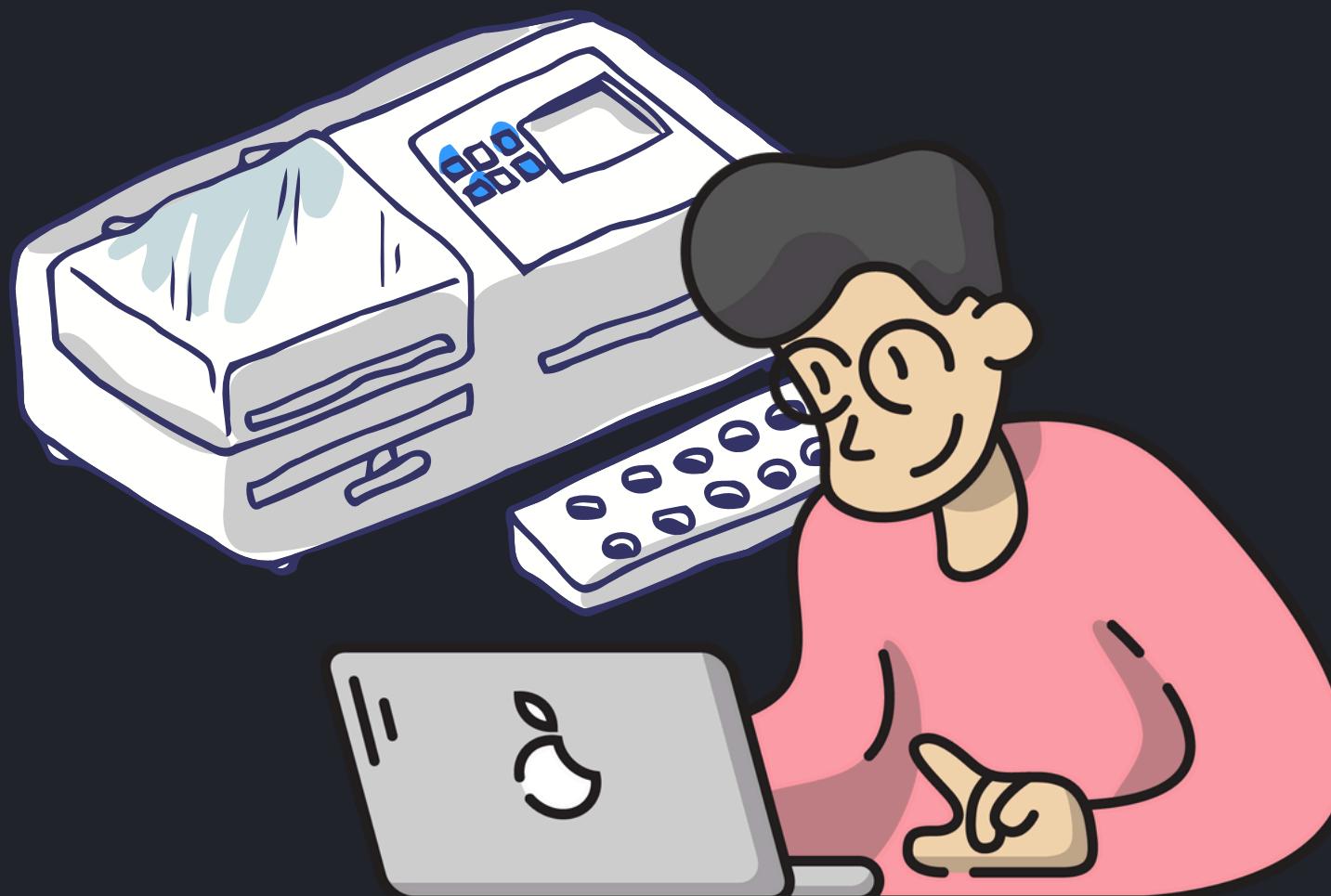


Proyecto final

A.M.P.L.I.F.Y

Amplification of Proteins For MicroBaby's



<Por="Pacheco Estrella María Fernanda &
Puente Rivera Diego"/>



LICENCIATURA EN
MICROBIOLOGIA

Contenidos

1	Introducción
9	Objetivo
11	Metodología
14	Demostración
15	Resultados
17	Conclusión

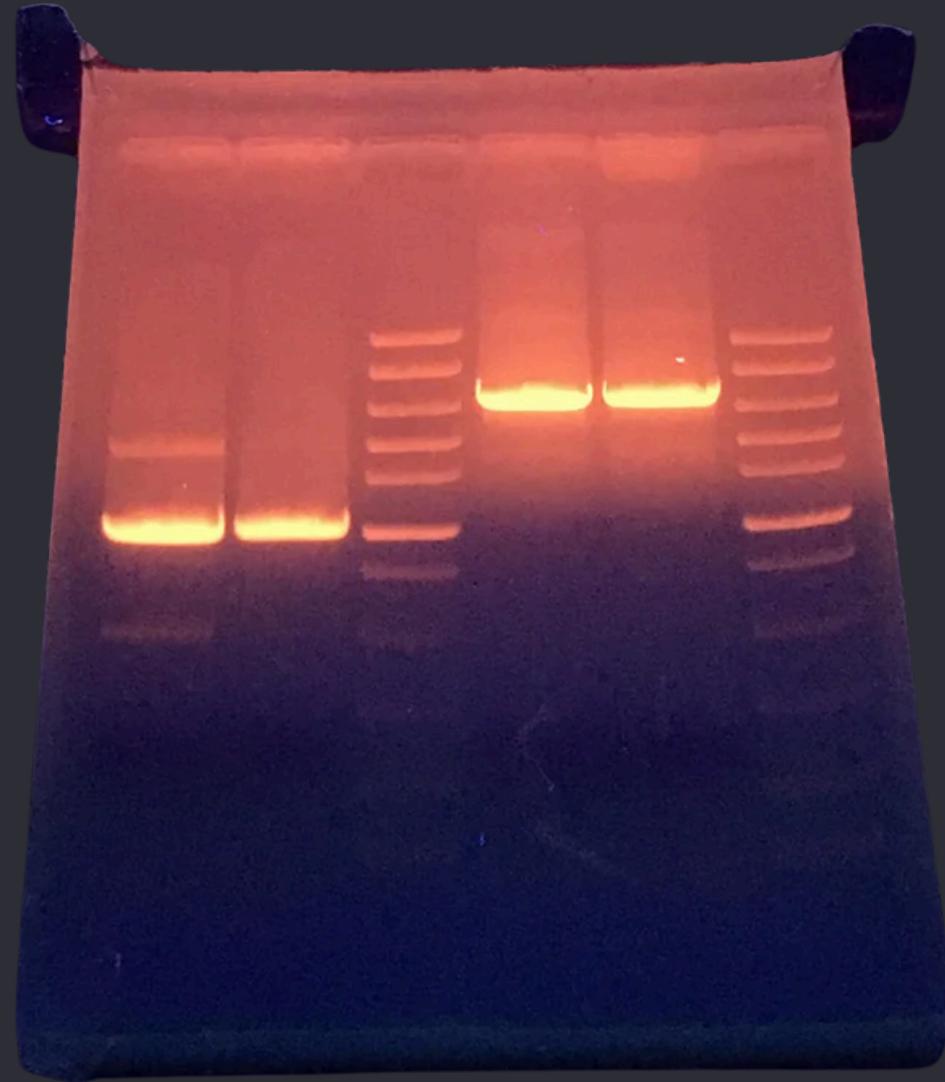
Introducción

¿Qué es una Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)?

Una PCR es una reacción enzimática *in vitro* la cual amplifica millones de veces una secuencia de DNA específica durante varios ciclos en los que se copia fielmente. La reacción se lleva a cabo con ayuda de la ADN polimerasa.

Se utiliza para diagnosticar enfermedades infecciosas, detectar cambios genéticos relacionados con el cáncer, etc.

Hay varios tipos: múltiple, anidada, tiempo real, punto final, etc.



Componentes de la PCR tiempo real

- **ADN:** Carga negativa por los grupos fosfatos. Son el templado porque funcionan como molde.
- **ADN polimerasa:** Se encarga de la catálisis de la reacción, sintetiza las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco.
- **Taq ADN polimerasa:** Resiste altas temperaturas y le da estabilidad en la reacción.
- **Primers:** Delimitan la secuencia del ADN que se va a simplificar y dirigen a la polimerasa para copie específicamente una región determinada.
- **dNTP's:** Sirven como los componentes básicos para la síntesis de las nuevas hebras de ADN.
- **Buffer:** Ayuda a mantener un pH estable para que la ADN polimerasa funcione correctamente y para proteger el material genético de la degradación con el EDTA.
- **Gen reportero con fluorescencia:** Para detectar la actividad del promotor.

¿Cómo se realiza una PCR
en tiempo real?

> Diseño de primers

Primers: Secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan a la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a esta. Hay forward y reverse.

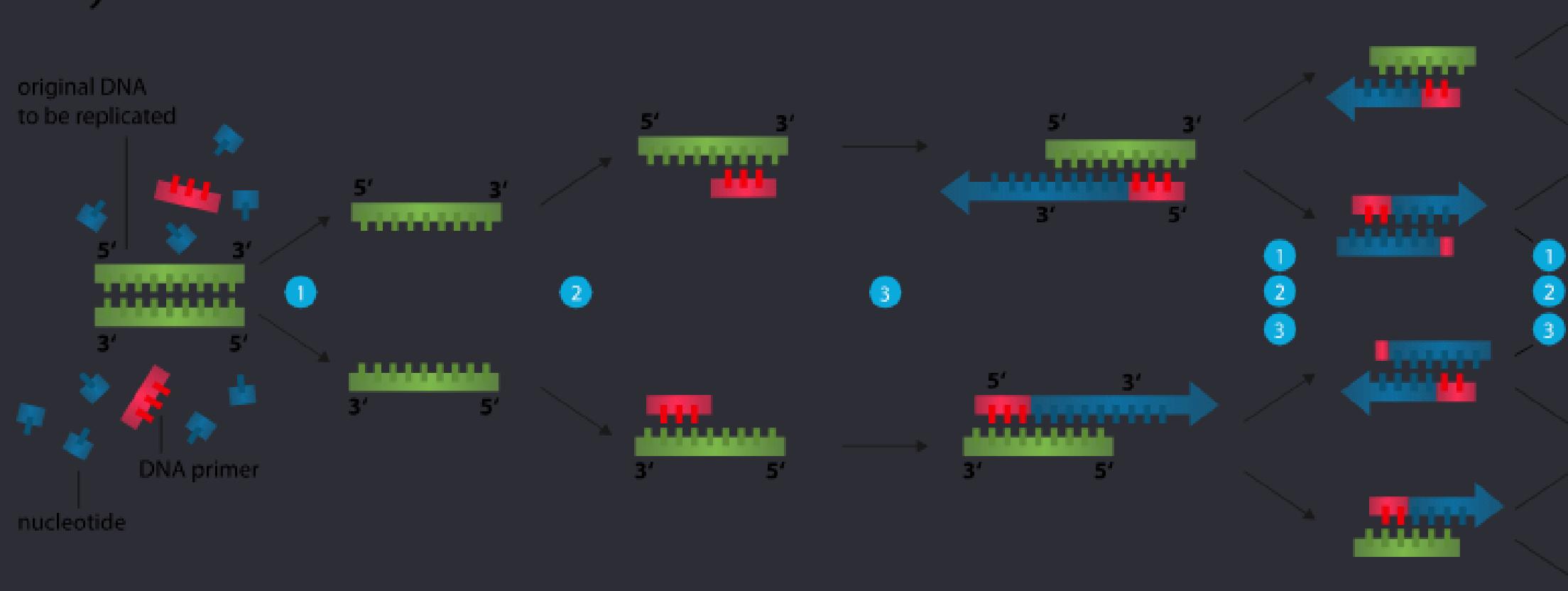
1. Identificar la secuencia diana.
2. Elegir el Forward (hebra de 5' a 3'); elegir el Reverse (hebra 3' a 5').
3. Se utiliza un software especializado para diseñarlos.
4. Usar herramientas para asegurar que los primers no se unen a otra región del genoma.

> Criterios para diseñar:

- Longitud: 18-25 bp.
- Contenido GC: 40/60%.
- Temperatura de fusión: F y R no diferir más de 5°C.
- Evitar más de 3 bases con GC en el 3'.
- Evitar que los primers formen horquillas o complementarios entre sí (dímeros).
- Asegurar que el primer solo se une al gen o región de interés.

Proceso de PCR

Polymerase chain reaction - PCR



- 1 Denaturation at 94-96°C
- 2 Annealing at ~68°C
- 3 Elongation at ca. 72 °C

Dificultades de la PCR y el diseño de primers

> PCR:

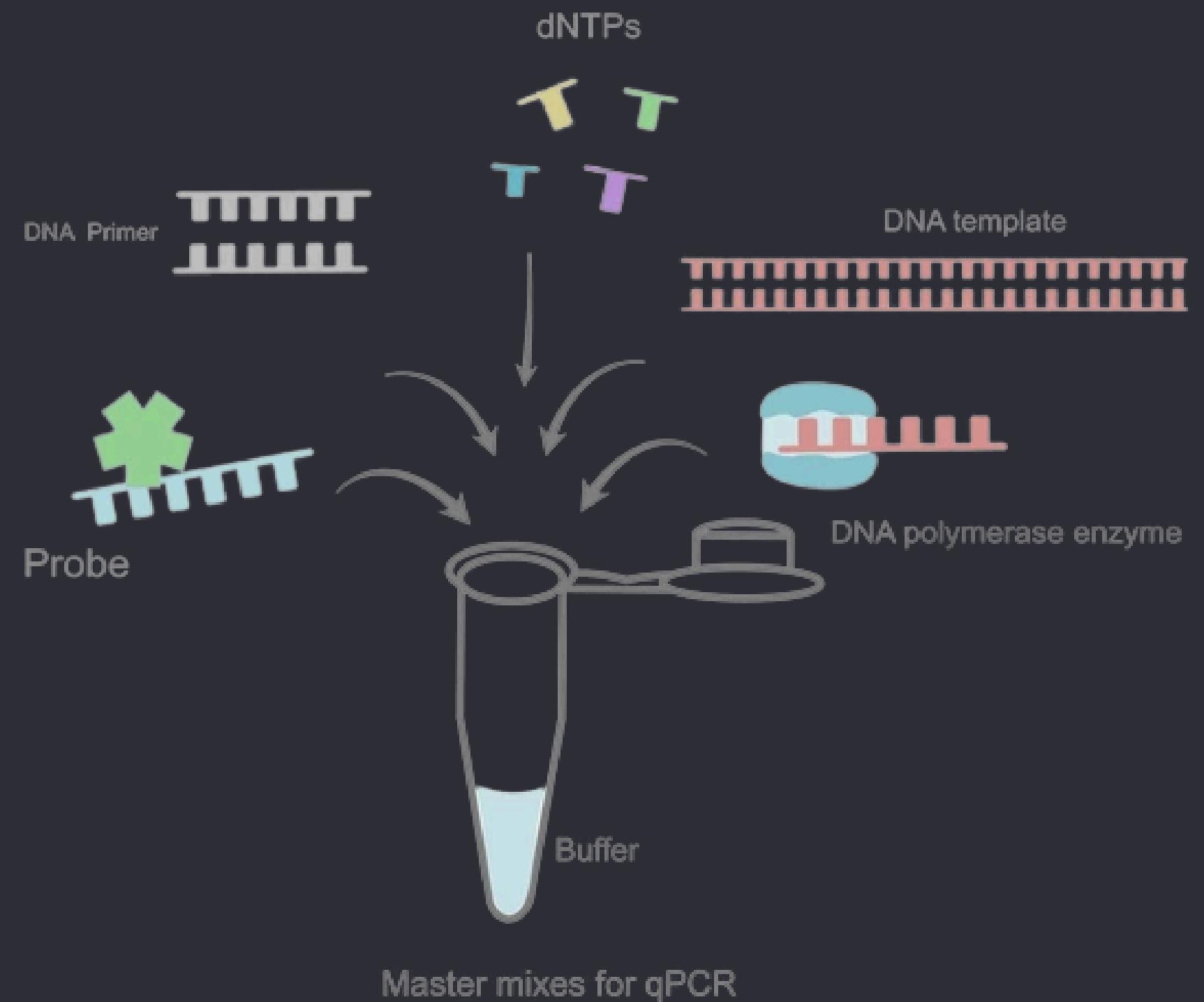
1. Contaminación de la muestra.
2. Degradación del DNA.
3. Concentración incorrecta de reactivos.
4. Programa de amplificación incorrecto (temperatura y tiempo mal ajustado).

> Diseño de primers:

1. Dímeros: Los primers se unen entre sí en lugar de al DNA.
2. Amplificación inespecífica.
3. Formar horquillas (al plegarse sobre sí mismos).
4. Homología cruzada (unirse a otras regiones similares al sitio de interés.).

Costos

> Costo total de 12 a 14 millones de pesos mexicanos (incluyendo insumos e inversión inicial de equipos).



Objetivos

> General:

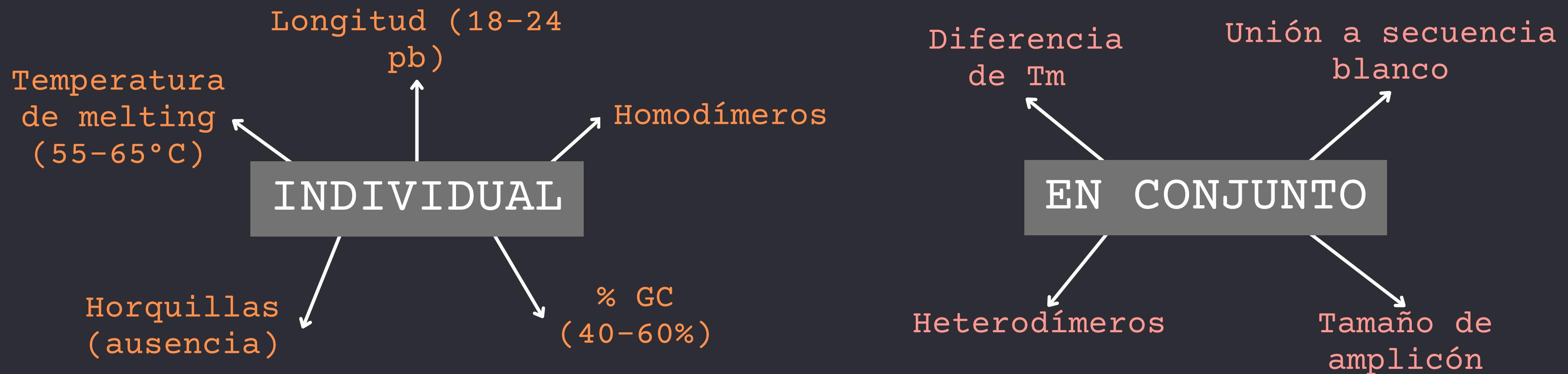
Desarrollar una herramienta profesional que permita simular una reacción de PCR *in silico*, evaluando la calidad de primers proporcionados por el usuario.

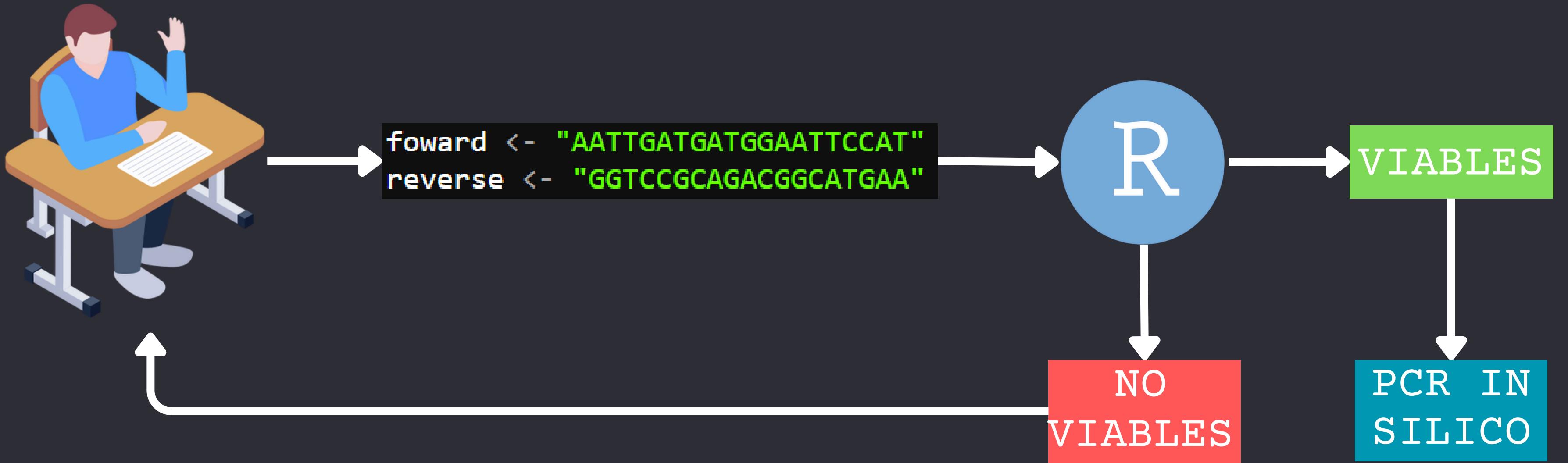
> Específicos:

- Evaluar la calidad y funcionamiento de primers dentro de una secuencia genética.
- Simular la amplificación por PCR a través de ciclos térmicos

Metodología

A . M . P . L . I . F . Y .





Estructura del script {

01

Normalización
de secuencia

02

Análisis
individual
de primers

03

Compatibilidad
del par

04

Unión a
secuencia
blanco

05

Simulación
de PCR

06

Reporte de
viabilidad

07

Entrada de
datos (primers
y secuencia)

Demonstración

Resultados

> Primer que sí funciona: > Primer que no funciona:

fw = AGAGCGGAATGACGCTGGCT
rv = CGATCGAGACGAAAGGTGGC

```
-----  
1) Individual  
Forward - AGAGCGGAATGACGCTGGCT  
Longitud: 20 pb. OK  
%GC: 60 %. OK  
Tm: 64 °C. OK  
Homodímeros máximos: 4 pb. No óptimo  
Horquillas: Sí, no óptimo  
  
Reverse - CGATCGAGACGAAAGGTGGC  
Longitud: 20 pb. OK  
%GC: 60 %. OK  
Tm: 64 °C. OK  
Homodímeros máximos: 6 pb. No óptimo  
Horquillas: Sí, no óptimo  
  
-----  
2) Compatibilidad de ambos  
Compatibilidad del par:  
ΔTm: 0 °C OK (ideal <=2°C)  
Heterodímero: 2 pb. Es aceptable  
  
-----  
3) Unión a la secuencia  
Ambos primers se unen.  
Forward en: 447  
Reverse en: 578  
Amplicón: 151 pb  
  
-----  
4) Viabilidad final y simulación PCR Los primers son viables .  
Tamaño del amplicón: 151 pb  
  
Eficiencia estimada: 0.95  
Copias después de 30 ciclos: 5.023869e+08  
  
RESULTADO FINAL: El proceso de simulación ha sido exitoso.
```

fw = AATTGATGATGGAATTCCAT
rv = GGTCCGCAGACGGCATGAA

```
=====  
Forward: AATTGATGATGGAATTCCAT  
Reverse: GGTCCGCAGACGGCATGAA  
=====  
[Evaluación de primers]  
-----  
1) Individual  
Forward - AATTGATGATGGAATTCCAT  
Longitud: 20 pb. OK  
%GC: 30 %. No óptimo  
Tm: 52 °C. No óptimo  
Homodímeros máximos: 12 pb. No óptimo  
Horquillas: Sí, no óptimo  
  
Reverse - GGTCCGCAGACGGCATGAA  
Longitud: 19 pb. OK  
%GC: 63.2 %. No óptimo  
Tm: 62 °C. OK  
Homodímeros máximos: 4 pb. No óptimo  
Horquillas: Sí, no óptimo  
  
-----  
2) Compatibilidad de ambos  
Compatibilidad del par:  
ΔTm: 10 °C No óptimo  
Heterodímero: 3 pb. Demasiados heterodímeros, no funcional  
  
-----  
3) Unión a la secuencia  
Problemas de unión:  
Reverse no se une.  
  
-----  
4) Viabilidad final y simulación PCR Los primers no funcionan porque no se pudieron alinear bien con la secuencia.  
Por esta razón no se hace la simulación PCR.
```

Conclusión

El diseño de primers es un proceso complejo que requiere de mucho tiempo de práctica. Debido a que los procedimientos experimentales involucran reactivos y equipos costosos, resulta más eficiente *in silico*. Esto les permite enfrentar los retos del proceso y optimizar sus diseños antes de invertir tiempo y recursos en síntesis real, evitando gastos innecesarios y aumentando la probabilidad de éxito en el laboratorio.

Gracias

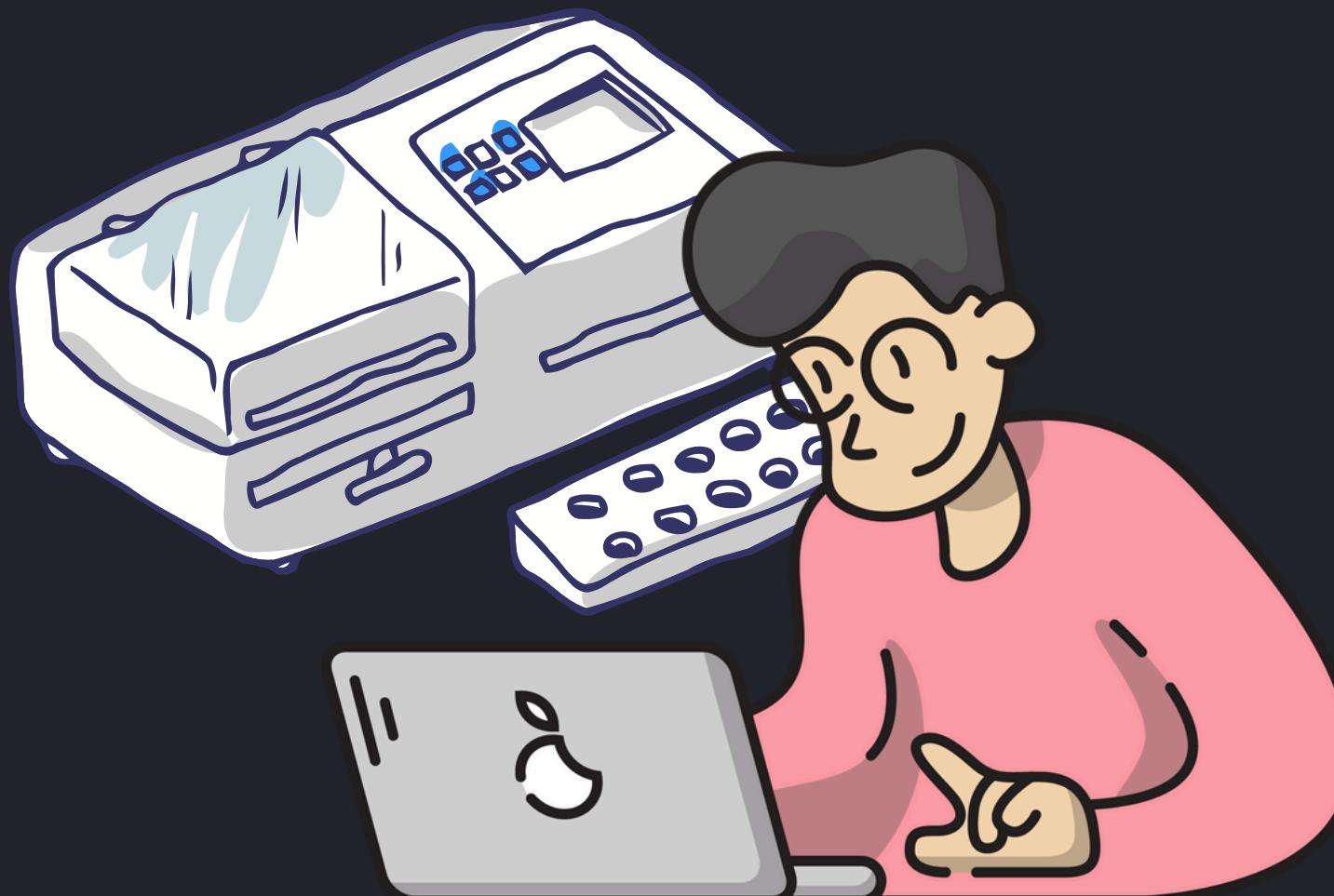
<Por="Pacheco Estrella María Fernanda &
Puente Rivera Diego"/>



Proyecto final

A.M.P.L.I.F.Y

Amplification of Proteins For MicroBaby´s



<Por="Pacheco Estrella María Fernanda &
Puente Rivera Diego"/>



LICENCIATURA EN
MICROBIOLOGIA