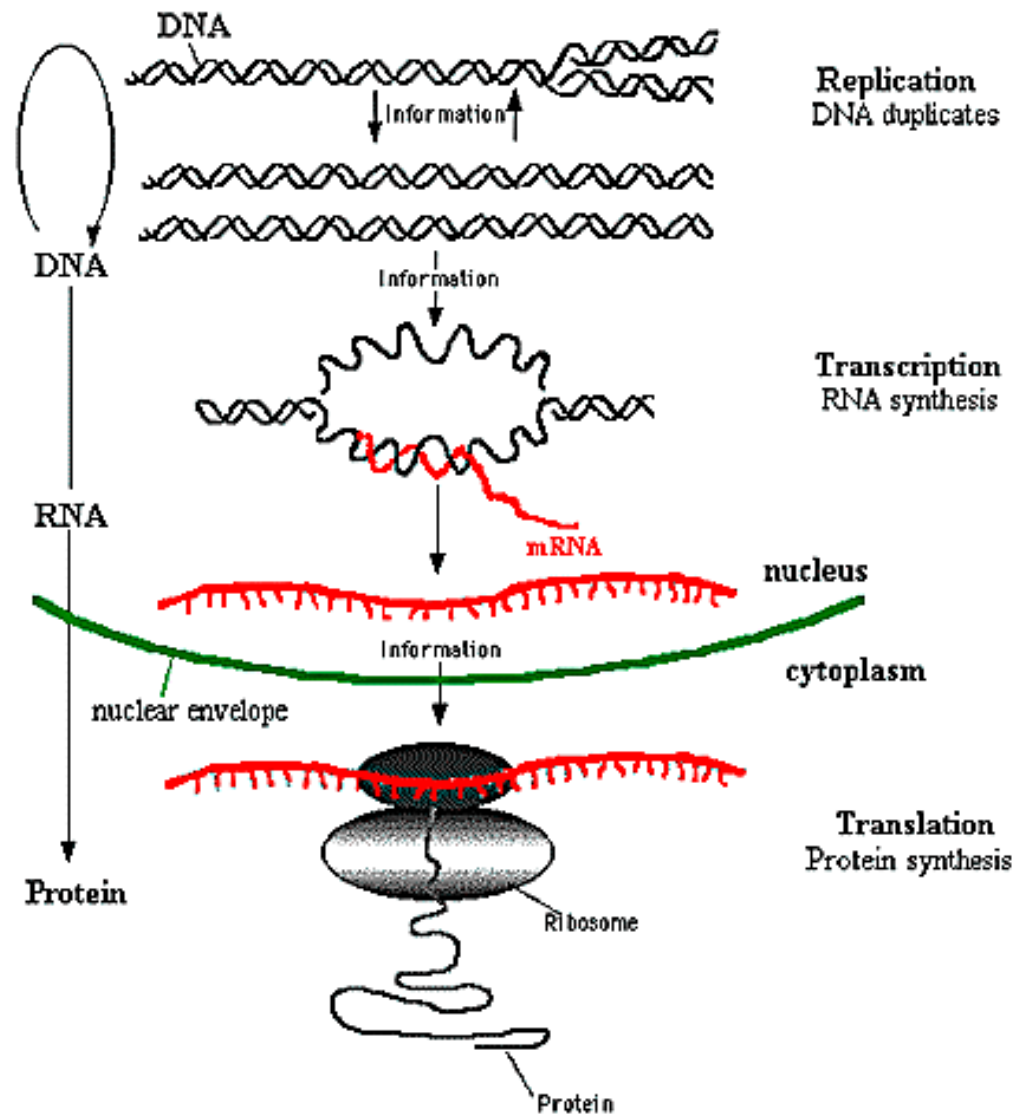


BIOTECNOLOGIA



The Central Dogma of Molecular Biology

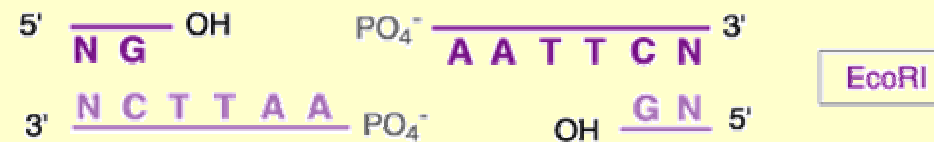
Enzimas de restricción

- Endonucleasas que reconocen dianas específicas en el ADN
- Protegen a cada cepa de bacterias de otro ADN que no pertenece al sistema
- El ADN propio está protegido porque las dianas de restricción están metiladas (metilasa)
- Clasificación
 - Tipo I
 - Tipo II
 - Tipo III
 - Otros tipos

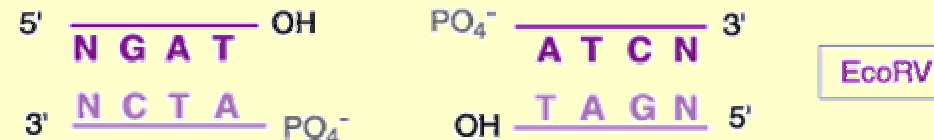
Enzimas de restricción de tipo II

- Son las mejor estudiadas
- Cortan en el mismo lugar que reconocen
- Las secuencias diana son palindrómicas (capicúa):

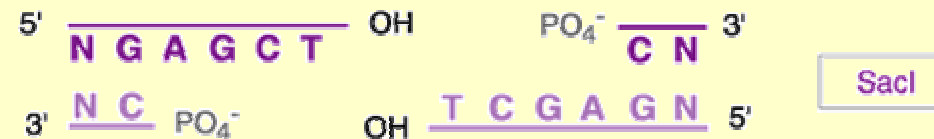
(a) 5' Staggered ends



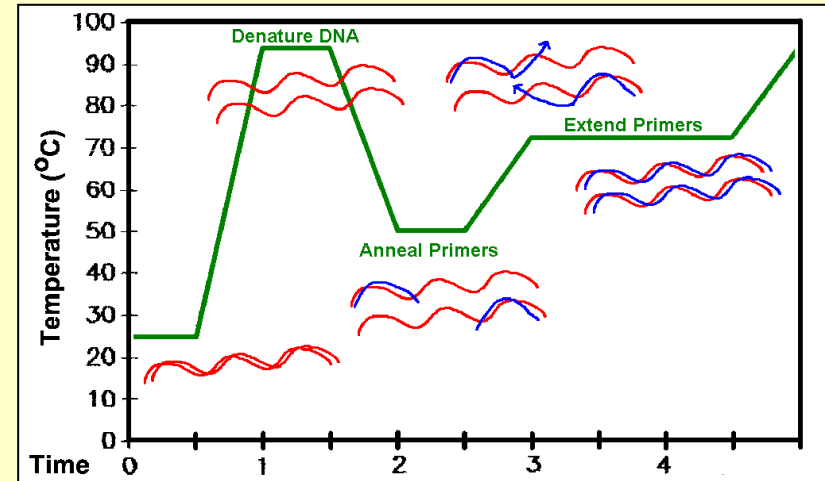
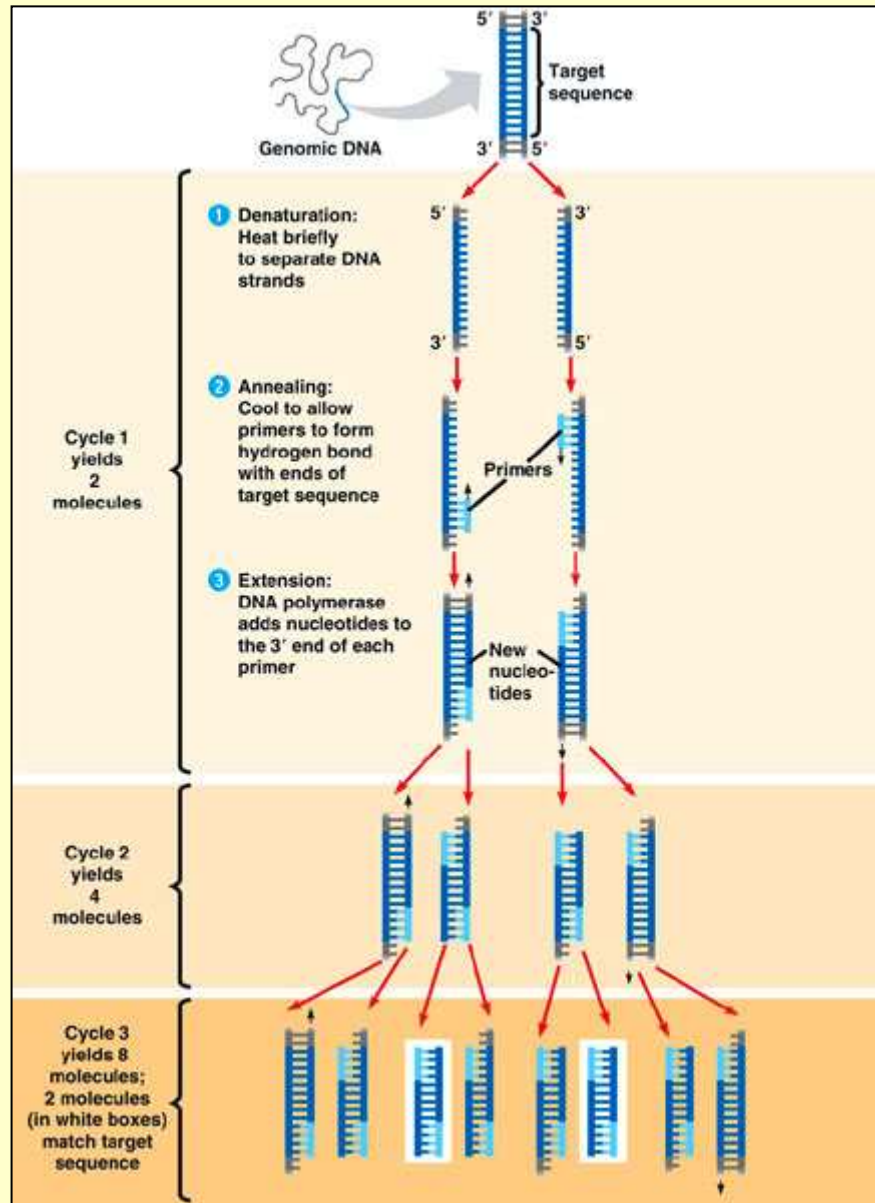
(b) Blunt ends



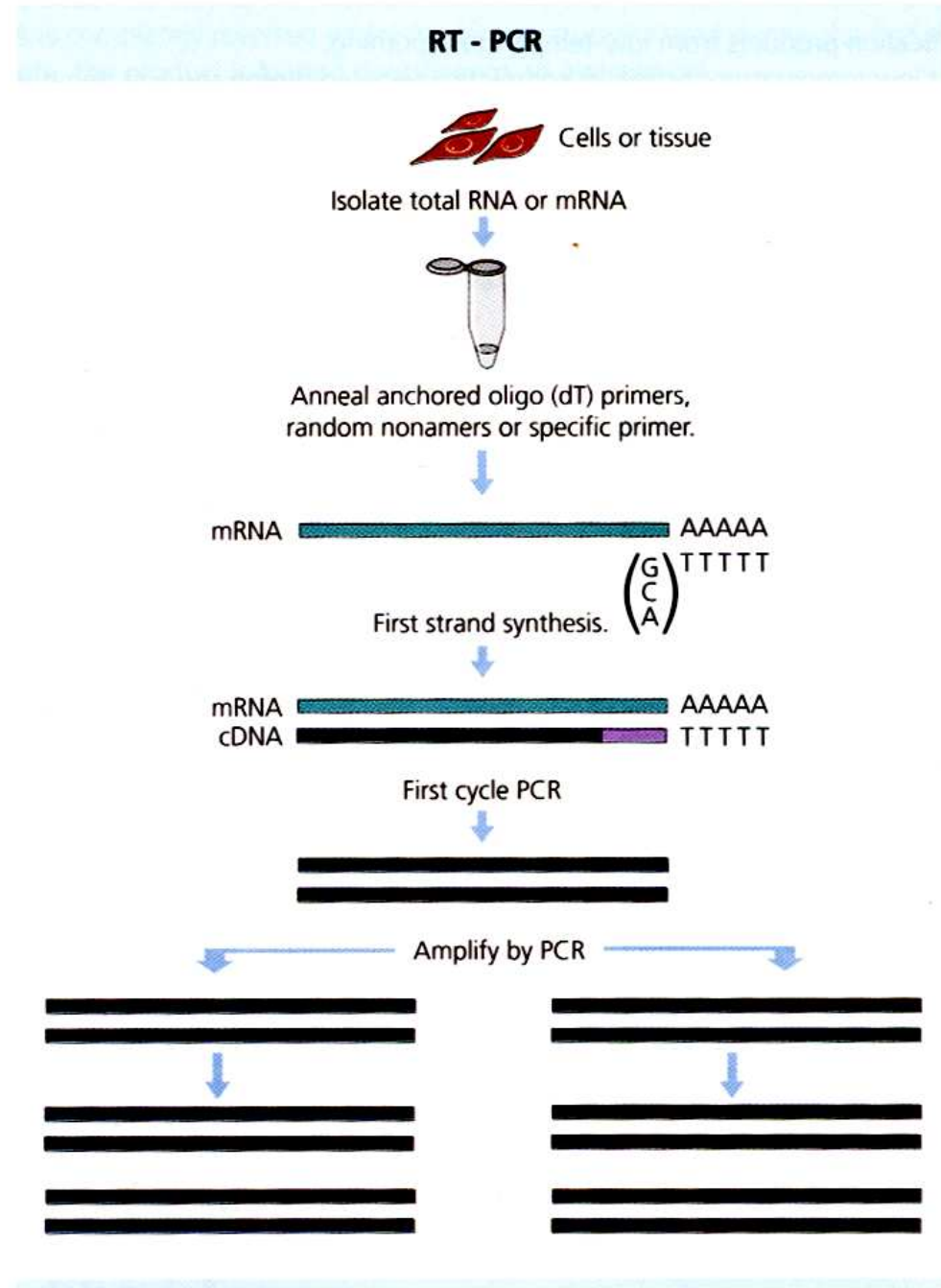
(c) 3' Staggered ends



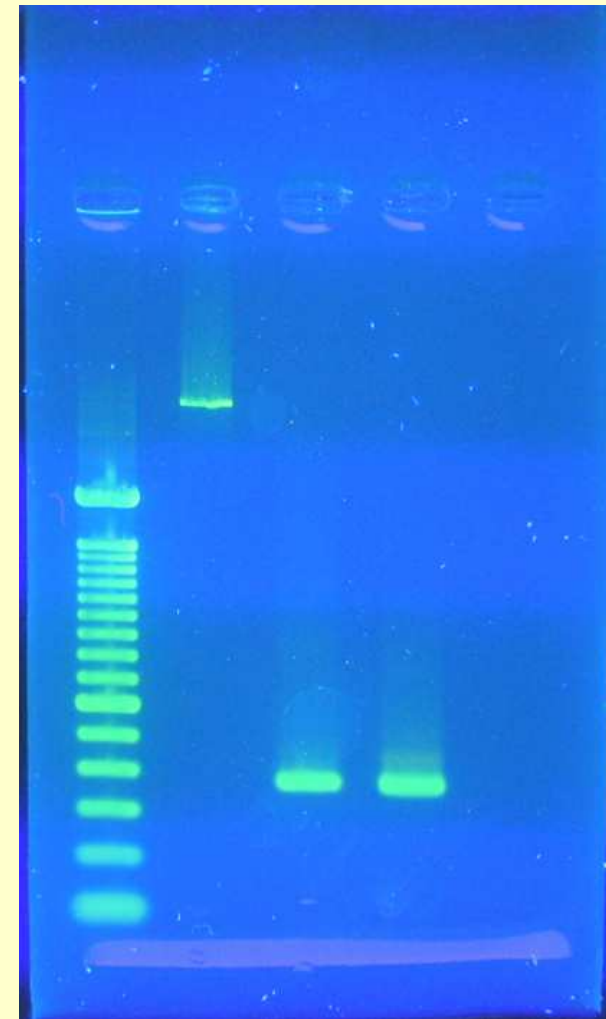
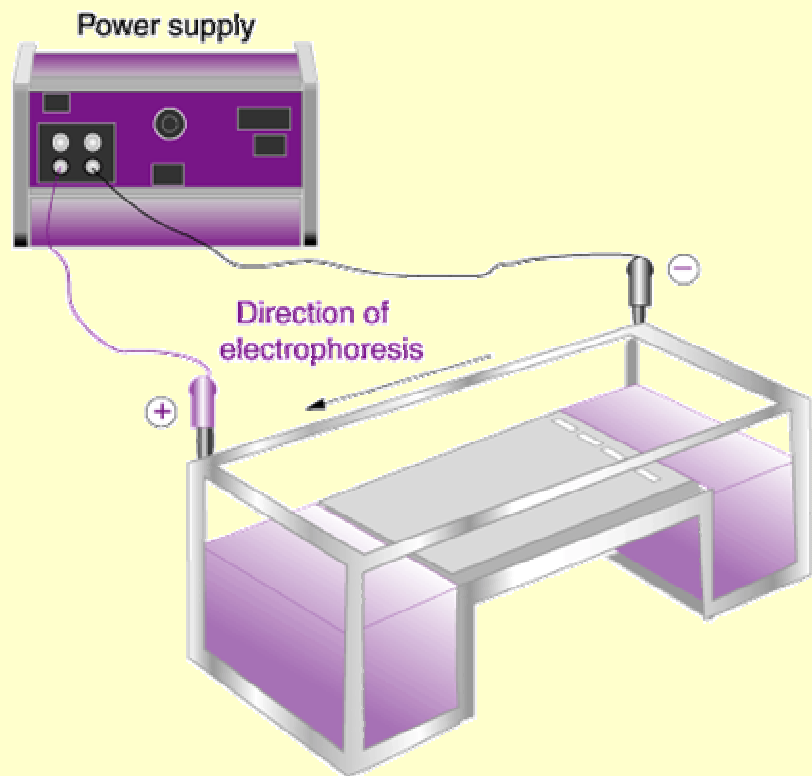
PCR – Reacción en Cadena de la Polimerasa



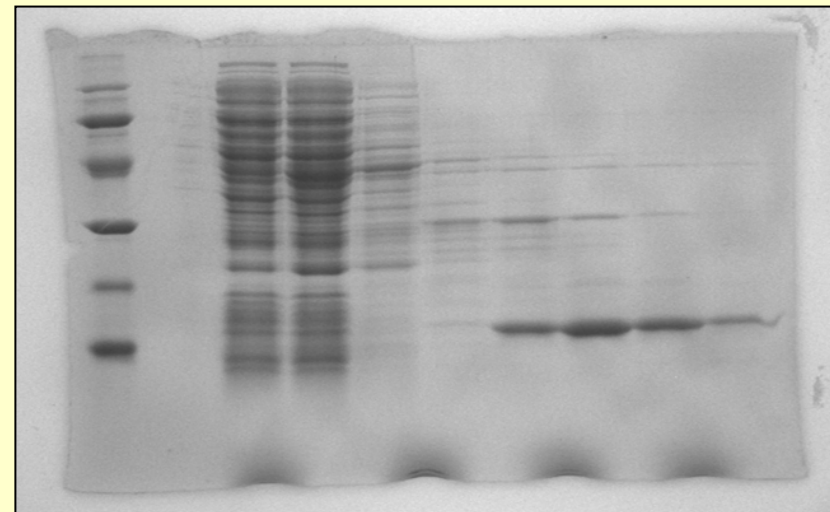
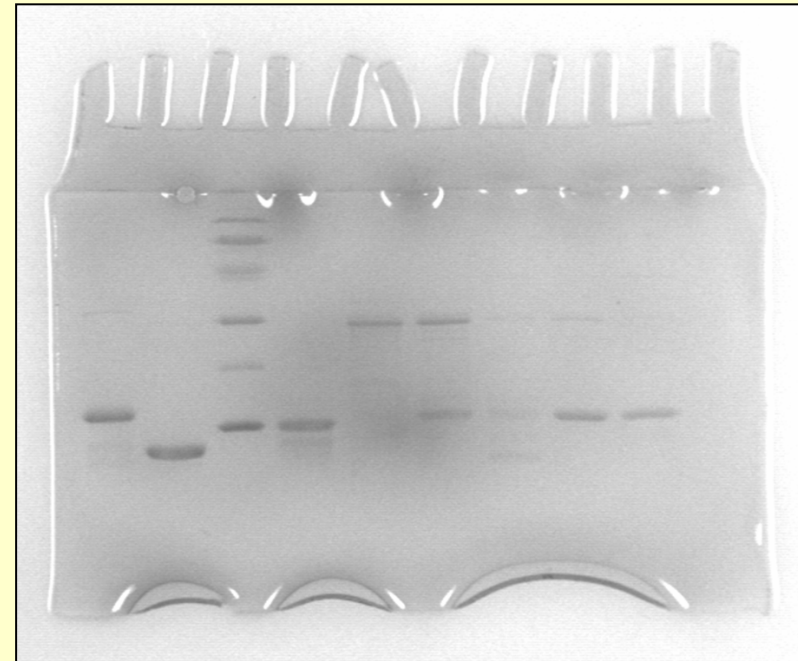
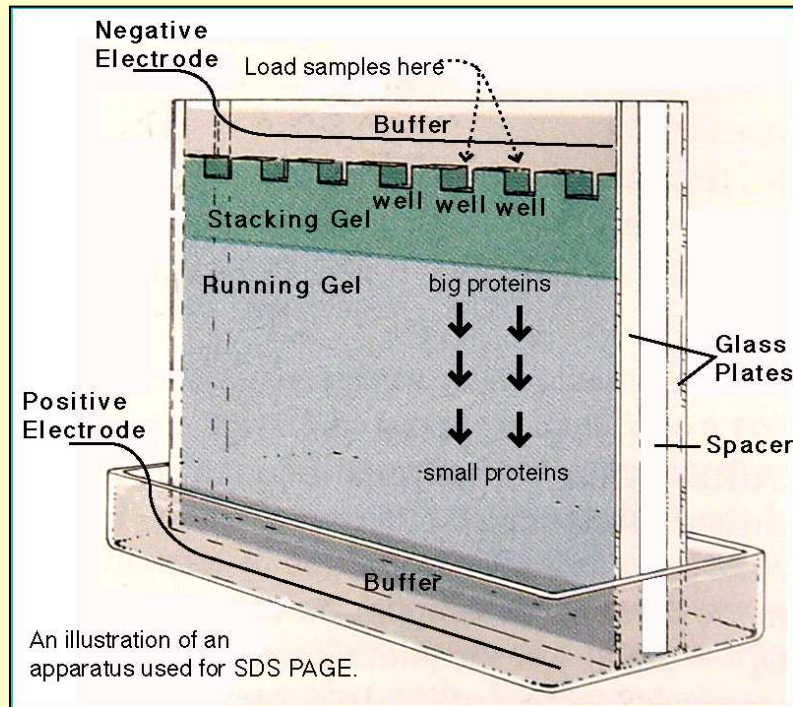
RT-PCR



Electroforesis de ADN

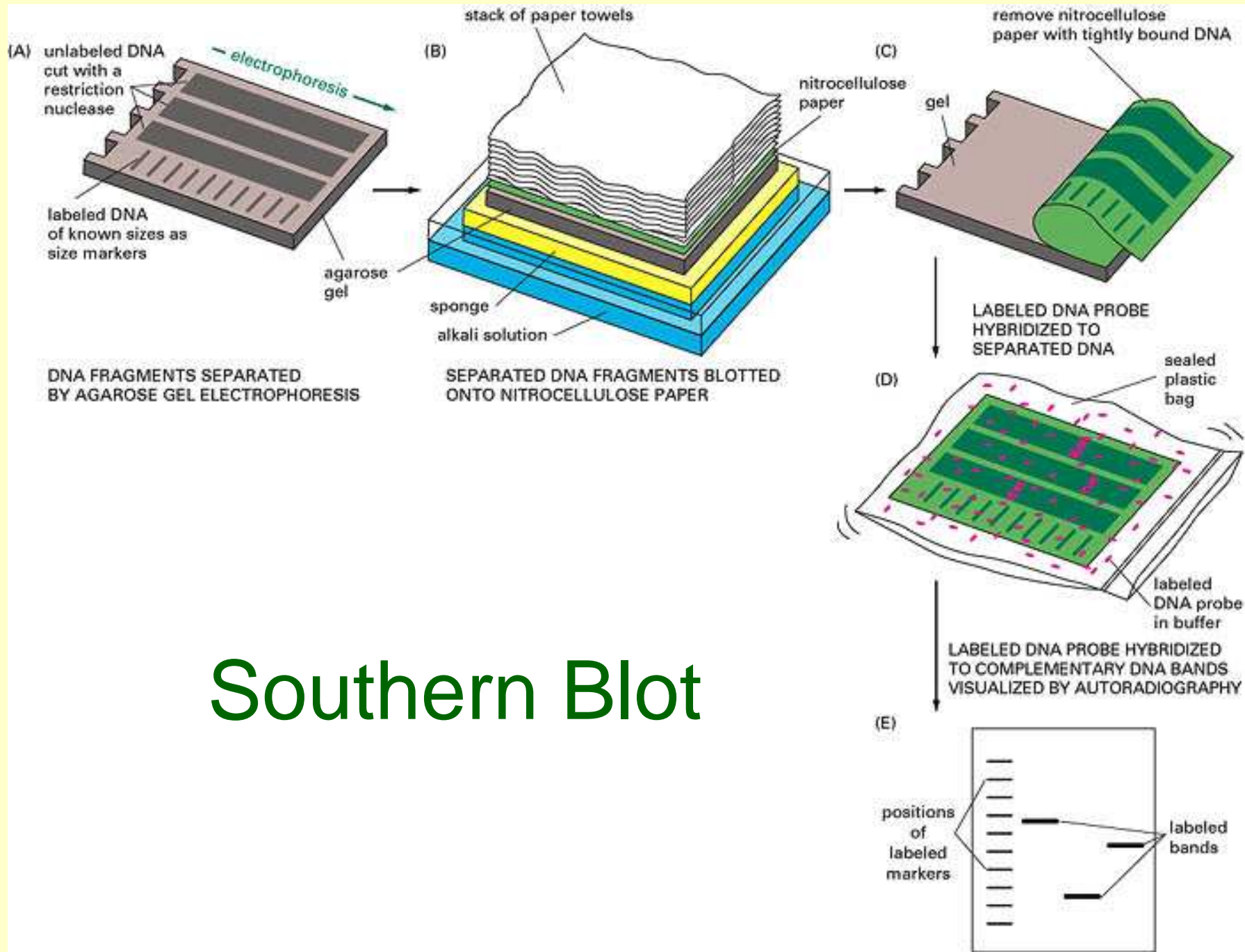


Electroforesis de Proteínas



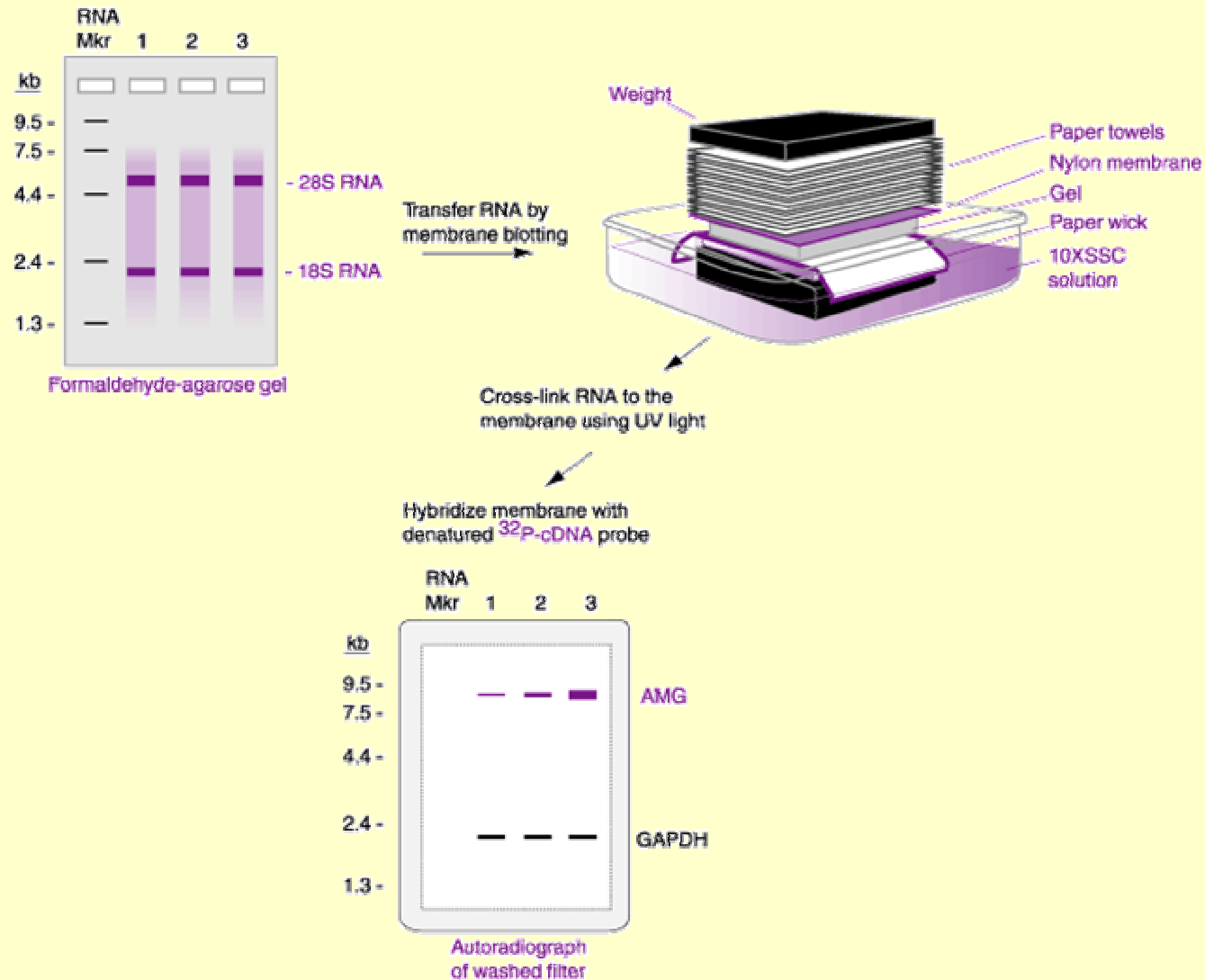
BLOTTING

- SOUTHERN (DNA)
- NORTHERN (RNA)
- WESTERN (proteínas)



Southern Blot

Northern Blot



INGENIERÍA GENÉTICA

Amplificación de secuencias y
obtención de ADN recombinante

Clonaje

- Utilización de una unidad replicativa procariótica para obtener grandes cantidades de un fragmento de ADN de interés.
- La unidad replicativa constituye el vector.
- El fragmento amplificado se denomina inserto.

Proceso de clonaje

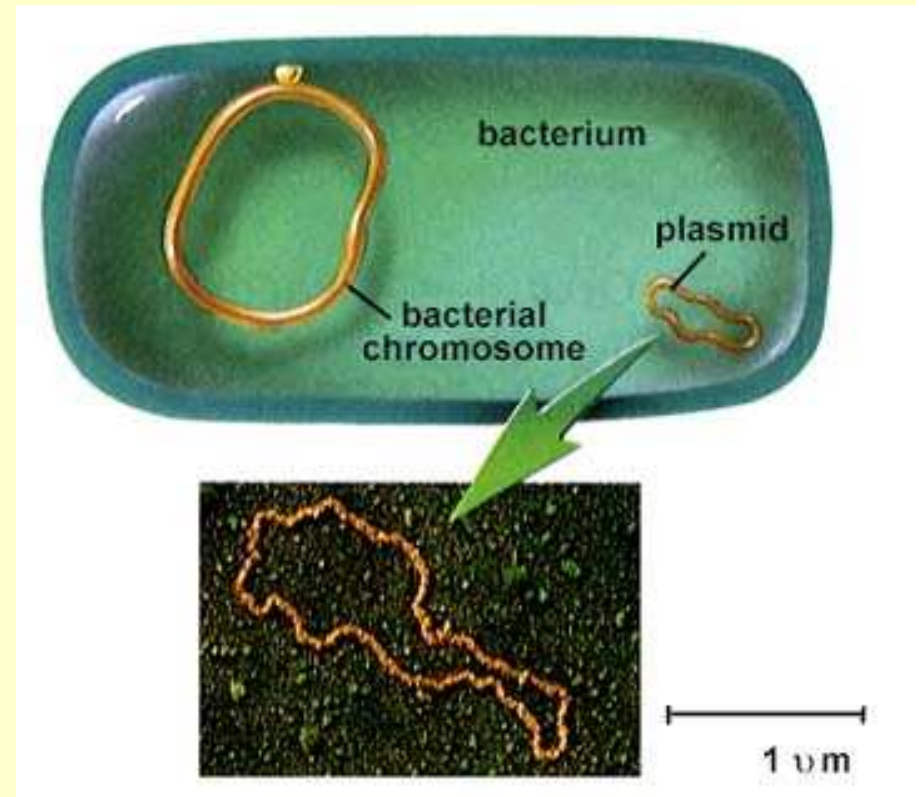
- 1) Generación del fragmento de ADN
- 2) Elección del vector conveniente
- 3) Unión del fragmento (inserto) al vector
- 4) Introducción de la construcción en un organismo en el que se pueda reproducir
- 5) Selección del recombinante

Vectores procarióticos

- Plásmidos
- Cósmidos
- Bacteriófagos
- Cromosomas artificiales de bacterias

Plásmidos

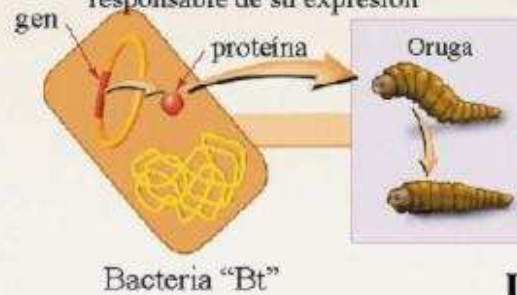
- Moléculas de ADN circular extracromosómico, presentes naturalmente en bacterias.
- Se replican autónomamente utilizando las enzimas de la bacteria.
- El número de copias por bacteria es variable.



La realización de la construcción genética

Identificar el gen de interés

Localizar un carácter interesante
Identificar la proteína y el gen responsable de su expresión



Aislar el gen de interés

Enzima de restricción

Gen de interés

Integrar

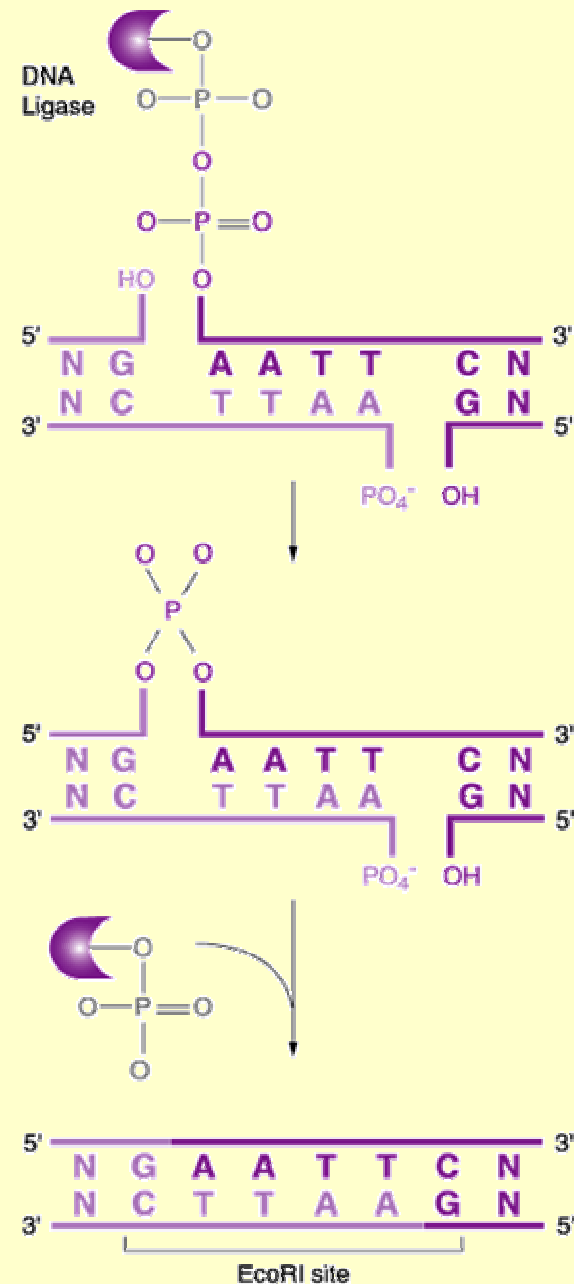
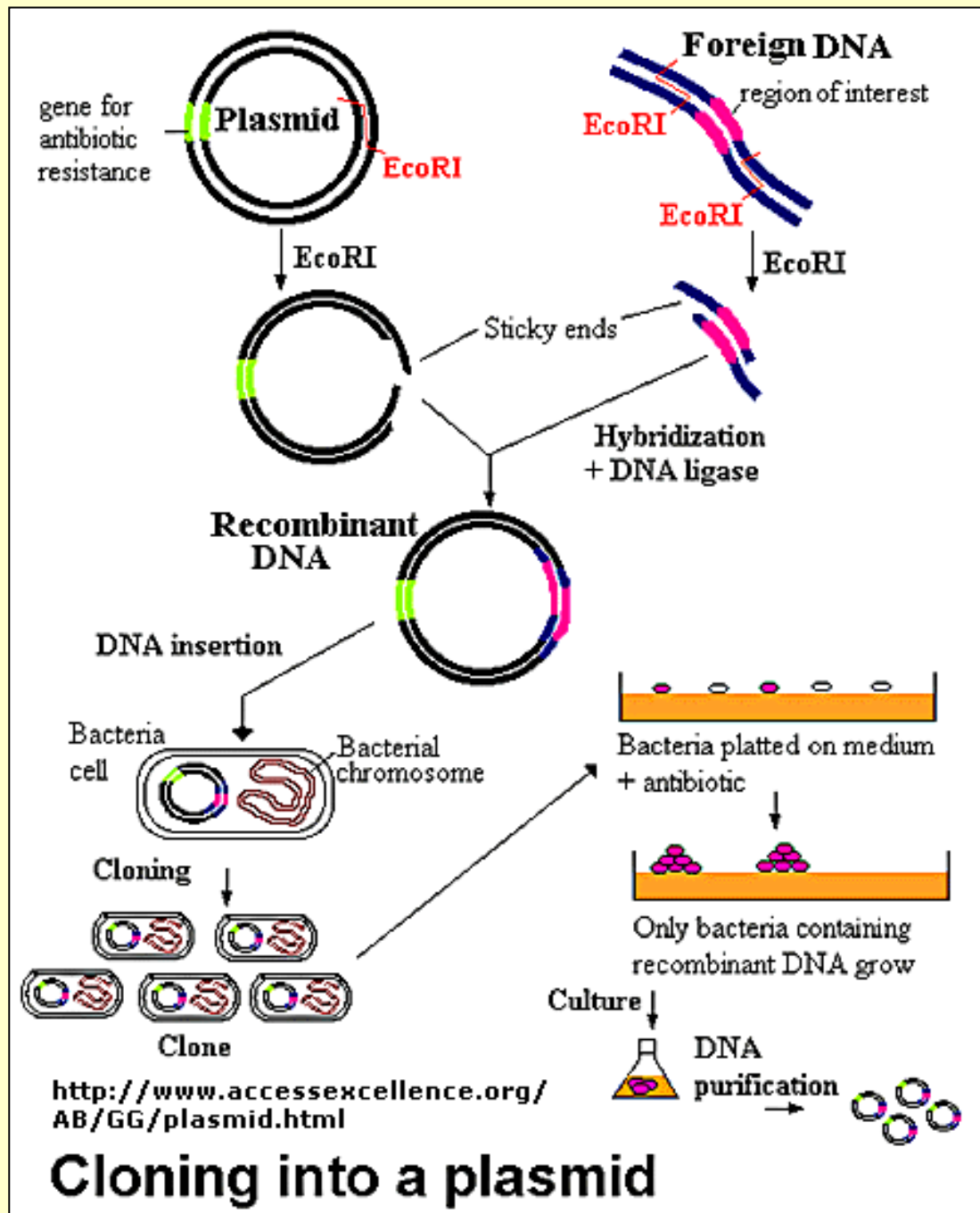
el gen de interés en una construcción genética



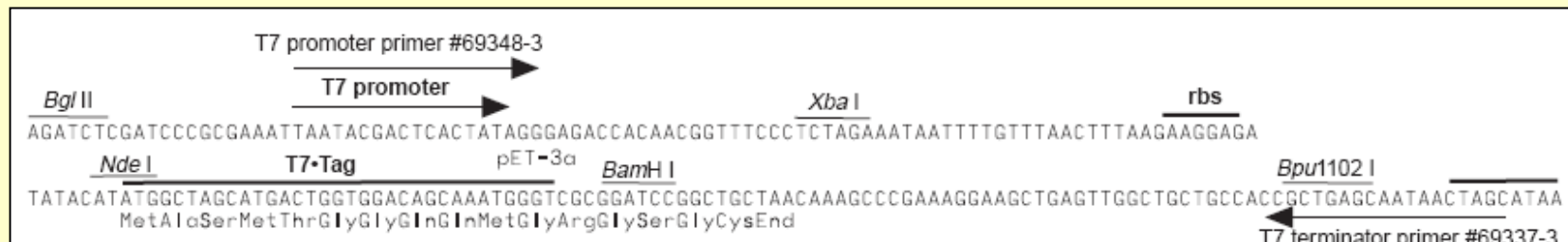
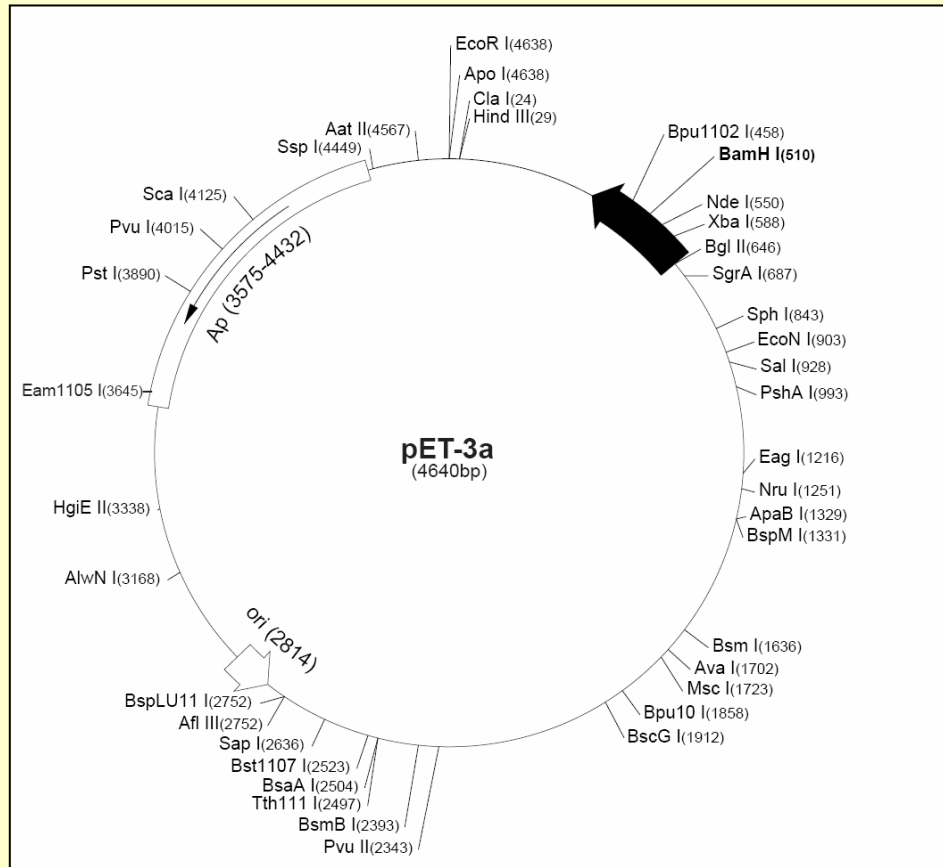
elementos de control que permiten la expresión en las células vegetales

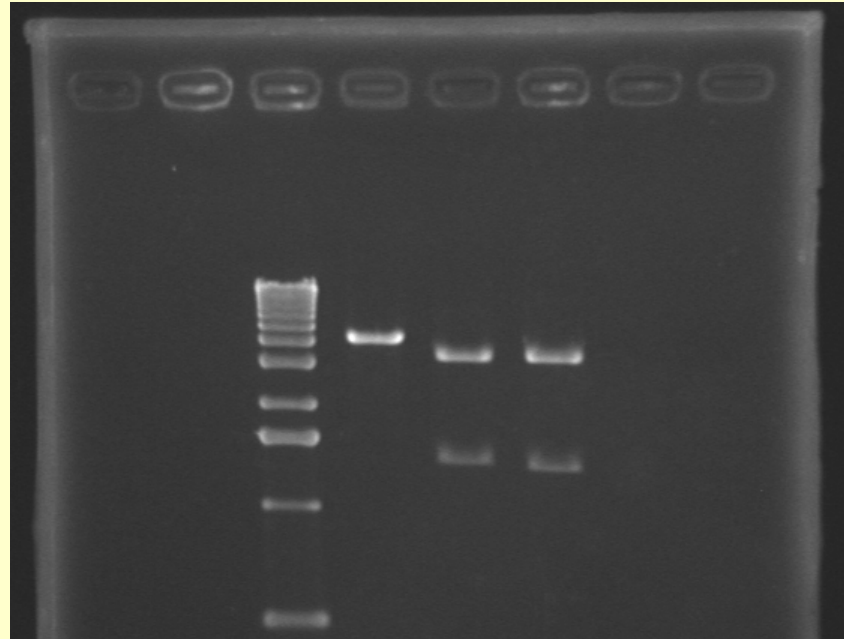
el gen marcador para seleccionar las células transformadas

P Promotor
T Terminador



Plásmido para expresión en *E. coli*





Electroforesis de ADN en gel de agarosa 1%. Calle 3: marcadores de peso molecular; Calle 4: plásmido pET-3a cortado con PstI; Calle 5 pET-3a cortado con PstI y XbaI; Calle 6 : el pET-3a cortado con PstI y NdeI.

INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL

METODOLOGÍA

¿Para qué plantas transgénicas?

- Rendimiento y calidad nutricional
- Biorreactores
- Estudio de procesos biológicos

Rasgos introducidos

- Resistencia a:
 - insectos
 - herbicidas
 - virus, hongos, bacterias
- Retraso de senescencia, tolerancia a estrés
- Mejora del valor biológico (proteínas, lípidos)
- Producción de polipéptidos de uso farmacológico.

Métodos de transferencia

- Plásmido Ti (*Agrobacterium tumefaciens*)
- Bombardeo de microproyectiles

Agrobacterium tumefaciens

- Bacteria del suelo gram negativa
- provoca tumores (Agalla de corona)
- afecta sólo dicotiledóneas
- modifica genéticamente las células que infecta

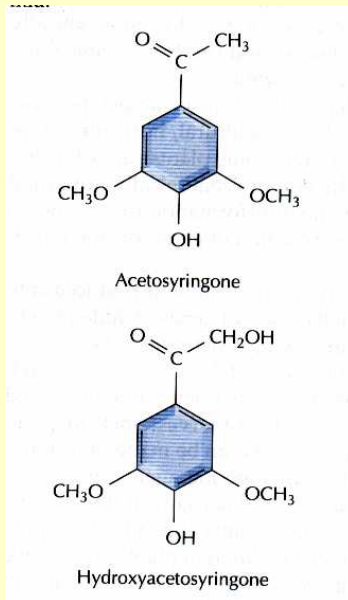
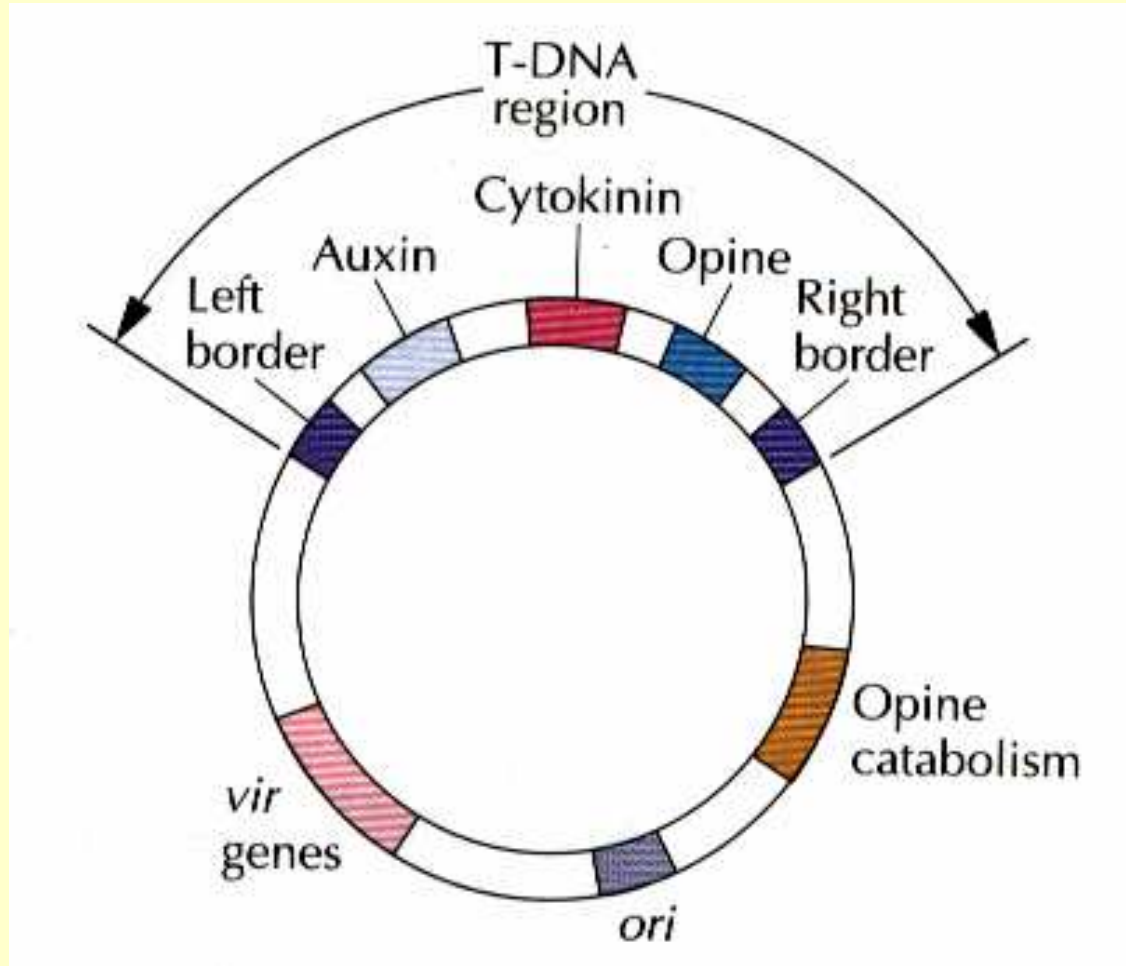
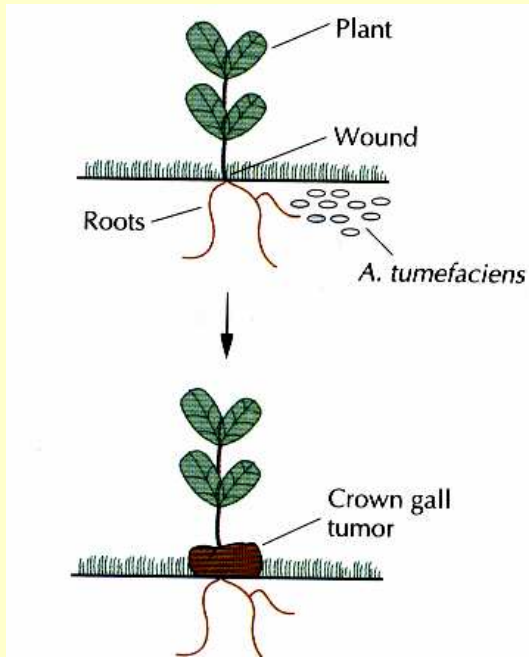


Características de la infección por *A. tumefaciens*

- La enfermedad que produce es la consecuencia de la transferencia, integración y expresión de un segmento de DNA bacteriano en las células de las plantas.
- Este segmento se denomina T-DNA, y está contenido en un plásmido natural de la bacteria llamado plásmido Ti.
- El plásmido Ti contiene además los denominados “genes *vir*”

¿Qué son los genes *vir*?

- Codifican factores esenciales para la transferencia e integración del T-DNA dentro del genoma de la planta.
- Están ubicados en una región de 35 kb del plásmido Ti fuera de la región del T-DNA.
- Hay 25 genes *vir* distribuidos en 7 operones.
- Responden a un metabolito secundario exudado por las plantas cuando se les provoca una herida (acetosiringona)

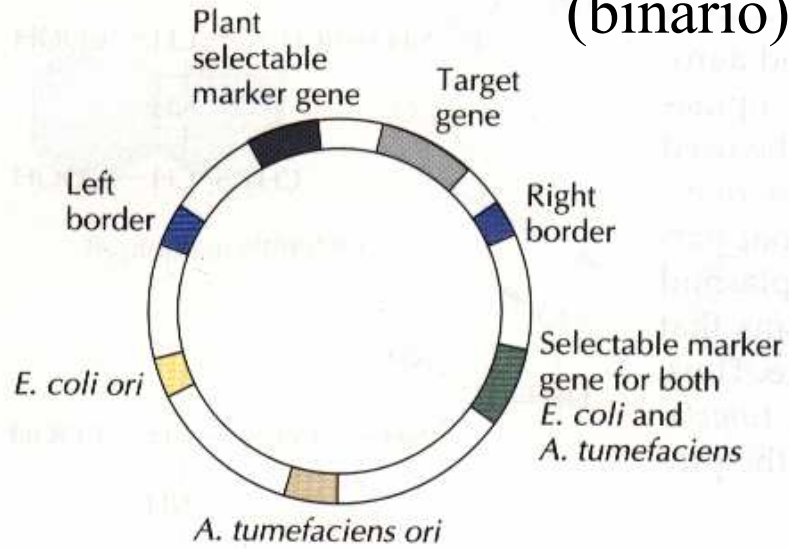


Vectores derivados del plásmido Ti

- Componentes necesarios:
 - Marcador de selección (resistencia a kanamicina)
 - Origen de replicación (para que se replique en E.coli)
 - Borde derecho de la secuencia T-DNA
 - Polylinker (región de multiple clonaje)
- Tipos:
 - binarios
 - cointegrados

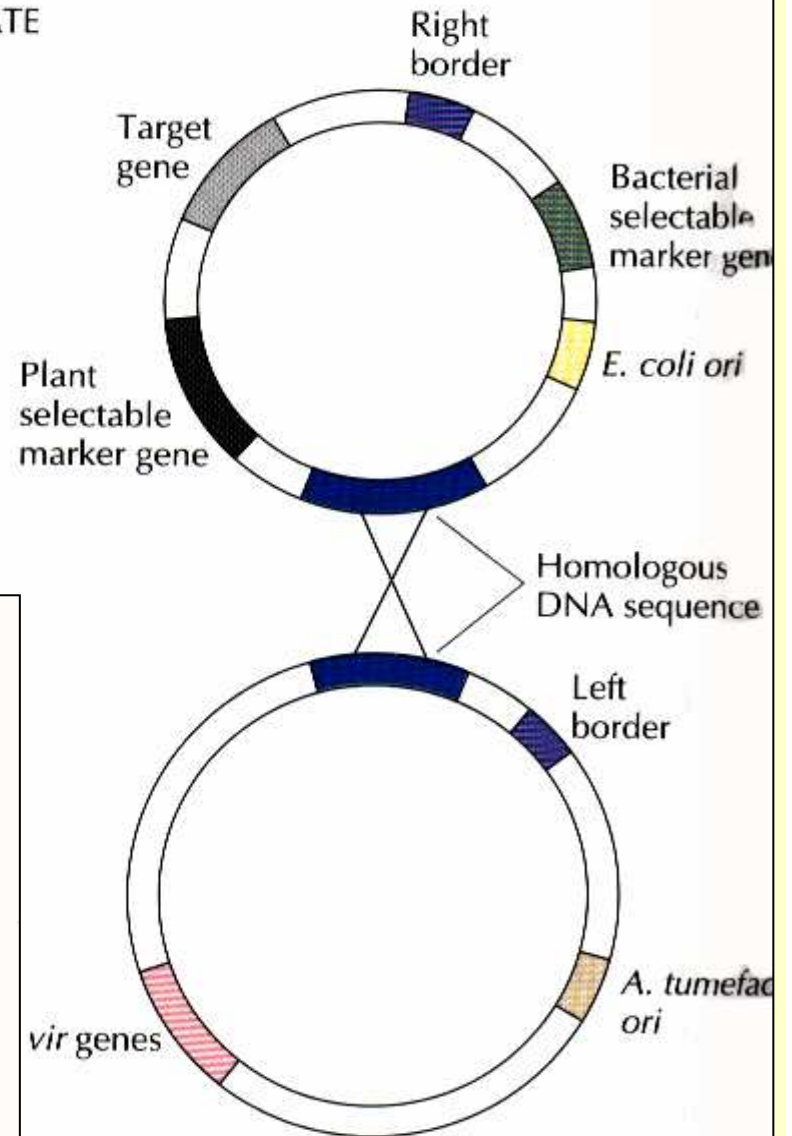
A

(binario)



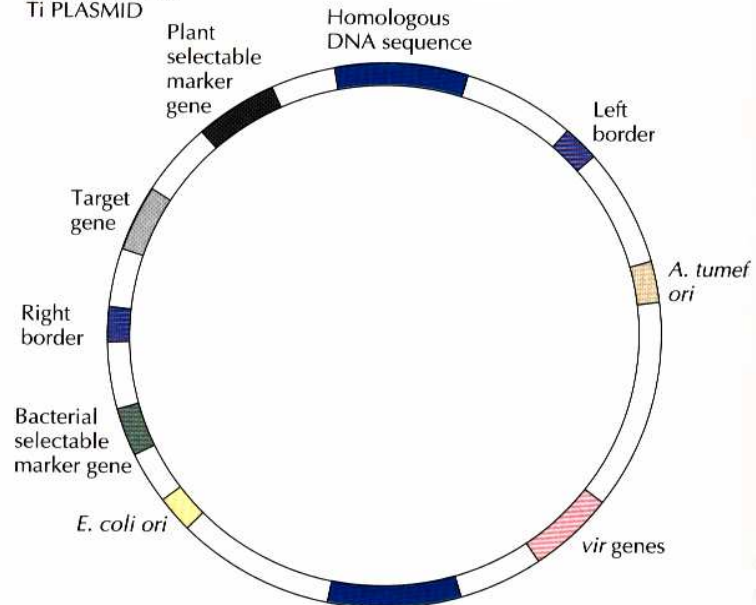
B

COINTEGRATE VECTOR



RECOMBINANT Ti PLASMID

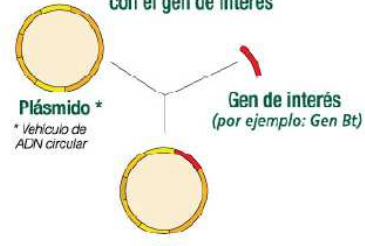
Recombine



¿CÓMO SE TRANSFORMA UNA PLANTA?

Método con *Agrobacterium*

1 Construcción de un plásmido con el gen de interés



2 Introducción del plásmido en *Agrobacterium* *

* bacteria que habita comúnmente en el suelo y que introduce ADN en las plantas naturalmente.



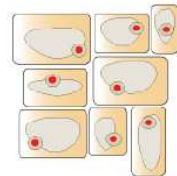
3 Incorporación del gen de interés dentro del cromosoma vegetal



Núcleo
Cromosoma vegetal

Célula vegetal ampliada

4 Multiplicación Celular



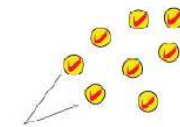
5 Regeneración y selección de plántulas transformadas *



*aquellas que recibieron el gen de interés

Método con Cañón de Partículas

1 Micropartículas recubiertas de ADN que contiene el gen deseado



Cañón de Partículas

2 Bombardeo de Micropartículas



6 Transferencia de las plántulas seleccionadas al suelo



Manipulación de la expresión génica

- Promotores:
 - constitutivos (35S del virus del mosaico del coliflor)
 - tejido específicos (FBPasa - Rubisco_m)
 - inducibles
- Secuencias “enhancer”
- Intrones que estabilizan el mRNA producido
- Secuencia terminadora (nopalina sintasa)

Manipulación post-transcripcional

- Antisentido
 - Se transfiere un gen que codifica para un RNA complementario (asRNA) al mRNA de interés.
 - Al transcribirse ambos genes se forma un híbrido asRNA-mRNA que impide la traducción del último.