



EXPLORANDO LA GENÉTICA DEL GUSTO: Análisis del SNP del gen PTC por PCR

Ref.PCRPTC

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 la amplificación del gen TAS2R38, el cual es el responsable de la capacidad de detectar el sabor amargo. Posteriormente, se realizará la purificación del producto de PCR y se digerirá con el enzima de restricción HaeIII para identificar la presencia o ausencia del SNP vinculado al fenotipo de detectar el sabor amargo en papeles de PTC.

2. INTRODUCCION

2.1 PCR

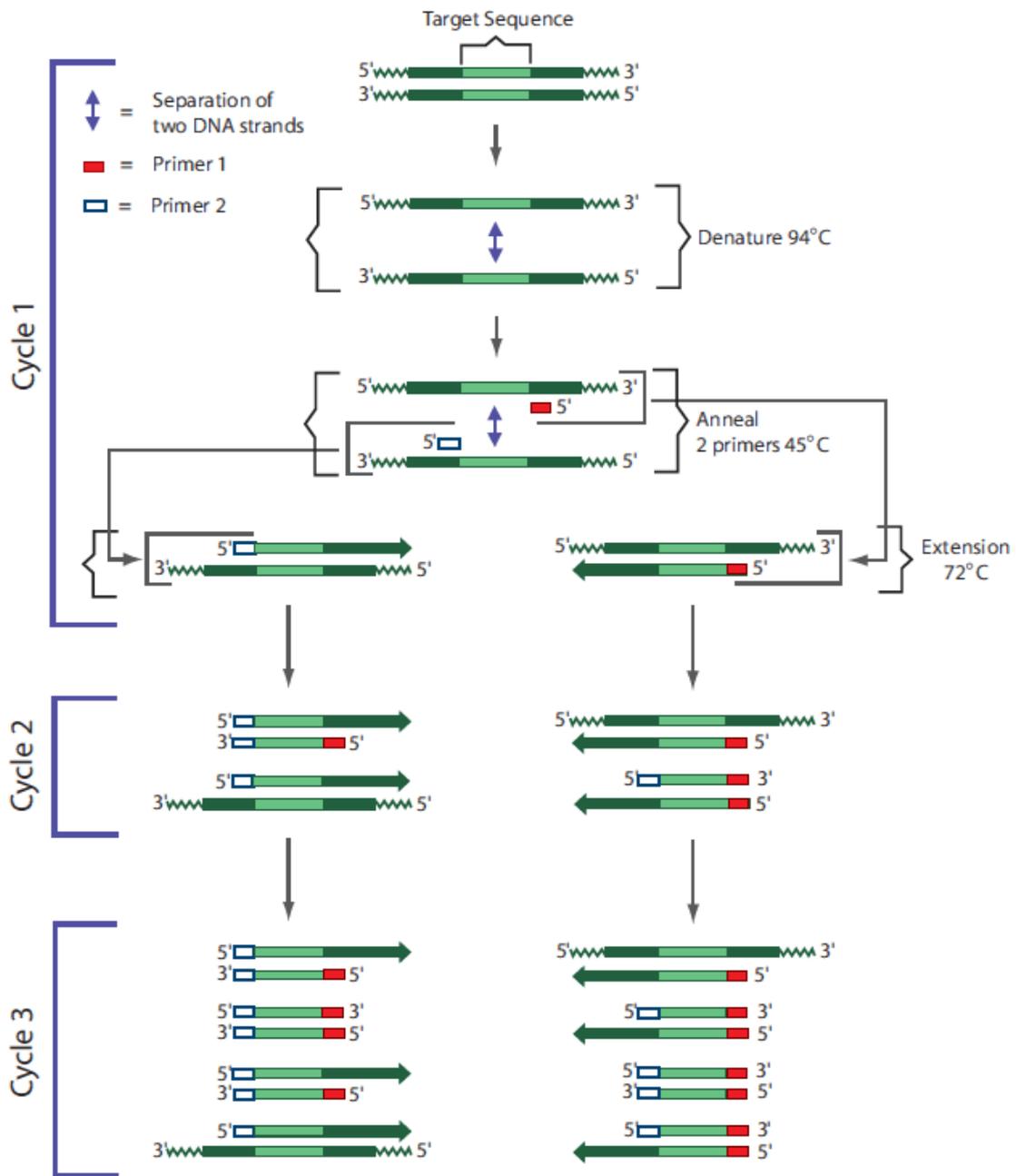
La PCR ha revolucionado la investigación y diagnóstico basado en la Biología Molecular. La PCR es un proceso simple, exacto y altamente reproducible que proporciona la ventaja de empezar con una pequeña cantidad de ADN y ser capaz de amplificarlo de forma que se tenga suficiente para realizar experimentos.

Se han desarrollado gran cantidad de test diagnósticos, también se ha utilizado en mapeo y secuenciación de ADN en proyectos de genoma y está siendo utilizado en determinaciones forenses, paternidades, diagnóstico clínico, 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 µl. 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. El producto amplificado es luego detectado por separación de la mezcla de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa.

2.1 Análisis del SNP del gen PTC

Cuatro letras de nucleótidos especifican el código genético: A (adenina), C (citosina), T (timina) y G (guanina). Una mutación puntual ocurre cuando un nucleótido es reemplazado por otro nucleótido. Por ejemplo, cuando una A se reemplaza por una C, T o G (Figura 1). Cuando dicha mutación está presente en al menos el 1% de la población, se conoce como **Polimorfismo de Nucleótido Único o SNP (pronunciado "snip")**. Un SNP también puede ocurrir cuando un único par de bases ha sido eliminado o agregado a un secuencia.

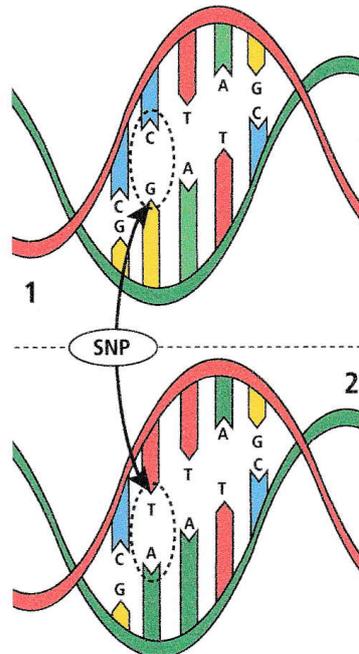


Figura 1

Los SNP son el tipo más común de variación genética entre las personas. **Ocurren más frecuentemente en las regiones no codificantes de los genes y en regiones entre genes.** Aunque estos SNP no se traducen en aminoácidos, pueden afectar la producción de proteínas a través del corte y empalme de genes, la unión del factor de transcripción o el ARN no codificante.

Un SNP también puede ocurrir en la secuencia de codificación de un gen, donde puede afectar el producto proteico de ese gen. Por ejemplo, la anemia de células falciformes se produce porque un polimorfismo de un solo nucleótido debido a que el aminoácido ácido glutámico hidrófilo se reemplazará por el aminoácido hidrófobo valina en la cadena de hemoglobina de la β -globina.

En esta práctica, los alumnos aislarán el ADN de su saliva y lo utilizarán para llevar a cabo la reacción de PCR del gen TAS2R38 para analizar la presencia o ausencia del SNP que se produce en la posición 145 de este gen de sensibilidad a un compuesto que tiene sabor amargo, el PTC (phenylthiocarbamide).

Existe una variabilidad en la población en la sensibilidad al compuesto amargo PTC. Este hecho fue descubierto en 1931 en una serie de eventos que implican por un lado una curiosidad científica y por otro lado una cuestión de seguridad en el laboratorio.

Un químico llamado Arthur Fox estaba mezclando una sustancia química en polvo cuando accidentalmente dejó un poco del polvo se liberará en el aire. Un colega cercano exclamó qué amargo sabía el polvo, pero Fox (que estaba más cerca del químico) no detectaba ningún sabor amargo. Interesados, ambos hombres se turnaron para probar el químico.

Fox siguió encontrando el químico insípido, mientras que su colega lo encontró amargo. Luego, Fox probó a un gran número de personas. Nuevamente encontró una mezcla de "catadores" y "no catadores" y publicó sus hallazgos. Esto atrajo el interés del genetista L.H. Snyder, quien probó el compuesto en las familias y formuló la hipótesis de que el estado de catador / no catador estaba determinado genéticamente.

La capacidad de detectar el compuesto PTC está unida a la presencia del miembro del receptor Taste 2 de la proteína 38 que está codificada por el gen TAS2R38. El gen TAS2R38 tiene dos alelos: el alelo dominante (T), que confiere la capacidad de detectar el sabor amargo del PTC, y el alelo recesivo no-catador (t). Una persona hereda una copia del gen de cada uno de sus padres. La combinación de estos alelos diferentes dentro de un individuo se conoce como genotipo, que a su vez dicta el fenotipo: en este caso, si un individuo es un "catador" o "no catador" del sabor amargo. Los catadores del PTC tienen uno de dos genotipos posibles; o son homocigotos dominantes y tienen dos copias del alelo (TT), o son heterocigotos y tienen un alelo T y un alelo no dominante t (Tt). Los "no catadores" son homocigotos recesivos y tienen dos copias del alelo recesivo (tt). Dentro de la población general, aproximadamente el 70% de las personas evaluadas pueden detectar el sabor amargo del PTC, mientras que el otro 30% no puede.

El análisis de secuencia a lo largo de la región de codificación del gen TAS2R38 reveló que los alelos PTC catadores y no catadores del sabor amargo difieren en 3 aminoácidos debido a SNPs en 3 ubicaciones distintas (Tabla 1). Se encuentran 5 versiones en todo el mundo: AVI, AAV, AAI, PAV, PVI, llamados así por la combinación de aminoácidos presentes en el gen. Los dos haplotipos más comunes son AVI y PAV, que representan no catadores y catadores, respectivamente. Los cambios en la secuencia de aminoácidos alteran la forma de la proteína del receptor, lo que determina la fuerza con que se puede unir al PTC. Como todas las personas tienen dos copias de cada gen, las combinaciones de variantes del gen del sabor amargo determinan si alguien encuentra el PTC intensamente amargo, algo amargo o sin sabor. Esto puede cuantificarse aproximadamente mediante una prueba de sabor o caracterizarse con mayor precisión determinando los nucleótidos en las posiciones 145, 785 y 886.

Posición	Cambio en nucleótido	Cambio en codón	Cambio en aminoácido
Nucleótido	No-catador > catador	No-catador > catador	No-catador > catador
145	G > C	GCA > CCA	Alanina > Prolina
785	T > C	GTT > GCT	Valina > Alanina
886	A > G	ATC > GTC	Isoleucina > Valina

Tabla 1. Relación de variaciones en localizaciones específicas en el gen TAS2R38 con la capacidad de detectar el sabor amargo

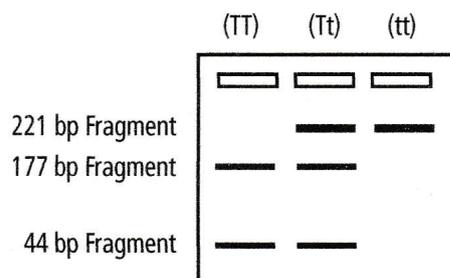
Una forma de detectar un SNP es usar enzimas de restricción. Las enzimas de restricción son endonucleasas que catalizan la escisión de los enlaces fosfato dentro de ambas cadenas de ADN. La característica distintiva de las enzimas de restricción es que solo cortan secuencias de bases muy específicas. Estos sitios de reconocimiento son generalmente de 4 a 8 pares de bases de longitud y la división ocurre dentro o cerca del sitio. Los sitios de reconocimiento son frecuentemente simétricos, es decir, ambas hebras de ADN en el sitio tienen la misma secuencia de bases cuando se leen 5' a 3'. Tales secuencias se llaman palíndromos. Un solo cambio de base en el palíndromo de reconocimiento da como resultado la incapacidad de la enzima de restricción para cortar el ADN en esa ubicación. Esto alterará la longitud y el número de fragmentos de ADN generados después de la digestión.

Estos fragmentos pueden separarse según su longitud mediante electroforesis en gel de agarosa. **El proceso de digestión enzimática seguido de electroforesis a menudo se denomina análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).**

En el ejemplo del gen PTC, **el enzima HaeIII** solo corta el alelo catador (T) con la capacidad de detectar el sabor amargo (5'-GGCG-G**CC**ACT-3 '). El polimorfismo presente en el alelo no catador que no tienen la capacidad de detectar el sabor amargo (5'-GGC-G**GG**CACT-3 ') se produce como un cambio en una única base precisamente en el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción, **por lo que HaeIII no puede digerir el ADN no catador (t)** (Figura 3).

Homozigotos catadores (TT)	Heterozigotos catadores (Tt)	No-catadores (tt)
1.Extracción ADN a partir de la saliva	1.Extracción ADN a partir de la saliva	1.Extracción ADN a partir de la saliva
2. Amplificación por PCR de la región del gen PTC	2. Amplificación por PCR de la región del gen PTC	2. Amplificación por PCR de la región del gen PTC
GGCGGCCACT Producto de PCR de 221 pb	GGCGGCCACT Producto de PCR de 221 pb + GGCGGCACT Producto de PCR de 221 pb	GGCGGCACT Producto de PCR de 221 pb
3.Digestión de restricción con Hae III	3.Digestión de restricción con Hae III	3.Digestión de restricción con Hae III
GGCGG CCACT	GGCGG CCACT + GGCGGCACT	GGCGGCACT
4. Electroforesis gel de agarosa	4. Electroforesis gel de agarosa	4. Electroforesis gel de agarosa
Fragmento de 44 pb Fragmento de 177 pb	Fragmento de 44 pb Fragmento de 177 pb Fragmento 221 pb	Fragmento de 221 pb (no se corta)

Figura 3. Análisis de genotipos del gen PTC



3. COMPONENTES

Se suministran reactivos suficientes para la realización de 25 PCR individuales y la realización de 4 geles de electroforesis en agarosa al 2.5 o 3 %.

Tampón de electroforesis concentrado 10 X	100 ml	
Agarosa	6.0 gr	
MIX PCR gen PTC	2 x 350 ul	Conservar a -20°C
GELSAFE tinción ADN	25 ul	Conservar a +4°C
Kit Purificación Fragmento PCR	25 muestras	
FastDigest Green Buffer	70 ul	Conservar a -20°C
Hae III enzima de restricción	70 ul	Conservar a -20°C
Control positivo ADN homocigoto catador	15 ul	Conservar a -20°C
Control Papel sin sabor	25 unid	
Control Papel PTC (sabor amargo)	25 unid	

Tampón de electroforesis 10 X para elaborar 2 x 500 ml de Tampón de electroforesis 1 X que es el Tampón de trabajo.

Se utiliza una polimerasa 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.

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, 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 ul** (100-250 ng) del ADN de cada alumno para cada reacción de PCR.

IMPORTANTE: b) Preparar un control positivo de amplificación, para ello colocar **2.5 ul del control positivo ADN homocigoto catador.**

REACTIVOS	VOLUMEN
MIX PCR	22.50 ul
ADN (100-250 ng)	2.5 ul
Volumen Total	25 ul

2. Mezclar bien, el colorante rojo incluido en la polimerasa facilita el proceso.
3. 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 PTC

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización HOT STAR	95°C	10 minutos
Ciclos PCR Realizar 35 ciclos	95°C 64°C 72°C	30 segundos 45 segundos 45 segundos
Extensión final	72°C	10 minutos
Final	4°C	

4.3 Purificación Fragmento de la PCR

Una vez ha terminado la PCR vamos a proceder a la purificación del fragmento amplificado de 221 pares de bases, para ello utilizaremos un kit utilizado en investigación DANAGENE CLEAN PCR Kit que permite eliminar la polimerasa, nucleótidos sobrantes, sales, etc y quedarnos sólo con el fragmento de 221 pb para que cuando realicemos la digestión con el enzima HaeIII está no se inhiba por la presencia de otros componentes.

1. **Añadir 150 ul Tampón de Unión** al microtubo que contiene los **25 µl de la PCR**. Mezclar bien por pipeteo.
2. **Transferir la muestra (175 ul) a una spin columna**. Colocar la spin columna en un tubo de recogida. **MUY IMPORTANTE colocar los 175 ul justo en el centro de la membrana blanca**.
3. **Centrifugar por 1 minuto a 10.000-12.000 r.p.m.**
4. **Eliminar el filtrado y añadir 700 µl de Tampón de Lavado**. Centrifugar por 1 minuto a 14.000 r.p.m.
5. **Eliminar el etanol residual** por centrifugación durante 3 minutos a 14.000 r.p.m.

6. Colocar la spin columna en un nuevo microtubo de 1.5 ml y **añadir 25 µl de Tampón de Elución** pre-calentado a 70°C **exactamente en el centro de la membrana blanca (tocar con la punta sin romper la membrana)**.
7. **Incubar durante 2 minutos y centrifugar durante 1 minuto a 14.000 r.p.m. Ahora el microtubo contiene el ADN a digerir con Hae III.**

4.4 Digestión con el enzima de restricción Hae III

1) Sacar el microtubo del FastDigest Green Buffer del congelador y dejar que se descongele. El enzima de restricción Hae III siempre estará en estado líquido y se debe mantener siempre en el congelador, sólo sacar al utilizarlo y devolverlo rápidamente al congelador.

Centrifugar para recoger las gotas que puedan quedar en las paredes.

2) Las reacciones que vamos a preparar tendrán un volumen total de 30 microlitros.

REACCIÓN	VOLUMEN
Fragmento ADN purificado (paso 7)	25 microlitros
FASTGREEN Tapón Verde	2.5 microlitros
Hae III Tapón Rojo	2.5 microlitros

3) Incubar en un baño maría a 37°C por lo menos durante 15 minutos.

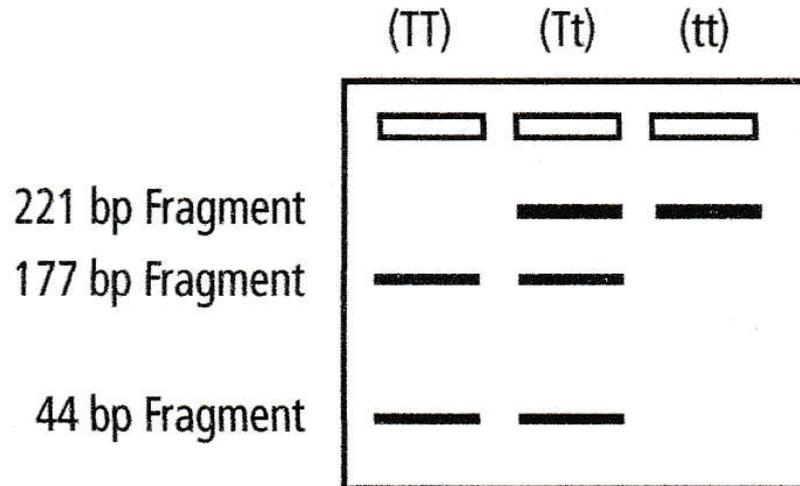
4) Sembrar las muestras en un **gel de agarosa al 3 %** y realizar la electroforesis. No es necesario la adición de un tampón de carga ya que el Fastgreen utilizado lo contiene de color verde.

MUY IMPORTANTE: a) El porcentaje de agarosa debe ser muy elevado ya que hay un fragmento muy pequeño de 44 pb y es necesario separar bien los fragmentos de 177 y 221 pares de bases.

b) El tiempo de electroforesis será mayor de lo normal para poder separar bien las bandas de 221 y 177 pares de bases en el caso de heterocigotos catadores.

c) Se recomienda el uso de un marcador de peso molecular para verificar los tamaños de los fragmentos.

5. RESULTADOS



CATADORES del sabor amargo del PTC:

Catadores Homocigotos (TT): fragmentos de 177 y 44 pares de bases. Ambas copias del gen contiene el polimorfismo, permitiendo ser cortado por el enzima HaeIII.

Catadores Heterocigotos (Tt): 1 alelo permanece sin ser cortado (221 pb) ya que no contiene el polimorfismo y el otro alelo es cortado al contener el polimorfismo, generando fragmentos de 177 y 44 pares de bases. **NOTA: la banda de 44 pares de bases se aprecia muy tenue en los heterocigotos al ser un fragmento pequeño tamaño.**

NO-CATADORES del sabor amargo del PTC:

Homocigoto recesivo (tt): Permanece sin ser cortado por el enzima HaeIII ya que ningún alelo contiene el polimorfismo.

Una vez determinado el genotipo de cada alumno comprobaremos el fenotipo mediante los papeles controles sin sabor y los papeles PTC (sabor amargo) que se suministran, si se ha determinado bien el genotipo tiene que coincidir con la capacidad de distinguir el sabor amargo o no del PTC.

GENOTIPO	PAPEL CONTROL	PAPEL PTC
TT	Sin sabor	Sabor amargo intenso
Tt	Sin sabor	Sabor amargo medio
tt	Sin sabor	Sin sabor