

## Més a prop de la genètica

Laia Comajuncosa Charques

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquest treball de recerca i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per a altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol del treball. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al web de la URL. Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts del treball com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de este trabajo de investigación y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título del trabajo. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al web de la URL. Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** The access to the contents of this research work and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the work must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside URL web is not allowed. These rights affect both the content of the work and its abstracts and indexes.

# MÉS A PROP DE LA GENÈTICA

nanoschematic 

DNA contains the genetic information that allows all modern living things to function, grow and reproduce. However, it is unclear how long in the 4-billion-year history of life DNA has performed this function, as it has been proposed that the earliest forms of life may have used RNA as their genetic material. [00][10] DNA may have acted as the central part of early cell metabolism as it can both transmit genetic information and carry out catalysis as part of ribozymes. [11] This ancient RNA world, where nucleic acid would have been used for both catalysis and genetics may have influenced the evolution of the current genetic code based on four nucleotide bases. This would occur, since the number of different bases in such an organism is a trade-off between a small number of bases increasing replication accuracy and a large number of bases increasing the catalytic efficiency of ribozymes. [12]

However, there is no direct evidence of ancient genetic systems, as the way in which DNA codes with the help of the ribosome, which is still used in the modern world, is a complex process. In the past, it was thought that the first genetic code was a simple code, but the discovery of the genetic code in the 1960s has shown that the genetic code is a complex system. A report of the genetic code is available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC116111/>

Ciència  
Curs 20-21  
2n Batxillerat

*Your genetics load the gun.  
Your lifestyle pulls the trigger  
~Caldwell Esselstyn~*

## ***AGRAÏMENTS***

M'agradaria donar les gràcies a totes les persones que m'han ajudat al llarg d'aquest treball, ja sigui de manera acadèmica com de suport emocional o moralment.

*~ I'd like to thank Mom and Dad, just for the genetics ~*

Per començar m'agradaria donar les gràcies a la meua família per l'ajuda que he rebut, donant-me suport i formant part del meu experiment.

M'agradaria donar les gràcies també a la Marta Pérez-Alcázar, PhD Neurociències (llicenciada en biologia) que actualment treballa a un dels laboratoris de la ciutat de Göteborg, Suècia. I a la meua cosina Júlia Pié Comajuncosa, estudiant de farmàcia de la UB, que m'ha proporcionat material teòric d'unes pràctiques de la seva carrera.

També m'agradaria parlar sobre les meves amigues, que en tot moment m'han ajudat en el que ha estat possible i ens hem aguantat mútuament a l'hora de queixar-nos sobre qualsevol cosa.

També m'agradaria donar les gràcies a la M.B, que tot i no ser la meua tutora m'ha ajudat molt sobretot en el tema de la correcció dels continguts, ja que ella coneix molt millor aquest àmbit i també em va ajudar moltíssim en el moment de l'elecció del treball.

I finalment però no menys important, al meu tutor, que tot i no estar gens familiaritzat amb aquest tema, com jo al principi, n'hem après junts.

## ***ABSTRACT***

### ***ENGLISH:***

Through my work, I had the intention to express my passion for genetics. Genetics studies the factors that are transmitted from generation to generation, hereditary factors. In this work, I had two objectives: the first was building a gel electrophoresis device that works correctly and the other objective was seeing if, with this same device, differences could be observed in the DNA of the saliva of four members of the same family. First I carried out the construction of the electrophoresis apparatus with homemade material and accessible to everyone. Then I did the experiment three times: the first with only food colouring, the second try, I did it with the saliva sample and food colouring again, and finally, the third test was done with the Runsafe colouring (a non-toxic alternative to Ethidium Bromide) and with saliva samples but for this trial, I had previously extracted the DNA from saliva in an easy, simple and homemade way.

The conclusions that I was able to draw from this work are mainly that the samples of the parents are totally different between them, while the samples of the two daughters are much more similar between them. This is because each person has a different genotype from all the others, it is a unique part of each person, therefore, the two sisters have more similarities between them than with the samples of the parents since the genotype of the sisters has the same origin.

Through this work, I would like to have been able to bring genetics to people and show that it is not always as complex as it seems.

### ***CASTELLANO:***

A través de mi trabajo he querido plasmar mi afición por la genética. La genética estudia los factores que se transmiten de generación en generación, los factores hereditarios. En este trabajo tenía dos objetivos: el primero construir un aparato de electroforesis en gel y que funcionara debidamente y el otro ver si con este mismo aparato se podían observar diferencias en el ADN de la saliva de cuatro miembros de una misma familia. Primero llevé a cabo la construcción del aparato de electroforesis con material casero y accesible para todo el mundo. Después realicé tres veces el experimento: el primero únicamente con colorante alimentario, el segundo con las muestras de saliva y colorante alimentario otra vez y, por último, la tercera prueba la hice con el colorante Runsafe (una alternativa no tóxica del Bromuro de Etidio) y con las muestras de saliva pero esta vez extrayendo previamente el ADN de la saliva de una manera fácil, sencilla y casera. Las conclusiones que pude extraer de este trabajo son principalmente que las muestras de los padres son totalmente distintas entre ellas mientras que las muestras de las dos hijas son mucho más parecidas entre ellas. Ésto es debido a que cada persona tiene un genotipo diferente a todos los demás, es una parte única de cada persona y por ello, las dos hermanas tienen más similitudes entre ellas que con las muestras de los padres ya que el genotipo de las hermanas tiene el mismo origen.

A través de este trabajo me gustaría haber podido acercar la genética a la gente y hacer ver que no siempre es tan compleja como parece.

# ÍNDEX

1. Introducció.....	1
2. Cos teòric:.....	4
2.1. Introducció a la genètica.....	4
2.2. Què és l'electroforesi en gel? .....	6
2.2.1. El gel:.....	7
2.2.2. Colorants: .....	9
2.3. Història i origen de l'electroforesi en gel .....	12
2.4. Utilitats de l'aparell: .....	13
2.5. Aplicacions pràctiques de l'electroforesi en gel.....	14
2.6. Construcció d'un aparell d'electroforesi en gel.....	17
2.6.1. Material necessari .....	17
2.6.2. Procediment:.....	18
2.7. Extracció d'ADN:.....	21
2.8. Primera prova: .....	24
2.9. Segona prova: .....	25
2.10. Prova definitiva: .....	26
3. Conclusions: .....	33
4. Glossari.....	36
5. Bibliografia:.....	39

## ***1. INTRODUCCIÓ:***

He triat aquest treball perquè des de tercer d'ESO, em va començar a interessar la biologia en general i encara més quan vam començar a treballar la genètica, les lleis de Mendel, els factors hereditaris, els grups sanguinis, les diferents bases de l'ADN\*... També em va sobtar molt que cada persona tingués un genotip\* únic i que fos diferent fins i tot dels nostres germans. Hem de tenir en compte que el codi genètic\* no és personal, és universal. El que sí que és diferent per cada individu és la seqüència de nucleòtids.

Em vaig començar a interessar en tot allò que es relaciona amb la policia científica arran de diferents sèries on trobaven el culpable a través d'una mostra de teixit o d'una gota de sang. Algunes sèries eren per exemple "*Rizzoli & Isles*", "*Crossing Lines*", "*Hawaii 5.0*" i qualsevol de *CSI*. També arrel de diferents de llibres com les de *Hjorth & Rosenfeldt* o les de *Jo Nesbø*. Un altre factor que va fer que entrés en aquest món va ser el Batxillerat Americà. Des que em van proposar les optatives a primer curs, sabia que la que triaria a tercer seria criminologia, i així va ser: aquest estiu vaig fer aquesta assignatura impartida per la professora Ivette Mendez Johnsen. Així va ser com vaig voler fer un treball relacionat amb aquest tema.

Partint de la premissa que el material genètic és hereditari, tal com va demostrar Mendel, **la hipòtesi que em vaig plantejar, era si hi havia més semblança entre les mostres de saliva de la meva germana i la meva que amb la dels nostres progenitors, fent servir un aparell d'electroforesi en gel que jo mateixa havia construït.** Per dur a terme aquesta comprovació, prèviament havia de fer l'extracció d'ADN de les mostres de saliva.

Al llarg del treball em vaig anar trobant algunes limitacions: la primera va ser que aquest estudi l'hauria d'haver dut a terme amb les mostres de tres generacions (avis paterns, tiets paterns i cosins), però degut a la COVID-19 i la privació de desplaçaments, m'ha impedit anar a veure a una gran part de la meva família paterna, amb la qual cosa he hagut d'adaptar-lo a l'estudi de les proteïnes de la saliva del meu nucli familiar (pare, mare, germana i jo mateixa). Un altre entrebanc

---

\* Veure glossari



va ser a l'hora de fer les proves, atès que degut al mateix tema no vaig poder accedir a un laboratori amb material específic, però per sort em van deixar alguns instruments de laboratori de l'escola (pipeta, vas de precipitats, erlenmeyer...) per poder dur a terme l'experiment a casa. També em vaig trobar que a l'hora de poder comprar el material ho havia de fer des de casa, sense poder anar a les botigues i veure-ho jo mateixa, perquè estaven tancades i això va comportar un endarreriment en l'obtenció del material, ja que havia d'arribar per correu i no era tan fluida l'entrega de paquets. I finalment, el colorant\*; per a la prova sense el material genètic vaig fer servir colorant alimentari, atès que després de parlar amb diversos especialistes em van dir que aniria bé i que es veuria correctament la separació de bandes. El problema va venir a l'hora de fer la prova amb saliva, perquè vaig veure que el millor colorant era el bromur d'etidi, però era tòxic i era evident que no el venien a particulars. La solució a aquest problema va ser el GELSAFE Nucleic Acid Gel Stain Solution (20,000x), el substitut del bromur d'etidi, un colorant que explico detalladament més endavant. Com que vaig haver de buscar alternatives, em va fer endarrerir els temps que jo m'havia marcat per la prova final.

La metodologia emprada ha estat el plantejament d'una hipòtesi. Per poder comprovar-la vaig haver de construir un aparell d'electroforesi en gel\* per després fer l'estudi de les mostres en l'aparell per veure si hi havia semblances i així poder demostrar la hipòtesi. Seguidament vaig analitzar les dades de l'experiment per extreure les conclusions i veure si la hipòtesi es complia.

El meu treball de recerca estava dividit en dues parts. Per tant, hi havia també dos objectius principals. El primer era construir un aparell d'electroforesi en gel a casa, amb material accessible per a tothom, i que funcionés correctament. El procés el vaig fer seguint els passos d'una pàgina web "*science buddies*" i de vídeos que prèviament havia buscat. Per poder complir el primer objectiu vaig haver de construir l'aparell i fer una primera prova. La vaig fer amb colorant alimentari, ja que era el més accessible. Cal tenir en compte que l'electroforesi en gel és una tècnica emprada per la separació de fragments d'ADN o altres macromolècules\* com ara ARN o proteïnes per la seva mida i la seva càrrega. Consisteix en el fet d'aplicar un corrent elèctric a

---

\* Veure Glossari

través d'un gel (en el meu cas agarosa\*) i que les molècules corrin més o menys ràpid en funció dels factors anomenats prèviament. El segon objectiu, ja era més complicat: veure si en un aparell d'electroforesi en gel fet a casa amb el material no professional es podien veure semblances amb l'ADN d'una mateixa família tenint en compte que l'ADN és l'expressió del codi genètic.

El treball comença amb l'explicació de què és l'electroforesi en gel, després s'expliquen els diferents components de l'aparell, així com el colorant i els tipus que hi ha i el gel i les seves variants; a continuació parlo de la història i els orígens de l'electroforesi en gel, on per cert, hi trobem un factor curiós: el creador de l'electroforesi en gel, Arne Tiselius va guanyar un premi Nobel de Química al 1948 i també va ser honorat amb un cràter a la lluna el qual porta el seu nom "cràter Tiselius". El següent que trobarem seran les aplicacions i seguidament les utilitats de l'aparell. Finalment veurem com construir el nostre propi aparell d'electroforesi en gel, i les diferents proves realitzades per extreure les conclusions del treball.

La principal font d'informació han estat diverses revistes i articles científics. He consultat la pàgina web *Khan Academy*, un portal on es pot trobar qualsevol tipus d'informació acadèmica; a part he fet servir buscadors com ara *MeSH (Medical Subject Headings)* i *PubMed (National Library of Medicine)* que m'han ajudat a trobar articles que parlessin de la genètica i l'electroforesi. D'altra banda m'he ajudat també de vídeos de *Science Buddies* on es veia la separació d'ADN. M'he documentat parlant amb una estudiant de farmàcia de la UB i una biòloga espanyola que resideix i treballa a Göteborg, Suècia.

La primera vegada que vaig sentir a parlar de genètica, vaig pensar que només seria possible fer experiments d'aquest tema a grans laboratoris especialitzats i a mida que vaig anar investigant, vaig veure que realment, la genètica pot estar a l'abast de tothom i no té perquè ser tan complicada, ja que amb aquest treball s'ha aconseguit separar ADN de la saliva i contrastar quatre mostres a més de construir un aparell d'electroforesi en gel amb material accessible per a tothom i, d'aquesta manera, estar *més a prop de la genètica*.

---

\* Veure Glossari

## ***2. COS TEÒRIC:***

### ***2.1. INTRODUCCIÓ A LA GENÈTICA***

La genètica és una branca de la biologia que estudia com els caràcters hereditaris es transmeten de generació en generació. El gens són les unitats d'informació que fan servir els organismes per transferir un caràcter a la seva descendència. El gen conté codificada les instruccions per sintetitzar les proteïnes d'un organisme.

Cada individu té per cada caràcter dos gens, un heretat del pare i un altre de la mare. Sempre hi ha gens dominants que s'imposen sobre el recessiu. En total tenim 23 parells de cromosomes homòlegs.

De la mateixa manera que s'hereten caràcters com ara el color dels ulls o el color del cabell, també ho fan les malalties hereditàries. Aquí és on la genètica adquireix una importància elevada a l'hora d'estudiar la transmissió de malalties o fins i tot per dur a terme tractaments preventius de moltes malalties. Aquestes malalties que s'hereten són degut al fet que la informació per sintetitzar les proteïnes\* no és correcta i per tant, no pot realitzar la seva funció de forma habitual.

Els gens són realment fragments d'ADN (àcid desoxiribonucleic), una molècula que es troba al nucli de totes les nostres cèl·lules i per tant constitueix una part essencial dels cromosomes. L'ADN emmagatzema aquesta informació en un codi de 4 lletres: Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) i Citosina (C), aquestes lletres són bases nitrogenades que formen part dels àcids nucleics\*.

Cada persona té un genotip únic i diferent, fins i tot dels nostres germans i es pot veure reflectit en diverses mostres a l'hora de fer estudis genètics, ja sigui la saliva, el cabell, la sang, les dents, els ossos, ungles i fins i tot objectes on hi quedin restes d'ADN com ara una cigarreta, un raspall de dents, un raspall de cabell...

En el meu cas, he escollit fer l'estudi genètic de l'ADN mitjançant la mostra de saliva per la seva fiabilitat, que és d'un gairebé 100% i perquè és totalment una prova no invasiva per a la persona.

---

\* Veure Glossari

De totes maneres s'ha de dur a terme un procés previ d'extracció de l'ADN un cop tenim la mostra de saliva.

La saliva està composta per les diferents secrecions de les glàndules paròtides, submandibulars i sublinguals. Les seves funcions inclouen la digestió, la facilitació de la degustació i funcions immunològiques dutes a terme per pèptids antimicrobians i immunoglobines. A la saliva existeixen cents de proteïnes, ARN missatger, microARN i metabòlits, que depenent de les seves concentracions es poden arribar a relacionar amb malalties sistèmiques.

El genoma salivar consisteix en l'ADN de l'individu, la microbiota oral i els virus infectants. Es podria fer servir fins i tot amplificació o seqüenciació també per reflectir la presència o absència de gens específics i alteracions a les seves seqüències.

Com s'ha dit anteriorment, les proteïnes es troben a la saliva. Aquestes proteïnes salivals es poden detectar mitjançant una espectrometria de masses, electroforesi i cromatografia líquida.

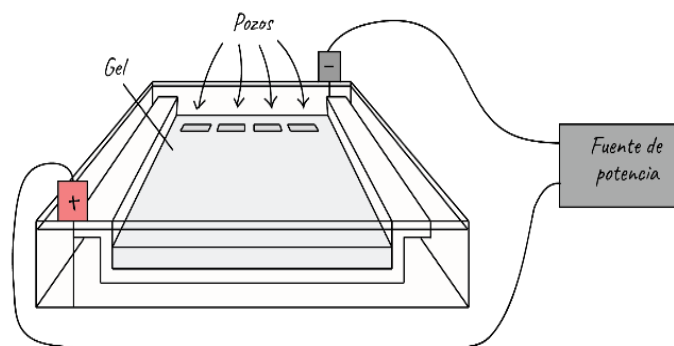
## 2.2. QUÈ ÉS L'ELECTROFORESI EN GEL?

L'electroforesi és una tècnica que serveix per separar ADN, o altres macromolècules com l'ARN i proteïnes en base a la seva mida i càrrega elèctrica. Altres mètodes de l'anàlisi de l'ADN podrien ser la reacció en cadena a de la polimerasa (PCR) o la seqüenciació d'ADN.

És a dir, que és un mètode per la separació i l'anàlisi de macromolècules com ara DNA, ARN i proteïnes. La separació és a base de la seva mida, i la seva càrrega, com he dit anteriorment. Això fa que, com tots els fragments d'ADN tenen la mateixa quantitat de càrrega per massa, els fragments més petits travessen més ràpidament el gel que els més grans.

S'utilitza un corrent elèctric per moure les molècules i que se separin a través d'un gel. La gran majoria dels fragments que s'analitzen tenen càrrega negativa, per tant es mouen cap al l'electrode\*positiu (ànode) i els que estiguin carregats positivament es mouran cap al càtode, el pol negatiu. Els porus del gel actuen com un colador, permetent que les molècules més petites es moguin més ràpid que les grans. Les condicions utilitzades durant l'electroforesi es poden ajustar per separar molècules en el rang de mida que es desitgi. Per poder observar millor el moviment, es tenyeixen les mostres i aleshores el que es veu són bandes de color.

En el cas de l'ADN, com que totes les molècules tenen la mateixa càrrega per massa, l'electroforesi en gel separa els fragments únicament per la seva mida. I el que ens permet és veure quants fragments diferents d'ADN hi ha en la mostra i la seva mida respecte als altres.



---

\* Veure Glossari

### 2.2.1. EL GEL:

El gel que es fa servir en l'electroforesi en gel és similar a la gelatina. El més emprat per separar fragments d'ADN sol ser el del polisacàrid agarosa, de poliacrilamida o del midó.

L'**agarosa** és el més útil en la separació de fragments d'ADN, ja que té un rang de separació més gran, es fa servir en fragments de 50 a 20.000 pb\*. El gel d'agarosa és un polisacàrid que s'extreu d'algunes algues marines, les seves dissolucions són capaces de mantenir-se líquides per sobre de 50°C. Quan aquesta agarosa s'escalfa en una solució esmorteïdora (aigua i algunes sals) i es deixa refredar, es forma un gel sòlid tou (semi sòlid). Aquest gel es manté unit mitjançant ponts d'hidrogen\* i també forma alguns porus. S'ha de tenir en compte que com més alt sigui el percentatge d'agarosa, els porus seran més petits i per tant hi haurà menys mobilitat d'ADN.

Com que el meu gel d'agarosa era d'un 1%, el rang de mobilitat previst va ser de 250pb a 12000pb aproximadament (veure taula adjunta). La mobilitat, a part de dependre del percentatge d'agarosa, també està influenciada per la solució tampó\* utilitzada.

% d'Agarosa	Mida del fragment de DNA (pb)	% d'Agarosa	Mida del fragment de DNA (pb)
0.3	< 700 pb	1.5	80 pb a 4000 pb
0.5	700 pb a 25000 pb	2.0	100 pb a 3000 pb
0.8	500 pb a 15000 pb	3.0	500 pb a 1000 pb
1.0	250 pb a 12000 pb	4.0	100 pb a 500 pb
1.2	150 pb a 6000 pb	6.0	10 pb a 100 pb

---

\* Veure Glossari

La **poliacrilamida** és el gel més usat per la separació de proteïnes i fragment més petits d'ADN per la mida dels seus porus. Les tècniques més populars de seqüenciació d'ADN amb poliacrilamida són els mètodes Maxam-Gilbert i Sanger. Aquests mètodes són capaços de separar fragments d'ADN que es diferencien en un sol parell de bases.

El **midó** de la patata parcialment hidrolitzat construeix un medi no tòxic per l'electroforesi de proteïnes. El problema és que el gel resultant és més opac que els anteriors i no es poden veure clarament els resultats. Les proteïnes no desnaturalitzades\* es poden separar també segons la càrrega i la mida i es veuen mitjançant la tinció de Naphtal Black o Amido Black.

	<b>Avantatges</b>	<b>Inconvenients</b>
<b>Agarosa</b>	Separació de molècules grans (virus, àcids nucleics*, lipoproteïnes...)	Tot i que té bona resolució, n'hi ha que en tenen de millor.
<b>Poliacrilamida</b>	Suport més emprat en electroforesi Alta resolució	Els seus components són tòxics
<b>Midó</b>	Tècnica barata, fàcil i ràpida	Resolució bastant dolenta en comparació als altres gels.

Com es mouen els fragments d'ADN a través del gel?

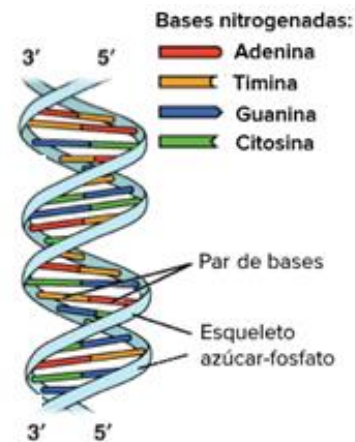
Una vegada el gel està a la càmera, es posa cada una de les mostres que volem analitzar en un dels pous que s'han creat mentre el gel es refredava. A continuació s'aplica l'energia elèctrica a la càmera i comença a fluir corrent elèctrica a través del gel. En el cas de l'agarosa, les mostres es

---

\* Veure Glossari

mouen per sota la superfície. Els grups fosfat del seu esquelet de sucre-fosfat donen càrrega negativa a les molècules d'ADN.

A l'ADN, les cadenes es troben en una doble hèlix (una estructura on les dues cadenes complementàries s'uneixen entre si). Els sucres i els fosfats es troben a l'exterior de l'hèlix i constitueixen l'esquelet de l'ADN; aquesta part de la molècula s'anomena esquelet de sucre-fosfat. Les bases nitrogenades s'orienten cap a l'interior en parelles i cada parell s'uneix entre si mitjançant ponts d'hidrogen.



En donar la càrrega negativa a les molècules d'ADN per part dels grups sucre-fosfat, això fa que es comencin a moure a través del gel cap al pol positiu.

Aleshores, els fragments més petits viatjaran de manera més ràpida a través del gel mentre que els grans romandran més a prop dels pous.

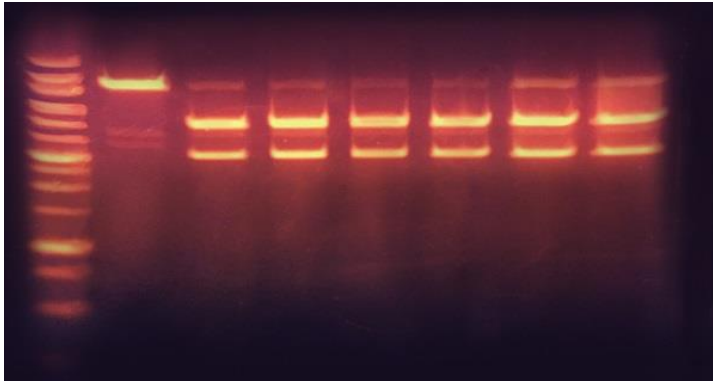
Una vegada els fragments s'han separat, podrem examinar el gel i saber la mida de les bandes que s'hi troben.

### 2.2.2. COLORANTS:

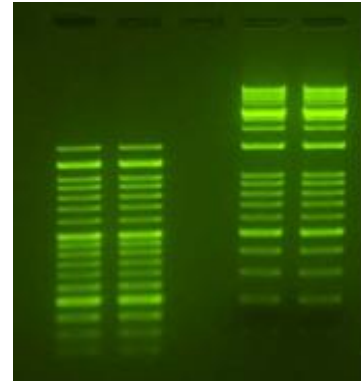
El colorant ideal per visualitzar l'ADN en gels d'agarosa, com ara l'aparell d'electroforesi en gel, és el **bromur d'etidi (BrEt)** que és un agent intercalant que s'utilitza normalment a laboratoris de biologia. Jo no l'he pogut fer servir atès que principalment és un molt potent mutagènic, i tot i que és nociu per ingestió, és molt tòxic per inhalació i també irritant per als ulls, la pell i les vies respiratòries. Tot i que els efectes secundaris a l'exposició d'aquest compost encara no han estat investigats totalment, se sospita que aquest producte podria ser cancerigen i teratogènic. Per totes aquestes raons ha de ser manipulat per personal capacitada i fent servir sempre els equips de protecció corresponents (davantal de màniga llarga, ulleres, mascareta, guants...).



També cal tenir en compte que s'han de descontaminar tots els aparells que s'han fet servir amb aquesta substància i el mètode més popular per desenvolupar aquesta funció és una solució de nitrit de sodi ( $\text{NaNO}_2$ ) i àcid hipofosforós ( $\text{H}_3\text{PO}_2$ ). Tampoc no tenia accés a aquests productes descontaminants.



*Colorant: Bromur d'etidi*



*Colorant: Runsafe*

En veure tots els efectes secundaris que tenia aquest colorant, vaig passar a fer servir un altre reactiu no tòxic, aquest és el **GELSAFE Nucleic Acid Gel Stain Solution** (20,000x). És una alternativa al tradicional Bromur d'etidi per tenyir els àcids nucleics.

En comparació amb el Bromur d'etidi, Gelsafe produeix moltes menys mutacions a tots els tests comparatius que s'han fet fins ara.

Aquest permet una visualització millor de les bandes d'ADN gràcies a la il·luminació blau transparent o UV. Pel que fa al protocol de tinció, és molt similar al del bromur d'etidi i té la mateixa sensibilitat.

Algunes de les característiques positives d'aquest nou mètode per tenyir són que es fa servir tant en ADN com en ARN, és una molt bona alternativa al bromur d'etidi ja que aquest contamina molt, té igual o més sensibilitat que el bromur d'etidi, no és tòxic, ni és mutagènic ni tampoc cancerigen i finalment produeix residus no perillosos.

Aquest colorant s'ha d'emmagatzemar a  $4^\circ\text{C}$  fins a 12 mesos, però per períodes més llargs s'ha de guardar a  $-20^\circ\text{C}$ . És molt sensible a la llum i per aquesta raó se n'ha de protegir.

El Runsafe té diverses aplicacions com que permeten la visualització de bandes d'ADN i ARN quan són separades en l'electroforesi en gel d'agarosa. Una d'aquestes aplicacions és que permet l'extracció de fragments d'ADN per la subclonació sense introduir mutacions les quals normalment són causades per l'altre colorant, el Bromur d'etidi.

El problema d'aquest compost per tenyir és que no el venien a particulars. Mentre anava fent les altres proves (la primera i la segona), anàvem contactant amb una pàgina web que sí que ens el podien vendre; aquesta pàgina és "*Cleaver Scientific*". Al cap d'unes setmanes, em van poder enviar el colorant **Runsafe**.

En definitiva, és el reactiu més sensible disponible per detectar l'ADN de doble cadena. El Runsafe està format per tres tincions de seguiment: xilè cianol (tenyeix de blau turquesa), el blau de bromofenol (tenyeix de color lila) i el Orange G (tenyeix de color taronja). I permet millor rastreig visual de l'emigració de l'ADN durant l'electroforesi.

**Xilè cianol:** en l'electroforesi, aquest colorant es mou aproximadament com un fragment d'ADN, de 3500 a 5000 pb. S'ha de tenir en compte que també depèn de la solució tampó i del percentatge d'agarosa al gel.

**Blau de bromofenol:** com que té menor mida, es mou més ràpid que les proteïnes o que la majoria de molècules de l'ADN (superiors a 300 pb).

**Orange G:** és el que fa córrer els fragments més petits, de 50 pb. També és el que marca el front i quan hem de parar l'electroforesi.

COLORANT	COM HO VISUALITZEM	NOMBRE DE PB
XILÈ CIANOL	Blau turquesa	3500-5000 pb
BLAU BROMOFENOL	Lila	Més de 300 pb
ORANGE G	Taronja	50 pb

### **2.3. HISTÒRIA I ORIGEN DE L'ELECTROFORESI EN GEL**

La història de l'electroforesi en gel per la separació de molècules en l'anàlisi química comença amb el treball que Arne Tiselius va fer al 1931. La seva feina amb l'aparell i el plasma sanguini el va dur a guanyar un premi Nobel de Química el 1948. Va desenvolupar "l'aparell Tiselius" amb ajuda de la Fundació Rockefeller a la Universitat de Princeton. Aquest mètode es va estendre molt lentament fins que va ser reconegut com electroforesi de zona.

Als anys seixanta, els mètodes ja eren més sofisticats i cada vegada permetien separar més molècules biològiques basades en diferències físiques i químiques minúscules. Finalment l'electroforesi en gel i les tècniques relacionades amb aquesta ven permetre crear una àmplia gamma de mètodes bioquímics com ara: l'empremta digital de proteïnes, "Southern blot", altres procediments de *blotting*, seqüenciació d'ADN, entre molts altres.

Els primers indicis de fer servir un aparell semblant a l'electroforesi daten a principis del segle XIX, es basaven en les lleis de l'electròlisi de Faraday (proposades a finals del segle XVIII). El més semblant que es va arribar a fer van ser els experiments de Johann Wilhelm Hittorf, Walther Nernst i Fiedrich Kohlrausch. Ells van mesurar les propietats i el comportament dels ions petits que es movien a través de solucions aquoses sota la influència d'un camp elèctric. Kohlrausch va crear també diferents equacions per les diferents concentracions de partícules carregades que es movien a través de la solució.

A mida que avançava la ciència, van veure que hi havia mancances en aquella electroforesi, degut al límit en moviment. Aquest aparell no era capaç de separar per complet els compostos que eren electroforèticament similars. Per solucionar aquest problema, Oliver Smithies va introduir el midó com a substrat (més endavant el tornarien a canviar per poliacrilamida i altres gels.)

La paraula electroforesi ve de la unió de la paraula "*foresi*" i de la forma prefixada "*electro*". El mot *foresi* significa "migració" o "moviment", i el prefix *electro* ens indica que estem fent servir electricitat per fer que les molècules emigrin.

## 2.4. UTILITATS DE L'APARELL:

L'electroforesi en gel és àmpliament usada en laboratoris de biologia molecular i bioquímica en àrees com per exemple medicina forense. Algunes de les utilitats per l'aparell d'electroforesi en gel serien: separació de fragments del DNA\*, per empremtes dactilars genètiques (per investigar escenes de crims), també serviria per analitzar resultats de reaccions en cadena de polimerasa i analitzar gens associats a malalties determinades, per dur a terme proves de paternitat fent servir l'empremta dactilar genètica, per l'estudi

de l'estructura i funcions de proteïnes, per l'anàlisi de resistència als antibiòtics i finalment per poder dur a terme estudis de parentesc evolutiu a l'hora d'estudiar semblances genètiques entre poblacions o espècies.

S'ha vist que els fragments d'ADN més fiables són els de la sang i els de la saliva, amb un 95%; amb un 90% hi hauria els de cigarrets i cabell; els seguirien les restes que hi podrien haver en xiclets o bastonets; després hi hauria el raspall de dents, que tot i estar en contacte amb la saliva, els resultats podrien sortir alterats degut al fet que també hi ha pasta de dents. Com a la imatge es pot veure, les mostres aptes per a estudis mèdics serien la sang i la saliva i per a estudis forenses, la resta.



\* Veure Glossari

## ***2.5. APLICACIONS PRÀCTIQUES DE L'ELECTROFORESI EN GEL***

L'electroforesi en gel separa mostres d'ADN i d'aquesta manera facilita la identificació i l'examen dels seus components. L'electroforesi en gel es fa servir en molts camps com ara a la química clínica per separar proteïnes, i a la bioquímica i biologia molecular per separar fragments barrejats de DNA i RNA\* per la seva mida.

### **Malalties:**

L'electroforesi en gel pot ajudar els científics a identificar els gens danyats incloent-hi oncogèns\*. Pot ajudar també a identificar certes malalties genètiques com per exemple l'anèmia de cèl·lules falciformes, la malaltia de Huntington i la distròfia muscular de Duchenne, segons el que explica la universitat estatal de Nova York. També pot ajudar a identificar algun virus.

També serveix per estudiar mutacions genètiques, perquè quan aquests fragments d'ADN estan mutats són sovint més o menys llargs que els habituals i per tant apareixen a l'electroforesi de manera diferent.

### **Vida animal:**

L'electroforesi en gel ofereix molts beneficis en camps relacionats amb els animals. Els zoològics poden utilitzar aquesta tècnica per reduir l'impacte negatiu de l'endogàmia. Els taxònoms i biòlegs evolutius poden obtenir més informació sobre les relacions evolutives, identificar espècies i documentar les diferències i les semblances entre ells. Els que estudien el comportament animal poden usar l'ADN per obtenir informació sobre el parentiu dels animals i com això afecta la interacció amb altres animals.

### **Parentesc humà:**

L'electroforesi en gel pot determinar paternitat, així com pot establir vincles genètics entre grans grups de persones segons explica la universitat de Colorado. També ajuda a dur a terme estudis de parentesc evolutiu quan s'estudien espècies o poblacions. Aquesta aplicació es podria dur a

---

\* Veure Glossari

terme si es troben mostres en algun jaciment, i comparar-les amb les dels animals que hi ha actualment, es podria determinar a quin d'aquests és més proper genèticament parlant.

### **Medicina forense i criminologia:**

També es pot utilitzar aquest procediment per la comparació de vestigis biològics com ara la sang, saliva, arrels de cabell, teixits corporals diversos, peces dentals... tant en procediments penals (per relacionar algun sospitós en alguna escena d'un crim) com en la identificació d'individus postmortem (si no es pot reconèixer d'altra manera, amb mostres es poden fer estudis comparatius).

En la ciència forense per procediments penals, es podria fer servir comparant una mostra que va quedar a l'escena del crim amb les mostres que es tenen dels possibles sospitosos. Després de l'electroforesi en gel, si entre les mostres dels sospitosos hi ha la del culpable, la mostra de l'escena del crim i la del sospitós seran idèntiques. Això és degut al fet que les peces i les mides d'aquest ADN són exclusives de cada individu, així doncs, es veurà que hi ha concordança exacta en el patró de fragments d'ADN estudiat amb el del sospitós.

### **Empremta genètica:**

Aquesta tècnica és molt utilitzada per distingir entre els individus d'una mateixa espècie utilitzant mostres del seu ADN. La primera vegada que es va fer servir va ser a l'àmbit de la medicina forense, als assassinats de *Narborough* (1984). L'empremta genètica és el mètode més fiable a l'actualitat per la identificació de persones i és utilitzada per la policia i els laboratoris forenses de tot el món.

La tècnica es basa en el fet que dos éssers humans tenen una gran part de la seva seqüència d'ADN en comú i per distingir dos individus es pot explorar la repetició de seqüències altament variables. Però no tindran mai exactament el mateix nombre de repeticions, seria com una "mena de codi de barres" de cada persona, únic. Dos éssers humans no relacionats serà poc probable que tinguin el mateix nombre de repeticions de les bases nitrogenades. En el STR (*Small Tandem Repeats*) de perfils, la reacció en cadena de polimerasa (PCR) s'utilitza per obtenir suficient ADN per

després poder detectar el nombre de repeticions. Si s'estableix una relació, és molt poc probable que sigui per casualitat, excepte en cas de bessons idèntics, que normalment tenen perfils genètics idèntics però mai les empremtes dactilars.

Així doncs, l'empremta genètica es fa servir principalment a la Medicina Forense, per identificar els sospitosos amb les mostres de sang, cabell i saliva entre altres, també serveix per identificar restes de persones desaparegudes. Aquesta prova, a part de condemnar a molta gent, també ha donat lloc a nombroses exoneracions de condemnats. Aquestes proves també serveixen per la identificació de restes humanes, per proves de paternitat, per provar la compatibilitat en la donació d'òrgans, i fins i tot per generar hipòtesis sobre les migracions dels éssers humans en la prehistòria.

L'ADN de cada individu és exactament el mateix des del moment de la seva concepció fins al moment de la seva mort, fins i tot postmortem (sempre i quan no hagi estat incinerat).

Totes les proves esmentades anteriorment es fan amb l'anàlisi STR. La mostra s'extreu mitjançant un anàlisi de sang.

Aquesta anàlisi consisteix en l'amplificació de seqüències amb petites repeticions. Una vegada amplificades, els fragments se separen per comprovar el nombre de repeticions i aquesta comprovació es fa mitjançant l'anàlisi en electroforesi en gel o en electroforesi capil·lar, de manera que, amb aquestes proves es poden distingir patrons de repeticions que poden ser fàcilment comparables i contrastades amb les altres proves.

El veritable valor de l'anàlisi STR es troba en el poder estadístic de la discriminació.

## **2.6. CONSTRUCCIÓ D'UN APARELL D'ELECTROFORESI EN GEL.**

### **2.6.1. MATERIAL NECESSARI**

- *Caixa de plàstic*: serà la cambra per on correran les mostres.
- *Filferro d'acer inoxidable*: ha de ser inoxidable perquè estarà submergit a la solució buffer i no convé que faci malbé l'experiment ni les mostres.
- *5 bateries de 9 volts*: normalment es faria amb un generador però amb 5 bateries de 9 volts cadascuna va bé ja que hem d'aplicar 45V en total.
- *Pinces de cocodril*: es faran servir per connectar el filferro d'acer inoxidable que estarà sota el gel amb els dos extrems de les bateries (un positiu i l'altre negatiu).
- *Placa de poliestirè*: serà el material amb el que farem la pinta per poder posar mentre el gel se solidifica; els forats que deixarà serà on posarem les mostres.
- *Balança de cuina*: caldrà pesar totes les mesures amb exactitud.
- *Cilindre graduat*: serà per poder mesurar les quantitats d'aigua desionitzada que necessitaríem i la quantitat de solució que s'haurà de barrejar amb l'agarosa.
- *Bol per a la barreja i la calefacció*: pot ser per exemple de vidre, ha de poder estar durant un temps al microones mentre es barreja l'agarosa fins que comenci a fer bombolles.
- *Bicarbonat*: serà per fer la solució buffer.
- *Aigua desionitzada*: per evitar que els minerals de l'aigua interfereixin en els resultats.
- *Agar agar en pols*: serà el que es farà servir com a gelificant de la solució.
- *Microones*: serà on escalfarem la solució buffer amb l'agar agar fins que comencin a fer bombolles per les vores del bol.
- *Ganivet*: servirà per tallar el gel d'agarosa un cop s'hagi solidificat per poder posar als dos extrems el filferro d'acer inoxidable.



Més a prop de la genètica

- *Xeringa de plàstic o pipeta:* ens servirà per poder introduir amb més facilitat les mostres dins dels pous.

### 2.6.2. PROCEDIMENT:

#### Preparació de l'aparell:

La caixa de plàstic serà la cambra de gel real, el cable d'acer inoxidable serà els elèctrodes, les bateries seran la font d'energia, i es farà servir l'escuma de poliestirè per fer una pinta per crear els pous (on posarem les mostres) en el gel.

El primer que caldrà fer serà tallar 2 peces de filferro d'acer inoxidable amb les alicates (el cable ha de ser més llarg que l'ample de la caixa) i de manera que aquests filferros quedin adaptats a la forma de la caixa (això es farà doblegant els dos extrems perquè encaixin amb la cambra i no es moguin, un a cada extrem).



El següent pas serà connectar les 5 bateries de 9V juntes, en sèrie (encaixant el positiu amb un negatiu). Han de quedar lliures un terminal positiu i un de negatiu.

A continuació caldrà connectar una pinça de cocodril a un dels terminals i a un dels filferros i l'altre pinça de cocodril a l'altre terminal i l'altre filferro (no es pot tancar el circuit fins que l'experiment no estigui preparat del tot).



Més a prop de la genètica

El següent pas serà tallar en forma de pinta l'escuma de poliestirè. Aquesta es col·locarà de manera vertical a la caixa de plàstic (de peu) de manera que la part superior de la pinta sigui tan ampla com la caixa de plàstic i es pugui subjectar sola.

Cal tenir en compte que les dents de la pinta han d'estar espaiades uniformement (amb almenys 2mm d'espai entre la part inferior de les dents i la part inferior de la caixa de plàstic).



### **Posada en marxa:**

Un cop està preparat l'aparell caldrà preparar les dues solucions.

La primera solució que caldrà fer és **la solució "buffer"** que serà el gel per on correran les mostres un cop l'aparell estigui connectat al corrent. Per fer-la es barregen 2 grams de bicarbonat de sodi i 200 mil·lilitres d'aigua desionitzada. La solució buffer o tampó servirà per mantenir el pH constant i fer que l'experiment es desenvolupi de manera correcta.

Per a la segona solució s'ha de crear una **dissolució d'un 1% d'agar**, això es faria amb 1 gram d'agar agar en pols i 100 mil·lilitres de la solució buffer (la que hem fet prèviament). Aquesta barreja s'ha d'escalfar al microones, cada 10-20 segons s'ha de barrejar per tal que l'agar agar no es quedi al fons del recipient, s'ha de posar al microones fins que comenci a fer bombolles, no a bullir, tardarà aproximadament 2 minuts. Aquesta solució sempre ha de ser translúcida per tal de poder veure les mostres que correran pel seu interior.

Aboquem la solució que hem escalfat al recipient traient el filferro i posem la pinta perquè quan s'assequi quedin formats els pous per poder posar les mostres. Aquesta pinta no s'ha d'enganxar a una de les parets, sí que hauria d'estar separada uns 10 centímetres per tal que després puguem

Més a prop de la genètica

posar els filferros sense perill de danyar els pous. Ha de quedar aproximadament mig centímetre de la pinta fins al terra.

Quan se solidifiqui el gel al nostre recipient, que tardarà uns 30 minuts aproximadament, talleu una peça de gel de cada extrem per posar el filferro, traiem la pinta perquè quedin els pous al descobert i finalment, aboquem els 100 mil·lilitres restants de la solució buffer fins cobrir la gelatina completament, inclosos els pous.



Seguidament posem les mostres als pous amb l'ajuda d'una pipeta molt suaument, perquè no s'escampin les mostres per la capa de dalt i ens assegurem que les mostres quedin dins els forats dels pous. Finalment connectem a les piles que prèviament havíem preparat. Si surten bombolles als filferros vol dir que hi ha corrent, és a dir el circuit funciona. Ara només cal esperar que les mostres se separin en bandes (des que ho connectem fins que es comencin a notar canvis solen passar uns 3-5 minuts i fins que acaba de córrer la mostra uns 30 minuts).

## **2.7. EXTRACCIÓ D'ADN:**

Encara que sembli complicat, l'extracció d'ADN és un procés simple que amb el seu degut procediment i amb cura es pot dur a terme a la cuina de qualsevol casa, amb les seves limitacions.

Igual que al laboratori, per extreure el material genètic, es requereixen una sèrie d'etapes bàsiques que s'han de complir. La primera seria trencar la paret cel·lular i/o membrana plasmàtica per poder accedir al nucli de la cèl·lula on es troba l'ADN. A continuació, s'ha de trencar de la mateixa manera la membrana nuclear per tal de deixar l'ADN lliure. Una vegada estigui alliberat s'ha de protegir l'ADN d'enzims i d'altres components cel·lulars que el poden fer malbé.

### **Material necessari:**

- Mostra a extreure de saliva
- Sal de taula
- Rentavaixelles o detergent líquid
- Alcohol 96°
- Aigua destil·lada o mineral
- Gots
- Una cullera sopera
- Una vareta fina
- Suc de pinya

### **Procediment:**

Per començar, cal aconseguir la mostra d'ADN, per això cal glopejar durant gairebé un minut la mida d'una cullerada sopera d'aigua per tota la boca i tornar-la a dipositar en un got. La saliva arrossegà les cèl·lules que recobreixen les parets internes de la boca.

A continuació caldrà preparar les diferents dissolucions que farem servir. La primera serà 5 cullerades soperes d'aigua per una cullerada soperes de sal comú, ho barrejarem tot fins que es dissolgui. La sal en dissolució actua disminuint la solubilitat de les proteïnes fent que es precipitin i es pugui separar l'ADN amb més facilitat. I la segona serà amb 3 cullerades soperes d'aigua per una de rentavaixelles. Aquest últim té la funció de destruir les membranes cel·lulars del teixit viu que estem fent servir. El detergent dissol els greixos o lípids que són el component principal de la membrana plasmàtica i nuclear de les cèl·lules. El que aconseguirem en trencar les membranes cel·lulars serà la sortida de l'ADN.

Després de fer les dissolucions caldrà afegir dues cullerades soperes de suc de pinya al got on hi havia la mostra de saliva. El suc de pinya conté un enzim anomenat papaïna. Aquest enzim proteolític s'encarrega d'atacar i degradar la resta de proteïnes i components cel·lulars, que ens facilitarà la separació d'aquests components del material que busquem, el nostre ADN.

Una vegada ho tenim tot preparat, afegirem una cullerada de cada dissolució (una de rentavaixelles i una de sal) al got que conté la saliva i el suc de pinya, ho barregem tot i ho deixem reposar un parell de minuts.

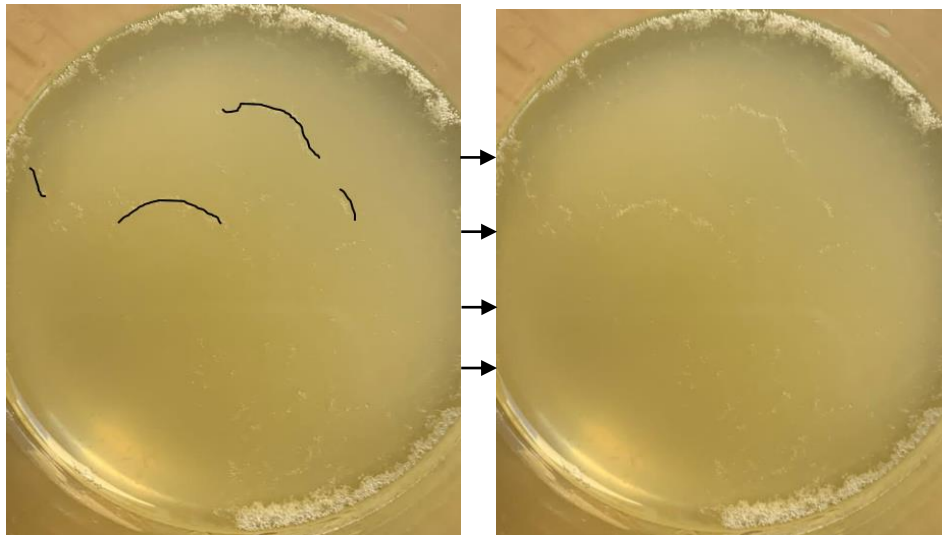
Ara ve la part més delicada de l'experiment, per finalitzar el procés haurem d'afegir l'alcohol molt a poc a poc no directament sinó fent que llisqui per les parets del got perquè quedi una pel·lícula per sobre, d'aquesta manera evitarem que es barregi i aconseguirem dues capes ben diferenciades. L'ADN precipitarà entre la capa de la barreja i la de l'alcohol. L'ADN és soluble en aigua però quan es troba amb alcohol precipita. L'alcohol separa l'ADN d'altres components cel·lulars que queden retinguts a la dissolució aquosa.



Més a prop de la genètica

Es veuran com uns filaments primets de color blanc que són les molècules d'ADN (aquest producte filamentós obtingut de l'extracció no és ben bé ADN pur ja que pot estar barrejat amb ARN i altres components contaminants).

Aquests filaments de color blanc són el que s'extreuen mitjançant una pipeta i es dipositen als pous de l'electroforesi en gel que hem fet durant la construcció de l'electroforesi en gel.



A la foto de la dreta és com es veuen els filaments a simple vista, a la fotografia de l'esquerra, els he remarcat amb el color negre perquè es vegin millor.

## 2.8. PRIMERA PROVA:

L'objectiu de la primera prova era comprovar si l'aparell en general funcionava; el gel, el corrent, els pous... per aquesta raó les mostres no van ser de saliva sinó que van ser bàsicament colorant alimentari. En posar diferents colors es va poder veure com actuava cadascun i al mateix temps poder veure quin m'aniria millor per poder fer l'experiment definitiu.

A les imatges següents es pot veure d'esquerra a dreta que els colors eren taronja, blau, vermell i verd. A la primera fotografia hi ha els colorants posats als pous i encara no està engegat el corrent. A la segona foto és al final i es pot veure que els colors ja s'han separat, el taronja s'ha separat en groc i un taronja "fosc", després el blau ha corregut, però res a veure amb el vermell ja que ha corregut molt més; i finalment el que es pot veure millor, el verd ja no existeix sinó que s'ha separat en blau, que està més o menys a la mateixa alçada que el segon blau i el groc que ha avançat gaire. Així doncs, el verd és el que millor se separa (groc i blau, ja que són els dos colors que el formen) i el que més es veia era el blau.

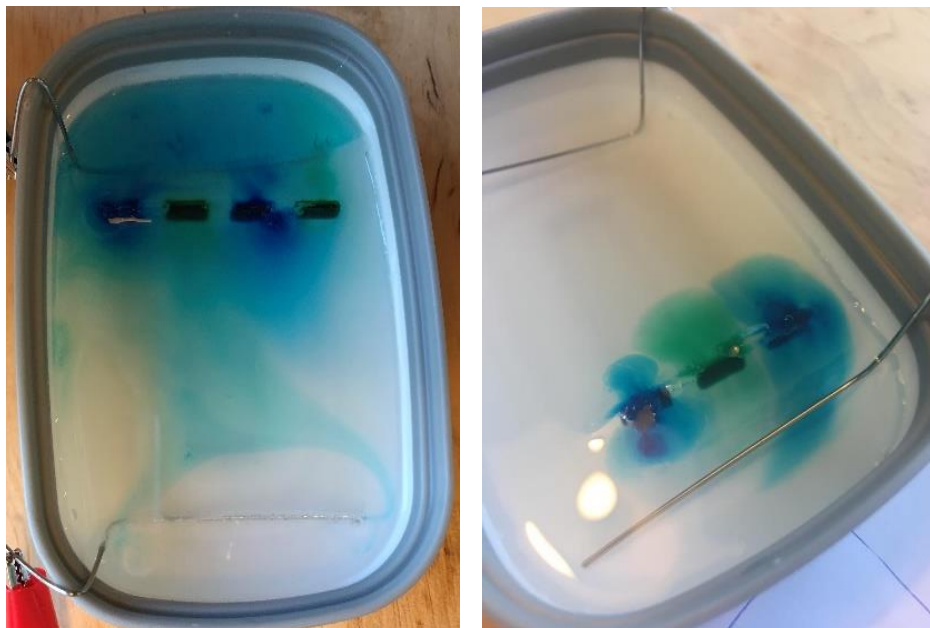
També es pot veure que tots els colorants han corregut cap a l'elèctrode positiu, ja que tenen tots càrrega negativa.



## **2.9. SEGONA PROVA:**

La segona prova ja va ser amb les mostres de saliva amb la seva totalitat, sense haver extret l'ADN. Les mostres que vaig fer servir van ser la del meu pare, la de la meua mare, la de la meua germana petita i la meua. Com a l'anterior vegada vam poder comprovar que els millors colorants eren el verd i el blau, vaig fer dues mostres blaves i dues verdes. Aquesta vegada vaig voler fer un experiment per veure si les mostres corrien cap al pol positiu independentment de la posició dels pous. El que vaig fer va ser: primer posar els elèctrodes positius a un extrem i connectar l'electricitat, en passar una estona vaig veure que les mostres, efectivament anaven cap al positiu i per veure si podien canviar de sentit, a mig experiment vaig intercanviar els elèctrodes per veure si la mostra canviava de sentit. Així va ser, en haver passat uns minuts d'haver intercanviat els elèctrodes, les mostres corrien cap a l'altra banda. Això ens porta a saber que les mostres poden rectificar el sentit, és a dir que un cop comencen a córrer cap a un costat, si els elèctrodes s'intercanvien de posició, la mostra pot canviar també. Vol dir que no tenen un sentit definit, un cop comencen poden canviar.

En fer aquest canvi amb els elèctrodes també va fer que el procés es parés una mica, per tant no es va poder veure bé les diferències entre aquestes mostres.





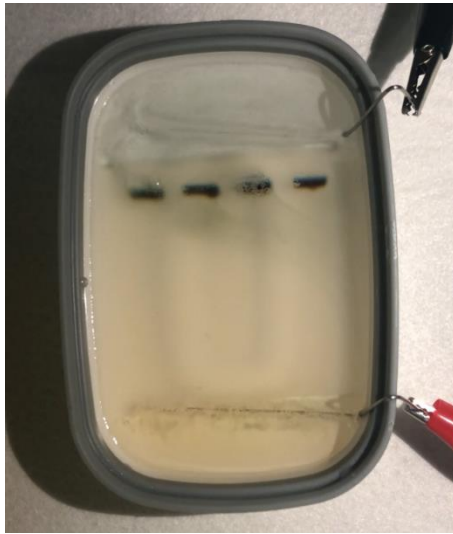
## **2.10. PROVA DEFINITIVA:**

En aquesta última i definitiva prova, les dues diferències més importants en relació a les dues anteriors són: no vaig posar les mostres de saliva sencera sinó que vaig ser servir el fragment d'ADN tal com esta explicat al punt 2.8 i la segona diferència és que vaig fer servir el colorant Runsafe enlloc de colorant alimentari.

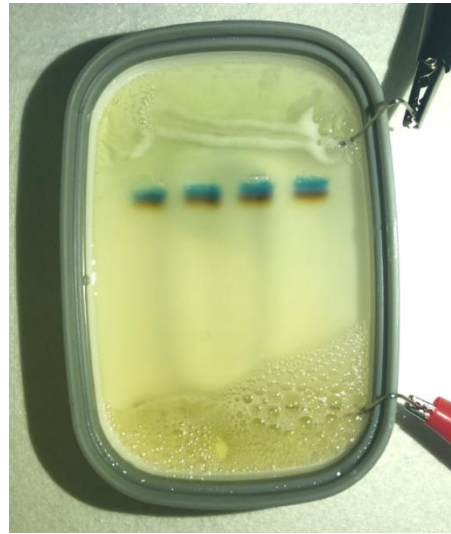
Per a l'última prova, per fabricar l'aparell i les diferents solucions, vaig seguir els mateixos passos que a les dues proves anteriors. En primer lloc vaig fer la solució buffer amb bicarbonat i aigua desionitzada, a continuació vaig fer la solució per on correrien les mostres, la de l'1% d'agar. Als 22 minuts d'espera, el gel ja s'havia solidificat, vaig treure la pinta i van quedar els pous al descobert. Vaig extreure les dues cantonades per poder posar els filferros i vaig cobrir el gel i els pous amb la primera solució, la buffer. A continuació vaig posar els filaments que prèviament havien extrets de les mostres de saliva i que havien estat també barrejades amb el colorant Runsafe i vaig procedir a introduir-les als pous. En connectar el corrent, els filferros van començar a fer bombolles i això significa que la corrent ja estava activa i que les mostres ja es podien començar a moure.

<b>COLORANT</b>	<b>COM HO VISUALITZEM</b>	<b>NOMBRE DE PB</b>
<b>XILÈ CIANOL</b>	Blau turquesa	3500-5000 pb
<b>BLAU BROMOFENOL</b>	Lila	Més de 300 pb
<b>ORANGE G</b>	Taronja	50 pb

A partir dels **3 minuts** ja es va començar a distingir el color blau (xilè cianol), als **8 minuts** el blau estava totalment separat dels altres dos colors.



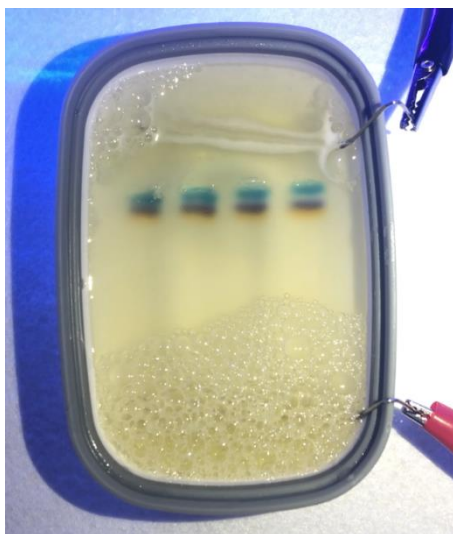
*3 Minuts*



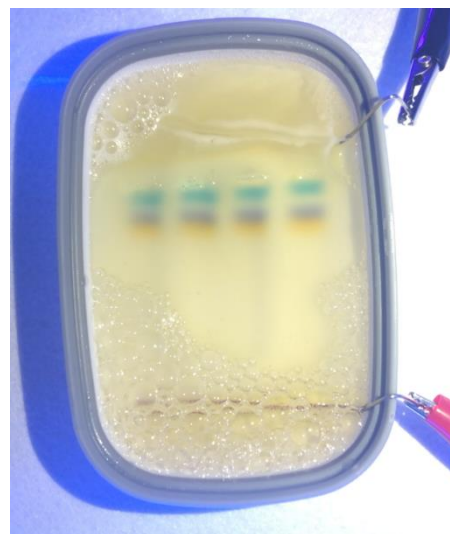
*8 Minuts*

Als **14 minuts** es van començar a moure el lila (blau bromofenol) i el groc (Orange G) de manera paral·lela, el groc sempre davant i el lila al darrere.

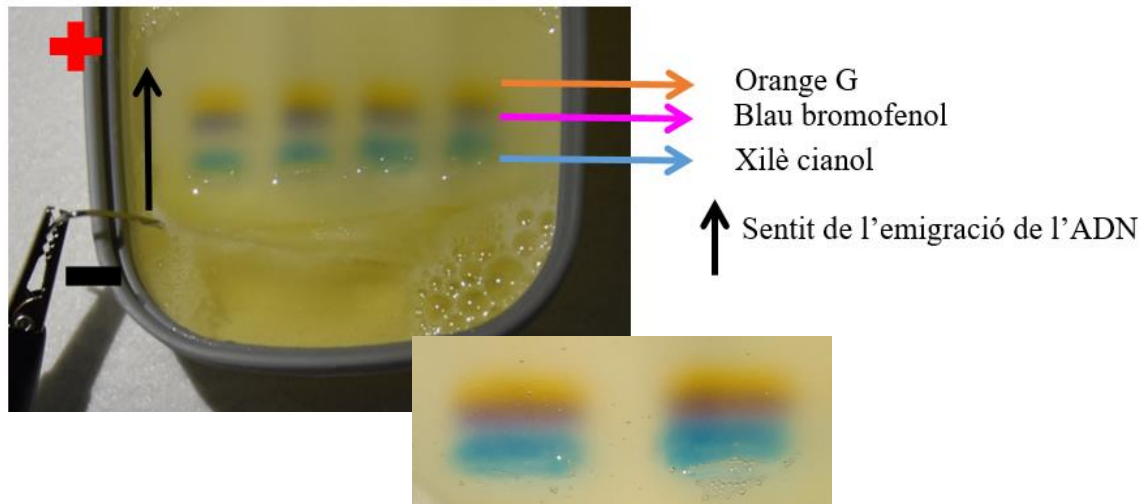
No va ser fins al **minut 25** que es van poder veure els dos darrers colors per separat, mai tan lluny com del blau però sí que no se sobreposaven, com havien estat fent durant tot l'experiment. Finalment, en aturar el corrent, es va veure clarament la separació dels tres colors: el groc primer (més a prop del pol positiu), el lila molt a prop del groc i finalment, el blau (al costat del pol negatiu), una mica allunyat dels pous inicials però per molt poc.



*14 Minuts*



*25 Minuts*



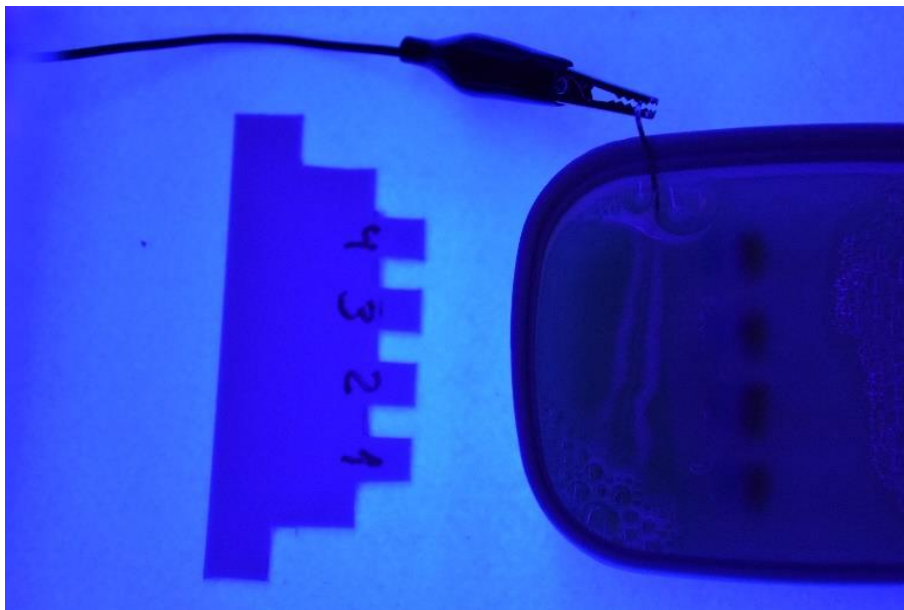
Durant aquest experiment també vaig voler veure si realment amb la llum ultraviolada es distingien les diferents mostres d'ADN i es veien molt més clarament que amb la llum natural degut a la seva fluorescència. Jo vaig fer servir un aparell de LED ultraviolada de 395-400nm (A) ja que no comportava cap problema ni perill però tampoc vaig poder visualitzar les bandes.

Això de la llum UV, ho vaig fer perquè en comprar el gel Runsafe, deien que la llum ultraviolada feia la visualització de les bandes molt més clara degut a la seva fluorescència, el que passava és que no deien quina. Vaig estar investigant i vaig veure que es distingien tres tipus de llum ultraviolada:

- A (de 315 a 400nm) aquesta és l'UVA
- B (de 280 a 315nm) – (UVB)
- C (de 100 a 280nm) – (UVC): aquest tipus de radiació té la capacitat d'inactivar infeccions, bacteris i virus, però suposa un perill per a la salut, ja que pot danyar el nostre ADN, afecta la Timina, però també pot causar lesions a la retina i lesions cutànies com ara irritacions o cremades.

Més a prop de la genètica

Els nucleòtids tenen la seva màxima absorció al voltant dels 260nm (radiació C). Per fer l'experiment hauria d'haver fet servir aquesta radiació d'ona, però no es pot tenir a casa pels problemes que comporta i la seva perillositat. Per tant, ja vaig fer servir un aparell de LED UV de longitud 395 – 400nm, pertany al grup A i no comporta cap perill tot i que no va ser suficient per visualitzar les bandes de l'ADN.



*El meu experiment amb la llum UVA*

El meu segon objectiu era investigar si en aquestes mostres de saliva hi havia més similitud entre les mostres de les dues germanes que amb la dels progenitors. Això ho volia investigar perquè a les proteïnes hi trobem part de l'ADN. També cal tenir en compte que s'hereta un 50% de material genètic de la mare i un altre 50% del pare, per això, haurien de tenir més similituds les mostres de les germanes entre elles que amb les dels pares tot i que hi hagi un parentesc molt directe.

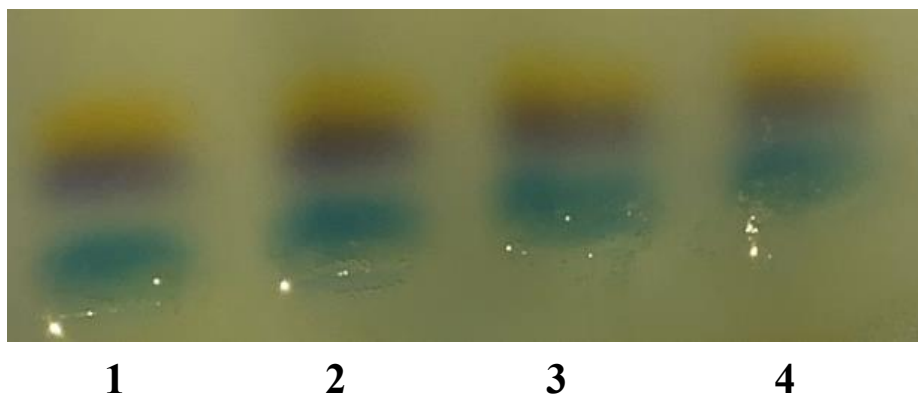
Un factor curiós és que si analitzem les mostres de saliva d'una família on els fills són bessons idèntics o monozigòtics, el perfil genètic individual dels bessons serà completament idèntic, no hi hauria manera de distingir-los quan parlem d'ADN. En canvi si són bessons però no són idèntics no ho serà.

En la següent imatge feta a l'experiment definitiu, amb l'ADN aïllat i el colorant Runsafe, es poden veure els resultats de l'experiment, d'esquerra a dreta veiem les mostres de la meua germana (1), la meua (2), la de la meua mare (3) i la del meu pare (4). Es pot veure clarament que les dues mostres més semblants són la número 1 i la 2, la de la meua germana i meua, en aquestes mostres hi ha un 50% de similitud, és a dir que compartim gens provinents dels dos progenitors.

Tornem a repetir que es pot veure que les mostres 1 (meua germana petita) i 2 (meua), són les dues mostres més semblants entre elles i això es pot veure sobretot per la distància que han corregut els colors, que és d'una manera similar. Un altre factor que en va fer veure això va ser la distància entre el Xilè cianol (blau) i el Blau bromofenol (lila) que és gairebé la mateixa.

En els quatre casos, el color que ha corregut més ha estat l'Orange G (groc) i això és degut al fet que és el que pesa menys, però en la última mostra (4), aquest mateix color, el groc, es veu que queda una mica superposat sobre el lila, cosa que en les dues mostres primeres gairebé no s'aprecia. A les mostres número 3 i 4 (mare i pare respectivament) és on hi ha menys separació entre el color lila i el color blau.

Si s'han de veure semblances entre una dels progenitors i una de les filles, les dues mostres més semblants són la número 2 (meua) i la número 3 (mare), sobretot es veu també en la separació entre els colors blau i lila.



### **Comparacions entre colorant alimentari i Runsafe:**

Els dos colorants que he fet servir al llarg del meu experiment són primer el colorant alimentari i en segon lloc, a la prova definitiva, vaig fer servir el colorant Runsafe.

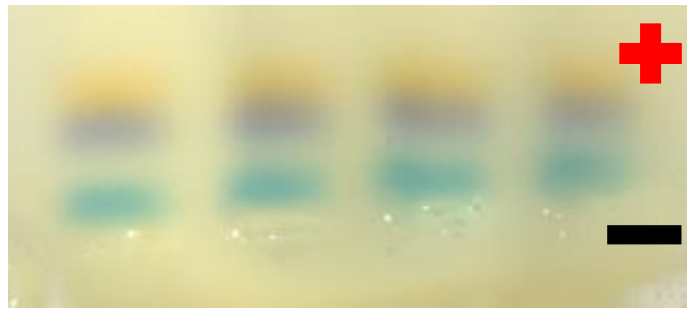
En referència als colors de les bandes, és cert que es va poder veure millor la separació de colors a la primera prova, quan vaig fer servir el colorant alimentari, el que més va córrer va ser el color groc. A la prova definitiva, amb el colorant Runsafe, també es van veure molt clarament els tres colors en els quals es podia separar, l'Orange G, Blau bromofenol i el Xilè cianol.

Si parlem de la velocitat a la qual van moure's les mostres, va ser la mateixa aproximadament en els dos casos, en el de l'alimentari i en el Runsafe. Respecte a la distància des dels pous fins a la posició final el que més va córrer va ser el colorant groc. És a dir van ser els colorants alimentaris, i entre aquests el groc i sobre el Runsafe, van córrer totes les mostres més o menys la mateixa distància però el colorant que més va córrer dels del Runsafe va ser l'Orange G. En ambdós casos és degut al fet que el pes d'aquest color és menor al de la resta.

### **Càtode (-) i Ànode (+)**



*Colorant alimentari*



*Runsafe*

**Taula comparativa dels dos colorants utilitzats:**

	<b>COLORANT ALIMENTARI</b>	<b>RUNSAFE</b>
<b>SEPARACIÓ DELS COLORS</b>	Vist més clarament la separació dels colors primaris (blau, vermell i groc)	Es va veure bé però com que eren tots el mateix colorant, no tanta diferència
<b>VELOCITAT</b>	Va començar a moure's als 3 minuts i van acabar als 20 minuts	Va començar a veure's diferència al minut 6 i va parar al minut 25
<b>DISTÀNCIA RECORREGUDA</b>	Depenent del color, el que més el groc i el que menys el blau	El que més va córrer va ser el groc i el que menys, el blau també.

### **3. CONCLUSIONS:**

Recordem que la hipòtesi principal del treball era comprovar si hi havia més semblança entre les mostres de saliva de la meva germana i la meva que amb la dels nostres progenitors, fent servir un aparell d'electroforesi en gel que jo mateixa havia construït. I després de fer el treball, he pogut comprovar que ha estat així i d'aquesta manera, que **la meva hipòtesi ha estat confirmada**.

Per altra banda hi havia l'objectiu de construir l'aparell d'electroforesi en gel i que funcionés de manera correcta intentant separar en bandes l'ADN per així poder-los comparar de manera més fàcil.

La gran conclusió del treball, a part d'haver comprovat que sí que es poden analitzar mostres d'ADN en un aparell d'electroforesi en gel i a més fet amb material accessible per a tothom, ha estat que les diferències entre l'ADN de la família s'han pogut visualitzar clarament. S'ha de tenir en compte que no és un experiment de laboratori i que tot i això s'han pogut veure les semblances i les diferències.

El que s'ha vist principalment és que l'ADN sí que es pot separar en bandes i de manera clara, s'ha vist molt bé sobretot amb el colorant Runsafe i els tres colors que contenia. Han corregut els colors i les mostres d'ADN depenent del pes de les mostres.

D'altra banda vaig voler fer una petita comprovació: al segon experiment (el que es va fer amb saliva i colorant alimentari) vaig provar de canviar els pols per veure si corrien sempre cap al lloc on hi hagués més espai. I vaig veure que no era així.

Vaig poder comprovar en aquesta mateixa prova, que si un cop començat l'experiment, quan les mostres començaven a córrer cap a un dels dos pols, en intercanviar els elèctrodes (el positiu amb el negatiu) les mostres tenien la capacitat d'invertir el sentit cap a on corrien inicialment.

Com a resultat, vaig poder veure que a mig experiment, les mostres podien canviar el sentit cap a on corrien quan jo intercanviava els elèctrodes. Vaig poder comprovar que sí, que les mostres sempre corren cap a l'elèctrode positiu ja que les mostres tenen càrrega negativa i que un cop l'experiment ha començat i les mostres tenen un sentit definit, poden canviar el sentit del recorregut si es canvien els elèctrodes. Així doncs, vaig acabar de comprovar que sempre correran



cap al positiu ja que tenen càrrega negativa, independentment de l'avançat que estigui l'experiment.

La part més espectacular i l'experiment principal era veure si hi havia semblances entre les mostres analitzades a l'electroforesi en gel.

El resultat ha estat que realment les mostres dels progenitors, entre elles, no s'assemblaven, això ja és el que esperàvem que passés perquè cadascun dels pares tenen dos orígens completament diferents genèticament parlant. És a dir que cadascun dels dos té 50% del seu pare i 50% de la seva mare.

Per altra banda, les mostres de la meva germana i la meva han estat molt semblants entre elles, cosa que també és lògica i esperable, ja que les dues tenim els mateixos progenitors i per tant, els nostres genotips tenen el mateix origen: no són iguals perquè som germanes, no bessones idèntiques. I això és perquè els nostres gens són 50% del mateix pare i 50% de la mateixa mare.

Aquestes semblances i diferències les he pogut veure bàsicament en l'espai que ha corregut cada mostra i en els diferents colors que s'han separat i la distància entre aquests.

La valoració personal sobre aquest treball és molt positiva. És cert que inicialment vaig tenir molts problemes amb el tema perquè no trobava l'enfocament correcte però després d'estar-ho mirant i amb ajuda, quan vaig tenir el treball encaminat on es veien clarament els objectius i la hipòtesi, vaig tenir moltes ganes de començar a treballar.

Quan de nou vaig trobar-me problemes a l'hora de l'obtenció del material, el treball va tornar-se a parar però un cop ho vaig tenir tot i vaig tenir el material necessari a les meves mans, vaig posar-me mans a l'obra i vaig començar a construir l'aparell per primera vegada.

Quan vaig poder veure la separació dels colors amb el colorant alimentari, em vaig emocionar molt en veure que l'aparell d'electroforesi en gel que havia construït amb material molt bàsic funcionava i bé.

La segona prova vaig seguir el mateix procediment i en comprovar que no es veia l'ADN amb el colorant alimentari em vaig posar a buscar alternatives i finalment vaig trobar el Runsafe, que després d'unes setmanes, quan va arribar em vaig alegrar molt perquè volia dir que podia fer finalment la prova definitiva.

Quan la vaig fer, amb l'extracció de l'ADN de la saliva inclosa, em va sorprendre molt veure la separació de bandes i que tot el que havia estat estudiant i preparant es veia reflectit en aquell experiment.

Finalment, em va agradar molt estar treballant amb aquest projecte i també em va acabar apassionant molt el tema ja que era una cosa que m'interessava molt i que inicialment no pensava que es pogués dur a terme a casa, sinó que pensava que només seria possible en laboratoris especialitzats, però degut a la COVID-19, ho vaig haver de fer a casa i realment mai no hagués pensat que jo, a casa meva hagués pogut fer la separació i l'extracció de l'ADN de la saliva veient els filaments de l'ADN, la separació de bandes d'ADN a l'aparell i sobretot fer aquestes comparacions dels resultats extrets.

També aquest treball m'ha ajudat a entrar en tot aquest món de la genètica i poder manipular-la de primera mà, i així també investigar i aprendre molt sobre mètodes de diferenciació d'ADN i altres usos professionals de l'aparell que jo havia construït. Es podria dir que el que més em va sorprendre dels usos de l'aparell es que serveix per identificar persones desaparegudes i es pot comprovar la compatibilitat a l'hora de donacions d'òrgans.

Amb aquest treball, també volia donar a entendre i intentar ensenyar que, al contrari del que em pensava, la genètica realment no està tan lluny, sí que és cert que és molt complexa i pot arribar a ser molt complicada però vist el que en aquest treball s'ha fet, crec que les parts més bàsiques no són tan difícils ni inaccessibles. Per altra banda m'agradaria dir que penso que la genètica és el futur i que en uns anys servirà per detectar malalties i per a futures proves diagnòstiques.

Finalment espero que aquest treball serveixi per acostar la genètica a més gent i que aquests s'interessin en aquest tema ja que és molt ampli. I per què no, també crec que el meu treball podria tenir una continuïtat.

#### **4. GLOSSARI**

**Àcid nucleic:** Els Àcids Nucleics són les biomolècules portadores de la informació genètica. Són biopolímers, d'elevat pes molecular, formats per altres subunitats estructurals o monòmers, denominats nucleòtids. Els àcids nucleics estan formats per llargues cadenes de nucleòtids, enllaçats entre si pel grup fosfat.

**ADN/DNA:** Sigla internacional de l'ADN (àcid desoxiribonucleic), àcid nucleic que es troba en el nucli de les cèl·lules i és el principal constituent del material genètic dels éssers vius. Aquest àcid nucleic conté les instruccions genètiques usades pel desenvolupament de tots els organismes vius. També és el responsable de la transmissió hereditària..

**Agarosa:** L'agarosa és un polímer natural i polisacàrid format per galactoses alfa i beta que s'extreuen de les algues dels gèneres *Gellidium* i *Gracillaria*. És soluble en aigua. Algunes de les seves propietats són que té una gran resistència mecànica; possibilitat de variació de la mida dels porus, això anterior es fa tenint en compte la partícula i variant la concentració del gel; també té una gran estabilitat tèrmica (diferència entre el punt de fusió i el de solidificació); gran transparència i per tant visibilitat i no és tòxic.

**Codi genètic:** és el conjunt de regles que defineix com es tradueix una seqüència de nucleòtids d'ADN en una seqüència d'aminoàcids en una proteïna. És universal.

**Colorant:** substàncies d'origen químic o biològic, generalment tints, pigments, reactius o altres compostos que es fan servir a la coloració de teixits de microorganismes per exàmens microscòpics, sempre han de tenir com a mínim un grup cromòfor que li proporcioni la propietat de tenyir.

**Desnaturalitzar:** En bioquímica, la desnaturalització és un canvi estructural de les proteïnes o àcids nucleics, on perden la seva estructura original, i també el seu funcionament òptim i a vegades també canvien les seves propietats físico-químiques-estructurals.

**Elèctrode:** extrem d'un conductor en contacte amb un medi que rep o porta corrent elèctrica

**Electroforesi en gel:** són un grup de tècniques que fan servir els científics per separar molècules basant-se en propietats com la mida, la forma...

L'electroforesi en gel es fa servir generalment per a anàlisi, tanmateix també pot servir per purificar molècules parcialment abans d'aplicar espectrometria de masses, PCR, clonació o seqüenciació d'ADN.

**Genotip:** En genètica, el genotip és la dotació de gens o al·lels que presenta una espècie o un individu concret. Normalment, els al·lels es troben de forma diploide, però en el cas de conjunts de gens monoploides s'anomena haplotip, els procariotes i alguns orgànuls cel·lulars tenen aquesta característica. En un sentit ampli, el genotip és el conjunt de gens que disposa un organisme viu o virus.

**Macromolècula:** molècula de gran mida i normalment creada per unitats més petites (monòmers). Generalment estan compostes per milers d'àtoms. Aquests poden ser tant orgànics com inorgànics

**Mendel:** Biòleg Txec conegut com el "pare de la genètica" que va experimentar amb el pèsol i va desenvolupar les famoses tres lleis de la genètica, conegudes com les Lleis de Mendel

**RNA:** L'àcid ribonucleic (ARN o RNA) és un àcid nucleic format per una cadena de ribonucleòtids. Està present tant en les cèl·lules procariotes com en les eucariotes, i és l'únic material genètic de certs virus (els virus ARN). En els organismes cel·lulars exerceix diverses funcions.

**Pb (parells de bases):** Molècules anomenades nucleòtids que estan en cadenes oposades de la doble hèlix de l'ADN i que formen enllaços químics que ajuden a unir les dues cadenes de l'ADN. En l'ADN hi ha quatre nucleòtids o bases: adenina (A), citosina (C), guanina (G) i timina (T). Aquestes bases formen parells específics (A amb T i G amb C).

**Pont d'hidrogen:** un pont d'hidrogen és aquell enllaç que és conseqüència de la força d'atracció entre un àtom d'Oxigen i un altre d'Hidrogen, Nitrogen o Fluor que tinguin càrrega negativa. D'aquesta manera es crea una connexió entre el pol positiu d'una partícula amb el negatiu d'una altra.

**Proteïna:** Les proteïnes són molècules orgàniques amb un elevat pes molecular formades per aminoàcids que estan units per un tipus d'enllaços coneguts com enllaços peptídics. L'ordre i la disposició dels aminoàcids depenen del codi genètic de cada persona. Totes les proteïnes estan compostes bàsicament per carboni, hidrogen, oxigen i nitrogen. Tot i que també poden contenir sofre, fòsfor i fins i tot, en petites porcions, ferro, coure, magnesi i iode.

**Solució tampó** (=buffer, dissolució amortidora, o dissolució reguladora): És una barreja en concentracions relativament altes d'un àcid i la seva base, és a dir sals actives. Aquestes solucions tenen la propietat de mantenir estable el pH d'una dissolució enfront de l'adició de quantitats relativament petites d'àcids o bases fortes.

**Oncogèn:** Gen que participa en el creixement de les cèl·lules normals però la seva forma ha tingut una mutació (canvi). Els oncogèns poden fer créixer les cèl·lules cancerígenes. Les mutacions dels gens que es converteixen en oncogèns poden ser heretades o poden resultar de l'exposició a substàncies de l'ambient que causin càncer.

## **5. BIBLIOGRAFIA:**

ARRÓ M. NOÉ V.

*Guió de pràctiques de biologia molecular i genòmica.*

Grau de farmàcia curs acadèmic 2018-2019

Facultat de farmàcia de la Universitat de Barcelona

Aula Genyca (27-3-2018) *Extracció casera de ADN* [en línia]

Aula Genyca

<<https://www.aulagenyca.com/>>

BARRANCO-MONTESINOS D.

“Aplicación de la electroforesis en la identificación forense”

*Visión criminológica-criminalística*

Abril – Juny 2019

BUTLER J.M. (2010)

“*Fundamentals of forensic DNA typing*”

Amsterdam, Netherlands

Christopher P. Austin, M.D. (25-11-2020) *Glossary of Genetic Terms*, [en línia]

National Human Genome Research Institute, NIH

< <https://www.genome.gov/>>

García R., (5-4-2018) *Electroforesis parte I* [en línia]

Universidad Nacional de Misiones, Facultad de ciencias exactas, químicas y naturales

< [www.aulavirtual-exactas.](http://www.aulavirtual-exactas.)>

Més a prop de la genètica

Hess, K. (20-11-2020) *DNA Fingerprinting*, *Science Buddies*, [en línia]

Idees per projectes de la fira de ciències, Kenneth Hess

< <https://www.sciencebuddies.org/>>

KLUG W.S,

*Conceptos de genética*

5° ed

Madrid, Prentice Hall, 1999

Lamy E., Costa A., Antunes C. (5-8-2019) *Protein Electrophoresis in Saliva Study* [en línia]

Intechopen books.

< <https://www.intechopen.com/>>

Madden D. (2006) *Descubriendo el ADN* [en línia]

< <https://www.scienceinschool.org/> >

MARQUÉS NEGREDO ML. et al

“Identificación sanitaria: la huella genética”

*Sanidad Militar*

Vol. 67 nº 3 Madrid Juliol/Setembre 2011

Microkit, (22-3-2019) *Agarosa* [en línia]

Medios de Cultivo para Microbiología

< <https://www.medioscultivo.com/>>

Phillips A. *RunSAFE stain reagent* [en línia]

Cleaver Scientifics, Medical Expo

< <https://www.medicalexpo.es/>>

Més a prop de la genètica

Reece, J. B., Taylor M. R., (19-1-2020) *Electroforesis en gel* [en línia]

Biotechnology, de OpenStax College, Biologia

< <https://es.khanacademy.org/>>

Robinson N., Bengtsson K., Nilsson S (13-5-2019) *Separation of DNA and proteins through improved gel electrophoresis* [en línia]

Linköping University, EurekaAlert!

< <https://www.eurekaalert.org/>>

SOLARI A.J,

*Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina*

4º ed

Editorial Medica Panamericana, 2011

SYNLAB (9-11-2019) *Huella genética: prueba de ADN para determinar la identidad genética personal* [en línia]

Laboratoris SYNLAB

< <https://www.synlab.es/>>

(16-10-2020) *Gel electrophoresis* [en línia]

Wikipedia, The free encyclopedia

< <https://en.wikipedia.org/>>



*“The laws of genetics apply  
even if you refuse to learn them”  
~Alison Plowden~*