

# Transferencia de genes

- Los microorganismos estrechamente relacionados que presentan fenotipos diferentes han mostrado claras diferencias en los genomas.
- Estas diferencias distintivas son el resultado de la transferencia horizontal de genes: desplazamiento de genes entre células que no descienden directamente unas de otras.
- La transferencia horizontal de genes permite a las células adquirir rápidamente características nuevas y promueve la diversidad metabólica.

- Before discussing the mechanisms of transfer, we consider the fate of transferred DNA
- Regardless of how it was transferred, DNA that enters the cell by horizontal gene transfer faces three possible fates: (1) It may be degraded by the recipient cell's restriction enzymes; (2) it may replicate by itself (but only if it possesses its own origin of replication, such as a plasmid or phage genome); or (3) it may recombine with the recipient cell's chromosome.

# Genetic Recombination

Recombination is the physical exchange of DNA between genetic elements (structures that carry genetic information).

**a) Recombinación homóloga.**- Es el intercambio genético entre secuencias homólogas de DNA. En este proceso, el apareamiento de bases homólogas ocurre en una gran longitud de las dos moléculas de DNA. De este modo se requieren secuencias idénticas o casi idénticas en las dos moléculas recombinantes.

**b) Recombinación sitio-específica.**- Difiere de la recombinación general en que no se requiere homología en el DNA. En cambio, se reconocen secuencias específicas cortas de nucleótidos por enzimas de recombinación. El proceso es llamado recombinación sitio-específica porque la enzima de recombinación reconoce secuencias de nucleótidos específicos (sitios). Es en esta secuencia en la que ocurre recombinación.

Ej. Bacteriófago lambda ( $\lambda$ ), transposones

# Eventos moleculares en la recombinación homóloga

- En bacterias, la recombinación homóloga involucra la participación de una proteína específica llamada RecA, la cual es especificada por el gen *recA*.
- RecA es una proteína helicoidal que se enrolla alrededor de la hélice de DNA facilitando de este modo la recombinación. Las bacterias que son mutantes en *recA* muestran niveles marcadamente reducidos de recombinación homóloga.

∴

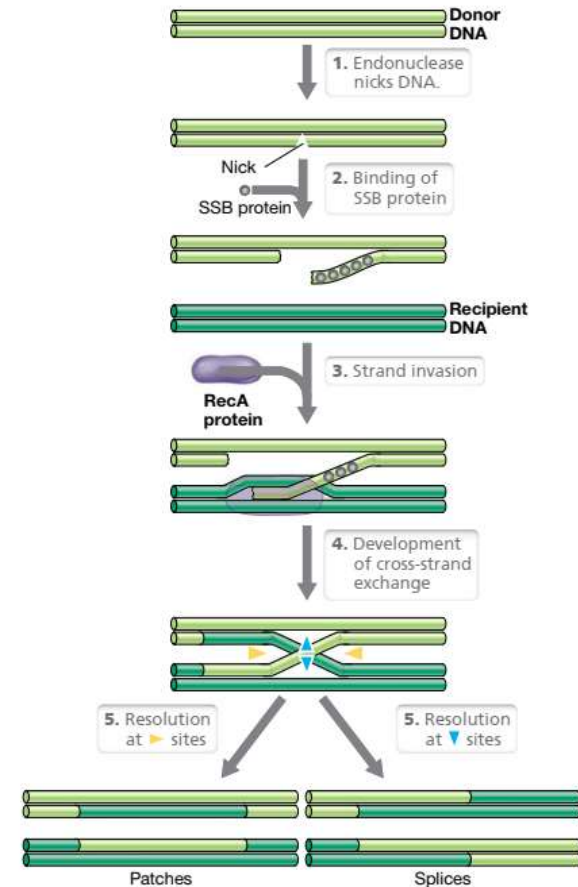
La recombinación homóloga implica el apareamiento de las moléculas de DNA en grandes extensiones.

# Mecanismo de la recombinación homóloga

1.- Mella (Nick), en una de las hebras, origina la formación de un segmento corto monocatenario

2.- Unión de proteína desestabilizante de la hélice, a la hebra monocatenaria, ayuda a la apertura de la doble hélice de DNA

3.- Unión de la proteína RecA, al segmento monocatenario y lo sitúa de modo que ocurra una reasociación con una secuencia complementaria en el dúplex adyacente.

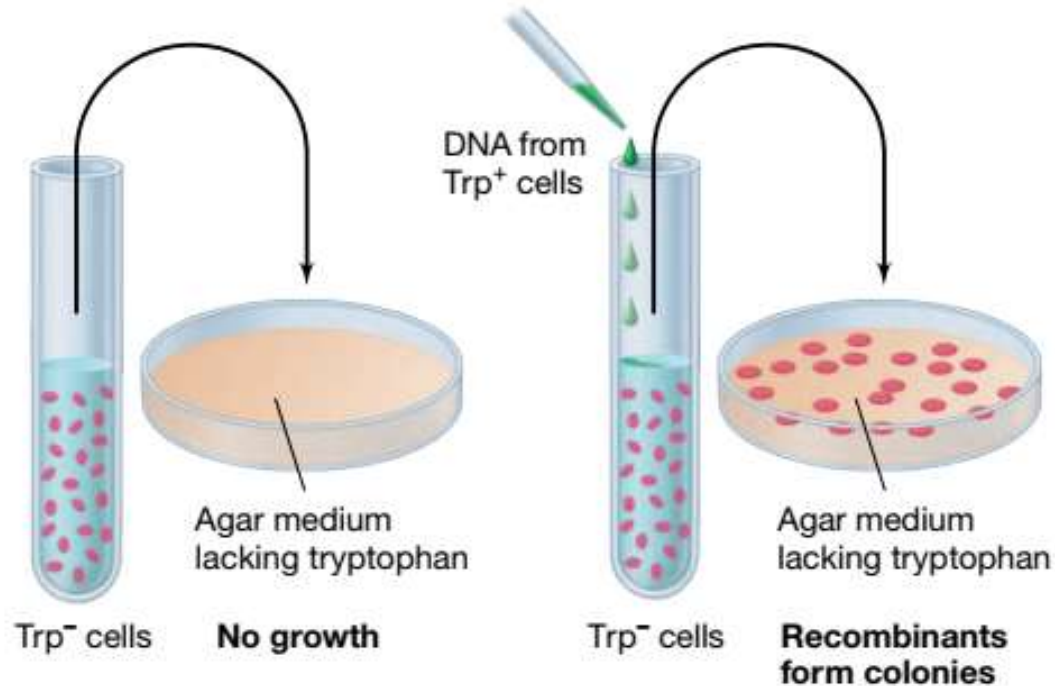


El apareamiento puede ocurrir a lo largo de cientos o miles de bases. La resolución se produce mediante el corte y la unión de nuevo de las moléculas de DNA entrecruzadas. Obsérvese que hay dos resultados posibles, los parches y los empalmes, según dónde se corten las cadenas durante el proceso de resolución.

# Detección de la recombinación

- Para detectar el cambio físico de segmentos de DNA, las células resultantes de la recombinación deben ser fenotípicamente diferentes de sus parentales.
- Por lo común se debe usar como cepas receptoras, aquellas que tengan características seleccionables, como la incapacidad para crecer en un medio en el cual los recombinantes sí pueden crecer.

# Using a selective medium to detect rare genetic recombinants



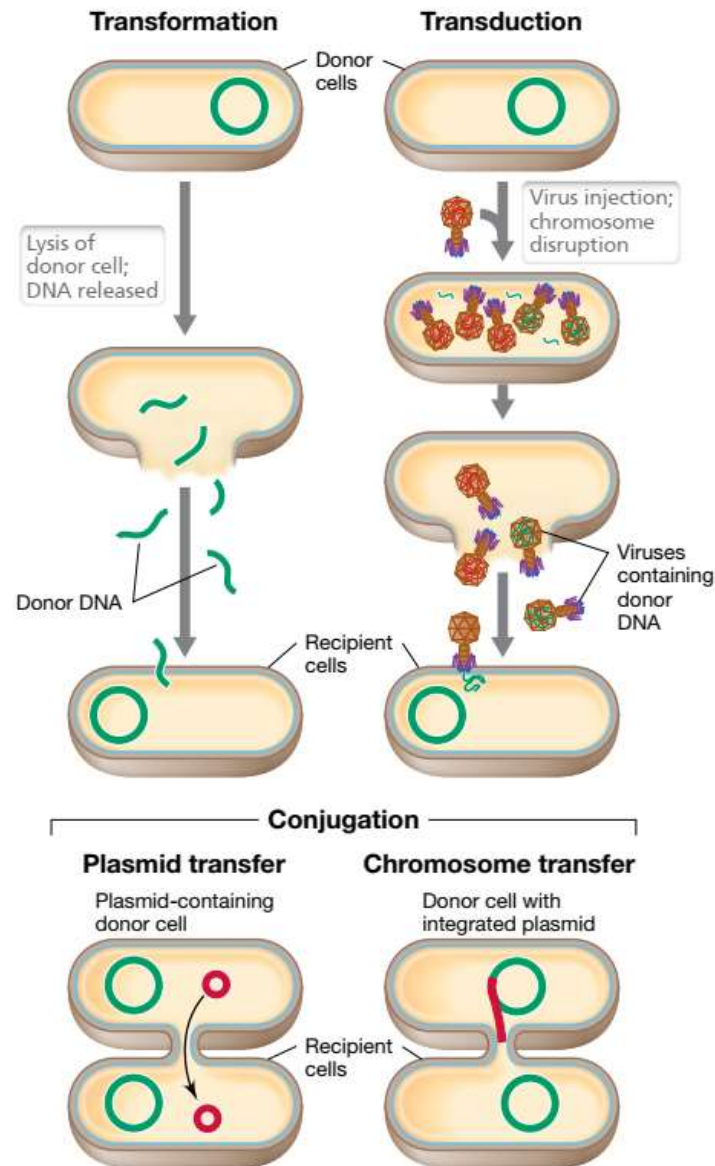
On the selective medium only the rare recombinants form colonies even though a very large population of bacteria was plated. Procedures such as this, which offer high resolution for genetic analyses, can ordinarily be used only with microorganisms. The type of genetic exchange being illustrated is transformation, but a similar outcome could result from any of the other forms of horizontal gene transfer.



# Transferencia de la información genética

- Los mecanismos por los cuales la información genética pasa de una bacteria a otra son:
  1. Transformación
  2. Transducción
  3. Conjugación

# Processes by which DNA is transferred from donor to recipient bacterial cell



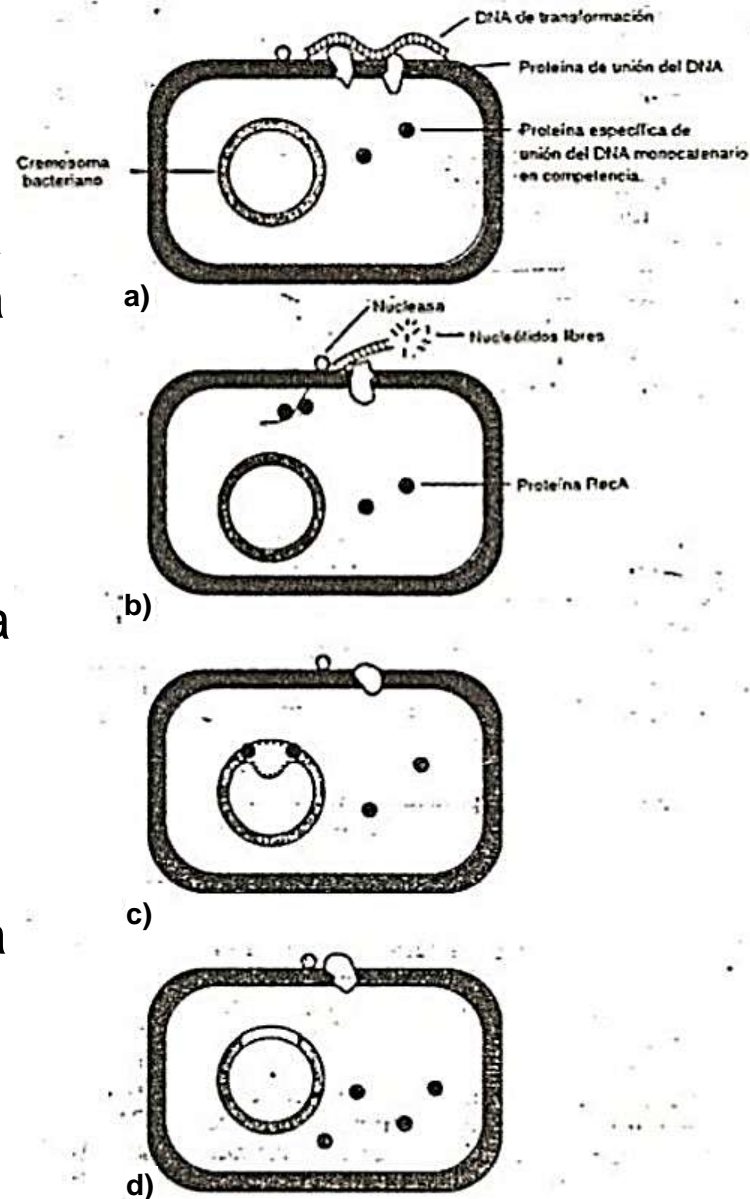
# Transformación

- Proceso por el que el DNA libre se inserta directamente en una célula receptora competente
- El descubrimiento de la transformación genética en las bacterias fue uno de los acontecimientos importantes en biología, dado que dio lugar a experimentos que probaron sin lugar a dudas que el DNA era el material genético
- Sólo ciertas cepas denominadas competentes son transformables
- Competencia.-Una célula capaz de adquirir una molécula de DNA y transformarse se dice que es competente.

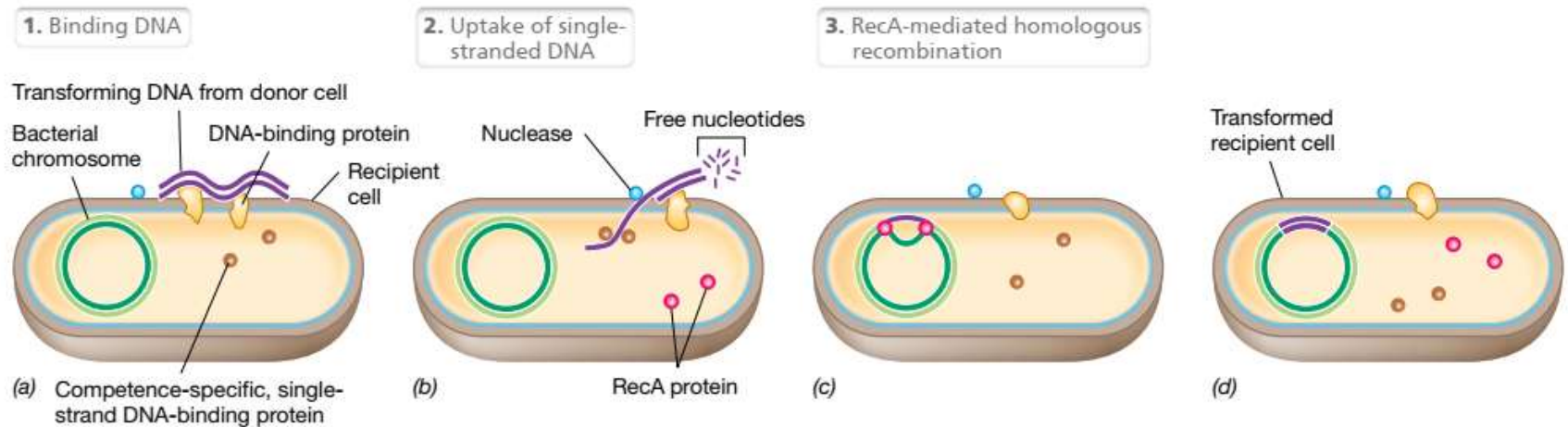
- Sólo ciertas cepas son competentes; parece que esta capacidad es una propiedad heredada por el organismo. La competencia está gobernada por proteínas especiales que juegan un papel en la captación y procesamiento del DNA
- Proteína de fijación del DNA asociado a membrana, una autolisina de la pared celular y varias nucleasas

# Mecanismos de transferencia de DNA por transformación

- a) Fijación del DNA libre por una proteína de unión del DNA unida a membrana
- b) Paso de una de las dos cadenas dentro de la célula mientras la actividad de la nucleasa degrada la otra cadena
- c) La cadena sencilla en la célula está unida por proteínas específicas y su recombinación con regiones homólogas del cromosoma bacteriano se media por la proteína RecA
- d) Célula transformada



# Mechanism of transformation



(a) Binding of double-stranded DNA by a membrane-bound DNA-binding protein. (b) Passage of one of the two strands into the cell while nuclease activity degrades the other strand. (c) The single strand of DNA in the cell is bound by specific proteins, and recombination with homologous regions of the bacterial chromosome is mediated by RecA protein. (d) Transformed cell.

# Transfección

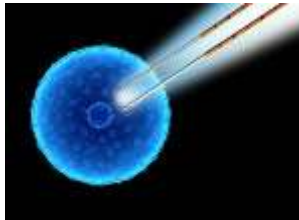
- Transformación con participación de DNA viral en lugar de DNA de otra bacteria.
- Las bacterias se pueden transformar con DNA extraído de un virus.
- Originalmente, infección artificial de células bacterianas por ácido nucleico viral, produciendo partículas virales maduras. Ahora incluye cualquier medio de introducción artificial de DNA extraño en cultivos de células eucariotas.

- Métodos mecánicos:
  - Electroporación.- Campos con pulsos eléctricos en presencia DNA.
  - Pistola de partículas (Gen Gun)



# Transfección

## Métodos mecánicos



Electroporación



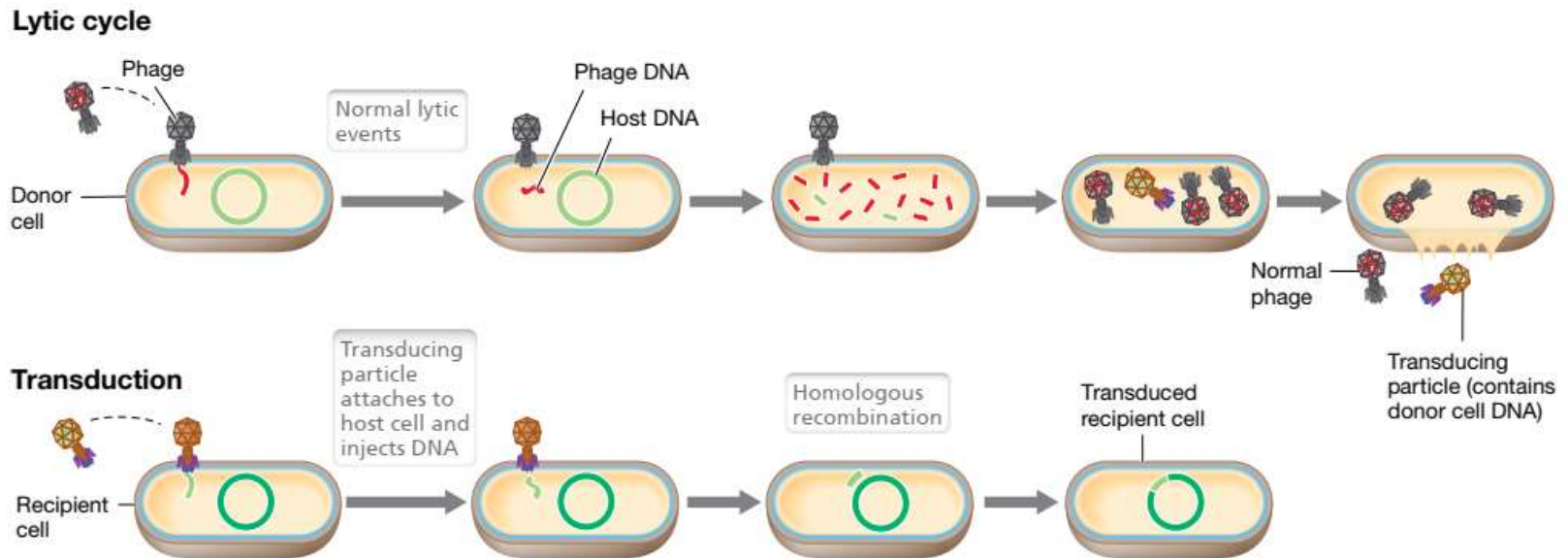
Pistola de genes (Gen Gun)

# Transducción

- El DNA es transferido de una célula a otra mediante la participación de un virus.
- Puede ser de dos formas:
  - 1.-Transducción generalizada, ocurre durante el ciclo lítico de un fago, puede transferir cualquier parte del genoma bacteriano.
  - 2.-Transducción especializada, sólo en virus temperados, grupo específico de genes del hospedero es integrado al genoma viral

# Generalized Transduction

Occurs during the lytic cycle of phage, may transfer any part of the bacterial genome

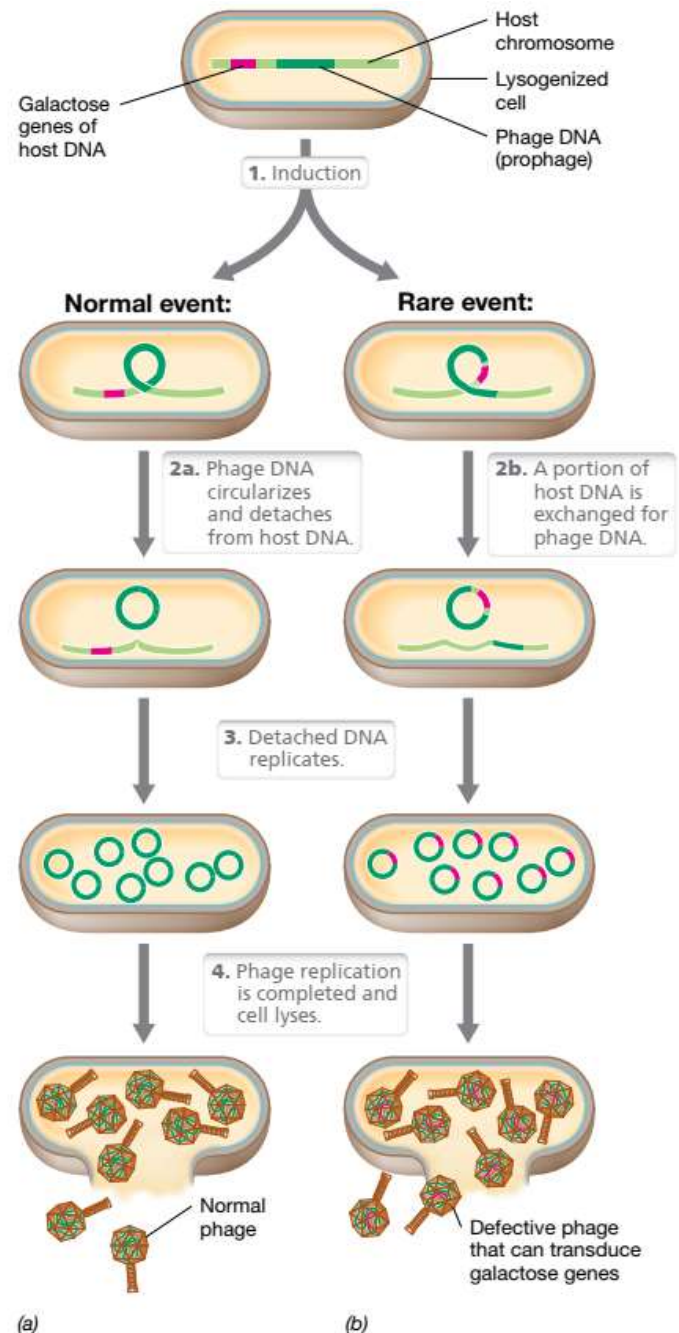


**Generalized transduction.** Note that “normal” virions contain phage genes, whereas a transducing particle contains host genes

# Specialized transduction

Only in temperate viruses, specific host group of genes is integrated into the viral genome

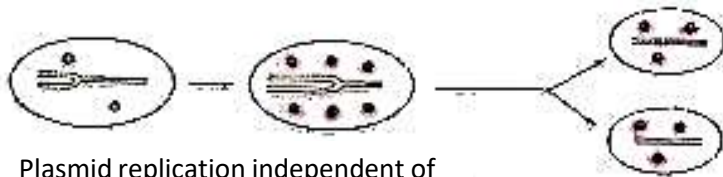
In an *Escherichia coli* cell containing a lambda prophage, (a) normal lytic events and (b) the production of particles transducing the galactose genes. Only a short region of the circular host chromosome is shown in the figure.



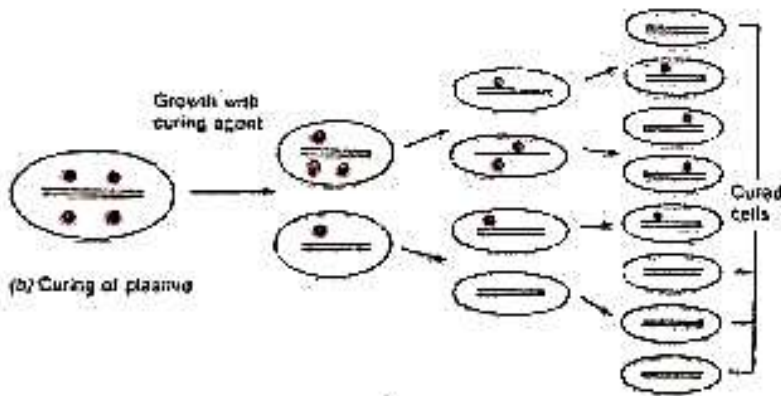
# Plásmidos

- Casi todos los plásmidos conocidos son DNA bicatenarios, la mayor parte son circulares, pero también se conocen lineales.
- Elementos genéticos circulares que se reproducen en forma autónoma y tienen una existencia extracromosómica.
- Muchos plásmidos se pueden transferir de célula a célula por medio de la conjugación. Algunos plásmidos también tienen la capacidad de integrarse a los cromosomas

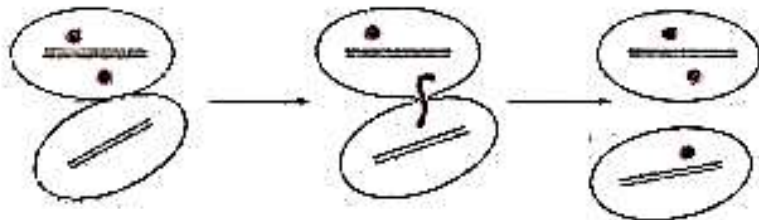
# Plásmidos



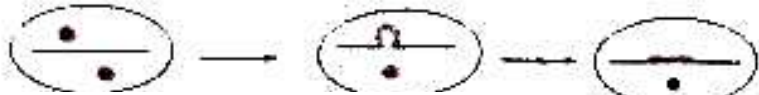
Plasmid replication independent of chromosome



(b) Curing of plasmid



Cell to cell transfer during conjugation



Integration of plasmid into chromosome

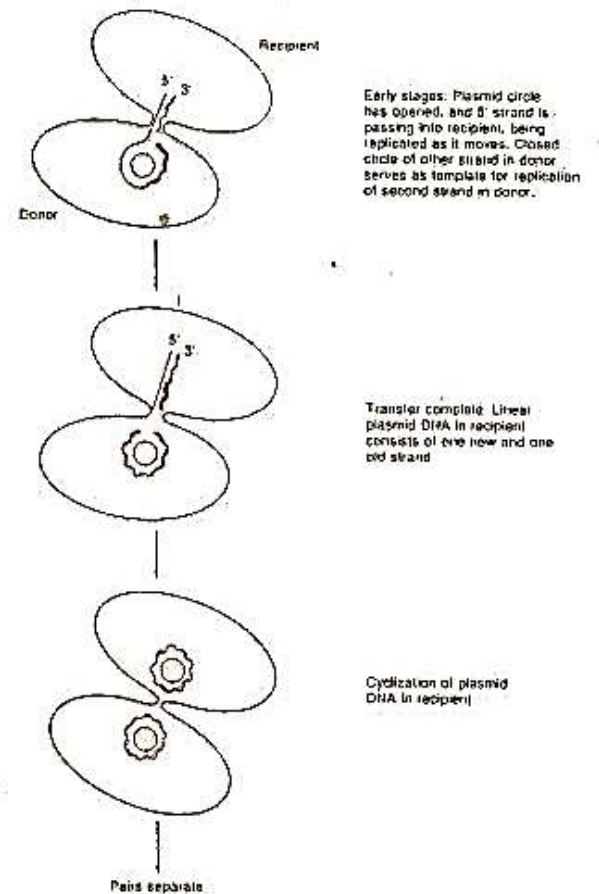


Figure 7.11 Rolling circle DNA replication during transfer of plasmid DNA from donor to recipient. Compare with Figure 5.16. Only the plasmid DNA is shown.

Los plásmidos pueden contener una variedad de genes, por ejemplo:

- Producción de toxinas
- Resistencia a antibióticos
- Resistencia a metales pesados

Algunos plásmidos llevan genes para el catabolismo de sustancias poco usuales, por ejemplo, compuestos aromáticos, plaguicidas, etc.

- Muchos plásmidos también llevan genes que controlan los procesos de conjugación:

genes que alteran la superficie de las células para permitir el contacto de célula a célula;

genes que llevan a cabo la transferencia de DNA de una célula a otra.

→ Plásmidos conjugativos: plásmidos que gobiernan su propia transferencia



# Clases de plásmidos

- 1.- Plásmido conjugativo, carries genes for sex pili and transfer of the plasmid.
- 2.- Plásmidos R (Factor R).- Confieren resistencia a antibióticos y a varios inhibidores de crecimiento. Ej. Plásmido R100 es un plásmido de 90 pares de kilobases.
- 3.- Plásmidos Col.- Produce bacteriocinas. Agentes que inhiben o matan especies estrechamente relacionadas. Colicina
- 4.- Plásmidos de virulencia, llevan genes virulentos
- 5.- Plásmidos catabólicos, encode enzymes for catabolism of unusual compounds

# Major Types of Bacterial Plasmids

Type	Function	Example	Size (kbp)	Hosts	Phenotypic Features <sup>1</sup>
<b>Conjugative Plasmids<sup>2</sup></b>	Transfer of DNA from one cell to another	F factor	95–100	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Citrobacter</i>	Sex pilus, conjugation
<b>R Plasmids</b>	Carry antibiotic-resistance genes	RP4	54	<i>Pseudomonas</i> and many other Gram-negative bacteria	Sex pilus, conjugation, resistance to Amp, Km, Nm, Tet
<b>Col Plasmids</b>	Produce bacteriocins, substances that destroy closely related species	ColE1	9	<i>E. coli</i>	Colicin E1 production
<b>Virulence Plasmids</b>	Carry virulence genes	Ti	200	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tumor induction in plants
<b>Metabolic Plasmids</b>	Carry genes for enzymes	CAM	230	<i>Pseudomonas</i>	Camphor degradation

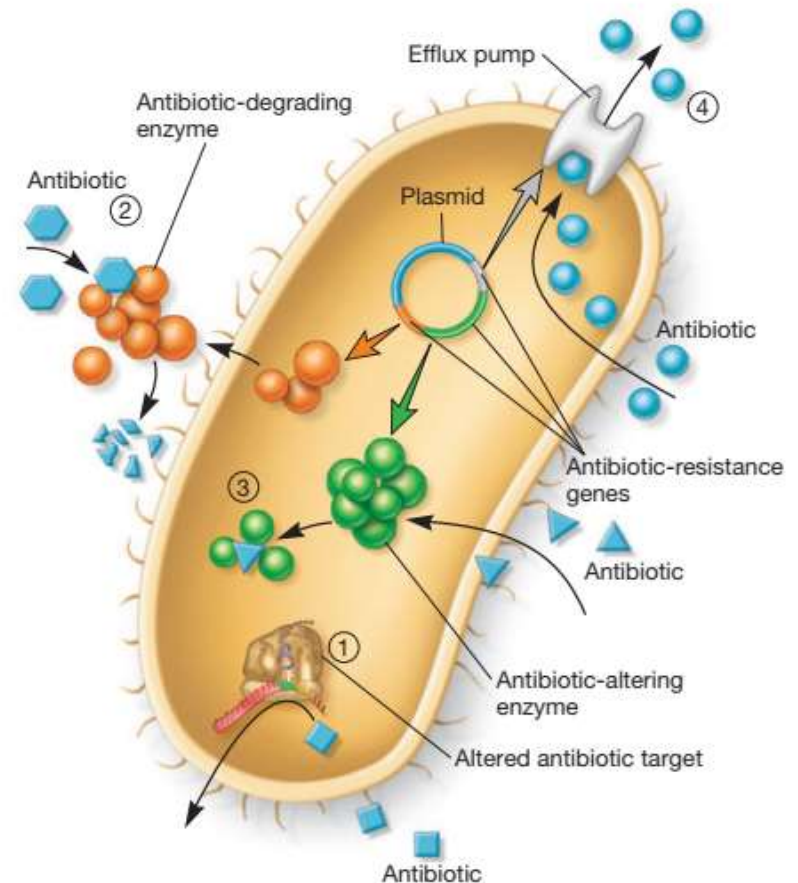
<sup>1</sup> Abbreviations used for resistance to antibiotics: Amp, ampicillin; Gm, gentamycin; Km, kanamycin; Nm, neomycin; Tet, tetracycline.

<sup>2</sup> Many R plasmids, metabolic plasmids, and others are also conjugative.

# Antibiotic-Resistance Mechanisms

Bacteria can resist the action of antibiotics by:

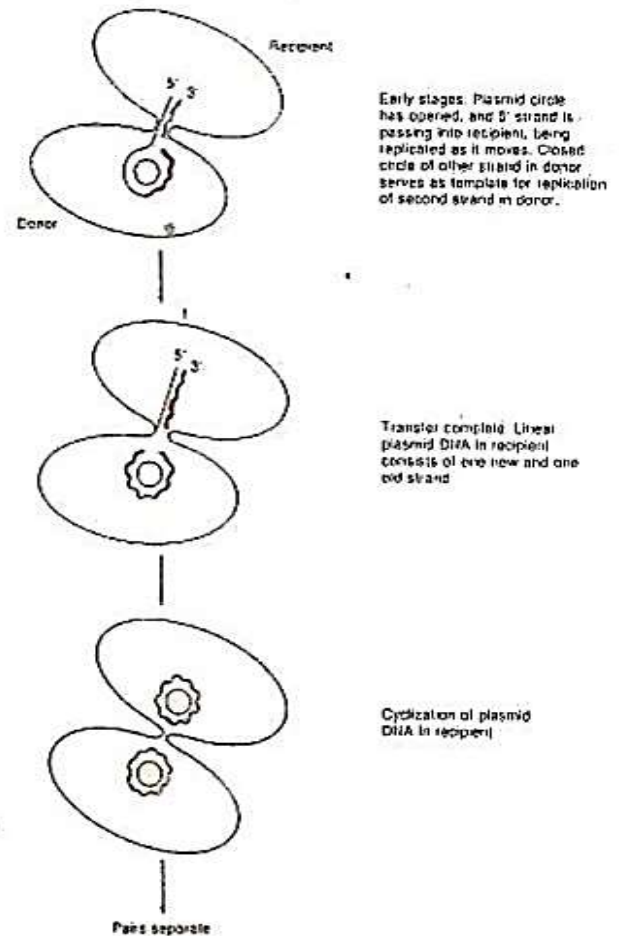
- (1) preventing access to (or altering) the target of the antibiotic
- (2) degrading the antibiotic
- (3) altering the antibiotic, or
- (4) rapidly extruding the antibiotic



# Conjugación

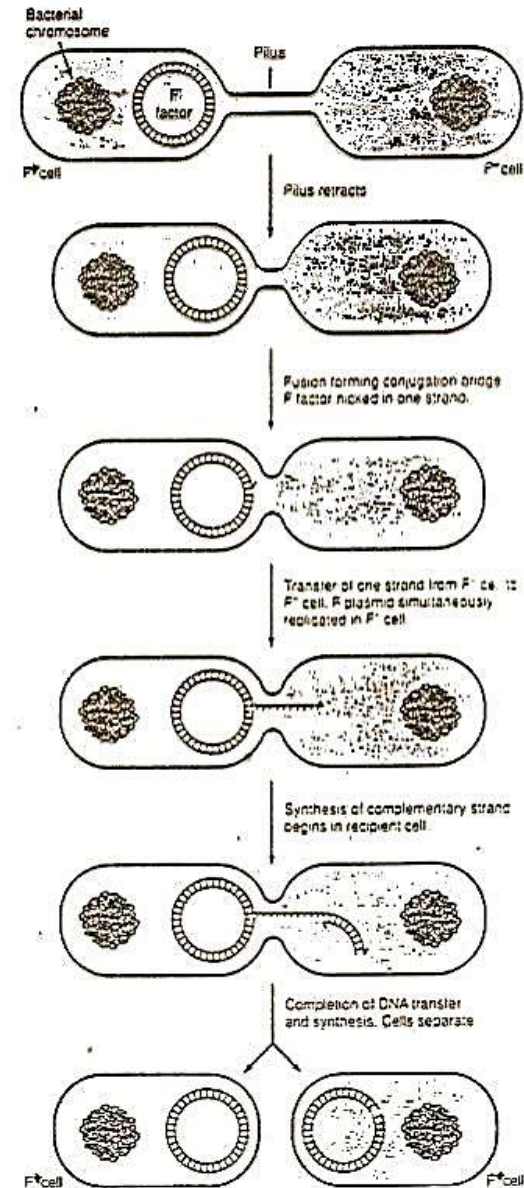
- La conjugación bacteriana o apareamiento es un proceso de transferencia genética que supone contacto célula a célula
- El material genético transferido puede ser un plásmido o una porción del cromosoma movilizada por el plásmido
- La célula donadora posee un plásmido conjugativo: plásmido F

Figure 7.11 Rolling circle DNA replication during transfer of plasmid DNA from donor to recipient. Compare with Figure 5.16. Only the plasmid DNA is shown.



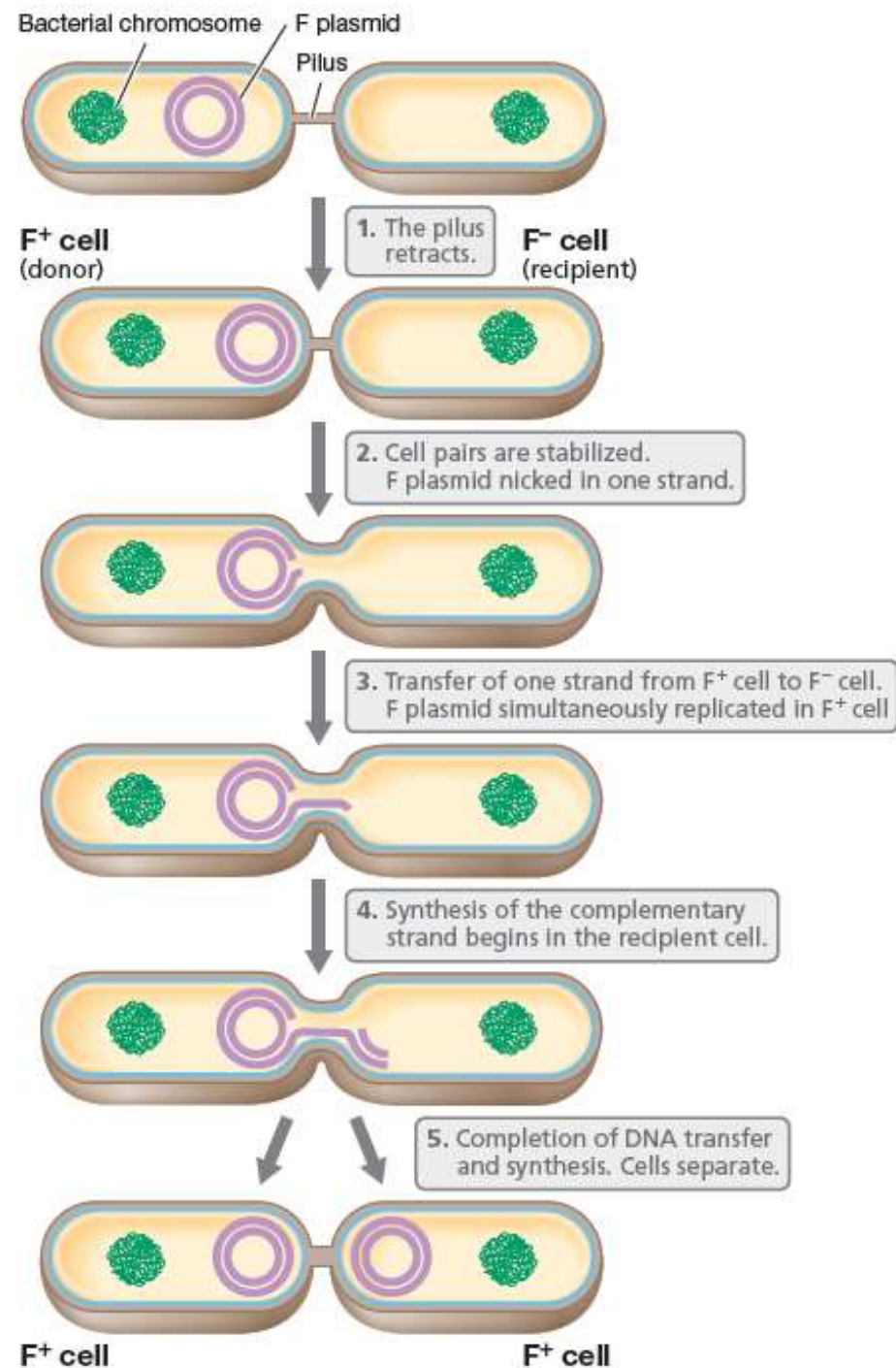
# ... conjugación

Una de las cadenas de DNA se deriva de la célula donadora y la otra es recién sintetizada en la receptora durante los procesos de transferencia: círculo rodante (rolling circle)



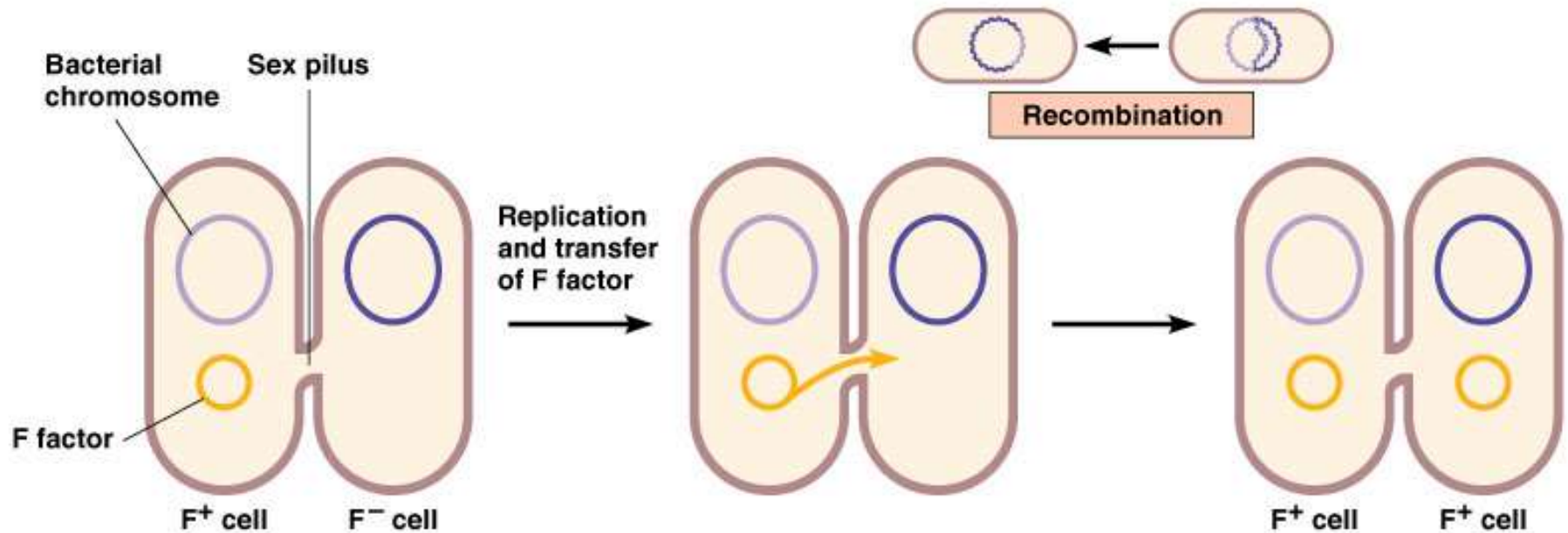
## Transfer of plasmid DNA by conjugation

The transfer of the F plasmid converts an F<sup>-</sup> recipient cell into an F<sup>+</sup> cell. Note the mechanism of rolling circle replication.



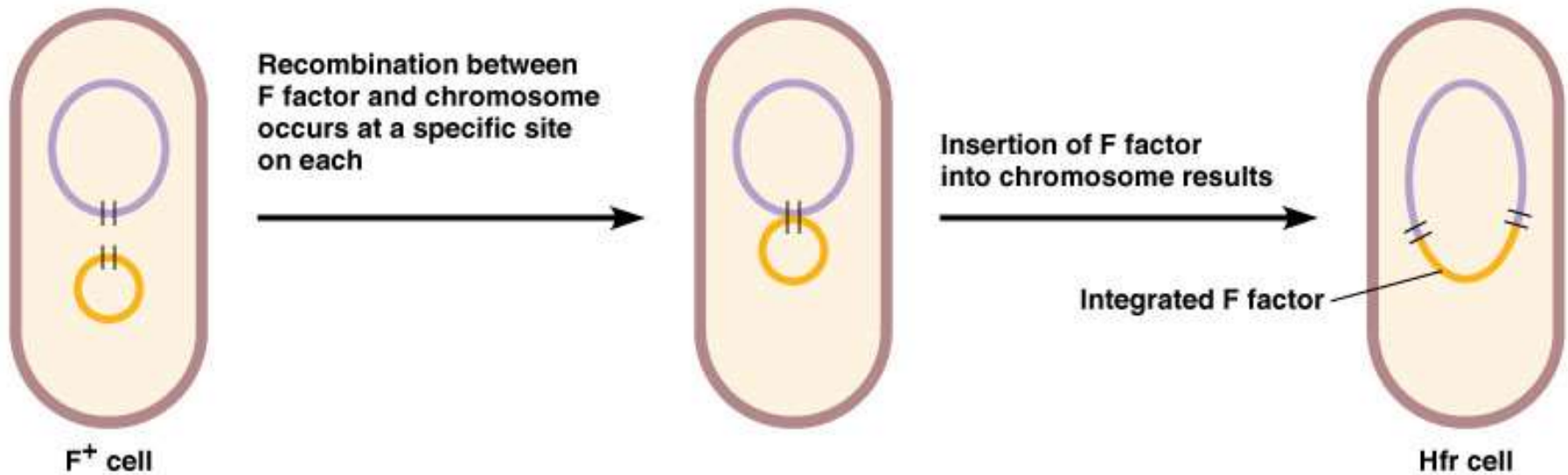


# Conjugación



**(a)** When an F factor (a plasmid) is transferred from a donor ( $F^+$ ) to a recipient ( $F^-$ ), the  $F^-$  cell is converted into an  $F^+$  cell.

# Conjugación



**(b)** When an F factor becomes integrated into the chromosome of an F<sup>+</sup> cell, it makes the cell a high frequency of recombination (Hfr) cell.



# Manipulación de genes

Ingeniería genética

# Ingeniería genética

- Genetic engineering refers to the use of in vitro techniques to alter genes in the laboratory. Such altered genes may be reinserted into the original source organism or into some other host organism. Expression of a gene from one organism in a different host organism is called heterologous expression.
- Genetic engineering requires that specific DNA be isolated, purified, and further manipulated.
- Tener grandes cantidades de DNA puro, permite la caracterización y manipulación de genes y sus productos

# Ingeniería genética: aplicaciones

La ingeniería genética tiene aplicaciones tanto en la investigación básica como en la aplicada

- **En la investigación básica:** Estudiar los mecanismos de replicación y la expresión de los genes, en los procariotas, eucariotas y los virus
- **En la investigación aplicada:** Desarrollo de cultivos bacterianos capaces de producir productos valiosos, por ejemplo, la insulina humana, la hormona de crecimiento, el interferón, vacunas y enzimas.

# Molecular Cloning

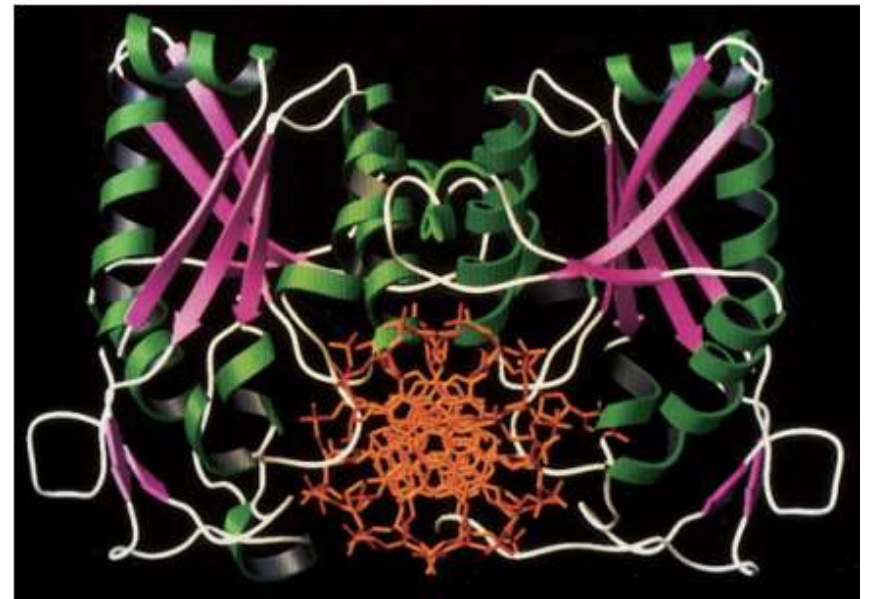
- The movement of desired genes from their original source to a small and manipulable genetic element (the vector) is called **molecular cloning**.
- Molecular cloning results in **recombinant DNA**, a molecule containing DNA from different sources.
- Once cloned, the gene(s) of interest can be manipulated, and when the recombinant vector is placed in an appropriate host, the cloned DNA is replicated.

# Molecular Cloning

- La clonación de genes es la base de la mayor parte de los procedimientos de ingeniería genética.
- **Objetivo de la clonación de genes:** Aislar grandes cantidades de genes específicos en forma pura
- **Estrategia básica de clonación de genes:** Trasladar el gen deseado de un genoma complejo grande a uno pequeño sencillo.

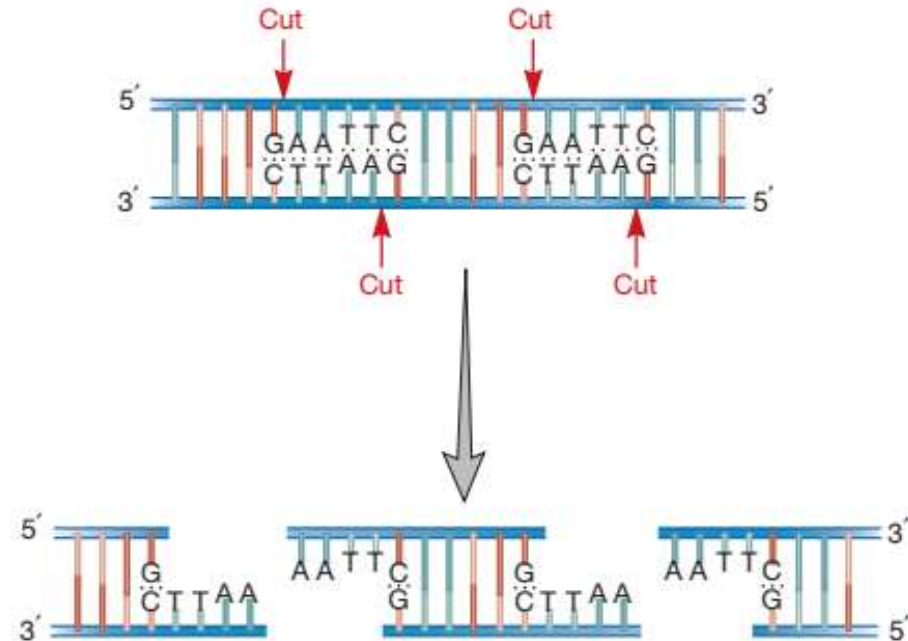
# Restriction Enzymes

- Recombinant DNA is DNA with a new nucleotide sequence. Such DNA is formed by joining fragments from two or more different sources.
- These enzymes, known as restriction enzymes or restriction endonucleases, recognize and cleave specific sequences about four to eight base pairs long.



Restriction Endonuclease Bound to DNA. The structure of BamHI bound to DNA viewed down the DNA axis. The enzyme's two subunits lie on each side of the DNA double helix. The  $\alpha$ -helices are in green, the  $\beta$  conformations in purple, and the DNA is in orange.

- Restriction enzymes identify specific DNA sequences called recognition sites. Each restriction enzyme has its own recognition site.
- Type I and type III endonucleases identify their unique recognition sites and then cleave DNA at a defined distance from it.
- The more common type II endonucleases cut DNA directly at their recognition sites. For example, the restriction enzyme EcoRI, cleaves DNA between G and A in the base sequence 5'-GAATTC-3'.



Restriction Endonuclease Action. The cleavage catalyzed by the restriction endonuclease EcoRI. The enzyme makes staggered cuts on the two DNA strands to form sticky ends.

# Some Type II Restriction Endonucleases and Their Recognition Sequences

Enzyme	Microbial Source	Recognition Sequence <sup>a</sup>	End Produced
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	5' AGCT 3' 3' TCGA 5' ↓ ↑	5' AG    CT 3' 3' TC    GA 5'
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	5' GGATCC 3' 3' CCTAGG 5' ↓ ↑	5' G            GATCC 3' 3' CCTAG        G 5'
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	5' GAATTC 3' 3' CTTAAG 5' ↓ ↑	5' G            AATTC 3' 3' CTTAA        G 5'
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5' GGCC 3' 3' CCGG 5' ↓ ↑	5' GG    CC 3' 3' CC    GG 5'
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> d	5' AAGCTT 3' 3' TTCGAA 5' ↓ ↑	5' A            AGCTT 3' 3' TTCGA        A 5'
<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	5' GCGGCCGC 3' 3' CGCCGGCG 5' ↓ ↑	5' GC            GGCCGC 3' 3' CGCCGG        CG 5'
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>	5' CTGCAG 3' 3' GACGTC 5' ↓ ↑	5' CTGCA        G 3' 3' G            ACGTC 5'
<i>SaI</i>	<i>Streptomyces albus</i>	5' GTCGAC 3' 3' CAGCTG 5' ↓ ↑	5' G            TCGAC 3' 3' CAGCT        G 5'

<sup>a</sup>The arrows indicate the sites of cleavage on each strand



# An Overview of Gene Cloning

## 1.- **Isolation and fragmentation of the source DNA.**- Puede ser:

DNA genómico total de un organismo de interés

DNA sintetizado a partir de una matriz de RNA por la transcriptasa inversa

DNA sintetizado a partir de nucleótidos in vitro.

## 2.- **Inserting the DNA fragment into a cloning vector**, con DNA ligasa

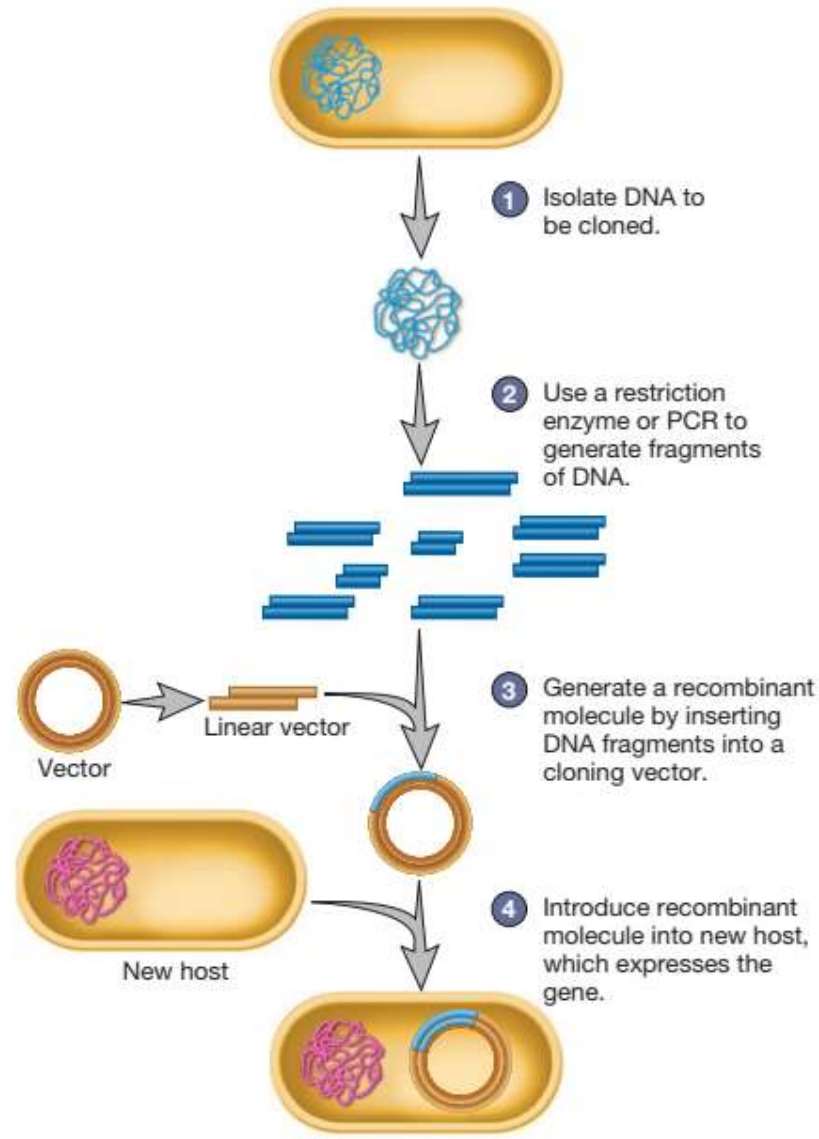
**Vector de clonación.**- Pequeños elementos genéticos que se replican en forma independiente y se usan para replicar genes. Los vectores de clonación son diseñados para permitir la integración de DNA extraño.

## 3.- **Introduction of the cloned DNA into a host organism.**- El DNA recombinante se puede introducir a un organismo huésped por transformación

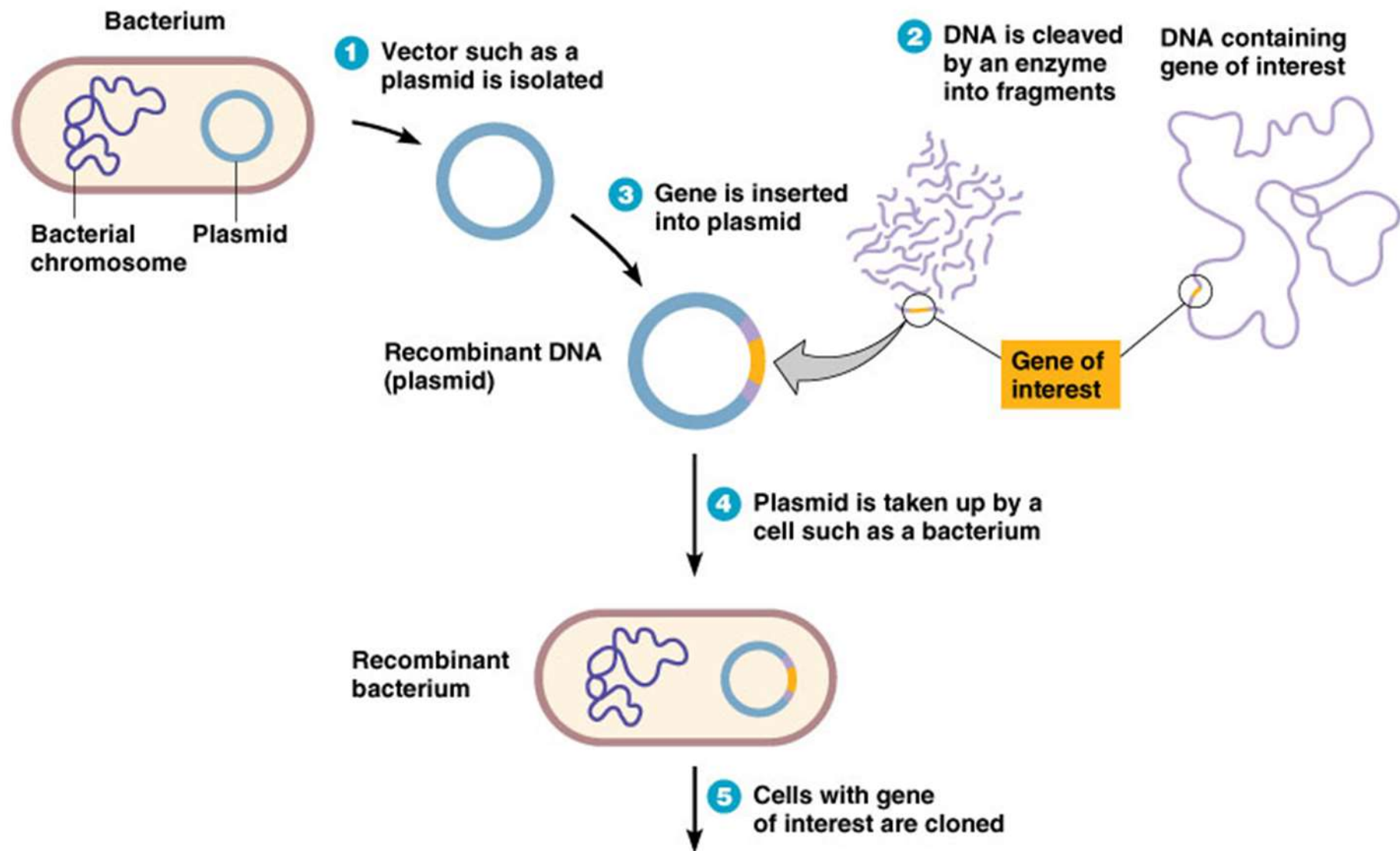
## 4.- **Detection and purification of the desired clone:**

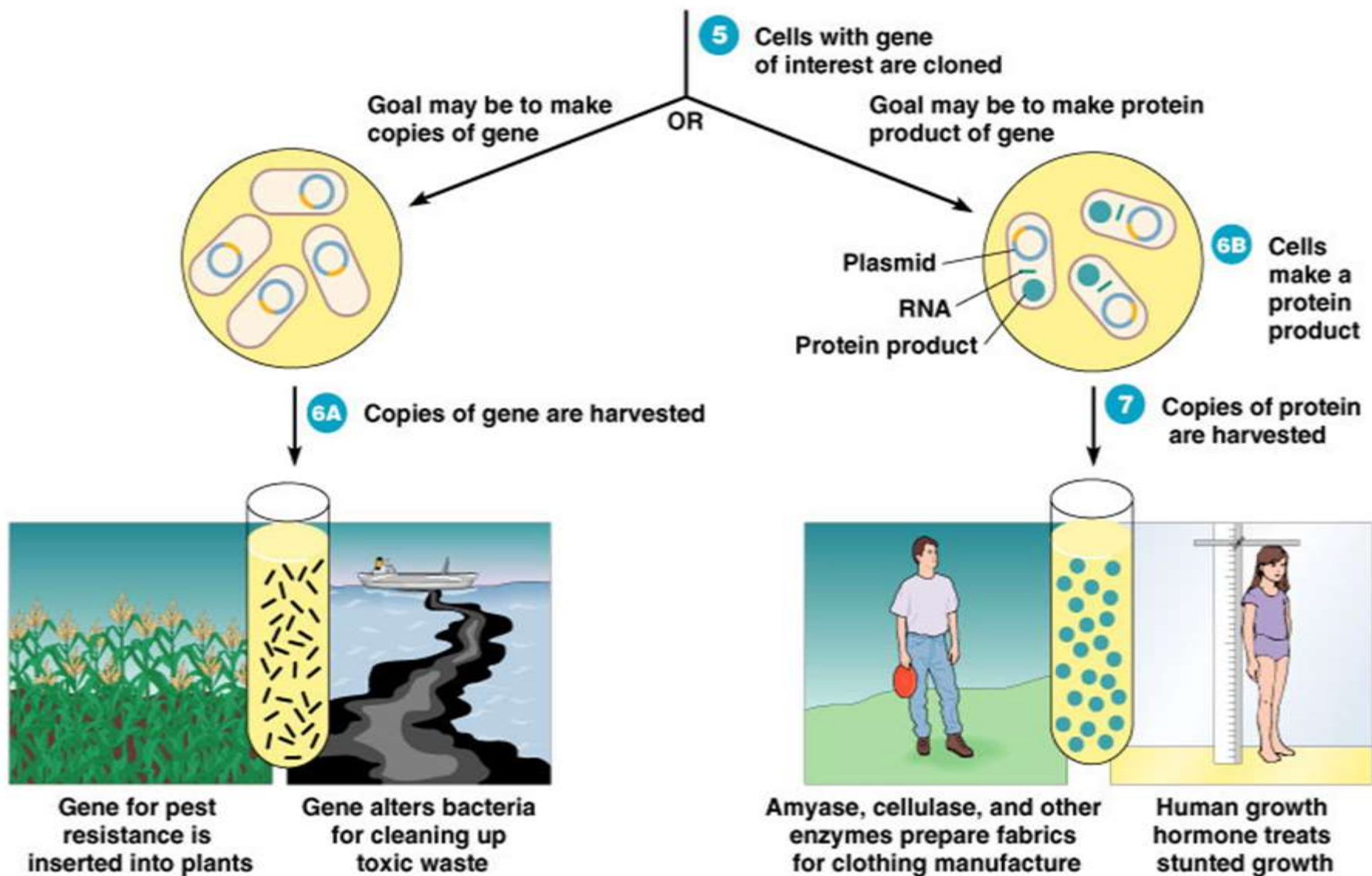
## 5.- **Production of large numbers of cells** que contienen el clon deseado para aislar y estudiar el DNA clonado.

# Steps in Cloning a Gene



*Which of the DNA molecules shown are recombinant?*





# Los plásmidos como vectores de clonación

Los plásmidos tienen propiedades muy útiles como vectores de clonación:

- 1.- Tamaño pequeño, que hacen al DNA más fácil de aislar y de manipular.
- 2.- DNA circular, que hace al DNA más estable durante el aislamiento químico.
- 3.- Origen de replicación independiente, de modo que su replicación en la célula se efectúa fuera del control celular directo.
- 4.- Puede estar presente en la célula en varias o numerosas copias, haciendo posible la amplificación del DNA.
- 5.- Frecuentemente, tienen resistencia a los antibióticos, lo que hace más fácil la detección y la selección de los clones que contienen el plásmido.

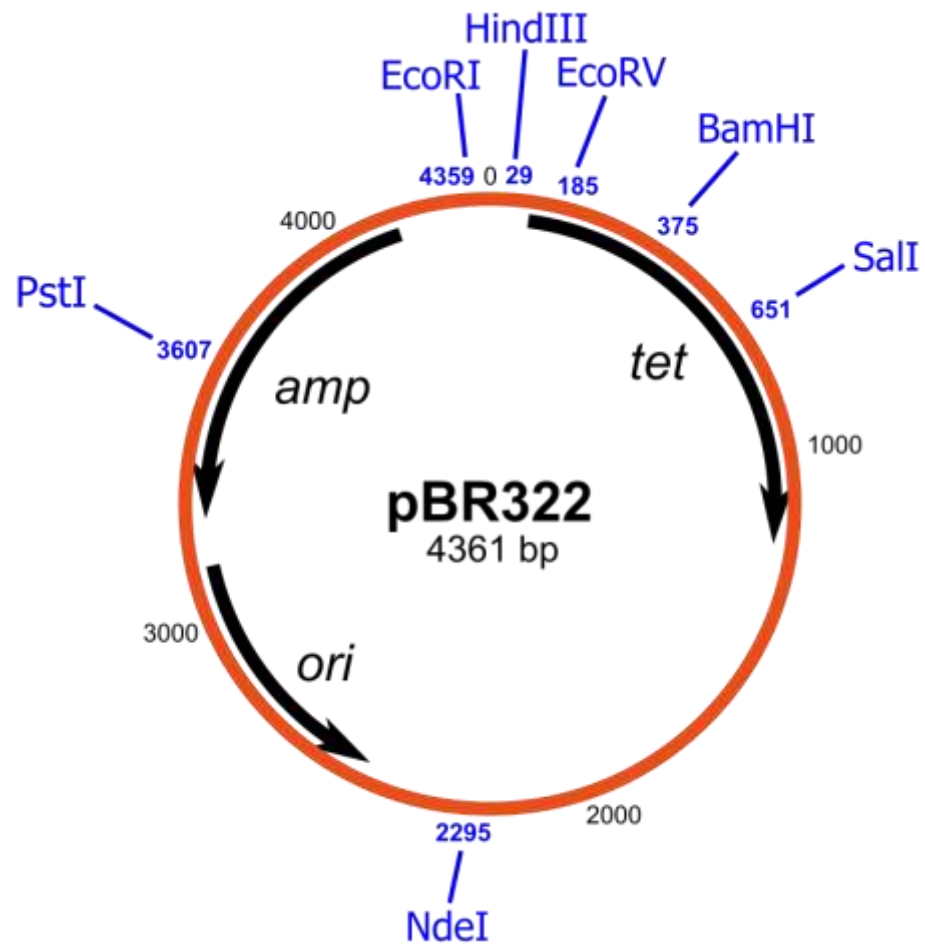
Control celular relajado.- Se hace una gran cantidad de copias

Control estricto.- Se hacen pocas copias

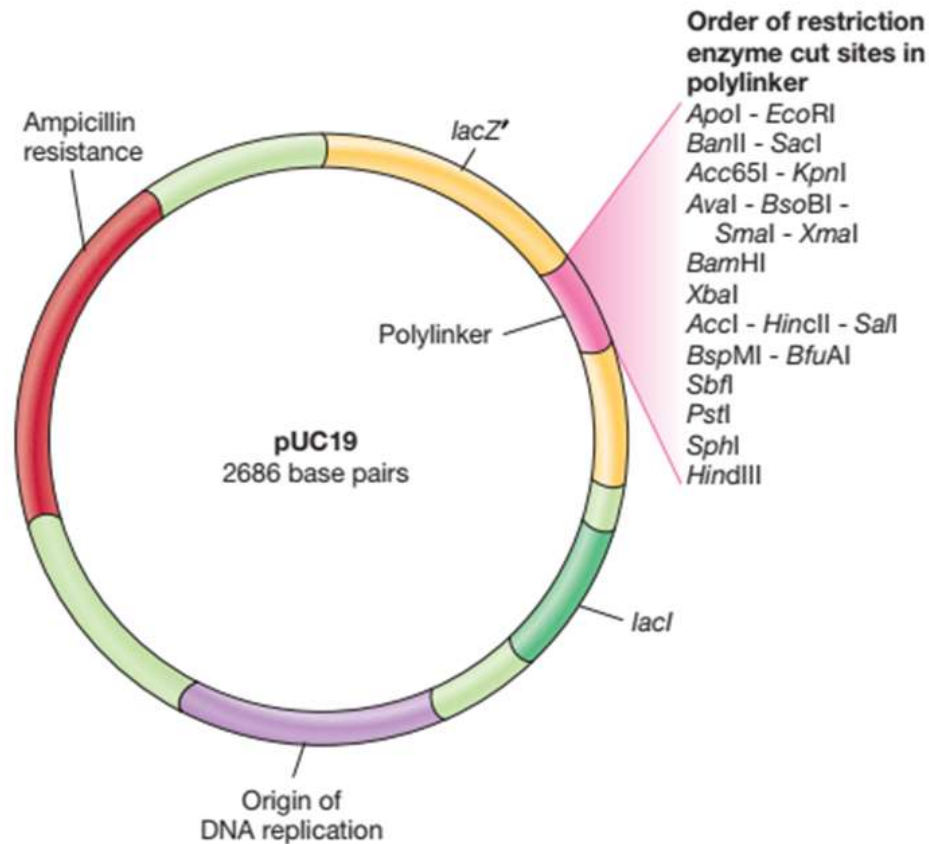
Es importante lograr alta cantidad de copias

# Plásmido pBR322

- 1.- Es relativamente pequeño,  $2,6 \times 10^6$
- 2.- Se mantiene estable en su huésped (*E. coli*) en una cantidad relativamente alta de copias: 20-30 copias por célula.
- 3.- Se puede amplificar a una cantidad muy alta de copias (1000-3000 copias por célula).
- 4.- Es fácil de aislar en forma superenrollada.
- 5.- Se puede insertar una gran cantidad de DNA extraño; hasta 10 Kb.
- 6.- Se conoce la secuencia completa de bases de este plásmido de 4 361 nucleótidos de largo.
- 7.- Hay sitios únicos de ruptura para varias enzimas de restricción como Pst1, Sall, EcoRI, HindIII, BamHI y otros más.
- 8.- Tiene dos marcadores de resistencia a antibióticos, ampicilina y tetraciclina, lo cual permite la fácil selección de los huéspedes que contienen el plásmido.
- 9.- Se pueden usar fácilmente en la transformación.



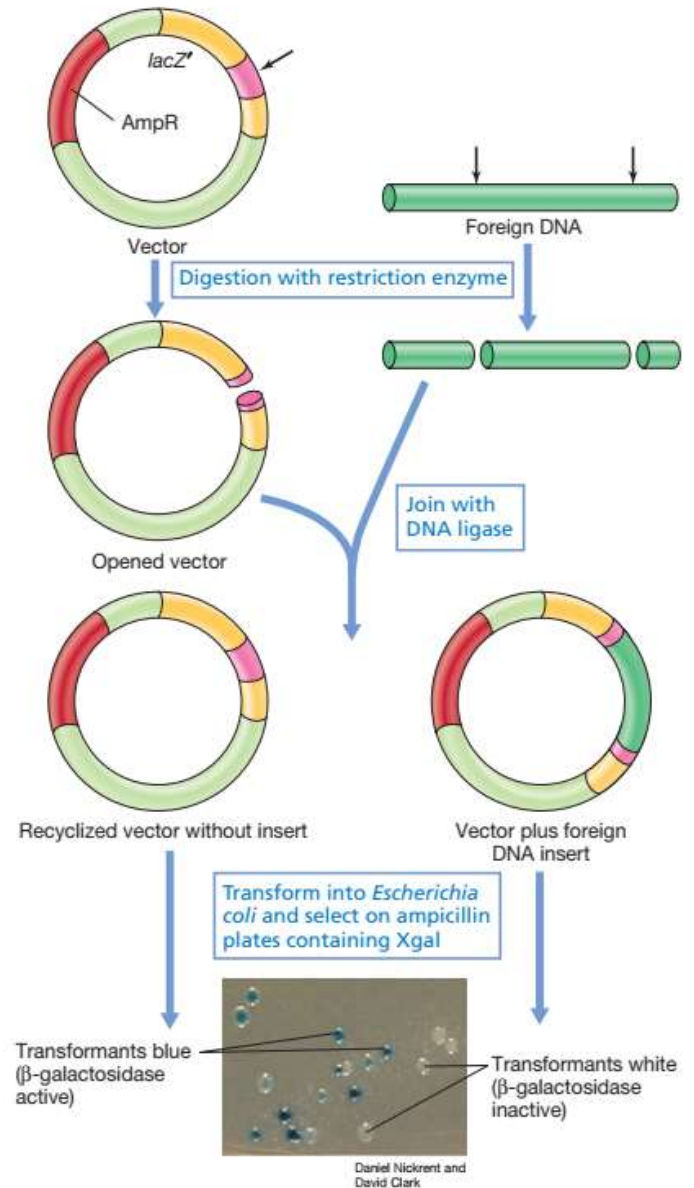
# Cloning vector plasmid pUC19



Essential features include an ampicillin resistance marker and the polylinker with multiple restriction enzyme cut sites. Insertion of cloned DNA within the polylinker inactivates the truncated *lacZ'* gene that encodes part of  $\beta$ -galactosidase and allows for easy identification of transformants by blue–white screening



# Cloning into the plasmid vector pUC19



The cloning vector is opened by cutting with a suitable restriction enzyme in the polylinker. Insertion of DNA inactivates  $\beta$ -galactosidase, allowing blue–white screening for the presence of the insert. The photo on the bottom shows colonies of *Escherichia coli* on an Xgal plate. The enzyme  $\beta$ -galactosidase can cleave the normally colorless Xgal to form a blue product.

# Bacteriophage Lambda as a Cloning Vector

El bacteriófago  $\lambda$ , es un vector de clonación útil:

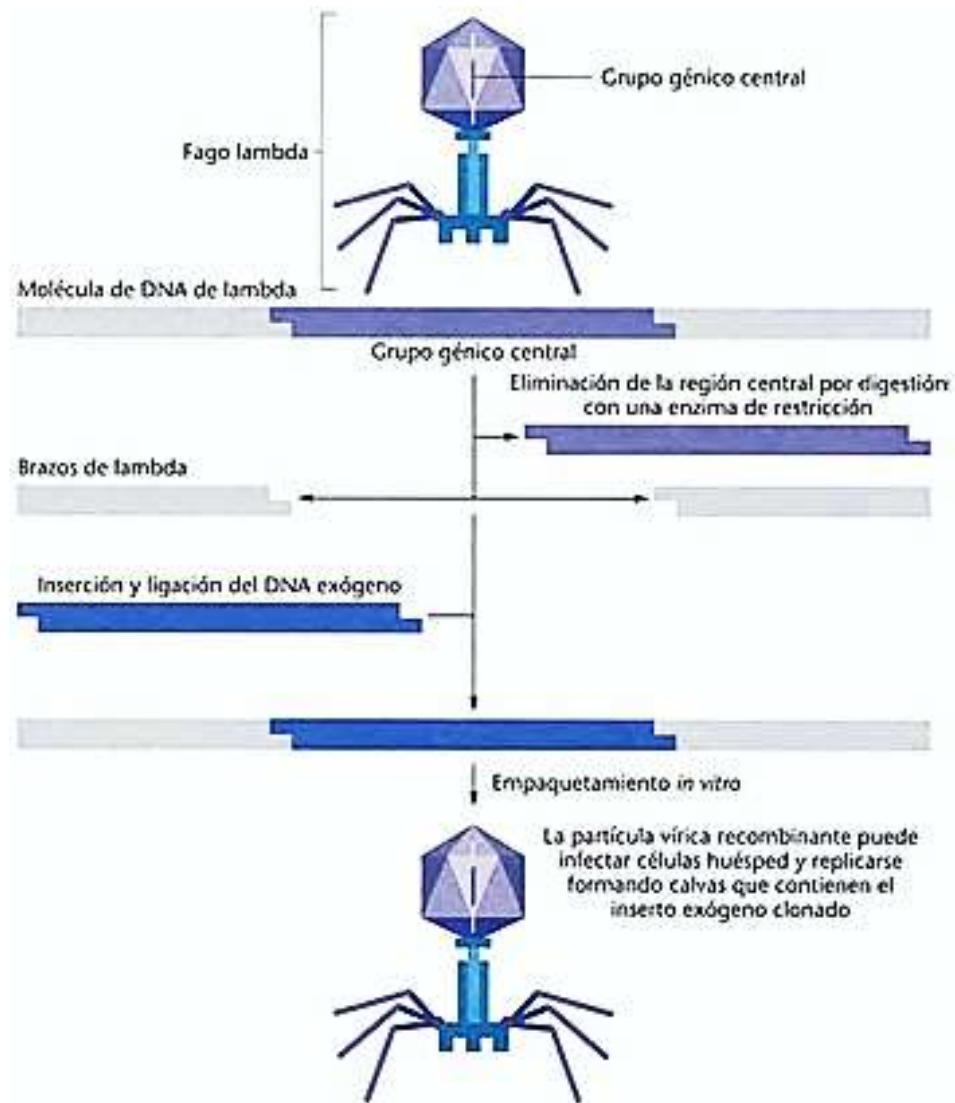
- Su genética molecular es bien conocida
- Puede contener más cantidad de DNA que la mayoría de los plásmidos
- Su DNA puede empaquetarse eficazmente en las partículas del fago in vitro.

## **Fagos lambda modificados**

- El fago lambda de tipo salvaje no es muy apropiado como vector de clonación porque tiene demasiados sitios de cortes de enzimas de restricción, lo cual hace difícil la introducción de cortes únicos sencillos.
- En el fago lambda modificado se han eliminado los sitios de corte de la enzima de restricción (ER) no deseados por mutación puntual, omisión o sustitución.

# Etapas de la clonación con lambda

- 1.- **Aislamiento del DNA** vector a partir de partículas de fago y digestión con ER apropiada.
- 2.- **Conexión de los dos fragmentos** lambda a fragmentos de DNA extraño usando DNA ligasa.
- 3.- **Encapsidación** del DNA por adición de extractos celulares que contienen las proteínas de la cabeza y de la cola y que permiten la formación de fagos viables.
- 4.- **Infección** de *E. coli* y aislamiento de los clones del fago, por formación de calvas en una cepa del huésped.
- 5.- **Comprobación** del fago recombinante por la presencia de la secuencia deseada en el DNA extraño mediante procedimientos de hibridación o de observación de las propiedades genéticas.



La viabilidad de las partículas del fago es baja si el DNA es más largo del 105 % del DNA normal de lambda, de tal modo que fragmentos realmente largos (más de 20 000 bases) no pueden clonarse eficientemente.

Entonces, **cósmidos**

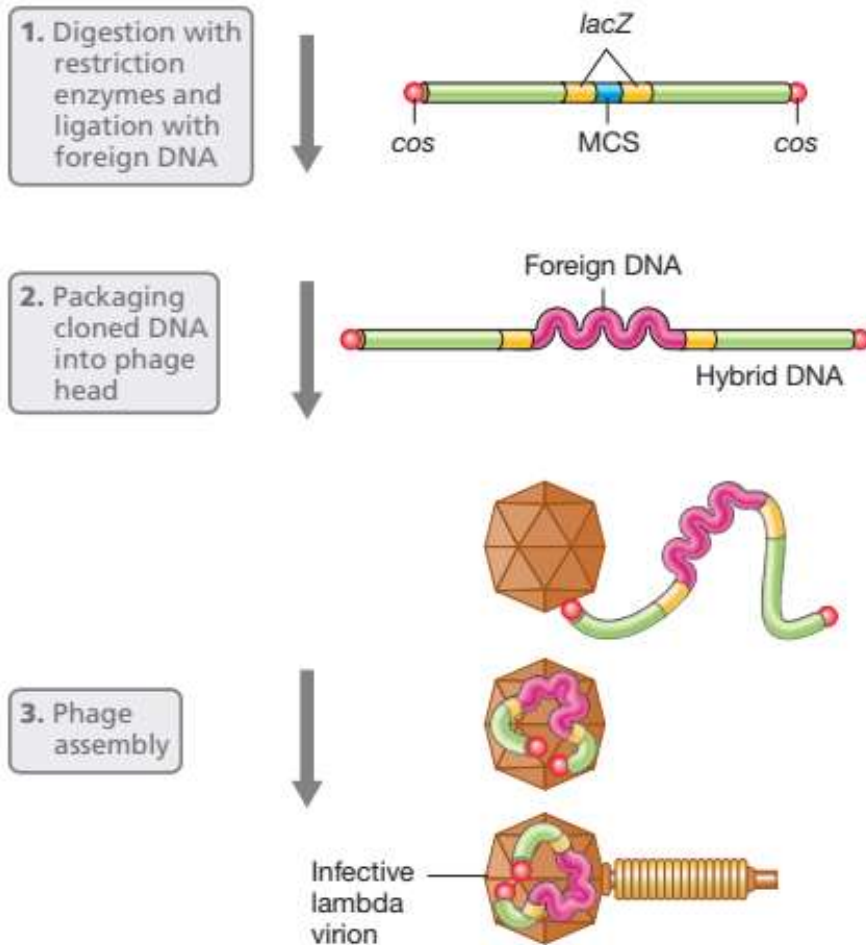
# CÓSMIDOS

- Los cósmidos se construyen a partir de plásmidos que contienen DNA clonado, ligando la región cos del lambda al DNA del plásmido
- Son plásmidos modificados que llevan una copia de las secuencias de DNA (secuencias cos) requeridos para el empaquetamiento del DNA dentro del bacteriófago
- Los vectores cósmidos fueron diseñados para clonar y propagar grandes fragmentos de DNA genómico

## **Ventajas:**

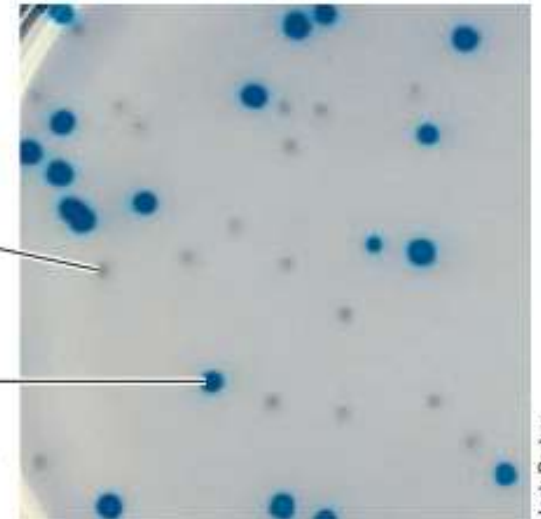
- Se utiliza para clonar segmentos muy grandes de DNA
- El DNA se puede almacenar en el fago en lugar del plásmido. Los fagos son más estables que los plásmidos, el DNA recombinante se puede almacenar por más tiempo

# Bacteriophage lambda as a cloning vector



Phage in clear plaques have cloned DNA

Phage in blue plaques do not have cloned DNA



(b) Portion of an Xgal-containing agar plate showing white plaques formed by lambda phage containing cloned DNA and blue plaques formed by phage lacking cloned DNA.

(a) Insertion of foreign DNA into lambda DNA modified to contain an MCS within a *lacZ* gene and subsequent packaging of a recombinant infective lambda virion. The maximum size of inserted DNA is about 20 kbp.

# Hospedadores de los vectores de clonación

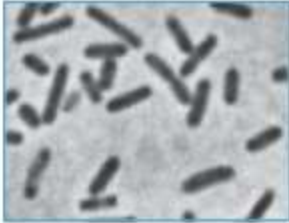
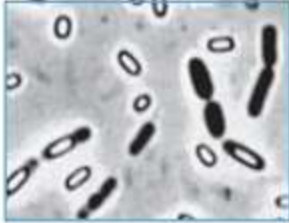
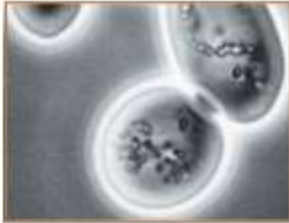
## Características

- a) Crecimiento rápido
- b) Capacidad de crecer en medios de cultivos baratos
- c) No perjudicial ni patógeno
- d) Transformable por DNA y estable en cultivos

Los hospedadores más útiles para la clonación son microorganismos que crecen fácilmente y para los que se dispone de abundante información genética son: *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*.



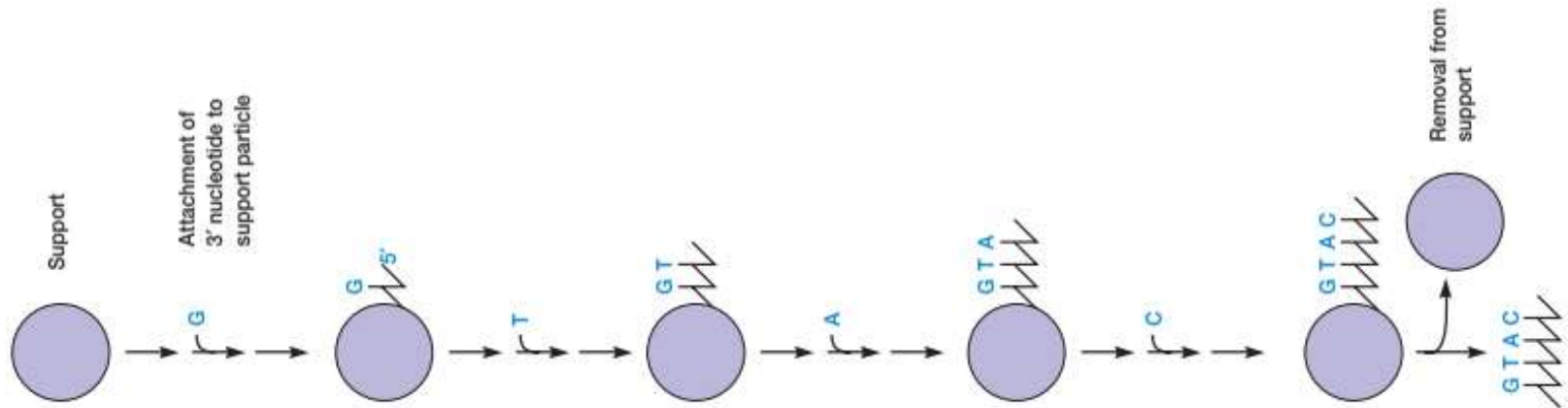
# Hosts for molecular cloning

Bacteria		Eukaryote
<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
		
Well-developed genetics Many strains available Best-known bacterium	Easily transformed Nonpathogenic Naturally secretes proteins Endospore formation simplifies culture	Well-developed genetics Nonpathogenic Can process mRNA and proteins Easy to grow
Potentially pathogenic Periplasm traps proteins	Genetically unstable Genetics less developed than in <i>E. coli</i>	Plasmids unstable Will not replicate most bacterial plasmids
Advantages		Disadvantages

A summary of the advantages and disadvantages of some common cloning hosts

# DNA SINTÉTICO

- Se pueden sintetizar artificialmente fragmentos de DNA para usarlos como cebadores o sondas para la reacción en cadena de la polimerasa, la hibridación de ácidos nucleicos, etc.
- El DNA se sintetiza por un procedimiento en fase sólida en el cual el primer nucleótido de la cadena se sujeta a un soporte poroso insoluble (Por ejemplo, gel de sílice, 50  $\mu\text{m}$  de diámetro)
- Se necesita varias etapas químicas para la adición de cada uno de los nucleótidos. Una vez completada cada etapa, la fase sólida que contiene el oligonucleótido en crecimiento se elimina de la mezcla de reacción por filtración o por centrifugación
- Las moléculas de DNA sintético son muy usadas como sondas en ingeniería genética, para detectar vía hibridación de ácido nucleico, las secuencias específicas de DNA



Hoy, resulta posible unir un extremo de la cadena a una bolita de resina (soporte) en una columna a través de la cual pueden ser pasados secuencialmente los nucleótidos y los reactivos químicos adecuados, lo que permite automatizar el procedimiento.

# AMPLIFICACIÓN DEL DNA

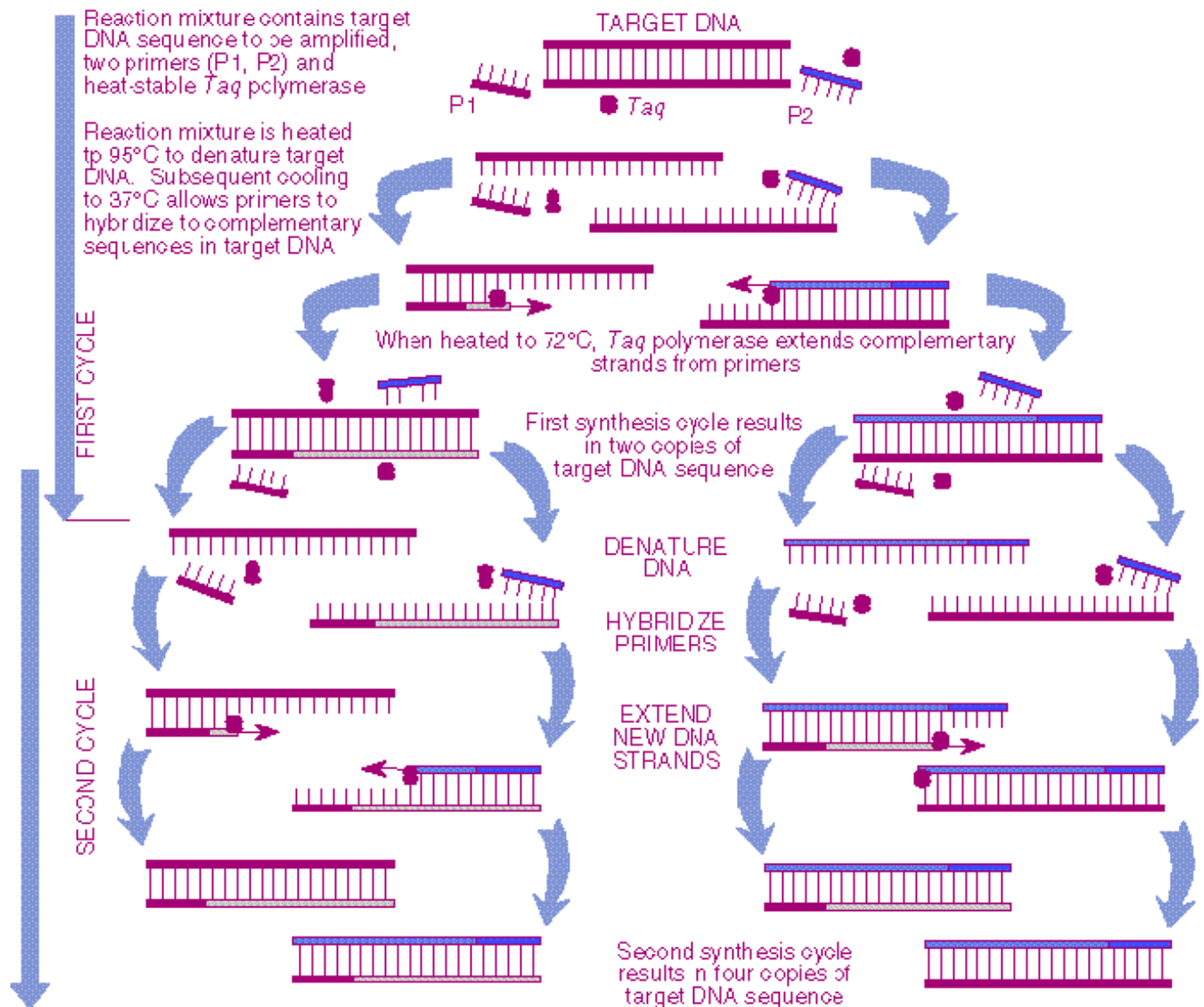
- La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR (Polymerase Chain Reaction), desarrollada en 1986 por Kary Mullis
- Objetivo: obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

Termociclador



# DNA Amplification Using Polymerase Chain Reaction

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- Requiere el conocimiento de la secuencia de nucleótidos de una porción del gen deseado



# EXPRESIÓN DE GENES DE MAMÍFEROS EN BACTERIAS

- Para que los genes clonados de mamíferos sean expresados en una bacteria es esencial que el gen del mamífero sea insertado junto al promotor, y que esté presente un sitio de unión del ribosoma, también es esencial que el marco de lectura sea la correcta.

# RESULTADOS PRÁCTICOS DE LA INGENIERÍA GENÉTICA

- 1.- Fermentaciones microbianas, producción de antibióticos
- 2.- Vacunas víricas
- 3.- Proteínas de mamíferos
- 4.- Plantas y animales transgénicos
- 5.- Biotecnología ambiental

# Resumen de los fundamentos en la que se apoya la ingeniería genética

Los siguientes avances fueron esenciales para el perfeccionamiento de la ingeniería genética

- Química del DNA
- Enzimología del DNA
- Replicación del DNA
- Plásmidos
- Bacteriófagos temperados
- Transformación
- RNA: química y enzimología
- Transcripción inversa
- Regulación
- Traducción
- Química de las proteínas
- Excreción de proteína y modificación post traduccional
- Código genético