

AMPLIFICACIÓN Y DETECCIÓN POR PCR DEL LOCUS HUMANO D1S80

Ref. PCR1

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 del polimorfismo D1S80 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 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 en 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.

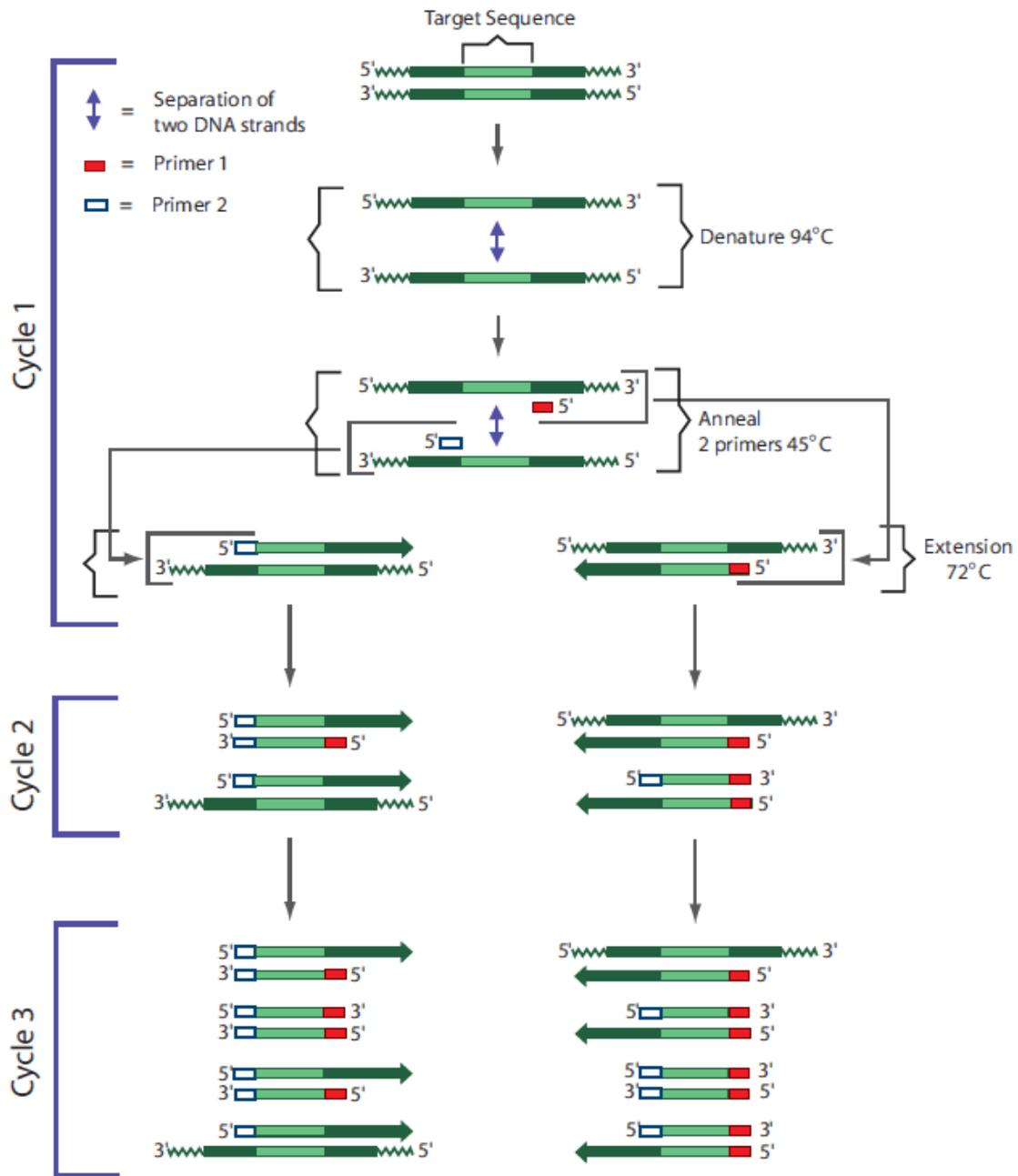


Figura 1

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.

2.2 Locus Humano D1S80

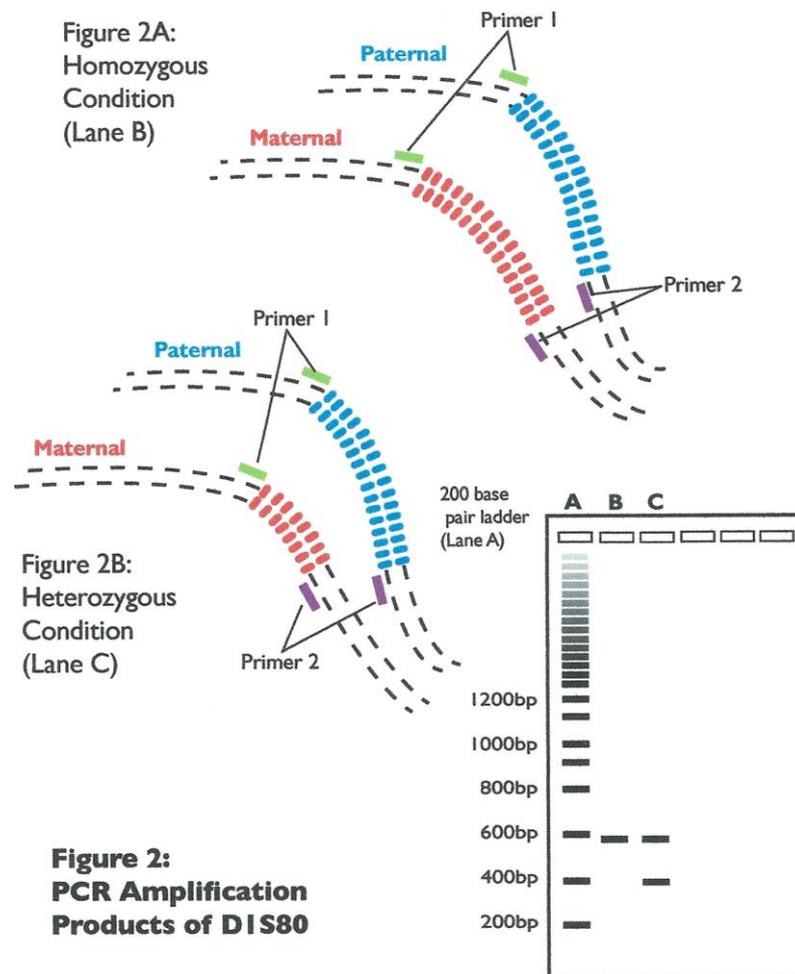
Los Polimorfismos de ADN se refieren a regiones de cromosomas que varían ampliamente de un individuo a otro. Examinando varias de estas regiones dentro del ADN genómico obtenido de un individuo, se puede determinar el "DNA fingerprinting" de un individuo.

Los polimorfismos del ADN se utilizan para la determinación de paternidades/maternidades, identificación de restos humanos, y la base genética de enfermedades. La aplicación más usual ha sido en el campo forense para la identificación de posibles criminales.

Diferentes tipos de ADN repetitivo ha sido encontrado útil para análisis de ADN "fingerprinting": **VNTRs** o minisatélites, y **STRs** o microsatélites. Mediante el análisis de diferentes VNTRs o STRs de un mismo individuo, los investigadores pueden obtener un "DNA fingerprinting" único que será diferente a cualquier otro individuo excepto para gemelos idénticos.

Los **Variable Number of Tandem Repeats** presentan una secuencia que oscila desde 7 a 100 pb de longitud, mientras que los **Short Tandem Repeats** la secuencia es menor de 2-6 pb de longitud. El número de repeticiones puede variar considerablemente.

El **locus humano D1S80** está presente en el cromosoma 1 y contiene un VNTR consenso de 16 pb (AGGACCACCAGGAAGG). El alelo con menor número de repeticiones contiene 14 repeticiones, mientras que el alelo con más repeticiones presenta hasta 72 repeticiones. El alelo más común contiene 18 y 24 repeticiones, mientras que el más raro contiene 14 y 38. No existe un fenotipo conocido asociado con el locus D1S80, haciendo ideal su estudio para distinguir personas sólo por su secuencia del ADN.



Gel results are not drawn to scale.

Fig.2 Un individuo que sea homocigoto para el locus D1S80 tendrá el mismo número de repeticiones en ambos cromosomas 1, lo cual llevará a mostrar una única banda en un gel de agarosa después de la PCR. Más común, una persona será heterocigota presentando diferente número de repeticiones de un cromosoma a otro, esto producirá 2 bandas en un gel de agarosa después de la PCR. Actualmente, muchos organismos oficiales están utilizando STRs ya que son más fácilmente amplificados y se requiere menos ADN inicial.

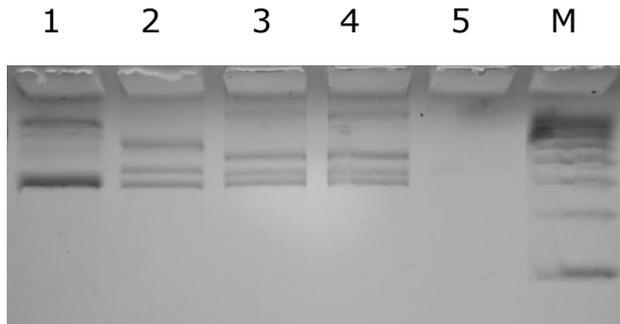


Figura 3

Fig. 3: Análisis de PCR de diferentes individuos para el estudio del polimorfismo D1S80.

Se utiliza un gel de agarosa 2.5 % que se tiñe con el DanaBlue-FlashBlue de DanaGen-Biotec para la detección de los productos de la PCR amplificados utilizando ADN genómico de diferentes individuos.

M: Marcador de peso molecular.

Pocillo 1: Homocigoto para el locus D1S80.

Pocillo 2, 3 y 4: Heterocigotos para el locus D1S80.

Pocillo 5: Control negativo.

Es cierto que se observan más de una banda tanto en los homocigotos como en los heterocigotos que se corresponde con amplificaciones inespecíficas y la unión de los fragmentos que genera un fragmento de mayor tamaño.

La electroforesis en gel de agarosa utilizando marcadores de peso molecular estándar no puede ser utilizada para determinar el número exacto de repeticiones debido a la insuficiente resolución de la agarosa. No obstante, sí que sirve para mostrar claramente los polimorfismos diferentes que presentarán varias muestras de individuos.

El alelo con menor número de repeticiones contiene 14 repeticiones, mientras que el alelo con más repeticiones presenta hasta 48 repeticiones por lo que los genotipos conocidos del locus D1S80 pueden presentar fragmentos que van desde 385-815 pb. Existen más de 22 alelos conocidos siendo el alelo más común el que contiene 18 y 24 repeticiones, mientras que el más raro contiene 14 y 38. No existe un fenotipo conocido asociado con el locus D1S80, haciendo ideal su estudio para distinguir personas sólo por su secuencia del ADN.

La electroforesis con gel de poliacrilamida es el método de elección para el análisis del locus D1S80 o la electroforesis capilar que es como se realiza actualmente en la mayoría de laboratorios de identificación forense.

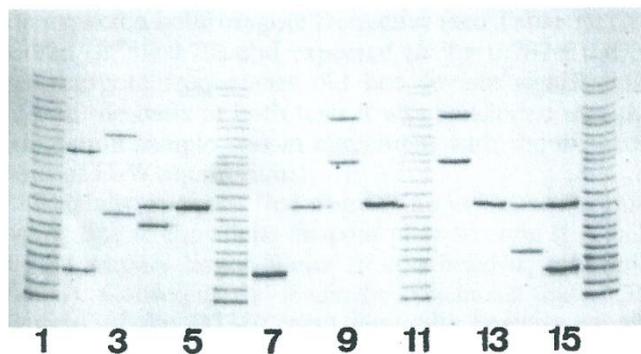


Figura 4

Fig. 4: Gel de poliacrilamida mostrando diferentes genotipos para el locus D1S80

- Pocillo 2: Control DNA para el genotipo de 18-29 fragmentos.*
- Pocillo 3: Genotipo de 23-31 fragmentos.*
- Pocillo 4: Genotipo de 22-24 fragmentos.*
- Pocillo 5: Genotipo de 24-24 fragmentos.*
- Pocillo 7: Genotipo de 18-18 fragmentos.*
- Pocillo 8: Genotipo de 24-24 fragmentos.*
- Pocillo 9: Genotipo de 28-33 fragmentos.*
- Pocillo 10: Genotipo de 24-24 fragmentos.*
- Pocillo 12: Genotipo de 28-33 fragmentos.*
- Pocillo 13: Genotipo de 24-24 fragmentos.*
- Pocillo 14: Genotipo de 20-24 fragmentos.*
- Pocillo 15: Genotipo de 18-24 fragmentos.*

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 10x	100 ml	
Agarosa	3.0 gr	
MIX PCR	2 x 350 µl	Conservar a -20°C
Control positivo DNA	25 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

Los primers utilizados para el locus D1S80 son los descritos por Budowle y colaboradores.

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, saliva, 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: 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.
2. Las concentraciones típicas de los primers y parámetros utilizados dependerá de cada sistema utilizado. Una concentración final típica de primers es 0.5 mM.

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 D1S80

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización HOT STAR	95°C	10 minutos
Ciclos PCR Realizar 35 ciclos	95°C 67°C 72°C	30 segundos 30 segundos 1 minuto
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-FLASHBLUE o GELSAFE, nuestros métodos no tóxicos.
8. Se ha de obtener un resultado similar al observado en la figura 4.
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 info@bioted.es