

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



CAMPUS CELAYA- SALVATIERRA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD E INGENIERÍAS

**SÍNTESIS Y ENSAMBLAJE DE CONTROLES SINTÉTICOS PARA
DETECCIÓN DE MUTACIONES PUNTUALES POR qPCR**

Monografía de ejercicio profesional que para obtener el título de
Ingeniera en Biotecnología

Presenta:

Mónica Yarizbeth Duarte Cerda

Director:

M.C. Mauricio Díaz Sánchez

Co-Director:

Dr. Adán Topilzin Morales Vargas

Celaya, Gto., a 27 de noviembre del 2023

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



CAMPUS CELAYA- SALVATIERRA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD E INGENIERÍAS

**SÍNTESIS Y ENSAMBLAJE DE CONTROLES SINTÉTICOS PARA
DETECCIÓN DE MUTACIONES PUNTUALES POR qPCR**

Monografía de ejercicio profesional que para obtener el título de
Ingeniera en Biotecnología

Presenta:

Mónica Yarizbeth Duarte Cerda

Director:

M.C. Mauricio Díaz Sánchez

Co-Director:

Dr. Adán Topilzin Morales Vargas

Celaya, Gto., a 27 de noviembre del 2023



Campus Celaya-Salvatierra

División de Ciencias de la
Salud e Ingenierías
Departamento de
Ingeniería Agroindustrial
Programa de Ingeniero
Biotecnólogo

Celaya, Gto., a 27 de noviembre del 2023

DRA. ISAURA ARREGUÍN ARREGUÍN
Directora de la División de Ciencias de la Salud e Ingenierías
Campus Celaya-Salvatierra

Los suscritos integrantes del jurado que habremos de participar en el examen recepcional que para obtener el TÍTULO de Ingeniera en Biotecnología presentará **Mónica Yarizbeth Duarte Cerda** con la monografía de ejercicio profesional denominada: **Síntesis y ensamblaje de controles sintéticos para detección de mutaciones puntuales por qPCR** tenemos a bien informarle que hemos acordado la APROBACIÓN de dicho trabajo académico.

Consecuentemente, y con fundamento en lo dispuesto por el artículo 68 del Estatuto Académico de la Universidad de Guanajuato le solicitamos tenga a bien fijar la fecha para la celebración del examen recepcional correspondiente.

ATENTAMENTE,

Director

Sinodal

Sinodal

A mis papás por su amor y apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

Culminar esta etapa representa el final de un ciclo, un ciclo lleno de aprendizajes y personas increíbles que han marcado pequeños puntos en mi vida profesional pero que constituyen una serie de eventos que fueron únicos y fundamentales para mi crecimiento.

Principalmente quiero agradecer a mi mamá por ser ejemplo de fortaleza para mí y por siempre luchar por darme lo mejor. A mi papá por ser mi motor, mi ángel y mi guía de vida.

A mi persona favorita, Marco Nárez, por ser mi lugar seguro y darme siempre su amor y comprensión.

A Anthony Venancio y Rocío Sánchez por ser más que mis amigos, mis mentores.

A Mauricio Sánchez, director del proyecto, por saber transmitirme sus amplios conocimientos y sabiduría.

A Adán Morales, codirector del proyecto, por saber transmitir su pasión por la ciencia en todas sus clases.

A Byron Galindo, por sus aportes y seguimiento al proyecto.

A la empresa T4OLIGO, por todo el crecimiento profesional que he tenido dentro de ella y permitirme ser la científica que soy hasta ahora.

A la Universidad de Guanajuato, por darme la formación académica para que esto fuera posible.

SÍNTESIS Y ENSAMBLAJE DE CONTROLES SINTÉTICOS PARA DETECCIÓN DE MUTACIONES PUNTUALES POR qPCR

Por: Mónica Yarizbeth Duarte Cerda

Dirigida por: Mauricio Díaz Sánchez

RESUMEN

Para establecer ensayos moleculares, los controles positivos son un requisito indispensable para determinar la especificidad, sensibilidad y garantizar que la reacción se llevó a cabo de manera adecuada. En ocasiones es complicado contar con las secuencias biológicas que fungen como controles positivos, por lo que la alternativa es llevar a cabo la síntesis química de esas secuencias. De manera general, la síntesis química de oligonucleótidos puede generar secuencias de cadena sencilla ≤ 200 nt, sin embargo, la producción de secuencias largas utilizadas como templados para PCR representa un riesgo de contaminación al momento de producirlos, por lo que es necesario sintetizar pequeños fragmentos que pueden ser ensamblados por PCR. Tomando como base lo anterior, se realizó el diseño, síntesis y ensamblaje de tres genes sintéticos (T4BRICKS) para la detección de las mutaciones puntuales L452R, R346K y N460K presentes en el gen S del virus SARS-CoV-2. La funcionalidad de los tres T4BRICKS fue evaluada comparando su desempeño contra los controles suministrados por el Kit comercial RT-qPCR MASTER MUT Configuración ómicron (GENES2LIFE, 2022). Los resultados obtenidos demuestran la funcionalidad de los T4BRICKS como controles sintéticos, ofreciendo una solución precisa, rápida, confiable y económica para la síntesis de secuencias complejas para su uso en técnicas moleculares como la qPCR.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
NOMENCLATURA	v
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES.....	4
2.1 Generalidades de SARS CoV-2	4
2.2 Mutaciones puntuales en SARS CoV-2	5
2.3 Controles positivos en qPCR	8
2.4 Construcción de genes sintéticos.....	8
CAPÍTULO 3 METODOLOGÍA	10
3.1 Diseño in silico de controles sintéticos.....	10
3.2 Síntesis de DNA.....	12
3.3 Ensamblaje y purificación.....	13
3.4 Evaluación de T4BRICK´s	15
CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	17
4.1 Construcción de T4BRICKS	17
4.2 Evaluación de T4BRICKS	18
CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES.....	24
CAPÍTULO 6 REFERENCIAS	25

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<i>Tabla 3.1 Subvariantes de SARS-CoV-2 para construcción de T4BRICKS</i>	<i>10</i>
<i>Tabla 3.2 Número de reacciones para ensamblaje.....</i>	<i>13</i>
<i>Tabla 3.3 Componentes de reacción #1 para ensamblaje de T4BRICKS</i>	<i>13</i>
<i>Tabla 3.4 Componentes de la qPCR para evaluación de T4BRICK´s</i>	<i>15</i>
<i>Tabla 4.1 Secuencias cortas para ensamble de T4BRICKS</i>	<i>17</i>
<i>Tabla 4.2 Resultados de cuantificación</i>	<i>18</i>
<i>Tabla 4.3 Reactivos suministrados por kit MASTER MUT Configuración Ómicron.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabla 4.4 Resumen de valores de Ct de amplificaciones.</i>	<i>20</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<i>Figura 2.1 Estructura morfológica de SARS-CoV-2. (Yüce, Filiztekin, & Ozkaya, 2021)..</i>	<i>5</i>
<i>Figura 2.2 Mutaciones presentes por variante del virus SARS-CoV-2 (GENES2LIFE, 2022).....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 3.1 Diagrama de ensamblaje para T4BRICKS.....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 3.2 Visualización de secuencias en UGENE.....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 3.3 Protocolo de termociclado- Ensamblaje de T4BRICKS</i>	<i>14</i>
<i>Figura 3.4 Programa de termociclado para evaluación de T4BRICK´s (GENES2LIFE, 2022).....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 4.1 Ensamblaje de N460K- Visualización en gel</i>	<i>18</i>
<i>Figura 4.2 Ensamblaje de R346K y L452R-Visualización en gel</i>	<i>18</i>
<i>Figura 4.3 Amplificación Ctrl Master Mut y T4BRICK para L452R (FAM).</i>	<i>21</i>
<i>Figura 4.5 Amplificación Ctrl Master Mut y T4BRICK para R346K (Cy5).</i>	<i>22</i>
<i>Figura 4.4 Amplificación Ctrl Master Mut y T4BRICK para N460K (FAM).....</i>	<i>21</i>

NOMENCLATURA

A	Adenina
C	Citosina
Ct	Cycle threshold (Ciclo umbral)
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
Fw	Oligonucleótido sentido
G	Guanina
nt	Nucleótido
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de base
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa
Rv	Oligonucleótido antisentido
T	Timina
U	Uracilo

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La implementación de técnicas de diagnóstico molecular como la PCR y qPCR ha cobrado una relevancia notable en los últimos años, mejorando la sensibilidad y permitiendo realizar diagnósticos rápidos y asertivos de distintos patógenos de plantas, animales y seres humanos. Sin embargo, para la validación de las técnicas es necesario el uso de estándares de referencia como controles positivos en la reacción. Esto puede ser un factor limitante, ya que en ocasiones los microorganismos que contienen la secuencia diana no son accesibles, son difíciles de cultivar, no se cuenta con los niveles de seguridad para poder trabajar con ellos o incluso son microorganismos emergentes y/o cambian su secuencia de manera acelerada como el virus del SARS-CoV-2.

La síntesis química de oligonucleótidos permite generar, a gran escala, secuencias de cadena sencilla ≤ 200 nt que pueden servir como templado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y en consecuencia ser usados como controles positivos, a pesar de ello, no es la técnica más factible para su obtención, ya que, el hecho de servir como templados para la amplificación representa un riesgo para la cadena de producción al momento de producirlos y purificarlos. Debido a la sensibilidad de la técnica, pequeñas cantidades de oligo que pueden permanecer en el sintetizador, así como en las áreas y equipos de producción, son considerados como agentes contaminantes en síntesis posteriores. Adicional a lo anterior, cuando la secuencia supera las 100 bases, es posible que subproductos de menor tamaño (secuencias truncas) sean mayoritarios, lo que implica que el rendimiento y pureza del producto final deseado se vea afectado. En este sentido, se planteó implementar secuencias sintéticas, llamadas T4BRICKS, como controles sintéticos para qPCR.

Los T4BRICKS son secuencias de ADN de doble cadena de 80-700 pb, obtenidos mediante la síntesis y ensamblaje de secuencias cortas que al hibridarse constituyen el fragmento deseado. Esta técnica no requiere clonación, ni ningún templado de ADN y disminuye la posibilidad de contaminación en las áreas y procesos productivos. Además, proporciona un estándar para qPCR de secuencias y muestras difíciles de obtener, como aquellas de fuentes no humanas o que contienen mutaciones inusuales, lo cual representa una gran ventaja. Por ejemplo, durante la pandemia de COVID 19, cuando el genotipado de variantes del virus SARS-CoV-2 se volvió un tema de vigilancia epidemiológica que exigía ser rápido, preciso y confiable.

Para evaluar la técnica de construcción de T4BRICK's, se llevó a cabo la síntesis y ensamblaje de los controles sintéticos que contienen mutaciones puntuales del virus SARS-CoV-2, evaluando el desempeño de estos contra los controles suministrados en el Kit RT-qPCR MASTER MUT Configuración ómicron (GENES2LIFE, 2022).

La detección de mutaciones puntuales del virus SARS-CoV-2 brinda un panorama epidemiológico general, a través de la identificación de los tipos de variantes genéticas circulantes en una región, y a su vez, permite tomar acciones tempranas ante los brotes, causados por las variantes de este virus. Por lo cual, el desarrollo de T4BRICK's representa una solución precisa, rápida y confiable para ensayos de qPCR.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo General:

Evaluar e implementar el uso de controles sintéticos de doble cadena (T4BRICK's) en la detección de mutaciones puntuales de SARS CoV-2 como controles positivos para qPCR.

1.1.2 Objetivos Específicos:

- Diseñar tres T4BRICK's (blancos para L452R, R346K y N460K) *in silico* mediante el uso de bases de datos de secuencias actualmente reportadas.
- Sintetizar y ensamblar las secuencias cortas de ADN mediante PCR.
- Evaluar la funcionalidad de los T4BRICK's obtenidos comparando contra controles comerciales suministrados en el Kit RT-qPCR MASTER MUT Configuración ómicron.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de SARS CoV-2

El coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo de tipo 2 (SARS-CoV-2) es el agente etiológico de la enfermedad COVID-19, caracterizada como pandemia por la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 11 de marzo del 2020 (OMS, 2021).

Los coronavirus son virus de RNA monocatenario (ssRNA) con polaridad positiva de aproximadamente 30 kb. Pertenecen taxonómicamente a la familia Coronaviridae, género *Betacoronavirus* y al subgénero *Sarbecovirus*, presentan una morfología esférica de un diámetro que varía entre 60 a 140 nm junto con espigas o “Spikes” de 8 a 12 nm de longitud aproximadamente (Pastrian, 2020).

Su genoma contiene al menos seis marcos abiertos de lectura (ORF). El genoma de SARSCoV-2 se puede dividir en tres tercios. Los dos primeros tercios (más cerca del extremo 5’) codifican para el gen de la replicasa viral. Este gen está constituido por dos ORF (ORF 1a y ORF 1b) los que, al comienzo de la infección, serán traducidos directamente en dos poliproteínas llamadas pp1a y pp1ab. Estas poliproteínas posteriormente serán procesadas proteolíticamente para generar 16 proteínas no estructurales (nsps), las cuales estarán implicadas en la replicación del genoma viral y en la transcripción de RNAm subgenómicos (sgRNAs). El último tercio del genoma (más cerca del extremo 3’) codifica los genes de las 4 proteínas estructurales principales (proteína (S), proteína (M), proteína (E) y proteína (N)) y de las proteínas accesorias (proteína (HE), 3, 7a, entre otras) (Yüce, Filiztekin, & Ozkaya, 2021). Estas proteínas se describen a continuación y en la Figura 2.1 se encuentran representadas:

- Proteína N (nucleocápside): Se halla fosforilada e insertada dentro de la bicapa de fosfolípidos de la envoltura externa, ayuda al virus a desarrollar la cápside y la estructura viral completa de manera apropiada.

- Glucoproteína S (espiga): Media la unión al receptor del hospedero. La glucoproteína S es escindido por una proteasa similar a la furina de la célula hospedera en dos polipéptidos separados denominados S1 y S2. S1 constituye el gran dominio de unión al receptor de la proteína S, mientras que S2 forma el tallo de la molécula espiga.
- Proteína M (membrana): Ayuda a mantener la curvatura de la membrana y la unión con la nucleocápside.
- Proteína E (envoltura): Juega un papel importante en el ensamblaje y liberación del virus.
- Hemaglutinina-esterasa (HE): Se halla solo en algunos Betacoronavirus y su actividad esterasa facilita la entrada del virus en la célula hospedera, además, de ayudar en la su propagación. (Guzmán & Llaveta , 2020)

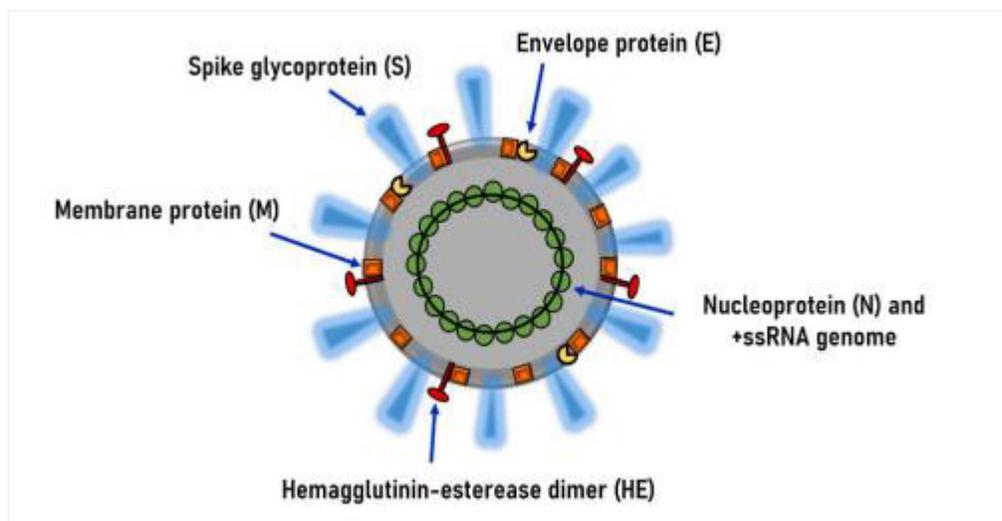


Figura 2.1 Estructura morfológica de SARS-CoV-2. (Yüce, Filiztekin, & Ozkaya, 2021)

2.2 Mutaciones puntuales en SARS CoV-2

Una mutación puntual se produce en un genoma cuando se agrega, se remueve o se cambia un único par de bases. Puede o no tener repercusiones funcionales, incluyendo cambios en la expresión génica o alteraciones en las proteínas codificadas.

Desde que comenzó la pandemia de COVID-19 en diciembre de 2019, el virus del síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ha evolucionado continuamente, dando origen a la aparición de variantes virales que presentan mutaciones en la proteína Spike (codificada por el gen S) y que influyen en los aspectos epidemiológicos y clínicos de la pandemia. Estas variantes se clasifican como variante de interés (VOI), variante de preocupación (VOC) y variante bajo supervisión (VUM) (Yong & Davey, 2021).

Las VOC tienen una mayor transmisibilidad en comparación con el virus original y tienen el potencial de aumentar la gravedad de la enfermedad. A partir del 15 de septiembre de 2021, hay cuatro linajes de SARS-CoV-2 designados como VOC; la variante Alpha (identificada originalmente en el Reino Unido), la variante Beta (identificada originalmente en Sudáfrica), la variante Gamma (identificada originalmente en Brasil) y la variante Delta (identificada originalmente en India). Las cuatro variantes comparten varias mutaciones entre sí, así como también con otras variantes del SARS-CoV-2 identificadas recientemente (Tao, et al., 2021). Algunas de las mutaciones compartidas entre las variantes se muestran en la Figura 2.2.

Se puede observar que la mutación L452R ha sido reportada previamente como un elemento conservado en las variantes Épsilon (B.1.427/9), Kappa (B.1.617.1) y Delta (B.1.617.1/.2) y puede presentarse dentro de las subvariantes de Ómicron. Esta mutación se origina específicamente por la sustitución de la base Uracilo (U) por Guanina (G) en el codón $CUG \rightarrow CGG$, provocando que el cambio de aminoácido de leucina se cambie por arginina en la posición 452 de la proteína S.

Reino Unido (B.1.1.7) α Alpha	Sudafrica (B.1.351) β Beta	Japon\Brasil (P.1) γ Gamma	India (B.1.617.2) δ Delta	California (B.1.427 /9) ε Epsilon	New York (B.1.525) η Eta	New York (B.1.526) ι Iota	India (B.1.617.1) κ Kappa	Lambda λ (C.37)	Mu μ (B.1.621)	Omicron O (B.1.529)
				M:S1E						
	M:L18F	M:L18F								
					M:A67V					M:A67V
M:H69					M:H69					M:H69
M:V70					M:V70					M:V70
						M:T95			M:T95	M:T95
										M:G142
										M:V143
M:I144					M:I144				M:Y144S	M:I144
									M:I145N	M:I145D
				M:W152C						
										M:N211I
										M:L212
										M:214insCPT
						M:D253G		M:D253N		
									M:R346K	
	M:K417N	M:K417N/T	M:L452R	M:L452R			M:L452R	M:L452Q		M:K417N
										M:S477N

Figura 2.2 Mutaciones presentes por variante del virus SARS-CoV-2 (GENES2LIFE, 2022).

Por otro lado, la mutación R346K origina un cambio de arginina por lisina, debido a la sustitución de la base Guanina (G) por Adenina (A) en el codón 346 (AGA → AAA). Fue reportada originalmente para la variante Mu, sin embargo, ahora se presenta dentro de la subvariante BA.1.15.

La mutación N460K se encuentra en la porción RBD (por sus siglas en inglés receptor-binding domain) de la proteína Spike, es originada por un cambio de bases (Uracilo por Citosina) en el codón 460 (AAU → AAG), causando la sustitución del aminoácido Asparagina por Lisina. Estudios acerca de esta mutación han encontrado que confiere al virus una mayor capacidad de escape ante los anticuerpos. Esta mutación es característica de la variante BA.2.75 (World Health Organization, 2022).

2.3 Controles positivos en qPCR

Los controles positivos además de permitir verificar que todos los reactivos de la qPCR son funcionales, pueden ser empleados para la validación de un ensayo, debido a que, nos permite determinar si las temperaturas de hibridación de los oligos sentido y antisentido son óptimas, si los tiempos de extensión son suficientes y nos ayudan a definir el comportamiento general de la reacción. Por otro lado, un control negativo nos indica la presencia de contaminantes. Los controles experimentales, tanto un control positivo como negativo, brindan un nivel de confianza en los datos y garantizan que el experimento se realizó correctamente (Moldovan & Moldovan, 2020).

Los métodos actuales para la obtención de controles para PCR incluyen la extracción de ADN genómico, generación de amplicones de PCR lineales, generación de secuencias diana clonadas o la construcción de genes o fragmentos de ADN sintéticos. Cada método tiene ventajas y desventajas inherentes; por ejemplo, la calidad y concentración del ADN genómico puede afectar la eficiencia de la PCR; los amplicones de PCR deben purificarse y representan un riesgo importante de contaminación para el laboratorio debido a la necesidad de manipular productos de PCR concentrados; y la clonación por otro lado, requiere equipo y capacitación especializados. Todos estos métodos pueden agregar costos adicionales significativos al desarrollo de un ensayo (Conte, Potoczniak, & Tobe, 2018).

En cuanto a la construcción de genes sintéticos, esta no requiere un ADN molde, esto es particularmente útil si del organismo de interés se tiene la información de su secuencia disponible en GenBank u otra base de datos, pero el organismo es difícil de obtener o mantener (Wang, Steain, Dwyer, Cunningham, & Saksena, 2011).

2.4 Construcción de genes sintéticos

Un gen sintético se define molecularmente como una secuencia obtenida mediante el ensamble de varios fragmentos de ADN o ARN que asemejan alguna región de interés biológico sin provenir de ésta.

El ensamblaje se puede realizar a través de varios métodos que incluyen: ligación, clonación en serie de oligonucleótidos o la extensión por PCR. Entre estos métodos, la PCR parece ser la más eficiente y rentable (Gang, et al., 2006).

Los primeros métodos de ensamblaje se basaban en la ligación de oligonucleótidos adyacentes mediante el uso de una ADN ligasa, posteriormente se utilizan ligasas termoestables para mejorar la rigurosidad de la reacción de ensamblaje (Randall & Ellington, 2017).

En la década de 1980, después del descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se desarrollaron métodos sin ligación para usar oligonucleótidos monocatenarios sintéticos para hacer piezas de ADN de doble cadena, sin la necesidad de un templado de ADN, como las metodologías reportadas por Dillon & Rosen (1990) y Stemmer et al. (1995). Desde entonces, se han creado diferentes métodos para ensamblar ADN bicatenario a partir de oligonucleótidos monocatenarios mediante métodos similares a la PCR. Las únicas diferencias entre métodos de ensamblaje de ADN basados en PCR radican en cómo se diseñan los oligonucleótidos para ensamblar y en las condiciones de reacción en las que se ensamblan. El producto final de todos estos métodos es el mismo, una secuencia de doble cadena (dsDNA) (Randall & Ellington, 2017).

Además de los métodos de ensamblaje basados en ADN polimerasas y ligasas, Gibson y sus colegas (2012) desarrollaron métodos de un sólo paso para ensamblar simultáneamente secuencias de ADN a partir de oligonucleótidos y clonarlos directamente en plásmidos. (Gibson, Hamilton, Hutchison, Craig, & Merryman, 2010). Estos tres métodos de ensamblaje se utilizan para la mayoría de las aplicaciones de síntesis de genes comerciales y académicas reportadas hasta la fecha.

Actualmente existen muchos otros métodos de clonación y ensamblaje libres de sitios de restricción, cada vez con procesos más simples y menos costosos. Algunos de ellos son los reportados por Engler et al. (2008) con el ensamblaje Golden Gate; De Kok et al. (2014) con la reacción de ligadura cíclica; y el ensamblaje de clips por Trubitsyna et al. (2014).

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

3.1 Diseño *in silico* de controles sintéticos

Se llevó a cabo el diseño, síntesis y ensamblaje de tres T4BRICK's, para su aplicación como controles positivos de reacción. En la Tabla 3.1 se enlistan las regiones seleccionadas para el diseño. Estos fragmentos se encuentran en el gen S e integran mutaciones puntuales (señaladas en rojo) que dan origen a algunas de las subvariantes de SARS-CoV-2, pertenecientes al grupo de Ómicron con mayor relevancia de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization - WHO).

Tabla 3.1 Secuencias de SARS-CoV-2 utilizadas para construcción de T4BRICKS

Mutación	Secuencia (5'-3')	Tamaño de amplicón (pb)	Región	Número de acceso NCBI
L452R	CTAACAAGCTTGATTCTAAGGTTGG TGGTAATTATAATTACCGGTATAGA TTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAAC CTTTTGA	82	22819- 22900	OP895619.1
R346K	AACTTG TGCCCTTTTGATGAAGTTTT TAACGCCACCAAAATTTGCATCTGTT TATGCTTGGAACAGGAAGAGAATCA GCAA	80	22538- 22617	OX376441.1
N460K	CTTGGAATTCTAACAAGCTTGATTC TAAGGTTGGTGGTTTCGGTATAGAT TGTTTAGGAAGTCTAAGCTCAAACC TTTTATTTCAACTGAAATCTATCAGT AACAAACCTTGTAATGGTGTTCAG	126	22399- 22542	OP684586.1

Las regiones fueron delimitadas por los pares de primers del Kit de detección RT-qPCR MASTER MUT Configuración Ómicron (secuencias proporcionadas por GENES2LIFE bajo confidencialidad) y localizadas mediante PRIMER BLAST (Ye, et al., 2012).

La metodología del ensamblaje de T4BRICKS consiste en generar fragmentos cortos monocatenarios de la secuencia de interés con un largo no mayor a 80 bases, a fin de evitar secuencias trucas en el producto final de síntesis. Para el diseño de los fragmentos cortos se utilizó como herramienta de visualización el software Unipro UGENE (Okonechnikov , Golosova, & Fursov , 2022). Cada fragmento está localizado de manera adyacente a un fragmento contiguo, para obtener regiones complementarias entre sí, con el objetivo de generar amplicones cada vez más grandes hasta obtener el tamaño de la secuencia de interés, como se muestra en la Figura 3.1

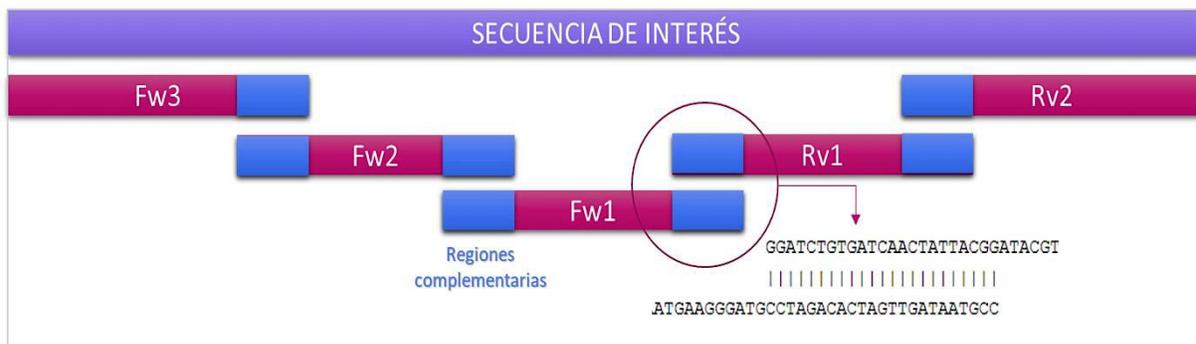


Figura 3.1 Diagrama de ensamblaje para T4BRICKS

Los fragmentos que se muestran en la figura 3.1, con la leyenda FW corresponden a los oligos sentido para la reacción, mientras que aquellos con la leyenda RV, corresponden a los oligos antisentido. Es importante generar el reverso complementario para que mediante complementariedad de bases por PCR se ensamble el T4BRICK. El número de reacciones de PCR para realizar el ensamblaje dependerá de la cantidad de fragmentos obtenidos, por ejemplo, en la Figura 3.1, serían necesarias tres reacciones como se describe a continuación:

- Reacción 1: *Fw1* – *Rv1*
- Reacción 2: *Fw2* – *Rv2*
- Reacción 3: *Fw3* – *Rv2*

Para el diseño *in silico*, se busca una región ubicada aproximadamente a la mitad de la secuencia a fragmentar, con un largo que permita tener una T_m de 60°C , y a su vez, que cumpla con los siguientes criterios respecto a sus estructuras secundarias:

- Hairpins con una $T_m < 45^\circ\text{C}$ y un ΔG de -4.5°C a 4.5°C

- Homodímeros con un $\Delta G1 <$ al 15% de la ΔG máxima y considerar que los homodímeros estén lo más alejadas posible del extremo 3', ya que este extremo es el de mayor afinidad enzimática.

Esta región proporciona la posición en la secuencia para comenzar a fragmentar. Por lo tanto, el primer oligonucleótido generado corresponderá a un fragmento no mayor a 80 bases y que contendrá la región con las propiedades antes mencionadas, además, de una región que sobrepasa con el fragmento contiguo, ver Figura 3.2. Las regiones de solapamiento deben tener una T_m de 60°C , no presentar degeneraciones, cumplir con los criterios para estructuras secundarias (harpins y homodímeros) mencionadas con anterioridad y tener Guanina o Citosina en sus extremos 3' y 5' con la finalidad de generar enlaces más estables.

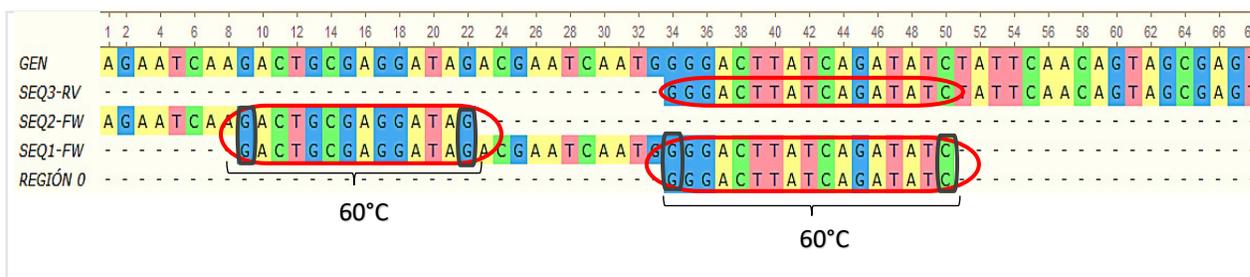


Figura 3.2 Visualización de secuencias en UGENE

Para el análisis de las propiedades de todas las secuencias se utilizó la herramienta Oligo Analyzer (Integrated DNA Technologies, 2022) y Oligo Calc (WA, 2007).

3.2 Síntesis de DNA

El protocolo de síntesis y procesamiento de los oligonucleótidos se llevaron a cabo con los procesos internos de T4OLIGO, sin embargo, no se profundiza ya que es información confidencial.

Los fragmentos para el ensamblaje de los T4bricks se sintetizaron mediante el método de nucleósidos fosforamidita (Beaucager & Iye, 1992) en un sintetizador Biolytic 3900 (Biolytic Lab Performance Inc.), en una escala de 25 nmol con acoplamiento en soporte universal de vidrio de poro controlado (CPG) de 1000 \AA y se desprotegieron con hidróxido de amonio al 30% (Drive, 2020).

3.3 Ensamblaje y purificación

En la Tabla 3.2 se muestra el número de reacciones de PCR necesarias para el ensamblaje de las secuencias de interés.

Tabla 3.2 Número de reacciones para ensamblaje

Mutación	Secuencia (5'-3')	Tamaño de amplicón (pb)	No. Fragmentos cortos	No. De reacciones
L452R	CTAACAAGCTTGATTCTAAGGTTGG TGGTAATTATAATTACCGGTATAGA TTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACC TTTTGA	82	2	1
R346K	AACTTGTGCCCTTTTGATGAAGTTTT TAACGCCACCAAATTTGCATCTGTTT ATGCTTGGAACAGGAAGAGAATCAG CAA	80	2	1
N460K	CTTGGAATTCTAACAAGCTTGATTCT AAGGTTGGTGGTTTCGGTATAGATT GTTTAGGAAGTCTAAGCTCAAACCT TTTATTTCAACTGAAATCTATCAGTA ACAAACCTTGTAAATGGTGTTCAG	126	3	2

El ensamblaje de los T4BRICKS fue realizado mediante PCR punto final, empleando una enzima de alta fidelidad, en un volumen de reacción de 20 μ L, los componentes para la primera reacción de cada T4BRICK se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Componentes de reacción #1 para ensamblaje de T4BRICKS

COMPONENTES	VOLUMEN (μ L)
5X PCR buffer (New England BioLabs)	4
250 μ M dNTPs	0.4
5 U/ μ L DNA polimerasa de alta fidelidad (Phusion Plus DNA Polymerase)	0.2
10 μ M de oligo Fw	1
10 μ M de oligo Rv	1
Agua	13.4
Volumen Total	20

Para las reacciones de PCR sucesivas, adicional a los componentes de la Tabla 3.3, se agregó 1 μ L del amplicón generado en la reacción inmediata anterior en dilución 1:1000.

El programa en el termocicador se llevó a cabo de acuerdo con los parámetros que se muestra en la Figura 3.3.

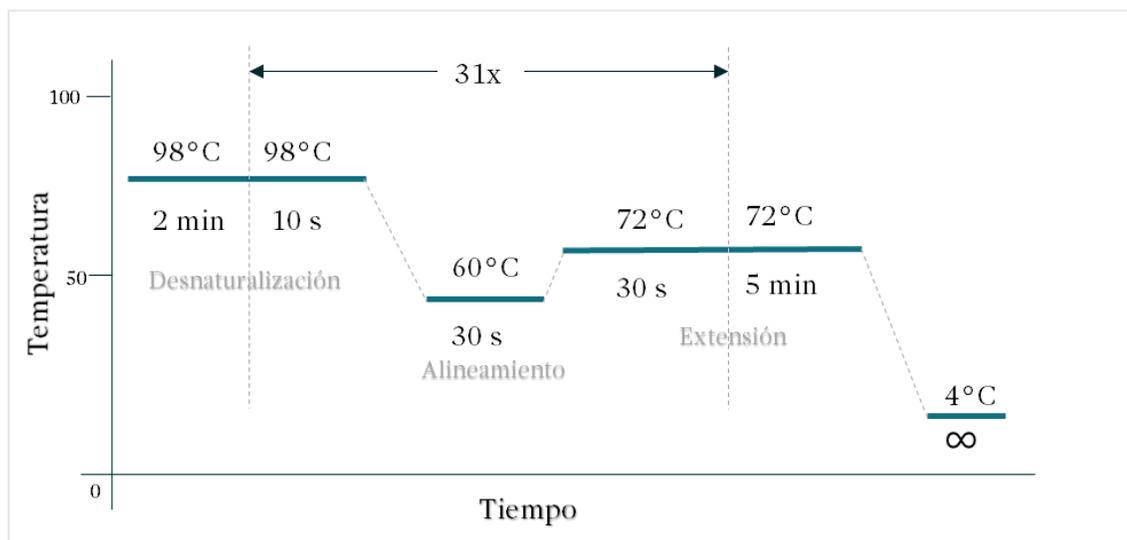


Figura 3.3 Protocolo de termociclado- Ensamblaje de T4BRICKS

Para la visualización del producto ensamblado se realizó una electroforesis en gel de agarosa, con la finalidad de comprobar que los T4BRICKS contaran con el tamaño deseado (pb). El porcentaje de agarosa depende del tamaño esperado del T4BRICK, por lo tanto, para las regiones blanco de L452R, R346K y N460K se utilizó al 2% (Sambrook & Russel, 2001).

El tamaño de los amplicones fue determinado por la comparación con el marcador de tamaño molecular de 100pb (IBI SCIENTIFIC).

Una vez comprobado el ensamble de los T4BRICK, se realizó la extracción y purificación de estos, empleando el kit GenCatch™ PCR Purification (Epoch Life Science) y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.4 Evaluación de T4BRICK's

La construcción de los productos finales se evaluó contra los controles comerciales suministrados en el Kit RT-qPCR MASTER MUT Configuración ómicron mediante la comparación y análisis por PCR empleando las concentraciones de 1×10^5 y 1×10^3 copias. Para el cálculo del número de copias presentes en la solución resultante, se cuantificó la concentración de cada uno de los T4BRICK's, así como su pureza, midiendo la absorbancia a 260 nm y los correspondientes ratios 260/280nm y 260/230nm, haciendo uso de un espectrofotómetro (NanoDrop™ 2000 Thermo scientific) y se determinó el número de copias empleando la siguiente fórmula (Lorenz, 2012):

$$\frac{\text{Número de copias}}{\mu\text{L}} = \frac{6.022 \times 10^{23} \times \text{cantidad de DNA (ng}/\mu\text{L)}}{\text{Largo (pb)} \times 1 \times 10^9 \times 660 \text{ Da}}$$

Donde:

- 6.022×10^{23} = Constante de Avogadro
- 660 Da = Peso promedio de un solo par de bases
- 1×10^9 = Factor de conversión

Con los datos obtenidos, se ajustaron los valores de número de copias mediante las diluciones correspondientes.

La reacción de qPCR para evaluar la eficiencia de los T4Brick's se llevó a cabo en un volumen total de 20 μL y se encuentra integrada por los componentes listados en la Tabla 3.4, las condiciones de amplificación para estas reacciones se pueden observar en la Figura 3.4. Tanto los componentes de reacción como las condiciones de amplificación son las recomendadas por el fabricante del kit de detección de mutaciones.

Tabla 3.4 Componentes de la qPCR para evaluación de T4BRICK's

COMPONENTES	VOLUMEN (μL)
Enzima StarQ	0.5
Buffer StarQ 5X	4
DiluyenT	6.5
Master Mix CO-1.1 /CO-2.1Primer Mix	4
Control commercial/T4BRICK	5
Volumen total	20

Referencia (GENES2LIFE, 2022)

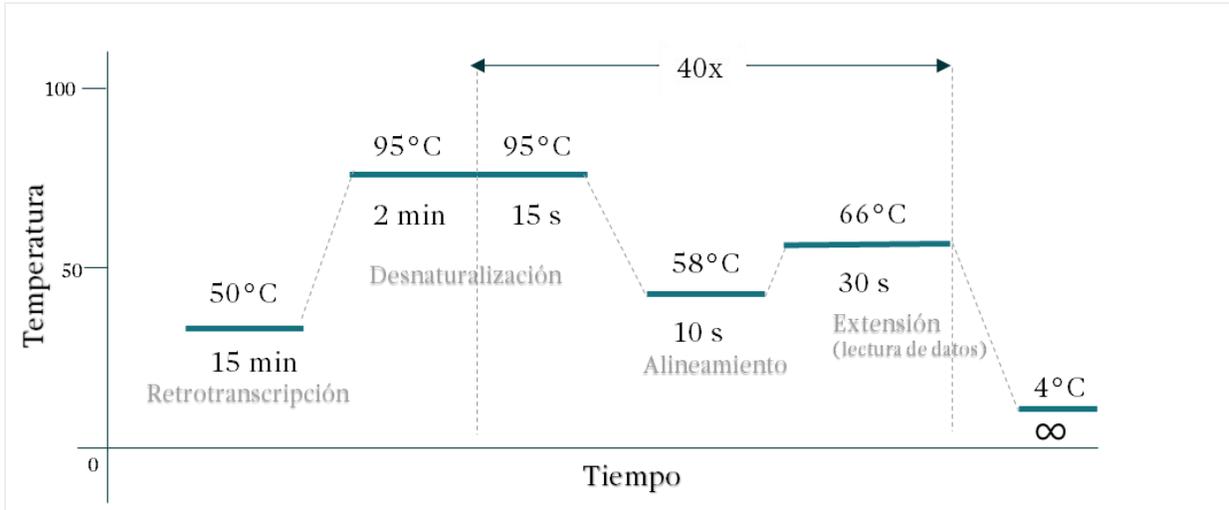


Figura 3.4 Programa de termociclado para evaluación de T4BRICK's (GENES2LIFE, 2022)

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Construcción de T4BRICKS

Durante el diseño in silico de los fragmentos cortos se obtuvieron las secuencias mostradas en la Tabla 4.1 para su posterior síntesis.

Tabla 4.1 Secuencias cortas para ensamble de T4BRICKS

T4BRICK	NOMBRE DE SECUENCIA	SECUENCIA	TAMAÑO (nt)
L452R	L452R-Fw	CTAACAAGCTTGATTCTAAGGTTGGTGGTAA TTATAATTACCGGTATAGATTG	53
	L452R-Rv	GTAATTATAATTACCGGTATAGATTGTTTAGG AAGTCTAATCTCAAACCTTTTGA	55
	L452R-Rv complementario	TCAAAAAGGTTTGAGATTAGACTTCCTAAACA ATCTATACCGGTAATTATAATTAC	55
R346K	R346K-Fw	AACTTGTGCCCTTTTGATGAAGTTTTTAACGC CACCAAATTTGCATCTG	49
	R346K-Rv	CGCCACCAAATTTGCATCTGTTTATGCTTGGA ACAGGAAGAGAATCAGCAA	51
	R346K -Rv complementario	TTGCTGATTCTCTTCCTGTTCCAAGCATAAAC AGATGCAAATTTGGTGGCG	51
N460K	N460K-Fw1	CGGTATAGATTGTTTAGGAAGTCTAAGCTCA AACCTTTTATTTCAACTGAAATCTATCAGTAA CAAAC	68
	N460K -Fw2	CTTGGAATTCTAACAAGCTTGATTCTAAGGTT GGTGGTTTCGGTATAGATTGTTTAGGAAGTC CAACTGAAATCTATCAGTAACAAACCTTGTA	63
	N460K -Rv	ATGGTGTTCAG ATGGTGTTCAG	43
	N460K -Rv complementario	CTGCAACACCATTACAAGGTTTGTACTGATA GATTCAGTTG	43

El ensamblaje se llevó a cabo mediante PCR punto final y se visualizó en gel de agarosa al 2%, donde, se observaron los productos esperados como se muestra en la Figura 4.1 y Figura 4.2.

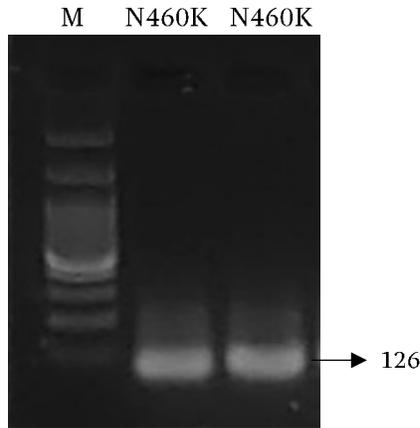


Figura 4.1 Ensamblaje de N460K- Visualización en gel

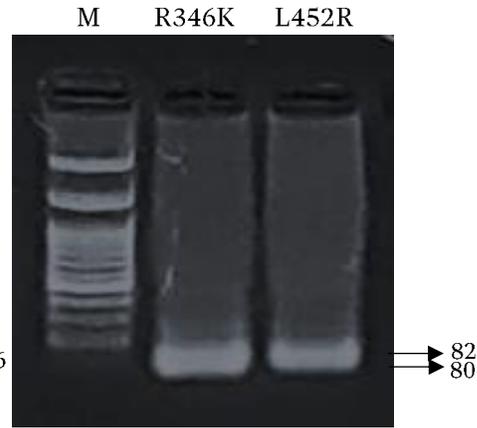


Figura 4.2 Ensamblaje de R346K y L452R-Visualización en gel

4.2 Evaluación de T4BRICKS

Los resultados de la cuantificación se muestran en la Tabla 4.2 se observa que la absorbancia obtenida en 260/280 y 260/230 cumple con los parámetros que demuestran la calidad y pureza de los T4BRICK's, adicional a esto, se muestra el resultado inicial del número de copias, la cual, posteriormente se ajustó a la concentración de trabajo de 1×10^5 y 1×10^3 copias.

Tabla 4.2 Resultados de cuantificación

T4 Brick	Abs 260/280	Abs 260/230	[ADN] ng/ μ L	Número de copias/ μ l
L452R	1.8	1.92	8.36	9.3×10^{10}
R346K	1.8	1.98	7.64	8.7×10^{10}
N460K	1.8	2.0	5.92	4.3×10^{10}

El Kit de detección RT-qPCR MASTER MUT Configuración ómicron (G2LMUSC-14, GENES2LIFE), está diseñado para la detección de las mutaciones D405N, R408S, Del69-70, R346K, L452R/Q y N460K, esto permitió evaluar los tres T4BRICK's con los reactivos suministrados por el kit (ver Tabla 4.3) y realizar las reacciones con los componentes como lo indica el instructivo.

Los certificados de análisis de los controles proporcionados en el kit indican que la concentración de estos está a 1×10^5 copias/ μ L. Por lo tanto, también se ajustó a la concentración de trabajo para los dos puntos a evaluar.

El kit identifica las mutaciones en 2 reacciones, distribuidas de la siguiente manera:

- Reacción 1: Mutación **N460K (FAM)**, Gen N (HEX), Control endógeno RNAsa P (Texas Red), y la mutación **R346K (Cy5)**.
- Reacción 2: Mutaciones **L452R/Q (FAM)**, Del69-70 (HEX), D405N, R408S (Texas Red), y M: D3N (CY5).

Tabla 4.3 Reactivos suministrados por kit MASTER MUT Configuración Ómicron

No. Viales	Reactivo	Volumen por vial (µL)	Fluoróforo
1	Enzima StarQ	125	N/A
1	Buffer StarQ 5X	1000	N/A
1	Diluyen T	1.8	N/A
1	Master Mut CO-1.1 Primer Mix	500	FAM, HEX, Texas Red, Cy5
1	Master Mut CO-2.1 Primer Mix	500	FAM, HEX, Texas Red, Cy5
1	Master Mut CO-1.1 Ctrl	80	N/A
1	Master Mut CO-2.1 Ctrl	80	N/A

Referencia (GENES2LIFE, 2022)

Por lo cual, para la amplificación de L452R, R346K y N460K, de igual manera se realizaron en dos reacciones por triplicado.

Los resultados de la qPCR se visualizan en los gráficos de amplificación de la Figura 4.3 para la mutación L452R, Figura 4.4 para N460K y Figura 4.5 para R346K, obteniendo curvas de amplificación positivas para los blancos objetivo y a su vez, los controles negativos no emitieron fluorescencia, descartando la posibilidad de contaminación.

La fluorescencia se representa en el eje Y de las gráficas, mientras que el número de ciclos de PCR se representa en el eje X. En el punto de intersección entre la curva de amplificación y la línea de umbral se encuentra marcado el Ct (Threshold Cycle), este punto indica el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor de umbral, es decir, el punto en el que la reacción alcanza una intensidad de fluorescencia por encima de los niveles de fondo, observándose desde ese punto, la lectura de la fluorescencia.

En la Tabla 4.4 se muestran los resultados de los valores de Ct de las amplificaciones evaluadas con los controles del Kit contra los T4BRICK's y se enfatiza en las diferencias presentadas entre estos valores, las cuales, fueron mínimas en cada dilución. Típicamente estas diferencias, se deben a diversos factores, siendo el principal el pipeteo, dado que, cuanto mayor sea la cantidad inicial de ADN, menor será el número de ciclos necesarios para alcanzar el umbral, a su vez, puede deberse a la aleatoriedad de la toma de muestra e incluso variaciones en la cuantificación y ajuste del material inicial.

Tabla 4.4 Resumen de valores de Ct de amplificaciones.

Control	C _T [1x10 ⁵ copias]	Δ C _T [1x10 ⁵ copias]	C _T [1x10 ³ copias]	Δ C _T [1x10 ³ copias]
L452R	24.16		32.91	
L452R_KIT	24.10	0.06	32.54	0.37
N460K	20.10		27.38	
N460K_KIT	20.04	0.06	27.04	0.34
R346K	23.83		31.56	
R346K_KIT	23.98	0.15	31.84	0.28

Adicional, se observó que el incremento de los valores de Ct fueron los correspondientes para cada dilución, es decir, se obtuvieron curvas de amplificación que indican una reacción eficiente, considerando que teóricamente, al diluir la cantidad de ADN en diez veces, los cambios en los valores de Ct deberían correrse en 3.3 ciclos para una reacción 100% eficiente. En este sentido es posible determinar que el desempeño de los controles sintetizados por la metodología establecida en el presente es idéntico al de los controles incluidos como parte del kit incluso al diluirlos.

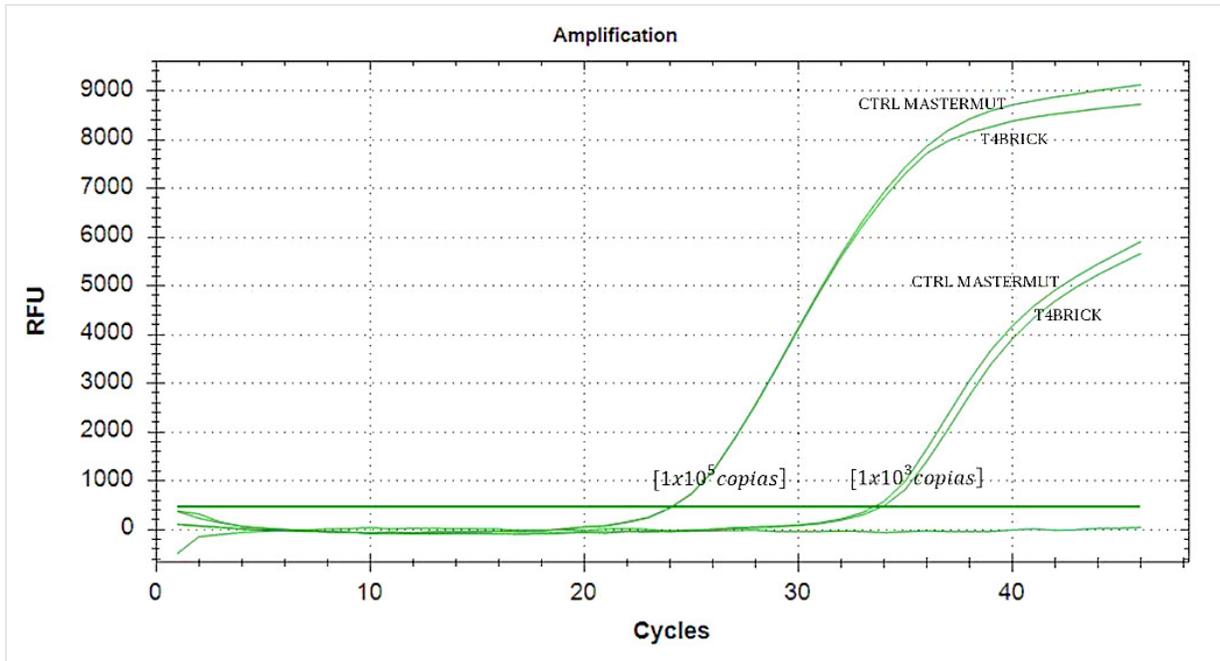


Figura 4.3 Amplificación Ctrl MASTER MUT y T4BRICK para L452R (FAM).

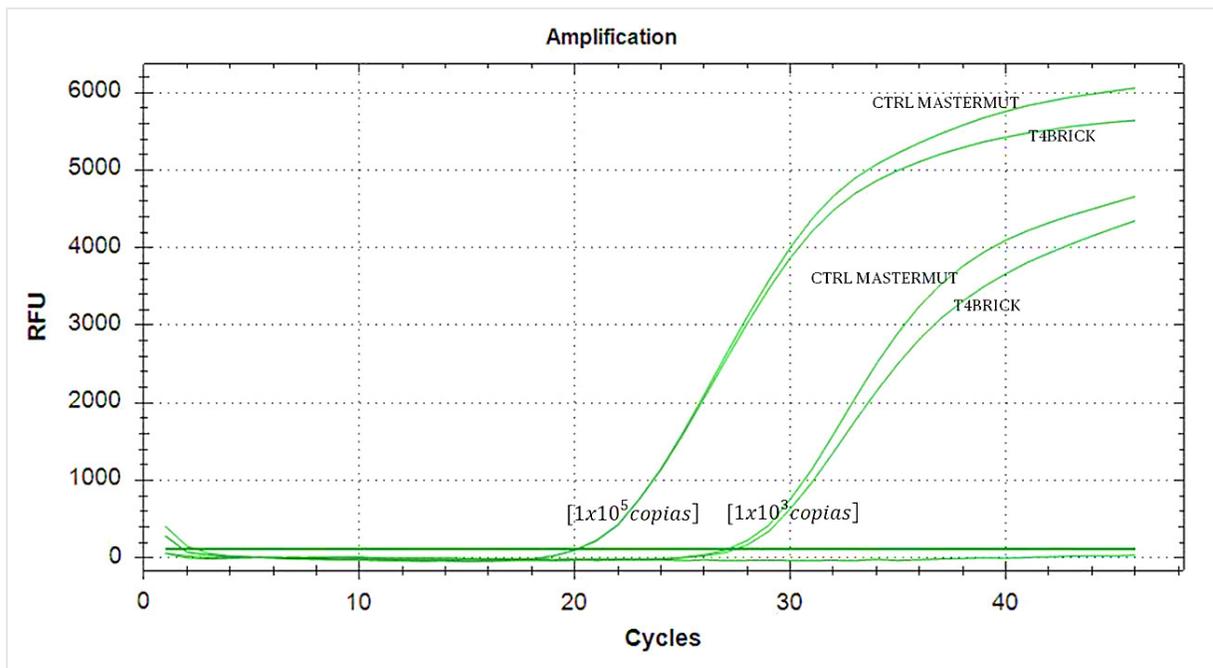


Figura 4.4 Amplificación Ctrl MASTER MUT y T4BRICK para N460K (FAM).

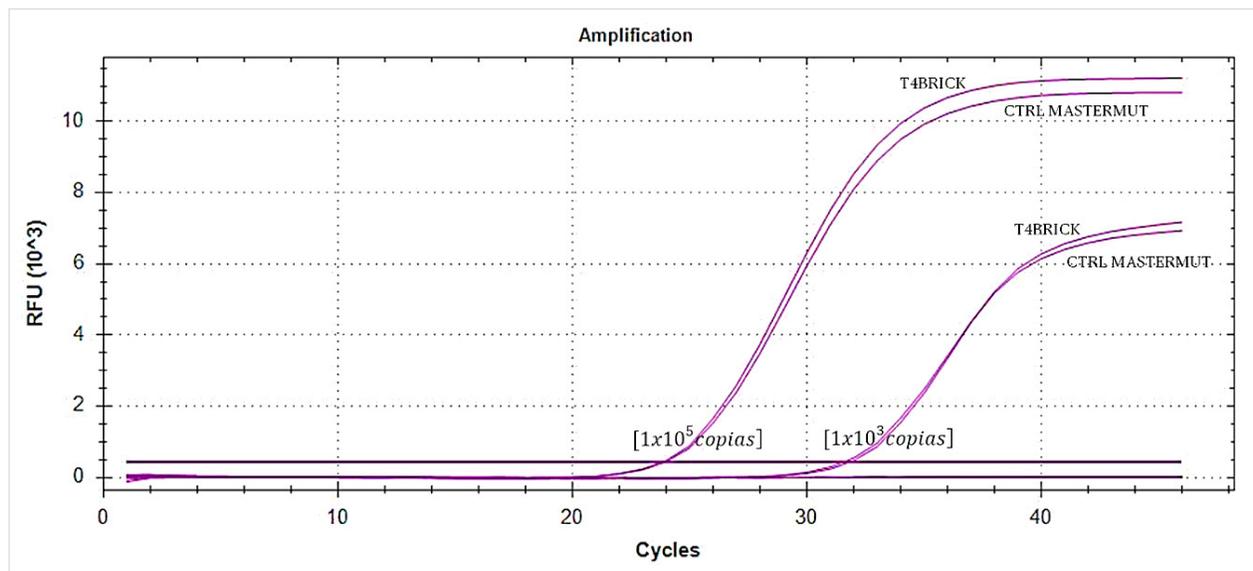


Figura 4.5 Amplificación Ctrl MASTER MUT y T4BRICK para R346K (Cy5).

En resumen, se ha descrito un método de ensamblaje de genes basado en PCR para la construcción rápida y precisa de tres fragmentos del virus de SARS- CoV-2. Es importante enfatizar en la flexibilidad del método, debido a que, no existe un límite práctico en la cantidad de oligos que se puedan mezclar, lo que sugiere que se podrían sintetizar con éxito genes mucho más grandes.

El parámetro crucial para el éxito general del método está determinado por la fidelidad de la polimerasa utilizada en la reacción. Los oligos utilizados para la construcción de los T4BRICKS fueron relativamente cortos en comparación con otros métodos de síntesis de genes basados en PCR, en los que se utilizaron oligos de más de 80 nucleótidos, por ejemplo, en el caso del estudio de Prodromou & Pearl (1992) y Casimiro et al. (1997).

El uso de oligos grandes tiene ciertas ventajas, debido a que el diseño del gen se simplifica y se puede utilizar una cantidad menor de oligos en una sola reacción, lo que reduce la cantidad de extremos de oligo y potencialmente reduce la frecuencia de errores derivados de la PCR. Por otro lado, los oligos más cortos tienen la importante ventaja de tener menos probabilidades de formar oligos truncos y es menos probable que contengan errores introducidos durante la síntesis.

Ambos métodos tienen sus ventajas, por lo que, dependiendo el fragmento de interés, se puede seleccionar el método a utilizar.

Por su parte, en el ensayo de Stemmer et al. (1995) utilizaron una combinación de polimerasa Taq y polimerasa Pfu con la finalidad de garantizar tanto la procesividad como las actividades de corrección para la síntesis por PCR del ensamblaje del gen de la β -lactamasa de 0.9 kb, obteniendo resultados exitosos. Debido al tamaño de los fragmentos de interés de nuestro estudio, no se exploró esta propuesta, sin embargo, abre la posibilidad a la experimentación futura para fragmentos más largos.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió elaborar secuencias sintéticas para detectar de manera exitosa las mutaciones puntuales L452R, R346K y N460K, mediante la implementación de los T4BRICK's como controles positivos de reacción, demostrando que su diseño y construcción es una metodología rápida, sencilla y funcional para qPCR, y a su vez, resuelve la problemática de la generación de trazas de oligos truncos al momento de síntesis que pueden interferir en la reacción o en la determinación precisa de la cantidad inicial de material genético, además que se disminuye el riesgo de contaminación en las instalaciones productivas.

Actualmente existen muchos otros métodos de ensamblaje, cada vez con procesos más simples y menos costos, por lo que, se enfatiza como ventaja adicional, el costo de venta ya que está 25% abajo del valor mercado.

Finalmente, la elaboración de secuencias sintéticas abre un abanico de posibilidades para todos aquellos que requieren material genético de organismos no disponibles o de manejo especial, generando la disponibilidad de este para la elaboración, estandarización e incluso la validación de ensayos, sobre todo, porque el desempeño de este material es idéntico al biológico.

CAPÍTULO 6

REFERENCIAS

- Beaucager, S., & Iye, R. (1992). Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach. *TETRAHEDRON*, Vol. 48. No. 12, pp. 2223-2311.
- Casimiro, D. W. (1997). *Structure*. 5, 1407–1412.
- Conte, J., Potoczniak, M., & Tobe, S. (2018). Using synthetic oligonucleotides as standards in probe-based qPCR. *BioTechniques*, 64:177–179, 10.2144/btn-2018-2000.
- De Kok, S., Stanton, L., Slaby, T., Durot, M., Holmes, V., & Patel, K. (2014). Rapid and Reliable DNA Assembly via Ligase Cycling Reaction. *ACS Synth. Biol.*, 3, 97–106.
- Dillon, P., & Rosen, C. (1990). A rapid method for the construction of synthetic genes using the polymerase chain reaction. *BioTechniques*, 9: 298–300.
- Drive, D. (2020). Deprotection Guide. *Glen Research*, 2-4.
- Engler, C., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2008). A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLoS ONE*, 3(11): e3647. doi:10.1371/journal.pone.0003647
- Gang, W., Wolf, B., Ameer, I., Vadasz, S., Gunasinghe, M., & Freeland, S. (2006). Simplified gene synthesis: A one-step approach to PCR-based gene construction. *Journal of Biotechnology*, 496–503.
- GENES2LIFE. (2022). *Kit para la detección preliminar de la variante VOC Ómicron y las subvariantes bajo vigilancia definidas por la OMS, desde BA.1 hasta BA.5*.
- GENES2LIFE. (23 de Febrero de 2022). *Variantes coronavirus México*. Recuperado el 18 de Diciembre de 2022, de <https://www.variantescoronavirus.com/>
- Gibson, D. (2012). Oligonucleotide Assembly in Yeast to Produce Synthetic DNA Fragments. *Springer Science+Business Media*, 11-21: 852. doi: 10.1007/978-1-61779-564-0_2
- Gibson, D., Hamilton, O., Hutchison, C., Craig, V., & Merryman, C. (2010). Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome. *Nature methods*, 901-904.

- Guzmán, J., & Llaveta, A. (2020). SARS-CoV-2: structure, replication and physiopathological mechanisms related to COVID-19. *Gaceta Médica Boliviana*, v.43 n.2 .
- Integrated DNA Technologies. (2022). *OligoAnalyzer Tool*. Recuperado el 02 de Diciembre de 2022, de IDT: <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>
- Lorenz, T. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J Vis Exp.*, (63): 3998.
- Moldovan, E., & Moldovan, V. (2020). Controls in Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Acta Marisiensis - Seria Medica*, 66(3):79-82. doi:10.2478/amma-2020-0025
- Okonechnikov, K., Golosova, O., & Fursov, M. (2022). *Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit (Versión v. 45.1)*. Obtenido de [Software]: <http://ugene.net/>
- OMS. (29 de Enero de 2021). Cronología de la respuesta de la OMS a la COVID-19.
- Pastrian, G. (2020). Genetic and Molecular Basis of COVID-19 (SARS-CoV-2) Mechanisms of Pathogenesis and Immune. *Int. J. Odontostomat*, vol.14 no.3 .
- Prodromou, C. P. (1992). Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis. *Protein Engineering, Design and Selection*, 5, 827–829.
- Randall, A., & Ellington, A. (2017). Synthetic DNA Synthesis and Assembly: Putting the Synthetic in Synthetic Biology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(1): a023812. doi:10.1101/cshperspect.a023812
- Sambrook, J., & Russel, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Ed*. Cold Spring Harbor, NY.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Stemmer, W., Cramer, A., Ha, K., Brennan T, & Heyneker, H. (1995). Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene*, 164: 49–53.
- Tao, K., Tzou, P., Nouhin, J., Gupta, R., Oliveira, T., Kosakovsky, S., . . . Shafer, R. (2021). The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nat Rev Genet*, 22(12):757-773. doi:10.1038/s41576-021-00408-x.
- Trubitsyna, M., Michlewski, G., Cai, Y., Elfick, A., & French, C. (2014). PaperClip: Rapid multi-part DNA assembly from existing libraries. *Nucleic Acids Res*, 42: e154.
- WA, K. (27 de Mayo de 2007). '*OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator*'. Recuperado el 02 de Diciembre de 2022, de Nucleic Acids Res: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>

- Wang, B., Steain, M., Dwyer, E., Cunningham, A., & Saksena, N. (2011). Synthetic long oligonucleotides to generate artificial templates for use as positive controls in molecular assays: drug resistance mutations in influenza virus as an example. *Virology Journal*, 8:405.
- World Health Organization. (2022). *Tracking SARS-CoV-2 variants*. Recuperado el 18 de Diciembre de 2022, de <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. (2012). *Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. Retrieved from [Web App]: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- Yong, J., & Davey, S. (2021). SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Yonsei Med J*, 62(11):961-968. doi:10.3349/ymj.2021.62.11.961
- Yüce, M., Filiztekin, E., & Ozkaya, K. (2021). COVID-19 diagnosis —A review of current methods. *ELSEVIER Biosensors and Bioelectronics*, Volume 172.