



Desarrollo a escala de laboratorio de una solución química de unión de ADN a matrices de sílica para purificación directa de bandas de PCR o plásmidos con diferentes aplicaciones docentes, industriales y biomédicas.

Guamán Paredes, Gabriel Alexander

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Dr. Trujillo Toledo, Luis Enrique Ph.D.

18 de octubre del 2020



Document Information

Analyzed document Tesis Guamán documento urkund.docx (D79200517)

Submitted 9/15/2020 9:27:00 PM

Submitted by Trujillo Toledo Luis Enrique

Submitter email letrujillo3@espe.edu.ec

Similarity 0%

Analysis address letrujillo3.espe@analysis.orkund.com

Sources included in the report

SA

Rodolfo_Quintana_analisis_diversidad_genetica_teca.docx

Document Rodolfo_Quintana_analisis_diversidad_genetica_teca.docx (D64224446)



1



LUIS ENRIQUE
TRUJILLO
TOLEDO

Trujillo Toledo, Luis Enrique, Ph.D.
C.C. 1755850276



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, **“Desarrollo a escala de laboratorio de una solución química de unión de ADN a matrices de silica para purificación directa de bandas de PCR o plásmidos con diferentes aplicaciones docentes, industriales y biomédicas.”** fue realizado por el señor **Guamán Paredes, Gabriel Alexander** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 15 de Agosto del 2020

Firma:



Trujillo Toledo, Luis Enrique, Ph.D.
C.C. 1755850276



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Guamán Paredes, Gabriel Alexander**, con cédula de ciudadanía n° 1720661576 declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Desarrollo a escala de laboratorio de una solución química de unión de ADN a matrices de sílica para purificación directa de bandas de PCR o plásmidos con diferentes aplicaciones docentes, industriales y biomédicas."** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 15 de agosto del 2020

Firma:

Guamán Paredes, Gabriel Alexander
C.C. 1720661576



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, Guzmán Paredes, Gabriel Alexander, Con cédula de ciudadanía n° 1720661576, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "Desarrollo a escala de laboratorio de una solución química de unión de ADN a matrices de sílica para purificación directa de bandas de PCR o plásmidos con diferentes aplicaciones docentes, industriales y biomédicas." En el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios es de mi responsabilidad

Sangolquí, 15 de agosto del 2020

Firma:

Guzmán Paredes, Gabriel Alexander
C.C. 1720661576

Dedicatoria

A Dios por permitirme llegar
Hasta estas instancias en
Mi carrera y todas las
Bendiciones otorgadas.
A mis padres Luis y Silvia,
Por ser una verdadera guía
En el camino a seguir
Y siempre brindarme su apoyo
Incondicional, cariño y respeto.

A mi abuelita María Isabel
Por ser mi motor y fuerza

A todos mis amigos,
Que han representado mi apoyo
En todo momento.

A mi novia Verónica por su
Apoyo incondicional

Gabriel Alexander Guamán Paredes

Agradecimientos

A Dios por otorgarme la bendición de la salud y la fe. A mis padres por siempre servirme de guías en que camino de mi vida seguir, por siempre ser pacientes y cariñosos conmigo y por demostrarme día a día que su apoyo es incondicional y su amor el más puro.

A mi abuelita porque en su inmensa sabiduría ha sabido impartir en mi paciencia, tolerancia, respeto y amor.

A mi mentor Dr. Luis E Trujillo, por permitirme ser parte de su grupo de tesis y encaminarme en una rama de la Biotecnología que me interesa mucho que es la industrial. Al Dr. Francisco Flores, por el apoyo que me ha mostrado en todo aspecto referente a la tesis.

A mis profesores, que han servido de pilar fundamental para alcanzar la fase en la que me encuentro ahora, ellos han sido quienes han guiado el camino de aprendizaje a lo largo de la carrera. A Andrea, Isa y Paty laboratoristas de Docencia y a la Dra Patricia Jiménez por facilitarme el acceso en el laboratorio y guiarme enormemente en este proceso.

A Verónica y a mis amigos, Gabriel, Josué, Jenny, Karla, Miguel, Dayanna, Richard, Carlos. Alicia, Omar, Milton y Juan. Algunos amigos desde el colegio y otros de La Universidad y a Perla Negra, gracias por todo su apoyo.

Gabriel Alexander Guamán Paredes

Índice de contenidos

Contenido

Desarrollo a escala de laboratorio de una solución química de unión de ADN a matrices de sílica para purificación directa de bandas de PCR o plásmidos con diferentes aplicaciones docentes, industriales y biomédicas.	1
Hoja de resultados de la herramienta urkund	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de contenidos	8
Índice de tablas	12
Índice de figuras.....	14
Listado de abreviaturas	16
Resumen	17
Palabras clave.....	17
Abstract.....	18
Keywords.....	18
Introducción	19
Formulación del problema	19

Justificación del problema	20
Objetivos de la investigación	21
<i>Objetivo General</i>	21
<i>Objetivos específicos</i>	21
Marco Teórico.....	22
Características físico químicas del ADN	22
<i>ADN in Vivo</i>	22
<i>ADN in Vitro</i>	22
Purificación de ADN	23
Cromatografía en Columna	24
Agentes caotrópicos	24
Matrices de sílica y tampones aminoacídicos.....	25
Concentración y pureza de Ácidos Nucleicos.....	26
Elaboración de Productos Biotecnológicos en Latinoamérica.....	27
Biotecnología en el Ecuador	28
Kits de purificación de Ácidos Nucleicos	29
Hipótesis	30
Materiales y métodos	31
Participantes	31
Zona de estudio	31
Duración de la investigación	31
Metodología.....	32

Obtención de reactivos para la elaboración de soluciones de ligación y lavado	32
Estandarización de uso del kit de purificación elaborado	33
<i>Purificación por centrifugación</i>	33
Análisis de pureza y concentración de muestras de ADN	34
Diagnóstico de presencia o ausencia de virus TMV	34
<i>Disolución de la fracción de gel que contiene la banda</i>	35
<i>Análisis de la muestra</i>	36
Elaboración de 3 kits de purificación completos	36
Comparación entre kit elaborado y kits comerciales (invitrogen, promega) .	37
Secuenciación de muestras purificadas con el kit elaborado	37
Diseño experimental	38
Análisis estadístico	38
Resultados	39
Obtención de reactivos para la elaboración de soluciones de ligación y lavado	39
Estandarización de uso del kit de purificación elaborado	41
<i>Purificación por centrifugación</i>	46
Análisis de pureza	51
Diagnóstico Virus TMV	54
Elaboración de 3 kits de purificación completos	63
Comparación entre kit elaborado y kits comerciales (invitrogen, promega) .	70

Secuenciación de muestras purificadas con el kit elaborado.....	73
Discusión.....	78
 Purificación directa de bandas de PCR y de gel agarosa	78
Conclusiones	83
Recomendaciones	85
Bibliografía	86
Anexos	91

Índice de tablas

Tabla 1 Valores indicativos de pureza en muestras de ADN.	26
Tabla 2 Programa de la PCR directa para diagnóstico TMV en muestra vegetal.....	35
Tabla 3 Purificación de amplicón ITS (R4) utilizando como agente caotrópico Hidrocloruro de guanidina. Los resultados tabulados son el resultado de 3 repeticiones experimentales \pm una desviación estándar.	40
Tabla 4 Purificación de amplicón ITS (R4, 1) utilizando como agente caotrópico tiocianato de guanidina. Los resultados tabulados son el resultado de 3 repeticiones experimentales \pm una desviación estándar	40
Tabla 5. Análisis de concentración y pureza obtenida después de purificar las muestras directamente después de la PCR y de cortar la porción de gel con el amplicón. Los resultados tabulados son el resultado de 3 repeticiones experimentales \pm una desviación estándar	46
Tabla 6 Parámetros de pureza y concentración de cDNA codificante de B-actina eluida en 100 μ l de agua DEPC. Los resultados tabulados son el resultado de 3 repeticiones experimentales \pm una desviación estándar	51
Tabla 7 Parámetros de concentración y pureza de amplicones purificados con el protocolo estandarizado para purificación de segmentos de ADN. Los resultados tabulados son el resultado de 3 repeticiones experimentales \pm una desviación estándar	52
Tabla 8 Datos de concentración y Purificación de la banda de cDNA codificante para B-actina, después de dejar concentrar la muestra por 24h. Los resultados	

tabulados son el resultado de 3 repeticiones experimentales \pm una desviación estándar	54
Tabla 9 Medición de parámetros de concentración y pureza de bandas cortadas a partir del gel de agarosa al 2% y eluidas en agua DEPC	56
Tabla 10 Costo de elaboración para un prototipo de kit de purificación de productos de PCR & gel. Sin tomar en cuenta gastos de cajas e imprenta	69
Tabla 11 Comparación entre la Cuantificación y análisis de relaciones de observancia entre kit elaborado y kit de Invitrogen. Los resultados tabulados son el resultado de 3 repeticiones experimentales \pm una desviación estándar.....	71
Tabla 12 Comparación entre la Cuantificación y análisis de relaciones de observancia entre kit elaborado y kit de Promega. Los resultados tabulados son el resultado de 3 repeticiones experimentales \pm una desviación estándar.....	72
Tabla 13 Parámetros de concentración y relación de absorbancias de productos de PCR purificados. Los resultados tabulados son el resultado de 3 repeticiones experimentales \pm una desviación estándar	73

Índice de figuras

Figura 1 Pasos que se llevan a cabo para realizar la purificación de ácidos nucleicos	30
Figura 2 Corrida electroforética vertical de amplicón a purificarse en gel de agarosa al 1,5%.....	42
Figura 3 Gel de agarosa al 1,5% en el que se observa la presencia de banda o amplicón	43
Figura 4 Purificación de banda de DNA cortada de gel al 1,5% de agarosa y como producto directo de PCR	44
Figura 5 Purificación de bandas de ADN en Gel de agarosa al 1,5%.....	45
Figura 6 Gel de agarosa al 2% con banda de cDNA purificada.....	48
Figura 7 Gel de agarosa al 2% con distintos amplicones purificados	49
Figura 8 Purificación de muestra de cDNA una vez concentrada la elución final	50
Figura 9 Electroforesis de amplicón para virus TMV sin purificar	55
Figura 10 Muestras V1_1 y V1_5 purificadas y corrida electroforética en gel de agarosa al 2%.....	57
Figura 11 Electroferograma TMV-f	58
Figura 12 Electroferograma TMV-r	59
Figura 13 Alineación de secuencias forward y reverse para obtener la secuencia consenso	61
Figura 14 Identificación genómica que se logra después de realizar BLASTn de la muestra a evaluar.....	62
Figura 15 Código QR generado para utilizarlo como mecanismo de comunicación entre el usuario del kit y el productor del mismo	63
Figura 16 Protocolo de uso para usuario del kit de purificación en español.....	65
Figura 17 Etiquetado de soluciones formuladas para uso del investigador.....	67

Figura 18 Prototipo de kit de purificación elaborado.....	68
Figura 19 Secuencia "forward" amplicón EF1	74
Figura 20 Secuencia "reverse" de amplicón EF1	75
Figura 21 Resultado de BLASTn para la identificación genética de amplicón EF1 presente en hongos.....	77

Listado de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albumina de suero bovino
Dalton	unidad de masa atómica unificada
DEPC	Dietilpirocarbonatada y desionizada
g	Gramos
HAP	Hidroxiapatita
M	Molar
MAK	Albumina metilada Kieselguhr
mAmp	Miliamperios
mM	Milimolar
mL	Mililitros
mol	Moles
NA	ácidos nucleicos
OGMs	Organismos genéticamente modificados
Pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de polimerasa)
PM	Peso molecular
rpm	Revoluciones por minuto
μL	microlitros
μM	micromolar
TMV	Tobacco mosaic virus
V	Voltios

Resumen

Ecuador es un país con limitadas opciones para la producción de reactivos biológicos y escasa producción científica en este sentido. La mayoría de productos necesarios para hacer ciencia en los campos de biología molecular y sus diferentes aplicaciones en ramas como la biotecnología industrial, biomédica, etc. La solución a esta problemática es empezar a generar nuestros propios productos biotecnológicos y así evitar aumentar costos y tiempo de investigación o producción. La generación de kits de purificación es un paso básico, ya que muchas investigaciones que se llevan a cabo en el país involucran secuenciar muestras de ADN de distintos tipos ya sean estos bacterianos, víricos, de vegetales o de animales, además de otras varias aplicaciones aguas abajo. Con este antecedente, en esta investigación decidimos formular el primer prototipo relacionado con un kit de purificación de ADN de productos de PCR o de bandas de ADN extraída de geles llevado a cabo en el país con el fin de ser competitivos y tratar de igualarnos con marcas comerciales ya reconocidas como lo son Invitrogen y Promega, y además demostrar que en nuestro territorio se puede elaborar productos de igual o mejor calidad sin tener que gastar tanto dinero. Usamos el principio de cromatografía en columnas y la afinidad que se genera entre una matriz de sílica y una sal caotrópica para purificar ácidos nucleicos de distintos orígenes, obteniendo resultados de concentración y de pureza incluso mejores que al compararlos con estos kits comerciales nombrados previamente.

Palabras clave

- **ADN**
- **PURIFICACIÓN**
- **CONCENTRACIÓN**
- **AGENTE CAOTRÓPICO**

Abstract

Ecuador is a country with limited options for the production of biological reagents and without an important scientific production on these matters. Actually, almost every product that is necessary to develop science in fields as molecular biology and different approaches in fields like industrial biotechnology, Biomedics or more are not generated here, but they are imported which raises not only the costs of production, also limits the research of teachers, investigators and science aficionados. Formulating the first prototype related with a PCR & gel purification kits developed in Ecuador is a basic step. Because, a lot of studies that take place in the country involve the sequencing of DNA samples of different kinds, whether they are of animal, vegetable, bacterial or viral origin, but also other downstream applications. Said all this, in this research we decided to formulate the very first prototype for DNA of PCR & gel purification kit developed in Ecuador, so that we could be competitive with commercial brands as Promega or Invitrogen, and also to show everyone that in our country we can elaborate products as good or even better than them without spending a huge amount of money. We employed the principle of column chromatography and the affinity generated between a silica matrix and a chaotropic salt to purify nucleic acids of distinct origin, obtaining even better results of concentration and purity compared to the commercial kits mentioned before.

Keywords

- **DNA**
- **PURIFICATION**
- **CONCENTRATION**
- **CAOTROPIC AGENT**

Introducción

Formulación del problema

En Ecuador no existe una industria de producción de reactivos biológicos. Actualmente el país solo importa este tipo de reactivos para la realización de investigaciones científicas con un costo elevado y con un tiempo de arribo al país de aproximadamente dos meses o más.

Al no generar estos productos, cada investigación representa un alto costo y pérdida de tiempo para el investigador encargado de llevar a cabo los proyectos. Por otra parte, la docencia también necesita nutrirse de este tipo de reactivos que permita ampliar el conocimiento de los estudiantes de diferentes carreras biológicas, así como a los tesisistas que necesitan aislar y purificar ADN de una forma eficiente y rápida. La investigadora (Eisik, 2018) comenta en su Tesis de investigación, que el generar kits con el apoyo de personal calificado, acompañado de jornadas científicas, permitirá integrar los conocimientos adquiridos en las aulas, además de permitir la divulgación científica. El costo para adquirir este tipo de productos para purificar muestras de ADN o proteínas de una marca internacional cuesta \$136,10 para 50 reacciones en su país de origen, sin tomar en cuenta costos de importación para otro país como el Ecuador.

Por lo mencionado, el objetivo de este trabajo es realizar con éxito una solución y prototipo de kit de purificación, que no solo sea para aplicación docente, sino también en investigación y comercializable, ya que se busca elaborar un producto que pueda

competir a nivel nacional, regional y con miras a su uso mundial comparado con las grandes corporaciones productoras de los mismos.

Justificación del problema

En biología molecular uno de los procesos más comunes y más utilizados, por la importancia que representa el proceso, es el secuenciar material genético de una muestra desconocida o aislar bandas de ADN para procesos de clonaje de genes. Otro caso como en microbiología clínica por ejemplo, la identificación rápida y correcta de agentes patógenos determina un diagnóstico veraz, por lo tanto su tratamiento posterior también será adecuado. (Rodicio, 2016).

Para poder secuenciar material genético, entre los procesos necesarios se tienen la extracción del material genético, seguido de una PCR ya sea convencional o de RT-PCR en su defecto para amplificar el producto y de esta manera tener más muestra disponible y que la misma sea observable por la intervención de luz UV o azul de un transiluminador. Finalmente el proceso clave para tener una muestra de calidad y secuenciable es la purificación de la muestra. Es necesaria e indispensable ya que después de realizar la amplificación del material genético quedan restos de proteínas y contaminantes que interfieren y generan ruido, causando así que la secuencia lograda no sea la esperada por el investigador. (Hengen, 1997)

En el Ecuador, la producción de kits de purificación de ácidos nucleicos es nula, además que la importación de los mismos resulta costosa y toma un tiempo prolongado hasta el arribo de los mismos. Es por esta razón que la producción de kits de purificación de ADN son de imperiosa necesidad con el fin de ahorrar costos, tiempo y sobretodo dejar

de ser importadores de productos que podemos fabricarlos en el país y ser una marca comercial capaz de competir con los gigantes fabricantes de este tipo de productos.

Objetivos de la investigación

Objetivo General

Desarrollar a escala de laboratorio una solución química que permite la unión de ADN a matrices de sílica para purificación directa de bandas de PCR o plásmidos con diferentes aplicaciones docentes, industriales y biomédicas.

Objetivos específicos

- Desarrollar una solución de unión de bandas basada en la técnica de cromatografía de adsorción con el uso de sales caotrópicas.
- Obtener bandas de PCR de diferentes tallas y utilizar purificación directa o extracción de gel de agarosa.
- Comparar la solución de unión desarrollada en nuestro laboratorio con una solución comercial obtenida de la firma Promega, Quiagen o Thermofisher.
- Determinar la calidad de la purificación de bandas o plásmidos por análisis moleculares o secuenciación de ADN y por relación de absorbancia DO260/DO280
- Evaluar la eficiencia de la solución a realizar y comparar.

Marco Teórico

Características físico químicas del ADN

Para poder realizar la extracción y posterior purificación de bandas de ADN es necesario entender las propiedades físicas y químicas del mismo como una macromolécula, en qué lugar de la célula se encuentra y como este se asocia a otras moléculas dentro de una célula. También se debe tomar en cuenta que las características del ADN dependen de su ambiente ya sea *in Vivo* o *in Vitro* (Travagliani, 1974).

ADN in Vivo

En células eucariotas el material genético se encuentra dentro del núcleo de la célula y cuando se lo extrae este es un polímero de doble cadena, sus elementos son subunidades de purina y pirimidina sostenidas por enlaces de hidrógeno, que terminan formando una doble hélice. Por otro lado, las células procariotas, mitocondrias y cloroplastos el DNA generalmente están libres de proteínas, razón por la cual los métodos de lisis y extracción de este material genético son similares. (Petes, 1972)

ADN in Vitro

Las moléculas de ADN pueden medir millones de Dalton como en el bacteriófago T2, que tiene un peso molecular de 130×10^6 g/mol, que en su estado nativo y en condiciones *in Vivo* se encuentra doblado y compactado, en soluciones, puede ser flexible y fácilmente degradable por fuerzas de esquilación o corte (Petes, 1972). Por esta razón se debe tener particular cuidado con la manipulación del material a obtener. Incluso

una falla de pipeteo podría causar la ruptura de la muestra por la mitad, causando errores en lo que al PM de la molécula se trata. (Travagliani, 1974)

Purificación de ADN

Desde el poder estudiar la variación genética entre individuos y más, es necesario, obtener marcadores moleculares que puedan no solo explicar patrones, sino también procesos ecológicos - evolutivos. Un marcador molecular es un determinado segmento de ADN, mismo que entrega información sobre algún tipo de variación genética o alélica (Schlötterer, 2004). Ciertas técnicas como la PCR y la secuenciación de ADN son aquellas que permiten la obtención de estos marcadores (Velázquez, 2010).

Una hidrólisis enzimática no basta para liberar ciertas macromoléculas del ADN de interés de estudio, incluso precipitar la muestra con alcohol no resulta suficiente, por esto se ocupa otros métodos de fraccionamiento como la cromatografía en columna, centrifugación con equilibrio de gradiente densitométrico y la sedimentación por centrifugación. (McBurney, 1972).

La ligación de ADN a soluciones de anclaje en la presencia de agentes caotrópicos como NaI o NaClO_4 a matrices de sílica o a partículas de vidrio es bien conocido y aplicado, pero no han tenido un buen resultado en lo que a suero u orina se refiere. Actualmente se utilizan como agentes caotrópicos tiocianato de guanidina e Hidrocloruro de guanidina por su poder de lisado celular (Boom, 1990)

Para la obtención del ADN es necesario romper la membrana celular y acceder al núcleo de la misma, además, se requiere tener una buena cantidad del material y con el mínimo nivel degradación, caso contrario la polimerasa no logrará llevar a cabo su reacción y de esta manera lograr la amplificación de genes o segmentos de estos de interés de estudio (Margarit, 2006). Lo que se busca con esta técnica es una amplificación

enzimática de un fragmento de NA, el cual se puede usar como molde y a partir de este identificar posibles modificaciones realizadas al ADN nativo. (Núñez, 2016)

Un método comúnmente usado es el uso del detergente bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) que forma micelas con los lípidos de la membrana celular y causa la liberación de las macromoléculas intracelulares (Núñez, 2016).

Cromatografía en Columna

Hasta los años 80 se utilizaban materiales adsorbentes para fraccionar el ADN como lo eran la albumina metilada Kieselguhr (MAK), y la hidroxiapatita (HAP). La columna de MAK se puede usar para fraccionar tanto ADN como ARN por tamaño molecular usando un gradiente continuo de sales para eluir los ácidos nucleicos, a los que nos referiremos como (NA). Estos se adsorben en una columna con NaCl a una concentración no mayor a 0.4 M y se eluen a concentraciones mayores (Travagliani, 1974).

Las columnas de HAP se usan para purificar ADN al aplicar el material genético en la columna y luego eluyendolo en un gradiente de tampón fosfato. El peso molecular del ADN no afecta considerablemente la elución. (Travagliani, 1974).

Agentes caotrópicos

La principal función de los agentes o sales caotrópicos es desnaturalizar las proteínas celulares al romper los puentes de hidrógeno, de esta manera aumentan la solubilidad de sustancias no polares en el agua, degradando la estructura secundaria de polímeros complejos como el ADN, ARN y proteínas. Además, las sales facilitan la unión

de NA a la columna de purificación, no hace falta precipitar el material y estos se suspenden en volúmenes pequeños de un medio líquido pudiendo ser incluso agua ultrapura o agua DEPC (Quiala, 2008)

Una manera de penetrar hasta el interior de la célula y captar los NA es el uso de agentes caotrópicos como la urea o el Guanidio, detergentes como Tween 20 o dodecil sulfato y agentes enzimáticos como la proteinasa K (Jasbeer, 2009)

Cada agente caotrópico tiene distinto uso y potencialidad, por ejemplo la urea se emplea como desnaturalizante de baja absorbancia para la obtención de proteínas de interés. Otro ejemplo es el Hidrocloruro de guanidio que cumple la misma función que la urea, además de ser utilizado para purificación de segmentos de ADN de proveniencia animal (Thermofischer, 2020).

Matrices de sílica y tampones aminoacídicos

Las sales caotrópicas representan un papel fundamental para poder purificar ADN, inhiben la amplificación del material genético que se da gracias a la polimerasa, en un tampón de elución. Los tampones de aminoácidos pueden modular la interacción entre el ADN y las matrices de sílica (Vandeventer, 2013).

La adsorción de ADN a las matrices de sílica gracias a la actividad de sales caotrópicas se considera que tiene un comportamiento entrópico dirigido por efectos hidrofóbicos, debido a que se utilizan estos agentes en altas concentraciones molares para formular la solución de anclaje. Estos deshidratan al ADN y a las superficies de sílica (Melzak, Sherwood, & al., 1996)

El soporte de sílica que se utiliza para la purificación de NA puede ser utilizado de dos maneras, en forma de un filtro de membrana, o como partículas magnéticas recubiertas con el material (Berensmier, 2006).

Para que se dé una correcta adsorción del material genético a la matriz de sílica se requieren soluciones tamponadas con altas concentraciones de sales caotrópicas como el tiocianato de guanidio, además de alcohol u otros solventes orgánicos. Después de realizar los lavados para remover impurezas (Vandeventer P. , 2012).

El ADN se eluye de la superficie usando un tampón con pH elevado y de fuerza iónica baja. Un problema común se da cuando las sales caotrópicas y etanol remanentes se acarrean hasta la reacción de amplificación y se encargan de inhibir la reacción de la polimerasa (Hourfar, 2005)

Investigaciones recientes han demostrado que los NA podrían unirse a la sílica independientemente del uso de sales caotrópicas, en condiciones de acides y usando sales kosmotropicas. EL ADN también se puede unir a la arena que tiene un comportamiento similar a la sílica (Lorenz, 1987)

Concentración y pureza de Ácidos Nucleicos

La concentración y pureza de una muestra de ADN se puede determinar a partir de la capacidad de absorbancia de luz que tiene la macromolécula a una determinada longitud de onda. Así, la concentración de ADN en la muestra se calcula con el valor obtenido a una longitud de onda de 260nm. La relación de absorbancias A260/280 y A260/230 sirven para determinar la pureza de la muestra (bancoadn, 2016)

Tabla 1

Valores indicativos de pureza en muestras de ADN.

Radio	valor	Pureza
A260/280	1.8-2	ADN de pureza óptima
	1.6-1.8	ADN de pureza aceptable
	<1.6	Presencia de compuestos aromáticos
	>2.1	contaminación con ARN
A260/230	<1.5	contaminación con sales, carbohidratos, fenoles

Nota. Recuperado de bancoadn.org

Elaboración de Productos Biotecnológicos en Latinoamérica

La biotecnología y su desarrollo es un hecho real en muchos campos, no necesariamente tecno científicos, si no también sociales, culturales y morales. La biotecnología del ADN recombinante permite introducir secuencias génicas foráneas en el interior de un organismo con el fin de generar una característica al interior de otro organismo (Arqué, 2003).

Latinoamérica se caracterizaba por el hecho que se la podía clasificar en tres sectores de acuerdo al desarrollo biotecnológico y de investigación hasta el año 2003, de esta manera:

- Países que no tienen centros formadores de investigadores en áreas biotecnológicas como El Salvador, Nicaragua, Honduras, Guyanas y Bolivia
- Otros con centros de formación, pero con recursos limitados como en el caso de Perú, Ecuador, Guatemala, Panamá y Venezuela
- Finalmente países con los recursos y la capacidad de formación de investigadores como Brasil, Argentina, Chile, Colombia, México y Costa Rica (Arqué, 2003)

La biotecnología se funda en el uso de la biodiversidad genética con el fin de lograr descubrimientos científicos para luego explotarlos y desarrollar sociedades enteras. Por supuesto, es un arma de doble filo, ya que también puede suceder como se ha visto el caso de monopolizar la comercialización de ciertos productos como el consumo de maíz en los Estados Unidos (RAFI, 2001).

Uno de los países Latinoamericanos mejor posicionados a nivel mundial es Costa Rica solamente detrás de Chile en el tema de investigación científica. Con el fin de dejar de

utilizar combustibles fósiles han recurrido a la biotecnología para desarrollar energías renovables. Además, cuentan con investigaciones direccionadas a tratar el cáncer de páncreas, hígado y ovario, hemoderivados o medicamentos con origen de la sangre humana, alimentos a base de insectos e incluso dientes creados a partir de huesos de vacas y otros materiales. A diferencia de Ecuador, en Costa Rica se tiene un banco de sueros antiofídicos para sobrevivir a la mordedura de serpientes, es necesaria la comparación ya que al ser países con climas tropicales en ciertos sectores la cantidad de reptiles venenosos es extensa y este tipo de recursos deben ser de uso masificado en estos sectores. (Barría, 2020).

Biotecnología en el Ecuador

En el año 2015 en el mandato de Rafael Correa Delgado se promovió una nueva ley de bioseguridad y manejo y control de OGMs en el país. En este nuevo escrito se pretendía transformar la matriz productiva del país y enfocarla a este tipo de “nuevas ciencias”, sin embargo dejaba varios vacíos legales, entre ellos el no uso de plantas y de semillas transgénicas ni la producción, ni la exportación de estos insumos. Sin embargo, la importación de semillas de este tipo si eran permitidas y aun en el año 2020 no se rectificó este escrito (ENGOV, 2015).

Ecuador ha enfocado sus recursos biotecnológicos en la agricultura con el fin de eliminar plagas en cultivos, los insectos han incrementado su resistencia a insecticidas y plaguicidas, por lo que su manejo se ve dificultado. Al implementar la biotecnología en este ámbito, no solo se emplearía al control de plagas si no, también a la recuperación de suelos en situación de monocultivo, incremento de rendimiento agrícola y otras (Farinango, 2018).

En el país, se derivan recursos para la investigación en biotecnología, sin embargo, no se puede apreciar una industria de elaboración de recursos y productos biotecnológicos. Entre los escasos productos generados en el país nos encontramos con la producción de carne de origen vegetal, que asemeje su olor y sabor, con el fin de combatir la contaminación y propiciar mayor consumo de esta a nivel mundial (Comercio, 2019)

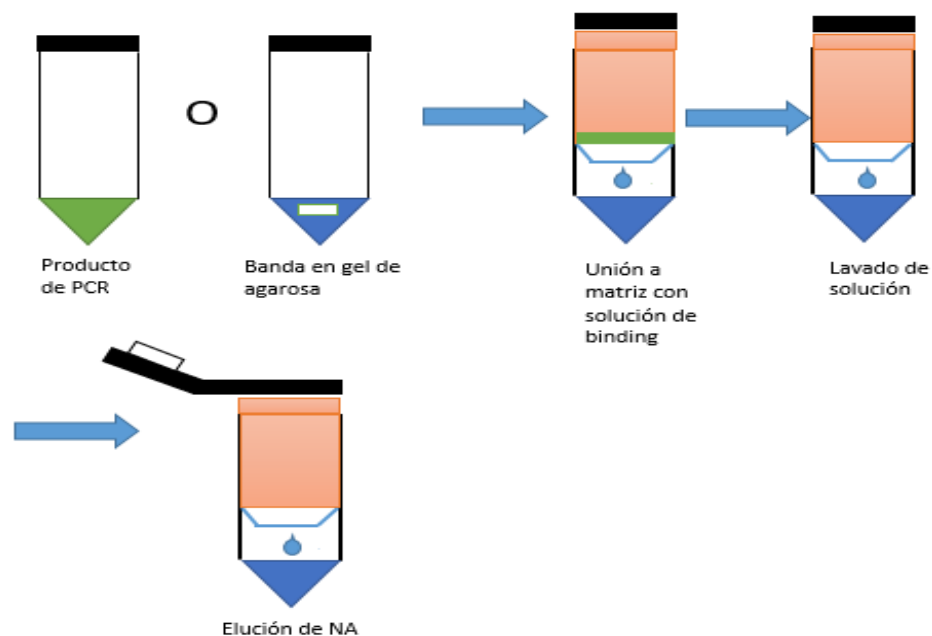
Otro aporte que entrega el país al desarrollo de la biotecnología es la producción de anticuerpos monoclonales, investigación dirigida por médicos del IESS (Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social). Esta investigación va enfocada a dar un tratamiento a la cisticercosis, problema de salud pública del país. Otro producto es la vacuna para el control de leishmaniasis, que es una parasitosis cutánea. Finalmente los ya mencionados productos enfocados a la agricultura como la micro propagación, conservación del germoplasma, mejoramiento genético y fitopatología (SENESCYT, 2015)

Kits de purificación de Ácidos Nucleicos

Los kits de purificación de NA son de gran importancia, ya que se ha demostrado que la sensibilidad de detección de la PCR y posterior secuenciación depende del tipo de kit usado. Por esta razón las marcas comerciales elaboran distintos tipos de kits de acuerdo al uso que se le vaya a dar y al material genético que se quiera obtener, desde NA de microbios, células y tejidos de mamíferos, plantas e incluso para NA obtenidos de gel de agarosa (Dhaliwal, 2013).

Figura 1

Pasos que se llevan a cabo para realizar la purificación de ácidos nucleicos



Nota. Esta imagen representa los pasos que se llevan a cabo para llevar a cabo la purificación de ácidos nucleicos utilizando un agente caotrópico de unión y una matriz de sílica para que se realice el proceso de adsorción.

Hipótesis

La realización de una solución adecuada de unión o binding a matrices de sílice permitirá un mayor índice de purificación de banda de ADN.

Materiales y métodos

Participantes

La presente investigación ha sido elaborada por Gabriel Guamán Paredes egresado de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, bajo la tutoría del Dr. Luis E Trujillo. Docente. El financiamiento de la investigación estuvo a cargo del Laboratorio multidisciplinario de la Universidad De Las Fuerzas Armadas ESPE y del investigador.

Zona de estudio

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio Multidisciplinario de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE campus ubicado en Sangolquí, en el cantón Rumiñahui, de la Provincia de Pichincha en la Av. General Rumiñahui S/N y calle Ambato, sector Santa Clara, Latitud: 0°18'53"S, Longitud: 78°26'36"O.

Duración de la investigación

El tiempo de duración de esta investigación fue de 10 meses aproximadamente. Se inició en el mes de Octubre de 2019 y se culminó en Agosto del 2020.

Metodología

El presente estudio se realizó en cinco fases: La primera fase consistió en la obtención de los reactivos para la elaboración de las soluciones de ligación y lavado, además de una solución de elución, los cuales se obtuvieron de los laboratorios multidisciplinarios y de microbiología de la Universidad de Las Fuerzas Armadas ESPE, y otros por cuenta propia. Para la segunda fase se estandarizó un protocolo de uso del nuevo kit de purificación elaborado al probarlo con distinto material genético de peso molecular bajo y en la tercera fase se analizó la pureza y concentración de las muestras de ADN obtenidas después de la purificación de las bandas o productos de PCR utilizados. También como parte del proyecto se planteó el análisis de una muestra vegetal para analizar la presencia o no del virus del mosaico del tabaco. Finalmente se realizó la producción de 3 kits de purificación completos como una muestra para ser donados y utilizados en los laboratorios de la Universidad.

Obtención de reactivos para la elaboración de soluciones de ligación y lavado

Los reactivos necesarios para la elaboración de estas soluciones se obtuvieron gracias a los laboratorios multidisciplinarios y de microbiología de la Universidad De Las Fuerzas Armadas ESPE, mientras otros reactivos fueron obtenidos de manera particular.

Para preparar la solución de ligación o unión se probaron dos sales: Hidrocloruro de guanidina y tiocianato de guanidina a una concentración de 4.5 M y acetato de potasio a 4.5 M (pH 5) y se compararon los parámetros de pureza, concentración y cantidad de ADN no ligado de ambas en un amplicón de la misma especie.

Para preparar la solución de lavado es necesario obtener una solución de acetato de potasio 10 mM (pH 5), etanol al 100 o 96% y EDTA 16.7 μ M.

La solución de elución de uso para suspender la muestra puede ser tanto agua ultra pura como agua DEPC.

Estandarización de uso del kit de purificación elaborado

El primer paso, si se tiene una fracción de gel que contenga la banda, es disolver la porción de gel para que el material genético a purificar esté libre y pueda ser posteriormente secuenciado. Para esto es necesario colocar el gel en un tubo de colección vacío y estéril al cual se le agrega 500 µl de solución de anclaje o binding y se lo deja incubar por un minuto a temperatura ambiente. Posteriormente se lo lleva a un termo bloque o a baño maría a 65° C por alrededor de diez minutos o hasta que se disuelva la fracción del gel.

Los pasos restantes de la purificación de NA puede ser utilizado de dos maneras, una es purificar la muestra por centrifugación o por purificación utilizando vacío. Nosotros nos enfocamos en realizar la purificación por centrifugado debido a la disponibilidad de materiales.

Purificación por centrifugación

Se utiliza una columna por cada fragmento de DNA a purificar, primero se activa la columna por un minuto utilizando el buffer de activación de las mismas. También se incuba por un minuto la muestra con la solución de anclaje y se lo centrifuga a 10000 rpm por un minuto y se descarta el líquido que queda en el tubo colector. Posteriormente, se lava la columna con 700 ul de la solución de lavado de membrana previamente diluida en etanol al 95%. Se vuelve a centrifugar a 10000 rpm por un minuto. Se replica el paso anterior pero esta vez se realiza el lavado con 500 µl de la solución de lavado de membrana y se deja centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos. Finalmente se recoge el contenido final de la columna y se la vuelve a centrifugar sin tapa por 1 minuto para

evaporar cualquier residuo sobrante de etanol. Para mantener la muestra, se la transfiere a un tubo colector nuevo de 1,5 ml o 2 ml y se coloca 40 μ l de solución de elución directamente al centro de la columna sin tocar la membrana con la punta de la pipeta, se deja incubar por 1 minuto y se la centrifuga 1 minuto a 10000 rpm. Se descarta la columna y se mantiene el tubo de microcentrifugación a temperatura ambiente y a 4°C si se debe ocupar la muestra hasta 20 días después de la purificación.

Análisis de pureza y concentración de muestras de ADN

Para analizar la concentración y la pureza de la muestra se realizó la lectura de la absorbancia a las longitudes de onda 230, 260 y 280 y se realizan las relaciones 260/230 y 260/280 respectivamente. Para medir tanto la relación de absorbancia como la concentración final de la muestra después de eluir la misma en el buffer de elución se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop *Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer* de ThermoFisher y se valoraron los datos según lo expuesto en la Tabla 1. Finalmente se realizó una corrida electroforética de las muestras purificadas en un gel de agarosa al 2% por 45 minutos a 90v 300mAmp.

Diagnóstico de presencia o ausencia de virus TMV

Para esta fase del proyecto se utilizó una muestra de ARN supuestamente viral proveniente de una planta obtenida del laboratorio IDgen, ubicado en la ciudad de Quito en las calles Eloy Alfaro y Granados, con el fin de determinar la presencia o ausencia del virus TMV. Para confirmar la presencia del patógeno se realizó una PCR con el programa mencionado en la Tabla2. Las concentraciones de los reactivos utilizados en la PCR directa se muestran el Anexo1. Después se realizó una corrida electroforética vertical en un Sistema de electroforeses *OwlTM EasyCastTM B1 de ThermoFisher* del resultado en un gel de agarosa al 2% por 45 minutos a 90v 300 mAmp. Posteriormente, al obtener

varias bandas, se procedió a cortar una fracción del gel que contenía la banda de interés y realizar su purificación.

Tabla 2

Programa de la PCR directa para diagnóstico TMV en muestra vegetal

Desnaturalización inicial	92 °C	2 min
Desnaturalización	92 °C	30 s
Anealing	62 °C	30 s
Anealing	56° C	30 s
Extensión	72 °C	1 min
Extensión final	72 °C	10 min
Enfriamiento	10°C	10 min
volumen	25 µl	

Disolución de la fracción de gel que contiene la banda

Una vez que se cargó la muestra y se corrió el gel, se obtuvieron varias bandas, por lo que fue necesario cortar la banda de interés (420 pb). Para esto se extrae la banda de ADN en un tubo de colección de 1,5 ml limpio y estéril. Se utilizó una lanceta estéril y bajo la luz de un transiluminador de luz azul *E-Gel™ Imager Blue Light Base* de *ThermoFisher* se cortó la fracción de interés. Posteriormente se coloca la solución de anclaje o binding a la muestra cómo se mencionó en el punto **2.4.2.1**.

Análisis de la muestra

Con la banda de interés ya cortada, se la purificó con el kit elaborado y se volvió a correr un gel de agarosa al 2% para observar que la misma se encuentre presente en la muestra y sin impurezas de por medio. Se la observó en un *E-Gel™ Imager Camera Hood Kit de ThermoFisher bajo luz uv*.

Posteriormente se analizó la secuencia obtenida con el software MEGA X, obteniendo así un electroferograma de los nucleótidos presentes en la lectura. A continuación se editaron los dos electroferogramas resultantes (forward y reverse) para obtener una secuencia limpia. Después, se realizó un reverso complemento a la secuencia reverse y se alinearon la secuencia forward con la secuencia reverso complemento con el fin de obtener una secuencia consenso con ayuda del software *Geneious*. Finalmente se realizó una alineación de nucleótidos en el programa BLAST a la secuencia consenso, disponible en la plataforma de libre acceso del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para de esta manera determinar el organismo que responde a la secuencia lograda.

Elaboración de 3 kits de purificación completos

Se elaboraron 3 kits para un total de 20 reacciones cada uno, se necesitaron 14 ml de solución de binding y 25 ml de solución de lavado por cada kit. Para llevar a cabo cada kit se utilizaron 417,5 µl de EDTA, lo que equivale a 1252,5 µl para los 3 productos, además de 85 µl (255 µl) de acetato de potasio para elaborar la solución de lavado. A esta solución se le debe agregar 20 ml de etanol al 96% y 4,5 ml de agua des ionizada. La solución de binding tiene 14 ml de solución por frasco y la solución de elución cuenta con 100 ml de sustancia. Cada kit incluye su set de columnas con tubos de colección y el buffer de activación de las mismas respectivamente.

Comparación entre kit elaborado y kits comerciales (invitrogen, promega)

Se realizó una comparación entre el kit elaborado en los laboratorios multidisciplinarios de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y dos kits de purificación de fragmentos de ADN de marcas comerciales como lo son: Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de la casa comercial Promega y Purelink PCR Purification kit de la casa comercial Invitrogen.

Se siguieron los protocolos establecidos por los fabricantes al pie de la letra y se comparó el mismo amplicón obtenido al purificarlo con los tres kits. Posteriormente se evaluó la concentración y pureza de estas bandas en el Espectrofotómetro Nanodrop *Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer* de ThermoFisher y se compararon los resultados entre los tres protocolos.

No se alcanzó a correr el gel de agarosa para visualizar la diferencia en la intensidad de banda entre el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de promega y nuestro kit por cierre total de laboratorios a causa de la Pandemia de Covid-19 que imposibilitó continuar con los experimentos.

Secuenciación de muestras purificadas con el kit elaborado

Como parte final del proyecto de titulación decidimos secuenciar unas muestras purificadas de amplicones donados por el laboratorio IDgen de distintas materias primas, como lo son: la secuencia de intrón del gen EF1 α presente en hongos, la región rpoB que codifica la subunidad β de la polimerasa de ARN bacteriano o que también se puede encontrar en los cloroplastos de las plantas donde forma la subunidad beta del plastido codificado de polimerasa de ARN O (PEP) según sus siglas en inglés. También el gen 16s presente en bacterias y el gen ITS presente en hongos. Se realizaron estas

secuenciaciones con el fin de analizar la calidad de secuencias y presencia de picos en un electroferograma con los nucleótidos presentes en la muestra enviada.

Posteriormente se realizó el mismo protocolo enlistado en el numeral **2.4.4.2** y se analizó la fidelidad de la muestra al comparar la secuencia consenso obtenida con el banco genómico de GenBank en la plataforma libre del NCBI.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con distintos tratamientos. Se evaluaron una variable independiente y algunas variables dependientes como la concentración y pureza final por cada muestra evaluada.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los ensayos se analizaron en el software R studio para observar la pureza y concentración obtenidas después de purificar la muestra de ADN. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) entre las medias obtenidas según el agente caotrópico usado y al comparar ambas variables con los valores obtenidos al hacer la comparación con kits de purificación comerciales con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha=0.05$)

Resultados

Obtención de reactivos para la elaboración de soluciones de ligación y lavado

Los reactivos, específicamente las sales necesarias para llevar a cabo la investigación fueron obtenidas del laboratorio IDgen y adquiridas por el investigador. Se evaluaron dos sales caotrópicas midiendo la concentración de un amplicón recuperado, además de su pureza. Hidrocloruro de guanidina mostró tener menor adsorción de la muestra a la matriz de sílica en comparación con la sal tiocianato de guanidina.

La sal tiocianato de guanidina arrojó mejores resultados en cuanto a la relación de absorbancia 260/280, la misma que es indicativa de la pureza final de la muestra. Estos datos fueron recopilados en las tablas 3 y 4. Al utilizar el Hidrocloruro de guanidina, se observa como el agente no ancla de manera óptima la muestra de ADN a la matriz de sílica, por lo que en la solución de unión o "binding" se encuentra una concentración del 67% del amplicón en esta sustancia y no en la elución final.

Por otro lado, al utilizar el tiocianato de guanidina se observa como varían los parámetros de medida con respecto al cloruro de guanidina, donde a pesar de la poca concentración de amplicón de partida, se obtiene una mayor recuperación y además se puede apreciar que la cantidad no ligada de ADN no se pierde en la misma solución, si no en el proceso mismo de la purificación como tal.

Las concentraciones de partida varían debido a que si bien son el mismo amplicón, también son de distintas reacciones de PCRs.

Tabla 3

Purificación de amplicón ITS (R4) utilizando como agente caotrópico Hidrocloruro de guanidina. Los resultados tabulados son el resultado de 3 repeticiones experimentales \pm una desviación estándar.

N° MEDICIÓN	MUESTRA	CONCENTRACIÓN [UG/ML]	RADIO 260/230	RADIO 260/280
1	Blanco	--	--	--
2	Control	39,1	1,63	1,98
3	Muestra final	8,14	1,38	1,77
4	Binding solution	26,2	0,237	1,75

Tabla 4

Purificación de amplicón ITS (R4, 1) utilizando como agente caotrópico tiocianato de guanidina. Los resultados tabulados son el resultado de 3 repeticiones experimentales \pm una desviación estándar

N° MEDICIÓN	MUESTRA	CONCENTRACIÓN [UG/ML]	RADIO 260/230	RADIO 260/280
1	Blanco	--	--	--
2	control	8,24	2,18	2,06
3	Muestra final	4,80	1,18	2,37
4	Binding solution	1,02	0,045	3,1

Una vez alcanzado este punto demostramos la afirmación de la hipótesis planteada, el índice de pureza de la muestra basada tanto en la recolección lograda como los valores de relación de absorbancia 260 y 280 indican que una solución de anclaje óptima permite una mejor purificación de los NA.

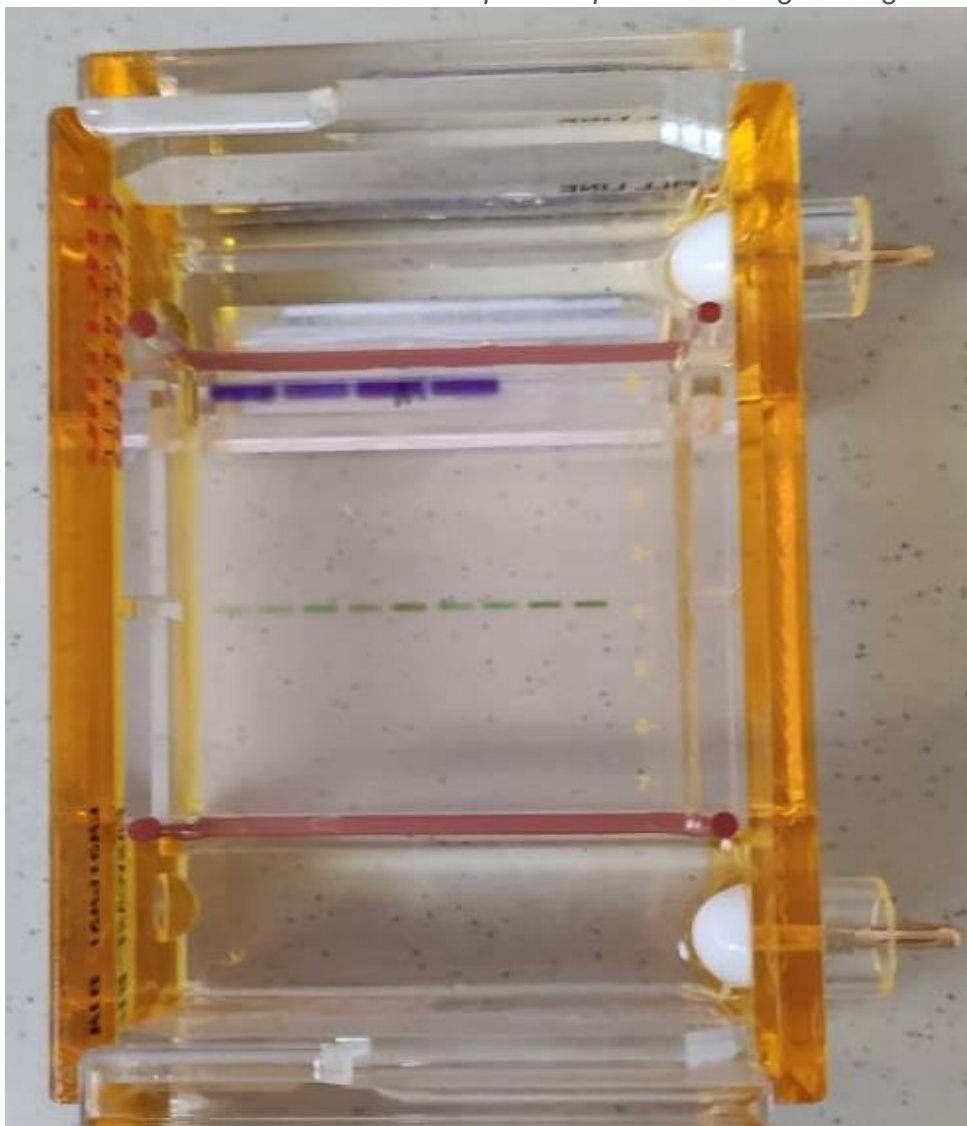
Estandarización de uso del kit de purificación elaborado

Se evaluó la eficacia del kit, purificando un mismo amplicón tanto al obtenerlo como producto directo de una PCR como al cortar la porción de gel que contiene la banda de interés y luego se purificó ambas muestras. Para la muestra obtenida directamente de la reacción de PCR se la corrió directamente en un gel de agarosa al 1,5% obteniendo así la banda de interés como se puede observar en la figura 3. Sin embargo, se puede observar en el gel que esta banda presenta suciedad, es decir no solo aparecen ácidos nucleicos como buscamos, si no otros componentes de bajo peso molecular que interfieren en el análisis de la muestra, y que pueden presentar un problema al intentar secuenciarla arrojando resultados alterados por estos componentes moleculares indeseados. En las figura 4 se muestran los pasos realizados una vez cortada la sección de banda a purificar con el kit formulado y después de disolver la fracción de gel para poder continuar con el protocolo de purificación enlistado en el numeral 2.4.2.1. En los resultados que aparecen en la figura 6.

Se puede observar como la banda tanto al purificarla por centrifugación la muestra directamente después de salir del termociclador, como al cortar la misma del gel de agarosa son claramente visibles bajo la luz ya sea UV o azul de un transiluminador. Se observa una diferencia de intensidad de banda al realizar la purificación directa, que es más intensa en comparación a la banda cortada y purificada a partir del gel.

Figura 2

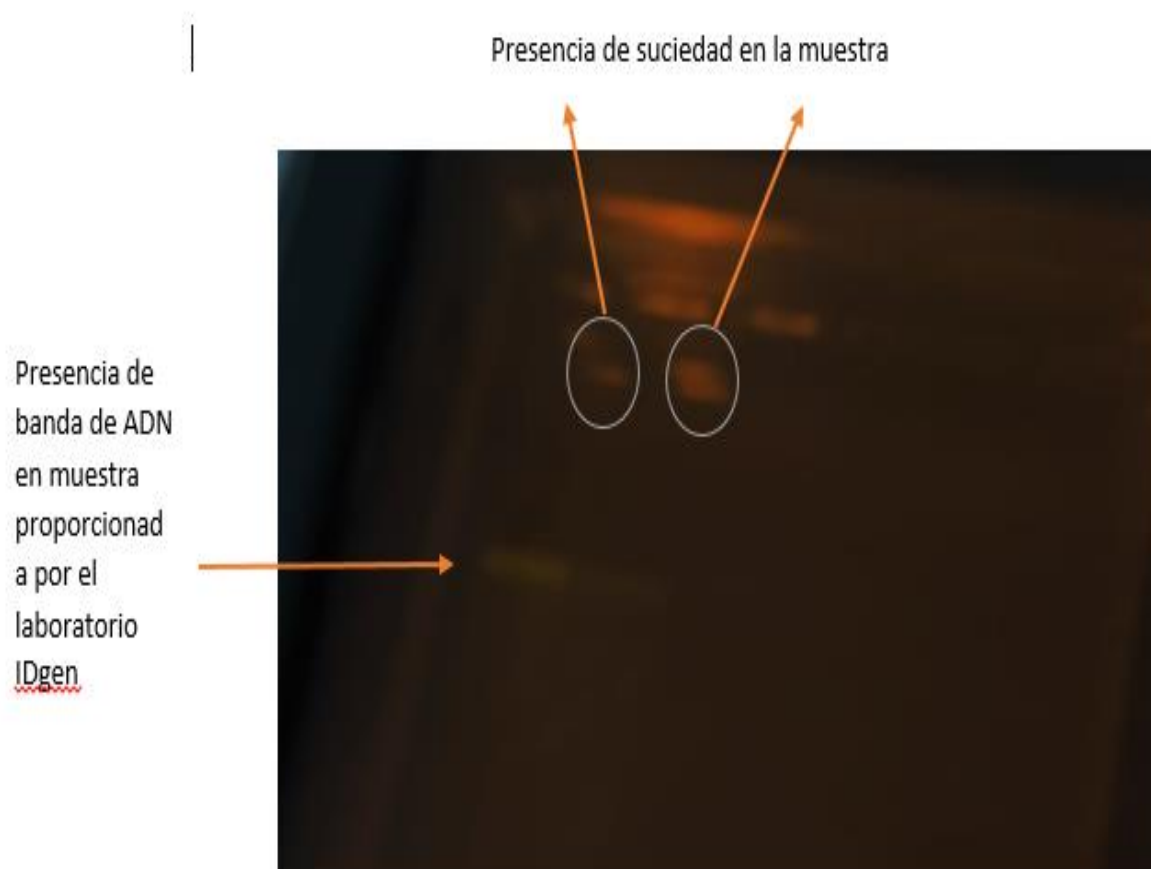
Corrida electroforética vertical de amplicón a purificarse en gel de agarosa



Nota: No se corre el gel con un marcador de peso molecular, ya que no necesitamos determinar el peso molecular de la muestra, si no la presencia de la banda en la muestra otorgada por el laboratorio IDgen. Los pocillo que se observan en la segunda fila del gel fueron ocupados con amplicones de distintas muestras tanto vegetales, animales y bacterianas para observar la concentración de las mismas y posteriormente purificarlos para los siguientes ensayos a realizarse.

Figura 3

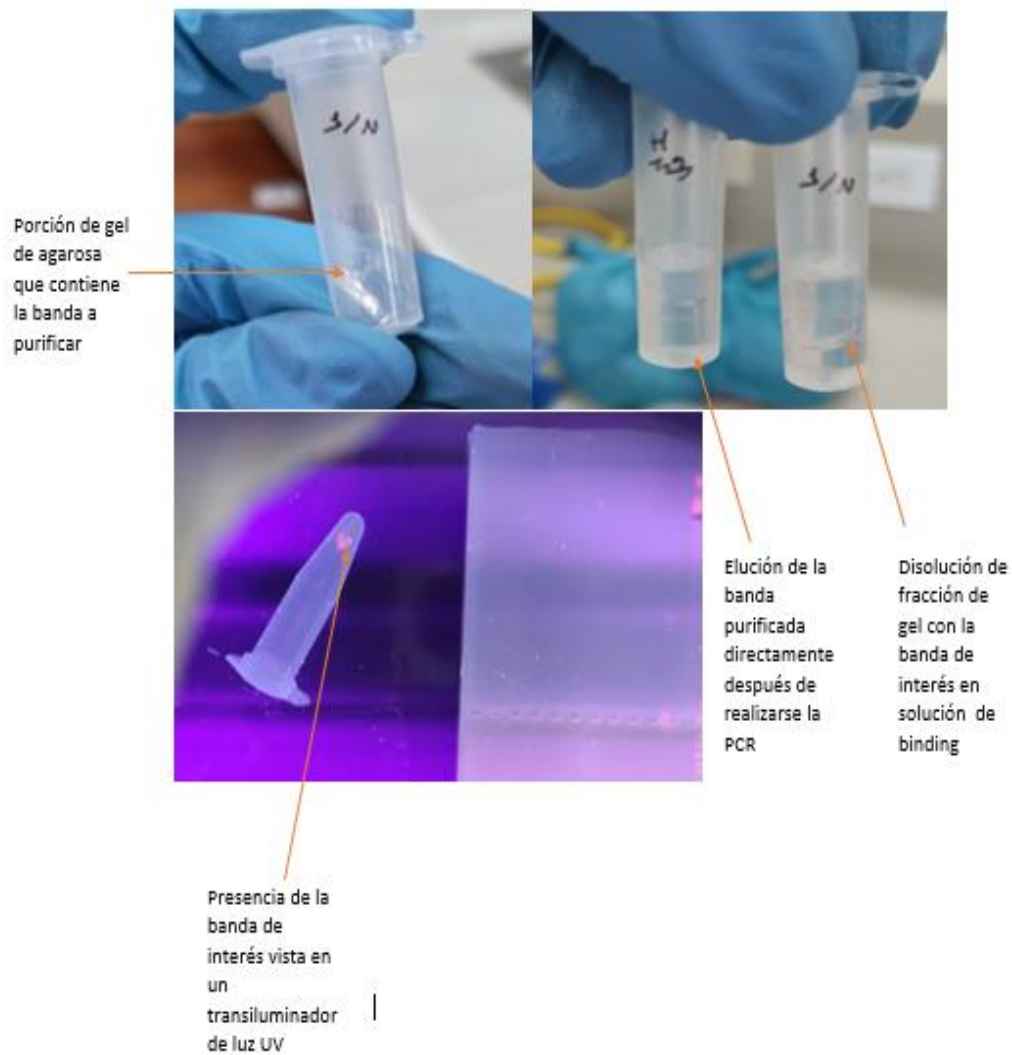
Gel de agarosa al 1,5% en el que se observa la presencia de banda o amplicón



Nota: La imagen muestra la presencia de las bandas, corridas por duplicado, sin embargo, se observa suciedad indeseada en la muestra por lo que procedemos a purificarla con el kit elaborado.

Figura 4

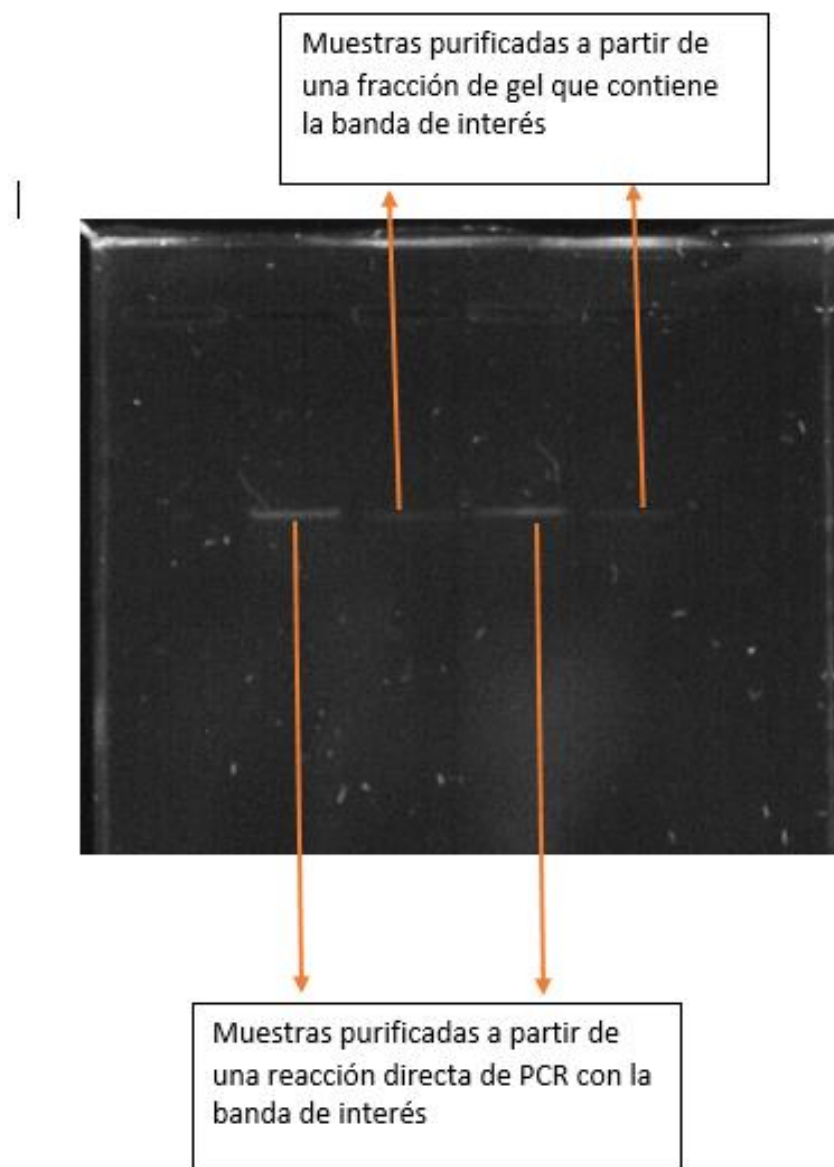
Purificación de banda de DNA cortada de gel al 1,5% de agarosa y como producto



Nota: En la imagen se observan los dos procesos de purificación que se llevan a cabo tanto al disolver la banda de interés de un gel de agarosa, como al obtener la banda directamente después de realizarse la PCR del material genético

Figura 5

Purificación de bandas de ADN en Gel de agarosa al 1,5%



Nota: En la imagen se observa cómo se visualizan algo más tenues las bandas purificadas a partir de una fracción de gel de agarosa en comparación con las bandas de ADN purificadas directamente después de realizar la PCR para obtener la banda de interés. Las eluciones finales se hicieron en 100 μ l de agua DEPC.

Tabla 5.

Análisis de concentración y pureza obtenida después de purificar las muestras directamente después de la PCR y de cortar la porción de gel con el amplicón. Los resultados tabulados son el resultado de 3 repeticiones experimentales \pm una desviación estándar

N° MEDICIÓN	MUESTRA	CONCENTRACIÓN [UG/ML]	RADIO 260/230	RADIO 260/280
1	Blanco	--	--	--
2	Banda PCR	4,31	0,583	1,69
3	Banda gel	3,24	1,56	1,65
4	Banda PCR	4,71	0,60	2,05
5	Banda gel	4,22	1,59	1,65

Purificación por centrifugación

Se probó el prototipo de kit ya estandarizado con amplicones de distintos orígenes, bacteriano, animal o vegetal. Primero se purificó una muestra de cDNA codificante para β -actina, amplicón donado por el laboratorio de Inmunología de la Universidad de Las Fuerzas Armadas ESPE. En la Figura 6 se observa la presencia de una sola banda de 140 pb aproximadamente, confirmando la presencia tanto del amplicón sin purificar como purificado, aunque más tenue debido a la elución llevada a cabo.

Tomando en cuenta que en la purificación mencionada previamente aún se puede observar que las bandas se ven claramente más atenuadas una vez purificadas con respecto a la muestra control se procedió a realizar la elución final en 45 μ l de agua DEPC, con el fin de poder visualizar de mejor manera los amplicones generados después de ser purificados, además de formular un posible marcador con otros amplicones de distintas tallas. Los amplicones utilizados fueron nombrados de la siguiente manera: C1201 que corresponde al gen 23s presente en comunidades bacterianas que tiene un tamaño de 960 pb aproximadamente, el gen reportero GFP de 800 pb. El gen GUS de

E.coli, codificante para la β -glucuronidasa, con tamaño de 1500 pb y finalmente el gen ITS presente en hongos cuya talla no supera las 500 pb. Con respecto a la muestra de β -actina, con la diferencia que esta vez se la dejó concentrar destapando el tubo con la elución y dejándola en un lugar fresco y seco por veinte y cuatro horas, y se midió su concentración nuevamente después de realizado este proceso obteniendo los resultados que se observan en la Figura 7.

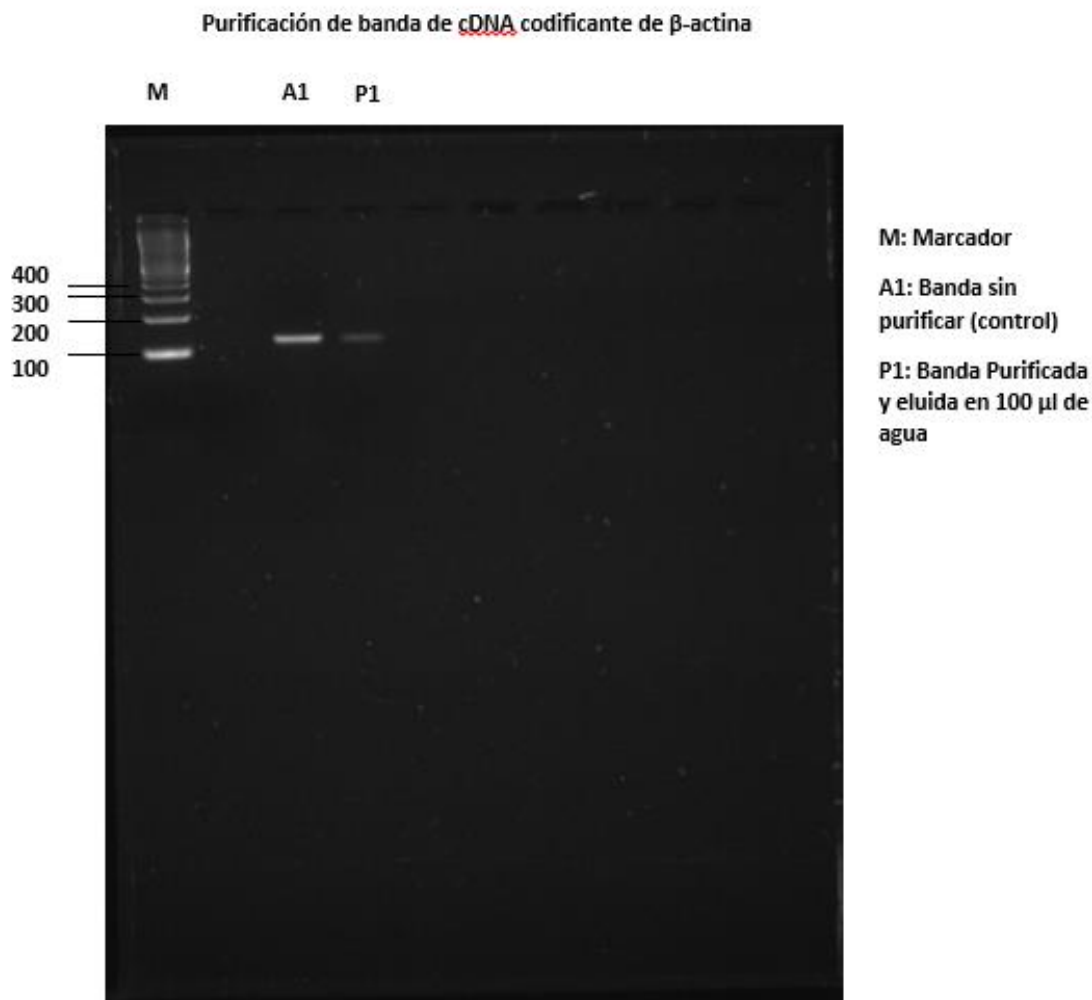
En esta última figura se puede observar como los amplicones presentan suciedad antes de ser purificados, además de sobreexposición en algunos casos (fracciones rojas en la imagen) y como al ser purificados estas huellas de sobreexposición desaparecen por completo.

Finalmente en el último pocillo del gel de agarosa al 2%, se corrieron todas las bandas diluidas en una proporción 2:10 por fracción para generar un potencial marcador o escalera de pesos moleculares, el cual resultó correr de manera adecuada al culminar la electroforesis. En la figura se muestra claramente como este marcador se observa con completa facilidad y no se muestra tenue como en la purificación pasada, además que no tendió a sobrelaparse la muestra entre las distintas bandas cargadas en el mismo pocillo.

Finalmente volvimos a correr la muestra purificada de cDNA en un gel de agarosa al 2% una vez que se dejó concentrar la muestra. De esta manera podemos observar que en la figura 8 ambas muestras tanto el control como la purificación de la misma se aprecian en la misma intensidad al cabo de dejar a la muestra en un espacio limpio y seco por alrededor de 24 horas.

Figura 6

Gel de agarosa al 2% con banda de cDNA purificada

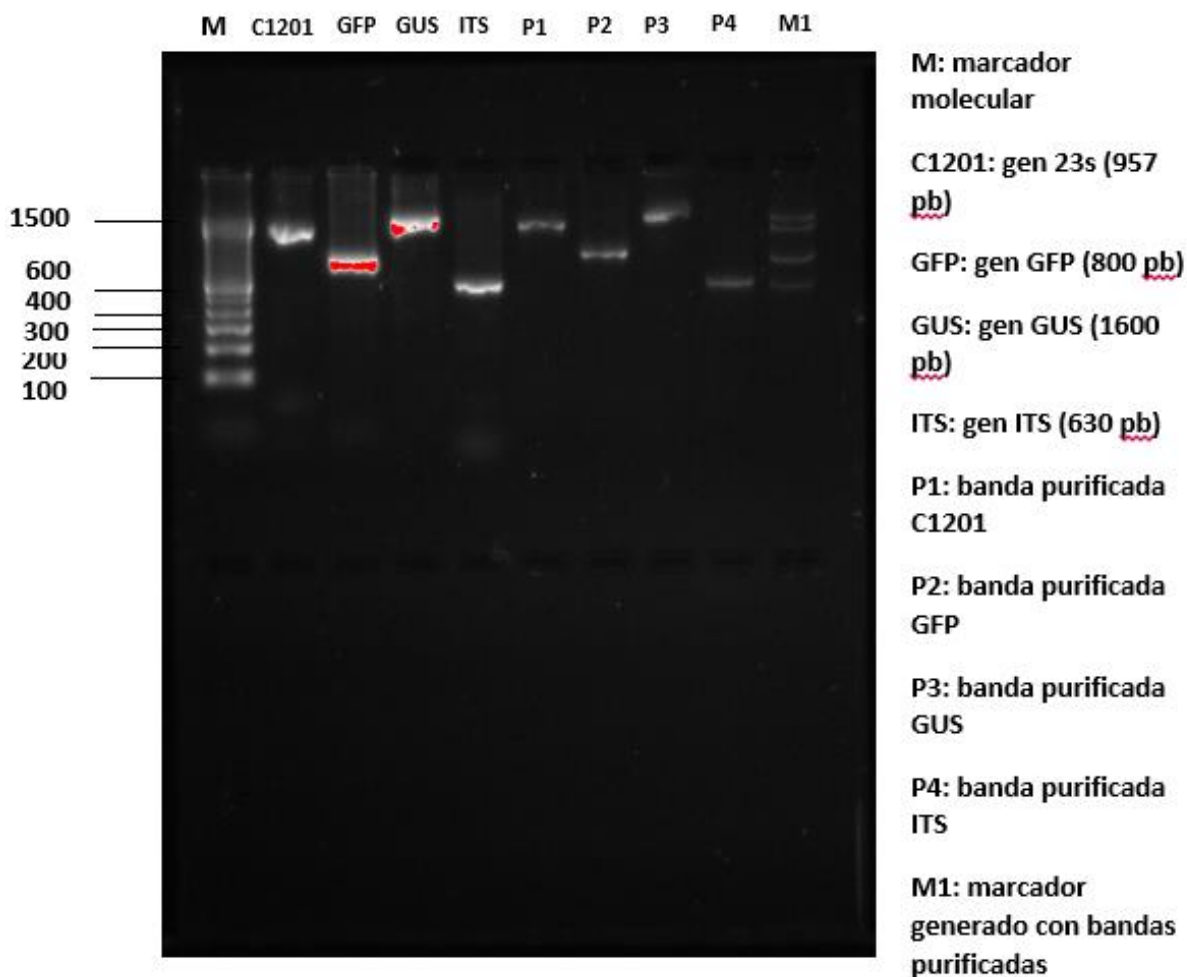


Nota: Si bien ambas bandas son visibles, se puede observar claramente como la banda purificada es más tenue en comparación a la banda control. Esto se debió a la elución realizada en 100 μ l de agua DEPC, por lo que optamos en reducir la cantidad de agua de elución a 45 μ l, pero en este caso solo dejamos concentrar la muestra destapada a temperatura ambiente por 24h.

Figura 7

Gel de agarosa al 2% con distintos amplicones purificados

Purificación de distintos amplicones y prueba de marcador

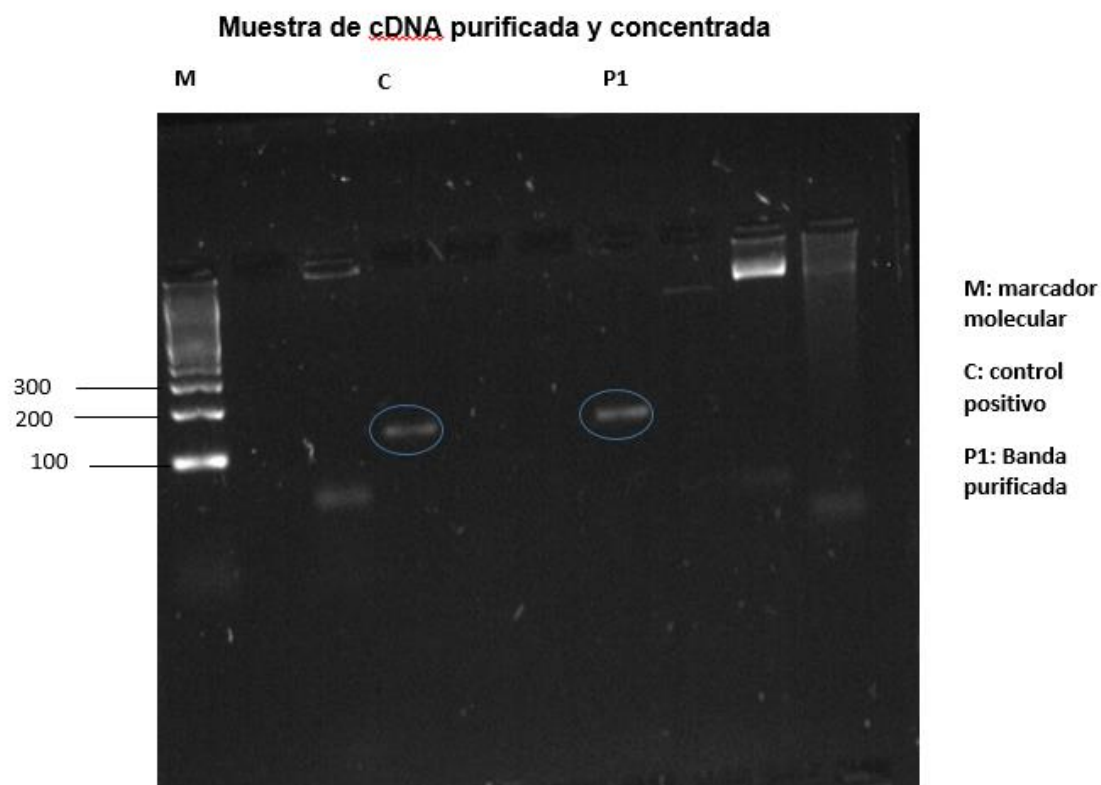


Nota: En la imagen se observan tanto las bandas obtenidas directamente después de realizar la PCR y su contraste cuando las mismas son tratadas con el kit de purificación, perdiendo así suciedad generada en la reacción al igual que sobreexposición que puede afectar la calidad de la secuenciación de estas muestras y un marcador generado con estas bandas purificadas que migraron satisfactoriamente sin sobrelaparse uno sobre

otro. Las manchas rojas que se observan en algunos amplicones son muestras de sobreexposición que algunos transiluminadores pueden marcar.

Figura 8

Purificación de muestra de cDNA una vez concentrada la elución final



Nota: En la imagen se puede observar como el control positivo o la banda sin purificar y la banda purificada se presentan de la misma intensidad luego de dejar la muestra purificada concentrar. Los amplicones no nombrados son pruebas de bandas de otros materiales genéticos sin purificar para posteriormente ser usados en otros experimentos si así lo requiriera el caso.

Análisis de pureza

Para analizar la pureza y concentración de las muestras purificadas utilizamos el equipo espectrofotómetro nanodrop *Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer* de ThermoFisher de los laboratorios Multidisciplinarios de la Universidad de Las Fuerzas Armadas ESPE, el cual nos permite analizar tanto la concentración de la muestra final y la calidad de la pureza de las mismas con las relaciones 260/230 y 260/280, ambas nos ayudan a determinar la contaminación presente en el gel de agarosa una vez realizada la electroforesis vertical de los amplicones tratados.

En la tabla 6 se observa los datos de absorbancia y concentración para el amplicón de cDNA codificante para β -actina. Estos datos nos permiten evaluar la calidad de la muestra en cuanto a su purificación, si esta es óptima o no. Los datos de relación de absorbancia 260/230 y 260/280 arrojan que existe contaminación por sales, ya que el valor obtenido es bajo con respecto al control, sin embargo, la pureza en sí de la muestra viene determinada por la relación 260/280 y obtenemos el mismo valor tanto para el control que es la muestra sin purificar como para la banda ya purificada. Por lo que determinamos que el rendimiento del kit es muy bueno.

Tabla 6

Parámetros de pureza y concentración de cDNA codificante de B-actina eluida en 100 μ l de agua DEPC. Los resultados tabulados son el resultado de 3 repeticiones experimentales \pm una desviación estándar

N° MEDICIÓN	MUESTRA	CONCENTRACIÓN [UG/ML]	RADIO 260/230	RADIO 260/280
1	blanco	0	0	0
2	Control+ B-actina	29,9	2,68	2,15
3	B-actina purificada y eluida	8,63	0,1	2,15

Nota: En la tabla se puede apreciar la diferencia en concentración entre el amplicón purificado y el amplicón obtenido directamente después de realizarse la PCR. Como se comentó anteriormente en este caso la elución fue realizada en 100 µl de agua DEPC.

Por otro lado, en la tabla 7 podemos observar los datos correspondientes a concentración y relación de observancia 260/230 y 260/280 necesarios para determinar la calidad de purificación llevada a cabo con las muestras a estudiar. Todas estas bandas muestran una concentración óptima para ser observadas en los geles como se observó en la figura 7. Además, Las relaciones de absorbancia obtenidas determinan que si bien las bandas purificadas muestran contaminación por sales si tomamos en cuenta la medida 260/230, que esto puede deberse a varios factores que posteriormente se explicará, sin embargo, la relación de absorbancia 260/280 nos da una clara muestra que las purificaciones son de buena calidad, y las mismas se podrían secuenciar sin problema alguno, obteniendo electroferogramas con buena disposición y de lectura simple.

La mayor concentración recuperada es del amplicón nombrado GUS y la menor corresponde a la banda purificada de ITS. Se debe tomar en cuenta también que las concentraciones de entrada son distintas para cada amplicón y son de distintas reacciones de PCR.

Tabla 7

Parámetros de concentración y pureza de amplicones purificados con el protocolo estandarizado para purificación de segmentos de ADN. Los resultados tabulados son el resultado de 3 repeticiones experimentales \pm una desviación estándar

N° MEDICIÓN	MUESTRA	CONCENTRACIÓN [UG/ML]	RADIO 260/230	RADIO 260/280
1	blanco	0	0	0
2	C1201	21	0,219	2,10
3	GFP	19,2	0,121	2,28
4	GUS	21,1	1,510	2,30
5	ITS	12,8	0,147	2,20

Nota: La tabla nos muestra distintas concentraciones e indicadores de pureza de acuerdo a cada amplicón o banda purificada. Cada banda purificada tiene distintas lecturas de acuerdo a la afinidad que muestren estos amplicones por el kit de purificación. Sin embargo, se puede observar que el kit muestra versatilidad y lecturas óptimas para llevar a cabo un proceso de secuenciación posteriormente.

La tabla 8 nos muestra los valores que se obtienen tanto para la concentración como para las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 que nos indican la pureza o nivel de contaminación en la muestra purificada para el cDNA codificante para β - actina

Esta muestra se dejó concentrar sin tapar la muestra pero en un lugar limpio y seco por 24 horas obteniendo resultados mejores si los comparamos con los datos obtenidos previos a la concentración de la banda.

Las concentraciones obtenidas no distan de manera amplia en cuanto a su cantidad recuperada, demostrando así que purificando con el kit elaborado y eluyendolo en la concentración adecuada de agua, se van a obtener bandas menos tenues y con mayor concentración con respecto a los anteriores experimentos, además que estas van a estar libres de otros componentes indeseados que pueden perturbar los datos si se requiriera realizar una secuenciación de la banda en cuestión.

Tabla 8

Datos de concentración y Purificación de la banda de cDNA codificante para B-actina, después de dejar concentrar la muestra por 24h. Los resultados tabulados son el resultado de 3 repeticiones experimentales \pm una desviación estándar

N° MEDICIÓN	MUESTRA	CONCENTRACIÓN [UG/ML]	RADIO 260/230	RADIO 260/280
1	blanco	0	0	0
2	Control+ B-actina	29,9	2,68	2,15
3	B-actina purificada y concentrada por 24h	16,0	0,1	2,16

Nota: La tabla nos arroja resultados similares a los obtenidos antes de dejar concentrar la muestra por 24 horas en cuanto a las relaciones de absorbancia se refiere o pureza de las mismas. Sin embargo la concentración se ve duplicada con respecto a la tabla 6.

Diagnóstico Virus TMV

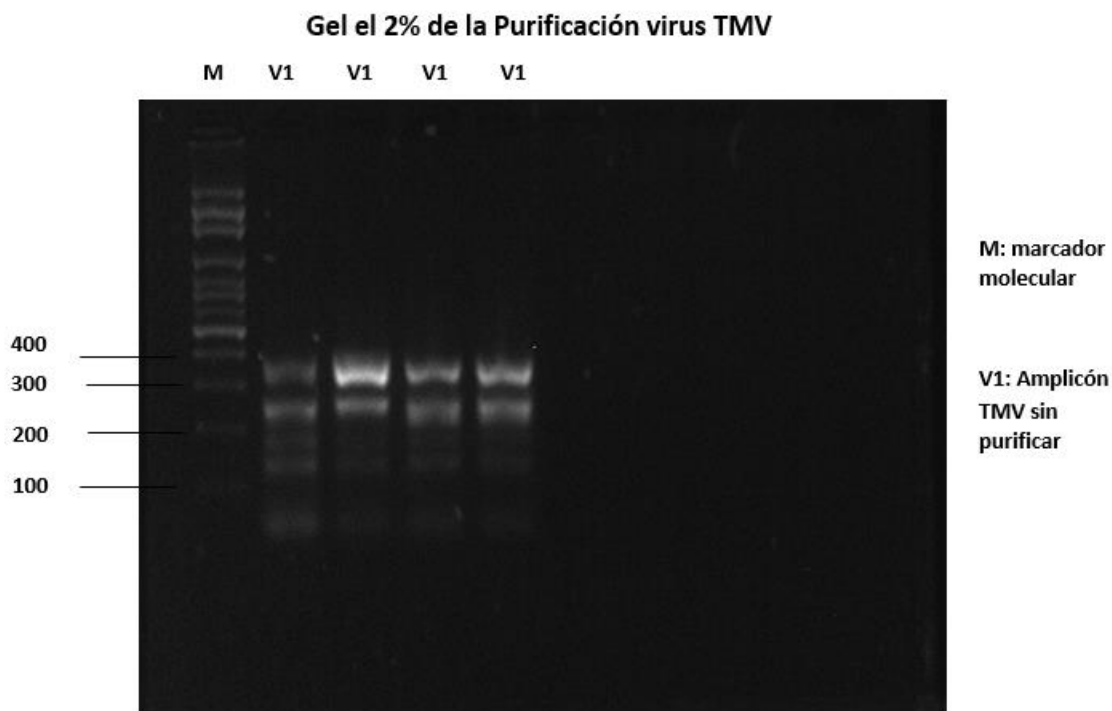
Uno de los últimos ensayos que realizamos fue el de purificar una muestra proveniente de una planta, la cual supuestamente presentaba síntomas de poseer TMV (Tobacco Mosaic Virus), pero teníamos un cúmulo de problemas al intentar purificar la muestra, ya que, al realizarse la PCR esta presentaba bandas inespecíficas y de distintas tallas a la que se buscaba conseguir (422 pb). En la figura 9 se puede observar el gel de agarosa al 2% en el que encontramos las distintas bandas mencionadas, que no debían aparecer en la figura haciendo parecer la reacción una PCR multiplex, sin embargo no necesitábamos que este fenómeno ocurra.

Un fenómeno que nos ocurrió en el ensayo de electroforesis del amplicón fue que la banda resultante no llegaba siquiera a la talla deseada, si no que se presentaba por debajo de las 400 pb. Sin embargo realizamos el corte de gel necesario y posteriormente

se purificó la muestra para volver a correrla en un gel nuevo. Los valores ingresados en la fuente de poder variaban de los valores originales por cuestión de tiempo. A diferencia de las otras corridas electroforéticas esta muestra se dejó correr a 120 V y por 30 min.

Figura 9

Electroforesis de amplicón para virus TMV sin purificar



Nota: En la imagen podemos observar como aparecen otras bandas que no necesitamos para realizar el diagnóstico de presencia o ausencia del virus, se realizaron varias corridas para recuperar una buena cantidad de material genético y posteriormente purificarlo.

Una vez cortada la fracción de gel y después de diluir la agarosa que envolvía este material genético se procedió con la purificación estandarizada. Primero analizamos la cantidad de muestra recuperada en el espectrofotómetro nanodrop para medir la

concentración final de la muestra además de las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 para de esta manera determinar su pureza.

En la tabla 9 se registran los valores obtenidos de concentración de la muestra purificada y sus respectivas relaciones de absorbancia. Para este caso se corrieron varias veces el producto de PCR obtenido en los distintos pocillos, con el fin de recolectar una buena cantidad de muestra y una buena concentración de la misma para que de este modo al purificar las mismas no perdamos material genético y las bandas sean visibles una vez purificadas y eluidas.

Tabla 9

Medición de parámetros de concentración y pureza de bandas cortadas a partir del gel de agarosa al 2% y eluidas en agua DEPC

N° MEDICIÓN	MUESTRA	CONCENTRACIÓN [UG/ML]	RADIO 260/230	RADIO 260/280
1	V1_0	19,40	0,90	1,45
2	V1_1	8,14	0,20	2,02
3	V1_2	2,94	0,10	4,29
4	V1_3	5,29	0,17	1,28
5	V1_4	2,45	0,10	6,25
6	V1_5	13,1	0,10	2,2
7	V1_6	11,3	0,1	2,30
8	V1_7	11,3	1.03	1,14
9	V1_8	11,7	1.03	1,19

Nota: los datos que se marcaron de color rojo fueron descartados ya que sus valores indicaban algún tipo de contaminación, presumiblemente una falla en el proceso de purificación.

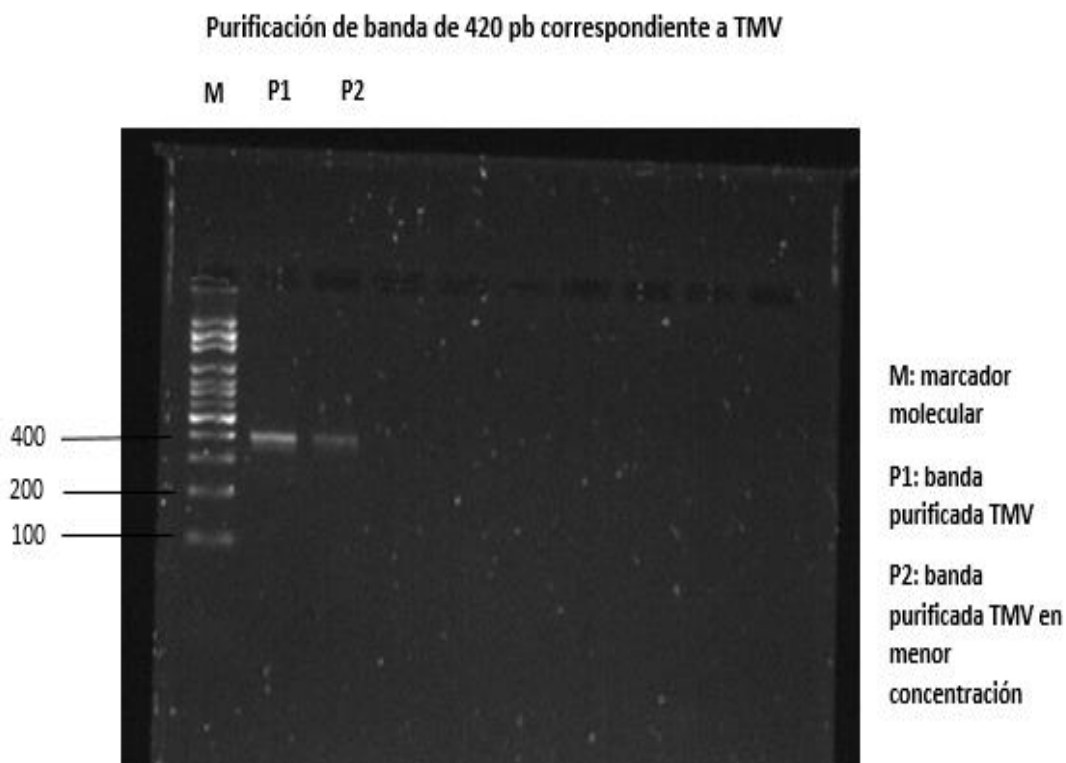
Posteriormente, con los datos obtenidos sacamos las mejores muestras que en la tabla 9 se ven en negrillas y procedimos a correr un gel con las mismas. Se cargó un marcador molecular y las muestras V1_1 y V1_5 que son las que obtuvieron mejores resultados. No se utilizó la muestra V1_6 ya que perdimos muestra cargándola en un gel

anterior y su banda al realizar la corrida electroforética no se distinguía de manera adecuada.

En la figura 10 se observan los amplicones corridos en la electroforesis. Esta vez utilizamos los mismos parámetros y valores con los que se venían manejando la fuente de poder anteriormente, los cuales son 90v y 50 minutos de corriente. De esta manera, no solo obtuvimos visibilidad del marcador y de las bandas, sino que también la banda resultante es del tamaño buscado el cual es de 420 pb aproximadamente.

Figura 10

Muestras V1_1 y V1_5 purificadas y corrida electroforética en gel de agarosa al 2%

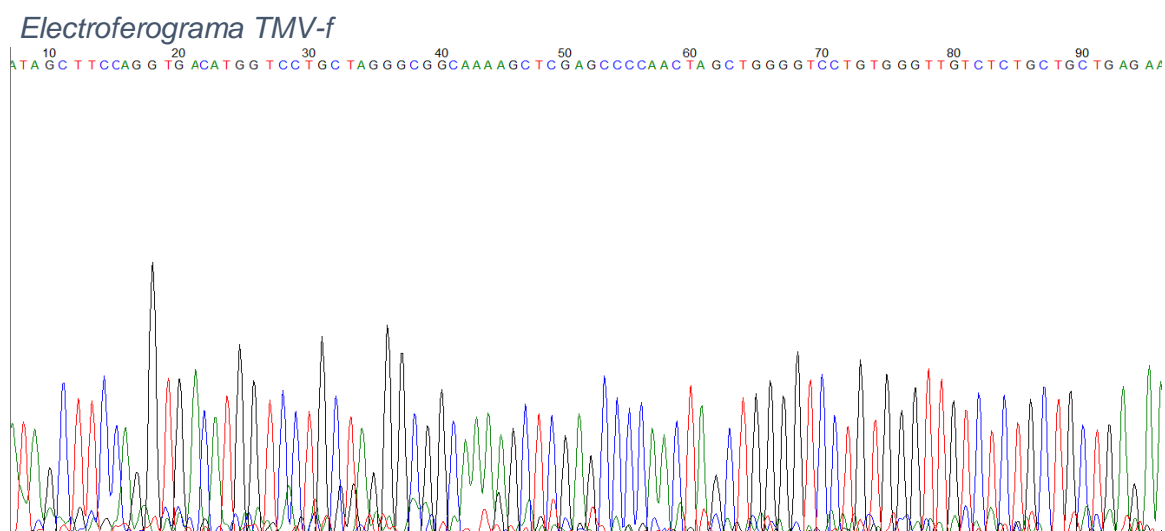


Nota: En el gel de agarosa, el pocillo marcado como p1 corresponde a la banda V1_1 y el pocillo marcado como p2 corresponde a la banda V1_5. Se observa que esta vez la banda resultante se encuentra por encima de los 400 pb (420pb aproximadamente), por

lo que presumimos que el error en la figura 10 sobre el tamaño de la banda se dio por el aumento de voltaje y el menor tiempo de corrida otorgado al experimento.

Una vez que regresaron las muestras luego de ser secuenciadas gracias a IDgen y MACROGEN se obtuvieron los electroferogramas que se muestran en las ilustraciones 11 y 12. Donde se observa que los picos son claros y simplemente se removió la basura que queda en los extremos para tener una muestra clara de lo que estamos observando. También nos podemos dar cuenta que los picos no son muy altos por lo que presumimos falta concentración en la muestra enviada a secuenciar.

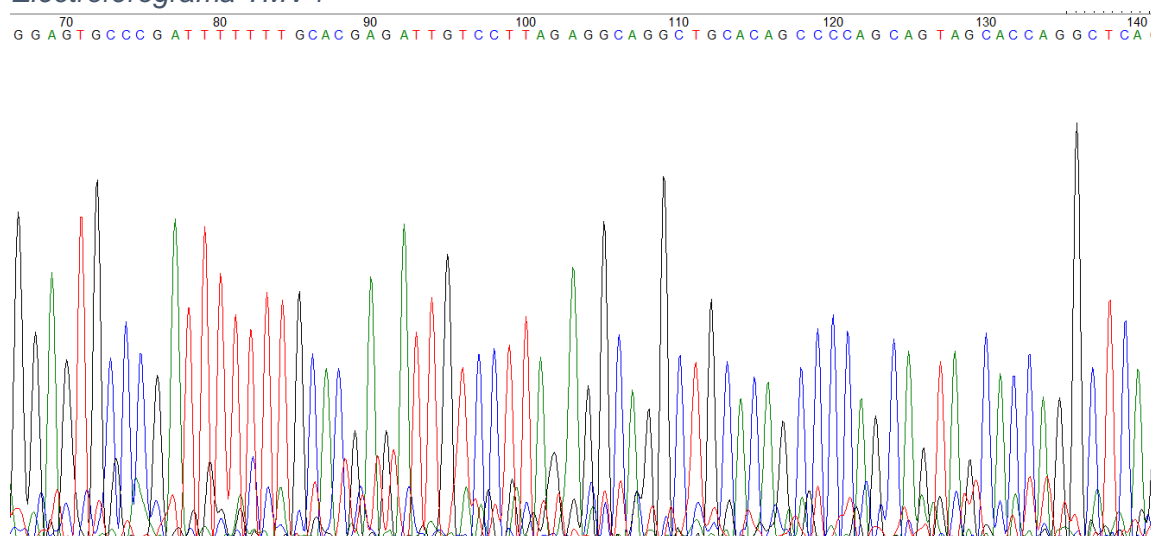
Figura 11



Nota: El electroferograma que observamos es de las primeras 90 pb que se obtienen al realizar la secuenciación utilizando el primer “forward” de la secuencia. Los picos permiten que se pueda realizar una buena lectura.

Figura 12

Electroferograma TMV-r



Nota: Al observar los picos obtenidos al correr la secuencia con el primer “reverse” los picos se observan más altos en comparación a la figura 11 y se puede tener una mejor lectura de los nucleótidos presentes en la muestra. En este caso podemos observar el electroferograma desde las 70 pb hasta las 140 pb.

A continuación observamos la secuencia consenso en la figura 13 lograda después de realizar el reverso complemento a la secuencia “reverse”. La misma fue posteriormente ingresada a BLAST obteniéndose como resultado que el “query” para confirmar si el origen de la muestra era en realidad TMV arrojó que los resultados concluyen en que la planta no posee este virus si no otro tipo de enfermedad. A la secuencia obtenida luego de realizar el BLASTn se la denominó una “secuencia artefacto”.

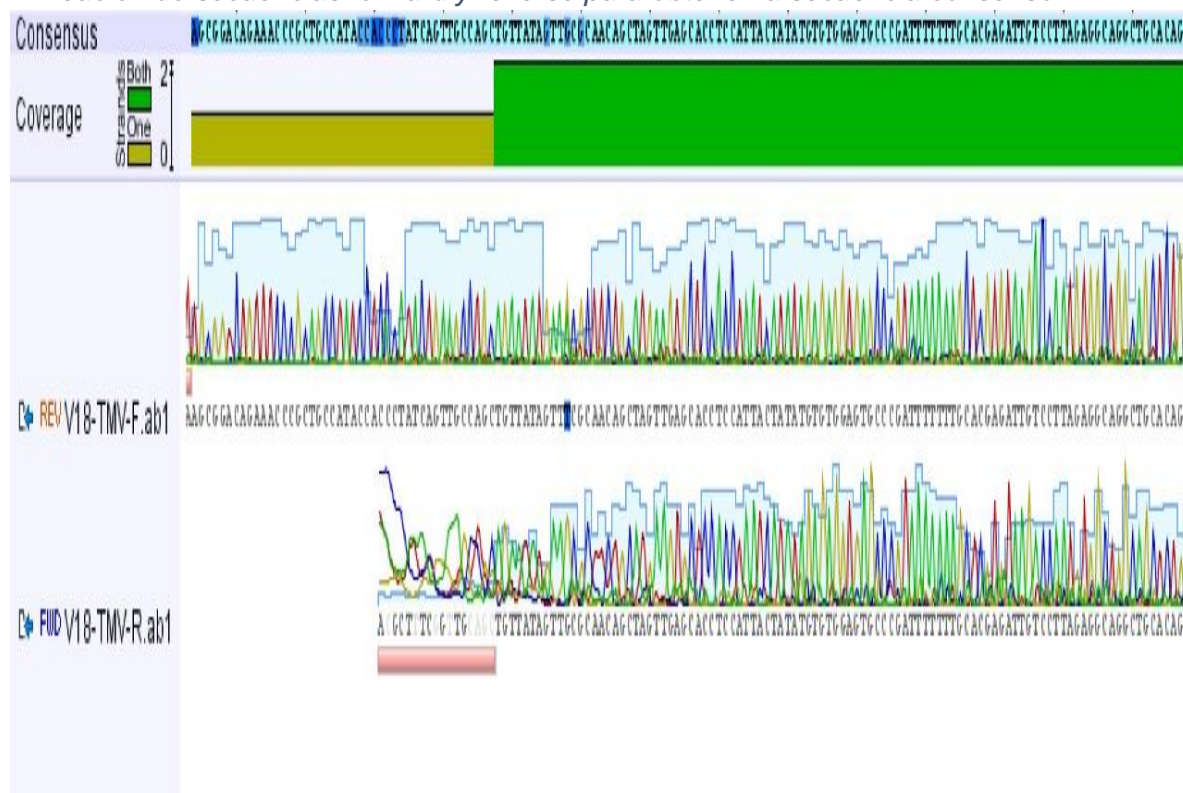
Se la denominó de esta manera ya que la secuencia no resultaba concordante con la base de datos proporcionada por el NCBI. Los resultados de la búsqueda realizada se observan en la figura 14.

Secuencia consenso

```
AGCGGACAGAAACCCGCTGCCATACCACCCTATCAGTTGCCAGCTGTTATAGTTGC
GCAACAGCTAGTTGAGCACCTCCATTACTATATGTGTGGAGTGCCCGATTTTTTTGC
ACGAGATTGTCCTTAGAGGCAGGCTGCACAGCCCCAGCAGTAGCACCAGGCTCAG
CCGCTTCAGCAATACCGACCGACACCCAAAGCACCAGTATCCAGAGGACGTGGCC
GAGGCCGCGGGCAGTATTCTCAGCAGCAGAGACAACCCACAGGACCCCAGCTAGT
TGGGGCTCGAGCTTTTGCCGCCCTAGCAGGACCATGTCACCTGGAAGCTATAATTC
CTTGTGCACCATCCCAGTTCCATATTTTGTTTGATACAAGATCTTCTCCATTTTTGTC
AGGTC
```

Figura 13

Alineación de secuencias forward y reverse para obtener la secuencia consenso



Nota: Para llegar a la secuencia consenso se utilizó la plataforma GENEIOUS. Se ingresan ambas secuencias tanto forward como reverse, pero a la secuencia reverse se le realiza un reverso complemento. Se empatan tanto la secuencia forward como la secuencia reverse complemento y se obtiene la secuencia consenso con la cual procedemos a realizar la búsqueda en BLAST

Figura 14

Identificación genómica que se logra después de realizar BLASTn de la muestra a evaluar

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Seriola lalandi</i> dorsalis ras-associated and pleckstrin homology domains-containing protein 1-like (LOC111644467), trans	50.9	50.9	18%	0.10	76.39%	XM_023393373.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Seriola lalandi</i> dorsalis ras-associated and pleckstrin homology domains-containing protein 1-like (LOC111644467), trans	50.9	50.9	18%	0.10	76.39%	XM_023393371.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Seriola lalandi</i> dorsalis ras-associated and pleckstrin homology domains-containing protein 1-like (LOC111644467), trans	50.9	50.9	18%	0.10	76.39%	XM_023393370.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Echeneis naucrates</i> genome assembly, chromosome: 20	50.0	50.0	12%	0.10	83.67%	LR584061.1
<input checked="" type="checkbox"/> Tobacco mosaic virus isolate Mudaniang, complete genome	50.0	50.0	6%	0.10	100.00%	MH595921.1
<input checked="" type="checkbox"/> Tobacco mosaic virus isolate Harbin-1, complete genome	50.0	50.0	6%	0.10	100.00%	MH595919.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Vombatus ursinus</i> sosondowah ankyrin repeat domain family member B (SOWAB), mRNA	50.0	50.0	10%	0.10	86.05%	XM_027854502.1
<input checked="" type="checkbox"/> Tobacco mosaic virus isolate Changde-9, complete genome	50.0	50.0	6%	0.10	100.00%	HE818411.1
<input checked="" type="checkbox"/> Tobacco mosaic virus movement protein gene, complete cds, and coat protein gene, partial cds	50.0	50.0	6%	0.10	100.00%	EU796225.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Odontomachus brunneus</i> O-acyltransferase like protein-like (LOC116848622), mRNA	48.2	48.2	9%	0.36	88.89%	XM_032824919.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Pseudomonas</i> sp. BIOMIG1BAC chromosome, complete genome	48.2	48.2	7%	0.36	93.55%	CP049045.1
<input checked="" type="checkbox"/> Tobacco mosaic virus isolate Harbin-2, complete genome	48.2	48.2	6%	0.36	100.00%	MH595920.1
<input checked="" type="checkbox"/> Tobacco mosaic virus isolate Shervang, complete genome	48.2	48.2	6%	0.36	100.00%	MG516107.1
<input checked="" type="checkbox"/> Tobacco mosaic virus strain FERA_111011, complete genome	48.2	48.2	6%	0.36	100.00%	KY310785.1
<input checked="" type="checkbox"/> Expression vector pSPOM DNA, complete sequence	48.2	48.2	6%	0.36	100.00%	AB861437.1
<input checked="" type="checkbox"/> Tobacco mosaic virus isolate Dzh-Qvg nonfunctional Replicase and nonfunctional movement protein genes, complete sequence	48.2	48.2	6%	0.36	100.00%	KX650856.1

Nota: En la imagen se puede observar que la muestra evaluada no pertenece a la secuencia determinada por el genbank del NCBI para el virus TMV, su query es bajo y no supera los 50 puntos de puntaje, cuando esperamos por lo menos un 98. Tampoco se puede decir que es *Seriola lalandi* como sugiere el análisis porque su porcentaje de identidad no alcanza ni el 80%, por estas razones concluimos que la secuencia lograda es una secuencia artefacto.

Elaboración de 3 kits de purificación completos

Una vez probado el kit de purificación con muestras varias de distintos orígenes tanto animales, vegetales y bacterianos. Decidimos multiplicar las soluciones para formar tres kits completos para ser usados y probados no solo por nosotros sino también por los distintos laboratorios de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. También el kit quedó a disposición y uso del laboratorio IDgen para que realicen los proyectos y purificaciones necesarias.

Realizamos los cálculos para formular una solución madre de cada uno de los buffers diseñados en soluciones de 50 ml cada una, lo que equivale a que se pueden llevar a cabo 40 purificaciones con una columna nueva por reacción. Los ejemplos de cálculo se observan en la sección de anexos.

Generamos un código QR único el cual al ser escaneado por un dispositivo móvil ya sea de sistema operativo Android o IOS genere un mensaje directo para que el consumidor pueda ponerse en contacto con el titular del proyecto de titulación.

Figura 15

Código QR generado para utilizarlo como mecanismo de comunicación entre el usuario del kit y el productor del mismo




Nota: El código QR generado permite al usuario del kit establecer comunicación directa con el titular del producto, con el fin de aclarar cualquier tipo de duda que no se vea solucionada con el protocolo de uso.

A continuación generamos un protocolo de uso para que cada usuario tenga todas las herramientas necesarias para llevar a cabo la purificación de productos de PCR además de fracciones de ADN que necesiten ser cortadas de un gel de agarosa.

Figura 16

Protocolo de uso para usuario del kit de purificación en español



Biopurifying
Science is the way

PCR & GEL PURIFICATION SYSTEM

Ejemplo de protocolo de uso de kit de purificación

Si se necesita purificar desde un gel de agarosa

- Cortar la porción de gel con la banda de interés con una lanceta estéril
- Incubar por 1 minuto la porción de gel con 600 µl de “binding solution”
- Llevar a termoshaker o agua caliente por 10 minutos a 65°C y agitar constantemente

Si se desea purificar a partir de una reacción de PCR iniciar en este punto

- Activar las columnas de purificación por 1 minuto a 10000 rpm con el buffer de activación
- Incubar la muestra en 700 µl de solución de binding por un minuto en una gradilla
- Verter la muestra incubada en la solución de binding en la columna de purificación activada
- Centrifugar por un minuto la muestra a 10000 rpm por 1 minuto
- Descartar la solución que queda en el tubo colector y añadir 700 µl de solución de lavado “washing solution” y centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos
- Descartar el sobrante del tubo colector y añadir 500 µl de “washing solution” por 10 minutos
- Colocar la columna de purificación en un tubo colector nuevo de 100 o 150 ml y eluir la muestra por 1 minuto a 10000 rpm en la centrifuga con 40-50 µl de buffer de elución
- Conservar la muestra en congelador por hasta 20 días después de purificar

Nota: Se sugiere que la muestra a purificar supere los 10 µl de volumen y su concentración sea superior a los 100 µg/ml.

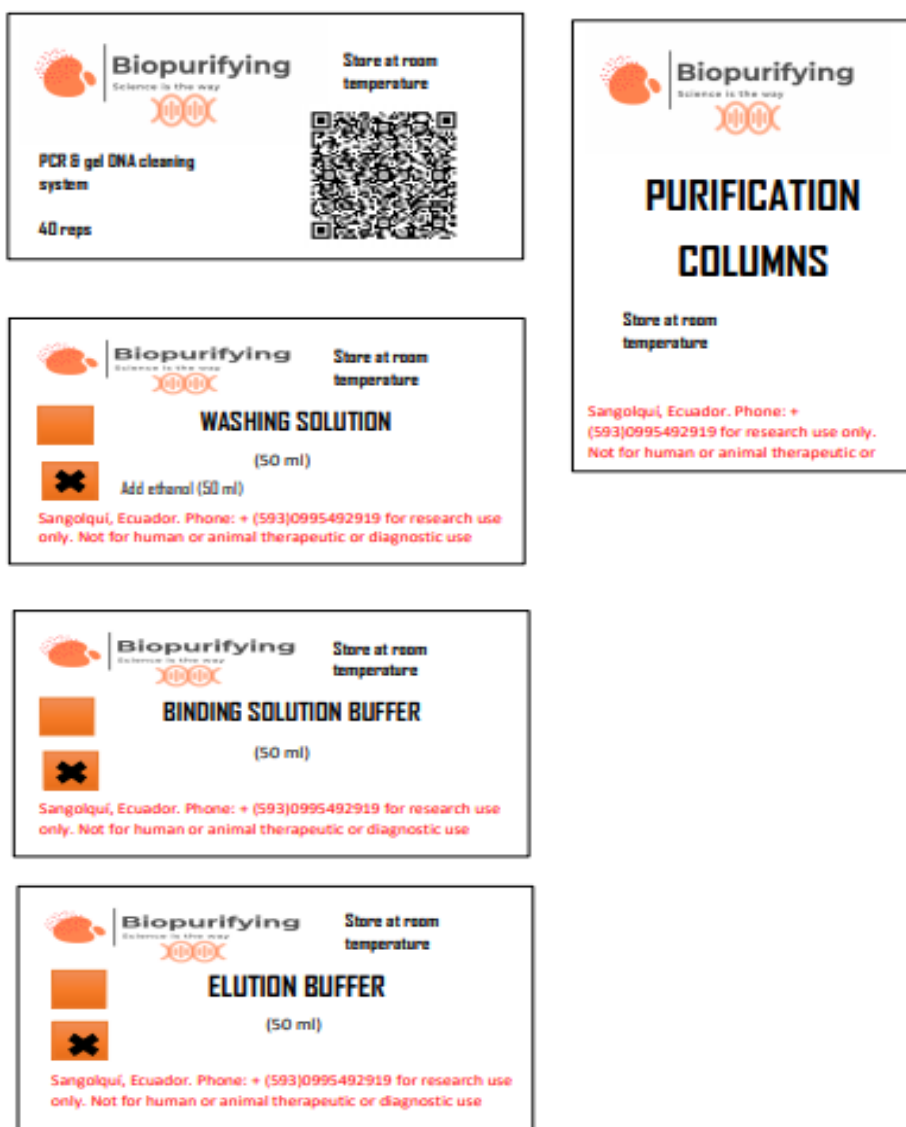
Sangolquí, Ecuador. Phone: + (593)0995492919 for research use only. Not for human or animal therapeutic or diagnostic use

Nota: El protocolo ejemplo está generado en español sin embargo en el kit se lo traducirá al inglés de igual manera para manejo del usuario.

Se generaron las etiquetas de cada una de las soluciones formuladas para que el usuario tenga perfecto entendimiento del contenido y uso de los buffers tanto de anclaje, lavado y elución. Se muestran las etiquetas en la figura 17.

Figura 17

Etiquetado de soluciones formuladas para uso del investigador



Nota: Las etiquetas contienen el nombre y volumen de cada solución

Para finalizar esta sección presentamos el producto final del kit de purificación para productos de PCR y bandas en gel de agarosa en la figura 18, la cual es una caja de cartón con los etiquetados y protocolos que se deben llevar a cabo para la manipulación del kit.

Figura 18

Prototipo de kit de purificación elaborado



Nota: Las soluciones están preparadas para poder realizar 40 purificaciones de ácidos nucleicos. El kit es funcional tanto para productos de PCR como para purificar un segmento de ADN en gel de agarosa.

Tabla 10

Costo de elaboración para un prototipo de kit de purificación de productos de PCR & gel. Sin tomar en cuenta gastos de cajas e imprenta

Para 50 reacciones							
Binding Solution						Precio unitario	
Producto	Concentración	Cantidad	precio	disponibilidad en país	Volumen		
agente caotrópico	4,5 M	26,6 g	\$20 x 100g	poca o nula	50 ml	\$5,32	
acetato de potasio	0,5 M	170 ul	\$17,26 x500g	si		\$0,08	
Wash solution						\$0	
Producto	Concentración	Cantidad	precio	disponibilidad en país	Volumen	\$0	
etanol	96-100%	40 ml	\$ 20 x 500 ml	si	50 ml	\$1,60	
EDTA	16,7 uM	835 ul	\$ 24 x 1,5 kg	si		\$0,01	
Acetato de potasio	10 mM	170 ul	\$17,26 x500g	si		\$0,04	
agua destilada	0 M	9 ml	\$20,50 x 4l	si		\$0,18	
Elution Buffer						\$0	
Producto	Concentración	Cantidad	precio	disponibilidad en país	Volumen	\$0	
agua DEPC	0 M	50 ml	\$124 x 1000 ml	si	50 ml	\$6,20	
TOTAL						\$13,43	
			\$320,76			Columnas centrifuga	\$25
						ENVIO EEUU	\$15
						Total Producción	\$28,43
						Ganancia calculada al 60% del costo de adquisición de materiales	\$18
						PVP x kit	\$75,00
<p><i>Nota: Lo que significa que se necesita realizar 4 ventas para recuperar el monto inicial de inversión, tomando en cuenta que se debe comprar al menos 250 columnas para purificación</i></p>							

Comparación entre kit elaborado y kits comerciales (invitrogen, promega)

Una vez estandarizados todos los protocolos y probado el correcto funcionamiento del kit de purificación elaborado decidimos comparar su rendimiento con respecto a kits de purificación del mismo tipo o similares al mismo.

La primera comparación se realizó entre nuestro kit y el kit de purificación Purelink PCR Purification kit de la casa comercial Invitrogen. Se siguió el protocolo establecido por el fabricante, además de los mismos amplicones de prueba y las eluciones se realizaron en 100 µl de agua DEPC. Los valores obtenidos distan entre ambos kits de purificación, mientras nuestro kit presentó mejor afinidad por las muestras tanto en concentración como en relación de absorbancia para medir la pureza de las muestras, los valores arrojados por el nanodrop mostraban claramente que el kit de Invitrogen no demostraban tener la misma afinidad que si tuvo nuestra formulación, los datos se ven reflejados en la tabla 10.

De acuerdo al fabricante del kit Invitrogen se requieren bandas superiores a las 400 pb, en tanto, nuestras soluciones pudieron ser afines a lecturas de bandas inferiores a los 200 pb sin problema. La concentración de muestra inicial también resultó ser un factor de suma importancia a ser considerado por la afinidad de la solución de anclaje utilizada.

Los amplicones utilizados fueron el gen *lyt A* presente en *Streptococcus pneumoniae*, también se utilizó el gen *BAB* presente para diagnóstico de *Babesia bobis* y el gen *16s* que se encuentra presente en casi todos los grupos bacterianos.

Tabla 11

Comparación entre la Cuantificación y análisis de relaciones de observancia entre kit elaborado y kit de Invitrogen. Los resultados tabulados son el resultado de 3 repeticiones experimentales \pm una desviación estándar

N° MEDICIÓN	MUESTRA	CONCENTRACIÓN [UG/ML]	RADIO 260/230	RADIO 260/280
1	blanco	--	--	--
2	control+ lyt A	18	4,97	2,09
3	Control + BAB	10,1	2,9	2,78
4	Control + 16s	17,7	4,1	2,16
NUUESTRO KIT				
5	lyt A	4,12	0,14	2,02
6	BAB	6,27	0,10	2,30
7	16S	5,88	0,10	2,13
KIT INVITROGEN				
8	LYT A	3,63	0,48	1,48
9	BAB	2,25	0,42	3,83
10	16S	3,73	0,20	1,73

Nota: Se observa en la tabla como las concentraciones recuperadas de cada uno de los amplicones después de ser purificados y eluidos en la misma cantidad de agua son superiores cuando utilizamos nuestro kit, además la relación de absorbancia 260/280 que es la que mide pureza de la muestra también presenta mejores lecturas si las comparamos con el kit de Invitrogen.

Posteriormente realizamos una comparación similar entre el kit producido pero esta vez comparamos con el sistema de purificación Wizard sv gel and PCR clean up system de la casa comercial Promega. En este caso comparamos dos muestras.

Comparamos el factor de elongación EF1 y cDNA codificante para β -actina. Los resultados que obtuvimos en este caso fue que el kit de promega si bien tiene más afinidad con orígenes bacterianos como lo hizo al purificar EF1, sin embargo con otros amplicones como el proveniente de cDNA se observa claramente como no presente afinidad con la muestra y sus datos de purificación nos muestran un error notorio en las

lecturas obtenidas. Nuestro kit desarrolló una afinidad óptima, además similar entre muestras varias sin importar casi el origen de la muestra. Los datos expuestos se revelan en la tabla 11

Tabla 12

Comparación entre la Cuantificación y análisis de relaciones de observancia entre kit elaborado y kit de Promega. Los resultados tabulados son el resultado de 3 repeticiones experimentales \pm una desviación estándar

N° MEDICIÓN	MUESTRA	CONCENTRACIÓN [UG/ML]	RADIO 260/230	RADIO 260/280
1	blanco	--	--	--
2	control+ B-act	16	2,68	2,15
3	Control + EF1	15,7	2,45	2,78
NUESTRO KIT				
5	B-ACT	11,80	0,10	2,18
6	EF1	10,40	0,20	1,80
KIT PROMEGA				
8	B-ACT	2,55	0,35	2,90
9	EF1	12,5	1,46	1,90

Nota: En la tabla se observa como el Kit de promega tiene mejor afinidad cuando comparamos regiones bacterianas como es el caso del amplicón EF1, sin embargo no dista de lo logrado con nuestro kit. Donde se observa una marcada diferencia es cuando comparamos ambos kits al emplearlos sobre el amplicón de β -actina donde claramente nuestro kit tiene mejores resultados no solo en concentración final después de eluir la muestra purificada en 50 μ l de agua DEPC si no también al comparar los detalles de calidad de pureza de la muestra con las relaciones de absorbancia. De hecho la muestra podría arrojar datos erróneos al secuenciarla si enviamos la purificación con el kit de Promega, la relación 260/280 indica que su pureza no es óptima para llevarse a cabo este proceso.

Secuenciación de muestras purificadas con el kit elaborado

El último ensayo que se realizó fue el purificar y secuenciar muestras con el fin de observar picos de lectura clara en un electroferograma y posteriormente evaluarlos y compararlos con la base de datos del NCBI. Utilizamos como referencia 6 amplicones donados por el laboratorio IDgen de la ciudad de Quito y purificamos los mismos. Los resultados de la concentración y porcentaje de pureza obtenido se pueden observar en la tabla 12.

Escogimos cuatro de las muestras en las que se observó banda para enviar a secuenciar con MACROGEN de las 6 muestras que se hizo en total, tomando en cuenta la concentración obtenida y la calidad de pureza que se valoraba en el espectrofotómetro nanodrop.

Tabla 13

Parámetros de concentración y relación de absorbancias de productos de PCR purificados. Los resultados tabulados son el resultado de 3 repeticiones experimentales \pm una desviación estándar

N° MEDICIÓN	MUESTRA	CONCENTRACIÓN [UG/ML]	RADIO 260/230	RADIO 260/280
1	blanco	0	0	0
2	EF1	10,6	0,10	1,80
3	EF	20,1	0,22	1,80
4	Girasa	8,1	2,18	1,75
5	rpoB	41,9	0,13	1,91
6	16s	22,4	0,13	1,83
7	ITS	14,3	0,10	1,70

Nota: Los amplicones que se marcaron con negritas fueron los seleccionados para ser purificados. No se enviaron todas las muestras por un tema de costos.

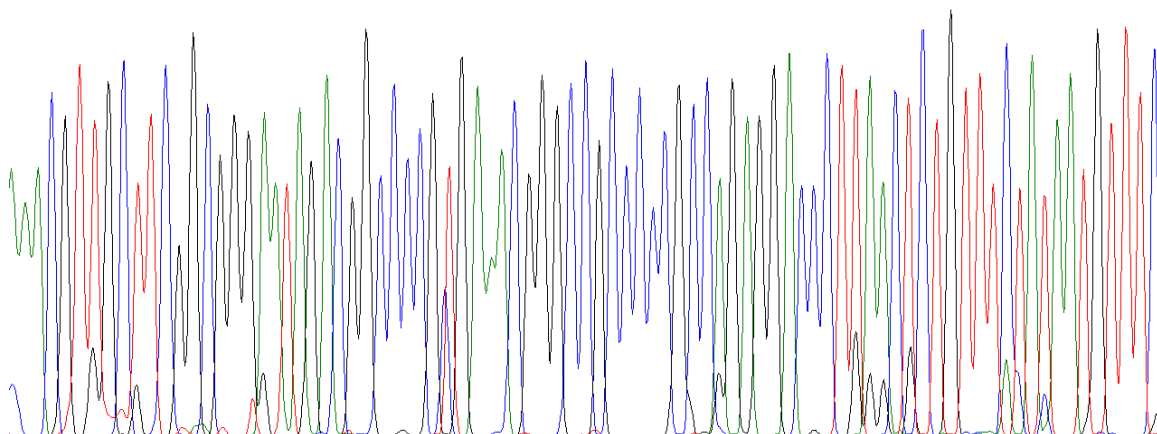
Sin embargo, de las muestras enviadas el tubo que contenía a la muestra rpoB se regó en el camino, 16 s mostró un comportamiento errático y EF1 no tuvo la concentración óptima para ser secuenciada, por lo que obtuvimos la secuenciación con un 92% de fidelidad de la muestra ITS.

Al igual que la secuenciación realizada a la banda de 420 pb de TMV, lo primero que realizamos fue leer los electroferogramas tanto de la secuencia "forward" como "reverse" de la muestra de ITS como se observan en las ilustraciones 19 y 20.

Figura 19

Secuencia "forward" amplicón EF1

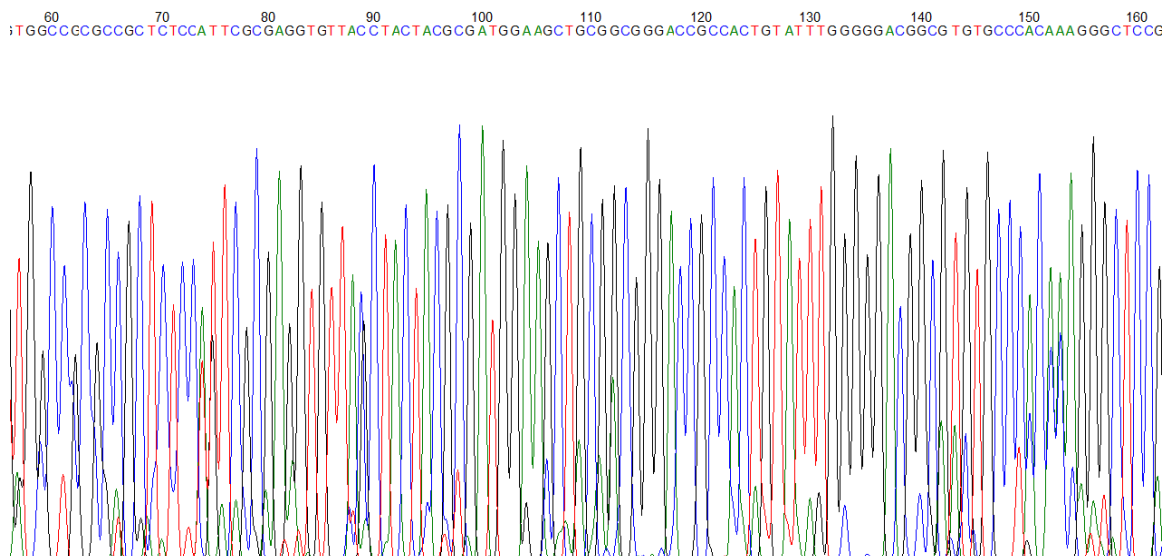
40 50 60 70 80 90 100 110 120
A A A C G T T G C T T C G G C G G G G A A T A G A C G G C C C C G T G A A A C G G G C C C C C C G C C A G A G G A C C C T T A A C T C T G T T T C T A T A A T G T T T C



Nota: El electroferograma es bastante claro y los picos se distinguen con facilidad por lo que presumimos de la buena calidad de pureza de la muestra.

Figura 20

Secuencia "reverse" de amplicón EF1



Nota: Corroboramos la información obtenida en la secuencia "forward" al visualizar que en la secuencia "reverse" los picos se presentan bastante similares y también son fácil de ver y distinguir, asegurándonos de esta manera que al realizar la secuencia de reversa complemento el resultado obtenido será óptimo.

Realizamos la operación de reversa complemento en el software GENEIOUS y de esta manera obtenemos la secuencia complemento que se muestra a continuación, y a esta la vamos a realizar un BLASTn en la plataforma del NCBI para de este modo determinar si el origen que teníamos de la muestra en efecto es el amplicón EF1 presente en hongos.

```

TTCTCCGCTTATTGTATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCCTACCTGATTCCG
AGGTCAACTTCAGAAGAGTTGGGTGTTTTACGGCGTGGCCGCGCCGCTCTCCAGT
CGCGAGGTGTTAGCTACTACGCGATGGAAGCTGCGGCGGGACCGCCACTGTATTT
GGGGACGGCGTGTGCCACAAAGGGCTCCGCCGATCCCCAACGCCAGGCCCGG
GGCCTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGG
GCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTT
ATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAA
GTTTTAATTTATTTGCTTGTTTTACTCAGAAGAAACATTATAGAAACAGAGTTAAGGG

```

```
TCCTCTGGCGGGGGCGGCCCGTTTCACGGGGCCGTCTATTCCCGCCGAAGCAAC  
GTTTAGGTATGTTTACAGGGTTGATGAGTTGAATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCA  
GGTCACCCTACGG
```

Finalmente ingresamos la secuencia consenso en el software y después de realizar el BLASTn obtenemos los resultados que se muestran en la figura 21. Se observa cómo se puede afirmar que la secuencia pertenece al amplicón de EF1 por el porcentaje de identidad de 99,2% y un porcentaje “query” del 99%. Demostrando así que es la región que buscábamos, la cual se encuentra presente en hongos como en este caso *Fusarium*. sp de una muestra de papaya.

Figura 21

Resultado de BLASTn para la identificación genética de amplicón EF1 presente en hongos

The screenshot shows a BLASTn search results page with the following table of sequences producing significant alignments:

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Fusarium sp. Papaya1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran	1000	1000	99%	0.0	99.29%	EU707572.1
Fusarium sp. isolate HPX4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, an	995	1151	100%	0.0	99.12%	MG827190.1
Fusarium solani isolate TR-14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter	990	990	99%	0.0	99.12%	KX385048.1
Fusarium sp. I-6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribe	990	990	98%	0.0	99.11%	HM535403.1
Fusarium sp. strain HUIB01 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, ai	989	989	99%	0.0	98.94%	KX388183.1
Fusarium solani strain HHXW01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and i	989	989	99%	0.0	98.94%	KT184398.1
Fusarium solani strain QUCMBI110106 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,	988	988	100%	0.0	98.77%	KP269017.1
Fusarium sp. E8524h 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal trans	987	987	99%	0.0	98.94%	HQ117863.1
Fusarium solani isolate GS222 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	986	986	99%	0.0	98.76%	MN511337.1
Fusarium redolens strain T1ST190421511 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosoma	986	986	100%	0.0	98.77%	MN486568.1
Earliella scabrosa strain F-51 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,	986	986	100%	0.0	98.77%	MF07240.1
Earliella scabrosa strain F-43 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,	986	986	100%	0.0	98.77%	MF07239.1
Fusarium solani strain C239 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, con	986	986	98%	0.0	99.46%	KU377471.1
Fusarium lateritium isolate CBPPR0046 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed sp	986	986	98%	0.0	99.46%	KT211538.1
Trametes corrugata strain 5.61 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inte	986	986	99%	0.0	98.76%	EU661875.1

Nota: Una vez realizado el BLASTn con la base de datos del NCBI debemos relacionar todos los valores obtenidos, ya que si alguno de estos se encuentra por debajo de los 90 puntos es claro asumir que la secuencia lograda no es una secuencia artefacto o que no responda a los parámetros de búsqueda.

Discusión

Purificación directa de bandas de PCR y de gel agarosa

El objetivo de la investigación es desarrollar a escala de laboratorio una solución química que permite la unión de ADN a matrices de sílica para purificación directa de bandas de PCR y poder ensamblar un prototipo de kit que permita de forma fácil a los investigadores realizar la purificación de distintas bandas de ADN para diferentes usos en diferentes campos de aplicación.

El primer paso a realizar es establecer el tipo de agente caotrópico que se pretende utilizar para formular la solución de anclaje de ácidos nucleicos a la matriz de sílica. Los principales fabricantes sugieren el guanidinio como agente base y sus formas más utilizadas son el tiocianato, isotiocianato e Hidrocloruro de guanidinio o guanidina (Zou, 2017).

Después de realizar una comparación entre dos de las tres sales mencionadas y calcular si existe una evidencia en las medias tanto de concentración como relación de absorbancia de las muestras obtenidas utilizando una prueba ANOVA simple, determinamos que la sal que mejor nos vendría a usar es el tiocianato de guanidinio. Esto se ve corroborado por el fabricante de un kit de purificación Thermofischer en el 2020 quienes utilizan Hidrocloruro de guanidina en su solución de lavado.

La diferencia de afinidad entre el material genético y el tipo de sales que se utiliza, depende de la concentración que se emplee de cada agente en la formulación a llevarse a cabo. De acuerdo a (Vandeventer P. , 2012) la adsorción de ADN a matrices de sílica

requiere soluciones tampón con altas concentraciones de sales. Por esta razón al comparar el funcionamiento tanto del Hidrocloruro como el tiocianato de guanidina a una misma molaridad (4M) obtuvimos mejores resultados con una sal en comparación con la otra.

Uno de los pasos más importantes para lograr una buena resolución de banda al correrla en un gel de agarosa es realizar una correcta elución del producto purificado y en una cantidad óptima de agua o solución acuosa, caso contrario la banda se verá tenue o no se verá en absoluto una vez que se realice la electroforesis del amplicón en cuestión (Ying Zhou., 2018).

En los primeros ensayos que realizamos una vez escogido el agente caotrópico que nos venía mejor para nuestro proyecto y presupuesto teníamos los primeros inconvenientes al tratar de observar nuestra banda de interés en un gel de agarosa al eluir el producto purificado en 100 μ l de agua DEPC, por lo que decidimos concentrar la muestra dejándola destapada en un lugar limpio y seco a temperatura ambiente para evaporar el agua al menos hasta la mitad de la capacidad del tubo que retenía la muestra. Por su parte, Ivonne Franco en su estudio comparativo de la purificación de DNA plasmídico por cromatografía de intercambio iónico en membranas y en partículas perfusivas corrobora lo expuesto al mencionar que las sales generan fuerzas iónicas que compiten con todos los componentes que han sido adsorbidos en una columna, por lo que los componentes con la carga neta más baja serán los primeros en eluir. Después de concluir los lavados de la muestra el componente con carga neta más alta será el ADN, por lo que la elución final no necesita que sea llevada a cabo con proporciones grandes de agua para no perder la calidad de la muestra purificada.

Cuando se realiza una corrida electroforética al forzar los ácidos nucleicos, ya sea ADN o ARN a través de un gel de malla tridimensional, como lo es la agarosa a un campo

eléctrico, estos por su carga neta eléctrica migraran hacia el ánodo. La fricción causa que las moléculas de mayor tamaño recorran o migren con mayor lentitud, mientras las de menor tamaño avanzan más (Fierro, 2020).

Al correr una muestra de ADN sin haberla purificado previamente suele suceder que la muestra viene cargado con más ácidos nucleicos que migran en el gel y que no forman parte de la banda deseada, sino que son fracciones de otros orígenes que nada tienen que ver con la muestra en cuestión, incluso podemos contaminar los pocillos del gel al realizar un mal manejo de pipeteo como reutilizar una punta contaminada o incluso por una extracción defectuosa. Esto se ve corroborado por Mariela López (2014). Quien al comparar la extracción de ADN usando resina Chelex 100 obtuvo mejor rendimiento que al utilizar solventes orgánicos como el fenol que puede oxidarse y degradar las muestras de ADN causando así que la corrida electroforética presente residuos de ácidos nucleicos.

Existen situaciones en las que por la contaminación presente en el gel es necesario aislar una parte de este o cortarlo para poder purificar y observar solo la banda o amplicón de interés, por lo que se han generado varios métodos para purificar estas muestras, una de ellas es cortar un pedazo de gel con una lanceta estéril, luego diluirla en una solución con sales caotrópicas para posteriormente realizar la purificación y elución de la muestra final (Promega, 2014).

En el trabajo realizado usamos un protocolo similar al del fabricante Promega para purificar bandas de ADN a partir de gel de agarosa, pero uno de los problemas que nos encontrábamos era que al cuantificar la relación de absorbancia generada 260/230 para medir la pureza de la muestra obtenida luego de la purificación, los valores logrados se encontraban por debajo de lo que consideraríamos óptimo. Sin embargo Jorge Contreras (1993) en su investigación de comparación de métodos para purificar ADN a partir de un

gel de agarosa indica que al usar el kit de purificación GENECLEAN quedan trazas de NAI incluso después de purificar las muestras, sin embargo, la presencia de estas sales no afecta significativamente las reacciones en las cuales se puede utilizar el ADN. Por lo que pudimos continuar con la investigación e incluso enviar a secuenciar muestras sin problema alguno.

Cuando se trabaja algunas muestras que pudieron haber sido almacenadas a temperatura ambiente o se vieron afectados sus ácidos nucleicos por tratamientos que incluyan parafina o incluso por una mala extracción pueden generar secuencias artefacto, la cual consiste en la aparición de lecturas quiméricas que parece son derivadas de porciones no contiguas del genoma (Haile, 2019).

Este es un problema que suele suceder con mucha facilidad, en nuestro caso teníamos que diagnosticar si una planta tenía el virus conocido como Tobacco Mosaic Virus (TMV) por las características de la enfermedad, El primer error que encontrábamos era que al realizar la corrida electroforética se visualizaban bandas sobrelapadas que no nos interesaban para el estudio, sino solo una banda de ~420 pb. Por lo que cortábamos la banda de interés y purificábamos la misma obteniendo así una banda sola, pero al momento de secuenciar la muestra el resultado fue inconcluso y se formó una secuencia artefacto que presumimos y fue por una pobre alineación de los primers con la muestra o en su defecto como fue explicado previamente por un mal uso de almacenamiento de la muestra o un defecto al realizar la extracción Norio Tanaka (2020) también nos menciona que estas secuencias artefacto pueden bien ser solo ruido que puede ser introducido por procesos no biológicos.

Tanto el gen 16s como el Espaciador Interno de transcripción (ITS) se utilizan en secuenciaciones por ser amplicones que se utilizan para identificar y comparar bacterias u hongos presentes en una muestra. De hecho con ambos se ha establecido métodos

para comparar muestras filogenéticas y taxonómicas de microbiomas complejos (Illumina, 2018).

Para finalizar el trabajo de titulación secuenciamos un amplicón de ITS para demostrar que en la muestra se encontraba un tipo de hongo contaminando esta muestra. La purificación fue de alta calidad obteniéndose parámetros de pureza de 0,10 en relación de absorbancia 260/230 y 1,70 en absorbancia 260/280. Por lo que resolvimos que la muestra iba a arrojar resultados favorables, y así fue. Se obtuvo como resultado final que el hongo presente en la muestra es *Fusarium*. Sp y aun sin saber el origen de la muestra, gracias a la base de datos del NCBI se determinó que pertenecía a una papaya.

Conclusiones

- El uso de Tiocianato de Guanidina como agente caotrópico para la formulación de la solución de anclaje o “binding”, permitió el anclaje del 73% o más de la muestra de ADN a la columna con matriz de sílica, a diferencia del Hidrocloruro de guanidina la cual permitía el anclaje del 21% de ADN a la matriz al usarlos en una concentración igual de 4,5M cada una. Ahorrando así, reactivo y obteniendo resultados óptimos en relaciones de absorbancia o índices de pureza.
- La elución de las muestras en agua DEPC cumple un papel fundamental en la purificación de amplicones de ADN, ya que al utilizar 100 μ l de esta, la muestra pierde un 50% de concentración. Si por el contrario eluimos en 40-50 μ l de agua el resultado es de una concentración final del 70% de la concentración inicial, además su imagen en la corrida electroforética es prácticamente la misma al comparar el producto de PCR sin purificar y una vez purificado. Pero la muestra se observa sin impurezas que puedan afectar la secuenciación de la misma.
- Con el prototipo de kit de purificación elaborado no solo se pueden obtener buenas secuenciaciones, también se demostró que puede tener un potencial importante para generar marcadores de peso molecular, las bandas no se sobrelapan, corren en el gel de agarosa aun aplicando un volumen pequeño de las muestras y las bandas resultantes son de fácil observación y de tamaños específicos.
- La calidad de pureza de las muestras es óptima en la relación de absorbancia 260/280 que es la relación que mide la pureza real de la muestra, en todas las purificaciones superamos el 1,7 por lo que se concluye que tenemos una pureza óptima.
- En la relación de absorbancia 260/230 que mide la contaminación por sales se obtuvieron valores pequeños, indicativo que en efecto hay contaminación. Sin

embargo este parámetro no es de mayor importancia, ya que las sales utilizadas no interfieren en las reacciones posteriores a realizarse, sobre todo si queremos secuenciar las muestras.

- Las secuencias logradas son de buena calidad, se puede observar picos visualmente bien logrados, además que al obtener una secuencia consenso entre las corridas “forward” y “reverse”, obtenemos como respuesta el organismo que buscábamos identificar sin inconveniente alguno.
- Los kits formulados pueden ser comercializados en el país sin problema, su resolución es óptima y lo más importante que el costo no va a sobrepasar el costo de kits de purificación de casas comerciales grandes como Promega o Invitrogen, ya que no tenemos que importarlos, solo expenderlos.

Recomendaciones

- Se recomienda patentar la marca de este prototipo para su divulgación y comercialización.
- Se recomienda realizar una nueva comparación entre las dos sales caotrópicas, pero aumentando la concentración del Hidrocloruro de guanidina hasta 6,5 M para determinar si en este caso su comportamiento es o no similar.
- Se recomienda realiza geles de agarosa superiores al 2% porque la concentración lograda una vez eluidas las muestras no son muy altas, y en geles de menor concentración las muestras no suelen verse de manera óptima, o no verse en absoluto.
- Se recomienda realizar nuevamente el ensayo final para secuenciar las muestras, ya que en nuestro caso las muestras finales se regaron en el camino por un empacado deficiente y de esta manera tener más secuencias bien logradas para robustecer el estudio.
- Se recomienda una alianza entre Universidades que cuenten con la misma carrera o afines para lograr proyectos más ambiciosos y dejar el celo profesional de lado ya que el conseguir los agentes caotrópicos en el país puede ahorrar al menos uno o dos meses de tiempo al investigador hasta encontrar y traer el reactivo al país además de abaratar costos de producción.
- Se recomienda un nuevo proyecto de investigación como generar columnas de purificación con matrices de sílica o utilizando nanopartículas o elaborar un proyecto de escalado de producción de este tipo de productos biotecnológicos.

Bibliografía

- Arqué, A. B. (2003). EL IMPACTO DE LA BIOTECNOLOGÍA EN AMÉRICA LATINA. ESPACIOS DE PARTICIPACIÓN SOCIAL. *SCIELO*, 1-7.
- bancoadn. (08 de 10 de 2016). *BANCO NACIONAL DE ADN CARLOS III*. Obtenido de Programa Control de Calidad de Muestras: <http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>
- Barría, C. (26 de 04 de 2020). *BBC*. Obtenido de News Mundo : <https://www.bbc.com/mundo/noticias-48193736>
- Berensmier, S. (2006). Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology Biotechnology*, 495-504.
- Boom, C. (1990). Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 495-503.
- Comercio, E. (03 de 08 de 2019). Ecuador participa en investigación que puede reducir consumo mundial de carne. *El Comercio*, págs. 12-17.
- Contreras, J. (1993). COMPARACION DE METODOS PARA LA RECUPERACION DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA. *Biomédica*, 1-5.
- Dhaliwal, A. (2013). Extracción y purificación de ADN. *Mater Methods*, 1-19.
- Eisik, M. F. (2018). *DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE UN KIT DE BIOLOGÍA MOLECULAR. DIFUSIÓN DE LAS CIENCIAS BIOLÓGICAS EN LA ENSEÑANZA MEDIA*. Argentina: UADE.
- ENGOV. (2015). El reenfoque de la biotecnología en el Ecuador: influencia y visión de un nuevo grupo de poder. *Policy Brief*, 1-8.

- Farinango, A. (2018). *El uso de la biotecnología aplicada a la agricultura en el Ecuador y su regulación dentro del marco jurídico*. Quito: Facultad de Jurisprudencia, Ciencias Políticas y Sociales. UCE.
- Fierro, F. F. (07 de 09 de 2020). *Electroforesis de ADN*. Obtenido de inecc: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/electroforesis.pdf>
- Franco, I. (2015). *Estudio comparativo de la purificación de DNA plasmídico por cromatografía de intercambio iónico en membranas y en partículas perfusivas*. Sonora: Universidad de Sonora.
- Haile, S. (2019). Sources of erroneous sequences and artifact chimeric reads in next generation sequencing of genomic DNA from formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Nucleic Acids Research*, 1-10.
- Hengen, P. (1997). Methods and reagents. Protectin vector DNA from UV light. *Trends Biochem. Sci*, 3-128.
- Hourfar, M. (2005). High-throughput purification of viral RNA based on novel aqueous chemistry for nucleic acid isolation. *Clinical Chemistry*, 1217-1222.
- Illumina. (25 de 09 de 2018). *Illumina*. Obtenido de Microbial Genomics: [Illumina.com/areas-of-interest/microbiology/microbial-sequencing-methods/16s-rna-sequencing.html](https://www.illumina.com/areas-of-interest/microbiology/microbial-sequencing-methods/16s-rna-sequencing.html)
- Jasbeer, K. (2009). Real -time PCR evaluation of seven extraction methods for the purpose of GMO analysis. *International Food Research Journal*, 329-341.
- Lorenz, M. (1987). Adsorption of Dna to sand and Variable Degradation Rates of Adsorbed Dna. *Applied Environmental Microbiology*, 2948-2952.

- Margarit, E. (2006). Detection of Bt transgenic maize in foodstuffs. *Food Research International*, 250-265.
- Mariela López., R. M. (2014). COMPARACIÓN DE DOS PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN DE *Trypanosoma cruzi* CULTIVADOS EN MEDIO AXÉNICO. *Scielo* , 1-6.
- McBurney, M. (1972). Biochemistry and Biophysics. *Nature*, 898-904.
- Melzak, K., Sherwood, C., & al., e. (1996). Driving Forces for DNA adsorption to Silica in perchlorate Solutions. *J. Colloid Interface Sci*, 635-644.
- Núñez, C. (2016). Diseño de soluciones químicas para la extracción de ácido desoxirribonucleico en productos biotecnológicos. *UGCiencia*, 37-44.
- Petes, T. F. (1972). Biochemistry. *Procedure Natural Academy*, 1188-1191.
- Promega. (12 de 02 de 2014). *Promega*. Obtenido de Wizard sv gel & PCR clean-up system : www.promega.com/protocols/Wizard%20SV%20Gel%20and%20PCR%20Clean-Up%20System%20TB308
- Quiala, E. (2008). Estandarización de un protocolo de obtención de ADN genómico para la cuantificación de 5mC en brotes epicórmicos de *Tectona grandis* L. *Biotecnología Vegetal*, 50-60. Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/335>
- RAFI. (25 de 04 de 2001). *etcgroup*. Obtenido de Biopiratería: <http://www.etcgroup.org>
- Rodicio, M. M. (2016). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *ELSEVIER*, 1-8.

- Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers –just a matter of fashion? .
Nature Reviews, 63-69.
- SENESCYT. (08 de 01 de 2015). *Algo sobre biotecnología*. Obtenido de La Biotecnología en el Ecuador: <https://algosobrebiotech.wordpress.com/2015/01/08/la-biotecnologia-en-el-ecuador/>
- Tanaka, N. (2020). Sequencing artifacts derived from a library preparation method using enzymatic fragmentation. *PLOS ONE*, 1-14.
- Thermofischer. (02 de 04 de 2020). *fisher scientific*. Obtenido de fisher scientific: <https://www.fishersci.es/es/es/products/I9C8L0I2/protein-denaturants-chaotropes.html>
- Travagliani, E. (1974). Methods for the extraction and Purification of Deoxyribonucleic Acids from Eukaryote Cells. En E. Travagliani, *Cancer an Medical Sciences* (págs. 100-123). Philadelphia: Fox Chase Center.
- Vandeventer, P. (2012). Multiphasic DNA Adsorption to Silica Surfaces under Varying Buffer, pH, and Ionic Strength Conditions. *The Journal of Physical Chemistry*, 5661-5670.
- Vandeventer, P. (2013). DNA Adsorption to and Elution from Silica Surfaces: Influence of Amino Acid Buffers. *The Journal of physical chemistry*, 1-8.
- Velázquez, L. (2010). *Extracción y Purificación de ADN*. Estado de México: Unidad de Biotecnología y Prototipos. Universidad Autónoma de México.
- Ying Zhou., Z. W. (2018). Rapid Regeneration and Reuse of Silica Columns from PCR Purification and Gel Extraction Kits. *Scientific Reports*, 1-11.

Zou, Y. M. (2017). Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds. *PLoS biology*, 1-22.

Anexos