

# ¿Qué es la Biotecnología?

## BIO

Materia viva  
(natural, manipulados o  
sintéticos)

Biosfera

- Eucariotas
  - animales/plantas
  - hongos
  - protistas
- Procariotas

Virosfera

**Virus**

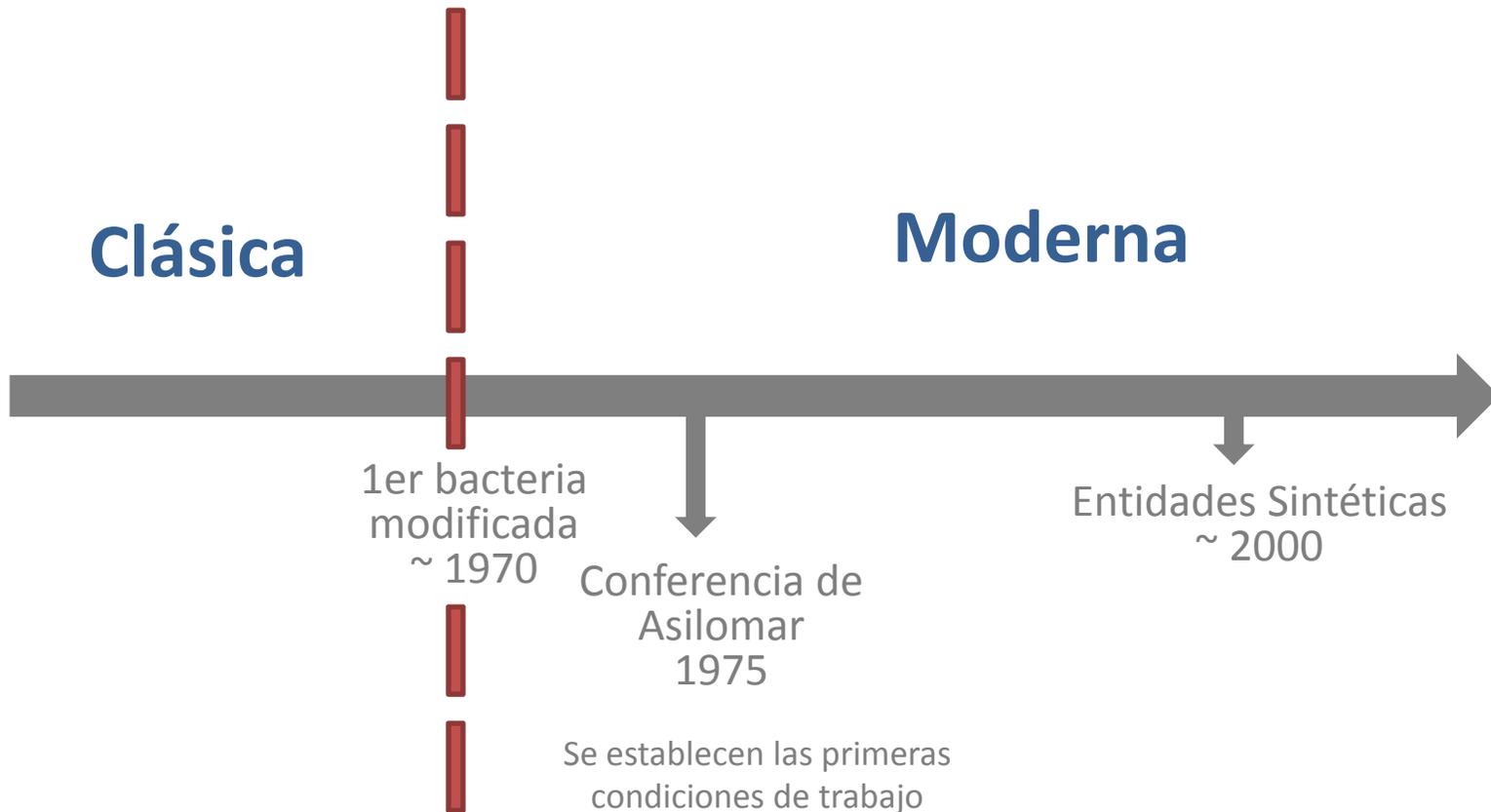
## TECNOLOGIA

Aplicación de una  
ciencia para producir  
Bienes y Servicios

- Generar conocimiento
- Salud (humana/animal)
- Industria
- etc

Aplicación de organismos y virus (naturales, manipulados o sintéticos) para producir bienes y servicios.

# Biotecnología



# Ingeniería

Aplicación de una ciencia

# Genética

Ciencia que estudia la **información contenida** en la materia viva y sus **procesos de transmisión**

**Información contenida:** genomas

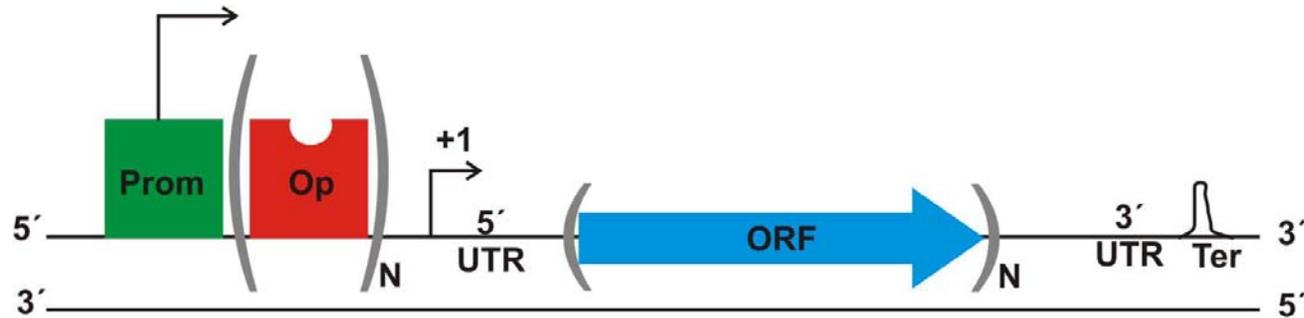
- Secuencia de ácidos nucleicos
- Empaquetamiento y modificaciones (metilaciones)
- Sintaxis génica (reglas)

**Procesos de transmisión**

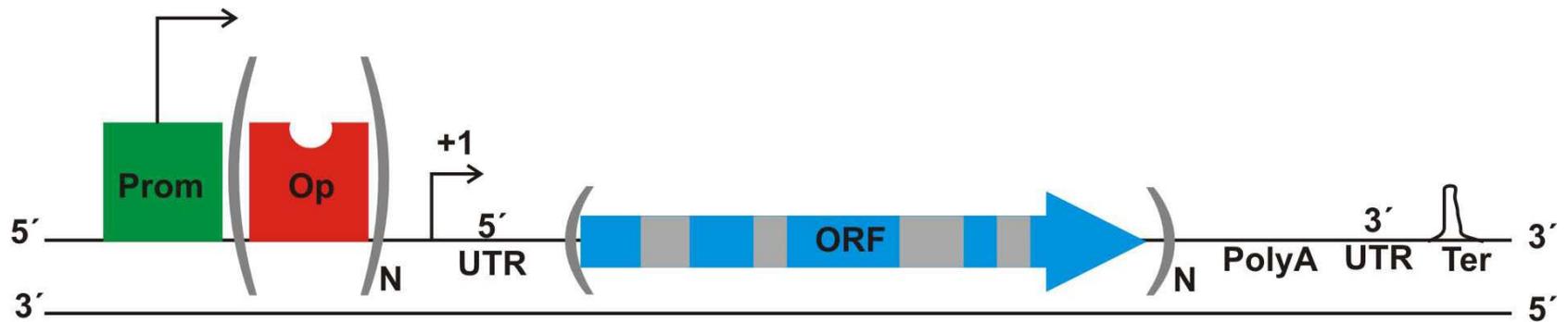
- Conjugación (dos organismos)
- Transformación (ac. nucleicos desnudos)
- Transducción (mediada por virus)

**Manipulación deliberada de la información genética**

# Gen Bacteriano



# Gen Eucariota



# Ingeniería genética



**Construcciones  
genéticas**

# Construcciones genéticas

La generación de **construcciones genéticas** nos introduce en el **clonado molecular**.

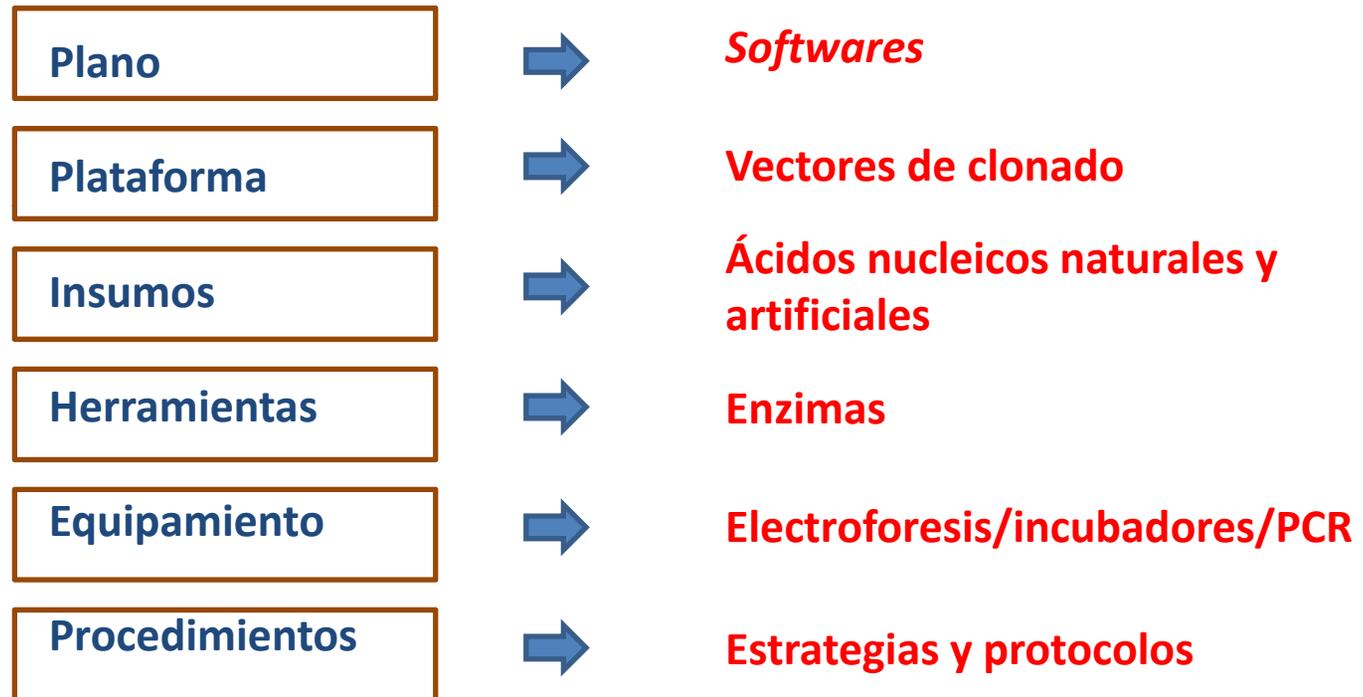


El **clonado molecular** consiste en **multiplicar** copias idénticas de una **molécula**.

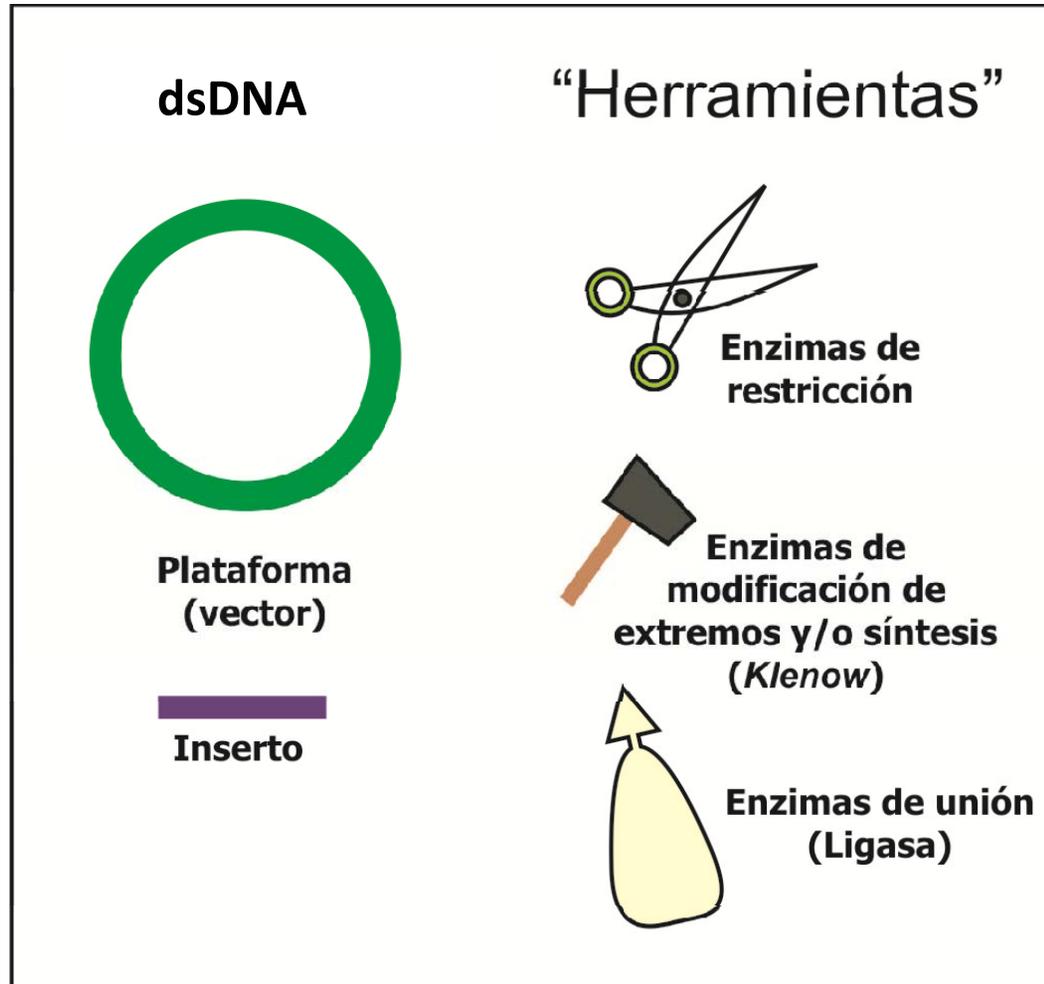


En nuestro caso, las **moléculas** son **ácidos nucleicos**, y la **multiplicación** la logramos **utilizando materia viva**.

# Construcciones genéticas



# Clonado molecular



# Clonado molecular

- Identificar objetivo
  - Diseño *in silico*
  - Aislar la plataforma
  - Aislar el inserto
  - Apertura de la plataforma
  - Compatibilización de extremos
  - Ligación
  - Transferencia horizontal
  - Selección de ORG/plataforma
  - Selección de ORG/plataforma Recombinante
- 
- The diagram uses blue brackets on the right side to group the steps into three categories:
- In silico:** This category includes the first two steps: 'Identificar objetivo' and 'Diseño *in silico*'.
  - In vitro:** This category includes the next five steps: 'Aislar la plataforma', 'Aislar el inserto', 'Apertura de la plataforma', 'Compatibilización de extremos', and 'Ligación'.
  - In vivo:** This category includes the final three steps: 'Transferencia horizontal', 'Selección de ORG/plataforma', and 'Selección de ORG/plataforma Recombinante'.

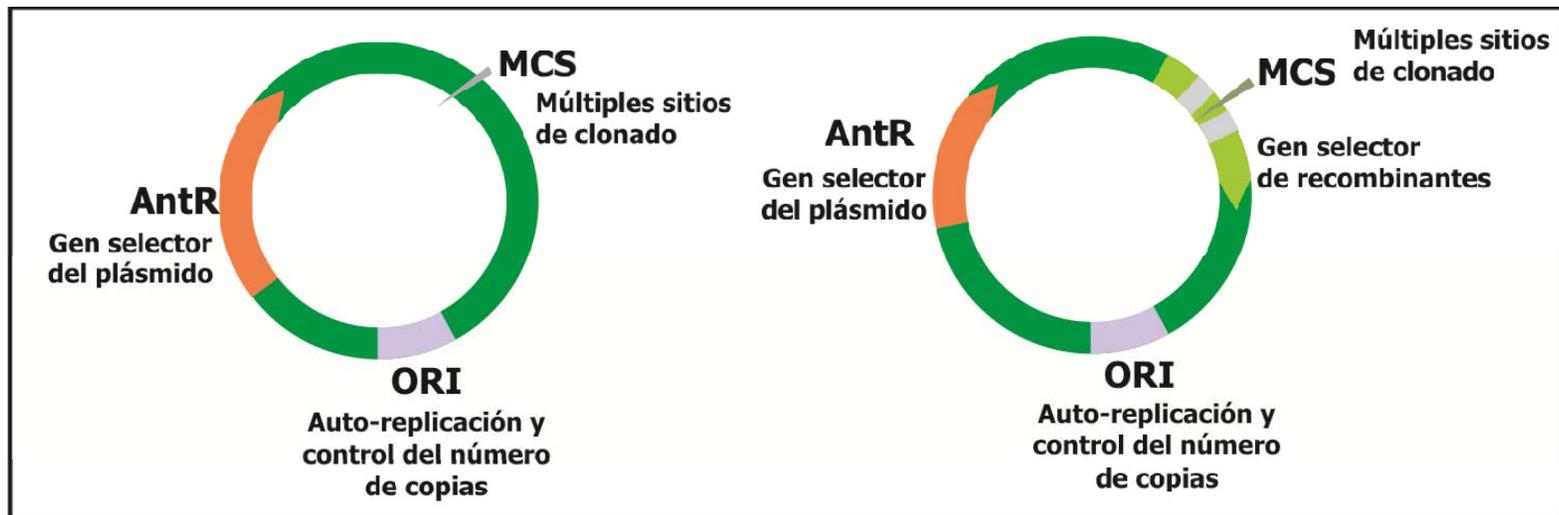
# Clonado molecular

- Identificar objetivo
  - Diseño *in silico*
  - **Aislar la plataforma**
  - Aislar el inserto
  - Apertura de la plataforma
  - Compatibilización de extremos
  - Ligación
  - Transferencia horizontal
  - Selección de ORG/plataforma
  - Selección de ORG/plataforma Recombinante
- 
- The diagram uses blue brackets on the right side to group the steps into three phases:
- In silico**: Includes 'Identificar objetivo' and 'Diseño *in silico*'.
  - In vitro**: Includes 'Aislar la plataforma', 'Aislar el inserto', 'Apertura de la plataforma', 'Compatibilización de extremos', and 'Ligación'.
  - In vivo**: Includes 'Transferencia horizontal', 'Selección de ORG/plataforma', and 'Selección de ORG/plataforma Recombinante'.

# Clonado molecular

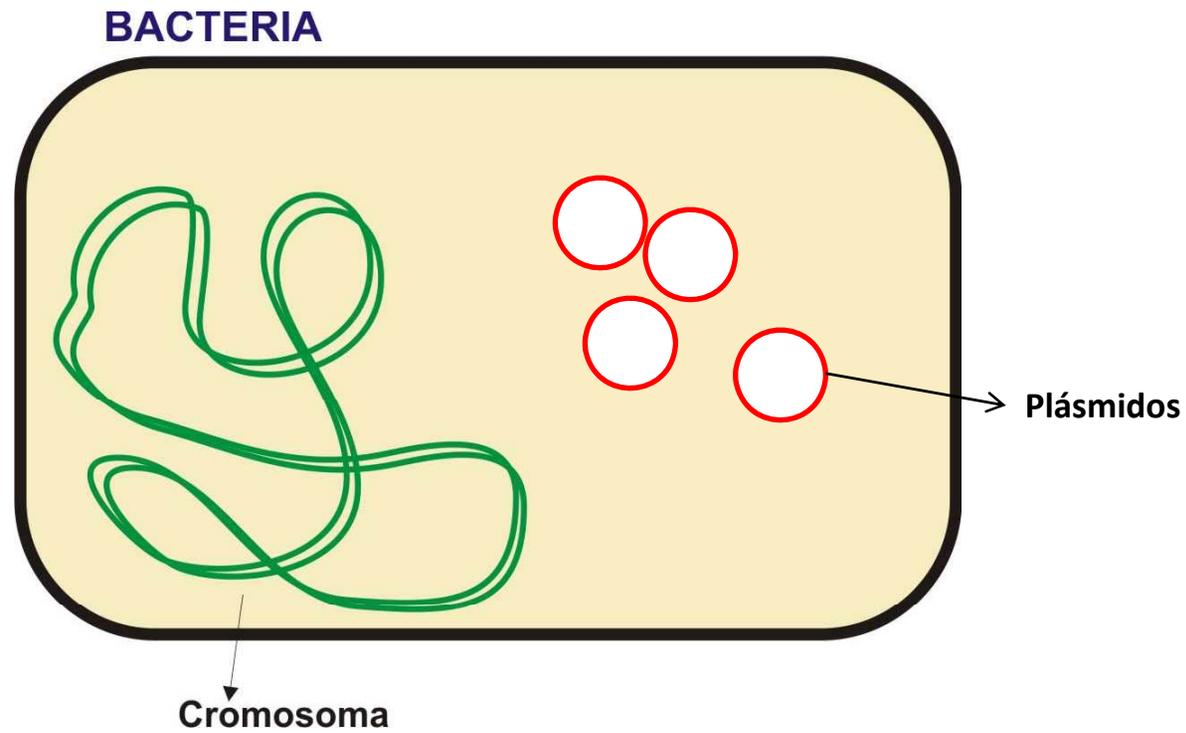
## Aislamiento de la plataforma

- Las plataformas más utilizadas en las construcciones genéticas son los plásmidos.
- Recordemos como es la constitución básica de los plásmidos de clonado...



# Clonado molecular

Aislamiento de la plataforma



# Clonado molecular

Aislamiento de la plataforma

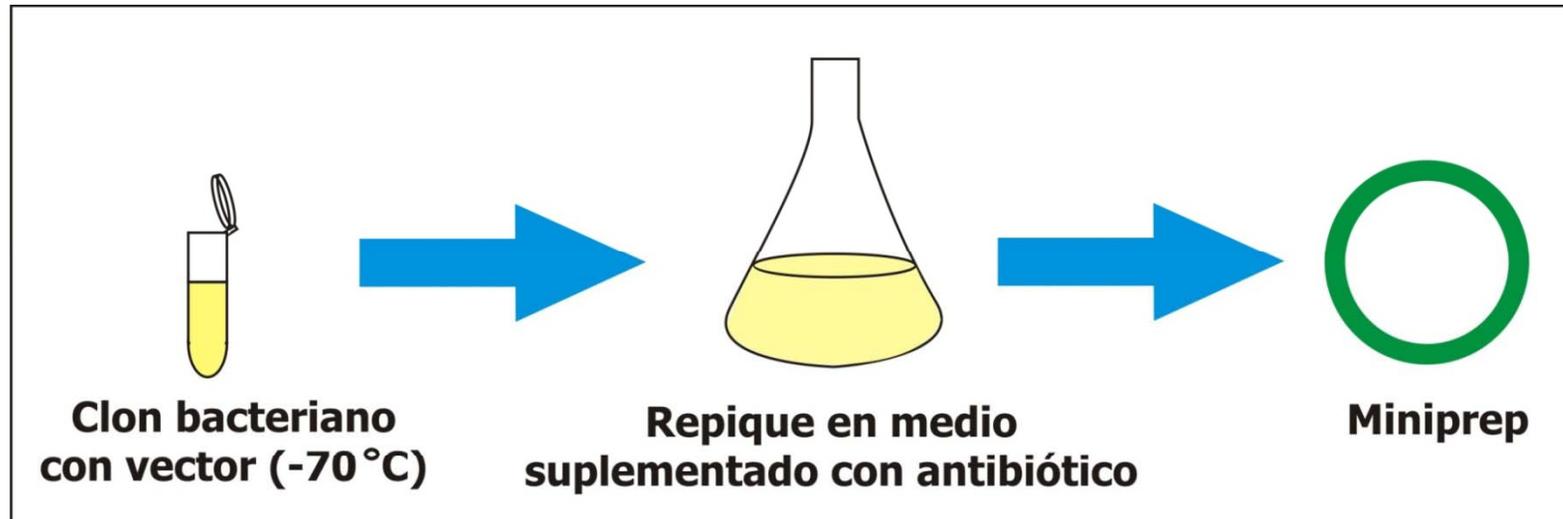
## Aislamiento de una macromolécula biológica

- A** Obtención de BIOMASA (fuente de la macromolécula)
- B** Disgregamiento/Disrupción celular
- C** Separaciones diferenciales
- D** Concentración

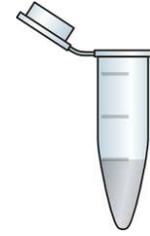
# Clonado molecular

Aislamiento de la plataforma

El protocolo por excelencia para aislar plásmidos a partir de bacterias es la *Miniprep por lisis alcalina*



# Clonado molecular



## Aislamiento de la plataforma

**A**

- 1) Inocular Bacterias en 5 ml de medio de cultivo suplementado con el antibiótico correspondiente (Medio Luria Bertani, comúnmente denominado LB).
- 2) Incubar ON (*Over Night*) a 37°C y 200 rpm.
- 3) Concentrar *pellet* bacteriano por centrifugación (14000 rpm, 30 segundos)
- 4) Resuspender las bacterias en 200 ul de **Solución I** (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM; pH 8).

**B**

- 5) Agregar 300 ul de **Solución II** (SDS 1%, NaOH 0,2 N). Mezclar por inversión.

**C**

- 6) Agregar 300 ul de **Solución III** (Mezcla de Acetato de K y Ácido Acético, pH 5,2). Mezclar por inversión. Agregar RNAsa A.
- 7) Centrifugar y recuperar fase líquida (14000 rpm, 10 minutos).
- 8) Extraer con solventes orgánicos (Fenol:cloroformo y/o cloroformo). Recuperar fase acuosa.

**D**

- 9) Concentrar por precipitación alcohólica agregando 1 volumen de isopropanol e incubando 15 minutos en frío.
- 10) Centrifugar (14000 rpm, 15 minutos), lavar el pellet de DNA con Etanol 70 %, secar y resuspender en 20 ul de agua.

# Clonado molecular

## Aislamiento de la plataforma

Actualmente existe la alternativa de **kits comerciales**, los cuales estandarizan la *miniprep por lisis alcalina*. La diferencia principal respecto al protocolo tradicional es la utilización de matrices cromatográficas para aislar el DNA luego de utilizar las soluciones I, II y III.



# Clonado molecular

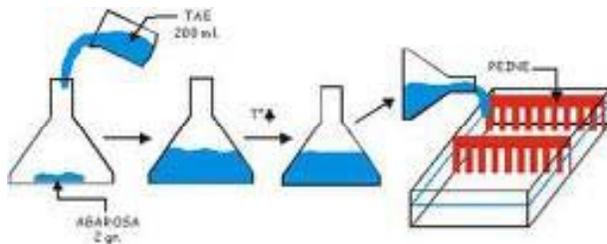
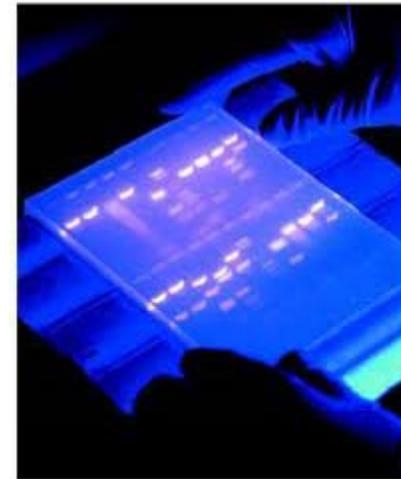
Aislamiento de la plataforma

Diagnóstico analítico del aislamiento de plásmido



**ELECTROFORESIS**  
(gel de agarosa)

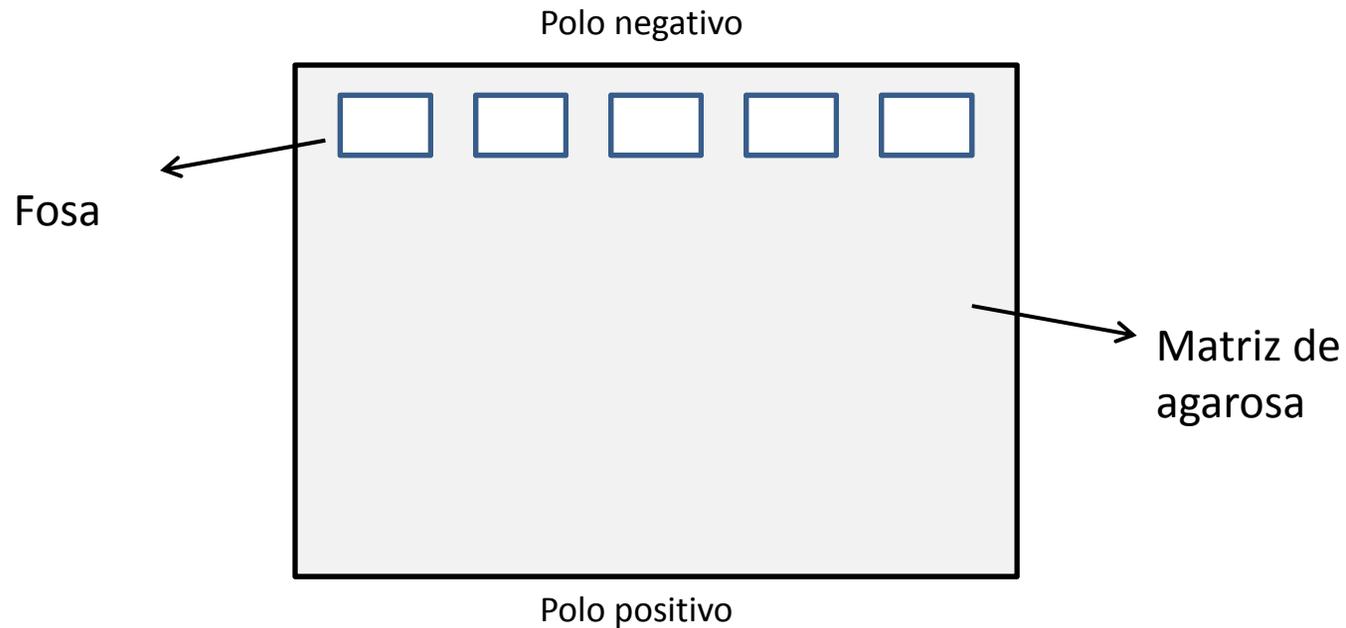
**CUANTIFICACIÓN**  
(DO 260 nm)



# Clonado molecular

Aislamiento de la plataforma

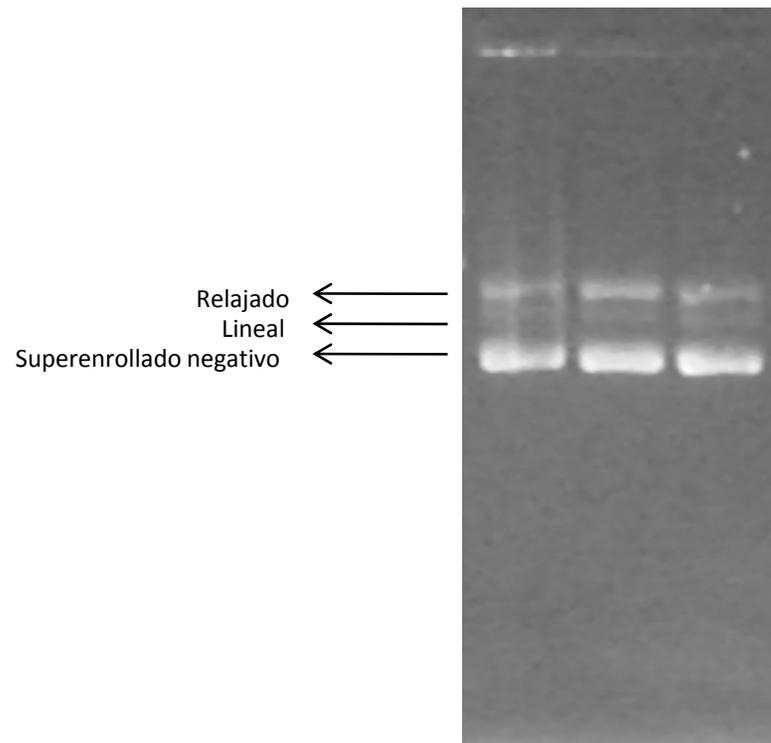
**ELECTROFORESIS**  
(gel de agarosa 0,8%)



# Clonado molecular

Aislamiento de la plataforma

**ELECTROFORESIS**  
(gel de agarosa 0,8%)



# Clonado molecular

- Identificar objetivo
  - Diseño *in silico*
  - Aislar la plataforma
  - **Aislar el inserto**
  - Apertura de la plataforma
  - Compatibilización de extremos
  - Ligación
  - Transferencia horizontal
  - Selección de ORG/plataforma
  - Selección de ORG/plataforma Recombinante
- 
- The diagram uses blue brackets on the right side to group the steps into three categories:
- In silico:** This category includes the first two steps: 'Identificar objetivo' and 'Diseño *in silico*'.
  - In vitro:** This category includes the next five steps: 'Aislar la plataforma', '**Aislar el inserto**', 'Apertura de la plataforma', 'Compatibilización de extremos', and 'Ligación'.
  - In vivo:** This category includes the final three steps: 'Transferencia horizontal', 'Selección de ORG/plataforma', and 'Selección de ORG/plataforma Recombinante'.

# Clonado molecular

## Aislamiento del inserto

- El inserto de una construcción genética debe ser un dsDNA.
- La fuente del inserto puede ser diversa, pero en general podemos clasificarla en dos grupos: **origen natural** u **origen artificial**.
- Es muy importante considerar la fuente del inserto para identificar el tipo de extremos que tiene la molécula.

# Clonado molecular

Aislamiento del inserto

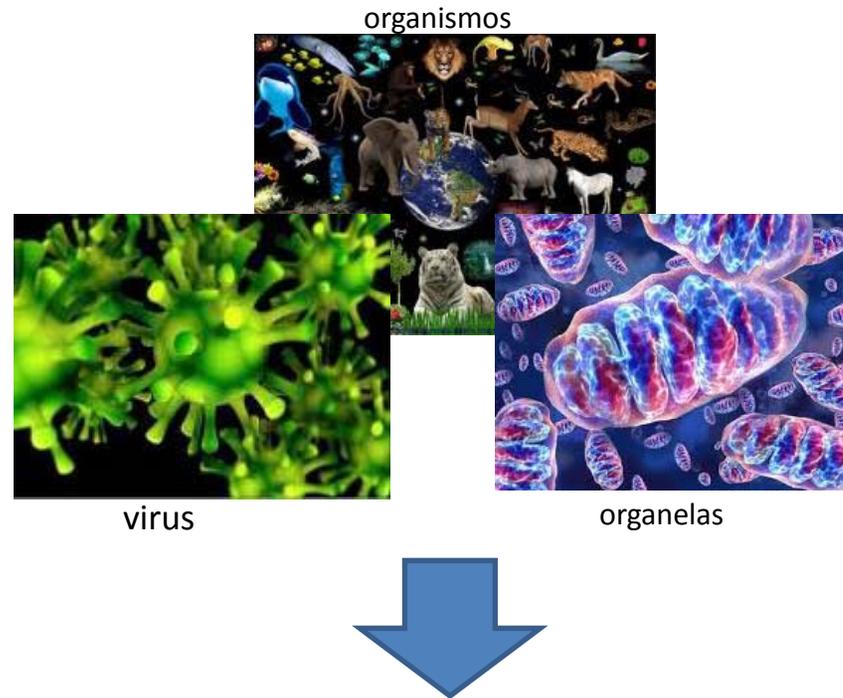
Tipos de insertos



**ER:** extremo de digestión con endonucleasas; **M:** extremo de fragmentación mecánica; **SE:** Extremo de síntesis enzimática; **SQ:** Extremo de síntesis química

# Clonado molecular

Aislamiento del inserto: Fuentes naturales



**Aislamiento de molécula genómica**

# Clonado molecular

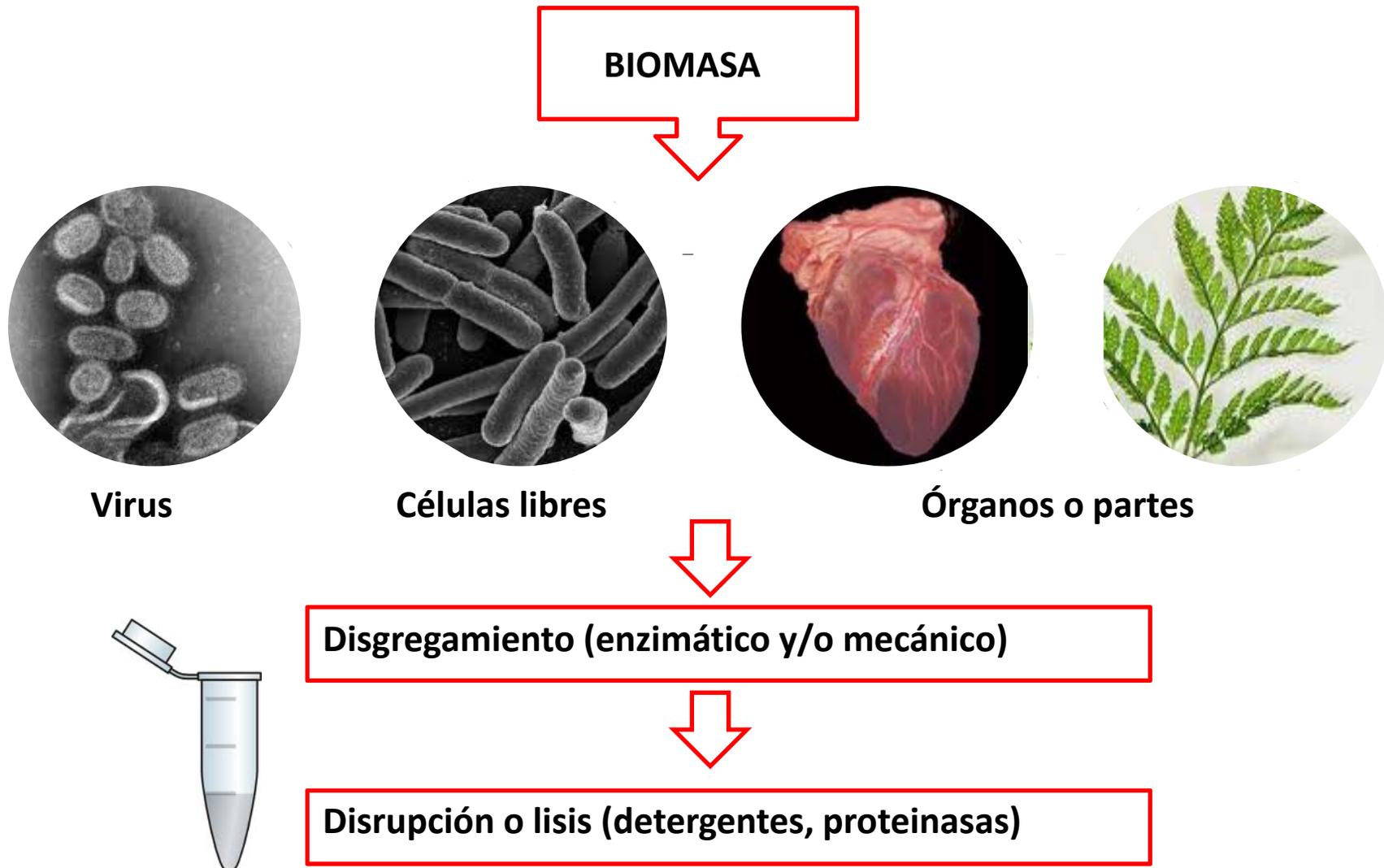
Aislamiento del inserto: Fuentes naturales

## Aislamiento de una macromolécula biológica

- A** Obtención de BIOMASA (fuente de la macromolécula)
- B** Disgregamiento/Disrupción celular
- C** Separaciones diferenciales
- D** Concentración

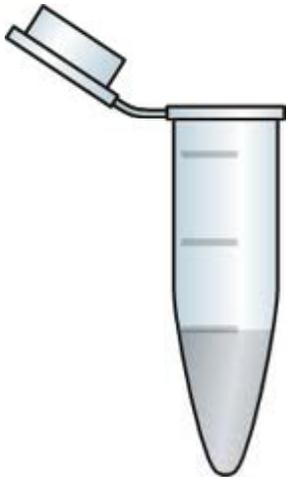
# Clonado molecular

Aislamiento del inserto: Fuentes naturales

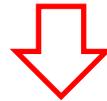


# Clonado molecular

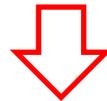
Aislamiento del inserto: Fuentes naturales



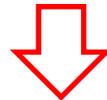
**Separaciones diferenciales**



**Concentración (precipitación alcohólica)**



**Diagnóstico de calidad y cantidad**



**Fraccionamiento**



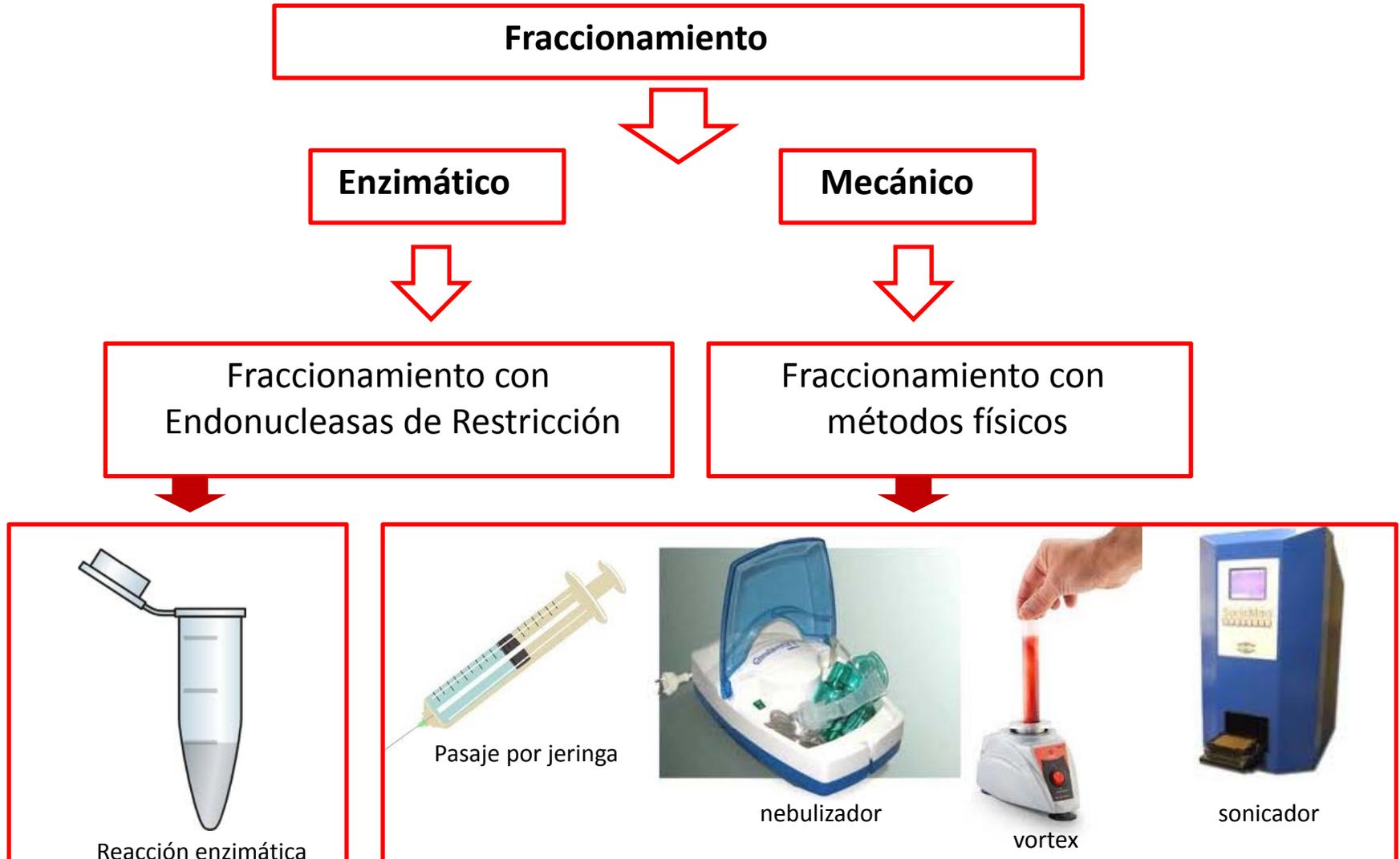
**Enzimático**



**Mecánico**

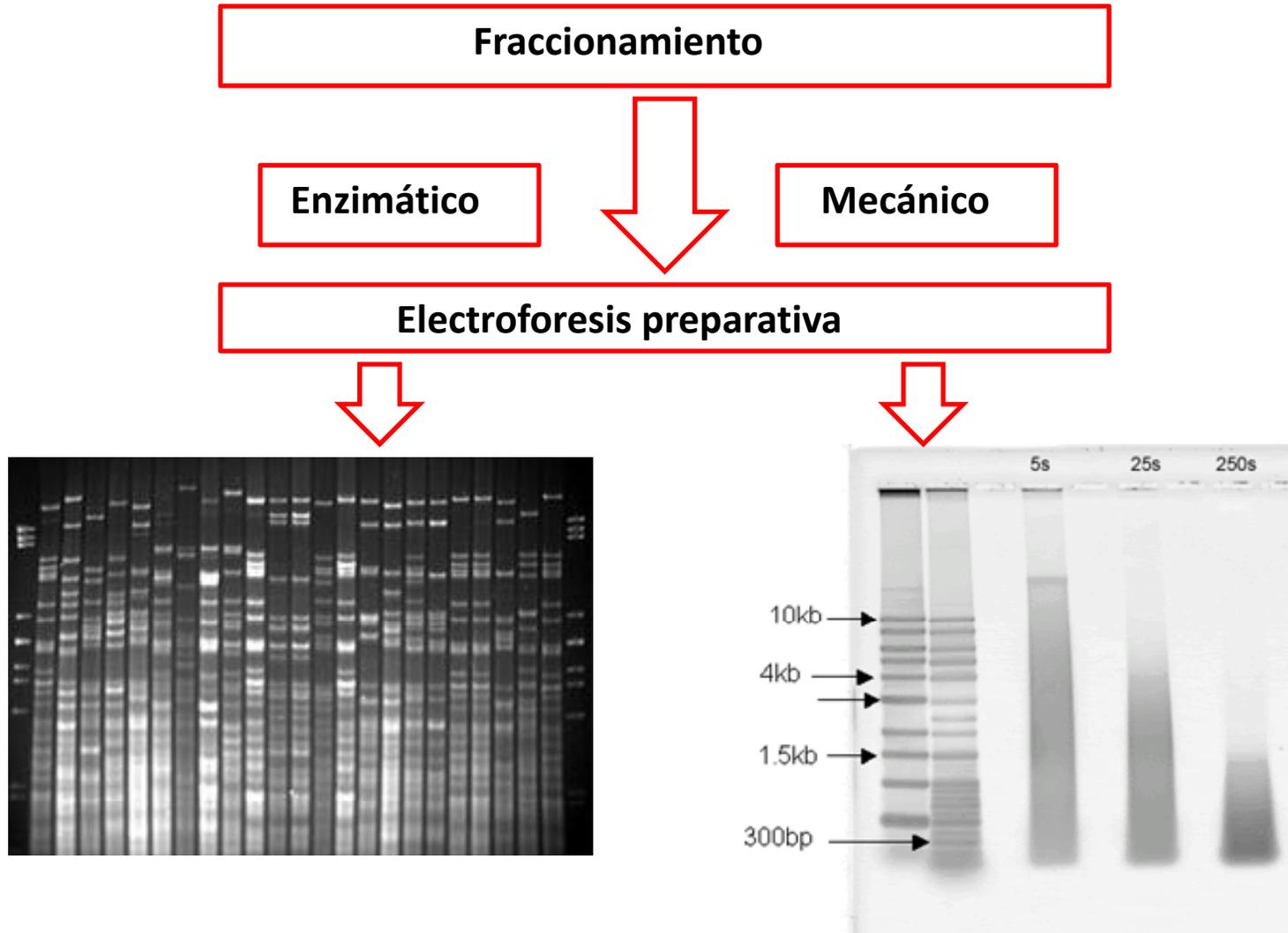
# Clonado molecular

Aislamiento del inserto: Fuentes naturales



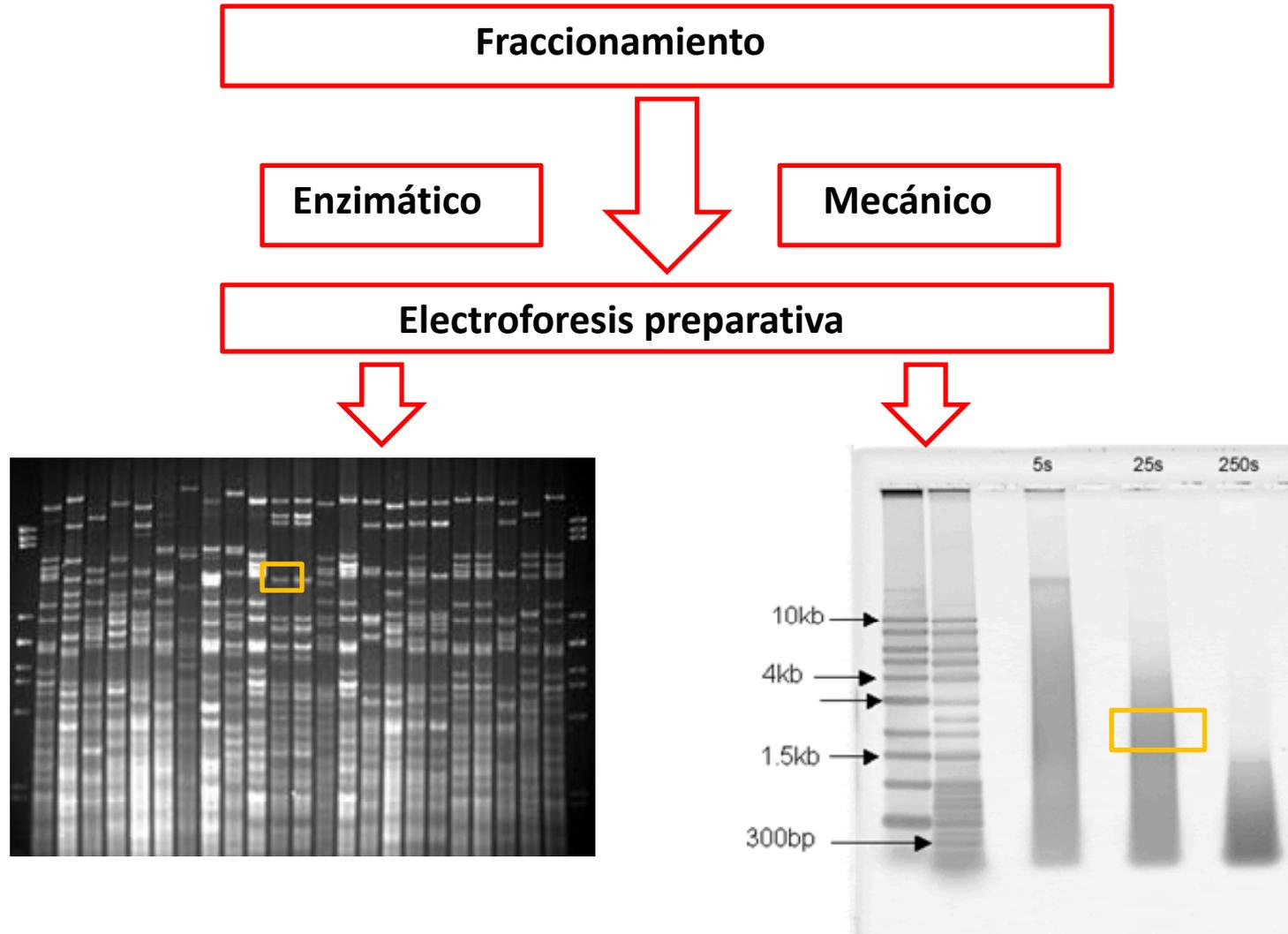
# Clonado molecular

Aislamiento del inserto: Fuentes naturales



# Clonado molecular

Aislamiento del inserto: Fuentes naturales

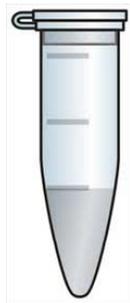


Se cortan los tacos de agarosa con el fragmento de interés

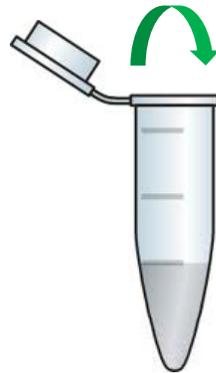
# Clonado molecular

Aislamiento del inserto: Fuentes naturales

Taco de agarosa con fragmentos

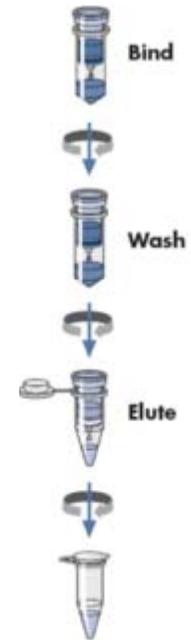


Tubo con taco



Tubo con taco + caótropro + calor

Solución caótropro



Solución caótropro

- Ioduro de sodio saturante
- Perclorato de sodio
- Sales de tiocianato



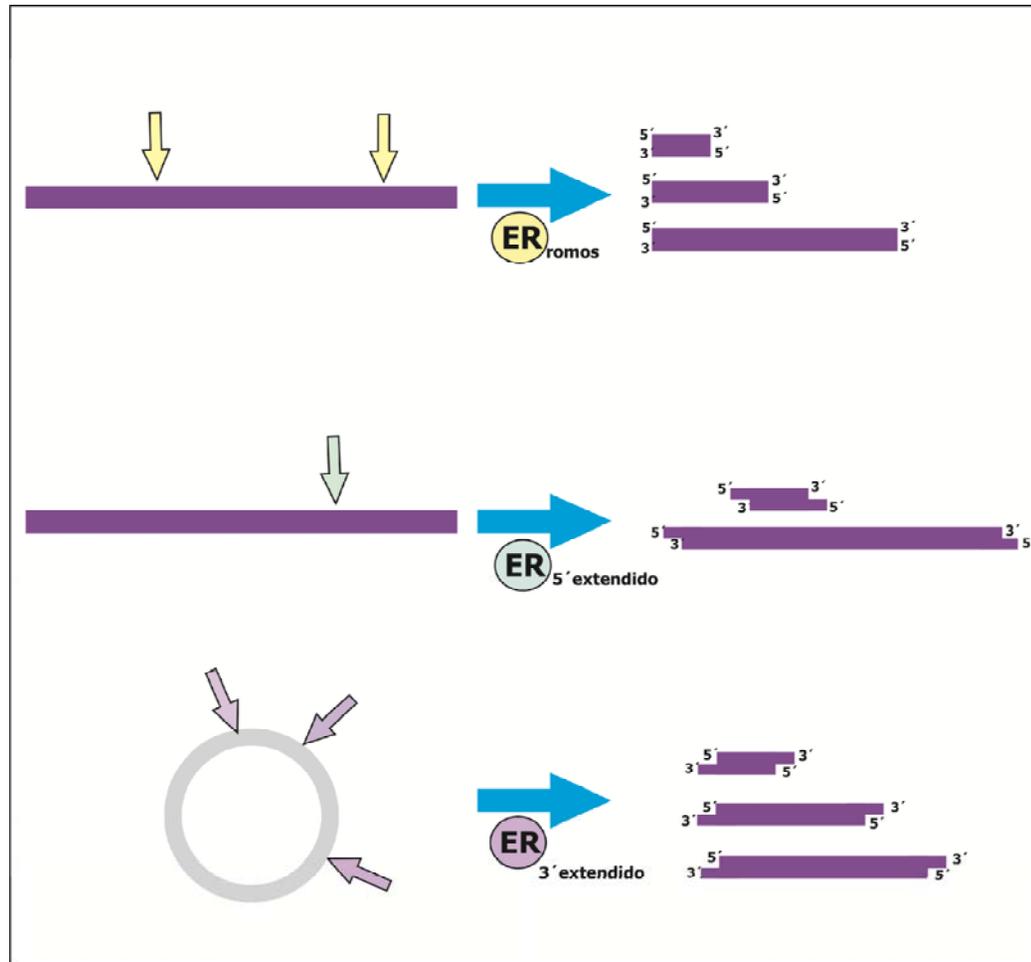
espectrofotómetro



microcentrífuga

# Clonado molecular

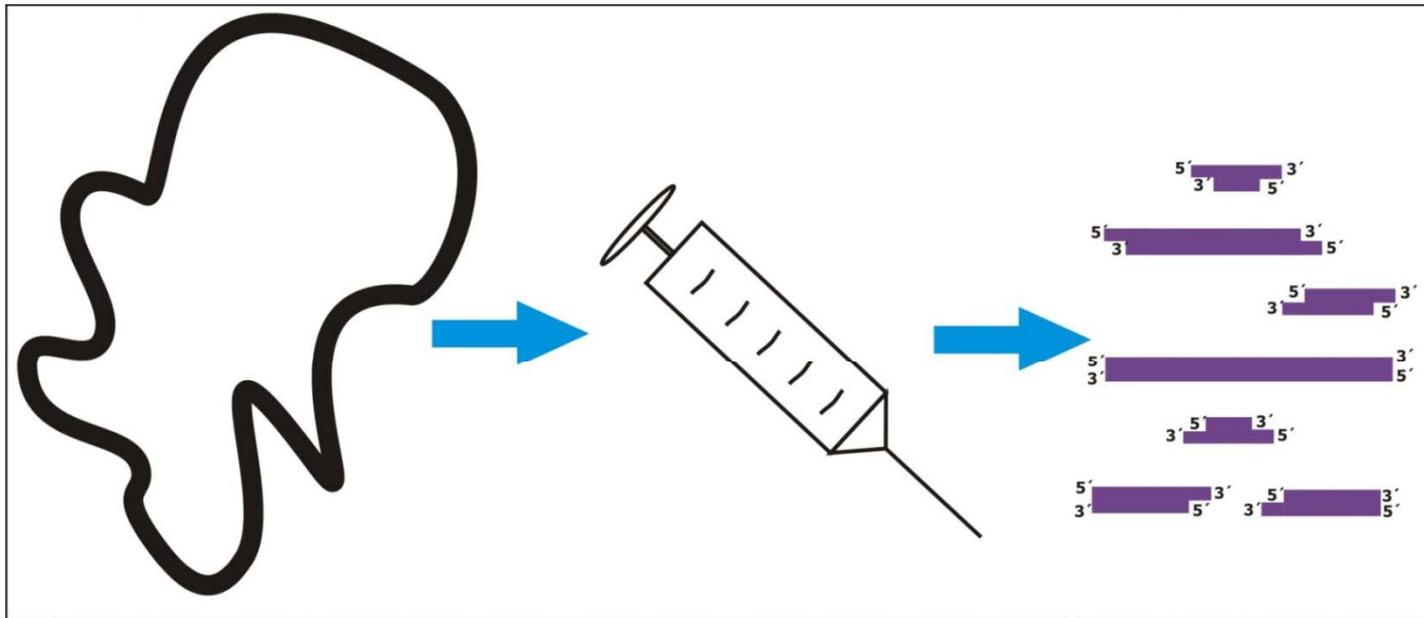
Aislamiento del inserto: Fuentes naturales



Fragmentación enzimática

# Clonado molecular

Aislamiento del inserto: Fuentes naturales



Fragmentación mecánica

# Clonado molecular

Aislamiento del inserto: Fuentes artificiales



Información de secuencia en bases de datos

Diseño de oligonucleótidos

Síntesis de oligonucleótidos

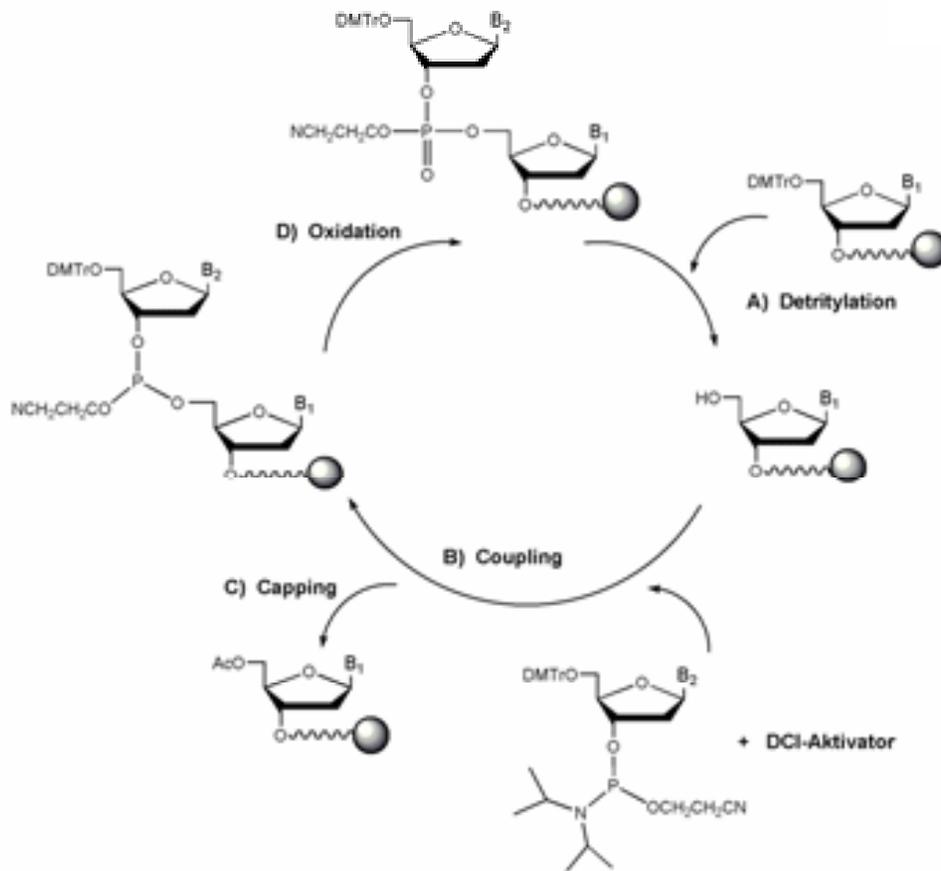
Replicación *in vitro*  
(PCR)

Hibridación *in vitro*

Necesidad de DNA original  
como molde de reacción

# Clonado molecular

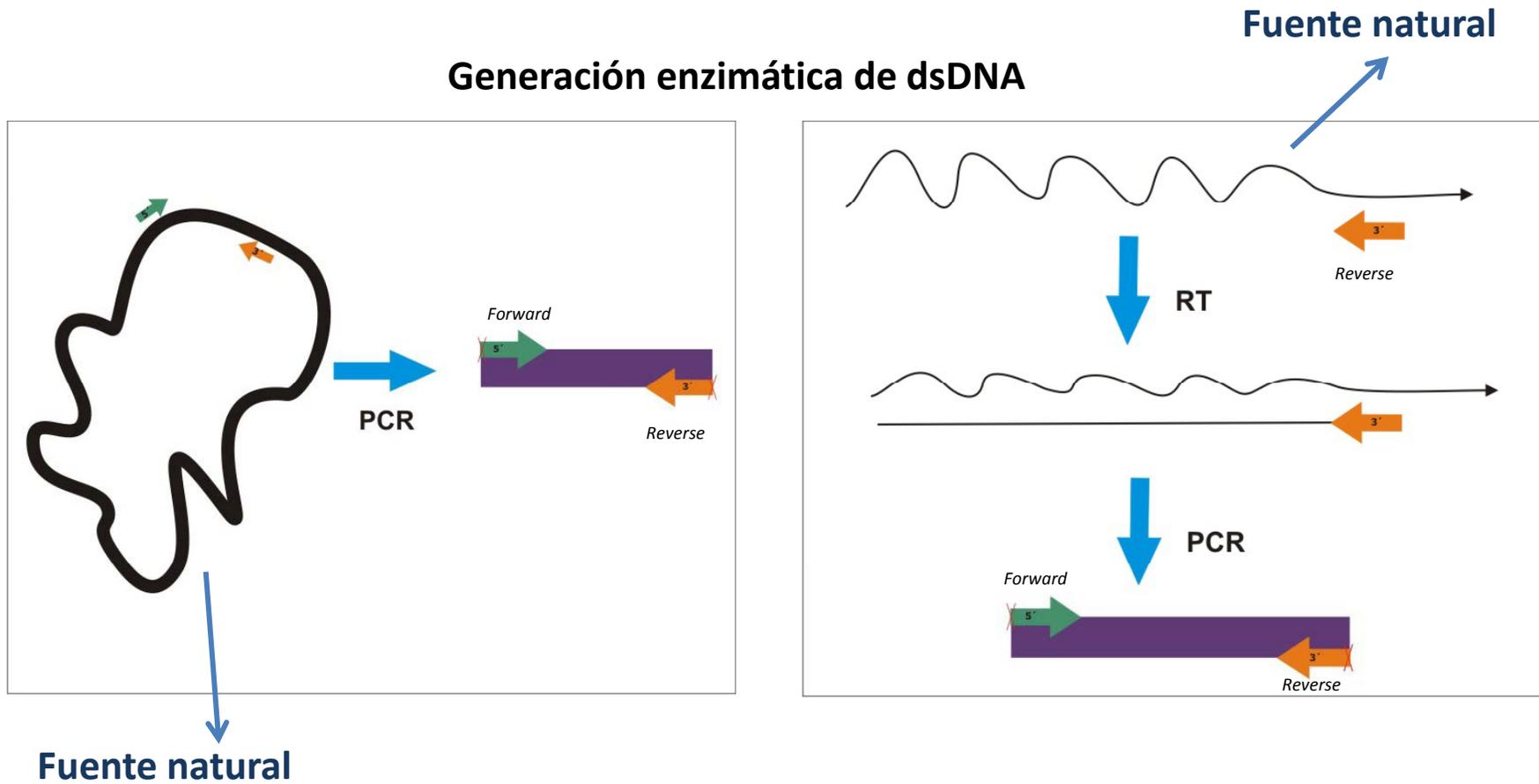
Aislamiento del inserto: Fuentes artificiales



Síntesis química de oligonucleótidos

# Clonado molecular

Aislamiento del inserto: Fuentes artificiales



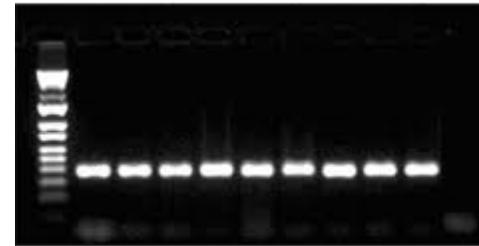
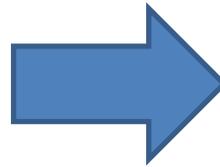
# Clonado molecular

Aislamiento del inserto: Fuentes artificiales

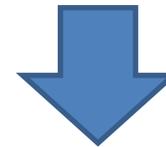


termociclador

PCR



Electroforesis

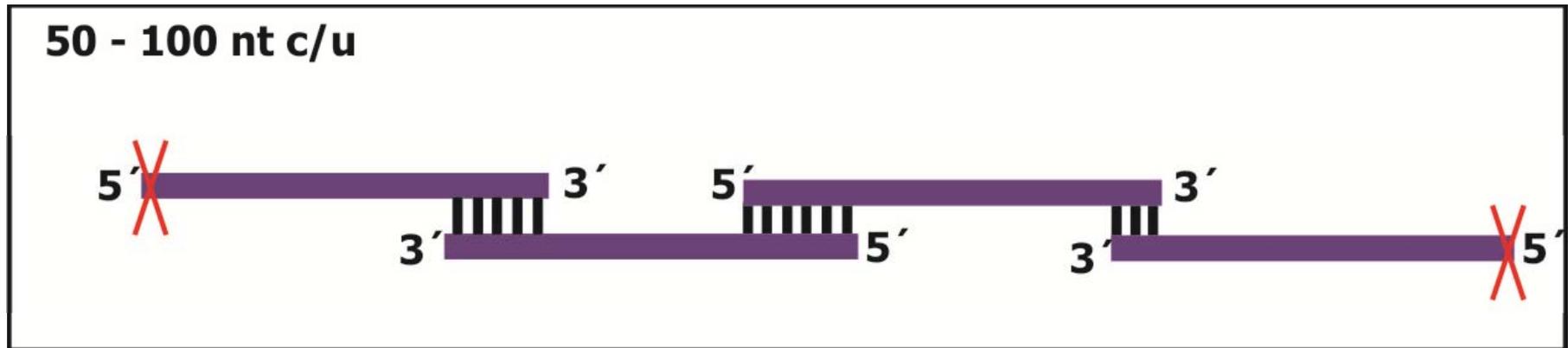


Amplicón aislado  
a partir de gel

# Clonado molecular

Aislamiento del inserto: Fuentes artificiales

Síntesis enzimática en ausencia de fuente natural



Incubar a 95 °C



Incubar a 60 °C



Incubar con *Taq* pol y  
*Taq* ligasa



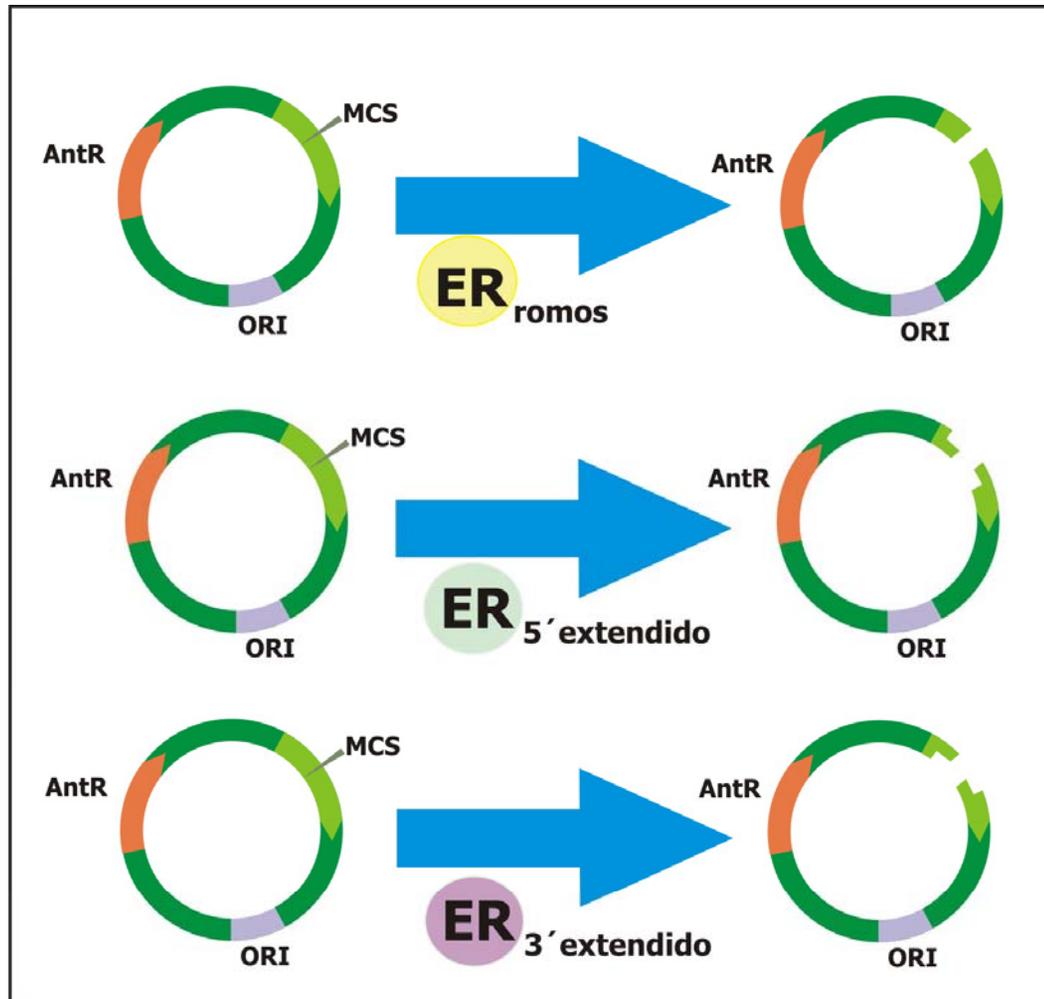
dsDNA  
en solución

# Clonado molecular

- Identificar objetivo
  - Diseño *in silico*
  - Aislar la plataforma
  - Aislar el inserto
  - **Apertura de la plataforma**
  - **Compatibilización de extremos**
  - Ligación
  - Transferencia horizontal
  - Selección de ORG/plataforma
  - Selección de ORG/plataforma Recombinante
- 
- The diagram uses blue brackets to group the steps into three phases:
- In silico:** Includes 'Identificar objetivo' and 'Diseño *in silico*'.
  - In vitro:** Includes 'Aislar la plataforma', 'Aislar el inserto', 'Apertura de la plataforma', 'Compatibilización de extremos', and 'Ligación'.
  - In vivo:** Includes 'Transferencia horizontal', 'Selección de ORG/plataforma', and 'Selección de ORG/plataforma Recombinante'.

# Clonado molecular

Apertura del plásmido y compatibilización de extremos



# Clonado molecular

## Apertura del plásmido y compatibilización de extremos

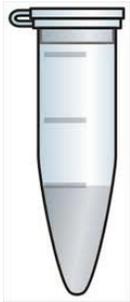
Reactivo	Volumen
Buffer Reacción 10X	1 $\mu$ l
Plásmido	1 $\mu$ g (vol. necesario)
ER (10 U/ $\mu$ l)	2-5 unidades
H <sub>2</sub> O	c.s.p.
<b>Vf</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>

Incubar a temperatura de reacción: 1-4 horas

Inactivar 20 minutos a 75°C

# Clonado molecular

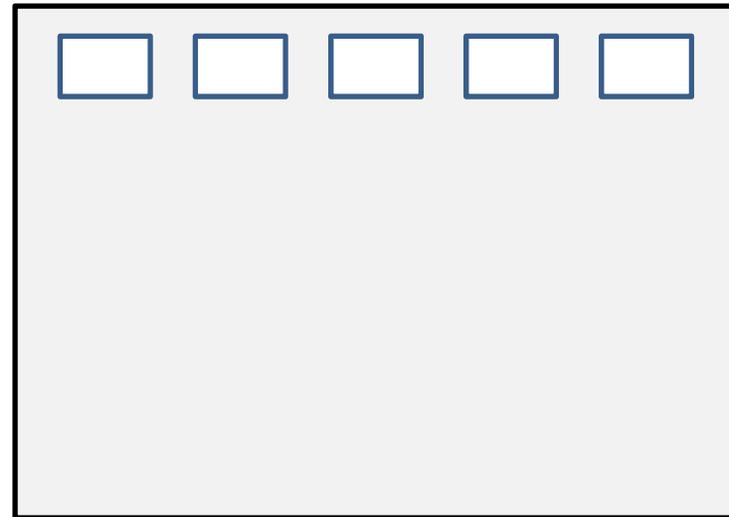
Apertura del plásmido y compatibilización de extremos



10 µl  
Digestión enzimática  
plásmido

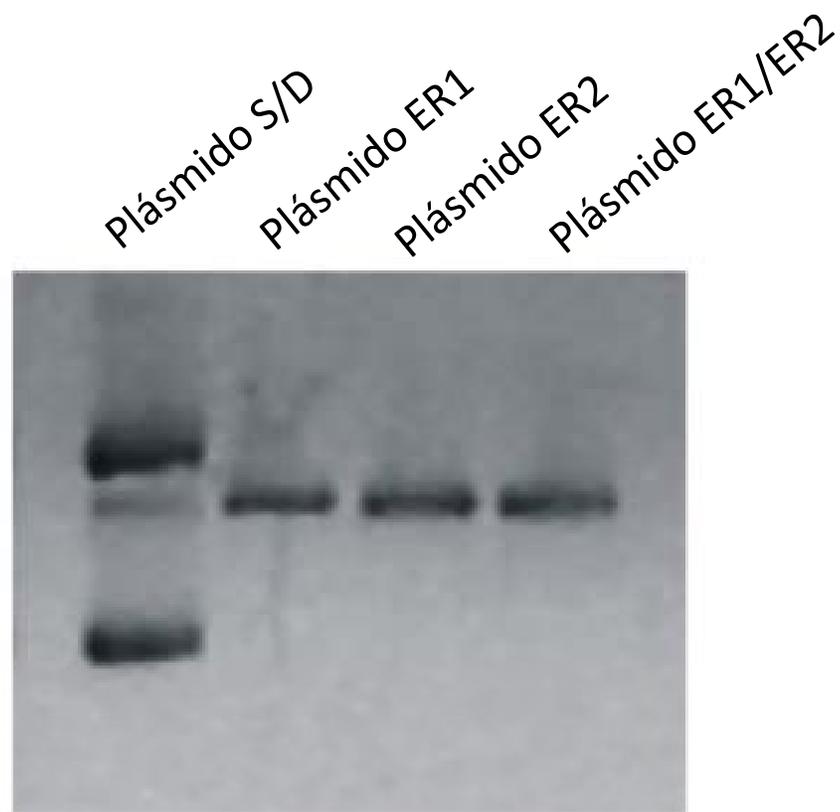


Electroforesis  
Analítica  
(1-2 µl)



# Clonado molecular

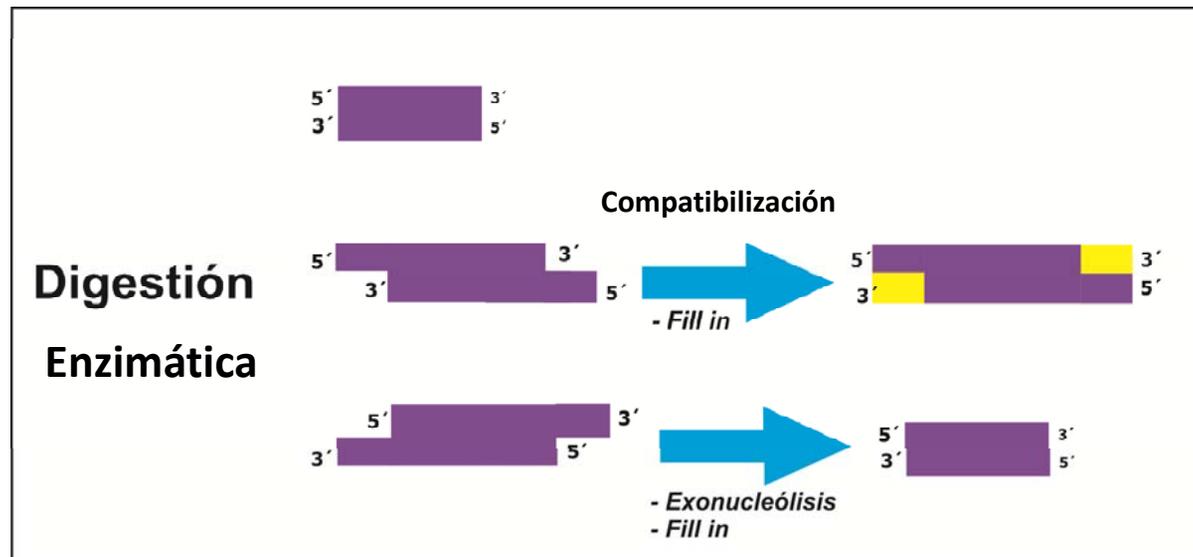
Apertura del plásmido y compatibilización de extremos



# Clonado molecular

Apertura del plásmido y compatibilización de extremos

Compatibilización de extremos (modificar a Romo)



# Clonado molecular

## Apertura del plásmido y compatibilización de extremos

Reactivo <i>Fill in</i>	Volumen
Buffer Reacción 10X	1 $\mu$ l
Plásmido lineal	100 ng (vol. necesario)
dNTP's	100 $\mu$ M <sub>final</sub>
Klenow (1 u/ $\mu$ l)	1 unidad
H <sub>2</sub> O	c.s.p.
<b>Vf</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>



Incubar a 37 °C: 15 minutos

Inactivar 20 minutos a 75°C. Extraer con solventes. Precipitación alcohólica

En caso de extremos 3' extendidos, primero incubar sin dNTPs, y luego con dNTP's

# Clonado molecular

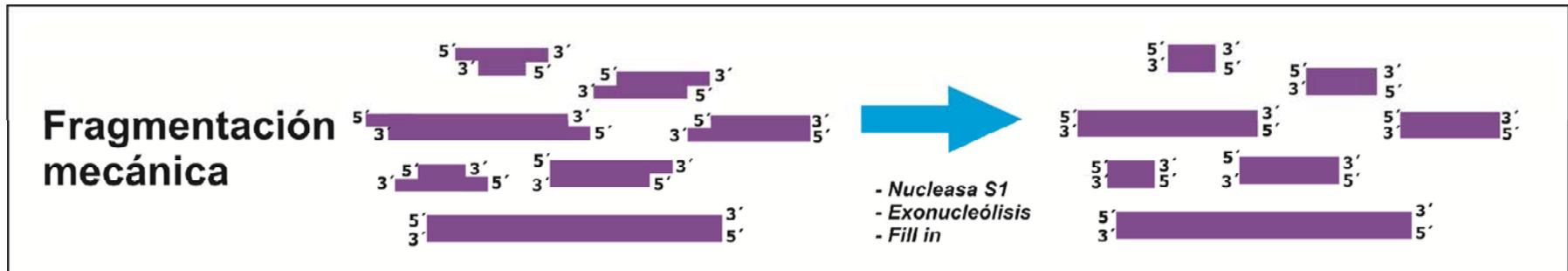
## Apertura del plásmido y compatibilización de extremos

- En resumen, el plásmido debe linearizarse con ER adecuadas, dejando los extremos compatibles para la ligación al inserto.
- En caso que no existan cohesivos compatibles con el inserto, los extremos del plásmido lineal deben ser transformados en romos.
- Así como puede modificarse a la molécula plasmídica, también es posible corregir los extremos de las moléculas inserto para facilitar su posterior clonado. Este es el caso de aquellos insertos derivados de fragmentación mecánica.

# Clonado molecular

Apertura del plásmido y compatibilización de extremos

Modificación de extremos de los fragmentos de dsDNA obtenidos por fragmentación mecánica



dsDNA con extremos  
diversos

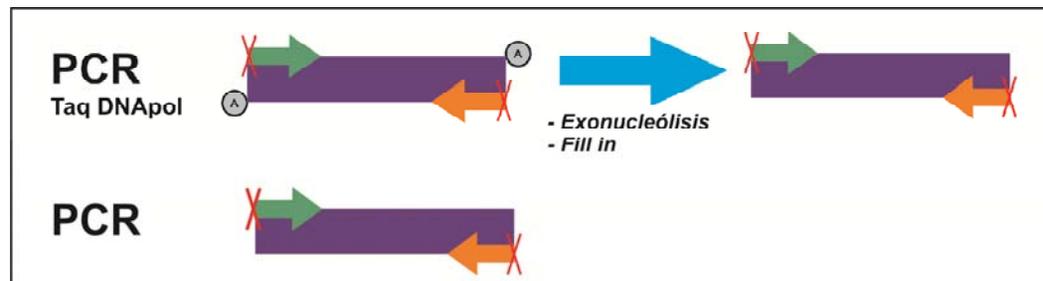
dsDNA con extremos  
romos

Siempre luego de modificar, es necesario extraer con solventes orgánicos y precipitar.

# Clonado molecular

## Apertura del plásmido y compatibilización de extremos

Modificación de extremos de los fragmentos de dsDNA obtenidos por PCR utilizando Taq DNA pol



dsDNA con extremos  
3'ext

dsDNA con extremos  
romos

Siempre luego de modificar, es necesario extraer con solventes orgánicos y precipitar. Si se desea fosforilar los extremos, es preciso tratar con PNK y ATP en condiciones de reacción adecuadas.

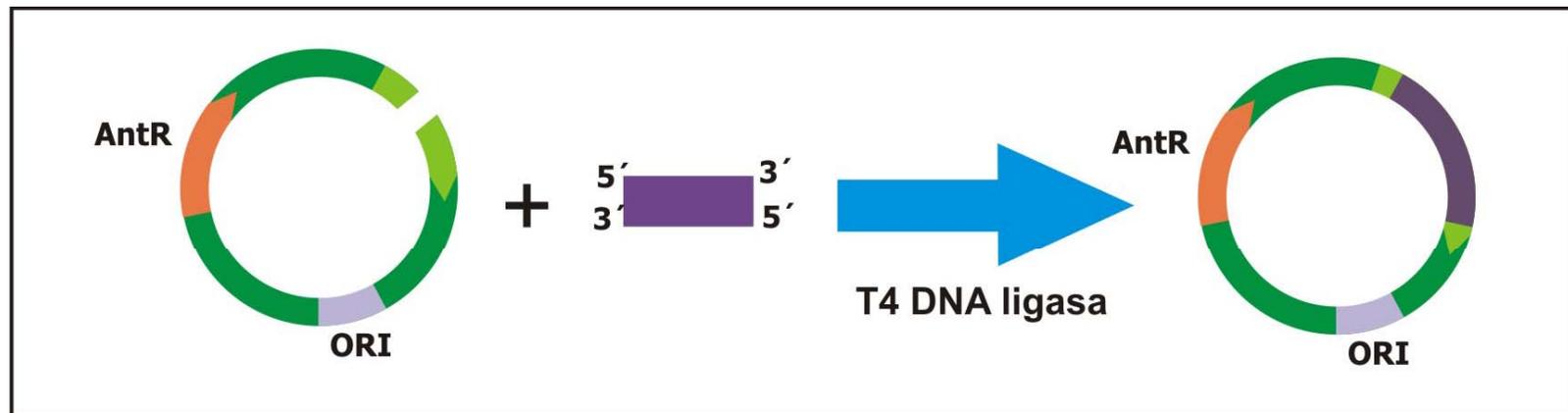
# Clonado molecular

- Identificar objetivo
  - Diseño *in silico*
  - Aislar la plataforma
  - Aislar el inserto
  - Apertura de la plataforma
  - Compatibilización de extremos
  - **Ligación**
  - Transferencia horizontal
  - Selección de ORG/plataforma
  - Selección de ORG/plataforma Recombinante
- 
- The diagram uses blue brackets on the right side to group the steps into three categories:
- In silico**: Includes 'Identificar objetivo' and 'Diseño *in silico*'.
  - In vitro**: Includes 'Aislar la plataforma', 'Aislar el inserto', 'Apertura de la plataforma', 'Compatibilización de extremos', and 'Ligación'.
  - In vivo**: Includes 'Transferencia horizontal', 'Selección de ORG/plataforma', and 'Selección de ORG/plataforma Recombinante'.

# Clonado molecular

Ligación entre el vector lineal y el inserto

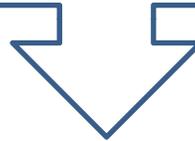
Una vez obtenidas las **moléculas de plásmido lineal e inserto**, en ambos casos **con extremos compatibles** (romos o cohesivos compatibles), se procede con la etapa de **ligación enzimática**.



# Clonado molecular

Ligación entre el vector lineal y el inserto

Ya disponibles vector lineal e insertos (ambos compatibles y de concentración conocida), se procede a establecer la relación molecular entre ambas moléculas.



$$\frac{\text{ng inserto}}{\text{pb inserto}} = R \frac{\text{ng plásmido}}{\text{pb plásmido}} \quad 3 < R < 10$$

Esta cuenta deriva de relacionar el número de moléculas de plásmido e inserto.

# Clonado molecular

## Ligación entre el vector lineal y el inserto

Ya disponibles vector lineal e insertos (ambos compatibles y de concentración conocida), se procede a establecer la relación molecular entre ambas moléculas.

$$\frac{\text{ng inserto}}{\text{pb inserto}} = R \frac{\text{ng plásmido}}{\text{pb plásmido}}$$

(Usualmente 10-50 ng)

$3 < R < 10$

Extremos cohesivos      Extremos romos

(Dato conocido)      (Dato conocido)

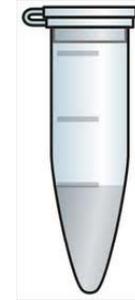
(Incógnita)

Esta cuenta deriva de relacionar el número de moléculas de plásmido e inserto.

# Clonado molecular

Ligación entre el vector lineal y el inserto

Reactivo <i>Ligación</i>	Volumen
Buffer Reacción 10X	1 $\mu$ l
Plásmido lineal	10 ng (vol. necesario)
Inserto	Ver fórmula anterior
DNA ligasa (1 U/ $\mu$ l)	1 unidad
H <sub>2</sub> O	c.s.p.
<b>Vf</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>



Incubar a 22 °C: 1 hora; o a 16°C: 4 horas; o a 4°C: ON.

# Clonado molecular

## Ligación entre el vector lineal y el inserto

- Las ligaciones a bajas temperaturas son recomendables para moléculas con extremos romos.
- A su vez, para optimizar aún más la ligación, es posible adicionar PEG<sub>8000</sub> al 15% para disminuir la movilidad de las moléculas.
- Recordar que sólo se catalizará la formación de enlaces fosfodiéster si existe un grupo fosfato 5' y un grupo OH en el 3' de cada molécula.

# Clonado molecular

Ligación entre el vector lineal y el inserto

Principales moléculas obtenidas durante la ligación del plásmido lineal con el inserto.



Plásmido lineal

+



Inserto

# Clonado molecular

Ligación entre el vector lineal y el inserto

Principales moléculas obtenidas durante la ligación del plásmido lineal con el inserto.



Como estrategia para disminuir la presencia de moléculas no deseables puede **desfosforilarse el vector lineal** antes de someterlo a ligación con el inserto.

Esto no puede realizarse para el caso donde el inserto sea un amplicón de PCR, dado que este tipo de moléculas no suele estar fosforilado en sus extremos.

# Clonado molecular

- Identificar objetivo
  - Diseño *in silico*
  - Aislar la plataforma
  - Aislar el inserto
  - Apertura de la plataforma
  - Compatibilización de extremos
  - Ligación
  - **Transferencia horizontal**
  - Selección de ORG/plataforma
  - Selección de ORG/plataforma Recombinante
- In silico*
- In vitro*
- In vivo*

# Clonado molecular

## Transferencia horizontal a bacterias

- Una vez ligadas las moléculas de vector e inserto, es preciso transferirlas a bacterias para así posibilitar su multiplicación y posterior selección (**clonación molecular**).
- Para este fin, existen cepas de laboratorio de *Escherichia coli*, las cuales son inocuas para el ser humano y deficientes para la supervivencia en la naturaleza.
- El mecanismo de ingreso del DNA a la bacteria se denomina **Transformación**, fenómeno natural que es mimetizado en condiciones de laboratorio.

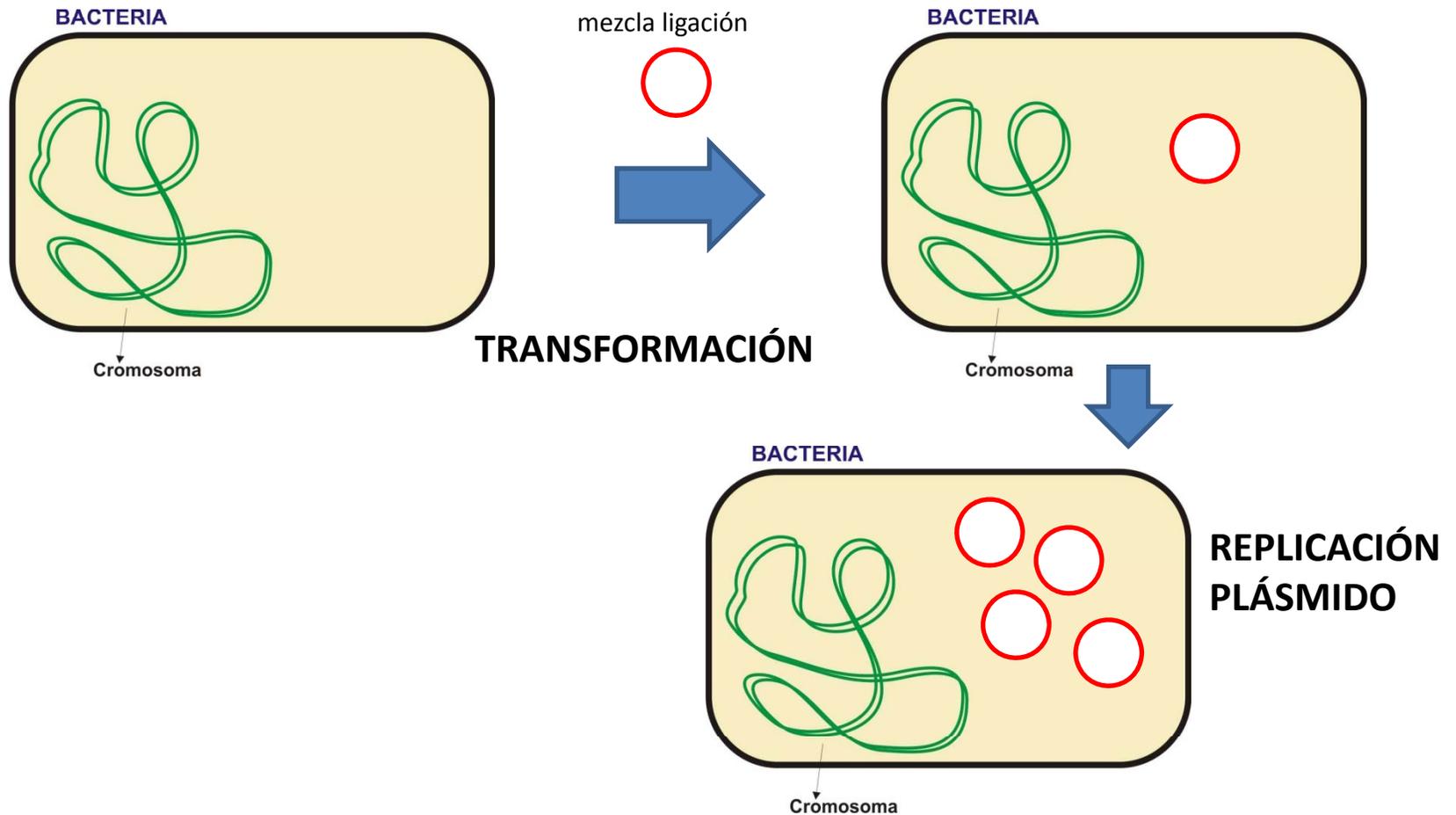
# Clonado molecular

Transferencia horizontal a bacterias



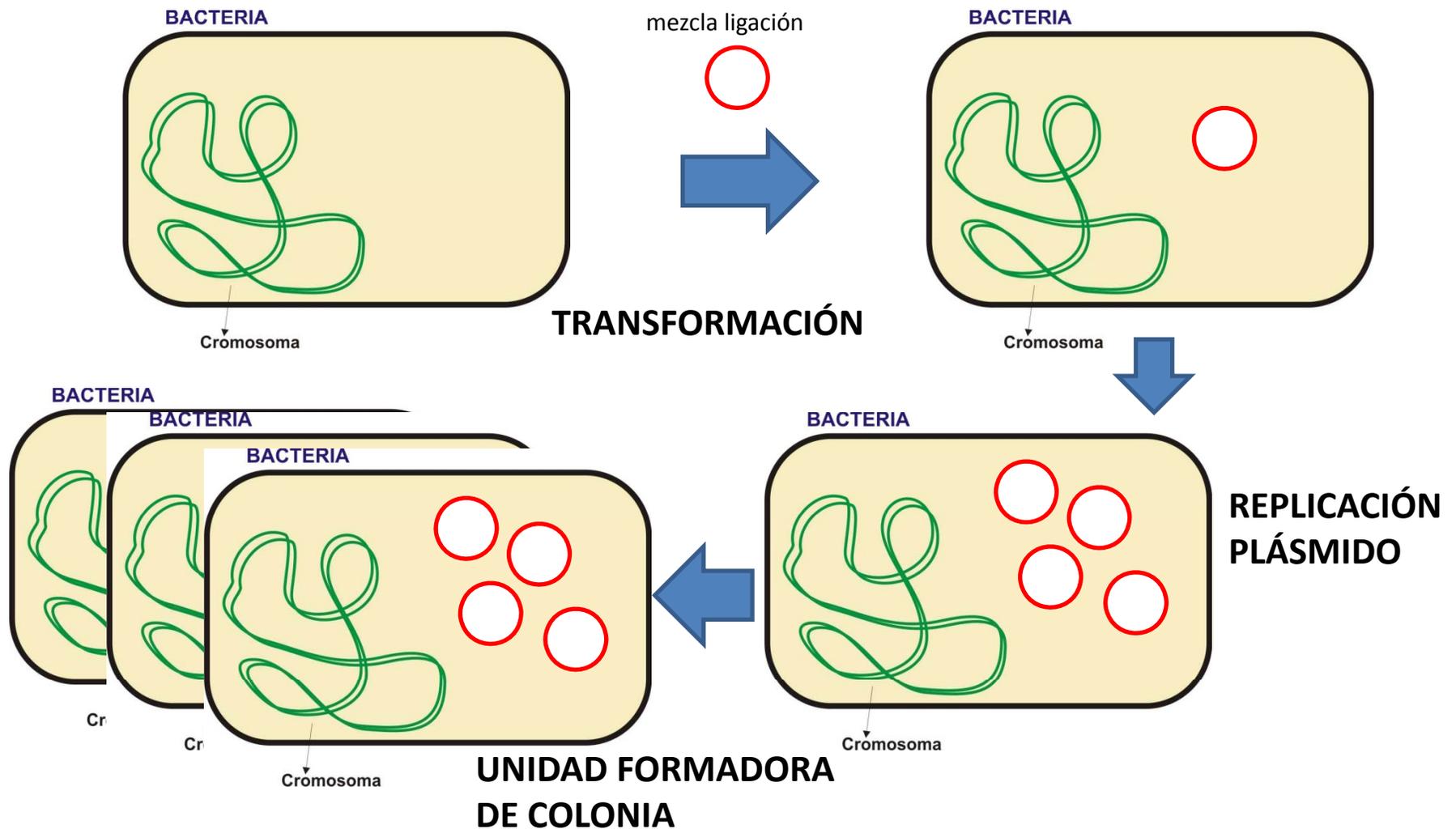
# Clonado molecular

Transferencia horizontal a bacterias



# Clonado molecular

Transferencia horizontal a bacterias



# Clonado molecular

Transferencia horizontal a bacterias

Algunas cepas de *Escherichia coli* utilizadas en el clonado molecular



Cepa	Rec A	Lac I	Proteasas
<b>Top10</b>	-	-	ND
<b>DH5<math>\alpha</math></b>	-	+	ND
<b>XL1-Blue</b>	-	Lac I <sup>q</sup>	ND
<b>BL21</b>	-	+	Muy bajo
<b>LE392</b>	+	+	ND

# Clonado molecular

## Transferencia horizontal a bacterias

- La **transformación** se puede realizar por *shock térmico* o *shock eléctrico*.
- En ambos casos, previamente las bacterias deben ser tratadas para inducir el **estado de competencia** a la transformación.
- Siempre, es necesario que en la transformación se encuentre un **exceso de bacterias a DNA** para así asegurar que cada UFC deriva del ingreso de una única molécula de cccdsDNA.
- Luego de transformar, es necesario incubar a las bacterias sin selección con el antibiótico correspondiente para permitir la expresión del fenotipo de resistencia.

# Clonado molecular

Transferencia horizontal a bacterias

**Shock eléctrico**

Mezcla de ligación + bacterias competentes

Pasar las bacterias a la cubeta de electroporación

Someter a *shock* eléctrico

Agregar medio líquido sin antibiótico e incubar 1 hora a 37 °C

Plaquear en medio sólido suplementado con antibiótico



# Clonado molecular

Transferencia horizontal a bacterias

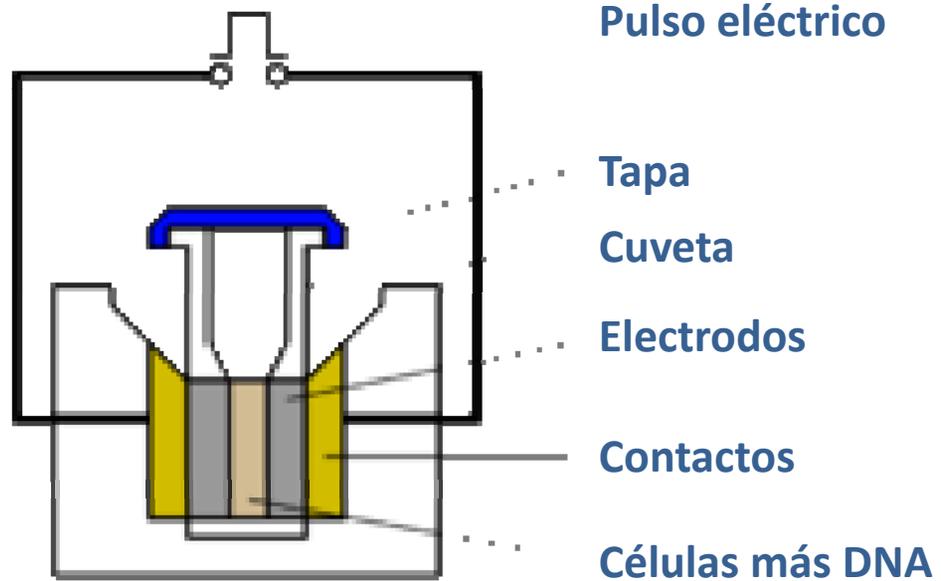
Electroporación



Electroporador

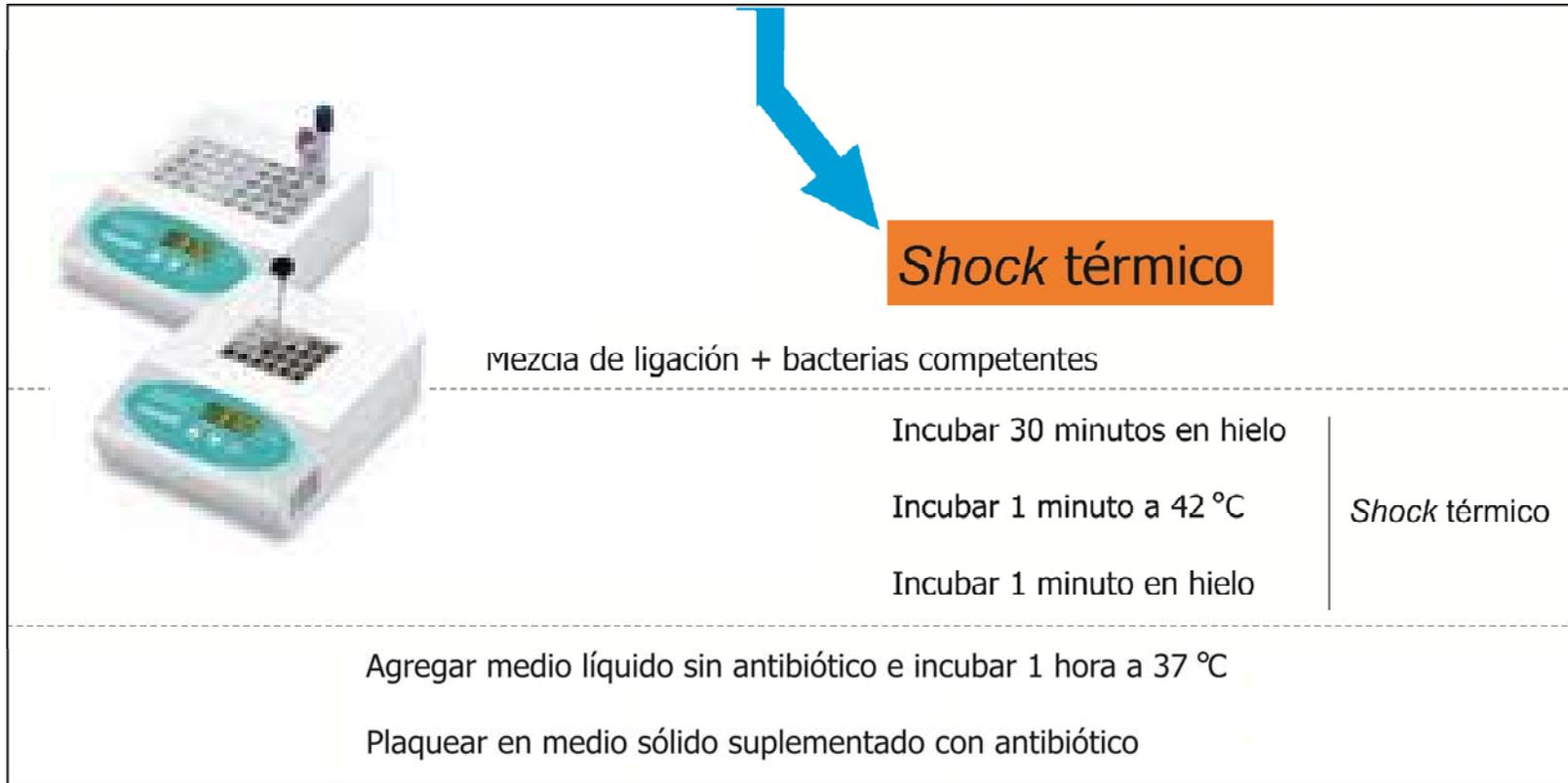


Cuvetas



# Clonado molecular

Transferencia horizontal a bacterias



# Clonado molecular

- Identificar objetivo
  - Diseño *in silico*
  - Aislar la plataforma
  - Aislar el inserto
  - Apertura de la plataforma
  - Compatibilización de extremos
  - Ligación
  - Transferencia horizontal
  - Selección de ORG/plataforma
  - Selección de ORG/plataforma Recombinante
- 
- The diagram uses blue brackets on the right side to group the steps into three categories:
- In silico:** This category includes the first two steps: 'Identificar objetivo' and 'Diseño *in silico*'.
  - In vitro:** This category includes the next five steps: 'Aislar la plataforma', 'Aislar el inserto', 'Apertura de la plataforma', 'Compatibilización de extremos', and 'Ligación'.
  - In vivo:** This category includes the final three steps: 'Transferencia horizontal', 'Selección de ORG/plataforma', and 'Selección de ORG/plataforma Recombinante'.

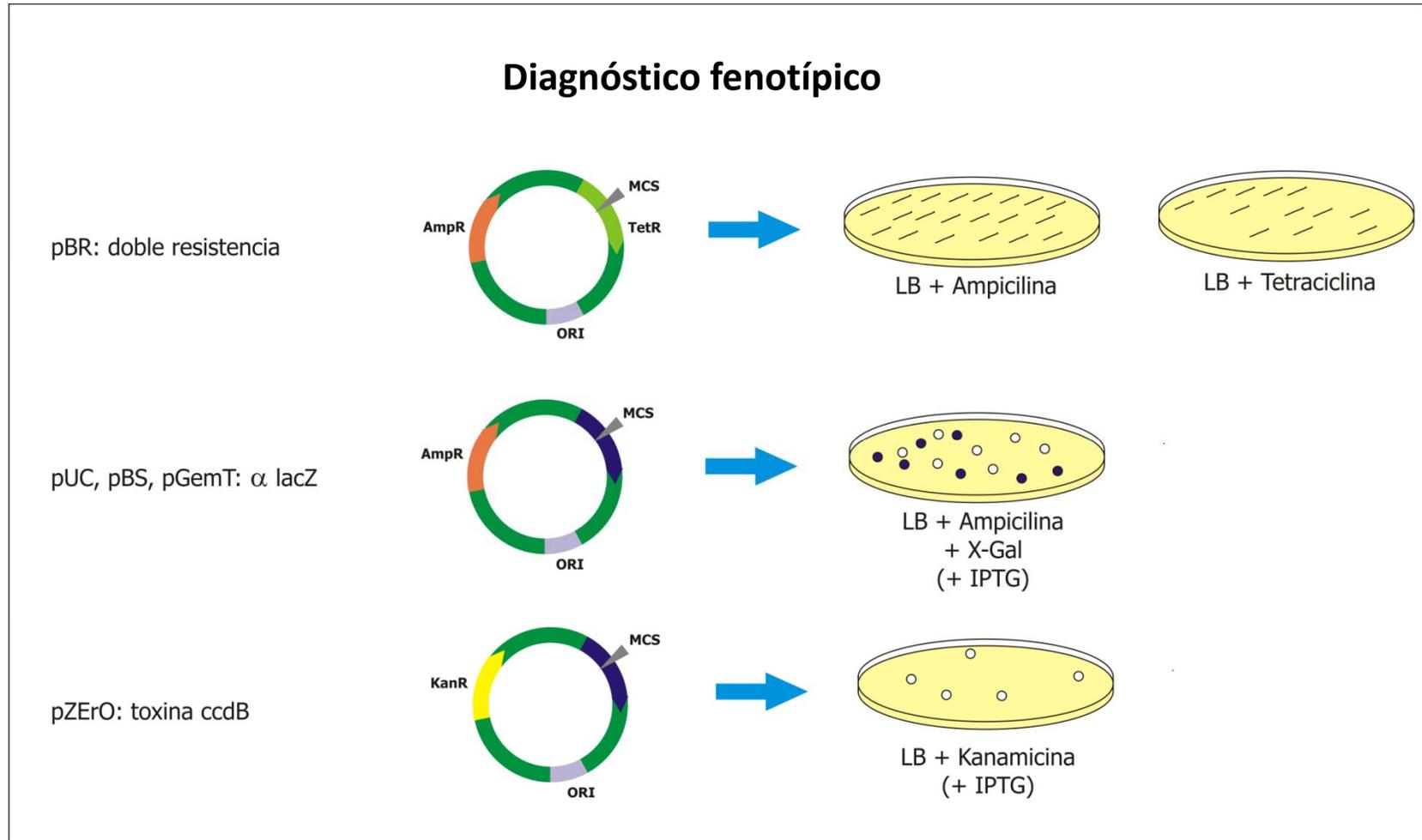
# Clonado molecular

## Selección de la construcción recombinante

- Una vez transformada la mezcla de ligación en bacterias adecuadas, y luego de incubar 1 hora a 37°C para posibilitar la expresión del fenotipo de resistencia al antibiótico, debe sembrarse una alícuota sobre medios de cultivo LB sólido suplementado con el antibiótico correspondiente (más cualquier otro agregado dependiendo del plásmido utilizado y de su sistema de selección de recombinantes).
- La incubación debe hacerse ON en estufa a 37°C, período de tiempo necesario para el establecimiento de UFC visibles.
- El análisis fenotípico de las UFC, y un posterior análisis genotípico de los plásmidos que éstas contienen, serían los pasos finales para dar con la construcción quimérica deseada.

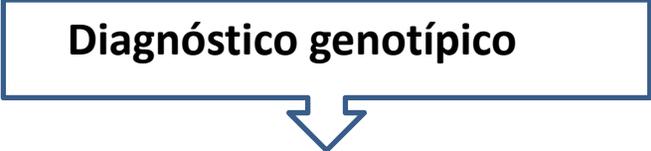
# Clonado molecular

## Selección de la construcción recombinante



# Clonado molecular

## Selección de la construcción recombinante



Diagnóstico genotípico

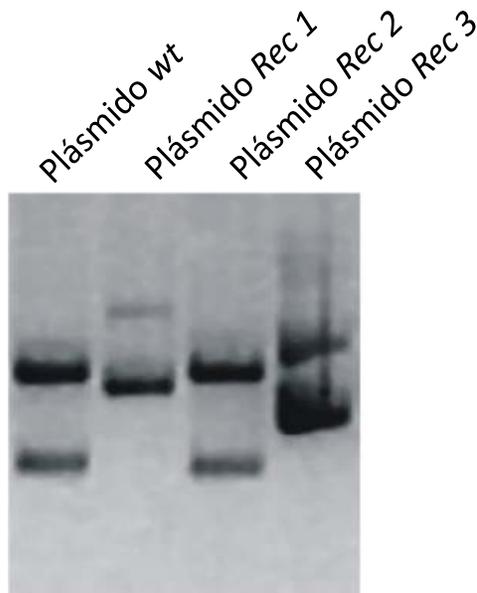
- Aislamiento de plásmidos mediante *miniprep* por lisis alcalina.
- Verificación de tamaños de plásmidos mediante electroforesis.
- Reacciones de PCR con *primers* específicos del inserto.
- Mapas físicos de restricción para corroborar identidad.
- Hibridación con sondas específicas para corroborar identidad.
- Reacciones de secuenciación para corroborar identidad.

# Clonado molecular

Selección de la construcción recombinante

Diagnóstico genotípico

- Aislamiento de plásmidos mediante *miniprep* por lisis alcalina.
- Verificación de tamaños de plásmidos mediante electroforesis.



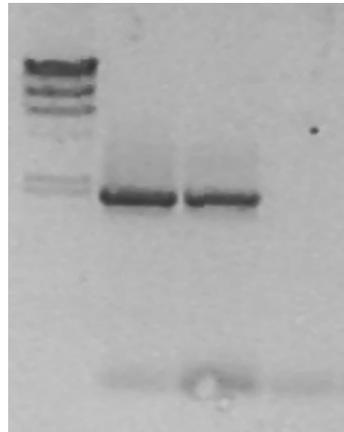
# Clonado molecular

## Selección de la construcción recombinante

### Diagnóstico genotípico

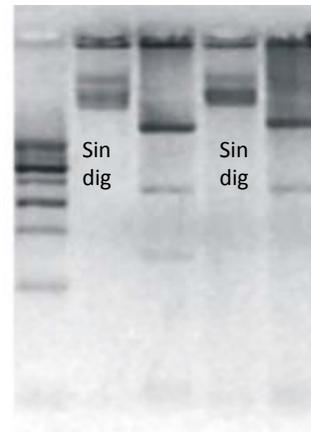
- Reacciones de PCR con *primers* específicos del inserto.
- Mapas físicos de restricción para corroborar identidad.

MW Plásmido Rec 1  
Plásmido Rec 3  
Plásmido wt



PCR

Plásmido Rec 1  
Plásmido Rec 3



Mapa físico

# Clonado molecular

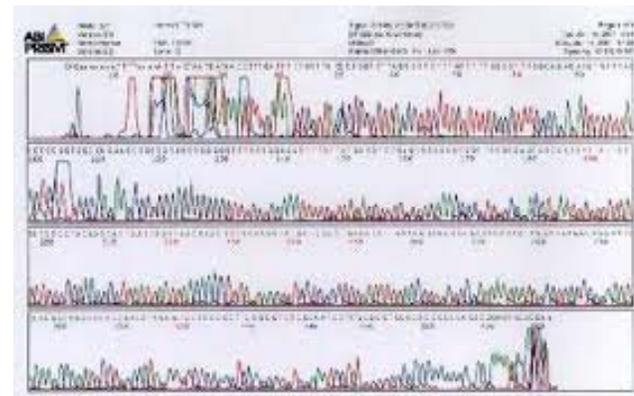
Selección de la construcción recombinante

Diagnóstico genotípico

- Hibridación con sondas específicas para corroborar identidad.
- Reacciones de secuenciación para corroborar identidad.



*Southern Blot*



Reacciones de secuenciación

# Clonado molecular

