



Bautista Acevedo Marco Antonio
Bernal Enríquez Oscar
Centeno Cruz Federico

Hernández Carbajal Luz Angélica
Luna Román Celso Miguel
Martínez Ortiz Leticia

Mejía García Martha Elvira
Ramírez Aguilar Eva Cristina
Serrano Reyes Gabriela

El ATC del Genoma

Estrategias Didácticas de Biología Molecular
para el Bachillerato Universitario



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Dr. Enrique Graue Wiechers
Rector

Dr. Leonardo Lomelí Vanegas
Secretario General

Dra. Mónica González Contró
Abogada General

Dr. Luis Álvarez Icaza Longoria
Secretario Administrativo

Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa
Secretario de Desarrollo Institucional

Lic. Raúl Arcenio Aguilar Tamayo
Secretario de Prevención, Atención y Seguridad Universitaria

Mtro. Néstor Martínez Cristo
Director General de Comunicación Social

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

Dr. Benjamín Barajas Sánchez
Director General

Plantel Oriente

Lic. Víctor Efraín Peralta Terrazas
Director

Biól. Marco Antonio Bautista Acevedo
Secretario General

Mtra. Gloria Caporal Campos
Secretaria Académica

Lic. Mario Guillermo Estrada Hernández
Secretario Administrativo

I.Q. Adolfo Portilla González
Secretario Docente

Lic. Norma Cervantes Arias
Secretaría de Administración Escolar

Ing. Humberto Zendejo Sánchez
Secretario de Asuntos Estudiantiles

El ATC del Genoma

Estrategias Didácticas de Biología Molecular para el Bachillerato Universitario

es una publicación editada por el Colegio de Ciencias y Humanidades
Plantel Oriente.



Bautista Acevedo Marco Antonio
Bernal Enríquez Oscar
Centeno Cruz Federico

Hernández Carbajal Luz Angélica
Luna Román Celso Miguel
Martínez Ortiz Leticia

Mejía García Martha Elvira
Ramírez Aguilar Eva Cristina
Serrano Reyes Gabriela

El ATC del Genoma

Estrategias Didácticas de Biología Molecular
para el Bachillerato Universitario



Esta publicación tiene fines didácticos y de investigación científica
acorde con lo establecido en el artículo 148 y análogos de
la Ley Federal del Derecho de Autor.

Este libro fue dictaminado favorablemente por el Comité Editorial
del Colegio de Ciencias y Humanidades.

Primera edición: 6 de noviembre de 2020.

D.R. © 2020 UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Ciudad Universitaria, Alcaldía Coyoacán, CP 04510, México, Cd. Mx.
Colegio de Ciencias y Humanidades, Plantel Oriente
Teléfono: 55 5773 6317.

Esta edición y sus características son propiedad de la
Universidad Nacional Autónoma de México.
Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio
sin la autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales.

Hecho en México.



ÍNDICE

BIOLOGÍA I

Presentación	9
Indicaciones para su utilización	10
Propósitos	11
Presentación de contenidos	12
Biología I	12
Biología II	14
Sugerencias de evaluación	16
Literatura consultada	17
El DNA, la llave de la realidad	19
Apertura	
Cuestionario diagnóstico	21
Actividad 1. "Recordando conceptos básicos"	21
Desarrollo	
Lectura. "DNA: molécula sencilla e interesante"	22
Actividad 2. Identificando los componentes del DNA	24
Lectura. "Utilizando el DNA no codificante"	25
Actividad 3. Sismo que sacudió a la Ciudad de México en septiembre de 2017	27
Cierre	
Actividad experimental. Extracción de DNA	29
Literatura consultada	
Anexo 1.1 Apertura. Cuestionario diagnóstico	30
Anexo 1.2 Actividad 1. "Recordando conceptos básicos"	31
Anexo 1.3 Recortable del DNA	32
Anexo 1.4 Actividad 2. Identificando los componentes del DNA	37
Anexo 1.5 Actividad 3. Sismo que sacudió a la Ciudad de México en septiembre de 2017	38
Anexo 1.6 Preparación de soluciones	40
Anexo 1.7 Actividad experimental. Extracción de DNA	41
Síntesis de proteínas. Life S.A. de C.V.	42
Apertura	
Cuestionario RA-P-RP	44
Desarrollo	
Exposición teórica. "De genes a proteínas"	44
Actividad 1. Construyendo una proteína (kit)	53
Actividad 2. Cuestionario y tabla	53
Exposición teórica. "De genes a proteínas fluorescentes"	53
Actividad experimental. Transformación bacteriana con pGLO	56
Actividad 3. Expresión del plásmido pGLO en bacterias	60

Cierre	
Actividad 4. Lectura “Osamu Shimomura y la medusa de cristal”	60
Cuestionario RA-P-RP	60
Anexo 2.1 Apertura. Cuestionario RA-P-RP	62
Anexo 2.2 Actividad 1. Construyendo una proteína (kit)	63
Anexo 2.3 Actividad 2. Cuestionario y tabla	73
Anexo 2.4 Preparación de soluciones y material microbiológico	75
Anexo 2.5 Actividad 3. Expresión de plásmido pGlo en bacterias	78
¿Qué es mejor unas tijerotas o miles de tijeritas?	79
Apertura	
Diagnóstico Sesión Buzz	81
Desarrollo	
Exposición teórica. “Recuerdas... ¿Qué son las enzimas y que función cumplen?”	82
Actividad 1. Video “¿Cómo trabajan las enzimas?”	86
Actividad experimental. “Reacción enzimática de la amilasa humana y amilasa bacteriana, aplicación de la biotecnología”	86
Cierre	
Actividad 2. Retoma la Sesión Buzz	88
Actividad 3. Técnica ABP “Dulces bacterias”	88
Literatura consultada	89
Anexo 3.1 Diagnóstico Sesión Buzz	90
Anexo 3.2 Actividad 1. Video “¿Cómo trabajan las enzimas?”	92
Anexo 3.3 Actividad experimental. Reacción enzimática de la amilasa humana y amilasa bacteriana, aplicación de la biotecnología	93
Anexo 3.3.1 Identificación cualitativa de glucosa	94
Anexo 3.3.2 Identificación cuantitativa de glucosa	95
Anexo 3.4 ABP “Dulces bacterias”	96
Primero ctrl+C y después ctrl+V, ctrl+V, ctrl+V...	98
Apertura	
Cuestionario diagnóstico	100
Desarrollo	
Lectura. “Génesis: La Replicación del DNA”	100
Actividad 1. Identificando la maquinaria de replicación	102
Lectura. “El origen inusual de la PCR”	102
Actividad 2. Discusión en plenaria	104
Lectura. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la técnica	105
Actividad 3. Etapas de la PCR	108
Actividad 4. Amplificando el DNA (kit)	108
Cierre	
Actividad experimental. Amplificación de DNA por PCR	109

Literatura consultada	111
Anexo 4.1 Cuestionario diagnóstico	112
Anexo 4.2 Actividad 1. Identifica la maquinaria de replicación	113
Anexo 4.3 Actividad 2. Amplificando el DNA (kit)	114
Anexo 4.4 Actividad experimental. Amplificación de DNA por PCR	117
Tijeras para cortar, pegar y diseñar moléculas de DNA	119
Apertura	
Cuestionario RA-P-RP	121
Lectura “Las enzimas de restricción un regalo para la biología molecular”	121
Desarrollo	
Exposición teórica. “Qué son las enzimas de restricción”	123
Actividad 1. “Cortando el DNA con diferentes tijeras”	129
Actividad 2. “Cortando DNA circular”	130
Actividad 3. “Visualizando fragmentos de DNA”	130
Actividad experimental. Enzimas de restricción	131
Cierre	
Actividad de cierre	133
Cuestionario RA-P-RP	133
Literatura consultada	133
Anexo 5.1 Apertura. Cuestionario RA-P-RP	134
Anexo 5.2 Actividad 1 “Cortando el DNA con diferentes tijeras”	135
Anexo 5.2.1 Cuestionario	136
Anexo 5.3 Actividad 2. “Cortando DNA circular”	137
Anexo 5.4 Actividad 3. “Visualizando fragmentos de DNA”	138
Anexo 5.5 Actividad de cierre	139
¿Quién es el culpable?	141
Apertura	
Actividad 1. Problema ¿Quién es el culpable?	143
Desarrollo	
Actividad 2. “Del peritaje al culpable”	144
Cierre	
Actividad de cierre	144
Literatura consultada	145
Anexo 6.1 Evidencias de la escena del crimen	146
Anexo 6.2 Actividad de cierre	158
¿Prohibido manipular?	159
Apertura	
Cuestionario diagnóstico	161
Desarrollo	
Lectura. “La bioética y el Proyecto Genoma Humano”	162
Actividad 1. Organizador gráfico	164
Lectura. “Cuestiones éticas de la ingeniería genética”	164

Actividad 2. Reflexión y cuestionario	164
Lectura. “Entrevista a Matthew Liao”	165
Actividad 3. Reflexión y cuestionario	167
Cierre	
Estudio de caso. “El paradigma genético: medicina predictiva”	167
Literatura consultada	169
Anexo 7.1 “Cuestiones éticas de la ingeniería genética”. Reflexión y cuestionario	170
Anexo 7.2 “Entrevista a Matthew Liao”. Reflexión y cuestionario	171
 BIOLOGÍA II	
Evidencias de la evolución. El DNA me respalda	173
Apertura	
Cuestionario RA-P-RP	175
Desarrollo	
Exposición teórica. “Nuevas evidencias de la evolución”	175
Actividad experimental. “Uno para todos”	176
Exposición teórica. “Especies vemos, relaciones no sabemos”	182
Actividad 1. “Manos a la secuencia”	183
Cierre	
Actividad 2: “The DNA Journey”	184
Literatura consultada	185
Anexo 8.1 Apertura. Cuestionario RA-P-RP	186
Anexo 8.2 Actividad experimental. “Preparación de soluciones”	187
Anexo 8.3 Actividad experimental. “Uno para todos”	188
Anexo 8.3.1 Actividad experimental. Cuestionario	189
Anexo 8.4 Actividad 1. “Manos a la secuencia”	191
Anexo 8.4.1 Recortable	193
Anexo 8.5 Actividad 2. “The DNA journey”	195
¡Viva la resistencia!... eso dicen las bacterias	196
Apertura	
Cuestionario RA-P-RP	198
Desarrollo	
Actividad 1. Lectura “Osamu Shimomura y la medusa de cristal” y cuestionario	198
Exposición teórica. “Resistencia a antibióticos y Selección Natural”	198
Actividad 2. “The evolution of bacteria on a Mega-Plate Petri Dish”	200
Actividad 3. “Obtención de plásmido”	200
Cierre	
Actividad Experimental. “Resistencia a antibióticos en bacterias transformadas”	202
Cuestionario RA-P-RP	
Literatura consultada	205
Anexo 9.1 Cuestionario RA-P-RP	206
Anexo 9.2 Cuestionario Lectura “Osamu Shimomura y la medusa de cristal”	207

Anexo 9.3 Actividad 1 “The evolution of bacteria on a Mega-Plate Petri Dish”	208
Anexo 9.4 Recortable. Plásmido bacteriano	209
Anexo 9.5 Actividad experimental. Resistencia a antibióticos en bacterias transformadas”	211
El pariente más cercano	213
Apertura	
Cuestionario RA-P-RP	215
Desarrollo	
Actividad 1. “Creación de árboles filogenéticos a partir de secuencias de DNA”	215
Lectura. Construcción de árboles filogenéticos. ¿Relaciones de parentesco?	215
Actividad 2. Alineación de secuencias con herramientas de bioinformática (MUSCLE)	217
Cierre	
Actividad 3. Obtención de un árbol filogenético y análisis	220
Cuestionario RA-P-RP	220
Literatura consultada	
Anexo 10.1 Cuestionario RA-P-RP	222
Anexo 10.2 Actividad 1. “Creación de árboles filogenéticos a partir de secuencias de DNA”	223
Anexo 10.3 Actividad 3. Obtención de un árbol filogenético y análisis	225



PRESENTACIÓN

PAQUETE DIDÁCTICO¹

El rápido progreso, avance y aplicaciones potenciales de la bioquímica y la biología molecular tiene profundas implicaciones no sólo en el conocimiento científico, sino también en nuestra prosperidad como especie. La sociedad actual se está beneficiando de avances y nuevos desarrollos en la farmacología, nuevas herramientas diagnósticas y tratamientos, pero subyace algo muy importante, las implicaciones éticas en algunos procesos, como la producción de alimentos, los perfiles genéticos, las técnicas forenses, entre otras (Lucumi, 2015). Por lo anterior, la inclusión de aprendizajes relacionados con las temáticas de la biología molecular dentro de los programas de Biología I y II del Plan de Estudios Actualizado del CCH (2016), ha sido un acierto.

Las implicaciones éticas y la compleja naturaleza de los contenidos en el contexto de una gran cantidad de información a la que estamos expuestos diariamente plantean grandes retos y desafíos para la educación en Biología. Nos obliga a plantear estrategias de enseñanza con un enfoque pedagógico y didáctico adecuado a nuestro Modelo Educativo y en el contexto de nuestro bachillerato universitario, ya que hasta el momento son escasas las actividades prácticas y experimentales en estas temáticas.

Es determinante la inclusión y la puesta en marcha de actividades experimentales de biología molecular en las aulas del CCH. Hasta ahora, la nula implementación en el aula de procesos y métodos contemporáneos de la biología molecular, aunado a que no se cuenta con equipo e instrumental necesario, limita las posibilidades de la realización de actividades experimentales en los laboratorios escolares.

De antemano, sabemos y hemos probado las ventajas de la participación-acción de los estudiantes en las actividades experimentales escolares, por lo que una forma de asegurar que los estudiantes tengan una visión integral de los nuevos campos de la investigación en la biología molecular y su impacto, es la inclusión de estas metodologías que permiten a los estudiantes apropiarse del lenguaje de la bioquímica y de la biología molecular, del uso de las TIC y de las herramientas de la bioinformática, sin dejar de lado el contexto Ciencia-Tecnología Sociedad-Ambiente y las implicaciones éticas de la manipulación genética.

Por lo anterior, en este paquete didáctico consideramos la selección de contenidos con base en las técnicas de la biología molecular, de ahí se plantearon las actividades teóricas-

¹ PAQUETE DIDÁCTICO SILADIN. RUBRO I-B o I-C. Es el conjunto estructurado de materiales necesarios para realizar actividades experimentales y de campo, extra-curriculares, que posibiliten completar, reforzar o aclarar contenidos de un tema o unidad de un curso. Contiene: a) indicaciones para su utilización, b) propósitos, c) presentación de los contenidos y sus respectivos materiales de apoyo, d) actividades de aprendizaje, e) sugerencias de evaluación, f) bibliografía. Debe responder a las necesidades teórico-metodológicas de la asignatura, en particular facilitar el trabajo experimental. Cuando el paquete corresponda a una asignatura y tenga el visto bueno de la Secretaría Técnica del SILADIN será de nivel B. Para ser considerado de nivel C, deberá corresponder a dos asignaturas secuenciadas y tener el visto bueno de la Secretaría Técnica y el aval positivo de un comité de pares.

prácticas y experimentales a desarrollar en cada una de las estrategias didácticas, en donde el docente es el mediador de los aprendizajes y el estudiante construye significados a partir de lo que él conoce y lo que incorpora desde su ámbito social y cultural. Por lo tanto, las estrategias didácticas intentan promover la motivación, a través del planteamiento de problemáticas de interés como pruebas de paternidad, perfiles de identificación, albinismo, escena del crimen, entre otras; además de propiciar la inclusión de la construcción histórica de algunos conceptos y procesos de producción del conocimiento científico. Todo lo anterior con la finalidad de incentivar a los estudiantes por el interés en la investigación y la producción de conocimiento científico.

El grupo de trabajo CTS-Oriente ya ha implementado de manera efectiva en la práctica (estrategias y secuencias didácticas) la extracción de DNA² de diferentes tejidos, la transformación bacteriana con plásmidos que contienen el gen que codifica para las proteínas tdTomate o GFP (proteína verde fluorescente), que permiten la expresión de proteínas fluorescentes en actividades experimentales realizadas en ambientes extracurriculares, como el Siladin del CCH Oriente, durante dos períodos escolares (2014-2016). Además, se ha dado a la tarea, a través de un proyecto INFOCAB, de instrumentar y equipar un laboratorio escolar de biología molecular en el marco institucional del CCH.

Con la implementación de este laboratorio en el CCH Oriente se ha podido concretar el desarrollo de estas propuestas didácticas de biología molecular, que permiten mejorar la apropiación de los aprendizajes de los programas de Biología I y II, así como profundizar en ellos, además permiten el manejo de equipo e instrumental especializado. Logrando así, perfilar a los estudiantes por la elección de carreras del área de las ciencias experimentales, o bien, propiciar una cultura científica en el campo de la biología molecular.

Los estudiantes que participen en las actividades prácticas y experimentales de biología molecular propuestas en este paquete didáctico se apropiarán de nuevos conceptos, métodos y técnicas básicas. Los aprendizajes les permitirán reconocer la importancia de la biología molecular en la sociedad actual, valorar las relaciones existentes entre Ciencia-Tecnología-Sociedad-Ambiente, construir un pensamiento crítico, racional en las aplicaciones biotecnológicas y la manipulación genética. Los profesores tendrán con este paquete didáctico una guía teórico-práctica y la posibilidad de contar con instrumental y equipo de laboratorio especializado para implementar las estrategias didácticas de biología molecular con sus estudiantes de cursos curriculares en el SILADIN.

INDICACIONES PARA SU UTILIZACIÓN

El presente paquete didáctico se enmarca en el PEA (2016) de Biología I y II. Da respuesta y profundiza en los aprendizajes de la tercera unidad de Biología I, “Reconoce las implicaciones biológicas y éticas de la manipulación del material genético”, y de la primera unidad de Biología II, “Aprecia las evidencias moleculares que apoyan las ideas evolucionistas”. Consideramos dentro de las estrategias incidir en los tres tipos de aprendizajes: declara-

2 El vocabulario científico y técnico, de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Madrid, 1990; 2a edición). recomiendan utilizar el término DNA (ácido desoxirribonucleico) según las indicaciones de IUPAC y IUBS, publicadas en el Journal of Biological Chemistry 241:527-533 (1966).

tivos, procedimentales y actitudinales. En cuanto a los declarativos de manera particular, enfocarlos en el área de la biología molecular, ya que ésta tiene múltiples aplicaciones y un gran impacto en la sociedad actual; en cuanto a los aprendizajes procedimentales y actitudinales, propician la optimización de instrumentos, equipos especializados, reactivos, uso de materiales biológicos (plásmidos y productos de PCR) y una visión integral de los ejes Ciencia-Tecnología-Sociedad- Ambiente.

Por lo anterior, se diseñaron estrategias de aprendizaje extracurriculares que mantienen los tres momentos de aprendizaje: apertura, desarrollo y cierre. En la fase de apertura, se generan cuestionamientos que permiten al profesor apreciar los conocimientos previos de los estudiantes con la finalidad de dirigir sus esfuerzos y/o reorientar la estrategia. Se intenta propiciar la reflexión durante el desarrollo de la estrategia, permitiéndole al estudiante ser consciente de su aprendizaje, se intenta generar un cambio cognitivo en el estudiante de manera individual y de forma colaborativa a través de diversas actividades (lecturas actualizadas, videos, herramientas de bioinformática en línea, actividades lúdicas, exposiciones teóricas, actividades experimentales, cuestionarios, organizadores gráficos, etcétera). En la fase de cierre, los alumnos integran el conocimiento, las habilidades y actitudes a partir de la aplicación de lo realizado en la estrategia didáctica, en la resolución de problemas, del desarrollo de alguna actividad experimental, de un estudio de caso y de la recuperación de la fase de apertura diagnóstica.

Aunque son dos los aprendizajes que se consideran en este paquete (uno por cada asignatura), existe una diversidad de profundización de éstos, por lo que las estrategias y su elección queda a criterio del docente para su aplicación, en función de sus conocimientos, de los recursos y de la inquietud de profundizar en los aprendizajes establecidos. Cabe aclarar que las estrategias tienen, por sí mismas, actividades que en algunos momentos pueden utilizarse de forma aislada, sin la necesidad de llevar a cabo la totalidad de la estrategia didáctica. Sin embargo, hacemos hincapié en que, por su naturaleza, es recomendable llevarlas a cabo en su totalidad; puntualizamos que los materiales, reactivos y equipo se encuentra a disposición en el CCH Oriente, en el Laboratorio Escolar de Biología Molecular.

PROPOSITOS

A partir de los conocimientos básicos de los estudiantes, en relación con los programas actualizados en donde han logrado comprender las aportaciones de la ciencia en el área de la biología molecular; considerando la estructura de la molécula del DNA, el dogma central de la biología molecular, los procesos involucrados como la replicación, transcripción, traducción, así como las enzimas implicadas en estos procesos; ahora los estudiantes podrán realizar una inmersión profunda a través del uso de recursos variados, materiales y equipo novedoso que les permitan desarrollar técnicas básicas de extracción de DNA, transformación bacteriana, amplificación de DNA por PCR, aplicación y uso de enzimas de restricción y plásmidos. Con la finalidad de valorar las implicaciones y aportaciones de la biología molecular en el diagnóstico médico, producción de alimentos, de fármacos, selección artificial, pruebas de la evolución y parentesco, etcétera. Además de que se familiaricen en el uso de las tecnologías (equipos y herramientas de la bioinformática) que permiten resolver cuestiones evolutivas, ecológicas, económicas y de conservación.

PRESENTACIÓN DE CONTENIDOS

El presente paquete didáctico es el conjunto estructurado de materiales necesarios para realizar actividades experimentales extracurriculares, que posibilitan completar y reforzar los contenidos del subtema “Manipulación genética” de la Tercera Unidad de Biología I y del subtema “Evidencias moleculares de la evolución” de la Primera Unidad de Biología II del Programa de Estudios Actualizados de Biología I y II (2016).

Biología I

En particular para Biología I (PEA, 2016) las estrategias propuestas son siete y se encuentran ubicadas en la Tercera Unidad de Biología I, que plantea la pregunta generadora:

¿Cómo se transmiten los caracteres hereditarios y se modifica la información genética?

El propósito de la unidad es:

Al finalizar la unidad, el alumno identificará los mecanismos de transmisión y modificación de la información genética, como responsables de la continuidad y cambio en los sistemas biológicos, para que comprenda su importancia biológica y evolutiva.

Tema 2. Herencia

- Subtema: **Manipulación del DNA**

Aprendizaje:

- Reconoce las implicaciones biológicas y éticas de la manipulación del material genético.
- A continuación, se describen cada una de las siete estrategias didácticas para Biología I:

El DNA, la llave de la realidad

La estrategia inicia con un cuestionario diagnóstico de opción múltiple y una actividad QQQ, “Qué veo, qué no veo y qué infiero”; en el desarrollo se presenta una lectura sobre el DNA y una actividad para identificar los componentes estructurales del DNA, para profundizar se plantea una lectura sobre los “Short Tandem Repeats” (STRs), que permiten identificar el perfil genético de una persona; con estos recursos se establece un problema para que el estudiante aplique sus conocimientos en un estudio de caso ficticio sobre la identificación de víctimas de un sismo, a través de muestras biológicas. El cierre es una actividad de integración donde el estudiante aplica sus conocimientos básicos para extraer DNA de una muestra biológica y poder asegurar, por una electroforesis, que lo que obtiene es DNA.

Síntesis de proteínas. Life S.A. de C.V.

Presenta en su fase de apertura un cuestionario diagnóstico: respuesta anterior-pregunta-respuesta posterior (RA-P-RP), en el desarrollo, una exposición teórica sobre el dogma central de la biología molecular y se problematiza con una actividad lúdica (kit) para la

construcción de una proteína (transcripción y traducción) en un contexto de un cambio en la secuencia de nucleótidos que conduce a un cambio en la secuencia de aminoácidos que produce una proteína no funcional y en consecuencia el albinismo. Además, se presenta una exposición teórica para comprender cómo se realiza la transformación bacteriana para la producción de proteínas fluorescentes, antecedente para realizar una actividad experimental de transformación bacteriana; donde los estudiantes utilizan un plásmido que contiene un gen de resistencia a la ampicilina y un gen que codifica para una proteína fluorescente (pGLO); que insertarán en una bacteria, lo que evidencia que su expresión cumple con el dogma central de la biología molecular.

¿Qué es mejor, unas tijerotas o miles de tijeritas?

Esta estrategia parte del hecho de que las enzimas son proteínas con funciones específicas y que su producción cumple con el dogma central de la biología; además de que su uso está muy extendido en las áreas biotecnológicas. Bajo este contexto, la estrategia propone una comparación entre un mismo tipo de enzimas producidas por diferentes vías, natural y por DNA recombinante. Al inicio de la estrategia se presenta un diagnóstico en donde el alumno ubica la importancia de la biotecnología en su vida cotidiana. En la fase de desarrollo se presenta una exposición teórica para profundizar en las generalidades de la producción de las enzimas y su utilidad, en especial sobre la amilasa. Se lleva a cabo una actividad experimental donde se compara la actividad enzimática de la amilasa salival y de la amilasa recombinante. Al finalizar, se ponen en juego los conocimientos con la finalidad de que el alumno desarrolle un planteamiento de indagación para resolver una problemática estructurada en un aprendizaje basado en problemas (ABP).

Primero ctrl+C y después ctrl+V, ctrl+V, ctrl+V...

La apertura de esta estrategia es un diagnóstico que permite evidenciar los conocimientos generales que el alumno tiene en relación con el proceso de replicación del DNA. En la fase de desarrollo se presentan actividades diversas (lecturas, videos, actividades lúdicas) para identificar los elementos moleculares involucrados en el proceso de replicación del DNA, así como preguntas generadoras para indagar sobre la técnica llamada Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). Al finalizar, en la fase de cierre se propone una actividad experimental en la cual se apliquen habilidades y conocimientos ya adquiridos previamente para amplificar un plásmido por medio de un termociclador y con esto entender la importancia de la técnica llamada PCR.

Tijeras para cortar, pegar y diseñar moléculas de DNA

La estrategia parte de un cuestionario RA-P-RP sobre enzimas de restricción (definición, función y utilidad), además en su desarrollo introduce al estudiante, desde el punto de vista histórico a través de una lectura, al proceso de producción de conocimiento científico y en

particular al descubrimiento de las enzimas de restricción. Se continúa con una exposición teórica que aporta elementos para la comprensión de la función de las enzimas de restricción, la cual se pone en práctica con actividades lúdicas de corte de DNA con enzimas de restricción y su visualización en geles de electroforesis en papel. En esta misma fase se propone una actividad experimental donde se corta un plásmido con dos enzimas de restricción y se ponen en práctica los conocimientos adquiridos. En su fase de cierre, se plantean problemas donde los alumnos aplican lo aprendido.

¿Quién es el culpable?

Esta actividad parte del hecho de que los estudiantes, hasta este momento, manejan los conocimientos básicos y la comprensión de las técnicas de biología molecular (extracción de DNA, electroforesis, PCR y enzimas de restricción). Con lo cual, a través de un plantearmiento de un problema ficticio de la criminalística, ponen en práctica lo aprendido y serán parte de la escena de un crimen y un perito experto, en la determinación y análisis de evidencias moleculares para emitir un dictamen. Esta estrategia contiene un diagnóstico RA-P-RP, una lectura problematizadora a partir de la cual se genera un procedimiento para la recolección de muestras de la escena del crimen (secuencias de DNA) y su tratamiento a nivel molecular con enzimas de restricción, que permiten la comparación entre las muestras y así poder determinar quién es el culpable de un crimen.

¿Prohibido manipular?

La bioética juega un papel primordial en la interpretación de la manipulación del material genético. De ahí la importancia de confrontar a los estudiantes con diferentes escenarios: la parte histórica del proyecto genoma humano (fase de apertura, diagnóstica), las implicaciones éticas de la ingeniería genética, y una entrevista sobre una propuesta de manipulación genética en la población como una solución para disminuir el consumo energético y evitar el impacto en el ambiente. Por último, se presenta un estudio de caso, en donde el alumno toma partido, se sensibiliza y toma decisiones en un caso de la enfermedad Corea de Huntington. Todas las actividades se llevan a cabo de forma colaborativa y siempre en un ambiente de trabajo en donde los resultados se discuten en plenaria.

Biología II

Para Biología II (PEA, 2016). Las estrategias propuestas son tres y se encuentran ubicadas en la primera unidad de Biología II que plantea la pregunta generadora

¿Cómo se explica el origen, evolución y diversidad de los sistemas vivos?

El propósito de la unidad es:

Al finalizar la unidad el alumno identificará los mecanismos que han favorecido la diversificación de los sistemas vivos, a través del análisis de las teorías que explican su origen y evolución, para que comprenda que la biodiversidad es el resultado del proceso evolutivo.

Tema 2. Evolución biológica

- Subtema: Evidencias moleculares de la evolución

Aprendizaje:

- Aprecia las evidencias moleculares que apoyan las ideas evolucionistas.

A continuación se describen cada una de las estrategias didácticas para esta asignatura:

Evidencias de la evolución. El DNA me respalda.

El DNA es la molécula más importante en el contexto evolutivo de los sistemas vivos, los cambios que se generan en él pueden propiciar grandes cambios del fenotipo y del genotipo, y trascender a nivel de poblaciones. Desde el punto de vista ancestro-descendencia los sistemas vivos comparten condiciones moleculares que los relacionan de manera directa. Esta estrategia inicia con un cuestionario RA-P-RP, donde los alumnos pondrán en juego sus conocimientos previos para entender qué es una evidencia evolutiva y las ventajas de las evidencias moleculares en el contexto actual; experimentalmente podrá aplicar procedimientos para extraer DNA de diferentes especies, y observar en geles de agarosa los patrones que estos generan. En el aspecto lúdico, se utilizan secuencias de DNA ficticias de diferentes especies, las cuales podrá comparar y de ahí inferir una relación de parentesco evolutivo. En relación con el cierre, observará un video que le servirá para analizar el contexto evolutivo de la especie humana, podrá contestar cuestionamientos relacionados con los conocimientos, procedimientos, actitudes y valores generados.

“¡Viva la resistencia!... eso dicen las bacterias”

En el contexto de la evolución, la adaptación es una de las condiciones que permiten a los organismos adecuarse a su ambiente, reproducirse y dejar descendientes. En el contexto de las evidencias evolutivas en bacterias, éstas han ganado información genética y adaptaciones a partir de mecanismos, como las mutaciones o inserción de plásmidos; estas ganancias son viables gracias a que todos los sistemas vivos presentan DNA. Esta estrategia inicia con un cuestionario RA-P-RP, retoma la lectura de “Osamu Shimomura y la medusa de cristal” a fin de relacionar la adaptación con su fundamento molecular, además de resaltar el proceso de recombinación genética en bacterias. Por otro lado, se presenta una exposición teórica para relacionar la resistencia a antibióticos con la selección natural, y un video “The evolution of bacteria on a mega-plate Petri dish” muy puntual donde se observa este fenómeno. De manera lúdica, se propone una actividad para construir un plásmido con resistencia a antibiótico y la expresión de una proteína fluorescente. Para finalizar, incluimos una actividad experimental en la cual los alumnos demuestran a partir de bacterias modificadas genéticamente, la resistencia a antibióticos y la expresión de una proteína fluorescente.

El pariente más cercano

Elucidar los patrones de ancestría común a partir de caracteres moleculares de grupos de especies implica realizar comparaciones de secuencias de nucleótidos de un mismo gen. Con la creciente aportación de bases de datos de secuencias de DNA (Gen Bank) y las tecnologías computacionales en línea en la actualidad esta tarea es mucho más fácil. Con esta secuencia se pretende que el alumno identifique las evidencias moleculares de la evolución y reconozca la utilidad de las secuencias de DNA para plantear hipótesis de relaciones de parentesco evolutivo. Se utilizan herramientas de bioinformática y secuencias de DNA de repositorios especializados para generar arboles filogenéticos.

SUGERENCIAS DE EVALUACIÓN

Valorar el desempeño del estudiante puede incluir una diversidad de instrumentos de evaluación. Queremos que nuestros estudiantes demuestren que poseen ciertas conductas o habilidades, es decir, un desempeño significativo en situaciones y escenarios que permitan capturar la riqueza de lo que los alumnos han logrado comprender, solucionar o intervenir, en relación con diferentes aspectos. Es posible, dependiendo de lo que el docente desea, observar en el estudiante el uso de pruebas objetivas, las cuales permiten obtener una muestra del conocimiento logrado a través de la memorización o habilidades del pensamiento. También se puede hacer uso de preguntas orales, las cuales evalúan el conocimiento durante la instrucción de manera sincrónica, de tal forma que el docente puede retroalimentar al estudiante y puede obtener indicios de qué tan efectiva es la enseñanza-aprendizaje. Además, el docente podría evaluar la habilidad del estudiante en trasladar o aplicar el conocimiento y la comprensión de este, a la acción, es decir, se puede evaluar la capacidad del estudiante para planear, construir y proporcionar respuestas originales, innovadoras o creativas. Este nivel de aprendizaje evidencia la posesión de habilidades y el desempeño que presenta el estudiante al intentar resolver problemas (Díaz-Barriga, 2005).

En particular, las estrategias planteadas en este paquete didáctico y sus actividades permiten hacer uso de una gran variedad de instrumentos de evaluación. Por ejemplo, el docente podrá implementar instrumentos que van desde sólo cuantificar aprendizajes declarativos hasta evidenciar en los estudiantes la capacidad de resolver problemas (por ejemplo, ABP). Cabe mencionar que las actividades propuestas están consideradas para que los estudiantes las lleven a cabo de forma individual, colaborativa o grupal. Así, las actividades están estructuradas para que en un primer momento el estudiante reflexione sobre sus conocimientos previos y posteriormente sea capaz de comprender el fenómeno en cuestión con actividades diversas (lúdicas, lecturas, videos, herramientas de la bioinformática, entre otras) que representan o pueden ser entendidas como modelos que permiten al estudiante implementar en un segundo momento una actividad experimental y/o en línea, después de que adquirió habilidades cognitivas el estudiante puede ejecutar otras acciones más complejas.

El docente puede utilizar de manera libre diferentes instrumentos de evaluación que le permitan tener evidencia del logro de los aprendizajes en los alumnos, como: interrogatorios durante el experimento, V de Gowing, rúbricas para evaluar habilidades, lista de cotejo, ensayos, reportes de práctica, portafolios, etcétera. Es muy recomendable que el docente propicie los espacios de reflexión en torno a los aprendizajes, al proceso de enseñanza que

permittió el logro de estos y, sobre todo, que comunique a los estudiantes la forma en la que son evaluados.

Por lo anterior, el docente tiene la libertad de elección para elegir tal o cual instrumento de evaluación o combinar una diversidad de estos con la finalidad de obtener una evaluación de calidad.

LITERATURA CONSULTADA

Díaz Barriga, F. (2005). *Enseñanza situada: Vínculo entre la escuela y la vida*. México. McGraw Hill

Lucumi M. A. (2015). *Retos en la enseñanza de la biología molecular y la bioquímica en las carreras del área de la salud*. Boletín virtual. Vol. 4. [Fecha de consulta, junio] 2018 Disponible en línea en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6232391.pdf>

Said N. A.; Acevedo J. E. , Urzúa O. B., Cifuentes G. V y Sepulveda L. D. (2013). *Estrategias didácticas para la enseñanza de la biología molecular y la biotecnología, en estudiantes de educación media*. IX Congreso internacional sobre investigación en didáctica de las ciencias. [Fecha de consulta: junio de 2018]. Disponible en línea en: https://ddd.uab.cat/pub/edlc/edlc_a2013nExtra/edlc_a2013nExtrap3138.pdf

Caballero Camejo, C. A., Recio Molina, P. P. (2007). Las tendencias de la Didáctica de las Ciencias Naturales en el Siglo XXI. VARONA Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=360635564007>

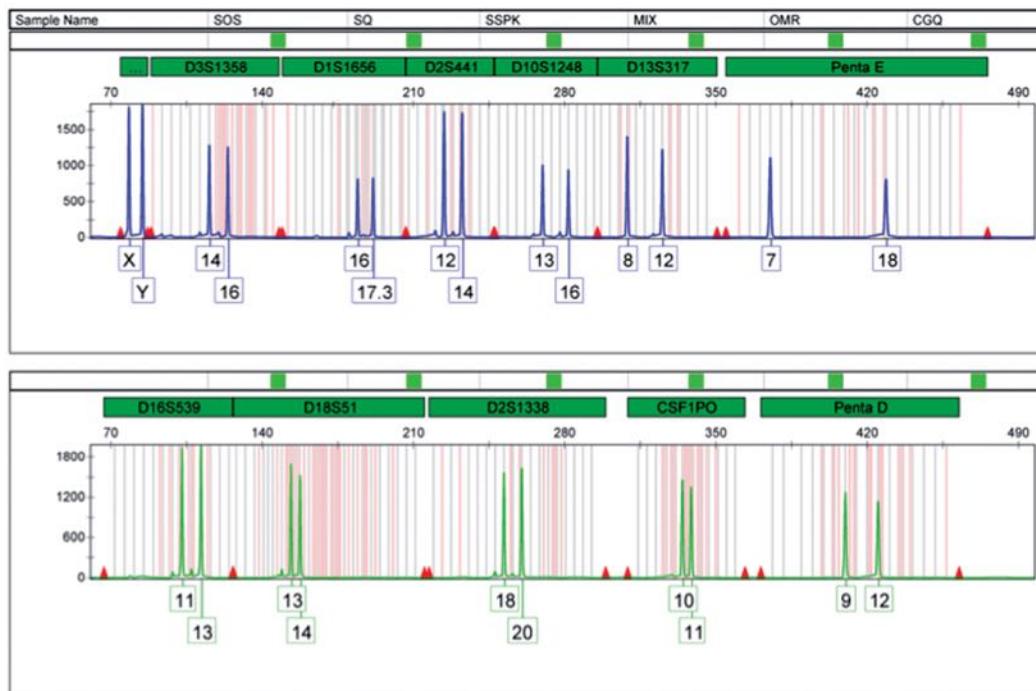
Protocolo de equivalencias para el ingreso y la promoción de los profesores ordinarios de carrera del Colegio de Ciencias y Humanidades. 3^a Versión. (2008). Suplemento Especial. Gaceta CCH. Número 4, 23 de mayo de 2008.

Escuela Nacional Colegio de Ciencias y Humanidades. Área de Ciencias Experimentales. (2016). Programas de estudio de Biología I y II. 1a. Edición UNAM.

BIOLOGÍA

El DNA, la llave de la realidad

Applied
Biosystems
GeneMapper®



STRs de individuo masculino, con empleo del sistema de identificación PowerPlex Fusion de Promega.

Imagen tomada de López-Armenta (2018), INCIFO.

Estructura del DNA y huella genética

Elaboraron:

Bautista Acevedo Marco Antonio

Mejía García Martha Elvira

Colaboraron:

Bernal Enriquez Óscar

Centeno Cruz Federico

Hernández Carbajal Luz Angélica

Luna Román Celso Miguel

Martínez Ortiz Leticia

Ramírez Aguilar Eva Cristina

Serrano Reyes Gabriela

BIOLOGÍA I (PEA, 2016). Tercera Unidad

¿Cómo se transmiten los caracteres hereditarios y se modifica la información genética?

Propósito

Al finalizar la unidad, el alumno identificará los mecanismos de transmisión y modificación de la información genética, como responsables de la continuidad y cambio en los sistemas biológicos, para que comprenda su importancia biológica y evolutiva.

Tema 2. Herencia

Subtema: Manipulación del DNA

Aprendizajes

Declarativos	<ul style="list-style-type: none"> Reconoce las implicaciones biológicas y éticas de la manipulación del material genético. Reconoce que la molécula de DNA está formada por nucleótidos. Relaciona la estructura del DNA con los mecanismos de manipulación genética. Comprende que la molécula de DNA es la molécula esencial de la vida.
Procedimentales	<ul style="list-style-type: none"> Aplica habilidades para comunicar de forma oral y escrita la información derivada de las actividades realizadas en forma individual y en equipo. Realiza extracción de DNA empleando un método básico.
Actitudinales	<ul style="list-style-type: none"> Valora la importancia de la manipulación genética en el beneficio de la sociedad. Aprecia la importancia del DNA en la identificación de individuos.

Actividades a realizar:

Apertura

- Cuestionario diagnóstico.
- Actividad 1. Recordando conceptos básicos

Desarrollo

- Lectura. “DNA: molécula sencilla e interesante”
- Actividad 2. Identificando los componentes del DNA.
- Lectura. “Utilizando el DNA no codificante”
- Actividad 3. Sismo que sacudió a la Ciudad de México en septiembre de 2017.

Cierre

- Actividad experimental. Extracción de DNA.

Apertura

Cuestionario diagnóstico

Instrucción: En el Anexo 1.1 encontrarás el formato del cuestionario diagnóstico, resuélvelo.

Actividad 1. “Recordando conceptos básicos”

Instrucciones: Relaciona la siguiente figura con los conceptos e indica en la tabla que se encuentra en el Anexo 1.2, ¿Cuáles conceptos están representados en el esquema? (¿Qué veo?) ¿Cuáles no están representados? (¿Qué no veo?) ¿Qué puedes deducir o concluir del esquema? (¿Qué infieres?).

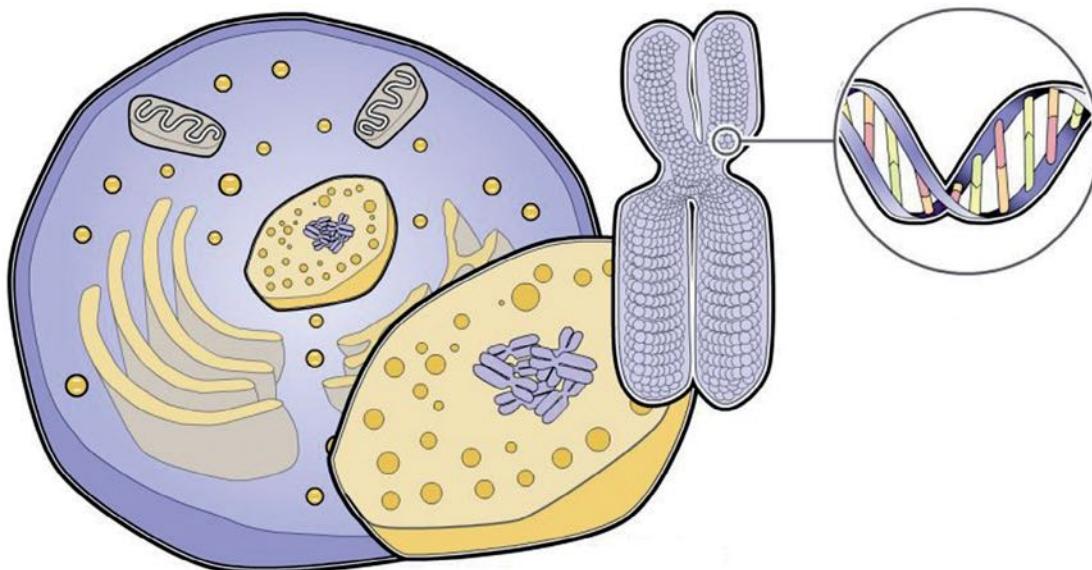


Figura 1. Tomada de “From de DNA to protein”.
<https://www.yourgenome.org/video/from-dna-to-protein-flash>

Conceptos

Célula Nucleótido Nucleólo Centromero Bacteria Aminoácidos	Núcleo Alelo Citoplasma Desoxirribosa Ribosomas Fosfolípidos	Cromosoma Base Nitrogenada Membrana Grupo Fosfato Puentes de Hidrógeno Mitocondria	Gen Histonas Cromatina Proteínas RNA DNA
---	---	---	---

Desarrollo

Lectura. “DNA: molécula sencilla e interesante”

El DNA (ácido desoxirribonucleico) es un polímero lineal formado por monómeros denominados **nucleótidos**, la molécula puede contener cientos de millones de éstos. El DNA está asociado a proteínas llamadas histonas, que se pueden teñir con colorantes, como: giemsa, galocianina, naranja de acridina, etcétera y visualizarse mediante el microscopio óptico, como cromatina o cromosomas (Figura 2).

La era moderna de la biología molecular comienza en 1953, cuando James D. Watson y Francis H. C. Crick propusieron correctamente la estructura doble helicoidal, esto no hubiera sido posible sin el trabajo realizado por la cristalografa Rosalind Franklin quien a partir de DNA extraído de timo de ternera, pudo obtener la famosa fotografía 51, en donde se observa una imagen nítida de la difracción por Rayos X en moléculas de DNA sólidas cristalizadas, comprobando la estructura de la doble hélice de la molécula (Figura 3). Desafortunadamente, el contexto de desigualdad de género, frenó su trabajo al no poder ella determinar la estructura antes de que lo hicieran Watson y Crick; no recibió el crédito merecido ya que murió víctima de cáncer de ovario en 1958.

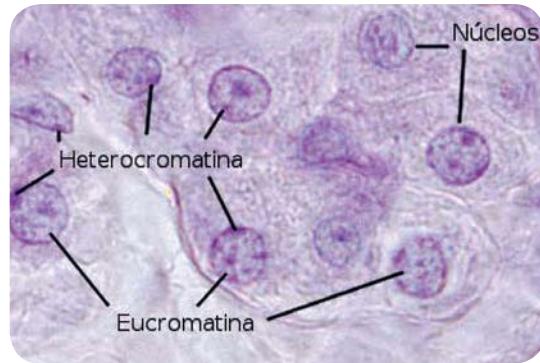


Figura 2. Tinción celular de la cromatina.
Recuperado el 20 de septiembre 2020 de:
<http://mmeigias.webs.uvigo.es/5-celulas/1-introduccion.php>

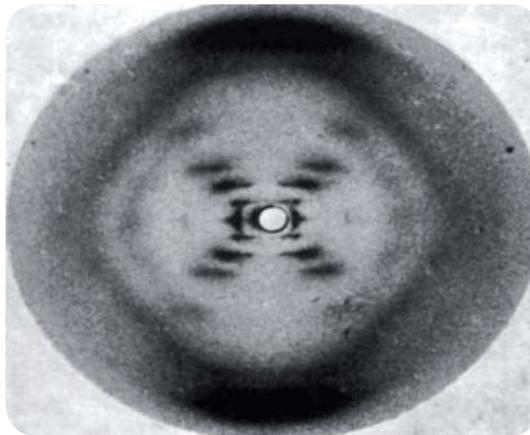


Figura 3. Difracción de rayos X del DNA.
Creador: Rosalind Franklin, Raymond G. Gosling. El original se encuentra en los documentos de Ava Helen y Linus Pauling.
Tomado de: <http://scarc.library.oregonstate.edu/coll/pauling/dna/pictures/sci9.001.5.html>

El DNA se compone de cuatro **nucleótidos** diferentes, todos con una estructura común: un **grupo fosfato** unido por un enlace fosfoéster a una **pentosa** de tipo desoxirribosa y esta última, unida por su carbono 1' a una **base nitrogenada**, ya sea adenina (A), guanina (G), citosina (C) o timina (T). Las bases nitrogenadas son compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno y carbono en sus anillos. **La adenina y guanina son purinas** que contienen un par de anillos fusionados, **la citosina y timina son pirimidinas** que contienen un solo anillo y la relación de estas bases en el DNA siempre es igual a 1, es decir, $A+G = C+T$. El carácter ácido de los nucleótidos se debe a la presencia del fosfato, que se disocia en el pH intracelular, libera iones hidrógeno y confiere una carga

negativa al fosfato. Esta carga atrae a proteínas (ricas en aminoácidos con carga positiva como: lisina, arginina e histidina) lo que hace que el DNA siempre esté asociado a ellas.

Una cadena de DNA tiene una orientación química de extremo a extremo, que depende de la orientación de los carbonos correspondientes a la desoxirribosa: el extremo 5' correspondiente a esta azúcar tiene al grupo fosfato; mientras que el extremo 3' tiene un grupo hidroxilo libre. Además, esta configuración se invierte cuando se aparea con su cadena complementaria para formar la doble hélice del DNA, lo que se conoce como sentido antiparalelo. Las uniones entre los nucleótidos en una cadena de DNA se denominan enlaces fosfodiéster y entre cadenas la unión se da por medio de puentes de hidrógeno, como se observa en la Figura 4. El DNA se ubica en el citoplasma de los procariontes y en el núcleo de las células eucariontes, además se encuentra en mitocondrias y cloroplastos.

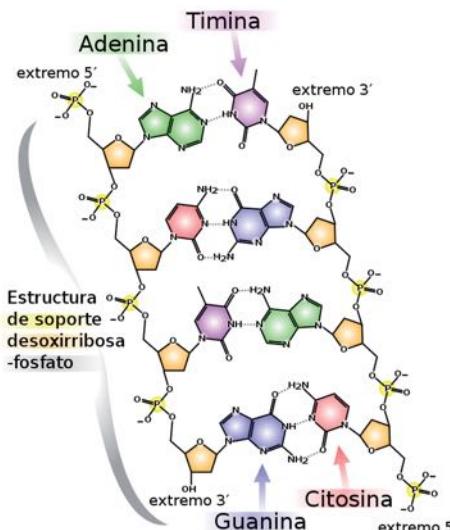


Figura 4. Esquema del DNA. Recuperado el 12 de octubre de 2020 de: https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:DNA_chemical_structure.svg#/media/File%3ADNA_chemical_structure_es.svg

En cuanto al aislamiento de la molécula, se deben de realizar tres pasos básicos:

1. Lisis celular, la cual consiste en romper las cubiertas celulares a través de detergentes como el SDS, cambios a pH alcalino o degradación de proteínas por enzimas como la proteinasa K, o lisozimas, también, por procesos de congelación-descongelación, etcétera.
2. Preparación de los lisados y separación de las proteínas a partir de sales de acetato de amonio o potasio, fraccionamiento con solventes orgánicos, como fenol/cloroformo/ alcohol isoamílico.
3. Concentración y purificación del DNA a partir de la precipitación con alcoholes, como isopropanol y etanol, seguido de centrifugación para separar el precipitado sólido insoluble (ver actividad 6).
4. Para poder observar los resultados de la extracción, se pueden usar geles de agarosa y electroforesis, colorantes específicos y marcadores para determinar el peso molecular de la muestra aislada.

Todos los sistemas vivos al originarse **reciben una copia del genoma** de sus progenitores, que posee DNA no codificante y genes que a través de su codificación establecen las características genéticas de cada individuo y dictan los mecanismos metabólicos, fisiológicos y de expresión morfológica para **dar continuidad a la vida**. Por este motivo, el DNA es la molécula responsable de la transmisión de las características hereditarias a través de las diferentes generaciones. Por otro lado, es la molécula que guarda la codificación para la producción de cada una de las proteínas que conforman a un individuo y generar con esto las diferencias genotípicas y fenotípicas en una especie. Desde el punto de vista de la manipulación en ingeniería genética, se han logrado producir moléculas reguladoras a partir de bacterias, introducción de genes (transgénicos) en diferentes seres vivos para hacerlos resistentes, por ejemplo a antibióticos o adquirir nuevas características morfológicas y fisiológicas, así como desarrollar terapia génica o edición de genes para corregir alteraciones genéticas o enfermedades.

Actividad 2. Identificando los componentes del DNA.

Como se mencionó en la lectura anterior, los ácidos nucleicos son polímeros formados por la unión de unidades básicas llamadas nucleótidos. Cada nucleótido está formado por un azúcar pentosa llamada desoxirribosa, a la que se une a su carbono 1' una base nitrogenada (adenina, guanina, citosina o timina) y al carbono 5' de la pentosa se une un grupo fosfato por medio de un enlace fosfoester. El DNA es bicatenario (dos cadenas), sus cadenas son complementarias y antiparalelas. En esta actividad identificarás cada uno de los componentes de esta molécula.

Materiales: Recortable del **Anexo 1.3**, plumines de colores, tijeras y pegamento.

Instrucciones:

1. Recorta por la línea punteada los nucleótidos del Anexo 1.3
2. En cada nucleótido ilumina sus componentes, como se indica a continuación:
 - Desoxirribosa -> Morado
 - Grupo fosfato-> Anaranjado
 - Bases nitrogenadas -> Adenina (rojo), Guanina (verde), Timina (azul), Citosina (amarillo)
3. Construye una molécula de DNA:
4. Genera una cadena de 10 nucleótidos, une cada nucleótido pegando el extremo 3' de uno con el grupo fosfato del otro.
5. Aparea la cadena elaborada de forma complementaria, según corresponda la unión de las bases nitrogenadas correspondientes.
6. Una vez terminada la doble hélice, realiza las actividades del **Anexo 1.4**

Lectura.

“Utilizando el DNA no codificante”

El DNA es una molécula esencial en los organismos vivos, puesto que almacena la información para generar todas las características morfológicas, fisiológicas y etológicas en los sistemas vivos. Pero, ¿cómo se logra a partir de cuatro nucleótidos fundamentales generar todas las formas de vida que existen actualmente en nuestro planeta? La respuesta es sencilla, el acomodo diverso de esos nucleótidos da como resultado tal variedad. Gracias a la capacidad del DNA de replicarse en los organismos vivos durante la división celular y a la reproducción de tipo sexual en los eucariontes se origina un sin-número de posibilidades de descendencia en los individuos de una misma especie (diversidad). Ya que cada progenitor de tipo sexual aporta la mitad de la información genética, de esta forma se hereda a los descendientes una copia de cada gen por progenitor, así cada individuo posee dos copias para cada gen, una proveniente de la madre y la otra del padre (Figura 5). Existen genes que poseen más de una forma llamada alelo, como se observa en la Figura 6, los alelos pueden ser iguales (homocigotos) o diferentes (heterocigotos).

Todo el material genético de una especie se conoce como genoma, es interesante saber

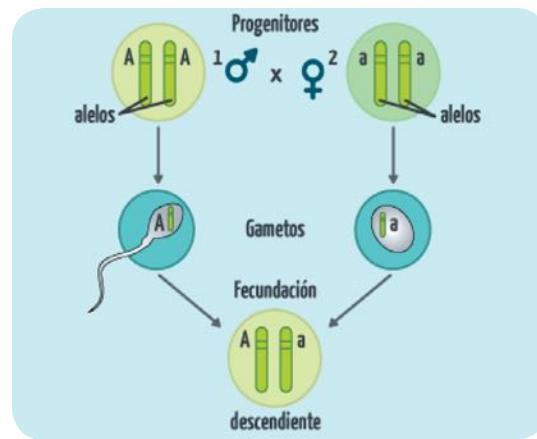


Figura 5. Cromosomas homólogos constituidos por un cromosoma proveniente del padre y otro de la madre (imagen tomada del portal académico del CCH).

<https://portalacademicodelcch.unam.mx/alumno/biologia1/genGenoma/genotipoFenotipo>

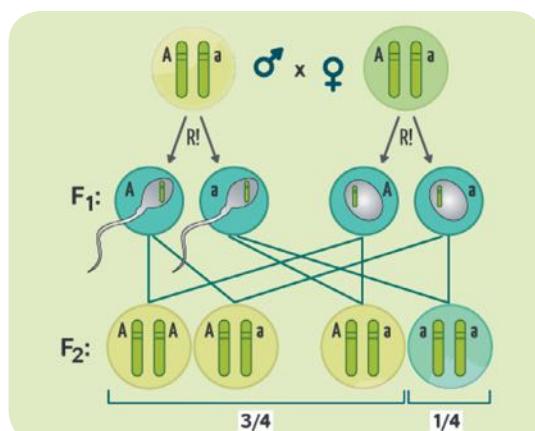


Figura 6. Combinación de alelos (imagen tomada del portal académico del CCH).

que aproximadamente el 5% de nuestro genoma corresponde a genes, es decir, es el material genético que se transcribe a RNA de transferencia (RNAt), ribosomal (RNAr), pequeño nuclear, mensajero (RNAm), etcétera. El RNAm se traducirá a una o más proteínas, ¿y qué pasa con el 95% de DNA restante?, ¿cuál es su función? Hasta la primera década de este siglo se le conocía como “DNA basura”, término que fue inapropiado, ya que este material genético tiene la función de regular la expresión del material codificante. Por lo que es el responsable de que cada individuo sea único genéticamente. Por ejemplo las secuencias conocidas como STRs (Short Tandem Repeats) Repeticiones Cortas en Tandem, nos distinguen de

forma individual, el análisis de estas regiones es conocido como Perfil de DNA o Finger-printing (Huella Dactilar Genética). Tal técnica es utilizada en las ciencias forenses para identificar sospechosos, realizar pruebas de paternidad, investigaciones históricas, de personas desaparecidas, víctimas de accidentes y enfermedades, entre otras.

La diferencia entre individuos de la misma especie es real y se puede analizar con el Perfil de DNA. Estas variaciones existen a lo largo del material genético y es parte del DNA no codificante, es decir, que no se traduce a proteínas. En el Perfil de DNA se utilizan estas variaciones génicas STRs, que son secuencias de nucleótidos de dos a cinco bases que se repiten varias veces. Las repeticiones se encuentran en diferentes loci¹ a través del genoma.

Cada STR tiene múltiples variantes, es decir, la secuencia de nucleótidos definida por el número de repeticiones, las cuales presentan en los extremos regiones delimitantes (flanqueantes). Como se puede ver en la Figura 7, en la que las secuencias en rojo representan un STR delimitado por secuencias al extremo 5' y 3'.



Figura 7. Ejemplo de STRs.

Cada progenitor hereda un juego de cromosomas a sus descendientes. De forma tal que cada individuo posee dos alelos de los STRs. Por lo anterior, una persona puede ser homocigota o heterocigota para un determinado STR, como se puede apreciar en la Figura 8, en el que la madre (círculo superior izquierdo) posee un tipo de STR de 10 repeticiones cada una, por lo que se considera homocigota. Mientras que el padre (cuadro superior derecho) posee para esa misma secuencia una repetición de 12 y otra de 14, lo que hace que sea un heterocigoto. Por lo anterior, las posibilidades de descendencia serán 10-12 o 10-14, ya que cada progenitor solo puede donar una copia de la secuencia (círculo inferior).

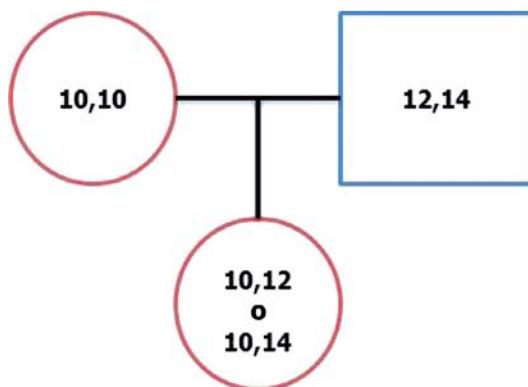


Figura 8. El círculo representa los dos alelos de STR maternos (homocigota), el cuadro representa los STR paternos (heterocigoto). La hija (heterocigota), puede presentar STRs (10, 12 o 10,14). Modelo de herencia de un STR.

¹ Plural de locus (lugar). Posición fija sobre un cromosoma (marcador genético).

El análisis del Perfil de DNA se realiza a partir de DNA extraído de las células de cualquier individuo. Se amplifica la secuencia STR blanco por medio de PCR (Polymerase Chain Reaction). El amplificado se analiza en un gel de electroforesis capilar que ofrece un patrón de líneas que indican el tamaño del fragmento amplificado, como se observa en la Figura 9.

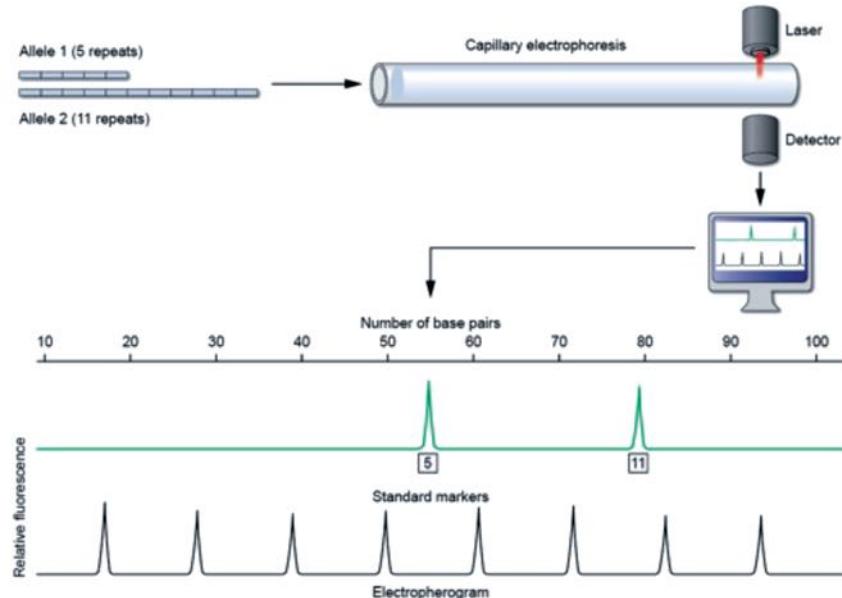


Figura 9. Modelo de electroforesis capilar. BioInteractive, hhmi. Lesson DNA Profiling Using STRs. Tomado de: <https://goo.gl/DZgDSe>

Existen varios STRs identificados hasta la fecha, en los laboratorios se utilizan un mínimo de 15 marcadores para poder identificar a un individuo.

Actividad 3. Sismo que sacudió a la Ciudad de México en septiembre de 2017. (Traducción y adaptación de “DNA PROFILING USING STRs” hhmi Biointeractive).

En septiembre de 2017 un terremoto sacudió a la Ciudad de México, varios estudiantes estadounidenses se encontraban entre las víctimas de un multifamiliar en Tlalpan. Una pareja (madre y padre) en Miami, perdió contacto con su hijo, quien vivía con otro estudiante en ese multifamiliar. El grupo de rescate Topos México, encontró los restos de dos jóvenes de sexo masculino entre las ruinas que no lograban ser identificados por el estado de descomposición. Los científicos forenses de la UNAM aislaron el DNA de las dos víctimas y de los padres, que viajaron desde Miami a la Ciudad de México. El DNA obtenido de las muestras de sangre de los padres fue comparado con el DNA obtenido de las muestras de las víctimas del terremoto. Los resultados parciales se muestran a continuación:

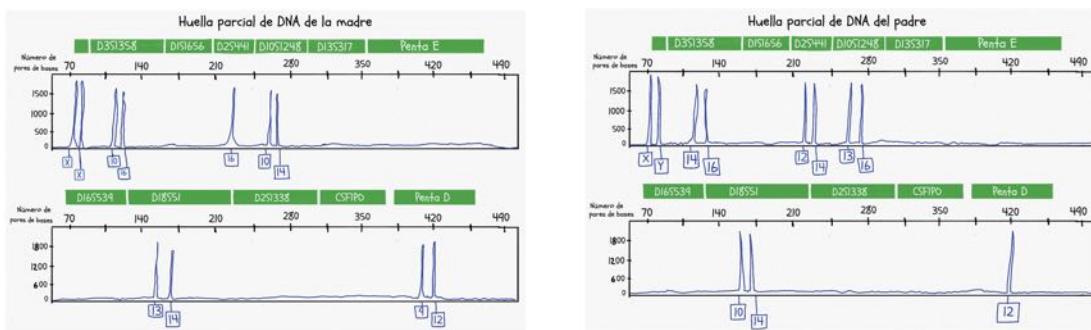
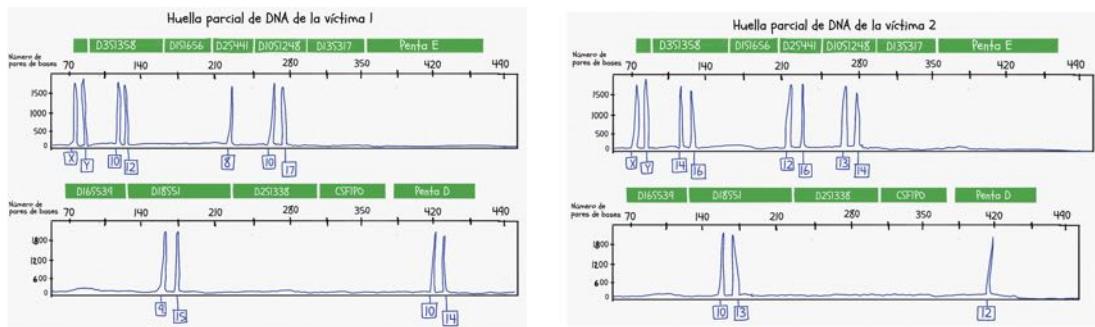


Figura 10. Electroferograma de los padres para cuatro STRs.



Instrucciones: Contesta lo que se solicita en función del problema planteado. Utiliza los formatos del **Anexo 1.5**.

- Completa los datos a partir de los resultados de los genotipos para cada uno de los marcadores de los padres, como se ejemplifica a continuación:

Marcador	Madre (forma genética, número de repeticiones)	Padre (forma genética, número de repeticiones)
D3S1358	Heterocigoto 10, 16	Heterocigoto 14, 16

Cierre

Actividad experimental. Extracción de DNA

La extracción del DNA resulta importante para el estudio de la regulación de la herencia, así como para otras áreas, como la medicina, la criminalística, la química, etc. Existen diversos métodos para la extracción del DNA, entre ellos, el método salino, que resulta ser de los más económicos y efectivos.

Objetivos

- Extracción de DNA de chícharos, por un método salino (acetato de amonio).
- Visualizar el DNA extraído en un gel de agarosa (electroforesis).

Materiales y equipo

Cada equipo debe tener los siguientes materiales:

Laboratorio	Reactivos	Material biológico
4 microtubos	<i>Alcohol etílico al 70%</i>	
Micropipetas	<i>Agua destilada</i>	
Puntas para micropipetas	<i>Hielo triturado</i>	
Centrifuga	* <i>Solución A</i>	
Hielera pequeña	* <i>Solución B</i>	
Vórtex	* <i>Solución C</i>	
Balanza analítica	<i>Solución TE 1X</i>	
Mortero con pistilo	<i>Loading Buffer Orange</i>	
Embudo tallo largo papel filtro	<i>Agarosa 1%</i>	
2 vasos de precipitados de 100 ml		
Guantes		
Cámara de electroforesis horizontal (BlueGel)		

*Ver preparación de sustancias en **Anexo 1.6**.

Procedimiento

1. Pesar en la balanza granataria 2 gr de chícharos y macerarlos en el mortero con pistilo.
2. Diluir el macerado en 10 ml de agua destilada.
3. Filtra el macerado utilizando una gasa y un embudo.
4. Utiliza 2 tubos eppendorf y coloca en cada uno 1.5 ml del filtrado.
5. Centrifuga los tubos durante 4 min a 8000-10000 rpm.
6. Decanta el sobrenadante y recupera la pastilla celular (pellet).
7. Resuspender el pellet en 100 µl de la Solución A, agita en vórtex (hasta disolver el pellet).
8. Agrega 200 µl de la Solución B.
9. Deja reposar en hielo durante 10 min.

10. Agregar 150 μl de la Solución C.
11. Dejar reposar en hielo 25 min.
12. Centrifuga durante 3 min.
13. Recupera 400 μl del sobrenadante y colócalo en tubos *eppendorf* nuevos.
14. Adiciona 1 ml de etanol al 70% frío.
15. Centrifuga durante 10 min.
16. Decanta el sobrenadante y recuperar el pellet.
17. Diluye el pellet en 50 μl de H_2O destilada.
18. Para visualizar el DNA prepara un gel de agarosa (ver Anexo 1.6)
19. En el gel de agarosa utilizaras 5 μl de cada tubo y combinalos con 1 μl de Loading Buffer.
20. Carga los 6 μl en el gel de agarosa, utilizando dos pozos (uno para la muestra de cada tubo).
21. Déjalo correr durante 15 min. Toma una foto del gel y pégala en el formato y responde lo que se te pide en el **Anexo 1.7**.

Literatura consultada

Lodish, H., Berk Ar., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., & Darnell J. (2002). *Biología celular y molecular*. Cuarta Edición. Editorial Panamericana. España.

Megías M, Molist P, Pombal MA. (2020). Atlas de histología vegetal y animal. La célula. Disponible en: <http://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/1-introduccion.php>

Miller R. K. y Levine J. (2006). Biology. Teachers edition. Prentice Hall, Pearson. EUA. BioInteractive, hhmi. Lesson DNA Profiling Using STRs. Diponible en: <https://goo.gl/DZgDSe>

Bonfil O. M., (2003). *50 años de la doble hélice. La molécula más bella del mundo. ¿Cómo ves?* Núm. 53.

Calva E., (2001). *El genoma humano. ¡Y sólo son treinta mil...! ¿Cómo ves?* Núm. 37.

Anexo 1.1

Apertura Cuestionario diagnóstico

Instrucción: Subraya la opción correcta.

1. La principal función del DNA es:

- a) Aporta energía a la célula
- b) Almacena la información genética
- c) Mantiene la homeostasis celular

- d) Sintetiza la expresión de las proteínas
2. ¿Cuáles son los componentes del DNA?
 - a) Glucosa, grupo fosfato, nucleótidos
 - b) Ribosa, grupo fosfato, bases nitrogenadas
 - c) Desoxirribosa, grupo fosfato, base nitrogenadas
 - d) Ácido fosfórico, desoxirribosa, nucleótidos
 3. El DNA es una molécula que se localiza en:
 - a) Plasma sanguíneo
 - b) Glucocalix
 - c) Plasma
 - d) Núcleo
 4. Son las principales características de las cadenas de nucleótidos:
 - a) Antiparalelas y complementarias
 - b) Paralelas y continuas
 - c) Análogas y conservativas
 - d) Semiconservativas y paralelas
 5. Es una propiedad especial del DNA para poder aislarlo
 - a) Soportar temperaturas por arriba de los 120 °C.
 - b) Tiene cadenas antiparalelas y recíprocas
 - c) Es insoluble en alcohol y soluble en agua
 - d) Reacciona fácilmente con colorantes básicos

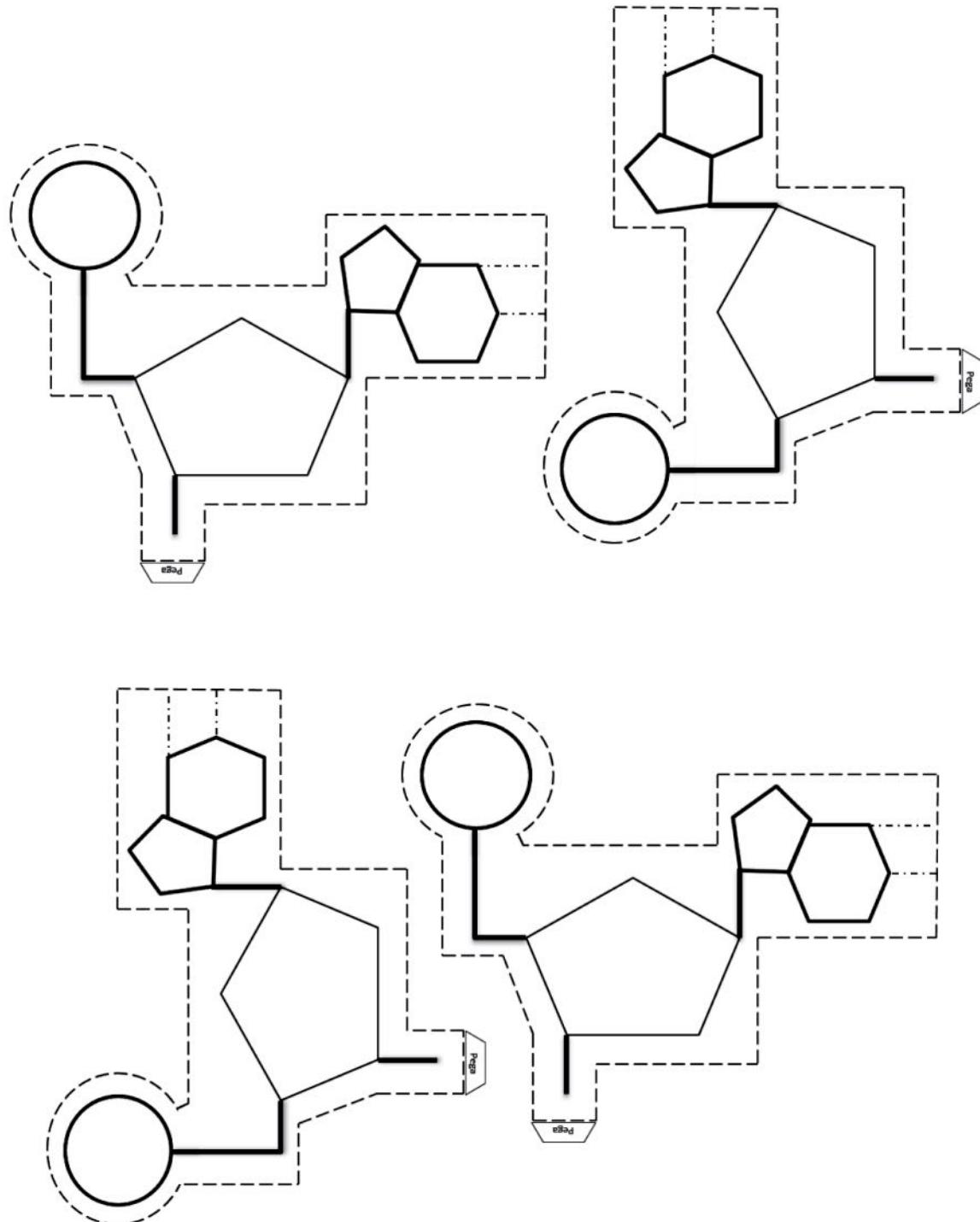
Anexo 1.2

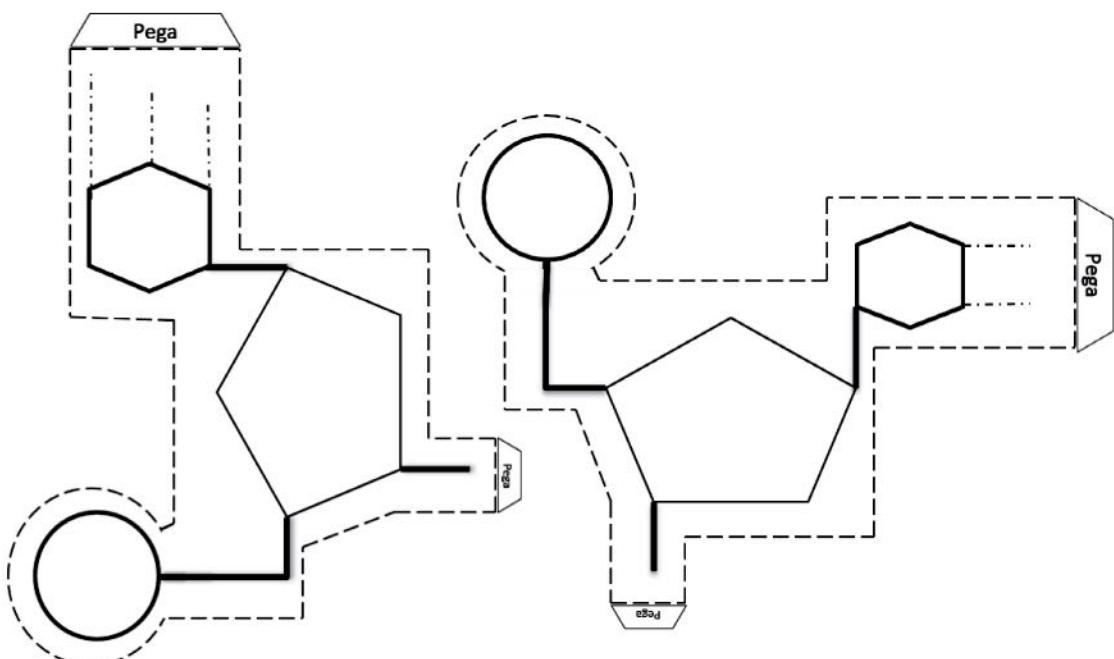
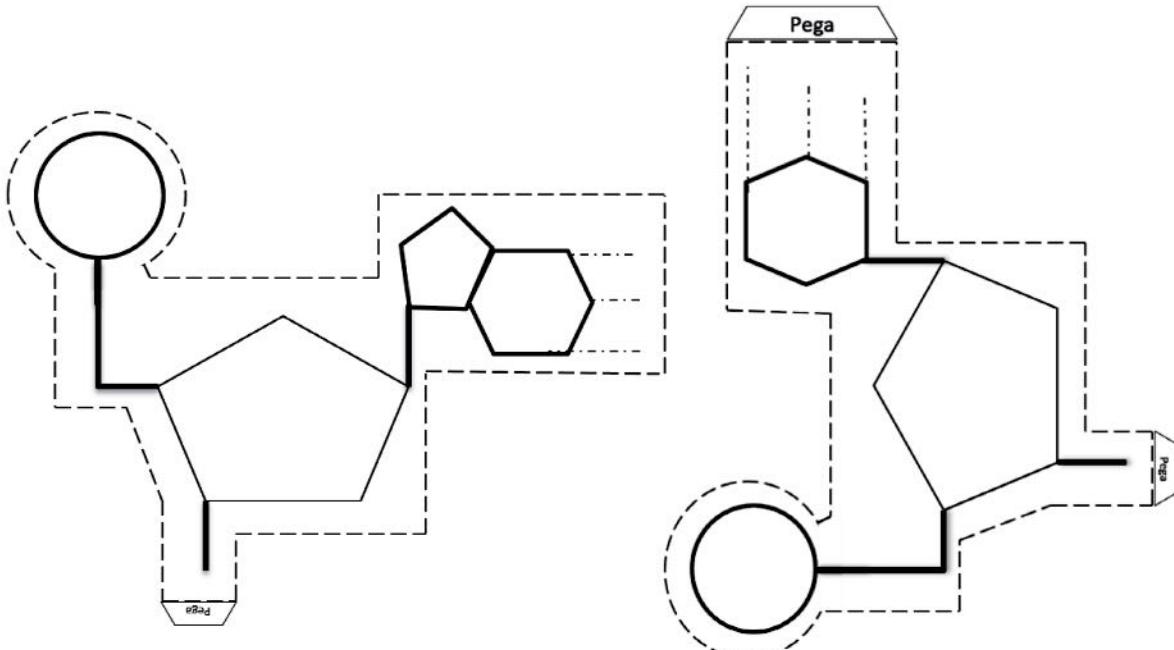
Actividad 1. “Recordando conceptos básicos”

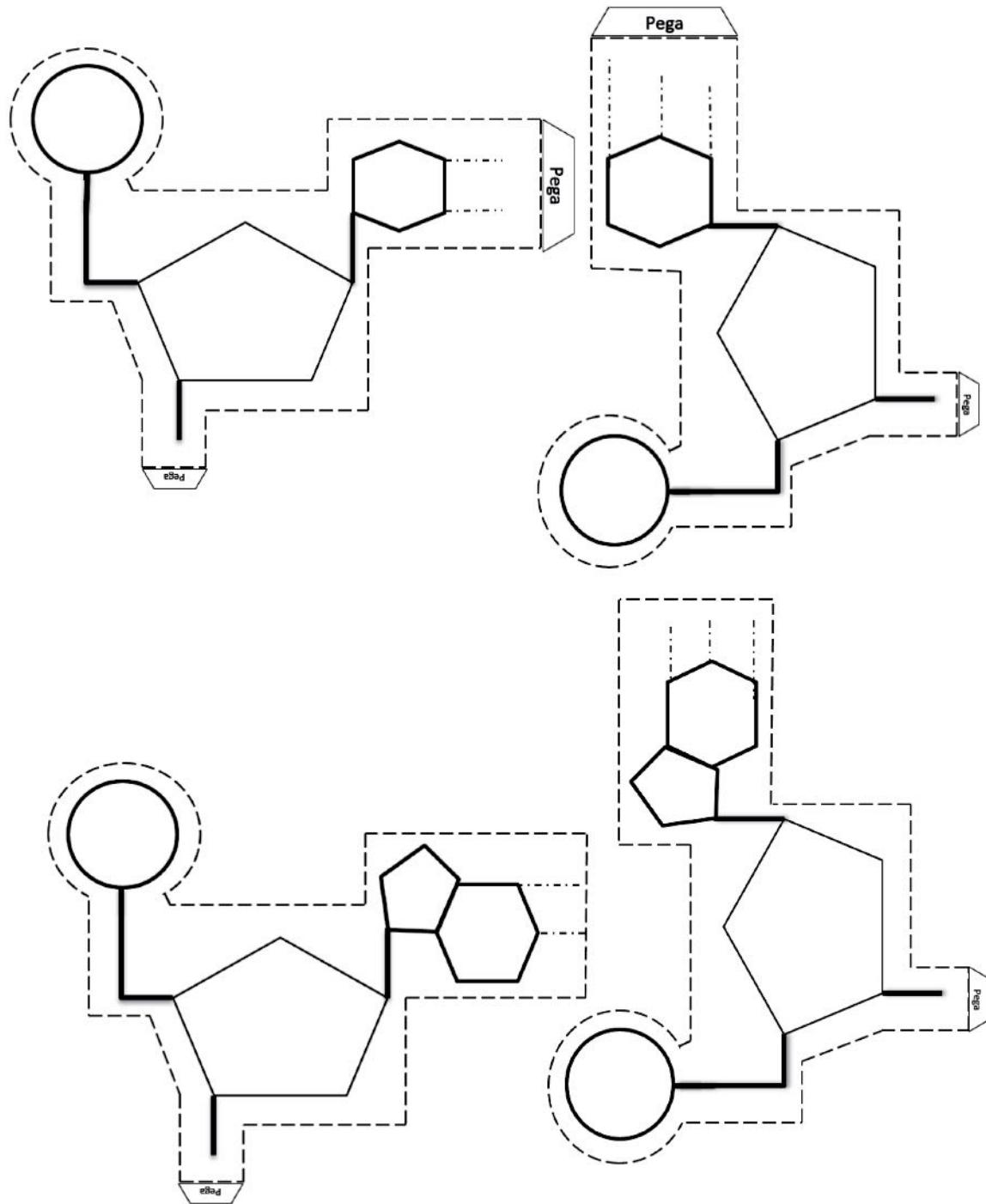
Instrucciones: Relaciona la imagen con los conceptos e indica en la tabla ¿cuáles conceptos están representados en el esquema? (¿qué veo?); ¿cuáles no están representados? (¿qué no veo?); y ¿qué puedes deducir o concluir del esquema? (¿qué infieres?).

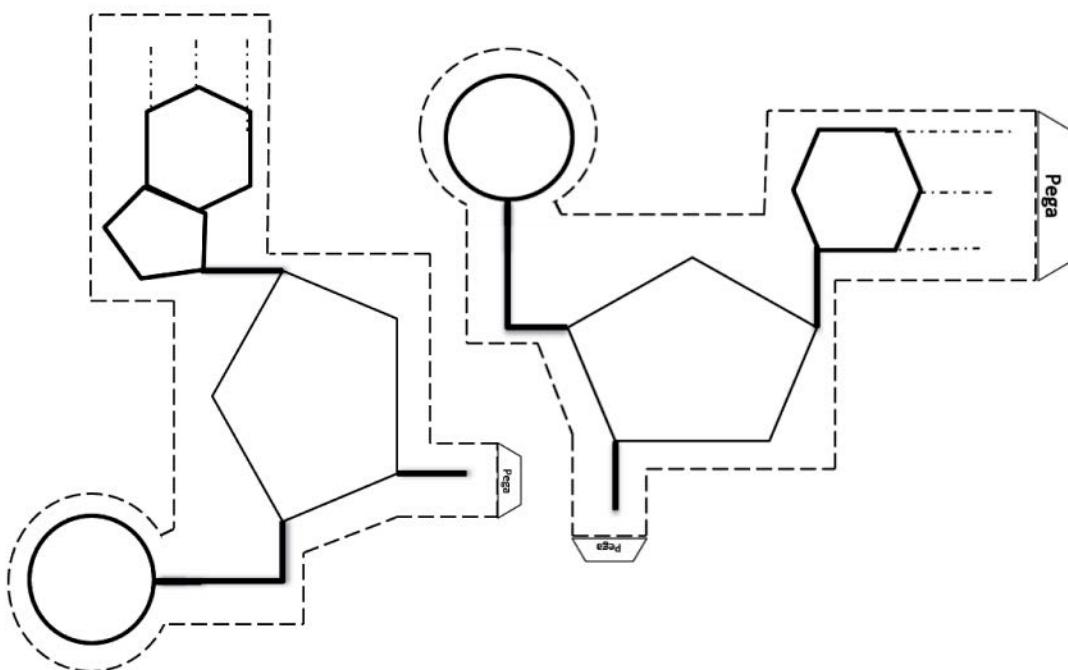
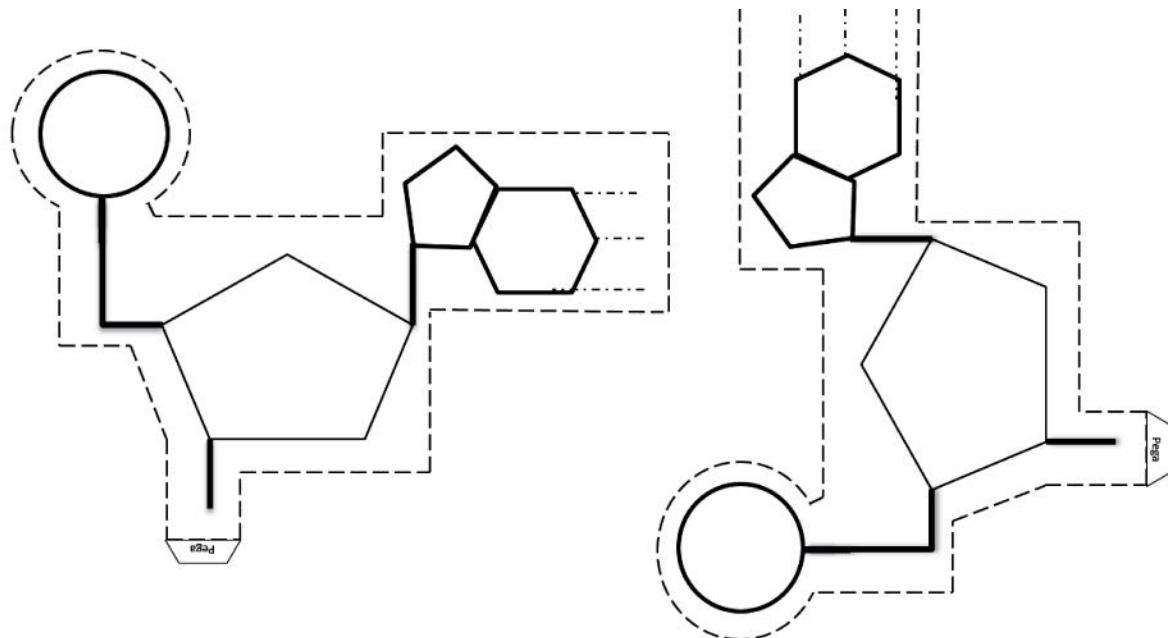
¿Qué veo?	¿Qué no veo?	¿Qué infiero?

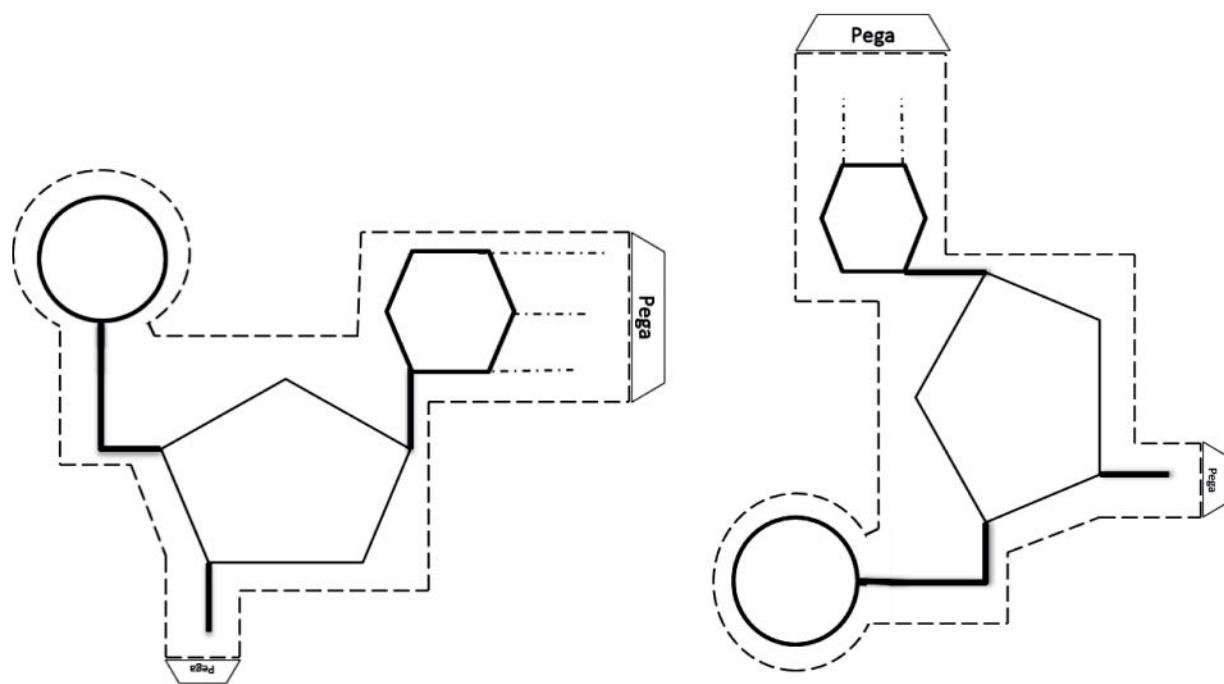
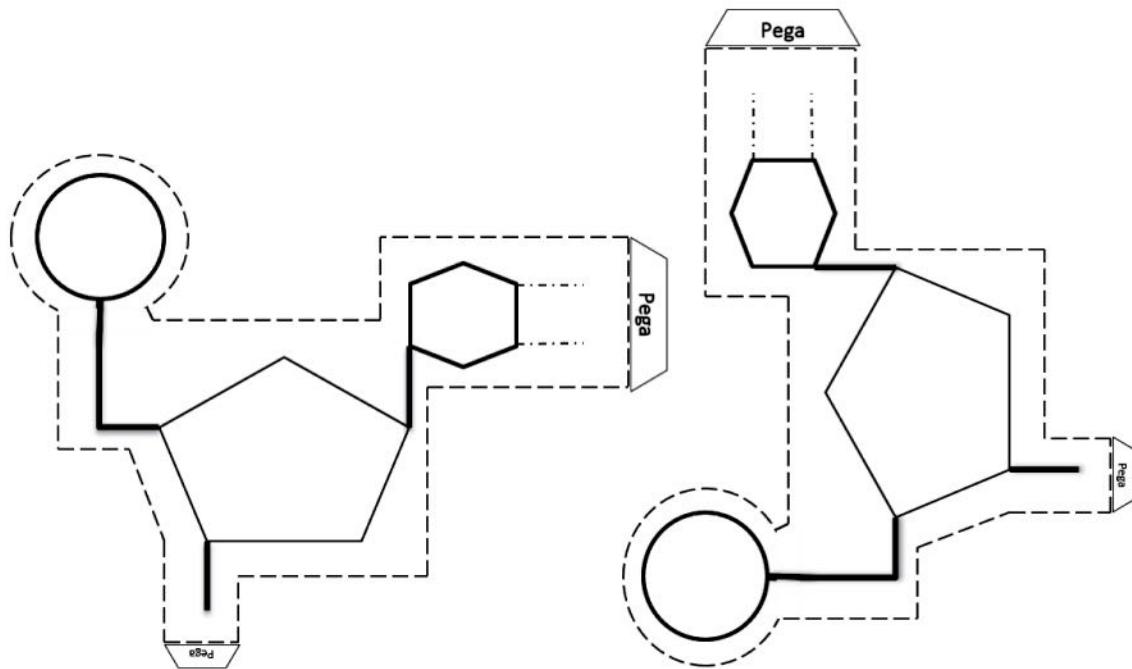
Anexo 1.3 Recortable del DNA











Anexo 1.4

Actividad 2. Identificando los componentes del DNA.

1. De acuerdo con el modelo que construiste en la actividad 2, explica de manera general cómo está organizado y estructurado el DNA. Utiliza las siguientes palabras en tu explicación y en el orden que se presentan, y subráyalas: *doble hélice, nucleótidos, pentosa, grupo fosfato, base nitrogenada, complementarias, antiparalelas*
2. En el siguiente recuadro pega dos pares de base de tu cadena construida, indica la complementariedad y el antiparalelismo en tu molécula.

Anexo 1.5

Actividad 3. Sismo que sacudió a la Ciudad de México en septiembre de 2017.

Instrucciones: Con los resultados de la actividad 3, responde lo que se te pide a continuación.

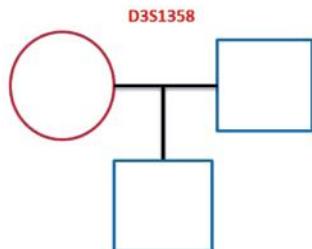
- Completa los datos de la siguiente tabla a partir de los resultados de los genotipos, para cada uno de los marcadores, de los **padres**.

Marcador	Madre (forma genética, número de repeticiones)	Padre (forma genética, número de repeticiones)
D3S1358	Heterocigoto 10, 16	Heterocigoto 14, 16

- Completa los datos de la siguiente tabla a partir de los resultados de los genotipos, para cada uno de los marcadores, de las **víctimas**.

Marcador	Víctima 1 (forma genética, número de repeticiones)	Víctima 2 (forma genética, número de repeticiones)
D2S441	Homocigoto 8	Heterocigoto 12, 16

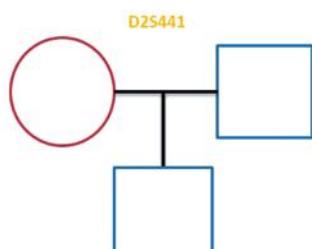
3. A partir de los resultados de los padres, completa los árboles genealógicos para cada marcador (STR) e indica la posible descendencia, para argumentar si alguna de las víctimas es su hijo.



Indica la forma genética:
Madre:

Padre:

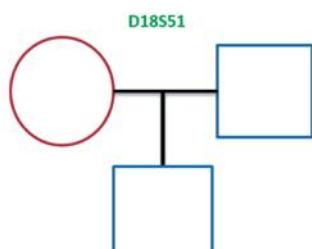
Posibilidades del hijo:



Indica la forma genética:
Madre:

Padre:

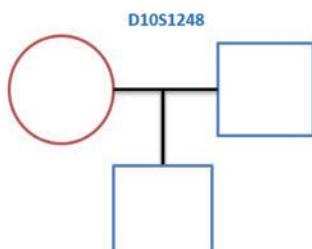
Posibilidades del hijo:



Indica la forma genética:
Madre:

Padre:

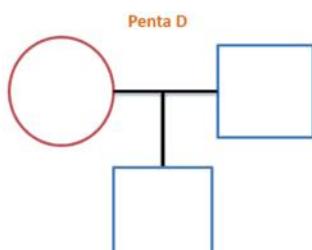
Posibilidades del hijo:



Indica la forma genética:
Madre:

Padre:

Posibilidades del hijo:



Indica la forma genética:
Madre:

Padre:

Posibilidades del hijo:

4. Con los resultados anteriores, indica si alguna de las víctimas podría ser el hijo de los padres extranjeros. Sí. No. ¿Por qué?

Anexo 1.6

Preparación de soluciones

Reactivos	Ingredientes	Volumen a preparar	Cantidades a agregar de reactivos o soluciones stock*
Solución A	EDTA 10 mM Tris-HCl 25 mM Agua destilada	1000 µl	400 µl EDTA 250mM 50 µl Tris-HCl 500mM 550 µl Agua destilada
Solución B	NaOH 0.2 N SDS 1% Agua destilada	10 ml	2 ml de NaOH 1N 1 ml de SDS 10% 7 ml de Agua destilada
Solución C	Acetato de amonio 7.5 M Agua destilada	10 ml	Disuelve 5.7 grs de acetato de amonio en 7 ml de agua, una vez disuelto aforar a 10 ml
TBE 1X		500 ml	*Proporcionada por el profesor
Agarosa 1%	Solución TBE 1X Agarosa	100 ml	Disuelve 1 gr de agarosa en 100 ml de TBE. Calienta en el horno de microondas hasta disolver. Mide 30 ml y colócalos en un vaso de precipitados, cuando esté a 50°C agrega 3 µl de Midori Advance, vierte la mezcla en el molde, coloca el peine y deja gelificar

*Las soluciones stock serán proporcionadas por el profesor.

Anexo 1.7

Actividad experimental. Extracción de DNA

InSTRUCCIONES: Pega la foto del gel de agarosa y contesta las preguntas.

Foto del gel (Extracción de DNA)

Foto

Gel de electroforesis

Considerando el procedimiento y resultados obtenidos (foto del gel) responde el siguiente cuestionario.

- A. ¿Cuál es la función del etanol? Explica.

- B. ¿Según su contenido cual es la función del la solución B?

- C. ¿Por qué se debe de manejar las muestras a baja temperatura?

- D. ¿Qué indican las bandas obtenidas en el gel de agarosa?

Síntesis de proteínas. Life S. A. de C. V.



Síntesis de proteínas y transformación bacteriana

Elaboraron:

*Hernández Carbajal Luz Angélica
Luna Román Celso Miguel*

Colaboraron:

*Bautista Acevedo Marco Antonio
Bernal Enriquez Óscar
Centeno Cruz Federico
Martínez Ortiz Leticia
Mejía García Martha Elvira
Ramírez Aguilar Eva Cristina
Serrano Reyes Gabriela*

BIOLOGÍA I (PEA, 2016). Tercera unidad

¿Cómo se transmiten los caracteres hereditarios y se modifica la información genética?

Propósito

Al finalizar la unidad, el alumno identificará los mecanismos de transmisión y modificación de la información genética, como responsables de la continuidad y cambio en los sistemas biológicos para que comprenda su importancia biológica y evolutiva.

Tema 2. Herencia

Subtema: Manipulación del DNA

Aprendizajes

Declarativos	<ul style="list-style-type: none"> Reconoce las implicaciones biológicas y éticas de la manipulación del material genético. Comprende que la mayoría de los genes codifican proteínas; la ruta de “expresión” consta de dos fases: transcripción y traducción. Comprende que es posible la introducción de DNA exógeno en células bacterianas, para que éstas puedan expresar este nuevo gen en una proteína fluorescente.
Procedimentales	<ul style="list-style-type: none"> Aplica habilidades para comunicar de forma oral y escrita la información derivada de las actividades realizadas en forma individual y en equipo. Adquiere habilidades propias de las técnicas de biología molecular para llevar a cabo una transformación bacteriana.
Actitudinales	<ul style="list-style-type: none"> Aplica actitudes y valores que contribuyan a la comprensión y valoración de la manipulación genética.

Actividades a realizar:

Apertura

- Cuestionario RA-P-RP

Desarrollo

- Exposición teórica. “De genes a proteínas”
- Actividad 1. Construyendo una proteína (kit)
- Actividad 2. Cuestionario y tabla
- Exposición teórica. “De genes a proteínas fluorescentes”
- Actividad experimental. Transformación bacteriana con pGLO
- Actividad 3. Expresión del plásmido pGLO en bacterias

Cierre

- Actividad 4. Lectura “Osamu Shimomura y la medusa de cristal”
- Cuestionario RA-P-RP

Apertura

Cuestionario RA-P-RP

Instrucción: En el **Anexo 2.1** encontrarás el formato del cuestionario. Contesta las preguntas, sólo utiliza la columna izquierda, RA (respuesta anterior).

Respuesta Anterior (RA)	Pregunta (P)	Respuesta Posterior (RP)
	¿Qué es la transcripción?	
	¿Qué es la traducción?	
	¿Qué importancia tiene la síntesis de proteínas?	
	¿Qué es la transformación bacteriana y qué relación tiene con la síntesis de proteínas?	

Desarrollo

Exposición teórica. “De genes a proteínas”

El albinismo tal como lo conocemos y definimos en el mundo de los animales, se produce como consecuencia de una mutación en la que el gen que contiene la información necesaria para sintetizar la enzima que participa en la producción de los pigmentos en la piel (melanina), se inactiva.

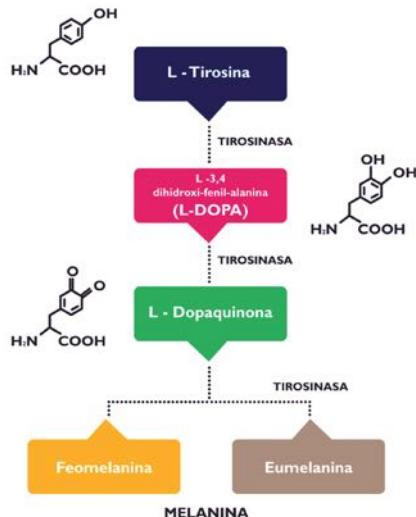


Copito de nieve (Figura 1) es un ejemplo de un gorila albino (único caso reportado); él fue atrapado por unos cazadores en la selva de Nko en Guinea Ecuatorial y vendido al zoológico de Barcelona en 1966. Su albinismo se debe a que la enzima tirosinasa está inactivada por cambios en algunos nucleótidos del gen que sintetiza a esta enzima. La tirosinasa es la encargada de transformar al aminoácido L tirosina en eumelanina o feomelanina (Figura 2).

Figura 1. Copito de Nieve, Zoológico de Barcelona. Tomado de:
<https://www.zoobarcelona.cat/es/historia>

BIOSÍNTESIS DE LA MELANINA

Figura 2. Vía metabólica de la producción del pigmento que se aloja en los melanocitos de la piel, y que le confiere color. La tiroxina, es una enzima que interviene en estas transformaciones para producir tales pigmentos. Imagen tomada de Lluís Montoliu y Ana Yturralde (ALBA, 2018): <http://wwwuser.cnb.csic.es/~albino/queeselalbinismo/melanina.html>



Las proteínas

Como recordarás, las proteínas son biomoléculas que están conformadas por una o más cadenas de aminoácidos (Figura 3).

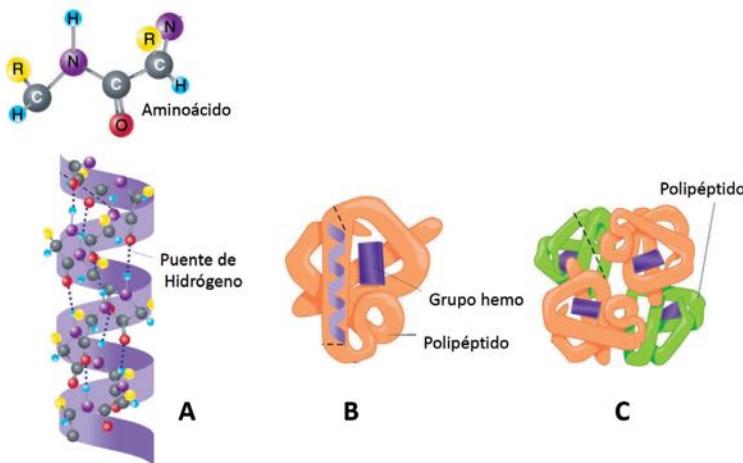


Figura 3. Estructura de una proteína. A. Estructura secundaria producto de la unión de muchos aminoácidos. B. Estructura terciaria, resultado de la interacción entre los aminoácidos a lo largo de toda la cadena. C. Estructura cuaternaria, puede estar conformada por dos o más cadenas de aminoácidos de estructura terciaria, las cuales interactúan entre sí. Imagen modificada de © 2010 PJ Russell, iGenetics 3rd ed.; © 2014 by Steven M. Carr

https://www.mun.ca/biology/scarr/iGen3_06-04.html

Los aminoácidos están estructurados por un grupo amino, un grupo carboxilo ambos unidos a un carbono central, el cual posee un grupo radical (R), el cual le confiere propiedades distintas (Figura 4).

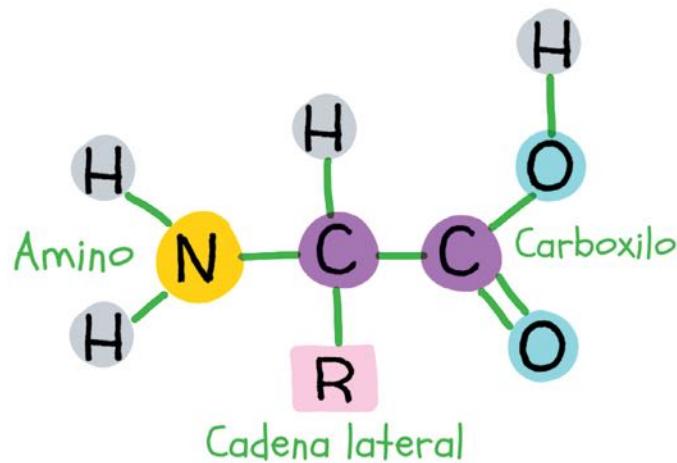


Figura 4. Estructura general de un aminoácido. Elaboración propia.

Las proteínas son los componentes más importantes en los sistemas vivos y se encuentran en mayor cantidad (Figura 5); desempeñan muchas funciones (estructurales, metabólicas y reguladoras). Dentro de las funciones metabólicas, las enzimas (que son proteínas) son las catalizadoras de las reacciones bioquímicas que suceden dentro de los sistemas vivos. De ahí que la **enzima tirosinasa** que está inactiva en Copito de Nieve, le confiera esa característica de no pigmentación (albinismo); por lo tanto, podemos decir que la expresión de los genes (fenotipo) definirá la identidad de un ser vivo.

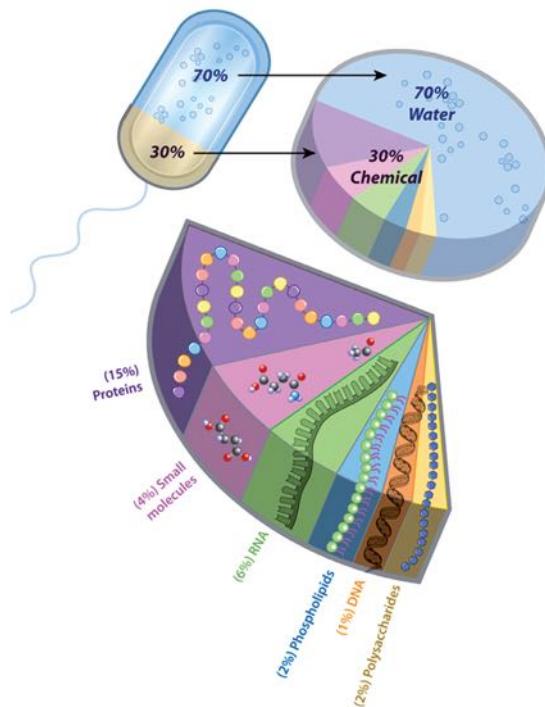


Figura 5. Porcentaje de biomoléculas en los sistemas vivos. Se muestra que el 70% del volumen de una célula bacteriana es agua. Mientras que el 30% restante de la célula, corresponde a biomoléculas tales: 15% de proteínas, 4% pequeñas moléculas, 6% RNA, 2% fosfolípidos, 1% DNA y 2% de polisacáridos. Tomado de: What is a cell?, disponible en <https://www.nature.com/scitable/topicpage/what-is-a-cell-14023083/>

La síntesis de proteínas

Todo comienza en el DNA, ya que las células de un organismo decodifican¹ las instrucciones contenidas en el DNA para sintetizar proteínas; a este proceso se le denomina **Síntesis de Proteínas**; lo podemos dividir en dos etapas para su estudio: **transcripción y traducción**.

La información almacenada en una secuencia de nucleótidos (Figura 6) que conforman a la molécula de DNA se decodifica de forma unidireccional, es decir, del DNA al RNA (transcripción) y del RNA a las proteínas (traducción). Este proceso (Figura 7) fue enunciado por el científico inglés Francis Crick, famoso además por proponer junto a James Watson un modelo de estructura para el DNA.

Transcripción

La transcripción ocurre dentro del núcleo celular en las células eucariotas y en el citoplasma en las procariotas. En esta primera etapa los genes, que son secuencias de nucleótidos, se transcriben en una molécula de RNA denominado RNA mensajero (RNAm). En este proceso la síntesis de una molécula de RNAm es catalizada por una enzima llamada **RNA polimerasa**. El proceso se inicia cuando dicha enzima reconoce un lugar específico del DNA llamado **promotor**. Luego de unirse al promotor, la RNA polimerasa desenrolla la hélice del DNA separando las cadenas. La cadena 5' → 3' se le nombra codificante y la 3' → 5' es la cadena molde (template) que se utiliza para que la RNA polimerasa vaya agregando nucleótidos complementarios uno tras otro, a medida que se desplaza en dirección 5' → 3' sobre el DNA (Figura 8).

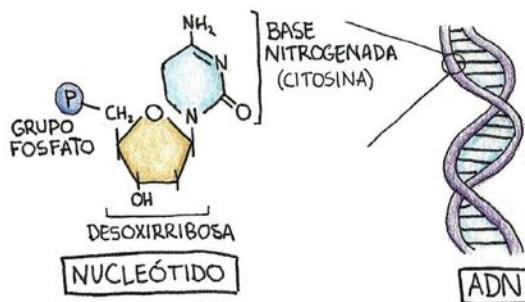


Figura 6. El DNA está formado por nucleótidos, que se constituyen por la unión de tres moléculas diferentes, una base nitrogenada (A, G, C, y T) unida a un carbohidrato (desoxirribosa), unido a su vez por un grupo fosfato.

Imagen tomada de:
<https://biomedvinetas.files.wordpress.com/2014/06/c3a1cidos-nucleicos1.jpg>

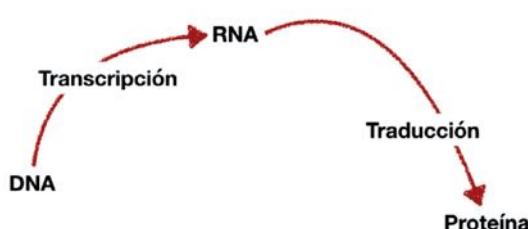


Figura 7. Flujo de la información genética en una célula para la síntesis de proteínas.

1 Aplicar las reglas adecuadas a un mensaje que ha sido emitido en un sistema de signos determinado para entenderlo.

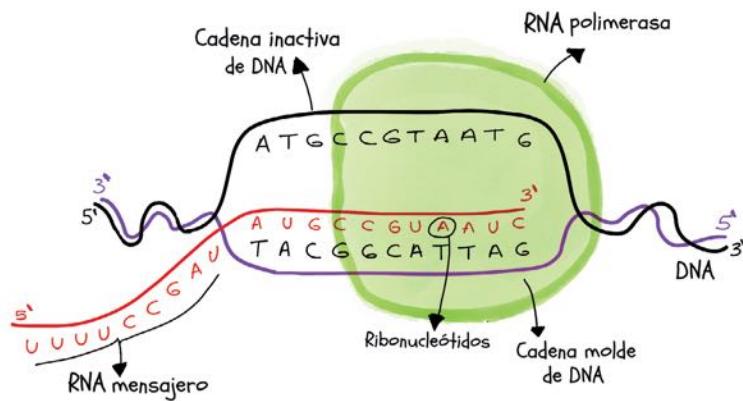


Figura 8. Representación esquemática de la transcripción de una secuencia de DNA, con la que se enlaza la RNA polimerasa en la obtención del RNAm. Elaboración propia.

Los nucleótidos que adiciona la RNA polimerasa para formar el RNAm son ribonucleótidos, es decir, nucleótidos que poseen en su estructura el azúcar ribosa. La complementariedad de nucleótidos se realiza de la siguiente manera:

si en el DNA hay:	SI en el RNA hay:
C (Citosina)	G
G (Guanina)	C
T (Timina)	A
A (Adenina)	U (uracilo)

Tabla 1: Apareamiento de nucleótidos

Traducción

La siguiente etapa consiste en que el RNAm sale del núcleo (en el caso de las células eucariotas) y en el citoplasma esta cadena de ribonucleótidos será traducida en una cadena de aminoácidos que formarán un proteína. Para que este proceso se lleve a cabo, se requieren diferentes moléculas, es decir, diferentes tipos de RNA (transferencia, mensajero y ribosomal). El objetivo de esta etapa es que el mensaje de la cadena de RNA tiene que ser traducido en una proteína. Para poder comprender esta etapa recurriremos a una analogía:

- Como sabrás, en cualquier idioma existe un alfabeto que contiene las letras necesarias para formar palabras y con ellas las oraciones. A nivel molecular, la vida se basa en un principio similar, el DNA es la molécula que proporciona el “alfabeto” maestro para formar proteínas, estos cuatro nucleótidos: Adenina, Guanina, Timina y Citosina, son los que en la etapa de transcripción sirvieron de molde para construir una cadena de RNAm, ahora este RNA tendrá que ser **traducido**, utilizando un **diccionario especial (código genético)**, para formar las palabras (unión de aminoácidos).

El RNAm se lee en codones para poder ser traducido, los codones no son otra cosa, que conjuntos de tres nucleótidos (Figura 9). Las diferentes combinaciones de tres nucleótidos (codón) determinan qué aminoácido será constituyente de la proteína en formación.



RNA

Codón 1	G U A
Codón 2	U G C
Codón 3	C A A
Codón 4	G C U
Codón 5	U G G
Codón 6	C C G
Codón 7	G G U
Codón 8	U A U
Codón 9	G C U
Codón 10	A A A

Ácido ribonucleico

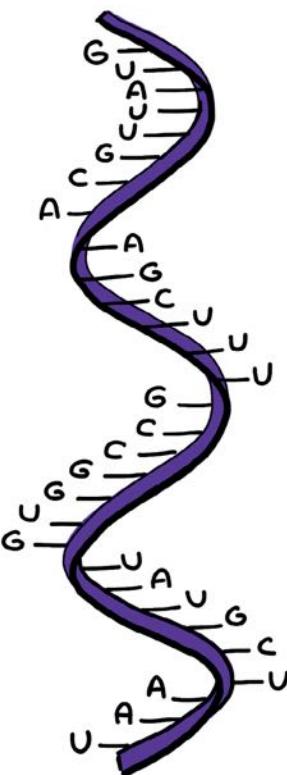


Figura 9. Secuencia de 21 ribonucleótidos de RNAm, que conforman siete codones diferentes, los cuales serán traducidos en siete aminoácidos.
Elaboración propia.

Código genético

El código genético es el diccionario que permite la traducción de ribonucleótidos en grupos de tres, "los codones", en aminoácidos. Es el conjunto de reglas que se descubrieron por diferentes investigadores y por las cuales se sabe que la información codificada dentro de material genético (secuencia de RNAm proveniente del DNA) se traduce en proteínas por las células vivas. El código establece una equivalencia entre tres nucleótidos sucesivos de RNAm que forman un codón, y lo que corresponde a uno de los 20 aminoácidos existentes (Figura 10). El código genético se caracteriza por:

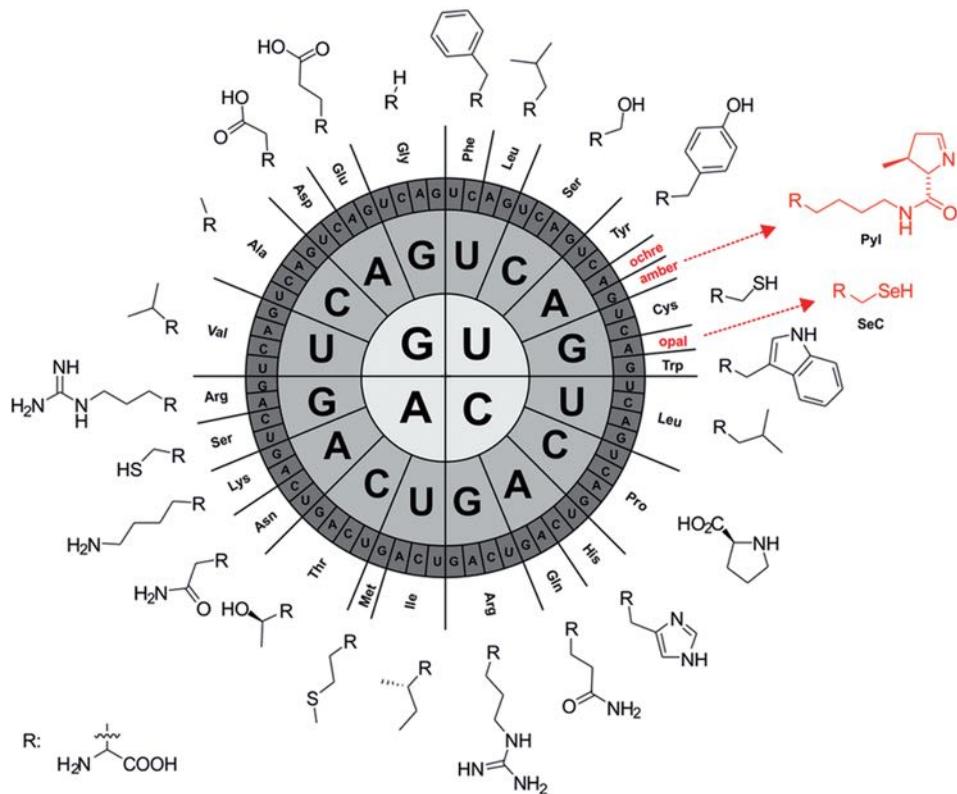


Figura 10. El código genético muestra los aminoácidos que corresponden a cada uno de los 64 codones posibles, a fin de codificar un codón comienza por el centro del círculo y continúa hacia afuera. Imagen tomada de ResearchGate. https://www.researchgate.net/The-genetic-code-structure-in-the-RNA-format-in-a-radial-representation-Chartfrom_fig1_305823780

1. **Está organizado en tripletes o codones:** cada aminoácido está determinado por tres nucleótidos.
2. **Ser degenerado**, es decir, un mismo aminoácido puede estar determinado por más de un triplete o codón.
3. **Tiene un codón de inicio**, suele ser AUG (Met).
4. Existen tres tripletes de terminación que no codifican para ningún aminoácido: UAA, UAG y UGA.
5. **Es universal:** coincide en todos los organismos estudiados hasta la fecha.

La maquinaria de la síntesis de proteínas

En el proceso de la traducción del RNAm es necesaria la participación de tres tipos de RNA, el mensajero, los RNA ribosomales y de transferencia. Con estas moléculas se conforma una maquinaria que sintetizará una proteína. Este proceso se puede describir en tres etapas: inicio, elongación y fin de la traducción.

Iniciación

La primera etapa de la traducción comienza en el citoplasma, cuando una molécula de RNAm se une a una subunidad pequeña de RNA ribosomal y a una molécula de RNA de transferencia. El proceso comienza con el **codón de inicio AUG**, el cual se une al **anticodón UAC**. Como paso final de la etapa de **iniciación** una subunidad ribosomal grande se une a la pequeña, una vez formado este complejo de iniciación, continúa la segunda fase de la traducción, la elongación (Figura 11).

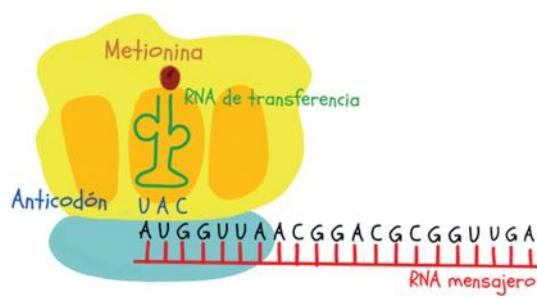


Figura 11. Primera etapa de la traducción, formación del complejo ribosomal.
Elaboración propia.

La subunidad ribosomal grande posee dos sitios de unión, el sitio A, donde el RNA de transferencia reconoce a su codón; y el sitio P donde el RNA de transferencia cede su aminoácido a la cadena polipeptídica.

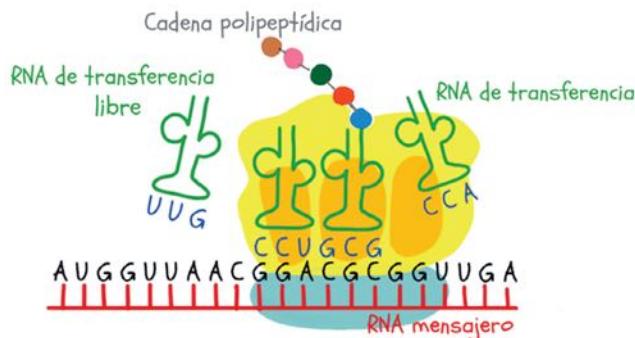


Figura 12. Segunda etapa de la traducción, elongación.
Ensamble de la cadena de aminoácidos.
Elaboración propia.

Elongación

En la segunda etapa de la traducción, la **elongación**, una cadena polipeptídica se ensambla, uniendo los aminoácidos entre sí (Figura 12). Conforme el RNA mensajero pasa entre las dos subunidades del ribosoma, siguiendo la secuencia dictada por los codones de la molécula del RNA mensajero, el RNA de transferencia cede su aminoácido y la enzima peptidiltransferasa establece el enlace peptídico adicionando aminoácidos a la cadena polipeptídica y se libera el RNA de transferencia. Otro RNA de transferencia se desplaza por uno de los sitios vacíos del complejo ribosomal para adicionar a su aminoácido e incorporarlo a la cadena polipeptídica, este proceso se realiza de manera consecutiva mientras haya codones que codifiquen para aminoácidos.

Fin de la traducción

Durante la última etapa, el **fin de la traducción**, aparece un codón de alto (*stop*) UGA, UAA y UAG, en el RNA mensajero, cuando esto ocurre, el primer sitio del ribosoma es ocupado por una proteína denominada factor de liberación y todas las moléculas participantes de este proceso se separan y es liberada la proteína (Figura 13).

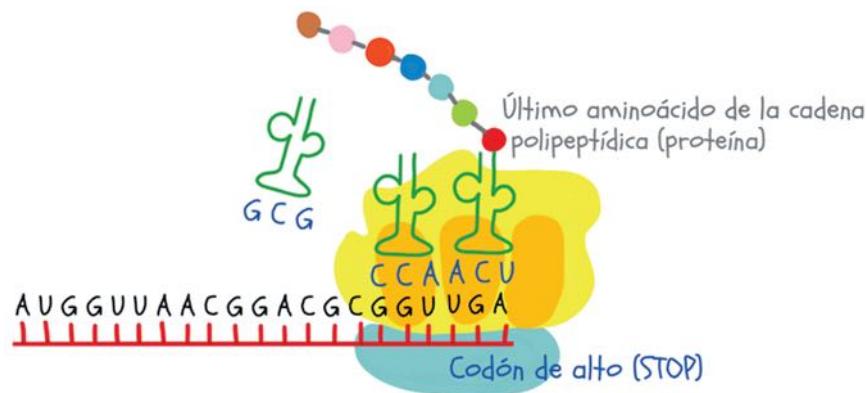
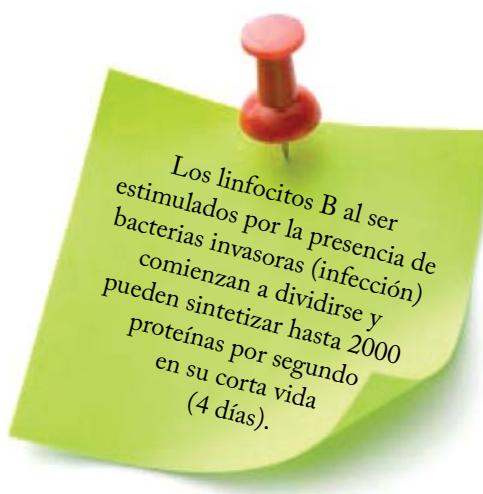


Figura 13. Fin de la traducción.
Elaboración propia.

¿Y Copito de Nieve?

Todos los seres vivos estamos hechos de biomoléculas, en especial las proteínas son de gran importancia porque realizan funciones vitales en las reacciones bioquímicas de las células. En el caso de Copito de Nieve, aunque sus células están sintetizando la enzima (proteína) que lleva a cabo la transformación del aminoácido tirosina en melanina (pigmento de la piel), un cambio en la secuencia del DNA de las células de Copito hace que la enzima no funcione adecuadamente. Así que lo que has aprendido acerca de la síntesis de proteínas, ahora te permite explicar y relacionar estos conceptos con otro tema muy importante: la herencia y las mutaciones. Pero estas son otra historia.



Actividad 1. Construyendo una proteína (kit)

Instrucciones: Utiliza el **kit de síntesis de proteínas** del Anexo 2.2, que te será útil para comprender el proceso de síntesis de proteínas .

Materiales: Kit de síntesis de proteínas, DNA (doble cadena), material para la transcripción de RNA mensajero, código genético universal, subunidades de RNA ribosomal, RNA de transferencia, aminoácidos.

1. **Realiza la transcripción** utilizando la doble cadena de DNA que forma parte del kit:
 - Transcribe los nucleótidos de esta secuencia de DNA utilizando los ribonucleótidos complementarios para formar un RNA mensajero.
2. **Realiza la traducción** del RNA mensajero que obtuviste en el paso anterior:
 - Utiliza las subunidades ribosomales, los RNA de transferencia y el código genético universal para sintetizar una proteína.

Actividad 2. Cuestionario y tabla

Instrucciones: Discute con tus compañeros de equipo los pasos que llevaron a cabo para la transcripción y la traducción en la síntesis de la proteína. En el **Anexo 2.3**, encontrarás los formatos para contestar el cuestionario y la tabla de esta actividad.

Exposición teórica. “De genes a proteínas fluorescentes”

Transformación

Transformación significa cambio. En biología molecular la transformación se refiere a una forma de cambio, en la que se altera el material genético de una célula individual por la incorporación de DNA externo (Figura 14). Las bacterias se usan comúnmente como células huésped para hacer copias de DNA en el laboratorio, porque son fáciles de cultivar en grandes cantidades. Su maquinaria celular realiza naturalmente la replicación del DNA y la síntesis de proteínas. Son organismos increíblemente versátiles que tienen la capacidad única de tomar DNA extraño y replicarlo. Esta característica adaptativa les da una ventaja evolutiva y les ayuda a sobrevivir a los cambios en su entorno. Por ejemplo, las bacterias pueden adquirir DNA que los hace resistentes a los antibióticos.

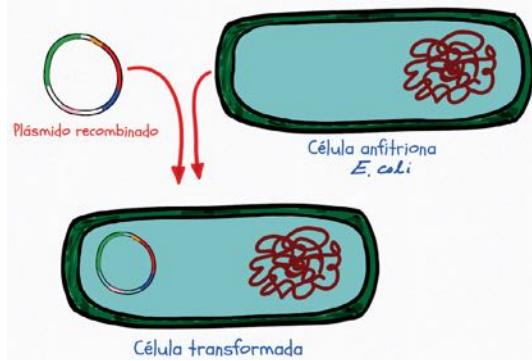


Figura 14. Transformación bacteriana.
Elaboración propia.

El genoma bacteriano está contenido en un solo cromosoma circular libre en el citoplasma y puede estar conformado por tres a cinco millones de bases de longitud. Además, las bacterias pueden contener círculos más pequeños de DNA, llamados plásmidos (Figura 15) de entre 5000-10000 bases de longitud, que pueden intercambiarse de forma natural entre bacterias, en un proceso llamado conjugación.

Es posible introducir plásmidos en células bacterianas; cuando una bacteria puede ser transformada naturalmente se le llama competente, así puede tomar el DNA externo. Algunas bacterias son naturalmente competentes, pero, otras bacterias requieren de productos químicos y tratamiento físico para poder incorporar el DNA externo. Al incorporar el plásmido, las bacterias expresan nuevas proteínas que no eran expresadas con su propio genoma; de esta manera, se dicen que han sido transformadas. Las nuevas copias del plásmido son sintetizadas por las enzimas de replicación del DNA de la célula y pasará a las células hijas a medida que las bacterias se multipliquen.

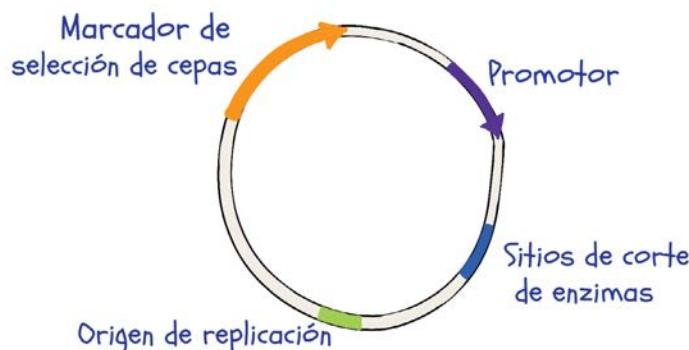


Figura 15. Mapa de un plásmido.
Elaboración propia.

pueden ser incorporados para ser expresados en las células de plantas y adquirir estas nuevas características de resistencia. Se puede transformar genéticamente a bacterias con genes para que sean capaces de degradar el petróleo de derrames. Las enfermedades causadas por genes deficientes actualmente pueden ser tratadas transformando las células de personas enfermas (terapia génica), con copias sanas de los genes deficientes que causan la enfermedad.

En esta actividad lúdica se transformará el genoma de una bacteria a través de la inserción de un fragmento de DNA exógeno. Las bacterias *E. coli* normalmente forman parte de la flora intestinal. Son relativamente simples y desde hace tiempo se conoce todo su genoma. Para la transformación se usará un plásmido (*pRSET-TdTomato*) que contiene un gen que codifica para una proteína roja fluorescente (*TdTomato*) y un gen para resistencia al antibiótico ampicilina.

Proteínas fluorescentes

La proteína *TdTomato* proviene del coral fluorescente *Discosoma sp.* Esta proteína ocasiona que el coral brille en la oscuridad. Después del proceso de transformación, las bacterias ex-

En el laboratorio los plásmidos se diseñan específicamente para que el DNA que contienen sea copiado por bacterias. Por estas características la transformación genética de bacterias es usada en muchas áreas de la biotecnología, los plásmidos son muy importantes en ingeniería genética, porque pueden ser usados como "taxis genéticos" para transformar células.

Por ejemplo, genes que codifican para resistencia a congelamiento, plagas o fármacos

presarán el nuevo gen adquirido y producirán la proteína fluorescente, lo que se verá como una fluorescencia roja bajo la luz ultravioleta. El plásmido pRSET-TdTomato contiene una versión modificada cuya fluorescencia es mayor a la natural, que fue desarrollada en el laboratorio del Dr. Roger Tsien, quien recibió el Premio Nobel de Química en 2008, por el desarrollo y aplicación de las proteínas fluorescentes.

La proteína verde fluorescente (GFP: green fluorescent protein) se expresa en muchas medusas bioluminiscentes. La proteína fue purificada bioquímicamente de un complejo de proteínas, a partir de medusas *Aequorea victoria* por Shimomura *et al.*, (1962), pero su versatilidad y utilidad como herramienta en el ámbito académico y de la biotecnología, resultó en la clonación y expresión de la proteína recombinante en *E. coli*, por varios investigadores (Prasher *et al.*, 1992; Chalfie *et al.*, 1994). La proteína recombinante está conformada de 239 aminoácidos (BIO-RAD, 2017)

Gracias a sus características, las proteínas fluorescentes han sido ampliamente usadas en la investigación biomédica como moléculas reporteras. Una molécula reportera es una proteína marcada, así la proteína reportera unida a la proteína que interesa estudiar, se podrá seguir por la fluorescencia de la proteína reportera.

Genes de resistencia

Además del gen que codifica para la proteína fluorescente, este plásmido también contiene un gen de resistencia a ampicilina. La ampicilina es un antibiótico que mata a las bacterias al evitar que estas construyan su pared celular. Si una cepa de *E. coli* tiene un gen de resistencia a ampicilina, la cepa sobrevive en una caja de cultivo que contenga ampicilina porque el gen dirige la producción de una enzima que bloquea la acción del antibiótico. Al incluir este marcador genético en el plásmido, se puede saber rápidamente si la transformación ha sido exitosa creciendo las bacterias en cajas de cultivo que contengan ampicilina. Únicamente sobrevivirán las bacterias que se hayan transformado.

En la práctica, la transformación es altamente ineficiente (una de cada 10,000 células incorporan el plásmido de DNA). Si las bacterias se transforman con un plásmido que contiene un marcador de selección (gen de resistencia a algún antibiótico) y se siembran en ambos medios (agar selectivo y no selectivo), se observarán resultados muy diferentes. Las placas de agar con medio no selectivo permitirán que bacterias transformadas y no transformadas crezcan. Por el contrario, en la placa de agar selectiva (con antibiótico), sólo las células transformadas que expresan el marcador crecerán, dando como resultado la recuperación de colonias aisladas.

La transformación bacteriana ha sido de una gran importancia en el desarrollo de la biología molecular. Actualmente es una de las técnicas más versátiles y también una de las más ampliamente usadas. En esta actividad experimental, se pretende que una cepa de la bacteria *E. coli* incorpore y exprese un plásmido que contiene un gen que codifica para una proteína fluorescente (TdTomato y pGLO). El origen de estos genes son el coral *Discosoma sp*, para la proteína roja (TdTomato) y la medusa *Aequorea victoria* para la proteína verde fluorescente. Ambos plásmidos también contienen un gen de resistencia al antibiótico ampicilina (β -Lactamasa).

Actividad experimental. Transformación bacteriana con pGLO

Objetivo

- Explorar el proceso de la transformación bacteriana usando *E. coli* y plásmidos específicos.
- Observar y analizar las características adquiridas por las bacterias transformadas (resistencia a la ampicilina y fluorescencia).

Materiales y equipo

Laboratorio	Reactivos	Material biológico
Gradilla	Cajas de Petri con medio LB-agar	Cultivos bacterianos de <i>E. coli</i> , cepa JM109
Mechero		
2 microtubos de 1.5 ml, estériles		
Micropipetas de 100 μ l	Cajas de Petri con medio LB-agar + Ampicilina	Plásmido pRSET-TdTomato y pGLO
Puntas para micropipetas		
2 vasos de precipitados 100 ml.		
Cajas de petri	Solución de CaCl_2 (50mM), estéril	
Cronómetro		
Baño María a 42 °C		
Termómetro	Solución de cloro al 10%	
Guantes		
Cubrebochas	Hielo	
Asas de siembra desechables		
Lámpara de luz UV	Medio líquido L.B.	
Hielera pequeña o vaso de unicel		

Previo

Un día antes de la transformación, sembrar bacterias *E. coli* en cajas con medio LB-agar, que se incubarán a 37 °C. Revisar el **Anexo 2.4** para los detalles en la preparación de recursos, reactivos y procedimientos.

Procedimientos

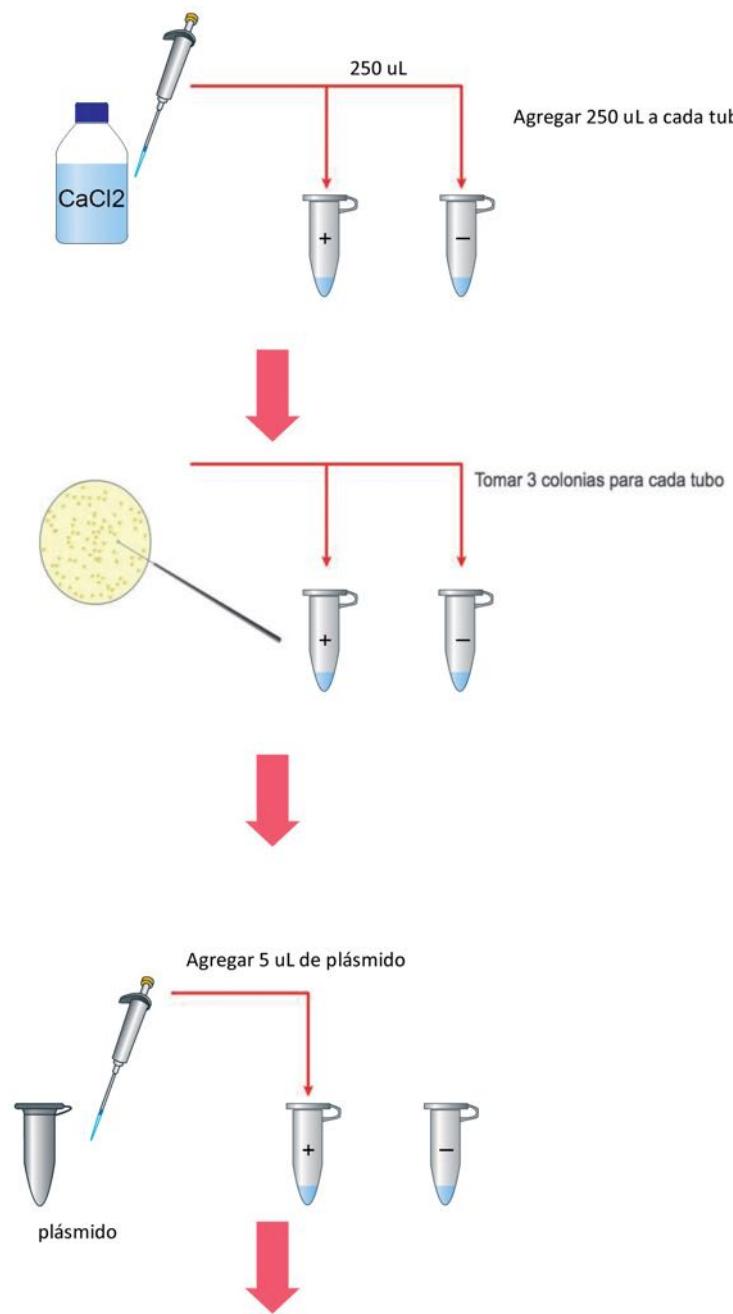
- Preparar una solución de hipoclorito de sodio al 10%. La mesa de trabajo se limpiará con un trapo humedecido en esta solución. Se coloca la solución de hipoclorito de sodio en un vaso de precipitado para la disposición de los desechos.
- Se colocan guantes y cubrebocas, se encienden mecheros para la generación de un campo estéril.
- En este momento ya se cuenta con una caja con cultivos de *E. coli*.
- Marcar un tubo Eppendorf con un + y otro tubo con -. Poner las iniciales o el número de equipo a cada tubo.

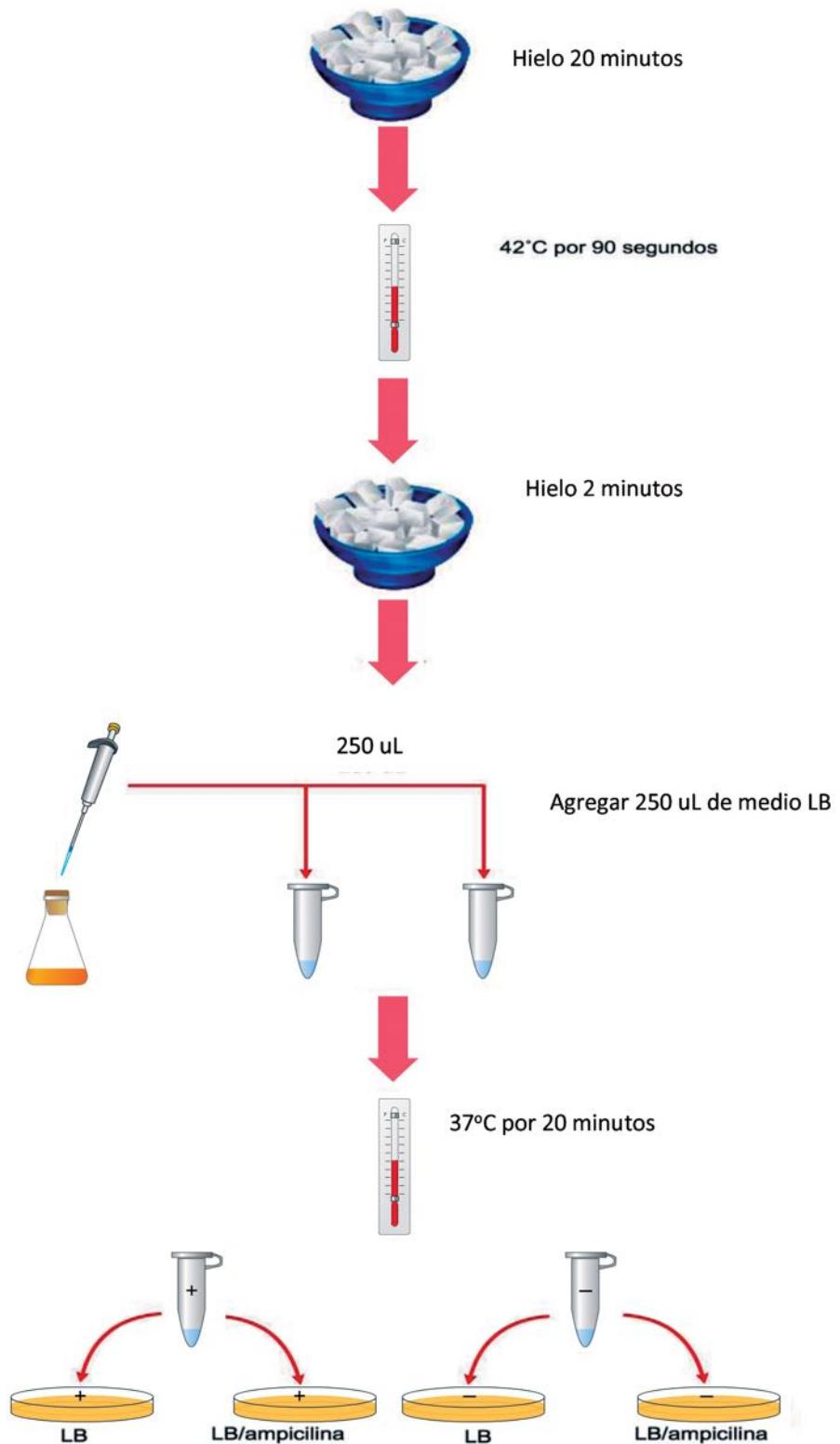
5. Usando una micropipeta, agregar 250 μ l de solución de cloruro de calcio² (CaCl_2 , 50mM) a cada tubo (+ y -). Tirar las puntas de micropipeta usadas.
6. Usando un asa de siembra estéril, tomar tres colonias de la caja de cultivo de *E. coli*. y colocarlas en cada tubo marcado. Agitar el asa de siembra dentro del tubo hasta disgregar por completo las colonias y resuspender completamente las bacterias, tapar el tubo y colocarlo en el hielo. El asa se deposita en el vaso de precipitados con hipoclorito de sodio.
7. El tubo con la solución de DNA del plásmido pGLO será observado incidiendo sobre él luz UV; ¿fluoresce?, anota tus observaciones.
8. Usando una micropipeta, se transferirán 5 μ l del tubo con la solución de DNA del plásmido en el tubo con el signo +.
 - Inmediatamente tapar el tubo, mezclar suavemente con los dedos y colocarlo en el hielo.

Nota: el plásmido sólo se agregará al tubo marcado con +

9. Incubar los tubos en el hielo por 20 minutos.
10. Después del tiempo de incubación se dará un choque térmico a las bacterias. Retirar los tubos del hielo y sumergirlos por 90 segundos en el termoblock a 42 °C.
11. Inmediatamente despues, retirar los tubos y colocarlos en el hielo. Dejarlos ahí al menos dos minutos.
12. Usando una micropipeta, agregar 250 μ l de medio LB al tubo marcado con +, tirar la punta. Repetir con el tubo marcado con -.
13. Dejar los tubos a 37°C por 20 minutos.
14. Marcar dos cajas con medio LB-Agar, una con + y otra con -. Marcar dos cajas con medio LB-Agar/ ampicilina una con signo + y otra con signo -.
15. Usando una micropipeta, tomar 200 μ l de la suspensión de bacterias + y colocarlas en la caja LB-agar correspondiente, tirar la punta. Colocar otros 200 μ l de bacterias + y colocarlas en la caja LB-agar/ampicilina correspondiente.
16. Repetir el paso 15, ahora usando las bacterias con signo -. Tomar 200 μ l y colocarlos en la caja LB-agar; repetir agregando 200 μ l en la caja LB agar/ampicilina.
17. Usando un asa estéril por cada caja, esparcir las bacterias por toda la superficie.
18. Tapar las cajas y dejarlas sobre la mesa por 15 minutos y posteriormente colocarlas boca abajo en una incubadora a 37 °C, por un día.
19. Al día siguiente, retirar las cajas de la incubadora y observar el crecimiento bacteriano. Observar las cajas bajo luz UV.

2 El CaCl_2 polariza el plásmido permitiendo su paso a través de la membrana durante el choque térmico.





Actividad 3. Expresión del plásmido pGLO en bacterias

Instrucciones: Después de haber realizado la actividad experimental, analiza los resultados obtenidos y completa la tabla que se encuentra en el **Anexo 2.5**.

Cierre

Actividad 4. Lectura “Osamu Shimomura y la medusa de cristal”

Instrucciones: Después de dar lectura en equipo a “Osamu Shimomura y la medusa de cristal” (disponible en línea en: <http://www.comoves.unam.mx/numeros/articulo/187/osamu-shimomura-y-la-medusa-de-cristal>), contesta las siguientes preguntas y en plenaria presenta tus respuestas.

1. ¿Cómo es que se llegó al aislamiento de la luciferina en su contexto de purificación?
2. Describe cuáles son las aplicaciones de la proteína fluorescente en el campo de la investigación.

Cuestionario RA-P-RP

Instrucciones: Después de haber realizado la actividad experimental y de analizar los resultados obtenidos retoma el cuestionario diagnóstico (**Anexo 2.1**) RA-P-RP y contesta la columna de la derecha y compara con las respuestas de la columna izquierda. Presenta tus resultados en plenaria.

Literatura consultada

Shaner, N. C., Lin, M. Z., McKeown, M. R., Steinbach, P. A., Hazelwood, K. L., Davidson, M. W., & Tsien, R. Y. (2008). *Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins*. *Nature methods*, 5(6), 545.

Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L., & Lukyanov, S. A. (1999). *Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species*. *Nature biotechnology*, 17(10), 969-973.

BIO-RAD. (2017). Biotechnology Explorer™ Protein Electrophoresis of GFP: A pGLO™ Bacterial Transformation Kit Extension. Disponible en: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lse/literature/M1660023.pdf>

Miller, R. K. y Levine, J. (2006). *Biology. Teachers Edition*. Prentice Hall, Pearson. EUA. 1146 págs.

Oram, R. F. (2007). Biología. Sistemas vivos. Mc Graw Hill. China. 966 págs.

Starr, C. y Taggart, R. (2004). Biología. La unidad y diversidad de la vida. 10^a ed. Thompson, México 933 págs.

Valdivia, B., Granillo, P. y Villareal, S. (2006). Biología La vida y sus procesos. 7^a reimpresión. Ed. Publicaciones Cultural. 582 págs.

Miller, K.y Levine, J. (2006). Biology. Pearson Prentice Hall. EUA. 1146 págs.

Montoliu, L. (2009). JORNADA ALBA: Albinismo, una condición genética, dos realidades: España y Senegal. Disponible en: <http://www.cnb.csic.es/~albino/albinismo/target37.html>

Martínez, P. M. (2008). Síntesis de proteínas. Blog Reme1970's Weblog. Disponible en: <http://www.maph49.galeon.com/RNA/rnapoly.html>

Posada-Swafford, A. (2006). Osamu Shimomura y la medusa de cristal. ¿Cómo ves? Revista de Divulgación de la Ciencia de la UNAM. Número 87, p. 10. Disponible en: <http://www.comoves.unam.mx/assets/revista/187/osamu-shimomura-y-la-medusa-de-cristal.pdf>

Xenomicrobiology: A roadmap for genetic code engineering - Scientific Figure on ResearchGate. Disponible en: https://www.researchgate.net/The-genetic-code-structure-in-the-RNA-format-in-a-radial-representation-Chartfrom_fig1_305823780

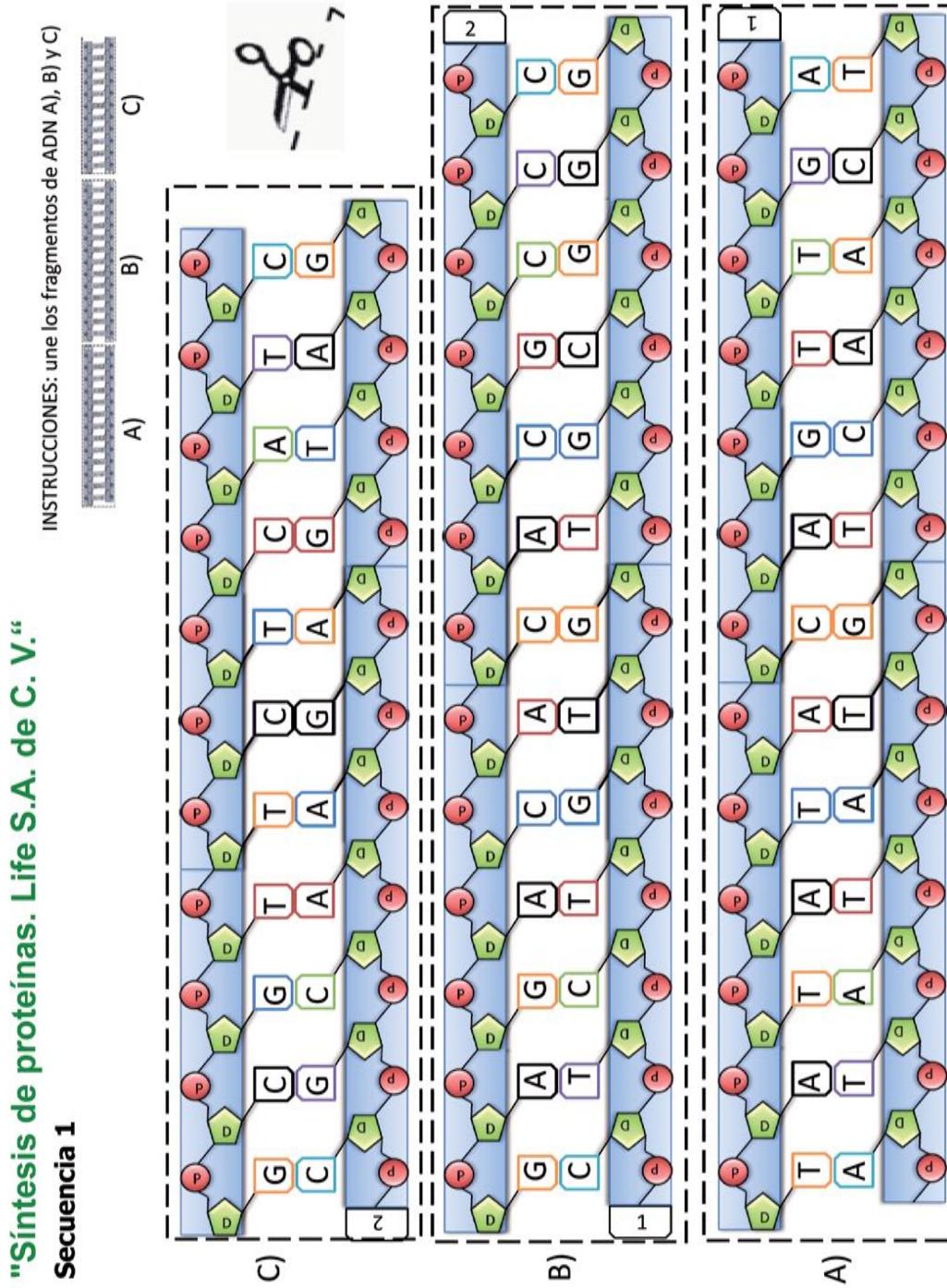
Anexo 2.1

Apertura Cuestionario RA-P-RP

Respuesta Anterior (RA)	Pregunta (P)	Respuesta Posterior (RP)
	¿Qué es la transcripción?	
	¿Qué es la traducción?	
	¿Qué importancia tiene la síntesis de proteínas?	
	¿Qué es la transformación bacteriana y qué relación tiene con la síntesis de proteínas?	

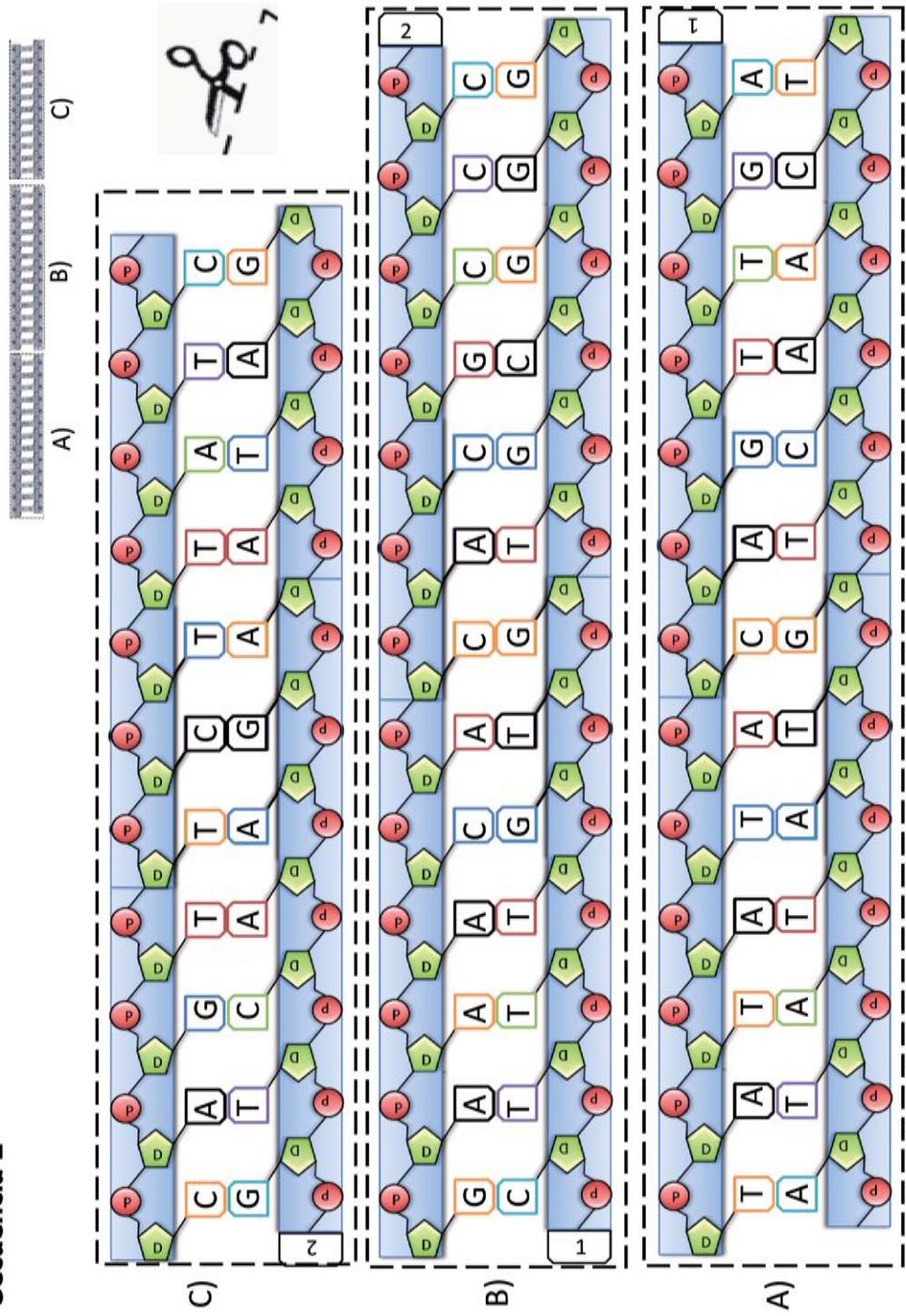
Anexo 2.2

Actividad 1. Construyendo una proteína (kit)



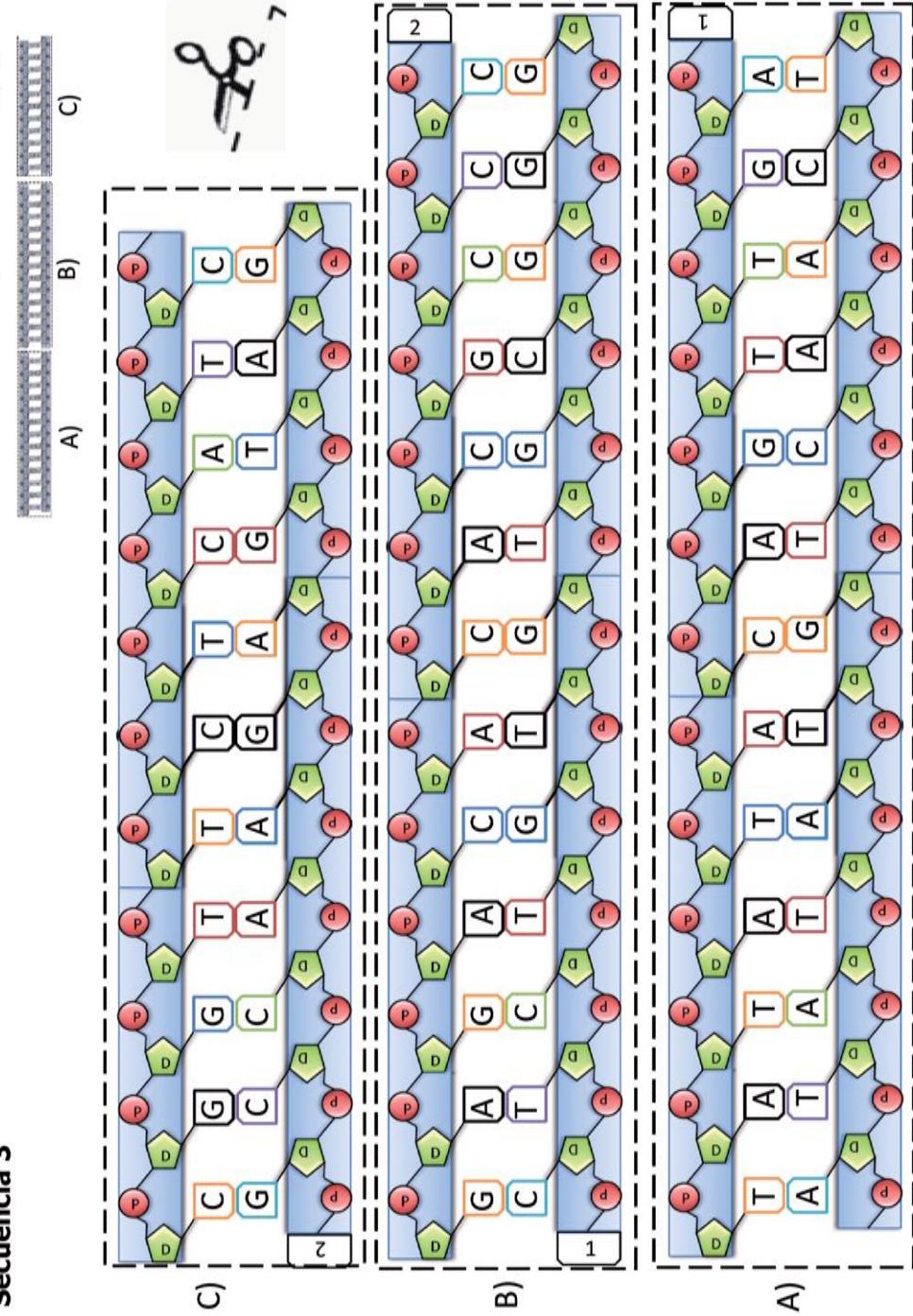
"Síntesis de proteínas. Life S.A. de C. V."
Secuencia 2

INSTRUCCIONES: une los fragmentos de ADN A), B) y C)



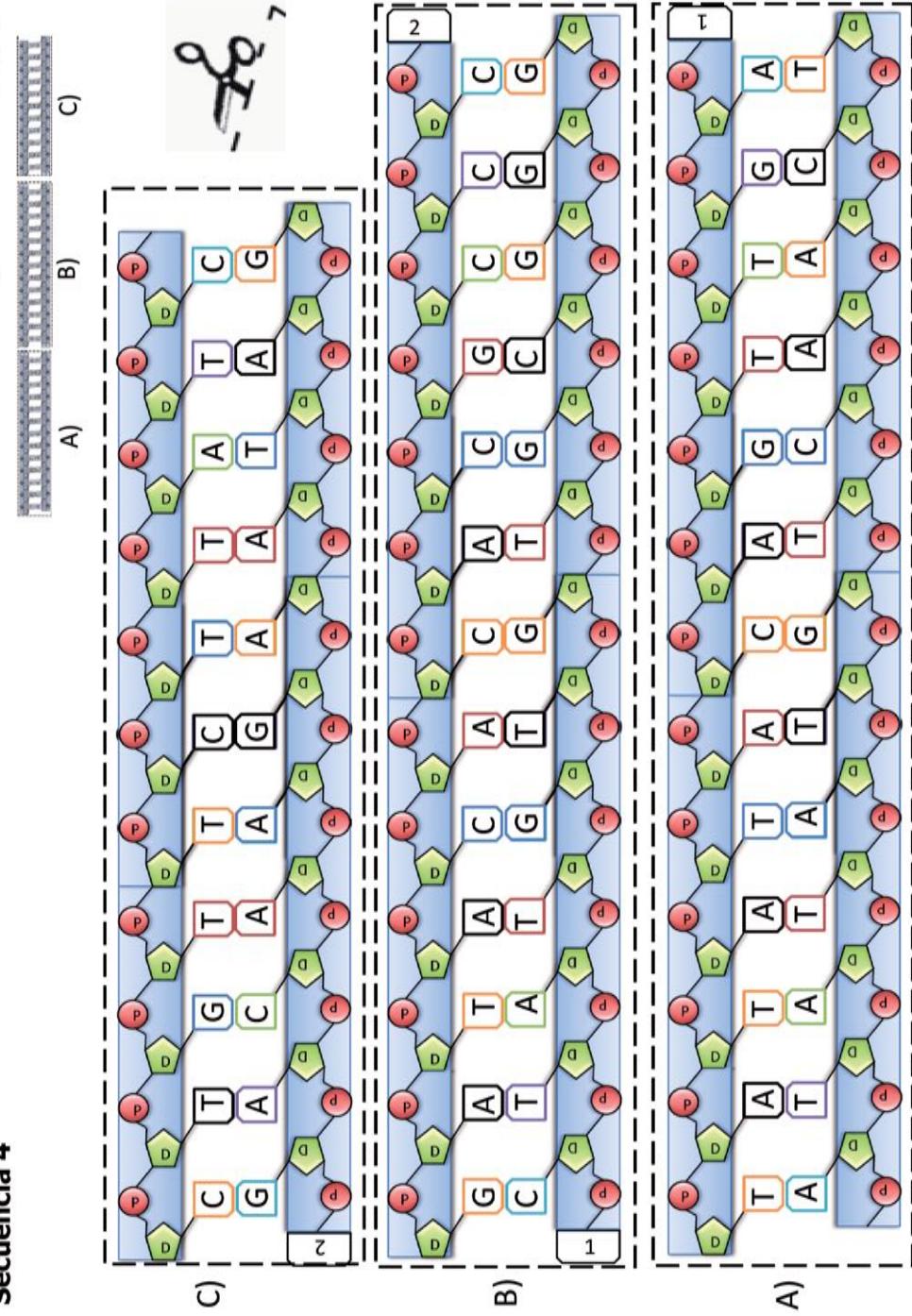
"Síntesis de proteínas. Life S.A. de C. V."
Secuencia 3

INSTRUCCIONES: une los fragmentos de ADN A), B) y C)



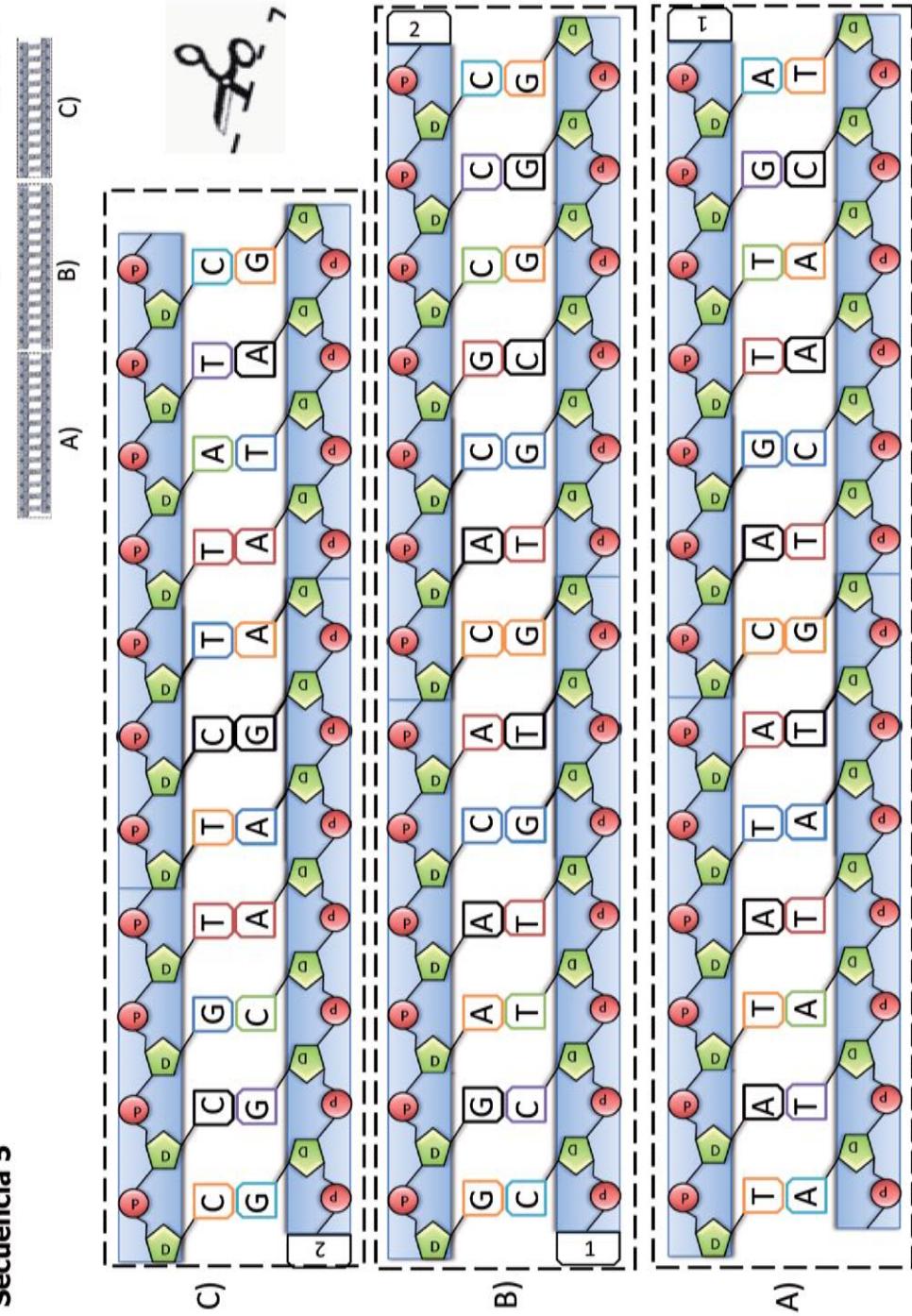
"Síntesis de proteínas. Life S.A. de C. V."
Secuencia 4

INSTRUCCIONES: une los fragmentos de ADN A), B) y C)



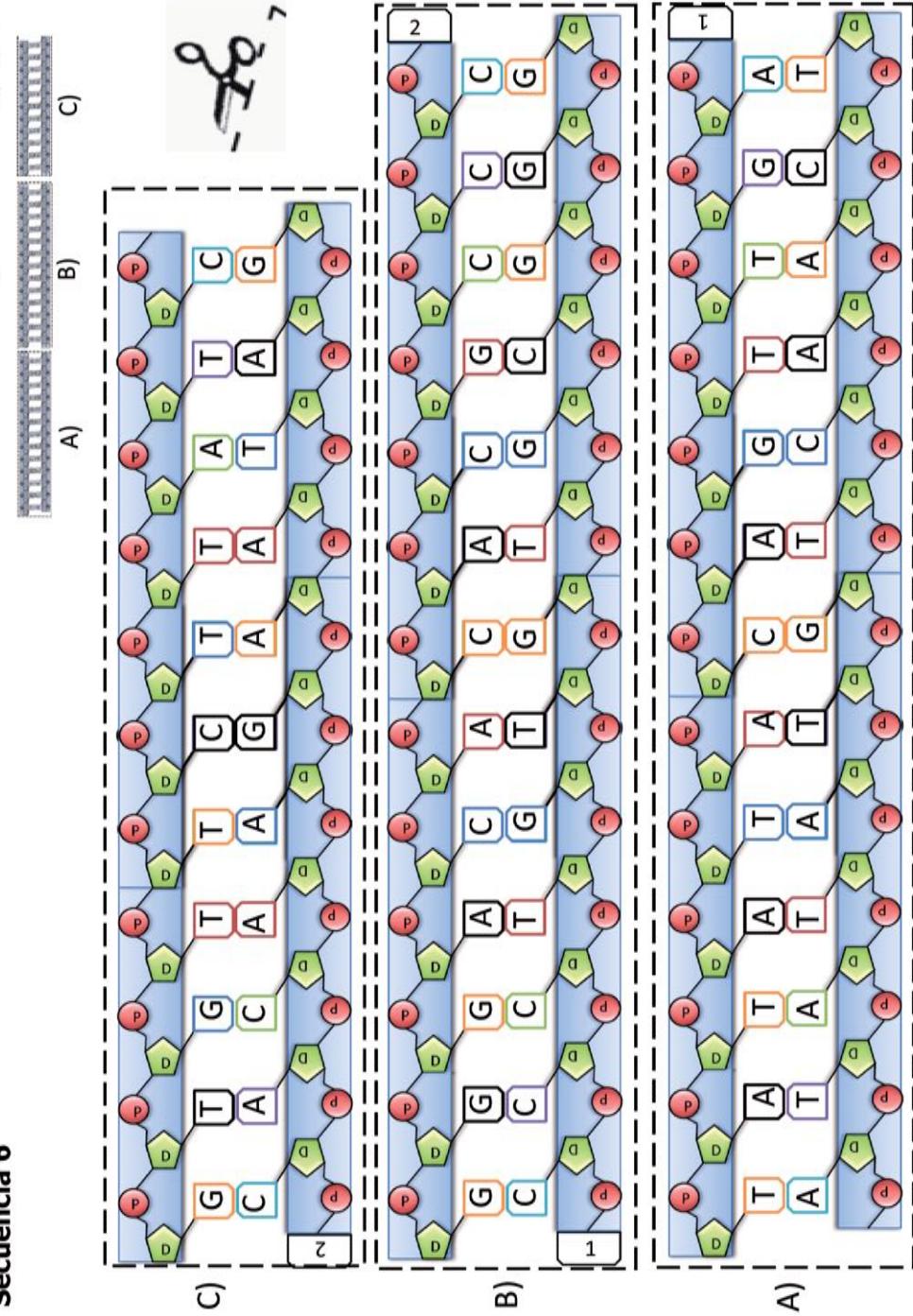
"Síntesis de proteínas. Life S.A. de C. V."
Secuencia 5

INSTRUCCIONES: une los fragmentos de ADN A, B) y C)



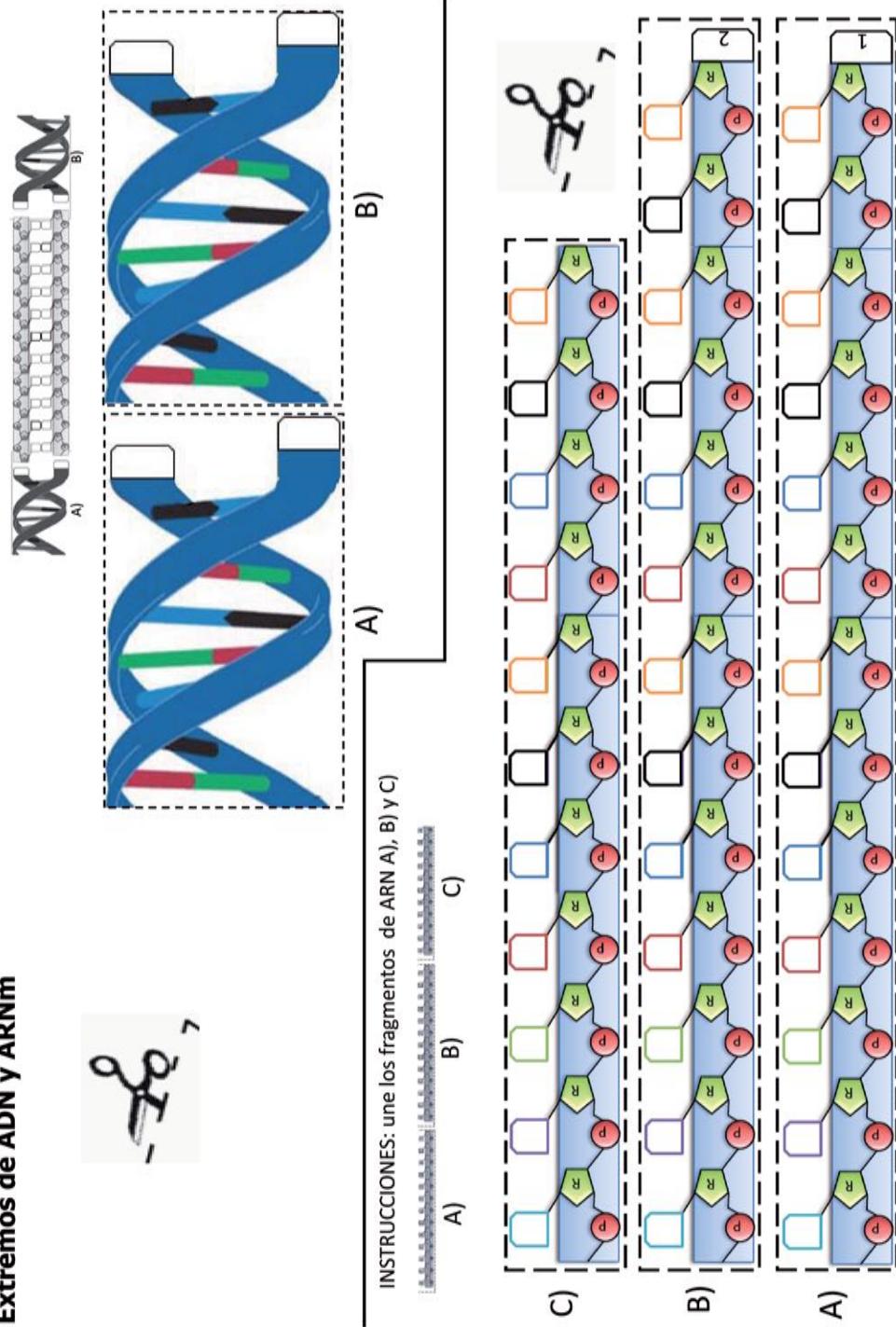
"Síntesis de proteínas. Life S.A. de C. V."
Secuencia 6

INSTRUCCIONES: une los fragmentos de ADN A), B) y C)



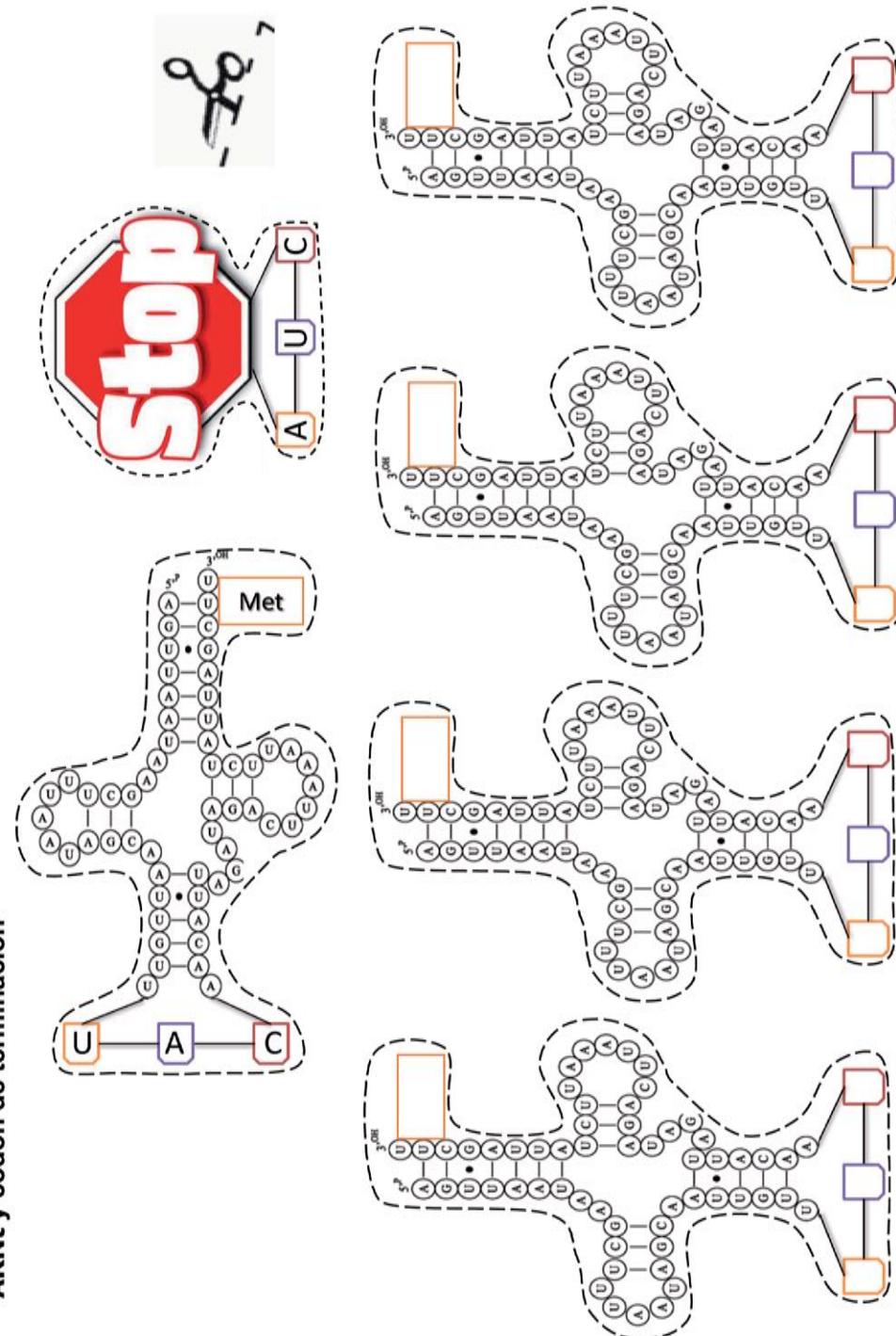
"Síntesis de proteínas. Life S.A. de C. V." INSTRUCCIONES: une los extremos A) y B) a la secuencia de ADN

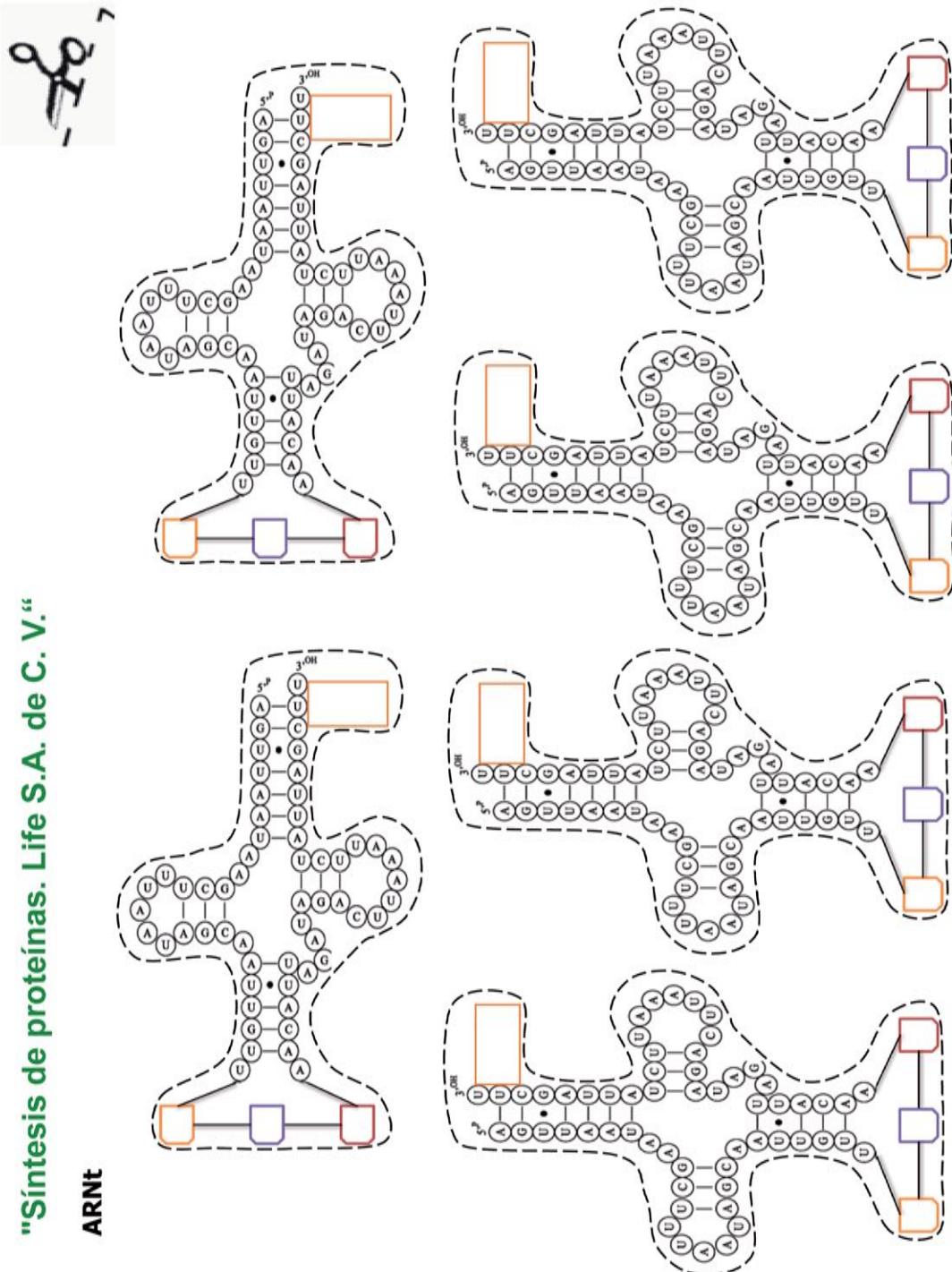
Extremos de ADN y ARNm



"Síntesis de proteínas. Life S.A. de C.V."

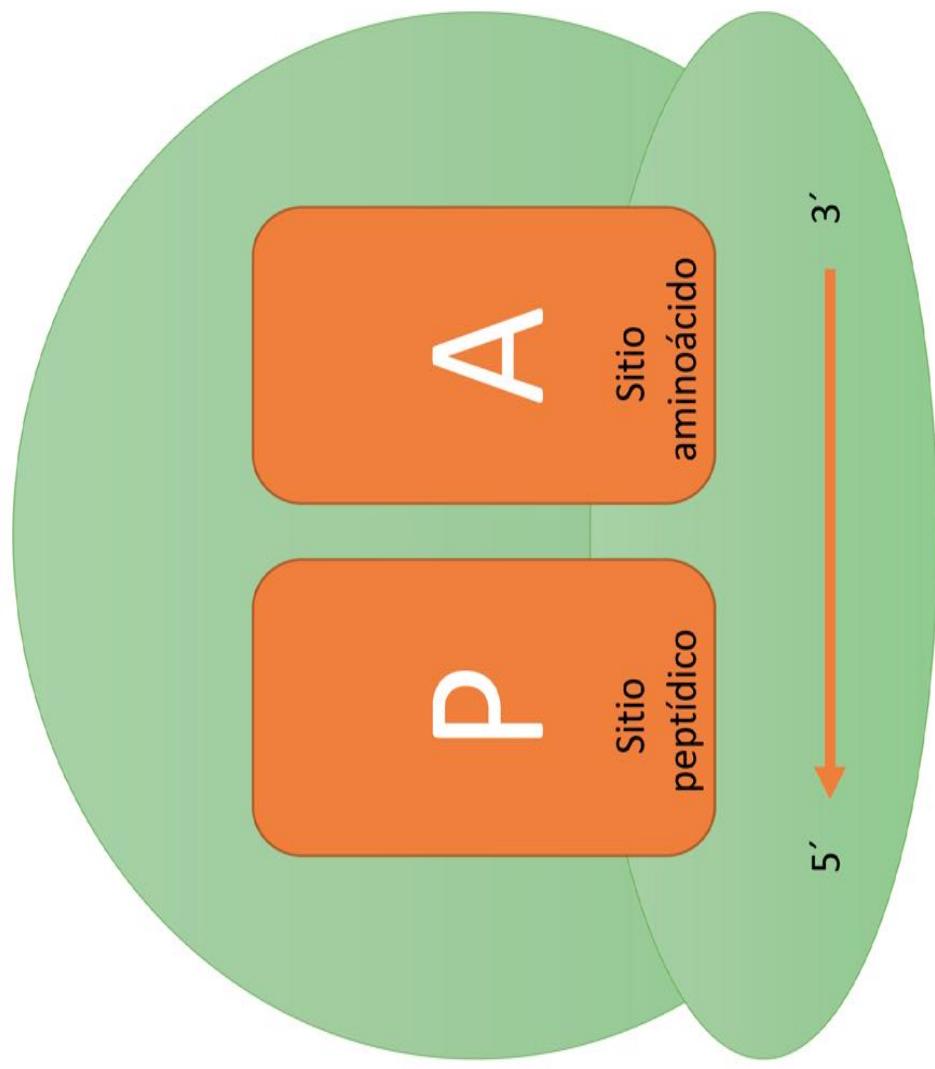
ARNt y codón de terminación





"Síntesis de proteínas. Life S.A. de C. V."

Ribosoma



Anexo 2.3

Actividad 2. Cuestionario y tabla

Instrucciones: Una vez que discutiste con tus compañeros de equipo los pasos que llevaron a cabo para la síntesis de proteínas, ahora contesta las siguientes preguntas de acuerdo a la actividad realizada con el kit.

1. ¿Cuál fue el codón de inicio y cuál el de paro?
 2. ¿Cuántos aminoácidos integran la proteína sintetizada?; enlistarlos.
 3. ¿Cuántos nucleótidos fueron codificados?
 4. ¿Qué función tienen los sitios A y P en las subunidades de RNA ribosomal?
 5. ¿Qué funciones realizan los diferentes tipos de RNA? ¿Todos son necesarios?
 6. ¿Qué diferencias hay en las proteínas sintetizadas por los otros equipos y la tuya? A qué se deben estas diferencias? Sugerencia: averigua con los compañeros de otros equipos la secuencia de aminoácidos obtenida y busca las diferencias.

Instrucciones: Una vez que todos los equipos construyeron sus proteínas, comparte la información de tu secuencia e indaga las de tus compañeros. Con esa información completa las siguientes tablas. ¿Qué cambios observas en las secuencias (DNA, RNAm y aa)? ¿Qué implicaciones biológicas tienen estos cambios?

SEC	DNA									
1	3'									5'
	5'									3'
2	3'									5'
	5'									3'
3	3'									5'
	5'									3'
4	3'									5'
	5'									3'
5	3'									5'
	5'									3'
6	3'									5'
	5'									3'

SEC	mRNA									
1	5'									3'
2	5'									3'
3	5'									3'
4	5'									3'
5	5'									3'
6	'5'									3'

SEC	Aminoácidos									
1										
2										
3										
4										
5										
6										

Anexo 2.4

Preparación de soluciones y material microbiológico

Previo al día del experimento

¿Qué hacer?	Tiempo requerido	¿Cuándo?	Pág.
Preparación de placas con agar LB	2 horas	2-7 días antes de usarse	76
Preparación de cultivos de <i>E. coli</i>	20 minutos para inocular; 16-18 horas para incubarlas	Un día antes de la realización del experimento	77

El día del experimento

¿Qué hacer?	Tiempo requerido	¿Cuándo?	Pág.
Equilibrar incubadora a 37°C	10 minutos	Una o dos horas antes de la realización del experimento	56-59
Realización del experimento	50 minutos	Durante la sesión	56-59
Incubación de células a 37°C	16- 18 horas	Posterior al experimento	57

Resultados y limpieza

¿Qué hacer?	Tiempo requerido	¿Cuándo?	Pág.
Observación de los resultados	50 minutos	Al día siguiente de la realización del experimento	57, 78
Disposición de residuos	45 minutos	Después de analizar los resultados	77

Preparaciones previas al día del experimento

Preparación de placas de agar LB

Medio Luria-Broth (LB)

Materiales:

Triptona o peptona	10 gr
Extracto de levadura	5 gr
NaCl	10 gr

Se disuelven los reactivos en 800 ml de agua destilada; una vez que estén disueltos, llevar a 1 litro. Esterilizar en autoclave.

Medio LB-Agar

Materiales:

Triptona o peptona	10 gr
Extracto de levadura	5 gr
NaCl	10 gr
Agar bacteriológico	15 gr

Se disuelven los reactivos en 800 ml de agua destilada; una vez que estén disueltos llevar a 1 litro. Esterilizar en autoclave. Si se requiere adicionar algún antibiótico, esperar a que el medio se enfrié a aproximadamente 50 °C antes de agregárselo.

Preparación de antibiótico

Para preparar una solución de ampicilina de 100 mg/ml se hidratarán 500 mg de polvo de ampicilina con 5 ml de agua inyectable. Una vez preparada la solución, se distribuye en alícuotas de 1 ml y se guarda congelada hasta el momento en que vaya a ser usada. Se utilizará esta solución en el medio en las cantidades que se requiera suplementar con antibiótico.

Preparación de cajas de cultivo

Las cajas de cultivo con medio LB-agar/ampicilina se preparan con los medios de cultivo estériles y aún calientes. En el caso de las cajas con antibiótico, se tiene que esperar a que el medio esté a menos de 60 °C para adicionarlo. Las cajas se preparan en una zona estéril (campana de flujo laminar o mesa con mecheros). Cuando se encuentre a una temperatura entre 40 y 50 °C, agregar aproximadamente 20 ml de antibiótico a cada caja y dejar que se enfrié a temperatura ambiente una vez que se encuentre frío se guardan las cajas en refrigeración hasta el día de la realización del experimento.

Preparación de placas con *E. coli*

Se utilizan bacterias *E. coli* de las cepas JM109DE3 o BL21DE3. Estas bacterias permiten la expresión del gen de la proteína fluorescente que se encuentra en el plásmido que se empleará para transformar a las bacterias *E. coli*. Un día antes de la práctica se realizará un cultivo en una caja de LB-Agar, para tener colonias frescas el día de la realización del experimento. A partir del cultivo líquido, se realizará el estriado del cultivo en la caja de LB agar, como se representa en el siguiente esquema.

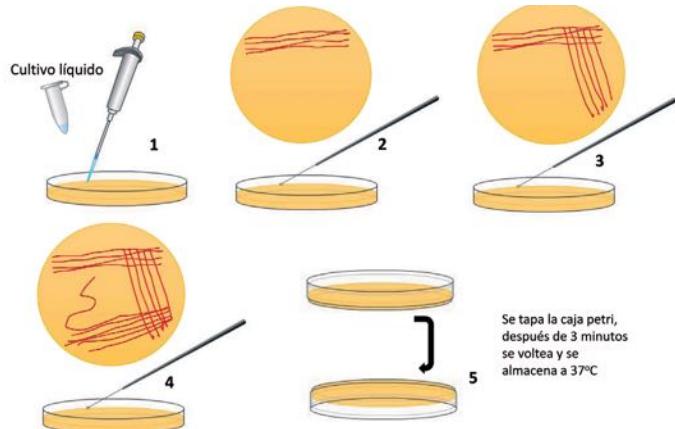


Figura 16. Inoculación por medio de la técnica de estría cruzada.

- 1) Levanta la tapa de la caja Petri y coloca tu icropipeta, en ángulo de 45° sobre el medio de cultivo.
- 2) Con el asa de inoculación, toca la muestra líquida y dispérsala a través de la superficie.
- 3) Realiza nuevamente la dispersión, pero en otra dirección y en otra región del cultivo,
- 4) por último realiza nuevamente otra dispersión tal como se muestra en la figura.
- 5) Tapa la caja y voltéala para su almacenamiento.

Disposición de residuos

Todo el material que tenga contacto con bacterias (cajas de petri con cultivos, asas, etc.) será tratado con una solución de hipoclorito de sodio al 10% por 20 minutos (al menos), antes de ser desecharo.



Preparar 100 ml. De una solución stock 1M de cloruro de calcio; esterilizar en autoclave; se almacena a 4 °C. Para preparar una solución 50mM, tomar 5 ml de la solución stock (1M) y agregar 95 ml de agua destilada; esterilizar en autoclave y almacenar a 4 °C.

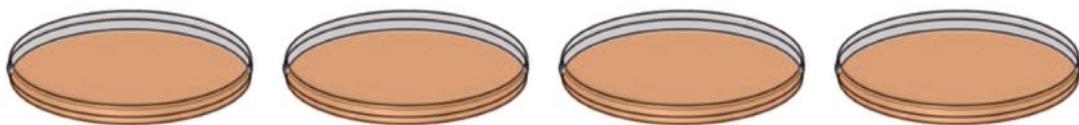
Plásmido pGLO

Para la actividad se necesita plásmido a una concentración de 10mg/ml; si no se encuentra a esa concentración, prepare la dilución correspondiente.

Anexo 2.5

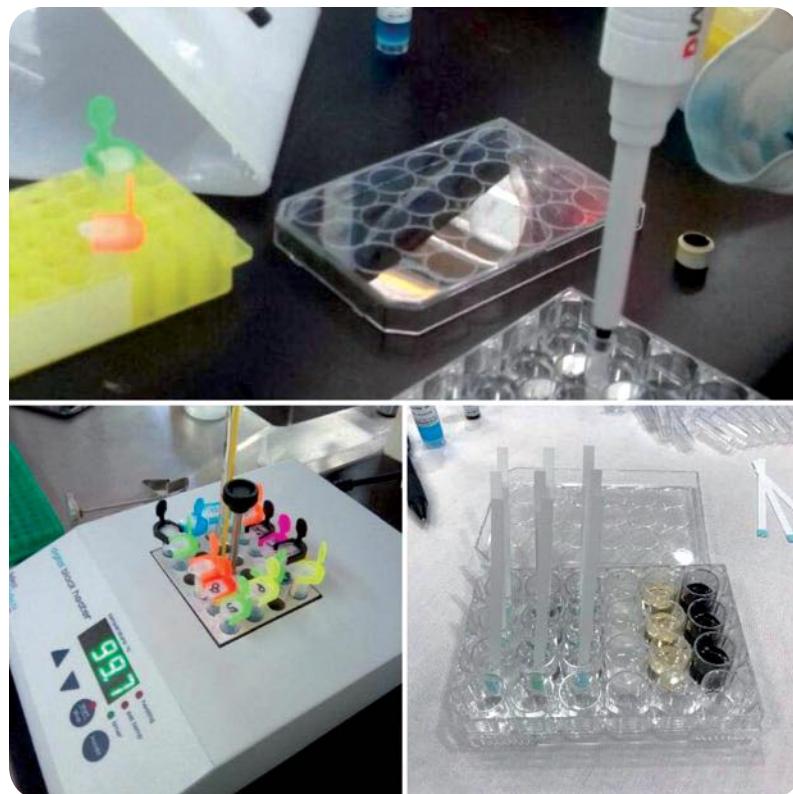
Actividad 3. Expresión del plásmido pGLO en bacterias

Dibuja en las placas lo observado a simple vista y completa la siguiente tabla con las observaciones del crecimiento bacteriano usando luz UV. Escribe el número de la etiqueta que corresponde a la explicación de lo observado.



-DNA Placa control con células (sin plásmido de DNA) sin antibiótico.	-DNA/ampicilina Placa control con células (sin plásmido de DNA) con antibiótico.	+DNA/ampicilina Placa con células transformadas (pGLO) con antibiótico.	+DNA/ampicilina Placa con células transformadas (pGLO) con antibiótico.
Resultados: ¿Células visibles? Sí ____ No ____	Resultados: ¿Células visibles? Sí ____ No ____	Resultado: ¿Células visibles? Sí ____ No ____	Resultado: ¿Células visibles? Sí ____ No ____
¿Fluorescen? Sí ____ No ____	¿Fluorescen? Sí ____ No ____	¿Fluorescen? Sí ____ No ____	¿Fluorescen? Sí ____ No ____
Explicación:	Explicación:	Explicación:	Explicación:

¿Qué es mejor, unas tijerotas o miles de tijeritas?



Amilasa humana y amilasa bacteriana, aplicación en la biotecnología.

Elaboraron:
Ramírez Aguilar Eva Cristina
Luna Román Celso Miguel
Colaboraron:
Bautista Acevedo Marco Antonio
Bernal Enríquez Oscar
Centeno Cruz Federico
Hernández Carbajal Luz Angélica
Martínez Ortiz Leticia
Mejía García Martha Elvira
Serrano Reyes Gabriela

BIOLOGÍA I (PEA, 2016). Tercera Unidad

¿Cómo se transmiten los caracteres hereditarios y se modifica la información genética?

Propósito

Al finalizar la unidad, el alumno identificará los mecanismos de transmisión y modificación de la información genética como responsables de la continuidad y cambio en los sistemas biológicos, para que comprenda su importancia biológica y evolutiva.

Tema 2. Herencia

Subtema: Manipulación del DNA

Aprendizajes

Declarativos	<ul style="list-style-type: none">Reconoce las implicaciones biológicas y éticas de la manipulación del material genético.Comparar la actividad enzimática de la amilasa salival humana y la amilasa bacteriana obtenida por biotecnología.
Procedimentales	<ul style="list-style-type: none">Manipular equipo de laboratorio de Biología Molecular.Aplicar habilidades para llevar a cabo actividades experimentales que contribuyan a la comprensión de la manipulación del material genético.
Actitudinales	<ul style="list-style-type: none">Valora las implicaciones en el manejo de la ingeniería genética para procesos que benefician al hombre.Muestra actitudes favorables hacia la ciencia y sus productos.Muestra una actitud crítica y reflexiva ante la relación ciencia-tecnología-sociedad-ambiente.

Actividades a realizar:

Apertura

- Diagnóstico sesión Buzz.¹

Desarrollo

- Exposición teórica. “Recuerdas... ¿Qué son las enzimas y qué función cumplen?”
- Actividad 1. Video “¿Cómo trabajan las enzimas?”
- Actividad experimental. “Reacción enzimática de la amilasa humana y amilasa bacteriana, aplicación de la biotecnología”.

Cierre

- Actividad 2. Retoma la sesión Buzz.
- Actividad 3. Técnica ABP “Dulces bacterias”.

¹ Sesión Buzz, Discusión de un tópico en grupos pequeños, que promueve la participación de los integrantes. https://www.unicef.org/knowledge-exchange/files/Buzz_Groups_production.pdf

Apertura

Diagnóstico Sesión Buzz

InSTRUCCIÓN: Observa las imágenes y contesta las preguntas, utiliza el formato del **Anexo 3.1.**²

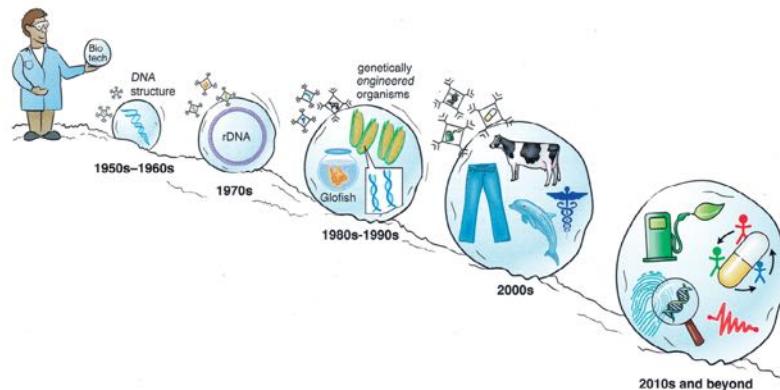


Figura 1. Tomada de Biotechnology: Science for the New Millennium Second Edition, 2017.

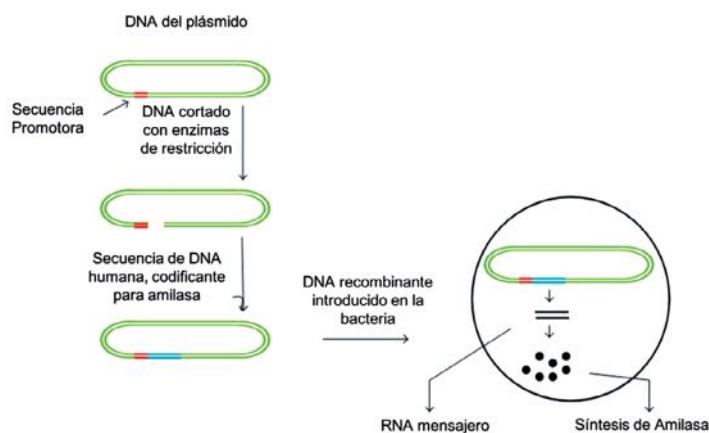


Figura 2. Tomada de “Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production,”²

² Subash C. B. Gopinath, Periasamy Anbu, M. K. Md Arshad, *et al.*, “Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production,” BioMed Research International, vol. 2017, Article ID 1272193, 9 pages, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1272193>.

Desarrollo

Exposición teórica. “Recuerdas... ¿Qué son las enzimas y qué función cumplen?”

Las enzimas son proteínas que aceleran la velocidad de las reacciones químicas que ocurren en una célula. Por esto, se las conoce como catalizadores biológicos. Ayudan en procesos esenciales, como la digestión de los alimentos, la coagulación de la sangre, la contracción muscular, entre otros. El modo de acción es específico ya que cada tipo de enzima actúa sobre un tipo particular de reacción y sobre un sustrato específico (Figura 3).

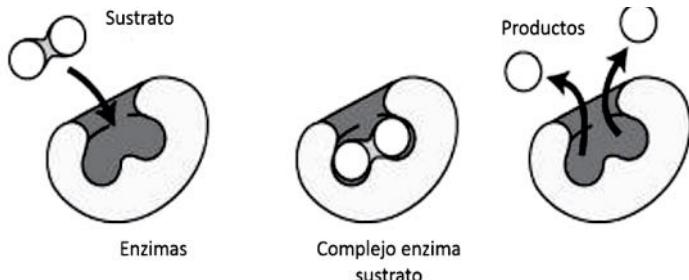


Figura 3. Modelo general que explica la acción enzimática. Implica que la enzima reconoce a su sustrato, molécula sobre la que actúa, en el sitio activo y genera un cambio químico. Tomado y modificado de <http://www.ehu.eus/biomoleculas/enzimas/jpg/catalisis.jpg>.

En ausencia de las enzimas, las reacciones bioquímicas serían extremadamente lentas y la vida no sería posible. Las enzimas pueden aumentar la velocidad de las reacciones en un millón de veces.

Esto es lo que conocemos ahora de las enzimas y se sigue aprendiendo más sobre cómo funcionan y regulan las reacciones químicas dentro de las células, pero el estudio de las enzimas se remonta a 3000 a.C. (Historia de las Enzimas).³ Los estudios de laboratorio muestran que, al igual que todas las proteínas, las enzimas son muy sensibles a los cambios de temperatura y acidez; además funcionan correctamente dentro un limitado rango de

HISTORIA DE LAS ENZIMAS

Una leyenda dice que un pastor árabe, de regreso a su casa después de una larga jornada en el campo, guardó la leche ordeñada de sus ovejas dentro de una bolsa hecha con la tripa de ternero; después de caminar y caminar a pleno sol, abrió la bolsa para saciar su sed y se sorprendió cuando encontró que la leche estaba separada en dos partes: un líquido acuoso pálido y un cuajo (grumo) blanco sólido.

¿En qué consistía este proceso? ¿Qué componentes desconocidos provocaban este cambio?

Hoy se sabe que la obtención, por ejemplo del queso, del pan o la cerveza, son resultado del proceso de fermentación, uno de los procesos enzimáticos más antiguos.

³ Tomado y modificado de http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/ec_30.asp?cuaderno=30

HAY
BIOTECNOLOGÍA
HASTA EN TU
JABÓN DE ROPA

¿Te has preguntado cómo es que el jabón en polvo limpia la ropa? La respuesta son las enzimas, responsables del trabajo sucio.

Las enzimas que se usan hoy en los productos de limpieza se usan para remplazar los blanqueadores y han sido mejoradas por técnicas de ingeniería de proteínas o provienen de microorganismos recombinantes genéticamente modificados para optimizar su proceso de fabricación. La popularidad de estos detergentes radica en que son biodegradables y que no contaminan el medio ambiente; hacen su trabajo de limpieza a bajas temperaturas y en períodos más cortos.

temperatura y pH. En condiciones de temperatura elevada o pH alto (por encima de las condiciones óptimas para su funcionamiento), se rompen las uniones débiles, pierde la estructura tridimensional la proteína (se desnaturaliza) y su capacidad para actuar como enzima (hay biotecnología hasta en tu jabón de ropa).

Cada tipo de enzima funciona óptimamente a una determinada temperatura; si la temperatura del medio en el que está la enzima se aleja de la óptima, la enzima disminuye su actividad. Esta particularidad de las enzimas se puede representar en el siguiente gráfico (Figura 4).

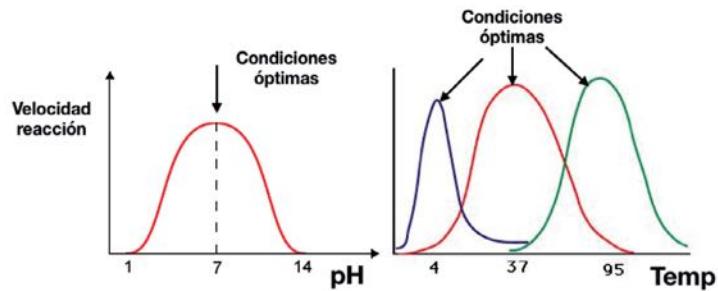


Figura 4. Las cargas de los aminoácidos (aa) en la molécula de proteína está determinada por la estructura terciaria y depende del pH y un aumento de la energía puede llegar a desnaturalizar o modificar la actividad enzimática, por lo que existe una temperatura óptima a la cual la enzima es más estable.

Modificado de Nelson, D. y Cox, M. (2005)
Lehninger Principios de Bioquímica.

Enzimas y biotecnología

A pesar de ser unas tres mil enzimas las que intervienen en diferentes procesos biológicos, se dividen en tres grupos generales: proteolíticas, que descomponen las proteínas en sus fracciones más simples, los aminoácidos (aa); lipasas, degradan las grasas y las amilasas necesarias para la digestión y el aprovechamiento de los carbohidratos.

Las enzimas presentan muchísimas aplicaciones, en particular en el ámbito industrial, el siguiente esquema ejemplifica lo anterior:

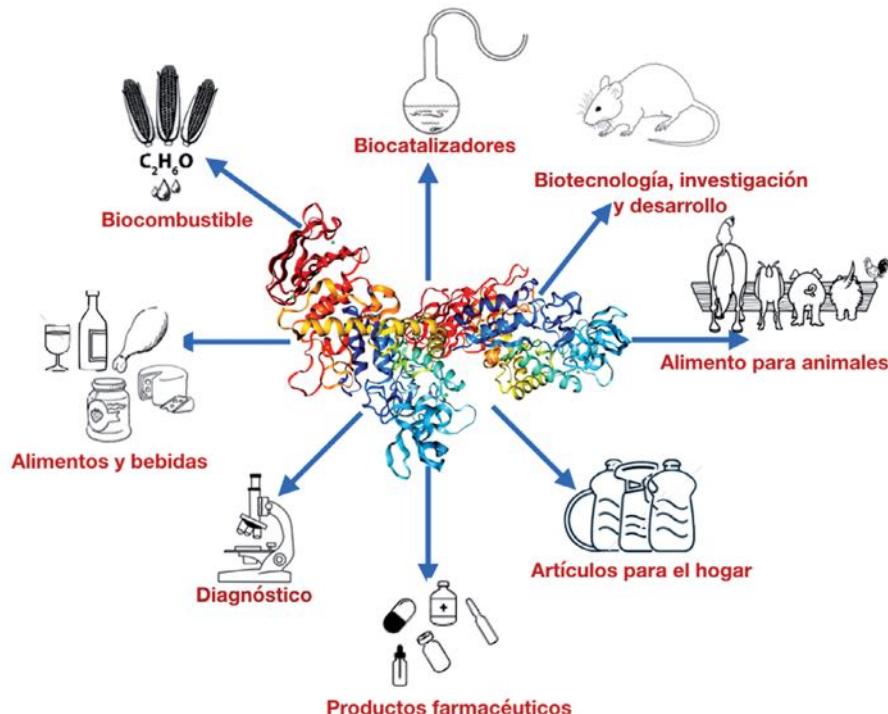


Figura 5. Aplicaciones de enzimas a diferentes procesos. Imagen central tomada de RCSB PDB, estructura de alta resolución de la enzima α -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens*.

<http://www.rcsb.org/3d-view/3BH4>

La mayoría de los procesos biotecnológicos tradicionales, como la fermentación para la obtención de yogur, la producción de cerveza y vino, es realizada por las enzimas de diferentes organismos.⁴

En los procesos industriales las enzimas se extraen de bacterias y hongos, por ejemplo: proteasas, α -amilasas, glucosa isomerasas y pectinasas.

4 Si deseas saber más puedes consultar el artículo “Enzimas aplicadas en procesos industriales”, disponible en <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art96/art96.pdf>

Generalidades de la α -amilasa humana

La α -amilasa de la saliva humana es una proteína que cumple un papel importante en la digestión inicial de polímeros, como el almidón, el glucógeno y otros, hasta la obtención de monómeros como la glucosa (Figura 6).

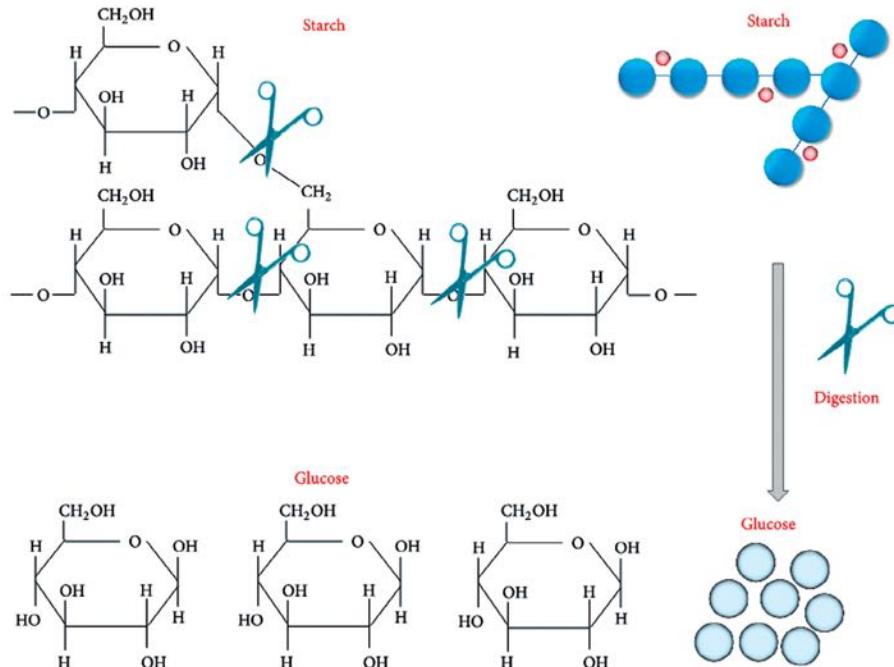


Figura 6. Esquema para la hidrólisis del almidón por la amilasa. El almidón es un polisacárido hecho de azúcares simples (glucosa). En la actividad experimental comprobarás la hidrólisis del almidón por la acción de la enzima amilasa salival y bacteriana. Tomado de Subash *et al.*, (2017).

Generalidades de la amilasa bacteriana

Las α -amilasas bacterianas del género *Bacillus* como *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens*, han encontrado una extensa aplicación en diversos procesos industriales debido a sus amplios rangos de operación de temperatura (25-90 °C), resistencia a pH extremos (1.0-11.5) y altos niveles de expresión (Thippeswamy, 2006).

La ingeniería genética y la tecnología del DNA recombinante son las técnicas moleculares actuales que se utilizan para promover la producción eficiente de enzimas. La tecnología de DNA recombinante para la producción de amilasa implica la selección de un gen de amilasa, inserción génica en un sistema de vector apropiado, transformación en un sistema bacteriano eficiente para producir una gran cantidad de proteína recombinante (en presencia de un agente inductor del promotor de expresión), y la purificación de la proteína para aplicaciones posteriores (Nielsen, 2000).

Actividad 1. Video “¿Cómo trabajan las enzimas?”

Instrucción: Observa el siguiente video: “¿Cómo trabajan las enzimas?”, en la siguiente dirección electrónica: <https://www.youtube.com/watch?v=yk14dOOvwMk> obsérvalo cuantas veces sea necesario para poder identificar las ideas y conceptos principales en él. Contesta lo que se te pide en el Anexo 3.2

Actividad experimental. Reacción enzimática de la amilasa humana y amilasa bacteriana, aplicación de la biotecnología.

Objetivo

- Comparar la actividad enzimática de la amilasa humana con la amilasa bacteriana⁵

Etapas

La siguiente actividad experimental está dividida en diferentes etapas:

- Ensayo de la amilasa
- Hidrólisis del almidón (lugol)
- Concentración de glucosa (Tiras reactivas)
- Hidrólisis del almidón hasta glucosa (solución de Benedict)

Procedimiento

Nota: Utiliza una punta diferente para cada uno de los pozos para evitar la contaminación cruzada y lograr la confiabilidad de tus resultados. Prepara 30 minutos antes del experimento la incubadora a 37 °C. Se sugiere trabajar en equipo la actividad.

1. Ensayo de la amilasa

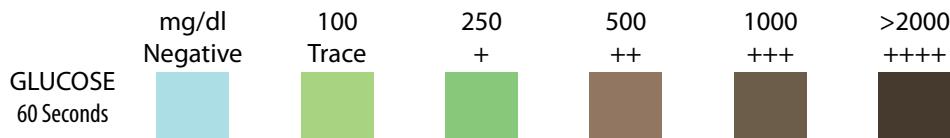
- Colectar, de alguno de los integrantes, 3 ml de saliva⁶ en el vaso de precipitado de 50 ml.
- Coloca 1 ml de solución de almidón en cada uno de los 18 pozos marcados con texto, como se muestra en la imagen:

		Columnas					
		1	2	3	4	5	6
Filas	1	Saliva	Amilasa Bacterial	PBS	Saliva	Amilasa Bacterial	PBS
	2	Saliva	Amilasa Bacterial	PBS	Saliva	Amilasa Bacterial	PBS
	3	Saliva	Amilasa Bacterial	PBS	Saliva	Amilasa Bacterial	PBS
	4						

5 Tomado y modificado de “Assaying for Amylase Activity” de *Biotechnology: Science for the New Millennium* de Ellyn Daugherty. G-Biosciences.

6 Procurar que el donador se enjuague la boca previamente.

- c) Agrega 300 µl de amilasa humana colectada en el paso 1, en los tres pozos de la primera y cuarta columna (marcados con el texto saliva) y mezcla (saliva + almidón).
 - d) Cambia de punta y agrega 300 µl de amilasa bacteriana en los tres pozos de la segunda y quinta columna, y mezcla.
 - e) Agrega 300 µl de PBS (1X a pH 7.0) en los tres pozos de la tercera y sexta columna, y mezcla.
 - f) Incuba a 37 °C durante 1 hora y continúa con los ensayos.
2. Hidrólisis del almidón (lugol)
- g) Agrega 20 µl de lugol en cada pozo de las siguientes columnas: cuarta, quinta y sexta, mezcla.
 - h) Identifica los controles positivos y negativos del experimento, registra tus resultados de lo que ocurre en cada columna, incluyendo el cambio de color. Coloca la caja sobre un papel blanco, para observar el cambio de color de las columnas 4, 5 y 6.
 - i) Análisis: Recuerda que la reacción de almidón y lugol da un color negro-morado-azul. El lugol es dorado-naranja y nos indica que el almidón no está presente. Utiliza el formato del **Anexo 3.3** para registrar tus observaciones.
3. Concentración de glucosa (tiras reactivas)
- Ahora medirás la concentración de glucosa en las columnas 1, 2, 3 usando tiras de identificación de glucosa.
- j) Marca las tiras por triplicado (tres de saliva, tres de amilasa bacteriana y tres de PBS), coloca cada una de las tiras dentro del pozo correspondiente, por unos tres segundos, retira y elimina el exceso de la muestra con un poco de papel absorbente.
 - k) Compara el color obtenido de la tira indicadora con el patrón indicador de concentración de glucosa.
 - l) Utiliza el formato para registrar tus observaciones de esta parte **Anexo 3.3.1**.



Indicador de concentración de glucosa, mg/dL.

4. Hidrólisis del almidón hasta glucosa (Solución de Benedict)
- m) Marca nueve tubos Eppendorf con lo indicado en cada pozo (columna 1, 2 y 3) y agrega 300 µl de solución de Benedict en cada tubo.
 - n) Transfiere 300 µl de cada pozo (columna 1, 2 y 3) en el tubo Eppendorf correspondiente, asegurándote de mezclar bien la muestra antes de colocarla en el tubo.

- o) Mezcla con el Vórtex todos los tubos y colócales un capuchón. Incuba en el Termoblock a 100 °C durante 5 minutos, saca los tubos y registra el cambio de color en el Anexo 3.3.2.
- p) Infiere la cantidad de glucosa presente en la muestra después de la reacción de Benedict usando un sistema de numeración donde 5 (rojo-anaranjado = alta concentración de azúcar), 4 (anaranjado), 3 (amarillo), 1 (verde) y 0 (azul no presencia de glucosa).

Instrucción: En plenaria discute los resultados globales de este ensayo considerando las siguientes ideas: saliva humana y amilasa bacteriana, el uso de diferentes indicadores o reactivos para la identificación de carbohidratos, el uso de PBS y la importancia biotecnológica de bacterias productoras de amilasa.

Cierre

Actividad 2. Retoma la sesión Buzz

Instrucción: Retoma el diagnóstico de la sesión Buzz y reestructura tus respuestas. En plenaria presenta tus resultados.

Actividad 3. ABP “Dulces bacterias”

Instrucción: Realiza la lectura “Producción de insulina humana por técnicas de DNA recombinante”⁷ (Disponible en línea <https://cutt.ly/Hf863RR>), contesta las preguntas de la Fase I (Diagnóstico) y la Fase II (ABP), con las respuestas desarrolla un planteamiento de investigación ABP, situado en el Anexo 3.4.

Fase I. *DIAGNÓSTICO*

Contesta las siguientes preguntas generadoras:

¿Algún familiar tuyo padece diabetes?

¿Conoces cuáles son las causas que provocan la diabetes?

¿Cuáles son los tratamientos farmacológicos de la diabetes?

Fase II. *ABP*

¿Te has preguntado cuál es el proceso de obtención de insulina de origen recombinante?

¿Cuáles son los beneficios del tratamiento con insulina de origen recombinante?

Desde el punto de vista ético, ¿por qué es mejor usar bacterias en lugar de ganado en la producción de insulina?

7 Flores Beatriz. Producción de insulina humana por técnicas de DNA recombinante” Revista Ciencias, abril-junio 1994.

Literatura consultada

Arivananthan, M. (2015). Buzz groups. Disponible en:
https://www.unicef.org/knowledgeexchange/files/Buzz_Groups_production.pdf

Daugherty, E. (2017). *Biotechnology: Science for the New Millennium*. Second Edition, EMC Paradigm

Subash, C. B. Gopinath, Periasamy, A., M. K. Md Arshad, Thangavel, L., Chun Hong, V., Uda,H. and Suresh, V. C. (2017). Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. BioMed Research International, vol. 2017, Article ID 1272193, 9 pages, 2017. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2017/1272193>.

Nelson, D. y Cox, M. (2015). Lehninger Principios de Bioquímica. 4a ed. Omega. Disponible en: http://www.esalq.usp.br/lepsc/imgs/conteudo_thumb/mini/Principles-of-Biochemistry-by-ALbert-Leningher.pdf

Castillo, R. y Rodríguez A. (2014). Enzimas aplicadas en procesos industriales. Vol. 15, Núm. 12, ISSN 1607 - 6079. _Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art96>

Lamby, C.P., Gómez, OL, Jaramillo, L. (2013). La α -amilasa salival: relación con la caries dental y la salud en general. Univ Odontol. Jul-Dic 32(69): 93-101.

Thippeswamy, S., Girigowda, K., y Mulimani, V. H. (2006). Isolation and identification of amylase producing *Bacillus* sp. from dhal industry waste. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics 43:295-298.

Nielsen, J. E., Borchert, T. V. (2000). *Protein engineering of bacterial α -amylases*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1543(2):253–274. doi: 10.1016/s0167-4838(00)00240-5.

Anexo 3.1

Apertura

Diagnóstico Sesión Buzz

Instrucción: Después de observar las imágenes, discute con tu equipo las siguientes preguntas, anota tus respuesta en el recuadro (sesión Buzz).

1. ¿Cuál es la importancia del conocimiento del DNA?
2. ¿Qué aplicaciones biotecnológicas conoce y que utilices a diario?

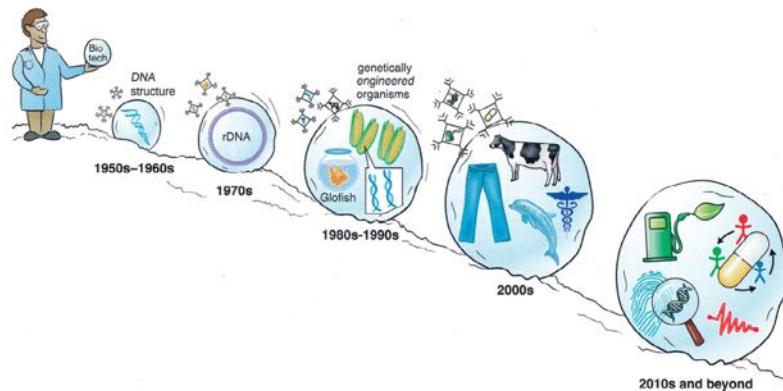


Figura 7. Tomada de Biotechnology: Science for the New Millennium Second Edition, 2017.

3. ¿Cómo se produce la amilasa recombinante?

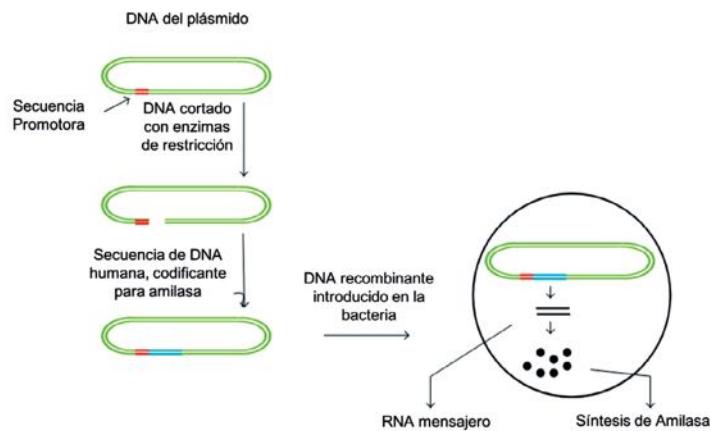


Figura 8. Tomada de “Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production (Subash *et al.*, 2017).

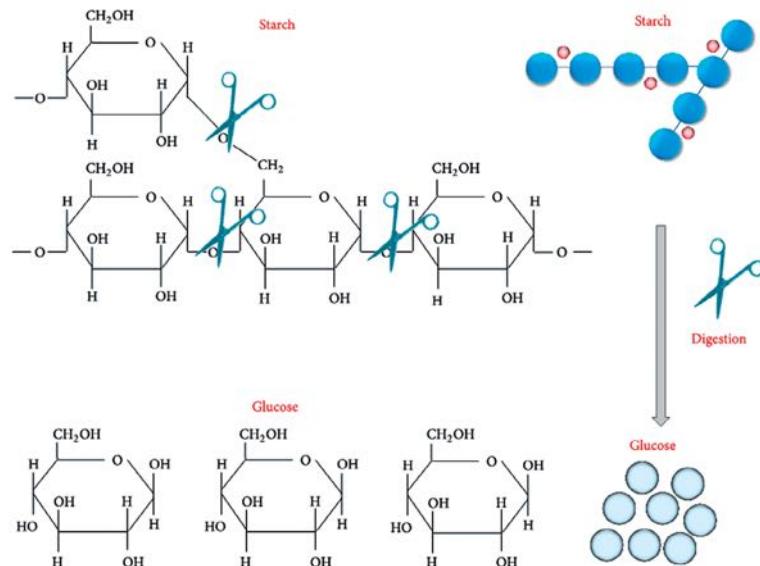
Anexo 3.2

Actividad 1. Video “¿Cómo trabajan las enzimas?”

<https://www.youtube.com/watch?v=yk14dOOvwMk>

Instrucciones: Despues de observar el video, lleva a cabo el análisis de la información; para su realización toma en cuenta lo siguiente:

1. Observa y escucha el video con atención
2. Relaciona la siguiente imagen con lo observado en el video.
3. Utiliza la tabla para identificar los elementos de esta reacción enzimática que sucede en tu boca y explica el proceso



Elementos de la reacción	Identificación de los elementos	Explicación del proceso
Sustratos		
Enzima		
Productos		

Anexo 3.3

Actividad experimental. Reacción enzimática de la amilasa humana y amilasa bacteriana, aplicación de la biotecnología

InSTRUCCIONES: Realiza las siguientes actividades y contesta lo que se te pide. Registra en la siguiente tabla los cambios de color⁸ observados.

Ensayo	Saliva	Amilasa bacteriana	PBS 1X
1			
2			
3			

A partir de los datos obtenidos en tu tabla, infiere donde hubo reacción enzimática y si existe diferencia entre la amilasa humana y bacteriana. Utiliza el siguiente recuadro para escribir tu explicación.

⁸ En una reacción positiva para identificar almidón, el lugol cambia a un color negro-morado-azul; y en una reacción negativa conserva su color dorado-naranja. De acuerdo a las concentraciones de almidón, varía el color.

Anexo 3.3.1 Identificación cualitativa de glucosa

Instrucciones: Pega las tiras de identificación de glucosa y anota la concentración de glucosa en mg/dL observada, de acuerdo con el color de la tira.

Ensayo	Saliva	Amilasa bacteriana	PBS 1X
1			
2			
3			

Compara las concentraciones de glucosa obtenidas de las reacciones (saliva, la amilasa bacteriana y PBS). Discute tus resultados y anótalos.

Anexo 3.3.2 Identificación cuantitativa de glucosa

Instrucción: Infiere la cantidad de glucosa presente en la muestra después de la reacción de Benedict usando un sistema de numeración donde 5 (rojo-anaranjado = alta concentración de azúcar), 4 (anaranjado), 3 (amarillo), 1 (verde), 0 (azul) no presencia de glucosa.

Ensayo	Saliva	Amilasa bacteriana	PBS
1			
2			
3			

Compara la cantidad de glucosa obtenida de las reacciones (saliva, la amilasa bacteriana y PBS), Discute tus resultados y anótalos.

Anexo 3.4

ABP⁹ “Dulces bacterias”

Fase I. Diagnóstico

Instrucciones: Contesta las siguientes preguntas, discute en equipo las respuestas.

¿Algún familiar tuyo padece diabetes?

¿Conoces cuáles son las causas que provocan la diabetes?

¿Cuáles son los tratamientos farmacológicos de la diabetes?

Fase II. Problema

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica caracterizada por la incapacidad del individuo para metabolizar glucosa de manera normal, debido a una deficiencia total o parcial de la insulina. Hasta 1983 toda la insulina utilizada para el tratamiento de la diabetes era extraída de páncreas de porcino y bovino, pero, el uso prolongado de este tipo de insulininas provocaba, en algunos individuos, una respuesta inmune. Para 1982, la primera proteína recombinante producida y aprobada como medicamento fue la Insulina.

¿Te has preguntado cuál es el proceso de obtención de insulina de origen recombinante?

¿Cuáles son los beneficios del tratamiento con insulina de origen recombinante?

Desde el punto de vista ético, ¿por qué es mejor usar bacterias en lugar de ganado en la producción de insulina?

Instrucciones: Para responder tus preguntas y validar tus hipótesis del ABP (utiliza la tabla que se encuentra después de la lectura), te recomendamos que leas el artículo “Producción de insulina humana por técnicas de DNA recombinante”.

⁹ El ABP (Aprendizaje Basado en Problemas) es una metodología centrada en el aprendizaje, en la investigación y reflexión que siguen los alumnos para llegar a una solución ante un problema planteado por el profesor.

Completa la siguiente tabla:

Elementos de la metodología ABP	
Pistas y hechos	
Planteamiento del problema	
Hipótesis	
Conclusión	
Áreas de estudio	

Fase III. **Presenta el desarrollo de tu investigación en plenaria**

Primero ctrl+C y después ctrl+V, ctrl+V, ctrl+V...



Amplificación del DNA con PCR

Elaboraron:

*Mejía García Martha Elvira
Luz Angélica Hernández Carbajal
Martínez Ortiz Leticia*

Colaboraron:

*Bautista Acevedo Marco Antonio
Bernal Enríquez Oscar
Centeno Cruz Federico
Hernández Carbajal Luz Angélica
Luna Román Celso Miguel
Ramírez Aguilar Eva Cristina
Serrano Reyes Gabriela*

BIOLOGÍA I (PEA, 2016). Tercera Unidad

¿Cómo se transmiten los caracteres hereditarios y se modifica la información genética?

Propósito

Al finalizar la unidad, el alumno identificará los mecanismos de transmisión y modificación de la información genética, como responsables de la continuidad y cambio en los sistemas biológicos, para que comprenda su importancia biológica y evolutiva.

Tema 2. Herencia

Subtema: Manipulación del DNA

Aprendizajes

Declarativos	<ul style="list-style-type: none"> Reconoce las implicaciones biológicas y éticas de la manipulación del material genético. Comprende el proceso de la replicación del DNA y su aplicación en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
Procedimentales	<ul style="list-style-type: none"> Aplica habilidades para comunicar de forma oral y escrita la información derivada de las actividades realizadas en forma individual y en equipo. Adquiere habilidades propias de las técnicas de biología molecular para llevar a cabo la amplificación de DNA con PCR.
Actitudinales	<ul style="list-style-type: none"> Aplica actitudes y valores que contribuyan al desarrollo de actividades experimentales. Valora la importancia de la manipulación genética en el beneficio de la sociedad, en particular de la técnica de PCR.

Actividades a realizar:

Apertura

- Cuestionario diagnóstico

Desarrollo

- Lectura. Génesis “La replicación del DNA”.
- Actividad 1. Identifica la maquinaria de replicación.
- Lectura. “El origen inusual de la PCR”.
- Actividad 2. Discusión en plenaria.
- Lectura. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la técnica.
- Actividad 3. Etapas de la PCR.
- Actividad 4. Amplificando el DNA (kit)

Cierre

- Actividad experimental. Amplificación de DNA por PCR
- Cuestionario

Apertura

Cuestionario diagnóstico

Instrucción: En el Anexo 4.1 encontrarás el formato del cuestionario, contéstalo.

Desarrollo

Lectura. Génesis “La replicación del DNA”

En la primera mitad del siglo XX, se dieron avances significativos en el descubrimiento de las moléculas implicadas en la herencia. Para 1940 se tenía claro que el DNA y las proteínas asociadas en el núcleo eran las responsables de tales mecanismos experimentados realizados por Hershey y Chase demostraron tales aseveraciones. A partir de estos trabajos se pudo comprender la capacidad del DNA para almacenar, copiar y transmitir la información genética de generación en generación.

En 1933 Erwin Chargaff determinó que la cantidad de bases púricas y pirimidínicas en el DNA se encuentran en la misma proporción, ya que hay la misma cantidad de adeninas que de timinas y de guaninas que de citosinas. Al inicio de la década de 1950 existía una competencia impresionante por establecer la estructura tridimensional de la molécula responsable de almacenar la información genética. En 1952 la mejor cristalógrafa de Inglaterra, Rosalind Franklin, adjunta al laboratorio dirigido por Maurice Wilkins, realizaba estudios de cristalográfica de rayos X de DNA, y obtuvo la famosa fotografía 51, que en 1953 llega de forma indirecta a manos de James Watson, quien junto con Francis Crick pudo determinar el acomodo correcto de los componentes de esta molécula, por lo cual recibieron el premio Nobel de medicina en 1962 (Figura 1).

El descubrimiento de la estructura tridimensional del DNA permitió conocer mecanismos involucrados en la transmisión de la información genética. Fue posible conocer la



Figura 1. Línea del tiempo de descubrimientos en la biología molecular en las décadas de los 1950 a 1990.

Elaboración propia.

replicación del DNA, que por experimentos realizados en 1957 por Meselson y Stahl, se pudo comprobar que este mecanismo es semiconservativo, ya que a partir de una molécula de DNA se generan dos cadenas nuevas y cada una de ellas conserva a una de las originales (Figura 2).

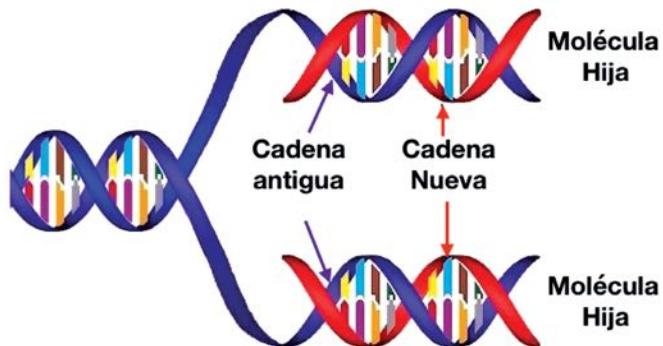


Figura 2. Replicación del DNA semiconservativa, tomado de: <https://www.quora.com/What-is-the-importance-of-semiconservative-replication-of-DNA#MoreAnswers>

El descubrimiento de Watson y Crick permitió conocer la forma en la que esta molécula se perpetúa transmitiéndose de generación en generación. Lo anterior es posible gracias a un conjunto de proteínas enzimáticas que permiten que durante la fase S de la interfase del ciclo celular que se sinteticen a partir de una molécula de DNA, dos moléculas hijas.

Este proceso se organiza en tres etapas: *inicio, elongación y terminación*.

El *inicio* se da en regiones del DNA ricas en A y T a las que se les conoce como sitios de origen de la replicación, en los que la enzima helicasa rompe los puentes de hidrógeno existentes entre las bases nitrogenadas provocando la apertura de la doble hélice del DNA. Las cadenas se mantienen abiertas por la acción de proteínas de unión a la cadena sencilla (*proteínas estabilizadoras “SSB”*), quienes se unen al esqueleto azúcar-fostato de cada cadena. Una vez formada la *horquilla de replicación*, la enzima *primasa* sintetiza el “primer” o cebador (secuencia corta de RNA) en dirección 5→3’; esta enzima sintetiza un solo “primer” en la cadena continua (la que se sintetiza en dirección 5→3’) y varios “primers” en la cadena discontinua (la que no se sintetiza de forma continua).

La *elongación* se realiza por la enzima DNA polimerasa, que adiciona nucleótidos en el extremo 3’ de cada “primer” en dirección 5→3’, en la cadena adelantada una sola enzima polimerasa alarga la cadena de manera continua. Mientras que en la cadena rezagada se adhieren varias enzimas polimerasas en cada uno de los “primers”, formando así los *fragmentos de Okazaki*, que forman parte de la nueva cadena de DNA que se sintetiza de forma contraria a la otra cadena, ya que la DNA polimerasa sólo adiciona nucleótidos en dirección 5→3’.

La *terminación* de este proceso está dada por la eliminación de los “primers”, la enzima que realiza este evento es la RNasa H y la DNA polimerasa adiciona nucleótidos en los espacios liberados. Las enzimas DNA polimerasas no tienen la capacidad de sellar los extremos finales de la cadena, por lo que una enzima diferente llamada *DNA ligasa* forma el enlace fosfodiéster entre el grupo fosfato y la desoxirribosa. Las DNA polimerasas son diferentes en procariontes y eucariontes aunque realizan la misma función.

Cabe mencionar que la replicación es bidireccional, la tensión que se produce en los extremos de la burbuja de replicación es eliminada por enzimas *topoisomerasas* que cortan y desenrollan los extremos de la cadena permitiendo el avance de las helicasas.

Con la finalidad de visualizar el proceso puedes ir a la siguiente liga.
<https://www.youtube.com/watch?v=WtRA-NsERKY>



Actividad 1. Identifica la maquinaria de replicación.

Instrucciones: En el Anexo 4.2 encontrarás un esquema para que identifiques los componentes de la replicación del DNA, en función de la lectura y el video que revisaste. Realiza la actividad que se solicita.

Lectura El origen inusual de la PCR.

Tomado y modificado de:

Kary B. Mullis

"The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction"

Scientific American, April 1990

Un método de sorprendente sencillez para fabricar copias de fragmentos de DNA sin límite, concebido a la luz de la luna a través de las montañas de California

Las buenas ideas surgen por casualidad, en mi caso ocurrió así: gracias a una rara combinación de coincidencias, ingenuidad y felices errores, me vino la inspiración un viernes de abril de 1983 mientras, al volante del coche, serpenteaba a la luz de la luna por una carretera de las montañas del norte de California. Caí en la cuenta, con un proceso que permite fabricar un número ilimitado de copias de cualquier gen: la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

A partir de una sola molécula de DNA, la PCR puede generar 100,000 millones de moléculas idénticas en una tarde. La reacción es muy sencilla, sólo se necesita un tubo de

ensayo, algunos reactivos y una fuente de calor. La muestra de DNA que se desea copiar no tiene forzosamente que ser pura. El DNA puede proceder de una muestra de tejido cualquiera, de un cabello humano, de una gota de sangre coagulada en la escena del crimen, de los tejidos de un cerebro momificado o de un mamut lanudo muerto hace 40,000 años y conservado en un glaciar.

El impacto de la PCR en las investigaciones biológicas y su sencillez conceptual, el hecho de que a nadie se le ocurriese durante más de quince años, a pesar de que todos los elementos necesarios se hallaban en circulación, no deja de sorprender a mucha gente. Con esta técnica se puede obtener la cantidad de DNA que deseen, aunque en la práctica cuesta conseguir una molécula bien conservada de DNA natural de cualquier organismo, debido a la propia naturaleza de la molécula, que es delicada por ser delgada y larga, hasta los tratamientos más suaves la rompen aleatoriamente en múltiples pedazos. Este problema se resolvió hasta los años setentas con el descubrimiento de las restrictasas, enzimas que cortan el DNA en sitios específicos, haciendo más fácil aislar los fragmentos que portan el gen de interés. A finales de esta década se utilizaban también las sondas de oligonucleótidos (cadena corta de nucleótidos específicamente ordenados), que bajo condiciones adecuadas se unen a sitios específicos en una cadena de DNA.

Para 1955 Arthur Kornberg y su grupo de la Universidad de Stanford descubrieron la DNA polimerasa, una enzima celular que desempeña varias funciones, entre ellas, la reparación y replicación del DNA. Esta enzima puede elongar un breve oligonucleótido “cebador” añadiendo en su extremo 3' más nucleótidos, pero sólo si el cebador se hibrida a una cadena complementaria. Frederick Sanger en 1975 ideó una técnica de secuenciación llamada “Técnica de Sanger”, en la que se utiliza una DNA polimerasa, cadenas moldes, cebadores, nucleótidos trifosfatados y dideoxidos trifosfatados especiales (ddNTP) para determinar las secuencias de DNA.

Un viernes por la noche a finales de la primavera me dirigía a Mendocino Country, no iba casi nadie por la autopista en aquellas horas, sentado tranquilamente durante tres horas en mi coche, las manos ocupadas, la mente libre. Esa noche concretamente, pensaba en mi experimento de secuenciación de DNA. Mis planes eran sencillos, comenzaría por separar un DNA diana en cadenas sencillas, calentándolo. Lo hibridaría después con un oligonucleótido cuya secuencia fuese complementaria con algún fragmento de una cadena, esta mezcla la pondría en cuatro tubos que contendrían los cuatro tipos de ddNTP, pero en cada uno de ellos habría un ddNTP distinto marcado con radiactividad. Añadiría a continuación la DNA polimerasa que elongaría la cadena.

Cerca de Cloverdale, donde se abandona la autopista para tomar una carretera que serpentea costa arriba, decidí que sería mejor sí, en vez de un sólo oligonucleótido, usaba dos. Los dos cebadores rodearían al par de bases que esperaba identificar, si cada oligonucleótido era específico del DNA diana de una cadena, obtendría información sobre las dos cadenas complementarias. Utilizaría la misma enzima, la DNA polimerasa, dos veces, primero para eliminar los nucleótidos trifosfatados extraños de la muestra y, luego para incorporar los ddNTP marcados. Sometiendo la muestra a una serie de reacciones preliminares, con cebadores de oligonucleótidos y polimerasa, pero sin ddNTP, eliminaría fácilmente los nucleótidos libres de la muestra, incorporándolos a los propios oligonucleótidos en extensión. Elevando entonces la temperatura podría separar estos nuevos oligonucleótidos, más largos, del DNA diana. En realidad, los oligonucleótidos elongados permanecerían en la muestra;

pero, como habría muchos más cebadores originales sin elongar que alargados, los DNA diana acabarían por hibridarse con los cebadores originales, cuando se enfriase la muestra.

Seguían acosándome algunas dudas. ¿Qué ocurriría si la elongación fuese de muchas bases, y no sólo de una o dos? ¿Qué pasaría si la elongación hubiese creado una secuencia que incluyese un fragmento complementario a la otra molécula cebadora? Eso causaría problemas... No. ¡Todo lo contrario! De repente, me sacudió la evidencia: las cadenas de DNA diana y los oligonucleótidos elongados tendrían la misma secuencia de bases. ¡En efecto, la reacción preliminar habría doblado el número de DNA dianas presentes en la muestra! Emocionado, empecé a calcular potencias de dos: dos, cuatro, ocho, 16, 32... Recordaba muy vagamente que dos elevado a la décima potencia era alrededor de 1000, y que, por tanto, dos elevado a la veinte se aproximaba al millón. Paré el coche en un mirador, saque de la guantera lápiz y papel (necesitaba comprobar mis cálculos), confirmé que dos a la veinte era en efecto alrededor de un millón y seguí adelante. Tras unas pocas rondas de elongar cebadores, disociarlos, rehibridar nuevos cebadores y elongarlos nuevamente, la longitud de las cadenas del DNA que se acumula de manera exponencial quedaría fijada, ya que sus extremos estarían perfectamente definidos por los extremos 5' de los cebadores. Podría replicar fragmentos mayores de la muestra original de DNA si diseñaba cebadores que hibridasen en sitios más alejados entre sí. Los fragmentos serían siempre entidades discretas de una longitud específica.

Durante las siguientes semanas expliqué mi idea a todo el que me quiso escuchar. Nadie había oído nada sobre eso; ni tenían alguna razón de peso para que no funcionara. A pesar de ello nadie se mostró emocionado con la novedad.

Pasaron meses mientras preparaba mi primer experimento para comprobar si la PCR funcionaba. Para realizar el experimento, seleccioné un fragmento diana de 25 pares de bases, procedente de un plásmido, y dos oligonucleótidos de 11 y 13 pares de bases como cebadores. La PCR multiplicó la secuencia de DNA seleccionada. Durante los siguientes meses fui refinando la técnica, confirmando que funcionaba mejor con fragmentos cada vez mayores de DNA plasmídico e incluso con DNA humano. Suelo aconsejar que las muestras de DNA se ciclen entre unos 98 °C, justo antes del punto de ebullición, y 60 °C, estos ciclos pueden ser de uno o dos minutos. Durante cada ciclo el número de moléculas de DNA diana se duplica. Los cebadores constan de unas 20 o 30 pares de bases de largo, además del uso de una DNA polimerasa especial, purificada de la bacteria *Thermus aquaticus*, que vive en fuentes termales. Esta polimerasa termoestable se produce ahora sin problemas por ingeniería genética y permite estos cambios de temperatura sin que se desnaturalice la enzima.

Actividad 2. Discusión en plenaria

Instrucciones: Despues de leer la lectura, contesta lo siguiente en equipo y discute en plenaria tus respuestas.

1. ¿Qué importancia tiene el descubrimiento de la PCR?
2. ¿Cuáles fueron los descubrimientos moleculares significativos que permitieron el desarrollo de la técnica de PCR?
3. ¿Cuáles son los ingredientes necesarios para realizar la PCR?

Lectura.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la técnica.

*Tomado y modificado de: PCR Amplification DNA (EDVO-kit #330)
The biotechnology Education Company.*

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) genera millones de copias de una secuencia de DNA de interés. Es una herramienta ubicua y esencial en casi cualquier laboratorio de biología.

Para realizar la técnica de PCR se necesitan iniciadores específicos, solución amortiguadora, desoxirribonucleótidos-trifosfatados, cloruro de magnesio, agua destilada, un DNA molde y la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa).

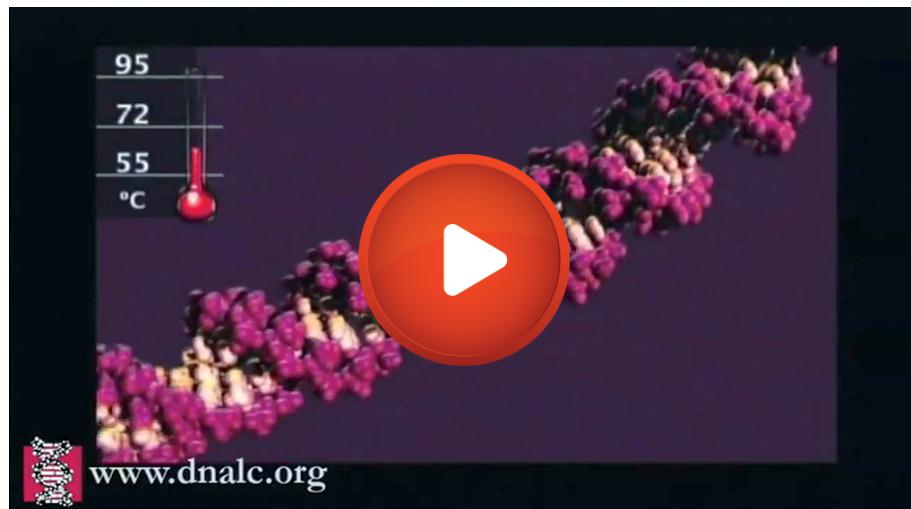
El método consiste en tres etapas que se desarrollan a diferentes temperaturas y que se repiten entre 25 y 40 ciclos.

Antes de realizar una PCR, el DNA tiene que ser extraído de una muestra biológica, después se tiene que preparar una mezcla que contenga secuencias cortas (oligonucleótidos) de DNA diseñadas especialmente como sondas, que se aparean a los extremos 5' y 3' de las cadenas molde de DNA. La mezcla, además, contiene el DNA molde y un buffer que contiene cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y la DNA polimerasa termoestable (Taq polimerasa). Después la mezcla de PCR se somete a ciclos secuenciales de calentamiento/enfriamiento a tres temperaturas, para amplificar el DNA (Figura 1). Para simplificar este proceso se utiliza una máquina especializada, denominada “termociclador”, que calienta y enfria rápidamente la mezcla de PCR, a través de ciclos intermitentes de temperatura que permiten duplicar la cantidad de DNA en un tiempo muy corto (generalmente menor a dos minutos). Esto hace a la PCR una técnica muy sensible, se requieren únicamente unas cuantas copias de DNA como molde para generar una gran cantidad de producto. Después de muchos ciclos (según la cantidad de DNA inicial), la cantidad de DNA amplificado alcanza una máxima cantidad de producto. Esto se debe a la disminución de componentes de la reacción, como los oligonucleótidos y los dNTPs, y a la pérdida de la actividad de la Taq polimerasa.

Las fases de la PCR son desnaturación, alineamiento y extensión. En la desnaturación la mezcla se calienta a 94 °C para romper los puentes de hidrógeno entre las cadenas complementarias. Esto provoca que el DNA se abra en cadenas sencillas. En el “alineamiento” la mezcla de reacción se enfria a 50-65 °C. Esto permite que los oligonucleótidos se apareen con las bases complementarias en la secuencia de DNA a amplificar. En la “extensión” la temperatura se incrementa a 72 °C. Esta temperatura es óptima para que la Taq polimerasa agregue nucleótidos en el extremo 3' del “primer”, sintetizando una nueva cadena de DNA. Juntos, estos tres pasos desnaturación-alineamiento-extensión componen un “ciclo” de PCR (Figura 3).

Por su facilidad de uso y su capacidad para amplificar DNA muy rápido, la PCR se ha convertido en una herramienta indispensable en laboratorios médicos y de investigación. Por ejemplo, se pueden rápidamente crear copias (clonar) de una región específica de DNA para su estudio, en el diagnóstico médico e identificar mutaciones y agentes infecciosos, análisis forense o determinación de paternidad.

Para reforzar el proceso de la PCR y sus fases, observa el siguiente video:
<https://youtu.be/2KoLnIwoZKU>



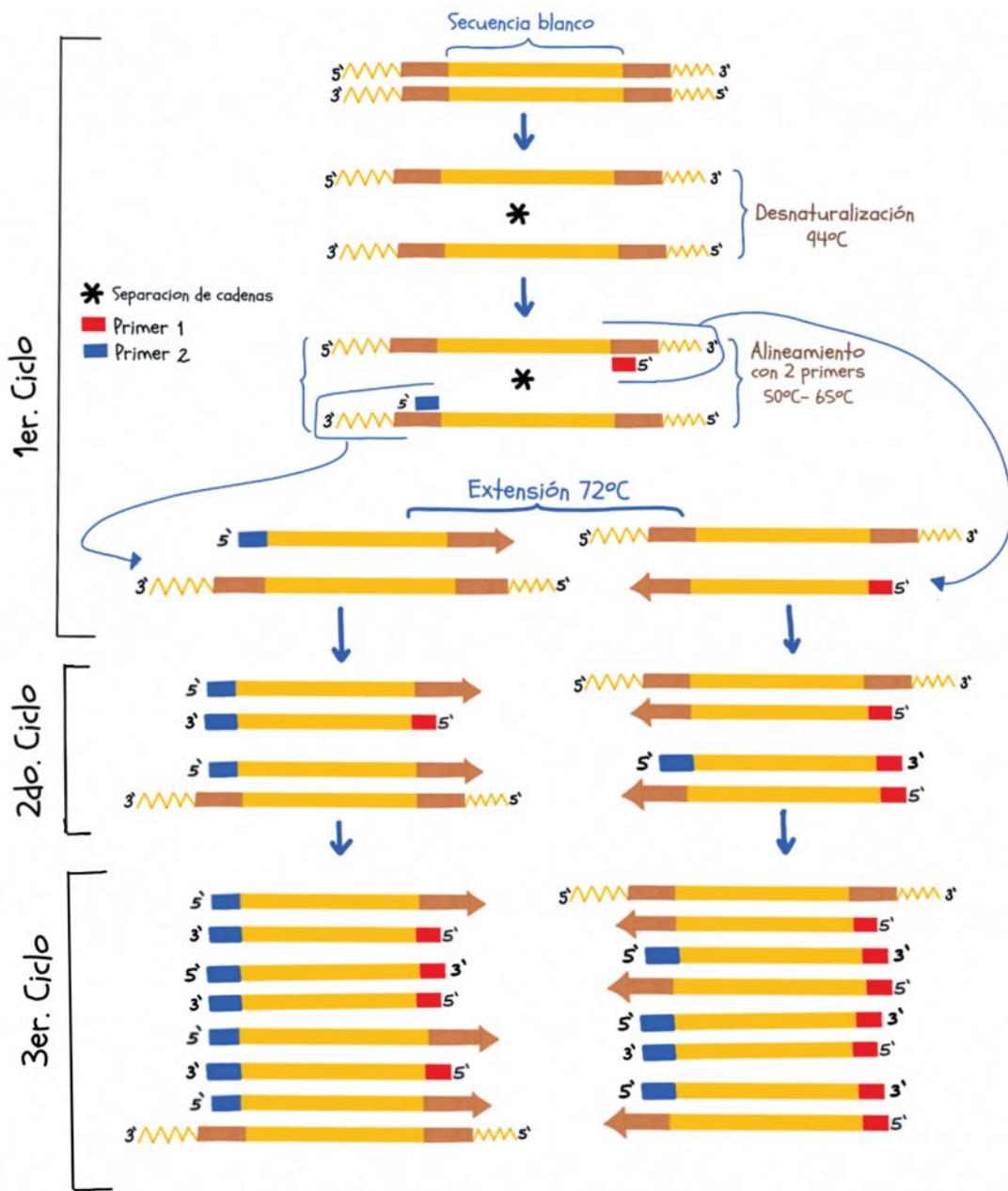


Figura 3. Representación de tres ciclos de la PCR, en el ciclo 1 se observa la desnaturalización, alineamiento y extensión. En los siguientes ciclos se aprecia el incremento del número de copias del DNA molde.

Elaboración propia.

Actividad 3. Etapas de la PCR.

Instrucción: Observa la Figura 4 y a partir de la información previa identifica las fases de la PCR.

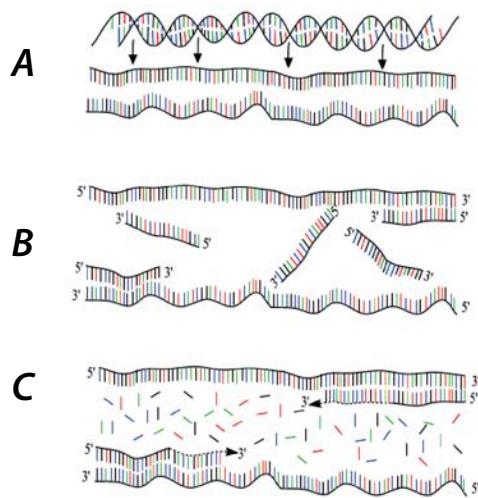


Figura 4 tomada de: https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Polymerase_Chain_Reaction/How_PCR_is_Performed#/media/File:PCR_Steps.JPG

Actividad 4. Amplificando el DNA (kit)

Instrucciones: En el Anexo 4.3 encontrarás el material recortable para realizar tres ciclos de PCR, a partir de una secuencia DNA.

Sigue en equipo las instrucciones que se te indican a continuación.

1. En el kit se te proporciona un fragmento de DNA molde, oligonucleótidos para los extremos 5' y 3' de la secuencia a amplificar y tiras azules para representar el primer ciclo de amplificación, amarillas para el segundo ciclo y verdes para el tercero.
2. Recorta cada uno de los elementos del kit.
3. Toma la secuencia molde (blanca), desnaturalízala y coloca los oligonucleótidos correspondientes. Recuerda el sentido de adición de nucleótidos de la DNA polimerasa.
4. Coloca las tiras azules y sintetiza la secuencia resultante después del primer ciclo, ¿cuántas cadenas de DNA te resultan?
5. Desnaturalízalas.
6. Ahora éstas son el molde para el segundo ciclo que representarás en las tiras amarillas, coloca los oligonucleótidos y sintetiza las secuencias complementarias, ¿cuántas cadenas de DNA te resultan?

7. Desnaturalízalas.
8. Finalmente, para el tercer ciclo, utilizarás las tiras verdes, coloca los oligonucleótidos y sintetiza las secuencias complementarias, ¿cuántas cadenas de DNA te resultan?
9. Discute con tus compañeros de equipo los pasos que llevaron a cabo para la amplificación de DNA por PCR.
10. Identifica brevemente los fundamentos de la técnica de PCR.

Cierre

Actividad experimental. Amplificación de DNA por PCR

Antes de realizar una PCR, el DNA tiene que ser extraído de una muestra biológica. Se diseñan dos primers que corresponden a los extremos 5' y 3' de la secuencia a amplificar. El DNA molde y los primers son mezclados con buffer, los cuatro desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y una DNA polimerasa termoestable (Taq). Después, la mezcla de PCR se somete a ciclos de secuenciales de calentamiento/enfriamiento a tres temperaturas para amplificar el DNA. A continuación, realizarás la amplificación por PCR. Al finalizar el experimento, contesta lo que se solicita en el **Anexo 4.4**.

Objetivo

- Comprender los principios fundamentales de la Reacción en cadena de la polimérica (PCR).

Materiales y equipo

Laboratorio	Reactivos	Material biológico
Termociclador (MiniPCR) Tubos de centrífuga Microcentrifuga Tubos para PCR Guantes Hielera pequeña o vaso de unicel Micropipetas con puntas Horno de microondas Cámara de electroforesis horizontal Transiluminador de luz azul	PARA LA PCR A. Taq Master Mix (-20 °C), mezcla de reactivos que contiene: <ul style="list-style-type: none"> • Mezcla de dNTPs • Taq DNA Polymerase • MgCl₂ • Buffer de reacción A. Primer forward (-20 °C) B. Primer reverse (-20 °C) C. Agua ultrapura (-20 °C) D. DNA molde (4 °C) GEL DE AGAROSA A. Agarosa 1% B. Buffer TBE C. Buffer de carga D. Loading Buffer E. Midori Advance	DNA molde (4 °C)

Procedimiento

1. Marcar un tubo de 0.5 ml con la etiqueta “MEZCLA PCR” y colocarlo en hielo.
2. Marcar cinco tubos de PCR (0.2 ml) con las etiquetas: 0, 10, 20, 30.
3. Preparar la mezcla de PCR en el tubo de 0.5 ml (en hielo), con el siguiente protocolo:
 - a) Taq Master MIX----- 43 µl
 - b) Oligo forward ----- 4 µl
 - c) Oligo Reverse ----- 4 µl
 - d) DNA molde ----- 5 µl
 - e) Agua ultrapura----- 30 µl
4. Mezclar dando suaves golpes al tubo. Colocar en el hielo esta mezcla de PCR.
5. Centrifugar unos segundos para colectar la mezcla en el fondo del tubo.
6. Transferir 2O µl de la mezcla de PCR a cada tubo de PCR de 0.2 ml (etiquetados como 0, 10, 20, y 30).
7. Centrifugar por unos segundos los tubos de 0.2 ml con la mezcla de PCR.
8. Colocar los tubos etiquetados como 10, 20 y 30 dentro del termociclador (MiniP-PCR). Mantener en el hielo el tubo etiquetado como 0.
9. Proceder a amplificar el DNA con las siguientes condiciones de PCR:

Desnaturalización inicial	94 °C/ 120 segundos
Desnaturalización	94 °C/ 30 segundos
Alineamiento	60 °C/ 30 segundos
Extensión	72 °C/ 30 segundos
Extensión final	72 °C/ 60 segundos

10. Una vez que hayan transcurrido 10 ciclos, hacer una pausa en el termociclador y retirar el tubo marcado como 10, colocar en el hielo. Continuar con la amplificación.
11. Una vez que hayan transcurrido 20 ciclos, hacer una pausa en el termociclador y retirar el tubo marcado como 20, colocar en el hielo. Continuar con la amplificación.
12. Una vez que hayan transcurrido 30 ciclos, hacer una pausa en el termociclador y retirar el tubo marcado como 30 y colocar en el hielo.
13. A cada tubo (0, 10, 20 y 30) agregar 5 µl de Loading Buffer; el tubo PM tendrá 5 µl de peso molecular.
14. Ahora proceder a la separación de los productos de PCR en un gel de agarosa.
15. Colocar el gel de agarosa en la cámara de electroforesis y agregar el buffer TBE 1X.
16. Cargar el gel, inicia colocando en el primer pozo 5 µl del tubo marcado como PM.
17. Colocar 20 µl de cada una de las muestras en los siguientes pozos.
18. En el Anexo 4 están los formatos para colocar la foto del gel producto de la PCR y contesta el cuestionario de esta actividad.

Literatura consultada

Mullis, K. B., (1990). *The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction*, Scientific American, 262 (4):56-61

Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L., & Lukyanov, S. A. (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. Nature biotechnology, 17(10), 969-973.

Rodríguez S.I.P.y Barrera S. H. A. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL, 7(3)

Shaner, N. C., Lin, M. Z., McKeown, M. R., Steinbach, P. A., Hazelwood, K. L., Davidson, M. W., y Tsien, R. Y. (2008). Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. Nature methods, 5(6), 545.

Bustin, S. A. (2009). The PCR Revolution. Basic Technologies and Applications. Cambridge University Press.

Cerna C. J, y Guapillo, V. M. R. (2014). Taq polimerasa: De los geiseres a la ciencia. Temas de Ciencia y Tecnología. Revista de la Universidad Tecnológica de La Mixteca. Pp 52-57.

Campbell, N., Reece J., Taylor, M. y Simon, E. (2005). Biology. EUA. Ed. Person. pp 181-189.

PCR Amplification of DNA. (2016). EDVOTEK #330. Disponible en:
<https://www.edvotek.com/330.161107.pdf>

Anexo 4.1

Cuestionario diagnóstico

Instrucción: Subraya la respuesta correcta y contesta:

1. ¿La replicación del DNA *es* semiconservativa, porque:
 - a) Las cadenas hijas constan de fragmentos de la cadena antigua y fragmentos de la nueva.
 - b) Se sintetiza una molécula totalmente nueva, copia de la original.
 - c) En cada una de las moléculas hijas se conserva una de las cadenas originales.
2. ¿En qué dirección se replica el DNA?
 - a) En el sentido 5'—> 3'.
 - b) En el sentido 3'—> 5'
 - c) La adición de nucleótidos se produce en los dos sentidos indistintamente.
3. ¿Cuáles son las etapas de la replicación del DNA?
4. Las funciones de las enzimas que intervienen en la replicación del DNA son:
5. La importancia biológica de la replicación del DNA consiste en:

Anexo 4.2

Actividad 1. Identifica la maquinaria de replicación.

Utiliza la siguiente figura para identificar los componentes de la replicación del DNA: helicasa, proteínas estabilizadoras (SSB), topoisomera, primasa, primer, DNA polimerasa, DNA ligasa, fragmento de Okazaki, cadena adelantada y cadena atrasada.

Horquilla de replicación

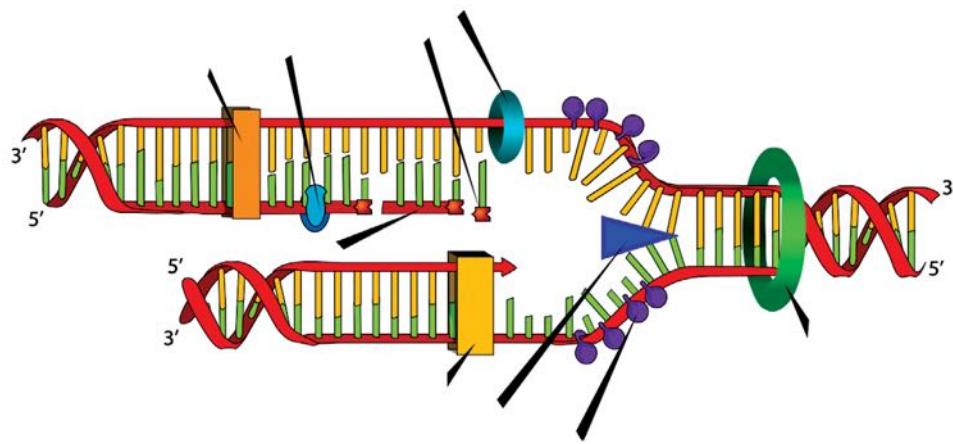
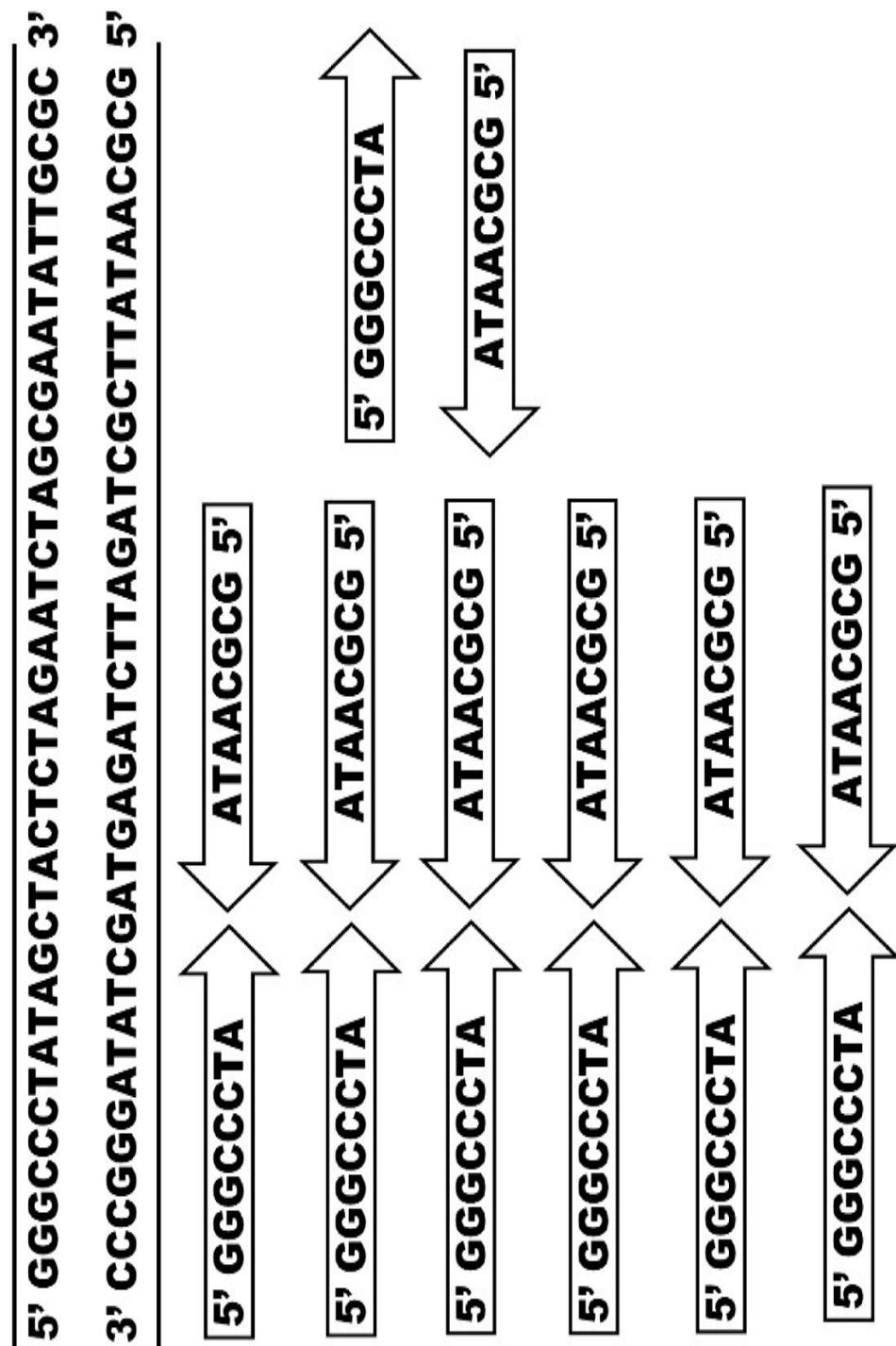


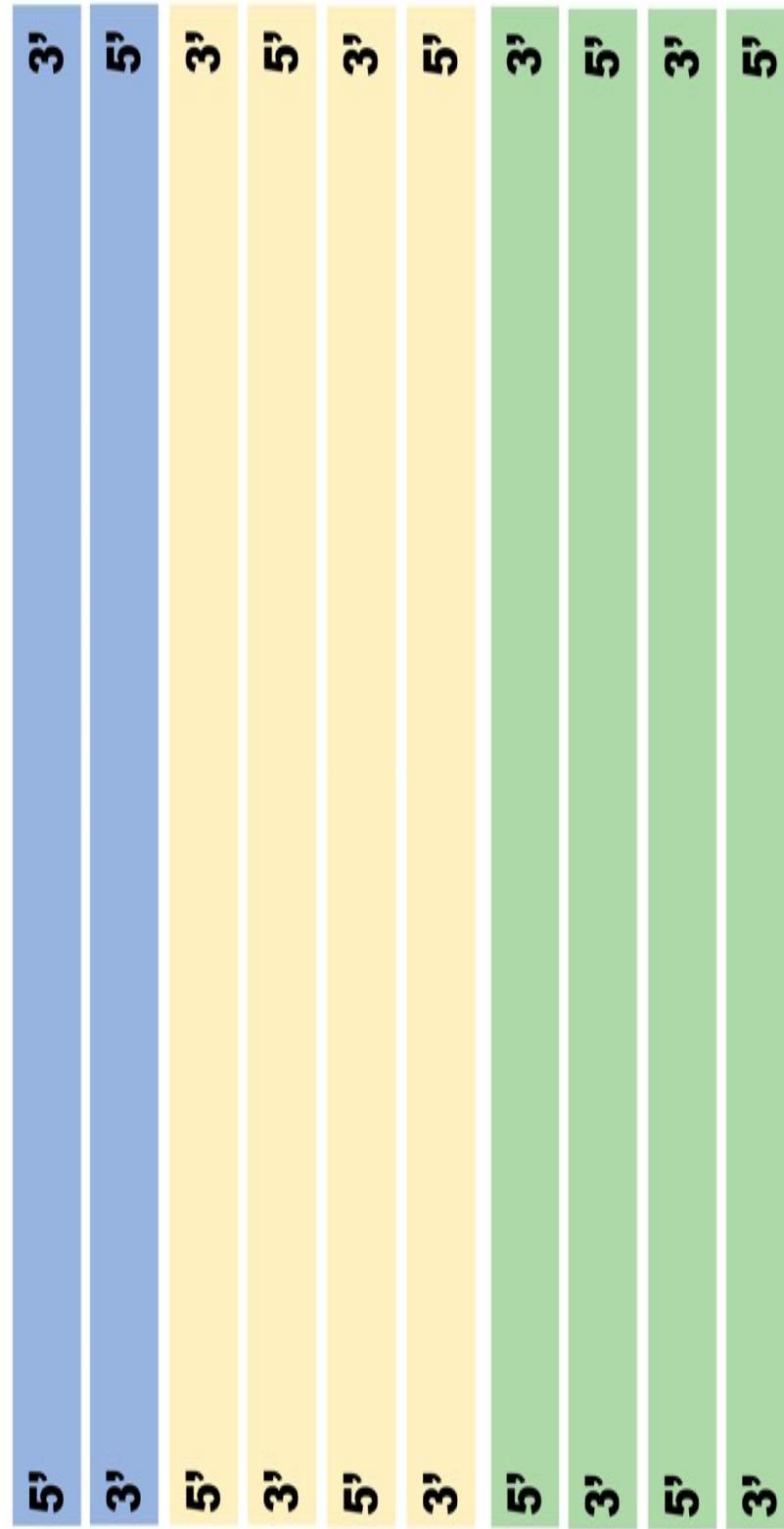
Figura 5. Tomada de: https://es.wikipedia.org/wiki/Replicaci%C3%B3n_de_DNA#/media/File:DNA_replication_es.svg

Anexo 4.3

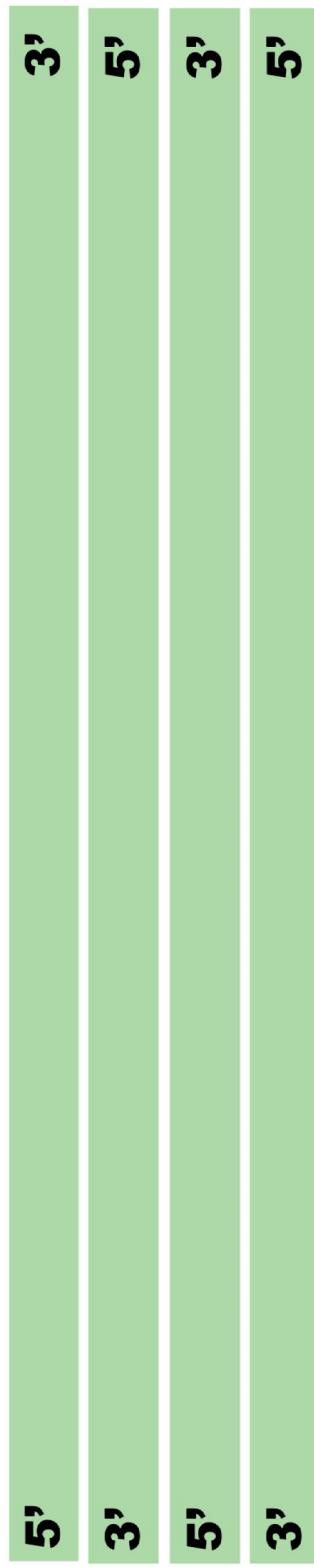
Actividad 2. Amplificando el DNA (kit)



Actividad 2. Amplificando el DNA (kit)



Actividad 2. Amplificando el DNA (kit)



Anexo 4.4

Actividad experimental. Amplificación de DNA por PCR

Instrucciones: Pega la foto del gel de agarosa, identifica el marcador de PM; determina el tamaño de los productos de la PCR a partir del marcador de PM. ¿Qué diferencias observas entre las bandas de las muestras etiquetadas como 0, 10, 20 y 30?

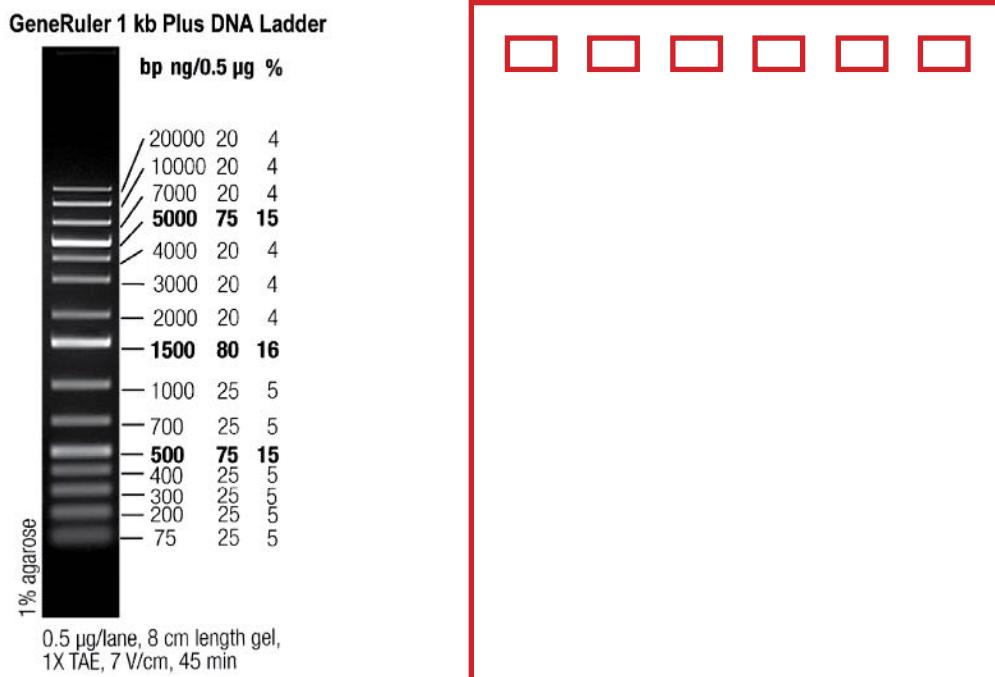


Figura 6. Tomada de: <https://www.fishersci.es/shop/products/fermentas-o-generuler-ready-to-use-1kb-plus-dna-ladder/11511635>

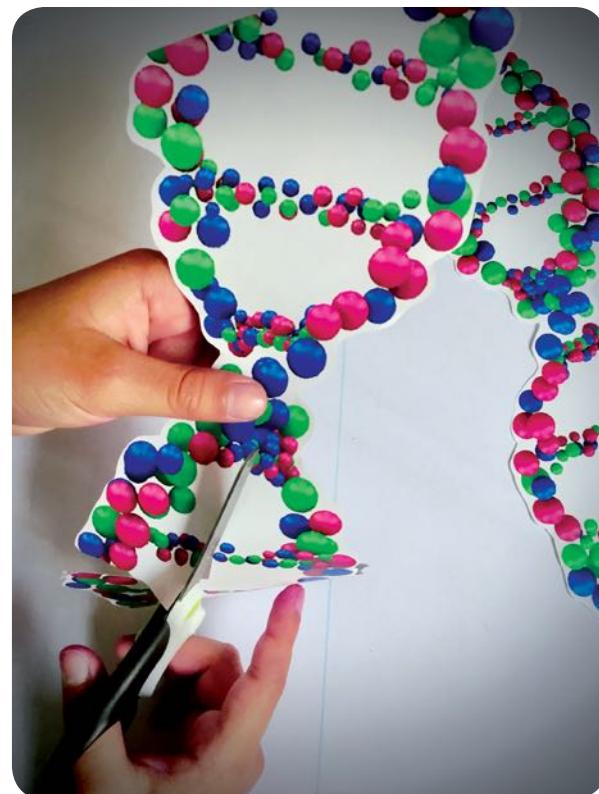
Cuestionario

Instrucciones: Discute con tus compañeros de equipo los pasos que llevaron a cabo para la amplificación de DNA por PCR.

1. Señala brevemente los fundamentos de la técnica de PCR.

2. Esquematiza y describe lo que sucede en cada uno de los tres pasos básicos de la técnica de PCR.
3. Explica por qué el termociclador resulta eficiente en la producción de copias de una secuencia de DNA.
4. Si se observan diferencias entre las bandas de las diferentes muestras (0, 10, 20 y 30), explica por qué.

Tijeras para cortar, pegar y diseñar moléculas de DNA



Enzimas de restricción

Elaboraron:

*Hernández Carbajal Luz Angélica
Luna Román Celso Miguel*

Colaboraron:

*Bautista Acevedo Marco Antonio
Bernal Enríquez Oscar
Centeno Cruz Federico
Martínez Ortiz Leticia
Mejía García Martha Elvira
Ramírez Aguilar Eva Cristina
Serrano Reyes Gabriela*

BIOLOGÍA I (PEA, 2016). Tercera Unidad

¿Cómo se transmiten los caracteres hereditarios y se modifica la información genética?

Propósito

Al finalizar la unidad, el alumno identificará los mecanismos de transmisión y modificación de la información genética, como responsables de la continuidad y cambio en los sistemas biológicos, para que comprenda su importancia biológica y evolutiva.

Tema 2. Herencia

Subtema: Manipulación del DNA

Aprendizajes

Declarativos	<ul style="list-style-type: none"> Reconoce las implicaciones biológicas y éticas de la manipulación del material genético. Reconoce que el DNA presenta sitios de restricción. Relaciona la estructura del DNA con los mecanismos de manipulación genética. Comprende que las enzimas de restricción son moléculas producidas por bacterias ante una situación de defensa.
Procedimentales	<ul style="list-style-type: none"> Aplica habilidades para comunicar, de forma oral y escrita, la información derivada de las actividades realizadas en forma individual y en equipo. Realiza actividades lúdicas y experimentales con enzimas de restricción.
Actitudinales	<ul style="list-style-type: none"> Valora la importancia de la manipulación genética en el beneficio de la sociedad, en particular de la tecnología del DNA recombinante.

Actividades a realizar:

Apertura

- Cuestionario RA-P-RP
- Lectura “Las enzimas de restricción un regalo para la biología molecular”

Desarrollo

- Exposición teórica ¿Qué son las enzimas de restricción?
- Actividad 1. “Cortando el DNA con diferentes tijeras”
- Actividad 2. “Cortando DNA circular”
- Actividad 3. “Visualizando fragmentos de DNA”
- Actividad experimental. Enzimas de restricción

Cierre

- Actividad de cierre
- Cuestionario RA-P-RP

Apertura

Cuestionario RA-P-RP

Instrucción: En el Anexo 5.1 encontrarás el formato del cuestionario (RA-P-RP). Contesta las preguntas, utiliza sólo la columna izquierda, RA (respuesta anterior).

Lectura.

“Las enzimas de restricción, un regalo para la biología molecular”

Instrucción: Lee el siguiente texto de manera dirigida en voz alta y, al finalizar, contesta el cuestionario y comenta en plenaria tus respuestas.

*Christen Brownlee
Escritor de ciencia independiente
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0502760102
Adaptación: Luz Angélica Hernández Carbajal.*

Abandona la medicina para dedicarse a la investigación

El descubrimiento de las enzimas de restricción comenzó en 1945, cuando Nathans se inscribió a una estancia de investigación en Química en la Universidad de Delaware (Newark), aun cuando no había ingresado a esa universidad. Nathans vivía en Delaware, en casa de sus padres y todos los días viajaba a la Universidad pidiendo avión para poder llegar a su curso. Fue el último de ocho hijos nacidos de padres judíos, rusos inmigrantes quienes alentaron su interés natural por la ciencia. Nathans afirmaba que su padre lo veía como “la última oportunidad de tener un médico en la familia”.¹

“Convertirme en médico me pareció más atractivo que cualquier otra alternativa que conociera”, señaló Nathans² en una entrevista. Así que hizo lo apropiado y se inscribió en la facultad de medicina; fue becado por la Universidad de Washington (St. Louis). Sin embargo, a partir de esa intensa estancia de investigación que realizó en las vacaciones de verano, fue que Nathans se convenció de que su futuro estaba en la investigación y la enseñanza, más que en la práctica médica.

Después de que recibió su grado de médico en 1954, hizo una pasantía en el Columbia-Presbyterian Medical Center en Nueva York; después estuvo dos años como asociado clínico en el National Institutes of Health (Bethesda). Todo esto confirmó el deseo de Nathans por centrarse en la investigación científica.

Para gran sorpresa y consternación de su padre, Nathans dejó la medicina y comenzó un doctorado en la Universidad Rockefeller (Nueva York) en 1959. Sin embargo, cansado de asistir a interminables conferencias, Nathans abandonó su doctorado y comenzó a investigar sobre proteínas bacterianas y RNA viral. El trabajo constante le dio confianza y experiencia en bioquímica, lo que le llevó a ocupar el puesto de profesor en el departamento de mi-

1 DiMaio, D. (2001) in *Biographical Memoirs*, ed. Berry, R. S. (Natl. Acad. Press, Washington, DC), Vol. 79, pp. 262–279.

2 Odelberg, W., ed. (1979) *Les Prix Nobel. The Nobel Prizes 1978* (Nobel Foundation, Stockholm).

crobiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Johns Hopkins (Baltimore) en 1962. En palabras de Nathans, él se convirtió en el “Departamento de Genética de un solo hombre”³, que gradualmente se transformó en un grupo considerable, que incluía a la estudiante de posgrado Kathleen Danna, al profesor Hamilton O. Smith y al estudiante de postdoctorado de Smith, Thomas Kelly. Esta combinación de talentos resultaría muy fructífera en los años venideros (Figura 1).

Endonucleasas subestimadas

Se le pidió a Nathans que diera clases a los estudiantes de medicina sobre virus que infectaban a animales. El tema lo intrigó, por lo que cambió su línea de investigación para estudiar un virus tumoral relativamente simple, el virus de simio 40 (SV40). Para aprender cómo cultivar y manejar el SV40, Nathans tomó un año sabático en el Instituto de Ciencia Weizmann en Rehovot, Israel, en 1969. Durante la ausencia de Nathan, Smith mantenía correspondencia con él sobre la investigación con endonucleasas (enzimas de restricción). Sin embargo, Smith no lograba ver el potencial de estas moléculas. Nathans le escribió una carta personal a Smith sobre este hallazgo, comentándole que “podría ser útil para muchas cosas”. Así, el equipo de investigación de Nathans comenzó con algunos experimentos preliminares.

A su regreso a la Facultad de Medicina de la Universidad Johns Hopkins, Nathans estudió el efecto de la enzima de Smith en el virus SV40. Danna pronto se unió al proyecto, y trabajó con las endonucleasas como el tema de su tesis de doctorado. “Siempre estuve disponible, primero tenías que intentar resolver un problema y luego recurrir a él si necesitabas ayuda”, comenta Danna respecto a Nathans, actualmente profesora asociada de la Universidad de Colorado (Boulder).



Figura 1. Dan Nathans (izq.) y Hamilton Smith (der.) en el laboratorio en la Universidad Johns Hopkins. Tomado de Roberts (2005).

Una visión clara

Smith y su estudiante postdoctoral Kelly progresaron rápidamente con su estudio independiente de la enzima de restricción *Hemophilus influenzae*, concluyendo en 1970 que la enzima dividía el DNA sólo en sitios con una disposición específica de pares de bases. Sin embargo, después de publicar sus hallazgos,³ los científicos abandonaron el tema de las enzimas de restricción y continuaron con otras investigaciones. “Hice mi buena pieza de bioquímica y, por alguna razón, no estaba interesado en la aplicación real de la enzima”, dijo Smith, miembro de la Academia y actualmente director científico del Institute for Biological Energy Alternatives (Rockville, MD). “Simplemente publiqué más o menos mi trabajo y lo puse en el estante. Si miras atrás, parece una noción tan simple. Pero el hecho es que creo que Nathans vio la utilidad de esto mucho más claramente que incluso aquellos de nosotros que estábamos más cercanos a la investigación”, dijo

³ Kelly, T. J. & Smith, H. O. (1970) J. Mol. Biol. 51, 393–409.

Kelly, miembro de la Academia y actualmente director del Sloan-Kettering Institute (Nueva York). “Claramente, debió haber tenido una visión desde el principio, que sólo la simple idea de poder separar los fragmentos de DNA viral en piezas específicas y que esto además tendría *enormes aplicaciones*”, dijo Kelly.

Un legado duradero

Nathans y Danna continuaron trabajando con la enzima, con un giro diferente al de Smith y Kelly. A lo largo de su vida, Nathans continuó desempeñando un papel integral en la biología molecular y la investigación en genética. Después de una carrera extremadamente fructífera en Johns Hopkins, así como de numerosos reconocimientos, Nathans sucumbió a la leucemia en 1999. Sin embargo, el legado de Nathans en 1971 con su artículo en PNAS es fácilmente visible en casi todas las áreas de la biotecnología moderna.

Cuestionario y reflexión

Instrucciones: A partir de la lectura anterior discute en equipo las siguientes preguntas y al final comenta en plenaria.

1. ¿Qué llevó al autor a tener un gusto por la investigación científica y dejar la medicina como profesión?
2. Discute con tu profesor cómo el conocimiento científico se produce, ¿hay alguna diferencia entre lo que narra el artículo y el cómo ahora se produce el conocimiento científico?
3. De esta lectura, ¿cuáles son las aportaciones más sobresalientes para comprender qué son las enzimas de restricción?

Desarrollo

Exposición teórica. “*¿Qué son las enzimas de restricción?*”

Kathleen Danna y Daniel Nathans, de la Universidad Johns Hopkins (Baltimore), demostraron por primera vez que la enzima de restricción llamada “endonucleasa R”, descubierta por Hamilton Smith, Tom Kelly y Kent Wilcox, podría usarse para cortar DNA y producir fragmentos específicos de DNA del virus 40 (SV40) de simio. Además, demostraron que estos fragmentos pueden ser separados unos de otros por electroforesis. La imagen resultante (Figura 1) proporcionó un ejemplo visual inmediato de cuán poderosa sería la combinación de endonucleasas de restricción y la electroforesis en gel. Fue Nathans quien dio el salto intuitivo clave y luego continuó demostrando no sólo que los fragmentos resultantes productos del corte de las enzimas de restricción podrían usarse para producir un mapa físico del virus SV40, sino también que este mapa físico permitió el mapeo del origen de la replicación y la ubicación de los genes del SV40. Estos estudios pioneros prepararon el escenario para la biología molecular moderna.

Las enzimas de restricción son producidas por las bacterias como un mecanismo de defensa contra las infecciones víricas, concretamente contra bacteriófagos, cuya reproducción depende de la maquinaria genética de la bacteria. Se trata de sistemas de restric-

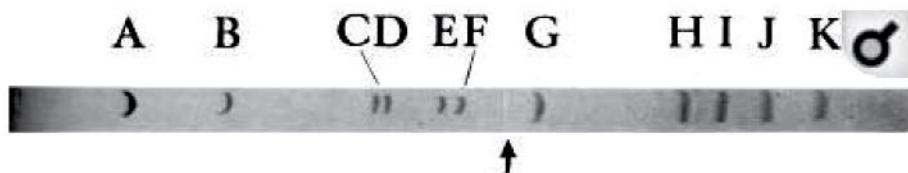


Figura 2. Radioautograma de DNA de SV40 marcado con ^{14}C escindido con endonucleasa R, muestra los 11 fragmentos distintos Tomado de Roberts (2005).

ción-modificación o metilación-restricción. Para cada enzima de restricción, una metilasa reconoce la misma secuencia que constituye el sitio de restricción y une covalentemente grupos metilo a determinadas bases del DNA en dicha secuencia (Figura 3). El mecanismo de defensa es el siguiente: el DNA propio de la bacteria es metilado de una forma específica, característica de cada especie bacteriana (en las secuencias reconocidas tanto por la restriktasa como por la metilasa de esa especie). La metilación de las bases impide la unión de la enzima de restricción, con lo que el DNA de la bacteria no es hidrolizado. Por el contrario, al entrar en la célula el DNA de otro organismo, no metilado o con un patrón de metilación diferente, este DNA puede ser degradado por la enzima de restricción. A partir de este mecanismo de acción combinada, surgió precisamente el nombre de enzimas de restricción, ya que la acción de estas enzimas restringe la posibilidad de infección por virus (Luque y Herráez, 2002).

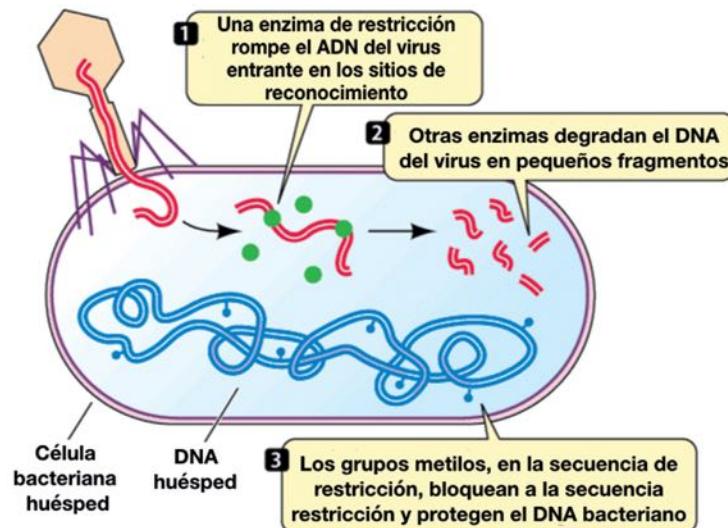


Figura 3. Las bacterias se defienden de los virus cortando su DNA, este proceso se denomina restricción porque las bacterias pueden restringir el crecimiento y la replicación de los virus. Las enzimas responsables se conocen como enzimas de restricción o endonucleasas de restricción.

Las bacterias se protegen de sus propias enzimas al agregar grupos metilo (CH_3) a su DNA (metilación). Purves. Life: The Science of Biology, 7a edition.

¿Cómo cortar?

Las enzimas de restricción se nombran con tres letras tomadas del género y especie de la bacteria de la que se aislaron originalmente, seguidas a veces por una letra más, que identifica el serotipo (variante antigénica de la bacteria) y, finalmente, por un número romano que las identifica en caso de que en una misma variante se hayan encontrado varias enzimas con distinta especificidad. Por ejemplo, la primera enzima de restricción fue nombrada como EcoRI, fue aislada de la bacteria *E. coli*, de ahí su nombre. Otro ejemplo es BamHI fue la primera descrita en la cepa H de *Bacillus amyloliquefaciens* (tabla 1).

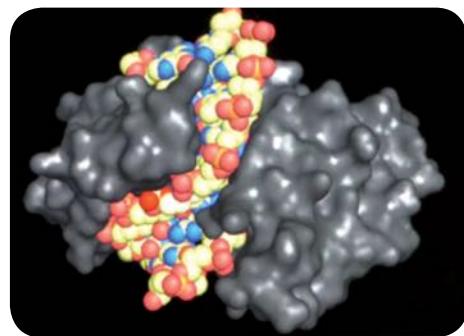


Figura 4. Enzima de restricción Mva1 (en color gris) se muestra envuelta alrededor del DNA (multicolor) (Kaus-Drobek *et al.*, 2007).

Enzima de restricción	Organismo
Bgl I	<i>Bacillus globigii</i>
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>
EcoRI	<i>Escherichia coli RY13</i>
EcoRII	<i>Escherichia coli R 245</i>
HaeIII	<i>Haemophilus aegyptius</i>
HindIII	<i>Haemophilus influenzae R₄</i>

Tabla 1. Enzimas de restricción de diferentes organismos.

Una enzima de restricción requiere una secuencia de reconocimiento de cadena doble específica de nucleótidos para cortar el DNA. Los sitios de reconocimiento son generalmente de 4 a 8 pares de bases de longitud. La ruptura o escisión (hidrólisis) se produce dentro o cerca del sitio. En la Figura 4, las posiciones de escisión (ruptura) se indican mediante flechas. Los sitios de reconocimiento son frecuentemente simétricos, es decir, ambas cadenas de DNA en el sitio de ruptura tienen la misma secuencia de bases cuando se leen de 5' a 3'. Tales secuencias se llaman palíndromas.

Considera el sitio de reconocimiento y el patrón de escisión de EcoRI en el siguiente ejemplo (Figura 5). Tal como se muestra, la enzima de restricción EcoRI provoca una división escalonada en el sitio de corte. Los extremos de los fragmentos de DNA se denominan extremos “pegajosos” o “cohesivos” porque las regiones monocatenarias de los extremos del DNA son complementarias.

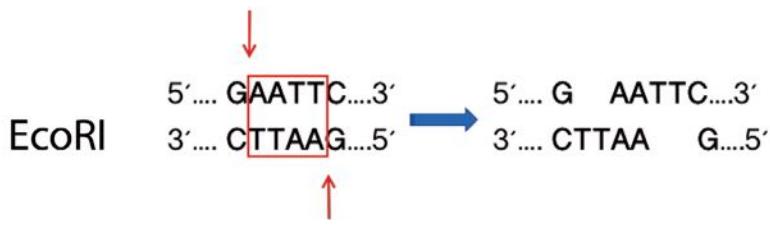


Figura 5. Sitio de corte de la enzima de restricción EcoRI, encerrada en rojo se muestra la secuencia palíndroma.

Algunas enzimas de restricción, como HaeIII, introducen cortes que son opuestos entre sí. Este tipo de escisión genera extremos “romos”, como se muestra en la Figura 6.

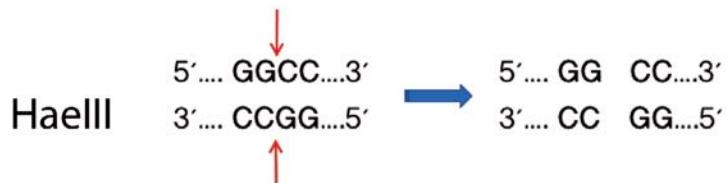


Figura 6. El sitio de corte de la enzima de restricción HaeIII, provoca extremos “romos”.

Los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción contienen posiciones de base variables, por ejemplo: AvaI (Figura 7) reconoce:

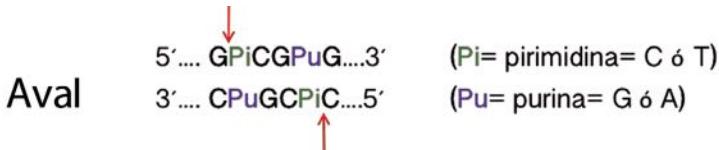


Figura 7. Sitios de base variables para la enzima de restricción AvaI.

Por lo tanto, al ser la Timina complementaria con Adenina y Guanina con Citosina, en consecuencia, hay cuatro posibles secuencias que AvaI reconoce. Los sitios de reconocimiento de este tipo se llaman “degenerados”.

Los plásmidos y muchos DNA víricos son moléculas circulares. Si el DNA circular contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, entonces se abrirá para formar una molécula lineal cuando se escinde. Por el contrario, si una molécula de DNA lineal contiene un sitio de reconocimiento simple, cuando se escinde una vez, generará dos fragmentos. El tamaño de los fragmentos producidos depende de la distancia entre los sitios. Si una molécula de DNA contiene varios sitios de reconocimiento para una enzima de restricción, entonces bajo ciertas condiciones experimentales, es posible que ciertos sitios sean escindidos y otros no. Estos fragmentos de DNA escindidos incompletamente se llaman parciales.

Pueden surgir fragmentos parciales si se utilizan cantidades bajas de enzima o se detiene la reacción después de un corto tiempo. En realidad, las reacciones que contienen fragmentos parciales también contienen algunas moléculas que han sido completamente escindidas (Figura 8).

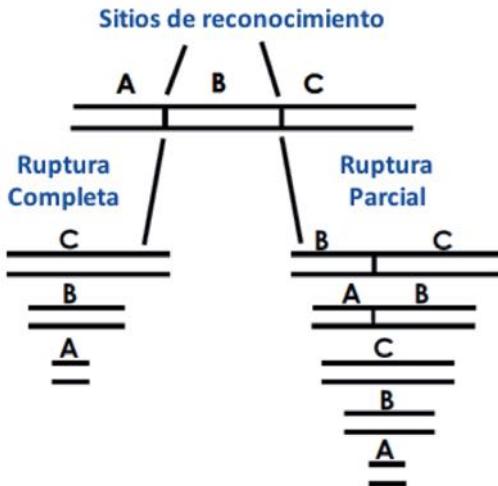


Figura 8. Tipos de fragmentos obtenidos de la ruptura completa o parcial de DNA

Usadas para cortar y pegar

Muchos métodos de la tecnología del DNA recombinante dependen de las bacterias. En los años 70, se desarrolló esta tecnología que permitió combinar genes de diferentes fuentes o diferentes especies en una misma molécula de DNA. El avance que hizo posible la tecnología del DNA recombinante son las enzimas de restricción, ya que al cortar secuencias específicas de DNA, permitió la manipulación del mismo. Cualquier molécula de DNA, de viral a humana, contiene sitios de restricción producidos al azar y, por lo tanto, puede cortarse en fragmentos definidos de un tamaño adecuado para posteriormente ser clonados y, además, hacen cortes escalonados que crean extremos adhesivos monocatenarios que conducen a la formación de DNA recombinante.

Comúnmente para unir diferentes moléculas de DNA se lleva a cabo lo siguiente: el DNA del donante y el DNA del vector se digieren con el uso de una enzima de restricción que produce extremos adhesivos y luego se mezclan en un tubo de ensayo para permitir que los extremos adhesivos del vector⁴ y el DNA del donador se unan y formen moléculas recombinantes, como se muestra en la Figura 9.

4 Un vector es una secuencia de DNA que es usada como un vehículo para incorporar material genético a otra célula en donde puede replicarse o expresarse. El vector contiene DNA extraño, (inserto), un transgene y una secuencia larga que sirve como “columna vertebral” del vector; hay varios tipos de vectores (plásmidos, cósmidos y cromosomas artificiales). Los vectores se diseñan dependiendo del uso que se les vaya a dar, ya sea para clonación, transcripción o expresión de proteínas (Campbell *et al*; 2008).

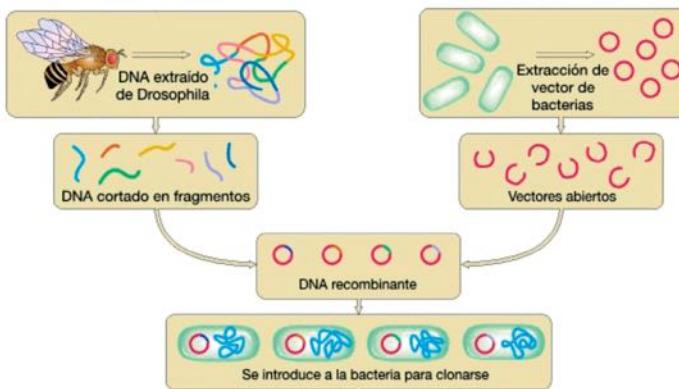


Figura 9. La tecnología de DNA recombinante permite que fragmentos individuales de DNA de cualquier genoma se inserten en moléculas de DNA vector, como plásmidos, y se amplifiquen individualmente en bacterias. Cada fragmento amplificado se llama clón de DNA. Imagen modificada de An introduction to genetic Analysis, Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, et al, disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21881/figure/A2095/?report=objectonly>

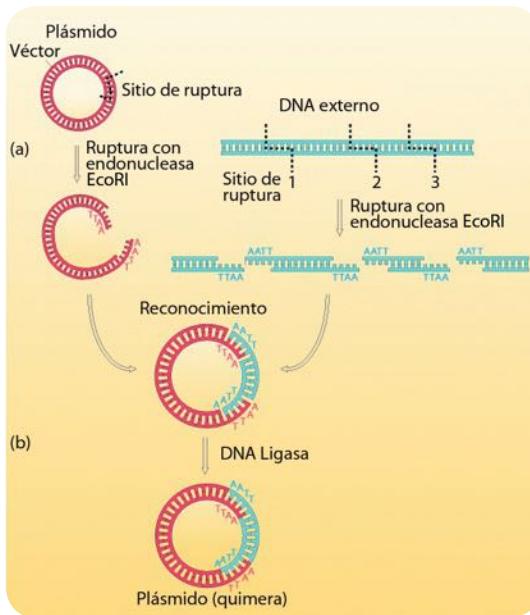


Figura 10. Método para generar plásmido DNA químero, que contiene genes derivados de DNA externo. Tomado de S. N. Cohen, "The Manipulation of Genes." Copyright © 1975 by Scientific American, Inc. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21881/>

La Figura 10 muestra cómo un vector plasmídico que porta un único sitio de restricción EcoRI al ser digerido con la enzima de restricción EcoRI convierte el DNA circular en una molécula lineal con extremos adhesivos. El DNA del donante, en este ejemplo (*Drosophila*), también es tratado con la misma enzima EcoRI para producir una población de fragmentos que llevan los mismos extremos adhesivos. Cuando las dos poblaciones se mezclan, los fragmentos de DNA de las dos fuentes pueden unirse. Hay muchas moléculas de vector abierto en la solución y muchos fragmentos diferentes de EcoRI del DNA del donante. Por lo tanto, se producirá una diversidad de vectores que llevan diferentes insertos donantes. Aunque los extremos adhesivos se han unido para generar una población de moléculas químéricas, las cadenas principales de azúcar y fosfato aún no están unidas. Por ello, es necesario que las cadenas principales se sellen mediante la adición de la enzima DNA ligasa, que crea enlaces fosfodiéster en las uniones. Ciertas ligasas son, incluso, capaces de unir fragmentos de DNA con extremos romos.

Actividad 1. “Cortando el DNA con diferentes tijeras”

Adaptación de Kreuzer H. y Massey A. (2008).

InSTRUCCIONES: Recorta las tiras de secuencias de DNA que encontrarás en el **Anexo 5.2**, a lo largo de los bordes. Estas tiras representan moléculas de DNA de doble cadena. Cada cadena de letras representa la secuencia de bases unidas por enlaces fosfodiéster (horizontal) y las líneas verticales entre las pares de bases representan los puentes de hidrógeno entre las bases.

Utiliza la tabla 2 para realizar las siguientes actividades:

1. Simula la actividad de EcoRI. Observa a lo largo de la secuencia de DNA de la tira 1 hasta encontrar el sitio EcoRI. Haz cortes a través del enlace fosfodiéster cortando entre la G (guanina) y la primera A (adeninda) del sitio de restricción en ambas hebras.
2. Ahora, separa los enlaces de hidrógeno cortando a través de las líneas verticales. Separa los dos fragmentos de DNA. ¿Cómo son los extremos producidos por el corte de EcoRI? Escribe “EcoRI” en los extremos cortados. Guarda los fragmentos.
3. Repite el procedimiento con la tira 2, pero ahora simula la actividad de SmaI. Encuentra el sitio SmaI y corta a través del enlace fosfodiéster. ¿Hay puentes de hidrógeno entre los sitios de corte? ¿Cómo son los cortes producidos por esta enzima? Etiqueta los nuevos extremos “SmaI”. Guarda los fragmentos.
4. Simula la actividad de HindIII con la tira 3. ¿Cómo son los extremos? ¿Pegajosos o romos? Etiqueta los nuevos extremos “HindIII” y guarda los fragmentos.
5. Repita el procedimiento una vez más con la tira 4, simulando a EcoRI.

Una vez finalizada la actividad contesta las preguntas del cuestionario en el formato del **Anexo 5.2.1**.

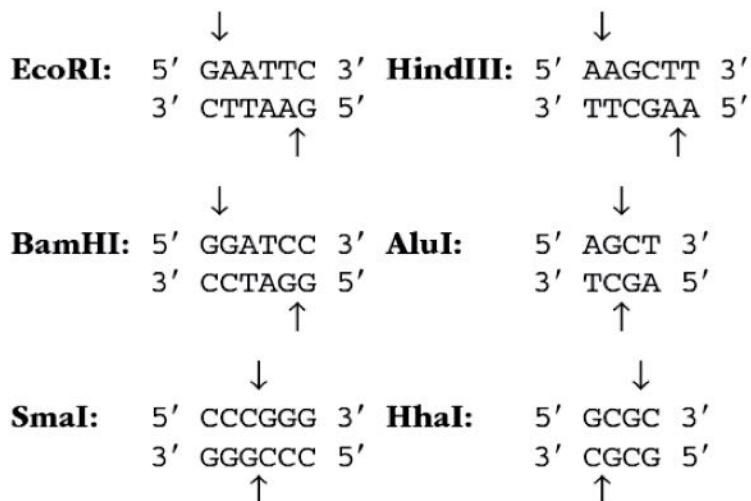


Tabla 2. Ejemplos de enzimas de restricción y sus secuencias de reconocimiento, las flechas indican los sitios de corte.

Imagen tomada de Molecular Biology and Biotechnology (teachers), Cap. 11.

Actividad 2. “Cortando DNA circular”

Adaptación de Kreuzer H. y Massey A. (2008).

Instrucciones: A partir de un mapa de un plásmido (circular) teórico, utiliza diferentes enzimas de restricción, realiza lo que se te solicita y contesta las preguntas del cuestionario en el formato que se encuentra en el **Anexo 5.3**.

Actividad 3. “Visualizando fragmentos de DNA”

Adaptación de Kreuzer H. y Massey A. (2008).

Para que la digestión de restricción sea significativa tienes que ver los diferentes fragmentos de DNA que se producen. En el laboratorio, los científicos separan los fragmentos de DNA un proceso llamado electroforesis en gel para que puedan observar los resultados de la actividad de las enzimas de restricción (además de otros procedimientos).

La electroforesis en gel aprovecha la química del DNA para separar los fragmentos, ya que los grupos fosfato en la estructura de DNA están cargados negativamente. Las moléculas de DNA son atraídas por cualquier cosa que tenga una carga positiva. En la electroforesis en gel, las moléculas de DNA se colocan en un campo eléctrico (entre dos polos, uno positivo y otro negativo) para que migren hacia el polo positivo.

El campo eléctrico hace que las moléculas de DNA se muevan, esto hace que se separen los diferentes fragmentos (de diferente longitud y peso molecular) y sean fáciles de observar en el gel de agarosa.

Todo el DNA migra a través del gel hacia el polo positivo, pero la estructura del gel de agarosa dificulta el movimiento de fragmentos grandes de DNA en comparación con los fragmentos de DNA más pequeños. Por lo tanto, en un mismo intervalo de tiempo, un pequeño fragmento de DNA puede migrar más rápido que uno grande. Haciendo una analogía, la electroforesis es similar a una carrera de DNA, donde los “corredores” (fragmentos) se separan a diferentes distancias como los corredores de una carrera real. Cuanto menor sea el tamaño del fragmento de la molécula de DNA, corre más rápido. Dos moléculas del mismo tamaño corren exactamente juntas.

Instrucciones: Recorta las tres imágenes de la molécula de DNA que se encuentran en el **Anexo 5.4**, realiza la actividad llevando a cabo las siguientes acciones.

1. Simula la actividad de la enzima de restricción EcoRI en la molécula de DNA que muestra el Sitio EcoRI, corta a través de la tira sobre las líneas verticales que representan los sitios de corte de EcoRI. Después de hacer los cortes, ahora tienes digerida la molécula de DNA con EcoRI.
2. Realiza la digestión de la segunda tira de DNA con BamHI. Coloca los fragmentos BamHI por separado, con respecto a las obtenidas de EcoRI.
3. Ahora realiza la digestión de la molécula de DNA restante (HindIII). Coloca estos fragmentos en un tercer montón.
4. En la imagen que representa la electroforesis, separa los fragmentos cortados por las enzimas EcoRI, HindIII y BamHI como si cargaras los tres conjuntos de fragmentos

en diferentes pozos separados, pero adyacentes. Organiza tus fragmentos de tal manera que al ser separados por la electroforesis en un gel de agarosa, éstos comiencen a correr. Comienza con los fragmentos EcoRI. Utiliza la escala de tamaño de pares de bases para ubicar hasta donde emigraría cada uno de los fragmentos durante la electroforesis. ¿Cómo corren los fragmentos? ¿Cuál corre más rápido?

5. Ahora separa los fragmentos obtenidos por la enzima HindIII y colócalos de forma adyacente a los fragmentos obtenidos por EcoRI. Asegúrate de ordenar los fragmentos correctamente por tamaño.
6. Repite el mismo procedimiento para los fragmentos de BamHI. Ahora tienes los tres conjuntos de fragmentos dispuestos frente a ti.
7. Utiliza la imagen que representa un gel de agarosa en el Anexo 4 para colocar tus resultados del corte con las enzimas de restricción.
8. Observa el contorno de los pozos en donde se cargan las muestras de los fragmentos de DNA, utilízalo como un patrón de tamaño de los fragmentos de papel. Dóblalos de tal manera que queden aproximadamente del tamaño del pozo. Utiliza pegamento para colocar por tamaño, cada uno de los fragmentos cortados por las diferentes enzimas en cada carril del gel de electroforesis.

Actividad experimental. Enzimas de restricción

En este experimento se elegirá digerir DNA plasmídico (TdTomato) con las enzimas de restricción EcoRI, BamHI y una mezcla de las dos enzimas. Se determinará el tamaño de los fragmentos resultantes observándolos en un gel de agarosa.

Objetivos

- Comprender la digestión de DNA, utilizando enzimas de restricción.
- Determinar el tamaño de los fragmentos de DNA producto de la digestión, a través de una electroforesis en gel de agarosa.



Seguridad en el laboratorio

Usa guantes mientras trabajas en el laboratorio.

Extrema precauciones cuando trabajes en el laboratorio -usarás equipo que puede ser peligroso si no se usa adecuadamente.

Usa guantes de protección cuando trabajes con reactivos calientes como la agarosa fundida.

NUNCA MANEJES PIPETAS
CON LA BOCA -USA SIEMPRE
AUXILIARES DE PIPETEO.

Siempre lávate *las manos antes trabajar en el laboratorio y al término de tus actividades.*

Materiales y equipo

Cada equipo debe tener los siguientes materiales:

Laboratorio	Reactivos	Material biológico
Microtubos Micropipetas Puntas para micropipetas Hielera pequeña Guantes Cámara de electroforesis horizontal (BlueGel)	Agua grado enzima Enzimas de restricción: • EcoRI diluida • BamHI diluida Buffer de Reacción 10X Buffer de carga 10X	Plásmido TdTomato Marcador de peso molecular

Procedimiento

1. Rotula cinco tubos Eppendorf de la siguiente manera: PM, 1, 2, 3 y 4.
2. Además de estos cinco tubos, tendrás un tubo con “Loading Buffer” y un tubo con colorante “Midori”.
 - El tubo “PM” será asignado previamente al marcador de peso molecular de DNA estándar, listo para la electroforesis, de tal forma que el tubo PM contendrá 1 μ l de Orange Loading Buffer y 5 μ l del marcador. Esta muestra será colocada en el primer pozo del gel de electroforesis.
3. Agrega las cantidades en orden de izquierda a derecha, según lo indica la tabla 3 (la enzima en último lugar) a los tubos de reacción que ha etiquetado. Utiliza puntas nuevas y estériles de micropipeta para cada transferencia de DNA y enzima.

Rótulo	Buffer de reacción	DNA plásmido	Agua	EcoRI	BamHI	Volumen final
1	1 μ l	2 μ l	7 μ l	-	-	10 μ l
2	1 μ l	2 μ l	6 μ l	1 μ l	-	10 μ l
3	1 μ l	2 μ l	5 μ l	-	2 μ l	10 μ l
4	1 μ l	2 μ l	4 μ l	1 μ l	2 μ l	10 μ l

Tabla 3. Cantidad de tubos y reactivos que irás colocando en cada uno de ellos. Inicia de izquierda a derecha, no olvides cambiar de punta cada vez que incluyas reactivos en los tubos eppendorf.

4. Tapa los tubos de reacción y golpea suavemente para mezclar. No debe haber una capa densa de solución enzimática en la parte inferior del tubo de reacción.
5. Centrifuga los tubos en una microcentrífuga para recoger el contenido del fondo del tubo.

6. Incuba los tubos en un baño seco a 37 °C durante 60 minutos.
7. Después de completar la incubación a 60 minutos, añadir 2 µl de Loading Buffer a los cinco tubos de reacción para detener las reacciones. Tape y mezcle con un vórtex.
8. Corre las muestras en una electroforesis en gel de agarosa.
9. Toma fotos del gel de agarosa para comparar o cotejar con las actividades de cierre.



Nota 1: Recuerda no contaminar-cruzar las enzimas y los stocks de DNA, para evitar la contaminación no uses la misma punta de la pipeta, debes cambiar la punta.

Nota 2: Después de la adición de la solución loading buffer, las muestras están listas para la electroforesis. Sin embargo, las muestras pueden ser almacenadas en el refrigerador para realizar la electroforesis en otro momento.

Nota 3: Revisa el formato de la actividad experimental de electroforesis para realizar el siguiente paso.

Actividad de cierre

Instrucción: A partir de la información revisada de las actividades lúdicas y de la actividad experimental realiza los siguientes ejercicios y contesta en los formatos del **Anexo 5.5**.

Cuestionario RA-P-RP

Instrucción: Retoma el cuestionario (RA-P-RP) del Anexo 1 y contesta las preguntas de la derecha.

Literatura consultada

Roberts, R. J. (2005). How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(17), 5905–5908. Disponible en: <http://doi.org/10.1073/pnas.0500923102>

Brownlee, C. (2005). Danna and Nathans: Restriction enzymes and the boon to modern molecular biology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(17), 5909. Disponible en: <http://doi.org/10.1073/pnas.0502760102>

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin R. y Gelbart W. (2000). An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition. New York: W. H. Freeman; Making recombinant DNA. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21881/>

Kreuzer H. & Massey A., (2008). Molecular Biology and Biotechnology. A guide for teachers. 3a edición. ASM Press, Washington, DC. USA.

Luque, J; Herráez, A. (2002). Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética, conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Primera edición. Elsevier Science. Madrid, España.

Anexo 5.1

Apertura Cuestionario RA-P-RP

Instrucción: Contesta las preguntas, utiliza sólo la columna izquierda, RA (respuesta anterior).

RA (Respuesta anterior)	P (Pregunta)	RP (Respuesta posterior)
	¿Qué son las enzimas de restricción?	
	¿Qué función desempeñan las enzimas de restricción?	
	¿Cuál es la utilidad de las enzimas de restricción?	

Anexo 5.2

Actividad 1. “Cortando el DNA con diferentes tijeras”

1

1

5' -TAGACTGAATTCAAGTCA-3'
||| ||| ||| ||| ||| |||
3' -ATCTGACTTAAGTTCAAGT-5'

2

2

5' -ATACGCCCGGGTTCTAAA-3'
||| ||| ||| ||| ||| |||
3' -TATGCCGGGCCAAGATT-5'

3

3

5' -CAGGATCGAAGCTTATGC-3'
||| ||| ||| ||| ||| |||
3' -GTCCTAGCTTCGAATACG-5'

4

4

5' -AATAGAATTCCGATCCGA-3'
||| ||| ||| ||| ||| |||
3' -TTATCTTAAGGCTAGGCT-5'

Anexo 5.2.1

Cuestionario

Instrucciones: Después de haber realizado la actividad lúdica con las enzimas de restricción, contesta lo siguiente:

1. Compara los fragmentos monocatenarios generados por la enzima EcoRI de la tira 4, con los fragmentos monocatenarios generados por la HindIII de la tira 3. ¿Las colas monocatenarias de HindIII y EcoRI son complementarias?
2. Compara las colas monocatenarias de los siguientes fragmentos de DNA: 1 con 3 (EcoRI y HindIII) y 1 con 4 (EcoRI y EcoRI). ¿Son complementarios?
3. Imagina que cortas un fragmento de DNA desconocido con la enzima EcoRI. ¿Crees que las colas monocatenarias de estos fragmentos serían complementarias a las colas monocatenarias de los fragmentos de las tiras 1 y 4?
4. Hay una enzima llamada DNA ligasa que reforma enlaces fosfodiéster entre nucleótidos. Para que la DNA ligasa funcione, dos nucleótidos deben acercarse en la orientación adecuada para un enlace (el extremo 5' de uno debe estar cercano al extremo 3' del otro). ¿Qué es más fácil, que la DNA ligasa reconecte dos fragmentos cortados por EcoRI o un fragmento cortado por EcoRI y uno cortado por HindIII? Explica por qué.

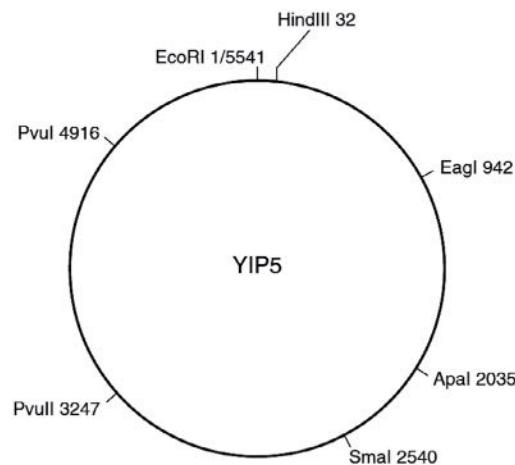
Anexo 5.3

Actividad 2. “Cortando DNA circular”

Adaptación de Kreuzer H. & Massey A. (2008).

Instrucciones: Observa el siguiente mapa del plásmido pYIP5, que contiene 5,541 bp. El número que está después del nombre de la enzima de restricción indica en qué par de base corta la enzima. Por ejemplo, EcoRI corta en el 1pb y/o en el 5541pb. Si este plásmido es cortado por EcoRI, se obtendrá un fragmento lineal de 5541pb de largo. Contesta lo siguiente, respecto al problema planteado.

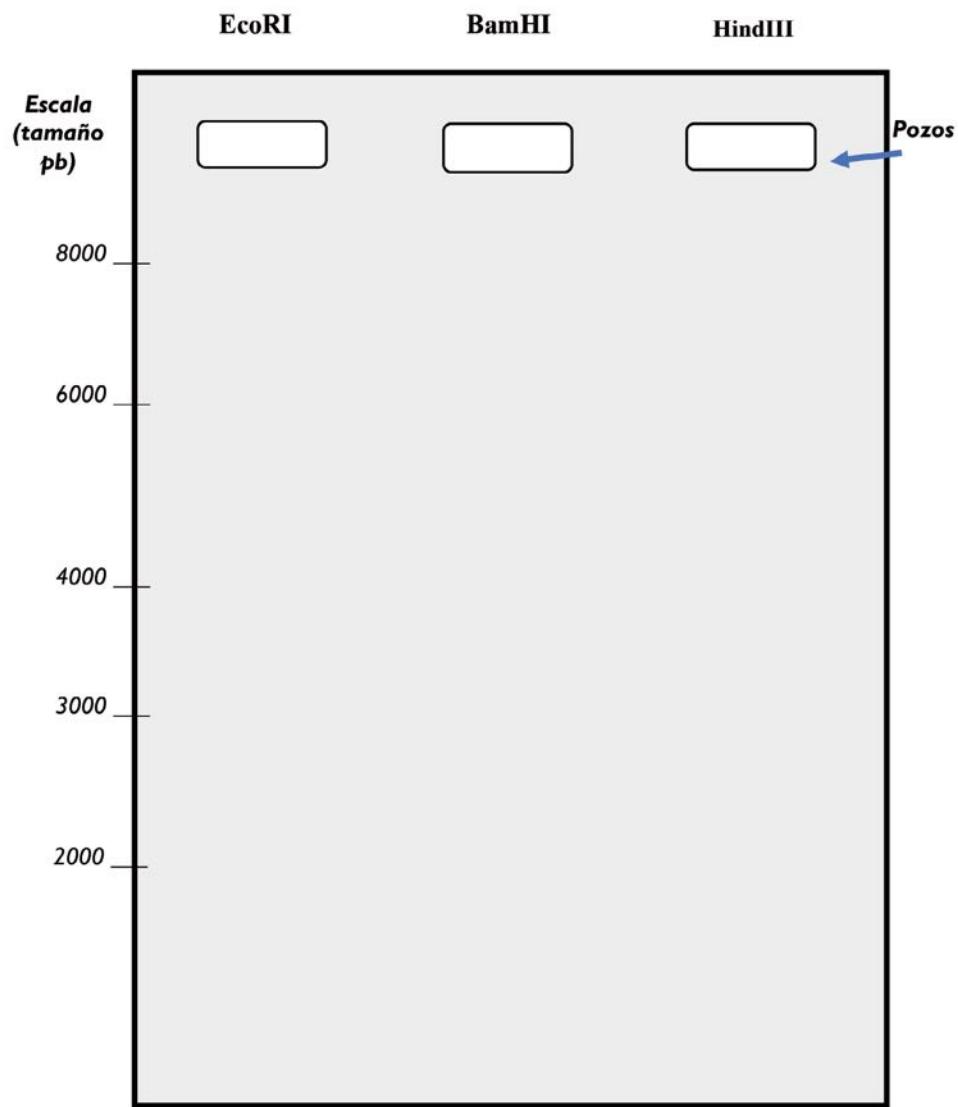
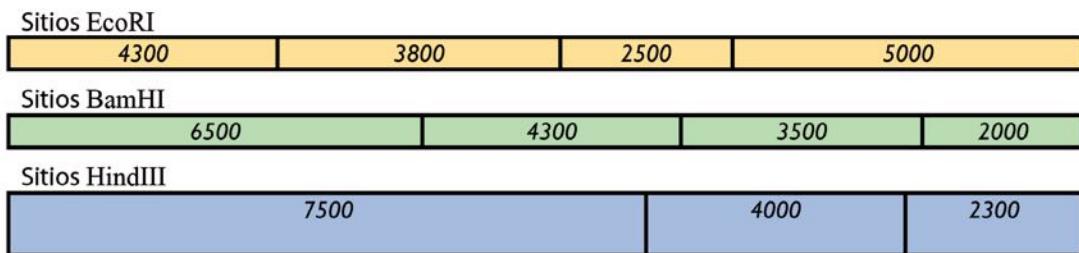
1. ¿Cuáles serían los productos de una digestión con las dos enzimas EcoRI y EagI?



2. ¿Cuáles serían los productos de una digestión con las dos enzimas HindIII y ApaI?
3. Cuáles serían los productos de una digestión con las tres enzimas HindIII, ApaI y PvuI?
4. Si tomas los productos de digestión de la pregunta 1 y los digerimos con PvuII, ¿cuáles serían los productos?

Anexo 5.4

Actividad 3. “Visualizando fragmentos de DNA”



Anexo 5.5

Actividad de cierre

InSTRUCCIÓN: Realiza los siguientes ejercicios:

Actividad adaptada de Molecular Biology CyberLab:

<http://www.life.illinois.edu/molbio/geldigest/assign1.html#one>

- Desafortunadamente, después de realizar la digestión por restricción y la electroforesis en gel de agarosa de un plásmido que se purificó usando 3 enzimas de restricción diferentes; olvidaste etiquetar los tubos y no registraste los pasos que se realizaron; lo que recuerdas es que los marcadores moleculares están en el carril 5 y tu control sin cortar está en el carril 1, y que cargaste aproximadamente la misma cantidad de DNA total en los carriles de muestra (1-4). De acuerdo con los resultados del gel de agarosa siguiente, ¿que puedes concluir?



Discute las respuestas a las siguientes preguntas, respecto de la imagen del gel problema:

- ¿Aproximadamente qué tan grande es el plásmido original?
- ¿Cuántas veces la enzima usada en el carril 2 digirió el plásmido? ¿Los resultados parecen razonables?
- ¿Cuáles son algunas explicaciones probables para el difuminado detectado en el carril 3?
- ¿Cuántas veces la enzima usada en el carril 4 digirió el plásmido? ¿Los datos parecen razonables?

2. Predice el número de fragmentos de DNA y sus tamaños, si el DNA del fago Lambda se incuba y se escinde simultáneamente con BamHI y EcoRI (observa la Figura 11). Escribe dentro del cuadro tus resultados.

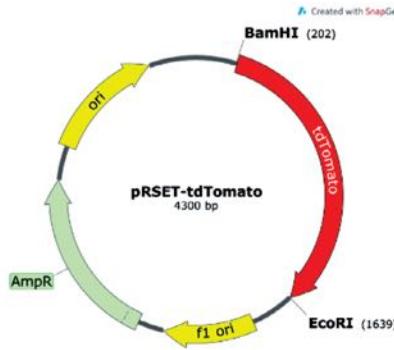


Figura 11. Plásmido pRSET-tdTomato
(Addgene #91767)
<http://www.addgene.org/91767/>

3. Analiza el gel de electroforesis obtenido en el experimento, compara con la imagen del marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb), describe los resultados dentro del cuadro.

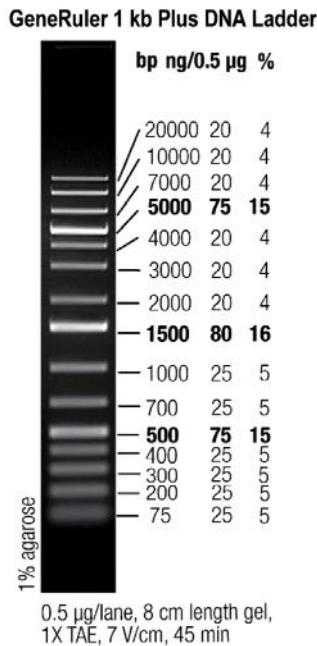


Figura 12 . Marcador de peso molecular. Pequeños fragmentos de DNA estándar difundidos en un gel de electroforesis, se identifican por el tamaño kb de la molécula (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM1331#/SM1331DNA Ladder>.)

¿Quién es el culpable?



Enzimas de restricción

Elaboraron:
Hernández Carbajal Luz Angélica
Luna Román Celso Miguel

Colaboraron:
Bautista Acevedo Marco Antonio
Centeno Cruz Federico
Bernal Enríquez Oscar
Mejía García Martha Elvira
Ramírez Aguilar Eva Cristina
Serrano Reyes Gabriela
Martínez Ortiz Leticia

BIOLOGÍA I (PEA, 2016). Tercera unidad

¿Cómo se transmiten los caracteres hereditarios y se modifica la información genética?

Propósito

Al finalizar la unidad, el alumno identificará los mecanismos de transmisión y modificación de la información genética, como responsables de la continuidad y cambio en los sistemas biológicos, para que comprenda su importancia biológica y evolutiva.

Tema 2. Herencia

Subtema: Manipulación del DNA

Aprendizajes

Declarativos	<ul style="list-style-type: none">Reconoce las implicaciones biológicas y éticas de la manipulación del material genético.Reconoce que el DNA presenta sitios de restricción.Comprende que las enzimas de restricción son útiles en la producción de patrones de corte de secuencias de DNA.
Procedimentales	<ul style="list-style-type: none">Aplica habilidades para comunicar de forma oral y escrita la información derivada de las actividades realizadas en forma individual y en equipo.Realiza actividades lúdicas con enzimas de restricción.
Actitudinales	<ul style="list-style-type: none">Valora la importancia de la manipulación genética en el beneficio de la sociedad.

Actividades a realizar:

Apertura

- Actividad 1. Problema: ¿Quién es el culpable?

Desarrollo

- Actividad 2. “Del peritaje al culpable”

Cierre

- Cuestionario

Apertura

Actividad 1. Problema: ¿Quién es el culpable?

Instrucciones: Lee con atención y de manera grupal la siguiente situación problemática, analiza en grupo el planteamiento a resolver.



El cadáver del saxofonista *Many Toledo*, fue encontrado en su departamento; se le vio a última hora de la noche saliendo del Tuna Jazz Club , de la calle Motolinia en la Ciudad de México; se dirigía a su departamento a sólo tres cuadras del club. Many era un músico talentoso, pero, tenía muchas deudas y comenzó a vender drogas para ganar dinero extra. A menudo llevaba grandes sumas de dinero y drogas a donde era invitado a tocar. Cuando Many fue hallado en su departamento, no se encontraron drogas ni dinero.

La policía ministerial de la Ciudad de México tiene tres líneas de investigación que corresponden con tres sospechosos, uno de ellos es su proveedor de drogas, un gringo residente en la Ciudad de México, Dylan Johns (sospechoso 1), quien es bastante paranoico y seguramente pudo haber pensado que Many le estaba robando.

La segunda línea de investigación apunta Salomón García (sospechoso 2), un ladrón con una larga historia criminal, quien fue visto por varios testigos que regresaban de una fiesta, salir huyendo del edificio en donde vivía Many, aproximadamente a la hora en la que ocurrió el asesinato.



El hombre fue atrapado por la policía a varias cuadras de distancia. Se especula que Many pudo haber atrapado a Salomón dentro de su departamento en el momento en el que intentaba robar y, al verse acorralado, pudo haber matado a Many. Salomón llevaba más de \$10,000 cuando la policía lo detuvo.

La otra línea de investigación tiene que ver Nancy (sospechoso 3) su asistente, quien era amante de Many desde hacía un par de meses y que desconocía hasta hacía tres días que Many mantenía una relación amorosa desde hace más de dos años con una cantante de jazz, que también trabajaba en el Tune Jazz Club.

La policía ministerial tomó muestras de las evidencias encontradas en la escena del crimen, se aisló el DNA de las muestras (células epiteliales de las uñas de Many y algunas manchas de sangre en la camisa). Además, se tomaron muestras de DNA de los tres sospechosos y de la víctima.



Actividad 2 “Del peritaje al culpable”

Instrucciones: En el **Anexo 6.1** encontrarás las evidencias de la escena del crimen. Esta actividad es grupal, cada uno de los equipos colectará una evidencia (manchas de sangre en la camiseta de la víctima, células en las uñas de la víctima, sospechoso 1, sospechoso 2, sospechoso 3).

1. Colecta la evidencia de la escena del crimen.
2. Utiliza las secuencias de DNA provenientes de la escena del crimen, de los sospechosos y la víctima.
3. Utiliza las secuencias que se te entregaron, recórtalas y une los fragmentos en orden ascendente de pb, utiliza tijeras y pegamento.
4. Corta la secuencia de DNA (evidencia) con la enzima de restricción *HaeIII* (*Hae-mophilus aegyptius*).
5. Obtén los fragmentos y determina el número de pares de bases de cada uno de ellos (cuenta los pares de bases, pb).
6. Dibujen de manera grupal un gel de agarosa en el pizarrón, incorporen el marcador de PM, en función del tamaño de los fragmentos obtenidos.
7. Dobla tus secuencias al tamaño del pozo dibujado en el pizarrón, anota el número de pares de bases que contiene cada fragmento (que sea visible).
8. Coloca tus secuencias en el gel de agarosa (pizarrón), según corresponda al tamaño del fragmento en función del marcador de peso molecular.
9. Realiza un dictamen pericial para determinar, según los resultados, quién es el culpable.

Actividad de cierre

Instrucción: A partir de la actividad lúdica-experimental contesta las siguientes preguntas, utiliza el formato del **Anexo 6.2**.

1. ¿Por qué es necesario amplificar con PCR, las seis evidencias?
2. Pega una fotografía del gel del pizarrón en el recuadro y discute cómo se deduce quién es el culpable de esta escena del crimen.

Literatura consultada

Roberts, R. J. (2005). *How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(17), 5905–5908. <http://doi.org/10.1073/pnas.0500923102>

Brownlee, C. (2005). *Danna and Nathans: Restriction enzymes and the boon to modern molecular biology*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(17), 5909. <http://doi.org/10.1073/pnas.0502760102>

Griffiths, A. J. F., Miller J. H., Suzuki, D. T., et al. (2000). *An Introduction to Genetic Analysis*. 7th edition. New York: W. H. Freeman; Making recombinant DNA. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21881/>

Kreuzer, H. & Massey A., (2008). *Molecular Biology and Biotechnology. A guide for teachers*. 3a edición AMS Press U.S.

Anexo 6.1

SOSPECHOSO 1

1pb 5' A G C C G T A A T G G G C C C G G G A C A G A T A C A G A T A -
 - - - - -
 3' T C G G C A T T A C C C G G C C T A T G T C T A T

32pb G G T C G G G A T T G G C C G G T A G C C G T A A T C A C C
 - - - - -
 C C A G C C C T A A C C G G C A T C G G C A T T A G T G G

63pb G G G C C C C C C G T A G C C G G T A A T T C A C C C G G G A T
 - - - - -
 C C C G G G G C A T C G G C A T T A A G T G G G C C T A

94pb A G C C G T A A T T G G C C T A A T A C A G A T A C A G A T A -
 - - - - -
 T C G G C A T T A A C C G G A T T A T G T C T A T

125pb G G T C G G G A T T G G G C C C G G T A G C C G T A C A C A C C
 - - - - -
 C C A G C C C T A A C C C G G C A T C G G C A T T G T G T G G

156pb T A C A C A C T A A T A G C C G T A A T T G G C C G G G A T
 - - - - -
 A T G T G T G A T T C G G C A T T A A C C G G C C T A

187pb C G T A G G G G C C C T T C T A A T T G A T T G G G C C G A
 - - - - -
 G C A T C C C C G G G A A G A T T A A A C T A A C C C G G C T

218pb	G G T C G G G A T T G G C C G T A G C C C G T A C A C A C C - C C A G C C C T A A C C G G C A T C G G C A T G T G T G G
249pb	T G G C C G G A T G G G C C C C C G T A G C T A A T C G T A - A C C G G C C T A C C C G G G C A T C G A T T A G C A T
280pb	C G T A G C C C G T A A T T A T T G G C T G G C C G C G T A C - G C A T C G G C A T T A T A A C C G A C C G G C G G C A T G

5' G G C C 3'
3' C C G G 5'

SOSPECHOSO 1

Haell

- *Haemophilus*

- *Haemophilus*

- *Haemophilus*

- Extremos Parejos

SOSPECHOSO 2	
1pb	5' A G C C G T A A T G G G C C C G G A C A G A T A C A G A T A - 3' T C G G C A T T A C C G G C C T G T C T A T G T C T A T
32pb	GGT C G G G A T T G G C C G G C G T A G C C G T A A T C A C C - C C A G C C C T A A C C G G C A T C G G C A T T A G T G G
63pb	T A C A C A C C C G T A G C C G T A A T T G G G C C G G A T - A T G T G T G G C A T C G G C A T T A C C C G G C C T A
94pb	A G C C G T A A T T G G C C T A A T A C A G A T A C A G A T A - T C G G C A T T A C C G G A T T A T G T C T A T G T C T A T
125pb	GGT C G G G A T T G T G C C G T A G C C G T A C A C A C C - C C A G C C C T A A C A A C G G C A T C G G C A T G T G T G G
156pb	T A C A C A C T A A T A G C C G T A A T T G G C C G G G A T - A T G T G T G A T T C G G C A T T A C C C G G C C T A
187pb	C G T A G C C G T A A T T C T A A T T G G G C C G C G A - G C A T C G G C A T T A A G A T T A A C C C G G G C G G C T

218pb GGT CGGGATT GGCCCGCGTAGCCACACC
 CCA GCTAACCGGCGATCGGTGG

249pb TGGCCGGT CGCGATCCCGTAACTCGTA
 ACCGGCCAGCGCTAGGGCATCGATTAGCATT

280pb CGTAGCCGTAATTCTAATTGGCCCGTAC
 GCATCGGCATTAGATTAAACGGGGCATG

SOSPECHOSO 2

†

5' GGC 3'
 CCC 5'

Haell
 - *Haemophilus*
 - *aequiptilis*
 - Extremos Parejos

SOSPECHOSO 3	
1pb	5' AGCCGTATTGGGGCCACAGATA - - - - - 3' TCGGCATTAACTGGTGTCTAT
32pb	GGTCGGGATTGGCCGGTAGCCCGTA - - - - - CCAGCCCTAACCGGCATCGGCATTAGTGG
63pb	TACACACCCGTAGCCGTATTGGGCCGGAT - - - - - ATGTGTGGCATCGGCATTAACTGGCCTA
94pb	AGCCGTATTGGCCCTAATACAGATA - - - - - TCGGCATTAACCGGATTATGTCTAT
125pb	GGTCGGGATTGGCCCGTAGCCCGTA - - - - - CCAGCCCTAACCGGCATCGGCATTGTGTGG
156pb	TACACACTAATAGCCGTATTGGGGGAT - - - - - ATGTGTGATTATCGGCATTAACTGGCCTA
187pb	CGTAGCCGTATTCTAAATTGGCCCGGA - - - - - GCATCGGCATTAAAGATTAAACCCGGGCT

218pb GGT CGGGATTGGCCGGTAGCCCCGTACACAC
 - - - - - CAGCCCTAACCGGCATCGGCGATCGTGTGG

249pb TTGCCGGCCCGATCCCCTAGCTAACTCGTA
 - - - - - AACGGCCCGGGCTAGGGCATCGATTAGGCAT

280pb CGTAGCCGTAATTCTAATTGGCCCGTAC
 - - - - - GCATCGGCATTAGATTAAACCGGGCATG

SOSPECHOSO 3

5' G G C C 3'
 3' C C G G 5'

Haellii
 - Haemophilus
aegyptius
 - Extremos Parejos

CÉLULAS EN LAS UÑAS DE LA VÍCTIMA

1pb	5' A G C C G T A A T T G G G G C C C A C A G A T A 3' T C G G C A T T A A C C C C G G G T G T C T A T G T C T A T
32pb	GGT CGGGATTGGCCGGTAGCCCGTAACTACAGATA CCAGCCCTAACCGGCATCGGCATTAGTGG
63pb	TACACACCCGTAGCCCGTAAATTGGGCCGGAT ATGTTGGCATTGGCATTAAACC GGCCCTA
94pb	AGCCGTAATTGGCCTAACTACAGATA TCGGCATTAACCGGATTATGTCTATTGTCTAT
125pb	GGT CGGGATTGGGCCCGTAGCCCGTACACAC CCAGCCCTAACCGGCATCGGCATTGTGG
156pb	TACACACTAA TAGCCCGTAAATTGGCCGGGAT ATGTTGGCATTGGCATTAAACC GGCCCTA
187pb	CGTAGCCCGTAAATTCTAATTGGCCCCCGA GCATCGGCATTAAAGATTAAACCCGGGGCT

			Células/Uñas
			3'
	G G	C C	<i>Haemophilus</i>
5'			- <i>aegyptius</i>
			- Extremos Parejos
			5'
	C C	G G	
5'			

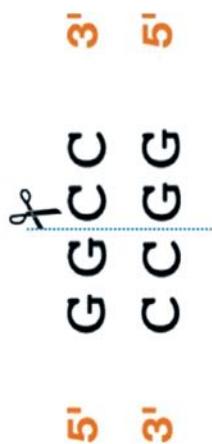
- *Haemophilus aegyptius*
- Extremos Parejos

MANCHAS DE SANGRE EN CAMISETA DE LA VICTIMA

1pb	5' A G C C C G T A A T T G G G G C C C A C A G A T A - 3' T C G G C A T T A A C C C C G G G T C T A T G T C T A T
32pb	GGT C G G G A T T G G C C G G T A G C C G T A A T C A C C - C C A G C C C T A A C C G G C A T T C G G C A T T A G T G G
63pb	T A C A C A C C C G T A G C C G T A A T T G G G C C G G A T - A T G T G T G G C A T C G G C A T T A A C C G G G C C T A
94pb	A G C C G T A A T T G G C C T A A T A C A G A T A C A G A T A - T C G G C A T T A A C C G G A T T A T G T C T A T G T C T A T
125pb	GGT C G G G A T T G G G C C C G T A G C C G T A C A C A C C - C C A G C C C T A A C C G G C A T T C G G C A T T G T G T G G
156pb	T A C A C A C T A A T A G C C G T A A T T G G C C G G G A T - A T G T G T G A T T A T C G G C A T T A A C C G G C C C T A
187pb	C G T A G C C G T A A T T C T A A T T G G G C C G C G A - G C A T C G G C A T T A A G A T T A A C C C G G G C T

218pb	G G T C G G G A T T G G C C G G T A G C C C - - - - C C A G C C C C T A A C C G G C A T C G G C A T G T G G
249pb	T T G C C G G G C C G A T C C C G T A G C T A A T C G T A - - - - A A C G G C C C C G G G C T A G G G C A T C G A T T A G C A T
280pb	C G T A G C C G T A A T T C T A A T T G G C C G T A C - - - - G C A T C G G C A T T A A G A T T A A C C G G C A T G

Manchas
de sangre en
la camiseta de
la víctima



 5'' G G C C 3'
 3'' C C G G 5'

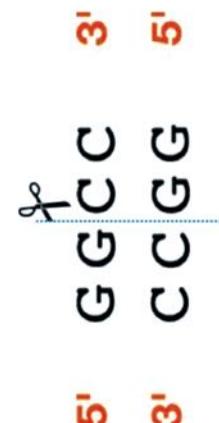
Haell
 - *Haemophilus*
 - *aegyptius*
 - Extremos Parejos

		VÍCTIMA
1pb	5' A G C C G T A A T T G G T T C C C C G G G A T A C A G A T A 3' T C G G C A T T A A C C A A G G G G C C C T A T G T C T A T	
32pb	GGT C G G G A T T G G C C G G T A G C C C G T A A T C A C C C C A G C C T A A C C G G C A T C G G C A T T A G T G G	
63pb	T A C A C A C C C G T A G C C G G T A C C C G G G T T C G G A T A T G T G T G G C A T C G G C A T G G G C C A A G C C T A	
94pb	A G C C G T A A T T G G C C T A A T A C A G A T A C A G A T A T C G G C A T T A A C C G G A T T A T G T C T A T G T C T A T	
125pb	GGT C G G G C C C G G G A C A G T A G C C C G T A C A C A C C C C A G C C C C C T G T C A T C G G C A T T G T G T G G	
156pb	T A C A C A C T A A T A G C C G T A A T T G G C C G G G A T A T G T G T G A T T C G G C A T T A C C G G C C C C T A	
187pb	C G T A G C C G T A A T T C T A A T T G G C C C G G A G C A T C G G C A T T A A G A T T A A C C C G G G G C T	

218pb GGT CGGGATTGGCCCGCGTAGCCACACC
 CCA GCTAACCGGCGCATCGGCATGTGGG

249pb TGGCCGGTTCCCGATCCCCGTAGCTAAATCGTA
 ACCGGCCAAAGGGCTAGGGCATCGATTAGCATT

280pb CGT AGCCGTAATTCTAAATTGGCCCGCTAC
 GCAT CGGCATTAGATTAAACGGGCATG



Sangre de
la víctima

5'	G G C C	3'	<i>Haemophilus</i>
3'	C C G G	5'	- <i>Haemophilus</i> - <i>aegyptius</i> - Extremos Parejos

Anexo 6.2

Actividad de cierre

Instrucción: A partir de la actividad lúdica-experimental contesta lo siguiente :

1. ¿Por qué es necesario amplificar con PCR, las seis muestras (evidencias)?

2. Pega una fotografía del gel que construyeron en el pizarrón dentro del recuadro y discute cómo se deduce quién es el culpable de esta escena del crimen.

Foto



¿Prohibido manipular?



Bioética en la manipulación del DNA

Elaboraron:

*Bernal Enríquez Oscar
Mejía García Martha Elvira*

Colaboraron:

*Bautista Acevedo Marco Antonio
Centeno Cruz Federico
Hernández Carbajal Luz Angélica
Luna Román Celso Miguel
Martínez Ortiz Leticia
Ramírez Aguilar Eva Cristina
Serrano Reyes Gabriela*

BIOLOGÍA I (PEA, 2016). Tercera Unidad

¿Cómo se transmiten los caracteres hereditarios y se modifica la información genética?

Propósito

Al finalizar la unidad, el alumno identificará los mecanismos de transmisión y modificación de la información genética, como responsables de la continuidad y cambio en los sistemas biológicos, para que comprenda su importancia biológica y evolutiva.

Tema 2. Herencia

Subtema: Manipulación del DNA

Aprendizajes

Declarativo	<ul style="list-style-type: none">Reconoce las implicaciones biológicas y éticas de la manipulación del material genético.
Procedimentales	<ul style="list-style-type: none">Aplica habilidades para comunicar de forma oral y escrita la información derivada de las actividades realizadas en forma individual y en equipo.
Actitudinales	<ul style="list-style-type: none">Aplica actitudes y valores que contribuyan a la comprensión y valoración de la manipulación genética.

Actividades a realizar:

Apertura

- Cuestionario diagnóstico.

Desarrollo

- Lectura. “La bioética y el Proyecto Genoma Humano”.
- Actividad 1. Organizador gráfico.
- Lectura. “Cuestiones éticas de la ingeniería genética”.
- Actividad 2. Reflexión y cuestionario.
- Lectura. “Entrevista a Matthew Liao”.
- Actividad 3. Reflexión y cuestionario.

Cierre

- Estudio de caso. “El paradigma genético: medicina predictiva”.

Definición de bioética

La bioética es el estudio sistemático de la conducta humana en los campos de las ciencias biológicas y de la atención de la salud, en la medida en que esta conducta se analiza a la luz de los principios y valores morales. Esta disciplina intenta dar una respuesta adecuada a la complejidad de la moral biológica, así como en la atención sanitaria y en las políticas de salud de ahí que la bioética se preocupa por las cuestiones morales involucradas en la comprensión humana de la vida. Es importante que no se considere como un protocolo que dice cuál de dos actitudes es correcta, sino que aporta elementos de reflexión que ayudan a analizar la situación concreta para que se llegue a la decisión más acertada, ya que no determina qué es el bien, sino que anima a las personas inmersas en una situación de conflicto a que lleguen a acuerdos a través del diálogo y el respeto.

Apertura

Cuestionario diagnóstico

Instrucción: Contesta las preguntas en equipo y comenta tus respuesta de manera dirigida por el profesor en plenaria.

1. ¿Qué entiendes por ética?
2. ¿Qué es bioética?
3. Define biotecnología.
4. ¿Qué utilidad tiene la bioética dentro de la biotecnología?

Desarrollo

Lectura.

“La bioética y el Proyecto Genoma Humano”

Modificado de:

Miravete N. N. G. y Suárez y López G.L. (2005).

Ciencias 79, julio- septiembre, 66-73.

Revista de Cultura Científica.

FACULTAD DE CIENCIAS.

UNAM.

“Tu meta no es prever el futuro, sino hacerlo posible.”

Antoine de Saint Exupéry

La bioética... ¿rendición o solución?

La bioética se origina a partir de los avances científicos y tecnológicos de mediados del siglo XX, caracterizados por sus fuertes connotaciones en los ámbitos ético, social y jurídico. Entre ellos, se cuentan los trasplantes de órganos, los diagnósticos prenatales, la muerte cerebral, la relación médico-paciente y otras más. En función de lo anterior, la bioética fue perfilándose como el espacio académico cuyo primer objetivo era sustentar la responsabilidad de los científicos, frente a los descubrimientos e invenciones de la ciencia y la tecnología, especialmente tratándose de aspectos directa o indirectamente relacionados con la vida humana.

La paternidad de esta nueva disciplina le corresponde a Van Ransselaer Potter, desde la construcción del neologismo elaborado del latín bios (vida) y ethos (valores), hasta el propósito de contribuir al futuro de la especie humana. En dos artículos y un libro, Potter expone su idea de la bioética. En el primer artículo, “Bioethics, the science of survival”, de 1970, acuñó el término que apareció por primera vez, un año más tarde; en el segundo “Bioethics” y en su libro Bioethics, Bridge to the Future, describe los objetivos planteados para esta disciplina en términos de una fructífera simbiosis de dos culturas, cuya comunicación no es sencilla, la de las ciencias naturales y la de las humanidades.

Aunque es justo el reconocimiento para Potter, André Hellegers, del Kennedy Institute, es quien le proporciona a la bioética una definición más precisa al caracterizarla como un “diálogo entre distintas disciplinas para configurar un futuro plenamente humano”, y los interlocutores ideales de este diálogo son, según él, los humanistas y los moralistas.

Donde la bioética generó grandes expectativas, por ejemplo, son los casos de organismos transgénicos, como el microrganismo capaz de digerir petróleo en 1980 o el ratón Apo E diseñado para estudios de ateroesclerosis y expresamente para el estudio del cáncer en 1988. En la misma década, se patentaron genes relacionados con algún problema o enfermedad genética, principalmente relativos a su diagnóstico, como los genes asociados a la neurofibromatosis tipo I y los implicados en la fibrosis quística.

En torno a la cuestión de patentar los genes, se presentan las discusiones más fuertes respecto al Proyecto Genoma Humano. Al grado que desde su inicio los científicos sugirieron algunas directrices sobre la propiedad intelectual del genoma humano. El mismo Venter (1998) planteó la necesidad de publicar la secuencia completa del genoma humano con el fin de evitar que una empresa privada se atribuyera su propiedad. Para fundamentar la propuesta, partía de la convención de que una patente se otorga si cumplía los siguientes requisitos: que el producto sea nuevo o novedoso, inventivo (que no resulte obvio ni para

el especialista en el tema), y útil (que se relacione con alguna utilidad industrial); Venter y otros de sus colegas sosténían que, al ser publicado, no se cumpliría el requisito de novedoso.

Otro lado del debate discurre sobre los conceptos de invento o descubrimiento; concretamente los genes del genoma humano se encuentran allí desde hace una gran cantidad de tiempo y se transmiten de generación en generación. Sin embargo, la ambigüedad con que en ocasiones se maneja el concepto de gen resulta en diferentes interpretaciones para patentarlos. Bajo este espectro puede considerarse la pregunta de si un gen se descubre o se inventa. En países, como los Estados Unidos, no se establece una clara distinción, lo que permite una gran flexibilidad al proceso de patentar.

En primera instancia, para patentar la utilidad sería un criterio y estaría referida a los genes cuya aplicación industrial no tiene discusión, como los que producen insulina u otra proteína terapéutica o, en el caso de la biotecnología vegetal, los que mejoran la producción agrícola; un segundo caso, serían los que están relacionados con procesos biológicos, como los neurotransmisores; finalmente, encontramos los que constituyen una herramienta indispensable para realizar el diagnóstico de determinada enfermedad. Aquí hay que considerar el papel que juega la mutación en la posibilidad de ser patentado, por ejemplo, cuando la mutación de un gen es la causante de la enfermedad y permite detectarla.

Asimismo, está el caso de la patente sobre pruebas diagnósticas otorgadas a un laboratorio que encarece tanto el producto que resulta inaccesible para muchos individuos necesitados, como la prueba para detectar el Alzheimer. Por otra parte, cabe recordar que a pesar de la recomendación de la UNESCO en 1997, según la cual el genoma humano en su estado natural no debe ser comercializado, las prácticas para patentarlo la contradicen y ahora se debate sobre el significado del estado natural de un gen.

Por su parte, la Organización Internacional del Genoma Humano, fundada en 1988, propuso repartir los beneficios obtenidos para invertir en investigación o bien, en la infraestructura que ésta requiere. Aunado a esto, la comercialización de la información obtenida del genoma humano resulta evidente si consideramos la proliferación de empresas de seguros relacionadas con los genes y la salud. En respuesta se ha creado una comisión para regular las relaciones entre la genética y las compañías aseguradoras, como la Genetics and Insurance Committee en Gran Bretaña. La patente depositada en Estados Unidos de un gen humano (que pertenece a un individuo radicado en Nueva Guinea) avivó la discusión y conduce a reconsiderar las implicaciones y riesgos que conlleva trabajar con muestras de material vivo. Al parecer, el problema de patentar genes, secuencias, métodos y otros elementos genéticos se vuelve un proceso irreversible ante la lentitud y la problemática alrededor de la legislación correspondiente. Por ejemplo, con la tecnología de DNA recombinante, la ingeniería genética se perfila como el rey Midas del presente siglo, ya que con la ayuda de instituciones y empresas dedicadas al estudio y comercialización del genoma humano se pretende convertir al material genético en oro.

Por último, los rezagos y dificultades en la legislación no significa olvidar que, tratándose del genoma humano, debe constituir un principio inalienable el que ningún individuo puede ser el medio o la herramienta de nadie más y tampoco se le puede privar de sus derechos fundamentales. Es necesaria una redefinición del concepto de vida humana emanado de la bioética, con la participación de personas morales, instituciones y comités de bioética, para dejar claramente asentado que el ser humano es el fin en sí mismo y no el medio para otros fines que vayan en detrimento de su autonomía.

Actividad 1. Organizador gráfico

Instrucciones: Con ayuda del artículo anterior realiza una representación gráfica (mapa mental, conceptual, diagrama) que contenga las fechas, eventos, conflictos, organizaciones implicadas, consideraciones importantes sobre la bioética y el proyecto genoma humano, además, subraya los conceptos que no son comprensibles y elabora un glosario.

Lectura. “Cuestiones éticas de la ingeniería genética”

“Lo que puede empezar como un control biológico de las enfermedades, podría convertirse en un intento de crear superhombres...”
Amitai Etzioni, Sociólogo.

Un mundo feliz es el título de una novela escrita en el año 1932 por Aldous Huxley. Según la novela, para crear este mundo se manipulaban masivamente a los embriones humanos por técnicas genéticas con el fin de convertirlos en seres humanos de ciertas clases sociales. El nivel de inteligencia se controlaba en parte mediante la proporción de oxígeno que se permitía administrar a los fetos. De esta manera, se clasificaba a los seres humanos en distintas categorías para que desempeñaran diferentes tareas en este “mundo feliz”, con el objetivo final de preservar una paz controlada por un despótico dominador mundial. Lo interesante de esta obra de 1932 es que el autor se adelantó a su tiempo, planteando la aplicación de refinadas técnicas de manipulación genética para moldear a los seres humanos a su voluntad. Actualmente, los adelantos de la medicina en el campo de trasplantes de órganos, de la fecundación *in vitro*, y de la terapias genéticas han provocado acalorados debates en el seno de la sociedad.

Se ha llegado al extremo en que no sólo podríamos clonar seres humanos, sino que es posible modificar genes en embriones para producir seres superdotados...

Los serios problemas éticos y morales que plantean la aplicación de técnicas de manipulación genética afectan principalmente a la dignidad humana y a la biodiversidad, generando una serie de preguntas inquietantes.

Actividad 2. Reflexión y cuestionario

Instrucciones: Contesta las preguntas que se plantean a partir de la lectura en los formatos que están en el **Anexo 7.1**.

Lectura.
“Entrevista a Matthew Liao”

EL PAÍS

MATTHEW LIAO | DIRECTOR DEL CENTRO DE BIOÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE NUEVA YORK

“Podemos darle a la gente la opción de tener un hijo alto o dos hijos de tamaño mediano”

El filósofo propone reducir la estatura de las personas para luchar contra el cambio climático

MANUEL ANSEDE

7 ABR 2017 - 13:20 CDT



El filósofo Matthew Liao, director del Centro de Bioética de la Universidad de Nueva York. BERNARDO PÉREZ

MATT DAMON
DOWNSIZING

get
small...
LIVE
LARGE



“AN INGENIOUS COMEDY.”
- Owen Gleiberman, VARIETY

Entrevista tomada de: Pérez B. (7 de Abril de 2017). “Podemos darle a la gente la opción de tener un hijo alto o dos de tamaño mediano”. *El País*. Consultado en Mayo de 2018: https://elpais.com/elpais/2017/04/06/ciencia/1491499309_778401.html

El filósofo **Matthew Liao** de 45 años, nacido en Taiwán y emigrado de niño a EE UU; propone la “ingeniería humana”: la modificación biomédica de las personas para luchar contra el cambio climático. Plantea, por ejemplo, reducir la estatura de los futuros ciudadanos. Para ello, sólo habría que recurrir al diagnóstico genético preimplantacional que ya se emplea en clínicas de fertilidad para evaluar embriones con enfermedades genéticas. Los padres lo harían voluntariamente. Reducir 15 centímetros la estatura media de los estadounidenses significaría un recorte de su energía necesaria para vivir de más de 15 por ciento. Según relata en *El próximo paso: la vida exponencial*, un nuevo libro de la iniciativa *Open Mind* de BBVA que analiza las implicaciones de la actual revolución tecnológica. Liao no es un charlatán, es el director del Centro de Bioética de la Universidad de Nueva York, la institución con el departamento de filosofía mejor valorado del mundo. El trabajo de Liao, según él sostiene, es “pensar con originalidad”. El tiempo dirá si es un visionario o sólo un autor involuntario de ciencia ficción.

Pregunta. Usted propuso hacer humanos más pequeños en el Festival de Ideas Peligrosas, celebrado en la ciudad australiana de Sídney en 2012. ¿Cree que, efectivamente, es una idea peligrosa?

Respuesta. No creo que sea una idea peligrosa, creo que podríamos llevarla a cabo de manera segura. Ya hay maneras en las que podemos tener niños más pequeños. Por ejemplo,

a través del diagnóstico genético preimplantacional. Ahora se oyen voces que dicen que quizá necesitamos algo similar a la política de hijo único de China. Es muy restrictivo comunicarles a los padres que sólo pueden tener un hijo. En ese contexto, si queremos reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, podemos darle a la gente la opción de tener un hijo grande o dos de tamaño mediano o tres más pequeños.

P. ¿Es ético que los padres tomen decisiones irreversibles sobre sus hijos?

R. En filosofía, el llamado problema de la no identidad plantea que si tienes dos embriones y coges el más pequeño, ese pequeño en realidad no podrá quejarse por la decisión de sus padres, porque si hubieras cogido el otro, él no existiría. En ese sentido, el pequeño se beneficia de la decisión de sus padres. La decisión no daña al niño. Y, por otro lado, hay que pensar en las consecuencias medioambientales. En China, la contaminación es tan horrible que a veces no puedes ver a las personas que están frente a ti. Si eres un niño que crece en esas sociedades, vas a tener problemas de salud. Y el niño se beneficiará también al crear un ambiente más limpio.

P. Para seleccionar niños de menor estatura se necesita dinero para las técnicas con embriones. Quizá sería más sencillo usar ese dinero, por ejemplo, para regalar bicicletas a la gente y reducir las emisiones, en lugar de hacer personas más pequeñas.

R. Es una buena sugerencia, pero la idea es tener múltiples soluciones, porque el cambio climático es un gran problema. Necesitamos una multitud de soluciones.

P. Con la revolucionaria técnica de edición genómica CRISPR será mucho más sencillo hacer niños más altos, más guapos, más inteligentes... ¿Qué opina de estas nuevas posibilidades?

R. He leído sobre CRISPR y esta especie de diseño de humanos. La gente habla de humanos sintéticos. Llegará el momento en el que podrás utilizar esta técnica para diseñar con precisión niños de menor estatura o con un metabolismo del alimento más eficiente energéticamente. Creo que ocurrirá y quizás deberíamos pensar ya en sus límites éticos y también en qué podríamos hacer con esta técnica. Pondré un ejemplo que es más de ciencia ficción. Cuando despegué de Nueva York, al anochecer, había muchísimas luces en la ciudad. Cada noche, la iluminación consume muchísima energía en el mundo. Los gatos pueden ver igual que nosotros durante el día, pero siete veces mejor de noche. Algunos monos también tienen visión nocturna. ¿Por qué no explorar la posibilidad de tener visión nocturna nosotros? Imaginemos que pudiéramos tener niños con visión nocturna. Imaginemos cuánta energía podríamos ahorrar. Las razones por las que los gatos tienen visión nocturna son genéticas. Podríamos usar CRISPR para conseguirlo para nosotros. Imaginemos que los humanos tuvieran visión nocturna. ¿Sería buena o mala idea? Yo busco este tipo de soluciones, en las que todos ganan. Pensemos en los teléfonos inteligentes. Tú no tienes que obligar a la gente a comprar un móvil. Cuando empiece a venderse el iPhone 8, las tiendas de Apple tendrán colas enormes, porque el producto es intrínsecamente deseable. Si hablamos de visión nocturna, yo querré tenerla. Hacer niños de menor estatura es polémico, pero tomemos el ejemplo de la visión nocturna. Es una solución de ingeniería humana que puede ahorrar muchísima energía.

Actividad 3. Reflexión y cuestionario

Instrucciones: Contesta las preguntas que se plantean a partir de la lectura en los formatos que están en el **Anexo 7.2** y en plenaria presenta tus resultados.

Cierre.

Estudio de caso. “**El paradigma genético: medicina predictiva**”

Instrucción: Lee el siguiente texto, discute en equipo tus respuestas y preséntalas en plenaria.

“Enfermedad Corea de Huntington”

*Gracia D. y Rodríguez S. J. J.
Guías de ética en la práctica médica. “Retos éticos en atención primaria”
Fundación de Ciencias de la Salud España s/a.*

Consideraciones preliminares

La enfermedad de Huntington (EH) es una grave y rara enfermedad neurológica degenerativa, progresiva y letal, invalidante una vez que comienzan a aparecer los síntomas (motores, cognitivos y/o psiquiátricos). Tiene un patrón de herencia autosómico dominante, por lo que la descendencia tendrá una probabilidad del 50% de padecerla. Se manifiesta en la edad adulta (sobre los 40 años). La mayoría muere por complicaciones derivadas de la propia evolución degenerativa de la enfermedad.

No existe ningún tipo de intervención preventiva o terapéutica, ni podemos afirmar en qué momento se desarrollará la enfermedad.

Las técnicas genéticas actualmente disponibles permiten la realización de test prenatales mediante amniocentesis o mediante el análisis de una muestra del cordón. Además, existe la posibilidad de concebir un hijo libre de la condición genética que produce la EH. La técnica empleada se denomina **diagnóstico genético preimplantacional (PGD)** o análisis embrionario, y es un procedimiento que se realiza en combinación con la técnica de **fertilización in vitro (FIV)**, donde los embriones son analizados antes de proceder a su implantación. Sólo se implantan aquellos embriones que no tienen la condición genética de la EH.

Se debe asegurar, además, el apoyo emocional durante todo el proceso, por la importancia y repercusión que va a tener sobre su vida futura.

El conocimiento y contacto con las Asociaciones de Corea de Huntington es una inestimable ayuda para los pacientes, los familiares y los profesionales de la salud, que no debemos subestimar.

Exposición del caso

Alberto es un varón sano de 32 años, que asiste poco a la consulta, pero muy conocido por su historia familiar. Su padre, enfermo de **Corea de Huntington**, falleció recientemente tras un largo y progresivo deterioro, que supuso una gran dedicación y esfuerzo familiar y

originó una buena y estrecha relación con los médicos implicados. Ni él ni sus otros dos hermanos desean hacerse el estudio genético para saber si son portadores.

Poco antes del fallecimiento del padre, Alberto contrajo matrimonio. Hoy acude a consulta manifestando su deseo de tener descendencia, y porque ha oído hablar de la posibilidad de tener hijos “sin la enfermedad” y “sin tener que conocer su condición genética”. Sigue información y consejo médico. El Dr. Pérez no está muy al día en estos temas y tampoco está de acuerdo con este tipo de técnicas de manipulación genética. Sale del paso diciendo que “estos tratamientos no se hacen en el ISSSTE”.

¿Fue correcta la actuación del profesional?, ¿Tiene éste obligación de informar de las posibilidades científicas, aunque no las comparta y no se encuentren incluidas en el cuadro básico en el ISSSTE?

- I. De acuerdo a los siguientes valores en conflicto, *¿Qué opción eliges y por qué? Justifica tu respuesta.*

Valores en conflicto

El Dr. Pérez, en este caso, tiene un conflicto entre dos valores:

- a) De un lado está el valor del respeto a las decisiones autónomas del paciente, que no desea conocer su carga genética, pero sí quiere evitar la posibilidad de que sus hijos la hereden.
- b) De otro, está el valor del embrión antes de su implantación, ya que la técnica a aplicar en este caso es el diagnóstico preimplantatorio, que obliga a desechar aquellos embriones que sean portadores de la enfermedad.

En caso de atender al primer valor con exclusión del segundo, y tomando en cuenta de su poco conocimiento de este tipo de técnicas y de su cobertura o no por el ISSSTE, el médico se limita a remitir al paciente a las clínicas privadas en las que puedan atender su petición.

En caso de optar por el segundo valor, la protección de las células embrionarias, sin atención al primero, el profesional negará al paciente la prestación que pide, e incluso la información que demanda.

- II. En caso de elegir la opción a), *¿deberían seguirse las siguientes opciones en el orden en que están expuestas?*

Propón el orden que consideres correcto:

1. Contactar con el servicio de genética del hospital de referencia para informar al paciente de las posibilidades actuales en el ISSSTE o dentro del Sistema Nacional de Salud.
2. Acordar una reunión con su pareja para comprobar el nivel de información y de aceptación que ésta tiene de dichas pruebas, dado su protagonismo en este asunto.
3. Informar a ambos conjuntamente de las asociaciones, centros de referencia y unidades especializadas en consejo genético que puedan asesorarles adecuadamente de las

- posibilidades, beneficios y riesgos de las pruebas, asegurando la confidencialidad y soporte emocional durante todo el proceso.
4. Realizar sesiones conjuntas con miembros de los equipos de genética clínica para formar adecuadamente a los profesionales de atención primaria, dado el papel esencial de mediadores en este tipo de conflictos.
 5. Valoración socioeconómica de acuerdo con las expectativas de la pareja.
 6. Objeción de conciencia las opciones propuestas.

Literatura consultada

Pérez, B. (2017). *Podemos darle a la gente la opción de tener un hijo alto o dos de tamaño mediano*. El País. Disponible en:
https://elpais.com/elpais/2017/04/06/ciencia/1491499309_778401.html

García, D. y Rodríguez, S. J. J. (2018). *Paradigma Genético: Medicina Preventiva Enfermedad Corea de Huntington*. España. Fundación de Ciencias de la Salud. Recuperado de: <https://www.cgcom.es/sites/default/files/retosEticosenAtencionPrimaria.pdf>

Rodríguez, N. J. C. (2018). *Manipulación Genética: Entre Ciencia y Conciencia*. Uruguay. Comisión del Reencuentro y la Amistad S.M.U. Jornada de reflexión. Recuperado de: http://www.smu.org.uy/elsmu/comisiones/reencuentro/charla_manipulacion_genetica_smu.pdf

Miravete, N. N. G. y Juárez y L. G. L. (2005). *La Bioética y el Proyecto Genoma Humano*. Ciencias. México. UNAM. No. 79 Jul-Sep. Pág 66-73. Disponible en:
<http://www.revistaciencias.unam.mx/pt/56-revistas/revista-ciencias-79/574>

Manipulación genética: entre ciencia y conciencia. Comisión del Reencuentro y la Amistad. S.M.U. Jornada de Reflexión. Disponible en línea en: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:tDJuOKBw3s8J:www.smu.org.uy/elsmu/comisiones/reencuentro/charla_manipulacion_genetica_smu.pdf+&cd=3&hl=es&ct=clnk&gl=mx&client=firefox-b-ab

Anexo 7.1

Actividad 2. Cuestiones éticas de la ingeniería genética. Reflexión y cuestionario

Instrucciones: Contesta lo siguiente a partir de la lectura. *¿Es ético experimentar con la vida humana?*

1. ¿Es ético experimentar con la vida humana?
 2. ¿Las modificaciones genéticas en humanos van en contra de las leyes naturales?
 3. ¿Qué valor tiene el decir: «todo sea por el bien de la ciencia o la humanidad»?
 4. ¿Para qué generar superhumanos? ¿Qué utilidad tendría?

Anexo 7.2

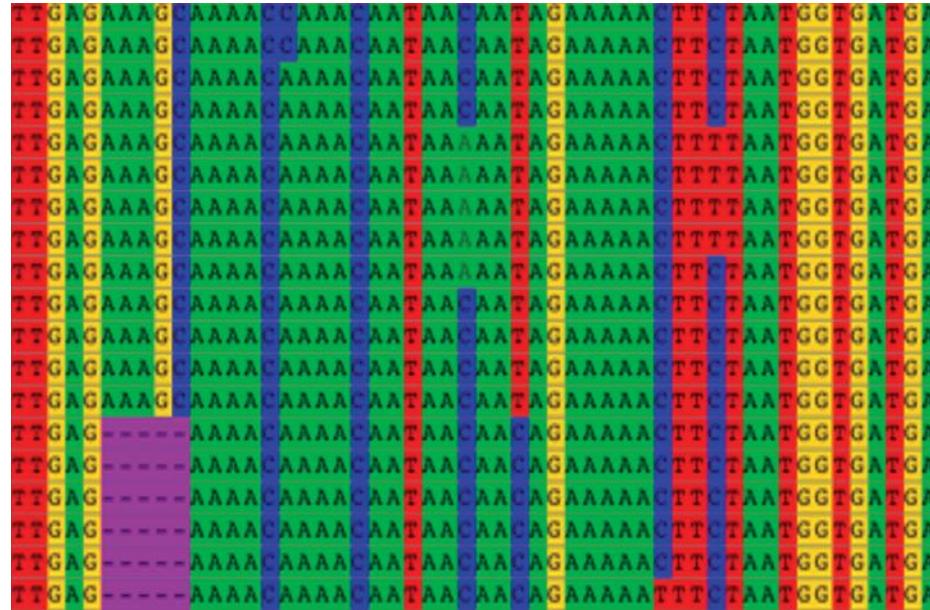
Actividad 3. Entrevista a Mattew Liao **Reflexión y cuestionario**

Instrucciones: Contesta lo siguiente a partir de la lectura y en plenaria presenta tus resultados.

1. ¿Los padres de familia tienen el derecho de decisión sobre sus hijos? ¿Por qué?
2. ¿El Dr. Liao está en lo correcto cuando lo cuestionan sobre la ética de decisiones irreversibles con los hijos?
3. ¿Tú tomarías una decisión irreversible sobre tus hijos? Justifica tu respuesta.
4. Si tuvieras que modificar las características genéticas de tus hijos, ¿qué les modificarías? Menciona mínimo tres modificaciones y justificalas. O si tu respuesta es negativa, justificala.
5. ¿Qué relación tiene lo planteado por el filósofo Matthew Liao con la película *Downsizing*? (observa el trailer, si aún no has visto la película: <https://youtu.be/xbYyje-7FR3c>).
6. ¿Es factible la disminución del tamaño como una solución ante el problema del cambio climático?

BIOLOGÍA

Evidencias de la evolución. El DNA me respalda



Evidencias moleculares de la evolución

Elaboraron:
Serrano Reyes Gabriela
Colaboraron:
Bautista Acevedo Marco Antonio
Bernal Enríquez Oscar
Centeno Cruz Federico
Hernández Carbajal Luz Angélica
Luna Román Celso Miguel
Martínez Ortiz Leticia
Mejía García Martha Elvira
Ramírez Aguilar Eva Cristina

BIOLOGÍA II (PEA, 2016). Primera Unidad

¿Cómo se explica el origen, evolución y diversidad de los sistemas biológicos?

Propósito

Al finalizar la unidad el alumno identificará los procesos que han favorecido la diversidad de los sistemas biológicos a través del análisis de las teorías que explican su origen y evolución para que comprenda que la biodiversidad es el resultado del proceso evolutivo.

Tema 2. Evolución biológica

Subtema: Evidencias moleculares de la evolución

Aprendizajes

Declarativos	<ul style="list-style-type: none"> • Aprecia las evidencias paleontológicas, anatómicas, moleculares y biogeográficas que apoyan las ideas evolucionistas. • Reconoce a la molécula de DNA como una homología molecular en todos los sistemas vivos, como prueba de origen común. • Comprende que las similitudes y diferencias en las secuencias del DNA pueden servir para inferir relaciones de parentesco entre especies.
Procedimentales	<ul style="list-style-type: none"> • Realiza investigaciones en las que aplica conocimientos y habilidades, al fomentar actividades con las características del trabajo científico y comunicará de forma oral y escrita los resultados empleando un vocabulario científico. • Adquiere habilidades propias de las técnicas de biología molecular para llevar a cabo una extracción de DNA.
Actitudinales	<ul style="list-style-type: none"> • Aplica actitudes y valores que contribuyan al desarrollo de actividades experimentales. • Muestra actitudes favorables hacia el trabajo colaborativo.

Actividades a realizar:

Apertura

- Cuestionario. RA-P-RP

Desarrollo

- Exposición teórica. “Nuevas evidencias de la evolución”
- Actividad experimental. “Uno para todos”
- Exposición teórica. “Especies vemos, relaciones no sabemos”
- Actividad 1. “Manos a la secuencia”

Cierre

- Actividad 2. “The DNA Journey”
- Cuestionario. RA-P-RP

Apertura

Cuestionario RA-P-RP

Instrucción: En el **Anexo 8.1** encontrarás el formato del cuestionario. Contesta las preguntas, utiliza sólo la columna izquierda para contestar (RA respuesta anterior).

Desarrollo

Exposición teórica. “Nuevas evidencias de la evolución”

Pocas ideas han modificado tan profundamente nuestra visión de la naturaleza como la idea de cambio en los seres vivos que implica la teoría de la evolución propuesta por Charles Darwin y Alfred Russel Wallace (Barbadilla, 1999). En ella se propone que la actual diversidad de especies se ha producido por descendencia con modificaciones a partir de un ancestro común y que el principal mecanismo de cambio a lo largo del tiempo es la selección natural (Muñoz, 2002). Las evidencias más convincentes que tenían de este proceso provenían de la biogeografía y de la evidencia fósil. Además, la anatomía y embriología comparadas mostraron las homologías morfológicas, como pruebas importantes de las relaciones que hay entre las especies, relaciones que sólo podían ser explicadas si procedían de un ancestro común. Darwin trabajó durante más de veinte años en sus ideas sobre la evolución y aún después de publicar su obra “The Origin of Species”, tanto Darwin como muchos evolucionistas, siguieron investigando y descubriendo pruebas a favor de la evolución, todos ellos sabían que para cambiar la forma de entender la vida en el planeta hay que tener evidencias sólidas.

Si bien actualmente se considera que la evolución es un hecho científico, como el que la tierra gira alrededor del sol, la discusión en torno a la Teoría de la Evolución seguía generando polémica y arduos debates durante casi un siglo después de ser propuesta. Fue hasta que la biología molecular comienza a desarrollarse a partir del descubrimiento de la estructura del DNA (1953) cuando se puso punto final a dichas discusiones. La biología molecular además de esclarecer el mecanismo de la herencia y el origen las variaciones, mostró que los sistemas biológicos llevamos nuestro material genético en la misma macromolécula “el DNA” es decir encontraron una homología molecular para todos los sistemas biológicos y esto, es una prueba irrefutable de la evolución con ascendencia común (Figura 1).

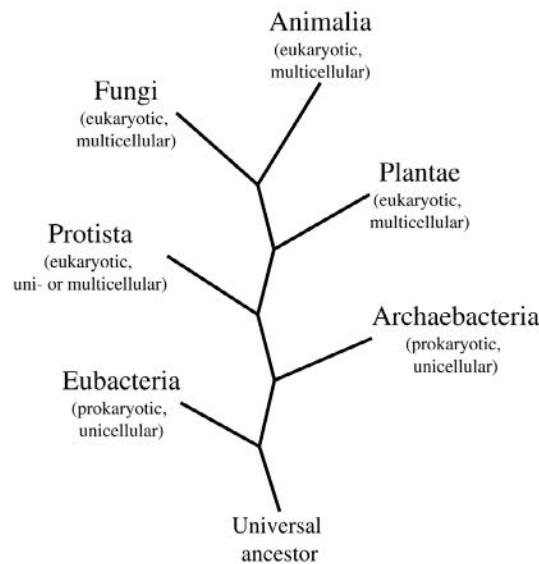


Figura 1. El árbol de la vida con seis reinos, de acuerdo con Woese (1997), tomado de Brock Biology of Microorganisms, 8th edition (1997)

Recurso sugerido

Según un sondeo de opinión, en Estados Unidos el 47 por ciento de la población rechaza la teoría de la evolución; de hecho, en algunos estados aún se discute sobre enseñar creacionismo o el “diseño inteligente” en las escuelas públicas.

Puedes leer el artículo completo en:
[http://news.bbc.co.uk/hi/spanish/science/
newsid_7878000/7878938.stm](http://news.bbc.co.uk/hi/spanish/science/newsid_7878000/7878938.stm)
BBC (2009)
El creacionismo gana terreno.
Redacción BBC mundo

En 1925 en Tennessee, Estados Unidos, el profesor de secundaria John Scopes perdió el famoso caso “El juicio del mono”, en el que se le acusaba de enseñar la teoría de la evolución en la secundaria, entonces en Tennessee, Mississippi y Arkansas estaba prohibida la enseñanza de la evolución en escuelas.

Actividad experimental. “Uno para todos”

Introducción

Actualmente existen muchas y variadas técnicas de biología molecular que nos permiten saber el orden de los nucleótidos en un gen, generar millones de copias a partir de una muestra pequeña de DNA e incluso insertar genes de un organismo en otro, entre otras cosas. Todas estas técnicas, desde las más sencillas hasta las más sofisticadas, requieren de DNA y ya que esta molécula se encuentra dentro de las células eucariotas revestido por membranas y asociado a proteínas, para obtenerlo hay que romper dichas membranas y separarlo de los otros componentes celulares. A este proceso se le conoce como “Extracción de DNA” y, aunque no hay un método único, todos se basan en las características fisicoquímicas de esta molécula.

¿Recuerdas cuáles son esas características?

El DNA está constituido por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí en forma de una doble hélice. Los nucleótidos están integrados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina). La unión de los nucleoti-

dos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrógeno que mantienen estable la estructura helicoidal. Los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere al DNA una carga neta negativa que lo hace altamente polar (Velázquez *et al.*, 2014). Figura 2.

Objetivos

- Extraer DNA genómico de las siguientes especies: *Pisum sativum* (chícharo), *Pleurotus ostreatus* (hongo), *Bacillus clausii* (Probiótico comercial), y *Homo sapiens* (humano).
- Observar y comparar DNA de las diferentes especies mediante electroforesis.

Ahora sí, vamos a la extracción

El primer paso en la extracción consiste en romper la célula para liberar el DNA. La ruptura o lisis celular puede realizarse con detergentes, medios hipotónicos o calentamiento, que no afecte la estabilidad del DNA, pero que modifique o destruya las membranas celulares permitiendo que se libere el material genético. En las células que sólo están delimitadas por una membrana, la lisis puede realizarse fácilmente con un detergente, como el SDS (dodecilsulfato sódico), el cual disuelve los lípidos que conforman la membrana, así como sucede con la grasa de un sartén al lavarlo. En otros tejidos, como los de vegetales, las paredes celulares se pueden romper por la acción mecánica de aplastamiento del tejido o por medio del calentamiento, previamente a la lisis celular.

Muchas soluciones de lisis contienen TRIS (hidroximetil) aminometano, para mantener el pH de la muestra de DNA, y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para proteger el DNA de la acción de enzimas nucleasas, que lo pueden degradar. Después de la lisis celular el DNA se libera de la célula, pero está acompañado de otros compuestos (proteínas, enzimas, carbohidratos). Los componentes celulares no solubles, como las proteínas que permanecen en solución, se separan del DNA por centrifugación (Velázquez *et al.*, 2014). Finalmente, la carga altamente negativa de la molécula de DNA es neutralizada por los iones de Na^+ en la solución que se unen al DNA, disminuyendo su carga negativa, permitiendo que las moléculas de DNA se acerquen y enrollen más fácilmente. Esta neutralización de cargas negativas de DNA permite que se precipite en alcohol. Sin la sal, el DNA permanece cargado negativamente y estará en la parte acuosa de la solución.

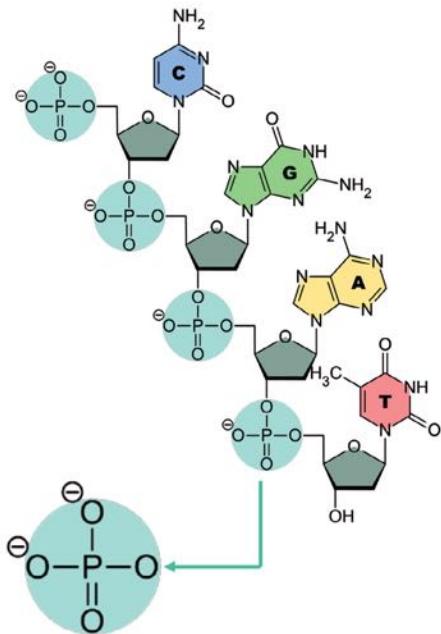


Figura 2. Cadena de nucleótidos de DNA

Materiales y equipo

Reactivos	Material biológico	Laboratorio
Agua destilada EDTA 10 mM Tris-HCl 25 mM NaOH 02.N SDS 1% Acetato de amonio 7.5 M Etanol al 70% Agarosa 1% Buffer TBE Buffer de carga Orange Loading Buffer	2 gr de <i>Pisum sativum</i> (chícharo) 2 gr de <i>Pleurotus ostreatus</i> (hongos), 2 ml de <i>Bacillus clausii</i> (Enterogermina)	Balanza Centrifuga Vortex Horno de microondas Cámara de electroforesis horizontal Hisopo Papel filtro Mortero Tubos eppendorf de 1.5 Micropipetas y puntas Papel pH Transiluminador de luz azul (Si se usa una cámara de electroforesis BlueGel, no se requiere del transiluminador)

Procedimiento

Obtención de las muestras

1. Pesa 2 gr de chícharo (*Pisum sativum*) y 2 gr de hongos (*Pleurotus ostreatus*).
2. Tritura en un mortero los 2 gr de chícharo con 10 ml de agua. Repite el mismo proceso para la muestra de hongo.
3. Filtra los macerados.
4. Disuelve 2 ml de Enterogermina (*Bacillus clausii*) en 8 ml de agua y filtrar.
5. Para la obtención de células del epitelio bucal, el donante (*Homo sapiens*) raspa suavemente con un hisopo el interior de su mejilla.
6. Cortar la punta del hisopo, colocar en 10 ml de agua y filtra.
7. En un tubo coloca 10 ml de agua, que servirá como control del experimento.

Extracción de DNA (*Consulta el Anexo 8.2 para la preparación de soluciones*)

8. Con una micropipeta coloca 1.5 ml de cada uno de los filtrados y del control en tubos eppendorf (previamente etiquetados).
9. Centrifuga las muestras durante 4 min a una velocidad de 8000 a 10000 rpm. Recuerda equilibrar los tubos dentro de la microcentrifuga.
10. Decanta el sobrenadante y recuperar el pellet celular
11. Resuspende el pellet en 100 µl de la solución A y agita en vortex hasta disolver.
12. Agrega 200 µl de la solución B y deja reposar en hielo durante por 10 min.

13. Agrega 150 μl de la solución C y deja reposar en hielo por 25 min.
14. Pasado el tiempo de espera centrifuga durante 3 min.
15. Toma 400 μl del sobrenadante y depositalos en un tubo eppendorf previamente etiquetado.
16. Adiciona 1 ml de etanol al 70% frío.
17. Centrifuga durante 10 min.
18. Decanta el sobrenadante y recupera el pellet.
19. Diluye el pellet en 50 μl de H_2O_d .

Elaboración del gel de agarosa

20. Calienta la agarosa hasta fundirla, usando un microondas en potencia media a baja. Recuerda utilizar guantes para manipular el matraz con la agarosa caliente.
21. Periódicamente remueve la agarosa del horno y mezcla cuidadosamente girando el envase.

Nota: La mezcla puede comenzar a ebullir y derramarse, para evitarlo, monitorea la fundición de la agarosa e interrumpe el calentamiento justo antes de comenzar a ebullir.

22. Retira la agarosa del horno cuando la mezcla esté completamente transparente y sin grumos.
23. Mientras la agarosa se enfriá, prepara la cámara de electroforesis, para ello coloca el carrito dentro de la charola y los peines correspondientes.
24. Deja enfriar la agarosa, hasta que el envase sea soportable al tacto.
25. Vacía lentamente la agarosa en la cámara de electroforesis sin que se formen burbujas. La altura pertinente (grosor del gel) debe ser de 5 mm aproximadamente.
26. El gel solidificará en aproximadamente 20 minutos.

Electroforesis

27. Retira el peine del gel con cuidado de no dañar los pozos que se formaron en el gel.
28. Coloca el gel (con todo y carrito) en la cámara de electroforesis y cubre completamente el gel con buffer de electroforesis (TBE).
29. Toma 10 μl de cada una de la muestra (usa diferentes puntas) y colócalas en microtubos de 0.5 ml. Nota: No olvides rotular estos nuevos tubos.
30. Agrega 2 μl de Orange Loading Buffer a cada tubo.
31. Rotula otro tubo con las letras PM. En éste agrega 5 μl de peso molecular y 2 μl de Orange Loading Buffer.
32. Carga la mezcla anterior (peso molecular con Orange Loading Buffer) en el pozo uno.
33. Carga la muestra uno en el pozo dos y el resto de las muestras en orden progresivo, como se muestra en la Figura 3.

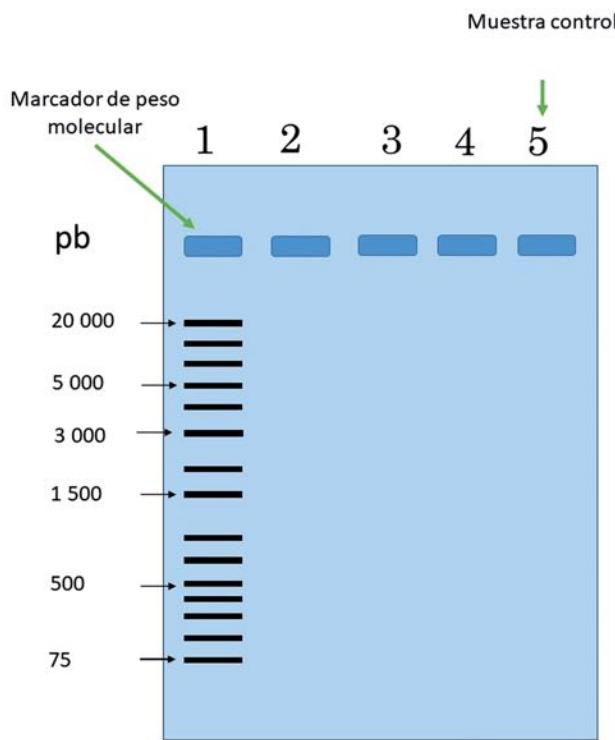
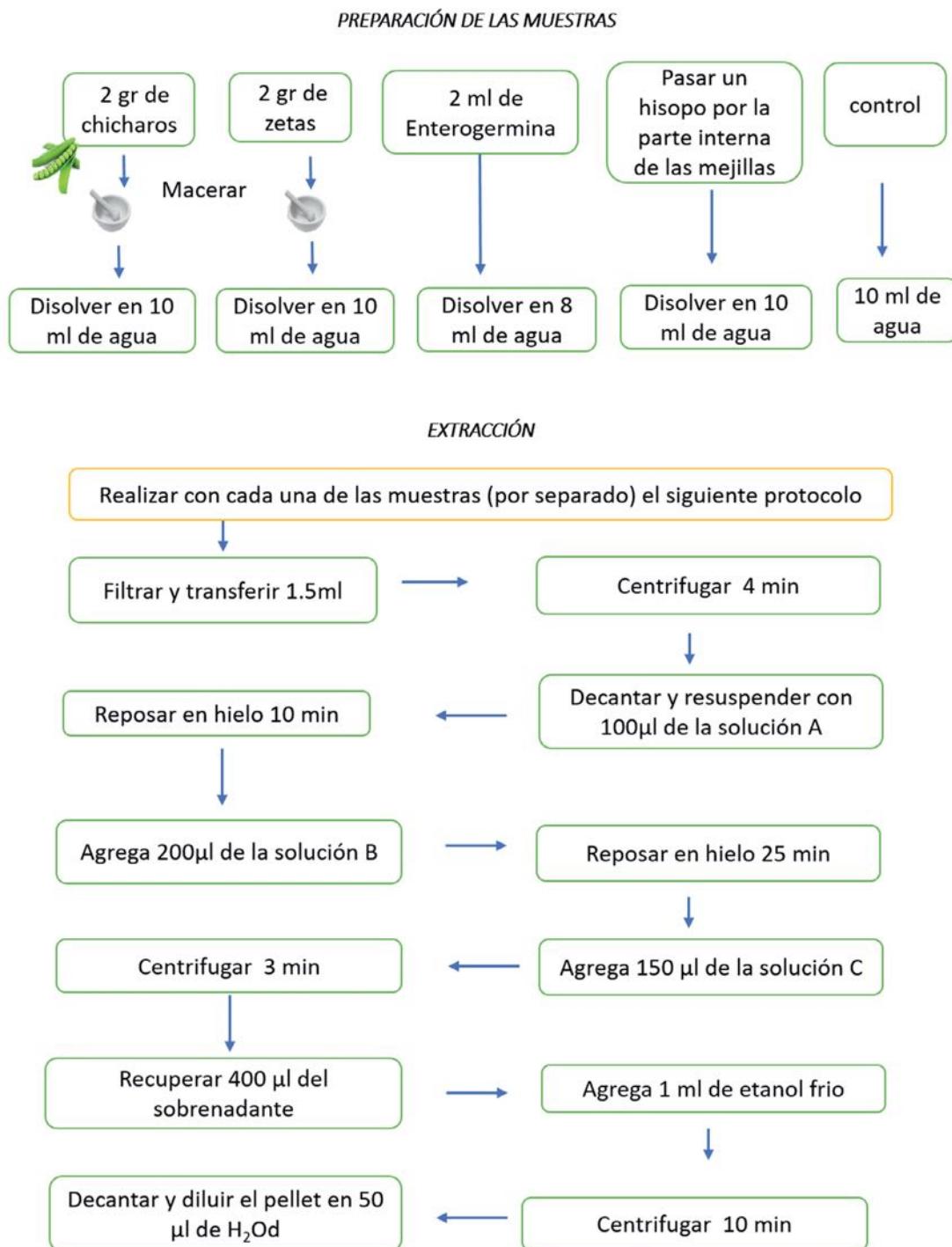


Figura 3. Orden para cargar las muestras, marcador de peso molecular y muestra control en el gel de agarosa

34. Coloca la cubierta de la cámara. Verifica que el gel esté orientado correctamente (pozos hacia el ánodo). Recuerda que el DNA migrará hacia el polo positivo.
35. Conecta a la fuente de poder e inicia la electroforesis.
36. Verifica el desplazamiento de los colorantes del buffer de carga
37. Despues de que se ha terminado la electroforesis (40 a 50 minutos) retira el gel de la cámara y procede a visualizarlo en un transiluminador. Si utilizas el sistema BlueGel, sólo enciende la luz azul, observa y fotografía.
38. Toma una fotografía del gel y pégala en el Anexo 8.3, en este espacio anota tus observaciones y análisis de resultados.

Diagrama de flujo

Análisis de resultados

Instrucciones: En el Anexo 8.3.1 encontrarás un cuestionario para realizar el análisis de los resultados que obtuviste en tu actividad experimental. Contéstalo y en el mismo anexo redacta tus conclusiones. Discute en plenaria las respuestas y conclusiones.

Exposición teórica. “Especies vemos, relaciones no sabemos”

Como sabes ahora, la molécula de DNA es igual en todos los sistemas vivos, lo cual es evidencia de que todos tenemos un origen común. Además, hay información evolutiva contenida en la secuencia de bases del DNA y, por lo tanto, también en la secuencia de aminoácidos de las proteínas. Hay especies que no es posible comparar morfológicamente, por ejemplo, un humano con una bacteria; sin embargo, al conocer la secuencia de bases nitrogenadas en un gen determinado es posible cuantificar el número de bases en la que éstos son similares o en la que difieren, no importa lo diferentes que sean a simple vista. Estas diferencias y similitudes en la secuencia de DNA han permitido establecer relaciones evolutivas entre las especies, de manera que, actualmente la taxonomía moderna ya no depende exclusivamente de las observaciones estructurales o funcionales de los organismos, y ahora utiliza secuencias moleculares para establecer las relaciones de todos los organismos vivos hasta la primera célula.



Figura 4. Se han dado casos en los que la evidencia molecular contradice al análisis de la anatomía comparada. Por ejemplo, por años se pensó que el panda gigante y el panda rojo estaban íntimamente relacionados, hasta que estudios moleculares revelaron que el ancestro del panda gigante es de la familia de los osos, mientras que el del panda rojo es de la familia de los mapaches (UNAM, 2014).

Para poder hacer este tipo de comparaciones debemos conocer el orden en el que se encuentran las bases en la secuencia de DNA que deseamos comparar, lo cual hoy en día se realiza de manera rutinaria en muchos laboratorios de biología molecular mediante técnicas de secuenciación. Posteriormente, se utiliza una técnica denominada hibridación, cuyo principio es que el DNA de especies cercanas, tendrá más secuencias de nucleótidos similares, que el DNA de especies con relaciones distantes.

Para saber más de secuenciación puede ver el video “¿Qué son las técnicas de secuenciación masiva?”, disponible en:
<https://www.youtube.com/watch?v=ewiBPvFsaGU>

Uno de los genes que se utilizan para realizar comparaciones entre especies es el responsable de sintetizar la proteína citocromo *c*, presente en todos los organismos e involucrada en la respiración aeróbica. Estas proteínas evolucionan lentamente es decir, que la tasa de sustitución de aminoácidos por unidad de tiempo es baja. Por lo que organismos muy distintos, como humanos, polillas y el moho, tienen una gran cantidad de aminoácidos en común en sus moléculas de citocromo *c*. Esta conservación molecular evolutiva hace posible estudiar las diferencias genéticas entre organismos remotamente relacionados, a la vez que evidencian nexos filogenéticos entre especies muy diferentes (UNAM, 2007).

Actividad 1. “Manos a la secuencia”

En el **Anexo 8.4** encontrarás la secuencia de DNA de cinco especies conocidas y la de tres especies desconocidas. Estas secuencias corresponden a un fragmento del gen que codifica para la proteína del citocromo, que, como dijimos anteriormente, está presente en todos los organismos. Trabaja con tu equipo para comparar las secuencias entre especies, descubre los nexos evolutivos que hay entre ellas y comparte tus resultados con el grupo, utiliza el **Anexo 8.4.1** para guiarte en el proceso.



Figura 5. De Izquierda a derecha en la imagen se muestran las especies, *Gallus gallus*, *Tineola bisselliella*, desconocida, *Gossypium herbaceum*, *Thunnus albacares*, desconocida, *Homo sapiens* y desconocida.

Cierre

Actividad 2. “The DNA journey”

Instrucciones:

1. Observa el video “The DNA Journey” (video disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=tyaEQEmt5lsmomondo>) y discute las ideas principales en plenaria, utiliza el cuestionario del Anexo 8.5 para guiar la discusión.



2. En equipo elabora un cartel en el que se plasmen las conclusiones a las que llegaste después de la discusión en plenaria.
3. El cartel se pegara en el salón o laboratorio a modo de galería. Recorre el laboratorio para observar el trabajo de tus compañeros.

Instrucciones: Regresa al Anexo 8.1. Discute nuevamente las preguntas y contesta en la columna derecha (respuesta posterior). Compara tus respuestas (anterior y posterior).

Literatura consultada

Barbadilla, A. (1999). *La evolución biológica*. Departamento de Genética y Microbiología. Universidad Autónoma de Barcelona. Disponible en: <http://bioinformatica.uab.es/divulgacio/evol.html>

Cárdenas, M. (2009). *¿Por qué aún cuesta tanto aceptar la teoría de la evolución? Algunas reflexiones*. Dossier Científico. SEBBM (Sociedad Española de Bioquímica y Biología molecular) 160: 14-16

Mosquera, R. (2005). *Marcadores moleculares y la extracción de DNA*. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 3(1), 14-18.

Zamora-Muñoz, C. (2002). *Evidencias a favor de la evolución*. Evolución: la base de la biología (pp. 57-74). Proyecto Sur.

UNAM, (2007). Programa de Conocimientos Fundamentales. Módulo IV, Evolución. Disponible en: <http://www.conocimientosfundamentales.unam.mx/vol2/biologia/m04/t01/04t01s0202.html#>

Velázquez, L, Martínez, M. y Romero, A. (2014). *Extracción y purificación de DNA. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*.

Páginas web

Evidencias de la evolución. (2014). Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: http://www.objetos.unam.mx/biologia/_evidenciasEvolucion/

Videos

Momondo (2016). *The DNA Journey*. Recuperado de <https://www.youtube.com/watch?v=tyaEQEmt5lsmomondo>

FECYT (2017). *¿Qué son las técnicas de secuenciación masiva?* Fundación española para la ciencia y la tecnología. Recuperado de <https://www.youtube.com/watch?v=ewiBPvFsaGU>

Anexo 8.1

Apertura Cuestionario RA-P-RP

Instrucciones: Lee las preguntas que se encuentran en la siguiente tabla RA-P-RP (Respuesta anterior-pregunta-respuesta posterior), discútelas en equipo y contesta únicamente en la columna de la izquierda (respuesta anterior).

Respuesta anterior (RA)	Pregunta (P)	Respuesta posterior (RP)
	¿Qué es una evidencia de la evolución?	
	¿Qué evidencias moleculares apoyan la evolución?	
	¿Qué ventajas tienen las evidencias moleculares con relación a otras?	

Anexo 8.2

Actividad experimental. Preparación de soluciones

Previos: Antes de realizar la práctica preparar las siguientes soluciones:

Reactivos	Ingredientes	Volumen a preparar	Cantidades a agregar de reactivos o soluciones stock*
Solución A	EDTA 10 mM Tris-HCl 25 mM	1000 µl	400 µl EDTA 250mM 50 µl TrisHCl 500mM 550 µl Agua Destilada
Solución B	NaOH 02.N SDS 1%	10 ml	2 ml de NaOH 1N 1 ml de SDS 10% 7 ml de agua destilada
Solución C	Acetato de Amonio 7.5 M	10 ml	Disolver 5.7 gr de acetato de amonio en 7 ml de agua, una vez disuelto aforar a 10 ml
TBE 1X		500 ml	*Proporcionada por el profesor
Agarosa 1%	Solución TBE 1X Agarosa	100 ml	Disolver 1 gr de agarosa en 100 ml de TBE 1X y calentar en el horno de microondas hasta que dé el primer hervor. Deja enfriar y prepara el gel.

*Las soluciones stock serán proporcionadas por el profesor.

Anexo 8.3

Actividad experimental. “Uno para todos”

Instrucciones: En este espacio coloca la fotografía del gel de agarosa y realiza el análisis de las bandas que observas.

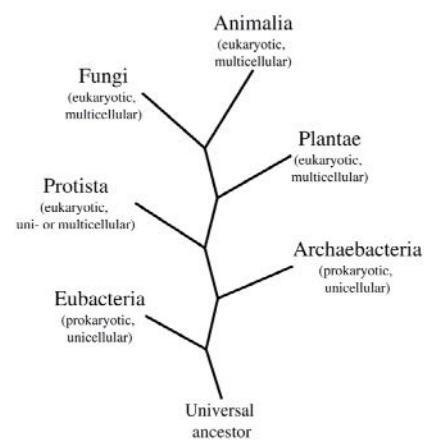
Observaciones:

*Anexo 8.3.1***Cuestionario**

Instrucciones: Lee el siguiente cuestionario. Discute con tu equipo el análisis de los resultados que obtuviste en tu actividad experimental. Contesta, recuerda las observaciones que realizaste en el gel de agarosa.

- | | |
|--|--|
| 1. ¿A qué reino pertenecen las especies: <i>Pisum sativum</i> (chícharo), <i>Pleurotus ostreatus</i> (hongo), <i>Bacillus clausii</i> (Probiótico comercial) y <i>Homo sapiens</i> (humano)? | |
| 2. ¿Qué molécula se extrajo de las diferentes muestras biológicas? | |
| 3. ¿Cómo sabes que se trata de esa molécula en particular? ¿Qué evidencia tienes de ello? | |
| 4. ¿Por qué es posible utilizar la misma técnica de extracción en organismos tan diferentes? | |
| 5. ¿Cuál es la función del SDS (dodecilsulfato sódico) en el método experimental que empleaste? | |
| 6. ¿Para qué se agregó Orange Loading Buffer a las muestras? | |

7. ¿Qué representa la siguiente imagen?



8. ¿Qué relación tiene la imagen anterior con la actividad experimental que desarrollaste?

9. En este espacio escribe los comentarios derivados de tu análisis de resultados que no estén considerados en las preguntas anteriores

10. Con base en el resultado y las respuestas del cuestionario, redacta en el siguiente espacio tus conclusiones; discute en plenaria los mismos.

Anexo 8.4

Actividad 1. "Manos a la secuencia"

Instrucciones: En el siguiente **Anexo 8.4.1** encontrarás siete secuencias de DNA (recortables) que codifican para la proteína del citocromo (presente en todos los organismos). Cinco secuencias corresponden a las especies: *Homo sapiens*, *Gallus gallus*, *Tineola bisselliella*, *Thunnus albacares* y *Gossypium herbaceum* y tres secuencias desconocidas. Trabaja con tu equipo para comparar las secuencias de DNA entre especies y determinar entre qué especies hay mayor proximidad evolutiva.

1. Recorta los cuadros a la mitad siguiendo la línea punteada y une los extremos 1 con el 2 para tener la secuencia de DNA en una sola tira, como se muestra en el ejemplo siguiente:

a) Secuencia antes de recortar

<i>Homo sapiens</i>	GGTGATGTTGAAAAAGGTAAAAAAATTTTT	1
2 <small>pega esta pestana atrás del extremo 1</small>	ATTATGAAATGTAGTCATGTCATGCTGTT	2

b) Secuencia en una sola tira después de unir los extremos:

<i>Homo sapiens</i>	GGTGATGTTGAAAAAGGTAAAAAAATTTTT	ATTATGAAATGTAGTCATGTCATGCTGTT
---------------------	--------------------------------	-------------------------------

2. Una vez que hayas unidos las tiras y tengas las secuencias de las siete especies, señala con color verde las adeninas, con amarillo las guaninas, con rojo las timinas y con azul las citosinas de todas las secuencias.
3. Compara las secuencias de las cinco especies conocidas con las secuencias de las especies A, B y C (desconocidas). ¿Cuáles se parecen más entre ellas?
4. Coloca las especies A junto a una de las cinco especie con la que creas que están más cercanamente emparentadas. Haz lo mismo para las especies B y C.
5. Toma una fotografía a la forma en que organizaste las especies y pégala en el siguiente espacio.

6. Comparte la fotografía en formato electrónico con tu profesor para que la proyecte y explica frente al grupo tus hipótesis de parentesco.

Nota: Si se prefiere o no se cuenta con video proyector, los alumnos pueden pegar sus secuencias en una cartulina y explicar frente al grupo.

7. Observa las tres imágenes siguientes y, según las similitudes de las secuencias que encontraste en el gen de citocromo, escribe en los cuadros cuál crees que representa a la especie A, B y C.



8. Comparte tus resultados con el grupo y discutan si hay coincidencia

Anexo 8.4.1

Recortable

<i>Homo sapiens</i>	GGTGATGTTGAAAGGTAAAAATTTTT ATTATGAAATGTAGTCATGCTGTT
pegar esta pestana atrás del extremo 1	
(2)	
<i>Gallus gallus</i>	GGTGATATTGAAAAGGTAAAAATTTTT GTTCAAAATGTAGTCATGCTGTT
pegar esta pestana atrás del extremo 1	
(2)	
<i>Tineola bisselliella</i>	GGTAATGCTGAAAATGGTAAAAATTTTT GTTCAACGTTGCTCAATGTCATGCTGTT
pegar esta pestana atrás del extremo 1	
(2)	
<i>Thunnus albacares</i>	GGUGATGTTAAAAGGTAAAAAACTTTT GTTCTTTGCTGCTTGTCTGCTGTT
pegar esta pestana atrás del extremo 1	
(2)	

<i>Gossypium herbaceum</i>	GGTGAAGCTAAAGCTGGTGAAAAATTTT AAAGCTAAATGTCATGCTGCTGTT
(2) pega esta pestana atrás del extremo 1	(1)
<i>Especie A</i>	GGTAATCCTGATGCTGCACAAATTTT AAAGCTAAATGTCATGCTGCTGTT
(2) pega esta pestana atrás del extremo 1	(1)
<i>Especie B</i>	GGTGATGTTGAAAAAGGTAAAAAATTTT ATTATGAAATGTTAGTCATGTCATGCTGTT
(2) pega esta pestana atrás del extremo 1	(1)
<i>Especie C</i>	GGTGATGTTGAAAAAGGTAAAAATTATTT GTTCAACGTTGCTCAATGTCATGCTGTT
(2) pega esta pestana atrás del extremo 1	(1)

Anexo 8.5

Actividad 2. “The DNA journey”

Instrucciones: Después de observar el video “The DNA Journey (video disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=tyaEQEmt5lsmomondo>) y discutir las ideas principales, contesta el siguiente cuestionario:

1. ¿Entre los humanos existen las razas o las variantes genéticas?

2. ¿La evolución implica un vínculo entre los sistemas biológicos? Explica.

3. Antes de que la tecnología permitiera tener evidencias moleculares de la evolución, ¿podía determinarse el nivel de parentesco que tenemos con otros individuos de nuestra especie?

4. ¿Qué implicaciones sociales tiene este hecho?

5. Entender la relación evolutiva entre los sistemas vivos, ¿cómo nos permite mejorar en actitudes y valores?

¡Viva la resistencia!... eso dicen las bacterias

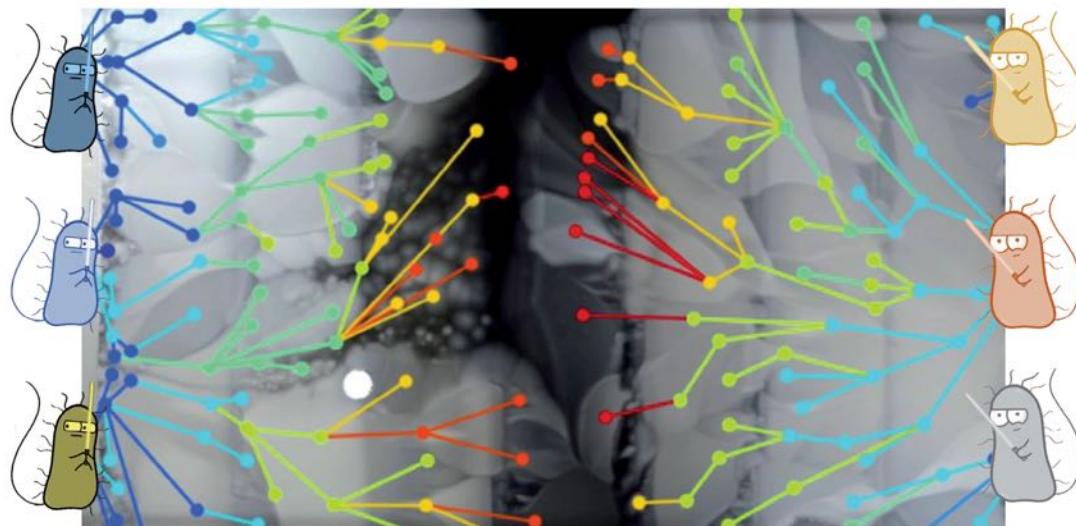


Imagen tomada y modificada de: <https://www.youtube.com/watch?v=pIVk4NVIUh8>

Resistencia a antibióticos y selección natural

Elaboraron:
Centeno Cruz Federico
Bautista Acevedo Marco Antonio
Hernández Carbajal Luz Angélica
Luna Román Celso Miguel
Ramírez Aguilar Eva Cristina
Colaboraron:
Mejía García Martha Elvira
Serrano Reyes Gabriela
Martínez Ortiz Leticia

BIOLOGÍA II (PEA, 2016). Primera unidad

¿Cómo se explica el origen, evolución y diversidad de los sistemas biológicos?

Propósito

Al finalizar la unidad el alumno identificará los procesos que han favorecido la diversificación de los sistemas biológicos a través del análisis de las teorías que explican su origen y evolución para que comprenda que la biodiversidad es el resultado del proceso evolutivo.

Tema 2. Evolución biológica

Subtema: Evidencias moleculares de la evolución

Aprendizajes

Declarativos	<ul style="list-style-type: none"> • Aprecia las evidencias moleculares, que apoyan las ideas evolucionistas. • Reconoce que la resistencia a antibióticos es una consecuencia de la selección natural. • Identifica que los seres vivos están constituidos de DNA y en consecuencia se puede realizar recombinación genética entre especies diferentes.
Procedimentales	<ul style="list-style-type: none"> • Aplica habilidades experimentales y de comunicación oral y escrita para la comprensión de las ideas evolucionistas.
Actitudinales	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra una actitud crítica y reflexiva ante la relación ciencia-tecnología-sociedad- ambiente.

Actividades a realizar:

Apertura

- Cuestionario RA-P-RP

Desarrollo

- Lectura. “Osamu Shimomura y la medusa de cristal” y cuestionario.
- Exposición Teórica. “Resistencia a antibióticos y selección natural”
- Actividad 1. “The evolution of bacteria on a mega-plate Petri dish”
- Actividad 2. Obtención de un plásmido.

Cierre

- Actividad experimental. Resistencia a antibióticos en bacterias transformadas.
- Cuestionario RA-P-RP

Apertura

Cuestionario RA-P-RP

Instrucción: En el Anexo 9.1 encontrarás el formato del cuestionario. Contesta sólo en la columna izquierda, RA (respuesta anterior).

Desarrollo

Actividad 1. Lectura “Osamu Shimomura y la medusa de cristal” y cuestionario

Instrucciones: Despues de leer en equipo la lectura “Osamu Shimomura y la medusa de cristal” (disponible en línea en: <http://www.comoves.unam.mx/numeros/articulo/187/osamu-shimomura-y-la-medusa-de-cristal>), contesta las preguntas del Anexo 9.2 de esta secuencia, presenta tus respuestas en plenaria.

Exposición Teórica. “Resistencia a antibióticos y selección natural”

Introducción

La selección natural es considerada por Darwin como la premisa de la evolución, el proceso por el cual una población que tiene ciertas adaptaciones a su medio tiene una tasa de supervivencia o reproducción más alta que otros individuos de la población y pasan estas características genéticas a su progenie. Puesto en forma simple, la selección natural es la supervivencia y la reproducción diferencial de genotipos diferentes, o genes diferentes, en lo que podríamos llamar el éxito reproductivo.

Adecuación = Éxito reproductivo

Los individuos con fenotipos y genotipos que son favorecidos por la selección natural no necesariamente son los que sobreviven. En realidad, son los que aportan mayor adecuación o eficacia biológica, la cual es una medida de qué tan bien sobreviven y se reproducen los organismos, en términos de “reproducción”. La adecuación se puede entender como el número promedio de descendientes que deja un individuo, con un genotipo y por lo tanto con un fenotipo en particular, en comparación con otros de la misma población.

Para que se genere la adecuación son necesarios tres elementos en los individuos de una población: la supervivencia, alcanzar la edad reproductiva, la capacidad del organismo para atraer a una pareja y el número de descendientes producidos por apareamiento. Por lo tanto, un organismo que sobrevive por muchos años, pero nunca atrae exitosamente a una pareja o no tuvo descendencia, tendría una adecuación de cero.

La adecuación depende del medio ambiente

Una característica que favorece la selección natural es el ambiente. Por ejemplo, una mantis de color verde y con forma de hoja puede ser más apta que una parda en un paisaje selvático y con depredadores de vista aguda. Sin embargo, en un entorno de tonos pardos secos, como los pastizales, las mantis verdes no podrían evadir a sus depredadores. Si no hubiera

depredadores, ambos colores de mantis serían igual de aptos, pero el ambiente y los depredadores juegan un papel decisivo en la supervivencia, es decir, conforman lo que se llama presión de selección.

En muchos casos, un rasgo (fenotipo) puede tener efectos positivos y negativos sobre la adecuación. Algunas veces podrán sobrevivir los individuos, pero pueden presentar con estos rasgos, dificultades para atraer parejas potenciales. Dado que la adecuación es una función de la supervivencia y de la reproducción, el color representa una “ganancia” neta que depende de las presiones relativas a la depredación y a la preferencia de las parejas.

Actualmente la incidencia humana en la selección de ciertas características ha permitido no sólo manipular los procesos de selección a través de la reproducción en las especies, sino alterar la composición genética y lograr con esto la mejora de organismos a voluntad, con lo cual se obtiene un gran impacto en la sobrevivencia y en los beneficios biotecnológicos para el desarrollo humano (alimentos, medicamentos, producción industrial, etcétera). A este mecanismo le llamamos selección artificial y se ha reflejado en algunas técnicas, como el uso de medicamentos para controlar enfermedades, cirugías, el uso de equipo médico para sustentar la vida, la inseminación artificial, clonación, transgénicos, domesticación de especies, uso de antibióticos para evitar infecciones, etcétera.

Selección y resistencia a antibióticos

La capacidad de una bacteria para resistir los efectos de un antibiótico se produce por selección natural, cuando el antibiótico entra en contacto con una población bacteriana permite sólo la proliferación de aquellas bacterias que presentan una adaptación o genes que al expresarse, sintetizan proteínas capaces de anular la acción del antibiótico, como se observa en la Figura 1. Las cepas resistentes producen la proteína que evita el efecto del antibiótico por lo que el antibiótico no induce resistencia, solamente selecciona.

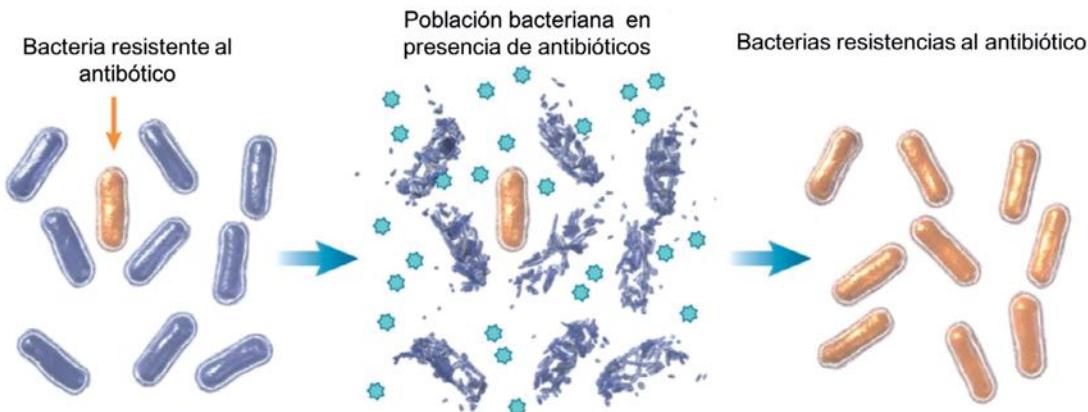


Figura 1. Esquema que representa el efecto de los antibióticos sobre una cepa bacteriana, donde una bacteria resistente al antibiótico sobrevive y puede dejar descendientes. Tomado de https://mostlyscience.com/wp-content/uploads/2014/05/F4.large_.jpg

La resistencia a los antibióticos ha sido por mucho tiempo una amenaza a la salud pública que pone en riesgo de muerte a pacientes por infecciones de gérmenes resistentes. En países como España, se consume 90% de antibióticos por infecciones de atención primaria y de éstas el 33% pertenecen a infecciones de vías respiratorias en adultos con un incremento del 50% en la población infantil.

En el sentido propio de la evolución, las mutaciones y la ganancia de nuevos genes en bacterias ha permitido generar una nueva versión de adaptaciones biológicas que les permite de manera aleatoria aumentar la frecuencia de éstas por selección natural para incrementar los cambios ventajosos, ya que las especies tienen más posibilidad de sobrevivir, reproducirse y transmitir estas mutaciones a su descendencia, situación que es precedente del cambio evolutivo.

Bajo este contexto el uso de la biología molecular ha permitido entender cómo las bacterias presentan genes o plásmidos que les confieren la capacidad de sobrevivir a los antibióticos; estos genes pueden ser insertados otras bacterias a través de un plásmido, así por transformación bacteriana, las bacterias adquieren esta resistencia a los antibióticos, lo que permite seleccionar aquellas capaces de sobrevivir y producir al mismo tiempo otras proteínas con impacto en la producción de medicamentos y enzimas capaces de servir en la mejora de la salud o en la industria.

Actividad 2. “The evolution of bacteria on a mega-plate Petri dish”

Instrucciones: Observa el siguiente video y después contesta el cuestionario que aparece en el Anexo 9.3. Realiza una discusión en plenaria de tus respuestas.



<https://www.youtube.com/watch?v=rrfJEZ3m1Tc>

Actividad 3. Obtención de un plásmido.

Modificado de Vargas y Pérez (2005).

Las técnicas de biología molecular y la obtención de DNA Recombinante han permitido clonar o introducir secuencias de DNA al interior de una bacteria por medio de vectores llamados plásmidos, que son propios de estos organismos. El principio básico para unir DNA de diferentes organismos se debe al uso de las enzimas de restricción y de la DNA

ligasa. Las enzimas de restricción hacen cortes específicos, cohesivos y romos con lo cual producen extremos sobresalientes de cadena sencilla, cuando dos cadenas tienen extremos complementarios, la enzima DNA ligasa permite la unión de diferentes segmentos de DNA para formar una sola cadena o fragmento.

Al introducir genes de cualquier organismo en bacterias, estas últimas serán capaces de adquirir las nuevas adaptaciones introducidas o expresar proteínas específicas en su medio de cultivo; esta situación puede ser observable directamente en las bacterias a nivel de factores de selección, como los antibióticos, y posteriormente se pueden aislar los productos o proteínas producidas.

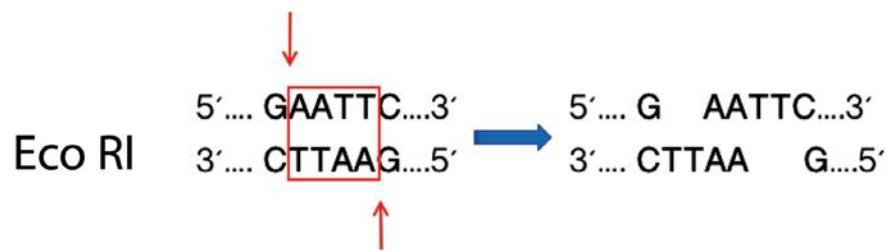
En el Anexo 9.4 encontrarás los materiales que se requieren para la realización de esta actividad lúdica. Además se requiere de:

Materiales:

- Tijeras.
- Cinta adhesiva.
- Lápices de colores.
- Plásmido con una secuencia de resistencia a la ampicilina.
- Secuencia de DNA con un gen que codifica para una proteína fluorescente.

Procedimiento

1. Colorea de azul el gen de resistencia a la ampicilina, de rojo la parte restante del plásmido (vector), de amarillo la secuencia de DNA con un gen que codifica para una proteína fluorescente.
 2. Recorta por los bordes el plásmido y la secuencia de DNA con un gen que codifica para una proteína fluorescente.
 3. Corta con la enzima de restricción ECORI: a) el plásmido; b) la secuencia de DNA con un gen que codifica para una proteína fluorescente, sigue las instrucciones en función de la enzima de restricción. Recuerda que esta enzima reconoce una secuencia particular del DNA.
- I. Localiza la secuencia de corte en la secuencia de DNA con un gen que codifica para una proteína fluorescente y corta en esos sitios, como en el siguiente ejemplo:



- II. Localiza la misma secuencia de corte siguiendo el ejemplo anterior, pero ahora en el plásmido que contiene el gen de resistencia al antibiótico.
- III. Ahora tienes el gen que codifica para una proteína fluorescente, coloca en ambos extremos de las cadenas un pedazo de cinta adhesiva (extremos pegajosos).
4. Abra la cadena del plásmido y une el gen de la proteína fluorescente.
 5. Revisa que las secuencias de bases sean las correctas.
 6. Presenta en equipo el nuevo plásmido generado por la adición del gen de proteína fluorescente y desarrolla una explicación del contexto técnico para su creación, utilizando los principios básicos de la técnica de DNA recombinante.

Con este procedimiento se ha construido un plásmido bacteriano con resistencia a antibiótico (ampicilina) y producción de una proteína fluorescente. Para continuar con la técnica de DNA recombinante sólo falta introducirlo en una bacteria, para que ésta pueda pasar por un factor de selección (uso de antibiótico ampicilina) y mediante su desarrollo en medios de cultivo produzca la proteína fluorescente.

Cierre

Actividad experimental. **Resistencia a antibióticos en bacterias transformadas**

Objetivo

- Comprobar que con la inserción de un plásmido con genes de otra especie en *E. coli* es posible observar un proceso de selección artificial en cultivos sometidos a antibiótico.

Materiales y equipo

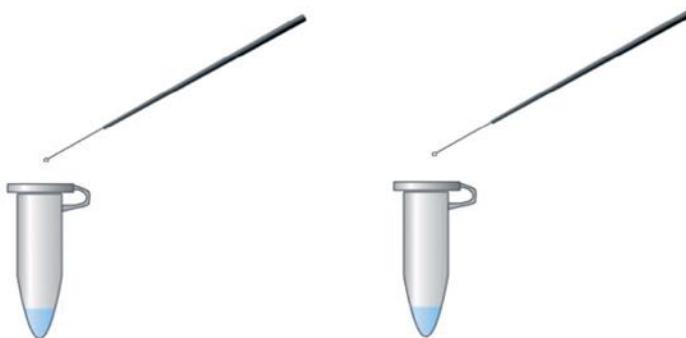
Laboratorio	Reactivos	Material biológico
<ul style="list-style-type: none"> • Gradilla • Mechero • 2 microtubos de 1.5 ml, estériles • 1 vaso de precipitados 100 ml. • Cajas petri • Guantes • Cubrebocas • Asas de siembra desechables 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 Caja de Petri con medio LB-agar • 3 Cajas de Petri con medio LB-agar con ampicilina a distintas concentraciones cada una (2.5, 5 y 25 ug/ml) • Solución de cloro al 10% • Hielo • Medio líquido L.B. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cultivo bacteriano de <i>E. coli</i> • Cultivo bacteriano de <i>E. coli</i> transformadas con el plásmido pGLO

Previo

Un día antes de la actividad, sembrar bacterias *E. coli* transformadas con pGLO y no transformadas, en tubos de 1.5 ml con 1 ml de medio líquido LB, e incubar a 37 °C toda la noche (recuerda etiquetar los tubos). Revisa el **Anexo 2.4** (preparación de soluciones y material microbiológico) de la secuencia “Síntesis de proteínas” para preparar los reactivos y materiales a emplear.

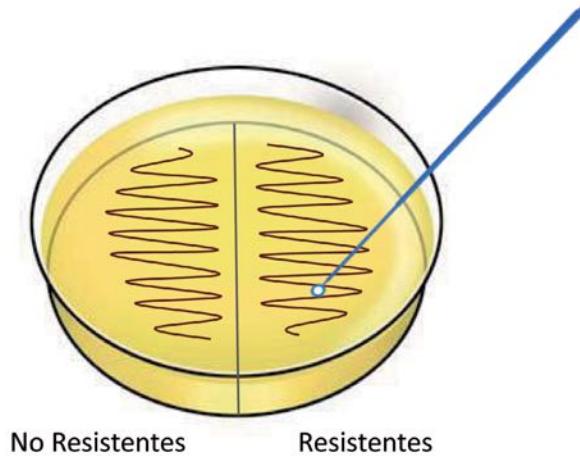
Procedimiento

1. Preparar una solución de hipoclorito de sodio al 10 por ciento. La mesa de trabajo se limpiará con un trapo humedecido de esta solución. Se coloca solución de hipoclorito de sodio en un vaso de precipitado para la disposición de los desechos.
2. Se colocan guantes y cubrebocas, se encienden mecheros para la generación de un ambiente estéril.
3. En este momento ya se cuenta con tubos de cultivos de *E. coli* (transformadas¹ y no transformadas).
4. Con un marcador indeleble pinta una línea a la mitad de cada una de las cuatro cajas que contienen medio agar-LB (1 caja) y medio agar LB con ampicilina a diferentes concentraciones (3 cajas), por la parte externa de la base de la caja.
5. En una mitad de la caja petri anotar “resistentes” y en la otra “no resistentes”. Poner las iniciales o el número de equipo a cada caja.
6. En el siguiente paso, vamos a sembrar las bacterias en las cajas de cultivo, iniciaremos con la caja de cultivo sin antibiótico y después repetiremos el proceso con las otras tres cajas. Usando un asa de siembra estéril, tomar una muestra del cultivo líquido de *E. coli* “no resistentes” (tubo) y esparcir las bacterias por la mitad correspondiente de la caja, después usaremos otra asa y tomaremos del cultivo de *E. coli* “resistentes” y sembraremos en la otra mitad.

*E. coli* “no resistentes” (tubo)*E. coli* “resistentes” (tubo)

¹ Las bacterias transformadas contienen un gen de resistencia al antibiótico ampicilina y un gen para una proteína fluorescente.

7. Tapar las cajas y dejarlas sobre la mesa por 15 minutos y posteriormente colocarlas boca abajo en una incubadora a 37 °C por un día o más.
8. Al día siguiente, retirar las cajas de la incubadora y observar el crecimiento bacteriano.



NOTA: Se utilizan bacterias E. coli de las cepas DH5- α . o BL21DE3. Estas bacterias permiten la expresión del gen de proteína fluorescente que se encuentra en el plásmido que se emplea para transformar a las bacterias E. coli. Para la actividad se utilizará un cultivo líquido de bacteria E. coli sin transformar (no resistentes), para lo cual se inocularán 10 ml de medio LB con una colonia de una caja con un cultivo. Si se cuenta con bacterias transformadas (resistentes) sólo se hace un cultivo líquido inoculando 10 ml de medio LB, con el antibiótico correspondiente. Si no se cuenta con bacterias transformadas, realizar la transformación, al menos dos días anteriores a la realización de esta práctica (ver actividad de transformación bacteriana).

Instrucción: En función de la actividad experimental realizada, las lecturas y las actividades que has llevado a cabo, ahora podrás realizar un análisis de tus resultados y contestar el cuestionario relacionado, en los formatos del Anexo 9.5.

Actividad de cierre

Instrucciones: Con la tabla (RA-P-RP) que contestaste en equipo al inicio, responde la última columna (RP). ¿Existen diferencias en las respuestas antes y después de haber realizado las actividades? Discútelo con tus compañeros en plenaria.

Literatura consultada

Vargas, C. A. y Pérez, D. S. (2005). *Ingeniería genética*. Curso “Biología Didáctica”. DGDC UNAM.

Las enzimas de restricción y la DNA ligasa. Digestión con enzimas de restricción. Extremos cohesivos y extremos romos. Reacciones de ligación.

Página web de consulta: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/restriction-enzymes-dna-ligase>

Coria, A. G. y Paredes, R. P. (2009). *La selección artificial*. Revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana. Volumen XXII Número 3.

Castellano, C. J. L. (2017). *Antibióticos: selección y resistencias*. Nota Informativa Farmacoterapéutica, Servicio Canario de Salud. Gobierno de Canarias.

The evolution of bacteria on a “Mega-Plate” Petris Dish. Harvar Medical School. (2016). Disponible en línea en: <https://www.youtube.com/watch?v=plVk4NVIUh8>

Anexo 9.1

Cuestionario RA-P-RP

Instrucciones: Responde las preguntas, sólo en la columna de la izquierda.

RA (Respuesta anterior)	P (Pregunta)	RP (Respuesta posterior)
	¿Qué es la recombinación genética?	
	¿Qué entiendes por ancestría común?	
	¿Cuáles son las evidencias moleculares de la evolución?	
	Da algunos ejemplos de adaptación	

Anexo 9.2

Cuestionario. Lectura “Osamu Shimomura y la medusa de cristal” y cuestionario

Instrucciones: Despues de dar lectura a “Osamu Shimomura y la medusa de cristal”, contesta lo siguiente en equipo:

1. ¿Qué funciones les confieren las proteínas fluorescentes a los organismos que viven en las profundidades abisales?
2. ¿Cómo es que se llegó al aislamiento de la luciferina en su contexto de purificación?
3. ¿Cuál es el principio fisiológico que permite a la medusa controlar la producción de luz?
4. Describe cuáles son las aplicaciones de la proteína fluorescente en el campo de la investigación.
5. ¿Por qué es posible la recombinación del genoma de la medusa con otras especies?

Anexo 9.3

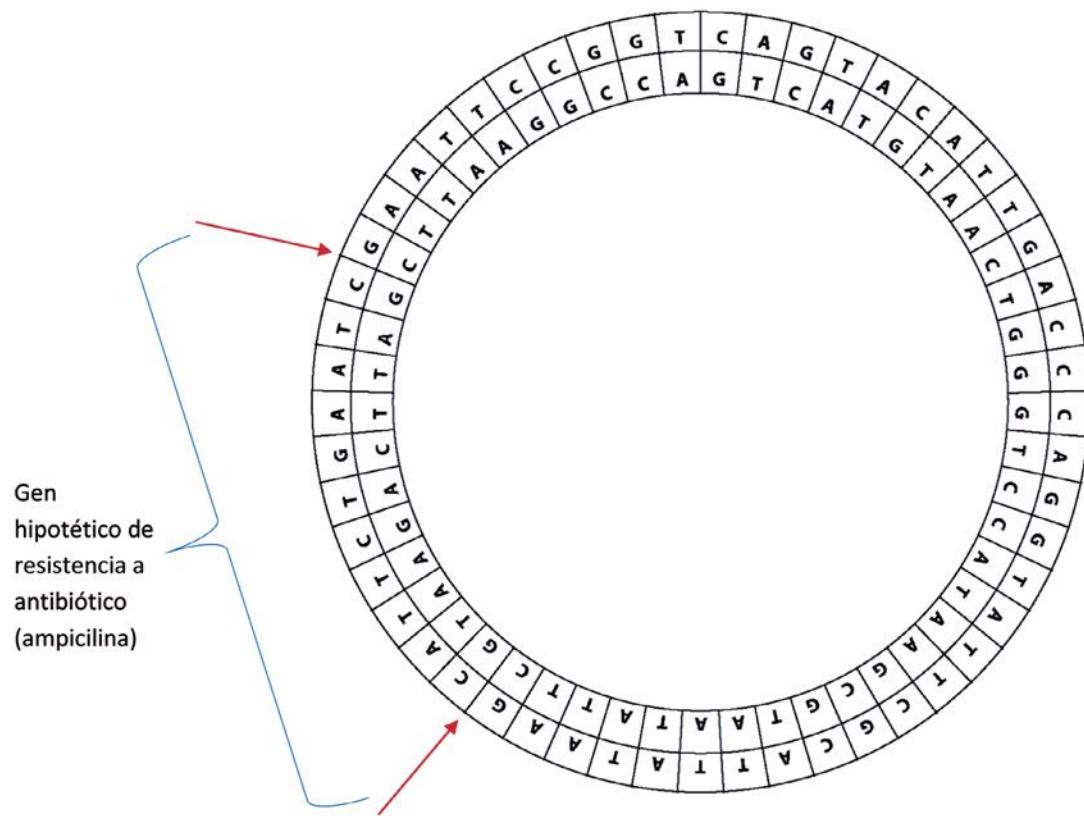
Actividad 1. “The evolution of bacteria on a mega-plate Petri dish”

Instrucciones: Observa el siguiente video:
<https://www.youtube.com/watch?v=rrfJEZ3m1Tc> y después contesta lo siguiente:

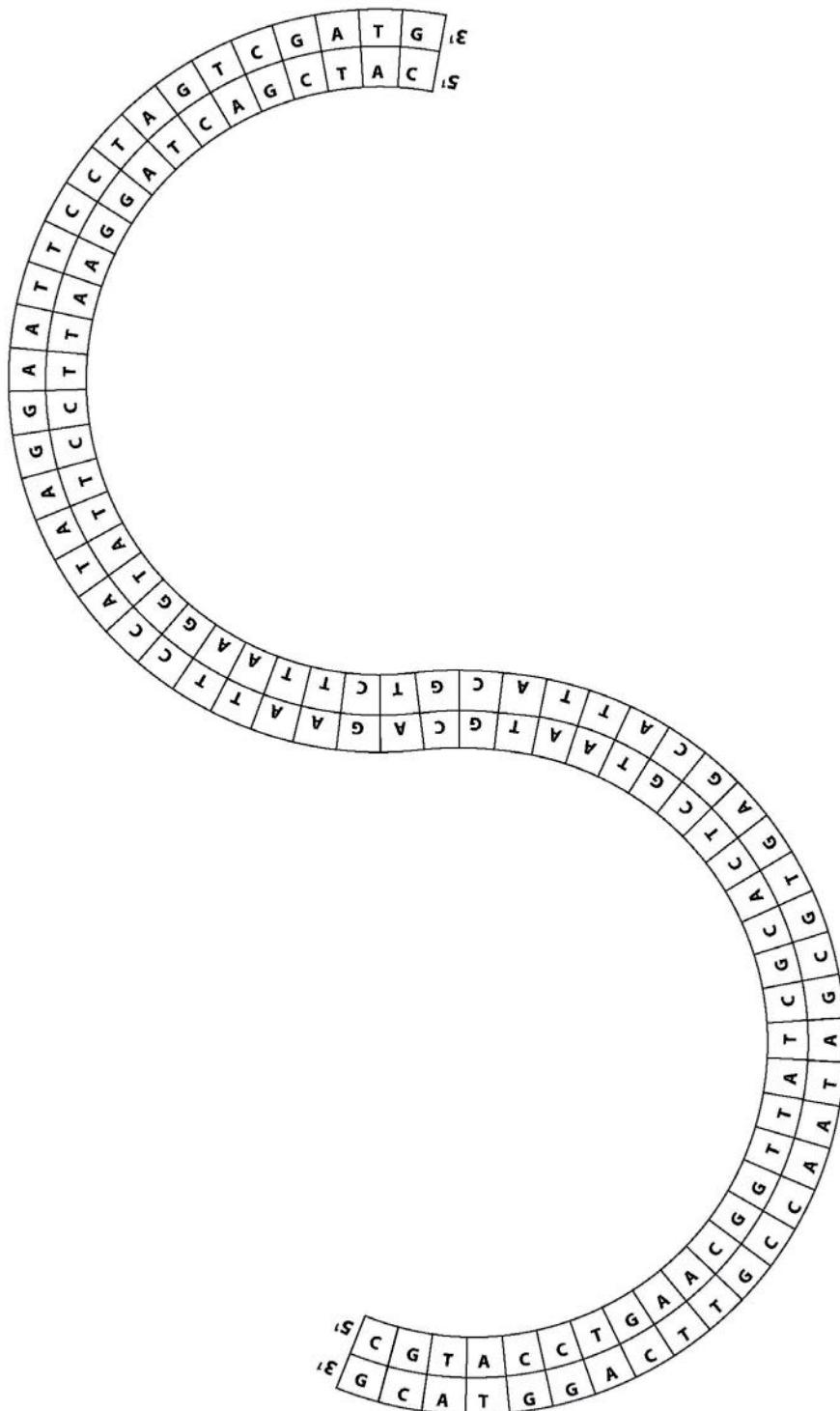
1. Las primeras células que se inoculan al inicio (lado izquierdo y derecho), ¿qué características presentan respecto a la resistencia a antibióticos?
2. ¿Cuál es la finalidad de colocar diferentes concentraciones de antibióticos?
3. Las bacterias presentan mutaciones a lo largo del tiempo, ¿éstas son producidas al azar o por algún factor o presión del ambiente?
4. ¿Las bacterias adquieren adaptaciones o ya las tienen?
5. Describe cómo es el crecimiento de las bacterias a través de la placa rectangular de agar con diferentes concentraciones de antibiótico

Anexo 9.4

Recortable. **PLÁSMIDO BACTERIANO** con gen hipotético de resistencia a ampicilina (vector)



SECUENCIA DE DNA con un gen hipotético que codifica para una proteína fluorescente.



Anexo 9.5

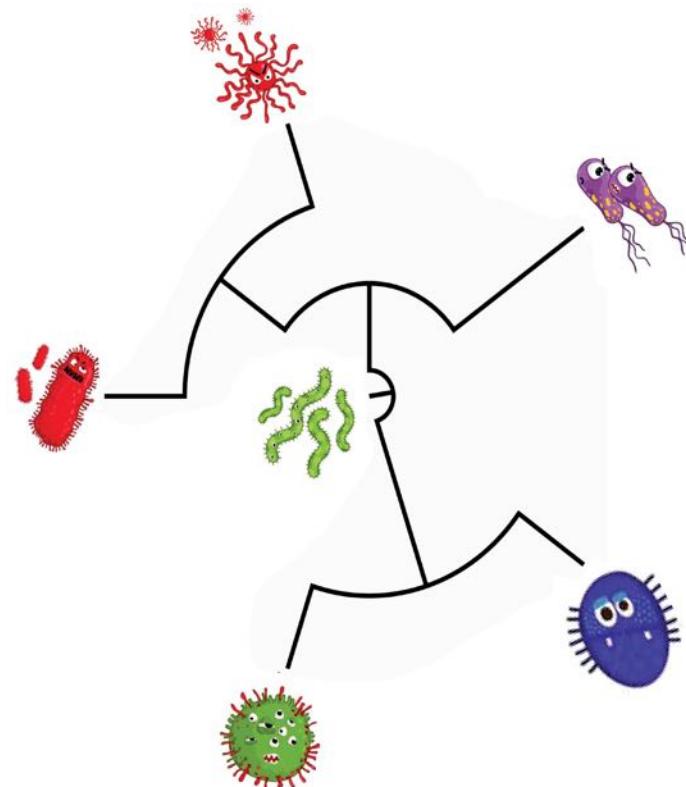
Actividad experimental. Resistencia a antibióticos en bacterias transformadas

Instrucciones: De acuerdo con tus observaciones, completa la siguiente tabla del crecimiento bacteriano y contesta las preguntas al final de la tabla. Analiza los resultados y comenta tus respuestas en plenaria.

Conc. de ampicilina	Dibuja tus resultados de la caja	# de colonias visibles		Presenta fluorescencia		Explicación
		No resistentes	Resistentes	No resistentes	Resistentes	
0 mg/l						
2.5 mg/l						
5 mg/l						
25 mg/l						

1. ¿Qué relación existe entre la actividad experimental realizada y el video que observaste al inicio?
2. ¿Qué evidencias te permiten explicar la adaptación de las bacterias a medios de cultivos ricos en antibiótico y qué relación tiene con la selección natural?
3. ¿Por qué es posible que en los plásmidos bacterianos se puedan incorporar genes de otras especies?, ¿qué implicación evolutiva tiene este proceso?

El pariente más cercano



Evidencias de la evolución: comparación de secuencias de DNA en bacterias

Elaboraron:

Hernández Carbajal Luz Angélica
Luna Román Celso Miguel

Colaboraron:

Bautista Acevedo Marco Antonio
Bernal Enríquez Oscar
Centeno Cruz Federico
Martínez Ortiz Leticia
Mejía García Martha Elvira
Ramírez Aguilar Eva Cristina
Serrano Reyes Gabriela

BIOLOGÍA II (PEA, 2016). Primera unidad

¿Cómo se explica el origen, evolución y diversidad de los sistemas vivos?

Propósito

Al finalizar la unidad el alumno identificará los mecanismos que han favorecido la diversificación de los sistemas vivos, a través del análisis de las teorías que explican su origen y evolución, para que comprenda que la biodiversidad es el resultado del proceso evolutivo.

Tema 2. Evolución biológica

Subtema: Evidencias moleculares de la evolución

Aprendizajes

Declarativos	<ul style="list-style-type: none"> • Aprecia las evidencias moleculares que apoyan las ideas evolucionistas. • Reconoce que las secuencias de DNA son útiles para realizar comparaciones y plantear hipótesis de relaciones de parentesco evolutivo.
Procedimentales	<ul style="list-style-type: none"> • Aplica habilidades de bioinformática al utilizar secuencias de DNA del genbank y herramientas en línea (MUSCLE) para producir alinear secuencias y producir árboles filogenéticos. • Aplica habilidades de comunicación oral y escrita para la comprensión de las ideas evolucionistas.
Actitudinales	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra una actitud crítica y reflexiva ante la relación ciencia-tecnología-sociedad-ambiente.

Actividades a realizar:

Apertura

- Cuestionario RA-P-RP.

Desarrollo

- Actividad 1. “Creación de árboles filogenéticos a partir de secuencias de DNA”.
- Lectura. Construcción de árboles filogenéticos. ¿Relaciones de parentesco?
- Actividad 2. Alineación de secuencias con herramientas de bioinformática (MUSCLE).

Cierre

- Actividad 3. Obtención de un árbol filogenético y análisis
- Cuestionario RA-P-RP.

Apertura

Cuestionario RA-P-RP

Instrucción: En el Anexo 10.1 encontrarás el formato del cuestionario. Contéstalo utilizando sólo la columna izquierda, RA (respuesta anterior).

Desarrollo

Actividad 1. “Creación de árboles filogenéticos a partir de secuencias de DNA”

InSTRUCCIONES: Observa el siguiente recurso (Click and learn) con ayuda de tu profesor, el cual te guiará durante el mismo. Posteriormente, lee el texto que se presenta a continuación y contesta en el formato del Anexo 10.2 el cuestionario.

http://media.hhmi.org/biointeractive/click/spanish/Phylogenetic_Trees/01.html?_ga=2.185925674.202083685.1531503543-963917255.1498187011

Lectura.

Construcción de árboles filogenéticos. ¿Relaciones de parentesco?

El análisis filogenético es un método que “se fundamenta en el principio de la herencia con modificación, que implica la transmisión vertical de los caracteres” (Espinoza y Llorente, 1993), los caracteres pueden ser morfológicos o moleculares y permiten generar hipótesis y reconstruir las relaciones filogenéticas (genealogías) entre los organismos (Forey *et al.*, 1994), elucidando así los patrones de ancestría común entre las especies. Es decir, los miembros de un grupo comparten una historia evolutiva común y están estrechamente relacionados entre ellos. Estos grupos son reconocidos por compartir características derivadas (sinapomorfías) que han sido generadas a través de diversos procesos de especiación y que no están presentes en su ancestro inmediato (Llorente, 1994).

Intentar elucidar la evolución molecular de un grupo de organismos, permite examinar la manera en que los nucleótidos cambian con el tiempo dentro de los grupos, es decir, la

dirección y frecuencia relativa del cambio. También es posible comparar a los descendientes de un solo antepasado para proponer modelos de origen y extinción en estos grupos o para observar el tamaño y diversidad de los grupos hermanos (Lipscomb, 1998).

Se parte de tres suposiciones básicas importantes:

- Los organismos agrupados en el taxón a estudiar deben conformar un grupo monofilético, es decir, deben estar relacionados por un ancestro común.
- El grupo, por lo tanto, ha evolucionado y transformado sus caracteres (producto de la especiación), formando linajes que tienen en común sinapomorfias. Los linajes se pueden representar en un diagrama de ramificación, como los patrones de bifurcación (árboles).
- Por lo que los caracteres (nucleótidos), si se conservan, son nombrados caracteres primitivos, se pierden o aparecen a lo largo de la evolución de ramas del árbol, pueden ser entendidas como convergencias o paralelismos (homoplasias) o autoapomorfias (caracteres derivados exclusivos de los grupos).

Para saber cuáles han sido los cambios en los caracteres y el orden de transformación de éstos, es necesaria la comparación de secuencias de DNA (nucleótidos) de un mismo gen de los organismos a analizar en algunos casos estas comparaciones se realizan con secuencias de organismos de un taxón hermano (grupo externo) (Hernández, 2007).

La ciencia que investiga las relaciones de parentesco evolutivo se llama sistemática filogenética; para esta ciencia es vital encontrar caracteres útiles en el rastreo de casos de descendencia con modificación para identificar grupos monofiléticos, es decir, especies que están relacionadas con un solo ancestro común. Obviamente, los caracteres que serán de mayor utilidad son los homólogos, es decir, los caracteres que suponemos se encuentran entre los grupos de comparación y que pudieron haber sido heredados desde un ancestro más antiguo, esto convierte al grupo de análisis en un grupo monofilético (proviene de un mismo ancestro común) (Hernández, 2007). Mientras que el uso de caracteres no homólogos será causa de errores en los árboles filogenéticos al inferir relaciones de parentesco erróneas. Existen tres métodos comúnmente utilizados en estudios de sistemática filogenética: a) la Cladística, usando el principio de Máxima Parsimonia (MP); b) Maximum Likelihood (ML) y la c) Inferencia Bayesiana (IB). En recientes años se han utilizado con frecuencia el método Neighbor-Joining (NJ), el cual no es un método filogenético como tal el objetivo fundamental de este método es poder identificar individuos cuando se desconoce la especie a la que pertenecen. Esto es factible ya que la variabilidad dentro de la especie es menor que la variación existente entre especies diferentes. Luego de secuenciar el fragmento es necesario analizar las secuencias entre los diferentes organismos a analizar con ayuda del algoritmo NJ, creado por Saitou & Nei (1987) y consiste en generar un único “árbol filogenético” final, que refleja el grado de similitud entre los grupos analizados, el cual, según los autores, no necesariamente será el “árbol verdadero” (Peña, 2011).

Como resultado de los recientes avances tecnológicos es relativamente rápido y fácil determinar, obtener y, por qué no, consultar en una base de datos una secuencia de DNA. Pero, ¿qué puede decírnos nuestra secuencia de DNA sobre nuestra historia evolutiva?, pues, como se dijo anteriormente, la comparación de DNA arroja mucha información. La

bioinformática comprende la aplicación de tecnologías computacionales y de estadística en la gestión y análisis de datos biológicos, en este caso, las secuencias de DNA.

Actividad 2. Alineación de secuencias con herramientas de bioinformática (MUSCLE)

La acumulación de mutaciones provoca que las secuencias de DNA cambien a través de generaciones. Sabemos por estudios de secuenciación de DNA que las mutaciones ocurren aleatoriamente a un ritmo muy lento y son transmitidas de padres a hijos. De este modo, si asumes que todos los organismos tienen un ancestro común, puedes utilizar las diferencias en secuencias homólogas para medir el tiempo que ha pasado desde que los organismos divergieron. En otras palabras, cuanto más tiempo haya pasado desde que dos especies divergieron de un ancestro común, más diferentes serán sus secuencias de DNA. Las secuencias homólogas, es decir, aquellas secuencias en dos organismos que tienen un origen común, es necesario alinearlas y compararlas para conocer el grado de similitud entre estas de dos secuencias. Hay que tener en cuenta que las diferentes regiones del DNA --regiones codificantes y no codificantes-- evolucionan a diferentes velocidades. En general, las regiones codificantes evolucionan más lentamente, ya que una mutación que provoca un cambio en una proteína es generalmente más costosa para el organismo es menos probable sobrevivir y dejar descendencia (Koslowski, 2010).

En el mundo de la bioinformática existen distintas instituciones como la European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), que ayuda a los científicos a realizar análisis de datos (*big data*) como las secuencias de DNA y de aminoácidos, explotando así la información para hacer descubrimientos en beneficio de la humanidad (EMBL-EBI, 2018). En particular, MUSCLE (Multiple Sequence Alignment) es una herramienta en internet que sirve para “alinear” las secuencias de DNA, es decir, organizarlas para encontrar el patrón de similitud entre todas ellas. Este alineamiento nos podría dar una idea del cambio evolutivo en un gen particular, entre distintas especies. Además, MUSCLE nos permite generar una filogenia que nos indica qué especies están más relacionadas entre sí.

Análisis de secuencias DNA 16S-ribosomal de seis bacterias con la herramienta en línea MUSCLE (Multiple Sequence Alignment) de EMBL-EBI

Instrucción: Realiza lo que se te solicita.

1. Descarga el archivo del siguiente ejercicio, el cual contiene secuencias de 6 bacterias, la liga del archivo: <https://drive.google.com/open?id=1iqmVrc5zzOx5eVkvB0Atibuz82g9lsJD>
2. Si lo prefieres puedes descargar las secuencias directamente de GenBank utilizando el número de referencia de la secuencia en cuestión. Para acceder al GenBank utiliza la siguiente liga: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Las seis especies de bacterias son:

Especie	NCBI secuencia de Referencia
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	NR_043183.1
<i>Escherichia coli</i>	NC_000913.3
<i>Halobacterium salinarum</i>	NC_010364.1
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	NZ_CP020364.1
<i>Haloferax volcanii</i>	NC_013967.1
<i>Metallosphaera hakonensis</i>	NZ_CP029287.1

3. Si prefieres puedes descargar las secuencias directamente del GenBank asegúrate de realizar los siguientes pasos:

a) Pega en la barra del buscador de la página el número de referencia

b) Cuando aparece la información sobre la secuencia del organismo en cuestión, debes descargar la secuencia en formato FASTA, ya que MUSCLE reconoce este formato.

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide Advanced Search Help

GenBank Due to the size of this record, annotated features are not shown by default. Use "Customize view" section to change the display

Halobacterium salinarum R1 complete genome

NCBI Reference Sequence: NC_010364.1

FASTA Graphics

Go to: NC_010364

LOCUS NC_010364 2000962 bp DNA circular CON 07-APR-2017

DEFINITION Halobacterium salinarum R1 complete genome.

ACCESSION NC_010364

VERSION NC_010364.1

VERSION 00000000.1

DBLINK BioProject: PRJNA224116

BioSample: SAMRA13B275

Assembly: GCF_00069025.1

Change region shown

Customize view

Analyze this sequence Run BLAST

Pick Primers

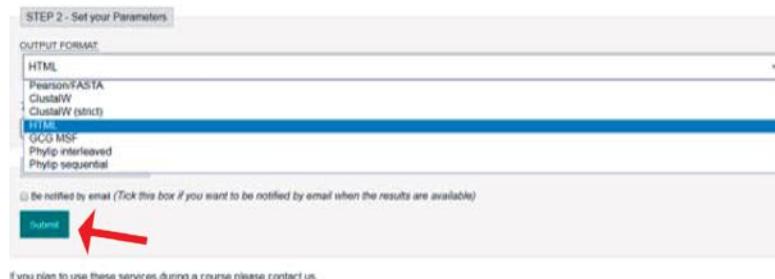
Highlight Sequence Features

Related information Assembly

4. Abre MUSCLE desde la siguiente liga: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>
5. Con el archivo que descargaste desde: <https://drive.google.com/open?id=1lqmVrc5zzOx5eVkvB0Atibuz82g9lsJD> súbelo a MUSCLE utilizando el botón “seleccionar archivo”.



6. Para alinear las secuencias de nuestro ejercicio, en el paso 2 “STEP 2- Set your Parameters”, selecciona el formato HTML. Para que la herramienta realice el análisis, darle clic al botón Submit del paso 3.



7. La herramienta te mostrará el alineamiento similar al de la imagen siguiente:

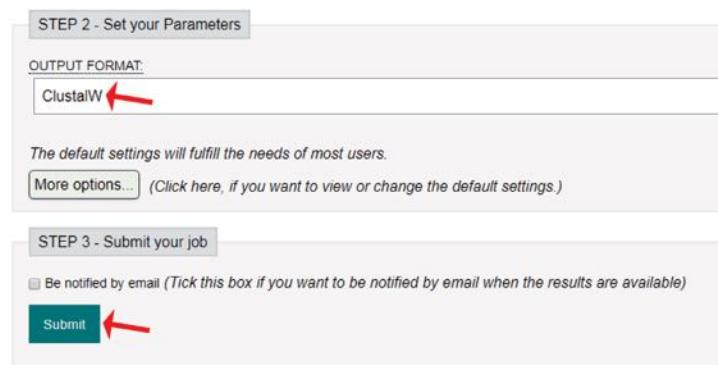
Results for job muscle-l20180713-061116-0918-93656848-p1m

Alignments Result Summary Submission Details

Download Alignment File

	Lactobacillus	Escherichia	Halobacterium	Haloferax	Sulfolobus	Metallosphaera
-gtttta-----ATCTTgggttcAAGaaCCGTg-cccggtggccTA-attttagatTTGATCnTgggtcAatttgAACCTg-ccggggccggccTATTCCGG-----TTGATCTGCCGGAGGtcATTGCTATGGGGTccgttttTTCCGG-----TTGATCTGCCGGAGGtcATTGCTATGGGGTccgtttt-GCCCCcgTTCCGG-----TTGATCTGCCGGAGGcc-CGACCCCTATCGGGGTAAGATActGGCCcaTTCCGG-----TTGATCTGCCGGAGGcc-CGATCGCTATGGGGTAAGATA

8. Retrocede en el navegador a la página principal de MUSCLE, si es necesario vuelve a cargar el archivo del ejercicio con las secuencias de las seis bacterias. Ahora cambia el formato del paso dos por CRUSTAL. Nuevamente darle clic al botón Submit del paso 3.



9. Para ver la comparación entre las especies, da clic en el botón Phylogenetic Tree.

Results for job muscle-I20180712-065614-0733-50416235-p1m

Alignments **Result Summary** **Phylogenetic Tree** **Submission Details**

[Download Alignment File](#) [View result with Java view](#) [Send to Simple Phylogeny](#) [Send to MView](#)

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

```

Lactobacillus      -----AGTTG-----ATCCTGGCTCAGGACGAACGCTG--GGGGCGTGCCCTA
Escherichia        -----AAATTGAAAGATTGATCATGGCTCAAGATTAAACGCTG--GGGGCGAGGCCCTA
Halobacterium     -----ATTCGG-----TTGATCCTGCCGGAGG-CCATTGCTATCGGAGTCGATT
Haloferax          -----ATTCGG-----TTGATCCTGCCGGAGG-TCATTGCTATTGGGGTCCGATT
Sulfobolus         -----CGCCCCGATTCCGG-----TTGATCCTGCCGGACCC-GAACCGCTATCGGGGTAGGGATA
Metallosphaera    CTGCCCTAATTCGG-----TTGATCCTGCCGGACCC-CGATCGCTATAGGGGTAGGGATA
*      *      ***   *      *      ***   *      *      *      *

```

Results for job muscle-I20180712-065956-0410-47458801-p1m

Alignments **Result Summary** **Phylogenetic Tree** **Submission Details**

Phylogenetic Tree

This is a Neighbour-joining tree without distance corrections.

Cierre

Actividad 3. Obtención de un árbol filogenético y análisis

Instrucciones: Despues de haber corrido las secuencias de DNA y obtener el árbol filogenético, copia de la pantalla de la PC el árbol generado y contesta el cuestionario. **Anexo 10.3.**

Cuestionario RA-P-RP

Instrucción: Contesta el cuestionario del **Anexo 10.1**; ahora utiliza sólo la columna derecha, RP (respuesta posterior). **Compara tus respuestas.**

Literatura consultada

Espinosa, O. D., y Llorente-Bousquets, J. E. (1993). *Fundamentos de biogeografías filogenéticas*. UNAM, México, D.F. (No. 574.9 E8)

Forey, P. L., Humphries, C. J., Kitching, I. J., Scotland, R. W., Siebert, D. J., and Williams, D. M. (1992). *Cladistics; A Practical Course in Systematics*. Clarendon Press, Oxford.

Hernández, C. L. A. (2007). *La filogenia del orden Dictyotales (Phaeophyceae), un análisis cladístico de los caracteres morfológicos*. México: UNAM, Ciencias del mar y Limnología. Tesis de Maestría en Ciencias del Mar y Limnología (Biología Marina).

Howard Hughes Medical Institute. (2011). *Colección de conferencias "Holiday Lectures on Science" Creación de árboles filogenéticos a partir de secuencias de ADN*. Acceso: 9/07/2018. Disponible en: <http://www.hhmi.org/biointeractivel/vlabs/index.html>

Madeira, F. P. Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P. Tivey A. R. N., Potter S. C., Finn R. D., Lopez, R. (2019). *The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019*. Nucleic Acids Res. DOI: 10.1093/nar/gkz268, Disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>

Kozlowski, C. (2010). *Bioinformatics with pen and paper: building a phylogenetic tree*. Bioinformatics, 7, 12. (EMBL-EBI, 2018).

Lipscomb, D. (1998). *Basics of cladistic analysis*. George Washington University.

Llorente-Bousquets, J. (1994). *Conceptos en cladismo*. Capítulo VII. J. Llorente-Bousquets y I. Luna-Vega (comps.). Taxonomía biológica. Ediciones Científicas Universitarias, UNAM, México, 117-141.

Bousquets LL. J. y I. Luna-Vega (comps.). (1994). *Taxonomía biológica*. Ediciones Científicas Universitarias, UNAM, México, 117-141.

Peña, C. (2011). *Métodos de inferencia filogenética*. Revista Peruana de Biología, 18(2), 265-267.

Saitou, N., y Nei, M. (1987). *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. Molecular biology and evolution, 4(4), 406-425.

Anexo 10.1

Cuestionario RA-P-RP

Instrucción: Contesta lo siguiente; utiliza sólo la columna izquierda, RA (respuesta anterior).

RA (Respuesta anterior)	P (Pregunta)	RP (Respuesta posterior)
	¿Cuáles son las evidencias de la evolución?	
	¿Qué es una relación de ancestría-descendencia y como la representarías?	
	¿Qué son las mutaciones puntuales y que implicaciones tienen en la historia evolutivas de los sistemas vivos?	

Anexo 10.2

Actividad 1. “Creación de árboles filogenéticos a partir de secuencias de DNA”

Instrucción: Después de observar el video y dar lectura, contesta el cuestionario.

1. ¿Cómo se utilizan las secuencias de DNA para inferir relaciones evolutivas?
2. ¿Cuál sería una ventaja de construir árboles filogenéticos utilizando comparaciones de DNA, en lugar de comparaciones de características anatómicas? Imagínate que tienes que comparar los caracoles de cono.
3. ¿Cómo ha afectado la biotecnología el proceso de construcción de árboles filogenéticos a partir de secuencias de DNA?
4. ¿Qué comparten los organismos que están relacionados evolutivamente?
5. Menciona dos tipos comunes de mutación:

6. ¿Qué significa comparar “manzanas con manzanas” en términos de las secuencias de DNA de organismos diferentes?
7. Describe qué son los SNP’s, las inserciones y las eliminaciones.
8. ¿Cuál es la importancia del alineamiento de las secuencias?
9. Define punto de ramificación (también llamado nodo) en un árbol filogenético y describe lo que representa.
10. ¿Qué es la raíz?
11. ¿Qué representa el nodo más cercano a la raíz?
12. Describe lo que representa un árbol filogenético sin raíz.

Anexo 10.3

Actividad 3. Obtención de un árbol filogenético y análisis

Instrucciones: Después de haber corrido las secuencias de DNAY obtener el árbol filogenético, copia de la pantalla de la PC el árbol generado y contesta el cuestionario.

1. Pega el árbol generado por MUSCLE en el siguiente recuadro.



2. Del árbol obtenido, indica qué especies se encuentran más relacionadas entre sí y por qué.

Cuestionario

3. ¿Qué regiones del DNA deberías utilizar para comparar los organismos que están estrechamente relacionados?
4. ¿Qué tipo de genes deberías utilizar para comparar organismos que están evolutivamente distantes unos de otros?

5. ¿Qué deberías hacer si estás comparando dos secuencias, pero una de ellas presenta huecos debido a eliminaciones de algunos nucleótidos (o inserciones en la otra secuencia)?
 6. ¿Puedes pensar en las razones por las que este método de simple comparación del número de diferencias entre nucleótidos podría no funcionar si estás comparando organismos que son muy diferentes?
 7. Te das cuenta de que una vez alineadas las secuencias de DNA, es posible ver las diferencias o similitudes. ¿Qué significan los colores turquesa, gris, blanco y los guiones? Analiza el resultado de la alineación de secuencias.

El ATC del Genoma

Estrategias Didácticas de Biología Molecular para el Bachillerato Universitario

Este texto fue editado por la Escuela Nacional
Colegio de Ciencias y Humanidades, en octubre de 2020.

Se usó en la composición el tipo Adobe Caslon Pro 11.5 pts.