

# Diagnóstico genético de variantes polimórficas asociadas a la celiaquía, mediante ensayo de PCR múltiplex sobre los marcadores DQ2 y DQ8

## (Práctica en laboratorio virtual Cibertorio)

### Fundamento:

Se habla de diversidad genética de los individuos como el resultado de que, en diversas regiones del genoma, unas personas tenemos secuencias de nucleótidos que nos diferencian de otras; esto se denomina polimorfismo genético. Cuando estas regiones polimórficas corresponden a zonas codificantes de un producto, existen consecuencias funcionales.

El diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad celíaca son complejos pero incluyen como uno de los indicios el análisis del genotipo en los genes DQA1 y DQB1 (pertenecientes a la familia de antígenos leucocitarios humanos, HLA). En este ensayo se detectan las diferencias entre los alelos más comunes de estos genes polimórficos, utilizando PCR con cebadores específicos para cada alelo. A continuación, los segmentos amplificados se analizarán mediante electroforesis. Es posible así diagnosticar en las muestras los haplotipos DQ2 y DQ8 asociados a la aparición de celiaquía.

### Bibliografía:

- *Genética y estrategias de inmunomodulación.- Nuevas estrategias terapéuticas.* E. Arranz, J. A. Garrote, 2008, en Libro Blanco de la Enfermedad Celíaca (I. Polanco Allué, coord.); ICM: Madrid; pp. 123–134. Disponible en <https://goo.gl/g6RNIg> [fecha de consulta 17 marzo 2017]
- *Estudio genético en la enfermedad celíaca.* M. D. García Novo, 2007, en Todo sobre la enfermedad celíaca (Asociación de Celíacos de Madrid, ed.); Consejería de Sanidad y Consumo de la Comunidad de Madrid: Madrid; pp. 25–28. Disponible en <https://goo.gl/BKbvFa> [fecha de consulta 17 marzo 2017]

### Cómo comenzar:

El laboratorio virtual funciona dentro de una página *web*, por lo que debes comenzar abriendo el navegador de internet en tu ordenador o tableta. Cualquier navegador moderno debería funcionar, siempre que tenga activado JavaScript (se recomienda Firefox o Chrome).

Visita la página de Cibertorio en <http://biomodel.uah.es/lab/cibertorio/>

### Ensayo:

#### **amplificación PCR múltiplex para determinar los alelos de HLA DQA1 y HLA DQB1**

### Objetivo:

Empleando cebadores específicos para algunos de los alelos más frecuentes, analizar el genotipo de varios pacientes. Se parte de muestras de DNA de los pacientes, se realiza la amplificación por PCR múltiplex y se separan los segmentos amplificados mediante electroforesis.

Empezaremos con un diseño experimental (*experimento 1*) conceptualmente más sencillo (PCR simple) y tras terminarlo plantearemos otro (*experimento 2*) que permite obtener los resultados empleando menos tubos y menos tiempo (PCR múltiplex).

#### *Experimento 1 (PCR simple):*

Pondremos la misma muestra de DNA en 6 tubos y en cada uno de ellos añadiremos una pareja de cebadores distinta (cebadores directo, F, e inverso, R). Así podemos averiguar el genotipo de un paciente (dos si usamos los 12 tubos disponibles). Para el resto de pacientes, habrá que repetir el experimento.

### Materiales virtuales:

#### Software:

- Laboratorio virtual de biología molecular “Cibertorio”, [biomodel.uah.es/lab/cibertorio/](http://biomodel.uah.es/lab/cibertorio/)

#### Reactivos virtuales:

- *Muestras para diagnóstico genético de celiaquía* (compradas en CygnusLab™), que contiene DNA genómico nuclear procedente de 6 pacientes.
- Mezcla maestra para PCR 10x (CygnusLab PCR master mix™), que contiene
  - DNA polimerasa Taq, 250 U/mL
  - nucleótidos dATP, dGTP, dTTP, cCTP, 2 mM de cada uno
  - MgCl<sub>2</sub> 15 mM
  - tampón TAPS 125 mM de pH=8.5

- Parejas de cebadores o iniciadores de PCR, específicas para los alelos más comunes: DQA1\*01, DQA1\*03, DQA1\*05, DQB1\*02, DQB1\*03 y DQB1\*05.
- Marcador de masa molecular de DNA Ladder2™ (de CygnusLab™)
- Agua libre de nucleasas
- Puntas de pipeta amarillas, capacidad de 1 a 100 µL
- Agarosa
- Tampón de electroforesis TBE 0.5x (Tris-Borato-EDTA)
- Bromuro de etidio
- Colorante de carga de muestras en el gel (contiene azul de bromofenol, xileno-cianol y glicerol)

#### Instrumentación virtual:

- Micropipeta variable hasta 100 µL
- Incubador con regulación de temperatura CygnusLab TempeMatic™
- Cubeta de electroforesis CygnusLab GelMatic™ Plus
- Fuente de corriente continua CygnusLab 1000ZX™ (de 10 a 1000 V)
- Transiluminador ultravioleta (acoplado a la cubeta)
- Pantalla y gafas de seguridad protectoras contra UV

#### Procedimiento:

Comienza pulsando en el botón “Iniciar Cibertorio”. Tras unos segundos, aparecerá un aviso requiriendo que se haga un pedido de muestras y cebadores; acéptalo.

- 1) Investiga la página del Catálogo en línea.
- 2) Pulsa el botón “Realizar un pedido”.
- 3) Selecciona las “Muestras para celiacía” y todos los cebadores que desees.
- 4) Al pie de página necesitarás proporcionar unos datos. (Esto es una simulación de una situación real, no es importante lo que escribas en nombre y apellido pero sí es importante que la contraseña corresponda al centro).
- 5) Pulsa el botón “Enviar el pedido” y luego “Confirmar el pedido”. Espera a que se actualice la pantalla y aparezca el laboratorio simulado (tubos, pipeta, etc.).

#### Uso de la micropipeta virtual

Para seleccionar el tubo sobre el que quieres actuar debes pulsar sobre él con el ratón (no sobre la tapa ni la etiqueta); se abrirá su tapa y la pipeta se desplazará a él. Haciendo clic en el pulsador superior del émbolo consigues que se desplace, expulsando o aspirando alternativamente el contenido de la punta. El volumen que se quiere pipetear se establece pulsando con el ratón sobre la rueda de ajuste (mitad izquierda disminuye, mitad derecha aumenta) o escribiendo en la casilla del indicador de volumen (no pulses la tecla Enter).

El intervalo de trabajo de la micropipeta es de 1 a 100 µL, en pasos de 1 µL.

Para evitar contaminación, se deben cambiar las puntas cada vez que se cambia de muestra. La punta se expulsa haciendo clic con el ratón sobre la palanca expulsora de puntas o sobre el cubo de basura.

Se consigue una punta nueva haciendo clic sobre la caja de puntas.



#### Posibles problemas:

Si, por algún error, necesitas empezar de nuevo con tubos limpios, pulsa sobre la imagen del recipiente a la izquierda de la caja de puntas.

Tras pulsar con el ratón sobre un tubo, pipeta, etc., deja tiempo para que ocurra lo que sea. No seas impaciente.

Al pulsar el émbolo de la pipeta, el cursor-mano no desaparece: mueve el puntero del ratón fuera de la pipeta. Si quieres ver mejor el líquido que hay dentro de un tubo, puedes hacer que la pipeta salga del tubo pulsando de nuevo en el tubo.

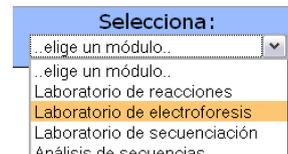
- 6) Prepara mezclas de reacción en los tubos para el ensayo de PCR. Para ello, debes poner:
  - en los tubos 1 a 6, 10 µL de muestra de DNA de uno de los pacientes (por ej., Pt1);
  - en los tubos 7 a 12, 10 µL de muestra de DNA de otro paciente (por ej., Pt2);
  - en todos los tubos, 3 µL de la mezcla de reactivos para PCR (“PCR Mix”);
  - en cada tubo, 1 µL de una de las parejas de cebadores, de este modo:

	PCR811	PCR813	PCR815	PCR822	PCR823	PCR825
en los tubos:	1 y 7	2 y 8	3 y 9	4 y 10	5 y 11	6 y 12

- completa con agua el volumen en cada tubo hasta un total de 30 µL.

Antes de empezar a pipetear es conveniente que hagas una tabla en la que planifiques los reactivos y los volúmenes que vas a poner en cada tubo.

- 7) Pon en marcha la reacción de PCR pulsando en el botón “incubar” (está en la parte central inferior, bajo el cronómetro). Transcurrido el tiempo virtual requerido, se habrán completado las reacciones. Dependiendo de la configuración del laboratorio, puede que aparezca un mensaje que te informa de lo que se ha añadido en cada tubo; verifica que coincide con lo que pretendías.
- 8) En el menú principal de Cibertorio, selecciona el módulo “Laboratorio de electroforesis”. Elige el gel de tipo agarosa 2%. Pulsa el botón “autocarga”, que hará que las muestras resultantes de la PCR anterior se transfieran a los pocillos del gel virtual. En el pocillo nº 13 se cargará automáticamente una mezcla de patrones de tamaño.



Los pocillos tras la carga se ven azules debido a los colorantes añadidos rutinariamente a las muestras (azul de bromofenol y xileno-cianol), para facilitar que se vean primero éstas y luego el frente de avance. También se ha añadido un agente denso (p.ej. glicerol, sacarosa o ficoll) que hace que la muestra se deposite al fondo del pocillo.

La “autocarga” es una característica única de los geles CygnusLab™; en la vida real las muestras se deben transferir laboriosamente a mano desde los tubos a los pocillos con una micropipeta.

- 9) Ajusta en la fuente de corriente el voltaje a 300 voltios y el tiempo a 2 horas y 10 min virtuales. Conecta la corriente para comenzar la electroforesis. Mientras progresa, puedes encender la luz UV (asegúrate de tener puestas tus gafas o careta virtuales de protección) y apagar las luces de la habitación virtual para ver cómo va avanzando el DNA y separándose las bandas.

En cualquier electroforesis, si la fuente de corriente de la que dispones no indica la intensidad (miliamperios), es importante que te asegures de que está circulando la corriente. Observa cómo de ambos electrodos se desprenden burbujas, efecto de la electrólisis del tampón. También verás que las bandas azules de ambos colorantes avanzan por el gel (al igual que lo hacen las del DNA, si enciendes la luz UV).

Si se usan voltajes superiores, las muestras avanzarán más rápido por el gel, pero los voltajes elevados producen corriente de alta intensidad y un calentamiento excesivo del gel que, aparte de afectar a la muestra (por ej., desnaturando el DNA), puede llegar a fundir la agarosa o alterar la estructura de la poliacrilamida. A diferencia de los geles reales, los geles CygnusLab™ nunca se funden, por lo que el único inconveniente de usar un voltaje muy alto puede ser que las muestras se pierdan por la parte inferior del gel antes de que puedas reaccionar.

- 10) Una vez completada la electroforesis, dibuja un esquema de cómo han quedado las bandas (puedes capturar una imagen usando la cámara digital incluida en la cubeta). Interpreta los resultados obtenidos: ¿cuál es el genotipo de cada paciente para los genes DQA1 y DQB1? ¿Cómo se puede valorar su propensión a la enfermedad celíaca?

### Experimento 2 (PCR múltiplex):

En cada tubo pondremos una muestra distinta de DNA y en todos ellos añadiremos una misma mezcla de todos los cebadores. Así podremos averiguar el genotipo de todos los pacientes usando sólo 6 tubos, pero necesitamos investigar previamente cuál es el tamaño del amplicón de cada alelo, a partir de las secuencias de los cebadores y consultando la secuencia genómica en las bases de datos.

#### Procedimiento:

Repite todo el proceso con tubos nuevos y esta disposición de mezclas:

- 10 µL de una muestra de DNA (Pt1 a Pt6);
- 3 µL de la mezcla de reactivos para PCR (“PCR Mix”);
- 1 µL de cada una de las parejas de cebadores que quieras ensayar;
- completa con agua el volumen en cada tubo hasta un total de 30 µL.