

Manual para la enseñanza de la genómica orientado a profesores de ciencias biológicas de educación media y superior



Guatemala, octubre de 2011

Manual para la enseñanza de la genómica orientado a profesores de ciencias biológicas de educación media y superior



UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR

Autoridades institucionales

Rector

Rolando Alvarado, S.J.

Vicerrectora académica

Lucrecia Méndez de Penedo

Vicerrector de investigación y proyección

Carlos Cabarrús, S.J.

Vicerrector de integración universitaria

Eduardo Valdés, S.J.

Vicerrector administrativo

Ariel Rivera

Secretaria general

Fabiola de Lorenzana

Director IARNA

Juventino Gálvez

Autor

Dra. Claudia Irene Calderón

Profesora de la Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas de la Universidad Rafael Landívar
Investigadora del Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente (IARNA-URL) (Guatemala)

cicalderon@url.edu.gt , cicalderon@uwalumni.com

Dr. Patrick Krysan

Profesor del departamento de Horticultura de la Universidad de Wisconsin (Estados Unidos)

fpat@biotech.wisc.edu

Revisión de textos y diagramación

Cecilia Cleaves

Edición

Cecilia Cleaves

Juventino Gálvez

IARNA-URL (Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente de la Universidad Rafael Landívar). *Manual para la enseñanza de la genómica orientado a profesores de ciencias biológicas de educación media y superior*. Autor, CONCYT y FONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Documento 39, serie educativa 3

Descriptores: genómica, ADN, ARN, genoma, *Arabidopsis thaliana*, microarreglos .

Publicado por: El proceso de elaboración técnica de este documento ha sido responsabilidad del Instituto de agricultura, Recursos Naturales y Ambiente de la Universidad Rafael Landívar (IARNA-URL). El presente manual tiene como objetivo presentar una adaptación pedagógica de un experimento genómico que utiliza microarreglos (o chips de ADN) para cursos de ciencias a nivel secundario y de educación superior. En este manual el docente encontrará explicaciones teóricas y material didáctico para poder implementar tres actividades con niveles de dificultad diferentes en el aula de clase. Estas actividades están relacionadas con la identificación de genes relacionados a la fotobiología de una planta modelo (*Arabidopsis thaliana*).

Copyright © 2011, IARNA/URL

Está autorizada la reproducción total o parcial y de cualquier otra forma de esta publicación para fines educativos o sin fines de lucro, sin ningún otro permiso especial del titular de los derechos, bajo la condición de que se indique la fuente de la que proviene. El IARNA agradecerá que se le remita un ejemplar de cualquier texto cuya fuente haya sido la presente publicación.

Disponible en: Universidad Rafael Landívar
Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente
Campus Central, Vista Hermosa III, zona 16
Edificio Q, oficina 101
Guatemala, Guatemala
Tel.: (502) 24262559 ó 24262626, extensión 2657. Fax: extensión 2649
Email: iarna@url.edu.gt
www.url.edu.gt/iarna - www.infoiarna.org.gt

Montaje de portada: Cecilia Cleaves

Agradecimientos: Maria René Quiñónez Alonzo y Edgar Moroni Escobar, Departamento de Promociones de la Universidad Rafael Landívar

Tabla de contenido

Presentación	7
1. Introducción	9
1.1 Introducción	9
1.2 Revisión general de los conceptos de fotosíntesis y fotomorfogénesis	10
1.3 Microarreglos	11
2. Adaptaciones de la actividad	15
2.1 Introducción	15
2.2 Versión 1: en duroport y limpiapipas	15
2.3 Versión 2: en papel	17
2.4 ¿En qué consiste la transcripción reversa?	18
3. Laboratorio: chips de ADN para estudiar los genes implicados en la fotosíntesis y fotomorfogénesis de <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
3.1 Sección 1: Germinación de semillas de <i>Arabidopsis</i>	21
3.2 Sección 2: Microarreglo de ADN	23
3.3 Sección 2A: Impresión del ADN en el chip	23
3.4 Sección 2B: Hibridación de ADNc con las sondas del chip	26
3.5 Información de los genes que se adherirán (imprimirán) en el microarreglo	29
4. Revisión: Pasos de un experimento con microarreglos	33
5. Resultados	35
6. Discusión de resultados	37
7. Anexos	39

Presentación

En el marco del Programa de Investigación y Capacitación en Biotecnología que impulsa el Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente (IARNA) y la Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas (FCAA) de la Universidad Rafael Landívar, se han promovido un conjunto de actividades encaminadas a fortalecer las capacidades nacionales en esta disciplina.

Una de estas actividades ha sido el diseño y puesta en marcha del curso teórico-práctico sobre la enseñanza de la genómica. El curso, que tuvo lugar en la URL en agosto del 2011, fue ofrecido a docentes de ciencias biológicas de educación media y superior de diferentes establecimientos educativos del País.

Como soporte del curso, pero al mismo tiempo retroalimentado por éste, se ha preparado el presente material, el cual permitirá a los docentes capacitados, reproducir su contenido. El manual presenta los fundamentos teóricos de la tecnología de los microarreglos, así como los detalles pedagógicos para implementar un experimento científico de manera conveniente para los fines del curso.

En esta ocasión, el experimento elegido permitió comparar la germinación de *Arabidopsis thaliana*, una planta de la familia de la mostaza, bajo dos tratamientos controlados: uno con luz y el otro en la oscuridad. Entre otros aspectos, el experimento permite comparar el efecto de ambos tratamientos e identificar las diferencias morfológicas (fenotípicas) y las diferencias genotípicas que ocurren en las plántulas de *Arabidopsis*.

En el presente manual se consideran tres actividades prácticas para la enseñanza de la genómica, utilizando tres adaptaciones de microarreglos o chips de ADN. La primera, y la más sencilla, describe de forma visual cómo funcionan los microarreglos; la segunda profundiza en aspectos sobre la función de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y conceptos tales como el de hibridación y la complementariedad de las bases. Finalmente, la tercera adaptación permite la implementación de un laboratorio en donde se imprime, hibrida, escanea y analiza un chip de ADN, simulando de manera simplificada lo que ocurre con los microarreglos en la academia y en la industria, y que pone en evidencia las diferencias en la expresión génica de *Arabidopsis* cuando crece bajo condiciones experimentales diferentes.

El curso completo, así como la generación del presente manual han sido auspiciados por la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) a través del Fondo de Apoyo a la Ciencia y Tecnología (FACYT), por lo que estamos muy agradecidos. Reconocemos la labor de la Dra. Claudia Irene Calderón en la coordinación de este proceso, y esperamos que este manual sea útil para fortalecer la enseñanza de la genómica en Guatemala.

Juventino Gálvez
Director Instituto de Agricultura, Recursos
Naturales y Ambiente
Universidad Rafael Landívar

Marco Arévalo
Decano
Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas
Universidad Rafael Landívar

1. Introducción

1.1 Introducción

El campo de la genómica incluye el estudio del conjunto de genes de un organismo (el genoma), sus funciones e interacciones. En la última década, los avances tecnológicos de secuenciación y bioinformática han impulsado el campo de la genómica y han revolucionado la forma en la que los biólogos pueden obtener y analizar sus datos. Actualmente existen más de 180 organismos cuyos genomas han sido completamente secuenciados, lo que permite analizarlos mediante el uso de herramientas genómicas.

En este manual se presenta una tecnología, la de los microarreglos (o chips de ADN) para estudiar la genómica de uno de los primeros organismos modelos: la planta *Arabidopsis thaliana*. Esta especie pertenece a la familia de la mostaza (Brassicaceae), que incluye especies cultivadas como brócoli, repollo, coliflor, nabo, rábano, entre otras. Se considera como una planta modelo por las siguientes razones:

- Es pequeña (en espacios pequeños se puede tener una gran cantidad de plantas, sin necesitar de un invernadero o cuarto de crecimiento);
- Tiene un ciclo de vida corto (tarda entre 6 y 8 semanas para pasar de semilla a semilla), por lo que se pueden tener múltiples generaciones en un año;
- Es fácil de cultivar;
- Produce numerosas semillas; y
- Tiene un pequeño genoma (125 megabases). Por ello, fue la primera planta en ser secuenciada (en el año 2000).



Con el fin de adaptar una tecnología moderna a las condiciones del aula de clase en Guatemala (normalmente desprovista de equipo y suministros para análisis molecular), se presentaron además de la versión de laboratorio, dos versiones simplificadas para ilustrar el fundamento teórico de los microarreglos a distintos niveles de complejidad. Por consiguiente, en este manual se detalla un experimento biológico en donde además de las observaciones fenotípicas convencionales en los cursos de ciencias biológicas, sobre los fenómenos que afectan el desarrollo de la plantas, se podrán asimismo identificar unos genes que están involucrados en la respuesta de los organismos ante dichos fenómenos. Este experimento se basa en un modelo simplificado de microarreglos o chips de ADN a través del cual se estudiará las diferencias en la **expresión génica** de *Arabidopsis thaliana* al ponerse a germinar en dos condiciones controladas: bajo un tratamiento de luz y bajo un tratamiento de sombra.

El manual tiene como fin apoyar la formación continua de los docentes de ciencias biológicas de educación media y superior.

Descripción

En este manual, se estudiará la **expresión génica** de *Arabidopsis*, al ponerse a germinar bajo dos

tratamientos (luz y sombra), para lo cual se realizarán dos series de actividades.

Resultados esperados

Al realizar esta actividad podremos comparar el fenotipo (la morfología, lo visual) de las plantas que crecieron bajo la luz, con el fenotipo de las plantas que crecieron bajo la oscuridad. Paralelamente, podremos analizar el genotipo, al saber cuáles son los genes que se “encienden” (que funcionan) durante el desarrollo de las plántulas que estuvieron bajo la luz, cuáles son los genes que se encienden durante el desarrollo de las plantas que estuvieron en la oscuridad, cuáles se encienden en ambas condiciones y cuáles no están involucrados en la respuesta a la luz.

Plántulas que crecieron bajo la luz



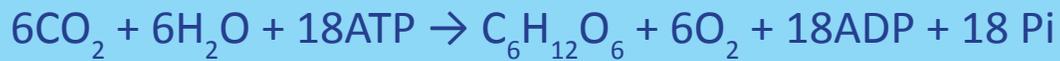
Plántulas que crecieron en la oscuridad

Crédito: montelab.org

1.2 Revisión general de los conceptos de fotosíntesis y fotomorfogénesis

La **fotosíntesis** es el proceso bioquímico en el cual las plantas aprovechan la energía lumínica y la convierten en alimento (glucosa). Las plantas tienen la habilidad para percibir el brillo, la dirección y el color de la luz. A esta sensibilidad a la luz, se le denomina “**fotomorfogénesis**” y es posible gracias a los fitocromos, que son los sensores de la planta que reciben las señales de luz del medio ambiente.

La fotomorfogénesis es la habilidad de crecimiento y desarrollo relacionada con la luz, pero no relacionada con la fotosíntesis. Los fenómenos fotomorfogénicos son la respuesta a las altas intensidades de la luz y muestran relación con la irradiación total como con la longitud de onda.



1.3 Microarreglos

a) ¿Cómo funciona un microarreglo?

La tecnología de microarreglos funciona con base en el nivel de afinidad de las bases nitrogenadas que conforman los ácidos nucleicos. En otras palabras, se fundamenta en las **propiedades químicas del ADN y ARN**. Es esta propiedad del ADN la que permitirá que secuencias de ácidos nucleicos extraídas de los organismos estudiados, puedan hibridar con las secuencias de ADN (sondas) incluidas (impresas) en el chip.

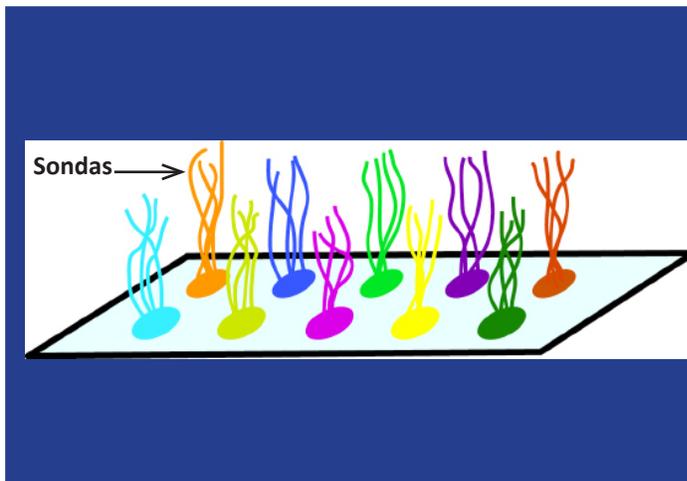
El ADN es un **ácido nucleico** formado por grupos de **fosfato**, un azúcar (la **desoxiribosa**) y **cuatro bases nitrogenadas**: la **adenina** (A), que es complementaria con la **timina** (T); y la **guanina** (G), que es complementaria con la **citocina** (C). Este arreglo es el concepto fundamental detrás del uso de sondas de ADN para identificar ADNc diana (target) y recopilar datos sobre la expresión génica. Al colocar las sondas en un formato de un chip, es posible detectar de forma simultánea miles de genes implicados en un fenómeno biológico, en un mismo experimento. Esto es importante porque las células expresan cientos o incluso miles de genes en un momento dado. El chip de ADN ofrece una “imagen instantánea” de la actividad genética del tejido de un organismo, convirtiéndose en una herramienta útil para caracterizar el funcionamiento a nivel molecular de un organismo en particular.

b) ¿En qué consiste un microarreglo?

Los microarreglos son herramientas de investigación extremadamente poderosas que permiten estudiar la expresión diferencial de genes que están implicados en procesos biológicos bajo estudio. Los resultados se pueden obtener en cuestión de días o semanas, lo que antes podía llegar a tardar meses o años.

Un microarreglo de ADN es una red ordenada de puntos, con secuencias conocidas de ADN de un organismo en particular (de unas 20 a 70 bases de largo) impresas en una superficie de vidrio. Estas secuencias de ADN, llamadas también **sondas**, representan la mayoría de los genes de un organismo. Esta tecnología es posible de utilizar cuando se conoce el genoma de dicho organismo, es decir que ya ha sido secuenciado. Cada secuencia es específica a un gen y está representada en un solo lugar (punto) del microarreglo. Cada punto corresponde a un solo gen.

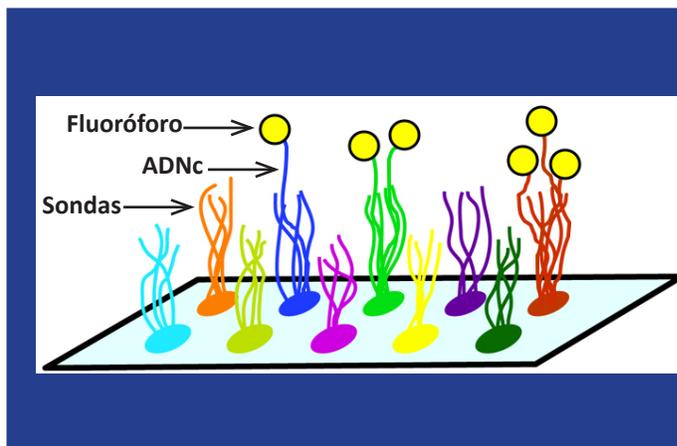
Un microarreglo puede tener decenas de miles de genes en un área más pequeña que el tamaño de un sello postal.



Esquema simplificado de un microarreglo: cada punto del microarreglo contiene miles de hebras simples de un mismo gen (se les denomina sondas) que han sido impresas sobre la matriz de vidrio. En el chip hay miles de puntos, por lo tanto, miles de genes impresos listos para hibridar con ADNc obtenidos en el laboratorio por el investigador.

El investigador procede a aislar **ARN** (expresión génica del ADN) de diferentes tipos de tejidos o de plantas sometidas a distintos tratamientos que se desea comparar. Posteriormente, se utiliza la enzima transcriptasa reversa para

obtener el **ADN complementario** (ADNc). Luego, una molécula fluorescente (fluoróforo) se une químicamente al ADNc, de tal manera que cada ADNc queda marcado para conteos posteriores.



Esquema simplificado de un microarreglo luego de la hibridación: Los ADNc (con la etiqueta fluorescente representada con un círculo amarillo) hibridaron con las sondas que correspondían a su complemento. Las demás se eliminan con procesos de lavados con sal.

Este ADNc, llamado también "ADN diana", es colocado sobre el chip y se procede a hacer la hibridación. Posteriormente, se lava el exceso de ADN diana, que corresponde al que no hibridó con las sondas en el chip. Finalmente, el chip es analizado con un escáner láser que excita a los dos fluoróforos utilizados.

ciertas condiciones. En otras palabras, los genes impresos sobre la matriz que hibriden con el ADNc de interés, representarán aquellos genes que están expresados en un tejido en particular, o en un tratamiento determinado.

c) Aplicaciones de los microarreglos

El análisis de la fluorescencia generada en el chip permite determinar cuáles son los genes que están siendo expresados en un determinado momento del desarrollo del organismo o bajo

Científicos y técnicos de diversos campos de la ciencia emplean en la actualidad esta tecnología.

Algunas de las aplicaciones son:

- Comprender funciones celulares básicas, tales como la división celular o la fotosíntesis.
- En el campo de la industria farmacéutica, se utilizan para predecir mecanismos de toxicidad de drogas y desarrollo de fármacos que promueven una vida saludable y aumento de la esperanza de vida.
- Determinar genes involucrados con la formación de tumores, en investigaciones sobre cáncer.
- En la producción del vino se han creado chips de ADN para ayudar a seleccionar uvas que se adapten mejor a ciertas zonas climáticas.

Los experimentos que utilizan microarreglos requieren del uso de equipos sofisticados y

habilidades técnicas muy especializadas. Puesto que un sólo experimento de microarreglos puede proporcionar a los investigadores enormes cantidades de información, esta tecnología ha creado una gran demanda de personas con conocimientos especializados en informática y estadística, que trabajan a la par de físicos y biólogos con el fin de interpretar dicha información. A este campo de investigación se le denomina bioinformática.

Por sus fines educativos, en este manual se utilizará un modelo simplificado de chip de ADN que contiene únicamente once genes (11 sondas), en lugar de miles como ocurre en los chips de ADN convencionales, para detectar diferencias en la expresión génica entre plántulas de *Arabidopsis* que germinaron en dos condiciones diferentes: luz u oscuridad.

2. Adaptaciones de la actividad

“Microarreglos para el salón de clases”

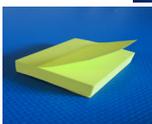
2.1 Introducción

Una manera de explicar los microarreglos de manera simplificada es a través de adaptaciones de esta tecnología prácticas que excluyan la parte de laboratorio y la replacen por una actividad que se pueda adecuar al salón de clases.

2.2 Versión 1: en duroport y limpiapipas

Materiales

- **Tablero** grueso de duroport (1 pulgada).
- **Limpiapipas** de diferentes colores (20 verdes, 20 azules, 20 amarillas, 20 rojas...), que corresponderán a las sondas impresas en el chip y a los ADNc que hibridarán con las sondas.
- Material para ilustrar la **fluorescencia**: pueden ser notas autoadhesivas (post-it), autoadhesivos, bolas de duroport de color, o simplemente cinta adhesiva (masking tape).



Adaptación de un microchip con plancha de duroport y limpiapipas: La plancha de duroport es la diapositiva, los limpiapipas son las sondas impresas sobre el chip. Otros limpiapipas con etiquetas (masking tape), correspondientes a los ADNc, serán hibridados sobre el chip.

Procedimiento

La versión del chip de ADN en duroport, es una versión introductoria en donde se explica de forma muy sencilla el fundamento teórico de esta tecnología.

El docente expone que la plancha de duroport representa la diapositiva en la que se van a imprimir sondas de ADN. Se recomienda explicar que las diapositivas pueden ser de vidrio o silicón, y sobre la superficie, por de enlaces covalentes, se “imprimirán” unas sondas de secuencias conocidas de ADN que corresponden a genes de la especie que estamos interesados en estudiar. Se pueden “imprimir” tantos genes como colores de limpiadores de pipa se tengan. La impresión se da por puntos, en donde cada punto corresponde a un gen. De esta forma se estarán poniendo grupos de limpiapipas de un mismo color en la superficie del duroport, formando círculos (como se mostró en la imagen anterior). Normalmente, los chips de ADN son fabricados por empresas que tienen la secuencia del genoma de un organismo de interés y pueden sintetizar e imprimir los genes de ese organismo sobre la diapositiva. El investigador compra esos chips de ADN que ya contienen si no todos, casi todos los genes de la especie que quiere investigar.

Por otro lado, el docente habrá repartido a los estudiantes, una serie de limpiapipas de colores (los mismos colores que se utilizaron para insertar en la plancha de duroport) que corresponden a los ADN complementarios (ADNc) obtenidos de la planta que deseamos estudiar y a la cual le extrajimos “virtualmente” ARN.

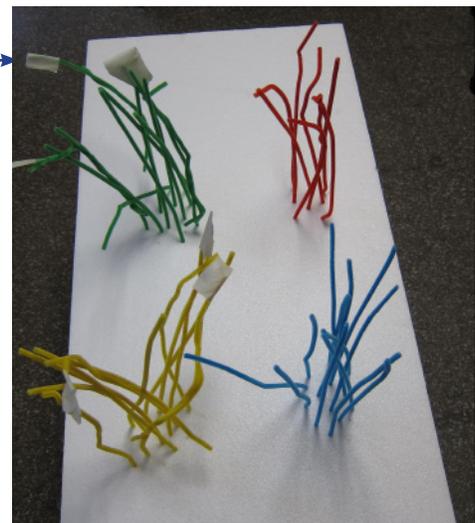
Normalmente el investigador está estudiando un organismo en su laboratorio y tiene alguna pregunta que quiere responder: ¿Qué genes se expresan en este estadio del ciclo de vida de este organismo? ¿Qué genes se expresan en este órgano del organismo de interés? Por tanto, se procede a extraer ARN del organismo,

particularmente ARN mensajero (ARNm), el cual es sometido a transcripción reversa con una enzima llamada retro-transcriptasa o transcriptasa reversa para obtener ADNc.

Finalmente, el investigador somete el ADNc a un proceso donde le agrega una etiqueta fluorescente, que le servirá como marcador para cuantificar la intensidad de fluorescencia que hibridó en cada sonda (gen). Entre más intenso es el brillo, se puede deducir que hubo más hibridación. Esto se interpreta por una mayor expresión de dicho gen en el organismo del cual extrajimos el ARN. Entre menor brillo se detecta, hubo menos ADNc que hibridó sobre las sondas del chip y, por lo tanto, ese gen estaba siendo expresado en menor proporción.

Se recomienda que se repartan grandes cantidades de uno o dos colores de limpiapipas en particular, otros en mediana cantidad y otros en pequeña cantidad. Incluso puede obviarse un color. Los estudiantes deberán colocar la etiqueta fluorescente (normalmente un fluoroforo, pero en esta adaptación puede ser simplemente un pedazo de cinta adhesiva).

Etiquetas



Una vez marcados con fluorescencia los ADNc, se procede al paso de hibridación. Los estudiantes se dirigen a la plancha de duroport y deben hibridar (enredar sus limpiapiipas –ADNc- con los limpiapiipas del mismo color –sondas- impresos en el duroport) como se muestra en la siguiente fotografía.



Al final se tendrán unas sondas que habrán hibridado con grandes, medianas o pequeñas cantidades o ningún ADNc. Se puede concluir que las sondas que hibridaron con muchas moléculas de ADNc, al tener más fluorescencia, brillarán más fuerte a la hora de ser escaneadas. Estas sondas corresponderán a genes que están siendo expresados intensamente en la planta de interés, a la que se le extrajo el ARN. Paralelamente, las sondas que hibridaron con poco ADNc, brillarán menos. Esto indicará que estos genes estaban siendo expresados en menores proporciones. Finalmente, aquellas sondas que no hibridaron, corresponderán a genes que están apagados, es decir, que NO están siendo expresados en ese momento en particular en la planta (o en la región de la planta de la cual se extrajo el ARN).

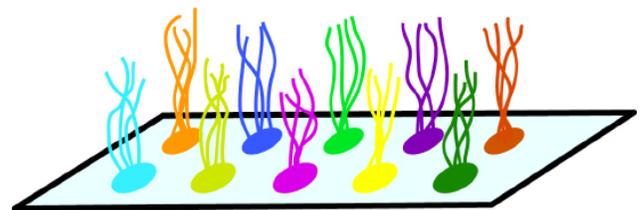
2.3 Versión 2: en papel

Materiales

- Dos cartulinas rectangulares que representarán a dos chips de ADN.
- Sondas sobre el chip (Anexo 1).
- ADNc de plantas que crecieron bajo el tratamiento de luz “ADNc en la luz” (Anexo 2).
- ADNc de plantas que crecieron bajo el tratamiento de oscuridad “ADNc en la oscuridad” (Anexo 3).

Procedimiento

- En la cartulina (se pueden utilizar varias hojas pegadas de tal forma de obtener una base de papel rectangular) se dibujarán 16 círculos en dos columnas, es decir 8 círculos por columna. Esta cartulina representa el chip de ADN (el porta-objetos) y cada círculo corresponderá al sitio en donde se imprimirán los genes.



- Para esto, el maestro procederá a recortar los dieciséis genes (sondas) incluidos en el anexo 1 y pegarlos en una cartulina hasta formar dos columnas de ocho genes cada una. Pegar las tiras de genes únicamente por el lado derecho de la mismas (donde dice el número del gen), de tal forma que la secuencia del gen quede despegada. Esta organización corresponde al arreglo ordenado de las sondas impresas sobre el chip.

- Por otro lado, hemos incluido unos documentos que contienen secuencias de moléculas de ADN complementario. Unos corresponden a ADNc proveniente de plantas que germinaron bajo la luz “ADNc en la luz” (anexo 2) y los otros a ADNc al de plantas que germinaron en la oscuridad “ADNc en la oscuridad” (anexo 3).

- El estudiante deberá completar los recuadros en blanco (ver ejemplo abajo), que corresponden al resultado del paso de transformación de ARN mensajero (ARNm) a ADN complementario (ADNc) por la acción de la transcriptasa reversa.

Imprimir tantas veces como el número indicado
x 5

En la luz

ARNm: 5' - **U U G G C A** - 3'

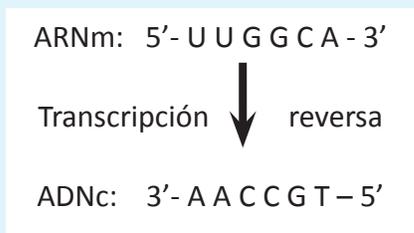
transcripción ↓ *reversa*

ADNc: 5' - - 3'

nucleasas

2.4 ¿En qué consiste la transcripción reversa?

- Para este paso, el estudiante deberá colocar una secuencia complementaria a la secuencia del ARNm provista, como se indica en el siguiente ejemplo:



- Una vez realizada la transcripción reversa, el estudiante hace un tratamiento enzimático con nucleasas para eliminar el excedente de ARNm. Este paso es representado al cortar los recuadros que contienen la secuencia del ADNc por la línea punteada (las tijeras corresponden a las nucleasas).

- Una vez sintetizado el ADNc, se marcan con fluorescencia (se le agrega básicamente una etiqueta (tag). En el laboratorio, la etiqueta es una molécula fluorescente que servirá para su detección ulterior. En esta adaptación de la actividad los estudiantes pueden utilizar marcadores fluorescentes para ejemplificar la etiqueta, o colocar los autoadhesivos.
- Luego se procede a realizar la hibridación del ADNc que se acaba de sintetizar y a marcar con las sondas de ADN del chip. Durante el paso de hibridación, los estudiantes buscarán cuidadosamente en el chip, secuencias de ADN complementarias a cada uno de los ADNc obtenidos.



- Al final de la hibridación, algunas sondas del chip tendrán una copia de un ADNc, otras podrán tener más de una copia (entre estas se recomienda poner muchas copias de control positivo) y otras podrán no tener ningún ADNc (entre éstas está el control negativo). Para contar cuántas moléculas de

ADNc -que representan moléculas de ARNm- hibridaron y determinar con qué genes lo hicieron, es necesario utilizar un escáner que mide la fluorescencia emitida por los ADNc marcados, que lograron hibridar con las sondas. Los otros serán lavados. Entre más fluorescencia se detecte, significa que más moléculas de ADNc hibridaron. Si no se detecta fluorescencia para una sonda, indicará que no hubo hibridación con ese gen en particular.

- Se recomienda llenar una tabla en la pizarra como la que se incluye a continuación, para que toda la clase reporte la cantidad de ADNc que hibridó en cada gen. Enfatizar en la importancia de los controles: el positivo (gen que se expresa constitutivamente, en grandes cantidades) y el negativo (un gen que no se expresa en el tejido analizado, o en el estadio fisiológico del organismo, etc).

Gen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Control negativo (gen 15)	Control positivo (gen 16)
	T	A	A	A	C	G	C	A	A	C	A	A	G	A	G	T
	C	T	A	T	T	A	A	G	C	G	T	T	T	A	C	T
	A	T	C	T	C	C	T	T	C	G	G	A	C	G	G	C
	C	A	C	T	C	C	A	A	C	G	G	T	A	G	G	T
Luz																
Oscuridad																



Tabla de respuesta de la actividad de microarreglos en papel

Gen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Control negativo (gen 15)	Control positivo (gen 16)
	T	A	A	A	C	G	C	A	A	C	A	A	G	A	G	T
	C	T	A	T	T	A	A	G	C	G	T	T	T	A	C	T
	A	T	C	T	C	C	T	T	C	G	G	A	C	G	G	T
	C	A	C	T	C	C	A	A	C	G	G	T	A	G	G	G
Luz	-	-	1	2	-	1	-	-	-	1	-	-	-	4	-	5
Oscuridad	-	2	-	-	1	1	-	5	-	1	1	-	-	-	-	4

¿Cómo analizar la tabla?

Enfatizar en la importancia de los controles: el positivo (gen que se expresa constitutivamente, en grandes cantidades y debe estar “prendido” en ambos tratamientos) y el negativo (un gen que no se expresa en el tejido analizado, o en el estadio fisiológico del organismo, etc y que no se expresa en ninguno de los tratamientos).

Identificar los genes que están encendidos en el tratamiento de luz (gen #3, 4, 6, 10, 14 y 16). ¿Cuáles se encuentran encendidos en ambos tratamientos (6, 10 y 16)? ¿Cuáles están encendidos solo en el tratamiento de luz (3,

4 y 14)? ¿Cuáles están encendidos solo en el tratamiento de oscuridad (2, 5, 8, 11)?

Notarán que hay genes que no están encendidos en ningún tratamiento (genes 1, 7, 9, 12, 13), éstos no se expresaron en las plantas que estuvieron sometidas a los dos tratamientos. Por otro lado incluimos unos ADNc que no hibridaron con sondas en el chip de ADN. Esto ocurre porque en los chips no están impresos TODOS los genes de un organismo, solamente una sub-muestra. Por lo tanto esto se interpretaría como que no están impresas en el chip las secuencias del gen (sonda) complementario al ADNc.

3. Laboratorio

chips de ADN para estudiar los genes implicados en la fotosíntesis y fotomorfogénesis de *Arabidopsis thaliana*

3.1 Sección 1: Germinación de semillas de *Arabidopsis*

En el kit de FOTODYNE se incluyen unas semillas de *Arabidopsis* y unas cajas petri, papel mayordomo y medio nutritivo. El objetivo de esta actividad es sembrar semillas de *Arabidopsis* y ponerlas a germinar durante el mismo tiempo en dos tratamientos diferentes (bajo la luz y en la oscuridad) para comparar las diferencias que ocurren en las plantas que crecen en cada uno de ellos.

Siembra de semillas de *Arabidopsis*:

- Colocar las semillas en cajas petri con papel filtro remojado en medio nutritivo (se recomienda colocar las semillas de manera que queden separadas para poder observar mejor su crecimiento y desarrollo (ver fotografías adjuntas).
- Las cajas se cubren con papel aluminio y se colocan en la refrigeradora (a 4°C, por 3 a 8 días para sincronizar la germinación de las semillas).
- Después de este tratamiento en frío, las cajas se destapan y se exponen por 30 minutos a la luz para estimular la germinación.
- Luego se colocan las cajas de petri en los dos tratamientos: la mitad irá bajo luz blanca (tratamiento de luz) y la otra será cubierta de nuevo con papel aluminio (tratamiento de oscuridad).
- Se dejarán germinar a una temperatura de 25°C por 3 a 5 días.
- Pasado este periodo, es posible observar la morfología de las plántulas (su fenotipo) y las diferencias en el crecimiento de las mismas bajo los dos tratamientos. Esta parte será preparada por los instructores.



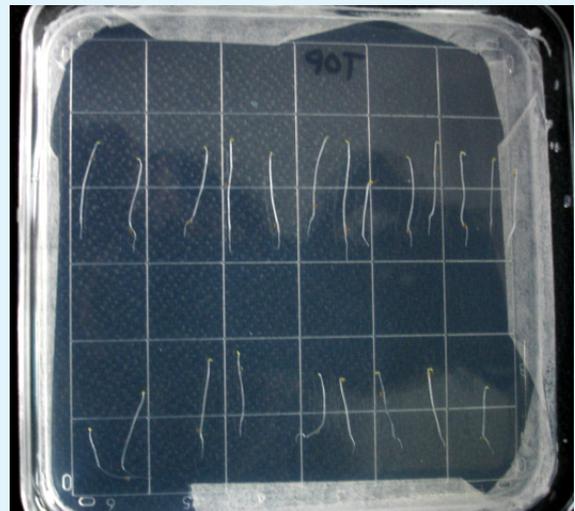
¿Qué diferencias espera observar entre las plántulas que crecieron bajo la luz y aquellas que estuvieron en la oscuridad? Anote sus ideas, compártalas con sus compañeros de grupo.



Observe con una lupa las plántulas de los dos tratamientos y anote las diferencias. Proponga posibles explicaciones de las diferencias observadas y discútalas con sus compañeros.



Plántulas que crecieron bajo la luz



Plántulas que crecieron bajo la oscuridad



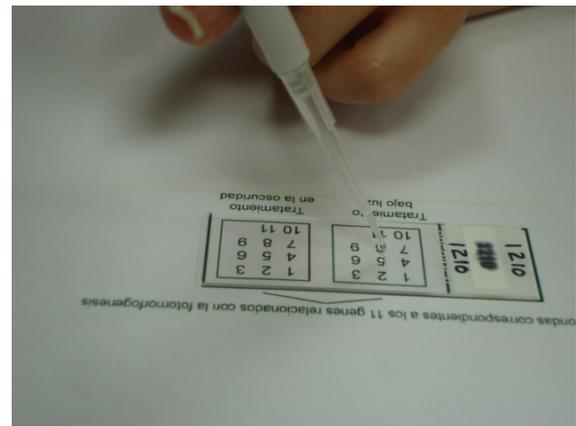
Anote un par de preguntas sobre lo que ha observado y para lo cual no ha podido encontrar una explicación. Discuta sus ideas en clase.

1. _____

2. _____

3.2 Sección 2: Microarreglo de ADN

En esta sección el estudiante imprimirá a mano las sondas sobre el chip de ADN, con 11 genes diferentes involucrados en la fotomorfogénesis. Un microarreglo convencional tendría miles de puntos que contienen secuencias únicas de ADN correspondientes a cada gen del genoma del organismo (cada punto contiene miles de copias de la misma secuencia génica).



3.3 Sección 2A: Impresión del ADN en el chip

Materiales para la impresión

- Micropipetas y puntas para micropipetas
- Porta objetos numerado (manipúlelos de los bordes, nunca toque la parte plana). Se les entregarán guantes para esto
- Once sondas (genes) en 11 tubos diferentes. Se recomienda que el instructor alicuote las sondas en tubos diferentes (5 uL por tubo). Estas son de 23 pares de bases y se encuentran en una solución con sales
- Contenedor para dispensar las puntas de micropipetas
- Marcador no soluble en agua

- Base para colocar los microtubos de 1.5 ml

Materiales para los lavados

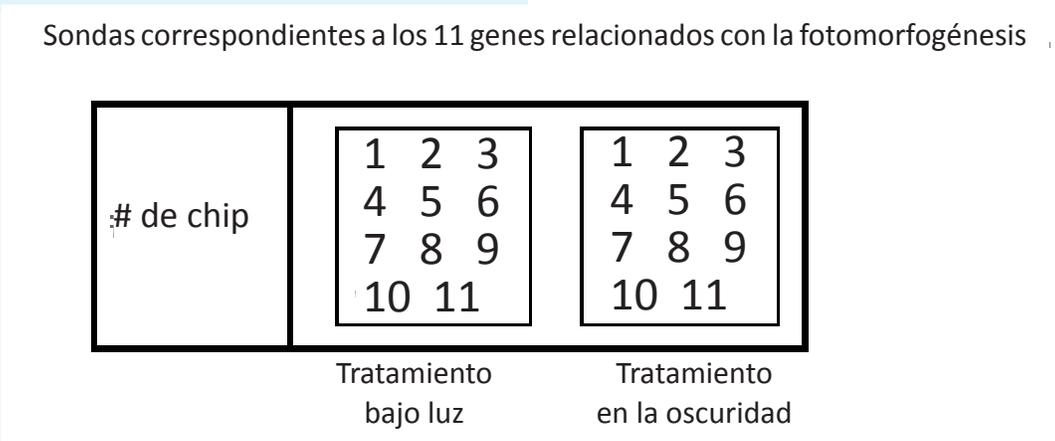
- 2 tubos cónicos de 50 ml con tapadera.
- Base para colocar los tubos de 50 ml.
- Frasco conteniendo la solución de lavado A (0.1% SDS).
- Frasco conteniendo la solución de lavado B (agua desmineralizada).
- Guantes.

- Anote el número que se le ha pre-asignado en su porta-objetos (este número será muy importante para buscar los resultados de su chip en internet).

Procedimiento



- Tomando el porta-objetos por los bordes, colóquelo sobre la imagen de abajo (evite que le caiga polvo u otros materiales a la superficie del mismo).



- Pipetee 1 μ L de la solución que contiene la sonda de ADN en un punto del chip (indicado aquí por un número) en la retícula de la izquierda (que corresponderá al tratamiento bajo luz). Evite tocar la superficie del porta-objetos. Puede soltar el microlitro

de sonda unos milímetros antes. Nota: no habrá ningún problema si se adhiere menos de 1 μ L del líquido por cada punto, así que no es necesario empujar el émbolo de la micropipeta hasta el fondo (y se evita pipetear burbujas).

- Con la misma punta de micropipeta, pipetee 1 μ L de esa misma solución (el mismo gen) en el punto equivalente de la retícula de la derecha (que corresponderá al tratamiento en la oscuridad). Prosiga de la misma manera con los 10 genes restantes.
- Deje el chip sobre la mesa para que seque al aire libre por unos minutos (las sondas que fueron agregadas deberán quedar viendo hacia arriba). Es posible dejar el chip secando durante toda la noche, en este caso se recomienda dejarlo dentro de una gaveta o en una cajita para evitar que le caiga polvo a la superficie.
- Una vez esté seco el chip, se procederá a hornearlo a 150-160°C (~300°F) por 30 minutos para unir covalentemente el ADN al vidrio del porta-objetos (al chip). Esto será realizado por el instructor.

Lavado de los chips para remover el exceso de sal

- Se procede a lavar el chip con las soluciones “Solución de lavado A” y “Solución de lavado B”.
- Ponga su diapositiva en el tubo que contiene la “Solución de lavado A”, para lavar el ADN que no hibridó. Cierre bien el tubo y agite vigorosamente por 2 minutos. Sin dejar caer el chip, vierta la solución A en un recipiente de descarte y vuelva a agregar 40 ml de la misma solución (A) en el tubo. Círralo y agite vigorosamente de nuevo por dos minutos.
- Colóquese un par de guantes (se podría también hacer con la ayuda de unas pinzas, pero pueden haber más riesgos de botar



el chip), agarre el chip cuidando de no tocar las retículas y transféralo al tubo con la “solución de lavado B”. Esta solución eliminará cualquier sal que permanezca en el porta-objetos. Cubra y agite por 1 minuto.

- Sin dejar caer el chip, vierta la solución B en un recipiente de descarte y vuelva a agregar 40 ml de la misma solución (B) en el tubo. Círralo y agite de nuevo por un minuto. Descarte la solución B.
- Con sus manos (usando guantes) elimine el exceso de agua sin botar el chip. Esto puede realizarse con un par de movimientos rápidos de muñeca.
- Deje secar al aire colocando el chip sobre la mesa (siempre con los puntos viendo hacia arriba). Es posible guardar los chips en este punto, durante semanas en un lugar seco y fresco.
- Lave con agua los tubos y tapaderas que contenían las soluciones de lavado A y B, y deles un lavado final con agua desmineralizada. Déjelos secar en una gradilla. Serán utilizados en la siguiente etapa de lavados.

3.4 Sección 2B: Hibridación de ADNc con las sondas del chip

En esta sección el estudiante hibridará un chip con ADNc diana (target DNA) que se simulará haber sido sintetizado a partir de ARNm de plantas que germinaron bajo la luz, y otro chip con ADNc diana de plantas que germinaron en la oscuridad.

Materiales para la hibridación

Se recomienda que el instructor alicuote 5 uL en un tubo para cada grupo de estudiantes.

- ADNc simulando haber sido extraído de las plántulas que crecieron bajo la luz.
- ADNc simulando haber sido extraído de las plántulas que crecieron en la oscuridad
- Micropipetas y puntas de micropipetas
- Chip de ADN de la sección A de este laboratorio
- Dos cubre-objetos de plástico
- Buffer de hibridación (aliquotado en un tubo: 40 uL)

- Frascos de 50 ml conteniendo la solución de hibridación
- Frascos de 50 ml conteniendo la solución de lavado
- Bases para colocar los tubos de 50 ml
- Guantes
- Contenedor para dispensar las puntas de micropipetas
- Microtubos

Materiales para los lavados

- 4 tubos cónicos de 50 ml con tapadera.
- Base para colocar los tubos de 50 ml.
- Frasco con la solución de lavado 1 (1X SSC + 0.03% SDS).
- Frascos con la solución de lavado 2 (0.2X SSC). Esta se utilizará dos veces.
- Frasco con la solución de lavado 3 (0.05X SSC).
- Guantes.

Solución	Solución A	Solución B	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Usada para:	Lavado del chip después de la impresión	Lavado del chip después de la impresión	Lavado del chip después de la hibridación	Lavado del chip después de la hibridación	Lavado del chip después de la hibridación
Volumen de SSC 20X que se debe agregar	-	-	25 mL	7.5 mL	1.25 mL
Volumen de 10% SDS que se debe agregar	10 mL	-	1.5 mL	-	-
Volumen final (agregar agua destilada)	1000 mL	640 mL	500 mL	750 mL	500 mL

Preparación del ADN complementario (“ADNc” que es el ADN diana u objetivo)

En esta actividad, se hará entrega de ADNc previamente marcado con los fluoróforos para que los estudiantes impriman en el chip de ADN (es decir que el estudiante no marcará él mismo los ADNc con fluorescencia, porque este proceso requiere el aislamiento de ARN -un procedimiento delicado incluso en laboratorios de investigación-).

Es importante recalcar de dónde viene este ADNc. Recordemos que el dogma central de la biología molecular indica que durante la síntesis de proteínas, el ADN es transcrito en ARNm, que a su vez es traducido en proteínas.

El ADNc es sintetizado generalmente de ARNm maduro, sin secuencias intrónicas, utilizando la enzima transcriptasa reversa (o retrotranscriptasa).



Dogma central de la biología molecular

Procedimiento

- Obtenga los dos tubos de ADNc diana simulado: el que proviene de plantas que crecieron bajo la luz y el otro que proviene de plantas que crecieron en la oscuridad.
- Pipetee el contenido del tubo de ADNc del tratamiento LUZ: “L” (son 20 uL) en el centro de la retícula de la izquierda (aproximadamente entre los números 5 y 8). Luego, cuidadosamente, coloque sobre la retícula el cubre-objetos.
- Pipetee el contenido del tubo de ADNc del tratamiento OSCURIDAD: “O” (son 20 uL) en el centro de la retícula de la derecha (aproximadamente entre los números 5 y 8). Luego, cuidadosamente, coloque sobre la retícula el cubre-objetos.

- Deje las sondas de ADN del chip hibridar con el ADNc por 30 minutos (puede ser más tiempo, mientras no se seque la solución de hibridación). Se recomienda cubrir los chips de la oscuridad para evitar que se dañe el fluoróforo.

Lavado de la diapositiva

- Marcar cuatro tubos de 50 ml con un marcador indeleble como sigue: 1, 2A, 2B, 3 y coloque 40 ml de las soluciones de lavado correspondientes en cada uno de ellos.



- Quite cuidadosamente el cubre-objetos del porta-objetos e inmediatamente póngalo en la solución de lavado 1. Se pondrán dos porta-objetos (se tocan por la parte posterior) por tubo con solución de lavado. La solución de lavado contiene SDS y sal (SSC). El SDS elimina el buffer de hibridación y el ADN que no hibridó con la sonda. El SSC (sal) ayuda al ADN que hibridó a mantenerse hibridado con la sonda complementaria.
- Cierre bien el tubo 1 y agite vigorosamente por 2 minutos. Cuidadosamente, con sus dedos (use guantes) saque el chip y transfíralo a la solución de lavado 2A. No toque la retícula, toque el chip por la parte blanca con el número de identificación. Esta solución de lavado contiene una concentración de sal menor que la solución de lavado 1. Una menor concentración de sal incrementa la probabilidad de lavar ADNc que no hibridó perfectamente con las sondas. Este paso es importante para asegurarse que la fluorescencia que se lea (de ADNc hibridado) corresponda exactamente al gen impreso en el chip, es un paso que asegura la especificidad de la hibridación.
- Cierre bien el tubo 2A y agite vigorosamente por 2 minutos. Cuidadosamente, con sus dedos (use guantes) saque el chip y transfíralo a la solución de lavado 2B (es igual que la 2A). No toque la retícula, toque el chip por la parte blanca con el número de identificación.
- Transfiera cuidadosamente a la solución de lavado 3. Cierre bien el tubo 3 y agite vigorosamente por 1 minuto.
- Esta solución de lavado contiene una concentración de sal menor que la solución de lavado 2A y 2B. Esto aumenta la especificidad de la hibridación, permitiendo aún más lavar los ADNc que no tenían un complemento perfecto.
- Con sus dedos (use guantes) saque el chip del tubo 3 y cuidadosamente sacúdalo para eliminar el exceso de líquido. No toque la retícula, toque el chip por la parte blanca con el número de identificación. Coloque los chips en toallas de papel para dejar secar (con la retícula viendo hacia arriba) y cubra para mantener fuera de la luz.
- El chip está ya listo para ser enviado al centro de Genómica de la Universidad de Wisconsin para su escaneo.
- El proceso de escaneo será realizado con un láser de longitud de onda de 488 nm. Esta luz excitará el fluoróforo de los ADNc que hibridaron con la sonda en el chip. Una señal intensa indica que hubo muchas copias de ADNc que hibridaron y, por consiguiente, una alta expresión de ese gen en particular. Los resultados del escaneo de su chip, se publicarán en el siguiente enlace bajo el nombre de Universidad Rafael Landívar (Guatemala) y el número de diapositiva:



3.5 Información de los genes que se adherirán (imprimirán) en el microarreglo

Gen #	Nombre del gen	Id. en base de datos de <i>Arabidopsis</i> (www.arabidopsis.org)	Señal detectada en muestras provenientes del tratamiento de luz	Señal detectada en muestras provenientes del tratamiento de oscuridad	Función
1	Circadian clock associated (CCA1)	AT2G46830	X	-	Este gen codifica para una proteína que está asociada a la regulación del ritmo circadiano en las plantas. Esta regulación es vital para las plantas, que son organismos sésiles y que requieren de medidores del tiempo precisos que les permitan responder a cambios en el ambiente. Basados en estudios de mutantes, la pérdida de la función de CCA1 afecta la expresión génica de la regulación del fitocromo.
2	Ribulose biphosphate carboxylase small subunit (RuBisCo)	AT1G67090	X	-	RuBisCo es la proteína más abundante en los organismos porque inicia el proceso que convierte el dióxido de carbono en azúcar (a través del ciclo de Calvin). Asimismo, RuBisCo cataliza la fijación de oxígeno.
3	Elongated hypocotyl (HY5)	AT5G11260	X	-	Este gen codifica para un factor de transcripción que se une al ADN y, en la presencia de la luz, activa a varios promotores de otros genes. En la oscuridad, este gen está reprimido por COP1.
4	Arabidopsis thaliana homeobox leucine zipper protein (ATHB)	AT2G44910	-	X	Este gen codifica para un factor de transcripción, del tipo "leucine zipper", que se une al ADN.

Gen #	Nombre del gen	Id. en base de datos de <i>Arabidopsis</i> (www.arabidopsis.org)	Señal detectada en muestras provenientes del tratamiento de luz	Señal detectada en muestras provenientes del tratamiento de oscuridad	Función
5	Beta expansin (bEXP)	AT2G20750	-	X	Involucrado en la expansión de la pared celular.
6	Phytochrome A (PHYA)	AT2G09570	-	X	Actúa como un switch que regula la fotomorfogénesis.
7	Chlorophyll A/B binding protein (CAB)	AT2G10340	X	-	Forma parte de la maquinaria molecular de la fotosíntesis.
8	Constitutive photomorphogenic (COP1)	AT2G32950	X	X	Es un gen que codifica para una proteína reguladora de la fotomorfogénesis.
9	De-etiolated (DET1)	AT2G10180	X	X	Es un gen que codifica para una proteína reguladora de la fotomorfogénesis.
10	Actin (control positivo)	AT2G09810	X	X	La actina es una proteína involucrada en la formación de los filamentos que son parte del citoesqueleto de la célula. El gen que codifica para la actina es expresado en todas las células, todo el tiempo.
11	Glycine-rich protein (control negativo)	AT2G07520	-	-	La proteína codificada por este gen funciona en estadios tardíos del desarrollo floral. Para experimentos que utilizan plantas jóvenes, este gen funciona como un buen control negativo porque no se espera que se exprese en este estadio del desarrollo de las plántulas.

Nota: Los genes trabajados en esta actividad no pretenden presentar el modelo completo de los genes implicados en la fotobiología. Más bien, fueron seleccionados para ilustrar distintos principios biológicos como la expresión génica, la transducción de señales químicas, las reacciones bioquímicas catalíticas y la conservación de las estructuras proteínicas.

- Imprimir esta imagen en una hoja aparte, para que al colocarle encima la diapositiva quede en una superficie plana.

# de chip	1 2 3	1 2 3
	4 5 6	4 5 6
	7 8 9	7 8 9
	10 11	10 11
	Tratamiento bajo luz	Tratamiento en la oscuridad

4. Revisión

Pasos de un experimento con microarreglos

En un experimento típico de microarreglos, se desea comparar dos tratamientos diferentes para identificar los genes que actúan bajo cada una de esas condiciones experimentales.

Preparación del chip

Las sondas de ADN que representan a cada gen del genoma son adheridas a la superficie de vidrio del porta-objetos. La posición de cada gen en el porta-objetos se registra, para saber en dónde se encuentra cada gen y saber cuáles son los que hibridaron (es decir, cuáles son los genes que están funcionando en ese tratamiento en particular).

Preparación y marcaje del ADN complementario (ADNc) proveniente de plantas sometidas a cada uno de los tratamientos.

Extracción del ARN mensajero (ARNm) del organismo bajo estudio. Eso se hace porque el ARNm es un registro de los genes que están siendo expresados en las células en una condición determinada.

Al ARNm se le hace una transcripción reversa para obtener el ADNc (ADN complementario). Esto se realiza porque el ARN es muy lábil, se degrada con facilidad y es más difícil de manipular.

Utilización de un tinte fluorescente para marcar el ADNc. Se utilizan dos chips, uno por cada tratamiento a ser analizado.

Hibridar el ADNc con las sondas de ADN que ya están impresas en el chip. Si el ADNc encuentra alguna sonda cuya secuencia sea complementaria a la suya, entonces ocurrirá una hibridación. Algunas sondas no tendrán ningún complemento de ADNc. Esto es porque algunos genes no se expresan en ciertos momentos, por lo que no habrá ningún ARNm presente a la hora de la extracción. Posterior a la hibridación, se realiza una serie de lavados para eliminar el exceso del ADNc que no hibridó.

Visualizar el chip con un escáner láser que excita el fluoróforo con el que fueron marcados los ADNc. Los genes que hibridaron con el ADNc, corresponden a los genes que se estaban expresando en la planta en el momento de la extracción del ARN y son los que van a fluorescer en el escáner.

5. Resultados

Observe las imágenes que provienen del Centro de Genómica de la Universidad de Wisconsin, en donde realizaron el barrido (scan) de las

diapositivas trabajadas en clase (<http://www.fotodyne.com/content/gallery>). En grupos observe los resultados obtenidos.

Responda:

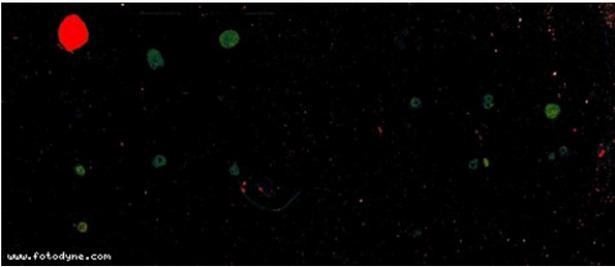
¿Cómo se observan los genes que están encendidos (expresados)?, ¿Cómo se observan los genes que están apagados (no están expresados)? y ¿Cómo se interpretan los controles positivo y negativo?

Anote qué pruebas en el chip hibridaron con ADNc proveniente del tratamiento de luz, qué pruebas hibridaron con ADNc proveniente del tratamiento de oscuridad, qué pruebas hibridaron con ambos tratamientos y cuáles con ninguno. Revise la función de esos genes.

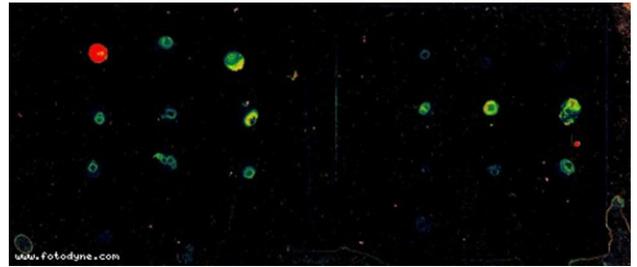
¿Qué ADNc que eran abundantes (puntos con mayor intensidad en fluorescencia)?

Ejemplo de chips preparados en Guatemala, durante el curso teórico-práctico para la enseñanza de la genómica orientado a profesores de ciencias biológicas de educación media y superior (FACYT 2011).

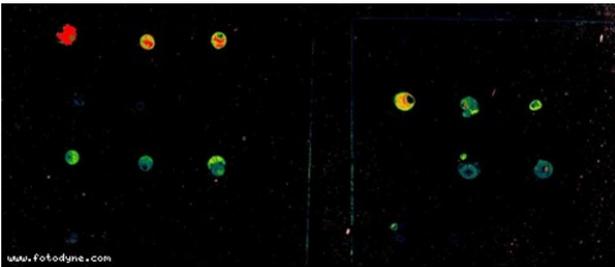
1209



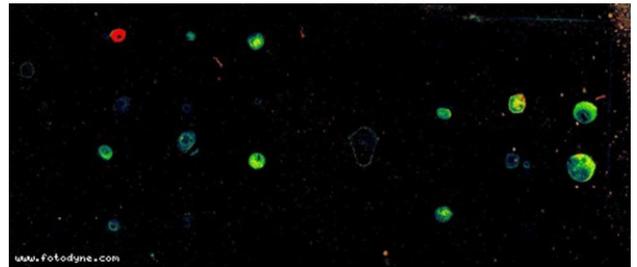
1210



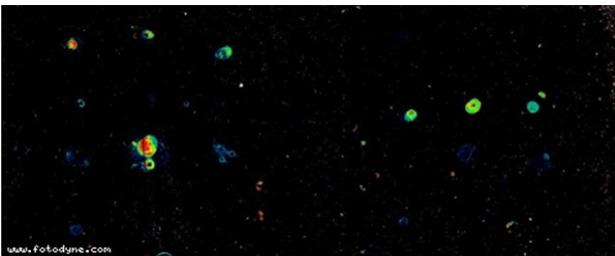
1211



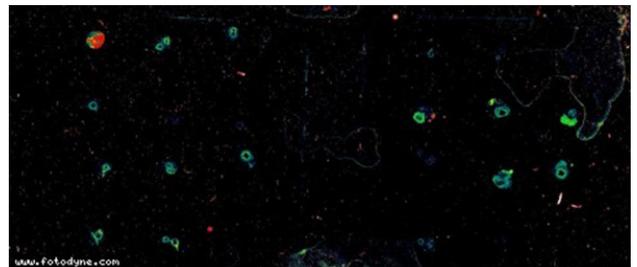
1214



1215



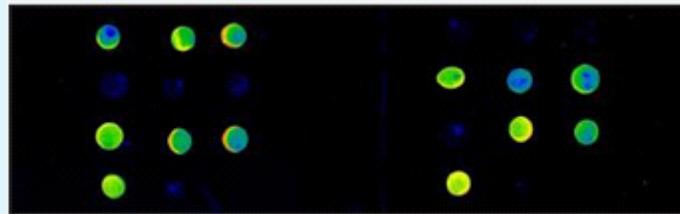
1216



6. Discusión de resultados

Los resultados esperados de la hibridación del chip de *Arabidopsis thaliana* con los 11 genes

impresos (ver listado en el cuadro de la página 27) son los siguientes:



Crédito: Fotodyne

Es importante enfatizar que el gen #10 –actina- (control positivo), debe estar fluorescente en los dos experimentos y el gen #11 – proteína glycin-rich- (control negativo) no debe estar fluorescente en ninguno de los experimentos.

El gen 10 (control positivo) es un gen que codifica la actina y es expresado en todas las células, todo el tiempo. En cambio, el gen 11 (control negativo) es un gen que se expresa únicamente en estadios tardíos del desarrollo de la planta

(floración). En este experimento, el ARN fue extraído de plantas jóvenes de *Arabidopsis* que aun no han iniciado la formación de botones florales.

Cada grupo deberá analizar su chip de ADN y comparar con los resultados esperados.

Es importante discutir sobre las razones por las cuales los resultados difieren de lo esperado.

7. Anexos

Anexo 1 Sondas sobre el chip

5' - **T C A C** - 3' gen 1 

5' - **A T T A** - 3' gen 2 

5' - **A A C C** - 3' gen 3 

5' - **A T T T** - 3' gen 4 

5' - **C T C C** - 3' gen 5 

5' - **G A C C** - 3' gen 6 

5' - **C A T A** - 3' gen 7 

5' - **A G T A** - 3' gen 8 

5' - **A C C C** -3' gen 9

5' - **C G G G** -3' gen 10

5' - **A T G G** -3' gen 11

5' - **A T A T** -3' gen 12

5' - **G T C A** -3' gen 13

5' - **A A G G** -3' gen 14

5' - **T C G G** -3' gen 15, control negativo

5' - **T T G G** -3' gen 16, control positivo

Anexo 2 ADNc proveniente de las plantas que crecieron bajo la luz

En la luz

ARNm: 5' - **U U G G C A** - 3' ^{x5}
transcripción ↓ *reversa*

ADNc: 5' - - 3'

En la luz

ARNm: 5' - **A A G G C C** - 3' ^{x4}
transcripción ↓ *reversa*

ADNc: 5' - - 3'

En la luz

ARNm: 5' - **C G G G A U** - 3' ^{x1}
transcripción ↓ *reversa*

ADNc: 5' - - 3'

En la luz

ARNm: 5' - **A A A U U U** - 3' ^{x2}
transcripción ↓ *reversa*

ADNc: 5' - - 3'

En la luz

ARNm: 5' - **A A C C G U** -3' ^{x2}
transcripción ↓ *reversa*

ADNc: 5' - -3'



En la luz

ARNm: 5' - **G A C C U A** -3' ^{x1}
transcripción ↓ *reversa*

ADNc: 5' - -3'

Anexo 3 ADNc proveniente de las plantas que crecieron en la oscuridad

En la oscuridad

ARNm: 5' - **U U G G C A** -3' ^{x4}
transcripción ↓ *reversa*

ADNc: 5' - -3'



En la oscuridad

ARNm: 5' - **A U G G G C** -3' ^{x1}
transcripción ↓ *reversa*

ADNc: 5' - -3'



En la oscuridad

ARNm: 5' - **C U C C U A** -3' ^{x1}
transcripción ↓ *reversa*

ADNc: 5' - -3'



En la oscuridad

ARNm: 5' - **A U U A G C** -3' ^{x2}
transcripción ↓ *reversa*

ADNc: 5' - -3'

En la oscuridad

ARNm: 5' - **C G G G A U** -3' ^{x1}
transcripción ↓ *reversa*

ADNc: 5' - -3'



En la oscuridad

ARNm: 5' - **G A C C U G** -3' ^{x1}
transcripción ↓ *reversa*

ADNc: 5' - -3'



En la oscuridad

ARNm: 5' - **C U C A A A** -3' ^{x1}
transcripción ↓ *reversa*

ADNc: 5' - -3'



En la oscuridad

ARNm: 5' - **A G U A C A** -3' ^{x5}
transcripción ↓ *reversa*

ADNc: 5' - -3'

Anexo 4 Glosario

A

ADNc: ADN complementario = ADN sintetizado a partir de ARN mensajero maduro con la transcriptasa reversa.

***Arabidopsis thaliana*:** planta con flor de la familia Brassicaceae, utilizada como un organismo modelo.

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero, obtenido después de la transcripción del ADN, que contiene la información genética necesaria para utilizarse en la síntesis de proteínas.

B

Bioinformática: análisis computarizado de datos biológicos.

C

Chip de ADN: otro nombre para microarreglos. Diana: (target) ADNc que hibrida con la sonda de ADN impresa en el chip o microarreglo.

E

Etiolación: proceso de descoloración de las plantas que crecen en la ausencia total o parcial de luz. Se caracteriza por tallos delgados, frágiles y clorosis.

F

Fenotipo: conjunto de características físicas, morfológicas y conductuales que posee un organismo en un ambiente dado. Es la expresión del genotipo moldeado por el ambiente.

Foto-morfogénesis: cambios en el desarrollo y crecimiento de la planta mediados por la luz.

G

Genoma: conjunto de genes que posee un organismo.

Genotipo: totalidad de la información genética que posee un organismo.

H

Hipocótilo: término botánico que se refiere a la parte de la plántula que germina en una semilla y que se encuentra debajo de los cotiledones y va hasta la punta de la radícula. En plántulas etioladas, el hipocótilo se encuentra notoriamente extendido.

M

Microarreglo: (chip de ADN) arreglo miniatura de fragmentos de genes (aproximadamente de 25-75 pares de bases) adheridos (o impresos) en superficies de vidrio. Tener miles de fragmentos únicos de los genes que conforman el genoma de un organismo en un solo chip, le permite a los investigadores definir cambios en la expresión génica.

O

Organismo modelo: organismos que poseen características ventajosas que los hacen ser idóneos para la investigación. Estas características pueden ser: tener un ciclo de vida corto o ser fáciles de manipular.

P

Promotor: región del ADN en la cual se une la enzima ARN polimerasa antes de iniciar la transcripción del ADN en ARN.

R

Ritmo circadiano: mecanismo biológico de variaciones rítmicas fisiológicas en intervalos regulares de tiempo, que permiten la sincronización celular.

T

Traducción: síntesis de proteínas a partir de ARNm.

Transcripción: síntesis de ARN a partir del ADN, utilizando la ARN polimerasa

Transcriptasa reversa: proteínas que están involucradas en el proceso de transcripción.

Enlace para acceder a las grabaciones del taller de genómica impartido a profesores de ciencias biológicas en agosto 2011:

<https://sas.illuminate.com/m.jnlp?sid=2009324&password=M.BD748E3BBFEB44FBB918A46203230C>

Es necesaria la descarga de JAVA, pueden hacerlo en este enlace:

<http://www.java.com/es/download/>