

Principios de Ingeniería Genética

I. Análisis de DNA



Propiedades del DNA que facilitan su análisis

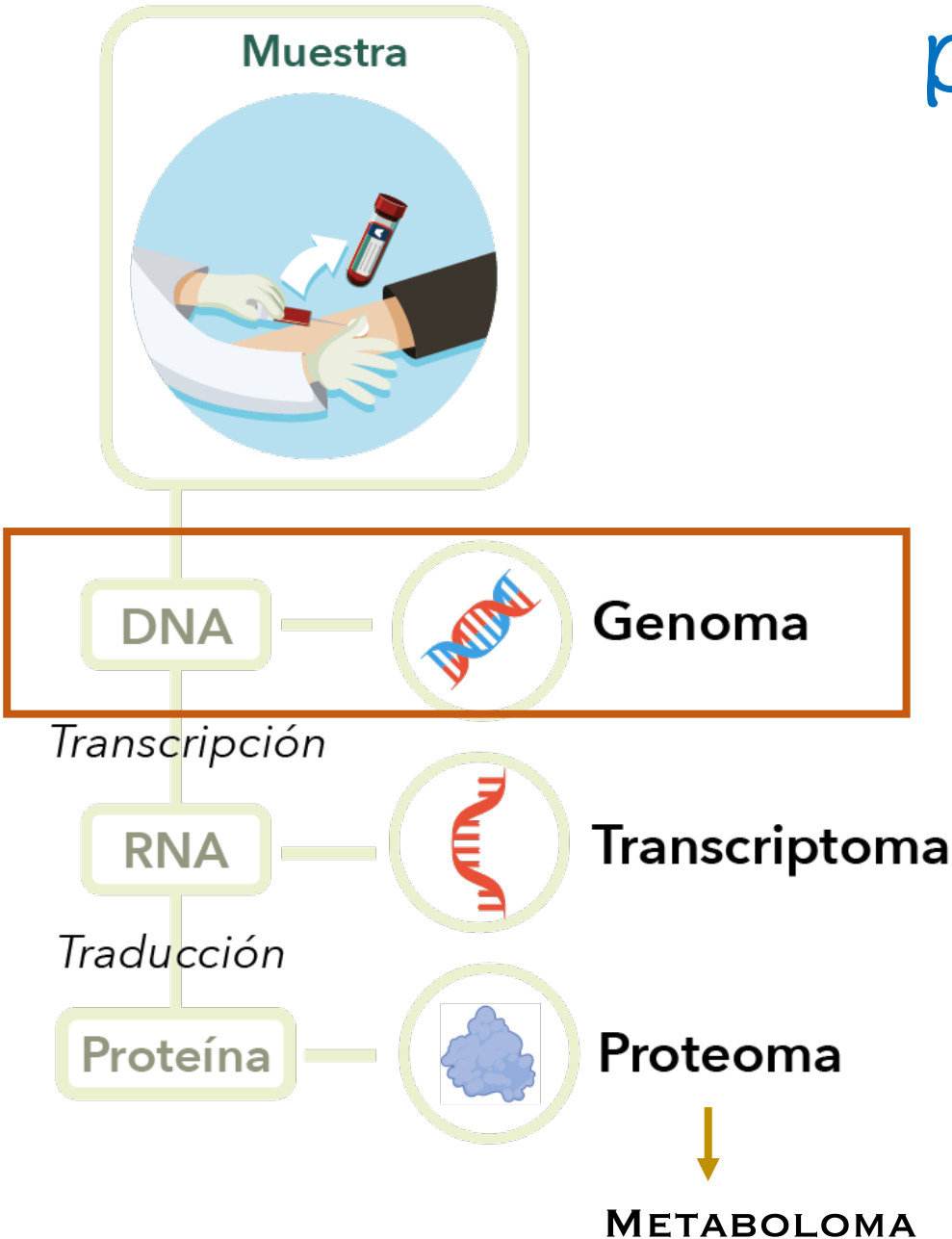
Cadenas muy largas de DNA (**forman hebras en estado muy puro**)

Soluble en agua e insoluble en EtOH (**precipitación DNA**)

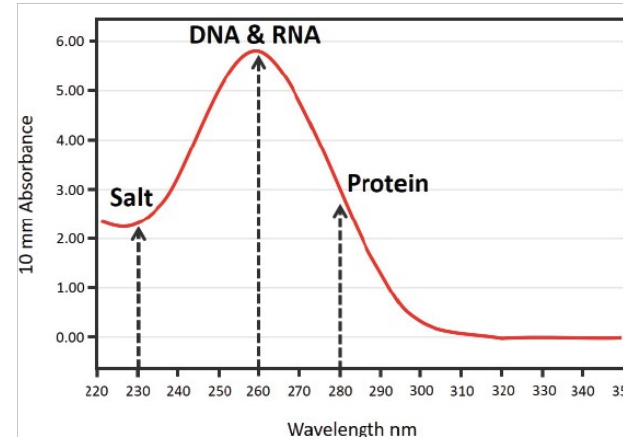
Carga negativa debida a los grupos fosfatos en el exterior (**separación**)

Máximo de Absorbancia a 260nm (**cuantificación de DNA**)

Desnaturalización por altas temperaturas $>90^{\circ}\text{C}$ (**amplificación PCR**)



Cuantificación de ácidos Nucleícos



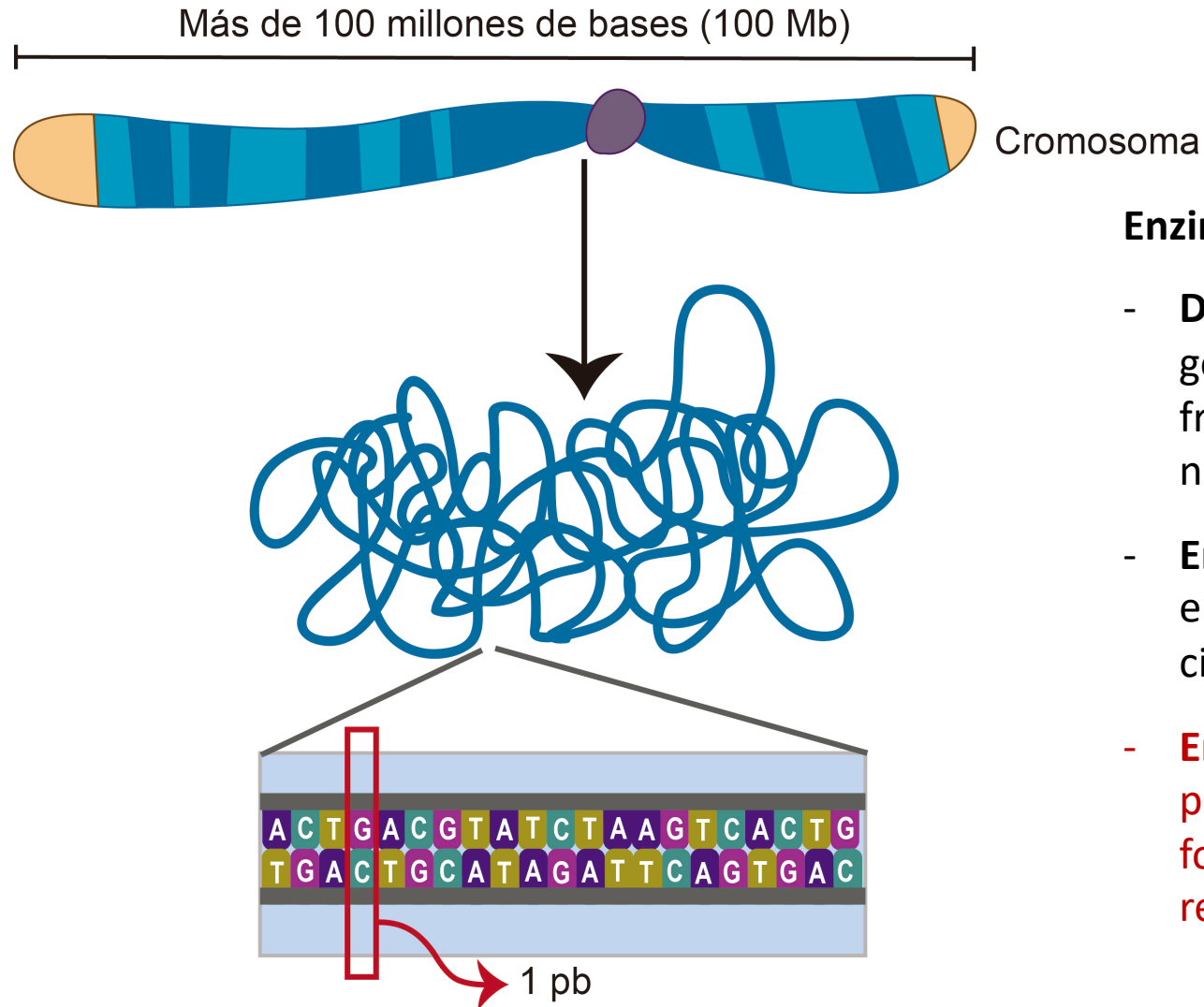
Precipitación con EtOH



Extracción de DNA en casa

<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/extraction/howto/>

El DNA debe ser fragmentado para su análisis



Enzimas que se pueden utilizar:

- **DNasas** (cortan enlaces fosfodiéster en general; se utilizan para enriquecer fragmentos de tamaño definido: por ejemplo nucleosoma – 200 pb)
- **Endonucleasas tipo I** (reconocen secuencias en el DNA y cortan enlaces fosfodiéster a cierta distancia de estas)
- **Endonucleasas tipo II** (reconocen secuencias palindrómicas en el DNA y cortan enlaces fosfodiéster en la misma secuencia que reconocen; son las más utilizadas)

Fraccionamiento controlado del DNA (Enzimas de restricción)

Más de 100 millones de bases (100 Mb)



Grupos Fosfatos

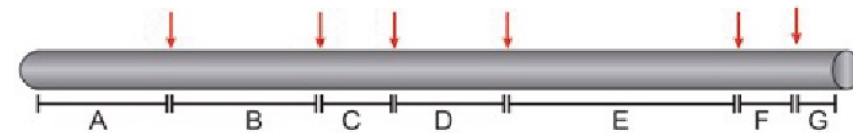
1 pb



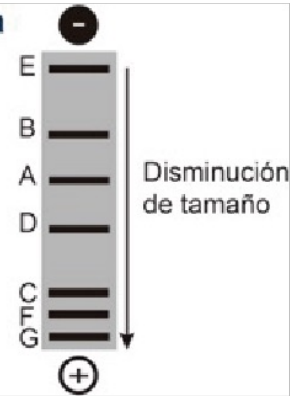
Las **enzimas de restricción** son **endonucleasas** que cortan el DNA en **sitios particulares** mediante el **reconocimiento** de una **secuencia** de nucleótidos específica.

Las enzimas de restricción fueron aisladas de bacterias. Su función natural es proteger la célula contra DNA extraño

Digestión de un fragmento de DNA con la endonucleasa EcoRI

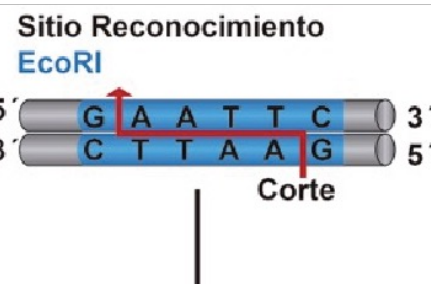


Sitios de corte EcoRI (↓)

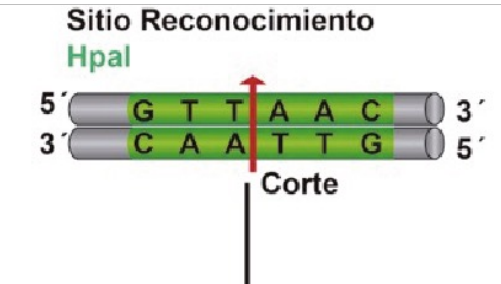
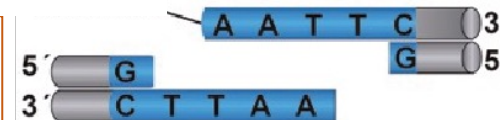


Secuencia de reconocimiento

Secuencias cortas (4-8pb) en una posición determinada
Palindrómicas



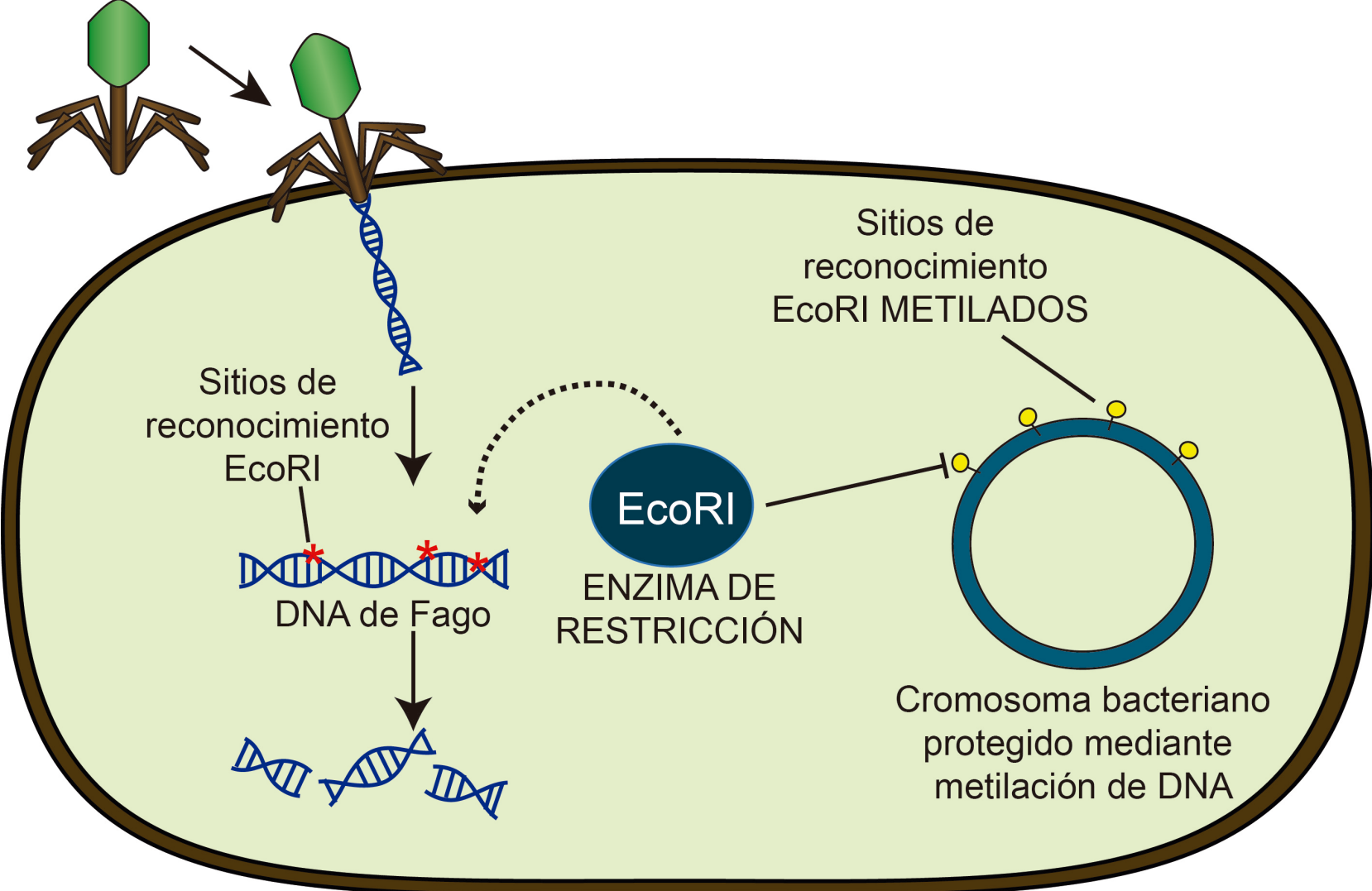
extremos cohesivos



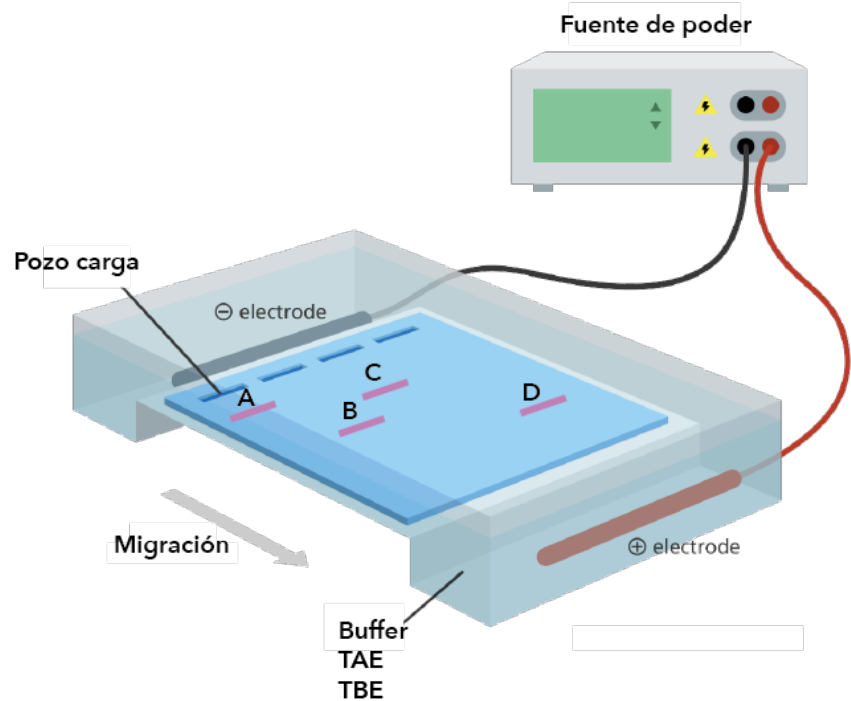
extremos romos



Las enzimas de restricción fueron aisladas de bacterias; su función natural es proteger contra DNA extraño ya que este tiene un patrón de METILACIÓN diferente al propio.

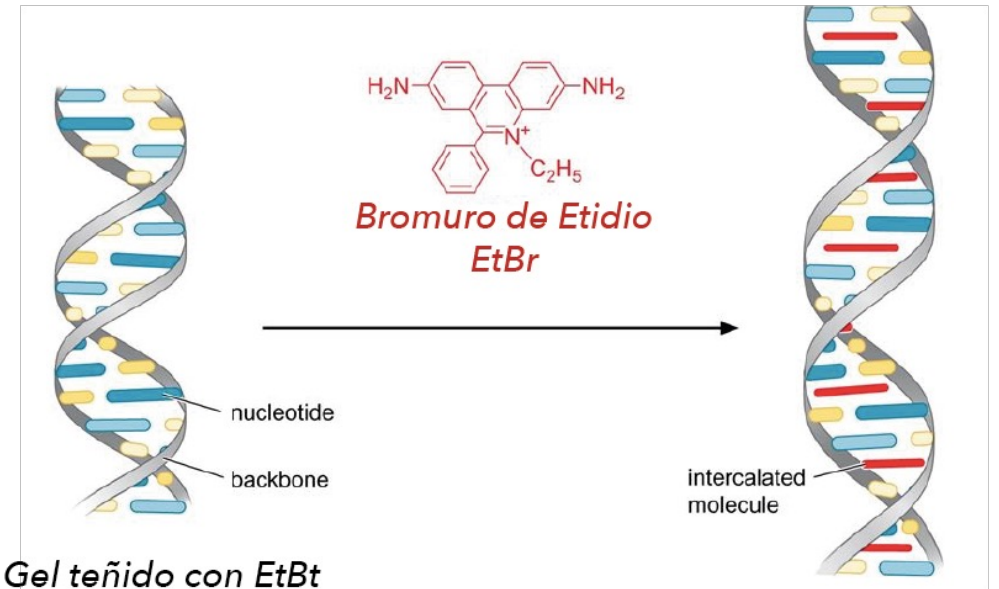


Separación de moléculas de DNA (electroforesis)

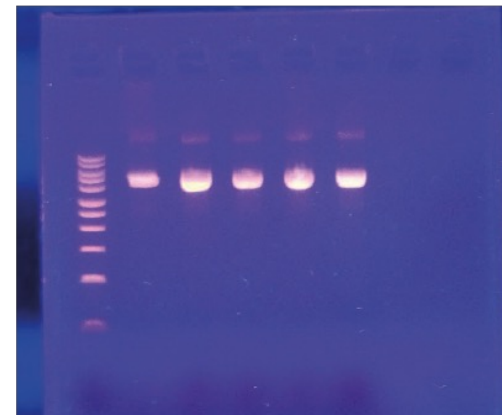


El DNA se separa por **tamaño** en matriz de Agarosa
El DNA migra hacia el polo (+)
Desde el cátodo hacia el **ánodo**

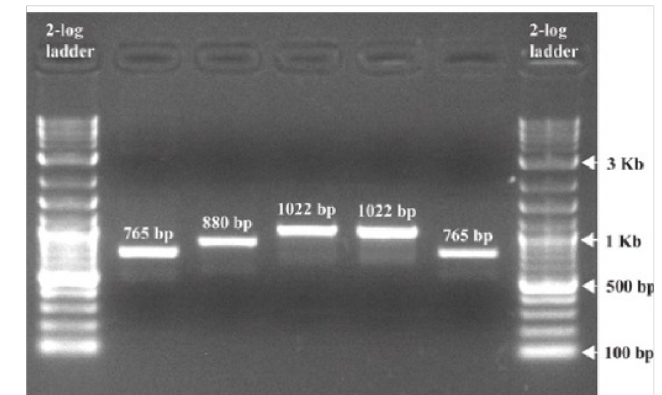
Visualización de moléculas de DNA (Agentes intercalantes)



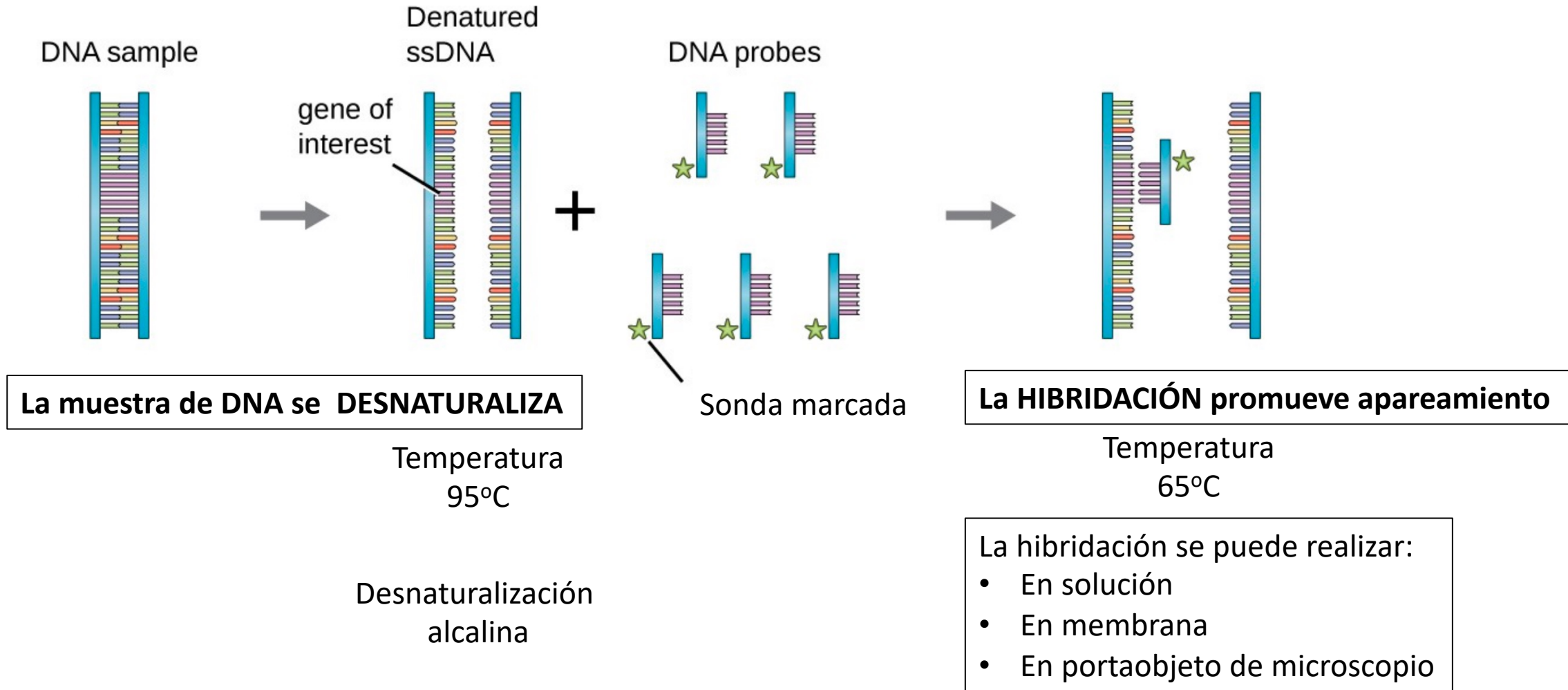
Gel teñido con EtBr en transiluminador



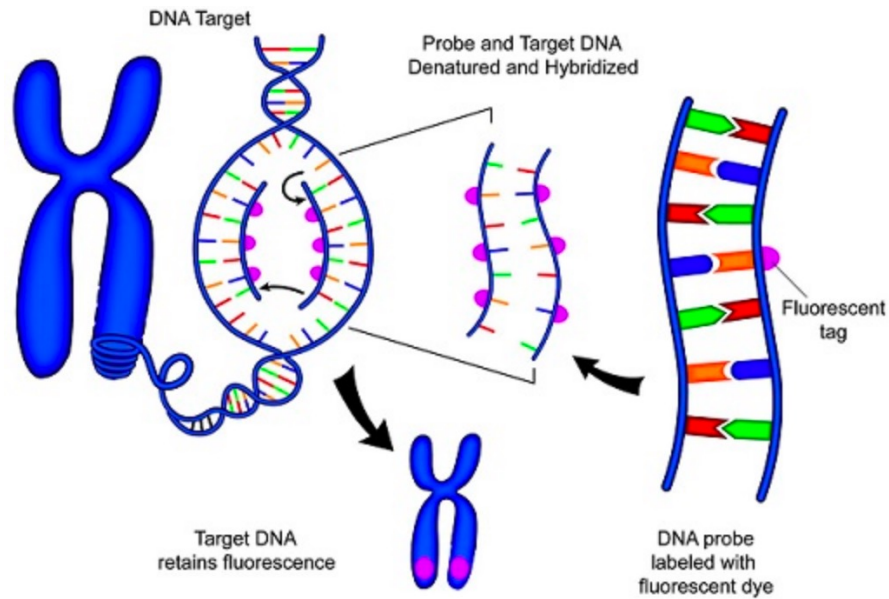
Sistema de Scanning & Image



Reconocimiento de secuencias específicas de DNA mediante HIBRIDACIÓN con sondas (fragmento de DNA con alta homología)

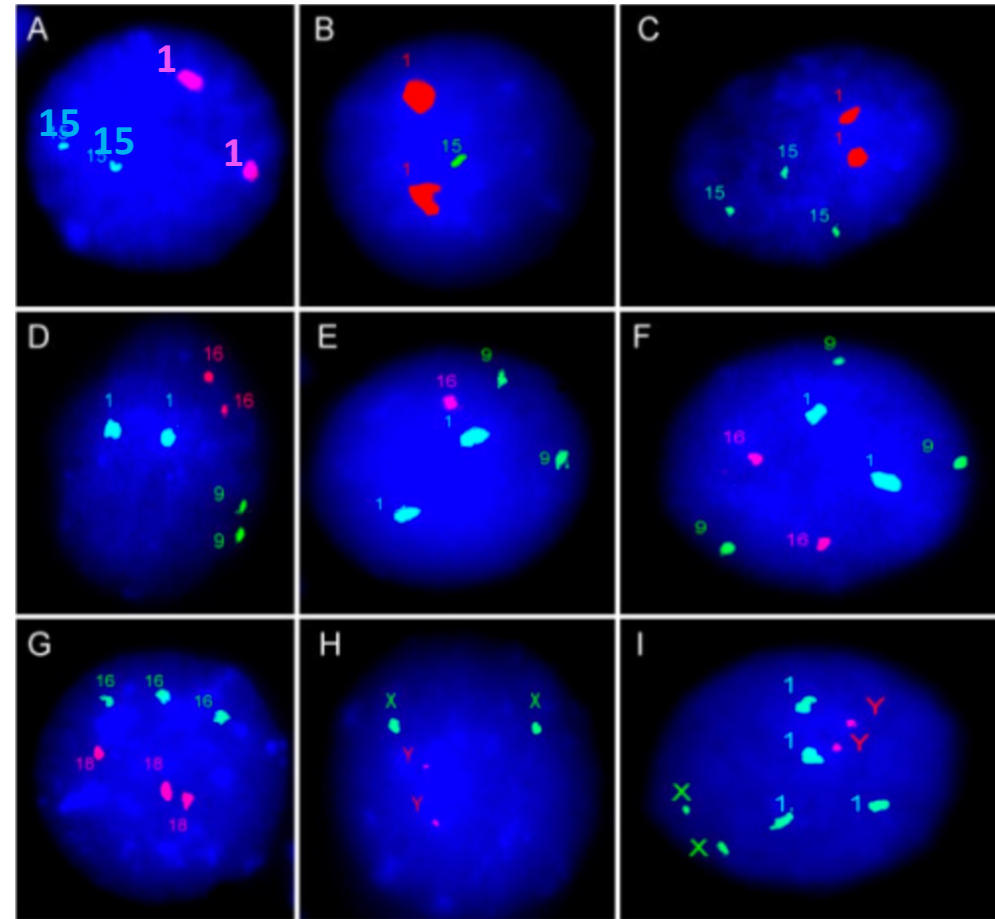


Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) – en portaobjeto



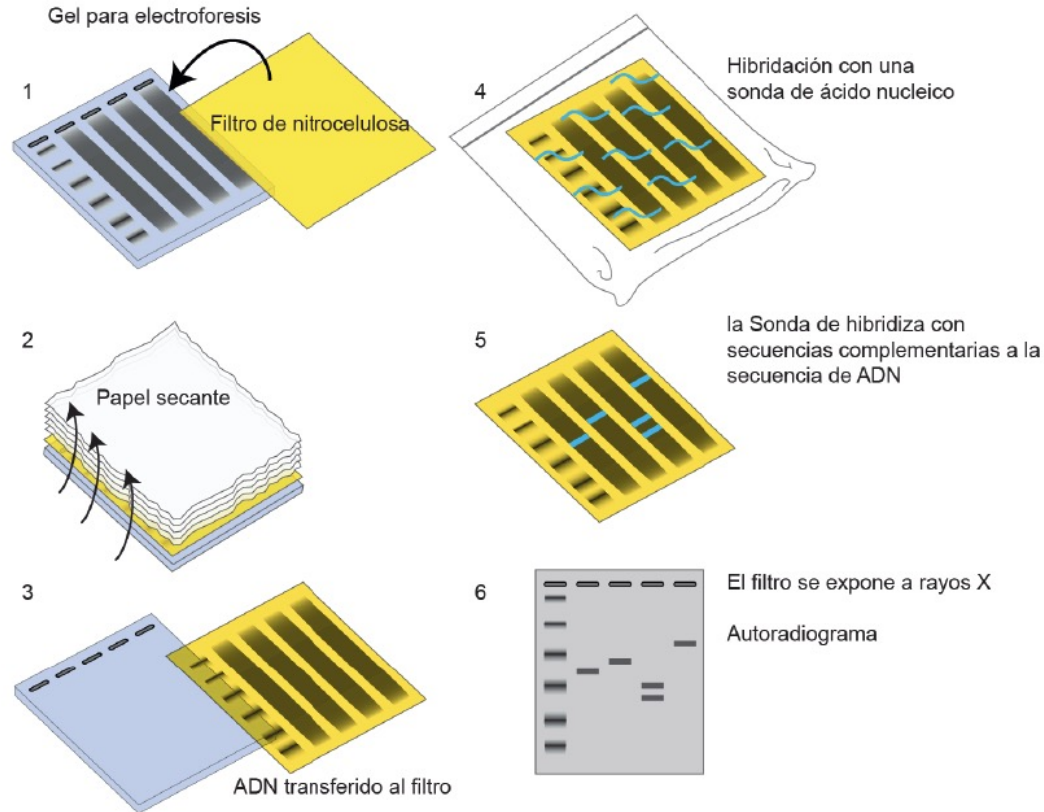
DNA-DNA

Permite analizar anomalías cromosómicas



Vorsanova et al., 2010

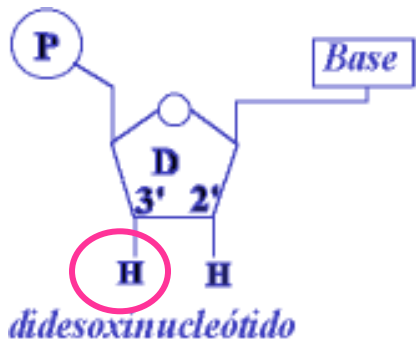
Southern blot – en membrana



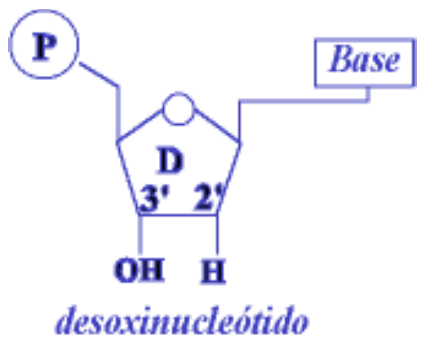
1. Aislamiento de **DNA**
2. Cortar con enzimas de restricción
3. Separar fragmentos por electroforesis
4. **Desnaturalizar el DNA**
5. Transferir a membrana de nitrocelulosa o nylon
6. **Hibridar con sonda específica**
7. Revelar con placa de Rayos X ó pantalla de fosforimager

Permite analizar genes, polimorfismos, mutaciones....

Secuenciación tipo Sanger

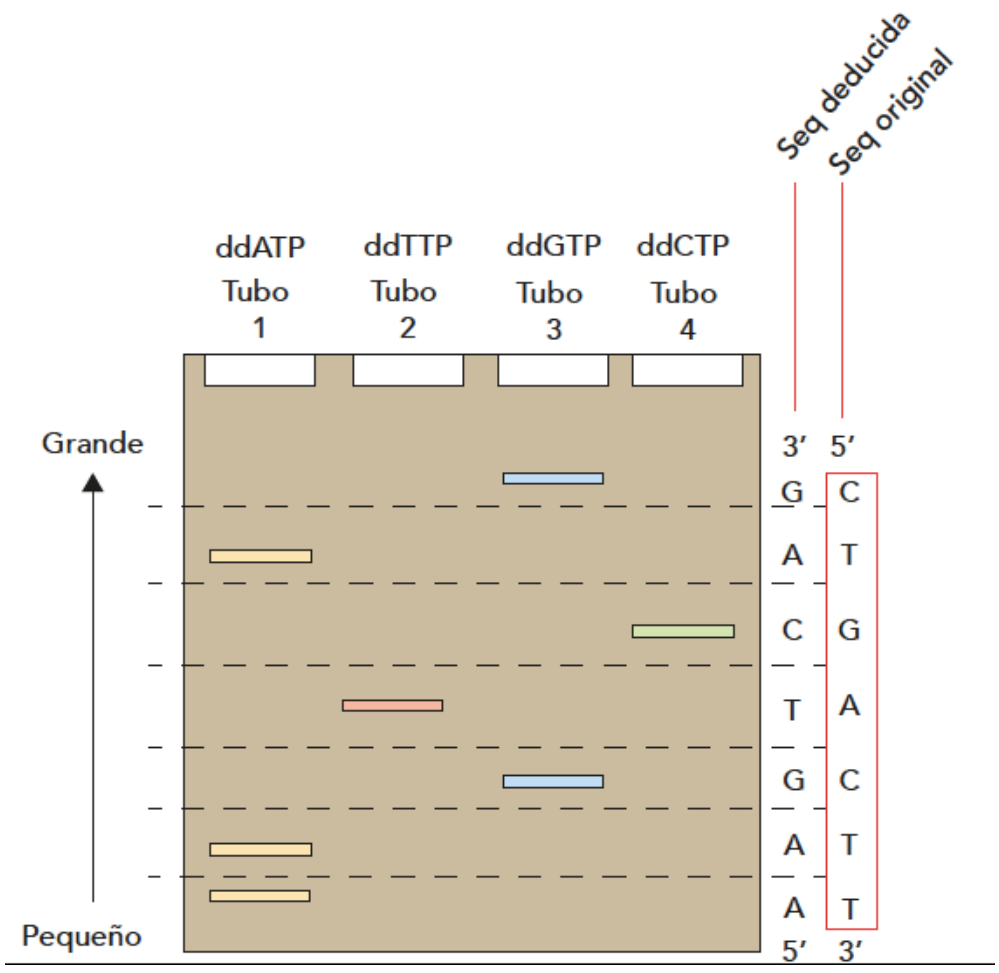
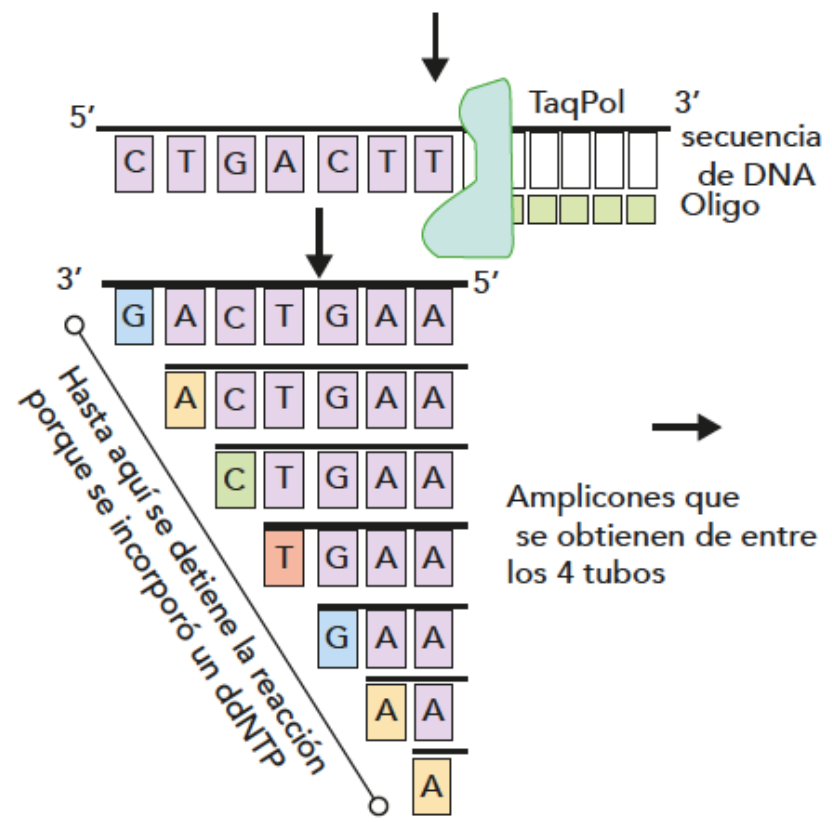
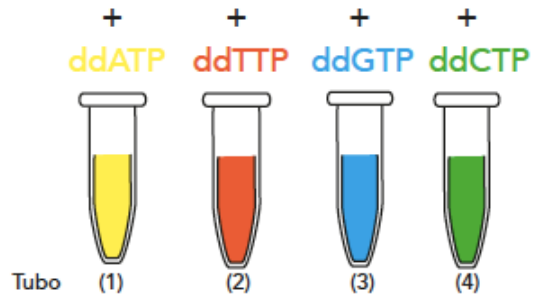


No acepta elongación de la cadena de nucleótidos por la DNA polimerasa

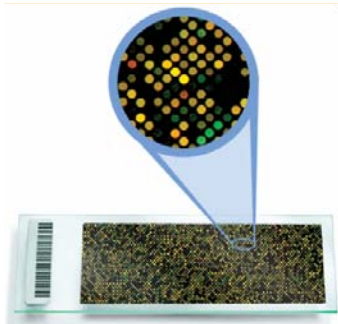


Si acepta elongación de la cadena de nucleótidos por la DNA polimerasa

4 reacciones de PCR
(DNA molde, dNTPs, Oligo, TaqPol)



Técnicas para el análisis GLOBAL de DNA

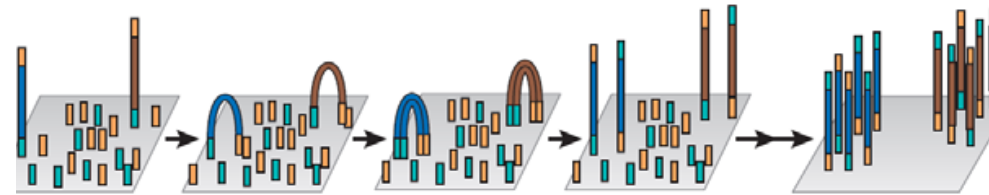


- Microarreglos de DNA

Hibridación con sondas de DNA

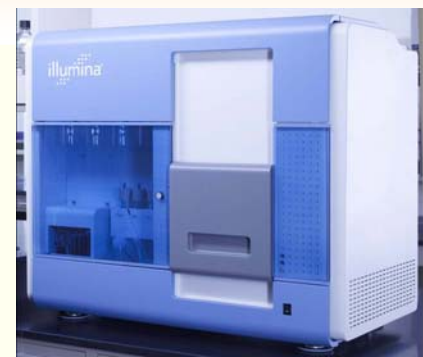
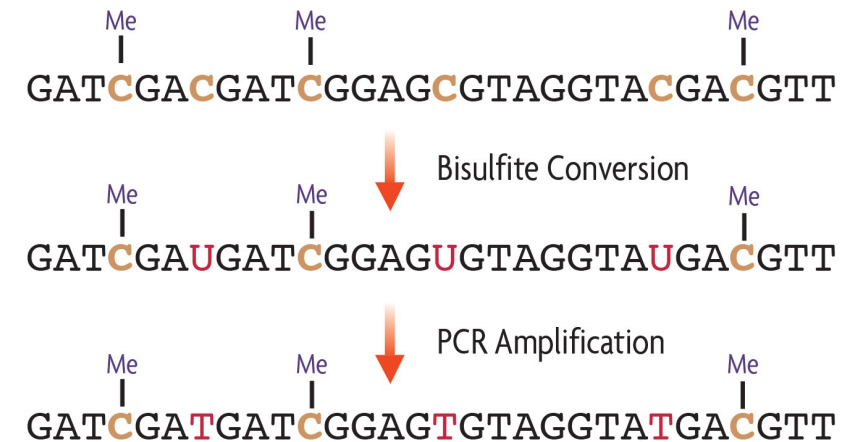
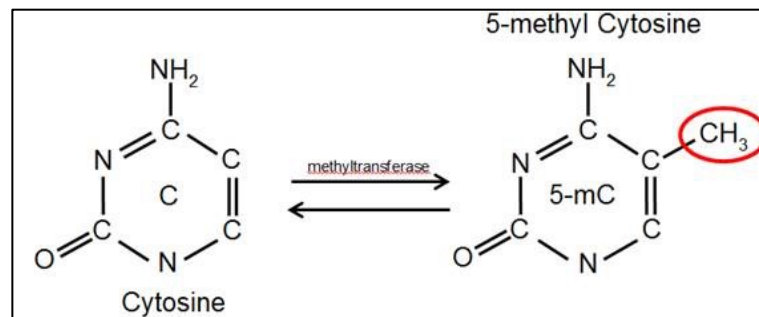
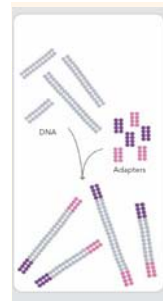
Métodos de análisis global (Genoma, Transcriptoma)

- Secuenciación masiva de DNA



Amplificación por PCR
Secuenciación de DNA

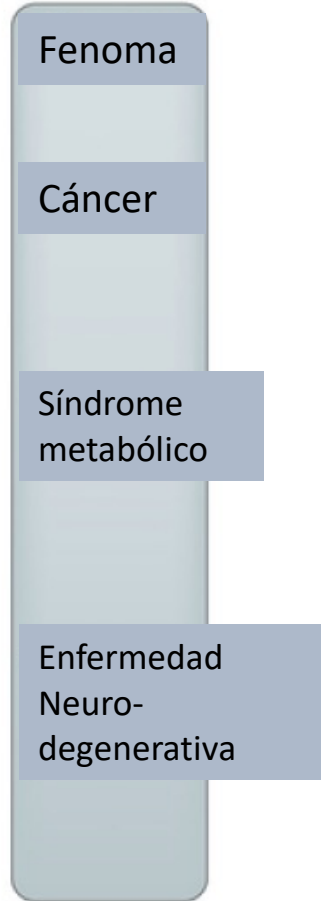
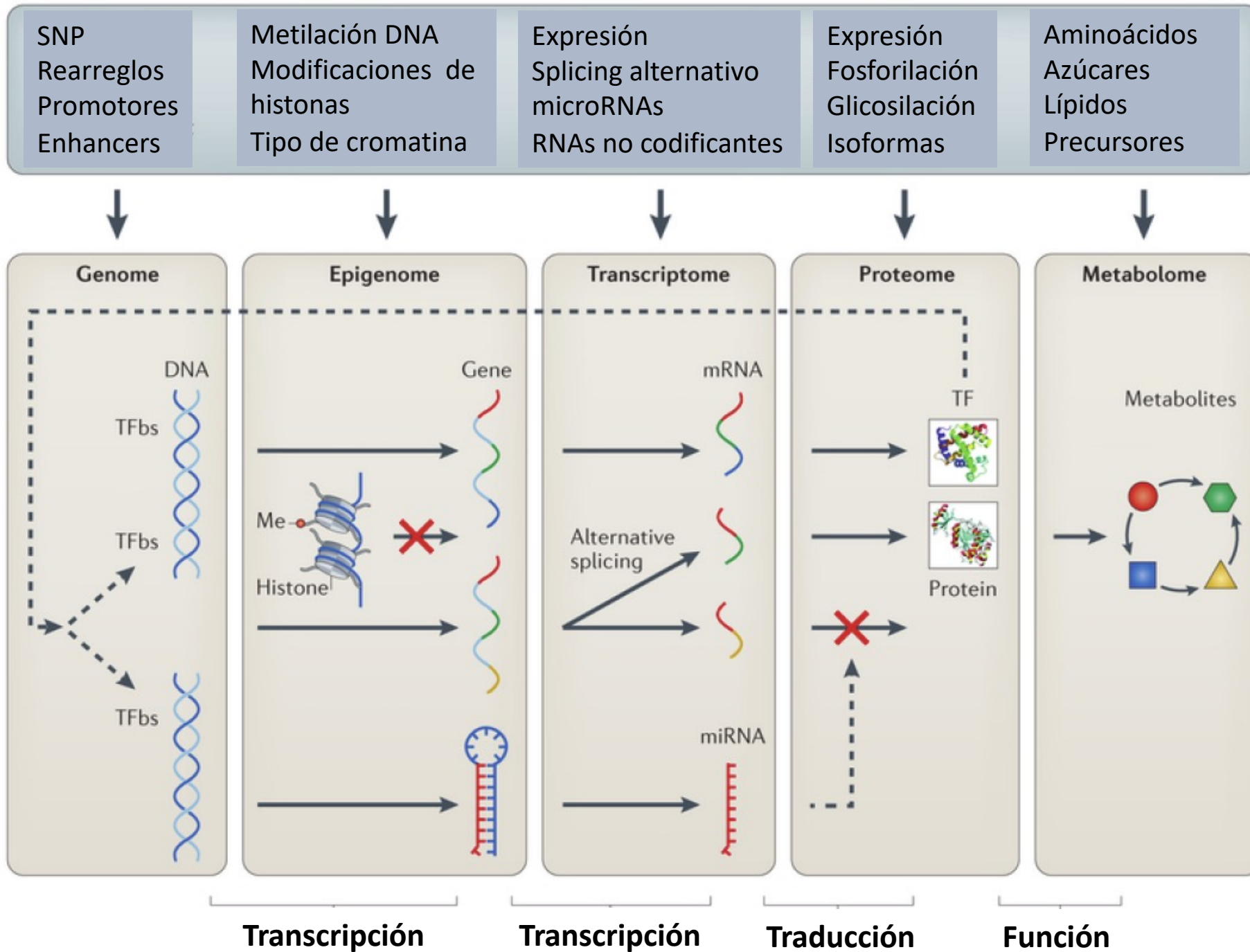
- Metilomas



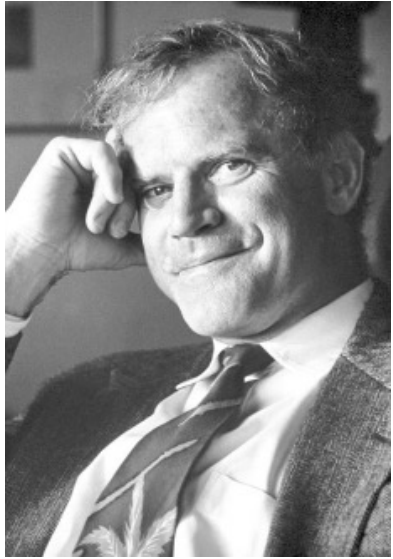
Solexa Genome Analyzer



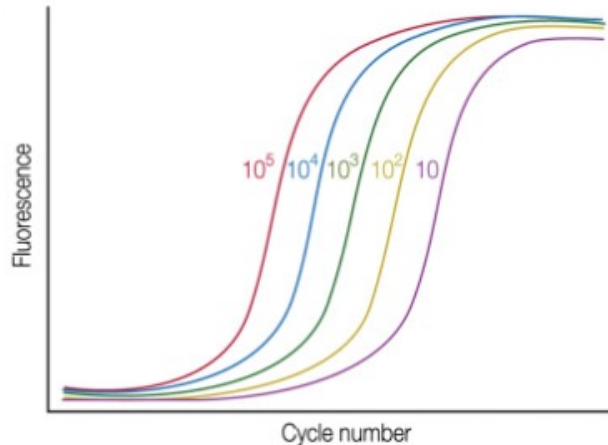
Uso de las "OMICAS"



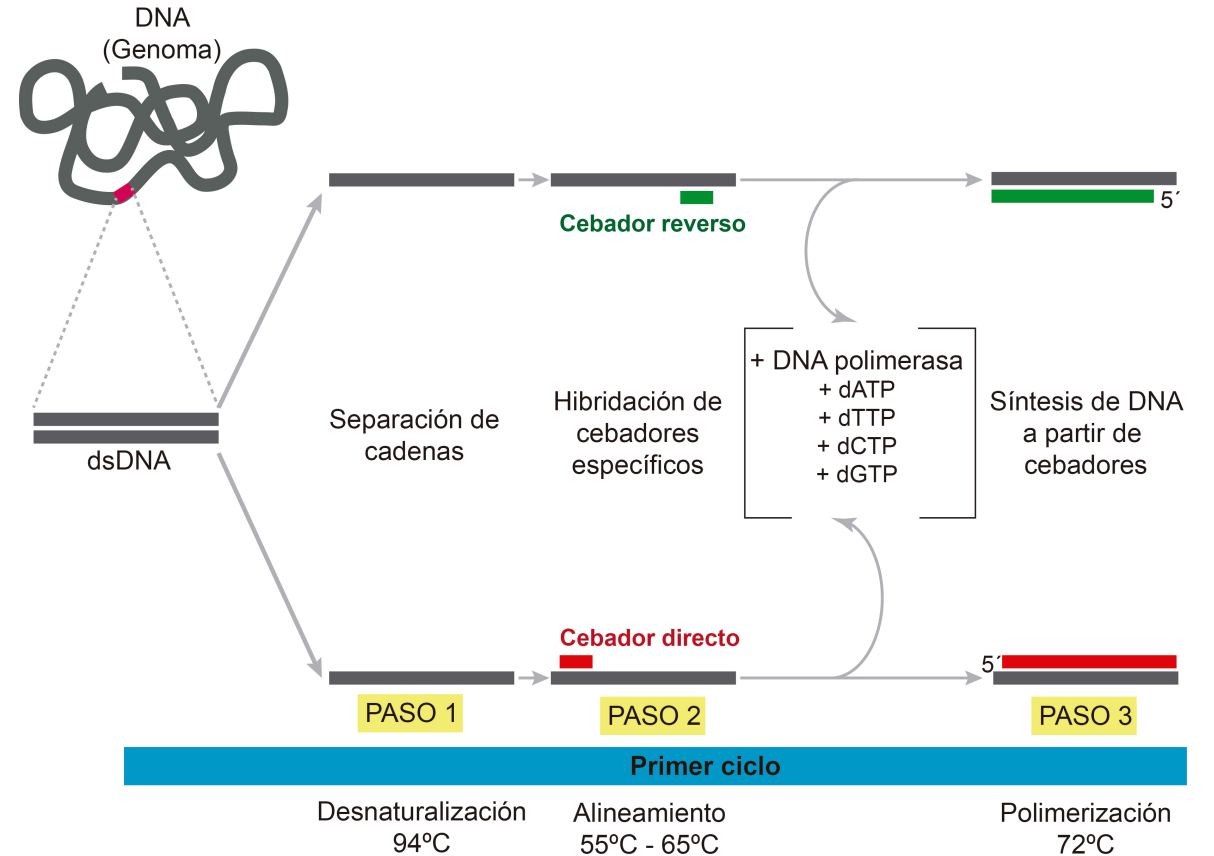
Reacción en cadena de la polimerasa PCR y sus aplicaciones



Kary Mullis, 1983



Presentación Equipo 8



Edición de Genomas mediante CRISPR-Cas

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Repetidas Palindrómicas Cortas Agrupadas Regularmente Espaciadas

Presentación Equipo 4

Cas: CRISPR associated protein

Sistema CRISPR/Cas

