

DETECCIÓN DE ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE POR PCR

Ref. PCROMG (4 prácticas)

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

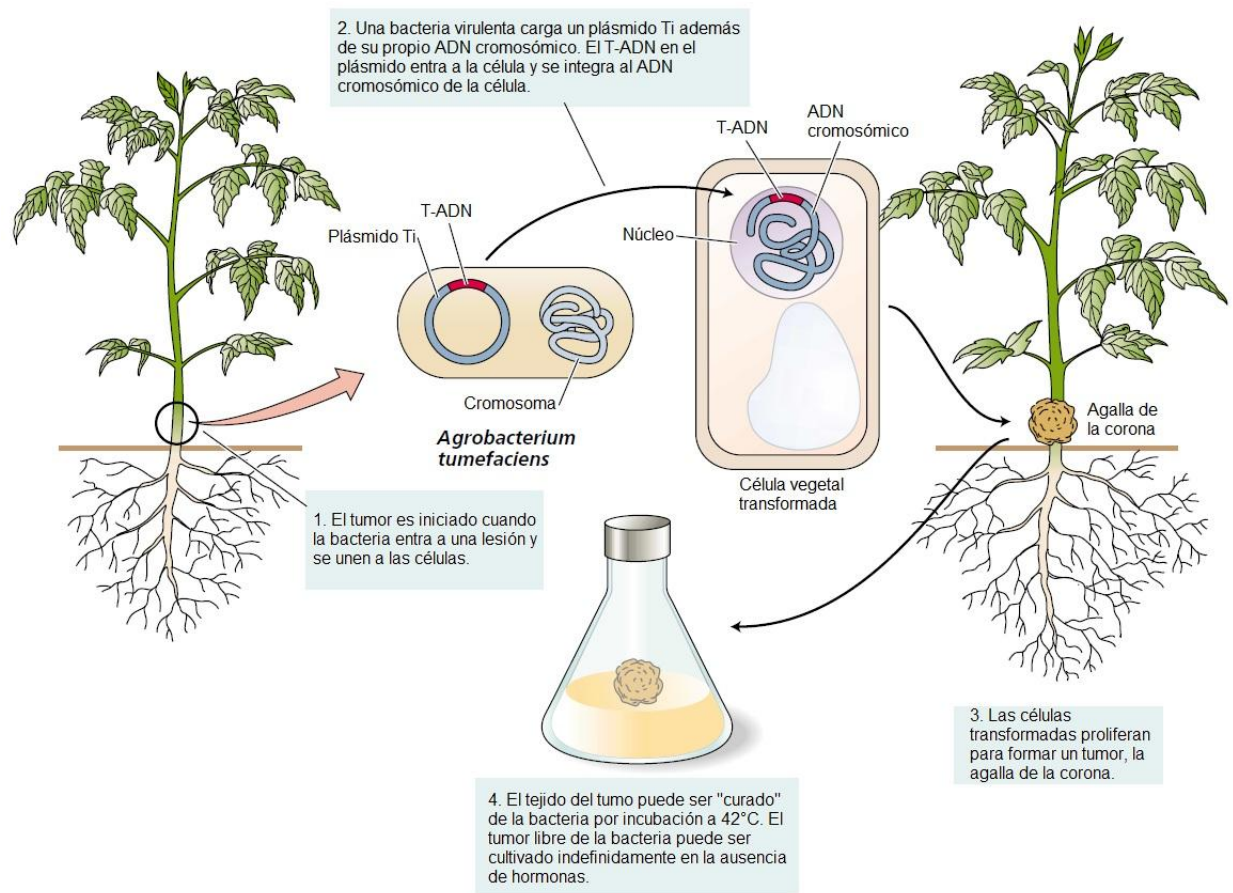
2.1 Organismos modificados genéticamente o transgénicos.

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 denomina **genéticamente modificadas** (GM).

La primera dificultad consiste en introducir el 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, conocido como agalla, en el tallo de plantas. 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 granjeos 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:

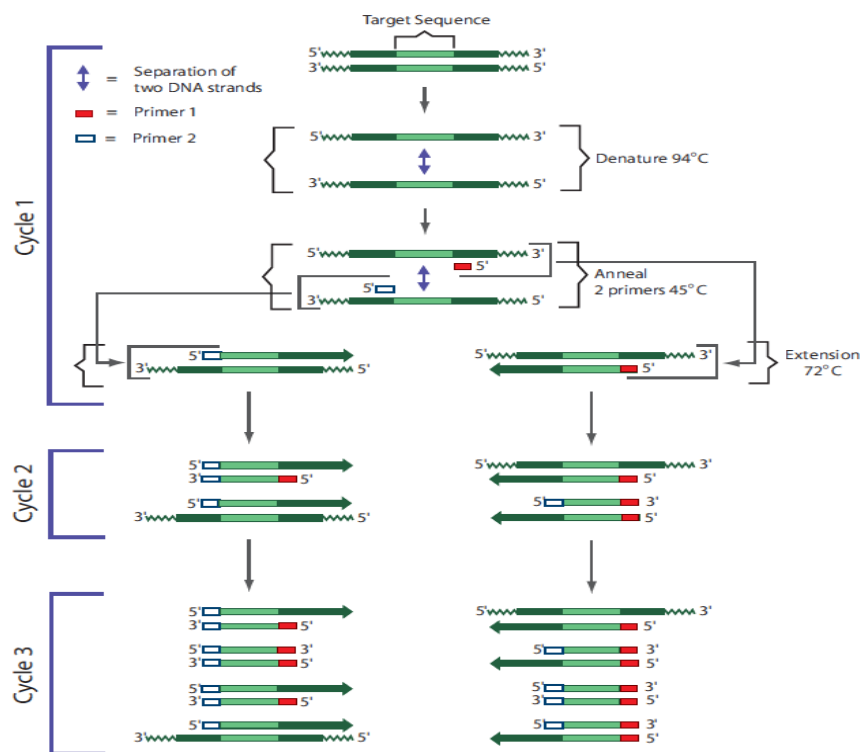
- No es natural. Actualmente nadie puede tomar una dieta estrictamente natural. Los agricultores antiguos cruzaban a menudo especies diferentes creando unas enteramente nuevas sin equivalentes directos en la naturaleza. El trigo, por ejemplo, es el resultado de una serie de cruzamientos. De este modo, 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 lo cuales 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.

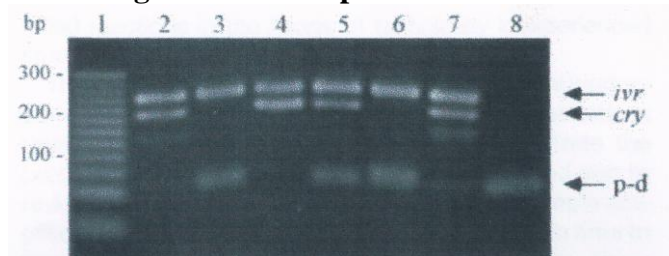
Una reacción típica de PCR contiene ADN molde, Taq polimerasa y los 4 dNTPS en un tampón de reacción apropiado. El volumen total de reacción es de 25-50 μ l. En el primer paso de la reacción de PCR, las cadenas complementarias de ADN se separan (desnaturalizadas) la una de la otra a 94°C, mientras que 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 son primers que 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, primers que amplificarán 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).

En esta práctica se realizará una PCR simulada ya que el instrumento para llevar a cabo la PCR tiene un coste muy elevado, para ello se utilizarán colorantes NO TOXICOS que migrarán en el gel de agarosa como si se tratasen de los fragmentos de ADN.

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: granos de maíz marca A; granos de maíz marca B; salvado de cereales marca A; salvado de cereales marca B; Tortitas de maíz.

Seguidamente, utilizaremos un kit comercial para la detección de maíz transgénico Bt.

4. COMPONENTES

Tampón de electroforesis concentrado 10 X (2 envases 500ml)	2 x 50 ml
Agarosa	1.75 gr
Micropipeta 20 microlitros	1
Rack de puntas	1
Microtubos de muestras	6

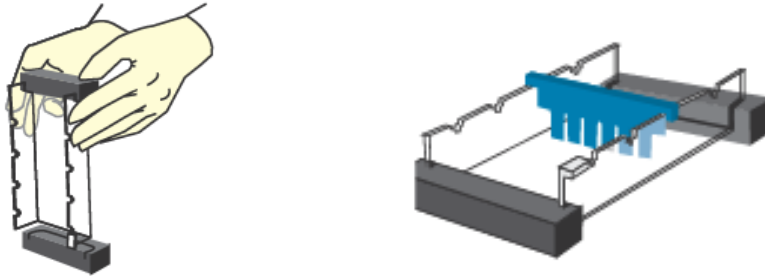
Añadir 450 ml de agua destilada a cada envase de Tampón de electroforesis 10 X para elaborar 2 x 500 ml de Tampón de electroforesis 1 X que es el Tampón de trabajo.

5. PRÁCTICA

4.1 PREPARACION GEL DE AGAROSA

A) Preparación del molde

Coger el molde para hacer los geles y cerrar los extremos con los topes para que no se salga la agarosa. Después colocar el peine para formar los pocillos.



B) Preparación del gel de agarosa

1.b) Utilizar un vaso o erlenmeyer de 100 ml para preparar la solución del gel:

2.b) **Para geles de 7 x 7 cm:** Añadir **32 gr de Tampón de electroforesis 1 X más 0.30 gr de agarosa**, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa.

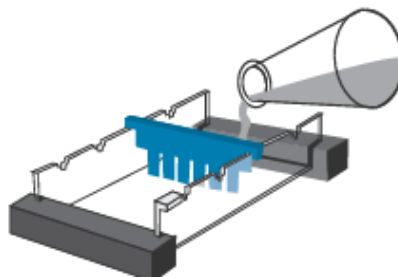
Para geles de 7 x 10 cm: Añadir **42 gr de Tampón de electroforesis 1 X más 0.40 gr de agarosa**, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa

Asegurarse que se ha añadido los 450 ml de agua destilada al Tampón de electroforesis 10 X

3.b) Calentar la mezcla para disolver la agarosa, el método más rápido es la utilización de un microondas, también puede utilizarse un placa calefactora, en ambos casos, para que la agarosa se disuelva se ha de llevar **la solución a punto de ebullición**. La solución final debe aparecer clara sin partículas aparentes.

4.b) **Enfriar** la solución de agarosa más o menos a 55°C (para acelerar el proceso se puede enfriar colocando el envase debajo de un grifo de agua y agitar). Si se produce mucha evaporación del líquido, añadir tampón de electroforesis.

5.b) Añadir la solución de agarosa al molde.

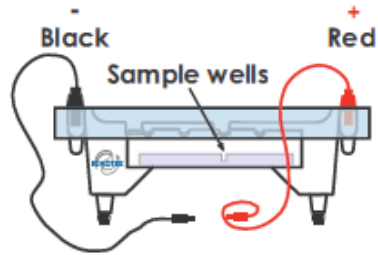


6.b) Permitir que el gel solidifique. Para acelerar el proceso se puede sembrar el gel en una nevera. (si la electroforesis se realizará al día siguiente, conservar el gel a 4°C).

C) Preparación del gel para la electroforesis

1.c) Después que el gel se ha solidificado con mucho cuidado sacar los topes.

2.c) Colocar el gel en la cámara de electroforesis correctamente orientada con los pocillos más cerca del polo negativo (color negro).



3.c) Llenar la cámara de electroforesis con **300 ml de Tampón de electroforesis**. **El tampón de electroforesis se puede utilizar para 2 experimentos de electroforesis, una vez terminada la electroforesis guardar este tampón utilizado en un envase diferente al suministrado para utilizarlo en una nueva electroforesis.**

4.c) Asegurarse que el gel está completamente cubierto de tampón.

5.c) Sacar el peine que ha formado los pocillos con mucho cuidado de no romper ningún pocillo.

6.c) Proceder a la siembra del gel y llevar a cabo la electroforesis.

4.2 SIEMBRA DEL GEL Y ELECTROFORESIS

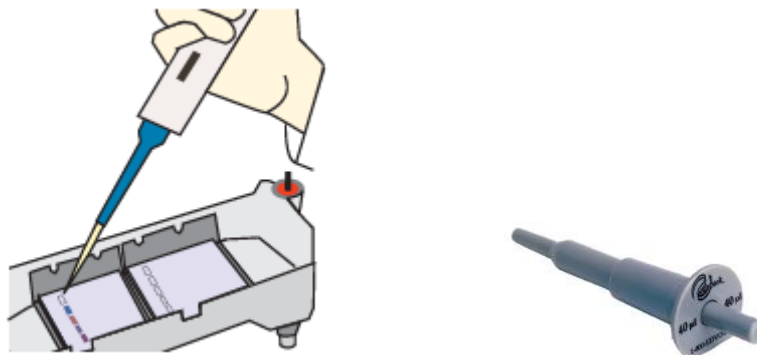
Nota: Si usted no está familiarizado con la siembra de geles de agarosa, es recomendable que practique la siembra antes de llevar a cabo el experimento, o llevar a cabo el experimento completo antes de realizarlo con los alumnos.

A) Muestras de electroforesis: *Chequear el volumen de las muestras. Algunas veces pequeñas gotas de la muestra puede estar en las paredes de los microtubos. Asegurarse de que toda la cantidad de muestra se encuentra uniforme antes de sembrar el gel. Centrifugar brevemente los microtubos de muestra, o golpear los microtubos contra una mesa para obtener toda la muestra en la parte inferior del microtubo.*

1.a) Se suministran 6 muestras diferentes presentadas en 6 tubitos cada uno de un color, sembrar o cargar las muestras en el siguiente orden:

Pocillo	Muestra	Descripción
1	Verde	Marcador peso molecular
2	Negro	Granos maíz marca A
3	Rojo	Granos maíz marca B
4	Lila	Salvado de cereales marca A
5	Azul	Salvado de cereales marca B
6	Amarillo	Tortita de maíz

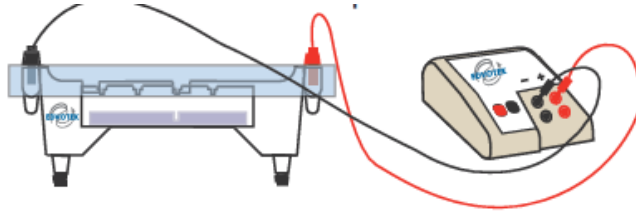
2.b) Sembrar 20 microlitros de cada muestra, utilizar para ello la micropipeta de volumen fijo que se suministra con una punta de pipeta.



B) Llevar a cabo la electroforesis

1.b) Después que se han sembrado las muestras, cuidadosamente colocar la cubierta del aparato de electroforesis en los terminales de los electrodos.

2.b) Insertar la clavija del cable negro en la entrada de color negro de la fuente de corriente (entrada negativa). Insertar la clavija del cable rojo en la entrada de color rojo de la fuente de corriente (entrada positiva).



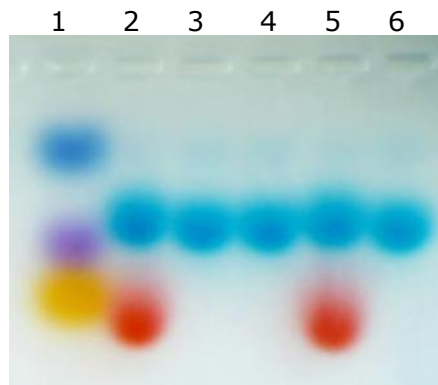
3.b) Configurar la fuente de corriente a **75 voltios (30 minutos) o a 150 voltios (20 minutos)**. **Vigilar que los colorantes no salen fuera del gel.**

4.b) Después de 10 minutos empezará a observarse la separación de los colorantes.

5.b) Después de que la electroforesis ha terminado, **apagar la fuente de corriente**, desconectar los cables y sacar la cubierta.

6.b) Colocar el gel en un transiluminador de luz blanca (si no se dispone, una hoja de papel blanco también puede utilizarse).

5. RESULTADOS



1: Marcador de peso molecular.

2: Granos maíz marca A.

3: Granos maíz marca B.

4: Salvado de cereales marca A.

5: Salvado de cereales marca B.

6: Tortita de maíz.

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?** Los alimentos que tienen maíz normal son los gramos de maíz marca B, salvado de cereales marca A y las tortitas de maíz, mientras que los alimentos transgénicos son los granos de maíz de la marca A y el salvado de cereales marca B.
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, 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 tú opinión sobre los alimentos modificados genéticamente o transgénicos?**

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