

Trabajo práctico N° 4.

Amplificación por PCR de una inserción *Alu* polimórfica presente en el intrón 16 del gen ACE

Katherine Marcelain
José Suazo
2008

PLAN DE TRABAJO

- ① Introducción
- ② Extracción de DNA genómico y preparación de las muestras para PCR
- ③ Realización del PCR
- ④ Análisis de los amplificados en gel de agarosa
- ⑤ Análisis de los resultados en seminario N°10 (Genética de Poblaciones).

¿Qué es el PCR?

- Es una técnica que permite la amplificación de una región específica del genoma varios millones de veces
- Se realiza simplemente en un tubo de plástico pequeño
- Usa una DNA polimerasa termoestable, la *Taq* polimerasa de *Thermus aquaticus*
- Utiliza DNA genómico como sustrato

Etapas de la Técnica de PCR

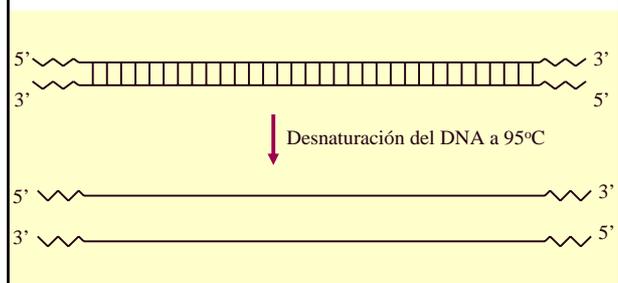
I) Composición de la mezcla de reacción (MR)

- Un DNA molde (el DNA que usted quiere amplificar en este estudio)
- Partidores de secuencia específica que flanqueen la región blanco (la repetición *Alu* en este caso)
 - ➔ directo
 - ➜ inverso
- Desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- $MgCl_2$ (cofactor de la enzima)
- Buffer de la enzima
- *Taq* DNA polimerasa

II) Pasos de un ciclo de PCR

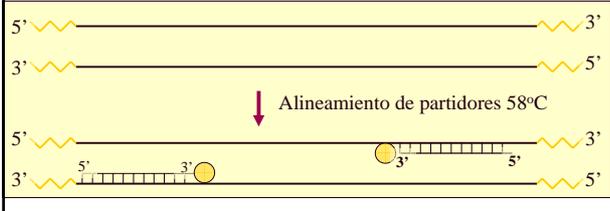
- Calentamiento de la MR (**95°C**) para separar las hebras de DNA
- Enfriamiento (**58°C**) para unir los partidores al molde
- Calentamiento (**72°C**) para activar la *Taq* DNA polimerasa, la cual extiende los partidores y replica el DNA
- Este proceso se repite múltiples veces (35)

IIa) Denaturación del DNA molde



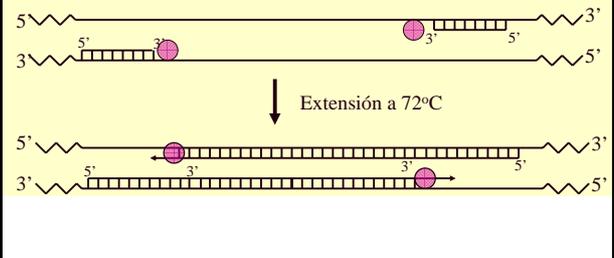
Iib) Unión de los partidores

- Los partidores se unen al DNA molde en regiones específicas por complementariedad de bases
- La *Taq* DNA polimerasa reconoce los sectores de DNA de doble hebra

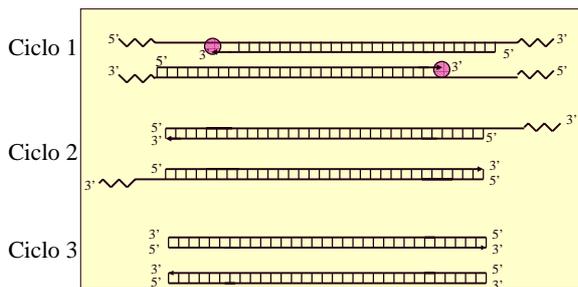


Iic) La *Taq* polimerasa extiende los partidores

- La *Taq* polimerasa extiende los partidores desde su extremo 3'OH
- El DNA es replicado



IId) Desde el tercer ciclo se obtienen fragmentos del largo esperado



Tiempo de polimerización se relaciona con el largo del segmento (1min/Kpb)

Objetivos del Trabajo Práctico

- Conocer y aplicar la técnica de PCR.
- Valorar su utilización en:
 - a. Identificar DNA repetido disperso (SINES, LINES).
 - b. Medir directamente la diversidad genética humana a nivel molecular.
 - c. Aplicar el PCR en genética de poblaciones determinando la frecuencia alélica de polimorfismos en una población.

9/2/2008

10

Que son las repeticiones *Alu*

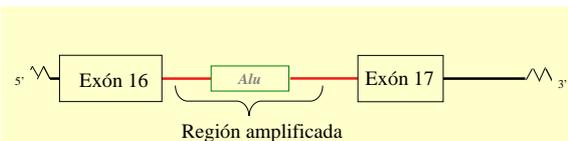
- Se clasifican como SINES (Short Interspersed Repetitive Element). Son cerca de 1.500.000 en todo el genoma.
- Se movilizan mediante un RNA intermediario (retrotransposición).
- Son más 500.000 copias *Alu* por genoma haploide, representando más del 5% de todo el genoma.
- Sólo unos pocos son dimórficos.
- Se denominan *Alu* por tener en su interior un sitio de corte para la enzima *Alu* I.

9/2/2008

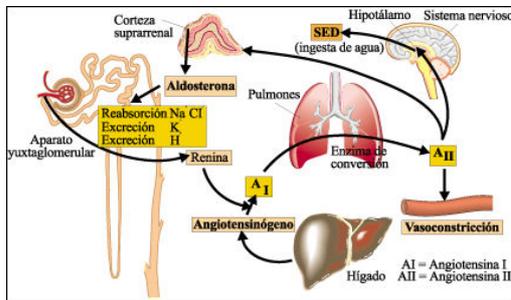
11

Detección de una inserción *Alu* en el gen ACE mediante PCR

- Se encuentra en el intrón 16 del gen ACE (enzima convertidora de angiotensina)
- Está en el cromosoma 17q23



Función del gen ACE



9/2/2008

13

¿por qué amplificamos la inserción *Alu* en el gen ACE?

- Es un miembro de la familia *Alu* de repetidos dispersos
- Es una inserción humano específica
- Es polimórfica
- Se encuentra en la región no codificante de su DNA
- **No está asociada con ningún desorden o enfermedad**

9/2/2008

14

Frecuencia de la inserción *Alu* en el gen ACE en diferentes poblaciones

Table 2. Allele Frequencies of the Angiotensin-I-Converting Enzyme Gene in Different Populations

Population	I	D	Reference	Population	I	D	Reference
Mexitlan (n = 98)	0.602 ^a	0.398 ^a	Present study	Australian (n=100)	0.455	0.545	Lester et al. 1999
Bereck (n = 64)	0.781 ^b	0.219 ^b	Present study	USA (n = 80)	0.481	0.519	Foy et al. 1996
Nahans (n = 49)	0.612 ^c	0.388 ^c	Present study	Nigerian (n = 80)	0.400	0.600	Barley et al. 1994
Yanomami (n = 49)	0.847 ^d	0.153 ^d	Barley et al. 1994	AA (n = 250)	0.390	0.610	Schmidt et al. 1993
Pima (n = 305)	0.713 ^e	0.287 ^e	Foy et al. 1996	Japanese (n = 100)	0.580	0.420	Nakai et al. 1994
Yendamma (n = 184)	0.970 ^f	0.030 ^f	Lester et al. 1999	Taiwanese (n = 197)	0.642	0.358	Chuang et al. 1997

Note: AA: African Americans.

a. Increased frequency (I allele) and decreased frequency (D allele) when compared to Australians and Africans (African Americans and Nigerians) ($p < 0.05$).

b. Increased frequency (I allele) and decreased frequency (D allele) when compared to Mexican Mestizos, Caucasians (Australians and USA), Africans (African Americans and Nigerians), and Asians (Japanese, Taiwanese) ($p < 0.05$).

c. Increased frequency (I allele) and decreased frequency (D allele) when compared to Africans (African Americans and Nigerians) ($p < 0.05$).

d. Increased frequency (I allele) and decreased frequency (D allele) when compared to Mexican Mestizos, Americans (Nahans and Pimas), Caucasians (Australians and USA), Africans (African Americans and Nigerians), and Asians (Japanese and Taiwanese) ($p < 0.05$).

e. Increased frequency (I allele) and decreased frequency (D allele) when compared to Mexican Mestizos, Caucasians (Australians and USA), Africans (African Americans and Nigerians), and Asians (Japanese) ($p < 0.05$).

f. Increased frequency (I allele) and decreased frequency (D allele) when compared to all populations ($p < 0.05$).

9/2/2008

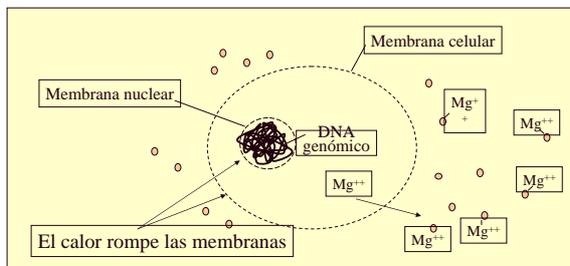
15

Metodología

I) Extracción de DNA genómico

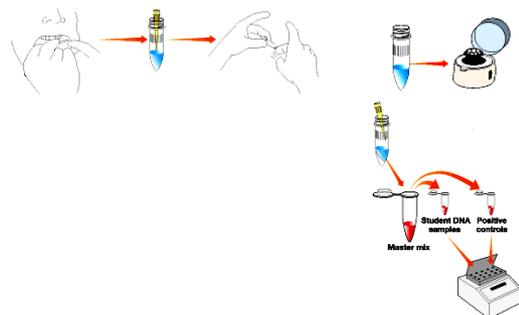
- 1 Se utiliza Chelex® una resina de intercambio catiónico que une Mg^{+2} y otros iones bivalentes
- 2 Incubación a 56°C rompe el tejido conectivo e inactiva las DNAsas
- 3 Incubación a 100°C rompe las membranas celulares y desnatura las proteínas

Extracción de DNA genómico



Chelex une el Mg^{+2} y los iones bivalentes que se liberan al romper las células y que inhiben la reacción de PCR

Procedimiento para la obtención de una muestra de células y extracción de DNA genómico



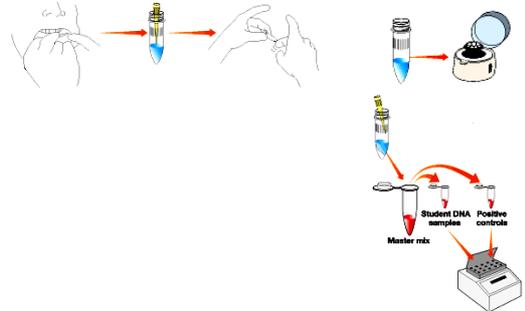
Centrifugación y obtención del DNA (sobrenadante)



9/2/2008

19

Procedimiento para la obtención de una muestra de células y extracción de DNA genómico



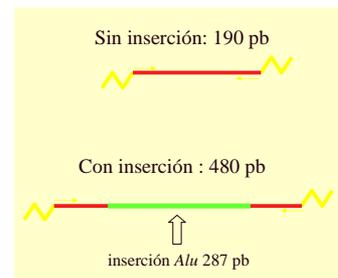
Protocolo para la MR del PCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Master Mix <i>Alu</i>	15µl									
Control +/+	3µl	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Control +/-	--	3µl	--	--	--	--	--	--	--	--
Control -/-	--	--	3µl	--	--	--	--	--	--	--
Alumno 1	--	--	--	3µl	--	--	--	--	--	--
Alumno 2	--	--	--	--	3µl	--	--	--	--	--
Alumno 3	--	--	--	--	--	3µl	--	--	--	--
Alumno 4	--	--	--	--	--	--	3µl	--	--	--
Alumno 5	--	--	--	--	--	--	--	3µl	--	--
Alumno 6	--	--	--	--	--	--	--	--	3µl	--
H ₂ O destilada	7µl	10µl								

Resultados esperados del PCR de *Alu*

La inserción *Alu* ACE es dimórfica por lo tanto hay dos posibles productos de PCR:

Con inserción: 480 pb
Sin inserción: 190 pb



Tamaño inserción *Alu*: 287 pb.

Identificación y análisis de los amplificados en gel de agarosa

