

DETECCIÓN DE MAÍZ TRANSGÉNICO POR PCR

Ref. PCR6 (25 alumnos)

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es introducir a los estudiantes en los principios y práctica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como herramienta para la detección de organismos modificados genéticamente.

Los estudiantes adquirirán conocimientos básicos sobre la biología molecular del proceso de obtención de un OMG.

2. INTRODUCCION

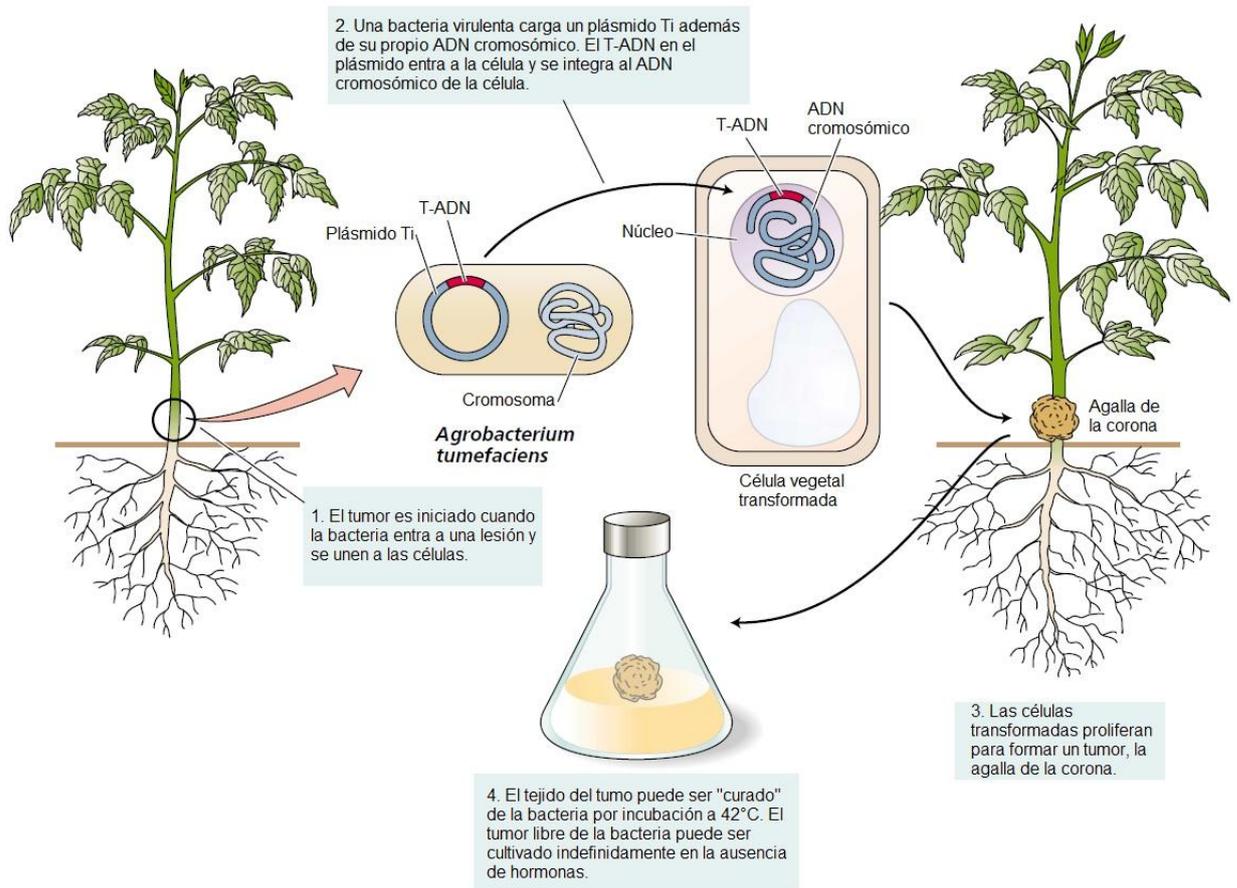
2.1 Organismos modificados genéticamente o transgénicos.

La **ingeniería genética** ha producido plantas de cultivo resistentes a las plagas. El que sale ganando es el medio ambiente, porque se disminuye el uso de pesticidas; pero lo más paradójico es que las organizaciones que se han dedicado a proteger el medio ambiente han sido las que se han opuesto de forma más ruidosa a la introducción de estas plantas, a las que se denominan genéticamente modificadas (GM).

La primera dificultad al trabajar con esta técnica es la introducción del fragmento deseado de ADN (gen útil) en la célula vegetal, y después en el genoma de la planta.

La enfermedad de las agallas acarrea la formación de un "tumor" irregular en el tallo de las plantas, conocido como agalla. La causa es una bacteria común del suelo llamada ***Agrobacterium tumefaciens***, que oportunamente infecta las plantas donde se ha visto dañadas por, digamos, el mordisqueo de los insectos herbívoros. El parásito bacteriano lleva a cabo el ataque mediante la construcción de un túnel a través del cual deposita un paquete de su propio material genético dentro de la célula vegetal. El paquete consta de un fragmento de ADN que se extrae cuidadosamente de un plásmido especial y luego se envuelve en una cubierta protectora antes de enviarlo a través del túnel. Una vez entregado el paquete de ADN, éste se integra, como lo haría el ADN viral, en el ADN de la célula huésped. Sin embargo, a diferencia de un virus y una vez que se ha alojado, este fragmento de ADN no fabrica más copias de sí mismo. En cambio, produce hormonas de crecimiento vegetal y proteínas especializadas que sirven de nutrientes a la bacteria, favoreciendo simultáneamente la división de las células vegetales y el crecimiento bacteriano y creando un circuito cerrado de intercomunicación positiva: las hormonas de crecimiento hacen que las células se multipliquen con más rapidez, y en cada división celular el ADN bacteriano invasor se copia conjuntamente con el de la célula huésped, de tal manera que se producen cada vez más nutrientes bacterianos y hormonas de crecimiento vegetal.

La consecuencia de este frenesí de crecimiento incontrolado es la aparición en la planta de una masa irregular, la agalla, muy útil para la bacteria porque constituye una especie de fábrica en la cual la planta se ve obligada a producir precisamente lo que necesita la bacteria, y aún en mayores cantidades.



El *Agrobacterium* es un sistema de transferencia prefabricado para introducir ADN ajeno en las plantas, un ingeniero genético natural. De forma que se podía insertar un gen a elección en el plásmido de *Agrobacterium* y transferirlo después a la célula vegetal, de esta forma cuando la bacteria modificada genéticamente infectara al huésped, insertaría el gen elegido en el cromosoma de la célula vegetal.

A medida que el debate sobre los alimentos GM se aviva a nuestro alrededor, es importante comprender que nuestra costumbre de tomar alimentos que han sido genéticamente modificados tiene realmente una antigüedad de miles de años. De hecho, tanto nuestros animales domésticos, origen de la carne que comemos, como las plantas de cultivo que nos suministran granos, frutas y verduras, están genéticamente muy alejadas de sus antepasados silvestres.



El efecto de siglos de selección artificial: el maíz y su antepasado silvestre teocinte a la izquierda.

Muchos de los antepasados silvestres de plantas de cultivo ofrecían relativamente poco a los primeros agricultores: eran difíciles de cultivar y su producción era escasa. Para que la agricultura diera buenos resultados fue necesario modificarla. Los primeros agricultores comprendieron que el que las características deseables se mantuvieran de generación en

generación implicaba una modificación ingénita (nosotros diríamos genética). De este modo comenzó el ingente programa agrícola de nuestros antepasados. La actividad dependía de una selección artificial, según lo cual los granjeros sólo criaban aquellos individuos que presentaban los rasgos deseados, por ejemplo, las vacas que producían más leche. En efecto, los granjeros hacían lo que hace la naturaleza en el curso de la selección natural: elegir de entre la gama de variaciones genéticas de las que disponían, con el fin de asegurarse de que la siguiente generación se enriqueciera con aquellas que se adaptan mejor al consumo, en el caso de los granjeros, y a la supervivencia, en el caso de la naturaleza. La biotecnología nos ha ofrecido un modo de generar variaciones deseadas, de manera que no tenemos que esperar a que aparezcan de forma natural; no es, de pro sí, más que el último de una serie de métodos que han sido utilizados para *modificar genéticamente* nuestros alimentos.

2.2 Maíz modificado genéticamente (Maíz Bt)

Las malas hierbas son difíciles de eliminar, también existen los insectos herbívoros que se aprovechan de nuestra agricultura, etc. para todos estos ataques a nuestra agricultura se han y se siguen utilizando **pesticidas, el alcance total de los riesgos de su uso no está muy claro**. Los agricultores que se dedican a los cultivos orgánicos han tenido siempre sus argucias para evitar los pesticidas. Un ingenioso método cuenta con una toxina obtenida de una bacteria para proteger las plantas de los insectos. El *Bacillus thuringiensis* (Bt) ataca de forma natural las células intestinales de los insectos, esto produce la muerte del insecto. Esto ha inspirado a los ingenieros genéticos ¿qué pasaría si en lugar de aplicar indiscriminadamente las bacterias a los cultivos se lograra introducir el gen de la toxina Bt en el genoma de las plantas de cultivo? El agricultor no necesitaría espolvorear nunca más sus cultivos porque cada bocado de la planta sería mortal para el insecto que lo ingiriera e inofensivo para nosotros.

Hoy en día tenemos una gama completa de cultivos de diseño Bt, entre los que figura el maíz Bt, la patata Bt, el algodón Bt, y la soja Bt, y el efecto neto ha sido que se ha reducido enormemente el uso de pesticidas. Se calcula que desde 1996 el resultado de utilizar cultivos Bt ha sido una reducción anual de 9 millones de litros de pesticidas en Estados Unidos.

En la Unión Europea están autorizados el cultivo de un maíz Bt, llamado MON810 de la multinacional Monsanto. En España se permite el cultivo de maíz transgénico desde 1998. Desde entonces se han cultivado variedades del evento Bt 176 de Syngenta (retirado del mercado a partir de enero de 2005), y un gran número de variedades de MON810 de Monsanto, que se siguen cultivando actualmente. En 2011, se cultivó en España unas 97.346,31 hectáreas del maíz Bt de Monsanto.

2.3 El debate de los alimentos GM

Este debate ha combinado 2 problemas. En primer lugar, las cuestiones puramente científicas de si los alimentos GM plantean una amenaza para nuestra salud o el medio ambiente. En segundo lugar, existen cuestiones económicas y políticas centradas en las prácticas agresivas de las compañías multinacionales y los efectos de la globalización. Gran parte de la retórica se ha concentrado en las empresas dedicadas a temas agrícolas, especialmente Monsanto.

Una valoración significativa del alimento GM debería basarse en consideraciones científicas, no políticas ni económicas. No obstante, examinemos algunas de las afirmaciones más comunes:

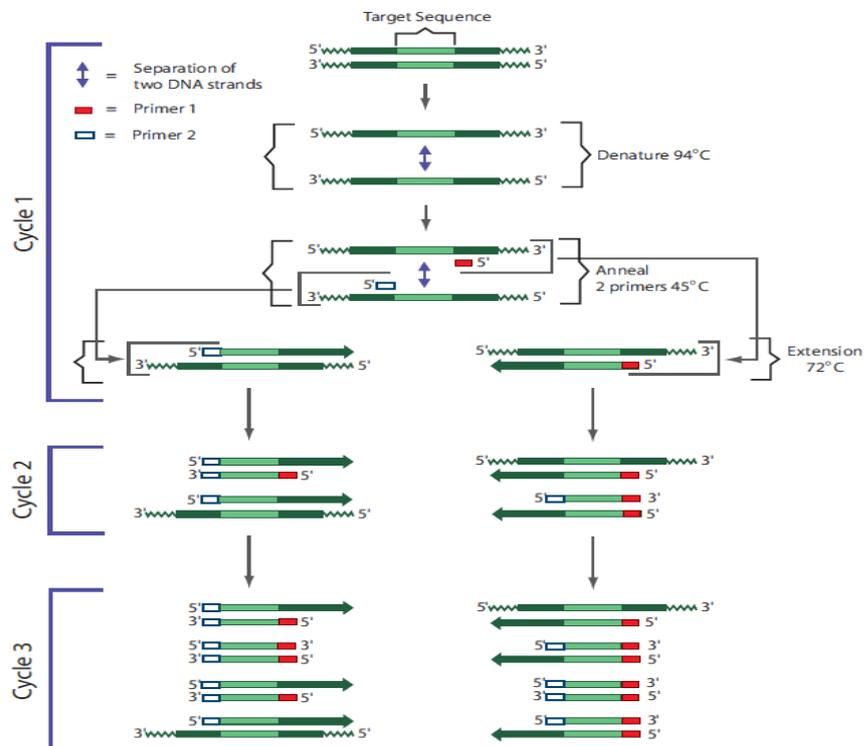
- No es natural. Actualmente nadie puede tomar una dieta estrictamente natural. Los agricultores antiguos cruzaban a menudo especies diferentes creando unas enteramente nuevas sin equivalentes directos en la naturaleza. El trigo, por ejemplo, es el resultado de una serie de cruzamientos. De este modo, nuestro trigo es una combinación de las características de varios ancestros que tal vez la naturaleza nunca hubiera inventado.

- Producirá alérgenos y toxinas en nuestros alimentos.
- Es indiscriminado y perjudicará a las especies a las que no va dirigido. Mientras que la toxina incorporada a las plantas Bt sólo afecta a los insectos que se alimentan del tejido vegetal, los pesticidas afectan inequívocamente a todos los insectos, nocivos y no nocivos, que se exponen a ellos.
- Acarreará una desgracia medioambiental con la aparición de "supercizañas". En este punto lo que preocupa es que los genes que confieren resistencia a los herbicidas emigren del genoma del cultivo al de las malas hierbas a través de la hibridación interespecies.

2.4 El análisis por PCR

En una reacción de PCR, el primer paso es la preparación de la muestra de ADN que es extraída de varias fuentes biológicas o tejidos. En la PCR, el ADN o gen a amplificar se define como "target" (diana) y los oligonucleótidos sintéticos utilizados se definen como "primers" (cebadores). Un set de 2 cebadores de entre 20-45 nucleótidos son sintetizados químicamente para que se correspondan con los extremos del gen a amplificar. Cada cebador se une a uno de los extremos de cada cadena de ADN y es el punto de inicio de la amplificación.

Una reacción típica de PCR contiene ADN molde, Taq polimerasa y los 4 dNTPS en un tampón de reacción apropiado. El volumen total de reacción es de 25-50 μ l. En el primer paso de la reacción de PCR, las cadenas complementarias de ADN se separan (desnaturalizan) la una de la otra a 94°C, mientras que la Taq polimerasa permanece estable. En el segundo paso, conocido como emparejamiento, la muestra es enfriada a una temperatura entre 40-65°C que permita la hibridación de los 2 cebadores, cada uno a una hebra del ADN molde. En el tercer paso, conocido como extensión, la temperatura es elevada a 72°C y la Taq polimerasa añade nucleótidos a los cebadores para completar la síntesis de una nueva cadena complementaria.



Estos tres pasos, desnaturalización-emparejamiento-extensión, constituye un ciclo de PCR. Este proceso se repite durante 20-40 ciclos amplificando la secuencia objeto exponencialmente. La PCR se lleva a cabo en un termociclador, un instrumento que es programado para un rápido calentamiento, enfriamiento y mantenimiento de las muestras durante varias veces. El producto amplificado es luego detectado por separación de la mezcla de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa.

PCR detección maíz BT

Los primers que se utilizan, por un lado, amplifican regiones endógenas del maíz, en este caso el **gen de la invertasa (Ivr1)** que dará lugar a un fragmento de **226 pb**, y, por otro lado, amplificarán también genes foráneos introducidos en el proceso de formación del transgénico, en este caso **el gen de la endotoxina Delta de *Bacillus thuringiensis* (CryI Ab)** que dará lugar a un fragmento de **184 pb**.



Análisis en gel de agarosa de productos de PCR a partir de diferentes alimentos que contienen maíz. Se puede observar como los alimentos con maíz normal sólo presentan una banda de 226 pb (3 y 6), mientras que los alimentos con maíz transgénico presentarán las 2 bandas 226 y 184 pb (2, 4, 5 y 7).

3. EXPOSICIÓN DE LOS HECHOS

Vamos a ir al mercado a comprar diferentes productos alimentarios que contiene maíz para ver si pertenece a una variedad normal o transgénica.

Para ello lo primero que haremos será la extracción del ADN de los diferentes alimentos seleccionados: 1. Harina de maíz marca A; 2. Harina de maíz marca B; 3. Harina de Maíz BIO; 4. Sémola de maíz. También pueden utilizarse otros productos con maíz que se decidan (es importante trabajar con muestras pulverizadas, por ejemplo, utilizando un molinillo). **VER PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN (ANEXO 1).**

Seguidamente, utilizaremos la MIX de PCR para la detección de maíz transgénico Bt.

4. COMPONENTES

Tampón de electroforesis concentrado 10x	100 ml
Agarosa	6.0 gr
Muestras maíz para extracción	4 muestras
Kit extracción ADN alimentos	para 25 muestras
MIX PCR Detección maíz transgénico	2 x 350 µl
Control positivo ADN normal	10 µl
Control positivo ADN transgénico	10 µl
GELSAFE tinción ADN	25 µl

Tampón de electroforesis 10 X para preparar Tampón de electroforesis 1 X que es el Tampón de trabajo para hacer los geles y el de la cubeta.

5. PRÁCTICA

5.1 EXTRACCIÓN DEL ADN DE ALIMENTOS QUE CONTIENEN MAÍZ

Se realizarán 4 grupos de trabajo.

Se suministran 4 muestras de alimentos que contiene maíz y se ha de detectar la presencia de ADN de maíz normal o transgénico: 1.Harina de maíz marca A; 2.Harina de maíz marca B; 3.Harina de Maíz BIO; 4.Sémola de maíz. También pueden utilizarse otros productos con maíz que se decidan (es importante trabajar con muestras pulverizadas, por ejemplo, utilizando un molinillo). **VER PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN (ANEXO 1).**

Para la extracción de las muestras suministradas utilizar 100 mg y para las muestras que se quieran evaluar empezar por 200 mg.

5.2 REACCIÓN DE LA PCR

NOTA: Utilizar siempre puntas con filtro y cambiar de punta cada vez que se realiza una acción para evitar contaminaciones que puede dar lugar a falsos resultados.

- Utilizar **2,5 µl** (100-250 ng) del ADN de cada extracción de ADN. **IMPORTANTE:** a) **Preparar un control negativo de amplificación**, para ello colocar **2,5 µl de agua libre de nucleasas** en lugar del ADN, esto sirve para saber si los reactivos o micropipetas y puntas pueden estar contaminados con ADN, no se ha de amplificar nada.
b) **Preparar un control positivo de amplificación**, para ello colocar **2,5 µl del control positivo ADN normal y ADN transgénico**.
- Las concentraciones típicas de los primers y parámetros utilizados dependerá de cada sistema utilizado. Una concentración final típica de primers es 0,5 µM.

REACTIVOS	VOLUMEN
MIX PCR	22,50 µl
ADN (100-250 ng)	2,5 µl
Volumen Total	25 µl

- Mezclar bien, el colorante rojo está incluido en la polimerasa facilita el proceso.
- Realizar el proceso de amplificación. **IMPORTANTE:** **Para la activación de la Polimerasa "HOT STAR" es necesario programar un paso de desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C**, después programar los 30 o 40 ciclos específicos de cada producto a amplificar.

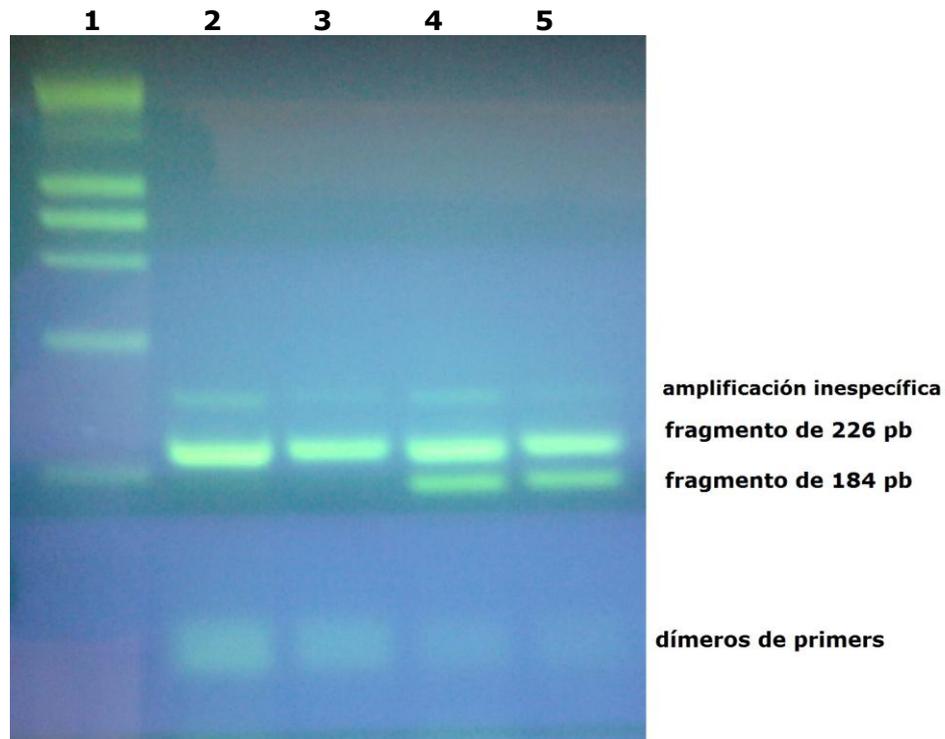
PROGRAMA PCR TRANSGENICOS

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización HOT STAR	95°C	10 minutos
Ciclos PCR Realizar 35 ciclos	95°C 66°C 72°C	30 segundos 30 segundos 45 segundos
Extensión final	72°C	10 minutos
Final	4°C	

- El producto de la PCR puede ser sembrado directamente en **un gel de agarosa 3.0%** después de la PCR, ya que el colorante rojo actúa como tampón de carga.

6. Utilizar el método de detección o tinción del ADN que se use en el laboratorio. Le recomendamos el uso del GELSAFE suministrado con el kit.

6. RESULTADOS



Gel de agarosa 3%

- 1: Marcador de peso molecular.
- 2: Control positivo ADN normal.
- 3: Control positivo ADN normal.
- 4: Control positivo ADN transgénico.
- 5: Control positivo ADN transgénico.

Se presenta un ejemplo de resultado de la amplificación de los controles positivo ADN normal y ADN transgénico que se suministran en el kit. Podemos observar en el caso de maíz normal la única banda de 226 pb y en el caso de maíz transgénico la presencia de las 2 bandas.

Se observa también un fragmento de mayor tamaño que se trata de una amplificación inespecífica pero que no afecta al resultado, y la formación de dímeros de primers, cosa muy habitual y que es la unión de los primers formando fragmentos mayores.

6. PREGUNTAS Y RESPUESTAS SOBRE LA PRÁCTICA

Una serie de preguntas se pueden realizar a los alumnos sobre la práctica:

1. **¿Cuál es la función de los 4 nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en una reacción de PCR?** Los 4 dNTPs son los componentes del ADN. Para la síntesis de ADN se requiere un ADN molde y 2 cebadores, la cadena opuesta del molde es sintetizada siguiendo la regla de emparejamiento de bases de Watson-Crick.
2. **¿Por qué hay 2 diferentes cebadores o "primers"?** Presentan una secuencia diferente que coincide con el inicio y final del gen o secuencia a amplificar (ADN molde).
3. **¿Qué productos de los que hemos comprado son normales y cuales OMG?** La harina de maíz de la marca B es transgénica mientras que el resto de productos que contiene maíz, este no es modificado.
4. **¿Explica cómo se diferencia en un gel de agarosa una variedad normal de una variedad transgénica de maíz Bt?** La reacción de PCR contiene 2 juegos de primers diferentes, uno amplificará un fragmento de un gen de la invertasa de maíz que estará presente en todas las muestras, y el otro juego amplificará un fragmento del gen exógeno de la toxina de *Bacillus thuringiensis* que también estará presente en las variedades transgénicas.
5. **¿Cuál es tu opinión sobre los alimentos modificados genéticamente o transgénicos?**

Para cualquier duda o consulta adicional, por favor, contacte con nosotros info@bioted.es

ANEXO1

Protocolo de extracción de ADN a partir de 100-200 mg de alimentos que contienen maíz

Dada la gran variedad de muestras que abarcan los alimentos que contienen maíz se hace difícil presentar un protocolo universal para todas las muestras.

El principal y más importante paso para obtener buenos rendimientos es una buena rotura y homogenización de la muestra que será específica para cada tipo de muestra. En todos los casos y para una mayor efectividad se debería utilizar nitrógeno líquido para pulverizar la muestra.

En muestras sólidas en polvo (harinas, etc.) homogenizar con un homogenizador eléctrico de mano; En muestras sólidas de gran tamaño (copos de maíz, chocolate, galletas, etc) utilizar un molinillo de café para pulverizar una muestra grande y luego pesar la cantidad requerida de polvo.

1. Pesar 100-200 mg de la muestra en un microtubo de 2.0 ml y añadir **1.2 ml de Tampón CTAB-1**. Vortex vigorosamente. **Incubar a 70°C durante 30 minutos**. Repetir el vortex varias veces durante la incubación. **En las muestras suministradas en el kit pesar sólo 100 mg.**
2. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos**. Aparecerá un pellet y en la superficie una capa de grasa, introducir la punta de pipeta atravesando esta capa superficial, intentando recoger sólo **600 µl de sobrenadante** que es el líquido transparente con color (evitar coger pellet y capa superficial) y colocar en un microtubo de 1.5 ml.
3. Añadir **300 µl del Tampón de Lisis/ Unión + 25 µl Proteínasa K a los 600 µl** de sobrenadante. Mezclar bien. **Incubar a 70°C durante 10 minutos**.
4. Añadir **225 µl de Isopropanol**. Mezclar bien.
5. Añadir **la mitad del líquido** en el reservorio de la Spin microcolumna con su tubo de recogida. **Centrifugar a 10.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el tubo de recogida.
6. Repetir el punto N.5 **con el líquido restante**.
7. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recogida y añadir al reservorio **500 µ de Tampón de Desinhibición**. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
8. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin microcolumna. **Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
9. 2º Lavado. **Añadir 500 µl de Tampón de Lavado** en el reservorio de la Spin microcolumna. **Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.
10. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual**.
11. Eliminar el tubo de recogida y insertar la spin microcolumna en un microtubo de 1.5 ml. **Añadir 150 µl de Tampón de elución** (precalentado a 70°C) en el centro de la membrana blanca. Incubar 2 minutos.
12. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos**. El microtubo contiene ahora el ADN.