



la aventura
de aprender

CÓMO HACER barcoding genético

MINISTERIO DE EDUCACIÓN, FORMACIÓN PROFESIONAL Y DEPORTES

Dirección General de Evaluación y Cooperación Territorial
Instituto Nacional de Tecnologías Educativas y de Formación del Profesorado (INTEF)
Recursos Educativos Digitales



La **Aventura de Aprender** es un espacio de encuentro e intercambio en torno a los aprendizajes para descubrir **qué prácticas, atmósferas, espacios y agentes hacen funcionar las comunidades**; sus porqués y sus cómo o en otras palabras, sus anhelos y protocolos.

Este proyecto parte de unos presupuestos mínimos y fáciles de formular. El primero tiene que ver con la convicción de que **el conocimiento es una empresa colaborativa, colectiva, social y abierta**. El segundo abraza la idea de que **hay mucho conocimiento que no surge intramuros de la academia** o de cualquiera de las instituciones canónicas especializadas en su producción y difusión. Y por último, el tercero milita a favor de que **el conocimiento es una actividad más de hacer que de pensar** y menos argumentativa que experimental.

Estas guías didácticas tienen por objetivo **favorecer la puesta en marcha de proyectos colaborativos que conecten la actividad de las aulas con lo que ocurre fuera del recinto escolar**.

Sin aventura no hay aprendizaje, ya que las tareas de aprender y producir son cada vez más inseparables de las prácticas asociadas al compartir, colaborar y cooperar.

<http://laaventuradeaprender.intef.es>

Antonio Lafuente

para INTEF

<https://intef.es>

NIPO (formato html) 164-24-001-7

NIPO (formato PDF) 164-24-002-2

NIPO (formato web) 164-24-010-3

DOI (formato web) 10.4438/LADA_164240103

DOI (formato PDF) 10.4438/LADA027_2024

Por José María Espinosa Bernal para INTEF

Obra publicada con licencia de Creative Commons Reconocimiento-Compartir Igual 4.0

Licencia Internacional.



<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Derechos de uso

El texto de esta guía ha sido creado expresamente para este artículo.

Para cualquier asunto relacionado con esta publicación contactar con:
Instituto Nacional de Tecnologías Educativas y de Formación del Profesorado
C/Torrelaguna, 58. 28027 Madrid.
Tfno.: 91-377 83 00. Fax: 91-368 07 09
Correo electrónico: lada@educacion.gob.es

ÍNDICE

Introducción	4
Materiales	8
Pasos	10
Consejos	27
Recursos	28

QUIÉN HACE ESTA GUÍA



Licenciado en Bioquímica y Química por la Universidad de Murcia. Profesor de Secundaria de la Especialidad Análisis y Química Industrial en I.E.S. Juan Carlos I, donde imparte desde hace años los módulos Química Aplicada y Ensayos Biotecnológicos. Aunque al trabajar en Formación Profesional dispone de equipamiento para realizar procedimientos biotecnológicos estándar, una parte de su tiempo la dedica a desarrollar métodos biotecnológicos de bajo coste, basados en las técnicas *DIYBio* y el *biohacking*. En el año 2017 coordinó el Proyecto de Innovación “Descubriendo nuevos antibióticos”. Un proyecto abierto basado en la democratización de la Ciencia y las técnicas *DIY (Do it yourself)* que obtuvo el 1er Premio a los Proyectos de Innovación Educativa de la Región de Murcia. Además, en el año 2021 coordinó el Proyecto “La fina hebra que nos une. Estudio comparativo del genoma de los huesos de la maqbara de San Esteban y del alumnado del I.E.S. Juan Carlos I” que obtuvo el 1er Premio a los Proyectos de Innovación Educativa en la modalidad A para F.P. Por último en el año 2022 recibí la Mención Especial modalidad B al proyecto “Amplificación Isotérmica mediada por *loop* (LAMP) de ácidos nucleicos. Un nuevo reto en las técnicas analíticas biotecnológicas” Esta guía está basada en el Proyecto de Innovación “Identificación biológica mediante el código de barras de ADN” financiado por el Centro de Profesores y Recursos de la Consejería de Educación de la Región de Murcia.

Twitter: [@BiotecnologiaF](https://twitter.com/BiotecnologiaF)

Web: <https://biotecnologiafacil.com/>

INTRO DUCCIÓN

Todos somos capaces, en cierta medida, de reconocer algunos seres vivos de nuestro alrededor. Por ejemplo, la mayoría podríamos reconocer sin problemas que el ave que estamos viendo en la imagen es una gaviota. Lo que sería más complicado, para la mayoría, es adivinar a qué especie en particular pertenece. Esta falta de precisión puede ser más evidente en plantas, insectos y hongos.

Hasta hace unos años, la taxonomía basada en características morfológicas era la forma habitual de clasificar e identificar una especie. A medida que se iba acumulando información genética de las diferentes especies, se generó un debate acerca de la utilidad de las reglas de la taxonomía tal como se estaban empleando. La crisis de la biodiversidad que estamos sufriendo puso también el acento en recopilar, en la medida de lo posible, el material genético disponible en todos los seres vivos.

En este contexto Paul Hebert de la Universidad de Guelph publicó un artículo titulado *Identificaciones biológicas a través de código de barras de ADN*. En él se propuso un nuevo sistema de identificación y descubrimiento de especies utilizando la secuenciación de ADN. Tenemos que recordar que el ADN está constituido por una secuencia de moléculas denominadas nucleótidos, los cuales se distinguen unos de otros por su base nitrogenada (que puede ser adenina, timina, citosina o guanina), y por ello la secuencia del ADN se especifica nombrando sólo la secuencia de sus bases.

La disposición secuencial de estas cuatro bases a lo largo de la cadena es la que codifica la informa-



Figura 1.1. La imagen muestra una gaviota pero ¿a qué especie pertenece?

ción genética. Una secuencia de ADN será de la forma AATCGTATTACTAGGA, por ejemplo.

La idea no consistía en secuenciar todo el ADN de una especie (algo complicado y costoso), sino que bastaba con encontrar un gen que estuviera en todos los seres vivos como modelo de referencia. Se escogió el gen de la enzima citocromo-oxidasa, CO1, que al ser uno de los responsables de la cadena respiratoria, era ubicuo en todos ellos.

Aunque podemos decir que, efectivamente, el gen es el mismo en todos los seres vivos, es lo suficientemente grande como para tener pequeñas variaciones en el contenido de sus nucleótidos.

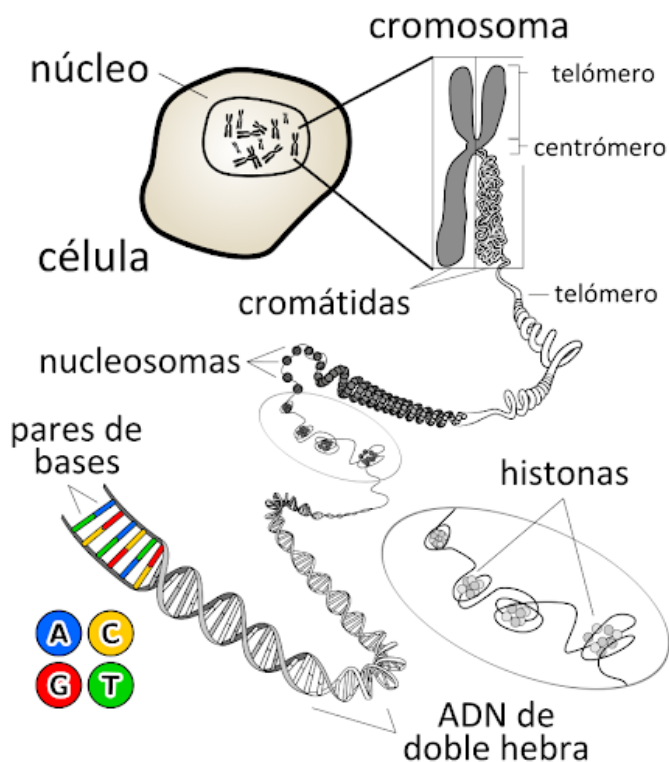


Figura 1.2. El ADN.

Por tanto, si amplificamos el gen CO1 de una especie de gaviota y lo secuenciamos, veremos que esa secuencia difiere ligeramente de la secuencia obtenida de otra especie diferente.

En conclusión, si podemos recopilar los códigos de barras de todas las especies del planeta y registrarlas en una base de datos, posteriormente podríamos identificar a cualquier ser vivo extrayendo su ADN y comparando este con la información recogida en esa base de datos.

Vamos a ver esto de una forma muy práctica: imaginemos que conseguimos una pluma de la gaviota que hemos visto, extraemos su ADN y lo enviamos a secuenciar. Obtendremos este conjunto de nucleótidos:

```
TTAATCTTTGGCGCATGAGCTGGCATAGTAGG-
TACTGCCCTCAGCCTGCTTATCCGTGCAGAACTT-
GGCCAACCCGGAACCCTCCTAGGAGACGACCAA-
ATCTATAACGTAATTGTCACCGCCCATGCCTTCGT-
GATAATCTTCTTCATAGTGATACCAATCATGATCG-
GTGGGTTTGGAAACTGACTAGTCCCACCTATAAT-
CGGTGCCCCGTGATATAGCATTTCCACGCATAAAA-
CAACATAAGCTTCTGACTATTACCCCCATCATTCC-
TACTCCTCCTAGCCTCTTCCACAGTAGAAGCTG-
GAGCCGGCACAGGATGAACAGTATACCCCCCTC-
TAGCTGGCAATCTAGCCCATGCTGGAGCCTCAG-
TAGACCTAGCAATCTTCTCTCTTCACTTAGCAGGT-
GTGTCTTCCATTCTGGGTGCTATCAACTTTATCAC-
TACAGCCATCAACATAAAACCCCTGCCCTCTCA-
CAATATCAAACCCCACTATTTCGTATGATCCGTACT-
CATCACTGCCGTCTACTACTACTTTCACTCCCAGT-
GCTTGCCGCAGGCATTACTATGCTACTTACAGACC-
GAAACCTAAACACAACATTCTTCGATCCCGCCGGA-
GGCGGTGACCCTGTACTGTACCAACACCTCTTC
```

Copiamos esta secuencia y nos vamos a esta [web](#).

En ella encontramos toda la información genética conocida. Basta con ir a "Nucleotide BLAST" pegar la secuencia en el recuadro que dice "Enter Query Sequence" y pulsar en "BLAST". Si a lo largo del tiempo este enlace falla, basta con escribir en Google "ncbi blast".

Basic Local Alignment Search Tool

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance. [Learn more](#)

NEWS

BLAST+ 2.13.0 is here!

Starting with this release, we are including the blastn_vdb and tblastn_vdb executables in the BLAST+ distribution.

Thu, 17 March 2022

[More BLAST news...](#)

Web BLAST

Nucleotide BLAST
nucleotide ► nucleotide

blastx
translated nucleotide ► protein

tblastn
protein ► translated nucleotide

Protein BLAST
protein ► protein

Figura 1.3. Página del NCBI para comparar secuencias.

El resultado que nos ofrece, después de unos segundos, es este:

☒	Larus argentatus voucher BISE-Aves427 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitoc...	Larus argentatus	1197	1197	100%
☒	Larus dominicanus voucher SP359 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Larus dominica...	1192	1192	100%

Figura 1.4. Resultado de utilizar BLAST

Nos dice que la especie a la que corresponde nuestra gaviota es *Larus argentatus*. Como vemos, la hemos identificado plenamente sin saber nada de taxonomía.

Para el caso de las plantas, no se utiliza el gen CO1. Se pueden utilizar dos genes: el gen *matK* de la maturasa K y el gen *rbcl*, de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCo), una enzima fundamental que se encuentra en todos los cloroplastos de las plantas. Esta última será la que usemos en esta guía.

Como consecuencia de ese artículo, en el año 2008 se creó el [International Barcode of Life \(iBOL\)](#) en Canadá, con el ilusionante objetivo de crear una biblioteca de códigos de barras para inventariar y evaluar toda la biodiversidad.

Ante el monumental reto de codificar todos los códigos de barras de la vida, desde el primer momento de su fundación, el iBOL se creó como un

proyecto, no solo abierto a todas las naciones y a numerosos grupos de investigación, sino también a centros educativos y organizaciones no académicas que desearán participar en este proceso.

Para albergar toda la información generada, se fundó [The Barcode of Life Data System \(BOLD\)](#), una base de datos que permite consultar esta información e incluir nuestros resultados una vez que nos damos de alta. Cualquiera puede, por tanto, subir una secuencia a esta plataforma y dejarla disponible para toda la comunidad científica. Además, puesto que el número de seres vivos de los que conocemos su código de barras es todavía escaso, la probabilidad de obtener un código de barras no descrito previamente en BOLD es bastante elevada.

Como podemos ver en la imagen de la portada de la web, la base de datos tiene una sección Educativa, que es con la que vamos a trabajar.



Figura 1.5..Portada de la web de BOLD System.

Para obtener y publicar un código de barras de ADN, es necesario el siguiente proceso, esquematizado en la Figura 1.6.

- Extraer el ADN de una muestra, ya sea de una planta, animal u hongo.
- Amplificar, mediante un equipo de PCR, el fragmento correspondiente a su código de barras.
- Comprobar, mediante una electroforesis, que se ha producido dicha amplificación y que corresponde con la banda esperada.

- Enviar a secuenciar esa sección, con lo que obtendremos un conjunto de nucleótidos en forma de cromatograma que constituyen la secuencia de código de barras del ADN.
- Revisar la información contenida en dicho cromatograma y corregir errores.
- Subir la secuencia a la plataforma BOLD, junto con una descripción completa del espécimen.

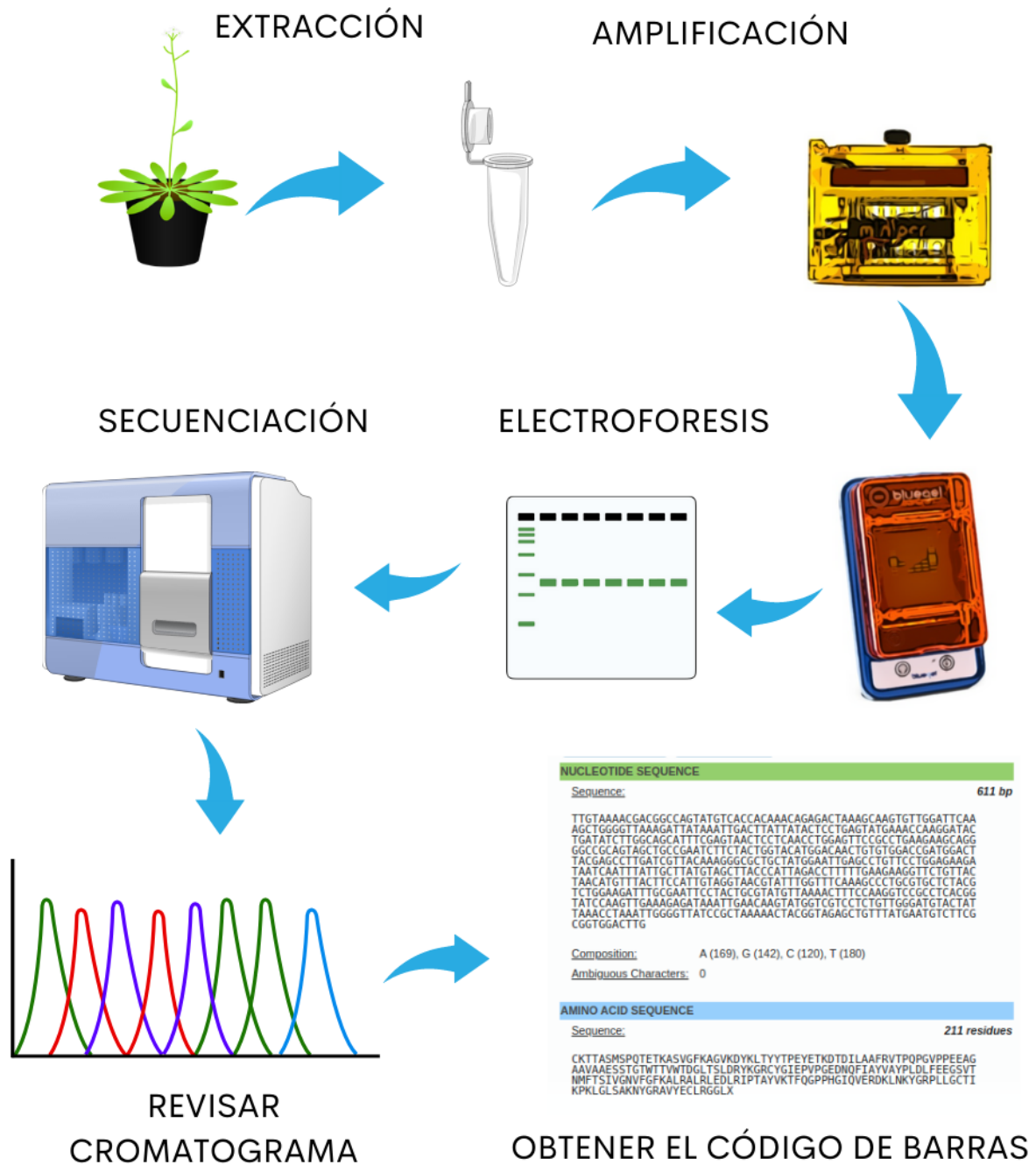


Figura 1.6 Resumen del protocolo de obtención de un código de barras de ADN

MATERIALES

MATERIALES NECESARIOS

Para llevar a cabo un proyecto de *barcoding* vamos a necesitar cierto equipamiento, reactivos y material fungible variado. Los repasamos aquí de

✓ Equipamiento

- **Un bloque termostático:** para calentar a una temperatura constante podemos adquirir un roner de cocina (que además podemos utilizar para cocinar).

forma genérica, pero en Recursos tenemos enlaces a todos ellos.



Figura 2.1. Roner de cocina en un baño de agua

- **Un termociclador/bloque termostático:** necesario para amplificar el ADN. Hay

varias opciones muy asequibles, como la miniPCR™ o la pocketPCR.

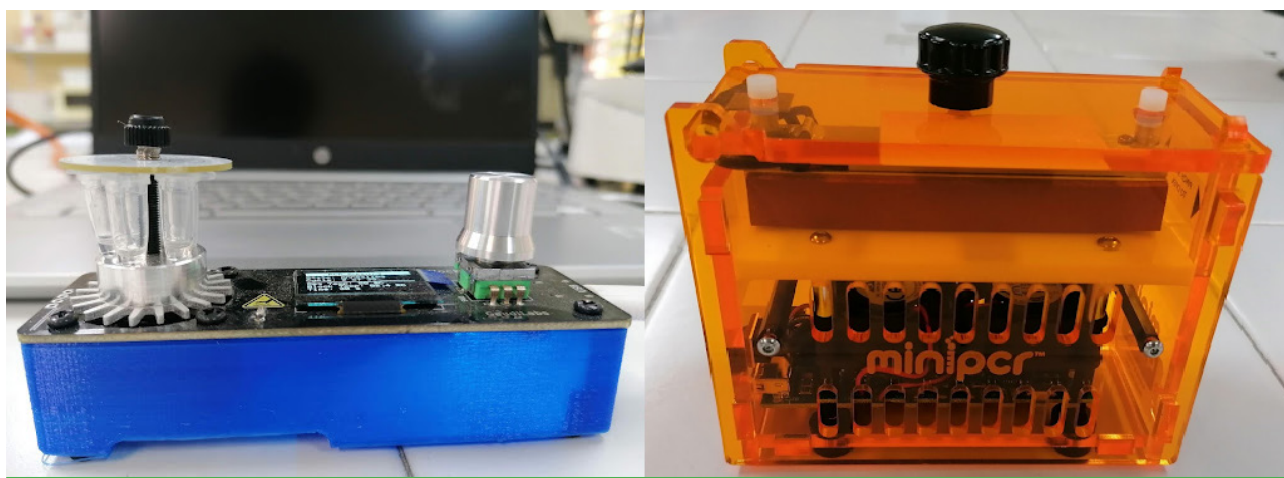


Figura 2.2. A la izquierda pocketPCR y a la derecha miniPCR™.

- **Una centrífuga:** para realizar algunas preparaciones es necesario centrifugar. Podemos construir nosotros mismos una, la Dremel Fuge. Solo necesitaremos un equipo multiherramientas e imprimir el soporte de los tubos en 3D.
- **Un equipo de electroforesis/transiluminador:** estos dos equipos suelen ser caros, pero podemos adquirir el blueGel™ de la empresa miniPCR bio™ que es, a la vez, un equipo de electroforesis y un transiluminador.



Figura 2.3. A la izquierda Dremel Fuge. A la derecha BlueGel™.

- **Micropipetas de volumen variable:** de 1000 µl, de 100 µl y de 10 µl.
- **pHmetro:** para ajustar el pH de las disoluciones. Podemos encontrar algunos muy asequibles por internet (10 euros).

✓ Reactivos

- **Para la extracción:**
 - Clorhidrato de guanidina, Tris(hidroximetil)aminometano (Tris), dióxido de silicio (Sílice) en polvo cloruro de sodio y EDTA disodio.
- **Para la amplificación de ADN:**
 - Una Master mix, como la que ofrece Thermo Scientific.
 - Cebadores específicos para gen *rbcL* de plantas. En nuestro caso son estos:

Oligo	Secuencia	Tamaño
<i>rbcLa-F</i>	5'-TGTAACGACGGCCAGTATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'	550 pb
<i>rbcLa-R</i>	5'-CAGGAAACAGCTATGACGTAAATCAAGTCCACCRGC-3'	

Tabla 1. Cebadores para el gen *rbcLa*.

- **Para la electroforesis:**
 - Agarosa para electroforesis.
 - Tampón TBE 10X.
 - Agente de tinción para el ADN. RedSafe™,
- SYBR Green o similar.
- Patrones de 100 a 1000/3000 pares de bases.

✓ Material de plástico

- untas de pipeta de 1000, 100 y 10 µl.
- Microtubos de 1500 µl y de 200 µl (microtubos de PCR).
- Micropistilos.
- Gradillas para microtubos.



PASOS

EXTRACCIÓN DE ADN

FUNDAMENTO

La extracción y purificación de ADN es la fase inicial de cualquier protocolo de una PCR. La buena noticia es que el ADN es una molécula relativamente fácil de separar del resto de la célula, tanto por su tamaño como por su naturaleza química. Los grupos fosfato que lo constituyen están cargados negativamente y son polares. Esto confiere al ADN una carga neta negativa y, además, lo hace altamente polar, características que son aprovechadas para su extracción. Lo malo es que, en el proceso de extracción, podemos arrastrar una serie de contaminantes que pueden impedir que tenga lugar la PCR.

Es esto, la presencia de contaminantes y no la cantidad de ADN, lo que determina, en la mayoría de los casos, que una PCR fracase o sea exitosa. Hay que tener en cuenta que la PCR es una técnica capaz de amplificar ADN en concentraciones muy bajas.

Para extraer ADN vamos a utilizar un protocolo *DIYBio* que funciona bastante bien: el de la suspensión de sílice. Si agregamos a una mezcla que contiene ADN un reactivo caotrópico, como la guanidina, este va a quedar pegado a las pequeñas partículas de sílice. Podremos, por tanto, separarlo del resto de los componentes, lavarlo y purificarlo. Una vez limpio, bastará con añadir una disolución de baja concentración en sales como el tampón T.E. o directamente agua destilada, para que el ADN se desprenda.

A continuación, veremos cómo preparar los reactivos. Se puede hacer directamente o preparando primero EDTA, Tris y NaCl concentrados (podemos ver cómo hacerlo en el apartado Recursos).

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

DISOLUCIÓN DE GUANIDINA-HCl 6 M, 100 ML (A TEMPERATURA AMBIENTE, 6 MESES)

- Disolver 57.32 g de guanidina (m.w. = 95.53) en 50 ml de agua desionizada.
- Añadir agua hasta un volumen de 100 ml.

SUSPENSIÓN DE SÍLICE, 50 ML (CONSERVAR A 4 °C)

- Disolver 25 g de dióxido de silicio en 35 ml de agua desionizada.
- Añadir agua hasta un volumen de 50 ml.
- Tampón de lavado, 500 ml (conservar a -20 °C indefinidamente)
- Agua destilada 234 ml
- 10 ml de Tris 1 M pH 7.4
- 5 ml de NaCl 5 M
- 1 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0
- 100% Ethanol, 250 ml

TAMPÓN TE (Tris/EDTA), 100 ML (TEMPERATURA AMBIENTE INDEFINIDAMENTE)

- 1 ml de Tris 1 M pH 8,0
- 200 µl de EDTA 0,5 M
- Mezclar bien y enrasar

PROCEDIMIENTO

1. Cortar unos 10 mg de tejido de la planta mediante unas tijeras o utilizando la parte posterior de una punta de 1000 µl para obtener un círculo de material vegetal. Dejar la muestra en un tubo de 1,5 ml.
2. Añadir 300 µl de disolución de lisis (guanidina-HCl 6 M).
3. Frotar el tejido contra la superficie del microtubo durante dos minutos con un micropestillo para disgregarlo.
4. Incubar el tubo en el bloque termostático a 65 °C durante 10 minutos.
5. Centrifugar durante 10 minutos a máxima velocidad.
6. Transferir 150 µl del sobrenadante a un tubo limpio, con cuidado de no tocar el precipitado. Descartar el tubo que contiene el precipitado.
7. Añadir 50 µl de suspensión de sílice (asegurarnos antes que la suspensión de resina es homogénea) y mezclar bien con agitador o invirtiendo.
8. Incubar durante 5 minutos en bloque termostático a 57 °C.
9. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante.
10. Añadir 500 µl de tampón de lavado frío y resuspender el precipitado utilizando la micropipeta.
11. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante.
12. Añadir otros 500 µl de tampón de lavado frío y resuspender el precipitado utilizando la micropipeta.
13. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante.
14. Centrifugar de nuevo 1 minuto a máxima velocidad para eliminar el resto de tampón de lavado con la micropipeta.
15. Añadir 50 µl de tampón T.E., mezclar bien e incubar durante 5 minutos en bloque termostático a 57 °C.
16. Centrifugar 30 segundos a máxima velocidad.
17. Transferir 40 µl del sobrenadante a otro tubo limpio y congelar a -20 °C hasta su uso. Como es un extracto crudo y contiene nucleasas no debe estar mucho tiempo a temperatura ambiente.

AMPLIFICACIÓN POR PCR

FUNDAMENTO

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, P.C.R (Polymerase Chain Reaction), se emplea para amplificar un fragmento muy concreto de ADN aunque este se encuentre en muy baja concentración. Se basa en utilizar de forma cíclica la replicación natural del ADN, acoplada a un proceso de separación previa de las hebras. En cada ciclo, el ADN de interés se va a duplicar utilizando una enzima denominada Taq Polimerasa, que es capaz de insertar nucleótidos en una hebra de ADN para obtener la cadena complementaria. Para que esa enzima pueda trabajar es necesario que previamente se unan a la cadena unos pequeños fragmentos complementarios denominados cebadores, oligonucleótidos (oligos) o primers. Puesto que son específicos para cada secuencia de ADN, sólo vamos a amplificar dicha secuencia.

De manera resumida, lo que ocurre en una PCR es lo siguiente:

- Primero se desnaturaliza durante un tiempo con calor, de manera que las hebras de ADN se separan. La temperatura a la que ocurre esto es la temperatura de desnaturalización, que suele ser de 95 °C. En este momento, lo que tenemos son las hebras de ADN monocatenario separadas.
- Luego se enfría para permitir, durante un tiempo, que se unan los cebadores. Esta temperatura suele estar por debajo de los 60 °C y se denomina temperatura de alineamiento.
- De nuevo subimos la temperatura, normalmente a 72 °C, y la mantenemos un tiempo. Es la temperatura de extensión, donde la polimerasa va a duplicar la cadena. Como es una enzima de un organismo termófilo, su temperatura óptima es muy elevada.

En la siguiente imagen se muestra un esquema del proceso.



Polymerase chain reaction - PCR

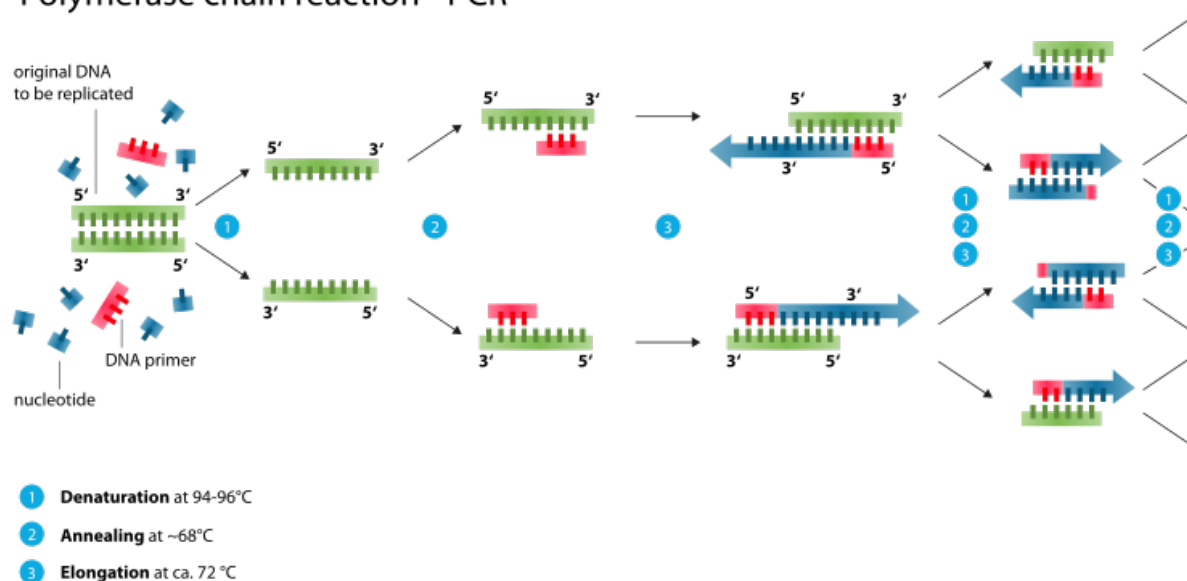


Figura 3.1. Esquema del proceso de amplificación por PCR.

Este conjunto de temperaturas y tiempos constituyen un ciclo, y este ciclo lo vamos a repetir un número determinado de veces, que suele estar entre 30 y 35. El equipo que utilizamos para una PCR es el termociclador, que es básicamente un

termobloque al que se le pueden programar ese conjunto de temperaturas. El que mostramos en la Figura 2.2. es un termociclador de la marca miniPCR bio™, que tiene un precio bastante asequible, pero también nos vale el equipo pocketPCR.

PROCEDIMIENTO

Partiendo del ADN extraído en el apartado anterior, vamos a amplificar el gen *rbcL* de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCo). Lo primero que tenemos que hacer es

programar nuestro equipo. Si estamos utilizando el equipo miniPCRTM, programarlo es tremendamente sencillo. Basta con conectarla a un ordenador y completar con los siguientes datos:

Ciclos	Temp (°C)	Tiempo	Proceso
1 x	94	1 min	Desnaturalización previa
30 x	94	15 seg	Desnaturalización
	54	15 seg	Alineamiento
	72	30 seg	Extensión
1 x	72	2 min	Polimerización final
1 x	4	Indefinido	

Tabla 2 Programa de temperaturas para la amplificación

Como podemos ver en la Figura 3.2., la interfaz de usuario es muy amigable.

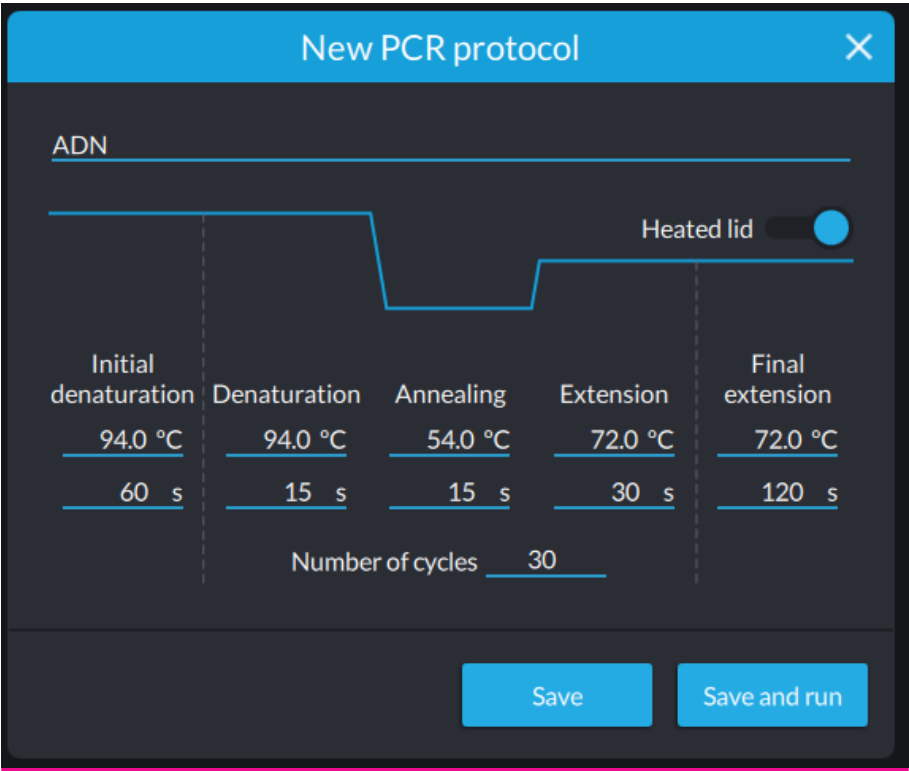


Figura 3.2. Programación de temperaturas en una miniPCR™.

Para amplificar ADN necesitamos:

- El ADN extraído. Como hemos comentado anteriormente, poner más cantidad de la recomendada, pensado que así tenemos más ADN, no nos va a llevar a un mejor resultado. Mejor menos que más.
- Una master mix que contenga la polimerasa, los oligonucleótidos y el tampón. Hay muchas que se pueden comprar *on-line*. Nosotros vamos a utilizar la que ofrece Thermo Scientific.
- Un par de oligos para gen *rbcl*.

Antes de nada, tenemos que preparar un recipiente con hielo. En él vamos a ir colocando todos los reactivos y posteriormente la mezcla de PCR

(si vamos a tardar un tiempo en introducirla en el termociclador).

Lo primero que tenemos que hacer es preparar una dilución adecuada de nuestros oligos. Si la concentración del oligo comercial es de 100 μM , lo normal es que para la mezcla de amplificación tenga que realizar una dilución previa a 10 μM . Bastará con preparar 100 μl .

Tomamos un tubo de PCR de 0,2 μl y vamos a ir agregando los componentes según las instrucciones. Para nuestro caso, el volumen final es 50 μl , por lo que tendremos que agregar la cantidad de agua hasta completar esos 50, en función de la cantidad ADN y oligos que pongamos.

Componente	Volumen μl
PCR Master mix	25
ADN molde	1-2
<i>rbcl</i> A-R	1-2
<i>rbcl</i> A-R	1-2
Agua	19-22

Tabla 3

La cantidad de ADN y oligos que hay que poner no es fija y depende de la calidad y cantidad de nuestro ADN. Como no podemos saberla, a menos que tengamos un equipo Nanodrop, nos tenemos que arriesgar con los volúmenes indicados. En cualquier caso, no es recomendable excederse. A más volumen de muestra, la PCR no sale mejor, ya que también tendrá más inhibidores de la PCR.

Puesto que las cantidades son pequeñas (1 μ l), es posible que cuando las agreguemos en el microtubo no tengamos claro si las hemos puesto realmente. Un truco para saber que, efectivamente, están en el microtubo, es dejar la gota pegada a la pared interna del tubo. De esa manera sabemos que hemos depositado esa pequeña gota.

Cuando vayamos a coger la master mix, es recomendable centrifugar ligeramente el microtubo y coger el volumen indicado del fondo. Para evitar que comience la polimerización a temperatura ambiente, añadimos la master mix al final.

Una vez tengamos todos los componentes de la mezcla dentro, mezclamos adecuadamente y damos un golpe breve de centrifuga, con lo que garantizamos que todos están juntos en el fondo del microtubo. Introducimos los microtubos en los huecos, cerramos y cargamos el programa en el equipo.

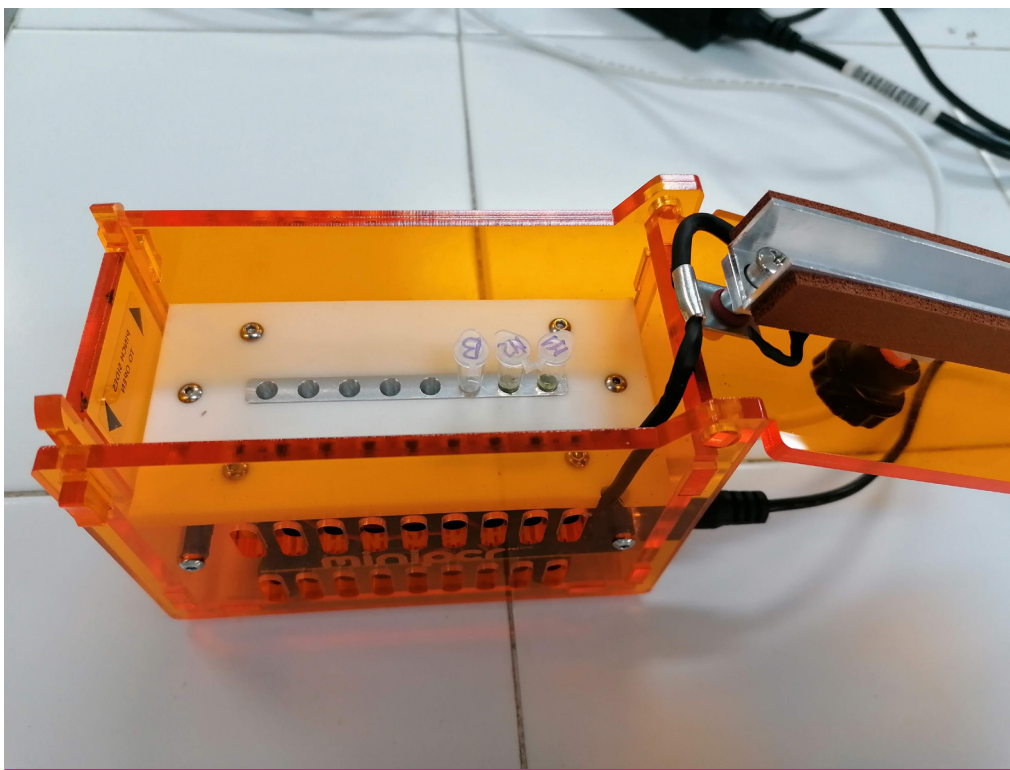


Figura 3.3. (miniPCR™ con los microtubos dentro)

Cuando termine el último ciclo, y si todo ha ido bien, tendremos nuestro fragmento de ADN am-

plificado. Conservamos ese microtubo para la electroforesis y la secuenciación.

ELECTROFORESIS

FUNDAMENTO

La electroforesis es una técnica de separación e identificación de ADN. Se basa en el movimiento o migración de las macromoléculas disueltas en un determinado medio (tampón de electroforesis) a través de un soporte reticulado como resultado de la acción de un campo eléctrico.

Para obtener ese soporte, primero tenemos que disolver una determinada cantidad de agarosa en un tampón. La cantidad de agarosa determina el grado de reticulación; a mayor cantidad de agarosa, más intrincada será esa reticulación. Cuando queremos separar fragmentos pequeños de ADN, como los que obtenemos en una PCR (de 300 a 600 pares de bases), utilizamos concentraciones de 1,5 a 2 %. Por otro lado, el tampón va a aportar la conductividad adecuada y nos servirá para controlar el pH y la temperatura.

Si calentamos una disolución de agarosa hasta la ebullición, una vez que esta solidifique, formará un gel consistente. Antes de que ocurra esto, debemos agregar un agente que revele donde está el ADN y así podamos visualizarlo posteriormente. Si, además, colocamos mientras aún está líquida una estructura en forma de peine, cuando solidifique se formarán unos pequeños pocillos. Es ahí donde tenemos que depositar el ADN.

Para ello, es necesario mezclarlo previamente con un tampón de carga. Este tampón tiñe la muestra y aumenta su densidad, lo que permite que el ADN quede en el fondo, de manera que es fácil realizar un seguimiento de la misma.



PROCEDIMIENTO

PREPARACIÓN DE LA AGAROSA AL 1,5 % (20 ML)

1. Pesar 0,3 g de agarosa.
2. En una probeta, medir 20 ml de tampón TBE 10X.
3. Agregar a un frasco ISO unos 15 ml de tampón TBE y calentar brevemente.
4. Agregar con cuidado y agitando los 0,3 g de agarosa al frasco ISO, con la precaución de no generar grumos.
5. Añadir el resto de tampón TBE y calentar en el microondas (nunca a la máxima temperatura). Es necesario ir sacando el frasco y agitarlo cada cierto tiempo.
6. Una vez disuelto (es transparente y no quedan fibras visibles), esperamos a que se enfríe.
7. Agregamos 3 µl de RedSafe™ y agitamos.

PREPARACIÓN DEL MOLDE DE ELECTROFORESIS

1. Pasamos la agarosa al molde para que gelifique. En dicho molde ya tiene que estar colocado el peine para las muestras.
2. Una vez gelifica, quitamos los peines, pasamos el molde a la cubeta y agregamos el tampón de electroforesis. El tampón debe cubrir el gel, pero no demasiado.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

1. Pasamos 10 µl del resultado de la PCR a un microtubo de 0,2 µl.
2. Agregamos 2 µl de tampón de carga, que suele estar incluido en el kit donde vienen los patrones.
3. Agitamos con vórtex y centrifugamos brevemente.

CONDICIONES PARA LA ELECTROFORESIS

Se introduce en cada pocillo 10 µl de muestra y tantos patrones como deseemos. Ajustamos en nuestro equipo de electroforesis las siguientes condiciones. Si estamos utilizando blueGel™, bas-

ta con encender el equipo, ya que las condiciones son fijas.

Voltaje	120 V
Tiempo	30 min

Tabla 4

Una vez terminada la electroforesis, comprobamos las bandas con un transiluminador. Tenemos que observar una banda que se encuentre entre 500 y 600 pb, similar a la que muestra la Figura 3.4.

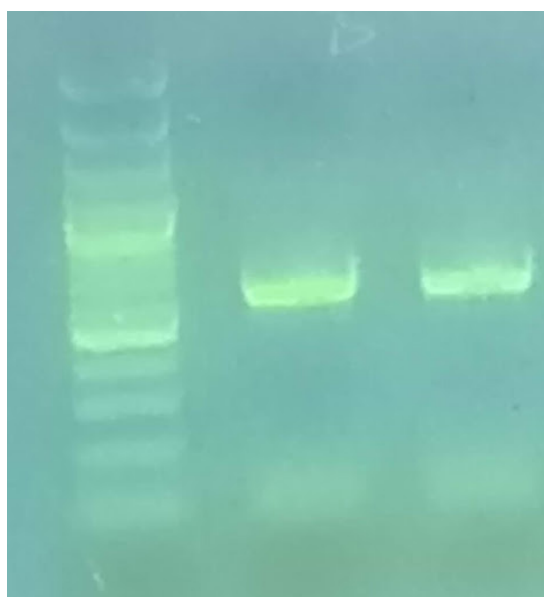


Figura 3.4. Resultado de una electroforesis.

ENVIAR A SECUENCIAR

Después de confirmar que hemos amplificado un fragmento de código de barras, tenemos que enviarlo a secuenciar. Este proceso es más sencillo de lo que puede parecer y está disponible para el público no investigador a un precio bastante asequible. Los servicios de apoyo a la investigación de la mayoría de las universidades ofrecen prestaciones de secuenciación a usuarios particulares externos, por precios que oscilan entre los 5 y los 8 euros. También hay numerosas empresas que ofrecen este servicio por precios similares.



Necesitamos secuenciar el fragmento *forward* y el *reverse* (más adelante explicaremos la razón), por lo que el gasto total será de entre 10 y 16 euros. Lo normal es que estos servicios trabajen con grandes cantidades de muestras, no con muestras individuales, por eso es necesario que contactemos previamente con ellos y les expliquemos nuestra situación y nuestro proyecto. Si forma parte de una universidad pública, es bastante probable que no tengan inconveniente en adaptarse a nuestras circunstancias.

¿Cómo lo hacemos?

Lo que tenemos que enviar no es el fragmento amplificado en el gel, ya que sería necesario separarlo del gel de agarosa y purificarlo, sino el resto que ha quedado en el microtubo de la amplificación.

Cada servicio de secuenciación tendrá un protocolo algo distinto para enviar las muestras, pero en todos los casos nos van a pedir:

- Unos microlitros de nuestro ADN. En nuestro caso, el volumen de amplificación era de 50 μ l. Como pusimos 10 μ l en la electroforesis, tenemos todavía 40 μ l de muestra, más que de sobra, ya que el servicio de secuenciación que escojamos nos va a pedir entre 5 y 25 μ l de nuestro fragmento de PCR (pero normalmente con 10 μ l es más que suficiente).
- Una concentración adecuada de nuestro ADN. No podemos determinar esa concentración, ya que necesitaríamos un equipo Nanodrop, lo único que podemos hacer es seleccionar entre todas las bandas de nuestra electroforesis aquellas que sean más anchas (a mayor tamaño, mayor cantidad de ADN). Si el servicio de secuenciación nos lo exige, nos tocará entonces explicarles nuestra circunstancia y convencerlos para que nos ayuden.
- El tipo de ADN y su tamaño. Tenemos que especificar que es un producto de PCR y el tamaño de amplificación, que en nuestro caso es de 550 pb.
- Los oligos *forward* y *reverse* de nuestro ADN. Hay que enviarlos, ya que también se utilizan para el proceso de secuenciación. El volumen que nos van a pedir es también pequeño, pero en lo que nos tenemos que fijar es la concentración a la que se lo tenemos que enviar y diluir nuestros oligos en consecuencia. Lo normal es que nos pidan una concentración de 5 μ M, así que bastará con diluir nuestra dilución previa de 10 μ M a la mitad.
- La temperatura de annealing o alineamiento, que en nuestro caso es 54 °C.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Una vez que el servicio de secuenciación termine, nos va a enviar un correo con una serie de archivos. Dichos archivos contienen los cromatogramas con las secuencias de nucleótidos de nuestros fragmentos. Tendremos un archivo para la secuencia *forward* y otro para la *reverse*. Para abrir estos archivos podemos utilizar un buen número de programas gratuitos, que además nos van a permitir revisar y corregir algún error en el cromatograma. Un listado de los mismos lo podemos encontrar en el apartado Recursos.

En nuestro caso, vamos a utilizar SnapGene Viewer, que es la versión gratuita de un software de pago, pero cualquiera de los programas de la lista vale.

- Repasando y corriendo nuestro cromatograma

Al abrir un archivo, nos vamos a encontrar una imagen similar a esta:

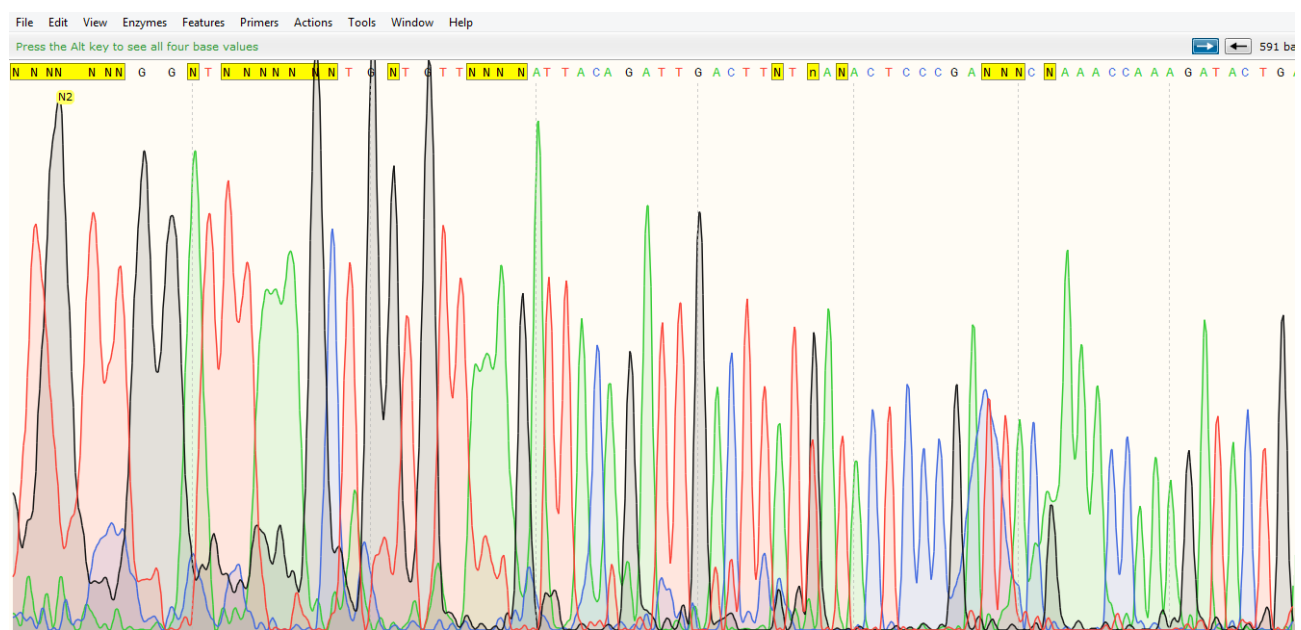


Figura 3.5. Cromatograma de la secuencia Forward

Como podemos ver, la secuencia de nucleótidos aparece como una serie de picos de cuatro colores, representando cada uno la adenina, timina, guanina y citosina. Cuando el sistema no es capaz de reconocer el nucleótido, aparecerá la letra N. Como podemos ver, en el inicio de todos los cromatogramas, el número de nucleótidos no resueltos es muy alto, y por tanto, esta parte no nos va a permitir obtener información de la secuencia. Ahora podemos entender la razón de obtener las dos secuencias. La secuencia *forward* corresponde al cromatograma obtenido desde el principio del fragmento hasta el final, mientras que la *reverse* va del final al principio. Puesto que son complementarias, la información que no se

puede leer en una de ellas, la podemos obtener de la otra. Por tanto, esa indeterminación no nos tiene que preocupar.

Lo que sí podemos corregir son los nucleótidos que están en medio de la cadena y que el sistema no ha sabido resolver. En la mayoría de los casos, podemos nosotros mismos evaluar cuál es el nucleótido más adecuado. En el ejemplo que mostramos, el sistema es incapaz de asignar un valor al nucleótido 366. Podemos ver en la Imagen 3.6. que lo más conveniente es asignar esa posición como G, ya que nos aparece un pequeño pico negro entre la citosina y la adenina. Todos los programas citados nos permiten realizar ese cambio.

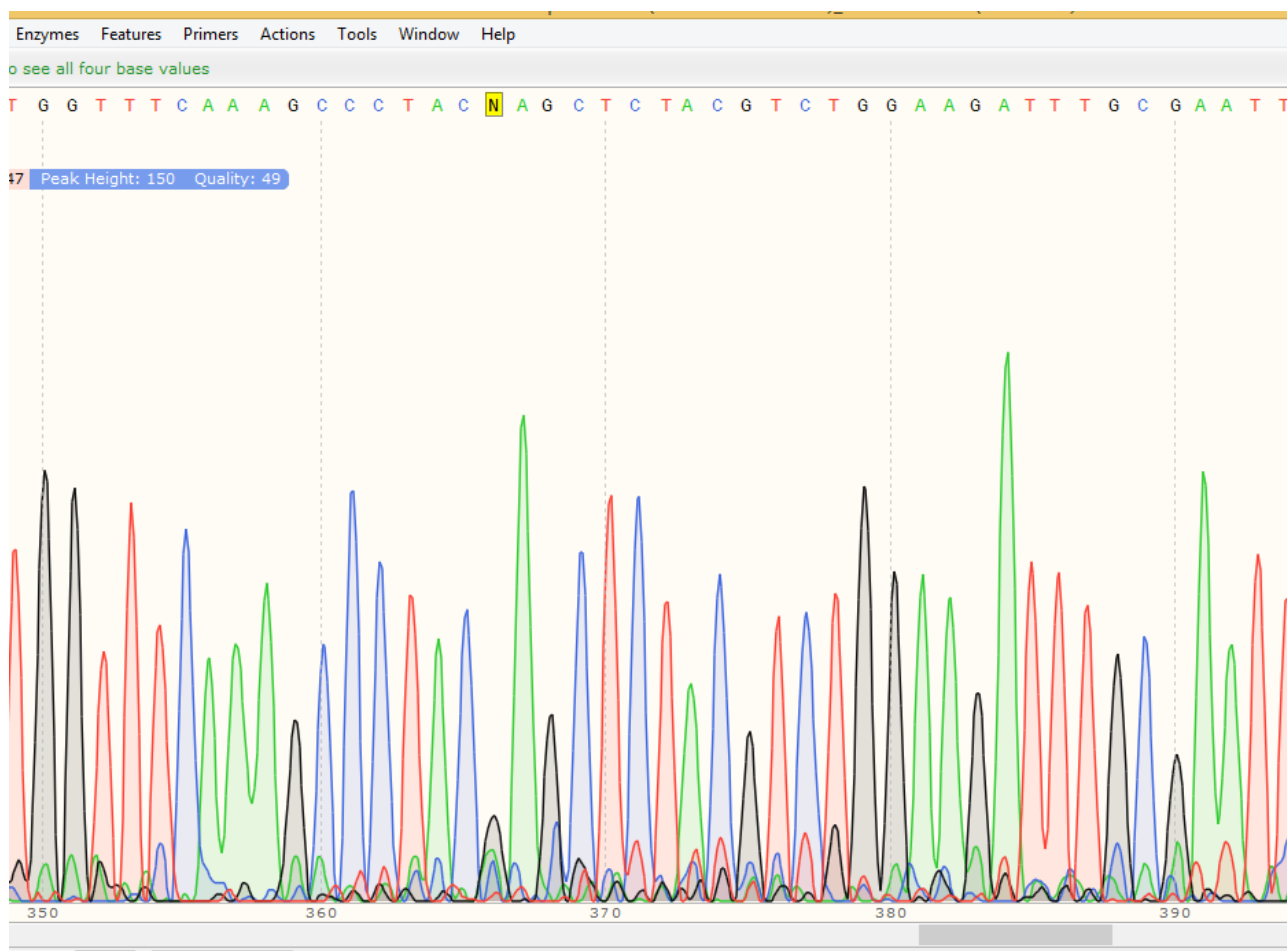


Figura 3.6. En el cromatograma se muestra que el nucleótido 366 no está asignado

Una vez repasado y corregido todo nuestro cromatograma, vamos a exportar el mismo como formato de texto. Solo vamos a copiar el fragmento que contenga todos los nucleótidos resueltos sin ambigüedad, borrando los del principio.

Al finalizar este paso debemos tener dos archivos de texto, uno para la secuencia *forward* y otra para la *reverse*.

1. Registrarnos en BoldSystem
Para ello, tenemos que entrar en la sección *Education Portal* y darnos de alta en la plataforma como *Instructors*.



Figura 3.7.

Después de unos días, recibiremos un correo electrónico en el que nos asignan una serie de claves para crear cursos. Cada curso o proyecto tendrá una clave y un usuario, común para la totalidad de las y los miembros del curso, y dentro

de cada curso podemos agregar tantos y tantas estudiantes como queramos.

1. Subir una secuencia
Si entramos en un curso como estudiante (*Students*), vamos a ver la siguiente consola:

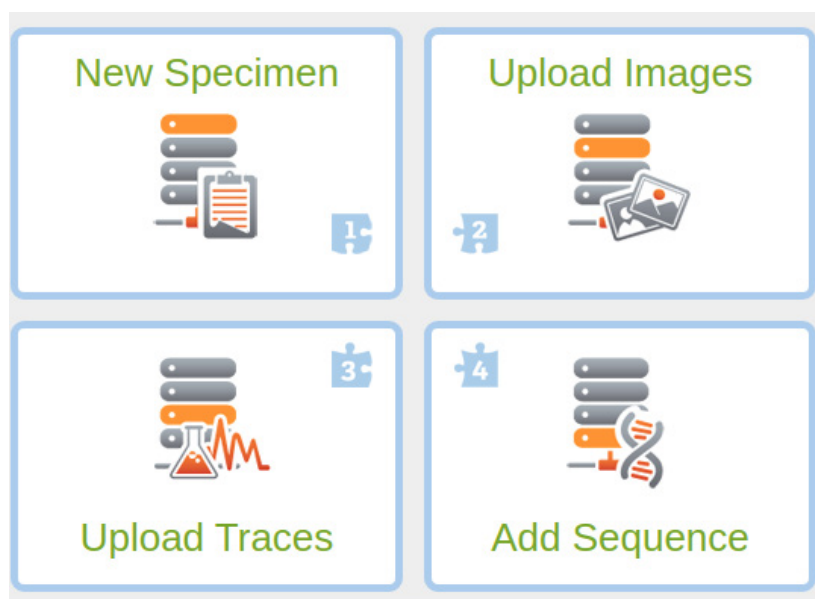


Figura 3.8. Consola inicial.

NEW SPECIMEN

Lo primero que tenemos que hacer es definir un identificador para la muestra (*Sample ID*). Podemos poner lo que queramos, pero es recomendable ser sistemático, como por ejemplo Año-Institución-Iniciales responsable-número.

En este apartado nos van a pedir todos los datos de nuestra muestra: lugar y fecha de recogida, detalles de la especie y, lo más importante, la taxonomía. Debemos, por tanto, tener completamente identificada nuestra especie para poder empezar.

The screenshot shows the 'New Specimen' form with two visible sections:

- A Specimen Identifier**: Contains a 'Sample ID' text input field with a 'Lookup' button below it, and a 'Select Marker' dropdown menu currently set to 'matK'.
- B Add Sequence**: Contains the text 'There are two options for uploading a sequence:' followed by two numbered instructions:
 1. Use the BOLD-SDP Sequence Editor to trim, assemble, and edit your trace files to generate a sequence. Below this is a button labeled 'BOLD Sequence Editor'.
 2. Use a third-party software package to trim, assemble, and edit your trace files. If this approach is used, the sequence will need to be uploaded directly. Below this is a button labeled 'Upload Assembled Sequence'.

At the bottom of the form are 'Submit' and 'Cancel' buttons.

Figura 3.9. Apartado New Specimen

UPLOAD IMAGES

Será necesario incluir una imagen de calidad de nuestra especie.

UPLOAD TRACES

Es aquí donde vamos a agregar nuestras dos secuencias, *forward* y *reverse*. Basta con subir los archivos.

The screenshot shows the 'Upload Traces' form with two visible sections:

- C PCR Primers**: Contains 'Forward' and 'Reverse' dropdown menus, both currently set to 'rbclLa-F' and 'rbclLa-R' respectively.
- D Attach Trace Files**: Contains 'Forward' and 'Reverse' sections. Each section has a 'Sequencing Primer' dropdown (set to 'rbclLa-F' and 'rbclLa-R' respectively) and a file selection area with a 'Seleccionar archivo' button and the text 'Ningún archivo seleccionado'.

Figura 3.10. Apartado Upload traces

ADD SEQUENCE

Como ya hemos comentado, la información completa de la secuencia que buscamos se obtiene ensamblando la información del fragmento *forward* y el *reverse*. Si lo hacemos nosotros mismos con Bioedit, el proceso no es complicado: tendríamos que subir el resultado en el apartado 2, donde indica «*Upload Assembled Sequence*», **pero esto no es necesario. Es suficiente con utilizar la opción «Bold Sequence Editor»** (Figura 3.11.) y el sistema realizará el ensamblaje. Además, si no hemos eliminado los nucleótidos N en el centro de la secuencia, aquí también lo podemos hacer (Figura 3.12.). Cuando la revisemos, guardamos (*Save*).

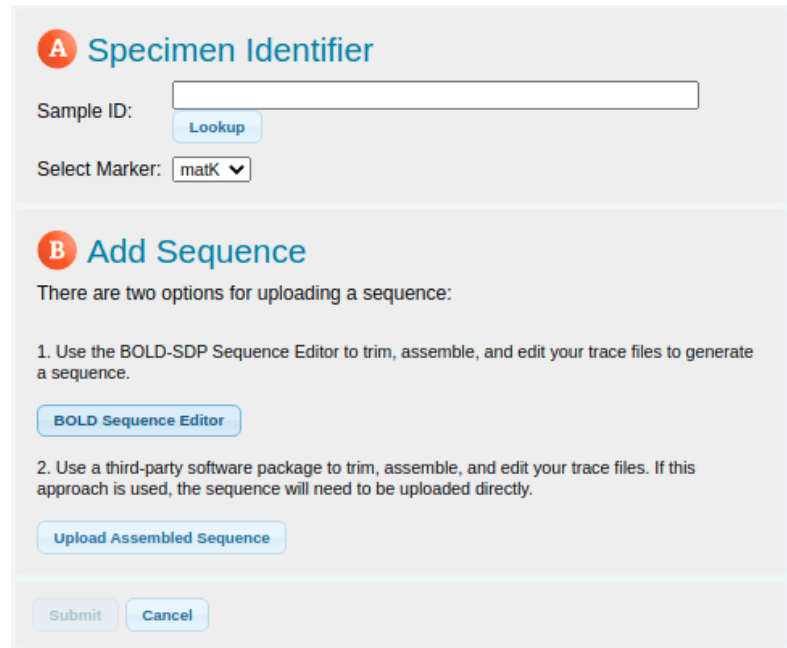


Figura 3.11. Apartado Add sequence

Por último, debemos eliminar de la secuencia los oligos, con la opción «*Process Sequence*». **Hecho esto, nos aparecerá lo siguiente:**

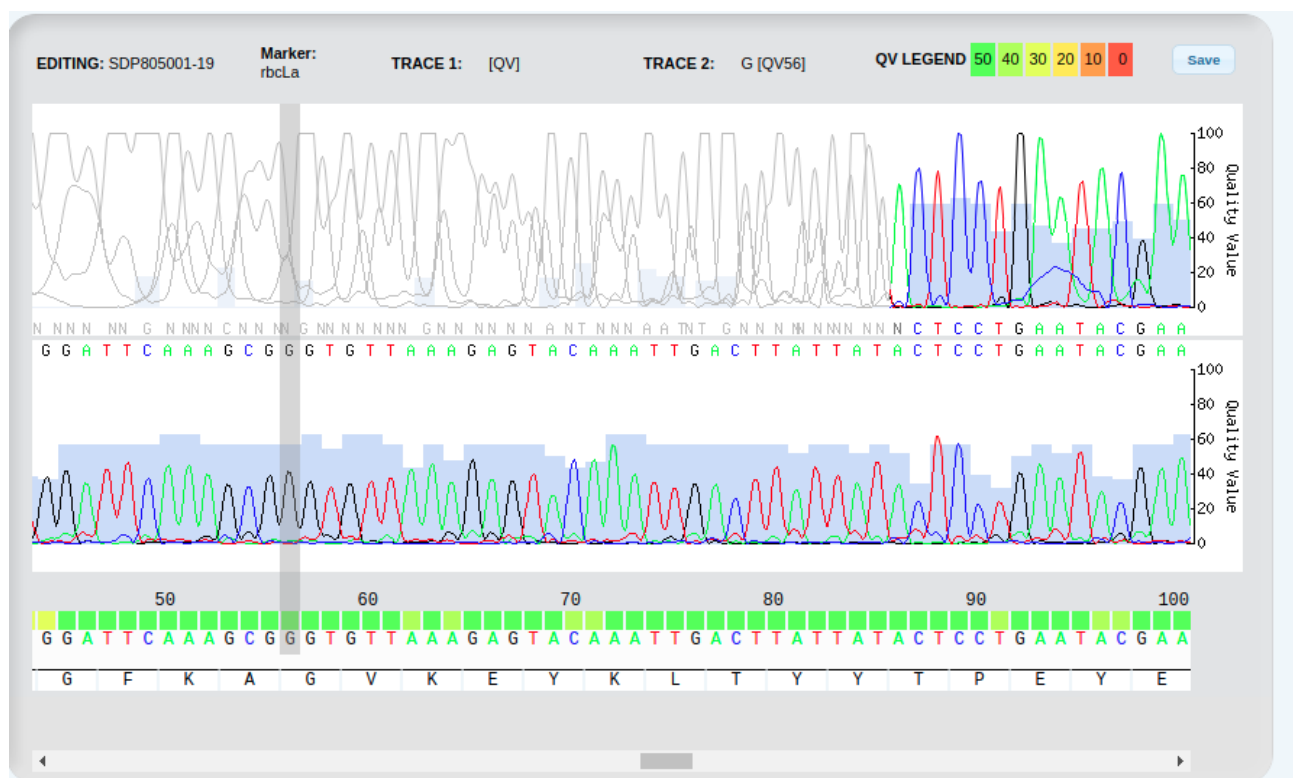


Figura 3.13. Imagen final que nos indica que todo está bien

Si pulsamos «*Submit*», **ya tendremos lista nuestra secuencia.**

1. Validar la secuencia

Una vez que completamos el proceso, tenemos que entrar en el sistema como instructores y vali-

dar la secuencia. En unos días, cuando sea revisada, dicha secuencia estará disponible para toda la comunidad científica en esta plataforma, asociada para siempre a los nombres de los responsables.

IDENTIFIERS

Sample ID: 19-IESJC1-ELB-07
Process ID: SDP799011-19
Institution Storing: *unvouchered
Field ID: 19-IESJC1-ELB-07
Museum ID:
Collection Code:

PHOTOGRAPHS



License: Creative Commons Attribution ShareAlike (2019) 

License Holder: Unspecified, I.E.S Juan Carlos I

Add Tags & Comments Comments: 0 Associated Tags: No Tags

TAXONOMY

Identification: Lavandula lanata
Rank: Species
Identifier: Student
Identification Method:
Identifier Institution:
Identifier Email:
Taxonomy Note:
Rank: Current Record (19-IESJC1-ELB-07)
Phylum: Magnoliophyta
Class: Magnoliopsida
Order: Lamiales
Family: Lamiaceae
Subfamily:
Genus: Lavandula
Species: Lavandula lanata
Subspecies:

SPECIMEN DETAILS

Voucher Status:
Tissue Descriptor:
Sex:
Reproduction:
Life Stage:
Extra Info:
Note:
Associated Taxa:
Associated Specimens:
Reference Link:
Contributors:

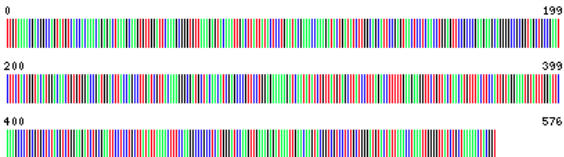
- Specimen: Kumar Antonio Shah Carrilero, Miguel Angel Gimenez Matallana, Jesus Martinez Gonzalez

Figura 3.14. Datos taxonómicos de nuestra planta.

SEQUENCE DATA

Genbank Accession: MN486523
Translation Matrix: Standard Code
Last Updated: 2019-06-09
Clear Sequence Edit Sequence

ILLUSTRATIVE BARCODE



NUCLEOTIDE SEQUENCE

Sequence: 577 bp

TTGTAACACGACGGCCAGTATGTCCACCAACAGAGACTAAAGCAAGTGTGGATTCAA
AGCGGGTTTAAAGAGTACAAATTGACTTATTACTCTCTGAATACGAAACCAAGATAC
TGATATCTTGGCAGCATTCGAGTAACCTCTCAACCTGGAGTTCGCCCGAAGACAGG
GCCCGGGTAGCTGCGCAATCTTCTACTGGTACATGGAACACTGTGTGGACGATGGACT
TACAGCCTTGATCTTACAAAGGGCGATGCTACACATCGAGCCGTTCTCTGGAGAAAA
AGATCAATATATCTGTATGTAGCTTATCTTTAGACTTTTGAAGAAGGTTCTGTAC
TAACATGTTTACTTCCATTGTAGGAATGTATTGGATTCAAAGCCCTGCGTCTACG
TCTGGAAGATCTGCAATCTCTCTGCTTATATTAAACCTTCAAGGCCGCTCATGG
GATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGCTGCTCTCTGCTGGGATGTACTAT
TAAACCTAATTGGGGTTATCTGCTAAAACTACGCT

Composition: A (169), G (127), C (124), T (157)
Ambiguous Characters: 0

AMINO ACID SEQUENCE

Sequence: 199 residues

CKTASMSPTETKASVGFKAGVKEYLTYTPEYETKDTDLAAFRVTPPGVPPEEAG
AFAAASSTGTWTTWTDGLTSLDRYKGRYNIETVPEKDOYICVAYPLDLFEEGVT
NMFTSIVGNVFGKALRALRLDLRIPPAYIKTFQGPPIGQVERDKLNKYGRPLLCTI
KPKLGLSAKNYG

SEQUENCING RUNS: Generic Commercial Labs

Run Date	Direction	Trace File	Seq Primer	Quality
2019-02-05	Reverse	JMEspino18(L-LAVATA-R)_13-19-49.ab1	rbclLa-R	high
2019-02-06	Forward	JMEspino13a(L-LAVATA-F)_13-02-15.ab1	rbclLa-F	high

Sequence Editor View Trace Files Download

ANNOTATION

Add Tags & Comments Comments: 0 Associated Tags: No Tags

Figura 3.15. Código de barras obtenido y su correspondiente secuencia de aminoácidos

Además, pasado un tiempo, estos datos se compartirán con las bases de datos genómicas más conocidos, como en GenBank.

1

EXTRACCIÓN
DE ADN

2

AMPLIFICACIÓN
POR PCR

3

ELECTROFORESIS

4

ENVIAR A
SECUENCIAR

5

ANÁLISIS DE
RESULTADOS



RESUMEN

CONSEJOS

Si después de realizar la electroforesis no obtienes ninguna banda, no desesperes. Fracasar en una PCR es algo común y se ha convertido en un meme muy conocido de Ernesto Llamas (Sketching Science).

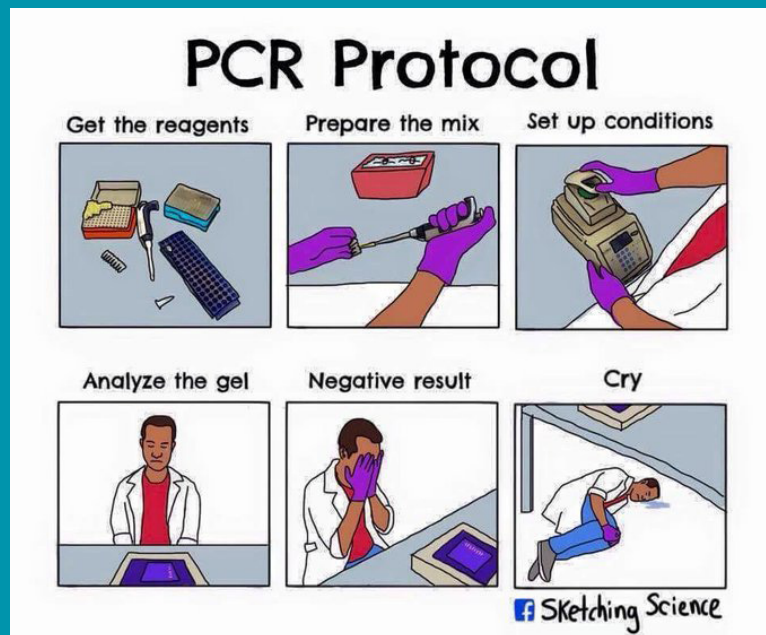


Figura 4.1. Meme de Sketching Science y Ernesto Llamas.

Pero si hay ADN (y por poco que extraigas, debe haber), la PCR tiene que salir. El problema serán, probablemente, los contaminantes. Prueba a:

- Diluir la muestra después de la extracción (a la mitad, diez veces, etc.).
- Aumentar la cantidad de sílice (más de 50 μ l).
- Tomar una porción más pequeña de la planta.
- Si tienes varias opciones, prueba con otra planta. En el proceso de extracción algunas plantas aportan más contaminación que otras. También puedes probar con otra parte de la planta.

RECURSOS

• WEBS DONDE ADQUIRIR EQUIPAMIENTO:

- [miniPCR bio™](#) (Termociclador, centrífuga para microtubos, electroforesis).
- [PocketPCR](#) (Termociclador).
- Roner (bloque termostático). Se puede adquirir en cualquier web de venta *on-line*.
- [Bento Lab](#) (un equipo todo en uno: termociclador, electroforesis y centrífuga).
- DremelFuge (centrífuga casera). Puedes comprar una multiherramienta en cualquier web de venta *on-line* y descargar e imprimir el modelo 3D del soporte para los microtubos [aquí](#).

• REACTIVOS:

- Clorhidrato de guanidina de Thermo Scientific™.
- Tris(hidroximetil)aminometano(Tris) de Biorad.
- Dióxido de silicio (Sílice) en polvo (Silica, fumed powder 0,007) de Sigma-Aldrich.
- EDTA de PanReac.
- Agarosa para electroforesis de Thermo Scientific™.
- Tampón TBE 10X de PanReac.
- Solución de tinción de ácidos nucleicos RedSafe™.
- Solución de tinción de ácidos nucleicos
- SeeGreen™.
- Escalera de ADN de 100 pb Plus de Thermo Scientific™ para mejorar el visionado de bandas.
- PCR Mastermix de Thermo Scientific™.

• CEBADORES

Obtener cebadores específicos es muy sencillo:

- Entramos en la [web de Thermo Fisher Scientific](#).
- En «*Oligo Sequence*», solo hay que copiar la secuencia que aparece en la Tabla 1.
- En «*Synthesis Scale*» y «*Purification*» podemos escoger la opción más básica (25 nmolar) y «*Desalted*», respectivamente. Podemos mejorar la purificación con una escala de síntesis 50 nmolar, pero no es necesario.
- En cuanto a «*Formulation*», sí que podemos escoger entre el oligo liofilizado («*Dry*»), el cual tendremos que resuspender, o disuelto a una concentración de 100 µM.

Como vemos el precio es bastante asequible.

Oligo Name: rbclA-F

Researcher Name: JM Espinosa Bernal

See sample label

Oligo Sequence (5' to 3')
TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT
AAA GC

+Mixed Bases | Base Count: 44 Tm: 79.0 (50mM), 100.6 (1M) GC%: 45
Minimum Yield: 52.2 (µg), 3.9 (nmol)

5' Mod: None

3' Mod: None

Synthesis Scale: 25 nmole

Purification: Desalted

Formulation: Liquid - 100µM in Water

Standard Shipping (selected) Next Day Shipping Ship by 27 de mayo. Order within 5 hr 60 min.

PRICE: EUR 10,48

Figura 5.1 Captura de pantalla de una compra de cebadores

• PROGRAMAS PARA EDITAR CROMATOGRAMAS:

- [SnapGene Viewer](#) (Windows, macOS y Linux).
- [BioEdit 7.2](#) (Windows)
- [Chromas](#) (Windows)
- [FinchTV](#) (Windows y macOS)

• PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS CONCENTRADOS:

Ácido etilendiaminotetraacético, EDTA 0.5 M, pH 8,0, 100 ml (temperatura ambiente indefinidamente)

- Agregar 18,8 gramos de EDTA (sal disódica dihidrato, M.m 372,24) a 80 ml de agua desionizada.
- Ajustar el pH añadiendo 2,2 g aproximadamente de NOH, controlando el pH con el pHmetro hasta que la disolución llegue a pH 8,0.
- Agitar con un agitador magnético.
- Añadir agua hasta un volumen de 100 ml.
- Autoclavar durante 15 minutos a 121 °C.
- Enfriar la disolución.

Cloruro de sodio 5 M, 100 ml, (temperatura ambiente indefinidamente)

- Disolver 29,22 gramos de NaCl (M.m: 58,44) en unos 60 ml de agua destilada en un vaso de precipitados.
- Pasar a un matraz de 100 ml y enrasar.

Tris-HCl 1 M, pH 8 y pH 7,3 100 ml, (temperatura ambiente indefinidamente)

- Disolver 12,1 gramos de Tris base (M.m: 121,10) en unos 70 ml de agua destilada en un vaso de precipitados.
- Ajustar el pH añadiendo con cuidado HCl concentrado. Monitorizar el pH con un pHmetro.
- Pasar a un matraz y añadir agua hasta 100 ml.
- Autoclavar 15 minutos a 121 °C. Dejar enfriar.

• BIBLIOGRAFÍA

Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. Proc Biol Sci. 2003 Feb 7;270(1512):313-21. doi: 10.1098/rspb.2002.2218. PMID: 12614582; PMCID: PMC1691236.

Cold Spring Harbor Laboratory DNA Learning Center "Using DNA Barcodes to Identify and Classify Living Things"

Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). Biotechniques. 2000 Jul;29(1):52, 54. doi: 10.2144/00291bm09. PMID: 10907076.

Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds

Zou Y, Mason MG, Wang Y, Wee E, Turni C, et al. (2017) Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds. PLOS Biology 15(11): e2003916. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003916>

• WEBGRAFÍA

<http://www.barcodeoflife.org/>

<https://dnabarcoding101.org/>

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



la aventura
de aprender