

SOUTHERN BLOT

5 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de esta práctica es introducir a los estudiantes en el conocimiento de una de las técnicas de hibridación utilizadas en laboratorio, el **Southern Blot**. En este caso se utiliza como herramienta para una prueba de "DNA fingerprinting" (huella genética) en un caso hipotético de determinación de paternidad.

2. COMPONENTES para 5 grupos de estudiantes

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
A Fragmentos estándar de ADN	-20°C
B ADN madre cortado con enzimas de restricción	-20°C
C ADN Hijo cortado con enzimas de restricción	-20°C
D ADN padre 1 cortado con enzimas de restricción	-20°C
E ADN padre 2 cortado con enzimas de restricción	-20°C
Practice Gel Loading Solution	Temperatura ambiente
Tampón de electroforesis 50X	Temperatura ambiente
Bote de Blue –Blot DNA Stain Solution 10 X	Temperatura ambiente
Membrana de Nylon 7 x 7 cm	Temperatura ambiente
Papel de filtro para el blotting 7 x 7 cm	Temperatura ambiente
Agarosa	Temperatura ambiente
Pipetas de transferencia	Temperatura ambiente
Pipetas de 1 ml estériles	Temperatura ambiente
Probeta 100 ml	Temperatura ambiente

Nota: Este kit NO UTIZA ningún material derivado de ADN Humano

2.1 Material requerido y no suministrado

- Aparato de electroforesis horizontal
- Fuente de energía para la electroforesis.
- Sistema de visualización del ADN
- Bandeja para la tinción.
- Baño de agua.
- Estufa o incubador 80°C (OPCIONAL).
- Micropipetas automáticas y puntas.
- Microtubos y tubos de 10 ml.
- Placa calefactora o microondas.
- Agua destilada
- NaCl.
- NaOH
- HCl concentrado.
- Plástico para envolver y papel secante.

3. INTRODUCCIÓN

El Southern Blot es una técnica de hibridación que permite identificar fragmentos de ADN separados por electroforesis en gel y transferidos a una membrana de nitrocelulosa o nylon.

Su nombre procede de la persona que lo diseñó Edwin Southern y permite la detección simultánea de varias secuencias diana de distintos tamaños con una única hibridación. Típicamente se utilizan sondas radiactivas, pero en este caso vamos a utilizar una detección no-isotópica para su uso escolar.

EL material de partida es el ADN purificado, el cual es sometido a una **digestión enzimática**, los enzimas más utilizados son el Hae III y Hinf I. El ADN digerido se somete a una **electroforesis en gel de agarosa** para separar los fragmentos producidos según su tamaño. Cuando se trabaja con ADN genómico, tras la electroforesis se observa una estela fluorescente continua o "smear" debido a que la digestión produce un número muy elevado de fragmentos diferentes con múltiples tamaños.

El siguiente paso es **la transferencia del ADN** a una membrana de nylon o nitrocelulosa para obtener una réplica exacta del patrón de bandas de ADN que hay en el gel. Esta consta de varios pasos que incluyen la desnaturalización para separar las cadenas de ADN de forma que la sonda pueda hibridar; la transferencia desde el gel a la membrana por capilaridad; y por último anclaje del ADN a la membrana que se consigue mediante incubación de la membrana a 80°C, o irradiando con luz UV las membranas.

La **hibridación** se realiza incubando la membrana con diferentes reactivos en un tubo de hibridación, entre ellos la sonda o sondas marcadas específicamente y diluidas en una solución de hibridación adecuada.

Finalmente, el **revelado** que se realiza mediante autorradiografía con una película de rayos X, de manera que aparecerá una mancha oscura en los puntos de la membrana en que se localicen los híbridos sonda/secuencia diana.

El ADN presente en el núcleo de cualquier célula es el material genético que actúa como traductor para la síntesis de proteínas de cada célula. No obstante, en mamíferos, una larga fracción del ADN total no codifica para proteínas y su función no está muy clara. El ADN polimórfico se refiere a las regiones del cromosoma que varía de un individuo a otro. Examinando varias de estas regiones dentro del ADN genómico obtenido de un individuo, uno puede determinar el **ADN "fingerprinting" (huella genética o tipaje)** para este individuo.

Las personas no pueden tener el mismo patrón de los lugares de reconocimiento de los enzimas de restricción. **Variaciones en la longitud de los fragmentos entre diferentes individuos es conocido como polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción FFLP.**

Los polimorfismos de ADN son ampliamente utilizados para determinar paternidades, parentescos, identificación de restos humanos y la base genética de varias enfermedades. El ADN "fingerprinting" (huella genética) permite la identificación del origen de una muestra de ADN, esto es muy importante en muchos casos forenses ya que puede permitir una identificación positiva con mucha precisión cotejando ADN de diferentes personas.

Actualmente se está utilizando la PCR para el análisis forense de ADN. Esta técnica requiere mucho menos ADN (500 veces) que el análisis de RFLP y es un método mucho más rápido.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

El Southern Blot tiene muchas aplicaciones, aunque muchas de ellas están siendo substituidas por técnicas como la PCR, que aportan mayor sensibilidad y rapidez.

El objetivo de esta práctica es introducir a los estudiantes en el conocimiento de una de las técnicas de hibridación utilizadas en laboratorio, el Southern Blot. En este caso se utiliza como herramienta para una prueba de "DNA fingerprinting" (huella genética) en un caso hipotético de determinación de paternidad.

Se obtuvo DNA de 2 posibles padres, esas muestras de DNA fueron digeridos con el mismo enzima de restricción en reacciones separadas. El objetivo de la prueba es determinar quién es el padre del hijo mediante el análisis y emparejar el patrón de fragmentación del ADN después de la electroforesis en gel de agarosa.

ORGANIZACIÓN DE ESTE KIT

Este kit contiene reactivos para 5 grupos. El experimento se divide en 3 partes:

- 1) Electroforesis gel de agarosa.
- 2) Transferencia Southern Blot.
- 3) Detección del ADN.

TIEMPO APROXIMADO PARA LAS PREPARACIONES PREVIAS Y PROCESOS DEL EXPERIMENTO

1. La electroforesis debería pararse cuando el colorante naranja de carga haya migrado aproximadamente 4,5 cm desde el pocillo de siembra del gel de agarosa.
2. Las preparaciones previas de reactivos se pueden hacer el día previo o el día de la práctica y puede llevar aproximadamente 1h 30'.
3. Se requieren 90 minutos para preparar los procedimientos de transferencia de Southern Blot, la cual tiene lugar durante toda la noche. Al día siguiente el blot se desmonta y se incuba durante 30 minutos.
4. La detección del ADN requerirá aproximadamente 25 minutos para la tinción y destinción.

4.1 Precauciones

1. Llevar gafas y guantes de laboratorio mientras se trabaja.
2. **NO PIPETEAR CON LA BOCA**, utilizar los dispositivos adecuados.
3. Extremar las precauciones cuando se trabajan con equipos que utilizan conjuntamente calor y mezcla de reactivos.
4. Lavarse las manos con jabón y agua después de haber trabajado en el laboratorio o utilizado reactivos o materiales biológicos.



4.2 Preparaciones Previas

PREPARACIÓN GENERALES

1. Para cada gel que debe ser procesado para el Southern Blot reunir el siguiente material:

- 1 pieza de Membrana de nylon 7 x 7 cm.
- 1 pieza de papel de filtro 7 x 7 cm.
- 20 toallitas de papel o papel secante (debería ser suficientes para cubrir el gel).

2. Como paso opcional para un mejor rendimiento, un día antes de la práctica de transferencia poner a 80°C el incubador, si se dispone.

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES PARA LA TRANSFERENCIA

1. Preparar 1 litro aproximadamente de 0,25 N HCl. Mezclar:

- 21 ml de HCl concentrado 12N**
- 979 ml de Agua destilada**

2. Preparar 2 litros de la solución de desnaturalización ADN alcalina/salina
0,5M NaOH / 0,6 M NaCl

Añadir el NaOH y NaCl al agua, utilizando un agitador magnético para disolverlos. Añadir agua hasta 2 litros:

- 1,8 litros de agua destilada**
- 40 gr de NaOH pellets**
- 70 gr de NaCl**

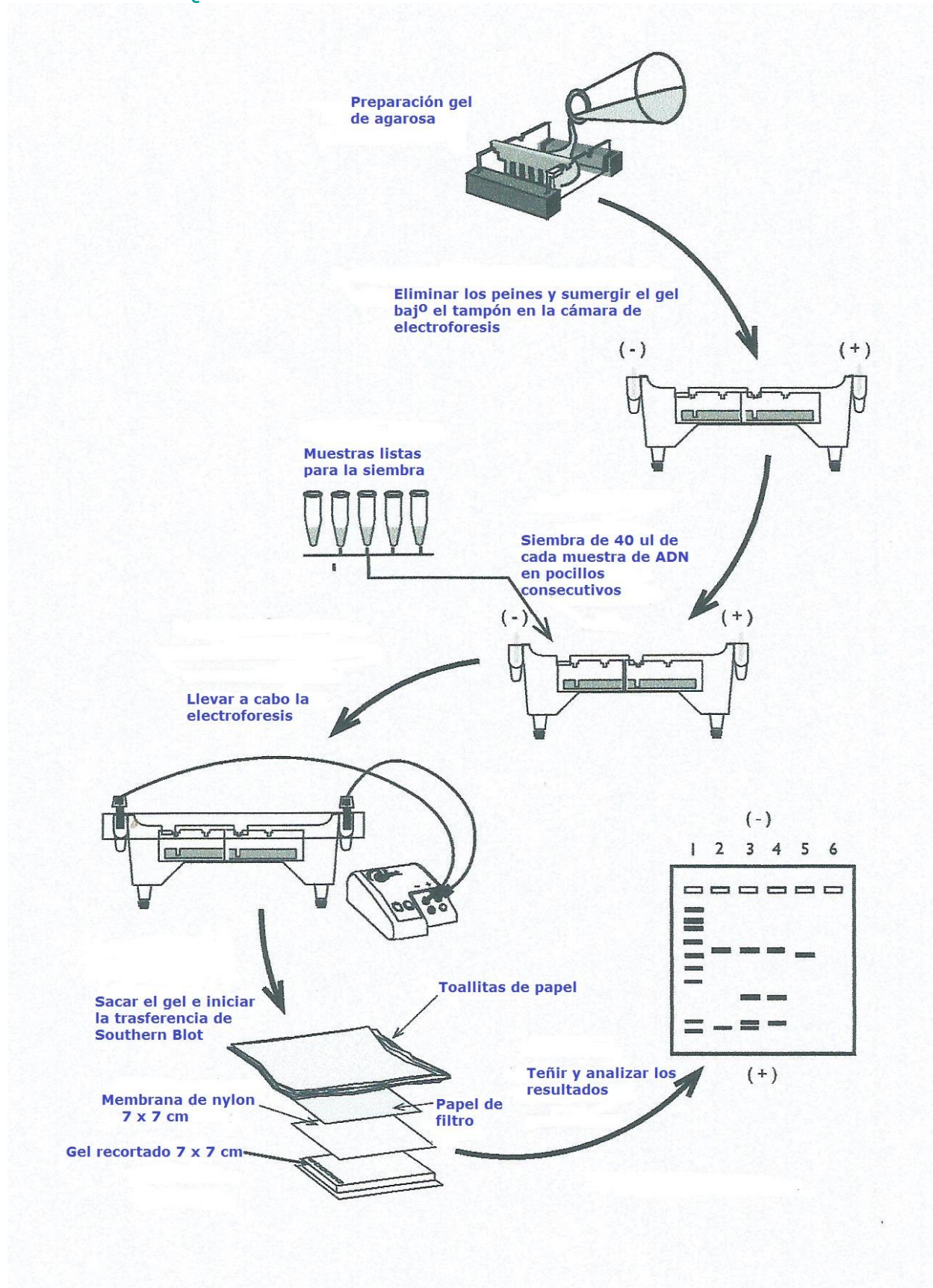
PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TINCIÓN

El día que los "blots" deben ser teñidos para su visualización preparar la solución de tinción Blue-Blot DNA stain, por mezcla como se indica:

- 540 ml de agua destilada**
- 60 ml Blue-Blot DNA stain 10x**

5. PRÁCTICA

ESQUEMA DE TODO EL PROCESO DE LA PRÁCTICA



1. ELECTROFORESIS DEL GEL DE AGAROSA

a) Preparar el gel

Preparar un gel de agarosa al 0,8% para la electroforesis de las muestras lista para ser sembradas. Utilizar un gel de 7x7 cm o 7x10 cm. Se necesitan 6 pocillos con una capacidad de 40 µl.

b) Antes de la siembra de las muestras

En un baño calentar un vaso a 65°C para calentar las muestras que contienen el ADN antes de su siembra. A 65°C las agregaciones no específicas que se pueden generar por los extremos cohesivos generados por los enzimas de restricción son eliminadas.

Calentar las muestras A-E a 65°C durante 2 minutos. Permitir enfriar las muestras otros 2 minutos.

c) Sembrar las muestras

Sembrar las muestras A-E en pocillos consecutivos. La cantidad de muestra a siembra debe ser de 35-38 µl.

d) Correr el gel

Después de la siembra, configurar la fuente de electroforesis al voltaje requerido. Una vez terminada la electroforesis proceder con el análisis de Southern Blot.

La electroforesis debería pararse cuando el colorante naranja de carga haya migrado aproximadamente 4,5 cm desde el pocillo de siembra del gel de agarosa.

2. ANÁLISIS DE SOUTHERN BLOT

Durante este proceso se transferirán los fragmentos de ADN desde el gel de agarosa a la membrana de nylon. Después de la transferencia, la membrana será incubada durante un periodo corto de tiempo para fijar el ADN a la membrana. **Para evitar reactivos TOXICOS, y especialmente los radioactivos, que son utilizados en el Southern, en este experimento se utilizará un sistema de detección no isotópico especialmente diseñado para su uso escolar.**

a) Despurinización/Desnaturalización

Después de la electroforesis, el gel es secuencialmente tratado con HCl y NaOH. El HCl introduce sitiosapurínicos en el ADN lo cual produce uniones fosfodiéster e introduce "nicks" en el ADN de doble cadena. El tratamiento con NaOH rompe los puentes de hidrógeno entre las bases. El secuencial tratamiento ácido/base resulta en la formación de pequeños fragmentos que facilita la transferencia de los fragmentos de ADN en la membrana de nylon.

1. Después de la electroforesis colocar el gel de agarosa en una cubeta con 100 ml de 0,25 N HCl. Incubar a temperatura ambiente durante 8 minutos (**no sobrepasar este tiempo**). El gel debe estar completamente cubierto con la solución y agitar periódicamente.

Eliminar con cuidado la solución, que no se podrá reutilizar. Lavar el gel con diversos cambios de 100 ml de agua destilada.

2. Colocar el gel durante 15 minutos en la solución de Desnaturalización del ADN (0,5 M NaOH/0,6 M NaCl). El gel debe estar completamente cubierto con la solución y agitar periódicamente. Eliminar la solución.

3. Utilizar otros 100 ml de Solución de Desnaturalización e incubar otros 15 minutos. Conservar esta solución para el punto 6.

b) Configurar la transferencia del Southern Blot

4. Colocar unas hojas de papel de plástico, de aluminio o papel "whatman" en una superficie plana del laboratorio. Sacar el gel e invirtiendo el gel (los pocillos hacia abajo), colocar la superficie lisa de forma que quede en contacto con la membrana de transferencia.

5. Utilizando siempre guantes, con pinzas y tijeras ajustar la membrana de nylon al tamaño del gel. Aquellas zonas de la membrana tocadas sin guantes dejarán residuos de aceite y no permitirán unir el ADN durante la transferencia. **Muchos guantes contienen polvo lo que aumentará el "background" en la membrana, colocarse los guantes y lavarse con agua para eliminar el polvo.**

6. Recoja con mucho cuidado la membrana por los extremos con 2 pinzas y ligeramente doblada en el centro y lentamente humedecer (desde la mitad hacia afuera) con la solución de Desnaturalización del punto 4.

7. Liberar la membrana y sumergir suavemente durante 5 minutos en la solución de Desnaturalización. Utilizando unas pinzas sacar la membrana saturada de la Solución de Desnaturalización y colocarla encima del gel de agarosa.

Es MUY IMPORTANTE que entre los diferentes elementos del dispositivo no queden burbujas de aire.

8. Recorte el papel de filtro de blotting del mismo tamaño del gel y la membrana de nylon. Colocar el papel de filtro encima de la membrana. Cuidadosamente, colocar un montón de papel absorbente 4-5 cm de grosor encima del filtro de "blotting". Colocar una bandeja o placa de cristal y colocar por ejemplo un vaso de 400 ml vacío como peso.

9. Permitir que la transferencia progrese durante 4 horas o toda la noche.

10. Eliminar la placa de vidrio, vaso y papeles absorbentes.

11. Con guantes enjuagados y pinzas voltear el conjunto (gel-nylon-papel de filtro) de forma que descansa sobre el papel de filtro.

12. Utilizando un rotulador dibujar los 6 pocillos de muestra y rastrear sus posiciones en la membrana de nylon

13. Utilizando pinzas retirar el gel de la membrana. El gel puede ser descartado y se observará que está deshidratado

14. Poner la membrana encima de un montón de papel seco con el ADN hacía arriba (el lado que estuvo en contacto con el gel).

15. Marcar la membrana por el lado del ADN con el nº de grupo o nombre

16. Para unos resultados óptimos, secar y fijar el ADN completamente a la membrana. Para ello colocar la membrana entre dos hojas de papel de filtro y colocar a 80°C durante 30 minutos.

3. DETECCIÓN NO-ISOTÓPICA DEL ADN

Durante este proceso se podrá visualizar el ADN en la membrana. El "Blue Blot DNA Stain" es un reactivo no-isotópico desarrollado para su uso a nivel escolar, que elimina los problemas asociados al uso de isótopos radiactivos.

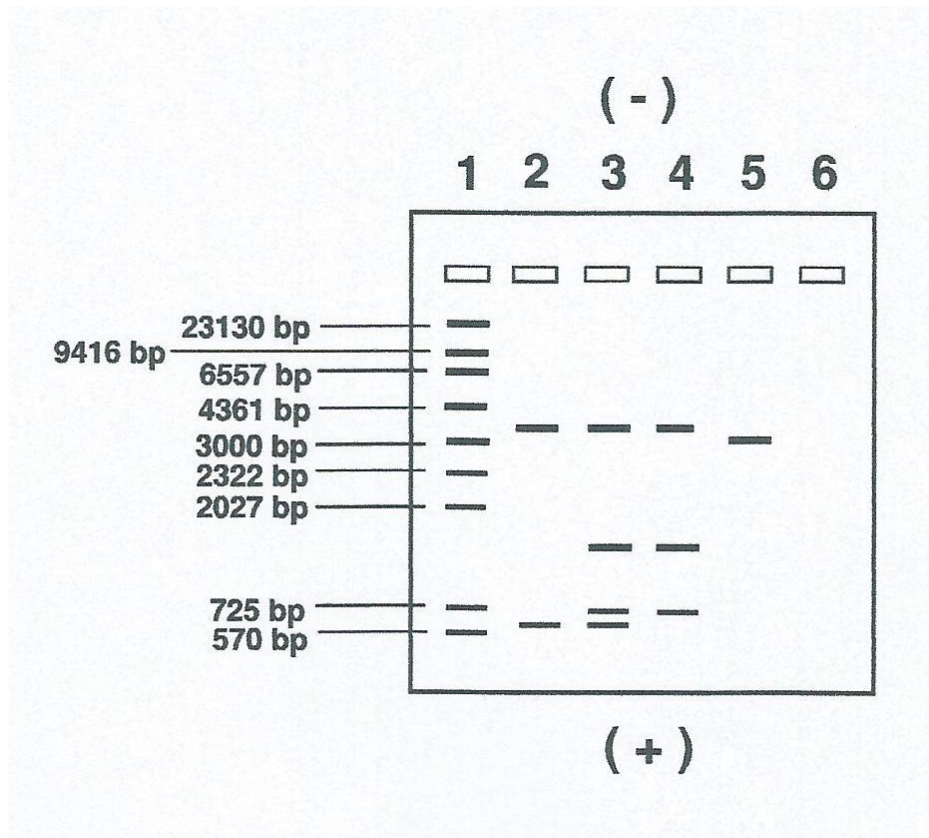
1. Colocar la membrana con el ADN en 100 ml de la solución diluida de "Blue Blot DNA Stain" durante 10-15 minutos.

2. Sacar la membrana con pinzas y colocar en 200 ml de agua destilada.

3. Cambiar el agua destilada 3 o 4 veces hasta que la membrana está desteñida y las bandas de ADN son claramente visibles.

6. RESULTADOS Y PREGUNTAS

Los resultados reales producen bandas más amplias de diferentes intensidades. El esquema muestra las posiciones relativas aproximadas de las bandas pero los resultados no están descritos a escala. **Alguna de las bandas pequeñas puede no ser visible.**



- Pocillo1 A: Fragmentos estándar ADN
- Pocillo2 B: ADN de madre cortado con enzima.
- Pocillo3 C: Hijo cortado con enzima.
- Pocillo4 D: Padre 1 cortado con enzima.
- Pocillo5 E: Padre 2 cortado con enzima.

Preguntas previas

1. ¿Por qué el Southern Blot es un análisis requerido para pruebas forenses o de paternidad? La digestión de los cromosomas humanos con enzimas de restricción produce gran cantidad de fragmentos de ADN que no pueden ser separados por electroforesis convencional. Además, los geles son difíciles de almacenar y frágiles para exponer a agentes desnaturizantes. La transferencia de las bandas de ADN a una membrana de nylon produce una imagen espejo de los fragmentos de ADN. De esta forma los fragmentos transferidos a la membrana pueden ser desnaturizados.

2. ¿Cuál es la función de las sondas en el análisis de paternidad? Sondas específicas pueden ser desarrolladas para determinar la presencia de los lugares de restricción. Las sondas pueden hibridar con uno o más fragmentos generados por los enzimas de restricción.

3. ¿Por qué se utiliza más de un locus en un test de paternidad? Se utilizan varias sondas para asegurar que el test determina diferentes diferencias alélicas en un individuo dado que se puede correlacionar con la suma tanto de su padre y su madre.

4. ¿Cuál es el padre en esta prueba de paternidad? Padre 1.

5. ¿Se demuestra que la madre también es la madre biológica? Sí.