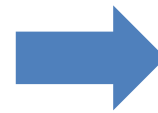


CLONACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

MÉTODOS DE CLONACIÓN MOLECULAR

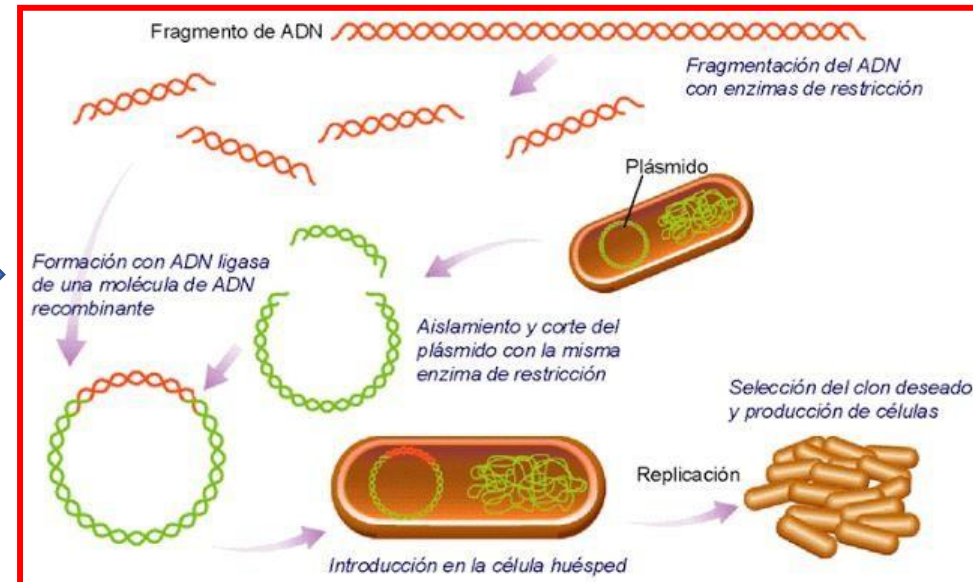
La **clonación molecular** es un proceso de amplificación in vivo de secuencias de ADN basada en la tecnología de ADN recombinante.

La **tecnología del ADN recombinante** es una aplicación de las **endonucleasas de restricción** que **permite crear las moléculas de ADN recombinante que serán introducidas en una célula huésped.**



Por multiplicación de estas células en cultivo se consiguen multitud de copias del ADN recombinante y, en consecuencia, del fragmento amplificado de interés.

- El proceso de **clonación molecular**, implica:
- La inserción del fragmento de ADN que se quiere amplificar en una **molécula portadora o vector**.
- La introducción del vector recombinante en una **célula viva hospedadora**.
- La **selección y multiplicación** en cultivo de las células que portan el ADN recombinante.
- La **recuperación** del fragmento utilizado.



COMPARACIÓN TÉCNICAS PCR/CLONACIÓN MOLECULAR

CLONACIÓN MOLECULAR	PCR
Técnica en vivo	Técnica in vitro
El fragmento de ADN de interés se introduce adecuadamente en una célula viva y se aprovecha la maquinaria replicativa de la célula para amplificarlo	El fragmento de ADN se replica en el tubo de ensayo en el que se generan artificialmente las condiciones apropiadas.
La técnica es manual y dura varios días	La técnica está automatizada y se lleva a cabo en horas .
Permite obtener prácticamente cantidades ilimitadas de la secuencia de interés	Las cantidades de secuencias de interés están limitadas por el número de ciclos de replicación que se realicen (25-40)
Permite amplificar secuencias de ADN de incluso millones de pares de bases dependiendo del vector utilizado	Niveles de amplificación menor (hasta 35 kb)

MÉTODOS DE CLONACIÓN MOLECULAR

Es una **técnica manual** que requiere dedicar *varios días a su realización*

Ofrece importantes ventajas:

- Permite obtener prácticamente cantidades ilimitadas de la secuencia de interés.
- Se pueden **clonar secuencias de ADN de gran tamaño**, mucho mayores que las que se pueden amplificar mediante PCR (incluso de millones de pares de bases), dependiendo del vector utilizado.
- En un único proceso se puede clonar el genoma entero de un organismo, fragmentándolo previamente, lo que permite la **creación de librerías genómicas**.
- Posibilita la **expresión de genes** o de **secuencias de interés**, de lo que se derivan aplicaciones industriales:
 - Para la producción de proteínas, hormonas...
 - Para investigación, agricultura o medicina como: la obtención de organismos transgénicos, terapia génica ...

COMPONENTES DE LA CLONACIÓN

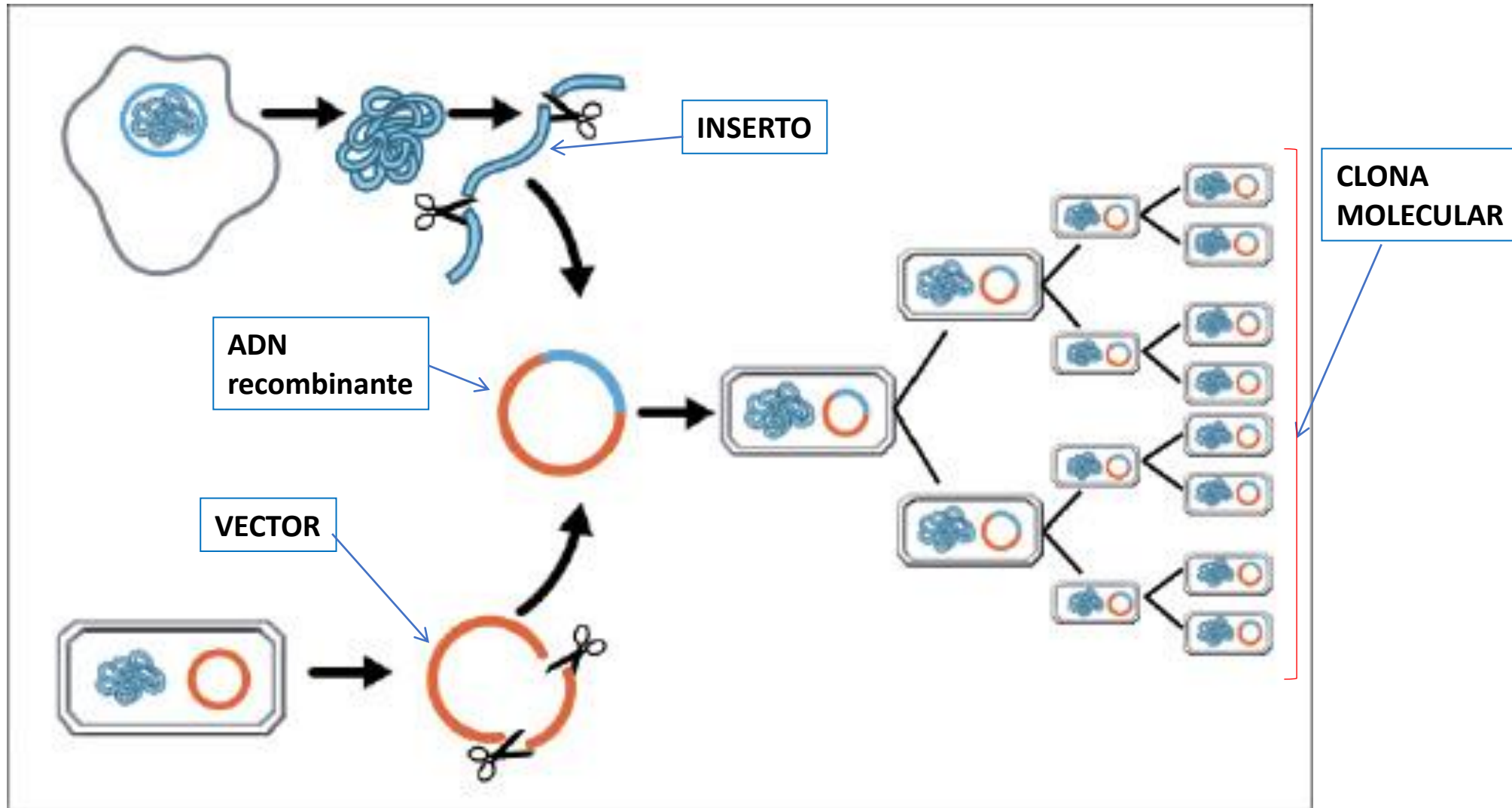
La clonación de ADN, o clonación molecular, es la introducción de un fragmento de ADN denominado **inserto** dentro de una molécula de ADN denominada **vector**, que puede replicarse de manera autónoma e independiente del genoma de la célula hospedadora.



El **resultado** es la obtención de **millones de copias de una molécula recombinante** o **clona molecular** compuesta por ADN proveniente del inserto y del vector.

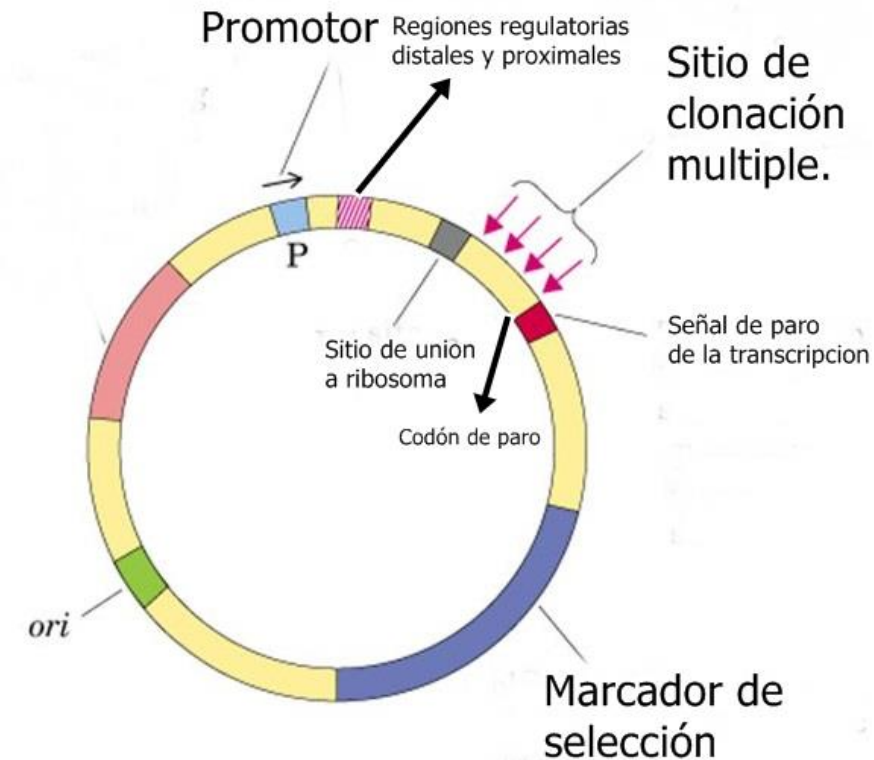
VECTOR DE CLONACIÓN: molécula de ADN de doble cadena, con capacidad de albergar un fragmento de ADN exógeno.

MÉTODOS DE CLONACIÓN MOLECULAR



CARACTERÍSTICAS DE LOS VECTORES DE CLONACIÓN

- **Origen de replicación** que le permite replicarse en la célula huésped junto con el fragmento de ADN extraño que transporta.
- Tener, como mínimo, **un sitio de inserción de ADN extraño**. Normalmente, los sitios de inserción son secuencias diana de enzimas de restricción, presentes una única vez en toda la molécula.
- Si el vector tiene varias dianas de restricción se pueden concentrar en un segmento corto del vector, denominado **sitio múltiple de restricción o sitio múltiple de clonación** (polylinker en inglés).
- Contener algún **marcador de selección**, que permita distinguir las células que portan el vector de aquellas que no lo portan → Suelen ser genes de resistencia a antibióticos o genes que codifican enzimas que no tiene de manera natural la célula huésped.
- Contener un **marcador de identificación**, que permita distinguir las células que portan un vector recombinante, con ADN extraño, de aquellas que portan un vector sin ADN extraño.



Algunos vectores contienen también un **promotor**, que posibilita la transcripción del inserto y su posterior traducción a proteína. Estos vectores especiales se denominan **vectores de expresión**.

TIPOS DE VECTORES

BACTERIÓFAGOS

Son virus que infectan bacterias y se comportan como parásitos intracelulares obligados que se multiplican haciendo uso de la maquinaria biosintética de las bacterias.

- Los bacteriófagos se replican de forma autónoma, portan información genética y pueden conferirle a la bacteria nuevas propiedades o desarrollarle procesos patológicos.
- Para convertirlo en un vector, el bacteriófago (virus natural) es modificado genéticamente.
- Dichas modificaciones consisten en la **adición de sitios de restricción específicos** y la **eliminación de aquellos genes que no se requieren para la replicación**, lo que permite la incorporación de fragmentos de ADN de mayor longitud que los plásmidos (de hasta 23 kb).
- **El bacteriófago lambda es el fago más utilizado como vector de clonación**, que contiene secuencias complementarias entre sí, denominados **sitios cos**.

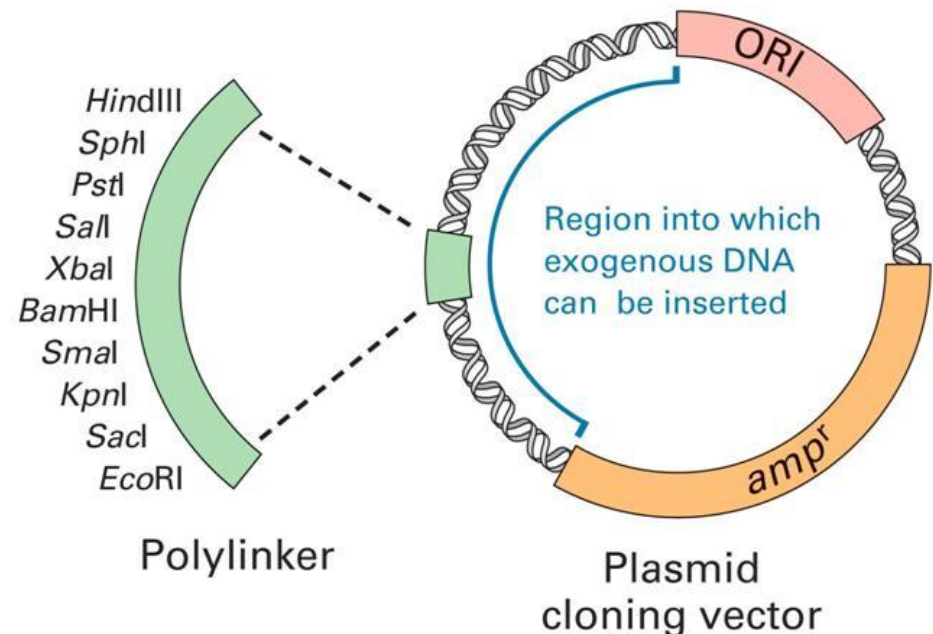
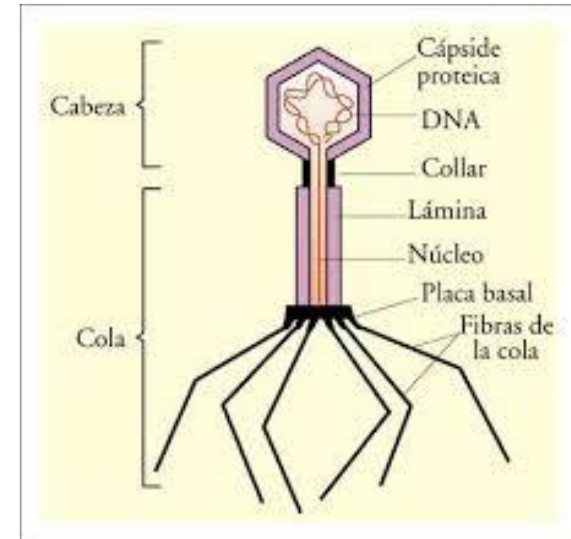
TIPOS DE VECTORES

CÓSMIDOS

Son vectores híbridos contruidos con parte del cromosoma del fago λ y parte de un plásmido bacteriano.

Contienen

- las secuencias cos del fago λ
 - El origen de replicación de un plásmido,
 - Un gen de resistencia a antibióticos y
 - Un polylinker.
- La presencia de las secuencias cos permite empaquetar estos vectores dentro de cápsides de fago λ .
- Este tipo de vectores admite insertos de mayor tamaño, de hasta 50 kb.



TIPOS DE VECTORES

FAGÉMIDOS

Son vectores híbridos compuestos por un **plásmido** (con su origen de replicación bacteriano) al que se le inserta el **origen de replicación de un fago M13**.

- Cuando se introducen en una célula hospedadora, se comportan como cualquier otro vector plasmídico, pero tienen la posibilidad de producir ADN monocatenario. Para ello se infecta la célula hospedadora que lo contiene con M13, de manera que las proteínas del virus reconocen el origen de replicación del fagémido e inician la replicación de cadenas sencillas que salen al medio externo.
- Estos vectores son útiles para experimentos de secuenciación y para producir sondas monocatenarias.

TIPOS DE VECTORES

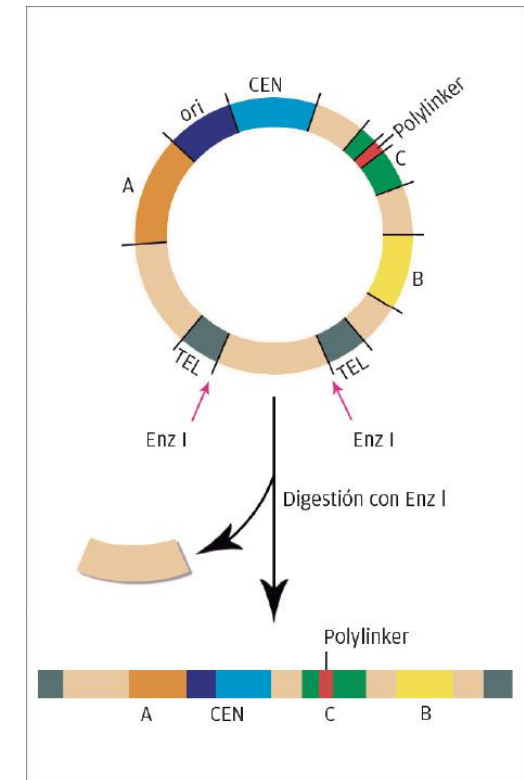
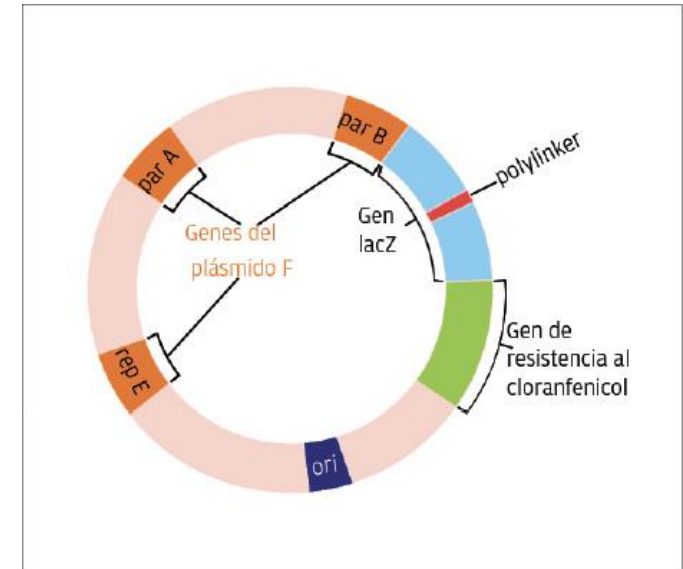
CROMOSOMAS ARTIFICIALES

Son vectores de clonación con capacidad de transportar fragmentos de gran tamaño.

- Se encuadran dentro de lo que se denominan **vectores de alta capacidad** y son idóneos para la construcción de genotecas genómicas, pues permiten clonar fragmentos de ADN de gran tamaño con gran estabilidad.
- Los más utilizados son los cromosomas artificiales bacterianos (BAC) y los cromosomas artificiales (YAC).

➤ **Cromosomas artificiales bacterianos (BAC):** pueden transportar insertos de ADN extraño de hasta 300 kb

➤ **Cromosomas artificiales de levaduras (YAC):** son los vectores de mayor capacidad ya que pueden transportar insertos mayores de 1 Mb.



TIPOS DE VECTORES

VECTORES LANZADERA

Llamados también **vectores transbordadores** son un tipo de **vectores híbridos** que **contienen orígenes de replicación de dos hospedadores diferentes, normalmente uno de plásmido bacteriano y otro de levadura o de virus animal, como el SV40.**

Se construyen con marcadores genéticos que permiten su selección en ambos sistemas huésped.

Se usan para transportar insertos entre dos hospedadores distintos, habitualmente para estudios de expresión génica: en el primero (normalmente *E. coli*) se amplifica el inserto y en el segundo se expresa el gen amplificado.

CÉLULAS HOSPEDADORAS

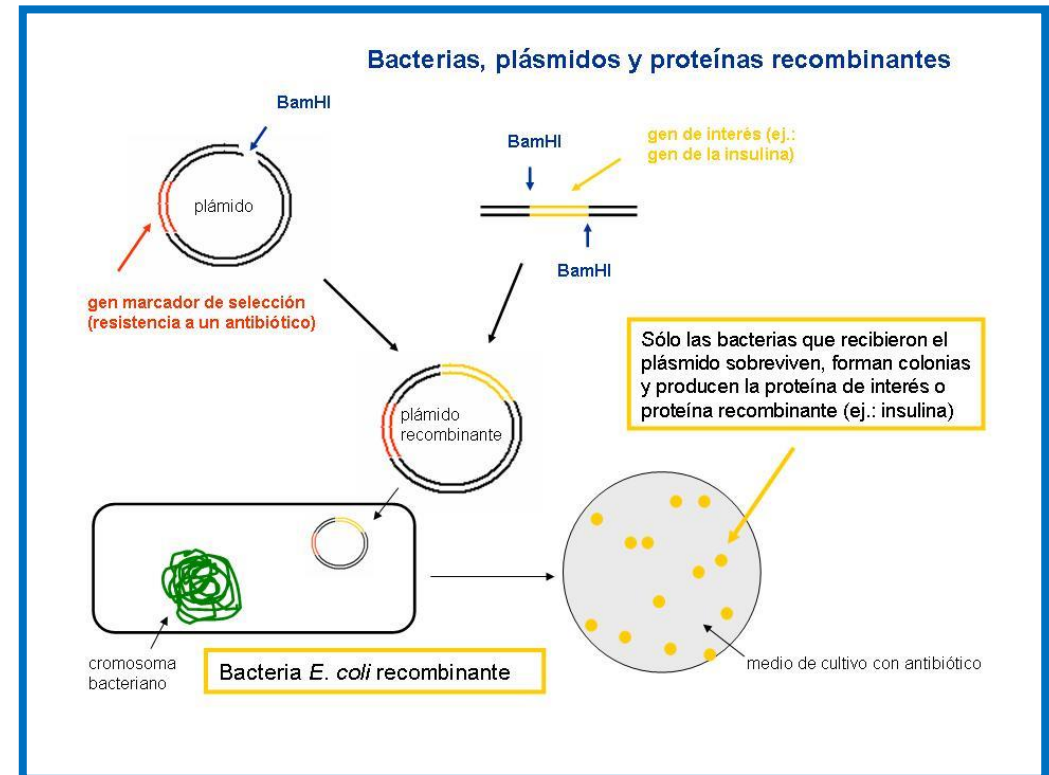
Las células hospedadoras son aquellas *en las que se introduce el vector de clonación para su amplificación mediante replicación*.

La célula hospedadora con el vector **se cultiva en medios adecuados** en los que se multiplica → dando lugar a una progenie de células hijas, todas con la misma carga genética, es decir, un **clon**.

La elección de la célula hospedadora depende del vector de clonación empleado y de la finalidad perseguida.

Los hospedadores pueden ser:

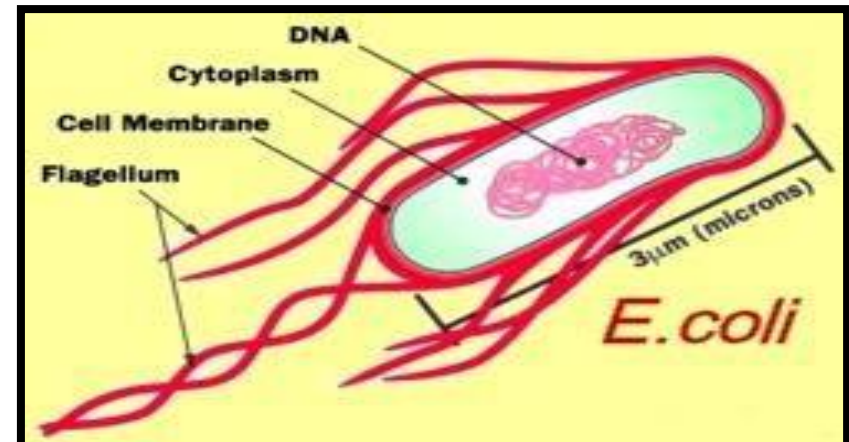
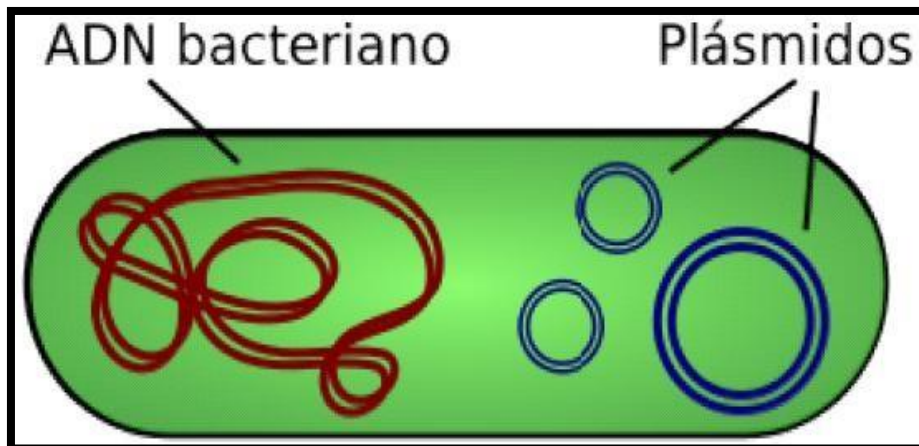
- Células procariotas (bacterias)
- Células eucariotas



CÉLULAS HOSPEDADORAS

CÉLULAS HOSPEDADORAS BACTERIANAS

- Las bacterias son las células más utilizadas como hospedadoras para clonar plásmidos, fagos y cósmidos, por la escasa complicación técnica que supone su manipulación, su gran versatilidad y la rapidez con que crecen.
- Se suelen usar **cepas defectivas especiales** que carecen de algunas actividades enzimáticas para favorecer la estabilidad de los vectores (Ejem: pueden carecer de exonucleasas para evitar la degradación de vectores de clonación).
- La bacteria más utilizada en la clonación es el ***E. Coli***, en concreto la cepa K12, pero se pueden utilizar otras especies, como ***Bacillus subtilis*** y especies del género ***Streptomyces***.



CÉLULAS HOSPEDADORAS

CÉLULAS HOSPEDADORAS EUCARIOTAS

LEVADURAS	<ul style="list-style-type: none">➤ Son organismos eucariotas unicelulares que crecen de manera similar a las bacterias en medios de cultivo sólidos y líquidos.➤ Las levaduras más utilizadas en clonación son <i>S.cerevisiae</i>➤ Podemos usar otras especies: <i>Pichia pastoris</i> y <i>Hansenula polymorpha</i>.
CÉLULAS VEGETALES Y ANIMALES	<ul style="list-style-type: none">➤ Las células de organismos superiores, vegetales y animales, en cultivo pueden también ser utilizadas como hospedadores de determinados vectores de clonación.➤ Este tipo de células se utilizan principalmente en experimentos de clonación encaminados a la inserción de genes extraños en el genoma de la células hospedadora y su posterior expresión para obtener organismos transgénicos.➤ En el caso de las células vegetales, se suelen utilizar vectores basados en el <i>plásmido Ti</i> de la bacteria <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.➤ En el caso de células animales se suelen utilizar <i>vectores víricos</i>, como los derivados del genoma <i>baculovirus</i>, que infectan células de insectos, o retrovirus que infectan células de mamíferos.

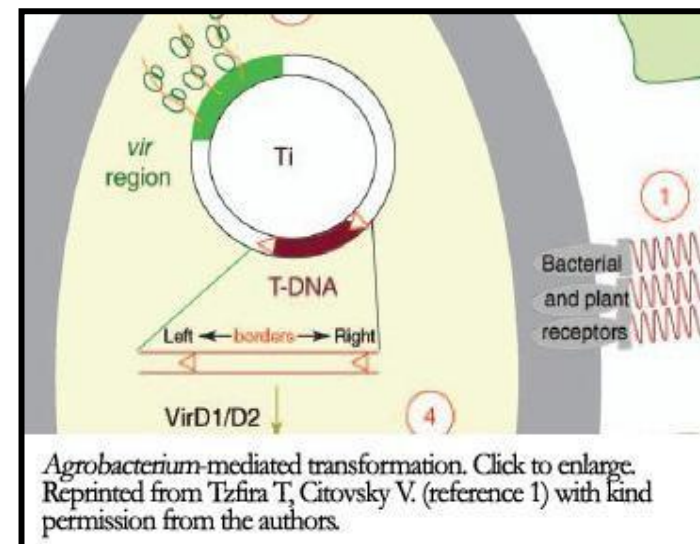
CÉLULAS HOSPEDADORAS

PLÁSMIDO TI DE AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria del suelo que infecta muchas especies de plantas, produciendo la aparición de tumores y “agallas”.

- Las cepas patógenas se caracterizan por tener un plásmido de gran tamaño, denominado *plásmido Ti*.
- Durante el proceso infectivo, las bacterias transfieren el plásmido Ti a la célula vegetal y una parte de él, conocido como T-DNA, se integra en el ADN cromosómico de la célula y se expresa.

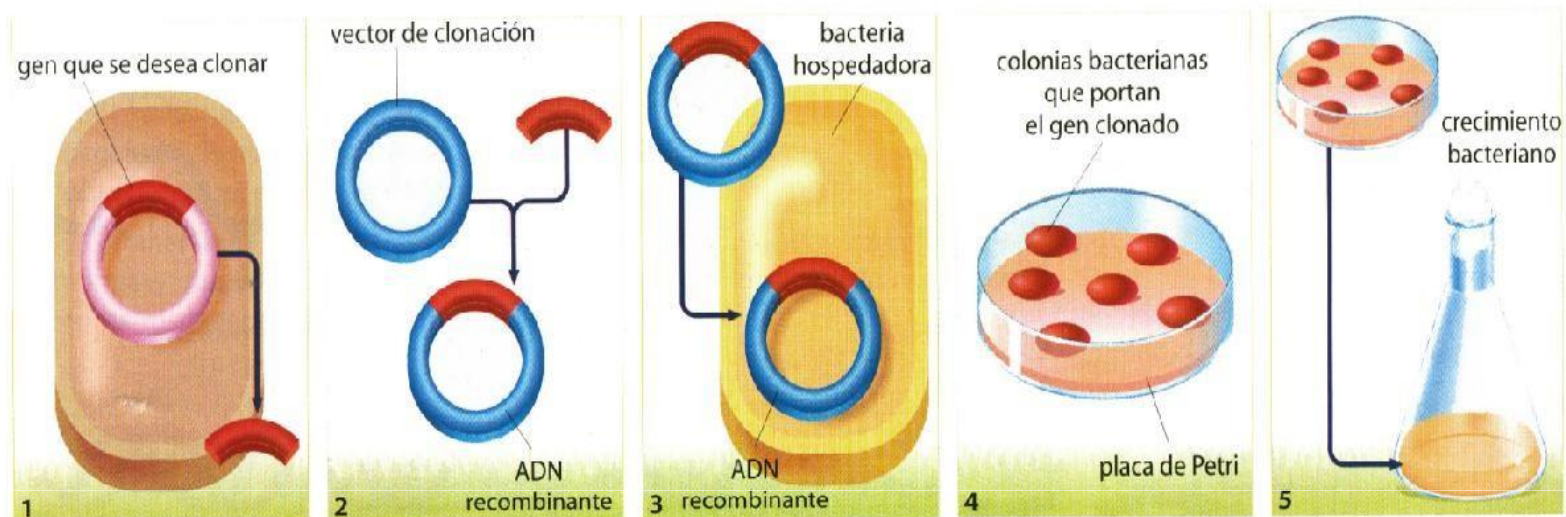
El plásmido Ti se usa como base para construir vectores de clonación en células vegetales, insertando genes extraños en la región T-DNA junto con genes marcadores de selección.



FASES DEL PROCESO DE CLONACIÓN

El proceso de clonación se desarrolla en tres fases:

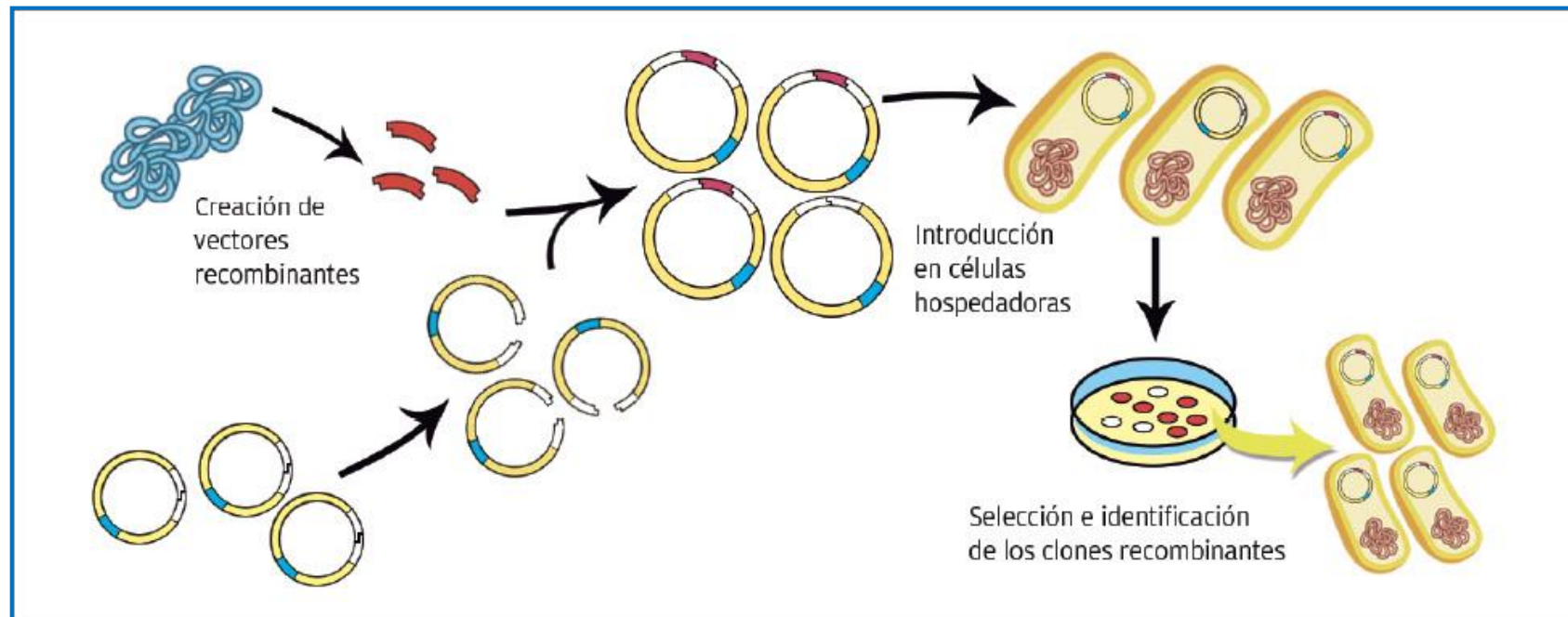
- Fase I: creación de un vector recombinante.
- Fase II: Introducción del vector recombinante en la célula hospedadora.
- Fase III: Selección e identificación de los clones que portan la secuencia de interés.



FASES DEL PROCESO DE CLONACIÓN

CREACIÓN DE UN VECTOR RECOMBINANTE

- Un **vector recombinante** es aquel que contiene un inserto de ADN extraño
- Para su creación es necesario preparar:
 - **El ADN que se va clonar**
 - **El vector de clonación**de manera que ambos puedan unirse mediante una ligasa
- Para ello es necesario crear **extremos cohesivos** y **complementarios** en los **extremos de ambas moléculas**.



FASES DEL PROCESO DE CLONACIÓN

CREACIÓN DE UN VECTOR RECOMBINANTE



Preparación del ADN que se va a clonar

- La forma más habitual de dotar a un ADN bicatenario de extremos cohesivos es tratarlo con una enzima de restricción que genere ese tipo de extremos
- Partimos de ADN genómico completo de un organismo purificado y digerirlo con una enzima de restricción compatible con el vector que se va a utilizar y que no tenga una diana de restricción en el interior de la secuencia que se quiere clonar.
- Esta digestión **genera múltiples fragmentos de diferentes tamaños**, alguno de los cuales contendrá la secuencia de interés.
- **Cuando se quiere clonar solo un gen se amplifica previamente el ADN que se quiere clonar mediante PCR.**
- Curiosamente, las polimerasas sin actividad correctora, como la Taq ADN polimerasa, generan amplicones con una A extra en cada extremo 3', desapareada y sobresaliendo de la doble hélice.
- Estos amplicones se pueden insertar en vectores que tienen sendas T desapareadas en sus extremos 3', llamados vectores-T.

FASES DEL PROCESO DE CLONACIÓN

CREACIÓN DE UN VECTOR RECOMBINANTE



Preparación del vector de clonación

La preparación del vector de clonación para aceptar una molécula de ADN extraño consiste principalmente en digerirlo con la misma enzima de restricción que se utilizó para preparar el ADN que se va a clonar.

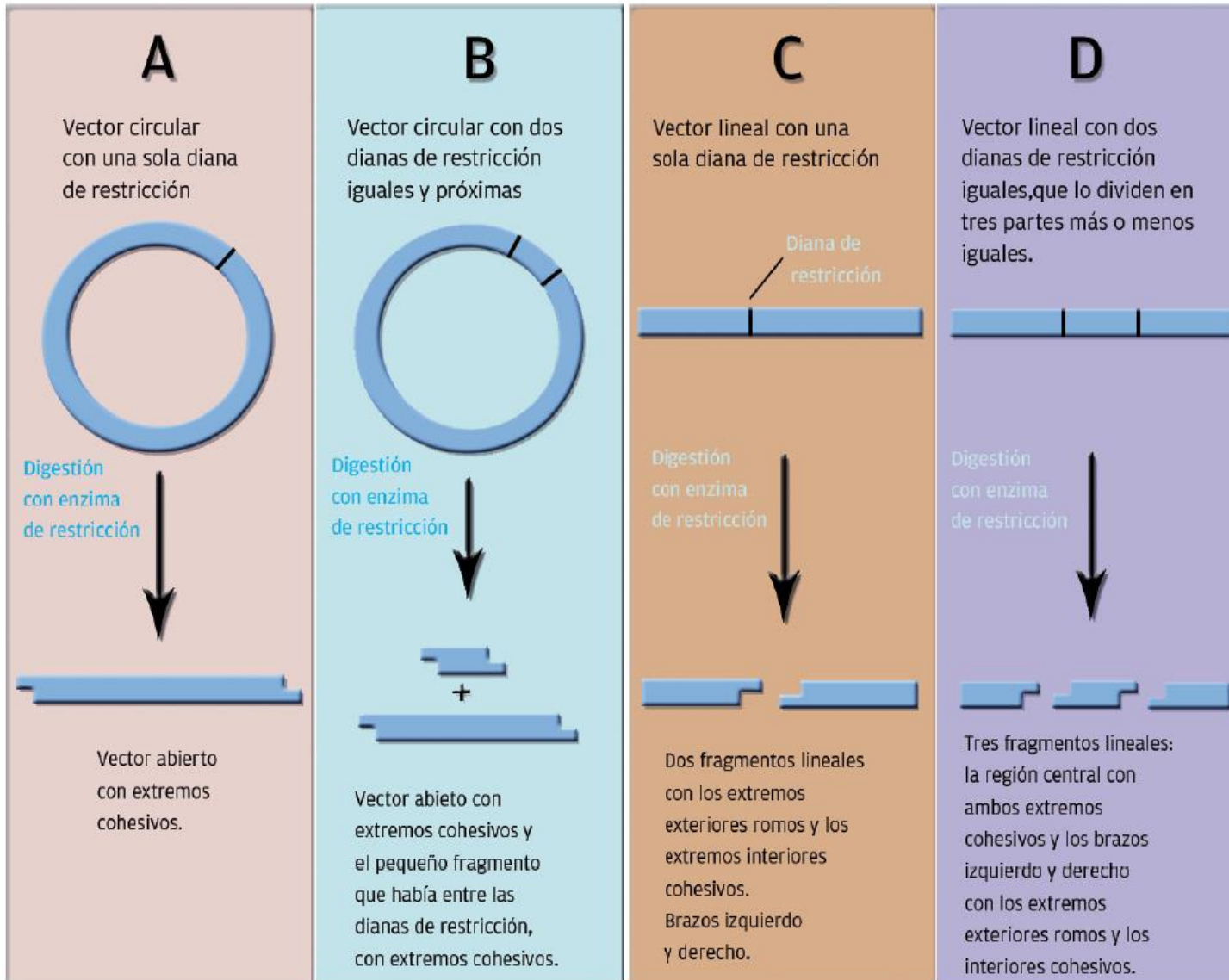
Hay varias situaciones posibles:

- **Vector circular, con diana de restricción única** (la mayoría de los plásmidos). Tras el tratamiento enzimático, el vector se transforma en una molécula lineal con extremos cohesivos.
- **Vector circular con dos dianas de restricción**. Tras la digestión enzimática se obtienen dos moléculas lineales con extremos cohesivos, normalmente con tamaños muy diferentes: uno grande, que contiene los marcadores genéticos de selección e identificación y que va a ser la base para el vector recombinante, y otro pequeño, que no porta información genética de interés para la clonación y que va a ser sustituido por el ADN extraño.
- **Vector lineal con diana de restricción única**. Tras la digestión enzimática, se divide en dos fragmentos o brazos, izquierdo y derecho, cada uno con un extremo romo y un extremo cohesivo.
- **Vector lineal con dos dianas de restricción** (como el fago λ). Tras la digestión enzimática se obtienen dos brazos, izquierdo y derecho, con un extremo romo y otro cohesivo y una región central con ambos extremos cohesivos. La región central no se requiere para la clonación y será sustituida por el ADN extraño. Los brazos portan los marcadores de selección e identificación.

FASES DEL PROCESO DE CLONACIÓN

CREACIÓN DE UN VECTOR RECOMBINANTE

Preparación del vector de clonación



En el caso de que el ADN que se va a clonar se haya preparado mediante PCR con ADN polimerasa sin actividad correctora, el vector debe ser lineal con una T no apareada sobresaliendo en cada extremo 3'.

FASES DEL PROCESO DE CLONACIÓN

CREACIÓN DE UN VECTOR RECOMBINANTE



Inserción del ADN extraño en el vector

Se realiza mezclando ambos en las concentraciones adecuadas e incubándolos en las condiciones óptimas para que las dos moléculas se unan a través de los extremos cohesivos generados por la misma enzima de restricción mediante complementariedad de bases, en presencia de una ADN ligasa.

La ligasa sella covalentemente las mellas en la doble hélice de ADN, produciendo el vector recombinante. Esta reacción se denomina **ligación**.

- Tras la ligación se obtiene una mezcla compleja de moléculas, una de las cuales es el vector recombinante específico.
- También se obtienen muchos **productos no deseados**: vectores recircularizados sin ADN extraño, moléculas de ADN extraño unidas entre sí, vectores unidos entre sí, combinaciones de vector y ADN extraño con distintos grados de complejidad, etc.
- Todos estos productos van a ser introducidos en células hospedadoras y habrá que eliminarlos en fases posteriores de la clonación.

FASES DEL PROCESO DE CLONACIÓN

INTRODUCCIÓN DEL VECTOR EN LA CÉLULA HOSPEDADORA

- Existen varios métodos para introducir el vector recombinante en células hospedadoras vivas, dependiendo del tipo de vector y de la célula empleada.
- Los métodos más habituales son:
 - Transformación bacteriana
 - Transfección
 - Transducción
 - Electroporación

Intentando maximizar la eficiencia de la introducción de vectores en las células hospedadoras se han desarrollado métodos nuevos.

Algunos de ellos son los basados en **ultrasonidos**, **láseres** e incluso en el **bombardeo de las células con nanopartículas** (generalmente de oro) recubiertas con el vector.

FASES DEL PROCESO DE CLONACIÓN

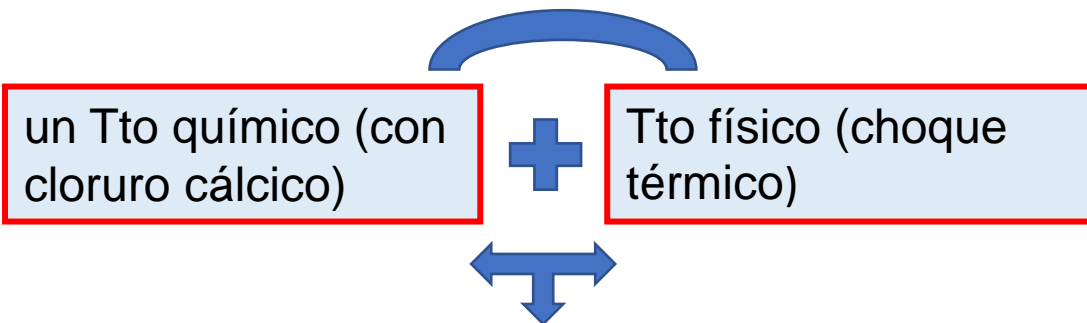
INTRODUCCIÓN DEL VECTOR EN LA CÉLULA HOSPEDADORA

Transformación bacteriana

Consiste en la captación e internalización por parte de una bacteria de moléculas de ADN desnudas presentes en el medio externo.

- Este proceso solo lo pueden realizar aquellas bacterias que se denominan «**competentes**».
- La competencia es un fenómeno que se da de forma natural en algunos géneros bacterianos (Streptococcus, Bacillus, Pseudomonas) bajo ciertas condiciones y en determinadas fases de crecimiento, normalmente en la fase exponencial, gracias al cual se intercambia material genético entre individuos.
- La especie bacteriana más utilizada como hospedadora, *E. coli*, no es competente de forma natural → hay que transformarla en competente.

El método de transformación más habitual para *E. coli* consiste en



Esto **incrementa la permeabilidad de la pared y la membrana celulares**, facilitando la incorporación del vector recombinante al interior de las bacterias.

Finalizado el protocolo, las bacterias se siembran en placas con el medio de cultivo sólido adecuado para proceder a la selección de los clones recombinantes.

FASES DEL PROCESO DE CLONACIÓN

INTRODUCCIÓN DEL VECTOR EN LA CÉLULA HOSPEDADORA



Transfección

Es un proceso similar a la transformación bacteriana, pero **en células hospedadoras eucarióticas, principalmente animales.**

En términos amplios la transfección se puede definir como la **introducción de vectores recombinantes en células eucarióticas no mediada por virus.**

Se englobarían en este término los métodos basados en la utilización de agentes químicos.

➤ El más sencillo consiste en **añadir el vector recombinante en una solución tamponada de fosfato cálcico sobre un cultivo de células animales en monocapa** → **El vector coprecipita junto con el fosfato cálcico sobre las membranas celulares y es introducido en el interior de la célula por endocitosis.**

➤ Otro método con el que se consigue una mayor eficiencia se basa **en incluir el vector en el interior de liposomas** → **Estos se fusionan con las membranas celulares y liberan su contenido al interior de la célula.**

FASES DEL PROCESO DE CLONACIÓN

INTRODUCCIÓN DEL VECTOR EN LA CÉLULA HOSPEDADORA



Transducción

- Consiste en la introducción de material genético extraño en una célula por la acción de un virus.
- Normalmente se infectan cultivos bacterianos con fagos recombinantes o cósmidos empaquetados en la cápside del fago.

fagos λ recombinantes y cósmidos



Ambos con secuencias cos en los extremos



- El empaquetamiento se consigue mezclando el vector recombinante con las proteínas de la cápside vírica → se originan partículas víricas que contienen vectores del tamaño adecuado.
- Al infectar un cultivo bacteriano sensible, los viriones introducen el material genético que contienen (vector) en el interior de la bacteria infectada.

Determinados virus (como baculovirus y adenovirus) y retrovirus se utilizan también para introducir vectores en células eucariotas vegetales y animales.

FASES DEL PROCESO DE CLONACIÓN

INTRODUCCIÓN DEL VECTOR EN LA CÉLULA HOSPEDADORA



Electroporación

Consiste en aplicar cortos pulsos eléctricos de alto voltaje a una mezcla de células hospedadoras en suspensión y vectores recombinantes en solución.

- Estos pulsos aumentan la permeabilidad de las membranas, permitiendo el paso de los vectores al interior de la célula.
- Es un método de gran eficiencia y se puede aplicar con todo tipo de células hospedadoras (bacterias, levaduras, células vegetales, células animales, etc.).

FASES DEL PROCESO DE CLONACIÓN

SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CLONES RECOMBINANTES

Terminado el proceso de introducción del vector en la célula hospedadora, se obtiene una mezcla con tres tipos de células:

- **Células no transformadas**, que no han captado ninguna molécula de ADN extraño.
- **Células transformadas que portan el vector recombinante específico.**
- **Células transformadas que portan un vector no recombinante** o alguna molécula de ADN no deseada producida durante la ligación.

Necesitamos un **proceso de selección** (eliminación de células no transformadas) **e identificación de los clones recombinantes**, que son aquellos que portan el vector recombinante específico



Este proceso **está condicionado** por los marcadores genéticos que porta el vector:

- Genes de resistencia a antibióticos,
- Enzimas que producen reacciones coloreadas
- Proteínas fluorescentes,
- Genes letales, etc.

FASES DEL PROCESO DE CLONACIÓN

SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CLONES RECOMBINANTES



GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Uno de los primeros sistemas de detección e identificación se basa en el empleo de vectores con dos genes de resistencia a antibióticos, normalmente ampicilina y tetraciclina.

El punto de inserción del ADN extraño se encuentra en el interior de la secuencia de uno de los genes de resistencia; de manera que en los vectores recombinantes ese gen no es funcional, ya que su secuencia está interrumpida por el inserto de ADN extraño (inactivación por inserción).

Introducimos este vector en bacterias sensibles a la ampicilina y la tetraciclina se obtienen **tres tipos de células:**

- Células **no transformadas**, sensibles a la ampicilina y la tetraciclina.
- Células **transformadas con el vector recombinante**, resistentes a la ampicilina y sensibles a la tetraciclina.
- Células **transformadas con el vector no recombinante**, resistentes a la ampicilina y la tetraciclina.

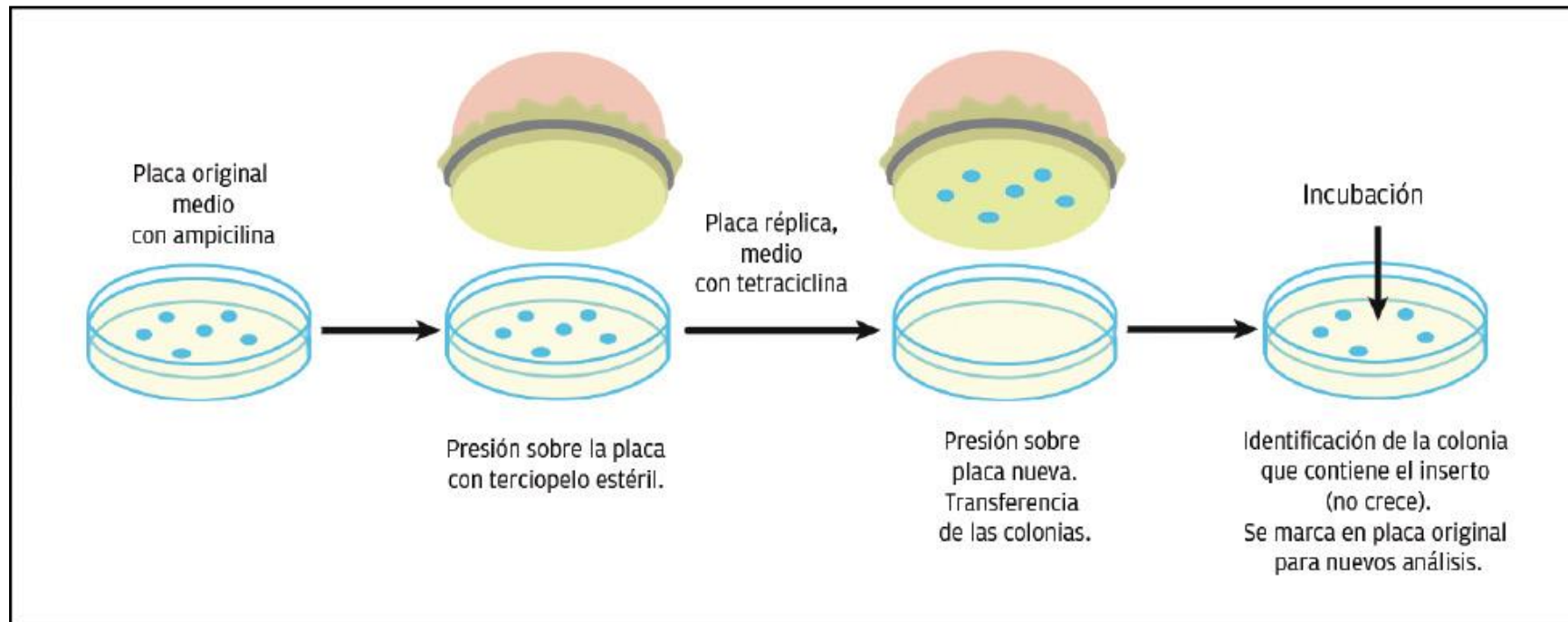
FASES DEL PROCESO DE CLONACIÓN

SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CLONES RECOMBINANTES



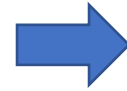
GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

- La **selección** se realiza cultivando las células en un medio de cultivo sólido con ampicilina, en el que solo crecerán las bacterias transformadas.
- La **identificación** se realiza replicando la placa con ampicilina en otra placa con tetraciclina, en la que solo crecerán las bacterias transformadas con el vector no recombinante.
- En consecuencia, **los clones recombinantes serán las colonias que crecen en la placa con ampicilina y no crecen en la placa con tetraciclina.**



FASES DEL PROCESO DE CLONACIÓN

SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CLONES RECOMBINANTES



ESTRATEGIA CROMOGENICA

Esta estrategia se utiliza cuando se combinan:

- **Bacterias hospedadoras defectivas: lactosa negativas o lac –** (incapaces de producir β -galactosidasa). La bacteria es además sensible al antibiótico para el que porta resistencia el vector.
- **Vectores que contienen un gen de resistencia al antibiótico y el gen LacZ α con un polylinker en su interior.** En los vectores recombinantes este gen no es funcional ya que su secuencia se interrumpe por el inserto de ADN extraño.

La selección y la identificación se realizan simultáneamente. Cuando se introduce el vector en bacterias sensibles al antibiótico se obtienen tres tipos de células:

- Células **no transformadas**, **sensibles al antibiótico y lac –**
- Células **transformadas con el vector recombinante**, **resistentes al antibiótico y lac –**
- Células **transformadas con el vector no recombinante**, **resistentes al antibiótico y lac +**

FASES DEL PROCESO DE CLONACIÓN

SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CLONES RECOMBINANTES



ESTRATEGIA CROMOGENICA

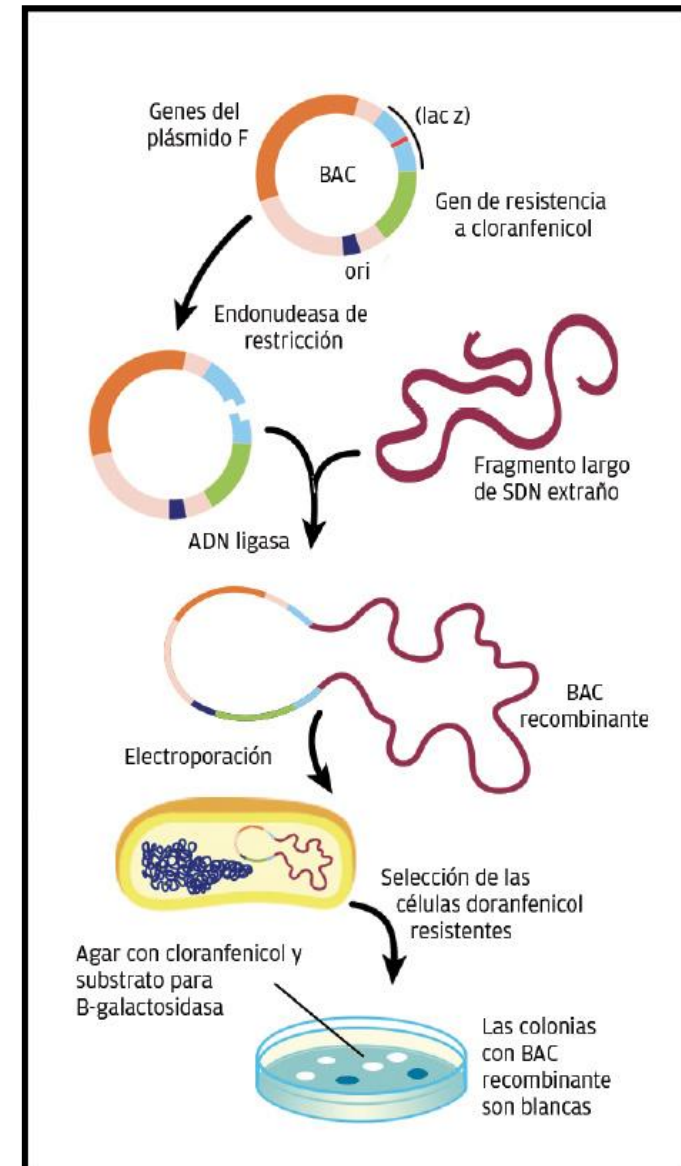
Cultivamos las bacterias en un medio de cultivo sólido con:

- El antibiótico,
- Un inductor del operón lac (IPTG)
- El sustrato cromogénico x-gal.

En este medio solo crecen las bacterias transformadas.

Las bacterias que portan:

- El vector recombinante (lac -) producen colonias **blancas**
- El vector no recombinante (lac +) producen colonias azules.



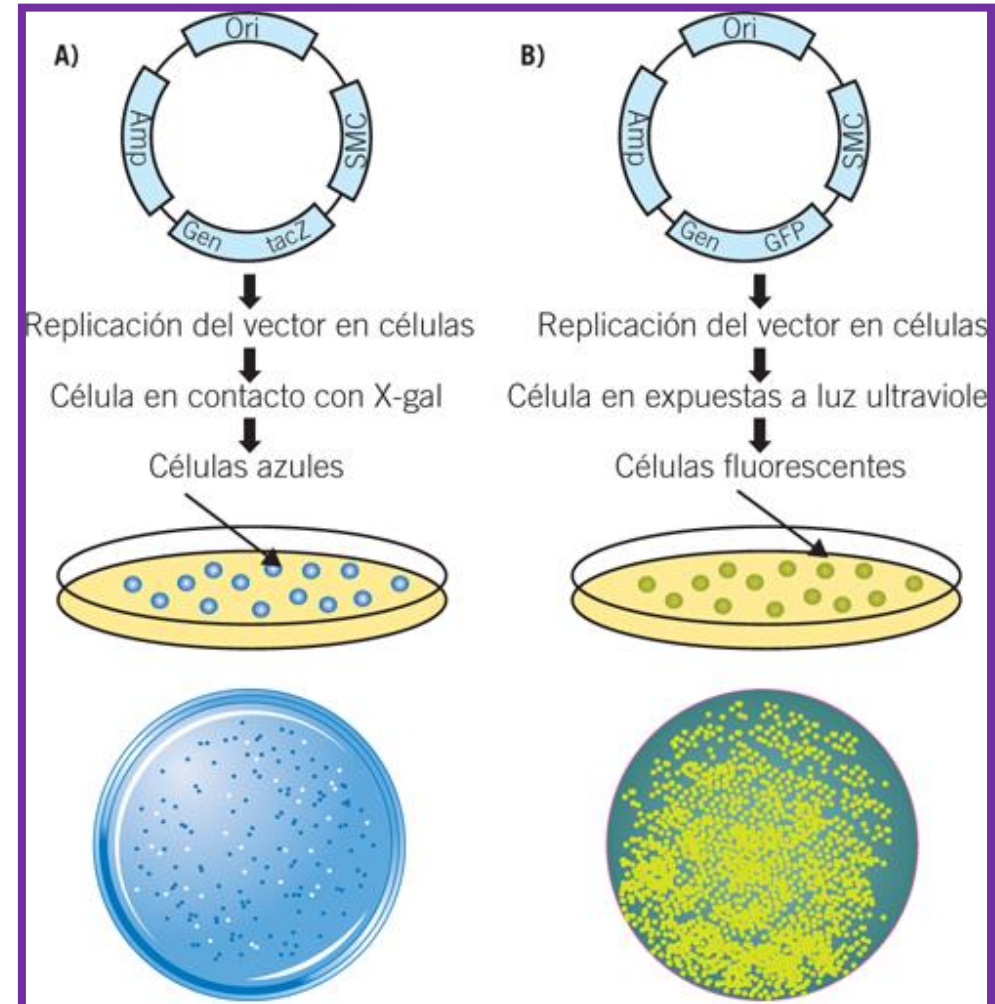
FASES DEL PROCESO DE CLONACIÓN

SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CLONES RECOMBINANTES



PROTEÍNAS FLUORESCENTES

- Se basa en el empleo de **vectores con un gen de resistencia para realizar la selección y un gen que codifica una proteína fluorescente (donde está el gen polylinker) para la identificación.**
- La proteína más utilizada es la **proteína verde fluorescente (GFP)**, cuyo gen se aisló de una medusa.
- La **selección** de bacterias transformadas se realiza por crecimiento en **medios de cultivo sólidos con antibiótico** y la **identificación** se realiza **iluminando las placas de cultivo con luz ultravioleta.**
 - Las colonias transformadas con plásmidos no recombinantes presentarán fluorescencia verde
 - Las colonias transformadas con plásmidos recombinantes **no tendrán fluorescencia.**



FASES DEL PROCESO DE CLONACIÓN

SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CLONES RECOMBINANTES



GENES LETALES

Es una metodología relativamente reciente.

Utiliza **vectores con:**

- un **gen de resistencia a un antibiótico** (marcador de **selección**)
- un **gen** que codifica para **una proteína letal para las bacterias con un polylinker en su interior** (marcador de **identificación**).

En los vectores recombinantes **la proteína letal no es funcional** porque la secuencia génica queda interrumpida por el inserto de ADN extraño.

La selección e identificación se realiza cultivando las bacterias en un medio con el antibiótico en cuestión.

- Las bacterias que **porten el vector recombinante**, **son las únicas que se desarrollan**
- Las bacterias **no transformadas** **no crecen porque son sensibles al antibiótico**
- Las bacterias **transformadas con el vector no recombinante** **mueren por efecto de la proteína letal.**

FASES DEL PROCESO DE CLONACIÓN

TASA DE TRANSFORMACIÓN

Mide la eficiencia de la introducción del vector en la célula hospedadora.

$$\text{Tasa de transformación} = \frac{UFC \cdot V_T}{C \cdot V_S}$$

- Donde **VT** es el volumen total de la solución en la que se realiza la transformación (μl);
- **C**, la cantidad del vector empleado (mezcla que incluye vector recombinante y vector no recombinante) (μg);
- **Vs**, el volumen de suspensión bacteriana transformada utilizada para sembrar una placa de medio de cultivo sólido con antibiótico y
- **UFC**, las unidades formadoras de colonias que crecen en dicha placa.

La tasa de transformación se expresa, entonces, como número de células transformadas/ μg de vector.

BIBLIOTECAS DE ADN

Una **biblioteca o librería de ADN** es una colección de vectores recombinantes clonados cuyas secuencias de ADN extraño se han obtenido de un único organismo.

BIBLIOTECAS GENÓMICAS	<ul style="list-style-type: none">➤ Son colecciones de vectores recombinantes clonados que incluyen el genoma completo de un organismo.➤ En una biblioteca genómica están representados, supuestamente, todos los genes de un organismo.➤ Un biblioteca genómica debe contener al menos una copia de cualquier secuencia presente en el genoma.
BIBLIOTECAS CROMOSÓMICAS	<ul style="list-style-type: none">➤ Son bibliotecas de ADN construidas a partir de <i>un único cromosoma o fracción cromosómica.</i>➤ Se fabrican partiendo de un único cromosoma previamente aislado.
BIBLIOTECAS DE ADNc	<ul style="list-style-type: none">➤ Se obtienen a partir de ARNm de un tejido o población celular determinada.➤ Representan solo el subconjunto de genes de un organismo que se están expresando en un tipo celular y un estado metabólico concreto.

BIBLIOTECAS DE ADN

ANÁLISIS DE UNA BIBLIOTECA DE ADN

Al final del proceso de clonación se obtiene una colección que contiene miles o cientos de miles de clones en forma de colonias bacterianas, fagos recombinantes, colonias de levaduras o clones celulares vegetales o animales.

El problema está en la forma de analizar la biblioteca.

Para resolverlo es necesario realizar **tres pasos** principales que consisten en:

- La **identificación del clon o clones** que contienen un gen o una secuencia concreta. Para identificar los clones que portan un inserto determinado se utilizan técnicas de hibridación
- El **paseo cromosómico** o identificación de clones que porten secuencias consecutivas. Permite localizar dentro de una biblioteca de ADN clones que portan una secuencia adyacente a la de un clon dado.
- La **secuenciación**: consiste en descifrar la secuencia del ADN insertado que porta el vector recombinante

APLICACIONES DE LA CLONACIÓN MOLECULAR

En investigación básica es una herramienta clave para



Descifrar las secuencias génicas completas de cualquier organismo

Estudios filogenéticos

Estudios de diversidad génica

Estudios de expresión génica

En investigación aplicada tiene especial interés



Clonación en vectores de expresión

Clonación mediante inserción de genes en el genoma de células vegetales

Clonación mediante inserción de genes en el genoma de células animales

APLICACIONES DE LA CLONACIÓN MOLECULAR

En investigación aplicada tiene especial interés:

Clonación en vectores de expresión

- Posibilitan la producción a nivel industrial de proteínas recombinantes
- **De interés médico y farmacéutico:** la insulina, la hormona del crecimiento, el factor VIII, vacunas, reactivos para diagnóstico, etc.
- **De interés en la industria química y de la alimentación:** enzimas y catalizadores.
- **De interés medioambiental:** la creación de microorganismos capaces de metabolizar petróleo

Clonación mediante inserción de genes en el genoma de células vegetales

- Ha producido grandes avances en agricultura
- Los organismos en los que se insertan genes nuevos o modificados se denominan **organismos transgénicos**

Clonación mediante inserción de genes en el genoma de células animales

- **Ratones transgénicos:** estudio de enfermedades genéticas, de la enfermedad, como a nivel de tratamiento.
- **Terapia génica:** consiste en transferir genes normales a células somáticas para corregir una enfermedad genética → pretende conseguir que las células tratadas sintetizen el producto génico normal, evitando así un tratamiento farmacológico de por vida.