

Genes con islas CpG amplificados con la mezcla formamida, albúmina sérica bovina y dimetilsulfóxido*

CG-rich genes amplified with the formamide, bovine seric albumin y dimethylsulfoxide mix

Genes com Ilhas CpG amplificados com a mistura formamida, albumina sérica bovina, e dimetilsulfóxido

- Miriam Carolina Martínez-López¹, Freddy De la Cruz-Ruiz², José Luis Cortes-Peñalosa³, Daniel Cadena-Sandoval², Erasmo Zamarrón-Licona²

¹ Prof. Inv. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México

² Estudiante de la Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas - UJAT, México

³ Coordinador del Programa de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas - UJAT, México

* Proyecto financiado: FOMIX 2008-2Apoyo a CA Consolidados

Resumen

Diversos aditivos químicos han sido utilizados para garantizar la polimerización de genes con islas CpG. El objetivo de este trabajo fue diseñar una mezcla potenciadora de PCR para amplificar genes con islas CpG. Con ese fin se analizaron fragmentos de los genes IRS2 y HNF1 α con el programa EMBOSS CpG Report. Los iniciadores se diseñaron con el programa Primer 3 y se analizaron con el programa e-PCR. Se usaron tres aditivos químicos: Albúmina sérica bovina (0,1 μ g/ μ L), dimetilsulfóxido (5%) y formamida (5%) para 5 ensayos de PCR: dos usando un solo aditivo, dos combinando dos aditivos y uno combinando tres aditivos. Las amplificaciones con las mezclas se realizaron con las enzimas Taq Nativa, taq Recombinante y Taq Platinum. La calidad de los amplicones se probó por secuenciación. Fragmentos sin islas CpG (HNF-1 α) amplificaron con las tres enzimas, sin el uso de los aditivos pero presentaron problemas de pureza en la secuenciación. Los fragmentos del gen IRS2 con islas CpG amplificaron sólo con la combinación de tres aditivos dimetilsulfóxido, albúmina sérica bovina y formamida, independientemente de la enzima usada, las secuencias fueron limpias. Se concluye que la mezcla de tres aditivos es una solución que permite obtener amplicones de alta calidad en genes con islas CpG, con cromatogramas limpios en la secuenciación.

Palabras clave: islas CpG * potenciadores de reacción en cadena de la polimerasa* gen sustrato del receptor de la insulina 2 * gen factor nuclear del hepatocito 1 α

Summary

Several chemical additives have been used to assure polymerization in CpG islands. The aim of the present work was to design a PCR enhancer mixture in order to amplify GC-rich genes. Fragments of IRS2 and HNF1 α genes were analyzed using EMBOSS CpG Report Software. Primers were designed with the Primer3 Software and were tested with ePCR Software. Three additives

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

were used: BSA (0.1µg/µL), DMSO (5%) and formamide (5%), in five PCR assays, two using one additive, two combining two additives and one with all additives. DNA sequences were amplified with the following enzymes: Native Taq, recombinant Taq and platinum Taq DNA polymerase. Amplicon quality was examined by sequencing. HNF1α gene was amplified without additives; however, the sequences were not amplified and showed purity problems in sequencing. The gene fragments IRS2 with CpG islands were amplified with additives DMSO, BSA and Formamida mixture, notwithstanding the enzyme used. These sequences were clean. DMSO-BSA-Formamide mixture can be a solution to obtain GC-rich DNA amplicons with such a high quality that it generates neat chromatograms during sequencing.

Key words: CpG island * chemistry enhancer polymerase chain reaction * insulin receptor substrate 2 gene * hepatic nuclear factor 1α gene

Resumo

Diversos aditivos químicos têm sido utilizados para garantir a polimerização de genes com ilhas CpG. O objetivo do trabalho foi desenhar uma mistura que potencie PCR para amplificar genes com ilhas CpG. Para esta finalidade foram analisados fragmentos dos genes IRS2 e HNF1α com o programa EMBOSS CpG Report. Os iniciadores foram desenhados com o programa Primer 3 e se analisaram com o programa e-PCR. Foram utilizados três aditivos químicos: Albumina sérica bovina (0,1µg/µL, Dimetilsulfóxido (5%) e formamida (5%) para 5 ensaios de PCR: dois usando um único aditivo, dois combinando dois aditivos e um combinando três aditivos. As ampliações com as misturas se realizaram com as enzimas, Taq Nativa, taq Recombinante e Taq Platinum. A qualidade das ampliações foi provada por sequenciação. Fragmentos sem ilhas CpG (HNF-1α) amplificaram com as três enzimas, sem o uso dos aditivos porém apresentaram problemas de pureza na sequenciação. Os fragmentos do gene IRS2 com ilhas CpG amplificaram apenas com a combinação de três aditivos dimetilsulfóxido, albumina sérica bovina e formamida, independentemente da enzima usada, as sequências foram limpas. A conclusão que a mistura de três aditivos é uma solução que permite obter ampliações de alta qualidade em genes com ilhas CpG, com cromatogramas limpos na sequenciação.

Palavras chaves: ilhas CpG* potenciadores de reação em cadeia da polimerase * gene substrato receptor da insulina 2 * gene fator nuclear do hepatócito 1α

Introducción

Las secuencias ricas en el dinucleótido Citosina-Guanina (islas CpG) se encuentran rodeando la región del promotor así como los sitios *hot-spot* o sitios calientes para las mutaciones en los genes; por su ubicación son las responsables en el silenciamiento de la expresión de genes tejido-específico en los perfiles de expresión directos (1). El arreglo en grupos ordenados de los dinucleótidos CG o regiones isocóricas, produce una gran región de ADN con un alto grado de temperaturas de fusión o desnaturalización, crea fuertes enlaces en las hebras complementarias y la interacción de la doble hebra con las moléculas de agua hace más fuerte la estabilidad de la conformación B del ADN y las hace menos susceptible de desnaturalizar (2) (3).

El dinucleótido CG necesita 6,9 Kcal/mol para romper este enlace a diferencia del dinucleótido AT que sólo necesita 5 Kcal/mol (4). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es la técnica de diagnóstico molecular más utilizada actualmente para la búsqueda de mutaciones. La temperatura media (Tm) para los ciclos de reacción depende de las características biofísicas de la secuencia de los iniciadores y de la secuencia del

ADN. Las islas CpG en la secuencia de ADN son indicadores de que la temperatura de desnaturalización será elevada al momento de la amplificación.

Debido a que la alta densidad de islas CpG en la secuencia de ADN ha mostrado ser un interferente de la PCR, diversos autores han propuesto a través del tiempo varias técnicas para resolver el problema de la no amplificación, dependiendo de las características intrínsecas de cada gen (5-11). Las aportaciones metodológicas para la amplificación por PCR van desde cambios físicos en la activación de la enzima y desnaturalización de la hebra de ADN como la *hot-start* (5), hasta el empleo de manera individual de moléculas orgánicas potenciadoras de la reacción de PCR como: Betaina (6), DMSO (7), formamida (8) y BSA (10). Algunos contaminantes remanentes en la preparación de la muestra de ADN también pueden ser potentes inhibidores durante la preparación de la muestra biológica, por ejemplo si es extraída de sangre total donde “el cloruro de hierro o la hemina, productos de la degradación de la hemoglobina pueden inhibir la reacción de PCR” (11).

En este trabajo se analizaron fragmentos de los genes sustrato receptor de la insulina 2 (IRS2) y factor nuclear del hepatocito 1α (HNF1α), utilizando el prime-

ro como problema y el segundo como control. El gen IRS 2 (12), tiene un único exón de 4017 pb y codifica para una proteína clave en las vías de señalización de la insulina. El gen HNF 1 α (13) consta de 10 exones y codifica para un factor de transcripción del gen de la insulina. El objetivo de este proyecto fue diseñar una mezcla potenciadora que permita obtener un alto rendimiento, especificidad y sensibilidad en los productos de reacción de PCR, en el diagnóstico de enfermedades con genes con alto porcentaje de islas CpG.

Materiales y Métodos

El ADN genómico se obtuvo de muestras de sangre mediante la ruptura de la membrana celular de los leucocitos con el equipo *Wizard Genomic DNA purification* (Promega, Madison, Wi, EE.UU.). Posterior a la extracción, la integridad del ADN fue corroborada mediante corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% y tanto la pureza como la concentración de éste, se estimó en un espectrofotómetro de luz ultravioleta a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm (Smart Spec 3000, Bio Rad, EE.UU.).

Las secuencias de los genes IRS 2 (NM_003749) y HNF 1 α (NM_000545.5) se obtuvieron de la base de datos Gen Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Se dividió al gen IRS2 en tres fragmentos de acuerdo a los sitios *hot-spot* en: IRS 2 A, IRS 2 B, IRS 2 C. En el gen HNF 1 α se analizaron los fragmentos del exón 1, 2 y 3. Los iniciadores se diseñaron con el programa Primer 3: *primer tools* (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) para IRS 2 y HNF 1 α . Una vez obtenidos los iniciadores se les realizó una PCR *in silico* con el programa ePCR del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Con el programa EMBOSS CpG report (14) se determinó la presencia de islas CpG en cada fragmento estudiado.

Se diseñaron cinco experimentos para cada fragmento de los genes, con tres potenciadores orgánicos, BSA (no. de cat. A2153-10G SIGMA), formamida (no. de dep. cat. 75-12-7 USB) y DMSO (no de cat 67-68-5 SIGMA). Cada uno de los ensayos fue corrido con tres diferentes tipos de enzima polimerasa, Taq nativa (Promega), Taq recombinante (Invitrogen) y Taq Platinum (Invitrogen). Las dos últimas enzimas son recomendadas para diversos problemas de amplificación. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

La mezcla convencional de PCR se preparó con 100 ng de ADN genómico, 0,4 μ M de los iniciadores, pH 8,5, Taq DNA polimerasa 5 U/ μ L, dNTPs 400 μ M, MgCl 3 mM y agua libre de nucleasas (Promega, catálogo # M7123). Se agregó a cada ensayo: 1.- formamida (5%); 2.- DMSO (5%); 3.- BSA (0,1 μ g/ μ L) más formamida (5%); 4.- BSA (0,1 μ g/ μ L) más DMSO (5%) y 5.- BSA (0,1 μ g/ μ L) más DMSO (5%) más formamida (5%). Finalmente se agregó una gota de 18 μ L de aceite mineral para prevenir la evaporación de la mezcla de PCR.

La reacción de PCR se inició con un paso de desnaturalización inicial de (5 min, 96 °C); 30 ciclos que comprenden desnaturalización (40s, 95 °C), alineamiento (40s a: 52 °C, 59 °C y 54 °C para IRS2 y 64 °C, 61 °C y 62 °C para HNF1 α), y elongación (40s, 72 °C), y un posterior paso de elongación (5 min, 72 °C). Se analizaron los amplicones mediante electroforesis (80 volts durante 5 min) en gel de agarosa al 1%, utilizando como marcador de peso molecular *DNA ladder* (Invitrogen, catálogo # 15628-050).

Después de haber obtenido el fragmento de ADN por purificación mediante la técnica por columna iónica (15) (Purelink, Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen) se llevó a cabo la secuenciación (ABI, Prisma 3100, de 16 capilares) para conocer la conformación de nucleótidos de cada uno de los fragmentos amplificados, la mezcla de reacción de Big Dye (3 μ L *Buffer* 3X más 2 μ L del Kit Big Dye más 50 ng del producto de la PCR más 1 μ L de cada *Primer* a 3,2 pmoles μ L, llevar a un volumen final de 20 μ L) se sometió a 95 °C por 5 min, después se purificó, liofilizó y reconstituyó la muestra en un volumen de 20 μ L H₂O_{dd} y se colocó en las columnas del secuenciador. En el caso de los amplicones del gen HNF 1 α fue necesario agregar un pos tratamiento con DMSO (5%).

Resultados

CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA

Las características biofísicas de los fragmentos fueron las siguientes: en el fragmento A del IRS2 el porcentaje de CG es 69% con dos islas CpG una de 58 nt y otra de 66 nt. En el fragmento B el porcentaje de CG fue de 73% con dos islas de 59 nt y otra de 114 nt. En el fragmento C del mismo gen el porcentaje de CG es de 75% con una isla de 179 nt (Figura 1). Los fragmentos del gen HNF1 α no presentaron islas CpG y el porcentaje de CG estuvo por debajo de los segmentos del gen IRS2 (Tabla I). En el análisis *in silico* de los fragmentos de los genes IRS2 y HNF 1 α , se demostró que son específicos, el tamaño de los fragmentos esperados, el sitio de amplificación, el cromosoma correspondiente al gen, el número de *hits* y la ausencia total de *gaps* en el ADN genómico (datos no presentados).

AMPLIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS SEGMENTOS

El corrimiento electroforético de los productos de la PCR convencional muestra las inespecificidades o no amplificación de los fragmentos del IRS 2, en comparación con lo observado en los fragmentos del gen HNF1 α que amplifica de manera eficiente e independientemente de la enzima con la que fue tratada, corroborando los resultados obtenidos en

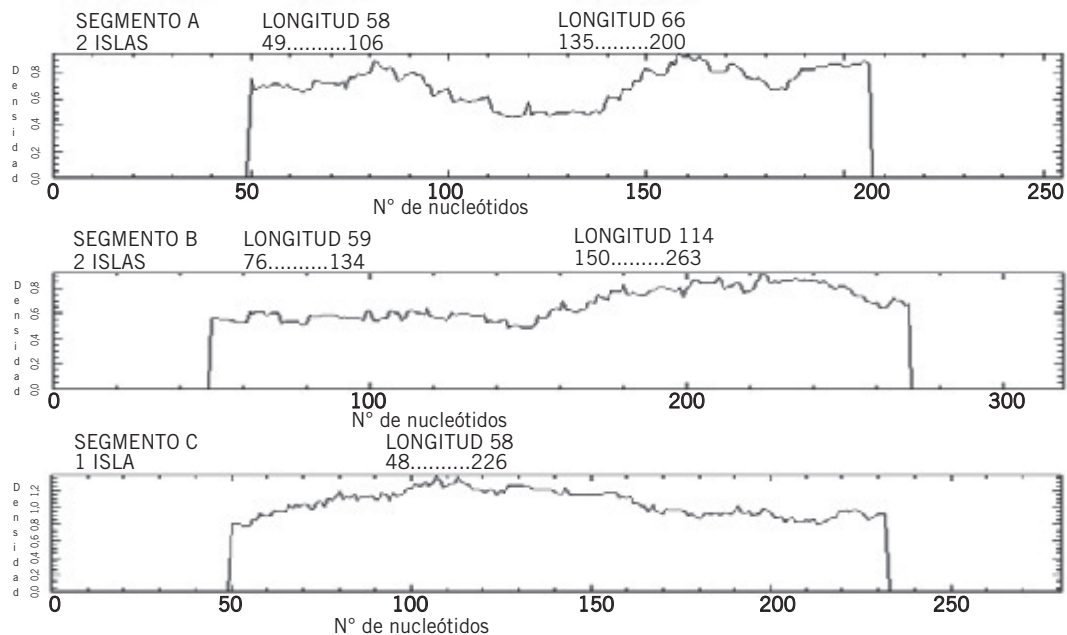


Figura 1. Las islas CpG se obtienen de la densidad del dinucleótido CG (abscisas) contra el número de nucleótidos (ordenadas). Los picos en la gráfica hacen referencia a la isla y al número de nucleótidos presente en ésta.

la ePCR para este gen en comparación del gen IRS2 (Figura 2 A). La débil o inespecífica amplificación con un aditivo se debe a las regiones isocóricas, las cuales proveen mayores temperaturas de fusión o de desnaturalización locales provocando que los aditivos formamida y DMSO no sean lo suficientemente efectivos en el mejoramiento de los ciclos de polimerización en la amplificación de los segmentos del IRS 2 (Figura 2 B, C).

La electroforesis de los productos de la PCR con la combinación de los aditivos BSA (0,1 µg/µL) más formamida 5%, revela que con la GoTaq hay amplificaciones del tamaño esperado, sin embargo, con las enzimas Taq Recombinante y Taq Platinum fue muy ineficiente la amplificación. Se obtienen los amplicones esperados para el gen HNF 1α (Figura 3 A). La mezcla de aditivos entre BSA y DMSO es menos efectiva que la descrita arriba. En relación a la Go Taq se observa que el único amplicon

Tabla 1. Características físico-químicas y número de islas CpG en los genes IRS 2 y HNF 1α. El tamaño de la isla se especifica en la columna denominada Ubicación de la isla. La ΔG en Kcal/mol se ha obtenido a partir de las Islas CpG en el caso del gen IRS 2 y en el caso del HNF 1α de la densidad del dinucleótido CG.

GENES	FRAGMENTOS	PORCENTAJES					TAMAÑO AMPLIACIÓN	NÚMERO ISLAS	UBICACIÓN DE LA ISLA	ΔG Kcal/Mol
		A	T	G	C	GC	Pb	CpG		
IRS2	Segmento A	18	13	31	38	69	256	2	49...106	1624
									135...201	
	Segmento B	13	14	34	39	73	320	2	76...134 150...263	2060
	Segmento C	9	16	29	46	75	282	1	48...227	1828
HNFα	Exón 1	20	12	37	31	67	356	0	0	2250
	Exón 2	22	16	26	36	62	299	0	0	1861
	Exón 3	25	16	36	23	59	282	0	0	1737

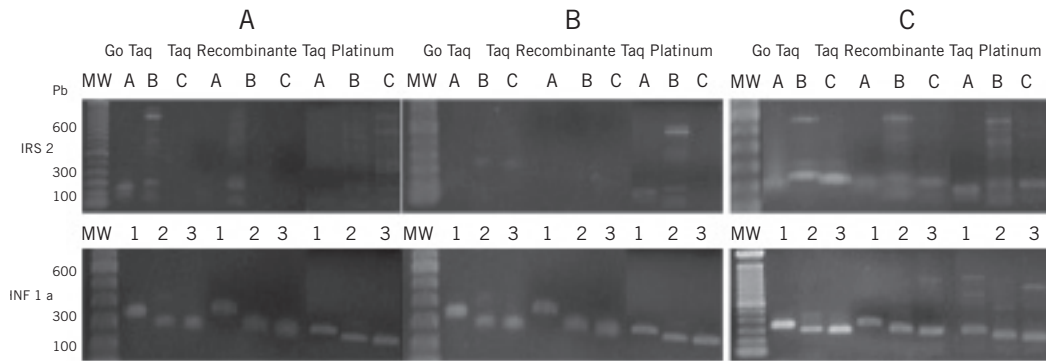


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR. Panel A, sin aditivo. Panel B, Formamida. Panel C DMSO. MW marcador de peso molecular (ladder 100 pb, Invitrogene). En el gen IRS 2 las columnas corresponden a los segmentos A, B y C con las enzimas Go Taq, Taq Recombinante y Taq Platinum. En el Gen HNF1 α las columnas corresponden a los exones 1, 2 y 3 con las enzimas Go Taq, Taq Recombinante y Taq Platinum.

obtenido fue el fragmento C, los otros dos fragmentos son inespecíficos. Con las otras dos enzimas no hubo amplificación alguna (Figura 3 B). El gen HNF 1 α se sigue amplificando de forma semejante a los casos anteriores a diferencia del exón 2 con la enzima Taq Platinum que al parecer esta mezcla interfiere con la polimerización.

La reacción de PCR realizada con los aditivos BSA (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), DMSO (5%) y formamida (5%) permite amortiguar el ruido de fondo que presenta la secuencia del gen IRS 2 debido a las islas CpG. Esta mezcla cede energía necesaria para desnaturalizar la doble hebra y evita la formación de estructuras secundarias en la hebra monocatenaria del gen, así como mejora la estabilidad térmica de los iniciadores y evitar la adsorción de los reactivos por la pared de los tubos permitiendo obtener los amplicones esperados (Figura 3 C). Los amplicones para el gen HNF 1 α también se pueden apreciar con esta mezcla, no obstante, el exón 2 con la enzima Go Taq no amplifica producto alguno.

CROMATOGRAMAS DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS CON Y SIN LA MEZCLA DE ADITIVOS

El gen HNF 1 α se puede amplificar mediante la PCR sin la necesidad de ser tratado con la mezcla de aditivos o con tratamientos físicos. Sin embargo, se observaron cromatogramas de baja calidad al secuenciar los amplicones de este gen (Figura 4 A). Debido a los interferentes para obtener las secuencias de los exones del gen HNF 1 α , se optó por realizar un tratamiento extra. A la mezcla de reacción de la secuencia se agregó DMSO (5%) [16], mejorando la calidad del cromatograma de los exones del HNF 1 α (Figura 4 A).

Un excelente cromatograma se obtuvo de la secuenciación de los amplicones del IRS2 obtenidos con la mezcla por PCR, como se demuestra en la Figura 4 B. Cada amplicon se secuenció por triplicado con muestras diferentes para demostrar la reproducibilidad de esta metodología.

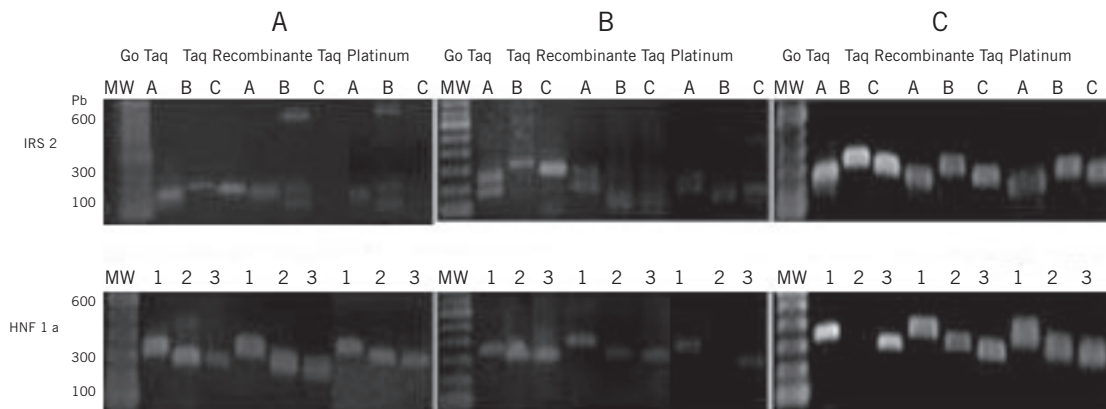


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR. Panel A. BSA-Formamida. Panel B. BSA-DMSO. Panel C. BSA-DMSO-Formamida. MW. marcador de peso molecular (ladder 100 pb, Invitrogene). En el gen IRS 2 las columnas corresponden los fragmentos A, B y C para las enzimas Go Taq, Taq Recombinante y Taq Platinum. En el Gen HNF 1 α las columnas corresponden a los exones 1, 2 y 3 con las enzimas Go Taq, Taq Recombinante y Taq Platinum.

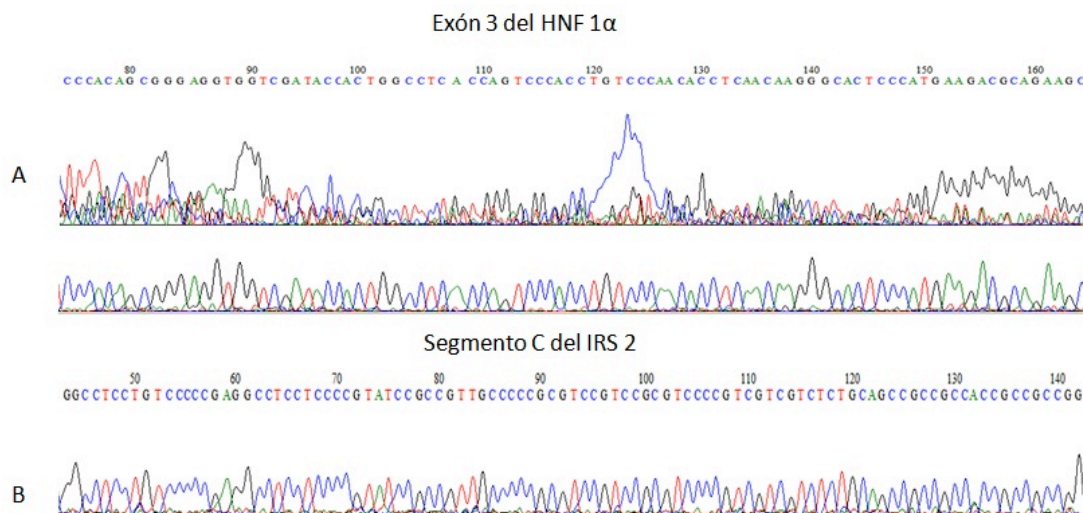


Figura 4. Cromatograma de la secuencia de nucleótidos del exón 3 del HNF 1 α y el fragmento C del IRS 2. Panel A cromatograma del exón 3, del gen HNF 1 α , amplificada sin aditivos y cromatograma de la secuencia de nucleótidos con pos tratamiento con DMSO (5%). Panel B cromatograma de la secuencia de nucleótidos del segmento C obtenida, con la mezcla de aditivos y sin pos tratamientos en la mezcla de secuenciación.

Discusión y Conclusiones

El análisis físico-químico de las islas CpG en la secuencia del gen IRS 2 reveló la formación de estructuras secundarias y la ineficiente separación de la hebra de ADN como consecuencia del aumento de la ΔG por el dinucleótido CG el cual es de 6,9 Kcal/mol (4).

El potenciador químico-formamida (8) reduce la temperatura de fusión de los dúplex de ácidos nucleicos y es ampliamente usado para mejorar la especificidad en la amplificación de muchos fragmentos de ADN con alto contenido del dinucleótido CG. El resultado de la amplificación sólo con este aditivo fue poco prometedor en este trabajo debido a que las amplificaciones fueron inespecíficas o no amplificó. La enzima que mejor funcionó con formamida fue la Go Taq nativa. La actividad de las enzimas Taq Platinum y Taq Recombinante fue deficiente debido a que la formamida no es capaz de interferir en la formación de las estructuras secundarias en la hebra monocatenaria del ADN, lo que propicia la formación de amplicones de bajo rendimiento, tamaños no deseados o simplemente no se amplificó (Figura 2 B).

Se ha utilizado al DMSO (18) como agente estabilizante de las estructuras secundarias para evitar la interferencia en la actividad de polimerización. Ambos solventes, DMSO y formamida afectan la estabilidad térmica de los iniciadores mientras que el DMSO solo regula la estabilidad de la hebra simple del ADN y el perfil de la actividad catalítica de la ADN Polimerasa. Estas moléculas se han descrito como agentes potenciadores individuales para la PCR. En este trabajo no

se encontraron los resultados esperados de manera independiente (8).

Diversos autores (9) (10) (17) consideran que la BSA en la mezcla de reacción es indispensable porque permite superar fallos en la amplificación debido a su capacidad para proporcionar estabilidad a la Taq Polimerasa y reducir la pérdida de reactivo a través de la adsorción por la pared del tubo. Como la extracción del ADN genómico fue de sangre total, es posible que contaminantes en la extracción, como hemina, bilirrubina, FeCl₃, fueron disminuidos con la BSA, de tal forma que la adición de BSA a la reacción de PCR brindó estabilidad a la enzima por la remoción de estos agentes interferentes.

La mezcla entre formamida (5%) más BSA (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) fue probada para mejorar el rendimiento en la reacción de polimerización, obteniendo resultados con calidad mejorada, más no eficiente. De forma similar se probó la combinación BSA (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) más DMSO (5%) con resultados parciales.

En este trabajo se observó que para amplificar los fragmentos del gen IRS 2 se tenían que superar tres características inherentes a la secuencia de este gen; superar la energía libre de activación necesaria para romper los tres enlaces de hidrógeno del dinucleótido CG, evitar la formación de estructuras secundarias como consecuencia de las islas CpG y estabilizar la enzima Taq Polimerasa. Además de estas tres características en relación a la naturaleza del templado de ADN a amplificar, fue elemental tomar a consideración las características de los aditivos: alta potencia, alta especificidad y amplio rango de especificidad o ventana de aplicabilidad, los cuales son factores que hacen a un aditivo ideal (19).

Una amplia ventana de aplicabilidad incrementa la probabilidad de identificar un aditivo efectivo durante la búsqueda inicial y también incrementa la probabilidad del rendimiento de resultados positivos para una variedad de amplicones (19). De tal manera que la correcta amplificación de cada uno de los amplicones se obtuvo cuando se combinaron los aditivos BSA (0,1 µg/µL) (20) más DMSO (5%) (21) más formamida (5%) (22), permitiendo obtener alta eficiencia cualitativa y cuantitativa en los amplicones independientemente de la enzima: Go Taq, Taq Platinum o Taq Recombinante.

Esta mezcla permitió obtener fragmentos difíciles de amplificar del gen IRS 2 porque presentaban porcentajes de CG de 69%, 73% y 75%. Por otro lado permitió que en la secuenciación se obtuvieran cromatogramas limpios para la lectura y análisis, Figura 4 C. En contraste en la literatura se puede observar que hay secuencias de ADN que son amplificadas con la PCR sin ningún problema pero son resistentes a la secuenciación obteniendo un cromatograma de muy baja calidad (Figura 4 A) a no ser que sean tratados con procedimientos extras (16) que permitan obtener el resultado esperado.

Obtener una secuencia limpia y de alta calidad es indispensable en estudios de análisis de SNPs, clonación, mapeo genético, construcción de bases de datos de secuencias de genes completos donde se realizan análisis filogenéticos en relación a haplotipos específicos, deriva génica o BLAST.

Se concluye que la combinación de los aditivos –BSA más DMSO más formamida- es una solución efectiva potenciadora de la reacción de PCR, lo que permite en genes con islas CpG obtener amplicones de alta calidad tanto cualitativa como cuantitativamente.

Los amplicones son de tal calidad y especificidad que no se necesita realizar tratamientos extras para los ciclos de secuenciación, lo que permite obtener secuencias limpias para el análisis de SNPs en genes ricos en CG.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por el FOMIX 2008-2 en el proyecto de Apoyo a CA Consolidados, así como por los recursos propios del Laboratorio Clínico de la UJAT.

CORRESPONDENCIA

DRA. CAROLINA MARTÍNEZ LÓPEZ

Centro de Investigación

División Académica Ciencias de la Salud

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT)

Av. Méndez 2838-A

COL TAMULTÉ CP 86150

martinezlopez@hotmail.com

carolina.martinez@dacs.ujat.mx

Referencias bibliográficas

- Rodríguez-Dorantes M, Téllez-Ascencio N, A-Cerbón M, López M, Cervantes A. Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Rev Invest Clin* 2004; 56: 56-71.
- L-Oliver J, Carpena P, Román-Roldán R, Mata-Balaguer T, Mejías-Romero A, Hackenberg M, *et al.* Isochore chromosome maps of the human genome. *Gene* 2002; 300: 117-27.
- González E, Cedeño FI, Teplukhin AV, Malenkov GG, Poltev VI. Refinamiento de la metodología de la simulación de la hidratación de los ácidos nucleicos. *Rev Mex Fís* 2000; 2: 142-7.
- Arora N, Jayaram B. Energetics of base pairs in B-DNA in solution: an appraisal of potential functions and dielectric treatments. *J Phys Chem* 1998; 102: 6139-44.
- Kaijalainen S, Karhunen PJ, Lahu K, Lindström K. An alternative hot start technique for PCR is small volumes using beads of wax-embedded reaction components dried in trehalose. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 2959-60.
- Henke W, Herdel K, Jung J, Schnorr D, Loenig SA. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 3957.
- Pomp D, Medrano JF. Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. *Bio Techniques* 1991; 10: 58-9.
- Sarkar G, Kapelner S, Sommer S.S. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 7465.
- Kreader CA. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 1102-6.
- Al-soud WB, Radstrom P. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *Biochem J. Clin Microbiol* 2000; 38: 4463-70.
- Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström, C. Pre-PCR processing, strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol Biotechnol* 2004; 26: 133-45.
- White MF. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 1997; 40: S2-S17.
- Ryffel GU. Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 and HNF 4 families: functional and pathological consequences. *J Mol Endocrinology* 2001; 27: 11-29.
- EBI Tools Sequence Analysis EMBOSS CpG Plot/CpGReport/Isochore. Disponible en: URL:-<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss>. (Fecha de acceso 30 enero de 2010).
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Recovery of DNA from Low-melting-temperature agarose gels. In: Harste E, R-Broker T, T-Chow L, I-Garrels, eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Jong-Soon C, Jin-Sung K, Cheol-O J, Soohyun K, Kwon-Soo Ha, Young-Mok P. Improved cycle sequencing of GC-rich DNA template. *EMM* 1999; 31: 20-4.

17. Promega. Nucleic acids amplifications. Protocols & Applications Guide 2009; 12: 1-28.
18. Frackman S, Kobs G, Simpson D, Storts D. Betaine and DMSO: Enhancing agents for PCR. Promega Notes, 1998; 65, 27.
19. Chakrabarti R, Schutt CE. The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides. Nucleic Acids Res 2001; 29: 2377-81.
20. Musso M, Bocciardi R, Parodi S, Ravazzolo R, Ceccherini I. Betaine, Dimethyl Sulfoxide, and 7-Deaza-Dgtp, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences. JMD 2006; 8: 544-50.
21. Ralser M, Querfurth R, Warnatz HJ, Lehrach H, Yaspo ML, Krobitsch S. An efficient and economic enhancer mix for PCR. Biochem Biophys Res Communication 2006; 347: 747-51.
22. Knoche K. Go Taq™ DNA Polimerase: A new enzyme formulation for amplifying DNA fragments. Promega Notes. 2002; 21: 2-5.

Aceptado para su publicación el 23 de febrero de 2012