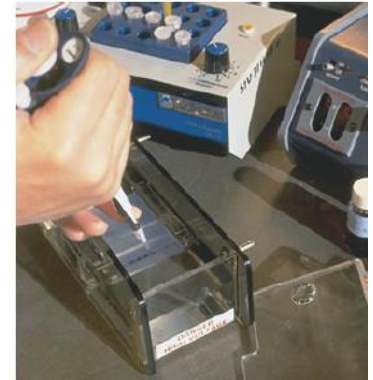
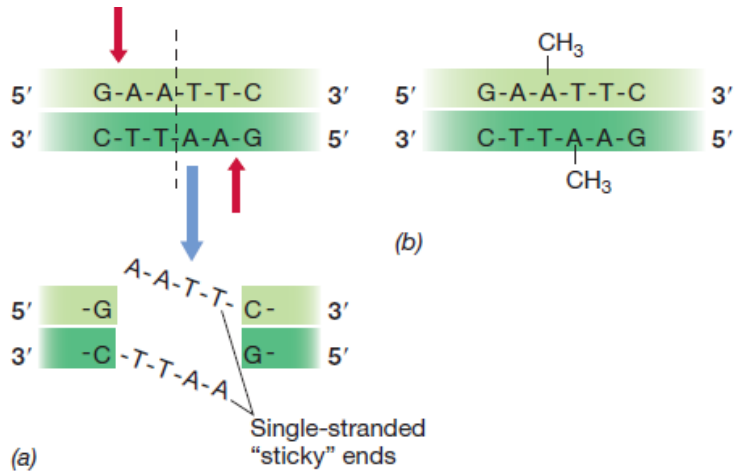




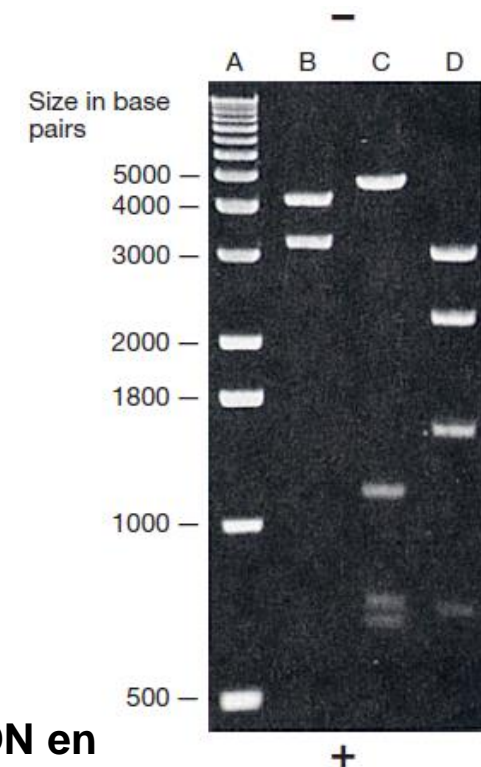
Métodos de Manipulación del ADN

Restricción y modificación del ADN



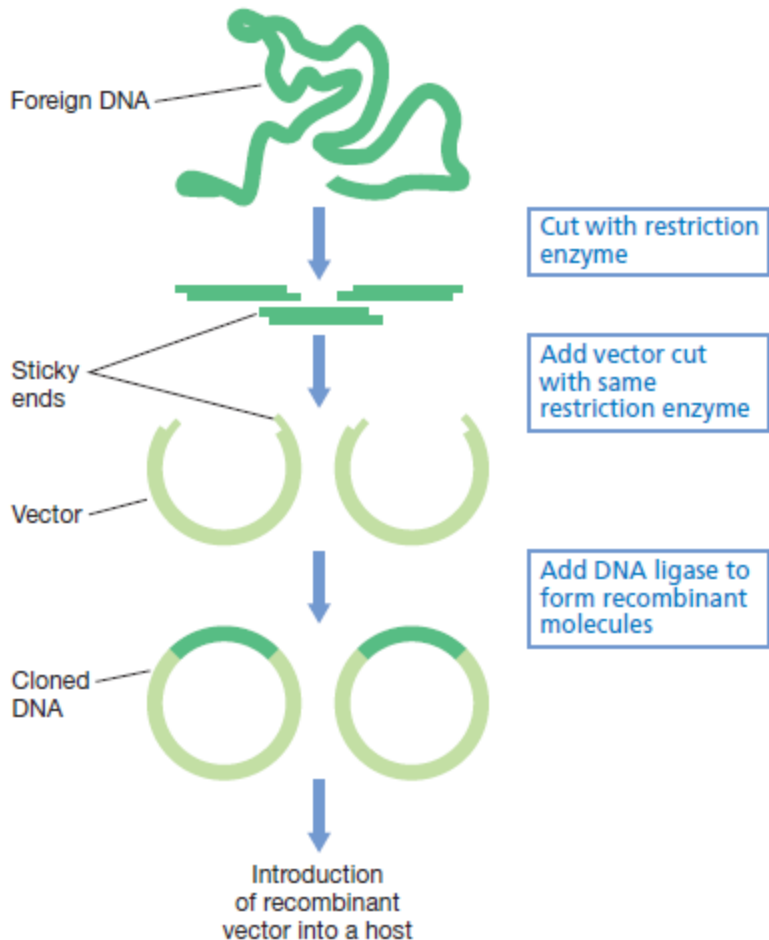
- Secuencia de ADN reconocida por la enzima de restricción EcoRI (producida por *E. coli*)
- Modificación por la metilasa EcoRI protege el mismo sitio del corte por EcoRI

Enzimas de restricción producidas por bacterias y arqueas. *In vivo* protegen al ADN propio de otros ADN exógenos (virus)



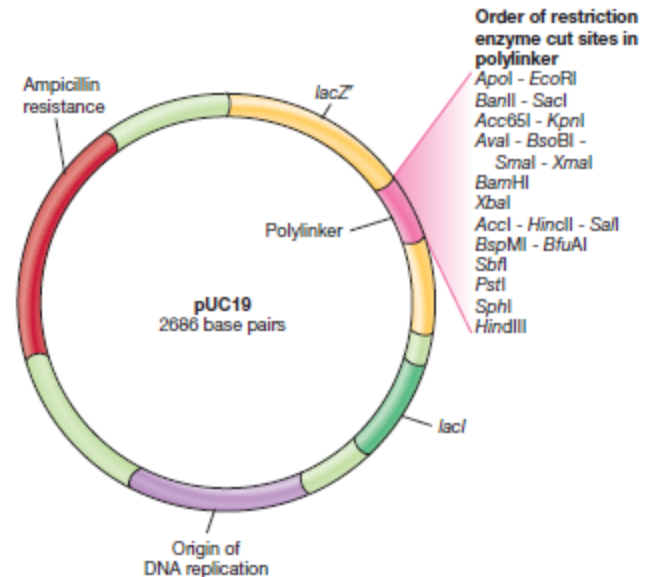
Electroforesis de ADN en geles de agarosa

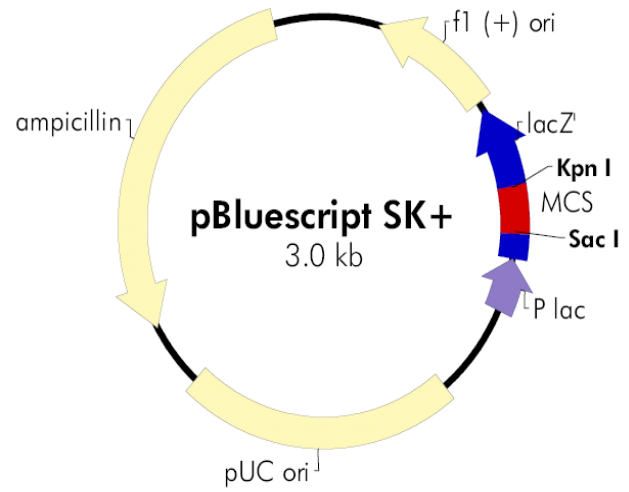
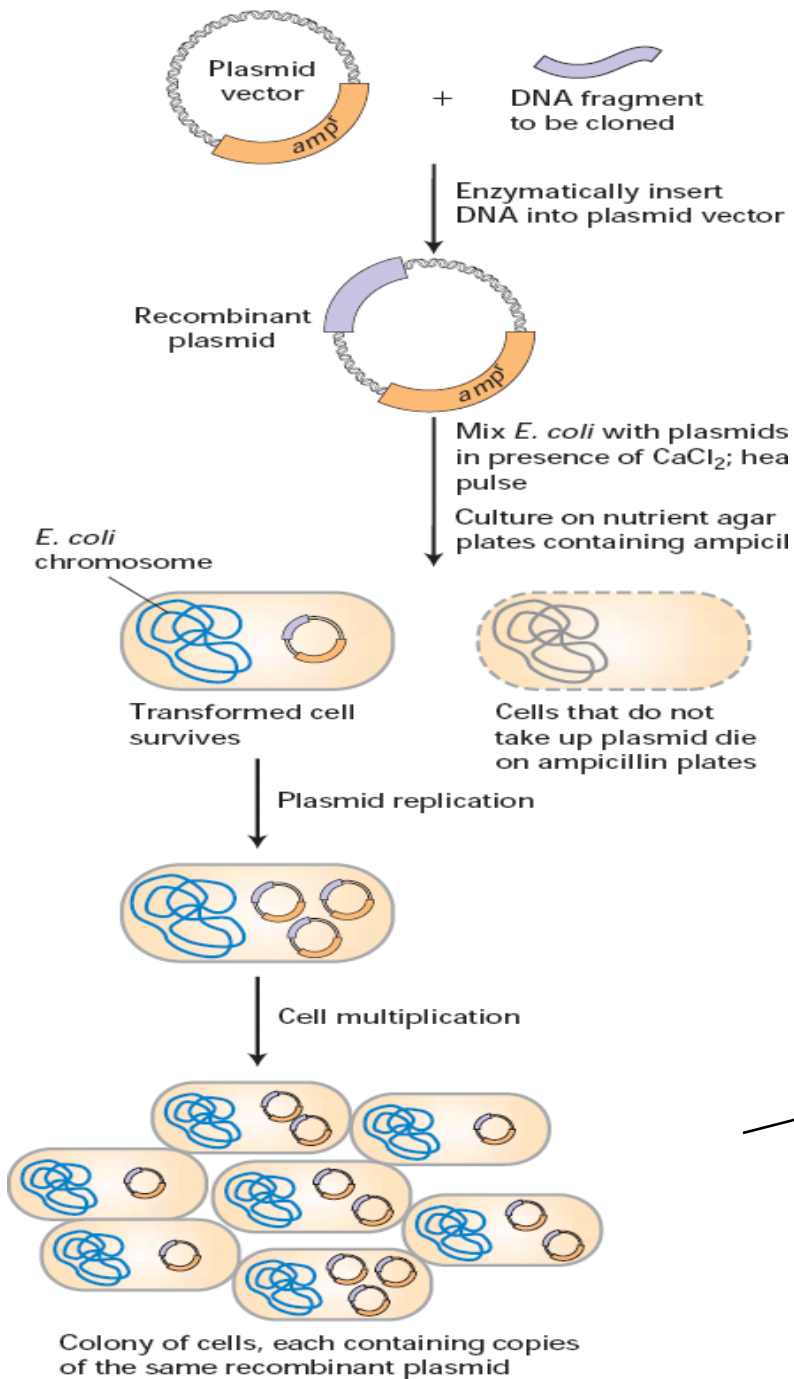
Clonado de fragmentos de ADN



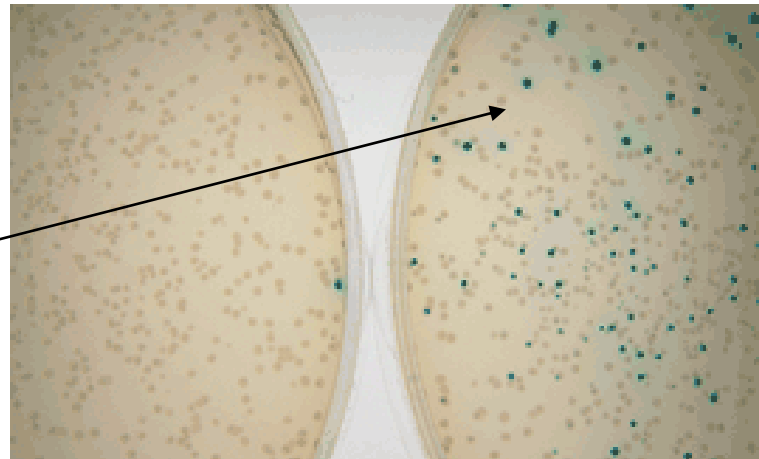
Principales pasos en el clonado de ADN

- 1. Fuente de ADN:** genómico, ADNc (derivado de ARNm), obtenido por PCR
- 2. Inserción de ADN en vector de clonado.** Vector: plásmido o fago. Debe tener ori, sitios de clonado y marcador de selección
- 3. Introducción del ADN recombinante en organismo huésped** donde pueda replicarse





Identificación de clones recombinantes mediante ensayo de actividad B- gal (medio con X-gal + IPTG)



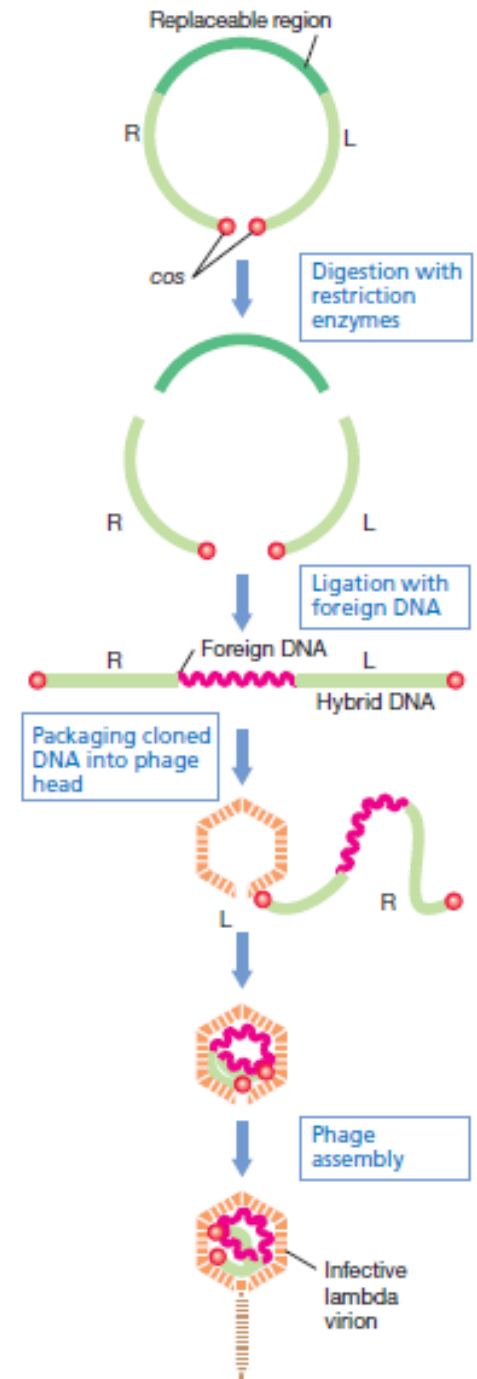
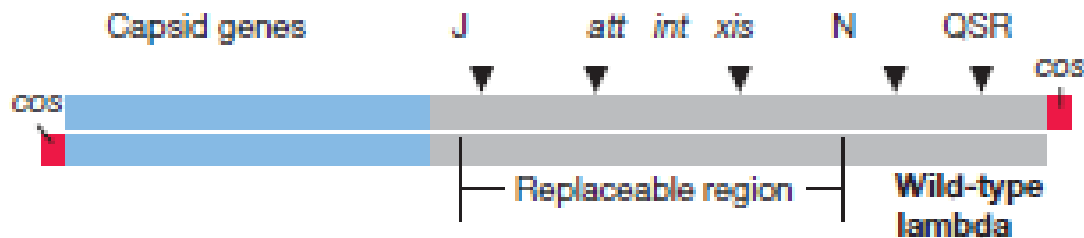
Clonado de genes en bacteriófago λ

Permite clonar fragmentos de mayor tamaño que los plásmidos (25 kpb)

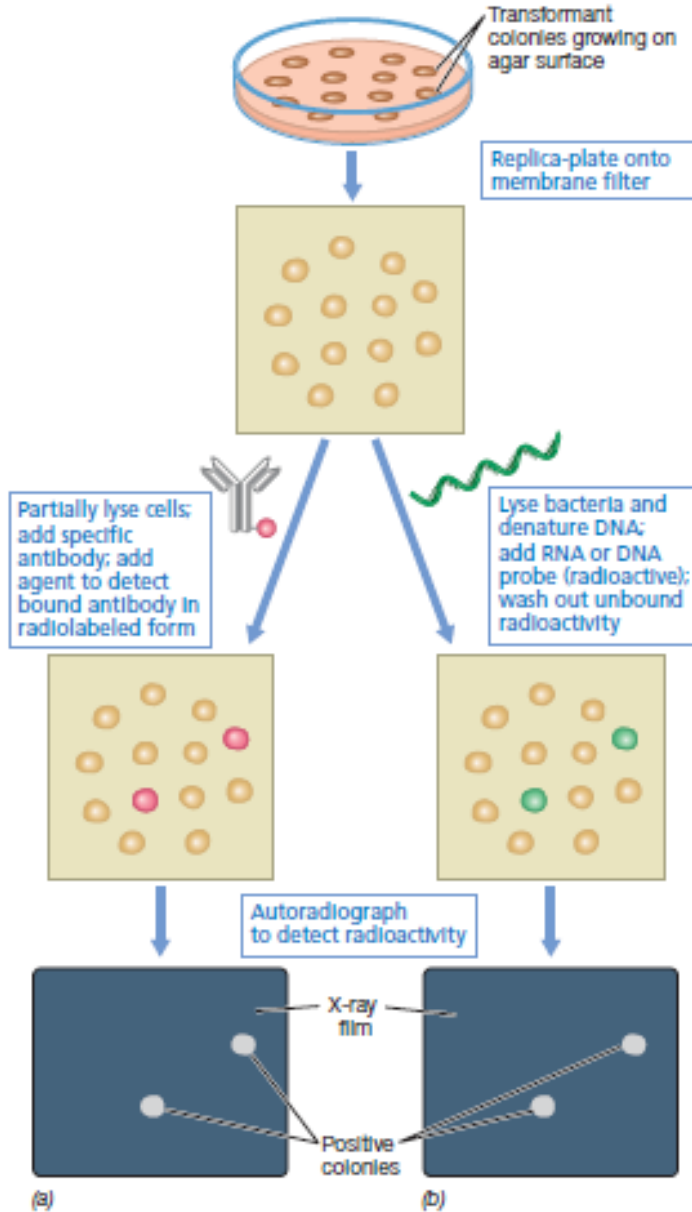
Sirven para la construcción de genotecas

Genoteca

Mezcla o conjunto de vectores recombinantes que representan el genoma de un organismo



Identificación (*screening*) del clon de interés



- Usando anticuerpos contra la proteína producida por el gen de interés
- Mediante hibridización con oligonucleótido radiactivo simple cadena

Polymerase Chain Reaction

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Permite amplificar regiones de ADN de secuencias conocidas.

Requiere de : templado, cebadores, *Taq* polimerasa, dNTPs,

Se realiza en 3 etapas:

1. Desnaturalización del templado (94 C)

2. Hibridación de los cebadores. La temperatura depende de cada par de cebadores (~ 50 C)

3. Polimerización (72 C)

1-3. Se repite varios ciclos (~30)

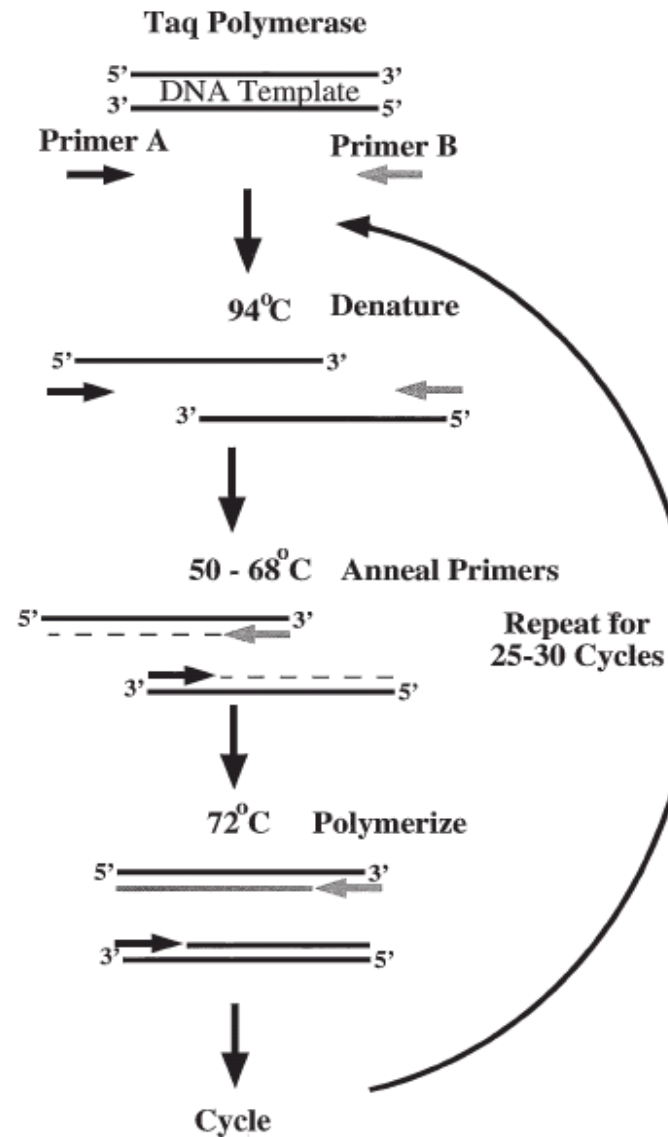
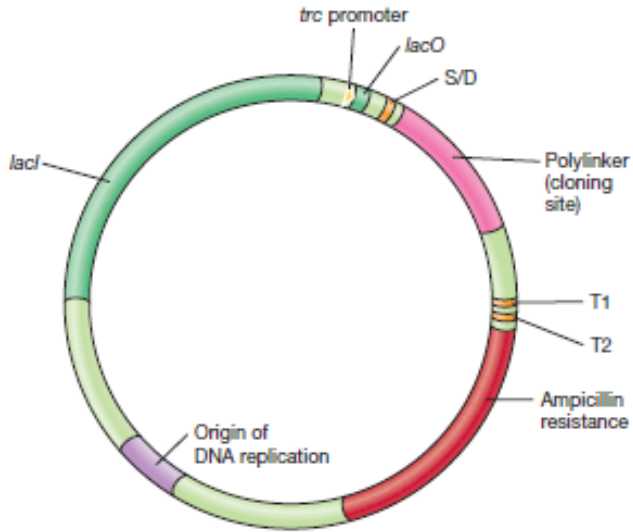
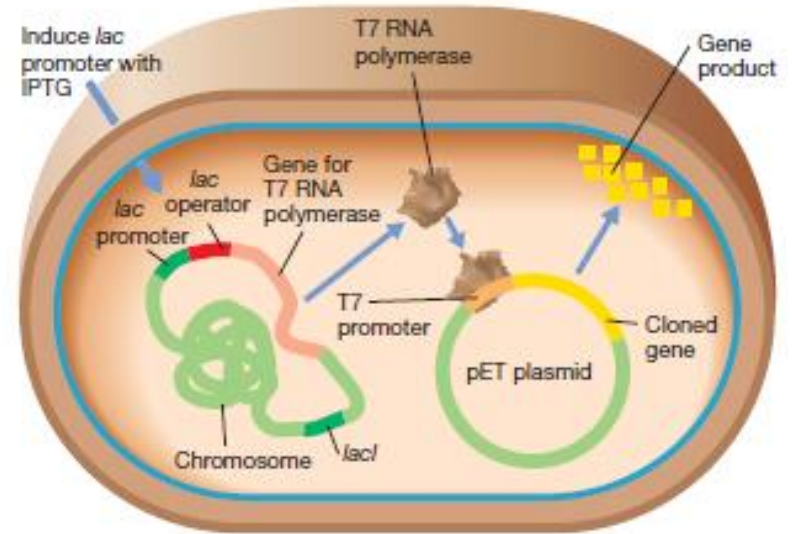


Figure 2-7 PCR reaction. DNA template, primers A and B, and DNA polymerase (*Taq*) are combined in a reaction that will cycle through denaturation, annealing, and extension temperatures, allowing the amplification of DNA between the primer pairs.

Expresión de proteínas recombinantes



Vector de expresión: debe tener un promotor, terminador transcripcional, (T1, T2) señales para el inicio de la traducción (S/D)

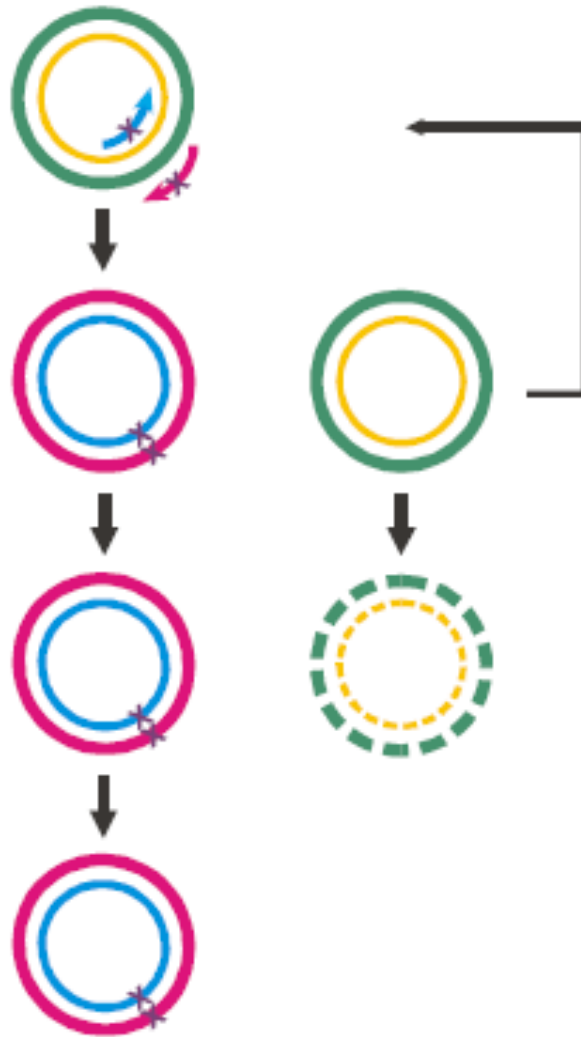


Sistema de expresión de proteínas recombinantes en bacterias (*E. coli*) en el plásmido pET

Tipo de vector	Inserto (kbp)
Plasmido	20
Fago lambda	25
Cosmido	45
P1	100
BAC	300
YAC	1000

Manipulación de genes bacterianos

Técnicas de mutagénesis dirigida. Permite cambiar bases en la secuencia nt de un gen.
Usos: determinar actividad biológica de proteínas con sustituciones de AA conocidas.



Mediante PCR

Mutant Strand Synthesis

Perform thermal cycling to:

- 1) Denature DNA template
- 2) Anneal mutagenic primers containing desired mutation
- 3) Extend primers with *PfuUltra* DNA polymerase

Dpn I Digestion of Template

Digest parental methylated and hemimethylated DNA with *Dpn* I

Transformation

Transform mutated molecule into competent cells for nick repair

Mutagénesis por interrupción génica

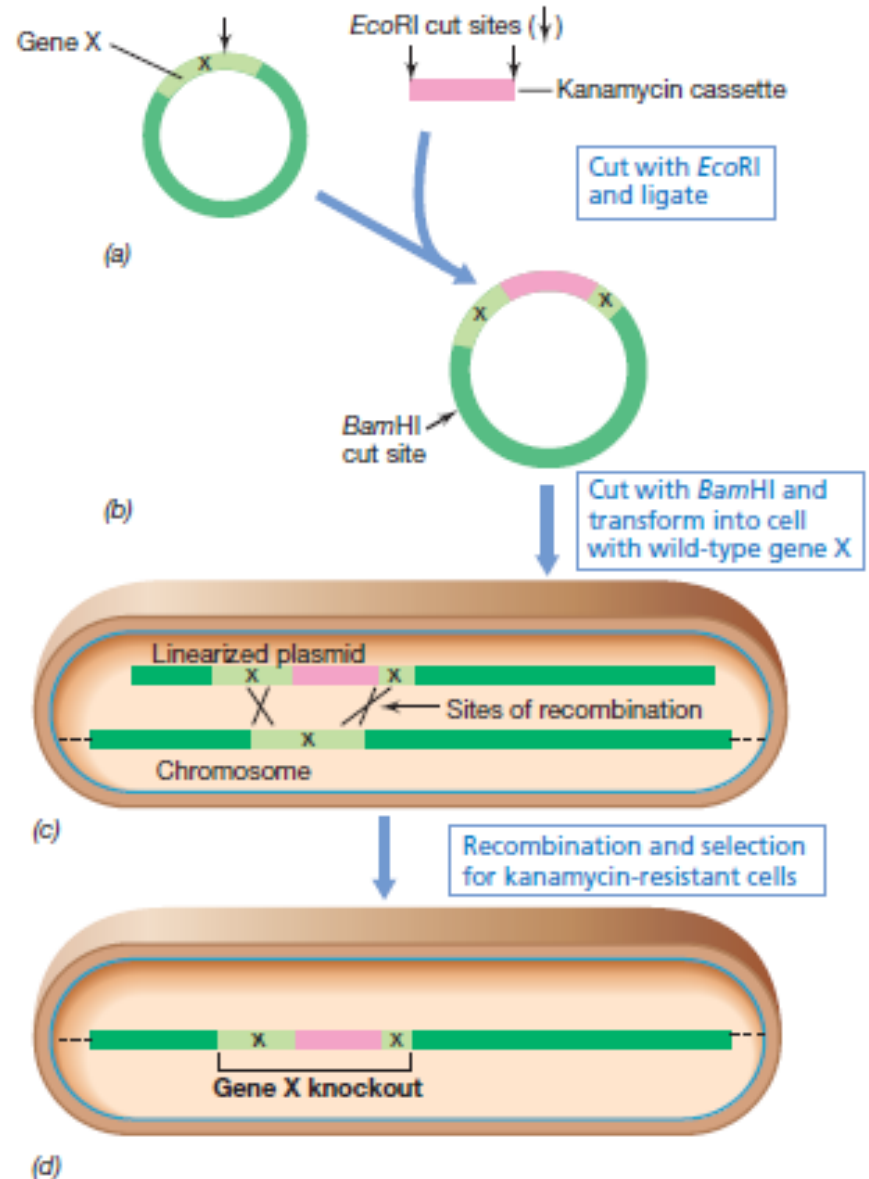
Cassette: fragmento de ADN sintético, lleva gen resistencia a Ab. Se usan para reemplazar o interrumpir un gen y generar una mutación.

Disrupción génica por cassette mutagénesis

Se anula la función de un gen dado por mutagénesis por inserción. Genera mutación *knockout* (KO).

En procariontas (haploides) las células KO son viables sólo si el gen no es esencial.

El plásmido con el *cassette* se lineariza para impedir su replicación en la bacteria transformada, por lo tanto, las células resistentes surgen por RH y poseen sólo una copia del gen (la mutante por inserción)

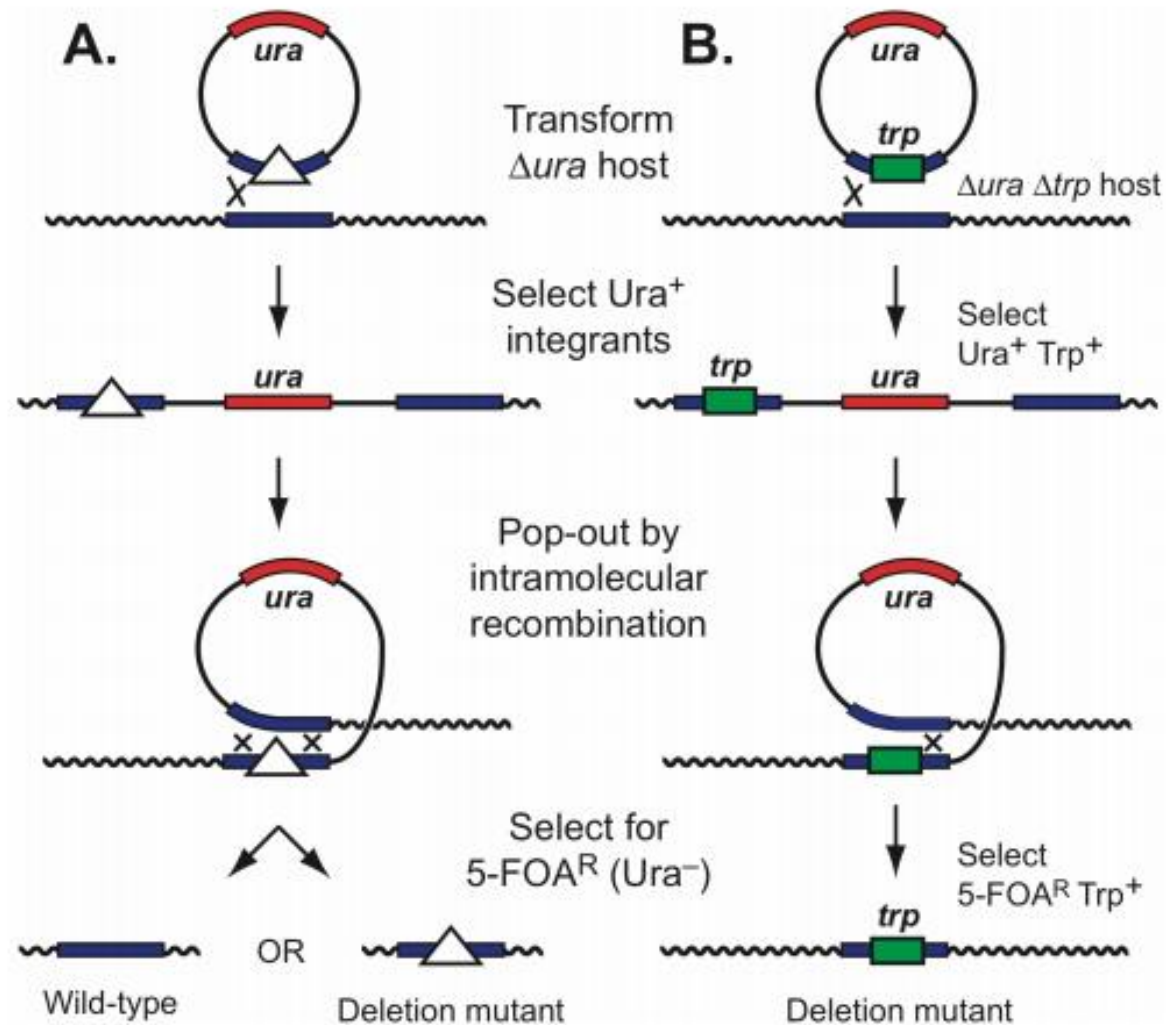


Técnica de mutagénesis *in vivo* por recombinación homóloga en haloarqueas

Método *pop-in pop-out*

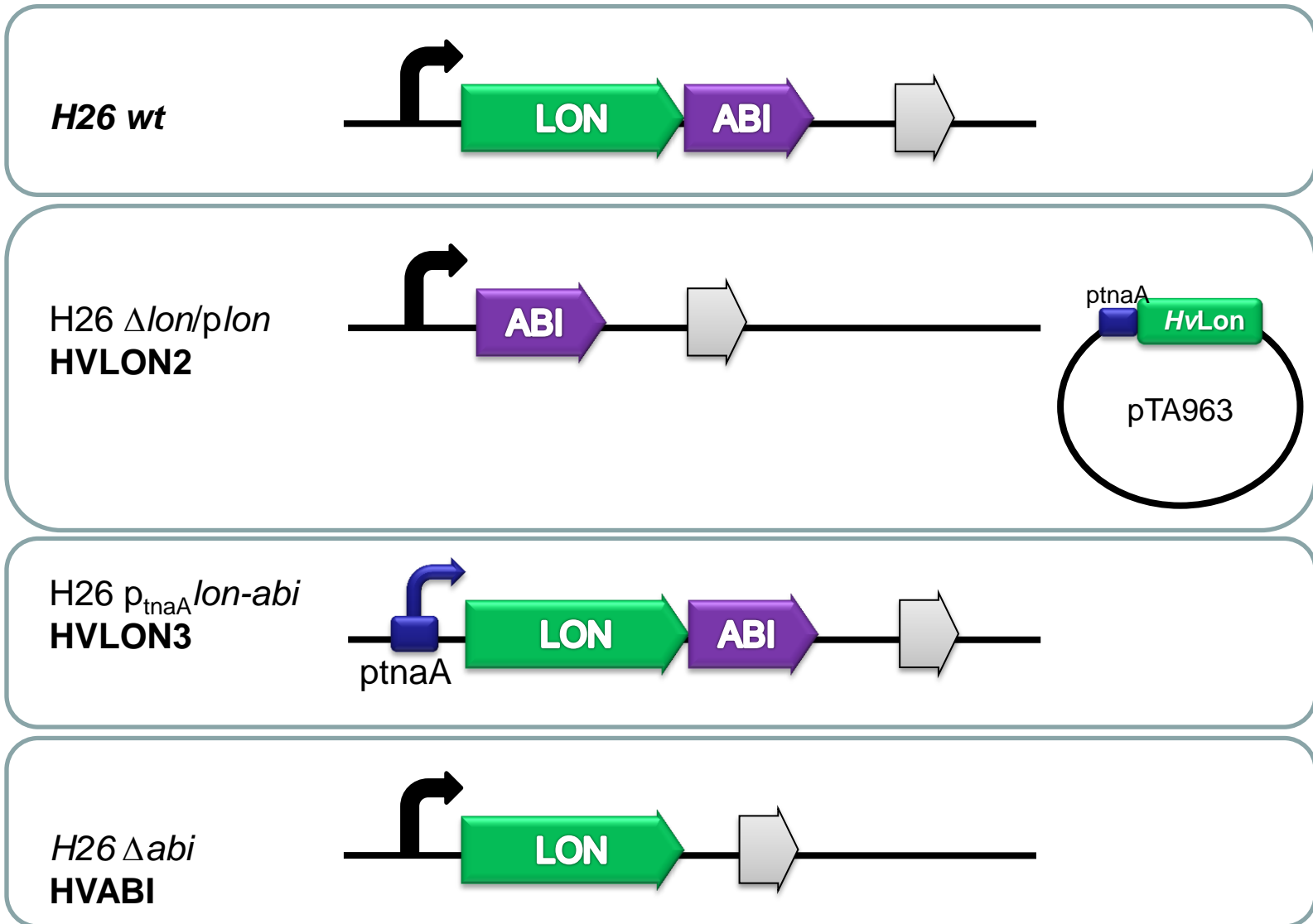
(Tomado del Halohandbook, M. Dyal-Smith 2008)

Cuando ocurren dos eventos de recombinación en lugares diferentes se reemplaza un fragmento de ADN por otro dando lugar a la mutación. (azul indica regiones homólogas)



Aplicación de las técnicas del ADN recombinante en las arqueas

Construcción de cepas mutantes del gen de la proteasa *lon* en *H. volcanii*

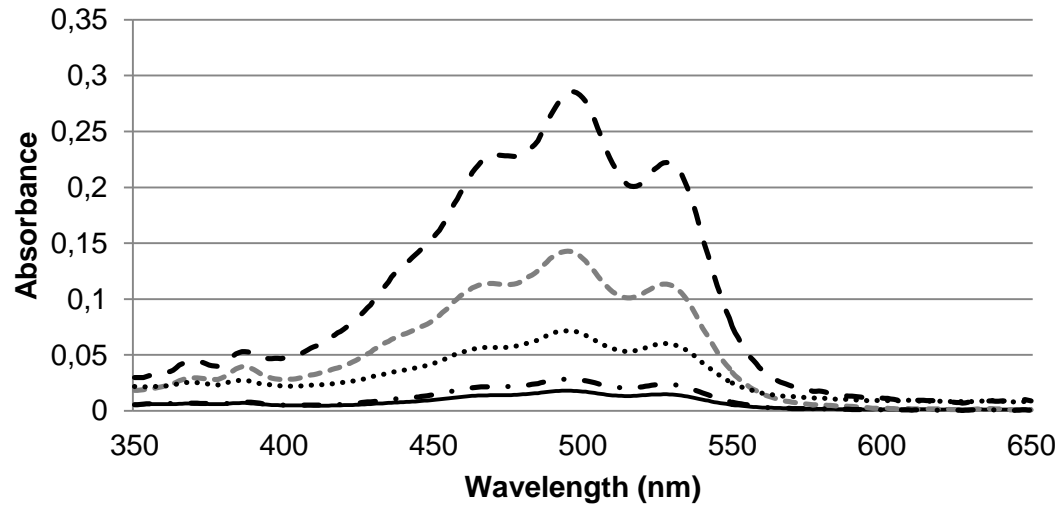
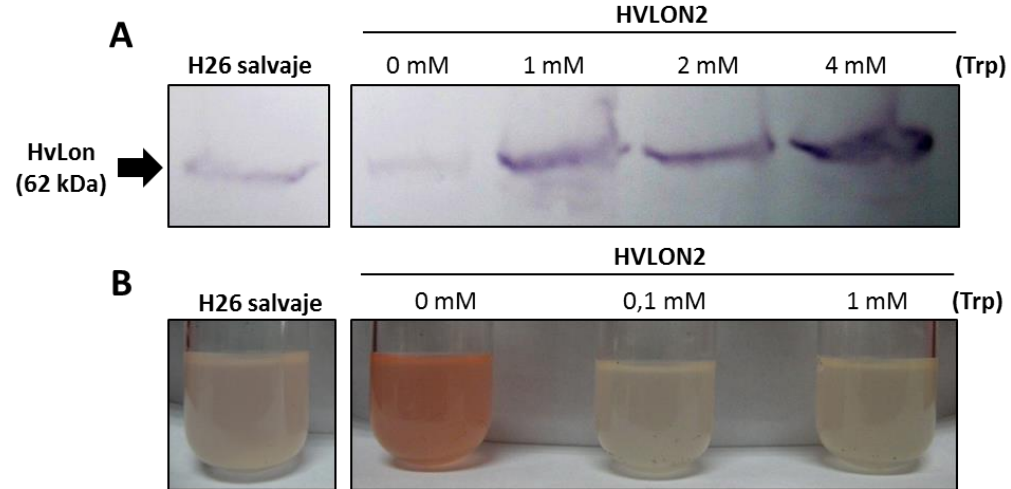


La subexpresión de Lon afecta la pigmentación celular en *H. volcanii*

H26/p vs HVLON2



H26 vs HVLON3



— H26/p - - - HVLON2 - · - HVABI/p
 - - - HVLON3/p ····· HVLON3/p-lon