

Análisis de adulteración en aceites vegetales mediante amplificación PCR y polimorfismo de restricción (RFLP) sobre marcadores de DNA del cloroplasto

(Práctica en laboratorio virtual Cibertorio)

Fundamento:

El diferente valor de mercado de los aceites vegetales de diverso origen hace necesario disponer de técnicas analíticas para valorar su composición. Más concretamente, la posible adulteración del aceite de oliva por mezcla con otros aceites de semillas más baratos.

En este ensayo se estudiará una región de DNA del cloroplasto, que presenta diferencias en su secuencia que permiten su diferenciación mediante corte con enzimas de restricción y, en consecuencia, detectar la especie vegetal de origen del aceite.

Como material de partida disponemos de muestras de DNA (virtuales) obtenidas mediante amplificación por PCR del DNA extraído de las muestras de aceite. Los cebadores permiten amplificar la región del intrón *trnL* (UAA), estando dirigidos a secuencias presentes en la mayoría de especies vegetales. El producto amplificado se someterá en este laboratorio virtual a digestión con diversas enzimas de restricción; conociendo de antemano o descubriendo cuáles cortan de forma diferencial el DNA de cada especie se podrá deducir el origen de cada aceite o la presencia de mezclas.

Cebadores para la PCR: CGAAATCGGTAGACGCTACG y GGGGATAGAGGGACTTGAAC. En condiciones de hibridación que toleren una falta de coincidencia en uno o dos nucleótidos permiten amplificar un fragmento de DNA plastídico de *Olea europaea* (olivo), *Glycine max* (soja), *Helianthus annuus* (girasol), *Brassica napus* (colza), *Zea mays* (maíz), *Arachis hypogaea* (cacahuete) y *Elaeis guineensis* (palma).

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.

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

Primera parte del ensayo:

búsqueda de una enzima de restricción adecuada para diferenciar las especies

Objetivo:

Encontrar varias enzimas de restricción que corten de forma diferente en cada especie vegetal el fragmento amplificado de DNA del cloroplasto, correspondiente a la región del intrón *trnL*.

Materiales virtuales:

Software:

- Cartógrafo CygnusLab™, parte del laboratorio virtual de biología molecular "Cibertorio", biomodel.uah.es/lab/cibertorio/analysis/re-map.htm

Reactivos virtuales:

- Enzimas de restricción disponibles en el cartógrafo.

Datos:

- Las secuencias de DNA que resultan amplificadas por la pareja de cebadores de PCR CGAAATCGGTAGACGCTACG y GGGGATAGAGGGACTTGAAC se indican en la tabla 1.

Procedimiento:

Traza el mapa de restricción de todas las especies vegetales que pretendas estudiar, buscando enzimas que corten de manera singular cada una de las especies y permitan así diferenciarlas. Anota los tamaños de los fragmentos producidos por las enzimas seleccionadas.

Enzimas sugeridas: Afl II, Aha III, Dde I, Dpn I, Mse I, Taq I, Tsp EI, Vsp I
(nada impide ensayar otras)

Segunda parte del ensayo: análisis de muestras problema para discernir la especie vegetal de origen del aceite o la presencia de mezclas

Objetivo:

Averiguar, empleando las enzimas de restricción previamente seleccionadas, el patrón de fragmentación del DNA para deducir la especie vegetal a la que pertenece el DNA de cada muestra.

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 análisis de aceites de uso alimentario* (también comprado en CygnusLab™), que contiene DNA preparado por amplificación PCR del DNA de varias muestras problema de aceite.
- 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 (**Escalera de DNA**) que emplearás más adelante para la electroforesis.
- 2) Pulsa el botón "Realizar un pedido".
- 3) Selecciona las "Muestras para análisis de aceites de uso alimentario" y las enzimas que desees ensayar (según las conclusiones obtenidas en la primera parte del ensayo).
- 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.).

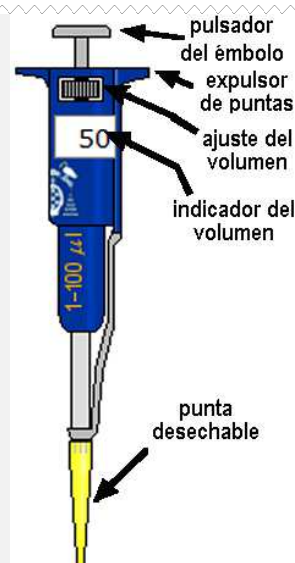
Uso de la micropipeta virtual

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.



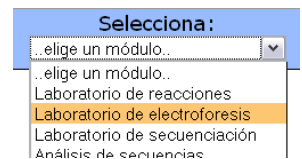
Posibles problemas:

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 muestras de DNA con alguna de las enzimas elegidas. 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. Puedes añadir varias enzimas en un mismo tubo, ajustando el volumen de agua.
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”. Elige el gel de agarosa y 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 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., desnaturalizando 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 la composición de cada una de las muestras problema de aceite.
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 $\log(\text{n}^\circ\text{pb})$ 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.

Tabla 1: amplicones para cada especie

<i>Olea europaea</i> (olivo)	CGAAATTGGTAGACGCTACGGACTTAATTGGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTACTAAGTGGAACTTTCAAATTCAG AGAAACCCCGGAATTAATAAAAAATGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTTCCAAAAACAAGGTTTCAGAAAGAAAAA GGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAGTGGACTGCGTTGGTAGAGGAATCTTCCATCGAAA CTTCAGAAAGGATGAAGGATAAACGTATATATTGAATACTATATCAAATGATTAATGACGACTCGAATCTCTATCTGTA TTTTTTTATATGAAAAATGGAAGAATTGATTCCACATTGAAGAAAGAATCGAATATTCATTGATCAATCATTCACTCC ATAGTCTGATAGATCTTTTAAAGAATGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCCATTCTACATGTCAATACCGG CAACAATGAAATTTATAGTAAAAGGAAAAATCCGTCGACTTTTAAAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCC
<i>Glycine max</i> (soja)	GGGGATAGAGGGACTTGAACCTCACGATTTCTTAAGTCGACGGATTTTCTCTTACTATAAATTTTCATTGTTGTCGGT ATTGACATGTAGAATAGGACTCTATCTTTATTCTCGTCTGATGGATCAGTTCTTCAAGGGATCTATCAGATTATGATGG AGTGAATAATTTGATCAATGAATATTTCCATCTTTTCTCAACTTGGAAATGATTTGATTACATCTTTTCATTGTTGAAT ATTTTTATCACAAATGGATCTTCATTAATCAATTGAAATACTATTTTCAGTATATATATGTTTATCTTTGATCCATTCCT GGAAATTTGACGGAAGGATCTATATTTTCTTAATGCAAAAAGGAAAAATCGTCAACTCTTTTGTGTAACAGCTTC CATTGAGTCTCTGCACCTATCCCTTTTTTATTACTTTATGAACCTTTCTTTGTTTTCGAAAAACAGGATTTGGCTC AGGATTGCCCTTGTGAATTCAGGGTTTCTCTGAATTTGAAAGTTCTCACTTGGTAAGTTTCCATACCAAGACTCAAT CCAATTA
<i>Helianthus annuus</i> (girasol)	CGAAATTGGTAGACGCTACGGACTTAATTGGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTACTAAGTGATAACTTTCAAATTCAG AGAAACCTGGAATTAATAAAAAATGGCAATCCTGAGCCAAATCACGTTTTCCGAAAAACAACAAAGGTTTCAGAAAGCG AAAATAAAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCGATGGAAGCTGTTCTAACGAATGGAGTTGATTGCTTACATTGGTAGAGG AATCCTTCTATCGAAACTTCAGAAAAGAGGAAGGATAAACCTGTATACATAGAAGAATTGGTATGAATCGATTCCATAT TGAAGAAAGAATCAAATATTCATTGATCAAAGCATTACGCATAATCTGATAGATCTTTTGAATAACTGATGAAATCGG ACGAGAATAAAGATAGAGTCCCGTTCTACATGTCAATACCGGCAACAATGAAATTTATAGTAAGAGGAAAAATCCGTCGA TTTCAAATCATGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCC
<i>Brassica napus</i> (colza)	CGGAATTGGTAGACGCTACGGACTTAATTGGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTACTAAGTGATAACTTTCAAATTCAG AGAAACCTGGAATTAACAATGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGGGTTACGCGAACAAACCAGAGTTTAGAAAGCGGGA TAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAGTCAATCCCTTGTGTTGAATCAAACGATTCACTTCATA GTCTGATAGATCCTTGGTGAACCTATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCCATTCTACATGTCAATACTGACAA CAATGAAATTTATAGTAAGATGAAATCCGTTGACTTTTAAAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCC
<i>Zea mays</i> (maíz)	CGAAATCGGTAGACGCTACGGACTTGATTGTATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGAACTTTCAAATTCAG AGAAACCTGGAATGAAAAATGGCAATCCTGAGCCAAATCCCTTTTTGAAAAACAAGTGGTTCTCAAACAGAACCC AAAGGAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACGAATCGAAGTAATAACGATTAATCACAGAACCC TATTATAATATAGGTTCTTTATTTTATTTTGAATGAAATAGGAATGATTATGAAATAGAAAATTCATAATTTTTTT TTAGAATTATTGTGAATCTATTCCAATCAAATATTGAGTAATCAAATCCTTCAATTCATTGTTTTCGAGATCTTTAAT TTTTAAAAGTGGATTAATCGGACGAGGATAAAGAGAGAGTCCCATTCTACATGTCAATACTGACAACAATGAAATTTCT AGTAAAAGGAAAAATCCGTCGACTTTATAAGTCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCC
<i>Arachis hypogaea</i> (cacahuete)	GGGGATAGAGGGACTTGAACCTCACGATTTCTTAAGTCGACGGATTTTCTCTTCTATAAATTTTCATTGTTGTCGAG ATTGACATGTAGAATGGGACTCTATCTTTATTCTCGTCCGATTAATCAGTTCTTTCAGAGGATCTATCAGACTAGGATGG AGTGAATAAATGATCAGTTAATATGAATATTCATTTTCTTAACTTGGAAATGATTTGATTACATCTTTCAATTT GTGATAGACATCTTTCCATTTGTGATATAAGGATTCAAAAATAGGGATTTTCGAGTAGTGTATTCAATTAATCAATGAAA TAGTATTTTCAGTACAAATACGTAACAAGTCTATATACATATTTCTGTATAGCCTTTCGAGAATTTCAATTTGTACAGAA GGATTCTTTTCTCACGCGAAAGGAAAGGTCGTCAACTCCATTTGTTAGAACAGCTTCCATTGAGTCTCTGCACCTATC CCTTTTTTATTCTCGCTTTCTTAATGTTTATTTCTTTCCGAAAACGGGATTTGGCTCAGGATTACCCATTGTTAATTC CAGGGTTTCTCTGAATTTGAAAGTTATCACTTGGTAAGTTTCCATACCAAGGCTCAATCCAATTAAGTCCGTAGCGTCT ACCAATTTG
<i>Elaeis guineensis</i> (palma)	CGAAATTGGTAGACGCTACGGACTTGATGGATTGAGCCTTAGTATGGAAACCTACTAAGTGGAACTTTCAAATTCAG AGAAACCTGGAATTAATAAAAAATGGCAATCCTGAGCCAAATCTTTATTTGAGAAAAACAAGGGTTTATAAACTAGAATA AAAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACGAATGGAGTGGACTACGTTGTTGGTAGCTGGAAT CCTCTATCGAAATTACAGAAAGGACGGCCCTATATAATATATCTAATACGTACGTATACATACTAACATATCAAACGAT TAATCACGACCCGAATCTATCGAATATATATATATGAAAGAAAAAATTCAGAGTTATTGTTGAATCCATTCCAATCGA AGTTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGTCAAATCATTTCCTCCGAGTTTGTAGATCTTTTGAAAAACGATTAAT CGGACGAGAATAAAGAGAGAGTCCCGTTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGAGGAAAAATCCG TGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCC