

## BIOLOGIA MOLECULAR Y NEFROLOGIA

### Análisis del DNA-I

#### E. Salido

Departamento de Anatomía Patológica. Facultad de Medicina. Universidad de La Laguna. Department of Pediatrics. University of California at San Francisco (UCSF)

La respuesta a un gran número de problemas en Biología y Patología Molecular pasa por el análisis de DNA. Dos características, en gran parte contrapuestas, definen funcionalmente el DNA: estabilidad y mutabilidad. La primera es la base de la transmisión hereditaria de características y enfermedades. En la mutabilidad del DNA reside la capacidad de evolución y la flexibilidad de los seres vivos en su adaptación al medio ambiente.

En la práctica médica, el análisis de DNA va enfocado eminentemente a la detección de mutaciones responsables de enfermedades. En principio, cualquier diferencia en la secuencia de DNA distinta de la secuencia normal del genoma humano es una *mutación*. En términos cotidianos, usamos «mutación» para cambios en la secuencia de DNA asociados a una condición patológica. Ahora bien, la inmensa mayoría de cambios en la secuencia de nuestro genoma no implica enfermedad alguna, sino que son la base de la variabilidad dentro de la norma en nuestra especie; a estos cambios les llamamos *polimorfismos*.

La estrategia a seguir en el análisis de DNA depende lógicamente del objetivo del mismo: detectar un cierto tipo de mutación en la mayoría de los casos. En función de esto se hace la elección de la técnica que más eficientemente la detecta, dentro de las posibilidades tecnológicas del laboratorio en cuestión. La técnica seleccionada determina a su vez qué grado de purificación e integridad del DNA es preciso y, por tanto, qué muestra biológica es válida como fuente de DNA.

#### Tipos de mutaciones:

En la tabla I se recogen los tipos de mutaciones implicados en patología humana.

1. *Mutaciones puntuales*: Los cambios de una sola base son un tipo frecuente de mutación y tienen consecuencias muy variadas.

1.1. *Con alteración de la transcripción*: En ciertos casos, las mutaciones puntuales afectan regiones críticas,

promotores, que controlan la transcripción. Así, por ejemplo, un cambio de A a G en el promotor del gen del factor IX de la coagulación hace que factores transcripcionales esenciales no se unan al promotor (fig. 1) y, por tanto, los niveles de transcripción son muy bajos; de ahí que los pacientes sufran hemofilia B<sup>1</sup>.

1.2. *Con alteración del procesado del mRNA*: En otros casos, cambios de una sola base afectan el proceso de «splicing», por el cual las regiones intrónicas son eliminadas del mRNA nuclear. Este es el caso de las mutaciones que afectan los dinucleótidos de los extremos 5' (siempre GT) y 3' (siempre AG) de los intrones. En talasemias de origen mediterráneo se ha descrito una mutación de A a G en el extremo 3' (AG) del intrón 2 del gen de la cadena beta de la hemoglobina (fig. 2). Esto hace que el mRNA sea procesado de modo aberrante, incluyendo porciones del intrón 2 en el exón 3<sup>2</sup>.

1.3. *Con alteración de la traducción y localización proteica*: Otras veces, la mutación puntual afecta la traducción proteica, de modo que la localización celular de la proteína se ve alterada. Así, un tercio de los pacientes con hiperoxaluria primaria tienen una mutación en la porción 5' de la alanina-gliosilato aminotransferasa (AGT)<sup>3</sup> que parece ser responsable de que la traducción proteica del mRNA incluya varios codones adicionales en el extre-

**Tabla I.** Tipos de mutaciones

1. Cambios de base (mutaciones puntuales):
  - Con alteración de la transcripción.
  - Con alteración del procesado del mRNA.
  - Con alteración de la traducción y localización proteica.
  - De sentido erróneo.
  - Sin sentido.
2. Deleciones:
  - Con cambio del marco de lectura.
  - Con pérdida de codones.
  - Deleción de todo un gen o genes contiguos.
3. Inserciones:
  - Con cambio de marco de lectura.
  - Con ganancia de codones.
  - Duplicación de todo un gen o región genómica.
  - De elementos repetitivos.
4. DNA inestable.

Correspondencia: Dr. Eduardo Salido Ruiz.  
Departamento de Anatomía Patológica.  
Facultad de Medicina.  
Universidad de La Laguna.  
La Laguna, Tenerife.

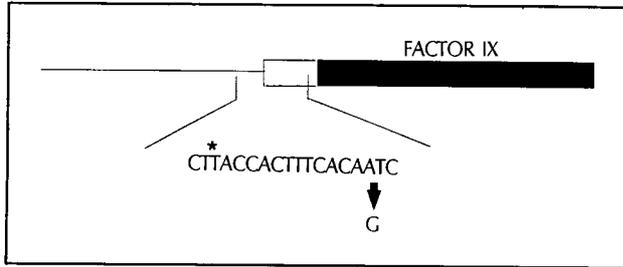


Fig. 1.—Mutación A-G en la región próxima al inicio de transcripción (\*) del gen del factor IX de la coagulación, que resulta en unos niveles de transcripción insuficientes. El rectángulo hace referencia al exón y su parte sólida a la zona codificante para proteína.

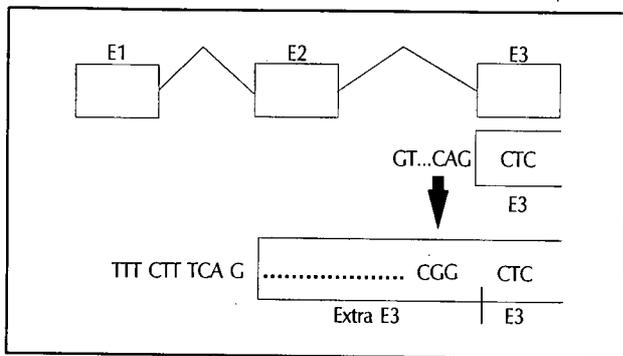


Fig. 2.—Mutación A-G en el duplete receptor AG del intrón 2, que resulta en un splicing anormal, que usa una secuencia TTTCTTCAG presente dentro del propio intrón 2 como receptor del fenómeno de splicing. El resultado es que una porción del intrón 2 queda englobada en el exón 3 (E3).

mo amino terminal de la AGT. Estos codones extra contienen una señal de localización mitocondrial, por lo que la AGT es transportada a la mitocondria en lugar de ir a los peroxisomas (fig. 3). Como en el humano la mayor parte de la síntesis de glioxilato tiene lugar en los peroxisomas hepáticos, la AGT es incapaz de llevar a cabo su función detoxificadora de glioxilato si se encuentra localizada en las mitocondrias. No obstante, existen aún puntos oscuros en la patogenia de esta mutación de la AGT.

1.4. *Con significado erróneo o «missense»:* Existen numerosos ejemplos en patología humana en que una mutación puntual supone un cambio de codón que hace que la proteína tenga un aminoácido distinto de la secuencia normal. De hecho, el primer ejemplo de patología molecular consiste en una mutación puntual «missense»: el grupo de Pauling<sup>4</sup> demostró que la anemia falciforme era el resultado de la presencia de una hemoglobina anormal (HbS), y posteriormente se comprobó que la HbS resulta de la presencia de valina en la posición 6 de la cadena beta de la hemoglobina, donde normalmente va glutámico<sup>5</sup>. Este cambio de aminoácido es el resultado de una mutación puntual de A a T en el codón sexto del gen de la cadena beta de la hemoglobina<sup>6</sup> (fig. 4).

1.5. *Sin significado o «nonsense»:* En estos casos, las mutaciones puntuales transforman un codón codificante de aminoácido en un codón de parada (TAG, TAA o TGA), lo que resulta en una proteína truncada en ese punto. Así, por ejemplo, una mutación puntual en el exón 11 del gen de la fibrosis quística (CFTR) consiste en un cambio de la G a T en el codón 542, lo que conlleva una parada de la traducción proteica en lugar de incorporar un aminoácido glicina en este punto (fig. 5). La proteína CFTR, de 1.480 aminoácidos en condiciones normales, queda truncada a los primeros 541 aminoácidos, con pérdida de su función en el transporte de cloro.

Aun cuando un cambio de base en la DNA puede dar lugar a las mutaciones descritas previamente, en la mayoría de los casos estos cambios son silentes, es decir, no se asocian a enfermedad, sino que dan lugar a polimorfismos a nivel de DNA. Este es el caso de la mayoría de los cambios que afectan a regiones no codificantes del gen

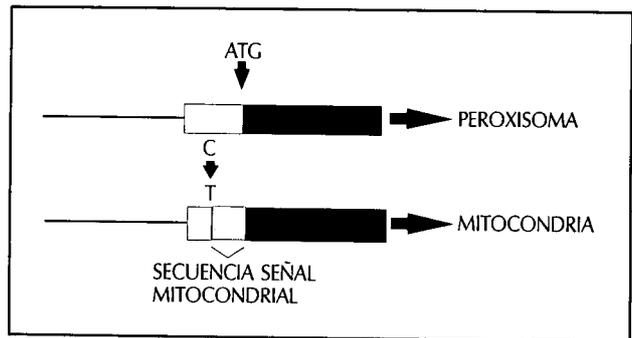


Fig. 3.—Mutación en la región 5' del gen alanina-glioxilato aminotransferasa, que resulta en la codificación de una secuencia señal que dirige la proteína a la mitocondria en lugar de ir al peroxisoma. Este defecto molecular de la hiperoxaluria primaria presenta puntos oscuros en su explicación que han sido omitidos en esta simplificación.

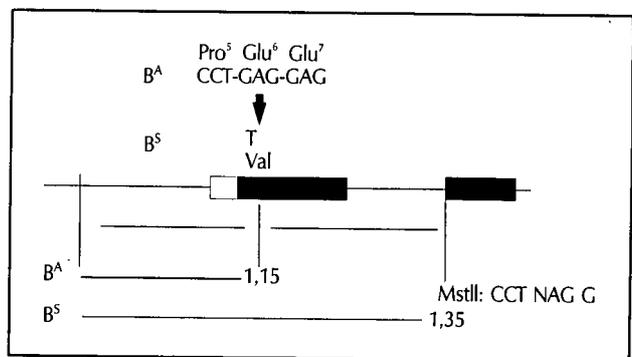


Fig. 4.—Mutación A-T en el codón 6 de la cadena beta de la hemoglobina, que resulta en la anemia falciforme. Esta mutación afecta la diana del enzima de restricción MstII (CCTNAGG), por lo que el alelo mutado (B<sup>S</sup>) es cortado por MstII en un fragmento de 1,35 kb, mientras que el alelo normal (B<sup>A</sup>) lo es en dos fragmentos de 1,15 y 0,2 kb.

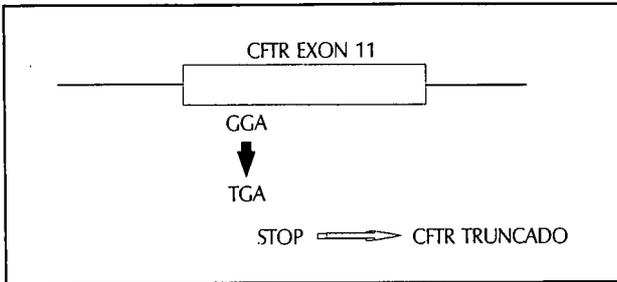


Fig. 5.—Mutación G542X del gen CFTR de la fibrosis quística, que resulta del cambio G-T en el codón 542 (GGA), que se convierte en un codón de parada (TGA) y, por tanto, la proteína queda truncada en este punto.

noma o bien implican la tercera base del triplete (codón), lo que en la mayoría de los casos no altera la traducción proteica o, incluso si el cambio de base se traduce en un aminoácido distinto, la proteína en su conjunto funciona normalmente. Uno de los cambios de base más frecuentes es la mutación puntual de C a T, donde C forma parte de dupletes CG en los que C está metilada (metil-C). Cuando metil-C pierde el grupo  $-NH_2$  (deaminación espontánea o inducida por mutágenos), se transforma en T. Este tipo de mutación se ha observado frecuentemente asociada a enfermedad, pero también es la base de polimorfismos corrientes; de ahí que enzimas de restricción (ver después) que incluyen la secuencia CG en su diadina—tales como TaqI (T.CGA)— sean muy útiles en la detección de polimorfismos.

2. *Deleciones e inserciones:* Un número importante de mutaciones consisten en la pérdida (delección) o ganancia (inserción) de material genético.

2.1. *Con alteración del marco de lectura:* Cuando el número de pares de bases perdido o ganado no es múltiplo de tres, la consecuencia de deleciones e inserciones es similar: alteración del marco de lectura del mRNA, de modo que la secuencia del mRNA 3' a la mutación cambia totalmente de significado y la proteína tiene una secuencia de aminoácidos completamente distinta, apareciendo con frecuencia codones de parada. Un ejemplo clásico de alteración del marco de lectura es el que da lugar al grupo sanguíneo O a partir del grupo A<sup>7</sup> (fig. 6A). El antígeno de grupo A resulta de la glicosilación de la proteína H por parte de la glicosiltransferasa A. La delección de una G en el gen de la glicosiltransferasa altera el marco de lectura, de modo que la secuencia de la proteína, que en este caso se conoce como glicoproteína O, es distinta e incapaz de glicosilar la proteína H. Si bien éste es un claro ejemplo de polimorfismo, ya que no conlleva enfermedad, los efectos de alteraciones del marco de lectura tienen una repercusión tan importante en la estructura proteica que con frecuencia se asocian a enfermedad. Este es el caso de la inserción de 4 bases (TATC) en el gen de la hexosaminidasa A<sup>8</sup> (fig. 6B), que da lugar a una proteína truncada en la enfermedad de Tay-Sachs porque,

después de cuatro codones en marco de lectura erróneo, aparece un codón de parada (TGA).

2.2. *Sin alteraciones del marco de lectura:* Cuando el número de bases implicadas en la inserción o delección es tres o un múltiplo pequeño de tres, el resultado es una proteína con uno o varios aminoácidos de más o de menos. Estas modificaciones discretas de la estructura proteica no se traducen siempre en pérdida de función, pero existen ejemplos donde la pérdida de un solo aminoácido en una región crítica de la proteína anula la función de la misma. La mutación más frecuente del gen de la fibrosis quística CFTR consiste precisamente en la delección de las bases CTT (fig. 7), con pérdida del aminoácido fenilalanina-508, en una de las dominios de unión a ATP del CFTR, lo que resulta en pérdida de función<sup>9,10</sup>.

2.3. *Deleciones e inserciones grandes:* Deleciones de grandes porciones de un gen, la totalidad del mismo o incluso varios genes contiguos resultan casi siempre en pérdida de función. En determinadas enfermedades, la mayoría de las mutaciones implicadas son del tipo delección grande; tal es el caso de la distrofia muscular de Duchenn-

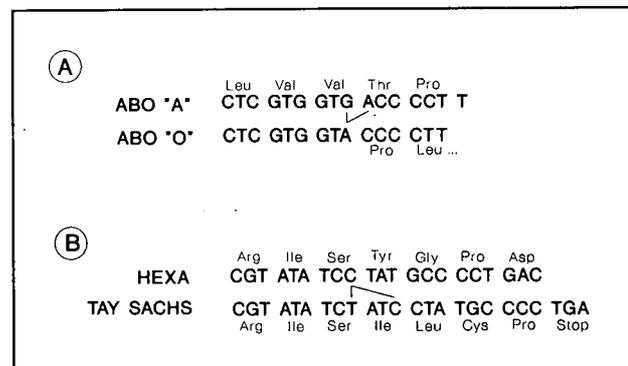


Fig. 6.—A) Delección de una G en el gen de la glicosiltransferasa A, responsable del grupo sanguíneo A, que resulta en un cambio del marco de lectura que da lugar a una proteína no funcional propia del grupo sanguíneo O. B) Inserción de cuatro bases TATC en el gen de la hexosaminidasa A, que resulta en cambio del marco de lectura, con aparición de un codón de parada (TGA) después de cuatro aminoácidos.

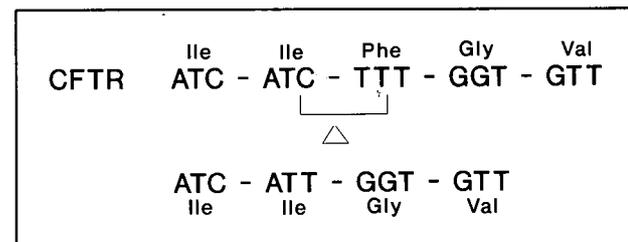


Fig. 7.—Delección F508 del gen CFTR de la fibrosis quística, donde se pierde el triplete CTT, pero el resto de la secuencia queda indemne. No obstante, la proteína CFTR sin el aminoácido fenilalanina 508, en la región de unión a ATP de la molécula, no es funcional.

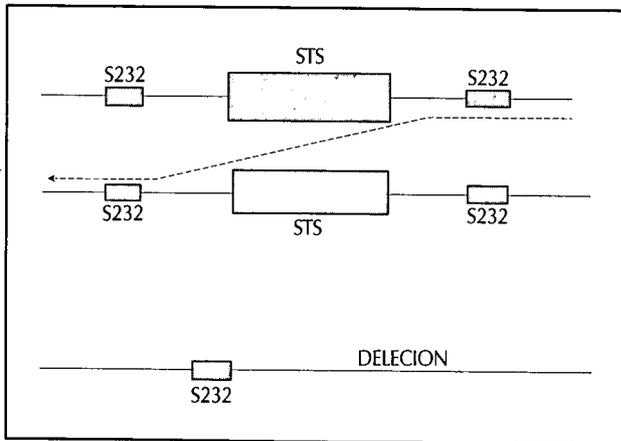


Fig. 8.—Deleción del gen de la sulfatasa esteroidea (STS) por recombinación homóloga desigual entre secuencias repetidas S232 a ambos lados del mismo. La flecha indica la recombinación que genera la deleción que se muestra en la parte inferior del gráfico.

ne (DMD) y del déficit de sulfatasa esteroidea (STS). Fenómenos de recombinación genética entre varios genes de una familia o entre secuencias homólogas no codificantes se han visto implicados como mecanismo causal de estas deleciones. Así, por ejemplo, recombinación entre los elementos no codificantes S232 localizados a ambos lados del gen STS (fig. 8) resulta en deleciones de las casi dos mebagases comprendidas entre ellos<sup>11</sup>.

2.4. *Inserciones de elementos repetitivos*: Un 15 % de nuestro genoma consiste en DNA de secuencia repetitiva y se halla disperso, entremezclado con genes de secuencia única. Existen dos familias principales de elementos repetitivos: *Alu*, elementos de unas 300 bases repetidos medio millón de veces en el genoma; y *L1*, elementos de hasta 6.000 bases repetidos unas 10.000 veces en el genoma. El papel que los elementos repetitivos juegan en el genoma es desconocido y existe la sospecha de que se trata de secuencias «egoístas» sin otra función que la de perpetuarse a sí mismas. Tanto secuencias *Alu* como *L1* pueden causar enfermedad por uno de estos mecanismos: *recombinación* entre secuencias homólogas con pérdida, deleción, del fragmento de DNA intermedio; y *disrupción* de un gen por inserción de elementos repetitivos que interrumpen la secuencia. Este es el caso de ciertas mutaciones de la hemofilia A, donde elementos *L1* se han visto insertados en el gen del factor VIII de la coagulación<sup>12</sup>.

3. *DNA inestable*: En el último año se han descrito los tres primeros ejemplos de mutaciones debidas a secuencias de DNA inestables, que contienen un número variable de trinucleótidos repetidos  $n$  veces. El análisis molecular de las secuencias inestables ha permitido explicar fenómenos genéticos como el de anticipación (generaciones sucesivas en una misma familia tienen formas de la enfermedad más severas o de aparición más temprana), que era bien conocido en la distrofia miotónica, o la pa-

*radoja de Sherman* (las madres y las hijas de varones asintomáticos portadores del síndrome del X frágil tienen riesgos muy distintos de tener descendencia con retraso mental). La mutación del síndrome del X frágil consiste en una secuencia de DNA inestable debido a cambios en el número de copias repetidas del trinucleótido CCG localizados en la región 5' del gen FMR-1<sup>13</sup>. Curiosamente, el número de repeticiones del trinucleótido aumenta cuando la mutación es transmitida por mujeres, mientras que permanece constante o se reduce cuando es transmitida por hombres; retraso mental importante se asocia a números elevados de secuencias repetidas. En los casos de la distrofia miotónica y de la enfermedad de Kennedy, el trinucleótido que se repite es AGC, en los genes de la proteína quinasa DM-1<sup>14</sup> y del receptor de andrógenos<sup>15</sup>, respectivamente.

### Extracción y purificación de DNA

Dada la estabilidad de la doble cadena de DNA, numerosas muestras biológicas son útiles como fuente de DNA. En principio, cualquier muestra que contenga células nucleadas, desde un lavado bucal hasta un fragmento tisular, pasando por la más frecuentemente usada muestra de sangre, es válida para análisis de DNA. De igual modo, líquidos biológicos son válidos para análisis de DNA de gérmenes. En cuanto a la estabilidad de la muestra una vez tomada, aunque el procedimiento ideal es hacer la extracción del DNA de inmediato y almacenarlo refrigerado, es posible conseguir DNA útil para análisis a partir de tejidos conservados en parafina. Es más, con la tecnología de que disponemos en la actualidad es incluso posible cierto tipo de análisis a partir de DNA anciano, conservado en momias de miles de años<sup>16</sup>.

La calidad del DNA extraído viene definida por el tamaño medio de molécula obtenido. Teóricamente, todo el DNA de un cromosoma podría obtenerse como una sola molécula de 50 millones de pares de bases (cromosoma 21, el más pequeño) hasta 250 millones de pares de bases (cromosoma 1, el más grande). Sin embargo, la gran sensibilidad al cizallamiento debida a la propia estructura del DNA (una cadena de hasta 15 cm de largo —cromosoma 1—, pero sólo 2 nm de diámetro) hace que normalmente se purifique DNA de tamaño medio muy inferior a una megabase. Cuando el tipo de análisis requiere DNA de alto peso molecular es preciso, pues, evitar el cizallamiento (usando pipetas de boca ancha y sin agitaciones turbulentas) y la acción de enzimas que degradan DNA (DNasas). Puesto que las DNasas precisan cationes divalentes ( $\text{Ca}^{++}$  o  $\text{Mg}^{++}$ ), la degradación enzimática del DNA se evita bastante eficazmente incluyendo EDTA en las soluciones de purificación y almacenamiento de DNA. Las soluciones de DNA se mantienen rutinariamente en el denominado buffer TE (10 mM TrisHCl, pH 8,0, 1 mM EDTA).

Existen numerosos métodos sencillos que permiten ais-

**Tabla II.** Extracción de DNA

1. Separar células blancas de hematíes o triturar muestra de tejido.
2. Suspender núcleos celulares en solución de lisis: 100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, pH 8,0, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS con 1 µg/ml de proteinasa K. Incubar a 55° C × 2 h.
3. Extraer con 1 vol. Fenol-cloroformo dos veces.
4. añadir 1/10 vol. 3M Na acetato y 2,5 vol. Etanol.
5. Tomar el precipitado y resuspender en Te (10 mM TrisHCl, pH 8,0, 1 mM EDTA).

lar DNA de tamaño adecuado para análisis. Sólo en casos en que el destino del DNA a aislar sea la clonación de grandes fragmentos (alrededor de 1 megabase) en cromosomas artificiales de levadura (YACs), o de fragmentos por encima de 100 kilobases en cósmidos, se han de seguir protocolos especiales que reducen al mínimo el cizallamiento del DNA. El procedimiento habitual de extracción de DNA (tabla II) consiste en la homogeneización del tejido o suspensión celular en una solución de lisis, que contiene el detergente SDS —rompe membranas celulares— y la proteinasa K —digiere proteínas—. Posteriormente se suelen separar los ácidos nucleicos del resto de los componentes celulares mediante extracción fenólica —a pH 8,0, el DNA particiona con la fase acuosa—, y a continuación se precipita el DNA con etanol. Si la concentración de DNA es suficiente, el precipitado de DNA se observa como una madeja filamentososa que se puede transferir con la punta de una pipeta a un nuevo tubo. Este protocolo básico proporciona DNA de hasta 100 kilobases en la mayoría de los casos, suficientemente bueno para análisis tipo Southern y para clonación en bacteriófago.

En casos en que la muestra de partida es tejido incluido en parafina, los cortes tisulares son desparafinados con xilol e hidratados en una serie de soluciones de etanol previamente a la digestión con proteinasa K.

En el momento presente, la detección de mutaciones puntuales y deleciones e inserciones pequeñas se tiende a hacer mediante amplificación de DNA por la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Aunque esta técnica será objeto de futuras presentaciones en esta serie de la revista NEFROLOGÍA, conviene aquí adelantar dos características de la PCR: 1) permite trabajar con cantidades mínimas de DNA, y 2) el DNA no tiene que ser altamente purificado. Por tanto, si el objetivo es el análisis por PCR, se puede usar un método alternativo más simple (tabla III) para preparar DNA a partir de tejidos o incluso de unas pocas células descamadas (líquidos amnióticos, citologías aspirativas, frotis vaginales, lavados bucales, etc.).

**Tabla III.** Extracción de DNA para PCR

1. Centrifugar las células.
2. Resuspender el pellet en solución de lisis PCR: 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl, pH 8,3, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 % Tween 20 con 0,1 µg/ml de proteinasa K. Incubar a 55° C × 1 h.

## Enzimas de restricción

El descubrimiento del fenómeno de restricción y la purificación de los enzimas responsables de este mecanismo de defensa bacteriano contra DNA foráneo supuso el principio de la denominada tecnología del DNA recombinante. Muchas bacterias tienen enzimas (endonucleasas: cortan el eje azúcar-fosfato de ácidos nucleicos —DNA— en puntos internos) que reconocen y cortan secuencias de DNA invasor, al que reconocen como extraño merced a un sistema complementario que marca (por metilación) el DNA propio; cada bacteria posee un sistema endonucleasa/metilasa propio, que se denomina sistema de restricción (restringe el DNA que es tolerado por la bacteria a aquel que es reconocido como propio), algo parecido al sistema inmune de organismos superiores. Aunque hay varios tipos de endonucleasas, sólo las endonucleasas tipo II son de interés práctico porque reconocen secuencias específicas en el DNA (a las que denominamos «dianas») y lo cortan en ese punto o región inmediatamente adyacente.

Las enzimas de restricción se denominan con una abreviatura de tres letras del nombre de la bacteria en la que se encontró (ej.: *Hin* de *Haemophilus influenzae*); una letra adicional identifica la cepa o serotipo, si es preciso (ej.: *Hind*), y finalmente un número romano refleja el orden en que se identificó (ej.: *HindIII*). Aunque en un principio los laboratorios tenían que purificar sus propios enzimas de restricción a partir de cepas bacterianas, en la actualidad existen varias casas comerciales que los proporcionan. La lista de enzimas de restricción de que disponemos está en continua expansión, existiendo muchos enzimas que reconocen secuencias específicas de 4-6 nucleótidos y algunos que lo hacen con secuencias mayores (7-8 nucleótidos, y excepcionalmente más). El tamaño de la diana determina en gran medida con qué frecuencia el enzima va a cortar un cierto DNA y, por tanto, el tamaño medio de los fragmentos generados. En el supuesto de que la secuencia de DNA sea totalmente aleatoria, con las cuatro bases representadas por igual, se podría predecir que un enzima que reconozca 4 nucleótidos (un 4-cutter en el argot), como la *TaqI*, cortará cada 256 bases (4<sup>4</sup>); uno que reconozca 6 bases, como el popular *EcoRI*, cortará fragmentos de unas 4 kilobases (kb). Pero en la realidad, las secuencias de DNA no son aleatorias, sino que la proporción de C+G en una región genómica puede ir de un 1/4 a 3/4. Alrededor de 500 enzimas de restricción han sido aisladas hasta el presente, y se denominan *isosquizómeros* a aquellos enzimas que reconocen la misma secuencia, aunque pueden cortar en distintos puntos de la misma. Por ejemplo, *XmaI* (C<sup>•</sup>CCGGG) y *SmaI* (CCC<sup>•</sup>CGGG), donde (•) indica el punto de corte en la secuencia.

Las secuencias de nucleótidos habitualmente reconocidas por los enzimas de restricción se denominan «palíndromes». De manera similar a su significado lingüístico, un palíndromo en bioquímica es una secuencia de DNA

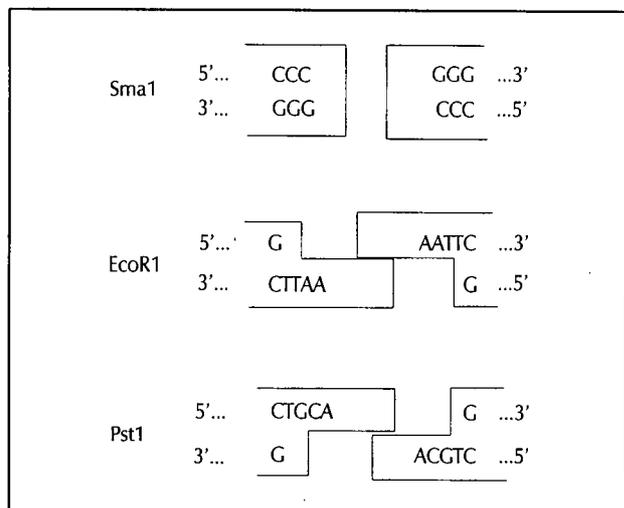


Fig. 9.—Cortes con enzimas de restricción tipo romo (como el de *SmaI*) y cohesivo, con extensión 5' (como el de *EcoRI*) y con extensión 3' (como el de *PstI*).

simétrica en la que la sucesión de nucleótidos es idéntica en las dos cadenas de DNA, leídas ambas en dirección 5'-3' (fig. 9). Las aplicaciones de los enzimas de restricción caen en dos categorías: 1. *Clonaje*, a través de la construcción de moléculas recombinantes. DNA recombinado es un DNA híbrido obtenido *in vitro* mediante la combinación de dos DNA pertenecientes a dos especies diferentes: por ejemplo, un gen humano se «injerta» en un DNA bacteriano (vector). La replicación del DNA recombinado da lugar a la obtención de numerosas copias idénticas del DNA injertado (clonación). 2. *Análisis*, detección de secuencias diana con fines diagnósticos o de construcción de mapas de moléculas. Una clasificación de los enzimas de restricción relevante en clonaje molecular se refiere al tipo de extremos que quedan en el DNA cortado (fig. 9):

a) *Romo (blunt)*: numerosos enzimas cortan en el punto medio de la diana en ambas cadenas de DNA; por ej.: *SmaI* reconoce CCCGGG, dejando dos extremos romos, que pueden ser ligados a otros extremos romos cualesquiera. La reacción de ligación es de baja eficacia, no obstante. En resumen, enzimas de corte romo proporcionan alta versatilidad, pero baja eficacia a la hora de construir moléculas recombinantes.

b) *Cohesivo (sticky)*: la mayoría de los enzimas de restricción no cortan en el punto medio del palíndromo, sino que generan cortes que se asemejan a «fracturas en tallo verde», con extensiones de DNA monocadena bien 5' (como *EcoRI*, G:AATTC, que deja extensiones monocadena 5'-AATT en ambos extremos del corte) o bien 3' (como *PstI*, CTGCA:G, que deja extensiones de DNA monocadena TGCA-3' en ambos extremos del corte). Debido a estas extensiones monocadena que protruyen en el sitio de corte, fragmentos cortados con un cierto enzima

tienen extremos compatibles con otras moléculas cortadas con el mismo enzima o con otro que genere extensiones monocadena idénticas. Por ejemplo, *Sau3AI*, GATC, genera extensiones 5'-GATC, compatibles con los extremos 5'-GATC creados por *BamHI*, G:GATCC. Estas extensiones dan a los cortes cohesivos dos propiedades importantes en clonaje: especificidad (sólo se pueden religar con extremos compatibles) y eficacia (las extensiones monocadena compatibles establecen puentes de hidrógeno que facilitan la reacción de ligación).

La especificidad de los enzimas de restricción por sus secuencias diana es muy alta siempre que las condiciones de la reacción sean óptimas. De no ser así, puede que un determinado enzima corte DNA en secuencias que no le son propias, a lo que se denomina «actividad estrella». *EcoRI* (G:AATTC), por ejemplo, en condiciones de baja concentración iónica, alto pH, presencia de solventes o de Mn<sup>2+</sup> en vez de Mg<sup>2+</sup>, corta en múltiples secuencias que contengan AATT. Dada la poca consistencia de la actividad estrella, se trata de un fenómeno sin aplicaciones prácticas y, en general, se debe evitar usando las condiciones adecuadas para la restricción enzimática.

Determinados enzimas de restricción no cortan el DNA si ciertas bases se encuentran metiladas en la secuencia diana, por lo que se denominan *metilación-sensibles*. Tal es el caso de *HpaII* (C:CGG), que no corta si existen bases metil-citosina; por el contrario, su isosquímico *MspI* no es sensible a la metilación y corta siempre en esa secuencia. Puesto que la inactividad transcripcional de determinados genes va asociada a metilación de citosinas, este fenómeno se puede explotar para analizar la inactivación del cromosoma X, por ejemplo.

En la práctica, la digestión de DNA con enzimas de restricción se lleva a cabo en reacciones que incluyen el buffer idóneo, DNA y enzima (tabla IV). Cada enzima tiene unas condiciones ideales diferentes, aunque se pueden agrupar en 4 grupos fundamentales, según la concentración iónica. En la actualidad, la mayoría de los proveedores de enzimas de restricción regalan el buffer idóneo al comprar el enzima, por lo que hemos dejado de preparar nuestros propios buffers en el laboratorio. La mayoría de las reacciones se llevan a cabo a 37° C, pero existen excepciones, como *SmaI*, que trabaja mejor a 25° C. Además de elegir el buffer y la temperatura adecuadas, una reacción de restricción depende de la calidad del DNA. Una de las causas más frecuentes de fracaso de la digestión es la presencia de impurezas en la muestra de DNA.

Tabla IV. Digestión con enzimas de restricción (*EcoRI* en 20 µl)

- 15,2 µl de H <sub>2</sub> O.
- 2 µl de 10X <i>EcoRI</i> Buffer.
- 0,8 µl de Sperdimina 100 mM.
- 1 µl de DNA (1 µg/µl)
- 1 µl e <i>EcoRI</i> (1 U/ml). Incubar a 37° C × 1 h.

En general, extracciones fenólicas y precipitaciones con etanol son precisas para obtener DNA sustrato de enzimas de restricción.

### Hibridación molecular

La interacción físico-química de cadenas de ácidos nucleicos con secuencias complementarias es el punto en que pivota todo tipo de análisis molecular. En el capítulo previo de «Introducción a la Biología Molecular» ya se presentaron las bases conceptuales de la interacción entre moléculas complementarias, ejemplificado en la estabilidad de la doble cadena de DNA. Usando los mismos principios, el establecimiento de puentes de hidrógeno entre bases complementarias, se pueden generar moléculas «híbridas» donde una cadena proceda del DNA (desnaturalizado) o del mRNA y la otra sea una herramienta de laboratorio (sonda molecular o «probe»), de secuencia conocida y marcada convenientemente. A este proceso de formación de moléculas doble cadena de ácidos nucleicos mediante el apareamiento específico de monocadenas de secuencias complementarias se denomina hibridación molecular. Conceptualmente, se trata de un proceso análogo a la interacción antígeno-anticuerpo: de modo similar a como utilizamos anticuerpos en el análisis de proteínas concretas, podemos usar sondas moleculares para analizar DNA o RNA. Pero mientras que las bases de la interacción antígeno-anticuerpo son complejas y sólo parcialmente conocidas, la interacción entre secuencias de ácidos nucleicos complementarias es simple y bien definida experimentalmente.

El objetivo de la hibridación molecular es, pues, la detección de secuencias concretas de DNA o RNA. Como en cualquier otro sistema de detección, dos parámetros resumen la utilidad del mismo: especificidad y sensibilidad. Un buen conocimiento de las bases físico-químicas de la hibridación permite el diseño de condiciones de óptima especificidad y sensibilidad. El término rigor («stringency»), muy usado en descripciones moleculares, equivale a especificidad.

La estabilidad de una molécula doble cadena depende esencialmente de la interacción tipo puente de hidrógeno entre bases complementarias y de las fuerzas hidrofóbicas establecidas entre bases apiladas. Las condiciones que afectan la estabilidad de moléculas doble cadena quedan resumidas en la tabla V. Por tanto, podemos aumentar la especificidad de la hibridación de una secuencia, de longitud y relación C+G/A+T determinadas, aumentando la concentración de formamida, disminuyendo la concentración de Na<sup>+</sup> o aumentando la temperatura. Dejando el resto de los parámetros constantes, la estabilidad de una doble cadena disminuye conforme la temperatura aumenta, de modo que alcanzaríamos una situación en la que todas las moléculas son monocadena, a lo que se denomina «DNA desnaturalizado». A una temperatura intermedia encontraríamos el 50 % de las molé-

**Tabla V.** Condiciones de hibridación

Parámetro	Estabilidad del híbrido	Efecto en el rigor
Temperatura.....	↓	↑
Cationes monovalentes .....	↑	↓
Longitud .....	↑	↓
Relación C+G/A+T.....	↑	↓
Formamida.....	↓	↑

culas como doble cadena y el otro 50 % como monocadena; a ésta se denomina temperatura de fusión (T<sub>m</sub>). La T<sub>m</sub> de un híbrido se puede poner en función del resto de los parámetros que controlan la estabilidad de la molécula, resultando en la fórmula:

$$T_m = 81,5 + 16,6 \log [Na] + 41 [C+G/A+T] - 0,62 [FA] - 500/L$$

Donde [Na] es la concentración molar de cationes monovalentes, [C+G/A+T] es la fracción molar de bases C+G (que establecen tres puentes de hidrógeno) versus A+T (que establecen sólo dos puentes de hidrógeno), [FA] es el porcentaje de formamida y L es la longitud del híbrido en pares de bases.

Para moléculas de menos de 50 pares de bases (bp) esta fórmula no es válida, y así, para hibridaciones con oligonucleótidos de alrededor de 20 nucleótidos (nt), tales como los primers usados en PCR, la fórmula de la T<sub>m</sub> se simplifica, de modo que para [Na] = 0,9 M, T<sub>m</sub> = 4 [C+G] + 2 [A+T]

Estas fórmulas han sido calculadas a partir de experimentos de hibridación de DNA en solución<sup>17</sup>, pero son esencialmente válidas para hibridaciones en membranas sólidas y otros tipos de hibridación. Los híbridos de RNA-RNA son algo más estables, 10° C de media, que los de DNA-DNA, y RNA puede desplazar una cadena de DNA, formando híbridos RNA-DNA.

Es asimismo importante considerar el efecto de pares de bases no complementarios en la estabilidad del híbrido. Se ha calculado que, para híbridos mayores de 150 bp, la T<sub>m</sub> de la doble cadena desciende 1 grado por cada 1 % de bases que no son complementarias (mismatching). Para híbridos pequeños, en torno a 20 bp, cada «mismatch» reduce la T<sub>m</sub> en 5 grados. Es precisamente en base a este efecto desestabilizante de pares no complementarios que se pueden diseñar condiciones de hibridación específicas para secuencias de DNA que sólo se diferencien en una base. Asimismo, eligiendo las condiciones lo suficientemente rigurosas, conseguimos que la sonda marcada se hibride exclusivamente a secuencias que son 100 % complementarias. Ahora bien, condiciones muy rigurosas reducen la sensibilidad del test, por lo que, en general, las hibridaciones se llevan a cabo en condiciones que favorecen la hibridación, unos 25° C por debajo de la T<sub>m</sub>, y posteriormente se realizan lavados de los filtros en condiciones crecientes de rigor hasta quedarnos en torno a 5° C por debajo de la T<sub>m</sub> o hasta las condi-

ciones que empíricamente nos den una mejor relación señal/fondo inespecífico.

En la práctica, los protocolos de hibridación incluyen: 1) preparación de DNA o RNA en forma desnaturalizada; 2) prehibridación: se busca equilibrar el sustrato a hibridar con las condiciones de hibridación; 3) hibridación: con la sonda marcada, a temperaturas 25° C por debajo de la T<sub>m</sub>, esto es, en torno a 65° C normalmente si la solución de hibridación no contiene formamida y 42° C si la solución contiene 50 % formamida; 4) lavados posthibridación: con soluciones de creciente rigor —[Na] decreciente— para limpiar el filtro de la sonda adherida inespecíficamente; 5) revelado de la señal: bien por autorradiografía o por reacciones colorimétricas, según el tipo de marcaje de la sonda usado.

En apartados sucesivos se irán presentando los distintos tipos de hibridación utilizados, entre los que se encuentran:

1. Hibridación en solución: tal como el ensayo de protección de RNasa.
2. Hibridación en fase sólida (filtro):
  - 2.1. Con electroforesis previa:
    - Southern blot: DNA.
    - Northern blot: RNA.
  - 2.2. Sin electroforesis previa:
    - Dot (o Slot) blot: la solución de ácidos nucleicos a analizar se pone directamente en un filtro, a modo de puntos (dot) o hendiduras (slot), usando como molde aparatos «manifold».
    - Hibridación de colonias o placas: las colonias bacterianas o placas de virus se transfieren directamente por contacto a un filtro (réplica) que se hibrida.
3. Hibridación in situ: cortes tisulares en portas se someten a hibridación de DNA o RNA en el propio porta y el resultado se visualiza al microscopio.

### Sondas moleculares

Se utilizan tres tipos fundamentales de sondas —moléculas de ácidos nucleicos de secuencia específica, marcadas de modo que se pueden visualizar—, según el origen de las mismas: DNA, RNA y oligonucleótidos sintéticos (oligos).

En cuanto al marcaje de las sondas, hay dos parámetros a considerar: a) uso de isótopos radiactivos o bien marcaje no isotópico; b) método de marcaje, que depende esencialmente del tipo de sonda usada. En la presentación que sigue describiremos los métodos de marcaje más usados para cada tipo de sonda.

#### a) Sondas isotópicas y alternativas no-isotópicas

Tradicionalmente, las sondas moleculares se han preparado con nucleótido-trifosfatos (ATP, dATP, CTP, dCTP,

GTP, dGTP, UTP o dTTP) radiactivos, que contienen fósforo-32 (<sup>32</sup>P) en la posición alfa. En ciertas aplicaciones, en que interesa el uso de isótopos de energía intermedia o baja, se usan nucleótidos que contienen azufre-35 (<sup>35</sup>S) o tritio (<sup>3</sup>H), respectivamente. Las sondas marcadas con isótopos se visualizan mediante autorradiografía, donde la energía radiactiva impresiona una película de rayos X. En general, si las condiciones del laboratorio lo permiten y contando con personal entrenado para el uso de isótopos radiactivos, el marcado de sondas por métodos radiactivos no conlleva mayores riesgos y proporciona una alta sensibilidad a los ensayos, por lo que es el método de elección en la mayoría de los centros. No obstante, en sitios donde no existen contratos entre la institución y el proveedor, como es el caso de la mayoría de los centros en España, los isótopos resultan bastante más caros que los métodos alternativos, debido a que al alto precio de catálogo se suman gastos adicionales, como el de eliminación de residuos radiactivos. Además, las sondas radiactivas tienen una vida media corta, no sólo por la desintegración del isótopo en sí, sino también por la ruptura de la cadena molecular por la energía radiactiva.

Varios métodos han surgido como alternativas al marcado isotópico de las sondas<sup>18</sup>, de los cuales dos son los más usados: sondas biotiniladas y sondas con digoxigenina. Ambas se basan en un principio similar: el uso de nucleótidos a los que se ha unido una molécula que puede ser reconocida específicamente en reacciones colorimétricas. Las moléculas de biotina interaccionan con altísima afinidad con la proteína avidina, el uso de avidina conjugada con enzimas como la peroxidasa o fosfatasa alcalina hace que allí donde se ha hibridado la sonda marcada con biotina exista actividad peroxidasa o fosfatasa, que producen depósitos de color al actuar sobre sustratos cromógenos. De manera análoga, las sondas se pueden marcar con digoxigenina, que es reconocida específicamente por un anticuerpo conjugado a un enzima. Recientemente se ha incorporado una modificación importante en el desarrollo de la señal que aumenta la sensibilidad de las sondas no isotópicas: en lugar de usar un sustrato cromógeno, el enzima se hace actuar sobre sustratos fotógenos, emisores de fotones que impresionan una película fotográfica.

#### b) Tipos de sonda y métodos de marcaje

Existen tres tipos de sondas moleculares, según su origen:

b.1. *Sondas de DNA*: consisten en fragmentos de cDNA o DNA genómico que han sido clonados y, por tanto, se pueden purificar en cantidades necesarias. Existen variantes según el vector usado al clonar el DNA en cuestión, pero el método más usado consiste en escindir el DNA clonado (inserto) del vector, mediante enzimas de restricción, y purificar el inserto mediante electroforesis.

Una vez identificada la banda de inserto en el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, se corta con una hoja de bisturí y el DNA contenido en la banda se eluye. Una variante de obtención de sondas de DNA que se está usando frecuentemente consiste en la amplificación de fragmentos de DNA mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR), que será tratada en futuras revisiones. Existen numerosos procedimientos para eluir el DNA del fragmento de gel aislado, desde la simple centrifugación hasta la purificación con resinas de afinidad, pasando por la electroelución. Con cualquiera de estos protocolos se obtiene DNA doble cadena, que puede ser marcado *in vitro* de varios modos, fundamentalmente dos:

1. *Nick translation* (reparación con DNA polimerasa I) (tabla VI): consiste en generar «mellas» en distintos puntos de la cadena de DNA con DNasa I, que son reparadas por la DNA polimerasa I utilizando nucleótidos trifosfato de la mezcla, alguno(s) de los cuales están marcados bien isotópicamente o bien con biotina o digoxigenina (fig. 1). Además, las mellas producidas por la DNasa son extendidas en sentido 5'-3' gracias a la actividad 5'-exonucleasa (degradación del extremo 5' del DNA) de la DNA polimerasa (fig. 10). Con ello se consiguen sondas de una actividad específica en torno a  $10^8$  cpm/ $\mu$ g al usar  $^{32}$ P.

**Tabla VI.** Nick translation

7,0 $\mu$ l H <sub>2</sub> O
2,5 $\mu$ l 0,5 mM dATP, dGTP, dTTP
2,5 $\mu$ l 10X Nick translation buffer
10,0 $\mu$ l dCTP marcado
1,0 $\mu$ l DNasa I (0,1 ng/ $\mu$ l)
1,0 $\mu$ l DNA (0,1 $\mu$ g)
1,0 $\mu$ l E. coli DNA polimerasa I (5-15 U). Incubar a 15 C $\times$ 1 hr

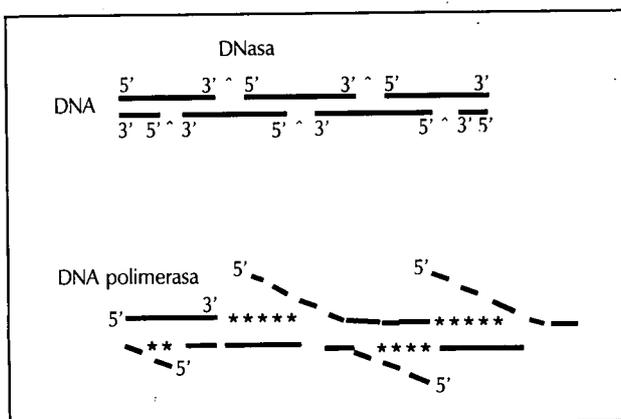


Fig. 10.—Marcado de sondas por nick translation. El DNA es «mellado» por la DNasa I y reparado por la DNA polimerasa, que, merced a sus actividades 5'-3' exonucleasa y polimerasa, sintetiza cadenas complementarias, usando los nucleótidos del medio, alguno de los cuales se encuentra marcado (\*).

**Tabla VII.** Random primer

1. Mezclar 0,1 $\mu$ g DNA y 1,0 $\mu$ g hexanucleóticos en 14,0 $\mu$ l TE.
2. Hervir $\times$ 2-3 m. Poner en hielo.
3. Añadir: 2,5 $\mu$ l 0,5 mM dATP, dGTP, dTTP. 2,5 $\mu$ l 10X Random primer buffer. 5,0 $\mu$ l dCTP marcado. 1,0 $\mu$ l Klenow (3-8 U).
4. Incubar 2-4 h a temperatura ambiente.

2. *Random primer* (síntesis de DNA con Klenow y hexanucleótidos) (tabla VII): consiste en la síntesis de cadenas complementarias de DNA con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, que, a diferencia del enzima completo, carece de actividad 5'-3' exonucleasa. Esta síntesis, que usa DNA desnaturalizado por calor como sustrato monocadena, hace uso de una mezcla de oligonucleótidos muy cortos (6, 7) de todas las posibles secuencias, que actúan de cebadores (primers) de la reacción de polimerización que incorpora nucleótidos marcados (fig. 11) a actividades específicas de  $10^8$  a  $10^9$  cpm/ $\mu$ g al usar  $^{32}$ P.

b.2. *Sondas de RNA*: consisten en fragmentos de RNA monocadena generados mediante reacciones de transcripción *in vitro* que incorporan nucleótidos trifosfato marcados (tabla VIII). Se usan fragmentos de cDNA clonados en vectores de expresión. Los vectores más frecuentemente usados contienen secuencias promotoras de la transcripción de la T7 o la SP6 RNA polimerasas inmediatamente adyacente al inserto (fig. 12). Es importante tener en cuenta la orientación del inserto con respecto al promotor, ya que de ello depende el que se obtengan sondas de RNA complementario (crRNA) útiles para hibridar mRNA celular o bien sondas de mRNA en sí, que no son complementarias al mRNA celular, obviamente. Así,

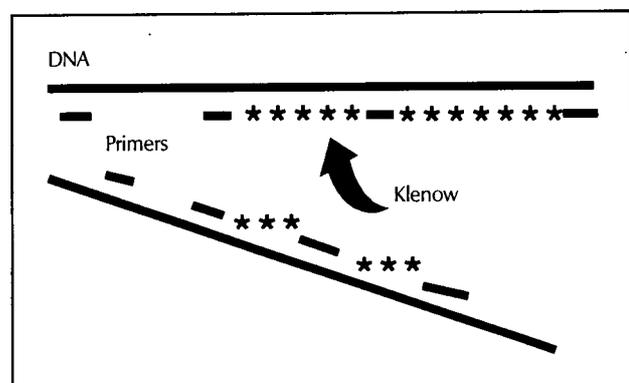


Fig. 11.—Marcado de sondas por random primer. El DNA es desnaturalizado por calor y se hibrida con oligonucleótidos de secuencia al azar (-). Estos oligos incitan la síntesis de cadenas de DNA complementarias por la fracción Klenow de la DNA polimerasa (que carece de actividad 5'-3' exonucleasa), incorporando los nucleótidos del medio, alguno de los cuales está marcado (\*).

**Tabla VIII.** Transcripción *in vitro*

1. Cortar (linearizar) el plásmido 3' at inserto.
2. Mezclar (para 20 µl):
 

4,0 µl 5X Buffer de transcripción.
2,0 µl 100 mM DTT.
0,8 µl RNasin.
4,0 µl 2,5 mM ATP, UTP, GTP.
2,2 µl 100 µM CTP.
1,0 µl plásmido con inserto DNA (1 µg).
5,0 µl CTP marcado.
1,0 µl RNA polimerasa.
3. Incubar a 37° C durante 1 h.

**Tabla IX.** Polinucleótido kinasa

- |   |
|---|
| 7,0 µl H <sub>2</sub> O.                |
| 2,0 µl 10X kinasa buffer.               |
| 9,0 µl ATP marcado en posición gamma.   |
| 1,0 µl (1 µg) oligo.                    |
| 1,0 µl T4 polinucleótido-kinasa (10 U). |

Incubar a 37° C durante 30 m.

cuando el inserto está dispuesto en el mismo sentido 5'-3' que el promotor (orientación denominada «sense»), se generan sondas de mRNA (útiles como control negativo o bien como fuente de mRNA para experimentos de traducción *in vitro*), las llamadas sondas sense. Por el contrario, cuando el inserto está orientado en el sentido contrario al promotor (orientación anti-sense), se generan sondas de cRNA, conocidas también como anti-sense, útiles para detectar mRNA.

b.3. *Oligonucleótidos*: consisten en sondas monocadena de 35-50 nucleótidos de secuencia específica que son sintetizados *in vitro*. Existen varios protocolos de marcaje de oligonucleótidos, de los que dos son los más usados:

1. *Fosforilación 5'* con T4 polinucleótido-kinasa (tabla IX): los procedimientos normales de síntesis (bien con fosforamiditas o con fosfotriésteres) generan oligos defos-

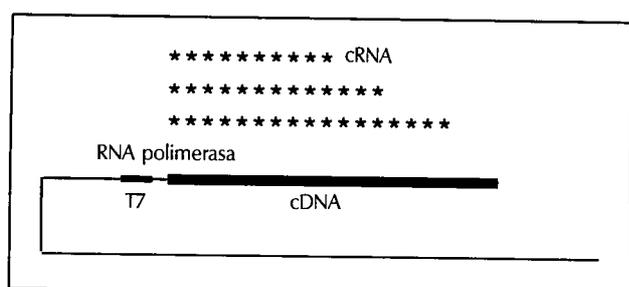


Fig. 12.—Marcado de sondas de RNA por transcripción *in vitro*. El vector de expresión contiene la secuencia promotora (T7) que es reconocida por la RNA polimerasa para sintetizar RNA usando el cDNA como molde e incorporando nucleótidos marcados del medio (\*).

**Tabla X.** Terminal-transferasa

- |  |
|--|
| 6,0 µl H <sub>2</sub> O.               |
| 1,0 µl (1 µg) oligo.                   |
| 4,0 µl 5X TdT buffer.                  |
| 8,0 µl ddATP marcado en posición alfa. |
| 1,0 µl TdT (10 U).                     |

Incubar a 37° C durante 1 h.

forilados, con un grupo -OH libre en el extremo 5'. Por tanto, se pueden usar directamente como sustrato de la T4 polinucleótido-kinasa en presencia de ATP marcado en el grupo fosfato gamma. La reacción de fosforilación transfiere este fosfato gamma marcado al extremo 5' del oligo.

2. *Adición 3'* con transferasa terminal (TdT) (tabla X): esta enzima incorpora nucleótidos al extremo 3', grupo OH-, de una cadena sin necesidad de la existencia de una cadena complementaria como molde. Por tanto, TdT se puede usar para añadir nucleótidos marcados al extremo 3' de un oligo. Cuando se usan deoxinucleótido-trifosfatos, como dATP marcado, la TdT incorpora varias moléculas seguidas. En la práctica es generalmente preferible incorporar sólo un nucleótido marcado por molécula de oligo. Esto se consigue mediante el uso de análogos di-deoxi-, como el ddATP marcado, que, por carecer del grupo OH- 3', no permiten la incorporación de nucleótidos adicionales (de manera similar a lo que ocurre con la reacción de terminación durante la secuenciación de DNA según el protocolo de Sanger).

### Análisis del DNA tipo Southern

E. Southern describió en 1975<sup>19</sup> un método para transferir DNA, previamente fraccionado según tamaño en un gel y desnaturalizado, a una membrana que puede ser hibridada con sondas para detectar secuencias concretas. Este procedimiento vino a ser conocido como «Southern» y, posteriormente, a una variante del mismo concepto para analizar RNA se denominó «Northern», jocosamente. Siguiendo el mismo juego de palabras, «Western» se usa para un análisis similar de proteínas. El principio físico utilizado para transferir DNA del gel a la membrana es la capilaridad, el mismo que se había utilizado durante años para limpiar manchones de tinta con papel secante; de ahí que E. Southern usara los términos «blot» y «blotting» para referirse a su protocolo. Aunque algunos han traducido literalmente estas palabras al español, creemos que es más práctico seguir usando los términos «Southern blot» o análisis tipo Southern. El término ha quedado tan arraigado que se usa incluso en ocasiones en que un campo eléctrico o la fuerza del vacío, en lugar de la capilar, es utilizada para transferir las moléculas a la membrana.

El protocolo del Southern blot se incluye en la tabla XI.

La esencia del análisis tipo Southern (fig. 13) es que los fragmentos resultantes de la digestión del DNA con un en-

**Tabla XI.** Southern blot

1. Digerir 10  $\mu$  DNA con enzima restricción.
2. Separar fragmentos por electroforesis en agarosa.
3. Desnaturalizar el DNA en el gel con solución alcalina.
4. Transferir por capilaridad, vacío o campo eléctrico a membrana.
5. Fijar el DNA a la membrana por calor o luz UV.
6. Hibridar con sonda específica.

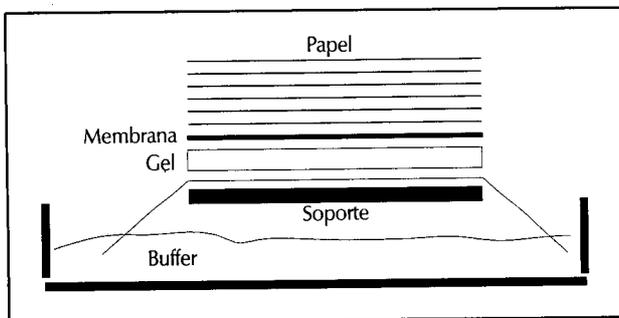


Fig. 13.—Análisis de DNA tipo Southern blot. El gel de agarosa en el que se han separado los fragmentos de DNA según su tamaño es transferido a una membrana gracias a la fuerza de capilaridad ejercida por un montón de papel seco colocado sobre la membrana, que atrae el buffer presente en el recipiente a través de un papel del filtro.

zima de restricción determinado son separados según tamaño y transferidos a una membrana respetando la distribución de fragmentos. A continuación se busca la existencia de una secuencia de DNA concreta en el filtro, mediante la hibridación con sondas complementarias a dicha secuencia. Puesto que estas sondas han sido marcadas previamente para que generen una señal radiactiva o colorimétrica, es posible visualizar una banda positiva allí donde exista un fragmento de DNA que contiene la secuencia complementaria a la sonda. Es mucha la información que se obtiene de un Southern blot, incluyendo: 1) existencia de una cierta secuencia en una muestra de DNA; 2) dosis: de modo semicuantitativo se puede determinar el número de veces que una secuencia está repetida en el genoma; 3) tamaño molecular del fragmento hibridado en relación a moléculas de tamaño conocido (estándar); 4) presencia de dianas de enzimas de restricción en una región genómica. Aquí reside la potencia de este tipo de análisis: dada la amplia gama de enzimas de restricción disponibles, es posible encontrar uno que se vea implicado en la mutación que queremos detectar y, por tanto, un análisis tipo Southern revelará fragmentos de DNA de distinto tamaño según que el enzima corte o no en un determinado punto. Esta técnica es la base del estudio de fragmentos de restricción polimórficos (RFLP),

esencia de estudios genéticos con fines diagnósticos y de construcción de mapas del genoma.

En lo que al diagnóstico de mutaciones se refiere, el Southern es el método de elección para determinar deleciones, inserciones, duplicaciones y otros reordenamientos genómicos que implican fragmentos grandes de DNA. También es útil en la detección de mutaciones puntuales, siempre que afecten la diana de un cierto enzima de restricción. Es asimismo la técnica fundamental en el análisis de mutaciones por DNA inestable.

### Bibliografía

1. Crossley M y Brownlee GG: Disruption of a C/EBP site in the factor IX promoter is associated with hemophilia B. *Nature*, 345:444-446, 1990.
2. Orkin SH: Disorders of hemoglobin synthesis: the thalasemias. En: Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Leder P y Majerus PW (eds.). *The molecular basis of blood diseases*. WB Saunders, Philadelphia, 106-126, 1987.
3. Purdue PE, Takada Y y Danpure CJ: Identification of mutations associated with peroxisome-to-mitochondrion mistargeting of alanine/glyoxylate aminotransferasa in primary hyperoxaluria type I. *J Cell Biol*, 111:2341-2351, 1990.
4. Pauling L, Itano HA, Singer SJ y Wells IG: Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science*, 110:543-548, 1949.
5. Ingram VM: Specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anemia hemoglobin. *Nature*, 178:792-794, 1956.
6. Chang JC y Kan YW: A sensitive new prenatal test for sickle cell anemia. *New Engl J Med*, 307:30-32, 1992.
7. Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J y Hakomori S: Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature*, 345:229-223, 1990.
8. Triggs-Raine BL, Feigenbaum ASJ, Natowitz M y cols.: Screening for carriers of Tay-Sachs disease among Ashkenazi Jews. *New Engl J Med*, 323:6-12, 1990.
9. Rommens JR, Iannuzzi MC, Kerem BS y cols.: Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*, 245:1059-1065, 1989.
10. Riordan JR, Rommens JR, Kerem BS y cols.: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245:1066-1073, 1989.
11. Yen PH, Li XM, Tsai SP y Shapiro LJ: Frequent deletions of the human X chromosome short arm result from recombination between low copy repetitive elements. *Cell*, 61:603-610, 1990.
12. Kazazian HH, Wong C y Youssoufian H: Hemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature*, 332:164-166, 1988.
13. Verkerk A, Pieretti M y Sutcliffe JS: Identification of a gene (FMR-1) containing a CCG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, 65:905-914, 1991.
14. Buxton J, Shelbourne P, Davies J y cols.: Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature*, 355:547-548, 1992.
15. La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE y Fischbeck KH: Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*, 352:77-79, 1991.
16. Paabo S, Higuchi RG y Wilson AC: Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *J Biol Chem*, 264:9709-9712, 1989.
17. Hames BD y Higgins SJ: *Nucleic acid hybridisation*. IRL Press. Oxford, 1985.
18. Kricka LJ: *Nonisotopic DNA probe technique*. Academic Press. San Diego, 1992.
19. Southern E: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98:503-517, 1975.