

TECNOLOGÍA

Biología Molecular

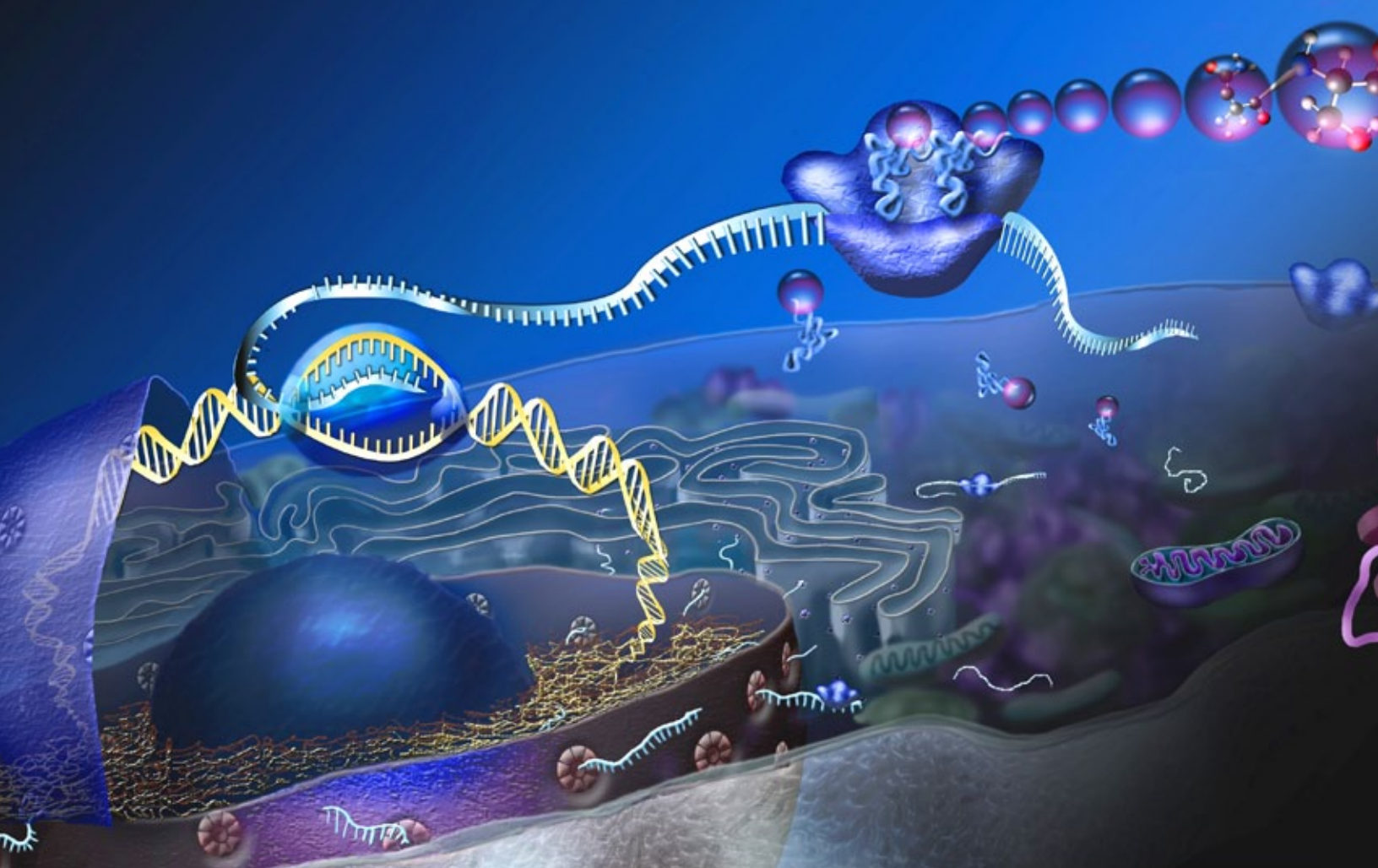
Al Alcance de Casi Cualquier Laboratorio para la Industria Alimentaria



¿Qué se imagina usted cuando escucha hablar de Biología Molecular? Parece un tema tan complicado que sólo pueden manejarlo científicos muy especializados dentro de un laboratorio con alta tecnología. No obstante, la biología molecular que se puede definir como “la disciplina científica que busca comprender las bases moleculares de la herencia, la variación genética y los patrones de expresión

de los genes” está hoy al alcance de casi cualquier laboratorio, ya sea de diagnóstico clínico o de análisis para la industria alimentaria.

¿Qué ha permitido esto?, ¿cómo se ha llegado a “democratizar” una disciplina tan compleja? Obviamente que detrás de esta maravilla hay años y años de investigación científica que, aplicada a la industria, nos permite utilizar herramientas de la biología molecular para propósitos muy específicos.



Dilucidar la estructura del ADN y cómo se replica (mitosis), ha sido fundamental para que, con técnicas de secuenciación, se haya podido entender y “leer” el genoma de casi todos los organismos vivos, incluso el del ser humano.

¿Cómo empezó esta historia? La Biología Molecular comienza con la investigación de los componentes moleculares de la célula. La piedra angular es el descubrimiento de las moléculas de ADN. El ADN, palabra que hoy se usa en forma trivial para referirse al constituyente intrínseco de algo o alguien, es justamente eso, la estructura básica con la cual se construye el genoma de todos los seres vivos (los virus constituyen un capítulo aparte que vamos a excluir en este artículo para no complicarnos más de la cuenta).

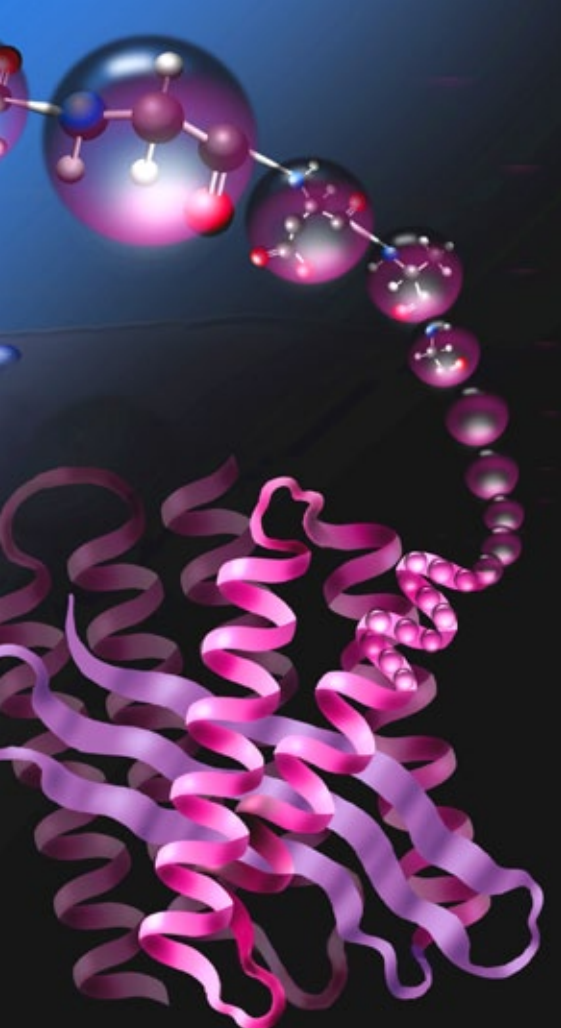
Dilucidar la estructura del ADN como una cadena de 2 hebras que son complementarias entre sí y la manera en que se replica, es un hito fundamental para entender cómo se

transmite la información genética de una célula a otra al momento de reproducirse. El ADN se replica dentro del núcleo de la célula, separa sus 2 hebras y se hace una “copia” de cada una duplicándose. Así, la nueva célula cuenta con la misma cantidad de ADN y por lo tanto la misma información genética. Este proceso que se repite cada vez que se replica una célula se conoce como mitosis.

Para descifrar o “leer” el genoma, se desarrollaron técnicas de secuenciación inicialmente muy complejas y numerosos experimentos para ver cómo se traducía esa información en proteínas. Hoy en día, se conoce el genoma de casi todos los organismos vivos, incluso el del ser humano cuyo ADN

contiene entre 20.000 y 25.000 genes. La mayoría de la secuenciación se realizó en universidades y centros de investigación de los Estados Unidos, Canadá, Nueva Zelanda, Gran Bretaña y España. Debido a la amplia colaboración internacional y los avances en la tecnología computacional, el genoma completo fue presentado en abril del 2003, dos años antes de lo esperado. Esto es lo que se conoce como “Proyecto Genoma Humano”.

¿Por qué contar toda esta historia? Porque actualmente, derivada de esta aventura, contamos con una tecnología muy poderosa que es el PCR en tiempo real. Esta herramienta nos permite identificar y diferenciar, dentro de muestras simples o mezclas muy complejas, la



presencia de virus, hongos (levaduras) y bacterias patógenas para hacer un diagnóstico rápido y fiable de la causa de una enfermedad en los seres humanos. Pero también se aplica a la industria alimentaria, donde además de los patógenos que puede haber presentes afectando la inocuidad de los alimentos, podemos identificar y diferenciar las distintas especies animales que contiene un alimento o si contiene alérgenos de origen vegetal o animal e incluso si contiene organismos genéticamente modificados (GMO). Todo lo que es necesario para cumplir con la legislación de cada país en cuanto al etiquetado de los alimentos.

El acrónimo PCR viene del inglés “*Polymerase Chain Reaction*” o reacción

de polimerasa en cadena en español. Esta tecnología utiliza 2 conocimientos fundamentales de la biología molecular: la secuencia del genoma de cada organismo y la capacidad del ADN de replicarse en presencia de la enzima conocida como polimerasa. Con el PCR buscamos una corta secuencia de ADN específica del organismo que queremos identificar. Se llama secuencia blanco o *target*. Para ello utilizamos “partidores” que son pequeños trozos de ADN que se adhieren al inicio de nuestra secuencia blanco en una hebra del ADN y al final de ella en la hebra complementaria. Desde ahí, en presencia de la Polimerasa y las 4 unidades básicas del ADN: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T) comienza la replicación en ambas direcciones y el pedacito que buscamos se duplica. Este ciclo se repite entre 30 y 40 veces para aumentar exponencialmente la cantidad de ADN. Hablamos de un PCR en tiempo real porque a medida que el ADN aumenta, lo visualizamos a través de una señal visible que emiten las “sondas”. Estas también son pequeños trozos de ADN complementarios a otra zona del ADN blanco que están marcadas con moléculas fluorescentes o fluoróforos. El equipo donde se realiza la reacción es capaz de detectar la señal de las sondas y transformarlas en un gráfico que nos informa en todo momento la presencia o ausencia del ADN blanco. También existen técnicas de PCR en tiempo real múltiples. Eso significa que, utilizando distintos fluoróforos, podemos identificar en una misma muestra el ADN de más de un organismo. El PCR en tiempo real puede ser cualitativo y/o



Determinación de Micotoxinas

soluciones analíticas para varios productos



RIDASCREEN®

ELISA sensibles para una detección cuantitativa



RIDASCREEN® FAST

ELISA cuantitativo para resultados rápidos



Immunoaffinity and Clean-up columns

Purificación de muestras antes de HPLC /GC/LC-MS/MS y ELISA



RIDA® QUICK RQS

Pruebas de Flujo Lateral para una detección cuantitativa



RIDA® QUICK

Pruebas de flujo Lateral para una detección semi cuantitativa



Trilogy®

Columnas de inmunofinidad, estándares, material de referencia certificado y ahora rondas interlaboratorios





El PCR en tiempo real permite identificar el ADN de patógenos en alimentos, diferenciar las distintas especies animales que pueda contener, si tiene alérgenos de origen vegetal o animal y hasta acusar la presencia de organismos genéticamente modificados (GMO).

cuantitativo, es decir sirve para identificar, pero también para determinar la cantidad del organismo presente.

Para diseñar y producir un *kit* de PCR en tiempo real, se necesitan años de investigación científica y experimentos para validarlos y certificarlos. Lo mismo para desarrollar equipos automatizados que simplifican la tarea y *software* que nos permiten interpretar los resultados en forma inmediata. Todo lo anterior, hace posible contar hoy en día con una tecnología que es altamente sensible, específica, rápida y confiable en un laboratorio de diagnóstico clínico o de análisis de alimentos.

¿Pero cómo empezar? Para empezar, debemos contar con un laboratorio que tenga 3 áreas separadas: un área para el pretratamiento y la extracción del material genético de las muestras a analizar; una segunda área limpia o libre de ADN para preparar los tubos donde se va a realizar la detección y una tercera área donde estará el equipo o termociclador en tiempo real.

Cada área debe contar con su propio equipamiento para evitar la contaminación y el flujo de trabajo debe ser unidireccional; es decir desde el área 1 hacia la 3. El equipamiento es relativamente simple: en la primera área necesitamos una campana de flujo laminar, centrífuga, vórtex, incubador con agitación, además del material para el pretratamiento de la muestra dependiendo de la matriz de partida. En la segunda área basta contar con un gabinete para manipular los reactivos y un *freezer* a -20°C para conservarlos. En la tercera área estará el termociclador, un computador para el análisis de los resultados y una zona sucia para eliminar el material amplificado. En cada área vamos a necesitar micropipetas de distintas medidas, puntas estériles libres de DNAsas y guantes libres de talco.

¿Pero cómo elijo los reactivos y el equipo? Esa es otra variable muy importante porque hay distintas marcas de reactivos; algunas mejores que otras. Aquí mencionamos algunas características que se deben tener en cuenta al

momento de elegir. La robustez, sensibilidad y especificidad de la técnica. El tipo de “sondas” y de polimerasa que utiliza. Si es cuantitativa se debe conocer su límite de detección. Las certificaciones con que cuenta. Y muy importante, los controles que utiliza.

En cuanto al equipo debemos fijarnos en el número de canales que tiene, ya que de ello depende si puedo realizar PCR múltiples. La facilidad de uso, la tecnología para manejar los cambios de T° de la cual depende su rapidez, el número de muestras que se pueden procesar simultáneamente, la cantidad de insumos que utiliza. También si es abierto, es decir si permite utilizar *kits* de distintas marcas. Debemos evaluar la calidad versus el precio y la funcionalidad del equipo. Es como un auto: hay que elegirlo a la medida de la necesidad de quien lo usa.

Y tal vez, lo más importante de todo es contar con un sólido soporte postventa: un buen servicio técnico para el equipo y especialistas capaces de solucionar dudas, que conozcan bien sus productos, que apoyen y aporten con su conocimiento científico.

¿Increíble no? En síntesis, actualmente podemos contar con el “*state of art*” de la tecnología en nuestro laboratorio de análisis: Biología Molecular Aplicada en la técnica de PCR en tiempo real.

¡El futuro ya llegó!

Angélica Araneda Juranovic, Bioquímica
angelica.araneda@ygeia.cl