

TEST de PATERNIDAD

Ref. PCR paternidad (4 prácticas)

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

Este experimento introduce a los alumnos en el uso del ADN y la PCR para simular una determinación de paternidad.

Los estudiantes aprenderán como la electroforesis en gel de agarosa separa diferentes moléculas de colorantes por su carga que simularán fragmentos d 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) utilizado en las determinaciones de paternidad.

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.

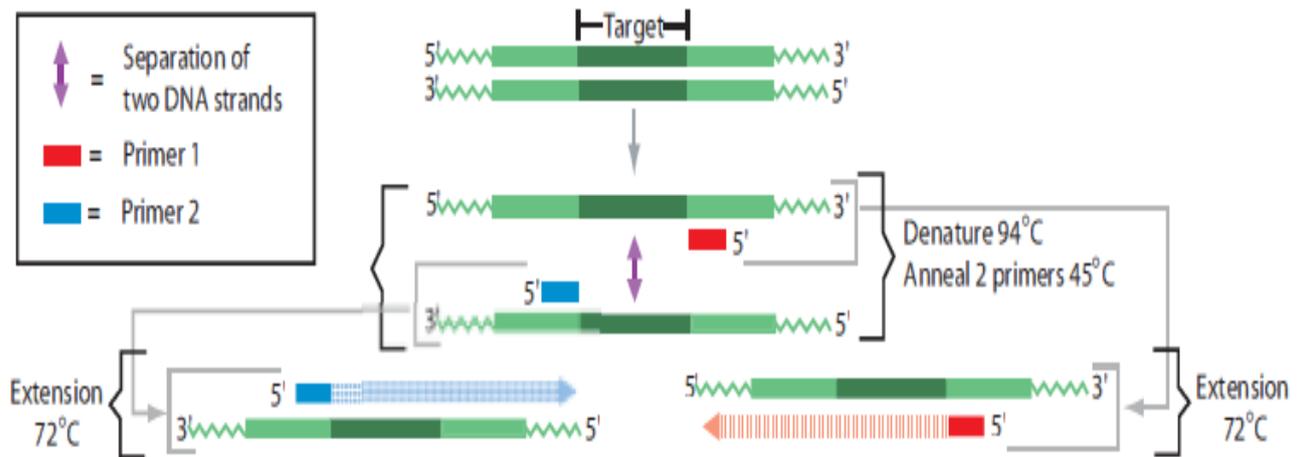
Los polimorfismos de ADN son ampliamente utilizados para determinar paternidades, parentescos, identificación de restos humanos y la base genética de varias enfermedades.

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

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 (cercanas 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.

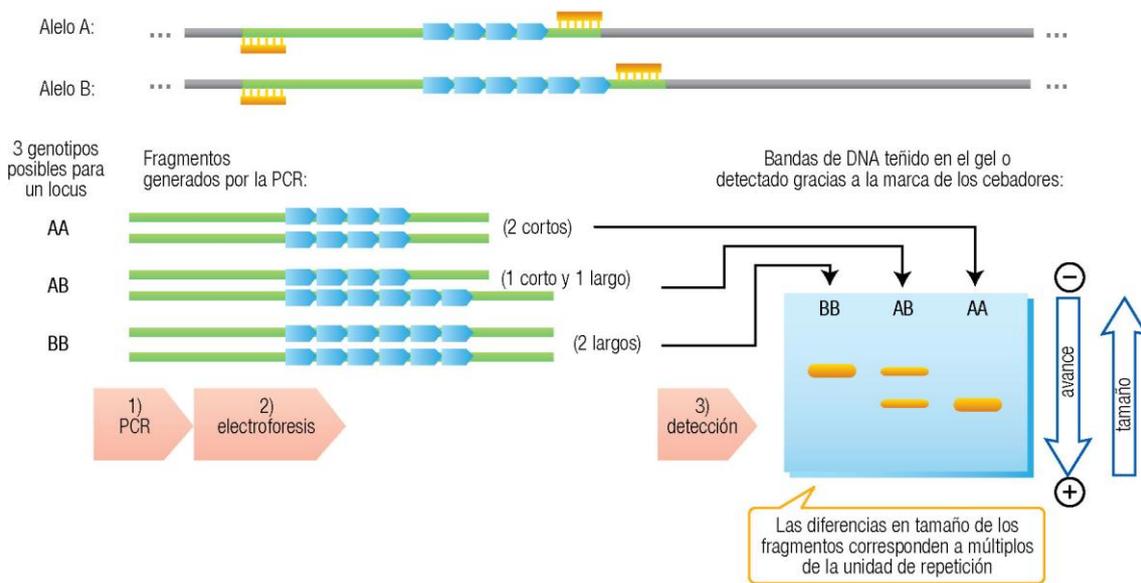
En estos casos, la PCR es utilizada para amplificar y examinar regiones altamente variables del ADN, estas regiones que varían de longitud de un individuo a otro se clasifican en 2 categorías:

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). Por ejemplo, el FBI utiliza 13 marcadores distintos para que el porcentaje de acierto sea del 99.9 %.

En este experimento, se analizarán ADNs (representado por colorantes) simulando el análisis de varios VNTR. En este hipotético caso, los colorantes representan fragmentos ADNs.

El patrón de ADN obtenido es muy sencillo para analizar directamente en un gel de agarosa. El ADN extraído de 2 posibles padres y la madre es analizado en varios lugares polimórficos (VNTRs), luego se debería comparar con el mismo estudio de VNTRs realizado al hijo para ver si se puede determinar el padre.



Esquema dónde se explica el proceso para un único locus o VNTR

Este VNTR concreto produce un alelo A que por amplificación por PCR produce un fragmento corto y un alelo B que al tener 2 unidades de repetición más como se observa en el dibujo producirá un fragmento mayor al ser amplificado por PCR.

3. COMPONENTES

Tampón de electroforesis 10X (2 botes de 500 ml)	2 x 50ml
Agarosa	1.75 gr
Micropipeta 20 microlitros	1
Rack de puntas	1
Microtubos de muestras	5

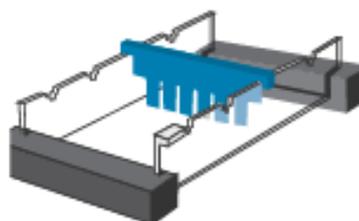
Añadir 450 ml de agua destilada a cada envase de Tampón de electroforesis 10 X para elaborar 2 x 500 ml de Tampón de electroforesis 1 X que es el Tampón de trabajo.

4. PRÁCTICA

4.1 PREPARACION GEL DE AGAROSA

A) Preparación del molde

Coger el molde para hacer los gels y cerrar los extremos con los toques 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 gels 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.

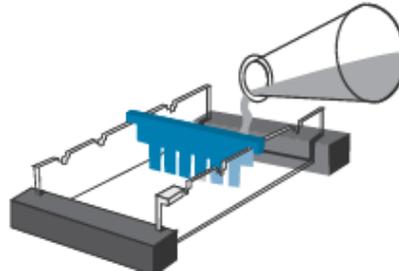
Para gels de 7 x 10 cm: Añadir **45 gr de Tampón de electroforesis 1 X más 0.40gr de agarosa**, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa.

Asegurarse que se ha añadido los 450 ml de agua destilada al Tampón de electroforesis concentrado 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.

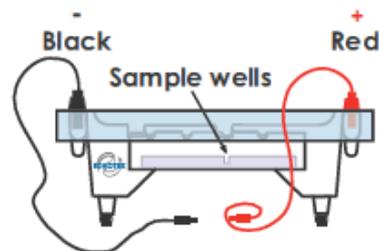


6.b) Permitir que el gel solidifique. Para acelerar el proceso se puede sembrar el gel en una nevera (si la electroforesis se realizará al día siguiente, conservar el gel a 4°C).

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 aprox. **300 ml de Tampón de electroforesis** o la cantidad necesaria para su cubeta. *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

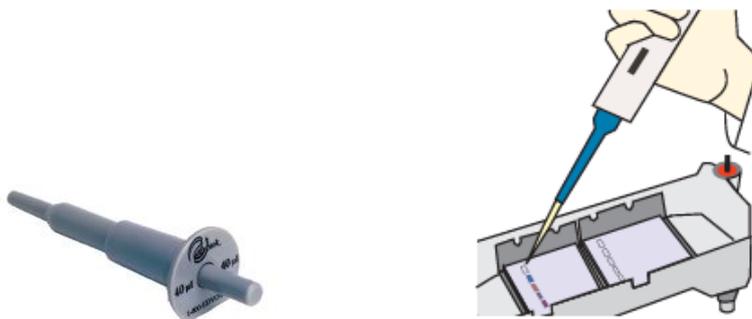
Nota: Si usted no está familiarizado con la siembra de geles de agarosa, es recomendable que practique la siembra antes de llevar a cabo el experimento, o llevar a cabo el experimento completo antes de realizarlo con los alumnos.

A) **Muestras de electroforesis** Chequear el volumen de las muestras. Algunas veces es posible que una pequeña cantidad de muestra se deposite en las paredes del microtubo. Asegurarse de que toda la cantidad del volumen de la muestra se encuentra en la parte inferior del microtubo antes de comenzar con la carga o siembra del gel. Brevemente centrifugar los microtubos de muestras, o golpear los microtubos en una sobremesa para obtener todo el volumen de la muestra en la parte inferior.

1.a) Se suministran 5 muestras diferentes presentadas en 5 tubitos cada uno de un color, sembrar o cargar las muestras en el siguiente orden:

Pocillo	Muestra	Descripción
1	Verde	Marcador de peso molecular
2	Rojo	Padre 1
3	Lila	Padre 2
4	Azul	Hijo
5	Amarillo	Madre

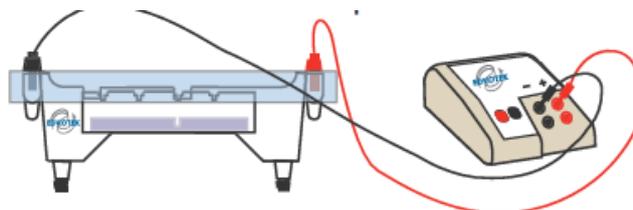
2.b) Sembrar 20 microlitros de cada muestra, utilizar para ello la micropipeta de volumen fijo que se suministra con una punta de pipeta.



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.**

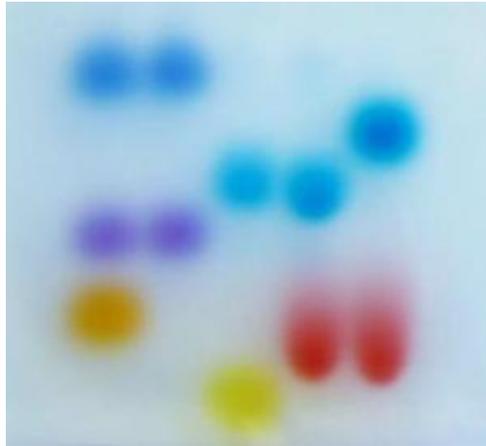
4.b) Después de 10 minutos empezará a observarse la separación de los colorantes.

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

Marcador Padre Padre Hijo Madre
1 2



Cada mancha de colorante simula un marcador genético (VNTR). De la simulación bastante simplificada de varios VNTR, ya que normalmente se suelen utilizar 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 padre del hijo es el Padre 2 ya que comparten el marcador azul y con la madre comparte el marcador naranja (recordemos que cada progenitor aporta la mitad de material genético), en cambio no comparte ningún marcador con el padre 1.

6. PREGUNTAS Y RESPUESTAS SOBRE LA PRÁCTICA

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

1. **¿Quién es el padre?** Se demuestra que el padre del hijo es el Padre 2 ya que comparten el marcador azul y con la madre comparte el marcador naranja (recordemos que cada progenitor aporta la mitad de material genético)
2. **¿Qué representan los diferentes colorantes de la electroforesis?** Los diferentes colorantes representan ADNs de diferente longitud obtenidos a partir de los posibles padres, hijo y madre.
3. **¿Por qué individuos diferentes, como hermanos, tienen una huella genética diferente (individual)?** Los cromosomas se encuentran en pares, uno se adquiere de la madre y el otro del padre. Se tienen 2 copias de un gen específico en un locus del cromosoma y representa el único genotipo para el determinado descendiente, por tanto, es posible que las copias de un mismo gen en hermanos la hayan recibido de forma diferente.
4. **¿Cuál es la base del análisis de huella genética del ADN mitocondrial?** El ADN mitocondrial es heredado de la madre ya que el óvulo contiene una gran cantidad de mitocondrias comparado con el de los espermatozoides.
5. **¿Cuál es la diferencia del análisis de huella genética utilizando el ADN mitocondrial y el ADN celular?** A diferencia del ADN mitocondrial el ADN nuclear celular se encuentra en igual proporción en ambos progenitores. En cada par de cromosomas uno es heredado de la madre y otro del padre.
6. **¿Qué determina que cada persona tiene un único patrón de su ADN?** Variaciones en la secuencia del ADN a nivel individual (VNTR, SRT) llamados polimorfismos producirán diferentes patrones para cada persona.
7. **¿Qué pensarás si 2 personas presentan un mismo patrón de ADN?** Que son gemelos genéticamente idénticos.

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