

1. ADN RECOMBINANTE

Técnica que permite cortar e unir fragmentos de ADN de procedencia diferente por puntos concretos. O corte faise con enzimas de restrición (tesoiras moleculares) e a unión con enzimas ligases. Ex. enzimas restrición EcoRI. Esta técnica permite CLONAR ADN.

2. CLONACIÓN DO ADN

Un clon é unha copia exacta de algo. A clonación é unha técnica de enxeñaría xenética que permite obter múltiples copias dun fragmento de ADN. Para elo precísase:

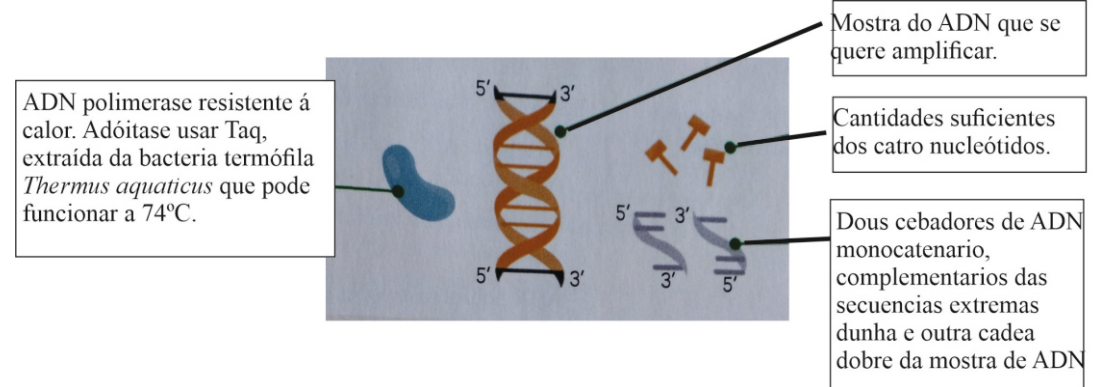
ADN que se quere clonar	VECTOR Axente biolóxico co que se vai introducir o ADN nunha célula. Plásmidos, fagos, cromosomas...	CÉLULA RECEPTORA	ENZIMAS DE RESTRICIÓN
-------------------------------	---	---------------------	--------------------------

1. Sométese a **dixestión** (corte) o ADN no cal está o xene que se quere clonar. Emprégase un enzima de restrición. Obtéñense diversos fragmentos.
2. Sométese a dixestión co mesmo enzima o plásmido que se vai usar como vector.
3. O plásmido e os fragmentos colócanse no mesmo medio. Como foron cortados co mesmo enzima, os seus extremos cohesivos pódense unir. Imos ter diferentes plásmidos cos novos fragmentos de ADN incorporados.
4. Os plásmidos insírense dentro de bacterias como *E. coli*. Vanse multiplicar creando diferentes colonias. Non sabemos en cal delas está o fragmento que se quere clonar, así que hai que buscalo.
5. Método directo: as colonias se meten en diferentes medios e son alimentadas de forma selectiva. Sobrevive a que interesa.
6. Método indirecto: nunha placa petri colócanse as diferentes colonias. Faise un “calco” delas nunha membrana de nailon. As colonias quedan adheridas á membrana. Esas colonias son desnaturizadas: as bacterias rompen e o seu ADN ábrese dando lugar a 2 febras. Engádese un ADN que é complementario ao xene buscado (**sonda**); ese ADN está marcado. O ADN complementario marcado vaise unir ao xene buscado (**hibridación**). Faise unha fotografía que permite identificar o xene marcado e por tanto a colonia que o contén. Esa colonia é sometida a multiplicación.

EXEMPLO: síntese da insulina, da hormona do crecemento ou do factor de coagulación para tratar a hemofilia.

3. AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR

A reacción en cadea da polimerasa é unha técnica de clonación acelular que permite **amplificar** (obter millóns de copias) dun fragmento de ADN cando a mostra de partida é moi pequena. Para amplificar ADN mediante unha PCR precísase:



A técnica consiste en someter a mostra de ADN a sucesivas etapas de quetamento e arrefriamento. Ao quentalas conséguense que se **desnaturalice** e se separen as cadeas; despois se arrefría e os cebadores únense aos extremos das cadeas (**hibridación**); quéntase de novo para que a polimerase empece a engadir nucleótidos a partir dos cebadores (**extensión**). E o ciclo volve a empezar. Pódense conseguir 1000000 de copias dun ADN en 5 minutos. Tamén se fai en tempo real.

EXEMPLO: PCR do ADN humano para detectar a presenza do coronavirus SARS-CoV-2 (que é un virus que ten ARN):

- Extáese unha mostra da gorxa ou nariz. Leva ADN da persoa e o posible virus.
- Recupérase o ARN da mostra, que será da persoa e do virus (se é que está presente).
- Lévese a cabo a transcripción inversa do ARN. Obtense ADN da persoa e do virus.
- Temos pouca mostra, necesitamos máis, así que o ADN é amplificado cunha PCR.
- No proceso de amplificación inclúense ADN complementarios a partes do ADN vírico que actuarán como cebadores e como marcadores fluorescentes.
- A PCR consta de 35 ciclos; consegue 35 millóns de copias do ADN. Os marcadores vanse unindo ó ARN vírico emitindo fluorescencia, o cal permite detectalos.

Outras APLICACIÓNS: medicina forense, antropoloxía.

4. SECUENCIACIÓN DE ADN

É unha técnica que permite a lectura ordenada da secuencia de nucleótidos que compoñen un ADN. Precisa de: múltiples copias do ADN a ler, fragmentos de ADN cebador, ADN polimerasa, desoxinucleótidos (dNTP) para a cadea e ddNTP marcados para frear o crecemento da cadea. Ver figura coa explicación nos apuntes. Consegue así a secuenciación completa do xenoma humano (2022). Os primeiros resultados foran do Proxecto Xenoma Humano (2003). Aplicacións en medicina forense, saúde (deseño de terapias xénicas), antropoloxía.