

ESTUDIO DE POLIMORFISMOS ALU HUMANOS POR PCR

Ref. PCRALU

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) mediante el estudio de polimorfismos Alu entre individuos utilizando para ello la técnica de la PCR.

2. INTRODUCCION

2.1 PCR

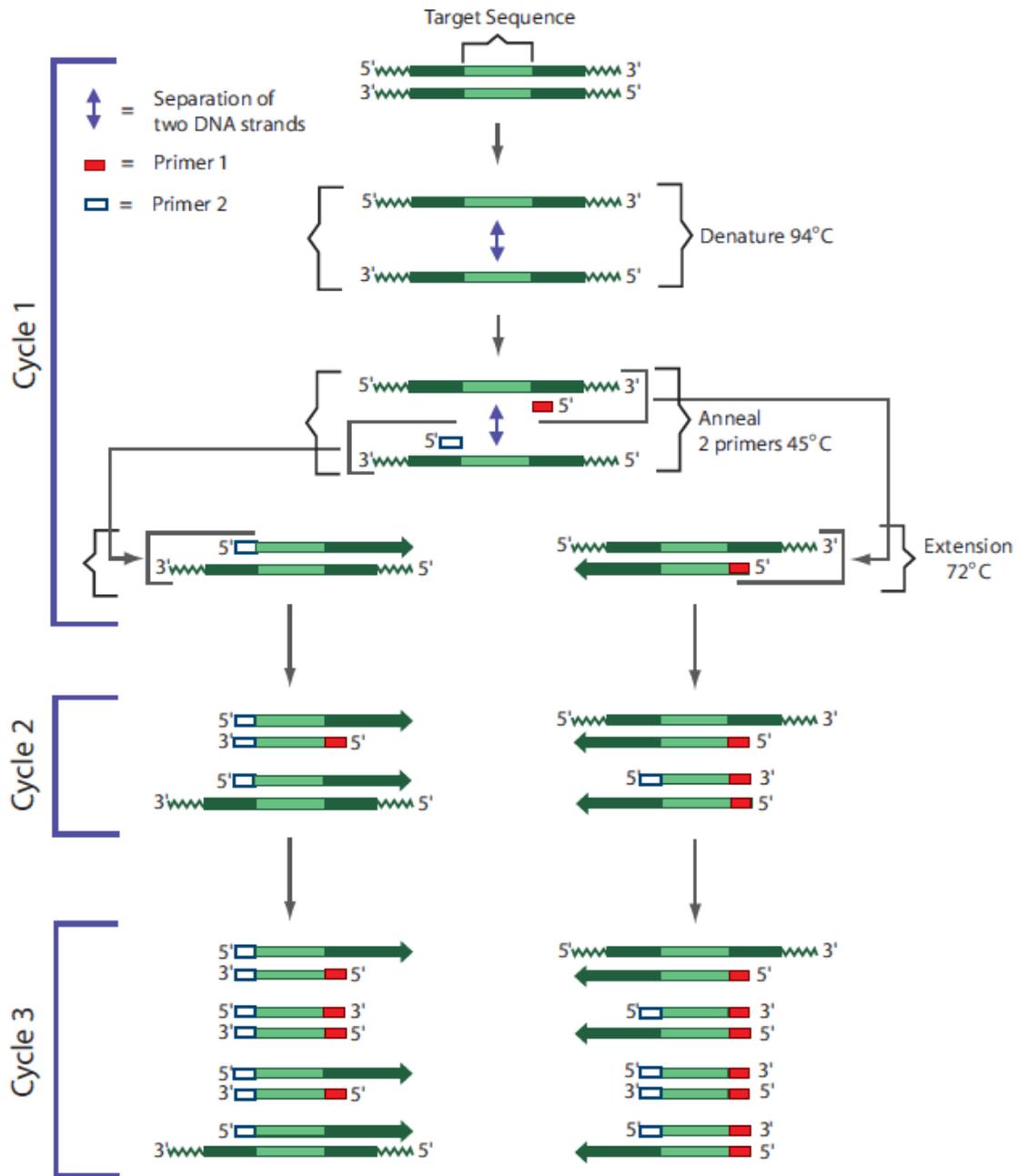
La PCR ha revolucionado la investigación y diagnóstico basado en la Biología Molecular. La PCR es un proceso simple, exacto y altamente reproducible que proporciona la ventaja de empezar con una pequeña cantidad de ADN y ser capaz de amplificarlo de forma que se tenga suficiente cantidad para realizar experimentos.

Se han desarrollado gran cantidad de test diagnósticos, también se ha utilizado en mapaje y secuenciación de ADN en proyectos de genoma y está siendo utilizado determinaciones forenses, paternidades, etc.

En todos los casos se amplifican segmentos de ADN que posteriormente son sometidos a análisis y estudios varios.

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 (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.

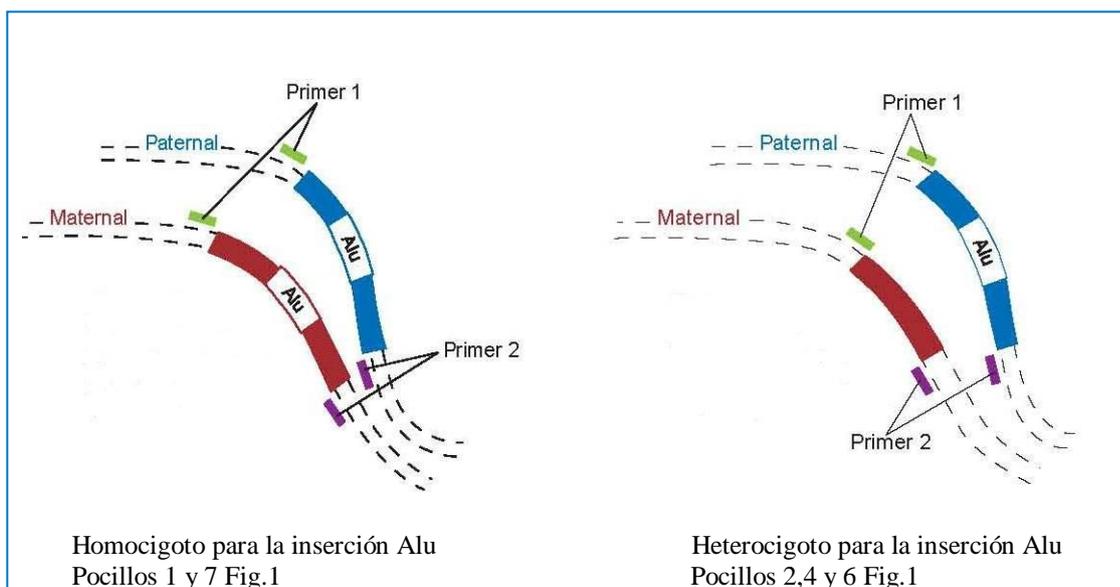
2.1 Polimorfismos Alu

El genoma humano consiste en 2.9 billones de pares de base de ADN. De este total, sólo un 5% consiste en exones los cuales codifican para proteínas. Los intrones y otras secuencias no codificantes pueden poseer funciones que están por descubrir aunque otras muchas parecen no tenerlas. Muchas de estas secuencias están repetidas cientos o miles de veces a través del genoma representando algo más del 20 % del genoma humano.

En 1979, se descubrió que el ADN humano contiene un elemento repetitivo de 300 pares de bases. Las copias de este elemento contienen un lugar de reconocimiento para el enzima de restricción Alu I, de forma que se denominaron **Elementos Alu**. Se han encontrado estos elementos en exones, intrones y en otras regiones no codificantes. Cuando las secuencias Alu se insertan en una región codificante para una proteína, la rotura del gen, normalmente conduce a un daño en el organismo.

Aunque todos los humanos y otros primates poseen cientos de miles de elementos Alu, variaciones en su emplazamiento pueden observarse. Las secuencias de ADN que varían entre individuos son conocidas como **POLIMORFISMOS**. Por ejemplo, una persona presenta una inserción Alu en un locus específico del ADN, mientras que otro individuo no la posee. Además, la inserción puede estar presente o ausente en cada uno de los cromosomas homólogos. **El polimorfismo Alu que vamos a estudiar en esta práctica, es la inserción que se encuentra en el intrón 8 del gen activador del plasminógeno tisular TPA Alu**. Esta sección tiene unos 260-270 nucleótidos de longitud y la inserción tiene aproximadamente unas 300 pares de base de longitud, de forma que la inserción producirá un aumento de la longitud en 570 pares de bases.

Se puede testar si una persona posee una inserción Alu al locus TPA por amplificación del locus utilizando la PCR. Si una persona es homocigoto para la inserción, la electroforesis en gel de agarosa del producto de la PCR producirá un única banda de **570 pares de bases**. Si una persona es heterocigoto, posee la inserción en uno de los cromosomas homólogos pero no en el otro, 2 bandas aparecerán en el gel, una de 570 pares de bases y otra de 260 pares de bases. Si una persona pierde la inserción en ambos cromosomas homólogos, la PCR resultará en una sola banda de 260 pares de bases.



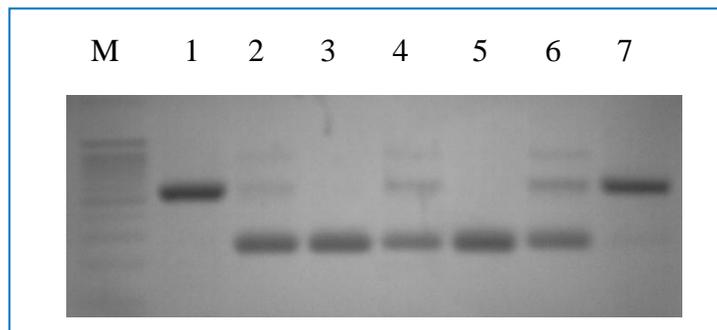
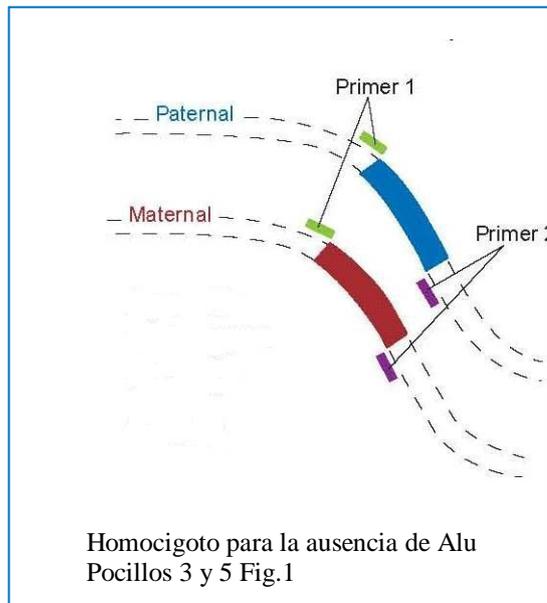


Fig.1 Análisis de PCR de diferentes individuos para el estudio de la inserción ALU en el intrón 8 del gen activador del plasminógeno tisular.

Se utiliza un gel de agarosa 2.5 % que se tiñe con el DanaBlue de DanaGen-Bioted para la detección de los productos de la PCR amplificados utilizando ADN genómico de diferentes individuos y utilizando los primers PLAT.A y PLAT.B.

Marker: DanaMarker Shuman, contiene 11 bandas de 1.250 pb hasta 100 pb

Homocigotos para el alelo Alu(+) produce un fragmento de 570 pb. (pocillos 1 y 7)

Homocigotos para el alelo Alu(-) produce un fragmento de 260 pb. (pocillos 3 y 5)

Heterocigotos producen fragmentos para ambos tamaños 570 y 260pb (pocillos 2, 4 y 6), en estos casos además se observa una ligera formación de bandas de heteroduplex que se forman por el anillamiento de cadenas de Alu(+) y Alu (-).

3. COMPONENTES

Se suministran reactivos suficientes para la realización de 25 PCR individuales y la realización de **4 geles de electroforesis en agarosa al 2.0-2.5 %**.

Tampón de electroforesis concentrado 10 X	100 ml	
Agarosa	3.0 gr	
MIX PCR	2 x 350 µl	Conservar a -20°C
Control positivo heterocigoto	20 µl	Conservar a -20°C

Tampón de electroforesis 10 X para elaborar 2 x 500 ml de Tampón de electroforesis 1 X que es el Tampón de trabajo.

*** La concentración de agarosa al 2% permite una mejor separación de los fragmentos menores de 1000 pares de bases.**

3.1 POLIMERASA MIX HOT STAR

Lista para su uso 2X, que permite amplificar cualquier fragmento a partir de ADN, de forma que el usuario sólo ha de añadir agua. **Se requiere un paso de activación de 10 minutos a 95°C** de forma que se eliminen los productos no específicos como “primers-dimers”. Además contiene un **colorante rojo** que permite la fácil visualización y la siembra directa en el gel sin necesidad de mezclar con un tampón de carga.

3.2 PRIMERS (PLAT.A + PLAT.B)

Los primers que flanquean el locus TPA fueron generados a partir de las secuencias publicadas por Frienzer-Degen et al. 1986.

4. PRÁCTICA

4.1 EXTRACCIÓN DEL ADN

El paso previo a cualquier estudio genético suele ser el aislamiento del ADN genómico, esto se puede llevar a cabo de diferentes formas (métodos caseros, kits comerciales, etc.) y a partir de diferentes muestras (sangre, tejido, etc.).

Para la realización de esta práctica se recomienda que la fuente del ADN provenga de la **saliva del alumno**, ya que es la fuente de ADN más accesible y no supone ningún riesgo como pueda ser la extracción de sangre. Para ello se recomienda el uso del DANAGENE SALIVA KIT que permite obtener el ADN genómico a partir de una muestra de saliva o frotis bucal.

4.2 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.

1. Utilizar **2.5 µl** (100-250 ng) del ADN de cada alumno para cada reacción de PCR. **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 heterocigoto** en lugar del ADN.
2. 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

3. Mezclar bien, el colorante rojo incluido en la polimerasa facilita el proceso.
4. Para aquellos termocicladores que no tengan un “heated lid”, añadir 25 µl de aceite mineral para prevenir la evaporación.
5. 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 ALU

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización HOT STAR	95°C	10 minutos
Ciclos PCR Realizar 35 ciclos	95°C	30 segundos
	65°C	30 segundos
	72°C	45 segundos
Extensión final	72°C	10 minutos
Final	4°C	

6. El producto de la PCR puede ser sembrado directamente en un gel de agarosa después de la PCR ya que el colorante rojo actúa como tampón de carga.
7. Utilizar el método de detección o tinción del ADN que se use en el laboratorio. Le recomendamos el uso del DANABLUE o GELSAFE, nuestros métodos no tóxicos.
8. Se ha de obtener un resultado similar al observado en la figura 1.
9. Se puede calcular la frecuencia observada de los diferentes polimorfismos en la clase.

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