

EJERCICIOS UD_7: CLONACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

1. ¿Qué es la clonación molecular? Enumera sus ventajas como técnica de amplificación de ADN. ¿Qué dos elementos son imprescindibles para clonar una molécula de ADN?
2. Ordena los tipos de vectores que aparecen en la columna de la izquierda según el tamaño del inserto que pueden transportar (de menor a mayor) y emparéjalos con las correspondientes características que figuran en la columna de la derecha.

Vectores	Característica
1. Cósmidos	A) Vector lineal en el que se puede sustituir la región central por un inserto de ADN extraño.
2. BAC	B) Molécula circular de ADN bicatenario extracromosómico de origen bacteriano.
3. Fago λ	C) Contienen un centrómero y sendas secuencias teloméricas en los extremos.
4. Plásmido	D) Vector híbrido que contiene parte de un plásmido y las secuencias cos del fago λ .
5. YAC	E) Vector híbrido que contiene parte de un plásmido y el origen de replicación del fago M13.
6. Fagémido	F) Es un vector basado en un plásmido natural de E. coli llamado Factor F.

3. Dibuja un esquema de un vector de clonación plasmídico con sus componentes principales y explica la función de cada uno de ellos.

4. Define los siguientes conceptos:

- a) Vector de clonación.
- b) Vector recombinante.
- c) Vector de expresión.
- d) Vector lanzadera.
- e) Célula hospedadora.

5. Di si son verdaderas o falsas las siguientes afirmaciones:

- a) Mediante el proceso denominado transformación, cualquier bacteria puede captar e internalizar moléculas de ADN desnudas presentes en el medio externo.
- b) La transfección es un método para introducir vectores recombinantes en bacterias infectándolas con un virus.
- c) La introducción de vectores recombinantes en células hospedadoras mediante virus se denomina transducción.
- d) En la electroporación, la introducción de vectores recombinantes en bacterias se consigue mediante un láser que produce nanoporos en la pared celular y en la membrana plasmática.

6. Una suspensión de *E. coli* lactosa negativa y sensible a ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol se transforma con un vector recombinante, obteniéndose una mezcla de bacterias no transformadas y transformadas con el vector recombinante o con el vector no recombinante. Explica cómo realizarías la selección e identificación de los clones recombinantes en los siguientes supuestos:

- a) El vector es un plásmido con un gen de resistencia a la ampicilina, un gen de resistencia a la tetraciclina y un *polylinker* en el centro del gen de resistencia a la ampicilina.
- b) El vector es un BAC con un gen de resistencia al cloranfenicol, un gen letal para la bacteria y un *polylinker* en el centro del gen letal.
- c) El vector es un cósmido con un gen de resistencia a tetraciclina, un gen *LacZ* y un *polylinker* en el centro del gen de resistencia a la tetraciclina.
- d) El vector es un plásmido con un gen de resistencia a la ampicilina, el gen que codifica para la GFP y un *polylinker* en el centro del gen *GFP*.

7. Se ha transformado una cepa de *E. coli* sensible a la ampicilina y lactosa negativa con un plásmido recombinante que tiene un gen de resistencia a la ampicilina, un gen *LacZ* y un *polylinker* en el centro del gen de resistencia a la ampicilina.

La transformación se realizó añadiendo 20 μl de una solución de plásmido con una concentración de 0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 480 μl de suspensión bacteriana, para un volumen final de solución de transformación de 500 μl .

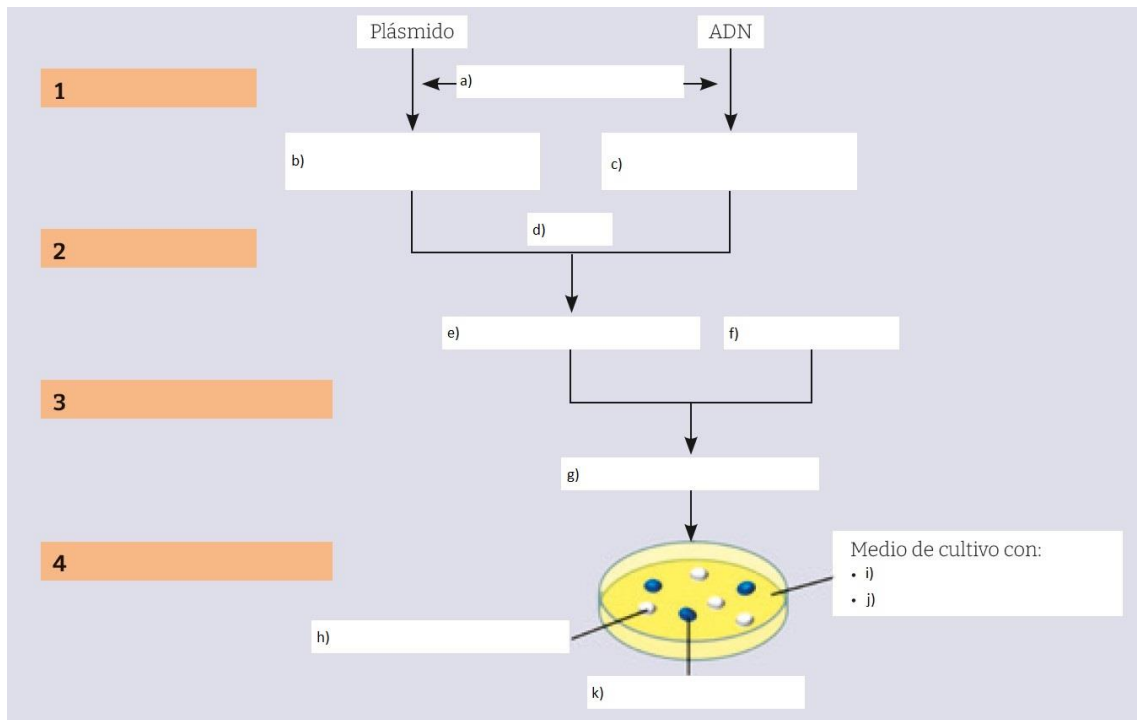
A continuación se sembraron 25 μl de la suspensión de bacterias transformadas en una placa control sin antibiótico y otros 25 μl en una placa con ampicilina, X-gal e IPTG.

A las 24 horas de incubación, a 37 °C, en la placa control crecieron 450 UFC y en la placa con ampicilina y X-gal crecieron 30 colonias blancas y 120 colonias azules.

Calcula:

- a) La tasa de transformación.
- b) La tasa de transformación recombinante.
- c) El porcentaje de clones recombinantes respecto del total de clones transformados.
- d) El porcentaje de células transformadas respecto del total de células presentes en la suspensión inicial.

8. A continuación tienes un mapa conceptual que esquematiza el proceso de clonación de una molécula de ADN utilizando un plásmido como vector.



Suponiendo que el plásmido contiene un gen de resistencia a la ampicilina y el gen LacZ con una diana de restricción en su interior, completa el mapa conceptual en tu cuaderno utilizando los siguientes textos (recuadros blancos):

- Ligasa.
- Enzima de restricción.
- Plásmido recombinante.
- Plásmido linearizado con extremos cohesivos.
- Colonias con vector recombinante.
- Colonias con vector no recombinante.
- Escherichia coli. Ampicilina.
- Fragmentos de ADN con extremos cohesivos.
- Bacterias transformadas.
- X-gal.

Indica las fases del proceso de clonación (recuadros naranja), utilizando estos textos:

- Transformación.
- Digestión.
- Selección e identificación.
- Ligación

9. Explica las diferencias que hay entre una biblioteca genómica, una biblioteca cromosómica y una biblioteca de ADNc.

10. En relación con el análisis de bibliotecas de ADN, empareja cada proceso con su correspondiente metodología:

Proceso	Metodología
1. Localizar clones con secuencias adyacentes.	A) Técnicas inmunológicas con anticuerpos específicos
2. Localizar genes en bibliotecas en fago λ	B) Hibridación en colonias
3. Establecer la secuencia de bases de un gen.	C) Paseo cromosómico
4. Localizar genes en bibliotecas en E. coli.	D) Secuenciación
5. Localizar clones productores de proteínas recombinantes.	E) Hibridación en placas virales

11. Relaciona los distintos tipos de aplicaciones de la clonación que figuran con los ejemplos concretos que se enumeran:

Aplicaciones de la clonación	Ejemplos
1) Terapia génica.	a) Producción de α -amilasa para la industria alimentaria
2) Clonación en vectores de expresión	b) Tratamiento de la enfermedad de Wilson
3) Organismo modificado genéticamente	c) Ciruelas resistentes al virus Sharka
4) Ratón transgénico	d) Producción del factor VIII para tratamiento de la hemofilia
	e) Modelo animal de sobreexpresión del oncogen Hras
	f) Producción de ADN polimerasa para biología molecular
	g) Tratamiento del síndrome de Usher
	h) Maíz resistente al herbicida glifosato
	i) Ratones gigantes
	j) Vaca productora de leche con un precursor de la insulina