

Ensayo de enzimas de restricción para analizar el polimorfismo de globina beta S mediante RFLP

(Práctica en laboratorio virtual Cibertorio)

Fundamento:

La anemia drepanocítica (anemia de células falciformes) se origina por la mutación de un solo nucleótido en el gen de globina beta humana. Esto genera en la población un polimorfismo, definido por la presencia del alelo normal o el mutado, en cada uno de los dos cromosomas 11 homólogos.

Pretendemos estudiar el posible diagnóstico genético de esta enfermedad a través de un polimorfismo RFLP, es decir, mediante restricción y electroforesis.

Como material de partida disponemos de muestras de DNA (virtuales) correspondientes a una parte de ese gen, para las dos variantes (normal, AA o WW, y drepanocítica, SS).

Por lo tanto, vamos a estudiar un locus que corresponde a una parte del gen de globina beta y que contiene el punto polimórfico.

Más información (no necesaria para la práctica):

Concretamente, las muestras comprenden el exón 1, el intrón A, el exón 2 y parte del intrón B.

Recuerda que el polimorfismo se sitúa en el exón 1.

Aclaración de la nomenclatura:

A la hemoglobina normal del adulto, $\alpha_2\beta_2$, se la llama habitualmente **hemoglobina A**; de ahí el nombre A para el alelo normal de la globina beta aquí estudiado. También se representa como W, de *wild type* (tipo silvestre).

La hemoglobina de las células falciformes (*sickle cells*), $\alpha_2\beta^S_2$, se denomina **hemoglobina S**.

Bibliografía:

- A. Herráez (2012) *Texto Ilustrado e Interactivo de Biología Molecular e Ingeniería Genética*, 2ª ed., págs. 418-420. Elsevier España, Madrid.
- J. Luque y A. Herráez (2001) *Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética*, págs. 381-383. Ediciones Harcourt / Elsevier España, Madrid.

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:

búsqueda de una enzima de restricción adecuada para detectar el polimorfismo

Objetivo:

Encontrar una enzima de restricción que corte de forma diferente los alelos normal (W o A) y mutado (S) del gen de globina beta.

Materiales virtuales:

Software:

- Laboratorio virtual de biología molecular "Cibertorio", biomodel.uah.es/lab/cibertorio/

Reactivos virtuales:

- Enzimas de restricción (deben comprarse en CygnusLab™, como se explica más adelante)
- Muestras para diagnóstico genético de hemoglobina S (también comprado en CygnusLab™), que contiene las siguientes muestras de DNA:
 - DNA del gen de globina β de una persona homocigótica normal (representada como AA o WW).
 - DNA del gen de globina β de una persona homocigótica drepanocítica (representada como SS).
 - Cuatro muestras de DNA de pacientes cuyo genotipo se pretende averiguar (designadas Pt1, Pt2, Pt3 y Pt4); en esta práctica no las usaremos.

- Marcador de masa molecular de DNA Ladder2™ (de CygnusLab™)
- Tampón universal de restricción 10x (de CygnusLab™)
- Agua
- Puntas de pipeta amarillas, capacidad de 1 a 100 μL
- Agarosa
- Tampón de electroforesis TBE (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 horizontal en agarosa 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 enzimas; acéptalo.

- 1) Investiga la página del Catálogo en línea. Anota el tamaño en pares de bases de los componentes del patrón de tamaños (**Escala de DNA**) que emplearás más adelante para la electroforesis.
- 2) Pulsa el botón “Realizar un pedido”.
- 3) Selecciona las “Muestras para hemoglobina S” y las 4 enzimas que te han asignado.
- 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.).

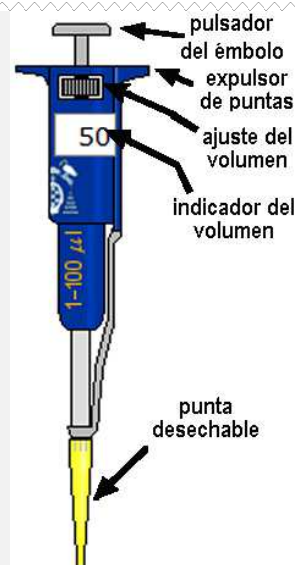
Uso de la micropipeta virtual

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.

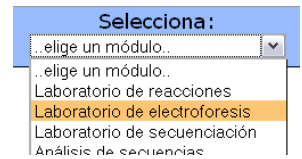
Si quieres ver mejor el líquido que hay dentro de un tubo, puedes hacer que la pipeta salga del tubo pulsando de nuevo en el tubo.

- 6) Prepara mezclas de reacción para ensayar la restricción de las dos muestras de DNA (AA y SS) con cada una de las cuatro enzimas asignadas. Para ello, debes poner en cada tubo 10 μL de uno de los tipos de DNA, 4 μL de tampón 10x, 25 μL de agua y 1 μL de una de las enzimas de restricción. Incluye también, como control, un tubo con cada muestra de DNA sin enzima.

Nota: de las 78 enzimas disponibles en el programa, 57 no cortan en esa región del DNA y, entre las 21 que sí cortan, sólo 3 ven afectada su diana por la mutación y, por ello, sirven para estudiar este polimorfismo. Esto ilustra la baja probabilidad de que se pueda detectar mediante análisis de restricción un polimorfismo causado por la mutación de un único nucleótido.

Haz una tabla en la que indiques los reactivos y los volúmenes que debes pipetear en cada tubo.

- 7) Pon en marcha la reacción de restricción pulsando en el botón “incubar” (está en la parte central inferior, bajo el cronómetro). Transcurrido el tiempo virtual requerido, se ha completado la reacción. 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”. Pulsa el botón “autocarga”, que hará que las muestras preparadas en la digestión anterior se transfieran a los pocillos del gel virtual. En el pocillo nº 13 se carga 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. Los geles de agarosa como éste se usan generalmente en horizontal.

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 200 voltios y el tiempo a 2,5 horas 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., desnaturizando el DNA), puede llegar a fundir la agarosa. 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, interpreta los resultados obtenidos: decide cuál de las enzimas es la adecuada para investigar el polimorfismo de la globina. Justifica la enzima elegida y dibuja un esquema de cómo han quedado las bandas (puedes capturar una imagen usando la cámara digital incluida en la cubeta).
- 11) Por comparación con el avance de las bandas del patrón (“escalera de DNA”), calcula el tamaño en pares de bases que tienen los fragmentos de restricción obtenidos del DNA de las muestras. (Este cálculo puede hacerse de forma precisa mediante una curva de calibrado, o bien de forma aproximada por comparación visual del avance.)
Para medir el avance de cada banda puedes usar la regla disponible en la pantalla. (Arrastra la regla usando el ratón y sitúala de modo que el cero coincida con los pocillos)

Para estimar el tamaño (nº de pares de bases) del DNA de cada banda, construye una curva de calibrado con $\log(n^\circ\text{pb})$ frente a distancia migrada, empleando los patrones que se hayan separado bien y que avancen en la misma zona a la que han llegado tus muestras (por ej., los 6 patrones más pequeños).

Representa la curva de calibrado y utilízala para calcular los tamaños.

Preguntas para evaluar los resultados:

Estas preguntas pueden también contestarse en línea con autoevaluación, en la sede web Biomodel, <http://biomodel.uah.es/lab/#cibertorio>)

1. Las muestras de los tubos a los que no has añadido ninguna enzima de restricción han mostrado en el análisis electroforético:

- una única banda de unos 90 pb
- una única banda de unos 250 pb
- una única banda de unos 770 pb
- varias bandas

	1ª enzima	2ª enzima	3ª enzima	4ª enzima
nombre de cada enzima en tu caso:				

2. ¿Cuáles de las enzimas ensayadas no han cortado el DNA de ninguna de las dos muestras?

3. ¿Cuáles de ellas han cortado sólo el DNA de una de las dos muestras?

4. ¿Cuáles de ellas han cortado ambas muestras de DNA del mismo modo?

5. ¿Cuáles de ellas han cortado de distinta forma el DNA de ambas muestras?

6. ¿Qué enzimas son adecuadas para analizar este polimorfismo mediante RFLP?

7. Las bandas que diferencian ambos tipos de DNA tienen un tamaño aproximado, en pb, de:

- 770 430 380 330 255 230 200 180 130 90 45