

Tópicos en Biofísica Molecular

1er Cuatrimestre de 2018

Docentes: Lía Pietrasanta y Alan Bush

Guía 4: Replicación del DNA

Problema 1

¿Cuáles fueron las conclusiones de los experimentos de Griffith; Avery-MacLeod-McCarthy, Hershey-Chase? ¿Cuál fue el aporte de Watson y Crick?

Problema 2

Describe en detalle el experimento de Meselson y Stahl.

Problema 3

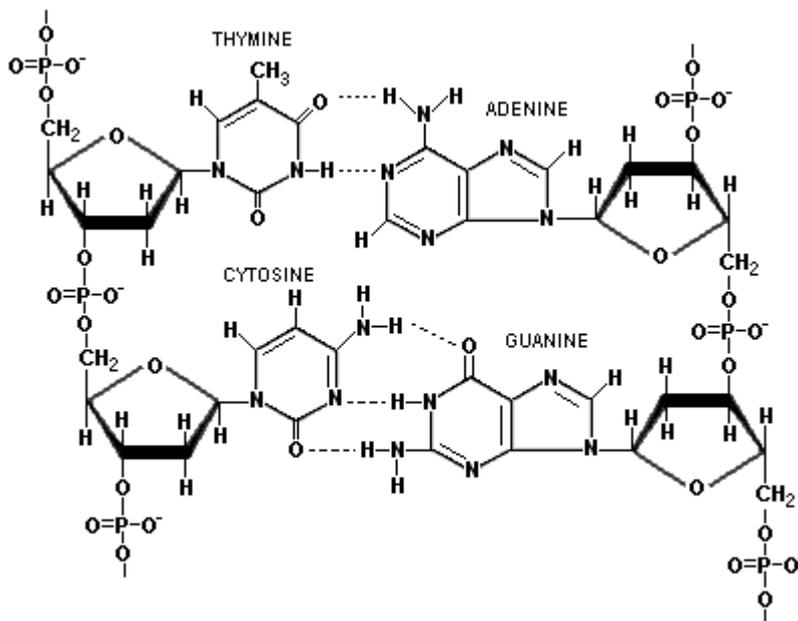
¿Qué diferencias hay en la estructura molecular de una molécula de DNA simple cadena y de RNA simple cadena? ¿Qué consecuencias tienen estas diferencias?

Problema 4

¿En la molécula de DNA, qué uniones relacionan: a) dos desoxirribosas entre sí; b) dos bases enfrentadas; c) dos bases apiladas?

Problema 5

En la figura señale, englobando con un trazo continuo, lo siguiente:



- 1- un nucleótido
- 2- un nucleósido
- 3- una base púrica
- 4- una base pirimídica
- 5- un puente de hidrógeno
- 6- una unión fosfodiéster
- 7- un extremo 3'
- 8- un extremo 5'
- 9- una desoxirribosa

Problema 5

Describe en detalle el proceso de replicación del DNA. Explique por qué al producirse la estructura en Y (horquilla de replicación) una de las cadenas hijas se sintetiza en fragmentos.

Problema 6

Dadas las siguientes moléculas de ácidos nucleicos de cadena doble:

- a) AAGTTCTCTGAA b) GTCGTCAATGCA c) GGACCTCTCAGG
TTCAAGAGACTT CAGCAGTTACGT CCTGGAGAGTCC

Señale V o F:

- i) Ninguna de las tres moléculas puede ser degradada por una RNasa.
- ii) Las tres moléculas tienen igual temperatura de fusión (T_m) porque tienen la misma longitud.
- iii) Las 3 tienen igual T_m porque $[T]/[A] = 1$ y $[G]/[C] = 1$ (Reglas de Chargaff)
- iv) Las dos hebras de cada una de ellas son antiparalelas.
- v) $T_m a > T_m b > T_m c$
- vi) $T_m b > T_m a > T_m c$
- vii) $T_m c > T_m b > T_m a$
- viii) $T_m a > T_m c > T_m b$

Justifique.

Problema 7

¿Qué consecuencias tendría para una bacteria la pérdida, por mutación, de la actividad nucleasa de 3' a 5' de la DNA polimerasa III? Justifique.

Problema 8

¿Cómo es posible que ciertas bacterias completen su división celular en un tiempo menor al necesario para la duplicación completa de su cromosoma circular, el cual es un único replicón?

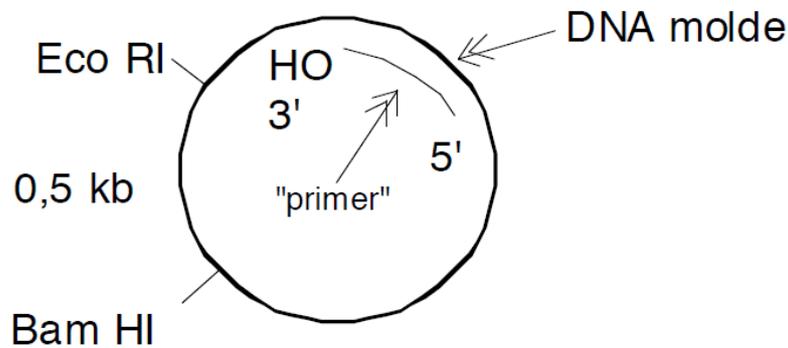
Problema 9

En un experimento, se usaron bacterias *E. coli* a las cuales se les introdujo el gen de una proteína de medusas que emite fluorescencia verde, llamada “*green fluorescent protein*” (GFP). Este gen había sido previamente modificado *in vitro* de la siguiente manera: su DNA estaba formado por una hebra con secuencia normal (*wild-type*) acompañada de su hebra complementaria que tenía una mutación, de modo de crear un apareamiento erróneo o *mismatch* en uno de sus pares de bases, es decir que no cumple las reglas de Watson-Crick. (Tal *mismatch* en la doble hélice resultó estable en estas bacterias porque éstas tenían mutaciones en algunos de sus genes, que les impedían hacer la habitual reparación de *mismatches*). Luego de la modificación genética mencionada, las bacterias fueron sembradas en una placa de Petri que tenía medio de cultivo sólido, y dejadas en estufa a 37°C. Teniendo presente los resultados del experimento de Messelson-Stahl, y que la mutación descripta anula la fluorescencia de la GFP, ¿Qué tipo de colonias esperarías Ud. ver al día siguiente?:

- colonias blancas
- colonias verdes
- colonias de color mixto
- Algunas blancas y algunas verdes

Problema 10

En un tubo de ensayo se agregan los siguientes componentes para la síntesis de DNA in vitro:



- DNA molde: DNA circular de cadena simple (7,3 kb) (ver figura)
- cebador o "primer" (ver figura)
- dATP (desoxiadenosina trifosfato)
- dGTP (desoxiguanosina trifosfato)
- dCTP (desoxicitidina trifosfato)
- dTTP (desoxitimidina trifosfato)
- buffer conteniendo Mg²⁺
- DNA polimerasa I purificada

- ¿Qué producto de reacción se obtiene?
- ¿Qué productos se obtendrán si al final de la reacción de la DNA polimerasa I se agrega la enzima de restricción* EcoRI?
- ¿Y si se agregan EcoRI y BamHI juntas?
- ¿Por qué no es necesario añadir primasa, helicasa o DNA girasa para que se produzca la síntesis de DNA in vitro como la descrita arriba?

*Las enzimas de restricción cortan secuencias específicas de DNA de cadena doble. Prácticamente todas, incluyendo EcoRI y BamHI, son incapaces de cortar DNA de cadena simple.

Problema 11

A continuación se muestra la secuencia codificante para la proteína fluorescente amarilla (YFP) en mayúscula, junto con la secuencia flanqueante del plásmido en el cual se encuentra clonado, en minúscula. Las secuencias codificantes se escriben de 5' a 3'. Diseñe un par de primers de 20 nucleótidos de longitud, para amplificar el marco abierto de lectura de la YFP por PCR.

```
5'_ctcgaggtcgacggtatcgataagcttgatcgaattcATGAGTAAAGGAGAAGA
ACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACA
AATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTACCCTTAAA
TTTATTTGCACTACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCGG
TTATGGTTTACAATGCTTTGCTAGATACCCAGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCA
AGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGACGGG
AACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCTTGTTAATAGAATCGA
GTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGGACACAAATTGGAATACA
ACTATAACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTT
AACTTCAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCA
ACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCT
ATCAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAG
TTTGTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAATAGggatccac
tagttctagagcggccgccaccgcggtggag_3'
```

BIBLIOGRAFÍA

- *Guía de Trabajos Prácticos* de la materia IBMC - cátedra Dr. A. Kornblitt, FCEN, UBA.