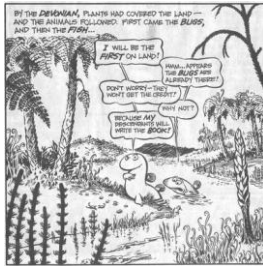


Morfología vs. ADN?



Breve introducción a la biología molecular y sus aplicaciones

Phascolarctus cinereus



Queensland koala



Victoria koala



New South Wales koala



3 subespecies

Morfológicamente: Diferencias en tamaño y color principalmente

Moleculamente: Un grupo dividido en dos subgrupos, uno en el norte y otro en el sur

Hay que considerar ambas herramientas en conjunto

Caracteres moleculares son universales

La cantidad de datos generados es mucho mas grande (cada nucleótido es un caracter)

AACTTCAAAGAGCTCTACACAGAGACCAGAATCGGAAG

38 nucleótidos = datos

Se trabaja directamente con la base genética de la evolución



Hay ocasiones en que los caracteres morfológicos no son variables

A nivel de población: marcadores moleculares

A nivel de delimitación de límites taxonómicos: morfología, ecología, citogenética, etc.

A nivel filogenético:

Inicia con datos morfológicos y los datos moleculares son a posteriori



Adeninas y Guaninas (purinas) tienen dos anillos

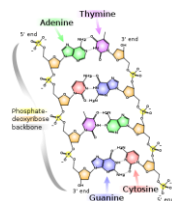
Mientras que las Timinas y Citosinas (pirimidinas) tienen un solo anillo

Mutaciones:

Tansiciones.- cambio entre purinas o pirimidinas

Tansversiones.- cambio de una pirimidina a una purina o viceversa

La estructura tan complicada del ADN sugiere que solo evolucionó una sola vez



ADN es una molécula estable



No es necesario matar al organismo para extraer el ADN


Extracción de ADN

Lisis para liberar al ADN
Nitrógeno líquido, arena

Buffers de extracción:
Detergentes (SDS, CTAB)
EDTA desestabiliza las membranas e inhibe a las DNAasas
Sales (NaCl) recubre al ADN con una capa iónica evitando su degradación
Tris (mantiene el pH)

Incubación a 50-70 C facilita la ruptura de lípidos en la membrana

Eliminar proteínas y residuos lipídicos
Fenol/cloroformo/



Precipitamos el ADN

Etanol absoluto y sales

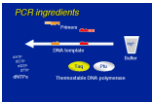
El ADN interactúa con las sales creando una carga positiva que permite su precipitación en presencia del alcohol.

Incuba en hielo

Se lava con alcoholes para eliminar las sales

"Ingredientes" del PCR:

DNA
Buffer (10x)
Taq
MgCl₂ co-factor que ayuda al funcionamiento de la Taq, se adhiere a los nucleótidos



dNTPs
Primers
Agua (bidestilada, auto clavada)
Aditivos, poco usados:
BSA (Bovine Serum albumin) capta iones e inhibidores de la taq
Tween 20 estabiliza a la taq y evita la formación de estructuras secundarias
DMSO Elimina estructura secundaria del ADN, para amplificar regiones ricas en GCs

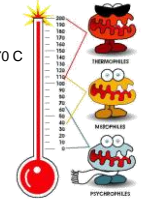


Yellowstone National Park

Thermus aquaticus

Taq Polimerasa

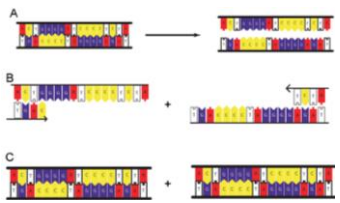
aislada en 1986



Primers

Secuencia que permite que funcione la taq polimerasa

Deben ser al menos de 17 pares de bases de largo



PCR: Polymerase Chain Reaction

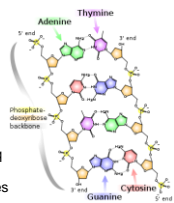
30 - 40 cycles of 3 steps

Step 1: denaturation
1 minute 94 °C

Step 2: annealing
45 seconds 54 °C
Forward and reverse primers !!!

Step 3: extension
2 minutes 72 °C
only 100°C

Annealing: Basado en la temperatura del primer
4°C (G + C) + 2°C(A + T) - 5°C= Temperatura ideal
ATTGACG = 4°C C(4) + 2°C C(4) = 24°C



Extensión: 72 C
Temperatura ideal para la actividad de la taq
Tiempo: 1 min por cada 1000 pares de bases

AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS METHOD

Place a buffer and DNA in the wells. Add DNA Sample onto Agarose Gel (10x) (10x buffer to 1x buffer #1).

NEGATIVE ELECTRODE (Left) / **POSITIVE ELECTRODE** (Right)

DNA Bands are separated by size.

DNA Bands are Exposed on Film.

Under UV Light (254 nm, 300W).

Side view: Sample loaded into well. Plastic gel box. Buffer. Electric field and Direction of migration. Negative (-) Electrode. Positive (+) Electrode.

Geles de agarosa

geles de agarosa
 Tinción con Bromuro de Etidio (0.5 µg/ml)
 Buffer (TBE) cierto pH y cantidad de iones necesarios para que fluya la corriente

Sample wells
 Glass or plastic plate
 Gel
 Buffer
 Plate
 Protein bands after staining

(a) (b)

Geles de poliacridamida

Geles de poliacridamida
 Tóxicos
 Tinción con Plata
 Alta resolución

Enzimas que reconocen 6 pares de bases: Enzimas de restricción

Cortan 4⁶= cortan cada 4096 pares de bases (si estamos usando DNA de cloroplasto indica que tendríamos 169000/4096 => 41 fragmentos)

4 pares de bases:
 4⁴= 256

5 pares de bases:
 4⁵= 1024

Blunt Ends
 Sticky Ends
 Restriction enzyme cleavage point

© 2006 Encyclopædia Britannica, Inc.

RFLPs

RFLPs (Restriction fragment length polymorphism)

Fue uno de los primeros métodos de ADN
 No necesita PCR

Se genera digiere el ADN

Se corre en un gel de agarosa

Hibridiza con fragmentos de tamaño conocido y se analizan los geles

Presencia-Ausencia

Análisis de genética de poblaciones

Variante:
 PCR-AFLP

RFLPs

Problemas:
 Costo
 Tóxico (si se usa poliacridamida y/o radioactividad)
 Se necesita tener la mezcla de fragmentos con la cual se hibridiza la muestra

Ventajas:
 La metodología es estándar
 Permite estudiar el genoma completo al azar

Homología de bandas? Generalmente se usa solo para comparar especies muy cercanas.

RFLPs

Solo usan un primer por reacción

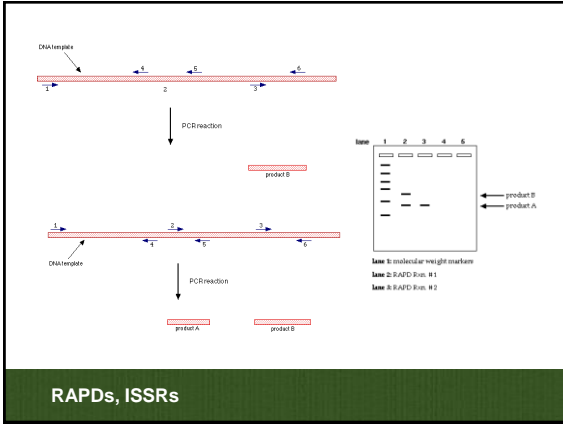
Amplifican aquellas regiones donde los sitios de alineamiento de los primers están suficientemente cerca (<3000pb)

Primers cortos lo que facilita el apareamiento con secuencias complementarias => bajas temperaturas de apareamiento

Se asume que: dos bandas del mismo tamaño son homologas

Marcadores dominantes

RAPDs, ISSRs



RAPDs, ISSRs

RAPDs (Randomly Amplified polymorphic loci)

Altamente utilizados en el pasado

Los primers son de 10 pares de bases

No se necesita información previa sobre el genoma de la especie

primer kits

los productos son altamente irrepetibles

muy susceptibles a diferencias en la concentración de ADN

RAPDs

ISSR's

los protocolos son casi idénticos a los de RAPDs pero las temperaturas de alineamiento de los primers son mas altas lo que los hace mas específicos.

Principle of ISSR

Amplification of inter simple sequence repeat segments using 5' and 3' anchored primers for CA repeats. Arrows indicate primers and double lines indicate amplification products

ISSRs

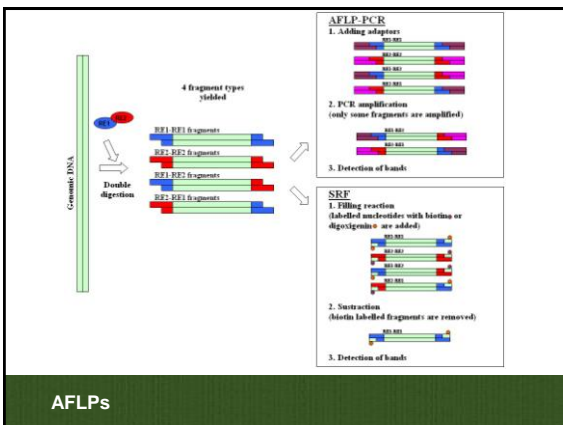
primers generalmente de 14 a 16 pares de bases, generalmente se le agregan dos pares de bases extras GC

No son tan sensibles a cambios en la concentración de ADN

3-4 primers son suficientes

Dominantes

ISSRs



AFLPs

Altamente confiables y reproducibles, pero se interpretan de la misma manera que ISSRs

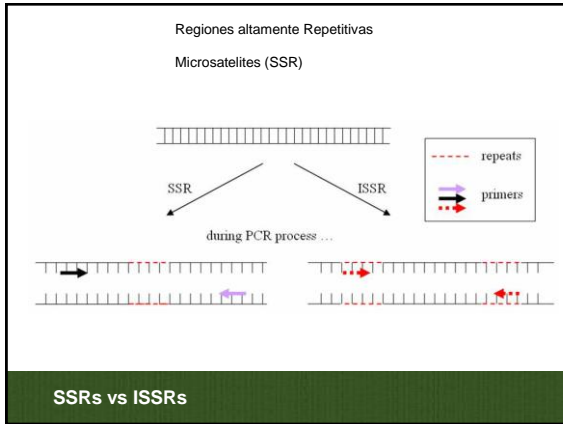
Dominantes

Se asume equilibrio de H-W

La variación se interpreta como resultado de mutaciones en el ADN que generan la pérdida de sitios de restricción, aparición de nuevos sitios, inserción o deleción de fragmentos

Homologías consideradas solo en especies cercanas

AFLPs



Secuencias pequeñas que están repetidas muchas veces:

Microsatélites (SSR's) Dos o tres nucleotidos repetidos

GCTACGATT.....ACACACACACACACACACAC.....GCAGC
TAC

Tienen altas tasas de mutación

Son regiones que no codifican y por lo tanto evolucionan rápidamente.

Se asumen que son neutrales, pero no siempre es así.
Trinucleótidos son equivalentes a codones

Microsatélites

Ventajas:

- * Tienen alta variabilidad incluso en especies en las cuales no hay variación en enzimas
- * Detectan genotipos co-dominantes
- * Usan PCR lo que permite su uso tanto en organismos vivos como extintos
- * Permiten determinar ADN "fingerprint"
- * Permiten resolver preguntas a nivel de especie

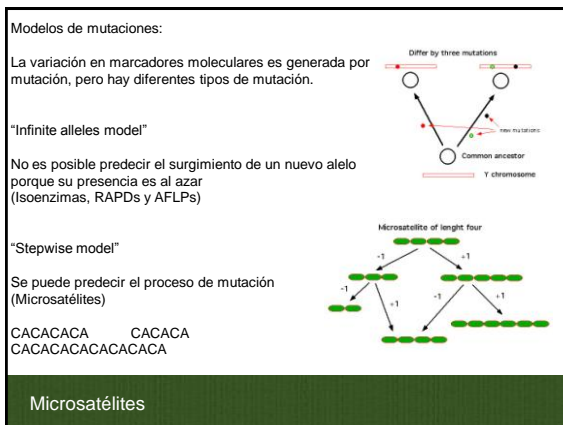
Microsatélites

Desventajas:

- * Hay que desarrollar nuevos primers para cada especie
- * No existen primers universales como los presentes en otras regiones como ITS1, ITS2
- * Existe la posibilidad de tener "null alleles" como resultado de mutaciones en la region del primer

GCTACGATT.....ACACACACACACACACACAC.....GCAGCTAC

Microsatélites



DNA mitocondrial, de cloroplasto o nuclear

Se usan primers universales que son específicos para cada región

Pueden ser altamente variables

Ampliamente usado en preguntas evolutivas

En ocasiones requieren clonación haciendo esta técnica altamente costosa

Las regiones que son altamente variables en un grupo pueden no serlo en otro

rbcl cloroplasto se usa para determinar relaciones entre familias y órdenes en plantas, pero en algas es tan variable que se usa para detectar diferencias entre especies

Secuenciación

Secuenciación:

PCR donde los nucleótidos están marcados fluorescentemente

A = Verde
 C = Azul
 G = Negro
 T = Rojo

Secuenciación

DNA que se transcribe pero no se traduce a DNA

ITS son lo suficientemente variables que permiten contestar preguntas filogenéticas

DNA ribosomal

Theory of Endosymbiosis

DNA de cloroplasto

DNA circular de 120 a 200 kb, con intrones y exones, altamente conservado, se hereda maternamente

DNA mitocondrial

DNA circular

En hongos y plantas no codifica y es mas grande que en animales

Heredado maternamente pero hay cierta evidencia que sugiere que se puede heredar paternamente

DNA de plastidos

FOREIGN AND DOMESTIC DNA REPAIR

"You're lucky nobody was injured. Your base pairs are out of alignment and that has your reading frames all messed up!"