



Análisis del genoma

**INGENIERÍA
GENÉTICA**



APLICACIONES DE LA INGENIERIA GENÉTICA



ROJA - Aplicaciones médicas

- Obtención de nuevos productos y fármacos por organismos
- Producción de Ac monoclonales
- Desarrollo de terapias génicas y celulares



VERDE – Aplicaciones agrícolas y ganaderas

- Desarrollo de cereales resistentes a plagas
- Desarrollo de animales resistentes a enfermedades
- Desarrollo de plantas que expresen pesticidas



AZUL – Aplicaciones acuáticas y marinas

- Uso de plantas y productos marinos para obtener nuevos fármacos
- Restauración y preservación de especies acuáticas
- Uso de genes de organismos acuáticos para obtener resistencias



BLANCA – Aplicaciones a procesos industriales

- Producción de nuevos compuestos
- Desarrollo de combustibles nuevos
- Uso de bacterias para eliminar vertidos de petróleo

ORGANISMOS TRANSGÉNICOS

Organismo transgénico: es aquél que ha sufrido la alteración de su material hereditario (genoma) por la introducción artificial (manipulación genética) de un gen exógeno, esto es, proveniente de otro organismo completamente diferente.

Aparentemente **no existen barreras** para mezclar los genes (DNA) de dos especies diferentes. Existen bioherramientas moleculares para componer y descomponer al DNA, intercambiando así fragmentos específicos de ADN de distintas especies e incluso transferirlos a bacterias.

Se descubrió posteriormente que esta práctica se venía haciendo en la naturaleza **de forma espontánea** desde hace millones de años en los vegetales a través de la bacteria llamada *Agrobacterium tumefaciens*.

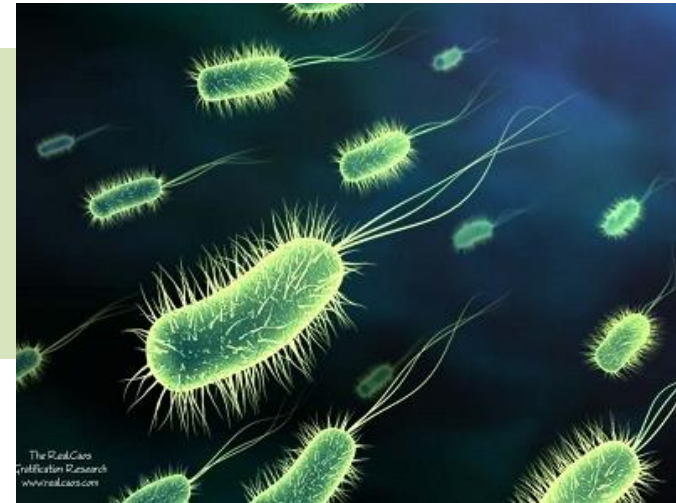
Las bacterias producen hoy en día, proteínas humanas por ingeniería genética como el interferón, la insulina y la hormona del crecimiento, de gran importancia en la medicina.



ORGANISMOS TRANSGÉNICOS

Microorganismos transgénicos

Producción de alimentos
Eliminación de basuras
Obtención de materias primas para la industria
Descontaminar lo que las industrias han contaminado



Animales de granja

(cerdos, ovejas, borregos)

"biorreactores" de proteínas terapéuticas humanas en su leche (antitripsina, factor VIII de coagulación...)

Plantas transgénicas "nueva revolución verde"

Resistentes a sequías, a herbicidas o a plagas de insectos,
Maduración tardía o con características para mantener el color y sabor después de congelación
Ejemplos : algodón, la soja, la papa, el tomate y el maíz



INGENIERÍA GENÉTICA

La Ingeniería Genética

Conjunto de técnicas, nacidas de la Biología molecular, que permiten manipular el genoma de un ser vivo, introduciendo genes en un organismo que carece de ellos

Se realiza por

Enzimas de restricción

Capaces de cortar el ADN por puntos concretos

Incluye

Técnicas biotecnológicas

- Recombinación de ADN
- Secuenciación del ADN
- Reacción en cadena de la polimerasa
- Aplicaciones diversas

Se obtiene

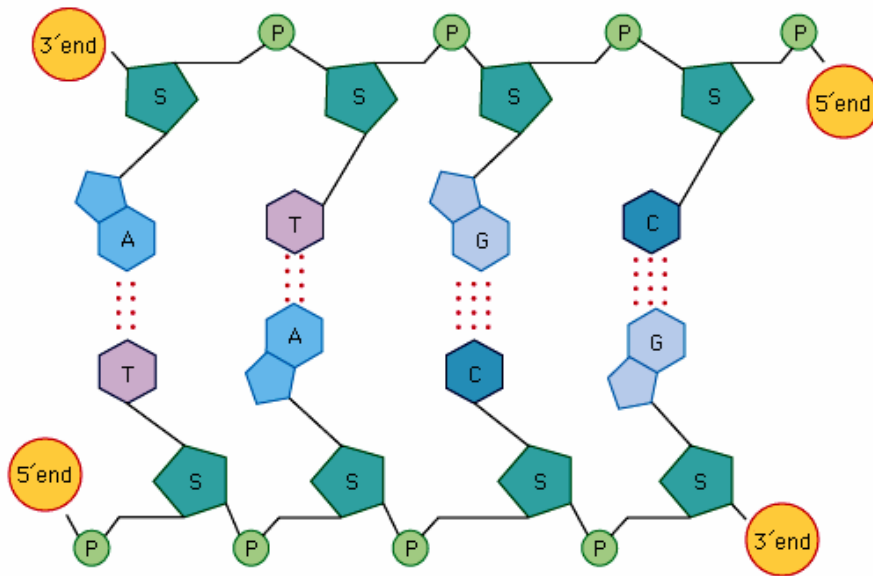
ADN Recombinante

Segmento de ADN extraño intercalado en un ADN receptor



Técnicas de ADN recombinante: la manipulación genética

Entre los años 70 y 80 se desarrollaron herramientas de la biología molecular y la ingeniería genética, lo que se conoce como técnicas del **ADN recombinante**



La técnica se fundamenta en:

- Doble cadena del ADN
- Complementariedad de bases
- Siempre que se encuentren secuencias complementarias se unen
- Orden de las bases determina información de proteínas
- Código de transcripción universal

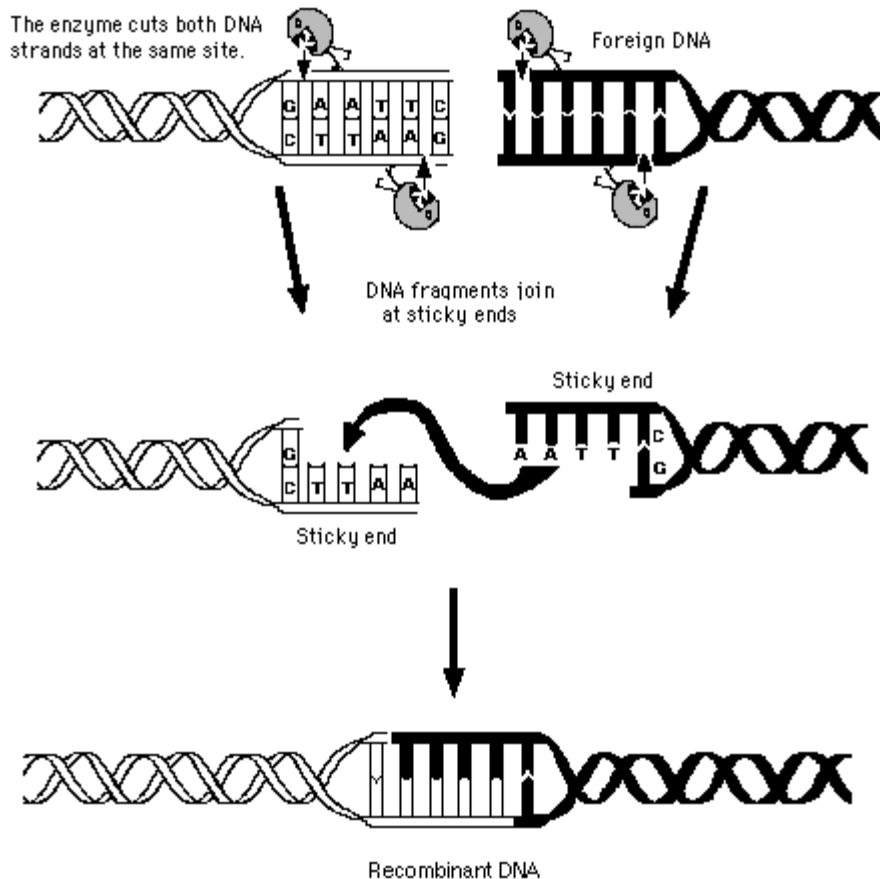
Técnicas de ADN recombinante: la manipulación genética

La tecnología del **ADN recombinante** incluye diferentes técnicas de las que destacan:

- **La rotura específica del ADN** mediante endonucleasas de restricción, que facilita el aislamiento y la manipulación de los genes individuales.
- **La secuenciación rápida** de todos los nucleótidos de un fragmento purificado de ADN, que posibilita determinar los límites de un gen y la secuencia de aminoácidos que codifica.
- **La hibridación de los ácidos nucleicos** que hace posible localizar secuencias determinadas de ADN o ARN, utilizando la capacidad que tienen estas moléculas de unirse a secuencias complementarias de otros ácidos nucleicos marcadas denominadas SONDAS.
- **La clonación del ADN**, mediante la cual se puede conseguir que un fragmento de ADN se integre en un elemento génico autorreplicante (plásmido o virus) que habita en una bacteria, de tal manera que una molécula simple de ADN puede ser producida generando muchos miles de millones de copias idénticas.
- **La ingeniería genética** mediante la cual se pueden alterar secuencias de ADN produciendo versiones modificadas de los genes, los cuales se pueden insertar a células u organismos.

Enzimas: Endonucleasas de restricción

Restriction Enzyme Action of EcoRI



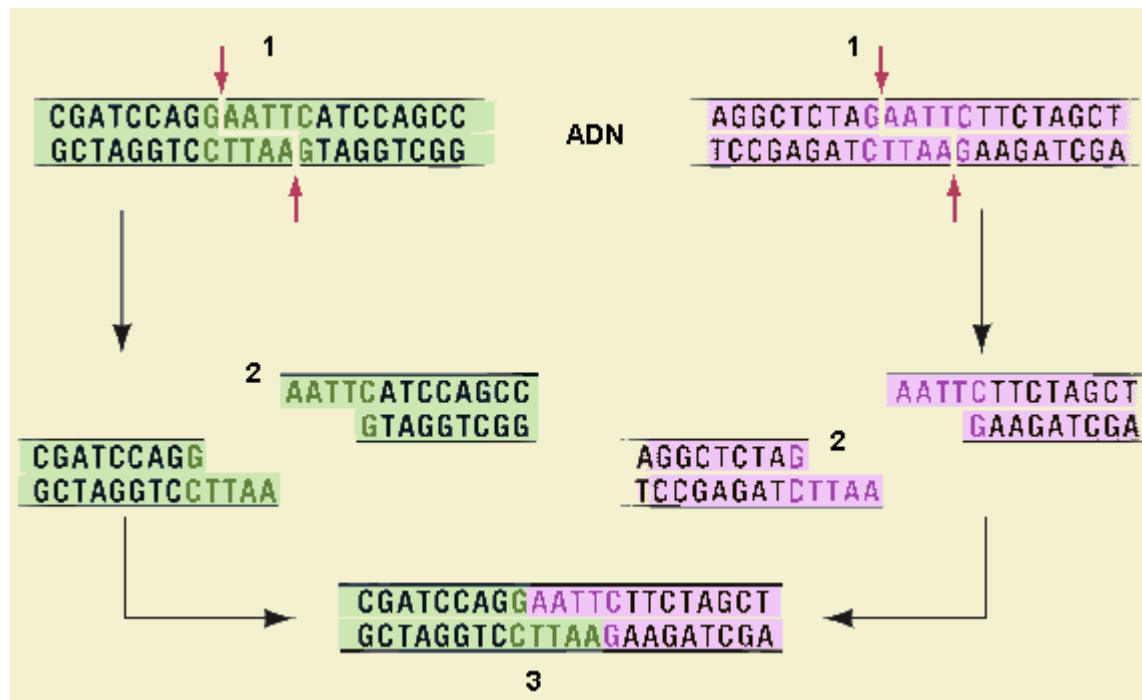
Endonucleasas de Restricción:

Enzimas que pueden cortar el ADN y lo hacen en secuencias concretas

Enzimas que las bacterias usan para destruir ADN que ingresa a ellas, por ejemplo ADN de virus bacteriófagos

Enzimas: Endonucleasas de restricción

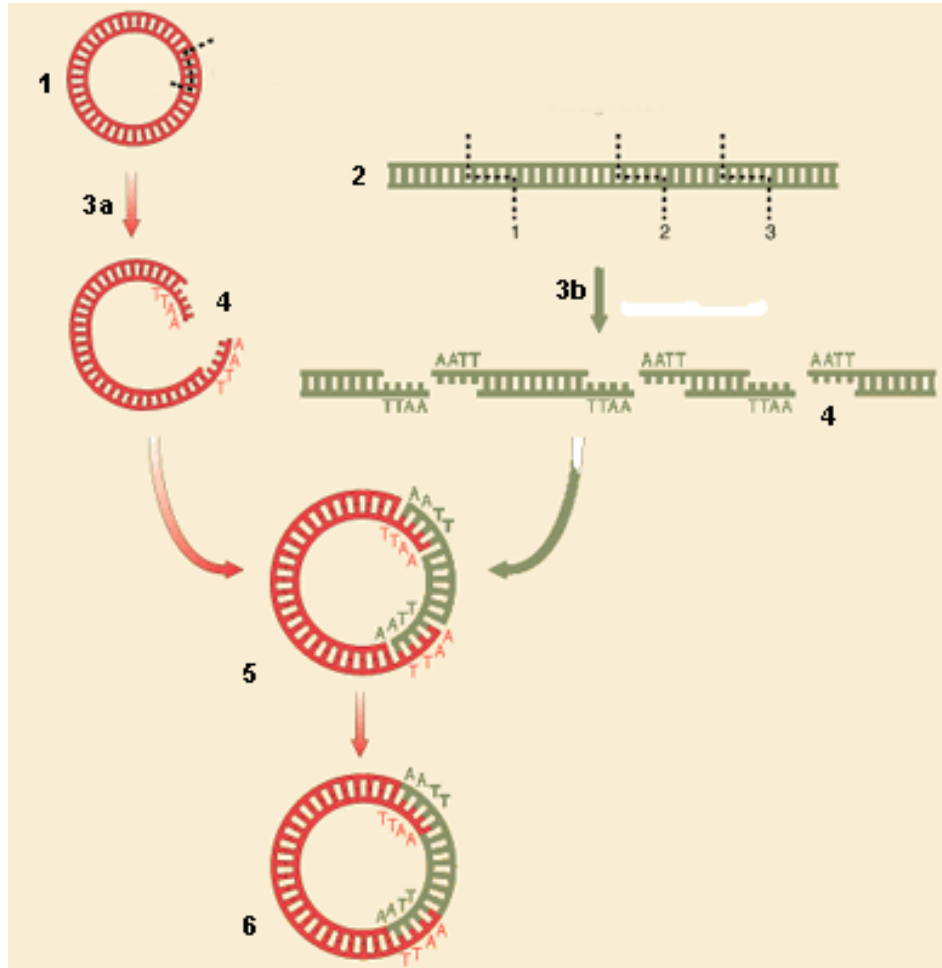
- Los enzimas de restricción sólo reconocen y cortan secuencias específicas.
- Generan extremos cohesivos (con monocadenas) o extremos romos.
- La rotura del DNA produce una serie característica de fragmentos, y estos se pueden ligar a otros DNA, como el vector de clonación cortado (plásmido).
- La reacción de ligación está facilitada por el apareamiento de extremos cohesivos complementarios, y los fragmentos de DNA con extremos cohesivos diferentes (no complementarios) no suelen ligarse.



Se conocen mas de 1200 enzimas de restricción

Eco RI (*E. coli*) reconoce secuencias GAATTC y corta entre G y A

Construcción de ADN recombinante



1 ADN plásmido

2 ADN extraño

3 Corte del plásmido y ADN extraño con Eco RI (endonucleasa de restricción)

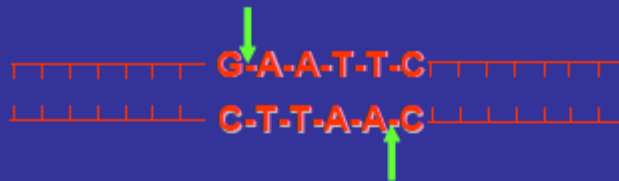
4 Formación de extremos cohesivos

5 Formación de ADN recombinantes

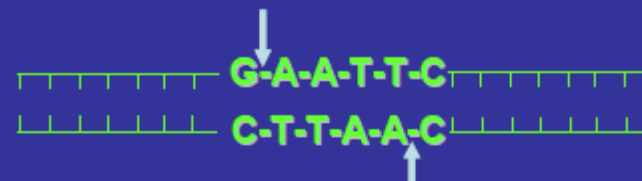
6 Acción de ADN ligasa que sella los extremos

Construcción de ADN recombinante

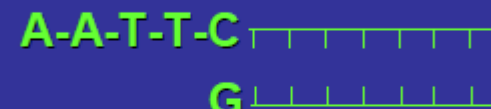
1.- Digestión del ADN



Corte con *Eco* RI

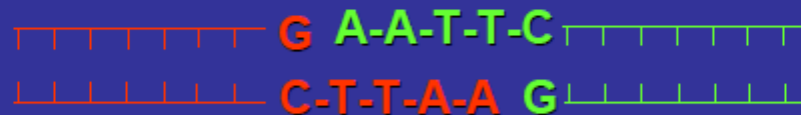


Corte con *Eco* RI

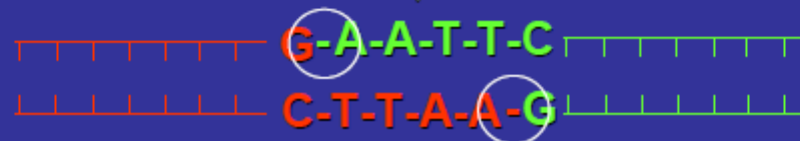


Fragmentos con colas
complementarias

2. Unión



ADN ligasa



Clonación del ADN

La clonación de un gen consiste en introducirlo en una célula de modo que se copie y se mantenga

El gen se inserta en un ADN llamado **vector de clonación (plásmidos)**, capaz de entrar y replicarse de forma independiente en una célula huésped

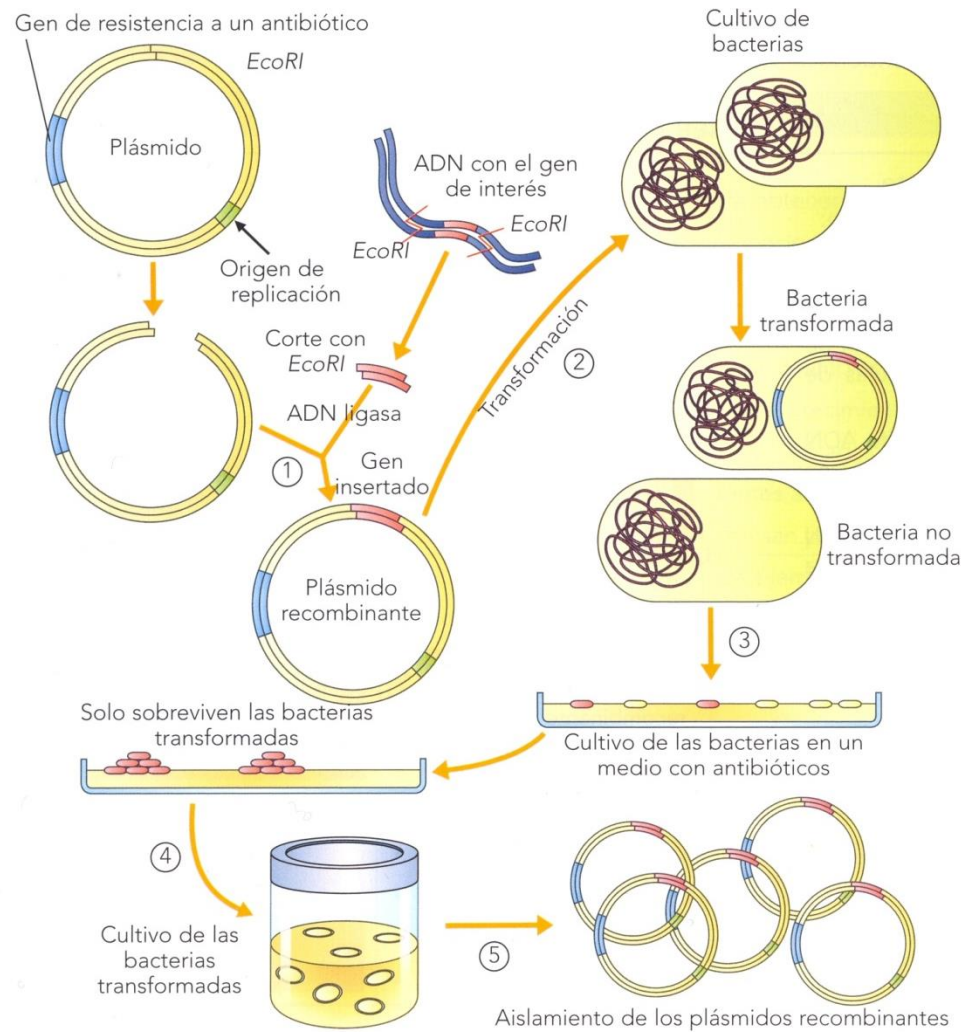
Resultado: **ADN recombinante**. Permite obtener grandes cantidades del gen insertado en la célula hospedadora adecuada apropiada

Cuando el genoma entero de un organismo es cortado en trozos y clonado en un determinado vector se construye una **genoteca o una biblioteca o librería genómica** las cuales permiten guardar indefinidamente el ADN de un organismo

Un **plásmido recombinante** en una bacteria se replica con ella pudiendo obtenerse y aislarse **millones de copias** de dicho plásmido

Clonación del ADN

Proceso de clonación de un gen en bacterias



1. Obtención de plásmido recombinante

2. Transformación de bacterias

3. Selección de bacterias transformadas

4. Crecimiento de bacterias transformadas

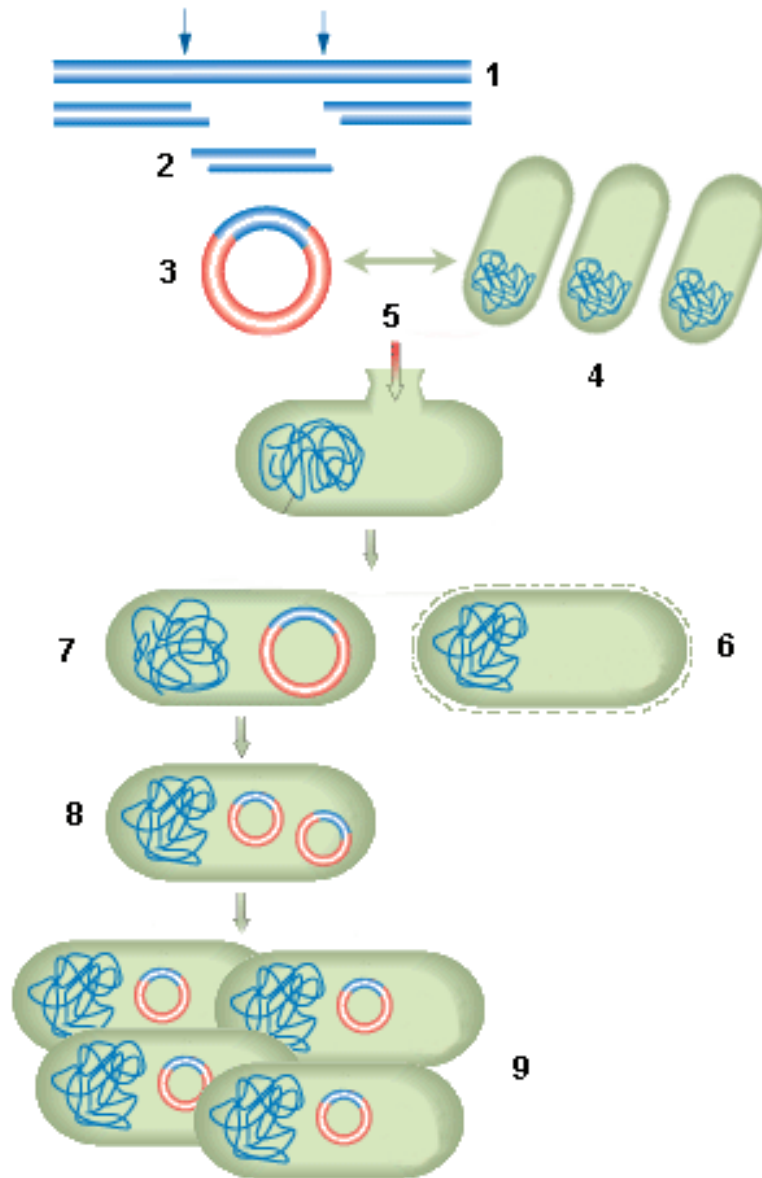
5. Aislamiento de los plásmidos recombinantes

Biblioteca de ADN genómico

- Una biblioteca genómica es un conjunto de clones, cada uno de los cuales contiene un fragmento de un genoma de un organismo dado.
- Las bibliotecas genómicas se consiguen clonando los fragmentos en vectores.



Biblioteca de ADN genómico

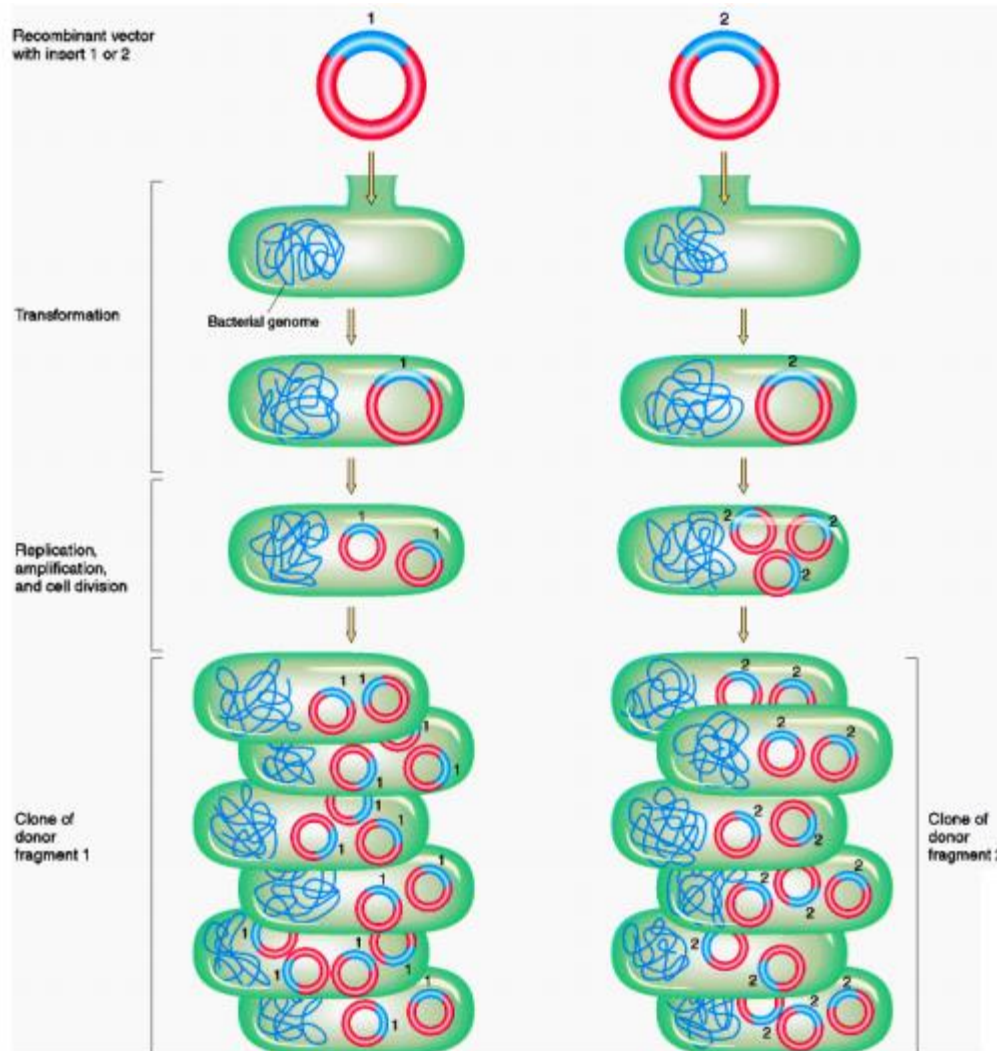


1. Obtención del fragmento de ADN a clonar mediante enzimas de restricción
2. Vector recombinante
3. Transformación de bacterias
4. Replicación, amplificación
5. División celular

Biblioteca de ADN copia

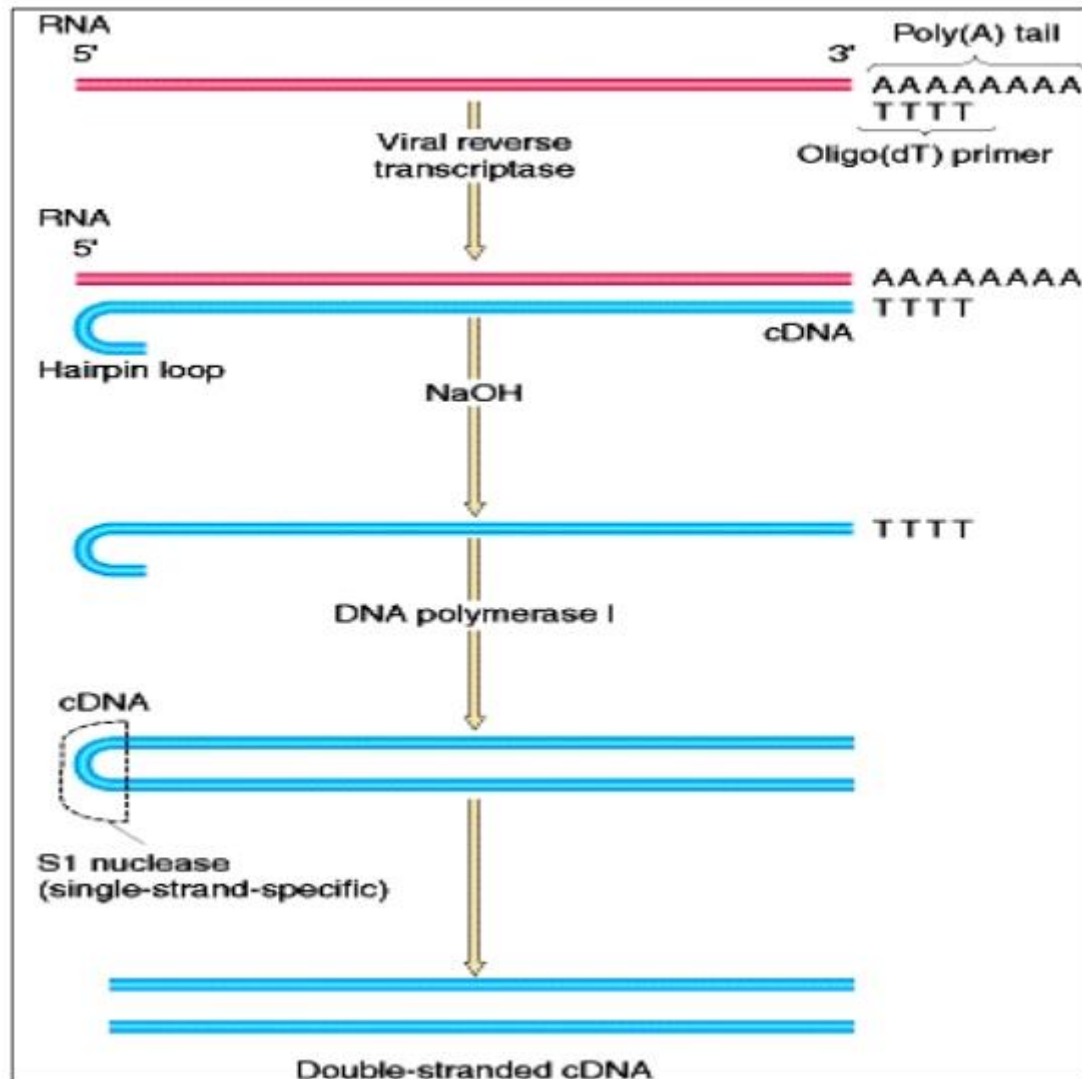
- Construidas a partir de la población total de ARNm de un organismo, de un tejido o tipo celular particular o de una etapa del desarrollo particular.
- Representa el conjunto de genes que están siendo expresados por esas células o por ese estadio.
- Se pueden explorar con sondas de ADN y/o anticuerpos (al estimular la expresión de los insertos en las bacterias)

Biblioteca de ADNc



1. Vector recombinante
2. Transformación de bacterias
3. Replicación, amplificación
4. División celular

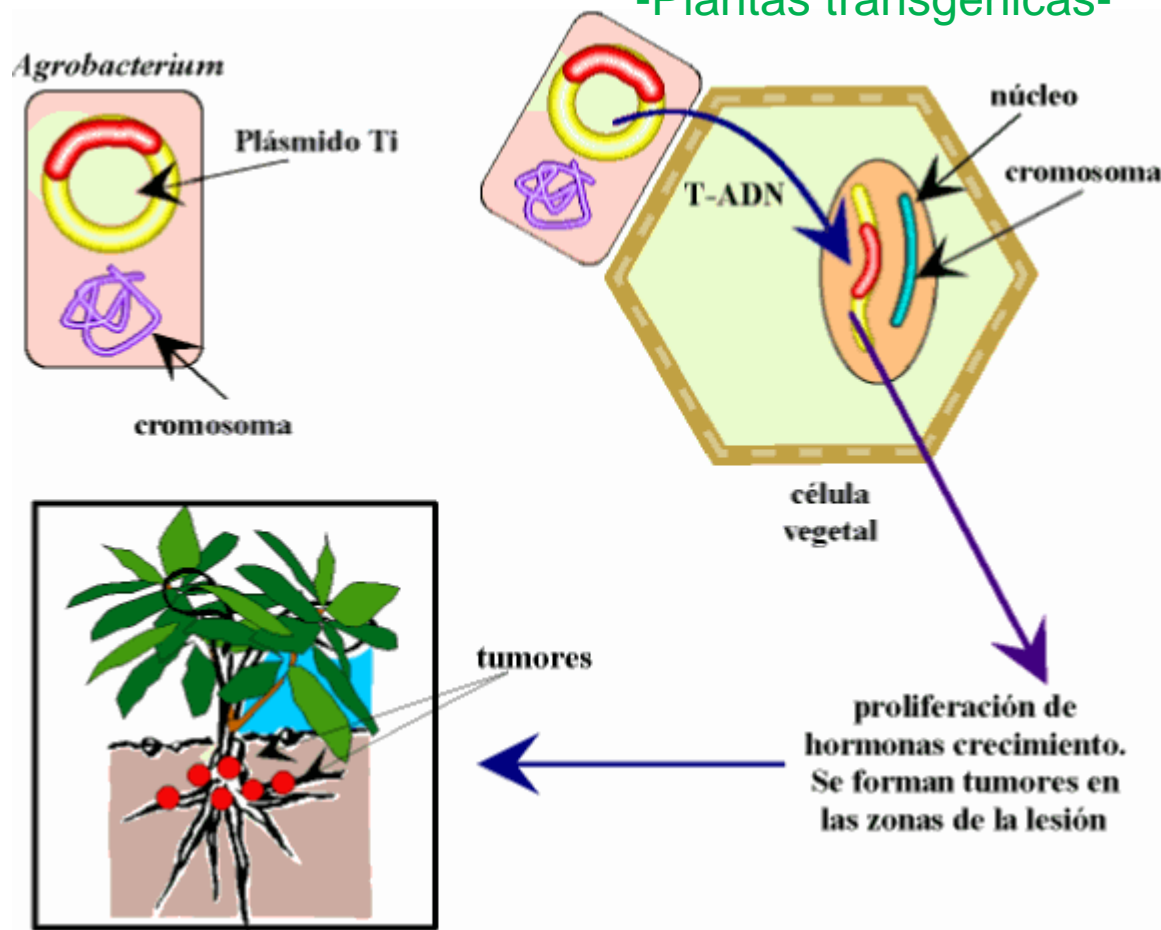
Obtención de ANDc a partir de ARNm



INGENIERÍA GENÉTICA: Agricultura y medio ambiente

- Tradicionalmente se han mejorado los cultivos por selección de ejemplares
- Actualmente se mejoran características con técnicas de ADN recombinante:

-Plantas transgénicas-



El **plásmido Ti o T-ADN de *Agrobacterium*** contiene genes (*onc*) que provocan una mayor producción de hormonas de crecimiento con la formación del tumor o agalla.

Se eliminan de Ti los **genes *onc*** y se sustituyen por otros genes que interese clonar, se habrá obtenido un sistema eficaz para introducir ADN interesante a la planta, evitando la aparición de la enfermedad

INGENIERÍA GENÉTICA: Agricultura y medio ambiente

Actualmente se consiguen mejorar diferentes características con técnicas de ADN recombinante -Plantas transgénicas-

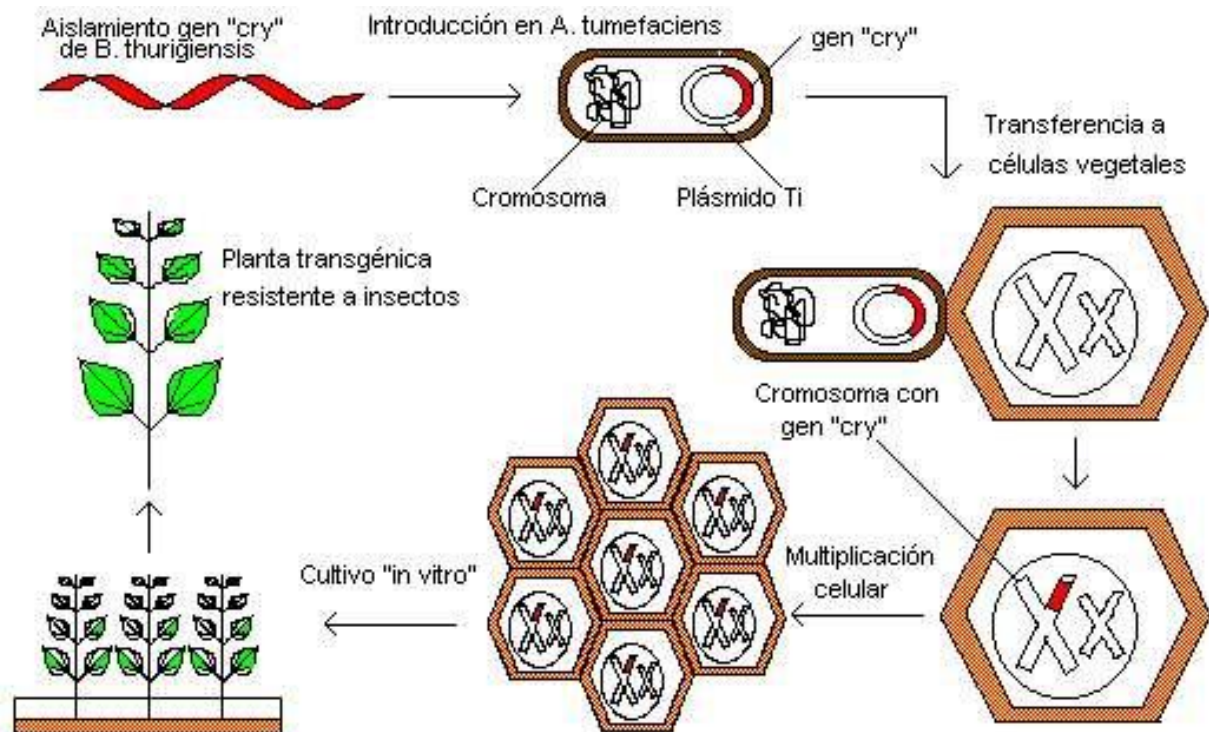
•Resistencia a herbicidas (mejora vegetal)

- Resistencia al glifosato** herbicida no selectivo, con gen de *E. coli* resistente, clonado e incorporado
- Resistencia a plagas, con toxina de *Bacillus thuringiensis*
- Resistencia a virus, con proteínas de la cápsida de dicho virus

FASES:

1. Transferencia de genes

2. Regeneración de plantas completas



INGENIERÍA GENÉTICA: Agricultura y medio ambiente

•Mejora del producto (alimentos)

- Arroz transgénico –arroz dorado- con β caroteno (vit A)



•Plantas farmacéuticas (biofarmacéutica)

- Producción de proteínas humanas, vacunas, anticuerpos, mas económicas y contienen mecanismos de modificación postraduccional de las proteínas, a diferencia de las bacterias



INGENIERÍA GENÉTICA: Agricultura y medio ambiente

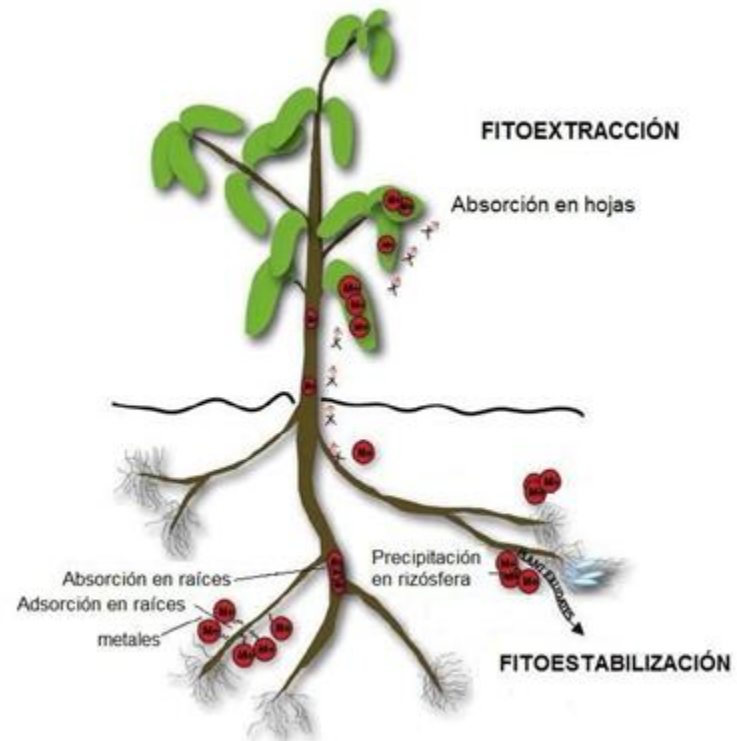
Fitorremediación: Plantas transgénicas que transforman contaminantes peligrosos en sustancias inocuas



chopos modificados para acumular metales, actualmente en condiciones controladas en invernadero

La fitoestabilización : plantas que inmovilizan los metales en el suelo por absorción o adsorción en las raíces. Los contaminantes permanecen retenidos bajo la superficie del suelo

La fitoextracción : plantas tolerantes capaces de absorber los metales desde el suelo y acumularlos en su biomasa aérea. Posteriormente, esta biomasa es cosechada, incinerada y tratada como residuo peligroso



Técnicas utilizadas

Utilización de nucleasas de restricción	Rotura específica del DNA, facilita enormemente el aislamiento y la manipulación de los genes individuales
Secuenciación	La secuenciación rápida de todos los nucleótidos de un fragmento purificado de DNA, hace posible determinar los límites precisos de un gen y la secuencia de aminoácidos que codifica.
Hibridación de los ácidos nucleicos	Hace posible localizar secuencias determinadas de DNA o de RNA, con una gran exactitud y sensibilidad, utilizando la capacidad que tienen estas moléculas de unirse a secuencias complementarias de otros ácidos nucleicos.
Clonación del DNA	Se puede conseguir que un fragmento de DNA se integre en un elemento génico autoreplicante (plásmidos, virus) que habita en una bacteria, de tal manera que de una molécula de DNA puede ser reproducida generando muchos miles de millones de copias idénticas.
Ingeniería génica	Se pueden alterar secuencias de DNA produciendo versiones modificadas de los genes, los cuales se pueden reinsertar en células u organismos.