

DETECCIÓN DE SOJA TRANSGÉNICA POR PCR

Ref.PCR9

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) como herramienta para la detección de organismos modificados genéticamente.

Los estudiantes adquirirán conocimientos básicos sobre la biología molecular del proceso de obtención de un OMG.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Organismos modificados genéticamente o transgénicos.

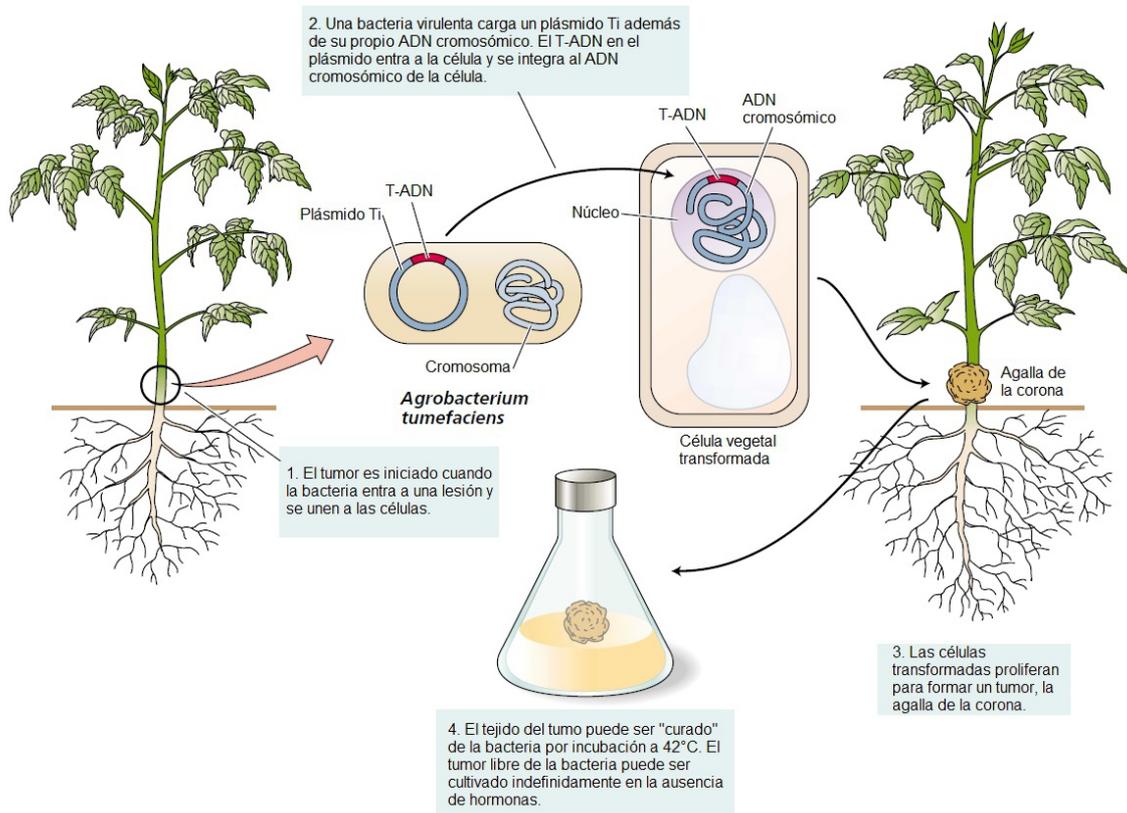
La **ingeniería genética** ha producido plantas de cultivo resistentes a las plagas. El que sale ganando es el medio ambiente, porque se disminuye el uso de pesticidas; pero lo más paradójico es que las organizaciones que se han dedicado a proteger el medio ambiente han sido las que se han opuesto de forma más ruidosa a la introducción de estas plantas, a las que se denominan genéticamente modificadas (GM).

La primera dificultad al trabajar con esta técnica es la introducción del fragmento deseado de ADN (gen útil) en la célula vegetal, y después en el genoma de la planta.

La enfermedad de las agallas acarrea la formación de un "tumor" irregular en el tallo de las plantas, conocido como agalla. La causa es una bacteria común del suelo llamada ***Agrobacterium tumefaciens***, que oportunamente infecta las plantas donde se ha visto dañadas por, digamos, el mordisqueo de los insectos herbívoros. El parásito bacteriano lleva a cabo el ataque mediante la construcción de un túnel a través del cual deposita un paquete de su propio material genético dentro de la célula vegetal. El paquete consta de un fragmento de ADN que se extrae cuidadosamente de un plásmido especial y luego se envuelve en una cubierta protectora antes de enviarlo a través del túnel. Una vez entregado el paquete de ADN, éste se integra, como lo haría el ADN viral, en el ADN de la célula huésped. Sin embargo, a diferencia de un virus y una vez que se ha alojado, este fragmento de ADN no fabrica más copias de sí mismo. En cambio, produce hormonas de crecimiento vegetal y proteínas especializadas que sirven de nutrientes a la bacteria, favoreciendo simultáneamente la división de las células vegetales y el crecimiento bacteriano y creando un circuito cerrado de intercomunicación positiva: las hormonas de crecimiento hacen que las células se multipliquen con más rapidez, y en cada división celular el ADN bacteriano invasor

se copia conjuntamente con el de la célula huésped, de tal manera que se producen cada vez más nutrientes bacterianos y hormonas de crecimiento vegetal.

La consecuencia de este frenesí de crecimiento incontrolado es la aparición en la planta de una masa irregular, la agalla, muy útil para la bacteria porque constituye una especie de fábrica en la cual la planta se ve obligada a producir precisamente lo que necesita la bacteria, y aún en mayores cantidades.



El *Agrobacterium* es un sistema de transferencia prefabricado para introducir ADN ajeno en las plantas, un ingeniero genético natural. De forma que se podía insertar un gen a elección en el plásmido de *Agrobacterium* y transferirlo después a la célula vegetal, de esta forma cuando la bacteria modificada genéticamente infectara al huésped, insertaría el gen elegido en el cromosoma de la célula vegetal.

A medida que el debate sobre los alimentos GM se aviva a nuestro alrededor, es importante comprender que nuestra costumbre de tomar alimentos que han sido genéticamente modificados tiene realmente una antigüedad de miles de años. De hecho, tanto nuestros animales domésticos, origen de la carne que comemos, como las plantas de cultivo que nos suministran granos, frutas y verduras, están genéticamente muy alejadas de sus antepasados silvestres.

Muchos de los antepasados silvestres de plantas de cultivo ofrecían relativamente poco a los primeros agricultores: eran difíciles de cultivar y su producción era escasa. Para que la agricultura diera buenos resultados fue necesario modificarla. Los primeros agricultores comprendieron que el que las características deseables se mantuvieran de generación en generación implicaba una modificación ingénita (nosotros diríamos genética). De este modo comenzó el ingente programa agrícola de nuestros antepasados. La actividad dependía de una selección artificial, según lo cual los granjeros sólo criaban aquellos individuos que presentaban los rasgos deseados, por ejemplo, las vacas que producían más leche. En efecto, los granjeros

hacían lo que hace la naturaleza en el curso de la selección natural: elegir de entre la gama de variaciones genéticas de las que disponían, con el fin de asegurarse de que la siguiente generación se enriqueciera con aquellas que se adaptan mejor al consumo, en el caso de los granjeros, y a la supervivencia, en el caso de la naturaleza. La biotecnología nos ha ofrecido un modo de generar variaciones deseadas, de manera que no tenemos que esperar a que aparezcan de forma natural; no es, de pro sí, más que el último de una serie de métodos que han sido utilizados para *modificar genéticamente* nuestros alimentos.

2.2 Soja modificada genéticamente (Soja RR)

El uso de pesticidas está muy extendido para poder erradicar los insectos y las malas hierbas que pueden comprometer la cosecha anual. Sin conocer exactamente los riesgos que puede conllevar el uso de ellos. Es por eso, que empresas como Monsanto, crean variedades de plantas resistentes a insecticidas, para poder reducir el uso de ellos. Además, asegurarnos el cultivo y la cosecha.

Uno de estos cultivos se trata de la soja RR o Roundup Ready o soja 40-3-2. Se trata de una variedad de soja la cual se le ha incorporado un gen de resistencia al herbicida glifosfato por transgénesis. Este gen de resistencia proviene de una bacteria del suelo, *Agrobacterium*.

Esta resistencia ayuda a sobrevivir a la planta de la soja al uso del herbicida glifosfato, el cual se usa contra las malas hierbas. Por tanto, ayuda a que el cultivo de soja pueda resistir sin tener que debatir el uso de los nutrientes, suelo y sol con las malas hierbas. Optimizando el cultivo y reduciendo también el uso de pesticidas.

El glifosfato actúa en todas las especies vegetales inhibiendo la actividad de las enzimas que sintetizan los aminoácidos aromáticos, necesarios en la fotosíntesis. Al no poder sintetizar estos aminoácidos las plantas mueren o frenan considerablemente su crecimiento. La soja transgénica resistente a glifosfato contiene una enzima proveniente de las bacterias encargada de la síntesis de aminoácidos aromáticos y que además es resistente al glifosfato.

En Europa las leyes y la permisibilidad de los alimentos transgénicos son muy estrictas, siendo muy pocas las variedades de transgénicos permitidas en Europa. Además, el producto obtenido de estas variedades normalmente es usado como alimento para animales. En este caso, la soja transgénica RR si está permitida para el cultivo en Europa al igual que en España desde 2017.

2.3 Controversias sobre los alimentos OMG

El cultivo de plantas modificadas genéticamente por intervención humana está siendo muy debatida y muy resistida por parte de las entidades ambientalistas. Lo consideran una amenaza a la salud humana, al medio ambiente y a la agricultura familiar o sostenible. La mayoría de los estudios científicos avalan su uso y la experiencia de su empleo durante décadas. Por otro lado, sí es cierto que países en vías de desarrollo y los del Tercer mundo, y también EEUU, se están volcando masivamente al cultivo de este tipo de productor, con un fin más económico.

Para ver cuál de las controversias o reticencias tiene la gente sobre los transgénicos analizaremos algunas frases más sonadas:

- No es natural. Actualmente no existe una dieta estrictamente natural. Los antiguos agricultores también cruzaban sus líneas más buenas o escogían aquellas cosechas más buenas con mayor rendimiento para seguir adelante.

Por lo tanto, nuestros alimentos actuales provienen de cruzamientos de ancestros.

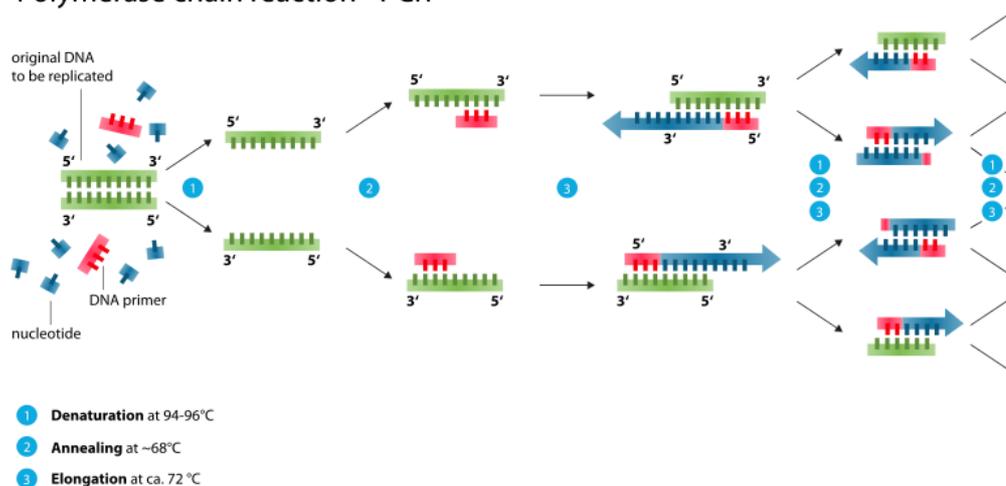
- Producirá alérgenos y toxinas en nuestros alimentos.
- No se sabe si estas especies son más invasoras. Al tratarse de un cultivo controlado con el fin de recoger no es cierto que vayan a invadir zonas que no les corresponde.
- Provocará resistencias a herbicidas. Es decir, las plantas de alrededor que son las que queremos erradicar crecerán y se harán resistentes por culpa del gen presente en estas plantas transgénicas.

2.4 El análisis por PCR

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, Taq polimerasa y los 4 dNTPs en un tampón de reacción apropiado. El volumen total de la reacción es de 25-50 μ l. En el primer paso de la reacción de PCR, las cadenas complementarias de ADN se separan (desnaturalizan) 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 45-65°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.

Polymerase chain reaction - PCR

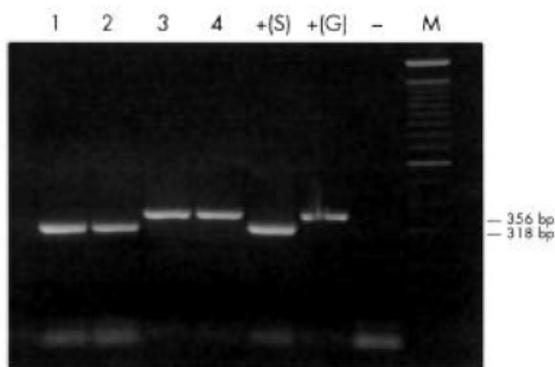


Estos tres pasos, desnaturalización-emparejamiento-extensión, constituye un ciclo de PCR. Este proceso se repite durante 20-40 ciclos amplificando la secuencia objeto exponencialmente. La PCR se lleva a cabo en un termociclador, un instrumento que es programado para un rápido calentamiento, enfriamiento 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.

PCR detección de la soja transgénica (soja RR)

Los primers que se utilizan para la reacción de PCR, por un lado, amplifican regiones endógenas de la soja, en este caso el gen de la lectina de soja (Le1) que dará lugar a un fragmento de 318 bp, y, por otro lado, amplificarán también los genes foráneos introducidos en el proceso de formación del transgénico, en este caso el gen de resistencia a glifosfato de *Agrobacterium tumefaciens* (EPSPS) que dará un fragmento de 356 bp.



Análisis en gel de agarosa de productos de PCR a partir de diferentes alimentos que contienen soja. La amplificación del gen normal y transgénico se ha realizado por separado, siendo los productos de amplificación del gen de la lectina el 1 y el 2 (fragmento de 318 bp), mientras que el 3 y 4 corresponden al gen transgénico (fragmento de 356 bp). Los alimentos estudiados son bebida de soja de chocolate (1 y 3) y pasta de miso (2 y 4). Estos dos alimentos presentan tanto soja normal como transgénica. Por otro lado, se puede observar que han realizado un control positivo del gen normal (+(S)), un control positivo transgénico (+(G)) y un control negativo (-), donde se ve que no ha habido amplificación.

3. EXPOSICIÓN DE LOS HECHOS

Vamos a ir al mercado a comprar diferentes productos alimentarios que contengan soja para ver si pertenece a una variedad normal o transgénica.

Para ello lo primero que haremos será la extracción del ADN de los diferentes alimentos seleccionados: 1. Soja verde; 2. Preparado en polvo de leche de soja. También pueden utilizarse otros productos con soja que se decidan (es importante trabajar con muestras pulverizadas, por ejemplo, utilizando un molinillo). **(Ver protocolo de extracción, anexo 1)**

Seguidamente utilizaremos la Mix de PCR para la detección de soja transgénica RR.

4. COMPONENTES

| | |
|--|------------------|
| Tampón de electroforesis concentrado 10x | 100ml |
| Agarosa | 6,0gr |
| Muestras soja para extracción | 4 muestras |
| Kit extracción ADN alimentos | Para 25 muestras |
| Mix PCR detección soja transgénica | 2 x 350 µl |
| Control positivo ADN normal | 10 µl |
| Control positivo ADN transgénico | 10 µl |
| GELSAFE tinción ADN | 25 µl |

Tampón de electroforesis 10 X para preparar Tampón de electroforesis 1 X que es el Tampón de trabajo para hacer los geles y el de la cubeta.

5. PRÁCTICA

5.1 EXTRACCIÓN DEL ADN DE ALIMENTOS QUE CONTIENEN SOJA

Se realizarán 4 grupos de trabajo.

Su suministran 4 muestras de alimentos que contiene soja y se ha de detectar la presencia de ADN de soja normal o transgénica: 1. Soja verde; 2. Preparado en polvo de leche de soja; 3. Galletas con soja; 4. Proteína de soja. También pueden utilizarse otros productos con soja que se decidan (es importante trabajar con muestras pulverizadas, por ejemplo, utilizando un molinillo). **Ver protocolo de extracción (anexo 1).**

Para la extracción de las muestras suministradas utilizar 100 mg y para las muestras que se quieran evaluar empezar con 200 mg

5.2 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 5 µl (100-250ng) del ADN de cada extracción de ADN. Importante:
 - a) Preparar un control negativo de amplificación, para ello colocar 5 µl de agua libre de nucleasas en lugar del ADN, esto sirve para saber si los reactivos o micropipetas y puntas pueden estar contaminados con ADN, no se ha de amplificar nada.

- b) Preparar un control positivo de amplificación, para ello colocar 5 µl del control positivo ADN normal y ADN transgénico.
2. Las concentraciones típicas de los "primers" y parámetros utilizados dependerá de cada sistema utilizado. Una concentración final típica de "primers" es 0,5 µM.

| Reactivos | Volumen |
|-----------------|---------|
| Mix PCR | 20 µl |
| ADN (100-250ng) | 5 µl |
| Volumen total | 25 µl |

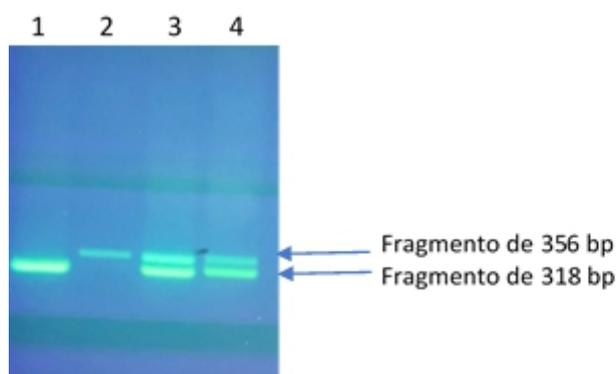
3. Mezclar bien, el colorante rosa está incluido en la polimerasa facilitando el proceso.
4. Realizar el proceso de amplificación. Importante: Para la activación de la Polimerasa "Hot Star" es necesario programar un paso de desnaturalización inicial de 3 minutos a 95°C, después programar los 35 ciclos específicos de cada producto a amplificar.

Programa PCR transgénicos

| Paso | Temperatura | Tiempo |
|--|-------------|-------------|
| Desnaturalización Hot Star | 95°C | 3 minutos |
| Ciclos PCR Realizar 35 ciclos | 95°C | 45 segundos |
| | 60°C | 45 segundos |
| | 72°C | 25 segundos |
| Extensión final | 72°C | 10 minutos |
| Final | 4°C | |

5. El producto de la PCR puede ser sembrado directamente en un gel de agarosa 3% después de la PCR, ya que el colorante rosa actúa como tampón de carga.
6. Utilizar el método de detección o tinción de ADN que se use en el laboratorio. Le recomendamos el uso del GELSAFE suministrado en el kit.

6. RESULTADOS



Gel de agarosa 3%

- 1: Control positivo ADN normal
- 2: Control positivo ADN transgénico (PCR solo con primer transgénico)
- 3: Control positivo ADN transgénico (PCR conjunta con los dos primers)
- 4: Control positivo ADN transgénico (PCR conjunta con los dos primers)

Se presenta un ejemplo de resultado de la amplificación de los controles positivo ADN normal y ADN transgénico que se suministra en el kit. Podemos observar en el caso de soja normal una única banda a 318 pb y en el caso de la soja transgénica aparecen dos bandas la común que es la de 318 pb y por otro lado la específica que es una banda que aparece a los 356pb .

7. PREGUNTAS Y RESPUESTAS SOBRE LA PRÁCTICA

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

1. **¿Cuál es la función de los 4 nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en una reacción de PCR?** Los 4 dNTPs son los componentes del ADN. Para la síntesis de ADN se requiere un ADN molde y 2 cebadores, la cadena opuesta del molde es sintetizada siguiendo la regla de emparejamiento de bases de Watson-Crick.
2. **¿Por qué hay 2 diferentes cebadores o "primers"?** Presentan una secuencia diferente que coincide con el inicio y final del gen o secuencia a amplificar (ADN molde)
3. **¿Qué productos de los que hemos comprado son normales y cuales OMG?** Todos los productos estudiados son normales
4. **Explica cómo se diferencia en un gel de agarosa una variedad normal de una variedad transgénica de soja RR.** La reacción de PCR contiene 2 juegos de "primers" diferentes, una amplificará un fragmento de un gen de la lectina de la soja que está presente en todas las muestras con soja normal, mientras que el otro juego amplificará para un fragmento de mayor peso que es el gen de EPSPS que contiene el gen de resistencia al glifosfato.
5. **¿Cuál es tu opinión sobre los alimentos modificados genéticamente o transgénicos?**

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

Anexo 1

Protocolo de extracción de ADN a partir de muestras de alimentos

Dada la gran variedad de muestras que abarcan los alimentos que contienen soja se hace difícil presentar un protocolo universal para todas las muestras.

El principal y más importante paso para obtener buenos rendimientos es una buena rotura y homogenización de la muestra que será específica para cada tipo de muestra. En todos los casos y para una mayor efectividad se debería utilizar nitrógeno líquido para pulverizar la muestra.

En muestras sólidas en polvo (leche en polvo de soja, etc) homogenizar con un homogenizador eléctrico de mano; en muestras sólidas (soja verde, etc) utilizar un molinillo de café para pulverizar una muestra grande y luego pesar la cantidad requerida en polvo.

1. Pesar 100-200mg de la muestra en un microtubo de 2,0ml y añadir 1,2ml de tampón CTAB + 25µl Proteinasa K. Vortex vigorosamente
2. Incubar a 65°C durante 30 minutos. Repetir vortex varias veces durante la incubación.
3. Centrifugar a 14.000 rpm durante 5-10 minutos. Aparecerá un pellet y en la superficie una capa de grasa, introducir la punta de pipeta atravesando esta capa superficial, intentando recoger sólo 500µl de sobrenadante que es el líquido transparente con color (evitar coger pellet y capa superficial) y colocarlo en un microtubo de 1,5ml nuevo.
4. Añadir 250µl de tampón de Unión Stool a los 500µl de sobrenadante. Mezclar bien por vortex.
5. Añadir en el reservorio de la spin microcolumna con su tubo de recogida. Centrifugar a 10.000 rpm durante 60 segundos. Eliminar el tubo de recogida.
6. Colocar la Microspin columna en un nuevo tubo de recogida y añadir al reservorio 500µl de tampón de desinhibición. Centrifugar a 12.000 rpm durante 60 segundos. Eliminar líquido.
7. Añadir 700µl de tampón de lavado en el reservorio de la Spin microcolumna. Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos. Eliminar líquido.
8. Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar el etanol residual.
9. Eliminar el tubo de recogida e insertar la spin microcolumna en un microtubo de 1,5ml. Añadir 50-200µl de tampón de elución (precalentado a 70°C) en el reservorio de la spin microcolumna. Incubar 2 minutos.
10. Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundo. El microtubo contiene ahora el ADN.