

Guión de la práctica

Secuenciación de DNA para analizar el polimorfismo de globina beta S

(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 salvaje o silvestre).

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

A lo largo de la práctica tendrás que conservar información para pasarla de una ventana a otra del programa; utiliza para ello el “Bloc de Notas” de Windows. Conviene que añadas tus propios comentarios para identificar la información que vas guardando; puedes imprimirlo al acabar, para llevarte toda la información e incluirla en tu cuaderno de prácticas.

Ayuda para copiar y pegar texto: utiliza el menú que aparece al pulsar el botón derecho del ratón o, con el teclado, pulsa Ctrl+C para copiar y Ctrl+V para pegar.

Bibliografía:

- J. Luque y A. Herráez (2001) *Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética*, págs. 235-237. 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 (Internet Explorer o Firefox).

Una vez que se abra el programa, debes buscar la página de Cibertorio:

Puede estar en los “Favoritos” o “Marcadores”; si no, visita <http://biomodel.uah.es/lab/cibertorio/>

Ensayo: **análisis del polimorfismo falciforme mediante secuenciación**

Objetivo:

Verificar la diferencia entre las dos variantes del gen de globina, una normal y otra responsable de la drepanocitosis, a la vez que se ilustra cuál es el resultado de la técnica enzimática de secuenciación del DNA (método didesoxi, de terminación de cadena o de Sanger).

El laboratorio virtual Cibertorio realiza el análisis electroforético de las mezclas de reacción de Sanger en las que se emplea un nucleótido marcado con fósforo radiactivo o con un fluorocromo, o bien los 4 didesoxirribonucleótidos marcados con 4 fluorocromos distintos.

Materiales virtuales:

- *Juego de muestras de diagnóstico genético* (comprado en BobCo™), 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).
- dATP, dGTP, dCTP, dTTP
- ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP
- [³²P]dATP, o bien ddATP*, ddGTP**, ddCTP**, ddTTP****
- DNA polimerasa
- Tampón de reacción
- Cebador: oligonucleótido **HbSeq.5** (búscalo en el catálogo de BobCo™)
- DNA molde: AA, SS, Pt1, Pt3, Pt2, Pt4 (del *Grupo de muestras de diagnóstico genético* pedido a BobCo™)
- Película de autorradiografía, cartucho y reactivos de revelado, o bien detector láser de fluorescencia.
- Sistema de electroforesis para secuenciación
- Acrilamida, bisacrilamida, TEMED, persulfato amónico, urea (para preparar el gel de poliacrilamida)
- Tampón 0.5X TBE (Tris-Borato-EDTA)
- Fuente de corriente continua BobCo 5000XS™ (hasta 5000V)

Procedimiento

Para conseguir las muestras de DNA y colocarlas en los tubos de ensayo, lee el procedimiento (puntos 1 a 4) de la práctica “ensayo de enzimas de restricción”.

Puesto que el gel tiene 12 pocillos y necesitamos 4 calles para cada muestra (una por didesoxinucleótido terminador), podemos analizar 3 muestras de una vez (excepto en el caso de 4 fluorocromos, donde las 4 alícuotas de una muestra se mezclan en una misma calle del gel, y podemos así analizar 12 muestras). El sistema electroforético usará siempre las muestras que tengamos en los tubos de ensayo del apartado de digestión con enzimas de restricción.

- 1) Ve al módulo “**Laboratorio de reacciones**”, pulsa el botón “vaciar tubos” y pipetea en los tubos 1 a 6 una cantidad cualquiera de muestras SS, AA, Pt1, Pt2, Pt3 y Pt4 (en ese orden)
- 2) Abre la sección “**Laboratorio de secuenciación**” en el menú de Cibertorio; verás un gel y una fuente de corriente para hacer la electroforesis. En el recuadro donde dice “**Cebador**” elige HbSeq.5. En las casillas “**Muestras de DNA**” debes indicar los tubos que quieras secuenciar (moldes para la reacción de la polimerasa con la que se hace la secuenciación); conviene que elijas las dos muestras conocidas (AA y SS) y uno de los pacientes (Pt₁).
- 3) Las reacciones de secuenciación se efectúan automáticamente sobre las 3 muestras elegidas, dividiendo cada una en 4 alícuotas para realizar la reacción con A, C, G y T como terminadores.
- 4) Pulsa el botón “**autocarga**” para aplicar en los 12 pocillos las muestras (muestra 1 en pocillos 1 a 4, muestra 2 en 5-8, muestra 3 en 9-12; orden para todas ellas: A,C,G,T).

¡Precaución! Estás usando ³²P en las mezclas de reacción, un isótopo radiactivo emisor de partículas beta. Asegúrate de emplear guantes, trabajar tras una pantalla de protección (de plexiglás), no comas ni bebas en el laboratorio, elimina los residuos en los contenedores adecuados y comprueba frecuentemente la contaminación con un detector Geiger.

- 5) Ajusta en la fuente el voltaje a 1000 V y el tiempo a 1 h virtual. Pulsa el botón “**(des)conectar**”. Mientras progresa la electroforesis puedes observar el avance de las bandas pulsando el botón “**detector**”.
- 6) Terminada la electroforesis, observa las bandas en la autorradiografía (“**detector**”) y deduce la secuencia de cada uno de los DNA muestra
 Recuerda de las clases de teoría: leyendo las bandas desde abajo se obtiene la secuencia complementaria y antiparalela a la de la muestra (pág. 237 del libro).

- 7) Repite todo el proceso con las 3 muestras restantes.
- 8) Anota las secuencias de DNA de cada muestra. Si has hecho anteriormente la práctica de análisis por RFLP, compara los resultados obtenidos en ambas.