



Facultad de Química
Genética y Biología Molecular
Clave 1630

Tarjetas de Estudio de la UNIDAD 8 **PRINCIPIOS DE INGENIERÍA GENÉTICA**

Prof. Javier Plasencia de la Parra
Departamento de Bioquímica, Facultad de Química;
UNAM. Proyectos PAPIME PE201017 y PE206021



Tarjetas de Estudio de la Unidad 8

Las diapositivas de este archivo vienen organizadas en pares; la primera tiene una pregunta sobre algún concepto de la Unidad, para responder en formato de opción múltiple (una o varias opciones) o de relacionar columnas. La siguiente diapositiva tiene la respuesta, explicando el concepto, generalmente ilustrada con alguna imagen. Además, en la diapositiva de respuesta hay una pregunta adicional que ayudará a justificar y promoverá trabajo de investigación para reforzar el aprendizaje.

Al final de la presentación, está la clave de respuestas y una lista de fuentes de referencias.

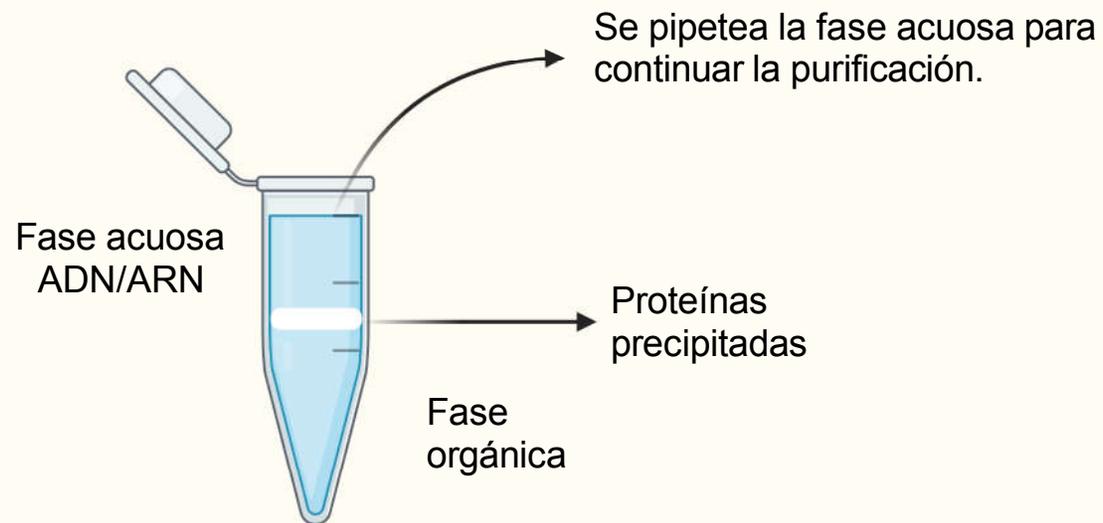
Recomendación: Abrir el archivo pdf en modo de pantalla completa.

1. En la extracción de ácidos nucleicos, ¿cuál es el objetivo de la adición de la mezcla fenol-cloroformo?

- A. Eliminar proteínas por precipitación/desnaturalización
- B. Eliminar proteínas por hidrólisis
- C. Precipitar a los ácidos nucleicos para separarlos por centrifugación
- D. Precipitar a la sal de los ácidos nucleicos para separarlos por centrifugación

En la extracción de ácidos nucleicos, se añade una mezcla de fenol / cloroformo al extracto celular y se agita para formar una emulsión.

La mezcla de estos solventes logra **precipitar proteínas** que permanecen en la interfase, una vez que se han separado las fases orgánica (inferior) y acuosa (superior).



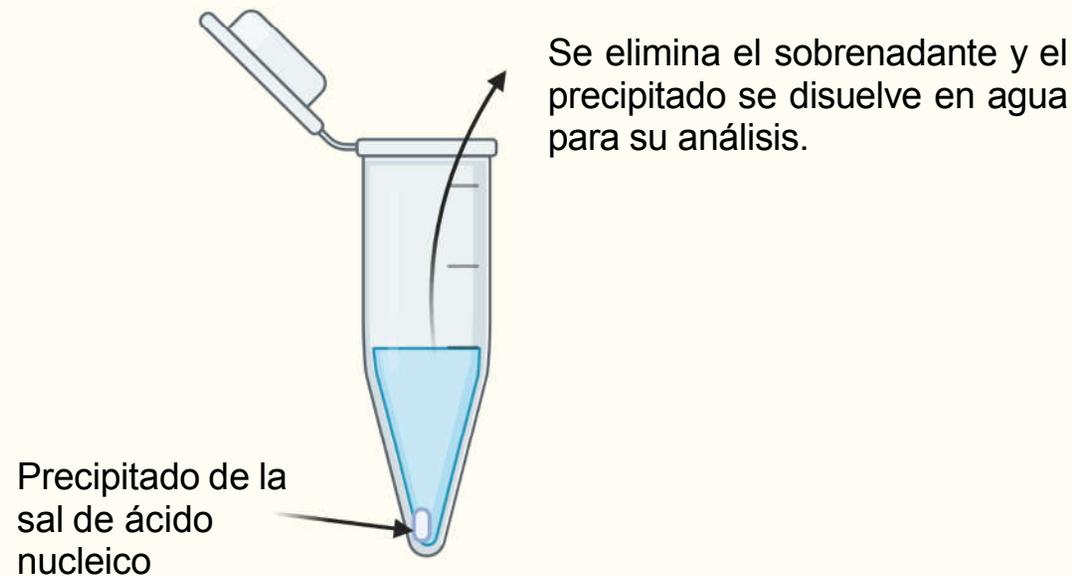
Este paso permite eliminar muchas proteínas de la preparación.

Mencione otras estrategias para purificar ácidos nucleicos

2. En la extracción de ácidos nucleicos, ¿cuál es el fundamento de la precipitación de éstos con algún alcohol?

- A. Eliminar proteínas por precipitación/desnaturalización
- B. Eliminar proteínas por hidrólisis
- C. Precipitar a los ácidos nucleicos para separarlos por centrifugación
- D. Precipitar a la sal de los ácidos nucleicos para separarlos por centrifugación

Para precipitar los ácidos nucleicos, se forma la **sal** de éstos por la adición de cloruro de sodio o acetato de sodio y se añade un alcohol, (**etanol o isopropanol**), para cambiar la constante dieléctrica del medio y en estas condiciones precipita la sal de ADN o ARN.

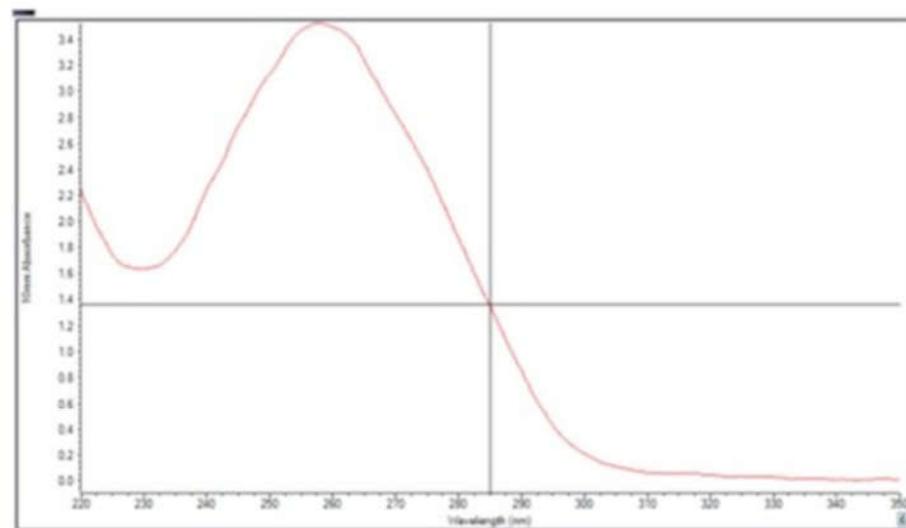


Si queremos purificar ADN, el ARN es un contaminante. ¿Cómo se puede eliminar de la preparación?

3. ¿Cuál es el fundamento de la determinación de ácidos nucleicos por espectrofotometría?

- A. Se aprovecha la propiedad de las bases de absorber luz UV a 260 nm
- B. Se aprovecha la propiedad de las pentosas de absorber luz UV a 260 nm
- C. Se aprovecha la propiedad de las bases de absorber luz UV a 280 nm
- D. Se aprovecha la propiedad de las bases de absorber luz UV a 260 nm y emitir a 280 nm

Las bases de los ácidos nucleicos (AN) absorben luz en el rango ultravioleta, con un máximo de absorbancia a $\lambda = 260 \text{ nm}$. También se mide la absorbancia a 280 nm, pues a esa longitud de onda, se determina el contenido de proteínas en la preparación.



Estimación de la concentración de AN por espectrofotometría:

$A_{260} = 1$ corresponde a concentración de 50 µg/mL

También se mide la relación de absorbancia:

A_{260}/A_{280} se espera que el valor de esta relación sea entre 1.8 y 2

4. ¿Cuál es el fundamento y el objetivo del análisis de ácidos nucleicos por electroforesis?

(Múltiples respuestas)

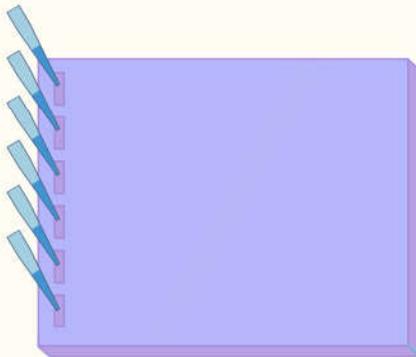
- A. Se tratan con un detergente para homogenizar la carga
- B. Se separan por migración hacia el ánodo, por su carga neta
- C. Se separan por migración hacia el cátodo, por su carga neta
- D. Permite estimar el tamaño y la integridad del fragmento de ADN

En la **electroforesis horizontal**, se separan los ácidos nucleicos en una matriz de **agarosa** (1–4%) al aplicar un campo eléctrico.

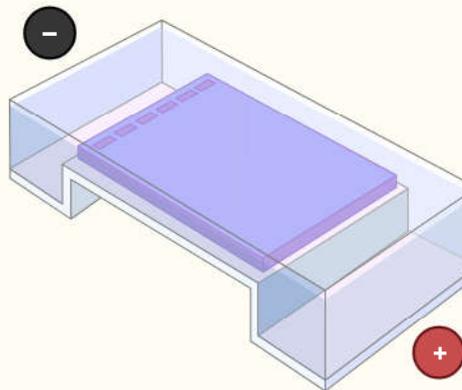
Los ácidos nucleicos migran al **ánodo (+)** pues tienen carga neta negativa. Para visualizar a los ácidos nucleicos se emplea **bromuro de etidio**, que se intercala entre las bases del ácido nucleico y forman complejos fluorescentes que se visualizan con luz ultravioleta.

Este análisis permite estimar el tamaño de las moléculas del ácido nucleico en ciertos rangos y también su integridad.

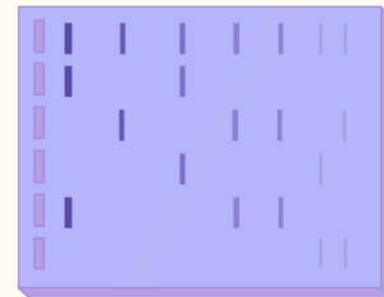
1 Se cargan las muestras en los pozos del gel



2 Se aplica corriente en la cámara de electroforesis



3 Se analiza el gel



Electroforesis en geles de agarosa

¿Qué medidas de seguridad se toman al manipular geles con bromuro de etidio?
¿Por qué?

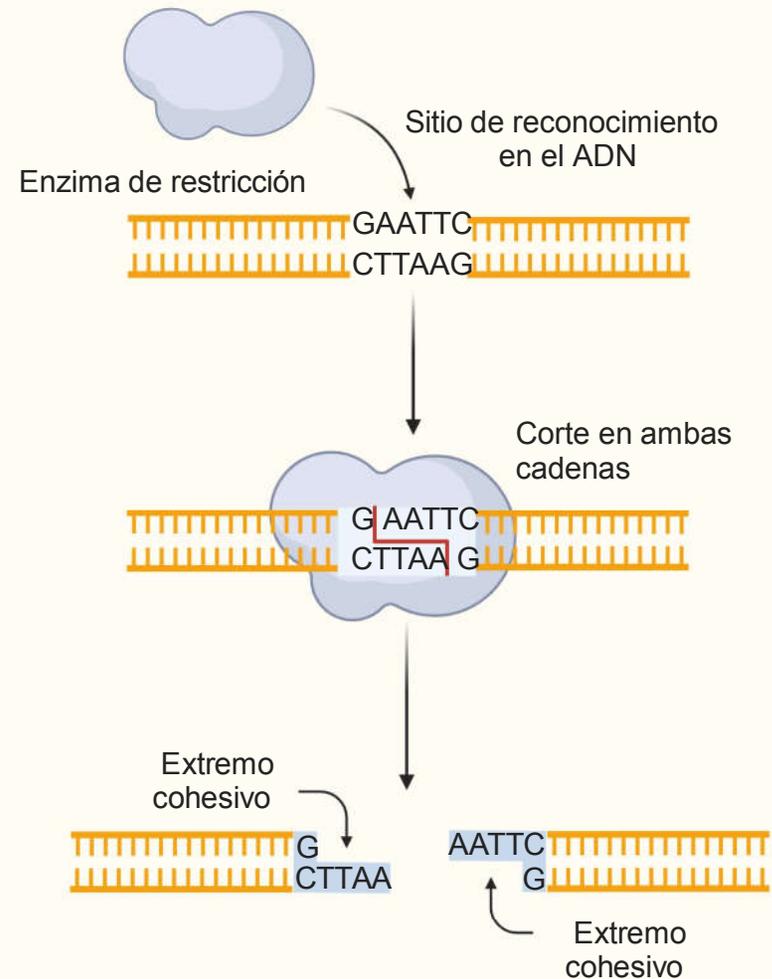
5. ¿Cuáles son las características de las enzimas de restricción que permiten su uso en Biología Molecular?

(Múltiples respuestas)

- A. Son endonucleasas que cortan en secuencias específicas de ADN
- B. Cortan las dos cadenas de la doble hélice de ADN
- C. Las secuencias reconocidas son palíndromes de 4, 6 ó 8 pares de bases
- D. Cortan solamente una de las cadenas de la doble hélice de ADN

- Las enzimas de restricción son **endonucleasas** sintetizadas por bacterias.
- Reconocen **secuencias específicas** en el ADN que funcionan como puntos de corte.
- Las secuencias reconocidas tienen la característica de ser **palíndromes de 4; 6 o 8 pares de bases**.
- Como muchas enzimas de restricción realizan **cortes asimétricos**, dejan **extremos cohesivos** en el ADN, lo que facilita su unión con otra molécula para formar secuencias quiméricas.
- La posibilidad de formar secuencias quiméricas constituye el principio de la ingeniería genética en Biología Molecular.

Reconocimiento de una secuencia palindrómica y corte por una enzima de restricción.



¿Cuál es la función de las enzimas de restricción en las bacterias que las producen?

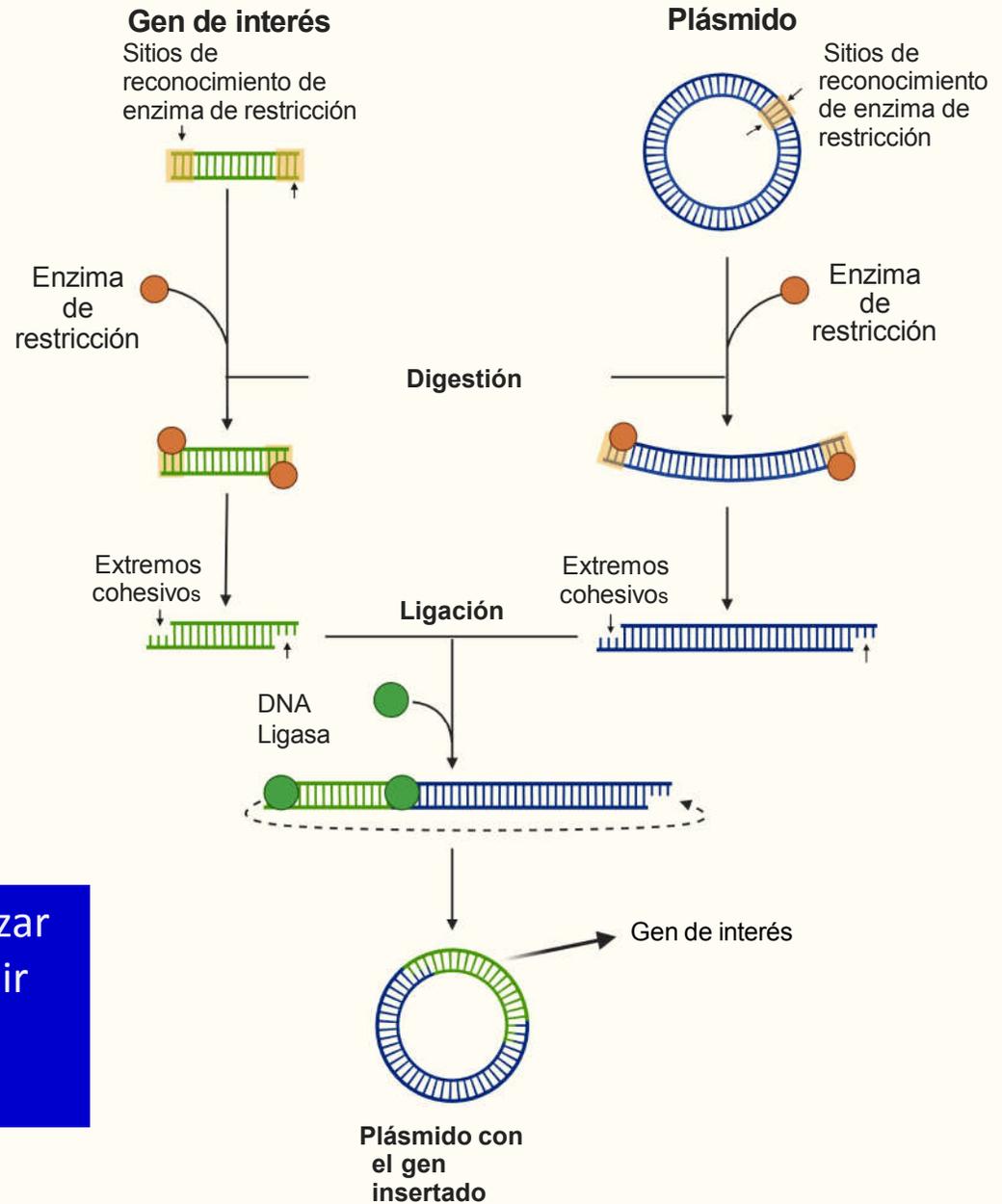
¿Qué significa el término "*clonación*" en Biología Molecular y por qué se hace?

(Múltiples Respuestas)

- A. Se refiere al aislamiento de un fragmento de ADN y su inserción en un vector, como un plásmido
- B. Se refiere al aislamiento de un fragmento de ARN y su inserción en un vector, como un plásmido
- C. El ADN clonado en el vector se puede propagar para obtener, por ejemplo, su secuencia
- D. Se refiere al aislamiento de un fragmento de ADN y tratarlo químicamente para obtener su secuencia

En Biología Molecular, “clonación” se refiere al aislamiento de un fragmento de ADN, que puede ser un gen, ADNc, etc. e **insertarlo** en un **vector de clonación**. El proceso es posible cuando ambas moléculas (fragmento de ADN y vector de clonación) han sido cortadas con la misma enzima de restricción y tienen extremos compatibles.

¿Qué tipo de análisis se debe realizar en la secuencia a clonar para definir la(s) enzima(s) de restricción y plásmido que se emplearán?

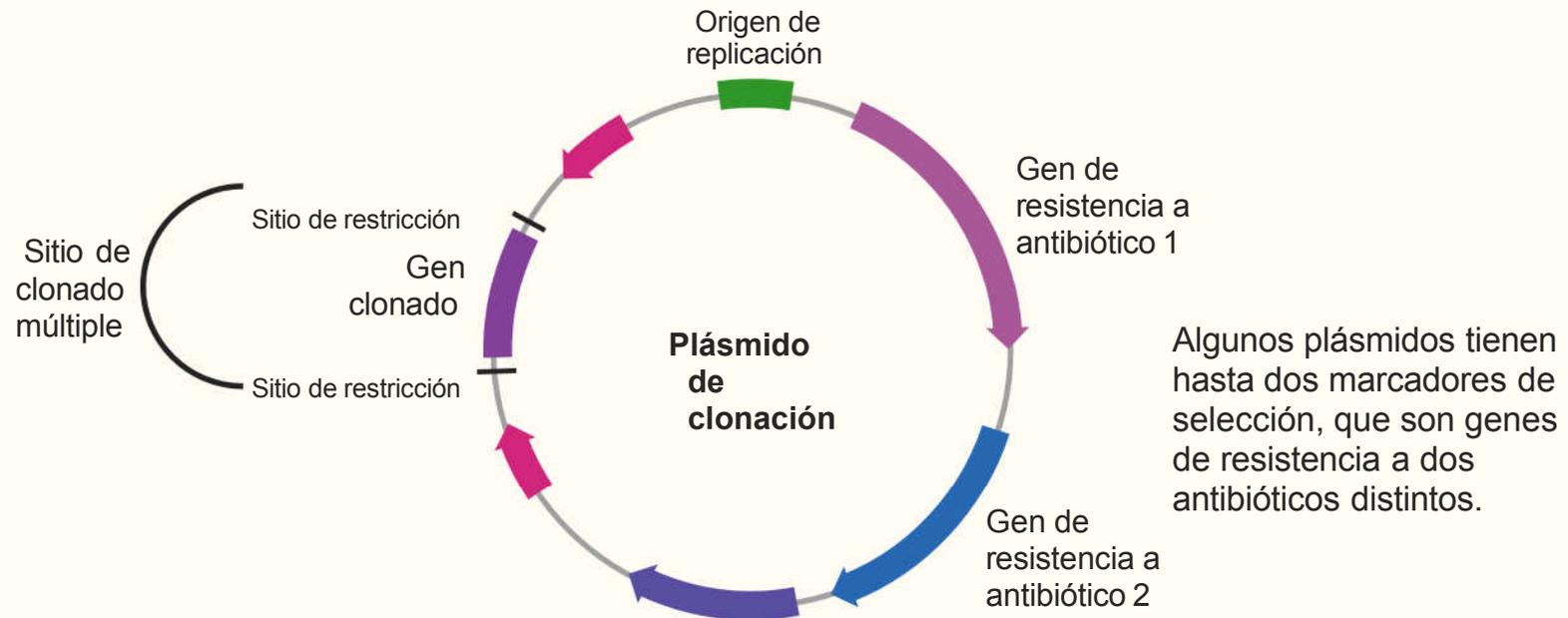


7. ¿Qué características debe tener un plásmido para funcionar como vector de clonación?

- A. Debe tener un origen de replicación y un sitio de clonado múltiple
- B. Debe tener un origen de replicación, un sitio de clonado múltiple y un marcador de selección
- C. Debe tener un sitio de clonado múltiple y un marcador de selección
- D. Debe tener al menos dos sitios de corte para la misma enzima de restricción, uno en el sitio de clonado múltiple y otro en el origen de replicación

Las secuencias mínimas que requiere un plásmido para funcionar como vector de clonación son:

- 1) **origen de replicación** que permite su propagación en la célula que lo contiene.
- 2) un **gen de resistencia a antibiótico** que permite realizar la selección fenotípica de células que contienen el plásmido.
- 3) un **sitio de clonado múltiple** que contiene las secuencias de reconocimiento de varias enzimas de restricción, que permiten la inserción del fragmento de DNA.



Distintos plásmidos pueden tener otras secuencias y genes, dependiendo de su aplicación, pero estas tres son las mínimas requeridas para su función como vectores de clonación.

¿Qué aplicación tendría un plásmido con dos genes marcadores de selección?

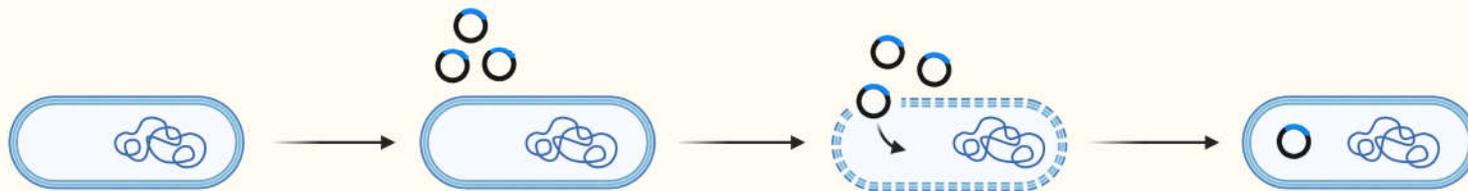
8. ¿En qué consiste la transformación de un organismo y qué aplicaciones tiene en Biología Molecular?

(Múltiples Respuestas)

- A. Consiste en la introducción de un fragmento de ADN exógeno que contiene uno o más genes
- B. El organismo transformado adquiere una característica fenotípica nueva
- C. Un aplicación es la producción de fármacos biotecnológicos en bacterias
- D. Consiste en una cruce entre dos cepas bacterianas mediada por la formación de un pilus

La transformación consiste en la introducción de un **fragmento de ADN exógeno** (uno o más genes) a una célula o un organismo, generalmente contenido en un plásmido, que permite la expresión del gen.

La transformación permite la adquisición de información genética del organismo receptor y, por lo tanto, características fenotípicas novedosas.



Una cepa de una bacteria se trata algún agente químico como cloruro de calcio (CaCl_2), lo que hace más permeable su pared celular y membrana.

Se incuba en presencia del plásmido, que penetra a la célula. Se aplica un choque térmico (42°C) para facilitar la transformación.

La bacteria adquiere el plásmido y la información genética que contiene. Por ejemplo, la resistencia a un antibiótico.

Otra técnica para transformar bacterias es la electroporación, ¿en qué consiste?

9. ¿Cómo se construye una biblioteca genómica y cuál es su uso?

(Múltiples Respuestas)

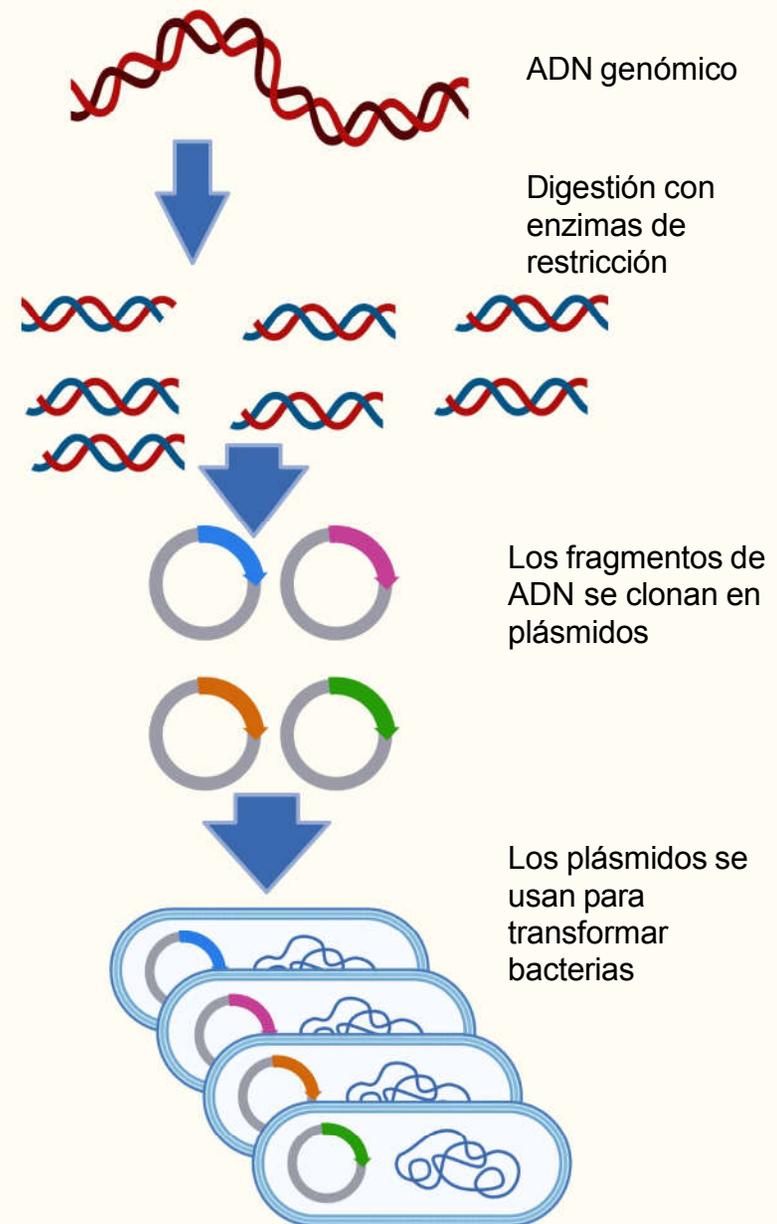
- A. Se parte de ARN mensajero total que es convertido a ADNc por una transcriptasa reversa
- B. Se parte de ADN genómico que es tratado con enzimas de restricción
- C. Representa todos los genes y secuencias intergénicas de un organismo
- D. Representa los genes expresados en el momento en que se extrajo el ARN mensajero

Una **biblioteca genómica** se construye a partir de ADN genómico, que es tratado con **enzimas de restricción**. Los fragmentos resultantes pueden contener uno o más genes y se **clonan en un vector**, que luego es usado para **transformar** bacterias.

La biblioteca tiene representado al genoma completo de un organismo y se ha empleado para el análisis de genes individuales y la secuenciación completa de los genomas.

Nota: también se le conoce como banco genómico.

Para construir bancos genómicos se han empleado vectores denominados Cromosoma artificial (de bacteria o levadura) ¿Qué son estos?



10. ¿Cómo se construye una biblioteca de ADN complementario (ADNc)?

(Múltiples Respuestas)

- A. Se parte de ARN mensajero total que es convertido a ADNc por una transcriptasa reversa
- B. Se parte de ADN genómico que es tratado con enzimas de restricción
- C. Representa todos los genes y secuencia intergénicas de un organismo
- D. Representa los genes expresados en el momento en que se extrajo el ARN mensajero

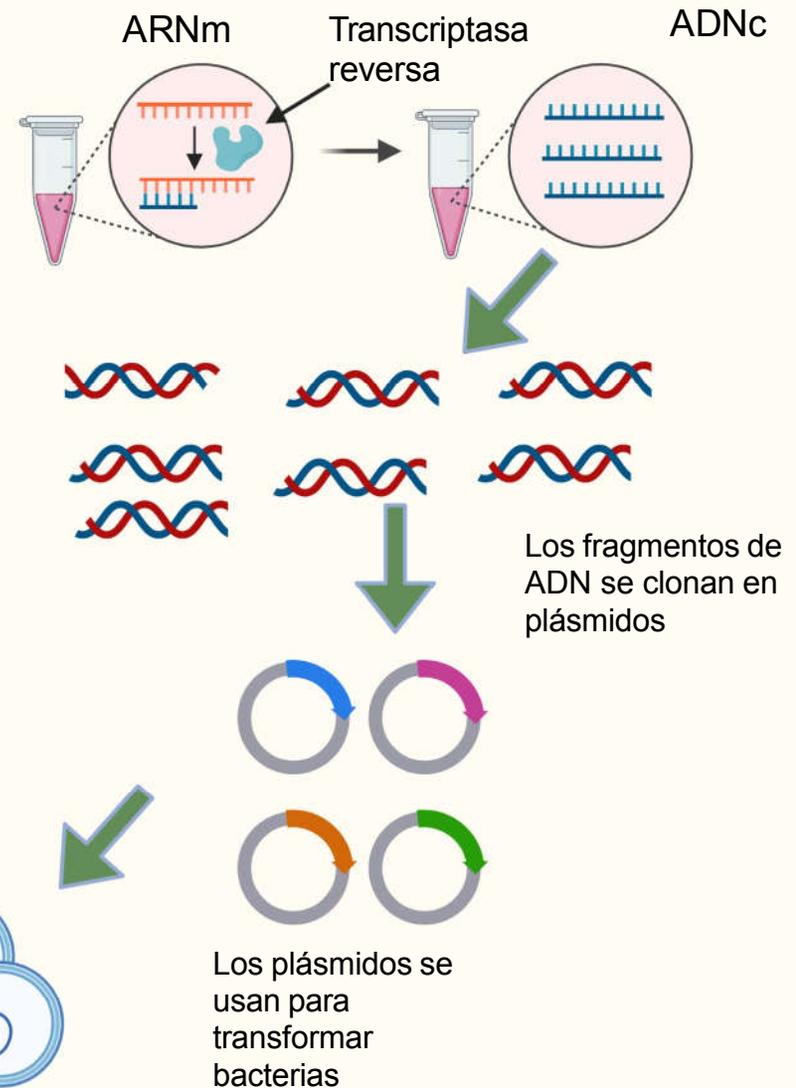
Una biblioteca de **ADN complementario** se construye a partir de **ARN mensajero** que es convertido a ADNc por acción de una **transcriptasa reversa**.

Una ADN polimerasa sintetiza la cadena complementaria.

Las secuencias de ADN de doble cadena son clonados en un vector, que se usa para transformar bacterias.

La biblioteca de ADNc representa los **genes expresados** en un tejido, en una condición particular, y representa la base para estudios funcionales.

¿Por qué se debe convertir el ARN a ADN complementario?

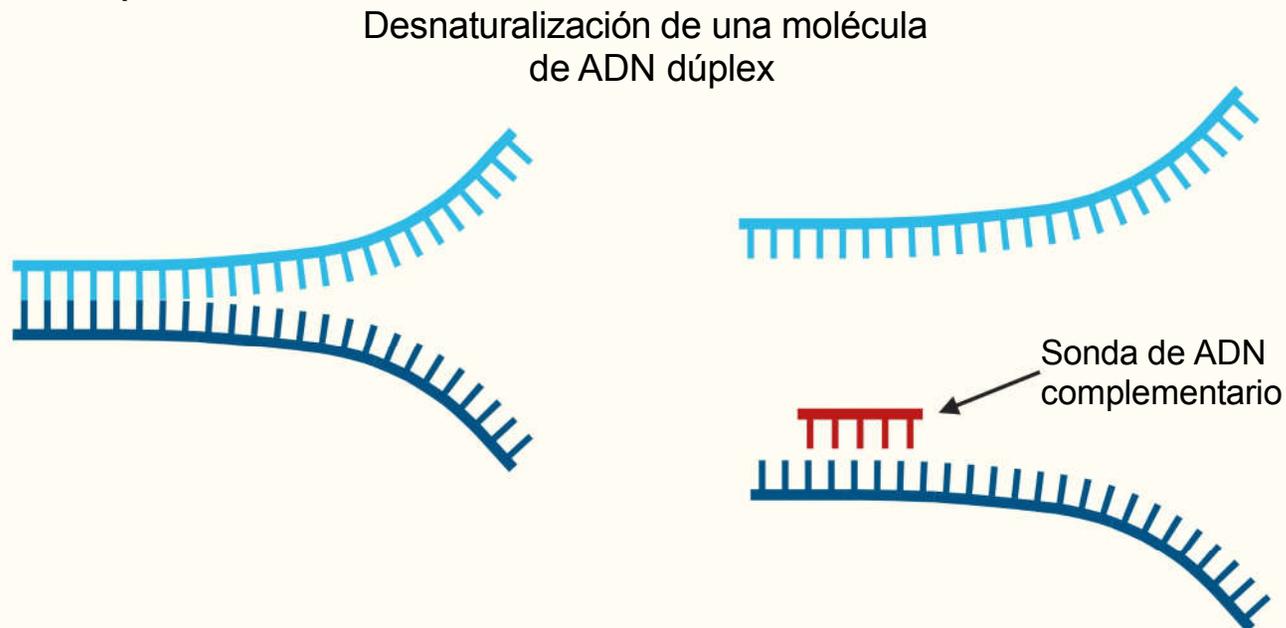


11. ¿Cuál es el fundamento de las técnicas de hibridación para la detección de ácidos nucleicos?

- A. Solamente es posible entre dos moléculas de ADN
- B. Solamente es posible entre una molécula de ADN y una de ARN
- C. Solamente es posible entre dos moléculas de ARN
- D. Se basa en la complementaridad de bases entre dos moléculas de ácidos nucleicos

Las **técnicas de hibridación** se fundamentan en la propiedad que tienen los ácidos nucleicos de asociarse por **complementaridad de bases** con otra molécula de secuencia conocida que se emplea como **sonda**.

Para la detección de una molécula de ADN, ésta se debe desnaturalizar primero (por incremento de temperatura o de pH) para tener las dos hebras separadas.



¿En qué rango de temperaturas se realizan este tipo de experimentos?

12. ¿Qué se detecta en las técnicas de blotting (*Southern, Northern & Western*) de biomoléculas y cuál es su aplicación?

(Relacionar columnas)

- A. Northern blot
- B. Southern blot
- C. Western blot

- I. Detecta genes en el ADN
- II. Detecta genes que se expresan
- III. Emplea un anticuerpo como sonda de detección
- IV. Emplea una molécula de ADN de cadena sencilla como sonda de detección
- V. Detecta proteínas celulares

Las técnicas de **blotting** de macromoléculas se nombran de acuerdo al tipo de molécula que se analiza.

	Southern Blot	Northern Blot	Western Blot
Molécula inmovilizada en la membrana	ADN cortado con enzimas de restricción	ARN celular separado por electroforesis	proteínas celulares separadas por electroforesis
Sonda	ADN de cadena sencilla marcado con una sonda	ADN de cadena sencilla marcado con una sonda	Anticuerpo específico vs. una proteína
Aplicación	Determinar la presencia de un gen o fragmento de éste	Determinar los niveles de un ARNmensajero o un microARN	Determinar los niveles de una proteína

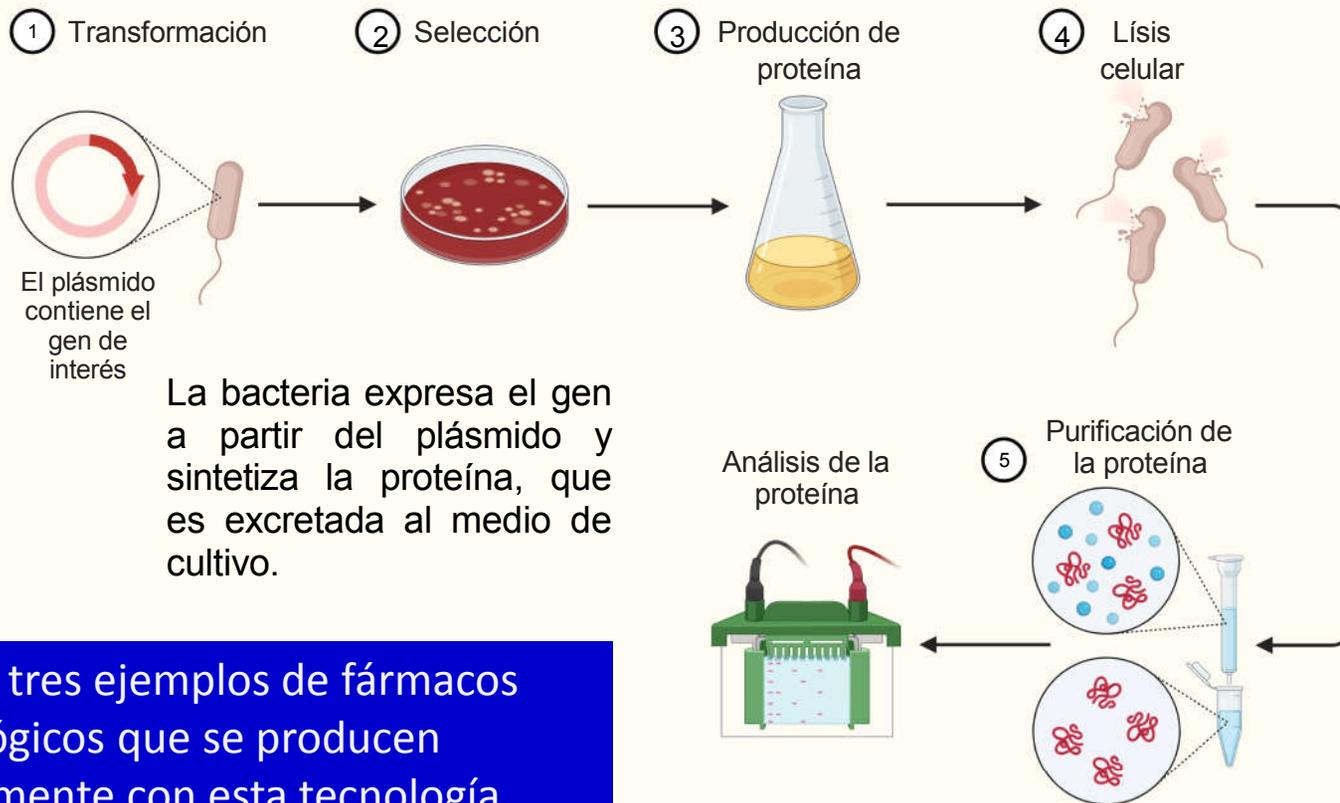
¿Cuál es el origen del nombre de estas técnicas?

13. ¿Cuáles son los pasos generales para poder expresar un gen eucarionte en bacterias?

(Múltiples Respuestas)

- A. Aislar el ARN mensajero del gen y convertirlo a ADNc
- B. Clonar el ADNc en un vector, como un plásmido, para transformar a la bacteria
- C. Aislar el ADN que corresponda al gen y clonarlo en un vector, como un plásmido, para transformar a la bacteria

Debido a que las bacterias no pueden procesar intrones de los genes eucariontes, se debe partir de **ARNm mensajero** y sintetizar **ADNc**, que es clonado en un plásmido para transformar una bacteria.



Mencione tres ejemplos de fármacos biotecnológicos que se producen comercialmente con esta tecnología.

14. ¿Cuáles son los principales obstáculos para transformar células vegetales y qué técnicas se emplean?

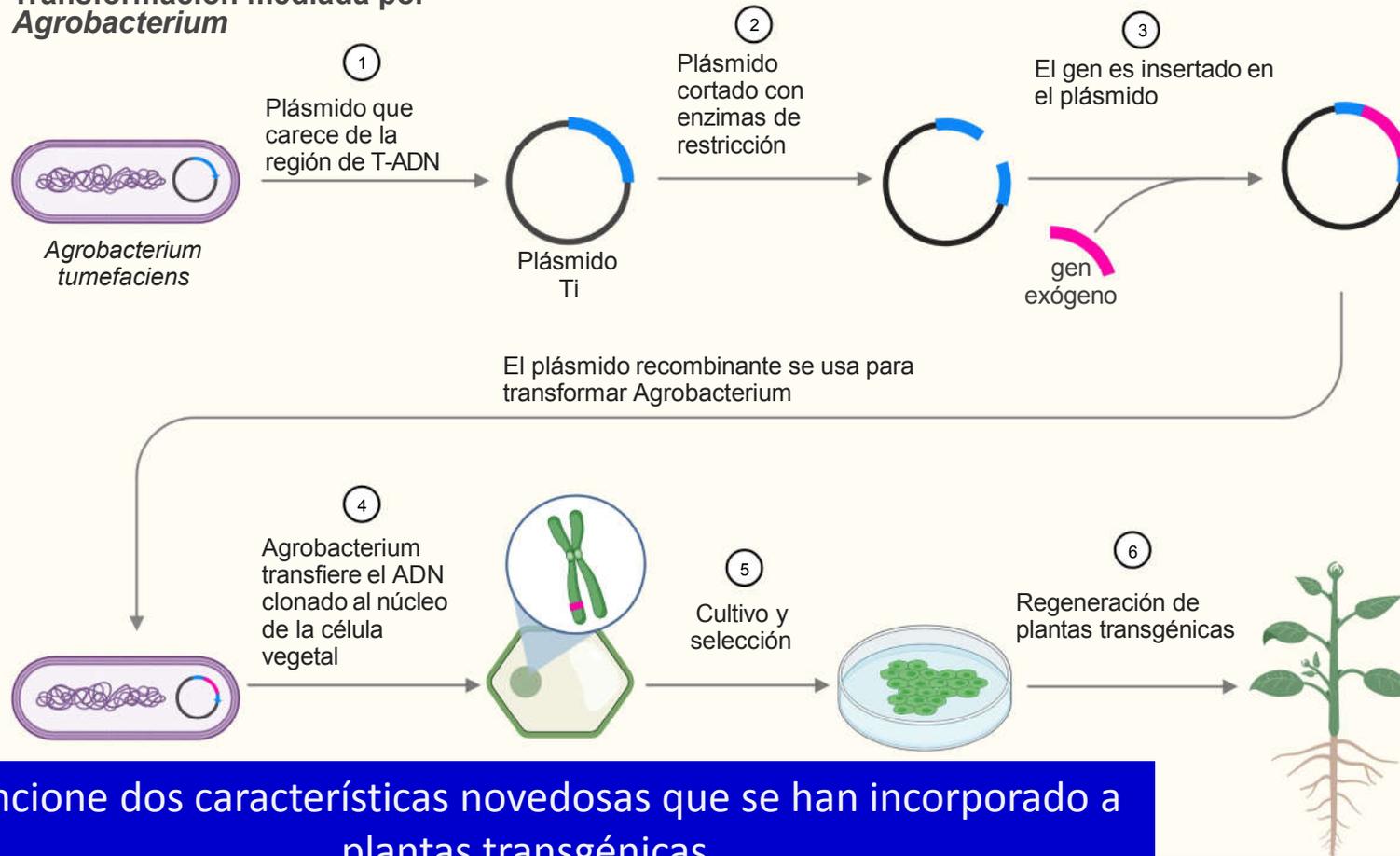
(Múltiples Respuestas)

- A. Biobalística y el empleo de *Agrobacterium tumefaciens*
- B. Generar células competentes con cloruro de calcio
- C. La presencia de la clorofila
- D. La presencia de la pared celular

Una barrera en la transformación de células de plantas es la presencia de la **pared celular**. Las dos estrategias que se han empleado para la transformación son:

- 1) El uso de la bacteria ***Agrobacterium tumefaciens***, que es capaz de transferir el ADN clonado en un plásmido.
- 2) La **biobalística**, en la que partículas recubiertas con ADN son bombardeadas a los tejidos de la planta.

Transformación mediada por *Agrobacterium*



Mencione dos características novedosas que se han incorporado a plantas transgénicas

15. ¿Qué es CRISPR-Cas y cuál es su aplicación?

(Múltiples Respuestas)

- A. Es un mecanismo de defensa innato contra fagos en bacterias
- B. Es un mecanismo de defensa adaptativo contra fagos en bacterias
- C. Una aplicación es la generación de una mutación en una posición específica dentro del genoma
- D. Una aplicación es la corrección de una mutación por la secuencia silvestre en el genoma

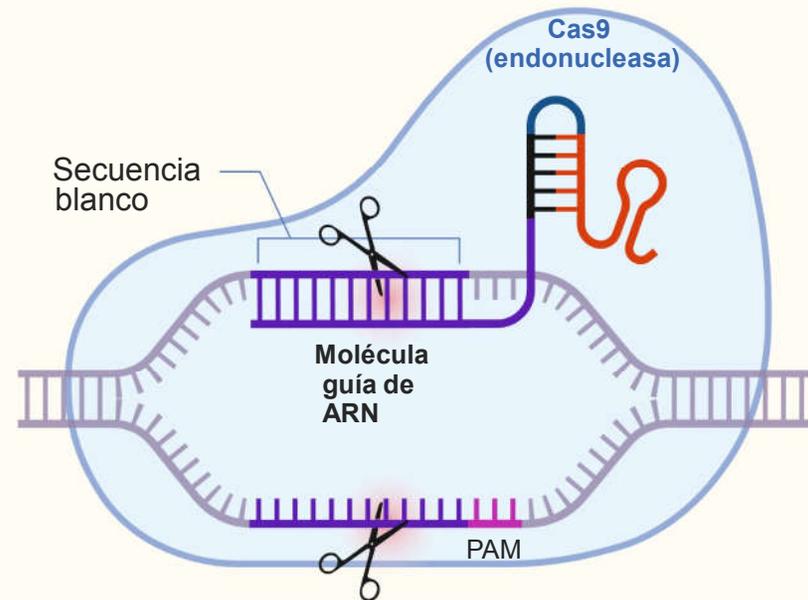
CRISPR-Cas es una terminología derivada de la aplicación del **mecanismo de defensa de bacterias contra infecciones por bacteriófagos**.

El termino CRISPR es el acrónimo del nombre completo del mecanismo (en inglés): **Clustered Regularly -Interspaced Short Palindromic Repeats**.

Cas es una **endonucleasa** que **actúa sobre el ADN** siguiendo una **molécula guía de ARN** que **determina la especificidad de la ruptura en la secuencia**.

Esta tecnología permite realizar la edición de genomas de manera dirigida y muy específica, permitiendo:

- Mutar un gen en una base específica.
- Corregir una mutación incorporando el gen silvestre.



¿Se ha empleado esta técnica para el tratamiento de alguna enfermedad en humanos?

Clave de Respuestas:

Pregunta	Respuesta
1	A
2	D
3	A
4	B, D
5	A, B, C
6	A, C
7	B
8	A, B, C
9	B, C
10	A, D

Pregunta	Respuesta
11	D
12	A: II y IV B: I y IV C: III y V
13	A, B
14	A, D
15	B, C, D

Referencias:

- Bergtrom, G. **Basic Cell and Molecular Biology**. UWM Digital Commons. (2018).
- Brooker, R.J. **Genetics: Analysis and Principles**. 4th. Ed. McGraw Hill. (2012).
- Griffiths; A.J.F., Gelbart, W.M., Miller, J.H., Lewontin, R.C. **An Introduction to Genetic Analysis**. 8th. Freeman Publishers. (2005).
- Krebbs, J.E., Goldstein, E.S., Kilpatrick, S.T. **Lewin's Essential Genes**. 3th. Ed. Jones & Bartlett Learning. (2013).
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Martina, K.C., Yaffe, M., Amon, A. **Molecular Cell Biology**. 9th. Ed. Freeman Publishers. (2021).
- McLennan, A., Bates, A., Turner, P., White, M. Bios. **Notas Instantáneas de Biología Molecular**. 4ta. Ed. Mc. Graw Hill Ed. (2013).

Agradecimientos



Proyecto PAPIME PE201017: Enseñanza interactiva mediante el empleo de las TIC's para la asignatura Genética y Biología Molecular.

Proyecto PAPIME PE206021: Elaboración de material para promover el aprendizaje activo de asignaturas de Bioquímica y Biología Molecular en la Facultad de Química.



Figuras elaboradas con
Biorender.com

