



**TECNOLÓGICO
DE MONTERREY**

Biblioteca
Campus Ciudad de México

128-24

Sistema de Ecuaciones para Optimización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en exones del gen del factor H del complemento

Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey

Campus Ciudad de México

Instituto Nacional de Medicina Genómica

Unidad de Genotipificación y Análisis de Expresión Illumina



**TECNOLÓGICO
DE MONTERREY**



**Instituto Nacional de
Medicina Genómica
MEXICO**

Materia: BI00881.2 Proyecto Integrador

***Sistema de Ecuaciones para Optimización de la Reacción
en Cadena de la Polimerasa en exones del gen del factor
H del complemento***

César Arturo Zapata Acevedo

Ingeniero Biomédico – IMD

1105984

Asesora: Dra. Olga López Ríos

Especialista en Diseño de Experimentos y Estadística

México, D.F., noviembre de 2010

LC12

ab K660994

Tesis

QH438.4.M3

Z37

2010

Contenido

Introducción	4
Resumen.....	5
Problemática.....	8
<i>Fundamentos de PCR</i>	10
<i>Thermus aquaticus (Taq) polimerasa</i>	11
<i>Componentes y etapas de la PCR</i>	12
<i>Magnesio en la PCR</i>	15
<i>Alternativas actuales</i>	16
Objetivos	19
Estado del arte	19
Justificación de la oportunidad.....	20
Metodología	21
<i>Materiales</i>	21
<i>Métodos</i>	22
Resultados	25
<i>Diagrama de flujo del software</i>	25
<i>Etapas de segmentación</i>	26
<i>Etapas de validación</i>	26
Análisis Estadístico.....	28
<i>Análisis estadístico de la PCR del exón 3</i>	29
<i>Análisis estadístico de la PCR del exón 5</i>	31
<i>Análisis estadístico de la PCR del exón 7</i>	32
<i>Análisis estadístico de la PCR del exón 10</i>	33
<i>Análisis estadístico de la PCR del exón 16</i>	35
<i>Análisis estadístico de la PCR del exón 17</i>	36
<i>Análisis estadístico de la PCR del exón 18</i>	37
<i>Análisis estadístico de la PCR del exón 19</i>	39
<i>Análisis estadístico de la PCR del exón 20</i>	40
<i>Análisis estadístico de la PCR del exón 22</i>	42
<i>Análisis general</i>	42
Conclusiones	46
Trabajo a futuro	46
Bibliografía	48

Agradecimientos

- ⊙ *A mi familia y novia*

- ⊙ *A mi asesora, la Dra. Olga López Ríos*

- ⊙ *Al personal de la unidad Ilumina, mi laboratorio en INMEGEN, que me permitieron hacer el experimento en el marco de otro proyecto.*

- ⊙ *A mis compañeros por su apoyo en todo momento, en especial al Sr. Soenksen por el apoyo en dudas de MATLAB.*

- ⊙ *A mis profesores por los conocimientos adquiridos*

- ⊙ *A ti, lector, gracias por tomar este estudio de entre tantos otros libros.*

Introducción

Dentro del proyecto "*Identificación de variantes genéticas en el gen del factor H del complemento (CFH) en pacientes mexicanos con Degeneración Macular Relacionado a la Edad*" [1] surgió la necesidad de optimizar uno de los procesos que se repitieron muchas veces.

La identificación de variantes genéticas en la secuenciación de segmentos de cualquier gen, no sólo el CFH, requiere obtener la secuencia de bases nucleotídicas del gen para analizar los cambios con respecto a otras razas y encontrar polimorfismos de nucleótido único (SNPs) [2], variaciones en una sola letra del código genético, que pueden significar predisposición para diversas enfermedades.

Una secuenciación de DNA devuelve el código genético: la secuencia de bases nucleotídicas Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) y Citosina (C) de la molécula. El proceso de secuenciación requiere soluciones de, al menos, 4 μ L de DNA. Esta cantidad representa billones de cadenas del mismo segmento deseado. En la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) una mezcla de DNA con otros reactivos es ciclado a diferentes temperaturas para crear billones de copias del segmento deseado en cuestión de horas. La PCR requiere de condiciones muy específicas para funcionar, además que su eficacia varía dependiendo de las condiciones de los ciclos y de la mezcla de DNA. [3]

Resumen

El presente proyecto describe la influencia de dos factores en la cantidad de fragmento diana que es polimerizado durante una PCR, mediante gráficas y un modelo de análisis estadístico. La enzima que se utiliza en la PCR es siempre Taq Polimerasa, una enzima con la característica de no desnaturalizarse y mantenerse activa ante cambios de temperatura.

La actividad de la Taq Polimerasa en PCR está determinada por muchos factores, pero la mayoría se han bloqueado para sólo trabajar con 2 de ellos. El primero de ellos es la "*melting temperature*" o T_m , definida como la temperatura en la que los iniciadores de la replicación se unen a la sección del DNA para el que fueron diseñados. La T_m es calculada por regla de Wallace [3]; una ecuación que obtiene un valor de T_m a partir de la longitud del iniciador y su contenido genético con una fórmula.

El segundo factor es la concentración de Magnesio. La actividad de la enzima Taq polimerasa (la polimerasa utilizada en PCR) está afectada por la proporción del Magnesio, que actúa como un cofactor para la enzima [4]. Los otros factores, que son igualmente importantes (como la concentración salina del medio o concentración de los reactivos), no afectarán los resultados porque se mantienen constantes en el experimento.

Para poder secuenciar los genes se requiere cantidad suficiente del fragmento deseado, por lo que es necesario hacer PCR. El sistema de ecuaciones permitirá predecir las condiciones para una PCR que maximice la amplificación del

segmento deseado del código genético. La obtención actual de estas condiciones actualmente es un proceso de prueba y error, totalmente empírico para cada investigación, como lo demuestra la metodología en artículos científicos de 2008 [5] 2001 [6] y 1993 [7]. Sobre todo si los iniciadores de la replicación o “primers” son fabricados bajo pedido, los “custom primers”. En [1] ha tomado más de 9 meses para los 23 exones del gen CFH, pues para obtener las condiciones óptimas de replicación sólo se consideró inicialmente a regla de Wallace [3].

Para [1], fueron fabricados 46 primers para amplificar 23 segmentos específicos diferentes del gen CFH. Estos segmentos son los 23 exones del gen, es decir, las 23 partes del código genético que codifican para proteínas (se usan 2 primers por segmento). Fueron primers de diferente longitud y ubicación, pero las condiciones para amplificar el segmento deseado de DNA son sumamente diferentes, hasta 16°C de diferencia entre las Tm, determinadas por la cantidad de pares de bases C-G y A-T. Por medio de experimentación con una muestra del 33% de los exones del gen CFH, se medirá cuánto afectan ambos factores al hacer 16 variantes de las condiciones de PCR para el mismo exón.

Exón x, Tm1, 0 Mg			
Exón x, Tm1, 0.5 Mg			
Exón x, Tm1, 1 Mg			
Exón x, Tm1, 1.5 Mg			

Tabla 1. Distribución de las 16 posibles combinaciones en el estudio de 1 exón

Los productos de cada PCR se separan posteriormente por tamaños mediante electroforesis en un gel de agarosa (para separar todos los componentes de la

PCR que no nos interesa), y todas las muestras del mismo exón son separadas a la misma altura del gel de agarosa (dado que en todos los casos es el mismo tamaño). Cada muestra tendrá diferente luminosidad, puesto que las condiciones de la PCR afectan la cantidad de DNA que se ha formado durante la reacción.

El Scientific Imaging System Kodak 1D v. 3.6.5 del INMEGEN permite tomar una fotografía en escala de grises de 8 bits al gel de agarosa mientras se está irradiando con luz UV. Cada pozo en el gel de agarosa es independiente y brilla con una intensidad dependiente de la cantidad de DNA que se haya formado durante la PCR. La fotografía asigna un valor numérico a cada pozo de entre 0 y 255 dependiendo del brillo, que después se relaciona con las condiciones utilizadas. Con esta relación, se harán gráficas punto por punto, y las líneas de tendencia describirán el comportamiento de la enzima. La creación del sistema de ecuaciones describiendo la línea permitirá optimizar en cuanto a esos 2 factores el proceso de PCR y se evitará gastar tiempo de investigación y muestra de DNA, en muchas ocasiones muy escasa e imposible de obtener de nuevo tras intentar y fallar hacer una PCR (muestra proveniente de un paciente muerto, por ejemplo). Las limitantes del estudio son que está enfocado sólo a 2 factores. En la metodología se describen todos los factores bloqueados que permiten resultados confiables en el experimento. Los factores bloqueados, sí afectan la precisión de las ecuaciones, ya que las condiciones iniciales y factores bloqueados son los utilizados en [1]. En especial la concentración salina modifica las condiciones óptimas de PCR, además de la concentración molar de reactivos. Se recomienda el uso de reactivos de la misma marca y a la misma concentración que los

descritos en la metodología. El trabajo a futuro debe considerar una estandarización de la escala de equivalentes de 256 valores de brillo con respecto a la cantidad de DNA, pues este estudio no contempla cuantificarla y maneja siempre los valores de entre 0 y 255. El hecho de que el estudio se realice en el gen CFH no limita los resultados a este gen, debido a que el proceso depende de los primers utilizados.

Problemática

La secuenciación genómica se ha convertido en parte fundamental de la investigación genómica y sus costos han bajado considerablemente [8]. El International HapMap Consortium permite identificar las bases genéticas de una enfermedad y la importancia que tienen pequeñas variaciones en el código, aunque la base de datos sólo considera raza negra, asiática [9]. La secuenciación del DNA es un proceso fundamental para poder comparar e identificar variaciones en poblaciones específicas con respecto a las bases de datos existentes que iniciaron desde el término del Proyecto del Genoma Humano en 2000. Los aparatos secuenciadores de vanguardia, como el secuenciador 3730 de la marca Applied Biosystems que se encuentra en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) necesita al menos 4 μ L de una solución de DNA en agua grado biología molecular a una concentración de 10 ng/dL a 20 ng/dL [10]. Naturalmente, el fragmento secuenciado debe ser sólo el de interés. La PCR es un proceso necesario para obtener el fragmento deseado en las cantidades requeridas por el secuenciador.

Una PCR funciona para clonar justo el segmento deseado, o segmento diana, del gen, permitiendo tener 100 billones de copias en cuestión de horas [11]. Para que la PCR funcione, se requieren iniciadores de la replicación, nucleótidos o primers, que se pegan a un sitio en la cadena de DNA y a partir de ellos la polimerasa empieza a crear una nueva cadena. Los 2 primers marcan el inicio y el final del segmento que se desea amplificar. El DNA es una doble hélice de nucleótidos, por lo que cada PCR cuenta con al menos 2 primer, el Forward para la cadena 5'→3' y el Reverse para la cadena 3'→5'. Cada primer cuenta con su propia T_m , pero para que la PCR pueda amplificar sólo el segmento deseado, ambos deben unirse con la T_m seleccionada. Este es un punto crítico a considerar al momento de diseñar el primer.

Existe una enorme base de datos, PrimerBank, de primers que sirven para la investigación en muchas zonas de los genomas de muchas especies [12], pero cuando los objetivos de las investigaciones lo requieren, se pueden obtener primers hechos a la medida. Los custom primers se fabrican bajo pedido por compañías como Invitrogen [13]. Los primers utilizados para el estudio del gen CFH fueron fabricados por Integrated DNA Technologies (IDT) [1], son altamente específicos y basta con que tengan una longitud de más de 20 bases para que sólo puedan pegarse a un sitio en todo el genoma –basta con una secuencia de 20 bases para que dicha combinación sea irrepitable-. Aunque supuestamente la regla de Wallace [4] predice la T_m funcional, la búsqueda de las condiciones óptimas para amplificación de los 23 exones del gen CFH en [1] encontró diferencias muy significativas hasta de 10°C entre la T_m calculada y la real. Cada

PCR requiere de reactivos y de muestra. La muestra de DNA es especialmente importante porque es imposible obtener más. Además, para hacer una PCR se requiere utilizar durante horas un termociclador, que sólo puede trabajar en ciclos con una sola T_m a la vez. El número de PCR al mismo tiempo está limitada por la cantidad de termocicladores en el laboratorio. Una ecuación que permitiera predecir las condiciones a utilizar para la PCR evitaría estos problemas.

Otro factor importante para la cantidad de DNA formada en una PCR es la concentración de Magnesio en el medio (debido a su influencia en la actividad de la enzima Taq Polimerasa). Incluso tras encontrar la T_m óptima, la cantidad de Magnesio puede mejorar la actividad de la enzima dentro de “ciertos límites” aunque [4] no especifica qué límites precisamente. Encontrar las T_m y concentraciones de Magnesio óptimas en [1] ha tardado más de 9 meses. El objetivo de [1] es la búsqueda de variantes genéticas en la secuenciación del gen. Obtener las condiciones óptimas de PCR no debería de frenar la investigación. Se observa un área de oportunidad en este punto de la metodología de [1].

Fundamentos de PCR

El DNA es polimerizado a partir de una hebra original, haciendo una hebra complementaria gracias a una enzima polimerasa y desoxinucleósidos 5'trifosfato (dNTPs), que son los monómeros de un ácido nucleico como el DNA. Esta síntesis sólo se puede dar en la dirección 5' a 3', pues el crecimiento de la cadena se da por un enlace fosfodiéster entre el oxígeno 3' de una hebra creciente y el fosfato alfa de un dNTP. La enzima DNA polimerasa no puede iniciar la

síntesis de una cadena de novo [11]. Requiere de una hebra corta de DNA o RNA ya existente, el cebador, o primer, para comenzar el crecimiento de una cadena. Una vez que el primer está apareado con la hebra molde, la polimerasa adiciona dNTPs al grupo OH libre del extremo 3' del primer y continúa agregando los dNTPs adecuados para crear una copia complementaria de la cadena original. La polimerasa no está exenta de errores, hay diversos tipos de polimerasa y unos más precisos que otros. La Taq polimerasa está entre las más precisas.

Thermus aquaticus (Taq) polimerasa

En la PCR se utiliza la Taq DNA polimerasa, que viene de la bacteria termofílica *Thermus Aquaticus* [11]. Es una proteína compuesta de 832 amino ácidos, estable al calor sin desnaturalizarse. Durante la PCR toda la mezcla de reactivos se calienta a 95°C, la temperatura necesaria para romper todos los puentes de hidrógeno entre cadenas complementarias de DNA. La actividad óptima de la Taq polimerasa es entre 72 y 75°C. Los ciclos de PCR en el proyecto [1] se hicieron con 72°C en la tercera etapa del ciclo.

La Taq polimerasa sólo funciona en dirección 5' a 3' por las características bioquímicas de los ácidos nucleicos. La PCR es un proceso artificial y no está relacionada con la replicación normal de genes que sucede dentro del cuerpo. Durante la PCR, las cadenas complementarias de DNA están completamente separadas, no hay fragmentos de Okazaki. La Taq polimerasa funciona de corrido por toda la cadena hasta que termina de replicarla.

Componentes y etapas de la PCR

La mezcla de componentes para la PCR son agua, buffer, dNTPs, primer Forward, primer Reverse, Taq polimerasa y DNA muestra. La PCR se hace en un aparato llamado termociclador, que pone la mezcla en un ciclo de 95°C durante 1 minuto, T_m durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, esto es:



Fig. 1. Ejemplo de ciclos en la pantalla de un termociclador utilizado para el proyecto. En este caso la T_m es 51°C

1. Una etapa a 95°C para romper todos los puentes de hidrógeno entre las cadenas complementarias de DNA de la muestra.
2. Una etapa donde la temperatura es la T_m, y los primer Forward y Reverse se unen a la cadena de DNA de la muestra. Las cadenas tienden a unirse de nuevo, pero los primers están en mayor proporción que el DNA, y logran unirse en algunas cadenas.

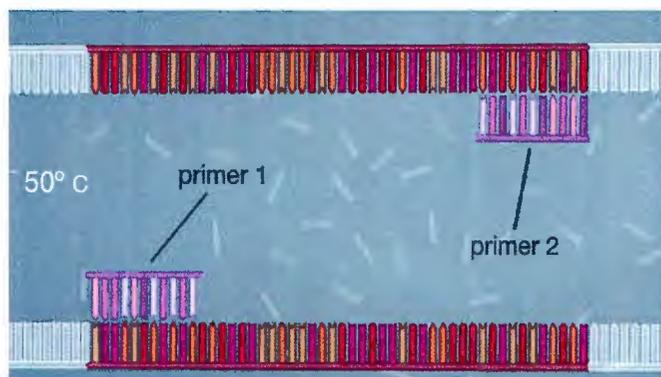
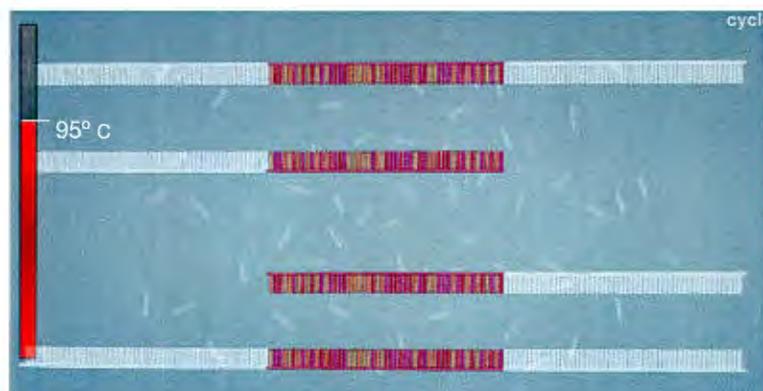


Fig. 2. Los primers Forward y Reverse están diseñados para unirse a sitios específicos de la cadena de DNA, y marcan el inicio y final del fragmento deseado.

3. Una etapa a la temperatura óptima para que funcione la Taq Polimerasa (72°C). Se polimerizan nuevas cadenas a partir de donde está el primer, cadenas complementarias a la hebra original.
4. El ciclo se repite. La siguiente etapa de 95°C rompe los puentes de hidrógeno de las nuevas cadenas y de las originales, iniciando el ciclo con más DNA molde que la primera vez. Esto se repite durante horas, efectivamente haciendo una reacción en cadena. Durante el primer y segundo ciclo, los fragmentos amplificados son polimerizados junto a otras secuencias.



Sistema de Ecuaciones para Optimización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en exones del gen del factor H del complemento

Fig. 3. La etapa a 95°C del ciclo 2 separa las cadenas originales de las recién formadas. En rosa está el fragmento deseado, en blanco está el resto. Para el inicio del ciclo 2, no hay cadenas que contengan únicamente el fragmento deseado. [14]

5. Una vez que el ciclo ha sucedido 2 veces, ya tendremos cadenas simples formadas únicamente por la sección delimitada por los primers F y R.

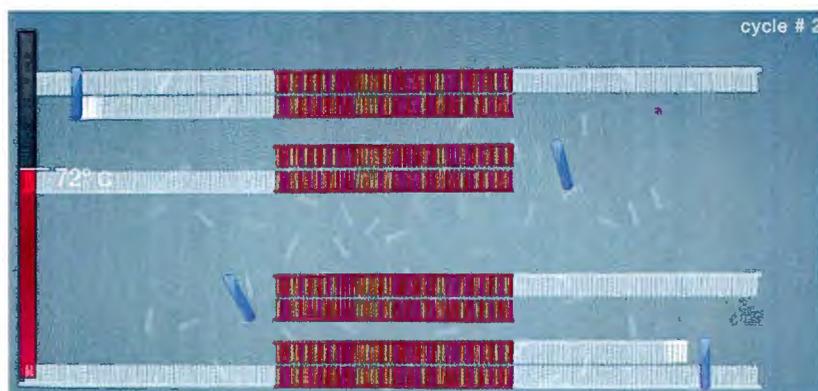
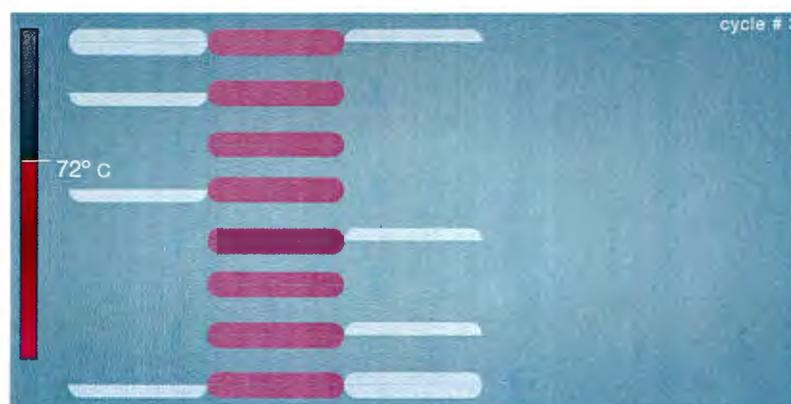


Fig. 4. Para el final del ciclo 2, las cadenas creadas durante el ciclo 1 son usadas como molde para crear nuevas cadenas. A las cadenas creadas en el ciclo 1 están delimitadas de un lado por el primer que las inició. 2 de las nuevas cadenas también estarán limitadas por el primer que las cree, pero del otro lado. [14]

6. Rápidamente, durante los siguientes ciclos, los fragmentos que contienen únicamente el segmento deseado se convierten en la mayoría, hasta que la solución final después de 30 ciclos la solución final se compone de más de treinta billones de segmentos que sólo tienen la secuencia deseada y 60 que tienen el segmento deseado pegado a otras secuencias. Prácticamente la solución es el fragmento diana puro.



Sistema de Ecuaciones para Optimización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en exones del gen del factor H del complemento

Fig. 5. Al final del ciclo 3, ya se tienen cadenas dobles que estuvieron delimitadas hacia ambas direcciones por los primers. Durante los siguientes ciclos rápidamente se convertirán en mayoría. [14]

7. Rápidamente, durante los siguientes ciclos, los fragmentos que contienen únicamente los segmentos deseados aumentan de número.

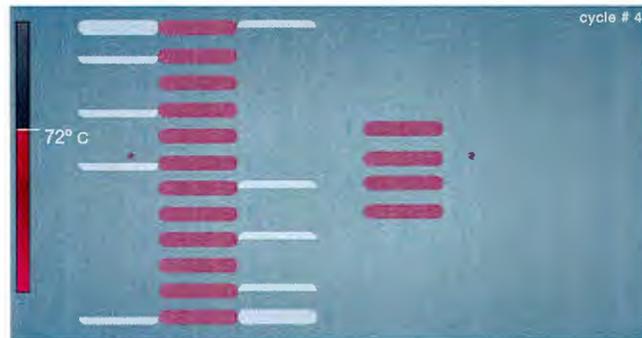


Fig. 6. Los fragmentos totalmente en rosa son los que contienen el fragmento deseado, y ya son más que los que aún tienen otros segmentos (en blanco) [14]

8. Al terminar el ciclo 30, se cuenta con más de un billón de copias del segmento deseado, y sólo 60 cadenas que contienen otras secuencias.

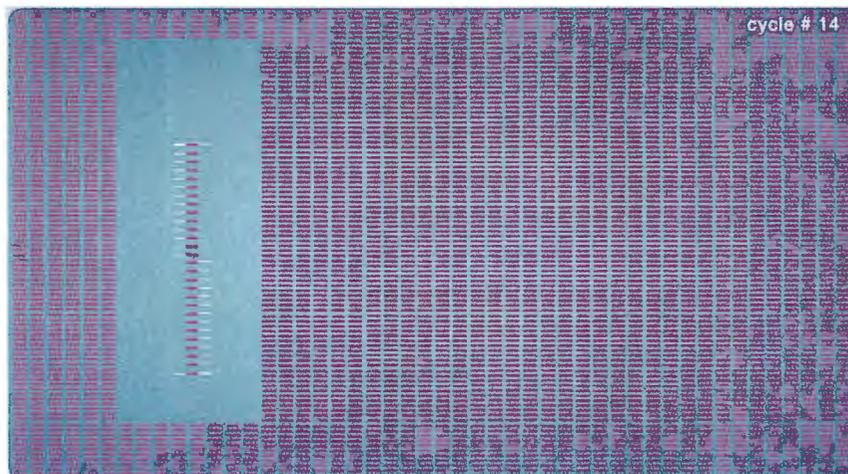


Fig. 7. Los copias de fragmentos deseados (en rosa) son copiados más veces que los fragmentos con otras secuencias. [14]

Magnesio en la PCR

Los iones Magnesio en la reacción son necesarios para una actividad máxima de la polimerasa. Debido a que los dNTPs se fijan a estos iones, la mezcla debe tener

más iones de magnesio [4]. Un estudio del Instituto de Microbiología y Genética de la Universidad de Viena concluyó que una concentración de 2mM MgCl₂ son ideales para la concentración de 0.2 mM de desoxirribonucleótidos que manejaron. Sin embargo, este estudio jamás considera los cambios que se dan en la actividad de la polimerasa al utilizar diversos tamaños de primer.

El Mg es importante porque la Taq polimerasa pega un dNTP a la cadena existente gracias a la ayuda de iones Mg²⁺ [11]. 2 iones de magnesio están involucrados en el mecanismo que cataliza la síntesis de DNA. La Taq polimerasa requiere magnesio libre para que la síntesis funcione correctamente. El primer ión prepara el final de la nueva cadena de DNA para que se pegue con el fosfato del siguiente dNTP. El siguiente estabiliza la carga negativa que se genera cuando los dos dNTPs pierden simultáneamente su fosfato.

Alternativas actuales

Ante la necesidad de una calculadora de Tms para primers, existen varias ecuaciones que supuestamente deberían de calcular la Tm del primer que se le introduce. Cada una tiene sus algoritmos y fórmulas propias, pero todas parten, como este estudio, de la Tm considerada "básica", la obtenida por regla de Wallace. Algunas compañías dedicadas a la manufactura de primers han diseñado una calculadora en línea para calcular las Tms. Por ejemplo, la calculadora de Tms de Promega defiende que "hay varias fórmulas para calcular Tms. En todos los casos estos cálculos te darán un buen punto de inicio para determinar las temperaturas de Tm en la PCR, pero una temperatura precisa debe ser

determinada empíricamente" [15]. La fórmula básica que utiliza Promega es la regla de Wallace:

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

Donde #G, #C, #A y #T son el número de Guaninas, Citosinas, Adeninas y Timinas, respectivamente, del primer. Se defiende que es válida para oligonucleótidos menores a 14 pares de bases. Para oligonucleótidos más largos la fórmula es:

$$T_m = 64.9^{\circ}\text{C} + 41^{\circ}\text{C} * \frac{(\#G + \#C - 16.4)}{(\#A + \#T + \#G + \#C)}$$

Donde, de nuevo, #G, #C, #A y #T son el número de Guaninas, Citosinas, Adeninas y Timinas respectivamente en el primer.

Sin embargo, el Magnesio no está considerado en esta ecuación. Promega reconoce esta omisión y aclara:

"Hemos encontrado que la mayoría de los cálculos de Tm no toman en cuenta los efectos del magnesio en la estabilidad de la hélice. Por lo tanto, la mayoría de las guías empíricas utilizadas para diseñar experimentos no aplicarán cuando los efectos del magnesio sean considerados. Hemos incluido la opción de considerar Magnesio en la ecuación si es necesario pero no aparece como default. Incluir el magnesio a una concentración de 1.5 mM generalmente incrementará la Tm teórica alrededor de 5-8°C en oligonucleótidos" [15]

A pesar de que esta calculadora tiene detrás el apoyo de un corporativo transnacional como Promega, se basa en una tesis muy débil para tratar de incluir al Magnesio en los cálculos. Por otro lado, la calculadora similar de la compañía Applied Biosystems ni siquiera considera concentraciones de Magnesio en su calculadora [16]. A favor de ambas se puede decir que sí consideran la concentración salina de la mezcla en la PCR, pero en este estudio ese factor está bloqueado: nunca varía. Hay un área de oportunidad para encontrar la relación entre la actividad de la polimerasa y la cantidad de Magnesio.

Es probable que ambas calculadoras realmente den un valor confiable de la T_m y el estudio sólo arroje valores de Magnesio que aumenten la cantidad de DNA polimerizado sin cambiar la T_m .

Estudios anteriores como [17] han demostrado que las condiciones óptimas en cuanto a Magnesio para la PCR están entre 1.5 mM cuando se utiliza una concentración de 200 μ M. La amplificación se vuelve más específica conforme aumenta la cantidad de Magnesio, hasta 10.8 mM. En PCR con Magnesio en concentraciones mayores (desde 10.8 hasta 20 mM), los productos dejaron de ser fácilmente visibles, en un efecto que es descrito por los autores como “si la reacción hubiera sido inhibida por el Magnesio”.

Es deseable obtener una cantidad del segmento deseado de DNA lo más alta posible al mismo tiempo que se ahorra la mayor cantidad de Magnesio. El ANOVA de los datos permite determinar si existe una diferencia estadística significativa entre los resultados en las PCR a diversas condiciones.

Objetivos

- Predecir los valores de Magnesio y T_m para una PCR que polimerice la mayor cantidad posible del fragmento de DNA deseado, a partir de los primers.
- Encontrar las condiciones óptimas para la amplificación de 8 exones del gen CFH.
- Determinar si la relación de los 2 factores que intervienen en la PCR (T_m obtenida por regla de Wallace y cantidad de Magnesio) es lineal, exponencial, asintótico o de otro tipo.
- Graficar el comportamiento de la Taq polimerasa en PCR con las 16 condiciones diferentes que se usarán en el estudio para cada exón de la muestra.

Estado del arte

Cuando se solicita la creación de custom primers, los investigadores tienen un objetivo de investigación. La PCR para obtener grandes cantidades del fragmento deseado de DNA sólo es un paso intermedio de la metodología, no debería tomar demasiado tiempo. El proceso de PCR y las tecnologías que utiliza ya son una muestra de un gran avance tecnológico, pero siempre se está buscando su optimización: Obtener mejores resultados en menor tiempo. Rodríguez-Corona y su equipo de trabajo, en [1], trabajaron con miras a presentar en el 60th Annual Meeting de la American Society of Human Genetics y tardaron demasiado en la parte de la metodología que involucró hacer PCR para obtener los segmentos deseados con los custom primers. Los investigadores tienen fechas límite para

terminar sus trabajos. Surge una necesidad de tecnologías que permitan acelerar la investigación.

Justificación de la oportunidad

El proyecto "Identificación de variantes genéticas en el gen del factor H del complemento en pacientes mexicanos con Degeneración Macular Relacionada a la Edad" [1] tiene como objetivo secuenciar todos los exones del gen CFH en el cromosoma 1. Para esto, se hizo un pedido a Integrated DNA Technologies, compañía estadounidense que manufacturara los primers bajo las especificaciones de uno de los miembros del equipo de trabajo. Estos primers sólo consideraron que después del sitio de unión del primer, se pierden cerca de 50 pares de bases antes de que inicie la replicación, pero no son homogéneos en cuanto a tamaño. La investigación en todo el mundo se lleva a cabo de manera similar [5] [6] [7]. Debido a la naturaleza del genoma humano, los primers no pueden ser hechos a que obedezcan una T_m universal (pues ésta está definida por las características bioquímicas del código genético de cada primer en específico). Ni tampoco una longitud universal. Se requiere de una solución al problema de las condiciones esenciales para hacer PCR, ya que una PCR toma horas de trabajo y si no se utilizaron las condiciones óptimas, todo ese trabajo no sirve de nada, en la electroforesis las bandas no tienen un límite definido o son muy tenues o simplemente el primer jamás se une al DNA y la electroforesis sale en blanco. Además, para la PCR se utilizan recursos y materiales como muestra – no recuperable- y equipo de laboratorio como los termocicladores, que sólo pueden ser utilizados en ciclos con una T_m a la vez, así se esté haciendo PCR de

1 o 96 muestras. [1] tardó de 9 meses en hacer la estandarización de las condiciones para una PCR óptima y no se logró para el exón 2 del gen. Se concluyó que el custom primer fue mal diseñado.

Un sistema de ecuaciones que responda a esta necesidad podrá ahorrar tiempo para investigadores tratando de amplificar varios segmentos de DNA en específico sin importar el segmento a amplificar.

Metodología

Materiales

- El Magnesio utilizado está en forma de $MgSO_4$ (sulfato de Magnesio) grado biología molecular a 50 mM de marca Invitrogen.
- Los primers fueron diseñados a la medida por Integrated DNA Technologies para delimitar los 23 exones del gen CFH y estuvieron concentrados a 10 mM.
- Los dNTPs son de la marca Takara Bio Inc., están concentrados a 100 mM y contienen cantidades iguales de A, T, G y C.
- El DNA de la muestra proviene de un paciente del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana, en Ciudad de México, y está concentrado a 100 mM.
- El buffer utilizado en las soluciones es el 10X PfuUltra Rxn Buffer 1 ml CAT#600670-52 de la marca Stratagene.
- La Taq Polimerasa es Pfu Ultra II Fusion HS DN Polymerase CAT#600674-51 de la marca Stratagene.
- Las cantidades utilizadas para cada PCR fueron:

Reactivo	Mix sin Mg (μL)	Mix con Mg normal (μL)	Mix con doble Mg (μL)	Mix con triple Mg (μL)
DNA	1	1	1	1
Buffer	2.5	2.5	2.5	2.5
dNTPs	1	1	1	1
Primer F.	0.75	0.75	0.75	0.75
Primer R.	0.75	0.75	0.75	0.75
Mg	0	0.5	1	1.5
Taq Polimerasa	0.5	0.5	0.5	0.5
Agua	18.5	18	17.5	17
Total	25	25	25	25

Tabla 2. Cantidades de reactivo utilizadas para cada tipo de PCR.

Métodos

Se utilizan 16 condiciones controladas para la PCR de 10 exones diferentes (elegidos aleatoriamente de los 23 exones del gen CFH), donde los factores que varían son la T_m y la concentración de Magnesio. A los 16 productos se les hace una electroforesis en un gel de agarosa para separarlos mediante tamaños. La zona donde queda el DNA deseado queda a la misma altura en todos los casos, pero la intensidad es diferente. Se le toma una fotografía al gel, que asigna un valor numérico entre 0 y 255 a los pozos. El valor en cada punto del pozo se promedia y se resta del valor de referencia (el valor entre 0 y 255 asignado al gel de agarosa). El resultado es un número entre 0 y 255 que describe la cantidad de DNA formado en una PCR con las condiciones controladas para cada caso.

Los datos obtenidos se trabajan con análisis de varianzas (ANOVA) en Minitab para descubrir si se puede concluir que las condiciones variaron los resultados de la PCR. Las condiciones y la cantidad de DNA serán relacionadas en gráficas.

Para cada exón se utilizó un par de primers diferente, que delimitaran la zona de interés. El trabajo previo del proyecto [1] ha determinado valores de T_m de los exones por medio de pruebas empíricas. Se parte de esa temperatura y se hacen PCR con 4 diferente concentraciones de Magnesio a temperaturas de - 4 °C, - 2 °C, 0 °C y +2°C con respecto a la T_m que fue obtenida en [1] por prueba y error. En cada una de esas T_m se varía 4 veces la cantidad de Magnesio (0 μg , .5 μg , 1 μg y 1.5 μg por cada 25 μL de muestra).

Los factores bloqueados del experimento son muy importantes porque aseguran que los resultados obtenidos provienen sólo de las condiciones que se modificaron a propósito [18]. Los geles de agarosa se preparan en todos los casos con .4 gr de agarosa grado biología molecular y 40 mL de buffer tris-acetato-EDTA para que la porosidad y las posibilidades de difusión del DNA sean lo más parecidos posible en la electroforesis. Los pozos que se hacen en el gel siempre se mantienen a la altura de 2 mm para bloquear el factor del “desplazamiento en z” en las fotografías.



Fig. 8. Los geles de agarosa son creados bajo las mismas condiciones. El voltaje y tiempo de las electroforesis también es el mismo en todos los casos

La cantidad de DNA al final de la PCR dependerá de las condiciones de Mg y Tm que se hayan utilizado. Aunque los 16 casos hayan tenido los mismos reactivos, en todos los casos la polimerasa funciona en diferente medida debido a las condiciones.

Cuando la PCR ha terminado, 5 μ L de la mezcla son mezcladas con buffer de carga y se les aplica una electroforesis con 90 V durante 45 minutos, en todos los casos, poniéndole al medio 5 μ L de bromuro de etidio. La electroforesis separará las partes de la mezcla, puesto que los dNTPs son muy pequeños y viajan muy rápido hasta el ánodo. Los fragmentos de DNA son muy grandes y tardan más en moverse a través de los poros del gel de agarosa. La distancia que recorren dentro del gel de agarosa es irrelevante para el estudio: sólo importa la luminosidad con la que brillan al aplicarles luz UV. Utilizando el Scientific Imaging System Kodak 1D v. 3.6.5 del INMEGEN se le toma una fotografía de 8 bits al gel de agarosa. El DNA en diferentes pozos tiene en todos los casos valores

diferentes de blanco. Este valor es promediado en todos los píxeles que representan este pozo mediante un algoritmo en MATLAB programado por el autor para este estudio y obtiene la media de los valores dentro del área seleccionada. Los valores serán relacionados con las condiciones que los originaron y se relacionan los 2 factores en Minitab, software de estadística. Las gráficas nos permitirán descubrir si existe diferencia significativa entre las medias de la eficacia de la polimerasa entre las diferentes condiciones. Si esta hipótesis se prueba, las 2 condiciones y el resultado (T_m según la regla de Wallace, concentración de Magnesio y eficacia de la polimerasa) se graficarán por medio de Matlab.

Resultados

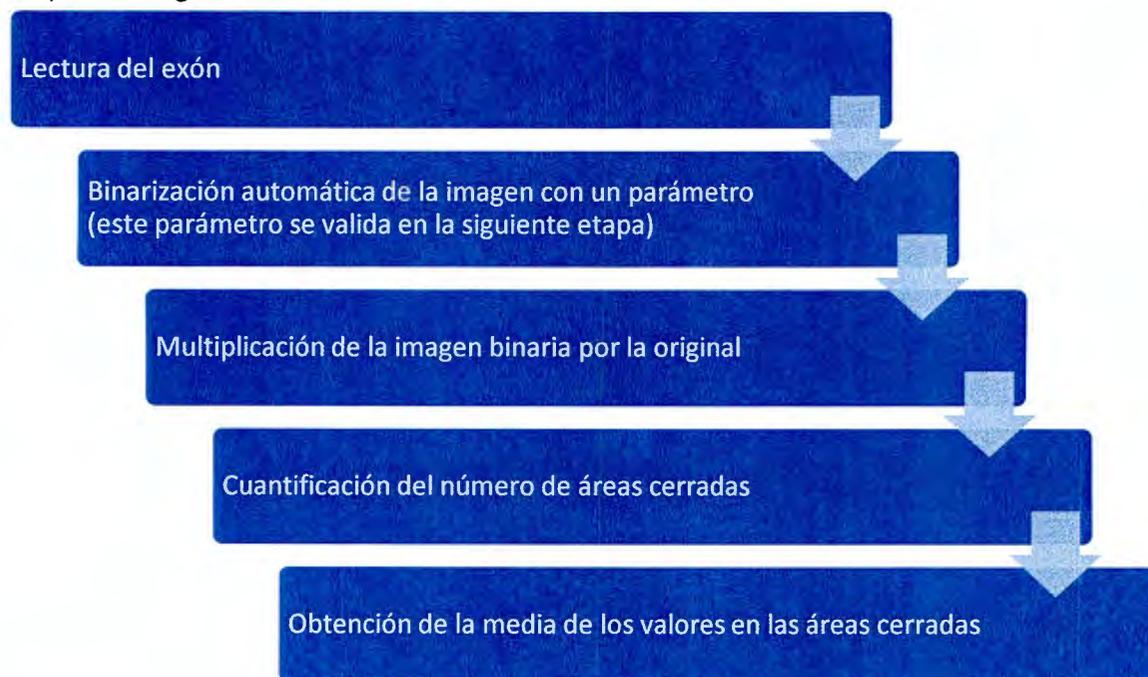
El proyecto se desarrolla en INMEGEN con recursos del Instituto y el DNA proviene de pacientes del Instituto de Oftalmología Conde de la Valenciana. Todo el equipo, material y servicios, como termocicladores, refrigeradores, espectrofotómetros y secuenciadores son parte de las instalaciones del INMEGEN. Para la obtención de fotografías del proceso de electroforesis se utiliza el software Scientific Imaging System Kodak 1D v. 3.6.5, que toma fotos del gel de agarosa al momento de ser bombardeado con luz UV. La cuantificación de luminosidad del DNA en cada banda se promedia con un algoritmo en MATLAB, y el análisis de varianzas se hace en el programa Minitab 15.

Diagrama de flujo del software

El algoritmo en MATLAB sirvió para obtener un valor promedio de la luminosidad de cada banda de DNA. Debido a que los cambios en percepciones de las

personas pueden hacer que varíe la lectura, se optó por un programa automatizado que percibía los pozos a partir de cierto umbral, que era diferente para cada fotografía.

Etapa de segmentación



Etapa de validación

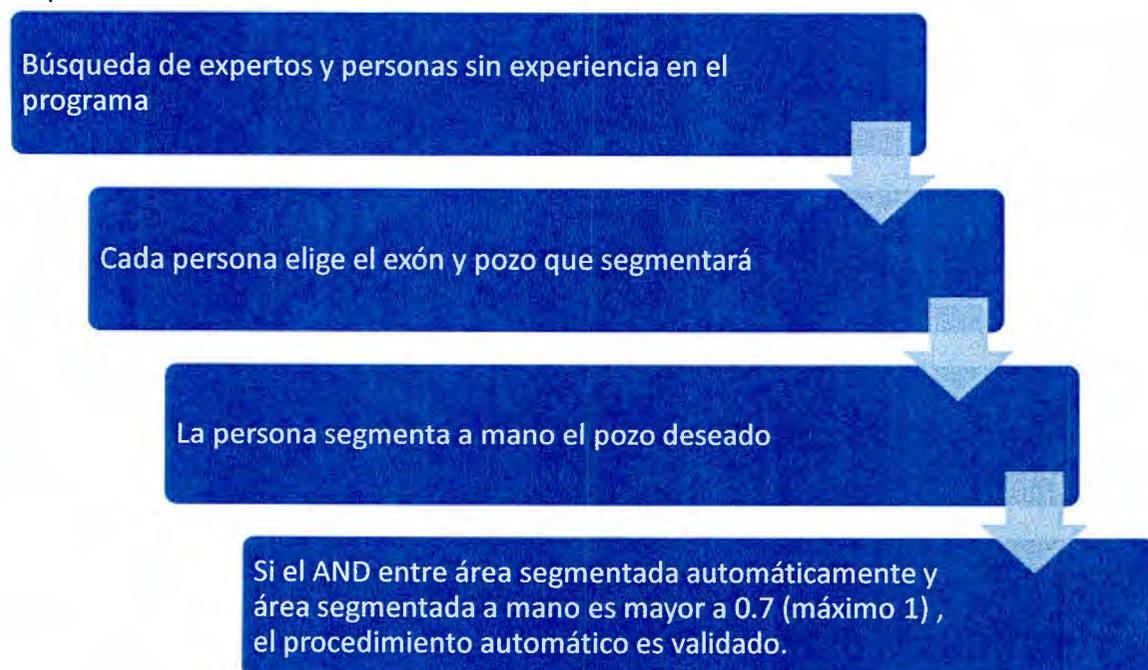


Fig. 9. Diagramas de flujo del software de MATLAB y la validación implementada para el código

La segunda parte del trabajo con el software involucró la validación, para asegurar que los resultados calculados con el software equivaldrían a los que adquiriría un usuario experto al segmentar las bandas. El umbral fue validado por dos investigadoras del INMEGEN y por una muestra de 10 alumnos de Ingeniería Biomédica.

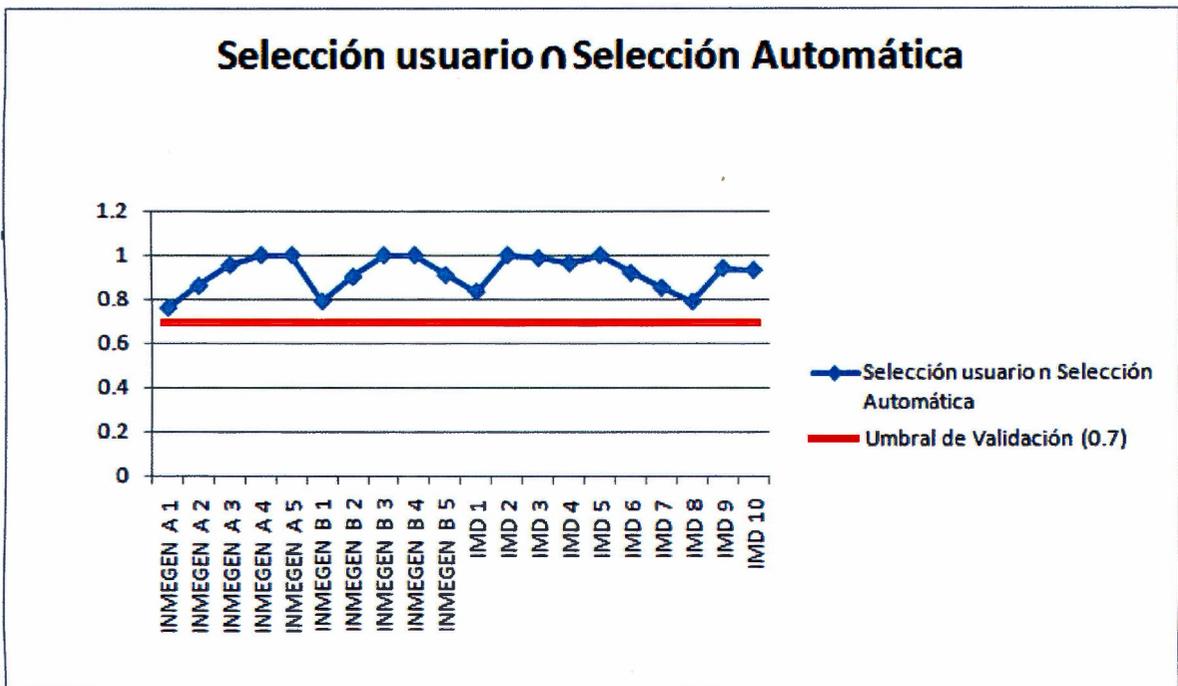


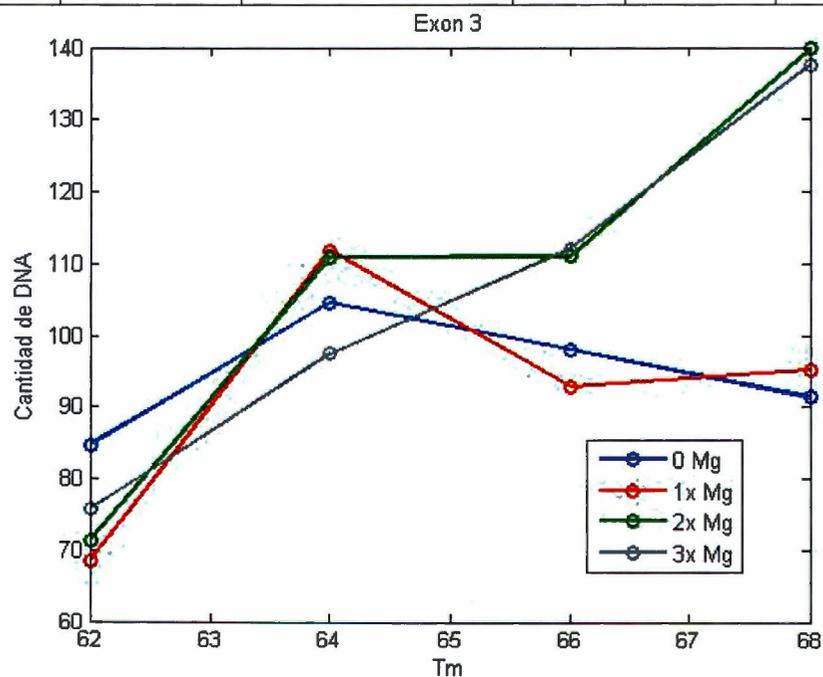
Fig. 10. Gráfica de los valores de AND obtenidos entre el algoritmo automático y el manual. Cada usuario eligió aleatoriamente el exón y el número de banda a validar. Se pudo notar en los usuarios expertos de INMEGEN, que aprendían a usar el programa y los AND de sus siguientes selecciones eran mucho más cercanas a 1 que los primeros.

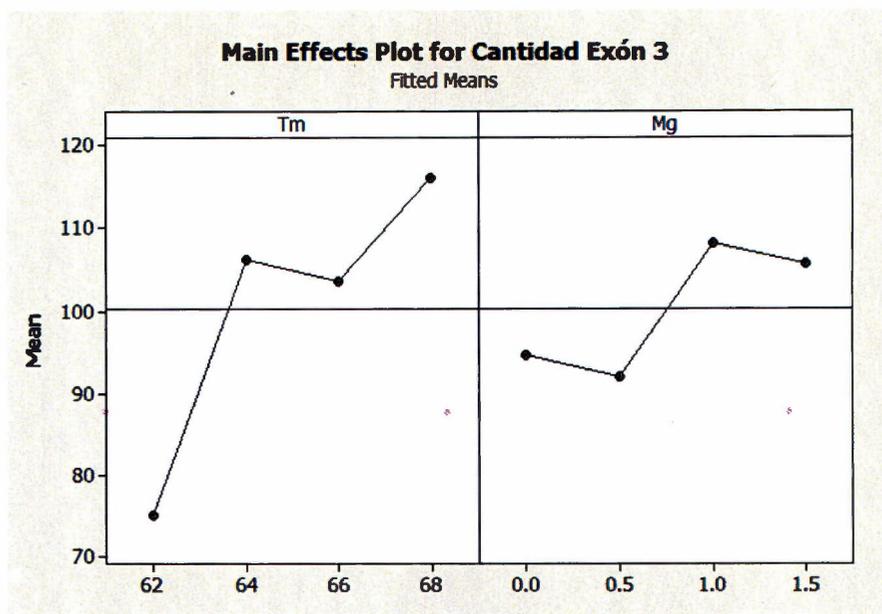
Se hizo el análisis estadístico de los valores promedio de cada banda al relacionarlas con las condiciones de T_m y M_g que las ocasionaron. A continuación se muestran las gráficas y el ANOVA [del tipo modelo lineal general] de cada exón analizado. El objetivo del ANOVA es determinar si las diferencias entre los resultados de cada condición pueden estadísticamente ser consideradas

diferentes o la diferencia no es significativa [19] ya que compara el grado de variabilidad entre los resultados con una prueba inversa de Fisher [20]. Además, se hizo un análisis de Tukey con intervalo de confianza de 95% para comparar las medias obtenidas y determinar, en caso de ser diferentes, qué variantes eran diferentes de otras y cuáles no.

Análisis Estadístico

EXÓN 3						
Primer F	Tm F teórica	Primer R	Tm F teórica	Promedio Tm teórica	Tm funcional	Mg funcional
TTCACCAATGCT GGGCAGGCT	56	AAGCAGGTGAAAGT CTTGCTTTCCCT	56	56	68	2x





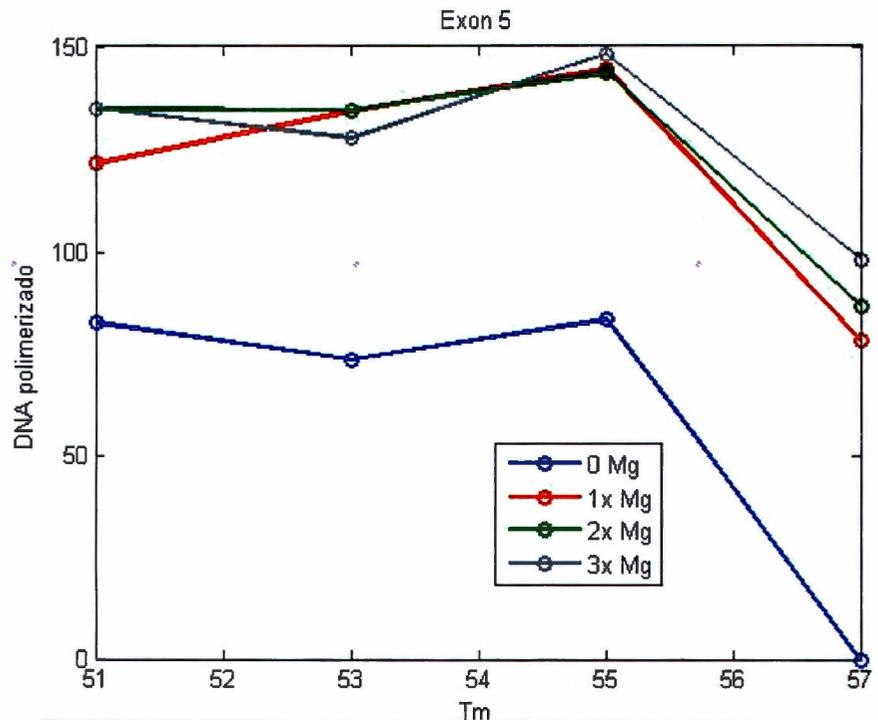
Análisis estadístico de la PCR del exón 3

El ANOVA demostró que el Magnesio sí es un factor determinante para los resultados de este exón al encontrar diferencias estadísticamente significativas en los resultados. La prueba de distribución de F inversa demuestra que el Magnesio es un factor estadísticamente determinante para la cantidad de DNA creado. La prueba de intervalos de confianza de Tukey encontró diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de DNA creado entre la PCR con Tm= 62°C contra las PCR con Tm= 64°C, 66°C y 68°C, respectivamente, pero demuestra que la cantidad de DNA creado entre 64°C, 66°C y 68°C no es estadísticamente diferente. La prueba de Tukey para Mg no encontró diferencias significativas entre ninguno de los resultados.

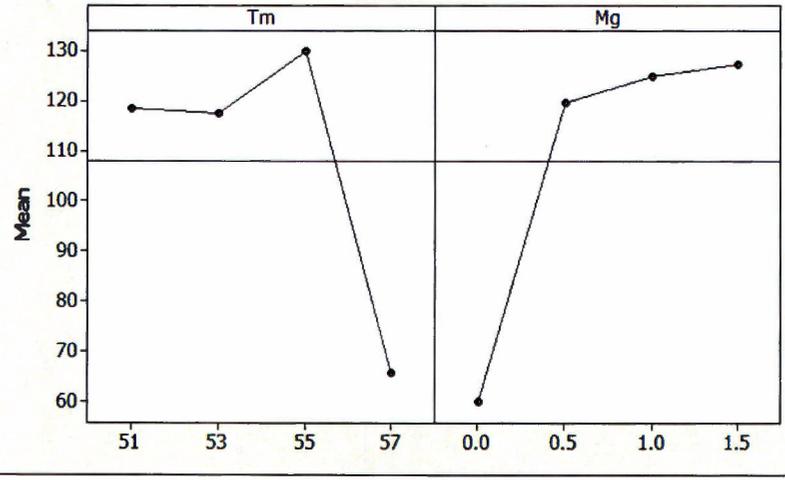
EXÓN 5						
Primer F	Tm F teórica	Primer R	Tm F teórica	Promedio Tm teórica	Tm funcional	Mg funcional

Sistema de Ecuaciones para Optimización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en exones del gen del factor H del complemento

TTTCCTCCAAT	51	TGCTGATATTCCT	52	51.5		3x
CTTATCCTGAG		TAGAATGAACG			55	



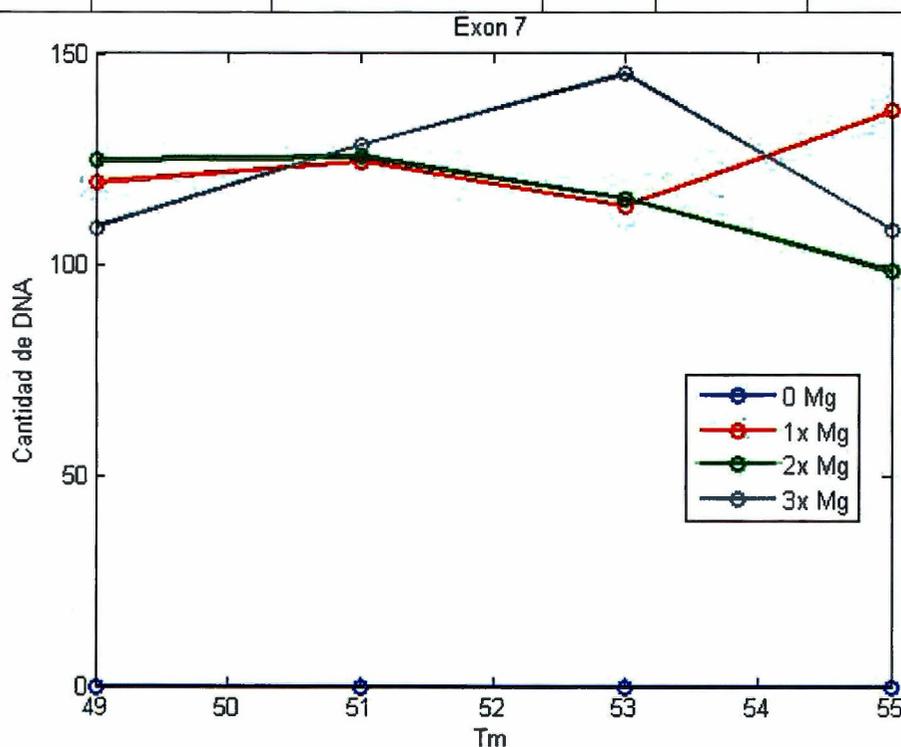
Main Effects Plot for Cantidad Exon 5
Fitted Means

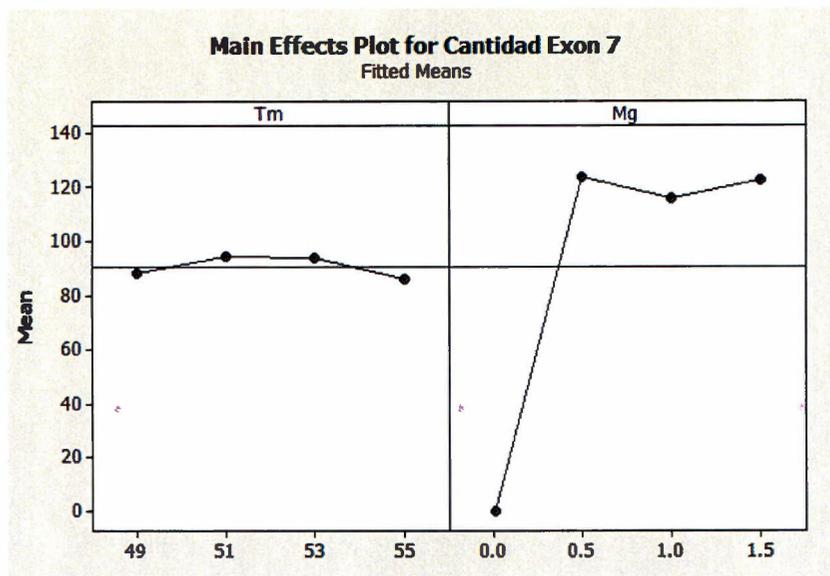


Análisis estadístico de la PCR del exón 5

Aunque la prueba inversa de F no encuentra diferencias entre los factores, la prueba de Tukey demuestra que el valor más alto de Tm (57°C), y el valor más bajo de Mg (0.0°C) son estadísticamente diferentes al resto de los resultados, que no son estadísticamente diferentes entre sí.

EXÓN 7						
Primer F	Tm F teórica	Primer R	Tm F teórica	Promedio Tm teórica	Tm funcional	Mg funcional
TGTTCAATTTAA TGCCATTTTG	46	TTTCGGCAACTTC GAAAACT	48	47	53	3x

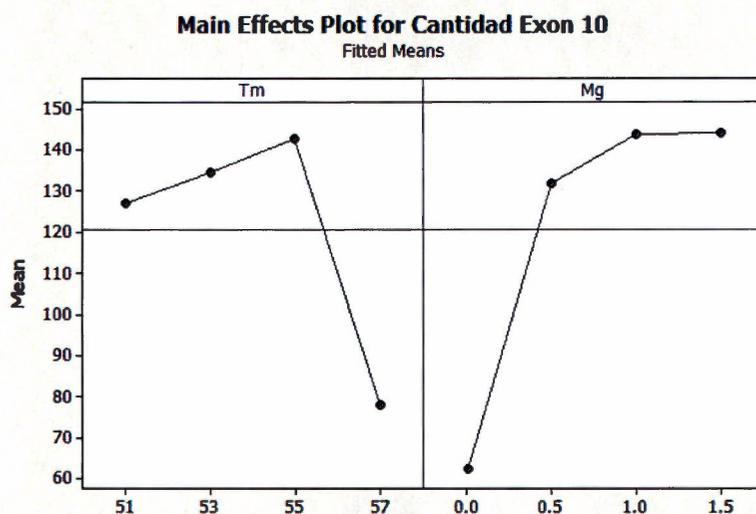
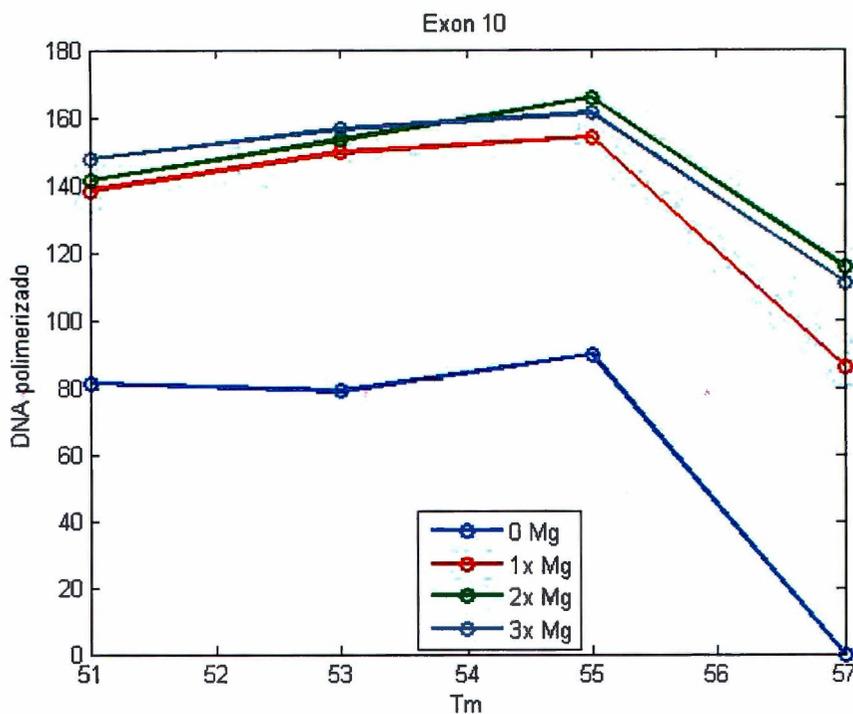




Análisis estadístico de la PCR del exón 7

Los resultados de la PCR no son estadísticamente diferentes en las diferentes temperaturas, revelando una afinidad muy alta de los primers por el segmento de DNA para el que fueron diseñados. La prueba de F inversa demuestra que los resultados en variaciones de Tm son estadísticamente diferentes, pero no puede demostrarlo con Mg. En cambio, la prueba de Tukey demuestra que el valor con 0 Mg anula totalmente la reacción para este exón y no encuentra diferencias entre los valores de Mg.

EXÓN 10							
Primer F	Tm teórica (°C)	F	Primer R	Tm teórica (°C)	Promedio Tm teórica (°C)	Tm funcional	Mg funcional
TGAATGCTTATG	52		AAACCTGCAG	49	50.5	55	2x
GTTATCCAGGT			GAACAAAGC				

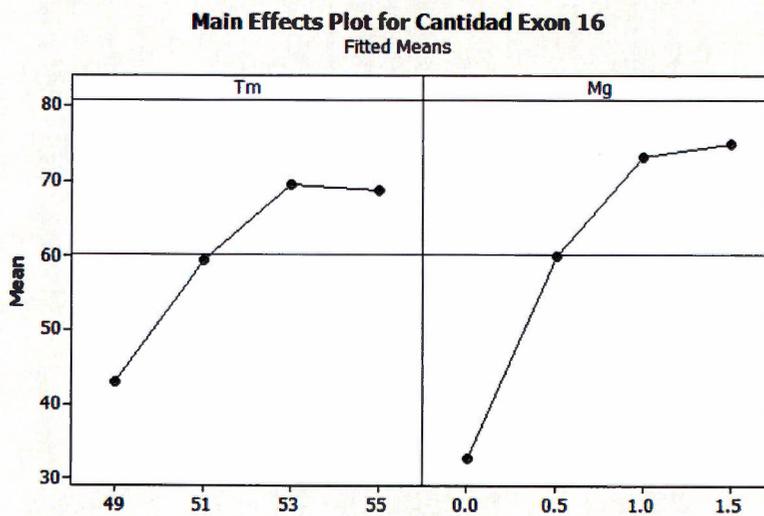
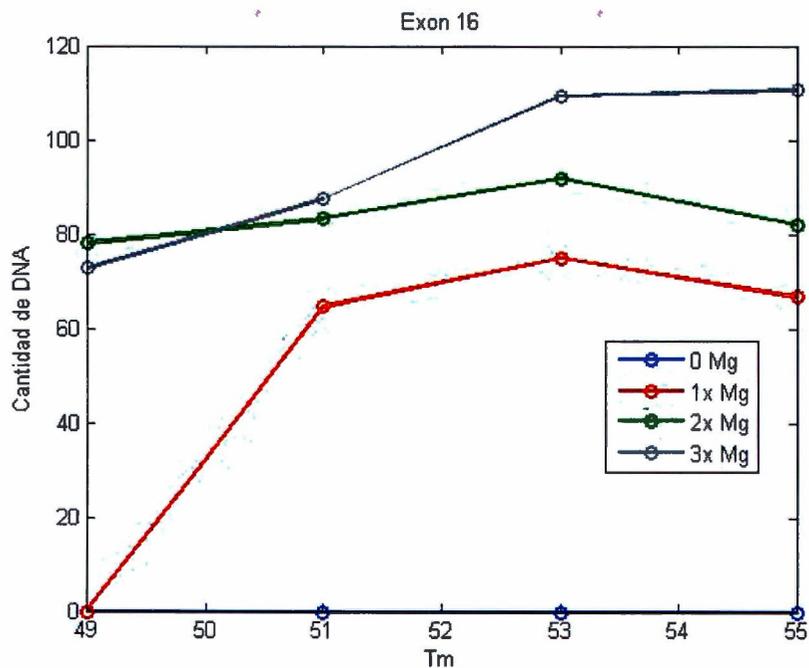


Análisis estadístico de la PCR del exón 10

En forma similar al exón 5, la prueba inversa de F no encuentra diferencias entre los factores, mientras que la prueba de Tukey demuestra que el valor más alto de Tm (57°C), y el valor más bajo de Mg (0.0°C) son estadísticamente diferentes al resto de los resultados, que no son estadísticamente diferentes entre sí.

Sistema de Ecuaciones para Optimización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en exones del gen del factor H del complemento

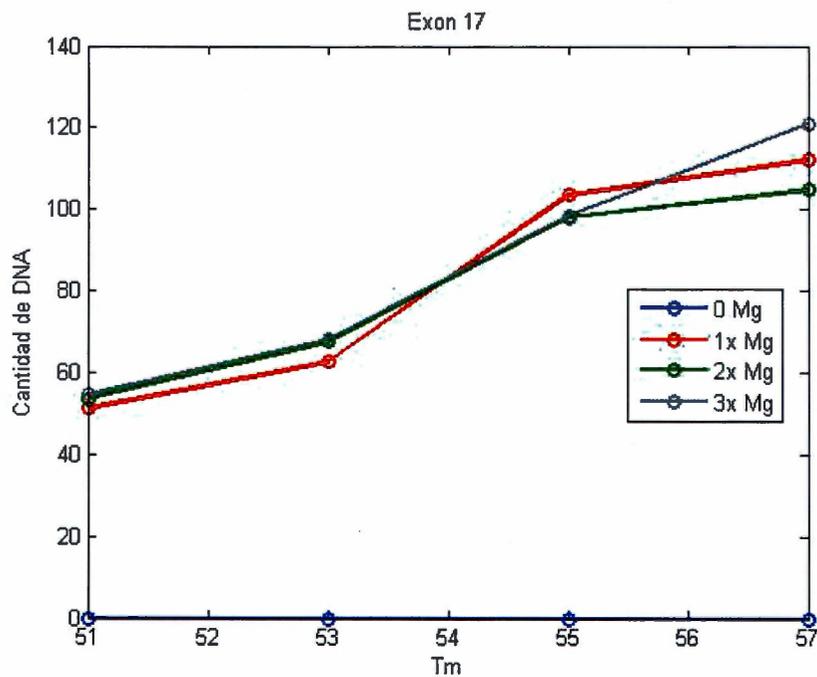
EXÓN 16						
Primer F	Tm F	Primer R	Tm F	Promedio	Tm	Mg
	teórica		teórica	Tm teórica	funcional	funcio- nal
	(°C)		(°C)	(°C)		
CTATGAGAATACA	53	TTGTTTACACGA	51	52	53	1x
AGCCAAAAGTTC		AGCACAGAGA				

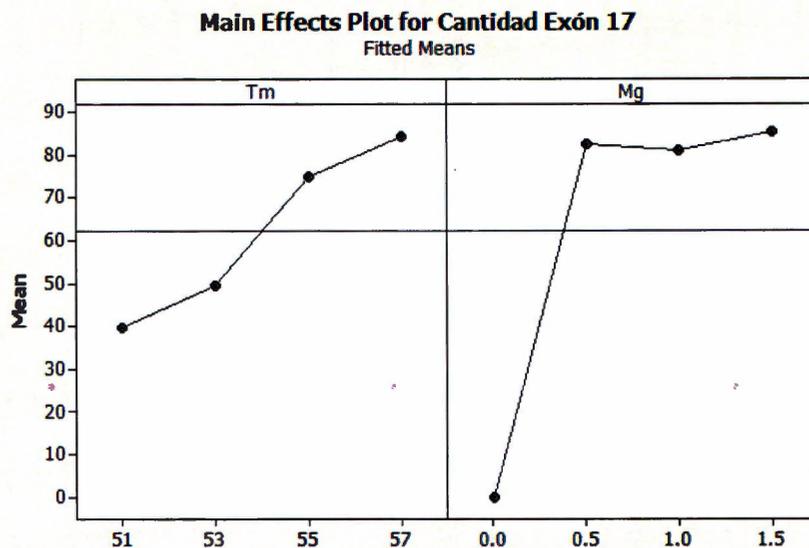


Análisis estadístico de la PCR del exón 16

La prueba de F inversa encuentra estadísticamente diferentes los valores de Tm, no en los de Mg, mientras que la prueba de Tukey sólo demuestra diferencias en el valor de 0 Mg y ninguna diferencia estadísticamente significativa en Tm.

EXÓN 17						
Primer F	Tm F teórica (°C)	Primer R	Tm F teórica (°C)	Promedio Tm teórica (°C)	Tm funcional	Mg funcio nal
GGACCTAGGCACA TTAATCAATCAC	56	GCGTTTGCTTC TCCCTCCACCA	59	57.5	57	3x

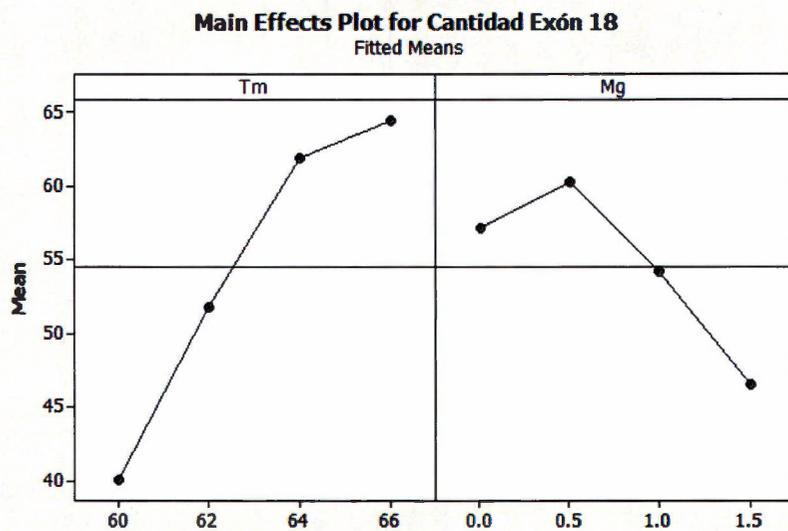
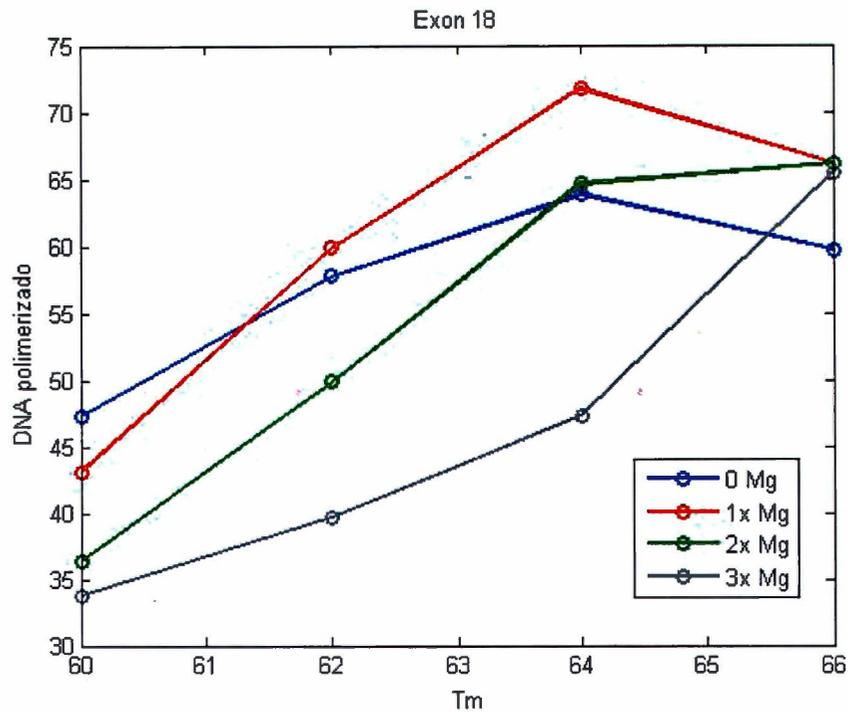




Análisis estadístico de la PCR del exón 17

La prueba de F inversa no demuestra que los valores de la PCR sean estadísticamente diferentes en las variaciones de ninguna de las 2 condiciones, pero los resultados con la prueba de Tukey son muy diferentes: Los valores obtenidos con Tm de 51°C, son a su vez diferentes de los valores a 55°C y 57°C. Los valores a 53°C no son estadísticamente diferentes a los obtenidos a 55°C pero sí a los de 57°C.

EXÓN 18						
Primer F	Tm F teórica (°C)	Primer R	Tm F teórica (°C)	Promedio Tm teórica (°C)	Tm funcional	Mg funcio nal
ACATTCTTCCCAC AATGCCCTTC	57	ATGAGTAGAGG CAGCTGTGCC	59	58	64	2x

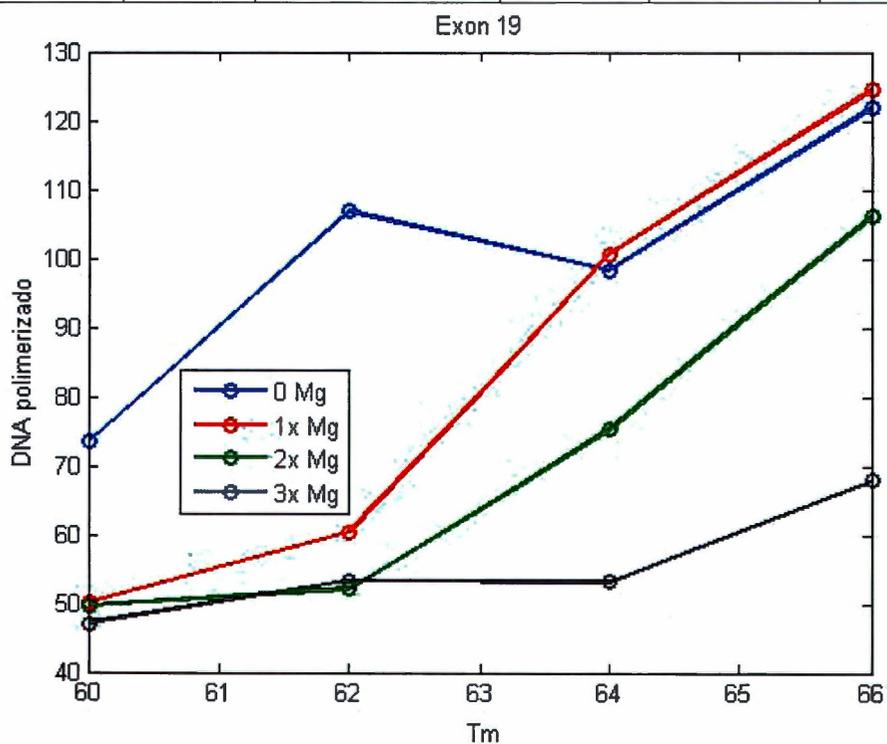


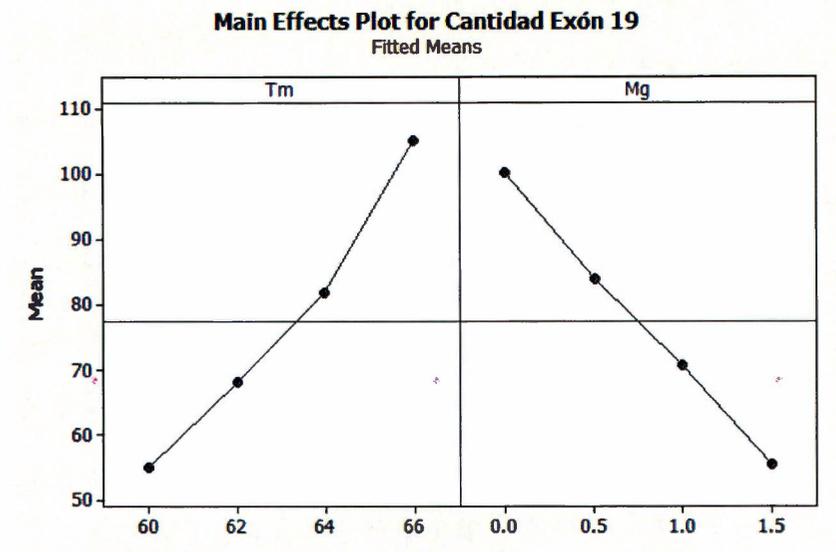
Análisis estadístico de la PCR del exón 18

La prueba de F inversa no encuentra diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes valores del DNA creado, mientras que la prueba de Tukey confirma que la PCR con Tm= 60°C polimeriza una cantidad de DNA estadísticamente diferente a la PCR con Tm=64°C y 66°C. En cuanto a Mg, la

prueba de Tukey sólo encuentre diferencia estadísticamente significativa entre el valor de DNA creado más alto, a 0.5 μ L de Mg, y el más bajo, a 1.5 μ L.

EXÓN 19						
Primer F	Tm F teórica (°C)	Primer R	Tm F teórica (°C)	Promedio Tm teórica (°C)	Tm funcional	Mg funcional
ACAGCATGTGGGA AACTGCCACC	59	TGCATGTCACC ATGCCCCACT	56	57.5	66	3x

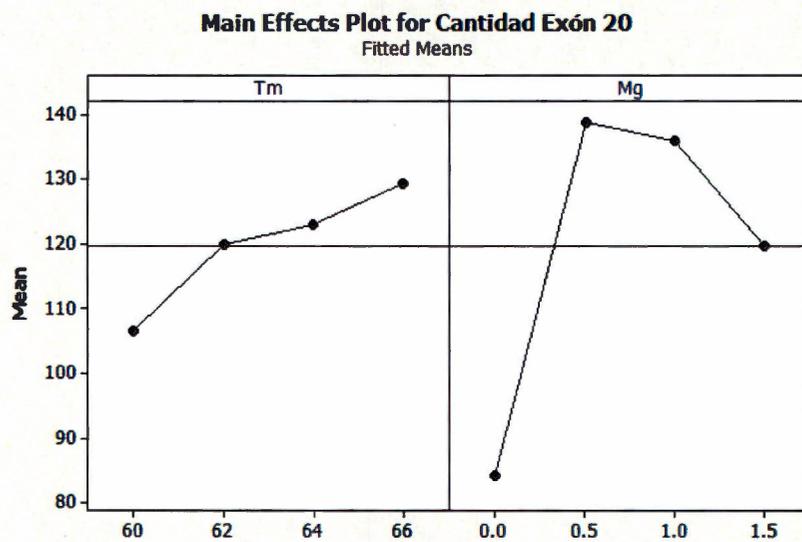
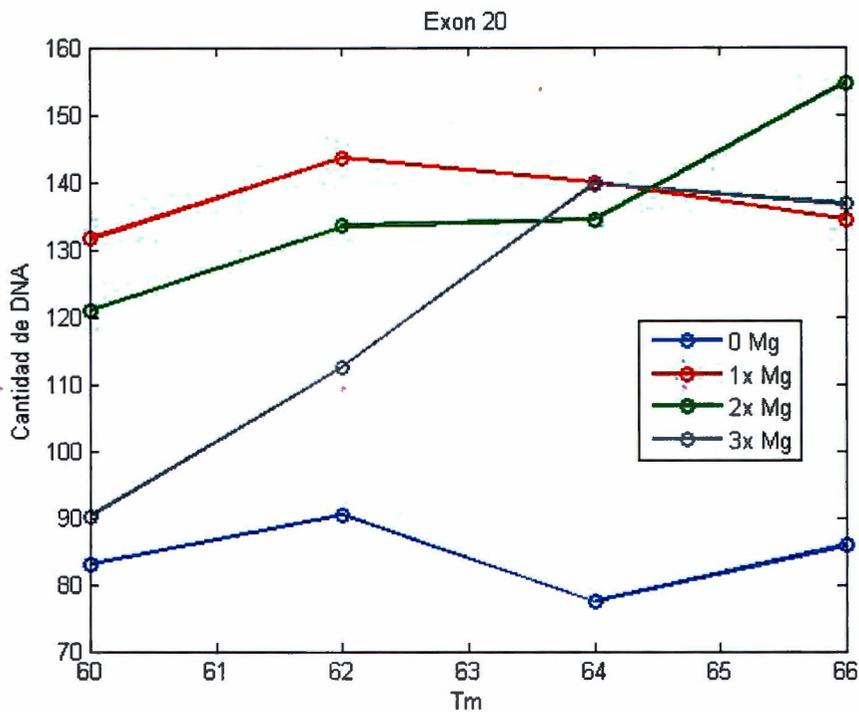




Análisis estadístico de la PCR del exón 19

La prueba de F inversa no demuestra diferencia significativa entre los valores de DNA creado de Tm ni Mg, mientras que la prueba de Tukey determina diferencias estadísticamente significativas en ambas variables dependientes, en ambos casos entre los valores más bajos (Tm=60°C y Tm=0.0) y los dos valores más altos.

EXÓN 20						
Primer F	Tm F teórica (°C)	Primer R	Tm F teórica (°C)	Promedio Tm teórica (°C)	Tm funcional	Mg funcio nal
CGTTTACACTGGC TTCCAGAAGGG	59	ACCCAGGACTAT GTGCTCGGACT	59	59	66	2x

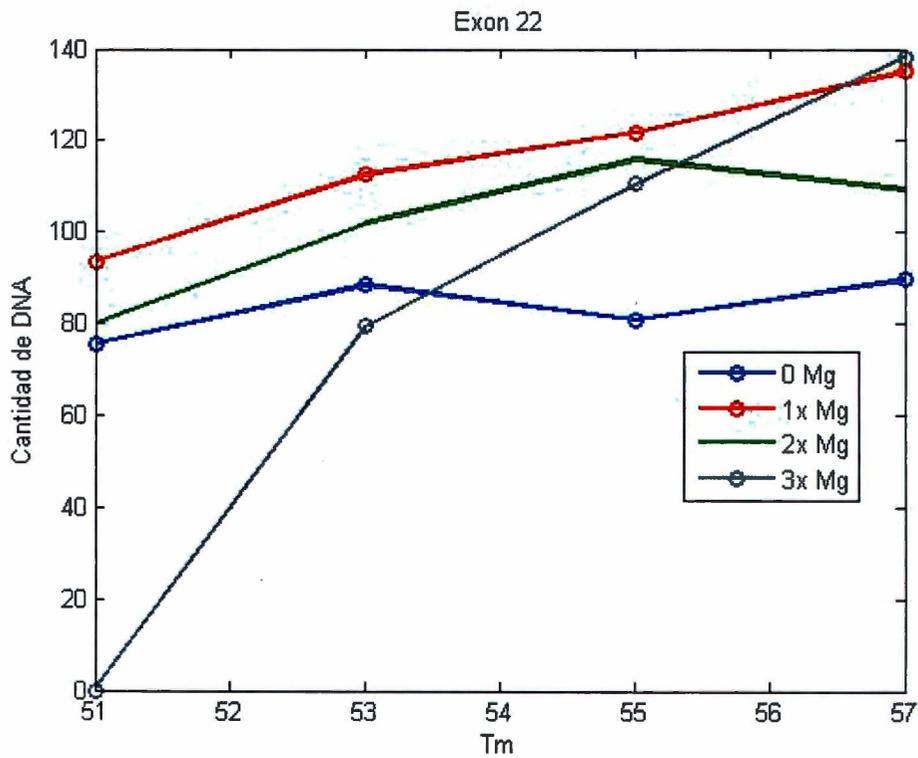


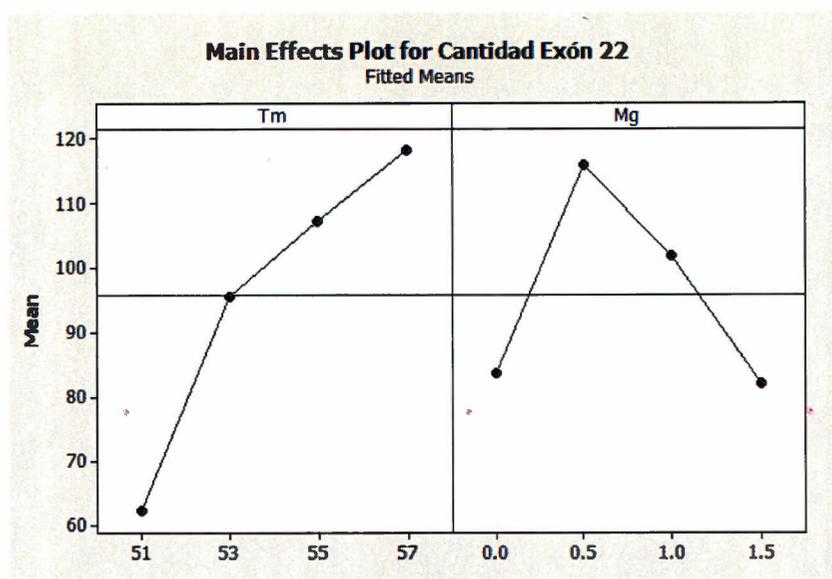
Análisis estadístico de la PCR del exón 20

La prueba de F inversa demuestra que la Temperatura es un factor estadísticamente significativo, pero no lo puede asegurar para Mg. La prueba de Tukey, por otro lado, reconoce que el Magnesio en 0 es un factor determinante

para un bajo rendimiento de la PCR, pero no encuentra diferencias significativas en los demás niveles de Mg ni en los niveles de Tm.

EXÓN 22						
Primer F	Tm F teórica (°C)	Primer R	Tm F teórica (°C)	Promedio Tm teórica (°C)	Tm funcional	Mg funcional
TGTGTGTGTGTTT GTGGTGAGGACA	58	ACAGTGAGCCTC AGAAGCTGTGGA	59	58.5	57	3x





Análisis estadístico de la PCR del exón 22

El exón 22 fue el único en el que la prueba de F inversa encontró significativamente diferentes ambas variables dependientes. La prueba de Tukey sólo encontró diferencias significativas en la variable Tm cuando Tm=51°C con respecto a Tm=57°C.

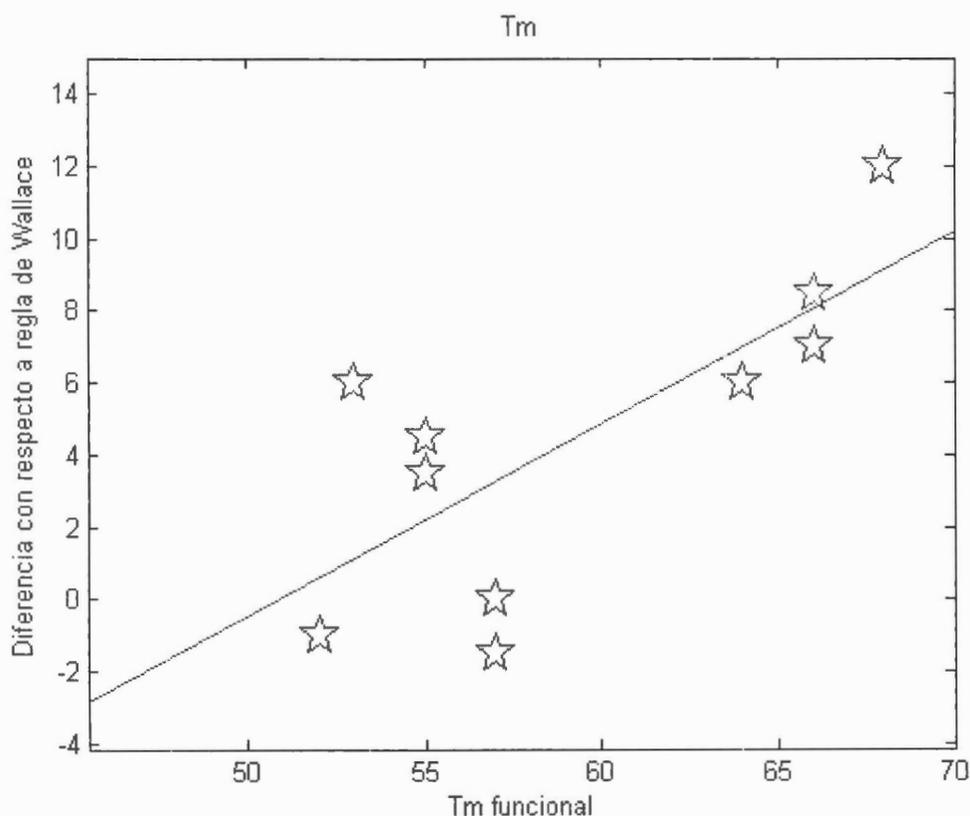
Análisis general

Exón	Es un factor significativo según la Prueba de F Inversa		Es un factor significativo según la Prueba de Tukey	
	Tm	Mg	Tm	Mg
Exón 3	No	Sí	Sí	No
Exón 5	No	No	Sí	Sí
Exón 7	Sí	No	No	Sí
Exón 10	No	No	Sí	Sí
Exón 16	Sí	No	No	Sí

Exón 17	No	No	Sí	Sí
Exón 18	No	No	No	Sí
Exón 19	No	No	Sí	Sí
Exón 20	Sí	No	No	Sí
Exón 22	Sí	Sí	Sí	No

Los resultados para cada exón son heterogéneos y aunque las gráficas sugieren tendencias, sólo se puede afirmar estadísticamente que el 50% de las variables independientes (T_m o M_g) del estudio cambian la cantidad de DNA creado significativamente.

Utilizando MATLAB, se obtuvo una línea de tendencia, donde se evalúa qué tan precisa es la regla de Wallace para calcular T_m , utilizando el método de linearización de mínimos cuadrados, obteniendo la siguiente gráfica:



Que describe cómo la regla de Wallace empieza a ser mucho más imprecisa cuando la Tm funcional rebasa 50°C. La relación entre la Tm funcional y la diferencia con la regla de Wallace puede ser descrita por la línea

$$y = 0.53337x - 27.129$$

donde x es la Tm funcional y y es la diferencia que tendría con respecto a la regla de Wallace. Sin embargo, para predecir la Tm hace falta un despeje más:

$$Tm_{real} - Tm_{Wallace} = 0.53337(Tm_{real}) - 27.129$$

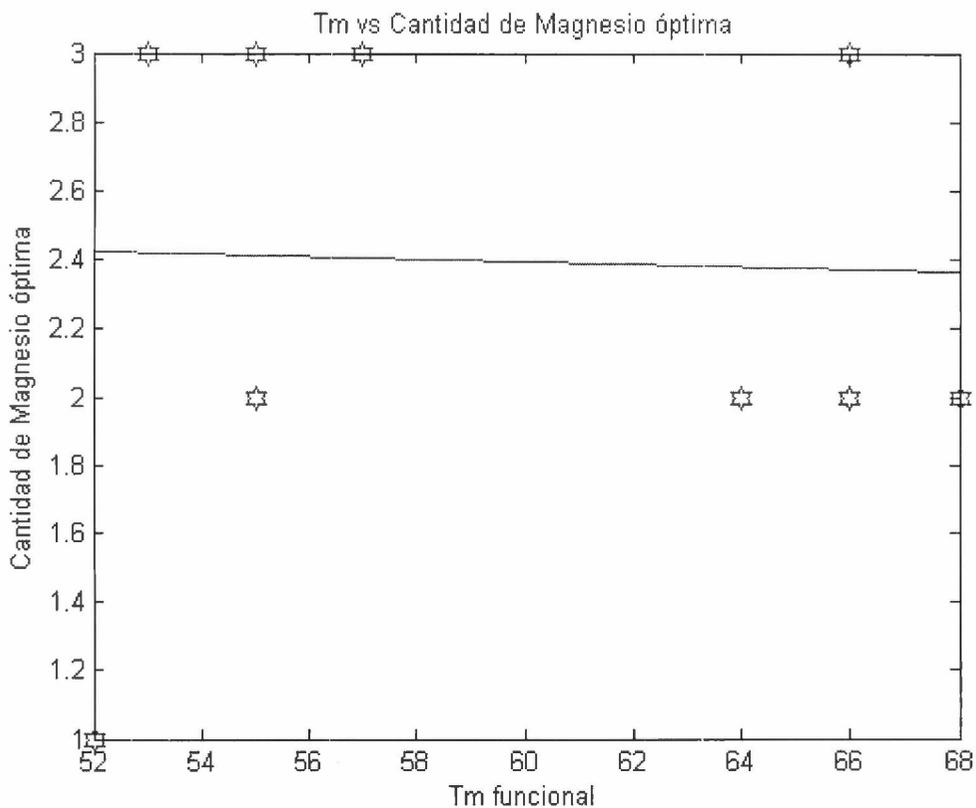
$$Tm_{Wallace} = Tm_{real} - 0.53337(Tm_{real}) - 27.129$$

$$Tm_{Wallace} = .46663(Tm_{real}) + 27.129$$

$$Tm_{real} = \frac{Tm_{Wallace} - 27.129}{.46663}$$

La linearización tiene una R-cuadrada de 0.4681, lamentablemente lejos del 0.95 que se requeriría para asegurar que la línea modela adecuadamente el fenómeno.

En cuanto al Magnesio, la relación es muy heterogénea, no parece seguir ningún tipo de tendencia asociada a T_m . Sin embargo, se confirmó que la generalización de Promega: “Incluir el magnesio a una concentración de 1.5 mM generalmente incrementará la T_m teórica alrededor de 5-8°C en oligonucleótidos” [15] es incorrecta porque la cantidad de Mg no parece estar relacionada con la T_m .



Conclusiones

Los resultados estadísticos impiden la generalización de la actividad de la enzima. Sin embargo, dentro del marco del experimento se pueden observar varios fenómenos. En ningún caso una PCR sin Magnesio polimerizó más DNA que una PCR con Magnesio. El uso de la cantidad normal (0.5 μ L), la usada comúnmente en [1], en la mezcla para la PCR sólo dio los mejores resultados en el 10% de las muestras analizadas. Con las pruebas estadísticas se encontró diferencia estadísticamente significativa en el 30% de los 20 casos (2 por cada una de las 10 muestras). El investigador buscará obtener la mayor cantidad posible del segmento que desea del DNA en una PCR. Este experimento demostró que en el 90% de los casos, no es suficiente con 0.5 μ L de Magnesio normalmente utilizado por el protocolo en [1] para aumentar la cantidad del segmento DNA deseado.

Trabajo a futuro

Para obtener nuevos datos, compararlo con los actuales y obtener un valor de la correlación de ambos factores es necesario repetir todo el trabajo y así tener 2 tomas de la misma medición. Los resultados de la PCR están refrigerados a -20°C en todo momento en el INMEGEN y el proyecto puede continuarse, buscando finalmente encontrar la correlación entre los factores.

Otra parte en la que es importante tener continuidad es en una idea implementada en la metodología: se toma una fotografía del gel de agarosa donde se ha hecho una electroforesis de productos de PCR y se le ha agregado bromuro de etidio. Como el DNA brilla al bombardearse con luz UV, se obtiene un valor de 0 a 255

directamente relacionado con la cantidad de DNA que hay en la banda. Este proyecto simplemente lo consideró con fines estadísticos, pero es posible relacionar la cantidad de brillo con la cantidad de DNA en la banda, sobre todo si se aumenta la resolución a 16 bits a las fotografías. Esta idea puede darle un valor numérico a la efectividad de una PCR para una rápida selección de condiciones idóneas.

Bibliografía

- [1] Rodríguez- Corona, U., et al. , *Resequencing analysis of the complement Factor H gene (CFH) in Mexican Mestizo patients with advanced age-related macular degeneration*. Washington, E.U.A.: 60th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 2010.
- [2] Brookes, A. J., , "The essence of SNPs," *Gene*, vol. 234, no. 2, pp. 177-186, Julio 1999.
- [3] Feldkamp, U., et al , "DNASequencesGenerator: A Program for the Construction of DNA Sequences," *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, vol. DNA7, no. LNCS 2340, pp. 23-32, 2002.
- [4] Koux, K., , "Optimization and troubleshooting in PCR.," *Genome Research*, pp. 185-194, Apr. 1995.
- [5] Brownley, L. K., et al , "Novel computational methods for increasing PCR primer design effectiveness in directed sequencing," *BMC Bioinformatics* .2008, p. 191, Sep. 2008.
- [6] King, M.C., et al , "Tamoxifen and Breast Cancer Incidence Among Women With Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2," *Journal of American Medical Association*, no. 286, pp. 2251-2256, 2001.
- [7] K., Schoen, E.D., Peters-Van Rijn, J. Wolff, "Optimizing the generation of random amplified polymorphic DNAs in chrysanthemum," *Springer Verlag Theoretical and Applied Genetics*, vol. 86, no. 8, pp. 1033-1037, 1993.
- [8] N.I., Allman, S.L., Golovlev, V.V., Taranenko, N.V., Isola, N.R. y Chen, C.H., Taranenko, "Sequencing DNA using mass spectrometry for ladder detection," *Nucleic Acids Research Journal*, vol. 26, no. 10, pp. 2488-2490, 1998.
- [9] T., Johnson, J., Casella, G., Wu, R. Liu, "Sequencing Complex Diseases With HapMap Vol. 168, pp. 503-5011. Septiembre 2004.," *Genetics*, vol. 168, pp. 503-511, Septiembre 2004.
- [10] Applied Biosystems , "Sequencing Chemistry Guide: Applied Biosystems 3730/3730xl DNA Analyzers," 2002.
- [11] Lodish, et al , , *Biología Celular y Molecular*. México: Médica Panamericana, 2005.
- [12] X., Seed, B. Wang, "A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis," *Nucleic Acids Research*, vol. 31, no. 24, p. 154, 2003.
- [13] Invitrogen. (2010, Noviembre) Oligonucleotide Design. [Online]. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Nucleic-Acid-Amplification-and-Expression-Profiling/Oligonucleotide-Design.html>

- [14] Genetic Science Learning Center. (2010, Octubre) PCR Virtual Lab. Learn.Genetics. [Online]. <http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr/>
- [15] Promega Biomath. (2010, Septiembre) Tm calculations for oligos. [Online]. <http://www.promega.com/biomath/calc11.htm>
- [16] Applied Biosystems. (2010, Septiembre) Tm calculator. [Online]. <http://www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/>
- [17] Henegariu, O., Heerema N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., Vogt, P.H. , "Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-By-Step Protocol," *BioTechniques*, vol. 23, pp. 504-511, septiembre 1997.
- [18] Gutiérrez, H., De la Vara, Román , *Análisis y diseño de experimentos*, Segunda Edición ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 2008.
- [19] Tabachnick, B., Fidell, L. , *Experimental Designs Using ANOVA*. Estados Unidos: Thomson Brooks/Cole, 2007.
- [20] Salkind, N. , *Statistics for People Who (Think They) Hate Statistics: Excel 2007 Edition*, 2nd ed. Estados Unidos: Sage Publications, 2010.
- [21] National Center for Biotechnology Information. (2010, Noviembre) Primer design tool. [Online]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- [22] Strachan, T. Read, A. P. , *Human Molecular Genetics*, Segunda edición ed. Estados Unidos: Wiley-Liss, 1999.