

## EL DNA ES POT MANIPULAR

NÚRIA CASALS I JOSEP CLOTET

*Àrea de Biologia Molecular i Cel·lular, Facultat de Ciències de la Salut,  
Universitat Internacional de Catalunya.*

Adreça per a la correspondència: Josep Clotet. Àrea de Biologia Molecular i Cel·lular,  
Facultat de Ciències de la Salut, Universitat Internacional de Catalunya. Josep Trueta, s/n.  
08195 Sant Cugat del Vallès. Adreça electrònica: [jclotet@csc.uic.es](mailto:jclotet@csc.uic.es).

### RESUM

Per comprendre les possibilitats que ofereix l'enginyeria genètica, es necessita primer conèixer les eines que permeten la manipulació dels àcids nucleics. En la primera part d'aquest capítol es farà un repàs d'algunes d'aquestes eines: els plasmidis, petites molècules de DNA que podem trobar en determinats organismes unicel·lulars; els enzims de restricció, proteïnes típicament bacterianes que fragmenten el DNA per punts concrets; la DNA-ligasa, proteïna vírica amb la capacitat d'unir-los de nou; l'electroforesi en gels d'agrosa, que pot separar per mides diferents fragments de DNA, i, per acabar, la PCR, que ens permet amplificar qualsevol DNA de seqüència coneguda. En la segona part es presenten alguns exemples de les aplicacions que poden tenir aquestes tècniques.

**Paraules clau:** clonatge, enginyeria genètica, PCR.

### DNA CAN BE MANIPULATED

### SUMMARY

To better understand the possibilities that come from genetic engineering, it is useful to know the main tools for the nucleic acid manipulation. In the first part of this chapter it will be done a revision of some of this tools: the plasmids, a little pieces of DNA of some microorganisms; the restriction enzymes, a typical bacterial protein with the capability to fragment DNA molecules in appropriate points; the DNA ligase from T4 phagus, a protein with the ability to regenerate joints between two DNA fragments; the electrophoreses, that allows to see the DNA and to separate by size; and lastly the PCR that could amplify any DNA of known sequence. In the second part of this chapter it will be presented some examples of real applications of these techniques.

**Key words:** cloning, genetic engineering, PCR.

## INTRODUCCIÓ

Per poder estudiar l'estructura i la funció d'un gen calen grans quantitats del gen individual en forma pura. Diverses tècniques, sovint anomenades *tecnologia del DNA recombinant*, s'utilitzen per al clonatge del DNA per obtenir un gran nombre de molècules de DNA idèntiques. La clau per clonar un fragment de DNA és enganxar-lo a un vector que ens el pugui mantenir estable dins d'una cèl·lula hoste i permetre que es repliqui en grans quantitats.

El desenvolupament d'aquesta tecnologia va començar als anys setanta, i un dels primers investigadors que va aconseguir clonar un fragment de DNA va ser el bioquímic de Stanford Paul Berg. El 1972 va tallar amb enzims de restricció el DNA circular del virus SV40 present en micos i li va introduir DNA del virus del fag lambda, de manera que va obtenir una molècula híbrida tancada covalentment (Jackson *et al.*, 1972). Des d'aquests experiments inicials fins avui dia hi ha hagut un llarg recorregut de gairebé quaranta anys en els quals la tecnologia del DNA recombinant ha manifestat un creixement espectacular.

En aquest capítol volem presentar de manera entenedora quines són les principals eines per manipular el DNA, tot seguint el fil argumental proposat en la presentació de diapositives que podeu trobar en el CD. Per tant, resulta aconsellable llegir-lo tenint al davant les imatges de la presentació digital.

## TÈCNiques I EINES BÀSIQUES PER A LA MANIPULACIÓ DEL DNA

### **Els plasmidis: els bacteris saben lluitar contra els fongs**

Els bacteris poden viure en molts ambients diferents gràcies a la seva extraordinària capacitat d'adaptació. A més, han de competir amb altres organismes per poder assegurar la seva presència en un hàbitat determinat. Probablement, una de les primeres guerres aparegudes al planeta va ser l'establerta entre fongs i bacteris. Els fongs són capaços de sintetitzar uns compostos especials que tenen propietats bactericides o bacteriostàtiques, anomenats *antibiòtics*, que impedeixen que els bacteris puguin reproduir-se en un determinat ambient. L'exemple més conegut d'aquestes substàncies és la penicil·lina, descoberta per Fleming el 1928 (Fleming, 1953, 1955); aquest antibiòtic altera l'estructura de la paret bacteriana dificultant capacitats i processos diversos d'alguns procariotes. També, els bacteris han sabut defensar-se mitjançant la síntesi de contramolècules que bloquen o inhibeixen els antibiòtics, de manera que permeten la seva supervivència en un hàbitat poblat de fongs. En aquest cas, l'exemple més conegut de defenses bacterianes són les  $\beta$ -lactamases, enzims que tenen la propietat de destruir la penicil·lina, concretament l'estructura de l'anell  $\beta$ -lactàmic. En aquesta guerra, guanyarà el qui secreti més quantitat del seu producte químic, però no sol haver-hi guanyadors absoluts: apareixen equilibris més o menys estables que permeten la coexistència de les dues espècies en el mateix lloc.

El genoma bacterià està format per un cromosoma principal i uns cromosomes accessoris: els plasmidis, petites molècules de DNA circular que es troben a l'interior dels bacteris i d'alguns eucariotes unicel·lulars.

Els plasmidis són uns elements clau a l'hora d'entendre la capacitat d'adaptació bacteriana a determinats ambients, ja que transporten, entre d'altres, gens de resistència a diferents competidors. Tenen les característiques següents:

- Són molècules de DNA circular de mida petita (dos mil a cinc mil parells de bases).

- Tenen un origen de replicació propi que els permet replicar-se diverses vegades al llarg del cicle cel·lular. D'aquesta manera, en un sol bacteri es poden trobar, juntament amb el seu cromosoma principal, diverses còpies d'un plasmidi.

- Tenen gens que confereixen resistència davant determinats antibiòtics produïts per fongs. Tots els bacteris són sensibles a aquest tipus de productes, però els que posseeixen un plasmidi es tornen resistents i poden créixer, per exemple, en un medi que contingui penicil·lina.

- Els bacteris es poden transmetre els plasmidis d'uns a altres.

A causa de totes aquestes propietats, es va considerar que els plasmidis podrien ser utilitzats com a vectors, és a dir, com a transportadors dels gens que volem manipular.

### **El DNA es pot extreure i reintroduir en els bacteris**

Per manipular el DNA és necessari, en primer lloc, saber-lo purificar, és a dir, extreure'l de les cèl·lules en les quals es troba tancat i separar-lo de la resta de components cel·lulars. Actualment existeixen nombrosos mètodes per extreure el DNA de qualsevol tipus cel·lular: bacteris, cèl·lules de fetge, cèl·lules vegetals, etc., tant si es tracta de DNA plasmídic com de DNA genòmic. Pot semblar un procés complex, però l'extracció de DNA plasmídic bacterià és un dels protocols més rutinaris en els laboratoris de bi-

ologia molecular (Sambrook *et al.*, 2003). Es necessita disposar d'un cert nombre de bacteris en cultiu i trencar les seves membranes (amb NaOH) per alliberar el contingut cel·lular. A la barreja resultant s'afegeixen sals per desnaturalitzar les proteïnes i provocar-ne la precipitació. Al final d'aquest procés, s'obté un tub amb DNA bastant pur i dissolt en aigua.

Una de les característiques dels plasmidis és que de manera natural poden passar d'un bacteri a un altre. Això significa que un cop purificats pels investigadors poden ser introduïts de nou als bacteris. El procés de introducció d'un DNA plasmídic a l'interior de cèl·lules bacterianes s'anomena *transformació*. Les soques d'*Escherichia coli* utilitzades normalment en els laboratoris no solen ser capaces de realitzar una transformació espontània; és per això que necessiten ser tractades amb CaCl<sub>2</sub> (clorur càlcic) fred per tornar-se competents. Després del tractament, les cèl·lules es barregen en un mateix tub amb el plasmidi purificat. Després de mitja hora, algunes cèl·lules hauran introduït el plasmidi en el seu interior, i altres no. A continuació s'aboca la barreja en una placa de cultiu que contingui un medi apte per al creixement dels bacteris juntament amb un antibiòtic, (l'antibiòtic més utilitzat és l'ampicil·lina, un derivat de la penicil·lina). Les cèl·lules que tinguin el plasmidi seran resistents a l'antibiòtic i es reproduiran formant petites agrupacions de cèl·lules, anomenades *colònies*, mentre que les que no tinguin plasmidis moriran sense deixar descendents.

### **Els enzims de restricció: els bacteris saben lluitar contra els fags**

Existeixen uns virus, anomenats *bacteriòfags*, que introdueixen el seu material genètic dins els bacteris, es reproduïxen en el seu interior i quan surten sovint destru-

eixen les membranes cel·lulars, alhora que provoquen la mort bacteriana. Els bacteris han desenvolupat diferents mecanismes de defensa davant aquestes amenaces, un dels quals són els *enzims de restricció*. Es tracta de proteïnes bacterianes capaces de tallar el DNA en múltiples trossos. Els talls realitzats no són a l'atzar, sinó en unes seqüències específiques reconegudes per l'enzim: les anomenades *dianes de restricció*. Aquestes seqüències solen ser palindròmiques, és a dir, que les dues cadenes diuen el mateix quan es llegeixen  $5' \rightarrow 3'$  o  $3' \rightarrow 5'$ , podríem dir-ne *cap-i-cues*. Un exemple de seqüència palindròmica és la següent: ATGCAT. Un altre exemple més intuïtiu per als alumnes de secundària podria ser el següent: *A Cornellà, Tània i Aina tallen roca*.

Una altra característica dels enzims de restricció és el tipus de tall que realitzen. Poden tallar netament les dues cadenes de DNA, i donen lloc en aquest cas a extrems roms o llisos. També poden realitzar un tall escalonat que produeix extrems complementaris, és a dir, que poden unir-se de nou.

Existeixen molts tipus d'enzims de restricció: cada un reconeix una diana concreta, realitza un tipus de tall determinat i els seus noms provenen de l'espècie bacteriana de la qual s'han extret. Avui dia els enzims de restricció són purificats i comercialitzats per moltes empreses de biologia molecular.

Aquesta estratègia de supervivència bacteriana va ser també aprofitada pels investigadors per generar la segona gran eina de les tècniques de DNA recombinant. Efectivament, els enzims de restricció, anomenats descriptivament les «tissors moleculars», s'han utilitzat des de fa temps per tallar qualsevol fragment de DNA de qualsevol espècie coneguda (Roberts, 1980). Actualment són purificats a gran escala i estan disponibles comercialment.

## **Els fags saben defensar-se: les guerres biològiques**

Cada bacteri posseeix un enzim de restricció que reconeix una seqüència concreta de DNA i d'aquesta manera es poden defensar de les infeccions per part dels bacteriòfags. En aquesta guerra per la supervivència els bacteriòfags no es varen quedar amb els braços creuats i varen dissenyar una proteïna per al contraatac: l'anomenada *ligasa T4*. Així, el bacteriòfag T4, quan vol infectar un bacteri introdueix, juntament amb el seu DNA, unes quantes molècules de DNA-ligasa, de manera que els talls realitzats pels enzims de restricció bacterians puguin ser un altre cop enganxats per aquest enzim. La batalla la guanyarà aquell enzim que sigui capaç de treballar més ràpid.

La ligasa del fag T4 és una altra de les eines bàsiques en els laboratoris de biologia molecular des dels inicis dels anys setanta (Mosig, 1970). Si els enzims de restricció poden considerar-se les tissors moleculars que permeten tallar el DNA per punts concrets, la ligasa és la cola que els torna a unir. Cal destacar que la DNA-ligasa uneix qualsevol tipus d'extrems roms entre si, però solament és capaç d'enganxar extrems complementaris que hagin estat tallats amb el mateix enzim de restricció. Mentre tinguin extrems compatibles, aquest enzim pot unir fragments de DNA de diferents procedències, i fins i tot d'espècies diferents.

Actualment aquest enzim també pot ser purificat a escala industrial i és comercialitzat.

## **El DNA es pot multiplicar tant com es vulgui: la PCR**

En el laboratori, la síntesi artificial del DNA es realitza a través d'una sèrie de reaccions químiques complexes. És un procés molt costós, que permet la fabricació de

petits oligonucleòtids de doble cadena de, com a molt, 70-80 parells de bases, d'una seqüència definida.

L'any 1981, el grup d'Itakura va automatitzar el procés mitjançant el desenvolupament d'un aparell que sintetitzava la seqüència introduïda a l'ordinador. Aquest fet va fer pensar que molt aviat es podrien dissenyar éssers vius nous, gràcies a la possibilitat de la síntesi de DNA. Però tots els aparells de síntesi química d'oligonucleòtids d'avui dia encara són incapaços de sintetitzar cadenes més llargues de vuitanta nucleòtids. Tenint en compte que el bacteri més senzill conegut fins al moment (*Mycoplasma genitalium*) té un genoma de 580.000 nucleòtids (que codifiquen uns cinc-cents disset gens), el somni de la síntesi química haurà d'esperar.

Una altra possibilitat radicalment diferent és intentar dur a terme, en un tub d'assaig (*in vitro*), el procés de replicació del DNA que normalment es dona a l'interior de la cèl·lula (*in vivo*). A diferència de la síntesi química, aquest procés utilitza enzims per a la fabricació d'un fragment de DNA; es tracta, per tant, d'una síntesi bioquímica. Una altra diferència és que en la síntesi biològica no es pot sintetitzar de nou una molècula, sinó solament replicar un DNA preexistent.

Per replicar *in vitro* el DNA necessitem:

- DNA-polimerasa. Igual com a l'interior celular, és la peça clau per realitzar la replicació del DNA. Aquest enzim s'obté dels bacteris i actualment existeixen preparacions comercials del mateix.

- ATP, CTP, GTP, TTP. És a dir, els quatre nucleòtids que la DNA-polimerasa anirà afegint durant la síntesi de les cadenes noves. Actualment també existeixen preparacions comercials de cadascun.

- Encebadors. La DNA-polimerasa necessita la presència d'uns petits fragments d'uns sis a quaranta nucleòtids per iniciar la síntesi d'una cadena nova. Aquests ence-

badors sí que s'obtenen mitjançant la síntesi química abans esmentada.

- DNA motlle. És el DNA que es desitja replicar, i es tracta d'una mostra de DNA purificat. La procedència d'aquesta mostra pot ser molt variada: cèl·lules vives, mortes, àdhuc cèl·lules de fa milers d'anys, sempre que mantinguin el seu material genètic en bon estat.

El tub amb el DNA purificat es col·loca en un bany a 95 °C per desnaturalitzar, és a dir, separar, la doble hèlix. A continuació es trasllada a 60 °C i es permet que els encebadors puguin unir-se a les seqüències específiques de DNA. Finalment es desplaça a un bany a 37 °C i s'afegeixen la DNA-polimerasa i els nucleòtids. Després d'un parell d'hores la DNA-polimerasa haurà format dues molècules noves de DNA.

De vegades, les coses més evidents ens passen desapercubudes per a tots excepte per als grans investigadors. Si el procés de replicació *in vitro* es repeteix diverses vegades, s'obtindran còpies múltiples del fragment desitjat. Això significa que a partir d'una sola molècula de DNA es poden obtenir milions de còpies. Aquesta idea tan simple, que va proporcionar el Premi Nobel de 1987 a Kary Mullis, es coneix amb el nom de *reacció en cadena de la DNA-polimerasa* o PCR (de l'anglès *polymerase chain reaction*) (Saiki *et al.*, 1985; Mullis i Faloona, 1987).

La tècnica de la PCR es basa a repetir diverses vegades el procés de replicació *in vitro*. És a dir, quan la DNA-polimerasa ha finalitzat la síntesi del DNA, les molècules acabades de formar es desnaturalitzen un altre cop i es torna a començar un cicle de síntesi nou. Per realitzar aquest procés, els tubs on s'ha dut a terme la PCR es col·loquen en petites estufes que varien la seva temperatura. Així, en un cicle de PCR s'assoliran tres temperatures diferents:

- Temperatura d'unió dels encebadors. Pot oscil·lar entre els 50 i els 68 °C, depenent del tipus d'encebadors utilitzats. La unió

dels encebadors és una reacció que pot durar uns trenta segons.

— Temperatura de síntesi del DNA. És la temperatura òptima de treball de la *Taq*-polimerasa, i és de 72 °C. La *Taq* col·loca uns mil parells de bases per minut; per tant, la duració d'aquesta fase dependrà de la longitud del gen a amplificar.

— Temperatura de desnaturalització del DNA. És de 95 °C i sol durar uns trenta segons. Cal tenir en compte que a aquesta temperatura les DNA-polimerases també es desnaturalitzarien i no podrien realitzar un cicle de síntesi nou. Per solucionar aquest problema, s'utilitza la DNA-polimerasa del bacteri *Thermus aquaticus*, que viu en fonts termals i presenta tots els seus enzims adaptats a les altes temperatures. Aquesta DNA-polimerasa rep el nom de *Taq*-polimerasa i la seva temperatura òptima de funcionament és de 72 °C.

Aquestes tres fases es repeteixen cíclicament unes trenta vegades. En cada cicle es duplica el DNA existent i, d'aquesta manera, cicle rere cicle, s'obté una amplificació exponencial del material genètic original.

La capacitat de síntesi *in vitro* de la *Taq*-polimerasa té un límit: no passa de set mil nucleòtids. Actualment s'han purificat DNA-polimerases d'altres bacteris que poden assolir com a màxim (i en condicions òptimes) fins a vint mil nucleòtids. Això significa que, de moment, no es pot amplificar, ni de bon tros, el genoma sencer, ni tan sols la majoria dels gens eucariotes. En canvi, sí que es poden fabricar fragments i empalmar-los, com ha succeït amb la síntesi del genoma sencer de *Mycoplasma genitalium* (Gibson *et al.*, 2008).

L'èxit de realitzar una bona PCR està en els encebadors. Si es vol amplificar un determinat gen d'un bacteri és necessari conèixer prèviament la seva seqüència de DNA per poder sintetitzar uns encebadors que s'uneixin eficientment a aquest gen i no a un altre. Si els encebadors són d'uns vint

nucleòtids, la probabilitat que es trobin a l'atzar una altra seqüència similar en tot el genoma és molt baixa i, per tant, solament s'uniran al gen per al qual han estat dissenyats.

Quan es realitza la barreja de reacció, cal anar molt amb compte durant la manipulació dels tubs, ja que és força fàcil introduir qualsevol DNA extern a l'interior del tub amb el simple contacte dels nostres dits (cèl·lules d'escatada de la pell, microgotetes de suor, bacteris, etc.). Si això succeís, a causa de la gran sensibilitat de la tècnica, podrien amplificar-se fragments de DNA contaminant, cosa que portaria a conclusions experimentals equivocades. Aquesta precaució ha de ser extrema quan es prenen mostres molt antigues, que en estar en la natura poden presentar fàcilment contaminacions degudes a la presència d'altres organismes vius.

## El DNA es pot visualitzar en una electroforesi

L'electroforesi és una tècnica que permet separar les molècules de DNA en funció de la seva grandària. Es basa en la capacitat que tenen els àcids nucleics de migrar cap a un pol elèctric travessant unes làmines més o menys gruixudes i molt poroses compostes d'una substància gelificada anomenada *agarosa*.

La solució que conté el DNA que es vol analitzar (un plasmidi purificat, un DNA amplificat per PCR, etc.) es col·loca en un pou d'un gel d'agarosa, i se li aplica un camp elèctric. Els grups fosfat del DNA tenen càrrega negativa, i per aquest motiu els fragments de DNA avançaran cap al pol positiu. Durant aquesta migració a les molècules més grans els costarà més travessar la xarxa d'agarosa del gel, mentre que les més petites ho faran més ràpidament. D'aquesta manera es produirà una separació de

les molècules en funció del pes molecular. Després d'un parell d'hores, se submergeix el gel en una solució amb un colorant fluorescent (el bromur d'etidi), que s'intercala entre les bases del DNA. Aquesta tinció farà que el DNA es pugui veure sota la llum ultravioleta com un patró de bandes més o menys complex, en funció de la quantitat i del tipus de DNA que es tracti.

## EXEMPLES I APLICACIONS DE LES TÈCNiques

Són moltes les aplicacions que té la biologia molecular en el camp de la medicina, la indústria i la recerca. En la presentació del CD en trobareu quatre, que són explicades a continuació.

### Qualsevol DNA es pot expressar en bacteris

L'expressió de determinats gens en els microorganismes té moltíssimes aplicacions. Un exemple és la fabricació de la insulina humana necessària per a totes aquelles persones diabètiques que no poden fabricar-la. O l'obtenció del factor VIII de coagulació absent en els hemofílics. També es pot expressar un gen víric en un bacteri perquè sintetitzi la corresponent proteïna vírica per a l'obtenció posterior d'una vacuna contra el virus. O simplement es poden expressar proteïnes humanes en bacteris per poder després estudiar-les des del punt de vista bioquímic.

Perquè un bacteri fabriqui una proteïna d'un gen eucariota, cal tenir en compte que els promotors i terminadors de les cèl·lules eucariotes són diferents dels de les procariotes i, d'altra banda, que la majoria de gens eucariotes posseeixen introns que els bacteris no saben eliminar. És necessari, per tant, eliminar el promotor, terminador i introns

d'un gen eucariota i, el que queda, clonar-ho en un plasmidi que tingui un promotor i un terminador bacterians.

En primer lloc s'agafen unes poques cèl·lules d'un teixit humà (fetge, múscul, etc.) en què sapiguem que s'expressa el gen que volem, i es procedeix a la purificació del seu RNA missatger. A continuació, s'utilitza un enzim capaç de transformar l'RNA a DNA: es tracta de la transcriptasa inversa, un enzim víric capaç de llegir una cadena de RNA i fer-ne una còpia de DNA. Al final del procés tenim un tub amb tots els RNA missatgers transformats en DNA, és a dir, tenim gens eucariotes sense promotors, sense terminadors i sense introns, que és just el que volíem. Ara, mitjançant una reacció de PCR, s'amplifica aquest gen.

Paral·lelament, en un tub a part, un plasmidi (purificat d'un bacteri o comprat en una casa comercial) és tractat amb enzims de restricció que donin extrems roms. Aquest plasmidi porta un promotor bacterià regulable (que s'activa quan posem un determinat compost en el medi) i un terminador també bacterià, de manera que si hi colloquem un tros de gen de qualsevol espècie (des de l'ATG fins al triplet de *stop*) aquest se'n expressarà sempre que vulguem.

Si barregem el contingut dels dos tubs obtindrem una barreja de DNA plasmídic bacterià i DNA humà que podrà formar molècules híbrides. De totes maneres, aquestes barreges no són estables. Per unir-les de manera definitiva hem d'afegir al tub la DNA-ligasa i, després de poques hores, cada un dels fragments de DNA humà estarà integrat en un plasmidi.

Un cop ja tenim la construcció feta només ens resta introduir-la a l'interior dels bacteris mitjançant la tècnica de la transformació bacteriana. Les cèl·lules que adquireixin el plasmidi seran capaces de créixer en una placa en presència d'un antibiòtic (medi selectiu). Gràcies al fet que els plasmidis es

multipliquen a l'interior de les cèl·lules i que els microorganismes es reproduïen molt ràpidament, en fer créixer una colònia de bacteris estem multiplicant un fragment de genoma tantes vegades com desitgem. Quan afegim el compost que activa el promotor, els bacteris començaran a fabricar grans quantitats d'una proteïna humana. Els processos industrials optimitaran la purificació i l'envasament d'aquesta proteïna.

### **El DNA es pot expressar en cèl·lules eucariotes**

El procés descrit anteriorment pot ser aplicat també a cèl·lules eucariotes. Existeixen plasmidis que donen resistència a aquest tipus de cèl·lules contra determinats antibiòtics i que, pel que fa a la resta, funcionen igual que els plasmidis bacterians. En general, aquests plasmidis no es poden introduir en cèl·lules d'organismes vius, sinó que normalment s'utilitzen en cultius de teixits, perquè el procediment per fer-los entrar desestructura una mica les membranes plasmàtiques i a les cèl·lules els costa recuperar-se. Un cop en el seu interior, els plasmidis es començaran a replicar de manera autònoma com si fossin un cromosoma més de la cèl·lula, i expressaran la informació del gen que haurem clonat.

### **La PCR pot ser una eina de diagnòstic en la medicina forense**

La seqüència de DNA és característica de cada persona, i per això és impossible trobar-ne una altra d'ídentic. Els fills tindran un DNA semblant al del seus pares i les diferències s'accentuaran amb els parents més llunyans. Les variacions encara seran més grans respecte a altres espècies, fins arribar als organismes més llunyans, en què les similituds es reduiran a uns pocs gens.

Aquest fet facilita l'elaboració d'arbres genealògics més precisos que els realitzats fins avui dia entre els diversos grups taxonòmics. Anteriorment, aquest tipus d'arbres genealògics es realitzava mitjançant comparacions morfològiques i bioquímiques, però les característiques genètiques dels organismes permeten emparentar de manera més fidedigna les diferents espècies.

Una de les aplicacions socials més actuals és la de permetre solucionar dubtes de paternitat o, en medicina forense, l'aportació de proves definitives en judicis sobre criminals. Podríem dir, com a l'anunci, que «la prova del DNA no enganya».

Per realitzar els estudis de comparació es podria clonar tot el DNA d'un individu, llegir la seva seqüència i comparar-la amb la d'un altre individu. Aquest treball podria durar desenes d'anys, i de moment no resulta un mètode factible. Una solució és observar solament petites porcions de DNA i comparar-les entre si, però han de ser fragments que presentin una gran variabilitat entre individus, per poder establir fàcilment relacions entre ells.

En el genoma humà existeixen algunes zones de DNA compostes per grups de deu a cinquanta nucleòtids repartides per tots els cromosomes, que es repeteixen diverses vegades i de les quals encara es desconeix la funció. Aquestes seqüències de DNA altament repetitiu s'anomenen *minisatèl·lits de DNA* i, encara que la seva seqüència és la mateixa, el nombre de repeticions varia d'un individu a un altre. Aquestes variacions s'han utilitzat, per exemple, per establir relacions de paternitat entre diferents individus, o per inculpar persones de delictes en què varen deixar restes biològiques (per exemple, un sol cabell), a partir de les quals s'obtenen el minisatèl·lits de DNA que es compararan amb els del sospitós.

Aquest tipus d'estudis es coneixen popularment com «la prova del DNA», i els podeu seguir en la presentació que es troba



al CD. Primerament s'agafen cèl·lules (sang, cabells, saliva, etc.) de la persona que es vol investigar, i se'n purifica el DNA. A continuació es talla amb enzims de restricció i els fragments resultants se separen en una electroforesi que, posteriorment, es transferirà a un full d'un material semblant al paper: la nitrocellulosa. Tot aquest procés rep el nom de *transferència Southern*, en honor a l'investigador E. M. Southern, que la va descriure per primer cop el 1975 (Southern, 1975). El full de nitrocellulosa s'incuba amb una sonda de DNA marcada, que és idèntica a les seqüències dels minisatèl·lits de DNA i que, per tant, s'unirà a tots els fragments de minisatèl·lit presents en el full de nitrocellulosa. Posteriorment, es detecten els punts d'unió mitjançant l'addició d'un anticòs que detecta la marca de la sonda del DNA. Aquest anticòs està unit a una proteïna: la fosfatasa alcalina, que té capacitat de transformar certs compostos incoloros en compostos acolorits. Per tant, l'addició del substrat de la fosfatasa alcalina ens permetrà visualitzar les bandes corresponents al DNA satèl·lit.

La longitud i disposició de les bandes variarà en funció del nombre de repeticions que presenti el genoma d'aquella persona. El conjunt de bandes s'anomena *empremta genètica*, i és característica de cada individu.

Si se cerca una persona amb un cognom determinat, apareixerà una llarga llista d'individus. Si es prenen els dos cognoms en la cerca, es reduirà la llista. Si en aquesta cerca, a més, s'incorpora el segon cognom de cada pare, de cada avi, etc., la concreció augmenta considerablement. La possibilitat que dues persones tinguin els cognoms de tot el seu arbre genealògic idèntics és pràcticament nul·la. Amb l'empremta genètica succeeix el mateix. Si es comparen diverses bandes de DNA, la probabilitat de trobar dues persones que coincideixin en el resultat, és d'una entre milers de milions. De ca-

ra a la identificació de sospitosos aquest fet és molt important, ja que si un delinqüent deixa restes de sang, o si un violador deixa esperma, o si queda un cabell o un tros de pell al lloc del delictes, a partir d'aquestes petites mostres de material biològic es poden obtenir proves que demostrin la presència de l'individu al lloc del crim. En el cas que es disposi de molt poques cèl·lules, és necessari recórrer prèviament a la tècnica de la PCR, la qual permet amplificar el material genètic d'una única cèl·lula i obtenir grans quantitats de DNA.

D'altra banda, l'empremta genètica d'un individu és el resultat de la combinació de les empremtes genètiques dels seus pares. Així, comparant les empremtes genètiques es poden solucionar casos en els quals existeixen dubtes sobre la paternitat d'una persona.

### **La PCR pot ser una eina de diagnòstic en la medicina clínica**

La PCR es va popularitzar entre el nostre alumnat de secundària arran de la pel·lícula *Jurassic Park*, del director nord-americà Steven Spielberg. Considerem que hem d'estar agraïts que de tant en tant hi hagi l'esforç per divulgar i transmetre algun coneixement científic des de fora les aules. De totes maneres hem de dir que aquesta tècnica no permet caçar dinosaures, però sí virus, i gràcies a això avui s'utilitza com a eina de diagnòstic clínic.

Si es coneix la seqüència de DNA d'un determinat virus, es poden fabricar encebadors de DNA que permetin amplificar un segment específic del genoma víric. D'aquesta manera es pot detectar la presència del virus de la hepatitis o del VIH en la sang dels pacients. Cal una quantitat molt petita de sang (uns 10 µl), que es barreja amb els reactius de PCR. Si el virus està present apareixerà una banda de DNA en

els gels d'electroforesi; en cas contrari, no es podrà donar la reacció d'amplificació i, per tant, no apareixerà cap banda.

La tècnica de la PCR és molt més sensible a l'hora de detectar la presència de virus en sang que la tècnica d'ELISA (vegeu el capítol següent), ja que una sola molècula serà amplificada repetidament fins a poder ser observable, mentre que en la tècnica ELISA els anticossos necessiten diverses molècules de proteïna per poder donar un senyal de color observable. Aquesta sensibilitat fa que avui dia la PCR sigui una eina de detecció molecular de patògens d'allò més diversos: des de virus en baixes quantitats fins a bacteris anaerobis gairebé impossibles de cultivar, que es troben als solcs de les genives i que poden produir malalties periodontals (Adserias i Clotet, 2006).

Sens dubte, és una de les eines de la biologia molecular que més ha col·laborat en el desenvolupament de la recerca i la medicina actuals.

## CONCLUSIÓ

Les eines que hem presentat en aquest capítol són les que més s'utilitzen a l'hora de manipular el DNA: els plasmidis, els enzims de restricció, la ligasa del fag T4, el protocol de transformació bacteriana, els protocols de purificació de DNA, l'electroforesi de DNA i la PCR. Amb aquestes eines, els laboratoris de recerca en biologia molecular podem realitzar el 90 % dels protocols experimentals de clonatge de gens. És cert que existeixen altres enzims modificadors del DNA (fosfatasa alcalina, polinucleòtid-cinasa, fragment *Klenow* de la DNA-polimerasa, etc.) i que existeixen protocols complementaris als descrits, però s'utilitzen en menor mesura i no aporten conceptes nous a l'hora d'explicar la tecnologia del DNA recombinant als alumnes de batxillerat. L'ensenyament d'aquestes tècni-

ques als instituts i escoles ha de permetre a l'alumne l'adquisició de continguts nous, però sobretot ha de desvetllar-li la passió per aquestes metodologies, que han tingut i tindran un paper important en el camp de la recerca i la clínica diàries.

## BIBLIOGRAFIA

- ADSERIAS, M. J.; CLOTET, J. (2007). *Molecular detection of new anaerobic oral pathogens*. [Tesi doctoral de M. J. Adserias i manuscrit en preparació]
- FLEMING, A. (1953). «Twentieth-century changes in the treatment of septic infections». *N. Engl. J. Med.*, 248: 1037-1045.
- (1955). «The story of penicillin». *Bull. Georgetown Univ. Med. Cent.*, 8: 128-132.
- GIBSON, D. A.; BENDERS G. A.; ANDREWS-PFANNKUCH, C.; DENISOVA, E. A.; BADEN-TILLSON, H.; ZAVERI, J.; STOCKWELL, T. B.; BROWNLEY, A.; THOMAS, D. W.; ALGIRE, M. A.; MERRYMAN, C.; YOUNG, L.; NOSKOV, V. N.; GLASS, J. Y.; VENTER, J. C.; HUTCHISON III, C. A.; SMITH, H. O. (2008). «Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome». *Science*, 319: 1215-1220.
- MOSIG, G. (1970). «Recombination in bacteriophage T4». *Adv Genet.*, 15: 1-53.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. (1987). «Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction». *Methods Enzymol.*, 155: 335-350.
- ROBERTS, R. J. (1980). «Directory of restriction endonucleases». *Methods Enzymol.*, 65: 1-15.
- SAIKI, R. K.; SCHARE, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. (1985). «Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia». *Science*, 230: 1350-1354.
- SOUTHERN, E. M. (1975). «Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis». *J. Mol. Biol.*, 98: 503-518.
- SYMONS, R. H.; BERG, P. (1972). «Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2904-2909.
- WALLACE, R. B.; JOHNSON, M. J.; HIROSE, T.; MIYAKE, T.; KAWASHIMA, E. H.; ITAKURA, K. (1981). «The use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes. II. Hybridization of oligonucleotides of mixed sequence to rabbit beta-globin DNA». *Nucleic Acids Res.*, 25: 879-894.