



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

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: DETECCIÓN FLUOROGÉNICA DE VIRUS VEGETALES
USANDO AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS
DEPENDIENTE DE HELICASA CON SELF-QUENCHED PRIMERS**

AUTOR: MOLINA CÁRDENAS, SANTIAGO GABRIEL

DIRECTOR: Ph. D. FLORES, FRANCISCO

SANGOLQUÍ

2015

LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "SANTIAGO", is written over a horizontal line.

Santiago Gabriel Molina Cárdenas

COORDINADOR DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "MARIA AUGUSTA", is written over a horizontal line.

Dra. María Augusta Chávez

Lugar y fecha: Sangolquí, 22 de Septiembre de 2015

CERTIFICACIÓN

Ph. D. Francisco Flores

Certifica:

Que el trabajo titulado “Detección Fluorogénica de Virus Vegetales usando Amplificación de Ácidos Nucleicos Dependiente de Helicasa con Self-Quenched Primers”, realizado por Santiago Gabriel Molina Cárdenas, ha sido guiado, revisado y cumple normas estatutarias establecidas por la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE en el Reglamento de Estudiantes.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Se autoriza a Santiago Gabriel Molina Cárdenas que lo entregue a la Dra. María Augusta Chávez, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, Agosto de 2015

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Francisco Flores', is written over a horizontal line.

Ph. D. Francisco Flores

DIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Santiago Gabriel Molina Cárdenas

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “Detección Fluorogénica de Virus Vegetales usando Amplificación de Ácidos Nucleicos Dependiente de Helicasa con Self-Quenched Primers”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, Agosto de 2015



Santiago Gabriel Molina Cárdenas

AUTORIZACIÓN

Yo, Santiago Gabriel Molina Cárdenas

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE la publicación en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “Detección Fluorogénica de Virus Vegetales usando Amplificación de Ácidos Nucleicos Dependiente de Helicasa con Self-Quenched Primers”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Agosto de 2015



Santiago Gabriel Molina Cárdenas

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación va dedicado a toda mi familia. A mis padres Raúl Molina y Mariana Cárdenas por brindarme su apoyo y ser una guía a lo largo de toda mi vida. A mis hermanos Ivón y Jefferson Molina por compartir junto a mí grandes e importantes momentos. Y finalmente a mi sobrina Camila Haro, quien siempre me ha regalado felicidad y alegría.

Santiago Gabriel Molina Cárdenas

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial al Dr. Francisco Ochoa Corona, quien fue mentor, tutor y amigo, permitiendo el desarrollo del presente trabajo de investigación. Le agradezco además por compartir conmigo su conocimiento y experiencia como científico, lo cual me ayudó en gran medida en el impulso de nuevas habilidades académicas, científicas y personales.

De igual manera agradezco a la M. Sc. Alma Koch y a la Dra. Carla Garzón, responsables del acuerdo entre la Universidad Estatal de Oklahoma y la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, quienes han brindado la oportunidad para la realización de importantes proyectos beneficiosos para ambas instituciones.

También, no puedo dejar de agradecer a todos los docentes, amigos e investigadores del Departamento de Entomología y Fitopatología y del Instituto Nacional de Microbiología Forense y de Bioseguridad Agrícola y Alimentaria (NIMFFAB) de la Universidad Estatal de Oklahoma.

Finalmente agradezco al Dr. Francisco Flores por ayudarme en el proceso de redacción y estructuración de la tesis.

Santiago Gabriel Molina Cárdenas

ÍNDICE DE CONTENIDOS

LEGALIZACIÓN DE FIRMAS.....	II
CERTIFICACIÓN.....	III
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	IV
AUTORIZACIÓN.....	V
DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTOS	VII
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIV
RESUMEN.....	XVIII
ABSTRACT	XIX
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema	1
1.2. Justificación del problema.....	2
1.3. Objetivos	4
1.3.1. Objetivo general.....	4
1.3.2. Objetivos específicos	4
1.4. Marco teórico.....	5
1.4.1. Patógenos Modelo	5
1.4.1.1. <i>Rose rosette virus</i>	5
1.4.1.2. High plains virus.....	5

1.4.1.3. <i>Hosta virus X</i>	5
1.4.2. Técnicas de Amplificación Isotérmica	6
1.4.2.1. Amplificación Dependiente de Helicasa (HDA).....	8
1.4.3. Técnicas de Detección de ADN Amplificado Basadas en Fluorescencia.....	9
1.4.3.1. Self-Quenched Primers	10
1.5. Hipótesis	11
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1. Participantes	12
2.2. Zona de estudio.....	12
2.3. Período de tiempo de investigación	12
2.4. Procedimientos	13
2.4.1. Diseño de self-quenched primers para tHDA.....	13
2.4.2. Muestras para el estudio	15
2.4.3. Extracción de ARN total de plantas infectadas.....	15
2.4.4. Síntesis de ADN complementario (ADNc)	16
2.4.5. Gradiente de temperatura usando tHDA	16
2.4.6. Prueba de referencia usando reacción en cadena de polimerasa (PCR)	17
2.4.7. Tratamientos para contrarrestar la inhibición de la amplificación de las muestras de RRV	18
2.4.7.1. Amplificación de muestras de RRV usando mejoradores	18
2.4.7.1.1. Amplificación dependiente de helicasa termofílica para RRV usando mejoradores	18
2.4.7.1.2. Prueba de referencia PCR para RRV usando mejoradores	19

2.4.7.2. Precipitación de ADNc de RRV	20
2.4.8. Clonación de productos de amplificación	21
2.4.9. Extracción y purificación de ADN plasmídico de las células transformadas	21
2.4.10. Optimización de concentraciones de primer y sulfato de magnesio para tHDA	21
2.4.11. Ensayo de sensibilidad	24
2.4.12. Detección de ácidos nucleicos mediante electroforesis en gel de agarosa	25
2.5. Análisis de datos	25
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	26
3.1. Diseño de self-quenched primers para tHDA	26
3.1.1. Estructuras secundarias de los self-quenched primers	28
3.1.2. Estructuras secundarias de los productos de amplificación	30
3.1.3. Análisis de especificidad <i>in silico</i>	31
3.2. Tratamientos para contrarrestar la inhibición de la amplificación de las muestras de RRV	32
3.3. Gradiente de temperatura usando tHDA	34
3.4. Clonación de productos de amplificación	35
3.5. Optimización de concentraciones de primers y sulfato de magnesio para tHDA	38
3.6. Ensayo de sensibilidad	41
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	48
4.1. Diseño de self-quenched primers para tHDA	48

4.2. Inhibición de la amplificación de las muestras de RRV	49
4.3. Gradiente de temperatura.....	50
4.4. Optimización de concentraciones de primers y sulfato de magnesio	51
4.5. Sensibilidad de la técnica de tHDA con self-quenched primers	52
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	55
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	57
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Principales características de las técnicas de amplificación isotérmicas de ácidos nucleicos.....	7
Tabla 2: Parámetros de diseño de primers para amplificación dependiente de helicasa termofílica.....	14
Tabla 3: Tratamientos del ensayo de optimización de concentraciones de primers y MgSO ₄ para amplificación dependiente de helicasa termofílica.....	22
Tabla 4: Características termodinámicas de los primers, secuencias diana y productos de amplificación diseñados para amplificación dependiente de helicasa termofílica. En la secuencia de los primers se muestra en mayúsculas la parte de la secuencia que es complementaria a la molécula diana de ADNc, en minúsculas se muestra la extensión del extremo 5' del primer self-quenched que permite que el oligonucleótido forme una estructura cerrada, en negrita se muestra la nucleobase a la cual se marcó con el fluoróforo fluoresceína, por último, con mayúsculas y en itálica se muestra una secuencia no complementaria añadida por Arif <i>et al.</i> (2014) al primer HPV 6F.LF para que funcione en el esquema de amplificación dependiente de helicasa termofílica.....	26
Tabla 5: Resultados de secuenciación de los productos de amplificación de PCR de las colonias de <i>E. coli</i> transformadas y análisis de alineamiento mediante la interface en línea BLASTn.....	37

Tabla 6: Media y coeficiente de variación de los resultados de ciclo umbral (Ct) de la detección de fluorescencia cuantitativa en tiempo real del ensayo de sensibilidad de 10 ng a 10 fg de ADN plasmídico de RRV, HPV y HVX usando amplificación dependiente de helicasa termofílica con self-quenched primers. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento.....	43
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Proceso de reacción de amplificación dependiente de helicasa.....	9
Figura 2:	Proceso de funcionamiento de los self-quenched primers.....	11
Figura 3:	Estructuras secundarias representativas que forman a 25°C (izquierda) y a 65°C (derecha) los self-quenched primers. (A) RRV 2R-SQ. (B) HPV 4R-SQ. (C) HVX 1R-SQ. (D) HVX 2R-SQ. (E) HVX 3R-SQ. (F) HVX 4R-SQ.....	29
Figura 4:	Estructuras secundarias representativas que forman a 65° los productos de amplificación de los primers diseñados con sus respectivas temperaturas de melting (T _m). (A) RRV 2F-HDA / RRV 2R-SQ. (B) HPV 6F.LF / HPV 4R-SQ. (C) HVX 1F-HDA / HVX 1R-SQ. (D) HVX 2F / HVX 2R-SQ. (E) HVX 3F / HVX 3R-SQ. (F) HVX 4F / HVX 4R-SQ.....	30
Figura 5:	Electroforesis en gel de agarosa al 2% de tratamientos para solucionar la inhibición de la amplificación de muestras de RRV. La muestras R1, R2 y R3 corresponden a 2, 4 y 6 µL de ADNc sin precipitar usando albúmina sérica bovina y polivinilpirrolidona en la reacción de amplificación dependiente de helicasa termofílica, con su respectivo control negativo NTC. La muestra PR corresponde a la reacción de PCR usando ADNc sin precipitar más albúmina sérica bovina y polivinilpirrolidona, con su control negativo PR-N. Las muestras R1P, R2P y R3P corresponden a 2, 4 y 6 µL de ADNc precipitado usando la reacción normal de amplificación dependiente de helicasa termofílica, con su	

- respectivo control negativo NTC-P. La muestra PRP corresponde a la reacción normal de PCR usando ADNc precipitado, con su control negativo PRP-N..... 33
- Figura 6:** Electroforesis en gel de agarosa al 2% del gradiente de temperatura de 60 a 70°C usando reacción de amplificación dependiente de helicasa termofílica con los seis pares de primers diseñados y su respectivo control negativo (NTC). Las muestras PR (muestra con ADNc) y PR-N (control negativo) pertenecen a la reacción de PCR usada como prueba de referencia. Los rectángulos blancos encierran las bandas correspondientes al rango de temperatura en el que se evidenció amplificación con el par de primers seleccionado para cada virus..... 34
- Figura 7:** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación de PCR de las colonias de *E. coli* transformadas..... 36
- Figura 8:** Detección de fluorescencia en tiempo real del ensayo de optimización de primers y sulfato de magnesio para amplificación dependiente de helicasa termofílica. El eje X representa el número de ciclos (en el presente caso por tratarse de una reacción isotérmica cada ciclo representa un minuto transcurrido). El eje Y representa la fluorescencia normalizada. Los tratamientos P1-4 corresponden a las reacciones a las que se les añadió el ADNc de cada virus, los tratamientos N1-4 corresponden a los controles negativos. (A) RRV 2F-HDA / RRV 2R-SQ. (B) HPV 6F.LF / HPV 4R-SQ. (C) HVX 4F / HVX 4R-SQ..... 38
- Figura 9:** Escaneo de fluorescencia post amplificación (absorción: 488 nm, emisión: 520 nM, fluoróforo: fluoresceína) y electroforesis en gel

de agarosa al 2% del ensayo de optimización de concentraciones de primers y sulfato de magnesio de RRV, HPV y HVX para amplificación dependiente de helicasa termofílica. El primer tubo de cada columna (color gris claro) corresponde al blanco, e indica el tono de color correspondiente a la cantidad fluorescencia en una reacción en la que no se ha producido amplificación. Un tono de color más oscuro que el del blanco denota incremento de fluorescencia debido a la amplificación de ácidos nucleicos..... 40

Figura 10: Detección de fluorescencia cuantitativa en tiempo real del ensayo de sensibilidad de 10 ng a 10 fg de ADN plasmídico usando amplificación dependiente de helicasa termofílica con self-quenched primers. El eje X representa el número de ciclos (en el presente caso por tratarse de una reacción isotérmica cada ciclo representa un minuto transcurrido). El eje Y representa la fluorescencia normalizada. (A) RRV 2F-HDA / RRV 2R-SQ. (B) HPV 6F.LF / HPV 4R-SQ. (C) HVX 4F / HVX 4R-SQ..... 42

Figura 11: Curva de estandarización y valores estadísticos asociados (R^2 , coeficiente de correlación) del ensayo de sensibilidad de 10 ng a 10 fg de ADN plasmídico de RRV, HPV y HVX usando amplificación dependiente de helicasa termofílica con self-quenched primers. El eje X representa el logaritmo en base 10 de la concentración inicial de ADN plasmídico. El eje Y representa los valores del ciclo umbral (Ct)..... 44

Figura 12: Escaneo de fluorescencia post amplificación (absorción: 488 nm, emisión: 520 nM, fluoróforo: fluoresceína) y electroforesis en gel de agarosa al 2% del ensayo de ensayo de sensibilidad de 10 ng a 10 fg de ADN plasmídico de RRV, HPV y HVX usando

amplificación dependiente de helicasa termofílica con self-quenched primers (tHDA). El primer tubo de cada columna (color gris) corresponde al blanco, e indica el tono de color correspondiente a la cantidad fluorescencia en una reacción en la que no se ha producido amplificación. Un tono de color más oscuro que el del blanco denota incremento de fluorescencia debido a la amplificación de ácidos nucleicos..... 46

RESUMEN

La detección adecuada de virus vegetales permite controlar la dispersión de enfermedades, establecer medidas de prevención y reducir las pérdidas económicas. El diagnóstico mediante amplificación de ácidos nucleicos es reconocido por su alta sensibilidad y especificidad. La amplificación dependiente de helicasa termofílica (tHDA) es una técnica de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que no requiere ciclos de temperatura, ya que realiza la separación de la doble cadena de ADN usando la enzima helicasa. En la presente investigación se desarrolló un método de detección de ácidos nucleicos basado en fluorescencia para diagnosticar los virus vegetales RRV, HPV y HVX usando tHDA con self-quenched primers. En primer lugar, se diseñaron seis parejas de primers de acuerdo a los parámetros de diseño de tHDA y self-quenched primers. En segundo lugar, se realizó un gradiente de temperatura de 60 a 70°C. En tercer lugar, se optimizó la reacción evaluando las concentraciones de primers 0.15 y 0.2 μM y de MgSO_4 4 y 4.5 mM. Por último, se determinó la sensibilidad de la técnica mediante medición cuantitativa de fluorescencia en tiempo real y electroforesis en gel de agarosa al 2% obteniendo un límite de detección de 0.0001 ng de ADN plasmídico con las secuencias diana de RRV y HPV. No hubo amplificación con ninguno de los primers de HVX, lo que se atribuye a un mayor contenido de G-C en los productos de amplificación. Los resultados del estudio muestran que los self-quenched primers pueden ser usados en tHDA para una detección sensible de virus vegetales.

Palabras clave: AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA, DISEÑO DE PRIMERS, VIRUS VEGETALES.

ABSTRACT

Proper plant virus detection allows to control disease spread, to establish measures of prevention, and to reduce economic losses. The diagnostic through nucleic acid amplification is recognized for its high sensitivity and specificity. Thermophilic helicase dependent amplification (tHDA) is an isothermal nucleic acids amplification technique that does not require temperature cycling because it separates the double stranded DNA by using the helicase enzyme. For this research, a fluorescence based nucleic acids detection method was developed in order to diagnose the plant viruses RRV, HPV and HVX by using tHDA with self-quenched primers. First, six primer pairs were designed according to tHDA and self-quenched primer design parameters. Second, a temperature gradient from 60 to 70°C was performed. Third, the reaction was optimized by assessing primer concentrations of 0.15 and 0.2 μM and MgSO_4 concentrations of 4 and 4.5 mM. Finally, the sensitivity of the technique was determined through quantitative real time fluorescence measurements and 2% agarose gel electrophoresis, getting a detection limit of 0.0001 ng of plasmid DNA with the target sequences of RRV and HPV. There was no amplification with any of the HVX primers, which is attributed to a higher G-C content of its amplification products. The study results show that self-quenched primers can be used in tHDA for a sensitive detection of plant viruses.

Key words: ISOTHERMAL AMPLIFICATION, PRIMER DESIGN, PLANT VIRUS.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

Los vegetales son comúnmente infectados por un amplio rango de virus que se caracterizan por causar pérdidas en la cantidad y calidad de los cultivos, hecho que a su vez conlleva un impacto económico y social (Cann, 2005; Gergerich & Dolja, 2006).

Rose rosette virus (RRV) es el agente causal de la enfermedad de la roseta de la rosa (Rose rosette disease, RRD) cuyo vector de transmisión es el ácaro eriófido *Phyllocoptes fructiphilus*. La enfermedad ha sido reportada en Canadá y Estados Unidos de Norte América (EE. UU). Los efectos de RRD incluyen crecimiento excesivo de brotes laterales, proliferación de hojas, malformaciones, patrones de mosaico, pigmentación roja, excesiva producción de espinas y eventualmente la muerte de la planta (Laney, Keller, Martin & Tzanetakis, 2011; Rohozinski, Epstein & Hill, 2001). Los huéspedes de RRV son un amplio rango de especies híbridas y silvestres de rosa. La especie silvestre *Rosa multiflora* es altamente susceptible a RRD y representa un foco de infección para las especies de interés comercial (Mielke & Mühlbach, 2012). Debido a su potencial letalidad y capacidad de dispersión, RRD es motivo de preocupación en la industria de viveros (Hong, Hansen & Day, 2012).

High plains virus (HPV) es el causante de la enfermedad del altiplano (High plains disease, HPD), la cual fue descubierta por primera vez en 1993 afectando cultivos de maíz y trigo en Texas, Kansas, Idaho, Colorado, Nebraska y Utah en EE. UU. Se conoce de reportes de la presencia de la enfermedad en Chile, Brasil, Israel y posiblemente en China y Australia (Arif, Aguilar-Moreno, Wayadande, Fletcher & Ochoa-Corona, 2014). Los efectos de la enfermedad son: manchas, clorosis, necrosis, retraso del crecimiento y muerte de la planta. Se debe tener en cuenta que los síntomas dependen del tiempo de infección, genotipo de la planta y condiciones ambientales (Lebas, Ochoa-Corona, Elliott,

Tang & Alexander, 2005). Siendo EE. UU. uno de los principales productores de maíz y trigo a nivel mundial, HPD causa serios daños en la economía del país (Mielke & Mühlbach, 2012).

Hosta virus X (HVX) es un virus que infecta exclusivamente a *Hosta* spp., plantas herbáceas ornamentales perennes que se encuentran entre las más comercializadas para jardinería en EE. UU. La caracterización de HVX se realizó por primera vez en 1996 en Minnesota, EE. UU. La presencia de HVX ha sido reportada también en Canadá, Holanda, Corea del Sur y China. Actualmente, debido al comercio internacional de plantas hosta el riesgo de transmisión de HVX se ha incrementado (De La Torre, 2009; Wei, Zhang, Li, Ma & Li, 2013). No existe un vector conocido para HVX, por lo que el principal medio de transmisión es mediante propagación vegetativa de plantas infectadas; además se ha demostrado que se puede transmitir a través de semillas y mediante métodos mecánicos, como cortes con herramientas de poda. Los síntomas causados por la infección de HVX varían de acuerdo a la variedad cultivada, e incluyen retraso en el crecimiento, distorsión de las hojas, patrones de mosaico, moteado, puntos, e inclusive la muerte de la planta (Lewandowski, 2008).

1.2. Justificación del problema

La detección de los virus vegetales en las etapas iniciales de la infección resulta crucial para controlar la dispersión de la enfermedad y reducir las pérdidas económicas. Al contar con un método de diagnóstico adecuado se pueden establecer medidas de prevención y manejo para las enfermedades virales (Punja, De Boer & Sanfacon, 2007). Las técnicas de diagnóstico basadas en ácidos nucleicos son ampliamente reconocidas por su sensibilidad y especificidad, y su uso en laboratorios de fitopatología se ha ido incrementado en los últimos años. Sin embargo su implementación muchas veces implica retos, como la adquisición equipos tecnológicos con costos elevados (Vincelli & Tisserat, 2008).

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) es uno de los métodos de amplificación de ácidos nucleicos más utilizados, sin embargo requiere de un termociclador, hecho que imposibilita su uso en muchos laboratorios. Ventajosamente se han venido creando una serie de métodos de amplificación isotérmica, los cuales trabajan a una sola temperatura y no requieren de procesos de termociclado (Gill & Ghaemi, 2008). De entre ellos, la amplificación dependiente de helicasa (Helicase Dependent Amplification, HDA) destaca por su esquema de reacción simple, similar al de PCR. La técnica de HDA amplifica una secuencia diana que es flanqueada por un par de oligonucleótidos específicos, pero, en lugar de separar la doble cadena de ADN con calor, usa la enzima helicasa (Motré, Li & Kong, 2008).

Los diversos estudios realizados con HDA han demostrado que es una técnica versátil que puede ser compatible con distintos métodos de detección como electroforesis en gel de agarosa, fluorescencia y cambio de color (Doseeva *et al.*, 2011). Citando algunos ejemplos Gill, Alvandi, Abdul-Tehrani & Sadeghizadeh (2008) desarrollaron un método de diagnóstico colorimétrico usando HDA con sondas y nanopartículas de oro para la detección de *Helicobacter pylori*. Tong, Tang, Kim, Pan, Ranalli & Kong (2008) realizaron ensayos de detección de organismos de riesgo biológico usando sondas TaqMan y HDA en tiempo real. De igual forma, en base a HDA se han desarrollado dispositivos desechables para la detección de patógenos humanos como *Staphylococcus aureus* o *Herpes simplex virus* (Goldmeyer *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011).

Por su parte, los métodos de detección de ácidos nucleicos han ido evolucionando desde los análisis en geles que requieren tiempo adicional y preparación de la muestra después de la amplificación, hasta los métodos basados en fluorescencia, los cuales se pueden examinar en un formato de tubo cerrado y en tiempo real (Nazarenko, 2006). Los self-quenched primers son un método de detección fluorogénico que se fundamenta en un oligonucleótido marcado con un fluoróforo, el cual tiene la propiedad de incrementar o disminuir su fluorescencia en función de cambios en la estructura del oligonucleótido (Kusser, 2006).

En el contexto de la detección basada en fluorescencia de ácidos nucleicos los self-quenched primers representan una alternativa rentable, puesto que en un solo oligonucleótido tenemos la sonda de hibridación y el primer sentido o antisentido (Nazarenko, Pires, Lowe, Obaidy & Rashtchian, 2002a). Además su costo es inferior al de otros métodos similares. Por ejemplo, los self-quenched primers tienen una especificidad y sensibilidad comparable al de las sondas TaqMan, pero su precio es de aproximadamente la mitad (Invitrogen Corporation, 2002).

Tomando en cuenta la necesidad de desarrollo de métodos de diagnóstico para virus vegetales que puedan brindar una detección efectiva y con costos razonables, en el presente proyecto de tesis se plantea fusionar la amplificación dependiente de helicasa con self-quenched primers, de modo que se obtengan los beneficios de ambas técnicas, entre ellos: sensibilidad, especificidad, rapidez, simplicidad y economía, siendo todas características necesarias en el desarrollo de una técnica de detección robusta que pueda aplicarse tanto en el trabajo laboratorio como en el de campo.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Desarrollar un método de detección fluorogénica para virus vegetales usando amplificación isotérmica de ácidos nucleicos dependiente de helicasa con self-quenched primers.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar las características termodinámicas de los self-quenched primers diseñados para amplificación dependiente de helicasa termofílica.
- Optimizar las concentraciones de primers y de sulfato de magnesio en la reacción.
- Realizar un ensayo de sensibilidad de la técnica.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Patógenos Modelo

1.4.1.1. *Rose rosette virus*

Rose rosette virus es un virus de ARN segmentado de sentido negativo y cadena simple, con viriones esféricos envueltos de 120 a 150 nm. *Rose rosette virus* pertenece al género *Emaravirus*, el cual aún no ha sido asignado a una familia ni a un orden. El genoma de RRV presenta cuatro segmentos de ARN. El ARN 1 tiene un tamaño de 7026 nucleótidos y codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN. El ARN 2 tiene 2245 nucleótidos y codifica un precursor de glicoproteína. El ARN 3 tiene 1544 nucleótidos y codifica la proteína de la nucleocápside. El ARN 4 está formado por 1541 nucleótidos y codifica una proteína de 41 kDa cuya función es desconocida (Laney *et al.*, 2011).

1.4.1.2. High plains virus

High plains virus, denominado también como Maize red stripe virus y Wheat mosaic virus es un posible miembro del género *Emaravirus*, que aún no ha sido reconocido por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). High plains virus comparte ciertas características con los *Emaravirus*, posee viriones esféricos envueltos de 150 a 200 nm, es transmitido por el ácaro *Aceria tosichella* y causa síntomas de mosaico (She, Seifers, Haber, Ens & Standing, 2004). A pesar que el genoma de HPV no está completamente caracterizado, estudios realizados mediante hibridación Northern blot con sondas en sentido y antisentido demostraron que el ARN de HPV es de polaridad negativa, otro aspecto en común con los *Emaravirus* (Mielke & Mühlbach, 2012).

1.4.1.3. *Hosta virus X*

Hosta virus X pertenece al género *Potexvirus*, familia *Alphaflexiviridae*, orden *Tymovirales* (ICTV, 2014). *Hosta virus X* posee viriones filamentosos, no envueltos, su genoma está compuesto por una cadena simple de ARN de sentido positivo de 6528

nucleótidos que codifica cinco marcos de lectura abiertos (Open reading frame, ORF). El ORF más cercano al extremo 5' codifica una proteína replicasa de 167 kDa, los tres siguientes ORFs codifican proteínas de 26, 13 y 8 kDa que tienen homología con el bloque de tres genes (Triple gen block, TGB) de los *Potexvirus* y presentan funciones de movimiento. El ORF más próximo al extremo 3' codifica la proteína de la cápside de 23 kDa (Swiss Institute of Bioinformatics, 2008; De La Torre, Qu, Redinbaugh & Lewandowski, 2012).

1.4.2. Técnicas de Amplificación Isotérmica

Las técnicas de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos se caracterizan por trabajar a temperatura constante, es decir no requieren ciclos de temperatura. Los avances en el entendimiento de la síntesis de ácidos nucleicos *in vivo* han contribuido en el desarrollo de las técnicas de amplificación isotérmicas, de tal manera se ha tratado de biomimetizar dicho proceso mediante el uso de enzimas y proteínas accesorias (Barreda, 2013). Existen varios métodos de amplificación isotérmicos, como: amplificación mediada por bucles (Loop-mediated amplification, LAMP), amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (Nucleic acid sequence-based amplification, NASBA), amplificación dependiente de helicasa termofílica (Thermophilic helicase-dependent amplification, tHDA), amplificación de polimerasa recombinasa (Recombinase polymerase amplification, RPA), amplificación de desplazamiento de cadena (Strand displacement amplification, SDA), etc. (Yan *et al.*, 2014). La tabla 1 detalla las principales características de algunos métodos de amplificación isotérmicos.

Tabla 1: Principales características de las técnicas de amplificación isotérmicas de ácidos nucleicos.

Características	LAMP	NASBA	tHDA	RPA	SDA
Principio	Desplazamiento termofílico de la polimerasa a través de la cadena	Transcripción inversa y desplazamiento termofílico de la polimerasa a través de la cadena	Helicasa y desplazamiento termofílico de la polimerasa a través de la cadena	Complejo recombinasa - polimerasa	Desplazamiento termofílico de la polimerasa a través de la cadena
Procesamiento de muestras antes de la amplificación	La amplificación es posible a partir de muestras crudas	Requiere extracción de ácidos nucleicos	La amplificación es posible a partir de muestras crudas	Requiere extracción de ácidos nucleicos	La amplificación es posible a partir de muestras crudas
Componentes de la reacción	4 primers, ADN polimerasa, dNTP ^a	2 primers, transcriptasa inversa, ribonucleasa H, ARN polimerasa, dNTP ^a , rNTP ^b	2 primers, helicasa, ADN polimerasa, dNTP ^a	2 primers, recombinasa, proteínas de unión a cadena simple de ADN, ADN polimerasa, dNTP ^a , endonucleasa de restricción IV (nfo)	4 primers, ADN polimerasa, endonucleasa de restricción HincII, dGTP ^c , dCTP ^d , dTTP ^e , dATP ^f
Temperatura de trabajo	65°C	41°C	60 – 65°C	37°C	40°C
Tiempo de amplificación	30–60 min	~2 h	~60 min	~60 min	30–60 min
Detección post-amplificación	A simple vista, medición de turbidez y electroforesis	Fluorescencia	Electroforesis, fluorescencia y banda de flujo lateral	Electroforesis y fluorescencia	Electroforesis y fluorescencia
Sensibilidad	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Especificidad	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Complejidad de diseño	Diseño de primers y optimización complejos	Diseño de primers y optimización complejos	Diseño de primers y optimización complejos	Diseño de primers y optimización complejos	Diseño de primers y optimización complejos
Facilidad de operación	Relativamente más fácil de realizar que PCR	Relativamente más fácil de realizar que PCR	Relativamente más fácil de realizar que PCR	Relativamente más fácil de realizar que PCR	Relativamente más fácil de realizar que PCR
Entrenamiento requerido	Moderado	Alto	Moderado	Moderado	Moderado
Estabilidad de reactivos	Cadena de frío requerida para enzimas	Cadena de frío requerida para enzimas	Cadena de frío requerida para enzimas	Reactivos disponibles como pellets deshidratados	Cadena de frío requerida para enzimas
Instrumentación requerida	Bloque de calentamiento o baño de agua	Termociclador de tiempo real	Termociclador de tiempo real, bloque de calentamiento o baño de agua	Termociclador de tiempo real, bloque de calentamiento o baño de agua	Termociclador de tiempo real, bloque de calentamiento o baño de agua

CONTINÚA →

Probado en el campo	Si	Si	Si	No	No
Inventor del producto	Eiken Group, Japón	Cangene Corporation, Canadá	Biohelix Corporation, EE. UU.	TwistDx, EE. UU.	Becton Dickinson and Co., EE. UU.

Fuente: Oriero, Jacobs, Van Geertruyden, Nwakanma & D'Alessandro (2015); Yan *et al.* (2014).

^a Desoxinucleótidos trifosfato.

^b Ribonucleótidos trifosfato.

^c Desoxiguanosina trifosfato.

^d Desoxicitidina trifosfato.

^e Desoxitimidina trifosfato.

^f Desoxiadenosina 5'-[α -thio] trifosfato.

1.4.2.1. Amplificación Dependiente de Helicasa (HDA)

La amplificación dependiente de helicasa es una técnica de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que se basa en la separación de la doble cadena de ADN mediante el uso de la enzima helicasa para su posterior extensión mediante una ADN polimerasa (Gill & Ghaemi, 2008).

El proceso de amplificación inicia con la enzima helicasa, que en presencia de desoxiadenosina trifosfato (dATP) como cofactor, se desplaza a través de la doble cadena de la molécula diana de ADN rompiendo los puentes de hidrógeno que unen las hebras y formando ADN de cadena simple. Luego, las hebras disociadas son recubiertas por proteínas de unión a cadena simple de ADN (Single-stranded DNA binding proteins, SSB) que impiden que las hebras separadas se vuelvan a reasociar. Seguidamente, los primers en sentido y antisentido se hibridan específicamente con las cadenas de ADN separadas. Por último la ADN polimerasa extiende la secuencia de nucleótidos complementariamente a la secuencia molde usando los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) que se encuentran en el medio. El proceso se repite logrando una amplificación exponencial de la secuencia diana a una sola temperatura (Barreda, 2013; Zanolli & Spoto, 2013). La figura 1 muestra los pasos de la reacción de HDA.

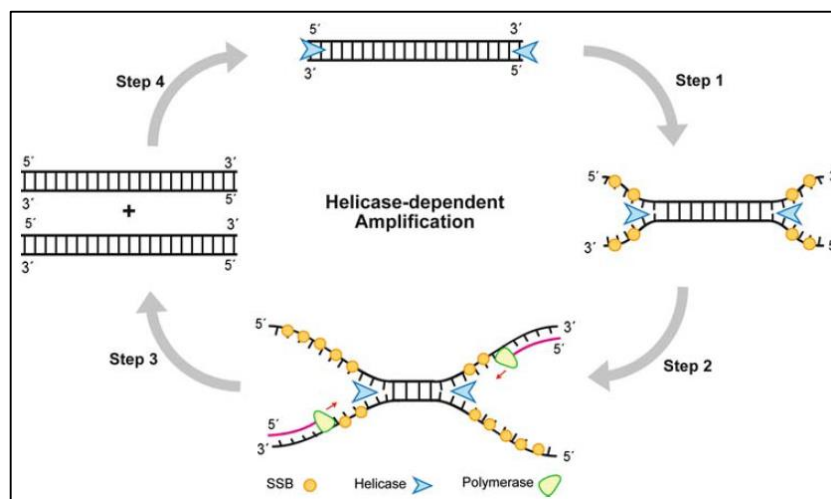


Figura 1: Proceso de reacción de amplificación dependiente de helicasa.

Fuente: Jeong, Park & Kim, 2009.

El proceso descrito anteriormente es la técnica de HDA mesofílica desarrollada originalmente usando la helicasa UvrD de *Escherichia coli*. La reacción se lleva a cabo una temperatura de 37°C y necesita de dos proteínas accesorias: SSB para impedir la reasociación de las cadenas separadas y MultL para estimular la actividad de la helicasa. Actualmente la técnica ha sido mejorada mediante el uso de la helicasa termofílica Tte-UvrD de *Thermoanaerobacter tengcongensis* que trabaja en un rango de temperatura de 60 a 65°C. Gracias al avance ya no es necesario el uso de proteínas accesorias, lo cual simplifica la reacción y la hace aplicable para el desarrollo de dispositivos de diagnóstico portátiles (Chang, Chen, Wei, Lu, Lian & Lin, 2012).

1.4.3. Técnicas de Detección de ADN Amplificado Basadas en Fluorescencia

Las técnicas de detección fluorogénicas de ADN amplificado se basan en el resultado de la interacción entre un reportero fluorescente y los demás reactantes del método de amplificación. La cantidad de ADN amplificado está directamente relacionado con el incremento de la señal de fluorescencia (Nazarenko, Lowe, Darfler, Ikonomi, Schuster & Rashtchian, 2002b). Existen varias técnicas basadas en fluorescencia, entre ellas están los tintes de unión a ADN, como SYBR Green, el cual incrementa la intensidad de su fluorescencia cuando se une a ADN de doble cadena. Los inconvenientes del SYBR Green

son: la detección de falsos positivos debido a la formación de artefactos (especialmente dímeros), la alteración de la estabilidad de la doble cadena de ADN y el favorecimiento de la unión de los primers a sitios inespecíficos (Kusser, 2006).

Otras técnicas se basan en sondas marcadas con un reportero fluorescente (fluoróforo) y un apagador (quencher). El apagador reduce la fluorescencia del fluoróforo por transferencia de energía de resonancia cuando las dos partes están separadas por una distancia menor a 100 Å, en el transcurso de la amplificación el fluoróforo y el apagador son separados por escisión o por cambios en la estructura secundaria de la sonda cuando se hibrida con el ADN diana, resultando en un incremento de fluorescencia. En otros métodos se prescinde de la sonda y se marca directamente a uno de los primers con el fluoróforo y el apagador, lo que simplifica la técnica y abarata los costos, sin embargo todavía sigue siendo caro generar un oligonucleótido con dos modificaciones (Kusser, 2006; Nazarenko, 2006).

1.4.3.1. Self-Quenched Primers

Los self-quenched primers son oligonucleótidos que se encuentran marcados con un solo fluoróforo cerca del extremo 3' y son diseñados para generar una estructura secundaria en forma de horquilla (Invitrogen Corporation, 2002). La detección fluorogénica con self-quenched primers se basa en la estructura primaria y secundaria del oligonucleótido. Inicialmente el oligonucleótido presenta una conformación de horquilla, la cual limita la emisión de fluorescencia, durante el curso de la amplificación a una determinada temperatura el oligonucleótido se abrirá y será incorporado a la doble cadena de ADN cambiando su estructura y aumentando la fluorescencia aproximadamente 10 veces (Nazarenko, 2006). La figura 2 muestra el esquema de funcionamiento de los self-quenched primers.

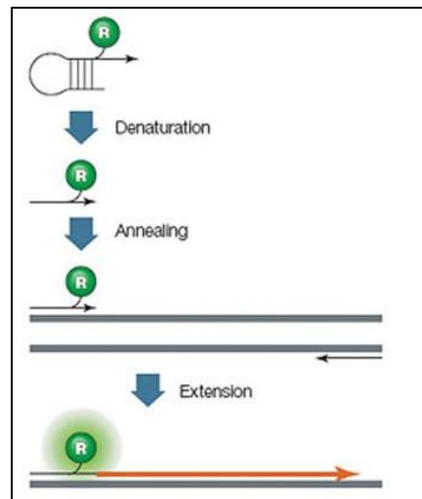


Figura 2: Proceso de funcionamiento de los self-quenched primers.

Fuente: Bio-Rad Laboratories (2015).

Nazarenko *et al.* (2002b) describen los principales parámetros de diseño de self-quenched primers. En primer lugar se debe procurar tener las nucleobases guanina o citosina en el extremo 3' del oligonucleótido. El fluoróforo debe estar unido a la segunda o tercera base más cercana al extremo 3'. Es preferible la presencia de una o mas guaninas dentro de los tres nucleótidos que rodean al nucleótido marcado con el fluoróforo, aunque no es un parámetro estrictamente necesario. Para formar la estructura de horquilla se debe añadir una extensión de 5 a 7 nucleótidos en el extremo 5' que sea complementaria a los nucleótidos del extremo 3'. La estructura de horquilla se debe formar a temperaturas por debajo del punto de melting del oligonucleótido. Finamente se ha observado que las horquillas con una energía libre de Gibbs entre -1.6 a -5.8 kcal/mol han dado buenos resultados.

1.5. Hipótesis

Los self-quenched primers pueden ser usados con la técnica de amplificación dependiente de helicasa termofílica para una detección sensible de virus vegetales.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio del Instituto Nacional de Microbiología Forense y de Bioseguridad Agrícola y Alimentaria (National Institute for Microbial Forensics & Food and Agricultural Biosecurity, NIMFFAB) del Departamento de Entomología y Fitopatología de la Universidad Estatal de Oklahoma (Oklahoma State University, OSU) bajo la tutela del Dr. Francisco Ochoa – Corona.

Además se contó con la ayuda del Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades Vegetales e Insectos (Plant Disease and Insect Diagnostic Laboratory, PDIDL) de la Universidad Estatal de Oklahoma a cargo de Jennifer Olson, quien facilitó muestras de material vegetal infectado con RRV y HVX.

2.2. Zona de estudio

La fase de experimental se desarrolló en el Laboratorio del Instituto Nacional de Microbiología Forense y de Bioseguridad Agrícola y Alimentaria del Departamento de Entomología y Fitopatología de la Universidad Estatal de Oklahoma, que se encuentra ubicado en Stillwater, Oklahoma, Estados Unidos de Norte América, Latitud: 36°7'25,3"N, Longitud: 97°4'16,6"O.

2.3. Período de tiempo de investigación

La investigación se inició el 20 de noviembre del 2014 y finalizó el 24 de marzo del 2015.

2.4. Procedimientos

2.4.1. Diseño de self-quenched primers para tHDA

Se diseñaron seis parejas de primers en total, una para RRV (RRV 2F-HDA / RRV 2R-SQ), una para HPV (HPV 6F.LF / HPV 4R-SQ) y cuatro para HVX (HVX 1F-HDA / HVX 1R-SQ, HVX 2F / HVX 2R-SQ, HVX 3F / HVX 3R-SQ y HVX 4F / HVX 4R-SQ)

Los primers RRV 2F-HDA / RRV 2R-SQ, HPV 6F.LF / HPV 4R-SQ y HVX 1F-HDA / HVX 1R-SQ se realizaron mediante modificaciones a las parejas de oligonucleótidos diseñados por Dobhal, Olson, Arif, Garcia-Suarez, & Ochoa-Corona (2014), Arif *et al.* (2014) y Dobhal, Arif, Olson & Ochoa-Corona (2014), respectivamente.

Los primers HVX 2R-SQ y HVX 3F / HVX 3R-SQ fueron diseñados a partir de secuencias de la proteína de la cubierta (coat protein) de HVX, mientras que el par de primers HVX 4F / HVX 4R-SQ fue diseñado a partir de secuencias de la proteína 1 del bloque de tres genes (Triple gen block 1, TGB1). Inicialmente, las secuencias fueron obtenidas de la base de datos Nucleotide del Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information, NCBI) (NCBI, 2015). Seguidamente, las secuencias fueron alineadas usando el programa MEGA 6, escogiendo el algoritmo Muscle (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski & Kumar, 2013). Luego, se obtuvo una secuencia consenso usando el programa GeneDoc 2.7 (Nicholas & Nicholas, 1997). Entonces, se procedió al diseño de primers propiamente dicho tomando en cuenta los parámetros recomendados para tHDA por Biohelix Corporation (2014) y usando el programa en línea Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012). La tabla 2 muestra los valores de los criterios usados para el diseño de primers para tHDA.

Tabla 2: Parámetros de diseño de primers para amplificación dependiente de helicasa termofílica.

Parámetros de diseño	Mínimo	Óptimo	Máximo
Longitud del producto (bp ^a)	80	100	129
Tm ^b del producto (°C)	68	71	75
%GC ^c del Producto	--	40	--
Longitud del Primer (nt ^d)	24	27	33
Tm ^a del Primer (°C)	60	68	74
%GC ^b del Primer	35	44	60

Fuente: Biohelix Corporation (2014).

^a Pares de bases.

^b Temperatura de melting.

^c Porcentaje de Guanina – Citosina.

^d Nucleótidos.

Una vez diseñados y/o seleccionados los primers para RRV, HPV y HVX, se procedió a realizar modificaciones para que funcionen como self-quenched primers, siguiendo los lineamientos de diseño establecidos por Nazarenko (2006). Para empezar, se seleccionó dentro de cada pareja de primers a aquel cuyo extremo 3' termine en guanina o citosina y presente una timina en la segunda o tercera posición cerca del extremo 3'. Luego, al primer seleccionado se le añadió una extensión de 5 a 7 nucleótidos en el extremo 5' complementaria al extremo 3'. El fluoróforo seleccionado fue fluoresceína, el cual se añadió a la timina más cercana al extremo 3'. Seguidamente se procedió a evaluar las características termodinámicas y estructuras secundarias de los primers modificados y de sus respectivos productos de amplificación haciendo uso del programa en línea Oligo Analyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, 2014). Los parámetros escogidos para el análisis fueron: molécula diana ADN, concentración de oligonucleótido 0.15 μ M, concentración de sal monovalente (Na⁺) 40 mM, concentración de sal divalente (Mg⁺⁺) 4 mM y concentración de dNTPs 0.2 mM. Se eligió a los primers cuyas estructuras secundarias formen una horquilla a una temperatura de 25°C (temperatura ambiente) y se abran a una temperatura de 65°C, a la cual se produce la reacción de tHDA.

Finalmente, se evaluó la especificidad *in silico* de los pares de primers HVX 2R-SQ, HVX 3F / HVX 3R-SQ y HVX 4F / HVX 4R-SQ usando la interface en línea BLASTn del NCBI (Zhang, Schwartz, Wagner & Miller, 2000). En el caso de los primers self-quenched no se ingresó la extensión del extremo 5' que permite que el oligonucleótido forme una estructura cerrada. Las parejas de primers RRV 2F-HDA / RRV 2R-SQ, HPV 6F.LF / HPV 4R-SQ y HVX 1F-HDA / HVX 1R-SQ no se analizaron puesto que como se mencionó anteriormente se hicieron en base a modificaciones de oligonucleótidos previamente diseñados y su especificidad *in silico* ya fue evaluada.

2.4.2. Muestras para el estudio

Las muestras de hojas de plantas infectadas con RRV y HVX para la posterior extracción de ARN total fueron proporcionadas por el Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades Vegetales e Insectos de la Universidad Estatal de Oklahoma. En el caso de HPV se utilizó muestras de ARN total previamente extraído y almacenado a -80°C en el Laboratorio del Instituto Nacional de Microbiología Forense y de Bioseguridad Agrícola y Alimentaria de la Universidad Estatal de Oklahoma.

2.4.3. Extracción de ARN total de plantas infectadas

La extracción de ARN total se realizó a partir de muestras de hojas de plantas infectadas con los patógenos RRV y HVX usando RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, EE. UU.). El proceso se hizo siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 1), se seleccionó el buffer de lisis RLT y se maceró la muestra con nitrógeno líquido.

Una vez finalizada la extracción se midió la concentración y pureza del ARN total usando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Las muestras se almacenaron a -80°C.

2.4.4. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La síntesis de ADNc se realizó usando la enzima transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV RT) en base las instrucciones del fabricante Promega (EE.UU.). El volumen de reacción escogido fue de 40 μL . En primer lugar, se preparó el mix A en un tubo plástico de microcentrífuga de 0.2 mL, añadiendo: 19 μL de agua libre de nucleasas, 2 μL de dNTPs (10 mM), 0.4 μL de primers hexámeros (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y 8 μL de la muestra de ARN total previamente extraída, dando un volumen total del mix A de 29.4 μL .

En segundo lugar, se preparó el mix B en un tubo plástico de microcentrífuga de 0.2 mL, añadiendo: 1 μL del inhibidor de ribonucleasas RNAsin[®] Plus (40 U/ μL), 8 μL de Buffer M-MLV RT (5 X) y 1.6 μL de la enzima M-MLV RT (200 U/ μL), dando un volumen total del mix B de 10.6 μL . Los tubos conteniendo los reactivos se mezclaron usando un vórtex por 20 segundos.

En tercer lugar, se desnaturalizó el mix A calentándolo a 70°C por 5 minutos, inmediatamente se enfrió en hielo por 2 minutos y se añadió el mix B. La reacción se mezcló usando un vórtex por 20 segundos y después se incubó a 37°C por 90 minutos en un bloque de calentamiento. Finalmente, se midió la concentración de ADN usando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Las muestras se almacenaron a -80°C.

2.4.5. Gradiente de temperatura usando tHDA

Los experimentos de tHDA se realizaron usando los reactivos de IsoAmp[®] III Universal tHDA Kit (BioHelix, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se seleccionó el esquema de reacción de dos etapas, para lo cual fue necesario la preparación de los mix A y B. En el experimento de gradiente de temperatura se evaluaron las seis parejas de primers diseñadas. El volumen de reacción seleccionado fue de 25 μL , se usaron tubos plásticos de microcentrífuga de 0.2 mL.

Primero, se preparó el mix A, añadiendo los siguientes reactivos por cada reacción individual: 8.75 μL de agua libre de nucleasas, 1.25 μL de Annealing Buffer II (10 X), 0.75 μL de primer sentido (5 μM), 0.75 μL de primer antisentido (5 μM) y 1 μL de ADNc (en el caso del control negativo se añadió 1 μL de agua libre de nucleasas), obteniendo un volumen total del mix A de 12.5 μL .

Seguidamente, se preparó el mix B, añadiendo los siguientes reactivos por cada reacción individual: 5.5 μL de agua libre de nucleasas, 1.25 μL de Annealing Buffer II (10 X), 1 μL de MgSO_4 (100 mM), 2 μL de NaCl (500 mM), 1.75 μL de IsoAmp[®] dNTP Solution y 1 μL de IsoAmp[®] III Enzyme mix, obteniendo un volumen total del mix B de 12.5 μL . Todos los componentes del mix A se mezclaron usando un vórtex por 20 segundos, de igual manera se procedió con el mix B.

Posteriormente, los tubos con el mix A fueron cubiertos con 25 μL de aceite mineral estéril y se desnaturalizaron por 2 minutos a 95°C. De inmediato, se colocaron en hielo por 2 minutos. Luego, se añadió 12.5 μL del mix B a cada tubo con el mix A, la reacción se mezcló gentilmente usando una micropipeta.

El gradiente de temperatura se realizó usando el termociclador Biometra TProfessional (Biometra, Alemania) en un rango de 60 a 70°C por 90 minutos. Las temperaturas seleccionadas fueron: 60, 61, 62, 63.2, 64.4, 65.6, 66.8, 68, 69 y 70°C. La detección de ácidos nucleicos se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa.

2.4.6. Prueba de referencia usando reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Con el fin de verificar el funcionamiento de los primers previamente diseñados para la detección de RRV, HPV y HVX se hizo una amplificación usando PCR como prueba de referencia.

Los experimentos de PCR se realizaron con las seis parejas de primers diseñadas. El volumen de reacción escogido fue de 20 μL , se utilizaron tubos plásticos de

microcentrífuga de 0.2 mL. En primer lugar, se añadieron los siguientes reactivos por cada reacción individual: 7 μ L de agua libre de nucleasas, 10 μ L de GoTaq® Green Master Mix (2 X) (Promega, EE. UU.), 1 μ L de primer sentido (5 μ M), 1 μ L de primer antisentido (5 μ M) y 1 μ L de ADNc (en el caso del control negativo se añadió 1 μ L de agua libre de nucleasas). La reacción se mezcló usando un vórtex por 20 segundos.

En segundo lugar, se realizó la amplificación en el termociclador Biometra TProfessional (Biometra, Alemania) programando los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 segundos, alineamiento a 60°C (para RRV y HPV) o 62°C (para HVX) por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, por último, una extensión final a 72°C por 3 minutos. Finalmente, se realizó la detección de ácidos nucleicos mediante electroforesis en gel de agarosa.

2.4.7. Tratamientos para contrarrestar la inhibición de la amplificación de las muestras de RRV

En el caso particular de RRV debido a la posible presencia de inhibidores en el tejido vegetal se optó por realizar dos tratamientos para lograr la amplificación del ADNc, como se detalla a continuación.

2.4.7.1. Amplificación de muestras de RRV usando mejoradores

2.4.7.1.1. Amplificación dependiente de helicasa termofílica para RRV usando mejoradores

La reacción se llevó a cabo agregando los mejoradores albúmina sérica bovina (BSA) y polivinilpirrolidona (PVP) a la reacción de tHDA, El volumen de reacción usado fue de 25 μ L, se usaron tubos plásticos de microcentrífuga de 0.2 mL.

Primero, se preparó el mix A, añadiendo los siguientes reactivos por cada reacción individual: 0.75 μ L de agua libre de nucleasas, 1.25 μ L de Annealing Buffer II (10 X),

0.75 μL de primer sentido (5 μM), 0.75 μL de primer antisentido (5 μM), 0.5 μL de BSA (50 mg/mL) (Invitrogen, EE. UU.), 2.5 μL de PVP 40 (10%) (Sigma – Aldrich, EE.UU.) y 2, 4 o 6 μL de ADNc dependiendo de cada tratamiento (en el caso del control negativo se añadió 6 μL de agua libre de nucleasas), a los tratamientos con 2 o 4 μL de ADNc se les añadió 4 o 2 μL de agua libre de nucleasas, respectivamente, obteniendo un volumen total del mix A para todos los tratamientos de 12.5 μL .

A continuación, se preparó el mix B, añadiendo los siguientes reactivos por cada reacción individual: 5.5 μL de agua libre de nucleasas, 1.25 μL de Annealing Buffer II (10 X), 1 μL de MgSO_4 (100 mM), 2 μL de NaCl (500 mM), 1.75 μL de IsoAmp[®] dNTP Solution y 1 μL de IsoAmp[®] III Enzyme mix, obteniendo un volumen total del mix B de 12.5 μL . Todos los componentes del mix A se mezclaron usando un vórtex por 20 segundos, de igual manera se procedió con el mix B.

Posteriormente, los tubos con el mix A se cubrieron con 25 μL de aceite mineral estéril y se desnaturalizaron por 2 minutos a 95°C. De forma inmediata se colocaron en hielo por 2 minutos. Luego, se añadió 12.5 μL del mix B a cada tubo conteniendo el mix A, la reacción se mezcló gentilmente usando una micropipeta.

La amplificación se realizó usando el termociclador Biometra TProfessional (Biometra, Alemania) a una temperatura de 62°C por 90 minutos. Una vez finalizada la reacción se procedió con la detección de ácidos nucleicos mediante electroforesis en gel de agarosa.

2.4.7.1.2. Prueba de referencia PCR para RRV usando mejoradores

La reacción se hizo agregando los mejoradores BSA y PVP a la reacción de PCR, El volumen de reacción usado fue de 20 μL , se usaron tubos plásticos de microcentrífuga de 0.2 mL.

Primero, se añadieron los siguientes reactivos por cada reacción individual: 4.6 μL de agua libre de nucleasas, 10 μL de GoTaq® Green Master Mix (2 X) (Promega, EE. UU.), 1 μL de primer sentido (5 μM), 1 μL de primer antisentido (5 μM), 0.4 μL de BSA (50 mg/mL) (Invitrogen, EE. UU.), 2 μL de PVP 40 (10%) (Sigma – Aldrich, EE.UU.) y 1 μL de ADNc (en el caso del control negativo se añadió 1 μL de agua libre de nucleasas). Luego, la reacción se mezcló usando un vórtex por 20 segundos. Por último, se realizó la amplificación de acuerdo al protocolo descrito anteriormente en el numeral 2.4.6.

2.4.7.2. Precipitación de ADNc de RRV

Al protocolo de síntesis de ADNc anteriormente descrito se le añadió un paso de purificación mediante precipitación, para lo cual se transfirieron 40 μL de la muestra de ADNc recientemente sintetizado a un tubo de microcentrífuga de 0.5 mL, seguidamente, se añadió 10 μL de NaCl (500 mM) y 100 μL de etanol absoluto. Los reactivos se mezclaron usando un vórtex por 20 segundos. Luego, el tubo se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó a 13000 x g durante 2 minutos. Cuidadosamente se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet con la tapa del tubo abierta en una cabina de flujo laminar durante 5 - 10 minutos. Por último, se resuspendió el pellet añadiendo 20 μL de agua libre de nucleasas y se midió la concentración de ADN en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Las muestras se almacenaron a -80°C .

La reacción de amplificación mediante tHDA se realizó usando el termociclador Biometra TProfessional (Biometra, Alemania) a una temperatura de 62°C por 90 minutos. La amplificación mediante PCR se realizó de acuerdo al protocolo descrito anteriormente en el numeral 2.4.6. Una vez finalizadas las reacciones se procedió con la detección de ácidos nucleicos mediante electroforesis en gel de agarosa.

2.4.8. Clonación de productos de amplificación

Debido al requerimiento de estándares puros para el ensayo de sensibilidad que contengan ADNc de los virus usados como modelo en una concentración conocida fue necesario clonar los productos de amplificación de los pares de primers RRV 2F-HDA / RRV 2R-SQ, HPV 6F.LF / HPV 4R-SQ y HVX 4F / HVX 4R-SQ, seleccionados en base al gradiente de temperatura. El clonaje se llevó a cabo usando TOPO[®] TA Cloning[®] Kit for Sequencing y las células de *E. coli* químicamente competentes One Shot Top10[®] (Invitrogen, EE. UU.). El experimento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 2), se seleccionó el protocolo de transformación One Shot[®] chemical transformation y el antibiótico ampicilina. Una vez finalizado el proceso de clonación se enviaron a secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de las células transformadas para verificar que las secuencias deseadas se encuentren en el plásmido. El proceso de secuenciación se realizó en el Centro de Facilidades (Core Facility) del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Estatal de Oklahoma, usando BigDye[™] y el equipo ABI Model 3730 DNA Analyzer.

2.4.9. Extracción y purificación de ADN plasmídico de las células transformadas

Tras finalizar el clonaje se procedió a extraer y purificar el ADN plasmídico que contenía los productos de amplificación de cada par de primers seleccionado. El proceso se realizó usando Plasmid Purification Mini Kit (Quiagen, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 3).

2.4.10. Optimización de concentraciones de primer y sulfato de magnesio para tHDA

Los ensayos de optimización y sensibilidad se hicieron únicamente con las parejas de primers RRV 2F-HDA / RRV 2R-SQ, HPV 6F.LF / HPV 4R-SQ y HVX 4F / HVX 4R-SQ, seleccionadas en base al gradiente de temperatura.

El proceso de optimización se realizó usando concentraciones finales de cada primer de 0.15 o 0.20 μM , y concentraciones finales de MgSO_4 de 4 o 4.5 mM, generando cuatro combinaciones diferentes, las cuales se realizaron por duplicado, una para la muestra de ADNc y otra para el control negativo, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3: Tratamientos del ensayo de optimización de concentraciones de primers y MgSO_4 para amplificación dependiente de helicasa termofílica.

Tratamiento	Muestra	Primers (μM)	MgSO_4 (mM)
P1	ADNc	0.15	4.0
N1	H ₂ O	0.15	4.0
P2	ADNc	0.15	4.5
N2	H ₂ O	0.15	4.5
P3	ADNc	0.20	4.0
N3	H ₂ O	0.20	4.0
P4	ADNc	0.20	4.5
N4	H ₂ O	0.20	4.5

En los ensayos de optimización y sensibilidad se sustituyó la solución IsoAmp[®] dNTP por una solución de dNTPs de concentración 10 X conteniendo: 80 μL de agua libre de nucleasas, 40 μL de dNTP Solution Mix (10 mM) (New England Biolabs, EE. UU.) y 80 μL de dATP Solution (100 mM) (New England Biolabs, EE. UU.).

El ensayo de optimización se llevó a cabo usando un volumen de reacción de 25 μL en tubos plásticos de microcentrífuga de 0.2 mL. En primer lugar, se prepararon los mix A1 y A2 con concentraciones finales de primer de 0.15 y 0.20 μM , respectivamente, añadiendo los siguientes reactivos por cada reacción individual: 1.25 μL de Annealing Buffer II (10 X), 0.75 μL de primer sentido (5 μM) y 0.75 μL de primer antisentido (5 μM) para el caso del mix A1, 1 μL de primer sentido (5 μM) y 1 μL de primer antisentido (5 μM) para el caso del mix A2, 1 μL de ADNc (en el caso del control negativo se añadió 1 μL de agua libre de nucleasas) y suficiente agua libre de nucleasas para completar un volumen de 12.5 μL .

En segundo lugar, se prepararon los mix B1 y B2 con concentraciones finales de MgSO_4 de 4 y 4.5 mM, respectivamente, añadiendo los siguientes reactivos por cada reacción individual: 1.25 μL de Annealing Buffer II (10 X), 1 μL de MgSO_4 (100 mM) para el caso del mix B1 y 1.13 μL de MgSO_4 (100 mM) para el caso del mix B2, 2 μL de NaCl (500 mM), 2.5 μL de Solución de dNTPs (10 X), 1 μL de IsoAmp[®] III Enzyme mix y suficiente agua libre de nucleasas para completar un volumen de 12.5 μL . Los tubos conteniendo los reactivos se mezclaron usando un vórtex por 20 segundos.

En tercer lugar, los tubos con los mix A1 y A2 se cubrieron con 25 μL de aceite mineral estéril y se desnaturalizaron por 2 minutos a 95°C. Inmediatamente se colocaron en hielo por 2 minutos. Luego, se añadió 12.5 μL del mix B1 a dos tubos con el mix A1 y a dos tubos con el mix A2, y 12.5 μL del mix B2 a dos tubos con el mix A1 y a dos tubos con el mix A2, de tal forma se realizaron las cuatro combinaciones de concentraciones de primers y MgSO_4 especificadas en la tabla 3. Los componentes de la reacción se mezclaron gentilmente usando una micropipeta.

En cuarto lugar, se realizó el proceso de amplificación en el termociclador de tiempo real Corbett Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Australia.). La programación de los parámetros de amplificación para RRV consistió en 90 ciclos de: paso 1 a 62°C por 20 segundos, paso 2 a 62°C por 20 segundos y paso 3 a 62°C por 20 segundos. En el caso de HPV y HVX se usó la misma programación pero con temperaturas de 64°C y 66°C, respectivamente. La medición de fluorescencia se hizo en el paso 3 con el canal verde (excitación 470 nm/ detección 510 nm). Las temperaturas de amplificación utilizadas fueron seleccionadas en base a los resultados del gradiente de temperatura.

En quinto lugar, se escanearon los tubos en el equipo Thypoon scanner (General Electric, EE.UU.) con el fin de realizar una detección de punto final mediante una imagen en la que se visualice la fluorescencia. Los parámetros seleccionados para el escaneo fueron: modo de adquisición fluorescencia, absorción 488 nm, emisión 520 BP 40 blue, voltaje PMT 500, sensibilidad normal y tamaño de pixel 50. Por último, se realizó la detección de ácidos nucleicos mediante electroforesis en gel de agarosa.

2.4.11. Ensayo de sensibilidad

El ensayo de sensibilidad se realizó haciendo diluciones decimales seriadas de 10 ng a 10 fg del ADN plasmídico previamente extraído y purificado. Se hicieron tres repeticiones de cada dilución. Las concentraciones de primers y de sulfato de magnesio usadas en el presente ensayo para cada virus fueron seleccionadas en base al ensayo de optimización. El volumen de reacción usado fue de 25 μL , se usaron tubos plásticos de microcentrífuga de 0.2 mL.

En primer lugar, se preparó el mix A añadiendo los siguientes reactivos por cada reacción individual: 1.25 μL de Annealing Buffer II (10 X), 0.75 μL del primer RRV 2F-HDA (5 μM) y 0.75 μL del primer RRV 2R-SQ (5 μM) para el caso de RRV, 1 μL del primer HPV 6F.LF (5 μM) y 1 μL del primer HPV 4R-SQ (5 μM) para el caso de HPV, 1 μL del primer HVX 4F (5 μM) y 1 μL del primer HVX 4R-SQ (5 μM) para el caso de HVX, 1 μL de ADN plasmídico (en el caso del control negativo se añadió 1 μL de agua libre de nucleasas) y suficiente agua libre de nucleasas para completar un volumen de 12.5 μL .

En segundo lugar, se preparó el mix B añadiendo los siguientes reactivos por cada reacción individual: 1.25 μL de Annealing Buffer II (10 X), 1 μL de MgSO_4 (100 mM) para los casos de RRV y HPV, 1.13 μL de MgSO_4 para el caso de HVX, 2 μL de NaCl (500 mM), 2.5 μL de Solución de dNTPs (10 X), 1 μL de IsoAmp[®] III Enzyme mix y suficiente agua libre de nucleasas para completar un volumen de 12.5 μL . Todos los componentes del mix A se mezclaron usando un vórtex por 20 segundos, de igual manera se procedió con el mix B.

En tercer lugar, los tubos con el mix A se cubrieron con 25 μL de aceite mineral estéril y se desnaturalizaron por 2 minutos a 95°C. Inmediatamente se colocaron en hielo por 2 minutos. Luego, se añadió 12.5 μL del mix B a los tubos con el mix A. Los componentes de la reacción se mezclaron gentilmente usando una micropipeta.

En cuarto lugar, se realizó el proceso de amplificación y escaneo de acuerdo a lo especificado en el numeral 2.4.10., con la única modificación que se disminuyó el número de ciclos a 45. Finalmente, se efectuó la detección de ácidos nucleicos mediante electroforesis en gel de agarosa.

2.4.12. Detección de ácidos nucleicos mediante electroforesis en gel de agarosa

Para empezar, se prepararon 100 mL de gel de agarosa al 2% con buffer TAE (1 X). El gel fue teñido con 2 μ L de SYBR® Safe (10,000 X) (Invitrogen, EE. UU.). Seguidamente, se añadieron 5 μ L de buffer colorante de carga Orange 6 X (New England Biolabs, EE. UU.) a los productos de amplificación de tHDA (en el caso de los productos de PCR no se añadió el colorante de carga, puesto que el master mix ya contenía otro colorante). Luego, se cargaron 20 μ L de la mezcla del producto de amplificación y buffer de carga en los pocillos del gel. Por último, se corrió la electroforesis a 100 V por 60 minutos.

2.5. Análisis de datos

El análisis de los resultados del ensayo de sensibilidad se llevó a cabo en base a las curvas de amplificación, valores de ciclo umbral (cycle threshold, ciclo en el que la curva de amplificación cruza el umbral de fluorescencia, Ct) y eficiencia de reacción obtenidos en el programa informático Rotor-Gene 6000 versión 1.7.

Además se calculó la media y coeficiente de variación de los valores de Ct obtenidos en el ensayo de sensibilidad usando el programa informático InfoStat versión 2013e.

Las curvas de estandarización del ensayo de sensibilidad se realizaron mediante una regresión lineal en el programa informático Microsoft Excel 2013, usando el Ct como variable dependiente y el logaritmo en base 10 de la concentración inicial de ADN plasmídico como variable independiente.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1. Diseño de self-quenched primers para tHDA

Las características termodinámicas de las seis parejas de primers diseñadas, así como de sus respectivas secuencias diana y productos de amplificación se exponen en la tabla 4.

Tabla 4: Características termodinámicas de los primers, secuencias diana y productos de amplificación diseñados para amplificación dependiente de helicasa termofílica. En la secuencia de los primers se muestra en mayúsculas la parte de la secuencia que es complementaria a la molécula diana de ADNc, en minúsculas se muestra la extensión del extremo 5' del primer self-quenched que permite que el oligonucleótido forme una estructura cerrada, en negrita se muestra la nucleobase a la cual se marcó con el fluoróforo fluoresceína, por último, con mayúsculas y en itálica se muestra una secuencia no complementaria añadida por Arif *et al.* (2014) al primer HPV 6F.LF para que funcione en el esquema de amplificación dependiente de helicasa termofílica.

Oligonucleótidos	Número de acceso	Secuencia	Longitud (nt ^a)	Tm ^b (°C)	%GC ^c
RRV 2F-HDA		TGATGCTATAAGTCTCATTGGAAGAGAAA	29	65.2	34.5
RRV 2R-SQ		caaagaCCTATAGCTTCATCATTCTCTTTG	31	66.1	38.7
Secuencia diana	<u>HQ891913.1</u>	ACATATCTGAAGCATATGTTGAACTTGCTA	54	74.7	35.2
RRV		GAGACATTGGTACAACAAGCAAAT			
Producto RRV		TGATGCTATAAGTCTCATTGGAAGAGAAA ACATATCTGAAGCATATGTTGAACTTGCTA GAGACATTGGTACAACAAGCAAAT CAAAGAGGAATGATGAAGCTATAGGtctttg	114	79.2	36
HPV 6F.LF		<i>ATACTACTATACTATATCATATGCAACAAGAGGTA</i> TGAGGACAA	44	69.4	31.8
HPV 4R-SQ		tgagtgTCCTTAGAAAAACCAGCACTCA	28	68.3	42.9
Secuencia Diana	<u>U60141.1</u>	CAAAAACACTATTAATTTCAATGAGGATGACG	53	73.7	32.1
HPV		ACTTCATGAACAAATTGGCAA			
Producto HPV		<i>ATACTACTATACTATATCATATGCAACAAGAGGTA</i> TGAGGACAACAAAAACACTATTAATTTCAATG	125	79.8	34.4

CONTINÚA →

		AGGATGACGACTTCATGAACAAATTGGCAA			
		TGAGTGCTGGTTTTTCTAAGGA			
HVX 1F-HDA		GGCGATGGGCTACAAAGAAAACACGAAGT	29	70.7	48.3
HVX 1R-SQ		aatcagaAGCTCCTCCTCTGTGGTTGTCTGATT	34	71.7	44.1
Secuencia diana	<u>NC_011544.1</u>	ACGCGGCTTTCGACACCTTCGACTCCATCCTCA	64	83.6	65.6
HVX1		ATCCCGCGGCGCTGCAACCCACGGGAGGCCT			
Producto HVX1		GGCGATGGGCTACAAAGAAAACACGAAGT	127	80.1	55.9
		ACGCGGCTTTCGACACCTTCGACTCCATCCTCA			
		ATCCCGCGGCGCTGCAACCCACGGGAGGCCT			
		AATCAGACAACCAACAGAGGAGGAGCT			
		tctgatt			
HVX 2F		CTAATCAGACAACCAACAGAGGAGGAG	27	66.3	48.1
HVX 2R-SQ		cacatcTTTCTCAGGAATCGAAGATGTG	29	67.2	44.8
Secuencia diana	<u>NC_011544.1</u>	CTCCTGGCCCACCAAGCAAACCTCAGCCCTC	30	75.3	63.3
HVX2					
Producto HVX2		CTAATCAGACAACCAACAGAGGAGGAG	86	79.9	52.3
		CTCCTGGCCCACCAAGCAAACCTCAGCCCTC			
		CACATCTTCGATTCCCTGAGAAA			
		gatgtg			
HVX 3F		CCATCATCTGGAATTATGCGATCGAGCACAAG	32	70.1	46.9
HVX 3R-SQ		gacacctGATTGAGGATGGAGTCGAAGGTGTC	32	71.5	53.1
Secuencia diana	<u>NC_011544.1</u>	ATTCCACCAGCCAACTGGGCGGCGATGGGCTA	60	80.6	55
HVX3		CAAAGAAAACACGAAGTACGCGGCTTTC			
Producto HVX3		CCATCATCTGGAATTATGCGATCGAGCACAAG	124	79.9	52.4
		ATTCCACCAGCCAACTGGGCGGCGATGGGCTA			
		CAAAGAAAACACGAAGTACGCGGCTTTC			
		GACACCTTCGACTCCATCCTCAATC			
		aggtgtc			
HVX 4F		CACTCTGGACGGAGCTTACATAAAGGCC	27	69.5	55.6
HVX 4R-SQ		gacgaatCTGCGCCGTGTATTCTGTC	25	69	56
Secuencia diana	<u>FJ903445.1</u>	TTTCTCAGGACCAGTTGCAAATCTCGTCAAC	37	72.3	40.5
HVX4		ATTCTT			
Producto HVX4		CACTCTGGACGGAGCTTACATAAAGGCC	89	79.4	49.4
		TTTCTCAGGACCAGTTGCAAATCTCGTCAAC			
		ATTCTTGACGAATACACGGCGCAG			
		gattcgtc			

^a Nucleótidos.

^b Temperatura de melting.

^c Porcentaje de Guanina – Citosina.

Los resultados de la tabla 4 muestran que hay una diferencia considerable en los porcentajes de guanina-citosina (G-C) de los productos de amplificación de RRV y HPV frente a los de HVX. Los porcentajes de G-C de los productos de amplificación de RRV

y HPV son de 36 y 34.4% respectivamente, mientras que los porcentajes de G-C de los cuatro productos de amplificación de HVX van desde 49.4 hasta 55.9%.

3.1.1. Estructuras secundarias de los self-quenched primers

Como parte del proceso de diseño se evaluó la formación de estructuras secundarias de los self-quenched primers. La figura 3 muestra una selección de las estructuras secundarias representativas obtenidas a temperaturas de 25°C (izquierda) y 65°C (derecha) usando el programa informático en línea Oligo Analyzer 3.1.

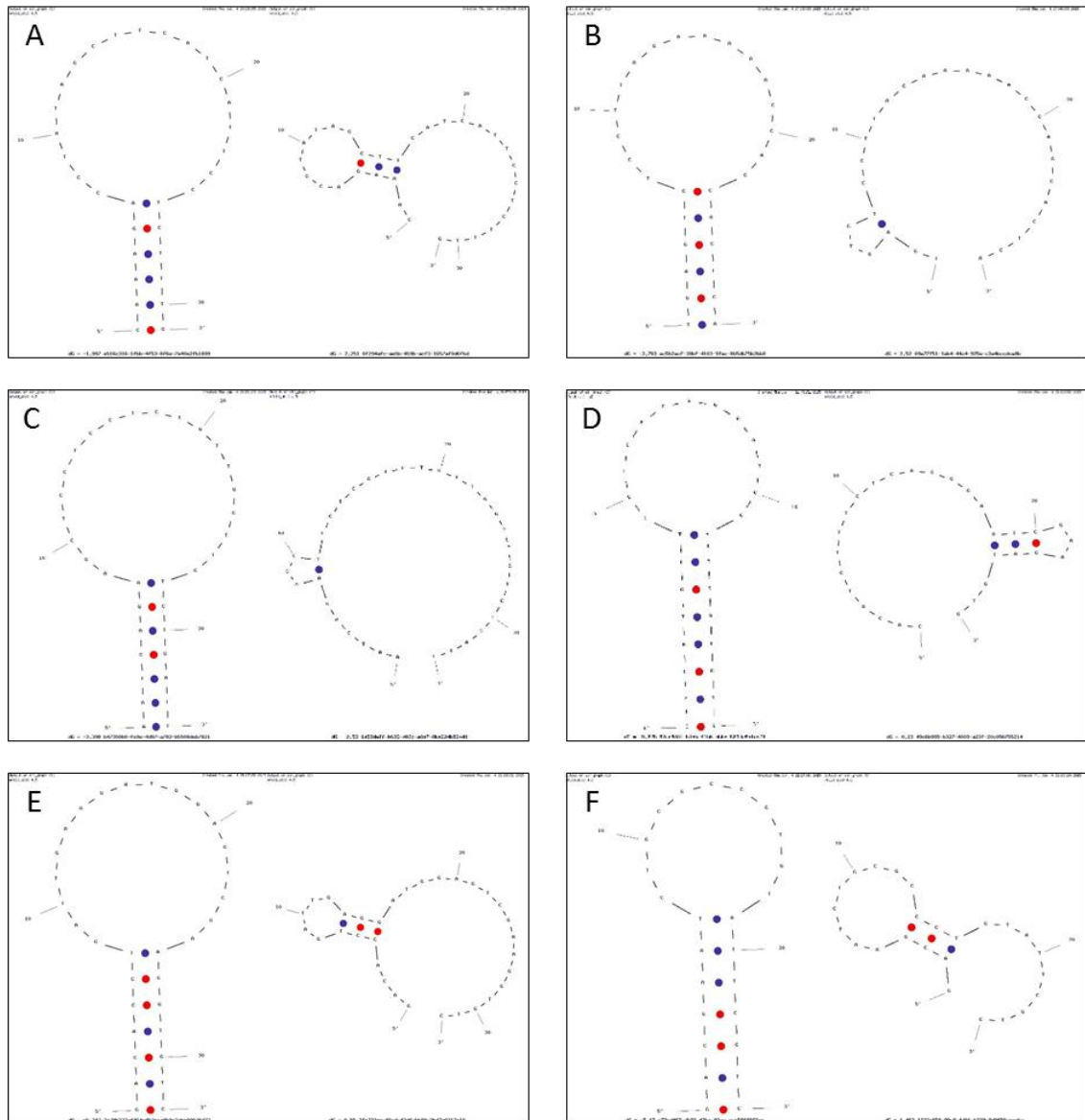


Figura 3: Estructuras secundarias representativas que forman a 25°C (izquierda) y a 65°C (derecha) los self-quenched primers. (A) RRV 2R-SQ. (B) HPV 4R-SQ. (C) HVX 1R-SQ. (D) HVX 2R-SQ. (E) HVX 3R-SQ. (F) HVX 4R-SQ.

De acuerdo a la figura 3 todos los primers a la temperatura de 25°C se encuentran cerrados formando una estructura de horquilla con extremo romo, conforme a lo deseado. Luego a la temperatura de 65°C se observa que todas las estructuras se encuentran abiertas. Los primers HPV 4R-SQ y HVX 1R-SQ muestran las mejores estructuras, ya que se encuentran casi completamente abiertas y solo tienen un enlace (Figs. 3B y 3C).

Por su parte los primers RRV 2R-SQ, HVX 2R-SQ, HVX 3R-SQ y HVX 4R-SQ muestran estructuras abiertas con tres enlaces (Figs. 3A, 3D-F).

3.1.2. Estructuras secundarias de los productos de amplificación

De igual manera se realizó el análisis de formación de estructuras secundarias de los productos de amplificación. La figura 4 muestra una selección de las estructuras secundarias representativas obtenidas a 65°C con sus respectivas temperaturas de melting (Tm) usando el programa informático en línea Oligo Analyzer 3.1.

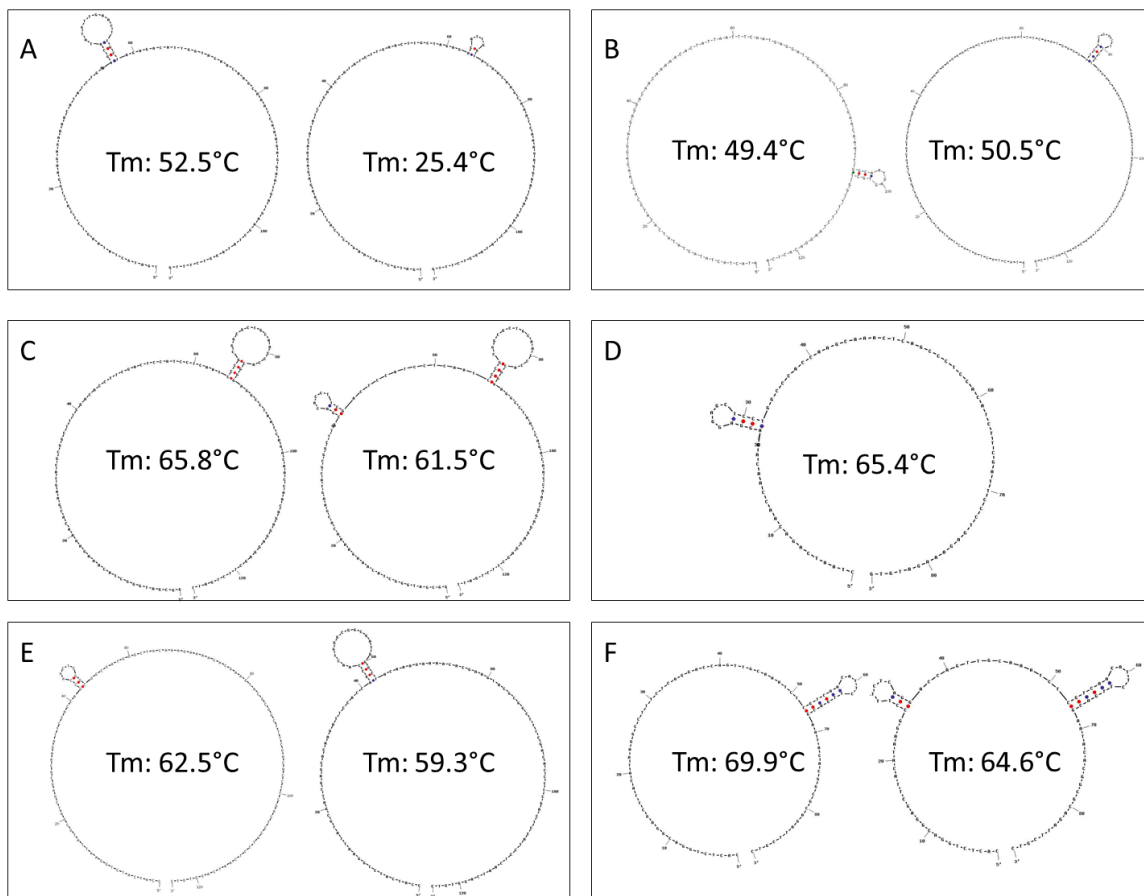


Figura 4: Estructuras secundarias representativas que forman a 65° los productos de amplificación de los primers diseñados con sus respectivas temperaturas de melting (Tm). (A) RRV 2F-HDA / RRV 2R-SQ. (B) HPV 6F.LF / HPV 4R-SQ. (C) HVX 1F-HDA / HVX 1R-SQ. (D) HVX 2F / HVX 2R-SQ. (E) HVX 3F / HVX 3R-SQ. (F) HVX 4F / HVX 4R-SQ.

La figura 4 evidencia que todos los productos de amplificación presentan estructuras secundarias en forma de horquilla de distintas longitudes a la temperatura promedio a la que se realiza la reacción de tHDA (65°C). Además, se observa que existen diferencias en cuanto a las temperaturas de melting. Las estructuras secundarias de los productos de amplificación de RRV y HPV registran las menores temperaturas de melting que van desde 25.4 hasta 52.5°C (Figs. 4A y 4B). Por su parte, las temperaturas de melting de las estructuras secundarias de todos los productos de amplificación de HVX son superiores y van desde 59.3 hasta 69.9°C (Figs. 4C-F).

3.1.3. Análisis de especificidad *in silico*

En general, los pares de primers HVX 2F / HVX 2R-SQ, HVX 3F / HVX 3R-SQ y HVX 4F / HVX 4R-SQ mostraron alineamientos significativos con las secuencias diana y no mostraron interacciones inespecíficas con otros patógenos vegetales, ni organismos que posiblemente pudieran encontrarse en las muestras.

Los primers HVX 2F / HVX 2R-SQ produjeron un porcentaje de identidad (identity) y de cobertura de la secuencia diana (query coverage) del 100%, el primer sentido produjo un E-value de $4e^{-05}$, mientras que el primer antisentido produjo un E-value de 0.005 para 46 de un total de 68 secuencias de proteína de la cubierta HVX presentes en la base de datos Nucleotide del NCBI en diciembre del 2014. Los números de acceso de las 46 secuencias se muestran a continuación: [JX891456.1](#), [JX891455.1](#), [JX891454.1](#), [JX891453.1](#), [KJ406186.1](#), [JX535294.1](#), [JQ911698.1](#), [JF732917.1](#), [JF301954.1](#), [JF301950.1](#), [JF301948.1](#), [FJ903414.1](#), [FJ903412.1](#), [FJ903411.1](#), [FJ903410.1](#), [FJ903408.1](#), [FJ903407.1](#), [FJ903406.1](#), [FJ903405.1](#), [FJ903404.1](#), [FJ903402.1](#), [FJ903401.1](#), [FJ903400.1](#), [FJ903399.1](#), [FJ903398.1](#), [FJ903396.1](#), [FJ903395.1](#), [FJ903391.1](#), [FJ903389.1](#), [FJ903387.1](#), [FJ903386.1](#), [FJ821705.1](#), [FJ821704.1](#), [FJ821703.1](#), [FJ821702.1](#), [FJ403387.1](#), [FJ403386.1](#), [FJ403385.1](#), [FJ403384.1](#), [FJ403383.1](#), [FJ403382.1](#), [FJ403381.1](#), [FJ403380.1](#), [AY181252.1](#), [AJ620114.1](#), [AJ517352.1](#).

Por su parte, los primers HVX 3F / HVX 3R-SQ produjeron un porcentaje de identidad y de cobertura de la secuencia diana del 100%, el primer sentido produjo un E-value de $4e^{-08}$, mientras que el primer antisentido produjo un E-value de $3e^{-04}$ para 31 de un total de 68 secuencias de proteína de la cubierta HVX presentes en la base de datos Nucleotide del NCBI en diciembre del 2014. Los números de acceso de las 31 secuencias son los siguientes: [JX891454.1](#), [JQ911698.1](#), [JF732917.1](#), [JF301954.1](#), [JF301949.1](#), [JF301948.1](#), [FJ903414.1](#), [FJ903412.1](#), [FJ903411.1](#), [FJ903410.1](#), [FJ903408.1](#), [FJ903407.1](#), [FJ903406.1](#), [FJ903405.1](#), [FJ903402.1](#), [FJ903401.1](#), [FJ903399.1](#), [FJ903398.1](#), [FJ903396.1](#), [FJ903395.1](#), [FJ903393.1](#), [FJ903391.1](#), [FJ903390.1](#), [FJ903389.1](#), [FJ821705.1](#), [FJ403387.1](#), [FJ403384.1](#), [FJ403382.1](#), [AY181252.1](#), [AJ620114.1](#), [AJ517352.1](#).

Por último, los primers HVX 4F / HVX 4R-SQ mostraron un porcentaje de identidad y de cobertura de la secuencia diana del 100%, el primer sentido produjo un E-value de $4e^{-05}$, mientras que el primer antisentido produjo un E-value de 4.8 para 23 de un total de 30 secuencias de la proteína 1 del bloque de tres genes de HVX presentes en la base de datos Nucleotide del NCBI en diciembre del 2014. Los números de acceso de las 23 secuencias se muestran a continuación: [JQ911698.1](#), [FJ903445.1](#), [FJ903443.1](#), [FJ903442.1](#), [FJ903441.1](#), [FJ903440.1](#), [FJ903439.1](#), [FJ903437.1](#), [FJ903436.1](#), [FJ903435.1](#), [FJ903434.1](#), [FJ903430.1](#), [FJ903428.1](#), [FJ903427.1](#), [FJ903426.1](#), [FJ903424.1](#), [FJ903423.1](#), [FJ903422.1](#), [FJ903421.1](#), [FJ903420.1](#), [FJ903419.1](#), [FJ903418.1](#), [FJ903416.1](#).

3.2. Tratamientos para contrarrestar la inhibición de la amplificación de las muestras de RRV

Posiblemente debido a la presencia de inhibidores en el tejido vegetal infectado con RRV a partir del cual se extrajo el ARN total no se pudieron realizar inicialmente las reacciones de amplificación. De tal manera se ensayaron dos tratamientos para solucionar el problema de inhibición con las muestras de RRV. En el primer tratamiento, se añadió BSA y PVP a la reacción de tHDA y PCR (prueba de referencia). En el segundo

tratamiento, se hizo precipitación del ADNc y se realizaron las reacciones normales de tHDA y PCR (prueba de referencia), como se detalló en el capítulo 2. La figura 5 muestra los resultados de los dos tratamientos.

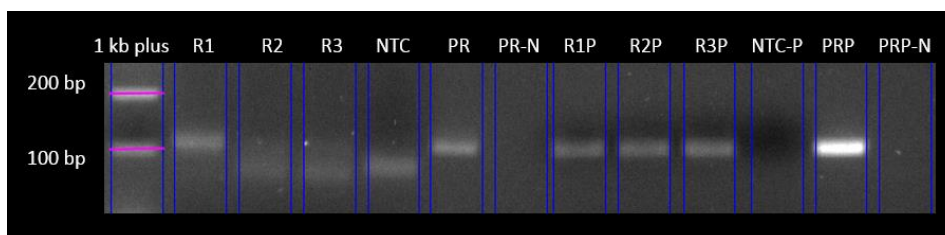


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de tratamientos para solucionar la inhibición de la amplificación de muestras de RRV. La muestras R1, R2 y R3 corresponden a 2, 4 y 6 μ L de ADNc sin precipitar usando albúmina sérica bovina y polivinilpirrolidona en la reacción de amplificación dependiente de helicasa termofílica, con su respectivo control negativo NTC. La muestra PR corresponde a la reacción de PCR usando ADNc sin precipitar más albúmina sérica bovina y polivinilpirrolidona, con su control negativo PR-N. Las muestras R1P, R2P y R3P corresponden a 2, 4 y 6 μ L de ADNc precipitado usando la reacción normal de amplificación dependiente de helicasa termofílica, con su respectivo control negativo NTC-P. La muestra PRP corresponde a la reacción normal de PCR usando ADNc precipitado, con su control negativo PRP-N.

Como se aprecia en la figura 5, en el tratamiento con mejoradores y ADNc sin precipitar solo se observó una banda en R1 (2 μ L de ADNc) en tHDA y una banda tenue en PCR (PR); en el control negativo (NTC) de tHDA se presentó una banda tenue de tamaño menor a 100 pb, posiblemente debido a la formación de artefactos durante la amplificación. Por lo contrario, el tratamiento en el que se realizó precipitación del ADNc generó bandas más claras, definidas y del tamaño esperado (114 bp) con todos los volúmenes de ADNc (R1P, R2P, R3P y PRP) tanto en tHDA como en PCR. De tal manera, se seleccionó el tratamiento de precipitación de ADNc para mitigar la inhibición de la amplificación con las muestras de RRV.

3.3. Gradiente de temperatura usando tHDA

El presente ensayo buscó determinar la temperatura a la cual se alinean los primers con la molécula de ADNc diana y se produce la reacción de tHDA. La figura 6 muestra los resultados del gradiente de temperatura de 60 a 70°C que se realizó con las seis parejas de primers diseñadas.

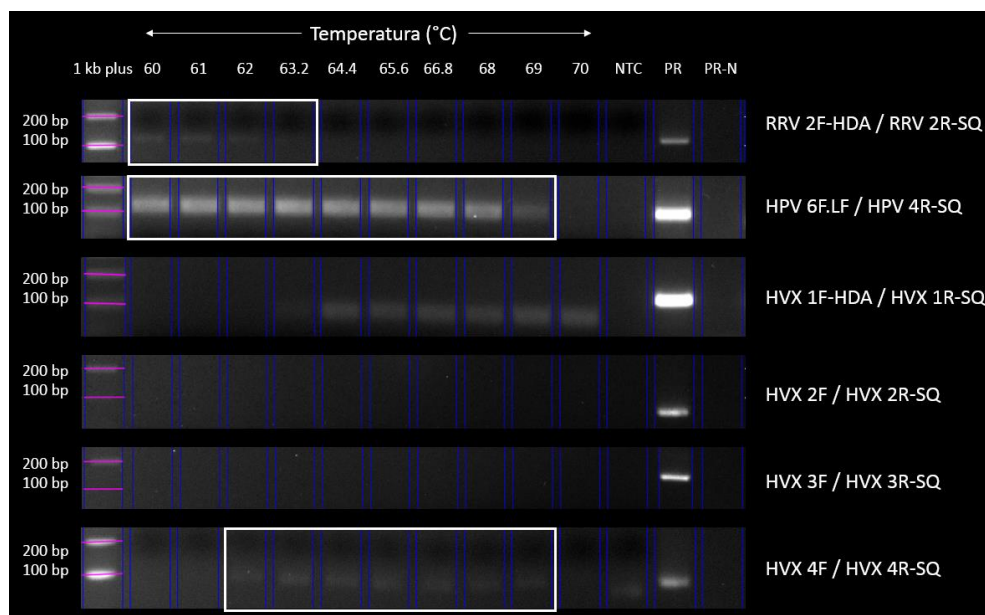


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa al 2% del gradiente de temperatura de 60 a 70°C usando reacción de amplificación dependiente de helicasa termofílica con los seis pares de primers diseñados y su respectivo control negativo (NTC). Las muestras PR (muestra con ADNc) y PR-N (control negativo) pertenecen a la reacción de PCR usada como prueba de referencia. Los rectángulos blancos encierran las bandas correspondientes al rango de temperatura en el que se evidenció amplificación con el par de primers seleccionado para cada virus.

En el ensayo con RRV, como se aprecia en la figura 6 resaltado con el rectángulo blanco, existió amplificación evidenciada por bandas tenues del tamaño esperado (114 bp) en un rango de 60 a 63.2 °C, el resultado fue corroborado por la prueba de referencia de PCR (muestra PR), lo que demuestra el funcionamiento de la pareja de primers RRV 2F-HDA / RRV 2R-SQ con las dos técnicas.

El gradiente con los primers de HPV mostró la amplificación con el rango de temperatura más amplio, de 60 a 69°C, además de bandas bien definidas del tamaño deseado (125 bp). De igual forma, el resultado fue comprobado mediante la reacción positiva de PCR (muestra PR).

En el caso de HVX se evaluaron cuatro pares de primers debido a que no se produjo amplificación mediante tHDA con algunos de ellos. Sin embargo, las cuatro parejas de primers dieron reacciones positivas con la prueba de referencia de PCR (muestras PR). La primera pareja de primers HVX 1F-HDA / HVX 1R-SQ generó productos de amplificación en un rango de 63.2 a 70°C, pero su tamaño fue menor a 100 bp, lo que no corresponde con el producto de amplificación deseado de 127 bp, por lo que se descartó esta pareja de primers para futuros ensayos. Los pares de primers HVX 2F / HVX 2R-SQ y HVX 3F / HVX 3R-SQ no produjeron productos de amplificación con tHDA, por lo que de igual forma fueron descartados. Con la última pareja de primers HVX 4F / HVX 4R-SQ se evidenció bandas tenues y difusas aproximadamente del tamaño esperado (89 bp) en un rango de 62 a 69°C, también se observó una banda tenue en el control negativo NTC de menor tamaño a las bandas obtenidas en el gradiente, lo que se presume puede ser un artefacto. De tal manera, se seleccionó el par de primers HVX 4F / HVX 4R-SQ para los futuros ensayos.

Así, de entre el rango de temperatura en el que se evidenció amplificación con los primers seleccionados RRV 2F-HDA / RRV 2R-SQ, HPV 6F.LF / HPV 4R-SQ y HVX 4F / HVX 4R-SQ se escogió la temperatura intermedia de 62, 64 y 66°C, respectivamente, para los siguientes ensayos de optimización y sensibilidad.

3.4. Clonación de productos de amplificación

Tras la realización del clonaje se analizaron mediante la prueba de referencia de PCR y electroforesis en gel de agarosa al 2% las colonias de *E. coli* transformadas para verificar que contengan los productos de amplificación de las parejas de primers RRV 2F-HDA /

RRV 2R-SQ, HPV 6F.LF / HPV 4R-SQ y HVX 4F / HVX 4R-SQ. La figura 7 muestra el resultado de la amplificación mediante PCR de las colonias de *E. coli* transformadas.

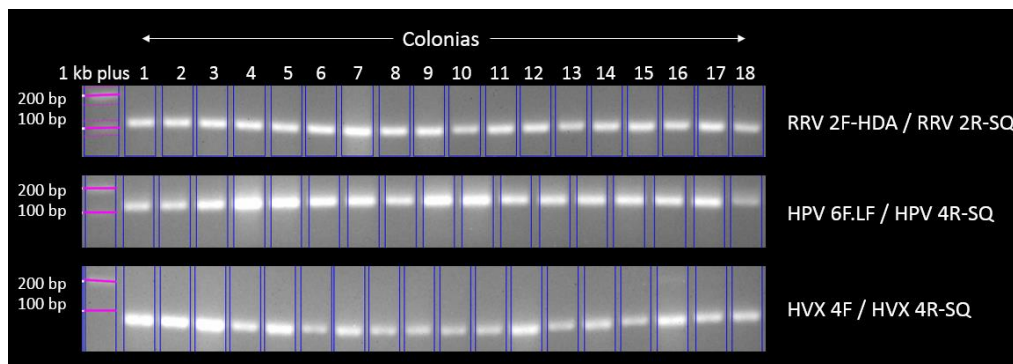


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación de PCR de las colonias de *E. coli* transformadas.

Como se observa en la figura 7 todas las colonias seleccionadas para el análisis mediante PCR fueron positivas, es decir que su ADN plasmídico contiene los productos de amplificación de los primers seleccionados para RRV, HPV y HVX.

Una vez observada la presencia de los productos de amplificación deseados se realizó la secuenciación de los mismos para confirmar de forma definitiva que se amplificó la secuencia deseada para cada virus. La tabla 5 muestra los resultados de la secuenciación y el análisis de las secuencias obtenidas usando la interface en línea BLASTn del NCBI.

Tabla 5: Resultados de secuenciación de los productos de amplificación de PCR de las colonias de *E. coli* transformadas y análisis de alineamiento mediante la interface en línea BLASTn.

Pareja de Primers	Secuencia del producto de amplificación	Secuencias que produjeron alineamientos significativos usando el algoritmo BLASTn			
		Query coverage	E-value	Identity	Números de acceso
RRV 2F-HDA / RRV 2R-SQ	TGATGCTATAAG TCTCATTGGAAG AGAAAACATATC TGAAGCATATGT TGAACCTGCTAGA GACATTGGTACA AACAAAGGCAAA	100%	$6e^{-29}$	96%	HQ891913.1, HQ891912.1, HQ891911.1, HQ891910.1, HQ891909.1, HQ891908.1, HQ891907.1, HQ891906.1, HQ891905.1, HQ891904.1, HQ891903.1, HQ891902.1, HQ891901.1, HQ891900.1, HQ891899.1, HQ891898.1, HQ891897.1, HQ891896.1, HQ891895.1, HQ891894.1, HQ891893.1, HQ891892.1
HPV 6F.LF / HPV 4R-SQ	TAAGAGGCTAAG CAAAAACACTAT TAATTTTCATGAG GATGACGACTTC ATGAACAAAATTG GCAATGAGTGCT GGTTTTTCTAAG GACACTCA	83%, 80%, 77%	$2e^{-28}$, $2e^{-19}$, $2e^{-18}$	97%, 92%	KJ939626.1, KF031532.1, KC337341.1, AY836525.1, AY836524.1, U60141.1, KJ939625.1, DQ324466.1
HVX 4F / HVX 4R-SQ	CACTCTGGACGG AGCTTACATAAG GCCTCTCAGGAC CAGTGCGATCTC GCAGGC	90%	$1e^{-8}$	91%	JQ911698.1, FJ903445.1, FJ903443.1, FJ903441.1, FJ903440.1, FJ903439.1, FJ903437.1, FJ903436.1, FJ903435.1, FJ903434.1, FJ903432.1, FJ903430.1, FJ903428.1, FJ903427.1, FJ903426.1, FJ903424.1, FJ903423.1, FJ903422.1, FJ903421.1, FJ903420.1, FJ903419.1, FJ903418.1, FJ903416.1, AY181252.1, AJ620114.1

Los resultados del análisis mediante BLASTn de las secuencias obtenidas demostraron que existieron alineamientos significativos con las secuencias diana de las parejas de primers seleccionadas de RRV, HPV y HVX. Además, mediante este análisis verificamos también que se insertaron las secuencias de interés en el vector y se clonaron con éxito.

3.5. Optimización de concentraciones de primers y sulfato de magnesio para tHDA

En el ensayo de optimización buscó la combinación más favorable de las concentraciones de primers y $MgSO_4$ para la reacción de tHDA. Los resultados del ensayo se observaron mediante detección de fluorescencia en tiempo real (en esta etapa de la investigación no se realizó cuantificación de la fluorescencia, únicamente se buscó observar el comportamiento de la reacción), visualización de fluorescencia post amplificación en un escáner y electroforesis en gel de agarosa.

La detección en tiempo real del incremento de fluorescencia durante la reacción de tHDA de los ensayos de optimización de RRV, HPV y HVX se expone en la figura 8.

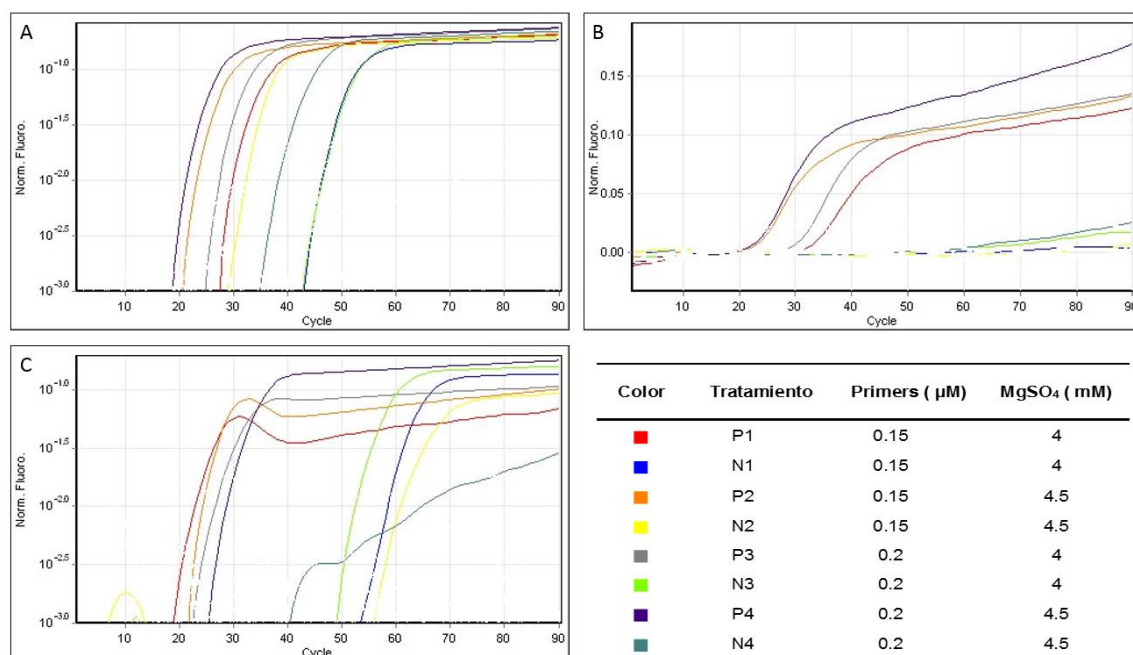


Figura 8: Detección de fluorescencia en tiempo real del ensayo de optimización de primers y sulfato de magnesio para amplificación dependiente de helicasa termofílica. El eje X representa el número de ciclos (en el presente caso por tratarse de una reacción isotérmica cada ciclo representa un minuto transcurrido).

El eje Y representa la fluorescencia normalizada. Los tratamientos P1-4 corresponden a las reacciones a las que se les añadió el ADNc de cada virus, los tratamientos N1-4 corresponden a los controles negativos.

(A) RRV 2F-HDA / RRV 2R-SQ. (B) HPV 6F.LF / HPV 4R-SQ. (C) HVX 4F / HVX 4R-SQ.

De acuerdo a lo observado en las figuras 8A y 8B, existió incremento de fluorescencia que llegó a fase exponencial en las curvas de amplificación de todos los tratamientos con ADNc de RRV y HPV (P1-4). El tratamiento P4, correspondiente a la concentración más alta de primers (0.2 μM) y de MgSO_4 (4.5 mM), alcanzó primero la fase exponencial, cerca del ciclo 20, seguido por los tratamientos P2 (0.15 μM de primers y 4.5 mM de MgSO_4) y P3 (0.2 μM de primers y 4 mM de MgSO_4). El tratamiento P1, el cual tuvo las concentraciones más bajas de primers (0.15 μM) y de MgSO_4 (4 mM) fue el último en alcanzar la fase exponencial, alrededor del ciclo 30.

En el caso de RRV (Fig. 8A), se evidenció también curvas que alcanzaron la fase exponencial en los controles negativos (N1-4), posiblemente debido a la formación de artefactos tipo dímeros de primers. En el caso de HPV (Fig. 8B) en torno al ciclo 60 los controles negativos N3 y N4 presentaron un ligero incremento de fluorescencia, el cual se sigue considerando una reacción negativa, mientras que los controles negativos N1 y N2 no presentaron ningún incremento apreciable de fluorescencia.

La figura 8C correspondiente al ensayo de optimización de HVX, muestra curvas de amplificación con formas atípicas en los tratamientos P1, P2, y N4. Además se evidencia incremento de fluorescencia en fase exponencial en los tratamientos P3 y P4, incluyendo los controles negativos N1, N2 y N3. El tratamiento P3 (0.2 μM de primers y 4 mM de MgSO_4) llegó a la fase exponencial después del ciclo 20, y a continuación lo hizo el tratamiento P4 (0.2 μM de primers y 4.5 mM de MgSO_4). El control negativo N3 alcanzó la fase exponencial alrededor del ciclo 50, mientras que los controles negativos N1 y N2 lo hicieron después del ciclo 50.

Otro aspecto a tener en consideración en la figura 8 es que las curvas de amplificación de los tratamientos con ADNc de RRV, HPV y HVX (P1-4) alcanzaron la fase estacionaria entre los ciclos 30 y 45, es decir que la reacción de tHDA finaliza alrededor de los 40 minutos, por tal motivo se decidió acortar el tiempo de reacción de 90 a 45 minutos para el ensayo de sensibilidad.

El escaneo de fluorescencia de los tubos una vez finalizada la reacción de amplificación junto con la imagen de la electroforesis en gel de agarosa al 2% del ensayo de optimización se muestra en la figura 9.

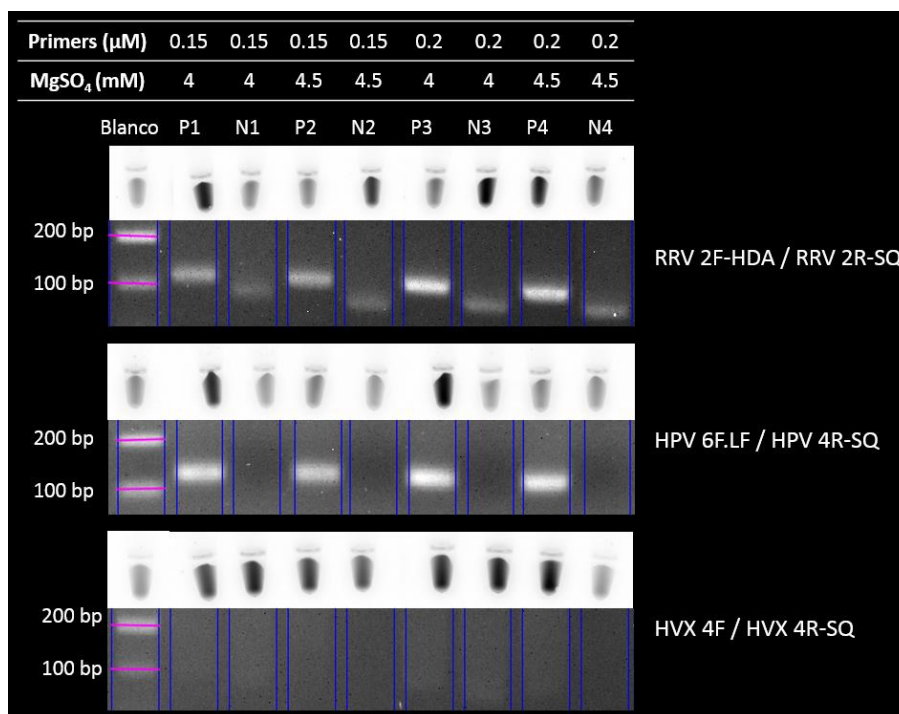


Figura 9: Escaneo de fluorescencia post amplificación (absorción: 488 nm, emisión: 520 nm, fluoróforo: fluoresceína) y electroforesis en gel de agarosa al 2% del ensayo de optimización de concentraciones de primers y sulfato de magnesio de RRV, HPV y HVX para amplificación dependiente de helicasa termofílica. El primer tubo de cada columna (color gris claro) corresponde al blanco, e indica el tono de color correspondiente a la cantidad de fluorescencia en una reacción en la que no se ha producido amplificación. Un tono de color más oscuro que el del blanco denota incremento de fluorescencia debido a la amplificación de ácidos nucleicos.

El escaneo de fluorescencia de los tubos de RRV muestra que los tratamientos P1, N2, N3 y P4 presentan un tono negro, mientras que los tratamientos N1, P2, P3 y N4 presentan un tono gris. Únicamente entre los tratamientos P1 y N1 se observa una diferencia marcada acorde a lo esperado, con un tono negro para la reacción positiva y un tono gris claro para la reacción negativa. La imagen de la electroforesis en gel de agarosa de RRV explica los falsos positivos obtenidos en la detección de fluorescencia en tiempo

real, puesto que, se observan bandas del tamaño esperado (114 bp) en las muestras positivas (P1-4) y bandas tenues de menor tamaño (<100 bp) en los controles negativos (N1-4), que podrían deberse a dímeros de primers.

Por su parte, el escaneo de fluorescencia post - amplificación de HPV muestra que los tratamientos P1 y P3 tienen un tono negro que se puede diferenciar claramente de los tratamientos N1, P2, N2, N3, P4 y N4 que presentan un tono gris. De tal forma, los tratamientos P1/N1 y P3/N3 evidencian una diferencia marcada para las reacciones positivas y negativas. En la imagen de la electroforesis en gel de agarosa de HPV se observan bandas del tamaño esperado (125 bp) en los tratamientos positivos (P1-4) y ausencia de bandas en los controles negativos (N1-4), acorde a lo observado en la detección de fluorescencia en tiempo real.

En el caso de HVX, el escaneo de fluorescencia evidencia que los tratamientos P1, N1, P2, N2, P3, N3 y P4 presentan un tono de gris oscuro a negro que se pueden diferenciar del tratamiento N4 que presenta un tono gris claro. Así, solamente entre los tratamientos P4 y N4 se aprecia la diferencia de una reacción positiva y negativa. Sin embargo, la imagen del resultado de la electroforesis en gel de agarosa de HVX no muestra ninguna reacción positiva, lo que explicaría las curvas de amplificación con formas atípicas obtenidas en la detección de fluorescencia en tiempo real.

Tomando en cuenta los resultados de los tres métodos de detección se seleccionaron los tratamientos P1 (0.15 μ M de primers y 4 mM de $MgSO_4$), P3 (0.2 μ M de primers y 4 mM de $MgSO_4$) y P4 (0.2 μ M de primers y 4.5 mM de $MgSO_4$) para realizar los ensayos de sensibilidad de RRV, HPV y HVX, respectivamente.

3.6. Ensayo de sensibilidad

En el ensayo de sensibilidad se determinó la mínima cantidad de material genético amplificado mediante tHDA con self-quenched primers que puede ser detectado usando

medición de fluorescencia cuantitativa en tiempo real, visualización de fluorescencia post-amplificación en un escáner y electroforesis en gel de agarosa.

Las curvas de amplificación del ensayo de sensibilidad de RRV, HPV y HVX con concentraciones de ADN plasmídico de 10 ng a 10 fg se aprecian en la figura 10.

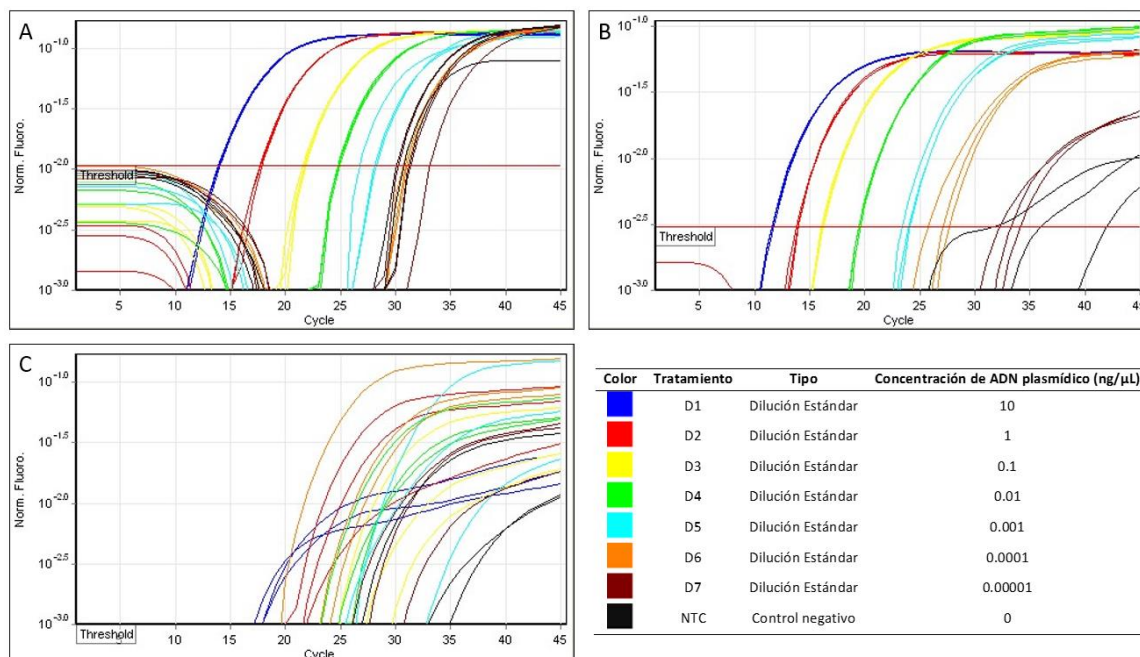


Figura 10: Detección de fluorescencia cuantitativa en tiempo real del ensayo de sensibilidad de 10 ng a 10 fg de ADN plasmídico usando amplificación dependiente de helicasa termofílica con self-quenched primers. El eje X representa el número de ciclos (en el presente caso por tratarse de una reacción isotérmica cada ciclo representa un minuto transcurrido). El eje Y representa la fluorescencia normalizada. (A) RRV 2F-HDA / RRV 2R-SQ. (B) HPV 6F.LF / HPV 4R-SQ. (C) HVX 4F / HVX 4R-SQ.

Las figuras 10A y 10B demuestran que las curvas de amplificación correspondientes a las diluciones estándares de 10 ng a 10 fg (0.00001 ng) alcanzaron la fase exponencial superando el valor umbral de fluorescencia (threshold) de 0.0108 para RRV y 0.003 para HPV, fijado por el programa informático Rotor-Gene 6000 versión 1.7., por lo que se las considerarían reacciones positivas. En el caso del control negativo de RRV también se presentaron curvas de amplificación que superaron el valor umbral de fluorescencia en las tres repeticiones y se consideran como falsos positivos. El control negativo de HPV

mostró curvas con formas atípicas y alta variabilidad que no se pueden establecer como reacciones positivas.

Por su parte, la figura 10C perteneciente a HVX muestra curvas de amplificación con formas atípicas, superpuestas y con alta variabilidad entre repeticiones, por lo que no se las puede considerar como reacciones positivas.

En la tabla 6 se presenta la media y el coeficiente de variación de los valores Ct de las tres repeticiones de cada tratamiento del ensayo de sensibilidad.

Tabla 6: Media y coeficiente de variación de los resultados de ciclo umbral (Ct) de la detección de fluorescencia cuantitativa en tiempo real del ensayo de sensibilidad de 10 ng a 10 fg de ADN plasmídico de RRV, HPV y HVX usando amplificación dependiente de helicasa termofílica con self-quenched primers. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento.

Tratamientos	RRV		HPV		HVX	
	Media	Coficiente de variación	Media	Coficiente de variación	Media	Coficiente de variación
D1	13.99	0.66%	11.52	0.76%	15.83	3.50%
D2	17.71	0.61%	13.88	0.75%	20.28	1.03%
D3	21.71	0.59%	16.11	0.45%	26.04	8.62%
D4	24.78	0.38%	19.45	0.43%	23.67	6.42%
D5	27.70	3.01%	23.77	1.58%	26.86	13.60%
D6	30.85	0.66%	26.82	3.79%	21.36	10.67%
D7	31.47	4.76%	33.16	2.75%	26.94	8.50%
NTC	30.64	1.80%	36.78	19.97%	28.41	11.80%

De acuerdo a los resultados de la tabla 6, en el caso de RRV y HPV se observa que la dilución estándar de 10 ng cruzó en primer lugar el valor de fluorescencia umbral en los ciclos 13.99 y 11.52, respectivamente. Seguido de forma consecutiva por las diluciones estándares de 1 ng a 0.00001 ng. Las diluciones estándares de 0.0001 ng, 0.00001 ng y el control negativo de RRV aparecieron alrededor de los ciclos 30 y 31, razón por la cual se observa superposición de las curvas en la gráfica de amplificación (Fig. 10A). En cuanto

a la variabilidad entre repeticiones, se aprecia que las diluciones estándares de 10 ng a 0.01 ng de RRV y HPV tuvieron un coeficiente de variación menor al 1%.

En el caso de HVX, los resultados en la tabla 6 evidencian que las diluciones estándares no aparecieron en forma consecutiva, de acuerdo a lo esperado. Por ejemplo, la dilución de 0.1 ng cruzó el valor de fluorescencia umbral en el ciclo 26.04 mientras que la dilución de 0.01 ng lo hizo antes, en el ciclo 23.67. Todos los tratamientos presentaron un coeficiente de variación superior al 1%.

Las curvas de estandarización del ensayo de sensibilidad de RRV, HPV y HVX junto con los valores estadísticos asociados se observan en la figura 11.

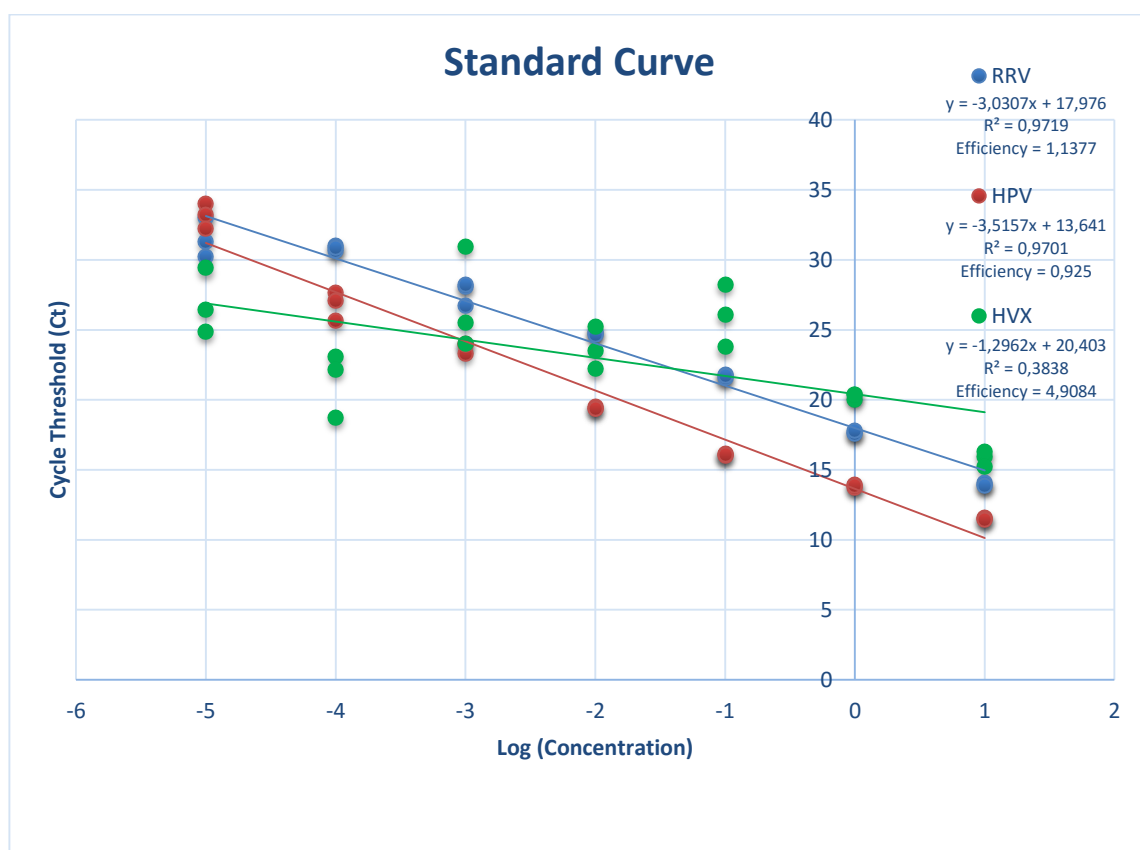


Figura 11: Curva de estandarización y valores estadísticos asociados (R^2 , coeficiente de correlación) del ensayo de sensibilidad de 10 ng a 10 fg de ADN plasmídico de RRV, HPV y HVX usando amplificación dependiente de helicasa termofílica con self-quenched primers. El eje X representa el logaritmo en base 10 de la concentración inicial de ADN plasmídico. El eje Y representa los valores del ciclo umbral (Ct).

Las curvas de estandarización de RRV y HPV obtuvieron un coeficiente de correlación (R^2) de 0.97, lo que significa que el 97% de los datos se ajustan al modelo de línea recta. Por su parte, la curva de estandarización de HVX obtuvo un valor R^2 inferior de 0.38, lo que implica que los datos no se ajustan correctamente al modelo de línea recta.

Las pendientes de las curvas de RRV, HPV y HVX fueron: -3.03, -3.52 y -1.30, respectivamente, y corresponden a una eficiencia de reacción de 113.77%, 92.5% y 490.84%. Los puntos de corte con el eje Y fueron: 17.98, 13.64 y 20.4, respectivamente, y representan el valor de Ct que se obtiene en la reacción cuando se usa una concentración inicial de material genético de una unidad, en el presente caso 1 ng/ μ L de ADN plasmídico.

Una vez finalizada la reacción de amplificación se realizó el escaneo de fluorescencia de los tubos y la electroforesis en gel de agarosa al 2%, los resultados se muestran en la figura 12.

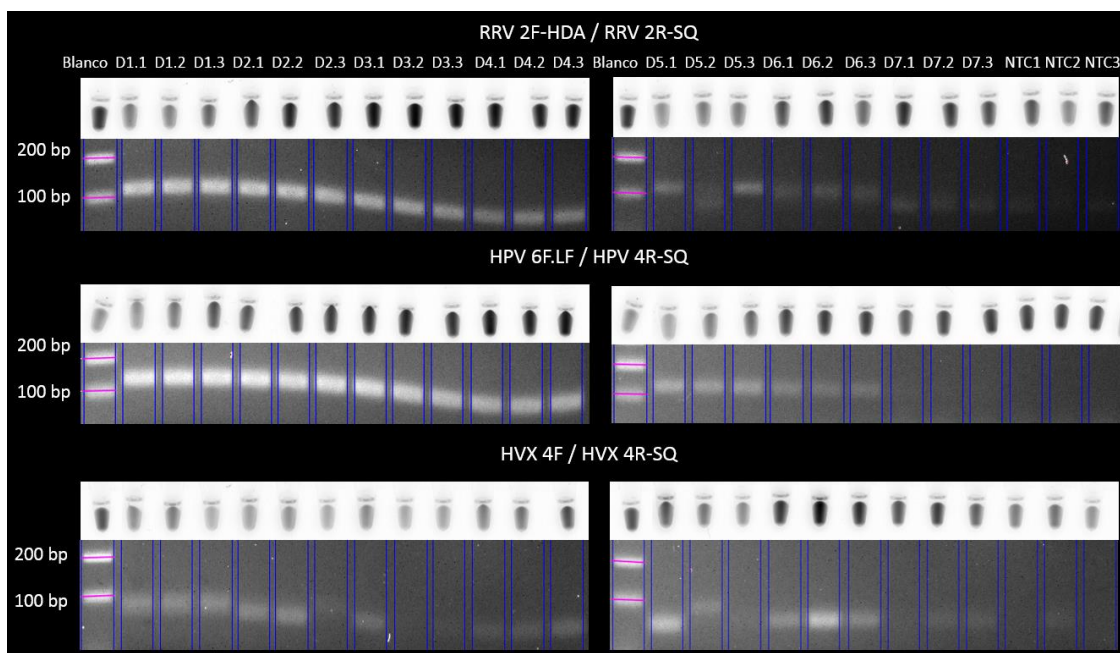


Figura 12: Escaneo de fluorescencia post amplificación (absorción: 488 nm, emisión: 520 nm, fluoróforo: fluoresceína) y electroforesis en gel de agarosa al 2% del ensayo de sensibilidad de 10 ng a 10 fg de ADN plasmídico de RRV, HPV y HVX usando amplificación dependiente de helicasa termofílica con self-quenched primers (tHDA). El primer tubo de cada columna (color gris) corresponde al blanco, e indica el tono de color correspondiente a la cantidad de fluorescencia en una reacción en la que no se ha producido amplificación. Un tono de color más oscuro que el del blanco denota incremento de fluorescencia debido a la amplificación de ácidos nucleicos.

El escaneo de los tubos de RRV, HPV y HVX muestra diluciones de mayor concentración (10 ng) con un tono de color más claro que las de menor concentración (0.01 ng), resultado opuesto a lo esperado. La reducción en el tono de color no es gradual (de un tono oscuro a tonos claros), además no existe una diferencia clara entre las diluciones estándares y el control negativo. Por tales motivos, no se puede usar la imagen del escaneo de fluorescencia post amplificación para establecer el resultado de la reacción.

La imagen de los resultados de la electroforesis en gel de agarosa de RRV y HPV muestra bandas definidas de aproximadamente el tamaño esperado (114 bp y 125 bp, respectivamente) en las diluciones de 10 ng a 0.01 ng, sin embargo en estos geles se observa el efecto smiling (sonrisa) que evita apreciar claramente el tamaño de las bandas. En las diluciones de 0.001 ng y 0.0001 ng se aprecian bandas de menor intensidad y del

tamaño esperado. En el caso de RRV, la dilución de 0.00001 ng y el control negativo muestran bandas tenues y de tamaño menor a 100 bp, posiblemente dímeros de primers. La dilución de 0.00001 ng y el control negativo de HPV no muestran bandas.

Por otra parte, los resultados de la electroforesis en gel de agarosa de HVX muestran bandas difusas del tamaño esperado (89 bp) únicamente en la dilución estándar de 10 ng, seguidamente, se aprecian algunas bandas de menor tamaño en las diluciones de 1 ng a 0.00001 ng. El control negativo muestra una banda tenue en la repetición 2.

Teniendo en cuenta los resultados de los métodos de detección, se estableció que el límite de detección confiable usando tHDA en tiempo real cuantitativa y electroforesis en gel de agarosa al 2% con los pares de primers RRV 2F-HDA / RRV 2R-SQ y HPV 6F.LF / HPV 4R-SQ es de 0.0001 ng/ μ L (D6) de ADN plasmídico de RRV o HPV, respectivamente. Por otra parte, la reacción de tHDA en tiempo real cuantitativa con el par de primers HVX 4F / HVX 4R-SQ no produce amplificación de la molécula diana.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1. Diseño de self-quenched primers para tHDA

El diseño de primers para tHDA es delineado por el uso de la enzima helicasa termoestable Tte-UvrD, la cual permite que la reacción se realice a temperaturas de alrededor de 65°C (An, Tang, Ranalli, Kim, Wytiaz & Kong, 2005). Además la reacción de tHDA tiene como particularidad que sólo puede amplificar eficientemente productos menores a 200 bp (Motré *et al.*, 2008). A diferencia de PCR, en la técnica de tHDA se deben tener en cuenta también las características termodinámicas del producto de amplificación en el proceso diseño de primers. Ventajosamente existen programas bioinformáticos como Primer 3 en los que se puede establecer en los parámetros de diseño las características deseadas del producto de amplificación (Untergasser *et al.*, 2012). Sin embargo, al mismo tiempo que los primers deben cumplir con los lineamientos de diseño para tHDA, un primer de cada pareja debe cumplir con los criterios de diseño de los self-quenched primers, haciendo el proceso de diseño más restrictivo.

Tras analizar los resultados del diseño de primers se aprecia que existe una diferencia considerable entre los tres patógenos modelo en cuanto a los porcentajes de G-C de los productos de amplificación. Los porcentajes de G-C de los productos de amplificación de RRV y HPV son menores al 40%, estimado por Biohelix Corporation (2014) como preferible y a su vez se encuentran cercanos a dicho valor (36 y 34.4% respectivamente), mientras que los porcentajes de G-C de los cuatro productos de amplificación de HVX son superiores al 40% y están más alejados de tal valor, fluctuando de 49.4 a 55.9%. A su vez, esto se ve reflejado en el análisis de estructuras secundarias de los productos de amplificación, en el que los productos de RRV y HPV presentaron las estructuras secundarias con las menores temperaturas de melting (de 25.4 a 52.5°C), mientras que todos los productos de HVX presentaron estructuras secundarias con temperaturas de melting superiores (de 59.3 a 69.9°C).

4.2. Inhibición de la amplificación de las muestras de RRV

La síntesis de ADNc y amplificación de las muestras de HPV y HVX se desarrolló sin inconvenientes. Sin embargo, en el caso de RRV inicialmente no se logró amplificar el ADNc mediante tHDA, ni con la prueba de referencia de PCR. Rohozinski *et al.* (2001) mencionan que el tejido de las hojas y tallo de rosa presenta altos niveles de compuestos fenólicos y taninos que dificultan la extracción de ácidos nucleicos. Los fenoles son inhibidores conocidos de la PCR, actúan entrelazándose con las moléculas de ARN bajo condiciones oxidantes impidiendo la extracción del ARN. Además, se conoce que el fenol tiene la propiedad de degradar las ADN polimerasas, lo que inhibe la reacción de amplificación (Schrader, Schielke, Ellerbroek & Johne, 2012). Ante tal situación se plantearon dos estrategias para la solución del problema.

La primera estrategia consistió en añadir los mejoradores BSA y PVP a las reacciones de amplificación. El mejorador BSA tiene la capacidad de enlazarse con algunos inhibidores, entre ellos el ácido tánico, además tiene un efecto benéfico en el rendimiento de la PCR (Schrader *et al.*, 2012; Farell & Alexandre, 2012). Por su parte, el PVP forma complejos con los polifenoles mediante enlaces de hidrógeno ayudando a su remoción (John, 1992). Pese a los beneficios citados en la literatura acerca del BSA y PVP, únicamente se observó amplificación del producto deseado en tHDA en la muestra que contenía menor volumen de ADNc (2 μ L), lo que puede deberse a que en un menor volumen de ADNc existe una menor cantidad de inhibidores. También existió amplificación del producto deseado en PCR, comprobado por una banda tenue en el gel de agarosa, lo que evidencia un bajo rendimiento de la reacción.

La segunda estrategia consistió en precipitar el ADNc con etanol absoluto y cloruro de sodio una vez finalizada la reacción de síntesis. La precipitación con etanol absoluto es un método de concentración y purificación de ADN, sirve para remover sales y productos de reacción tras realizar una reacción enzimática (Crouse & Amorese, 1987; Fregel, González & Cabrera, 2010). La amplificación del ADNc precipitado de RRV mediante tHDA generó bandas definidas del tamaño deseado con todos los volúmenes de ADNc,

además la amplificación mediante PCR produjo una banda más intensa que la generada con la primera estrategia. A pesar que con el proceso de precipitación se puede perder concentración de ácidos nucleicos, el método demostró ser eficiente eliminando las sustancias que causaron la inhibición de la amplificación. Además, cabe mencionar que se trata de un método sencillo y que requiere de reactivos de menor costo que los mejoradores BSA y PVP.

4.3. Gradiente de temperatura

La reacción de tHDA es isotérmica, lo que implica que la separación de la doble cadena de ADN, el alineamiento de los primers, la apertura e hibridación de los self-quenched primers (en el caso de la presente investigación) y la polimerización ocurren a una sola temperatura (Tong *et al.*, 2008). De tal manera, mediante la realización del gradiente de temperatura se determina la temperatura óptima a la cual pueden ocurrir de forma coordinada todos los procesos de tHDA con self-quenched primers.

Tomando en cuenta los resultados del gradiente de temperatura en el que los primers de RRV y HPV generaron los productos de amplificación deseados, mientras que los primers de HVX generaron productos de menor tamaño, no generaron amplificación o generaron bandas difusas aproximadamente del tamaño esperado, se presume que el mayor porcentaje de G-C (de 49.4 a 55.9%) común a todos los productos de amplificación de HVX en relación a los productos de amplificación de RRV y HPV (36 y 34.4%, respectivamente) pudo ocasionar dificultades en la reacción de tHDA.

Es de amplio conocimiento que los pares de bases G-C tienen tres enlaces de hidrógeno, mientras que los pares de bases adenina – timina (A-T) solo poseen dos. De tal forma, las secuencias ricas en pares G-C tienen temperaturas de melting superiores, que requieren más energía para su separación que aquellas ricas en pares A-T (Suspène *et al.*, 2008). Comúnmente las fallas en la amplificación de PCR a partir de bibliotecas de ADNc o secuencias de ARN se atribuyen a altos porcentajes de G-C. Además, se sabe que las regiones ricas en G-C generan estructuras secundarias complejas que pueden provocar la

terminación prematura de la polimerización generando productos de menor tamaño (Sahdev, Saini, Tiwari, Saxena & Singh Saini, 2007; Jensen, Fukushima & Davis, 2010).

La información mencionada sobre los efectos de los altos porcentajes de G-C en la reacción de PCR coincide con los resultados observados en el gradiente de temperatura de HVX usando tHDA y es respaldada por el análisis de las estructuras secundarias de los productos de amplificación en las que se evidenció horquillas con temperaturas de melting de hasta 69.9°C, que en teoría no llegarían a abrirse e interrumpirían la polimerización. Si bien existió amplificación en PCR con todos los primers de HVX, se debe tener en consideración que la reacción de tHDA no usa calor para separar la doble cadena de ADN, en cambio, se vale de la enzima helicasa, la cual usa la energía química del dATP que se consume conforme avanza la reacción. Así, resultaría más difícil amplificar una secuencia rica en G-C mediante tHDA, que mediante PCR, ya que el recurso de energía para separar la doble cadena del ADN en tHDA es agotable mientras que en PCR cuenta con una fuente continua de calor. Por lo tanto, la reacción de tHDA podría ser más susceptible a las regiones ricas en G-C que la reacción de PCR.

4.4. Optimización de concentraciones de primers y sulfato de magnesio

Dentro de los parámetros que se recomienda optimizar en la reacción de tHDA están la concentración de primers y de MgSO₄ (Biohelix Corporation, 2014). En el ensayo de optimización de RRV se produjo amplificación en todos los tratamientos, sin embargo, también existió amplificación de productos de menor tamaño en los controles negativos, que corresponderían a la formación de dímeros de primers. Innis y Gelfand (1990) mencionan que las altas concentraciones de primers pueden favorecer la formación de productos no específicos y de artefactos tipo dímeros, los cuales pueden convertirse en sustrato para la reacción de amplificación y competir con el producto deseado por la enzima, los dNTPs y los primers. Por otro lado, entre algunos factores que son influenciados por la concentración del ion de magnesio (Mg⁺⁺) están: el alineamiento de los primers, la temperatura de disociación de la secuencia diana y del producto de amplificación, la especificidad del producto y la formación de dímeros de primers.

Nazarenko (2006) recomienda bajar la concentración de Mg^{++} cuando exista aparición de dímeros de primers. Así, de acuerdo con las recomendaciones de la literatura para el caso de RRV se escogió el tratamiento con menor concentración de primers y de $MgSO_4$ con el fin de mitigar la aparición de dímeros.

El ensayo de optimización de HPV mostró amplificación en todos los tratamientos y no se evidenció la formación de artefactos, demostrando que la pareja de primers HPV 6F.LF / HPV 4R-SQ posee las características necesarias para el uso de la técnica de tHDA con self-quenched primers. Los resultados de la optimización de RRV y HPV evidenciaron además que la reacción de tHDA con self-quenched primers fue favorecida con la combinación de las mayores concentraciones de primers (0.2 μM) y de $MgSO_4$ (4.5 mM) evaluadas en el presente estudio, ya que dicho tratamiento fue el primero en alcanzar la fase exponencial según las curvas de detección de fluorescencia en tiempo real, seguido por los tratamientos con menores concentraciones de primers y de $MgSO_4$. Sin embargo, como se mencionó anteriormente se debe tener en cuenta al momento de seleccionar las concentraciones de primers y de $MgSO_4$ que al favorecer la reacción también se puede favorecer la formación de artefactos.

En el caso de HVX, los primers HVX 4F / HVX 4R-SQ seleccionados para el ensayo de optimización no produjeron amplificación, lo que puede deberse al mayor porcentaje de G-C presente en los productos de amplificación de HVX, como se explicó anteriormente.

4.5. Sensibilidad de la técnica de tHDA con self-quenched primers

El ensayo de sensibilidad demostró que es posible la detección y medición de fluorescencia en tiempo real usando self-quenched primers con tHDA para realizar el diagnóstico de virus vegetales, siempre y cuando la técnica sea correctamente estandarizada y se compruebe que no se produzca la formación de artefactos que provoquen falsos positivos. Por lo contrario, la detección de la fluorescencia post amplificación mediante un escaneo no es un método confiable de detección para el caso

del presente estudio, puesto que, no fue posible diferenciar claramente las reacciones positivas de las negativas. Nazarenko (2006) menciona que los self-quenched primers poseen una fluorescencia de fondo superior a la de los primers etiquetados con dos moléculas (fluoróforo y apagador), por lo que en el caso de querer utilizar un método de detección de fluorescencia post amplificación, se recomienda el uso de oligonucleótidos marcados con un fluoróforo y un apagador.

Pese a seleccionar las menores concentraciones de primers y de $MgSO_4$ para el ensayo de sensibilidad de RRV, siguieron apareciendo en control negativo productos de tamaño menor a 100 bp que corresponden a dímeros de primers. Vincent, Xu y Kong (2004) también reportan la presencia productos de amplificación de menor peso molecular al deseado atribuidos a dímeros de primers en un ensayo de HDA para la detección de células de *Treponema denticola*, los dímeros se observaron conforme la concentración de células fue disminuyendo y también aparecieron en el control negativo. Además mencionan que los dímeros de primers pueden producirse en la reacción de HDA cuando la concentración inicial de material genético a ser amplificado es demasiado baja. Doseeva *et al.* (2011) señalan que la reacción de tHDA tiene algunas limitaciones, entre ellas que la amplificación de productos inespecíficos y la formación de dímeros de primers son más pronunciados que en PCR. Por ende, el diseño de self-quenched primers para tHDA requeriría de una revisión más exhaustiva de la formación de estructuras secundarias como homodímeros y heterodímeros, para evitar así la posible obtención de falsos positivos.

En cuanto a los resultados de las curvas de estandarización, Invitrogen Corporation (2008) recomienda que la eficiencia de la reacción se encuentre dentro del rango de 90 a 110%, como es el caso de HPV, en que la eficiencia obtenida fue de 92.5%. También se menciona que una eficiencia superior al 110%, como en el caso de RRV con una eficiencia de 113.77%, puede deberse a la presencia de inhibidores.

El límite de detección de la técnica de tHDA con los primers RRV 2F-HDA / RRV 2R-SQ y HPV 6F.LF / HPV 4R-SQ llegó hasta 0.0001 ng (100 fg) de ADN plasmídico, rebasando el límite de detección de 300 fg obtenido por Tong *et al.* (2008) en su

experimento de detección de ADN plasmídico de *Bacillus anthracis* usando tHDA multiplex con sondas TaqMan. A pesar que las sondas TaqMan se caracterizan por su alta sensibilidad y especificidad, su diseño es complejo y el hecho de que posean dos moléculas añadidas al oligonucleótido usado como sonda (fluoróforo y apagador) hace que su costo se eleve (Invitrogen Corporation, 2008). Por otra parte, los self-quenched primers prescinden del uso de una sonda y son etiquetados únicamente con un fluoróforo, convirtiéndose en una alternativa sencilla y económica frente a otros métodos de detección fluorogénica (Kusser, 2006).

Interesantemente Arif *et al.* (2014) lograron alcanzar un límite de detección de 1 fg de ADN plasmídico usando la técnica de tHDA con la pareja de primers HPV 6F.LF / HPV 4R.LF en la que se basó el diseño de los primers de HPV del actual proyecto, lo que demuestra que la técnica de tHDA puede alcanzar límites de detección superiores al obtenido en la presente investigación.

El hecho de contar con dos parejas de primers (RRV 2F-HDA / RRV 2R-SQ y HPV 6F.LF / HPV 4R-SQ) que produjeron amplificación con la técnica de tHDA y con cuatro parejas que no (HVX 1F-HDA / HVX 1R-SQ, HVX 2F / HVX 2R-SQ, HVX 3F / HVX 3R-SQ y HVX 4F / HVX 4R-SQ) sirvió para contrastar las características de los primers que funcionaron y de los que no. De tal forma, se puede delinear de mejor manera los criterios de diseño de self-quenched primers para tHDA. Como se mencionó anteriormente, los productos de amplificación de HVX se caracterizaron por tener un contenido de G-C superior al 49%, así que lo aconsejable sería tener productos de amplificación con porcentajes de G-C entre 35 y 45%, teniendo en cuenta el porcentaje de 40% recomendado por Biohelix Corporation (2014). También se debe verificar que la temperatura de melting de las estructuras secundarias de los productos de amplificación sea menor a 60°C, puesto que la reacción de tHDA se produce en un rango de 60 a 70°C. Por último, se sugiere que la extensión en el extremo 5' de los self-quenched primers que ayuda a formar la estructura de horquilla no sobrepase los 6 nucleótidos, como en el caso de los primers RRV 2R-SQ y HPV 4R-SQ.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- La técnica de tHDA con self-quenched primers es afectada por secuencias de nucleótidos con porcentajes de G-C superiores al 50%.
- La amplificación de los productos deseados usando la técnica de tHDA con self-quenched primers se logró únicamente con las parejas de primers RRV 2F-HDA / RRV 2R-SQ y HPV 6F.LF / HPV 4R-SQ, que presentaron productos de amplificación con porcentajes de G-C de 36 y 34.4% respectivamente.
- Las parejas de primers HVX 1F-HDA / HVX 1R-SQ, HVX 2F / HVX 2R-SQ, HVX 3F / HVX 3R-SQ y HVX 4F / HVX 4R-SQ cuyos productos de amplificación presentaron porcentajes de G-C de 55.9, 52.3, 52.4 y 49.4%, respectivamente, no produjeron amplificación de los productos deseados con la técnica de tHDA.
- La temperatura de melting de las estructuras secundarias de los productos de amplificación es un indicador de diseño para self-quenched primers en el esquema de tHDA, de tal manera que si la temperatura de melting de las estructuras secundarias supera el valor de 60°C existe la posibilidad de que se trunque la reacción.
- El análisis *in silico* de las estructuras secundarias de los self-quenched primers es una herramienta de gran utilidad durante el diseño de primers, puesto que, permite observar si existe la formación de la horquilla a temperaturas menores a la de reacción y si la horquilla se abre a la temperatura que se produce la reacción.
- La combinación óptima de las concentraciones de primers y de Mg⁺⁺ son exclusivas para cada pareja de primers y producto de amplificación.

- Las concentraciones más bajas de primer (0.15 μM) y de sulfato de magnesio (4 mM) evaluadas en el presente estudio no lograron eliminar la formación de dímeros primers durante la amplificación de RRV.
- La técnica de tHDA con los primers RRV 2F-HDA / RRV 2R-SQ y HPV 6F.LF / HPV 4R-SQ alcanzó un límite de sensibilidad de 0.0001 ng de ADN plasmídico.
- Se confirmó la hipótesis planteada de que los self-quenched primers pueden ser usados con la técnica de tHDA para una detección sensible de virus vegetales.
- La detección y medición de fluorescencia en tiempo real usando self-quenched primers con tHDA es un método viable de diagnóstico de virus vegetales.
- La detección de fluorescencia mediante la imagen de un escaneo post amplificación usando self-quenched primers con tHDA no permite distinguir de forma clara las muestras positivas de las negativas, por lo tanto, no es un método de detección confiable.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- Se recomienda seguir las normas de bioseguridad del laboratorio y usar los equipos de protección personal como guantes y mandil con el fin de evitar la contaminación de las muestras, reactivos y equipos.
- Para evitar la formación de artefactos es recomendable realizar durante el diseño de primers una revisión exhaustiva de las posibles estructuras como homodímeros y heterodímeros que pueden generar los primers.
- Se recomienda realizar ensayos piloto con primers que tengan la misma secuencia de los self-quenched primers diseñados pero que no estén marcados con el fluoróforo. Así se puede comprobar el funcionamiento de los primers mediante electroforesis en gel de agarosa y seleccionar aquellos que produzcan los mejores resultados. La presente estrategia constituye un ahorro representativo de dinero, puesto que, los primers con modificaciones son mucho más costosos que los primers regulares.
- Debido a que la técnica de tHDA es sensible a los cambios en la concentración de sales se recomienda cubrir la mezcla de la reacción con aceite mineral estéril.
- Se recomienda la implementación de un control interno para comprobar los casos en los que se produce inhibición de la reacción de amplificación, especialmente en cuando se trabaja con tejidos que se conoce presentan inhibidores, como es el caso de las hojas y tallos de rosa.
- Se recomienda realizar un estudio más a fondo sobre la influencia del contenido de G-C en la reacción de tHDA.
- El desarrollo de un programa bioinformático de acceso libre para el diseño de self-quenched primers sería de gran ayuda para la difusión y uso de esta técnica de detección fluorogénica de ácidos nucleicos.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

1. An, L., Tang, W., Ranalli, T. A., Kim, H. J., Wytiaz, J., & Kong, H. (2005). Characterization of a Thermostable UvrD Helicase and Its Participation in Helicase-dependent Amplification. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (32), 28952-28958.
2. Arif, M., Aguilar-Moreno, G., Wayadande, A., Fletcher, J., & Ochoa-Corona, F. (2014). Primer Modification Improves Rapid and Sensitive *In Vitro* and Field-Deployable Assays for Detection of High Plains Virus Variants. *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (1), 320-327.
3. Barreda, S. (2013). Detección rápida de *Mycobacterium tuberculosis* mediante un genoensayo electroquímico. *Repositorio de la Universidad de Oviedo*, 1-64.
4. Biohelix Corporation. (2014). *IsoAmp®III Universal tHDA Kit*. Obtenido de BioHelix: http://www.biohelix.com/pdf/H0120S_IsoAmp%20III_BH_eDatacard.pdf
5. Bio-Rad Laboratories. (2015). *PCR Primer and Probe Chemistries*. Obtenido de Bio-Rad: <http://www.bio-rad.com/en-us/applications-technologies/pcr-primer-probe-chemistries>
6. Cann, A. (2005). *Principios de Virología Molecular*. Burlington, USA: ELSEVIER.
7. Chang, C. C., Chen, C. C., Wei, S. C., Lu, H. H., Lian, Y. H., & Lin, C. W. (2012). Diagnostic Devices for Isothermal Nucleic Acid Amplification. *Sensors*, 12, 8319-8337.
8. Crouse, J., & Amorese, D. (1987). Ethanol Precipitation: Ammonium Acetate as an Alternative to Sodium Acetate. *Focus*, 9(2), 3-5.

9. De La Torre, C. (2009). Molecular characterization, differential movement and construction of infectious cDNA clones of an Ohio isolate of *Hosta virus X*. *Ohio State University, Plant Pathology*, 1-107.
10. De La Torre, C. M., Qu, F., Redinbaugh, M. G., & Lewandowski, D. J. (2012). Biological and Molecular Characterization of a U.S. Isolate of *Hosta virus X*. *Phytopathology*, 102 (12), 1176-1181.
11. Dobhal, S., Arif, M., Olson, J., & Ochoa-Corona, F. M. (2014). Comparison of end point RT-PCR and RT-HDA using primer pairs for five viruses frequently infecting ornamental and nursery crops. *Phytopathology*, 104 (Suppl. 3), S3.34.
12. Dobhal, S., Olson, J., Arif, M., Garcia-Suarez, J. A., & Ochoa-Corona, F. M. (2014). Development of endpoint RT-PCR for *Rose Rosette virus* and screening of *Rosa* spp. from eight states of the United States. *Phytopathology*, 104 (Suppl. 3), S3.34.
13. Doseeva, V., Forbes, T., Wolff, J., Khripin, Y., O'Neil, D., Rothmann, T., & Nazarenko, I. (2011). Multiplex isothermal helicase-dependent amplification assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 71, 354-365.
14. Farrell, E. M., & Alexandre, G. (2012). Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. *BMC Research Notes*, 5(257).
15. Fregel, R., González, A., & Cabrera, V. M. (2010). Improved ethanol precipitation of DNA. *Electrophoresis*, 31, 1350–1352.
16. Gergerich, R., & Dolja, V. (2006). Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. *The Plant Health Instructor*.
17. Gill, P., & Ghaemi, A. (2008). Nucleic Acid Isothermal Amplification Technologies - A Review. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, 27 (3), 224-243.

18. Gill, P., Alvandi, A.-H., Abdul-Tehrani, H., & Sadeghizadeh, M. (2008). Colorimetric detection of *Helicobacter pylori* DNA using isothermal helicase-dependent amplification and gold nanoparticle probes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 62, 119-124.
19. Goldmeyer, J., Li, H., McCormac, M., Cook, S., Stratton, C., Lemieux, B., . . . Tang, Y.-W. (2008). Identification of *Staphylococcus aureus* and Determination of Methicillin Resistance Directly from Positive Blood Cultures by Isothermal Amplification and a Disposable Detection Device. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (4), 1534-1536.
20. Hong, C., Hansen, M., & Day, E. (2012). *Rose Rosette Disease*. Obtenido de Virginia Cooperative Extension: http://pubs.ext.vt.edu/450/450-620/450-620_pdf.pdf
21. ICTV. (2014). *Virus Taxonomy: 2014 Release*. Obtenido de International Committee on Taxonomy of Viruses: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
22. Innis, M. A., & Gelfand, D. H. (1990). Optimization of PCRs. En M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (págs. 3-12). San Diego, California: Academic Press.
23. Integrated DNA Technologies. (2014). *Oligo Analyzer 3.1*. Obtenido de Integrated DNA Technologies: <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>
24. Invitrogen Corporation. (2002). *Sensitive, specific real-time PCR without probes*. Obtenido de Life Technologies: <http://www.gene-quantification.de/invitrogen-lux-brochure.pdf>
25. Invitrogen Corporation. (2008). *REAL-TIME PCR: From theory to practice*. Obtenido de Warwick: http://www2.warwick.ac.uk/fac/sci/lifesci/intranet/staffpg/support/genomics_new/real-time_pcr/qpcr_handbook.pdf

26. Jensen, M. A., Fukushima, M., & Davis, R. W. (2010). DMSO and Betaine Greatly Improve Amplification of GC-Rich Constructs in *De Novo* Synthesis. *PLoS ONE*, 5(6), 1-5.
27. Jeong, Y.-J., Park, K., & Kim, D.-E. (2009). Isothermal DNA amplification *in vitro*: the helicase-dependent amplification system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66.
28. John, M. E. (1992). An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Research*, 20(9), 2381.
29. Kim, H.-J., Tong, Y., Tang, W., Quimson, L., Cope, V. A., Pan, X., . . . Yen-Lieberman, B. (2011). A rapid and simple isothermal nucleic acid amplification test for detection of herpes simplex virus types 1 and 2. *Journal of Clinical Virology*, 50, 26-30.
30. Kusser, W. (2006). Use of Self-Quenched, Fluorogenic LUX™ Primers for Gene Expression Profiling. In V. V. Didenko, *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes* (pp. 115-133). New Jersey: Humana Press.
31. Laney, A., Keller, K., Martin, R., & Tzanetakis, I. (2011). A discovery 70 years in the making: characterization of the *Rose rosette virus*. *Journal of General Virology*, 92, 1727-1732.
32. Lebas, B. S., Ochoa-Corona, F. M., Elliott, D. R., Tang, Z., & Alexander, B. J. (2005). Development of an RT-PCR for High Plains virus Indexing Scheme in New Zealand Post-Entry Quarantine. *Plant Disease*, 89, 1103-1108.
33. Lewandowski, D. J. (2008). *Hosta virus X - Ohioline*. Obtenido de The Ohio State University: <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/pdf/3069.pdf>
34. Mielke, N., & Mühlbach, P. (2012). Emaravirus: A Novel Genus of Multipartite, Negative Strand RNA Plant Viruses. *Viruses*, 4, 1515-1536.

35. Motré, A., Li, Y., & Kong, H. (2008). Enhancing helicase-dependent amplification by fusing the helicase with the DNA polymerase. *Gene* 420, 17-22.
36. Nazarenko, I. (2006). Homogeneous Detection of Nucleic Acids Using Self-Quenched Polymerase Chain Reaction Primers Labeled With a Single Fluorophore (LUX™ Primers). In V. V. Didenko, *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes* (pp. 95-114). New Jersey: Humana Press.
37. Nazarenko, I., Pires, R., Lowe, B., Obaidy, M., & Rashtchian, A. (2002a). Effect of primary and secondary structure of oligodeoxyribonucleotides on the fluorescent properties of conjugated dyes. *Nucleic Acids Research*, 30 (9), 2089-2195.
38. Nazarenko, I., Lowe, B., Darfler, M., Ikonomi, P., Schuster, D., & Rashtchian, A. (2002b). Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic Acids Research*, 30 (9), 1-7.
39. NCBI. (2015). *Nucleotide*. Obtenido de National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
40. Nicholas, K. B., & Nicholas, H. B. (1997). GenDoc: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments. *Distributed by the author*.
41. Oriero, E. C., Jacobs, J., Van Geertruyden, J. P., Nwakanma, D., & D'Alessandro, U. (2015). Molecular-based isothermal tests for field diagnosis of malaria and their potential contribution to malaria elimination. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70, 2-13.
42. Punja, Z., De Boer, S., & Sanfacon, H. (2007). *Biotechnology and Plant Disease Management*. Oxfordshire, UK: CABI.
43. Rohozinski, J., Epstein, A., & Hill, J. (2001). Probable mechanical transmission of a virus-like agent from rose rosette disease-infected multiflora rose to *Nicotiana* species. *Association of Applied Biologists*, 138, 181-186.

44. Sahdev, S., Saini, S., Tiwari, P., Saxena, S., & Singh Saini, K. (2007). Amplification of GC-rich genes by following a combination strategy of primer design, enhancers and modified PCR cycle conditions. *Molecular and Cellular Probes*, 21(4), 303-307.
45. Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 1014-1026.
46. She, Y.-M., Seifers, D. L., Haber, S., Ens, W., & Standing, K. G. (2004). Characterization of the Agent of ‘High Plains Disease’ Mass Spectrometry Determines the Sequence of the Disease-Specific Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (1), 488-494.
47. Suspène, R., Renard, M., Henry, M., Guétard, D., Puyraimond-Zemmour, D., Billecocq, A., . . . Wain-Hobson, S. (2008). Inverting the natural hydrogen bonding rule to selectively amplify GC-rich ADAR-edited RNAs. *Nucleic Acids Research*, 36(12).
48. Swiss Institute of Bioinformatics. (2008). *Potexvirus*. Obtenido de ViralZone: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/272.html
49. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12), 2725–2729.
50. Tong, Y., Tang, W., Kim, H.-J., Pan, X., Ranalli, T., & Kong, H. (2008). Development of isothermal TaqMan assays for detection of biothreat organisms. *BioTechniques*, 45 (5), 543-557.
51. Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B., Remm, M., & Rozen, S. (2012). Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40, 40 (15), 1-12.

52. Vincelli, P., & Tisserat, N. (2008). Nucleic Acid–Based Pathogen Detection in Applied Plant Pathology. *Plant Disease*, 92 (5), 660-669.
53. Vincent, M., Xu, Y., & Kong, H. (2004). Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *European Molecular Biology Organization*, 5 (8), 795-800.
54. Wei, M. S., Zhang, Y. J., Li, G. F., Ma, J., & Li, M. (2013). First Report of *Hosta virus X* Infecting Hosta Plants in China. *Plant Disease*, 97 (3), 429.2 - 429.2.
55. Yan, L., Zhou, J., Zheng, Y., Gamson, A. S., Roembke, B. T., Nakayama, S., & Sintim, H. O. (2014). Isothermal amplified detection of DNA and RNA. *Molecular Biosystems*, 10, 970-1003.
56. Zanolli, L. M., & Spoto, G. (2013). Isothermal Amplification Methods for the Detection of Nucleic Acids in Microfluidic Devices. *Biosensors*, 3, 18-43.
57. Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(1-2), 203-214.