

MANUAL

PRÁCTICAS DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

-Dr. Adrien Gallou
-M.C. Alba P. Suaste Dzul
-M.C. María G. Serna Domínguez
-Biól. Gilda Y. Andrade Michel

Juntos alimentamos el futuro de México.

SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PECUARIA Y ALIMENTACIÓN



SENASICA
SECRETARÍA DE ECONOMÍA
COMISIÓN NACIONAL DE SEGURIDAD
ALIMENTARIA Y NUTRICIONAL

www.sagarpa.gob.mx | www.senasica.gob.mx
SENASICA @SENASICA SENASICA
Este programa es posible gracias a tu apoyo. Gracias.
Cualquier duda o comentario, comuníquese al correo: senasica@senasica.gob.mx

Dirección General
Organismo de Control del SENASICA
+52(55) 5406 1000, ext. 5144
+52(55) 3471 8900, ext. 20384

Call center
+52(55) 5406 1000
+52(55) 3471 8900, ext. 20384
01 800 987 9879

Primera edición 2015
Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
SENASICA

Diseño Editorial
Unidad de Promoción y Vinculación - SENASICA

ISBN: 978-968-5384-09-4

Reservados todos los derechos. No se permite la reproducción, total o parcial de este libro ni el almacenamiento en un sistema informático, ni la transmisión de cualquier forma o cualquier medio, electrónico, mecánico, fotocopia, registro u otros medios sin el permiso previo y por escrito de los titulares de los derechos de reproducción.

MANUAL DE PRÁCTICAS DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

**Centro Nacional de Referencia de Control Biológico
Laboratorio de Biología Molecular**

Desarrollado por:

Dr. Adrien Gallou
M.C. Alba Priscilia Suaste Dzul
M.C. María Guadalupe Serna Domínguez
Biól. Gilda Yadi Andrade Michel

Revisión:

M.C. Hugo César Arredondo Bernal, Subdirector del **Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.**

Dra. Beatriz Xoconostle Cázares, Investigadora Titular 3D, **Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco.**

Dr. Antonio Cárdenas Flores, Investigador asociado, **Departamento de Plásticos en la Agricultura del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA).**

PRÓLOGO	6
ABREVIATURAS	8
CAPÍTULO I	11
Técnicas de extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN)	
I.A. Extracción de ADN de hongos entomopatógenos (HE)	13
I.B. Extracción de ADN de insectos entomófagos (IE)	19
I.C. Extracción de ADN de muestras de cítricos	24
CAPÍTULO II	27
Técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	
II.A. Identificación por PCR de organismos benéficos para el control biológico..	28
II.A.1. Protocolos de amplificación: hongos entomopatógenos (HE)	29
II.A.2. Protocolos de amplificación: insectos entomófagos (IE)	34
II.B. PCR anidada para la detección de fitoplasmas	36
II.C. PCR tiempo real para el diagnóstico del Huanglongbing de los cítricos	45
CAPÍTULO III	57
Control de calidad de extracción de ADN, cuantificación y purificación	
III.A. Cuantificación espectrofotométrica de ADN genómico	58
III.B. Electroforesis en gel de agarosa	60
III.C. Protocolos de purificación de productos de PCR	62

CAPÍTULO IV	67
Análisis bioinformático de secuencias	
ANEXOS	77
A. Preparación de soluciones básicas para los protocolos de biología molecular	78
B. Fórmulas y conversiones básicas para los protocolos de biología molecular	80
C. Guías rápidas de uso de equipos empleados en el LBM-CNRCB	81
D. Ejemplo de formato para el registro de uso de equipos en el LBM-CNRCB	84
E. Distribuidores globales	85
CONTACTO	87
LITERATURA CITADA	89

PRÓLOGO

Mediante un convenio signado en 2010 entre el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), a través de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) y el Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Colima (CESAVECOL), se destinaron recursos hacia la adaptación de instalaciones en el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) para un Laboratorio de Biología Molecular (LBM) (Figura 1; <http://senasica.gob.mx/?id=4793>), así como para la adquisición de equipo, contratación de recursos humanos y servicios.



Figura 1. Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (Tecomán, Colima).

La misión del LBM-CNRCB es atender de manera eficaz y oportuna las necesidades emergentes de identificación, tipificación y clasificación de organismos benéficos, así como contribuir con la investigación científica del sector agrícola, en apoyo a los productores e instituciones para la solución de problemas de relevancia económica.

Durante el 2010 y hasta el 2012, la labor del LBM-CNRCB fue la detección por métodos moleculares del agente causal del Huanglongbing (HLB) de los cítricos para los estados de Colima, Michoacán, Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Guerrero, Oaxaca, San Luis Potosí, Tamaulipas y Nuevo León, a través de sus respectivos Comités de Sanidad Vegetal. Ante el reciente establecimiento de las colecciones de referencia en el CNRCB, a partir de mayo de 2012, la tarea primordial del LBM es la identificación y caracterización molecular de los organismos benéficos depositados en la Colección de Hongos Entomopatógenos (CHE) y la Colección de Insectos Entomófagos (CIE) del CNRCB. Esta tarea implica una demanda de nuevas técnicas,

puesto que la identificación por claves taxonómicas tradicionales es limitada. En la actualidad se proponen enfoques analíticos rigurosos para el manejo de datos provenientes de estrategias moleculares, tales como la caracterización multigénica (MLST, por sus siglas en inglés).

Además el LBM-CNRCB pretende servir como herramienta auxiliar para las distintas áreas del CNRCB, por ejemplo, para evaluar la estabilidad genética de los microorganismos benéficos y permitir el seguimiento/control de los microorganismos después de la aplicación en campo con el desarrollo de técnicas como la huella genética con la adquisición de nuevos equipos (por ejemplo, analizador de fragmentos). A su vez, la misión del LBM-CNRCB es apoyar en la identificación y clasificación de los organismos benéficos utilizados en programas de control biológico (SENASICA) por medio de tecnología y herramientas moleculares de vanguardia y de esta manera brindar información certera e inequívoca.

El manual de prácticas del LBM-CNRCB pretende presentar las diferentes técnicas moleculares disponibles en el área del control biológico en el CNRCB y servir de herramienta a estudiantes o profesionistas con poca experiencia en el uso de estas técnicas. Este manual está dividido en cuatro capítulos. El primero presenta los protocolos para el aislamiento del ácido desoxirribonucleico (ADN) en diferentes tipos de organismos. El segundo aborda todos los procesos relacionados con el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación molecular de hongos entomopatógenos (HE) e insectos entomófagos (IE), además de la detección de microorganismos fitopatógenos (bacterias, hongos, nemátodos, etc.). Fue incluido un tercer capítulo, para presentar las técnicas de control de calidad del ADN y purificación de los productos de PCR. Finalmente en el capítulo cuarto se introduce brevemente al estudio de la bioinformática de secuencias nucleotídicas.

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	DEFINICIÓN
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
CESAVECOL	Comité Estatal de Sanidad Vegetal en el Estado de Colima
CHE	Colección de Hongos Entomopatógenos
CIE	Colección de Insectos Entomófagos
CNRCB	Centro Nacional de Referencia de Control Biológico
COI	Gen que codifica a la enzima Citocromo c Oxidasa I
COX	Gen que codifica a la enzima Citocromo Oxidasa I
DGSV	Dirección General de Sanidad Vegetal
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
HE	Hongos Entomopatógenos
HLB	Huanglongbing
IB	Inferencia Bayesiana
IE	Insectos Entomófagos
ITS	Espaciadores Internos Transcritos
Lam	<i>Candidatus Liberibacter americanus</i>
Las	<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>
LBM	Laboratorio de Biología Molecular
MV	Máxima Verosimilitud
MLST	Estrategia Multigénica
MP	Máxima Parsimonia
NTC	No Template Control (control sin molde de ADN/ARN)
PBS	Buffer de Fosfato Salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
TBE	Tris Borato EDTA
UV	Luz Ultravioleta

WG	Glicoproteína Asociada al Psílido
----	-----------------------------------

CAPÍTULO 1

TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)

El procedimiento completo de extracción convencional de ADN por lo regular se requiere mucho tiempo y además suele involucrar agentes químicos tóxicos. En biología molecular, la extracción y purificación de ácidos nucleicos es de suma importancia debido a que se necesita partir de un ADN de excelente calidad (ADN no degradado y de alta pureza) para estudios posteriores, por ejemplo para marcadores moleculares, técnicas de PCR, entre otros (Tapia-Tussell et al., 2009).

TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE ADN

Usualmente diferentes tejidos requieren el uso de diferentes protocolos para purificar sus ácidos nucleicos. Muchas de las técnicas de extracción de ADN de plantas, hongos y células animales requieren del uso de nitrógeno líquido o que la muestra se encuentre liofilizada para la ruptura total del tejido (Aljanabi y Martínez, 1997). Los procedimientos de extracción convencional de ADN genómico, en algunas ocasiones no pueden remover en gran medida los compuestos inhibidores de la reacción de amplificación por PCR (polisacáridos, proteínas, sales minerales, etc.) y por lo tanto limitan la sensibilidad de las diferentes reacciones en las cuales participa el ADN (Plaza *et al.*, 2003). Ante la necesidad de un procedimiento universal y eficiente se han elaborado kits que proveen la extracción de un ADN de excelente calidad para los diferentes tipos de tejidos, los cuales por ejemplo utilizan columnas de sílice que fijan la molécula de ADN y permiten realizar lavados para eliminar las proteínas, metabolitos y otros compuestos. Un aislamiento de ADN total consta de los siguientes pasos: lisis celular, extracción del ADN, purificación y precipitación. La lisis involucra generalmente la ruptura celular por medio de buffers o amortiguadores que contienen detergentes iónicos y proteasas (para la digestión de los componentes proteicos). En algunos organismos como bacterias se presenta una menor dificultad para lograr este paso, sin embargo para muestras de células animales, vegetales y hongos, la ruptura celular se dificulta debido a los componentes que conforman la membrana celular y/o pared celular según sea el caso. Algunas técnicas suelen facilitar la lisis por ruptura mecánica (ej. en mortero u homogeneizador) o con enzimas hidrolíticas que digieren dichos componentes (Clark, 2005). Posteriormente, se continúa con el proceso de extracción del ADN, separándolo del resto de las moléculas por diferentes pasos de lavado y purificación. Finalmente, se conserva en agua o algún buffer libre de nucleasas y RNasas a -20°C para su posterior uso. En el LBM-CNRCB, la calidad y eficiencia en los protocolos de

extracción de ADN genómico son de suma importancia debido a los análisis moleculares subsecuentes; es por ello que los kits que se utilizan para las diferentes muestras recibidas resultan ser una de las mejores herramientas de la obtención de ADN en adecuada concentración, pureza y excelente integridad, cumpliendo con los parámetros de calidad estipulados por el mismo Laboratorio.

I.A. EXTRACCIÓN DE ADN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS (HE)

Lineamientos para la recepción de muestras de HE

Las muestras de HE se reciben por parte de la CHE-CNRCB con una etiqueta legible (que contenga los siguiente datos: clave, tipo de cultivo, crecimiento y fecha de entrega) de dos formas: liofilizadas y en micelio fresco, estas muestras deben cubrir ciertos requisitos establecidos por el LBM-CNRCB (Figura 2).



Figura 2. Requisitos para la entrega de muestras de hongos entomopatógenos al Laboratorio de Biología Molecular.

Kit Axyprep MULTISOURCETM Genomic DNA Miniprep (Axygen®, Corning Life Sciences, NL, México)

El kit está diseñado para purificar ADN genómico de una gran variedad de materiales, incluyendo hongos filamentosos. Este sistema emplea buffers especiales para hacer eficiente la liberación del ADN y que los pigmentos y otros componentes inhibidores sean removidos por precipitación. La columna provee una unión selectiva del ADN que después de los lavados es eluído en un buffer Tris o agua desionizada (AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit).



!!!Precaución!!!

Los Buffers C-L, P-D y el W1 contienen químicos irritantes. Cuando se trabaje con ellos portar siempre equipo de protección adecuado: bata y guantes. Evitar el contacto con piel y ojos; en caso de contacto lavar inmediatamente con agua.

Procedimiento

Lisis y homogeneización del tejido

1. Limpiar perfectamente con alcohol al 70% la mesa de trabajo a utilizar. Colocar y marcar los tubos de 2 mL necesarios en una gradilla y precalentar el Buffer E (buffer de elución) en termo block a 56°C. Apagar el aire acondicionado.

2. Colocar la caja de Petri que contiene el micelio de la cepa sobre la superficie limpia. Con una navaja estéril, tomar una muestra de aproximadamente 3 mm² de micelio, que corresponden a 200 mg.

NOTA: En caso de utilizar material liofilizado, pesar aproximadamente 200 mg y continuar con el procedimiento.

3. Colocar el micelio (fresco o liofilizado) en un tubo de 2 mL (opcional: los tubos con la muestra fúngica se pueden congelar a -80°C durante 15 min). Para efectuar la lisis del tejido por vibración, agregar el balón de tungsteno (Qiagen, Hilden, Alemania).

4. Añadir 700 µL de Buffer PBS y 1 µL de RNasa A (10 µg/ml), mezclar por 30 s en vórtex.

5. Homogeneizar la muestra en el TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Alemania) por 10 min a 30 Hz (equilibrar el equipo con la misma cantidad de tubos).

6. Adicionar 20 µL de Proteinasa K y 150 µL de Buffer C-L, mezclar inmediatamente en vórtex durante 1 min.

7. Incubar la muestra en baño María a 56°C por 15 min. Transcurrido el tiempo, centrifugar a 13,000 rpm por 1 min.

8. Adicionar 350 µL de Buffer P-D y mezclar en vórtex por 30 s.

9. Centrifugar a 13,300 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.

Unión y lavados

10. Transferir el sobrenadante a la columna con extremo cuidado, evitando tocar la matriz con la punta.
11. Centrifugar por 1 min a 13,300 rpm.
12. Desechar el tubo con el centrifugado y cambiar la columna a un nuevo tubo de 2 mL, previamente etiquetado.
13. Agregar 500 μ L de Buffer W1 y centrifugar por 1 min a 13,300 rpm. Descartar el filtrado.
14. Continuar añadiendo 700 μ L de Buffer W2 a la columna. Centrifugar nuevamente y desechar filtrado.
15. Repetir el paso 14.
16. Regresar la columna al tubo y centrifugar a 13,300 rpm por 1 min.
17. Transferir la columna a un tubo nuevo estéril de 1.5 mL.

Elución

18. Eluir el ADN genómico agregando 25 μ L de buffer (precalentado) al centro de la columna sin tocar la matriz. Incubar por 5 min a temperatura ambiente; transcurrido el tiempo centrifugar a 13,300 rpm por 1 min.
19. Repetir el paso 18.

20. Desechar la columna y conservar el ADN a -20°C si se desea almacenar o bien, a 4°C para su procesamiento inmediato.

Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, WI, EUA)

El kit está diseñado para purificar ADN de diferentes tipos celulares: células de la sangre, células animales y cultivo de tejidos, material vegetal, levaduras y bacterias. El proceso consta de cuatro pasos principales 1) lisis celular y nuclear, 2) digestión con RNasa, 3) precipitación salina de proteínas y finalmente 4) concentración del ADN por eliminación de sales y precipitación con isopropanol (Technical Manual Wizard® Genomic DNA Purification Kit).

Procedimiento

Lisis y homogeneización

1. Limpiar perfectamente con alcohol al 70% la mesa de trabajo a utilizar. Colocar y marcar los tubos de 2 mL, 1.5 mL y columnas del kit necesarios en una gradilla. Apagar el aire acondicionado.

2. Procesamiento de la muestra para lisis:

- Micelio fresco: cortar con una navaja o bisturí nuevo 3 mm^2 de micelio fresco (~40 mg o un volumen igual al de la esfera de tungsteno)

- Micelio liofilizado: con una espátula, tomar ~40 mg y depositarlos en un mortero o un tubo de 2 mL.

Si se decide lisar la muestra con nitrógeno líquido, el mortero y pistilo tendrán que enfriarse previamente. Se deberá macerar la muestra hasta obtener un polvo fino, el cual se deposita en el tubo de 2 mL. Para el procedimiento de homogeneización en el TissueLyser II, se deberá colocar la muestra en un tubo de 2 mL y agregar el balín de tungsteno.

3. Agregar 600 μL de Nuclei Lysis Solution y mezclar con vórtex por lapso de 1-3 s. Calentar la muestra a 56°C por 15 min.
4. Adicionar 3 μL de solución de RNasa A y mezclar por inversión. Posteriormente incubar la muestra a 37°C por 15 min. Transcurrido el tiempo, permitir que la muestra se enfríe durante 5 min a temperatura ambiente.
5. Adicionar 200 μL de Protein precipitation solution y mezclar por vórtex a máxima velocidad por 20 s.
6. Centrifugar por 3 min a 12,000 rpm. La precipitación de proteínas puede formar una pastilla o película muy delgada.

Purificación y precipitación

7. Remover cuidadosamente el sobrenadante que contiene el ADN y transferirlo a un tubo estéril de microcentrífuga de 1.5 mL.

NOTA: Dejar el líquido residual en el tubo ya que puede contaminar el purificado genómico con proteínas

8. Adicionar 600 μL de isopropanol. Mezclar el tubo por inversión hasta que una masa blanquecina sea visible (ADN).
9. Centrifugar a 12,000 rpm por 1 min y decantar el sobrenadante cuidadosamente. Adicionar 600 μL de etanol al 70% e invertir el tubo suavemente en varias ocasiones para lavar el ADN. Centrifugar nuevamente por 1 min a temperatura ambiente.
10. Decantar el etanol cuidadosamente, para no desechar la pastilla de ADN, que tiene aspecto de un precipitado blanquecino.

11. Invertir el tubo en una toalla de papel absorbente para permitir que el etanol residual se retire totalmente.

Elución

12. Adicionar 100 μ L de Rehydration solution e incubar el pellet o pastilla de ADN por 1 hora a 65°C. Periódicamente mezclar cuidadosamente la solución. Como método alternativo, la rehidratación del ADN se puede realizar por incubación a 4°C durante toda la noche. Almacenar el ADN a -20°C para su uso posterior.

I.B. EXTRACCIÓN DE ADN DE INSECTOS ENTOMÓFAGOS (IE)

Kit Axyprep Blood GenomicTM DNA Miniprep (Axygen®, Corning Life Sciences, NL, México)

Este método está basado en la eficiente liberación de ADN de células sanguíneas por lisis especial y precipitación de proteínas, acoplado a una adsorción selectiva del ADN. El ADN genómico es eluído en un buffer que contiene Tris y EDTA (10 mM/1mM), lo que incrementa la solubilidad y lo protege de la degradación por nucleasas (AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit).



!!!Precaución!!!

Los Buffers AP1 y W1 contienen químicos irritantes. Cuando se trabaje con ellos portar siempre equipo de protección adecuado: bata y guantes. Evitar el contacto con piel y ojos, en caso de contacto lavar inmediatamente con agua.

Procedimiento

Lisis y homogeneización

1. Limpiar con alcohol al 70% la mesa de trabajo a utilizar. Colocar y marcar los tubos de 2 mL y 1.5 mL necesarios en una gradilla y precalentar el Buffer TE (buffer de elución) en termoblock a 56°C.
2. En un tubo de 2 mL estéril depositar un balín de tungsteno y la muestra de insecto; agregar 350 µL de Buffer PBS, 500 µL de Buffer AP1 y 100 µL de Buffer AP2.
3. Homogeneizar la muestra en el TissueLyser II a 20 Hz por 6 min (equilibrar el equipo con la misma cantidad de tubos).
4. Centrifugar a 13,000 rpm por 12 min.

Unión de ADN y lavados

5. Transferir el sobrenadante a la columna con extremo cuidado evitando tocar la matriz con la punta si se transfiere con pipeta; si es de forma manual se deberá evitar que el balín toque la membrana.
6. Centrifugar a 8,000 rpm por lapso de 1 min y desechar el filtrado.
7. Adicionar 700 µL de Buffer AW1 y centrifugar a 8,000 rpm por lapso de 1 min. Descartar el filtrado.
8. Continuar añadiendo 700 µL de Buffer AW2 a la columna. Centrifugar nuevamente y desechar el filtrado.
9. Repetir el paso 8 agregando 300 µL de Buffer AW2.

10. Transferir cuidadosamente la columna a un tubo nuevo estéril de 1.5 mL.

Elución

11. Eluir el ADN genómico agregando 35 μ L de Buffer TE precalentado directamente al centro de la columna sin tocar la matriz. Reposar por 5 min a temperatura ambiente; transcurrido el tiempo centrifugar a 8,000 rpm por 1 min.

12. Repetir el paso 11 a 13,000 rpm (opcional).

13. Desechar la columna y conservar el ADN a -20°C si se desea almacenar, a 4°C para su procesamiento inmediato.

Kit DNeasy® Blood and Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania)

Este kit ofrece una rápida purificación de ADN genómico, mitocondrial y de una gran variedad de muestras incluyendo tejido fresco o congelado, procedente de células, sangre o bacterias. El ADN purificado se encuentra libre de contaminantes e inhibidores enzimáticos por lo que es adecuado para análisis por PCR, Southern Blot, RAPD, AFLP y RFLP's (DNeasy Blood and Tissue Handbook).



!!!Precaución!!!

Utilizar siempre bata de laboratorio, guantes y lentes protectores. Los Buffers AL y W1 contienen hidroclorehidrato guanidina, éste puede formar compuestos altamente reactivos en combinación con blanqueadores y/o cloro. En caso de derrame limpiar con abundante agua y detergente.

Notas previas:

- Mezclar perfectamente los Buffers AL y ATL en caso de presentar precipitado.
- Verificar la adición de etanol a los Buffers AW1 y AW2.
- Equilibrar a temperatura ambiente las muestras a utilizarse.
- Precalentar el termoblock o baño maría a 56°C.

Lisis y homogeneización

Nitrógeno líquido:

1. Cortar el tejido con un área de 3 mm² con bisturí (~25 mg) en piezas pequeñas y con cuidado ponerlo en un mortero frío; agregar poco a poco nitrógeno líquido y con el pistilo macerar la muestra perfectamente hasta hacer un polvo fino (adicionar más nitrógeno líquido si es necesario). Colocar la muestra en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL.
2. Adicionar 180 µL de Buffer ATL y adicionar 20 µL de Proteínasa K, mezclar con vórtex. Posteriormente incubar a 56°C hasta lisar por completo la muestra (tiempo aproximado de lisis: 1-3 horas) y mezclar ocasionalmente.
3. Una vez lisada la muestra, mezclar directamente con vórtex por 15 s y añadir 200 µL de Buffer AL y mezclar nuevamente con vórtex, continuar con el paso 5.

TissueLyser II:

4. Depositar la muestra de insecto (~25 mg) en un tubo de 2 mL y un balín de tungsteno. Agregar 180 µL de Buffer PBS, 20 µL de Proteínasa K y 200 µL de Buffer AL, mezclar inmediatamente con vórtex e incubar por 10 min a 56°C.
5. Adicionar 200 µL de etanol (96-100%) y mezclar.

NOTA: Es necesario que al momento de adicionar el Buffer AL y el etanol se mezcle inmediatamente para homogeneizar la muestra. Se puede formar un precipitado blanquecino con la adición del Buffer AL y el etanol, el cual no interfiere con el procedimiento de extracción; si se torna la muestra viscosa mezclar vigorosamente con vórtex.

Unión y lavados

6. Transferir toda la muestra a la columna DNeasy Mini spin y centrifugar a 8,000 rpm por 1 min. Descartar el filtrado junto con el tubo de recolección.

7. Colocar la columna en un nuevo tubo de 2 mL y adicionar 500 μ L de Buffer AW1. Centrifugar por 1 min a 8,000 rpm y descartar nuevamente el sobrenadante y el tubo de recolección.

8. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección y agregar 500 μ L de Buffer AW2; centrifugar por 3 min a 14,000 rpm. Retirar el tubo de recolección y el sobrenadante.

NOTA: Es importante secar por completo la membrana de la columna ya que el etanol residual puede interferir en las subsecuentes reacciones.

9. Transferir la columna a un nuevo tubo de 1.5 mL estéril.

NOTA: Evitar que la columna toque el filtrado, si llegara a ocurrir, colocar la columna en un nuevo tubo de recolección de 2 mL y centrifugar nuevamente a 14,000 rpm por 1 min.

Elución

10. Eluir el ADN por adición de 200 μ L de Buffer AE al centro de la membrana de la columna. Incubar por 1 min a temperatura ambiente y posteriormente centrifugar a 8,000 rpm por 1 min.

NOTA: Para concentrar el ADN genómico, agregar 100 μL de Buffer AE.

11. **Opcional:** Repetir el paso 10 para incrementar la cantidad del ADN extraído.
12. Desechar la columna y conservar el ADN a -20°C si se desea almacenar o a 4°C para su procesamiento inmediato.

I.C. EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS DE CÍTRICOS

Kit Axyprep MULTISOURCE™ Genomic DNA Miniprep para tejidos vegetales (Axygen®, Corning Life Sciences, NL, México)

Lisis y homogeneización

1. Limpiar con alcohol al 70% la mesa de trabajo a utilizar. Colocar y marcar los tubos de 2 mL necesarios en una gradilla y precalentar el Buffer E (buffer de elución) en termoblock a 65°C . Apagar el aire acondicionado.
2. En un tubo de 2 mL estéril agregar un balín de tungsteno, 550 μL de Buffer PBS, 150 μL de Buffer C-L y 200 mg de nervadura cortada previamente en pedazos pequeños.
3. Homogeneizar las muestras a 30 Hz por 5 min. Repetir el procedimiento anterior una vez más. Posteriormente centrifugar a 13,300 rpm durante 1 min.



!!!Precaución!!!

Los Buffers C-L, P-D y el W1 contienen químicos irritantes. Cuando se trabaje con ellos portar siempre equipo de protección adecuado: bata y guantes. Evitar el contacto con piel y ojos, en caso de contacto lavar inmediatamente con agua.

4. Adicionar 350 μ L de Buffer P-D y agitar en vórtex a máxima velocidad durante 30 s y centrifugar a 13,300 rpm.

Unión y lavados

5. Cuidadosamente pasar el sobrenadante a la columna, evitando que el balín de tungsteno pase al tubo de la columna y llegue a tocar la membrana. Centrifugar por 1 min a 13,300 rpm.

6. Transferir la columna a un nuevo tubo de recolección de 2 mL.

7. Adicionar 500 μ L de Buffer W1. Centrifugar a 13,300 rpm por 1 min y desechar el filtrado.

8. Agregar 700 μ L de Buffer W2. Centrifugar por 1 min a 13,300 rpm y descartar nuevamente el filtrado.

9. Repetir el paso 8. Regresar el tubo a la columna y centrifugar 1 min a 13,300 rpm.

Elución

10. Transferir la columna a un nuevo tubo estéril de microcentrífuga de 1.5 mL.

11. Eluir con 75 μ L de Buffer E precalentado y aplicarlo directamente al centro de la columna, incubar durante 5 min a temperatura ambiente y centrifugar por 1 min a 13,300 rpm.

12. Repetir el paso 11. Desechar la columna y almacenar el ADN a -20°C .

NOTA: Todos los desechos de las soluciones de extracción se conservarán en un recipiente preferentemente ámbar y se procederá a la eliminación según el plan de manejo de residuos del laboratorio.

CAPÍTULO 2

TÉCNICAS DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

El control biológico se ha convertido en una importante herramienta para el control de plagas y enfermedades que afectan la producción agrícola, proveyendo una alternativa mucho más eficiente, perdurable y amigable con el ambiente que el control químico convencional (Neher et al. 2009). El conocimiento previo acerca de la ecología de poblaciones endémicas de organismos benéficos (ej. HE e IE) forma parte esencial en la evaluación del control de insectos plaga ya que de esta manera se provee información suficiente para poder establecer una predicción sobre su posible impacto hacia agentes perjudiciales (Meyling y Eilenberg, 2007). Otro grupo de organismos asociados a infecciones de plantas y algunos grupos de insectos son los fitoplasmas. Éstos no se pueden cultivar in vitro con las técnicas actuales y son los fitopatógenos más pobremente estudiados; sin embargo, su interés radica en las enormes pérdidas económicas mundiales causadas por estos organismos (Kube et al., 2012).

TÉCNICAS DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

El uso de herramientas moleculares para la identificación de estas especies ha revolucionado la forma de su caracterización proporcionando mayor información a nivel específico (Thakur y Sandhu, 2010). En la actualidad existen diferentes técnicas moleculares que brindan gran soporte en la tipificación de este tipo de organismos, como la reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), esta técnica ha revolucionado los últimos 20 años la investigación biológica e incluso interdisciplinaria.

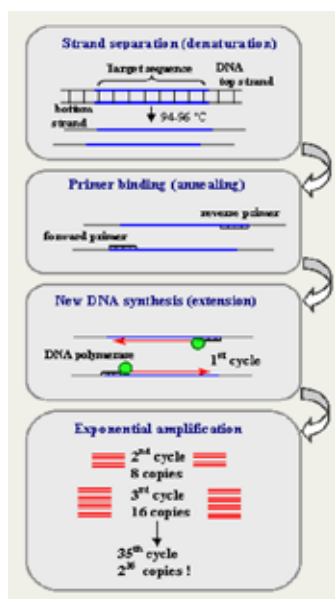


Figura 3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/doc/TechPCR.shtml>

II.A. IDENTIFICACIÓN POR PCR DE ORGANISMOS BENÉFICOS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO

La PCR permite la síntesis exponencial (amplificación) de una determinada región de ADN utilizando a una enzima polimerasa termoestable, un par de oligonucleótidos flanqueantes de la región de interés, denominados también “primers” u “oligonucleótidos”. Esta técnica es un proceso cíclico donde la molécula de ADN es inicialmente desnaturalizada (apertura de la doble hélice) por el calentamiento a altas temperaturas, continuando con la hibridación o alineamiento de los primers a menor temperatura para su posterior polimerización por la enzima (Figura 3). Todo el ciclo anterior (desnaturalización, alineamiento y polimerización) es repetido por un número determinado de veces.

Al concluir la reacción, los productos de amplificación son analizados por electroforesis en geles de agarosa o acrilamida según se requiera (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

La iniciativa de caracterizar molecularmente a las especies, denominada “Código de barras” involucra la amplificación por PCR de un marcador genético el cual es útil en diferentes estudios incluyendo el manejo de plagas; así como la caracterización y tipificación de organismos (Jenkins *et al.*, 2012). Entre los marcadores moleculares mayormente utilizados se encuentran los genes de ADN ribosomal, genes de ADN mitocondrial y/o genes de mantenimiento celular, su elección depende del nivel de discriminación taxonómico que se requiera (Jenkins *et al.*, 2012; Chesters *et al.*, 2012).

II.A.1. PROTOCOLOS DE AMPLIFICACIÓN: HONGOS ENTOMOPATÓGENOS (HE)

Para la identificación de hongos, la región de los espaciadores internos transcritos (ITS, por su siglas en inglés) encontrada en una de las unidades del ADN ribosomal, es regularmente utilizada como marcador molecular, garantizando una exitosa identificación para un amplio grupo de organismos, incluyendo a los HE (Schoch *et al.*, 2012).

Amplificación de la región ribosomal ITS (ITS5/ITS4) (Figura 4)

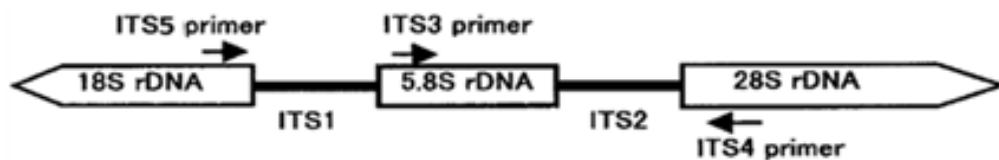


Figura 4. Representación esquemática de la localización de los primers ITS5/ITS4 en la región ribosomal ITS de hongos. Modificado de Fujita *et al.*, 2001.

Oligonucleótidos

Sentido (Forward):	ITS5	5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	~550-600 pb	White <i>et al.</i> , 1990
Antisentido (Reverse):	ITS4	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'		

Procedimiento

1. Limpiar perfectamente la zona a utilizar con cloro al 5% y después con alcohol al 70%. Si es en campana esperar 15 min para esterilización con luz ultravioleta (UV).
2. Anotar en su correspondiente formato el orden y número de muestras que se someterán a amplificación (incluyendo el control negativo: No Template Control, NTC).
3. Verificar que en el contenedor a -20°C estén todos los reactivos necesarios, al igual que haya cantidad suficiente de cada uno de ellos.
4. Descongelar los reactivos de manera gradual y mezclarlos suavemente.
5. A continuación, marcar el tubo en el que se hará la mezcla de reacción y mantenerlo en la hielera.
6. Con base en el cuadro 1, añadir los volúmenes indicados de cada uno de los reactivos excepto el ADN, procurando depositarlos hasta el fondo del tubo.

NOTA: Los reactivos deberán manejarse cuidadosamente, evitando corrientes de aire.

Cuadro 1. Condiciones de la reacción de amplificación para los oligonucleótidos ITS5/ITS4.

Reactivo	Concentración stock	Concentración final
Agua destilada	--	--
Buffer para PCR	5X	1X
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM
dNTP 's	10 mM	0.2 mM
Oligonucleótido ITS5	10 μM	10 ρmol ó 0.4 μM
Oligonucleótido ITS4	10 μM	10 ρmol ó 0.4 μM
Taq ADN polimerasa	5 U/μL	1 U/25 μL
*ADN genómico	~ 50 ng/μL	100 ng/25 μL
Volumen de reacción: 25 μL		

**El ADN debe agregarse a cada uno de los tubos individuales al final de repartir la mezcla de reacción.*

7. Agitar la mezcla de reacción con pequeños golpes al tubo y colocarlo en la hielera.
8. En una gradilla refrigerada poner una tira de tubos de 0.2 mL y la tira de tapas para cubrirla.
9. Depositar 23 μL de la mezcla de reacción a cada tubo.
10. Depositar el ADN genómico de cada una de las muestras en el orden asignado (la manipulación del ADN se hará en la zona de trabajo correspondiente).
11. Tapar perfectamente los tubos y centrifugar por 30 s, mantenerlos en la gradilla refrigerada.
12. Colocar la tira de tubos en el Termociclador C1000™ (BIO-RAD, D.F., México) y programar el equipo con el programa de amplificación del Cuadro 2.

Cuadro 2. Programa de amplificación para los oligonucleótidos ITS5/ITS4.

Programa de amplificación			
Desnaturalización inicial	94°C	4 min	
Desnaturalización	94°C	1 min	*30 ciclos
Alineamiento	55°C	1 min	
Extensión	72°C	2 min	
Extensión final	72°C	5 min	
Conservación	4°C	∞	
Condiciones: Estandarizado en LBM-CNRCB			

*Para muestras de *Isaria* spp. se aumenta el programa a 35 ciclos.

13. Después de la PCR, guardar los tubos a 4°C.

14. Analizar 10 µL del producto de PCR por medio de electroforesis en gel de agarosa y fotodocumentar el gel (Fotodocumentador GEL DOC XR+, BIO-RAD, D.F., México) (Ver **Capítulo III.A**).

Amplificación de la región ribosomal ITS (AB28/TW81) (Figura 5)



Figura 5. Representación esquemática de la localización de los primers TW81/AB28 en la región ribosomal de hongos (Drenth e Irwin, 2001).

Oligonucleótidos

Sentido (Forward): TW81	5'- GTTTCGTTAGGTGAACCTGC-3'	~550-600 pb	Curran <i>et al.</i> , 1994
Antisentido (Reverse): AB28	5'- ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3'		

Procedimiento

Se deberá seguir el procedimiento anteriormente descrito para el desarrollo del protocolo de amplificación con este juego de oligonucleótidos (Cuadro 3 y 4).

Cuadro 3. Condiciones de la reacción de amplificación para los oligonucleótidos TW81/AB28.

Reactivo	Concentración stock	Concentración final
Agua destilada	--	--
Buffer para PCR	10X	1X
MgCl ₂	30 mM	1.5 mM
dNTP's	10 mM	0.5 mM
Oligonucleótido TW81	10 μM	10 pmol ó 0.4 μM
Oligonucleótido AB28	10 μM	10 pmol ó 0.4 μM
Taq ADN polimerasa	5 U/μL	1 U/25 μL
*ADN genómico	~ 50 ng/μL	100 ng/25 μL
Volumen de reacción: 25 μL		

*El ADN debe agregarse a cada uno de los tubos individuales luego de repartir la mezcla de reacción.

Cuadro 4. Programa de amplificación para los oligonucleótidos TW81/AB28.

Programa de amplificación			
Desnaturalización inicial	94°C	5 min	
Desnaturalización	94°C	1 min	30 ciclos
Alineamiento	55°C	1:30 min	
Extensión	72°C	2 min	
Extensión final	72°C	5 min	
Conservación	4°C	--	
Condiciones: Entz <i>et al.</i> , 2005			

II.A.2. PROTOCOLOS DE AMPLIFICACIÓN: INSECTOS ENTOMÓFAGOS (IE)

El código de barras de ADN utiliza primers universales para secuenciar un fragmento de ADN, por lo regular se emplea el gen mitocondrial citocromo oxidasa 1 (COI), esta región asegura una adecuada discriminación para muchas especies incluyendo una gran variedad de artrópodos (Jenkins et al., 2012; Chesters et al., 2012).

Amplificación de la región 5' del gen mitocondrial que codifica para la citocromo c oxidasa I (COI) (Figura 6)

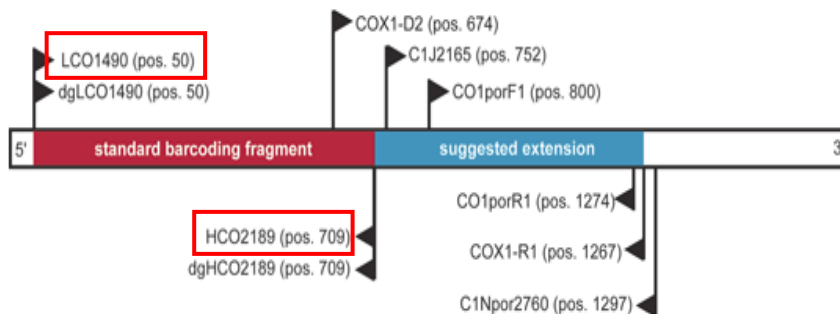


Figura 6. Representación esquemática de la región del ADN mitocondrial que amplifica los primers universales LCO1490/HCO2198. Fuente: www.palaeontologie.geo.uni-muenchen.de/SBP/index.php?option=com_content&view=article&id=47&Itemid=54.

Oligonucleótidos

Sentido (Forward): LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATT GG-3'	~750 pb	Folmer et al., 1994
Antisentido (Reverse): HCO2198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCA-3		

Procedimiento

Se deberá seguir el procedimiento anteriormente descrito para el desarrollo del protocolo de amplificación con este juego de oligonucleótidos (Cuadro 5 y 6).

Cuadro 5. Condiciones de la reacción de amplificación para los oligonucleótidos LCO1490/HCO2198.

Reactivo	Concentración stock	Concentración final
Agua destilada	--	--
Buffer para PCR	5x	1x
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM
dNTP's	10 mM	0.2 mM
Oligonucleótido LCO1490	10 μM	10 pmol/0.4 μM
Oligonucleótido HCO2198	10 μM	10 pmol/0.4 μM
Taq ADN polimerasa	5 U/μL	1 U/25 μL
ADN genómico	50 ng/μL	50 ng/25 μL
Volumen de reacción: 25 μL		

Cuadro 6. Programa de amplificación para los oligonucleótidos LCO1490/HCO2198.

Programa de amplificación		
Desnaturalización inicial	94°C	3 min
Desnaturalización	94°C	1 min
Alineamiento	45°C	1 min
Extensión	72°C	1.5 min
Desnaturalización	94°C	1 min
Alineamiento	50°C	1 min
Extensión	72°C	1 min
Extensión Final	72°C	5 min
Conservación	4°C	∞
Condiciones: Chesters <i>et al.</i> , 2012		

II.B. PCR ANIDADA PARA LA DETECCIÓN DE FITOPLASMAS

A partir de la invención de la PCR, se han generado diferentes variantes de esta técnica y hasta ahora se cuenta con una vasta gama de innovaciones que permiten afinar u obtener una mejor especificidad/sensibilidad. Una de estas modificaciones o variantes de PCR es la técnica de PCR anidada o Nested PCR, que se usa para aumentar la especificidad y la sensibilidad de la reacción. Consiste en dos reacciones secuenciales y funciona re-amplificando parte de la reacción inicial. Después de que concluye la primera PCR, una pequeña fracción de los productos de amplificación de ésta, son agregados a una nueva mezcla de reacción para una segunda PCR que contiene un segundo par de primers distintos. Estos primers están diseñados para hibridar específicamente en secuencias internas presentes dentro de los productos de amplificación generados en la primera PCR (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). La segunda PCR aumenta la concentración del producto específico, al incluir en la reacción un par de primers internos. Se anida una PCR cuando se trabaja con muestras que tengan un bajo número de copias de la molécula diana o en caso de que la reacción favorezca la generación de productos inespecíficos (Pelt-Verkuil

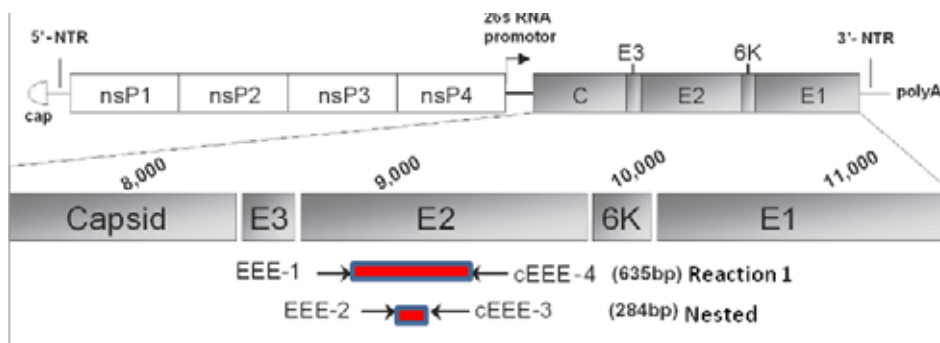


Figura 7. Esquema del genoma de un alfavirus; EEE-1/cEEE-4 y EEE-2/cEEE-3, comprenden el juego de primers para una reacción anidada; el primer par de primers forman un producto de amplificación de 635 pb (primera PCR) y el producto de PCR de 284 pb surge de la segunda PCR. Modificado de Pelt-Verkuil *et al.*, 2008.

Los fitoplasmas son bacterias que carecen de pared celular, pertenecen a la clase Mollicutes, se encuentran en el floema de las plantas y en insectos vectores (Figura 8). Causan enfermedades en una gran variedad de plantas alrededor del mundo, asimismo pérdidas económicas. Es necesario obtener un ADN de buena calidad y concentración para tener éxito en la detección de fitoplasmas por PCR ya que sólo el 1% del ADN total extraído de tejido corresponde a fitoplasma. Debido a que se requiere incrementar la sensibilidad de la detección por PCR y disminuir los inhibidores que puedan interferir con la eficacia de la reacción, se utiliza esta técnica de PCR anidado (Bertaccini y Duduk, 2009) o doble anidado (Fránová *et al.*, 2007).

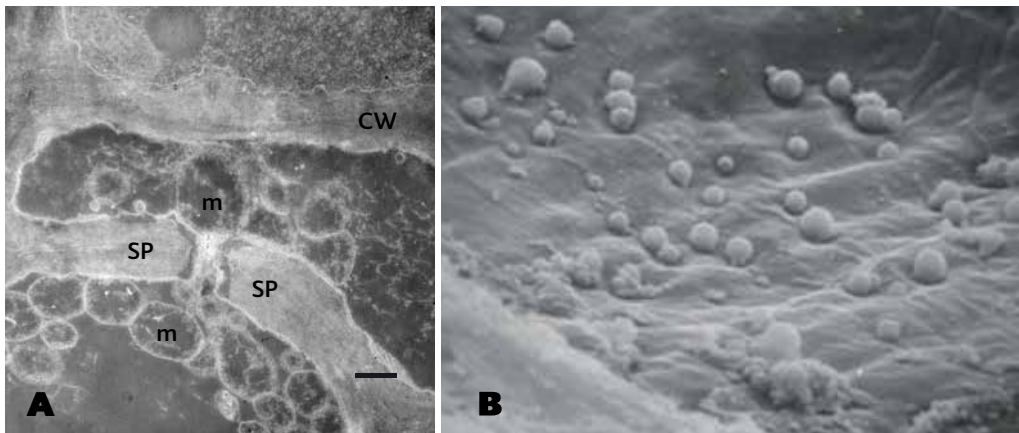


Figura 8. A) Micrografía electrónica de transmisión que muestra la presencia de fitoplasmas en el floema. CW, pared celular; m, fitoplasmas; SP placa cribosa. La escala de la barra representa 700 nm. B) Micrografía electrónica de barrido donde se observan fitoplasmas unidos a la membrana del tubo criboso de una planta infectada. Imágenes modificadas de Marcone, 2010.

Procedimiento para la detección de fitoplasmas por PCR anidada

En el LBM-CNRCB la detección de fitoplasmas se lleva a cabo en tres reacciones de PCR:

- La primera se realiza con el par de primers P1/P7.
- En la segunda, se toma 1 uL de la dilución de los productos de amplificación de P1/P7 y se amplifica con los primers P1A/P7A.
- En la última reacción se toma como templado 1 uL del producto de amplificación de P1A/P7A diluido 1:30 para ser amplificado con los primers R16F2n/R16R2.

Reacción directa

La región que amplifica el primer par de oligonucleótidos universales va del extremo 5' del gen 16S rRNA a la región 5' del 23S rDNA (Figura 9).

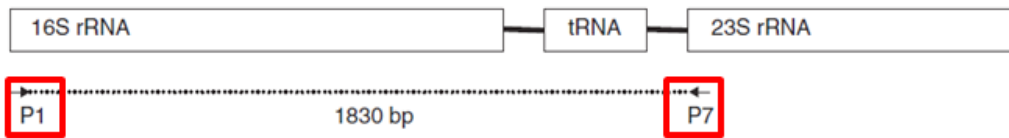


Figura 9. Representación esquemática de la posición de los primers P1 y P7. Modificado de Hodgetts y Dickinson, 2010.

Oligonucleótidos

Sentido (Forward): P1	5' - AAGAGTTTGACTCTGGCTCAG GATT-3'	~1800 pb	Deng y Hiruki, 1991
Antisentido (Reverse): P7	5' - CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'		Schneider et al. 1995

1. Registrar en un formato el orden de las muestras y hacer los cálculos para preparar la mezcla de reacción (incluir un NTC).
2. Limpiar el área de trabajo con cloro al 5% y después con alcohol al 70%. Si es en campana esterilizar con luz UV por 15 min.
3. Organizar los reactivos a utilizar en una hielera congelada a -20°C , (asegurarse de que los reactivos tengan la cantidad suficiente para realizar la mezcla de reacción).
4. Descongelar los reactivos de manera gradual y mezclarlos suavemente.
5. A continuación, marcar el tubo que contendrá la mezcla de reacción y mantenerlo en la hielera.
6. Añadir al tubo de la mezcla de reacción (según el Cuadro 7) los volúmenes indicados de cada uno de los reactivos excepto el ADN, procurando depositarlos hasta el final del tubo.

Cuadro 7. Condiciones de la reacción de amplificación para los oligonucleótidos P1/P7.

Reactivo	Concentración stock	Concentración final
Agua destilada	--	--
Buffer para PCR	5x	1x
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM
dNTP's	10 mM	0.1 mM
Oligonucleótido P1	10 μM	0.5 μM
Oligonucleótido P7	10 μM	0.5 μM
Taq ADN polimerasa	5 U/ μL	1 U/25 μL
*ADN genómico	~50 ng/ μL	100 ng/25 μL
Volumen de reacción: 25 μL		

*El ADN debe agregarse a cada uno de los tubos individuales luego de repartir la mezcla de reacción.

NOTA: Se deberán manejar todos los reactivos con cuidado, evitando corrientes de aire y se deberá permanecer en silencio durante todo el procedimiento para impedir contaminaciones.

7. Agitar suavemente la mezcla de reacción con pequeños golpes al tubo y colocarlo en la hielera.
8. En una gradilla refrigerada poner una tira de tubos de 0.2 mL.
9. Depositar 23 μ L de la mezcla de reacción a cada tubo.
10. Cubrir la tira de tubos con la mezcla de reacción.
11. Trasladar la gradilla con la tira de tubos al área correspondiente para la manipulación de ADN.
12. Depositar el ADN genómico de cada una de las muestras en el orden asignado procurando no hablar durante el proceso.
13. Tapar perfectamente los tubos y centrifugar por 30 s, mantenerlos en la gradilla refrigerada.
14. Colocar la tira de tubos en el termociclador y programar el equipo con el programa de amplificación del Cuadro 8.

Cuadro 8. Programa de amplificación para los oligonucleótidos P1/P7.

Programa de amplificación para P1/P7			
Desnaturalización inicial	94°C	5 min	
Desnaturalización	94°C	45 s	35 ciclos
Alineamiento	58°C	45 s	
Extensión	72°C	1.5 min	
Extensión final	72°C	7 min	
Conservación	4°C	∞	
Condiciones: Teixeira <i>et al.</i> , 2008			

15. Después de la PCR, guardar los tubos a 4°C.

Opcional:

16. Analizar 10 µL del producto de PCR por medio de electroforesis en gel de agarosa y fotodocumentar el gel (Fotodocumentador GEL DOC XR+, BIO-RAD, D.F., México) (Ver **Capítulo III.A**).

PCR anidada

La región que amplifica el primer va del extremo 5' del gen 16S rRNA a la región 5' del 23S rDNA (Figura 10).

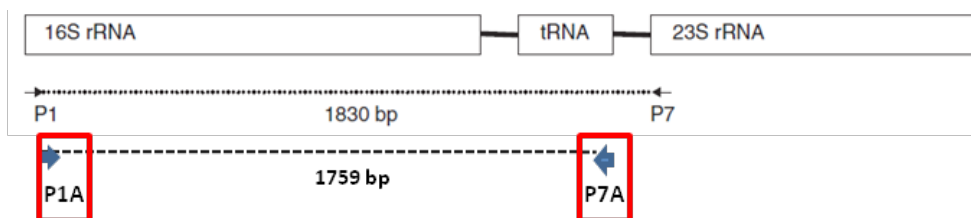


Figura 10. Representación esquemática de la posición de los primers P1A y P7A. Modificado de Hodgetts y Dickinson, 2010.

Sentido (Forward): P1A	5´- ACGCTGGCGGGCGCGCCTAATAC -3´	~1800 pb	Lee <i>et al.</i> , 2004
Antisentido (Reverse): P7A	5´- CCTTCATCGGCTCTTAGTGC-3´		

1. Preparar las diluciones 1:30 de los productos de amplificación de P1/P7.
2. Después se deberá seguir el procedimiento anteriormente descrito para el desarrollo del protocolo de amplificación con este juego de oligonucleótidos (Cuadro 9 y 10).
3. Después de la PCR, guardar los tubos a 4°C o continuar con el siguiente paso.
4. Analizar 10 µL del producto de PCR por medio de electroforesis en gel de agarosa y fotodocumentar el gel (Fotodocumentador GEL DOC XR+, BIO-RAD, D.F., México) (Ver **Capítulo III.A**).

Cuadro 9. Condiciones de la reacción de amplificación para los oligonucleótidos P1A/P7A.

Reactivo	Concentración stock	Concentración final
Agua destilada	--	--
Buffer para PCR	5x	1x
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM
dNTP's	10 mM	0.1 mM
Oligonucleótido P1A	10 µM	0.5 µM
Oligonucleótido P7A	10 µM	0.5 µM
Taq ADN polimerasa	5 U/µL	1 U/25 µL
Dilución 1:30 de los productos de PCR de P1/P7	--	--
Volumen de reacción: 25 µL		

Cuadro 10. Programa de amplificación para los oligonucleótidos P1A/P7A.

Programa de amplificación			
Desnaturalización inicial	94°C	5 min	
Desnaturalización	94°C	45 s	35 ciclos
Alineamiento	58°C	45 s	
Extensión	72°C	1.5 min	
Extensión final	72°C	7 min	
Conservación	4°C	∞	
Condiciones: Lee <i>et al.</i> , 2004			

PCR doble anidada

La región que amplifica oligonucleótidos R16F2n/R16R2 es un fragmento del gen 16S rRNA (Figura 11).

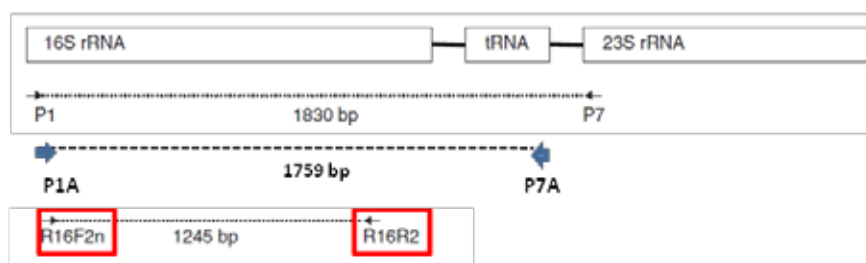


Figura 11. Representación esquemática de la posición de los primers R16F2n y R16R2. Modificado de Hodgetts y Dickinson, 2010.

Sentido (Forward): R16F2n	5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'	~1200 pb	Gundersen y Lee, 1996
Antisentido (Reverse): R16R2	5'-TGACGGGCGGTGTGTACAA-ACCCCG-3'		

1. Preparar la dilución 1:30 de los productos de PCR de P1A/P7A.
2. Después se deberá seguir el procedimiento anteriormente descrito para el desarrollo del protocolo de amplificación con este juego de oligonucleótidos (Cuadro 11 y 12).

Cuadro 11. Condiciones de la reacción de amplificación para los oligonucleótidos R16F2n/R16R2.

Reactivo	Concentración stock	Concentración final
Agua destilada	--	--
Buffer para PCR	5x	1x
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM
dNTP's	10 mM	0.1 mM
Oligonucleótido R16F2n	10 μM	0.4 μM
Oligonucleótido R16R2	10 μM	0.4 μM
Taq ADN polimerasa	5 U/μL	1 U/25 μL
Dilución 1:30 de los productos de PCR de P1A/P7A	--	--
Volumen de reacción: 25 μL		

Cuadro 12. Programa de amplificación para los oligonucleótidos R16F2n/R16R2.

Programa de amplificación			
Desnaturalización inicial	94°C	2 min	
Desnaturalización	94°C	1 min	35 ciclos
Alineamiento	55°C	2 min	
Extensión	72°C	3 min	
Extensión final	72°C	7 min	
Conservación	4°C	∞	
Condiciones: Gundersen y Lee, 1996			

3. Después de la PCR, guardar los tubos a 4°C o continuar con el siguiente paso.
4. Analizar 10 µL del producto de PCR por medio de electroforesis en gel de agarosa y fotodocumentar el gel (Fotodocumentador GEL DOC XR+, BIO-RAD, D.F., México) (Ver **Capítulo III.A**).

II.C. PCR TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DEL HUANGLONGBING DE LOS CÍTRICOS

La PCR tiempo real es una técnica basada en fluorescencia que permite la cuantificación precisa del ADN amplificado “en tiempo real” durante la fase exponencial de la reacción (Bustin *et al.*, 2012). Requiere sondas fluorescentes o moléculas fluorescentes con afinidad a ADN de doble cadena, un termociclador equipado con los mecanismos de excitación para fluoróforos y un sistema de fibras ópticas sensibles a la detección de fluorescencia, los cuales son controlados por computadora a través de un software especializado (Farrell, 2010). La técnica de PCR tiempo real es rápida, robusta, cuantitativa, reproducible y sensible. Derivado de la reciente presencia del Huanglongbing (HLB) de los cítricos en México, ocasionada por una bacteria limitada a floema (*Candidatus Liberibacter spp.*) se inició una campaña fitosanitaria de prioridad nacional con el objetivo de detectar oportunamente la enfermedad (NOM-079-FITO-2002; ACUERDO DOF: 16 agosto 2010). Por esta razón y las características que ofrece la técnica, ha sido validada y aceptada para la detección oficial del HLB en México en laboratorios aprobados por el SENASICA, entre éstos se encuentra el LBM-CNRCB.

Procedimiento para el diagnóstico del Huanglongbing de los cítricos por PCR tiempo real

Método de extracción del ADN genómico

La detección del HLB se realiza a partir de muestras vegetales de cítricos y en el psílido asiático, insecto vector (*Diaphorina citri* Kuwayama) de la enfermedad. En el LBM-CNRCB se han utilizado dos métodos para la obtención del ADN total a partir de muestras vegetales y psílicos, los cuales han sido descritos previamente, el método AxyPrep™ Multisource Genomic DNA MiniPrep Kit y AxyPrep™ Blood Genomic DNA MiniPrep Kit, para cada caso respectivamente (Ver **Capítulo I.B** y **I.C**). Estos métodos se caracterizan por la combinación de procesos químicos, físicos y mecánicos, así como la rapidez y calidad en la obtención del ADN para posteriores estudios moleculares.

Sondas y primers

1. Obtención de primers y sondas TaqMan® grado HPLC, preferentemente con empresas que ofrezcan garantía en la pureza y 100% de control de calidad (Cuadro 13).

Controles de validación

1. Emplear como control de validación de la corrida para el análisis de muestras vegetales, sonda y primer basado en la enzima Citocromo oxidasa (COX) (Cuadro 13 y 14).
2. Para muestras de psílicos, utilizar una sonda y primer basados en genes de glicoproteína del psílido (WG) (Cuadro 13 y 15).

Cuadro 13. Secuencias de primers para la amplificación de las variantes de *C. Liberibacter* spp. y de genes control.

Primers TaqMan®	Secuencia del primer	Región objetivo	Especificidad	Tipo de muestra
HLBas ¹	5'-TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG-3'	16S rDNA	<i>C. Liberibacter asiaticus</i>	
HLBr ¹	5'-GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG-3'			
HLBam ²	5'-GAG CGA GTA CGC AAG TAC TAG-3'	16S rDNA	<i>C. Liberibacter americanus</i>	
HLBr ²	5'-GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG-3'			
COX ³	5'-GTA TGC CAC GTC GCA TTC CAG A-3'	Citocromo oxidasa	Gen COX	cítricos
COXr ³	5'-GCC AAA ACT GCT AAG GGC ATT C-3'			cítricos
WG ⁴	5'-GCT CTC AAA GAT CGG TTT GAC GG-3'	Glicoproteína	Gen WG	psílicos
WGr ⁴	5'-GCT GCC ACG AAC GTT ACC TTC-3'			psílicos

¹ Mezcla de primers (HLBas/HLBr) para la detección de *C. Liberibacter asiaticus*.

² Mezcla de primers (HLBam/HLBr) para la detección de *C. Liberibacter americanus*.

³ Mezcla de primers (COX/COXr) utilizados con controles de validación de la reacción de PCR tiempo real para la detección de la enzima Citocromo oxidasa en material vegetal de cítricos.

⁴ Mezcla de primers (WG/WGr) utilizados como control para la validación de la corrida de PCR para la detección de glicoproteína en psílicos.

Cuadro 14. Sondas TaqMan® para el diagnóstico de HLB en material vegetal

Sonda TaqMan®	Fluoróforo marcado-Secuencia
HLBp	56-FAM/AGA CGG GTG AGT AAC GCG/3BHQ-1
COXp	5-TET/ATC CAG ATG CTT ACG CTG G/3BHQ-2

Cuadro 15. Sonda TaqMan® para el diagnóstico del HLB en psílicos

Sonda TaqMan®	Fluoróforo marcado-Secuencia
HLBp	56-FAM/AGA CGG GTG AGT AAC GCG/3BHQ-1
WGp	5-TET/TTA CTG ACC ATC ACT CTG GAC GC/3BHQ-2

NOTA: Los primers y sondas TaqMan® que utiliza el LBM-CNRCB son específicos para la amplificación del 16S ADNr de todas las especies de *Candidatus Liberibacter* spp. asociadas con el HLB de los cítricos (Li *et al.*, 2006) y se solicitan a través de la empresa IDT (Integrated DNA Technologies).

Origen de los controles positivos y negativos

1. Determinar los controles positivos y negativos internos para el análisis en material vegetal de cítricos:

- ADN positivo de muestra vegetal de cítricos para HLB (muestra positiva, previamente analizada por PCR tiempo real).
- ADN clonado de *Candidatus* spp. (*asiaticus* o *americanus*, según sea el caso).
- ADN negativo de muestra vegetal de cítricos para HLB (muestra negativa, previamente analizada por PCR tiempo real).
- No Template Control (NTC, muestra sin ADN).

2. Emplear controles positivos y negativos internos para el análisis en muestras de psílicos:

- ADN positivo de muestra de psílicos para HLB (muestra positiva, previamente analizada por PCR tiempo real).
- ADN clonado de *Candidatus Liberibacter* spp. (*asiaticus* o *americanus*, según sea el caso).
- ADN negativo de muestra de psílicos para HLB (muestra negativa, previamente analizada por PCR tiempo real).
- No Template Control (NTC, muestra sin ADN).

NOTA: Los controles positivos validados se pueden solicitar directamente a laboratorios aprobados para realizar el diagnóstico del HLB por medio de la técnica de PCR tiempo real (ENECUSAV-Directorio).

Preparación de soluciones stock y soluciones de trabajo para sondas y primers

1. Debido a que las sondas y primers se reciben liofilizados, es necesario centrifugar para depositar el material en el fondo del tubo, previo a la resuspensión en Buffer TE (Tris-EDTA).
2. Se recomienda realizar soluciones stock de primers y sondas en Buffer TE a concentraciones de 100 μM para su almacenamiento a -20°C . Una vez resuspendidos, hacer alícuotas numeradas y guardar a -20°C .
3. Emplear alícuotas de trabajo para primers y sondas ajustando la concentración 2 μM y 1 μM , respectivamente.

NOTA: Las unidades de medida de primers y sondas liofilizados se indican en nmoles (nanomoles), por lo tanto, para obtener una solución stock 100 μM , se debe multiplicar por 10 el número de nmoles presentes en el tubo del primer o sonda para obtener el número de μL de Buffer TE en los que deben ser diluidos (ej. disolver 24 nmoles del primer HLBas en 240 μL de Buffer TE para obtener una solución stock a 100 μM). Diluir solo cantidades mínimas para las alícuotas de trabajo (se recomienda 500 μL). La frecuente congelación/descongelación debe ser evitada, así como la exposición de las sondas a luz directa.

Mezcla de primers

Para la mezcla de primers correspondientes a la detección del HLB (*asiaticus* y *americanus*), COX y WG se realizará lo siguiente:

1. Se tomará 10 μL del primer HLBas y 10 μL de HLBr para su dilución en 480 μL de Buffer TE y así obtener una concentración de 2 μM de la combinación de primers HLBas/HLBr en volumen final de 500 μL , para el empleo en la detección de la variante *asiaticus*. Repetir el procedimiento para obtener la combinación HLBam/HLBr para la variante *americanus*, COX/COXr y WG/WGr.

Manejo de las sondas

1. Las sondas se prepararán en tubos individuales ámbar (sin mezclas).
2. Ajustar la concentración a 1 μM a partir de la solución stock de la sonda (5 μL de la sonda stock a 100 μM diluida en 495 μL de Buffer TE para obtener una alícuota de trabajo a 1 μM en volumen final de 500 μL).
3. Almacenar en tubos ámbar a -20°C para proteger de la luz a los fluoróforos

Pasos para la mezcla de reacción de PCR tiempo real

1. La mezcla de reacción de PCR se debe preparar en un área limpia y evitar las corrientes de aire, preferentemente en una cabina con grado de bioseguridad tipo A2.
2. Para determinar el número total de muestras y realizar la mezcla de reacción de PCR tiempo real, se debe considerar el número total de muestras problema, muestras adicionales considerando el error de pipeteo (1 muestra adicional por cada 10 muestras problema) y 4 reacciones que corresponden a los controles positivos y negativos internos.

3. Realizar los cálculos con base en las concentraciones finales de los reactivos por medio de la fórmula: $C_1V_1=C_2V_2$ ya que las concentraciones iniciales pueden variar con respecto a la marca comercial que se emplee.
4. Someter a descongelación todos los reactivos, excepto la enzima Taq ADN polimerasa, la cual debe ser conservada en congelación antes, durante y después de su uso.
5. En un tubo nuevo y estéril de 1.5-2 mL, adicionar cada uno de los reactivos en el orden mencionado en el cuadro 16 o 17 (excepto el ADN) y mezclar suavemente sin generar burbujas en el tubo.
6. Una vez finalizada la mezcla, se procederá a repartir el volumen de reacción por muestra (12 μ L) en tubos individuales, tiras de tubos o placas para PCR tiempo real (dependiendo del número de muestras), los cuales estarán conservados en gradillas frigoríficas.

Cuadro 16. Condiciones de la reacción de amplificación para las muestras vegetal de cítricos.

Cálculos para la reacción de PCR tiempo real				
Tipo de muestra: vegetal de cítricos				V _r ***:13 μ L
Reactivos	Final		1 reacción (μ L)	# reacciones (ej.10)
H ₂ Odd*	--		2.85	28.5
Buffer 10X	1	X	1.25	12.5
MgCl ₂ 50 mM	6	mM	1.5	15
dNTP mix 10 mM	0.24	mM	0.3	3
Mezcla de primers HLB/HLBr** 2 μ M	240	nM	1.5	15
Mezcla de primers COX/COXr 2 μ M	240	nM	1.5	15
Sonda HLBp 1 μ M	120	nM	1.5	15
Sonda COXp 1 μ M	120	nM	1.5	15
Taq ADN polimerasa 5 U/ μ L	1	U/13 μ L	0.1	1
ADN objetivo	--		1	--

*Utilizar H₂O ultra pura, grado biología molecular libre de DNAsas y RNAsas.

**La mezcla de primers HLB se refiere ya sea a HLBas/HLBr o a HLBam/HLBr para cada caso de manera independiente.

***Volumen final de una reacción.

Cuadro 17. Condiciones de la reacción de amplificación para las muestras de psílicos.

Cálculos para la reacción de PCR tiempo real				
Tipo de muestra: psílicos				Vr:13 µL
Reactivos	Final		1 reacción (µL)	# reacciones (ej.10)
H ₂ Odd*	--		4.85	48.5
Buffer 10X	1	X	1.25	12.5
MgCl ₂ 50 Mm	6	mM	1.5	15
dNTP mix 10mM	0.24	mM	0.3	3
Mezcla de primers HLB/HLBr** 2 µM c/u	160	nM	1	10
Mezcla de primers WG/WGr 2 µM c/u	160	nM	1	10
Sonda HLBp 1 µM	80	nM	1	10
Sonda COXp 1 µM	80	nM	1	10
Taq ADN polimerasa 5 U/µL	1	U/13 µL	0.1	1
ADN objetivo	--		1	--

*Utilizar H₂Odd ultra pura, grado biología molecular libre de DNAsas y RNAsas.

**La mezcla de primers HLB se refiere ya sea a HLBas/HLBr o a HLBam/HLBr para cada caso de manera independiente.

***Volumen final de una reacción.

Adición de la muestra

1. Para el proceso de adición de la muestra se debe limpiar la mesa de trabajo con soluciones que eliminen DNAsas y RNAsas, en el LBM del CNRCB se utiliza el Discide® Ultra Disinfectant y alternativamente el producto comercial Apex® RNase free.

2. Evitar todo tipo de corriente de aire para evitar la contaminación cruzada entre las muestras. Se inicia con un pulso de vórtex para la adición de 1 µL de muestra de ADN de material vegetal o bien, 1 µL de muestra de psílicos, según el tipo de análisis a desarrollar.

NOTA: Utilizar puntas para micropipetas con filtro libre de pirógenos y RNAsas, guantes de nitrilo nuevos (sin polvo) y bata exclusiva para realizar la mezcla de reacción de PCR. En el LBM del CNRCB se ha optimizado la concentración de los reactivos y el volumen de reacción (Vr) a 13 µL. En el protocolo oficial de detección por PCR-RT se encuentra el procedimiento ajustado para un volumen de 25 µL por reacción.

3. Una vez adicionado el ADNg de las muestras bajo análisis, colocar 1 μ L de ADN de los controles positivos y negativos, exceptuando el NTC.

NOTA: Preferentemente utilizar puntas extra largas con filtro para la adición de la muestra. El área de adición de la muestra debe estar separada del área de preparación de la mezcla de reacción de PCR.

Programa de amplificación

En el LBM-CNRCB se utiliza un termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, D.F., México) con ayuda del programa CFX Manager™ software (BIO-RAD, D.F., México).

Parámetros para el análisis de datos

1 ciclo	40 ciclos	Punto crítico
95°C por 20 s	95°C por 1 s	Ópticos desconectados
	58°C por 40 s	Ópticos conectados

1. Revisar que los valores Ct sean los adecuados para los controles positivos, negativos y NTC. Indicar en el programa cuales son las reacciones NTC para que el programa asigne el valor de Ct=0

NOTA: No evaluar las muestras bajo análisis hasta determinar que los controles positivos y negativos son aceptables.

- a) Para el control positivo a partir de ADN (psílido o vegetal) a Las y Las:
TET Ct \leq 32
FAM Ct \leq 32
- b) Para el control positivo a partir de ADN clonado de HLB (Las o Lam)
TET Ct=0
0.00 < FAM Ct < 32

Interpretación de resultados para las muestras analizadas

- a) Muestra positiva a Las o Lam: si se obtienen valores entre 0.00 < FAM Ct < 32
- b) Muestra negativa a Las o Lam: si se obtienen valores FAM Ct \geq 36.5
- c) Muestra indeterminada: Si los valores FAM Ct: 33-35

Los procedimientos de análisis moleculares para el diagnóstico del Huanglongbing de los cítricos están basados en las instrucciones de trabajo del Laboratorio Nacional de Germoplasma y Biotecnología de Plantas (USDA, APHIS, PPQ, CPHST), según el protocolo establecido para el laboratorio de la Estación Nacional de Epidemiología, Cuarentena y Saneamiento Vegetal (ENECUSAV) (http://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/citrus_greening/downloads/pdf_files/cg-nprg.pdf).

NOTAS: Las muestras obtenidas con valores de TET Ct = 0.00 o bien $>$ 38 deberán ser probadas de nuevo, pues el fluoróforo TET indica los valores de amplificación para la señal de COX o bien de WG, por lo tanto, si se obtiene este resultado, la muestra indica que no presenta una calidad adecuada y se deberá repetir el análisis de corrida y en otros casos, el proceso de extracción de ADN.

Una muestra indeterminada puede darse cuando los valores de Ct para FAM indican baja concentración de ADN de Las o Lam o cuando no se recibió señal de TET o FAM o de ambos.

Fundamento legal

Para mayor información sobre la técnica, consultar el **Protocolo de Diagnóstico de *Candidatus Liberibacter* spp. mediante la Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real** (Documento). Así como, el **ACUERDO** por el que se dan a conocer las medidas fitosanitarias que deberán aplicarse para el control del *Huanglongbing* (*Candidatus Liberibacter* spp.) y su vector (DOF: 16 agosto 2010). Los documentos actualizados se encuentran en el sitio web del SENASICA, micrositio de Sanidad Vegetal (<http://www.senasica.gob.mx/?id=4737>).

CAPÍTULO 3

CONTROL DE CALIDAD DE EXTRACCIÓN DE ADN, CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA Y PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

El control de calidad de los procesos de extracción de ADN, purificación de los productos de PCR y en general de biología molecular es determinante debido a que se necesita partir de un producto de excelente calidad para estudios posteriores, por ejemplo, la purificación del producto de PCR, antes de secuenciar, es muy importante para los propósitos de validación de la secuencia.

III.A. CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ADN GENÓMICO

Las longitudes de onda que se utilizan para evaluar la pureza relativa y la concentración de una muestra de ADN son 260 nm y 280 nm. Las proteínas absorben luz UV a 280 nm, debido en gran parte al anillo aromático del triptófano, la fenilalanina y la tirosina. Un ADN puro en relación A₂₆₀/A₂₈₀ es de aproximadamente 1.8; si hay proteínas presentes, el valor será menor y si hay ARN, la relación será mayor a 2.0 (Clark, 2005).

Procedimiento

1. Limpiar perfectamente el área de trabajo. Encender la computadora y el equipo EPOCH (BioTek, VT, EUA). Abrir el software correspondiente e iniciar sesión para cuantificar ADN en una relación 260/280 nm.
2. Colocar la placa del espectrofotómetro sobre una toalla de papel con mucho cuidado EVITANDO el daño a la placa de cristal.

Limpieza general de la placa

3. En una toallita (kimwipe), aplicar un poco de limpiador Apex y pasarla cuidadosamente por las placas de vidrio.
4. Colocar 2 µL de la solución que se utilizó para la eluir la muestra de ADN a evaluar, en cada uno de los pozos; cerrar la placa poco a poco.
5. Abrir la placa y con la kimwipe retirar el exceso de la solución.

Lectura de blancos

6. Una vez limpia la placa; colocar 2 μL de la solución que se utilizó para eluir la muestra de ADN que servirá como blanco en los 2 primeros pozos de la placa (A2 y A3).
7. Llevar la placa al lector del espectrofotómetro y alinearla con la posición A1 del soporte. En la pantalla, seleccionar los pozos correspondientes donde se encuentran los blancos y dar clic en el botón “READ BLANKS”.
8. Esperar a que en la pantalla los pozos seleccionados aparezcan en verde para continuar con la lectura de las muestras.
9. Poner la placa sobre la toalla de papel y limpiarla perfectamente.

Lectura de muestras

10. Sacar las muestras del refrigerador a 4°C y mezclarlas con un ligero vórtex.
11. Anotar las muestras en el formato de registro de muestras del EPOCH (BioTek, VT, EUA) en orden de aplicación.
12. Colocar 2 μL de cada muestra en el pozo correspondiente.
13. Cerrar la placa y ubicarla en el lector; seleccionar los pozos en la pantalla y dar clic en el botón “READ SAMPLES”.
14. Esperar a que el equipo termine de realizar la lectura y exporte los resultados a un archivo de Excel. El software arrojará los datos de concentración en $\text{ng}/\mu\text{L}$ y la relación de pureza 260/280 nm.

NOTA: Durante la manipulación de todo el proceso se trabajará con guantes a excepción del manejo de la computadora.

15. Concluido el procedimiento, limpiar adecuadamente la placa, pasando la toallita con Apex para retirar el exceso de muestra. Secarla perfectamente con mucho cuidado.

III.B. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Después del proceso de extracción del ADN genómico o análisis por PCR, los productos de ambas técnicas se analizan mediante electroforesis en gel normalmente de agarosa y el porcentaje depende del tamaño del o los segmentos esperados. La electroforesis en gel de agarosa provee información sobre la cantidad y calidad del ADN genómico extraído y de productos de PCR (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Procedimiento

1. Ubicar la zona de electroforesis y tener cuidado con los materiales, evitar manipular objetos ajenos al área.
2. Preparar Buffer TBE (Ver **Anexo A**) al 1X y vaciar en una probeta 40 mL.

Preparación del gel de agarosa al 1%

3. Pesar 400 mg de agarosa en polvo. Se mantendrá apagado el aire acondicionado para evitar corrientes de aire que puedan ocasionar errores en el peso del reactivo.
4. Montar los soportes y materiales adecuados para preparar el gel procurando nivelar la superficie, verificar que no existan fugas y colocar los peines adecuados.
5. Depositar la agarosa en el matraz de 250 mL y agregar 40 mL del Buffer TBE 1X. Calentar la agarosa en el horno de microondas por 1 min o hasta que se disuelva perfectamente.

NOTA: Manejar con extremo cuidado el matraz y evitar respirar los vapores del contenido.

6. Enfriar un poco sin que se solidifique la agarosa y agregar una gota de bromuro de etidio* (manipular el reactivo lo menos posible y evitar derrames o mancharse). Mezclar perfectamente hasta homogeneizar y verter el contenido en el molde.

7. Esperar a que solidifique (aproximadamente 20 min) y colocar el gel en la cámara de electroforesis de tal forma que los pozos principales queden del lado correspondiente al polo negativo (color NEGRO). Llenar la cámara hasta la marca indicada con TBE 1X y con precaución retirar los peines.

Preparación de las muestras

8. En un papel parafilm, colocar 3 μ L del buffer de carga para 10 μ L de muestra. Mezclar la muestra con el buffer y vaciar en un pozo del gel (dejar libre el primer pozo para el marcador de peso molecular) para cada una de las muestras.

9. Concluido el proceso, tapan la cámara de electroforesis haciendo coincidir los polos: positivo con positivo y negativo con negativo. Conectar la cámara a la fuente de poder y programar la corrida a 90 volts constantes durante 20-30 min.



!!!NOTA IMPORTANTE!!!

Debido a que el bromuro de etidio es un compuesto altamente tóxico por ser mutagénico y carcinogénico, se deberá manejar siempre con guantes y eliminar los desechos de acuerdo al plan de manejo de residuos de laboratorio.

Visualización de resultados

10. Sacar el gel de la cámara de electroforesis y colocarlo en la charola del equipo; configurar el software con los parámetros adecuados para su visualización.
11. Tomar la foto del gel.

III.C. PROTOCOLOS DE PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Kit QIAquick® PCR Purification (Qiagen, Hilden, Alemania)

Este sistema combina la eficiencia del uso de columnas con una unión selectiva hacia la membrana de sílica. Cada uno de los buffers que contiene el kit optimiza la recuperación del ADN y remueve los contaminantes en cada una de las muestras. El ADN se adsorbe en la membrana en presencia de sales y los contaminantes pasan a través de la membrana. La adsorción también depende del pH, recuperando hasta un 95% a 7.5 de pH y se reduce drásticamente cuando el pH aumenta (QIAquick Spin Handbook).



!!!Precaución!!!

Utilizar siempre bata de laboratorio, guantes y lentes protectores. El Buffer PB contiene hidrocloreuro de guanidina, éste puede formar compuestos altamente reactivos en combinación con blanqueadores y/o cloro. En caso de derrame limpiar con abundante agua y detergente. No adicionar cloro ni soluciones ácidas a los desechos de extracción

Notas previas

- Las soluciones del kit pueden almacenarse a temperatura ambiente (15-25°C) por lapso de 12 meses.
- Verificar que el Buffer PE contenga etanol.
- El Buffer PB deberá estar a un pH igual a 7.5 (verificar la coloración amarilla con el indicador de pH en una alícuota del buffer).
- Revisar el protocolo para uso de la microcentrífuga.

Procedimiento

1. Adicionar 5 volúmenes del Buffer PB por cada volumen de producto de PCR y mezclar perfectamente.

NOTA: Si el color de la mezcla es violeta (debido al cambio de pH) adicionar 10 µL de acetato de sodio 3 M, la coloración deberá tornarse amarilla.

2. Colocar la columna en el tubo de colección de 2 mL.
3. **Unión:** Transferir toda la muestra a la columna y centrifugar por 1 min a 13,000 rpm. Descartar el filtrado y regresar la columna al tubo de recolección.
4. **Lavado:** Adicionar 750 µL de Buffer PE al centro de la columna y centrifugar a 13,000 rpm por 1 min. Descartar filtrado y regresar la columna al tubo.
5. Centrifugar nuevamente por 1 min a 13,000 rpm para remover el buffer de lavado residual.
6. Colocar la columna en un nuevo tubo de 1.5 mL.

7. **Elución:** Agregar 50 μL (30 μL para una mayor concentración) de Buffer EB o agua libre de nucleasas al centro de la columna. Incubar por 1 min y centrifugar a 13,000 rpm por 1 min. Conservar a 4°C si se procesará inmediatamente o a -20°C para conservación.
8. Cuantificar y analizar en gel de agarosa el producto de purificación según el procedimiento del capítulo III.B.

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, WI, EUA)

El sistema del kit usa columnas con membranas de sílica lo que hace que el ADN se una por la presencia de sales caotrópicas. El buffer de unión contiene isotiocianato de guanidina que ayuda en la lisis celular y desnaturaliza enzimas RNAsas y DNAsas previniendo la degradación del ADN. Los productos de PCR pasan directamente a la membrana y se unen a la superficie de sílica. Después de los lavados el fragmento de ADN finalmente es eluido con agua. Este sistema puede purificar ADN linear, ADN plasmídico o circular de una o dos cadenas. El rendimiento de ADN de doble cadena suele ser mayor que el de una sola cadena (Technical Bulletin Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System).

Notas previas

- Capacidad máxima de la columna: 1 mL. Para volúmenes mayores a 350 μL dividir en 2 muestras el paso a la columna.
- Cantidad máxima para purificar por columna: 400 mg.
- Los aceites minerales no interfieren en la purificación.
- Adicionar 15 mL de etanol (95-100%) a la Membrane Wash Solution.
- Revisar el protocolo para microcentrífuga.

Procedimiento

1. Adicionar un volumen igual al de la muestra de Membrane Binding Solution (MBS).
2. Colocar una columna en un tubo de recolección por cada una de las muestras a purificar.
3. **Unión:** Transferir la muestra a la columna e incubar por un min a temperatura ambiente para permitir la unión del producto de PCR a la membrana de la columna.
4. Transcurrido el tiempo, centrifugar a 16,000 xg (14,000 rpm) por 1 min. Remover la columna y descartar el líquido del tubo de colección. Regresar la columna al tubo.

NOTA: No disminuir las unidades de centrifugado debido a que puede interferir en la purificación de ADN.

5. **Lavados:** adicionar 700 μ L de Membrane Wash Solution a la columna.
6. Centrifugar por 1 min a 14,000 rpm. Vaciar el tubo de recolección y regresar la columna al tubo. Repetir el lavado con 500 μ L de Membrane Wash Solution y centrifugar por 5 min a 14,000 rpm.
7. Remover con cuidado la columna del tubo de recolección, sin que la membrana toque el líquido. Desechar el filtrado y centrifugar nuevamente a 14,000 rpm por 1 min.
8. Transferir la columna a un nuevo tubo estéril de 1.5 mL e incubar por 1 min a temperatura ambiente para permitir evaporar el etanol residual.

9. **Elución:** agregar 50 μL (o dos veces 20 μL para concentrar la muestra) de agua libre de nucleasas directamente al centro de la columna evitando tocar la membrana con la punta de la pipeta. Incubar por 1 min a temperatura ambiente y centrifugar a 14,000 rpm por 1 min.

NOTA: Para obtener una mayor concentración de ADN purificado, se puede eluir hasta con 15 μL , un volumen menor NO es recomendable porque disminuye la recuperación del ADN.

10. Descartar la columna y almacenar el tubo junto con el purificado a 4°C o -20°C.

CAPÍTULO 4

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS

El ADN codifica los genes de un organismo y la información que contiene funciona como una receta para su desarrollo. Una secuencia de ADN se refiere al orden de nucleótidos de los cuales está compuesto el ADN. Hay cuatro nucleótidos diferentes en el ADN los cuales tienen respectivamente en su estructura las bases adenina, timina, citosina y guanina. Secuenciar el ADN ayuda a los científicos a obtener información sobre enfermedades, identificar moléculas involucradas en complicados procesos metabólicos y procesos evolutivos. En el LBM-CNRCB se utiliza actualmente el análisis de secuencias a partir de una estrategia multigénica (MLST) para la identificación de los organismos benéficos depositados en las CHE-CNRCB y la CIE-CNRCB (Figura 12) con la finalidad de obtener información sobre la evolución de agentes de control biológico.

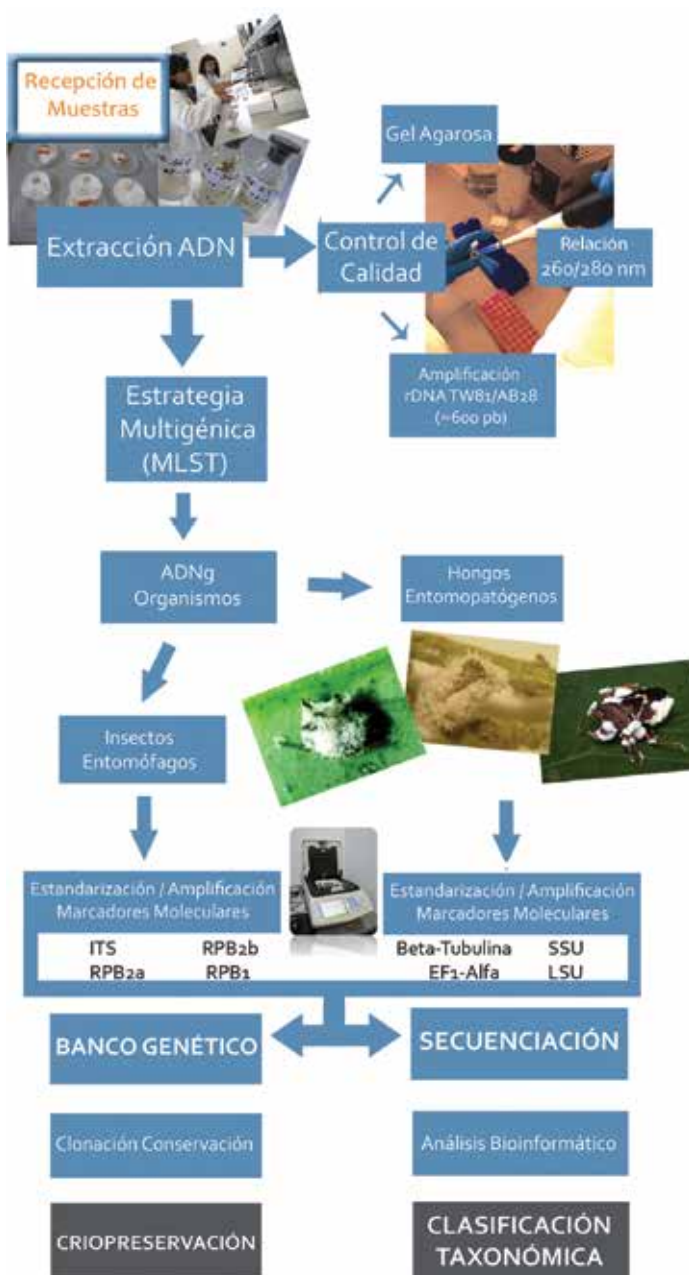


Figura 12. Estrategia experimental del LBM-CNRCB para la identificación de hongos entomopatógenos e insectos entomófagos.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS

El primer paso para secuenciar el ADN involucra extraerlo de las células que lo contienen. Hay muchos métodos que pueden usarse para extraer ADN (convencionales o comerciales) (Ver **Capítulo I**). Después de que el ADN ha sido aislado, para la identificación molecular con estrategia MSLT, el segundo paso es amplificar por PCR los fragmentos de ADN (ej. genes) deseados (Ver **Capítulo II.A**). El siguiente paso antes de secuenciar, es la purificación de los fragmentos de ADN. Este paso es muy importante para propósitos de validación de la secuencia (Ver **Capítulo III.C**).

Los fragmentos de ADN obtenidos en el LBM-CNRCB son enviados a secuenciar en una plataforma de genómica. Existen en México y en todo el mundo, laboratorios o empresas comerciales dedicados al servicio de secuenciación automática que permiten reducir los costos de este proceso cuando se hace a pequeña escala (ej. equipos y reactivos especializados costosos). Además, estas plataformas tienen una alta experiencia en las diferentes técnicas, lo que les permite ofrecer un soporte de garantía para encontrar una solución a cualquier dificultad. El único punto crítico para la confiabilidad de los resultados es la calidad del ADN o fragmento de ADN a enviar. Por eso es muy importante seguir los requisitos en materia de calidad y cantidad de las muestras.

Las muestras de ADN del LBM-CNRCB son secuenciadas con la técnica de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Esta técnica se basa en la habilidad que tienen las polimerasas de introducir tanto deoxinucleótidos como di-deoxinucleótidos a una cadena de DNA en crecimiento. Utilizando la técnica en sistemas automatizados de tecnología capilar y de fluorescencia, se puede detectar de manera diferencial cada uno de los di-deoxinucleótidos que se adicionan al final de un fragmento en la polimerización, los cuales son separados de otros fragmentos de diferente tamaño, por medio de una electroforesis capilar y a través de un software, se descifra la secuencia de un fragmento de ADN. Existen otras técnicas de secuenciación

como la técnica de pirosecuenciación que se basa en la detección de la señal luminosa generada por una reacción quimioluminiscente, en la cual se utiliza como sustrato el pirofosfato que se libera como resultado de la incorporación de un nucleótido a la cadena de ADN naciente (Shendure *et al.*, 2004). La técnica más reciente es la secuenciación con chip semiconductor (Ion Torrent Semiconductor Sequencing; Perkel, 2011). Este método es basado en la capacidad de detectar un ion de hidrógeno [H⁺], proveniente de la polimerización de la cadena complementaria a un ADN patrón, los dNTP's son incorporados durante un ciclo de secuenciación, permitiendo la formación del enlace fosfodiéster y una posterior liberación de PPi e H⁺. Esta polimerización se lleva a cabo en conjunto de pocillos, colocados sobre un sensor de efecto de campo sensible a iones, utilizados en las mediciones de pH en soluciones, por lo que cuando cambia la concentración de iones, cambia por consecuencia la corriente del transmisor y genera una señal eléctrica detectada en el chip. A diferencia de otras técnicas de secuenciación, ésta no utiliza un sistema óptico de detección.

Después del proceso de secuenciación, la plataforma de genómica nos envía los resultados en archivos electrónicos que contienen el electroferograma y toda la información del análisis. La última etapa para la identificación molecular por estrategia MLST es el análisis de secuencia de ADN con métodos bioinformáticos. El análisis de la secuencia de ADN, es el descubrimiento de similitudes funcionales y estructurales, y las diferencias entre múltiples secuencias biológicas. Esto puede hacerse comparando las nuevas (desconocidas) con las bien estudiadas y registradas (conocidas) secuencias. Este análisis incluye la búsqueda en la base de datos de secuencias, la alineación de secuencias, el descubrimiento de patrones, la reconstrucción de las relaciones evolutivas, la formación y la comparación del genoma. Los científicos han encontrado que dos secuencias similares poseen el mismo papel funcional. La comparación se puede hacer desde aspectos de comportamiento bioquímico o de acuerdo a la estructura de la proteína. Si dos secuencias de diferentes organismos son similares, se dice que son secuencias homólogas.

En el LBM-CNRCB, para el análisis de secuencias, se utiliza un protocolo modificado del publicado en Protocol Exchange (www.nature.com) por Bast (2013).

Corrección y ensamble de las secuencias de ADN

El primer paso del análisis es la corrección manual de las secuencias y posteriormente el ensamble de las secuencias de un mismo fragmento en contig (ej. superposición de las secuencias sentido, anti sentido e internas). Este paso se efectúa en el LBM-CNRCB con el programa libre “BioEdit”, que se puede descargar en la página: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html> (Figura 13).

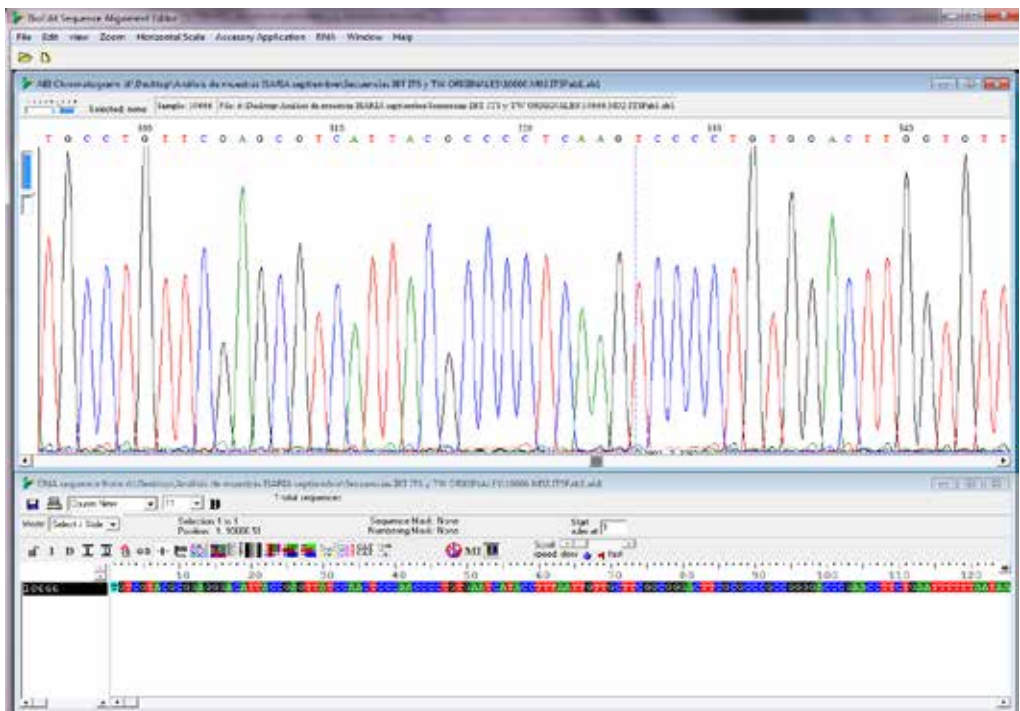


Figura 13. Ejemplo de un electroferograma representativo de una secuenciación de ADN con el programa “BioEdit”.

Búsqueda de secuencias registradas

El segundo paso es comparar la secuencia nucleotídica obtenida con otras secuencias depositadas en bancos públicos (ej. GenBank®) de genes. Una vez hecha la comparación, se importan las secuencias registradas con mayor similitud o adecuadas para hacer el análisis bioinformático. Este paso es crucial para tener una buena identificación de los organismos bajo estudio y establecer las correctas relaciones de filogenia o evolutivas.

Alineación de secuencias de ADN

En este paso, se comparan las secuencias mediante la búsqueda de patrones de caracteres comunes y el establecimiento de los residuos de correspondencia entre las secuencias relacionadas. El alineamiento de pares de secuencias es fundamental en la búsqueda de similitudes dentro de la base de datos y el alineamiento de secuencias múltiples. Un concepto importante en el análisis de la secuencia es la homología de secuencia. Cuando dos secuencias son descendientes de un origen evolutivo común, se dice que tienen una relación homóloga u homología. Un término relacionado, pero diferente es la similitud de secuencias (estos términos suelen utilizarse indistintamente de manera errónea). Este paso se efectúa en el LBM-CNRCB con el programa MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) después de la importación de las secuencias en el programa libre MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, <http://www.megasoftware.net/index.php>) (Figura 14).



Figura 14. Ejemplo del proceso de alineamiento de secuencia de ADN generado con MUSCLE en el programa MEGA 5.

Análisis filogenético

La finalidad de los análisis filogenéticos es estimar una relación de parentesco (árbol filogenético) que muestre la historia evolutiva del grupo taxonómico de estudio. Es decir, el objetivo final es obtener un árbol filogenético que sea reflejo del proceso evolutivo donde las entidades biológicas son el resultado de la descendencia con modificación entre especies ancestrales y descendientes. Existen diferentes métodos utilizados en estudios de sistemática filogenética [Máxima Parsimonia (MP), Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB), entre otros] que deben ser propiamente seleccionados en dependencia de los objetivos de las diferentes investigaciones. Estos estudios permiten al LBM-CNRCB una identificación precisa de los diferentes agentes de control biológico depositados en las colecciones del CNRCB. Estos análisis son realizados con el programa MEGA 5, por ejemplo, el algoritmo Neighbor-Joining (NJ) es utilizado en el LBM-CNRCB para la identificación de los agentes de control biológico porque este modelo une las dos secuencias que tengan la menor distancia genética (Figura 15). Mientras, el modelo MV es utilizado para establecer la historia evolutiva de un grupo taxonómico estudiado, ya que es un método estadístico basado en modelos de evolución molecular, donde se toma en cuenta conocimiento *a priori* acerca de los caracteres, especialmente cuando son caracteres moleculares (secuencias de nucleótidos de ADN) (Figura 16).

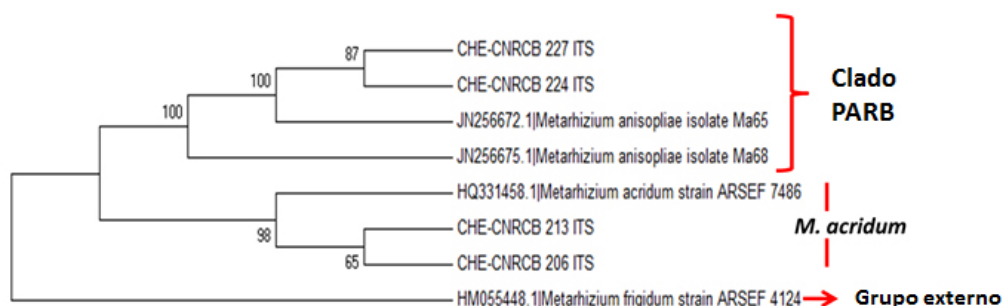


Figura 15. Ejemplo de un análisis de Neighbor Joining (NJ) para la identificación de agentes de control biológico. Árbol generado con NJ basado en análisis de las secuencias de ITS para CHE-CNRCB 224, CHE-CNRCB 213, CHE-CNRCB 206 y CHE-CNRCB 227. *Metarhizium frigidum* strain ARSEF 4124 (ITS) se utilizó como grupo externo.

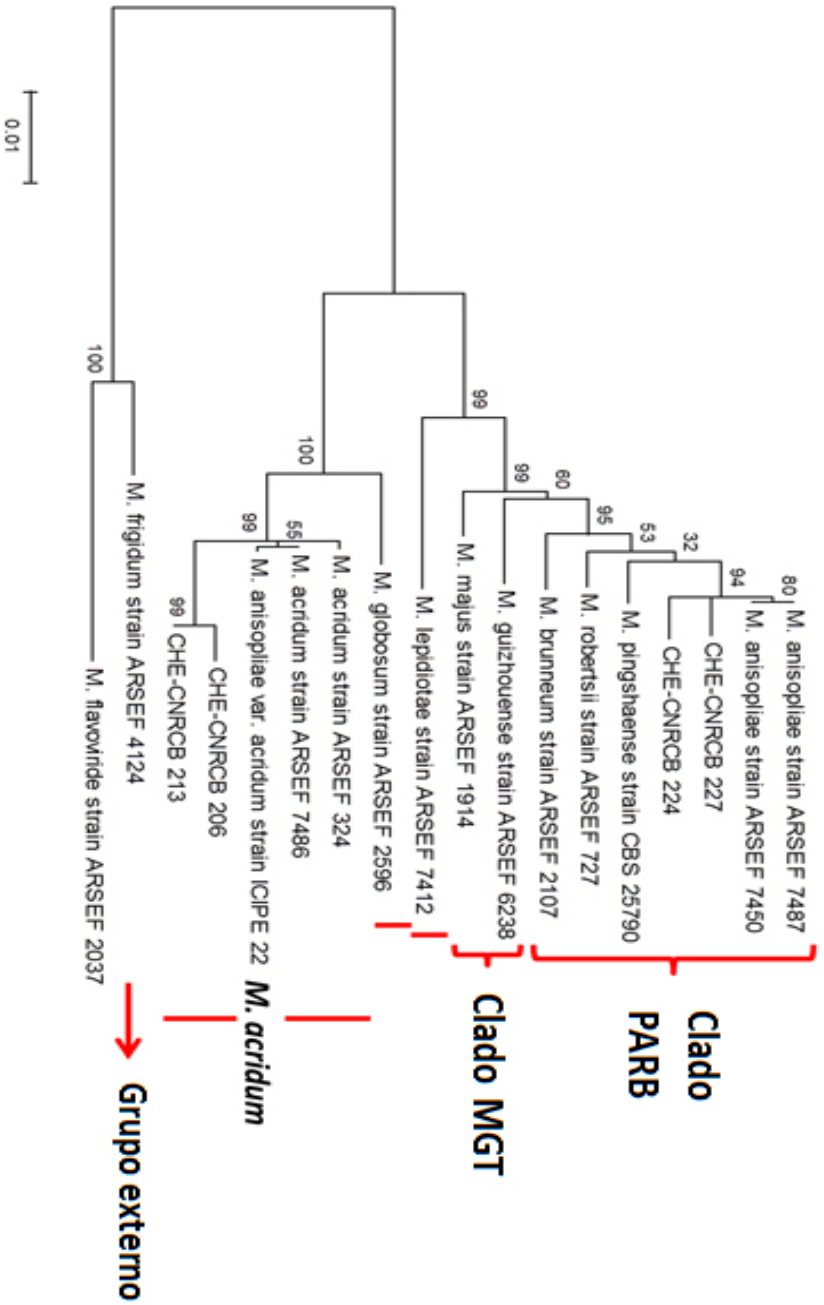


Figura 16. Ejemplo de un análisis de Maxima Verosimilitud (MV) para establecer la historia evolutiva de un grupo taxonómico. Árbol generado con MV basado en análisis de las secuencias de ITS y RPB2a para CHE-CNRCB 224, CHE-CNRCB 213, CHE-CNRCB 206 y CHE-CNRCB 227. *Metarhizium flavoviride* ARSEF 2037 y *M. frigidum* ARSEF 4124 (ITS y RPB2a) se utilizaron como grupo externo.

La bioinformática, al igual que todas las ciencias que son base en la investigación científica, provee grandes volúmenes de información que requiere de técnicas computacionales avanzadas para permitir hacer un procesamiento en tiempo real. Muchas de estas técnicas se enmarcan dentro de temas de investigación y desarrollo informático que tienen que ver con el almacenamiento y procesamiento de datos, entre las cuales podemos mencionar las bases de datos y algunas técnicas de inteligencia artificial, entre otras. Por lo anterior, estos análisis que estaban restringidos a los centros de investigación que tenían importantes recursos a nivel bioinformático, son ahora accesibles para cualquier centro. La disponibilidad de herramientas en línea, permite incluso al biólogo molecular principiante, obtener una cantidad considerable de información útil a partir de los bancos de datos de nucleótidos, y así realizar casi cualquier análisis vía servidor.

El sitio “phylogeny.fr” (http://www.phylogeny.fr/version2_cgi/index.cgi) está diseñado principalmente para los biólogos que no tienen experiencia en la filogenia. Este sitio tiene un cuadro en el que puede “pegar” secuencias en diferentes formatos y disponer de una cuenta de correo electrónico. Después, simplemente hacer clic en el botón “Ejecutar” y al finalizar el usuario recibirá los resultados de su análisis en su correo electrónico. Mientras, el sitio “CIPRES” (Cyber Infrastructure for Phylogenetic RESearch; <http://www.phylo.org/portal2/login!input.action>) es una plataforma que permite reconstrucciones filogenéticas a gran escala (cientos de miles de secuencias) para los especialistas en filogenia.

A blurred, monochromatic image of a microscope, showing various components like the eyepiece, objective lenses, and the base, all in shades of blue and grey.

ANEXOS

A solid green horizontal bar located at the bottom of the page, below the word 'ANEXOS'.

A. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES BÁSICAS PARA LOS PROTOCOLOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Proteinasa K (10 mg/mL)

Disolver 100 mg de Proteinasa K en H₂Odd hasta obtener un volumen final de 10 mL. Dispensar en tubos de 0.5 mL con alícuotas de 200 µL y almacenar a -20°C.

Etanol 70%

Agregar 700 mL de etanol 96-100% en una probeta y aforar con H₂Odd hasta 1 000 mL.

Stock	[Final]	500 mL	1000 mL
Etanol 100%	70%	350 mL	700 mL

EDTA 0.5 M pH 8.0 (ácido etilendiaminotetraacético)

En un vaso de precipitado disolver lo siguiente:

Stock	[Final]	500 mL	1000 mL
EDTA (disódico) (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ •2H ₂ O) (PM= 372.24 g/mol)	0.5 M	93.06 g	186.12 g
H ₂ Odd	--	375 mL	750 mL

Realizada la mezcla anterior, agregar perlas de NaOH (hidróxido de sodio) y ajustar el pH 8.0. Aforar a 500 o bien, 1 000 mL de H₂Odd. Esterilizar en autoclave (121°C durante 20 min a 15-20 PSI). El EDTA no se disuelve en agua hasta que el pH sea ajustado a 8.0.

TBE 10 X (Tris-Borato-EDTA, pH 8.0)

STOCK	500 mL	1000 mL	2000 mL
Tris base (PM= 121.14 g/mol)	54 g	108 g	216 g
Ácido bórico (H_3BO_3) (PM= 61.83 g/mol)	27.5 g	55 g	110 g
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	20 mL	40 mL	80 mL
H ₂ Odd	375 mL	750 mL	1 500 mL

Aforar al volumen final deseado, esterilizar en autoclave (121°C durante 20 min a 15-20 PSI) y almacenar a temperatura ambiente.

PBS 1 X (buffer de fosfatos salino)

En un vaso de precipitado disolver lo siguiente:

STOCK	[Final]	1000 mL
Cloruro de sodio (NaCl) (PM= 58.44 g/mol)	137 mM	8 g
Cloruro de potasio (KCl) (PM= 74.56 g/mol)	2.7 mM	0.2 g
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) (PM= 177.99 g/mol)	8 mM	1.42 g
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) (PM=136.09 g/mol)	1.46 mM	0.24 g
H ₂ Odd	--	800 mL

Ajustar el pH a 7.4 y aforar al volumen final deseado, posteriormente esterilizar en autoclave (121°C durante 20 min a 15-20 PSI) y almacenar a temperatura ambiente.

B. FÓRMULAS Y CONVERSIONES BÁSICAS PARA LOS PROTOCOLOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Fórmula de determinación de concentración

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Fórmula de espectrofotometría para el ADN

$$50\mu\text{g} \frac{\text{ADN}}{\text{mL}} = \text{D.O.}(A_{260}) = 1$$

Conversiones utilizadas en biología molecular

$$1 \mu\text{L} = 0.001 \text{ mL}$$

$$10 \mu\text{L} = 0.01 \text{ mL}$$

$$100 \mu\text{L} = 0.1 \text{ mL}$$

$$1000 \mu\text{L} = 1 \text{ mL}$$

$$1 \mu\text{g} = 1\,000 \text{ ng}$$

$$1 \mu\text{g} = 1\,000\,000 \text{ pg}$$

$$1 \text{ ng} = 0.001 \mu\text{g}$$

$$1 \text{ ng} = 1000 \text{ pg}$$

$$1 \text{ pg} = 0.0001 \text{ ng}$$

$$1 \text{ pg} = 0.000001 \mu\text{g}$$

C. GUÍAS RÁPIDAS DE USO DE EQUIPOS EMPLEADOS EN EL LBM-CNRCB

TISSUE LYSER II Qiagen®

1. Conectar y encender el equipo.
2. Verificar que el juego de adaptadores y brazos estén adecuadamente colocados, retirarlos cuidadosamente girando la perilla azul de los costados.
3. Abrir las placas y colocar los tubos de forma equilibrada (NO derramar líquidos), cerrar la tapa y colocarlas en los brazos del equipo.
4. Asegurar las placas girando la perilla azul de tal manera que queden fijas (**EVITAR forzarlas**).
5. Cerrar la tapa de acrílico.
6. Seleccionar el programa conforme a los parámetros requeridos presionando el botón **PROG**.
7. Si se desea cambiar los parámetros del programa seleccionado, presionar los botones “+” y/o “-“ en la pantalla de frecuencia y tiempo.
8. Presionar **START** para iniciar la operación.
9. Concluido el tiempo, retirar las placas para sacar los tubos y asegurarlas nuevamente, sin colocar el seguro de las perillas.
10. Apagar y desconectar el equipo. Verificar limpieza.

Para cancelar la operación, presionar STOP dos veces. Se puede cambiar el tiempo de operación aun cuando esté funcionando el equipo.

CENTRÍFUGA 24D LABNET®

1. Conectar y encender la centrífuga. El botón de encendido se encuentra en la parte posterior del equipo.
2. Para cambiar las unidades de velocidad (RPM) y el tiempo (min), se debe girar los botones dispuestos a los lados del equipo.
3. Levantar la tapa del equipo, y quitar el seguro de una segunda tapa plástica para el cabezal con cierre hermético.
4. Colocar en el cabezal las muestras a centrifugar equilibradas en número y peso.
5. Asegurar nuevamente la tapa plástica y cerrar el cabezal
6. Dar inicio a la centrifugación presionando el botón **TIMER**
7. Apagar y desconectar la centrífuga cuando se concluya su uso. Verificar limpieza.

Posee una tecla **QUICK** que permite realizar ensayos rápidos sin necesidad de programar el timer.

FUENTE DE PODER PowerPac Bio-Rad®

1. Conectar el equipo y encender por la parte trasera con el interruptor ON/OFF.
2. Dirigirse al panel frontal para programar los parámetros de corrida (Voltaje o Amperaje y determinar el valor numérico requerido con los botones "+" o "-").
3. Programar el tiempo de corrida utilizando los botones "+" o "-".
4. Conectar correctamente los electrodos de la cámara de electroforesis a la fuente de poder (hacer coincidir los colores: ROJO-ROJO y NEGRO-NEGRO).
5. Verificar nuevamente los parámetros y seleccionar el botón de corrida para detener el procedimiento, presionar STOP.
6. Al terminar, apagar el equipo con el interruptor ON/OFF. Verificar limpieza.

NOTA: la manipulación de la fuente de poder deberá manejarse SIEMPRE con GUANTES y PRECAUCIÓN.

TRANSILUMINADOR Benchtop UV®

1. Conectar y encender el equipo.
2. Colocar el gel o la muestra a analizar en el área del filtro del transiluminador (**USAR GUANTES** durante TODO el proceso de manipulación del gel y/o colorantes).
NOTA: cuidar que el gel no toque otras superficies o regiones de trabajo.
3. Cubrir el transiluminador con el acrílico o la cobertura del equipo (OPCIONAL).
4. Encender el equipo con el interruptor ON/OFF.
5. Seleccionar la longitud de onda o intensidad de luz apropiada para el análisis requerido.
Alta: visualización de fluoróforos, baja concentración de muestra o fotografías.
Baja: posicionamiento del gel, enfoque para fotografías y/o corte de bandas.
6. Concluido el análisis, apagar el equipo y limpiar la superficie.

Minimizar el uso de líquidos en el cristal del transiluminador, limpiar con un paño suave en caso de derrame al finalizar su uso.

ESPECTROFOTÓMETRO Epoch BioTek®

1. Conectar y encender el espectrofotómetro y la PC.
- Para la LIMPIEZA GENERAL de la placa:
 2. Limpiar perfectamente la placa, colocar 1 μL de agua libre de DNAsas y RNAsas/buffer TE en cada pozo. Cerrar la placa.
 3. Abrir el programa **Gen5 Take3**, colocar la placa sobre el lector. Alinear “A1” de la placa con la posición **A1** del soporte. Seleccionar **GEN5 TAKE3 MODULE**: marcar los pozos “blanco” y dar clic en **READ BLANKS**. Una vez que en la pantalla aparezcan los pozos en verde se continuará con la lectura de las muestras.
 - Para la LECTURA DE LAS MUESTRAS:
 4. Preparar la placa con los blancos y las muestras a leer (2 μL por pozo) y **repetir paso 3**.
 5. Una vez configurados los blancos, seleccionar los pocillos que contienen las muestras y dar clic en **READ SAMPLES > OK**.
 6. Terminado el proceso, dar clic en **END OF BATCH** para mostrar los resultados, después de su análisis guardar los archivos.
 7. Concluido el proceso, sacar la placa del lector y limpiarla perfectamente. Apagar los equipos y desconectarlos.

TERMOCICLADOR C1000 Bio-Rad®

1. Conectar y encender el termociclador adaptado a un No break-UPS.
- Para CREAR UNA CORRIDA en el equipo:
 2. Seleccionar **New Protocol** del menú principal o presionar **EDIT** y seleccione el protocolo que se modificará.
 3. Use las teclas de flechas (arriba y abajo) y desplazar por el campo que se desee.
 4. Presione las claves alfanuméricas para introducir un nuevo valor.
 5. Presione **RUN** para correr el protocolo sin guardarlo. Alternativamente, seleccione **Done** para escoger la ubicación de una carpeta y guardar el protocolo.
 - Para PREPARAR UNA CORRIDA:

Use alguno de los siguientes métodos:

 6. Seleccionar un protocolo de la librería de archivos del equipo, presiona **RUN** o **ENTER**.
 7. Selecciona un protocolo en la carpeta **PREVIOUS RUN**, después presionar **RUN** o **ENTER**.
 8. Abrir la librería de archivos para seleccionar un protocolo, después presionar **RUN** o **ENTER**.
 9. Editar un protocolo, después presionar **RUN**.
 10. Crear un nuevo protocolo, después presionar **RUN**.
 11. Concluido el proceso, presione **CANCEL RUN** para cancelar la temperatura de almacenamiento del programa (4°C) y presionar **MAIN MENU**.
 12. Abrir el **OPEN LID** para sacar la placa o tubos del termociclador. Apagar el equipo, registrar su uso y desconectarlo.

E. DISTRIBUIDORES GLOBALES

BIO-RAD, S.A.

Eugenia 197, Piso 10-A
Colonia Narvarte
Delegación Benito Juárez
C.P. 03020 México, D.F.
Tel: +52 (55) 5488 7670
Fax: +52 (55) 1107 7246
E-mail: lsg_mexico@bio-rad.com
<http://www.bio-rad.com/>

BioTek

P.O. Box 998, Highland Park
Winooski, VT 05404
United States
Phone: (888) 451-5171
Fax: (802) 655-7941
Email: customercare@biotek.com
Website: www.biotek.com

Corning Mexicana S.A.

Life Sciences (Axygen®)
Ant. Carr. a Roma Km 3.6
C.P. 66480, San Nicolás
Nuevo León, México
Phone: 52-81-8158-8400
Fax: 52-81-8313-8589
E-mail: GrupoLA@corning.com
<http://www.corning.com/index.aspx>

Integrated DNA Technologies (IDT)

1710 Commercial Park
Coralville, IA 52241
Tel: +1 319 626 8400
Email: international@idtdna.com
<http://www.idtdna.com>

Invitrogen™

Life Technologies Corporation
1600 Faraday Avenue
P. O. Box 6482
Carlsbad, California 92008
Telephone: (760) 603 7200
Fax: (760) 602 6500
<http://www.lifetechnologies.com>

Promega Corporation

2800 Woods Hollow Road
Madison, WI 53711 USA
Tel: 608 274 4330
Línea gratuita: 800 356 9526
Fax 608 277 2516
www.promega.com

QIAGEN

GmbH QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden

Tel: +49 2103 29 0

Fax: +49 2103 29 21700

Email: qiagen@qiagen.com

<http://www.qiagen.com>

USDA-APHIS-PPQ-CPHST

National Plant Germplasm and Biotechnology Laboratory

BARC-East, Bldg 580

Powder Mill Rd

Beltsville, MD 20705

Tel: 301 504 7100

Fax: 301 504 8539

http://www.aphis.usda.gov/plant_health/cphst/

CONTACTO

M.C. Hugo César Arredondo Bernal

Subdirector del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico

SENASICA-DGSV-CNRF-CNRCB

Km. 1.5 Carretera Tecomán-Estación FFCC

Apdo. Postal 67, C.P. 28110 Tecomán, Col.

Tel. +52 (313) 324 07 45/324 27 73

E-mail: hugo.arredondo@senasica.gob.mx

Dr. Adrien Gallou

Coordinador del Laboratorio de Biología Molecular (LBM)

Centro Nacional de Referencia de Control Biológico

Km. 1.5 Carretera Tecomán-Estación FFCC

Apdo. Postal 67, C.P. 28110 Tecomán, Col.

Tel. +52 (313) 324 07 45/324 27 73

E-mail: dgsv.cnrf3@senasica.gob.mx

M.C. Alba Priscilia Suaste Dzul

M.C. María Guadalupe Serna Domínguez

Biól. Gilda Yadi Andrade Michel

Laboratorio de Biología Molecular

Centro Nacional de Referencia de Control Biológico

Km. 1.5 Carretera Tecomán-Estación FFCC

Apdo. Postal 67, C.P. 28110 Tecomán, Col.

Tel. +52 (313) 324 07 45/324 27 73

DIRECTORIO

LIC. ENRIQUE MARTÍNEZ Y MARTÍNEZ

Secretario de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

M.V.Z. ENRIQUE SANCHEZ CRUZ

Director en Jefe de la Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria

DR. FRANCISCO JAVIER TRUJILLO ARRIAGA

Director General de Sanidad Vegetal

M. en C. JOSÉ ABEL LÓPEZ BUENFIL

Director del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

M.C. HUGO C. ARREDONDO BERNAL

Subdirector de Control Biológico

LITERATURA CITADA

Aljanabi, S.M. y Martínez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25 (22).

Arenas-Sosa, I. y López-Sánchez, J.L. 2004. Curso: Métodos de laboratorio, Espectrofotometría de absorción. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, México).

AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit. Axygen®, Corning Life Sciences. <http://www.bio-protech.com.tw/databank/DataSheet/DNARNAPuri/Axyprep%20Multi-Source%20Genomic%20DNA%20miniprep%20kit.pdf>. Revised 09/02. Versión 1.

AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit. Axygen®, Corning Life Sciences. <http://www.bio-protech.com.tw/databank/DataSheet/DNARNAPuri/axyprep%20blood%20genomic%20DNA%20miniprep%20kit.pdf>. Revised 05/11, Versión 1.

Bast, F. 2013. Sequence similarity search, multiple sequence alignment, model selection, distance matrix and phylogeny reconstruction. *Protocol Exchange*, doi:10.1038/protex.2013.065.

Bertaccini, A. y Duduk, B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 355–378.

Bustin, S. A., Zaccara, S. y Nolan, T. 2012. An introduction to Real-Time Polymerase Chain Reaction. In: *Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology*. Edited by Norfolk F.M., UK: Caister Academic Press.

Chesters, D., Wang, Y., Yu, F., Bai, M., Zhang, T., Hu, H., Zhu, C., Li, C. y Zhang, Y. 2012. The Integrative Taxonomic Approach Reveals Host Specific Species in an Encyrtid Parasitoid Species Complex. PLoS ONE 5: 1-7.

Clark, D.P. 2005. Molecular Biology. Elsevier Academic Press Publications. ISBN: 0-12-175551-7.

DNeasy Blood and Tissue handbook. Qiagen. http://mvz.berkeley.edu/egl/resources/product%20inserts/DNeasy_Blood_&_Tissue_Handbook.pdf. Revised 07/06.

Drenth, A. y Irwin, J.A.G. 2001. Routine DNA based Diagnostic Tests for *Phytophthora*. Rural Industries Research and Development Corporation. Publication No. 01/36. ISSN 1440-6845.

ENECUSAV-SENASICA, Estación Nacional de Epidemiología, Cuarentena y Saneamiento Vegetal. 2010. Protocolo de diagnóstico de *Candidatus Liberibacter* spp. mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. pp. 1-16.

Entz, S.C., Johnson, D.L. y Kawchuk, L.M. 2005. Development of a PCR-based diagnostic assay for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Mycology Research 109 (11): 1302-1312.

Farrell, R. E. 2010. Quantitative PCR Techniques. In: RNA Methodologies: A Laboratory guide for Isolation and characterization. Academic Press-Elsevier, London-USA. pp. 453-454.

Fredricks, D.N., Smith, C. y Meier, A. 2005. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. Journal of Clinical Microbiology 43: 5122-5128.

Fujita, S., Senda, Y., Nakaguchi, S. y Hashimoto, T. 2001. Multiplex PCR using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 3617-3622.

Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R. y Dickinson, M. 2009. Panel of 23S rRNA gene-based real-time pcr assays for improved universal and group-specific detection of phytoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 2945-2950.

Hodgetts, J. y Dickinson, M. 2010. Phytoplasma phylogeny and detection based on genes other than 16S rRNA. In: *Phytoplasmas: Genomes, Plant Host and Vectors*. Edited by Weintraub, P. G. and Jones, P. CAB International, MA-USA. pp. 93-113.

Jenkins, C., Chapman, T., Micallef, J. y Reynolds, O. 2012. Molecular techniques for the detection and differentiation of host and parasitoid species and the implications for fruit fly management. *Insects* 3: 763-788.

Kube, M., Mitrovic, J., Duduk, B., Rabus, R. y Seemüller, E. 2012. Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. *The Scientific World Journal*. Article ID 185942, 25 pages.

Li, W., Hartung, J. S. y Levi, L. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification for *Candidatus Liberibacter* species associated with Citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66: 104-115.

Marcone, C. 2010. Movement of phytoplasmas and the development of disease in the plant. In: *Phytoplasmas: Genomes, Plant Host and Vectors*. Edited by Weintraub, P. G. and Jones, P. CAB International, MA-USA. pp. 114-129.

Meyling, N. V. y Eilenberg, J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control* 43: 145-155.

Neher, O. T., Johnston, M. R., Zidack, N. K. y Jacobsen, B. J. 2009. Evaluation of *Bacillus mycoides* isolate BmJ and *B. mojavensis* isolate 203-7 for the control of anthracnose of cucurbits caused by *Glomerella cingulata* var. *orbiculare*. *Biological Control* 48: 140-146.

Pelt-Verkuil, E., Belkum, A. y Hays, J.P. 2008. Principles and technical aspects of PCR amplification. Springer Science. ISBN 978-1-4020-6240-7.

Perkel, J. 2011. Making Contact with Sequencing's Fourth Generation. *BioTechniques* 50 (2): 93-95.

Plaza, G.A., Upchurch, R., Bringmon, R.L., Whitman, W.B. y Ulfing, K. 2003. Rapid DNA extraction for screening soil filamentous fungi using PCR amplification. *Polish Journal of Environmental Studies* 133: 315-318.

PubMed query: “*Polymerase Chain Reaction*” [MAJR]. (s.f.). Recuperado el: 12 de Diciembre de 2013. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/doc/TechPCR.shtml>

Puerta, B.C. y Urueña, C. 2005. *Prácticas de Biología Molecular*. Editorial Pontificia Universidad Javeriana.

QIAquick Spin Handbook. Qiagen. <http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center/resource-download.aspx?id=05356d52-ff29-4ac2-be49-48cba2381cfa&lang=EN>. Revised 03/08.

Reddy, P.R. y Raju, N. 2012. Gel-electrophoresis and Its Applications, Gel Electrophoresis-Principles and Basics. Edited by Magdeldin S. ISBN 978-953-51-0458-2.

Rouessac, F. y Rouessac, A. 2007. Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques. Edited by Wiley J. and Sons. ISBN: 978-0-470-85903-2.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences 74: 5463-5467.

Schoch, C.L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesqué, C.A., Chen W. y Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences, doi:10.1073/pnas.1117018109.

Shendure, J., Mitra, R.D., Varma, C. y Church, G.M. 2004. Advanced sequencing technologies: Methods and goals. Nature Reviews Genetics 5: 335-344.

Tapia-Tusell, R., Magaña Gomez, J.A., Cortés Velazquez, A., Higuera Ciapara, I. y Pérez-Brito, D. 2009. Protocolos para la detección molecular de fitopatógenos y organismos genéticamente modificados. Laboratorio GeMBio, grupo de estudios moleculares aplicados a la Biología. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Mérida, Yucatán, México.

Technical Bulletin Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. PROMEGA. <http://www.promega.es/resources/protocols/technical-bulletins/101/wizard-sv-gel-and-pcr-cleanup-system-protocol/>. Revised 12/10. Part # TB308.

Technical Manual Wizard® Genomic DNA Purification Kit. PROMEGA. <http://www.promega.es/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/>. Revised 12/10. Part # TM050.

Teixeira, D. C., Wulff, N. A., Martins, E. C., Kitajima, E. W., Bassanezi, R., Ayres, A. J., Eveillard, S., Saillard, C. y Bové, J. M. 2008. A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches'-broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of São Paulo, Brazil. *Phytopathology* 98: 977-984.

Thakur, R. y Sandhu, S. 2010. Species confirmation of fungal isolates by molecular analysis. *Indian Journal Microbiology* 50: 280-291.

USDA-APHIS-RPQ-CPHST, www.aphis.usda.gov. 2012. New pest response guidelines. Citrus greening disease. First edition 2008. Emergency and Domestic Programs. pp. 1-9.

Voytas, D. 2000. Agarose gel electrophoresis. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. Edited by Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. Wiley J. and Sons, Hoboken, N.J. pp. 2.5A.1-2.5A.9

Zamharir, M. G., Mardi, M., Alavi, S. M., Hasanzadeh, N., Nekouei, M. K., Zamanizadeh, H. R., Alizadeh, A. y Salekdeh, G. H. 2011. Identification of genes differentially expressed during interaction of Mexican lime tree infected with "*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*". *BMC Microbiology* 11:1

