

Diagnóstico genético molecular del 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:

diagnóstico genético de drepanocitosis mediante RFLP

Objetivo:

Empleando una enzima de restricción elegida previamente, que corta de forma diferente los alelos normal y mutado del gen de globina beta, realizar el diagnóstico genético de cuatro pacientes.

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).

- 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:

Debes haber realizado previamente la práctica “ensayo de enzimas de restricción”. Ahora, utilizando únicamente la enzima adecuada para detectar este polimorfismo (seleccionada en la práctica anterior), realizarás el análisis de cuatro muestras de pacientes a los que hay que diagnosticar si son portadores del alelo causante de la drepanocitosis.

- 1) Si no lo has hecho ya, sigue las instrucciones de la práctica de ensayo de enzimas para comprar muestras y enzimas en el impreso de pedido en línea de CygnusLab, así como para usar el laboratorio virtual.
- 2) Prepara una tabla con los reactivos y cantidad de cada uno que necesitarás para cada tubo, completando ésta:

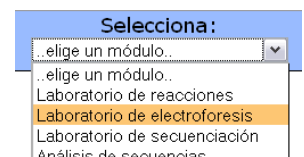
tubo nº	1	2	3	4	5	6
vol. de agua						
vol. de tampón						
tipo de muestra	SS	AA	Pt1	Pt2	Pt3	Pt4
vol. de muestra	22 µL	22 µL	22 µL	22 µL	22 µL	22 µL
volumen total	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL

Prepara los 6 tubos de ensayo con el contenido indicado en la tabla.

A continuación, transfiere la mitad del contenido de cada tubo (40 µL) al tubo situado debajo de él (es decir, del tubo 1 al 7, del 2 al 8, etc.). Así has creado duplicados de cada tubo, uno quedará como control y al otro añadiremos enzima de restricción.

A los tubos 7 a 12 añade ahora 1 µL de la enzima de restricción que seleccionaste en la práctica “ensayo de enzimas de restricción”.

- 3) Pon en marcha la reacción de restricción pulsando en el botón “incubar”. Transcurrido el tiempo virtual requerido, se habrá 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.
- 4) En el menú principal de Cibertorio, selecciona el módulo “Laboratorio de electroforesis”. En la cubeta, pulsa el botón “autocarga”, que hará que las 12 muestras preparadas en la digestión anterior se transfieran a los 12 primeros pocillos del gel virtual; en el pocillo nº 13 se carga automáticamente una mezcla de patrones de tamaño (“escalera de DNA” Ladder2™).
- 5) Ajusta en la fuente 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.
- 6) Una vez completada la electroforesis, dibuja un esquema de la posición de las bandas (puedes capturar una imagen usando la cámara digital incluida en la cubeta) e interpreta los resultados obtenidos:
 - ¿Cuál es el genotipo de los cuatro pacientes?
 - ¿Serán portadores o desarrollarán la enfermedad?



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>)

Para hacer esta evaluación necesitas haber anotado la clave que te asigna el sistema al hacer un pedido (una clave de 2 dígitos o letras que se muestra en la pantalla "Gracias por formalizar su pedido", bajo el botón "confirmar el pedido y recibir los reactivos")

Escribe aquí la clave asignada a tu experimento: _____

1. ¿Cuántos genotipos diferentes has encontrado en el conjunto de 6 muestras (2 patrones y 4 pacientes)?

	Pt1	Pt2	Pt3	Pt4
2. Deduce el genotipo de los pacientes:				
3. Pacientes que probablemente desarrollen anemia drepanocítica:				
4. Pacientes que no desarrollarán la enfermedad pero la pueden transmitir a su descendencia::				