

Tema 9, introducción: Introducción a la clonación

Clonación= obtención de clones.

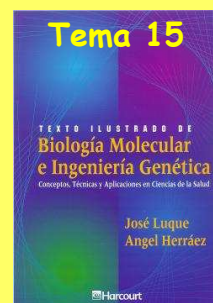
Clones: elementos genéticamente idénticos.

Clon=conjunto, Clon=relación entre miembros.

Para moléculas, sinónimo:
amplificación (genética).



Libro: 15.1



❖ Clones naturales:

- gemelos
- división del cigoto (células embrionarias totipotentes)
- células de un individuo

❖ Interés biotecnológico

❖ Clonación de organismos

❖ Clonación de células

❖ Clonación de moléculas

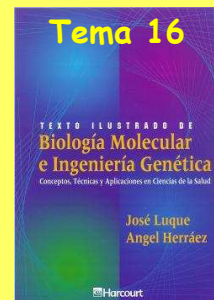
- Clonación "acelular", sin células, *in vitro*: PCR
- Clonación "celular", en o con células

Tecnología del "DNA recombinante" rDNA
(recomendado: DNA recombinado)

Tema 9, parte B: Clonación celular (tecnología del DNA recombinado)

- Enzimas de restricción.
- Clonación celular de moléculas de DNA.

Libro: 16: todo excepto 16.1.2.2,
16.2.1.2, fig.p.210, 16.3



Clonación celular

- Clonación de moléculas de DNA empleando células
- "Tecnología del DNA recombinado"
- Ingeniería Genética

Previo: Enzimas de restricción

Enzimas de restricción

Son DNAsas y son endonucleasas

Otros nombres:

endonucleasas de restricción, "restrictasas"

Nomenclatura:

bacteria *Hae* III
de origen: *Haemophilus aegyptius*

Eco RI
Escherichia coli, cepa RY13

Bam HI
Bacillus amyloliquefaciens, cepa H

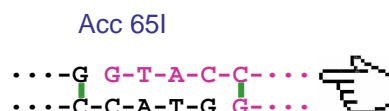
199b

16-clonación celular

- Simetría en el corte => los dos extremos son iguales

- Debido a:

- secuencia palindrómica
- enzima dimérica



- Los extremos cohesivos se reasocian con facilidad

- pero no necesariamente con su "compañero" original:

Clonación celular

- Clonación de moléculas de DNA empleando células "anfitrionas" (*host cells*)
 - "Tecnología del DNA recombinado"
 - Ingeniería Genética
- ¿Cómo se hace la clonación del DNA en células?
- El DNA se amplifica por replicación dentro de una célula "anfitriona", en cultivo
 - Fragmento de DNA que queremos clonar: "inserto"
 - se une (se inserta) a otra molécula de DNA: "vector", que lo transporta o introduce a la célula anfitriona

Vector de clonación

- Terminología:
 - Vector
 - ❖ Características:
 - DNA
 - pequeño
 - fácil de aislar y estudiar
 - secuencia conocida => dianas de restricción, origen...
 - fácil de introducir en la célula anfitriona
 - replicación autónoma
 - con sitios de restricción, con marcadores de selección
 - ❖ Naturales o artificiales (recombinados)
 - ❖ De clonación o de expresión
 - Inserto
 - DNA que queremos clonar, insertado en el vector (formando entonces un DNA recombinado)

Etapa 4- Incorporación del DNA recombinado a la célula anfitriona

- Terminología: *host cell* => célula anfitriona, hospedadora, receptora; pero no "huésped"
- Tipos de célula anfitriona
 - Procariótica, fácil manejo ::
"Transformación" de la bacteria
 - Eucariótica, más difícil de cultivar y mantener
 - ❖ Levaduras
 - ❖ Mamíferos

Etapa 7- Expresión

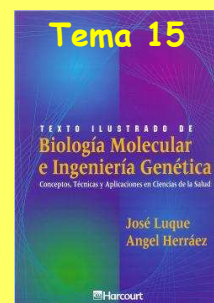
Sólo a veces:

- Clonación para amplificar :: copias de DNA
- Clonación para expresar :: producir la proteína o estudiar la expresión
- Vectores de clonación
- Vectores de expresión :: incluyen un promotor

Tema 9, parte A: Reacción en cadena de la polimerasa (clonación acelular)

- Principio del método
- Etapas del proceso
- Rendimiento

Libro: 15.2, 15.2.1, 15.2.2,
(15.2.5.6)



Objetivo básico de la PCR:
amplificar DNA

AMPLIFICACIÓN propiamente dicha

Para disponer de cantidad suficiente como para utilizarlo, con fines diversos

DETECCIÓN

Para poderlo detectar en muestras con pequeñas cantidades del DNA diana

¡Atención!

- Necesitamos conocer una pequeña parte de la secuencia, a ambos lados de la región a amplificar
- No se requiere purificar el DNA o RNA
- Innumerables aplicaciones

- Clonación acelular de fragmentos de DNA
- Detección de secuencias sin purificación previa
- Secuenciación de ácidos nucleicos
- Detección y análisis de polimorfismos de secuencia o de mutaciones
- Tipado de DNA para trasplantes
- Diagnóstico de enfermedades genéticas, prenatales o no, o de factores de riesgo
- Resolución de problemas forenses o arqueológicos
- Estudios evolutivos
- Detección de microorganismos infecciosos
- Detección de células tumorales
- Amplificación de DNA para su posterior clonación celular

Principios de la PCR

1. Desnaturalización
 2. Hibridación con **cebadores** (o iniciadores)
 3. Replicación de la cadena de DNA (elongación de los cebadores) con una **DNA-polimerasa**
- Proceso iterativo, repetición cíclica

189

15-clonación acelular

polimerasa Taq

- una DNA polimerasa
- termoestable
- originaria de *Thermus aquaticus*, una bacteria en manantiales termales
- sin actividad correctora de pruebas

Otras:

- **Pfu** , de *Pyrococcus furiosus* (sí 3'-exo)
- **Vent** o **Tli**, de *Thermococcus litoralis* (sí 3'-exo)
- **®™** Modificadas por ingeniería genética