



**UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA**

**FACULTAD CIENCIAS DEL MAR
CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA**

“EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA AMPLIFICACIÓN DEL
GEN 18S ARNr DE DOS MICROALGAS A TRAVÉS DE LA REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)”

TRABAJO DE TITULACIÓN

Previo a la obtención del Título de

BIÓLOGA MARINA

AUTOR

ESCALANTE PIN KIURA MADELANE

TUTOR

Blga. JANETH GALARZA TIPÁN, Ph. D.

LA LIBERTAD-ECUADOR

2019

**UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA**

**FACULTAD CIENCIAS DEL MAR
CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA**

“EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA AMPLIFICACIÓN DEL
GEN 18S ARNr DE DOS MICROALGAS A TRAVÉS DE LA REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)”

TRABAJO DE TITULACIÓN

Previo a la obtención del Título de

BIÓLOGA MARINA

AUTOR

ESCALANTE PIN KIURA MADELANE

TUTOR

Blga. JANETH GALARZA TIPÁN, Ph. D.

LA LIBERTAD-ECUADOR

2019

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por las ideas, hechos y resultados expuestos en esta tesis de grado me corresponden exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la misma, a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

A handwritten signature in blue ink, reading "Kiura Madelane Escalante Pin", written over a horizontal line.

Kiura Madelane Escalante Pin
C.I. 131246682-2

DEDICATORIA

El presente trabajo es dedicado a mis padres, Fulton y Alexi quienes me han apoyado siempre a lo largo de mis años de estudio y, que con su esfuerzo, dedicación y sacrificio me han permitido cumplir una meta más. A mi hermana Ammy, por su apoyo y consejos durante mis años de estudio, y a quien deseo servirle como un ejemplo a seguir en la familia.

AGRADECIMIENTOS

A las autoridades y personal académico de la Universidad Estatal Península de Santa Elena por la orientación durante mi formación profesional.

A la Blga. Janeth Galarza, Ph.D., tutora de tesis, por sus ideas, conocimiento, orientación y aporte para la realización de este trabajo de investigación.

A mi familia, Fulton, Alexi y Ammy, por su esfuerzo y apoyo incondicional, ya que constituyen el pilar fundamental en mi vida y son la razón principal para alcanzar mis metas.

Gracias a aquellas personas que dedicaron parte de su tiempo para que yo pudiera llegar a realizar este trabajo de titulación.

TRIBUNAL DE GRADO



Blga. Mayra Cuenca Zambrano, Mgt.
Decana (e)
Facultad de Ciencias del Mar



Blga. Tanya González Banchón, Mgt.
Directora (e)
Facultad Ciencias del Mar



Blga. Ericka Salavarría Palma, Ph.D.
Docente de área



Blga. Janeth Galarza Tipán, Ph.D.
Docente Tutora



Abg. Victor Coronel Ortiz, M.Sc.
Secretario General (e)



INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	4
3. OBJETIVOS	6
3.1. OBJETIVO GENERAL	6
3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	6
4. HIPÓTESIS	7
5. MARCO TEÓRICO	8
5.1. AMPLIFICACIÓN DEL ADN	8
5.2. MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN DE ADN	9
5.2.1. Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP).....	9
5.2.2. Amplificación basada en la Secuencia de Ácido Nucleico (NASBA).....	10
5.2.3. Amplificación de desplazamiento de cadena (SDA)	11
5.2.4. Reacción en cadena de ligasa (LCR)	11
5.2.5. Amplificación dependiente de helicasa (HDA)	12
5.2.6. Método de amplificación de ramificación (RAM).....	13
5.2.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	13
5.2.7.1. ADN molde	14
5.2.7.2. dNTPs	14
5.2.7.3. MgCl ₂	15
5.2.7.5. Buffer.....	16
5.2.7.7. Ciclo de PCR.....	17

5.3.	MARCADORES MOLECULARES AMPLIFICADOS POR PCR.....	18
5.4.	EL <i>18S ARNr</i> UN MARCADOR ALTAMENTE CONSERVADO	19
5.5.	AMPLIFICACIÓN DEL <i>GEN 18S ARNr</i> EN LA IDENTIFICACIÓN DE MICROALGAS	20
6.	MARCO METODOLÓGICO	22
6.1.	TRABAJO DE LABORATORIO	22
6.1.1.	Obtención de muestras	22
6.2.	TRABAJO BIOINFORMÁTICO	22
6.2.1.	Diseño de Partidores	22
6.3.	ANÁLISIS MOLECULARES	23
6.3.1.	Extracción de ADN	23
6.3.1.1.	Protocolo TENS Modificado.....	23
6.3.1.2.	Protocolo de Método Salino (NaCl) Modificado	24
6.3.2.	Purificación de ADN.....	24
6.3.3.	Cuantificación de ADN.....	25
6.4.	VARIACIONES DE TEMPERATURA EN LA AMPLIFICACIÓN DEL <i>gen 18s ARNr</i>	25
6.4.1.	Evaluación de la temperatura respecto al ciclo de amplificación ...	26
7.	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	27
7.1.	TRABAJO BIOINFORMÁTICO	27
7.1.1.	Diseño de Partidores	27
7.2.	ANÁLISIS MOLECULARES	30

7.2.1. Extracción de ADN	30
7.2.1.1. Protocolo TENS modificado	30
7.2.1.2. Protocolo NaCl modificado.....	32
7.3. VARIACIONES DE TEMPERATURA EN LA AMPLIFICACIÓN DEL <i>gen 18S ARNr</i>	34
7.3.1. Evaluación de la temperatura respecto al ciclo de amplificación ...	38
8. CONCLUSIONES	42
9. RECOMENDACIONES	44
10. BIBLIOGRAFÍA	45
11. ANEXOS.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de la PCR, temperaturas, tiempos y ciclos estándares.	18
Figura 2. Alineamiento de secuencias del <i>gen 18S ARNr</i> . A.....	28
Figura 3. Resultados obtenidos en el programa Primer-BLAST.....	29
Figura 4. Perfil espectral de las muestras de ADN de la cepa PM016 y cepa PM017 extraídas con el protocolo TENS obtenido a partir de espectrofotometría en NanoDrop 2000.....	31
Figura 5. ADN genómico de las microalgas obtenido con el protocolo TENS.....	31
Figura 6. Perfil espectral de las muestras de ADN de la cepa PM016 y cepa PM017 extraídas con el protocolo NaCl obtenido a partir de espectrofotometría en NanoDrop 2000.....	32
Figura 7. ADN genómico de las microalgas obtenido con el protocolo NaCl.....	33
Figura 8. Gradiente de temperatura de la cepa PM016 empleando los partidores <i>TH100F</i> y <i>TH101R</i>	35
Figura 9. Gradiente de temperatura de la cepa PM017 empleando los partidores <i>PM017F</i> y <i>PM017R</i>	36
Figura 10. Número de ciclos evaluados en la PCR de la cepa PM016.....	39
Figura 11. Número de ciclos evaluados en la PCR de la cepa PM017.	40
Figura 12. Gabinete de Seguridad utilizado para la realizar la mezcla de PCR ..	52
Figura 13. Pastilla celular obtenida de las muestras después de la extracción ADN	52
Figura 14. Trabajo realizado en el Laboratorio de Biología Molecular.....	53
Figura 15. Geles de agarosa realizados durante el trabajo de investigación.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Identificación de las secuencias de microalgas utilizadas para el diseño de los partidores del <i>gen 18S ARNr</i>	27
Tabla 2. Características de los partidores utilizados para la amplificación del <i>gen 18S ARNr</i>	28
Tabla 3. Datos de concentración y pureza del ADN – Protocolo TENS	30
Tabla 4. Datos de concentración y pureza del ADN – Protocolo NaCl.....	32

GLOSARIO

Material genético

El material genético de un organismo se refiere al ADN o ARN que se encuentra en el núcleo, las mitocondrias y el citoplasma, y que juegan un papel fundamental en la determinación de la estructura y la naturaleza de las sustancias celulares.

Replicación

La replicación del ADN es el proceso mediante el cual se copia una molécula de ADN para producir dos moléculas de ADN idénticas.

Horquilla de replicación

Zona de la doble hélice de DNA donde se produce el desenrollamiento de las dos cadenas y se desarrolla la replicación del ADN

ARNr

El ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal es un ARN que forma parte de los ribosomas y es esencial para la síntesis proteica en todos los seres vivos.

Cofactor enzimático

La actividad de algunos enzimas depende solamente de su estructura como proteínas, mientras que otros necesitan, además uno o más componentes no proteicos, llamados cofactores. El cofactor puede ser un ion metálico, o bien una molécula orgánica.

Taq polimerasa

Es una ADN polimerasa resistente a la temperatura aislada de *Thermus aquaticus* que puede extender partidores a altas temperaturas; utilizado en la reacción en cadena de la polimerasa.

Partidores

Un iniciador o cebador es una secuencia corta de ADN de cadena simple que se utiliza en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

PCR

La reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, es una técnica de laboratorio utilizada para hacer copias múltiples de un segmento de ADN. La PCR es muy precisa y se puede utilizar para amplificar o copiar un objetivo de ADN específico de una mezcla de moléculas de ADN.

ABREVIATURAS

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
dNTPs	Deoxinucleósido trifosfato
18S ARNr	Componente de la subunidad ribosómica eucariota pequeña (40S).
ITS	Espaciador transcrito interno
rbcL	Gen de la subunidad mayor de la ribulosa-1,- bifosfato carboxilasa/oxigenasa
COI	Citocromo oxidasa I
MgCl₂	Cloruro de magnesio
T_m	Temperatura melting o de fusión
SSU	Subunidad ribosómica menor
LSU	Subunidad ribosómica grande

RESUMEN

La amplificación o replicación de la molécula de ADN, consiste en que una molécula madre puede producir dos moléculas hijas idénticas en toda su secuencia. Una forma de amplificar el ADN *in vitro* es a través de la técnica de la PCR, en donde, la temperatura de hibridación de los partidores juega un rol importante a la hora de amplificar un gen. Existen diversos marcadores moleculares en el estudio de las microalgas; sin embargo, el *gen 18S ARNr* sobresale como marcador molecular en la identificación de células eucariotas. Por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la temperatura en la amplificación del *gen 18S ARNr* de dos microalgas a través de la Reacción en Cadena Polimerasa (PCR). Para el efecto, se utilizaron muestras aisladas de la Península de Santa Elena, registradas con los códigos PM016 y PM017, pertenecientes al proyecto INCYT-PNF-2017M3112. La extracción de ADN se realizó mediante el protocolo NaCl modificado y el protocolo TENS modificado, para la amplificación se diseñaron partidores con herramientas bioinformáticas como Geneious Prime® y Primer-BLAST, posteriormente se evaluaron gradientes de temperatura y ciclos de PCR. El protocolo TENS arrojó mejores resultados con respecto a los valores de concentración (150-700ng/μl) y pureza (>1,8). La evaluación de gradientes de temperatura demostró que la temperatura óptima para la cepa PM017 es de 64°C con los partidores PM017F y PM017R amplificando fragmentos de 1320pb; mientras que para la cepa PM016 la temperatura eficiente es a 59°C empleando los partidores TH100F y TH101R logrando fragmentos de 1230pb. Mientras que la evaluación del efecto de la temperatura con respecto al ciclo de amplificación mostró que 25 ciclos son suficientes para generar amplicones que permitan demostrar la presencia del *gen 18S ARNr*.

Palabras clave: PCR, replicación, amplificación, temperatura.

ABSTRACT

The amplification or replication of the DNA molecule consists of that a mother molecule can produce two identical daughter molecules throughout its sequence. A way to amplify DNA in vitro is through the PCR technique, where, the hybridization temperature of primers plays an important role in amplifying a gene. There are several molecular markers in the study of microalgae; the 18S rRNA gene stands out as a molecular marker in the identification of eukaryotic cells. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of temperature on the amplification of the *18S rRNA gene* of two microalgae through the Polymerase Chain Reaction (PCR). For this purpose, isolated samples from the Santa Elena Peninsula, registered with codes PM016 and PM017, belonging to the INCYT-PNF-2017M3112 project were used. DNA extraction was performed using the modified NaCl protocol and the modified TENS protocol, for the amplification splitters were designed with bioinformatic tools such as Geneious Prime® and Primer-BLAST, subsequently temperature gradients and PCR cycles were evaluated. The TENS protocol showed better results with respect to concentration values (150-700 ng/L) and purity (>1.8). The evaluation of temperature gradients showed that the optimum temperature for strain PM017 is 64 ° C with primers PM017F and PM017R amplifying fragments of 1320bp; while for strain PM016 the efficient temperature is at 59 ° C using the TH100F and TH101R primers, achieving fragments of 1230 bp. While assessing the effect of temperature with respect to the DNA amplification cycle showed that 25 cycles are enough to generate amplicons to demonstrate the presence of the *18S ARr gene*.

Keywords: PCR, replication, amplification, temperature.

1. INTRODUCCIÓN

Todos los organismos vivos poseen la capacidad de reproducción, y esta idea surge con base en que su material genético, ADN, se preserva de una generación a la siguiente; mediante la amplificación o replicación de la molécula de ADN (Stuart, 2013). En la célula eucariota, la amplificación del ADN consiste en que una molécula puede producir dos moléculas de ADN hijas idénticas con una secuencia de nucleótidos igual a la molécula madre, debido a este proceso se le atribuye que la amplificación o replicación sea semiconservativa; siendo considerada como la base de la herencia, de genes de padres a hijos (Norriss, 2019; Saitou, 2013).

Desde el descubrimiento de la molécula de ADN por Watson y Crick (1953), se han buscado diferentes métodos alternativos para la amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos ya que ha adquirido gran relevancia en la biología molecular para diferentes fines de investigación. Entre los métodos de amplificación de ADN que se han desarrollado destacan la Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Notomi et al., 2000), Amplificación basada en la Secuencia de Ácido Nucleico (NASBA) (Guatelli et al., 1990), Amplificación de desplazamiento de cadena (SDA) (Walker, 1993), Reacción en cadena de ligasa (LCR) (Barany, 1991; Wu & Wallace, 1989), Amplificación dependiente de helicasa (HDA), (Jeong et al., 2009) y Método de amplificación de ramificación (RAM) (Zhang et al., 2001). Sin embargo, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ha sido la técnica revolucionaria en biología molecular, ya que permite *in vitro* amplificar una o

algunas copias de un fragmento de ADN en varios órdenes de magnitud, generando de miles a millones de copias de una secuencia de ADN en particular. Desarrollada en 1983 por Kary Mullis, quien se basó en la capacidad de la ADN polimerasa y su actuación en la replicación del ADN, desde entonces ha adquirido gran popularidad (Mullis, 1990; K. Mullis et al., 1986; Mullis & Faloona, 1987).

Para llevar a cabo la PCR son indispensables diferentes componentes como la molécula de ADN molde, dNTPs, $MgCl_2$, partidores *forward* y *reverse*, Buffer y la enzima *Taq* polimerasa. De los cuales, el que posee mayor relevancia son los partidores tanto *forward* como *reverse*; debido a que son los que determinan la especificidad de la hibridación durante la PCR. Entre las características más importantes que debe tener un partididor óptimo se encuentran el tamaño de estos que debe ser entre los 25 a 40 nucleótidos, el contenido de citocina y guanina (CG) deber entre el 40-50 %, y por último que la temperatura entre los partidores no debe diferir de 2-3°C; todas estas características permitirán llevar a cabo una PCR óptima (Green & Sambrook, 2019; van Pelt-Verkuil et al., 2008). Por otro lado, cada PCR consta de diferentes etapas, en las que se encuentran la desnaturalización en la cual las cadenas de ADN de doble hélice se separan a una temperatura entre 94°C y 96°C; la hibridación en la cual los partidores se unen en las zonas complementarias del ADN molde de cadena sencilla para flanquear el fragmento que se desea amplificar, esto ocurre a una temperatura de 50-60°C; y por último la extensión o conocida también como elongación en la cual se lleva a cabo la síntesis de ADN mediante la actuación de la *Taq* polimerasa, este proceso ocurre a 72°C.

En los últimos años, se han llevado a cabo diferentes investigaciones en el campo de la biología molecular que incluyen la amplificación por PCR de diferentes genes como el *COI*, *ITS*, *rbcL*; sin embargo, el *gen 18S ARNr* ha sido el más utilizado debido a que es un marcador altamente conservado (Alanis, 2013). De hecho se han realizado varios estudios empleando este marcador para el estudio de diferentes especies de microalgas como por ejemplo *Dunalliella*, *Haematococcus*, *Tetraselmis*, *Chaetoceros*, entre otros (Chantzistroutsiou et al., 2016; Gomaa et al., 2019; Li et al., 2017). Los protocolos de PCR empleados varían de acuerdo con las diferentes especies de estudio, sobre todo en la temperatura de hibridación; por lo tanto, la evaluación de gradientes de temperatura en la PCR para la amplificación del *gen 18S ARNr* en microalgas es un método para determinar la temperatura en la cual se puedan obtener productos de óptima calidad. Dada la importancia de la amplificación de genes *in vitro*, en esta investigación se evaluó el efecto de la temperatura en la amplificación del *gen 18S ARNr* de dos microalgas a través de la Reacción en Cadena Polimerasa (PCR).

2. JUSTIFICACIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa conocida como PCR es una técnica que permite la amplificación de regiones del ADN *in vitro*, y desde su aparición ha adquirido una alta popularidad en la biología molecular debido a su alta especificidad, eficiencia y fidelidad (Cha & Thilly, 1993).

En la PCR, la temperatura de hibridación es considerada uno de los parámetros más importantes ya que está ligada al diseño de partidores y su temperatura de fusión (T_m), siendo el principal determinante de la especificidad de la reacción; ya que un partidador mal diseñado puede dar como resultado poco o ningún producto, además si la temperatura es demasiado alta los partidores no se reconocerán eficientemente, mientras que si es muy baja pueden producirse una amplificación inespecífica, llevando en ambos casos a un bajo rendimiento de la PCR, y simplemente no se hibridan con la molécula molde, causando pérdidas económicas por el consumo de reactivos y tiempo de trabajo en el laboratorio.

Debido a que es una técnica rápida y eficiente, la PCR ha sido empleada para llevar a cabo estudios de diversidad genética, interacciones biológicas, relaciones filogenéticas, entre otros. Una de sus aplicaciones más importante ha sido en la identificación de especies, incluyendo a las microalgas mediante diversos marcadores moleculares como el *gen 18S ARNr*; sin embargo, los protocolos de PCR empleados en cada estudio difieren principalmente en la temperatura de

hibridación (Bérard et al., 2005; Eland et al., 2012; Kaczmarska et al., 2009; Kadar et al., 2018; Radha et al., 2013), ya que este parámetro es considerado el factor clave para la optimización de una PCR. La mejor alternativa para la optimización de la técnica es evaluar la temperatura de hibridación de los partidores. Esta práctica se lleva a cabo experimentando gradientes de temperatura que permitan la amplificación del gen en estudio.

Por este motivo, el desarrollo de esta investigación enfocada a la evaluación del efecto de la temperatura permitirá demostrar el alto potencial de la reacción en cadena de la polimerasa mediante su simplificación en tiempo empleando gradientes de temperatura, y por otro lado la capacidad en la amplificación del *gen 18S ARNr* permitiendo obtener amplicones de alta intensidad a una temperatura específica que pueden ser usados en posteriores análisis moleculares. Además, los resultados de este estudio sentarán las bases para relacionar el diseño de partidores con la temperatura de hibridación y aplicarlos en posteriores estudios afines a la biología molecular en microalgas, ya que aportará y demostrará información relevante que hay que considerar cuando se trabaja con la PCR. Finalmente, proporcionará información relevante con respecto a los protocolos, parámetros y consideraciones generales que se deben tomar en cuenta para la amplificación del *gen 18S ARNr* en microalgas presentes en la Península de Santa Elena.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la temperatura en la amplificación del *gen 18S ARNr* de dos microalgas a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar partidores específicos para la amplificación del *gen 18S ARNr* de dos especies de microalgas.
- Amplificar el *gen 18S ARNr* mediante gradientes de temperatura en las que se ajusten los partidores diseñados.
- Analizar los productos de PCR a través de electroforesis en geles de agarosa.
- Determinar la temperatura que mejor se ajuste a la amplificación del *gen 18S ARNr* en las microalgas en estudio.

4. HIPÓTESIS

Si la temperatura es la variable clave en la amplificación del ADN a través de la PCR, entonces se logrará obtener una buena amplificación del *gen 18S ARNr*

5. MARCO TEÓRICO

5.1. AMPLIFICACIÓN DEL ADN

Una de las características fundamentales de todos los organismos vivos, es su capacidad de reproducción. Esto se basa principalmente en la premisa de que su material genético, el ADN, debe preservarse de una generación a la siguiente; esto ocurre mediante la replicación del ADN, llegando este proceso a ser parte fundamental del ciclo de vida de todos los organismos (Gutierrez et al., 2013; Stuart, 2013). La replicación del ADN ha sido un foco central de la biología molecular desde el principio y lo sigue siendo hoy en día, y la búsqueda para comprender cómo se duplican nuestros genomas comenzó con la descripción de la doble hélice por Watson y Crick (1953) (Masai & Foiani, 2017).

En la célula eucariota, la amplificación del ADN consiste en que una molécula de ADN puede producir dos moléculas de ADN hijas idénticas con una secuencia de nucleótidos igual a la molécula madre, debido a este proceso se le atribuye que la amplificación o replicación sea semiconservativa; siendo considerada como la base misma de la herencia, cuyos genes se transmiten de padres a hijos (Norrissa, 2019; Peña-Castro et al., 2013; Saitou, 2013). La replicación tiene lugar en la zona denominada horquilla de replicación en el ADN. Una enzima ADN polimerasa se encarga de copiar en dirección 5' a 3' una cadena de la plantilla molde de ADN con alta fidelidad. Debido a que las dos cadenas de ADN son antiparalelas, la síntesis 5' a 3' se lleva a cabo en la cadena principal; mientras que, en la cadena rezagada, la ADN polimerasa no puede iniciar una nueva cadena, por lo que a los fragmentos

de ADN de esta cadena rezagada se unen moléculas cortas con cebadores de ARN, que posteriormente son reemplazados por nucleótidos de ADN (Alberts et al., 2002; Masai et al., 2010). En este proceso de amplificación del ADN están involucradas diversas enzimas y proteínas, de las cuales sobresale la ADN polimerasa, que es la enzima responsable de la síntesis de la molécula de ADN *in vivo* (Goedecke, 2007; Hyone-Myong, 1996).

5.2. MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN DE ADN

En la actualidad la amplificación de ácidos nucleicos es un proceso fundamental en la biología molecular, que se viene utilizando en diferentes áreas de investigación. Desde el descubrimiento de la molécula de ADN por Watson y Crick en 1853, varios métodos alternativos de amplificación *in vitro* se han venido experimentando, de los cuales los que mayor o mejores resultados han demostrado son los siguientes:

5.2.1. Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)

LAMP es un método que se caracteriza por amplificar el ADN con alta especificidad, eficiencia y rapidez en condiciones isotérmicas. Se basa en la síntesis de ADN de desplazamiento de la cadena de ADN, se realiza en presencia de la ADN polimerasa *Bacillus stearothermophilus* (Bst), desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP), y cuatro cebadores diseñados especialmente que reconocen secuencias distintas en la plantilla de ADN objetivo (Garrido, 2016). Posee ventajas entre las cuales se pueden destacar que utiliza equipos rentables y de reacción simple, posee

una alta eficiencia de amplificación; presenta mayor tolerancia a materiales inhibidores; los productos de amplificación se pueden visualizar directamente y posee la capacidad de amplificar secuencias específicas de ADN en condiciones isotérmicas evitando la necesidad de un ciclador térmico (Fakruddin, 2011; Fakruddin et al., 2013; Salamin et al., 2017).

5.2.2. Amplificación basada en la Secuencia de Ácido Nucleico (NASBA)

Fue desarrollado a principios de los 90 para amplificar los ácidos nucleicos sin la ayuda de un termociclador (Compton, 1991). Consiste en un sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS) para la replicación específica de ácidos nucleicos *in vitro*, y también se la conoce como 3SR (Replicación de Secuencia Autosostenida) y Amplificación mediada por transcripción (TMA) (Gill & Ghaemi, 2008; Guatelli et al., 1990). En este proceso intervienen tres enzimas: la transcriptasa inversa (RT) del virus de la mieloblastosis aviar (AMV), la ARNasa H y la ADN T7 dependiente de la ARN polimerasa (DdRp) (Fakruddin et al., 2012). Los productos que se obtienen a partir este método pueden ser detectados mediante electroforesis en gel, sondas de fluorescencia (NASBA real-time) y ensayo colorimétrico (NASBA-ELISA). Además, esta técnica ha resultado efectiva para la detección molecular de algunos microorganismos tales como el HVC y VIH (Gill & Ghaemi, 2008).'

5.2.3. Amplificación de desplazamiento de cadena (SDA)

Este método proporciona una amplificación compatible con ensayos de diagnóstico de ácido nucleico (Walker et al., 1992), ya que se basa en la actividad coordinada de dos enzimas, una ADN polimerasa de desplazamiento de cadena y una endonucleasa de restricción, para lograr la amplificación exponencial dirigida por el cebador de una secuencia diana en condiciones isotérmicas (Hellyer & Nadeau, 2004; Walker, 1993). Se caracteriza por ser una técnica de amplificación de ADN que utiliza enzimas fácilmente disponibles y no requiere ciclos de temperatura (Walker et al., 1992). Ha sido usada para detectar ADN genómico de micobacterias, ya sea isotópicamente o con quimioluminiscencia, además de ser la base de algunas pruebas de detección comerciales como BDProbeTec y se la ha evaluado para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* (McHugh et al., 2004; Walter & Strunk, 1994).

5.2.4. Reacción en cadena de ligasa (LCR)

La LCR (Barany, 1991; Wu & Wallace, 1989) es una reacción de amplificación dependiente del molde de ADN cíclico que emplea cuatro partidores, dos que hibridan de manera única con una cadena de ADN molde y un conjunto complementario adyacentes, que hibridan con la cadena opuesta, además utiliza una ADN ligasa termoestable para la amplificación (Barany, 1991; Lisby, 1999). Sin embargo, el problema de esta tecnología es su potencial riesgo de contaminación. La detección de productos LCR se puede realizar mediante electroforesis o mediante un procedimiento de microplaca similar a un ensayo inmunoabsorbente

ligado a enzimas (ELISA) (Andras et al., 2001). Posee una alta sensibilidad y especificidad (Prasad & Vidyarthi, 2009). Se ha empleado para detectar patógenos como *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* y *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas humanas, así como detectar mutaciones puntuales en el ADN del plásmido *C. trachomastis*, fragmentos clonados por virus VIH y en muestras clínicas de células falciformes humanas.(Andras et al., 2001).

5.2.5. Amplificación dependiente de helicasa (HDA)

El sistema HDA proporciona una herramienta muy útil para amplificar el ADN *in vitro* en condiciones isotérmicas con un esquema de reacción simplificado (Jeong et al., 2009). En este sistema, las cadenas de ADN dúplex se separan mediante una helicasa de ADN en presencia de dATP como cofactor, posteriormente se recubren con proteínas de unión a ADN de una cadena (SSB), y dos cebadores se hibridan con el ADN objetivo, finalmente la ADN polimerasa extiende la secuencia molde utilizando los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) del medio (Molina, 2015; Vincent et al., 2004). Este proceso se lleva a cabo a 65°C, permitiendo que se realicen múltiples ciclos de replicación a una sola temperatura de incubación, eliminando por completo la necesidad de equipos de termociclado. Los amplicones de HDA se pueden detectar mediante electroforesis en gel, formato en tiempo real y análisis de inmunosorción enzimática (ELISA) (García, 2013; Gill et al., 2010; Gill et al., 2007; Gill & Ghaemi, 2008).

5.2.6. Método de amplificación de ramificación (RAM)

RAM es un método de amplificación de ácido nucleico isotérmico. Esta técnica se denomina RAM porque la potencia de amplificación se deriva de la extensión del cebador, el desplazamiento del filamento y los puntos de ramificación múltiple. El ensayo RAM ofrece ventajas entre las cuales de partidores se unen fácilmente, lo que permite que la reacción se realice en condiciones isotérmicas, evitando la necesidad de un termociclador y que los cebadores genéricos amplifican con igual eficiencia, lo que resulta en una mejor capacidad que la PCR convencional. Se puede utilizar fácilmente en laboratorios clínicos para la detección de genes y agentes infecciosos en diversas áreas, como hematología, oncología, enfermedades infecciosas, patología, análisis forense, bancos de sangre y enfermedades genéticas. Además, tiene un gran potencial para su uso en pruebas de campo y consultorios médicos debido a su formato de amplificación simple e isotérmico (Beals et al., 2010; Fakruddin et al., 2013; Hsuih et al., 1996; Zhang et al., 2001).

5.2.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Es una técnica revolucionaria en biología molecular, conocida como PCR que permite *in vitro* amplificar una o algunas copias de un fragmento de ADN en varios órdenes de magnitud, generando de miles a millones de copias de una secuencia de ADN en particular. Fue desarrollada en 1983 por el bioquímico estadounidense Kary Mullis (Mullis & Faloona, 1987; Mullis et al., 1986), quién se basó en la actuación de la ADN polimerasa en la replicación del ADN (Mullis, 1990); desde entonces ha adquirido popularidad debido a su simplicidad y alta probabilidad de

éxito (Erich, 1989; Joshi & Deshpande, 2010). La PCR incluye diferentes componentes tales como: molécula de ADN molde, dNTPs, MgCl₂, partidores *Forward* y *Reverse*, Buffer y la enzima *Taq* polimerasa.

5.2.7.1. ADN molde

El ADN molde debe ser fácilmente accesible a los partidores y la ADN polimerasa, además debe estar libre de concentraciones inhibitoras de proteínas, lípidos, carbohidratos y sales contaminantes. El ADN objetivo debe encontrarse libre de nucleasas (pueden degradar el ADN molde y el ADN amplificado), de endo o exoproteasas (pueden inactivar la ADN polimerasa dependiente de ADN termoestable) y otras proteínas de unión al ADN (que podrían ayudar a estabilizar el doble estructura helicoidal del ADN y, por lo tanto, interfiere con el desenrollado del ADN, el reconocido del cebador y, además, en la amplificación por PCR) (Green & Sambrook, 2019; van Pelt-Verkuil et al., 2008).

5.2.7.2. dNTPs

Son componentes esenciales para la construcción de las cadenas amplificadas durante la PCR. Los cuatro desoxinucleótidos individuales son trifosfato de desoxiadenosina, dATP; trifosfato de desoxitimidina, dTTP; trifosfato de desoxitosina, dCTP y trifosfato de desoxiguanosina, dGTP. Los dNTPs generalmente se adquieren de proveedores comerciales de manera individual o como una mezcla, y son químicamente estables a una temperatura de -20°C (van Pelt-Verkuil et al., 2008).

5.2.7.3. MgCl₂

Es un cofactor enzimático requerido para la ADN polimerasa termoestable durante la amplificación en la PCR. La concentración alta de MgCl₂ provoca que el emparejamiento de bases formados durante la amplificación se desnaturalicen de manera ineficiente (Debnath et al., 2010; Green & Sambrook, 2019; Maddocks & Jenkins, 2016).

5.2.7.4. Partidores

Los partidores son los principales determinantes de la especificidad de la PCR. Para el diseño de estos se debe tomar en cuenta que la longitud de cada partidor debe ser entre los 18 a 30 nucleótidos, ya que partidores de menor tamaño pueden unirse inespecíficamente al ADN molde, mientras que si el tamaño es >30 nucleótidos existe una mayor probabilidad de que se formen estructuras secundarias. También es necesario tener en cuenta el contenido de citosina y guanina (CG), generalmente se recomienda un contenido CG entre 40% y 50%. La eficacia y la especificidad de la hibridación en la PCR aumentan si el extremo 3' del partidor es G, sin embargo, deben evitarse más de tres G o C en las últimas cinco bases del extremo 3'. Las temperaturas de los partidores conocida como T_m (Temperatura melting o de fusión) no deben diferir entre ellos de 2°C a 3°C, ya que puede llevar a un desajuste en los cambios de temperatura de reconocido entre los partidores y el ADN molde y a la hibridación no específica. En la actualidad, existen diversos programas que calculan los diferentes parámetros para el correcto diseño de partidores, disminuyendo así la

probabilidad de error al usarlos en la práctica (Debnath et al., 2010; Green & Sambrook, 2019; van Pelt-Verkuil et al., 2008).

5.2.7.5. Buffer

El buffer está compuesto generalmente de Tris-HCl, y es la solución amortiguadora que regula el pH de la reacción, facilitando la actividad de la ADN polimerasa termoestable (sensibilidad óptima), además permite la hibridación entre los partidores y el ADN molde (especificidad óptima) (Tamay de Dios et al., 2013; van Pelt-Verkuil et al., 2008).

5.2.7.6. *Taq* polimerasa

Diferentes ADN polimerasas termoestables se encuentran disponibles comercialmente, ya que esta constituye un factor importante para facilitar el éxito de la amplificación por PCR. Una de las utilizadas en la *Taq* polimerasa, la misma que descrita en 1976 (Chien et al., 1976), esta polimerasa termoestable deriva de una bacteria llamada *Thermus aquaticus*, cuyo hábitat natural son las aguas termales con temperatura entre 70°C y 75°C. Esta polimerasa termoestable tiene la capacidad de sintetizar productos de PCR relativamente largos, y además tiene la capacidad no inhibirse frente a contaminantes químicos que puedan quedar después de la extracción de ADN (van Pelt-Verkuil et al., 2008).

5.2.7.7. Ciclo de PCR

El proceso de la PCR consta de una desnaturalización inicial; seguida de ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación, extensión; y una extensión final (Cha & Thilly, 1993; Cornejo et al., 2014; Tamay de Dios et al., 2013)(Fig.1)

- Desnaturalización inicial. Las cadenas de ADN de doble hélice son separadas mediante el aumento de temperatura para que los puentes de hidrógeno puedan romperse. Generalmente ocurre entre 94°C y 96°C durante 5-10 minutos.
- Ciclos de la PCR. Se realizan ciclos sucesivos de desnaturalización y extensión, cada ciclo se repite entre 25 a 35 veces.
 - ❖ Desnaturalización. La reacción a una temperatura de 94°C a 95°C y durante 30 segundos a 1 minuto logra la desnaturalización completa de las cadenas del ADN molde, proporcionando moldes de cadena sencilla para el siguiente paso.
 - ❖ Hibridación. La temperatura disminuye, permitiendo a los partidores unirse en las zonas complementarias del ADN molde de cadena sencilla. Ambos partidores se unen de manera específica flanqueando el fragmento que se desea amplificar. Para que este paso se lleve a cabo la T_m debe ser óptima y depende específicamente de los partidores; generalmente oscila entre los 50°C y 60°C, y con un tiempo de 30 segundos a 1 minuto.
 - ❖ Extensión. Conocida también como elongación, consiste en la síntesis de la nueva cadena de ADN, mediante la actuación de la *Taq* polimerasa que emplea como sustrato los dNTPs se encuentran en el medio. La

temperatura óptima para la reacción es de 72°C y el tiempo de la extensión depende de la longitud del fragmento a amplificar.

- Extensión Final. Al concluir los ciclos, generalmente se realiza una última extensión que puede variar de 5-10 minutos a 72°C, para permitir que la polimerasa termine de sintetizar los fragmentos que pudieron quedar incompletos.

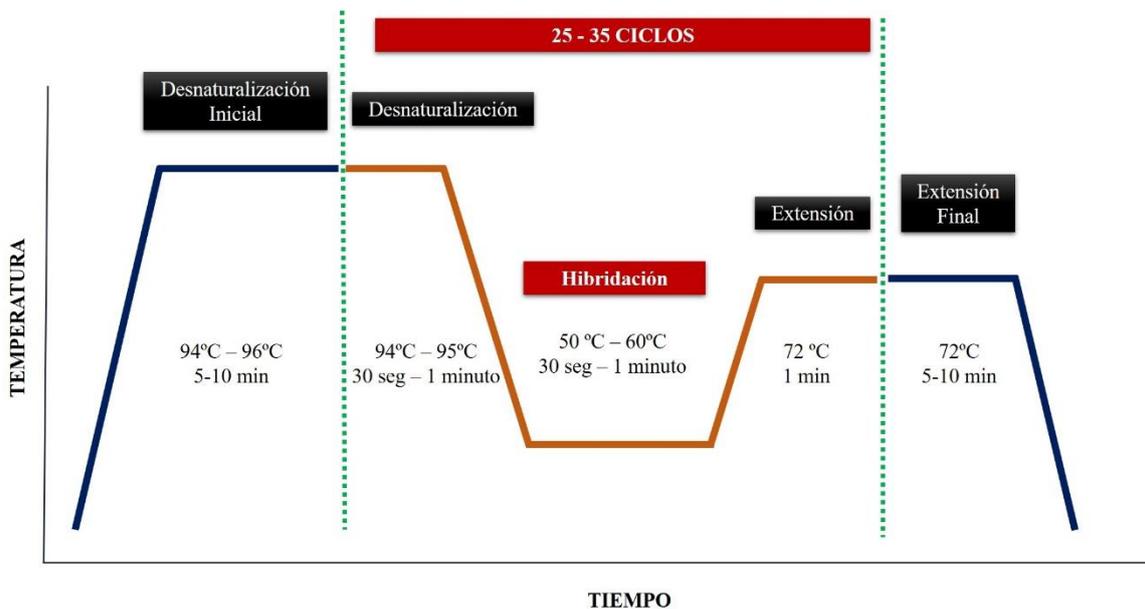


Figura 1. Etapas de la PCR, temperaturas, tiempos y ciclos estándares. Fuente: Escalante, 2019

5.3. MARCADORES MOLECULARES AMPLIFICADOS POR PCR

Durante los últimos años, con el auge de la biología molecular y biotecnología se han llevado a cabo investigaciones que incluyen la amplificación por PCR de diferentes genes, sobre todo en genes relacionados a la identificación; entre los cuales se destacan el *COI* (citocromo oxidasa I) que se ha utilizado ampliamente en

animales, algas rojas, pardas, diatomeas, sin embargo, el *COI* es poco utilizado en la identificación de microalgas verdes debido a la presencia de varios intrones (Guo et al., 2015; Hall et al., 2010). El *gen 18S ARNr* está presente en todos los organismos, contiene regiones bien conservadas dentro de una especie y que son diferentes entre especies, motivo por el cual ha sido utilizado en análisis filogenéticos e identificación de microalgas (Ebenezer et al., 2012; Guo et al., 2015; Moreno, 2008). El *ITS* (espaciador transcrito interno), también es usado para la identificación de microalgas, estas secuencias son útiles para definir las diferencias intraespecíficas o de población debido a su rápida evolución (Guo et al., 2015; Lang & Kaczmarska, 2011). El *rbcL* (Gen de la subunidad mayor de la ribulosa-1,-bifosfato carboxilasa/oxigenasa), se ha utilizado ampliamente en estudios de evolución, filogenia, biogeografía, genética de poblaciones, debido a la velocidad relativamente rápida a la que se fijan las mutaciones, resulta útil para la identificación de divergencia genética (Lang & Kaczmarska, 2011; Wongsawad & Peerapornpisal, 2014).

5.4. EL 18S ARNr UN MARCADOR ALTAMENTE CONSERVADO

Las secuencias moleculares de ADN han sido utilizadas para entender la organización entre los diferentes grupos de vida y sus relaciones evolutivas, el ADN ribosomal (*ADNr*) ha sido ampliamente usado, ya que es una secuencia genética que codifica ARN ribosomal (*ARNr*), el cual es un componente para el desarrollo de los ribosomas que traducen el ARN mensajero (*ARNm*) en proteínas, las mismas

que son esenciales para sustentar la vida (Alanis, 2013). Las moléculas de *ARNr* y las subunidades ribosomales se designan en unidades Svedberg (S), una medida de la velocidad de sedimentación de partículas centrifugadas en condiciones estándares (Vallejo, 2010). Los organismos eucariotas poseen ribosomas 80S, los cuales se componen de: la subunidad ribosómica grande (60S), la cual consta de tres regiones codificantes 28S, 5S y la 5,8S; y la subunidad ribosómica pequeña (40S), que está compuesta por la subunidad 18S (Alverson & Kolnick, 2005; Torres-Machorro et al., 2010). Debido a la naturaleza multicopia y las diversas tasas de evolución de las diferentes regiones de ADNr, el *gen 18S ARNr* es muy utilizado para estudios filogenéticos (Xu et al., 2016). Además, ya que sus secuencias son fácilmente accesibles y que posee regiones flanqueantes altamente conservadas, es posible el uso de cebadores universales, y por su disposición repetitiva en el genoma proporciona altas cantidades de ADN para la PCR (Alanis, 2013; Meyer et al., 2010).

5.5. AMPLIFICACIÓN DEL *GEN 18S ARNr* EN LA IDENTIFICACIÓN DE MICROALGAS

La SSU o *18S ARNr* ha sido usada para identificación molecular en diferentes especies de microalgas, tales como *Dunalliella salina*, *Haematococcus* sp., *Tetraselmis verrucosa*, *Chaetoceros gracilis*, *Thalassiosira weissflogii*, *Nannochloropsis oceánica*, *Isochrysis* sp., *Haslea*, *Pseudothecadinium campbellii*, entre otras. De manera que, el *gen 18S ARNr* posee un alto potencial ya que puede ser ampliamente utilizado para la amplificación en especies de los grupos

Chlorophytas, Bacillariophytas y Dinophyceae (Chantzistrountsiou et al., 2016; Efimova et al., 2019; Gomaa et al., 2019; Kadar et al., 2018; Kim et al., 2015; Li et al., 2017; Nikookar et al., 2017).

Para llevar a cabo la amplificación de genes empleando la técnica de PCR, es necesario evaluar los diferentes parámetros que implican realizarla, siendo el más importante la temperatura de hibridación, debido a que es el factor clave para que la PCR se lleve a cabo en óptimas condiciones, y la evaluación de gradientes de temperatura permite determinar la temperatura correcta de reconocido de los partidores durante la hibridación en una sola ejecución, haciendo que esta técnica sea más eficiente y rápida al emplearla en estudios moleculares.

6. MARCO METODOLÓGICO

6.1. TRABAJO DE LABORATORIO

6.1.1. Obtención de muestras

Las muestras que se utilizaron para el desarrollo de este trabajo fueron obtenidas desde cultivos de microalgas, registradas con los códigos PM016 y PM017 que corresponden al proyecto INCYT-PNF-2017M3112. La biomasa fue concentrada por centrifugación a 8000 RPM durante 5 minutos y almacenada a -20°C para su posterior uso.

6.2. TRABAJO BIOINFORMÁTICO

6.2.1. Diseño de Partidores

Para el diseño de partidores que amplifiquen el *gen 18S ARNr*, se descargaron 8 secuencias de microalgas chlorophyta de la base de datos GENBANK (NCBI) las mismas que fueron evaluadas y alineadas en el programa ClustalW Alignment (Thompson et al., 1994) implementado el software Geneious Prime® 2019.2.3. A partir de tres secuencias altamente similares, se diseñaron un juego de partidores, los mismos que fueron evaluados tanto en el programa Oligo Calc (Kibbe, 2007) como en el programa Primer-BLAST (NCBI) (Ye et al., 2012). Las secuencias utilizadas en este trabajo corresponden a los códigos de acceso al GenBank descritos en la (Tabla 1).

La amplificación del *gen 18S ARNr* también fue evaluado utilizando un juego de partidores *TH100F* (5'-AYGGCAACCTCATCCCAGGAAR-3') y *TH101R* (5'-

TGGACTAAGGGCAGCGACGTAWTC - 3´) diseñados por Yañez (2011) que amplifican microalgas y entregan un producto de 1230 pb.

6.3. ANÁLISIS MOLECULARES

Los análisis moleculares de las muestras biológicas fueron llevados a cabo en las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

6.3.1. Extracción de ADN

Se probaron dos protocolos para la extracción de ADN a) Técnica de extracción TENS modificado con Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (TENS) (Green & Sambrook, 2017; Sambrook & Russell, 2001), y b) Técnica de extracción por Método Salino (NaCl) modificado (Aljanabi & Martinez, 1997); ambos métodos fueron evaluados de acuerdo a la concentración y pureza.

6.3.1.1. Protocolo TENS Modificado

Se emplearon tubos eppendorf con 400 µL de biomasa concentrada de cada cepa, a cada tubo se le añadió 400 µL de buffer TENS, más 2 µL de proteinasa K y se incubaron a 37°C por 1 hora. Posteriormente se agregaron 200 µL de fenol y 100 mL de cloroformo y 100 µL de alcohol isoamílico y se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo eppendorf y se le agregó 500 µL de alcohol frío al 96%. La muestra fue mantenida en frío durante una hora y posteriormente centrifugada a 12000 rpm durante 10

minutos. Adicionalmente, se realizó el lavado con 300 μL de etanol frío al 75%, y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y la pastilla celular fue secada durante aproximadamente 20 minutos. Finalmente, fueron resuspendidas en 50 μL de Agua UltraPure™ y se conservaron a -20°C .

6.3.1.2. Protocolo de Método Salino (NaCl) Modificado

Tubos eppendorf con 400 μL de biomasa concentrada de cada cepa fueron tratados con 600 μL de tampón de extracción y 70 μL de SDS, posteriormente los tubos fueron incubados a 55°C durante 15 minutos. Adicionalmente se añadieron 200 μL de NaCl 5M, y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos. Luego se transfirió 800 μL del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf, y se le agregaron 700 μL de etanol frío al 96%. Las muestras fueron mantenidas en frío durante una hora y posteriormente centrifugadas a 10000 rpm durante 5 minutos. La pastilla celular fue lavada con 800 μL de etanol frío al 75%, y centrifugada a 12000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y la pastilla celular fue secada durante aproximadamente 20 minutos. Finalmente, fueron resuspendidas en 50 μL de Agua UltraPure™ y conservado a -20°C .

6.3.2. Purificación de ADN

La purificación del ADN se realizó mediante el método de Acetato de Sodio (3M, pH 5,2) que es una sal comúnmente usada para la mayoría de las precipitaciones rutinarias de ADN y ARN (Green & Sambrook, 2016). En este procedimiento se

utilizaron 10 μL de Acetato de Sodio por cada 100 μl de ADN. Además, se añadieron 250 μL de etanol frío al 96% y se lo dejó reposar a -20°C durante una hora. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 12000 rpm durante 10 minutos para la precipitación del ADN. El pellet fue lavado con 250 μL de etanol frío al 75%, y finalmente resuspendido en 40 μL de Agua UltrapureTM y conservado a -20°C .

6.3.3. Cuantificación de ADN

El producto extraído con los dos protocolos que pasó por el proceso de purificación fue cuantificado a través del equipo NanoDrop 2000 de Thermo ScientificTM, y mediante el software de este equipo se evaluó la cantidad del ácido nucleico ADN ($\text{ng}/\mu\text{L}$), así como la pureza de las muestras a través de la relación del valor de absorbancia 260/280, para el posterior uso de las muestras de ADN en la reacción en cadena de la polimerasa.

6.4. VARIACIONES DE TEMPERATURA EN LA AMPLIFICACIÓN DEL *gen 18s ARNr*

Las dos cepas PM016 y PM017, fueron sometidas a evaluación de un gradiente de temperatura que va de 59°C a 64°C para la cepa PM016. Mientras que para la cepa PM017 se aplicó un gradiente de temperatura de 55°C a 65°C . Los gradientes fueron establecidos con base en las temperaturas de los partidores.

La mezcla de PCR, para amplificar el *gen 18S ARNr* de las dos cepas de microalgas: PM016 y PM017; se siguió del protocolo descrito por Yañez (2011), un volumen de 30 μL fue preparado mezclando 1X PCR Buffer (10X PCR Rxn Buffer, INVITROGENTM), 0,2 mM de dNTPs (100mM dNTPs Set, INVITROGENTM), 3mM de MgCl_2 (25 mM MgCl_2 , INVITROGENTM), 0,125 μM de cada partidor, (10 μM), 1 U de Platinum® Taq DNA Polymerase (5 U/ μL , INVITROGENTM) y 1 μL de ADN genómico.

El programa de PCR utilizado en este estudio se siguió del protocolo descrito por Yañez (2011). Para el efecto se utilizó un Termociclador T100TM Thermal Cycler (BIORAD), empleando los siguientes ciclos: una desnaturalización inicial de 94°C por 10 minutos; seguido de 35 ciclos que consistieron en la desnaturalización a 94°C por 40 segundos, gradiente de temperatura de hibridación acuerdo a los partidores empleados en la mezcla por 30 segundos, elongación a 72°C por 1 minuto 30 segundos; y una elongación final a 72°C por 10 minutos.

6.4.1. Evaluación de la temperatura respecto al ciclo de amplificación

Para conseguir un potencial de amplificación se evaluó el efecto de la temperatura frente al número de ciclos de amplificación del *gen 18S ARNr* por PCR, y obtener un amplicón de mayor intensidad en el menor tiempo posible. Se evaluó un protocolo de amplificación con 25, 30 y 35 ciclos manteniendo el mismo programa de amplificación de PCR descrito anteriormente.

7. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

7.1. TRABAJO BIOINFORMÁTICO

7.1.1. Diseño de Partidores

Para la amplificación del *gen 18S ARNr* se utilizaron tres secuencias altamente similares de la base de datos GENBANK (Tabla 1), las cuales fueron analizadas en el software Geneious Prime® para el diseño de los partidores. Se realizó una alineación utilizando ClustalW Alignment, la cual mostró que las secuencias seleccionadas presentaban regiones conservadas cercanas a los 254 pb y 1552 pb. Sobre estas regiones se diseñaron partidores conservados para la amplificación del *gen* (Fig. 2). Los partidores diseñados fueron *Forward PM017F* (5'-TTCTGCTCTACCAACTTTTCG-3') y *Reverse PM017R* (5'-ACAAAGGGCTGGCACGAAATCAAC-3').

Tabla 1. Identificación de las secuencias de microalgas utilizadas para el diseño de los partidores, número de acceso en GenBank para las secuencias del *gen 18S ARNr*.

Organismo	GenBank	Loci	Lugar de origen	Tamaño (bp)	Autor
<i>Pseudendoclonium akinetum</i>	DQ011230.1	Nc. 18S	USA	1688	Pombert, et al., (2005)
<i>Pseudendoclonium</i> sp.	MF000572.1	Nc. 18S	---	1592	Škaloud, et al., (2018)
<i>Pseudendoclonium printzii</i>	HF570952.1	Nc. 18S	Antártida	1679	Škaloud, et al., (2013)

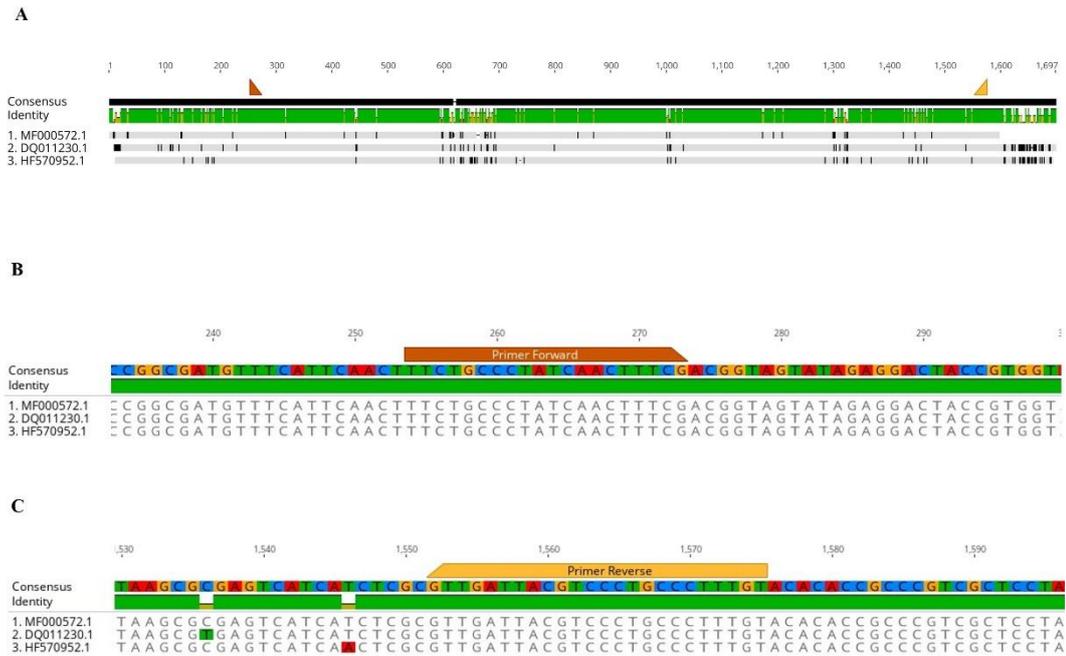


Figura 2. Alineamiento de secuencias del *gen 18S ARNr*. A. Vista general del alineamiento del *gen 18S ARNr* de las secuencias seleccionadas. B. Vista del sitio de hibridación del Primer *Forward* (color naranja). C. Vista del sitio de hibridación del Primer *Reverse*

Tanto los partidores diseñados en este estudio, así como el juego de partidores diseñados por Yañez (2011) *TH100F* (5'-AYGGCAACCTCATCCCAGGAAR-3') y *TH101R* (5'-TGGACTAAGGGCAGCGACGTAWTC-3'), cumplieron con las condiciones y parámetros establecidos para su funcionamiento. (Tabla 2).

Tabla 2. Características de los partidores utilizados para la amplificación del *gen 18S ARNr*.

Región	Partidor	Secuencia 5' → 3'	Largo (pb)	G+C (%)	T _m (°C) Teórico	Tamaño del amplicón (pb)
<i>18S ARNr</i>	<i>PM017F</i> *	5'-TTCTGCTCTACCAACTTTCG-3'	20	46%	56,4	≈ 1320
<i>18S ARNr</i>	<i>PM017R</i> *	5'-ACAAAGGGCTGGCACGAAATCAAC-3'	24	50	65,2	
<i>18S ARNr</i>	<i>TH100F</i> ¹	5'- AYGGCAACCTCATCCCAGGAAR - 3'	22	45-55	60-64	≈ 1230
<i>18S ARNr</i>	<i>TH101R</i> ¹	5'- TGGACTAAGGGCAGCGACGTAWTC - 3'	24	50	65	

* Partidores diseñados en este estudio

¹Partidores diseñados por Yañez (2011)

El tamaño de los amplicones se pudo obtener a través de un análisis *in silico* del gen *18S ARNr* en el programa Primer-BLAST. Con los partidores diseñados *PM017F* y *PM017R*, se obtuvieron productos amplificados de ≈ 1320 pb (Fig.3A); al igual que con los partidores *TH100F* y *TH101R* diseñados por Yañez (2011), se obtuvieron productos amplificados de ≈ 1230 pb (Fig. 3B).

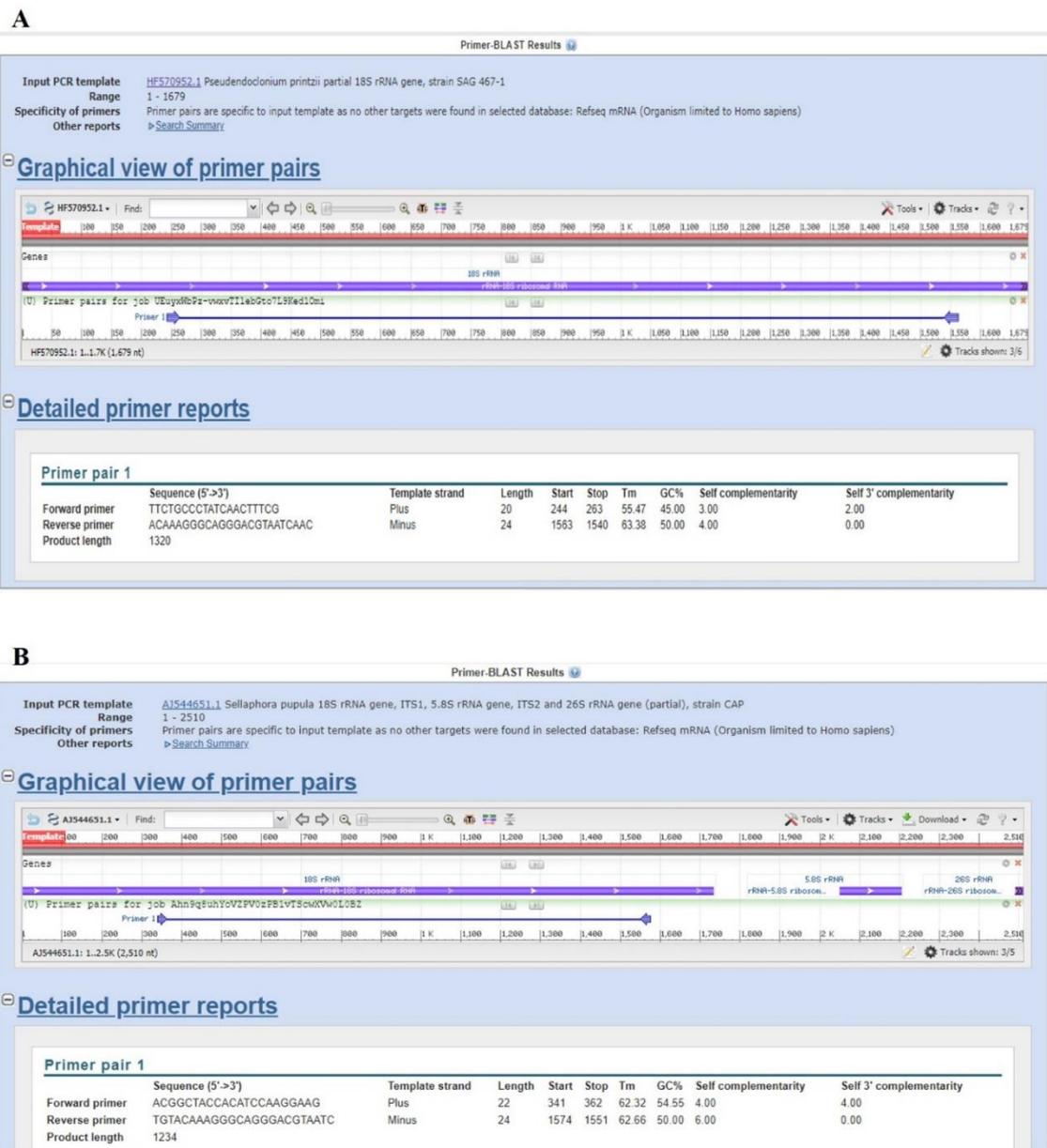


Figura 3. Resultados obtenidos en el programa Primer-BLAST. A. Amplificación obtenida utilizando los partidores *PM017F* y *PM017R*, obteniendo un producto amplificado de 1320 pb. B. Amplificación obtenida utilizando los partidores diseñados *TH100F* y *TH101R*, obteniendo un producto amplificado de 1230 pb.

7.2. ANÁLISIS MOLECULARES

7.2.1. Extracción de ADN

Se realizaron un total de 8 extracciones de ADN genómico, cuatro muestras corresponden al protocolo TENS y cuatro muestras con el protocolo NaCl.

7.2.1.1. Protocolo TENS modificado

Las extracciones de ADN con el protocolo TENS dieron como resultado concentraciones >150 ng/ μ L y <700 ng/ μ L para las cepas de microalgas en estudio, siendo la muestra PM016-1 la de menor concentración con 157,9 ng/ μ L, mientras que la muestra PM017-4 presentó la mayor concentración con este protocolo. Además, se obtuvieron valores de absorbancia 260/280 $>1,8$ en todas las muestras procesadas; de manera que reflejaron una pureza óptima en las muestras de ADN (Tabla 3).

Tabla 3. Datos de concentración y pureza del ADN – Protocolo TENS

Muestra Cepa 016	TENS		Muestra Cepa 017	TENS	
	Concentración ADN (ng/ μ L)	Relación A 260/280		Concentración ADN (ng/ μ L)	Relación A 260/280
1	157,9	2,03	3	556,0	1,98
2	360,3	1,84	4	675,0	1,88

La concentración y pureza de las muestras de ADN empleando el protocolo TENS modificado fueron evaluados por espectrofotometría, obteniendo un perfil espectral a partir de la relación de la absorbancia y la longitud de onda para cada una de las muestras analizadas (Fig. 4).

PROTOCOLO TENS

Sample ID	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	Sample Type	Factor	Factor type
016_1	157.9	ng/µl	3.159	1.560	2.03	DNA	50.00	Factor
016_2	360.3	ng/µl	7.205	3.918	1.84	DNA	50.00	Factor
017_3	556.0	ng/µl	11.119	5.609	1.98	DNA	50.00	Factor
017_4	675.0	ng/µl	13.500	7.183	1.88	DNA	50.00	Factor

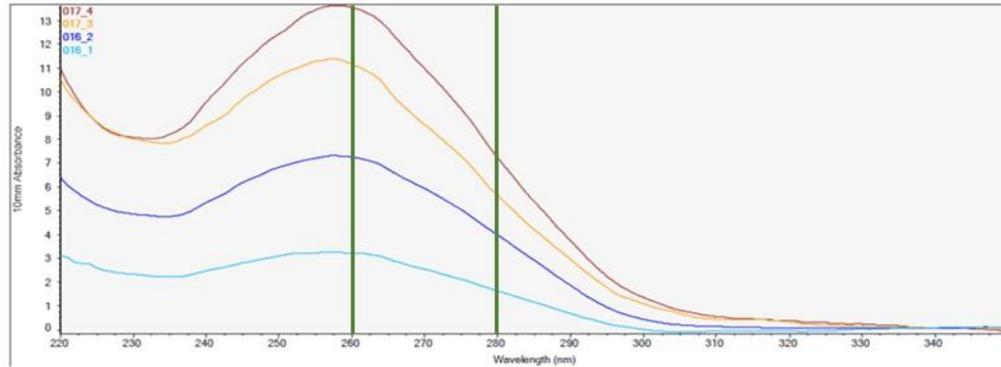


Figura 4. Perfil espectral de las muestras de ADN de la cepa PM016 y cepa PM017 extraídas con el protocolo TENS obtenido a partir de espectrofotometría en NanoDrop 2000.

La integridad del ADN fue evaluada mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, se obtuvieron mejores bandas correspondientes a las muestras de la cepa PM017, mientras que para las muestras de la cepa PM016 se obtuvieron bandas de menor intensidad (Fig. 5); lo cual está correlacionado con la concentración reflejada por espectrofotometría en el NanoDrop 2000.

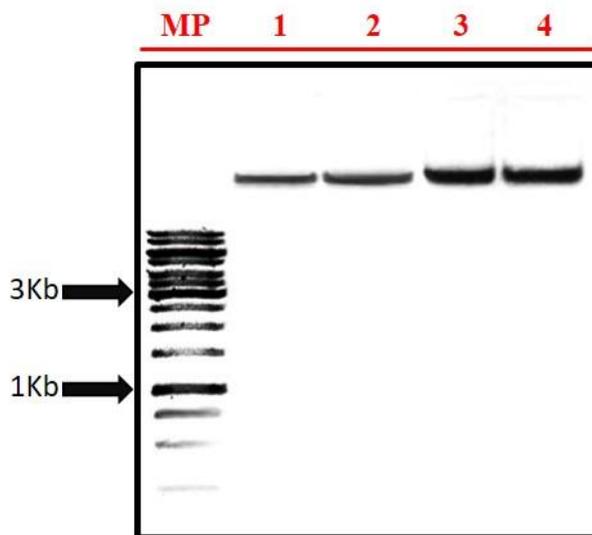


Figura 5. ADN genómico de las microalgas obtenido con el protocolo TENS. MP: Marcador de peso molecular de 1Kb. Carril 1-2 ADN genómico de la cepa PM016. Carril 3-4 ADN genómico de la cepa PM017.

7.2.1.2. Protocolo NaCl modificado

Los productos obtenidos a partir de las extracciones de ADN realizadas con el protocolo NaCl mostraron concentraciones >500 ng/ μ L, siendo la muestra 017-3 la de mayor concentración. De igual manera, los valores de absorbancia 260/280 fueron $>1,8$ para la mientras de la cepa PM017 lo que reflejó una pureza óptima en las muestras con este método de extracción de ADN, mientras que para la cepa PM016 los valores de absorbancia 260/280 fueron inferiores a 1.8 (Tabla 4).

Tabla 4. Datos de concentración y pureza del ADN – Protocolo NaCl

Muestra Cepa 016	NaCl		Muestra Cepa 017	NaCl	
	Concentración ADN (ng/ μ L)	Relación A 260/280		Concentración ADN (ng/ μ L)	Relación A 260/280
1	88,5	1,72	3	654,7	1,91
2	97,6	1,65	4	580,6	1,89

Los valores de concentración y pureza de las muestras de ADN utilizando el protocolo NaCl modificado fueron evaluados por espectrofotometría, de manera que se obtuvieron perfiles espectrales de cada una de las muestras a partir de la relación de absorbancia y la longitud de onda (Fig 6).

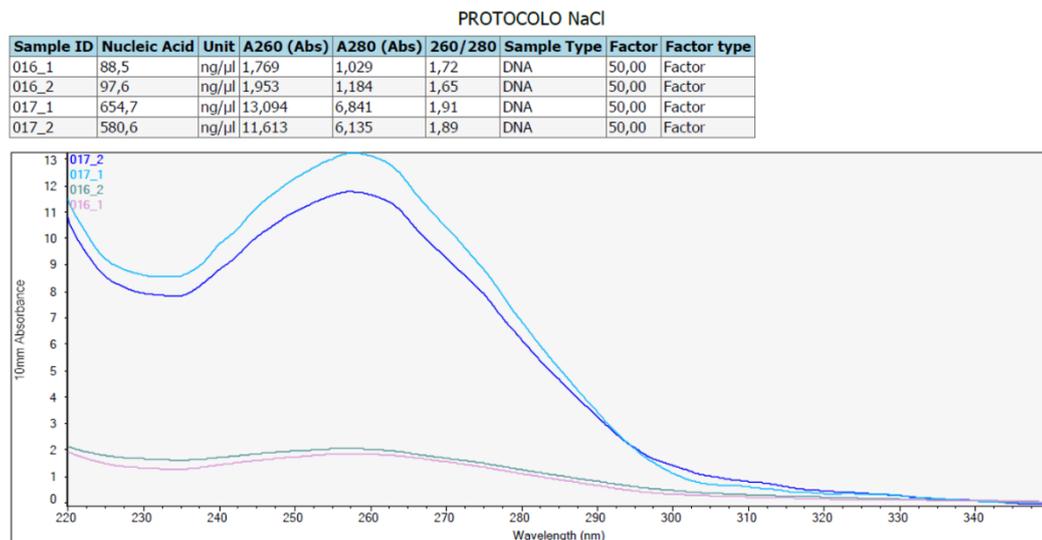


Figura 6. Perfil espectral de las muestras de ADN de la cepa PM016 y cepa PM017 extraídas con el protocolo NaCl obtenido a partir de espectrofotometría en NanoDrop 2000

Así también, se realizó una evaluación de la integridad de las muestras de ADN extraídas con el protocolo NaCl, mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Se obtuvieron bandas de buena calidad correspondientes a la cepa PM017, al contrario de las bandas de la cepa PM016 que presentaron de menor intensidad (Fig.7).

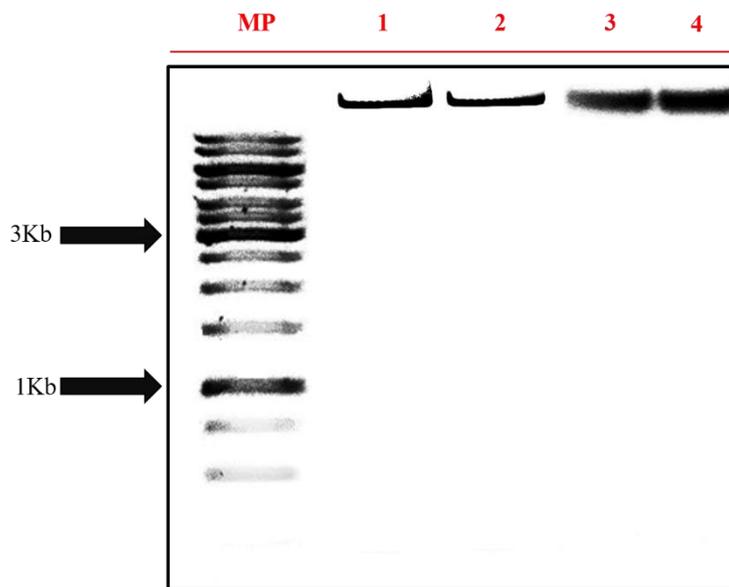


Figura 7. ADN genómico de las microalgas obtenido con el protocolo NaCl. MP: Marcador de peso molecular de 1Kb. Carril 1-2 ADN genómico de la cepa PM016. Carril 3-4 ADN genómico de la cepa PM017.

Mediante un análisis de varianza, los datos de concentración de ADN empleando el protocolo TENS y el protocolo NaCl, no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$). En cuanto a la pureza de las muestras, los valores de analizados de A260/280 de las muestras de ADN extraídas con ambos protocolos, tampoco mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$). Sin embargo, entre ambos protocolos, el TENS requiere un menor tiempo de inversión dentro del laboratorio para realizar extracciones de ADN.

Diversos protocolos de extracción de ADN se han reportado en la literatura (Butler, 2012; Tan & Yiap, 2009), algunos de los cuales son ampliamente usados en la extracción de ADN de diferentes especies de microalgas (Eland et al., 2012; Jagielski et al., 2017). Por ejemplo el protocolo de extracción NaCl (Aljanabi & Martinez, 1997) ha sido utilizado para extracción de ADN y con usos posteriores en la reacción en cadena de la polimerasa (Liu et al., 2018; Mallet & Lee, 2006). Sin embargo, el protocolo TENS (Green & Sambrook, 2017; Sambrook & Russell, 2001), ha sido evaluado con otros métodos de extracción de ADN de microalgas y ha arrojado productos de mediana a alta concentración pero con alta pureza con respecto a otros métodos de extracción. Por lo tanto, este protocolo es altamente fiable para extracciones de ADN de microalgas y su posterior uso en la amplificación de genes mediante PCR (Gumińska et al., 2018; Min et al., 2008). Con base en esta información científica, nuestros resultados están en acuerdo a lo indicado anteriormente, al utilizar el protocolo TENS se obtuvo un producto de mediana concentración, pero de alta pureza.

7.3. VARIACIONES DE TEMPERATURA EN LA AMPLIFICACIÓN DEL *gen 18S ARNr*

Los partidores *TH100F* y *TH101R* empleados para la amplificación del *gen 18S ARNr* de la cepa PM016, lograron amplificar productos visibles notablemente en el gel de agarosa al 1%, con un tamaño esperado de 1230 pb para todas las muestras en cada uno de los gradientes evaluados; lo cual corrobora los resultados de Yañez

(2011) que obtiene productos de igual tamaño (pb) en las muestras de ADN evaluadas en este trabajo.

Por otro lado, se observó que el amplicón que corresponde a una temperatura de 59°C fue el más definido y además se diferenció claramente de los demás amplicones obtenidos. La intensidad de los amplicones fue baja a medida que la temperatura incrementa, los amplicones muestran menor nitidez; por eso a una temperatura de 64°C el amplicón es casi imperceptible en el gel de agarosa (Fig. 8).

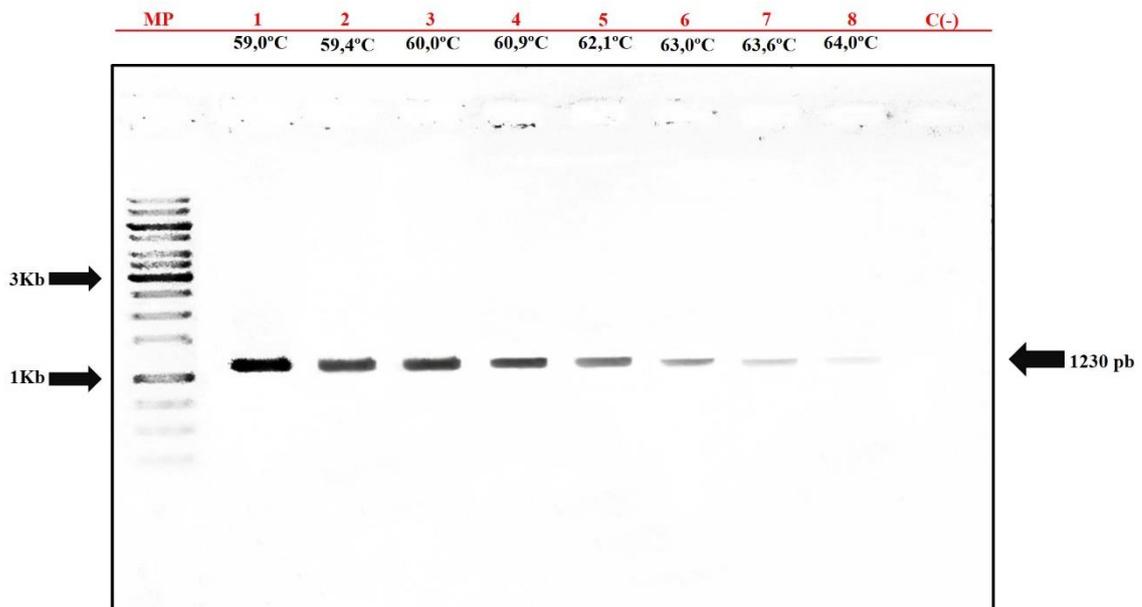


Figura 8. Gradiente de temperatura de la cepa PM016 empleando los partidores *TH100F* y *TH101R*. MP: Marcador de peso molecular de 1Kb. (lado izquierdo). Carril del 1-8 amplicones obtenidos a diferentes temperaturas de la cepa PM016 con un tamaño de 1230 pb. C(-): Control negativo.

Así también, los partidores *PM017F* y *PM017R* utilizados para la amplificación del gen *18ARNr* de la cepa PM017, amplificaron un producto de 1320 pb, tal como se lo había pronosticado en el diseño *in silico*. De esta manera se confirma el tamaño del fragmento esperado. En este resultado el efecto de la temperatura se manifestó

de la misma manera que en el experimento anterior. La intensidad del amplicón se observó mejor definido con una temperatura de 65°C, mientras que, a menor temperatura los amplicones fueron menos visibles. En las temperaturas 55,0°C, 59°C y 64,4°C no se observaron amplicones, esto pudo suceder por alguna falencia en la manipulación de la muestra o por la especificidad de los partidores (Fig. 9).

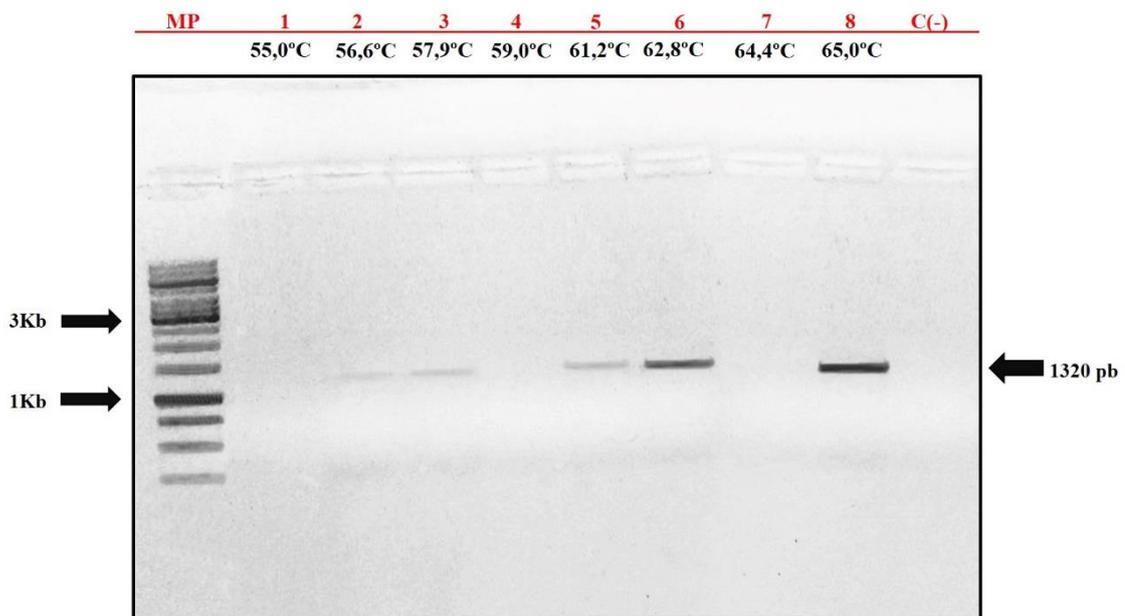


Figura 9. Gradiente de temperatura de la cepa PM017 empleando los partidores *PM017F* y *PM017R*. MP: Marcador de peso molecular de 1Kb (lado izquierdo). Carril del 1-8 amplicones obtenidos a diferentes temperaturas de la cepa PM017 con un tamaño de 1230 pb. C(-): Control negativo

Está descrito que, los gradientes de temperatura en una reacción de cadena de la polimerasa son importantes debido a que se los considera una estrategia de optimización de la rapidez y especificidad de la PCR, permitiendo encontrar la temperatura de hibridación óptima en cada reacción en particular (Sullivan et al., 2006). Para escoger los gradientes de temperatura a evaluar, es necesario considerar la T_m (Temperatura melting o de fusión) de los partidores ya que se usan como indicador de la fuerza de hibridación de estos. De manera general, se considera que

temperaturas de 55°C a 60°C son óptimas para una PCR, pero esto puede variar de acuerdo con cada protocolo empleado. Sin embargo, la especificidad de la PCR depende en gran medida de la T_m , motivo por el cual es necesario considerar que la T_m entre ambos partidores solo puede variar de 2°C a 3°C, caso contrario pueden crear amplificaciones deficientes o amplificar productos no deseados. Además, si la T_m de ambos partidores es muy baja, los fragmentos de ADN no específicos se amplifican provocando la aparición de múltiples amplicones en el gel de agarosa; mientras que, si la T_m de ambos partidores es demasiado alta, el rendimiento y la pureza del producto se reducen debido a la deficiencia de reconocimiento de los partidores (Apte & Daniel, 2009; Hernandez-Flores & Valdez-Mijares, 2018; Rychlik et al., 1990). En los resultados obtenidos la cepa PM016 mostró amplificaciones en todos los gradientes, pero el amplicón más definido fue a una temperatura de 59°C; mientras que para la cepa PM017 no hubo amplicones en todos los gradientes, pero a 65°C mostró un amplicón óptimo en el gel de agarosa. Esto puede ser debido a que, en el caso de la cepa PM016 los partidores empleados tenían una T_m cercana, es decir entre los 60°C y los 65°C obteniendo una amplificación de productos de buena calidad; en el caso de la cepa PM017 los partidores utilizados presentaban una T_m entre los 56°C y los 65°C, de manera que la diferencia de temperaturas era muy amplia, llevando a no obtener productos amplificados a ciertas temperaturas analizadas. En todo el trabajo, el gradiente de temperatura de los partidores nos permitió demostrar con claridad el efecto de la temperatura frente a la amplificación.

7.3.1. Evaluación de la temperatura respecto al ciclo de amplificación

Una vez definida la temperatura de hibridación de los partidores, se quiso conocer cómo afecta la temperatura al número de ciclos de la amplificación por PCR. Para esto, se utilizaron los partidores *TH100F* y *TH101R* que demostraron una mejor amplificación a los 59°C. Los ciclos evaluados fueron a 25,30 y 35. Los resultados obtenidos fueron positivos en todos los casos, la intensidad de los amplicones fueron graduales, es decir, a mayor número de ciclos mayor intensidad del amplicón. Por lo tanto, a 35 ciclos la intensidad de los amplicones fue mayor, mientras que a 25 ciclos la intensidad de los amplicones fue menos intensa. Este hecho sugiere que, para validar una PCR cualitativa para la cepa PM016, solo se necesitan 25 ciclos de amplificación (Fig. 10).

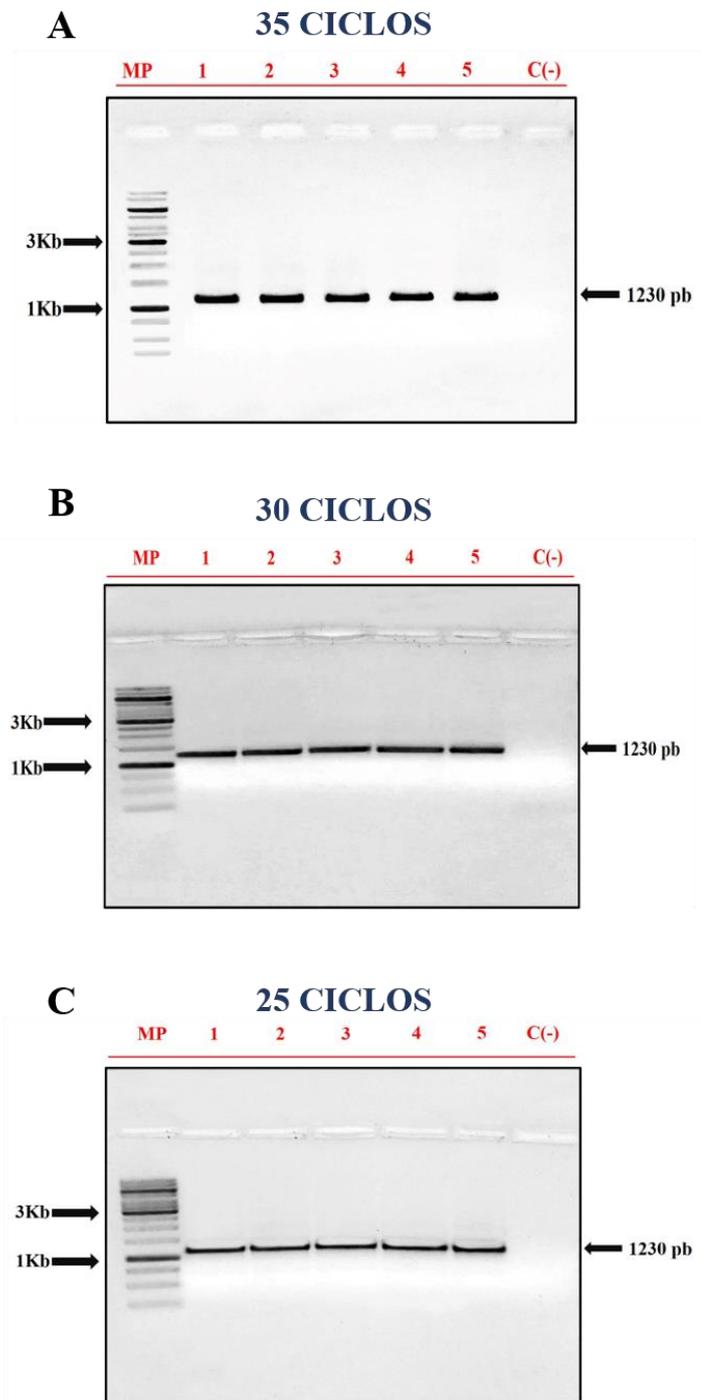


Figura 10. Número de ciclos evaluados en la PCR de la cepa PM016. A. Amplicones obtenidos a 35 ciclos. B. Amplicones obtenidos a 30 ciclos. C. Amplicones obtenidos empleando 25 ciclos. MP. Marcador de peso molecular de 1Kb. C(-): Control negativo.

Caso parecido sucedió con la cepa PM017 empleando los partidores *PM017F* y *PM017R*, al evaluar el efecto de la temperatura frente al número de ciclos, resultó que a una temperatura de 65°C y 25 ciclos, fue suficiente para obtener un amplicón y saber que la amplificación fue positiva (Fig. 11)

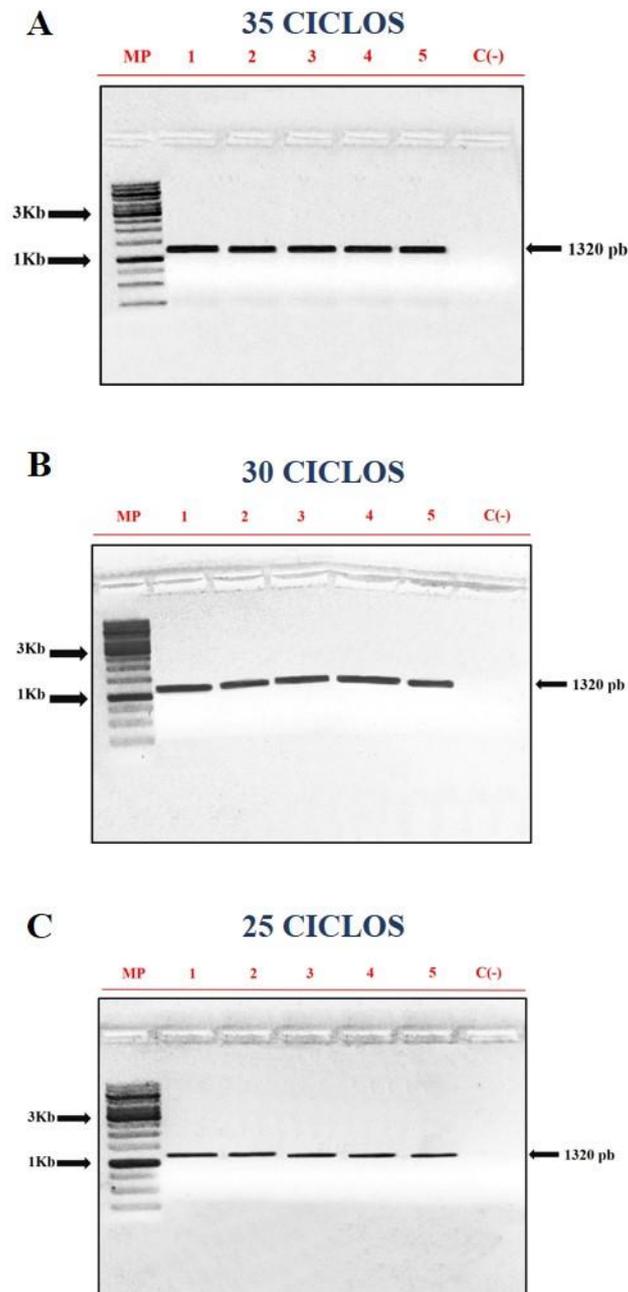


Figura 11. Número de ciclos evaluados en la PCR de la cepa PM017. A. Amplicones obtenidos a 35 ciclos. B. Amplicones obtenidos a 30 ciclos. C. Amplicones obtenidos empleando 25 ciclos. MP. Marcador de peso molecular de 1Kb. C(-): Control negativo.

La evaluación de ciclos de amplificación en un gen determinado y una especie en particular es ampliamente utilizado ya que permite optimizar la reacción en cadena de la polimerasa para obtener productos amplificados de buena calidad, confiables y reproducibles, en un menor tiempo (Rameckers et al., 1997). Varios estudios han utilizado este método de evaluación de ciclos y su efecto en la amplificación de productos de PCR (Ahn et al., 2012; Bouabouls et al., 1992; Henegariu et al., 1997; Sipos et al., 2007; Wu et al., 2010), los mismos han determinado mediante sus resultados que aproximadamente a 25 ciclos se obtienen amplicones con producto suficiente y a medida que se incrementan el número de ciclos (entre 30 a 40 ciclos) existe un aumento gradual de la cantidad de producto. Estos datos corroboran los resultados obtenidos en este estudio ya que se obtuvieron amplicones en todos los ciclos analizados, existiendo disminución gradual de la intensidad de los amplicones a medida que el número de ciclos disminuía. Sin embargo, al igual que en otras investigaciones, un número de 25 ciclos puede considerarse suficiente para saber que un gen amplificó, en este caso el *gen 18S ARNr* de la cepa PM016 y PM017 que fueron analizadas pueden amplificarse solamente a 25 ciclos; obteniendo como resultado un producto con cantidad suficiente para análisis posteriores.

8. CONCLUSIONES

El protocolo TENS modificado, mostró mejores resultados para extracciones de ADN de las cepas PM016 y PM017. Con valores medios de concentración de 259,1 ng/ μ L para la cepa PM016 y 615,5 ng/ μ L para la cepa 017, mientras que los valores de pureza fueron de 2,0 en ambos casos presentando pureza óptima en las muestras. Mientras que el protocolo NaCl modificado mostró valores variables en ambas cepas tanto de concentración como de pureza.

Los partidores diseñados *PM017F Forward* (5'-TTCTGCCCTATCAACTTTCG-3') y *PM017R Reverse* (5'-ACAAAGGGCAGGGACGTAATCAAC-3'), cumplieron los parámetros y condiciones para su funcionamiento permitiendo amplificar fragmentos de 1320 pb del *gen 18S ARNr* para la cepa PM017. Mientras que los partidores diseñados por Yañez (2011), *TH100F Forward* (5'-AYGGCTACCACATCCAAGGAAR-3') y *TH101R Reverse* (5'-TGTACAAAGGGCAGGGACGTAWTC-3') utilizados en este estudio permitieron amplificar fragmentos de 1230 pb del *gen 18S ARNr* para la cepa PM016.

A través del gradiente de temperatura se determinó que la temperatura óptima para la amplificación del *gen 18S ARNr* con los partidores PM017F y PM017R es de 65°C para la cepa PM017. Mientras que para la cepa PM016, utilizando los partidores TH100F y TH101R es de 59°C.

El efecto de la temperatura, con respecto al ciclo de amplificación del ADN, mostró que una cantidad de 25 ciclos son suficientes para generar amplicones de buena intensidad y demostrar la presencia del *gen 18S ARNr*.

9. RECOMENDACIONES

La optimización de la PCR se basa principalmente en la temperatura de hibridación empleada, la cual debe depender de los parámetros de los partidores, los mismos que deben presentar características óptimas para ser empleados en la PCR; por lo cual se recomienda este trabajo para que pueda ser utilizado en el diseño de partidores de cualquier organismo.

La evaluación de ciclos es una opción eficaz para reducir el tiempo en el que obtiene los productos de PCR cuando se hace un análisis cualitativo, minimizando así el tiempo invertido del investigador en el laboratorio.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, J. H., Kim, B. Y., Song, J., & Weon, H. Y. (2012). Effects of PCR cycle number and DNA polymerase type on the 16S rRNA gene pyrosequencing analysis of bacterial communities. *Journal of Microbiology*, 50(6), 1071–1074.
- Alanis, P. A. L. (2013). *Isolation , Characterization and Identification of Microalgae from the Red Sea*. King Abdullah University of Science and Technology.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science.
- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22), 4692–4693.
- Alverson, A. J., & Kolnick, L. (2005). Intragenomic nucleotide polymorphism among small subunit (18S) rDNA paralogs in the diatom genus *Skeletonema* (Bacillariophyta). *Journal of Phycology*, 41(6), 1248–1257.
- Andras, S. C., Davey, M. R., Power, J. B., & Cocking, E. C. (2001). Strategies for signal amplification in nucleic acid detection. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 19(1), 29–44.
- Apte, A., & Daniel, S. (2009). Design of Primers and Probes for qPCR. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(3), 1–10.
- Barany, F. (1991). Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(1), 189–193.
- Barany, Francis. (1991). The ligase chain reaction in a PCR world. *Genome Research*, 1(1), 5–16.
- Beals, T. P., Smith, J. H., Nietupski, R. M., & Lane, D. J. (2010). A mechanism for ramified rolling circle amplification. *BMC Molecular Biology*, 11(December).
- Bérard, A., Dorigo, U., Humbert, J. F., & Martin-Laurent, F. (2005). Microalgae community structure analysis based on 18S rDNA amplification from DNA extracted directly from soil as a potential soil bioindicator. *Agronomy for Sustainable Development*, 25(2), 285–291.
- Bouabouls, M., Legoux, P., Pessegue, B., Delpech, B., Dumont, X., Piechaczyk, M., ... Shire, D. (1992). Standardization of mRNA Titration Using a Polymerase Chain Reaction Method Involving Co-amplification with a Multispecific Internal Control*. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(30), 21830–21838.
- Butler, J. M. (2012). DNA Extraction Methods. In *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. (Vol. 1, pp. 29–47).
- Cha, R. S., & Thilly, W. G. (1993). Specificity, Efficiency, and Fidelity of PCR. *PCR Methods And Applications*, 3(3), 18–29.
- Chantzistroutsiou, X., Tzovenis, I., Parmakelis, A., & Economou-Amilli, A. (2016). Characterization of *Tetraselmis verrucosa* F. Rubens (Chlorodendrophyceae) strains from coastal lagoons of Western Greece using

- a multivariate approach. *Phytotaxa*, 278(3), 225–240.
- Chien, A., Edgar, D. B., & Trela, J. M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, 127(3), 1550–1557.
- Compton, J. (1991). Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *Nature*, 350, 91–92.
- Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B., & Rocha, M. (2014). *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos* (1st ed.). Ciudad de México D.F.: SERMANAT, INECC, UAM-I.
- Debnath, M., Prasad, G. B. K. S., & Bisen, P. S. (2010). *Molecular Diagnostics: Promise and Possibilities*. Springer Netherlands.
- Ebenezer, V., Medlin, L. K., & Ki, J. S. (2012). Molecular Detection, Quantification, and Diversity Evaluation of Microalgae. *Marine Biotechnology*, 14(2), 129–142.
- Efimova, K. V., Selina, M. S., & Hoppenrath, M. (2019). New morphological data and molecular phylogeny of the benthic dinoflagellate *Pseudothecadinium campbellii* (Dinophyceae, Gonyaulacales). *European Journal of Protistology*, 71.
- Eland, L. E., Davenport, R., & Mota, C. R. (2012). Evaluation of DNA extraction methods for freshwater eukaryotic microalgae. *Water Research*, 46(16), 5355–5364.
- Erlich, H. A. (1989). *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*. New York: Stockton Press.
- Fakruddin, M. (2011). Loop mediated Isothermal Amplification (LAMP) - An Alternative to Polymerase Chain Reaction (PCR). *Bangladesh Res. Pub. J.*, 5(4), 425–439.
- Fakruddin, M., Mannan, K. S. B., Chowdhury, A., Mazumdar, R. M., Hossain, M. N., Islam, S., & Chowdhury, M. A. (2013). Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 5(4), 245–252.
- Fakruddin, M., Mazumdar, R., Chowdhury, A., & Mannan, K. S. Bin. (2012). Nucleic acid sequence based amplification (NASBA)-prospects and applications. *Int J Life Sci Pharma Res*, 2, L106–L121.
- García, S. B. (2013). *Detección rápida de Mycobacterium tuberculosis mediante un genoensayo electroquímico*. Universidad de Oviedo.
- Garrido, P. (2016). Técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle o LAMP . Ventajas en el Diagnóstico Sanitario. *Ecuador Es Calidad: Revista Científica Ecuatoriana*, 3(1), 11–14.
- Gill, P., Abdul-Tehrani, H., Ghaemi, A., Hashempour, T., Amiri, M., Ghalami, M., ... Noori-Dalooi, M. (2010). Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* by tHDA-ELISA DIG detection system. *International Journal of Antimicrobial Agents*, (29), S570–S571.
- Gill, Pooria, Amini, M., Ghaemi, A., Shokouhizadeh, L., Abdul-Tehrani, H., Karami, A., & Gilak, A. (2007). Detection of *Helicobacter pylori* by enzyme-linked immunosorbent assay of thermophilic helicase-dependent isothermal DNA amplification. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 59(3),

243–249.

- Gill, Pooria, & Ghaemi, A. (2008). Nucleic acid isothermal amplification technologies - A review. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 27(3), 224–243.
- Goedecke, W. (2007). DNA Polymerases. Elsevier.
- Gomaa, M., Refaat, M., Salim, T., El-Sayed, A. E., & Bekhit, M. (2019). Identification of Green Alga *Chlorella vulgaris* Isolated from Freshwater and Improvement Biodiesel Productivity via UV Irradiation. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 47(3), 381–389.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2016). Precipitation of DNA with ethanol. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(12), 1116–1120.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2017). Isolation of high-molecular-weight DNA using organic solvents. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(4), 356–359.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, (6).
- Guatelli, J. C., Whitfield, K. M., Kwoh, D. Y., Barringer, K. J., Richman, D. D., & Gingeras, T. R. (1990). Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(5), 1874–1878.
- Gumińska, N., Płecha, M., Walkiewicz, H., Hałakuc, P., Zakryś, B., & Milanowski, R. (2018). Culture purification and DNA extraction procedures suitable for next-generation sequencing of euglenids. *Journal of Applied Phycology*, 30(6), 3541–3549.
- Guo, L., Sui, Z., Zhang, S., Ren, Y., & Liu, Y. (2015). Comparison of potential diatom ‘barcode’ genes (The 18S rRNA gene and ITS, COI, rbcL) and their effectiveness in discriminating and determining species taxonomy in the Bacillariophyta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(2015), 1369–1380.
- Gutierrez, C., Sequeira-Mendes, J., & Aragüez, I. (2013). Nucleus and Genome: DNA Replication Crisanto. In *Molecular Biology* (pp. 1–19). Springer, New York, NY.
- Hall, J. D., Fučíková, K., Lo, C., Lewis, L. A., & Karol, K. G. (2010). An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. *Cryptogamie, Algologie*, 31(4), 529–555.
- Hellyer, T. J., & Nadeau, J. G. (2004). Strand displacement amplification: A versatile tool for molecular diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 4(2), 251–261.
- Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., & Vogt, P. H. (1997). Research Reports Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques*, 23(3), 504–511.
- Hernandez-Flores, C., & Valdez-Mijares, R. (2018). Análisis de iniciadores con herramientas bioinformáticas libres en línea. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 22(64), 5–9.
- Hernández-Flores, C., & Valdez-Mijares, R. (2018). Análisis de iniciadores con herramientas bioinformáticas libres en línea. *Temas de Ciencia y Tecnología*,

22(64), 5–19.

- Hsuih, T. C. H., Park, Y. N., Zaretsky, C., Wu, F., Tyagi, S., Kramer, F. R., ... Zhang, D. Y. (1996). Novel, ligation-dependent PCR assay for detection of hepatitis C virus in serum. *Journal of Clinical Microbiology*, *34*(3), 501–507.
- Hyone-Myong, E. (1996). DNA Polymerases. In *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology* (pp. 345–489). Academic Press.
- Jagielski, T., Gawor, J., Bakula, Z., Zuchniewicz, K., Zak, I., & Gromadka, R. (2017). An optimized method for high quality DNA extraction from microalga *Prototheca wickerhamii* for genome sequencing. *Plant Methods*, *13*(1), 1–8.
- Jeong, Y. J., Park, K., & Kim, D. E. (2009). Isothermal DNA amplification in vitro: the helicase-dependent amplification system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *66*(20), 3325–3336.
- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2010). Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research*, *1*(5), 81–97. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>
- Kaczmarek, I., Lovejoy, C., Potvin, M., & Macgillivray, M. (2009). Morphological and molecular characteristics of selected species of *Minidiscus* (Bacillariophyta, Thalassiosiraceae). *European Journal of Phycology*, *44*(4), 461–475.
- Kadar, N. A., Shaleh, S. R., & Suali, E. (2018). Molecular and phylogenetic identification of marine microalgae inferred by 18S rDNA gene. *Malaysian Applied Biology*, *47*(6), 41–45.
- Kibbe, W. A. (2007). OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research*, *35*(suppl.2), W43–W46.
- Kim, J. H., Affan, M. A., Jang, J., Kang, M. H., Ko, A. R., Jeon, S. M., ... Kang, D. H. (2015). Morphological, molecular, and biochemical characterization of astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus* sp. KORDI03 (Haematococcaceae, Chlorophyta) isolated from Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*(2), 238–246.
- Lang, I., & Kaczmarek, I. (2011). A protocol for a single-cell pcr of diatoms from fixed samples: Method validation using *Ditylum brightwellii* (T. West) Grunow. *Diatom Research*, *26*(1), 43–49.
- Li, Y., Chen, X., Sun, Z., & Xu, K. (2017). Taxonomy and molecular phylogeny of three marine benthic species of *Haslea* (Bacillariophyceae), with transfer of two species to *Navicula*. *Diatom Research*, *32*(4), 451–463.
- Lisby, G. (1999). Application of nucleic acid amplification in clinical microbiology. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, *12*(1), 75–99.
- Liu, P., Wei, J., Yang, K., Massey, I. Y., Guo, J., Zhang, C., & Yang, F. (2018). Isolation, molecular identification, and characterization of a unique toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. found in Hunan Province, China. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, *81*(21), 1142–1149.
- Maddocks, S., & Jenkins, R. (2016). *Understanding PCR: A Practical Bench-Top Guide*. Academic Press.
- Mallet, M. A., & Lee, R. W. (2006). Identification of three distinct *Polytomella*

- lineages based on mitochondrial DNA features. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53(2), 79–84.
- Masai, H., & Foiani, M. (2017). *DNA Replication: From Old Principles to New Discoveries* (Vol. 1042). Springer Singapore.
- Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N., & Oda, M. (2010). Eukaryotic Chromosome DNA Replication: Where, When, and How? *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 89–130.
- McHugh, T. D., Pope, C. F., Ling, C. L., Patel, S., Billington, O. J., Gosling, R. D., ... Gillespie, S. H. (2004). Prospective evaluation of BDProbeTec strand displacement amplification (SDA) system for diagnosis of tuberculosis in non-respiratory and respiratory samples. *Journal of Medical Microbiology*, 53(12), 1215–1219.
- Meyer, A., Todt, C., Mikkelsen, N. T., & Lieb, B. (2010). Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1).
- Min, J. K., Rhim, T. Y., Shin, H. W., & Lee, M. Y. (2008). Isolation of cadmium-induced DNA sequence in microalga *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Environmental Biology*, 29(4), 457–460.
- Molina, S. (2015). *Detección Fluorogénica de virus vegetales usando amplificación de ácidos nucleicos dependiendo de helicasa con self-quenched primers*. Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Moreno, R. (2008). *Identification of algal strains by PCR amplification and evaluation of their fatty acid profiles for biodiesel production*.
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56–65. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 51, 263–273.
- Mullis, Kary B., & Faloona, F. A. (1987). Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods in Enzymology*, 155(C), 335–350.
- Nikookar, K., Moghaddam, A., Niazi, A., Kholdebarin, B., & Mohsenzadeh, S. (2017). Molecular Identification of a New *Dunaliella salina* Strain, and its Carotenogenesis in Response to Nitrate. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science*, 41(3), 637–643.
- Norrissa, V. (2019). Does the semiconservative nature of DNA replication facilitate coherent phenotypic diversity? *Journal of Bacteriology*, 201(12), 1–7.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), e63.
- Peña-Castro, J. M., Gregorio-Ramírez, O., & Barrera-Figueroa, B. E. (2013). Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educacion Química*, 24(2), 237–246.
- Prasad, D., & Vidyarthi, A. S. (2009). DNA based methods used for

- characterization and detection of food borne bacterial pathogens with special consideration to recent rapid methods. *African Journal of Biotechnology*, 8(9), 1768–1775.
- Radha, S., Fathima, A. A., Iyappan, S., & Ramya, M. (2013a). Direct colony PCR for rapid identification of varied microalgae from freshwater environment. *Journal of Applied Phycology*, 25(2), 609–613.
- Rameckers, J., Hummel, S., & Herrmann, B. (1997). How Many Cycles Does a PCR need? Determinations of Cycle Numbers Depending on the Number of Targets and the Reaction Efficiency Factor. *Naturwissenschaften*, 84(6), 259–262.
- Rychlik, W., Spencer, W. J., & Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research*, 18(21), 6409–6412.
- Saitou, N. (2013). *Introduction to Evolutionary Genomics* (Second Edi, Vol. 17). London: Springer.
- Salamin, O., Kuuranne, T., Saugy, M., & Leuenberger, N. (2017). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as an alternative to PCR: A rapid on-site detection of gene doping. *Drug Testing and Analysis*, 9(11–12), 1731–1737.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Editio). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sipos, R., Székely, A. J., Palatinszky, M., Révész, S., Márialigeti, K., & Nikolausz, M. (2007). Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 60(2), 341–350.
- Song'oro, E., Muigai, A., Kimwelw, C., Gatebe, E., Mwaniki, M., Kinuthia, J., & Osiemo, Z. (2012). Optimization of PCR condition to amplify mitochondrial COI gene fragments of wildlife species in Kenya. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 1(3), 191–196.
- Stuart, D. (2013). *The Mechanisms of DNA Replication*. InTech.
- Sullivan, D., Fahey, B., & Titus, D. (2006). Fast PCR: General Considerations for Minimizing Run Times and Maximizing Throughput. *BioRad Amplification Bulletin*.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimera (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación En Discapacidad*, 2(2), 70–78.
- Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.
- Torres-Machorro, A. L., Hernández, R., Cevallos, A. M., & López-Villaseñor, I. (2010). Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: Witnesses of phylogeny? *FEMS Microbiology Reviews*, 34(1), 59–86.
- Vallejo, P. J. (2010). *Caracterización estructural de complejos ribosomales de iniciación y de pre-translocación mediante microscopía electrónica*.

- Universidad del País Vasco-Eukal Herriko Unibertsitatea.
- van Pelt-Verkuil, E., van Belkum, A., & Hays, J. P. (2008). *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Dordrecht: Springer.
- Vincent, M., Xu, Y., & Kong, H. (2004). Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Reports*, 5(8), 795–800.
- Walker, G., Fraiser, M. S., Schram, J. L., Little, M. C., Nadeau, J. G., & Malinowski, D. P. (1992). Strand displacement amplification - an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Research*, 20(7), 1691–1696.
- Walker, G. T. (1993). Empirical aspects of strand displacement amplification. *PCR Methods and Applications*, 3(1), 1–6.
- Walker, G. T., Little, M. C., Nadeau, J. G., & Shank, D. D. (1992). Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(1), 392–396.
- Walter, N. G., & Strunk, G. (1994). Strand displacement amplification as an in vitro model for rolling-circle replication: Deletion formation and evolution during serial transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(17), 7937–7941.
- Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (1953). The Structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 18, 123–131.
- Wongsawad, P., & Peerapornpisal, Y. (2014). Molecular identification and phylogenetic relationship of green algae, *Spirogyra ellipsospora* (Chlorophyta) using ISSR and rbcL markers. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(5), 505–510.
- Wu, D. Y., & Wallace, R. B. (1989). The ligation amplification reaction (LAR)-Amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. *Genomics*, 4(4), 560–569.
- Wu, J., Jiang, X., Jiang, Y., Lu, S., Zou, F., & Zhou, H. (2010). Effects of polymerase , template dilution and cycle number on PCR based 16 S rRNA diversity analysis using the deep sequencing method. *BMC Microbiology*, 10(1).
- Xu, J., Bo, J., Chai, S., He, Y., Zhu, J., Shen, Z., & Shen, S. (2016). Complete nuclear ribosomal DNA sequence amplification and molecular analyses of *Bangia* (Bangiales , Rhodophyta) from China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 34(5), 1044–1053.
- Yañez, R. (2011). *Categorización taxonómica en base a marcadores moleculares de microalgas extremófilas nativas del Norte de Chile*. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 134.
- Zhang, D. Y., Brandwein, M., Hsuih, T., & Li, H. B. (2001). Ramification amplification: A novel isothermal DNA amplification method. *Molecular Diagnosis*, 6(2), 141–150.

11. ANEXOS



Figura 12. Gabinete de Seguridad utilizado para la realizar la mezcla de PCR



Figura 13. Pastilla celular obtenida de las muestras después de la extracción ADN.



Figura 14. Trabajo realizado en el Laboratorio de Biología Molecular



Figura 15. Geles de agarosa realizados durante el trabajo de investigación