

Introducción

- ⇒ No existe una relación directa entre la cantidad de ADN y la complejidad del organismo
- ⇒ La organización de la información genética es diferente entre organismos eucariontes y procariontes.
 - ⇒ En los **procariontes** los cromosomas están muy compactados y son traducidos en su totalidad.
 - ⇒ En los **eucariontes** el cromosoma no es tan condensado, los genes aparecen dispersos y son más complejos. Existen, además, zonas de ADN del que no se conoce la función.

Tipos de secuencias en el ADN

- ⇒ **Únicas** (solo se presentan una vez en el genoma) [70 %]
 - ⇒ **Codifican proteínas** (genes: **intrones** y **exones** [*con más intrones que exones*]) un 3 %
 - ⇒ **Pseudogenes** (función desconocida) → copias inactivas de genes repetidos.
 - ⇒ **ADN espaciador** (función desconocida) → largas secuencias de ADN dispersas por el genoma y separando los genes.
- ⇒ **Moderadamente repetidas** (cientos de veces) [20 %]
 - ⇒ **Codifican proteínas** (histonas o proteínas ribosomales).
 - ⇒ **Codifican ARNs** (ARN_r y ARN_t)
- ⇒ **Altamente repetidas**
 - ⇒ **ADN satélite** (función desconocida)
 - ⇒ Secuencias muy cortas de nucleótidos (entre 3 y 4 nucleótidos) repetidas miles de veces y adyacentes entre sí.
 - ⇒ Localizado en zonas muy concretas de los cromosomas (telómeros y centrómero)
 - ⇒ **Telómeros** (función de protección de los cromosomas)
 - ⇒ **Centrómero** (reparto de los cromosomas en la división celular)
 - ⇒ Existen enfermedades que se dan por estas repeticiones dentro de un gen.
 - ⇒ **ADN repetitivo y disperso** (secuencias muy largas y dispersas por todos los cromosomas).
 - ⇒ Secuencias *Alu* (aproximadamente 200 nucleótidos, repetidos miles de veces). Tienen un punto de corte para la enzima Alu1.
 - ⇒ Elementos genéticos móviles. Tienen la capacidad de migrar de una parte a otra del genoma.
 - ⇒ Secuencias palindrómicas
 - 5' – **ATGCTTAAGCAT** – 3'
 - 3' – **TACGAATTCGTA** – 5'
 - ⇒ Estas secuencias se pueden enrollar entre sí y forman señales de parada de la transcripción.

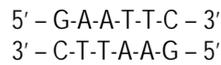
Requisitos de un gen

- ⇒ Un gen debe tener unas determinadas características:
 - ⇒ Una región reguladora
 - ⇒ Sin región reguladora no se puede hablar de gen. Puede haber zonas reguladoras en cualquier zona del gen o alejada a miles de nucleótidos de distancia.
 - ⇒ Parte estructural (gen estructural)
 - ⇒ **Intrones**: mayor parte del gen que no formarán parte de la molécula codificada final.
 - ⇒ **Exones**: menor parte del gen que formarán parte de la molécula codificada final.
 - ⇒ **Ambos** se transcriben.
- ⇒ **GEN**: unidad funcional compleja para la síntesis regulada de, al menos, una molécula de ARN, ya que algunos no llegan a ser proteínas (ARN_r, ARN_t...)

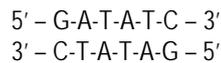
Determinación de las secuencias de los ácidos nucleicos.

- ⇒ Corte con endonucleasas
 - ⇒ **DNAasas** o **RNAasas**
 - ⇒ **Exonucleasas**: atacan los extremos de los ácidos nucleicos, nucleótido tras nucleótido, liberando mononucleótidos.
 - ⇒ **Endonucleasas**: atacan las partes centrales de los ácidos nucleicos.
 - ⇒ **Endonucleasas de restricción**:

- ⇒ Atacan por **secuencias específicas** al ácido nucleico.
- ⇒ Son sintetizadas por bacterias como mecanismo de defensa contra los bacteriófagos.
- ⇒ Las bacterias metilan las secuencias contenidas en su DNA para que este no sea degradado.
- ⇒ Pueden **cortar** de **dos** maneras distintas.
 - ⇒ **Extremos pegajosos:** Las hebras de ADN quedan cortadas a distinta altura.



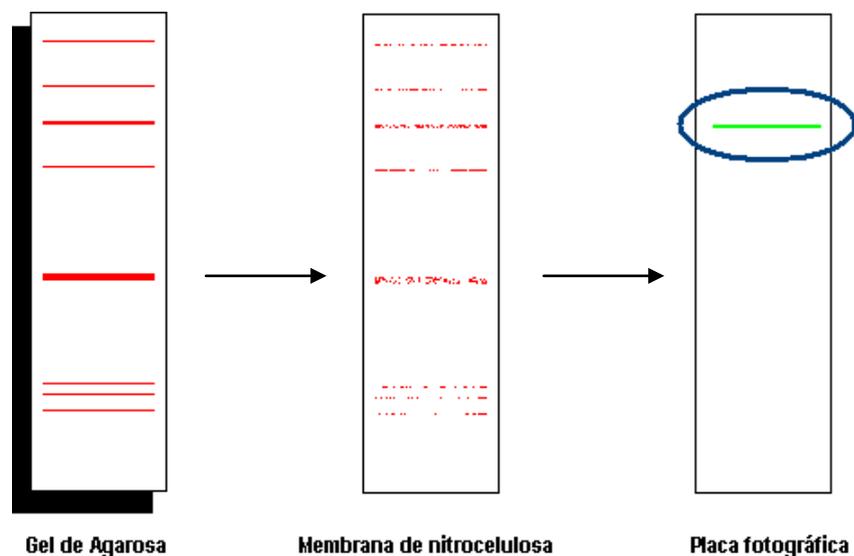
- ⇒ **Extremos romos.** Las hebras de ADN quedan a la misma altura.



Análisis de secuencias determinadas

⇒ Southern blotting (ADN)

- ⇒ Análisis de secuencias víricas, bacterianas o tumorales que señalan al 100 % la presencia de los mismos.
- ⇒ **TÉCNICA:**
 - ⇒ Se fragmenta el ADN.
 - ⇒ Se realiza una electroforesis.
 - ⇒ Se desnaturaliza el DNA
 - ⇒ Se transfiere el ADN a una membrana de nitrocelulosa.
 - ⇒ Se coloca una sonda radiactiva.
 - ⇒ Se observa mediante autorradiografía.



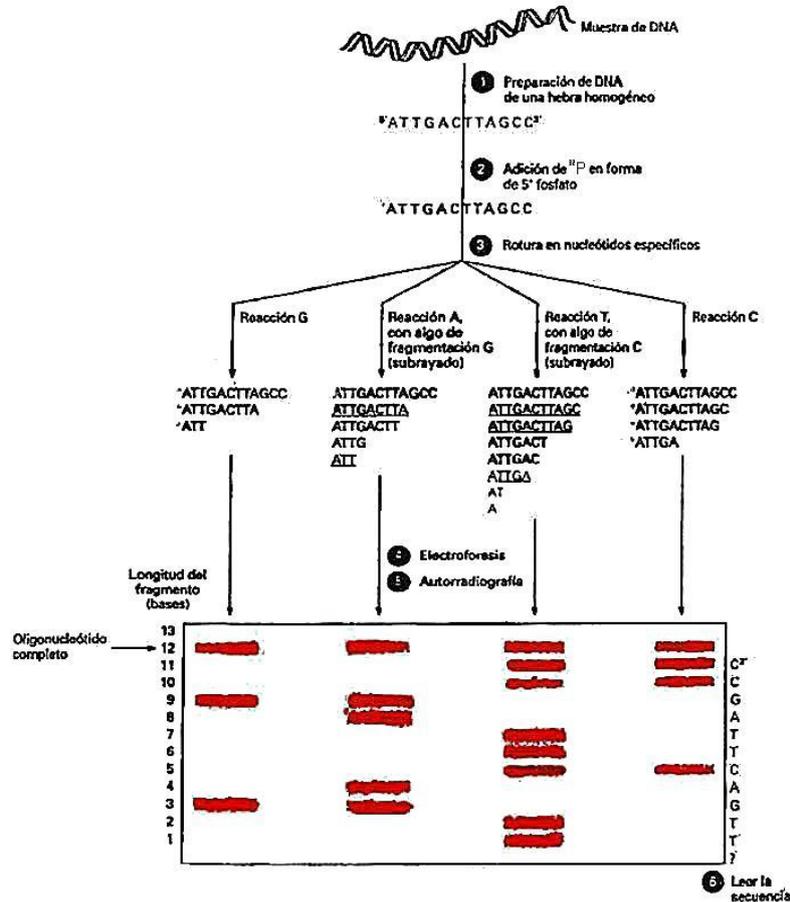
⇒ Northern blotting (ARN)

- ⇒ Se realiza la misma técnica que con el southern blotting, pero con moléculas de ARN.

Análisis de secuencias completas

⇒ Los análisis completos nos dicen exactamente el orden de cada uno de los nucleótidos contenidos en el fragmento.

⇒ Método químico



⇒ Como las moléculas más pequeñas han migrado más, tendremos franjas desde la parte superior a la inferior, de las cuales, la más inferior, corresponde a un mononucleótido, la superior a esta a un dinucleótido, con lo que sabremos el orden exacto de la secuencia del ADN.

⇒ Método enzimático

⇒ La molécula inicial la cortamos, ahora, a partir de la secuencia obtenida, fabricamos la hebra complementaria con una enzima.

⇒ Repartiremos la muestra en cuatro tubos.

⇒ En cada uno de ellos meteremos lo necesario para que la ADN polimerasa I fabrique el ADN complementario.

⇒ En los tubos debe haber: cebadores, DAN polimerasa I, nucleótidos trifosfato y didesoxirribonucleótidos trifostato con la base que se desee (A, T, C o G) y magnesio iónico (Mg^{2+})

⇒ Se practica una electroforesis

⇒ Para marcar la muestra pueden usarse marcadores radiactivos (^{32}P) o fluorescentes.

⇒ Se suele marcar sólo el cebador.

⇒ Si se marca con fluorescencia se utiliza un color para cada base y se colocan en el mismo tubo. Se realiza una electroforesis conjunta y se ordenan las bases. El orden puede venir marcado por un scanner de fluorescencia que registra la secuencia de bases mediante picos.