
Biotechnology Explorer™
Kit de huella genética (ADN fingerprint)
Manual de instrucciones

Número de catálogo
166-0007-EDU

www.explorer.bio-rad.com

Los reactivos liofilizados se pueden almacenar a temperatura ambiente.
Los marcadores de ADN deben guardarse a 4°C (o a temperaturas inferiores) durante
almacenamientos superiores a 4 semanas.

La duplicación de cualquier parte de este documento está autorizada sólo para su uso en clase.



Índice

Manual del profesor

Información básica para el profesor

Planificación de la práctica

Guía del profesor para la preparación de la práctica

Guía rápida para el uso del *kit ADN Fingerprinting*

Manual del alumno

Unidad 1 **Introducción al ADN *Fingerprinting***

Unidad 2 **Digestión de las muestras de ADN con enzimas de restricción**

Unidad 3 **Electroforesis y tinción de las muestras de ADN**

Unidad 4 **Secado de los geles y análisis de las patrones de ADN**

ADN *Fingerprinting*

Manual del profesor

Información básica para el profesor.....	3
Planificación de la práctica	7
Guía del profesor para la preparación de la práctica.....	9
Guía rápida para el uso del <i>kit</i> ADN <i>Fingerprinting</i>	15

Información básica para el profesor

Introducción

A los técnicos que trabajan en laboratorios forenses a menudo se les solicita que determinen la huella genética o “ADN *fingerprinting*” para aportar evidencias en juicios o para otras aplicaciones ¹. Determinar la huella genética implica la amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR ²) para analizar pequeñas cantidades de ADN o mediante el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP ³) si se dispone de grandes cantidades de ADN. Una etapa del análisis mediante RFLP requiere que el estudiante compare los patrones de bandas producidas por las muestras de ADN cuando se separan en un gel de agarosa. En esta práctica se comparan las bandas producidas por una muestra que representa el ADN recogido en la escena del crimen, y cinco muestras obtenidas de sospechosos en el caso. Es importante que indiques a tus alumnos que en esta práctica se utiliza la técnica más sofisticada para muestras complejas de ADN humano.

Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción se sitúan en la molécula de ADN y se desplazan por la hélice hasta que reconocen unas secuencias específicas de pares de bases que indican a la enzima que deje de desplazarse. Las enzimas entonces digieren (separan químicamente) la molécula de ADN en ese punto (llamado “diana de restricción”) actuando como tijeras moleculares, cortando el ADN por secuencias específicas de pares de bases.

Si existe más de una diana de restricción en una molécula de ADN, la enzima de restricción cortará en cada uno de esos sitios, obteniéndose múltiples fragmentos. Así, si un fragmento lineal de ADN se corta con una enzima de restricción cuya diana de restricción se encuentra en dos puntos diferentes de la molécula de ADN, se obtendrán tres fragmentos de diferentes longitudes. La longitud de cada fragmento dependerá de la localización de las dianas de restricción en la molécula de ADN.

Cuando las enzimas de restricción se usan para cortar cadenas de ADN plasmídico circular, como las muestras incluidas en este *kit*, se obtienen fragmentos de ADN de varios tamaños. El ADN cortado con enzimas de restricción puede ser separado y observado utilizando una técnica denominada **electroforesis en gel de agarosa**. El término electroforesis significa “mover con electricidad”.

Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis separa los fragmentos de ADN en función de su tamaño. Los fragmentos de ADN se cargan en un gel de agarosa, que se sitúa en una cubeta que contiene una solución líquida conductora. La corriente eléctrica pasa a través de dos electrodos situados en cada extremo de la cubeta. Los fragmentos de ADN están cargados negativamente, y cuando se sitúan en un campo eléctrico migrarán hacia el polo positivo. La matriz del gel de agarosa actúa como un tamiz molecular a través de la cual los fragmentos pequeños de ADN se pueden mover con más facilidad que los más grandes. Tras cierto tiempo, los fragmentos pequeños avanzarán más que los más grandes. Los fragmentos del mismo tamaño permanecen juntos y migran juntos produciendo una sola *banda* de ADN.

Análogamente se podría comparar este proceso con lo que ocurriría si todos los pupitres y sillas se hubieran dispersado simétricamente por todo un aula. Un solo estudiante podría avanzar por el laberinto rápidamente y con poca dificultad, mientras que cuatro estudiantes unidos por las manos tardarían más tiempo y tendrían más dificultades para avanzar entre el laberinto de sillas.

ADN Fingerprinting

Todas las personas tienen similitudes y diferencias en sus secuencias de ADN. Para demostrar que un fragmento de ADN contiene una secuencia de nucleótidos específica, se puede construir una sonda de ADN complementario marcado radiactivamente, de manera que reconozca y se una a la secuencia en el fragmento original de ADN. Las sondas radiactivas permiten a los biólogos moleculares localizar, identificar y comparar el ADN de diferentes personas. Esta sonda se puede describir como una *etiqueta* radiactiva que se unirá a una cadena simple de ADN y producirá una banda en un gel o una banda en una membrana de nylon que es una réplica del gel (*Southern blot*). Por su especificidad, la sonda radiactiva se puede usar para demostrar similitudes genéticas entre individuos. Las posiciones relativas de las bandas marcadas radiactivamente en un gel están determinadas por el tamaño de los fragmentos de ADN que las forman. El tamaño de los fragmentos indica variaciones en el ADN de cada individuo.

Estamos yendo más allá de lo que este manual pretende. Para tener información más detallada, recomendamos revisar las referencias de la página 6.

La muestra necesaria para esta técnica se puede obtener de cualquier material biológico que contenga ADN: tejidos, fluidos corporales (sangre y semen), folículos pilosos, etc. El análisis de ADN se puede hacer incluso de material desecado, como una mancha de sangre o tejido momificado. Si la muestra de ADN es muy pequeña se puede amplificar utilizando la PCR. El ADN se trata después con enzimas de restricción que cortan el ADN en fragmentos de diferentes longitudes⁴.

Digestión enzimática del ADN

Dado que cortan el ADN, las enzimas de restricción son las "tijeras químicas" de los biólogos moleculares. Cuando una determinada enzima de restricción reconoce una **secuencia de reconocimiento** (de 4 o 6 pares de bases) en un fragmento de ADN, corta la molécula en ese punto. Las secuencias de reconocimiento de dos enzimas usadas habitualmente, **EcoRI** y **PstI**, aparecen a continuación. El lugar exacto en que se corta la cadena de ADN se señala con unas tijeras como símbolo:

Para la enzima: Eco RI



Para la enzima: Pst I



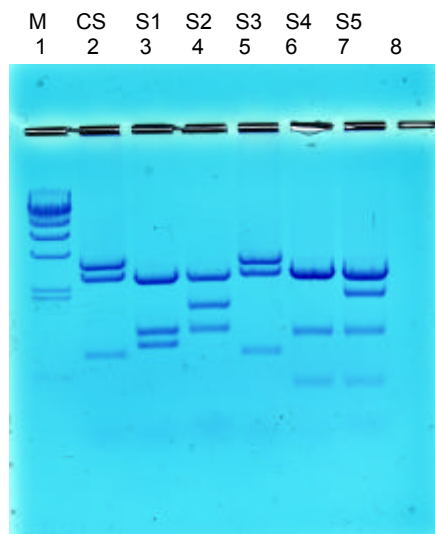
Como todas las enzimas, las enzimas de restricción funcionan mejor en un tampón (*buffer*) y a una temperatura específicos. El tampón apropiado para las enzimas de restricción se incluye con la muestra de ADN, de manera que cuando el ADN rehidratado y las enzimas se mezclan, se crean las condiciones ideales para el óptimo funcionamiento de las enzimas. El *buffer* contiene Tris 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, DDT 1 mM, pH 8.0, que son las condiciones ideales para el funcionamiento correcto de las enzimas *EcoRI* y *PstI*.

Visualización de los fragmentos de restricción

El ADN es incoloro, de manera que los fragmentos de ADN no se pueden ver en el gel durante la electroforesis. Se utiliza un tampón de carga, que contiene dos colorantes azules, y que se añade a la solución de ADN. Los colorantes no tiñen el ADN, pero facilitan la carga de los geles y permiten ver el avance de la electroforesis. Los colorantes migran hacia el polo positivo situado al final del gel, al igual que los fragmentos de ADN. El colorante "rápido" migra con los fragmentos de ADN de aproximadamente 500 pb, mientras que el colorante "lento" migra con los fragmentos de ADN de tamaño aproximado de 5 kpb.

La tinción del ADN muestra su localización en el gel. Cuando el gel se sumerge en una solución diluida de colorante Bio-Safe, las moléculas del colorante se unen a las moléculas de ADN atrapadas en el gel de agarosa. Para aumentar el contraste y visualizar con facilidad las bandas de ADN, el exceso de colorante se puede eliminar del gel destiñéndolo con agua. Cuando las bandas sean visibles, tus alumnos pueden comparar los patrones de restricción de diferentes muestras de ADN.

El gel situado a continuación, muestra el patrón de ADN que obtendrían los estudiantes tras la electroforesis. El ADN de la escena del crimen se ha marcado como CS, el del sospechoso 1 como S1, y así sucesivamente. El ADN recogido en la escena del crimen se carga en el pocillo 2, y el ADN de cada sospechoso se carga en los pocillos 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente. El pocillo 1 contiene los marcadores (de tamaño conocido) obtenidos de la digestión de un ADN por la enzima *HindIII*. Por acuerdo, los pocillos se numeran empezando por la parte superior izquierda. Los estudiantes deben observar los patrones de bandas y comprobar si las bandas de algún sospechoso coinciden con las del ADN recogido en la escena del crimen.



Se observa fácilmente que el ADN procedente de la escena del crimen y el del sospechoso 3 (S3) son idénticos. Quizá quieras saber si este hallazgo es una prueba válida o no para condenar al sospechoso. La realidad es que esta prueba sitúa al sospechoso en la escena del crimen, pero puede que se necesiten más pruebas para probar que es el o la culpable^{5,6}.

Puedes indicar a tus alumnos que esto es una simulación. En la realidad, los técnicos analizan segmentos mucho más largos de ADN, y se obtienen muchas más bandas. Se buscan segmentos específicos de ADN, comunes en una población, y que producirán un patrón de bandas único para cada individuo.

Fiabilidad de las pruebas de ADN

Los dos principales factores que afectan a la fiabilidad de la tecnología del ADN en la medicina forense son la genética de las poblaciones y la estadística genética. En los humanos hay miles de *loci* RFLP o de segmentos de ADN que se pueden seleccionar y usar para analizar la huella genética. En función de factores demográficos como el origen étnico o el aislamiento geográfico, algunos segmentos mostrarán más variabilidad que otros.

Algunas poblaciones muestran mucha menos variabilidad en segmentos particulares de ADN que otras. El grado de variabilidad afectará a la probabilidad de que exista más de un individuo con la misma secuencia. Si el 90% de una población presenta el mismo patrón para un determinado segmento de ADN, poca información se podrá obtener. Pero si la frecuencia de aparición de un patrón de ADN para un determinado segmento en una población, es extremadamente baja, entonces este segmento puede ser una herramienta muy útil para discriminar entre los individuos de esa población. Cada población muestra diferentes patrones en sus genotipos debido a las distintas aportaciones realizadas a sus genes individuales a lo largo del tiempo.

Por eso, para determinar hasta qué punto incrimina una prueba de ADN, se necesita hacer la siguiente pregunta:

“Estadísticamente, ¿cuántas personas en una población presentarán un patrón idéntico al observado en la muestra recogida en la escena del crimen? ¿1 de cada 10.000? o ¿1 de cada 10?”

Notas y lecturas recomendadas

1. ADN profiling Fast Becoming Accepted Tool For Identification, Pamela Zurer, *Chemical and Engineering News*, Oct. 10, 1994.
2. PCR significa **Reacción en cadena de la polimerasa**; es una técnica usada para amplificar pequeñas cantidades de ADN (en este caso para posibilitar el posterior análisis de ese ADN).
3. RFLP significa **Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción** (*riff-lips*, en la jerga). En esta técnica el ADN se corta con enzimas de restricción en fragmentos de diferentes longitudes. Cada individuo posee distintos puntos de restricción, de manera que dos piezas de ADN de diferente origen pueden producir fragmentos de diferente longitud cuando se cortan con la misma enzima.
4. Una excelente fuente de información para el profesor es: Genetic *Fingerprinting*, Pauline Lowrie and Susan Wells, *New Scientist*, 16 November 1991.
5. Is ADN *Fingerprinting* ready for the courts?, William C. Thompson and Simon Ford, *New Scientist*, March 31, 1990.
6. When Science Takes the Witness Stand, Peter Neufled and Nevelle Coleman, *Scientific American*, Vol. 262: 5, May 1990.

Planificación de la práctica

Hay cinco unidades o prácticas en este cuaderno. Todas las sesiones se realizan en periodos de 50 minutos. Cada práctica incluye:

- Una serie de consideraciones previas para los alumnos
- Una tarea de investigación activa para los alumnos
- Cuestiones para el análisis e interpretación de los resultados obtenidos

Programación para el alumno

Unidad 1:	Introducción: “ADN <i>fingerprinting</i>”
Actividad	Lecturas y discusión Consideraciones previas 1 y 2.
Unidad 2:	Digestión de muestras de ADN con enzimas de restricción
Actividad	Preparar los geles; realizar la digestión con las enzimas de restricción Hacer análisis preliminar y cuestiones de revisión
Unidad 3:	Electroforesis de ADN
Actividad	Cargar y correr los geles; teñir los geles (toda noche) Contestar las preguntas de análisis y revisión
Unidad 4:	Análisis e interpretación de resultados
Actividad	Desteñir los geles Contestar las preguntas de análisis Hacer la curva estándar o patrón Discutir y sopesar los resultados

Preparación de las prácticas por el profesor

En este apartado se perfila el calendario recomendado para la preparación anticipada de las sesiones prácticas por parte del profesor. Para más detalles consultar la Guía del profesor para la preparación de la práctica, en las páginas 10-16.

Actividad	Realización	Duración
Lectura del manual	Inmediatamente	1 hora
Preparación del tampón de electroforesis (TAE) y de los geles de agarosa	Antes de o durante la Unidad 2	1 hora
Rehidratación de muestras de ADN y enzimas, y preparación de alícuotas	Antes de la Unidad 2	20 minutos
Preparación del colorante para ADN Bio-Safe	Antes de la Unidad 2	10 minutos
Preparación puestos trabajo	Día de prácticas	10 minutos / día

Listado de material

Puesto de trabajo de los alumnos: El material necesario para el desarrollo de cada práctica y que debe estar en cada puesto de trabajo al inicio de la misma, aparece en los siguiente listados. Los componentes presentes en el *kit* son suficientes para montar 8 puestos de trabajo para alumnos.

Puesto común: El listado de material y equipos necesarios para cada práctica, y que deben estar en una zona común a la que tengan acceso todos los grupos de trabajo, aparece a continuación. El profesor decidirá si los alumnos acceden al material común y equipos, o si es el profesor el que alícuota el material y maneja los aparatos.

Unidad 2 Digestión del ADN con enzimas de restricción

Puesto de trabajo alumnos	Número	(<input type="checkbox"/>)
Enzimas <i>EcoRI/PstI</i>	1 tubo (80 µl)	<input type="checkbox"/>
Puntas pipeta	15	<input type="checkbox"/>
Micropipeta P-10 o P-20	1	<input type="checkbox"/>
Microtubos de colores: verde, azul, naranja, violeta, rojo, amarillo	1	<input type="checkbox"/>
Rotulador de tinta indeleble	1	<input type="checkbox"/>
Contenedor para residuos	1	<input type="checkbox"/>
Gradilla	1	<input type="checkbox"/>
Cubeta con hielo	1	<input type="checkbox"/>
Puesto común		
ADN escena crimen, rehidratado con tampón	1 vial	<input type="checkbox"/>
ADN sospechoso 1, rehidratado con tampón	1 vial	<input type="checkbox"/>
ADN sospechoso 2, rehidratado con tampón	1 vial	<input type="checkbox"/>
ADN sospechoso 3, rehidratado con tampón	1 vial	<input type="checkbox"/>
ADN sospechoso 4, rehidratado con tampón	1 vial	<input type="checkbox"/>
ADN sospechoso 5, rehidratado con tampón	1 vial	<input type="checkbox"/>
Estufa o baño a 37 °C	1/laboratorio	<input type="checkbox"/>
Agarosa líquida	35-40 ml/gel	<input type="checkbox"/>
Molde para preparar geles (cristales)	1/puesto	<input type="checkbox"/>
Cinta adhesiva	1/puesto	<input type="checkbox"/>

Se deben usar gafas protectoras mientras se está en el laboratorio.

Se deben seguir las medidas generales de seguridad, como no comer ni beber en el laboratorio.

Unidad 3 Electroforesis de las muestras de ADN

Puesto de trabajo alumnos	Número	(ü)
Gel de agarosa	1	<input type="checkbox"/>
Muestras con ADN digerido	5	<input type="checkbox"/>
Colorante para ADN (Tampón carga)	1	<input type="checkbox"/>
2 Rotuladores	1	<input type="checkbox"/>
Puntas pipeta	1 caja	<input type="checkbox"/>
Micropipeta P-10 o P-20	1	<input type="checkbox"/>
Contenedor para residuos	1	
Gradilla	1	
Cubeta electroforesis y fuente alimentación	1	<input type="checkbox"/>
Cristalizador o cubeta para tinción gel	1	<input type="checkbox"/>
Puesto común		
Tampón electroforesis (TAE 1x)	275 ml gel/caja	<input type="checkbox"/>
Colorante Bio-Safe (1x)	500 ml	<input type="checkbox"/>
Marcadores <i>HindIII</i>	1	<input type="checkbox"/>

Unidad 4 Análisis de resultados

Puesto de trabajo alumnos	Número	(ü)
Agua para desteñir geles	60 ml	<input type="checkbox"/>
Regla milimetrada	1	<input type="checkbox"/>
Papel semilogarítmico	1	<input type="checkbox"/>
Puesto común		
No se necesita material común		

Guía del profesor para la preparación de la práctica

Este apartado describe los preparativos que debe realizar el profesor antes de cada sesión práctica. Se incluye una estimación del tiempo de preparación para cada sesión.

Unidad 2 Digestión con enzimas de restricción de las muestras de ADN

Preparación previa

Objetivos	Rehidratar las muestras de ADN y las enzimas de restricción Alicuotar las enzimas de restricción Preparar los puestos de trabajo comunes y de los alumnos Preparar los geles de agarosa, o si los van a preparar los alumnos, preparar la agarosa y mantenerla en el baño a 50-55 °C hasta que la usen. Calentar un baño a 37 °C.
Tiempo a emplear	30 min – 1 hora (dependerá de quién prepare los geles de agarosa)
Material necesario	Cubetas, moldes y peines para electroforesis Tampón electroforesis (TAE 50x) Agarosa en polvo 16 microtubos

Metodología

1. Rehidratación de las muestras:

Nota: Todos los viales de ADN y de enzimas deben contener un residuo blanco, que aparecerá como un polvo suelto en los viales de ADN. Las muestras liofilizadas de ADN se encuentran en viales de cristal transparente marcados con etiquetas de colores. La mezcla liofilizada de las enzimas *EcoRI/PstI* se encuentra en un vial de color ámbar.

A. Para rehidratar las muestras de ADN, añadir 200 µl de agua estéril en cada vial de ADN liofilizado y agitarlo para resuspenderlo. Dejar que las muestras se rehidraten a temperatura ambiente, durante 5 minutos o hasta que se disuelvan. Puede que sea necesario un suave calentamiento a 37 °C durante 10 minutos. Si quieres, puedes traspasar las muestras rehidratadas a los tubos microtubos coloreados de 1.5 ml para facilitar el pipeteo a los alumnos.

Las muestras rehidratadas de ADN están en una solución tampón a una concentración de 0.3 µg/µl en Tris 100 mM, NaCl 200 mM, MgCl₂ 20 mM, DTT 2mM, pH 8.0. Al añadir las enzimas de restricción la concentración final del tampón será Tris 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1mM, pH 8.0, siendo éstas las condiciones óptimas para la actividad de las enzimas *EcoRI* y *PstI*.

B. Para rehidratar la mezcla de enzimas *EcoRI/PstI*, añadir 750 µl de agua estéril y agitar para resuspender las enzimas. Dejar que las enzimas se rehidraten en hielo durante 5 minutos. Es crucial que la mezcla de enzimas se mantenga **en hielo**, pero sin congelar, una vez que se hayan rehidratado. Las enzimas rehidratadas se deben usar en las 12 horas siguientes.

2. Preparación de las alícuotas de la mezcla de enzimas. Transferir 80 µl de la mezcla enzimática rehidratada a cada uno de los 8 microtubos de 1.5 ml marcados como **ENZ**.

3. Preparación del tampón de electroforesis. El tampón de electroforesis TAE (Tris, acetato, EDTA) se encuentra en una solución concentrada 50x. Usaremos el tampón TAE 1x, necesitando un volumen total de unos 275 ml para cada cubeta de electroforesis. Serán suficiente 3 litros de tampón TAE-1x para las 8 cubetas de electroforesis y la preparación de los 8 geles de agarosa. Para preparar 3 litros de TAE-1x a partir de TAE-50x, añadir 60 ml de TAE-50x a 2.94 litros de agua destilada.

4. Preparación de la agarosa. Esto puede hacerse con 1 ó 2 días de antelación por el profesor, o durante la sesión práctica por los propios alumnos.

A. La concentración recomendada para la preparación del gel es de agarosa al 1%. Esta concentración de agarosa proporciona una excelente resolución y minimiza el tiempo requerido para la separación de los fragmentos de ADN en la electroforesis. Para preparar agarosa al 1%, añadir 1 g de agarosa a 100 ml de tampón TAE-1x. La agarosa se debe preparar con tampón de electroforesis, no con agua.

Si las cubetas de electroforesis son escasas, puedes utilizar moldes o cristales de 7 x 10 cm, y dos peines con 8 pocillos, y preparar un gel para cargar las muestras de dos grupos de estudiantes.

Esta tabla te puede servir de guía para saber los volúmenes a utilizar:

Volumen de agarosa al 1% necesario:

Número de geles	Molde 7 x 7 cm	Molde 7 x 10 cm
1	40 ml	50 ml
2	80	100
4	160	200
8	320	400

B. Añade la agarosa en polvo a un recipiente adecuado (p. ej. un matraz Erlenmeyer de 500 ml, para preparar 200 ml). Añade la cantidad apropiada de TAE-1x y agita para resuspender la agarosa en el tampón. Si utilizas un matraz Erlenmeyer, sitúa otro matraz Erlenmeyer de 25 ml en la boca del primero y en posición invertida. El matraz pequeño actuará como una cámara de reflujo, permitiendo una ebullición prolongada o vigorosa sin que se produzcan muchas pérdidas por evaporación. La agarosa se puede fundir en un agitador magnético a temperatura elevada, en un baño caliente, o en un horno microondas.

Precaución: Usar siempre guantes, gafas protectoras y bata mientras se prepara el gel de agarosa. La agarosa hirviendo o los recipientes con agarosa caliente pueden producir graves quemaduras en la piel.

Uso del horno microondas: Este es el método más rápido y seguro para disolver la agarosa. Introduce el matraz o botella con el gel en el microondas. AFLOJA EL TAPÓN SI UTILIZAS UNA BOTELLA. Déjalo 3 minutos a media intensidad. Para el horno cada 30 segundos y agita el matraz para disolver la agarosa. Calienta y agita la solución hasta que todas las partículas de agarosa se hayan disuelto. Déjalo enfriar hasta los (55-60) °C antes de utilizarlo.

Uso del agitador magnético: Añade un imán a la solución de agarosa. Calienta hasta ebullición el matraz en el agitador magnético. Se debe evitar que las burbujas alcancen el cuello del matraz.

Calienta y agita la solución hasta que todas las partículas de agarosa se hayan disueltas. Déjalo enfriar hasta los (55-60) °C antes de utilizarlo.

Si quieres, puedes preparar la agarosa con varias horas de antelación a la práctica, y mantenerla caliente en un baño a 55-60 °C hasta su uso.

5. **Preparación de los geles de agarosa.** Es necesario que cada gel tenga al menos 8 pocillos. Siguiendo las instrucciones del apartado anterior, prepara la agarosa, calculando el volumen que se necesita. Añade la agarosa al molde e introduce el peine. La cantidad de agarosa debe alcanzar entre 0.5 y 0.7 cm de profundidad, o bien ser suficiente como para cubrir los dientes del peine. No muevas ni toques el molde o el peine hasta que la agarosa haya solidificado. Una vez solidificada, los geles pueden almacenarse en bolsas precintadas a temperatura ambiente o en el frigorífico hasta el día siguiente. El tiempo necesario para preparar los geles para todos los grupos de alumnos es de aproximadamente 30 minutos. Si es posible, prepara 1 ó 2 geles extra de reserva.
6. **Digestión con enzimas de restricción.** Las condiciones óptimas para la digestión enzimática son de 45 minutos a 37 °C. Si no se dispone de una placa térmica, baño o estufa, las muestras se pueden digerir introduciendo los tubos en una gradilla de plástico o corcho, que se sitúa en aproximadamente 1 litro de agua a 37 °C, y dejándolas en incubación toda la noche mientras el agua se va enfriando.

Procedimiento para preparar los geles

Con el sistema Bio-Rad's Mini Sub-Cell® GT, los geles se pueden preparar fácilmente. En esta sección se indica como preparar los geles de forma convencional. Se detallan otros métodos en el manual de instrucciones del sistema Bio-Rad's Mini Sub-Cell® GT.

- | | |
|--------|--|
| Paso 1 | Sellar los bordes del molde o soporte donde se va a preparar el gel con cinta adhesiva de laboratorio. Apretar la cinta firmemente a los bordes para formar un precinto hermético. |
| Paso 2 | Nivelar el molde sobre una mesa usando el nivelador proporcionado. |
| Paso 3 | Preparar la cantidad de agarosa adecuada en tampón TAE. |
| Paso 4 | Dejar enfriar la agarosa hasta al menos los 60 °C, y verterla sobre el soporte. |
| Paso 5 | Mientras se enfría la agarosa, colocar el peine en el molde. El peine se debe colocar a unos 2 cm del extremo del soporte (nunca en la mitad del gel). |
| Paso 6 | Dejar que el gel solidifique a temperatura ambiente durante 10-20 minutos. Tendrá aspecto opaco cuando esté listo para su uso. |
| Paso 7 | Retirar el peine del gel con precaución. |
| Paso 8 | Retirar la cinta de los bordes del soporte. |
| Paso 9 | Colocar el molde o soporte en la cubeta de electroforesis, situando los pocillos en el cátodo (negro). Las muestras de ADN migrarán hacia el ánodo (rojo) durante la electroforesis. |

Para preparar un gel doble en el soporte de 7 x 10 cm con dos peines de 8 pocillos, coloca un peine en un extremo y el otro peine a la mitad del soporte.

Unidad 3 Electroforesis y tinción de las muestras de ADN

Preparación previa

Objetivos	Alicuotar el tampón de carga Preparar los marcadores Lambda <i>Hind</i> III Preparar la solución Bio-Safe 1x para la tinción de ADN Preparar los puestos de trabajo para los alumnos y comunes
Tiempo requerido	20 minutos
Material requerido	Tampón de carga Solución Bio-Safe Marcadores Lambda <i>Hind</i> III

1. Alicuotar el tampón de carga

- A. Rotular 8 microtubos como **TC** (Tampón de carga). Alicuotar 35 μ l del tampón de carga en cada tubo. Distribuir los tubos a cada puesto de trabajo de los alumnos.
- B. Añadir 20 μ l del tampón de carga al tubo que contiene los marcadores *Hind*III. Si es posible, calentar los marcadores 5 minutos a 65 °C, y luego enfriarlos en hielo –al hacer esto se separan mejor las bandas de los marcadores. Rotular 8 microtubos con una M. Añadir 15 μ l de los marcadores con el tampón de carga a cada tubo M. Distribuir los tubos a cada puesto de trabajo de los alumnos.

2. Preparar la solución Bio-Safe para la tinción de ADN.

Diluir 1 ml de la solución 500x en 499 ml de agua destilada en un recipiente adecuado. Cubrir el recipiente y almacenarlo a temperatura ambiente hasta su uso.

3. Electroforesis de las muestras

El tiempo requerido es de 30 minutos, aunque si es posible dejarla correr 40 minutos se obtendrá una mayor resolución.

Procedimiento de tinción del ADN con la solución Bio-Safe

El volumen de solución Bio-Safe 1x necesario para teñir un gel de 7 x 7 ó 7 x 10 cm es de aproximadamente 60 ml. Los geles se deben separar del soporte antes de la tinción. Esto se realiza fácilmente sujetando la base del gel en una mano y empujándolo suavemente con el pulgar de la otra mano. Se debe tener especial precaución para no romper la zona de los pocillos al separar el gel. Situar el gel en una cubeta o cristizador y cubrirlo completamente con la solución colorante.

Para obtener mejores resultados, dejar los geles en agitación toda la noche. Se pueden teñir varios geles en un recipiente grande, marcándolos con cortes en diferentes esquinas, para diferenciarlos. Si se utilizan las cubetas del *kit*, cada gel se puede teñir de forma individual en una cubeta.

Dejar los geles teñiéndose toda la noche. Al día siguiente, aclarar los geles teñidos con agua y destañarlos al menos 10 minutos. Para obtener el máximo contraste, los geles se pueden dejar destañándose en agua toda una noche. El colorante no es tóxico, pero se deben utilizar guantes mientras se tocan los geles para evitar teñirse las manos.

Unidad 4 Secado de los geles y análisis de las bandas de ADN

Preparación previa

Objetivo	Preparar puestos de trabajo
Tiempo requerido	10 minutos
Material	No es necesario preparar ningún reactivo

Para obtener una copia permanente del gel antes de su secado, bien se puede calcar dibujando los pocillos y las bandas de ADN en papel acetato, o se puede fotografiar con una cámara y película normales (Bio-Rad's Standard Polaroid gel documentation system).

Secado del gel de agarosa

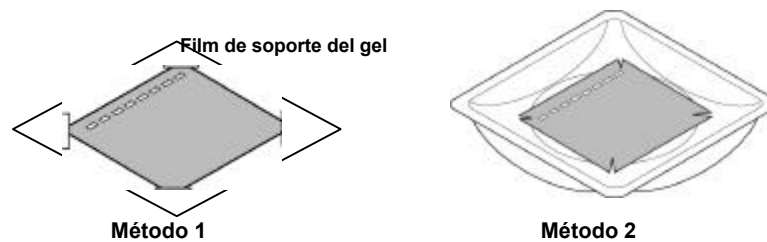
Nota: El secado de los geles de agarosa requiere el uso de la agarosa de alta resistencia Bio-Rad. Otras agarosas pueden resultar inapropiadas para este fin. Existen dos métodos para el secado de geles de agarosa:

Método 1

El método 1 es el preferido y requiere el uso del film de soporte del gel (número de catálogo 170-2984-EDU). Simplemente, sacar el gel de agarosa destañido de la cubeta y recortar las zonas sin bandas con un cuchillo. Situar el gel directamente sobre la cara hidrofílica de un trozo de film de soporte del gel. El agua formará gotas en la cara hidrofóbica pero se esparcirá en la cara hidrofílica. Centrar el gel en el film. Situar el film en una hoja de papel secante y dejar secar, evitando la exposición directa a la luz. Al secarse, el gel se pegará al film y no encogerá. Si se deja el gel sobre el film sin tocarlo, se secará completamente a temperatura ambiente en 2-3 días. Se obtendrá una copia lisa, transparente y duradera del experimento.

Método 2

Después de teñir y destañar el gel, dejarlo en la cubeta o cristizador. Dejarlo secar al aire durante 2-3 días. Al secarse el gel encogerá considerablemente, pero proporcionalmente. Si se deja en la cubeta sin tocarlo, el gel debería quedar relativamente liso, pero se puede arrugar mientras se seca.



Nota: Evitar la exposición prolongada de los geles secados a luz directa para evitar que las bandas se decoloren.

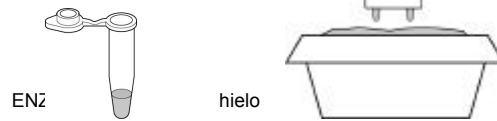
Representación gráfica de los datos

Muchos de los alumnos pueden no estar familiarizados con el papel logarítmico y semilogarítmico. Se sugiere que se les enseñe la manera adecuada de utilizarlo. Se puede incluir una explicación sobre los diferentes usos del papel semilogarítmico frente al papel milimetrado lineal. Es una oportunidad para repasar las matemáticas y recordar las secuencias numéricas lineales y exponenciales. Se incluyen ambos tipos de papel, lineal y semilogarítmico en las páginas 37 y 38 de este manual.

Guía rápida para el uso del kit ADN Fingerprinting

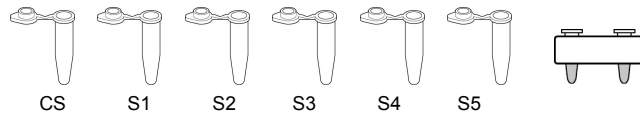
Día 1 Preparación de las muestras de ADN

1. Colocar en hielo el tubo con la mezcla de enzimas de restricción, rotulado como ENZ.



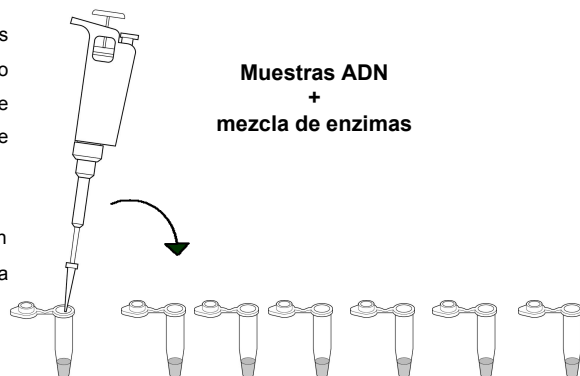
2. Rotular cada uno de los microtubos coloreados de la siguiente forma:

Verde	EC = Escena del crimen
Azul	S1 = Sospechoso 1
Naranja	S2 = Sospechoso 2
Violeta	S3 = Sospechoso 3
Rojo	S4 = Sospechoso 4
Amarillo	S5 = Sospechoso 5



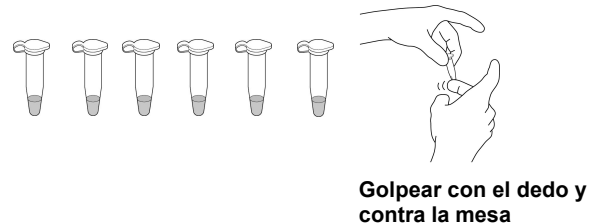
Marca los tubos con tu nombre, fecha y sesión de prácticas. Pon los tubos en la gradilla de corcho.

3. Pipetear 10 µl de cada muestra de ADN de los tubos del kit al correspondiente microtubo coloreado. Usar una punta de pipeta diferente para cada muestra de ADN. Asegurarse de que las muestras quedan en el fondo de los tubos.

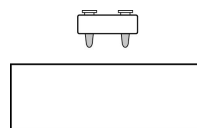


4. Pipetear 10 µl de la mezcla de enzimas (ENZ) en el fondo de cada tubo. Cambiar la punta de la pipeta para cada muestra de enzimas.

5. Tapar los tubos y mezclar los componentes golpeando suavemente los tubos con el dedo. Si se dispone de microcentrifuga, dar un pulso para que todo el líquido quede en el fondo del tubo. De lo contrario, golpear el tubo sobre la mesa.



6. Colocar los tubos en una gradilla de corcho e incubar 45 minutos a 37 °C, o toda la noche a temperatura ambiente en un volumen elevado de agua calentada a 37 °C.



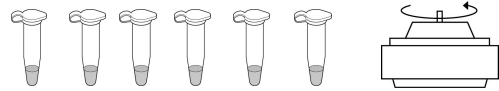
Baño

7. Después de la incubación, sacar los tubos del baño y dejarlos en la nevera hasta su uso.

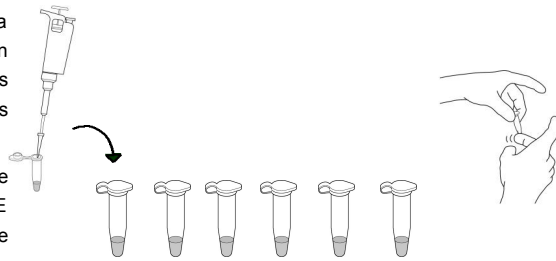


Día 2 Electroforesis

1. Sacar las muestras de ADN digerido de la nevera. Si se dispone de centrifuga, dar un pulso a los tubos para que todo el líquido quede en el fondo del tubo.

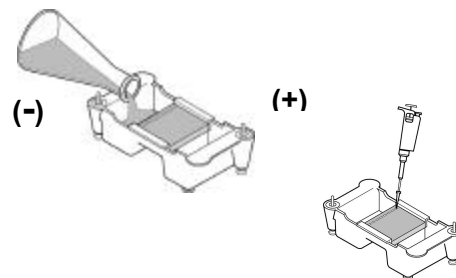


2. Utilizando una punta de pipeta diferente para cada muestra, añadir 15 µl de tampón de carga "TC" en cada tubo. Cerrar los tubos y mezclar los componentes golpeando suavemente los tubos con el dedo.



3. Colocar un gel de agarosa en la cubeta de electroforesis. Rellenar la cubeta con tampón TAE 1x hasta cubrir el gel, usando aproximadamente 275 ml de tampón.

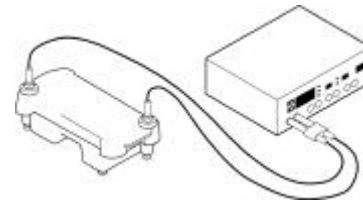
4. Comprueba que los pocillos del gel están cerca del electrodo negro (-) y que la base del gel está cerca del electrodo rojo (+).



5. Utilizando una punta de pipeta diferente para cada muestra, cargar el volumen indicado de cada muestra en los 7 pocillos del gel en el siguiente orden:

Pocillo 1:	M, Marcadores de ADN, 10 µl
Pocillo 2	EC, tubo verde, 20 µl
Pocillo 3	S1, tubo azul, 20 µl
Pocillo 4	S2, tubo naranja, 20 µl
Pocillo 5	S3, tubo violeta, 20 µl
Pocillo 6	S4, tubo rojo, 20 µl
Pocillo7	S5, tubo amarillo, 20 µl

6. Colocar la tapa en la cubeta de electroforesis. La tapa encaja en una única posición. Los puntos rojo y negro de la tapa se unen a los puntos rojo y negro de la cubeta. Conectar los electrodos a la fuente de alimentación.

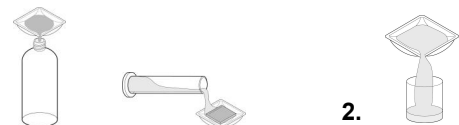


7. Encender y dejar 30 minutos a 100 V

8. Cuando la electroforesis haya terminado, desconectar y retirar la tapa. Con cuidado sacar de la cubeta el molde con el gel. ¡Ten cuidado, el gel es muy escurridizo! Poner el gel en el cristalizador o cubeta de tinción.



9. Añadir 60 ml del colorante para ADN en la cubeta. Cubrir la cubeta con una película de plástico. Dejar el gel tiñéndose toda la noche, en agitación.

**Día 3 Análisis del gel**

1. Eliminar el colorante traspasándolo a una botella. Añadir 60 ml de agua al gel y dejar destiñendo 15 minutos.

1.

2. Eliminar el agua tirándola al contenedor de residuos. Analizar los resultados con la ayuda del profesor.

3. Dejar que el gel se seque sobre el film de soporte o sobre la mesa del laboratorio. Cuando esté seco, pégalo en tu cuaderno de laboratorio.



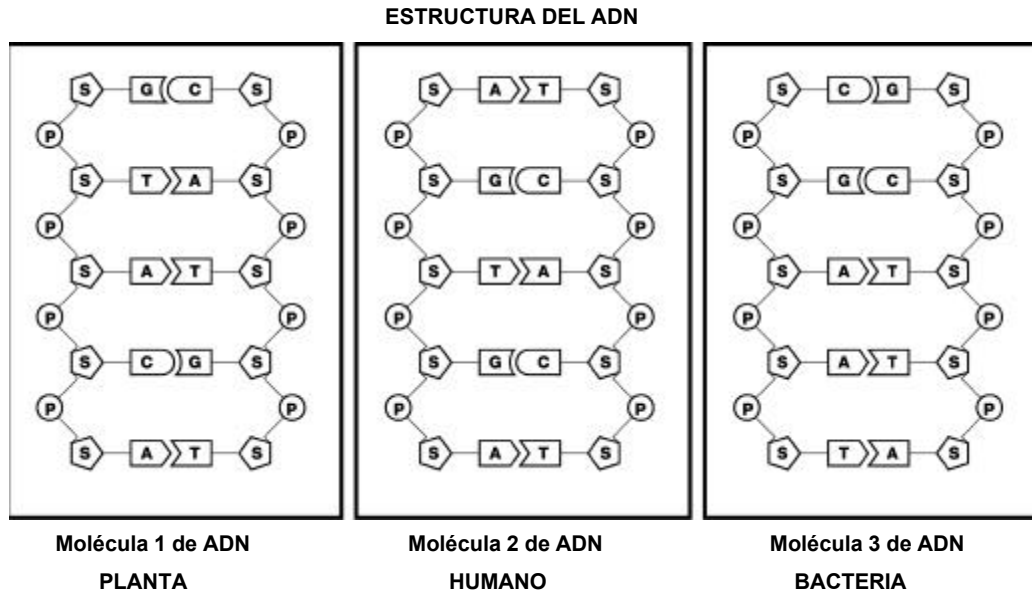
ADN *Fingerprinting*

Manual del alumno

Unidad 1	Introducción al ADN <i>Fingerprinting</i>	18
Unidad 2	Digestión de las muestras de ADN con enzimas de restricción.....	20
Unidad 3	Electroforesis y tinción de las muestras de ADN.....	27
Unidad 4	Secado de los geles y análisis de las patrones de ADN.....	32

Unidad 1 Introducción al “ADN fingerprinting”

Vas a realizar un procedimiento denominado “ADN fingerprinting”. Los datos obtenidos te permitirán determinar si las muestras de ADN que te serán proporcionadas son del mismo individuo o de varios diferentes. Para este experimento es necesario repasar la estructura de la molécula de ADN.



El esquema anterior representa una pequeña porción de ADN de tres seres vivos diferentes. En esta representación el sistema de símbolos es el siguiente:

Cadenas laterales:

S = Azúcar de 5 carbonos denominado desoxirribosa.

P = Molécula de **fosfato** compuesta de átomos de fósforo y oxígeno.

Bases nitrogenadas:

A = adenina **C** = citosina **G** = guanina **T** = timina

El análisis de las tres muestras de ADN anteriores (mira la siguiente página) nos ayudará a detectar similitudes y diferencias en las muestras de ADN de diferentes personas.

Unidad 1 Introducción al ADN *fingerprinting*

¿Cuál es la estructura del ADN?

1. Compara la estructura y colocación del azúcar y el fosfato en las cadenas laterales de las tres muestras. ¿Hay alguna diferencia?
2. En la figura anterior, ¿las tres muestras contienen las mismas bases? Describe tus observaciones.
3. ¿Están las bases apareadas de la misma manera en las tres muestras? Describe el patrón de apareamiento de las bases.
4. En tu intento de analizar las muestras de ADN de tres seres vivos diferentes, ¿qué conclusiones sacas sobre las similitudes y diferencias de las muestras de ADN?
5. ¿Qué necesitas para comparar esas muestras de ADN y determinar si son idénticas o no?

Unidad 2 Digestión de las muestras de ADN con enzimas de restricción

¿Cómo podemos detectar diferencias en la secuencia de bases?

A primera vista, esta tarea te puede parecer difícil. ¡Necesitas determinar si la secuencia lineal de pares de bases en las muestras de ADN es idéntica o no! La comprensión de algunos hallazgos relativamente recientes en la **tecnología del ADN recombinante** te puede ayudar a elaborar un plan.

En 1968, el Dr. Werner Arber de la Universidad de Basel, Suiza, y el Dr. Hamilton Smith de la Universidad Johns Hopkins, Baltimore, descubrieron varias enzimas en las bacterias, las cuales cuando se añadían a **cualquier** ADN rompían (hidrolizaban) los enlaces entre las moléculas de azúcar fosforilado, actuando de forma específica en algunas secuencias de bases (sitios de reconocimiento). Esto producía la ruptura de la doble cadena de ADN en el sitio de reconocimiento y la molécula de ADN se fracturaba en dos fragmentos. Estas tijeras moleculares o enzimas hidrolíticas son las **endonucleasas de restricción**.

(¿Puedes imaginar por qué se llaman endonucleasas de restricción?)

Dos endonucleasas de restricción muy comunes son *EcoRI* y *PstI*, y las utilizarás en esta práctica. Para comprender mejor cómo *EcoRI* y *PstI* te pueden ayudar a realizar el ensayo ADN *fingerprinting*, primero debes entender y visualizar el efecto del corte del ADN por las endonucleasas de restricción:



La línea entre los pares de bases representa los puntos en los que se romperán los enlaces si la endonucleasa de restricción reconoce la secuencia **GAATTC**. Las siguientes preguntas se refieren a cómo se vería afectado un fragmento de ADN si la endonucleasa de restricción cortara la molécula de la manera descrita arriba.

1. ¿Cuántos fragmentos de ADN se obtendrían tras el corte?

2. Escribe la **secuencia de bases** de los dos fragmentos, el izquierdo y el derecho:

Izquierdo:

Derecho:

3. ¿Qué diferencias hay entre los dos fragmentos?

4. El tamaño del fragmento de ADN se puede expresar como el número de pares de bases del fragmento. Indicar el tamaño de los fragmentos obtenidos.
- El fragmento más pequeño tiene pares de bases (pb).
 - ¿Cuál es el tamaño del fragmento más largo?
5. Observa las dos muestras de ADN mostradas a continuación, en las que por simplificación se representa una sola cadena:

Muestra 1**CAGTGATCTCGAATTCGCTAGTAACGTT****Muestra 2****TCATGAATTCCTGGAATCAGCAAATGCA**

Si ambas muestras fueran tratadas con una enzima de restricción cuyo sitio de reconocimiento fuera GAATTC, indica el número de fragmentos y el tamaño de los mismos que se obtendrían para cada muestra de ADN.

Muestra 1**Muestra 2**

Nº de fragmentos:

Nº de fragmentos:

Escribe el tamaño de cada fragmento en orden, del más grande al más pequeño:

Muestra 1**Muestra 2**

Unidad 2 Digestión de las muestras de ADN con enzimas de restricción

Metodología

Tras observar con detenimiento, es evidente que la única diferencia entre el ADN de diferentes individuos es la secuencia lineal de pares de bases. En esta práctica, tu grupo recibirá 6 muestras de ADN. Recuerda que tu tarea es determinar si alguna de ellas pertenece al mismo individuo o si son todas de diferentes individuos.

Hasta aquí tu análisis preliminar ha incluido los siguientes puntos:

- Las similitudes y diferencias entre ADN de diferentes individuos.
- Cómo las endonucleasas cortan (hidrolizan) las moléculas de ADN.
- Cómo el añadir la misma endonucleasa de restricción a dos muestras de ADN puede proporcionar algunas pistas sobre las diferencias entre la secuencia lineal de pares bases.

Ahora que tienes nociones básicas sobre estos tres puntos, estás listo para realizar la primera fase del procedimiento de "ADN *fingerprinting*": la digestión con enzimas de restricción de tus muestras de ADN.

Listado de material necesario en tu puesto de trabajo

Asegúrate que los materiales de la siguiente lista están en tu puesto de trabajo antes de comenzar la práctica.

Puesto de trabajo alumnos	Número	(ü)
Enzimas <i>EcoRI/PstI</i> (ENZ)	1 tubo (80 µl)	<input type="checkbox"/>
Puntas pipeta	15	<input type="checkbox"/>
Micropipeta P-10 o P-20	1	<input type="checkbox"/>
Microtubos de colores: verde, azul, naranja, violeta rojo, amarillo	1	<input type="checkbox"/>
Rotulador de tinta indeleble	1	<input type="checkbox"/>
Contenedor para residuos	1	<input type="checkbox"/>
Gradilla de corcho	1	<input type="checkbox"/>
Cubeta con hielo	1	<input type="checkbox"/>
Puesto común		
ADN escena crimen	1 vial	<input type="checkbox"/>
ADN sospechoso 1	1 vial	<input type="checkbox"/>
ADN sospechoso 2	1 vial	<input type="checkbox"/>
ADN sospechoso 3	1 vial	<input type="checkbox"/>
ADN sospechoso 4	1 vial	<input type="checkbox"/>
ADN sospechoso 5	1 vial	<input type="checkbox"/>
Estufa o baño a 37 °C	1/laboratorio	<input type="checkbox"/>

Unidad 2 Protocolo

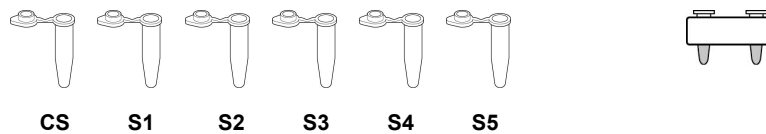
Digestión de las muestras de ADN

1. Rotula los tubos

- a. Utiliza microtubos de los siguientes colores, y rotúlalos como se indica a continuación:

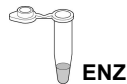
Verde	EC = Escena del crimen
Azul	S1 = Sospechoso 1
Naranja	S2 = Sospechoso 2
Violeta	S3 = Sospechoso 3
Rojo	S4 = Sospechoso 4
Amarillo	S5 = Sospechoso 5

Marca los tubos con tu nombre, fecha y sesión de prácticas. La digestión enzimática tendrá lugar en estos tubos. Pon los tubos en la gradilla de corcho.



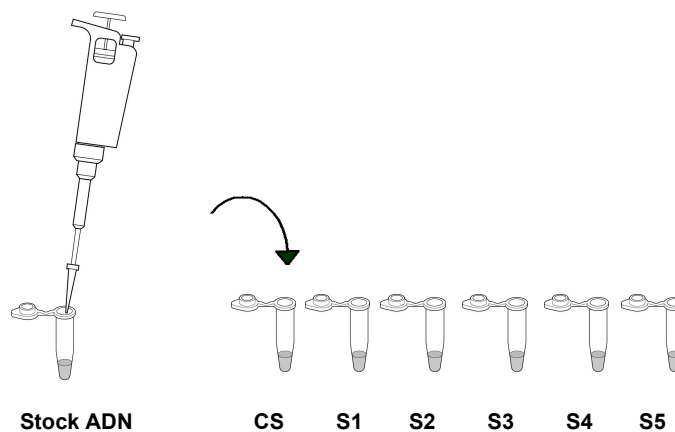
2. Localiza el tubo que contiene la mezcla de enzimas de restricción, marcado como "ENZ".

ENZ = mezcla enzimática.



3. Localiza tus muestras de ADN.

Usando una nueva punta de pipeta para cada muestra, pasa 10 μ l de cada muestra de ADN al correspondiente microtubo coloreado.

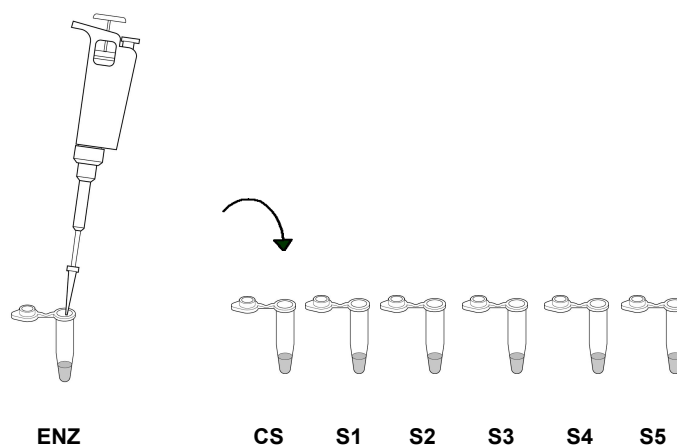


Observaciones

1. Describe las muestras de ADN (propiedades físicas).
2. ¿Hay alguna diferencia observable a simple vista entre las muestras de ADN?
3. Describe la apariencia de la mezcla de endonucleasas de restricción.
4. Añade la mezcla enzimática.

Con la micropipeta, y utilizando una nueva punta de pipeta para cada muestra, pasa 10 μ l de la mezcla enzimática a cada tubo según se muestra a continuación.

Nota: Cambia las puntas siempre que cambies de reactivo, o si de forma accidental la punta toca el líquido de uno de los tubos. Ante la duda, ¡cambia la punta!. El ADN se añade antes que las enzimas. Añade siempre las enzimas en último lugar.

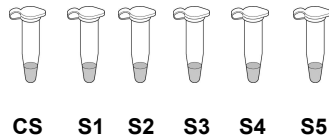


Ahora tus muestras de ADN contendrán:

Muestras ADN (10 μl)	Mezcla EcoRI/PstI	Volumen total de reacción
EC = Escena del crimen	10 μ l	20 μ l
S1 = Sospechoso 1	10 μ l	20 μ l
S2 = Sospechoso 2	10 μ l	20 μ l
S3 = Sospechoso 2	10 μ l	20 μ l
S4 = Sospechoso 2	10 μ l	20 μ l
S5 = Sospechoso 2	10 μ l	20 μ l

5. Mezcla el contenido.

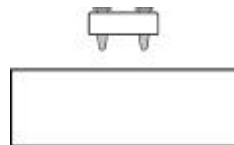
Cierra todos los tubos. Mezcla los componentes golpeando suavemente los tubos con el dedo. Si dispones de centrífuga, da un pulso a los tubos durante 2 segundos para hacer que el líquido quede en el fondo del tubo y se mezclen y reaccionen los componentes. (Asegúrate de que los tubos se colocan de forma equilibrada en la centrífuga). Si no dispones de centrífuga, golpea el tubo (con una vez es suficiente) como si fuera un termómetro. Golpear los tubos sobre la mesa también ayuda a mezclar los componentes.



Golpear con el dedo y contra la mesa

6. Incuba las muestras.

Pon los tubos en la gradilla de corcho e incúbalos a 37 °C en el baño durante 45 minutos. Alternativamente, los tubos se pueden incubar dejándolos en un volumen elevado de agua calentada a 37 °C y dejando que se enfríe lentamente durante toda la noche hasta que alcance la temperatura ambiental. Después de la incubación, guarda los tubos en la nevera hasta que los necesites.



Baño

Unidad 2 Digestión de las muestras de ADN con enzimas de restricción

Cuestionario

1. Antes de incubar las muestras, describe cualquier cambio visible que se pudiera producir en los tubos que contenían la muestra de ADN, después de añadir las enzimas de restricción.
2. ¿Puedes ver alguna evidencia que indique que las muestras de ADN estén fragmentadas o alteradas de alguna forma por la adición de *EcoRI/PstI*? Explica tu respuesta.
3. En ausencia de evidencia visible de cambio, ¿es posible que las muestras de ADN estén fragmentadas?
4. (Contestar al día siguiente)
Después de incubar 24 horas, ¿hay alguna pista visible de que las enzimas de restricción hayan modificado de alguna forma el ADN en los tubos? Razona tu respuesta.

Unidad 3 Electroforesis y tinción de las muestras de ADN

¿Cómo podemos detectar la posición de los sitios de restricción para *EcoRI* y *PstI* en nuestras muestras de ADN?

Dado que intentamos detectar cambios a nivel molecular, y no hay pistas o evidencias visibles de ellos, esta tarea puede parecerse imposible. Veamos si podemos entenderlo. Una manera para determinar la localización de los sitios de restricción podría ser averiguar lo siguiente:

- 1) ¿Cuántos fragmentos de ADN de diferente tamaño hay en cada muestra?
- 2) ¿Cuales son los tamaños relativos de cada fragmento?

Por tanto, de alguna forma, debes obtener evidencias para contestar la siguiente pregunta: ¿Se encuentran los sitios de restricción para *EcoRI* y *PstI* localizados en los mismos puntos en cada muestra de ADN?

Los siguientes hechos te serán de ayuda para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN en tus muestras.

Análisis de la digestión con enzimas de restricción

La estructura tridimensional de las enzimas de restricción les permite fijarse a una molécula de ADN de doble cadena y desplazarse a lo largo de la hélice hasta que reconocen una secuencia específica de pares de bases que indica a la enzima que deje de desplazarse. Las enzimas entonces digieren (separan químicamente) la molécula de ADN en ese sitio (denominado "sitio de restricción") actuando como unas tijeras moleculares, que cortan el ADN en una secuencia específica de pares de bases.

Si un sitio de restricción aparece en más de un punto en la molécula de ADN, la enzima de restricción hará un corte en todos y cada uno de esos sitios, obteniéndose múltiples fragmentos. La longitud de cada fragmento dependerá de la posición de los sitios de restricción en la molécula de ADN.

Cuando las enzimas de restricción se usan para cortar una larga cadena de ADN, se pueden obtener varios fragmentos. Esos fragmentos se pueden separar y visualizar usando una técnica denominada **electroforesis en gel de agarosa**. El término electroforesis significa "mover con electricidad".

Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis separa fragmentos de ADN en función de su tamaño. Los fragmentos de ADN se cargan en un gel de agarosa, que se sitúa en una cubeta rellena con una solución tampón conductora. La corriente pasa a través de electrodos situados en cada extremo de la cubeta. Los fragmentos de ADN están cargados negativamente, y cuando se sitúan en un campo eléctrico migran hacia el polo positivo. La matriz del gel de agarosa actúa como una malla molecular a través del cual los fragmentos pequeños de ADN se pueden mover con más facilidad que los

grandes. Tras un periodo de tiempo los fragmentos pequeños migrarán más lejos que los grandes. Los fragmentos del mismo tamaño permanecen juntos y forman una sola "banda" de ADN.

Una analogía: Compara este proceso con lo que ocurriría si en un aula todos los pupitres y sillas se hubieran dispersado simétricamente por todo el aula. Un solo estudiante podría avanzar por el laberinto rápidamente y con poca dificultad, mientras que cuatro estudiantes unidos por las manos tardarían más tiempo y tendrían más dificultades para avanzar entre el laberinto de sillas. ¡Compruébalo!

Unidad 3 Electroforesis de las muestras de ADN

Material necesario

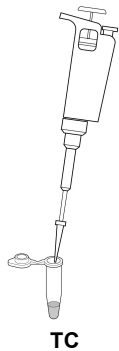
Puesto de trabajo alumnos	Número	(<input type="checkbox"/>)
Gel agarosa	1	<input type="checkbox"/>
Muestras de ADN digerido	5	<input type="checkbox"/>
Tampón carga	1	<input type="checkbox"/>
Rotulador	1	<input type="checkbox"/>
Puntas pipeta	1 caja	<input type="checkbox"/>
Micropipeta P-10 o P-20	1	<input type="checkbox"/>
Contenedor para residuos	1	<input type="checkbox"/>
Gradilla de corcho	1	<input type="checkbox"/>
Cubeta electroforesis y fuente alimentación	1	<input type="checkbox"/>
Cristalizador o cubeta para tinción gel	1	<input type="checkbox"/>
Marcadores <i>HindIII</i>	1	<input type="checkbox"/>
Puesto común		
Tampón electroforesis (TAE 1x)	275 ml gel/cubeta	<input type="checkbox"/>
Colorante Bio-Safe- 1x	500 ml	<input type="checkbox"/>

Unidad 3 Protocolo

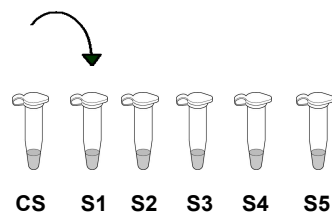
Electroforesis de las muestras de ADN

1. Utiliza un gel de agarosa preparado por tu profesor, o si el profesor te enseña, prepáralo tu mismo.
2. Cuando el gel esté preparado, saca de la nevera las muestras de ADN digeridas.
Usando una nueva punta de pipeta para cada muestra añade 5 μ l de tampón de carga a cada tubo:

Muestras ADN	Tampón de carga
Escena del crimen (EC)	5 μ l
Sospechoso 1 (S1)	5 μ l
Sospechoso 2 (S1)	5 μ l
Sospechoso 3 (S1)	5 μ l
Sospechoso 4 (S1)	5 μ l
Sospechoso 5 (S1)	5 μ l



Tampón de carga TC



Golpear con el dedo y contra la mesa

Cierra los tubos. Mezcla los componentes golpeando suavemente los tubos con el dedo. Si dispones de centrifuga, dales un pulso para que el contenido quede en el fondo de los tubos. Si no, golpea los tubos suavemente sobre la mesa.

3. Coloca en la cubeta de electroforesis el molde con el gel preparado. Los pocillos deben estar en el extremo en el que se sitúa el cátodo (-), donde se conecta el cable negro. Con mucho cuidado, retira el peine del gel.
4. Añade 275 ml de tampón de electroforesis en la cubeta, justo hasta que cubra los pocillos.

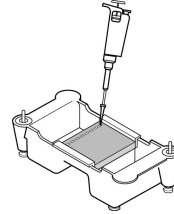


5. Localiza los marcadores de ADN *Hind*III en el tubo rotulado como "M".

Los gels se interpretan de izquierda a derecha. Así, la primera muestra se carga en el pocillo del lado izquierdo del gel.

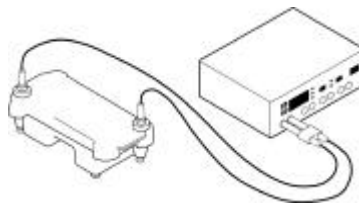
6. Utilizando una punta de pipeta diferente para cada muestra, cargar el gel de la siguiente manera:

Pocillo 1:	M, Marcadores de ADN, 10 μ l
Pocillo 2	EC, tubo verde, 20 μ l
Pocillo 3	S1, tubo azul, 20 μ l
Pocillo 4	S2, tubo naranja, 20 μ l
Pocillo 5	S3, tubo violeta, 20 μ l
Pocillo 6	S4, tubo rojo, 20 μ l
Pocillo 7	S5, tubo amarillo, 20 μ l



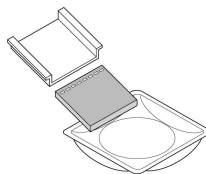
7. Colocar la tapa a la cubeta de electroforesis. La tapa encaja en una única posición: rojo con rojo y negro con negro. Conectar los cables a la fuente de alimentación.

8. Encender la fuente a 100 V, y dejar correr la electroforesis durante 30-40 minutos.



Mientras, puedes ir contestando las preguntas de revisión de la siguiente página.

9. Cuando la electroforesis haya terminado, desconectar de la fuente de alimentación y quitar la tapa de la cubeta. Con cuidado sacar de la cubeta el molde con el gel. Ten precaución, el gel es muy resbaladizo. Para retirar el gel del molde, empuja el gel con el pulgar para que se deslice, y con cuidado déjalo caer en el cristizador o cubeta para la tinción.



10. Añade 60 ml del colorante Bio-Safe en el cristizador, y cúbrelo con plástico. Deja que el gel se tiña durante toda la noche, moviéndolo intermitentemente si no se dispone de agitador.



Unidad 4 Secado de los geles y análisis de los patrones de ADN

¿Alguna de las muestras de ADN de los sospechosos coincide con la del individuo presente en la escena del crimen?

Tómate un momento para pensar cómo analizarás tu gel. En los dos últimos pasos, tendrás que:

- Visualizar los fragmentos de ADN en tu gel.
- Analizar el número y posición de las bandas visibles de ADN en tu gel.

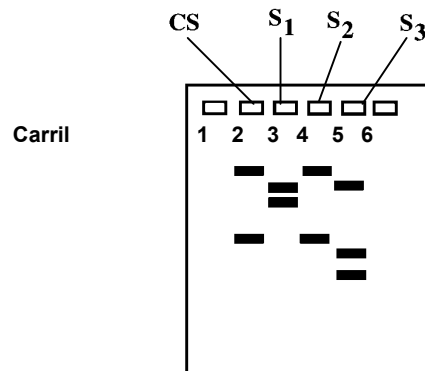
Visualización de los fragmentos de ADN

Un examen visual de los geles permite ver la posición del tampón de carga, pero no las posiciones de los fragmentos de ADN. Los fragmentos de ADN se visualizan tiñendo el gel con un colorante azul. El colorante tiene una alta afinidad por el ADN y se une fuertemente a los fragmentos de ADN, haciéndolos visibles. Estas bandas visibles de ADN se pueden fotografiar, dibujar o conservar secando el gel para su análisis.

El dibujo situado más abajo representa un ejemplo de un gel teñido después de una electroforesis. Para analizarlo, es importante recordar la siguiente información:

- Cada carril contiene una muestra diferente de ADN.
- Cada muestra de ADN fue tratada con las mismas endonucleasas de restricción.

Analiza las bandas del siguiente gel, y luego contesta a las preguntas de la siguiente página.



Unidad 4 Cuestionario

1. ¿Qué crees que contiene cada banda?
2. En este gel, ¿cuántas muestras de ADN crees que se cargaron en cada pocillo?
3. ¿Cuál sería una explicación lógica a que haya más de una banda de ADN para cada muestra?
4. ¿Qué es lo que produjo la fragmentación del ADN?
5. ¿Cuál de las muestras de ADN tiene el mismo número de sitios de restricción para las endonucleasas de restricción utilizadas? Indica los números de los pocillos.
6. ¿Qué muestra tiene el fragmento más pequeño de ADN?
7. Asumiendo que se utilizara un fragmento circular de ADN (plásmido) como material de partida, ¿cuántos sitios de restricción tendría la muestra del carril 3?
8. ¿Qué muestras de ADN parecen haber sido cortadas en el mismo número de fragmentos y del mismo tamaño?
9. Basándote en tu análisis de este gel, ¿cuál es tu conclusión sobre las muestras de ADN del dibujo? ¿Alguna de las muestras parece proceder de la misma fuente? Si es así, ¿cuáles? Describe las evidencias que justifican tus conclusiones.

Unidad 4 Análisis de los patrones de ADN

Protocolo

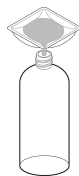
Puesto de trabajo alumnos	Número	(Ö)
Agua para desteñir geles	60 ml	<input type="checkbox"/>
Regla milimetrada	1	<input type="checkbox"/>
Papel milimetrado lineal	1	<input type="checkbox"/>
Papel milimetrado semilogarítmico	1	<input type="checkbox"/>

Puesto común

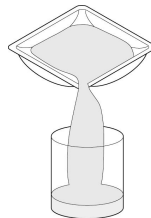
No se necesita material común

Pasos para teñir y desteñir el gel

1. Elimina el colorante Bio-Safe recogéndolo en una botella o similar y destiñe el gel con 60 ml de agua durante unos 15 minutos.



2. Elimina el agua del cristalizador. Pregunta al profesor cómo tirar de forma adecuada el colorante.



3. Recorta los carriles sin bandas del gel con un cuchillo. Deja secar el gel sobre la cara hidrofílica de un trozo de film de soporte del gel o en el cristalizador sobre la mesa del laboratorio durante 3-5 días. Cuando el gel esté seco, pégalo en tu cuaderno de laboratorio como recuerdo.

Análisis cuantitativo del tamaño de los fragmentos de ADN

Si estuvieras en un juicio, ¿querrías confiar en la estimación ocular de coincidencia entre dos muestras hecha por un técnico de laboratorio o querrías una medida más precisa?

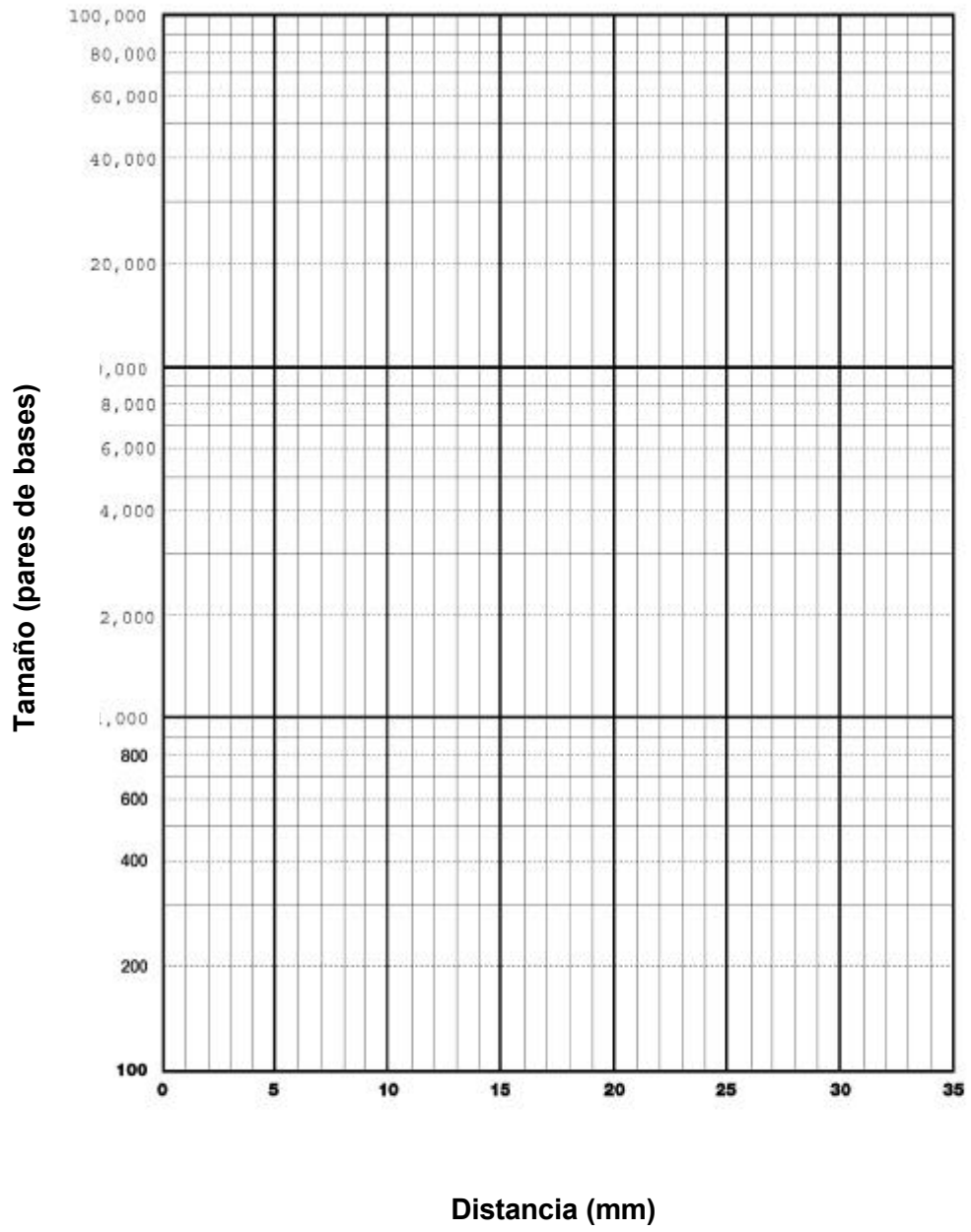
Con el fin de hacer más precisa la comparación entre el ADN de la escena del crimen y el ADN del sospechoso, algo que sea más que una impresión visual, se necesita crear una medida cuantitativa del tamaño de los fragmentos. Se realiza de la siguiente manera:

1. Usando la regla, mide la distancia a la que ha migrado cada banda. Mide la distancia en milímetros desde el fondo del pocillo hasta el centro de cada banda de ADN, y apunta los datos en la tabla de la siguiente hoja. Los datos de la tabla se usarán para construir una curva patrón y para estimar el tamaño de los fragmentos de la escena del crimen y de los sospechosos.
2. Para hacer una estimación exacta del tamaño de los fragmentos tanto de la escena del crimen como de los sospechosos, se construye una curva patrón usando las distancias (eje X) y el tamaño de los fragmentos (eje Y) de los marcadores de tamaño *Lambda/HindIII*. Usando tanto el papel lineal como el semilogarítmico, dibuja la distancia frente al tamaño de las bandas 2-6. En cada gráfica, usa una regla y traza una línea uniendo los puntos. Continúa la línea hacia el lado derecho del papel.
¿En qué papel se obtiene la línea más recta para estimar el tamaño de los fragmentos de la escena del crimen y de los sospechosos? ¿Por qué crees que una gráfica es más recta que la otra?
3. Decide qué gráfica, la del papel lineal o la del semilogarítmico, se debe usar para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN de las escena del crimen y de los sospechosos. Justifica tu elección.
4. Para estimar el tamaño de un fragmento de la escena del crimen o de un sospechoso, mide la distancia a la que migró ese fragmento. Localiza esa distancia en el eje X de tu curva patrón, y desde esa posición en el eje X, sube hasta la curva patrón, y luego sigue la línea milimetrada del papel hasta el eje Y. Quizás quieras dibujar una marca en lápiz de la trayectoria que has seguido desde el eje X al Y. El punto en el que la línea se encuentra con el eje Y, indica el tamaño aproximado del fragmento de ADN. Haz esto para todos los fragmentos de la escena del crimen y de los sospechosos.
5. Compara los tamaños de los fragmentos de los sospechosos y de la escena del crimen. ¿Hay algún sospechoso que coincida con la escena del crimen?

¿Estás seguro de que coinciden?

banda	Marcadores Lambda/HindIII		Escena crimen		Sospechoso 1		Sospechoso 2		Sospechoso 3		Sospechoso 4		Sospechoso 5	
	Distancia (mm)	Tamaño (pb)	Distancia (mm)	Tamaño (pb)	Distancia (mm)	Tamaño (pb)	Distancia (mm)	Tamaño (pb)	Distancia (mm)	Tamaño (pb)	Distancia (mm)	Tamaño (pb)	Distancia (mm)	Tamaño (pb)
1		23,130												
2		9,416												
3		6,557												
4		4,361												
5		2,322												
6		2,027												

Papel semilogarítmico



5. Una endonucleasa de restricción corta dos moléculas de ADN en el mismo punto. ¿Qué asumes que es idéntico en las dos moléculas en ese punto?

6. ¿La muestra de algún sospechoso parece tener los mismos sitios de reconocimiento para *EcoRI* o *PstI* en el mismo punto que el ADN procedente de la escena del crimen?

7. Basándote en el análisis anterior, ¿la muestra de ADN de algún sospechoso parece ser del mismo individuo que el ADN recogido en la escena del crimen? Describe la evidencia científica que sustenta tu conclusión.