

Ingeniería Genética II

Unidad I

Nuevas técnicas de clonado molecular

Clonado Molecular

- El **clonado molecular** es un **conjunto de procedimientos** que permiten generar **quimeras de dsDNA** con capacidad de **multiplicación dentro de materia viva**, racionalmente construidas con el objetivo de **producir bienes y/o servicios biotecnológicos**.
- El **clonado molecular** es parte fundamental de la **Ingeniería Genética**, ya que **aplica** el conocimiento genético sobre **sintaxis y transmisión** de la **información biológica** contenida en la biosfera y virosfera.
- El **clonado molecular** nace como procedimiento en los **años 70 del siglo XX**, gracias al descubrimiento y caracterización realizados previamente sobre enzimas de restricción, ligasas, plásmidos y fisiología bacteriana.

Clonado molecular

10 etapas
del clonado
molecular
tradicional

- **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*

¿Cuáles son las etapas del clonado molecular que mayormente condicionan el éxito del procedimiento?

Clonado molecular

10 etapas
del clonado
molecular
tradicional

- 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

10 etapas
del clonado
molecular
tradicional

● 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

- **Apertura de la plataforma**
- **Compatibilización de extremos**
- **Ligación**

Involucra las etapas dónde se generan las quimeras de dsDNA *in vitro*, principal fuente de ruido para los últimos pasos del clonado.

Clonado molecular

- **Apertura de la plataforma**
- Compatibilización de extremos
- Ligación

Clonado molecular

- Apertura de la plataforma
- **Compatibilización de extremos**
- Ligación

Clonado molecular

- Apertura de la plataforma
- Compatibilización de extremos
- **Ligación**

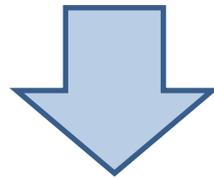
Clonado molecular

Ante tales problemáticas surgió la idea de hacer un **cambio tecnológico** que sustituya las etapas anteriores (uso de endonucleasas de restricción, enzimas modificadoras de extremos y tratamiento con DNA ligasa), las cuales son necesarias para quimerizar la plataforma junto con el inserto.

Clonado molecular

Nuevas estrategias

- Los **nuevos sistemas de clonado molecular** reemplazan el uso de endonucleasas de restricción y DNA ligasa por enzimas con **actividad integrasa** o procesos equivalentes.
- Estas enzimas tienen la capacidad de catalizar tanto la hidrólisis de enlaces fosfodiéster (actividad endonucleasa) como la generación de los mismos (actividad DNA ligasa).



Clonado molecular mediante tecnología
recombinogénica
(*Recombineering Technology*)

Clonado molecular

Nuevas estrategias

- A.** Clonados basados en la topoisomerasa I del virus Vaccinia.
- B.** Clonados basados en recombinaciones homólogas de organismos.
- C.** Clonados basados en Cre/loxp.
- D.** Clonados basados en la maquinaria integrasa del fago lambda.

Clonado molecular

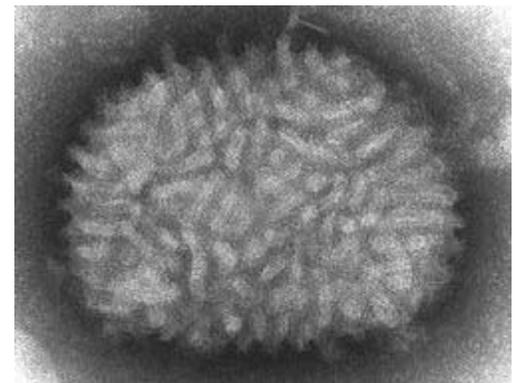
Nuevas estrategias

- A. Clonados basados en la topoisomerasa I del virus Vaccinia.**
- B. Clonados basados en recombinaciones homólogas de organismos.
- C. Clonados basados en Cre/loxp.
- D. Clonados basados en la maquinaria integrasa del fago lambda.

Clonado molecular

Basados en topoisomerasas

- El **virus Vaccinia** pertenece a la familia *Poxviridae*.
- Posee un genoma de dsDNA de 190 kpb y su ciclo de multiplicación sucede en el citoplasma de la célula infectada.
- Durante la **replicación** del genoma actúa una **topoisomerasa** (Topoisomerasa 1, 32 kDa) codificada por el virus.
- La **Topoisomerasa I** reconoce una secuencia específica y tiene la capacidad de catalizar hidrólisis y formación de enlaces fosfodiéster.



Clonado molecular

Basados en topoisomerasas

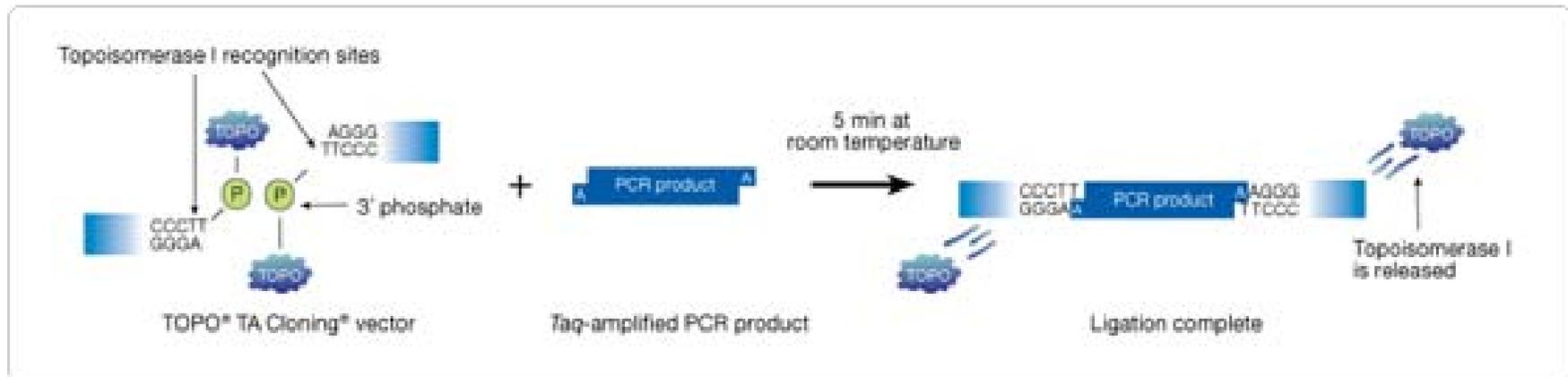
- La secuencia de **reconocimiento** de la **Topoisomerasa I** es:

5´ (C/T)CCTT 3´

- La proteína, al reconocer esa secuencia cataliza la hidrólisis del enlace fosfodiéster posterior a la T (uniéndose por el fosfato a una tirosina y dejando un extremo 5´ desfosforilado), para así relajar el dsDNA y luego catalizar la nueva formación del enlace.
- Aprovechando esta particularidad, se comercializan vectores de clonado lineales conteniendo en cada uno de los extremos una enzima Topoisomerasa unida.
- El inserto ideal para su reacción es un fragmento de PCR.

Clonado molecular

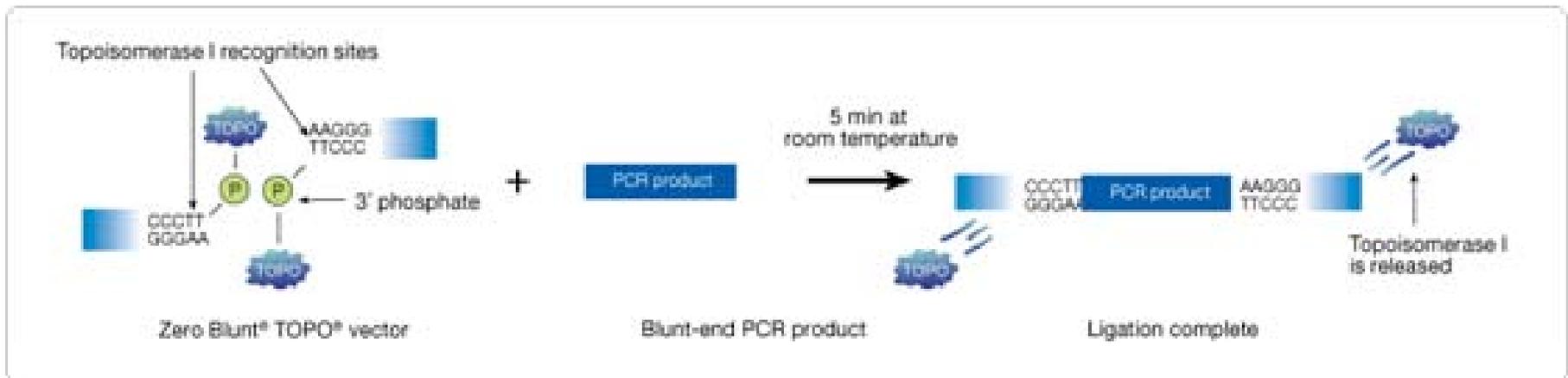
Basados en topoisomerasas



Invitrogen

Clonado molecular

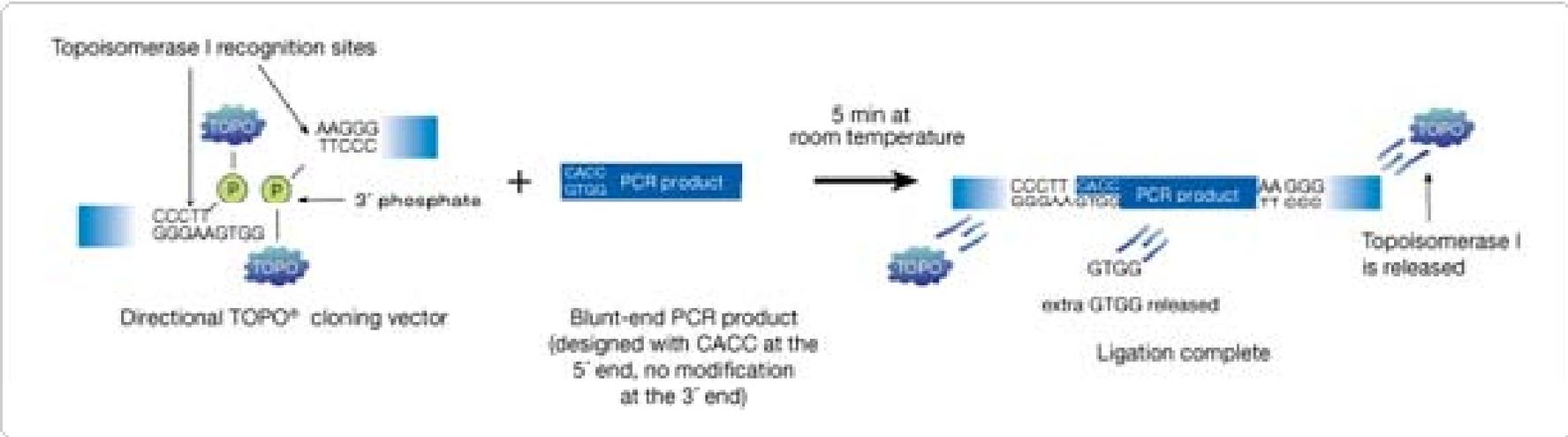
Basados en topoisomerasas



Invitrogen

Clonado molecular

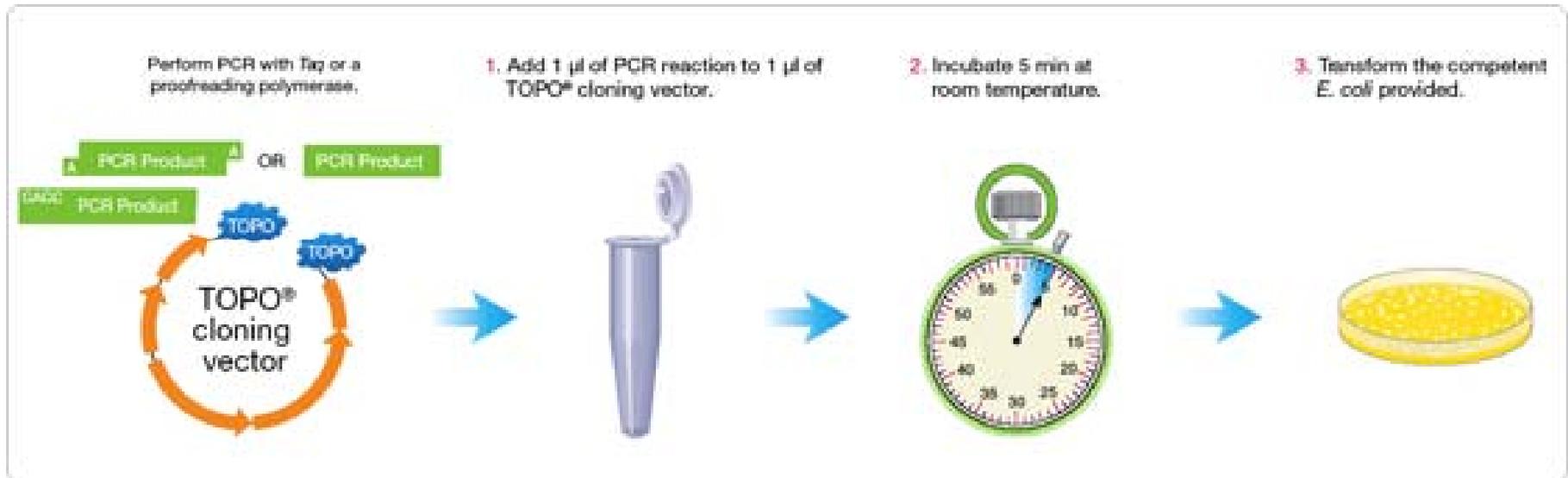
Basados en topoisomerasas



Invitrogen

Clonado molecular

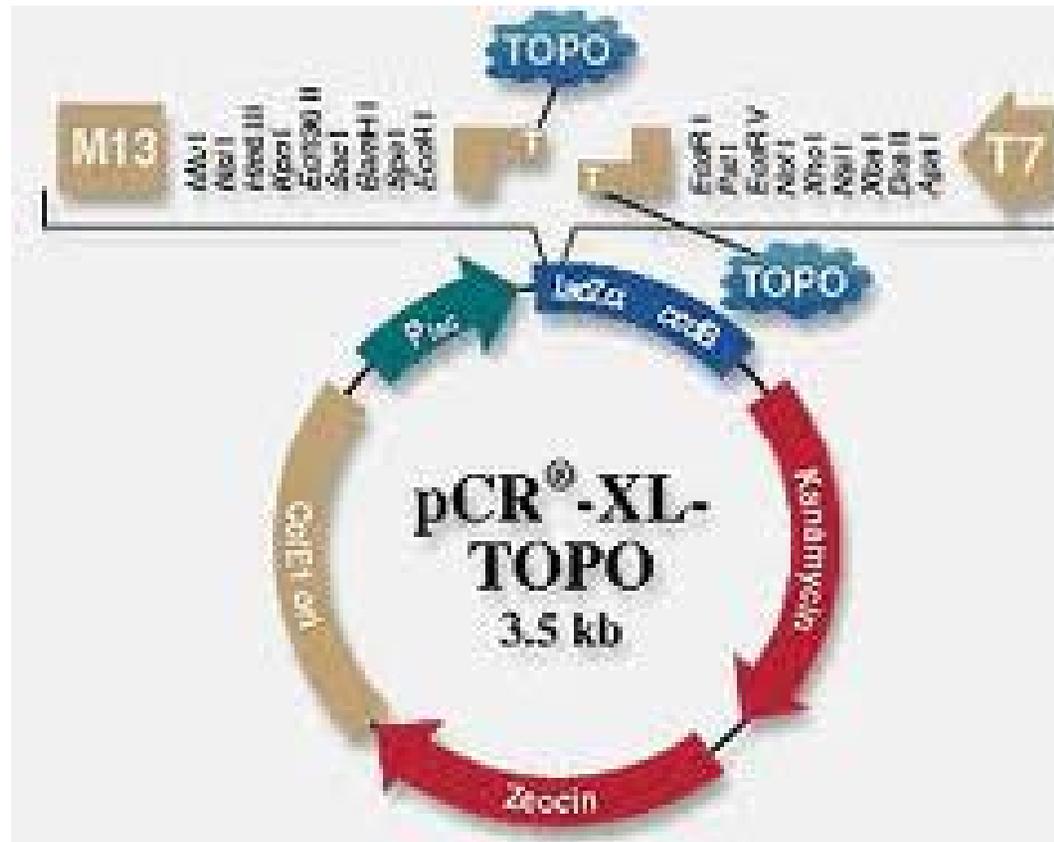
Basados en topoisomerasas



Invitrogen

Clonado molecular

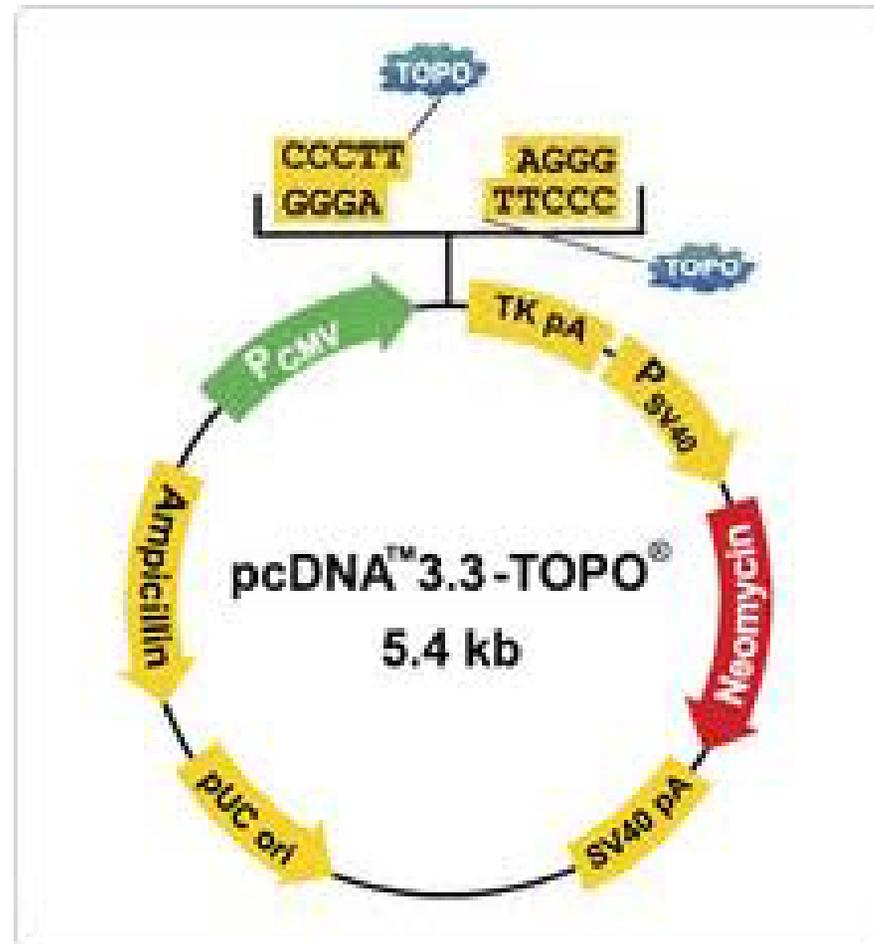
Basados en topoisomerasas



Invitrogen

Clonado molecular

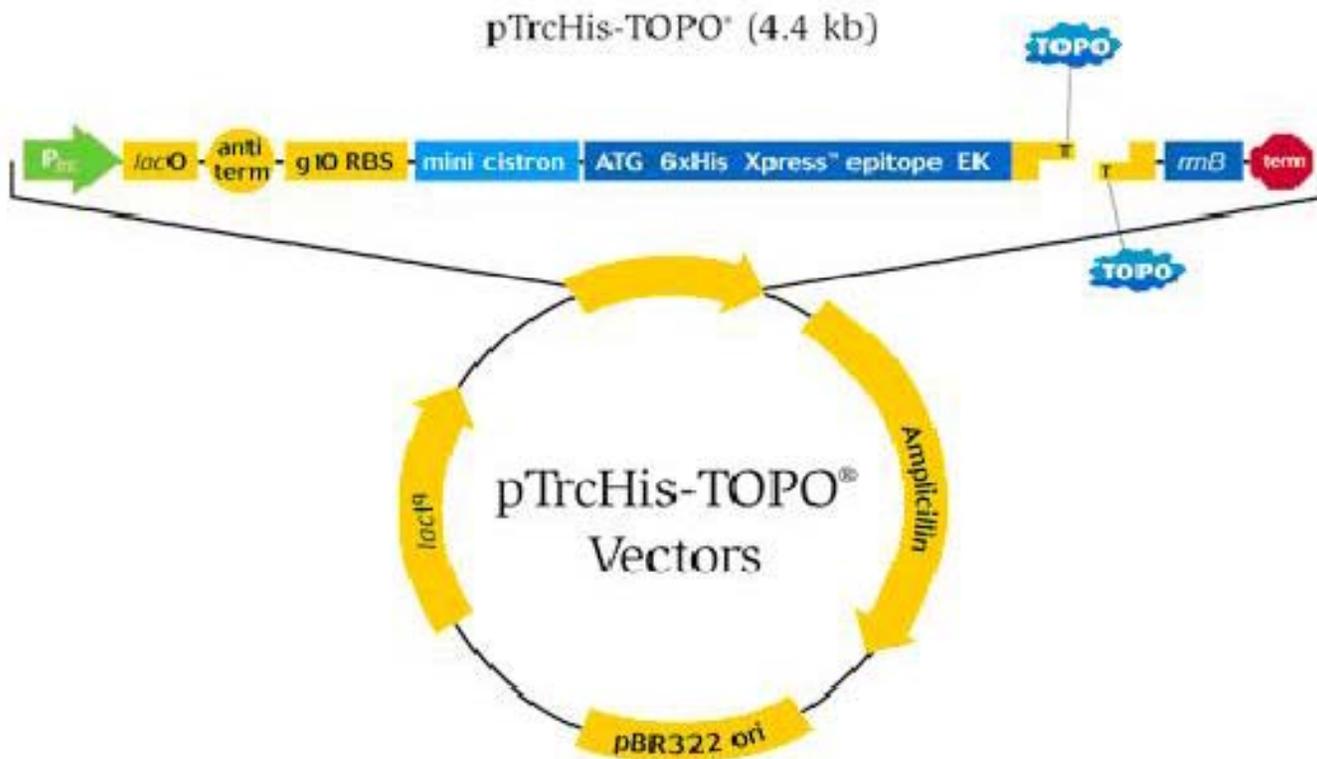
Basados en topoisomerasas



Invitrogen

Clonado molecular

Basados en topoisomerasas



Represents covalently bound topoisomerase I

Invitrogen

Clonado molecular

Nuevas estrategias

- A. Clonados basados en la topoisomerasa I del virus Vaccinia.
- B. Clonados basados en recombinaciones homólogas de organismos.**
- C. Clonados basados en Cre/loxp.
- D. Clonados basados en la maquinaria integrasa del fago lambda.

Clonado molecular

Basados en recombinación homóloga

- Los sistemas de **recombinación *in vivo*** más utilizados para el clonado molecular se basan en las **funciones recombinogénicas Red**.
- Las **funciones recombinogénicas Red** son parte de **bacteriofagos** del tipo lambda y se basan en homologías de secuencias (recombinaciones homólogas).
- Existen **cepas de *Escherichia coli*** que poseen **profagos** conteniendo las **funciones recombinogénicas Red**.

Clonado molecular

Basados en recombinación homóloga

Cepas bacterianas utilizadas en recombinogénesis

Cepa	Genotipo
DY329	W3110 Δ lacU169 nadA::Tn10 gal490 pgl Δ 8 λ cl857 Δ (cro bioA) (TetR)
DY330	W3110 Δ lacU169gal490 pgl Δ 8 λ cl857 Δ (cro-bioA)
DY331	W3110 Δ lacU169 srlA::Tn10 Δ recA gal490 pgl Δ 8 λ cl857 Δ (cro-bioA) (TetR)
DY378	W3110 λ cl857 Δ (cro-bioA)
DY380	mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80dlacZ Δ M15 lacX74 deoR recA1endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU gal490 pgl Δ 8 rpsL nupG λ (cl857ind1) Δ {(cro-bioA)<>tetRA} (TetR)
DY441	W3110 gal490 pgl Δ 8 λ cl857 Δ (cro-bioA)int<>cat-sacB
HME5	W3110 Δ lacU169 λ cl857 Δ (cro-bioA)
HME45	W3110 gal490 pgl Δ 8 λ cl857 Δ (cro-bioA)
HME63	W3110 Δ lacU169 λ cl857 Δ (cro-bioA) galKam mutS<>amp
HME64	W3110 Δ lacU169 λ cl857 Δ (cro-bioA) galKam uvrD<>kan

Clonado molecular

Basados en recombinación homóloga

- Todas estas cepas de *Escherichia coli* son **RecA-** y poseen un **profago lambda** que ha sido **mutagenizado** en ciertos genes reguladores, como **cro**.
- El **profago** contiene el **operón PL** que codifica el sistema de **recombinación Red** (proteínas Exo y Bet) y la **proteína Gam**.
- El **operón PL** está bajo el **control** de un **represor Lambda** sensible a la temperatura (inducción a 42°C durante 15 minutos).
- La proteína **Gam** (16 kDa) **inhibe** a las **nucleasas RecBCD** y **SbcCD** de *Escherichia coli* (que ataca dsDNA lineal).
- La proteína **Exo** (24 kDa) tiene actividad **exonucleasa 5'→3'** y **Bet** (28 kDa) **actividad de unión a ssDNA** mayores a 35 nt.

Clonado molecular

Basados en recombinación homóloga

- El **clonado molecular** basado en este sistema involucra la amplificación por **PCR** del **inserto** y del **plásmido**.
- En los *primers* a utilizarse deben **agregarse las secuencias adecuadas** para que **ambas moléculas compartan al menos 35 pb**.
- Una vez purificados ambos amplicones, deben **transformarse** en una cepa de *Escherichia coli* con **actividad recombinogénica**.
- La preparación de la **competencia a la transformación** para dicha cepa debe incluir una **inducción** de las proteínas asociadas a la **recombinación Red**.

Clonado molecular

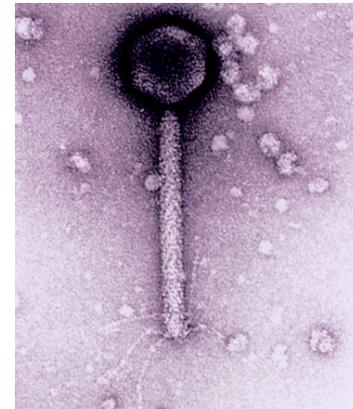
Nuevas estrategias

- A. Clonados basados en la topoisomerasa I del virus Vaccinia.
- B. Clonados basados en recombinaciones homólogas de organismos.
- C. Clonados basados en Cre/loxp.**
- D. Clonados basados en la maquinaria integrasa del fago lambda.

Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica

- El **fago P1** es un virus bacteriano del tipo icosaédrico que utiliza una **recombinación sitio específica** para circularizar su genoma dentro del hospedador y para resolver dímeros genómicos durante la replicación.
- La proteína responsable es una **integrasa** que se denomina **Cre** (Causes recombination or Cyclic recombinase; 38 kDa), la cual reconoce como **secuencia específica** un segmento de 34pb denominado **loxP** (locus of crossing (x) over, P1).



Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica

- La secuencia **Lox** tiene **34 pb** (dos regiones de 13 pb invertidas a los extremos y una zona interna variable de 8 pb)

5´ **ATAACTTCGTATA**–NNNTANNN–**TATACGAAGTTAT** 3´

- La integrasa **Cre** reconoce específicamente a la secuencia *lox*, y es la responsable de realizar la **recombinación sitio específica** sin necesidad de cofactores.

Clonado molecular

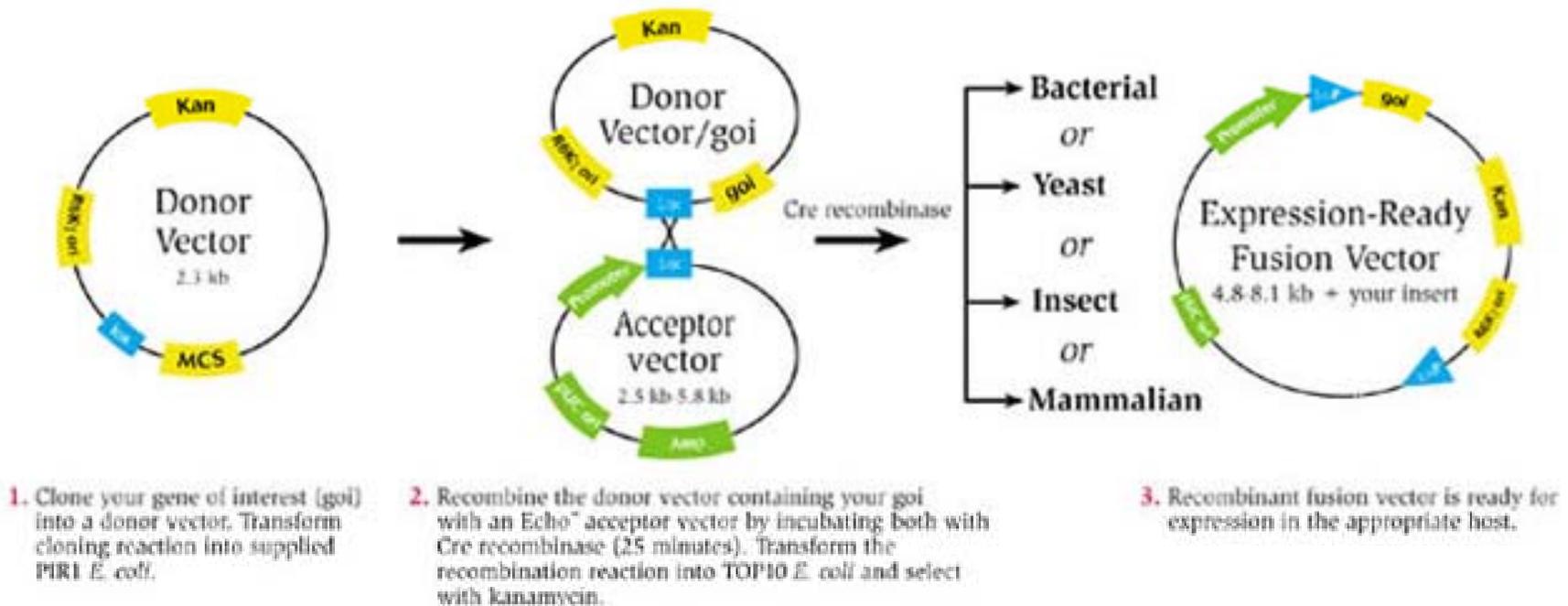
Basados en recombinación sitio específica

- Las **regiones flanqueadas** por secuencias **lox** se denominan **floxed** (floxeadas).
- De acuerdo a las **orientaciones** en que se encuentren las **secuencias lox**, el resultado de la acción de Cre derivará en una **delección** o en una **inversión**.
- Este sistema se utiliza en numerosas aplicaciones de ingeniería genética, las cuales incluyen el **clonado molecular**.
- El **clonado molecular** utilizando el sistema **Cre-loxP** facilita el subclonado, por lo que existen **vectores** denominados **Entry** (o Donor) y **Destination** (o Aceptor).

Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica

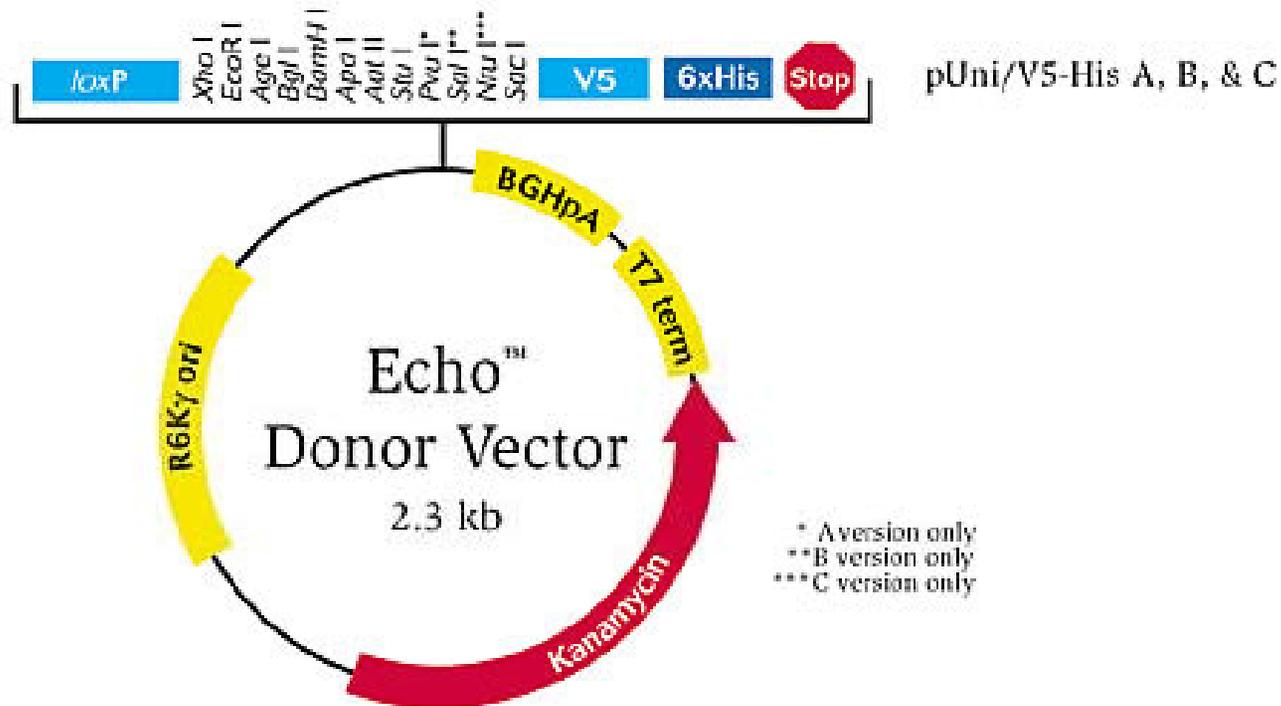
Figure 1 - Recombination of a gene of interest into an expression vector using the Echo™ Cloning System



Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica

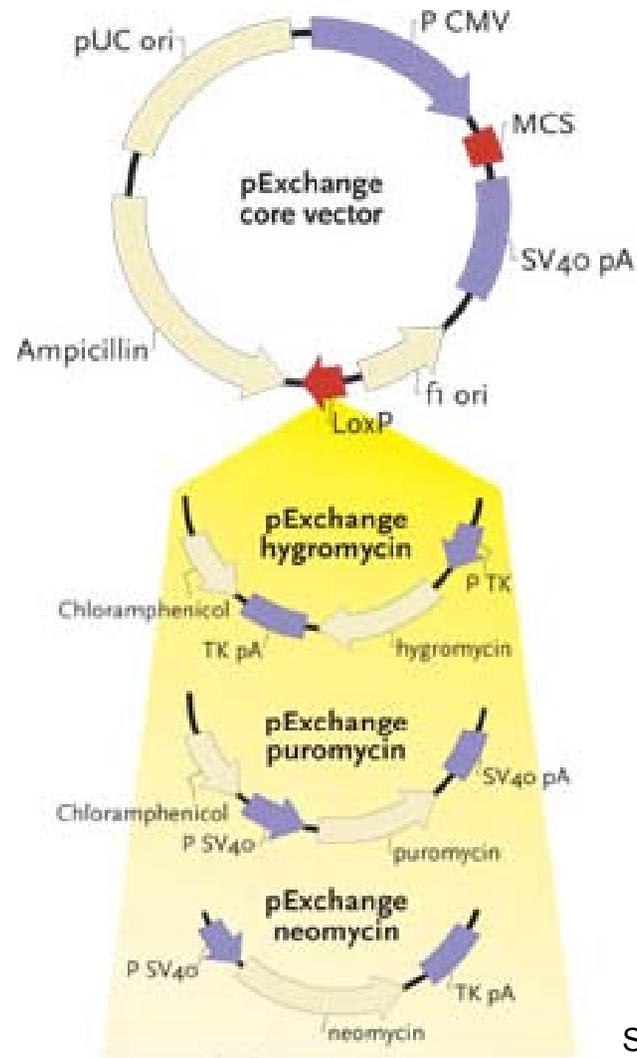
Figure 2 - Echo™ Cloning System donor vector



Invitrogen

Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica

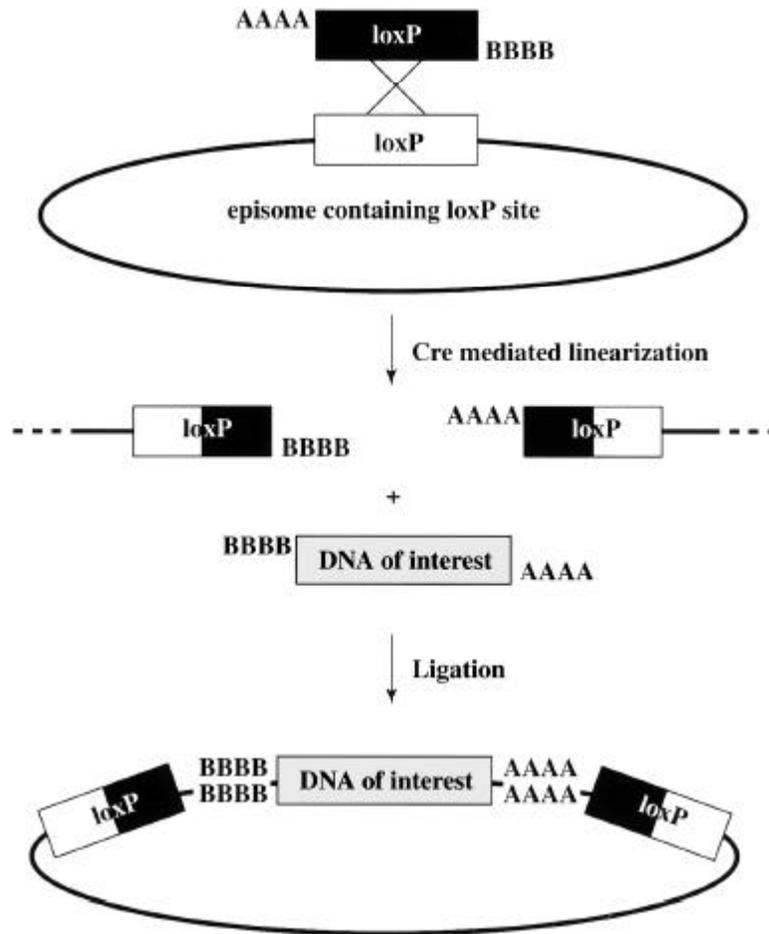


Ejemplo de facilidades que aporta el uso de Cre/loxP

Stratagene

Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica



Sistema que mezcla clonado molecular Cre/loxP con el tradicional

Clonado molecular

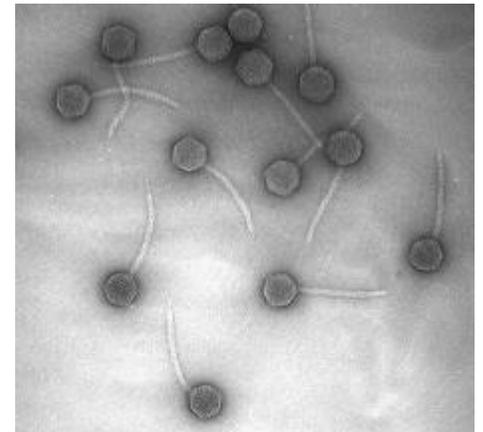
Nuevas estrategias

- A. Clonados basados en la topoisomerasa I del virus Vaccinia.
- B. Clonados basados en recombinaciones homólogas de organismos.
- C. Clonados basados en Cre/loxp.
- D. Clonados basados en la maquinaria integrasa del fago lambda.**

Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica

- El **clonado molecular** basado en la **recombinación sitio específica** del fago **lambda** es conocido como sistema **Gateway** (Invitrogen).
- El fago **lambda** presenta **dos fenotipos** durante su ciclo de multiplicación que se conocen como **ciclos lítico** y **lisogénico**.
- El **proceso de integración** del genoma viral dentro del cromosoma de la bacteria hospedadora (lisogenia) **es reversible** y mediado **por la acción de integrasas y secuencias específicas**.



Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica

- La **recombinación sitio específica** entre el genoma viral y el bacteriano **sucede** en secuencias particulares denominadas ***attachment sites (att)***.
- El ***attB*** y el ***attP*** son las secuencias involucradas en la bacteria y en el genoma viral, respectivamente. Comparten 15 pb de homología.
- El ***attL*** y ***attR*** son las secuencias resultantes posteriores a la recombinación.
- La **recombinación es conservativa** (no se pierden ni ganan secuencias) y no involucra síntesis de DNA.

Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica

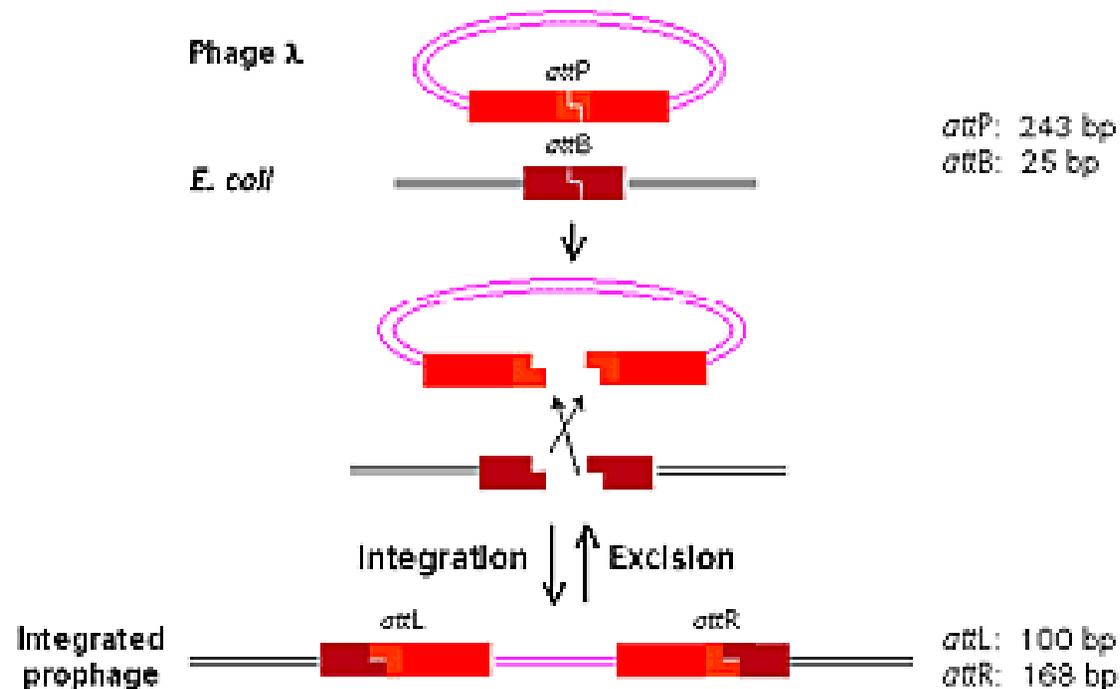
- Las **proteínas** involucradas en la **lisogenización** son:
Integrasa (Int), **Proteína de integración del hospedador (HIF)**.
- Las **proteínas** involucradas en la **escisión** del genoma viral son:
Integrasa (Int), **Proteína de integración del hospedador (HIF)** y
la **escisionasa (Xis)**.

$$\mathbf{attB} \times \mathbf{attP} \longrightarrow \mathbf{attL} \times \mathbf{attR}$$
$$\mathbf{attL} \times \mathbf{attR} \longrightarrow \mathbf{attB} \times \mathbf{attP}$$

Clonado molecular

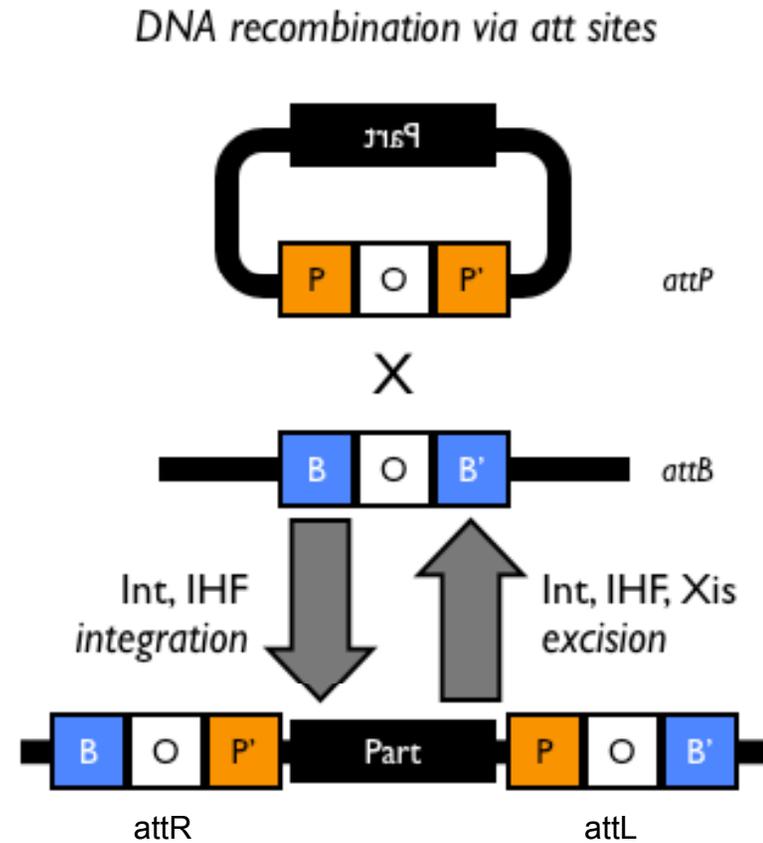
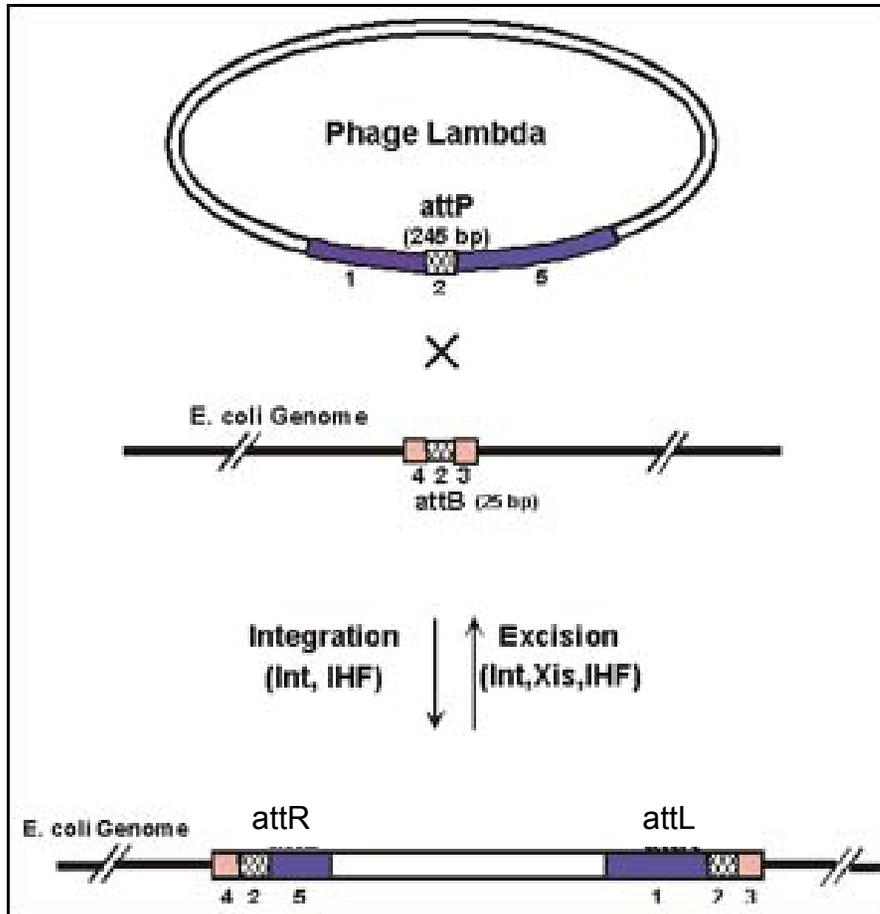
Basados en recombinación sitio específica

Phage λ Recombination in *E. coli*



Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica



Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica

- El **sistema Gateway** está basado en el sistema recombinogénico de Lambda, estableciendo un mecanismo que **facilita el subclonado**.

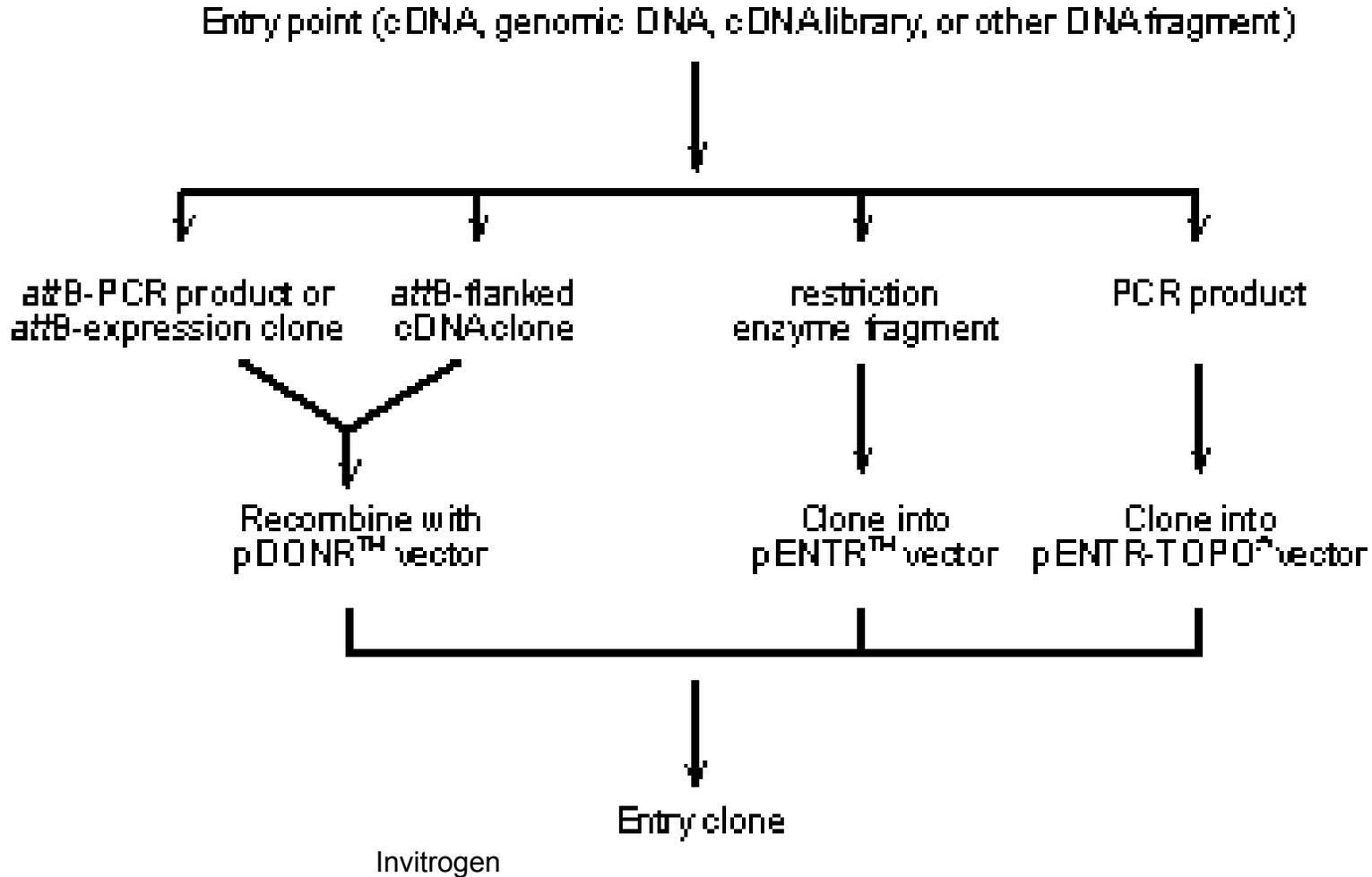
- Los sitios ***att*** han sido **modificados** de manera tal de transformarse en específicos (***attB1*** y ***attB2*** -25 pb-, ***attP1*** y ***attP2*** -200 pb-, ***attL1*** y ***attL2*** -100 pb-, ***attR1*** y ***attR2*** -125 pb-) y así poder hacer dos recombinaciones por evento de clonado molecular.

- Las enzimas que se utilizan se denominan **Clonase BP** (Int, HIF) y **Clonase LR** (Int, HIF, Xis).

- Existen **vectores *Entry*** y otros ***Destination***.

Clonado molecular

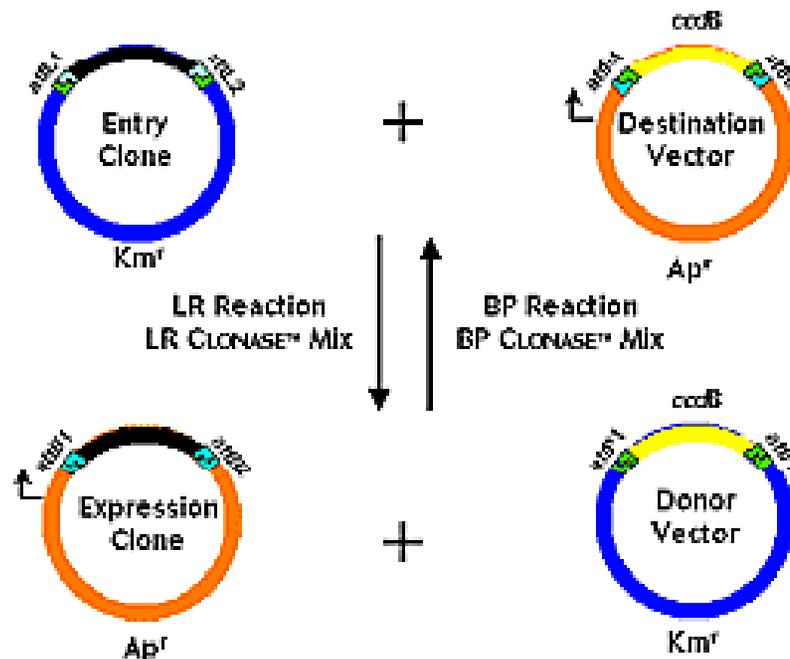
Basados en recombinación sitio específica



Clonado molecular

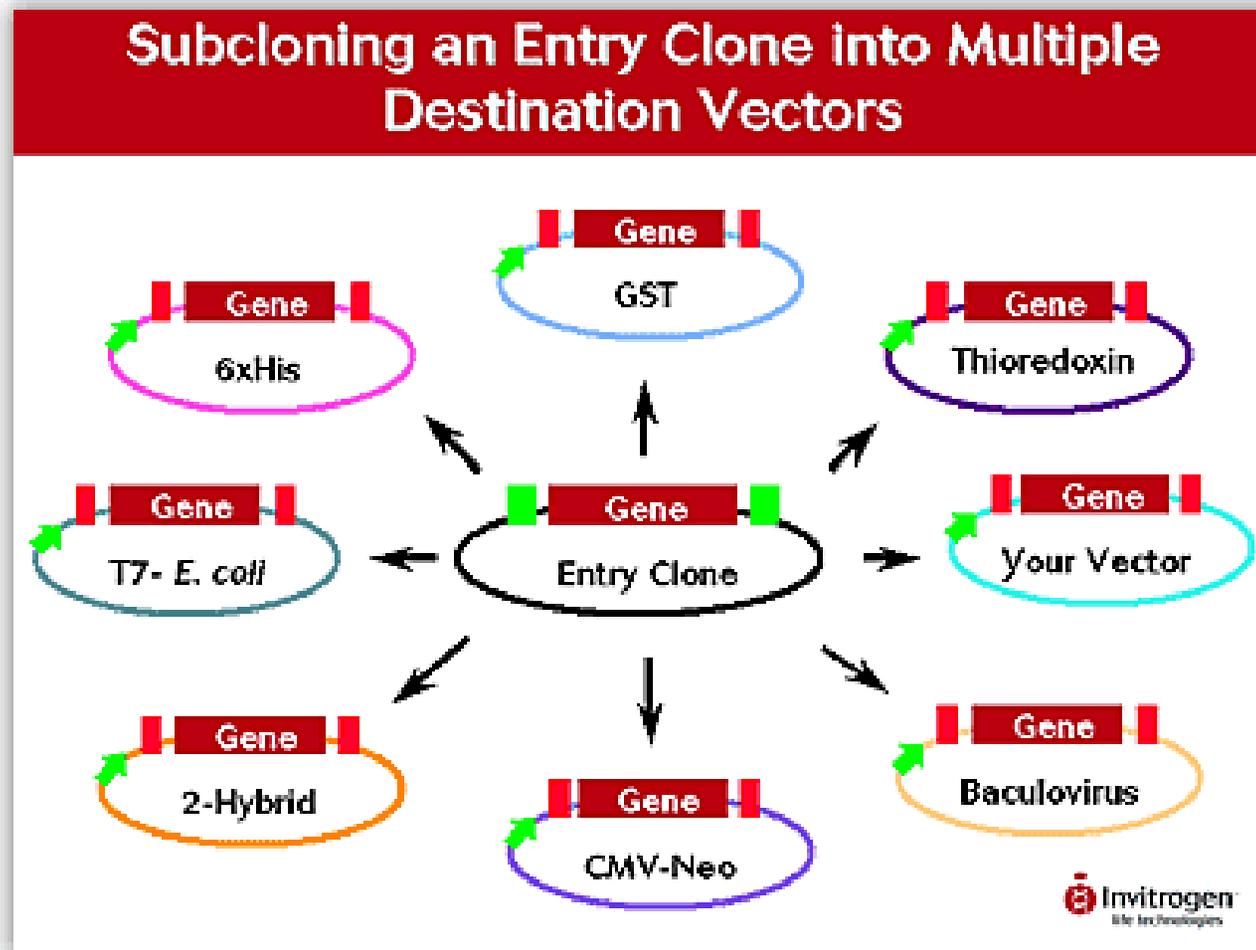
Basados en recombinación sitio específica

GATEWAY Cloning Technology



Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica



Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica

Diseño primer Forward del inserto (manual Invitrogen)

Guidelines to Design the Forward PCR Primer

When designing your forward PCR primer, consider the points below.

To enable efficient Gateway cloning, the forward primer **MUST contain the** following structure:

Four guanine (G) residues at the 5' end followed by the 25 bp *attB1 site followed by* at least 18-25 bp of template- or gene-specific sequences

Note: If you plan to express native protein in *E. coli* or mammalian cells, you may want to include a Shine-Dalgarno (Shine and Dalgarno, 1975) or Kozak consensus sequence (Kozak, 1987; Kozak, 1991; Kozak, 1990), respectively, in your PCR primer.

The *attB1 site ends with a thymidine (T)*. If you wish to fuse your PCR product in frame with an N-terminal tag, the primer must include two additional nucleotides to maintain the proper reading frame with the *attB1 region*. **These two nucleotides cannot be AA, AG, or GA**, because these additions will create a translation termination codon.

5' GGGG-ACA-AGT-TTG-TAC-AAA-AAA-GCA-GGC-TNN-sec específica 3'
attB1 18-25 nt

Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica

Diseño Primer Forward del inserto (*manual Invitrogen*)

5'GGGG-ACA-AGT-TTG-TAC-AAA-AAA-GCA-GGC-TNN-sec específica 3'
attB1 18-25 nt

Un ejemplo con regiones para traducción de proteínas:

5'GGGG-ACA-AGT-TTG-TAC-AAA-AAA-GCA-GGC-TTTC-GAAGGAGATAGAACCATGGsec específica 3'
attB1 *Shine Delgarno* *Kozak* 18-25 nt

Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica

Diseño Primer Reverse del inserto (manual Invitrogen)

Guidelines to Design the Reverse PCR Primer

When designing your reverse PCR primer, consider the points below.

To enable efficient Gateway cloning, the reverse primer **MUST contain the** following structure:

Four guanine (G) residues at the 5' end followed by the 25 bp *attB2 site followed by* 18-25 bp of template- or gene-specific sequences If you wish to fuse your PCR product in frame with a C-terminal tag:

The primer must include one additional nucleotide to maintain the proper reading frame with the *attB2 region*

Any in-frame stop codons between the *attB2 site and your gene of interest* must be removed

If you do not wish to fuse your PCR product in frame with a C-terminal tag, your gene of interest or the primer must include a stop codon.

5'GGGG-AC-CAC-TTT-GTA-CAA-GAA-AGC-TGG-GTN-sec específica 3'

attB2

Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica

Segundo paso del clonado: Diseño Primer Reverse(manual Invitrogen)

5'GGGG-AC-CAC-TTT-GTA-CAA-GAA-AGC-TGG-GTN-sec específica 3'
attB2 18-25 nt

Un ejemplo con codón de terminación:

5'GGGG-ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC CTA sec específica 3'
attB2 *Stop* 18-25 nt

Clonado molecular

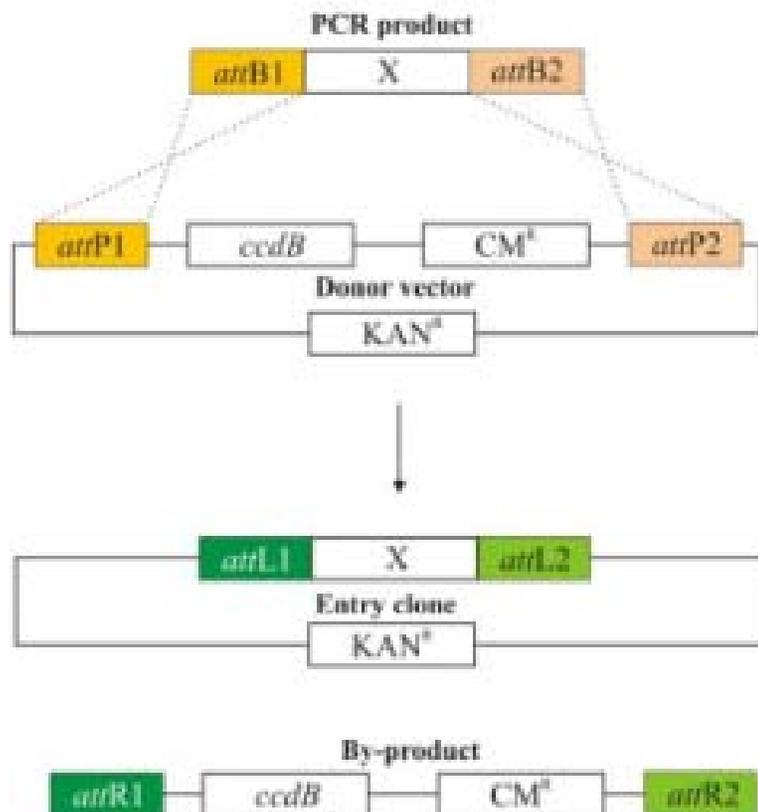
Basados en recombinación sitio específica

- Una vez **diseñados** los *primers*, debe realizarse la **PCR** para generar el inserto inicial.
- Luego de realizar una electroforesis preparativa y aislar el **DNA inserto**, el mismo debe **mezclarse** con un **plásmido *Donor*** y **Clonase BP**.
- Posterior a **transformar *Escherichia coli*** y **seleccionar** las colonias con los **plásmidos *Entry***, se deben aislar a los mismos para mezclarlos con **plásmidos *Destination*** y **Clonase LR**.
- Después de **transformar** y **seleccionar** con el antibiótico adecuado, se obtendrán las **construcciones de interés**.

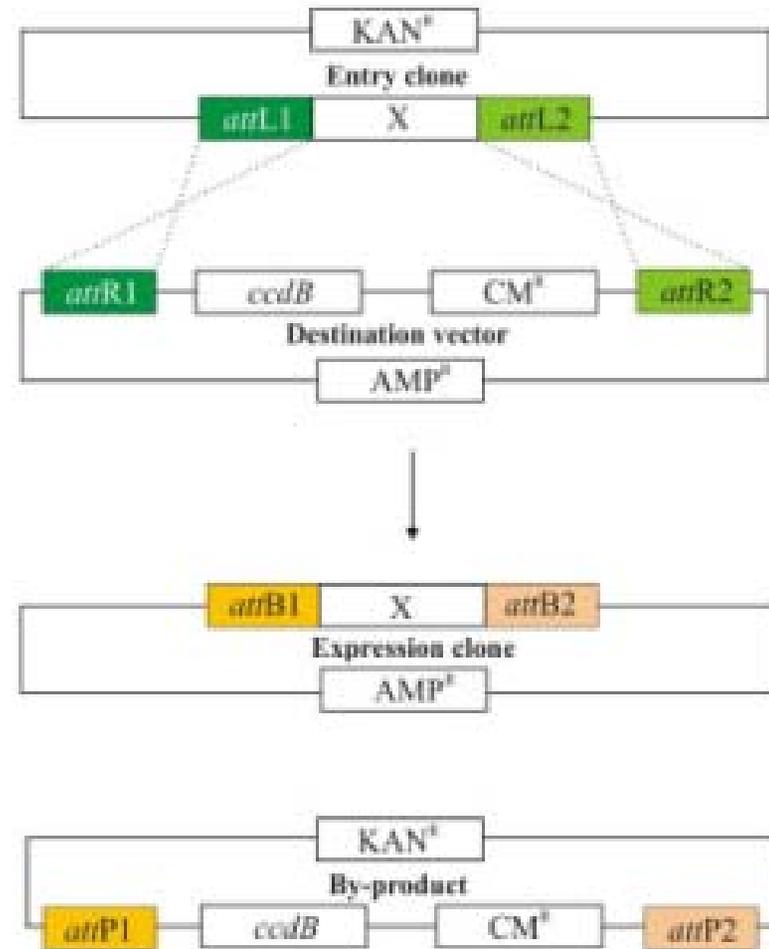
Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica

A

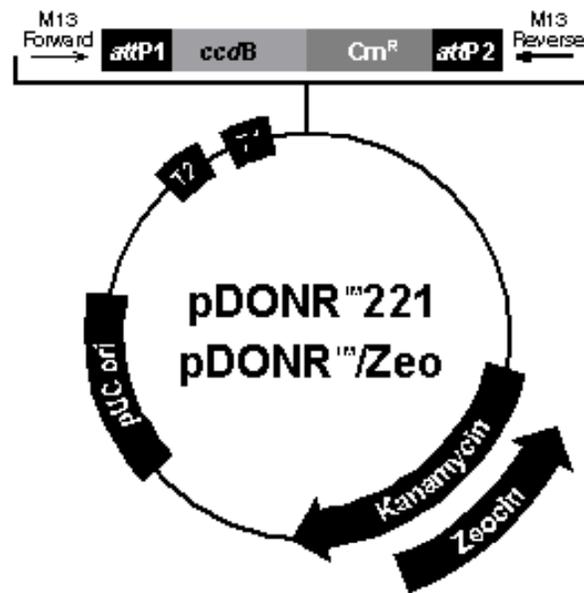


B



Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica



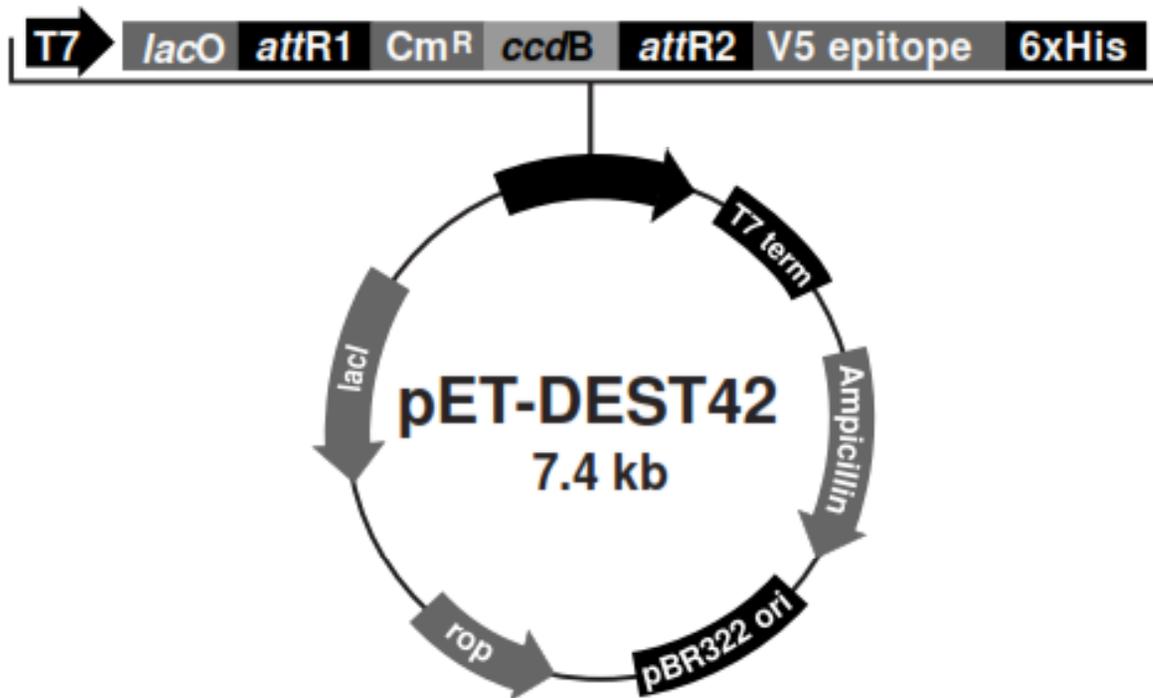
Comments for:

	pDONR™221 4762 nucleotides	pDONR™/Zeo 4291 nucleotides
<i>rrmB</i> T2 transcription termination sequence (c):	268-295	268-295
<i>rrmB</i> T1 transcription termination sequence (c):	427-470	427-470
M13 Forward (-20) priming site:	537-552	537-552
<i>attP1</i> :	570-801	570-801
<i>ccdB</i> gene (c):	1197-1502	1197-1502
Chloramphenicol resistance gene (c):	1847-2506	1847-2506
<i>attP2</i> (c):	2754-2985	2754-2985
M13 Reverse priming site:	3027-3043	3027-3043
Kanamycin resistance gene:	3155-3965	---
EM7 promoter (c):	---	3485-3552
Zeocin resistance gene (c):	---	3111-3485
pUC origin:	4085-4759	3615-4288

(c) = complementary strand

Clonado molecular

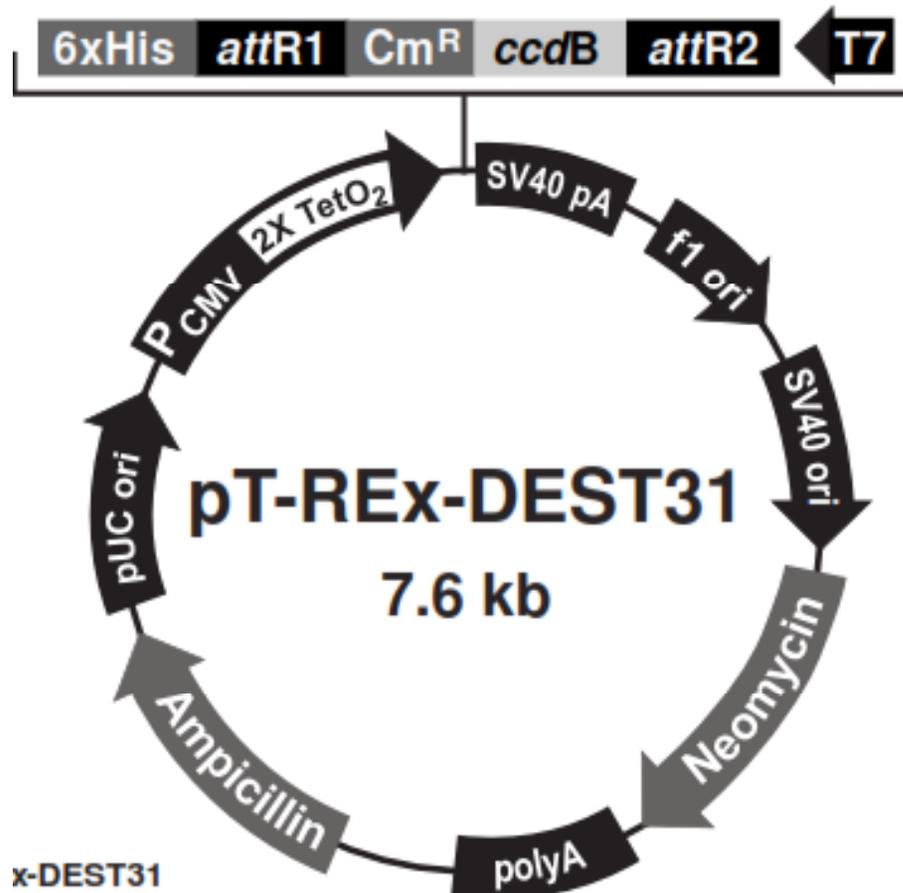
Basados en recombinación sitio específica



GenBank: F05114

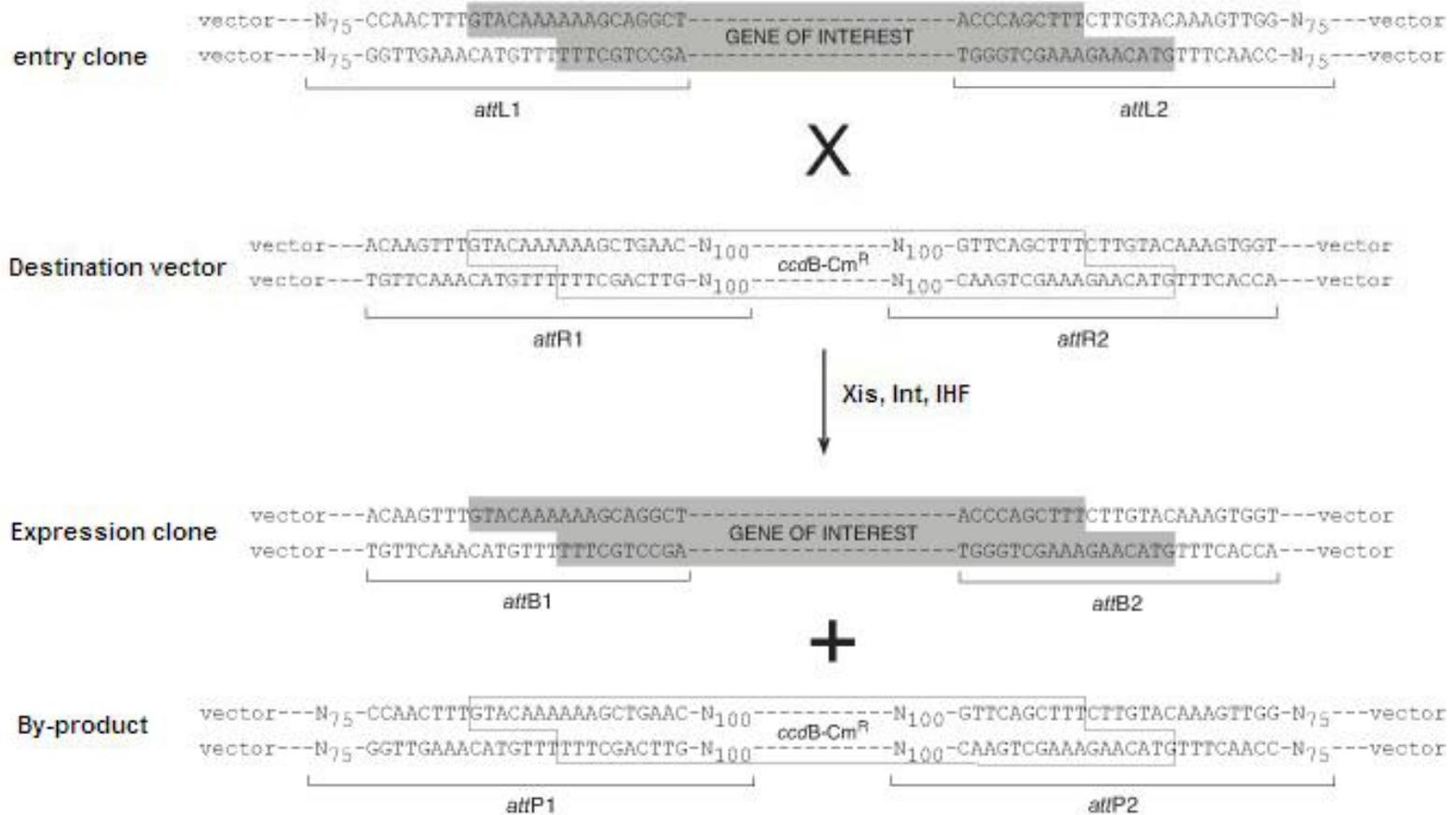
Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica



Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica



Clonado molecular

Basados en recombinación sitio específica

