

XII OLIMPIADA IBEROAMERICANA DE BIOLOGÍA

SETIEMBRE 2018

LOJA-ECUADOR

EXAMEN PRÁCTICO

BIOLOGÍA MOLECULAR

TOTAL DE PUNTOS: 90

TIEMPO PERMITIDO: 120 minutos

País: ESPAÑA

**ESCRIBA EL CÓDIGO EN EL
SIGUIENTE CUADRADO**

CÓDIGO DE ESTUDIANTE	
-----------------------------	--

EXÁMEN PRÁCTICO DE BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA

Este año las Olimpiadas se desarrollan en uno de los países que albergan la mayor diversidad de orquídeas a nivel mundial. En Ecuador se han descrito 3920 especies de 228 géneros, 40% de las especies son endémicas. Esta diversidad está sometida a varias amenazas como la deforestación y fragmentación de su hábitat, y la extracción de plantas destinadas al comercio ilegal. CITES (Convenio Internacional de Comercio de las especies amenazadas) es una convención que regula el movimiento de especies que están amenazadas como resultado del comercio internacional. Hay pocas orquídeas que se pueden extraer y comercializar legalmente y la gran mayoría no. En el país se han desarrollado medidas de control de la extracción ilegal de orquídeas de sus bosques naturales; sin embargo, esta amenaza persiste. Uno de los retos para combatir el comercio ilegal es la complejidad taxonómica de familia, por la cual es muy difícil identificar si la especie que ha sido extraída del bosque es o no una especie protegida bajo el convenio CITES. El análisis de ADN puede ser utilizado en investigaciones en torno a la colección ilegal de especies y en algunos casos, como el de la familia Orchidaceae, puede ser la única opción factible.



Masdevallia mendozae
Fuente: Alberto Mendoza

Este examen tiene dos tareas prácticas y algunas preguntas relacionadas; todas diseñadas en torno a un caso de comercio ilegal de orquídeas, el objetivo será la identificación de una orquídea, muy parecida a *Masdevallia mendozae*, que ha sido confiscada en la frontera entre Ecuador y Perú, cuyos portadores alegan que es una especie parecida que está amparada por el convenio CITES para ser legalmente comercializada. Hay tres portadores y tenemos que identificar si alguno de éstos tiene razón.

Cada tarea práctica está explicada con detalle. Al iniciar verifique que cuenta con todos los materiales que requiere, lea con mucha atención las instrucciones y trabaje cuidadosamente, si por error daña o pierde alguna muestra o reactivo este no será reemplazado.

Material

Al empezar confirma si tienes en tu mesa todo el material abajo indicado. Si faltara algún material, levanta la mano para llamar a un ayudante.

- a) Tubo con agua estéril (Tubo H₂O)
- b) Tubo con buffer 5x (Tubo T)
- c) Tubo con cloruro de magnesio (Tubo M)
- d) Tubo con Cebador (Primer) sentido (Fw) (Tubo Fw)
- e) Tubo con Cebador (Primer) antisentido (Rv)
- f) Tubo con dNTPs (tubo D)
- g) Tubo con polimerasa (Tubo GoTAQ)
- h) Tubos con muestras de ADN (Tubo 1, tubo 2, y tubo 3).
- i) Tubo con tampón de carga o de corrida (Tubo "Col")
- j) Gradilla para mantener en frío los tubos indicados en los puntos a-g.
- k) Pipetas P10, P20 y P200
- l) Cajas con puntas amarillas y blancas
- m) Tubos Eppendorf de 1.5 uL (5)
- n) Tubos de PCR (10)
- o) Guantes de látex
- p) Marcador de tinta permanente
- q) Recipiente de desechos

Actividad 1: Reacción de PCR a partir de ADN total

ATENCIÓN En la actividad 1 tendrás un tiempo máximo de 30 minutos para preparar la reacción y entregar los cuatro tubos al asistente. Si los tubos no están listos en ese tiempo, podrás continuar con las demás preguntas.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que te permite copiar billones de veces un segmento de ADN. La especificidad del fragmento de ADN amplificado está determinada por los primers utilizados. En esta PCR usted utilizará primers diseñados en una región específica, a la que llamaremos *MasD*, cuya variabilidad es única para la especie *Masdevallia mendozae*, endémica de Loja y protegida por el convenio CITES. Así, el fragmento *MasD* se amplificará únicamente si la muestra corresponde a esta especie.

Procedimiento

(Trabaje siempre con guantes, para no contaminar las muestras y para protegerte del contacto con los reactivos)

1. Tomar un tubo tipo Eppendorf (1,5 ml) estéril

- Con el marcador permanente, etiqueta el tubo como *Mix-PCR* (en este colocarás la mezcla con los reactivos para la PCR, excepto el ADN), y colócalo en hielo.
- Añade al tubo *Mix PCR* el volumen indicado de cada reactivo, usa la pipeta que se indica y no olvides cambiar cada vez de punta.

Reactivo	Volumen (µL)	Pipeta
H ₂ O	53,5	P200
Buffer 5x "T"	20	P20
MgCl ₂ "M"	8	P20
Cebador (Primer) sentido (Fw)	5	P20
Cebador (Primer) antisentido (Rv)	5	P20
dNTPs "D"	3	P20
Polimerasa GoTAQ	0.5	P10

- Una vez que tengas todos los reactivos del paso anterior en el tubo *Mix-PCR* con la pipeta P20 y una punta estéril mezcla todos los reactivos por pipeteo.
- Prepara 4 tubos de PCR y con el marcador permanente etiquétalos: el primer tubo con el código de tu mesa y el número 1, por ejemplo, A1; el segundo con el código de tu mesa y el número 2, el tercero con el código de tu mesa y el número 3, y el último con el código de tu mesa y el signo negativo "-".
- Coloca los cuatro tubos en el hielo.
- En cada tubo coloca 19µL de la mezcla de reactivos *Mix-PCR* y 1µL del ADN correspondiente (1, 2 o 3).
- En el tubo que etiquetaste como negativo, coloca 1 µL de agua estéril.
- Llama a un asistente y entrégale tus cuatro tubos de PCR, verifica que el código de tu mesa esté bien escrito. El asistente centrifugará los tubos y colocará en el termociclador con el programa de amplificación adecuado. La amplificación del fragmento *MasD* tomará 1 hora, al finalizar este tiempo usted cargará sus muestras en un gel de agarosa para verificar la amplificación.

(Puntuación: 10 puntos por cada muestra correcta, incluido el agua = 40 puntos.)

Durante este tiempo de espera, dé respuesta a las siguientes preguntas:

- La PCR es una técnica que consiste en una serie de ciclos que permitirán: la separación de la doble hélice del ADN molde, la unión de los cebadores (primers) molde, y la amplificación de la nueva cadena. Escoja la opción con los pasos de la PCR en el orden correcto en que éstos deben darse. **Coloca la opción que escogiste en la hoja de respuestas.**
 - Desnaturalización inicial (10 ciclos), desnaturalización de cada hebra sintetizada + anillamiento de cebadores + extensión (20-40 ciclos) y extensión final (1 ciclo).
 - Desnaturalización inicial (10 ciclos), desnaturalización de cada hebra sintetizada + extensión + anillamiento de cebadores (20-40 ciclos) y extensión final (1 ciclo).
 - Desnaturalización inicial (1 ciclo), desnaturalización de cada hebra sintetizada + anillamiento de cebadores + extensión (20-40 ciclos) y extensión final (1 ciclo).

- d. Desnaturalización inicial (1 ciclo), desnaturalización de cada hebra sintetizada + anillamiento de cebadores + extensión (5 ciclos) y extensión final (1 ciclo).
2. Cada paso de la PCR requiere de un tiempo y una temperatura específica. ¿Cuál es la base para seleccionar la temperatura de anillamiento de los cebadores que se usan en una reacción de PCR? **Coloca la opción correcta en la hoja de respuestas.**
- a. La longitud y el contenido de guaninas (G) y citosinas (C) del cebadores.
 - b. La longitud y el contenido de guaninas (G) y citosinas (C) del fragmento a amplificar.
 - c. Los sitios de restricción que contiene el cebadores diseñado.
 - d. La temperatura de reacción ideal para la polimerasa.
3. ¿Cuál es el propósito de haber preparado una master mix? **Anota la opción correcta en la hoja de respuestas**
- a. Minimizar el error por el pipeteo de pequeños volúmenes
 - b. Reducir la variabilidad entre las muestras.
 - c. Ahorrar tiempo
 - d. Todas las anteriores
4. Asume que la PCR realizada con cebadores específicos ha finalizado y que el resultado es el que se muestra en la figura 1.
- 4.1. ¿Cuál es la razón más probable por la cual en el pocillo en el que se cargó el resultado de la PCR con agua estéril ("-") se observa también una banda débil de un tamaño similar al esperado, que se observa también en las demás muestras? **Anota la opción que escoja en su hoja de respuestas**
- a) Porque el investigador cometió un error y el lugar de colocar agua, colocó ADN de la muestra 1.
 - b) Porque al manipular sin cuidado los tubos pudo salpicar una mínima cantidad de ADN al tubo que debía contener sólo agua estéril.
 - c) Porque el agua no era estéril y pudo contener algún microorganismo que se amplificó con los oligonucleótidos utilizados.
 - d) Porque los tubos de PCR no estaban esterilizados y por tanto el tubo en el que se colocó el agua estéril pudo contener algún microorganismo que se amplificó con los oligonucleótidos utilizados.

En otra experiencia de PCR con los mismos cebadores específicos para todos los tubos se obtuvo el resultado observado para las muestras 1-7

4.2 ¿Podemos confiar en este resultado?

- a) No
- b) Sí

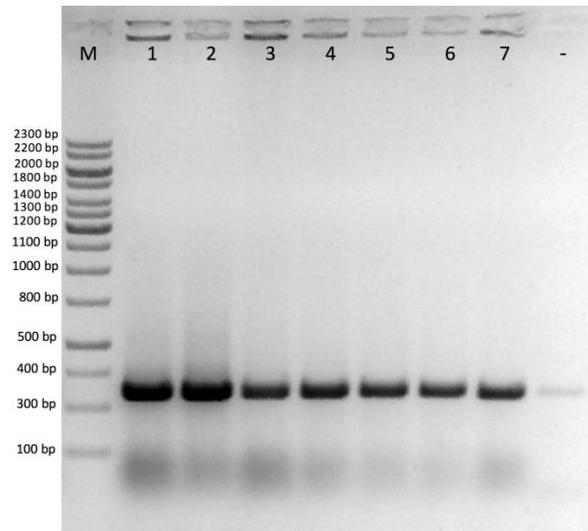


Figura 1: Fotografía de un gel de electroforesis en gel de agarosa: M: marcador de peso molecular con bandas que corresponden a diferentes tamaños (indicados en el gel); 1-7: resultados de la PCR con 7 muestras distintas de ADN (1-7); "-" resultado de la PCR con agua estéril en lugar de ADN.

5. La PCR para la amplificación del gen *MasD* genera un fragmento de 700bp. Asume que tienes ya el resultado de la electroforesis que vas a realizar al finalizar la amplificación y es la que observas en la figura 3. Interpreta el resultado de tu PCR, tras procesar las muestras de ADN de la orquídea 1, 2 y 3 y responde a la siguiente pregunta.

¿Cuál de las orquídeas es la especie prohibida para comercialización? Y cuyo portador, por tanto, debe ser procesado. **Anota la opción que considera correcta en la hoja de respuestas**

- a) La correspondiente a la muestra 1
- b) La correspondiente a la muestra 2
- c) Las correspondientes a la muestra 1 y 2
- d) La correspondiente a la muestra 3.

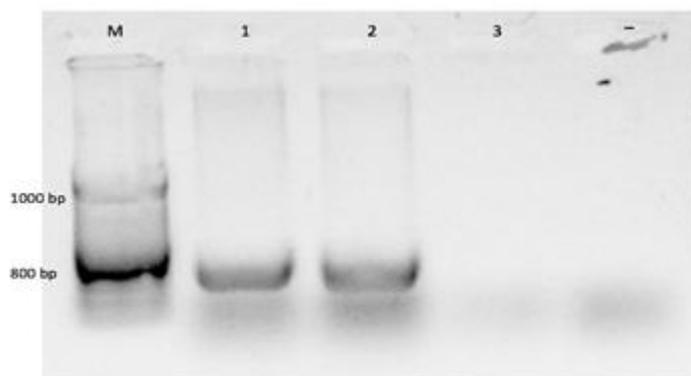


Figura 2. Fotografía de un gel de electroforesis en gel de agarosa: M: marcador de peso molecular con bandas que corresponden a diferentes tamaños (indicados en el gel); 1-3 Resultado de la PCR para la amplificación del gen *MasD* a partir del ADN de la orquídea 1, 2 y 3 respectivamente, "-" resultado de la PCR con agua estéril en lugar de ADN.

Actividad 2: Aplicación de las cuatro muestras resultado de la PCR (ADN 1-3) y negativo en el gel de agarosa.

ATENCIÓN En el caso que no hayas podido entregar los cuatro tubos de PCR, el asistente le entregará otras muestras para realizar la siguiente actividad.

- 1- Etiquete cuatro tubos de PCR con las mismas etiquetas que uso para la PCR
- 2- En cada tubo correctamente etiquetado coloque 10uL de la reacción de PCR del tubo correspondiente (por ejemplo, A1).
- 3- Adicione 2uL de Tampón de aplicación (Col) al tubo con la muestra de PCR.
- 4- Llama a un asistente para poder iniciar la aplicación de cada una de las cuatro muestras preparadas (12 μ L en total) en un pozo distinto del gel de agarosa para electroforesis.
- 5- Indique en cuáles de los pozos del gel aplicó las muestras, en el esquema de la hoja de respuestas.

EVALUACIÓN: Cada muestra bien aplicada en el gel = 10 puntos (total 40 puntos)

Has llegado al final de la prueba, has podido aplicar algunas técnicas moleculares interesantes y resolver el caso.

¡FELICIDADES!