Unha actividade práctica proposta como un problema a resolver polo alumnado baseada nunha PCR seguida de dixestión con enzimas de restricción

Carlos Reigosa
IES Lucus Augusti

Resumo
Neste traballo exponse unha experiencia realizada co alumnado do módulo *Ensaios Biotecnolóxicos* do ciclo formativo de grao superior *Laboratorio de Análise e de Control de Calidade*. Nela, propúxoselles aos estudiantes un problema a resolver no laboratorio: a identificación da procedencia dunha mostra de carne en base a algunha proba xenética. A solución desenvolta polos alumnos e alumnas incluíu extracción do ADN, realización dunha reacción en cadea da polimerasa, e dixestión do ADN amplificado con endonucleasas de restricción.

Introducción

a) As actividades prácticas no laboratorio

O traballo práctico é unha parte fundamental do ensino das ciencias, xa que pode axudar aos estudiantes a desenvolver a comprensión da ciencia, a apreciar que a ciencia se basea en probas experimentais e a adquirir habilidades manipulativas (Abrahams e Millar, 2008). De tódolos xeitos, a efectividade das tarefas prácticas ten sido posta a proba e analizada en distintas investigacións (ver, por exemplo, Glaesser *et al.*, 2009), véndose, por exemplo, que, se se queren plantexar como problemas a resolver, é moi importante o dominio do coñecemento procedemental relevante por parte dos estudiantes, dimensión que moitas veces é relegada no ensino para favorecer o coñecemento conceptual.

Cabe destacar que rigorosos estudios cuantitativos como o de Pease e Kuhn (2011) mostran ventaxes do ensino baseado na resolución de problemas fronte a métodos máis tradicionais, como o baseado en exposicións a cargo do docente seguidas de discusións. Estes autores mostran que concebir as actividades prácticas en termos de que os estudiantes se impliquen na resolución de problemas fai que sexan máis efectivas, xa que o ensino baseado na resolución colaborativa de problemas permite compartir a información e o coñecemento, proporcionando un contexto apto para o desenvolvemento da cognición distribuida, e ademáis facilita diálogos auténticos, nos que os estudiantes confrontan puntos de vista. Así se da lugar a un importante potencial de transformación de coñecemento. Noutras experiencias (Reigosa, 2009 e 2010), levadas a cabo na ESO e no Bacharelato, mostramos casos nos que os estudiantes eran capaces de abordar con éxito tarefas no laboratorio de complexidade significativa, aportando solucións creativas e sorprendentes.

As oportunidades de aprendizaxe dos estudiantes no contexto das tarefas prácticas no laboratorio dependen criticamente da interacción profesor-estudiantes (Högström *et al.*, 2010), a cal aquí se concibíu buscando permitir aos estudiantes o desenvolvemento dunha crecente capacidade e competencia autónoma, transferíndolles progresiva responsabilidade no proceso de resolución. Para iso, nesta tarefa non se lles daban pasos a seguir, senón que eran eles os que debían propoñelos. A interacción entre o profesor e os estudiantes plantexouse orientada a axudarlles a dominar a comprensión e uso das ferramentas conceptuais e procedimentais necesarias.

b) Extracción de ADN, PCR e análise de restricción

O plantexamento desta actividade baseouse na aplicación das técnicas expostas en dous cursos organizados polos servizos de formación do profesorado da Consellería de Educación (Quinteiro, 2008 e Sanjuán *et al.*, 2009). Para identificar a procedencia dunha mostra biolóxica, extraeuselle o ADN, despois fíxose unha PCR empregando uns cebadores axeitados e, por último, realizouse unha dixestión con endonucleasas de restricción seguida de electroforese en xel de agarosa con tinción con bromuro de etidio para diferenciar entre distintos ADNs. Máis información sobre estas técnicas pode atoparse en Perera *et al.* (2002), por exemplo.

A extracción do ADN fíxose co kit comercial EZNA Tissue Kit, de Omega Biotek, o cal inclúe diversos reactivos que, usados secuencialmente, permiten seguir varias etapas que permiten a extracción e purificación do ADN. Despois do lisado celular, no que se rompen estructuras celulares tales como membranas, a mostra depositase nunha minicolumna con placa filtrante na que queda retido o ADN. Tras isto son eliminados por centrifugación cunha microfuga e usando diversos disolventes os compoñentes da mostra distintos do ADN, como as proteínas. Nalgunhas etapas de centrifugación acádanse aceleracións de ata 16000 xg. Finalmente engádese un reactivo no que o ADN se disolve e, por centrifugación, atravesa a columna, obténdose así purificado.

En canto á PCR, aquí fixéronse dúas con dúas parellas distintas de cebadores. Unha destas parellas de cebadores foi a composta por H15149 e L14725, útiles para ADN de peixes (Sanjuán e Comesaña, 2002), pero utilizables tamén con algunhas outras especies. Serven para amplificar un segmento que engloba os últimos 50 bp do xene do ARNt do ácido glutámico, así como os primeiros 436 bp do extremo 5' do xene do citocromo b, resultando un fragmento de 486 bp. A esta PCR chamarémola PCR A. A outra PCR, que usa a parella de cebadores L14841 e H15149, deseñouse (Kocher *et al.*, 1989) de xeito que permite a amplificación de ADN de moitos vertebrados, insectos e arácnidos. Estes dous cebadores permiten a amplificación dun segmento do ADN mitocondrial que para moitas especies ten 307 bp. Chamaremos a esta reacción PCR B.

Empregáronse reactivos de Promega para preparar un cóctel de PCR, que, aparte dos cebadores, incluía polimerasa, mestura de nucleótidos activados, tampón, magnesio e auga. Mesturábanse 24 µL de cóctel con 1 µL de ADN e introducíanse no termociclador, onde seguía o seguinte programa, idéntico para as dúas PCRs:

-Desnaturalización inicial: 95ºC, 5 min.

-35 ciclos de:

-Desnaturalización: 93ºC, 1 min.

-Fusión: 47ºC, 1 min.

-Extensión: 72ºC, 2 min.

-Extensión final: 72ºC, 10 min.

Os segmentos de ADN así obtidos son moi semellantes en tamaño para ADNs de distintas especies, pero a súa secuencia de nucleótidos non é igual, polo que, se se fai unha dixestión con enzimas de restricción, xéranse fragmentos que si permiten diferenciar ADNs de distintas especies. As enzimas de restricción fragmentan o ADN por sitios específicos, de xeito que os fragmentos xerados son sempre os mesmos para unha mesma cadea de ADN. Aquí contouse con 4: EcoRI, BamHI, HindIII e HaeIII, aisladas a partires de *Escherichia coli*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Haemophilus influenzae* e *Haemophilus aegyptius*, respectivamente.

Por último, para visualizar os fragmentos obtidos tras a dixestión, pode facerse unha electroforese en xel de agarosa con tinción de bromuro de etidio. Tras someter durante 30 minutos aproximadamente o xel cargado coas mostras a unha diferencia de

potencial de 160 V, e poñéndoo despois nun transiluminador, pódense ver as distintas bandas, correspondentes aos distintos fragmentos de ADN.

Contexto educativo

A experiencia levouse a cabo cun grupo de estudiantes de 2º curso do ciclo formativo de grao superior *Laboratorio de Análise e de Control de Calidade*, no módulo *Ensaios Biotecnolóxicos*. O currículo oficial establece que os estudiantes, como resultado da aprendizaxe deste módulo, deben ser capaces, entre outras cousas, de extraer ácidos nucleicos e de realizar ensaios xenéticos (Consellería de Educación, 2008).

Nesta actividade, propúxoselles aos estudiantes unha tarefa que podería darse nun contexto real de traballo, co cal se pretendía que a abordaran con maior motivación. A situación que se lles plantexaba consistía en que o xefe do seu laboratorio quería comprobar se unha mostra consistente nuns restos de carne eran de polo ou de porco. A mostra estaba bastante deteriorada e a identificación da súa procedencia por inspección visual era difícil. Por iso, eles debían deseñar algún tipo de proba xenética para ver se a mostra era de carne de polo ou de porco.

Os alumnos e alumnas xa recibiran antes de abordar esta tarefa formación teórica e práctica sobre as técnicas que despois empregaron. Na aula traballáranse conceptos de bioquímica, incluindo loxicamente a estructura dos ácidos nucleicos e o seu metabolismo, así como o fluxo de información xenética e aspectos como métodos de obtención, análise e manipulación de ácidos nucleicos, a reacción en cadea da polimerasa, a obtención e manupulación de ADN recombinante, etc. Tamén realizaron numerosas prácticas de laboratorio, entre elas a obtención e purificación de ADN humán e doutros animais, a realización de diversas PCRs usando distintas parellas de cebadores, a dixestión de ADN amplificado empregando endonucleasas de restricción e a electroforese en xel de agarosa, nas cales aprenderon técnicas necesarias para a solución que os estudiantes propuxeron para esta práctica.

Resultados: o proceso de resolución da tarefa adoptado polos estudiantes

Ante o problema plantexado, os estudiantes optaron por extraer o ADN da mostra, facer unha PCR que permitise a amplificación dun segmento de ADN, continuando cunha dixestión cunha endonucleasa de restricción que xenerase fragmentos distintos con ADN de polo ou porco, e rematando cunha electroforese en xel de agarosa.

Decidiron facer iso tamén con mostras patrón de polo e porco, para poder comparar a mostra problema con elas e así decidir sobre a súa procedencia. O traballo con mostrar patrón ademáis permitíu optimizar as condicións do ensaio, escollendo unha PCR axeitada e a enzima de restricción que permitise ver maior diferencia entre os fragmentos xenerados a partires de ADN de polo ou porco.

O ADN de mostra e patrón foi extraido co kit comercial EZNA Tissue Kit. Empregando un espectrofotómetro visible-UV medíuse a absorbancia a 260 e 280 nm, constatando que estaba en valores aceptables.

Os estudiantes, en prácticas realizadas previamente, fixeran tres PCRs. Unha delas era específica para ADN humán polo que quedou descartada. As outras dúas, como xa se indicou, chamámolas PCR A e PCR B. En canto as enzimas de restricción, eran as catro que xa dixemos: EcoRI, BamHI, HindIII e HaeIII.

Para escoller os cebadores e a endonucleasa mellores para os fins da tarefa, os estudiantes decidiron facer con parellas de mostras patrón de polo e porco as dúas PCRs e as catro dixestións, tras o cal se faría a electroforese en xel de agarosa para ver os resultados. En total foron 2 mostras x 2 PCRs x 4 dixestións = 16 ensaios, organizados según a táboa 1.

Mostra	Procedencia	PCR	Enzima
1	Polo	A	HindIII
2	Porco	A	HindIII
3	Polo	A	BamHI
4	Porco	A	BamHI
5	Polo	A	HaeIII
6	Porco	A	HaeIII
7	Polo	A	EcoRI
8	Porco	A	EcoRI
9	Polo	B	HindIII
10	Porco	B	HindIII
11	Polo	B	BamHI
12	Porco	B	BamHI
13	Polo	B	HaeIII
14	Porco	B	HaeIII
15	Polo	B	EcoRI
16	Porco	B	EcoRI

Táboa 1. Mostras patrón sometidas a distintas PCRs e dixestións

Os resultados de todo o proceso, rematado coa electroforese, móstranse na figura 1, obtida cun analizador de imáxes cunha cámarna conectada. As mostras están ordeadas na figura de dereita a esquerda e as dúas últimas son dous marcadores de pesos moleculares de 500 e 1000 bp, respectivamente.

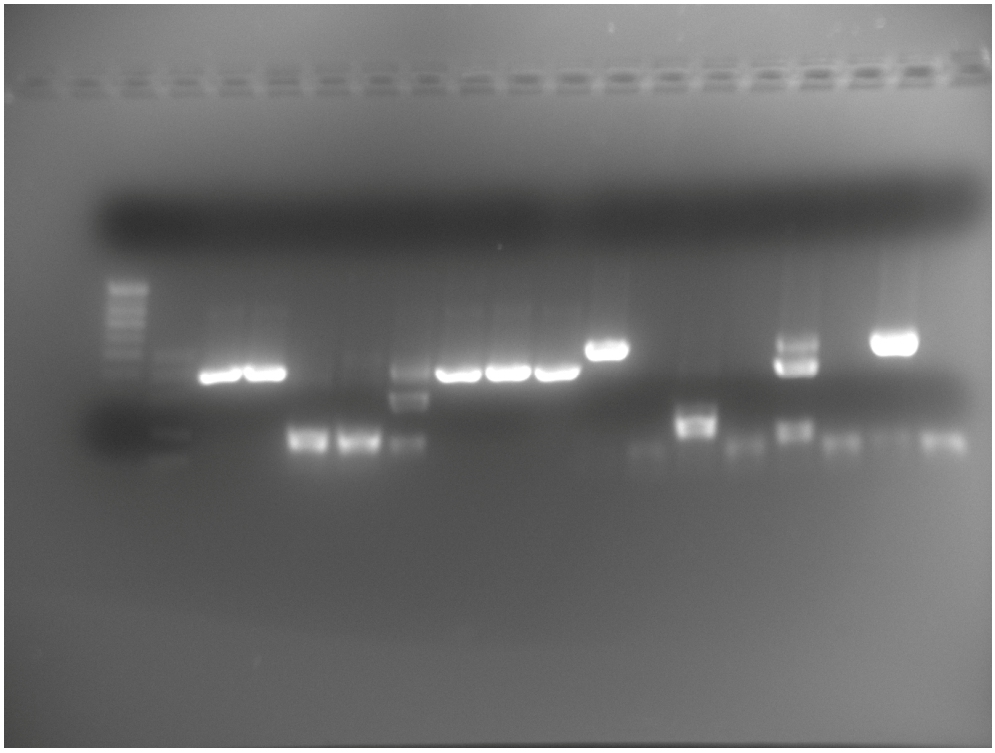

Figura 1. Foto dos resultados cos patróns

Á vista da imaxe mostrada na figura 1, os estudiantes consideraron que as condicións máis axeitadas, por haber máis diferencias nos fragmentos xerados eran:

-Mostras patrón 3 e 4 – PCR A – BamHI

-Mostras patrón 7 e 8 – PCR A – EcoRI

-Mostras patrón 11 e 12 – PCR B – BamHI

Finalmente, os estudiantes optaron pola PCR B, cos cebadores L14841 e H15149, e a enzima BamHI, por ser claramente distintos os resultados obtidos: o ADN de polo non sufríu fragmentación, mentres que o ADN de porco mostrou división en dous fragmentos menores, observándose tamén a banda correspondente ás moléculas de ADN que non se fragmentaron..

Usando o software PhotoCapt, os estudiantes fixeron unha determinación aproximada do tamaño dos fragmentos xerados coas mosrtas 11 e 12, obténdose os valores que se mostran na táboa 2.

Porco	Polo
400	400
300	
150	

Táboa 2. Tamaños en bp dos fragmentos de ADN dos patróns sometidos á PCR B e dixestión con BamHI

O tamaño da banda meirande, a de 400 bp, ten un valor maior do que ten este segmento habitualmente, 307 bp. Isto pode deberse a que ese fragmento sexa maior para o polo e o porco, ou a unha incorrecta asignación dos valores de referencia do marcador de pesos moleculares.

Unha vez posto a punto o procedemento, os estudiantes fixeron o experimento decisivo para averiguar a procedencia da mostra, facendo extracción do ADN, a PCR B, dixestión con BamHI e electroforese en xel de agarosa usando bromuro de etidio para a tinción. Este proceso foi seguido para a mostra problema xunto con patróns de polo e porco, como se mostra na táboa 3.

Número	Mostra
1	Problema
2	Patrón de polo
3	Patrón de porco

Táboa 3. ADNs analizados no experimento final

A fotografía tomada despois da electroforese móstrase na figura 2. As mostras están ordeadas de dereita á esquerda e as dúas últimas son marcadores comerciales de pesos moleculares de 500 e 1000 bp, respectivamente.

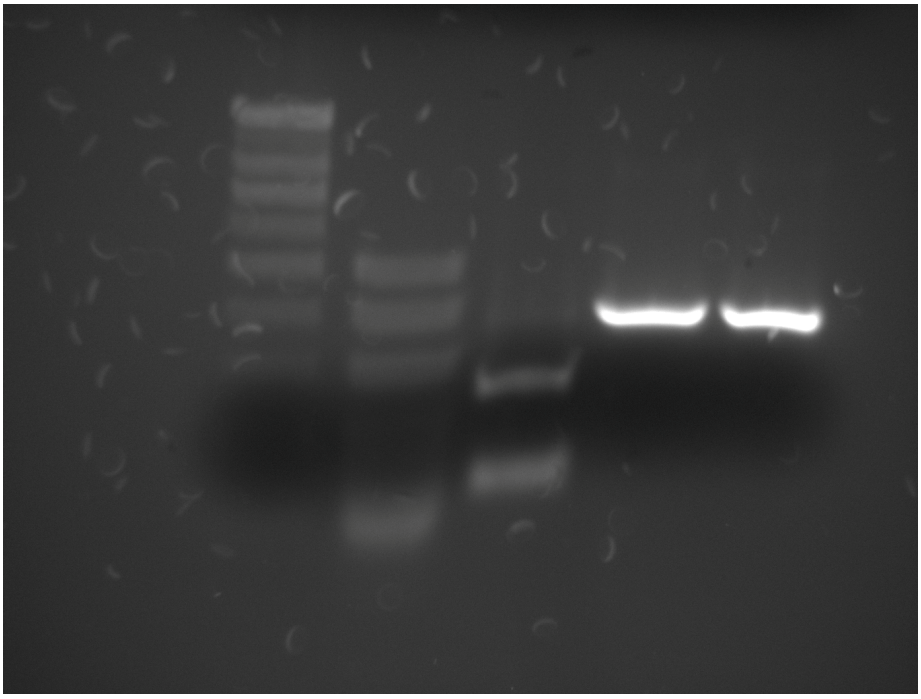

Figura 2. Foto do experimento decisivo

Na figura 2 vese claramente que a mostra problema é igual que o patrón de polo e distinta da de porco. Así, os estudiantes puideron diferenciar a procedencia da mostra e cumplir co encargo que se lles pedía.

Usando o software PhotoCapt realizouse unha estimación do tamaño das bandas, resultando ser practicamente coincidentes cos da táboa 1.

Discusión e conclusión

Os estudiantes foron quen de planificar un experimento de alta complexidade conceptual e manipulativa, implicando conceptos propios de xenética, e de poñelo en práctica de xeito, ademáis, exitoso.

Cabe, pois, facer unha valoración positiva da experiencia levada a cabo, a cal lles resultou motivadora xa que estaba plantexada nun contexto compatible co que pode ser a súa actividade profesional real. A planificación desta actividade práctica permitíulles tomar decisións metodolóxicas e epistemolóxicas, decidindo qué probas se podían construir no laboratorio que fosen relavantes para resolver o problema. Ademáis, foron capaces de usar de xeito integrado e harmónico coñecementos conceptuais e procedementais.

Por outra banda, cabe indicar que o contexto social resultou axeitado, cunha participación boa de todos os estudiantes e unha boa relación entre eles, así como unha interacción positiva co profesor, que orientou os seus contacto cos estudiantes a axudarlles a que eles fosen capaces de resolver o problema plantexado, evitando darlles instruccións concretas a seguir.

Bibliografía

-ABRAHAMS, I. e MILLAR, R.: Does practical work really work? A study of the effectiveness of practical work as a teaching and learning method in school science. *International Journal of Science Education*. 30(14), 2008.- pp. 1945-1969.

-CONSELLERÍA DE EDUCACIÓN: Decreto 221/2008 polo que se establece o corrículo do título en técnico superior en Laboratorio de Análise e de Control de Calidade. 2008.

-GLAESSER, J., GOTT, R., ROBERTS, R. e COOPER, B.: Underlying success in open-ended investigations in science: using qualitatitive comparative analysis to identify necessary and sufficient conditions. *Research in Science and Technological Education.* 27(1), 2009.- pp. 5-30.
-HÖGSTRÖM, P., OTTANDER, C. e BENCKERT, S. Lab work and learning in secondary school chemistry: the importance of teacher and student interaction. *Research in Science Education*. 40, 2010.- pp. 505-523.
-KOCHER, T.D., THOMAS, W.K, MEYER, A, EDWARDS, S.V., PÄÄBO, S., VILLABLANCA, F.X. e WILSON, A.C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 86, 1989.- pp. 6196-6200.
-PERERA, J., TORMO, A. e GARCÍA, J.L. *Ingeniería Genética. Volumen I. Preparación, Análisis, Manipulación y Clonaje de DNA*. Madrid: Síntesis, 2002.
-PEASE, M.A. e KUHN, D. Experimental analysis of the effective components of problem-based learning. *Science Education*. 95, 2011.- pp. 57-86.
-QUINTEIRO, J. *Biotecnoloxía*. Curso organizado polo Centro de Formación e Recursos de Santiago, 2008.
-REIGOSA, C. A challenge for students to design a experiment to measure force in circular motion. *School Science Review*. 91(334), 2009.- pp. 87-92.
-REIGOSA, C. Una experiencia de resolución de problemas de física y química en el laboratorio de ESO. *Alambique. Didáctica de las Ciencias Experimentales*. 65, 2010.- pp. 110-116.
-SANJUÁN, A e COMESAÑA, A.S. Molecular identification of nine commercial flat fish species by polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism analysis of a segment of the cytochrome b region. *Journal of Food Protection.* 65(6), 2002.- pp. 1016-1023.
-SANJUÁN, A., DE CARLOS, A. e COMESAÑA, A.S. *Ensaios Biotecnolóxicos: Aplicacións da PCR e DNA Recombinante.* Curso organizado polo Centro de Formación e Recursos de Vigo, 2009.