

DETECCIÓN DE HIPOLACTASIA POR PCR

Ref.PCR11

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 un polimorfismo de un solo nucleótido.

Los estudiantes adquirirán conocimientos básicos sobre la biología y la genética.

2. INTRODUCCIÓN

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 cantidad para realizar experimentos.

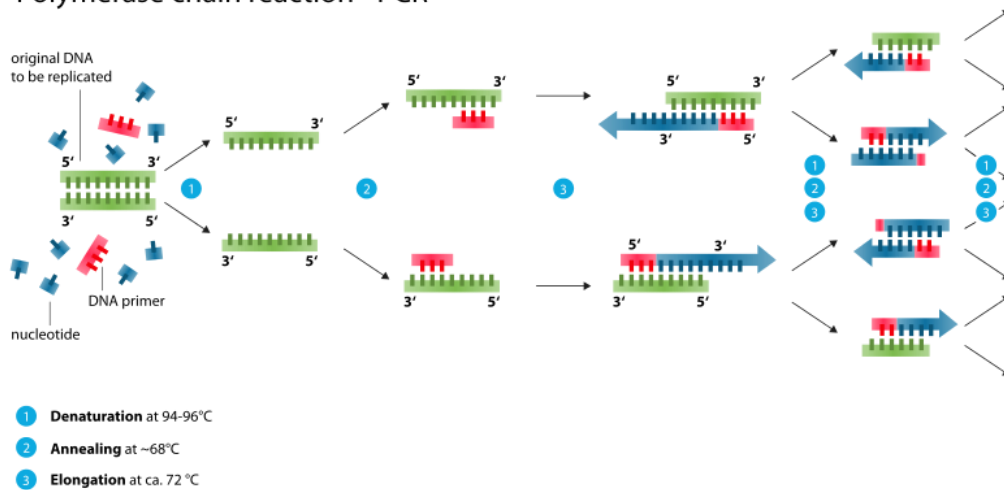
Se han desarrollado gran cantidad de test diagnósticos, también se ha utilizado en mapaje y secuenciación de ADN en proyectos de genoma y está siendo utilizado en determinaciones forenses, paternidades, etc.

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.

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.

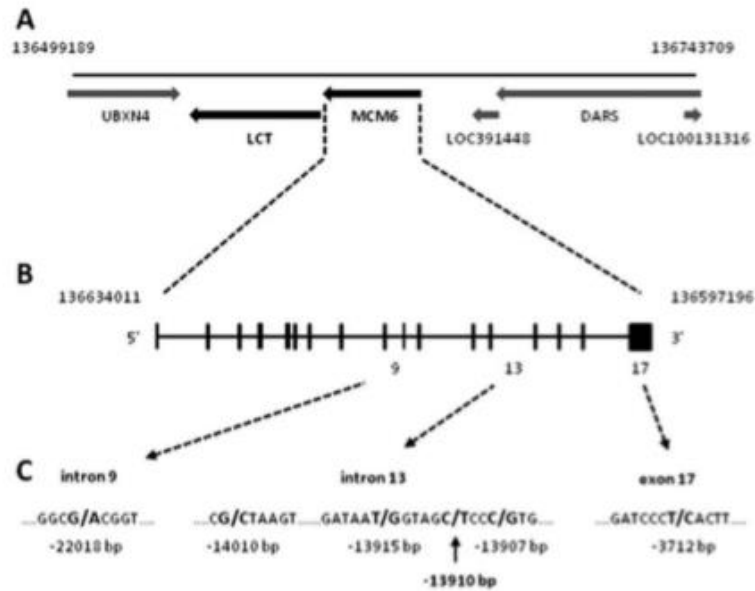
2.3 Polimorfismo de la actividad de la lactasa

El consumo de leche y otros productos derivados de la leche en personas con intolerancia a la lactosa puede causar diarreas, flatulencias, sensación de estar hinchados y dolores abdominales. Estos síntomas son muy similares a otras patologías que afectan al sistema gastrointestinal, es por esto por lo que es muy importante poder hacer un diagnóstico correcto a pacientes con este tipo de sintomatología.

En algunas poblaciones, una proporción de individuos adultos han mantenido la habilidad de hidrolizar la lactosa. Esta persistencia de la lactasa es debida a una variante de un solo nucleótido con herencia autosómica dominante. Este cambio de nucleótido se encuentra a 100 pares de bases de la región reguladora del gen de la lactasa (LCT). Esta región reguladora es localizada aproximadamente a unas 14kbp corriente arriba del gen de la lactasa, en una región intrónica que ayuda a la transcripción del gen de la lactasa. El cambio de un solo nucleótido fue descubierto en 2002, se trata de un cambio en -13910 C>T y está presente en un 80-90% de la población europea del norte. También se han descubierto otras variantes asociadas a la resistencia a la lactasa como es -13915 T>G que está presente en sudaneses, kenianos, etíopes y poblaciones del medio este. Otra es la -13907 C>G presente en sudaneses y kenianos.

La inhabilidad de digerir la lactosa en adultos se ha visto asociado con el genotipo C/C, es decir homocigoto a citosina, en este SNP. Varios métodos han sido descritos para detectar la variante del gen de persistencia a la lactosa. Nosotros realizaremos la detección de esta variante de un solo nucleótido a través de la técnica de PCR y posteriormente una digestión con el enzima de restricción *FaqI*, para poder identificar los diferentes genotipos.

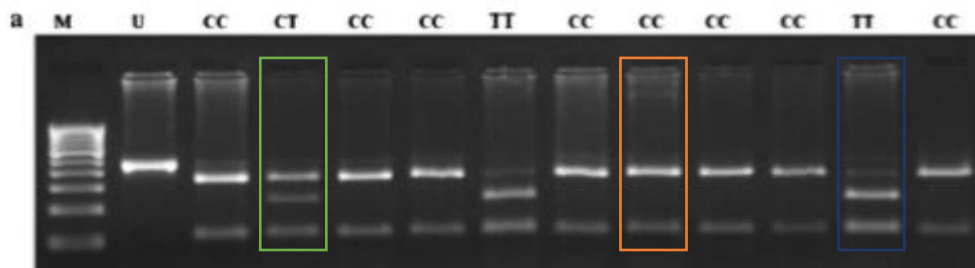
El genoma humano consiste en 2.9 billones de pares de base de ADN. De este total, sólo un 2% consiste en exones los cuales codifican para proteínas. Los intrones y otras secuencias no codificantes pueden poseer funciones que están por descubrir, aunque otras muchas parecen no tenerlas. Muchas de estas secuencias están repetidas cientos o miles de veces a través del genoma representando algo más del 20% del genoma humano.



SNPs asociados a persistencia de la lactasa. Mapa de la región del cromosoma humano 2q21 que contiene el gen humano de la lactasa y el minicromosoma 6 de los genes. La organización del intrón-exón del gen MCM6. La localización del SNP se da en pares de bases respecto al codón de iniciación del gen de la lactasa.

PCR detección del gen de la lactasa

Los primers que se utilizan para la reacción de PCR amplifican el gen de la lactasa, con la que obtenemos un fragmento de amplificación de 448bp. Posteriormente, la digestión con el enzima de restricciónFaqI resultan los diferentes fragmentos de peso molecular dependiendo del genotipo presente. En el caso de ser homocigoto C/C se obtienen dos fragmentos en la digestión, uno de 350bp y otro de 100bp, por otro lado, en el caso de ser homocigoto para T/T obtenemos también dos fragmentos, uno de 250 y otro de 100bp, finalmente si es heterocigoto C/T se obtienen tres fragmentos, 350bp, 250bp y 100/98bp



Análisis en gel de agarosa del gen de la lactasa. Análisis del gen de la lactasa en distintos sujetos para el SNP C>T. Podemos ver marcado en color verde el heterocigoto, donde se ven tres bandas de distinto peso molecular, 350bp, 250bp y 100bp. Por otro lado, en color naranja el homocigoto para C/C, en este caso aparecen solamente dos bandas una de 350bp y una de 100bp. Y finalmente en azul el homocigoto para T/T donde aparecen dos bandas una de 250bp y otra de 100bp.

3. EXPOSICIÓN DE LOS HECHOS

Se recolectará aproximadamente 1,5ml de saliva de los alumnos en el tubo correspondiente de recogida de muestra de saliva. Se recomienda no haber comido nada durante los 30 minutos previos a la toma de muestra. Para ello pasar la lengua con movimientos arriba-abajo por las paredes de las mejillas, mandíbulas y paladar para recoger las células.

4. COMPONENTES

Tampón de electroforesis concentrado 10x	100ml	
Agarosa	6,0gr	
Mix PCR detección lactasa	2 x 350 µl	Conservar a -20°C
Control positivo ADN de gen lactasa en homocigosis (C/C)	10 µl	Conservar a -20°C
Control positivo ADN de gen lactasa en heterocigosis (C/T)	10 µl	Conservar a -20°C
GELSAFE tinción ADN	25 µl	Conservar a +4°C
Kit de purificación fragmento PCR	25 muestras	
Enzima de restricción Fae I	25 µl	Conservar a -20°C
Buffer FastDigest Green	50 µl	Conservar a -20°C
SAM	37,5µl	Conservar a -20°C
Agua libre de nucleasas	425 µl	Conservar a -20°C

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 LA MUESTRA DE SALIVA

Se realizarán 4 grupos de trabajo.

Cada uno de ellos o bien por parejas recogerán la muestra de saliva propia en un tubo de recogida de saliva (se suministra). Además, se adjuntará con el kit un control positivo de ADN. **Se recomienda usar el kit de extracción de DNA saliva para la extracción del ADN de la saliva.**

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 2,5 µl (100-250ng) del ADN de cada extracción de ADN. Importante:
 - a) Preparar un control negativo de amplificación, para ello colocar 2,5 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 dos controles positivos de amplificación, para ello colocar 2,5 µl del ADN proporcionado en el kit

- 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	22,5 µl
ADN (100-250ng)	2,5 µl
Volumen total	25 µl

- Mezclar bien, el colorante rosa está incluido en la polimerasa facilitando el proceso.
- 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 lactasa

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Hot Star	95°C	3 minutos
Ciclos PCR Realizar 35 ciclos	94°C	30 segundos
	60°C	30 segundos
	72°C	30 segundos
Extensión final	72°C	5 minutos
Final	4°C	

5.2 PURIFICACIÓN DEL ADN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Una vez ha terminado la PCR vamos a proceder a la purificación del fragmento amplificado de 448 pb, 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 448 pb para que cuando realicemos la digestión con la enzima Fag I ésta no se inhiba por la presencia de otros componentes.

- Añadir 150 µl tampón de Unión** al microtubo que contiene **25 µl de la PCR**. Mezclar bien por pipeteo.
- Transferir la muestra (175 µl) a una spin columna**. Colocar la spin columna en un tubo de recogida. **MUY IMPORTANTE colocar los 175 µl en el centro de la membrana blanca**
- Centrifugar por 1 minuto a 10.000-12.000 rpm.**
- Eliminar el filtrado y añadir 700 µl de Tampón de Lavado**. Centrifugar por 1 minuto a 14.000 rpm

5. **Eliminar el etanol residual** por centrifugación durante 3 minutos a 14.000 rpm.
6. Colocar la spin column 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 rpm. Ahora el microtubo contiene el ADN a digerir con Faq I.**

5.3 DIGESTIÓN POR LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN Faq I

Para realizar la digestión por el enzima de restricción FaqI colocar los siguientes volúmenes en un microtubo de 1,5ml.

Agua libre de nucleasas	17 µl
10x FastDigest Green Buffer	2 µl
20x SAM (1.0mM)	1,5 µl
DNA	15-20 µl
FastDigestenzyme	1 µl

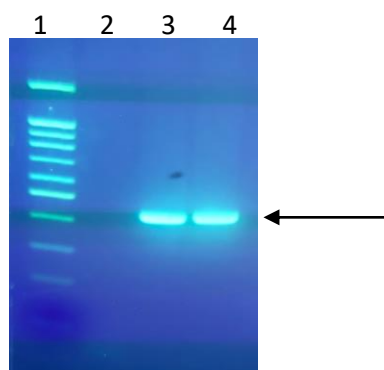
Mezclar y realizar un spin. Incubar a 37°C durante 30 minutos en un termostato de agua o bien en un bloque de calor. Al finalizar este tiempo incubar 5 minutos a 65°C para desactivar la enzima.

Al colocar el FastDigest Green Buffer no es necesario cargar tampón de muestras para correrlo en un gel de agarosa del 2%, ya que el tampón ya nos sirve para ello.

Nota: si al introducir un poco de producto de la digestión por enzimas observáis que este no se deposita en el fondo del pocillo, si no que sale para fuera. Podéis resolver el problema añadiendo 2,5 µl de tampón de carga. Esto es debido a que en la purificación anterior no se ha eliminado correctamente el etanol de la muestra y provoca que la muestra no se deposite en el fondo del pocillo.

6. RESULTADOS

Resultados amplificación del gen de la lactasa por PCR



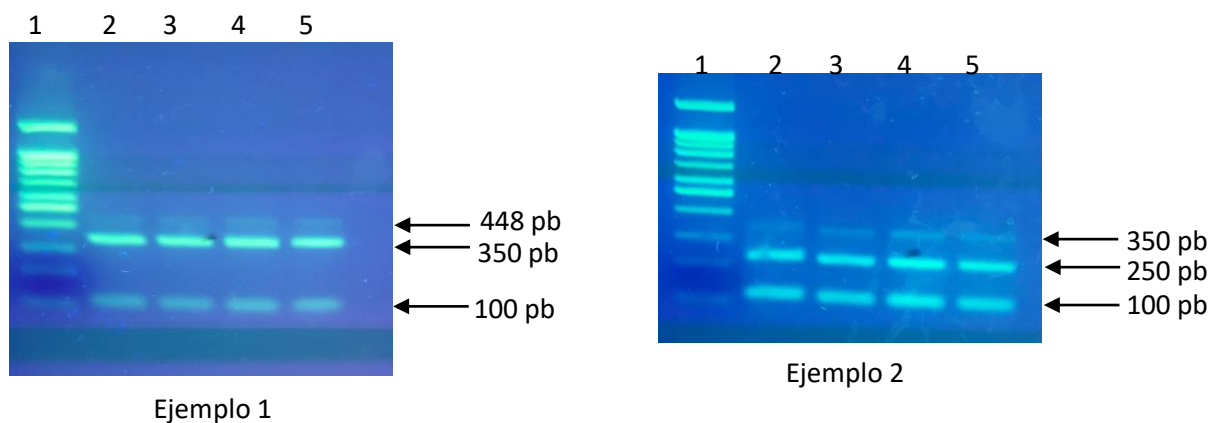
Gel de agarosa 2%

1: Marcador de peso molecular

- 2: Control negativo
- 3: Muestra 1 amplificación gen lactasa
- 4: Muestra 2 amplificación gen lactasa

Se presenta un ejemplo de resultado de la amplificación del gen de la lactasa con un control negativo, en el pocillo 2 donde no se ve ningún tipo de resultado de amplificación, y dos muestras en los pocillos 3 y 4, donde se ha realizado la amplificación del gen de la lactasa y nos aparece una banda de amplificación de 448bp. Finalmente, en el pocillo 1 podemos ver el marcador de peso molecular para poder identificar de forma correcta el peso de la banda.

Resultados de la digestión del gen de la lactasa



Gel de agarosa 2%

Para los dos geles la distribución de las muestras son las mismas, pero las muestras no son iguales para los dos geles.

- 1: Marcador de peso molecular
- 2: Muestra 1
- 3: Muestra 2
- 4: Muestra 3
- 5: Muestra 4

Se presenta dos ejemplos del resultado de la digestión de los productos de la PCR realizada con el enzima de restricción *FaqI*. En el ejemplo 1 tenemos 4 muestras y un marcador de peso molecular para poder identificar las bandas que nos aparecen. Podemos ver en los 4 casos que nos aparecen 2 bandas muy marcadas mientras que aparece una tercera banda muy tenue de mayor peso molecular. La banda de mayor peso molecular corresponde a la banda de 448 pb, se trata de producto de la PCR que no se ha digerido. Por otro lado, las dos otras bandas que aparecen en todas las muestras son la banda de 350 pb y de 100 pb, en este caso las muestras corresponden al genotipo homocigoto para nucleótido C. En el ejemplo 2 también tenemos 4 muestras y un marcador de peso molecular. Podemos ver que en los 4 casos nos aparecen tres bandas. Estas bandas corresponden a los pesos moleculares de 100pb, 250 pb y 350 pb. Es decir, que las muestras del ejemplo 2 son heterocigotos para el SNPs de la lactosa, y por tanto no presentan problemas en la digestión de este azúcar.

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. **¿Cuántas personas del grupo de alumnos que han realizado la practica presentan hipolactasia?**

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

Anexo preparación mix PCR

Mixprimers:

Forward lactasa	10µl
Reverse lactasa	10 µl
Agua libre nucleasas	180 µl
Volumen final	200 µl

Mix PCR

Agua libre nucleasas	400 µl
Primers	200 µl
Polimerasa	1250 µl
Volumen total	1850 µl

Muestra control positivo: ADN saliva de David o Francisco para homocigosis C/C y ADN Pili para heterocigosis (C/T)