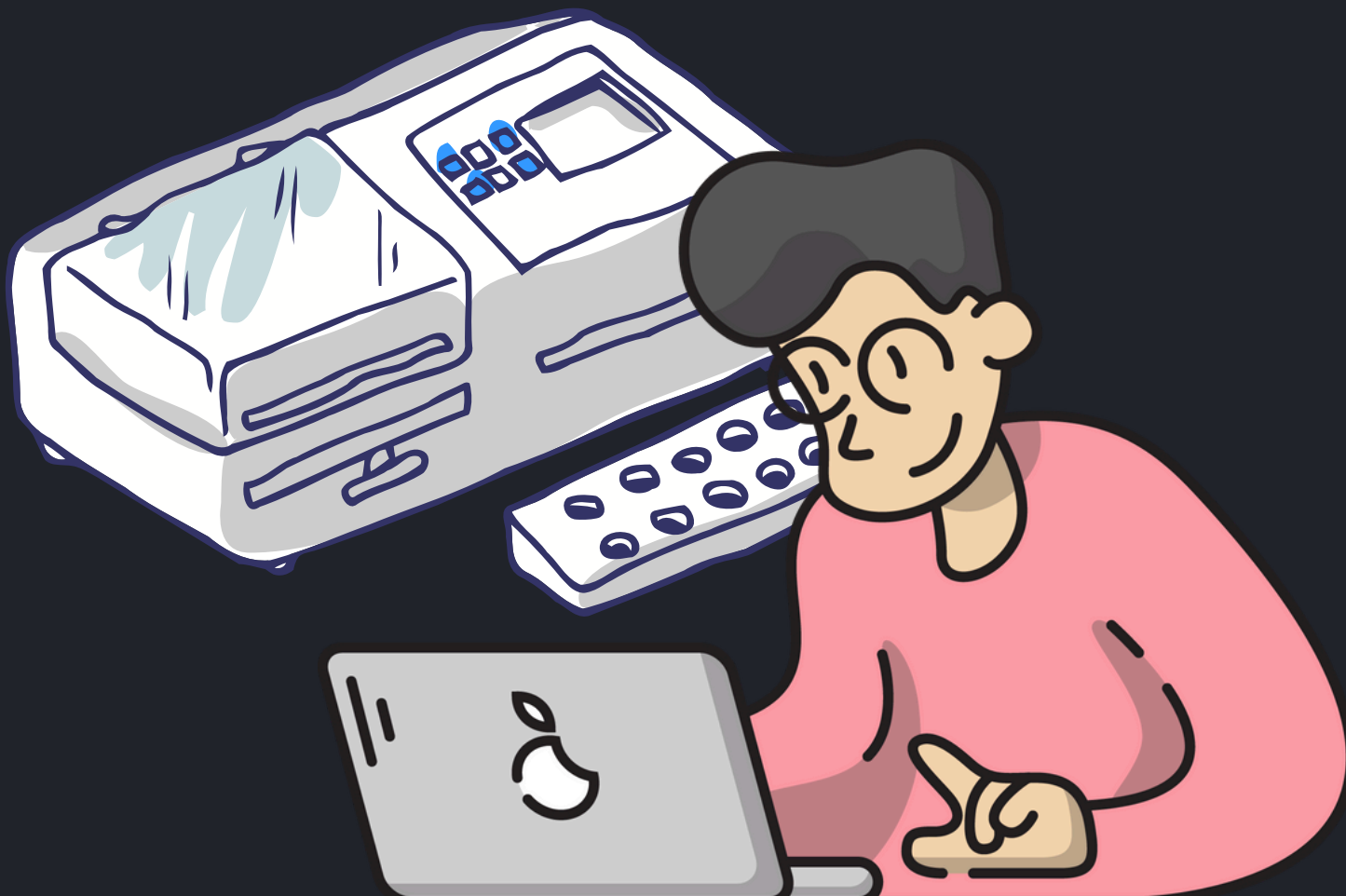


Proyecto final

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

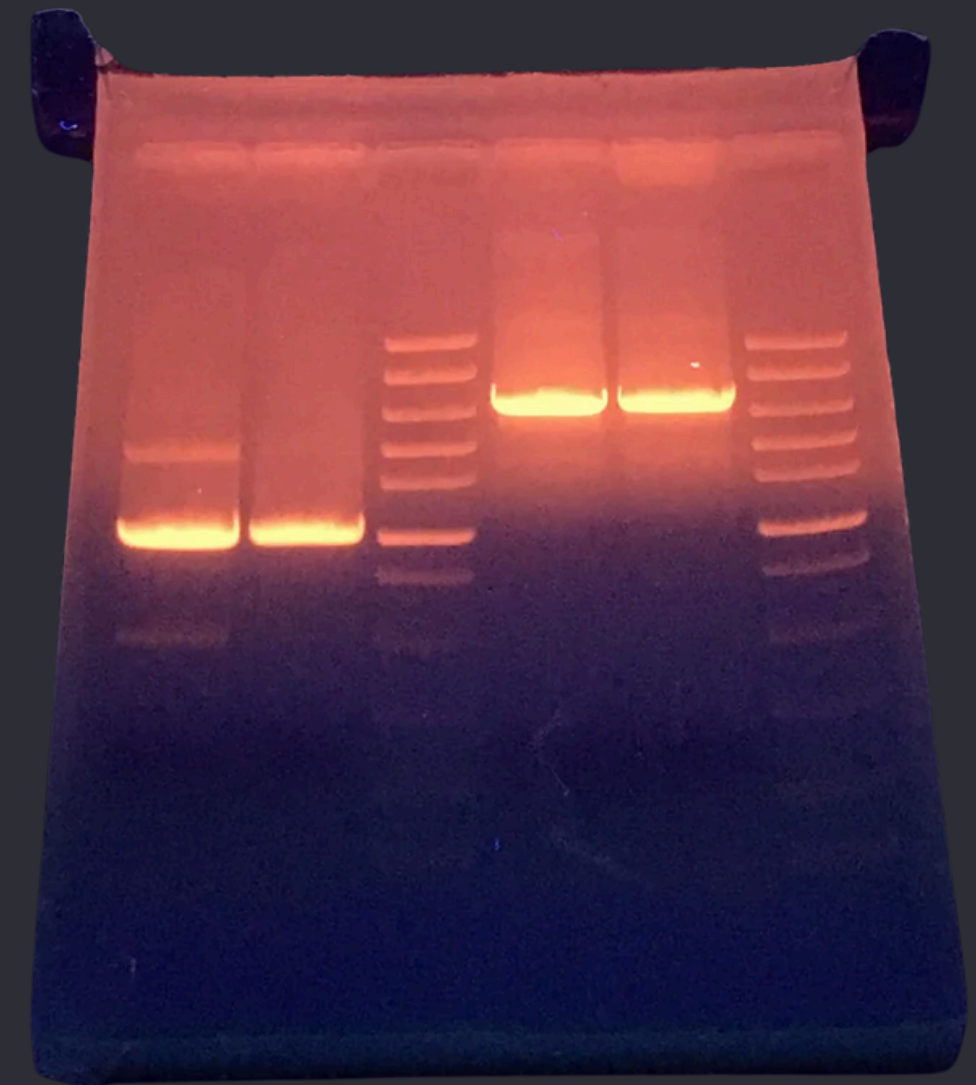
Introducción

¿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: múltiplex, 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.

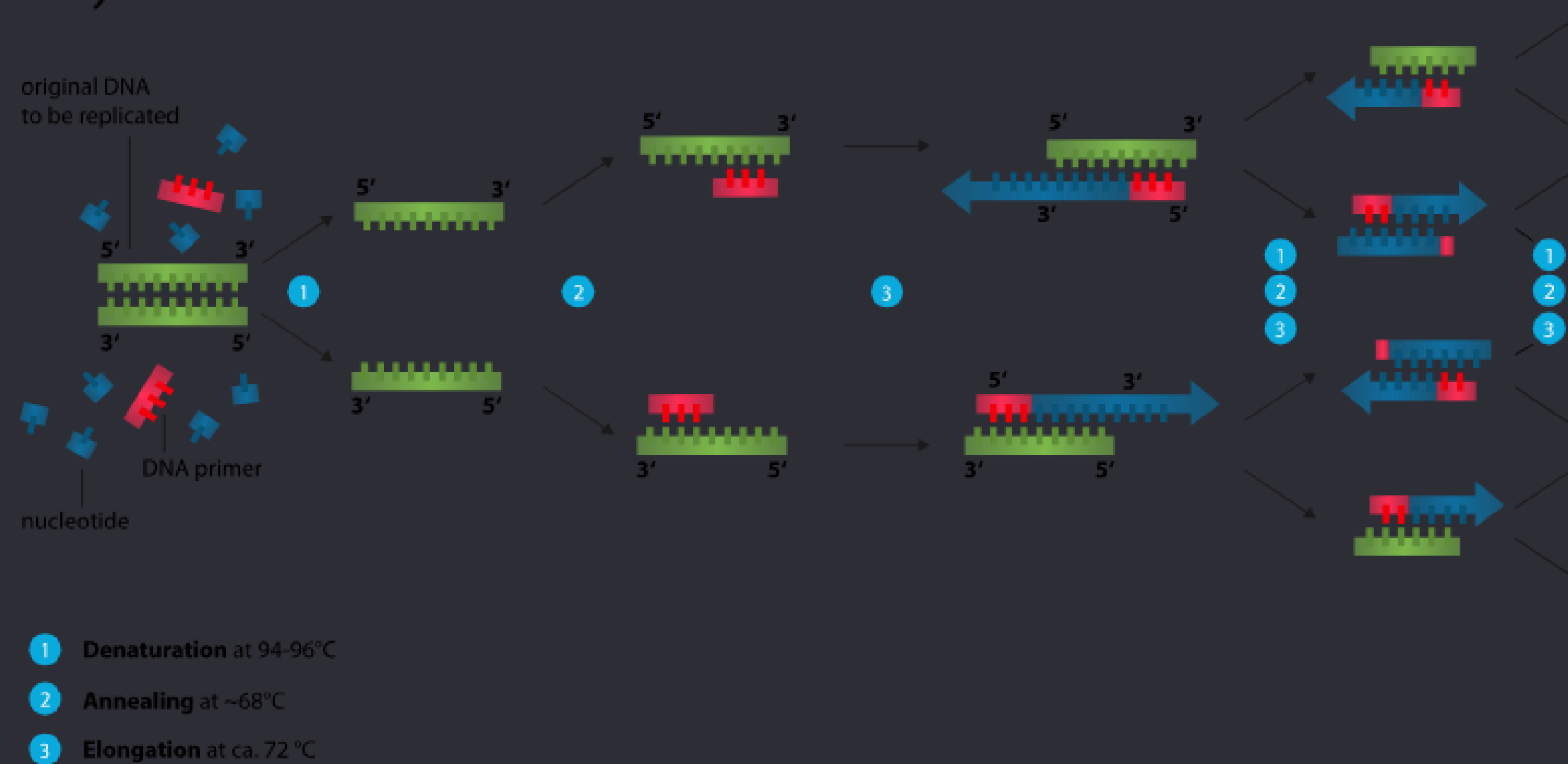
1. Identificar la secuencia diana.
2. Elegir el Forward (hebra de 5' a 3'); elegir el Reverse (hebra 3' a 5').
3. Se utiliza un software especializado para diseñarlos.
4. Usar herramientas para asegurar que los primers no se unen a otra región del genoma.

> 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 una al gen o región de interés.

Proceso de PCR

Polymerase chain reaction - PCR



Difficultades de la PCR y el diseño de primers

> PCR:

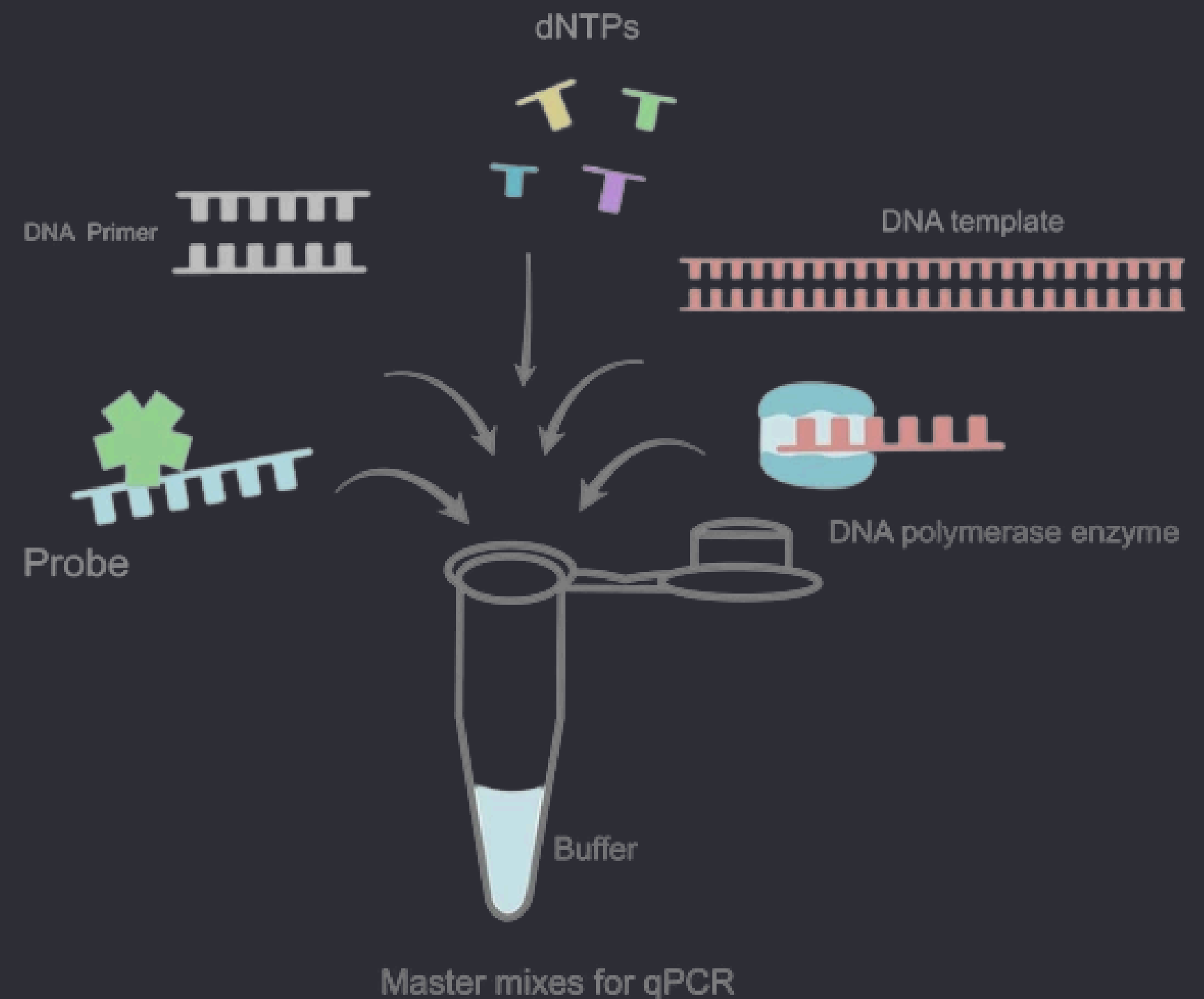
1. Contaminación de la muestra.
2. Degradación del DNA.
3. Concentración incorrecta de reactivos.
4. Programa de amplificación incorrecto (temperatura y tiempo mal ajustado).

> 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:**

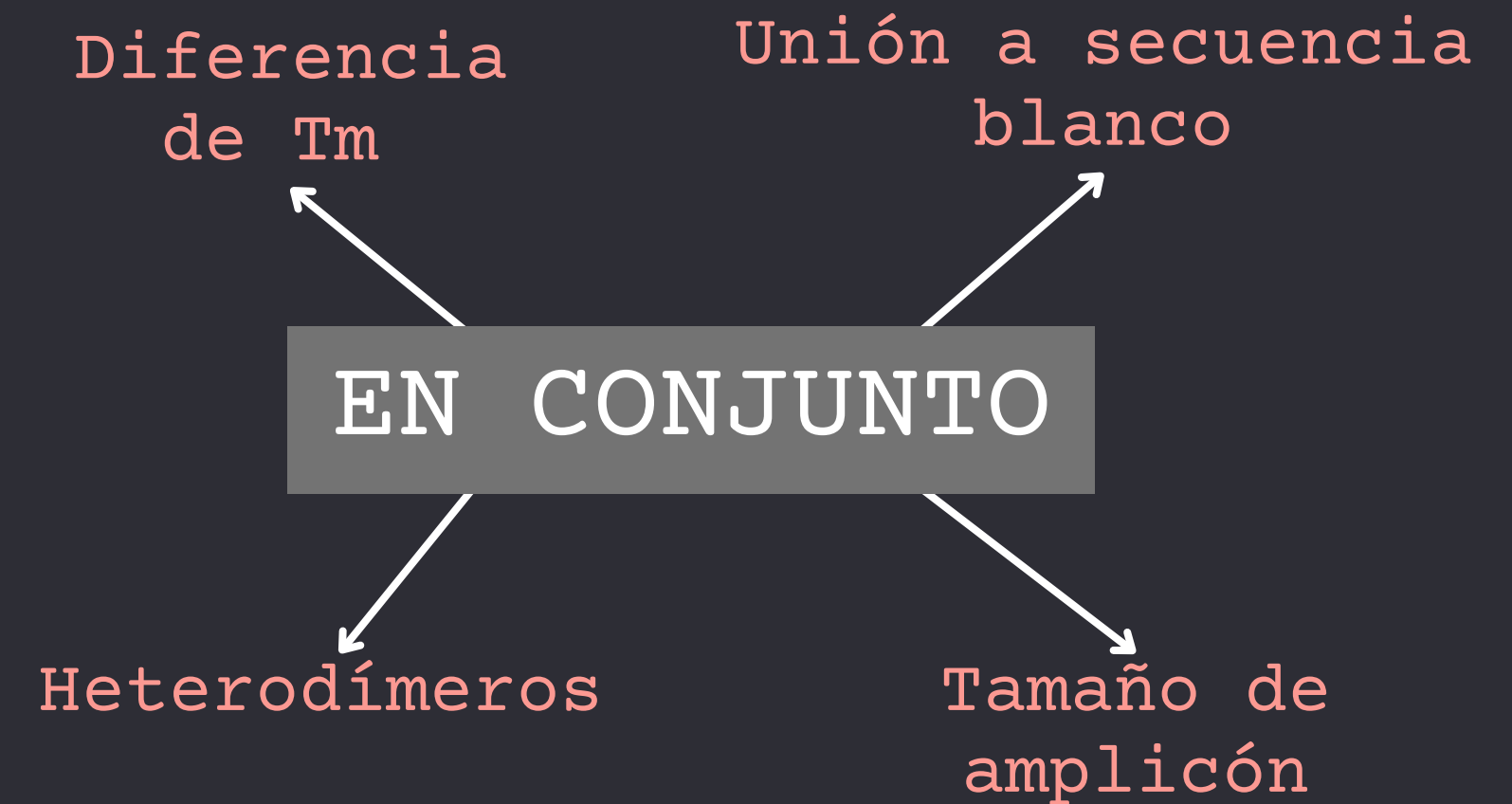
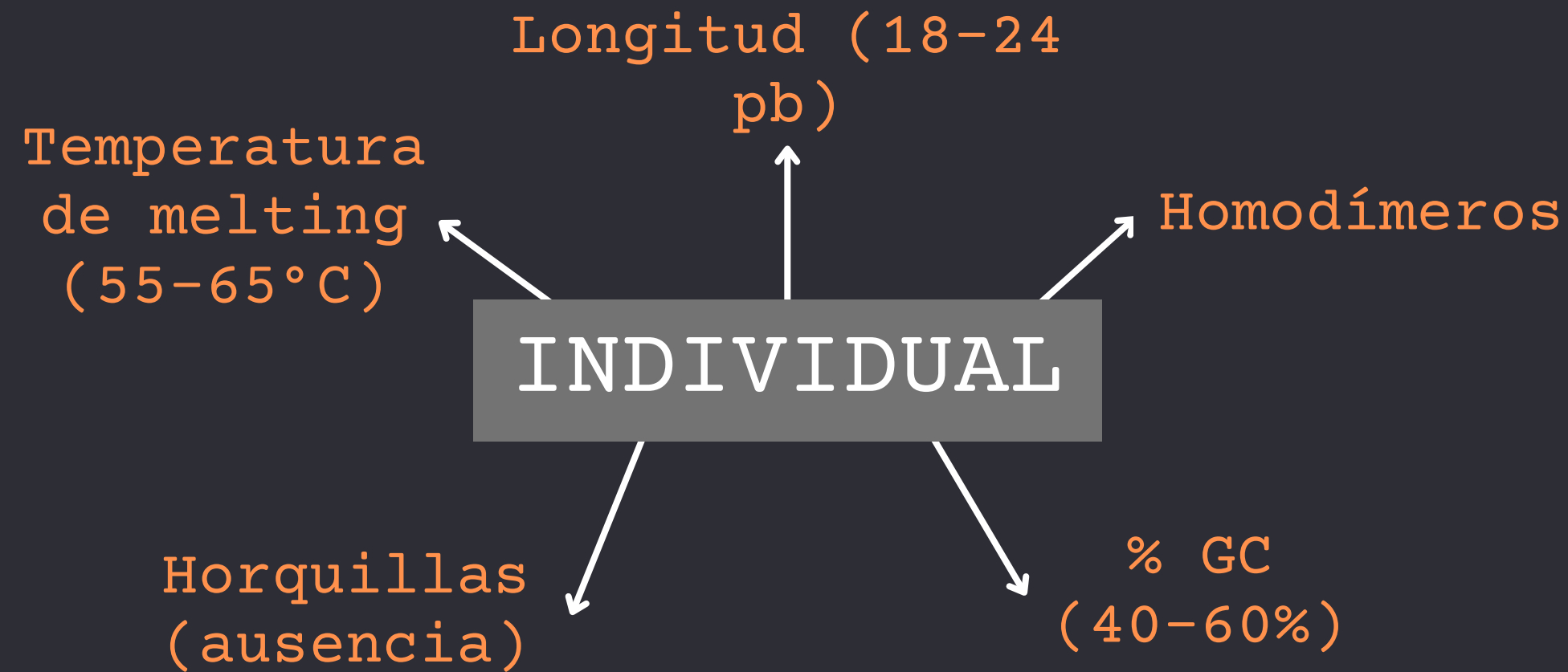
Desarrollar una herramienta profesional que permita simular una reacción de PCR *in silico*, evaluando la calidad de primers proporcionados por el usuario.

> **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.





```
foward <- "AATTGATGATGGAATTCCAT"  
reverse <- "GGTCCGCAGACGGCATGAA"
```



VIABLES

NO
VIABLES

PCR IN
SILICO

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:

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 astimada: 0.95
Copias después de 30 ciclos: 5.023869e+08
-----
```

RESULTADO FINAL: El proceso de simulación ha sido exitoso.

> Primer que no funciona:

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"/>**

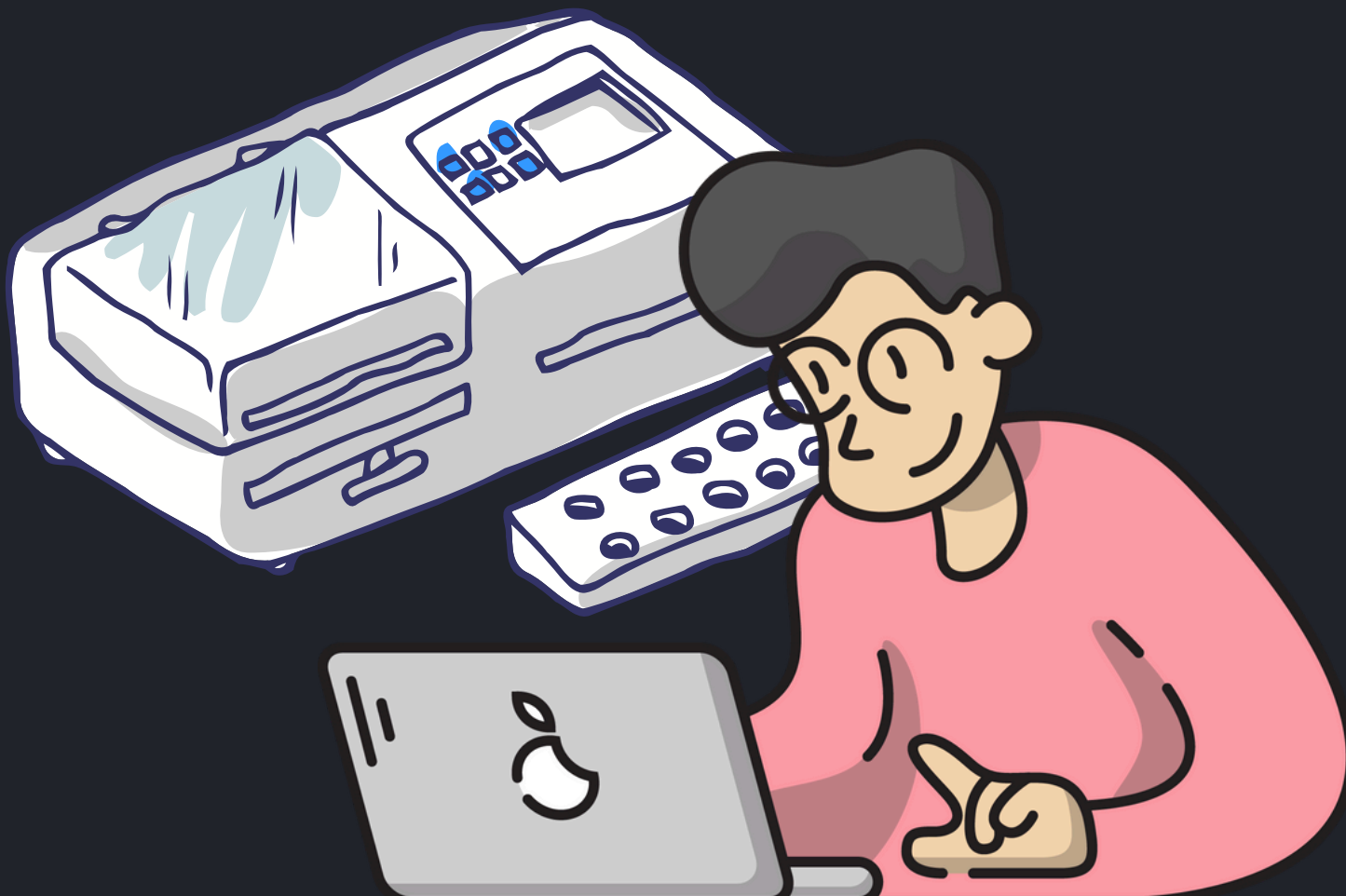


Proyecto final

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

Amplification of Proteins For MicroBaby's

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



LICENCIATURA EN
MICROBIOLOGIA