



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO(A) EN BIOLOGÍA

**Implementación de técnicas de biología
molecular
para la obtención de código de barras
genéticos
de especies variadas**

QUE PRESENTA EL ALUMNO

Andrés Viñas Martínez

Matrícula
2143023289

ASESORES:

Externo: M. en C. Andrea Rubí Jiménez Marín

Interno: Dra. Aida Hamdan Partida

No. Económico: 26343

México, D.F.

Fecha: 03/10/19

Índice

Introducción:	3
Estandarización de los Códigos de Barras.....	4
Las Bases de Datos Genéticas	5
Características Generales del Servicio Social:	5
Ubicación geográfica:	5
La institución:	6
Fundamento de las Actividades:	7
Objetivo:	7
Actividades desarrolladas:	7
Método:	8
Tipo de muestra y método de extracción:.....	8
Cuantificación:.....	8
PCR:.....	8
Electroforesis:	9
Clonación (sólo DNA antiguo):.....	9
Resultados y Conclusiones:.....	10
Recomendaciones generales:	13
Recomendaciones para un óptimo PCR:	13
Optimización del máster mix:.....	14
Programa en el termociclador:.....	15
Referencias:	16

Introducción:

La identificación de especies ciertamente es una tarea difícil, realizarla efectivamente requiere de experiencia en grupos taxonómicos particulares y materiales especializados que le puedan dar sustento al veredicto. Aunado a esto, existen por lo menos otras tres limitaciones que se presentan en la labor de un biólogo al momento de identificar especies: la primera es la plasticidad y variabilidad genética en las características utilizadas para el reconocimiento de la especie. La segunda es la existencia de taxones morfológicamente crípticos (dos o más especies aparentan ser una misma). En tercer lugar nos encontramos con que las claves taxonómicas normalmente son efectivas para una sola etapa vital e inclusive un género, presentando problemas para aquellos taxónomos que decidan aventurarse a identificar insectos con un pronunciado dimorfismo sexual (Hebert *et. al.*, 2003).

Las limitaciones mencionadas son las razones por la cual Paul Herbert y su equipo en la Universidad de Guelph, propusieron hace 16 años la utilización de “códigos de barras” con fines taxonómicos. Antes que nada, cabe aclarar a qué nos referimos cuando hablamos de códigos de barras. En la literatura biológica actualmente existen dos diferentes significados para este término. El primero, también conocido como identificador de secuencia de DNA único, se refiere al método que permite que múltiples muestras sean agrupadas para secuenciación, cada muestra es identificada por un código de barras único. El segundo significado, que concierne al presente escrito, tiene que ver con el método taxonómico basado en un código de barras identificado dentro del DNA de alguna especie en concreto (Foxman, 2012).

La obtención de código de barras genéticos para la identificación de especímenes presenta diversas ventajas: el requerir de pequeñas cantidades de muestras biológicas, aplicabilidad para todos los estadios de vida e identificación entre especies fenotípicamente similares (Dudu *et. al.*, 2016). Además, en los últimos años ésta técnica ha demostrado ser versátil, con potencial de ser usada en una gran variedad de áreas. En conservación, el primer paso crucial para conservar y manejar una especie amenazada es la correcta identificación y delimitación de la especie de interés. Los casos son numerosos, los códigos de barras genéticos han sido útiles para la identificación de especies de palisandro (*Dalbergia spp.*), taxón de plantas rico y complejo amenazado de Indochina (Hartvig *et. al.*, 2015). Ramas como la genética forense también han echado mano de los códigos de barras genéticos, con casos en los que se han llevado ante la justicia a cazadores furtivos utilizando como evidencia el DNA obtenido a partir de cuernos de rinocerontes confiscados (Callaway, 2018). Aunado a esto, se ha podido rastrear el origen de pangolines y colmillos de elefante utilizando esta técnica, lo que permite la implementación más localizada de medidas de seguridad e inclusive la posibilidad de desmantelar redes criminales de tráfico de especies (Weintraub, 2018, Zhang, *et. al.*, 2015).

La técnica inclusive ha demostrado tener importantes aplicaciones en la economía. En el mercado de los alimentos del mar, los productos son susceptibles a ser mal etiquetados, es decir, especies baratas se venden como si fueran un símil de mayor precio. Esto se debe a la dificultad de identificar a las especies comercializadas a simple vista y al gran número de intermediarios que se encuentran entre el lugar de pesca y el punto de venta. Los códigos de

barras pueden determinar con certeza la especie que se está poniendo en venta y evitar este tipo de fraudes (Dudu *et. al.*, 2016, Ruryk & Chunk, 2018, IBOL, 2017). De forma similar, en la industria de los productos herbolarios asegurar la autenticidad de las materias primas es un paso esencial anterior al procesamiento. Desgraciadamente el adulteramiento de este tipo de productos ha sido un problema común en esta industria, no solo representando un problema económico, sino también uno para la salud de los consumidores. Es por esto que la autentificación de especies es fundamental en la confirmación de la calidad de los productos herbales. Las técnicas de códigos de barras son eficaces al momento de detectar adulterantes basados en plantas encontrados en los productos herbales comercializados (Tnah *et. al.*, 2019, Menon, s.f., IBOL, 2017).

Ahora bien, es importante resaltar que las aplicaciones anteriormente mencionadas son posibles gracias dos factores principales: la estandarización de los fragmentos de los genomas mitocondriales y a las secuencias de referencia encontradas en bases de datos.

Estandarización de los Códigos de Barras

El primer factor, la estandarización de los códigos de barras, es la selección de un fragmento o partición del genoma que pueda ser ampliamente utilizado para diferenciar entre especies distintas y a la vez reunir en un taxón a un grupo de conoespecíficos. En el 2001 Paul D.N. Herbert y sus colaboradores de la universidad de Guelph abordaron este problema, dos años más tarde publicaron un artículo en el que se acuñaría el término “código de barras” y se propondría el gen que codifica para la proteína mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) como el estándar para la identificación de especies animales. Lo que hizo que este equipo pusiera su foco de atención sobre este gen son dos de sus particularidades: la primera es la universalidad de sus primers, permitiendo la recuperación del extremo 5' de representantes de prácticamente todos los filos del reino animal. En segundo lugar, el COI parece tener el mayor rango de señal filogenética de todos los genes mitocondriales, es decir, los nucleótidos que se encuentran en la tercera posición muestran una alta incidencia de sustitución de bases, generando una tasa de evolución molecular tres veces mayor que aquella del DNA ribosomal 12S y 16S. Esto lo hace perfecto porque su evolución es lo suficientemente rápida como para poder discriminar entre especies cercanas (Hebert *et. al.*, 2003).

Para poner a prueba la capacidad “discriminadora” del COI, el mismo equipo se dispuso a identificar un grupo en específico: lepidópteros. Esto les suponía un reto debido al gran número de especies contenidas en este taxón. Se realizaron perfiles de COI para 200 especies cercanas que después se utilizaron para identificar las especies de otros 150, al final el éxito de identificación reportado fue del 100% (Hebert *et. al.*, 2003).

Pasaron algunos años antes de que nuevos códigos de barras fueran propuestos y estandarizados, el COI ya se utilizaba para la identificación de especies animales sin embargo para grupos como las plantas no eran de mucha ayuda. Fue hasta el 2009 cuando el Consorcio del Código de Barras de la Vida (CBOL por sus siglas en inglés), se propuso a estandarizar un gen con potencial para identificar plantas terrestres. Siete genes fueron analizados en total pero sólo dos se encontraron viables. El primero fue el gen *rbcL* que codifica para la enzima plástida ribulosa 1-5 bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RUBISCO), con buena universalidad

y buen (pero no sobresaliente) poder discriminativo. En segundo lugar se postuló el gen *matK*, otro gen plastidal que codifica una especie de proteína maturasa, su uso ofrece una alta resolución pero carece de universalidad. Para compensar el desbalance entre universalidad, calidad de secuencia y discriminación, finalmente se propuso el uso de ambos genes, dando solución pragmática a dicho desbalance (CBOL Plant Working Group, 2009).

Las Bases de Datos Genéticas

La identificación de especies sólo es posible gracias a una base de datos sobre la cual se puedan comparar y contrastar las secuencias obtenidas. Actualmente podemos encontrar dos iniciativas predominantes que ayudan a este propósito: GeneBank e International Barcode of Life (IBOL).

GenBank es la base de datos de secuencias genéticas de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH por sus siglas en inglés), una colección anotada de todas las secuencias de ADN disponibles al público. GenBank forma parte de la Colaboración Internacional de Bases de Datos de Secuencias de Nucleótidos, que comprende el DNA DataBank de Japón (DDBJ), el European Nucleotide Archive (ENA) y GenBank en NCBI. Estas tres organizaciones intercambian datos de forma cotidiana. Esta base de datos no está restringida a códigos de barras para la identificación de especies, también ofrece acceso a genomas completos de procariotas, algunos de interés médico, y metagenomas.

El IBOL es un proyecto para crear una colección pública de secuencias de referencia a partir de especímenes con cupones de todas las especies de la vida. Las secuencias de códigos de barras se colocan en la base de datos de sistemas de datos de código de barras (BOLD), un banco de trabajo en línea que incluye una biblioteca de referencia de códigos de barras de ADN que se pueden usar para asignar identidades a secuencias de origen desconocido.

BOLD es un repositorio de búsqueda de registros de códigos de barras, que almacena datos e imágenes de muestras, así como secuencias y archivos de rastreo. Proporciona un motor de identificación basado en la biblioteca de códigos de barras actual y controla el número de registros de secuencia de códigos de barras y la cobertura de especies. Esta base de datos se encuentra más enfocada a la identificación de especies eucariontes.

Características Generales del Servicio Social:

Ubicación geográfica:

El servicio social se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Zoología en el Instituto de Biología de la UNAM, ubicado en el circuito Zona Deportiva de Ciudad Universitaria (CU), delegación Coyoacán, Ciudad de México.

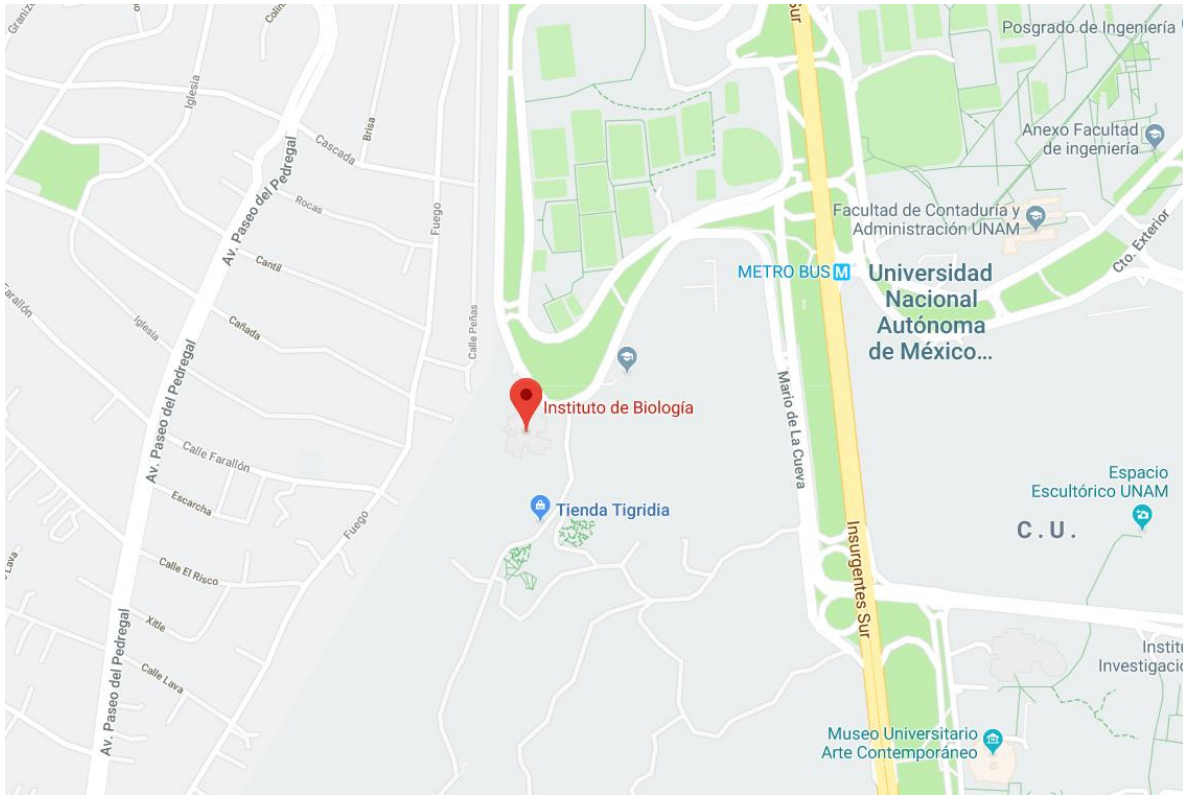


Figura1: Ubicación del Instituto de Biología dentro de Ciudad Universitaria de la UNAM, Ciudad de México (fuente: Google maps).

La institución:

El Instituto de Biología de la UNAM es considerado como el epicentro nacional del estudio de la biodiversidad mexicana. Fundado en 1929, sus objetivos principales han sido el desarrollar investigación científica sobre variados aspectos de la diversidad biológica, la formación de investigadores del nivel de excelencia y la divulgación científica con fines de conservación. El instituto alberga las Colecciones Biológicas Nacionales que entre las que se encuentran el Herbario Nacional y colecciones zoológicas de diversos taxones. Asimismo, entidades que integran al instituto son el Jardín Botánico, la Estación Biológica en los Tuxtles Veracruz, la Estación Chamela en Colima, el Departamento de Zoología y el Departamento de Botánica (IBUNAM, 2012).

La documentación y estudio de la fauna mexicana es tarea del departamento de Zoología, conformado por 31 investigadores y 21 técnicos académicos, los cuales se apoyan en alguna de las diez colecciones Zoológicas Nacionales: helmintos, moluscos, ácaros, arácnidos, crustáceos, insectos, peces, anfibios y reptiles, aves y mamíferos. Entre esas colecciones juntas se reúne un aproximado de dos millones de ejemplares. El departamento cuenta con más de 10 laboratorios certificados siendo el de Biología Molecular uno de ellos (IBUNAM, 2012).

Fundamento de las Actividades:

En el estudio de la biodiversidad, la determinación de la especie puede ser considerada como el paso crucial en el desarrollo de un proyecto, y la obtención de código de barras (genetic barcoding) es una herramienta de suma utilidad para ello. Es por esto que el laboratorio funge como una conexión entre los investigadores y las técnicas moleculares para que estos puedan brindar a su investigación una mayor robustez científica. La colaboración es el eje principal en este espacio.

Objetivo:

- Obtener mediante los protocolos estandarizados acordados, el código de barras de las especies seleccionadas en diferentes proyectos.

Actividades desarrolladas:

Uno de los principales proyectos en los que se colaboró durante el servicio fue el de DNA antiguo, que buscó identificar las pieles de animales utilizadas para la elaboración de un escudo azteca. Dicho artefacto llamado “Cuetzalcuexyo Chimalli”, que en lo posterior se le denominará como “Chimalli”, posee más de 500 años de antigüedad y se encuentra actualmente resguardado en el museo del Castillo de Chapultepec.

Asimismo, otro proyecto de importancia en el que se participó fue el de identificación de plantas consumidas por tapires en Chetumal. Las muestras se trataban de tejidos vegetales encontrados en las excretas de estos animales las cuales fueron posteriormente lavadas y transportadas hasta la Ciudad de México. Al mismo tiempo, se participó en diversos proyectos más pequeños en los que se extrajo DNA de variadas especies de peces, mamíferos, artrópodos, equinodermos, así como una especie de hongo y muestras de de DNA ambiental recolectada de un estanque en la reserva del Pedregal.

En general, el flujo de trabajo comenzaba con el proceso de extracción de DNA el cual buscaba aislar dicho polímero de otras biomoléculas como proteínas y desechos celulares a través de distintos métodos de extracción. La calidad y cantidad del material genético extraído se verificaba cuantificándolo y realizando electroforesis (detalles en la siguiente sección).

Posteriormente, se realizaban los ensayos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés). Esta técnica permite amplificar exponencialmente una región de DNA determinada gracias a la capacidad replicadora de la DNA polimerasa. El material genético es sometido a varios ciclos a temperaturas diferentes, cada una con un efecto específico ya sea sobre las enzimas o el DNA. Conforme los ciclos se concluyen queda más material genético que a su vez sirve como templado para los ciclos posteriores, de ahí el nombre “reacción en cadena” (NCBI, 2017).

Una vez amplificado el gen de interés, se procedió enviando las muestras positivas al servicio de secuenciación genómica de la biodiversidad del IBUNAM, donde las muestras fueron secuenciadas por medio del método Sanger. Todas muestras que entraron al laboratorio fueron sometidas a los procedimientos anteriormente mencionados, siendo estas trabajadas en función de las necesidades del laboratorio y de sus dueños.

Método:

Tipo de muestra y método de extracción:

El método de extracción de DNA dependió del tipo de muestra a procesar, a continuación se enuncian los tipos de muestra trabajados junto su respectivo método de extracción:

DNA antiguo: Piel sin medio de conservación. El proceso se realizó con el protocolo de extracción de DNA a partir de hueso o diente, método estandarizado en el laboratorio de biología molecular.

Plantas de Chetumal: Tejido vegetal deshidratado y lavado. El proceso se realizó utilizando el método CTAB para extracción de DNA a partir de restos de plantas conservadas en sílica gel, método estandarizado en el laboratorio de biología molecular.

Especies animales y hongos: Tejidos conservados en formol. Su extracción se llevó a cabo siguiendo el protocolo indicado en el kit “Animal and Fungi DNA Preparation Kit” #PP-208XS de Jena Bioscience®.

DNA ambiental: Agua extraída directamente de la laguna. La extracción se realizó utilizando el protocolo indicado en el kit “Dneasy Powersoil Pro Kit” #7014 de Qiagen®.

Cuantificación:

Este paso se realizó colocando 2µl del DNA extraído en un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c de la marca Thermo Scientific®.

PCR:

Las soluciones máster mix utilizadas en los ensayos de PCR fueron preparadas mezclando los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración	Cantidad (por muestra)
My Taq reaction buffer	5x	3µl
Dimetilsulfóxido (DMSO)	100%	0.45 µl
Albúmina de suero bovino (BSA)	0.4%	0.6µl

DNA Polimerasa 500 unit pack	5u/ μ l	0.1 μ l
DNA Extraído	-	2,3 o 5 μ l
Agua Desionizada	100%	Dependiendo de la cantidad de DNA
Primers Utilizados:		Foward: 0.2 μ l Reverse: 0.2 μ l
Plantas:		
• rbcL_f & rbcL_r		
• matK_f & matK_r		
Piel del Chimalli:		
• Unibar_f1 & Unibar_r1		
Animales y hongos :		
• COI-II_f & COI-II_r		
• HCO & LCO		
• cox-1_f & cox-1_r}		
eDNA:		
• Custom Oligonucleotid		

Electroforesis:

Los geles utilizados se prepararon al 1.5% de agarosa. Ésta se mezcló junto con buffer TAE antes de calentarse. Previo a la carga del gel, se mezcló 1 μ l de la solución Gel red (azul de bromofenol + glicerol como espesante) y 2 μ l de muestra con alta concentración de DNA o 5 μ l en casos de baja concentración.

Como estándar, las electroforesis realizadas corrieron durante 30 minutos a 100v y 500A.

En el caso de los geles utilizados para las muestras del Chimalli se utilizó una concentración del 3% de agarosa y la electroforesis corrió durante 45 minutos a 120v y 500A. Esto se debe a las bajas concentraciones de DNA presentes en estas muestras. Las especificaciones mencionadas permitieron una mayor resolución al momento de observar los resultados de la electroforesis.

Clonación (sólo DNA antiguo):

La antigüedad de las muestras del escudo azteca hizo que las probabilidades de éxito de la amplificación del material genético presente fueran bajas. Para superar esto se hicieron distintas diluciones del DNA extraído (1 a 5, 20, 30, 40 y 50) con el fin de encontrar la proporción óptima entre el material genético y los posibles inhibidores presentes en la muestra. Las amplificación se realizó a través de clonación siguiendo la metodología indicada en el kit “CloneJET PCR Cloning Kit” No.K1231 de Thermo Scientific®.

Resultados y Conclusiones:

En cuanto al proyecto de DNA antiguo, tras el proceso de clonación a partir de las diluciones, los geles mostraron algunas amplificaciones exitosas, sobre todo aquellas en dilución 1:20 (figuras 2 y 3), sin embargo, los electroferogramas indicaron poca certidumbre acerca de qué bases en efecto conformaban las secuencias obtenidas (figura 4).

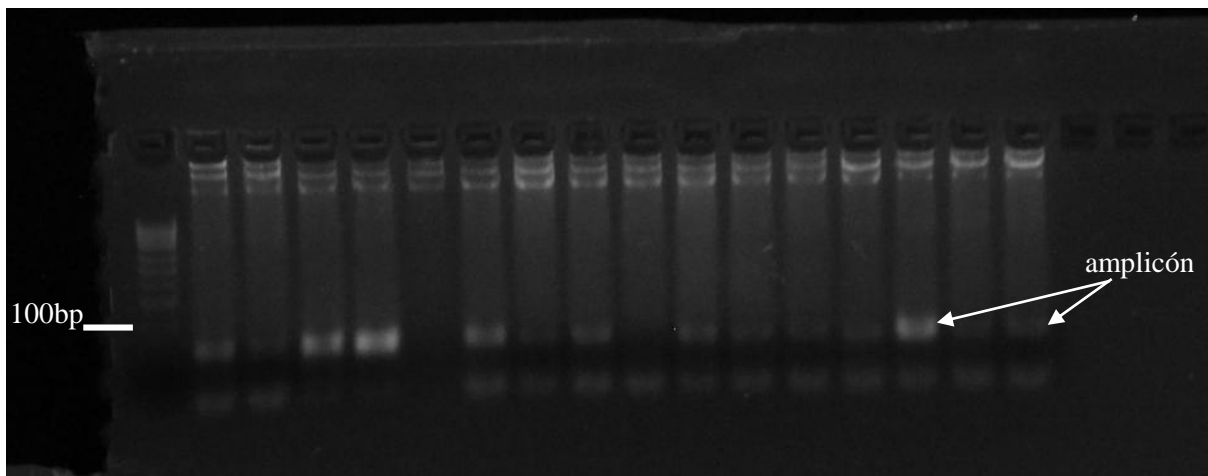


Figura 2: Gel de ensayos de PCR de algunas muestras obtenidas del Chimalli. Un ladder (DNA de referencia) de 100bp se encuentra en la celda del extremo izquierdo.

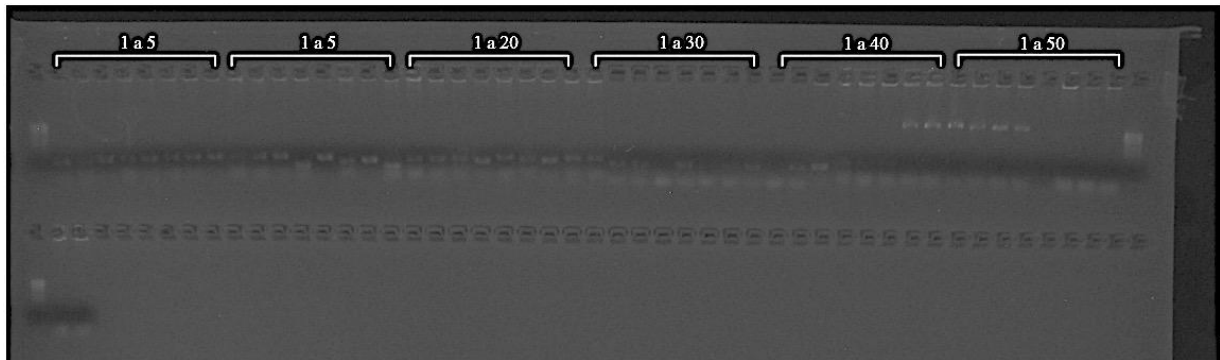


Figura 3: Gel de 52 ensayos de PCR del Chimalli separados por dilución.

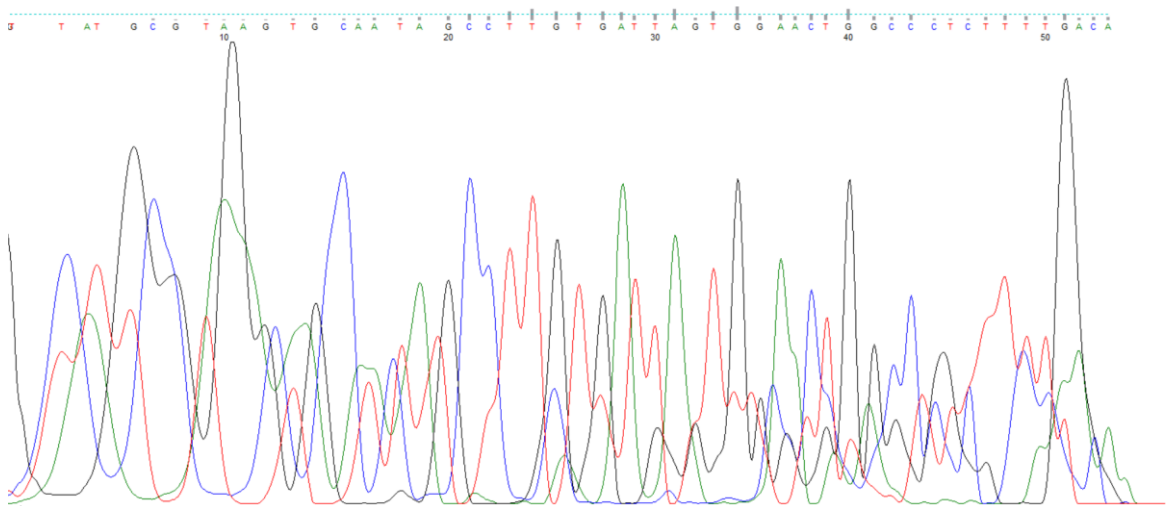


Figura 4: Electroferograma de la reacción de PCR de una de las muestras de Chimalli. La sobreposición entre las curvas de distinto color indica la incertidumbre de la base nitrogenada que realmente se encuentra en la secuencia.

Ya que las muestras obtenidas del Chimalli son extremadamente antiguas, la obtención de amplicones de 700bp que puedan ser utilizados como códigos de barras para identificación taxonómica es extremadamente difícil, por lo que se utilizaron primers que permitían la obtención de un “mini” código de barras de aproximadamente 100bp (Meusnier *et. al.*, 2008). No obstante, los amplicones obtenidos no mostraron la longitud esperada alcanzando apenas los 50bp. Es lo más probable que las secuencias que se pueden apreciar en los electroferogramas (tanto forward como reverse) sean más bien los primers utilizados. Debido a estos resultados, se llegó a la conclusión que para la adecuada determinación de la secuencia del DNA extraído se necesitará el uso de tecnologías de secuenciación masiva, proyecto en el cual el autor no formará parte ya que se encuentra fuera del marco de tiempo del servicio social.

Gran parte de las muestras procesadas durante el servicio en el laboratorio fueron de fragmentos vegetales encontrados en excretas de varios ejemplares de tapir en cautiverio y de vida libre provenientes de Quintana Roo. Las verificaciones del estado de DNA extraído mostraron la marcada degradación del materia genético. Mientras que los geles realizados a partir de la extracción revelaron que el DNA se encontraba fragmentado (figura 5), las cuantificaciones utilizando Nanodrop indicaron sus bajas concentraciones (de 3 a 40 ng/ μ l) y contaminación existente. Se debe considerar que el material vegetal atravesó el tracto digestivo del animal y después fue depositado a la intemperie en forma de excreta junto con un sinnúmero de inhibidores, enzimas, organismos degradadores y material genético exógeno durante un periodo de tiempo indefinido. Además, las fibras vegetales tuvieron que ser lavadas separándolas del resto de desechos para su posterior traslado hasta la Ciudad de México. Los resultados obtenidos son de esperarse debido a que para cuando las muestras llegaron al laboratorio, éstas habían ya atravesado una serie de procesos perjudiciales para la calidad y cantidad del material genético (Menon, s.f.).

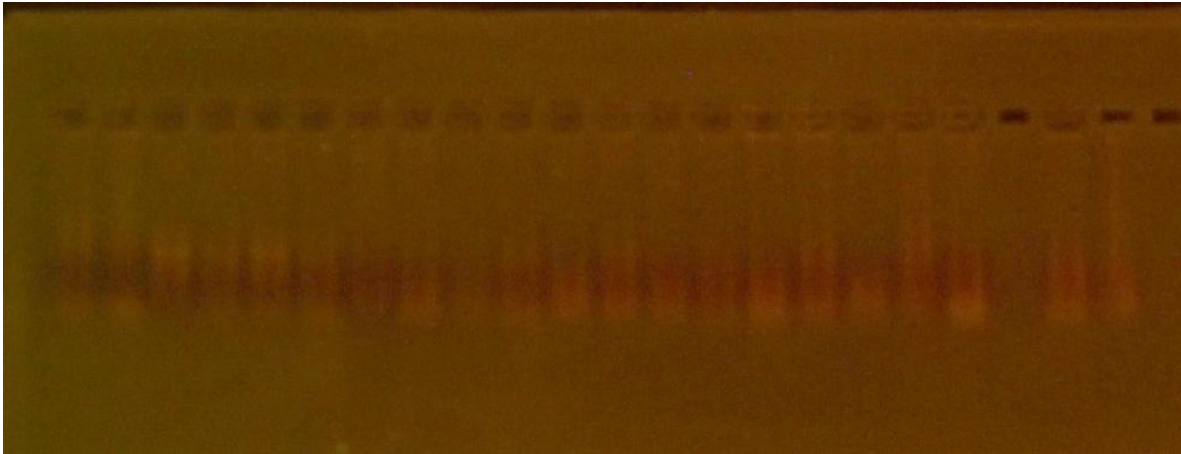


Figura 5: Gel de algunas muestras vegetales de Chetumal. La distancia que migró el DNA teñido indica la poca longitud de los polímeros.

Aunque el DNA extraído no fuera de la mejor calidad, se prosiguió con los ensayos de PCR obteniendo resultados favorables en gran parte de las muestras (figura 6). Los tubos con las reacciones de PCR se mandaron al laboratorio de secuenciación para determinar las secuencia del código de barras amplificado.

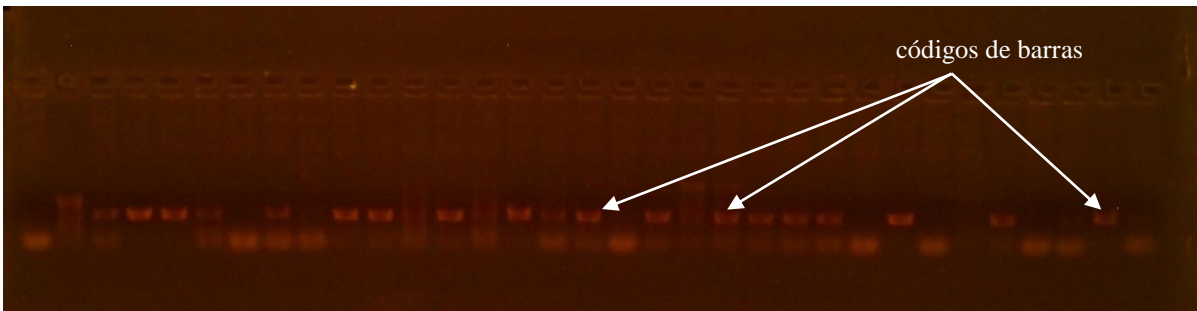


Figura 6: Gel de ensayos de PCR de material vegetal.

Los dos proyectos mencionados anteriormente fueron aquellos de mayor importancia durante el servicio social, no obstante, la estancia también involucró participación en otros numerosos proyectos mas pequeños. En dichos proyectos se obtuvieron códigos de barras de diversas especies de peces, mamíferos, artrópodos, equinodermos, hongos (figura 7), e inclusive de DNA ambiental. Es importante resaltar que las secuencias de los códigos de barras obtenidos no se encuentran incluidas en el presente informe debido a que se tratan de resultados inéditos pertenecientes a terceros, por lo que se han limitado los resultados hasta el proceso de amplificación de códigos de barras (PCR). Esto aplica tanto para las muestras de plantas como para el resto de los proyectos en los que el autor se involucró durante la realización del servicio social.

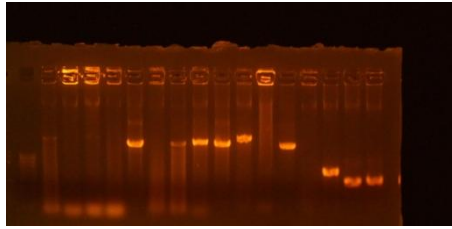


Figura 7: Gel de ensayos de PCR de hongos.

Recomendaciones generales:

La experiencia de haber realizado el servicio social en el laboratorio de biología molecular puede ser la fuente de numerosas recomendaciones en diferentes enfoques. A continuación, se enlistarán algunas que pueden ser útiles para futuros estudiantes e investigadores que deseen trabajar con técnicas de biología molecular. Puede que algunas de estas parezcan obvias o insignificantes, pero cuando se manejan cantidades pequeñas jamás se puede estar lo suficientemente seguro.

Siempre limpiar el espacio de trabajo primero con alcohol y después con cloro. El alcohol se encargará de los microorganismos presentes mientras que el cloro desnaturizará el material genético que pueda quedar en la superficie.

Se debe evitar utilizar las micropipetas para extracciones en cualquier otro procedimiento que no involucre su función original.

Si se está trabajando en un laboratorio concurrido por otros investigadores y se requiere procesar un gran número de muestras, es recomendable manejar por sesión un número de muestras (como 24 por ejemplo) que evite la necesidad de utilizar más de una vez aparatos como centrifugas y bloques térmicos. De esta forma se evita interferir con el trabajo de otros viceversa.

Siempre marcar los tubos de las muestras con plumón permanente en la tapa y en el costado. Algunos aparatos borran el nombre escrito en la tapa haciendo imposible su posterior identificación.

Recomendaciones para un óptimo PCR:

Para optimizar el proceso de PCR se deben de considerar tres factores: especificidad, sensibilidad y el rendimiento. Puede que la mejora de alguno de estos factores perjudique a los otros dos, por lo que es importante mantener en mente que la optimización está estrechamente relacionada con los objetivos planteados por el o la investigadora.

Optimización del máster mix:

Al momento de preparar el máster mix es recomendable agregar los reactivos el siguiente orden:

1. H₂O
2. Buffer
3. Mg
4. dNTP's
5. Primer R
6. Primer F
7. Aditivo (en caso de ser necesario)
8. Polimerasa
9. DNA templado

El orden de algunos de estos elementos no afecta el resultado, pero como regla general se debe evitar añadir la polimerasa antes que el buffer. Este componente asegura un pH adecuado (8.3-8.6) para que la enzima trabaje. Asimismo, se debe procurar agregarla justo antes del DNA templado. La mayoría de las enzimas utilizadas en PCR son realmente sensibles a cambios de temperatura y pH, por lo que además de seguir las recomendaciones mencionadas se debe mantener el tubo en una gradilla refrigerada al momento de preparar el mix.

En PCR, el magnesio actúa como cofactor enzimático, no obstante, al momento de añadirlo a la reacción una parte no cumple con esta función adhiriéndose a los grupos fosfatos. Se debe ajustar la concentración de magnesio de modo que, tras haberse adherido al fosfato, una porción quede libre para su uso como cofactor. Hay que considerar que su concentración debe ser optimizada para cada combinación de primers y templado. Probar distintas concentraciones y hacer una curva de rendimiento puede ser útil.

Del mismo modo, asegurar la calidad y cantidad de los dNTP's usados es esencial. Congelarlos y descongelarlos repetidamente afecta su efectividad y el exceso de ellos aumenta en gran medida la inespecificidad de la reacción.

La concentración de los primers es importante. Excederse se puede traducir en inespecificidad de la reacción, es decir, que los primers se adhieran por homología en un lugar no deseado. Esto también puede resultar en la formación de dímeros de primers, la unión de un primer forward con su homólogo reverse.

En caso de que el diseño de los primers sea necesario, es recomendable procurar que estos tengan una longitud de 16-30bp, que el contenido de G y C se encuentre en un rango del 40-60%, evitar complementariedad entre primers (para evitar los ya mencionados dímeros) y evitar regiones que puedan dar origen a problemas estructurales como los llamados "hairpins". Actualmente existen diversos softwares que ayudan al diseño de primers considerando estos y muchos otros aspectos.

Si se sospecha de la existencia de problemas estructurales en el DNA templado, se pueden utilizar diversos componentes aditivos que ayudan a aminorar estos problemas. Uno de ellos es el DMSO que lidia con problemas de estructura secundaria, sin embargo, puede llegar a afectar las proteínas (enzimas) presentes, por lo que su volumen final jamás debe de exceder el 10%. Además, éste se debe añadir al final de la preparación del máster mix.

Programa en el termociclador:

Siempre asegurarse de que se esté utilizando el programa correcto en el termociclador, éste debe ser específico para el tipo de muestra, primers, las enzimas agregadas y por supuesto, los resultados deseados.

En caso de que no se obtengan resultados favorables del PCR se puede optimizar considerando los siguientes factores:

La longitud del primer. Un primer más largo requiere de tiempos más prolongados.

La cantidad de uniones G-C de DNA templado (en caso se conocerse). Mientras más de estas uniones estén presentes, más alta tendrá que ser la temperatura. Se debe tener presente que mientras más alta sea la temperatura, la inespecificidad de la reacción también aumentará.

Asegurarse de que las temperaturas sean compatibles con la polimerasa que se esté utilizando, cada una tiene requerimientos específicos que garantizan su buen funcionamiento.

Tener en cuenta la rampa, es decir, el tiempo que el termociclador tarda en cambiar de temperatura, así como el volumen final de la reacción, más volumen implicará más tiempo para calentar y enfriar.

Referencias:

- Callaway E., 2018, *Rhino poachers prosecuted using DNA database: Genetic information about African rhinos is leading to stiffer convictions [en línea]*, Nature, recuperado el 31.05.19 de: www.nature.com.
- CBOL Plant Working Group1, 2009, A DNA Barcode for Land Plants, Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 106 (31), pp. 12794-12797.
- Dudu A., Popa GO., Barbalata T., Georgescu SE., 2016, Advantages and Limitations of DNA Barcoding in Identifying Commercially-Exploited Fish Species, Animal Science and Biotechnologies, vol. 49(1).
- Foxman B., 2012, *Chapter 5: A Primer of Molecular Biology*, en Molecular Tools and Infectious Disease Epidemiology, Academic Press.
- Hartvig I., Czarko M., Dahl E., Rostgaard L., Theilade I., 2015, *The Use of DNA Barcoding in Identification and Conservation of Rosewood (Dalbergia spp.)*, PLoS One, 10(9).
- Herbert PD., Cywinska A., Ball SL., de Waard JR., 20013, *Biological identifications through DNA barcodes*, Proceedings, Biological Sciences, The Royal Society, vol. 270(1512), pp. 313-21.
- Meusnier I., Singer G., Landry J., Hickey D., Hebert PD., *Hajibabaei M., 2008, A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis*, BMC Genomics vol. 9(214).
- IBUNAM, 2012, Instituto de Biología [en línea], IBUNAM, recuperado el 14.05.19 de: www.ib.unam.mx.
- IBOL, 2017, *What is DNA Barcoding? How DNA barcoding works and what it will do? [en línea]*, International Barcode of Life recuperado el 14.05.19 de: www.ibol.org.
- Menon M., s.f., *Bringing authenticity to the herbal medicinal trade [en línea]*, Research Matters, recuperado el 03.06.19 de researchmatters.in.
- NCBI, 2017, *Polymerase Chain Reaction: Introduction [en línea]*, National Center for Biotechnology Information, recuperado el 14.05.19 de: www.ncbi.nlm.nih.gov.
- Ruryk J., Chung E., 2018, *Widespread mislabelling of seafood reported in cities across Canada [en línea]*, CBC News, recuperado el 03.06.19 de www.cbc.ca.

- Tnah LH., Lee SL., Tan CT., Lee CT., Ng KKS., Ng CH, Nurul Farhanah Z., 2019, *DNA barcode database of common herbal plants in the tropics: a resource for herbal product authentication*, Food Control, vol. 95, pp. 318-326.
- Weintraub K., *Elephant Tusk DNA Helps Track Ivory Poachers* [en línea], The New York Times, recuperado el 31.05.19 de: www.nytimes.com.
- Zhang H., Miller MP., Yang F., KiChan H., Gaubert P., Ades G., Fischer GA., 2015, *Molecular tracing of confiscated pangolin scales for conservation and illegal trade monitoring in Southeast Asia*, Global Ecology and Conservation, vol. 4, pp. 414-422.