

# Aplicaciones de la Biología Molecular

## Parte III. Ingeniería Genética

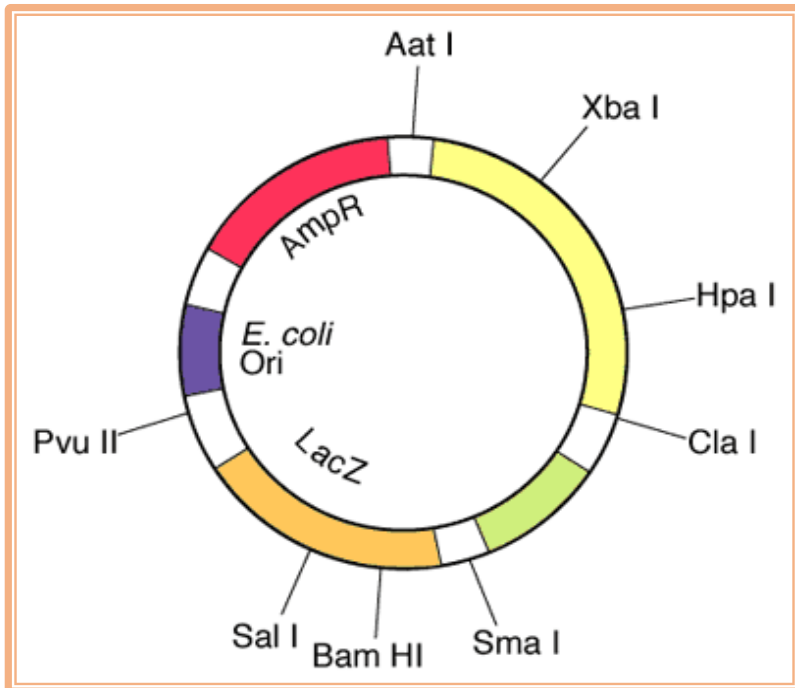


**GMO: Organismo genéticamente modificado**

# Ingeniería Genética

## Plásmido:

Molécula de DNA circular de doble cadena extracromosomal



Puede aceptar fragmentos de hasta 12 000 pb



## Origen de Replicación propio

Propicia la multiplicación del plásmido independiente de la replicación bacteriana

## Marcador de selección

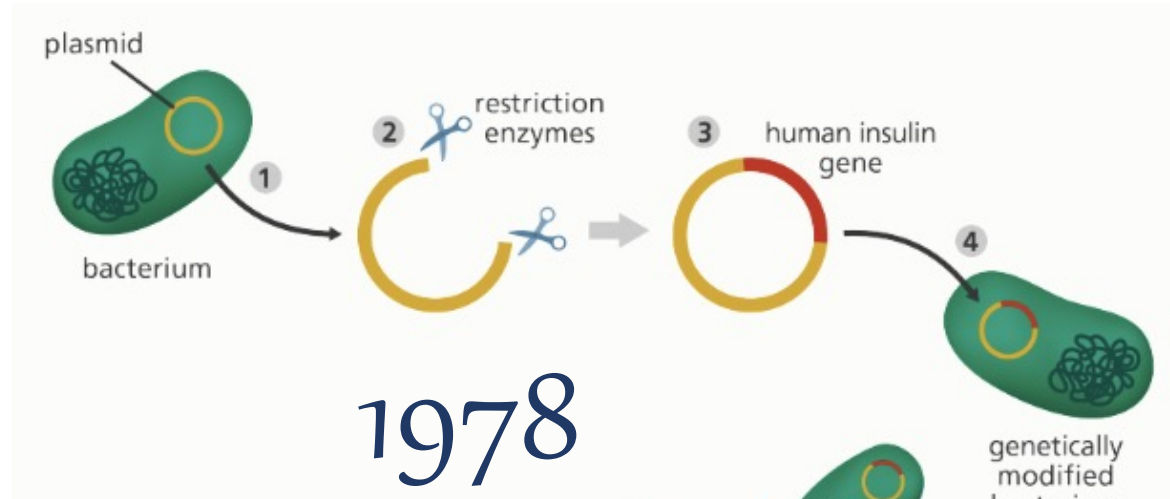
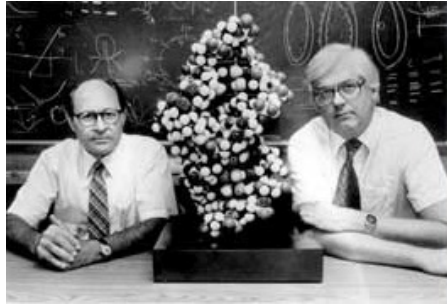
Permite la selección de bacterias transformadas con el plásmido

## Sitios reconocidos por enzimas de restricción:

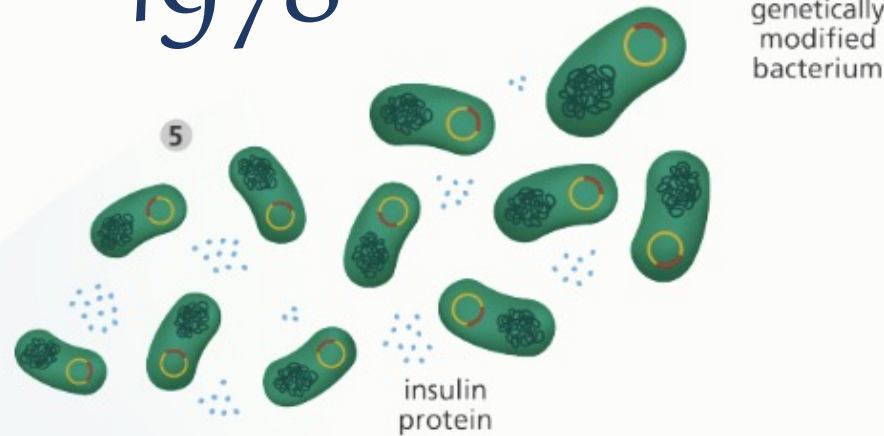
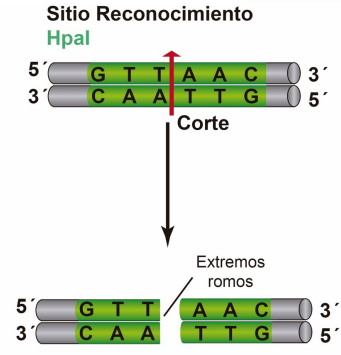
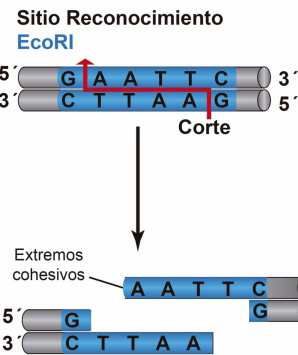
Secuencias únicas para varias enzimas de restricción comunes

# Ingeniería Genética

1970



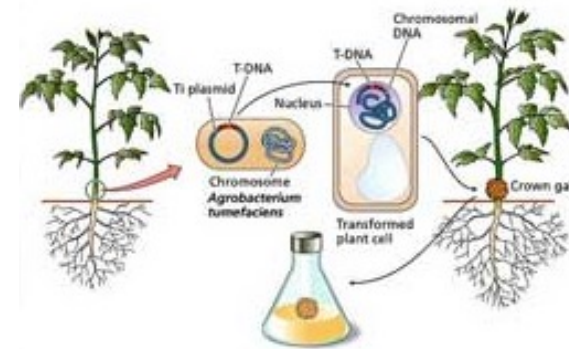
1978



1981



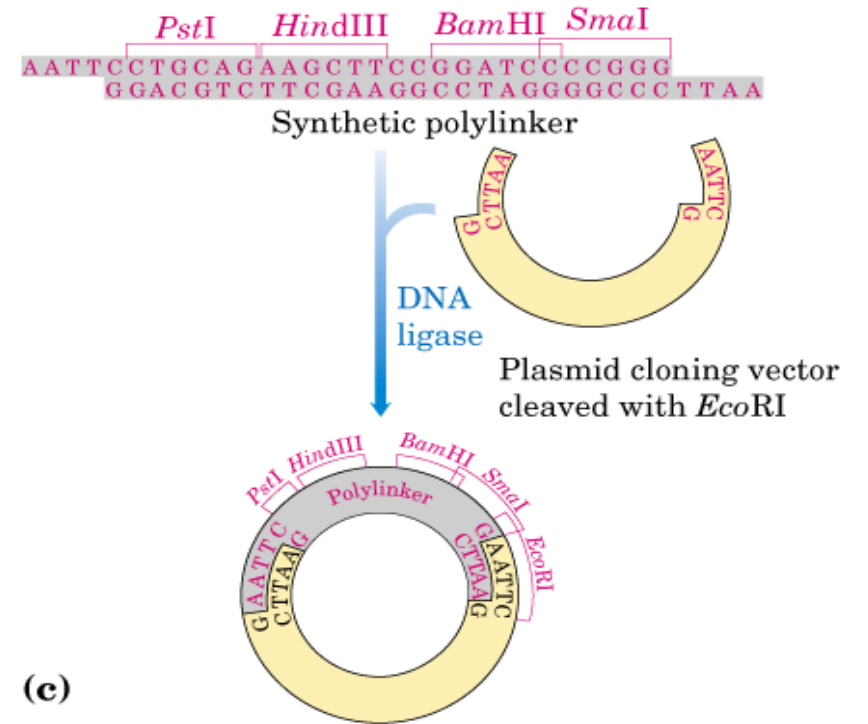
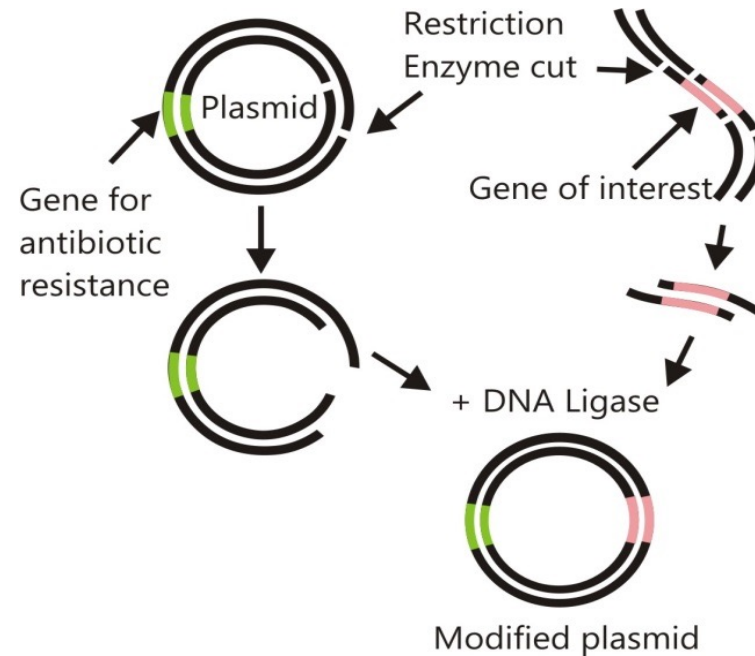
1983



# Ingeniería Genética

## Plasmido modificado (recombinante)

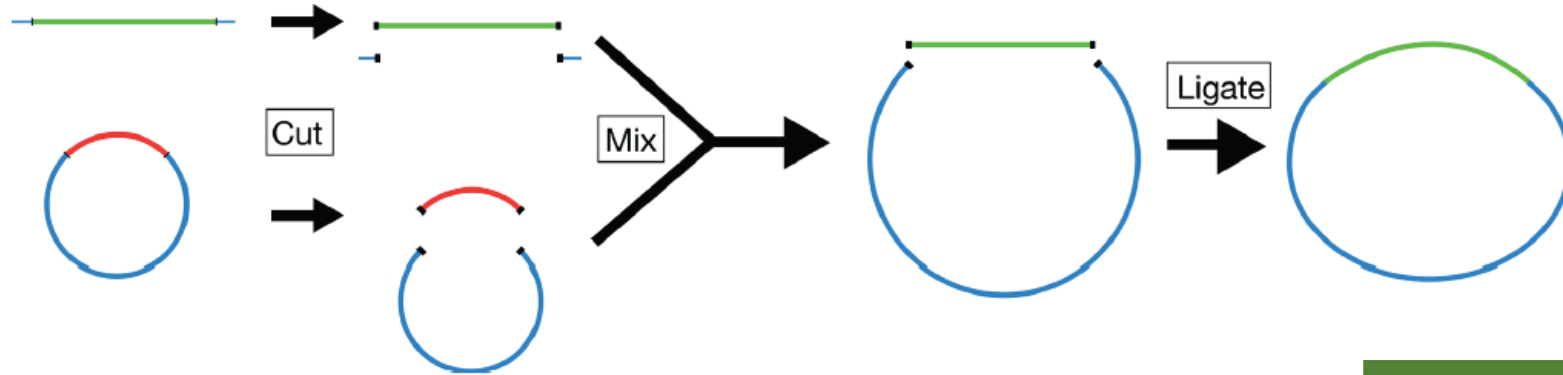
1. Cortar con las enzimas de restricción apropiadas plásmido y fragmento de DNA de interés
2. Mezclar en presencia de Ligasa
3. Transformar bacterias
4. Seleccionar por marcador



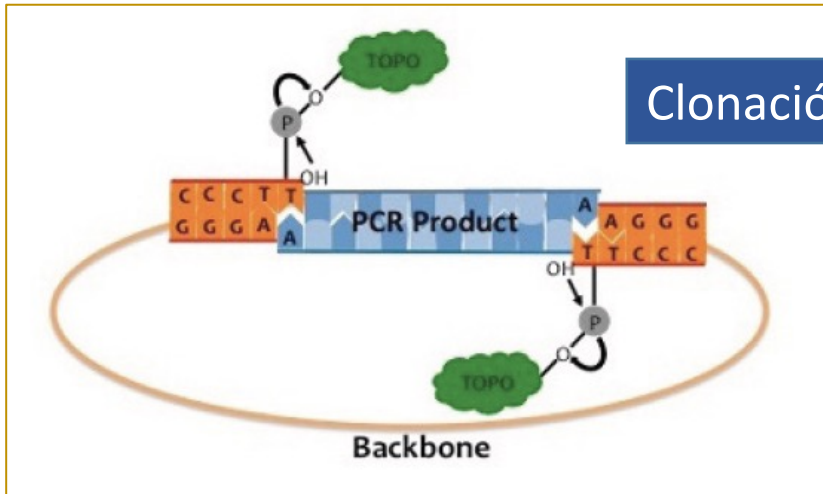
(c)

Sitios de clonación múltiple MCS: Secuencias únicas para varias enzimas de restricción comunes

### Clonación clásica (enzimas de restricción / ligasa)

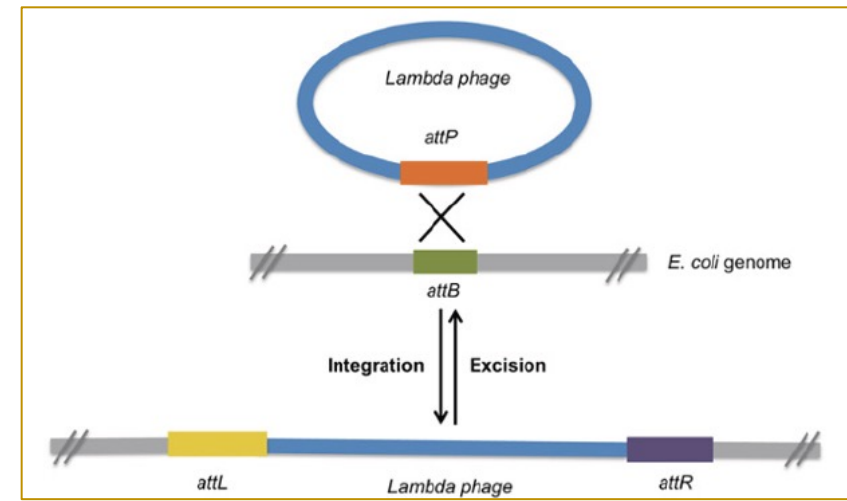


### Clonación con "T" sobresaliente para PCR / ligasa



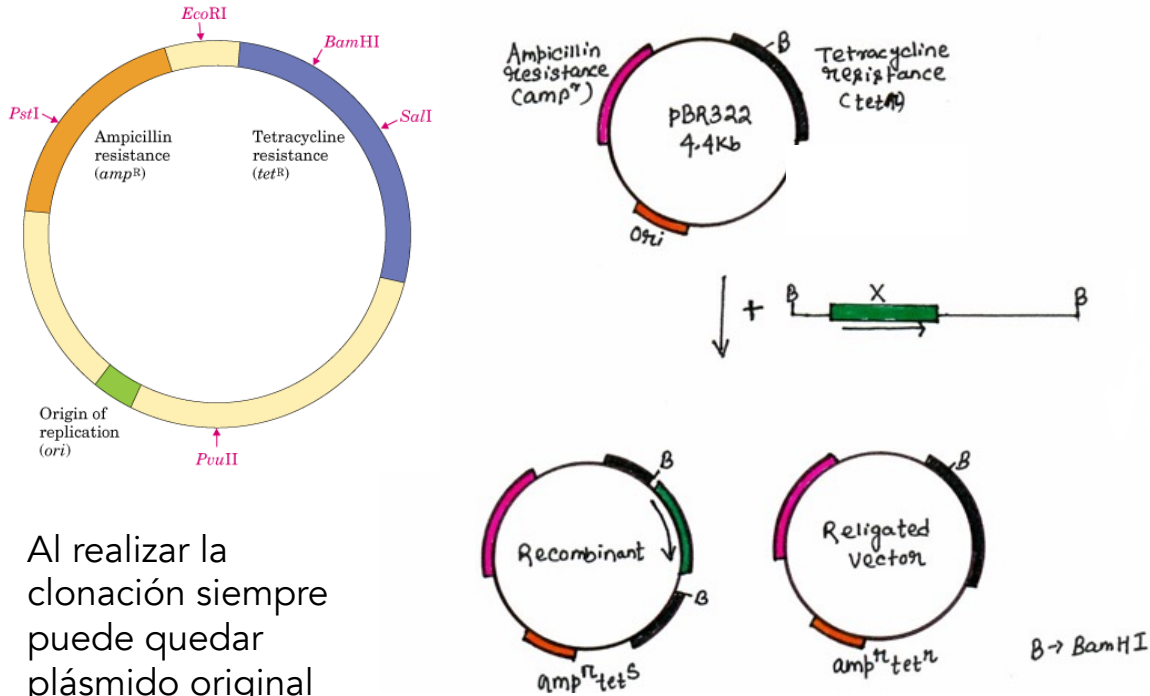
### Clonación con Topoisomerasa

### Clonación con Recombinasa



# Ingeniería Genética

Selección de colonias transformadas (depende de características del plásmido utilizado)



Al realizar la clonación siempre puede quedar plásmido original (no recombinante)

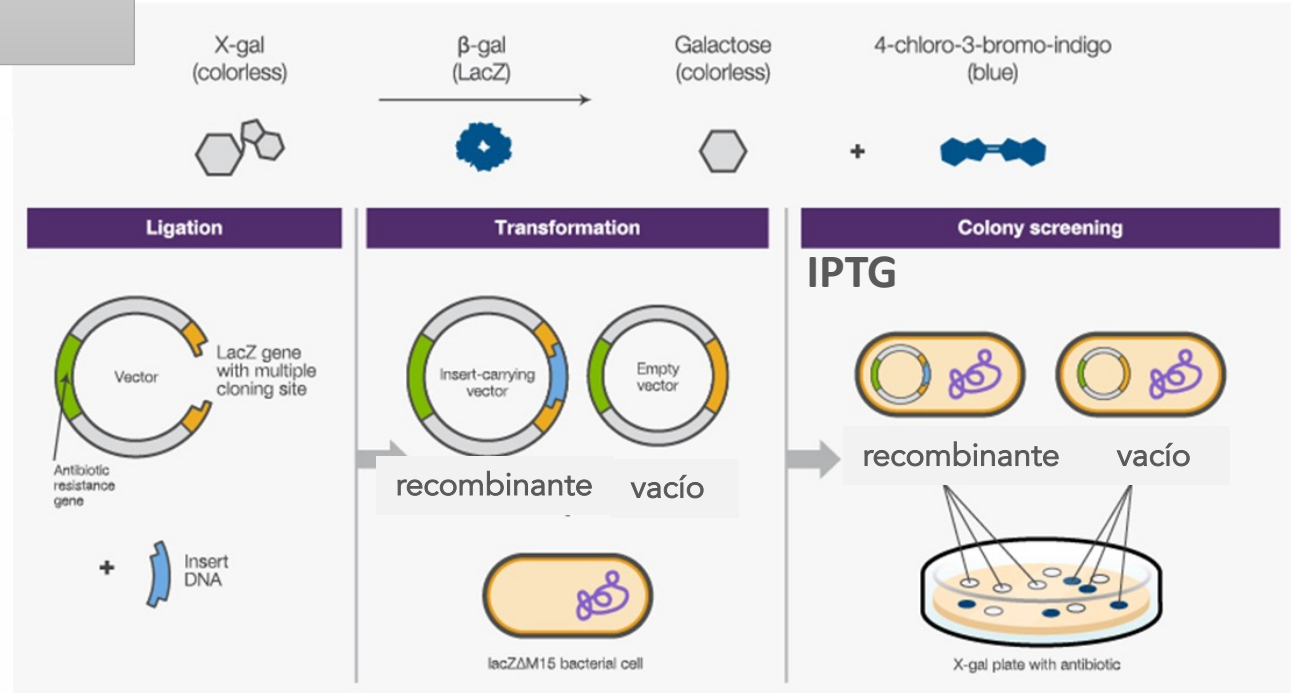
recombinante

Crece en presencia de Amp pero NO con Tet

vacío

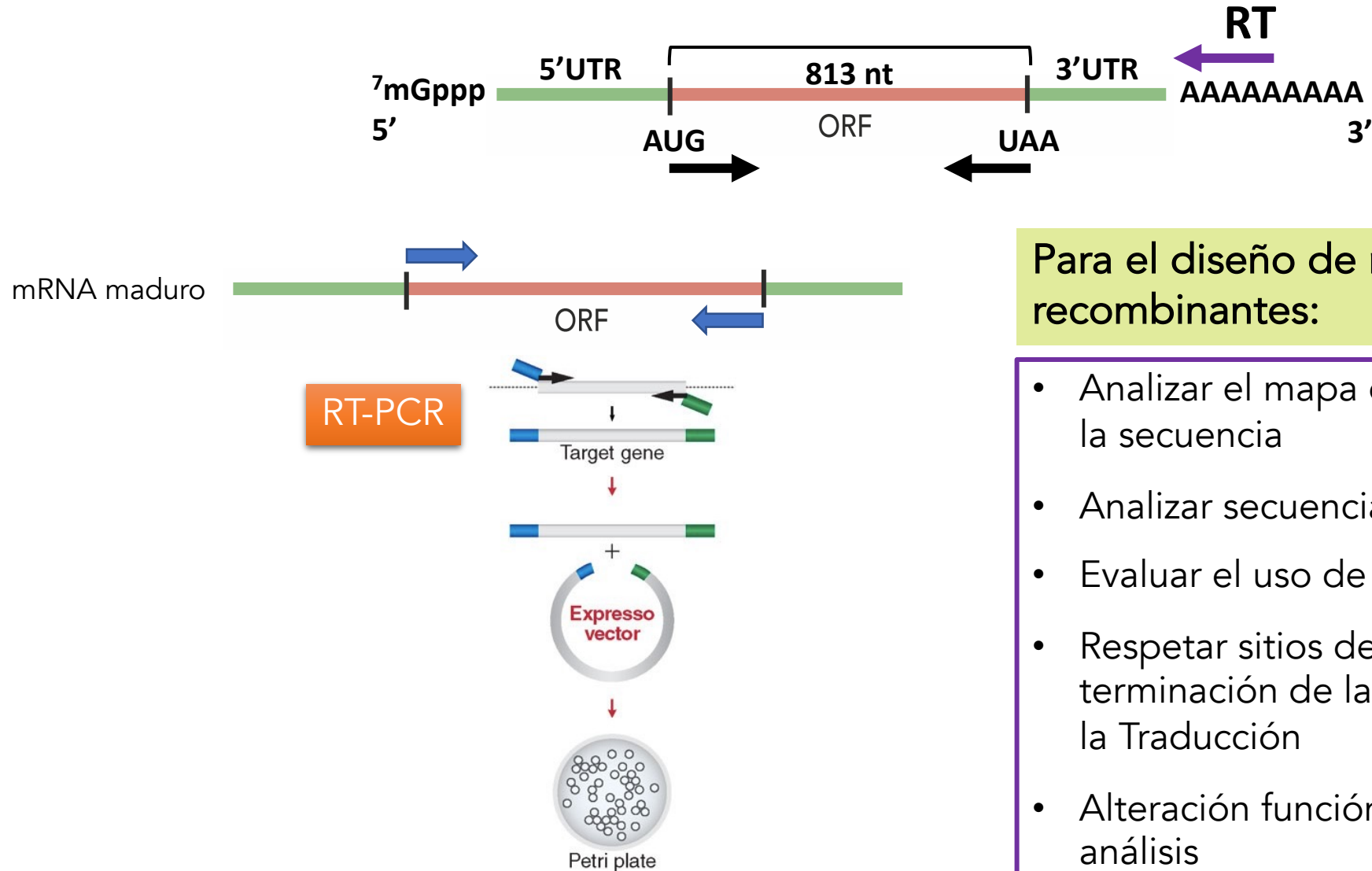
Crece con ambos antibióticos

Plásmidos que tienen un MCS en gen LacZ (Regulación Operon Lac)



# Ingeniería Genética

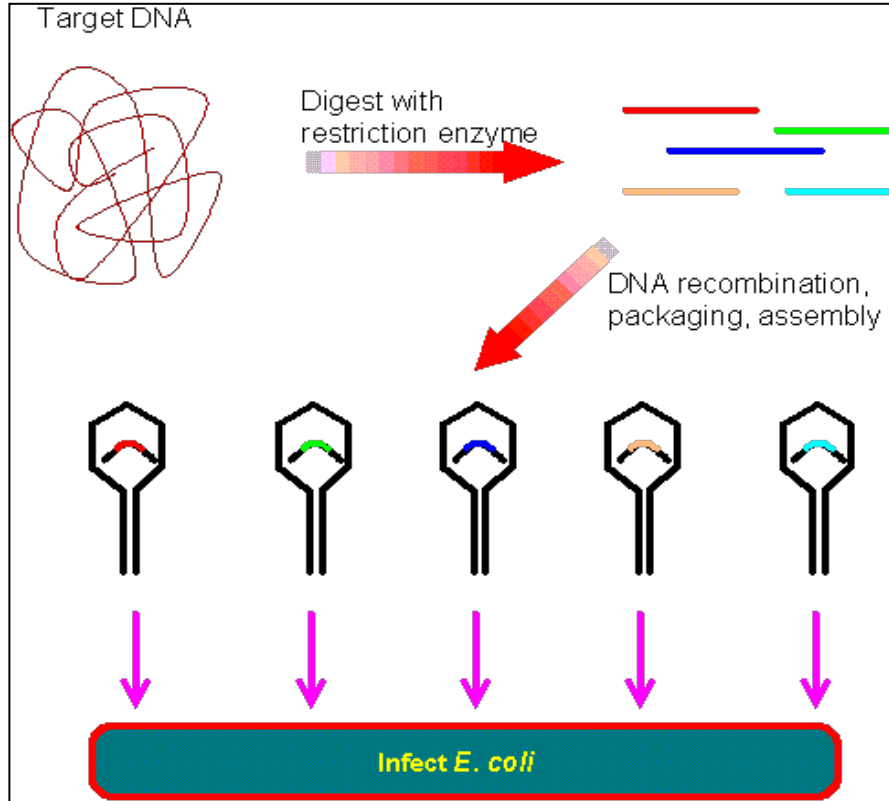
Diseño de cebadores para PCR cuando el fragmento será usado en clonación



Para el diseño de moléculas recombinantes:

- Analizar el mapa de restricción de la secuencia
- Analizar secuencias regulatorias
- Evaluar el uso de codones
- Respetar sitios de inicio y terminación de la Transcripción y la Traducción
- Alteración función o regulación – análisis

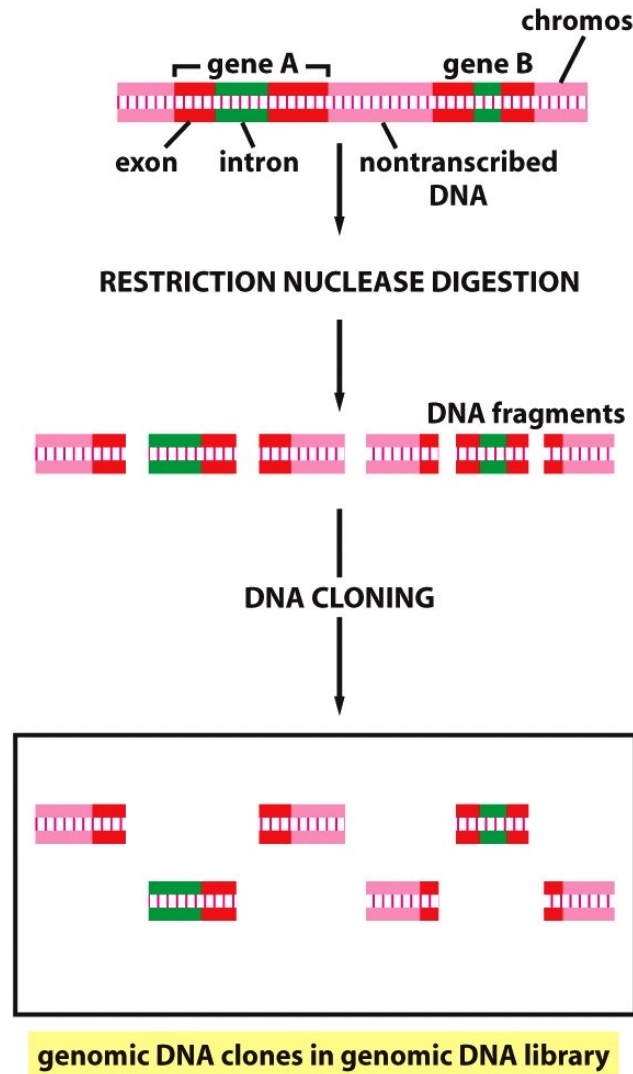
# Bibliotecas de Fagos



Cada Fago lleva un fragmento de DNA (13-20 kb)

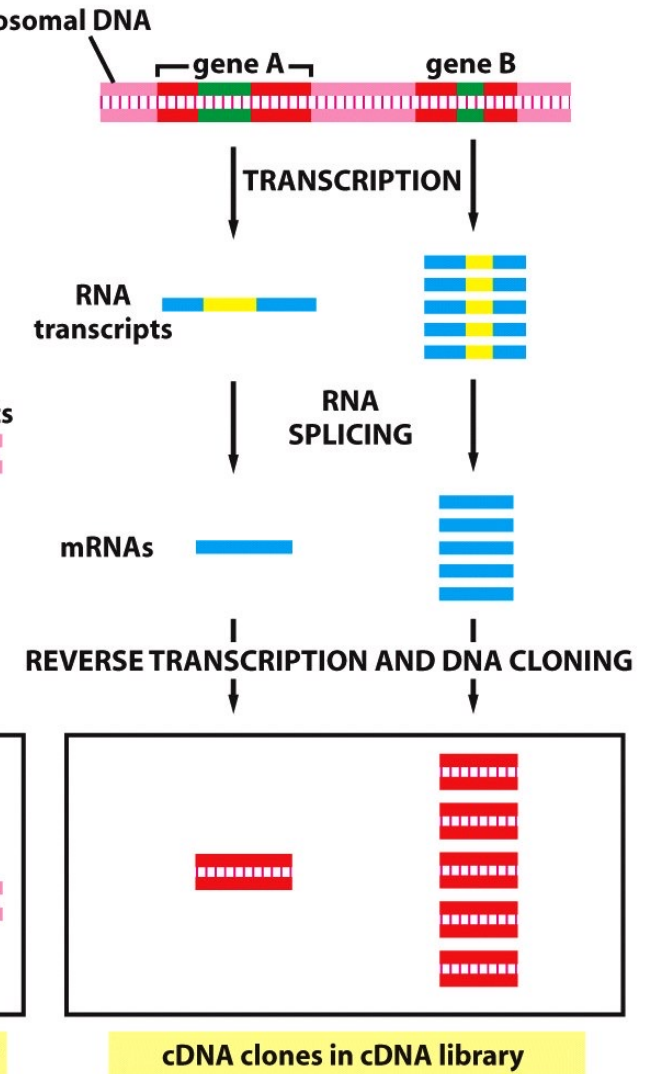
Se identifica el fago con DNA de interés por hibridación con Sondas o PCR.

# Biblioteca genómica



Promotores + exones + intrones

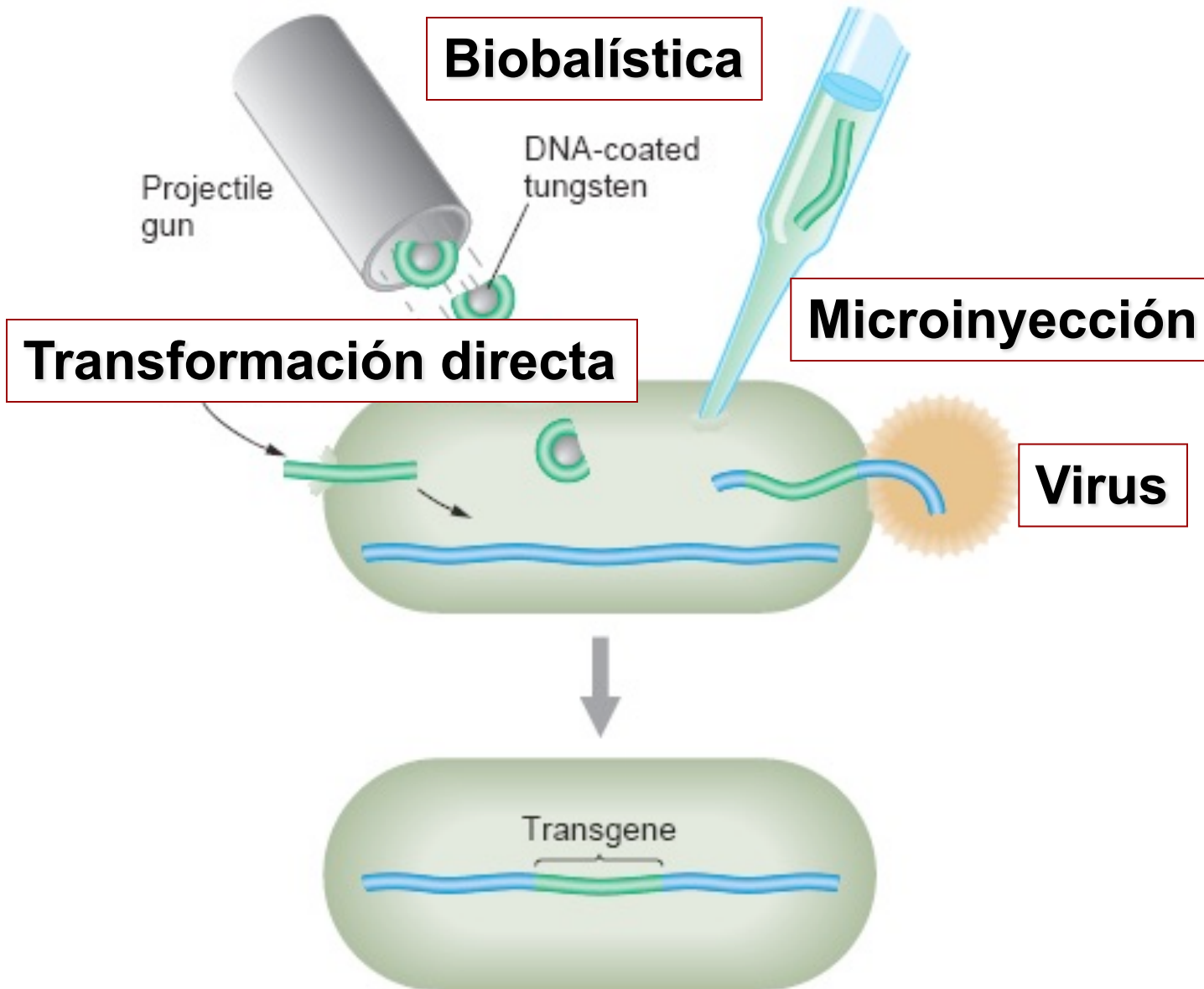
# Biblioteca de cDNA



Solo exones



# Transformación en células eucariontes



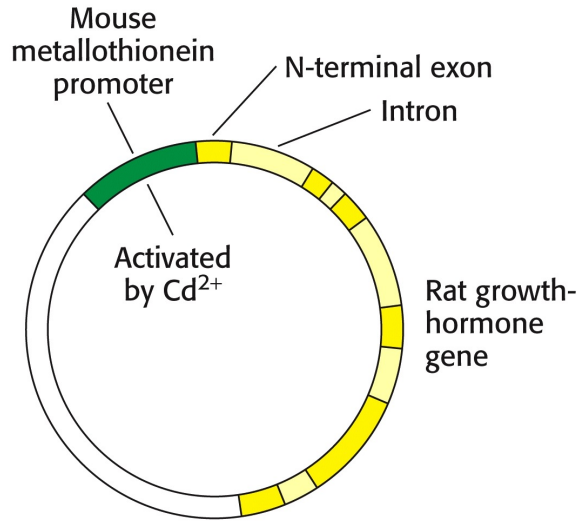
Métodos de transfección  
Permeabilización química de las membranas  
Electroporación  
Liposomas

Vectores  
Vectores derivados de virus animales  
SV40  
Retrovirus  
Vacuna  
Plásmidos

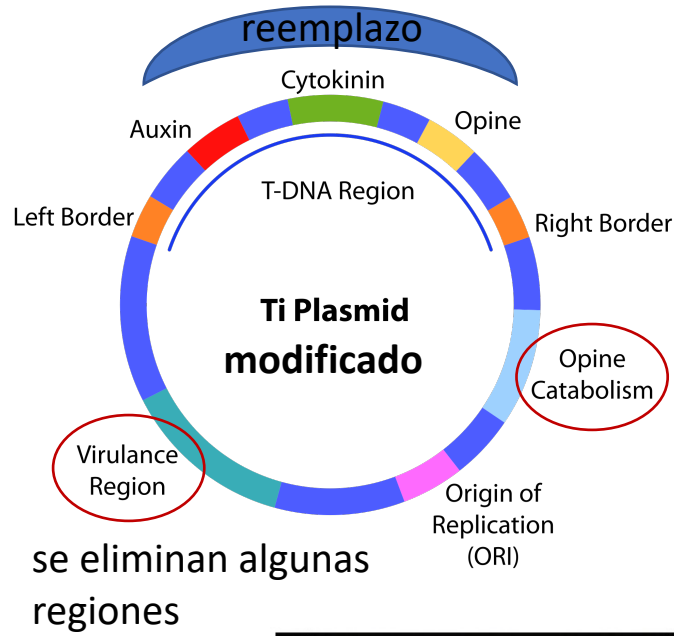
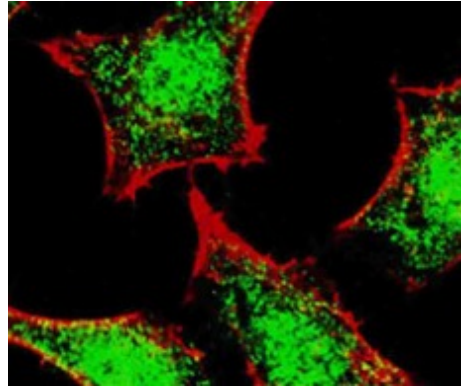
Métodos de selección  
Detección de actividades enzimáticas  
Resistencia a inhibidores  
Resistencia a antibióticos

Integración dirigida (CRISPR-Cas)

# Para que la expresión de transgenes sea estable DEBE insertarse en el GENOMA



Plásmidos con **Promotor inducible** para Animales, Plantas ó Levadura

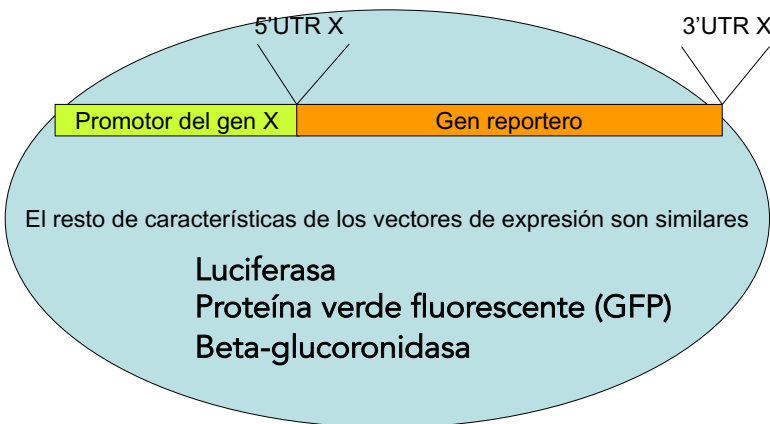


Función  
Localización  
Regulación  
Interacciones

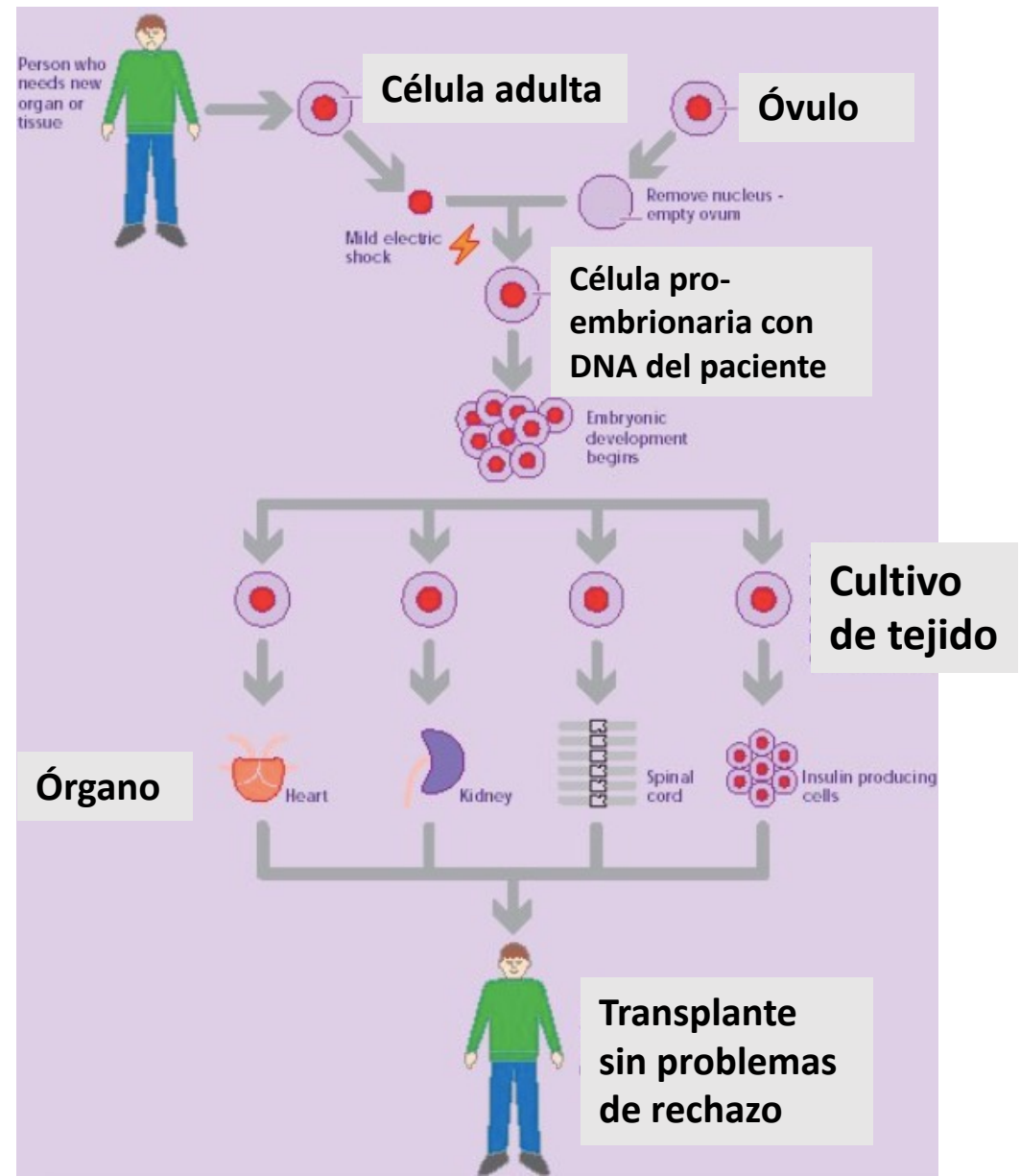
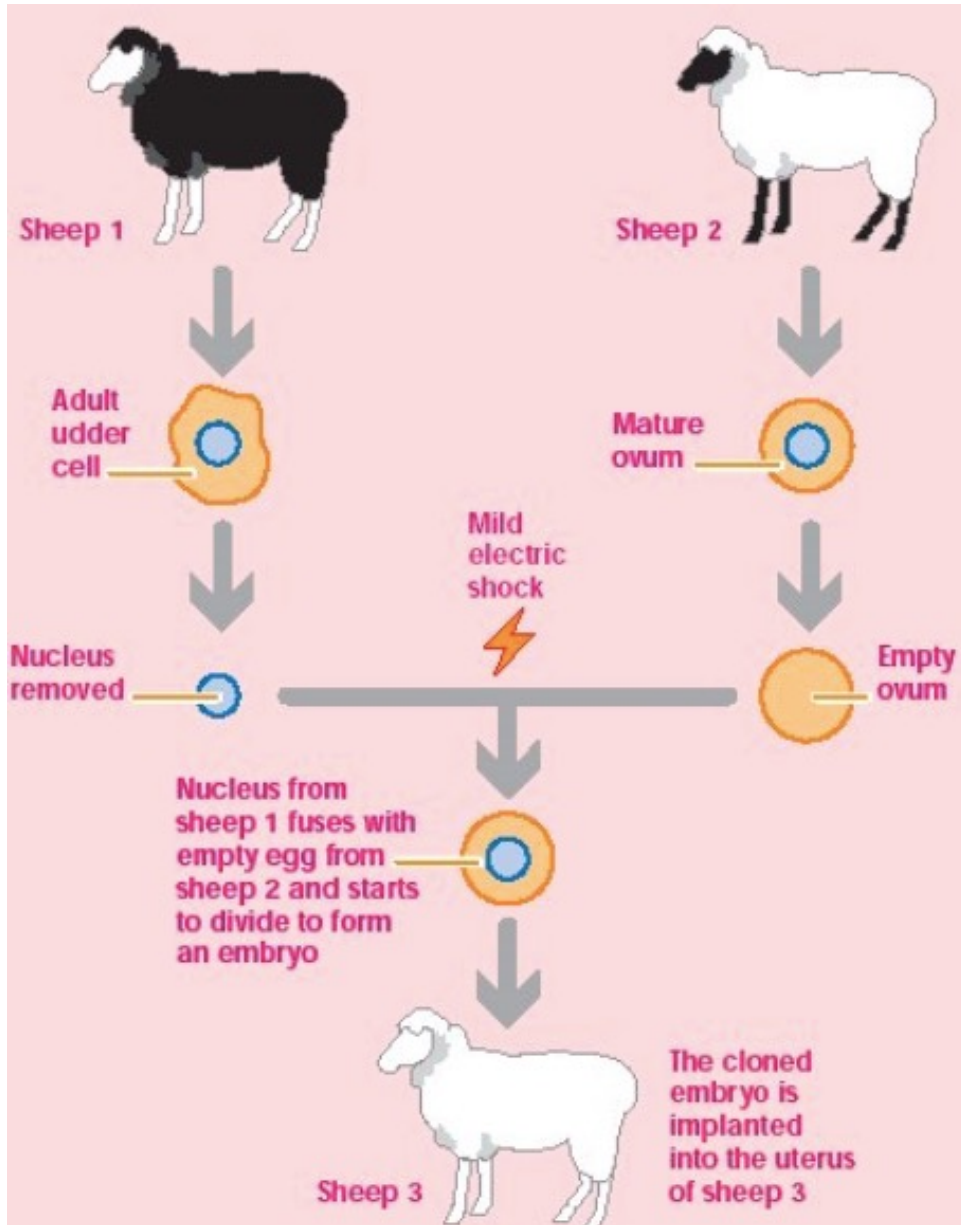
En plantas se utiliza el plásmido modificado de *A. tumefaciens* que es una bacteria que infecta de manera natural a muchas plantas



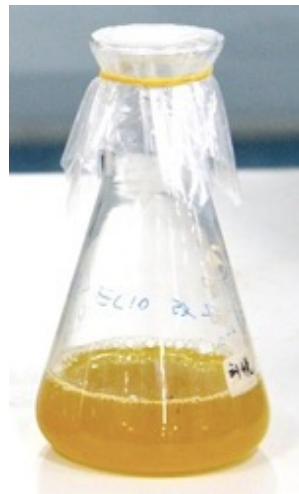
Plásmidos con **genes REPORTEROS** para estudiar promotores



# Clonación de organismos o células



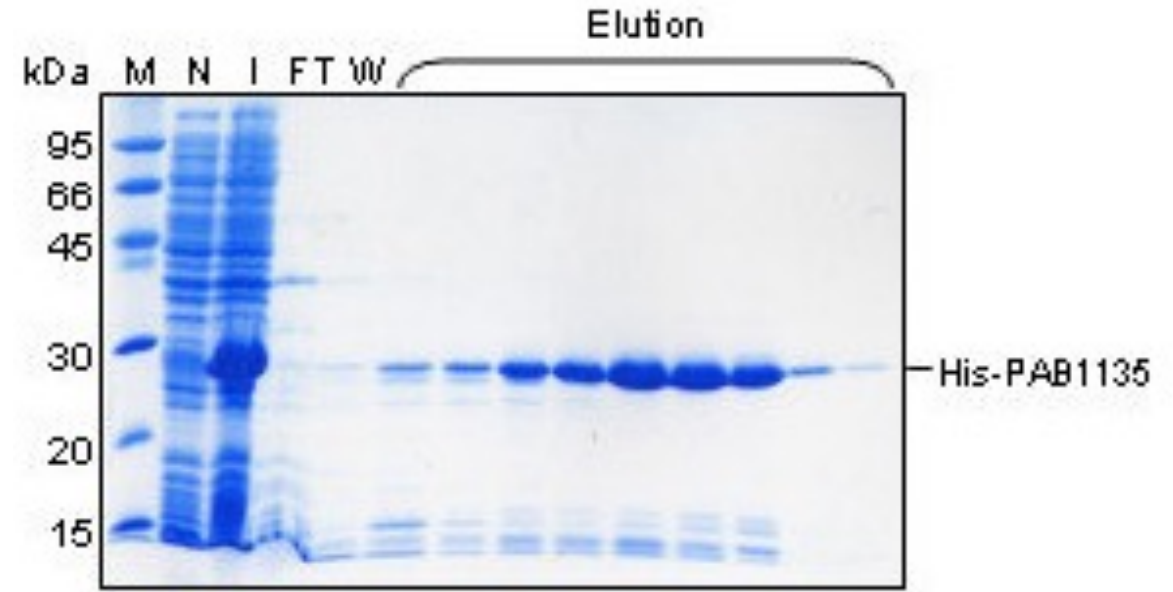
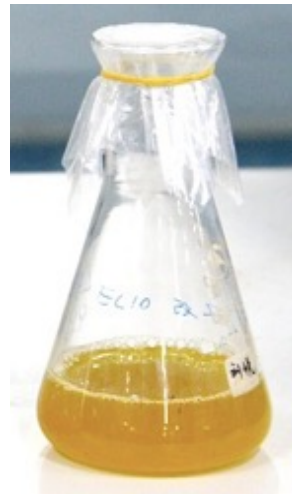
# Proteínas recombinantes producidas en bacteria. Ventajas y desventajas Equipo 9



IPTG



Inducción



# Uso de los sistemas libres de células para la síntesis de proteínas

## Equipo 10

