

CAPÍTULO 8

Protocolos de trabajo de laboratorio

*Alejandro del Palacio, Cecilia I. Catanesi
y Lucas González García*

*“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es
también un niño colocado ante fenómenos naturales que le
impresionan como un cuento de hadas”*

Maria Salomea Skłodowska-Curie

En esta sección se presentan prácticas de laboratorio, utilizadas en relación al enfoque y materiales que los docentes dispongan. Los mismos pueden adaptarse e incrementarse dependiendo de las variables antes mencionadas. Se incluyen aquí, protocolos para diferentes actividades que ofrecen al estudiantado la posibilidad de familiarizarse con el trabajo en distintas áreas de Genética.

El recorrido comienza con la cría y el mantenimiento de líneas mutantes de *Drosophila melanogaster*, los cruzamientos y el análisis de los resultados obtenidos. También con las mismas líneas de moscas, a partir de larvas, se preparan las muestras para la observación de cromosomas politénicos. Del mismo modo se presenta la extracción de ácido desoxirribonucleico a partir de muestras de diferente origen, y su evaluación a través de electroforesis en geles de agarosa. Posteriormente este material volverá a utilizarse en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), conociendo los diferentes requerimientos y etapas del proceso.

***Drosophila melanogaster* como modelo de estudio**

Drosophila melanogaster (Figura 8.1) también llamada vulgarmente mosca del vinagre o mosca de la fruta, es una especie de díptero de la familia Drosophilidae que recibe su nombre debido a que se alimenta de frutas en proceso de fermentación tales como manzanas, bananas, uvas, etc.

Esta especie es muy conveniente como modelo de estudio. En primer lugar, es fácil de criar, requiere poco espacio y no demanda altos costos para su mantenimiento como sucede, por ejemplo, para líneas de roedores u otros modelos animales. En segundo lugar, su ciclo de vida dura sólo de 9 a 10 días y muestra una clara distinción entre fases. Además, aporta una descendencia numerosa en cada ciclo reproductivo.

Fue adoptada como animal para la experimentación genética por Thomas Morgan a principios del siglo XX. En el año 2000 la compañía Celera Genomics junto al consorcio público, describieron su genoma completo; éste contiene alrededor de 165 Mb (1 Mb = 1 millón de pares de bases) que conforman 13.600 genes; su número cromosómico es bajo, sólo cuatro pares de cromosomas, incluido el par sexual. Y algo muy particular, es que en las glándulas salivales de las larvas se encuentran cromosomas gigantes (politénicos) que son útiles para estudios citogenéticos. Hoy en día se cuenta con una gran cantidad de líneas mutantes que producen fenotipos claramente observables.

Una de las principales características que los convierten en organismo modelo es la similitud entre el funcionamiento de su genoma y el de nuestra especie: el 75% de los genes asociados con enfermedades genéticas o cáncer en humanos tienen su contraparte en el genoma de la mosca. Esa similitud muestra que los mecanismos biológicos básicos que provienen de lejanos ancestros se han conservado a lo largo de la línea evolutiva de ambas especies, y resalta la aptitud de la mosca como modelo para estudiar genes asociados con enfermedades neurológicas, neurodegenerativas, proliferación celular cancerosa, enfermedades cardiovasculares, estrés oxidativo, desórdenes metabólicos, diabetes y envejecimiento. Recientemente se ha visto que los genes *Hox* conocidos en la mosca también se encuentran en los humanos, y se ha podido demostrar que las moscas deficientes en un gen *Hox* a las que se inserta el gen *Hox* humano recuperan la función perdida. Esto es importante porque algunas malformaciones congénitas en humanos están relacionadas con mutaciones en los genes *Hox*, y gracias a los estudios desarrollados con *Drosophila* se conocen mucho mejor las causas de dichas malformaciones.

Por todas estas razones, *Drosophila melanogaster* es un organismo modelo muy estudiado, ya que permite entender fenómenos biológicos particulares con facilidad y extrapolar estos conocimientos a otras especies como por ejemplo a la especie humana.

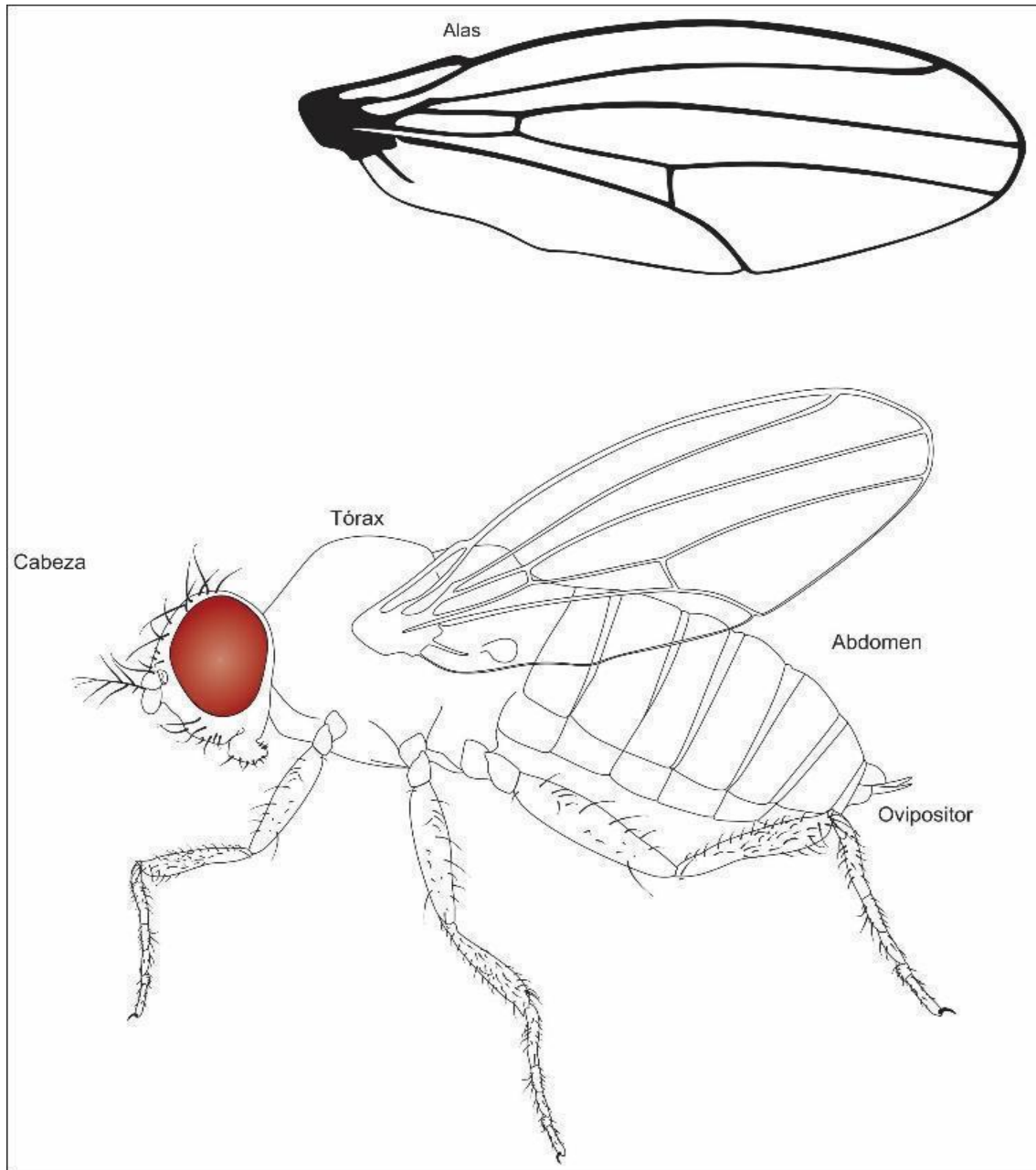


Figura 8.1. *Drosophila melanogaster*.

Ciclo de vida

Normalmente el desarrollo embrionario demora sólo un día, luego del cual eclosiona del huevo una larva de primer estadio que presenta dos linajes celulares distintos: larvario e imagal. Las células larvales, diferenciadas, forman el cuerpo de la larva y son poliploides; y las células imagales, indiferenciadas, forman los discos imagales en número de nueve pares y un disco impar, son pequeñas, diploides, y van a diferenciarse cuando la larva entra en metamorfosis, desarrollando la **cabeza** (discos labiales, clipeolabiales y ojo-antenas), el **tórax** (discos humerales, alares y halteriales) y el **abdomen** (disco genital).

La duración de su ciclo de vida depende de varios factores ambientales, como la temperatura y la humedad. A una temperatura de 25 °C y una humedad relativa del 60 %, el ciclo de la *Drosophila melanogaster* desde huevo a adulto dura aproximadamente 10 días, pero cuando la temperatura se disminuye a 20, 15 y 10 °C la cantidad de días aumenta a 15, 25 y 70 días respectivamente, lo cual le confiere gran plasticidad para el manejo en laboratorio.

En un ciclo bajo condiciones de 25 °C, la primera y segunda muda se producen en la larva cada 24 horas, mientras que la tercera lo hace 48 horas después, fácilmente diferenciable ya que emerge del medio y comienza a desplazarse sobre las paredes del recipiente para finalmente formar el **pupario**. La metamorfosis comienza en este momento, demorando 3-5 días en los cuales las estructuras del imago son conformadas por los anteriormente mencionados **discos imagales** y las células (ahora diferenciadas) larvales. Finalmente emerge el imago del pupario, y durante las primeras horas de vida comienza el endurecimiento de la cutícula (con la aparición de la pigmentación característica de la especie), se produce el endurecimiento y extensión de las alas, para finalmente llegar a la madurez sexual a partir de las 8 hs luego de la emergencia (dependiente del sexo).

Las moscas maduras producen una “canción de cortejo” generada por los machos mediante la vibración de sus alas, las parejas se aparean, y se produce la fertilización mediante el ingreso de los espermatozoides al huevo a través del micrópilo, para finalmente ser almacenados en la **espermateca** de la hembra. (Figura 8.2)

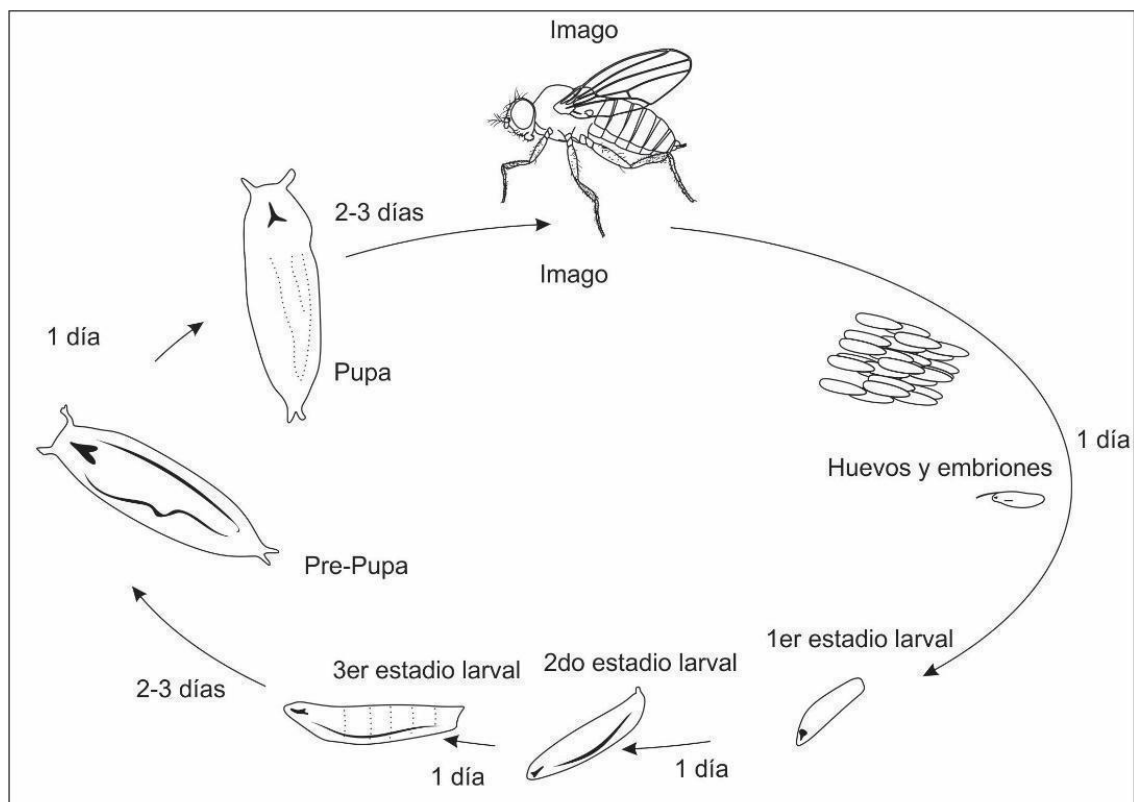


Figura 8.2. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

Medio de cultivo y técnica de observación

Para poder investigar a estos organismos se requiere de un medio de cultivo apropiado. Éste, debe contener cantidad de azúcar que permita el crecimiento de las levaduras, principal alimento de las larvas por su alto contenido de proteínas. Además, debe contar con consistencia apropiada a partir de la mezcla de agar agar o carragenina combinada con harina de maíz, que se utiliza como fuente de hidratos de carbono. El medio debe poseer también elementos conservantes para inhibir el crecimiento de hongos y bacterias que contaminan o retardan el desarrollo de las moscas, como el metilparabeno (conocido comercialmente como Nipagín). Por último, pero no menos importante es una cantidad suficiente de agua, ya que la causa más habitual de muerte de los individuos es la desecación.

Para el manejo de las moscas en el laboratorio se requieren los siguientes materiales:

- Microscopio estereoscópico
- Pincel de cerdas suaves y punta redondeada. Pinzas
- Eterizador.
- Éter etílico y pipetas de plástico de 3ml.
- Frasco “Morgue” para la eliminación de individuos, con una mezcla de compuestos que permiten esta tarea (por ejemplo aceite y éter al 70%)
- Frascos o tubos homeopáticos conteniendo el medio de cultivo y tapones que no sean impermeables (por ejemplo de algodón y gasa), para permitir el aireado del cultivo, y marcador indeleble.

Antes de comenzar se debe realizar una higienización de todo el instrumental, mesadas y material óptico con etanol al 70%.

Las moscas deben inmovilizarse para su observación bajo lupa. Para este fin, se han desarrollado una variedad de métodos para anestesiarse moscas; entre los más utilizados se incluyen **éter**, marcas comerciales (por ejemplo *Flynap*®), dióxido de carbono y enfriamiento.

El éter es inflamable, tiene un olor fuerte y matará a las moscas si están demasiado tiempo expuestas al gas pero debido a sus bajos requerimientos técnicos y económicos será la metodología más frecuentemente utilizada durante las experiencias en el laboratorio. Con este fin es necesario utilizar el eterizador, en el cual se introducirán las moscas y mediante unas gotas de éter se dormirán (no olvidar tener cuidado al dar vuelta el vial con las moscas, y para asegurar la introducción de la mayoría se debe golpear cuidadosamente el mismo). Luego de 15-30 segundos observar las moscas bajo lupa, para finalmente incluir las moscas deseadas para cada cruce en nuevos viales (para evitar que se peguen al medio las moscas se deben depositar sobre un vial en posición horizontal hasta que se despierten).

Recordar que es de suma importancia etiquetar los nuevos viales con el sexo, cantidad y fenotipo de las moscas introducidas, y la fecha. Finalmente descartar en caso de ser necesario los adultos restantes.

Dimorfismo sexual y obtención de hembras vírgenes

Al realizar cruces, es necesario **reconocer el sexo** de los individuos, para lo cual se aprovecha el dimorfismo sexual que presenta esta especie (Figura 8.3). En general, los adultos miden entre 2 y 3 mm de largo, siendo las hembras de mayor tamaño. El macho tiene los tres segmentos finales del **abdomen** fusionados y muy pigmentados, mientras que en la hembra estos segmentos no se muestran fusionados y su coloración es más clara que en el macho, además de presentar su parte terminal en forma puntiaguda, mientras que en el macho el abdomen termina en forma redondeada.

En algunos casos la coloración de macho y hembra no resulta tan clara, como es el caso cuando los individuos recién emergen del pupario y aún no han adquirido su coloración definitiva. También pueden presentarse algunas mutaciones que aumentan o disminuyen el grado de melanización de las moscas, haciendo más difícil el reconocimiento del patrón típico de pigmentación. En estos casos es de utilidad observar una serie de cerdas cortas presentes en el tarso del par de patas anteriores del macho, denominada **peine sexual**, estructura que está ausente en las hembras.

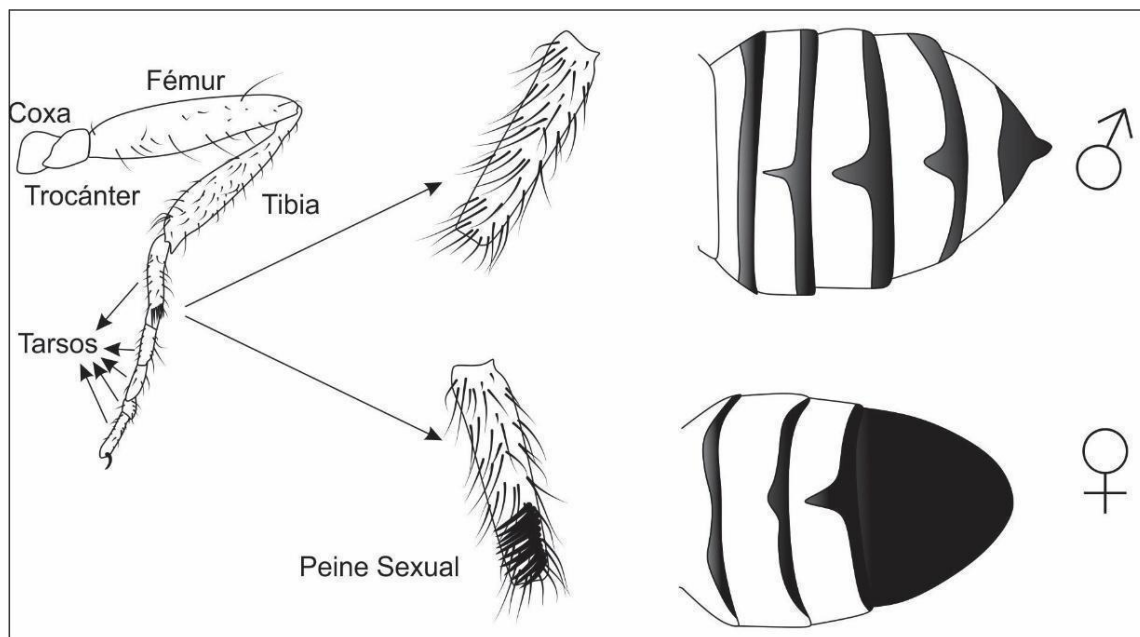


Figura 8.3. Dimorfismo sexual de *Drosophila melanogaster*.

Para estudiar los patrones de herencia mediante cruces experimentales de *Drosophila*, es muy importante que las hembras con el genotipo de interés sean vírgenes, debido a su capacidad de producir descendencia utilizando el esperma almacenado, por lo cual es preciso evitar las hembras no vírgenes para lograr éxito al planear los cruces.

Los machos maduran sexualmente aproximadamente 6 horas después de emerger del pupario mientras que las hembras aproximadamente 8-10 horas después de haber emergido. Esta diferencia en la maduración sexual permite que la separación durante las primeras 8 horas

luego de la emergencia brinde las hembras vírgenes necesarias para los experimentos. Alternativamente en las primeras horas después de la eclosión, se puede observar una mancha verdosa oscura que corresponde al meconio (los restos de su última comida antes de pupar) en la parte inferior del abdomen lo cual es de gran utilidad si por alguna razón no se pudo controlar de manera rigurosa el tiempo de emergencia.

Es necesario contar con una buena diagnosis de los sexos para poder asegurar la correcta asignación a cada individuo y, de esta manera, optimizar los tiempos de esta ardua tarea.

Extracción y Purificación de ADN

En la actualidad, el estudio de la variación genética entre individuos, poblaciones y especies para explicar patrones y procesos ecológico-evolutivos se aborda mediante marcadores moleculares que permiten distinguir individuos, para lo cual es necesario aislar las moléculas de ADN del genoma de los individuos a estudiar.

Los nucleótidos que componen la molécula de ADN poseen grupos fosfato que le confieren una carga negativa y lo hacen altamente polar, por lo cual el ADN puede disolverse en solución acuosa y formar una capa hidratante a su alrededor. Esto permite la purificación del ADN separándolo de las proteínas presentes en la célula, mediante el uso de moléculas con carga positiva, o utilizando resinas inorgánicas a las cuales el ADN se une.

La posibilidad de almacenar ADN purificado por tiempo indefinido dependerá de la calidad de la extracción, pues la estructura de la molécula puede alterarse si quedan otros componentes (proteínas o reactivos de extracción) en la solución, lo cual afectará la durabilidad y la posibilidad de reproducir experimentos. La cantidad de ADN extraído va a depender de la muestra de la cual se parte, siendo fundamental entre otros factores el número y estado de las células del tejido que se muestrea. De acuerdo con Sambrook (2001) y como regla general, un buen método de extracción debe resultar en una alta pureza y concentración del ADN a fin de mantener su integridad física y bioquímica.

El tipo de tejido que se utilice como fuente de ADN va a definir la técnica de extracción y la pureza y concentración del material obtenido. Por ejemplo, la metodología para obtener ADN de las hojas de un vegetal es diferente al método empleado para obtenerlo de las semillas. También debe considerarse que la cantidad y la calidad del ADN obtenido determinarán qué técnicas de análisis genético podrán realizarse posteriormente (RFLP, RAPD, AFLP, secuenciación, etc.).

En términos generales, la extracción de ADN consta de 3 etapas: colecta del material, extracción y purificación del ADN (Figura 8.4).

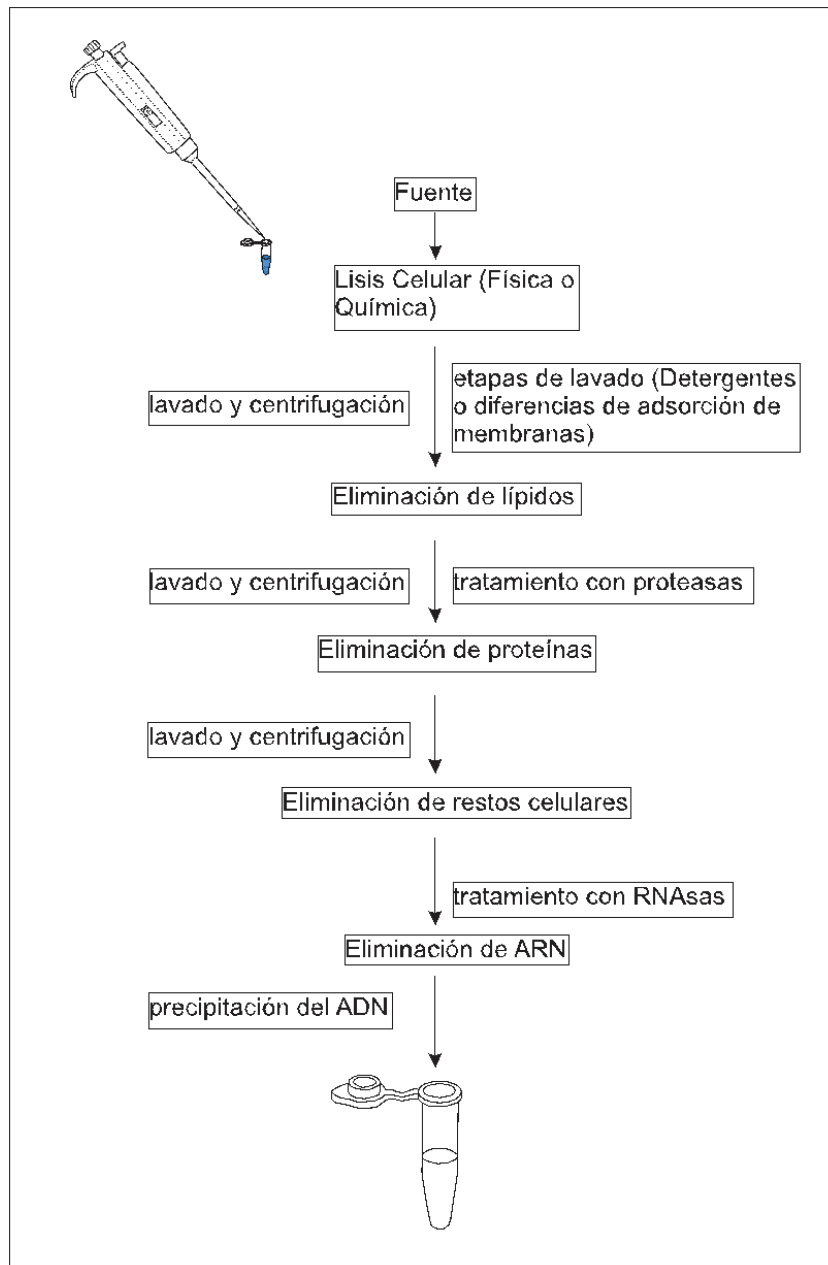


Figura 8.4. Pasos de la extracción y purificación de ADN

Colecta del Material

La obtención, transporte y almacenamiento del material es específica del grupo a estudiar y debe ser debidamente investigado previamente, ya que un error en esta etapa reduce drásticamente la viabilidad de la muestra. En la Tabla 8.1 se muestran de manera general las recomendaciones para los tipos de tejidos más utilizados.

Tabla 8.1. Colecta, transporte y almacenamiento de muestras vegetales y animales

Organismo	Colecta en campo/transporte de la muestra	Almacenamiento de la muestra previo a la extracción
Plantas	Es recomendable colectar tejido joven (contiene más células por unidad de peso que el tejido viejo y menos polisacáridos y polifenoles que dificultan la extracción). Debe congelarse lo antes posible en nitrógeno líquido (evita formación de cristales y síntesis de metabolitos secundarios post-abscisión). Para tejido obtenido de invernadero o cultivo in vitro, no es necesario congelar el material, puede hacerse la extracción directamente.	Almacenar el tejido a -80 °C y evitar ciclos de congelación/descongelación. Se recomienda separar la muestra en varios paquetes pequeños con la cantidad de material a procesar. Alternativamente, el tejido puede ser liofilizado y almacenado a temperatura ambiente entre 15 y 25 °C, aunque esta alternativa no es viable para suculentas.
Animales	<p>Tejido</p> <p>Cortar en pedazos pequeños (aproximadamente 0,5x0,5 cm o menores) para facilitar su maceración posterior. El tejido puede deshidratarse con etanol 100% o congelarse con nitrógeno líquido. Para el transporte debe inactivarse la acción de las endonucleasas mediante un buffer (ej. RNAlater) u homogeneizar el tejido en buffer de lisis que contenga sales de guanidina o β-mercaptoetanol, que inhiben las nucleasas.</p>	Las muestras deben almacenarse de acuerdo con el método de colecta utilizado, en etanol a 4 °C o si fue congelado con nitrógeno líquido a -80 °C.
	<p>Sangre</p> <p>Utilizar agujas de calibre apropiado, respetar la relación muestra/anticoagulante. Homogeneizar la muestra para evitar la hemólisis (la hemoglobina inhibe las reacciones enzimáticas posteriores) la coagulación (la fibrina es insoluble, e impide una lisis apropiada por su capacidad de entrelazarse y atrapar entre sus fibras proteínas, agua y células) y la contaminación bacteriana. Es importante evitar movimientos bruscos durante el transporte.</p>	Las muestras pueden mantenerse por unas horas a 4 °C después de su colecta. Si se congela a -20 °C, debe descongelarse a temperatura ambiente y procesarse en su totalidad, por lo cual es aconsejable hacer alícuotas.

Fuente: modificado de Velázquez Alejos, Aragón Martínez y Romero (2008).

Extracción de ADN

A excepción de unos pocos tipos celulares, podemos extraer ADN de cualquier tejido o rastro biológico de los diferentes organismos. La primera etapa es la **homogeneización** de la muestra, que puede ser mecánica o química y consiste en romper las uniones entre las células. Esta homogeneización facilita a continuación, la interacción con las soluciones de lisis que producen ruptura de la membrana plasmática celular, liberando el material genético. Siguiendo los pasos propuestos por Rocha-Salavarieta (2002) podemos dividir el proceso en 3 pasos generales:

- I. **Ruptura de tejidos y paredes celulares.** Para disgregar tejidos blandos puede realizarse una incubación con proteasa durante 16 horas (incubación *overnight*) a 37° C. Si se trata de material vegetal, por ejemplo semillas, generalmente se utiliza nitrógeno líquido o hielo seco y acción mecánica, y luego puede realizarse una digestión de las paredes celulares utilizando enzimas de tipo celulasa. Las muestras de sangre, saliva u otros fluidos no requieren de este paso.
- II. **Ruptura de membranas.** El paso siguiente es la ruptura de las membranas celulares para liberar el ADN, mediante un buffer de lisis que contiene detergentes como el dodecil sulfato sódico (SDS) o el tritón X-100, que ejercen su acción sobre los lípidos de membrana. Alternativamente, en caso de disponer de un equipo de sonicación, puede aplicarse ultrasonido como método físico de ruptura.
- III. Luego de esta etapa se centrifuga la muestra para separar el material genético de los componentes celulares no solubles.
- IV. **Inhibición de enzimas nucleasas.** En general toda célula contiene nucleasas que destruyen los ácidos nucleicos (ADNasas y también ARNasas) las cuales rápidamente deben ser inactivadas para evitar la destrucción del material genético de la muestra. Como las nucleasas son proteínas, su inactivación se realiza con métodos que promueven la lisis proteica sin afectar a los ácidos nucleicos. Generalmente se utiliza proteinasa K y posterior tratamiento con solventes orgánicos (fenol y cloroformo) y/o antioxidantes (dithiothreitol y β -mercaptoetanol).

El objetivo de extraer ADN es obtener preparaciones altamente enriquecidas en este ácido nucleico y libres de otras moléculas, entre las cuales se encuentran los propios reactivos utilizados en el proceso de extracción (Tabla 8.2). Opcionalmente, la muestra puede tratarse con enzima ARNasa que degrada específicamente las moléculas de ARN presentes en la muestra; en tal caso esto debe realizarse mediante una incubación con ARNasa previa a la lisis con proteinasa K.

Precipitación y cuantificación del ADN

Una vez eliminado todo tipo de moléculas lipídicas y proteicas, se agrega etanol a la suspensión que contiene el ADN, pudiendo suplementarse con acetato de sodio o acetato de amonio, dado que estas sales interactúan con los grupos fosfato. Estos componentes hacen que la molécula de ADN, normalmente hidrofílica, se pliegue sobre sí y se vuelva más insoluble, precipitando con facilidad mediante centrifugado. El pellet obtenido se “enjuaga” con etanol 70% y luego de descartar el alcohol, se resuspende el ADN en distintos medios, como agua o buffer tris-EDTA para su conservación.

Previamente a utilizar la muestra de ADN en análisis genéticos, es importante determinar el rendimiento obtenido, para lo cual existen diversos métodos de estimación de la **concentración** de los ácidos nucleicos en una preparación. Dado que las bases nitrogenadas del ADN absorben luz ultravioleta (UV) a 260 nanómetros (nm), pueden realizarse mediciones mediante espectrofotometría.

Otra estrategia posible es la separación del material genético por electroforesis (ver protocolo de electroforesis más abajo) y medir la intensidad de fluorescencia emitida por un compuesto intercalante que se une al ADN. Existen diversos intercalantes que tiñen las moléculas de ADN, entre ellos el bromuro de etidio se encuentra en desuso por su alto potencial cancerígeno, y en su reemplazo, se comercializan agentes intercalantes menos agresivos, como por ejemplo GelRed®. La concentración de la muestra en la corrida electroforética se mide por comparación con una muestra control de la cual se conozca previamente la concentración y cantidad sembrada. A su vez, la técnica de electroforesis también permite comprobar la **integridad de las moléculas** de ADN, pudiendo observarse si el mismo se encuentra degradado en fragmentos pequeños o como molécula íntegra (fragmentos de gran tamaño).

Tabla 8.2. Reactivos utilizados en la extracción y purificación de ADN

Reactivo	Característica	Función
Tris (hidroximetil amino metano)	Tampón biológico	Estabiliza el pH de la solución (entre 7,0 y 8,0)
EDTA (ácido etilendiamintetracético)	Agente quelante	Atrapa los iones magnesio presentes en el medio para evitar la acción de enzimas que degradan al ADN.
Cloruro de sodio.	Sal	A altas concentraciones solubiliza al ADN.
Cloruro de potasio	Sal	Equilibra fuerzas iónicas.
Acetato de sodio	Sal	Precipita al ADN.
Acetato de potasio	Sal	Precipita proteínas.
Fenol	Solvente orgánico (tóxico)	Desnaturaliza proteínas.

Cloroformo	Solvente orgánico (tóxico)	Desnaturaliza proteínas. Remueve lípidos. Solubiliza al fenol y lo elimina de la solución.
SDS (dodecil sulfato de sodio)	Detergente aniónico	Solubiliza proteínas y membranas.
Sarkosyl (lauril sarcosina)	Detergente aniónico	Inhibe hexoquinasas. Solubiliza proteínas y membranas.
CTAB (hexadecil trimetil bromuro de amonio)	Detergente catiónico	Solubiliza polisacáridos.
Triton X-100	Detergente	Solubiliza proteínas y membranas.
β-Mercaptoetanol	Antioxidante	Inactiva proteínas por reducción de los puentes disulfuro.
DTI (dithiothreitol)	Antioxidante	Reduce los grupos sulfuro de las proteínas.
Octanol isoamilalcohol	Alcoholes	Agente antioxidante.
PVP (polivinil pirrolidona)	Detergente	Elimina compuestos fenólicos que tienden a inhibir la actividad de enzimas. Precipita ácidos nucleicos.
Etanol	Alcohol	Precipita ácidos nucleicos
Isopropanol	Alcohol	Precipita ácidos nucleicos

Fuente: modificado de Sambrook, Fritsch, y Maniatis (1989).

Protocolos de Laboratorio

A continuación se presentan dos protocolos a desarrollar en los trabajos de laboratorio. Debe tenerse en cuenta que las mesadas de trabajo, antes de comenzar con el método de extracción elegido, deben repasarse con hipoclorito de sodio al 10%. Por otra parte, todo el material que se desecha de los métodos de extracción debe descartarse adecuadamente y por el método validado según las normas vigentes.

Método 1: purificación de ADN por técnica de salting-out

Esta técnica es de utilidad para aislar ADN a partir de fluidos corporales como sangre (linfocitos) o saliva (células de exfoliación bucal), y se basa en el trabajo de Miller y colaboradores (1988). Para realizarla, un docente voluntario se hará un enjuague bucal con 1 ml de agua destilada o agua mineral, y luego de un buche enérgico lo recolectará en un tubo de polipropileno de 15 ml (es importante que el voluntario no haya comido ni bebido infusiones durante la última media hora).

- Equilibrar los volúmenes en tubos de 15ml y centrifugar a 4.000 rpm 10 minutos con refrigeración.
- Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 300 ul de Buffer de Digestión con 5ul de Proteinasa K (10mg/ml). Incubar *over night* (O.N.=16 horas) a 37 °C.
- Inactivar la Proteinasa K, hirviendo la muestra durante 5 minutos
- Luego de la incubación, agregar un volumen de acetato de amonio a concentración final 2,5 M (aproximadamente 100ul a cada muestra). Mezclar por inversión varias veces
- Centrifugar a 12.000 rpm por 8 minutos para precipitar las proteínas
- Transferir el sobrenadante a otro tubo y descartar el precipitado
- Agregar igual volumen de Isopropanol para deshidratar y precipitar el ADN, agitar por inversión.
- Centrifugar a 14.000 rpm por 20 min, descartar el sobrenadante.
- Lavar con 1 ml de etanol 70% y centrifugar a 14.000 rpm por 5 min
- Descartar el sobrenadante, secar a T° ambiente durante 5 a 10 minutos (o a 37 °C, por 5 minutos).
- Resuspender en 100 ul de H₂O bidestilada para rehidratar la muestra.
- Homogeneizar y conservar en freezer a -20°C.

Método 2: purificación de ADN con resina chelex-100® para muestras de exfoliación bucal

Esta técnica se basa en un trabajo previo de Walsh y colaboradores (2013) para técnicas forenses, y permite aislar ADN de muestras de exfoliación bucal, para lo cual un docente voluntario se hará un enjuague bucal con 1 ml de agua destilada o agua mineral, y luego de un buche enérgico lo recolectarán en un tubo de polipropileno de 15 ml.

- Centrifugar la muestra a 12.000 rpm durante 5 minutos con refrigeración. Descartar el sobrenadante.
- Agregar 200 ul de resina chelex-100® al 5% y resuspender con vórtex por 10 segundos.
- Transferir el material a un tubo tipo eppendorf.
- Incubar a 56°C por 30 minutos.
- Agitar por vórtex por 10 segundos.
- Hervir en baño maría por 10 minutos.
- Agitar por vórtex 10 segundos. Centrifugar a 4.000 rpm durante 1 minuto. La resina queda en el fondo y el ADN queda disuelto en el líquido sobrenadante.
- Al utilizar la muestra, tomar material del sobrenadante cuidando de no tomar resina al pipetear.
- Conservar en freezer a -20°C.

PCR

Como se expuso en el capítulo 5, la reacción en cadena de la polimerasa o PCR se basa en la síntesis repetida muchas veces de un fragmento de ADN, utilizando una ADN-polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, por ejemplo la enzima proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C), conocida como “Taq polimerasa”. La reacción de PCR es una simulación *in vitro* de lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN, pero en este caso para una secuencia de ADN diana limitada por un par de oligonucleótidos iniciadores o cebadores, a partir de una muestra de ADN genómico. Dicha reacción se somete a ciclos de diferente temperatura donde se suceden tres etapas, desnaturalización, hibridación y extensión que se repiten sucesivamente, logrando la amplificación de la región de interés en las dos cadenas complementarias. Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial gracias a que cada nueva copia sirve de molde en el siguiente ciclo, dando origen a millones de copias (Figura 8.5).

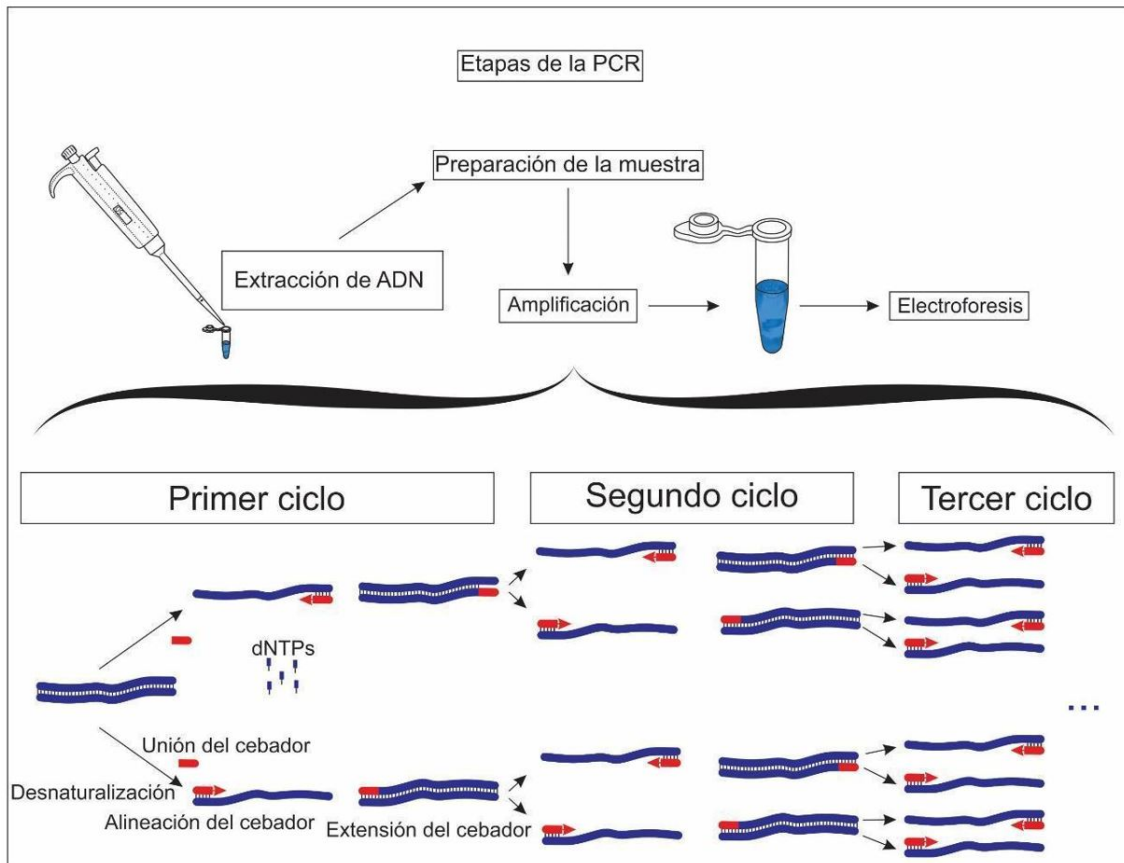


Figura 8.5. Etapas de la PCR.

La técnica de PCR tiene muchísimas aplicaciones, por ejemplo en genética de poblaciones, genética forense y medicina genómica, entre otras. Tiene como ventaja su alta sensibilidad, permitiendo la obtención de copias a partir de unas pocas moléculas originales presentes en una muestra. A su vez, esto presenta también una desventaja en cuanto al riesgo de contaminación con ADN proveniente de otras muestras, por lo cual es importante considerar ciertas recomendaciones. Es muy

importante separar el trabajo en áreas exclusivas pre-PCR (extracción de ADN y preparación de la reacción de PCR) y post-PCR (electroforesis) para evitar la contaminación del material a amplificar. Antes de comenzar, debe descontaminarse la mesada de trabajo (puede utilizarse hipoclorito de sodio 10% o radiación UV) a fin de eliminar cualquier fuente de ADN presente en el área, y es conveniente mantener separados los reactivos de las muestras de ADN durante la tarea. También es importante, como en toda tarea de laboratorio, controlar el correcto rotulado de los tubos y descartar adecuadamente los materiales de desecho. El uso de guantes descartables en la manipulación de los reactivos y las muestras es también esencial para evitar la acción de nucleasas presentes en el sudor u otros componentes que puedan afectar la reacción.

Como medida de control de posibles contaminaciones se recomienda incluir en cada ronda de PCR al menos un control negativo, el cual contendrá todos los reactivos menos el ADN molde, el cual se reemplazará por agua. Este tubo no debería desarrollar amplificación, por lo tanto si la hay, es indicativo de contaminación con alguna fuente de ADN indeseada. También suele ser conveniente incluir un control positivo, utilizando una muestra estandarizada que debe amplificar siempre que no haya problema con los reactivos.

Protocolo de amplificación

Se utilizarán 5 tubos, para 3 muestras de ADN, un control positivo y un control negativo. Para este último, se colocará agua ultrapura en reemplazo del volumen de ADN requerido. Son 5 tubos con 10ul finales cada uno = 50 ul.

Preparar una master-mix considerando el volumen final de 50ul totales.

Antes de iniciar la preparación, descongelar y agitar cada reactivo, y pasar por una minicentrífuga para evitar que quede el líquido en la tapa o las paredes del tubo. Mantener los reactivos en hielo para evitar la desfosforilación de los nucleótidos y la degradación de los cebadores y la polimerasa.

Tabla 8.3 Reactivos y concentraciones necesarios para una reacción de PCR estándar

Reactivo	Conc. Inicial	Conc. Final	Cantidad
H ₂ O	Csp 50ul		50-21,75=28,25*
Buffer de reacción	10X	1X	5ul
Cl ₂ Mg	25mM	2mM	4ul
dNTP	5mM	0,2mM	2ul
Oligonucleótidos	25pmol/ul	2,5ul /reacción	0,5ul
Taq pol	5 U/ul	0,25 U/reacción	0,25ul

* En la resta se incluye también el ADN que se colocará en cada tubo (total=20ul), aunque éste no se agregará hasta el final de la preparación.

Mezclar y centrifugar, repartir 8ul de mezcla en cada uno de los 5 tubos, rotular uno como control negativo, otro como control positivo y los otros 3 tubos con el código de cada muestra. Agregar el ADN (o el agua para el control negativo) y colocar una gota de aceite mineral para evitar la evaporación durante el ciclado.

ADN 10ng/ul20ng/reacción 2ul
 Aceite mineral *1 gota
 Centrifugar y llevar al termociclador (Tabla 8.4).

** Según el equipo termociclador utilizado, puede no requerirse el aceite mineral ya que los modelos más modernos presentan un bonete térmico que evita la evaporación, no haciendo necesario el agregado del aceite.

Tabla 8.4. Ejemplo de parámetros para un ciclado de PCR

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	2'30''
Desnaturalización	93°C	0'45''
Hibridación de cebadores	45 a 70°C***	50''
Extensión	72°C	1'
Extensión final	72°C	5'

*** En función de la secuencia de los cebadores, se definirá la temperatura a utilizar.

Las etapas de Desnaturalización, Hibridación de cebadores y Extensión se repetirán un número determinado de veces.

Finalizada la reacción, chequear los amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa, en una concentración acorde al tamaño del segmento a analizar.

Electroforesis

La electroforesis en gel es una técnica donde se hacen migrar a través de una matriz porosa las moléculas a estudiar, utilizando como fuerza de desplazamiento el impulso de un campo eléctrico de voltaje controlado. Se utiliza para separar macromoléculas, tales como proteínas y ácidos nucleicos, según su tamaño y su carga. En el caso de los ácidos nucleicos, la carga es siempre negativa, por lo cual la separación de moléculas dependerá solamente del tamaño de las hebras.

Para separar moléculas de ADN se utilizan tanto geles de agarosa (electroforesis horizontal) como de poliacrilamida (electroforesis vertical), dependiendo del nivel de resolución que se requiera, ya que los de agarosa permiten separar fragmentos de tamaños muy diferentes entre sí, mientras que los geles de poliacrilamida pueden separar fragmentos que se diferencian en unos pocos nucleótidos. Como compensación, los geles de agarosa tienen la ventaja de que son fáciles de utilizar y pueden guardarse para usarse más de una vez.

Los geles de agarosa se preparan a partir de un polímero lineal de galactosa y 3,6-anhidrogalaactosa que se funde con calor en un buffer de electroforesis, hasta obtener una solución homogénea. Ésta se vierte en un molde que contiene un peine, cuyos dientes van a generar los pocillos donde se sembrarán posteriormente las muestras de ADN (Figura 8.6). El gel ya frío queda con una consistencia similar a la gelatina, y su poder de resolución va a depender de la concentración de agarosa que se utilice, ya que la matriz del gel tendrá un tamaño de poro determinado según dicha concentración, cuando mayor sea ésta, los poros serán más pequeños.

El gel así preparado se introduce en una cuba de electroforesis (Figura 8.6) donde se conectan un electrodo positivo y uno negativo. Los pocillos del gel deben colocarse del lado negativo ya que, debido a su carga negativa, todas las moléculas de ADN migrarán hacia el polo contrario. En las dos cámaras de la cuba se agrega buffer de corrida, que debe ser el mismo que se utilizó para preparar el gel. Existen distintas alternativas, por ejemplo puede ser un buffer de tris-ácido acético-EDTA (TAE), o bien de tris-ácido bórico-EDTA (TBE).

Las muestras de ADN se siembran acompañadas de un buffer de carga que facilita el ingreso de las mismas en cada pocillo y la posterior visualización de un frente de corrida, gracias a un colorante que se incorpora con el buffer mencionado. Utilizando una micropipeta, se siembran las muestras en los respectivos pocillos y se enciende la fuente de voltaje. Las muestras pueden consistir en ADN genómico purificado, productos de PCR (llamados amplicones), o fragmentos de ADN digeridos con enzimas de restricción, entre otros. En uno de los pocillos debe sembrarse una muestra control con uno o más fragmentos de ADN de longitud conocida, a fin de tener una referencia de los tamaños en pares de bases de las muestras a correr. En la figura 8.7 se muestran dos marcadores, uno en la cuarta calle presenta bandas cada 50pb y el otro en la última calle, con bandas cada 100pb.

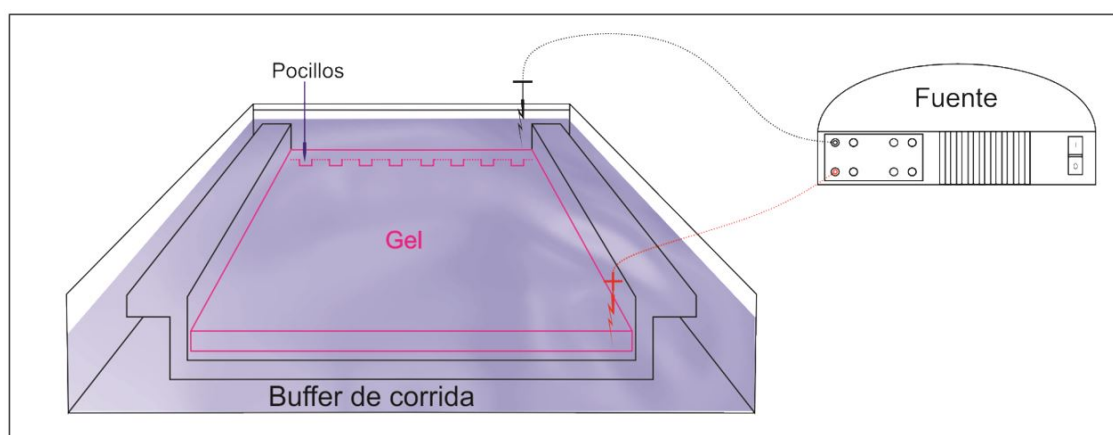


Figura 8.6. Esquema de una cuba de electroforesis horizontal para geles de agarosa.

En la corrida electroforética los fragmentos más cortos de ADN tendrán una mayor velocidad de migración a través de los poros del gel (Figura 8.7). Asimismo, la estructura de la doble hebra también tendrá un efecto en la capacidad de migración del ADN, ya que las moléculas circulares y las lineales migran de manera diferente.

Finalizada la corrida electroforética se procede a la visualización de los fragmentos, los cuales a simple vista no pueden observarse a menos que se realice una tinción de las moléculas de ADN con un agente intercalante, análogo de bases, fluorescente. Entre estos agentes, el bromuro de etidio está siendo menos utilizado debido a su potencial carcinogénico, y actualmente se tiende a reemplazarlo por agentes comerciales menos tóxicos (por ejemplo SybrGreen® o GelRed®, entre otros). Estas moléculas intercalantes en asociación con los fragmentos de ADN emiten fluorescencia al ser sometidas a la luz UV, permitiendo observar así los fragmentos que migraron a través del gel (Figura 8.7). Aquellos fragmentos que comparten el mismo tamaño en pares de bases, migrarán juntos en el gel formando una banda, la que se comparará con la muestra control de referencia para determinar su longitud en pares de bases (pb).

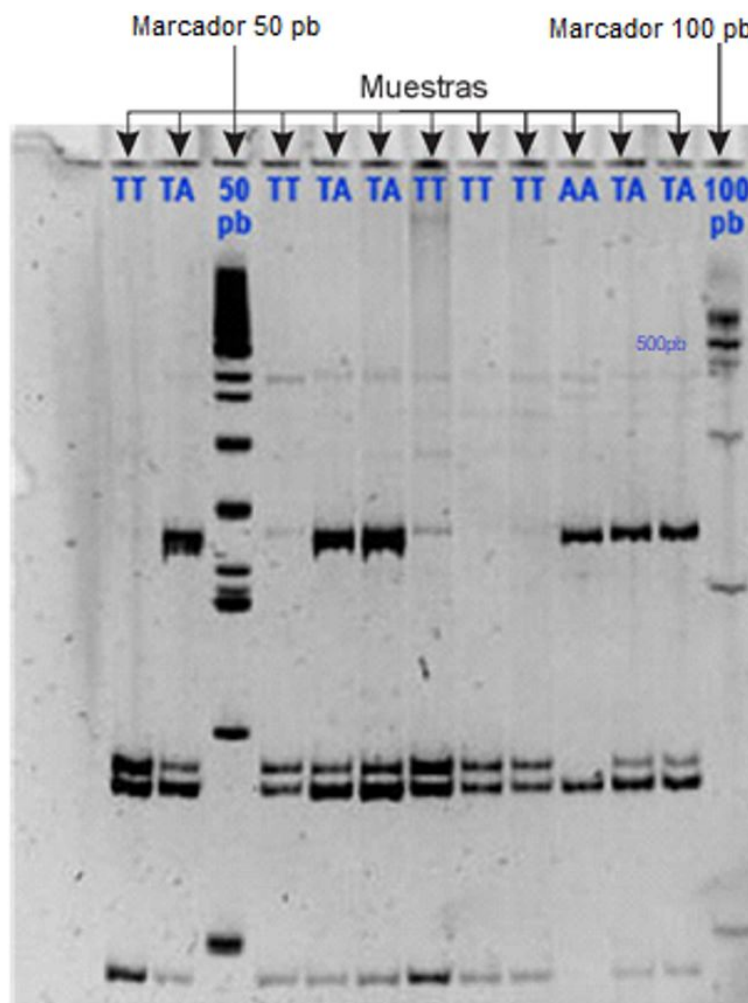


Figura 8.7. Corrida en gel de fragmentos de ADN digeridos con enzima de restricción, con 2 marcadores de tamaños (50 y 100 pares de bases). Las muestras tienen entre dos y cuatro fragmentos de diferente tamaño, dependiendo de las variantes alélicas que presenten.

Protocolo para electroforesis de ADN en gel de agarosa

Calentar y disolver agarosa en buffer TAE (tris-ácido acético-ácido bórico) y volcar en la base acrílica, luego de esperar que se enfríe levemente. Hay otras alternativas al buffer de preparación del gel y de la corrida en la cuba, pero ambos deben estar en coincidencia.

No olvidar colocar el peine antes de que la solución se haya solidificado. El ancho y profundidad de los dientes va a determinar la cantidad de muestra que pueda sembrarse en los pocillos.

Una vez gelificada la agarosa, quitar el peine, colocar el gel en la cuba electroforética y agregar buffer de corrida TAE en ambas cámaras de la cuba.

Preparar las muestras a sembrar con buffer de carga (azul de bromofenol+sacarosa) y agente de tinción (por ejemplo intercalante GelRed®).

Colocar las muestras en los pocillos.

Conectar los electrodos y definir los parámetros de la corrida electroforética en la fuente de voltaje.

Referencias

- Ashburner, M. (1898). *Drosophila: a laboratory handbook and manual*. Cold Spring Harbor laboratory Press, Nueva York.
- Base de Datos de Drosophila, FLYBASE: www.flybase.org
- Demerec, M. Ed. (1965). *Biology of Drosophila*. Editorial Hafner Publishing Co., Nueva York.
- Checa Rojas, A. (2017). *Método: Gel de electroforesis Agarosa. Conogasi, Conocimiento para la vida*. Fecha de consulta: Enero 18, 2020
- Espinosa, L. (2007) Guía práctica sobre la técnica de PCR 517 Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Ecología Molecular*, 517–536.
- Gleason, J., Nuzhdin, S. & Ritchie, M. (2002). Quantitative trait loci affecting a courtship signal in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 89, 1–6. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800099>
- Guevara, Palmira, Riward Campelo Morillo, Richard Clack, Veronica Guariglia, Félix Moronta, and Kamran Rizzolo. (2009). *Manual de Laboratorio*. Editorial Universidad Central de Venezuela, Venezuela.
- Larrachea, E. (1997) Reaccion en cadena de la Polimerasa. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatria* 35, 247–249.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. R. N. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, 16(3), 1215.
- Ramos Morales, P. *Manual de laboratorio de genética para Drosophila melanogaster*, McGraw-Hill Interamericana de México, 1993.
- Roberts, D. B. (1984). *Drosophila a practical approach*, IRL. Editorial Oxford Press, Oxford.
- Rocha-Salavarieta, P. J. (2002). “Teoría y Práctica Para La Extracción y Purificación Del ADN de Palma de Aceite.” *Revista Palmas* 23(3):9–17.

- Sambrook, Joseph, E. F. Fritsch, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2da Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Pres, Nueva York.
- Velázquez Alejos L. P., Aragón Martínez M. del C., Cornejo Romero A. (2008). Extracción y Purificación de ADN, en *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. SEMARNAT, México, pp. 1-26
- Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. (2013, Reimpresión de 1991). Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques*, Vol. 54 No. 3: 134-139.