



La secuenciación de genomas

El genoma es el conjunto del material hereditario de un organismo, es decir, todas las instrucciones genéticas para el desarrollo y funcionamiento del mismo y que son transmitidas de generación en generación, de padres a hijos (ver Cuaderno n° 55). En él, además de los genes propiamente dichos, se incluyen regiones espaciadoras, regiones reguladoras, genes que dejaron de ser funcionales y muchas otras secuencias de función o papel todavía desconocido. Además, el genoma es depositario de los cambios (mutaciones) que se han acumulado a lo largo de la historia evolutiva de la especie y de todas sus antecesoras. En consecuencia, en el genoma se almacena información de inmediata utilidad para el organismo y otra que sirve como registro histórico de su especie y ancestros.

¿Para qué se estudian los genomas?

El estudio de los genomas de organismos de distintas especies y su comparación, permite obtener claves para comprender más de 3000 millones de años de evolución. La secuenciación de genomas de plantas y animales domésticos podría conducir a nuevos avances en la mejora agronómica y ganadera (ver Cuaderno n° 6, 9). También permitiría numerosas aplicaciones médicas (Cuaderno n° 21, 51, 71), y nuevos enfoques dentro de la biotecnología y la biología industrial.

Los primeros pasos

La secuenciación de ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un fragmento de esta molécula (ver Cuaderno n° 3, 32, 65, 67). La primera generación de técnicas para secuenciar el ADN empezó en 1975 con la metodología de **Sanger y Coulson**, llamada “más y menos” (del inglés, “plus and minus”), la cual necesitaba clonar cada fragmento inicial de “lectura” para producir un ADN de cadena simple.

En 1977, **Maxam y Gilbert** publicaron la metodología de secuenciación de ADN mediante degradación química. Este método estaba basado en la modificación química y posterior rotura del ADN (Figura 1), y empezó a ser el método de secuenciación más utilizado porque permitía utilizar un ADN purificado sin necesidad de clonarlo.

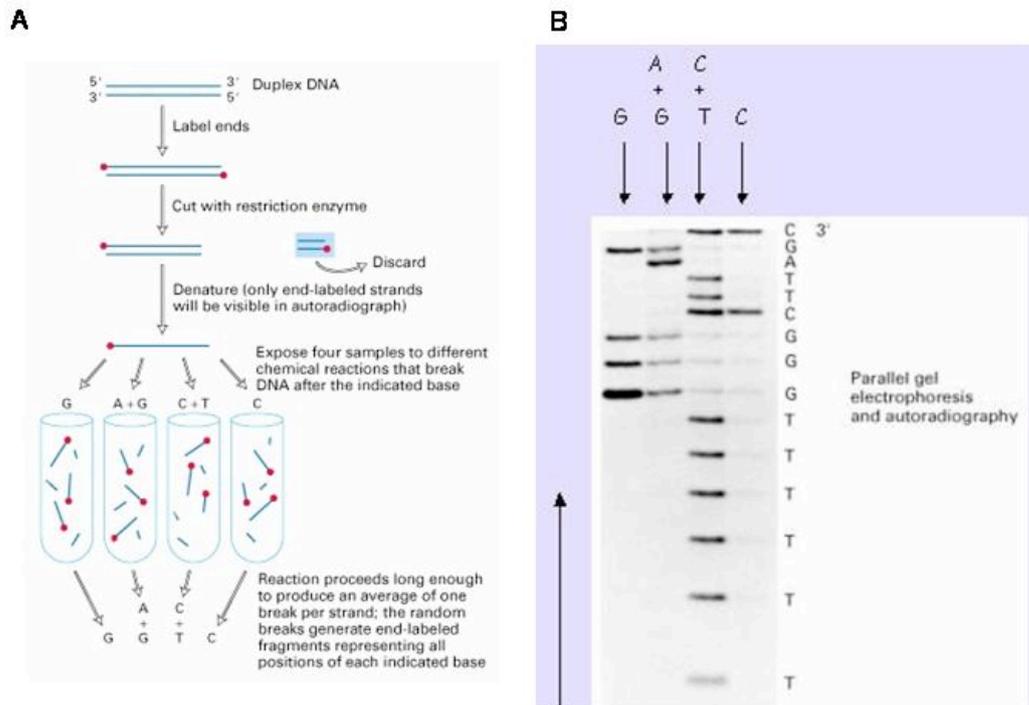


Figura 1: método de secuenciación de Maxam y Gilbert (1977)

Fuente: <http://homepages.strath.ac.uk/~dfs99109/BB211/MGSeq.html>

Explicación de la figura: (A) el método requiere marcaje radiactivo en uno de los extremos y la purificación del fragmento de ADN que se desea secuenciar. El tratamiento químico genera rupturas en una pequeña proporción de uno o dos de los cuatro nucleótidos en cada una de las cuatro reacciones (G, A+G, C, C+T). Luego, se realiza el tratamiento con piperidina a 90°C para clivar el enlace azúcar-fosfato en los sitios correspondientes. De ese modo se genera una serie de fragmentos a partir del extremo marcado radiactivamente hasta el primer lugar de corte en cada molécula. (B) Los fragmentos posteriormente se separan por tamaño mediante electroforesis en gel, separando los productos de las cuatro reacciones en cuatro calles del gel distintas. Para visualizar los fragmentos generados se hace una autoradiografía, lo que provee una imagen de una serie de bandas oscuras correspondientes a los fragmentos marcados con el radioisótopo. A partir de la lectura de estos fragmentos, desde abajo (fragmentos más pequeños) hacia arriba (fragmentos más grandes), se puede inferir la secuencia de ADN de interés.

En 1977 **Sanger** publicó su método de secuenciación de ADN por síntesis química llamado *método de terminación de la cadena*, el cual se convirtió en el método más utilizado en los siguientes 30 años. En este método se utilizan pocos reactivos tóxicos y cantidades menores de radiactividad que en el método de Maxam-Gilbert, y su característica particular es el uso de

didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) como terminadores de la cadena de ADN.

Los ddNTPs son desoxinucleótidos de las 4 nucleótidos diferentes (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) que carecen de uno de los grupos hidroxilo, de manera que cuando uno de estos nucleótidos se incorpora a una cadena de ADN en crecimiento, esta cadena no puede continuar elongándose ya que la enzima ADN polimerasa necesita un extremo 3' OH para añadir el siguiente nucleótido, y el ddNTP incorporado carece de este grupo hidroxilo (Figura 2). Al terminar la elongación de la cadena, se producen varios fragmentos de ADN de longitud variable, los cuales son desnaturalizados por calor y separados por tamaño (con una resolución de un solo nucleótido) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida - urea. Cada una de las cuatro reacciones de síntesis se corre en calles individuales (A, T, G y C) y se visualizan las bandas de ADN mediante autoradiografía o luz ultravioleta. Las bandas obtenidas en el gel corresponden a los fragmentos de ADN de diferentes longitudes. Una banda en una calle indica un fragmento de ADN que es el resultado de una terminación de la cadena tras la incorporación de un didesoxinucleótido (ddATP, ddGTP, ddCTP o ddTTP). El nucleótido terminal puede ser identificado de acuerdo al didesoxinucleótido que se añadió en la reacción que dio lugar a esa banda. Las posiciones relativas entre las cuatro calles se utilizan entonces para leer (de abajo a arriba) la secuencia de ADN.

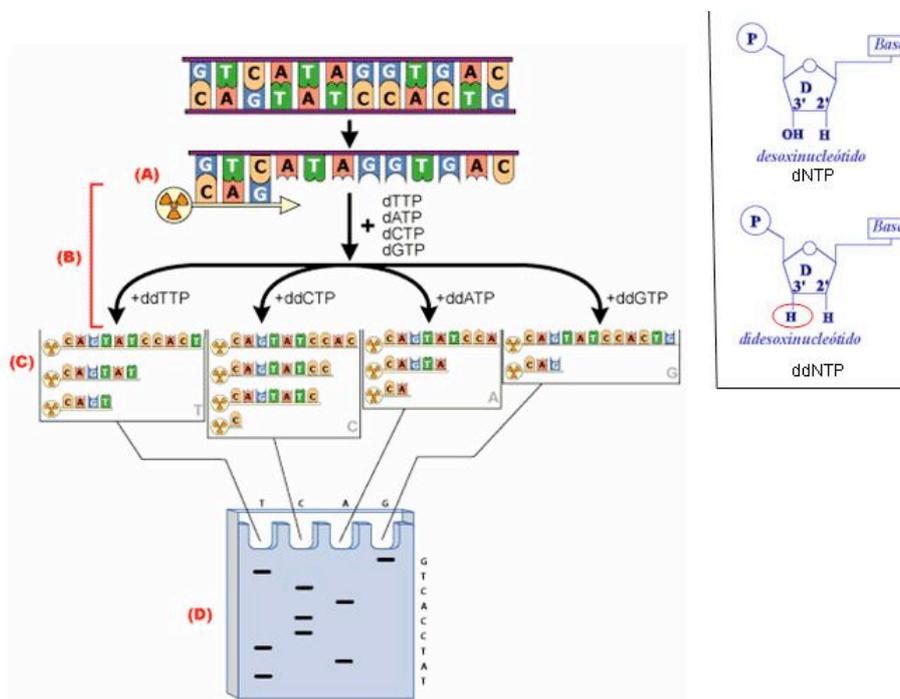


Figura 2: método de secuenciación de Sanger (1977)

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.

Fuente: Adaptado de *National Biological Information Infrastructure (NNBI)*,
http://www.nbi.gov/portal/server.pt?open=512&objID=402&&PageID=571&mode=2&in_hi_userid=2&cached=true

Los secuenciadores automáticos

Existen algunas variaciones del método de secuenciación de terminación de la cadena de Sanger que permiten la optimización de dicha técnica. Una de ellas es la secuenciación por terminador fluorescente, en la cual se marca cada uno de los cuatro ddNTPs que terminan la cadena con un colorante fluorescente diferente, los cuales fluorescen a diferentes longitudes de onda.

Se realizan cuatro reacciones de secuencia separadas, cada con un ddNTP terminador con una etiqueta fluorescente distinta. Después, los productos se mezclan y se someten a electroforesis en gel. Mientras que los fragmentos de ADN se desplazan a través del gel, pasan por un rayo láser que excita al compuesto fluorescente. La luz emitida es detectada por un fotomultiplicador, que está conectado con una computadora que colecta y analiza los datos (figura 3).

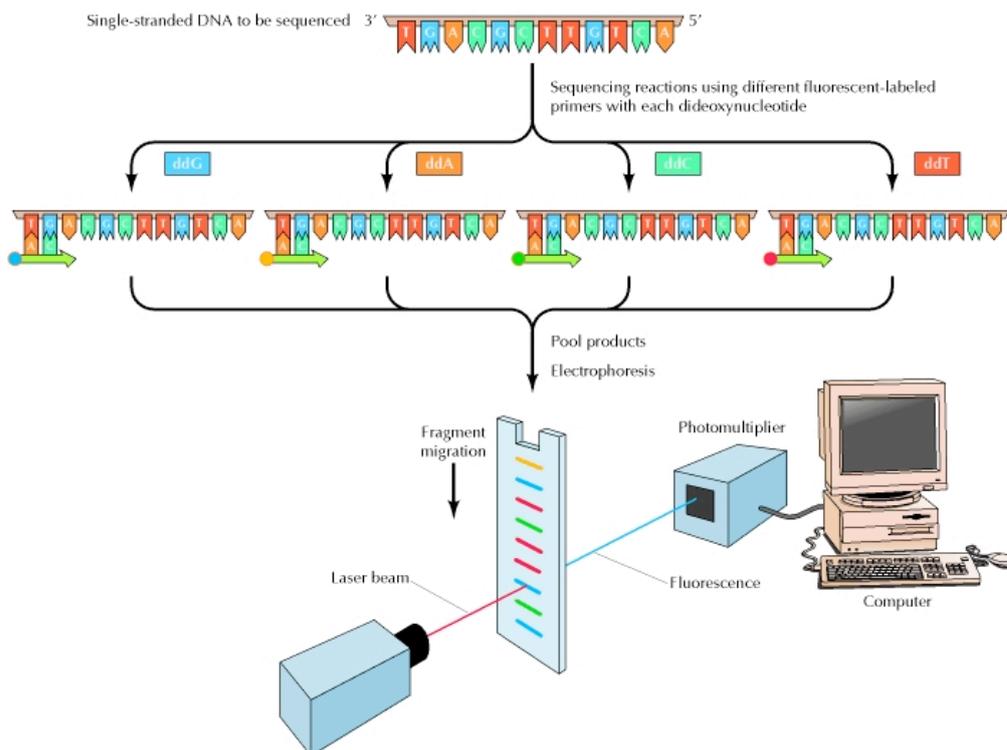


Figura 3: secuenciación automática de ADN

Fuente: *The Cell a Molecular approach*, 2ª Ed. Geoffrey Cooper. Disponible en
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cooper&part=A448#A461>

El método de secuenciado por terminador fluorescente junto con analizadores de secuencia de ADN de alto rendimiento se utilizan en la actualidad para la

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



mayoría de los proyectos de secuenciación, puesto que es más fácil de llevar a cabo y tiene un costo menor que los anteriores métodos de secuenciación.

La secuenciación de genomas a gran escala

La secuenciación a gran escala se refiere a conocer la secuencia de fragmentos muy grandes de ADN. Esto es necesario en cualquier proyecto genoma en donde el ADN puede estar formado por miles de nucleótidos (genomas bacterianos) a 200 millones de bases (Cromosoma 1 humano).

Dentro de las principales formas de secuenciar a gran escala el genoma, se pueden mencionar dos procedimientos:

- Secuenciación jerárquica (*hierarchical shotgun sequencing*): el primer paso consiste en construir una “genoteca” por fragmentación del ADN e introducción del mismo en vectores que aceptan grandes insertos, en este caso de BACs. Los fragmentos de ADN representados en la genoteca son organizados en un mapa físico y los clones individuales son seleccionados y secuenciados para lo cual se hace una nueva genoteca de trozos más pequeños («shotgun library»). La secuencia de los clones se ensambla finalmente para reconstruir la secuencia del genoma (figura 4 a)
http://www.argenbio.org/adc/uploads/libro/22_VII_1.pdf
- Secuenciación de genomas completos (*whole genome shotgun sequencing*): En este método el genoma completo es cortado en pequeños fragmentos de ADN. A diferencia del método anterior no se utilizan mapas físicos como referencia para ordenar los fragmentos. Así, cada fragmento es secuenciado primero y las secuencias solapantes se ubican juntas para crear un contiguo. Para lograr el solapamiento, los fragmentos de ADN deben ser secuenciados varias veces (Figura 4 b)

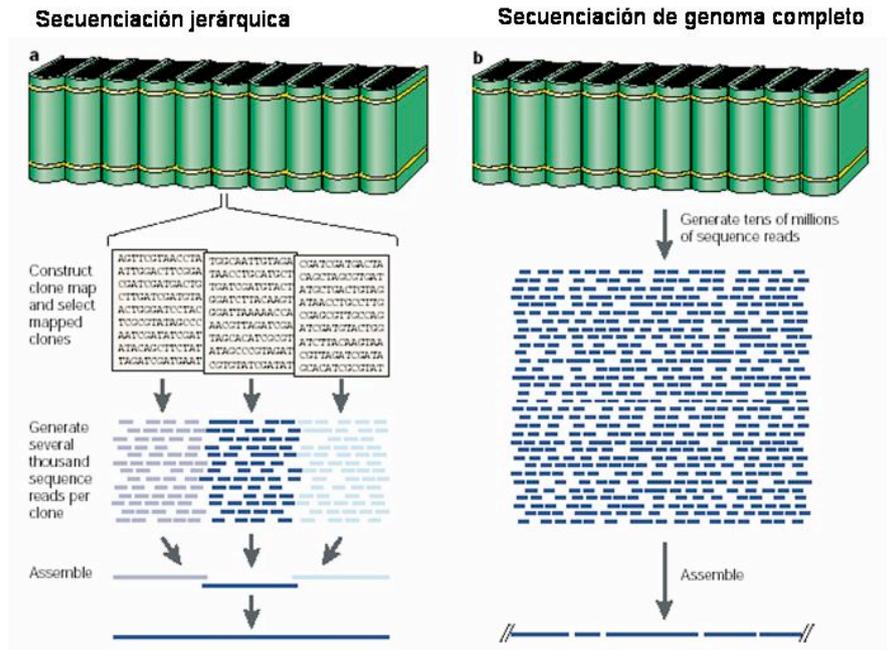


Figura 4: métodos de secuenciación a gran escala. A) secuenciación jerárquica. B) secuenciación de genoma completo.

Fuente: adaptado de "Strategies for the systematic sequencing of complex genomes" ED Green. Nature Reviews Genetics, 2001

Nuevos métodos de secuenciación: secuenciación de alto rendimiento

La elevada demanda de secuenciación de bajo costo ha dado lugar a distintas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento. Estos emprendimientos han sido financiados por instituciones públicas y privadas así como desarrolladas y comercializadas por empresas privadas. Éstas permiten una secuenciación más barata y eficiente, a pesar de obtener fragmentos de menor tamaño. Así, las secuencias obtenidas requieren el empleo de potentes herramientas informáticas para su ensamblaje. Actualmente, los sistemas de nueva generación disponibles en el mercado son el método 454 de Roche, Solexa de Illumina y SOLiD de Applied Biosystems.

La mayoría de los métodos utilizan un paso con clonación *in vitro* para generar muchas copias de cada molécula individual, ya que los métodos de detección molecular frecuentemente no son lo suficientemente sensibles para la secuenciación de una sola molécula.

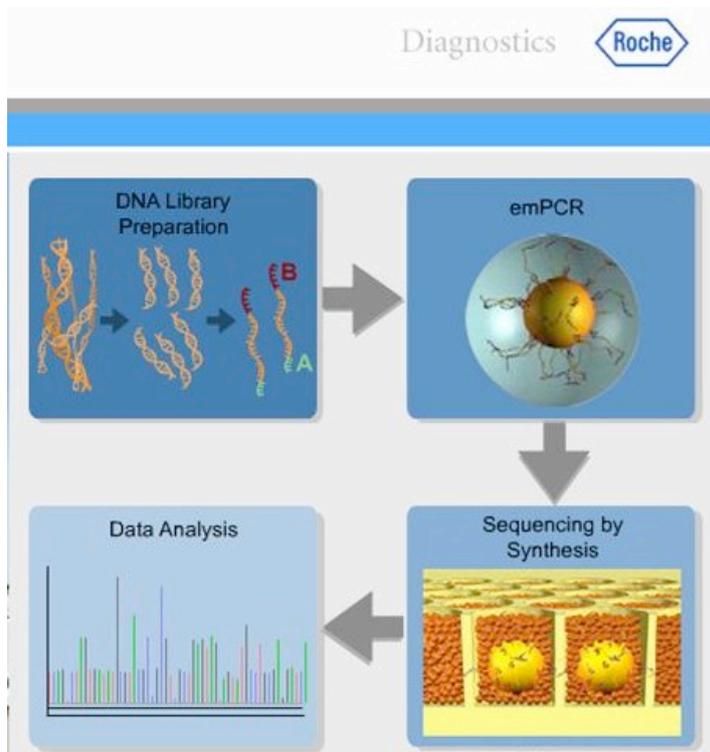
Uno de los métodos es la *PCR de emulsión*, en la que se aíslan las moléculas individuales de ADN junto con microesferas. Luego, mediante una reacción de PCR se recubre cada microesfera con copias clonales de la biblioteca de

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.

moléculas aisladas y seguidamente se inmovilizan para ser más tarde secuenciadas. La PCR de emulsión se usa en los métodos 454 Life Sciences (adquirido por Roche) (Figura 5), "secuenciación polony" (término formado por polimerasa "pol" y colonia "colony"), y la secuenciación SOLiD (adquirida por Applied Biosystems).

Otro método para la amplificación clonal in vitro es la *PCR de puente*, en la que los fragmentos se amplifican a partir de los cebadores unidos a una superficie sólida, desarrollados y usados por el método Solexa (adquirida por la empresa Illumina). Estos métodos producen muchas copias de un solo fragmento localizadas físicamente en forma aislada una de otras.

Una vez que las secuencias clonales de ADN se localizan físicamente en posiciones separadas de la superficie, se pueden utilizar diferentes métodos de secuenciación para determinar las secuencias de ADN de todas las localizaciones en paralelo. La secuenciación por síntesis, como en la popular secuenciación electroforética con terminador marcado con colorante, usa el proceso de síntesis de ADN usando la enzima ADN polimerasa para identificar las bases presentes en la molécula complementaria de ADN. En cambio, en la secuenciación por ligación se emplea una ADN ligasa en lugar de una polimerasa para identificar la secuencia objetivo.



"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.

Figura 5: Esquema del método de secuenciación 454

Fuente: Roche. http://www.roche-applied-science.com/publications/multimedia/genome_sequencer/flx_multimedia/wbt.htm

La comparación de estos métodos de secuenciación de alto rendimiento se pueden observar en la siguiente tabla:

Tecnología	454	Solexa	SOLiD
Secuenciador	GS FLX serie Titanium	HiSeq 2000	SOLiD™ 4 System
Potencia por análisis	$500 \cdot 10^6$ pb	$200 \cdot 10^9$ pb	$100 \cdot 10^9$ pb
Tiempo de ejecución	10 horas	8 días	14 días
Longitud de los fragmentos (reads)	450 pb	$2 \cdot 100$ pb	$2 \cdot 50$ pb
Fragmentos por ejecución	$>10^6$	$2 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^9$
Precio por secuenciar un genoma humano	\$180.000 (USD)	$< \$10.000$ (USD)	\$6.000 (USD)

El avance logrado con estas técnicas se puede ejemplificar con la secuenciación del genoma humano (ver Cuaderno n° 55). La primera secuenciación ha requerido cientos de máquinas trabajando 24 horas al día, durante 13 años, con un costo de más de 300 millones de dólares. El proyecto empezó en 1990, generando un borrador del genoma en el año 2000 y uno más completo en 2003. Más tarde, la empresa Celera secuenció el genoma diploide de J. Craig Venter mediante secuenciación de genomas completos (*“whole genome shotgun sequencing”*), requiriendo 10 años y 70 millones de dólares. Finalmente, el genoma de Watson fue secuenciado en sólo dos meses y un costo de un millón de dólares, usando la maquina “454 Life Sciences”.

A pesar del potencial de las técnicas mencionadas, se están desarrollando actualmente métodos mucho más eficaces que provocarán una revolución en el campo de la genómica. Por ejemplo, la *espectrometría de masas* también se puede usar para secuenciar las moléculas de ADN. Las reacciones de terminación de la cadena producen moléculas de ADN de diferentes longitudes y la longitud de esos fragmentos se determina entonces por las diferencias de masa entre ellas (en lugar de utilizar una separación por gel). Otra técnica

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.

novedosa es la *secuenciación por hibridación*, un método no enzimático que usa un chip de ADN. En este método, una única muestra de ADN se marca mediante fluorescencia y se hibrida (por complementariedad de bases) con una colección de secuencias conocidas. Si el ADN desconocido se hibrida fuertemente en un punto dado de entre las secuencias, se deduce que esa secuencia existe dentro de los ADN desconocidos que son secuenciados.

La reducción del precio de la secuenciación, la mejora de los microprocesadores de las computadoras y las herramientas bioinformáticas permitieron completar la secuenciación de más de 1000 genomas de bacterias y arqueobacterias, más de 500 eucariotas y un número aún mayor de orgánulos, virus, plásmidos y viroides.

Estadística de Proyectos de secuenciación genómica

Organismo	Completo	Bosquejo de ensamble	En progreso	total
Prokaryotes	728	560	488	1776
Archaea	66	7	26	99
Bacteria	663	553	462	1678
Eukaryotes	37	229	260	526
Animals	5	103	117	225
Mammals	2	37	42	81
Birds		2	13	15
Fishes		13	13	26
Insects	2	22	16	40
Flatworms		2	3	5
Roundworms	1	13	11	25
Amphibians		1		1
Reptiles		1		1
Other animals		14	22	36
Plants	6	18	69	93
Land plants	3	16	63	82
Green Algae	3	2	6	11
Fungi	17	77	35	129
Ascomycetes	15	59	25	99
Basidiomycetes	1	11	7	19
Other fungi	1	7	3	11
Protists	9	29	35	73
Apicomplexans	5	10	4	19
Kinetooplasts	3	2	3	8
Other protists	1	16	28	45
total:	765	789	748	2302

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



Fuente: NCBI, revisado el 23 Abril 2010

Todo esto demuestra que la era genómica está en pleno auge, no sólo por las nuevas tecnologías, sino también porque sólo un pequeño número de genomas han sido secuenciados por el momento, cuando se compara con la enorme cantidad de entidades biológicas que ocupan nuestro planeta. De modo que se pueden esperar grandes avances en la secuenciación genómica en los próximos años (ver Cuadernos n° 114, 117).



CONSIDERACIONES PARA EL DOCENTE

El Cuaderno presenta de manera detallada técnicas empleadas en el desciframiento del material genético, es decir cuáles y cuántos son los nucleótidos que integran la molécula de ADN, o un fragmento de ella, y cuál es el orden en que se ubican. Estas técnicas permiten conocer la estructura del material genético de diferentes especies (genoma) y pueden llevar a descifrar la función de los diferentes genes. Esto llevará luego a la aplicación de estos conocimientos en aspectos como la salud, la agricultura y la industria. Si bien los temas explicados en este Cuaderno resultan complejos para el nivel escolar medio, el docente puede aprovechar estos conceptos para trabajar en clase los siguientes aspectos:

1. Los avances en el conocimiento y aplicación del ADN. Teniendo en cuenta que la estructura del ADN (la doble hélice) fue publicada a mediados del siglo XX, los avances logrados en sólo 50 años son muy importantes. No sólo se conoce la estructura de la molécula, sino que se puede empezar a descifrar la función de los genes en los diferentes tipos de organismos.
2. La aplicación del conocimiento de la estructura del ADN en el estudio de la relación entre especies y en su evolución. Secuenciar el ADN y compararlo permite establecer relaciones de parentesco entre individuos de una misma especie o de especies diferentes. Se emplea en el estudio de la evolución.
3. La posibilidad de modificar el ADN. Conocer la estructura y función de un gen permite aislarlo y emplearlo en la modificación genética de otros organismos, y en la obtención de nuevos caracteres como en el mejoramiento de plantas, en la industria y en la salud.
4. El uso de enzimas de restricción. Habitualmente en la enseñanza escolar se hace referencia a las enzimas, particularmente a las enzimas digestivas. Es interesante que los alumnos conozcan diferentes enzimas, con diferente función y su especificidad. En la secuenciación del ADN explicadas en el Cuaderno se hace referencia a enzimas que actúan específicamente sobre el ADN.
5. El carácter universal del código genético. El hecho de que el ADN esté formado a partir de las mismas unidades en todos los seres vivos permite la utilización de enzimas de restricción en diferentes especies y la transferencia de material genético entre un organismo y otro, incluso de diferentes especies (transgénesis).

Otro aspecto interesante para tener en cuenta al trabajar el ADN y los cuatro tipos de nucleótidos (A, T, C, G) es que las “letras” que se leen o las “líneas” que se ven en un gel, hacen referencia a moléculas, a sustancias químicas. Ocurre, en ocasiones, que la representación de las sustancias mediante letras y su “lectura” lleva a perder de vista el carácter químico de estas representaciones, y puede motivar una resolución prácticamente matemática

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



de los problemas genéticos, sin comprender el proceso biológico implicado. Por esto se sugiere a los docentes que al trabajar con representaciones, como son las "letras" de los nucleótidos o dibujos de moléculas, se retome durante la clase el significado químico de estas representaciones.

ACTIVIDADES

Actividad N° 1: Análisis de texto

Lograron la secuenciación del genoma de la papa

Es el tercer cultivo del mundo; podría ayudar a mitigar el hambre

Noticias de Ciencia/Salud Diario La Nación. Publicado el 23 de setiembre de 2009.

http://www.lanacion.com.ar/nota.asp?nota_id=1177859

Desde hace unos 8000 años (época en la que fue domesticada en el altiplano andino), es un verdadero "clásico" de la dieta americana. Más tarde los españoles la llevaron a Europa y, en las últimas décadas, ingresó en los menús asiáticos.

Se trata ni más ni menos que de la papa, el familiar tubérculo que constituye el tercer cultivo en importancia, después del arroz y el trigo, y del que todos los años se producen en el mundo 325.000.000 de toneladas. La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) le dedicó el año último (consagrado Año Mundial de la Papa) porque sus especialistas consideran que puede mitigar el hambre.

Por eso, el avance logrado por un consorcio internacional formado por científicos de 14 países (entre los que se cuentan China, Estados Unidos, Chile, Brasil y Perú) reviste una importancia especial: el grupo, en el que participó la Argentina a través del INTA Balcarce, unidad pionera en el estudio y mejoramiento de este tubérculo, anuncia hoy la secuenciación del genoma completo de la papa.

Con el catálogo completo de sus genes al alcance de la mano, ya que será puesto a disposición de la comunidad científica internacional, ahora los investigadores podrán buscar variedades para acelerar la productividad, el valor nutricional y la resistencia a los patógenos de nuevas variedades, además de que contarán con una guía para identificar variantes de esos genes presentes en las formas silvestres y podrán mejorar los aspectos industriales de su producción.

"Por sus propiedades nutritivas [es fuente de carbohidratos, muchas vitaminas, entre otras la C, y de minerales, como potasio y hierro], es uno de los cultivos sobre los que descansa la esperanza de paliar el hambre -dice Sergio Feingold, director del Laboratorio de Agrobiotecnología del INTA Balcarce-. Con la secuenciación de su genoma [está en www.potatogenome.net] tenemos la herramienta para adaptarla a distintos climas y ambientes determinados. Los mejoradores de papa podrán acortar los 10 o 12 años que actualmente son necesarios para obtener nuevas variedades."

De acuerdo con este primer borrador, que contiene la secuencia completa de sus genes, pero sin asignarles una función determinada, la papa tiene entre 40.000 y 50.000 genes, formados por 840 millones de pares de bases, lo que equivaldría a algo así como una cuarta parte del genoma humano.

Para los investigadores argentinos, la participación en este consorcio fue la ocasión de ingresar en un "club" exclusivo que ofrece privilegios que no se pueden comprar con dinero: "Básicamente -afirma Feinstein-, es una oportunidad de capacitar recursos humanos en bioinformática y genómica. Es una *know how* que sólo puede obtenerse estando dentro del consorcio. Desde hoy, el conocimiento es público, pero no basta con tener el CD con las instrucciones, es una gran maraña de datos. La Argentina recién adquirió un equipo de secuenciamiento en paralelo y ahora podremos usar esta experiencia, por ejemplo, para secuenciar otros genomas relacionados."

Para Alejandro Mentaberry, investigador del Conicet y director del grupo que logró desarrollar una papa resistente a hongos y bacterias, "Ahora hay mucha secuenciación de genomas. Esto lo que tiene de interesante es que se trata de un cultivo originario de América, que posee un genoma complicado y que tiene impacto social. La tecnología dio un salto cualitativo y espero que a fin de año el país esté en condiciones de ingresar de lleno en ese terreno".

El trabajo para decodificarlo se desarrolló a lo largo de dos años. Gracias a avances tecnológicos, fue uno menos de lo que se había calculado.

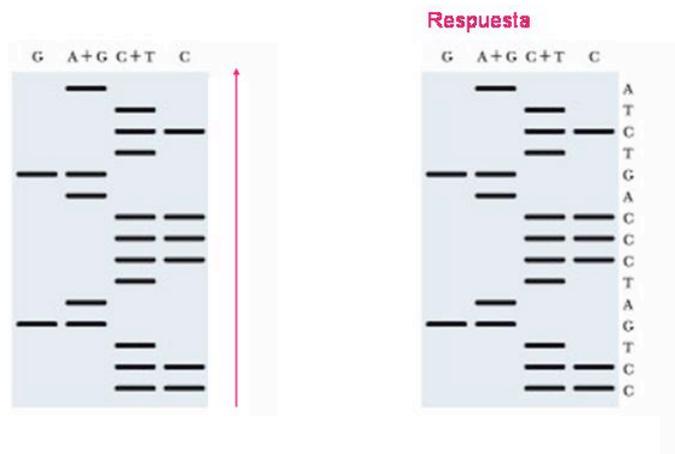
"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.

Responder a las siguientes preguntas a partir de la lectura del artículo:

- 1) ¿Cuál es la importancia de este cultivo en la población humana?
- 2) ¿Cuáles son los países que participan en el consorcio formado para la secuenciación del genoma?
- 3) ¿Cuál es la importancia de la participación de un instituto de investigación nacional como el INTA, en este proyecto?
- 4) ¿Cuál es el equipamiento adquirido en este proyecto y cuál será su posible utilidad?
- 5) ¿Cuál es la importancia del conocimiento del genoma de la papa para el mejoramiento de este cultivo?

Actividad 2: Técnica de Maxam y Gilbert

A partir del siguiente esquema, en donde se muestra un gel con las bandas obtenidas por la técnica de Maxam y Gilbert, inferir la secuencia de ADN de 15 nucleótidos.



Fuente: Libro Biochemistry. Capítulo 12. Autores: Garret y Grisham

<http://web.virginia.edu/Heidi/chapter12/chp12frameset.htm>

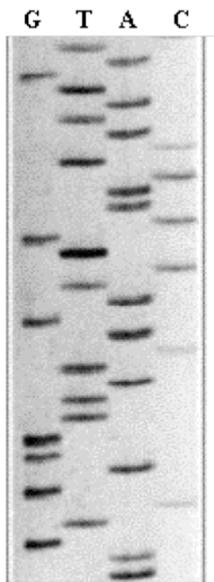
Explicación de la lectura del gel: Suponiendo que el marcaje radioactivo se realizó en el extremo 5', la secuencia se lee de abajo hacia arriba del gel. Por ejemplo, la banda inferior (de menor tamaño) aparece en las calles 3 y 4 (tratamientos con sustancias químicas específicas que cortan en C+T y C), por lo tanto se infiere que la base en esa posición es una C. La segunda banda (por tamaño) en el gel tiene el mismo comportamiento que la anterior, y por ende es otra C. Por el contrario, la tercera banda, presenta amplificación en la calle 3 (corte cuando hay CoT), pero no en la calle 4 (corte en donde hay una C), entonces se infiere que en esa posición de la secuencia de ADN hay una base T.

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.

Actividad 3: Método de Sanger

Fuente: Universidad Complutense de Madrid

Parte A: La siguiente autorradiografía se ha obtenido por el método dideoxinucleótido para averiguar la secuencia de un segmento de ADN de centeno. ¿Cuál es la secuencia de este fragmento de ADN?



Método dideoxi
de Sanger

Rta: 5' AAGTCGAGGTTATCAGATCTGCAACTCATATGAT 3'

Parte B: Dibuje un esquema del gel de acrilamida que se obtendría al secuenciar por el método dideoxi de Sanger un segmento de ADN molde con la siguiente secuencia: 5' GAATTGGCGGGCTA 3'

MATERIAL DE CONSULTA

- Genome online: un sitio web en donde se encuentran diferentes proyectos de secuenciación genómica a gran escala
http://www.genomesonline.org/Large_scale_projects.htm
- Genome.gov es el sitio web educativo del National Human Genome Institute
<http://www.genome.gov/Education/>

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



- Videos demostrativos de los nuevos métodos de secuenciación:
 - Secuenciación 454: http://www.roche-applied-science.com/publications/multimedia/genome_sequencer/flx_multimedia/wbt.htm
 - Solexa: http://www.illumina.com/Media/flash_player.ilmn?dirname=systems&swfname=GA_workflow_vid&width=780&height=485&iframe
 - SOLID: http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/solid-next-generation-sequencing/next-generation-systems/solid-4-system.html?CID=FL-091411_solid4
- Guía rápida de genomas secuenciados
 - http://www.genomenewsnetwork.org/resources/sequenced_genomes/genome_guide_p1.shtml
 - http://www.genomenewsnetwork.org/resources/whats_a_genome/Chp2_3.shtml