

Capítulo 8

PCR y diseño de oligonucleótidos

Daniel Alejandro Díaz García
José Francisco Morales Domínguez
*Departamento de Química del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes*

Resumen

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica de biología molecular desarrollada por Kary B. Mullis que permite amplificar *in vitro* una gran cantidad de fragmentos de ADN específicos a partir de una mezcla de reactivos sometidos a diversas temperaturas. Los componentes de la mezcla incluyen una plantilla de ADN, dNTPs, enzima polimerasa, buffer de reacción, magnesio y oligonucleótidos. Para este último componente, resulta indispensable el previo análisis y diseño, ya que deberán presentar características que permitan su correcto funcionamiento. Gracias a la existencia de plataformas bioinformáticas esta tarea se facilita. Diversas variantes como PCR anidada, múltiple, touchdown, RT-PCR, qPCR y RACE, han

sido desarrolladas con el objetivo de mejorar algunas características como sensibilidad y especificidad además de aumentar las aplicaciones.

Introducción

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR; por sus siglas en inglés) es una técnica de biología molecular que permite amplificar *in vitro* una gran cantidad de fragmentos de ADN específicos a partir de un molde. En esta técnica se aprovecha, aunque con ciertas diferencias, el principio de la replicación de ADN, donde, por medio de la exposición a ciclos de diferentes temperaturas y con reactivos como dNTPs, ADN molde, oligonucleótidos, buffer y una polimerasa, se sintetizan nuevas cadenas de ADN logrando obtener millones de copias.

Kary B. Mullis desarrolló esta técnica a mediados de los 80s del siglo pasado tomando en cuenta estudios sobre el uso de oligonucleótidos para la síntesis de nuevas cadenas de ADN. Gracias a esto, Mullis ganó el premio nobel de química en 1993.

La PCR se caracteriza por su rapidez, facilidad, especificidad, sensibilidad y fiabilidad. Gracias a su gran variedad de aplicaciones, resulta de gran importancia en laboratorios de investigación. Particularmente, en biotecnología vegetal, sus aplicaciones incluyen la identificación, secuenciación y análisis de expresión de genes, detección de patógenos, análisis de mutaciones y polimorfismos, entre otras.

Componentes para la PCR

Como ya se mencionó, la PCR utiliza una metodología similar a la replicación, sin embargo, la síntesis *in vivo* de ADN depende de varias enzimas y cofactores, mientras que *in vitro* se utiliza un conjunto de componentes expuestos a diferentes temperaturas. Estos componentes se presentan a continuación:

- ADN: Sirve como molde para generar las copias de un fragmento específico. Puede ser de cualquier organismo y de cualquier tipo (genómico, complementario, plasmídico, etc.).

- dNTPs: Es una mezcla de los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos libres (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) que serán utilizados para la síntesis del fragmento de ADN.
- Enzima ADN polimerasa: Se encarga de la síntesis de la nueva cadena por medio de los dNTPs con base en la cadena molde. Actualmente, entre las enzimas más utilizadas se encuentran la *Taq* y la *Pfu*, obtenidas de la bacteria *Thermus aquaticus* y la arquea *Pyrococcus furiosus*, respectivamente. Estas enzimas se utilizan por ser termoestables, ya que mantienen su actividad durante la reacción a pesar de las altas temperaturas a las que son sometidas.
- Buffer de reacción: Provee la fuerza iónica y mantiene el pH de la solución durante la reacción.
- Magnesio: Es un cofactor de la polimerasa, generalmente provisto como $MgCl_2$ o $MgSO_4$. La concentración de este elemento tiene un efecto sobre la especificidad de la reacción por lo que debe ser optimizada.
- Oligonucleótidos: También llamados cebadores o iniciadores. Son fragmentos cortos de ADN de una sola cadena complementarios a la hebra molde. Limitan el fragmento a amplificar y aportan el grupo 3'OH para que la polimerasa inicie su actividad. Estos deben ser específicos al amplicón que se desea obtener, por lo cual, es necesario llevar a cabo un análisis para su diseño.

Diseño de oligonucleótidos

El diseño de oligonucleótidos es un paso fundamental, ya que, de él dependerá el éxito de la PCR. De acuerdo con diversos autores los parámetros varían ligeramente, pero de forma general, los oligonucleótidos deben cumplir con las siguientes características:

- Longitud: Esta característica influye en la especificidad; a mayor tamaño más específico, sin embargo, oligonucleótidos muy largos dan como resultado una lenta hibridación. Generalmente el tamaño va de 18 a 24 nucleótidos de longitud.
- Temperatura de fusión (T_m): Es la temperatura en la cual el 50% del ADN bicatenario se desnaturaliza. Es recomendable una T_m de 55 a 60

°C con una diferencia máxima de 5 °C entre ambos oligonucleótidos. El cálculo preciso de este parámetro se realiza por medio del modelo termodinámico del vecino más cercano, sin embargo, una fórmula simple para el cálculo de este parámetro con oligonucleótidos de 20 nucleótidos o menos es la siguiente:

$$T_m \approx 4 (G + C) + 2 (A + T)$$

Por medio de este parámetro es posible estimar la temperatura de alineamiento, frecuentemente calculada a 5 °C por debajo de la T_m , aunque, el valor óptimo debe ser obtenido experimentalmente.

$$T_a \approx T_m - 5 \text{ °C}$$

- Contenido de G y C: Influye directamente en la T_m de los oligonucleótidos. Se recomienda un porcentaje de G y C del 45 al 60 %.
- Presencia de 2 a 3 G o C dentro de los últimos 5 nucleótidos: Una de estas C o G debe estar en el extremo 3'. Esto ayuda a la unión específica de los oligonucleótidos.
- Especificidad: Los oligonucleótidos utilizados deben ser específicos al gen de interés, buscando regiones no conservadas con otros genes para evitar amplificaciones no deseadas.
- Longitud del amplicón: Para la PCR convencional la longitud recomendada es de alrededor de 500 pb. Para una PCR en tiempo real el fragmento recomendado es de 70 a 200 pb, además, cuando este tipo de PCR se utiliza para análisis de expresión, es recomendable que cada uno de los oligonucleótidos hibriden en un exón diferente, y de ser posible, en la unión de dos exones para evitar la amplificación no deseada de ADN.

Adicionalmente, debe evitarse la complementariedad entre oligonucleótidos, repeticiones consecutivas de dos nucleótidos (por ejemplo, ATATAT) y repetición de 4 veces o más el mismo nucleótido con el fin de evitar la formación de dímeros o estructuras secundarias.

Es importante señalar que por medio de los oligonucleótidos es posible agregar una secuencia corta en los extremos 5' o 3' del amplicón, por ejemplo, sitios de restricción. Para esto, además de la secuencia de reconocimiento de

la enzima, es necesario agregar de 3 a 6 nucleótidos extra hacia el extremo 5' para permitir el correcto anclaje de la enzima de restricción para el corte.

Para el diseño de oligonucleótidos, existe una gran variedad de programas o plataformas informáticas que facilitan la tarea. Entre estas se encuentran PrimerSelect de DNASTar, FastPCR, Primer designing tool de NCBI [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>], Primer3Plus [<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>] y PCR Primer Design Tool [<https://www.eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/pcr-primer-design/>].

Proceso de la PCR

Una PCR se basa en la repetición de ciclos de tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión. La temperatura y tiempo de cada una de estas etapas dependerá del amplicón, de los oligonucleótidos y del kit utilizado.

La desnaturalización consiste en la separación de las dos cadenas de ADN por el rompimiento de los puentes de hidrógeno que las unen. En este paso, la mezcla de reacción se lleva a una temperatura de 94 o 95 °C.

En el alineamiento, los oligonucleótidos se hibridan a cada una de las cadenas previamente separadas. Aquí, la temperatura juega un papel importante en la eficiencia de amplificación y de ella depende la especificidad de la reacción: a mayor temperatura, mayor especificidad. En esta etapa, la temperatura varía entre 40 y 60 °C de acuerdo con la secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

Por último, la extensión es el proceso en el que la polimerasa genera una nueva cadena en dirección 5' a 3' a partir de los oligonucleótidos al unir los dNTPs. Este proceso se lleva a cabo a una temperatura de alrededor de 72 °C con una duración variable de acuerdo con la enzima y la longitud del amplicón. En la Figura 8.1 se muestra un esquema de un ciclo de PCR.

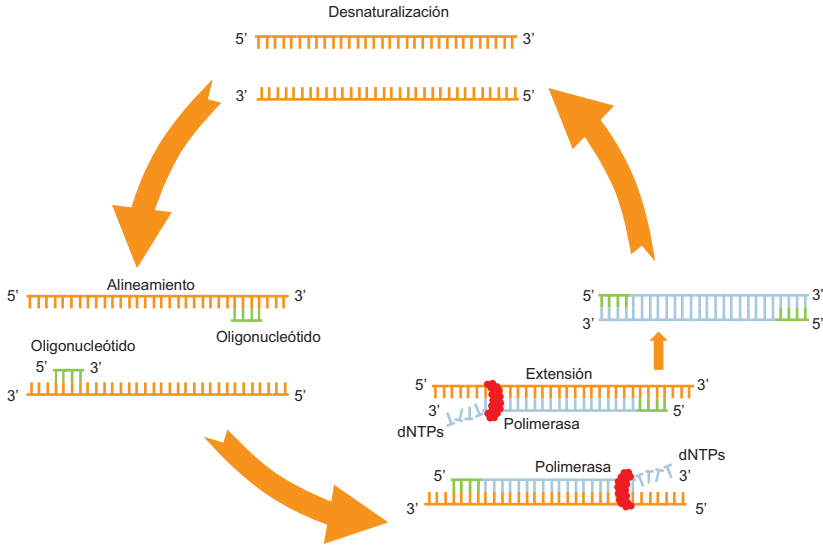


Figura 8.1. Esquema de un ciclo de PCR donde se muestran las tres etapas que lo componen: desnaturalización, alineamiento y extensión.

Por cada ciclo de la PCR se aumenta exponencialmente el número de copias del gen (durante el primer ciclo se obtienen dos copias, durante el segundo ciclo se obtienen cuatro copias, durante el tercero se obtienen ocho copias y así sucesivamente), por lo que, después de 30 ciclos, es posible obtener más de mil millones de copias del fragmento por cada molde de ADN de doble cadena inicial.

Entonces, una PCR convencional o también llamada PCR punto final, consiste en la repetición de alrededor de 30 ciclos (comúnmente entre 25 y 40 ciclos) de estas tres etapas, en la que, además se adiciona una desnaturalización inicial previa a los ciclos para asegurar la separación de las hebras de ADN, y una extensión final después de los mismos, para garantizar la completa extensión de los amplicones. Para esto, se utiliza un equipo llamado termociclador que permite mantener diferentes temperaturas durante periodos controlados.

Tipos de PCR más utilizados

Se han realizado algunas modificaciones a esta técnica, lo que ha dado como resultado el desarrollo de diversas variantes de la PCR, aumentando así, sus

aplicaciones y mejorando sus características. Algunas de estas variantes se presentan a continuación.

PCR anidada

Este tipo de PCR consiste en dos reacciones por separado, cada una, con un par de oligonucleótidos diferente. En la primera reacción, se utiliza un par de oligonucleótidos denominados externos para amplificar una secuencia de ADN de interés. El producto que se obtiene se toma como molde para la segunda amplificación, donde se utiliza el segundo par de oligonucleótidos (internos) para obtener un fragmento dentro del primer amplicón. De esta forma se obtiene mayor especificidad y sensibilidad en el producto final. En la Figura 8.2 se muestra un esquema de esta técnica.

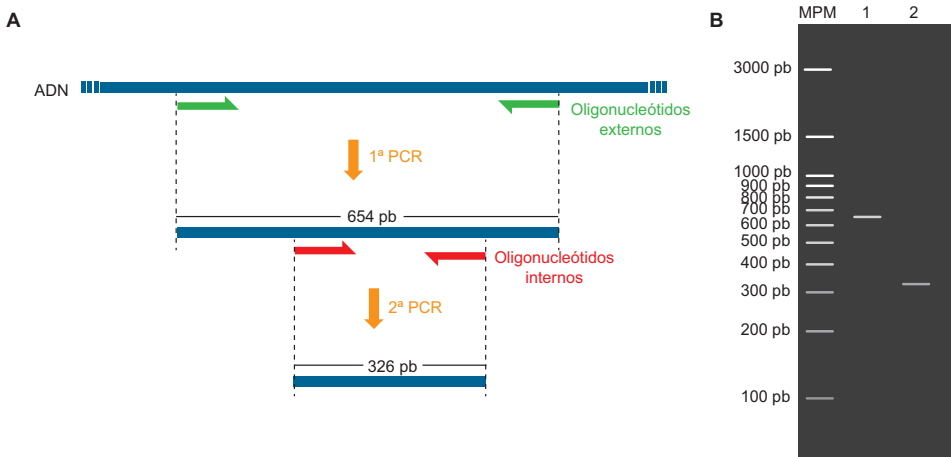


Figura 8.2. Esquema de PCR anidada. A) Se muestra una plantilla de ADN, a partir de la cual, con el par de oligonucleótidos externos (flechas color verde) se amplifica un fragmento de 654 pb; este amplicón es utilizado en una segunda reacción con el par de oligonucleótidos internos (flechas color rojo) que dan como resultado un fragmento de 326 pb que se encuentra dentro de la región del primer amplicón. B) Representación de la electroforesis de la PCR anidada, en el carril 1 se muestra la amplificación con los oligonucleótidos externos, en el carril 2 se muestra la amplificación obtenida con los oligonucleótidos internos.

Cabe mencionar que cuando se utiliza ARN como molde, este debe ser convertido a ADN complementario (ADNc); proceso donde actúa la transcriptasa reversa (este proceso se explica más adelante en el apartado de RT-PCR). Cuando se utiliza ADNc la técnica recibe el nombre de RT-PCR anidada.

La PCR anidada ha sido ampliamente utilizada para la identificación de patógenos de plantas como hongos, bacterias, virus y fitoplasmas.

Un ejemplo de esta técnica es la detección temprana de *Alternaria carthami*, hongo que produce la enfermedad de la mancha foliar (una de las principales enfermedades de cultivos como el cártamo), con el fin de establecer medidas para restringir su transmisión y proliferación. Para esto, en la primera amplificación se han utilizado oligonucleótidos universales (externos) que se unen a ITS, mientras que en la segunda amplificación, los oligonucleótidos (internos) son específicos de la especie. Así mismo, se han identificado otros organismos fitopatógenos como *Ralstonia solanacearum* en papa, *Pilidiella granati* en granada, entre muchos otros que representan un grave problema en el cultivo de diversas especies vegetales.

PCR múltiple

Este tipo de PCR surgió como una variante de la PCR convencional para obtener por medio de una sola reacción diferentes amplicones objetivo. Para llevarla a cabo, es necesario el uso de más de un par de oligonucleótidos en una única reacción y puede utilizarse una o varias plantillas. Las ventajas que presenta este tipo de PCR son el ahorro de tiempo y reactivos y menor cantidad de muestra necesaria, además, es útil para genes muy grandes donde se requiere obtener amplicones de varias regiones dentro del mismo gen. Una desventaja de este tipo de PCR es que se ve reducida la sensibilidad en comparación con una PCR simple. En la Figura 8.3 se muestra un esquema del uso de esta técnica con tres pares de oligonucleótidos.

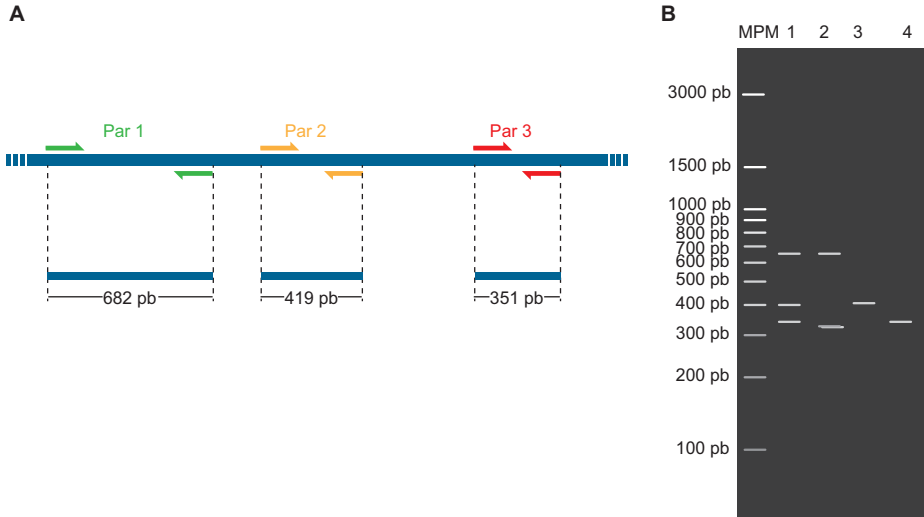


Figura 8.3. Esquema de PCR múltiple. A) Se muestra una plantilla de ADN, a partir de la cual, con tres pares de oligonucleótidos (flechas color verde indican par 1, flechas color beige indican par 2 y flechas color rojo indican par 3) se amplifican tres fragmentos de longitudes de 682, 419 y 351 pb, respectivamente. B) Representación de la electroforesis de la PCR múltiple, en el carril 1 se encuentra la muestra con la PCR múltiple donde se utilizaron los tres pares de oligonucleótidos en una sola reacción, en los carriles 2, 3 y 4 se observan las muestras de PCR individual con cada uno de los tres pares de oligonucleótidos.

La PCR múltiple tiene aplicaciones en el genotipado mediante marcadores moleculares, en la detección de organismos genéticamente modificados y en la detección de patógenos en plantas.

Por ejemplo, esta técnica se ha utilizado en el genotipado de microsatélites de algunas especies de roble, así como en especies de la familia Salicaceae. En cuanto a la identificación de fitopatógenos, se ha aplicado en la detección simultánea de tres especies de hongos del género *Phytophthora* en plantaciones de kiwi mediante oligonucleótidos específicos al gen *Ypt1* para cada una de las especies. Por último, en la identificación de organismos genéticamente modificados, se han utilizado eficiente y simultáneamente oligonucleótidos específicos al promotor 35S, al terminador NOS y al gen *epsps* en maíz y soya, además de proponerse su utilidad en otras especies vegetales.

RT-PCR

La PCR con transcriptasa reversa o RT-PCR consiste en la síntesis de ADNc a partir de ARNm. Esta reacción se lleva a cabo por medio de la enzima transcriptasa reversa capaz de retrotranscribir el ARNm a ADN. Para esto, se pueden utilizar tres tipos de oligonucleótidos: oligo dT, oligonucleótidos aleatorios u oligonucleótidos específicos.

El oligo dT consiste en una secuencia de 12 a 18 desoxitimidinas que se unen a la cola de poliA del ARNm por lo que se obtiene el ADNc completo. Para el uso de este oligonucleótido es necesario que el ARNm no se encuentre degradado.

Los oligonucleótidos aleatorios son secuencias cortas generalmente de seis bases en orden aleatorio. Estos pueden mejorar la síntesis de ADNc debido a que pueden unirse a cualquier sitio dentro del ARNm incluso degradado, siempre que este sea complementario, sin embargo, no produce la misma eficiencia para todos los objetivos de la muestra.

Los oligonucleótidos específicos son diseñados a partir de secuencias conocidas para obtener en un solo paso el gen de interés a partir de ARNm. Este es el método de mayor especificidad y sensibilidad, sin embargo, la cantidad de ARNm puede ser un factor limitante.

En la Figura 8.4 se presenta un esquema donde se observa la diferencia del amplicón que se obtiene de una PCR convencional utilizando como plantilla una muestra de ADN y ADNc (después de realizar RT-PCR).

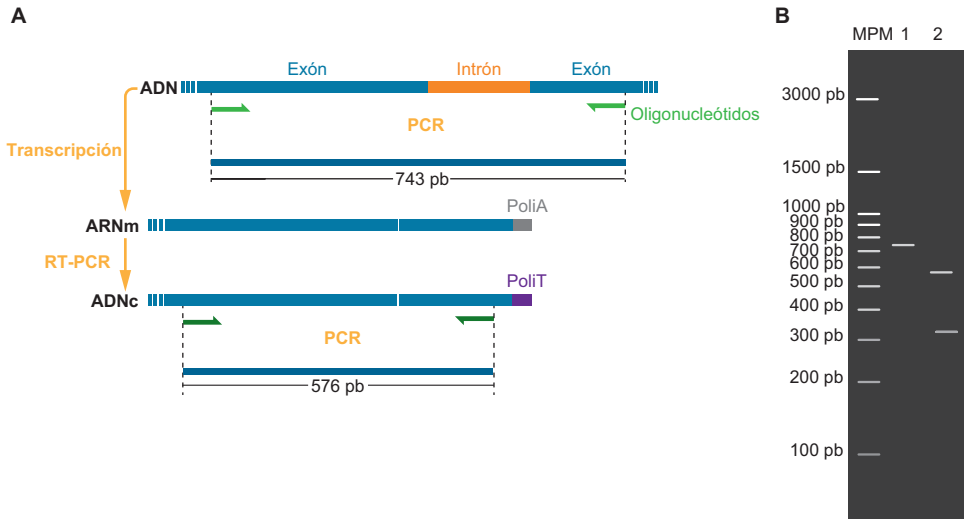


Figura 8.4. Esquema de PCR convencional diferenciando el uso de plantilla de ADN y ADNc. A) Se muestra el proceso donde el ADN, compuesto por dos exones separados por un intrón, es transcrito a ARNm, y este, es retrotranscrito a ADNc mediante RT-PCR utilizando un oligo dT. A partir de la plantilla de ADN, al amplificar mediante un par de oligonucleótidos específicos (diseñados en los exones), se obtiene un fragmento de 743 pb, mientras que, si la plantilla utilizada es ADNc, con los mismos oligonucleótidos se obtiene un fragmento de 576 pb. La diferencia de tamaño entre estos amplicones se debe a la ausencia del intrón en el ADNc. B) Representación de la electroforesis de la PCR realizada utilizando como plantilla ADN y ADNc, donde se observa la diferencia de tamaño, en el carril 1 se muestra la amplificación a partir de ADN, en el carril 2 se muestra la amplificación a partir de ADNc.

Por medio de este tipo de PCR (en algunos casos con algunas modificaciones, por ejemplo, el uso de oligo dT modificado) se sintetiza ADNc que es utilizado para la PCR cuantitativa, para la construcción de librerías de ADNc y el análisis de *splicing* alternativo.

Se han construido librerías de diversas especies de plantas bajo diferentes condiciones con el fin de identificar la respuesta de genes que ayuden al mejoramiento vegetal. Por ejemplo, el tabaco es una planta con gran capacidad de acumulación y tolerancia al cadmio, por lo que ha sido utilizada como planta fitorremediadora. Por ello, se han construido librerías de ADNc de la planta bajo condiciones de estrés por este metal para identificar genes involucrados

y así, poder generar plantas con mejores características. También existen muchos estudios con diferentes tipos de plantas y condiciones como estrés por sequía, salinidad y altas y bajas temperaturas para dilucidar el mecanismo de respuesta con el fin de obtener cultivos mejorados.

PCR en tiempo real o cuantitativa

La qPCR, PCR cuantitativa o PCR en tiempo real permite cuantificar la cantidad de copias de ADN presentes en una muestra. Es ampliamente utilizada debido a su sensibilidad, reproducibilidad y precisión. Durante la reacción se detecta por medio de fluorescencia, la cantidad de producto de PCR obtenido tras cada ciclo, lo que permite calcular la cantidad de cadenas de ácidos nucleicos. Uno de los fluorescentes más utilizados es SYBR Green que al unirse a ADN bicatenario y ser excitado emite fluorescencia. Una desventaja de este colorante es que puede unirse a cualquier producto bicatenario incluyendo dímeros de oligonucleótidos. Debido a esto, se ha recomendado el uso de sondas fluorogénicas TaqMan, ya que por la forma en que funcionan presentan mayor especificidad. El equipo que se utiliza es un termociclador de PCR en tiempo real capaz de excitar al colorante, medir la señal que emite y realizar el análisis cuantitativo.

En esta técnica se utilizan al menos dos pares de oligonucleótidos en diferentes reacciones: un par específico al gen de interés, los demás a genes de referencia.

El gen de referencia cumple la función de normalizar la expresión del gen diana y se caracteriza por tener una única copia dentro del genoma, expresarse de forma constitutiva y no presentar variación en diferentes tejidos y etapas fisiológicas. Es recomendable usar más de un gen de referencia para disminuir el error en el análisis de la expresión, ya que se ha demostrado que ciertos genes utilizados presentan variación en su expresión bajo diferentes condiciones experimentales. Algunos de los genes de referencia más utilizados son *Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa*, gen codificante a la subunidad ribosomal 18S, *ubiquitina*, β -*actina* y β -*tubulina*. Para determinar si un gen es adecuado debe validarse su uso como gen de referencia para cada especie.

La PCR en tiempo real ha sido ampliamente utilizada para cuantificar la expresión de genes bajo diversas condiciones, determinar el número de copias de genes y transgenes y detectar patógenos.

Un ejemplo es la cuantificación del número de copias de un péptido natriurético de plantas (*PNP*) en ajo. Para ello, se utilizaron oligonucleótidos específicos de este gen, mientras que, para el gen de referencia, se utilizaron oligonucleótidos específicos a actina. Además, esta técnica ha sido utilizada para cuantificar la expresión de genes implicados en la respuesta de defensa de las plantas y desarrollar estrategias de mejoramiento y control, por ejemplo, se ha cuantificado la expresión de genes como *PR1*, *ERF1*, *CH5b*, *HPL*, *GSTa*, entre otros, durante la interacción de frijol con *Rhizoctonia solani* (hongo que causa enfermedad de raíz e hipocótilos) y *Trichoderma velutinum* (usado como control biológico de enfermedades fúngicas).

PCR touchdown

Es una técnica que permite el aumento de la sensibilidad, rendimiento y especificidad de la reacción, facilitando la amplificación de fragmentos difíciles y en reacciones donde se sospecha que la secuencia de los oligonucleótidos no es totalmente complementaria a la cadena molde. En esta, en el ciclo inicial, la temperatura de alineamiento es alrededor de 10 °C arriba de la T_m calculada y conforme avanzan los ciclos, esta temperatura va disminuyendo de 1 a 2 °C cada ciclo durante 10 a 15 ciclos hasta llegar de 2 a 5 °C debajo de la T_m calculada, a partir del cual, se continúa con 20 o 25 ciclos manteniendo la misma temperatura de alineamiento.

RACE

La amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE por sus siglas en inglés) es una técnica utilizada para obtener un fragmento de secuencia desconocida a partir de una región conocida. Por medio de este proceso es posible obtener la secuencia completa de ADNc de un gen, a partir de solo un fragmento conocido. Existen dos tipos de reacción dependiendo del extremo que se desconozca de la secuencia: 5' RACE y 3' RACE.

En el 3' RACE se puede obtener la secuencia desconocida hacia el extremo 3'. Esto es posible mediante el uso del fundamento de la RT-PCR con oligo dT, para lo cual, se aprovecha la cola de poliA del ARNm. En esta técnica se sintetiza por transcripción reversa el ADNc mediante un oligo dT unido a una secuencia adaptadora. Después, se utiliza un oligonucleótido específico

de la región conocida y otro a la secuencia adaptadora y por medio de PCR se obtiene la región intermedia entre ambos oligonucleótidos.

En el 5' RACE se puede obtener la secuencia desconocida hacia el extremo 5'. Aquí, se utiliza ARNm y un oligonucleótido específico a la región conocida en antisentido, a partir del cual se sintetiza el ADNc. Una vez obtenido, se elimina el ARNm, los dNTPs y oligonucleótidos no incorporados y se agrega una enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) capaz de agregar nucleótidos sin necesidad de un molde, y alguno de los 4 dNTPs para agregar una cadena homopolimérica al extremo 3' del ADNc. Posteriormente, se realiza una PCR con un oligonucleótido que se alinea al extremo 3' del primer oligonucleótido utilizado y uno complementario a la región homopolimérica.

Un ejemplo del uso de la técnica 3' RACE es la obtención de la secuencia de un nuevo gen del factor de transcripción *NAC* en trigo para predecir la proteína a la que codifica, así como sus dominios y motivos para determinar su papel en el desarrollo y bajo condiciones de estrés biótico y abiótico.

Protocolos

En el laboratorio de Biología Molecular de plantas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes se identificó una dehidrina en maíz (*Zea mays* L.) por medio de PCR. Estas proteínas son parte del grupo de las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), las cuales, son intrínsecamente desordenadas y cumplen una función como protectoras de estructuras celulares. Las dehidrinas se caracterizan por la presencia de regiones conservadas llamadas segmentos K, Y, S y F y regiones ricas en histidinas. Se clasifican en 5 grupos de acuerdo con la presencia y disposición de estas regiones.

Se ha visto que estas proteínas responden ante condiciones de estrés abiótico, tales como altas y bajas temperaturas, salinidad y sequía, brindando a la planta una mayor tolerancia a condiciones adversas. La condición estresante bajo la cual se expresan los genes codificantes para dehidrinas depende de su tipo.

Debido a esto, es importante la identificación y clasificación de los genes que codifican a estas proteínas en diversas especies vegetales, determinando las condiciones bajo las cuales, se aumenta su expresión. Una vez identificada esta característica, es posible sobreexpresarlas en plantas de interés para aumentar su tolerancia a un tipo de estrés específico.

Para esto, primero se realizó la búsqueda de secuencias codificantes a dehidrinas en maíz. En la base de datos de Phytozome [https://phytozome.jgi.doe.gov/] se seleccionó una de ellas [número de acceso Zm00008a031183] y se nombró *ZmDHN*.

Esta secuencia es de 1075 pb y codifica a una proteína del tipo YSK₃, es decir, tiene un segmento Y, un segmento S y tres segmentos K (Figura 8.5). De acuerdo con diversos estudios, este gen podría ser inducido por deshidratación y ácido abscísico.

```

M A H Y Q Q G R R Q Q V D E Y G N P V P
ATGGCGCACTACCAGCAGGGGAGGCGGCAGCAAGTGGACGAGTACGGCAACCCGGTCCCT
G G H G V Q Q G Q Q L G E S A G G Y G V A
GGGGGCCACGGTTCAGGGCCAGCAGCTGGGTGAATCCGCCGGGCGGTACGGGCTCGCA
G T G S Y G G Q H Q A G Y G P T G T G T
GGCACCGGCAGCTACGGCGCCAGCATCAGGCTGGGTATGGACCCACGGCCACCGGCACG
H D A G G Y G G S G H P G Y G V T G T G
CATGACGCCGGGGCTACGGCGGCTCGGGCCATCCGGGTACGGGGTTACCGGAAACGGGC
V H D A G G P G A Y G A A T G T R A H G
GTCCACAGCCGGTGGCCAGGTGCGTATGGAGCAGCCACGGGCACGAGAGCCACGGC
T H G G V T G I Q D G A A G L T G G G L
ACTCATGGCGCGTACCGGGATCCAGGACGGCGCCGGCCCGCTCACCGTGGTGGTCTG
H G G A T G M G T T A G T G A H G A I G M
CATGGCGCAACAGGCATGGGTACGACTGCCGTTACTGGCGCGCACGGTCCATCGGAATG
L D T G V L G G G G H A A T G M P A G H
CTTGACACGGGGTCTTAGGCGCGGAGGGCACGGCCACCGGCATGCCCGCCGGCCAC
G T R P G A T G I S G T G G A F P H A A
GGCACGGCTCCCGGCCACAGGCATATCTGGAACCGCGCGCGTTCGCCCATGCAGT
E H K T G D D I L R R S G S S S S S S S
GAGCACAAAGCGGCGACGACATCCTTCGCGCTCCGGCAGCAGCTGCAGTCCAGCAGC
S
TCGGTGGTTCGTTGCTCCATCGCAATATTCTCGTCCGGCTATATCCACTCCCACACCA
S S S E D D
TGCATGTGCATGCAGTACCTGGTGTGGCATGTCTCTCCATGCAGTCATCGAAGACGA
G M G G R R K K G L K E K I R E K M P A
CGGCATGGTGGGCGCGAAGAAGGGCCCTGAAGGAGAAGATCAAGGAGAAAATGCCAGC
S H R E G Q A T A T G A Y G G T G Y V A
AGGCCACAGGGAAGGCCAGGCGACGGCCACCGGCGGTACGGCGGGACAGGGTACCTGGC
G L T T G G P H E K K G V V E K I K E K
TGGGCTGACGACCGGAGGCCCCACGAGAAGAGGGTGTGGTGGAGAAGATCAAGGAGAA
I P G G H K D Y D Q H Q H T T A A T G G
GATCCAGCGGGCCACAAGGACTACGACCAGCATCAGCACACCACCGCGGCAACCGGTGG
G G G Y G G T T D T T Y G T T T E G T H
CGGCGTGGCTATGGCGGAACCCAGCACGACGATATGGGACGACGACTGAGGGTACGGA
E K K G F M E K I K E K L P G Q H *
CGAGAAGAGGGCTTCATGGAGAAGATCAAGGAGAACTCCAGGTTCAGCACTAA
    
```

Figura 8.5. Secuencia de dehidrina *ZmDHN* reportada en Phytozome. El segmento Y se encuentra subrayado; en el recuadro con líneas diagonales se encuentra resaltado el segmento S; en el recuadro blanco se encuentra resaltado el intrón; en el recuadro gris se encuentran resaltados los segmentos K.

Esta secuencia contiene dos exones separados por un intrón de 103 pb. El primer exón contiene una secuencia codificante de 603 pb y el segundo de

369 pb. Con el fin de obtener una secuencia a partir de la cual sea posible diseñar oligonucleótidos de PCR en tiempo real, se diseñaron oligonucleótidos que amplifiquen parte de los dos exones. El diseño se realizó por medio de la plataforma bioinformática de NCBI, agregando parámetros como el tamaño de amplicón, la Tm de los oligonucleótidos y la región donde hibriden ambos oligonucleótidos (Figura 8.6).

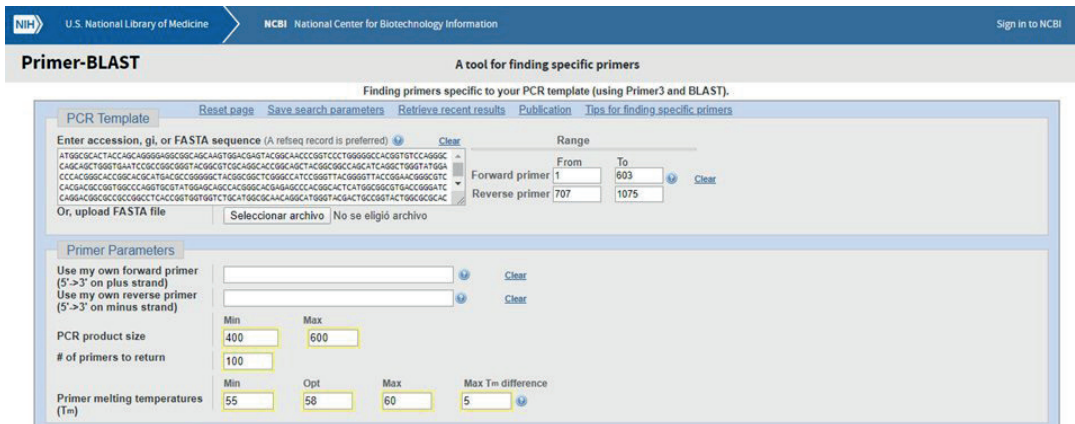


Figura 8.6. Plataforma de NCBI para el diseño de oligonucleótidos.

Las condiciones del par de oligonucleótidos seleccionado se muestran en la tabla 8.1.

Tabla 8.1. Características de los oligonucleótidos seleccionados.

Oligonucleótido	Secuencia	Longitud	Tm	%GC	Longitud del amplicón
FZmDHN	GCCATCGGAATGCTTGACAC	20 pb	59.90	55	531
RZmDHN	TGCTGATGCTGGTCGTAGTC	20 pb	59.83	55	

Una vez sintetizados los oligonucleótidos se llevó a cabo la PCR con el programa de la tabla 8.2.

Tabla 8.2. Programa de PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3 min	1
Desnaturalización	94°C	45 s	
Alineamiento	56°C	30 s	30
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	10 min	1

La PCR se verificó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se visualizó bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador DyNA Light Dual Intensity UV de Labnet. Se obtuvo un amplicón de aproximadamente 500 pb (Figura 8.7).

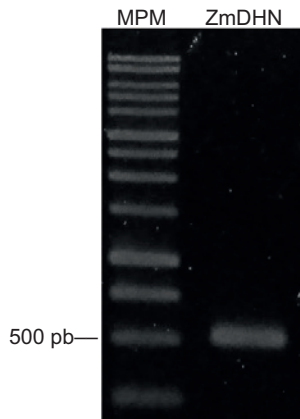


Figura 8.7. Electroforesis en gel de agarosa del amplicón obtenido del gen parcial de la dehidrina ZmDHN. MPM, Marcador de peso molecular 1 Kb (Promega); *ZmDHN*, dehidrina de maíz.

Hasta este punto se realizó la parte experimental de este protocolo, sin embargo, a continuación se puede realizar la secuenciación del amplicón obtenido para confirmar que se trata de la dehidrina deseada. Posterior a esto, se puede llevar a cabo el diseño de oligonucleótidos para PCR en tiempo real con el fin de analizar su expresión bajo diferentes condiciones y corroborar si solo se expresa bajo déficit hídrico o también bajo diferentes condiciones como temperatura, salinidad, etc.

Finalmente, cabe mencionar que esta investigación puede ser utilizada para el mejoramiento genético de plantas con el fin de obtener especies con características deseadas como mayor tolerancia a diversos tipos de estrés.

Abreviaturas

A: adenina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

C: citosina

dATP: desoxiadenosina trifosfato

dCTP: desoxicitidina trifosfato

dGTP: desoxiguanosina trifosfato

dTTP: desoxitimidina trifosfato

G: guanina

ITS: internal transcribed spacer (espaciador interno transcrito)

MgCl₂: cloruro de magnesio

MgSO₄: sulfato de magnesio

pb: pares de bases

PCR: polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

PNP: péptido natriurético de plantas

RACE: rapid amplification of cDNA ends (amplificación rápida de los extremos de ADNc)

T: timina

U: uracilo

Glosario

Ácidos nucleicos: macromoléculas compuestas por nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster. Existen dos tipos: ADN y ARN.

ADN: material genético que almacena toda la información de los organismos vivos y algunos virus.

- ADN complementario: ADN obtenido a partir de ARNm por medio de una retrotranscriptasa.
- ADN genómico: ADN contenido en los cromosomas que almacena la información genética de cada organismo.
- ADN plasmídico: ADN circular que puede encontrarse en bacterias y se replica y transcribe independientemente del ADN cromosómico.
- Amplicón: conjunto de copias de un fragmento de ADN obtenido a partir de PCR.
- Electroforesis: técnica para separar moléculas de ADN, ARN o proteínas de acuerdo con su tamaño y carga por medio de un campo eléctrico.
- Enzima: proteína catalizadora de reacciones químicas.
- Exón: región del gen codificante a proteína que se mantiene en el ARNm maduro después del proceso de *splicing*.
- Gen: región de ADN que contiene la información necesaria para la síntesis de ARNm y proteínas.
- Genoma: secuencia de ADN completa de un organismo.
- Genotipado: estudio de la diversidad genética para identificar variaciones en el genoma entre individuos.
- Intrón: región del gen no codificante a proteína que es eliminado durante el proceso de *splicing*.
- Librería de ADNc: colección de secuencias de ADNc clonadas que son obtenidas a partir de ARNm mediante retrotranscripción por lo que solo representa la región codificante a proteínas.
- Mutación: cambio en la secuencia de ADN o ARN de un organismo provocado por un error en la replicación o por la exposición a algún factor o agente mutágeno.
- Nucleótido: molécula formada por una de las bases nitrogenadas (A, G, C o T para ADN y A, G, C o U para ARN), una pentosa y un grupo fosfato.
- Organismo genéticamente modificado: organismo cuyo material genético ha sido modificado.
- Polimorfismo: presencia de variantes de una secuencia específica de ADN en una población.
- Sitio de restricción: secuencia de ADN que puede ser reconocida y cortada por una endonucleasa específica.
- Splicing*: proceso de maduración del ARNm donde se eliminan los intrones y se unen los exones. Comúnmente se le conoce como corte y empalme.

Splicing alternativo: proceso en el que un gen puede generar diversas isoformas de ARNm debido al diferente orden en que se pueden unir los exones.

Bibliografía

- Abd-Elsalam, K. A. (2003). Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology*, 2(5), 91-95.
- Anand, G. & Kapoor, R. (2020). Nested PCR assay for specific and sensitive detection of *Alternaria carthami*. *Archives of Microbiology*, 202, 171-179.
- Apte, A. & Daniel, S. (2009). PCR Primer design. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(3), 1-10.
- Ashmawy, N. A. (2015). Detection and molecular characterization of some Egyptian isolates of *Ralstonia solanacearum* by nested-PCR and PCR-RFLP analyses. *Plant Pathology Journal*, 14(4), 168-174.
- Bertioli, D. (2000). Rapid Amplification of cDNA Ends. En *The Nucleic Acid Protocols Handbook* (pp. 613-617). Totowa, NJ: Humana Press.
- Bi, X., Hieno, A., Otsubo, K., Kageyama, K., Liu, G. & Li, M. (2019). A multiplex PCR assay for three pathogenic *Phytophthora* species related to kiwifruit diseases in China. *Journal of General Plant Pathology*, 85, 12-22.
- Campbell, S. A. & Close, T. J. (1997). Dehydrins: genes, proteins and associations with phenotypic traits. *New Phytologist*, 137, 61-74.
- Carr, K. (1993). Nobel rewards two laboratory revolutions. *Nature*, 365, 685.
- Chuang, L. Y., Cheng, Y. H. & Yang, C. H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters*, 35, 1541-1549.
- Datukishvili, N., Kutateladze, T., Gabriadze, I., Bitskinashvili, K. & Vishnepolsky, B. (2015). New multiplex PCR methods for rapid screening of genetically modified organism in foods. *Frontiers in Microbiology*, 6, 757-765.
- Deepa, N., Adkar-Purushothama, C. R. & Sreenivasa, M. Y. (2016). Nested PCR method for early detection of fumonisin producing *Fusarium verticillioides* un pure cultures, cereal simples and plant parts. *Food Biotechnology*, 30(1), 18-29.
- Díaz, A., Taberner, A. & Vilaplana, L. (2020). The emergence of a new weed in maize plantations: characterization and genetic structure using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 67, 225-239.

- Erlich, H. A., Gelfand, D. & Sninsky, J. J. (1991). Recent advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science*, 252, 1643-1651.
- Green, M. R. & Sambrook, J. (2019). Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2, 175-178.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Léger, P. & Petit, R. J. (2011). Two highly validated multiplexes (12-plex and 8-plex) for species delimitation and parentage analysis in oaks (*Quercus* spp.). *Molecular Ecology Resources*, 11(3), 578-585.
- Hahim, I., Borth, W., Melzer, M. J. & Hu, J. (2018). Ultra-sensitive detection of papaya ringspot virus using single-tube nested PCR. *Acta virológica*, 62, 379-385.
- Hernández-Camacho, S., Pérez-Molphe-Balch, E., Alpuche-Solís, A. G. & Morales-Domínguez, J. F. (2017). Identification and evolutionary relationships of partial gene sequences from dehydrin group in three species of cacti. *Phyton, International Journal of Experimental Botany*, 86, 151-162.
- Ingham, D. J., Beer, S., Money, S. & Hansen, G. (2001). Quantitative Real-Time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. *BioTechniques*, 31(1), 132-140.
- Jamal, A., Shahid, M. N., Aftab, B., Zahur, M., Rashid, B., Johargy, A. K. & Husnain, T. (2019). Generation and analysis of expressed sequence tags from root cDNA library of cotton (*Gossypium arboreum*). *Pakistan Journal of Botany*, 51(4), 1303-1310.
- Kageyana, K., Komatsu, T. & Suga, H. (2003). Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil. *Journal of General Plant Pathology*, 69, 153-160.
- Kalendar, R., Khassenov, B., Ramankulov, Y., Samuilova, O. & Ivanov, K. I. (2017). FastPCR: an *in silico* tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics*, 109, 312-319.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I. & Khorana, H. G. (1971). Studies on polynucleotides: XCVI. Repair replication of short synthetic DNAs as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*, 56(2), 341-361.
- Korbie, D. J. & Mattick, J., S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3(9), 1452-1456.
- Kozera, B. & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, 54(4), 391-406.

- Li, R., Mock, R., Huang, Q., Abad, J., Hartung, J. & Kinard, G. (2008). A reliable and inexpensive method of a nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *Journal of Virological Methods*, 154, 48-55.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, (63), e3998.
- Marquez, Y., Brown, J. W., Simpson, C., Barta, A. & Kalyna, M. (2012). Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis. *Genome Research*, 22(6), 1184-1195.
- Mayo, S., Cominelli, E., Sparvoli, F., González-López, O., Rodríguez-González, A., Gutiérrez, S. & Casquero, P. A. (2016). Development of a qPCR strategy to select bean genes involved in plant defense response and regulated by the *Trichoderma velutinum* - *Rhizoctonia solani* interaction. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1109.
- Nolan, T., Hands, R. E. & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3), 1559-1582.
- Ochoa-Alfaro, A. E., Rodríguez-Kessler, M., Pérez-Morales, M. B., Delgado-Sánchez, P., Cuevas-Velazquez, C. L., Gómez-Anduro, G. & Jiménez-Bremont, J. F. (2012). Functional characterization of an acidic SK3 dehydrin isolated from an *Opuntia streptacantha* cDNA library. *Planta*, 235, 565-578.
- Peters, I. R., Helps, C. R., Hall, E. J. & Day, M. J. (2004). Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design. *Journal of Immunological Methods*, 286, 203-217.
- Raza, A., Mehmood, S. S., Ashraf, F. & Ahmad-Khan, R. S. (2018). Genetic diversity analysis of *Brassica* species using PCR-based SSR markers. *Gesunde Pflanzen*, 71, 1-7.
- Ren, Y., Li, Z., He, Z., Wu, L., Bai, B., Lan, C., Wang, C., Zhou, G., Zhu, H. & Xia, X. (2012). QTL mapping of adult-plant resistances to strip rust and leaf rust in Chinese wheat cultivar Bainong 64. *Theoretical and Applied Genetics*, 125, 1253-1262.
- Rydzak, P., Ochoa-Corona, F. M., Whitfield, A. E. & Wayadande, A. C. (2020). Combining multiplex PCR and high-resolution melting for the detection and discrimination of arthropod transmitted viruses of cereals. *Journal of Virological Methods*, 278, 113823.

- Sibarani, S. M., Joko, T. & Subandiyah, S. (2019). Detection and identification of Banana-associated phytoplasma using nested-PCR method. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 23(1), 148-155.
- Sint, D., Raso, L. & Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 898-905.
- Stemmer, W. P., Cramer, A., Ha, K. D., Brennan, T. M. & Heyneker, H. L. (1995). Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene*, 164, 49-53.
- Stimbeck, G. R. (2017). Hiding in plain sight: the F segment and other conserved features of seed plant SK_n dehydrins. *Plant*, 245(5), 1061-1066.
- TerMaat, J. R., Pienaar, E., Whitney, S. E., Mamedov, T. G. & Subramanian, A. (2009). Gene synthesis by integrated polymerase chain assembly and PCR amplification using a high-speed thermocycler. *Journal of Microbiological Methods*, 79(3), 295-300.
- Valle-Rodríguez, C. M., Valdés-Rodríguez, S., Vasco-Méndez, N. L., Garcidueñas-Piña, C., Soria-Guerra, R. E. & Morales-Domínguez, J. F. (2017). Evidencias bioquímicas y moleculares de la presencia de un péptido natriurético de plantas en ajo (*Allium sativum* L.). *Phyton*, 86, 143-150.
- Van Orsouw, N. J., Li, D., Van der Vlies, P., Scheffer, H., Eng, C., Buys, C. H., Li, F. P. & Vijg, J. (1996). Mutational scanning of large genes by extensive PCR multiplexing and two-dimensional electrophoresis: application to the *RB1* gene. *Human Molecular Genetics*, 5(6), 755-761.
- Van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A. & Hays, J. P. (2008). *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Berlin: Springer.
- Xia, N., Zhang, G., Sun, Y. F., Zhu, L., Xu, L. S., Chen, X. M., Liu, B., Yu, Y. T., Wang, X. J., Huang, L. L. & Kang, Z. S. (2010). *TaNAC8*, a novel NAC transcription factor gene in wheat, responds to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(5-6), 394-402.
- Xu, F., Feng, S., Wu, R. & Du, F. K. (2012). Two highly validated SSR multiplexes (8-plex) for Euphrates' poplar, *Populus euphratica* (Salicaceae). *Molecular Ecology Resources*, 13(1), 144-153.
- Yadav, S. K. U., Singh, J., Padmanaban, B. & Kumar, L. S. (2017). Genetic variability in Indian populations of banana corn weevil [*Cosmopolites sordidus*

- (Coleoptera: Curculionidae)] assessed by RAPDs and AFLPs. *International Journal of Tropical Insect Science*, 37(3), 149-162.
- Yang, A. & Juzwik, J. (2017). Use of Nested and Real-Time PCR for the detection of *Ceratocystis fagacearum* in the Sapwood of diseased Oak species in Minnesota. *Plant Disease*, 101, 480-486.
- Yang, X., Hameed, U., Zhang, A. F., Zang, H. Y., Gu, C. Y., Chen, Y. & Xu, Y. L. (2017). Development of a nested-PCR assay for the rapid detection of *Pilidiella granati* in pomegranate fruit. *Scientific Reports*. 7(40954).
- Zhang, M., Mo, H., Sun, W., Guo, Y. & Li, J. (2016). Systematic isolation and characterization of cadmium tolerant genes in tobacco: A cDNA library construction and screening approach. *PloS one*, 11(8), 1-22.
- Zhu, W., Zhang, D., Lu, X., Zhang, L., Yu, Z., Lv, H. & Zhang, H. (2014). Characterisation of an SKn-type dehydrin promoter from wheat and its responsiveness to various abiotic and biotic stresses. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32, 664-678.