

<http://www.bionova.org.es/animbio/anim/meselson/intromeselson.swf>

Objetivo: Explicar, sobre la base de una animación y de las actividades propuestas en la guía, cómo el experimento de Meselson y Stahl estableció de manera concluyente que la replicación del ADN es semiconservadora. Describir el experimento de Meselson y Stahl.

INTRODUCCIÓN

En la década de 1950, James Watson y Francis Crick sugirieron un mecanismo para la replicación del DNA al cual denominaron "**Modelo de replicación Semiconservativo**". Durante la replicación semiconservativa, cada una de las dos hebras de DNA actuaría como una plantilla para la síntesis de una hebra nueva. Las dos nuevas moléculas de DNA consistirían de una hebra de la molécula original y una hebra recién sintetizada. En aquellos tiempos, los científicos estaban considerando tres posibles modelos de replicación. Estos eran:

Tipo de Replicación	Composición de Moléculas de DNA antes y después
(a) Replicación Conservativa – la molécula de DNA original permanece intacta y se sintetiza una nueva molécula de DNA que no contiene ninguna parte de la original. Es una molécula completamente nueva.	<p>Original DNA</p> <p>After one replication</p>
(b) Replicación Semiconservativa – cada una de las dos moléculas de DNA está compuesta por una hebra de la molécula original y una hebra recién sintetizada.	<p>Original DNA</p> <p>After one replication</p>
(c) Replicación Dispersiva – cada una de las dos moléculas de DNA está compuesta de secciones del DNA original y del DNA recién sintetizado intercaladas aleatoriamente a lo largo de cada hebra. <i>Nótese que, aunque en las ilustraciones pareciera que hay un patrón, en la replicación dispersiva los nucleótidos originales y recién sintetizados se mezclarían aleatoriamente.</i>	<p>Original DNA</p> <p>After one replication</p>

En 1958, **Matthew Meselson y Franklin Stahl** condujeron su famoso y elegante experimento de **pulso-caza** para determinar cuál de estos tres modelos era el correcto.

La clave del experimento de Meselson-Stahl fue el uso de los isótopos no radioactivos del nitrógeno, ¹⁴N y ¹⁵N, en los medios para el cultivo de bacterias de *E. coli*. A medida que se reproduce *E. coli*, se sintetizan nuevas moléculas de DNA que incorporan a estos isótopos. Aquellas *E. coli* cultivadas en presencia de ¹⁵N crearon DNA "pesado". Después de muchas generaciones, todo el DNA en las células de *E. coli* era pesado. Las células cultivadas en presencia de ¹⁴N produjeron DNA "liviano" y, después de muchas generaciones, todo el DNA en las células de *E. coli* era liviano. La ventaja de tener DNA de diferentes densidades es que pueden separarse por centrifugación. Para este proceso, las células de *E. coli* primero fueron abiertas para sacar su DNA; después de eso, el contenido celular con los DNA pesado y liviano (llamado el "extracto crudo") fue mezclado con una solución que contenía la sal cloruro de cesio y, luego, fue puesto en un tubo de centrífuga con cuarzo transparente que permitió que la solución fuese fotografiada mientras daba vueltas. El DNA liviano y pesado se separaron. Las moléculas de diferente densidad se acumularon a distintas profundidades. El DNA pesado formó una banda en un punto más abajo de la mezcla, mientras que el DNA liviano formó una banda más arriba. La diferencia en la densidad del DNA fue suficiente para la separación. (Fig. 1.)

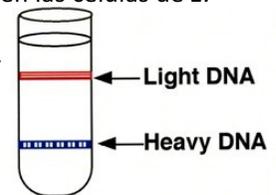


Figure 1: Result of the centrifugation of light and heavy DNA

LA FASE DE PULSO

Usando esta técnica, Meselson y Stahl cultivaron, durante muchas generaciones a cepas de *E. coli* en un medio que contenía ¹⁵N. Con esto se aseguraron que todo el DNA de las bacterias sería marcado con ¹⁵N. A medida que las bacterias crecían y se reproducían, incorporaban el isótopo ¹⁵N. A esto se denomina fase de pulso del experimento (es decir, el pulso está exponiendo a las células a una versión particular de un compuesto). Luego, Meselson y Stahl tomaron algunas de estas bacterias, prepararon el DNA como lo habían hecho antes y lo centrifugaron. Debido a que todo el DNA se marcó con ¹⁵N, se formó una sola banda. Esta es la "Generación Cero".

1. Elige un lápiz de color. Utilizando la figura 1 como referencia, indica la localización de la banda para el DNA pesado (¹⁵N) en la generación cero, en el tubo de centrifuga representado a la derecha.



GENERACIÓN CERO

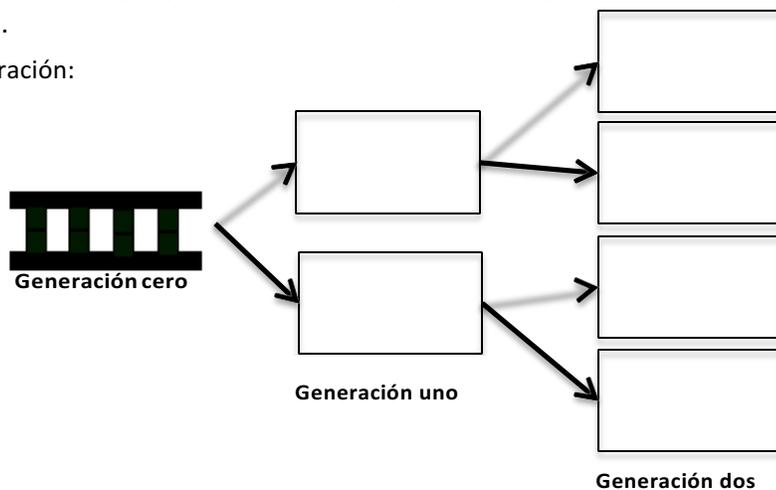
LA FASE DE CAZA

A continuación, las bacterias con DNA pesado se movieron a un medio de cultivo que contenía ¹⁴N. Este paso marca el comienzo de la fase de **caza** del experimento (es decir, exponiendo las células a una versión diferente del mismo compuesto). Después de 20 minutos (el tiempo que tarda *E. coli* en crecer y producir la siguiente generación), se preparó una muestra para centrifugación. Esta fue identificada como "Generación Uno". Otra muestra fue tomada después de que pasaron otros 20 minutos. Esta fue la "Generación Dos", y así sucesivamente.

PREGUNTAS

2. Si la replicación del DNA es semiconservativa, usa la clave dada a la derecha para ilustrar la disposición de los isótopos ligeros y pesados del nitrógeno en las moléculas de DNA formadas en la Generación Uno y Dos. Supón que cada bacteria se dividió exactamente una vez por generación. Aplica el mismo color que usaste antes para el isótopo pesado (¹⁵N) y elige un nuevo color para el isótopo liviano (¹⁴N).

a. Ilustración:

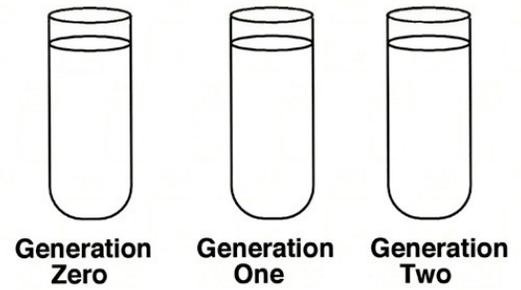


KEY	
Single light nucleotide	Single heavy nucleotide
DNA with light nitrogen	DNA with heavy nitrogen

Clave	
Nucleótido liviano	Nucleótido pesado
N con DNA liviano	N con DNA pesado

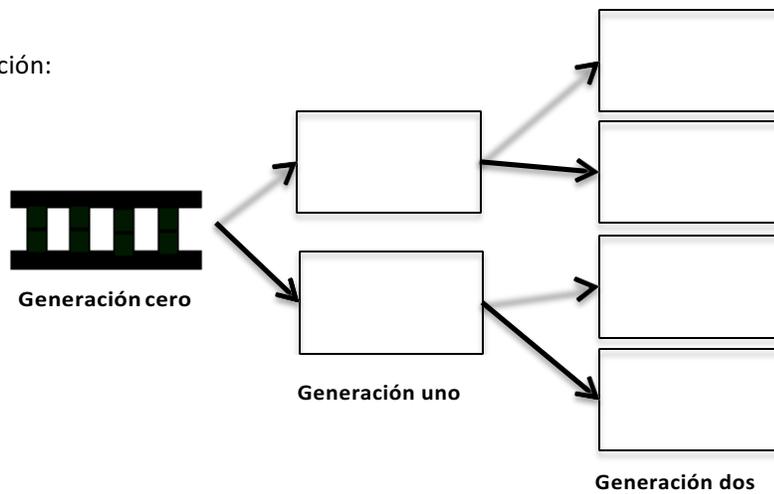
- b. Explicación: _____

c. Utilizando la **figura 1** como estándar, dibuja bandas que ilustren el área donde se concentrará el DNA en los tubos para las Generaciones Cero, Uno y Dos si la replicación del DNA es **Semiconservativa**.



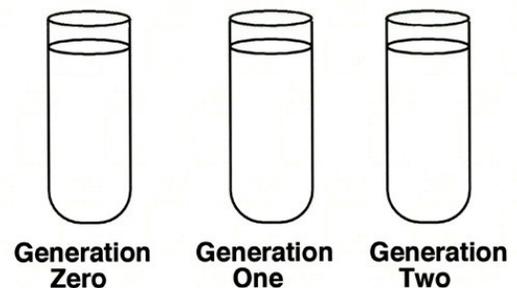
3. Usando la clave proporcionada en la pregunta 2, ilustra la localización de los isótopos ligeros y pesados del N en las cadenas de DNA de la Generaciones Cero, Uno y Dos si la replicación del DNA fuese **conservativa**.

a. Ilustración:



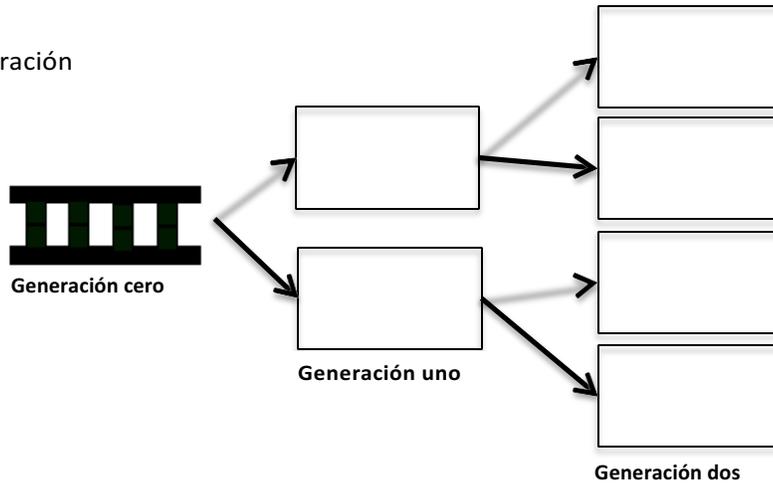
b. Explicación: _____

c. En los tubos dibujados a la derecha, ilustra los patrones de bandas que Meselson y Stahl habrían observado si los resultados de su experimento hubiesen apoyado el **modelo conservativo** de la replicación del DNA.



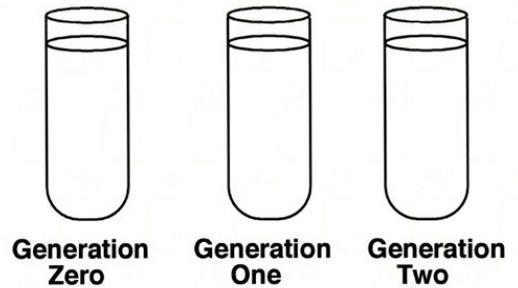
4. Usando la clave proporcionada en la pregunta 2, ilustra la localización de los isótopos del N ligeros y pesados en las cadenas de DNA de la Generaciones Cero, Uno y Dos si la replicación del DNA fuese **dispersiva**.

a. Ilustración



b. Explicación: _____

- c. En los tubos dibujados a la derecha, ilustra los patrones de bandas que Meselson y Stahl habrían observado si los resultados de su experimento hubiesen apoyado el **modelo dispersivo** de la replicación del DNA.



RESULTADOS DEL EXPERIMENTO DE MESELSON Y STAHL

Ahora que conoces los resultados de los diversos modelos de replicación, evalúa los datos de Meselson y Stahl. Su primera replicación en el medio de ¹⁴N produjo una banda de DNA híbrido de peso medio (¹⁴N y ¹⁵N). La segunda replicación en el medio ¹⁴N produjo tanto DNA ligero (¹⁴N) como DNA híbrido (¹⁴N y ¹⁵N).

5. ¿Cuál modelo de replicación apoyaron los resultados obtenidos por el experimento de Meselson-Stahl? Explica tu respuesta. _____

<https://www.youtube.com/watch?v=cvU4kEMvbm4> (Video sobre su experimento, explicado por el mismísimo Meselson)