

Universidad Nacional Autónoma de México.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
Departamento de Genética y Bioestadística.
Laboratorio de Genética Molecular.

ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA
AMPLIFICACIÓN DE GENOMAS COMPLETOS MEDIANTE
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)
EMPLEANDO INICIADORES AL AZAR.

Tesis
Que Para Obtener el Título de:
Médico Veterinario Zootecnista
Presenta

Benedict Aarón López Iglesias.

Asesor: Dr. Rogelio A. Alonso Morales

México D.F

2015

I



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“En un momento de mi vida me sentí muy humano y quería con mis manos curar a ese ser mítico y alabado, pero un aullido y un nacimiento bastaron para que yo renunciara a mi humanidad y al antropocentrismo, logre ver a los seres más increíbles y magníficos de la tierra, estudiarlos desde dentro y entender su relación con el universo. En ese momento entendí que yo deje de ser humano y me convertí en un ser vivo más de este universo maravilloso”

Autor. Benedict Aarón López Iglesias.

DEDICATORIA.

A mis padres, amigos, pareja, familia, mis profesores y asesores, compañeros de laboratorio, miembros del Departamento de Genética y Bioestadística, compañeros y colegas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, a mis colegas y amigos del Departamento de Salud Ambiental de la Dirección General de Servicios Médicos de la UNAM, y a mis seres queridos que ya no están entre nosotros.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los que me apoyaron en este camino interesante y magnifico de la ciencia, agradezco a mi familia, amigos y a mi pareja, agradezco a todos los miembros del laboratorio de Genética Molecular, a mis amigos y profesores del Departamento de Genética y Bioestadística de la FMVZ UNAM ya que aprendí cosas increíbles gracias a su apoyo y ayuda, a mis compañeros del Departamento de Salud Ambiental de la DGSM por tanto apoyo y comprensión, al Zoológico de Chapultepec por darme tantas oportunidades de crecer y aprender, a la UNAM por ser mi segunda casa y mi corazón, finalmente a mi escuela la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por arroparme y creer en mí.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
MATERIAL Y MÉTODOS	15
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	36
REFERENCIAS	37

RESUMEN

LOPEZ IGLESIAS BENEDICT AARON. Estandarización y evaluación de la amplificación de genomas completos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando iniciadores al azar (bajo la dirección del Dr. Rogelio A. Alonso Morales, Biól. Amanda Gayosso Vázquez).

Un problema común en laboratorios de biología molecular es la relativa escasez de ácidos nucleídos de interés en las muestras de estudio para ser empleados en diversas aplicaciones, por lo tanto, los métodos para preservar y/o aumentar la cantidad de ADN son cruciales para el éxito de estos estudios. La PCR como método de amplificación de ADN, permite aumentar las cantidades disponibles de ADN. En el presente trabajo se evalúa el comportamiento de la amplificación de ADN genómico utilizando PCR con iniciadores al azar (Random Primers). En este trabajo se implementó y evaluó la amplificación de genomas completos definiendo las condiciones que llevan a una amplificación óptima, estableciendo su nivel de sensibilidad y los niveles de producción de ADN alcanzados. Esta tecnología tiene aplicaciones importantes en diversas áreas de la biomedicina.

Los objetivos del trabajo fueron evaluar diversas condiciones de la PCR en la amplificación de ADN en genomas completos de células animales empleando iniciadores aleatorios (Random Primers), se determinó el grado de sensibilidad de la amplificación de ADN genómico. Se evaluó el grado de reproducibilidad de la amplificación genómica.

En los experimentos se utilizó ADN de la línea celular BL3.1, diferentes cantidades de ADN se amplificaron mediante PCR con oligonucleótidos al azar. La amplificación se verificó por electroforesis, el producto de PCR se cuantificó por fluometría (Picogreen), y por PCR en tiempo real.

Finalmente el trabajo logro encontrar las condiciones para la amplificación de genomas empleando iniciadores al azar, las cuales fueron 5ng a una temperatura de 40C° con una concentración de MgCl₂ a 1.5mM de y una concentración de 5uM de iniciadores al azar.

INTRODUCCIÓN

James Watson y Francis Crick revolucionaron la biología con su descubrimiento de la doble hélice del ADN en 1953, dando inicio a la biología molecular. Esto ha llevado al desarrollo de diversas metodologías como la amplificación de ADN y la secuenciación de genomas que son parte de la revolución genómica (Chenghang, Z. 2013).

La biología molecular han facilitado un sinfín de actividades en diversas áreas de las ciencias médico-biológicas; incluyendo la Medicina Veterinaria, donde una gran variedad de pruebas diagnósticas son utilizadas ampliamente para la detección de diversos patógenos, de mutaciones genéticas, trastornos y a predisposición genética a enfermedades, así como neoplasias, hipertensión y otras enfermedades (Beard, A.2003).

La genómica, es el área de la biología que intenta comprender la organización, la función y la evolución (Kaisa, S. 2008). El estudio de genomas completos nos ayuda a tener un panorama más preciso sobre las enfermedades de origen genético y nos acerca a conocer sus posibles causas. También permite entender la participación de las variantes genéticas en las capacidades fisiológicas. En general es posible determinar una relación más estricta entre las variantes en el genotipo y fenotipo. Estos estudios se han impulsado gracias a un rápido progreso en las técnicas de secuenciación masiva de nueva generación (Elowitz, B. 2002).

En lo que refiere al estudio de la epidemiología molecular de los agentes infecciosos, la amplificación de genomas completos representa una herramienta que facilita entender los procesos evolutivos, sus características biológicas, similitudes y divergencias (Elowitz, B. 2002).

Un logro tecnológico ha sido la secuenciación del genoma de células individuales. Estos métodos se han basado en la amplificación de todo el genoma (WGA) de células individuales para generar cantidad suficiente de ADN para la secuenciación (Chenghang, Z. 2014). Algunas investigaciones mencionan que el análisis del genoma de una sola célula de ovocitos humanos es importante para aclarar principios sobre la meiosis y la exploración del genoma de preimplantación. El estudio de genomas completos tiene también como enfoque detectar anomalías en blastocitos, para evaluar la presencia de aneuploidias, que pueden dar lugar a enfermedades genéticas (Chenghang, Z. 2014).

El estudio de los genomas de blastómeros puede aplicarse además a la determinación de sexo y a la evaluación del valor genómico para la selección genómica (Chenghang, Z. 2014).

El análisis de la genómica de una sola célula también es necesario cuando el número de células disponibles está limitado a pocos o uno, como son las muestras de pruebas prenatales (Wei, F. 2014). El análisis de células individuales puede ofrecer importante información médica. En la actualidad, el análisis de células individuales ayuda a identificar poblaciones de células preexistentes que son resistentes a la quimioterapia o subpoblaciones poco comunes que son capaces de invadir tejidos o provocar metástasis (Nicholas, E .2014).

Actualmente se tiene el interés de aislar y analizar el genoma de microorganismos presentes en un medio ambiente determinado. Estos estudios son conocidos como metagenómica, la cual emplea ADN de comunidades de microorganismos para identificar las diversas especies microbianas a través de los ensamblados y reconstrucción de genomas. Se analizan las diferentes variantes genéticas presentes en un entorno determinado, tomando directamente las muestras de ese ambiente, sin necesidad de aislar y cultivar los microorganismos (Wilson, H. 2003).

Un ejemplo importante de metagenómica en la salud humana es que nuestro cuerpo contiene una enorme variedad y número de microbios, y el estudio de estas comunidades, el microbioma humano, puede ayudarnos a prevenir enfermedades, descubrir nuevos fármacos o ahondar en el conocimiento de enfermedades complejas como el cáncer o la obesidad (Makler, A.1998).

La metagenómica juega un papel muy importante en el estudio de estas comunidades. En agricultura las comunidades microbianas que se encuentran en los campos de cultivo son esenciales para que los productos agrícolas crezcan más y más sanos (James, E. 2014).

Por otro lado, la investigación de la biología molecular de los tumores, comúnmente emplea muestras tumorales que en realidad contiene decenas o cientos de miles de células, las cuales no todas son neoplásicas. Esas muestras tienen células inmunitarias, células endoteliales y otras células infiltrantes, todo lo cual comprende lo que en realidad es un tumor y eso hace que sea verdaderamente difícil entender lo que define a un tumor o, más importante aún, cómo tratarlo (Nicholas, E .2014).

Un problema a enfrentar en estudios de análisis genéticos es contar con cantidades suficientes de ADN de alta calidad de las muestras problema. Es por esto que los mecanismos para preservar o aumentar la cantidad del ADN obtenidos, resultan ser cruciales para el éxito de estas pruebas (James, E .2014).

Actualmente, la técnica más utilizada para la amplificación de fragmentos específicos de ADN es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fue desarrollada en 1987 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, en teoría basta una única copia de ese fragmento original como molde para obtener un gran número de copias (Reimar, J. 2009).

La PCR es una técnica tan poderosa y versátil, que prácticamente resulta imprescindible en todas aquellas disciplinas que tienen que ver con las ciencias de la vida, teniendo múltiples aplicaciones que van desde la clonación de ADN para la secuenciación, la filogenia basada en ADN, el análisis funcional de genes, el diagnóstico de trastornos hereditarios, la identificación de huellas genéticas (usada en técnicas forenses y test de paternidad) y la detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas, entre otras (Reimar, J. 2009).

Actualmente se tiene el interés de amplificar genomas completos de diversos organismos, para su análisis y estudio, en este caso, la PCR puede ser de gran ayuda, empleando iniciadores al azar (random primers) (James, E. 2014).

Métodos o estrategia para amplificar genomas

Los iniciadores al azar (random primers) son secuencias de iniciadores de 6 bases que se sintetizan por completo al azar para dar una numerosa serie de secuencias que tienen el potencial para reconocer en muchos sitios al azar en una secuencia de ADN y actuar como un cebador de una ADN polimerasa para iniciar la síntesis de ADN (Nicholas, E. 2014).

Empleando random primers se ha reportado la amplificación del 93% del genoma a partir de una sola célula humana. Algunas de las ventajas de esta tecnología incluyen la reducción del sesgo de amplificación y el aumento de la cobertura del genoma pues los primers se unen al azar en todo el genoma (Nicholas, E. 2014).

Otro método sobresaliente para la amplificación de genomas completos, es la amplificación isotérmica, la cual se basa en una ADN polimerasa obtenida del bacteriófago ϕ 29 (Reimar, J.2009). La ADN polimerasa ϕ 29 es una enzima monomérica (66 kDa) responsable de la replicación del ADN del bacteriófago ϕ 29. Entre sus principales características destacan su capacidad de desplazamiento de cadenas en la síntesis de ADN, su elevada procesividad sin la intervención de proteínas tipo helicasas. Estas propiedades, junto con su alta fidelidad, y su actividad exonucleasa (3'-5') correctora de errores, le confieren ventajas en los procesos de amplificación de ADN (John, R. 2002).

Para el estudio de genomas completos la amplificación isotérmica utiliza random primers resistentes a la actividad exonucleasa que son iniciadores cortos (6 bases), una mezcla de oligonucleótidos aleatorios de cadena sencilla. Este cebador tiene modificaciones 3'-terminales que consiste en dos fosforotioato (PTO) que los hace resistentes a la actividad 3' \rightarrow 5' exonucleasa de la ADN polimerasa. El iniciador se unirá al ADN molde en secuencias complementarias de ubicación desconocida, y dará una numerosa serie de inicios de síntesis al azar en la secuencia del ADN (Kaisa, S.2008).

Otro método de nueva generación de amplificación de genomas es el MALBAC (Multiple Annealing and Looping Based Amplification Cycles), la cual es una

técnica donde el ADN se amplifica de forma casi lineal. La utilización de los oligonucleótidos especializados permite un “círculo” de amplicones que luego les impide ser amplificada aún más en los siguientes ciclos de MALBAC. Estos cebadores son 35 nucleótidos de longitud, con 8 nucleótidos variables que se hibridan con las plantillas y 27 nucleótidos comunes. La secuencia de nucleótidos común es GTG AGT GAT GGT GGT TGA AGT GTG GAG. Los 8 nucleótidos variables hibridan al azar a la molécula de ADN genómico de cadena sencilla. Después de una extensión, semi-amplificación, una amplificación que contiene la secuencia de nucleótidos común sólo en el extremo 5'. Esta semi-amplicón se utiliza como una plantilla para otra ronda de extensión, que luego se traduce en un amplicón completo, un amplicón donde el extremo 3' es complementaria a la secuencia en el extremo 5' (Chenghang, Z. 2013).

MALBAC ofrece un enfoque imparcial para la amplificación de ADN de una sola célula. Este método de secuenciación de una sola célula tiene un gran número de aplicaciones, muchas de las cuales aún no han sido explotados. MALBAC puede ayudar en el análisis de muestras forenses, en el cribado prenatal de enfermedades genéticas, para comprender el desarrollo de las células reproductoras, o en la aclaración de la complejidad de un tumor. En su fundación, esta tecnología permite a los investigadores observar la frecuencia con la que las mutaciones se acumulan en las células individuales. Por otra parte, permite la detección de anomalías cromosómicas, variaciones en los genes y variaciones del número de copias (CNV) dentro de y entre las células, y facilita aún más la detección de mutaciones poco frecuentes que resultan en polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) (Yu,H. 2013).

JUSTIFICACIÓN

En biología molecular la frecuente escasez de ácidos nucleicos de interés en las muestras de estudio es un problema común por lo cual los métodos para preservar y/o aumentar la cantidad de ADN son cruciales para el éxito en diversos estudios.

HIPÓTESIS

La PCR con iniciadores aleatorios puede emplearse como una metodología eficiente en la amplificación de ADN de genoma completo de células animales.

OBJETIVOS

Estandarizar y evaluar las condiciones de la PCR para la amplificación de genomas completos de células eucariontes empleando iniciadores aleatorios (random primers).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar diferentes condiciones para la amplificación por PCR de genomas de células animales.

Determinar el grado de sensibilidad de la amplificación de ADN genómico.

Evaluar el grado de reproducibilidad de la amplificación genómica.

METAS

Obtener y cuantificar ADN de la línea celular BL3.1 (ATCC® No. catálogo CRL-2306™).

Estandarizar la cuantificación de ADN por fluorimetría y PCR en Tiempo Real.

Evaluar el efecto en la amplificación de ADN genómico empleando random primers, diferentes concentraciones de MgCl₂, iniciadores, diferentes temperaturas y cantidades iniciales de ADN.

Estandarizar la evaluación y cuantificación del ADN amplificado por: 1) electroforesis en gel de agarosa al 1%. 2) fluorimetría y espectrometría y 3) PCR en tiempo real.

Evaluar el grado de reproducibilidad de la amplificación genómica. Con al menos 4 ensayos.

Determinar la sensibilidad de la amplificación de ADN genómico. Con diferentes cantidades iniciales de ADN celular.

Valorar la cantidad de ADN producido y el número de copias del genoma obtenidas a partir de diferentes cantidades iniciales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Células de bovino (línea celular BL3.1 (ATCC® CRL-2306™), las cuales tienen integrado a su genoma el virus de Leucosis Bovina de las cuales se obtuvo el ADN.

Oligonucleótidos para PCR

Oligonucleótido aleatorio (Random Primers: 5'-NNNNNN-3' (T4Oligo®).

Purificación de ADN

Se efectuó por el método de Manuelids L(1977), con las siguientes modificaciones. A partir de 1×10^6 células de la línea BL3.1 provenientes de un cultivo en medio RPMI con 10% de suero fetal bovino, se centrifugó a 1,840 G/10min. La pastilla celular se resuspendió en 500ul de solución de lisis (50mM Tris-HCl pH8,0.1mM EDTA;0.5% sarkosyl). Se adiciona RNasa a una concentración final de 15 µg/ml incubando a 37°C durante una hora. Posteriormente se adicionó proteinasa K a una concentración final de 100 µg/ml incubando durante 2hrs a 55°C y 1 hora a 65°C. Se agregó NaCl a una concentración final de 2M, mezclando por vortex por 15 segundos. Centrifugando a 10,600 G/10min. Se mezcla el sobrenadante con 2 volúmenes de etanol absoluto frío, centrifugando a 15,300G/15 min/4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla de ADN se lavó en dos ocasiones con 500ul de etanol al 70% con centrifugaciones a 10,600 G/5min, finalmente la pastilla se secó por calor al vacío y se resuspendió en 100 ul de dH2O estéril, para posteriormente verificar la calidad de éste por electroforesis y se cuantificó por espectrofotometría y fluorometría.

PCR

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en un volumen de 40ul. Se evaluaron diferentes concentraciones de los iniciadores, MgCl₂, así como diversas temperaturas de alineamiento (30°C, 40°C, 50°C y 60°C). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 paso de desnaturalización inicial a 94°C/3', 30 ciclos de desnaturalización a 94°C/30'', alineación /30'' y extensión a 72°C/1'; y 1 ciclo de extensión final a 72°C/3'.

Evaluación del ADN amplificado

Electroforesis

Para evaluar la amplificación de las diferentes condiciones de PCR se empleó electroforesis en geles de agarosa al 1%, el buffer de electroforesis empleado fue TAE 1X (40mM Tris, 20mM ácido acético, y 1mM EDTA pH8) y utilizando como marcador de peso molecular ADN del bacteriófago λ digerido con BstEII (λ BstEII 100 ng/ μ l), los geles se tiñeron con bromuro de etidio [5mg/mL en H₂O] por 2 minutos, destañido en agua por 10 min y posteriormente se visualiza con luz ultravioleta (UV) en un fotodocumentador UVP.

Cuantificación de ADN

El ADN fue cuantificado por dos métodos: espectrofotometría a 260 y 280 nanómetros en un espectrofotómetro (Epoch, BioTek Modelo Epochh # 131168), y por fluorometría empleando el colorante Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit, © 2015 Thermo Fisher Scientific Inc.

Para evaluar la cantidad de ADN amplificado en la diferentes condiciones de la PCR se emplearon los kits comerciales Findit B-Actina® y Findit LB®, siguiendo a las instrucciones del fabricante (BioTECMol®). Estos kits nos ayudan a cuantifican el número de copias del ADN celular, a partir de la copia del gen beta actina y la copia del retrovirus de la Leucosis Bovina que tiene la línea celular BL3.1.

RESULTADOS

Purificación y cuantificación de ADN

El DNA fue cuantificado por fluorometría (Picogreen®), se determinó una concentración de 36ng/ul, siempre se tuvo este resultado en la purificación.

El gel de agarosa al 1 % sometido a electroforesis podemos ver el marcador de peso molecular, el control positivo que fue ADN del plásmido pTZ57R, ADN de la línea celular BL3.1 y finalmente un control negativo que es agua destilada.

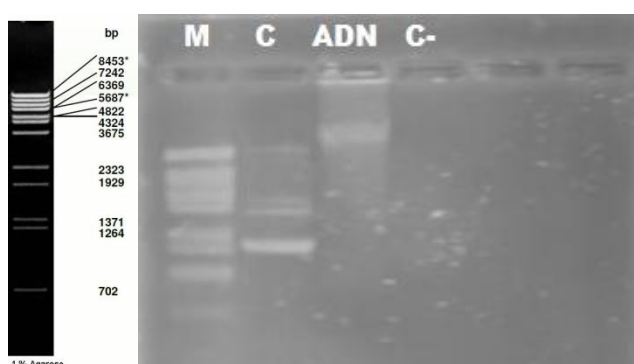


Figura 1.- Electroforesis del ADN de la célula BL3.1. M: marcador de peso molecular (λ /BstEII); C ADN de plásmido pTZ57R; en el carril 3 se separaron 36ng del ADN de la célula BL3.1; C- Agua destilada.

Estandarización de la amplificación por PCR variando diferentes condiciones.

Las diferentes condiciones evaluadas son identificadas de acuerdo a la siguiente nomenclatura **a= 1.5mM de MgCl₂**; **A=3mM de MgCl₂**; **B=5uM de random primer** y **b=1uM de random primer**.

En los cuadros 1- 5 se muestra como se elaboraron las diferentes mezclas de amplificación en las cuales varia el ADN genómico.

Cuadro 1.- Condiciones de la mezcla de reacción a diferentes concentraciones de amplificación [MgCl₂], [primers] con 50 ng/rx de ADN para la amplificación por PCR.

Condición de PCR Rx				ab	aB	Ab	AB
Reactivo	(stock)	(final)	1X ul	x5 ul	x5 ul	x5 ul	x5 ul
ADN	36ng/ul	50ng	1.36	6.8	6.8	6.8	6.8
Primer	10uM	1uM 5uM	4 20	20	100	20	100
dNTPs	2mM	0.2mM	4	20	20	20	20
Taq Pol	5u/rx	2u/rx	0.4	2	2	2	2
Buffer	10x	1x	4	20	20	20	20
Mgcl2	30mM	1.5mM 3mM	2 4	10	10	20	20
H ₂ O	-	Cbp 40ul	-	121.2	41.2	111.2	31.2

Cuadro 2.- Condiciones de la mezcla de reacción a diferentes concentraciones de amplificación [MgCl₂], [primers] con 5 ng/rx de ADN para la amplificación por PCR.

Condición de PCR Rx				ab	aB	Ab	AB
Reactivo	(stock)	(final)	1X ul	x5 ul	x5 ul	x5 ul	x5 ul
ADN	1ng/ul	5ng	5	25	25	25	25
Primer	10uM	1uM 5uM	4 20	20	100	20	100
dNTPs	2mM	0.2mM	4	20	20	20	20
Taq Pol	5u/rx	2u/rx	0.4	2	2	2	2
Buffer	10x	1x	4	20	20	20	20
Mgcl2	30mM	1.5mM 3mM	2 4	10	10	20	20
H ₂ O	-	Cbp 40ul	-	103	23	93	13

Cuadro 3.- Condiciones de la mezcla de reacción a diferentes concentraciones de amplificación [MgCl₂], [primers] con 1 ng/rx de ADN para la amplificación por PCR.

Condición de PCR Rx				ab	aB	Ab	AB
Reactivo	stock	final	1X ul	x5 ul	x5 ul	x5 ul	x5 ul
ADN	0.2ng/ul	1ng	5	25	25	25	25
Primer	10uM	1uM 5uM	4 20	20	100	20	100
dNTPs	2mM	0.2mM	4	20	20	20	20
Taq Pol	5u/rx	2u/rx	0.4	2	2	2	2
Buffer	10x	1x	4	20	20	20	20
Mgcl2	30mM	1.5mM 3mM	2 4	10	10	20	20
H ₂ O	-	Cbp 40ul	-	103	23	93	13

Cuadro 4.- Condiciones de la mezcla de reacción a diferentes concentraciones de amplificación [MgCl₂], [primers] con 0.5 ng/rx de ADN para la amplificación por PCR.

Condición de PCR Rx				ab	aB	Ab	AB
Reactivo	stock	final	1X ul	x5 ul	x5 ul	x5 ul	x5 ul
ADN	0.1ng/ul	0.5ng	5	25	25	25	25
Primer	10uM	1uM 5uM	4 20	20		20	
dNTPs	2mM	0.2mM	4	20	20	20	20
Taq Pol	5u/rx	2u/rx	0.4	2	2	2	2
Buffer	10x	1x	4	20	20	20	20
Mgcl2	30mM	1.5mM 3mM	2 4	10	10		20
H2O	-	Cbp 40ul	-	103	23	93	13

Cuadro 5.- Condiciones de la mezcla de reacción a diferentes concentraciones de amplificación [MgCl₂], [primers] con 0.1 ng/rx de ADN para la amplificación por PCR.

Condición de PCR Rx				ab	aB	Ab	AB
Reactivo	stock	final	1X ul	x5 ul	x5 ul	x5 ul	x5 ul
ADN	0.02ng/ul	0.1ng	5	25	25	25	25
Primer	10uM	1uM 5uM	4 20	20		20	
dNTPs	2mM	0.2mM	4	20	20	20	20
Taq Pol	5u/rx	2u/rx	0.4	2	2	2	2
Buffer	10x	1x	4	20	20	20	20
Mgcl2	30mM	1.5mM 3mM	2 4	10	10		20
H ₂ O	-	Cbp 40ul	-	103	23	93	13

Evaluación de amplificación de ADN genómico empleando random primers mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%

La amplificación por PCR del ADN genómico empleando random primers se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, TAE 1X. Se evaluaron 15ul del producto de PCR. En las figuras 2 y 3 se muestran los productos amplificados en las diferentes condiciones de amplificación.

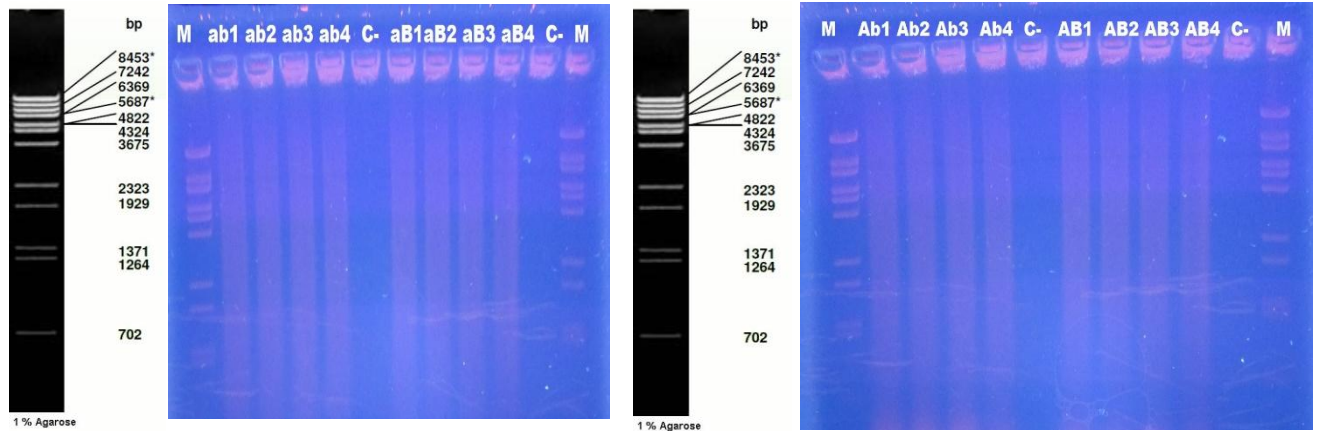


Figura 2.- Electroforesis del ADN amplificado de la célula BL3.1. En el carril M se tiene un marcador de peso molecular (λ /BstEII); se presentan los productos de amplificación con las condiciones A=3mM de MgCl₂; a= 1.5mM de MgCl₂; B=5uM de random primer y b=1uM de random primer. del carril 2 a 5 se tiene producto de amplificación por PCR con random primers con diferentes temperaturas (30°,40°,50°,60°);carril 6 control negativo; del carril 7 a10 se tiene producto de amplificación por PCR con random primers con diferentes temperaturas (30°,40°,50°,60°):carril 11 control negativo y en cual carril 12 se tiene un marcador de peso molecular (λ /BstEII).

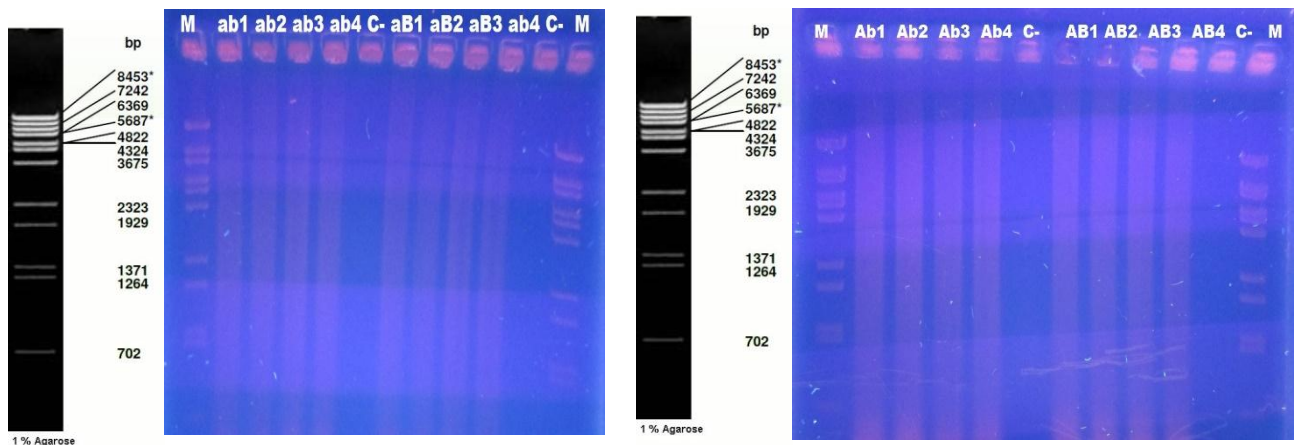


Figura 3.- Electroforesis del ADN amplificado de la célula BL3.1. En el carril M se tiene un marcador de peso molecular (λ /BstEII); se presentan los productos de amplificación con las condiciones A=3mM de MgCl₂; a= 1.5mM de MgCl₂; B=5uM de random primer y b=1uM de random primer. del carril 2 a 5 se tiene producto de amplificación por PCR con random primers con diferentes temperaturas (30°,40°,50°,60°);carril 6 control negativo; del carril 7 a10 se tiene producto de amplificación por PCR con random primers con diferentes temperaturas (30°,40°,50°,60°):carril 11 control negativo y en cual carril 12 se tiene un marcador de peso molecular (λ /BstEII).

Evaluación de amplificación de ADN genómico por fluometría

En el cuadro 6 se presentan los datos de la cuantificación del ADN amplificado en las diferentes condiciones. Los resultados se presentan en nanogramos por reacción en un volumen de 40ul, utilizando en la amplificación una concentración inicial de ADN de 50ng,5ng y 1 ng.

En el cuadro 7 se presentan los datos de la cuantificación del ADN amplificado en las diferentes condiciones. Los resultados se presentan en nanogramos por reacción, en un volumen de 40ul, utilizando en la amplificación una concentración inicial de ADN de 0.1 ng, 0.5 ng, 1ng y 5 ng

La cuantificación de los productos de PCR se realizó por duplicado, diluyendo volumen a volumen (10ul /v del producto de PCR y 10ul de Reactivo de Picogreen®) en un volumen final de 20ul. En la figura 4 se muestra la curva de cuantificación empleando Picogreen® donde las muestras del producto de PCR se ven en color rojo, se puede observar que las determinaciones de las muestras caen dentro de la curva de cuantificación.

En los cuadros 6 y 7 se muestran los resultados de la cuantificación del ADN amplificado usando Fluorometría. Los resultados se presentan en nanogramos por reacción en un volumen de 40ul. . Esto mismo se muestra en las figuras 5 a 9.

En la figura 10 muestra las cuantificaciones del ADN amplificado para 5ng y 1ng. En la figura 11 se muestra los niveles de amplificación para 0.1 ng, 0.5 ng, 1ng y 5 ng

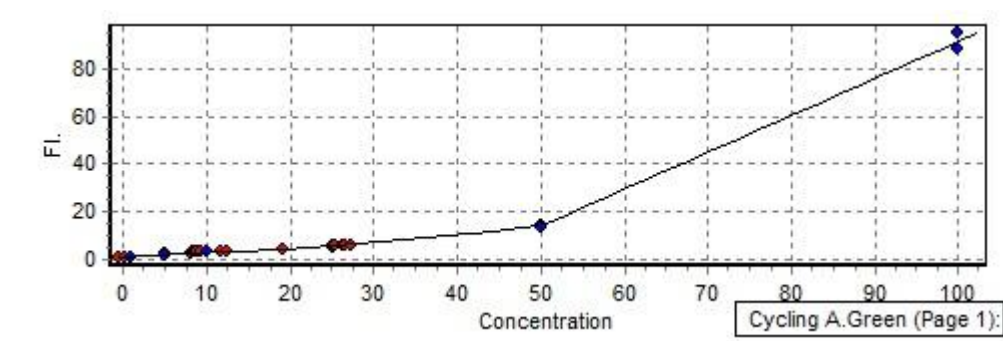


Figura 4.- Curva de cuantificación del ADN amplificado empleando Picogreen®. Las muestras del producto de PCR se ven en color rojo.

Cuadro 6.- Cantidad promedio de ADN (en ng) amplificado y su desviación estándar (DS) a partir de diferentes cantidades iniciales de ADN (1, 5 y 50 ng) empleando diferentes condiciones de amplificación. Los resultados representan promedios y Desviación estándar (DS) de 2 experimentos evaluando cada condición por duplicado

Temp	Condición*	Promedio 1ng**	DS	Promedio 5ng****	Ds	Promedio 50ng****
30°C	ab1	232.08	0.11	523.22	0	896
40°C	ab2	256	0	458.61	4.45	901
50°C	ab3	224	0	436.18	13.2	896
60°C	ab4	216	0	427.92	11.65	894
30°C	aB1	296	0	718.03	324.5	894
40°C	aB2	288.04	0.05	668.02	190.50	1015
50°C	aB3	288	0	800.90	221.4	896
60°C	aB4	272	0	722.66	126.34	892
30°C	Ab1	225.88	0.05	480.00	11.3	893
40°C	Ab2	227.92	0	476.00	28.28	896
50°C	Ab3	217.44	0	468.00	5.65	894
60°C	Ab4	213.12	0	440.00	11.31	893
30°C	AB1	130.6	0.05	544.00	67.88	894
40°C	AB2	148.68	0.05	648.00	45.25	1023
50°C	AB3	149.48	0.05	508.00	141.42	895
60°C	AB4	134.36	0.05	464.00	214.9	897
	c-	15.76	0	40.00	0	48

*= A=3mM de MgCl₂; a= 1.5mM de MgCl₂; B=5uM de random primer y b=1uM de random primer.**= Cantidad inicial de ADN

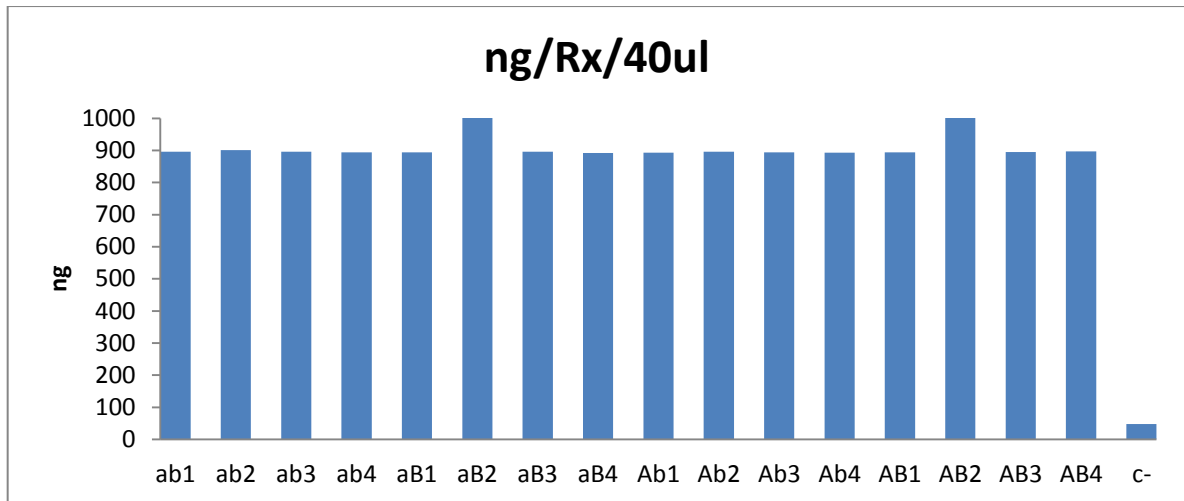


Figura 5. Cantidad de ADN producida por reacción a partir de 50 ng iniciales de ADN empleando diferentes condiciones de amplificación variando la temperatura (1=30°C; 2=40°C; 3=50; 4=60) y cantidad de primer y MgCl₂= A=3mM de Mgcl₂; a= 1.5mM de MgCl₂; B=5uM de random primer y b=1uM de random primer.

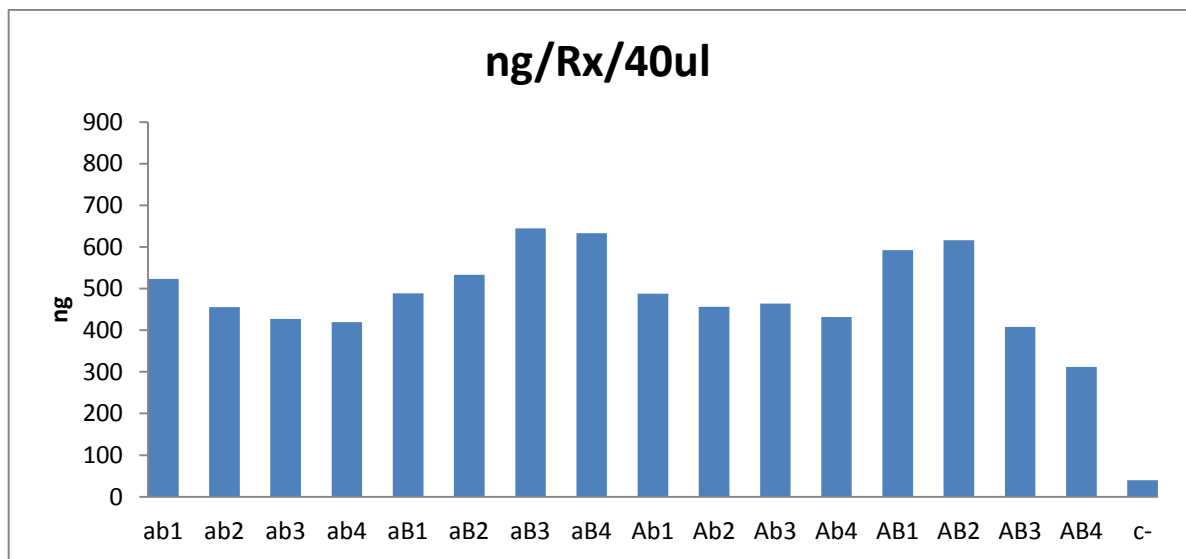


Figura 6. Cantidad de ADN producida por reacción a partir de 5 ng iniciales de ADN empleando diferentes condiciones de amplificación variando la temperatura (1=30°C; 2=40°C; 3=50; 4=60) y cantidad de primers, y MgCl₂: A=3mM de Mgcl₂; a= 1.5mM de MgCl₂; B=5uM de random primer y b=1uM de random primer.

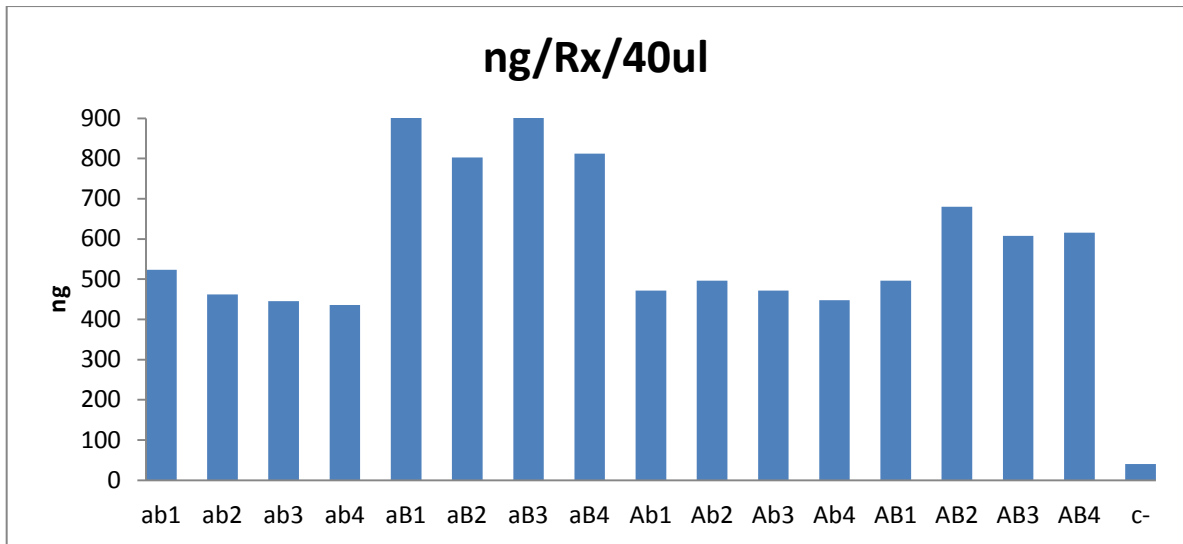


Figura 7. Cantidad de ADN producida por reacción, a partir de 5 ng iniciales de ADN empleando diferentes condiciones de amplificación variando la temperatura (1=30°C; 2=40°C; 3=50; 4=60) y cantidad de primers y MgCl₂: A=3mM de Mgcl₂; a= 1.5mM de MgCl₂; B=5uM de random primer y b=1uM de random primer.

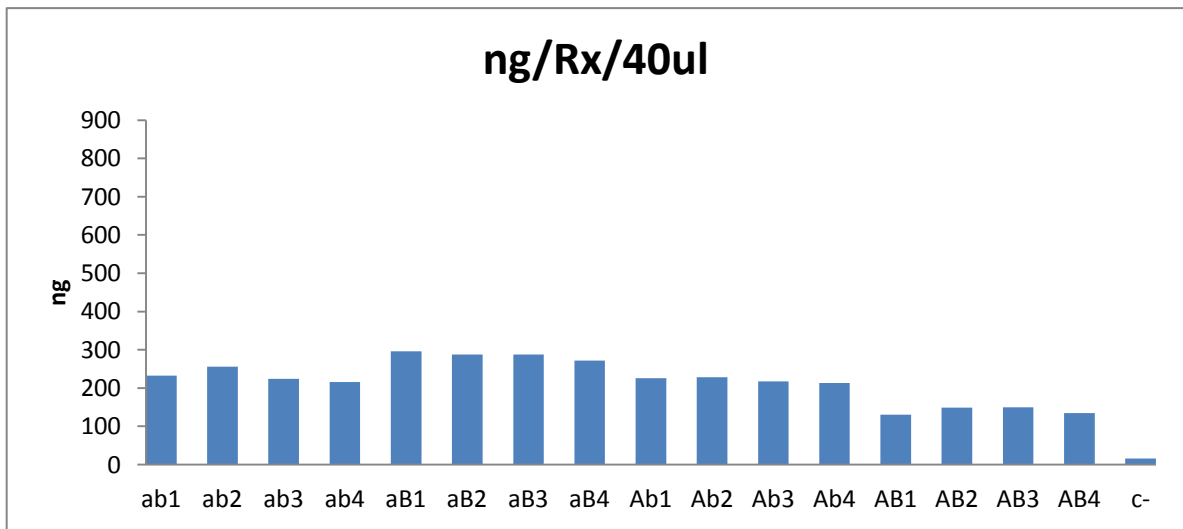


Figura 8. Cantidad de ADN producida por reacción, a partir de 1 ng iniciales de ADN empleando diferentes condiciones de amplificación variando la temperatura (1=30°C; 2=40°C; 3=50; 4=60) y cantidad de primers y MgCl₂: A=3mM de Mgcl₂; a= 1.5mM de MgCl₂; B=5uM de random primer y b=1uM de random primer.

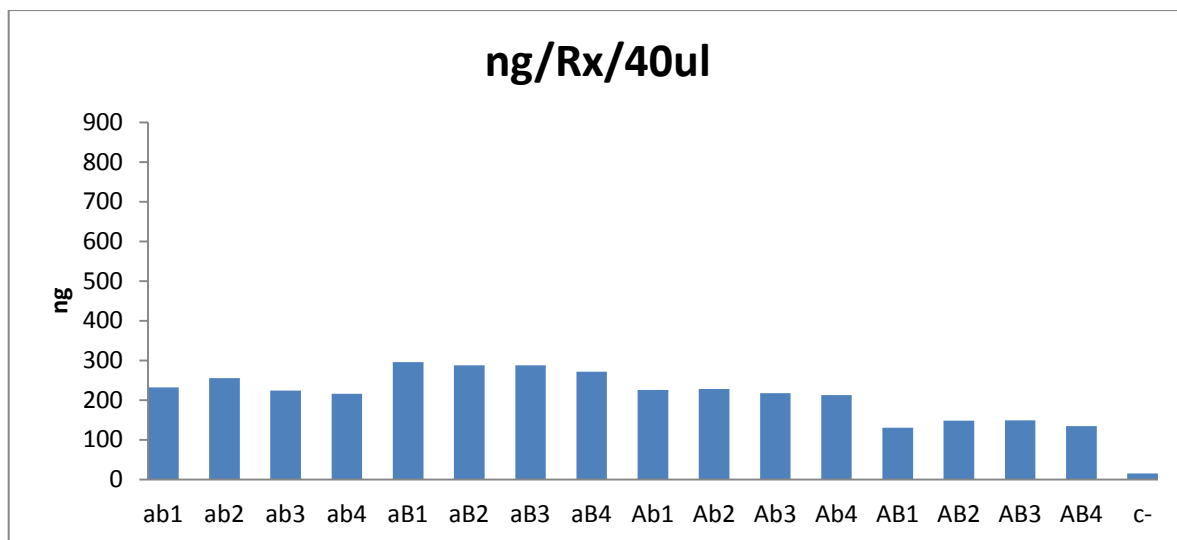


Figura 9. Cantidad de ADN producida por reacción, a partir de 1 ng iniciales de ADN empleando diferentes condiciones de amplificación variando la temperatura (1=30°C; 2=40°C; 3=50; 4=60) y cantidad de primers y MgCl₂ : A=3mM de Mgcl₂; a= 1.5mM de MgCl₂; B=5uM de random primer y b=1uM de random primer.

Cuadro 7.-Promedio y Desviación estándar (DS) de la cantidad de ADN amplificado a 40°C, con diferentes concentraciones de magnesio y de primers, a partir de 0.1ng, 0.5ng, 1 ng y 5ng de ADN genómico inicial. Los resultados representan promedios y DS de 2 experimentos evaluando cada condición por duplicado

Condiciones* (Cantidad ADN inicial)	Promedio de la cantidad de ADN amplificado	DS	Condiciones* (Cantidad ADN inicial)	Promedio de la cantidad de ADN amplificado	DS
aB (0.1ng)	38.4	0.11	ab (1ng)	256.56	0.67
AB (0.1ng)	24.48	0.22	aB (1ng)	297.44	1.92
aB (0.5ng)	127.2	0	Ab (1ng)	228.24	0.4
AB (0.5ng)	102.68	1.6	AB (1ng)	149.08	0.3
aB (1ng)	299.84	0.1	ab (5ng)	461.52	0.2
AB (1ng)	149.4	0.05	aB (5ng)	802.8	0.3
aB (5ng)	803.28	0	Ab (5ng)	496.168	0.2
AB (5ng)	672.64	0.11	AB (5ng)	672.36	0.5
c-	40	0	c-	40	0

*= A=3mM de Mgcl₂; a= 1.5mM de MgCl₂; B=5uM de random primer y b=1uM de random primer.

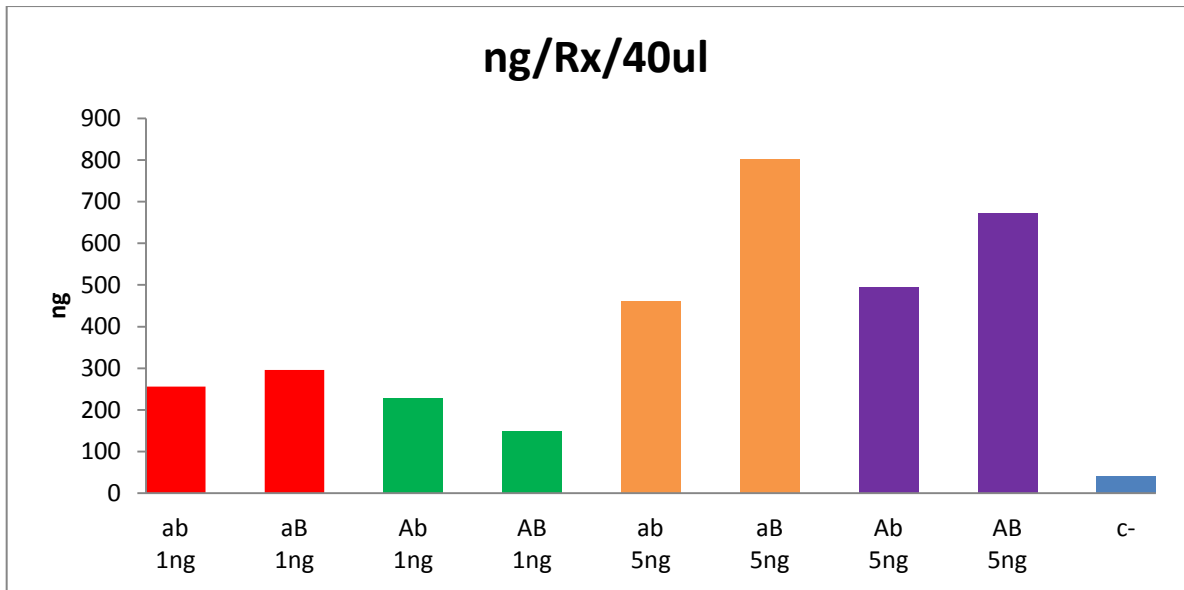


Figura 10. Cantidad de ADN producida por reacción a partir de 1 ng y 5ng iniciales de ADN empleando diferentes condiciones de amplificación (A=3mM de MgCl₂; a= 1.5mM de MgCl₂; B=5uM de random primer y b=1uM de random primer) a una temperatura de 40°.

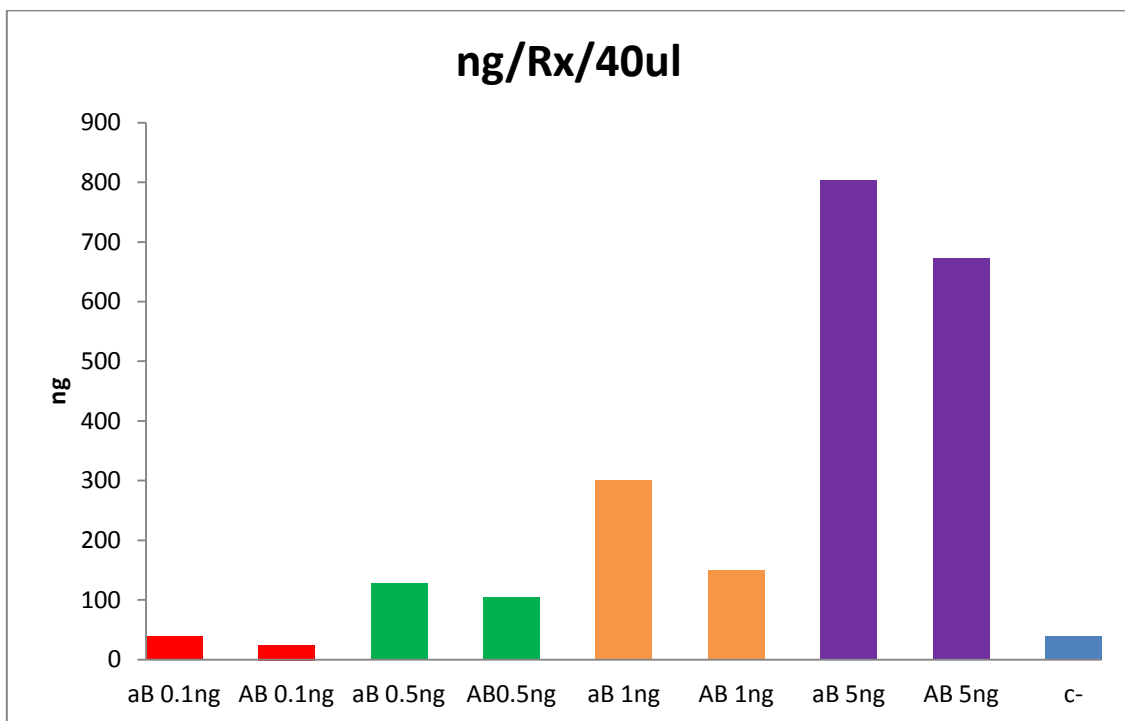


Figura 11. Cantidad de ADN producida por reacción a partir de de 0.1 ng ,0.5ng,1ng y 5ng iniciales de ADN empleando diferentes condiciones de amplificación (A=3mM de MgCl₂; a= 1.5mM de MgCl₂; B=5uM de random primer y b=1uM de random primer) a una temperatura de 40°.

Cuantificación del ADN genómico amplificado mediante PCR en Tiempo Real.

Los productos de amplificación genómica además de ser cuantificaron por fluorometría, y por PCR en tiempo real. Se mide la cantidad de ADN amplificado bajo condiciones de PCR empleando los kits FinditB-Actina y Findit LB.

En los cuadros 8 y 9 se muestran los resultados del número de copias de genomas en un volumen de 20ul. Esto mismo se muestra en las gráficas 12 a 19. Los valores fueron obtenidos de 2 experimentos diferentes en donde cada condición se realizó por duplicado.

Cuadro 8.-Promedio del número de copias de ADN cuantificados por PCR en tiempo real y su desviación estándar (DS) a partir de diferentes cantidades iniciales de ADN (1, 5 y 50 ng) empleando diferentes condiciones de amplificación. Los resultados representan promedios y DS de 2 experimentos evaluando cada condición por duplicado

Temp	Condición *	Promedio 1ng**	DS	Promedio 5ng****	Ds	Promedio 50ng****
30°C	ab1	2.55E+08	2.83E+05	1.05E+08	1.20E+08	1.07E+08
40°C	ab2	2.28E+08	2.83E+05	1.17E+08	1.29E+08	9.70E+07
50°C	ab3	2.71E+08	0.00E+00	1.95E+08	2.54E+08	1.56E+08
60°C	ab4	2.36E+08	0.00E+00	1.54E+08	2.03E+08	7.57E+07
30°C	aB1	2.58E+09	0.00E+00	8.00E+07	1.06E+08	3.53E+08
40°C	aB2	2.04E+09	0.00E+00	1.02E+08	1.41E+08	1.23E+08
50°C	aB3	1.91E+09	0.00E+00	7.72E+07	1.01E+08	9.81E+07
60°C	aB4	1.90E+09	0.00E+00	8.98E+07	1.18E+08	9.81E+08
30°C	Ab1	5.37E+09	0.00E+00	9.08E+07	0.00E+00	2.42E+07
40°C	Ab2	4.92E+09	0.00E+00	1.42E+08	0.00E+00	1.64E+07
50°C	Ab3	5.08E+09	0.00E+00	1.22E+08	0.00E+00	5.08E+08
60°C	Ab4	4.46E+09	0.00E+00	1.19E+08	0.00E+00	2.04E+08
30°C	AB1	3.28E+08	0.00E+00	9.23E+07	0.00E+00	1.81E+08
40°C	AB2	2.71E+08	2.83E+05	1.69E+08	1.32E+08	1.44E+07
50°C	AB3	3.86E+08	0.00E+00	1.15E+08	0.00E+00	9.38E+07
60°C	AB4	4.79E+08	0.00E+00	9.92E+07	0.00E+00	1.21E+07
	c-	2.90E+05	0.00E+00	2.22E+05	0.00E+00	2.68E+05

*= A=3mM de MgCl₂; a= 1.5mM de MgCl₂; B=5uM de random primer y b=1uM de random primer.

**= Cantidad inicial de ADN

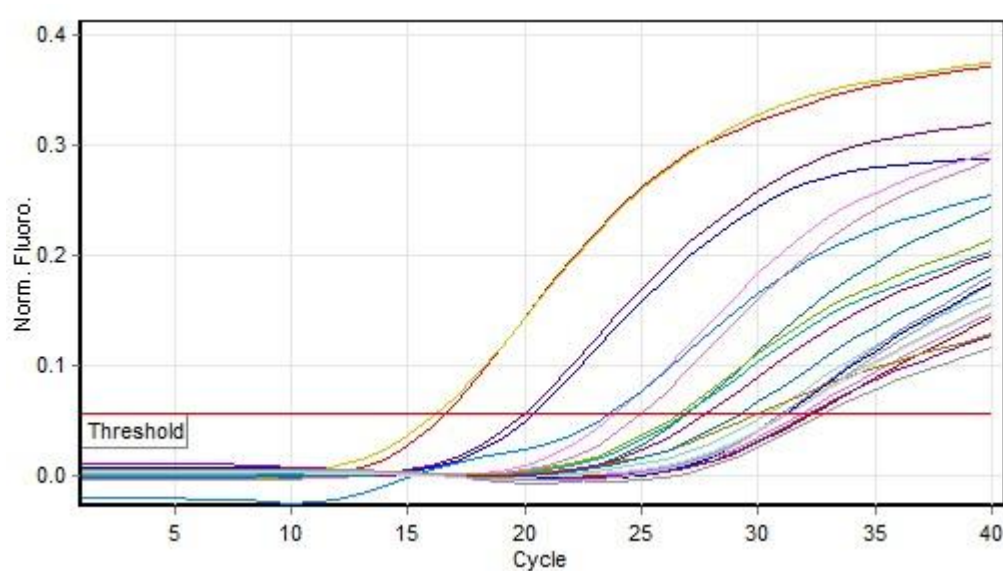


Figura 12 .Resultados del número de copias obtenidas por PCR en tiempo real, a partir de una copia del retrovirus de la Leucosis Bovina

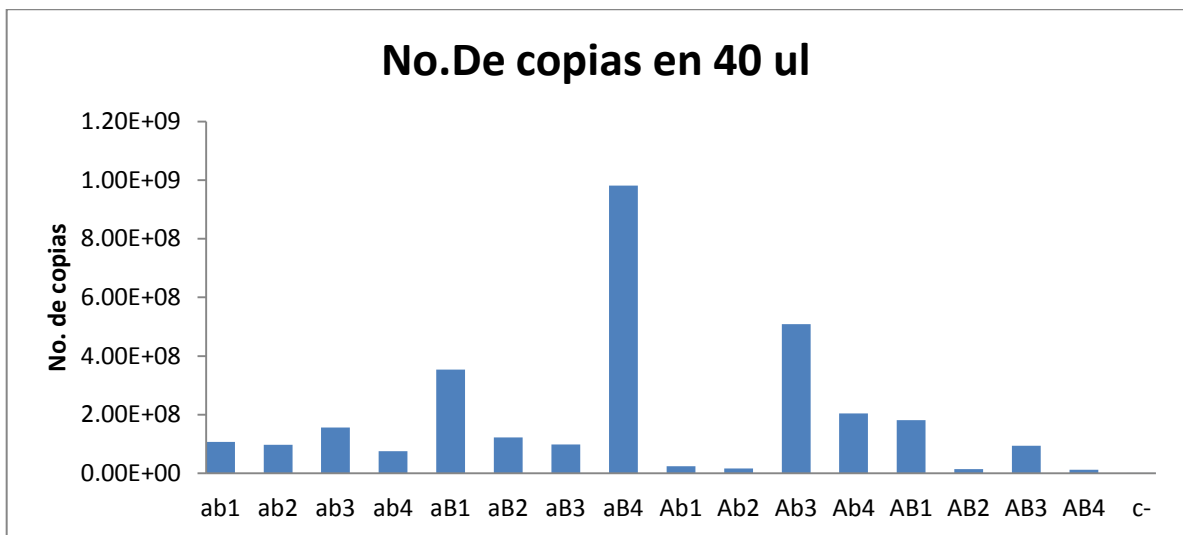


Figura 13. Número de copias de ADN producida por reacción a partir de 50 ng iniciales de ADN empleando diferentes condiciones de amplificación variando la temperatura (1=30°C; 2=40°C; 3=50; 4=60) y cantidad de primer y MgCl₂= A=3mM de Mgcl₂; a= 1.5mM de MgCl₂; B=5uM de random primer y b=1uM de random primer.

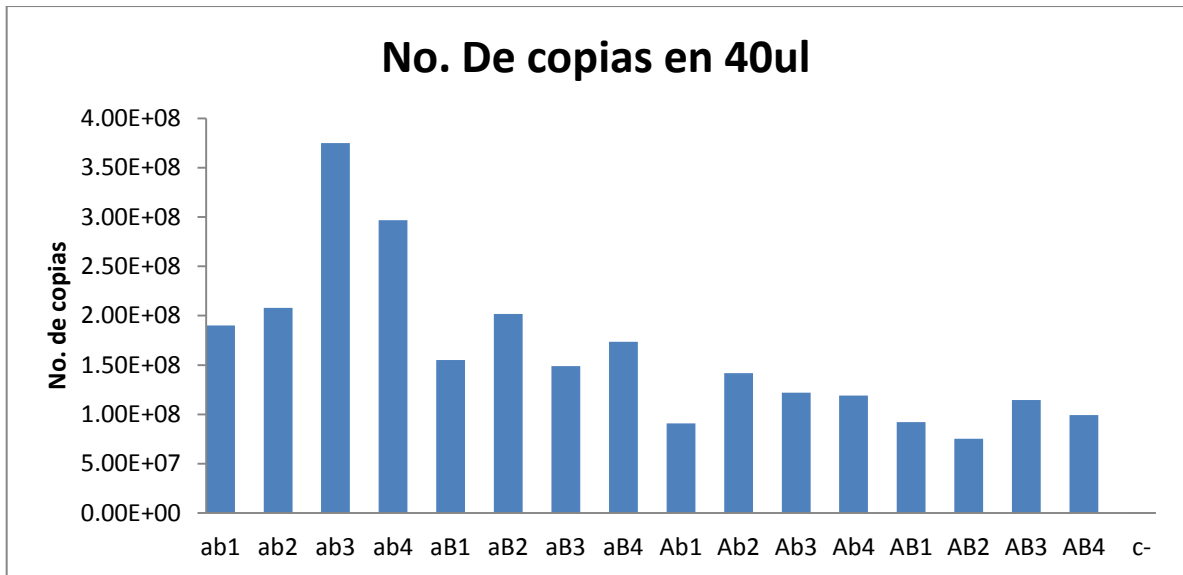


Figura 14. Número de copias de ADN producida por reacción a partir de 5 ng iniciales de ADN empleando diferentes condiciones de amplificación variando la temperatura (1=30°C; 2=40°C; 3=50; 4=60) y cantidad de primers, y MgCl₂: A=3mM de Mgcl₂; a= 1.5mM de MgCl₂; B=5uM de random primer y b=1uM de random primer.

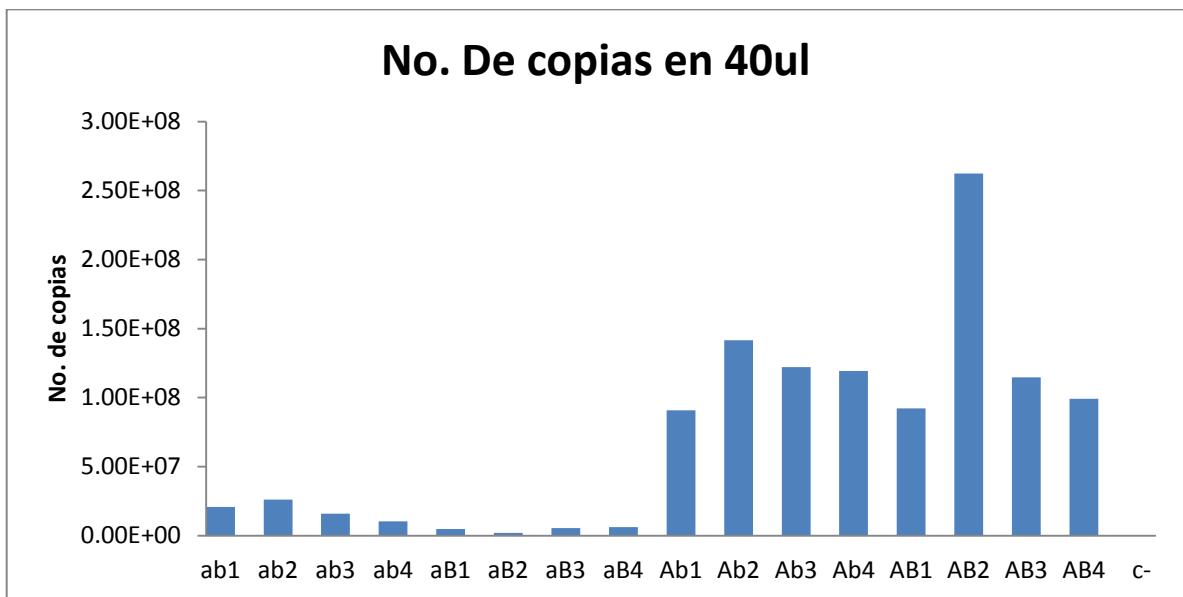


Figura 15. Número de copias de ADN producida por reacción, a partir de 5 ng iniciales de ADN empleando diferentes condiciones de amplificación variando la temperatura (1=30°C; 2=40°C; 3=50; 4=60) y cantidad de primers y MgCl₂: A=3mM de Mgcl₂; a= 1.5mM de MgCl₂; B=5uM de random primer y b=1uM de random primer.

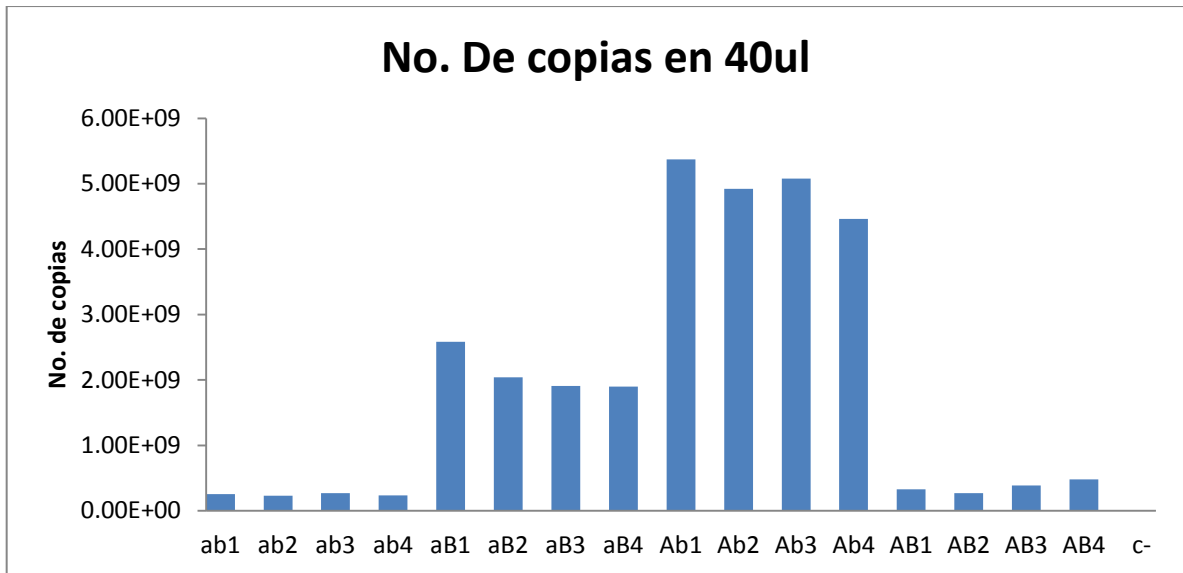


Figura 16. Número de copias de ADN producida por reacción, a partir de 1 ng iniciales de ADN empleando diferentes condiciones de amplificación variando la temperatura (1=30°C; 2=40°C; 3=50; 4=60) y cantidad de primers y MgCl₂: A=3mM de Mgcl₂; a= 1.5mM de MgCl₂; B=5uM de random primer y b=1uM de random primer.

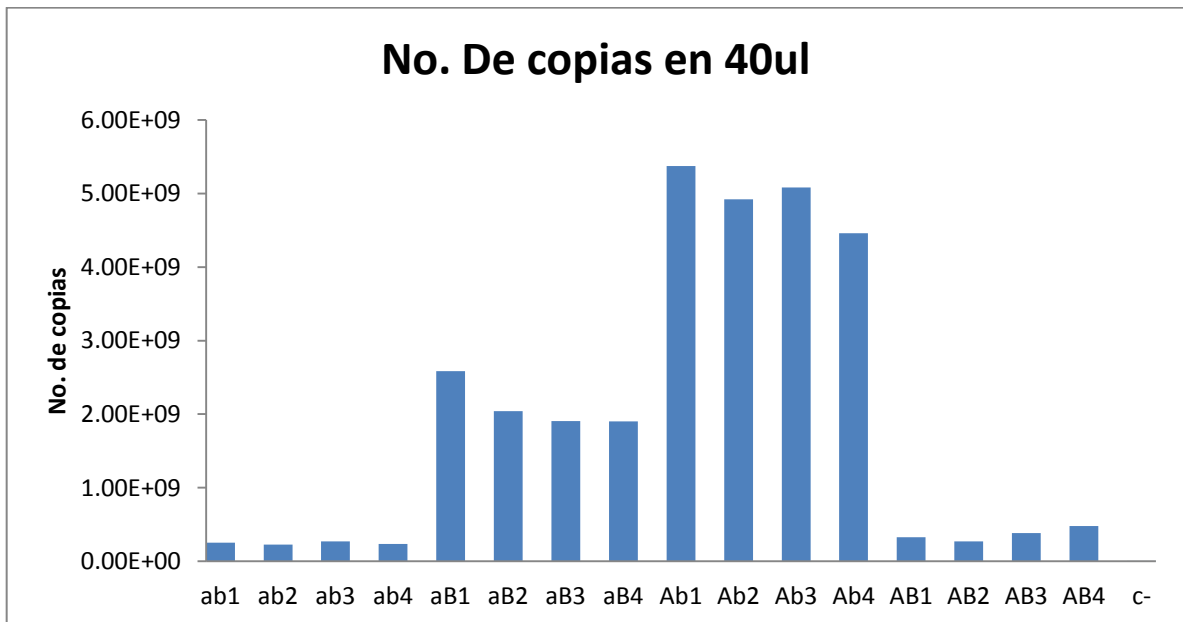


Figura 17. Número de copias de ADN producida por reacción, a partir de 1 ng iniciales de ADN empleando diferentes condiciones de amplificación variando la temperatura (1=30°C; 2=40°C; 3=50; 4=60) y cantidad de primers y MgCl₂: A=3mM de Mgcl₂; a= 1.5mM de MgCl₂; B=5uM de random primer y b=1uM de random primer.

Cuadro 9.-Promedio y DS del número de copias de ADN amplificado a 40°C, con diferentes concentraciones de magnesio y de primers, a partir de 0.1ng, 0.5ng, 1 ng y 5ng de ADN genómico inicial.

Condiciones* (Cantidad ADN inicial)	Promedio del número de copias amplificadas	DS	Condiciones* (Cantidad ADN inicial)	Promedio del número de copias amplificadas	DS
aB (0.1ng)	2.70E+05	0.00E+00	ab (1ng)	2.28E+08	0.00E+00
AB (0.1ng)	2.62E+04	0.00E+00	aB (1ng)	3.64E+08	2.83E+05
aB (0.5ng)	6.70E+06	0.00E+00	Ab (1ng)	4.92E+07	5.66E+04
AB(0.5ng)	2.62E+05	0.00E+00	AB (1ng)	2.71E+07	0.00E+00
aB (1ng)	3.64E+08	0.00E+00	ab (5ng)	2.62E+08	2.83E+05
AB (1ng)	2.71E+07	0.00E+00	aB (5ng)	1.13E+09	3.11E+06
aB (5ng)	1.13E+09	2.83E+05	Ab (5ng)	1.42E+08	2.83E+05
AB (5ng)	2.63E+08	2.83E+05	AB (5ng)	2.63E+08	2.83E+05
c-	2.23E+05	0.00E+00	c-	2.22E+05	5.66E+02

*= A=3mM de MgCl₂; a= 1.5mM de MgCl₂; B=5uM de random primer y b=1uM de random primer.

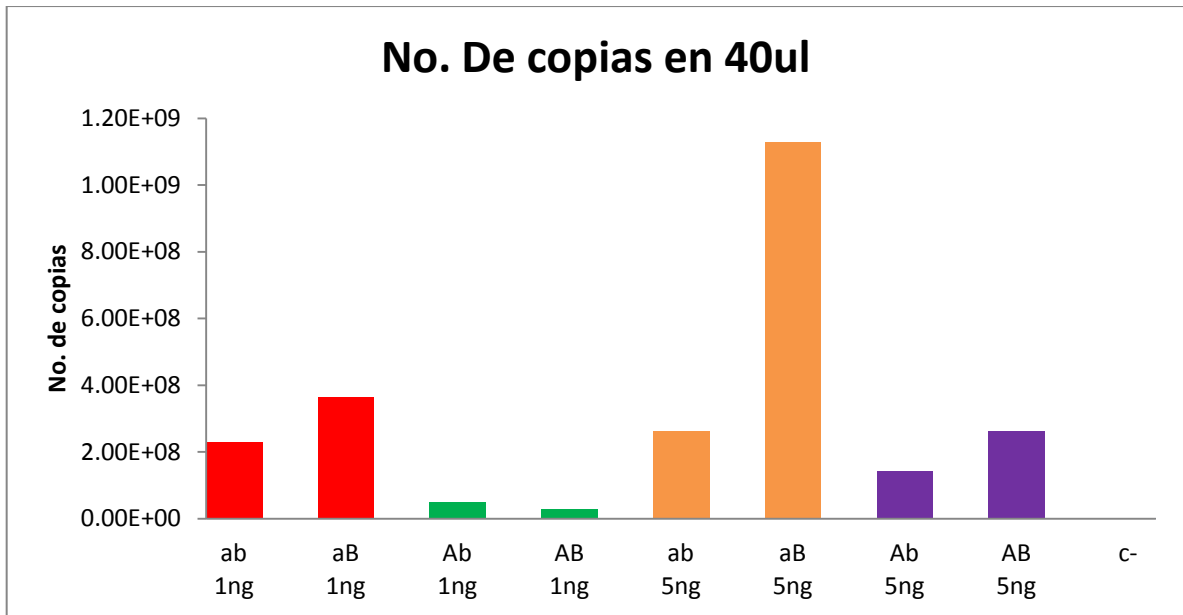


Figura 18. Número de copias de ADN producida por reacción a partir de 1 ng y 5ng iniciales de ADN empleando diferentes condiciones de amplificación (A=3mM de MgCl₂; a= 1.5mM de MgCl₂; B=5uM de random primer y b=1uM de random primer) a una temperatura de 40°.

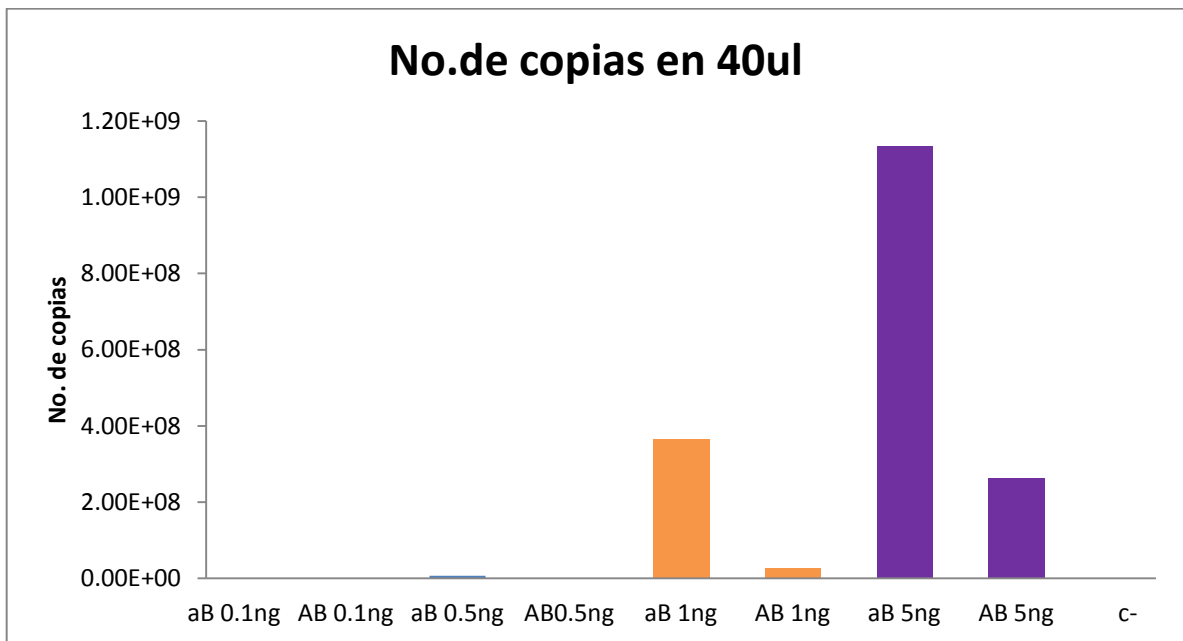


Figura 19. Número de copias de ADN producida por reacción a partir de de 0.1 ng ,0.5ng,1ng y 5ng iniciales de ADN empleando diferentes condiciones de amplificación (A=3mM de MgCl₂; a= 1.5mM de MgCl₂; B=5uM de random primer y b=1uM de random primer) a una temperatura de 40°.

DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluaron diferentes condiciones para amplificar ADN genómico empleando PCR con iniciadores al azar. Se ensayaron diferentes concentraciones de Mg_2 (1.5 y 3 mM), concentraciones de iniciadores (1 y 5 μM), diferentes temperaturas de asociación (30°, 40°, 50° y 60°C). En estas condiciones se evaluaron diferentes cantidades iniciales de ADN.

En la técnica de PCR, la temperatura de asociación resulta fundamental para la amplificación y funcionamiento correcto de los primers. Por lo cual se probaron diferentes gradientes de temperatura, que van de 30C°, 40C°, 50C° y 60 C°. De acuerdo a los resultados obtenidos la mejor temperatura de amplificación se obtuvo a los 40 C°, en donde se encontró la mayor cantidad de ADN producida. A diferencia de K. Silander(2007) y J. Saarela (2008) quienes observaron que la temperatura de 55 C° les dió el mejor resultado de amplificación ,mientras que, S.Moghaddaszadeh-Ahrabi (2012) al probar 30 C° y 40 C°, determinaron que la mejor la temperatura fue 30C°.

En el presente trabajo se evaluaron dos concentraciones de Mg de 1.5 mM y 3 mM, encontrando que la mayor cantidad producida de ADN se obtiene al utilizar 1.5 mM de $MgCl_2$, resultados similares a los de K. Silander (2008). La mayor cantidad expresada en ng de ADN se observó al utilizar 1.5mM de $MgCl_2$, esto sucede debido a que a 1.5mM de $MgCl_2$ hace más específica la reacción, sin embargo a 3mM la actividad de la ADN Taq polimerasa es mayor (Julie E ,2008). De las diferentes cantidades de iniciadores al azar evaluados se observó que empleando 5 μM es donde hay mayor producción de ADN, a diferencia del trabajo de Cheryl I (2006) donde al utilizar 2 μM de oligonucleótidos al azar obtuvo resultados favorables en la amplificación de genomas completos. Un resultado interesante fue que al utilizar 1 μM de random primers ésta fue insuficiente para amplificar, en cambio con 5 μM de random primers se logró un buen nivel de amplificación de número de copias y ng de ADN.

De las diferentes cantidades iniciales de ADN que se utilizaron para la amplificación (0.1ng, 0.5ng, 1ng, 5ng, 50ng), se encontró que la cantidad de ADN producida está en relación directa a la cantidad inicial de ADN.

La sensibilidad de la técnica se basa en la mínima cantidad inicial con la que es posible obtener amplificación. En el presente estudio fue de 0.1ng de ADN, amplificando hasta 300 veces más el ADN inicial, a diferencia de James, E (2014) que observó que la cantidad de ADN se obtenía 10 veces más a partir de 1ng de

ADN, esto nos permite inferir que en su trabajo utilizan primers con mayor número de nucleótidos, en el presente trabajo se utilizaron iniciadores al azar de 6 nucleótidos (6N) por esta razón tiene mayor posibilidades de amplificar el genoma, pues estos primers se alinean completamente al azar a lo largo de todo el genoma de esta manera obteniendo mayor cobertura.

En el presente estudio se evaluó el grado de amplificación de ADN obtenida mediante la cuantificación directa del ADN en el tubo de reacción, empleando fluorometría. Igualmente, se evaluó el número de copias del genoma por la técnica de PCR en tiempo real; es importante considerar que las células que se utilizaron tienen integrado en su genoma el virus de la Leucosis bovina. Aunque, el blanco de detección del ensayo de PCR en tiempo real es el virus integrado al genoma celular, nos permite inferir que es un buen parámetro para evaluar las copias del genoma completo que es amplificado.

Idealmente, una evaluación más adecuada del proceso de amplificación del genoma es identificar si todas las regiones del genoma han sido igualmente amplificado, es decir el grado de cobertura en el genoma que tuvo la amplificación. Este análisis solo podría ser realizado mediante el empleo de micro arreglos de SNPs o CGH, o mejor aún mediante la secuenciación masiva de los productos de PCR. Sin embargo estas tecnologías no están disponibles en el ámbito de este trabajo.

Debido que a partir de una pequeña cantidad inicial de ADN de (nanogramos) se puede iniciar el proceso de amplificación, coincidiendo con Hou Y (2015). Esta tecnología implementada se puede utilizar para amplificar el ADN a partir casos en donde hay muestras de acceso limitado o unas pocas células disponibles, para posteriormente secuenciarlo y estudiarlo.

De esta forma se puede aplicar en el análisis de las células tumorales individuales y determinar los cambios genómicos y asociarlo al grado de malignidad, esto proporcionaría parámetros para establecer pronósticos y tratamientos más específicos. Igualmente, se puede emplear en la determinación del sexo a nivel embrionario temprano, así como en la detección de aneuploidias presentes en blastómeros individuales. Una área importante es su empleo en muestras para diagnóstico virológico, en donde muchas veces la muestra es de acceso limitado. Igualmente su uso en muestras forenses, escasas como piezas animales incautadas sospechosas de ser el producto de comercio ilegal de especies amenazadas. Se puede vislumbrar también su uso en muestras de museos o restos antiguos para emplearlos en estudios evolutivos en donde la recuperación de ADN muchas veces es muy limitado.

CONCLUSIONES

Con base a los resultados del presente estudio se concluye que las condiciones óptimas para la amplificación de genomas completos utilizando 5ng; iniciadores al azar (random primers), fueron 5ng de ADN a una temperatura de alineación 40C con una concentración de 1.5mM de MgCl₂.

REFERENCIAS

1. Abbotts, J., Zmudzka, B., Widen, G., Notario, V., Wilson, H., (1988) Expression of human DNA polymerase β in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Biochemistry*, 27: 901-909
2. Bamford, H., Ravantti, J., Ronnholm, G., Laurinavicius, S., Kukkaro, P., Dyll-Smith, M., Somerharju, P., Kalkkinen, N., Bamford, K., (2005) Constituents of SH1, a novel lipid-containing virus infecting the halophilic euryarchaeon *Haloarcula hispanica*. *Journal Virology*, 79, 9097-9107
3. Bailey, S., Wing, A., Steitz, A., (2006) The structure of *T. aquaticus* DNA polymerase III is distinct from eukaryotic replicative DNA polymerases. *Cell*, 126, 893-904.
4. Baker, A., Bell, P., (1998) Polymerases and the replisome: machines within machines. *Cell*, 92, 295-305.
5. Beard, A., Wilson, H., (2003) Structural insights into the origins of DNA polymerase fidelity. *Structure*, 11, 489-496.
6. Beard, A., Wilson, H., (2000) Structural design of a eukaryotic DNA repair polymerase: DNA polymerase β . *Science*, 288, 231-244.
7. Charles, F., (2014) A Quantitative Comparison of Single-Cell Whole Genome Amplification Methods. *Plos One*, 9, 1-9.
8. Chenghang Z., Sijia Lu., Alec R., Chapman, X., Sunney X., (2013) Genome-Wide Detection of Single-Nucleotide and Copy-Number Variations of a Single Human Cell. *Cell*, 154:1622-1626
9. Cheryl, I., Siew H., (2006) An Isothermal Method for Whole Genome Amplification of Fresh and Degraded DNA for Comparative Genomic Hybridization, Genotyping and Mutation Detection. *DNA Research Institute*, 13, 77-88.
10. Claudio, A., (2007) Sequencing of avian influenza virus genomes following random amplification. U.d Department of agriculture, Athens G.A, USA. *Biotechniques*, 43, 188-192
11. Dirk, H., Bernd H., (2011) A Comprehensive Deep Sequencing Strategy for Full Length Genomes of Influenza A, *Plos One*, 6, 1- 8

12. Elowitz, B., Levine, J., Siggia, D., Swain, S., (2002) Stochastic gene expression in a single cell. *Science*, 297, 1183-1184
13. Emi, I., Xiaofeng, W., Yoshiaki, O., (2010) Full Genomic Amplification And Subtyping of influenza A virus using single set of universal primers. *Microbiology and immunology*, 54, 129-134
14. Gemma A., Michael J., (2009) A low density oligonucleotide microarray for the detection of viral and atypical bacterial respiratory pathogens. *Elsevier*, 163, 17-24
15. James, E., Jai-Yoon, S., Tamas, B., Jnh Yong, K., (2014) The promise of single-cell sequencing, *Method of the year. Nature*, 11, 25-27
16. John, R., Yuyang, C., Theresa, L., Joseph, W., (2002) TempliPhi, ϕ 29 DNA polymerase based Rolling Circle Amplification of Templates for DNA sequencing. *Biotechniques*, 32, 44-47
17. Joseph, D., Shenglong, W., (2008) Complementary RNA amplification methods enhance microarray identification of transcripts expressed in the *C. elegans* nervous system, *BioMed Central*, 26, 1471-216
18. Julie, E., Mark J., (2008) A comparison of RNA amplification techniques at sub-nanogram input concentration. *BMC Genomics*, 1471, 1-12
19. Kaisa, S., Janna, S., (2008) Whole Genome Amplification with Phi29 DNA Polymerase to Enable Genetic or Genomic Analysis of Samples of Low DNA Yield Chapter. *National Public Health Institute, Helsinki, Finland*, 439, 1-18
20. Laura K., Mahesh, P., (2011) Global Array-Based Transcriptomics from Minimal Input RNA Utilising an Optimal RNA Isolation Process Combined with SPIA cDNA Probes, *Plos One*, 6, 1-17
21. Masahiro, I., Masahiro, W., (2006) Rapid detection and typing of influenza A and B by loop-mediated isothermal amplification: Comparison with immunochromatography and virus isolation, *Elsevier*, 135, 272-275.
22. Makler, A., (1998) Review of practical techniques for the diagnosis of malaria. *Med Parasitol*, 92, 419-33
23. Manuelidis, L., (1977) A simplified method for preparation of mouse satellite DNA. *Anal. Biochem*, 78, 561-568

24. Mathieu ,C., David, G.,(2009) Evaluation of methods for amplification of picogram amounts of total RNA for whole genome expression profiling, *BioMed Central*, 10-246
25. Manmohan, P., Santhosh ,S.,(2008) Loop mediated isothermal amplification(LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases, *Reviews in Medical Virology*, 18: 407–421
26. Marina ,E., Martha,I., (2014) Molecular Epidemiology of Influenza A/H3N2 Viruses Circulating in Mexico from 2003 to 2012, *Plos One*,9,1-11
27. Molecular probes ,Invitrogen ,Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits copyright ,(2008), Molecular Probes, Inc. All rights reserved. This information is subject to change without notice
28. Norihiro ,T., Yasuyoshi, M.,(2008) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products, *Biochemical Research Laboratory*, 877-882
29. Nicholas, E.,(2014) Cancer genomics: one cell at a time. *Genome Biology*,15, 1-13
30. Nianxiang Z., Susan D.,(2003) Random priming PCR strategy to amplify and clone trace amounts of DNA, *BioTechniques*, 35,758-765
31. Reimar, J., Hermann, M., Annabel, R., Marc, R., Hans, S., (2009) Rolling-Circle amplification of viral DNA Genomes using PHI29 polymerase. *Cell*, 17, 205-222
32. Seiyu, H., Fawad, F., Frank, B., Yuefen, D., Zhenyu, S., Xiaohong, W., Jing, D., Stephen, F., (2003) Whole-Genome Amplification Directly From Clinical Samples. *Science*, 13 , 954-964
33. Shuanghui, Y., Youjun S.,(2009) Development and evaluation of rapid detection of classical swine fever virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, *Journal of Biotechnology*,147–150
34. Shijun ,Fu.,Guanggang ,Qu.,(2011) Applications of Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification, *Biochem Biotechnol*, 163,845–850
35. Taku M., Jun S.,(2009) Sensitive isothermal detection of nucleic-acid sequence by primer generation–rolling circle amplification, *Nucleic Acids Research*,3,1-9

36. Tsugunori, N., Hiroto ,O.,(2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA, Oxford University Press,28, 1-7
37. Yasuyoshi M., Tsugunori, N., (2009) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases .Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases, 15,62–69
38. Yu H.,Wei F.,Liyang Y.,(2013)Genome Analyses of Single Human Oocytes. Cell, 13,1492–1506
39. Xinghua, P., Alexander, E.,(2008) A procedure for highly specific, sensitive, and unbiased whole genome amplification. PNAS, 40, 15499 –15504