

Aplicación de la PCR al diagnóstico genético: detección de parásitos que infectan a moluscos

Objetivo

En esta práctica se pretende comprobar la eficacia de la PCR en el diagnóstico genético de enfermedades e infecciones parasitarias en moluscos bivalvos. Se utiliza la especificidad de los *primers* para amplificar una región concreta del genoma del parásito cuando se encuentra presente en una muestra.

Fundamento teórico

La PCR es una técnica que permite la amplificación (multiplicación) específica de ADN *in vitro*. Para llevarla a cabo se necesita un ADN molde, un par de cebadores o *primers* que marcan los puntos del inicio de síntesis de la cadena 3' y 5' del ADN a amplificar, una cantidad suficiente de desoxiribonucleótidos tri-fosfato (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), una ADN polimerasa, su tampón, y las condiciones para una eficiente reacción. La reacción es cíclica y, tras una etapa inicial de desnaturalización del ADN molde (de 2 a 5 minutos), consta generalmente de unos 25 a 35 ciclos. Cada uno de los ciclos está compuesto por una etapa de **desnaturalización** (unos 30-60 segundos), una de **alineamiento** de los cebadores al ADN molde (unos 30-60 segundos), y una de **extensión** (o polimerización, cuyo tiempo depende del tamaño del ADN a amplificar y de la polimerasa usada, y, por lo general, una aproximación es de un minuto por kilobase de ADN a amplificar). Tras los ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión, la reacción termina con una etapa de extensión final que suele ser de cinco minutos.

Aunque la PCR puede detectar desde una única molécula de ADN, para su buen funcionamiento el ADN molde debe ser de buena calidad (no degradado) y libre de inhibidores de actividad enzimática. Por su parte, la región de ADN a amplificar (amplicón) debe tener un tamaño no superior a las 3 ó 4 kilobases y, preferiblemente, sin estructuras secundarias (éstas bloquean la progresión de la ADN polimerasa durante la síntesis). Por su parte, los cebadores son la cadena inversa y complementaria a la secuencia de inicio de síntesis de cada una de las dos hebras del ADN a amplificar. Deben ser específicos, de forma que se alineen exclusivamente con la región complementaria en el fragmento de ADN que se desea amplificar y no se unan a ninguna otra secuencia de ADN cercana. Suelen ser de un tamaño entre 15 y 35 nucleótidos (cuantos más nucleótidos, más especificidad). Los cebadores deben tener una composición equilibrada de CGs (bases Citosina y Guanina) y ATs (bases Adenina y Timina) y, sobre todo, no deben tener estructuras secundarias ni complementariedad interna o con el otro cebador (de lo contrario se plegarían sobre sí o se alinearían entre sí formando dímeros).

La desnaturalización del ADN se consigue mediante su incubación a 94°C. Posteriormente, el alineamiento de los cebadores se consigue bajando la temperatura hasta un nivel (T_m = *Temperature of melting*) que permite a éstos unirse específicamente a su secuencia inversa y complementaria. Dicha temperatura (T_m) debe ser aproximadamente similar para los dos cebadores (no más de 5°C de diferencia) y depende tanto de la composición como del tamaño del cebador. Hay una variedad de algoritmos que permiten calcular la T_m ; una fórmula básica para estimarla es: $4 \times GC + 2 \times AT$, donde GC es el número de Gs y Cs en el cebador y AT el de As y Ts. Dichos algoritmos también permiten chequear el potencial de formación de estructuras secundarias o de complementariedad tanto interna como entre cebadores.

En principio cualquier ADN polimerasa puede servir para sintetizar ADN *in vitro*. Sin embargo, la PCR requiere altas temperaturas para la desnaturalización del ADN molde (94°C) y para el alineamiento de los cebadores (40-65°C o más dependiendo de los cebadores). Por eso, la PCR requiere ADN polimerasas termoestables, las cuales se consiguen a partir de microorganismos que viven en lugares con altas temperaturas y cuyas polimerasas están adaptadas a esta situación. La ADN polimerasa comúnmente utilizada para PCR es la polimerasa Taq, obtenida a partir de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, la cual tiene una temperatura óptima de polimerización del ADN de 72°C, temperatura similar a la de donde vive este microorganismo. La fase de extensión con la Taq polimerasa se hace, por tanto, a 72°C (otras ADN polimerasas tendrán otras temperaturas óptimas de síntesis de ADN).

Como cualquier reacción bioquímica, la PCR necesita una solución tampón que es una mezcla de sales y reactivos (entre los cuales destaca el cloruro de magnesio). Las repeticiones cíclicas de diferentes temperaturas a lo largo de la reacción de PCR se consiguen mediante el uso de **termocicladores**. Estos son aparatos capaces de conseguir temperaturas precisas, mantenerlas durante un tiempo determinado y cambiar entre temperaturas de forma homogénea y rápida.

Así, la PCR consiste en la desnaturalización que abre la doble cadena del ADN molde, el alineamiento que permite el anclaje de los cebadores a sus correspondientes secuencias inversas y complementarias, y la extensión que permite la síntesis de ADN partiendo desde el último nucleótido 3' del cebador anclado a su correspondiente hebra de ADN molde. Un ciclo resulta en la duplicación del número de moléculas correspondientes al ADN a amplificar, tras el segundo ciclo habrá cuatro veces ese número, tras el tercer ciclo habrá ocho veces ese número de moléculas, etc. Al final habrá una cantidad teórica de $2^n \times C$ moléculas de ADN amplificado donde n es el número de ciclos de PCR y C la cantidad de moléculas molde iniciales. Se recomienda no superar los 35 ciclos de PCR ya que, por un lado, la ADN polimerasa tiene una tasa de error de síntesis (cerca de uno por cada millón de nucleótidos incorporados) y, por otro lado, el agotamiento diferencial de productos en la reacción puede resultar en más errores (por ejemplo si se agotan los dATPs, puede que la Taq inserte un dTTP en una posición correspondiente a un dATP).

Una vez finalizada la reacción de PCR se visualizan los productos de la reacción mediante la técnica de electroforesis en gel agarosa. Al cargar el producto de la PCR en el gel agarosa y someter este último en un campo eléctrico directo, se aprovecha la carga eléctrica negativa del ADN para hacerlo migrar diferencialmente desde el polo negativo al polo positivo del campo eléctrico directo (de polos positivo y negativo estables). La porosidad del gel de agarosa hará que, a medida que migren desde el polo negativo hacia el polo positivo, las moléculas de ADN se separen en base a su tamaño de forma que las moléculas más cortas migren más rápido (y por consiguiente avancen más en el gel). Para tener una referencia, se separan también las moléculas de ADN de una mezcla de fragmentos de tamaños conocidos y cantidades relativas (marcadores de peso molecular). La separación simultánea, pero por separado (en diferentes pocillos), de los productos de la PCR y del marcador de peso molecular en el mismo gel permite al investigador determinar los tamaños moleculares de los productos de la PCR que deben coincidir con los esperados.

La presencia de *Perkinsus spp.* es conocida prácticamente en todas las aguas cálidas del mundo y ha sido históricamente asociada a mortalidades masivas de moluscos bivalvos. La presencia de *Perkinsus olseni* en las almejas del litoral europeo se conoce desde 1987. Este parásito se ha detectado por ejemplo en la almeja fina (*Ruditapes decussatus*), en la almeja japonesa (*R. philippinarum*), en la madreameja (*Venerupis pullastra*), en el pirulo (*V. aurea*) y en la almeja rubia (*V. rhomboides*). *Perkinsus olseni* puede considerarse en la actualidad el principal problema patológico para el desarrollo del cultivo de almejas en el litoral europeo. Antes, su diagnóstico precisaba de técnicas que requieran de tres a cinco días, y cuyo desarrollo y eficacia oscilaba entre el 60-90%. La puesta en marcha de nuevas técnicas más sensibles y rápidas constituye un avance muy importante en el control, ordenación y protección de las poblaciones y cultivos de moluscos bivalvos. Desde su implantación, la aplicación de la técnica de amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha revolucionado el diagnóstico de enfermedades infecciosas en Acuicultura. La sensibilidad y la rapidez son las cualidades más notables de estas técnicas.

En esta práctica se pretende determinar la presencia de parásitos en distintas muestras de moluscos bivalvos mediante la amplificación por PCR de un fragmento de ADN cuya secuencia es específica del parásito. Se trata de un fragmento del espaciador intergénico de los genes ribosómicos (Figura 1). Los genes que codifican para tres de los cuatro ARNs que forman parte del ribosoma (ARN ribosómicos 18S, 5.8S y 28S) se disponen formando una unidad de transcripción compuesta por la secuencia ETS (espaciador externo que se transcribe por delante del gen 18S), el gen 18S, ITS-1 (espaciador interno entre el gen 18S y el 5.8S), el gen 5.8S, ITS-2 (espaciador interno entre el gen 5.8S y el 28S), 28S y otro ETS (espaciador externo que se transcribe por detrás del gen 28S). En un locus ribosómico, varios cientos de estas unidades de transcripción se repiten en tándem separados por una secuencia NTS (espaciador no transcrito). Juntos, el NTS y los ETSs constituyen el llamado IGS (espaciador intergénico). Los genes ribosómicos se caracterizan por su elevado grado de conservación. No es el caso de los espaciadores

entre estos genes, que al no codificar ningún producto génico, no están sujetos a presión selectiva, y por tanto, su secuencia es muy variable entre especies. Esto hace que el fragmento de ADN que nosotros vamos a amplificar (un fragmento de 800 pb del NTS de *P. olsenii*) tenga una secuencia específica del parásito.

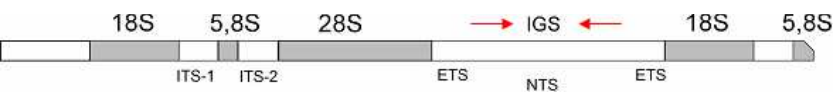


Figura 1. Organización de los genes ribosómicos en los genomas eucarióticos. Las flechas indican el lugar de anclaje de los cebadores específicos.

Metodología

Reacción de Amplificación (PCR)

En un microtubo de 200µl añadir, siguiendo el orden indicado, los siguientes reactivos para un volumen final de 25µl:

- Agua estéril 16 µl
- 10% Tampón de PCR 10x 2.5 µl
- 2mM de cada dNTPs 1 µl
- Primer PkI (0.2 µM) 2 µl
- Primer PkII (0.2 µM) 2 µl
- ADN de almeja 1 µl
- Taq polimerasa (2U) 0,5 µl

A continuación se colocan los microtubos en el termociclador y se programa para 35 ciclos según el programa:

Desnaturalización:	94°C	30 seg.
Alineamiento:	58°C	30 seg.
Extensión:	72°C	30 seg.

Se analizarán muestras de ADN procedentes de distintas almejas para determinar si están infectadas o no por el parásito. Una vez terminada la PCR, se someterán las muestras a una electroforesis en gel de agarosa y se procederá al diagnóstico de los individuos.

Preparación del gel de agarosa

En un matraz de 250 ml de capacidad, añadir 40 ml de tampón TAE (0.04 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA) y 0,4 g de agarosa.

Calentar utilizando el microondas hasta que se funda la agarosa.

Dejar enfriar hasta aproximadamente 50°C y añadir 4 µl de solución decolorante para ADN SYBR® Safe (10.000x).

Mientras se enfría la agarosa, sellar con cinta adhesiva el molde en el que se preparará el gel. Colocar el molde en una superficie horizontal y situar el peine que labrará los pocillos a unos centímetros del borde.

Una vez se ha enfriado la agarosa, se añade la solución al molde con cuidado de retirar las burbujas que se formen. Dejar gelificar la agarosa hasta que adquiera una apariencia translúcida.

Retirar el peine y la cinta adhesiva. Colocar el gel en la cubeta de electroforesis y cubrirlo con tampón de electroforesis (TAE 1x o TBE 0.5x).

Electroforesis

Con cuidado de no romper los pocillos, cargar en el gel las diferentes muestras correspondientes a cada una de las reacciones de amplificación. Para ello, añadir 4 µl de tampón de carga a los tubos en los que se desarrolló la PCR y, una vez mezclado con el ADN, con la ayuda de una micropipeta, cargar la mezcla en un pocillo del gel (una muestra por pocillo). Cargar en otro pocillo 4 µl de la mezcla ya preparada de marcador de peso molecular, que nos servirá de referencia para determinar el tamaño de los fragmentos que queremos caracterizar.

Conectar la fuente de alimentación al gel durante 30 minutos a 50 volts/cm.

Analizar los resultados mediante la observación en un transiluminador.

Diagnóstico de los individuos

En aquellos individuos donde observemos una amplificación correspondiente a 554 pb estará presente el parásito, y por tanto, los podremos diagnosticar como positivos para esta enfermedad.

Se espera un resultado como el de la figura:

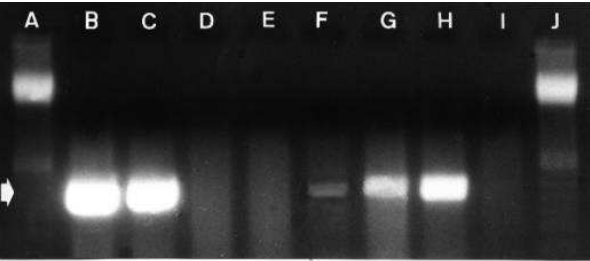


Figura 2. Se muestra el resultado del test de diagnóstico para *Perkinsus*. Se muestra un gel de electroforesis en el que se cargaron diferentes muestras con el contenido de la reacción de amplificación: A y J. Marcadores de ADN para determinación del tamaño del fragmento amplificado. B. Amplificación de producto a partir de una muestra utilizada como control positivo (ADN de *Perkinsus*). C. Amplificación de producto a partir de una muestra utilizada como control negativo (ADN clonado a partir del que se diseñaron los oligonucleótidos). D-E. Ausencia de amplificación del producto en muestras de tejidos de almejas procedentes de cultivos no infectados. F-H. Amplificación del producto en muestras de tejidos de almejas procedentes de cultivos infectados. I. Ausencia de amplificación del producto en muestras carentes de material biológico (prueba de control negativo). En esta Figura, la flecha señala los fragmentos amplificados de ADN (550 pb). Se demuestra la eficacia del método de diagnóstico para *Perkinsus olsenii* en cultivos de almejas dado que los oligonucleótidos de que disponemos detectan la presencia del parásito en almejas infectadas y no ocasiona problemas de falsos positivos puesto cultivos no infectados no mostraron amplificación. Además, se demuestra la gran sensibilidad del método, puesto que detecta la presencia del parásito en cultivos aun cuando el nivel de infección es mínimo. Así, en los productos de amplificación que se observan en las calles F a H del gel, se puede observar una gradación de menor a mayor en cuanto a la cantidad de producto amplificado, gradación que se corresponde con los niveles de infección de cada uno de los tres cultivos de donde procedían las tres muestras.

Cuestiones

1. ¿Qué criterios se debe seguir a la hora de diseñar cebadores para este tipo de análisis?
2. ¿Qué harías si observa amplificación en muestras que claramente sabemos que no están infectadas?
3. ¿Qué es lo que hace de la PCR una técnica idónea para diagnóstico?
4. ¿Podríamos descartar completamente una infección si para una muestra observamos ausencia de amplificación tras la PCR?