

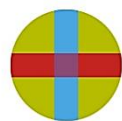
Genética y Biotecnología

Bases Aplicadas a la
Veterinaria (BAV)

Prácticas de laboratorio: Técnicas Básicas de Genética Molecular



La portada ha sido diseñada usando imágenes de Freepik.com



CEU
*Universidad
Cardenal Herrera*

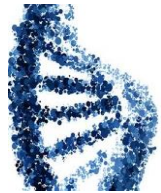
Irene Tadeo
Carolina Gil
Joan Climent
Juan José Quereda
Pilar Rentero

Dpto. de Producción y Sanidad
Animal, Salud Pública Veterinaria y
Ciencia y Tecnología de los
Alimentos (PASAPTA)
Facultad de Veterinaria.
Curso 2020-2021



ÍNDICE

Justificación	3
Medidas de seguridad en el laboratorio de biología molecular	4
Práctica 1: obtención y envío de muestras para análisis genético, extracción de ADN genómico y cuantificación	9
Práctica 2: estudio de polimorfismos vntr del gen PER3 y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	21
Práctica 3: digestión enzimática (RFLP) de ADN humano para detectar un polimorfismo de nucleótido único (SNP) en el gen <i>TAS2R38</i> , responsable de la capacidad de detectar el sabor amargo e identificación de las variantes asociadas a cada fenotipo por electroforesis	31
Práctica 4: detección de <i>listeria monocytogenes</i> por PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR)	45



JUSTIFICACIÓN

La genética molecular es la rama de la genética que analiza, a nivel molecular, la estructura y la función del material genético basándose en métodos de biología molecular.

A finales del siglo XX se empezaron a implementar técnicas con el fin de aislar, analizar y manipular a los ácidos nucleicos, así como a las proteínas codificadas por estos, dando lugar a la ciencia de la Biología Molecular. En 1973 Stanley Cohen (Stanford University) y Herbert Boyer y cols. (University of California School of Medicine at San Francisco) insertaron un fragmento de ADN de un plásmido en otro, creando una molécula de ADN recombinante totalmente nueva, revolucionando así la biología. Anteriormente, la información acerca de la estructura y la organización de los genes se obtenía examinando sus efectos fenotípicos, pero el análisis genético molecular permite incluso leer las propias secuencias nucleotídicas, aportando nueva información sobre la estructura y la función de los genes.

Las técnicas genéticas moleculares son múltiples y se emplean actualmente en muchos campos: además de en biología, se utiliza en ramas como la bioquímica, microbiología, biología del desarrollo, neurobiología, evolución, ecología y, por descontado, en diversas ramas de la veterinaria, donde es ahora indispensable para el diagnóstico de enfermedades o la selección de individuos en animales de compañía o ganadería, entre otros.

Este manual tiene como objetivo proveer a los estudiantes del Grado en Veterinaria de la Universidad CEU Cardenal Herrera de las competencias necesarias para llevar a cabo algunas de las técnicas más empleadas durante el desarrollo de la investigación veterinaria y de la práctica clínica. Para ello, se incluye la descripción clara de los fundamentos teóricos de los principales métodos y la explicación, paso a paso, de las técnicas empleadas.



MEDIDAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Para permitir la seguridad de los alumnos que realizan las prácticas aquí descritas, se deben seguir las siguientes normas:

- **Normas generales de laboratorio:**

1. No comer, ni beber, ni mascar chicle. Obviamente, no fumar en las instalaciones del CEU.
2. No correr ni empujarse dentro del laboratorio.
3. Recogerse el pelo en una coleta en el caso de llevar el pelo largo.
4. Usar siempre bata cuando se permanezca en el laboratorio y guantes para las actividades que se indiquen.
5. Calzar zapatos cerrados y con suela antideslizante.
6. Cuando se empleen los guantes, no tocar objetos de uso común (interruptores, pomos de puertas, instrumentos de escritura, teclados y ratón del ordenador, etc.) ni partes del cuerpo (cara o pelo).
7. No utilizar ningún equipo del laboratorio (nevera, congelador, horno de microondas, etc.) para almacenar o preparar alimentos.
8. No pipetear ninguna solución con la boca.
9. No oler directamente, ni probar ninguna sustancia utilizada en el laboratorio.
10. Informarse previamente de los riesgos de salud a los que se exponen por el uso de las sustancias químicas que se manejan en el laboratorio.
11. Limpiar el espacio de trabajo antes y después de utilizarlo con desinfectante (viricida).
12. No obstruir el paso entre las mesas, ni las salidas del laboratorio.
13. No utilizar material de vidrio dañado o astillado.
14. Utilizar la campana de extracción de humos cuando se trabaje con los ácidos líquidos.
15. No dejar destapados los frascos que contengan sustancias químicas o algún material estéril.
16. Respetar la asignación de espacios y reactivos.
17. Al terminar de trabajar, guardar o entregar el material limpio y seco.

NOTA: Ante una situación de urgencia dar aviso inmediatamente a su profesor o profesora; en caso de emergencia se deberá mantener la calma y abandonar las instalaciones en orden.

NOTA: Durante la pandemia por COVID-19, será necesario utilizar una mascarilla FFP2 nueva y bien ajustada antes de cada sesión de prácticas.

- **Normas para el manejo de muestras biológicas:**

Con respecto a la seguridad en el uso de muestras biológicas, en el ámbito de la sanidad no se consideran infectantes la orina, saliva, heces, lágrimas, sudor y vómitos, salvo que estén contaminados con sangre, o muestras de ADN ya extraído. No obstante, siempre que se trabaja



con muestras biológicas, se aconseja considerar toda muestra como potencialmente infecciosa. Así, se recomienda:

- Lavarse las manos antes y después de manipular las muestras.
- Emplear **EPIs**, que son **Equipos de Protección Individual** (bata, guantes, gafas, mascarilla).
- Protegerse heridas y cortes.
- Mantener limpio el lugar de trabajo.
- Tener las vacunas en regla.

- **Normas para uso de reactivos o material de laboratorio:**

Manejo de la micropipeta

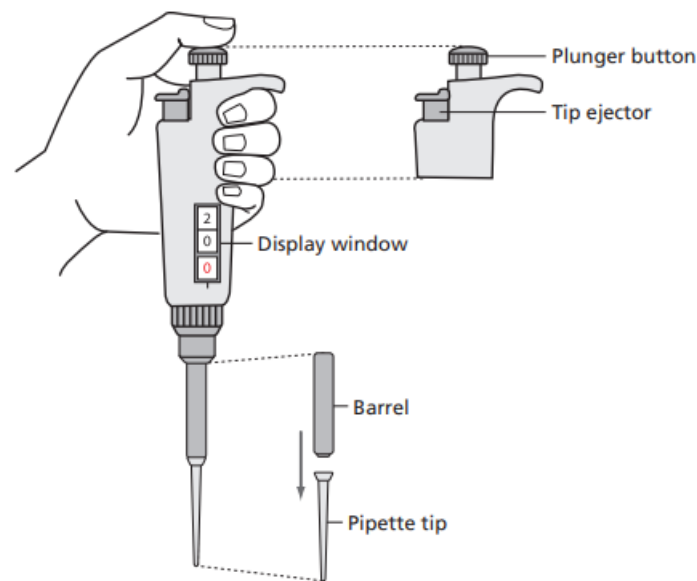


Figura 1: Esquema de una micropipeta. Fuente: Amgen Foundation. Introduction to biotechnology. Student guide. 2015

1. Emplear solamente con soluciones acuosas. Siempre que sea posible, evitar emplearla con ácidos y solventes que la puedan dañar.
2. No usar nunca la micropipeta sin punta desechable.
3. Elegir la punta adecuada para cada micropipeta de acuerdo con su capacidad.
4. No dejar nunca la micropipeta en posición horizontal con líquido en la punta.
5. Para aspirar: apretar el émbolo hasta la primera parada. Hacer esto fuera del líquido que se quiera absorber para no introducir burbujas. Una vez dentro del tubo con el líquido, levantar lentamente el émbolo para aspirar todo el volumen, asegurándose de que no queda aire al final de la punta.
6. Si no se sumerge correctamente la punta en el líquido, no se aspirará el volumen seleccionado, formándose gotas y, como consecuencia, el líquido puede introducirse al cuerpo de la micropipeta y, de esta manera dañarla.
7. Para verter el líquido aspirado: apretar el émbolo lentamente hasta la segunda parada.



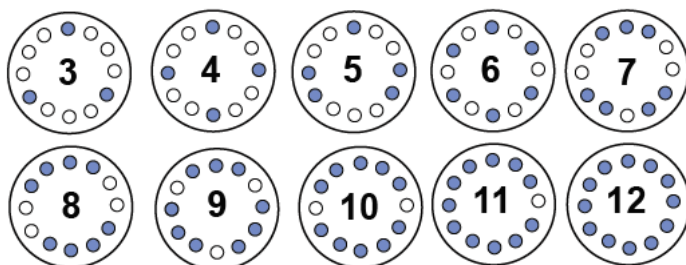
8. Se debe extraer la punta empleando el eyector.
9. Es imprescindible tener cuidado al regular el volumen deseado. Preguntad al profesor o la profesora si tenéis dudas.

Manejo de la microcentrífuga

La microcentrífuga es un equipo básico en el laboratorio de biología molecular que nos permite separar de forma rápida y segura distintos componentes de una solución (sólidos de líquidos) por su peso. Las microcentrífugas alcanzan una velocidad giratoria enorme y es precisamente por esto por lo que se pueden dañar fácilmente si no se toman las precauciones adecuadas:

1. Manejar la centrífuga en una superficie plana y segura.
2. Mantener la cubierta de la máquina cerrada mientras está girando.
3. Introducir los tubos de manera balanceada. Si la máquina no está correctamente equilibrada, hará mucho más ruido del que sería esperable. Apaga inmediatamente la microcentrífuga para evitar daños en el equipo y a tus compañeros. Para balancear la centrífuga es necesario:
 - Colocar los tubos en lados opuestos de la centrífuga.
 - Los tubos enfrentados deben tener la misma masa.
 - Si no es posible balancear la carga por número impar de tubos o volúmenes distintos, hay que añadir un contrapeso, que es un tubo que se situará enfrente al de la muestra y que contendrá el mismo volumen.
4. Configurar las velocidades de rotación y los tiempos antes de ponerla en marcha.
5. Esperar a que se detenga completamente antes de retirar los tubos.
6. Retirar los tubos con cuidado para evitar que se vuelvan a mezclar los componentes.

Indica, para un rotor de 12 muestras como el que vamos a emplear, cuál de las siguientes disposiciones no es correcta para los distintos números de tubos que se indican en el interior de los esquemas.



Fuente: Damián PG, González L, López A, Espino NY. Manual de prácticas de laboratorio. Técnicas básicas de biología molecular.2013. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Méjico.

¿Qué harías para solucionarlo?



Uso del transiluminador

En las instalaciones de la UCH-CEU disponemos de un sistema de documentación de genes en cuyo interior se encuentra un transiluminador. El riesgo, en este caso, es nulo puesto que la luz ultravioleta se enciende únicamente con la puerta cerrada y los resultados se muestran en una pantalla. No obstante, conviene recordar que, en caso de no disponer de este sistema, el transiluminador trabaja con luz ultravioleta por lo que debe evitarse al máximo mirarla directamente durante la visualización del ADN, incluso con la pantalla protectora bajada. La exposición debe de ser mínima y empleando siempre protección para ojos (gafas) y manos (guantes) (EPIs).

Manejo de Red Safe o GelSafe

Este producto está clasificado como no peligroso. Sin embargo, es necesario evitar el contacto con la piel y los ojos, empleando los EPIs pertinentes. En caso de contacto, aclarar la zona con abundante agua.

Uso de agarosa

La agarosa es un producto inocuo, aunque en caso de ingestión puede producir trastornos gastrointestinales, por lo que es conveniente emplear EPIs para su manipulación y evitar su ingesta.

Bibliografía

- Damián PG, González L, López A, Espino NY. Manual de prácticas de laboratorio. Técnicas básicas de biología molecular. 2013. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Méjico. <http://publicacionescbs.izt.uam.mx/DOCS/biomolec.pdf>.
- Amgen Foundation. *Introduction to biotechnology. Student guide*. 2015. https://www.amgenbiotechexperience.com/sites/default/files/abe_english_student_sequence_4_05.15.15.pdf.



PRÁCTICA 1: Obtención y envío de muestras para análisis genético, extracción de ADN genómico y cuantificación.

El análisis genético conlleva siempre el estudio de muestras de ADN de los individuos a estudiar. Así, es necesario conocer cuáles son las formas adecuadas para poder extraer y enviar muestras biológicas a los laboratorios que las vayan a analizar, garantizando la preservación del ADN. En esta práctica hablaremos de los distintos análisis que se pueden realizar y de las fuentes y formas de envío de muestras para el estudio genético. Asimismo, realizaremos la extracción de ADN a partir de una muestra de sangre animal para aprender cuáles son las etapas de este procedimiento y para comprender cuál es el camino que sigue una muestra biológica en un laboratorio de análisis genético. Por último, cuantificaremos la cantidad y calidad de una muestra de ADN extraído mediante absorbancia, proceso esencial para poder realizar técnicas posteriores.

Objetivos:

- A:** Conocer las fuentes de ADN, y formas de envío y conservación de muestras para el estudio genético.
- B:** Realizar la extracción de ADN genómico a partir de sangre.
- C:** Valorar la calidad y cantidad del ADN extraído.

Material:

- EPIS
- Hisopos
- Tubos Vacutainer
- Micropipetas y puntas de micropipeta
- Hielo
- Vortex
- Microcentrífuga
- Isopropanol
- Etanol 70%
- Kit de extracción de ADN: Danagene Ref.0603.4
- Nanodrop



A: Conocer las fuentes y formas de envío de muestras para el estudio genético.

El análisis de ADN es básico en veterinaria y se emplea para múltiples fines. Entre ellos:

- Test de paternidad, identidad genética y filiación (pedigríes).
- Selección de progenitores para ganadería: libres de enfermedades, portadores de fenotipos beneficiosos, etc.
- Diagnóstico de enfermedades genéticas.
- Sexado de aves.
- Identificación de animales por las heces (ayuntamientos que tienen censo de animales).
- Diagnóstico de infecciones bacterianas, víricas y parasitarias (ej: *leishmania*).

La toma de muestras de ADN se realiza en las clínicas veterinarias o en la misma explotación ganadera pero el análisis, generalmente, se lleva a cabo en laboratorios especializados, por lo que hay que conocer cuáles son las formas adecuadas de tomar y enviar las muestras para preservar la integridad del ADN. Las fuentes de material genético son aquellas que incluyan células nucleadas como:

- Células descamadas de la piel o mucosas: raspado, frotis con hisopo, pelo arrancado si contiene el folículo piloso.
- Fluidos que contienen células desprendidas de manera natural: heces y orina contienen células epiteliales.
- Sangre (glóbulos blancos).

Rodea aquellos materiales que pueden emplearse como fuente de ADN:		
Pelo cortado	Saliva	Raspado de epidermis
Frotis de mucosa oral	Pelo arrancado	Heces
Orina	Glóbulos rojos	Sangre

Para evitar la degradación del material biológico, existen varias alternativas como, por ejemplo:

- En el caso de la extracción de sangre (más común), la muestra se introducirá en tubos *Vacutainer* que contienen un anticoagulante (EDTA) (figura 1) para evitar la coagulación de las proteínas y la hemólisis de la sangre. La muestra se enviará al laboratorio en que se realice el análisis genético refrigerada pero no congelada (la congelación sin agentes crioprotectores conllevaría la lisis de las células o hemólisis, en este caso). En el laboratorio se separarán las células nucleadas y se extraerá el ADN constitutivo.
- En el caso de frotis de la mucosa oral, se frota la mucosa oral con un hisopo que puede analizarse directamente o que se fijará si hay que enviar al laboratorio. En este segundo caso, se dejará secar (fijar) durante 30 minutos al aire libre o se introducirá en un medio con fijador.
- Como alternativa, existen en el mercado unas tarjetas FTA-Whatman que tienen unas áreas circulares de papel Whatman (filtro) en las que se incluye el material biológico y que están impregnadas con compuestos químicos que producen la lisis celular, la inactivación enzimática bacteriana y vírica y, así, la protección del material genético (figura 1).

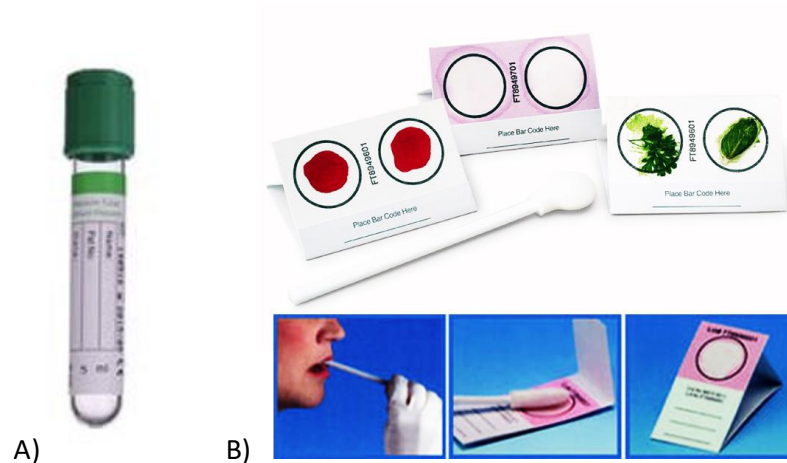
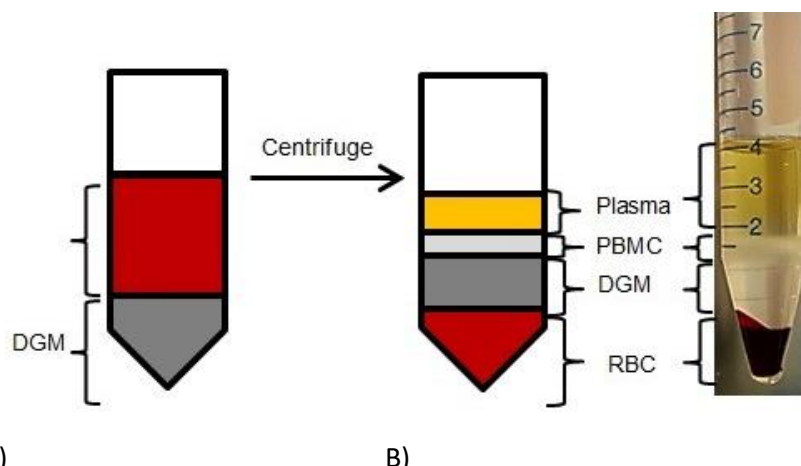


Figura 1. A) tubo Vacutainer con EDTA. B) distintas tarjetas FTA-Whatman.

Una vez recolectada debidamente la muestra de tejido (que contiene el ADN), se rellenará el formulario requerido por el laboratorio al que se enviará la muestra, que deberá incluir información identificativa del animal (especie, raza, edad, género), datos sobre la muestra y el envío, e información relevante para el diagnóstico (síntomas, antecedentes...). Fuente: Carloth.com/com/en/sample-conservation/fta-cards/p/ci90.1?hcb=1

Durante esta práctica, vais a extraer ADN de una muestra de sangre, que es una fuente excelente de ADN. Éste está presente en los glóbulos blancos (no así en los glóbulos rojos, que carecen de núcleo). Para extraer ADN a partir de sangre, es previamente necesario extraer de ella las células nucleadas empleando Ficoll-Paque, que es un medio de gradiente de densidad. El procedimiento se realiza de la siguiente manera (figura 2):

- Introducir 3ml de Ficoll-Paque en un tubo de ensayo. Cerrar el tubo e impregnar sus paredes con el producto.
- Mezclar, en otro tubo, 3ml de sangre periférica con el mismo volumen de tampón PBS (Phosphate Buffered Saline), que es una solución amortiguadora e isotónica, cuya función es mantener una presión osmótica y un pH similares a los fisiológicos.
- Introducir suavemente los 6mL de sangre + tampón PBS, haciendo que la mezcla se deslice por la pared hasta quedar por encima del volumen de Ficoll-Paque, con una densidad mayor.
- Centrifugar a 3000rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los eritrocitos atraviesan la capa de Ficoll-Paque y sedimentan en el fondo del tubo, mientras que el plasma queda en la parte superficial, y las células nucleadas quedan localizadas entre la capa de plasma y el Ficoll-Plaque.



A)

B)

Figura 2. A) tubo de ensayo con 3ml de Ficoll-Paque (gris, DGM: Density Gradient Medium) y 6 mL de sangre + tampón PBS. B) mismo tubo tras la centrifugación. Los eritrocitos y granulocitos han sedimentado (RBC: Red, Blood Cells) y por encima han quedado el medio de Ficoll (DGM), las células nucleadas (PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell) y el plasma. Fuente: <https://www.abcam.com/human-peripheral-blood-mononuclear-cell-isolation-and-viability-kit-ab234628.html#lb>

B: Realizar la extracción de ADN genómico.

La extracción de ADN tiene como objetivo aislar y purificar moléculas de ADN a partir de una muestra biológica que contiene células nucleadas. Se basa en las propiedades bioquímicas de la molécula de ADN, que está constituida por dos cadenas antiparalelas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Los nucleótidos están compuestos por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina - AGTC-). La unión de los nucleótidos de una misma cadena se lleva a través de los grupos fosfato, que unen los azúcares (desoxirribosas en este caso) mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrógeno y mantienen estable la estructura helicoidal (figura 3).

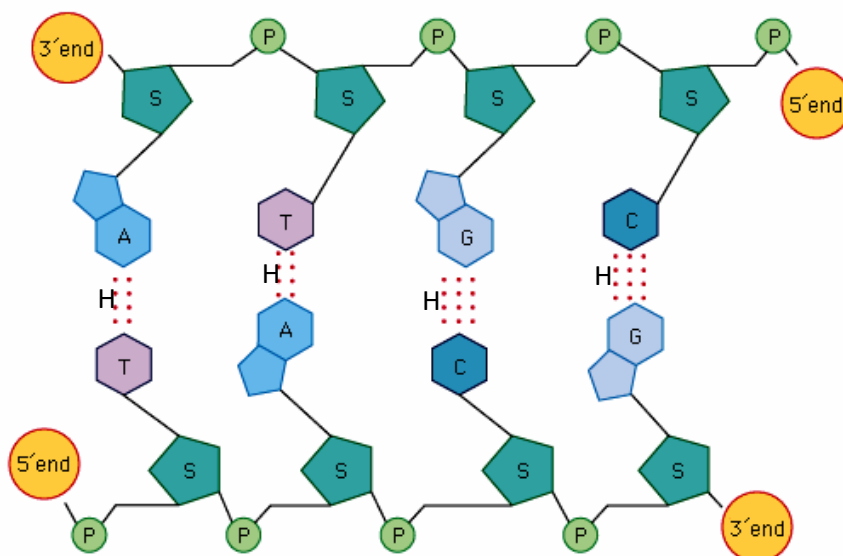
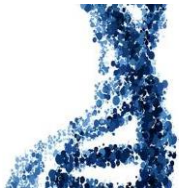


Figura 3. Detalle de una molécula de ADN. S: desoxirribosa (azúcar, pentosa), A: adenina, T: Timina, G: Guanina, C: Citosina, P: Grupo fosfato (une los nucleótidos contiguos por enlaces fosfodiéster), H: puentes de hidrógeno que mantienen unidas las cadenas complementarias. Fuente: modificada de Encyclopaedia Britannica, Inc, 1998.



Los grupos fosfato están cargados negativamente, lo que le confiere al ADN una carga neta negativa y lo hace altamente polar (con cargas eléctricas separadas dentro de una misma molécula). Debido a estas propiedades fisicoquímicas, el ADN es soluble en soluciones acuosas, pero, en presencia de alcohol (isopropanol o etanol), se rompe la capa hidratante envolvente existente en soluciones acuosas y los grupos fosfato quedan expuestos en el exterior de la molécula. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como el sodio (Na^+), que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN precipite.

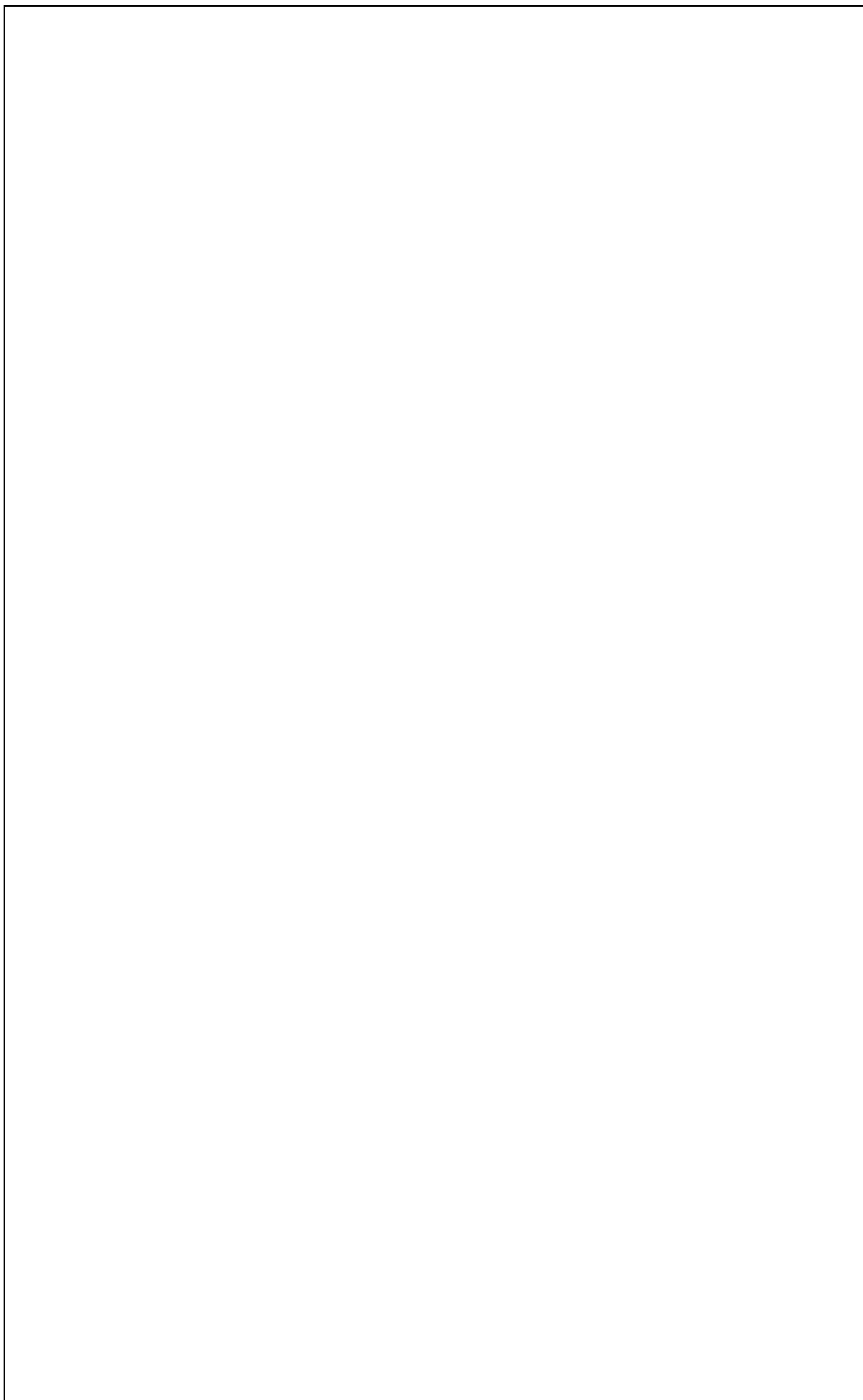
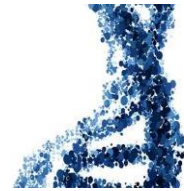
Los métodos tradicionales, como el empleado en el kit *Danagene*, utilizan solventes orgánicos para separar a las proteínas del ADN y, una vez suspendido en la fase acuosa, aislarlo por precipitación con alcohol. En general, los protocolos tradicionales consisten en cuatro etapas principales:

1. **Lisis celular:** durante el proceso de lisis las interacciones entre las moléculas que conforman la pared, la membrana celular y nuclear se modifican o destruyen permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen. Se utilizan soluciones básicas, detergentes o agentes caotrópicos que permiten disolver la membrana celular, así como inhibidores para inactivar las enzimas que degradan el ADN (DNAsas). Muchas soluciones de lisis contienen también EDTA, que forma un complejo con los iones de magnesio (Mg^{2+}) impidiendo el funcionamiento de las DNAsas.
2. **Separación de proteínas y lípidos:** se separa el ADN de las proteínas y lípidos mediante solventes orgánicos y ciclos de centrifugación. Se utiliza la fuerte tendencia hidrofílica de los grupos fosfato para disolver el ADN en medios acuosos, separándolo de las proteínas y los lípidos que se disuelven en solventes orgánicos. La fase acuosa y la orgánica se separan por centrifugación, lo que permite aislar al ADN.
3. **Precipitación del ADN:** Después de eliminar los lípidos y las proteínas, se recupera el ADN. Para ello, se adiciona alcohol y soluciones con altas concentraciones de iones de sodio o amonio que se unen a los grupos fosfato. Esta mezcla reduce las fuerzas repulsivas entre las cadenas y permite que el ADN se pliegue sobre sí mismo haciéndolo insoluble. Un paso de centrifugación permite que el ADN permanezca en el fondo del tubo mientras que el alcohol es desechado. Los restos de alcohol se eliminan con un lavado con etanol al 70% y el remanente se elimina por evaporación.
4. **Redisolución del ADN:** Una vez que se ha eliminado el etanol, el paso siguiente es hidratar el ADN para mantenerlo en solución. En el caso de emplear agua, el pH debe ser de 7 para permitir la redisolución completa del ADN y evitar una hidrólisis ácida. Cuando se utiliza una solución amortiguadora, es preferible utilizar una solución de Tris-HCl a 10mM y EDTA a 0,1M a un pH de 8,0 para almacenar el material. Cuando se está disolviendo el ADN es importante evitar el pipeteo y la agitación agresiva pues se pueden fragmentar moléculas de alto peso molecular. Una opción que evita la fragmentación consiste en incubar a 55 °C el ADN, de 1 a 2 horas con agitación suave.



Presta atención a las explicaciones del profesor o la profesora y ve haciendo un esquema detallado del proceso de extracción mientras vas avanzando en las distintas etapas, indicando en cada una de ellas:

- El nombre de la etapa.
- Objetivo.
- Reactivos empleados.
- Localización del ADN genómico dentro del tubo.
- Velocidades (en el caso de centrifugación), tiempos, temperaturas.





C: Valorar la calidad y cantidad del ADN extraído.

La cantidad y calidad del ADN extraído puede variar enormemente entre un individuo y otro. Puede variar, además, según el momento de recogida de la muestra, dándose el caso de que no se obtenga una gran cantidad de ADN/ml y no se puedan llevar a cabo aplicaciones posteriores que requieran gran cantidad de muestra. Antes de realizar otras pruebas sobre el ADN extraído es, pues, indispensable conocer la cantidad de ADN extraído y su calidad (pureza). Para ello, emplearemos el NanoDrop®, que es un espectrofotómetro de espectro total (220-750nm) que mide concentraciones de ácidos nucleicos con gran exactitud y reproducibilidad, sin necesidad de emplear cubetas (figura 4). Tan sólo requiere un volumen de muestra de 1-2µl y gracias a su pequeño tamaño y fácil manejo permite medir un gran número de muestras en poco tiempo.

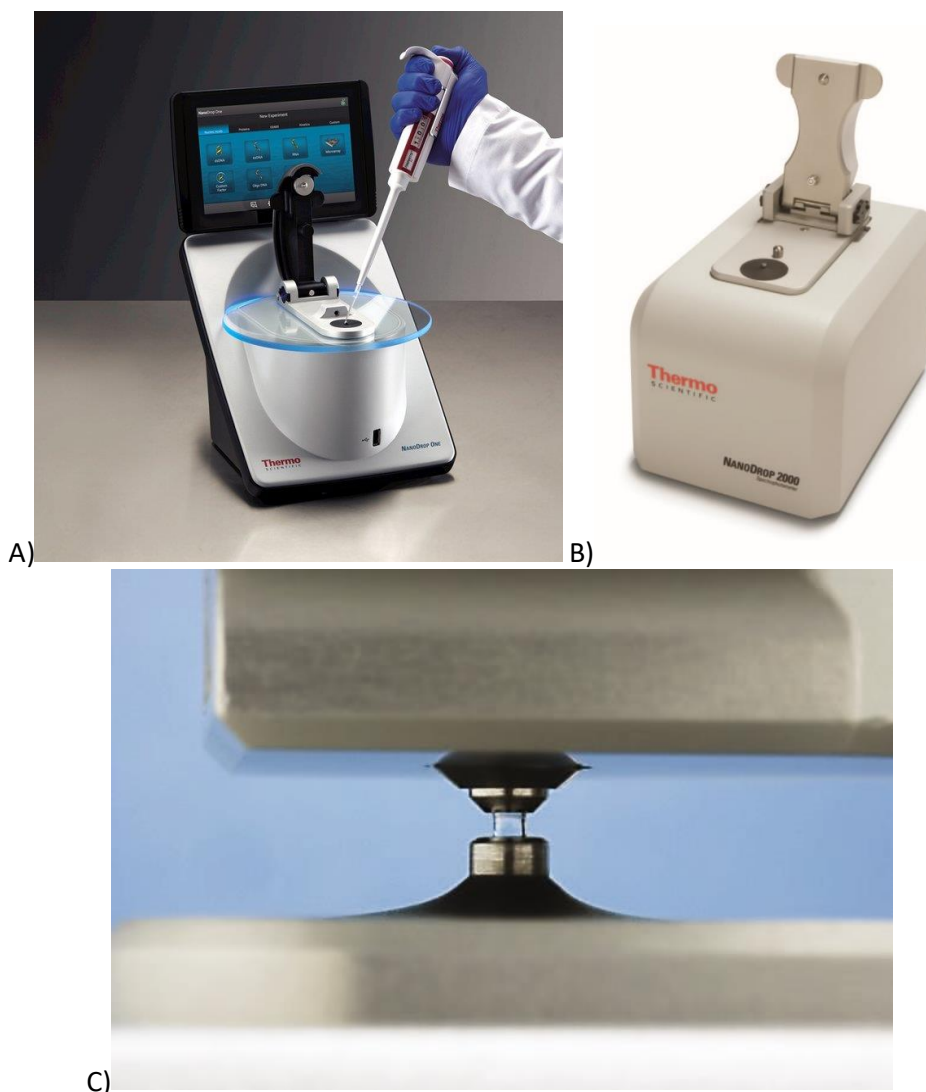


Figura 4. Distintos modelos de Nanodrop: A) NanoDrop™ One/One^c; B) NanoDrop™ 2000 y C) vista en detalle del puente de líquido entre los pedestales inferior y superior. Fuente: Thermo Fisher Scientific, Inc. Guía del usuario NanoDrop One. 2016.

Su funcionamiento se basa en el empleo de un sistema de retención de muestra que aprovecha la tensión superficial para formar un puente de líquido entre el pedestal inferior y el pedestal superior. En los espectrofotómetros NanoDrop, el pedestal superior es el extremo de una fibra óptica conectada a una fuente de emisión de Xenon. Ambos pedestales definen un preciso y estrecho paso óptico cuya longitud varía automáticamente con la concentración de la muestra,



permitiendo hacer mediciones en un rango muy amplio de concentraciones sin hacer diluciones. Esta característica lo hace idóneo para determinar la concentración y pureza de los ácidos nucleicos.

El software asociado al equipo incorpora una serie de aplicaciones específicas para el tipo de medidas que se desee realizar (concentración de ácidos nucleídos a 260 nm y su pureza usando la relación 260/280 -concentración de proteínas- o 260/230 – concentración de sales-).

Para medir la concentración de una muestra se han de seguir los siguientes pasos:

- Abrir el software de análisis (en ordenador o incorporado en el espectrofotómetro) “Nucleic Acid application”.
- Levantar el pedestal superior y limpiar ambos pedestales con papel de laboratorio.
- Depositar 1µl del medio en el que esté disuelto el ADN (debe tener el mismo pH y la misma fuerza iónica que la solución de ADN, generalmente, dH_2O o tampón) y cerrar el pedestal.
- Seleccionar “blank” para medir y almacenar el espectro de referencia.
- Limpiar con papel de laboratorio en ambos pedestales.
- Volver a levantar el pedestal superior.
- Depositar el volumen de muestra requerido en el pedestal inferior empleando una micropipeta. Para soluciones acuosas de ácidos nucleicos se recomienda emplear 1µl.
- Cerrar el pedestal superior e iniciar la medida espectral seleccionando “measure”, empleando el software asociado al equipo que dependerá del modelo empleado.
- Revisar la imagen espectral (figura 5) para averiguar la calidad de la muestra.
- Al acabar de medir todas las muestras, seleccionar “end experiment”.

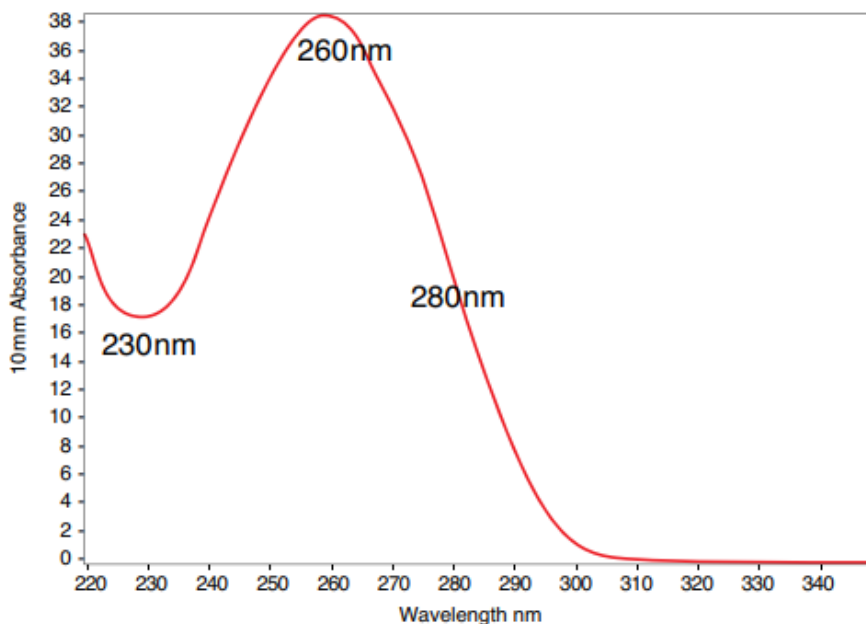


Figura 5. Espectro típico de ácidos nucleicos. Fuente: Thermo Fisher Scientific, Inc. Guía del usuario NanoDrop One. 2016.



Al acabar de medir todas las muestras obtenemos un gráfico con todos los espectros superpuestos y una tabla con la información de absorbancias, ratios de absorbancias (A260/A280) y las concentraciones calculadas por el propio software (figura 6).

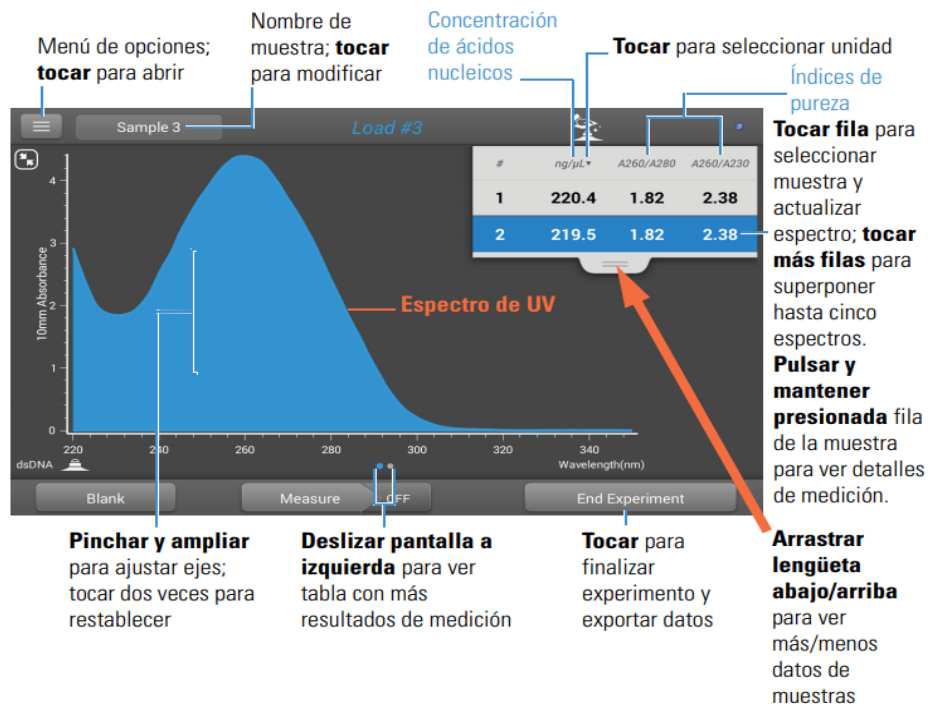


Figura 6. Información recogida por el software. Fuente: Thermo Fisher Scientific, Inc. Guía del usuario NanoDrop One. 2016.

La información proporcionada que nos interesa es:

- Concentración de ácidos nucleicos: se proporciona en la unidad seleccionada. Los cálculos se basan en una variación de la ecuación de la Ley de Beer que utiliza el valor de absorbancia de ácidos nucleicos corregido.
- Índice de pureza A260/A280: Un índice de pureza de alrededor de 1,8 se considera puro para ADN.
- Índice de pureza A260/A230: Para el ADN, un índice de pureza de entre 1,8 y 2,2 es considerado como puro.

Anota la siguiente información relativa a tu muestra:

A260:

A260/A280:

A260/A230:

[ADN]:

¿Tu muestra es de buena calidad?

A pesar de recibir la concentración ya calculada, conviene recordar la forma de calcularlo, basándonos en la Ecuación de Beer-Lambert, con la concentración despejada:



$$c = A / (\epsilon * b) \quad o \quad c = A * [1 / (\epsilon * b)] \quad o \quad c = A * f$$

Donde,

- c: concentración de analitos en moles/L o molaridad (M).
- A: absorbancia UV en unidades de absorbancia (AU).
- ϵ : coeficiente de absorptividad molar dependiente de longitud de onda, o coeficiente de extinción, expresado en L/mol-cm.
- b: camino óptico en cm.
- factor (f), en ng-cm/ μ l, = $1 / (\epsilon * b)$,
 - $ADNs_{factor} = 50 \text{ ng-cm}/\mu\text{l}$.
 - $ADNs_{factor} = 33 \text{ ng-cm}/\mu\text{l}$.
 - $ARN_{factor} = 40 \text{ ng-cm}/\mu\text{l}$.

$$\text{Así, } c_{ADN} = A_{260} * 50 \text{ (ng-cm}/\mu\text{l)}$$

Desafío para casa:

Extracción de ADN de frutas.

Basándote en el documento publicado en la página del Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC): <https://digital.csic.es/handle/10261/94991>

Explica las etapas seguidas, por qué las sigues y cuál es el paralelismo con lo que has hecho en esta práctica.

Bibliografía

- Alejos L.P., Aragón M.D.C, Cornejo A. *Extracción y purificación de ADN* <http://www.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/extraccion.pdf>.
- Distribuciones científicas Nessler S.A.L. *Preparación de muestras de ácido nucleico y proteína*: 2010. <http://www.dcnessler.com/marcas-catalogos/whatman/catalogo-whatman-06-preparacion-muestras-2010.pdf>.
- Matzumura P.G., González L., López A, Espino N. *Manual de prácticas de laboratorio. Técnicas Básicas de Biología Molecular*. 2013. Universidad autónoma metropolitana, Iztapalapa.
- Thermo Fisher Scientific, Inc. *Guía del usuario NanoDrop One*. Julio 2016.
- Ramos S. *Introducción e importancia de la extracción del ADN*. 2018. Blog analitek. <http://blog.analitek.com/extraccion-y-purificacion-de-adn-introduccion-e-importancia-de-la-extraccion-del-adn-0-0-1>.
- Protocolo kit comercial Danagene Saliva Kit. Ref.0603.41. <https://www.danagen.es/wp-content/uploads/2019/10/DANAGENE-SALIVA-PROTOCOLO-castellano.pdf>.
- Encyclopaedia Britannica, Inc, 1998. <https://www.britannica.com/science/nucleic-acid/Deoxyribonucleic-acid-DNA>.
- Thermo Fisher Scientific, Inc. *Guía del usuario NanoDrop One*. 2016. <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/3091-NanoDrop-One-User-Guide-v1.3-sw-SPANISH.pdf>.



PRÁCTICA 2: Estudio de polimorfismos VNTR del gen *PER3* y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Durante la primera práctica extrajimos ADN genómico a partir de una muestra de sangre de mamífero que contenía células nucleadas (linfocitos). En esta práctica, estudiaremos muestras celulares humanas (líneas celulares comerciales): amplificaremos el ADN correspondiente a regiones que contienen marcadores VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) por PCR (Polymerase Chain Reaction), y analizaremos los resultados gracias a una electroforesis en gel de agarosa. Revisaremos, además, varios conceptos teóricos, empezando por el concepto de marcador molecular.

En ocasiones, no se conoce exactamente cuál es el gen responsable de un fenotipo (característica física distintiva o enfermedad), pero sí podemos analizar múltiples regiones del genoma y asociar la presencia o ausencia de ciertas variaciones en su secuencia a la incidencia de esta condición fenotípica. Existen distintos tipos de variaciones que nos sirven de marcador: desde cambios en un único nucleótido en muchas regiones del genoma (SNPs: Single Nucleotide Polymorphism), hasta secuencias de varios nucleótidos que se caracterizan por estar repetidas más o menos veces. En este último grupo se encuentran los VNTRs, también llamados minisatélites. Son repeticiones de secuencias de 9 a 100 pares de bases que se repiten en tándem, es decir, unas a continuación de las otras, en número variable pero inferior a 50. Cada individuo tiene miles de VNTRs en su genoma, cada uno de los cuáles está repetido un número de veces concreto y específico para ese individuo. A veces, al explorar el patrón de repeticiones de diversos VNTRs, podemos observar que la presencia de un número concreto de repeticiones para un VNTR específico se asocia a un fenotipo. Así, podemos, sin necesidad de conocer el gen responsable del fenotipo, predecir el fenotipo a partir del número de repeticiones que posea el individuo en el VNTR, que será, pues, un marcador molecular útil para investigar la condición fenotípica en cuestión.

El objetivo del estudio de polimorfismos de VNTRs es, además del conocimiento propiamente dicho del estado del polimorfismo para un individuo, conocer si podemos asociarlo a un fenotipo. En este caso, nos centraremos en un polimorfismo VNTR en el gen *PER3*. Diversos estudios han relacionado las distintas variantes del polimorfismo VNTR del gen *PER3* con un fenotipo asociado al ritmo circadiano, es decir, con preferencias matutinas/vespertinas para la actividad. Asimismo, algunos estudios relacionan alguna de las variaciones de *PER3* con mayor incidencia de trastornos del sueño, y enfermedades como Alzheimer o incluso cáncer.

Objetivos:

A: Conocer los fundamentos de la PCR y las etapas a seguir.

B: Interpretar los resultados de la electroforesis: asignar un polimorfismo a cada individuo.

Material:

- EPIS
- Microcentrifuga
- Termociclador
- Micropipetas y puntas de micropipeta
- Agarosa
- Tampón TAE
- Cubetas de electroforesis
- Fuente de corriente
- Transiluminador
- Cinta
- Red Safe



- Tampón de carga
- Marcador de peso molecular
- Balanza
- Agua destilada
- ADN genómico (de otro grupo de prácticas)
- Hielo
- *Primers* (oligonucleótidos)
- Tubos PCR, TaqPol, dNTPs, Mg²⁺ → comercial, ya preparado

A: Conocer los fundamentos de la PCR y las etapas a seguir.

La técnica de la PCR, del inglés Polymerase Chain Reaction, consiste en amplificar el número de copias de una secuencia de nucleótidos, más o menos larga, de manera exponencial. Es decir, pasar de una copia a millones de copias para, posteriormente, trabajar (identificar su presencia o cuantificarla) con el producto de la reacción. Esta técnica simula el proceso de replicación que ocurre naturalmente en las células a la hora de sintetizar células hijas.

Etapas de la PCR

Tal y como ocurre de manera natural durante la replicación, el ADN de doble cadena se debe separar para dar lugar a dos cadenas sencillas y complementarias entre sí. Esto, en biología molecular se consigue por calor y se conoce como etapa de **desnaturalización**. La temperatura de desnaturalización debe ser muy alta (90-100°C) y dependerá de la proporción de bases C y G, puesto que éstas se unen por tres puentes hidrógeno en lugar de los dos que existen entre las bases A y T (figura 1).

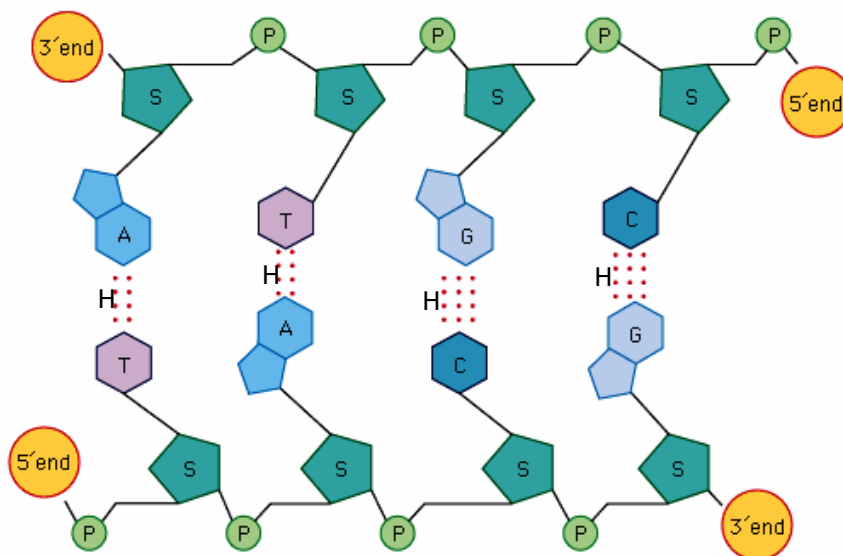


Figura 1. Detalle de una molécula de ADN. S: desoxirribosa (azúcar, pentosa), A: adenina, T: Timina, G: Guanina, C: Citosina, P: Grupo fosfato une los nucleótidos contiguos por enlaces fosfodiester, H: puentes de hidrógeno que mantienen unidas las cadenas complementarias. Fuente: modificada de Encyclopaedia Britannica, Inc, 1998.

Una vez ambas hebras están separadas, será necesario disminuir la temperatura (a alrededor de 50°C) para permitir la **hibridación de los primers** (u oligonucleótidos) en las regiones complementarias a su secuencia (hibridación es la unión "artificial", por complementariedad de bases, de dos secuencias de nucleótidos de origen distinto). Es importante que la temperatura a la que hibridan ambos *primers* sea cercana ($\pm 5^\circ\text{C}$) para que ambos hibriden correctamente a la temperatura fijada. Una vez los oligonucleótidos se han unido a la hebra molde, la enzima



polimerasa encargada de la reacción (generalmente Taq polimerasa) comienza a sintetizar las hebras hijas complementarias en una etapa que se conoce como **elongación** a una temperatura intermedia entre la de desnaturalización y la de hibridación, de alrededor de 70°C, que dependerá de la polimerasa que se emplea (Tª óptima Taq Polimerasa: 72°C). Así, en cada ciclo de PCR, se duplica la cantidad de copias de la secuencia de ADN de interés. La figura 2 esquematiza el proceso.

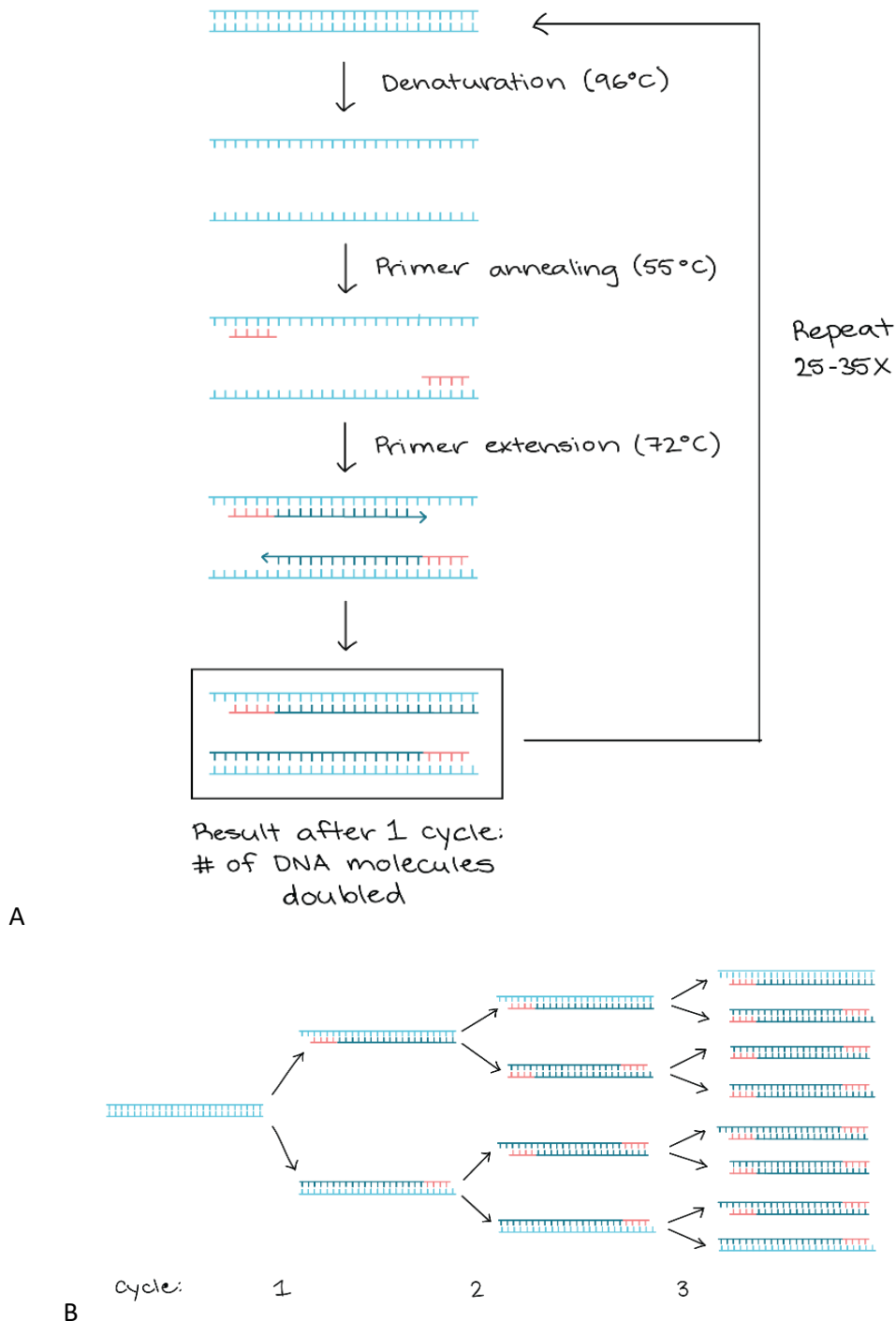


Figura 2. A) fases de una PCR: desnaturalización en la que se separa el ADN de doble cadena; Hibridación de los *primers* (en rojo) y elongación de la nueva cadena gracias a la Taq polimerasa y empleando dNTPs como sustrato, en un medio tamponado y provisto de cationes divalentes B) duplicación de la cantidad de ADN en cada ciclo. Imágenes extraídas de Khan Academy. Polymerase Chain Reaction.



A continuación (figura 3), se representa el esquema típico de la reacción de PCR (un ciclo), con la temperatura como eje de ordenadas y el tiempo como eje de abscisas.

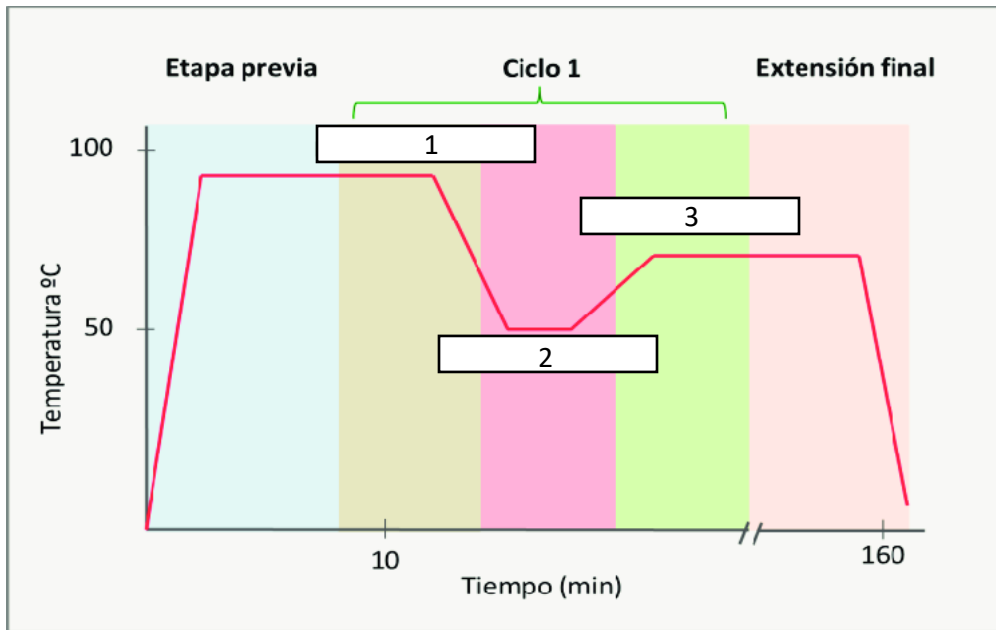


Figura 3. Esquema de las fases de una PCR representando los cambios de temperatura a lo largo del tiempo. Fuente: modificada de https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Esquema-temporal-de-una-reaccion-de-PCR_fig2_281436261.

Nombra las etapas de la figura anterior, en inglés y español e indica los tiempos y temperaturas que emplearemos durante esta práctica y el número de ciclos totales.

1-

2-

3-

Nº de ciclos:

Las etapas de desnaturalización, hibridación y elongación que constituyen cada uno de los ciclos, van precedidas por una etapa previa, antes del primer ciclo, de establecimiento de la temperatura correcta de desnaturalización (*hot-start*: para activar la polimerasa), y seguidas, en el último ciclo, por una extensión final.

Todos los cambios de temperatura extremos y bruscos, se llevan a cabo gracias al **termociclador** (figura 4). Se trata de un equipo electrónico que dispone de unos huecos en los que se introducen los tubos de PCR y que permite regular los tiempos de incubación y las temperaturas, para cada una de las etapas. Por otra parte, tras finalizar la reacción permite conservar los tubos a 4°C (como si estuvieran en el refrigerador), hasta que se trabaja con las muestras.



Figura 4. Termociclador. Permite el cambio brusco y rápido de temperaturas. Fuente: modificada de Wikipedia, Reacción en cadena de la polimerasa, y iStock.

Muestras

A la hora de hacer una reacción PCR en el termociclador, se analizarán siempre:

- Las muestras “problema”: que son aquellas en las que queremos averiguar la presencia/ausencia o la cantidad de una secuencia de ADN concreta y conocida.
- Un control positivo: añadimos una muestra en la que sabemos que sí está la secuencia de ADN que queremos amplificar y a qué concentración. Si sale positiva, nos permitirá comprobar que los reactivos empleados están en buen estado y que la reacción de amplificación por PCR ha tenido lugar correctamente.
- Un control negativo: es una muestra sin ADN en la que añadimos todos los demás componentes. Si sale negativa, nos permitirá comprobar que los reactivos no están contaminados.

En nuestro caso, no queremos conocer la presencia o la ausencia de una secuencia, si no que queremos estudiar el número de veces que se repite un polimorfismo VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) en el gen *PER3*. Todos los ADNs analizados presentan la secuencia del VNTR pero habrá quien tenga 4 veces la secuencia repetida en tándem, o 5 veces.

Componentes de la PCR

Necesitaremos, pues, para una correcta amplificación a partir del ADN original:

- El ADN que queremos amplificar (copiar, reproducir): ADN molde.
- Oligonucleótidos complementarios a las secuencias que flanquean el ADN molde para delimitar la secuencia que queremos amplificar → *primers forward* y *reverse*.
- H₂O destilada o Milli-Q (ultra pura).
- Enzima que sintetizará la nueva hebra a partir del ADN molde: ADN polimerasa (Taq polimerasa).
- Sustrato para generar nueva síntesis: dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP).
- Tampones, cationes divalentes (Mg²⁺).



Todos estos componentes se tienen que introducir en tubos de PCR. Como hablamos de cantidades muy pequeñas, es muy fácil cometer errores de pipeteo. Para evitarlo, generalmente se suele preparar lo que se conoce como *Master Mix* que no es más que una mezcla “madre” del volumen total que se necesitará de todos los componentes, excepto el ADN, calculado para el total de muestras que se analizarán. Después, se alicuotará en tubos de PCR en los que, finalmente, se añadirá la muestra de ADN.

¿Por qué no se puede introducir el ADN en el *Master Mix*?

Ejemplo: Imaginemos que vamos a preparar 15 muestras en tubos de PCR (estériles), con un volumen total de 25µL, para su análisis. En cada una de ellas necesitaremos:

- ADN molde (10-50 ng/µL*) → 1µL
- *Primer forward* (20µM) → 2,5µL
- *Primer reverse* (20µM) → 2,5µL
- Taq polimerasa (5 U/µL) → 0,2µL
- Mezcla de dNTPS (1 mM c/u) → 0,5µL
- Tampón de reacción (10X) → 2,5µL
- MgCl₂ (25 mM) → 1,5µL
- H₂O → Hasta completar los 25µL ** [25-(1+2,5+2,5+0,2+0,5+2,5+1,5)] → 14,3µL

* Las concentraciones de cada uno de los volúmenes varían y han de ajustarse para cada reacción (tipo de muestra, concentración del ADN original, concentraciones del stock de los productos, etc.)

** En el control negativo, el volumen de ADN se sustituye por H₂O.

Pues bien, en lugar de pipetear cada uno de los volúmenes 15 veces + 1 para el control negativo (sin ADN molde) + 1 para el control positivo (que sabemos que sí tiene la secuencia que queremos amplificar), haremos la mezcla de todos los reactivos una sola vez, en lo que se conoce como *Master Mix* y haremos las alicuotas (figura 5).

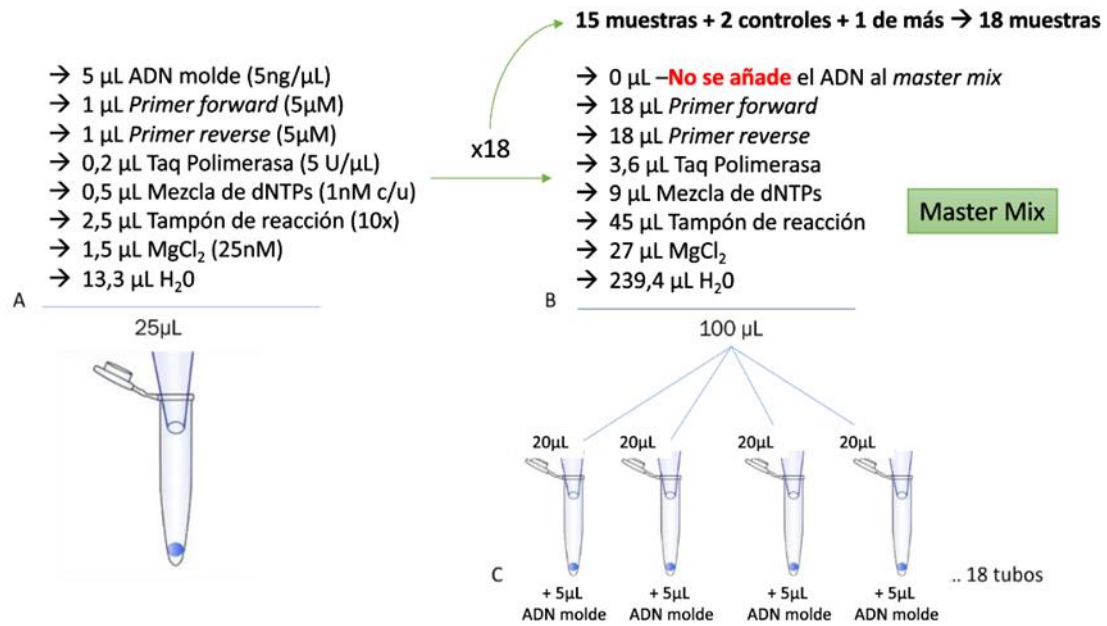


Figura 5. Preparación de un *Master Mix* para el conjunto de pruebas que se vayan a realizar, en el caso de este ejemplo, 15. A) volúmenes a añadir para una única muestra; B) volúmenes a añadir para el total de las muestras; C) alicuotamos los volúmenes en un tubo de PCR estéril para cada muestra y añadimos el ADN molde que corresponda (si el tubo tiene 25µL y 5 corresponde al ADN, añadiremos 20µL del *Master Mix*).

Para agilizar y simplificar el proceso, emplearemos unos tubos comerciales en los que la Taq polimerasa, dNTPS, tampón y cationes ya se encuentran mezclados y liofilizados y forman una bolita blanca en el fondo del tubo. Así, en esta práctica, no consideraremos estos componentes para calcular las proporciones. A continuación, podéis ver los volúmenes a añadir, para esta práctica concreta, de cada uno de los componentes:

- ADN molde → 5µL
- *Primer forward* → 1µL
- *Primer reverse* → 1µL
- Taq polimerasa, dNTPS, tampón y cationes → ya mezclado y liofilizado → 0 µL
- H₂O → 18µL

Calcula los volúmenes que añadirás para hacer el *Master mix* necesario para las muestras de tu grupo. ¿Qué volumen alicuotarás en cada tubo de PCR final y qué volumen de ADN molde añadirás?

NOTA: al añadir la alícuota del *Master Mix* y el ADN en el tubo de PCR con el liófilo, es conveniente **pipetear suavemente** para no hacer burbujas ni salpicar en las paredes del tubo parte de la solución.

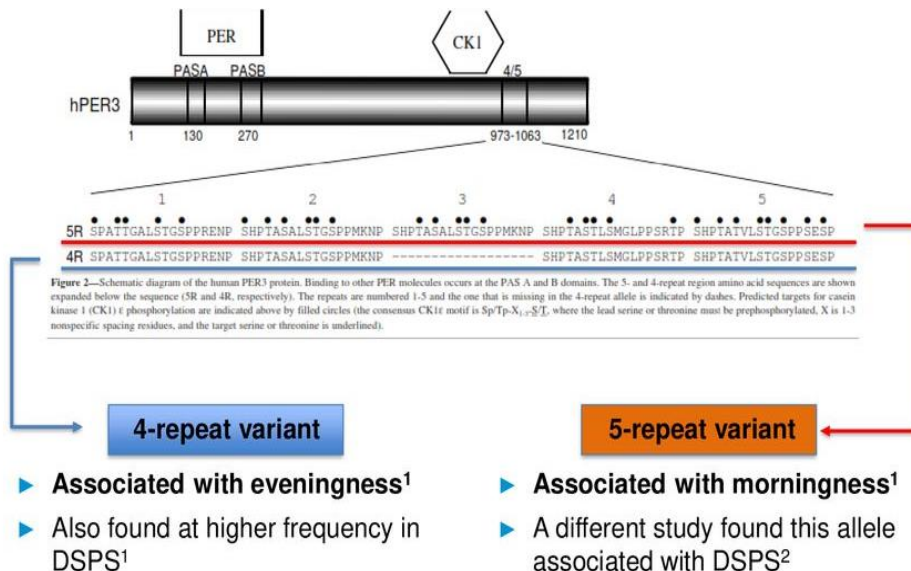


B: Interpretar los resultados de la electroforesis: asignar un polimorfismo a cada individuo.

La evaluación de la parte teórico-práctica correspondiente a la electroforesis, se realizará en la práctica siguiente (parcial correspondiente a prácticas 3 y 4). No obstante, introduciremos en esta práctica los conceptos esenciales para poder interpretar la migración de los fragmentos de ADN en el gel de agarosa (ver power point). Emplearemos:

- Agarosa al 1,2%: 1,2g de agarosa diluidos en 100ml de tampón TAE.
- Primer carril: 4 µL de marcador de peso molecular de 1Kb.
- Carriles siguientes: 10 µL de cada una de las muestras + 2 µL de tampón de carga, mezclados en papel Parafilm.

Como decíamos antes, el objetivo de esta práctica es emplear la PCR y la electroforesis para estudiar un polimorfismo VNTR. Es decir, queremos averiguar el número de veces que se repite una secuencia de ADN. Todos los ADNs analizados presentan la secuencia del VNTR, pero habrá muestras que la tengan repetida en tándem 4 veces y muestras que la tengan repetida 5 veces. Los individuos que sean homocigotos para las 4 repeticiones se describen como PER3^{4/4}, los homocigotos con 5 repeticiones como PER3^{5/5} y los heterocigotos como PER3^{4/5} (figura 6).



1. Archer SN, et al. A length polymorphism in the circadian clock gene Per3 is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. *Sleep* (2003) 26:413-415.

2. Pereira DS, et al. Association of the length polymorphism in the human Per3 gene with the delayed sleep phase syndrome: does latitude have an influence upon it? *Sleep* (2005) 28:29-32.



Figura 6. Secuencia del VNTR estudiado y polimorfismos posibles. Fuente: miniPCR Sleep Lab™. *Science for everyone, everywhere.*

Así, las distintas opciones que podrán encontrarse tras la electroforesis son:

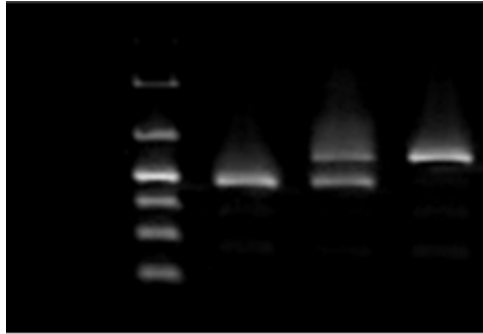
- Si la muestra analizada corresponde a una muestra homocigota PER3^{4/4} para el número de copias del VNTR, obtendremos una única banda de aproximadamente 200pb.
- Si la muestra analizada corresponde a una muestra homocigota PER3^{5/5} para el número de copias del VNTR, obtendremos una única banda de 250pb.



- Si la muestra analizada corresponde a una muestra heterocigota $PER3^{4/5}$, es decir, que en uno de los cromosomas homólogos tiene 4 número de copias y en el otro cromosoma homólogo tiene 5 número de copias, encontraremos dos bandas, correspondientes a ambos polimorfismos.

Observa la imagen y relaciona cada genotipo con el carril correspondiente:

- $PER3^{4/4}$
- $PER3^{5/5}$
- $PER3^{4/5}$
- Carril 1
- Carril 2
- Carril 3



Fuente: cedida por el profesor Joan Climent.

Indica la frecuencia, en tu grupo de prácticas, de cada uno de los resultados posibles:

- 1- $PER3^{4/4}$
- 2- $PER3^{5/5}$
- 3- $PER3^{4/5}$

Bibliografía

- Encyclopaedia Britannica, Inc, 1998. <https://www.britannica.com/science/nucleic-acid/Deoxyribonucleic-acid-DNA>.
- Khan Academy. *Polymerase Chain Reaction*. <https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>.
- miniPCR Sleep LabTM *Science for everyone, everywhere*. <https://slideplayer.com/slide/14178482/>.
- Archer SN, Schmidt C, Vandewalle G, Dijk DJ. *Phenotyping of PER3 variants reveals widespread effects on circadian preference, sleep regulation, and health*. 2018. Sleep Med Rev. 40:109-126. doi: 10.1016/j.smrv.2017.10.008.



PRÁCTICA 3: Digestión enzimática (RFLP) de ADN humano para detectar un polimorfismo de nucleótido único (SNP) en el gen *TAS2R38*, responsable de la capacidad de detectar el sabor amargo e identificación de las variantes asociadas a cada fenotipo por electroforesis.

En esta práctica vamos a identificar polimorfismos (variantes) en un único nucleótido (SNP) en el gen *TAS2R38*, responsable de la capacidad de detectar el sabor amargo, mediante el uso de enzimas de restricción y electroforesis. Durante el desarrollo de esta práctica digeriremos ADNs previamente extraídos de diversas líneas celulares y diluidos a la concentración óptima durante la práctica anterior, para aprender tanto el modo de acción de las enzimas de restricción, como la interpretación de resultados de la técnica de RLFP, empleando una electroforesis en gel de agarosa para observar los resultados. Así, podremos identificar los distintos SNPs y asociarlos con su fenotipo correspondiente.

Objetivos:

A: Entender el concepto de SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

B: Conocer los fundamentos de la RFLP y la utilidad de las enzimas de restricción en biotecnología. Llevar a cabo la digestión enzimática del ADN.

C: Conocer el principio de separación y detección de ácidos nucleicos en geles de agarosa, empleando la electroforesis, así como aprender a determinar el tamaño y a interpretar los resultados de los fragmentos de ácidos nucleicos separados en dichos geles.

Material

- EPIS
- Microcentrífuga
- Micropipetas y puntas de micropipeta
- Agarosa
- Tampón TAE
- Cubetas de electroforesis, fuente de corriente, transiluminador
- Red Safe / GelSafe
- Tampón de carga
- Marcador de peso molecular
- Enzima de restricción: HAEIII
- Incubador (37°C)
- Balanza
- Agua destilada
- ADN amplificado y purificado
- Hielo



A: Entender el concepto de SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

Cuatro nucleótidos especifican el código genético: A (adenina), C (citosina), T (timina) y G (guanina). Una mutación puntual ocurre cuando un nucleótido es reemplazado por otro nucleótido. Por ejemplo, cuando una A se reemplaza por una C, T o G (figura 1). Cuando dicha mutación está presente en al menos el 1% de la población, se conoce como Polimorfismo de Nucleótido Único o SNP (pronunciado "snip").

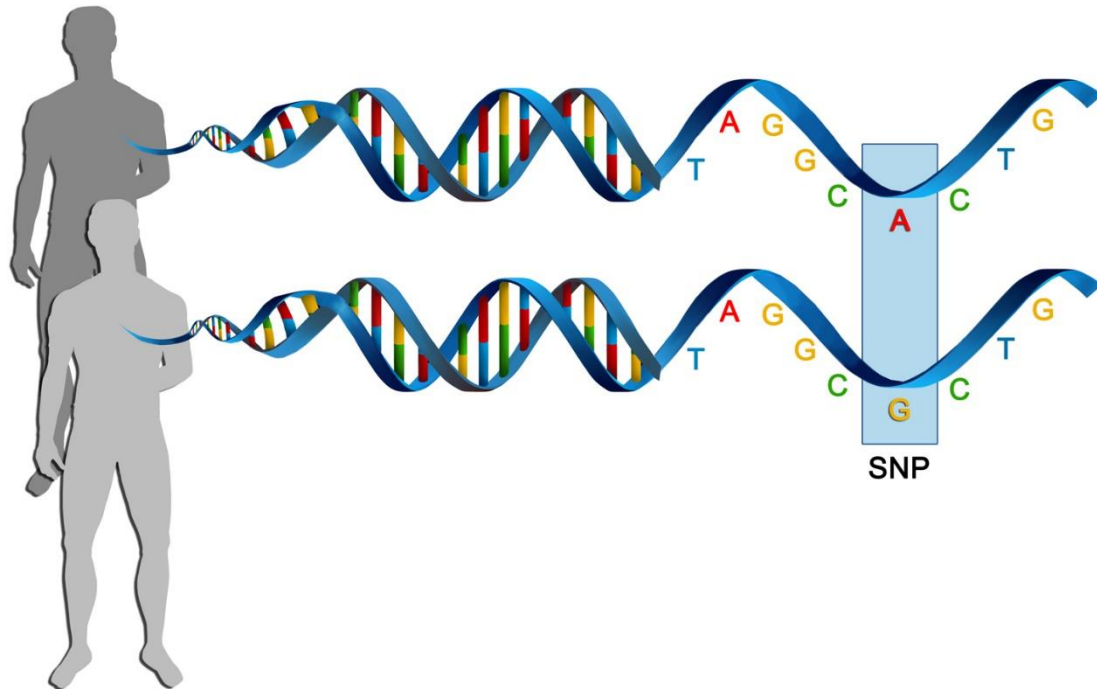


Figura 1. Dos individuos presentan una variación en un único nucleótido (SNP) en la región mostrada en el cuadrado. Fuente: Mendoza-León A. *Farmacogenética en dermatología*. 2018.

Los SNP son el tipo más común de variación genética entre las personas. Ocurren más frecuentemente en las regiones no codificantes de los genes y en regiones entre genes, pero también pueden ocurrir en la secuencia de codificación de un gen, donde pueden afectar a la síntesis del producto proteico de ese gen. Por ejemplo, la anemia de células falciformes se produce por un polimorfismo de un solo nucleótido que produce el remplazo del aminoácido hidrófilo ácido glutámico por el aminoácido hidrófobo valina en la cadena de hemoglobina de la β -globina.

En esta práctica, vais a analizar la presencia o ausencia del SNP que se produce en la posición 145 del gen *TAS2R38*, responsable de la sensibilidad a un compuesto que tiene sabor amargo: el PTC (phenylthiocarbamide). Previamente es necesario hacer la amplificación del gen *TAS2R38* mediante una PCR con las siguientes condiciones:

- Añadir, en un tubo de PCR:
 - 22,5 μ L del Mix de Reacción (provisto por el kit).
 - 2,5 μ L diluido a 40ng/ μ L en la Práctica 2 (contiene, en total, 40 x 2,5 =100 ng de ADN).
- Llevar a cabo la PCR con las siguientes condiciones: 10 min – 95°C de desnaturalización inicial; 30s – 95°C desnaturalización; 45s – 64°C hibridación; 45s – 72°C elongación; 10 min – 72°C elongación final; 4°C – infinito. 35 ciclos.



Tras la PCR, el producto obtenido deberá ser purificado mediante unión a membranas a través del uso de columnas para que no haya interferencias con la digestión, siguiendo el procedimiento detallado por el profesor o la profesora.

Anota las etapas a seguir para la purificación del producto de PCR:

El objetivo de la purificación es:

Existe una variabilidad en la población en la sensibilidad al compuesto amargo PTC. Este hecho fue descubierto en 1931 en una serie de eventos que implican por un lado una curiosidad científica y por otro lado una cuestión de seguridad en el laboratorio. Un químico llamado Arthur Fox estaba mezclando una sustancia química en polvo cuando accidentalmente dejó que un poco del polvo se liberara en el aire. Un colega cercano exclamó que qué amargo sabía el polvo, pero Fox (que estaba más cerca de la sustancia química) no detectó ningún sabor amargo. Interesados, ambos hombres se turnaron para probar el químico. Fox siguió encontrando el químico insípido, mientras que su colega lo encontró amargo. Luego, Fox lo dio a probar a un gran número de personas. Nuevamente encontró una mezcla de "catadores" y "no catadores" y publicó sus hallazgos. Esto atrajo el interés del genetista L.H. Snyder, quien probó el compuesto en distintas familias y formuló la hipótesis de que el estado de catador / no catador estaba determinado genéticamente.

La capacidad de detectar el compuesto PTC se encuentra en aproximadamente el 70% de las personas evaluadas, mientras que el otro 30% no puede detectar el sabor amargo. El gen *TAS2R38* tiene dos alelos: el alelo dominante catador (T), que confiere la capacidad de detectar el sabor amargo del PTC, y el alelo recesivo no catador (t). Así, los genotipos y fenotipos posibles son:

- Catadores del PTC, que pueden ser:
 - homocigotos dominantes: TT.
 - heterocigotos: Tt.
- No catadores, que deben ser homocigotos recesivos: tt.

La secuenciación de la región codificante del gen *TAS2R38* reveló que los alelos PTC catadores y no catadores del sabor amargo pueden diferir en 3 aminoácidos distintos debido a SNPs en 3 ubicaciones distintas (tabla 1).



Tabla 1. Relación de variaciones en localizaciones específicas en el gen *TAS2R38* con la capacidad de detectar el sabor amargo. Extraída de Bioted. *Protocolo Explorando la Genética del Gusto: Análisis del SNP del gen PTC por PCR*. Ref.PCRPTC.

Posición	Cambio en nucleótido	Cambio en codón	Cambio en aminoácido
Nucleótido	No-catador > catador	No-catador > catador	No-catador > catador
145	G > C	GCA > CCA	Alanina > Prolina
785	T > C	GTT > GCT	Valina > Alanina
886	A > G	ATC > GTC	Isoleucina > Valina

Se encuentran 5 versiones en todo el mundo: AVI, AAV, AAI, PAV, PVI, llamados así por la combinación de aminoácidos presentes en el gen. Los dos haplotipos más comunes son AVI y PAV, que representan no catadores y catadores, respectivamente. Los cambios en la secuencia de aminoácidos alteran la forma del receptor del compuesto PTC, lo que determina la fuerza con que éste se puede unir. Como todas las personas tienen dos copias de cada gen, las combinaciones de variantes del gen del sabor amargo determinan si alguien encuentra el PTC intensamente amargo, algo amargo o sin sabor. Esto puede cuantificarse aproximadamente mediante una prueba de sabor o caracterizarse con mayor precisión determinando los nucleótidos en las posiciones 145, 785 y 886.

B: Conocer los fundamentos de la RFLP y la utilidad de las enzimas de restricción en biotecnología. Llevar a cabo la digestión enzimática del ADN.

Una forma de detectar un SNP es usar enzimas de restricción. Las enzimas de restricción, también llamadas endonucleasas, fueron descubiertas a finales de 1960. Se producen de manera natural en las bacterias como mecanismo de defensa contra infecciones víricas, de modo que estas enzimas reconocerían el ADN exógeno y lo cortarían [el propio ADN bacteriano no es cortado puesto que está metilado (mecanismo epigenético)]. Existen varios tipos de enzimas, siendo las endonucleasas tipo II las más comunes. Las enzimas de restricción se nombran siguiendo una nomenclatura especial que deriva de una combinación del género de la bacteria de la que se extrajo, la especie, la cepa y el orden de aislamiento con respecto al total de enzimas extraídas del mismo organismo (tabla 2). Por ejemplo, en la enzima EcoRI:

- E: género *Escherichia*.
- Co: especie *coli*.
- R: cepa RV 13.
- I: **primera** endonucleasa aislada de esta cepa.

Tabla 2. Ejemplo de enzimas de restricción, bacterias de las que se obtienen y secuencias de reconocimiento. Las flechas indican los puntos de corte del ADN. Extraída de *Digestión de DNA usando enzimas de restricción*.

Fuente	Enzima de restricción	Sitio de reconocimiento
<i>Escherichia coli</i>	EcoRI	5' GAATTC 3' 3' CTTAAG 5' ↓ ↑
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	BamHI	5' GGATCC 3' 3' CCTAGG 5' ↓ ↑
<i>Haemophilus influenzae</i>	HindIII	5' AAGCTT 3' 3' TTCGAA 5' ↓ ↑



Las enzimas de restricción son capaces de reconocer y cortar secuencias específicas de ADN de doble cadena con unos patrones de corte determinados. Estas enzimas se emplean en la técnica de la RFLP, cuyas siglas vienen de Restriction Fragment Length Polymorphism, en español, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción. Es decir, que las enzimas de restricción reconocen y cortan secuencias que se sabe que varían de un individuo a otro (polimorfismo) por constituir alelos diferentes o por tener una mutación que implique una condición patológica (individuos enfermos) respecto de la secuencia normal (individuos sanos). Así, algunos individuos presentarán un polimorfismo con la secuencia de nucleótidos reconocida por las enzimas y su ADN será cortado, y otros individuos presentarán otro polimorfismo cuya secuencia no será reconocida y, por lo tanto, no será cortada por las enzimas de restricción. Esto nos permitirá identificar la variante (la secuencia) de los distintos individuos en función de si la enzima ha reconocido y cortado la secuencia o no, lo cual podremos saber en función del patrón de bandas resultante tras realizar una electroforesis.

Como decíamos, estas enzimas reconocen y cortan secuencias específicas de ADN de doble cadena. Estas secuencias, si bien son específicas para cada enzima, tienen ciertas propiedades comunes:

- Son secuencias cortas de 4-8pb.
- Son palindrómicas (5'-3' = 3'-5'; ej. 5'GAATTC3'/3'CTTAAG5').

Cuando la enzima de restricción o endonucleasa reconoce la secuencia específica, entonces realiza un corte. Este corte puede ser de dos tipos. El primero es el que se muestra en la tabla 2, marcado con flechitas en la columna "sitio de reconocimiento". Como veis, se trata de un corte asimétrico de modo que, al separarse los fragmentos, quedan dos colas o extremos de cadena sencilla y complementarios. Estos extremos se llaman extremos cohesivos y, dado que son complementarios, pueden unirse espontáneamente con la ayuda de una ADN ligasa. Se llaman también "sticky ends". Este principio es el que se emplea para transformar bacterias insertando plásmidos en los que se ha incluido un gen que nos interesa clonar. Tanto el plásmido como el ADN del que queremos extraer el gen de interés se cortan con la misma enzima y los extremos cohesivos del plásmido y del gen, que son complementarios, se unen (figura 2).

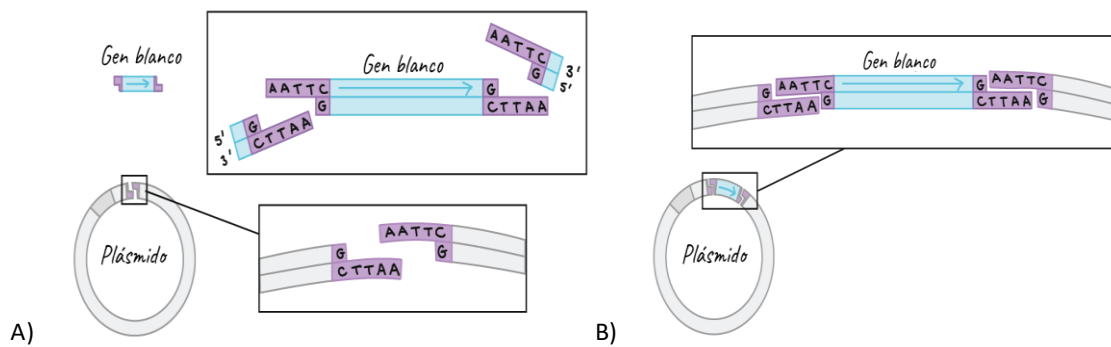


Figura 2. Esquema que representa A) el corte del plásmido y del gen con la misma enzima de restricción, dejando extremos cohesivos que B) permiten su unión por complementariedad de bases, dentro del plásmido. Imágenes extraídas de Khan Academy. *Las enzimas de restricción y la ADN ligasa.*



Otro tipo de corte es el que produce extremos romos (figura 3B). En este tipo de corte, se cortan ambas cadenas en línea recta y ambos extremos son de doble cadena. En la figura 3 se representan ambos tipos de corte.

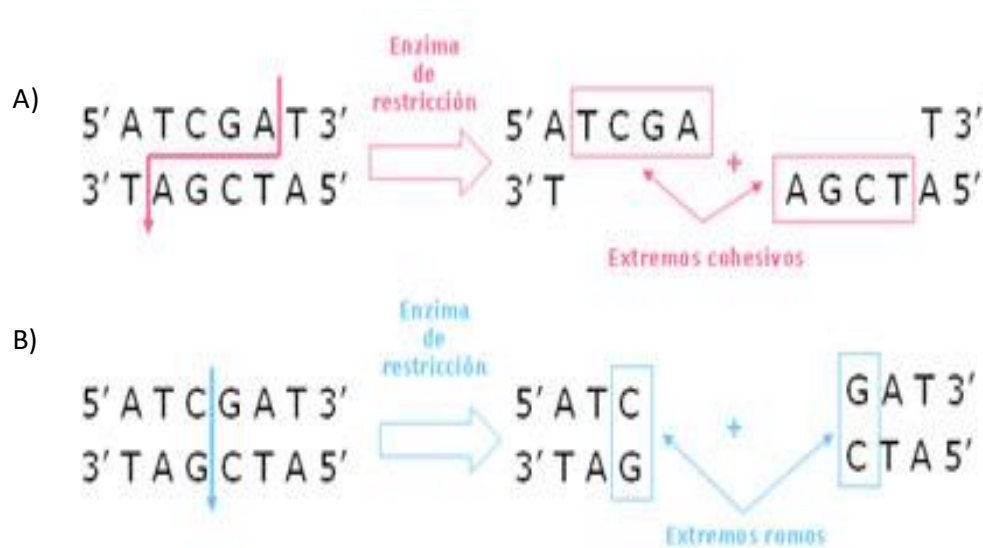


Figura 3. Esquema que representa A) un corte que produce extremos cohesivos y B) un corte que produce extremos romos. Fuente:

<http://hiscience.pbworks.com/w/page/114464500/4%20ESO%20ENERO%202017>.

La propiedad de reconocimiento y corte de estas enzimas de origen bacteriano puede emplearse para elaborar librerías de ADN o genotecas que, muy resumidamente, son colecciones en las que múltiples fragmentos de ADN (genes), flanqueados por sitios de restricción (secuencias reconocibles por las enzimas de restricción) se extraen e incorporan en plásmidos que, posteriormente se clonarán, es decir, se multiplicarán junto con la proliferación de las bacterias en cultivo. Así, finalmente se dispondrá de miles de copias del gen de interés y de su producto proteico (ejemplo: síntesis de insulina).

Otra aplicación muy importante de las enzimas de restricción es usar su capacidad de reconocimiento y corte de secuencias para identificar polimorfismos, dando lugar a la técnica de **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism) o polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción. Aquí, las enzimas de restricción se emplean para identificar los distintos alelos o el gen sano / enfermo, que podrán ser reconocidos o diagnosticados en función del patrón de corte que generan estas enzimas.

Por ejemplo, imaginemos una enzima capaz de reconocer y de cortar la secuencia palindrómica de un gen $5' \text{-AGCTCGAGCT-3'}$ (sólo se representa una de las cadenas para simplificar) generando estos dos fragmentos: AGC y TCGAGCT. Sabemos que una enfermedad es debida a una mutación en el mismo gen, con un cambio de nucleótido $T \rightarrow A$, siendo la secuencia del gen mutado: $5' \text{-AGCACGAGCT-3'}$. En este caso, al incubar el ADN con la misma enzima de restricción, ésta no podrá reconocer la secuencia y no podrá realizar cortes, de modo que encontraremos un único fragmento (AGCAGCT) en lugar de los dos que obtendríamos tras digerir el ADN sano con la enzima. De este modo, podemos identificar la variante sana o enferma por el número de fragmentos generados tras la digestión con una enzima, siempre que conozcamos la secuencia de reconocimiento de la enzima y el punto de corte. La separación y visualización de los

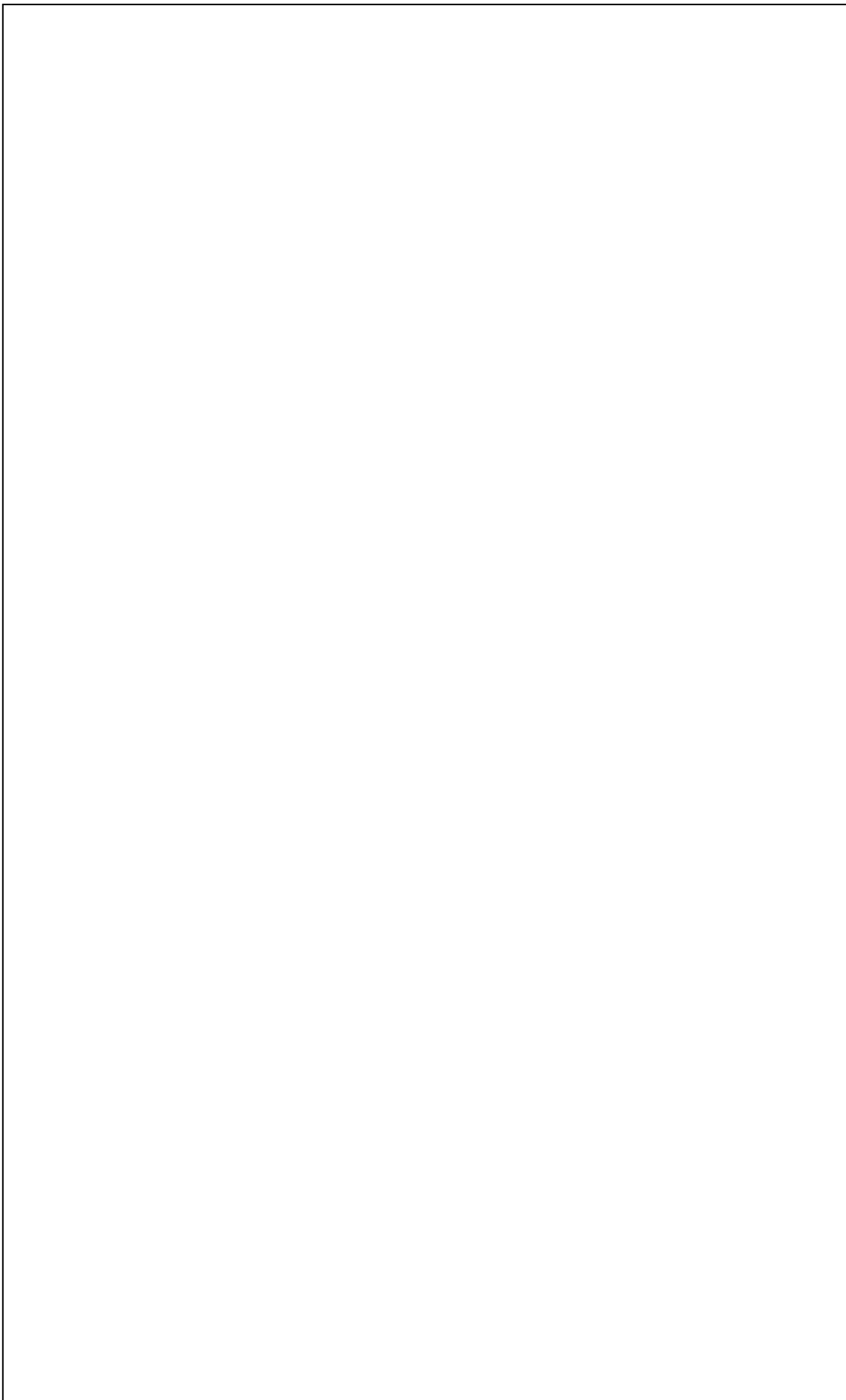


fragmentos generados tras incubar una muestra de ADN con una enzima de restricción se hace gracias a una electroforesis, cuyo fundamento veremos a continuación.

En el ejemplo del gen PTC, la enzima HaeIII solo corta el alelo catador (T) con la capacidad de detectar el sabor amargo (5'-GGCG-GCCACT-3'). El polimorfismo presente en el alelo no catador (t), carente de la capacidad de detectar el sabor amargo (5'-GGCG-GGCACT-3'), se produce como un cambio en una única base precisamente en el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción, por lo que HaeIII no puede digerir el ADN no catador. La secuencia del gen *TAS2R38* tiene 221pb. Si la enzima HaeIII digiere el ADN (alelo catador), se generarán dos fragmentos de 44 y 177 pb, respectivamente. El alelo no catador no es reconocido por la enzima y, por lo tanto, tras la digestión, encontramos únicamente el fragmento de 221pb.

Presta atención a las explicaciones del profesor o la profesora y escribe los pasos seguidos para la digestión, incluyendo:

- Las muestras que se analizan (controles y desconocidos).
- Los componentes que intervienen en la reacción.
- Volúmenes.
- Tiempos y temperaturas.
- Resultado esperado de la incubación para los controles, muestras de catadores, no catadores y heterocigotos.





C: Conocer el principio de separación y detección de ácidos nucleicos en geles de agarosa, empleando la electroforesis, así como aprender a determinar el tamaño y a interpretar los resultados de los fragmentos de ácidos nucleicos separados en dichos geles.

La electroforesis es una técnica de separación de sustancias, en nuestro caso ácidos nucleicos, basada en el movimiento de los componentes a través de un gel poroso (de agarosa) gracias a la aplicación de un campo eléctrico. El funcionamiento es muy sencillo: si en el polo negativo de un campo eléctrico colocamos muestras de ácidos nucleicos que, recordemos que están cargados negativamente por los grupos fosfato, éstos migrarán hacia el polo positivo. Por otra parte, dado que el gel de agarosa es poroso, la velocidad de migración dependerá del tamaño de los fragmentos de ADN: los fragmentos más pequeños migrarán más rápido que los grandes y, por tanto, en un tiempo concreto de migración, habrán llegado más lejos. La figura 4 ilustra el funcionamiento de la electroforesis.

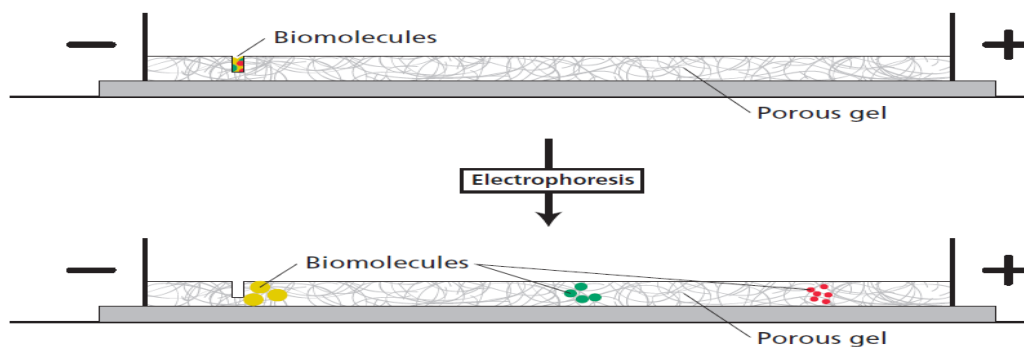


Figura 4. Migración de moléculas de ADN en un gel de agarosa, durante una electroforesis. Los fragmentos, con carga negativa, migran hacia el polo positivo siendo los más pequeños los que más rápido atraviesan el gel. Fuente: Amgen Foundation. *Laboratory 1.2: Gel electrophoresis*. 2013. Capítulo 1.

Durante esta práctica prepararéis un gel de agarosa, introduciréis una muestra resultante de cada una de las digestiones llevadas a cabo en el **objetivo B** de la práctica, “correréis” la electroforesis y observaréis e interpretaréis los resultados.

Veamos los protocolos a seguir para las distintas fases del **objetivo C**:

1. *Preparar el gel de agarosa al 3% (cuanto más concentrado, menos poroso y más tiempo tardarán las moléculas en migrar una distancia determinada, pero mejor se separan los tamaños).*
 - Preparar la solución de agarosa (figura 5):
 - Pesar 3g de agarosa en polvo e introducirlo en un matraz Erlenmeyer.
 - Añadir 100 ml de tampón TAE 1x.
 - Calentar al microondas en dos tandas de 30s. No debe llegar a hervir. Entre ambas tandas removemos un poco (NOTA: ¡Usar guantes!). La mezcla estará lista cuando sea transparente y sin grumos.
 - Dejar enfriar un poco (hasta que se pueda tocar) y añadir 3µl de Red Safe o GelSafe. Ambos son productos químicos que, al diluirse en el matraz son incoloros y que, en presencia de ADN (es decir, allá donde haya ADN), da una señal fluorescente bajo la luz UV del transiluminador. Es lo que nos permitirá visualizar dónde ha corrido el ADN, en forma de bandas.

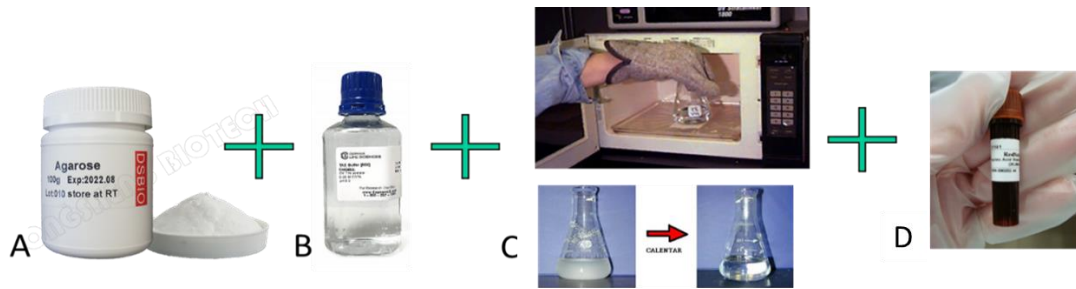
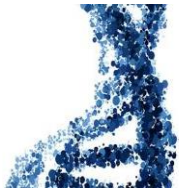


Figura 5. A) agarosa en polvo, B) tampón TAE, C) microondas y cambio de apariencia de la mezcla hasta que sea transparente y sin grumos, D) Red Safe/Gelsafe.

- Preparar el gel (figura 6):
 - Poner gomas o cinta adhesiva para sellar la bandeja sobre la que se hará el gel para que no se salga el líquido al añadirlo.
 - Verter la mezcla.
 - Añadir el peine y sacar las burbujas que hayan podido quedar, con toquécitos o con una punta de pipeta.
 - Dejar enfriar 10-15' hasta que solidifique y eliminar el peine y las gomas o la cinta que se añadieron.
 - Introducir la bandeja con el gel en la cubeta de electroforesis y cubrir completamente con tampón TAE 1x.
 - Si no se va a utilizar el gel hasta el día siguiente, envolverlo en un plástico y dejarlo en la nevera hasta entonces.

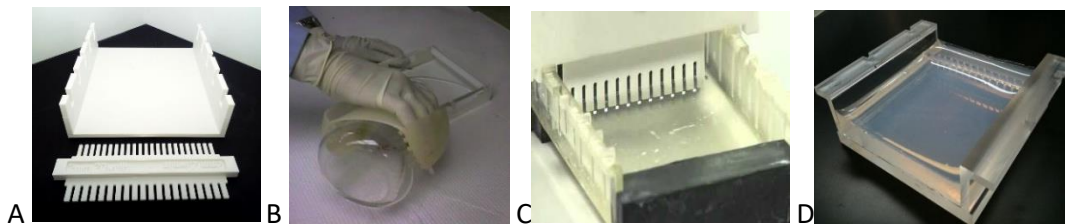


Figura 6. A) bandeja y peine, B) vertido de la mezcla en la bandeja, C) adición del peine, D) gel solidificado y pocillos que quedan al haber quitado el peine. Fuente: Martínez M, Farias HA, Ballesteros L, Abrego JK, Arciga MA. *Manual de prácticas. Biología celular y molecular*. 2017. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; <https://en.wikipedia.org/wiki/Agarose>.

2. Introducir las muestras en los pocillos.

Una vez transcurrido el tiempo de digestión de la muestra de ADN, añadiremos un tampón de carga antes de cargarla en el gel. Este tampón contiene glicerol (un agente densificante que sirve para que las muestras sedimenten en el fondo de los pocillos) y azul de bromofenol (un colorante de pequeño tamaño molecular que sirve para controlar la migración del frente de la electroforesis)**. Añadiremos 10µl de cada una de las muestras y de un control homocigoto catador TT. Se colocará cuidadosamente cada muestra en un pocillo distinto con una micropipeta. Es aconsejable apoyar la mano que controla la pipeta sobre la otra mano, apoyada en la bancada, para evitar movimientos indeseados. Es muy importante introducir la punta hasta la base del pocillo, asegurándose de no perforar el gel, y depositar la muestra poco a poco (figura 7). En el primer pocillo introduciremos 4µl de un marcador de peso molecular, lo que nos permitirá conocer el tamaño aproximado de los fragmentos de ADN.

En nuestro caso, el tampón de digestión con la enzima HaeIII, **fastgreen, hace las veces de tampón de carga, por lo que no será necesario añadirlo. Se transferirá la muestra directamente en el pocillo. No obstante, conviene saber que si se trabaja con tampón de carga el protocolo a seguir es el siguiente: se



mezclan el tampón de carga y la muestra en un trozo de papel de film transparente o papel encerado. Primero se añadirá una gota de 2µl de tampón de carga por cada muestra, y posteriormente, se añadirá y mezclará sobre la gota 10µl de cada muestra de ADN. La mezcla de tampón de carga y muestra se recogerá con la pipeta y se introducirá en el pocillo correspondiente.

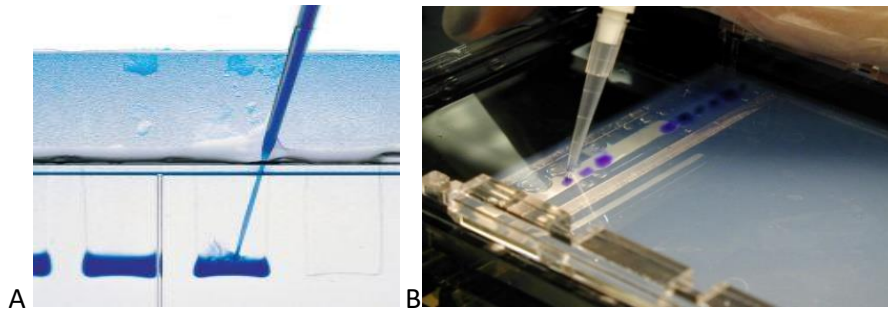


Figura 7. A) detalle de los pocillos y de la introducción de una muestra. El color azul corresponde al tampón de carga y permite observar el proceso de introducción de la muestra. También permitirá controlar la migración de las muestras durante la electroforesis, B) vista de un gel en el que se han cargado ya varias muestras en distintos pocillos. Fuente:

<http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/reactivos/argot.htm> y <https://schoolworkhelper.net/gel-electrophoresis-basics-steps/>.

3. *Correr el gel.*

Conectar los electrodos del tanque de electroforesis a la fuente de alimentación, aplicando un voltaje de 120-125 V durante aproximadamente 20 minutos. Comprobar que al empezar la electroforesis salen burbujitas (significa que está pasando corriente).

Dibuja la cubeta de electroforesis con los pocillos en los que se cargan las muestras y e indica qué muestra has añadido en cada carril y dónde conectarás el polo positivo y el polo negativo, así como una flecha que represente el sentido de migración.



4. Interpretar los resultados.

Al acabar la electroforesis, observaremos que la coloración azul añadida a cada carril ha avanzado (línea conocida como “frente de electroforesis”) hacia el polo que corresponde, lo cual significa que la electroforesis ha funcionado correctamente. Desconectaremos la fuente de alimentación y colocaremos la bandeja con el gel en la fuente de iluminación UV (transiluminador). Apagaremos la luz y encenderemos la luz UV (utilizar gafas protectoras) que, gracias a la adición de Red safe/Gelsafe durante la preparación del gel, permite observar una banda fluorescente allá donde haya ADN y ver el patrón de bandas que indicará el tamaño aproximado de los fragmentos de ADN que han migrado.

En nuestro caso, si el individuo es homocigoto catador (TT), la enzima HaeIII realizará un corte generando dos bandas de 44pb y 177pb. Si el individuo es homocigoto no catador (tt), la enzima HaeIII no realizará ningún corte puesto que no reconoce ninguna secuencia, por lo que encontraremos una única banda de 221 pb. Si el individuo es heterocigoto (Tt), uno de los alelos será cortado, generando bandas de 44pb y de 177 pb, y el otro alelo no será cortado, generando una única banda de 221pb. Por tanto, encontraremos 3 bandas de 44pb, 177pb y 221pb. La figura 8 muestra los resultados esperados para cada genotipo.

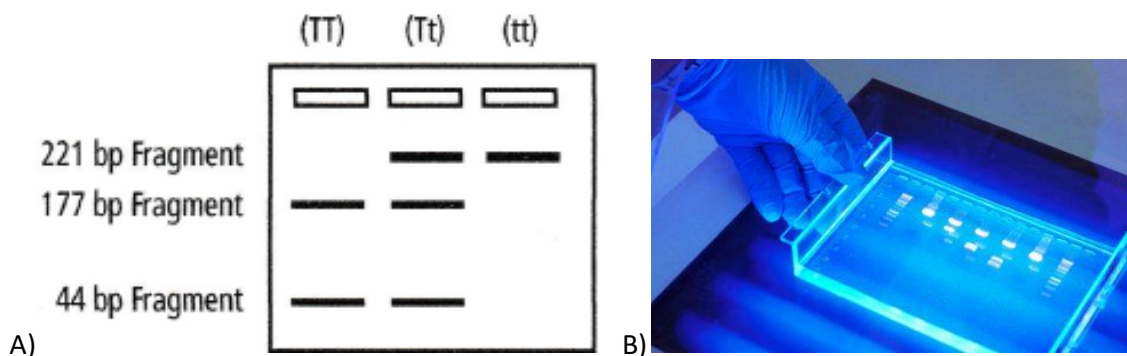
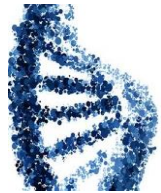


Figura 8. A) patrón de bandas esperado para los tres genotipos posibles. TT: catador; Tt: heterocigoto; tt: no catador. B) ejemplo de bandas observadas con transiluminador. Fuente: Bioted. *Protocolo Explorando la Genética del Gusto: Análisis del SNP del gen PTC por PCR*. Ref.PCRPTC; y <https://www.facebook.com/login/?next=https%3A%2F%2Fwww.facebook.com%2FYoAmoLaBiologia%2Fposts%2F1477766552340930%2F>.

Nota 1: cada banda representa múltiples fragmentos de ADN que tienen el mismo número de pares de bases.

Nota 2: es posible que el tamaño de bandas generado por uno de los cortes en ambas variantes sea el mismo, en ese caso, no encontraríamos dos bandas en el mismo punto, sino una única banda.



Dibuja el patrón de bandas obtenido para tu muestra e indica el genotipo al que corresponde.

Por otra parte, disponemos de unas tiras de papel de sabor amargo. Pruébala y anota tu fenotipo, que puede ser no catador o catador (mucho o un poco): _____

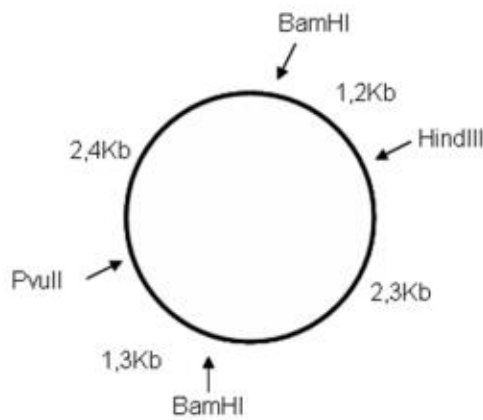
¿A qué genotipo corresponde tu fenotipo?



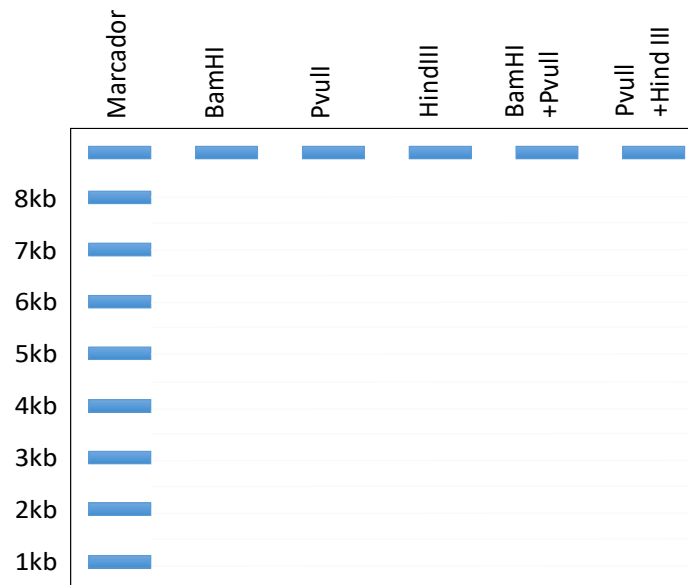
ANEXO

Las enzimas de restricción pueden emplearse también para generar **mapas de restricción** de plásmidos. Se trata de un experimento de cartografía por restricción en que el ADN plasmídico se corta con varias enzimas de restricción, solas y en parejas, para determinar el número de sitios de corte y sus posiciones relativas sobre el círculo plasmídico. El ADN cortado (o digerido) se separa en un gel de agarosa y se determinan los tamaños de los fragmentos mediante comparación con los tamaños de moléculas conocidas (los "patrones") situadas en otra calle del gel. Los fragmentos se organizan en forma de mapa comparando los tamaños de fragmentos que se cortaron con una sola enzima (digestiones simples) con los que se cortaron con dos enzimas (digestiones dobles).

Tenemos el siguiente mapa de restricción de un plásmido:



¿Qué patrón de bandas obtendrías en una electroforesis si en los distintos carriles añades una muestra de plásmido digerido con (indica los tamaños sobre las bandas):



Fuente: modificado de Bakkali M, Barrionuevo FJ, Burgos M, Cabrero J, De la Herrán R, et al. *Manual de problemas, prácticas de laboratorio y simulación de genética II*. 2011. Universidad de Granada. ISBN.: 978-84-15261-49-0



Bibliografía

- Mendoza-León A. *Farmacogenética en dermatología*. 2018. <https://piel-l.org/blog/46269>.
- Bioted. *Protocolo Explorando la Genética del Gusto: Análisis del SNP del gen PTC por PCR*. Ref.PCRPTC. <https://www.bioted.es/protocolos/EXPLORANDO-GENETICA-DEL-GUSTO.pdf>.
- *Digestión de DNA usando enzimas de restricción*. <http://fernandotuya.org/wp-content/uploads/2010/10/digestion-DNA.pdf>.
- Khan Academy. *Las enzimas de restricción y la ADN ligasa*. <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/restriction-enzymes-dna-ligase>.
- Martínez M, Farias HA, Ballesteros L, Abrego JK, Arciga MA. *Manual de prácticas. Biología celular y molecular*. 2017. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. http://bios.biologia.umich.mx/obligatorias/biol_cel_mol/manual_biologia_celular_ii_2017.pdf.
- Bakkali M, Barrionuevo FJ, Burgos M, Cabrero J, De la Herrán R, *et al*. *Manual de problemas, prácticas de laboratorio y simulación de genética II*. 2011. Universidad de Granada. ISBN.: 978-84-15261-49-0.
- Amgen Foundation. *Laboratory 1.2: Gel electrophoresis*. 2013. Capítulo 1. http://www.conejousd.org/Portals/49/Departments/Science/Andrew/Lab%201.2A_SG.pdf.



PRÁCTICA 4: Detección de *Listeria monocytogenes* por PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR).

La PCR (Polymerase Chain Reaction) es una técnica que se emplea amplia y constantemente en todos los laboratorios de biología molecular. Así, nosotros estudiamos las etapas que la componen en la práctica 2 y la empleamos en la práctica 3 para, tras purificar su producto, estudiar un RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Hasta ahora, hemos hablado siempre de PCR “convencional”, pero existen múltiples variaciones de la PCR que veréis en las clases teóricas de genética molecular. Una de estas variantes y en la que nos vamos a centrar hoy es la PCR cuantitativa, también llamada PCR en tiempo real (o real time PCR*), que se abrevia qPCR (por **Q**uantitative PCR). La qPCR nos permite visualizar en tiempo real, es decir, mientras se está produciendo la amplificación, el progreso de la reacción en cada muestra, por lo que no será necesario realizar una electroforesis posteriormente para poder estudiar los resultados. Además, se llama PCR cuantitativa porque nos permite calcular exactamente la cantidad de ADN de cada muestra.

En esta práctica estudiaremos los fundamentos de esta variante de la PCR, así como la forma de llevarla a cabo y las diferencias con respecto a la PCR convencional. Emplearemos esta sofisticada técnica de diagnóstico molecular para detectar la presencia de *Listeria monocytogenes* en muestras animales.

* no hay que confundir real time PCR (qPCR) con RT-PCR, que viene de las siglas en inglés de Retro-transcriptase PCR, que es una PCR con transcriptasa inversa.

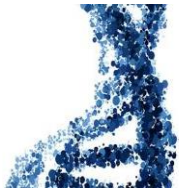
Objetivos:

A: Conocer los fundamentos de la PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR), los tipos y las diferencias con respecto a la PCR convencional.

B: Diagnosticar por qPCR la presencia de *Listeria monocytogenes* en muestras animales.

Material:

- EPIS
- Microcentrifuga
- Micropipetas y puntas de micropipeta
- Vortex
- Agua destilada
- Hielo
- ADN purificado
- Termociclador qPCR
- Kit Mericon *Listeria* spp Kit (QIAGEN) Cat No./ID: 290025 de qPCR: *primers*, dNTPs, sondas Taqman, Polimerasa, tampón, control positivo y negativo



A: Conocer los fundamentos de la PCR en tiempo real, los tipos y las diferencias con respecto a la PCR tradicional.

La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior. Los ensayos de la PCR en tiempo real son entre 10.000 y 100.000 veces más sensibles otras pruebas genéticas.

La qPCR es, pues, una herramienta útil y extremadamente sensible en investigación clínica, industrial, biológica y biomédica, con aplicaciones para el diagnóstico de enfermedades genéticas o para la identificación de agentes causales de enfermedades víricas o bacterianas (estudio de la titulación vírica), para la cuantificación del ADN, para la detección de contaminantes en alimentos (detección de microorganismos) o para el análisis de la expresión génica. La tabla 1 muestra una comparativa entre ambas PCRs.

Tabla 1. Comparación de PCR convencional y PCR en tiempo real, en cuanto a la obtención de resultados, la cuantificación, la sensibilidad y el procesamiento que se requiere.

Característica	PCR convencional (P3)	PCR en tiempo real (P4)
Obtención de resultados	Mide la cantidad de producto de PCR al final de la PCR	Mide la amplificación de la PCR mientras se produce
Cuantificación	No. Puede ser semi-cuantitativa si se compara la intensidad de la banda mediante electroforesis con una muestra referencia	Sí. Durante la fase exponencial de la PCR la cantidad de producto de PCR es directamente proporcional a la cantidad de muestra inicial
Sensibilidad	Baja sensibilidad	Alta sensibilidad (puede detectar hasta 10 copias de ADN en una muestra)
Procesamiento posterior	Hace falta procesamiento posterior a la PCR (p.ej, electroforesis)	No hace falta procesamiento posterior

Componentes de la reacción:

Como se trata de una PCR, necesitaremos emplear los mismos reactivos que en una PCR convencional y alguno más (figura 1), es decir:

- ADN molde.
- *Primers* específicos para la secuencia diana.
- Enzima polimerasa.
- Tampón.
- dNTPS.
- cationes divalentes.



- H₂O ultrapura.

Además, debemos añadir otros componentes que son los que permitirán la detección en tiempo real del producto de la reacción. Como el número de copias generadas se detecta gracias a una señal fluorescente, necesitaremos un fluoróforo de detección. Los más usados son las sondas Taqman o el fluoróforo SYBR Green.

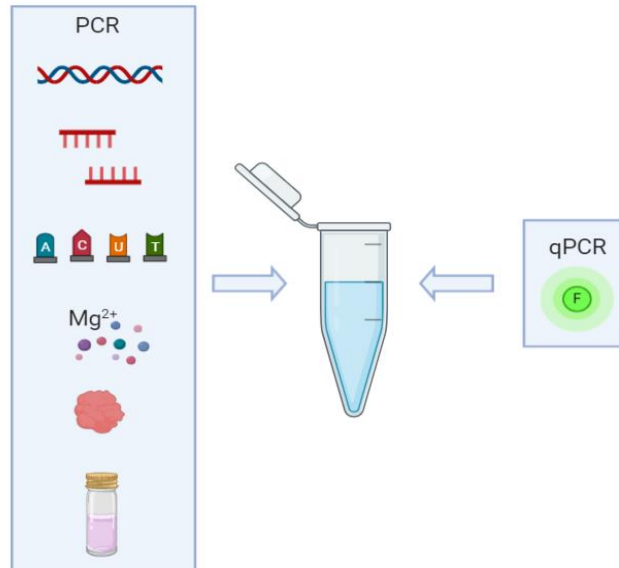


Figura 1. Componentes que se emplean en una qPCR. Fuente: elaboración propia, creada con BioRender.com.

Equipo para la qPCR

Los equipos para llevar a cabo la PCR en tiempo real incluyen un termociclador y una unidad capaz de detectar señales fluorescentes (fluorómetro) para monitorear el progreso de la reacción de amplificación. El termociclador del equipo debe ser capaz de mantener una temperatura uniforme para todas las muestras y ser lo suficientemente rápido en la transición de temperaturas de una etapa a otra (desnaturalización del ADN molde, hibridación de los *primers* y elongación). El sistema fluorimétrico consiste en una fuente de energía para excitar a los fluoróforos (a una determinada longitud de onda de excitación) y un sistema de detección que permita monitorear la señal emitida (a una longitud de onda de emisión). Las diferentes longitudes de onda de emisión se detectan con dispositivos que incluyen filtros, multiplicadores y fotodetectores. En la figura 2, se muestran los principales fluoróforos empleados y sus espectros de emisión.

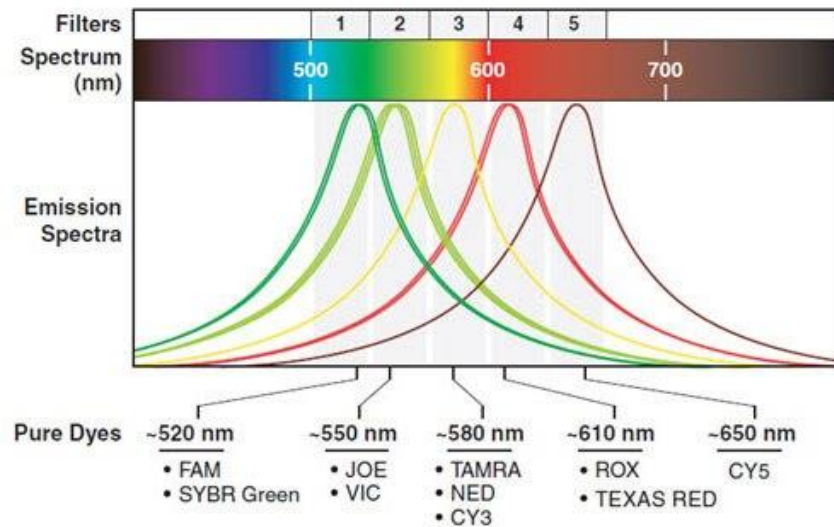


Figura 2. Espectro de emisión de los fluoróforos comúnmente usados en la PCR en tiempo real. En la figura se observan los espectros de emisión de diversos fluoróforos a diferentes longitudes de onda. Las letras A a la E representan las longitudes de onda empleadas por diferentes filtros para detectar el grupo de fluoróforos listados en la parte inferior. Fuente: Aguilera P, Ruiz M, Rocha MG, Pineda B, Cháñez ME. *PCR en tiempo real*.

Sistemas de detección usados en PCR en tiempo real (fluoróforos)

Los fluoróforos pueden ser de dos tipos:

A) Fluoróforos con afinidad por el ADN

Estos fluoróforos emiten fluorescencia cuando se unen al ADN, independientemente de su secuencia. La intensidad de la fluorescencia se incrementa proporcionalmente a la concentración de ADN de doble cadena. El compuesto que se emplea con más frecuencia es el **SYBR Green**, que se une al **ADN de doble cadena**. Así, cuanto más ADN de doble cadena haya en la muestra, y cuantos más ciclos se lleven a cabo (y por lo tanto se aumente la cantidad de copias de la molécula de ADN de doble cadena), más fluorescencia se detectará. Este sistema es muy económico y permite el uso de un solo fluoróforo en diferentes ensayos. Bastará con añadir los *primers* específicos para la secuencia concreta que queremos amplificar y, allá donde haya ADN de doble cadena, *SYBR Green* se unirá y emitirá una señal detectable. Por otra parte, no permite hacer reacciones múltiples en las que varios genes se amplifiquen en la misma reacción porque el fluoróforo se une a cualquier ADN y no permitiría distinguir a qué fragmento pertenece cada una de las moléculas neoformadas.

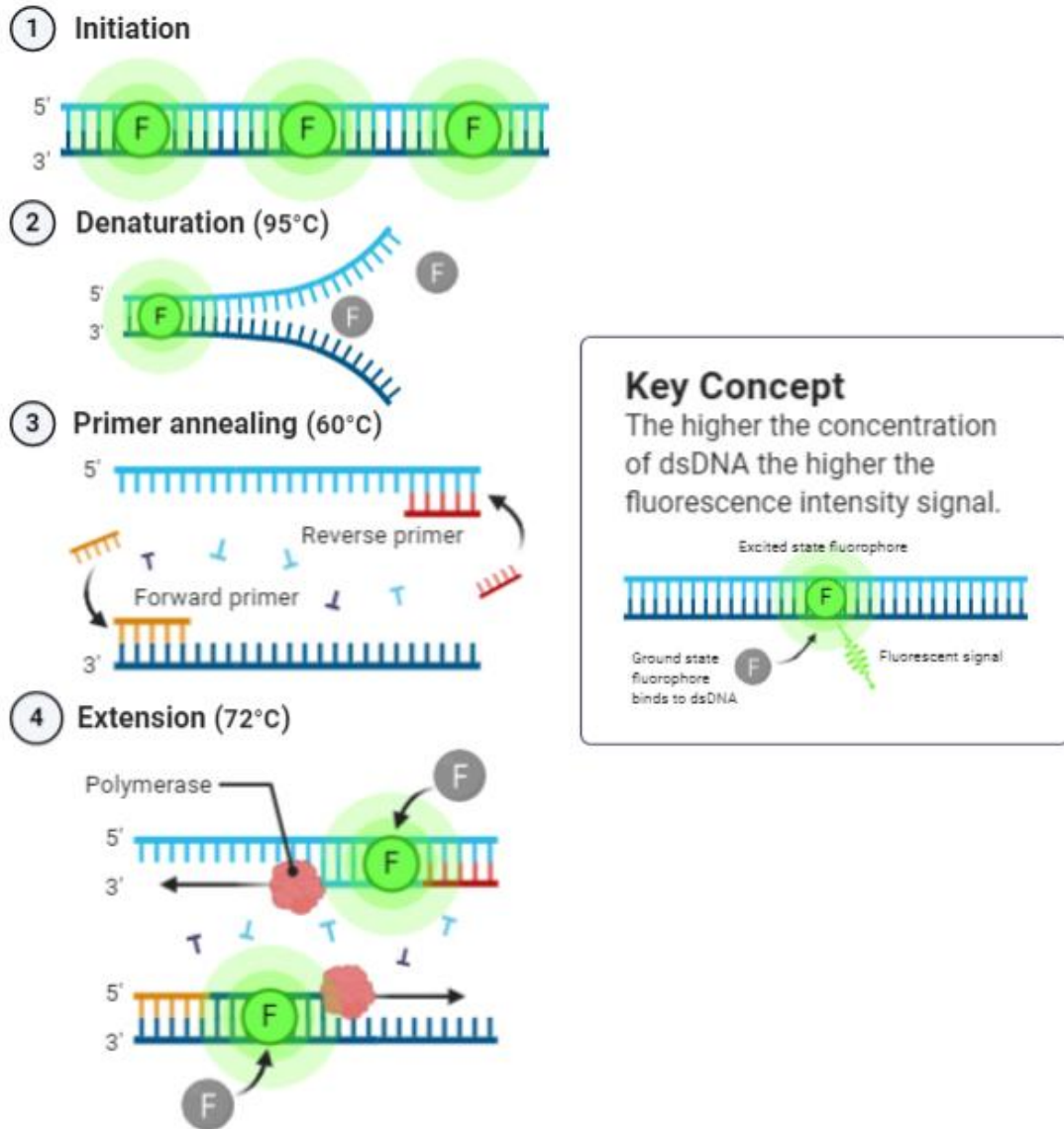


Figura 3. Esquema que representa una reacción de qPCR empleando *SYBR Green*. El fluoróforo se encuentra en el tubo de reacción. En la fase de desnaturalización no se une al ADN puesto que tenemos ADN de cadena sencilla. Al hibridar los *primers forward* y *reverse* (como en la PCR convencional), se genera ADN de doble cadena de muy pequeño tamaño y, al elongarse las nuevas moléculas de ADN por la polimerasa, *SYBR Green* se une a las nuevas moléculas de ADN que son de doble cadena. Cuantos más ciclos se realicen, más copias de ADN de doble cadena obtendremos y mayor será la fluorescencia detectada. Fuente: elaboración propia, creada con BioRender.com.

B) Sondas específicas para fragmentos del ADN concretos

Existen varios tipos, pero nos centraremos en las más empleadas: las sondas *TaqMan*[®]. Este sistema utiliza una sonda, un oligonucleótido específico de aproximadamente 20 bases, complementaria a la secuencia del gen de interés, y que está marcado por dos elementos: un fluoróforo *reporter* o “reportero” unido al extremo 5’ y un *quencher* o “apagador” en el extremo 3’. La longitud de la sonda es la distancia entre ambos elementos, de manera que la fluorescencia del reportero está apagada por el *quencher* o apagador. Cuando la polimerasa elonga el nuevo fragmento de ADN durante la amplificación, flanqueado por los *primers forward* y *reverse*, la actividad 5’ exonucleasa de la ADN polimerasa corta los nucleótidos de la sonda *TaqMan*[®], haciendo que ambos elementos se separen y se observe la señal de fluorescencia. Es



decir, la hidrólisis de la sonda provoca un incremento en la señal del reportero y ésta aumenta proporcionalmente al incremento del producto de PCR. Algunos ejemplos de fluoróforos reporteros son FAM, VIC y NED, y entre los apagadores se encuentran TAMRA, DABCYL y BHQ.

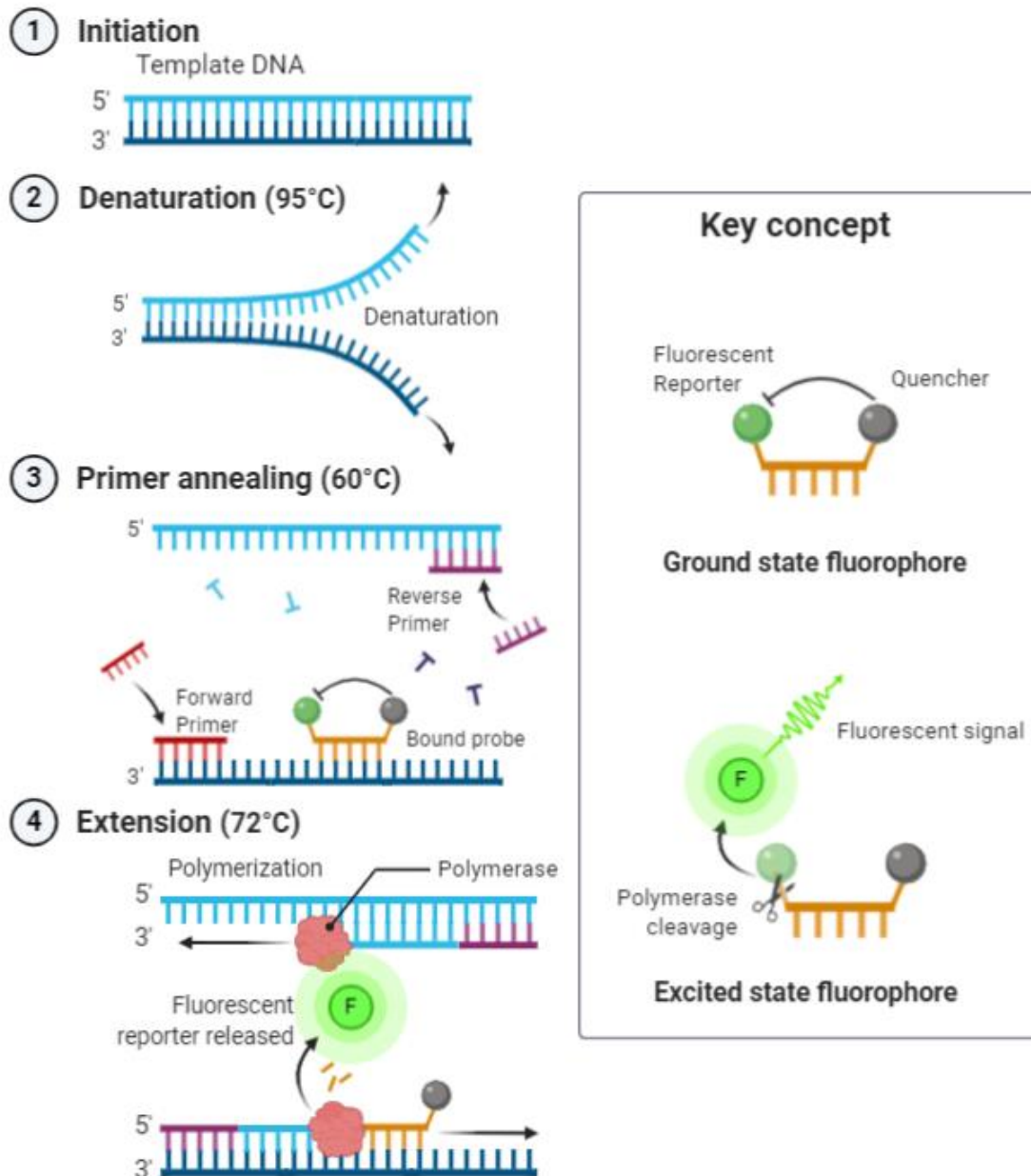


Figura 4. Esquema que representa una reacción de qPCR empleando sondas *TaqMan*. La sonda *TaqMan*, sintetizada para hibridar en el centro de la secuencia de ADN que queremos amplificar, se une pero no emite fluorescencia, puesto que el *quencher* inhibe la emisión del *reporter*. Una vez hibridan los *primers* que delimitan la secuencia a amplificar, la polimerasa lleva a cabo la elongación y rompe la sonda *TaqMan*. De este modo, el reportero y el apagador se separan, y puede así emitirse la fluorescencia, que será proporcional al número de copias sintetizadas. Fuente: elaboración propia, creada con BioRender.com.

La tabla 2 muestra una comparativa entre ambos fluoróforos, así como las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.



Tabla 2. Ventajas y desventajas del sistema SYBR Green y las sondas TaqMan®.

	SYBR Green	TaqMan
Ventajas	El mismo colorante puede usarse para diferentes blancos de amplificación	Incrementa la especificidad de la reacción
	Relativamente económico	Permite PCR multiplex (identificar distintos ADNs usando diferentes fluoróforos)
	Fácil optimización de las condiciones de reacción	Permite discriminación alélica por sondas ASO
Desventajas	Presencia de dímeros de primers y amplificaciones inespecíficas generan falsos positivos	Debe diseñarse una sonda diferente para cada blanco a estudiar
	No agrega especificidad a la reacción. Necesita realizar curva de disociación	Relativamente más costoso
	No permite realizar PCR multiplex	

Etapas de la qPCR

Tal y como ocurre en la PCR convencional, en el termociclador se realizan varios ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación. No obstante, la información que recibimos en la qPCR, es la cantidad de copias de ADN que se encuentran en cada muestra y en cada momento (en tiempo real). Esto se obtiene por la detección creciente de la emisión del fluoróforo, sea de un tipo o de otro, y se representa como producto de PCR (fluorescencia detectada) en función de los ciclos realizados. La cinética de amplificación de la qPCR se puede dividir en cuatro fases (figura 5):

- 1) **Fase inicial o basal:** entre los primeros 10-15 ciclos, la fluorescencia es insuficiente para lograr discriminar el ruido basal. Esta fase sirve para delimitar la línea de base o umbral, *threshold* en inglés. El ciclo en el que la señal de fluorescencia detectada cruza el umbral se conoce como Ct** (*Cycle Threshold*).
- 2) **Fase exponencial, también llamada logarítmica o geométrica:** los reactivos de la reacción se encuentran de forma abundante, por lo que la amplificación tiene una eficiencia cercana al 100%. En esta fase, la cantidad de moléculas de ADN es muy cercana a 2^n (como en la PCR convencional, a partir de cada molécula de ADN se generan dos moléculas en cada uno de los ciclos), donde n es igual al número de ciclos.
- 3) **Fase lineal:** comprende el momento en que los reactivos empiezan a ser limitantes de la reacción y se presenta un decaimiento en la actividad enzimática. La eficiencia de la amplificación es inconstante durante esta fase.
- 4) **Fase estacionaria o de plateau:** muestra una señal saturada. La amplificación se detiene debido a que los componentes de la reacción (dNTPs...) se han agotado. La cantidad de producto (fluorescencia) encontrada es constante, aunque los ciclos aumenten.

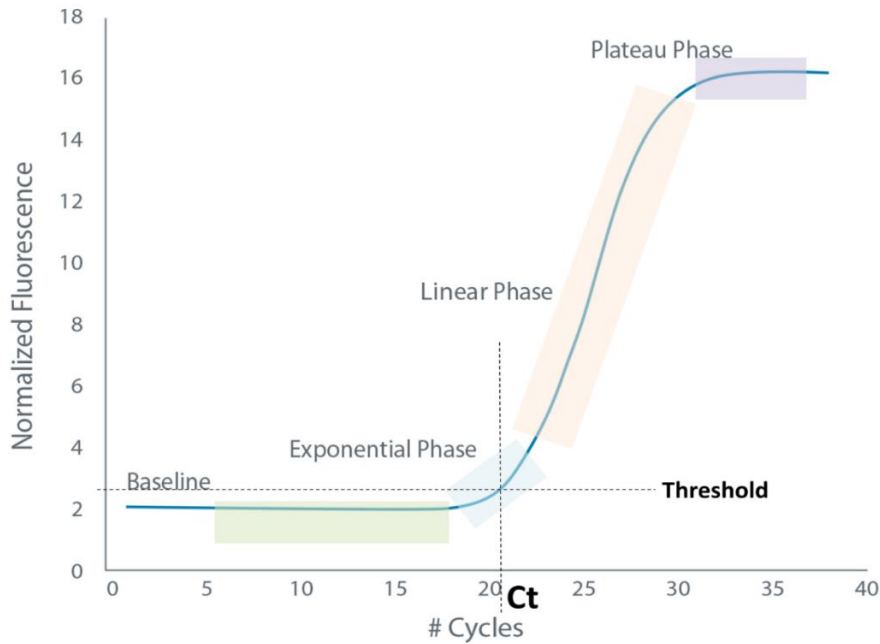


Figura 5. Esquema que representa cinética de una reacción de qPCR: detección de señal basal, fase exponencial, fase lineal y fase estacionaria. Se indican el umbral (threshold) y el Ct. Fuente: modificada de Biocompare. *qPCR Checklist: Steps to Better Results*. 2017.

****El valor Ct:** Equivale al número de ciclos necesarios para que cada curva de amplificación alcance el umbral en la señal de fluorescencia. El Ct es indicativo de la cantidad de ADN que había en la muestra al inicio de la reacción. Cuanto mayor sea la cantidad de ADN en una muestra, menor será el número de ciclos (Ct) que se requiere para alcanzar este umbral (figura 6). El Ct es un valor directamente proporcional a la cantidad inicial del ADN molde y a partir de este valor se puede calcular la cantidad del ADN. El valor de Ct puede ser asignado de manera automática por el Software del equipo mediante diferentes algoritmos o bien se puede asignar de forma manual. La cuantificación del ADN a partir del valor Ct se puede hacer **sólo durante la fase exponencial** de la amplificación, donde la eficiencia de la reacción es máxima.

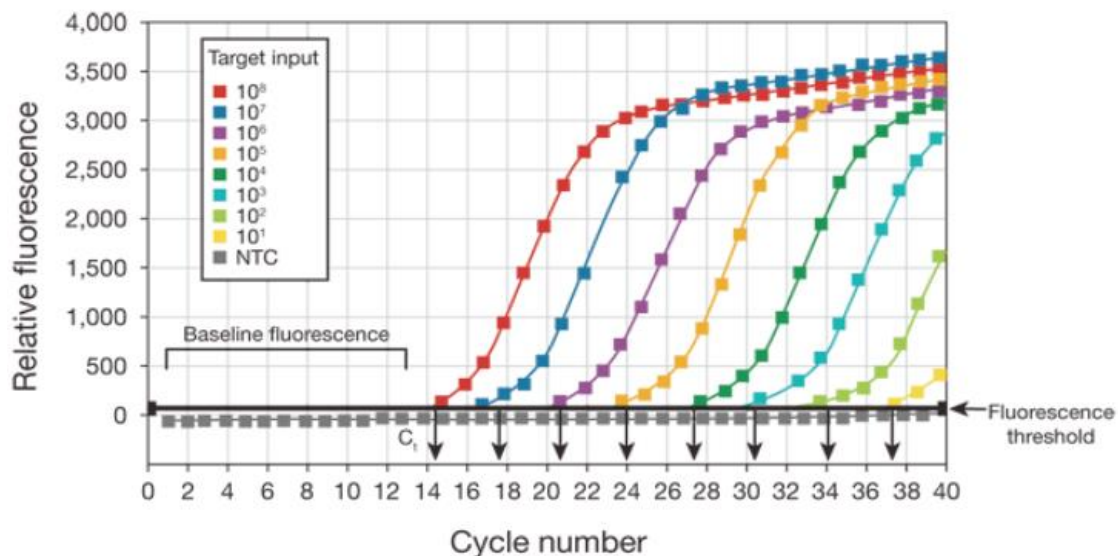


Figura 6. Cinética de qPCR en función de la cantidad inicial de ADN. A medida que la cantidad de ADN inicial decrece, el Ct aumenta, puesto que necesitamos más ciclos para generar el producto de PCR suficiente como para que la fluorescencia supere el umbral o threshold. Fuente: Thermo Fisher Scientific Inc. *Real-time PCR handbook*. 2014.



B: Diagnosticar por qPCR la presencia de *Listeria monocytogenes* en muestras animales.

Vamos a emplear la qPCR para detectar la presencia de *Listeria monocytogenes* en muestras animales de vacuno. Hemos extraído ADN a partir de heces de varios animales con la intención de comprobar si están infectados por este microorganismo.

Las bacterias del género *Listeria* son bacilos grampositivos. La infección por *Listeria monocytogenes* puede producirse en una amplia variedad de especies animales, pero en veterinaria la listeriosis clínica es esencialmente una enfermedad de rumiantes. La tasa de morbilidad media en los rumiantes oscila entre un 0,2 y un 8%, aunque en diversos países europeos como Noruega, Reino Unido, Francia y Alemania, las infecciones por *Listeria* spp. en rumiantes se presentan con una alta incidencia. Las principales manifestaciones en rumiantes son abortos, encefalitis (“enfermedad en círculo”) y septicemia, aunque también se ha asociado a mastitis. La enfermedad se adquiere por vía oral, a través de la alimentación, dado que la bacteria se encuentra naturalmente en pastos y diversos sustratos, así como en ensilaje sin una correcta acidificación.

Analizaremos las muestras empleando un kit comercial (Mericon *Listeria* spp Kit, Qiagen Cat No./ID: 290025) que incluye un *Master Mix* con los oligonucleótidos, la Taq Polimerasa, los dNTPs y el control interno para esta detección. El control interno es una muestra de ADN que vamos a añadir a todas nuestras muestras y que vamos a amplificar junto con nuestros ADN. El fluoróforo con el que se detecta la amplificación de este ADN es distinto al que emplearemos para detectar la amplificación de *L. monocytogenes* y nos permitirá comprobar que la reacción ha funcionado correctamente. Para este experimento, analizaremos las muestras siguientes:

- 1- Un control positivo: muestra que sabemos que contiene la bacteria.
- 2- Un control negativo: muestra sin ADN para comprobar que los reactivos no están contaminados.
- 3- Nuestras muestras: muestras correspondientes a distintos animales.

Para la reacción añadiremos 10µL de ADN de cada una de las muestras (H₂O en el caso del control negativo) y 10µL del *Master Mix* Mericon assay, tal y como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Preparación de las muestras y los controles. Extraída de Qiagen® Mericon® *Pathogen Detection Handbook*. 2012.

Component	Sample	Positive PCR control	Negative PCR control
Reconstituted mericon Assay	10 µl	10 µl	10 µl
Sample DNA	10 µl	–	–
Dissolved Positive Control DNA	–	10 µl	–
QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer or RNase-free water	–	–	10 µl
Total volume	20 µl	20 µl	20 µl



Las etapas de la PCR serán:

- Desnaturalización previa: 5min, 95°C → Activación de la polimerasa.
- 40 ciclos de:
 - o Desnaturalización: 15s, 95°C.
 - o Hibridación: 23s, 60°C → Aquí se mide la fluorescencia.
 - o Extensión: 10s, 72°C.

Emplearemos dos sondas TaqMan:

- TaqMan con reporter FAM → **verde** → será la señal de amplificación del ADN de *L. monocytogenes* que sólo encontraremos cuando la muestra presente la bacteria.
- TaqMan con reporter MAX → **amarillo** → será la señal de amplificación del control interno que nos permite comprobar que la reacción ha funcionado bien. Debemos encontrar siempre esta señal.

A continuación, se muestran los posibles resultados obtenidos:

- Amplificación del control interno + amplificación de la muestra → la muestra contiene la bacteria. En función de la cantidad de *L. monocytogenes*, la fase exponencial empezará antes (para más cantidad de bacteria) o después (menor cantidad de bacteria).
- Amplificación del control interno + no amplificación de la muestra → la muestra no contiene la bacteria. Encontraremos la señal del control interno que sí amplifica, pero la emisión de fluorescencia de nuestra muestra estará representada por una línea recta.
- No amplificación del control interno → la PCR ha fallado.

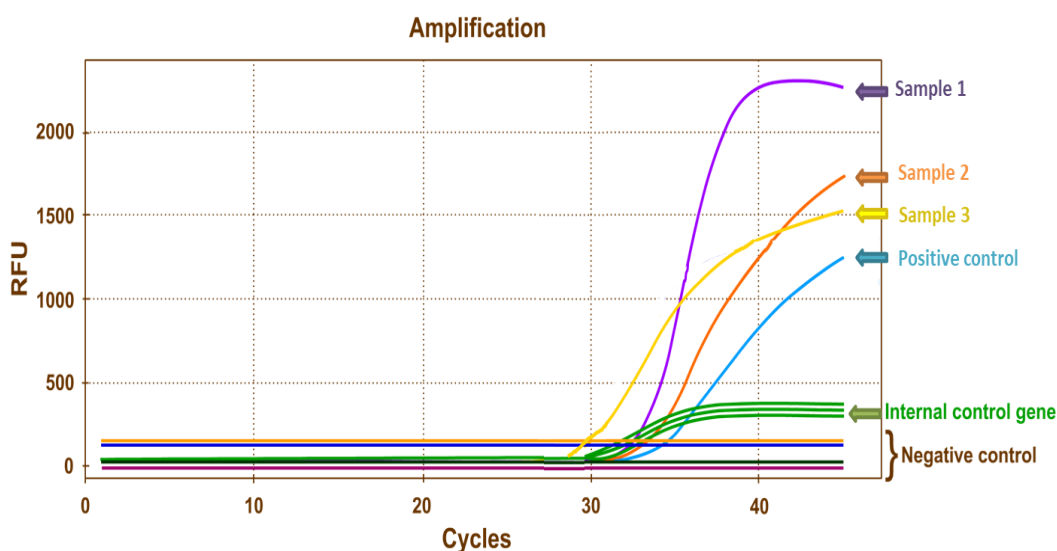


Figura 7. Ejemplo de reacción de qPCR en la que se han amplificado tres muestras, un control positivo, un control negativo y el control interno. En este caso, las 3 muestras han mostrado producto de amplificación y el control interno también ha sido amplificado en todos los casos, por lo que podemos concluir que las muestras presentaban la secuencia a amplificar (infección bacteriana si estuviéramos buscando la presencia de una bacteria, como en nuestro caso). De entre las tres muestras, la muestra 3 es la que más cantidad de ADN presenta, seguida por la muestra 1 y, finalmente, por la muestra 2, cuyo Ct es posterior a las otras dos muestras. Fuente: modificada de meded.psu.ac.th.



Cuantificación del ADN

Como hemos dicho previamente, la qPCR nos permite además de visualizar en tiempo real la amplificación del ADN, cuantificar la cantidad de ADN que hay en la muestra mediante ciertas fórmulas matemáticas. Existen dos métodos de cuantificación:

A) Cuantificación absoluta

La cuantificación absoluta permite cuantificar el ADN de una muestra independientemente de las demás. Se emplea, por ejemplo, en estudios que pretenden correlacionar el número de copias de un virus o bacteria con un estado de enfermedad. Para esto, necesitamos hacer una curva de calibrado con al menos 5 muestras de diluciones seriadas, que llamaremos estándares, con cantidad de ADN conocida para conocer el Ct de cada uno de estos estándares para las condiciones específicas de una reacción. Representando el Ct en función del logaritmo de la concentración de ADN conocido de los estándares, podemos establecer una recta, llamada curva de patrones o curva estándar, tal y como vemos en la figura 8. Podemos conocer el logaritmo de la concentración de nuestra muestra y, por lo tanto, la concentración de ADN en la muestra, buscando el punto de intersección del Ct de nuestra muestra con la curva de patrones o estándar, o mediante cálculos matemáticos más complejos que se basan en el cálculo de la eficiencia de la reacción a partir de la pendiente de la curva y que no trataremos en esta práctica.

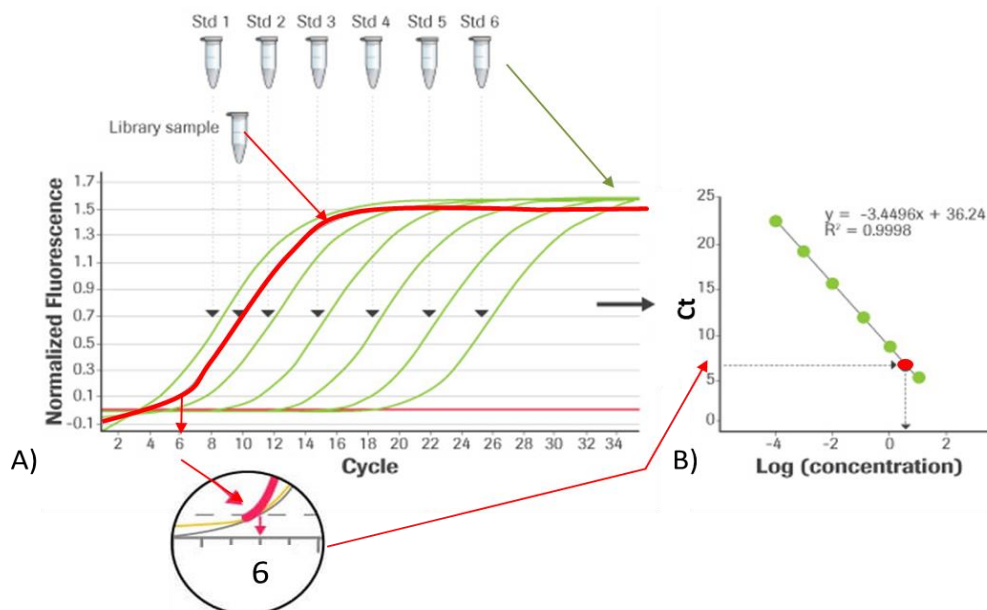


Figura 8. A) resultado de una amplificación de 6 estándares y de una muestra de concentración desconocida, representando la fluorescencia emitida (ordenadas) en función del ciclo (abscisas). B) los Ct de cada muestra se representan en ordenadas y el eje de abscisas representa el logaritmo de la concentración de cada uno de los estándares. Podemos inferir el logaritmo de la concentración de nuestra muestra buscando la intersección del Ct para nuestra muestra en la curva de estándares o mediante cálculos matemáticos. Fuente: modificada de <https://onelab.andrewalliance.com/library/kapa-dna-library-quantification-WbwZkM1L>.

B) Cuantificación relativa

La cuantificación relativa se emplea, por ejemplo, en estudios de expresión génica en respuesta a un fármaco, en los que se quiere comparar el nivel de expresión de un gen de interés en una muestra tratada químicamente en relación con el nivel de expresión del mismo gen en una



muestra sin tratar. Para la cuantificación relativa (**RQ**) necesitamos comparar los niveles de expresión del gen de interés en muestras tratadas con los niveles de expresión de muestras control (sin tratar), ambos relativizados con la expresión de otro gen constitutivo (control endógeno o interno), cuyos niveles sabemos que no cambian entre los distintos tratamientos o condiciones del experimento en las mismas muestras (tratadas y sin tratar). Los genes cuya expresión no cambia se conocen como genes de referencia o *housekeeping genes*. La fórmula para el cálculo de la variación relativa de la expresión en las muestras tratadas con respecto a las muestras control se muestra en la figura 9.

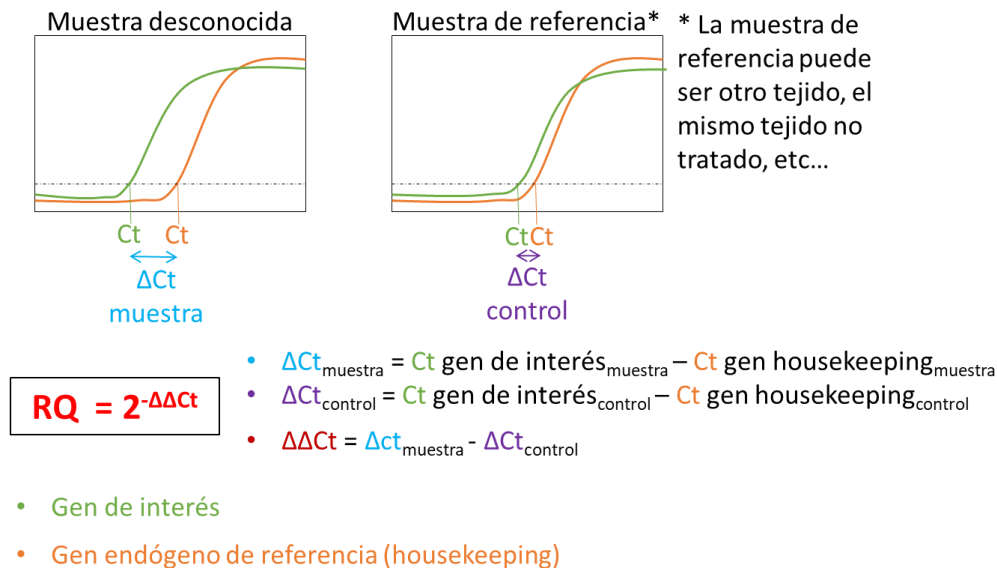


Figura 9. Fórmula para el cálculo de la diferencia relativa de expresión de un gen en una muestra tratada con respecto a una muestra control (sin tratar) en relación con la expresión de un *housekeeping gene*, cuya expresión es constitutiva (invariable). Fuente: elaboración propia.

Bibliografía

- Aguilera P, Ruiz M, Rocha MG, Pineda B, Cháñez ME. PCR en tiempo real. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcrtiempo.pdf>.
- Biocompare. *qPCR Checklist: Steps to Better Results*. 2017. <https://www.biocompare.com/Bench-Tips/343854-qPCR-Checklist-Steps-to-Better-Results>.
- ThermoFisher Scientific Inc. *Real-time PCR handbook*. 2014. <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>.
- ThermoFisher Scientific. *Aspectos básicos de la PCR a tiempo real*. <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html>
- Qiagen® Mericon®. *Pathogen Detection Handbook*. 2012.
- R-biopharm. *PCR en tiempo real. Diagnóstico molecular para análisis alimentario*. <https://food.r-biopharm.com/es/tecnologias/pcr-en-tiempo-real/>
- Castanera R. *Estudio de la variación en los niveles de transcripción de genes de enzimas degradadoras de lignina en cultivos sólidos y sumergidos de *Pleurotus ostreatus**. 2011. Tesis de Máster. Universidad de Navarra.
- Juan T, Estrada O. *Listeriosis*. Portal veterinaria. <https://www.portalveterinaria.com/articoli/articulos/11502/listeriosis.html>.