

3 Manipulación genética.

La investigación genética necesita la manipulación de ADN para poder construir teorías sobre los mecanismos que suceden en las células *in vivo* y elucidar la estructura del genoma y su organización (intrones, exones, elementos de regulación), también para poder desarrollar técnicas nuevas de curación y terapia mediante la caracterización de los genes terapéuticamente interesantes, y para la fabricación de plantas y animales de las características deseadas, con un mayor rendimiento agrícola y ganadero. Es importante mantener siempre en el pensamiento que la manipulación genética sirve un fin muy determinado, que a veces se difumina cuando se entra en profundidades técnicas.

Técnicas básicas.

Hay que tener en cuenta que toda la manipulación genética implica un aislamiento del medio celular, por lo que las condiciones de experimentación son todas *in vitro*, y no tienen nada que ver con el metabolismo de los ácidos nucleicos. Con esta premisa en mente, los resultados que se pudieran obtener mediante estas técnicas siempre deberán ser contrastados y verificados antes de extrapolarlos a la situación de un organismo vivo. Estas técnicas utilizan las enzimas presentes en las células como herramientas para poder cortar, empalmar, duplicar, amplificar y recombinar los fragmentos de ADN con los que se trabaja; en suma, las enzimas efectúan las mismas funciones que en el medio fisiológico, pero libres de todo factor de regulación, para hacer su actividad más predecible y permitir una manipulación al antojo del experimentador. Ésta es la principal diferencia entre los sistemas *in vivo* e *in vitro*.

Degradación de ácidos nucleicos.

Métodos químicos.

Desde hace mucho tiempo se conoce la degradación química de los ácidos nucleicos mediante cambios de pH (hidrólisis ácida o alcalina, despurinización), pero son métodos demasiado radicales e incontrolables, por lo que su utilización está muy limitada a determinados fines, como el cálculo del porcentaje de bases. Los ácidos nucleicos tienen distintas sensibilidades a la hora de sufrir una hidrólisis: a pH muy bajos (1) se obtiene un hidrolizado total de todos los ácidos nucleicos (azúcares, fosfatos y bases), a pH = 4 se hidrolizan sólo los enlaces glucosídicos (más en el ADN que en el ARN), a un pH neutro los ácidos nucleicos son estables (más el ADN que el ARN), y a pH alcalino (11) el ADN es estable, pero el ARN se hidroliza dando nucleósidos 2' y 3'-fosfato, por el efecto de la catálisis básica que ejerce el 2'-OH (esta distinción es útil cuando se quiere eliminar el ARN de un aislado de ácidos nucleicos).

Métodos enzimáticos.

Las técnicas de manipulación enzimática de los ácidos nucleicos son mucho más finas y específicas que las anteriores, por lo que se puede hablar de disección génica. Las enzimas, llamadas nucleasas, se extraen de diversos organismos, generalmente microscópicos, y hay de todos los tipos: endo- y exonucleasas, ADN o ARNasas, específicas de secuencia o no, específicas de hebra sencilla o de doble hebra, y todas las combinaciones entre ellas. En la siguiente lista se detallan algunas de las más utilizadas.

ADNasa I.

Es una endonucleasa de *E. coli* que corta ADNds y ADNss, sin especificidad de secuencia, pero preferentemente detrás de pirimidinas. El corte al azar sobre ADNds se realiza en distintos sitios en cada hebra si el medio tiene Mg^{2+} , pero si el catión es Mn^{2+} los dos cortes están generalmente en el mismo sitio. El uso indiscriminado (al azar) de esta enzima permite determinar zonas de actividad de la cromatina

mediante la mayor abundancia de cortes, lo que significaría que el ADN está más expuesto al corte.

Exonucleasa III.

Otra enzima de *E. coli* que elimina nucleótidos uno por uno desde los extremos 3'-OH. Actúa sobre todos los tipos de ADNds que tengan esos extremos (lineal y circular con una muesca), y en los ADNds se utiliza para fabricar extremos cohesivos (extremos de una molécula de ADNds en los que una de las hebras sobresale un poco sobre la otra).

ExoS1.

Exonucleasa y endonucleasa que actúa sobre ADNss (y sobre ADNds si está en grandes concentraciones), requiere Zn^{2+} y, como característica principal, el pH óptimo de actuación es 4, con lo que hay que tener en cuenta las posibles despurinizaciones de los ácidos nucleicos.

Bal31.

Es una exo y endonucleasa que necesita un extremo 3'-OH para anclarse al ácido nucleico. Actúa también sobre ADNds y ADNss y necesita Ca^{2+} . Se utiliza cuando se necesita acortar una molécula larga de ADN, pudiéndose parar la reacción fácilmente con EDTA, que quela los cationes divalentes, especialmente el Ca^{2+} , con lo que la actividad de la enzima resulta muy controlable. Las moléculas que resultan del tratamiento con esta enzima tienen que ser limadas con la ADN polimerasa I, cuyo mecanismo se comentará después.

ARNasa H.

Elimina el ARN de un híbrido ADN-ARN.

ARNasa A.

Es una endonucleasa pancreática, generalmente de origen bovino, que rompe siempre detrás de las pirimidinas.

ARNasa de T1.

Es una endonucleasa del fago T1 que corta siempre detrás de las G. Se utiliza en la secuenciación de ARN.

Síntesis de ácidos nucleicos.

Para la síntesis *in vitro* se recurre a copiar, de una manera simplificada, la maquinaria existente en la célula, con lo que se debe disponer de las polimerasas, los dNTP y el ADN molde. Es necesario resaltar que la síntesis y la polimerización son independientes del origen, tanto de las enzimas, como del propio ADN, ya que éste es absolutamente indistinguible del de cualquier otro de otra especie distinta. Si en el cóctel de reacción se incluyen determinados dNTP marcados de cualquier modo, se pueden conseguir fácilmente sondas de secuencia conocida, o sobre productos de degradación de ADNasa I.

La lista siguiente enumera las principales enzimas utilizadas.

ADN polimerasa I.

Es la reina de la fiesta por excelencia. Se obtiene de *E. coli* y fue una de las primeras en estudiarse y caracterizarse. Como todas las ADN polimerasas conocidas, tiene tres actividades diferenciadas: ADN polimerasa 5'-3' (necesita empezar por un extremo 3'-OH libre), exonucleasa 5'-3' (para eliminar cebadores

in vivo), y ADN exonucleasa 3'-5' (Actividad correctora de errores). La actividad $exo5'-3'$ se utiliza para sustituir una hebra en un ADNds con una muesca (producida por la ADNasa I) por otra exactamente igual, pero marcada, en lo que se llama marcaje por desplazamiento de la mella. Sin embargo, esta actividad es tan potente que puede significar un problema, al eliminar cualquier hebra con un extremo 5'-fosfato, por lo que se ha diseñado una ADN polimerasa especial, llamada ADN polimerasa Klenow (que sólo consta de la subunidad con ese mismo nombre, el núcleo), en la que falta la actividad exonucleasa 5'-3'. Estas ADN polimerasas especiales no pueden hacer traslado de la mella, sino sólo rellenar huecos o eliminar extremos cohesivos al alargar el extremo más corto sobre el más largo (rellenar los huecos generados con Bal31). Otra función de esta polimerasa es la técnica de polimerización con iniciación al azar (*random priming*), en la que un oligo pequeño (4 ó 6 nt) se une más o menos inespecíficamente a un fragmento de ADN desnaturalizado (la unión inespecífica se obtiene suavizando las condiciones de hibridación). El oligo presenta el extremo 3'-OH necesario para comenzar la síntesis, que ha de hacerse a un pH ligeramente ácido (6,6) para minimizar el efecto de la actividad correctora de errores, que evitaría la polimerización sobre el oligo, al no aparearse exactamente éste con el ADN molde.

ADN polimerasa de T7.

Originaria del fago T7, es la polimerasa más potente que se conoce en todas las actividades, y la que sintetiza los fragmentos más largos. Se utiliza por esto en la secuenciación de ADN (la llaman secuenasa), pero también se necesita eliminar la actividad correctora de errores para que comience a polimerizar aunque los cebadores no aparezcan demasiado bien. Esto se consigue mediante ingeniería genética, eliminando el extremo N-terminal, o también mediante una incubación con un agente reductor. (¿Oxígeno molecular?).

ADN polimerasas para PCR.

Estas enzimas realizan la amplificación de ADN mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction: PCR*), de la que se hablará más adelante, pero uno de los requisitos de esta técnica es la alta temperatura, por lo que las enzimas deben ser termorresistentes. Esto excluye la ADN polimerasa I, porque se desnaturaliza a los 40 °C, y se utilizan las enzimas de organismos termófilos o hipertermófilos, que tienen su mayor actividad a temperaturas cercanas a los 70 u 80 °C. La más utilizada (y que da nombre al grupo de enzimas afines) es la polimerasa Taq (*Thermophilus aquaticus*), cuyo principal inconveniente es que no tiene actividad correctora de errores, con lo que se incorpora uno cada 5 Kb de promedio. Algunas son mejores (y más caras), como la polimerasa Vent, llamada así porque se aisló de la ventana de un submarino a la que se había adherido una colonia de *Thermococcus litoralis*, y también la Pfu (*Pyrococcus furiosus*), ambas con actividad correctora de errores (cometen 12 veces menos errores que la Taq), aunque no tan buena como la de la ADN polimerasa I.

La polimerasa Tth (*Thermus thermophilus*) no distingue entre moldes de ADN o de ARN, con lo que se utiliza como transcriptasa inversa para, por ejemplo, obtener el ADNc a partir de un ARNm. Otra enzima curiosa es la Tfl (*Thermus flavus*), que es capaz de leer ADN con estructura secundaria compleja.

Transcriptasas inversas.

La definición técnica sería polimerasas de ADN dependientes de ARN, todas obtenidas a partir de retrovirus como el del mieloblastosis (excepto la Tth, que es la excepción). Se utilizan para obtener el ADNc a partir de un ARNm. Para este fin se fabrica un oligo de poliT que presente el extremo 3'-OH libre y aparezca perfectamente con la cola de poliA. La transcripción inversa continúa hasta el comienzo del ARNm, en el que la enzima hace un bucle con el ADN recién sintetizado y queda un extremo 3'-OH libre para que una polimerasa normal (Klenow) acabe la síntesis. El resultado es una molécula de ADN en horquilla que se trata con una endonucleasa para obtener un ADNc de banda doble. Hay que tener cuidado con la actividad ARNasa H que tienen estas enzimas (actividad $exo5'-3'$ del ARN en híbridos con ADN), ya que no se puede eliminar porque es esencial para la estabilidad de la enzima, y puede suceder que no se transcriba la parte 5' del ARNm

porque se elimina antes.

Transferasa terminal.

Añade restos de purina o pirimidina a partir de dNTP en el extremo 3'-OH de una molécula de ADNds independientemente del molde; la reacción se controla con las cantidades de Mn^{2+} y Co^{2+} , respectivamente. Fue la primera polimerasa que se descubrió (lo hizo Ochoa, llamándola polinucleótido fosforilasa) y también la primera que se utilizó para clonar, al poder fabricar extremos cohesivos de poliPu · poliPy. Sólo se conoce esta enzima en procariotas y no se sabe muy bien para qué se mantiene, porque parece muy primitiva.

ARN polimerasas.

Estas enzimas copian el ADN en ARN, para lo que necesitan un promotor reconocible, que es específico de cada ARN polimerasa, incluso dentro de la misma especie. Si se quiere transcribir un gen a ARN, se necesita añadir una secuencia promotora en 5', que puede oscilar entre 50 y 100 nt y dentro de la cual comienza la transcripción.

Otras formas de manipulación de ácidos nucleicos.

- **Ligasas:** Cierran mellas en ADNds entre un extremo 3'-OH y otro 5'-fosfato, para lo que necesita energía. La ligasa de T4 utiliza ATP, mientras que la ligasa Eco (*E. coli*) utiliza NADH.
- **Fosfatasas:** Quitan el fosfato en 5' y dejan extremos 5'-OH.
- **Quinasas:** Añaden fosfato sobre extremos 5'-OH, proveniente del fosfato del ATP, por lo que se utilizan, junto con las anteriores, para marcar muchas moléculas de ADN en un extremo.

Enzimas de restricción.

Son endonucleasas de ADNds específicas de secuencia (a diferencia de las endonucleasas anteriores), a la que reconocen para llevar a cabo su actividad, ya sea dentro o a una cierta distancia de ella. En cualquier caso, no cortarán el ADN si la secuencia de reconocimiento tiene una C o una A metiladas, lo que supone un mecanismo de control y regulación.

Realmente las endonucleasas de restricción (llamadas así porque se restringe su acción al reconocimiento de una secuencia dada) forman parte de un sistema mayor y más o menos complicado, llamado de restrictasa y metilasa, en la que un número más o menos grande de enzimas está implicado en el reconocimiento y metilación de las secuencias limitando, de este modo, la acción de la nucleasa. Estos sistemas dan la impresión de ser el análogo bacteriano de los sistemas inmunes de los animales, porque evitan la invasión por fagos, ya que éstos no tienen su ADN metilado y son sustrato de las enzimas de restricción.

Se descubrió primeramente en cepas de *E. coli* que tenían resistencia al fago ϕ , pero no podían pasar esta resistencia a su descendencia. Se sembró un fago sobre un césped de la cepa K, obteniéndose una lisis prácticamente total, luego esos fagos se sembraron sobre la cepa C, con escaso efecto, pero los que sí pudieron entrar en ella se volvieron a poner en contacto con la cepa K, observándose una bajada extraordinaria de la eficiencia de plaqueo (edp: tanto por uno de fagos que lisan la bacteria que infectan). Aun así, algunos fagos consiguieron infectar algunas bacterias, y éstos se recogieron y se volvieron a llevar sobre la cepa C, que resultó prácticamente destruida. Es decir, la resistencia no era constante, sino que variaba según los hospedadores anteriores con los que el fago había mantenido contacto previamente. Este sistema tan complejo se caracterizó como sistema de restricción tipo I (por ser el primero que se describió), del que se hablará posteriormente, y que es enormemente complicado. Hay otros tipos de sistemas de restricción (II, III, IV), que se diferencian en el número de enzimas implicados y en el mecanismo de restricción y metilación.

Sistemas de tipo II.

Son los más sencillos que se conocen, y los que tienen una utilidad importante a la hora de manipular material genético. Estos sistemas constan de dos enzimas, una metilasa y una restrictasa, con capacidad para reconocer la misma diana a medio metilar (con una hebra metilada y la otra no) o sin metilaciones, respectivamente. La utilidad de este sistema de restricción radica en que las dianas son palíndromos de 4, 6 u 8 pb y la enzima corta dentro de ellos, produciendo extremos cohesivos o romos, pero siempre doblemente simétricos. No se sabe cómo es el sistema de reconocimiento, pero se especula que la formación de cruciformes es la vía para la unión de la metilasa y de la restrictasa. La metilasa suele ser un monómero y la restrictasa un dímero doblemente simétrico.

Hay enzimas de especies distintas que reconocen la misma, o parte de una misma diana, en cuyo caso se habla de enzimas isoesquizómeras. Este hecho permite utilizar enzimas distintas para el corte de ADN distintos, y luego poder unirlos y empalmarlos en una sola molécula.

Estos sistemas se nombran con una clave de cuatro letras y los números romanos del I al IV. La primera letra es la inicial del género del microorganismo en que se aisló, y las dos siguientes son las dos primeras del nombre específico. La cuarta letra es la cepa, y el número corresponde con el tipo de sistema de restricción en el que se incluye. Por ejemplo, la enzima Hind II (que fue también la primera que se aisló) proviene de *Haemophilus influenza* cepa **d** y sistema de restricción de tipo **II**.

La frecuencia de corte para una enzima dada se determina teóricamente mediante métodos estadísticos; para ello se calculan todas las variaciones con repetición de cuatro elementos tomados de cuatro en cuatro, de seis en seis o de ocho en ocho, según el número de nucleótidos de la secuencia diana. Para una enzima que corte hexanucleótidos, el cálculo teórico deberá ser $4^6 = 4096$ variaciones posibles, de las que sólo una es la diana, por lo que, aproximadamente, hay una diana cada 4 Kpb. Sin embargo, se observa que esta cuenta no se aproxima a la realidad, ya que la proporción de pares G + C no es la misma que la de los pares A + T y, además, varía entre especies. Otro dato que se desvía de los cálculos es que los sitios de restricción no están homogéneamente distribuidos y, además, hay que tener en cuenta que en eucariotas la mayoría de los pares GC están metilados. Como estas enzimas de restricción que reconocen hexanucleótidos no sirven para proporcionar fragmentos cortos (4 Kpb), se utilizan, a la luz de los datos obtenidos experimentalmente, para obtenerlos más largos (mucho más largos si se reconoce un octanucleótido y, además, la diana tiene C), mientras que las enzimas que cortan más frecuentemente (tetranucleótidos) se utilizan para la disección más fina e, incluso, realizar cortes al azar, si no se completa totalmente la digestión.

Sistemas tipo I.

Siguen un modelo de restricción más complicado. Los sistemas EcoK y EcoB son dos sistemas de este tipo, tan parecidos que se suponen alelos distintos, y no sistemas diferentes. Constan de tres genes: metilasa, restrictasa y enzima de reconocimiento común a las otras dos; además, el sistema requiere la utilización de SAM (S-adenosilmetionina) como cofactor de la metilasa. Estos genes se agrupan en un solo operón con la siguiente estructura:

Se han detectado mutantes para la restrictasa y para la proteína de reconocimiento, pero los posibles mutantes para la metilasa no sobreviven, ya que destruyen su propio genoma al no poderlo metilar. Se ha llegado a la conclusión de que EcoK y EcoB son alelos porque sus productos son totalmente intercambiables (mediante estudios con diploides y con genes híbridos), y la secuencia diana depende del alelo s que se incorpore.

Estas tres proteínas se ensamblan para formar una holoenzima en la que intervienen dos unidades de cada actividad más una de reconocimiento, a la que ya se ha unido el SAM. La secuencia diana de uno de los dos sistemas es TGA*N8TGCT, donde N8 indica un grupo de ocho nucleótidos cualesquiera. Hay que resaltar que esta diana ya no es un palíndromo, y que el corte se realiza a una distancia variable, aproximadamente 1 Kpb más allá de ella, tal y como está escrita. Se pueden crear genes híbridos de la proteína s de modo que reconozca parte de la diana de un sistema y parte de la diana del otro. El corte no presenta ningún patrón

definido y los extremos son cohesivos, pero no se generan de un corte limpio, sino de dos cortes sucesivos, y no siempre a la misma distancia. Sin embargo, no parece ser al azar, quizás debido al mecanismo que, como característica principal, cabe citar la dependencia de ATP para el proceso, a pesar de que las hidrólisis son todas espontáneas. Esto se explica porque la enzima se une a la secuencia de reconocimiento y, desde ella, fuerza al ADN a la formación de bucles con gasto de energía, hasta la distancia aproximada de 1 Kpb, donde corta.

Sistemas tipo III.

Estos sistemas constan de dos subunidades: restrictasa y metilasa, ambas con capacidad para unirse a la misma secuencia diana sin metilar, por lo que existe una competencia por el sustrato. En este caso la diana tampoco es un palíndromo. Una característica interesante de este sistema es que la metilasa sólo metila una de las bandas del ADN (consecuencia de que las dianas no sean palindrómicas), con lo que al duplicar el genoma existe un grave riesgo de restricción de la hebra que no lleve metilación. Esto se solventa haciendo que la restrictasa sólo corte entre dos repeticiones inversas (a unos 25 pb de una de ellas), cercanas y sin metilar, lo que las identificaría como ADN extraño. Es decir, la restrictasa corta secuencias de este tipo:

Los extremos de las moléculas resultantes son cohesivos y también necesitan ATP para su actividad. (Parecen las IR de una secuencia de inserción).

Sistemas tipo IV y otros.

Éstos son sistemas que se han descubierto y caracterizado hace poco. El sistema de restricción tipo IV de *E. coli* (Eco 571) consta de una sola enzima que es, a la vez, restrictasa y metilasa y que, además, corta dentro de la secuencia diana.

El sistema Mcr (*modified cytosine restriction*) es la excepción a la regla de que las dianas metiladas no se cortan, porque sólo tiene actividad cuando en su diana hay una citosina metilada. Este sistema debe de haber surgido en la evolución como una defensa frente a los fagos de la serie Tpar, que son capaces de metilar sus citosinas y, además, glucosilarlas. Los fagos mutantes en los que esta última actividad falta son eliminados y no proliferan. Este sistema se divide en dos subsistemas: McrA, codificado por un profago, y McrBC, codificado por los fagos de la serie Tpar. Parece que en ambos casos protegen a la bacteria de la infección por nuevos fagos y, por tanto, protegen al que ya está dentro. La diana del subsistema McrBC se conoce es muy compleja: AGC*N40–80AGC*, y el sitio de corte está en esos 40 a 80 pb de en medio. (Parece un transposón corto).

Todos los sistemas de restricción son el equivalente bacteriano al sistema inmune, ya que se encargan de proteger frente a infecciones bacterianas. En el caso de este último sistema, se comprueba cómo pueden llegar a complicarse las dianas, las enzimas, el patrón de metilación e, incluso, darse relaciones endosimbióticas entre la bacteria y el profago, ambos con la única intención de protegerse a sí mismos. Evidentemente, las implicaciones evolutivas son enormes.

Aplicaciones de las enzimas de restricción.

Estas enzimas (y me refiero sólo a las de tipo II, por su facilidad de manejo) son la herramienta principal en cualquier estudio médico o biológico, clínico o básico, porque, no importa cómo, siempre se necesitará determinar qué gen o qué mutación es la responsable de cualquier cosa que se esté estudiando, lo que implica manipular el ADN y, evidentemente, utilizar estas enzimas para hacerlo en fragmentos más cómodos. Aquí se enumeran las aplicaciones de las enzimas de restricción más directas, porque generalmente se asocian a otras técnicas como una herramienta más.

Digestión de genomas.

La utilización indiscriminada y completa de una enzima de restricción sobre un ADN genómico total producirá una colección de fragmentos que se pueden posteriormente separar mediante electroforesis y, en caso de que el genoma sea pequeño y hayan producido pocos fragmentos, resolverse para su posterior estudio. En el caso de genomas mayores, y no tienen porqué ser muy grandes, la electroforesis no resuelve bandas individuales, sino una mancha difusa en la que se aprecian oscurecimientos que corresponden con el ADN altamente repetido (en el caso de eucariotas). Para ver un solo fragmento de interés se puede someter el gel a una transferencia a papel (técnica de Southern) y, posteriormente, incubar con una sonda marcada.

Mapas de restricción.

Es una extensión o consecuencia de la digestión genómica. Consiste en la determinación y posicionamiento de las dianas de restricción sobre un fragmento determinado, mediante la digestión total combinada con varias enzimas diferentes. Hay varios métodos y abordajes, siendo uno de los más corrientes el consistente en la digestión secuencial con enzimas que tengan cada vez más frecuencia de corte, hasta llegar a una especie de secuenciación de los sitios de restricción. Realmente y en la práctica, consiste en hacer encajar el rompecabezas, con la ayuda de trucos como el marcaje de los extremos con quinasas, o la digestión parcial, con lo que tendremos una colección de fragmentos cortados al azar y que podremos ordenar siguiendo una analogía con el método de secuenciación de ADN mediante rotura de cadena.

Polimorfismo y diagnóstico de enfermedades.

Existe polimorfismo de un determinado fragmento de restricción (RFLP: *restriction fragment length polymorphism*) cuando se aprecian diferencias, normales o anormales, de movilidad electroforética (longitud) en la población. Equivale al concepto de alelo en el caso de los genes, pero como éstos no lo son, no se pueden llamar de ese modo. Los conceptos de polimorfismo y de alelo no son excluyentes, sino que puede haber alelos normales que no presenten polimorfismo y fragmentos polimórficos sobre el mismo alelo, hecho muy observado en los intrones de determinados alelos de determinados genes.

Estas variaciones en longitud pueden responder a mutaciones en dianas de restricción, que están presentes o ausentes en cada polimorfismo, que es el caso de la anemia falciforme: el codón 6 de la hemoglobina δ se cambia de GAG (Glu) a GTG (Val), eliminando una de las dianas para Mst II (CCTNAGG). Los pacientes tienen un polimorfismo de 1,4 Kb, mientras que los individuos normales lo tienen de 1,2 Kb. Los polimorfismos también se pueden deber a diferente longitud real entre dos dianas de restricción invariantes (por ejemplo, dianas de restricción sobre exones que flanquean un intrón cuyo tamaño es variable). En cualquiera de los dos casos, se puede hacer un seguimiento genealógico, ya que estos polimorfismos se heredan de manera mendeliana, exactamente igual que los alelos de los genes. Por esta característica se dice que los polimorfismos son informativos.

Un método más rápido que la electroforesis para determinar la existencia de un polimorfismo de interés generado por un cambio de diana consiste en la hibridación con un ASO (*allele-specific oligonucleotide*; oligo específico de alelo) sobre una gota de ADN en papel y en condiciones extremadamente restrictivas. Este ASO tiene la secuencia de bases específica del alelo o polimorfismo buscado (generalmente el de una enfermedad), pero podría hibridar con cualquiera de los otros porque sus secuencias son muy parecidas, excepto en un nucleótido, de ahí las condiciones muy restrictivas de hibridación. A pesar de la rapidez, con este método no se puede determinar fiablemente la condición de homo- o heterocigosis, porque no existe una separación entre alelos diferentes.

Reconocimiento (s).

Proteína que une SAM.

Metilasa (m).

Restricción (r).

Promotores.

SAM

s

m

r

r

m