

ENZIMAS

✂ Endonucleasas de restricción

➤ Metilasas

➤ **ADN Ligasas:** establece enlaces covalentes (fosfodiester) en el ADN (muy útil en Ingeniería Genética).

➤ **Taq polimerasa:** ADN polimerasa que necesita cebadores u oligonucleótidos para polimerizar ADN. (Necesaria para la técnica de PCR)

ENZIMAS

- **Transcriptasa Reversa:** Sintetiza ADN copia o complementario a partir de ARN (Muy útil en I.G).
- **Fragmento Klenow:** ADN polimerasa I de E.coli (tiene acción polimerasa 5→3 sobre ADN monocatenario (Se utiliza en secuenciación del ADN).
- **Nucleasa S1:** endonucleasa que actúa sobre ADN monocatenario (Muy útil en I.G).

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (E.R)✂

1970 – Aislamiento de la primer E.R del Haemophilus influenzae

Hidrolizan el enlace fosfodiéster en el esqueleto de la cadena de ADN

TIPOS

TIPO I y III: Reconocen una secuencia específica y cortan a una distancia de varios nucleótidos a partir del punto de reconocimiento.

Poco útiles para crear ADN recombinante.

TIPO II: Reconocen secuencias específicas (4-7 nucleótidos) Generalmente secuencias palindrómicas.

Muy útiles para crear ADN recombinante.

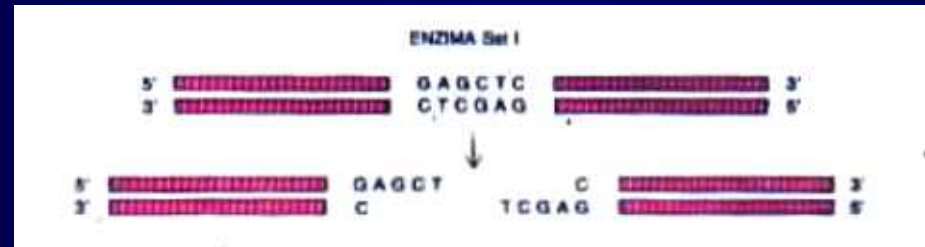
EL NÚMERO DE CORTES QUE PUEDE HACER UNA ENZIMA DE RESTRICCIÓN EN UN FRAGMENTO DE ADN DEPENDE DEL TAMAÑO DEL ADN, DE SU SECUENCIA Y DEL NÚMERO DE PARES DE BASES DE LA SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO DE LA ENZIMA



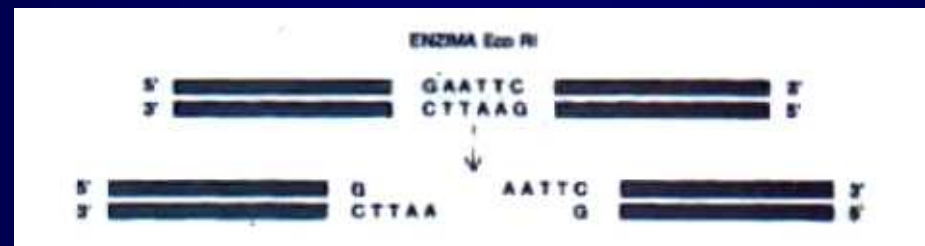
Generan mayor n° de fragmentos a menor n° de nucleótidos en la secuencia de reconocimiento.

TIPO DE CORTES

➤ TERMINALES 5' PROTUBERANTES (EXTREMO PEGAJOSO)



➤ TERMINALES 3' PROTUBERANTE (EXTREMO PEGAJOSO)



➤ TERMINAL ROMO

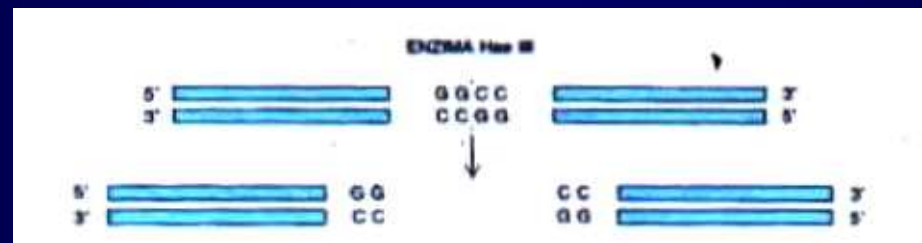
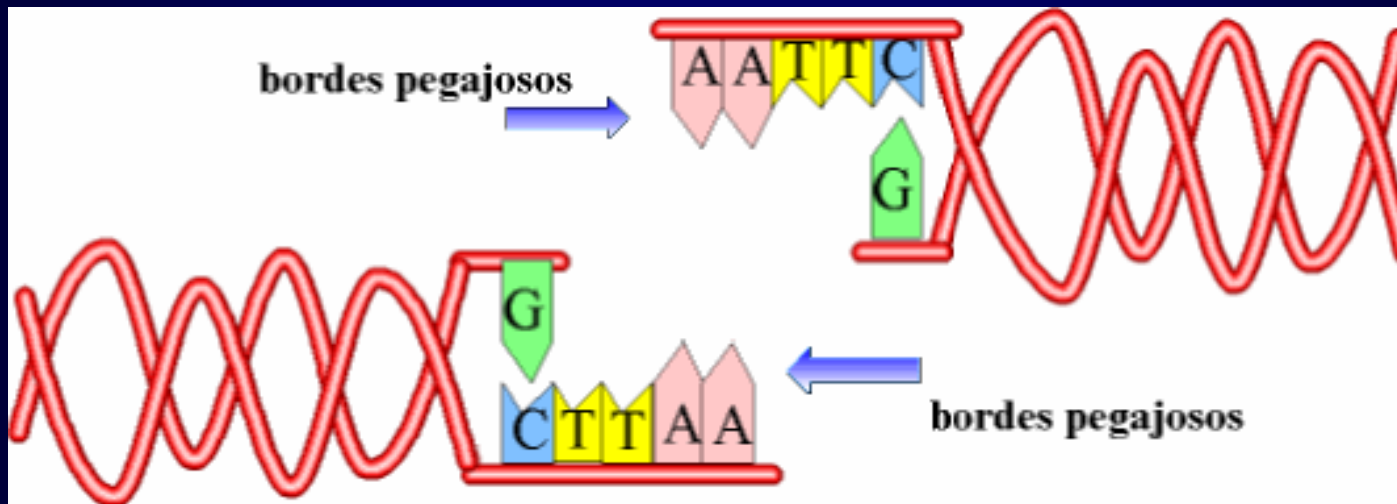
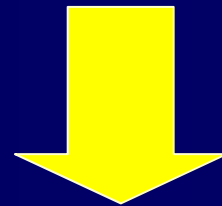
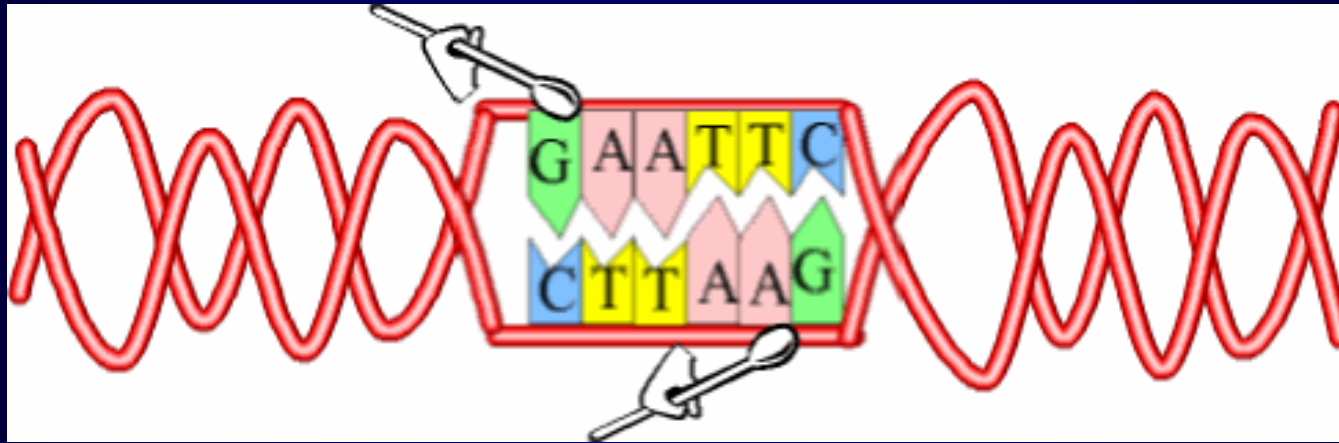


Tabla 15.2 Algunas endonucleasas de restricción y sus secuencias de reconocimiento

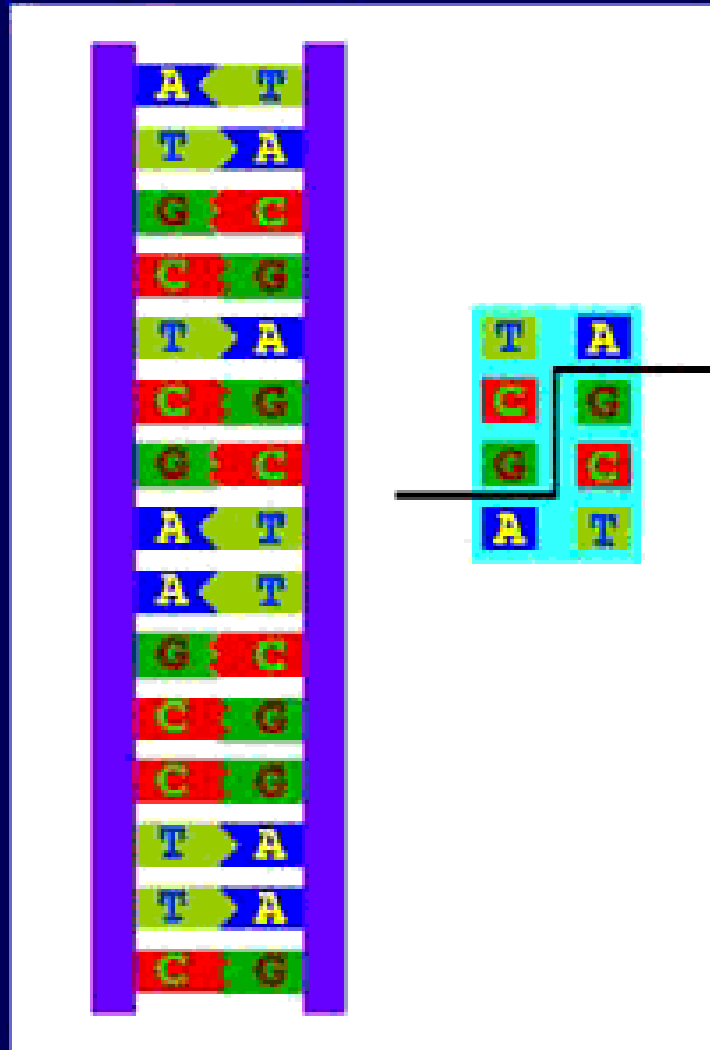
Enzima	Fuente microbiana	Secuencia ^a
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	$\begin{array}{c} 5'-A-G-C-T-3' \\ 3'-T-C-G-A-5' \end{array}$ <p style="text-align: center;">↓ ↑</p>
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	$\begin{array}{c} 5'-G-G-A-T-C-C-3' \\ 3'-C-C-T-A-G-G-5' \end{array}$ <p style="text-align: center;">↓ ↑</p>
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	$\begin{array}{c} 5'-G-A-A-T-T-C-3' \\ 3'-C-T-T-A-A-G-5' \end{array}$ <p style="text-align: center;">↓ ↑</p>
<i>EcoRII</i>	<i>Escherichia coli</i>	$\begin{array}{c} 5'-C-C-T-G-G-3' \\ 3'-G-G-A-C-C-5' \end{array}$ <p style="text-align: center;">↓ ↑</p>
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	$\begin{array}{c} 5'-G-G-C-C-3' \\ 3'-C-C-G-G-5' \end{array}$ <p style="text-align: center;">↓ ↑</p>
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae b</i>	$\begin{array}{c} 5'-A-A-G-C-T-T-3' \\ 3'-T-T-C-G-A-A-5' \end{array}$ <p style="text-align: center;">↓ ↑</p>
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>	$\begin{array}{c} 5'-C-T-G-C-A-G-3' \\ 3'-G-A-C-G-T-C-5' \end{array}$ <p style="text-align: center;">↓ ↑</p>
<i>SalI</i>	<i>Streptomyces albus</i>	$\begin{array}{c} 5'-G-T-C-G-A-C-3' \\ 3'-C-A-G-C-T-G-5' \end{array}$ <p style="text-align: center;">↓ ↑</p>

^aLas flechas indican los sitios de escisión en cada cadena

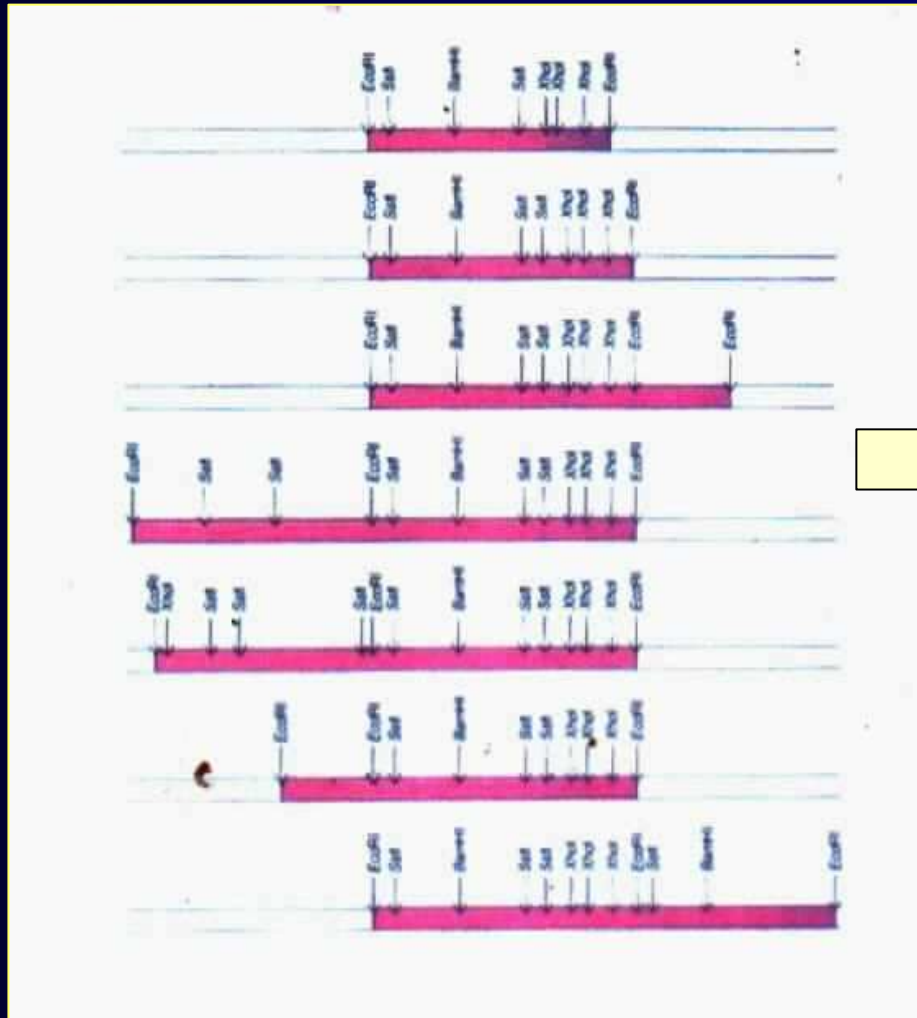
Enzima de Restricción Tipo II



ACCIÓN DE “TIJERA” O CORTE DE LA E.R AL RECONOCER LA SECUENCIA ESPECÍFICA



MAPAS DE RESTRICCIÓN



Mezcla de fragmentos
de ADN



Gel al comienzo

Los fragmentos grandes
se mueven lentamente
en el campo eléctrico



Los fragmentos pequeños
se mueven
rápidamente



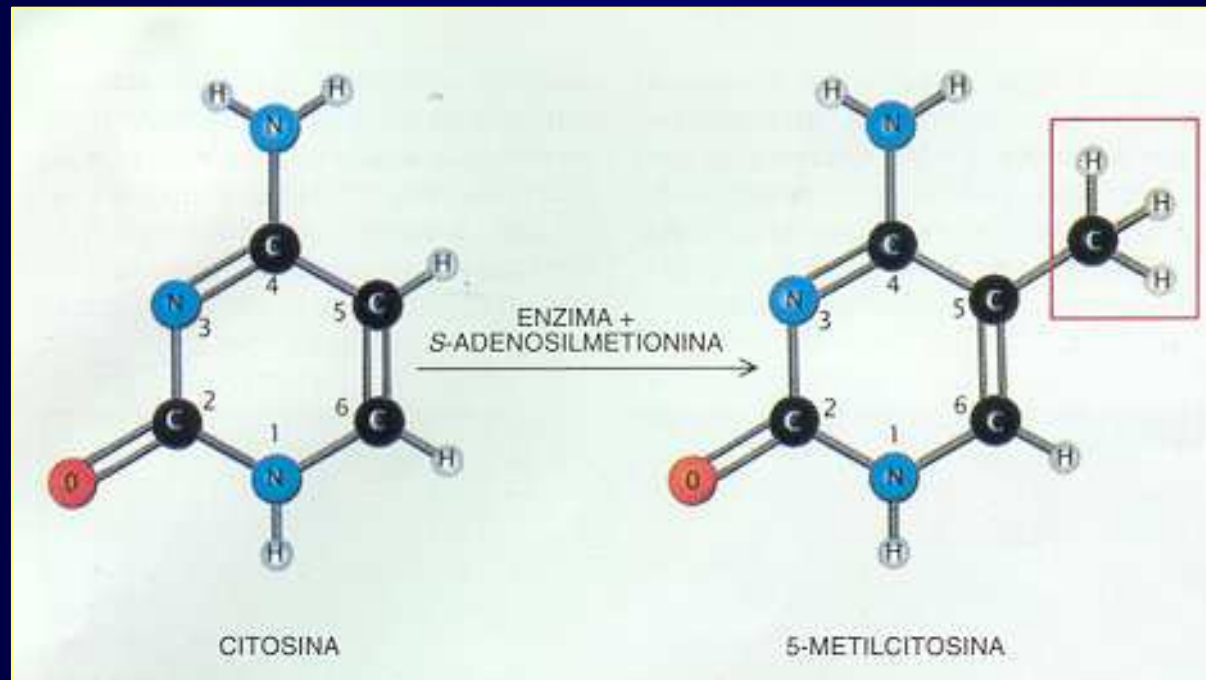
Número de
pares de bases

350
320
270
150

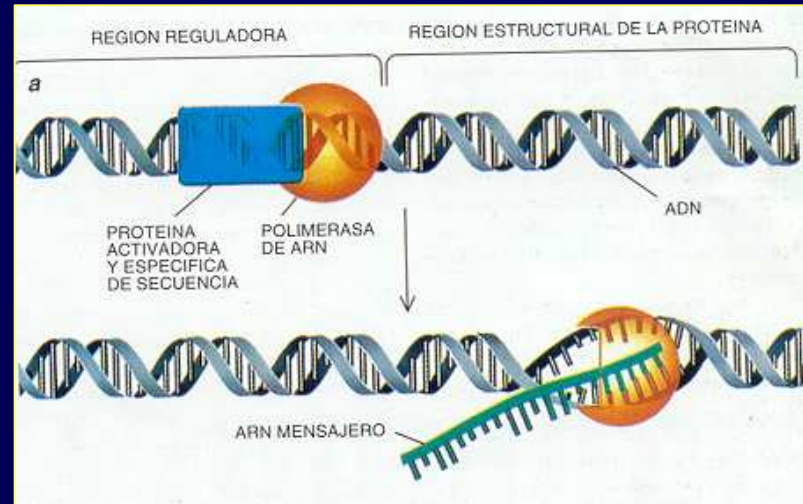
48
30

Gel al final

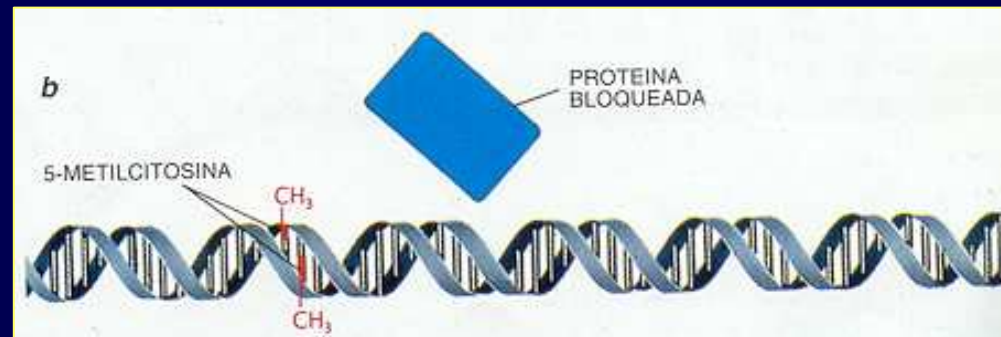
Enzimas Metilases



GEN NO METILADO (ACTIVO, SE EXPRESA)



GEN METILADO (SE SILENCIA)



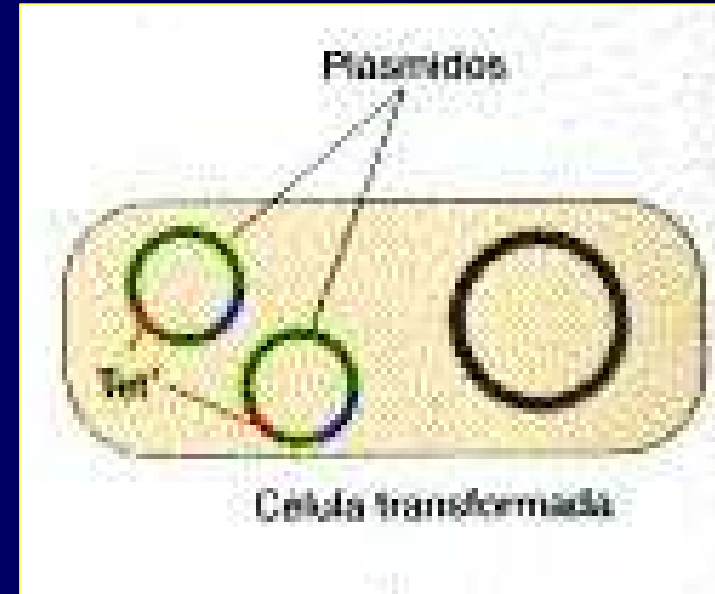
VECTORES

① PLASMIDOS

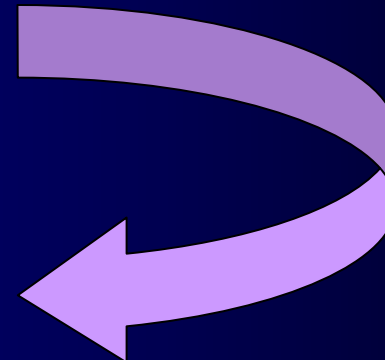
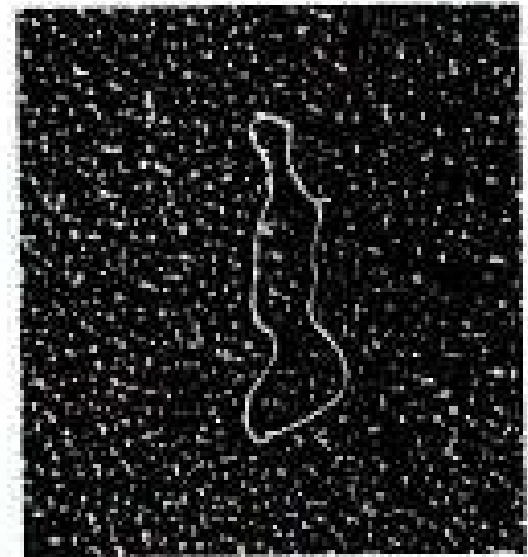
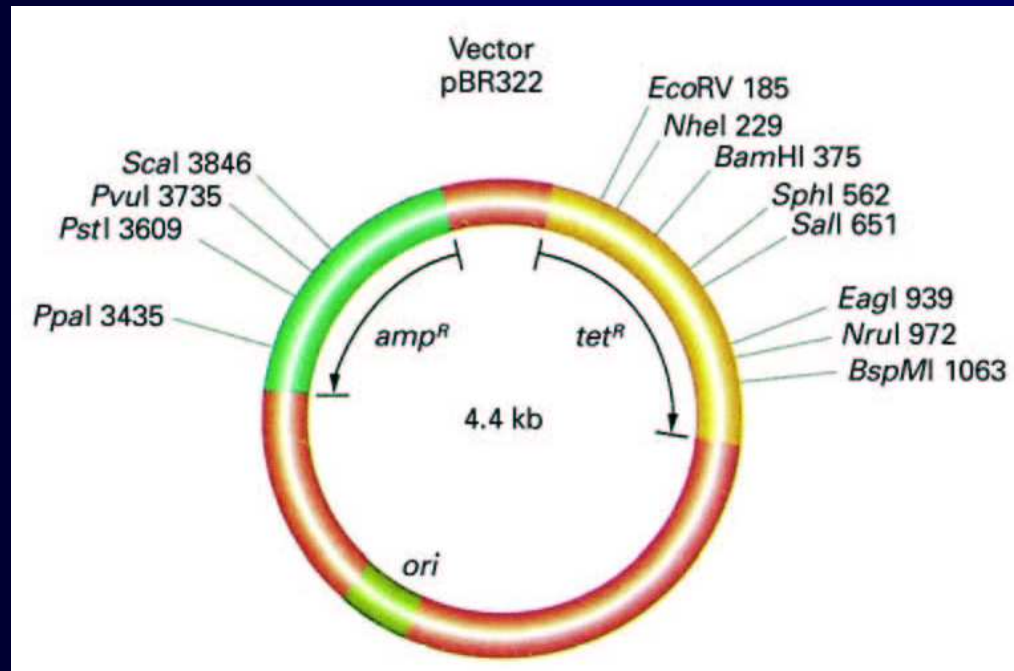
(HASTA 3KB)

IDEAL:

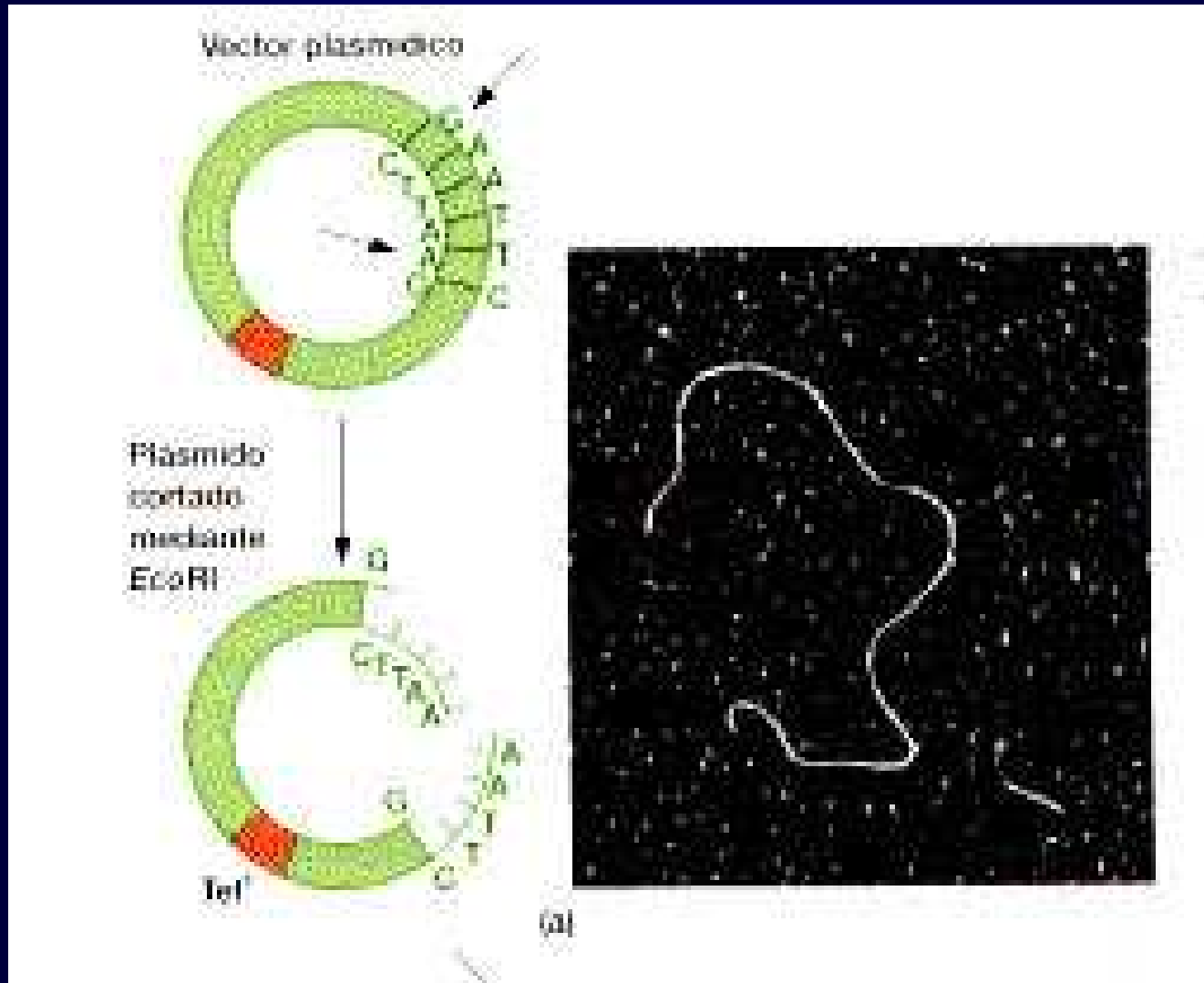
- Elementos de control (Multicopias)
- Genes de Resistencia a antibióticos
- Poseer secuencias de ADN que si se sacan y sustituyen no se ve afectada su estabilidad ni replicación.
- No movilizables de una bacteria a otra. (seguridad).
- Poseen varios sitios de reconocimiento para enzimas de restricción.



① PLASMIDO



Corte del plásmido con enzimas de restricción



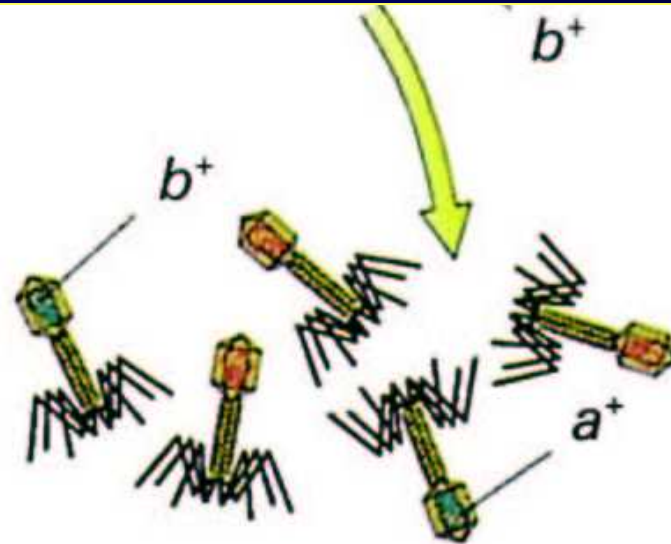
vectores

② BACTERIOFAGOS

FAGO LAMBDA

FAGO M13

Fagos portadores de
genes del donante



VECTORES

③ COSMIDOS

(HASTA 40-45 KB)

④ TRANSPOSONES

⑤ YACs (CROMOSOMAS ARTIFICIALES DE LEVADURA)

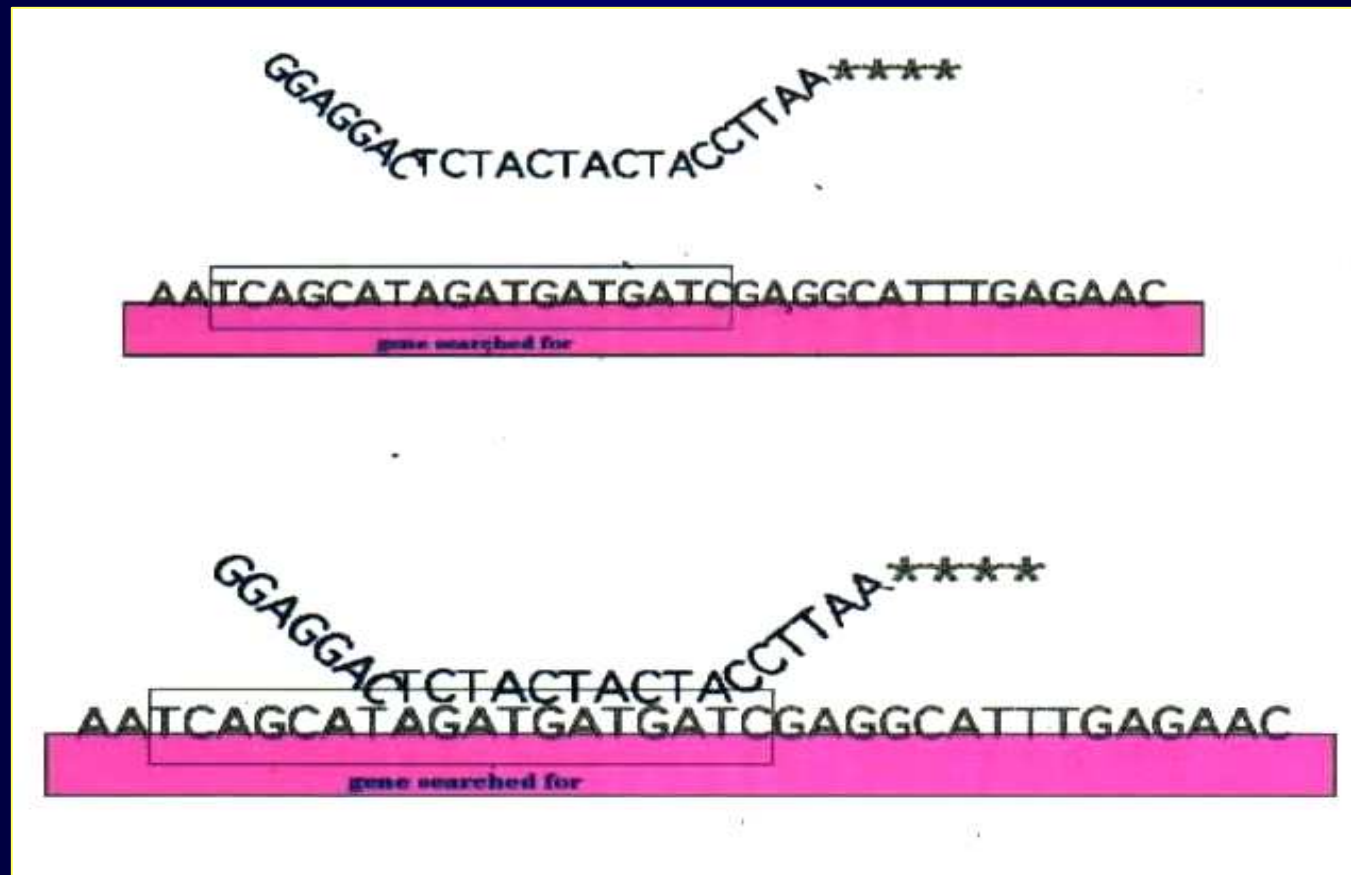
(HASTA 100KB)

⑥ BAC (CROMOSOMAS ARTIFICIALES DE BACTERIAS)

(MAS DE 100KB)

SONDAS DE ACIDOS NUCLEICOS

Segmento de ADN o ARN marcado en un extremo con fósforo radiactivo o un fluorocromo u otra sustancia que permite su identificación



Tecnología del ADN Recombinante

Ingeniería Genética
Clonación génica

La ingeniería genética puede definirse como un conjunto de técnicas, nacidas de la Biología molecular, que permiten manipular el genoma de un ser vivo.

PASOS PARA CLONAR UN GEN

a)

AISLAMIENTO DEL ARNm
DEL ORGANISMO DONANTE



b)

FORMACIÓN DEL ADNc (ADN copia o
complementario)

Enzima Transcriptasa Inversa (TI)

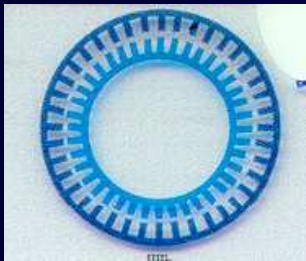
ARNm \Rightarrow ADNc



d)



**CORTAR EL ADNc Y EL ADN VECTOR
(Vector genético) con la misma enzima de
restricción**



(ej. Plásmido)

**Unión del ADNc con el Vector genético
(Utilizando enzimas como las ADN ligasas)**

e)

Formación del ADN recombinante



f)

INTRODUCCIÓN DEL ADN recombinante en un organismo huésped que permita su propagación (Ej: Bacterias)



g)

Selección de las células huésped (clones) que recibieron al ADN recombinante



h)

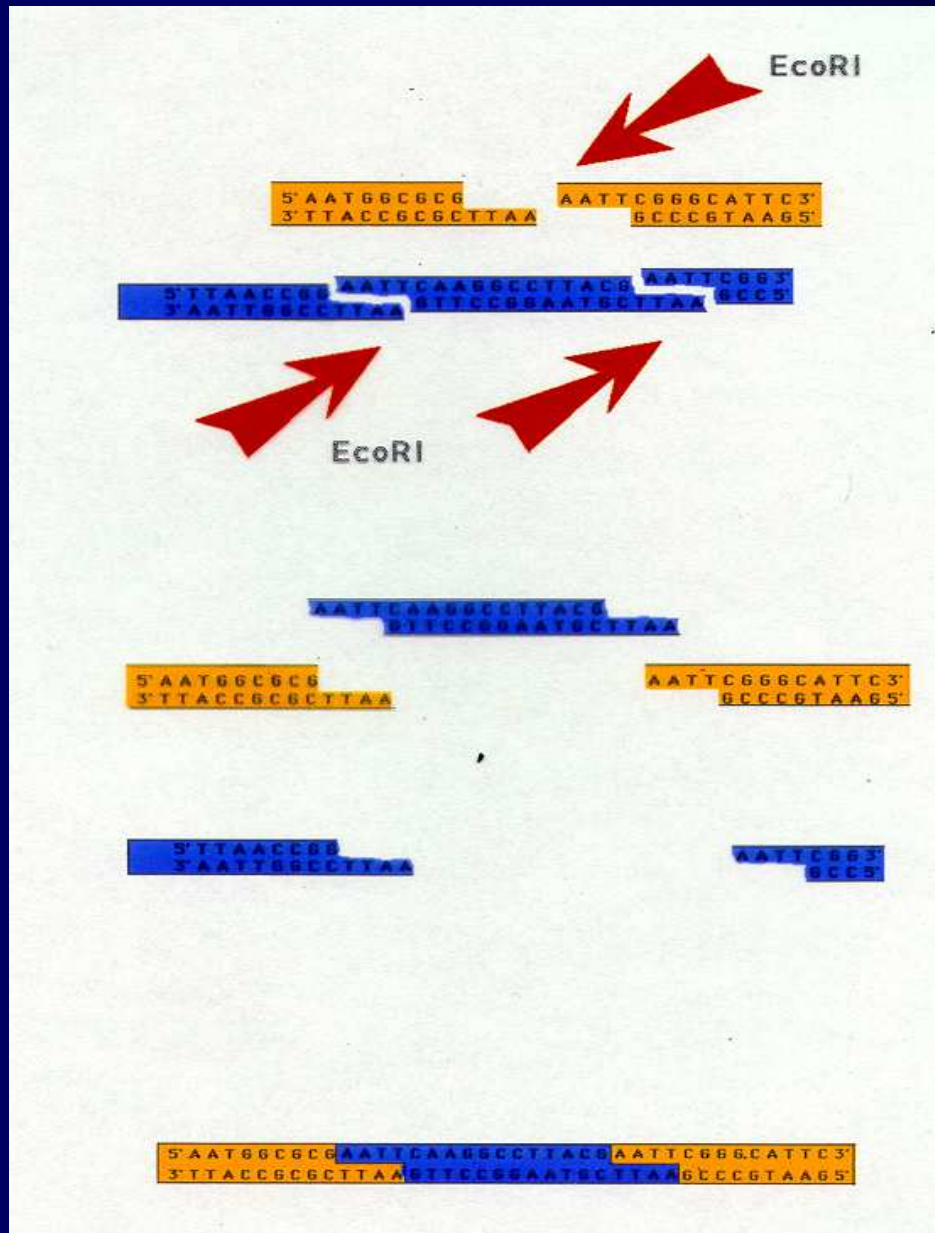
Selección de los clones positivos que estén expresando la proteína de interés codificada por el gen clonado

Fragmentación de ADNc

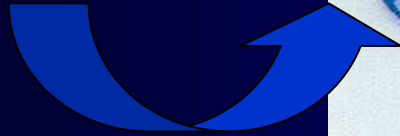
Con extremos pegajosos

Endonucleasas de
restricción Tipo II

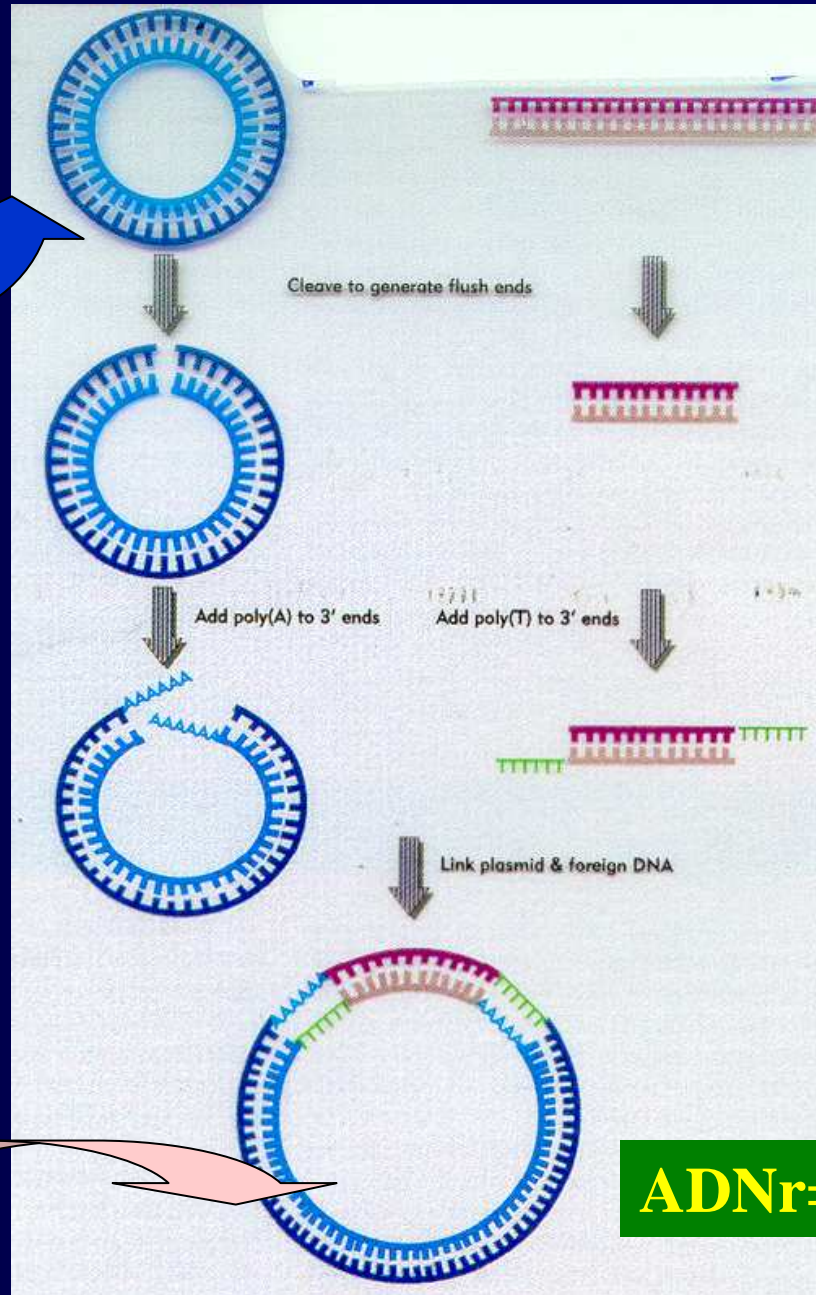
ADN
recombinante



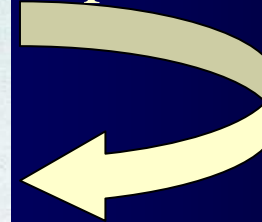
ADN VECTOR



ADN
recombinante

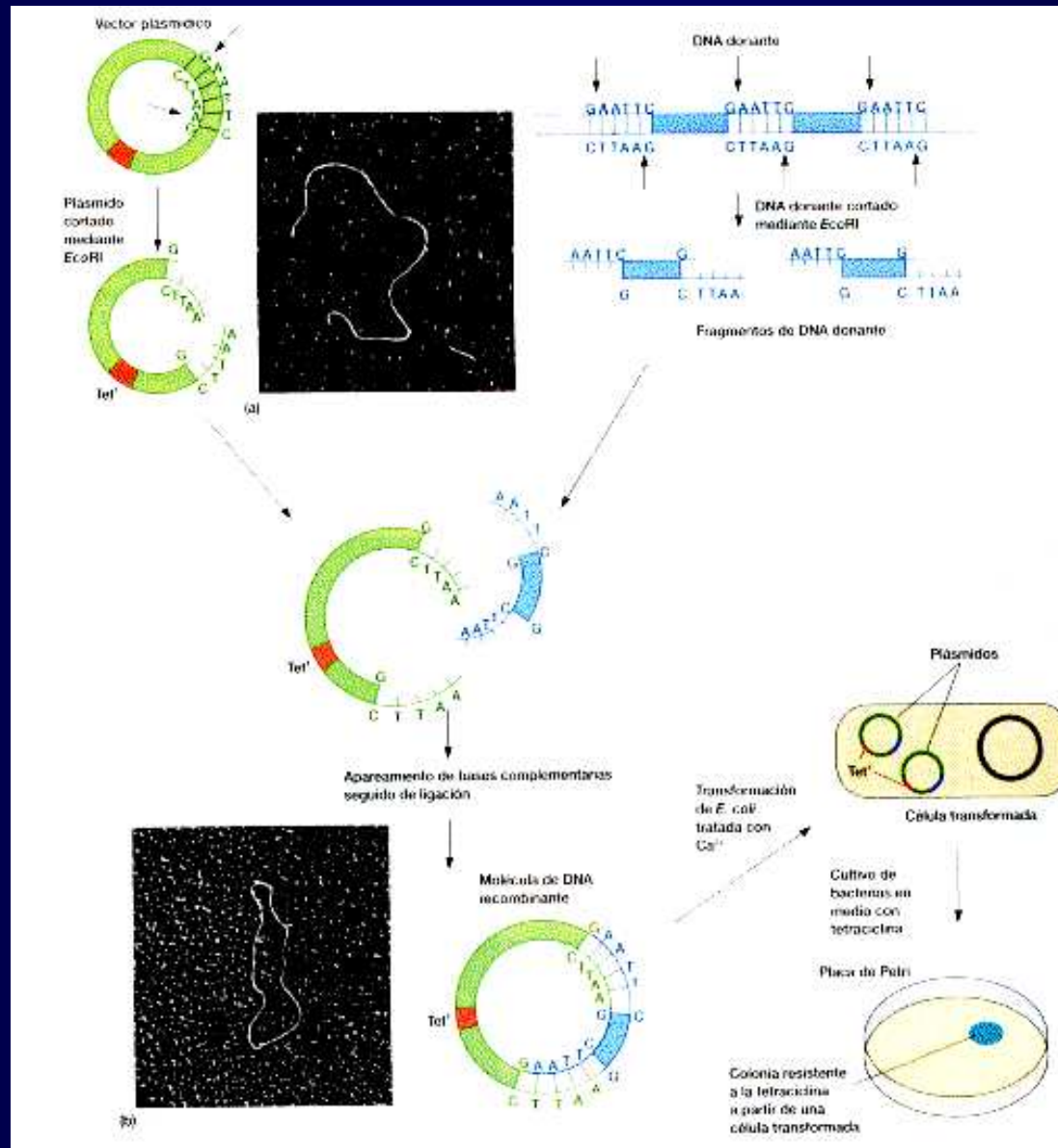


ADN viajero o
copia

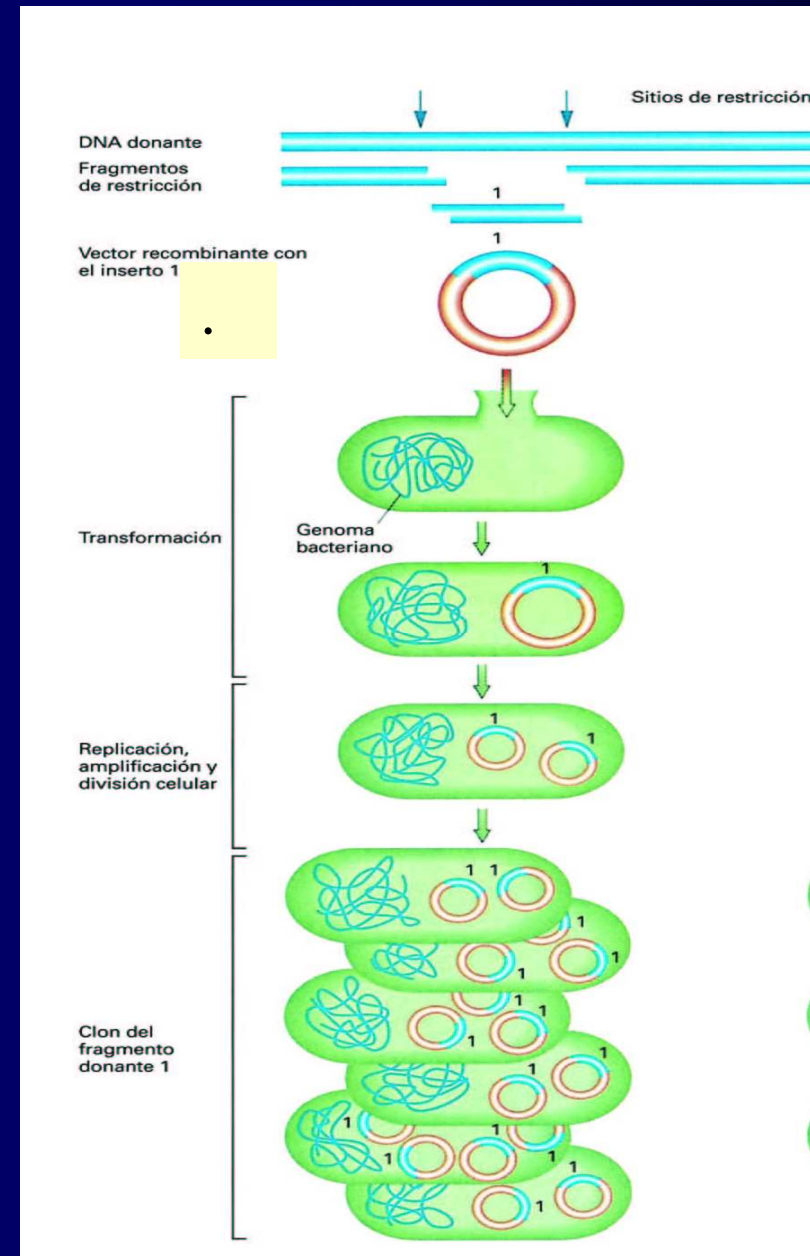
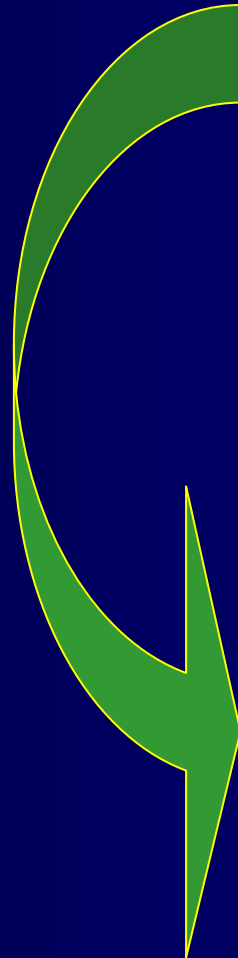


ADNr = ADNc + ADNvector

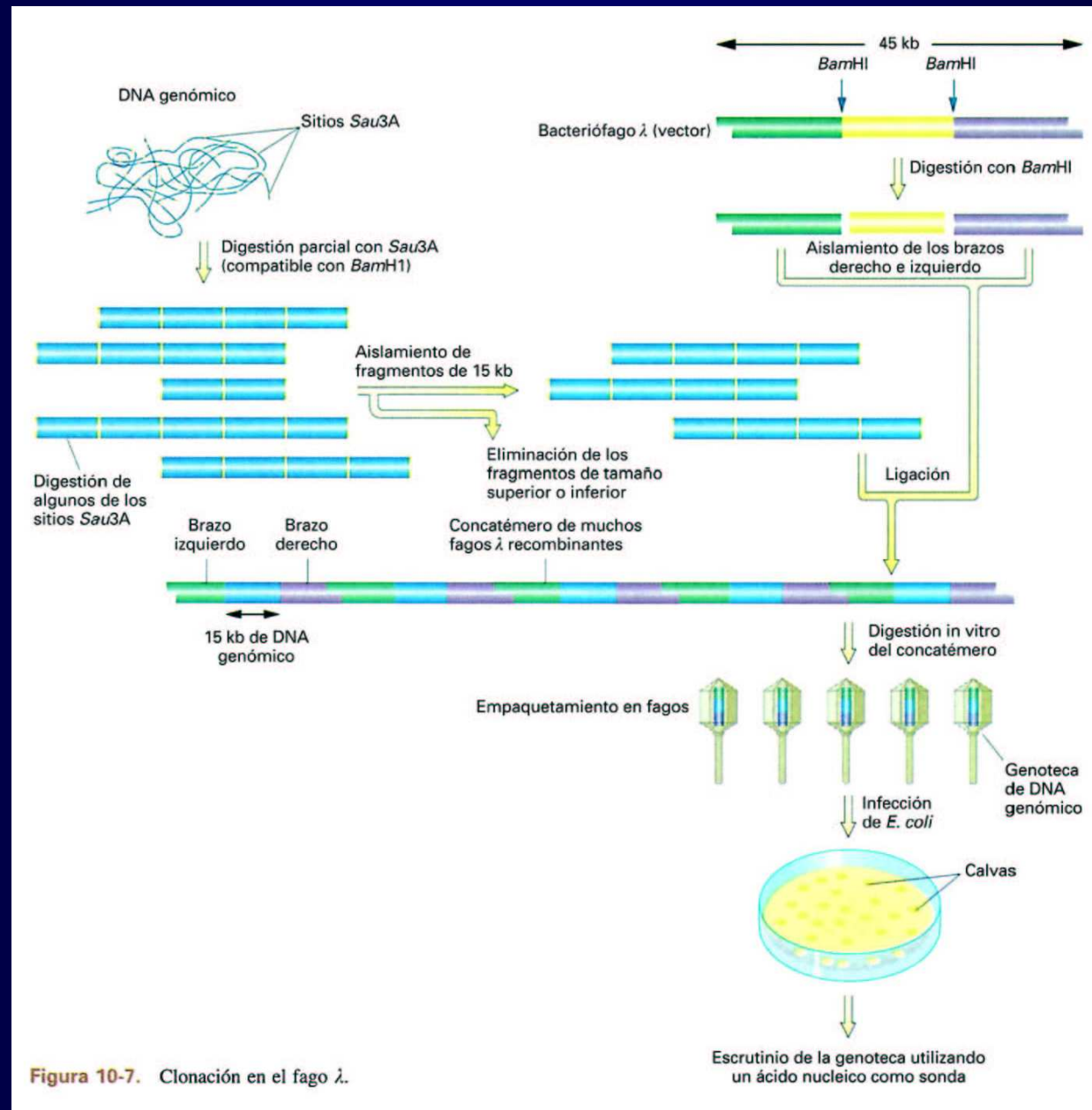
Observación por microscopía electrónica de la formación del ADNr



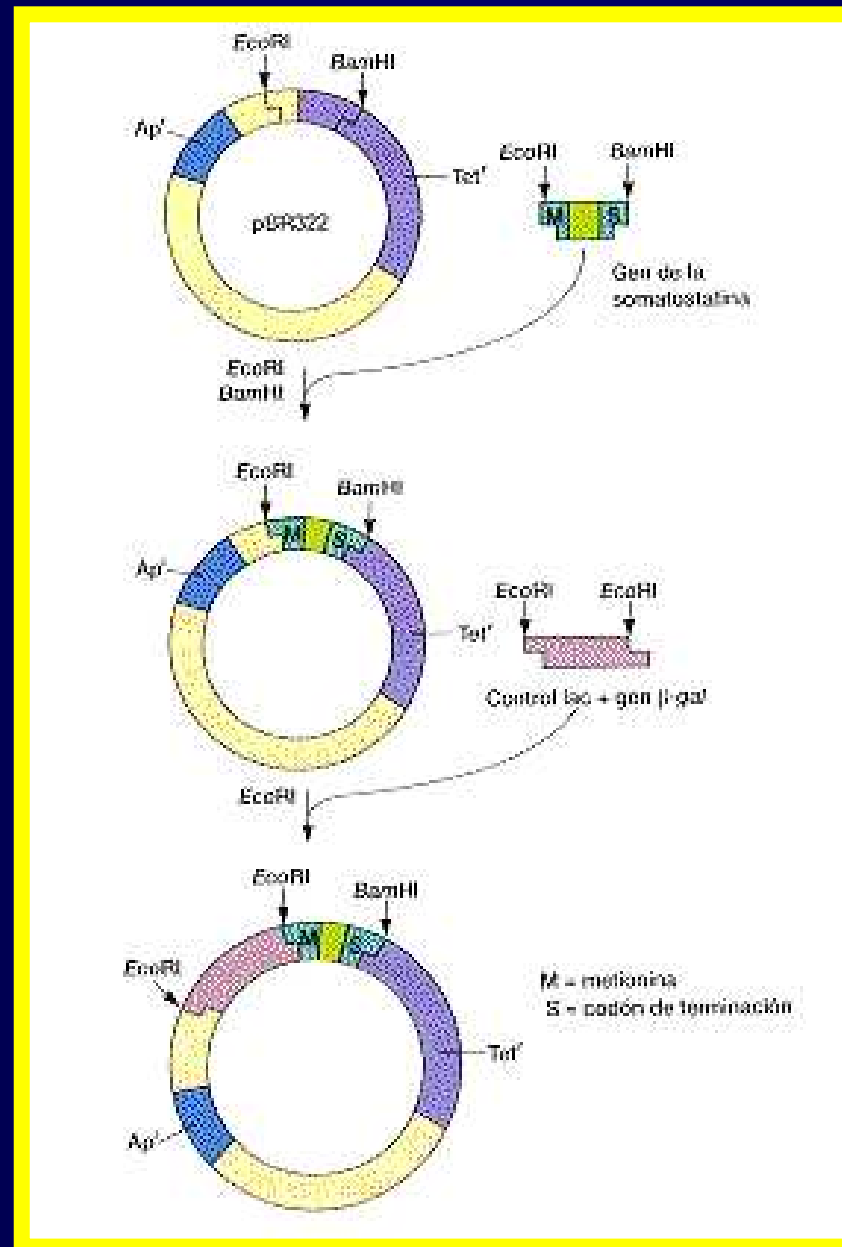
Amplificación del material Genético recombinante en bacterias



GENOTECA UTILIZANDO FAGOS COMO VECTORES



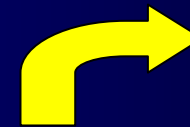
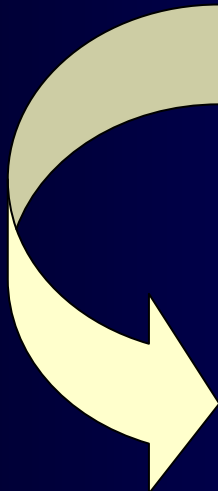
GEN DE LA SOMATOSTATINA



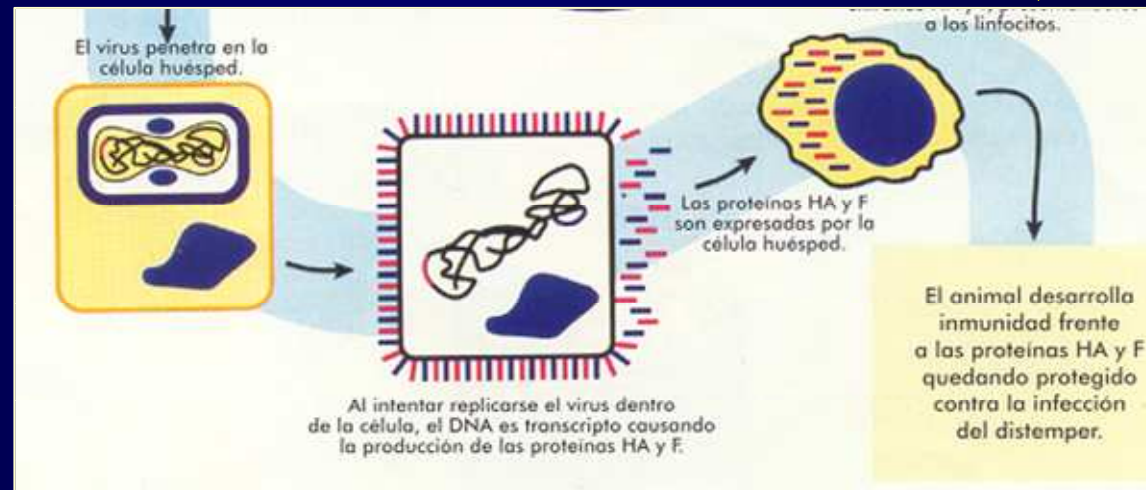
VACUNA DISTEMPER CANINO



Vacuna recombitek



**Linfocitos
(Defensa)**



TECNOLOGIA DEL ADN_r


BIOTECNOLOGÍA

- ➡ UTILIZACIÓN DE MICRORGANISMOS VIVOS EN PROCESOS INDUSTRIALES**
- ➡ UTILIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE CLONACIÓN DE ADN PARA CONTROLAR O AUMENTAR LA SINTESIS DE UN PRODUCTO METABÓLICO**
- ➡ MODIFICAR LAS PROPIEDADES DE UN ORGANISMO HUESPED.**

APLICACIONES DE LA TECNOLOGIA DEL ADN_r

PRODUCCIÓN DE GRANDES CANTIDADES DE UNA MOLÉCULA PROTEICA

 ENZIMAS MICROBIANAS

 HORMONAS: INSULINA, HORMONA DEL CRECIMIENTO, FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO.

 ANTÍGENOS VIRALES O BACTERIANOS: ej FIEBRE AFTOSA, DISTEMPER CANINO, SALMONELAS, IBR

APLICACIONES DE LA TECNOLOGIA DEL ADN_r

PRODUCCION DE SONDAS DE ADN

 **DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES HEREDITARIAS.**

 **MEDICINA FORENSE**

 **DETECCION DE GENES DE RESISTENCIA A ENFERMEDADES.**

Tabla 15.4 Algunos péptidos y proteínas humanos sintetizados mediante ingeniería genética

Péptido o proteína	Uso potencial
α_1 -antitripsina	Tratamiento del enfisema
α -, β - y γ -interferones	Como agentes antivirales, antitumorales y antiinflamatorios
Factor de la coagulación VIII	Tratamiento de la hemofilia
Calcitonina	Tratamiento de la osteomalacia
Factor de crecimiento epidérmico	Tratamiento de las heridas
Eritropoyetina	Tratamiento de la anemia
Hormona del crecimiento	Promoción del crecimiento
Insulina	Tratamiento de la diabetes
Interleucinas 1, 2 y 3	Tratamiento de trastornos inmunitarios y tumores
Factor estimulante de colonias de macrófagos	Tratamiento del cáncer
Relaxina	Auxiliar del parto
Albumina sérica	Suplemento del plasma
Somatostatina	Tratamiento de la acromegalia
Estreptoquinasa	Anticoagulante
Activador del plasminógeno tisular	Anticoagulante
Factor de necrosis tumoral	Tratamiento contra el cáncer



Era de la
transgénesis animal

ANIMAL TRANSGÉNICO

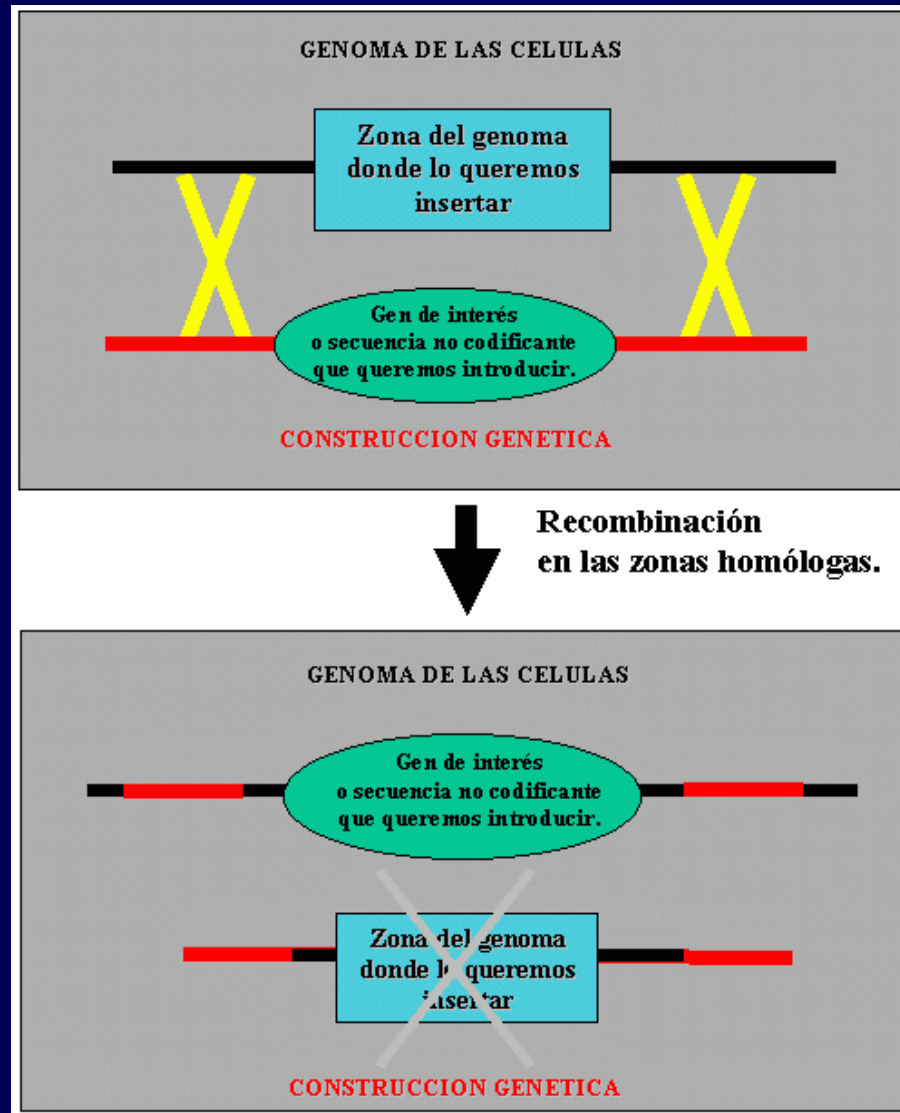
DEFINICIÓN:

**ORGANISMO EUCARIOTA AL
CUAL SE LE INTRODUCE
MATERIAL GENÉTICO FORÁNEO
(EXTRAÑO)**

CONSTRUCCIÓN GENÉTICA O TRANSGEN



¿Qué puede suceder con la construcción genética o transgen en el genoma de las células?



Técnicas de transgénesis

1974 Mezclar células de cepas de ratones distintos (obtención de quimeras)



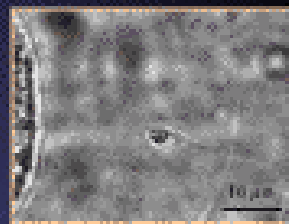
1976 Introducción de ADN en embriones de ratón utilizando retrovirus

1981 Microinyección de ADN en pronúcleo de mamíferos o en citoplasma de peces.

Otras técnicas : BIOLÍSTICA (pistola de genes)

ELECTROPORACIÓN

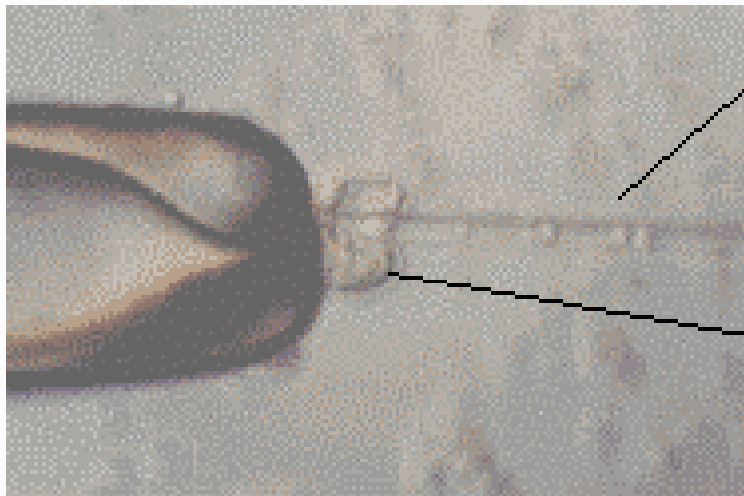
USO DE ESPERMATOZOIDES VECTORES



Epermatozoides vectores

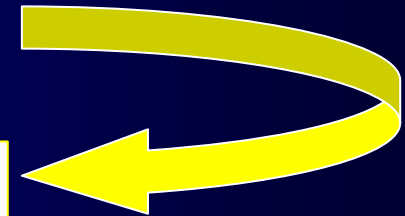
UTILIZACIÓN DE CÉLULAS “ES” o Células embrionarias indiferenciadas

A la células “ES” se les introduce la construcción transgénica



Células ES en la micropipeta de inyección

Botón embrionario del blastocisto de ratón.

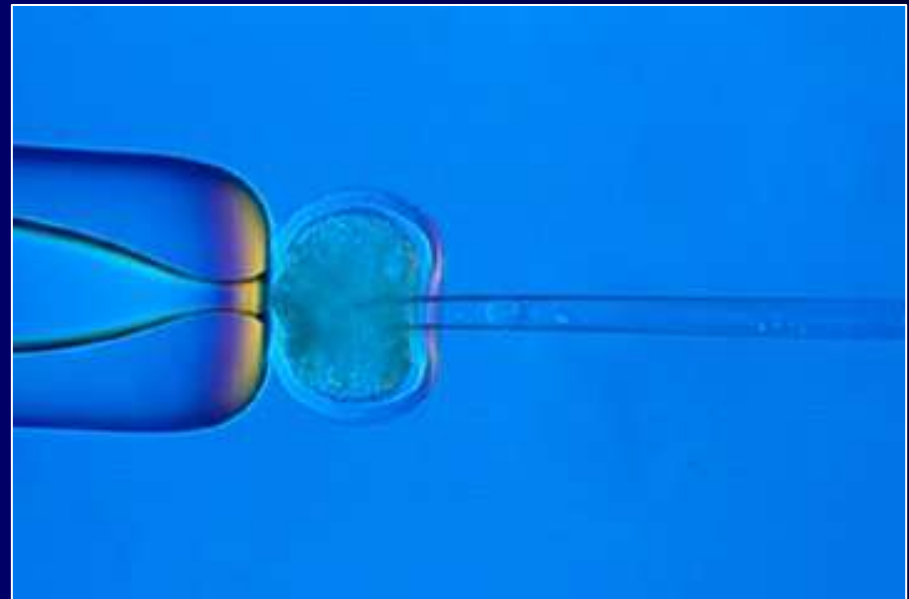


1982

**INTRODUCCIÓN DEL GEN
DE LA HORMONA DE
CRECIMIENTO DE RATAS**

**Ratones transgénicos
gigantes**

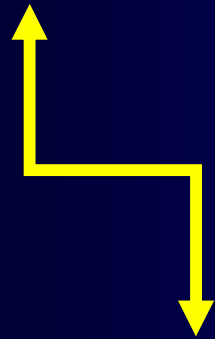
TECNICA
Microinyección de genes



Aplicación de la Transgénesis Animal



**Utilización de roedores transgénicos portadores
del gen que codifica para proteína humana de
acumulación cerebral**

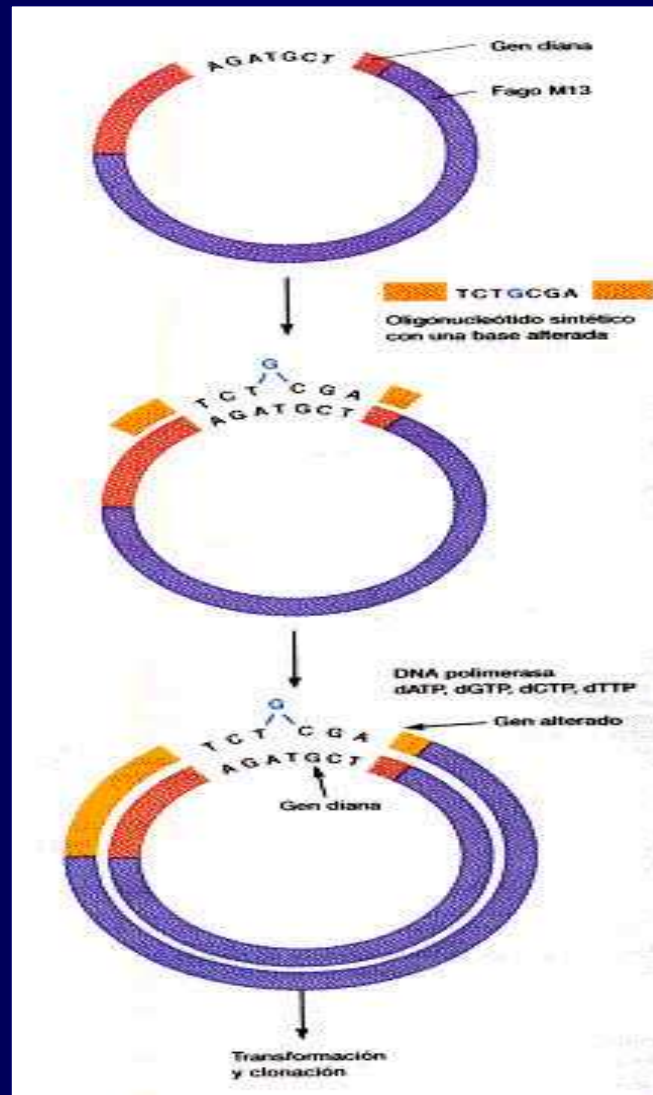


**Mal de
Alzheimer**



**Pruebas de nuevas
terapias contra este
mal en las roedores
transgénicos**

Mutagénesis dirigida



GEN HOX-A-3 (genes del control de la transformación de una estructura del cuerpo en otra)



MUTACION DIRIGIDA DE GENES (GEN Int-2)

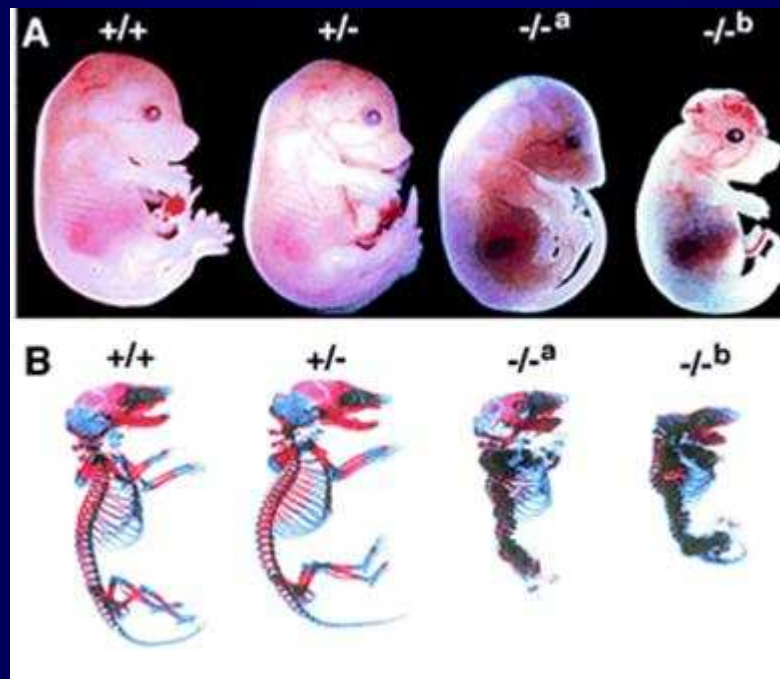
CREACIÓN DE RATONES "knockout" organismo genéticamente modificados para que uno o más de sus genes estén inactivados



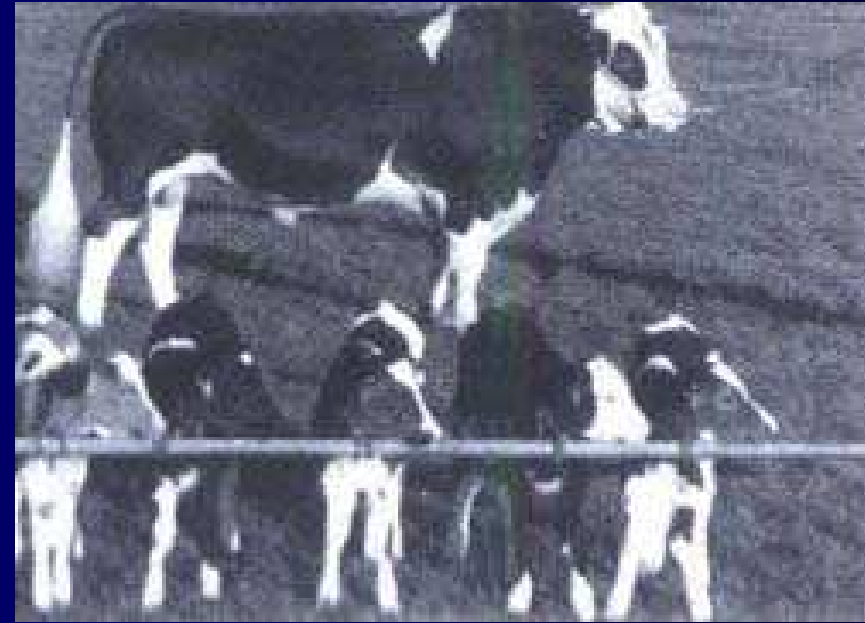
MUTACION DIRIGIDA DE GENES (GEN Int-2)

CREACIÓN DE RATONES “knock-in”

organismo genéticamente modificado al cual se le ha reemplazado un gen normal por uno alterado con una mutaciones específica



Toro Herman

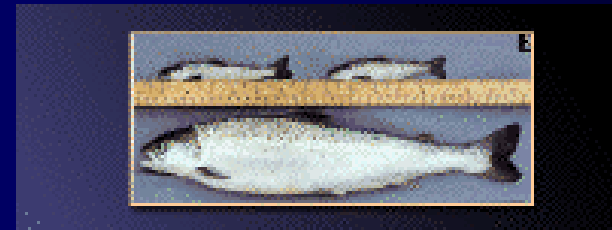


1990

**GEN DE LA
PROTEINA
LACTOFERINA**

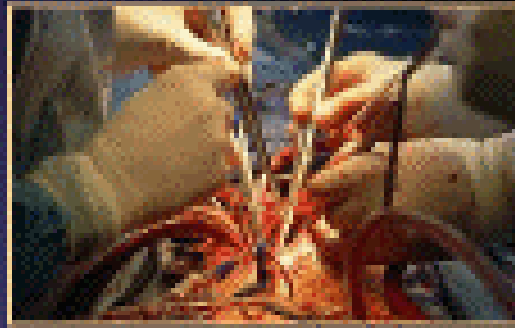
- Preparados lacteos para bebes prematuros
- Enfermos con tratamiento quimioterápico

**Mejora
de
producción**



**Mejora resistencia a
enfermedades**

XENOTRASPLANTES



**Injertos de órganos
animales en humanos**

**Creación de Animales
inmunológicamente compatibles con
humanos**

Inserted DNA

2001

experimento

- 224 óvulos de macaco
- inserto: gen de medusa (codifica para una proteína que emite fluorescencia)
- Solo se generan y prosperan 40 embriones
- 5 terminan en embarazo
- nacen 3 macacos
- solo ANDi presenta la huella del gen foráneo de medusa



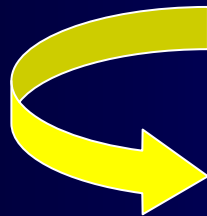
Andi:
el primer
mono
transgénico



*Modificación de la leche
para consumo humano*



*Supresión de lactosa
de la leche*



*Aislamiento Genes
Proteínas de la Leche*

BIORREACTORES O ANIMALES FÁBRICAS



Instrumentos muy útiles

1. Instituto Roslin (Edinburgo):

<http://www.roslin.ac.uk/research/transgenics.html>