

TEST de CSI

Ref. PCR detectives (4 prácticas)

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

Este experimento introduce a los alumnos en el uso del ADN y la PCR para simular como ADN obtenido de un pelo o saliva de una escena de un crimen puede ser utilizado para identificar a un criminal. Para ello se utilizan colorantes que migran en el gel de agarosa como si fueran fragmentos de ADN.

Los estudiantes aprenderán como los enzimas de restricción cortan las moléculas de ADN en secuencias específicas del ADN produciendo fragmentos de ADN de diferentes longitudes.

Los estudiantes aprenderán como la electroforesis en gel de agarosa separa diferentes tamaños de fragmentos de ADN.

Los estudiantes aprenderán como estos fragmentos forman un patrón único para cada persona, lo cual es básico para el análisis del ADN "fingerprinting" (huella genética).

2. INTRODUCCION

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.

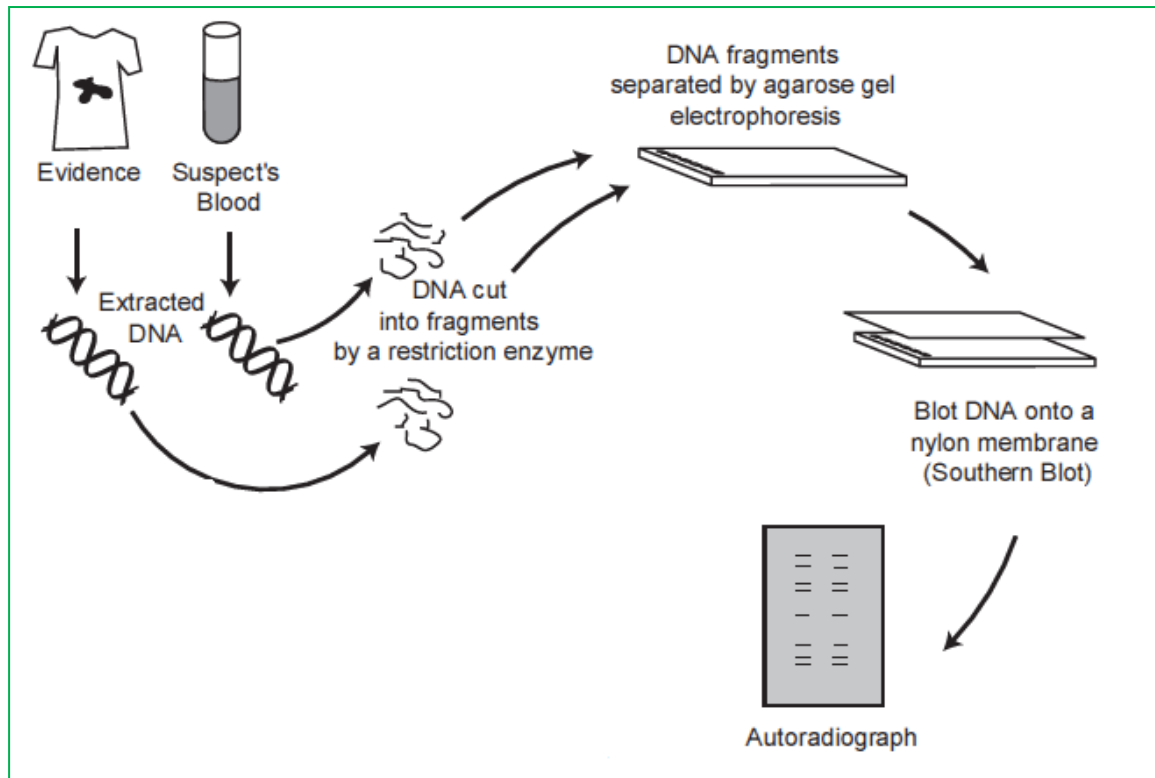
Los polimorfismos de ADN son ampliamente utilizados para determinar paternidades, parentescos, identificación de restos humanos y la base genética de varias enfermedades.

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 obtenido de una escena de un crimen contra el ADN de presuntos sospechosos.

Varios pasos están implicados en el ADN "fingerprinting". Primero, se debe obtener una muestra, los forenses deben tener mucho cuidado en conseguir una evidencia de la escena de un crimen donde el ADN presuntamente no esté dañado, como por ejemplo sangre o un pelo. Luego, el ADN es extraído y digerido con enzimas de restricción, o sometido a una PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa).

El método denominado polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) implica la digestión del ADN con enzimas de restricción, transferencia del ADN a

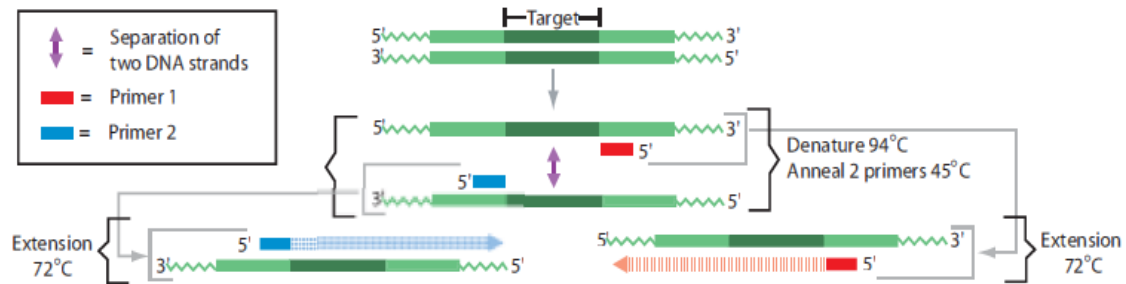
una membrana (Southern blot), y hibridación de la membrana con una sonda de regiones polimórficas (autoradiografía). Este método lleva varios días y requiere gran cantidad de ADN, lo cual a veces es bastante difícil de conseguir en una evidencia de un crimen. A pesar de ello, es un método con una precisión muy elevada.



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.

La amplificación por PCR utiliza un enzima conocido como Taq polimerasa, la cual fue originalmente purificada de una bacteria que habita en lugares a altas temperaturas (cercas a ebullición). La reacción de PCR incluye 2 oligonucleótidos sintéticos (15-30 nucleótidos), conocidos como “primers” (cebadores), la Taq, nucleótidos y el ADN extraído, conocido como “template” (molde).

La región de ADN a amplificar se llama “target” (diana). 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.

En estos casos, la PCR es utilizada para amplificar y examinar regiones altamente variables del ADN, estas regiones que varían de longitud de un individuo a otro se clasifican en 2 categorías:

1. VNTR (variable number of tandem repeats), región variable compuesta de secuencias de 15-70 pares de bases, típicamente repetidas de 5-100 veces.
2. STR (short tandem repeats) , similares a los VNTR pero la secuencia de repetición es de sólo 2-4 pares de bases.

Examinando varios diferentes VNTR o STR de un mismo individuo, los investigadores pueden obtener un patrón de ADN único para cada individuo que es diferente de otra persona (excepto para gemelos idénticos).

En este experimento, se analizarán ADNs (representado por colorantes) simulando el análisis de 2 VNTR. En este hipotético caso, los colorantes representan ADNs obtenidos de la escena de un crimen y 2 sospechosos.

3. 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.

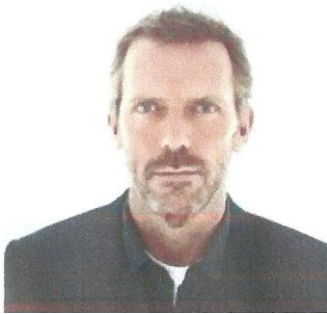
Para cualquier duda o consulta adicional, por favor, contacte con nosotros biotod@arrakis.es

EXPOSICIÓN DE LOS HECHOS

Pedro Polimerasa de 50 años ha aparecido muerto en su residencia de Gataca, han aparecido signos de haberse producido una pelea y un candelabro manchado de sangre con el que se cree que ha sido golpeado y le ha producido la muerte finalmente. El primer motivo del crimen parece ser un robo ya que Pedro Polimerasa es un empresario rico. Pero pronto los interrogatorios de la policía hacen tener 2 sospechosos:

Malena Drosofila de 47 años, mujer de la víctima y heredera de todo el imperio de su marido ya que no tienen hijos.

Carla Ecoli de 28 años, amante del fallecido durante los últimos 4 años. Dijo que el fallecido le había prometido varias veces que iba a dejar a su esposa para casarse con ella, cosa que nunca hizo.



El fallecido: Pedro Polimerasa



La mujer: Malena Drosofila



La amante: Carla Ecoli

De la escena del crimen se han recogido evidencias, entre ellas muestras de sangre y pelos que se van a evaluar si pertenecen a alguno de los sospechosos.

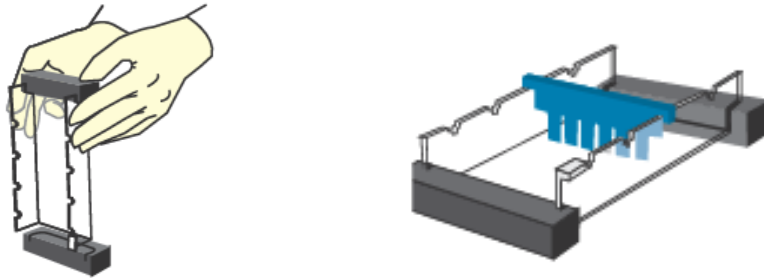
El patrón de ADN obtenido es muy sencillo para analizar directamente en un gel de agarosa. El objetivo es analizar y comparar el patrón de fragmentos de ADN después de la electroforesis y determinar si Malena Drosofila o Carla Ecoli estuvo en la escena del crimen.

4. PRACTICA

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 ml de Tampón de electroforesis 1 X** más **0.30 gr de agarosa**, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa.

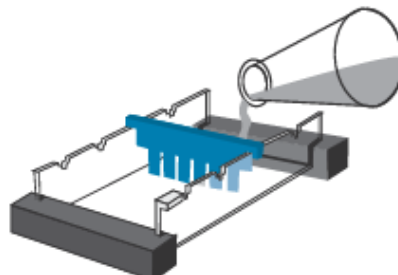
Para geles de 7 x 10 cm: Añadir **42 ml de Tampón de electroforesis 1 X** más **0.40 gr de agarosa**, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa

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.

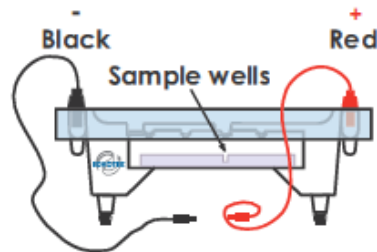
5.b) Añadir la solución de agarosa al molde.



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

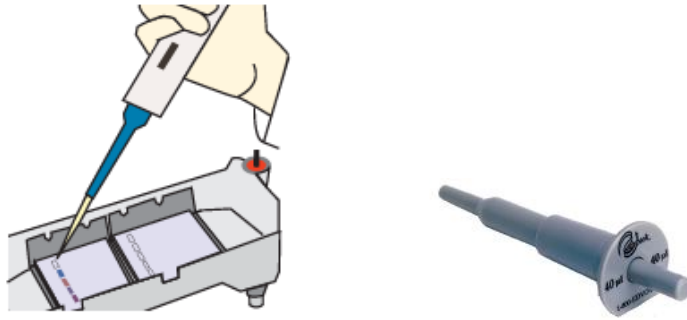
Nota: Si usted no está familiarizado con la siembra de geles de agarosa, es recomendable que practique la siembra antes de llevar a cabo el experimento, o llevar a cabo el experimento completo antes de realizarlo con los alumnos.

A) Muestras de electroforesis: *Chequear el volumen de las muestras. Algunas veces pequeñas gotas de la muestra pueden 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	ADN 1 muestra escena del crimen (pelo)
2	Rojo	ADN 2 muestra escena del crimen (sangre)
3	Lila	Malena Drosophila ADN1
4	Azul	Malena Drosophila ADN2
5	Amarillo	Carla Ecoli ADN1
6	Blanco	Carla Ecoli ADN2

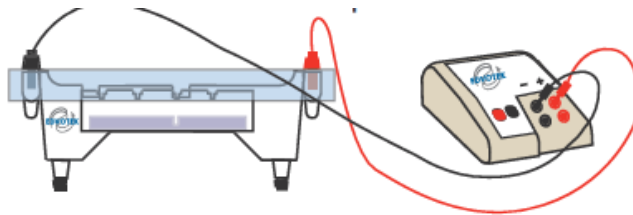
2.b) Sembrar 20 microlitros de cada muestra, utilizar para ello la micropipeta de volumen fijo que se suministra con una punta de pipeta.



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.**

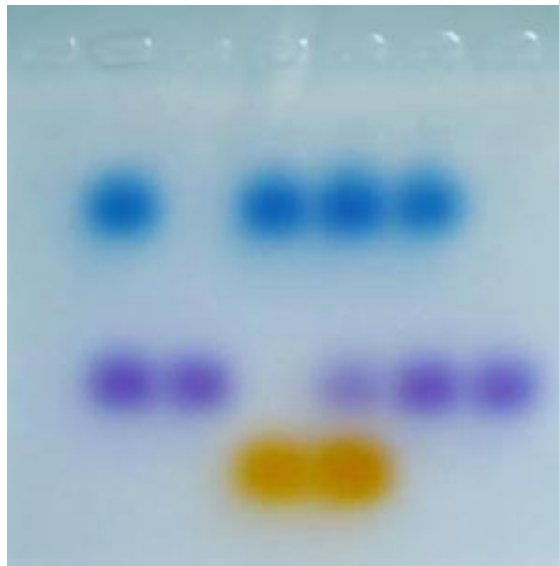
4.b) Después de 10 minutos empezará a observarse la separación de los colorantes.

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 2 3 4 5 6



1. ADN 1 muestra escena del crimen (pelo).
2. ADN 2 muestra escena del crimen (sangre).
3. Malena Drosophila ADN1.
4. Malena Drosophila ADN2.
5. Carla Ecoli ADN1.
6. Carla Ecoli ADN2.

De la simulación bastante simplificada de varios de 2 VNTR o STR, ya que normalmente el FBI utiliza 13 marcadores distintos para que el porcentaje de acierto sea del 99.9 % y su patrón en el gel de agarosa: Se demuestra que el ADN que se encuentra en la escena del crimen pertenece a Carla Ecoli .

6. PREGUNTAS Y RESPUESTAS SOBRE LA PRACTICA

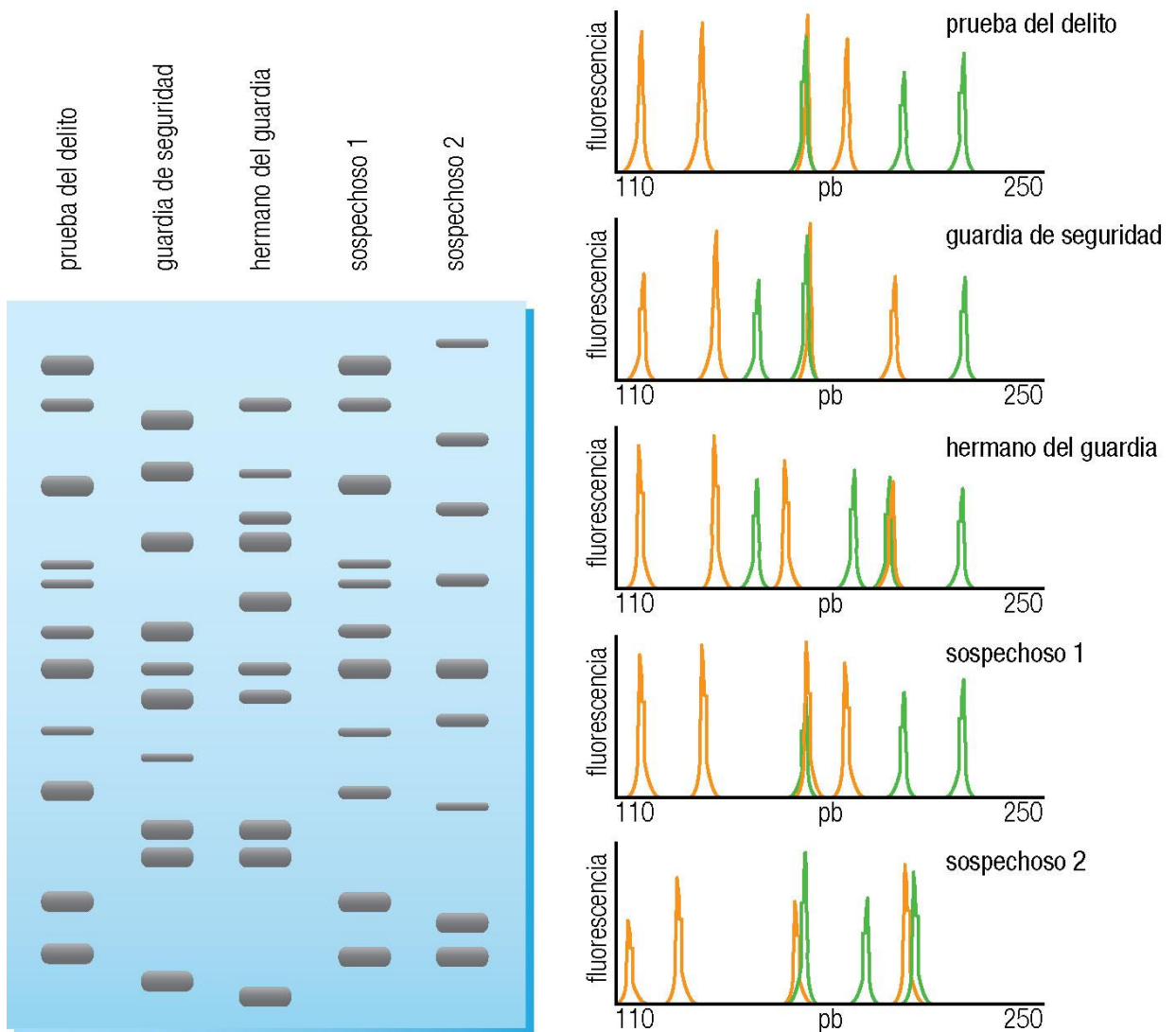
Una serie de preguntas se pueden realizar a los alumnos sobre la práctica:

1. **¿Por qué es importante la posición de las muestras cerca del electrodo negativo?**
EL ADN está cargado negativamente y viajará hacia el polo positivo.
2. **¿Qué tipo de evidencias se pueden observar en una escena de un crimen para obtener ADN?** Pelo, sangre, piel.
3. **¿Cómo serás capaz de determinar quien ha cometido el crimen?** El patrón de ADN del criminal debe coincidir con el encontrado en la escena del crimen.
4. **¿Qué determina que cada persona tiene un único patrón de su ADN?** Variaciones en la secuencia del ADN a nivel individual (VNTR, SRT) producirá diferentes patrones para cada persona.
5. **¿Qué pensarás si 2 personas presentan un mismo patrón de ADN?** Que son gemelos genéticamente idénticos.
6. **¿Cuál es el sospechoso que ha estado en la escena del crimen y posiblemente puede haber cometido el crimen?** Carla Ecoli.

En el siguiente esquema podemos ver cómo se hace realmente, utilizando muchos marcadores genéticos (VNTR o STR) que permitan dar una fiabilidad en los resultados de inculpar a alguien. Vemos a la izquierda el método tradicional que lo realiza prácticamente todo el técnico de laboratorio y el método moderno dónde todo lo realiza un equipo moderno de laboratorio.

Según los resultados ¿A qué sospechoso pertenece el ADN aislado de la mancha de sangre?

Ejemplo de aplicación de la huella genética (huella dactilar de DNA) a la investigación de un delito. Se ha producido el robo de una obra de arte en un museo. Al romper la vitrina el ladrón dejó una mancha de sangre a partir de la cual los investigadores han aislado el DNA. La policía interrogó al guardia de seguridad, a un hermano suyo y a dos delincuentes habituales, y obtuvo muestras de DNA de todos ellos. Aparte de identificar al probable autor del delito, puede observarse cómo la huella es más parecida entre familiares que entre individuos no relacionados.



Análisis tradicional:
 Polimorfismo VNTR en múltiples loci de la misma secuencia repetitiva.
 Detección por hibridación de Southern o por PCR y electroforesis en gel.

Análisis moderno:
 Polimorfismo de varios marcadores STR diferentes (4 en el ejemplo, de 8 a 13 en la realidad).
 Detección por PCR múltiplex con cebadores fluorescentes y electroforesis capilar.