



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

GENERACIÓN DE MARCADORES DE PESO
MOLECULAR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
FRAGMENTOS DE ADN (ÁCIDO
DESOXIRRIBONUCLEICO) PARA ENSAYOS DE
ELECTROFORÉISIS

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO (A) EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

JULIETA MARIANA MUÑOZ MORALES

DIRECTORA: DRA. VERÓNICA QUINTERO
HERNÁNDEZ

CO-DIRECTORA: DRA. AMÉRICA PAULINA RIVERA
URBALEJO



MARZO, 2021

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que se tomaron el tiempo para que pudiera seguir adelante con el proyecto y me animaron a concluirlo

DEDICATORIA

A todos los que hicieron posible la realización de este proyecto, tutoras, familia, amigos y colegas.

Índice

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN.....	6
Fundamento y aplicaciones de la electroforesis	13
Estrategias para obtener marcadores de peso molecular de ADN.....	15
<i>Pseudomonas</i> como punto de partida para la generación de un marcador de peso molecular	18
ANTECEDENTES	19
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVOS	26
Objetivo general.....	26
Objetivos particulares	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Microorganismos empleados.....	27
Vector utilizado en las ligaciones	28
Extracción de ADN genómico en <i>P. putida</i> KT2440 y <i>P. protegens</i> EMM1	29
Diseño de oligonucleótidos para fragmentos de 102 pb a 2.4 kb	30
Amplificación de los fragmentos <i>KatA</i> , <i>rpoB</i> , <i>gyrB</i> , <i>rpoD</i> , <i>phlD</i> , <i>llpA</i> , <i>rrs</i> y <i>plt</i> mediante PCR	31
Purificación y cuantificación de fragmentos de ADN.....	33
Células competentes	33
Elaboración de células competentes <i>Escherichia coli</i> DH5- α	33
Transformación de <i>Escherichia coli</i> DH5- α	34
Detección y amplificación de los genes <i>katA</i> , <i>rpoB</i> , <i>gyrB</i> , <i>rpoD</i> , <i>phlD</i> , <i>llpA</i> , <i>rrs</i> y <i>Plt</i> por PCR de colonia.....	35
PCR de colonia con oligonucleótidos específicos para pGEM-T Easy Vector.....	37
Preparación de gliceroles	38

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
Análisis de marcadores de peso molecular de ADN comerciales	38
Extracción de <i>katA</i>, <i>rpoB</i>, <i>gyrB</i>, <i>rpoD</i>, <i>phlD</i>, <i>llpA</i>, <i>rrs</i> y <i>Plt</i> en <i>Pseudomonas</i> KT2440 y <i>P. protegens</i> EMM1	41
Amplificación por PCR de <i>katA</i>, <i>rpoB</i>, <i>gyrB</i>, <i>rpoD</i>, <i>phlD</i>, <i>llpA</i>, <i>rrs</i> y <i>plt</i>	43
Purificación y cuantificación de fragmentos de ADN	44
Estimación de la pureza del ADN amplificado	46
Mapas de ligaciones y digestión de enzimas de <i>KatA</i>, <i>rpoB</i>, <i>gyrB</i>, <i>rpoD</i>, <i>phlD</i>, <i>llpA</i>, <i>rrs</i> y <i>Plt</i>	46
Transformación en <i>Escherichia coli</i> DH5-α	55
Amplificación por PCR de colonia	55
Extracción de plásmido con oligonucleótidos específicos para pGEM-T Easy Vector y el fragmento de ADN de interés con enzimas de restricción	58
Propuesta de marcadores de peso molecular para ADN	59
Costo de manufactura	69
CONCLUSIONES	71
REFERENCIAS	73

GENERACIÓN DE MARCADORES DE PESO MOLECULAR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN (ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO) PARA ENSAYOS DE ELECTROFORÉISIS

RESUMEN

Los marcadores de peso molecular para ADN son una herramienta utilizada durante la electroforesis para conocer el tamaño estimado de un fragmento y es comúnmente usada en laboratorios de biología molecular, al igual que, en áreas como la medicina, la agricultura, la industria, entre otras. En la presente tesis se describe un protocolo y todas sus implicaciones para generar un nuevo marcador de peso molecular mediante métodos de PCR, electroforesis, clonación y transformación de ocho fragmentos de ADN provenientes de *Pseudomonas putida* KT2440 y *Pseudomonas protegens* EMIM-1. Las transformaciones se llevaron a cabo en *E. coli* DH5 α y los resultados se observaron con PCR de colonia. Los marcadores postulados resultaron en fragmentos con rangos de 102-5461 pb (pares de bases), aplicables para conseguir en un futuro marcadores de peso molecular personalizados. Los marcadores de peso para ADN varían dependiendo de la cantidad y número de fragmentos que contienen, su forma de obtención, así como de la marca. Este marcador supone un costo más barato con un protocolo sencillo de elaborar, consiguiendo que el costo del producto sea menor al esperado al precio que ofertan el producto de manera comercial.

INTRODUCCIÓN

El ADN es el material genético que proporciona la información necesaria para la codificación y expresión de características que diferencia un organismo de otro, si bien, cada especie difiere en su genoma por el tamaño y la proporción de nucleótidos en pares de bases (pb), el código genético es universal y todos los organismos están conformados

por esta molécula. El ADN es un polímero de hélice doble dextro-rotatoria que se compone de dos cadenas de polinucleótidos enlazadas por puentes de hidrógeno entre las bases de purina (adenina o guanina) y pirimidina (citosina o timina), que a su vez presentan enlaces glicosídicos con 2-desoxirribosa y enlaces fosfodiéster con el ácido fosfórico [1].

Gracias al desarrollo de técnicas de biología molecular como la clonación, transformación celular y electroforesis, actualmente es posible la modificación de organismos. La clonación molecular es una técnica donde se pueden unir dos o más fragmentos de ADN provenientes de un organismo donador. Esto tiene como finalidad sintetizar ADN híbrido con propósitos comerciales o de investigación [2],[3]. Esta tecnología usualmente hace uso de enzimas de restricción y ligasas, las primeras encargadas de cortar las moléculas de ADN sobre o cerca de secuencias específicas en extremos romos o cohesivos, mientras que las segundas, son capaces de reconocer secuencias específicas y unir las, la probabilidad de que dos moléculas de ADN se unan entre sí depende de la concentración de las secuencias reconocidas que se emparentan entre sí. [4]. El ADN del organismo donador usualmente es insertado en vectores como plásmidos bacterianos o fagos, para después ser incorporado en un organismo receptor, capaz de aceptar DNA exógeno llamado organismo receptor o célula competente.

Existe dos tipos de células competentes: quimiocompetentes o electrocompetentes, esta diferencia deriva del tipo de preparación y del método de inserción del material genético exógeno, en las células quimiocompetentes el método de inserción del material genético es a través de un choque térmico, mientras que en las células electrocompetentes la inserción del material exógeno es a través de la aplicación de un campo eléctrico, sin embargo ambos tipos de células presentan una membrana debilitada para facilitar la incorporación del DNA exógeno, proceso que se le conoce como transformación celular.

Una vez realizada la transformación, lo siguiente es la selección por plating, regularmente hecho en medios selectivos como el medio mínimo, diferencial o alguna combinación, a los cuales se les incorpora uno o varios antibióticos que permiten el crecimiento específico de las unidades formadoras de colonias (UFC) transformadas que llevan el inserto de interés.

Al seleccionar las colonias, se verifica si se ha logrado una correcta aceptación del vector en el hospedero, mediante el uso de enzimas de restricción o el uso de la reacción en cadena de polimerasa, por sus siglas en inglés “*Polymerase Chain Reaction*” (PCR). Tanto las enzimas de restricción como los oligonucleótidos deben reconocer sitios específicos del plásmido o el inserto. Posteriormente se visualiza el resultado en una electroforesis.

Cada célula transformada es capaz de replicar el vector reproduciendo miles de copias dentro de ella. Las modificaciones confieren a los organismos nuevas características como la sobreexpresión de genes o represión para la producción de enzimas, bacteriocinas o resistencia a antibióticos que son de interés industrial [5].

Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

La PCR, descrita por primera vez por Kary Mullis en 1985 [6], es una técnica que simula la replicación del ADN genómico de manera *in vitro* y con la cual se pueden amplificar millones de copias de un fragmento específico de DNA (Figura 1). Para llevarla a cabo, se requiere de una muestra de ADN (purificado preferentemente), el cual inicialmente será mezclado con los reactivos mostrados en la siguiente tabla (*tabla 1*).



Figura 1. Reacción en cadena de la polimerasa, PCR. En esta imagen se representa la técnica de PCR, la cual consiste en amplificar copias de un fragmento de ADN a partir de un templado de ADN (izquierda) o de ARN (derecha). Imagen tomada y modificada de Fig.3 del libro Genomes 3 por T. A Brown. [60]

Tabla 1. Reactivos necesarios para ejecutar la técnica de PCR [7].

Reactivo	Función
Oligonucleótidos	Flanquean las regiones donde ocurrirá la amplificación de la secuencia deseada en cada ciclo. Son secuencias cortas de 20-30 pares de bases (pb) que limitarán la zona de acción de la ADN pol [8]. Proveen el extremo 3' para iniciar la replicación. Son complementarios a la región amplificada permitiendo unirse a una de las dos hebras del ADN (forward Fw o revers Rv).

ADN Polimerasa	Enzima necesaria capaz de incorporar nucleótidos a la hebra molde, sintetizando nuevas cadenas de ADN complementarias, con los dNTPs disponibles. Se requiere que la enzima sea termoestable, con alta especificidad, sensibilidad, afinidad y actividad inmediata. Comúnmente se usa la taq polimerasa (<i>taq pol</i>).
Cloruro de magnesio (MgCl₂)	Funciona como un co-factor de la ADN polimerasa.
Buffer	Solución amortiguadora que mantiene el pH óptimo para la amplificación de ADN en cada ciclo.
dNTPs (2-desoxinucleósidos trifosfatados)	Conformados por las cuatro bases nucleotídicas, en concentración equimolar; 2 son bases nitrogenada ligada en N1 (pirimidinas: timina y citosina) y 2 bases nitrogenadas unidas al N9 (purinas: guanina y adenina) por un enlace glucosídico a 2'-desoxirribosa unida en la posición 5' o 3' a un grupo trifosfato [9]. Es el producto primario que necesita la polimerasa para sintetizar nuevas cadenas complementarias.

Una vez se tiene la mezcla (Mix) de los componentes previamente mencionados, las muestras se depositan en un termociclador, aparato implementado especialmente para esta técnica que permite los cambios de temperatura necesarios para cada proceso:

Desnaturalización inicial, donde los puentes de hidrógenos se rompen, provocando que la doble hélice del ADN blanco se separe en dos hebras, que posteriormente serán usadas como moldes, la temperatura generalmente implementada es de 94-95°C/30s-

1min (no se recomienda aumentar temperaturas mayores a 95°C ya que la enzima (*taq polimerasa*) decrece a partir de temperaturas mayores. El **alineamiento** consiste en disminuir la temperatura a una óptima (temperatura de alineamiento o Tm) donde los oligonucleótidos se unen específicamente a las hebras molde. La Tm y el tiempo dependerán de la concentración de G-C (50-60%) que contengan los oligonucleótidos, el número de bases (18-30pb) y la concentración de estos (5pmol preferentemente). Una vez se encuentren unidos a las hebras molde, se prosigue a aumentar la temperatura a 72°C (*taq pol* y la mayoría de las ADN polimerasas logran su mayor actividad a esta temperatura), permitiendo la síntesis de las nuevas cadenas de ADN por acción de la *Taq pol*, iniciando desde el extremo 3' del oligonucleótido. Esta amplificación se logra por la presencia de los DNTP's agregados, este paso es conocido como **elongación**, polimerización o amplificación [7].

Este proceso se repite en forma de ciclos, usualmente se realizan un total de 30 ciclos, si por cada ciclo tenemos 2n copias, entonces al alcanzar los 30 ciclos, tendríamos aproximadamente 2,147,483,648 de número de copias de nuestra secuencia de ADN o ARN deseada [10]. En el siguiente esquema se puede observar el proceso de la técnica de PCR empleado en un termociclador. Figura 2.

La PCR ofrece variantes para amplificar ADN de cualquier organismo y lo único requerido para el proceso son cantidades mínimas de DNA en la muestra para generar suficientes copias de la secuencia deseada [11]. Generalmente es aplicada para la clonación molecular, secuenciación del ADN, en mutagénesis *in vitro*, detección de mutaciones, clonación de ADNc y ADN genómico y alelotipificación [6], de hecho, se recalca que la electroforesis junto a la PCR marcó una nueva era en la biología molecular.



Figura 2. Protocolo de templado para PCR del modelo T100™ Thermal Cycler. (a) Paso 1. Desnaturalización inicial. (c) paso 2. Alineación de los oligonucleótidos. (d) Paso 3. Elongación o amplificación desde 3'. (e) Indica el número de ciclos al que es sometida la muestra (34X). (b) Desnaturalización seguida del primer ciclo, en este momento se repiten los pasos hasta concluir el número de ciclos. (f) Elongación final. (g) Temperatura final que se mantendrá hasta que se extrae la muestra del termociclador. Imagen extraída de: <https://www.bio-rad.com/es-mx/product/t100-thermal-cycler?ID=LGTWGIE8Z>

En el proceso de la síntesis de marcadores de peso molecular de ADN habitualmente se usan variantes de PCR, como la técnica de marcador sintetizado por PCR (PSM) [12], esta técnica de PCR combinada con el uso de enzimas de restricción, aprovecha la longitud de un plásmido de n pb para obtener otras bandas, dando lugar a marcadores

con diferentes tamaños de fragmentos de bajo y alto peso molecular [13]. Igualmente se pueden obtener fragmentos con tamaños exactos de n pb, como lo elaboró Gopalakrishnan y colaboradores mediante PCR multiplex [14].

Fundamento y aplicaciones de la electroforesis

Para corroborar la amplificación de un fragmento de ADN mediante PCR, una de las técnicas generalmente utilizada es la electroforesis, definida como un método que permite la separación de ADN, ARN o proteínas con el fin de visualizar, identificar o purificar segmentos específicos. La separación se consigue mediante un campo eléctrico; con el uso de una matriz; conformada por un electrodo negativo y uno positivo (cátodo y ánodo respectivamente). Para la separación de ADN o ARN es necesario ocupar componentes como TAE (Tris-Acetato-EDTA) o TBE (Tris-Borato-EDTA) medios de pH alcalino de 8 [15], con el fin de conservar a los grupos fosfatos ionizados, manteniendo la carga negativa de las moléculas de ADN o ARN. También es preciso ocupar un gel donde serán depositadas las muestras y un marcador de peso molecular utilizado como referencia. Al aplicar voltaje sobre la matriz, las muestras migrarán hacia el ánodo, dando como resultado la formación de diferentes bandas en el gel, acorde a la longitud, el tamaño y la estructura de las muestras [16].

Existen dos tipos de geles que son ocupados para la electroforesis: gel de agarosa, usado para separar tamaños de 100 pb hasta 25 kb (kilobases), y gel de poliacrilamida, para tamaños menores a 100 pb. El uso de cada uno dependerá de los objetivos y la capacidad de resolución que se requiere alcanzar. Regularmente es ocupado el gel de agarosa, polisacárido proveniente de algas marinas [17]. Es un polímero lineal compuesto de

residuos alternos de D- y L- galactosa unidos por enlaces glucosídicos $\alpha(1-3)$ y $\beta(1-4)$ [18].

Por otro lado, la poliacrilamida se compone de cadenas de monómeros de acrilamida ($\text{CH}_2 = \text{CH-CO-NH}_2$) que se entrecruzan con unidades de N, N 'metilenbisacrilamida ($\text{CH}_2 = \text{CHCO-NH-CH}_2\text{-NH-CO-CH-CH}_2$), la electroforesis en gel de poliacrilamida tiene un poder de resolución mucho mayor que la electroforesis en gel de agarosa, generalmente se ocupa para caracterizar proteínas, péptidos y ácidos nucleicos con bajo peso molecular, logrando separar cadenas de moléculas de ADN cuyo tamaño es muy cercano entre sí [16].

La concentración de agarosa o poliacrilamida están correlacionadas con la longitud de migración de las moléculas de DNA, RNA o proteínas: entre mayor concentración de agarosa contenida en el gel, el poro será de menor tamaño y aumentará el tiempo de migración de las muestras. Así, la tasa de migración de una muestra también dependerá de esta variante.

La preparación de las muestras previamente a la electroforesis es clave para obtener buenos resultados y por lo general, se hace uso de un buffer de carga con alta densidad, para que la muestra se retenga en el pozo donde es depositada, sin que esta quede dispersa en el buffer TAE o TBE (running buffer) que se usa como conducto para la migración de las partículas de la muestra. Generalmente se usa una solución glicerol-agua, mezclado con un colorante que hace visible el trayecto de las muestras durante la electroforesis, hay varias alternativas del colorante como el azul de bromofenol, xilencianol, por mencionar algunos [15].

Las bandas producidas se visualizarán con el uso de colorantes, estos se intercalan entre las bases nitrogenadas que emiten fluorescencia en presencia de rayos UV (a una

longitud de onda de 300 nm). El colorante puede ser aplicado durante la preparación de la muestra o directamente en el gel posterior a la electroforesis. Anteriormente, era común la tinción con bromuro de etidio (EtBr) pero debido a su mutagenicidad, la mayoría de los laboratorios ha suspendido su uso, actualmente existen otras alternativas con una mayor sensibilidad que el EtBr y fueron diseñados para usarse de la misma forma. GelRed es una opción asequible, que no cruza las membranas celulares, por lo tanto, no son tóxicos ni mutagénicos, esto debido a su mayor masa comparada con EtBr y a pesar de que, ralentiza el corrimiento del ADN, es recomendable su uso [19]. Se puede optar por la aplicación de otros productos similares como GelGreen o SYBR Green.

La aplicación de esta técnica incluye desde el mapeo de enfermedades genéticas [20], [21], diagnóstico de enfermedades crónicas provocadas por infecciones bacterianas [22] o mutaciones genéticas puntuales [23]; hasta el reconocimiento en la microbiota de géneros bacterianos como *Lactobacillus* en humanos [24] o en animales [25] mediante uso de genes específicos para el diagnóstico de enfermedades donde son determinadas las diferencias entre microbiotas de individuos sanos y enfermos; identificación de comunidades dominantes en la rizosfera de un suelo [26] o ambiente en particular [27]; permitiendo medir la diversidad y abundancia de genes [28]. Es importante recalcar que las aplicaciones no se verán limitadas a un campo en particular.

Estrategias para obtener marcadores de peso molecular de ADN

Durante la electroforesis ya sea de proteínas o ADN, es indispensable el uso de marcadores de peso molecular (*Molecular weight markers*, en inglés), en áreas como la biotecnología, bioquímica y biología molecular. Los marcadores de peso molecular de proteínas están constituidos de péptidos de distintos pesos moleculares con tamaño, forma y fuerza iónica conocidas, mientras que los marcadores de peso molecular de ADN contienen diversos fragmentos de distinta longitud de nucleótidos [15], [29], [30]. Ambos

marcadores se constituyen de ADN o proteínas patrón, de los que sus tamaños son conocidos, permitiendo una comparación respecto a una muestra de la misma naturaleza, derivados de otros procesos como purificaciones, extracciones, PCR, transformaciones, digestiones, entre otros.

Debido a su gran utilidad y practicidad, han surgido diversas metodologías para obtenerlos, desarrolladas con el objetivo de optimizar el proceso de elaboración, haciéndolos accesibles para el presupuesto de laboratorios y empresas emergentes. Abbasian y colaboradores [31], dividen los marcadores de peso molecular en dos tipos: marcadores de peso molecular tipo I; aquellos producidos por digestión enzimática en plásmidos de *Escherichia coli*, DNA genómico de bacteriófagos, o cualquier organismo conocido y previamente secuenciado, no obstante, esta alternativa presenta patrones poco uniformes, donde el tamaño y número de bandas dependen de la frecuencia de los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción. Generalmente en este tipo de marcadores se hace uso de enzimas de restricción accesibles como *Eco RI*. En segundo lugar, se encuentran los marcadores de peso molecular tipo II, marcadores de tamaño molecular o escaleras de ADN (*DNA Ladder*, en inglés), estos tienen numerosas bandas que incrementan su tamaño exponencialmente en intervalos regulares [32], permitiendo concentraciones que se visualizan en bandas uniformes y actualmente son los más comercializados. Generalmente son desarrollados mediante las siguientes estrategias mostradas en la *figura 3*.

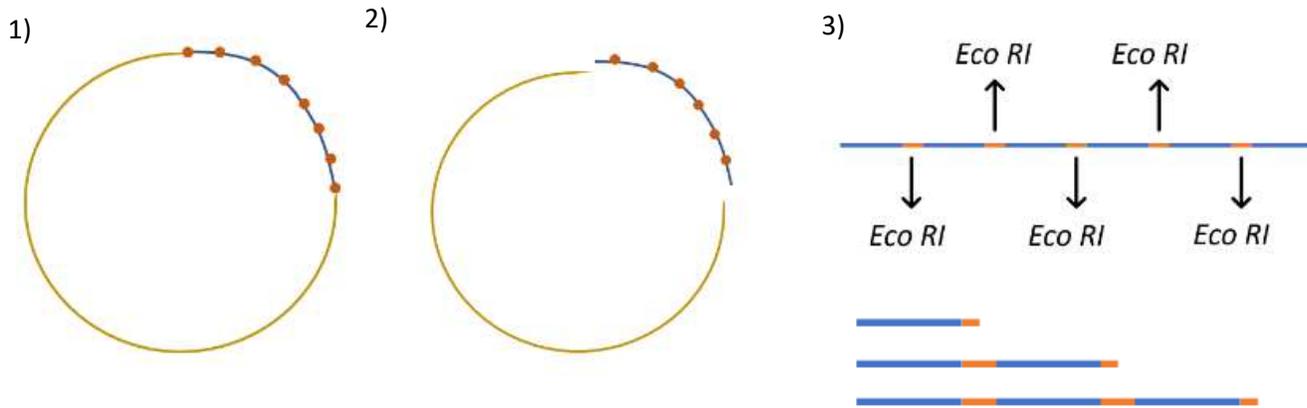


Figura 3. Estrategias básicas para la producción de marcadores de peso molecular tipo II [31]. 1) Ligación de subunidades sin clonar en concatémeros. 2) Post-clonación: se digiere por restricción parcial el inserto del vector. 3) Se realiza una digestión de restricción parcial del inserto, sin el ADN plasmídico, dando como resultado numerosos fragmentos con tamaños conocidos.

Actualmente, los vectores más ocupados para obtener los marcadores de peso molecular de ADN son: pbr32 pUC 18, pUC 19 de *E.coli*. Debido a su practicidad y fácil aceptación durante la transformación en células competentes. Sin embargo, también existen plásmidos artificiales que se han hecho con el fin de transferir material genético de manera exitosa, mostrando un mayor manejo y manipulación al momento de insertar y transformar las células [12]. El inserto puede ser requerido o no dependiendo de la obtención del marcador, si se usan únicamente enzimas de restricción, no será necesario, siempre y cuando se cuente con un mapeo de restricción. Si es requerido, el inserto será derivado de cualquier microorganismo o sintetizado *in novo*, con la única condición de que su secuencia sea conocida.

***Pseudomonas* como punto de partida para la generación de un marcador de peso molecular**

Partiendo de esta premisa, “toda secuencia previamente conocida de cualquier organismo o sintetizadas son capaces de ejercer como componente de nuevos marcadores de peso molecular”, en este trabajo se seleccionaron secuencias conocidas de ADN, del género *Pseudomonas*, que codifican para diversos genes para la generación de un nuevo marcador de peso molecular:

katA (102pb) es un gen que codifica a la catalasa encargada mayormente de generar la respuesta de estrés oxidativo y osmótico en *Pseudomonas aeruginosa* PA14, permitiendo la adaptación y supervivencia en ambientes hostiles y desfavorables [33]. rpoB (508pb) gen constitutivo o “*Housekeeping*” en inglés, que codifica la subunidad β de la RNA polimerasa, crucial para el proceso de transcripción, siendo el objetivo final para las vías de regulación que controlan la expresión génica en todos los organismos, ha sido ampliamente aplicado para la identificación y análisis filogenético [34], [35]. gyrB (586) pb gen que codifica a la subunidad b de la proteína girasa que forma parte de la DNA topoisomerosa tipo II, esencial para la replicación, encontrada en diversas especies de bacteria, Actualmente se aplica en estudios filogenéticos para géneros como *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Mycobacterium*, entre otras [36]–[39]. rpoD (695pb) es un gen constitutivo que codifica el factor sigma principal de la RNA polimerasa, es usado para análisis filogenético (como gyrB, rpoD ofreciendo una alta resolución para identificar a *Pseudomonas*, en comparación a cuando se utiliza la secuenciación de solo el 16S rRNA) de la rizósfera promotora del crecimiento en plantas [40], [41]. phlD (745pb) gen responsable de codificar una policétido sintasa para la síntesis del monoacetilfloroglucino (MAPG) precursor de 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), componente antifúngico producido por diferentes cepas de *Pseudomonas*: *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. protegens*, *P. putida* y *P. brassicacearum* siendo la

primera la especie más reportada. [42]–[44]. *lIpA* (841pb) lectin-like putidacin A, por sus siglas en inglés, es un gen que codifica una bacteriocina reportada hasta ahora en cepas de interés como *P. putida* y *P. fluorescens* con potencial de uso como control de agentes biológicos [45,46], *rrs* (1500pb) o 16S ribosomal RNA es un gen que se encuentra en la mitocondria y codifica a la subunidad I del citocromo c oxidasa (COI). Se usa ampliamente para la clasificación e identificación en estudios filogenéticos y taxonómicos [16,17]. *plt* (2444pb) es la secuencia más extensa, el gen codifica a pioluterina, una bacteriocina encontrada en distintas cepas de *P. fluorescens*, actúa como inhibidor de patógenos en plantas [49].

ANTECEDENTES

El desarrollo y la publicación respecto a marcadores de peso molecular usando oligonucleótidos data desde los años 90 hasta la actualidad, varias de las publicaciones expuestas, muestran un mejoramiento en los protocolos y las técnicas de elaboración, haciéndolos cada vez más sofisticados y eficientes. A continuación, en la Tabla 2, se muestran los marcadores de peso molecular que se han propuesto y publicado hasta la actualidad con una breve descripción.

Tabla 2. Marcadores de peso molecular reportados en artículos científicos.

Título	Descripción	Referencia
--------	-------------	------------

<p>Síntesis dirigida por oligonucleótidos de un marcador de peso molecular.</p>	<p>Proponen un método de síntesis dirigida por oligonucleótidos de marcadores (MPDS) que implica la amplificación de una diana (blanco o fragmento de ADN) de ADN con dos conjuntos diferentes de oligonucleótidos que definen la longitud de los fragmentos. Se sintetizó un marcador de 6 fragmentos que varía de 90 a 204 pb útil para la clasificación de microsatélites.</p>	<p>[50]</p>
<hr/>		
<p>Preparación de marcadores de ADN basados en ADN plasmídico de E. coli.</p>	<p>Utilizaron el ADN lineal de los plásmidos de <i>E. coli</i>: pUC-18, preS1-S, p-15 y pYI dando como resultado el marcador de plásmido M1. Con un tamaño de 3.2 kb a 11.5 kb dividido en 4 fragmentos representado por cada plásmido. Afirmando que el ADN plasmídico en la conformación lineal es el necesario para los marcadores, por la migración durante la electroforesis.</p>	<p>[51]</p>
<hr/>		
<p>Método sencillo para la producción de un marcador de ADN casera en todos los laboratorios.</p>	<p>Utilizaron técnicas de PCR y bioinformática para sintetizar 14 fragmentos de ADN que van desde 100 a 3 kb. Primero se diseñaron los oligonucleótidos para la amplificación de fragmentos en un solo programa de PCR sin ningún subproducto ni paso de purificación.</p>	<p>[31]</p>

Producción en laboratorio de marcadores de peso molecular de ADN de 100 pares de bases. Reportaron el método llamado marcador de sintetizado por PCR (PSM) para generar marcadores moleculares (*DNA ladder*) de ADN de bajo peso molecular (100 pb a 1 kb) mediante PCR. [12]

Construcción de un rango de marcador de ADN para el fago Lambda mediante PCR multiplex. Se obtuvo un marcador de peso molecular de ADN con base en la técnica de PCR multiplex, donde se amplificaron diferentes longitudes de fragmentos de ADN utilizando pares de oligonucleótidos diseñados de acuerdo con la extensión de la secuencia 1216-2136 del ADN del fago lambda, amplificando en sitios blanco particulares mediante el uso de 1 oligonucleótido directo (*forward*) y 6 oligonucleótidos inversos (*reverse*) para 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 pb. [14]

Preparación de un marcador de ADN basada en la técnica de PCR multiplex. Mediante PCR multiplex se obtuvo un marcador de peso molecular de ADN amplificando fragmentos de ADN de 100 pb a 1 kb utilizando 10 oligonucleótidos con el mismo sentido, diseñados según la posición 6631~7630 del ADN lambda. Estos fragmentos se amplificaron mediante Touchdown PCR (caracterizado por utilizar altas temperaturas de alineamiento y por lo tanto alta especificidad de unión del oligonucleótido al templado) combinado con Hot Start PCR (inicia con temperaturas altas de desnaturalización para evitar dimerización de oligonucleótidos e inespecificidad de su unión al templado).

[52]

Procedimiento sencillo para la producción en laboratorio de un marcador de ADN. En este estudio, presentamos un nuevo procedimiento para preparar un marcador de peso molecular de ADN con un tamaño de 100 pb a 1kb. Los fragmentos de ADN de 100 pb con un sitio de restricción único en ambos extremos se autoligaron para crear una repetición en *tándem*. Una vez clonada, la repetición en *tándem* se amplificó rápidamente mediante PCR y se digirió parcialmente mediante enzimas de restricción para producir un marcador que contenía múltiplos de los fragmentos de ADN repetidos, ofreciendo un producto simple, ahorrativo y económico en comparación con los comerciales.

[13]

Construcción de un vector sintético para la preparación de un marcador de ADN (DNA ladder) de 100 pares de bases. Describen la construcción de un plásmido sintético que produce un marcador de ADN de bajo peso molecular (100 bp-1kb) clonado en el plásmido pTZ57R, por digestión de una enzima de restricción *EcoRV*, utilizando el reconocimiento de los sitios de restricción *BamHI* y *BglII*, de esta manera, liberando los fragmentos de plásmido recombinante. [29]

Un nuevo método combinado para la producción de marcadores de ADN (DNA ladders) en función del costo-beneficio. Se utilizó una combinación de dos métodos: digestión con enzimas de restricción y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para obtener dos marcadores de peso molecular, 100 pb y 1 kb respectivamente. El proceso de digestión enzimática se basó en el diseño y construcción de plásmidos que igualaran en tamaño a las bandas en escala, produciendo los fragmentos de ADN por linealización del plásmido pTZ57T / A por digestión. [32]

<p>Los plásmidos pPSU para generar marcadores de peso molecular de ADN.</p>	<p>Se crearon los plásmidos pPSU1 y pPSU2 para los marcadores de peso molecular que permiten producir marcadores de ADN de 100 bp y 1 kb, proporcionando fragmentos de referencia de 50 hasta 10kb a una fracción del coste de los marcadores de ADN comerciales. Lograron una migración adecuada tanto de geles en agarosa como en poliacrilamida nativa. Se clonaron exitosamente los plásmidos en <i>E. coli</i> y la obtención del marcador se da con el uso de una enzima de restricción (<i>Pst</i>I), optimizando su producción. Esto supone la obtención de marcadores de peso molecular de alta calidad y bajo costo disponibles de forma gratuita.</p>	<p>[53]</p>
--	--	-------------

JUSTIFICACIÓN

Frente a la situación económica del país, depender de tecnología extranjera se ha vuelto poco accesible para los grupos de investigación. Por ello, resulta indispensable definir estrategias para estimular la innovación y el desarrollo tecnológico.

En los laboratorios de Biología Molecular, los marcadores de peso molecular son una herramienta necesaria para estimar la cantidad, calidad y tamaño de una muestra de

ADN. Sin embargo, su uso resulta relativamente costoso. Como estrategia para economizar el uso de estos reactivos, se han reportado protocolos de investigación para la elaboración de marcadores de peso molecular en el laboratorio; desafortunadamente, los protocolos pueden resultar largos y laboriosos.

Además, la mayoría de los protocolos destinados para su producción han sido patentados o han presentado intereses comerciales, dificultando el acceso de pequeños laboratorios.

Con la elaboración de un nuevo marcador de peso molecular, se busca reemplazar parcialmente el uso de los marcadores comerciales con fines educativos o de investigación, implementando una técnica más eficiente y de menor costo que favorezca la economía del campo científico.

Los marcadores son comercializados por diferentes compañías como Sigma, Roche, Life Technologies, Promega, entre otras, sin embargo, pese a la demanda que tienen, los precios siguen siendo elevados para laboratorios con fondos limitados, es por ello que el presente proyecto, brinda una alternativa para poder sintetizar un marcador de peso molecular para su posterior uso en el Laboratorio de Ecología Molecular con el fin de disminuir el gasto que representa obtenerlos de manera comercial.

HIPÓTESIS

Se puede generar un marcador de peso molecular accesible haciendo uso de: PCR, electroforesis y un vector de clonación, que nos permita identificar y clonar ocho genes específicos, previamente secuenciados, presentes en *Pseudomonas* y, que sirva como alternativa o complemento para corroborar resultados derivados de otros métodos.

El marcador resultante tendrá una densidad y corrimiento durante la electroforesis uniforme, mediante el protocolo propuesto y será por lo tanto, de gran utilidad en laboratorios que opten por alternativas económicas pero funcionales de marcadores de peso molecular de ADN.

OBJETIVOS

Objetivo general

Generar un marcador de peso molecular que sea aplicable en ensayos de electroforesis de ADN versátil y de bajo costo de producción.

Objetivos particulares

1. Diseñar un protocolo para la elaboración de un marcador de peso molecular, funcional, versátil y con bajo costo de producción.
2. Seleccionar fragmentos de ADN que sean de interés para la generación del marcador de peso molecular.
3. Optimizar el proceso de amplificación de los genes seleccionados mediante la técnica de PCR.
4. Utilización del marcador de peso molecular como herramienta en la identificación de genes específicos del género *Pseudomonas*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos empleados

En el siguiente trabajo se extrajo material genómico de un cultivo líquido con 24h de incubación u “overnight” de *Pseudomonas putida* KT2440 y *P. protegens* EMM1 donados por el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la BUAP. Para las transformaciones se utilizaron cepas competentes de *E.coli* DH5- α , cepa bacteriana ampliamente utilizada en amplificación y recombinación de ADN. Las condiciones de crecimiento se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de crecimiento de los microorganismos utilizados en el presente trabajo.

Microorganismo	Medio de cultivo	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación	Agitación
<i>P. putida</i> KT244	LB + Cm ¹⁰⁰	30 °C	24 h	200 rpm
<i>P. protegens</i> EMM1	LB Cm ¹⁰⁰	30 °C	24 h	200 rpm
<i>E. coli</i> DH5- α	LB + NaI ¹⁰	37°C	24 h	200-250 rpm

Vector utilizado en las ligaciones

Para las transformaciones se utilizó el vector pGEM-T Easy Vector System I de Promega, vector artificial, linearizado con una base de timina en cada uno de los extremos terminales 3', así el inserto amplificado es capaz de unirse después de ser amplificado por la polimesa *taq pol*, que añade una adenina en cada extremo 3' al finalizar cada amplificación. Figura 4. La T4 ligasa reconoce las adeninas y los empalma exitosamente al vector que contiene las colas de timina en sus extremos. La concentración del vector es de 50 ng/μl.

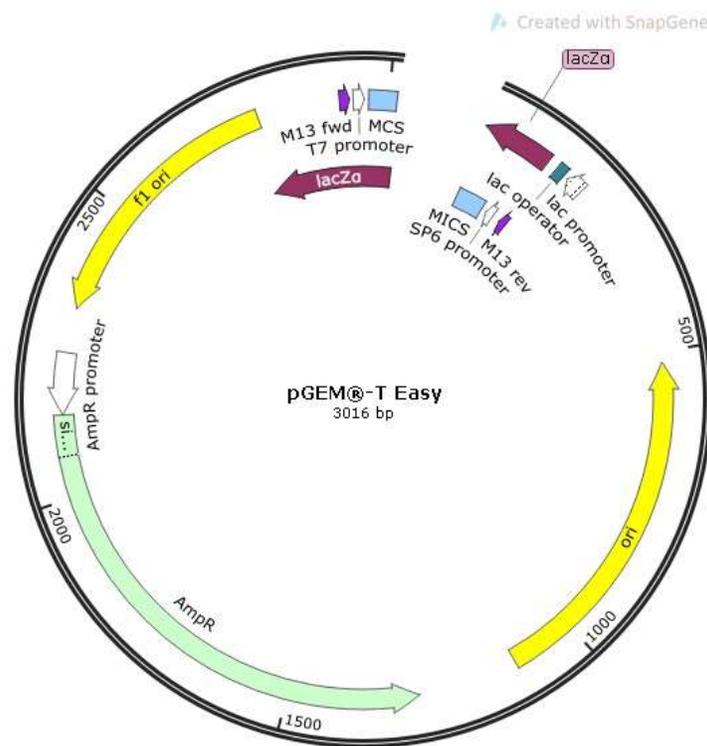


Figura 4. Plásmido pGEM[®]-T Easy. Imagen del plásmido generado en SnapGene, secuencia tomada del protocolo pGEM-T Easy Vector System I: <https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector->

systems/?catNum=A1360. El plásmido con un tamaño de 3,016 pb, contiene un gen de resistencia a ampicilina y el gen *lacZ* interrumpido por dos timinas en cada extremo 3', presentándose linearizado.

Extracción de ADN genómico en *P. putida* KT2440 y *P. protegens* EMM1

La extracción de ADN se realizó con el protocolo Kit Wizard Genomic DNA purification PROMEGA para bacterias Gram negativas. Se centrifugó 1 mililitro (ml) de cultivo incubado toda la noche en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml por 2 minutos (min) a 14,000 revoluciones por minuto (rpm) desechando el sobrenadante. Se repite dos veces el proceso para obtener mayor cantidad de *pellet* (paquete) celular. Posteriormente se hizo una lisis celular, agregando 600 µl de “*Nuclei Lysis Solution*” sobre el *pellet* y mezclando. Se incubó por 5 min a 80°C y se enfrió a temperatura ambiente (TA). Se agregaron 3 µl de RNAsa, mezclando vigorosamente, se incubó a 37°C por un rango de 15 a 16 min. La precipitación de proteínas se consiguió vertiendo 200 µl de “*Protein Precipitation Solution*” y agitando con un vortex por 30 segundos (s), se incubó en hielo de 5 a 7 minutos. Después se centrifugó durante 3 min a 14,000 rpm y se transfirió a hielo por 7 min. Para la precipitación y rehidratación del DNA se transfirió el sobrenadante a un tubo con 600 µl de isopropanol a TA y se mezcló. Se centrifugó por 2 min a 14,000 rpm y se desecha el sobrenadante. Se agregaron 600 µl etanol al 70%, se mezcló y centrifugó por 2 min (14,000 rpm), se desechó el sobrenadante. Finalmente se dejó evaporar los residuos de etanol restantes en una estufa por 30 min y se rehidrató con 50 µl de “*Rehidratation Solution*” por 1h a 65°C o toda la noche a 4°C. Conservando el ADN a -20°C.

Diseño de oligonucleótidos para fragmentos de 102 pb a 2.4 kb

Se diseñaron ocho pares de oligonucleótidos sintetizados en la Unidad de Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Biotecnología de la UNAM (<http://www.ibt.unam.mx/sintesis>) que codifican a genes altamente conservados en los microorganismos. Tabla 3.

Tabla 4. Oligonucleótidos seleccionados para la generación de un marcador de 100 pb a 2,444 pb.

Gen que amplifica (producto)	Oligo-nucleótidos	Secuencia 5' □ 3'	Tamaño (pb)	Genoma
<i>katA</i> ** (Catalasa)	KatA-F KatA-R	CTTCATTCGCGACCCACTTA GACCAGAAGTCCCACATCATC**	102	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440
<i>rpoB</i> * RNA polimerasa subunidad B (K)	rpoBf1 rpoBr1	CAGTTCATGGACCAGAACAACCCGCT CCCATCAACGCACGGTTGGCGTC	508	<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>gyrB</i> * subunidad B (L) DNA girasa	gyrBf gyrBr2	TTCAGCTGGGACATCCTGGCCAA TCGATCATCTTGCCGACRACCA	586	<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>rpoD</i> * RNA polimerasa subunidad D (K)	rpoDf rpoDr	ACTTCCCTGGCACGGTTGACCA TCGACATGCGACGGTTGATGTC	695	<i>Pseudomonas</i> sp.

<i>phlD</i> * (2,4 DAPG)	Phl2a (F) Phl2b (R)	GAGGACGTCGAAGACCACCA ACCGCAGCATCGTGTATGAG	745	<i>Pseudomonas protegens</i>
<i>llpA</i> * (bacteriocina LlpA)	PF-F PF-R	ATGGCTTGGATTGATACGAC TTAGAACACGTTGTCCCAGGTG	841	<i>Pseudomonas protegens</i>
<i>rrs</i> (16Sr DNA) [54]	fD1 rD1	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGTAT CCTGGCTCAG CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGAT CCAGCC	1500	<i>Pseudomonas</i> sp, <i>Klebsiella</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp.
<i>plt</i> * (pioluteorina)	catplt (F) pltR (R)	GCAGCAGCGTCAATGATGAAC CATGCTCGCGCTCGAACAGTTC	2444	<i>Pseudomonas protegens</i>

Cesa-Luna*, López-Cruz**. (Comunicación personal, 2019).

Amplificación de los fragmentos *KatA*, *rpoB*, *gyrB*, *rpoD*, *phlD*, *llpA*, *rrs* y *plt* mediante PCR

Para amplificar los fragmentos deseados se usó el kit de Promega GoTaq® Green y el equipo 100TM Thermal Cycler. Se ocupó un volumen total de 50 µl por cada microtubo de 0.2 ml. Tres réplicas por gen fueron realizadas con su respectivo control negativo para asegurar la especificidad de los oligonucleótidos. Los oligonucleótidos se ajustaron a una concentración de 5 a 10 pmol/ µl y se amplificaron los fragmentos de ADN en las

condiciones representadas en la tabla 4, con una elongación final de 72°C/10 min y temperatura final de 10°C/∞. El resultado de la amplificación fue verificado por electroforesis en gel de agarosa al 1% (80V/10min) (100V/40min), se le añadió GelRed® (Biotium) para su visualización en un transiluminador de rayos UV. Figura 5A.

Tabla 5. Condiciones de PCR para cada gen amplificado

Gen amplificado	Desnaturalización inicial	Alineamiento	Elongación	Desnaturalización después del primer ciclo
<i>katA</i>	95°C/2min	Tm 63°C/45s	72°C/30s	95°C/1min
<i>rpoB</i>	95°C/2min	Tm 60°C/45s	72°C/30s	94°C/1min
<i>gyrB</i>	94°C/2min	Tm 65°C/45s	72°C/30s	94°C/1min
<i>rpoD</i>	95°C/2min	Tm 60°C/45s	72°C/30s	94°C/1min
<i>phlD</i>	94°C/2min	Tm 65°C/45s	72°C/30s	94°C/1min
<i>llpa</i>	94°C/2min	Tm 60°C/45s	72°C/1min	94°C/30s
<i>rrs</i>	95°C/5min	Tm 52°C/45s	72°C/1.5 min	95°C/30s
<i>plt</i>	94°C/2min	Tm 60°C/45s	72°C/1min	94°C/30s
Condiciones para amplificación de GEMT-U y EMT-D [15]				
Oligonucleótidos generales para vector pGEM-T Easy	94°C/2min	Tm 50°C/15s	72°C/1min	94°C/15s

Purificación y cuantificación de fragmentos de ADN

Posterior a obtener los productos de PCR se purificaron los fragmentos siguiendo el protocolo *High Pure PCR Product Purification Kit; Purification of DNA Fragments from Agarose Gel* de la compañía Sigma-Aldrich. Una vez terminado el proceso se cuantificó en Nanodrop la concentración del DNA (ng/μl) y se registró la absorbancia para medir la pureza y calidad del ADN a una absorbancia de A_{260}/A_{280} .

Células competentes

Elaboración de células competentes *Escherichia coli* DH5-α

De un cultivo madre se extrajo una alícuota de *Escherichia coli* DH5α diluida en una proporción de 1:100 en un cultivo estéril de LB con Ácido Nalidixico (Nal30) para evitar riesgos de contaminación. Se incubó a 37°C durante 2 horas a 250 rpm. Se midió la densidad óptica con un espectrofotómetro (EQUIPO) ajustada a 600 nm (DO_{600}) con el fin de cuantificar la biomasa de la alícuota (se recomienda que la densidad de biomasa se encuentre en un rango de 0.4 a 0.7). El cultivo fue sometido a un baño de frío por 30 minutos y se centrifugó a 10 rpm por 10 min durante 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 50 ml de CaCl₂ 0.1M. Se incubó en hielo durante 2h. Se centrifugó por 10 min descartando el sobrenadante y se agregaron 5ml de CaCl₂ 0.1M y 850 μl de glicerol estéril. Se mezcló y finalmente se elaboraron alícuotas de 100 μl y se almacenaron a una temperatura de -20°C.

Transformación de *Escherichia coli* DH5- α

Las células competentes se sometieron a un baño de hielo, se agregaron 10 μ l de cada ligación en cada alícuota de 100 μ l. Se incubó durante 30 min y cada alícuota fue sometida a un choque térmico de 42°C por 2 min y depositadas en hielo durante 5 min. Se incubaron a 37°C en LB estéril (1ml) por 1 hora. Se procedió a platear 500 μ l de cultivo en cajas Petri con LB sólido con ampicilina Amp¹⁵⁰ y NaI³⁰. Se obtuvo una réplica de cada tubo que contenía una ligación.

Ligación de *KatA*, *rpoB*, *gyrB*, *rpoD*, *phlD*, *llpA*, *rrs* y *Plt*

Cada uno de los genes amplificados por PCR (*KatA*, *rpoB*, *gyrB*, *rpoD*, *phlD*, *llpA*, *rrs* y *Plt*) se ligaron al vector pGEM-T Easy Vector System I, con ayuda de la enzima T4 ADN ligasa, obteniendo un total de 8 ligaciones (Tabla 6). La concentración del inserto fue de 3:1 respecto al plásmido empleado y por cada ligación se utilizaron 50 ng/ μ l del plásmido pGem-T easy.

Tabla 6. Concentración y volumen empleado en las ligaciones

Gen	Concentración del inserto 3:1 (ng/ μ l) respecto al vector	μ l del inserto por cada μ l del vector (50 ng/ μ l)
<i>katA</i>	5.075	0.13
<i>rpoB</i>	25.27	0.40
<i>gyrB</i>	29.15	0.88
<i>rpoD</i>	34.58	0.47

<i>phlD</i>	37.06	1.32
<i>llpA</i>	41.84	0.45
<i>rrs</i>	74.63	0.97
<i>plt</i>	121.6	1.79

Una vez listas las células competentes de *Escherichia coli* DH5- α y las ligaciones de los genes respectivos en el pGEM-T Easy Vector System I, se procedió a descongelar en hielo células competentes (100 μ l por alícuota), donde se agregaron 8 μ l de ligación.

Transformación de *Escherichia coli* DH5- α

Las células competentes de *E. coli* DH5- α resuspendidas con cada reacción de ligación se mantuvieron en hielo durante 30 min. Después se llevaron a una temperatura de 42°C durante 45 s, transcurrido el tiempo se depositan en hielo nuevamente durante 5 min y se incubaron a 37°C con agitación en 200 μ l de medio LB líquido sin antibiótico durante 1 h. Se repitió el mismo procedimiento para cada reacción de ligación.

Plateo en medio LB sólido

Se platearon 100 μ l de cada transformación en cajas Petri con medio selectivo sólido de LB Amp¹⁵⁰ y NaI³⁰. Se incubaron a 37°C durante 24 h. Durante el proceso de transformación se incluyó un control negativo en cada proceso para verificar la correcta manipulación y funcionamiento de los protocolos y reactivos.

Detección y amplificación de los genes *katA*, *rpoB*, *gyrB*, *rpoD*, *phlD*, *llpA*, *rrs* y *Plt* por PCR de colonia

De las colonias que crecieron en el medio sólido con antibiótico, se seleccionaron colonias al azar para detectar el fragmento de interés clonado, mediante PCR de colonia

(Figura 6). La amplificación por PCR de colonia se llevó a cabo con el el kit de Promega GoTaq® Green y el equipo T100™ Thermal Cycler. y el equipo T100™ Thermal Cycler. Se seleccionaron 5 colonias de cada transformación, como potenciales portadoras del plásmido pGEM-T Easy Vector System I. Se aisló cada colonia en una nueva caja Petri con LB Amp¹⁰⁰ sólido para confirmar la resistencia de las cepas, poniendo como control negativo a *Eschericia coli* DH5α, siendo incapaz de crecer en medios con ampicilina.

Se incubaron durante 24 h y posteriormente en microtubos conteniendo la mezcla del kit Master Mix y los oligonucleótidos específicos, se agrego, de manera individual y con ayuda de palillos estériles, tres colonias diferentes por cada fragmento de gen clonado, amplificando por PCR directamente las muestras sin pasar por un proceso de purificación de ADN templado. En cada proceso de PCR se añadió un control negativo para evitar cualquier riesgo de contaminación. Se verificaron los resultados de las reacciones de PCR con un ensayo de electroforesis (0.5 agarosa, 50ml TAE, 1ul de RedGel, 80V/10min,100V/40min).

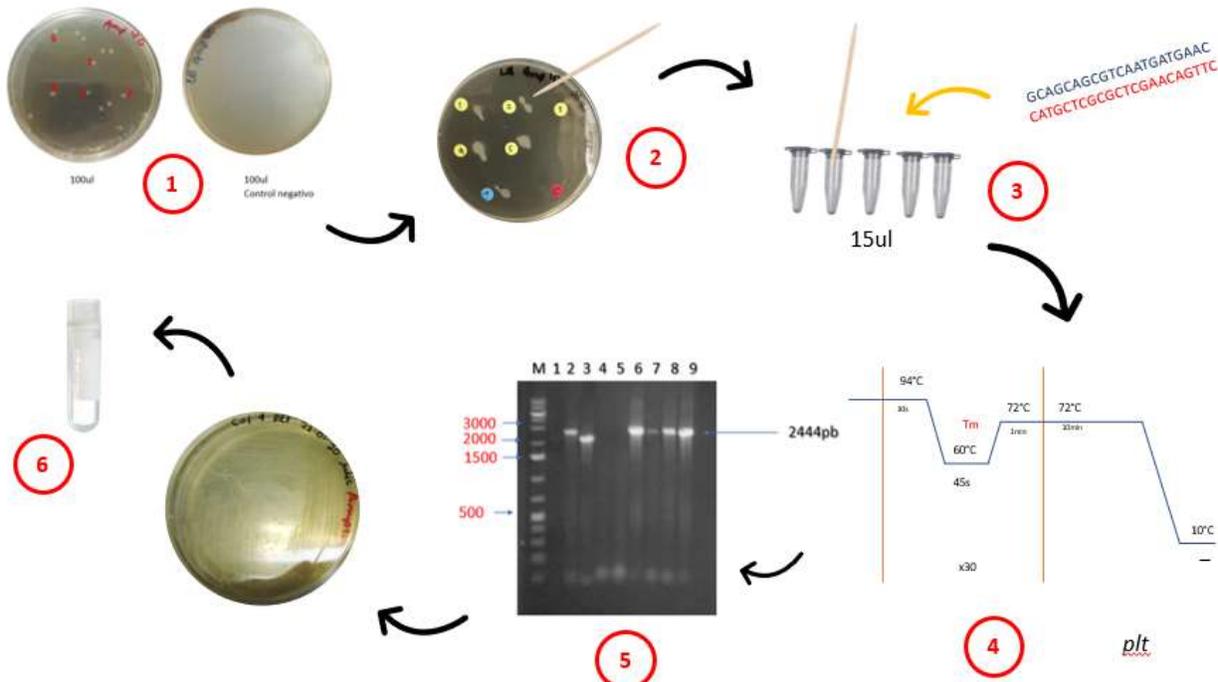


Figura 5. PCR de colonia. (1) Selección de colonias. (2) Re-siembra de colonias. (3) Preparación de Mix para PCR con los oligonucleótidos específicos. (4) PCR. (5) Electroforesis de verificación (6) Re-siembra. (7) Guardar colonias seleccionadas en glicerol criogénicos.

PCR de colonia con oligonucleótidos específicos para pGEM-T Easy Vector

Una vez demostrada la presencia de los genes en *E. Coli* DH5 α , con oligonucleótidos específicos de cada gen, se procedió a la amplificación de cada gen pero ahora con oligonucleótidos específicos de vector, reportados previamente por Chang y colaboradores [12]; GEMT-U (5'-TAATACGACTCACTATAGGGCGAATTG-3'). Y EMT-D (5'-ACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTGTGAT-3'). Se hicieron tres réplicas de este proceso por cada transformación conseguida junto a un control negativo.

A partir de los fragmentos conseguidos, se realizó una segunda amplificación donde se consiguen los fragmentos que forman parte de los marcadores de peso molecular propuestos.

Preparación de gliceroles

Posterior a la comprobación de la presencia del plásmido y del fragmento del gen de interés, se aseguraron los cultivos respectivos de cada gen, con el uso de glicerol estéril al 100% y en tubos criogénicos de 2 ml. Se agregó 1 ml de células transformadas (en LB estéril) mezclado con 1 ml de glicerol al 100% estéril. Este proceso se realizó para cada vector conteniendo a cada fragmento de gen de interés y en condiciones de campana para conservar esterilidad. Finalmente se conservan a -20°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de marcadores de peso molecular de ADN comerciales

Los marcadores de peso molecular son insumos que se pueden adquirir con un proveedor o directamente con la compañía que los fabrica.

A continuación, en la tabla comparativa (tabla 7) se muestra una lista de marcadores de peso moleculares de ADN comerciales con los rangos de los fragmentos obtenidos, donde se compara el precio, concentración, tamaño y número de aplicaciones, siendo estos los valores considerados para su compra.

La transparencia de un producto es uno de los factores más importantes que se tiene que considerar para su venta, así como el tiempo que tarda el cliente en adquirirlo. La muestra del precio entonces es esencial, sin embargo, existen compañías que no lo reflejan sin una previa cotización, dificultando la selección y por lo tanto la compra del producto ya que pueden transcurrir días para obtenerla. Otra desventaja se presenta posterior a la

cotización, puesto que el envío muchas veces puede ser costoso, más aún si el producto debe ser importado.

Existen marcas mexicanas que manejan este tipo de productos, empero, también presentan problemas de transparencia y tiempos de cotización. Cabe destacar que la selección de estos productos es limitada en comparación a los que ofrecen las empresas extranjeras, pero son más baratos y por lo tanto más accesibles.

Se observa que el rango de volumen varía, de 50 a 300 μg , el volumen final que se considera en el producto propuesto es de 50 μg . La concentración varía desde los 50 $\mu\text{g/ml}$ hasta los 500 $\mu\text{g/ml}$, una diferencia significativa que se logra percibir por la cantidad de producto que se añade en cada línea de gel que se requiere para visualizar las bandas del marcador cuando se realiza la electroforesis, afectando directamente el número de aplicaciones.

Las aplicaciones se encuentran en un rango de 50 a 500, siendo MP50 PUC19/Msp I el producto que ofrece mayor número de aplicaciones, esto debido a la concentración del producto y la manera en que se obtuvo (mediante una digestión por endonucleasa de restricción MspI del plásmido PUC19, plásmido encontrado comúnmente en E.coli y estudiado ampliamente), por lo tanto el costo es menor. Entonces el precio de un marcador se eleva en ocasiones por el número de fragmentos empleados y la técnica empleada para obtenerlo, por ejemplo; BenchTop 100bp DNA Ladder con un volumen total de 300 μg , y con un número de 50 aplicaciones, es una mezcla de fragmentos preparada por escisión de un plásmido construido con endonucleasas de restricción [64], por ende el marcador puede contar con un mayor precio, no sólo por la metodología empleada, sino también por la aplicación de la propiedad industrial, a pesar de que la calidad sea la misma o menor.

Las marcas comerciales se han estandarizado, ofreciendo un aproximado de 50 a 100 aplicaciones. La cantidad ocupada para cada línea o carril de gel puede ser desde el uso de 1 μg hasta 6 μg . Esto dependerá del tamaño del pozo.

Los marcadores comerciales ofertan su producto en un rango de \$1,000 hasta \$3,204 MXN. Se remarca el precio del marcador que oferta BioTecMol, siendo el único producto nacional encontrado y el más accesible dentro de la lista, pero la menos conocida. La tecnología extranjera suele ser menos accesible en precio, por costos de exportación y aranceles, pero fácilmente seleccionada por consumidores en comparación con la marca nacional. Esto en su mayoría por el rango de tamaño de los fragmentos que ofrecen, pero también a la confianza y el prestigio de las compañías transnacionales que son otorgadas por el consumidor, así como los usos reportados en diferentes publicaciones científicas que los avalan.

Tabla 7. Marcadores comerciales de empresas reconocidas

Marcador	Empresa	Precio (MXN)	Concentración	Tamaño	Rango de tamaño	Aplicaciones	Referencia
DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder)	Sigma-Aldrich	\$ 3,236.00	250 µg/ml	50 µg	100 a 1500 bp y una banda de 2642 bp	50	[62]
100 bp DNA Ladder	New England BioLabs Inc.	\$ 1,371.90	500 µg/ml	100 µg	100 bp a 1,517 bp	100	[63]
BenchTop 100bp DNA Ladder	Promega	\$ 3,204.95	250 µg/ml	300 µg	100 bp a 1,000 bp y una banda de 1500 bp	50	[64]

Estándar de ADN GeneRuler™ 100 bp	TermoFischer	\$ 1,642.64	500 µg/ml	50 µg	100 bp a 1,000 bp	100	[65]
100pb DNA Ladder Invitrogen	TermoFischer	\$1,871.98	500 µg/ml	50 µg	100 bp a 2,000 bp	100	[66]

Marcadores mexicanos comerciales

MP50 PUC19/Msp I	BioTecMol	\$1,000	0.05 µg/µl	50 µg	110 a 501 bp	300-500	[67]
-------------------------	-----------	---------	------------	-------	--------------	---------	------

Precios Marzo, 2021.

La aprobación de los productos emergentes solo se determinará por su uso, presentando la calidad de las marcas por la densidad y el corrimiento de bandas observado en los geles de agarosa. A pesar de encontrar empresas mexicanas dedicadas a la elaboración de herramientas moleculares, aún son escasos sus productos y su oferta se ve limitada, a diferencia de las compañías transnacionales. La brecha tecnológica es evidente en este sector.

Extracción de *katA*, *rpoB*, *gyrB*, *rpoD*, *phlD*, *lfpA*, *rrs* y *Plt* en *Pseudomonas* KT2440 y *P. protegens* EMM1

Para la elaboración de un nuevo marcador de peso molecular de ADN se extrajo el ADN de *Pseudomonas protegens* EMM1 mediante lisis alcalina, para la posterior amplificación de *rpoB*, *gyrB*, *rpoD*, *phlD*, *lfpA*, y *plt*, y la extracción de ADN de *P. Putida* KT2440 para la amplificación de *katA* y *rrs*. Esto debido a que anteriormente el gen que codifica a la catalasa *katA* ha sido reportado en *Pseudomonas putida* Kt2442 [61] y se rectificó si existía la secuencia por medio del programa SnapGene, ensamblando los oligonucleótidos correspondientes en la secuencia NC_002947.4 de la cepa KT2440.

Se realizaron duplicados. La extracción de ADN se comprobó en una electroforesis (figura 6).

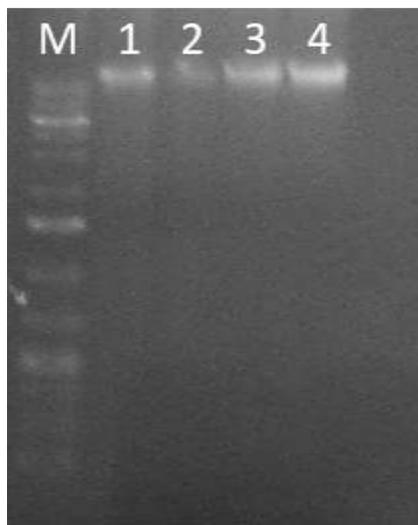


Figura 6. Visualización del ADN extraído de cepas de *Pseudomonas* mediante Electroforesis. M: GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. ADN de *Pseudomonas protegens* EMM1 (carriles 1, 2). ADN de *Pseudomonas putida* KT2440 (carriles 3, 4).

Amplificación por PCR de *katA*, *rpoB*, *gyrB*, *rpoD*, *phlD*, *llpA*, *rrs* y *plt*

Mediante PCR y con las condiciones establecidas en la tabla 4 se llevaron a cabo las amplificaciones y posteriores purificaciones de los genes *katA*, *rpoB*, *gyrB*, *rpoD*, *phlD*, *llpA*, *rrs* y *plt*, ver figura 7.

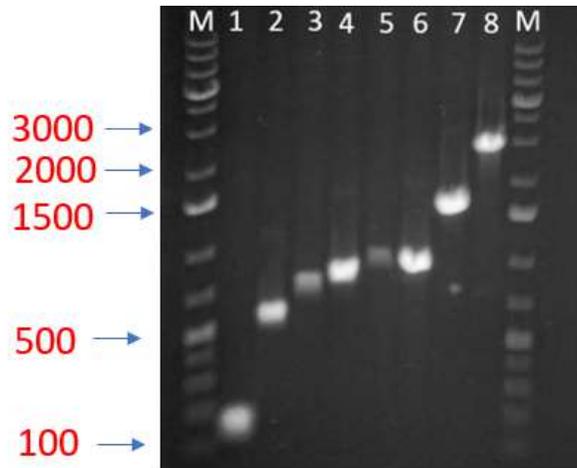


Figura 7. Amplificación por PCR de los genes seleccionados y su visualización por electroforesis. M: GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, 1: *kat A*, 2: *rpoB*, 3: *gyrB*, 4: *rpoD*, 5: *phlD*, 6: *llpa*, 7: *rrs* y 8: *plt*.

En la electroforesis se pudo visualizar un total de ocho fragmentos, correspondientes a los que se buscaba obtener. La intensidad de las bandas se debe a la concentración de ADN que se consiguió durante las amplificaciones como se muestra en la tabla 6. Las bandas de los fragmentos con la definición deseada fueron obtenidas de los genes *rpoB* y *rpoD*, con una concentración de 62.9 ng/ μ l y 72.3 ng/ μ l respectivamente, sin embargo, un ajuste de concentración de los fragmentos a 50 ng/ μ l también puede llegar a ser óptimo para mejorar la visualización de las bandas.

Durante la PCR de cada fragmento se ocupó la enzima *Taq DNA pol*, dando como resultado amplificaciones con una adenina añadida en cada extremo 3', permitiendo a los

productos resultantes ligarse a un plásmido de clonación con colas de timina directamente, sin modificación alguna o el uso de enzimas de restricción.

Purificación y cuantificación de fragmentos de ADN

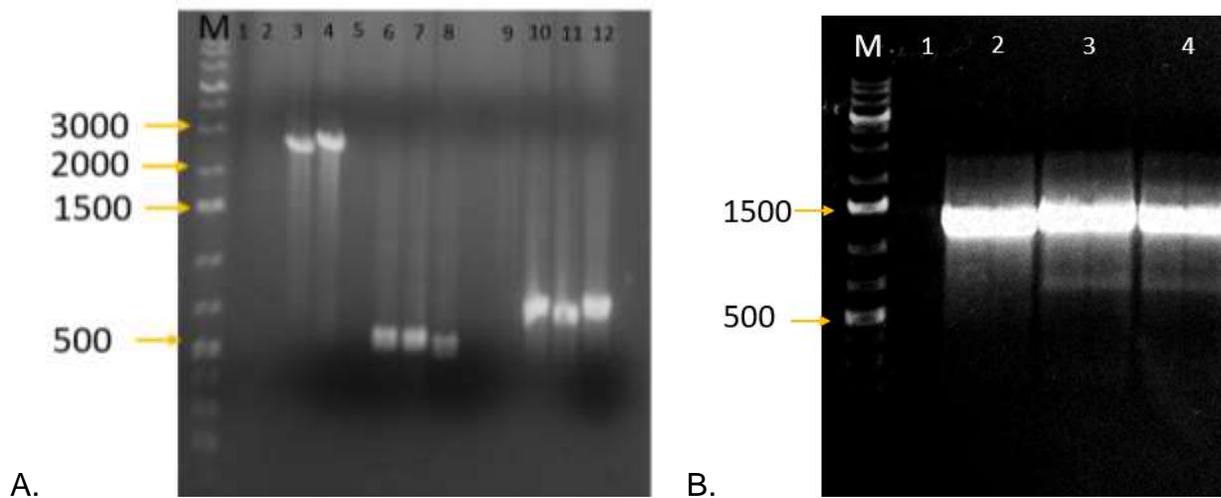


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los fragmentos de ADN del marcador de pesos molecular, amplificados por PCR. Se muestran dos gels de electroforesis, resultado de diferentes PCR. **Imagen A.** Para el resultado de PCR de *plt*, *rpoB* y *gyrB* se verificó la presencia de los genes amplificados previo a su purificación. Marcador (M). Control negativo *plt*; (carril 1) *plt*; (carriles 2,3,4) Control negativo *rpoB*; (carril 5). *rpoB*; (carriles 6,7,8) control negativo *gyrB* (carril 9). *gyrB* (carriles 10,11,12). **Imagen B.** Para *rpoD* (carriles 2,3,4), *katA*, *rrs* y *llpA* se realizó la PCR por separado y posteriormente se hizo una purificación directa. En ambas electroforesis se agregó el marcador GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (M) y un control negativo (1).

Posterior a obtener los productos de PCR se corrieron diferentes electroforesis para extraer la banda con el fragmento deseado y purificarlo, como se muestra en la figura 8B.

El resultado de las purificaciones mostró altas concentraciones de ADN, debido a las tres réplicas que se realizaron por fragmento amplificado. La purificación se hizo con el fin de disminuir la probabilidad de adquirir ligaciones con fragmentos de diferentes tamaños. Una vez terminado el proceso se cuantificó en Nanodrop la concentración del DNA (ng/μl) y se registró la absorbancia para medir la pureza y calidad del ADN a una absorbancia de A_{260}/A_{280} Tabla 8.

Tabla 8. Concentración absorbancia y tamaño de los fragmentos resultantes.

Gen	Tamaño (bp)	ng/μl	Espectrometría A_{260}/A_{280}
<i>katA</i>	102	38.3	1.69*
<i>rpoB</i>	508	62.9	1.73
<i>gyrB</i>	586	32.8	1.81
<i>rpoD</i>	695	72.3	1.75
<i>phlD</i>	745	28	1.79
<i>llpa</i>	841	91.2	1.87
<i>rrs</i>	1500	76.3	1.83
<i>plt</i>	2444	67.6	1.82

Estimación de la pureza del ADN amplificado

En la tabla 6 se muestran los resultados en una relación recomendada de A_{260}/A_{280} para la evaluación de la pureza del ADN, las referencias y protocolos para el uso del espectrofotómetro Nanodrop indican que un rango adecuado de pureza óptima de la muestra se encuentra en un valor de ~ 1.8 [55]. Por lo tanto la amplificación de los genes *gyrB*, *llpA*, *rrs* y *plt* resultaron con una pureza óptima, sin embargo, los genes *katA*, *rpoB*, *rpoD* y *phlD* resultaron con una pureza aceptable, con un valor > 1.6 [56]. Si los resultados se hubiesen obtenido por abajo del valor de 1.6 indicaría presencia de compuestos aromáticos y/o proteínas, mientras que un rango mayor a 2.1 presencia de ARN [56].

Mapas de ligaciones y digestión de enzimas de *KatA*, *rpoB*, *gyrB*, *rpoD*, *phlD*, *llpA*, *rrs* y *Plt*

Se realizaron ocho construcciones *in silico* de las ligaciones en el plásmido pGEM-T Easy (Figuras 9-16), usando del programa SnapGene (<https://www.snapgene.com/>). Esto supone un apoyo para próximos experimentos de futuras investigaciones y aplicaciones. El mapa contempla las enzimas de restricción con un sitio de corte único y a su vez se muestran las regiones donde actúan los oligonucleótidos utilizados.

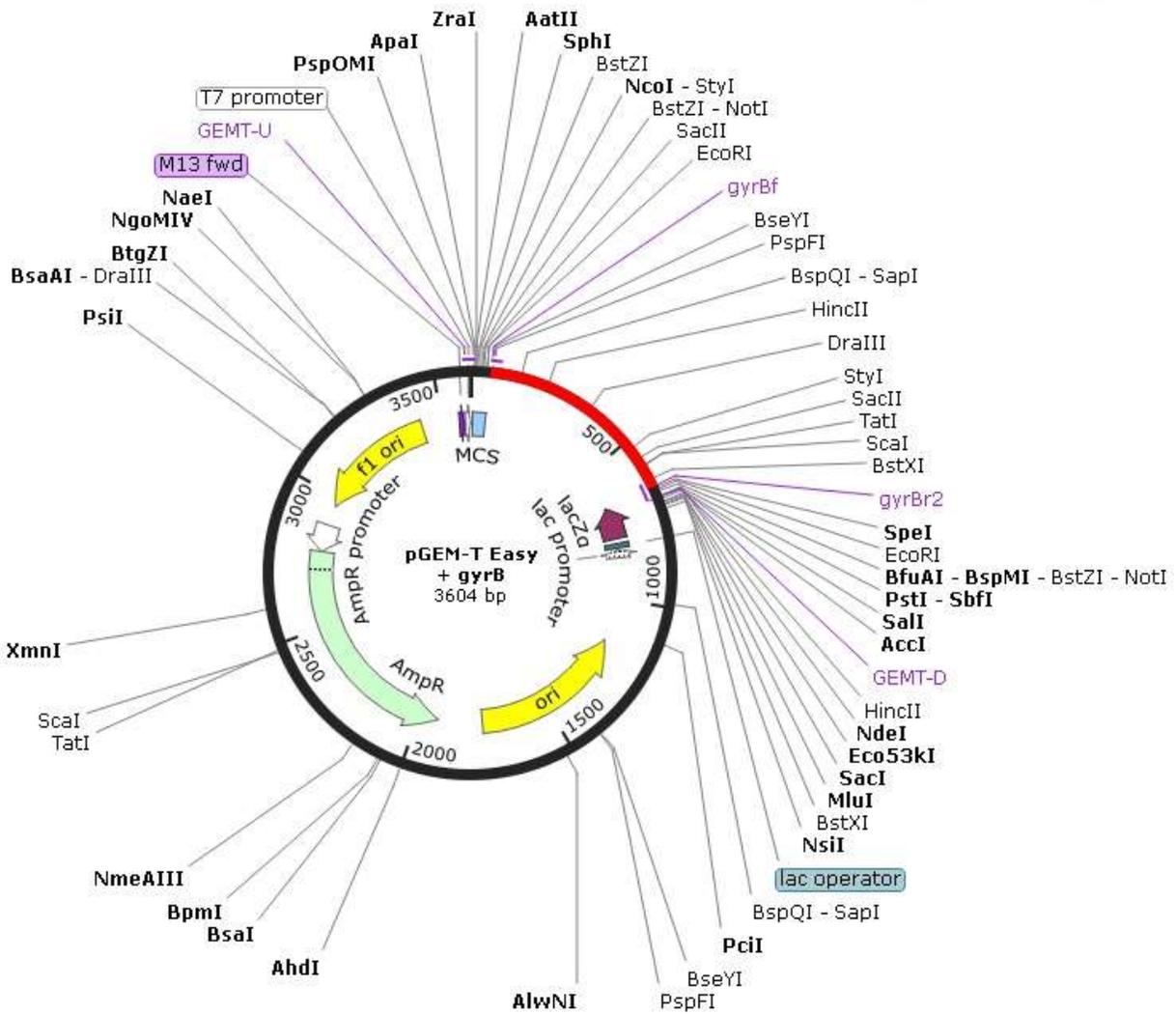


Figura 10. Mapa del vector pGEM-T*trpB*. Se indica el sitio de ligación y enzimas de restricción. Referencia de secuencia del inserto: KX236070.1 (GeneBank)

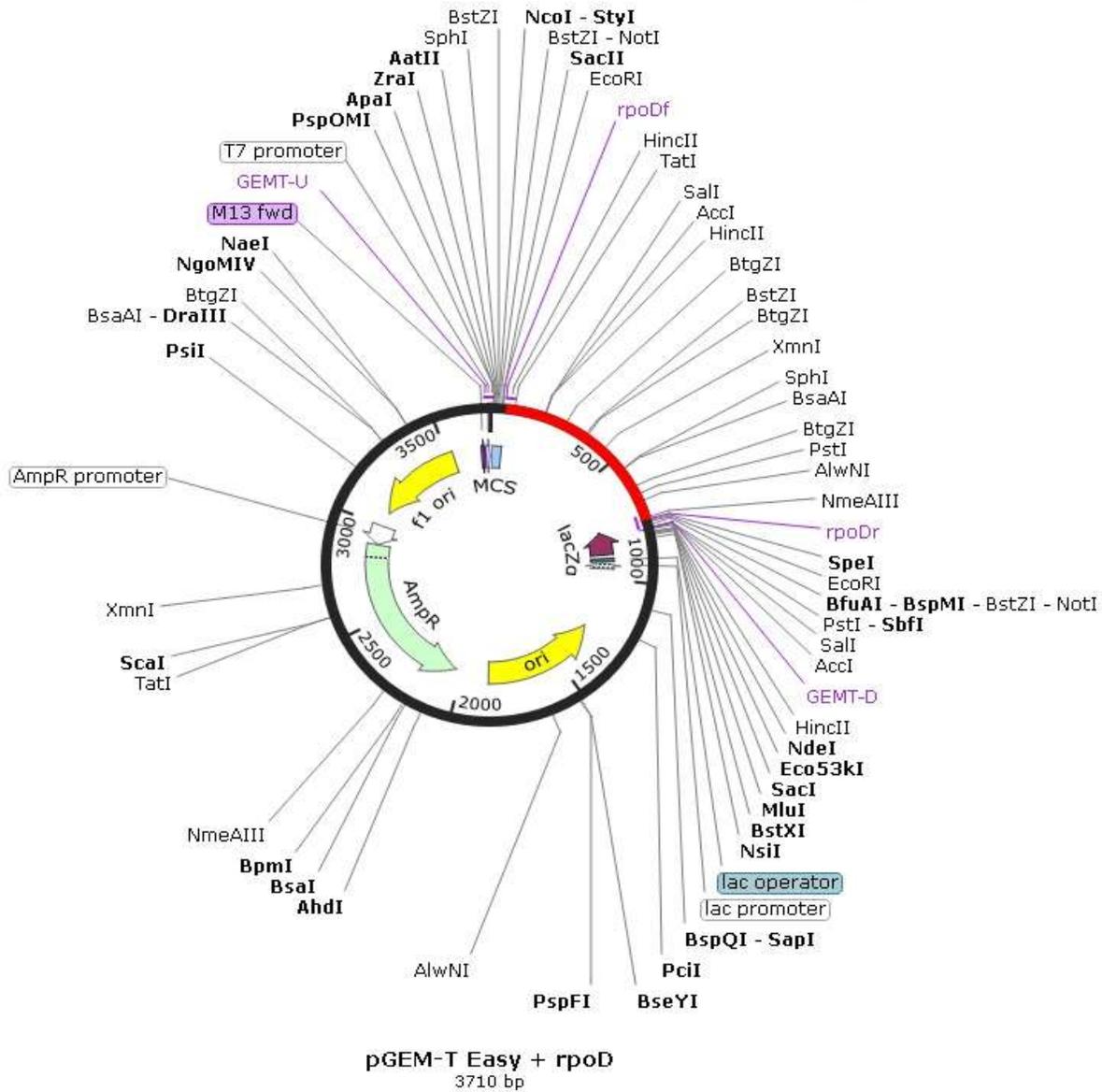


Figura 12. Mapa del vector pGEM-T*rpoD*. Se indica el sitio de ligación y enzimas de restricción. Referencia de secuencia del inserto: KX236071.1 (GeneBank)

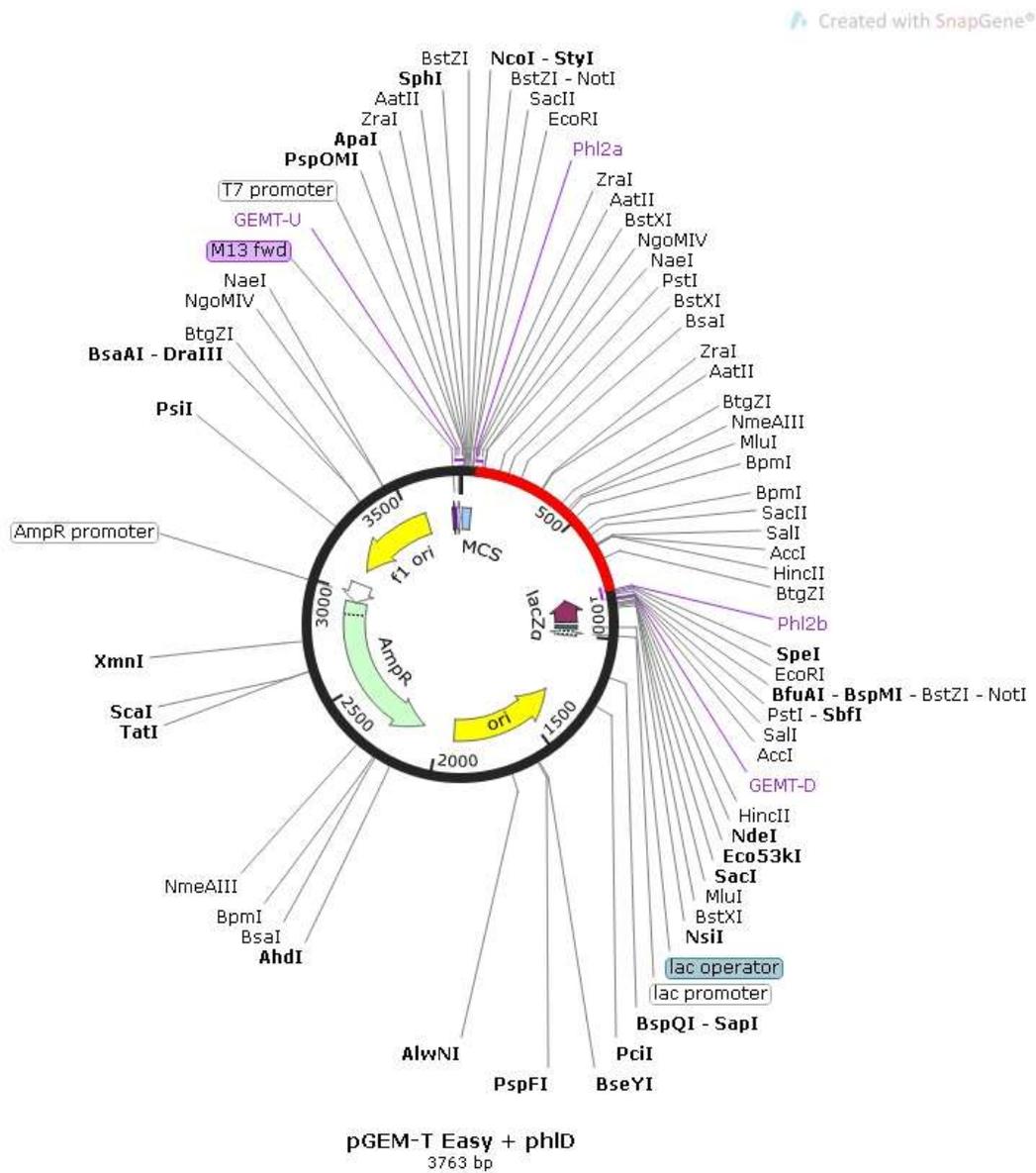


Figura 13. Mapa del vector pGEM-T $phID$. Se indica el sitio de ligación y enzimas de restricción. Referencia de secuencia del inserto: U41818.1 (GeneBank)

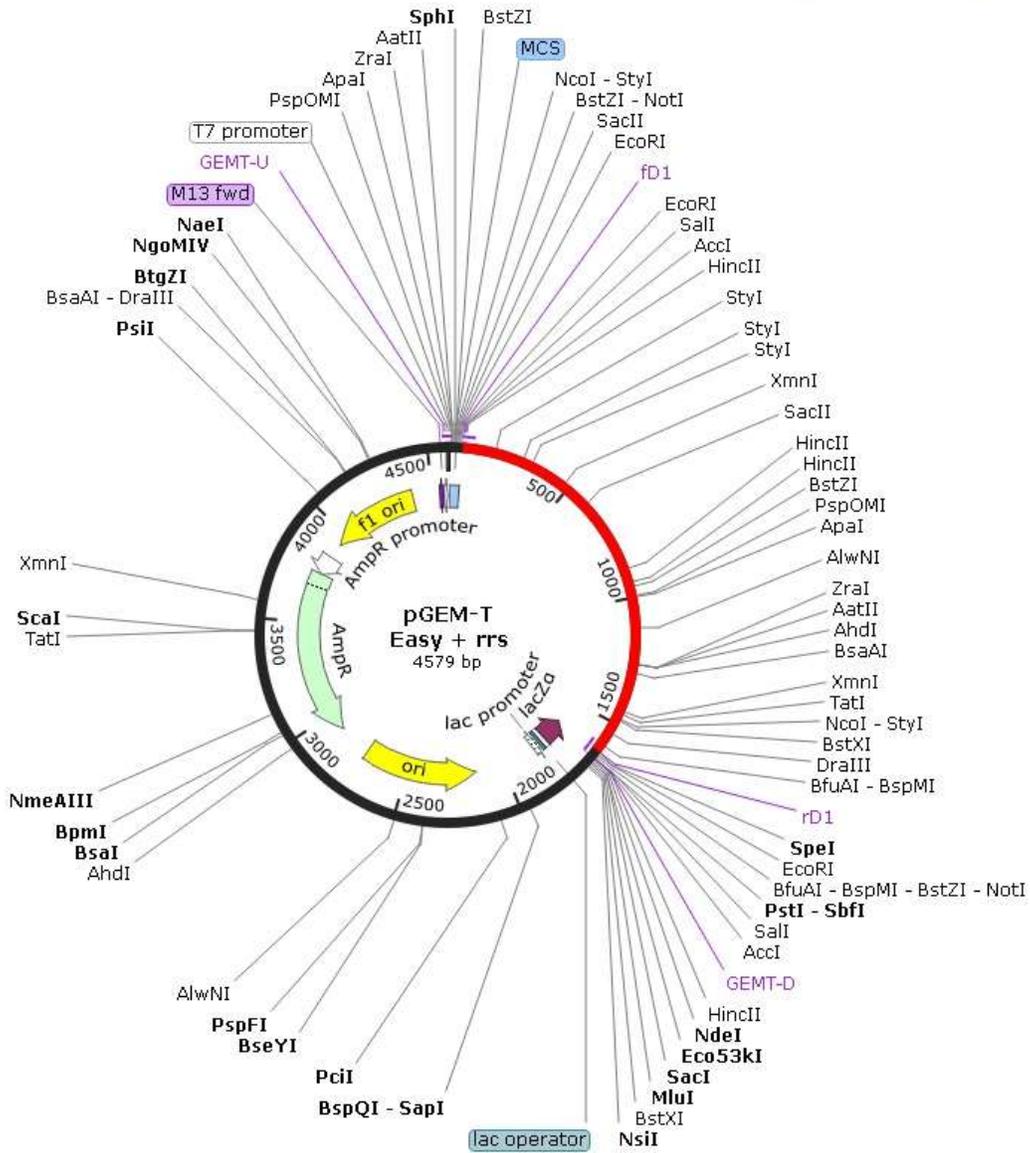


Figura 15. Mapa del vector pGEM-Trrs (16S RNA ribosomal). Se indica el sitio de ligación y enzimas de restricción. Referencia de secuencia del inserto: NC_002947.4 (GeneBank).

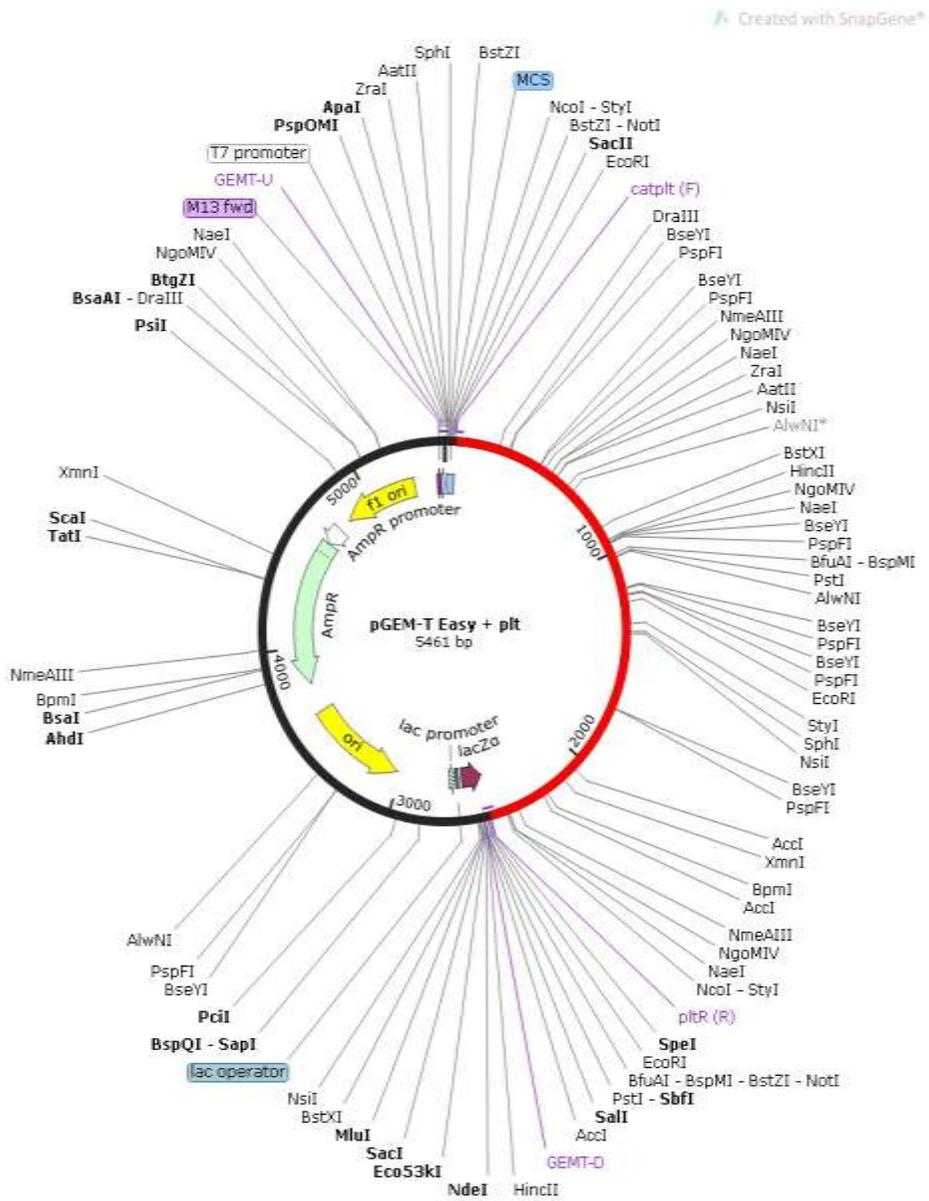


Figura 16. Mapa del vector pGEM-T_{plit}. Se indica el sitio de ligación y enzimas de restricción. Referencia de secuencia del inserto: AP014522.1 (GeneBank).

Transformación en *Escherichia coli* DH5- α

Las transformaciones de las reacciones de ligación del vector más el fragmento de ADN amplificado de los genes se llevaron a cabo usando *E. coli* DH5 α . Se destaca que cada gen seleccionado para amplificarse es altamente conservado en el género *Pseudomonas*, pero algunos de estos también son expresados en otras bacterias porque son genes constitutivos, genes requeridos para el mantenimiento de las funciones celulares básicas [57]. Los genes constitutivos reportados son los siguientes; *rpoB*, *gyrB*, *rpoD* y *rrs*.

Amplificación por PCR de colonia

Se realizaron amplificaciones únicamente de *rpoB*, *gyrB* y *plt* (Fig. 17) debido a la contingencia, no se llevaron a cabo las reacciones de PCR de colonia de *katA*, *llpA*, *rpoD*, *phlD* y *rrs*. Para realizar las reacciones de PCR de colonia se emplearon los oligonucleótidos específicos de cada gen, provocando que los genes constitutivos dieran falsos positivos como lo muestra el gel de electroforesis de *rpoB* y *gyrB*, Figura 18.

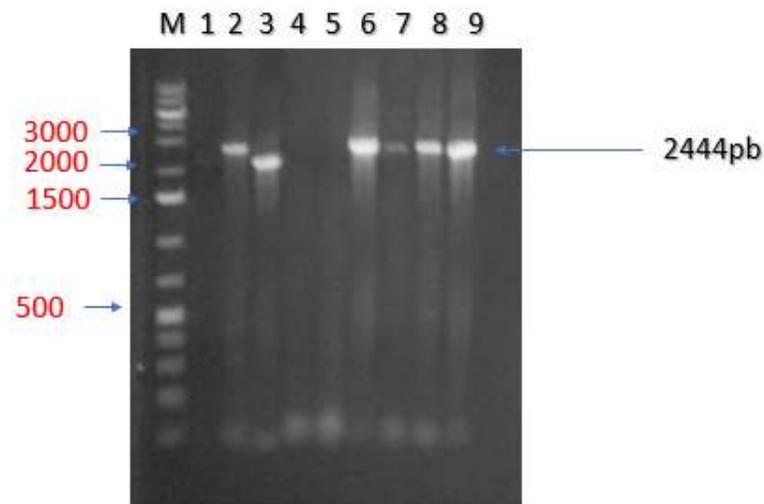


Figura 17. Resultados de PCR de colonia de *plt*. M; Marcador, carril 1: Control negativo, carriles 3, 4 y 5: PCR con oligonucleótidos caplt y pltR, usando ADN purificado del vector como templado, carriles 2, 6, 7, 8 y 9: PCR de colonia de *plt*. Se indica con una flecha el tamaño esperado del inserto de 2444 pb.

Para la electroforesis de *plt*, el control negativo consistió en añadir únicamente los reactivos para realizar la PCR sin ADN, para comprobar que los oligonucleótidos o cualquier otro componente no estuviese contaminado por incorrecta manipulación.

Sin embargo, para genes constitutivos se le agregó como control negativo: *E.coli Dh5 α* , con finalidad de rectificar que los fragmentos fueran similares a los que se habían transformado.

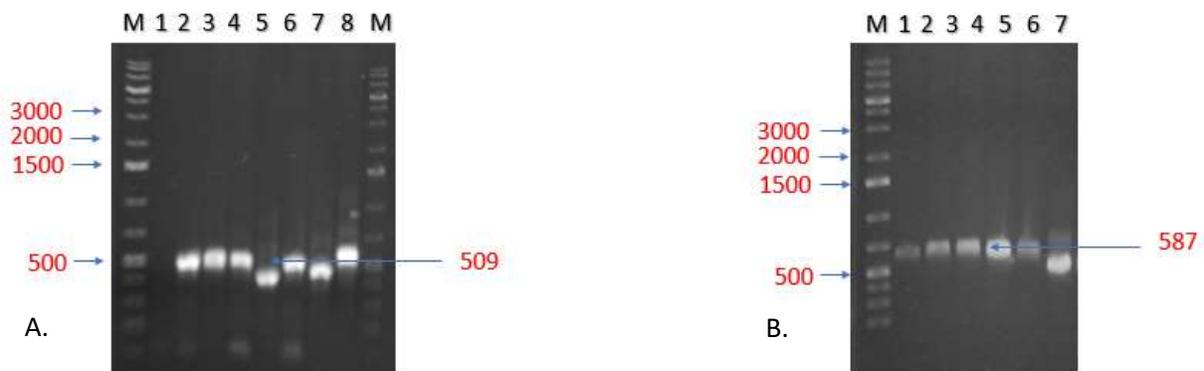


Figura 18. Imagen A. Productos amplificados de PCR de colonia correspondientes a *rpoB*.

Carril M: Marcador, carril 1: Control negativo, carril 2: Control negativo (PCR de colonia de *E.coli Dh5 α* , carril 3: Control positivo (PCR de colonia de *Pseudomonas protegens EMM1*), carriles 4, 5, 6, 7, 8: PCR de colonia de *rpoB*. **Imagen B.** Bandas resultantes de PCR de colonia de *gyrB*.

Carril M: Marcador, carril1: Control negativo (PCR de colonia de *E.coli Dh5 α*), 2: Control positivo

(PCR de colonia de *Pseudomonas protegens EMM1*), carriles 3, 4, 5, 6, 7: PCR de colonia de *gyrB*.

En la Figura 18.A se observa que hay una diferencia de corrimiento entre los productos de PCR de colonias, específicamente de los carriles 5 y 7 y en Fig18.B se percibe el mismo comportamiento en el carril 7. Posiblemente esta alteración es causada porque no se usó ningún componente desnaturizante durante la PCR, permitiendo la formación de estructuras secundarias por la abundancia de GC, que tienen más estabilidad de sus enlaces debido a sus tres puentes de hidrógeno, dificultando la desnaturalización, provocando la formación de bucles o loops. También puede llegar a afectar los oligonucleótidos, formando dímeros y evitando la amplificación deseada.

El dimetilsulfoxido (CH₃)₂SO o DMSO es un compuesto organosulfurado con alta polaridad y constante dieléctrica [58]. Se usa como adyuvante porque logra disminuir las estructuras secundarias del ADN por medio de interacciones por puentes de hidrógeno provocando una lábil desnaturalización o desestabilización de la formación de la estructura doble hélice. [59][58]. Serrato Díaz y colaboradores recomiendan su uso a una concentración de 2 y 10%. [7]

Finalmente, para evitar falsos positivos se propone el uso de oligonucleótidos específicos para pGEM-T Easy Vector I; los oligonucleótidos GEMT-U y GEMT-D postulados por Chang [12]. O bien, llevar a cabo el protocolo de extracción del plásmido y posteriormente purificar y realizar una digestión con enzimas de restricción que provoquen cortes exclusivos en el plásmido sin afectar el inserto para comprobar que este se encuentre dentro del plásmido.

Extracción de plásmido con oligonucleótidos específicos para pGEM-T Easy Vector y el fragmento de ADN de interés con enzimas de restricción.

Si se opta por la extracción del plásmido como método de comprobación se necesita hacer un una PCR para amplificar el inserto de interés o una restricción enzimática para comprobar la presencia del vector y del inserto.

En el segundo caso, se propone una digestión enzimática con uso de enzimas de restricción para generar dos cortes (*EcoRI*, *NotI*) o cortes únicos (*SacII*, *SpeI*, *NcoI*) en regiones cercanas al inserto del plásmido. A continuación, se muestra en la tabla 9 las potenciales enzimas de restricción que pueden ser utilizadas.

Tabla 9. Enzimas de restricción para la comprobación de presencia del inserto por digestión enzimática.

Plásmido	Enzimas de restricción
pGEM-Tkat	<i>SacII</i> , <i>EcoRI</i> , <i>SpeI</i> , <i>NotI</i>
pGEM-TrpoB	<i>SacII</i> , <i>SpeI</i> , <i>NotI</i>
pGEM-TgyrB	<i>EcoRI</i> , <i>SpeI</i> , <i>NotI</i> , <i>NcoI</i>
pGEMT-TrpoD	<i>SacII</i> , <i>EcoRI</i> , <i>SpeI</i> , <i>NotI</i>
pGEM-TphID	<i>EcoRI</i> , <i>SpeI</i> , <i>NotI</i> , <i>NcoI</i>

pGEM-TIIpa	<i>SacII,</i> <i>EcoRI, SpeI, NotI</i>
pGEM-Trrs	<i>SacII, EcoRI, SpeI, NotI</i>
pGEMT-plt	<i>SacII, SpeI, NotI, BstZI</i>

Propuesta de marcadores de peso molecular para ADN

Los marcadores de peso molecular son una de las herramientas más importantes en la biología molecular y diferentes ramas de la biotecnología, la mayoría de las veces son ocupados para diagnóstico durante una electroforesis. Se proponen cuatro marcadores de peso molecular con diferentes tamaños (pb) que pueden ser aplicados durante el reconocimiento de genes de interés o ensayos de electroforesis para secuencias de ADN que se encuentren dentro del rango que cubren los marcadores que a continuación se muestran.

Las propuestas de los marcadores fueron elaboradas usando la herramienta de electroforesis *in silico* del programa SnapGene usando el marcador GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder como marcador de referencia. La primera propuesta abarca únicamente los fragmentos resultado del uso de los oligonucleótidos específicos. Tabla 10. Figura 19.

Tabla 10. Primer marcador de peso molecular.

Marcador propuesto	Fragmentos totales	Figura	Pares de Oligonucleótidos utilizados	Gen	Fragmentos resultantes (pb)
Marcador I	8	18	katA-F katA-R	katA	102
			rpoBf1 rpoBr1	rpoB	509
			gyrBf gyrBr2	gyrB	587
			rpoDf rpoDr	rpoD	693
			Phl2a Phl2b	phlD	746
			pf-F pf-R	llpA	843
			fD1 rD1	16s RNA	1562
			catplt (F) pltR (R)	plt	2444

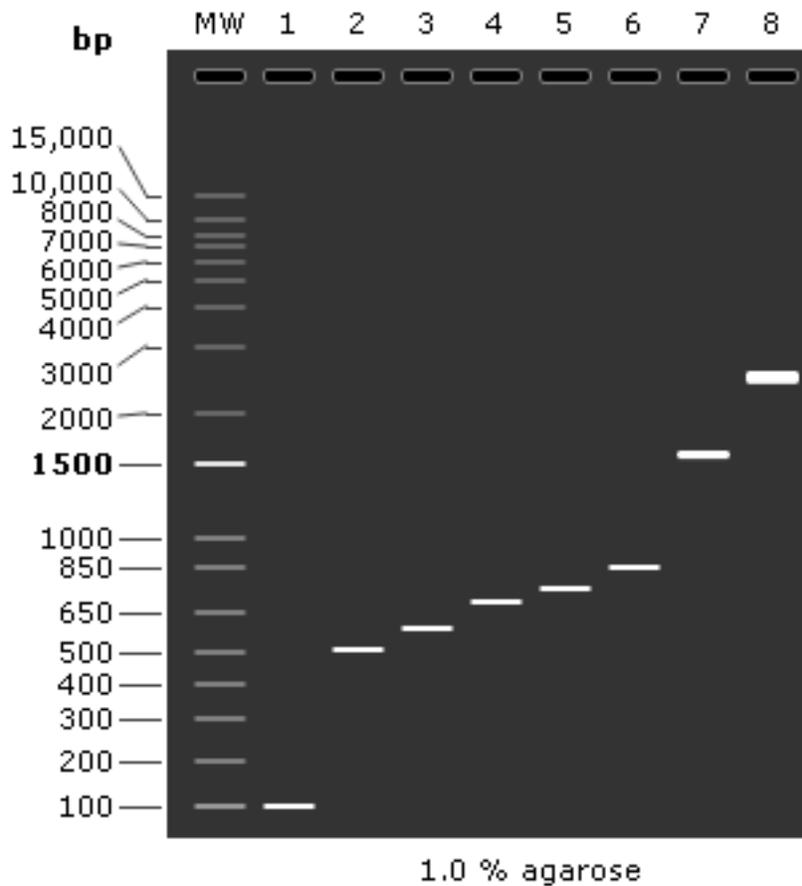


Figura 19. Primera propuesta de marcador *in silico*. MW: 1 kb Plus DNA Ladder. 1: *katA*, 2: *rpoB*, 3: *gyrB*, 4: *rpoD*, 7: *phiD*, 6: *llpA*, 7: *rrs*, 8: *plt*.

El Segundo marcador se obtiene a partir del uso único de los oligonucleótidos GEMT-U y GEMT-D. Tabla 11. Figura 20. La utilización de los oligonucleótidos GEMT-U y GEMT-D genera un aumento de pb en cada fragmento de ADN de 90 pb. El uso de estos oligonucleótidos para pGEMT- Easy combinados con los otros oligonucleótidos específicos de cada gen, puede resultar en fragmentos más pequeños o grandes,

proporcionando otras alternativas para la generación de nuevos marcadores. Figuras 19, 20, 21 y 22.

Tabla 11. Segundo marcador de peso molecular

Marcador propuesto	Fragmentos totales	Figura	Pares de Oligonucleótidos utilizados	Gen	Fragmentos resultantes (pb)
Marcador II	8-9	19	GEMT-U GEMT-D	katA	212
				rpoB	619
				gyrB	697
				rpoD	803
				phlD	856
				llpA	953
				rrs	1672
				plt	2554
				pGEM-T Easy linearizado	3016

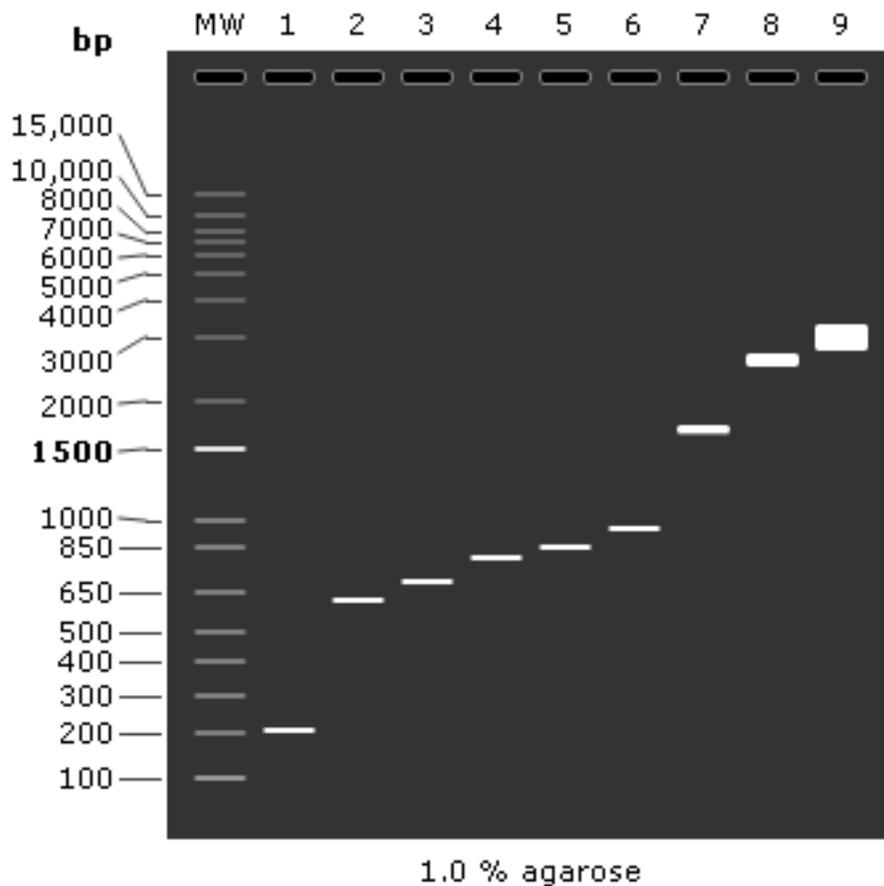


Figura 20. Segunda propuesta de marcador *in silico*. 1: *katA*, 2: *rpoB*, 3: *gyrB*, 4: *rpoD*, 7: *phlD*, 6: *llpA*, 7: *rrs*, 8: *plt*, 9: pGEMT-Easy linearizado (superenrollado).

A continuación, se muestra la tabla 12 con todos los fragmentos obtenidos por la combinación de oligonucleótidos compatibles en cada plásmido. La elaboración de marcadores personalizados es viable gracias a la cercanía de los tamaños. Figura 21.

Tabla 12. Todos los fragmentos obtenidos para personalizar un marcador de peso molecular

Marcador propuesto	Fragmentos totales	Figura	Pares de Oligonucleótidos utilizados	Gen	Fragmentos resultantes (pb)
Marcador personalizado	33	20	katA-F katA-R	katA	102
			KatA-F GEMT-D	katA	134
			GEMT-U katA-R	katA	180
			GEMT-U GEMT-D	katA	212
			rpoBf1 rpoBr1	rpoB	509
			rpoBf1 GEMT-D	rpoB	541
			GEMT-U rpoBr1	rpoB	587
			gyrBf gyrBr2	gyrB	587
			GEMT-U GEMT-D	rpoB	619
			gyrBf GEMT-D	gyrB	619

			GEMT-U gyrBr2	gyrB	665
			rpoDf rpoDr	rpoD	693
			GEMT-U GEMT-D	gyrB	697
			rpoDf GEMT-D	rpoD	725
			Phl2a Phl2b	phlD	746
			GEMT-U rpoDr	rpoD	771
			Phl2a GEMT-D	phlD	778
			GEMT-U GEMT-D	rpoD	803
			GEMT-U Phl2b	phlD	824
			pf-F pf-R	llpA	843
			GEMT-U GEMT-D	phlD	856
			pf-F GEMT-D	llpA	875

			GEMT-U pf-R	llpA	921
			GEMT-U GEMT-D	llpA	953
			fD1 rD1	16s RNA	1562
			fD1 GEMT-D	16s RNA	1594
			GEMT-U rD1	16s RNA	1640
			GEMT-U GEMT-D	16s RNA	1672
			catplt (F) pltR (R)	plt	2444
			catplt (F) GEMT-D	plt	2476
			GEMT-U pltR (R)	plt	2522
			GEMT-D GEMT-U	plt	2554

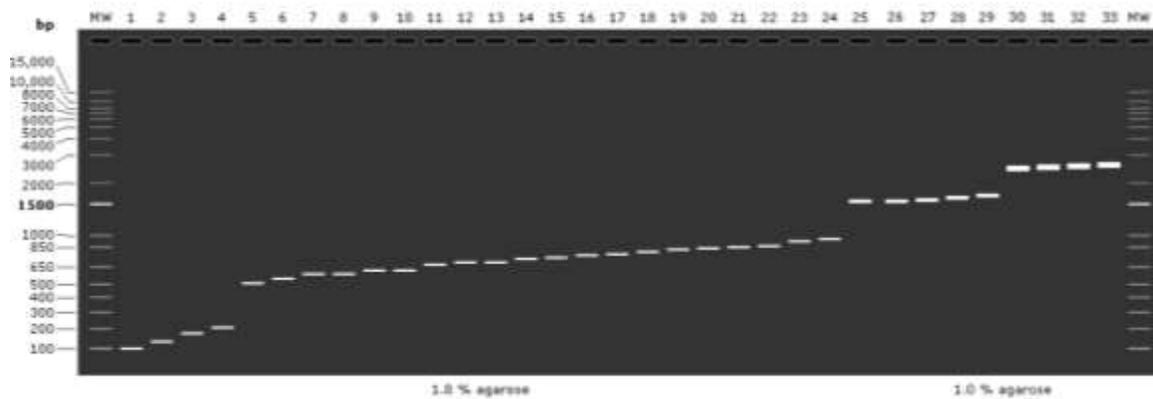


Figura 21. Tercera propuesta de marcador *in silico*. (MW) 1 kb Plus DNA Ladder. carriles 1-33: Fragmentos resultantes de las combinaciones de los oligonucleótidos en la tabla 12.

El último marcador propuesto se obtiene por extracción de ADN plasmídico, o usando un solo oligonucleótido durante la PCR de colonia. La electroforesis *in silico* muestra únicamente los plásmidos superenrollados. Tabla 13. Figura 22.

Tabla 13. Cuarto marcador de peso molecular

Marcador propuesto	Fragmentos totales	Figura	Gen + pGem-T easy	Fragmentos resultantes (pb)
Marcador IV	8	21	katA	3119
			rpoB	3526
			gyrB	3604
			rpoD	3710

			phID	3763
			llpA	3860
			16S RNA	4579
			plt	5461

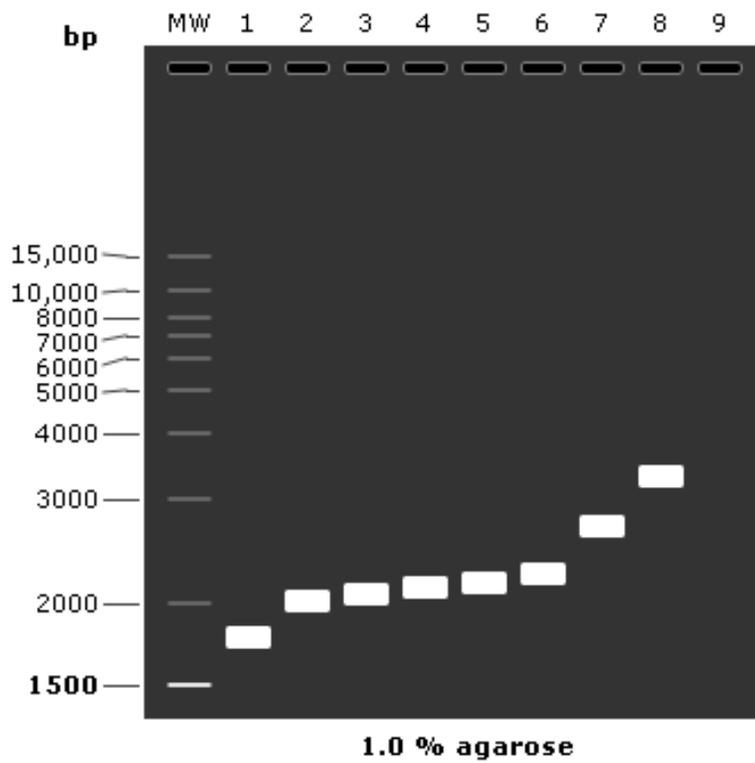


Figura 22. Cuarta propuesta de marcador *in silico*. (MW) 1 kb Plus DNA Ladder. (1) *katA* (2) *rpoB* (3) *gyrB* (4) *rpoD* (5) *phID* (6) *llpA* (7) *rrs* (8) *plt*.

Costo de manufactura

Para definir el precio unitario del producto se presenta el precio estimado por las reacciones recomendadas a partir del resultado de las diferentes concentraciones de las secuencias amplificadas. El costo total para la elaboración de las PCR fue de \$309 MXN. Cada precio se calculó por el número de reacciones, siendo que el costo por reacción (25µl) es de \$10.65 MXN (calculado a partir del precio ofertado en enero de 2021). Así mismo, los resultados se ajustaron para tener una concentración superior a 50 µg/µl de ADN, posterior a una purificación.

Tabla 14. Precio por reacción de PCR.

Gen	ng/µl	No. De reacciones (25 µl)	No. De reacciones recomendada	Costo
katA	38.3	3	5	\$ 53.29
rpoB	62.9	3	3	\$ 31.97
gyrB	32.8	3	5	\$ 53.29
rpoD	72.3	3	3	\$ 31.97
phlD	28	2	5	\$ 53.29
llpa	91.2	3	2	\$ 21.32
rrs	76.3	3	3	\$ 31.97
plt	67.6	3	3	\$ 31.97
			Total	\$ 309.07

Después, mediante la siguiente ecuación:

$$C1V1=C2V2$$

Se ajusta a una concentración de 50 µg/µl, misma que es ocupada para una correcta visualización de la banda en un gel, se mostrará definida pero no saturada, efecto que se observa

en la mayoría de los marcadores comerciales. Se propone un volumen total de 250 µl por marcador de peso molecular, volumen promedio que se utiliza como los expuestos en la tabla 7, con un volumen de 31.25 µl de cada secuencia amplificada.

Todas las secuencias después de ser purificadas se almacenan en volúmenes totales de 50µl. Siguiendo esta premisa, se calculó el precio final de cada banda por reacción de PCR y se calculó el precio final del producto, siendo de \$172.51 MXN.

Tabla 15. Ajuste de precios por volumen usado para generar el producto final.

Gen	No. De reacciones recomendada	Costo	Volumen final (µl)	Costo final (31.5ul)*
katA	5	\$ 53.29	50	\$ 33.31
rpoB	3	\$ 31.97	50	\$ 19.98
gyrB	5	\$ 53.29	50	\$ 35.50
rpoD	3	\$ 31.97	50	\$ 12.78
phlD	5	\$ 53.29	50	\$ 37.83
lpa	2	\$ 21.32	50	\$ 5.45
rrs	3	\$ 31.97	50	\$ 24.19
plt	3	\$ 31.97	50	\$ 3.48
Total		\$ 309.07	Total	\$ 172.51

Sin embargo, si se llegan a utilizar únicamente los oligonucleótidos específicos para los genes y no los GEMT-D o GEMT-U, es preciso realizar una purificación y por ello es importante sumar el costo del número de reacciones ocupadas.

Para los marcadores I y el personalizado se requiere de purificación, específicamente para el primero, se necesitaron 8 aplicaciones con un costo total de \$301.81 MXN. Sumado al costo total de las PCR, el producto final es aproximadamente de \$474.32 MXN. Se realizó un ajuste para los otros marcadores, el marcador II sólo requerirá de PCR de colonia, por lo que el costo queda en \$172.51MXN, para el marcador III o

personalizado, variará dependiendo de las bandas a amplificar, y el marcador IV únicamente necesitará de una extracción de plásmido en las células transformadas, con un costo aproximado de \$579, precio basado en el número de reacciones que ofrece un kit comercial (Kit Wizard Genomic DNA purification para 50 aplicaciones, precio de marzo 2021).

La producción escalada significaría un gran ahorro debido a los costos de mayoreo y el tiempo de producción que se acortan, sin embargo, esto significa contemplar otros riesgos, controles y para otorgar un precio final.

Algunos experimentos no se pudieron concluir, debido a la contingencia provocada por SARS-CoV-2, Sin embargo, a pesar de esta situación, se utilizaron programas para presentar resultados *in silico* en los propuestos de los marcadores de peso molecular.

CONCLUSIONES

Un marcador de peso molecular es una herramienta que es usada de manera indispensable en la electroforesis, las opciones que hay en el mercado, son en su mayoría extranjeras, y sólo unas pocas son mexicanas. Existe por lo tanto, una gran oportunidad para la elaboración de este tipo de productos en México y producir nuestra propia tecnología disminuyendo la gran brecha tecnológica respecto a otros países así como situar de lado la dependencia en este tipo de insumos.

En este trabajo de tesis se logró la obtención de 8 fragmentos derivados de diversos genes, con tamaños diferentes y los cuales se pueden combinar para generar varios marcadores de peso molecular.

Una opción es amplificar directamente cada fragmento mediante PCR y mezclarlos para generar el marcador de peso molecular. Esta opción es la más simple, aunque implica contar con ADN genómico como templado.

Una segunda opción es clonar cada fragmento de ADN en un vector plasmídico para posteriormente amplificarlos mediante PCR, con oligonucleótidos específicos o del vector.

La tercera opción es digerir los vectores que portan cada fragmento de ADN con enzimas de restricción para liberarlos, sin embargo, esto implica dos pasos de purificación del fragmento liberado.

La segunda opción es muy atractiva ya que al tener clonado cada fragmento de ADN en el vector, este puede ser almacenado tanto de manera sola como introducido en una bacteria como *E. coli*, se puede además amplificar ADN plasmídico (se logran una gran cantidad y se requiere una mínima cantidad para la reacción de PCR) y resguardarlo solo a -20 °C, hasta su uso como templado para amplificar los fragmentos de ADN que integran el marcador de peso molecular.

Por lo anterior, el trabajo realizado en esta tesis ofrece una gran versatilidad de producción y ensamble de diversos marcadores de peso molecular, de manera rápida, cubriendo un amplio rango de tamaño y a bajo costo.

Los marcadores de peso molecular generados en esta tesis, son un producto acorde con la licenciatura de biotecnología cursada y además ofrece la posibilidad de ser utilizado en todos los laboratorios de investigación que empleen biología molecular dentro de la BUAP y además puede ser ofertado al resto de los laboratorios nacionales.

REFERENCIAS

- [1] Rovenský J, Payer J, “DNA (Deoxyribonucleic Acid)”, *Dict. Rheumatol.*, pp. 57–57, 2009, doi: 10.1007/978-3-211-79280-3_321.
- [2] D. Wall, “Recombinant DNA, Basic Procedures”, *M. B. T.-E. of M.* Third E. Schaechter, Ed. Oxford: Academic Press, 2009, pp. 271–280.
- [3] A. Griffiths JF, J. Miller H, D. T. Suzuki, R. C. Lewontin, and W. M. Gelbart., *An Introduction to Genetic Analysis*, NY, USA: W.H Freeman, 2000. ISBN-10: 0-7167-3520-2.
- [4] F. H. Stephenson, “Chapter 10 - Recombinant DNA”, in *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology*. F. H. Stephenson, 3th Ed, Academic Press, pp. 321-373, 2016.
- [5] Khan, M. W. Ullah, R. Siddique, G. Nabi, S. Manan, M. Yousaf, H. Hou, "Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life", *International Journal of Genomics*, vol. 2016, 14 pages, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2405954>
- [6] M. R. Green and J. Sambrook, “Polymerase chain reaction”, *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2019, no. 6, pp. 436–456, 2019, doi: 10.1101/pdb.top095109.
- [7] A. Serrato, L. Rentería, J. Aportela, y E. Sierra, “PCR : reacción en cadena de la polimerasa”, en *Herramientas Mol. Apl. en Ecol.* A. Cornejo, A. Serrato, B. Rendón, M. Rocha, Ed. Semarnat. CDMX, México, 2014, pp. 53–73.
- [8] L. Garibyan and N. Avashia, “Polymerase Chain Reaction”, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, no. 3, pp. 1–4, mar. 2013, doi: 10.1038/jid.2013.1.
- [9] B. Lewin, *Genes IX, Volumen 9*. México: McGraw-Hill Interamericana Editores. 2008.

- [10] L. Espinosa, “Guía práctica sobre la técnica de PCR”, en: *Ecología Molecular*, L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre. D.F, México: INE, CONABIO y UNAM, 2007, pp. 517–536.
- [11] K. B. Mullis, “The unusual origin of the polymerase chain reaction”, *Sci. Am.*, vol. 262, no. 4, pp. 56–65, 1990. doi: 10.1038/scientificamerican0490-56.
- [12] M. Chang, J. H. Wang, and H. J. Lee, “Laboratory production of 100 base pair DNA molecular weight markers”, *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 70, no. 6, pp. 1199–1202, 2008. doi: 10.1016/j.jbbm.2007.08.002.
- [13] V. T. T. Lan, P. T. T. Loan, P. A. T. Duong, L. T. Thanh, N. T. Ha, and T. B. Thuan, “Straightforward procedure for laboratory production of DNA ladder”, *J. Nucleic Acids*, vol. 2012, 2012. doi: 10.1155/2012/254630.
- [14] Gopalakrishnan R, Joseph S, Sellappa S. “Constructing a DNA ladder Range for Lambda Phage by multiplex PCR”. *Iran J Microbiol.* 2010, vol. 2, no. 4 pp. 210-2, dec. 2010.
- [15] F. Fierro, “Electroforesis de ADN, en *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*”, 2014, pp. 27–51.
- [16] J. Chin, H. Kah, C. Sieo, and B. Yiap, “Electrophoresis : what does a century old technology hold for the future of separation science?,” *Int. Res. J. Appl. Basic Sci.*, vol. 7, no. 4, pp. 213–221, 2013.
- [17] I. I. Amarakoon, C. L. Hamilton, S. A. Mitchell, P. F. Tennant, and M. E. Roye, “Biotechnology” in *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*, S. Badal and R. Delgod. Academic Press, 2016.
- [18] S. Chutia, S. Pal, and K. Bera, “Fundamentals of Agarose Gel Electrophoresis,”

Aqua Star Mag, sep, pp. 34–36, 2019.

- [19] A. C. Hall, “A comparison of DNA stains and staining methods for Agarose Gel Electrophoresis,” *bioRxiv*, pp. 1–9, jan, 2020. doi:<https://doi.org/10.1101/568253>
- [20] C. Y. Taylor, I. A. Guillén, M. Nazabal, J. R. Fernández, and J. A. Silva, “Electrophoretic Techniques Applied to the Detection and Analysis of the Human Microsatellite Dg10s478,” *J Biomol Tech.* vol. 18, no. 5, pp. 298–305, 2007.
- [21] M. J. Cabrejas N., C. Izquierdo A., E. González V, A. Almería L, and R. A. Silvestre M., “Detection and molecular diagnosis of a new case of congenital analbuminaemia,” *Med. Clin. (Barc).*, vol. 154, no. 7, pp. 243–288, 2020.
- [22] J. Amania, A. Ahmadpoura, A. A. Fooladia I., and S. Nazarianb, “Detection of *E. coli* O157:H7 and *Shigella dysenteriae* toxins in clinical samples by PCR-ELISA,” *brazilian journal Infect. Dis.*, vol. 9, no. 3, pp. 278–284, 2015.
- [23] A. Cuzcano, J. Sandoval, M. L. Guevara F., and R. Fujita, “Uso de la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano,” *Rev. peru biol*, vol. 12, no. 3, p. 349-358, oct. 2005.
- [24] Girón Fernández-Crehuet *et al.*, “La composición de la microbiota duodenal en niños con enfermedad celíaca activa está influenciada por el grado de enteropatía,” *An. Pediatría*, vol. 84, no. 4, pp. 224–230, 2016. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2015.06.014>.
- [25] M. E. Cerón, G. Marcoppido, M. D. Trangoni, and S. L. Cravero, “Detection of fiber-digesting bacteria in the forestomach contents of llamas (*Lama glama*) by PCR”, *Rev Argent Microbiol*, vol. 45, no.2, pp. 147–149, 2013.
- [26] J. Cui, L. Bai, X. Liu, W. Jie, and B. Cai, “Arbuscular mycorrhizal fungal communities

in the rhizosphere of a continuous cropping soybean system at the seedling stage”, *Brazilian Journal of Microbiology* , vol. 49, no. 2, pp. 240–247, 2018.

- [27] J. Amorim-Conselheiro et al., “Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* indoors: A public health approach”, *Rev. Iberoam. Micol.*, vol. 36, no. 2, pp. 79–82, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2019.01.002>
- [28] Q. Meng et al., “Diversity and abundance of denitrifiers during cow manure composting”, *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 51, no. 3, pp. 191–200, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.08.003>.
- [29] M. Rashno, M. Shapouri, and A. Jolodar, “Construction of a synthetic vector for preparation of a 100 base pair DNA ladder”, *Iran. J. Biotechnol.*, vol. 10, no. 2, pp. 106–110, 2012.
- [30] N. Á. Mittelman et al., “Polyacrylamide gel electrophoresis: a powerful tool in the food-processing sector”, 2013.
- [31] M. Abbasian, H. A. Seyedi, Z. Boroujeni, and M. Mofid, “Easy method for production of a home-made DNA ladder in every laboratory”, *Adv. Biomed. Res.*, vol. 4, no. 1, p. 70, Jan. 2015, doi: [10.4103/2277-9175.153894](https://doi.org/10.4103/2277-9175.153894).
- [32] S. Mostaan et al., “A novel combined method for cost-benefit production of DNA ladders”, *Adv. Biomed. Res.*, vol. 4, no. 1, p. 15, Jan. 2015, doi: [10.4103/2277-9175.148298](https://doi.org/10.4103/2277-9175.148298).
- [33] J.-S. Lee, Y.-J. Heo, J. K. Lee, and Y.-H. Cho, “KatA, the Major Catalase, Is Critical for Osmoprotection and Virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PA14”, *Infect. Immun.*, vol. 73, no. 7, pp. 4399 – 4403, Jul. 2005, doi: [10.1128/IAI.73.7.4399-4403.2005](https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.4399-4403.2005).

- [34] T. Adékambi, M. Drancourt, and D. Raoult, “The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists”, *Trends Microbiol.*, vol. 17, no. 1, pp. 37–45, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.09.008>.
- [35] L. Ait Tayeb, E. Ageron, F. Grimont, and P. A. D. Grimont, “Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on rpoB sequences and application for the identification of isolates”, *Res. Microbiol.*, vol. 156, no. 5, pp. 763–773, 2005, doi: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.02.009>.
- [36] L.-T. Wang, F.-L. Lee, C.-J. Tai, and H. Kasai, “Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 57, no. 8, pp. 1846–1850, 2007, doi: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64685-0>.
- [37] H. Aghamollaei, M. M. Moghaddam, H. Kooshki, M. Heiat, R. Mirnejad, and N. S. Barzi, “Detection of *Pseudomonas aeruginosa* by a triplex polymerase chain reaction assay based on *lasI/R* and *gyrB* genes”, *J. Infect. Public Health*, vol. 8, no. 4, pp. 314–322, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.03.003>.
- [38] S. Yamamoto and S. Harayama, “PCR amplification and direct sequencing of gyrB genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, no. 3, pp. 1104–1109, Mar. 1995, doi: [10.1128/AEM.61.3.1104-1109.1995](https://doi.org/10.1128/AEM.61.3.1104-1109.1995).
- [39] A. J. Schoeffler, A. P. May, and J. M. Berger, “A domain insertion in *Escherichia coli* GyrB adopts a novel fold that plays a critical role in gyrase function”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. 21, pp. 7830–7844, nov. 2010, doi: [10.1093/nar/gkq665](https://doi.org/10.1093/nar/gkq665).
- [40] M. Narusaka, T. Shiraishi, M. Iwabuchi, and Y. Narusaka, “rpoD gene expression

as an indicator of bacterial pathogens in host plants”, *J. Gen. Plant Pathol.*, vol. 77, no. 2, pp. 75–80, 2011, doi: 10.1007/s10327-011-0298-x.

- [41] M. Mulet, A. Bennasar, J. Lalucat, and E. García-Valdés, “An rpoD-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples”, *Mol. Cell. Probes*, vol. 23, no. 3–4, pp. 140–147, 2009, doi: 10.1016/j.mcp.2009.02.001.
- [42] G. Santoyo et al., “Detección de los genes phlD y hcnC en bacterias antagonistas productoras de sideroforinas asociadas a *Rubus fruticosus* L.”, *Nov. Sci.*, vol. 12, 2020. [Online]. Available: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-07052020000100008&nrm=iso.
- [43] D. V Mavrodi, O. V Mavrodi, B. B. McSpadden-Gardener, B. B. Landa, D. M. Weller, and L. S. Thomashow, “Identification of differences in genome content among phlD-positive *Pseudomonas fluorescens* strains by using PCR-based subtractive hybridization.”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, no. 10, pp. 5170–5176, oct. 2002, doi: 10.1128/aem.68.10.5170-5176.2002.
- [44] C. Picard and M. Bosco, “Genetic diversity of phl D gene from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. strains from the maize rhizosphere,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 219, no. 2, pp. 167–172, Feb. 2003, doi: 10.1016/S0378-1097(03)00027-2.
- [45] P. E. De Los Santos, A. H. A. Parret, and R. De Mot, “Stress-related *Pseudomonas* genes involved in production of bacteriocin LlpA”, *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 244, no. 2, pp. 243–250, 2005, doi: 10.1016/j.femsle.2005.01.049.

- [46] A. H. A. Parret, G. Schoofs, P. Proost, and R. De Mot, "Plant Lectin-Like Bacteriocin from a Rhizosphere-Colonizing *Pseudomonas* Isolate", *J. Bacteriol.*, vol. Vol. 185, pp. 897–908, 2002, doi: 10.1128/JB.185.3.897.
- [47] F. Valenzuela-González, R. Casillas-Hernández, E. Villalpando, and F. Vargas-Albores, "El Gen aRNR 16s en el estudio de comunidades microbianas marinas", *Ciencias Mar.*, vol. 41, no. 4, pp. 297–313, 2015, doi: 10.7773/cm.v41i4.2492.
- [48] M. D. R. Rodicio and M. D. C. Mendoza, "Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica", *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 22, no. 4, pp. 238–245, 2004, doi: 10.1157/13059055.
- [49] L. Braga, "Evaluación de la capacidad promotora del crecimiento vegetal de una cepa de *Pseudomonas fluorescens* y la influencia de su inoculación sobre la comunidad microbiana de la rizósfera de alfalfa", *Tesis de grado, Univ. de la Rep., Uruguay.* 2015, [Online]. Available: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/123456789/8456/1/uy24-17746.pdf>.
- [50] M. Amills, O. Francino, and A. Sánchez, "Primer-directed synthesis of a molecular weight marker", *Genet. Anal.*, vol. 13, no. 6, pp. 147–149, Dec. 1996, doi: 10.1016/s1050-3862(96)00165-9.
- [51] S. V Polyarush, S. S. Egamberdiev, D. R. Mansurov, and S. S. Azimova, "Preparation of DNA Markers Based on *E. Coli* Plasmid DNA," *Chem. Nat. Compd.*, vol. 39, no. 6, pp. 592–594, 2003, doi: 10.1023/B:CONC.0000018117.85641.b5.
- [52] T.-Y. Wang, L. Guo, and J.-H. Zhang, "Preparation of DNA ladder based on

multiplex PCR technique”, *J. Nucleic Acids*, vol. 2010, ID 421803, Jul. 2010, doi: 10.4061/2010/421803.

- [53] R. C. Henrici, T. J. Pecen, J. L. Johnston, and S. Tan, “The pPSU Plasmids for Generating DNA Molecular Weight Markers”, *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, ID 2438, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-02693-1.
- [54] S. Qiu *et al.*, “Effects of open drainage ditch design on bacterial and fungal communities of cold waterlogged paddy soils,” *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 44, no. 3, pp. 983–991, 2013, doi: 10.1590/S1517-83822013000300050.
- [55] ThermoScientific, “Interpretation of Nucleic Acid 260 / 280 Ratios,” *Tech. Bull.*, ID 7707, 2012.
- [56] Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN, “Programa de control de calidad de muestras de adn y arn”, *Univ. de Sal.* pp. 1–10, oct. 2020. [online] Disponible en: <http://www.bancoadn.org/>
- [57] B. W. Hounkpe, F. Chenou, F. de Lima, and E. V. De Paula, “HRT Atlas v1.0 database: redefining human and mouse housekeeping genes and candidate reference transcripts by mining massive RNA-seq datasets”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 49, no. D1, pp. 24-27, Jan. 2021, doi: 10.1093/nar/gkaa609.
- [58] A. Hardjasa, M. Ling, K. Ma, and H. Yu, “Investigating the Effects of DMSO on PCR Fidelity Using a Restriction Digest-Based Method,” *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, vol. 14, no. April, pp. 161–164, 2010.
- [59] A. M. Bolívar Sánchez, A. del V Rojas E., and P. J. García Lugo, “PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización,” *Av. en Biomed.* Vol. 3, No. 1, abril 2014, 2014, [Online]. Available:

<http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/biomedicina/article/view/4584>.

- [60] T. A. Brown, *Genomes 3*, 3rd ed. New York: Garland Science Pub., 2007.
- [61] S. Hishinuma, M. Yuki, M. Fujimura, and F. Fukumori, "OxyR regulated the expression of two major catalases, KatA and KatB, along with peroxiredoxin, AhpC in *Pseudomonas putida*," *Environ. Microbiol.*, vol. 8, no. 12, pp. 2115–2124, Dec. 2006, doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01088.x.
- [62] Sigma Aldrich, "DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder)", 2021. [En línea]. Disponible en: [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11721933001?lang=es®ion=MX#:~:text=DNA%20Molecular%20Weight%20Marker%20XIV%20\(100%20bp%20ladder\)%20allows%20accurate,ladder\)%20for%20precise%20size%20determination](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11721933001?lang=es®ion=MX#:~:text=DNA%20Molecular%20Weight%20Marker%20XIV%20(100%20bp%20ladder)%20allows%20accurate,ladder)%20for%20precise%20size%20determination.). [Accedio: 21-Mar-2021]
- [63] New England BioLabs, "100 bp DNA Ladder", 2021. [En línea]. Disponible en: [https://www.neb.uk.com/products/neb-catalogue/nucleic-acids-\(cloning\)/100-bp-dna-ladder?returnurl=/SearchResults%3Fs%3DN3231S&pn=1&ps=12&b=true#jump](https://www.neb.uk.com/products/neb-catalogue/nucleic-acids-(cloning)/100-bp-dna-ladder?returnurl=/SearchResults%3Fs%3DN3231S&pn=1&ps=12&b=true#jump) [Accedio: 21-Mar-2021]
- [64] Promega, "BenchTop 100bp DNA Ladder", 2021. [En línea]. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/molecular-weight-markers/benchtop-dna-markers/?catNum=G8291> [Accedio: 21-Mar-2021]
- [65] ThermoFischer, "Estándar de ADN GeneRuler 100 bp", 2021. [En línea]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM0241#/SM024> [Accedio: 21-Mar-2021]

- [66] ThermoFischer, “Escalera de ADN de 100 bp”, 2021. [En línea]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15628019#/15628019>
[Accedio: 21-Mar-2021]
- [67] BioTecMol, “ADN pUC19/Mspl Marcador de bajo peso molecular. 501-110 pb”, 2021. [En línea]. Disponible en: <http://biotecmol.mx/productos-servicios/pcr-y-biologia-molecular/> [Accedio: 21-Mar-2021]