificación, el pasaje de ADN a través de la malla y la capacidad de recuperar el ADN a partir del gel para ser empleado en reacciones enzimáticas. Estos problemas se minimizan usando agarosa de alta calidad que ha sido testada para que no tenga inhibidores ni nucleasas ni que de un *background* de fluorescencia cuando se usa la tinción con Bromuro de Etidio (Lee y col., 2012).

Al aplicar un campo eléctrico de fuerza constante y unidireccional, la velocidad del ADN decrece cuanto mayor es el tamaño de la molécula, debido a la resistencia que ofrece la molécula de ADN a la migración a través de la agarosa. Además, la velocidad del ADN es proporcional a la fuerza del campo eléctrico. Esta proporcionalidad se pierde cuando el ADN llega a un tamaño máximo, que se define de acuerdo a la composición del gel y la fuerza del campo eléctrico. El poder de resolución de los geles de poliacrilamida es superior que el de agarosa, pero esta última tiene un mayor rango de separación (desde 50 pb a megabases) (Lee y col., 2012).

Al preparar el gel se agrega Bromuro de Etidio (BrEt) que se intercala entre las bases del ADN y permite visualizarlo al ser iluminado con luz UV. Las bandas luminosas corresponden a los fragmentos de ADN amplificados. El BrEt es un agente tóxico clasificado como mutágeno, una exposición prolongada a través de ingestión o contacto con la piel, puede causar mutaciones hereditarias y cáncer. Por esta razón es muy importante realizar la electroforesis utilizando todos los elementos de protección personal. En la actualidad existen sustitutos del BrEt que son más seguros, como lo son el *Gel Green* o *Sybr Green*, entre otros (Iglesias-Osores, 2019; Castro-Chacín y Díaz-Martínez, 2021).

La tasa de migración de ADN a través de un gel de agarosa depende de los siguientes factores:

- El tamaño molecular del ADN: La molécula de ADN doble cadena migra a través de la matriz del gel en forma inversamente proporcional al \log_{10} del número de pares de bases. Las moléculas grandes migran más lento debido a que hay un arrastre con mayor fricción y porque “viborean” a través de los poros del gel con menor eficiencia que las moléculas más pequeñas.
- La concentración de agarosa: Dado un fragmento de ADN lineal de un tamaño determinado, la tasa de migración va a variar de acuerdo a la concentración del gel. Los geles con baja concentración de agarosa son capaces de resolver mejor, moléculas de ADN de gran tamaño y viceversa. En forma rutinaria se usan geles de 0,8 – 1% de agarosa.

- La conformación del ADN: Las moléculas de ADN pueden presentar tres conformaciones: circular superenrollado (forma I), circular con una hebra rota (forma II), lineal (forma III). Las tres formas migran distinto. Influye el campo eléctrico, la fuerza iónica del *buffer*, el tipo de agarosa, etc.
- La presencia de Bromuro de Etidio en el gel y el *buffer* de electroforesis: La intercalación del Br Et causa que decrezca la carga negativa del ADN doble cadena y que aumente el largo y la rigidez. La tasa de migración del complejo ADN – Bromuro de Etidio a través del gel se retarda aproximadamente un 15%.
- El voltaje aplicado: A bajo voltaje, la tasa de migración de fragmentos de ADN lineal es proporcional al voltaje aplicado. Cuando aumenta la fuerza del campo eléctrico, la movilidad de los fragmentos de alto peso molecular aumenta diferencialmente; entonces el rango efectivo de separación en geles de agarosa decrece cuando el voltaje aumenta. Para obtener la máxima resolución de fragmentos mayores a 2 kb, los geles deben correrse a no más de 5 - 8 V/cm
- El tipo de agarosa: Hay dos tipos principales de agarosa: la agarosa estándar y la agarosa *low melting*. Esta última tiene una baja temperatura de fusión (65°C) que permite fundir la agarosa sin dañar el ADN. Se utiliza para la separación de fragmentos ≥ 1000 pb y extraer ADN de un gel.
- El *buffer* de electroforesis: La movilidad electroforética del ADN se ve afectada por la composición y la fuerza iónica del *buffer* de electroforesis. En ausencia de iones (por ejemplo, si se sustituye el *buffer* por agua) la conductividad es mínima y el ADN prácticamente no migra. Si se usa un *buffer* de alta fuerza iónica (por ejemplo, el *buffer* 10x, por error), la conductancia eléctrica es muy eficiente y se genera una gran cantidad de calor, aunque se aplique un voltaje bajo por lo que puede ocurrir que el gel se funda y que el ADN se desnaturalice. Los *buffers* más usados son TAE (Tris-acetato de 0,04 M; EDTA 1 mM; pH 8) o TBE (Tris-borato 0,09 M; EDTA 0,002 M; pH 8) y la concentración de uso es 1X o 0,5X.

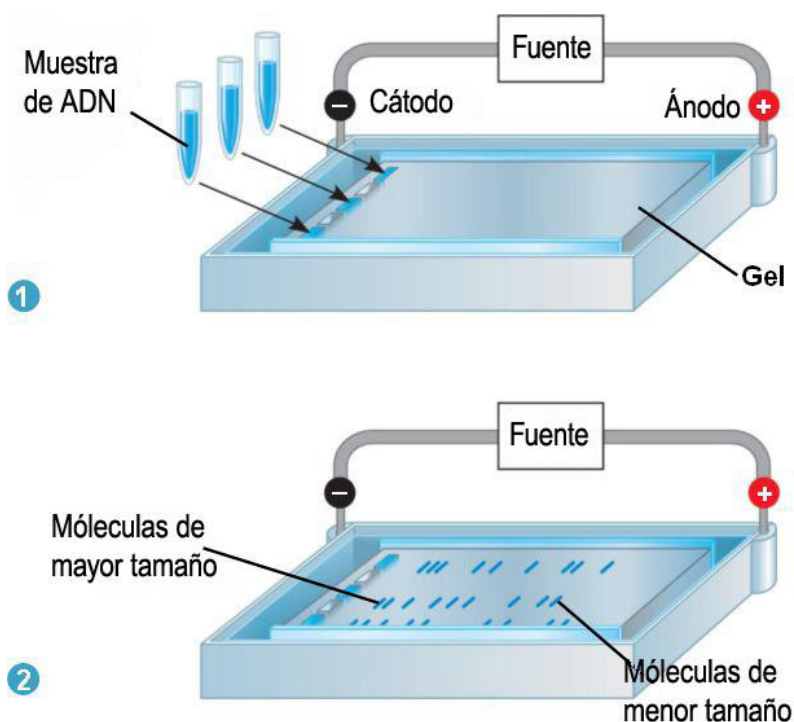


Figura 3. Corrida de electroforesis en gel de agarosa. El ADN, con carga negativa, se carga en el cátodo y migra hacia el ánodo cuando se le aplica una corriente eléctrica. Imagen extraída y modificada de Ciborowski y Silberring, 2016.

Otros elementos a tener en cuenta:

- **Buffer de carga:** Para cargar la muestra de ADN en el gel, se mezcla con un *buffer* de carga. El *buffer* de carga cumple tres objetivos: (a) aumentar la densidad de la muestra para que el ADN entre en el pocillo; (b) agregar color a la muestra que simplifica el proceso de carga; (c) los colorantes se mueven hacia el ánodo, al igual que el ADN, a una velocidad predecible, que nos permite inferir cómo está migrando el ADN.
- **Marcador de peso molecular:** Usualmente se incluye una muestra de ADN comercial que está formado por una mezcla de fragmentos de ADN de distintos tamaños conocidos. Funciona como una “regla” calibradora para medir por comparación con la distancia recorrida, cual es el tamaño de nuestra muestra de ADN.

3. VARIANTES DE PCR

Distintas variantes a la técnica de PCR se han ido desarrollando a lo largo del tiempo. Entre ellas se destacan:

3.1. PCR Múltiple

Esta PCR implica utilizar más de una pareja de cebadores en cada reacción, se pueden emplear hasta ocho cebadores. Este tipo de PCR es adecuada para la detección de distintos genes simultáneamente en la misma reacción, en un mismo tubo. Los productos pueden verse como múltiples bandas en un gel de agarosa. La Multiplex PCR es frecuentemente usada en diagnóstico médico, ya que ahorra templado, tiempo y gastos, pero requiere una cuidadosa optimización, porque primero deben optimizarse cada reacción por separado (Markoulatos y col., 2002; Bolivar y col., 2014).

3.2. RAPD-PCR

La amplificación aleatoria de ADN polimórfico, más conocida por el acrónimo inglés RAPDs (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), es una técnica basada en el uso de cebadores simples de secuencia arbitraria, de 9 a 10 pares de bases de longitud, en una reacción de baja especificidad para amplificar fragmentos genómicos de ADN. El ensayo de RAPD-PCR en algunas instancias detecta cambios simples de bases en el ADN genómico. Esta estrategia permite la detección de polimorfismos en forma rápida y el análisis de un alto número de cepas. Estos polimorfismos son de utilidad para discriminar entre individuos relacionados, realizar estudios de diversidad genética, determinar relaciones genéticas, construir mapas de genes, realizar mejoramiento vegetal, obtener marcadores de ADN y realizar el análisis genético de poblaciones (Fernández Cuenca y col., 2013; Zare y col., 2019).

3.3. REP-PCR

La REP-PCR (del inglés, *Repetitive element palindromic PCR*) utiliza cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas, amplificando elementos repetitivos en los genomas bacterianos. Los elementos repetidos consisten de secuencias poliméricas simples de un solo nucleótido, como por ejemplo poli A, poli G, poli T o poli C o de un número pequeño o grande de multímeros repetidos. Los multímeros repetidos de ADN pueden estar formados por unidades idénticas, unidades mixtas o secuencias repetidas degeneradas. En el genoma se encuentran cientos de copias de estas secuencias repetidas. Estos elementos se caracterizan por mostrar hipervariabilidad entre cada cepa, por lo tanto, los perfiles de ADN son específicos para cada cepa. La amplificación de este tipo de secuencias se lleva a cabo con cebadores altamente conservados, de secuencias repetidas presentes tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas. Se han identificado tres familias de secuencias repetitivas (rep), ellas son: REP (secuencias repetidas extragénicas palindrómicas) de aproximadamente 35 - 40 pares de bases, ERIC (consensos intergénicos repetidos de enterobacterias) de aproximadamente 124 - 127 pares de bases, y BOX, formados por tres subunidades boxA, boxB y boxC. La técnica de REP-PCR es fácil de realizar, puede ser aplicada para el análisis de

gran cantidad de muestras y posee un buen poder de discriminación (Reinoso y col., 2007; Fernández Cuenca y col., 2013).

3.4. PCR anidada

La PCR anidada (PCR Nested), se utiliza cuando es necesario aumentar la sensibilidad y la especificidad de la reacción, generalmente cuando se dispone de poco ADN en la muestra. Consiste de dos reacciones de PCR consecutivas. En la primera reacción se amplifica un determinado fragmento de ADN, menos específico y más grande, que se utilizará como molde en la segunda reacción. Los cebadores de la segunda PCR son diferentes de los de la primera y están contenidos en el interior del primer amplicón. El segundo amplicón es de menor tamaño que el obtenido en la primera reacción. El aumento de sensibilidad se debe a la re-amplificación del primer amplicón, mientras que el aumento de especificidad se debe a que para que la segunda reacción de PCR sea eficiente es necesario que la primera haya tenido éxito (Green and Sambrook, 2019; Foo y col., 2020).

3.5. PCR - *In situ*

En la PCR *In situ*, se utilizan células intactas o tejidos, los cuales son fijados e impermeabilizados para preservar la morfología y permitir el acceso de los reactivos de PCR. Se utiliza para poder detectar secuencias de ADN en el interior de las células que no son detectables mediante otras técnicas. La amplificación se puede realizar en células intactas resuspendidas en tubos *Eppendorf* o en secciones de tejidos sobre portaobjetos. Las células o tejidos son sometidos a la reacción de PCR y luego centrifugadas para permitir la visualización de los productos intracelulares de PCR mediante inmunohistoquímica (Komminoth y col., 1994; Nuovo, 2001).

3.6. PCR digital

La PCR digital es una técnica que emplea una tecnología basada en microfluidos para la formación de decenas de miles de nano gotas y se usa para detección y cuantificación de ácidos nucleicos. Es un método alternativo a la PCR cuantitativa en tiempo real para la cuantificación absoluta y para la detección de alelos raros. Permite la cuantificación absoluta mediante la partición de la muestra en miles de sub-réplicas funcionales, eliminando así la necesidad de utilizar réplicas técnicas y curvas de calibración. Diferentes métodos son usados para dividir muestras, incluidas placas de micropocillos, capilares, emulsión de aceite y matrices de cámaras miniaturizadas con superficies de unión de ácido nucleico. Así, una muestra de PCR es particionada en muchas reacciones de PCR individuales en paralelo. Algunas de estas reacciones contienen la molécula blanco. En esta reacción una sola molécula se puede amplificar más de un millón de veces. Durante la amplificación, se utilizan sondas de fluorescencia y se realiza una lectura binaria de “0” o “1”. Cuando no hay ninguna secuencia blanco presente, no se acumula ninguna señal. Tras el análisis de PCR, la fracción de reacciones negativas se usa para generar un recuento absoluto del número de moléculas de la muestra, sin necesidad de estándares ni controles endógenos. Para representar los pocillos que pueden haber recibido más de una molécula de la secuencia objetivo, se aplica un factor de corrección mediante la distribución de Poisson. La distribución de la molécula blanco dentro de la muestra se puede aproximar con precisión (Pohl y Shih, 2004; Salipante y Jerome, 2020).

3.7. LAMP - PCR

La Técnica de LAMP- PCR (Amplificación Isotérmica Mediada por Loop) se caracteriza por ser una reacción isotérmica a una sola temperatura (63 - 67°C). Se emplean entre de 4 a 6 cebadores, tanto internos como externos. Generalmente, dos cebadores internos (FIP y BIP) y dos externos (F3 y B3) que pueden reconocer un total de seis regiones distintas dentro del ADN blanco. Además, se emplean dos cebadores de bucle (cebador de bucle hacia adelante; LF, y cebador de bucle hacia atrás; LB) para acelerar la amplificación y la eficacia de la detección. Permite la detección de plantillas de ADN y ARN en aproximadamente 1 hora, superando la eficiencia de la técnica RT-PCR. Se emplea la enzima *Bst* polimerasa, la cual tiene la capacidad de separar las hebras de ADN a medida que sintetiza las hebras complementarias. LAMP es una valiosa herramienta para ser utilizada en la investigación de la medicina clínica, diagnóstico de enfermedades infecciosas y trastornos genéticos, y detección de tumores (Fakruddin, 2011; Fakruddin y col., 2013).

3.8. Real Time PCR

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta pero no es una técnica cuantitativa. Para solventar este problema se han generado unas variaciones sobre el esquema inicial de la PCR, dando lugar a lo que se conoce como PCR en Tiempo Real Cuantitativa, la cual es una técnica de Transcripción Reversa seguida de una Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (RT-qPCR). Es una metodología de referencia para determinar los niveles de expresión génica debido a su precisión, sensibilidad, exactitud, especificidad, reproducibilidad y robustez. Además de su óptima performance analítica presenta una amplia variedad de aplicaciones lo que en conjunto determinó su amplia y rápida difusión. La RT-qPCR ha revolucionado el campo del diagnóstico molecular y la técnica se está utilizando en un número de aplicaciones en rápida expansión. La clave en la RT-qPCR es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de nuestro gen de interés y cuantificar el grado de producto obtenido en cualquier momento de la amplificación mediante la señal de fluorescencia. Emplea los mismos reactivos que la PCR convencional y a la mezcla se le adiciona un **fluorocromo no específico** o una **sonda específica** que permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Para detectar los productos amplificados en cada ciclo de la reacción necesita de termocicladores de PCR en tiempo real que permita: a) excitar al reportero, b) capturar la señal de emisión del mismo y c) realizar el análisis cuantitativo. Estos equipos están provistos de una PC con un *software* que permite analizar los resultados. En el mercado existen diferentes tipos de termocicladores para esta finalidad, cuyas diferencias principales son la fuente de energía que utilizan para la excitación. En general son tres las fuentes: las lámparas de luz, diodos de emisión de luz (LED, por sus siglas en inglés) y láseres. Cualquiera que sea la fuente, primero el reportero es excitado y su señal de emisión colectada a través de un filtro que permite el paso de la longitud de onda correspondiente que llega hasta un fotodetector que captura la información proveniente de la muestra para su análisis en el *software* del equipo. Otros rasgos característicos son las velocidades para incrementar o disminuir las temperaturas en cada etapa de la reacción, el número de muestras que puede soportar, los consumibles para la reacción y los kits que se utilizan para la amplificación (Arya y col., 2005; Aguilera y col., 2014).

En las técnicas basadas en fluorocromos inespecíficos se detecta la generación exponencial del ADN de doble cadena empleando un fluorocromo que se une inespecíficamente al surco menor del ADN. Un ejemplo de colorante que permite esta detección es el *Sybr Green* (Verde SYBR), que excitado mediante luz azul ($\lambda_{\max} = 488 \text{ nm}$) emite luz verde ($\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$). Posee la ventaja de requerir sólo un par de cebadores para efectuar la amplificación, lo que abarata su coste; sin embargo, sólo es posible amplificar un producto en cada reacción. Mientras que, las técnicas basadas en sondas específicas utilizan al menos un oligonucleótido marcado fluorescentemente. Típicamente esta sonda está unida a dos fluorocromos e hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo (forward) y el inverso (reverse); esto es, en el amplicón. De este modo, cuando la sonda está intacta, presentan una transferencia energética de fluorescencia por resonancia. Los *softwares* que se utilizan generan una serie de gráficas en donde se muestran todos los datos necesarios para conocer si la reacción fue exitosa. Una de estas gráficas es la de amplificación que muestra el curso y el progreso de la reacción, otra gráfica es la curva de disociación o curva *melting* que muestra información sobre la especificidad de la reacción (Figura 4) (Arya y col., 2005).

Existen dos tipos de cuantificación: la **absoluta** y la **relativa**. Cualquiera que sea el tipo de cuantificación que se elija, casi todos los *softwares* de los equipos están provistos para llevar a cabo los análisis matemáticos y estadísticos que se requieren en cada tipo de cuantificación. La **cuantificación absoluta** generalmente se utiliza para conocer el número exacto de copias amplificadas del blanco o la concentración precisa de ácidos nucleicos en una muestra. En la práctica, este tipo de cuantificación se usa para medir la carga viral o bacteriana en diferentes tejidos. Mientras que, la **cuantificación relativa** se aplica cuando se desean evaluar los cambios en la expresión de genes en distintos estados fisiológicos. Estos cambios se basan en los niveles del ARNm del gen blanco comparados con un gen de referencia (*gen housekeeping*) que no cambia su expresión a pesar de que los estados fisiológicos se modifiquen por diversas causas. Los datos son expresados como relativos al gen de referencia y generalmente son referidos como el número de veces en el que aumentaron, disminuyeron o se mantuvieron sin cambio los niveles de ARNm (Arya y col., 2005).

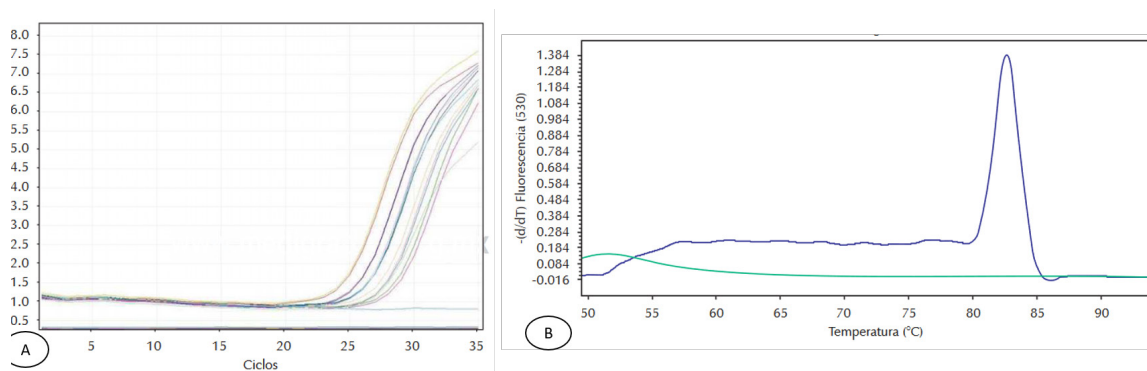


Figura 4. Curvas típicas en tiempo real para reacciones de amplificación. **A)** Curva de amplificación. En el eje «Y» se observa la cantidad de fluorescencia y en el eje «X» los ciclos de la reacción. La fluorescencia es proporcional al aumento de ADN. **B)** Curva de disociación. Se observa un único pico de amplificación que indica que se generó un producto de PCR específico con el conjunto de cebadores. La línea de abajo corresponde al control negativo, el cual no amplifica. Imagen extraída y modificada de Tamay de Dios y col., 2013.

3.8.1. Etapas en Real Time PCR

- **Toma de muestra:** la muestra puede tomarse a través de una biopsia, sangre, diferentes tejidos, entre otros. Para ello se aconseja conservar en nitrógeno líquido y en *buffer* de extracción.
- **Aislamiento del ácido nucleico:** se extrae ARN total de las diferentes muestras. Existen diferentes kits comerciales que permiten la extracción de ARN. También puede usarse la técnica convencional utilizando TRIZOL (Ver Anexo punto II).
- **Transcripción reversa:** es un proceso donde se genera una cadena de ADN doble cadena complementaria a partir de un ARN de simple cadena. En el mercado existen distintos kits para llevar a cabo este paso. El producto que se obtiene se denomina ADN copia (ADNc).
- **Amplificación del ADN:** se realiza una mezcla de reacción o master mix, que posee los siguientes componentes: cebadores, dNTPs, Mg^{+2} , *buffer*, H_2O , Taq ADN polimerasa y ADNc. Además, se agrega el fluorocromo o en su defecto, la sonda específica. La reacción se lleva a cabo en un termociclador en donde cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión. En el mercado existen diferentes kits que permiten realizar la transcripción reversa y la amplificación del ADNc en un solo paso, se denominan Kit One Step RT-qPCR.
- **Detección del producto de amplificación:** se utiliza un *software* que provee el termociclador y que permite cuantificar la cantidad de ADN.
- **Análisis estadístico:** se aplica la bioinformática para llegar a un resultado que tenga un significado biológico.

4. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción (nucleasas o endonucleasas de restricción) son proteínas, extraídas de distintas bacterias, que catalizan reacciones químicas. Son enzimas de modificación que protegen el ADN. La mayoría de las enzimas de restricción no cortan el ADN, el cual está metilado en una o ambas cadenas de su sitio de reconocimiento, aunque algunos requieren metilación de sustrato (Agraway y col., 2021).

Actualmente, se comercializa un gran número de enzimas de restricción con elevada especificidad, estabilidad y pureza.

Las enzimas de restricción fueron descubiertas por Werner Arber y Stuart Linn en 1969 en *Escherichia coli* (Alber y Linn, 1969). Son endonucleasas que reconocen secuencias de ADN y las digieren (cortan), produciendo rupturas en los enlaces fosfodiéster. Así es como el número y tamaño de los fragmentos generados depende de la frecuencia y la ocurrencia del sitio de restricción.

4.1. Tipos de enzimas de restricción

Las enzimas de restricción se caracterizan porque se unen específicamente a una molécula de ADN de doble cadena y la cortan en sitios específicos, dentro o adyacentes, a una secuencia particular conocida como secuencia de reconocimiento (Agraway y col., 2021).

Estas enzimas han sido clasificadas en tres grupos:

- **Tipo I:** se unen a la secuencia de reconocimiento, pero clivan en sitios al azar fuera de ella. Necesitan ATP, Mg^{+2} y S Adenosilmetionina como cofactores.
- **Tipo II:** son homodímeros que consisten en una endonucleasa de restricción que cliva una secuencia de nucleótidos y una metilasa separada que modifica la misma secuencia de reconocimiento. La mayoría de la ER tipo II reconocen secuencias específicas de 4, 5 o 6 nucleótidos de largo. La localización del sitio de clivaje dentro de un eje de simetría varía de una enzima a otra. Algunas clivan ambas hebras exactamente en el eje de simetría generando lo que se denomina “*blunt ends*” o extremos romos y otras clivan cada hebra en posiciones similares en lados opuestos de un eje de simetría creando terminaciones cohesivas (Figura 5).

Las enzimas de tipo I y III que poseen actividad de modificación (metilación) y de restricción ATP-dependiente en la misma proteína.

- **Tipo III:** cortan el ADN en el sitio de reconocimiento y luego se disocian del sustrato, mientras que las de tipo I se unen a la secuencia de reconocimiento, pero clivan en sitios al azar fuera de ella.

La característica de estas enzimas que cortan en un lugar exacto, ha hecho que su empleo sea de rutina en el clonado molecular.

En general diferentes enzimas de restricción reconocen diferentes secuencias, sin embargo, hay muchos ejemplos de ER que clivan la misma o muy parecida secuencia de reconocimiento generando los mismos extremos de restricción, estas ER son llamadas isoesquizómeros.

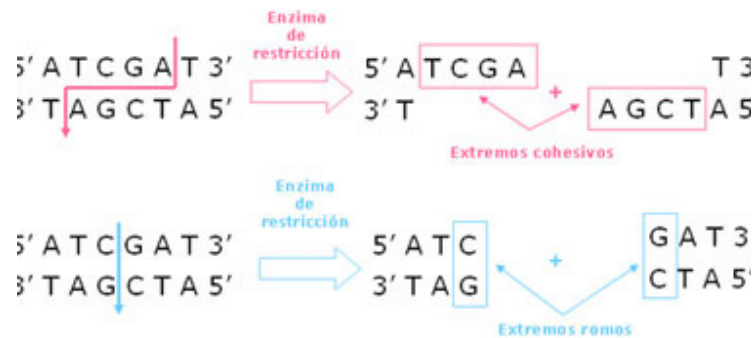


Figura 5. Enzimas de restricción o endonucleasas. Se observan dos tipos de extremos. En el primer caso, el corte genera nucleótidos de simple cadena llamados extremos cohesivos. En el segundo caso, se generan extremos de doble cadena denominados extremos romos. Estos extremos no son complementarios. Imagen extraída y modificada de https://cdn.educ.ar/dinamico/UnidadHtml__get__9eb48935-926b-4f77-b165-408a69e146cb/index.html

4.2. Nomenclatura

Las enzimas de restricción se nombran de acuerdo a la especie bacteriana en la que fueron identificadas.

EcoRI proviene de la cepa de *Escherichia coli* (Eco), *R* pertenece a la cepa y *V* número de endonucleasa.

Por convención una unidad de actividad de enzima de restricción es definida como la cantidad de enzima requerida para digerir completamente 1 µg de ADN.

4.3. Componentes de una reacción de restricción

Para llevar a cabo una reacción enzimática se necesita contar con:

- **Sustrato**, en este caso el ADN, el cual es el componente crítico de la reacción y debe contener la secuencia específica a cortar por la enzima a ensayar. El ADN a digerir puede ser el bacteriófago *lambda*, un plásmido bacteriano, ADN genómico o un producto de PCR. Cuando hay varios sitios de restricción en el ADN de los plásmidos de ADN superenrollados y los ADN genómicos a analizar, se requieren más unidades de enzimas por microgramo (entre 2 y 10 veces más) que para un ADN lineal. Los productos de PCR son relativamente pequeños, por lo tanto, es importante considerar la masa del ADN como la concentración molar de los sitios de reconocimiento de la enzima.
- **Suero de albúmina bovina**, es un estabilizante de proteínas, la cual protege a la enzima durante la reacción, como así también la adhesión de la enzima al tubo. Puede venir junto con la enzima o se puede adquirir separadamente.

- **Buffer de reacción** el cual contiene los cofactores necesarios, como Mg^{+2} o Mn^{+2} , y brinda el pH necesario para llevar a cabo la reacción. Cada fabricante provee un *buffer* de reacción para cada tipo de enzima el cual tiene actividad del 100 %. Asimismo, cada fabricante dispone de una solución *buffer* universal cuando es necesario realizar digestiones con más de una enzima.
- **Enzima**

4.4. Condiciones a tener en cuenta al trabajar con enzimas de restricción

- **Pureza del ADN**, el ADN debe estar lo suficientemente limpio de impurezas para que la enzima pueda actuar en su sitio blanco. El efecto de los contaminantes es generalmente dosis dependiente. El ADN debe estar libre de nucleasas y otras proteínas, para lo cual es necesario desproteinizarlo mediante extracción con fenol-cloroformo o con agregado de 2,5 M de acetato de amonio en la precipitación con etanol, previo al tratamiento con la enzima. Por otro lado, la concentración de ADN debe ser la adecuada, si hay mucho ADN la enzima no alcanzará para digerir todos los sitios blancos. Además, es necesario que el ADN contenga la secuencia específica a ser reconocida por la enzima, como así también tener en cuenta la estructura secundaria y terciaria del mismo.
- **Los reactivos** a emplear deben estar libres de contaminantes. Si las muestras de ADN están preparadas inadecuadamente se producirá una digestión parcial del sustrato.
- **El volumen de reacción final** debe ser pequeño, entre 10 y 20 μ l para que la enzima sea más eficiente al realizar la digestión. Si el volumen es muy grande, a la enzima le costará más encontrar su sustrato.
- **El tiempo y temperatura de incubación** deben ser los recomendados por el fabricante. Las endonucleasas son muy sensibles a una secuencia específica, pero a veces pueden producir cortes inespecíficos si se modifica la temperatura de incubación, la fuerza iónica, el pH o hay exceso de enzima.

4.5. Cómo seleccionar la enzima de restricción correcta

Existen distintas herramientas disponibles en la web que toman una secuencia de ADN y encuentran los marcos de lectura abiertos grandes que no se superponen, utilizando la base de datos de bibliotecas genómicas y los sitios para todas las enzimas de restricción Tipo II y Tipo III disponibles comercialmente que cortan la secuencia una sola vez. Estos *softwares on-line*, como por ejemplo *NEBcutter* o *WEBcutter*, son muy sencillos de utilizar, simplemente hay que ingresar la secuencia de nucleótidos, seleccionar los parámetros deseados y “*submit*” (Makalowski, 2001; Vincze y col., 2003).

5. EPIDEMIOLOGÍA: ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSANTE (PFGE)

La epidemiología molecular permite estudiar la diversidad genética de los organismos infecciosos mediante la aplicación de distintas técnicas de laboratorio con objetivos como determinar su naturaleza, establecer su origen más probable, caracterizar una epidemia, conocer las posibles mutaciones relacionadas con patogenicidad y resistencia a antimicrobianos. La técnica de electroforesis de campo pulsante (PFGE) posee la capacidad de separar fragmentos de ADN mayores de 25 kb, mediante la alternancia del ángulo del campo eléctrico. Este método ofrece ventajas sobre otras técnicas de tipificación ya que se ha determinado una alta sensibilidad y reproducibilidad y está siendo analizado su uso en estudios epidemiológicos. Por su elevada resolución es considerado el método de oro o *Gold Standard* dentro de los métodos de tipificación molecular (Olive y Bean, 1999; Bannerman y col., 1995; Neoh y col., 2019).

Las moléculas de ADN linear doble cadena de alto peso molecular migran a través de un gel de agarosa a una misma velocidad. Mientras mayor es el poro del gel de agarosa, mayor el tamaño de la molécula de ADN que puede ser separada. Geles de agarosa de muy baja concentración (0,1 - 0,2%) son capaces de resolver moléculas de ADN de gran tamaño. Estos geles son muy frágiles y deben ser corridos muy lentamente. Aun así, son incapaces de resolver moléculas de ADN lineal mayores a 750 kb. Una solución a este problema se logró en 1984 cuando Schwartz y Cantor desarrollaron la electroforesis de campos pulsantes (PFGE). En este método campos eléctricos alternantes son aplicados sobre el gel. De esta manera es posible resolver moléculas de ADN mayores a 2 Mb (Kaufmann y col, 2018); Neoh y col., 2019).

Para determinados estudios epidemiológicos en bacteriología, se utilizan enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, es decir, enzimas cuyo lugar de restricción, por su longitud y secuencia, se encuentran raramente a lo largo del ADN cromosómico de una especie bacteriana. El uso de este tipo de enzimas permite la macrorrestricción del ADN de la bacteria y la división del ADN en pocos fragmentos (entre 10 y 30), muchos de estos fragmentos son de gran tamaño, más de 40 kb, los que son adecuadamente resueltos por PFGE (Kaufmann y col, 2018; Neoh y col., 2019).

Las características de esta técnica determinan una serie de cambios a tener en cuenta en las distintas fases en las que se divide el proceso de macrorrestricción y PFGE. El procedimiento de extracción de ADN, obliga a inmovilizar las células bacterianas en bloques de agarosa de bajo punto de fusión, en los que se llevará a cabo la lisis, de manera que el ADN cromosómico también quede embebido en agarosa, el objetivo es que el ADN permanezca íntegro y no se fracture accidentalmente (Kaufmann y col, 2018; Neoh y col., 2019).

5.1. Etapas de la electroforesis en campo pulsante (PFGE)

→ **Crecimiento microbiano.** Los microorganismos se pueden obtener a partir de un cultivo en medio líquido o bien realizar una suspensión procedente de un medio sólido.

En cualquier caso, se debe tratar de cultivos puros, en medios no selectivos, de no más de 18 - 24 h de incubación. Es conveniente estandarizar el inóculo mediante espectrofotometría. Seguidamente, se mezcla parte del inóculo con el mismo volumen de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) fundida, y se deja solidificar en un molde especialmente diseñado para ello. A partir de este momento, el resto del procesamiento se realizará utilizando el bloque completo.

- **Lisis.** Para conseguir la lisis de los microorganismos, los bloques se sumergen en una solución de lisis que contenga las enzimas precisas para romper las células. La composición de la solución de lisis es variable en función de la especie bacteriana. También es necesario proteinasa K para eliminar nucleasas presentes. Como las enzimas deben actuar en el interior de la malla de agarosa en que están embebidas las células, se precisan enzimas concentradas e incubaciones prolongadas.
- **Lavados.** A continuación, es preciso someter los bloques a sucesivos lavados con una solución TE¹. El objetivo de los lavados es arrastrar fuera del bloque de agarosa restos celulares procedentes de la lisis, así como eliminar componentes que puedan inhibir la restricción posterior (proteínasa K, detergente o EDTA).
- **Restricción.** La restricción del ADN debe hacerse inmovilizado en los bloques de agarosa, utilizando enzimas de baja frecuencia de corte. En general, los enzimas con un lugar de restricción rico en G + C, son adecuados para tratar el ADN bacteriano de especies con genoma rico en A + T y, a la inversa, enzimas que reconocen, enzimas que reconocen secuencias A + T, son adecuados para digerir ADN rico en G + C. La presencia de agarosa conlleva cierto grado de inhibición de la reacción de digestión, por tanto, es preciso aumentar el número de unidades de enzima por reacción.
- **Electroforesis.** Para la separación de fragmentos de macrorestricción se utiliza una agarosa muy pura, con un mínimo de contaminantes, llamada agarosa *Low EEO* con baja electroendósmosis para permitir una rápida migración del ADN. Durante la electroforesis las moléculas de ADN bajo la acción de un campo eléctrico se orientaban y se despliegan avanzando en dirección al polo positivo. Cuando el campo eléctrico cesa, las moléculas de ADN se relajan recuperando su estado inicial. La aplicación de un segundo campo eléctrico, con una orientación distinta del primero, obliga al ADN a cambiar su conformación y reorientarse de nuevo para poder avanzar en la dirección del segundo campo eléctrico. El tiempo requerido para esta reorientación es dependiente de la longitud de la molécula, esto es de su peso molecular. Tras el cambio de orientación del campo eléctrico, las moléculas grandes tardan más tiempo en alinearse y poder comenzar el avance a través del gel de lo que tardan las moléculas de ADN más pequeñas.

5.2. Componentes de un sistema de PFGE

Se diseñaron distintos aparatos, siendo el más extendido el CHEF (*Clamped Homogeneous Electric Field Electrophoresis*). Este sistema dispone de veinticuatro electrodos dispuestos periféricamente y fijos a un contorno hexagonal. Además, dispone de una bomba para la recirculación del *buffer* y un equipo de refrigeración para mantener la temperatura adecuada del *buffer* durante la electroforesis, ya que la técnica de PFGE requiere voltajes elevados durante muchas horas (Figura 6).

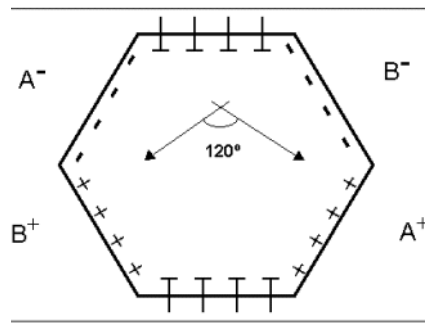


Figura 6. Distribución de los electrodos en el equipo CHEF utilizado en PFGE. Las flechas muestran los vectores de fuerza de campo de los campos eléctricos alternantes. Los símbolos A+ y A-, B+ y B- indican posiciones de los pares de electrodos de los campos eléctricos alternantes. Imagen extraída y modificada de Cardozo-Bernal y col., 2013.

Las funciones de los componentes del equipo son:

- **Unidad de control de pulsos-generador de corriente.** En la misma unidad se reúnen la fuente de poder y el dispositivo que controla los 24 electrodos y la duración de la alternancia de los pulsos eléctricos.
- **Cuba de electroforesis.** Es una cubeta acrílica en la que se encuentran los 24 electrodos distribuidos en forma hexagonal y en cuyo centro se coloca el gel de agarosa, sumergido en el *buffer* de electroforesis.
- **Bomba de recirculación del *buffer*.** Aspira el *buffer* de electroforesis de la cubeta, lo empuja a través de la unidad de refrigeración y lo devuelve a la cubeta.
- **Unidad de refrigeración.** Es un aparato de refrigeración portátil. La refrigeración del *buffer* de electroforesis permite mantener constante la temperatura de la cubeta (se recomienda 14°C).

5.3. Patrón de PM

Como marcador de PM se usa un marcador de ADN de alto peso molecular, como por ejemplo *Lambda Ladder*. Está constituido por el Fago λ cortado con la enzima de restricción *HindIII*, el cual consiste en sucesivos concatémeros de λ que van de 48,5 a 1 Mb.

5.4. Variables que afectan a la resolución de PFGE.

La técnica es muy sensible a variaciones de los siguientes parámetros electroforéticos

- **Pulsos: duración y alternancia.** El sistema de PFGE consigue separar fragmentos grandes de ADN al inducir la reorientación de las moléculas mediante cambios periódicos en el campo eléctrico. La duración de los campos eléctricos que se alternan determina el tamaño del ADN que puede separarse. Así, se denomina pulso al campo eléctrico alternante o *switch time*, y su duración hace referencia a cuánto tiempo está actuando en una dirección u otra. Los pulsos pueden durar fracciones de segundo, para separar moléculas de pocas kb, o puede durar algo más de una hora para separar moléculas mayores de 5 Mb. En general, cuanto mayor es la molécula de ADN, mayor tiempo de

reorientación se requiere; las moléculas pequeñas que pueden reorientarse con rapidez, invierten gran parte del tiempo del intervalo de pulso en avanzar a lo largo del gel. Como habitualmente interesa separar un rango amplio de fragmentos de ADN con distintos tamaños, los sistemas de PFGE permiten establecer un incremento progresivo en la duración de los pulsos a lo largo de la duración total de la electroforesis.

- **Voltaje.** El voltaje generado por la fuente de electroforesis o generador de corriente se divide entre los electrodos, de manera que se crea un gradiente constante a lo largo de todo el gel. Este valor representa la fuerza que conduce el ADN a través del gel. Por ejemplo, si la fuente de electroforesis genera un voltaje de 180 V a una cubeta en la que los electrodos están separados 30 cm, el gradiente de voltaje será de 6 V/cm.
- **Temperatura de electroforesis.** La recirculación del *buffer* de electroforesis y el mantenimiento de una temperatura constante a 14°C son condiciones indispensables para obtener resultados reproducibles.
- **Tiempo de electroforesis.** Se debe mantener el tiempo mínimo de electroforesis necesario para obtener una resolución adecuada, por lo general son 20 h. En electroforesis largas la presencia de nucleasas residuales puede contribuir a la degradación del ADN, además, las bandas pierden definición en la zona más distal del gel.
- **Buffer de electroforesis.** TBE 0,5X es el *buffer* más utilizado y es útil para la mayoría de las separaciones de hasta 1000 Kb de ADN de tamaño y no necesita ser cambiado por varias corridas.
- **Ángulo de reorientación.** Es el ángulo que forman los vectores correspondientes a los dos campos eléctricos que se alternan. El estándar es de 120°. Para separar moléculas de ADN de gran tamaño (> 2 Mb) se requieren ángulos de reorientación de hasta 90°.

5.5. Inconvenientes de la técnica

Las técnicas de macrorrestricción son de utilidad para la mayoría de las bacterias, aunque existen especies en las que, la degradación del ADN cromosómico hace que determinadas cepas sean “no tipificables” por PFGE. En algunos casos el agregado de tiourea al *buffer* de electroforesis permite neutralizar los derivados perácidos nucleolíticos derivados del *buffer* TRIS, que se forman en el ánodo durante la electroforesis, lográndose mejorar notablemente la resolución de las bandas.

Un gran inconveniente de PFGE es que necesita de personal capacitado, ya que es una técnica muy larga y laboriosa.

5.6. Interpretación de los resultados

Las técnicas de macrorrestricción y PFGE se usan para la tipificación molecular de un gran número de especies bacterianas. Son técnicas que exploran la organización del ADN cromosómico bacteriano bajo la acción de la digestión por una enzima, por tanto dan información general sobre el genotipo bacteriano y sus cambios más recientes. En general, sus resultados han demostrado ser suficientemente discriminativos, con excelente reproducibilidad y fáciles de interpretar cuando se estudian colecciones de microorganismos aisladas en un periodo de tiempo corto.

Esta técnica de tipificación molecular se puede aplicar al análisis de brotes de infección y permite poner de manifiesto que los aislamientos relacionados epidemiológicamente, lo están también genéticamente. En una situación ideal, los patrones de PFGE de los aislamientos que representan una cepa epidémica deberían ser idénticos y fácilmente diferenciables de los aislamientos epidemiológicamente no relacionados.

A la hora de interpretar los patrones de PFGE, debe examinarse la colección completa de cepas a estudiar en busca de un patrón epidémico, que sería el más común entre los aislamientos. A continuación, todos los otros patrones deben compararse con éste y a la vez entre sí. Es preciso contabilizar el número de fragmentos distintos de cada cepa con todas las demás, fragmento a fragmento. Esta clasificación en base a la relación genética entre microorganismos, pretende ser sólo orientativa. Es preciso individualizar cada situación, tener en cuenta otras características de los microorganismos y sobre todo, la información epidemiológica que deriva de una investigación clínica cuidadosa.

Se pueden analizar los patrones de PFGE mediante sistemas informáticos que objetivan el número de diferencias entre dos aislamientos y les asignan una “distancia genética”. En estos sistemas, se precisa captar la imagen del gel primero, normalizarlo e identificar las bandas que quieren ser incluidas en el análisis. Son sistemas muy útiles para analizar colecciones que incluyen muchos microorganismos.

Tenover y col. (1995) señalan que los aislados que tienen el mismo número de fragmentos con el mismo peso molecular se consideran genéticamente idénticos, los aislados que difieren en dos a tres fragmentos son considerados como estrechamente relacionados y los aislados que difieren en más de siete fragmentos se considera que no están relacionados genéticamente.

6. TRANSFERENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS A SOPORTES SÓLIDOS

La técnica de transferencia (*blotting*) consiste básicamente en la transferencia de ADN, ARN o proteínas de una muestra y permite identificar la presencia de una banda determinada en un gel de electroforesis, tanto de ácidos nucleicos como de proteínas, el cual es transferido a una membrana, que puede ser papel de nitrocelulosa, membranas de nailon o filtros Whatman No 541), para luego ser hibridada con una sonda y así permitir su separación, identificación y posterior cuantificación. Es una técnica analítica en la que se lleva a cabo una electroforesis en gel, de agarosa para ácidos nucleicos y geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para las proteínas y luego la hibridación de un sonda complementaria en el caso de ácidos nucleicos o de anticuerpos, para el caso de las proteínas. En ambos casos, se terminan visualizando por medios colorimétricos.

Si se trata de ADN, la técnica se llama *Southern blot*. Se utilizan sondas de ADN (moléculas de ADN marcadas con radioactividad mediante un isótopo radiactivo como el fósforo ^{32}P o mediante un compuesto como la biotina para identificar qué bandas del gel contienen secuencias complementarias a la de la sonda. Si se trata de ARN, la técnica se llama *Northern blot* y se utilizan sondas de ARN. Si se trata de proteínas, la técnica se llama *Western blot*. Se utilizan anticuerpos marcados a fin de identificar cuál es la banda que presenta la proteína que me interesa localizar.

6.1. Tipos de marcación

A fin de poder identificar la secuencia de interés en la transferencia es necesario usar una sonda, ya que esta posee una secuencia conocida de nucleótidos. La sonda debe tener una secuencia entre 100 y 1000 bases y puede estar marcada radiactivamente o por fluorescencia. Es necesario marcar ciertos nucleótidos en la sonda para conocer si ha habido o no hibridación. Comúnmente se utilizan como marcadores isótopos radiactivos, entre ellos el P^{32} (un isótopo radiactivo de fósforo incorporado en el enlace fosfodiéster de la sonda). Aunque este método tiene una alta sensibilidad, existen problemas generales asociados al uso de radioisótopos, los cuales han hecho que se desarrollen otros métodos de marcaje. Así, enzimas como la fosfatasa alcalina o peroxidasa pueden ser unidas químicamente a sondas sintéticas de oligonucleótidos. Las sondas marcadas son capaces de detectar con gran sensibilidad debido a la acción catalítica de la enzima en el sustrato apropiado. También puede usarse biotina para marcar. Luego de la hibridación, la preparación es tratada con un complejo avidina-enzima. Como la avidina tiene gran afección por la unión con biotina, la sonda queda marcada con un complejo biotina-avidina-enzima cuya acción catalítica es fácil de detectar. La acción enzimática muchas veces se detecta visualmente por un cambio de color (Fernández, 1985).

6.2. Southern Blot

La técnica de *Southern Blot* es una técnica de hibridación que permite identificar fragmentos de ADN separados por electroforesis en gel y transferidos a una membrana de nylon o nitrocelulosa y permite la detección de varias secuencias diana de distintos tamaños con una única hibridación. Su nombre se debe al investigador que lo diseñó, un biólogo inglés llamado Edwin Southern (Southern, 2006; Glenn y Andreou, 2013; Green y Sambrook, 2021).

Se parte de ADN purificado, el cual es sometido a una digestión enzimática. Posteriormente, el ADN digerido se somete a una electroforesis en gel de agarosa para separar los fragmentos según el tamaño. Al trabajar con un ADN genómico, luego de la electroforesis se observa una estela fluorescente continua o “smear” debido a que la digestión produce un número muy elevado de fragmentos diferentes con múltiples tamaños. Luego, se transfiere el ADN a una membrana de nylon o nitrocelulosa para obtener una réplica exacta del patrón de bandas de ADN del gel (Figura 7).

La transferencia consta de varios pasos que incluyen:

- la desnaturalización para separar las cadenas de ADN de forma que la sonda pueda hibridar
- la transferencia desde el gel a la membrana por capilaridad
- el anclaje del ADN a la membrana mediante incubación de la misma a 80°C, o irradiando con luz UV las membranas.

La hibridación se realiza incubando la membrana con diferentes reactivos en un tubo de hibridación, entre ellos la sonda marcada específicamente y diluida en una solución de hibridación adecuada. Finalmente, el revelado se lleva a cabo mediante autorradiografía con una película de rayos X, de manera que aparecerá una mancha oscura en los puntos de la membrana en que se localicen los híbridos sonda/secuencia diana. La técnica de *Southern blot* ha sido de gran utilidad para identificar genes en procariontas y genes asociados con enfermedades de transmisión genética, e identificar mutaciones, como rearrreglos, deleciones en eucariotas.

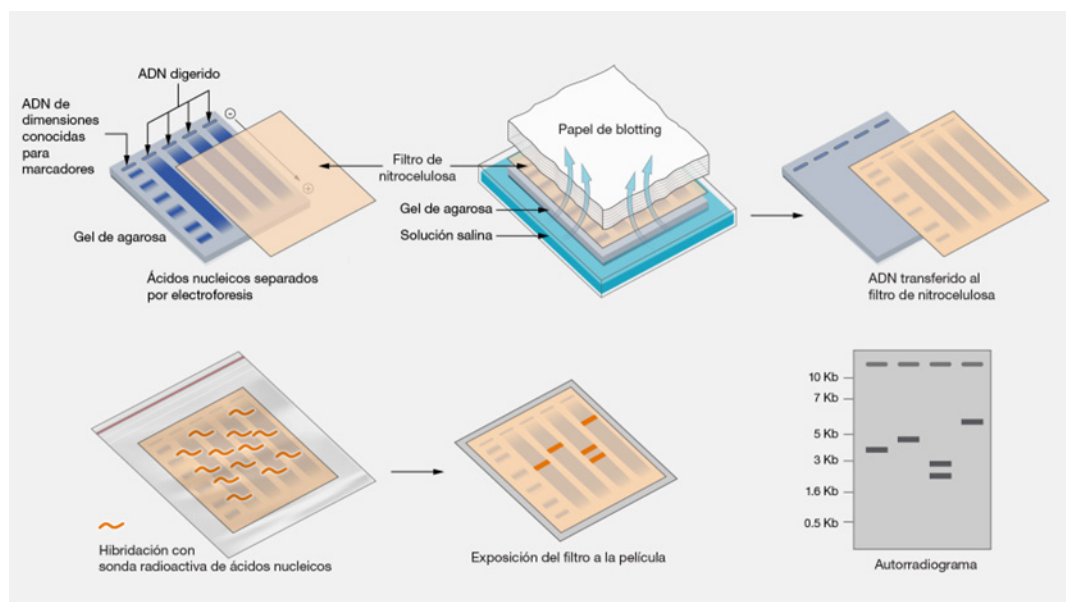


Figura 7. Representación esquemática de la técnica de Southern Blot. Extraído de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Southern-Blot>

6.3. Northern Blot

La técnica de *Northern blot* se utiliza para detectar una secuencia de ARN específica en una muestra biológica. Las moléculas de ARN en una muestra se separan por tamaño mediante electroforesis en gel. Luego, los fragmentos de ARN son transferidos del gel a una membrana. La membrana se expone a una sonda de ADN marcada con una marca radiactiva o química. Si la sonda se une a la membrana, se observa una banda, indicando que la secuencia de ARN está presente en la muestra.

La principal diferencia con la técnica de *Southern blot*, se basa en el uso de diferentes reactivos y algunas técnicas previas que se emplean en el procedimiento. Entre ellas se destacan el pretratamiento con formaldehído a fin de evitar la formación de estructuras secundarias internas en la molécula de ARN, el aislamiento de ARNm con colas poli-adeninas, el empleo de geles con poliacrilamida y urea para separar los ARNm, el uso preferente de transferencia por capilaridad o vacío debido a la mayor fragilidad de la molécula de ARN, la preferencia por el empleo de membranas de celulosa tratada químicamente (papel DBM) o nailon y el uso de *buffers* de transferencia con formamida o el uso de sondas de ADN y ARN indistintamente para la hibridación (Hoopes y col., 2012; He y Green, 2013; Bhardwaj y col., 2021).

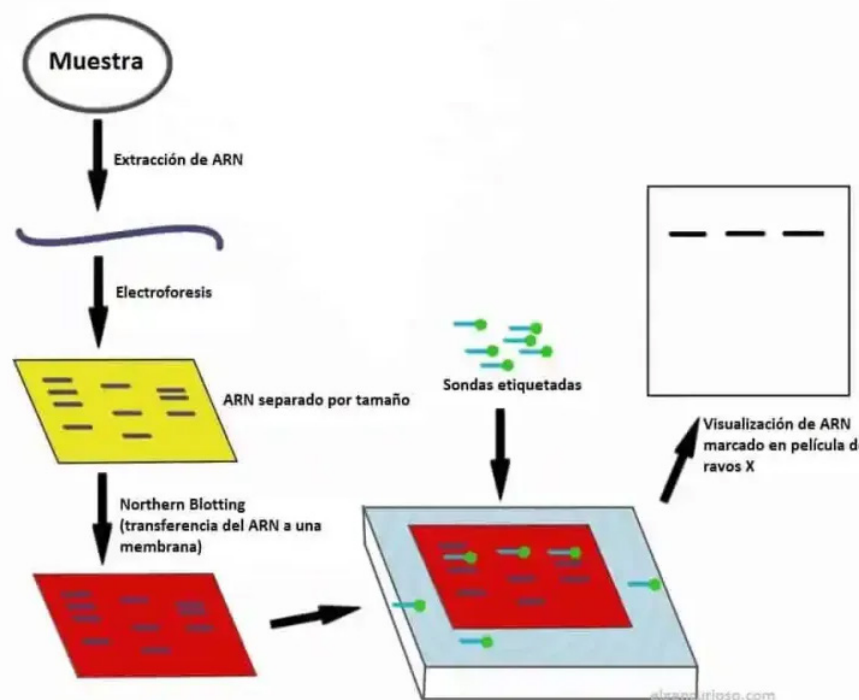


Figura 8. Representación esquemática de la técnica de Northern Blot. Adaptado de <https://www.mybiosource.com/learn/testing-procedures/northern-blotting/>

A pesar de las distintas aplicaciones que tienen las técnicas de *Southern* y *Northern blot*, muchas de ellas han sido reemplazadas por técnicas más rápidas y sensibles como la PCR y sus variantes.

6.4. Western Blot

La técnica de *Western blot* o inmunoelectrotransferencia, permite identificar una determinada proteína en una mezcla (Figura 9). Las proteínas son separadas mediante una electroforesis desnaturizante en un gel de poliacrilamida. Posteriormente, se realiza una segunda electroforesis para transferir las proteínas desde el gel hasta una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) o nitrocelulosa), donde se emplea un anticuerpo específico de la proteína de interés para detectar su presencia y su posición en el gel original. Esta interacción no se detecta a simple vista, por lo tanto, es necesario emplear un anticuerpo secundario marcado, que reaccionará contra el isotipo y la especie del anticuerpo primario (Moritz, 2020; Gandhi y col., 2022).

El empleo de agentes de **bloqueo** de la membrana es un paso crítico a fin de evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo. El bloqueo se realiza antes de incorporar el anticuerpo primario y es necesario hacerlo para bloquear los puntos de la membrana que no contienen ligando. Es importante mencionar que las membranas tienen una alta afinidad por todas las proteínas (incluyendo los anticuerpos), entonces el anticuerpo se uniría inespecíficamente a todos los lugares libres de proteínas.

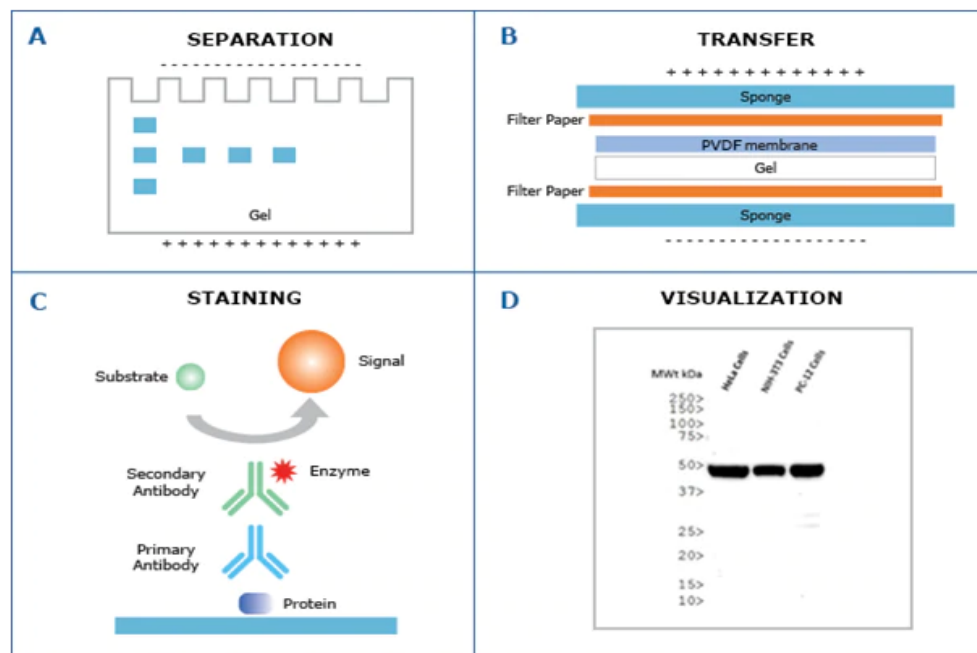


Figura 1. Pasos generales en el Western Blot. A. Electroforesis; B. Transferencia; C. Inmunotinción; D. Detección de bandas

Figura 9. Pasos generales en el Western Blot. A. Electroforesis; B. Transferencia; C. Inmunotinción; D. Detección de bandas. Extraído de <https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/introduccion-a-western-blot>.

7. SECUENCIACIÓN

La secuenciación es el conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuyo objetivo es conocer el orden de los nucleótidos.

7.1. Primeros métodos de secuenciación

El primer método de secuenciación de ADN fue desarrollado por A. Maxam y W. Gilbert en 1977 y es un método de secuenciación química en el cual el ADN es sometido a distintos métodos de ruptura. Esta metodología empleaba químicos tóxicos y grandes cantidades de ADN marcado con fósforo radioactivo. El método era bastante laborioso y actualmente ha quedado en desuso. Posteriormente, en 1975 surge el método de “secuenciación por terminadores”, desarrollado por F. Sanger, también conocido como método didesoxi o secuenciación por terminación de la cadena. Es un método enzimático que permite determinar la secuencia del ADN molde a medida que se sintetiza su hebra complementaria y corresponde al método de secuenciación de primera generación.

Para el desarrollo de la técnica es necesario contar con:

- un ADN de cadena simple que funciona como molde
- la enzima ADN-polimerasa
- un cebador, el cual es necesario para iniciar la síntesis de ADN
- los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP)
- los cuatro didesoxirribonucleótidos trifosfato (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP), los cuales son empleados por la ADN polimerasa. Como a los nucleótidos les faltan 2 grupos 'OH, al ser incorporados no pueden enlazar otros nucleótidos.

Esta metodología se lleva a cabo en cuatro tubos separados. En cada tubo, cuando la ADN polimerasa incorpora aleatoriamente un ddNTP la reacción se detiene, y de esta manera se generan fragmentos de distinta longitud, todos ellos con el mismo ddNTP terminal. Los diversos fragmentos se separan en función de su tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, una técnica que permite separar fragmentos de ADN cuya longitud difiere en un sólo nucleótido. A partir del gel se puede reconstruir la secuencia que se ha sintetizado, que es complementaria a la secuencia del molde. Mediante esta tecnología, se puede determinar la secuencia de moléculas de ADN de hasta 800 nucleótidos de longitud.

7.2. Tecnologías de segunda generación

Los métodos de la primera generación son capaces de secuenciar hasta 100 kb al día, con lo que se necesitan varios años para secuenciar un genoma grande. Así es como se han desarrollado los “métodos de segunda generación”, los cuales son capaces de llevar a cabo el proceso de secuenciación de forma mucho más rápida. Estos métodos se caracterizan porque secuencian de forma masiva y simultánea, o sea en paralelo, la genoteca completa y permiten secuenciar la totalidad de un genoma grande en cuestión de días. La técnica de

Sanger ha ido evolucionando, se han introducido distintas variaciones y hacia fines de los años 80 surgen los primeros secuenciadores automatizados utilizando electroforesis capilar dando origen a la **secuenciación de segunda generación, tecnología masiva en paralelo o NGS (*next-generation sequencing*)**. El primer secuenciador NGS con éxito comercial fue el GS20 de 454 Life Sciences y salió al mercado en 2005.

Actualmente, la reacción de secuenciación se lleva a cabo en un solo tubo y cada ddNTP terminador de la cadena de ADN es marcado con un fluoróforo distinto, el cual emite luz de distinto color. También se emplea una Taq-polimerasa para automatizar el proceso de manera que en cada ciclo aumenta de forma exponencial el número de fragmentos que se producen. Hoy en día, la separación de los fragmentos se realiza mediante electroforesis capilar, la cual es más rápida que la electroforesis en gel. Los fragmentos de variados tamaños llegan al final del capilar, donde son excitados con un láser y detecta la fluorescencia emitida por el ddNTP terminal. Así, el color de la fluorescencia determina de qué nucleótido se trata. El gráfico resultante se denomina electroferograma, en el que se observan picos de diversos colores. Cada color indica qué nucleótido ocupa cada posición en la molécula de ADN o, lo que es lo mismo, su secuencia.

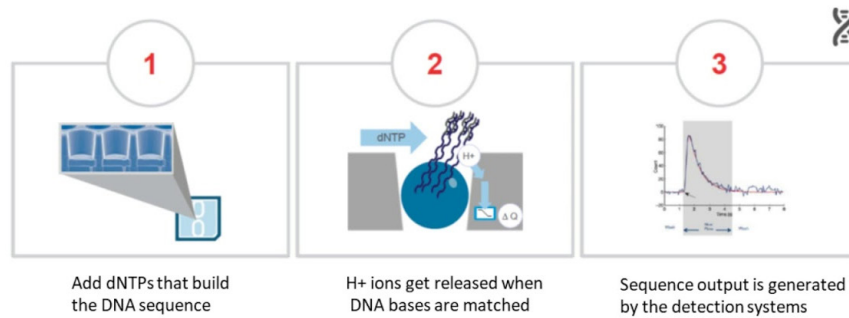
La técnica de secuenciación masiva más popularizada es Solexa, una compañía fundada en Reino Unido en 1998. La misma se basaba en la secuenciación por síntesis con terminadores fluorescentes reversibles. Las bibliotecas eran amplificadas en una celda de flujo mediante un proceso llamado PCR puente (*bridge-PCR*) formando grupos o *clusters*. Al momento de secuenciar, dada la adición de nucleótidos terminadores fluorescentes reversibles durante cada flujo, se generaba una señal al tiempo que la cadena se elongaba. Illumina adquirió Solexa en el año 2007, y siguiendo el mismo fundamento, desarrolló secuenciadores más veloces, de mayor escala y capaces de leer fragmentos de mayor tamaño. A medida que fueron pasando los años, otras compañías desarrollaron plataformas de secuenciación NGS con fundamentos similares, aunque hoy en día el mercado está dominado por los secuenciadores Illumina.

7.3. Ion Torrent

La tecnología de Ion Torrent reemplaza la detección de emisión lumínica por la detección de un cambio de pH en un chip semiconductor. Esta tecnología fue desarrollada por el ex-fundador de 454 Life Sciences, Ion Torrent Systems Inc. y salió al mercado en febrero de 2010.

En esta técnica, el ADN aislado se corta en fragmentos más pequeños, los cuales se unen a pequeñas perlas denominadas *bead*. Cada una de ellas, quedan unidas con millones de fragmentos de ADN y se incorporan en los micropocillos de un microchip. Se agrega una solución de uno de los nucleótidos y si el nucleótido se incorpora en la cadena de ADN entonces se libera un protón. Recordemos que la incorporación de dNTPs en el ADN en replicación genera un enlace covalente y la liberación de un pirofosfato y un protón. Este protón es detectado por la base del pocillo, la cual actúa como un mini-pHmetro. Como cada lámina del microchip es semiconductor, se pueden detectar estos cambios iónicos. Este proceso se repite cada 15 segundos con una nueva solución de cada nucleótido, por lo que el micropocillo debe lavarse adecuadamente antes de añadir la siguiente solución para evitar interferencia que falseen los resultados (Jauk, 2019).

Principles of Ion Torrent Sequencing



icomineWorld May 14 2020

For research use only. Not for use in diagnostics procedures

Figura 10. Metodología de Ion Torrent. Extraído de First experience with the Ion Torrent Genexus Workflow.

7.4. Pirosecuenciación

Otra técnica de secuenciación es la pirosecuenciación, la cual es un método enzimático en el cual se detecta la incorporación de nucleótidos al ADN por acción de la ADN polimerasa mediante luminiscencia.

La reacción se lleva a cabo en tubo de reacción donde se encuentran las enzimas luciferasa, ATP sulfurilasa, ADN polimerasa y apirasa además de los sustratos luciferina y adenosín-5-fosfosulfato (APS). Se añaden los nucleótidos de a uno por vez y si el nucleótido añadido corresponde al que necesita la polimerasa, se incorpora a la cadena que se está sintetizando y en esta reacción se libera un pirofosfato (PPi). Luego, una ATP sulfurilasa en presencia del APS, que se encuentra en el tubo de reacción, transforma el pirofosfato (PPi) en ATP. Este ATP causa la conversión de luciferina en oxiluciferina mediante la enzima luciferasa. Esta reacción genera una cantidad de luz visible proporcional a la cantidad de ATP consumido. La luz es captada por un fotodetector, dando lugar a un pico en el pirograma. La altura del pico es proporcional al número de nucleótidos que se han incorporado. De esta forma se puede deducir la secuencia partiendo del tamaño de los picos obtenidos (Figura 11).

Una apirasa se encarga de degradar aquellos nucleótidos que no han sido incorporados, como también él y el dATP•S y el exceso de ATP producido por la reacción de la ATP sulfurilasa. Durante la pirosecuenciación, no se añade un nuevo desoxirribonucleótido trifosfato hasta que la apirasa haya degradado por completo todos los nucleótidos no incorporados y el ATP.

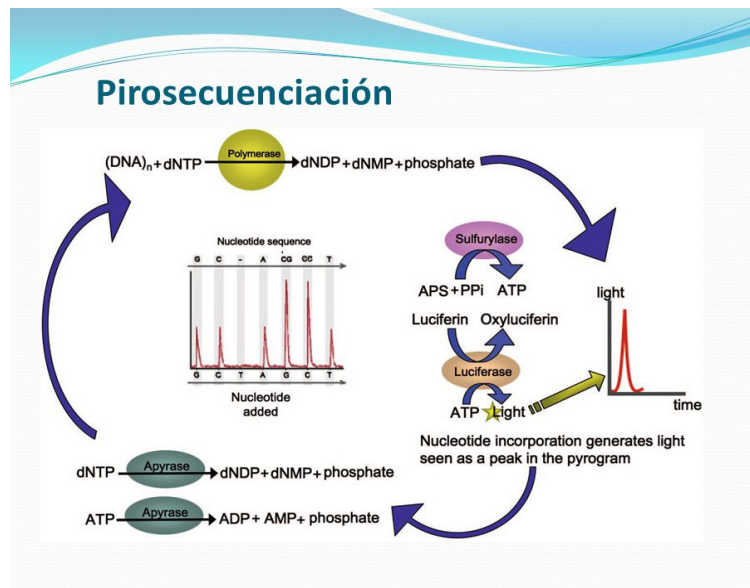


Figura 11. Reacción de pirosecuenciación. Extraído de Biolagranja.

7.5. Flujo de trabajo de NGS

7.5.1. Preparación de bibliotecas genómicas

Se deben obtener fragmentos cortos de ADN, obtenidos por medio de sonicación o bien enzimático, que varían según las plataformas utilizadas, pero habitualmente son fragmentos entre 150 y 400 pares de bases. Dependiendo de la estrategia, la preparación de las bibliotecas puede realizarse previo o posterior al enriquecimiento y consiste en la adición de adaptadores a ambos extremos de cada uno de los millones de fragmentos de ADN a secuenciar. En esta etapa también pueden añadirse etiquetas, que son secuencias establecidas de ADN para diferenciar cada muestra, denominados comúnmente códigos de barra de la muestra (*sample barcodes*), esto hace que en un mismo ensayo se puedan combinar múltiples muestras sin riesgo de entrecruzamiento entre las mismas. Cabe destacar que los adaptadores son específicos para cada plataforma de secuenciación. Los mismos son fragmentos de ADN de doble cadena que tienen secuencias consenso donde se alinean los cebadores para las etapas de amplificación, ya sea por PCR-puente o PCR en emulsión, según la plataforma a utilizar y los cebadores para la secuenciación propiamente dicha. La obtención de fragmentos flanqueados por adaptadores con secuencias específicas permite realizar millones de reacciones a la vez para obtener la secuencia de cada inserto.

7.5.2. Enriquecimiento del blanco

A fin de desarrollar cualquier protocolo de secuenciación dirigida, es necesario enriquecer las regiones de interés a la vez que se separa el resto del ADN genómico. El enriquecimiento puede ser basado en captura o enriquecimiento basado en PCR. En el enriquecimiento basado en captura el ADN de la muestra es fragmentado a fin de obtener fragmentos de ADN cortos. Se preparan las bibliotecas con dichos fragmentos y éstas se hibridan con sondas de ADN o ARN complementarias a las regiones de interés. En el enriquecimiento basado en

PCR, se utilizan múltiples cebadores específicos en una misma reacción para enriquecer las regiones de interés generando amplicones de tamaño corto.

7.5.3. Amplificación del templado y secuenciación masiva paralela

Illumina y Ion Torrent utilizan las bibliotecas como templado de secuenciación, y necesitan de la amplificación del mismo para alcanzar la cantidad de señal necesaria. En las plataformas Illumina, las bibliotecas son cargadas en una celda de flujo donde cada inserto de la biblioteca es amplificado clonalmente por medio de una PCR-puente, a fin de generar un grupo o *cluster* unido al soporte sólido, que se utilizará como templado. Luego, se lleva a cabo la secuenciación por síntesis con terminadores reversibles marcados con fluorescencia, los que compiten para elongar la cadena. Debido a la presencia de terminadores, sólo se puede añadir un nucleótido por ciclo. El nucleótido incorporado es excitado y su emisión lumínica es registrada por un dispositivo óptico. El fluoróforo y el terminador se clivan y comienza un nuevo ciclo. Las imágenes obtenidas de cada grupo o *cluster* son procesadas para generar el llamado de bases (*base calling*) y obtener la secuencia de cada una de las lecturas. El proceso de secuenciación se realiza en ambos sentidos, a partir de ambos adaptadores, por lo que se obtienen lecturas de extremos pareados (o *paired-end reads*). En las plataformas Ion Torrent, se genera una PCR en emulsión con perlas para amplificar clonalmente cada hebra de la biblioteca.

7.5.4. Procesamiento de datos

El procesamiento de datos comienza con la señal cruda obtenida por el secuenciador. Al trabajo bioinformático se lo denomina habitualmente tubería o *pipeline* bioinformático. El análisis primario es la conversión de la señal cruda obtenida por el secuenciador en millones de secuencias cortas de ADN, lecturas o *reads* y su archivo resultante es un archivo denominado FASTQ, que contiene la secuencia de cada una de las lecturas obtenidas, con un valor de calidad para cada nucleótido (*Phred score*). El análisis secundario consiste en una serie de pasos de control de calidad, recorte o eliminación de lecturas de baja calidad, mapeo de cada lectura a la secuencia de referencia, alineamiento local y llamado de variantes, o sea todas las variantes que muestren alguna diferencia con el genoma de referencia. El análisis terciario se realiza a partir del llamado de variantes y es la anotación y el filtrado de cada una de las variantes según el objetivo del análisis.

En la secuenciación siempre hay que considerar los conceptos de cobertura y profundidad. La cobertura se expresa como el porcentaje de lecturas mapeadas contra la referencia esperada y la profundidad es la cantidad de lecturas realizadas en una misma secuencia.

7.6. Tecnologías de tercera generación

Una de las principales debilidades de la tecnología NGS está en el reducido tamaño de las lecturas que producen (hasta 300 pb) lo que aumenta la probabilidad de producir errores de ensamblaje. Por otro lado, las lecturas de pequeño tamaño también pueden llevar a problemas en la identificación de especies filogenéticamente cercanas. Otra debilidad de estos métodos es la necesidad de amplificar la muestra de ácidos nucleicos previamente a la secuenciación, por lo que siempre se secuencian copias de las moléculas originales.

Actualmente, además de la tecnología de NGS se han desarrollado nuevos secuenciadores con un concepto diferente y son los de **tercera generación** ya que son capaces de secuenciar sin amplificación, realizando la secuenciación de molécula única. La Tecnología *Single Molecule Real Time Sequencing* (SMRT-Seq) o Secuenciación de Moléculas Individuales en Tiempo Real, se ubica dentro de las tecnologías de secuenciación de tercera generación. La misma tiene la capacidad de generar lecturas largas de hasta 30,000 pb siempre y cuando el material genético cuente con los requisitos necesarios. Entre ellas se encuentran las plataformas PacBio y Nanopore.

7.7. PacBio

La plataforma PacBio es un sistema de secuenciación a tiempo real de una sola molécula (Single Molecule Real Time Sequencing (SMRT-Seq) empleando células de flujo que se basan en la tecnología «guía de onda de modo cero» (ZMW). Es una plataforma de secuenciación de lecturas de decenas de kilobases de longitud y permite ensamblar fácilmente genomas completos y secuenciar transcritos completos. La metodología fue desarrollada por Pacific Biosciences of California, Inc. en 2011.

La metodología emplea arrays nanofabricados de silicio, los SMRT Cells 8M, que contienen un gran número de pozos microscópicos llamados ZMW (zero-mode waveguides donde quedan inmovilizados los complejos polimerasa-molécula molde. La ZMW permite el estudio de un único nucleótido incorporado a la polimerización. Cada una de las cuatro bases nitrogenadas del ADN se marca con un fluoróforo diferente. Así, cuando un nucleótido se incorpora a la cadena incipiente, se libera el fluoróforo y se observa una señal que es recogida en un detector (Valderrama Martin y col., 2020).

7.8. Nanopore

La tecnología de Nanopore se basa en los perfiles de corriente eléctrica que genera una molécula de ácido nucleico al pasar a través de un nanoporo en una membrana a cuyos lados hay establecido un diferencial de voltaje.

Un nanoporo es un pequeño agujero del orden de un nanómetro en su diámetro interno. Los nanoporos pueden ser creados por proteínas que perforan membranas (nanoporos biológicos) o pueden crearse sobre materiales sólidos tales como silicón y grafeno. Los mismos, se generan en un medio conductor y al aplicar un voltaje se puede observar una corriente eléctrica producida por la conducción de iones a través del orificio. Si pasa una base, una molécula de ADN u otra molécula por el nanoporo, la magnitud de la corriente varía en función de la conductividad. De esta manera, al pasar alguna de las cuatro bases nitrogenadas, la corriente eléctrica se modifica y permite conocer la secuencia en la hebra de ADN.

El MinION, es el equipo de secuenciación empleado, es portátil y tiene un tamaño ligeramente mayor que el de una memoria USB (Valderrama Martin y col., 2020).

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, S., Anderson, S., Edwards, D., Gibb, B., y Mastropaolo, M. (2021). Understanding Restriction Enzyme Digests. HHMI Science Education Alliance (SEA) Faculty Group, QUBES Educational Resources. Recuperado de: <https://qubeshub.org/publications/2778/?v=1>
- Aguilera, P., Tachiquín, M., Graciela, Munive, R., y Olvera, B. (2014). PCR en tiempo real. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, pp. 175-201. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Martha-Eugenia-Ruiz-Tachiquin/publication/259042551_PCR_en_tiempo_real/links/53d119740cf2fd75bc5d725e/PCR-en-tiempo-real.pdf
- Arber, W., y Linn, S. (1969). DNA modification and restriction. *Annual Review of Biochemistry*, 38(1), 467-500.
- Arya, M., Shergill, I., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., y Patel, H. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5(2), 209-219.
- Asuar, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Ecología Molecular*. LE Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre (Eds). INECC. México, pp. 517-552.
- Baker, G., Smith, J., y Cowan, D. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 541-555.
- Bannerman, T., Hancock, G., Tenover, F., y Miller, J. (1995). Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(3), 551-555.
- Bhardwaj, A., Pandey, R., Agarwal, M., y Katiyar-Agarwal, S. (2021). Northern blotting technique for detection and expression analysis of mRNAs and small RNAs. In *RNA Abundance Analysis*. Humana, New York, pp. 155-183.
- Bolivar, A., Rojas, A., y Lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*, 3(1), 25-33.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J., y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608.
- Bridson, R., Bull, S., Mansoor, S., Amin, I., y Markham, P. (2002). Universal primers for the PCR-mediated amplification of DNA β . *Molecular Biotechnology*, 20(3), 315-318.
- Cardozo-Bernal, Á., Ramón, L., Poutou-Piñales, R., Carrascal-Camacho, A., y Zambrano, D. (2013). Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *Universitas Scientiarum*, 18(2), 203-222.
- Castro-Chacín, L., y Díaz-Martínez, L. (2021). Biosafety in the use of ethidium bromide in molecular biology laboratories. *Revista Crítica Transdisciplinar*, 4(2), 17-28.
- Ciborowski, P., y Silberring, J. (2016). Proteomic profiling and analytical chemistry: the crossroads. Elsevier. Capítulo 7. pp. 115-143. doi.org/10.1016/B978-0-444-63688-1.00007-0

- Cuenca, F., Cerero, L., y Hernández, Á. (2013). Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31, 20-25.
- Dieffenbach C., y Dveksler G. (1995). PCR Protocols. Academic Press, San Diego, California. pp. 3-18.
- Fakruddin, M. (2011). Loop mediated isothermal amplification (LAMP) an alternative to polymerase chain reaction (PCR). *Bangladesh Research Publ. Journal*, 5(4).
- Fakruddin, M., Mannan, K., Chowdhury, A., Mazumdar, R., Hossain, M., Islam, S., y Chowdhury, M. (2013). Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 5(4), 245.
- Fernández Cuenca, F., Cerero, L., y Hernández, Á. (2013). Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31, 20-25.
- Fernández, D. (1985). El complejo avidina-biotina y su uso en la biología molecular. *Interferón Biotechnology*, 137-41.
- Foo, P., Nurul Najian, A., Muhamad, N., Ahamad, M., Mohamed, M., Yean Yean, C., y Lim, B. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction as viable PCR substitute for diagnostic applications: a comparative analysis study of LAMP, conventional PCR, nested PCR (nPCR) and real-time PCR (qPCR) based on *Entamoeba histolytica* DNA derived from faecal sample. *BMC Biotechnology*, 20(1), 1-15.
- Gandhi, K., Sharma, N., Gautam, P., Sharma, R., Mann, B., y Pandey, V. (2022). Western Blotting. In *Advanced Analytical Techniques in Dairy Chemistry*. Springer, New York, NY. pp. 121-130.
- Gilbert, F., Fromageau, A., Gélinau, L., y Poutrel, B. (2006). Differentiation of bovine *Staphylococcus aureus* isolates by use of polymorphic tandem repeat typing. *Veterinary Microbiology*, 117(2-4), 297-303.
- Glenn, G., y Andreou, L. (2013). Analysis of DNA by Southern blotting. In *Methods in Enzymology*, 529, 47-63.
- Green, M., y Sambrook, J. (2019). Nested polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, doi:10.1101/pdb.prot095182
- Green, M., y Sambrook, J. (2021). Southern blotting. *Cold Spring Harbor Protocols*, doi:10.1101/pdb.prot100487
- He, S., y Green, R. (2013). Northern blotting. In *Methods in Enzymology*, 530, 75-87.
- Herron-Olson, L., Fitzgerald, J., Musser, J., y Kapur, V. (2007). Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. *PloS one*, 2(10), e1120.
- Hoopes, L. (2012). Nucleic acid blotting: Southern and northern. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 6(1), 8-2.
- Iglesias-Osores, S. (2019). Bromuro de etidio: ¿Agente mutágeno en el laboratorio? *Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*, 12(3), 243-244.
- Jauk, F. (2019). Secuenciación masiva paralela (NGS): conceptos básicos y aplicaciones. In *Hematología: XXIV Congreso Argentino*. Sociedad Argentina de Hematología. 4, 21.

- Kaufmann, M., y Pitt, T. (2018). Pulsed-field gel electrophoresis of bacterial DNA. *In Methods in Practical Laboratory Bacteriology*, pp. 83-92.
- Komminoth, P., Heitz, P., y Long, A. (1994). In situ polymerase chain reaction: general methodology and recent advances. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*, 78, 146-152.
- Lee, P., Costumbrado, J., Hsu, C., y Kim, Y. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, (62), e3923.
- Makalowski, W. (2001). *Bioinformatics*. e LS. Recuperado de: <https://www.bioinformatics.uni-muenster.de/publications/papers/A0005247-001-000.pdf>
- Markoulatos, P., Siafakas, N., y Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(1), 47-51.
- Moritz, C. (2020). 40 years Western blotting: A scientific birthday toast. *Journal of Proteomics*, 212, 103575.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., y Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *In Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 51, 263-273.
- Nelson, A., Bradley, L., Mejía, G., Rybka, T., Alexander, L., Wilfert, R., y Orellana, P. (2008). Diagnóstico de Laboratorio: Un Resumen General. *FOCUS on Field Epidemiology*, 4, 3.
- Neoh, H., Tan, X., Sapri, H., y Tan, T. (2019). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infection, Genetics and Evolution*, 74, 103935.
- Nuovo, G. (2001). Co-labeling using in situ PCR: a review. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49(11), 1329-1339.
- Olive, D., y Bean, P. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1661-1669.
- Pohl, G., y Shih, I. (2004). Principle and applications of digital PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 4(1), 41-47.
- Reinoso, E., Bettera, S., Odierno, L., y Bogno, C. (2007). rep-PCR of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Argentina. *Journal Veterinary Research Animal Science*, 4, 115-121.
- Salipante, S., y Jerome, K. (2020). Digital PCR an emerging technology with broad applications in microbiology. *Clinical Chemistry*, 66(1), 117-123.
- Southern, E. (2006). Southern blotting. *Nature Protocols*, 1(2), 518-525.
- Swartz, D., y Cantor, C. (1984). Separation of yeast chromosome sized DNAs by pulsed-field gel electrophoresis. *Cell*, 37, 67-75.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Tenover, F., Arbeit, R., Goering, R., Mickelsen, P., Murray, B., Persing, D., y Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233-2239.

- Tenover, F., Arbeit, R., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., Goering, R., y Hollis, R. (1994). Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(2), 407-415.
- Travers, A., y Muskhelishvili, G. (2015). DNA structure and function. *The FEBS journal*, 282(12), 2279-2295.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B., Remm, M., y Rozen, S. (2012). Primer3 new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115-e115.
- Valderrama Martín, J., Ortigosa, F., y Pendon, R. (2020). Métodos de secuenciación: tercera generación. *Encuentros en la Biología*, 13(175), 15-21.
- van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A., y Hays, J. (2008). Principles and technical aspects of PCR amplification. *Springer Science & Business Media*. Recuperado de: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4020-6241-4>
- Vincze, T., Posfai, J., y Roberts, R. (2003). NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3688-3691.
- Voytas, D. (2000). Agarose gel electrophoresis. *Current Protocols in Molecular Biology*, 51(1), 2-5.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., y Madden, T. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 1-11.
- Zare, S., Derakhshandeh, A., Haghkhah, M., Naziri, Z., y Broujeni, A. (2019). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* from different sources by RAPD-PCR analysis. *Heliyon*, 5(8), e02231.

ANEXO I: PROTOCOLOS DE TRABAJO

I. EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSOMAL A PARTIR DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS

A partir de un cultivo *overnight*, trasvasar 1 ml a un tubo *Eppendorf* y centrifugar 1 min a 12000 rpm. Descartar sobrenadante con micropipeta.

- Resuspender en 400 μ l de *buffer* STET. Mezclar con vortex.
- Agregar 5 μ l de Lisostafina (1 μ g/ml) en frío. Resuspender bien.
- Incubar 1,5 h a 37°C. Agitar varias veces mientras se está incubando.
- Calentar 1 min a 94°C, para inactivar nucleasas.
- Agregar 1 μ l de RNAsa en frío (10 mg/ml).
- Agregar 20 μ l de SDS 10%.
- Agregar 50 μ l de Proteasa (20 mg/ml). Mezclar suavemente.
- Incubar 2 h a 37°C (o toda la noche).
- Agregar 94 μ l de NaCl 3 M.
- Agregar 46,7 μ l de NaCl/CTAB (NaCl 0,5 M; CTAB 5% p/v).
- Incubar 10 min a 65°C
- Agregar un volumen de Cloroformo-Isoamílico (49:1). Mezclar bien.
- Centrifugar 12 min a 12000 rpm.
- Sacar sobrenadante sin tocar la interfase.
- Agregar un volumen de Cloroformo. Mezclar bien.
- Centrifugar 5 min a 10000 rpm.
- Sacar sobrenadante a tubo limpio.
- Agregar 2 volúmenes de Etanol 100% y guardar a -20°C toda la noche.
- Centrifugar 10 min a 10000 rpm.
- Descartar el sobrenadante y dejar secar el tubo abierto en estufa.
- Resuspender en 30 μ l de *buffer* TE.
- Guardar en heladera hasta su siembra en agarosa 0,8 %.
- Conservar a -20°C hasta su uso.

II. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL CON TRIZOL

Homogeneización

- Tomar la muestra y agregar 300 μl de Trizol (4°C) por cada 50 - 100 mg de tejido.
- Incubar el homogenato durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la digestión. Se puede guardar la muestra a -20°C , esto ayuda a lisar las células.

Nota: Las muestras pueden ser almacenadas en Trizol a -80°C durante 1 mes.

Extracción de ARN

- Agregar 60 μl de cloroformo por cada 300 μl de Trizol. Vorterear y dejar reposar 5 min. El cloroformo debe mezclarse bien con el Trizol.
- Incubar las muestras durante 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12000 rpm a 4°C durante 20 min.

Nota: Se observa una fase acuosa (ARN), una interfase (ADN) y una fase orgánica al fondo del tubo (lípidos y proteínas).

Precipitación de ARN

- Transferir la fase acuosa (arriba) que contiene el ARN a un nuevo tubo *Eppendorf*.
- Agregar 200 μl de isopropanol, invertir el tubo para mezclar, incubar a temperatura ambiente durante 5 min (no vorterear). Se puede observar el ARN precipitado.
- Centrifugar a 12000 rpm a 4°C durante 20 min.

Lavado de ARN

- Mezclar el pellet de ARN con 300 μl de etanol 80%.
- Centrifugar a 12000 rpm a 4°C durante 5 min.

Solubilización de ARN

- Secar el pellet de ARN durante 5 - 10 min. Colocar el tubo boca abajo en papel absorbente hasta que el pellet quede traslúcido.
- Resuspender el ARN en 20 - 200 μl de agua estéril libre de nucleasas. No vorterear.

III. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS A PARTIR DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

- A partir de cultivo *overnight*, trasvasar 1,5 ml a un tubo *Eppendorf* y centrifugar durante 1 min a 12000 rpm. Mantener a 4°C.
- Remover el sobrenadante y dejar el precipitado (pellet) tan seco como sea posible. Para ésto, tirar el sobrenadante a un frasco y dejando el tubo invertido, golpearlo suavemente sobre unas hojas de papel absorbente.
- Resuspender el precipitado en 200 µl de Solución I, mezclar con vórtex. Mantener en hielo-agua 10 min.
- Añadir 300 µl de solución II. Punto crítico: no demorar más de 5 min. Mezclar por inversión suavemente 5 - 7 veces (NO vorterear). Mantener en hielo.
- Añadir 300 µl de Solución III. Mezclar suavemente por inversión. Incubar en hielo 5 min.
- Centrifugar 10 min a temperatura ambiente. Trasvasar suavemente el sobrenadante a otro tubo, teniendo cuidado de no transferir partes del material precipitado, blancuzco.
- Retirar el sobrenadante por inversión, añadir 2 volúmenes de etanol 70%.
- Conservar a -20°C 2 h.
- Centrifugar, descartar el sobrenadante y dejar el tubo invertido sobre papel absorbente para que se seque.
- Dejar secar y resuspender en 20 µl de agua deionizada.
- Conservar a -20°C hasta su uso.

IV. REACCIÓN CONVENCIONAL DE PCR DE PUNTO FINAL

Si bien existen diferentes protocolos para realizar una reacción de PCR, en la siguiente tabla se puede observar una reacción convencional de PCR con un volumen final de 25 μ l.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen de reacción 1x
<i>Buffer</i>	10X	1X	2,5 μ l
MgCl ₂	25 mM	3,5 mM	3,5 μ l
<i>Primer</i>	20 μ M	3 μ M	3,75 μ l
dNTP	25 mM	200 μ M	0,2 μ l
ADN	-	10 ng	5 μ l
ADN <i>Taq Pol</i>	2,5 U/ μ l	0,05 U/ μ l	0,2 μ l
H ₂ O	-	-	5,15 μ l

V. REACCIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL

Mezcla de reacción para la síntesis de ADNc, con un volumen final de 10 μ l

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μ l)
Buffer RT	10X	2X	2
Mix dNTP	100 mM	0,8 mM	1
<i>Random Primers</i>	10X	2X	2
<i>Reverse Transcriptase</i>	200 U	10 U	1
Inhibidor ARN	40 U/ μ l	1 U	1
Agua libre de nucleasas	-	-	3,2
Volumen final			10

Componentes de la mezcla de reacción de una qPCR, utilizando SYBR Green

- Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen; Cat. Nro: 10966-018)
- Buffer 10X (Kit Taq Platinum)
- MgCl₂ (Kit Taq Platinum).
- MgCl₂ (Kit Taq Platinum)
- dNTPs
- SYBR Green

VI. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Preparación del gel y Corrida electroforética

- Disolver la agarosa en *buffer* corrida TBE 1X hasta concentración final de 1X en baño maría durante 15 minutos.
- Enfriar hasta 45 - 50°C, agregar un agente intercalante como por ejemplo *Sybr Green* a concentración final 1 µg/ml.
- Verter la agarosa sobre un vidrio al que se le ha colocado un peine, el cual formará las calles para la siembra.
- Dejar solidificar y retirar el peine.
- Colocar el gel en la cuba de electroforesis.
- Agregar *buffer* de corrida hasta 1 - 2 mm por encima del gel.
- Agregar *buffer* a las muestras y al marcador de PM (Ladder 100 pb). Sembrar 8 - 10 µl de cada muestra en las calles del gel.
- Llevar a cabo la corrida a 70 V durante 1 h aproximadamente.
- Observar bajo luz ultravioleta.
- Confirmar la pureza e integridad del ADN amplificado.

Nota: La corrida electroforética debe ser realizada con el mismo *buffer* con el cual preparó su gel.

VII. REACCIÓN DE DIGESTIÓN ENZIMÁTICA

Las reacciones de restricción generalmente se realizan en un volumen final de 20 μl conteniendo entre 0,2 a 1,5 mg de ADN molde. En un tubo *Eppendorf* estéril se colocan los siguientes componentes:

→ H ₂ O (estéril, libre de nucleasas)	16,3 μl
→ <i>Buffer</i> 10X	2 μl
→ Albúmina Sérica Bovina (BSA)	0,2 μl
→ Sustrato (ADN)	1 μl
→ Enzima (10 U/ml)	0,5 μl

Antes de realizar la mezcla de reacción, se debe mezclar cada componente y luego centrifugar para bajar el contenido. En general se comienza agregando los componentes de mayores volúmenes. La enzima de restricción es el último componente a agregar en la mezcla. Posteriormente se mezcla muy suavemente por pipeteo todos los componentes de la mezcla y se incuba a la temperatura óptima entre 1 y 2 h. Finalmente se procede a realizar el análisis a través de una corrida electroforética en geles de agarosa 0,8% o poliacrilamida, dependiendo del tamaño de los fragmentos generados.

VIII. ELECTROFORESIS EN CAMPOS PULSANTES

a) Preparación de las muestras

1. A partir de un cultivo de 18 h en medio líquido sembrar en una placa con medio agarizado específico para el microorganismo motivo de estudio, por diseminación en superficie. Incubar por 24 h.
2. Resuspender el crecimiento en 2 ml de *buffer* TE¹ hasta alcanzar Escala de *Mc Farland* de 2 o 3 aproximadamente equivalente a una OD_{660nm} de 0,8. Es necesario estandarizar la concentración adecuada para cada microorganismo.
3. A 225 µl de la suspensión, agregar 20 µl de Lisozima (50 mg/ml) o Lisostafina (5 mg/ml) según el microorganismo e incubar 30 min a 37°C.
4. Agregar 5 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) y 250 µl de agarosa fundida *Low Melting Point* al 1,5 % temperada a 50°C. Homogeneizar suavemente. Hacer los cubos y dejar solidificar a 4°C durante 20 min.
5. Incubar los cubos con 1275 µl de solución EDTA (0,5 M EDTA; pH 9) 150 µl de n-lauryl sarcosine al 10% y 75 µl de Proteinasa K (20 mg/ml), durante 90 min en baño a 55°C.
6. Lavar los cubos con agua tridestilada estéril a 50°C durante 15 min.
7. Efectuar 3 lavados con *buffer* TE² a 50°C por 15 min cada uno.

b) Digestión con *SmaI*

Digerir los cubos durante 3 h a 25°C con 5 µl de enzima *SmaI* (10 U/µl), 2 µl de albúmina, 20 µl de *buffer* J y 73 µl de agua libre de nucleasas.

c) Electroforesis

Preparación del gel

1. Preparar 100 ml de agarosa EEO (baja electroendosmosis) al 1% en TBE 0,5X. Fundirla y equilibrar la temperatura a 50°C.
2. Hacer el gel y dejar enfriar 20 min a 4°C.
3. Cortar los bloques de aproximadamente el 80% del tamaño de la calle del gel.
4. Colocar el bloque en el gel tratando de que el mismo quede bien pegado a la pared del frente de la calle.
5. Llenar el resto de la celda con agarosa LMP (bajo punto de fusión) 1%.
6. Dejar enfriar 20 min a 4°C.

Marcador de Peso Molecular: *Lambda Ladder* (bandas desde 48,5 kb hasta 1000 kb aproximadamente).

Corrida electroforética

1. Llenar la cuba con 2,3 lt de *buffer* TBE 0,5X.
2. Situar el gel en la plataforma central.
3. Prender el módulo de enfriamiento y ajustar la temperatura entre 12 - 14°C
4. Encender la bomba junto con el equipo y poner la velocidad en 80.
5. Una vez estabilizada la temperatura, bajar la velocidad de la bomba en 60. Observar que la velocidad de flujo no altere o perturbe demasiado al *buffer*.
6. Establecer los parámetros para la electroforesis: Tiempo pulso inicial 5 seg, tiempo pulso final 25 seg, ángulo del campo eléctrico 120°, voltaje 6 V/cm, tiempo de corrida: 17 h*.
7. Comenzar la corrida.
8. Teñir el gel con 150 µl de *buffer* TBE 0,5X y 6 µl de Bromuro de Etidio (10 mg/ml), durante 45 min.
9. Observar los perfiles de las bandas en un digitalizador de imágenes.

*Este programa es válido para microorganismos cuyo patrón de bandas esté entre 40 a 700 Kb, aproximadamente.

ANEXO II: SOLUCIONES DE TRABAJO

PBS (*Buffer* Fosfato Salino) (1 litro): NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na₂HPO₄ 1,44 g; KH₂PO₄ 0,24 g; pH 7,4

***Buffer* STET 1X:** 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl; 5% Triton X-100

TE: 10 mM Tris-ClH; 1 mM EDTA; pH 8

***Buffer* TE¹:** 100 mM Tris-ClH; 100 mM EDTA; pH 7,6

***Buffer* TE²:** 10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7,6

Sn EDTA: 0,5 M EDTA; pH 9

***Buffer* TBE 5X** (1 litro): Tris Base 54 g/l; Ácido Bórico 27,5 g/l; EDTA 0,5 M; pH 8

BP_{BAL}: 0,5 M EDTA; 0,5% SDS (Dodecilsulfato de Sodio); Proteínasa K (2 mg/ml)

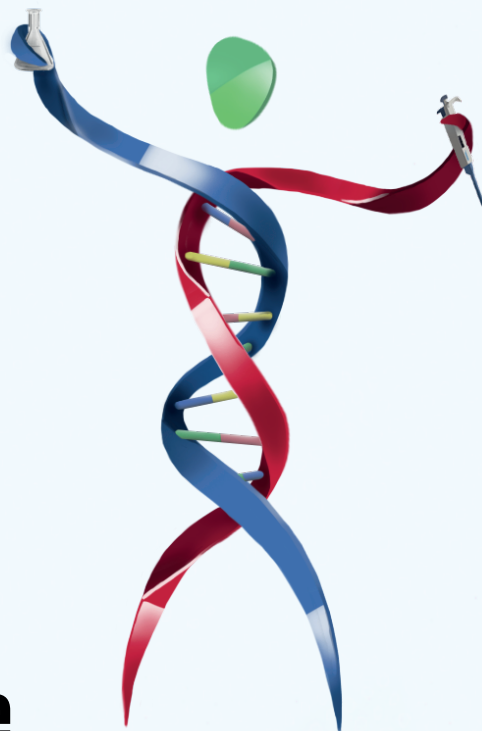
Solución I: 50 mM Glucosa; Tris-Cl (pH 8) 25 mM; EDTA (pH 8) 10 mM

Solución II: 0,2 N NaOH; SDS 1% (preparar en el momento)

Solución III (100 ml): Acetato de potasio (5 M) 60 ml; Ácido acético glacial 11,5 ml; H₂O 28,5 ml

Nota: Las enzimas se adicionan en el momento en que se va a usar la solución

e-book



Manual de herramientas moleculares

Conceptos básicos y técnicas empleadas
en el estudio de la genética microbiana

Elina Reinoso, Silvana Dieser y Melina Moliva

La Biología Molecular es un área de la Biología que se encarga de estudiar los procesos que se llevan a cabo en los seres vivos desde un punto de vista molecular. Se nutre de los aportes de la bioquímica, la biología celular y la genética. Los ácidos nucleicos y las proteínas son su principal objeto de estudio.

El descubrimiento de la doble hélice de ADN, el conocimiento de la actividad de ciertas enzimas sobre el ADN, el uso de la PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) y sus variantes, el desarrollo del ADN recombinante y la ingeniería genética han revolucionado por completo la biología. El estudio molecular ha sido fundamental para múltiples adelantos científicos aplicados a la industria, la agricultura, la medicina humana y animal. El objetivo de este *Manual de herramientas moleculares* es realizar una síntesis de los conceptos básicos necesarios para desarrollar las principales técnicas moleculares empleadas en el estudio de la genética microbiana.



UniRio
editora
Secretaría Académica



Colección PA SATEXTOS

UniRio
editora