

Revisió de les tècniques de genètica molecular més habituals en el laboratori clínic

O. Díez Gibert
Servei de Genètica
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Barcelona

En l'estudi del DNA s'utilitzen elements indispensables (enzims de restricció, sondes genètiques, etc.) i el fenomen de la hibridació, és a dir, l'aparellament de seqüències de nucleòtids complementàries entre elles mateixes.

Els enzims de restricció són endonucleases que tallen la doble cadena de DNA en els punts en els que existeix una seqüència de nucleòtids (diana de restricció), específica per a cada enzim i que aquest reconeix. Les sondes són fragments de DNA que s'aparellen amb el DNA d'interès en seqüències corresponents a un gen conegut o en zones del genoma de funció desconeguda, però que es troba a prop o adjacent a un gen d'interès. El marcatge previ, radioactiu o no, és útil per a la localització d'aquestes seqüències. Les dues cadenes de DNA poden dissociar-se (desnaturalització) per escalfament i reassociar-se *in vitro* per refredament. També poden formar-se híbrids DNA-RNA. El procés de reassociació (hibridació) és altament específic i en condicions adequades té lloc només entre cadenes, les bases de les quals són complementàries. Les sondes s'uneixen als fragments complementaris del DNA en estudi gràcies al procés d'hibridació.

La tècnica de transferència Southern permet la visualització de fragments del genoma. Consisteix en tallar el DNA amb un enzim de restricció, separar per electroforesi els fragments generats, transferir aquests a un suport sòlid (generalment una membrana de niló) i, posteriorment, hibridar amb una sonda marcada (amb ^{32}P , digoxigenina, o altres). El senyal obtingut identifica el fragment de DNA d'interès, que s'haurà desplaçat d'acord a la seva grandària. Qualsevol variació implica algun canvi en la seqüència (un nombre anormal de dianes de restricció) o l'absència de seqüències específiques en el DNA en estudi.

Una tècnica bàsica en el diagnòstic molecular és la reacció en cadena per la polimerasa o PCR (sigles de *polymerase chain reaction*). La tècnica de la PCR és un mètode capaç de produir *in vitro* un gran nombre de còpies d'un determinat fragment de DNA, del qual solem conèixer al menys els dos extrems, i facilitar d'aquesta forma les manipulacions posteriors. Per això s'usen, bàsicament dos encebadors (fragments oligonucleotídics, cada un complementari d'un dels extrems del fragment de DNA a amplificar) i una DNA polimerasa, capaç d'afegir a cada encebador nous nucleòtids, ja disposats en excés en la solució. Es realitzen de forma automàtica cicles repetits curts d'augment i disminució de la temperatura. El calor causa la desnaturalització de la doble cadena de DNA, mentre que la seva disminució porta a la hibridació

dels encebadors a les seqüències complementàries del DNA d'interès ja desnaturalitzat. Els encebadors s'hibriden orientats de manera que l'addició de nous nucleòtids té lloc al llarg de la regió de DNA flanquejada pels encebadors, duplicant-se així, la quantitat de la seqüència original de DNA. El DNA sintetitzat és també complementari i capaç d'unir-se de nou als encebadors. Per aquesta raó, en cada cicle de desnaturalització-hibridació-síntesi es duplica la quantitat de DNA present en el cicle anterior. Mitjançant uns 30 cicles s'aconsegueix un nombre extraordinàriament alt de còpies d'un mateix fragment de DNA, amb la possibilitat de l'anàlisi posterior de la seva seqüència, per a la identificació de mutacions o altres variants.

La tècnica d'examen dels polimorfismes de conformació de cadena senzilla és una de les més usuals. Consisteix en l'examen de la mobilitat electroforètica en gels de poliacrilamida de fragments de DNA prèviament amplificats mitjançant PCR. En cada electroforesi es compara un mateix fragment de DNA de diferents pacients. Una mobilitat diferent de qualsevol mostra respecte a les altres suggereix l'existència de canvis en la seqüència de nucleòtids del fragment corresponent i s'haurà d'analitzar per mitjà de la seqüenciació. Poden realitzar-se a més electroforesis en gels amb un gradient desnaturalitzant, ja sigui químic o tèrmic. La mostra, DNA de doble cadena, migra trobant-se amb un factor desnaturalitzant de forma creixent, fins un punt en el que les dues cadenes comencen a separar-se i s'endarrereix el seu avenç. Per tant, els canvis que pot presentar una mostra en la seva seqüència modifiquen el punt de la seva desnaturalització i la seva mobilitat respecte les altres.

S'han dissenyat nombroses variacions i adaptacions d'aquestes tècniques electroforètiques, capaces de la identificació de fragments amb canvis en la seva seqüència. En tots els casos, les mostres que presenten un patró anòmal s'han de seqüenciar posteriorment per a caracteritzar de forma definitiva el tipus de canvi en la seqüència.

Una altra de les tècniques utilitzades per a la detecció de mutacions és l'estudi de la proteïna truncada. Consisteix en l'amplificació mitjançant PCR de fragments grans de DNA, corresponents al gen en estudi, per mitjà d'encebadors dissenyats adequadament. Posteriorment, es realitza una incubació *in vitro* amb aminoàcids, un d'ells marcat, i lisats cel·lulars, obtinguts comercialment. En aquest pas es produeix la transcripció a RNA i la traducció final a proteïna, corresponent al fragment de DNA inicial. Finalment, es realitza una electroforesi de proteïnes marcades i s'examina la seva mobilitat. Si en el fragment de DNA inicial existeix una mutació causant d'una interrupció de la traducció, la proteïna sintetitzada és de menor longitud i migra més ràpidament en el gel. Aquesta tècnica, no obstant, no és útil per a detectar mutacions que comportin el canvi d'un aminoàcid per un altre, ja que en aquest cas la proteïna és anormal, però d'igual longitud.

Per a l'estudi del RNA s'efectua la transferència Northern (anàloga a la transferència Southern), en la que les diferents cadenes de RNA d'un grup cel·lular o teixit es separen en una electroforesi, se transfereixen a una membrana i s'hibriden amb la sonda corresponent. Si es desitja amplificar un fragment específic de RNA, aquest pot usar-se com a motlle per a la síntesi de

la cadena còpia (cDNA), per mitjà d'una transcriptasa inversa. El cDNA obtingut pot amplificar-se posteriorment amb la PCR. Aquesta tècnica, anomenada RT-PCR (sigles de *reverse transcriptase-PCR*), ha estat àmpliament utilitzada tant per a la detecció de mutacions com per estudiar l'expressió de certs gens.

Citació recomanada per a aquest document:

Díez Gibert O. Revisió de les tècniques de genètica molecular més habituals en el laboratori clínic. *In vitro veritas* 2001;2, art. 9:<<http://www.acclc.cat>>