

29. Polimorfismos proteicos de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*)

Gabriel Dorado

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales,
Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba

RESUMEN

Las proteínas pueden presentar diversas formas moleculares. Éstas, en el caso de las enzimas, se denominan isoenzimas o isozimas. Es el llamado polimorfismo proteico. El objetivo de este capítulo es analizar los polimorfismos proteicos de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). Para ello se emplea la técnica de electroforesis en gel de almidón. La enzima es identificada en forma de bandas gracias a una reacción coloreada.

Palabras clave: actividad enzimática, “fingerprinting”, marcador molecular, tinción.

Abreviaturas empleadas. ADH: proteína alcohol deshidrogenasa; *Adh^F*: alelo *F* del gen *adh*; *Adh^S*: alelo *S* del gen *adh*; β -NAD⁺: beta-nicotín adenín dinucleótido oxidado; Na₂-EDTA: sal sódica del ácido etilén diamino tetraacético; DNA: ácido desoxirribonucleico; NBT: azul de nitrotetrazolio; PM: peso molecular; PMS: fenacina metasulfato; Tris, Tris base o Trizma base: Tris (hidroximetil) aminometano; Tris-HCl, Tris clorhídrico, Trizma-HCl o Trizma-clorhídrico: Tris (hidroximetil) aminometano · clorhídrico.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El ser humano ha intentado clasificar el mundo natural desde tiempos remotos. Los polimorfismos de péptidos (proteínas/enzimas) representan el primer intento con metodología “molecular” para identificar organismos y asociar sus variaciones a características de interés o para estudiar su evolución (Dorado et al, 2001). Esta técnica se ha aplicado en numerosas ocasiones para el estudio de la genética de poblaciones en animales y plantas. La evaluación de este marcador molecular es más compleja que la de los caracteres morfológicos, pero la influencia ambiental sobre ellos es menor.

Las proteínas pueden presentar diversas formas moleculares, las cuales, en el caso de las enzimas, se denominan isoenzimas o isozimas. Las primeras pruebas de un polimorfismo proteico equilibrado datan de mediados del siglo pasado (Allison, 1954). Así, se descubrió que los humanos heterocigotos para el gen de la anemia falciforme son más resistentes a la malaria (paludismo). Es lo que se llama vigor híbrido de los heterocigotos (heterosis). Los polimorfismos

proteicos en poblaciones naturales fueron descritos por primera vez en *Drosophila pseudoobscura* (Hubby y Lewontin, 1966; Lewontin y Hubby, 1966), empleando métodos electroforéticos y de tinción de proteínas, que aprovechaban su actividad enzimática. Estos resultados fueron confirmados por Harris el mismo año, en poblaciones humanas y con técnicas similares (Harris, 1966). La técnica se popularizó rápidamente, siendo muy usada con posterioridad (Dorado, 1986), hasta el desarrollo de las técnicas basadas en DNA (Dorado et al, 2001).

El objetivo de este capítulo es analizar los polimorfismos proteicos de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) en la mosca de la fruta o del vinagre (*Drosophila melanogaster*). Se trata de un organismo muy importante y ampliamente utilizado en diversas disciplinas científicas (genética, genómica, bioquímica, desarrollo, comportamiento, evolución, etc).

2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

A continuación se indica el material empleado en los distintos apartados.

2.1. Mantenimiento y manejo de *Drosophila melanogaster*

Ácido propiónico.
Agar.
Agua del grifo.
Algodón en rama.
Anhídrido carbónico (CO₂).
Aparato de captura por succión.
Armario frigorífico.
Balanza.
Botellas.
Botellines.
Cacerola.
Calentador.
Campana extractora de gases.
Cloruro sódico (NaCl).
Cuchara de madera.
Drosophila melanogaster.
Estufa.
Etanol 99'5% (v/v).
Éter etílico.
Flexo.
Frigorífico.
Infernillo.
Levadura de panadería fresca.
Pipetas de 5 ml.
Probetas de 100 ml y 1 l.
Propipetas.
Sacarosa.
Termómetro.
Tubos de ensayo.
Vaso de aluminio.

2.2. Gel de almidón, electroforesis, tinción y revelado

Ácido acético glacial.
Ácido bórico.
Agua destilada.
Almidón.
Anhídrido carbónico.
Aparato de captura por succión.
Armario frigorífico (4 °C).
Azul de nitrotetrazolio (NBT).
Balanza.
Bandeja-molde para geles.
Bandeja-recipiente para tinción y revelado.
Beta-nicotín adenín dinucleótido oxidado (β -NAD⁺).
Bisturí.
Bloque de metacrilato con pocillos.
Bomba de vacío.
Campana extractora de gases.
Congelador (-20 °C).
Cubeta de electroforesis.
Estufa.
Éter etílico.
Fenacina metasulfato (PMS).
Flexo.
Frigorífico.
Fuente de alimentación para electroforesis.
Guantes de cuero.
Hilo de nylon (sedal).
Isopropanol (2-propanol).
Kitasatos.
Mechero Bunsen.
Metanol.
Micropipetas.
Papel absorbente higiénico.
Papel de aluminio.
Papel de filtro Whatman nº 1.
Papel indicador de pH.
pH-metro.
Pinzas.
Plástico fino (tipo "Saran Wrap").
Puntas de micropipeta.
Reglas-guías.
Sal sódica del ácido etilén diamino tetra-acético (Na₂-EDTA).
Tela o tejido esponjoso.
Termómetro.
Tijeras.
Tris base.
Tris-HCl.
Varilla de vidrio con extremo romo.
Vaso de precipitados.

3. PROTOCOLO A REALIZAR

Básicamente consiste en obtener moscas de la fruta, homogeneizar los individuos, separar las proteínas del extracto crudo resultante mediante electroforesis y teñir la proteína de interés mediante una reacción enzimática.

El mantenimiento de *Drosophila melanogaster* se llevó a cabo según Dorado y Barbancho (1984). La detección de los polimorfismos bioquímicos se realizó según Ayala et al (1972), con modificaciones (Dorado, 1983).

3.1. Mantenimiento y manejo de *Drosophila melanogaster*

Las moscas pueden capturarse con trampas en una bodega o en el campo y son mantenidas y manejadas de la siguiente forma:

1. Añadir 1 l de agua del grifo en una cacerola y calentar con la ayuda de un infernillo u otro tipo de calentador.

2. Añadir 100 g de azúcar de mesa (sacarosa), 100 g de levadura de panadería, 12 g de agar y 0,5 g de sal común (cloruro sódico). Los ingredientes se van añadiendo poco a poco, removiendo con una cuchara de madera hasta la homogeneización de la mezcla.

3. Hervir durante 10 minutos.

4. Cuando la temperatura baje a 50 °C, añadir 5 ml de ácido propiónico con una pipeta, mezclando bien con la cuchara de madera.

ATENCIÓN: el ácido propiónico es tóxico. Utilizarlo con precaución y en una campana extractora de gases.

5. En su caso (opcional), añadir al medio etanol absoluto, hasta una concentración del 11% (v/v) con la ayuda de una probeta y pipeta. Este tipo de medio es útil para seleccionar y mantener moscas resistentes al etanol (que pueden presentar una mayor actividad de enzima ADH).

6. Repartir en tubos de ensayo, botellines y botellas con la ayuda de un vaso de aluminio o de una probeta.

7. Tapar los tubos de ensayo, botellines y botellas con algodón en rama.

8. Dejar enfriar hasta temperatura ambiente y guardar en armario frigorífico (4 °C) hasta su uso.

9. Introducir los recipientes con medio nutritivo en una estufa a 25 °C. Una vez alcancen dicha temperatura, transferir a ellos las moscas para su reproducción y crecimiento.

Nota: la manipulación de las moscas puede realizarse usando un flexo y un aparato de captura por succión. En caso necesario, las moscas pueden dormirse mediante éter etílico o –mejor– mediante anhídrido carbónico (CO₂).

ATENCIÓN: el éter etílico es tóxico y puede provocar adicción. Utilizarlo con precaución y en una campana extractora de gases.

ATENCIÓN: el CO₂ puede causar asfixia. Utilizarlo con precaución y en una campana extractora de gases.

3.2. Preparación del gel de almidón y homogenado proteico

El amortiguador (del inglés, “buffer”) de la electroforesis y el amortiguador del gel, el gel de almidón y el homogenado proteico crudo se obtienen de la siguiente forma:

1. Preparar una solución que contenga Tris 87 mM, ácido bórico 8,7 mM, Na₂-EDTA 1 mM y β-NAD⁺ 1 mM, ajustando el pH a 9,0. Esta solución será usada como amortiguador de la electroforesis y del gel.

ATENCIÓN: las soluciones con “Tris” envenenan los electrodos de los pH-metros normales. Para ajustar el pH de este tipo de soluciones, deben emplearse electrodos especiales o papel indicador.

2. Añadir 12,5 g de almidón a un kitasato que contenga 1 l del amortiguador previamente preparado, para fabricar el gel.

3. Calentar en un mechero Bunsen mientras se agita vigorosamente en círculo, con la ayuda de guantes de cuero, hasta conseguir la solubilización completa del almidón.

ATENCIÓN: jamás usar guantes de amianto y derivados, que están prohibidos por ser carcinógenos.

4. Seguir agitando hasta casi el punto de ebullición. Se apreciará que la solución se vuelve semitransparente.

5. Desgasificar la solución del gel con la ayuda de una bomba de vacío.

6. Cuando la temperatura descienda a 55 °C, verter el gel líquido desgasificado en la bandeja-molde correspondiente. De este modo pueden generarse geles de unos 340 ml (19,5 x 17,5 x 1 cm).

7. Cubrir la bandeja-molde que contiene el gel con plástico de tipo “Saran Wrap” y dejar que se enfríe durante toda la noche.

8. Aislar las moscas que vayan a utilizarse con la ayuda de un flexo y un aparato de captura por succión.

9. Dormir las moscas con éter etílico o anhídrido carbónico.

ATENCIÓN: el éter etílico es tóxico y puede provocar adicción. Utilizarlo con precaución y en una campana extractora de gases.

ATENCIÓN: el CO₂ puede causar asfixia. Utilizarlo con precaución y en una campana extractora de gases.

10. Homogeneizar las moscas de forma independiente en los pocillos de un bloque de metacrilato, con la ayuda de una varilla de vidrio con extremo romo y en presencia de 5 µl de amortiguador o agua destilada.

ATENCIÓN: para evitar la contaminación cruzada de las muestras, la punta de la varilla de vidrio debe sumergirse en un vaso con agua destilada y luego debe secarse con papel absorbente higiénico para cada muestra.

11. Añadir a cada pocillo un trozo de papel de filtro Whatman nº 1 previamente recortado con unas tijeras (1 x 0,4 cm, o del tamaño deseado). Cada papel absorberá el homogenado crudo de cada mosca.

12. Cortar el gel unos 5 cm del extremo con la ayuda de un bisturí. Separar sus dos partes unos 5 mm.

13. Adherir los trozos de papel impregnados del homogenado de las muestras a un lado del corte del gel, con la ayuda de unas pinzas.

ATENCIÓN: para evitar la contaminación cruzada de las muestras, la punta de las pinzas debe sumergirse en un vaso con agua destilada y luego debe secarse con papel absorbente higiénico para cada muestra.

14. Unir las dos piezas del gel, una vez estén colocadas todas las muestras.

3.3. Electroforesis, tinción y revelado

1. Añadir el amortiguador de electroforesis a las dos cubetas en un sistema de electroforesis horizontal situado dentro de un armario frigorífico (4 °C).

2. Colocar la bandeja que contiene el gel y las muestras entre las cubetas.

3. Conectar el gel con el electrolito de las cubetas mediante sendos puentes de papel Whatman nº 1, o –mejor– mediante una tela o tejido esponjoso apropiado como el que se usa como absorbente para limpieza o en cocina.

Nota: la ventaja de los puentes de tejido respecto a los de papel es que son reutilizables, y por tanto más baratos y menos contaminantes.

4. Someter el gel con las muestras a electroforesis (30 mA y 25 V/cm durante 6 h), lo cual hará que el frente llegue a la mitad del gel.

5. Apagar la corriente eléctrica, desmontar el sistema y cortar los extremos no útiles del gel (donde no hay muestra) con un bisturí.

6. Cortar el gel horizontalmente en dos o más lonchas con la ayuda de un hilo de nylon (como el sedal de pescar) y unas reglas-guías cuyo grosor será el apropiado para generar lonchas de gel con un grosor dado.

7. Colocar las lonchas en la bandeja-recipientes donde se vaya a realizar la tinción y revelado posterior.

8. Preparar la solución de reacción, disolviendo los siguientes reactivos en 100 ml de amortiguador Tris-HCl 50 mM (pH 8,6): 4,5 ml de isopropanol, 25 mg de beta-nicotín adenín dinucleótido oxidado (β -NAD⁺) y 20 mg de azul de nitrotetrazolio (NBT).

ATENCIÓN: las soluciones con “Tris” envenenan los electrodos de los pH-metros normales. Para ajustar el pH de este tipo de soluciones, deben emplearse electrodos especiales o papel indicador.

ATENCIÓN: el isopropanol es tóxico. Utilizarlo con precaución y en una campana extractora de gases.

ATENCIÓN: el NBT es tóxico. Utilizarlo con precaución.

9. Añadir la solución de reacción a la bandeja-recipiente que contiene las lonchas de gel, e incubar a temperatura ambiente durante 90 minutos.

10. Añadir 5 mg de fenacina metasulfato (PMS) en la oscuridad (manteniendo la reacción en la oscuridad, tapando la bandeja con papel de aluminio).

ATENCIÓN: el PMS es tóxico. Utilizarlo con precaución.

11. Preparar la solución de fijación: 45 partes de metanol y 55 partes de una solución de ácido acético (ácido acético glacial diluido 1:5 en agua destilada).

ATENCIÓN: el metanol es tóxico. Utilizarlo con precaución y en una campana extractora de gases.

ATENCIÓN: el ácido acético glacial es tóxico. Utilizarlo con precaución y en una campana extractora de gases.

12. Vigilar el gel hasta que aparezcan las bandas con la intensidad y fondo deseados. Dependiendo de la temperatura ambiente, ello sucederá al cabo de unos minutos o unas horas. Para acelerar el proceso puede realizarse la incubación en una estufa a 37 °C.

13. Parar la reacción lavando el gel en agua destilada y añadiendo luego la solución de fijación previamente preparada.

14. En su caso (opcional), fotografiar el gel.

15. En su caso (opcional), envolver y sellar el gel en plástico fino de tipo “Saran Wrap”, transcurridas 8 horas.

16. El gel sellado puede almacenarse a temperatura ambiente.

ATENCIÓN: las bandas de los geles teñidos con NBT comienzan a decolorarse y desaparecer después de unas pocas semanas. Por ello, deben fotografiarse antes si se desea tener un registro gráfico más duradero.

4. RESULTADOS ESPERADOS

Los resultados esperados y obtenidos en este caso se muestran en la Fig. 1. Se aprecian las diferentes bandas, correspondientes a las isoenzimas ADH en moscas de genotipo $Adh^S Adh^S$ (SS) y $Adh^F Adh^F$ (FF).

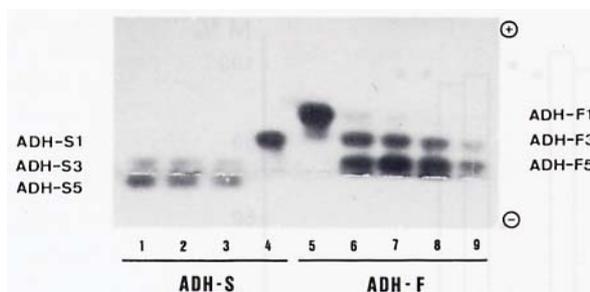


Figura 1. Patrón electroforético de las isoenzimas ADH en *Drosophila melanogaster*.

Se muestran las bandas correspondientes a las isoenzimas ADH-S (izquierda) y ADH-F (derecha) tras segregación en gel de almidón (Garrido et al, 1988).

La migración diferencial de las bandas depende no sólo del genotipo de las moscas, sino también del tratamiento al que fueron sometidas (Garrido et al, 1988). Cada enzima presenta tres formas, existiendo un solapamiento entre las formas S1 y S3 con las formas F3 y F5, respectivamente. Las formas S5 y F1 son exclusivas de las isoenzimas S y F, respectivamente.

5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

El almidón ha sido una de las matrices más usadas en el estudio de los polimorfismos proteicos/enzimáticos. Estos geles presentan la ventaja de una fácil preparación y una resolución suficiente en muchos casos. Además el almidón es barato y no presenta ningún riesgo de toxicidad. Para conseguir mayores resoluciones, se pueden emplear geles de poliacrilamida, si bien se trata de un producto clasificado como neurocarcinógeno.

Dependiendo del pH del tampón empleado en la preparación del gel y como electrolito, los péptidos podrán estar más o menos ionizados y con carga neta positiva o negativa. De este modo, segregarán hacia el cátodo o ánodo, respectivamente. O bien permanecerán en el lugar de aplicación de la muestra (carga neta cero o punto isoeléctrico).

Aunque el poder de resolución de los polimorfismos proteicos/enzimáticos no es muy alto, se trata de una técnica muy cómoda y poco costosa, de modo que todavía sigue empleándose en algunos laboratorios. Entre sus características cabe destacar:

- Requiere conocimiento previo de la proteína/enzima a estudiar.
- Requiere que dicha proteína/enzima reaccione con un sustrato, generando un producto coloreado que pueda ser identificado.
- Es un “fingerprinting” peptídico.
- Tiene requerimientos relativamente bajos de mano de obra y costo.
- Puede mostrar genética de segregación codominante (nivel proteico).

En la Fig. 1 se muestra un ejemplo del polimorfismo proteico SS/FF en *Drosophila melanogaster*. La razón de que cada isoenzima (S o F) presente tres bandas diferentes se debe a que se trata de una proteína dimérica. De forma que cada isoenzima puede encontrarse ionizada de tres formas diferentes: 1, 3 y 5 (Garrido et al, 1988). La interconversión de las isozimas es debida a la unión no covalente de una (ADH-3) o dos (ADH-1) moléculas de un aducto NAD-carbonilo a la enzima nativa (ADH-5). Este efecto es particularmente relevante en las moscas heterocigotas (FS), que pueden mostrar las bandas típicas de las isoenzimas S y de las F (no mostrado).

Por otro lado, la Fig. 1 muestra también el efecto de la exposición a distintos compuestos químicos (Garrido et al, 1988). Se trata por tanto de una técnica simple y barata para estudiar los cambios de las isoenzimas debidos al genotipo y al ambiente.

6. BIBLIOGRAFÍA COMENTADA

- Allison AC (1954) Protection afforded by sickle cell trait against subtertian malarial infection. *Brit Med J* 1: 290-294. Primera descripción de un polimorfismo proteico.
- Ayala FJ, Powell JR, Tracey ML, Mourão CA, Pérez-Salas S (1972) Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics* 70:113-139. Trabajo clásico de descripción e identificación electroforética de los polimorfismos proteicos.
- Dorado (1983) "Modificación de la Eficacia Biológica del Locus *Adh* en *Drosophila melanogaster*, en Respuesta a una Selección para la Tolerancia al Etanol". Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba. Estudio de los polimorfismos genéticos/proteicos en la mosca del vinagre.
- Dorado G, Barbancho M (1984) Differential responses in *Drosophila melanogaster* to environmental ethanol: modification of fitness components at the *Adh* locus. *Heredity* 53: 309-320.
- Dorado G, Caballero JL, Muñoz Blanco J (2001) "Fingerprinting" mediante marcadores moleculares en biotecnología: descripción, aplicaciones y perspectivas. En Caballero JL, Valpuesta V, Muñoz Blanco J (eds): "Introducción a la Biotecnología Vegetal: Métodos y Aplicaciones". Capítulo 7. Colección Mayor. pp 163-195. Publicaciones Obra Social y Cultural CajaSur (Córdoba). Revisión de los diferentes tipos de marcadores moleculares para identificar entidades biológicas, seres vivos o sus partes.
- Garrido JJ, Dorado G, Barbancho M (1988) Participation of *Drosophila melanogaster* alcohol dehydrogenase (ADH) in the detoxification of 1-pentene-3-ol and 1-pentene-3-one. *Heredity* 61: 85-91. Implicaciones de los polimorfismos proteicos en el metabolismo de alcoholes y cetonas.
- Harris H (1966) Enzyme polymorphisms in man. *Proc Roy Soc Ser B* 164: 298-310. Confirmación de polimorfismos proteicos en poblaciones humanas.
- Hubby JL, Lewontin RC (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 546-595. Primera descripción de polimorfismos proteicos en poblaciones naturales.
- Lewontin RC, Hubby JL (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of

heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics 54: 595-560. Primera descripción de polimorfismos proteicos en poblaciones naturales.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto PAFPU 'FORMAPROFE' ('UCO-N-031') de Formación del Profesorado Universitario, Junta de Andalucía.

ANEXO 1: MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

En este apartado se indica la composición de los medios y soluciones empleados, así como el tipo de material biológico usado.

Medio nutritivo para *Drosophila melanogaster*

La Tabla 1 muestra la composición del medio nutritivo empleado para el mantenimiento y crecimiento de la mosca del vinagre. Se indica también la opción para preparar medios con etanol, a fin de seleccionar moscas resistentes al etanol (que pueden presentar una mayor actividad de enzima ADH):

	100 ml (g)	1 litro (g)
Sacarosa	10	100
Levadura de panadería	10	100
Agar	1,2	12
NaCl	0,05	0,5
Agua destilada	Hasta 100 ml	Hasta 1 litro
Mezclar bien, hervir durante 10 min y dejar enfriar hasta 50 °C		
Ácido propiónico	0,5 ml	5 ml
Etanol absoluto (opcional) ^a	% apropiado	% apropiado
Repartir, tapar, dejar enfriar y guardar a 4 °C		

^aEn caso de preparar medio con etanol, debe añadirse el porcentaje apropiado mediante el uso de probetas y pipetas (p.ej., 11%).

ATENCIÓN: el ácido propiónico es tóxico. Utilizarlo con precaución y en una campana extractora de gases.

Solución amortiguadora (gel y electrolito)

La Tabla 2 muestra la solución amortiguadora empleada para fabricar el gel de almidón y para realizar la electroforesis (electrolito):

	100 ml (g)	1 litro (g)
"Tris base" (PM: 121,14)	1'054 [87 mM]	10'539 [87 mM]
Ácido bórico (PM: 61,83)	0'054 [8'7 mM]	0'537 [8'7 mM]
Na ₂ -EDTA (PM: 336,21)	0'034 [1 mM]	0'336 [1 mM]
β-NAD ⁺ (PM: 663,44)	0'066 [1 mM]	0'663 [1 mM]
Agua destilada	Hasta 100 ml	Hasta 1 litro
Disolver y ajustar pH a 9'0		

ATENCIÓN: las soluciones con “Tris” envenenan los electrodos de los pH-metros normales. Para ajustar el pH de este tipo de soluciones, deben emplearse electrodos especiales o papel indicador.

Gel de almidón

La Tabla 3 muestra la preparación de un gel de almidón:

Tabla 3. Gel de almidón.		
	100 ml (g)	1 litro (g)
Almidón	1,2	12,5
Amortiguador (pH 9,0)	Hasta 100 ml	Hasta 1 litro
Solubilizar calentando y agitando hasta punto de ebullición		
Desgasificar		
Enfriar hasta 55 °C y verter sobre molde de gel		

ATENCIÓN: jamás usar guantes de amianto y derivados, que están prohibidos por ser carcinógenos.

Solución de Tris-HCl (50 mM, pH 8,6)

La Tabla 2 muestra la preparación de una solución de Tris-HCl:

Tabla 2. Solución de Tris-HCl (50 mM, pH 8,6).		
	100 ml (g)	1 litro (g)
Tris-HCl (PM: 157,60)	0,788 [50 mM]	7,88 [50 mM]
Agua destilada	Hasta 100 ml	Hasta 1 litro
Ajustar el pH a 8,6		

ATENCIÓN: las soluciones con “Tris” envenenan los electrodos de los pH-metros normales. Para ajustar el pH de este tipo de soluciones, deben emplearse electrodos especiales o papel indicador.

Solución de ácido acético glacial (1:5)

La Tabla 5 muestra la preparación de una solución de ácido acético glacial al 16,7% (1:5):

Tabla 5. Solución de ácido acético glacial (1:5).		
	6 ml (ml)	60 ml (ml)
Ácido acético glacial	1	10
Agua destilada	5	50

ATENCIÓN: el ácido acético glacial es tóxico. Utilizarlo con precaución y en una campana extractora de gases.

Solución de fijación

La Tabla 6 muestra la composición de la solución de fijación:

Tabla 6. Solución de fijación.		
	100 ml (ml)	1 litro (ml)
Metanol	45	450
Ácido acético glacial (1:5)	55	550

ATENCIÓN: el metanol es tóxico. Utilizarlo con precaución y en una campana extractora de gases.

Solución de tinción, revelado y fijación

La Tabla 7 muestra la solución de tinción, revelado y fijación:

Tabla 7. Solución de tinción, revelado y fijación.		
	100 ml (mg)	1 litro (mg)
Isopropanol	4,5 ml	45 ml
β -NAD ⁺	25	250
NBT	20	200
Solución Tris-HCl (50 mM, pH 8,6)	Hasta 100 ml	Hasta 1 litro
Añadir la solución de reacción hasta cubrir la loncha de gel		
Incubar a temperatura ambiente durante 90 min		
Enfriar hasta 55 °C y verter sobre molde de gel		
PMS (añadir en oscuridad)	5	50
Incubar en oscuridad hasta que aparezcan las bandas		
Parar la reacción lavando el gel en agua destilada		
Añadir solución de fijación		

ATENCIÓN: el isopropanol es tóxico. Utilizarlo con precaución y en una campana extractora de gases.

ATENCIÓN: el NBT es tóxico. Utilizarlo con precaución.

ATENCIÓN: el PMS es tóxico. Utilizarlo con precaución.

Material biológico (*Drosophila melanogaster*)

Las moscas de la fruta silvestres (poblaciones naturales) pueden obtenerse en una bodega con trampas succionadoras. También pueden capturarse en el campo con trampas de comida (les encantan el plátano, los higos chumbos, y en general las frutas maduras y fermentadas).