

Detección de una mutación en el protooncogén *RET* causante de neoplasia endocrina múltiple de tipo 2A (MEN2A) empleando PCR y enzima de restricción

(Práctica en laboratorio virtual Cibertorio)

Fundamento:

Los estudios de genética molecular han puesto de manifiesto que la neoplasia MEN2A aparece como consecuencia de mutaciones del protooncogén *RET*. Se puede realizar un diagnóstico presintomático detectando directamente la presencia de tales mutaciones en una muestra de DNA genómico. La mutación más frecuente (T>C, 80% de los casos de MEN2A) tiene como consecuencia la aparición de una secuencia diana para la enzima de restricción *Hin* 6I, secuencia ausente en el gen normal. En consecuencia, tras amplificar mediante PCR la región que rodea al punto donde se ubica la mutación se puede diferenciar la presencia de la mutación analizando los fragmentos generados con *Hin* 6I.



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/>

Primera parte del ensayo:

amplificación mediante PCR del exón 11 del protooncogén RET

Objetivo:

Analizar el material genético obtenido de muestras de varios pacientes, empleando una pareja de cebadores específica para una región del exón 11 que incluye el punto polimórfico donde se ubica la mutación T>C responsable de MEN2A. Se parte del DNA genómico de los pacientes y se realiza la amplificación de la región de interés mediante PCR. Las muestras resultantes se conservan para usarlas en la 2ª parte del ensayo.

Como control para verificar la especificidad de los resultados, se prepararán mezclas de reacción adicionales, una sin DNA y otra sin cebadores.

Materiales virtuales:

Software:

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

Reactivos virtuales:

- Muestras para diagnóstico genético de MEN2A (compradas en CygnusLab™), que contiene DNA genómico procedente de 3 pacientes (Pt1, Pt2, Pt3).
- Mezcla maestra para PCR 10x (CygnusLab PCR master mix™), que contiene
 - DNA polimerasa *CygnusTaq*™, 250 U/mL
 - nucleótidos dATP, dGTP, dTTP, cCTP, 2 mM de cada uno
 - MgCl₂ 15 mM
 - tampón TAPS 125 mM de pH=8.5
- Pareja de cebadores o iniciadores de PCR, específica para una región del exón 11 del protooncogén RET.
- Agua libre de nucleasas

Instrumentación virtual:

- Micropipeta variable hasta 100 µL
- Puntas de pipeta amarillas, capacidad de 1 a 100 µL, tratadas en autoclave
- Termociclador CygnusLab PCtRonic™

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 protooncogén RET, 1ª parte del experimento” y los cebadores PCR401.
- 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.).

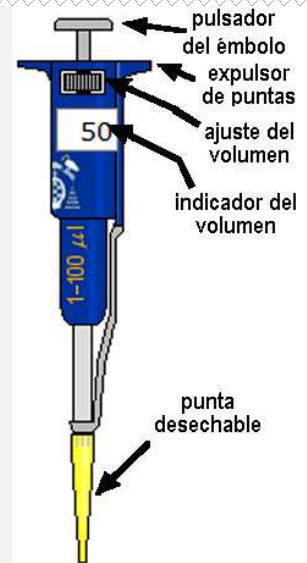
Uso de la micropipeta virtual

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 pulsando 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, diferentes en cada uno de los tubos, para el ensayo de PCR. Para ello, debes mezclar en sendos tubos los volúmenes indicados en esta tabla:

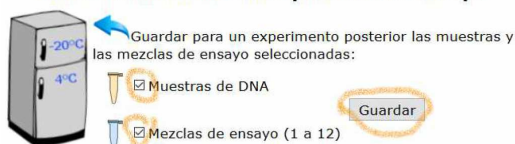
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
Muestra de DNA	25 μL de Pt1	25 μL de Pt2	25 μL de Pt3	–	25 μL de Pt3
Agua estéril				25 μL	2 μL
Mezcla de cebadores “PCR401”	2 μL	2 μL	2 μL	2 μL	–
PCR mix 10 \times	3 μL	3 μL	3 μL	3 μL	3 μL

El tubo 4 servirá como control sin DNA.

El tubo 5 servirá como control sin cebadores.

- 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) Para conservar las muestras de DNA y las mezclas resultantes de la reacción de PCR para la 2ª parte del experimento, pulsa sobre la nevera, marca ambas casillas y pulsa en “Guardar”.

Conservación de muestras y mezclas de ensayo



Nota:

para que se conserven las muestras entre ambas etapas del experimento, no debes cerrar la pestaña o ventana del navegador.

Segunda parte del ensayo: digestión de los productos de PCR con la enzima de restricción para detectar la mutación

Objetivo:

Una vez la PCR nos ha proporcionado suficiente cantidad de DNA para su observación en un gel de electroforesis, se puede detectar la presencia o ausencia de la mutación observando los diferentes fragmentos de DNA generados por la enzima de restricción.

Como control para verificar la especificidad de los resultados, se preparará una mezcla de reacción adicional omitiendo la enzima, además de someter también a la acción de la enzima los controles de la primera parte del experimento.

Materiales virtuales:

Software:

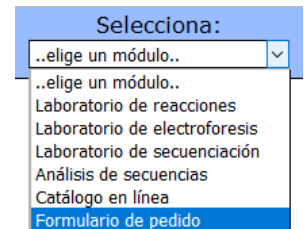
- Laboratorio virtual de biología molecular "Cibertorio", biomodel.uah.es/lab/cibertorio/

Reactivos virtuales:

- Enzima de restricción *Hin* 6I (debe comprarse en CygnusLab™, como se explica más adelante)
- Muestras preparadas en la 1ª parte del experimento a partir del DNA genómico de los 3 pacientes y conservadas en la nevera.
- Marcador de masa molecular de DNA Ladder2™ (de CygnusLab™)
- Tampón universal de restricción 10x (de CygnusLab™)
- Agua libre de nucleasas
- 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:

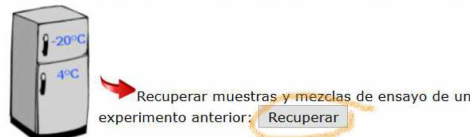
- Micropipeta variable hasta 100 µL
- Puntas de pipeta amarillas, capacidad de 1 a 100 µL, tratadas en autoclave
- Incubador con regulación de temperatura CygnusLab TempeMatic™
- Cubeta de electroforesis horizontal en agarosa CygnusLab GelMatic™Plus
- Fuente de corriente continua CygnusLab 1000ZX™ (de 10 a 1000 V)
- Transiluminador ultravioleta (acoplado a la cubeta)
- Pantalla y gafas de seguridad protectoras contra UV



Procedimiento:

- 1) Utiliza el menú principal de Cibertorio (arriba a la derecha) para regresar al "Formulario de pedidos".
- 2) Selecciona las "Muestras para protooncogén RET, 2ª parte del experimento" y la enzima *Hin* 6I. (En realidad no usaremos esas muestras, sino las que hemos preparado mediante PCR en la 1ª parte del experimento)
- 3) Introduce datos y contraseña y 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.).
- 4) Para trabajar con las muestras que se prepararon en la 1ª parte, pulsa sobre la nevera y luego en "Recuperar".

Conservación de muestras y mezclas de ensayo



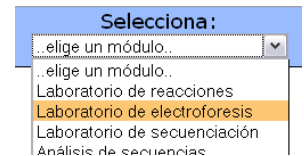
- 5) Prepara mezclas de reacción usando el contenido de los tubos 1 a 5, para realizar la digestión con la enzima *Hin* 6I, por ejemplo de este modo:

	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10	Tubo 11	Tubo 12
Producto de la PCR	10 µL del tubo 1	10 µL del tubo 2	10 µL del tubo 3	10 µL del tubo 4	10 µL del tubo 5	10 µL del tubo 2
Tampón 10x	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL
Agua estéril	16 µL	16 µL	16 µL	16 µL	16 µL	17 µL
<i>Hin</i> 6I	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	–

El tubo 12 servirá como control sin enzima.

- 6) 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.

- 7) En el menú principal de Cibertorio, selecciona el módulo “Laboratorio de electroforesis”. Se recomienda elegir el gel de tipo poli(acrilamida) 5%. pero puede repetirse el ensayo con un gel de 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.

- 8) Ajusta en la fuente de corriente el voltaje y el tiempo virtual (200 V durante una hora si se elige un gel de poli(acrilamida) 5%. o bien 300 V durante hora y media para un gel de agarosa 2%). 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 o alterar la estructura de la poli(acrilamida). 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.

- 9) 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:
- Explica la diferencia observada entre los tubos 1 y 7 (preparados con DNA del mismo paciente). Igualmente para las parejas 2 y 8, 3 y 9.
 - Interpreta a qué corresponde cada banda de DNA observada en el gel bajo luz ultravioleta.
 - ¿Cuál de los pacientes presenta la mutación?
 - ¿Son homocigóticos o heterocigóticos para la mutación?
 - ¿Qué información han aportado los controles (tubos 4, 5, 10, 11 y 12)?
 - ¿Por qué es importante que el agua y todos los materiales utilizados estén esterilizados?