

Guía de Problemas

Estructura y propiedades fisicoquímicas del ADN y el ARN

Problema 1

Una solución de ADN doble cadena es calentada y luego enfriada rápidamente. Explicá cómo cambiará la absorbancia a 260 nm durante el enfriamiento, si:

- a) La solución fue calentada hasta una temperatura algo menor que T_m .
- b) La solución fue calentada hasta una temperatura algo mayor que T_m .
- c) Explicá lo que esperarías observar si la molécula de DNA utilizada fuera:

c1) Simple cadena, con la secuencia: CTTGAACCGTCGACGGTTCAAG

c2) Doble cadena, con la secuencia: AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

En ambos casos el experimento se realiza como en la situación b).

Nota: Suponé que la longitud de los polinucleótidos no tiene incidencia, y que las mismas conclusiones que obtengas, se aplican igualmente a cadenas mucho más largas.

Problema 2

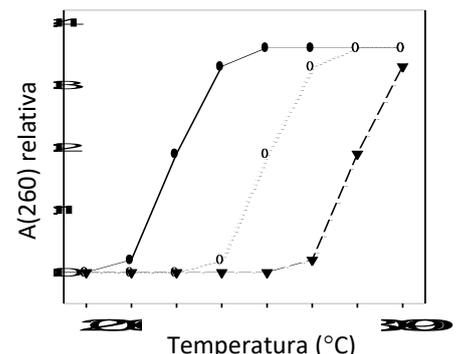
- a) El ADN en solución se desnaturaliza mediante el empleo de calor. ¿Por qué ocurre esto?
- b) ¿Cómo podrías medir el grado de desnaturalización que posee una molécula de ADN a distintas temperaturas?
- c) La temperatura a la cual se alcanza la mitad de la desnaturalización de una molécula de ADN ¿depende de su composición de bases?
- d) Hacé un gráfico que muestre el proceso de desnaturalización a medida que aumenta la temperatura para una molécula de ADN rica en (A+T) comparada con otra rica en (G+C).
- e) Una vez que una molécula de ADN ha sido desnaturalizada por calor ¿puede renaturalizarse por enfriamiento? ¿Cómo harías el experimento que corrobore o no esta pregunta?

Problema 3

- a) Bajo ciertas condiciones el ADN posee carga eléctrica. ¿Cuáles son esas condiciones y a qué grupos moleculares ionizables se debe esta carga? Explicalo con un esquema de la molécula.
- b) Esta propiedad se aprovecha en un método de separación de las moléculas del ADN llamado electroforesis en gel. Esquematizá el procedimiento y cómo se vería el resultado de uno de estos experimentos si se separaran dos moléculas de ADN de distinto tamaño molecular.
- c) Si el procedimiento se basa en la carga eléctrica de la molécula, ¿por qué las separa por tamaños?

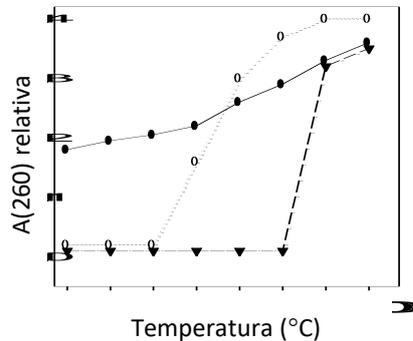
Problema 4

Los gráficos de desnaturalización térmica que se muestran a la derecha corresponden a experimentos realizados a partir de un mismo ácido nucleico (ADN de doble cadena), pero en diferentes condiciones de concentración de Na^+ (NaCl 0.01M; 0.1M y 1 M). ¿Cuál es la curva que corresponde a la mayor concentración de Na^+ ? ¿Por qué?



Problema 5

Las curvas a continuación corresponden a experimentos de desnaturalización térmica de ácidos nucleicos distintos. ¿Qué información puede obtenerse de la estructura secundaria y composición de bases de estos ácidos nucleicos?



Enzimas de restricción

Problema 1

La Figura a continuación fue tomada de una lista de sitios de restricción de un catálogo de una empresa que comercializa reactivos y productos para trabajos en biología molecular. Se indica una de las hebras de ADN con la secuencia de reconocimiento de las enzimas seleccionadas, indicando el "corte" con un triángulo.

EcoRI

5'-G-A-A-T-T-C-

PstI

5'-C-T-G-C-A-G-

SmaI

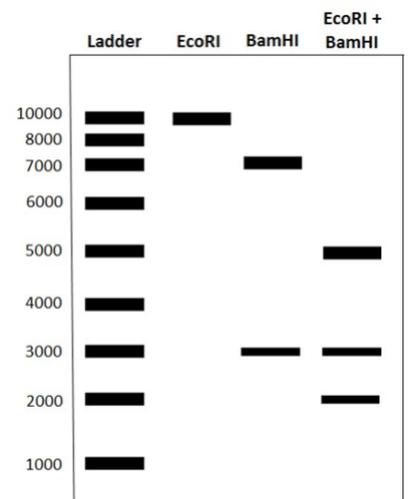
5'-C-C-C-G-G-G-

a) Completá con la segunda hebra, indicá los extremos 5' y 3', y el lugar de corte en esta segunda hebra (con un triángulo).

b) Hacé un esquema mostrando los productos finales de la acción de las enzimas *EcoRI*, *PstI* y *SmaI* sobre sendos fragmentos de ADN de doble cadena conteniendo las secuencias de reconocimiento de dichas enzimas. No escribas las fórmulas de las bases, pero sí el esqueleto de las desoxirribosas (con la posición a la que se encuentra unida la base) y mostrá con una flecha el lugar de ataque de la nucleasa de restricción (el enlace que es hidrolizado).

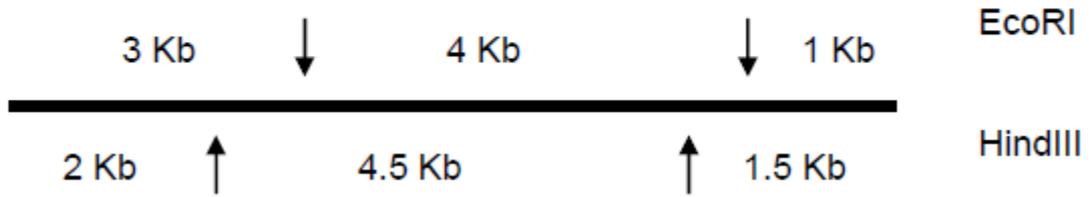
Problema 2

Se ha digerido un fragmento de ADN con las enzimas *EcoRI*, *BamHI* o ambas. Posteriormente, los fragmentos resultantes se separaron en gel de agarosa, dando por resultado el patrón de bandas que se muestra a la derecha. Sobre la base de ese patrón, reconstruí el mapa de restricción de este fragmento.



Problema 3

La figura a continuación muestra el mapa de restricción de una región del ADN cuando se la corta con *EcoRI*, *HindIII* o ambas. Graficá el resultado que esperarías en una electroforesis en gel si corrieras cada una de estas digestiones en una calle distinta.



Videos ilustrativos

Preparación de la reacción de restricción enzimática de ADN

<https://www.youtube.com/watch?v=G5Wo8dCivWs>

Preparación del gel de agarosa

<https://www.youtube.com/watch?v=wXiiTW3pflM>

Siembra, corrida electroforética y revelado de ADN

https://www.youtube.com/watch?v=U2-5ukpKg_Q

Estructura Génica

Problema 1

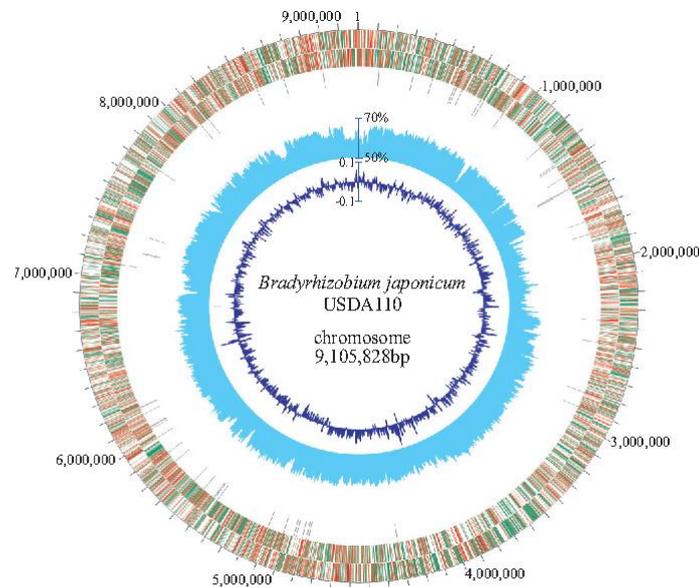
El esquema de la figura a continuación representa una región del genoma de una bacteria donde se encuentran codificados cuatro genes, con funciones relacionadas entre sí y que por lo tanto se llaman *hid*.



- ¿Qué representan las flechas y el rectángulo negro?
- ¿Qué significan los números seguidos de "aa"?
- ¿Por qué las flechas apuntan en sentidos opuestos?
- ¿Cuántos pares de bases (pb) tiene cada gen?

Problema 2

En la figura a continuación se representa la secuencia de ADN del genoma completo de la bacteria *Bradyrhizobium japonicum*, que realiza la simbiosis fijadora de N_2 con plantas de soja. Las líneas de colores representan genes individuales, y el círculo celeste indica el porcentaje de (G+C) en cada región del genoma.



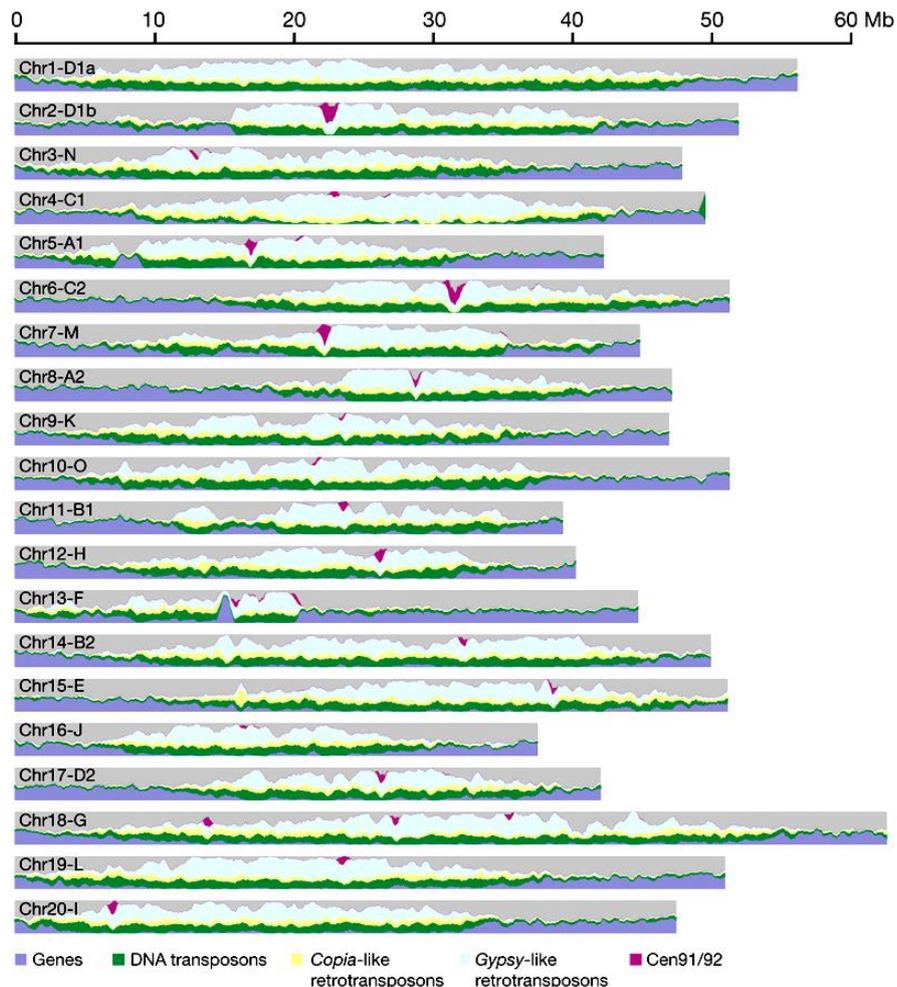
Representación del genoma completo de *Bradyrhizobium japonicum*. El círculo externo representa la ubicación de los genes, y el círculo celeste más interno indica los porcentajes de (G+C) en cada región del genoma. La altura de cada línea celeste representa un porcentaje, según la escala indicada en la parte central, que va de 50% a 70%.

- ¿Qué relación tienen las líneas de color con las flechas del problema 2.5?
- Mirá atentamente la altura de las barras celestes del círculo interior. Fíjate que a la derecha son sensiblemente más bajas que en el resto del círculo. ¿Qué indica esto? ¿A qué puede deberse?

Problema 3

En la figura de la página siguiente se representa la secuencia de ADN del genoma de la soja. Las zonas en gris oscuro indican los lugares de los cromosomas donde probablemente se encuentran los genes, mientras que las zonas en verde indican ADN proveniente de la inserción de elementos móviles como virus, transposones, etc. Finalmente, las zonas en violeta indican las secuencias de lo que probablemente son los centrómeros en cada cromosoma.

- Compará este genoma con el de *B. japonicum* mostrado en la figura del problema 2 y observá la densidad de ADN ocupado por genes en uno y otro caso. ¿Qué conclusiones podés sacar de la comparación de la distribución de genes en procariontas y eucariotas?
- ¿Por qué en un genoma eucariota no puede especificarse inequívocamente dónde están los genes, y solamente puede indicarse una probabilidad, mientras que en los genomas procariontas sí puede hacerse?



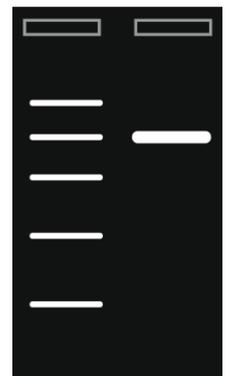
Representación del genoma completo de la soja (*Glycine max*). En la escala superior se indica el tamaño del ADN en megabases (Mb); 1 Mb = 1.000.000 bases. A la izquierda se indica el número de cromosoma (Chr). El código de color de la parte inferior de la figura indica las posiciones de los genes, elementos de inserción y centrómeros. Dado que en eucariotas no puede especificarse unívocamente la secuencia de los genes, los mismos se predicen con una probabilidad, que está dada por la altura de la línea serrada horizontal.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Problema 1

Una solución contiene fragmentos de ADN de doble cadena de 1000, 500, 250, 100 y 50 kb de tamaño. El presente diagrama representa un gel de agarosa. Ubicá en la primer celda o calle las bandas según el tamaño correspondiente. Indicá el tamaño de la banda de la segunda calle y explicá por qué ésta banda es más ancha que las anteriores.

(+)



Problema 2

Se quiere amplificar una secuencia de 144 pares de bases (bp) que solamente se encuentra en una cepa de levadura:

```
GGATCCTGCGGACGCAGCTTGTCTGTTCTCGTTACGATGCGCGCTGCGTTAGCAGAGCATGGTGGGTGTGATCAGCGTGA
ATGGCACCCGACAAAGCCGTGGCGAGTCATACGAGGCTGCCCTGCGTTCTGCGACCCGCTCGCTT
```

a) ¿Qué significa esta sucesión de letras? ¿Representa ADN? ¿Una cadena? ¿Dos? ¿Dónde están los extremos 5' y 3'?

b) Escribí las secuencias de los cebadores empleados para amplificar el fragmento de 144 bp por PCR. Las secuencias **deben estar escritas en sentido 5'→3' con el extremo 5' a la izquierda**. Los cebadores deben ser de 20 nucleótidos cada uno.

c) Para llevar a cabo la reacción, además del molde, se añaden los cebadores o *primers* adecuados, una ADN polimerasa termo-resistente (Taq polimerasa) y el resto de los componentes necesarios para la reacción, de manera de completar un volumen final de 25 µl. Se emplean las siguientes condiciones de ciclado:

- 1) 92 °C durante 15 segundos
- 2) 56 °C durante 15 segundos
- 3) 72 °C durante 30 segundos

Escribí al lado de cada uno de los pasos anteriores, qué proceso ocurre. Comparalos con lo que ocurre en la replicación en las células. ¿Cuál es la fuente de energía para la separación de las hebras de ADN en uno y otro caso?

c) En la figura de la derecha se muestra el resultado de la electroforesis del producto de PCR obtenido con los cebadores que propusiste en b) y realizando la reacción como dijiste en c). En la calle 1 se utilizó como molde un extracto de ADN de la levadura, en la calle 2 se utilizó como molde agua destilada y en la calle "marker" se sembraron los marcadores de peso molecular. Explicá para qué sirve cada calle y si ellas nos permiten asegurar que la reacción de PCR fue exitosa.

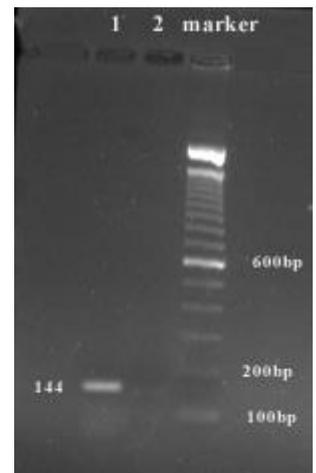


Fig. 4.1 Electroforesis en gel de agarosa. **1** El producto de la PCR realizada para amplificar un fragmento de 144 bp del ADN de una levadura. Calle 1: molde de ADN de la levadura, calle 2: sin molde, marker: marcadores de tamaño molecular

Problema 3

A continuación se muestra la secuencia del gen que codifica una β -(1,6) glicosidasa en un hongo fitopatógeno. Las letras minúsculas indican zonas del ADN que no codifican la enzima, mientras que las letras mayúsculas indican la zona donde se codifica la enzima:

```
atcgggtgtccaatcATGCCTGATTGTGGTCATCTTCATCTGTGGTCATTCATGTAACAATCAATGTAAGGTCATTGCTGCAGCAT
GCTGGCAGAATTGTCAAGTCAAAATGCAACCAATGAGTCGTACAATGACAGGTCAATGAACGTCTGAATCTGTagtcaa.
```

a) Escribí la secuencia de un par de cebadores de 20 bp cada uno, para amplificar por PCR la zona indicada en letras mayúsculas. Escribí las secuencias en el sentido 5'→3'.

b) ¿Tiene que ser solamente esta región? ¿Entera tal cual, o se permite que peguen los cebadores más afuera? ¿Buscarías que terminen en CG?

c) Explicá, sobre la base de la reacción de polimerización del ADN, por qué los cebadores deben orientarse en el sentido 5'→3'.

Problema 4

Una de las producciones sustentables más difundidas en el Delta del Paraná es el cultivo forestal de Salicáceas: álamos (*Populus spp.*) y sauces (*Salix spp.*). Esta actividad provee materia prima para cuatro cadenas industriales: celulosa y papel, tableros de partículas, de bobinados y aserrío. Mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites (SSR), se logró diferenciar a clones y líneas avanzadas del programa de mejoramiento de Salicáceas.

La tabla a continuación muestra tres de los 18 SSR utilizados para la identificación de los clones y algunas de sus características.

Loci de SSR	Amplificación (P: Populus, S: Salix)	Tm (temperatura de Melting)	Motivo SSR	Producto esperado (pb)
1) PMGC 2217	P S	55	GA	160
2) PMGC 2030	P	55	GA	85
3) PMGC14	P	50	CTT	210

La figura a continuación representa un gel de agarosa donde se observa la variación alélica de dos SSR (llamados PMGC 2217 y PMGC 2030). Las calles de 1-7 corresponden a clones de álamo y las calles 8-12 clones de sauce. M, corresponde al marcador de peso molecular.



a) ¿Cuál habrá sido la secuencia de trabajo que los investigadores utilizaron en este estudio? Ordenen del 1 al 5 los diferentes pasos del procedimiento:

- Amplificación de los microsatélites mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Extracción de ADN de hojas de álamo y sauce.
- Diseño de cebadores específicos para los marcadores microsatélites (búsqueda en bibliografía de la temática o en bases de datos en internet: ej NCBI).
- Análisis de los geles, obtención de resultados y agrupamiento de clones.
- Separación de los productos amplificados en geles de agarosa y visualización mediante tinción del ADN.

b) Observá la tabla y analizá a qué podría deberse la diferencia en la T_m entre el SSR 2 (PMGC 2030) y el SSR 3 (PMGC14). ¿Por qué es importante disponer de esta información? Relacionalo con la técnica de PCR y sus tres pasos: (1) Desnaturalización del ADN, 2) Hibridación de los primers o cebadores y 3) Elongación de la cadena.

c) ¿Cuántos alelos podés identificar para cada microsatélite PMGC 2217 y PMGC 2030? ¿Considerás que fue posible diferenciar a todos los cultivares con el empleo de estos marcadores?

d) ¿Cuál de los dos marcadores es más polimórfico? ¿Podrías identificar cultivares homocigotas y heterocigotas para los marcadores? Da un ejemplo de cada caso.

Problema 5

En la Tabla a continuación se presentan los resultados experimentales de una corrida de qPCR realizada con el fin de comparar la expresión de cierto gen, que en una cepa bacteriana patógena se cree que está relacionado con la virulencia, con el gen correspondiente en la cepa salvaje. Para el experimento se utilizaron 300 ng de ADNc en presencia de SybrGreen más los cebadores específicos para un gen de referencia (en este caso, el que codifica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, abreviada GAPDH) y el gen de interés. Los cebadores se usaron a una concentración final de 20 μ M. Las condiciones de reacción de la qPCR fueron las siguientes: 1 ciclo a 95 °C por 5 minutos, 55 ciclos de 5 s a 95 °C seguido de 10 s a 60 °C y finalmente 1 ciclo de incremento de temperatura desde 60 °C hasta 95 °C.

a) Utilizando los datos de la Tabla 4.1, graficá las curvas de amplificación tanto para el gen de interés como para el gen de referencia, en ambas condiciones (control y experimental). Se recomienda utilizar un excel.

b) Calculá el valor del C_t para cada curva de amplificación.

c) Determiná la eficiencia para cada curva de amplificación usando el valor de la pendiente (m) de la Tabla 4.1.

d) Calculá el cambio en la expresión relativa del gen de interés (GOI) con la ecuación de $\Delta\Delta C_t$ utilizando solamente los valores de C_t obtenidos.

e) Calculá el cambio en la expresión relativa del gen de interés (GOI) con la ecuación de Pfaffl utilizando los valores de C_t y E obtenidos anteriormente.

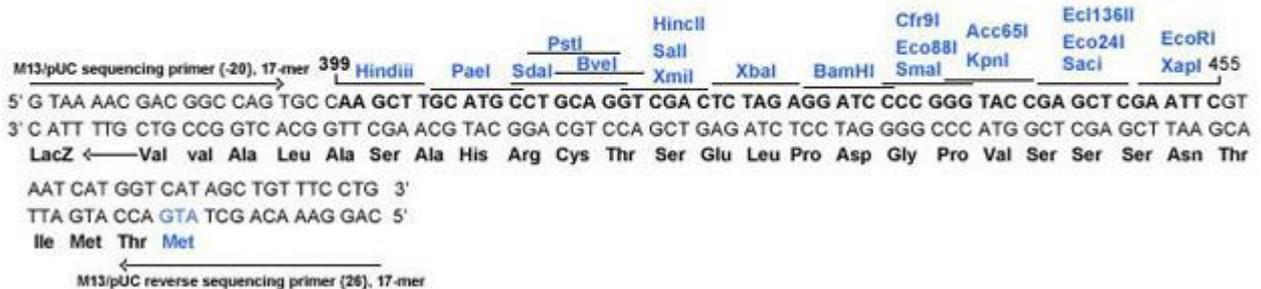
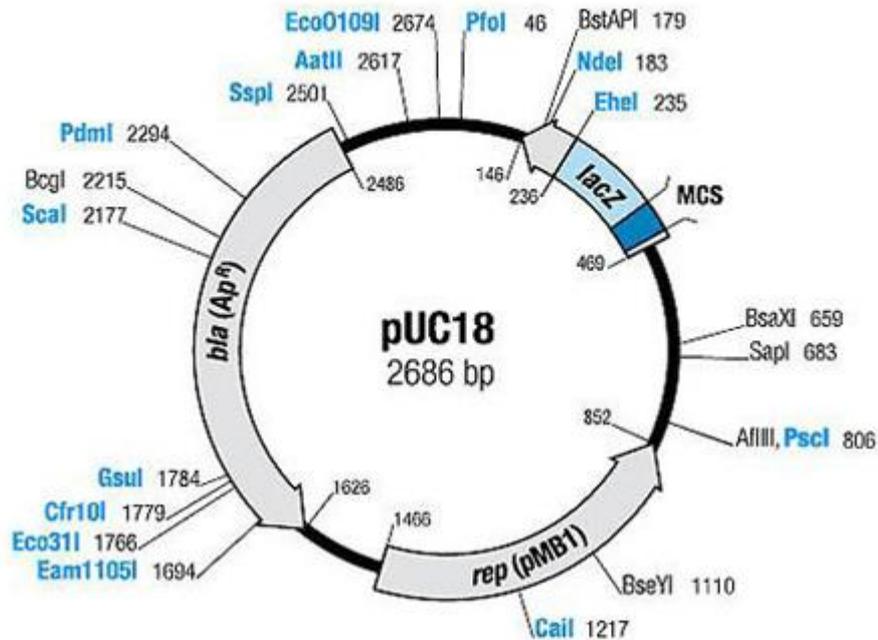
Número de ciclo (Ciclo) y valores de fluorescencia correspondientes (F), registrados a 522 nm para el SYBR green que se obtuvieron en una reacción de qPCR. Ref, gen de referencia; GOI, gen de interés; Ctl, control; Exp, condición experimental; m , pendiente.

Ref Ctl		Ref Exp		GOI Ctl		GOI Exp	
Ciclo	F	Ciclo	F	Ciclo	F	Ciclo	F
3	1.239	1	1.120	4	3.613	5	1.693
6	1.257	4	1.139	8	3.683	7	1.745
8	1.280	5	1.154	11	3.724	8	1.760
9	1.290	7	1.180	12	3.729	10	1.773
11	1.307	8	1.180	18	3.726	12	1.792
13	1.329	12	1.218	22	3.771	14	1.798
14	1.334	14	1.231	25	3.797	17	1.815
16	1.354	17	1.250	27	3.794	21	1.826
18	1.385	19	1.297	29	3.992	23	1.854
22	1.785	20	1.346	31	4.552	26	2.605
25	4.175	23	2.057	32	5.199	28	4.652
26	5.929	25	4.044	34	7.819	29	6.549
28	10.010	27	7.995	35	9.537	30	8.842
30	13.188	28	10.150	37	12.323	32	12.944
31	14.274	30	13.590	38	13.271	33	14.364
33	15.633	31	14.736	40	14.603	35	16.457
36	16.892	33	16.134	43	15.341	37	17.588
38	17.196	35	17.070	46	15.875	39	18.216
42	17.657	38	17.742	48	16.040	43	18.717
48	17.869	47	17.993	55	16.306	47	18.967
m	-3.955	m	-4.033	m	-3.917	m	-3.917

Clonado

Problema 1

Se pretende clonar un fragmento *EcoRI-EcoRI* de 700 pb dentro del vector pUC18 (*Amp^R*, Fig. 2.1) en su sitio *EcoRI*.



Para realizar el clonado se aislaron el fragmento y el vector digeridos a partir de geles de agarosa por electroelución. Se realizaron las reacciones de ligación que se indican, en un volumen final de 10 μ l.

Mezclas de reacción empleadas para clonar un fragmento <i>EcoRI-EcoRI</i> en pUC18.							
Reactivo	Volumen de reactivo agregado al tubo (μ l)						
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7
Fragmento <i>EcoRI-EcoRI</i>	1	1	1	—	—	—	—
Vector pUC18 <i>EcoRI</i>	1	—	—	1	—	1	—
Vector pUC18 <i>EcoRI</i> + BAP*	—	1	1	—	1	—	—
Buffer ligasa 5X	2	2	2	2	2	2	—
ATP 100 mM	1	1	—	1	1	1	—
Vector pUC18	—	—	—	—	—	—	1
T4 DNA ligasa	1	1	1	1	1	—	—
H ₂ O	4	4	5	5	5	6	9

*BAP: fosfatasa alcalina bacteriana. Remueve fosfatos de extremos 5'.

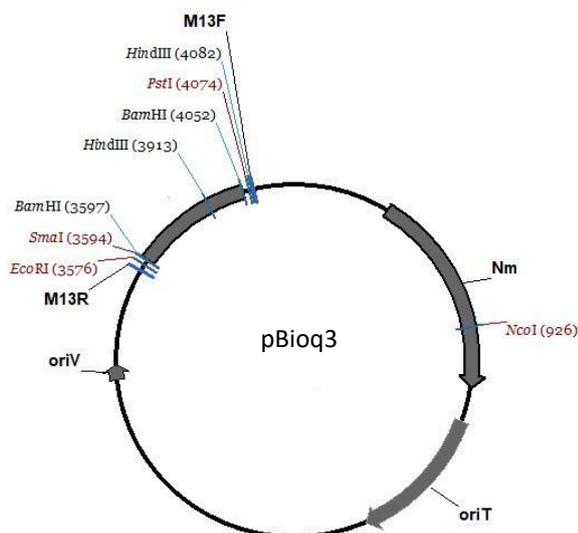
Las reacciones de ligación se dejaron 3 hs a 16 °C. Luego se transformaron células de *Escherichia coli* competentes DH5 α (aptas para α -complementación), las cuales se plaquearon en medio LB (Luria-Bertani) conteniendo ampicilina, IPTG (inductor del gen de la β -galactosidasa) y X-Gal (sustrato de la enzima β -galactosidasa). Se las dejó crecer una noche a 37 °C para que se produzca el desarrollo de colonias aisladas. El resultado de la transformación se muestra a continuación.

Números de colonias azules y blancas transformantes, obtenidas luego de transformar <i>E. coli</i> DH5 α con las mezclas de ligación indicadas en la Tabla 2.1.		
Mezcla de ligación	Cantidad de colonias azules	Cantidad de colonias blancas
Tubo 1	2.600	27
Tubo 2	4	650
Tubo 3	0	0
Tubo 4	3.200	30
Tubo 5	2	1
Tubo 6	0	0
Tubo 7	5.000	0

- ¿En qué ensayo considerás que fue más eficiente la generación de DNA recombinante?
- Explicá el resultado obtenido con cada mezcla de ligación.
- ¿Cuáles son, a tu criterio, los factores decisivos para el éxito de la ligación? ¿Por qué?
- ¿Qué ensayos realizarías para comprobar que has obtenido la construcción deseada?
- ¿Por qué fue en la placa 7 donde más colonias azules aparecieron?
- ¿Alguna de estas mezclas de ligación podría servir como control positivo o negativo?

Problema 2

Se ha clonado un fragmento de 455 bp en el sitio *Bam*HI del plásmido pK18mob generando el plásmido designado pBioq3. En la figura de la página siguiente se muestra la construcción obtenida.



Endonucleasas de restricción y sitios de reconocimiento (corte indicado por /)

<i>Eco</i> RI	G/AATTC
<i>Sma</i> I	CCC/GGG
<i>Bam</i> HI	G/GATCC
<i>Hind</i> III	A/AGCTT
<i>Pst</i> I	CTGCA/G

Los números entre paréntesis indican la posición de corte de la enzima de restricción.

a) Las bacterias competentes que se utilizaron se controlaron de la siguiente manera para evaluar el procedimiento de transformación: 100 μ l de bacterias competentes (10^8 bacterias/ml) se transformaron con 1 μ l de una solución de un plásmido control (concentración: 40 ng/ μ l). Se agregaron 900 μ l de medio de cultivo sin antibiótico, se incubó durante 1 h a 37°C en agitador rotatorio y luego se plaqueó en medio LB-agar con antibiótico, sembrando 100 μ l en cada una de tres placas por cada dilución analizada. En las placas en las que se sembró la dilución 1/100 se contaron 180, 167 y 200 colonias, respectivamente. Con estos datos calculó la eficiencia de las células competentes.

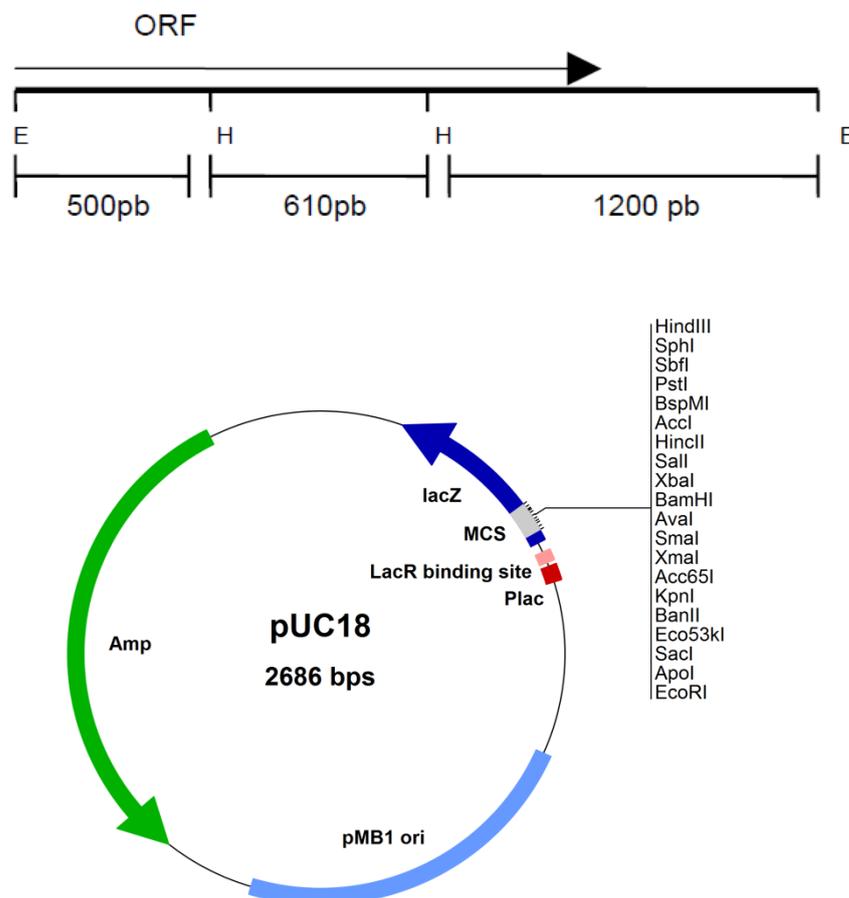
b) Identificó los elementos presentes en el esquema del plásmido, que son necesarios para el clonado y explicó qué función cumple cada uno de ellos.

c) Describí los pasos que se realizaron para obtener la construcción deseada (indicando las enzimas que se utilizaron, controles, etc.). Hacé un esquema que muestre la estrategia propuesta.

d) Para la determinación de la orientación del fragmento clonado se realizó un análisis de los fragmentos de restricción utilizando la enzima de restricción *HindIII*. Realizó un esquema del gel de electroforesis que obtendrías usando el plásmido pBioq3; incluyendo los controles pertinentes.

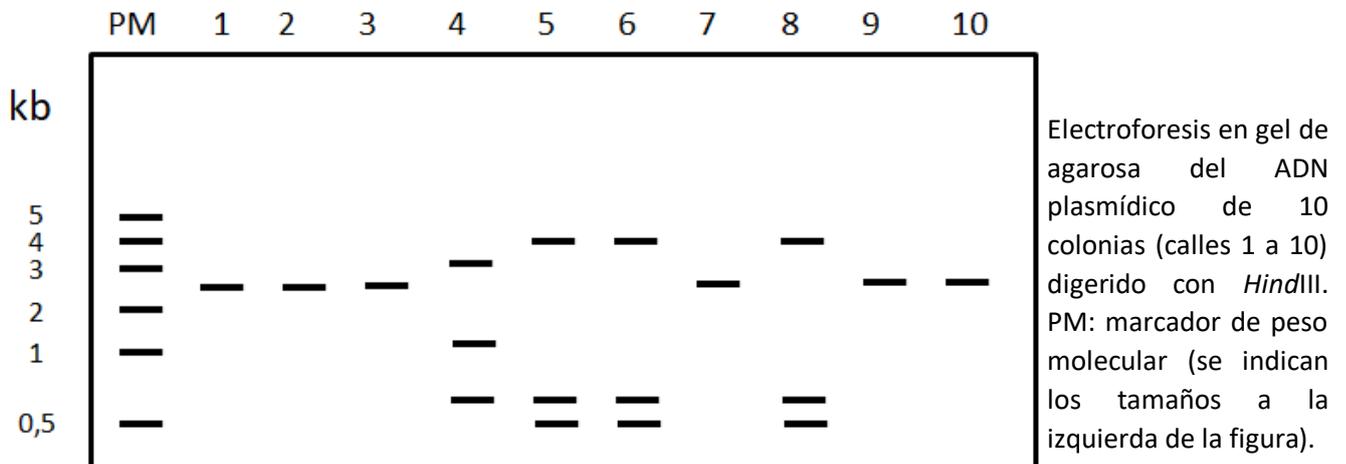
Problema 3

En un laboratorio se pretende expresar en *Escherichia coli* el ORF contenido en un fragmento *EcoRI-EcoRI* (ver esquema siguiente) en un plásmido pUC18 para lo cual se cuenta con el ADNc correspondiente:



Mapa del vector pUC18. El sitio de clonado múltiple indicado como MCS. El tamaño total del plásmido de 2.686 bp. El promotor Lac se encuentra en el mismo sentido que el gen *LacZ'*. *Lac R binding site*, corresponde al operador *lac (op)*.

La ligación se realiza entre el fragmento *EcoRI-EcoRI* y el pUC18 linealizado con *EcoRI* durante 3 hs a 16 °C. Con el producto de la ligación se transformaron células competentes JM109 que se plaquearon en medio LB conteniendo ampicilina, IPTG y X-gal. Se aislaron los plásmidos correspondientes a las colonias blancas. El ADN plasmídico de 10 colonias se trató con *HindIII*, y se separó en geles de agarosa conteniendo bromuro de etidio (ver esquema a continuación).



a) Para cumplir con el propósito de expresar la proteína. ¿por qué es necesario que el promotor y el ADNc estén en el mismo sentido?

b) Analizó los resultados obtenidos mostrados en la electroforesis. ¿Se obtuvo el clon que buscado?

c) ¿Qué modificación podrías hacer en la estrategia de clonado para favorecer la obtención de la construcción deseada? Considera que se conoce la secuencia de ADNc.

d) Para la transformación de las ligaciones se utilizó el siguiente protocolo

1. Se incubó en hielo durante 30 min la mezcla de bacterias competentes con el plásmido.
2. Los tubos fueron transferidos a un bloque térmico a 42 °C y se incubaron sin agitación durante 60 segundos.
3. Se transfirieron los tubos a hielo, manteniéndose durante 2 min.
4. Luego se agregaron a cada tubo 900 µl de medio LB líquido y se incubaron a 37 °C con agitación durante 1 hora.
5. Se plaquearon alícuotas de 100 µl de cada una de las muestras en placas de Petri conteniendo medio LB sólido con ampicilina.
6. Una vez secas, las placas se invirtieron y se incubaron en estufa a 37 °C durante toda la noche.

¿Cómo se vería afectada (sin cambios/aumenta/disminuye) la eficiencia de transformación si:

i) se incubara 20 segundos a 80 °C en el paso 2

ii) se omitiera el agregado de medio de cultivo del paso 4;

e) Si el promotor es el pLac, ¿Qué deberías agregar al medio de cultivo para maximizar la expresión? ¿Qué compuesto deberías evitar?