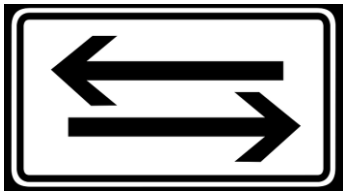
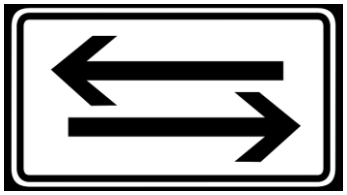
Ingeniería Genética II

Clonado molecular

Ciencia  **Tecnología**

Ciencia



Tecnología

- Objeto de estudio
- Recortes
- Métodos
- Registro de evidencias
- Uso de lenguajes abstractos
- Sistematización de la información

- Objeto/Área de intervención
- Construcción
- (bien/servicio → herramientas)
- Evaluación de capacidades y límites
- Extensiones biológicas

El conocimiento es intangible

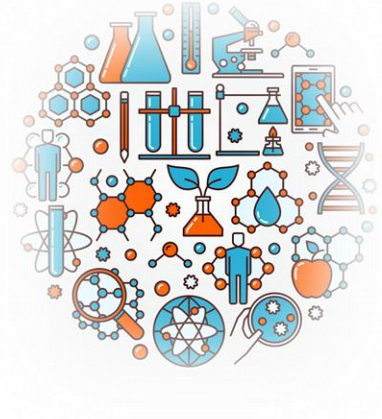
El conocimiento es relativo

Las tecnologías son tangibles

Las tecnologías son reemplazables

Biología

Biotecnología

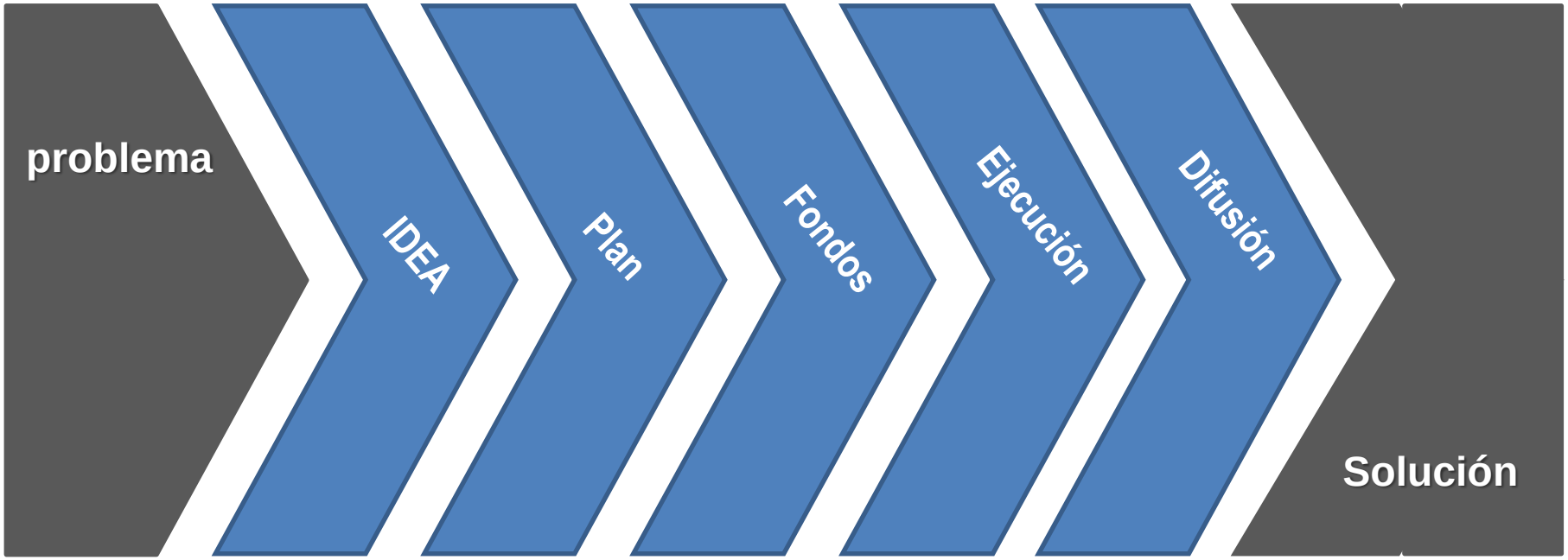


Genética

Ingeniería Genética

Construcción de Ciencia y Tecnología

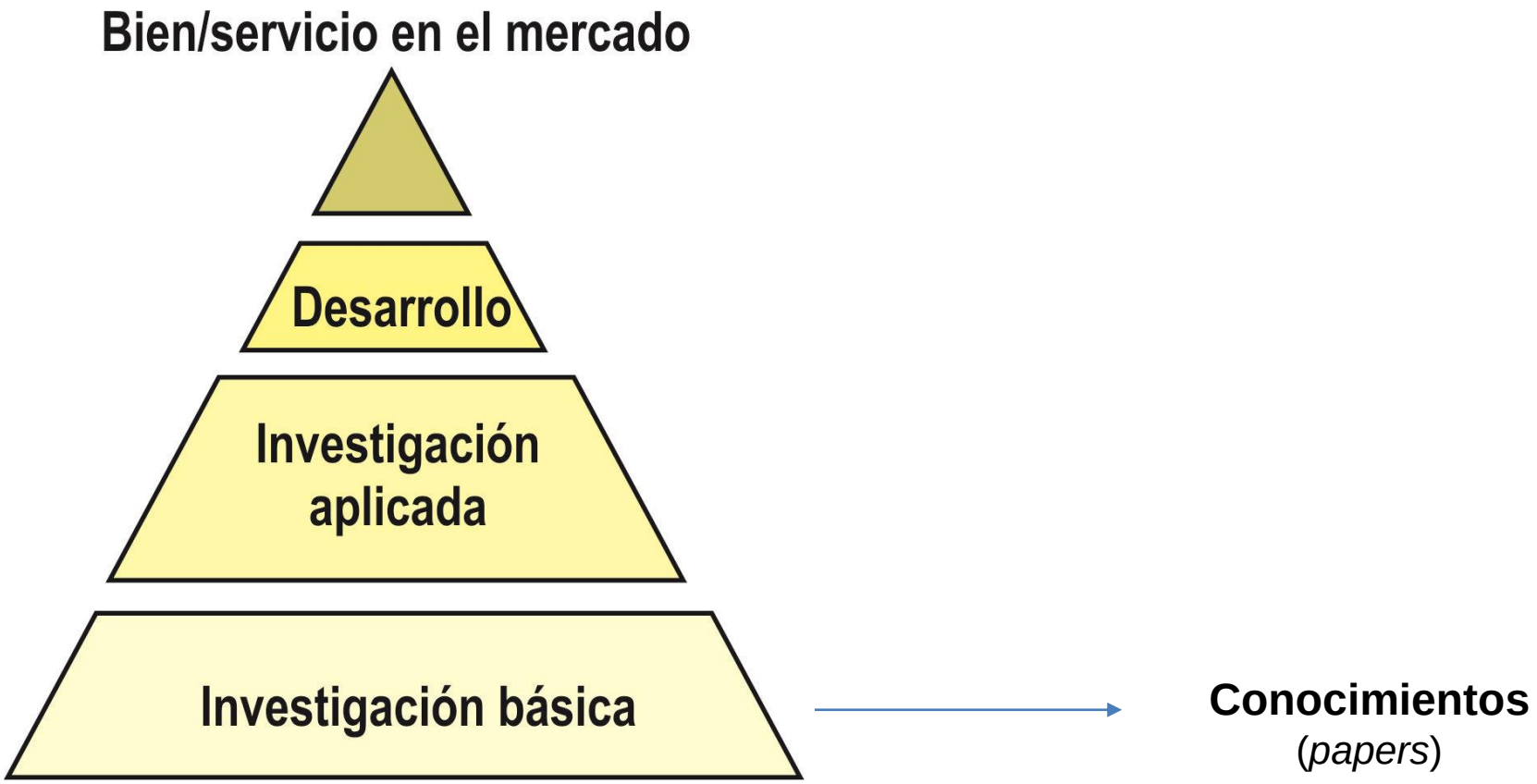
(o construcción de conocimientos y capacidades)



I+D+i

Bien/servicio en el mercado
Desarrollo
Investigación aplicada
Investigación básica

I+D+i


Bien/servicio en el mercado
Desarrollo
Investigación aplicada
Investigación básica
Conocimientos
(*papers*)

I+D+i

Pruebas de concepto
(*papers*, patentes)

Conocimientos
(*papers*)

I+D+i

Prototipos
(registros, sistemas de producción)

Pruebas de concepto
(*papers,* patentes)

Conocimientos
(*papers*)

I+D+i

Bien/servicio
(calidad/mejora continua)

Prototipos
(registros, sistemas de producción)

Pruebas de concepto
(*papers,* patentes)

Conocimientos
(*papers*)

I+D+i

Financiamiento
Bien/servicio en el mercado
Desarrollo
Investigación aplicada
Investigación básica
Empresas
Estados

Ingeniería genética

Construcciones genéticas

GENÉTICA

Estudio de:

- *…la información contenida en la materia viva*;
- *su sintaxis*;
- *y sus mecanismos de transmisión*.

CONOCIMIENTO

El conocimiento es intangible

El conocimiento es relativo

INGENIERÍA GENÉTICA

Aplicación basada en la:

- *…creación o recreación de información genética*;
- *respetando sintaxis*;
- *e implantándola en materia viva*.

BIEN/SERVICIO

Las tecnologías son tangibles

Las tecnologías son reemplazables

La información: deconstrucción

TEXTO

PÁRRAFO

ORACION

PALABRA

LETRA

GENOMA

CIRCUITO GÉNICO

GEN

BIOBRICK GÉNICO

NUCLEÓTIDO

SISTEMA OPERATIVO

RUTINA

SUBRUTINA

COMANDO

LETRA

INGENIERÍA GENÉTICA

Aplicación basada en la:

- *…creación o recreación de información genética*;
- *respetando sintaxis*;
- *e implantándola en materia viva*.

BIEN/SERVICIO

Las tecnologías son tangibles

Las tecnologías son reemplazables

INGENIERÍA GENÉTICA

Aplicación basada en la:

- *…creación o recreación de información genética*;
- *respetando sintaxis*;
- *e implantándola en materia viva*.

BIEN/SERVICIO

Materia viva con nuevas (o distintas) actividades o funciones

Punto de partida

Las tecnologías son tangibles

Las tecnologías son reemplazables

INGENIERÍA GENÉTICA

Aplicación basada en la:

- *…creación o recreación de información genética*;
- *respetando sintaxis*;
- *e implantándola en materia viva*.

BIEN/SERVICIO

Inserción genómica o nuevo replicón

Materia viva con nuevas (o distintas) actividades o funciones

Punto de partida

Las tecnologías son tangibles

Las tecnologías son reemplazables

INGENIERÍA GENÉTICA

Aplicación basada en la:

- *…creación o recreación de información genética*;
- *respetando sintaxis*;
- *e implantándola en materia viva*.

BIEN/SERVICIO

Necesidad de secuencias estandarizadas (*bricks*)

Inserción genómica o nuevo replicón

Materia viva con nuevas (o distintas) actividades o funciones

Punto de partida

Las tecnologías son tangibles

Las tecnologías son reemplazables

INGENIERÍA GENÉTICA

Aplicación basada en la:

- *…creación o recreación de información genética*;
- *respetando sintaxis*;
- *e implantándola en materia viva*.

BIEN/SERVICIO

Necesidad de métodos de ensamblado

Necesidad de secuencias estandarizadas (*bricks*)

Inserción genómica o nuevo replicón

Materia viva con nuevas (o distintas) actividades o funciones

Punto de partida

Las tecnologías son tangibles

Las tecnologías son reemplazables

INGENIERÍA GENÉTICA

Aplicación basada en la:

- *…creación o recreación de información genética*;
- *respetando sintaxis*;
- *e implantándola en materia viva*.

BIEN/SERVICIO

CONSTRUCCIÓN GENÉTICA

Punto de partida

Materia viva con nuevas (o distintas) actividades o funciones

Inserción genómica o nuevo replicón

Necesidad de secuencias estandarizadas (*bricks*)

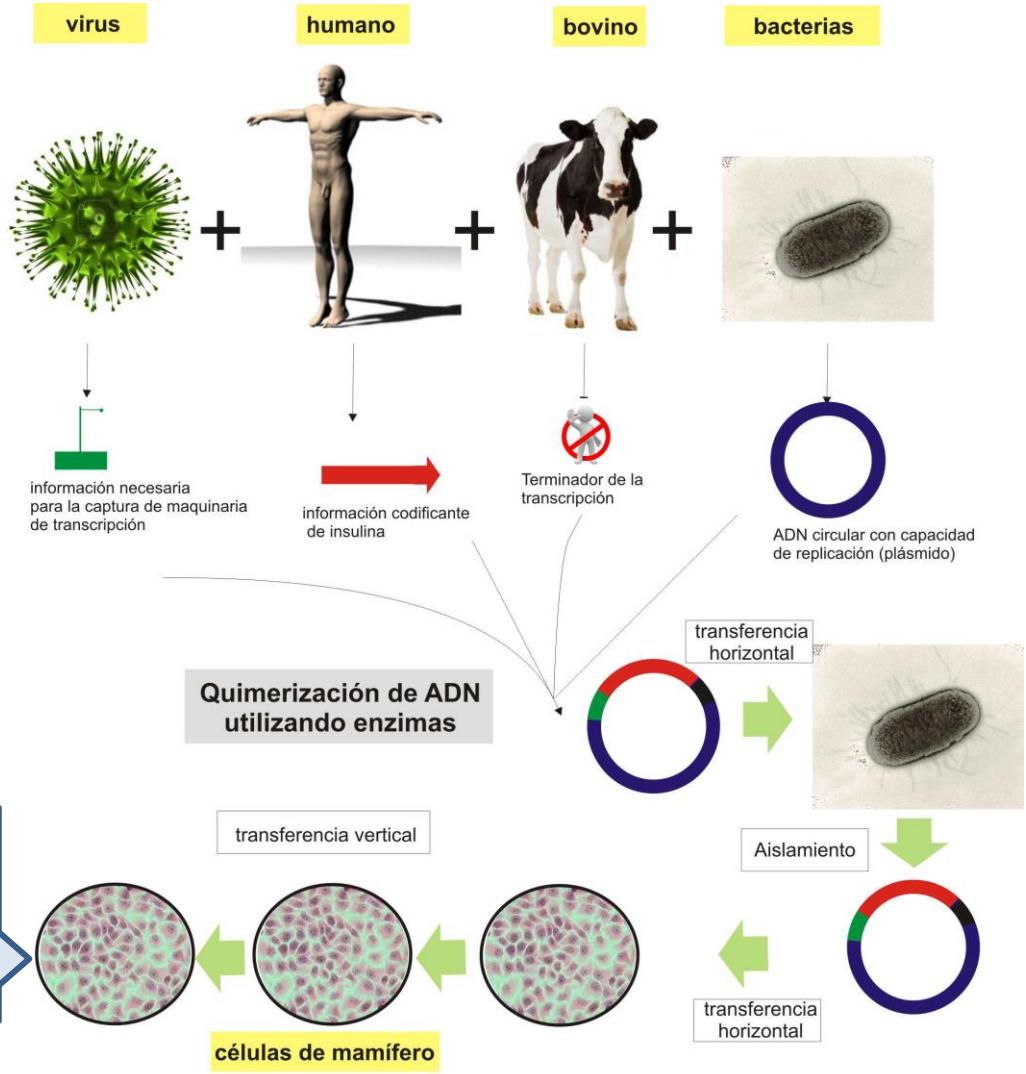
Necesidad de métodos de ensamblado

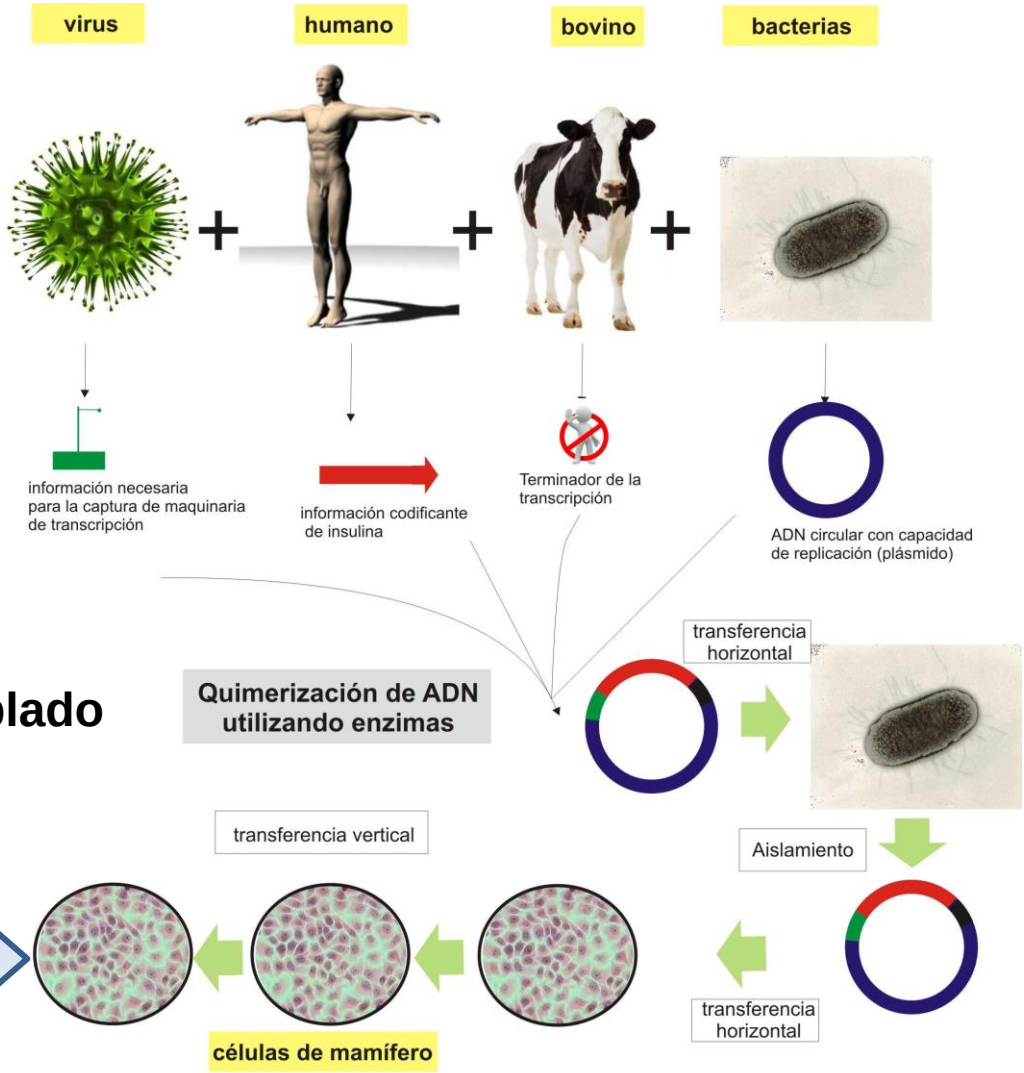
Las tecnologías son tangibles

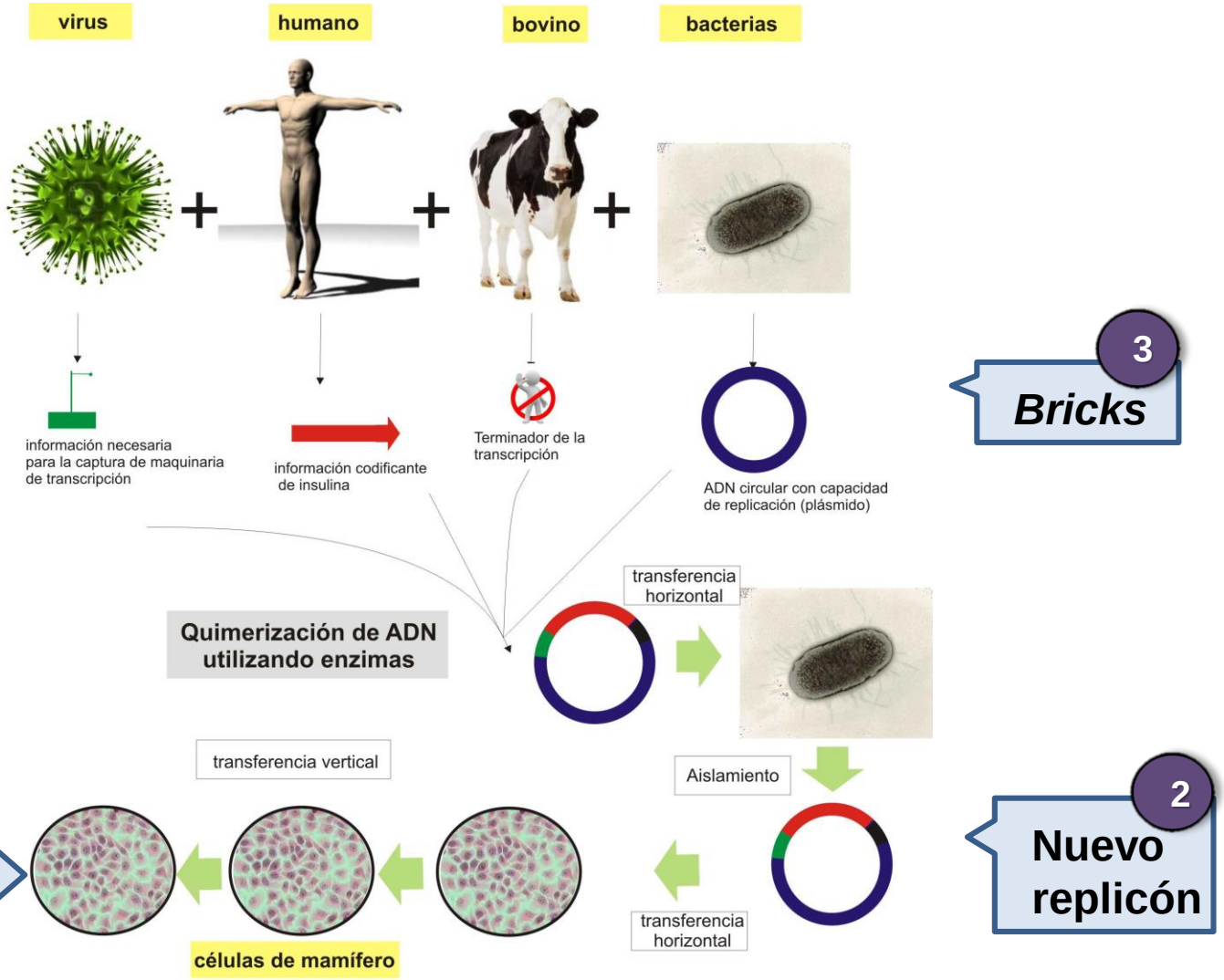
Las tecnologías son reemplazables

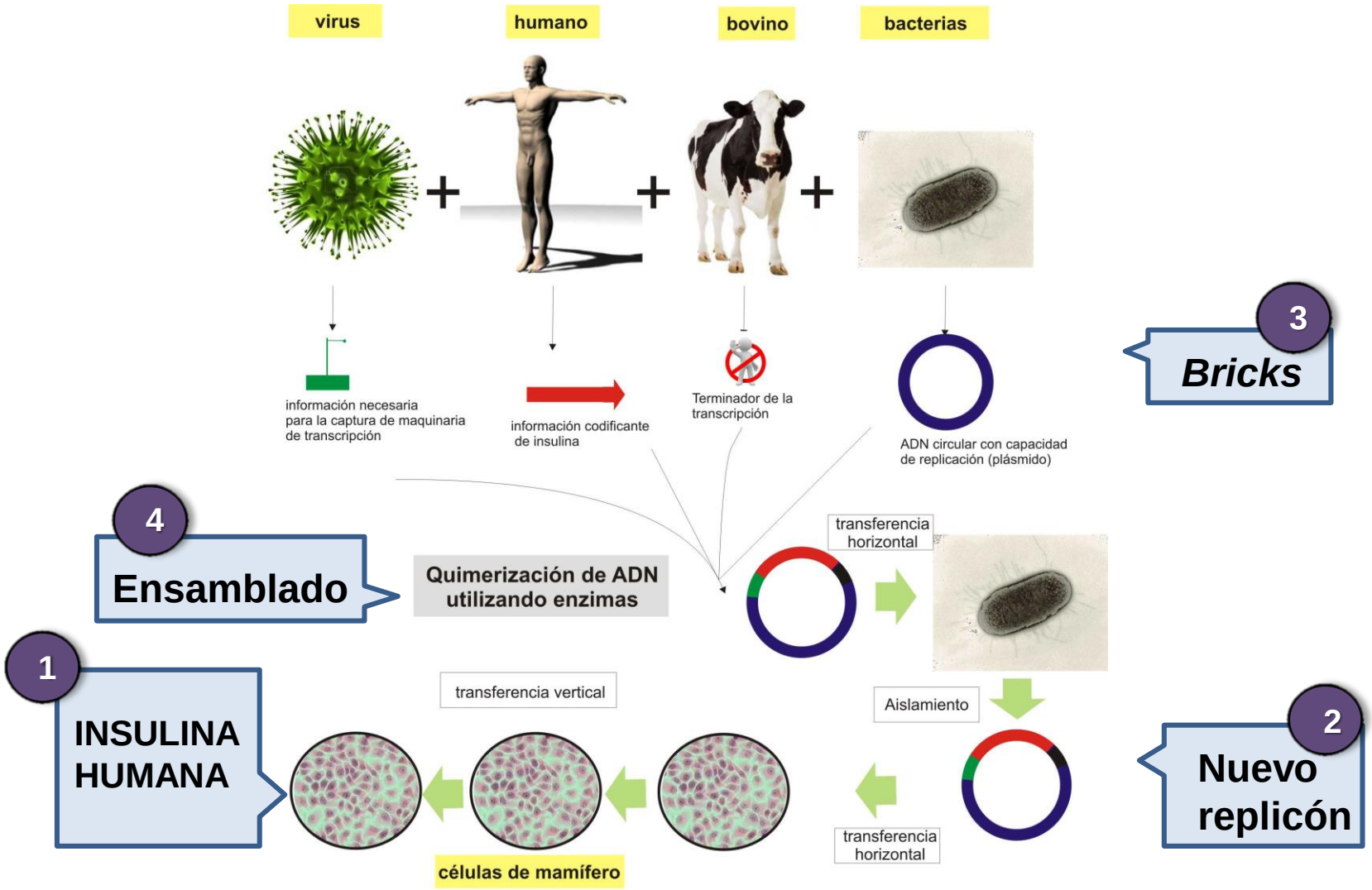
1

INSULINA HUMANA

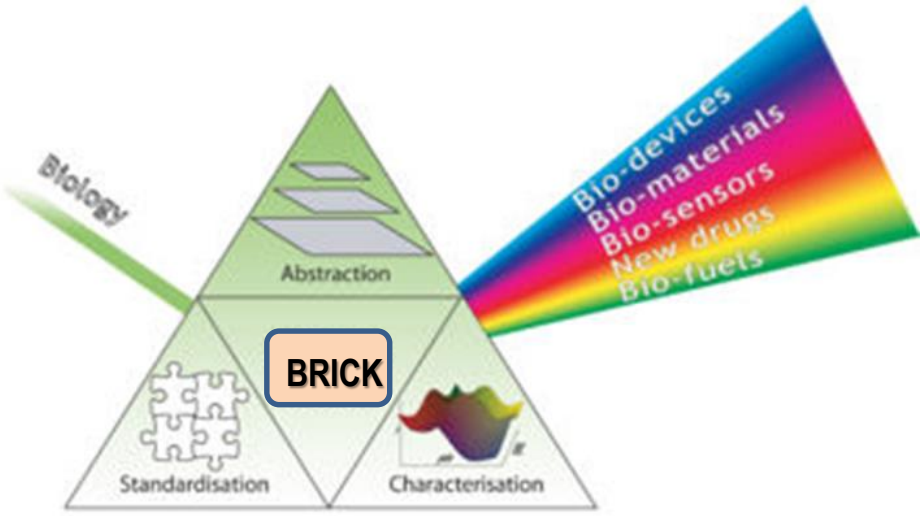



virus
humano
bovino
bacterias
información necesaria para la captura de maquinaria de transcripción
información codificante de insulina
Terminador de la transcripción
ADN circular con capacidad de replicación (plásmido)
transferencia horizontal
Quimerización de ADN utilizando enzimas
Ensamblado
1
INSULINA HUMANA
transferencia vertical
células de mamífero
Aislamiento
transferencia horizontal
2
Nuevo replicón


virus
humano
bovino
bacterias
información necesaria para la captura de maquinaria de transcripción
información codificante de insulina
Terminador de la transcripción
ADN circular con capacidad de replicación (plásmido)
3
Bricks
Quimerización de ADN utilizando enzimas
transferencia horizontal
Aislamiento
2
Nuevo replicón
transferencia horizontal
transferencia vertical
células de mamífero
1
INSULINA HUMANA


virus
humano
bovino
bacterias
información necesaria para la captura de maquinaria de transcripción
información codificante de insulina
Terminador de la transcripción
ADN circular con capacidad de replicación (plásmido)
3
Bricks
4
Ensamblado
Quimerización de ADN utilizando enzimas
transferencia horizontal
1
INSULINA HUMANA
transferencia vertical
Aislamiento
2
Nuevo replicón
transferencia horizontal
células de mamífero

Secuencias estandarizadas y sintaxis



Secuencias estandarizadas (bricks) y sintaxis

ABSTRACCIÓN

CARACTERIZACIÓN

ESTANDARIZACIÓN

Secuencias estandarizadas (bricks) y sintaxis

ABSTRACCIÓN

Delimitar de moléculas genómicas naturales **segmentos de DNA** con roles particulares.

CARACTERIZACIÓN

ESTANDARIZACIÓN

Secuencias estandarizadas (bricks) y sintaxis

ABSTRACCIÓN

Delimitar de moléculas genómicas naturales **segmentos de DNA** con roles particulares.

CARACTERIZACIÓN

Caracterizar el rol de los **segmentos de DNA** abstraídos.

ESTANDARIZACIÓN

Secuencias estandarizadas (bricks) y sintaxis

ABSTRACCIÓN

Delimitar de moléculas genómicas naturales **segmentos de DNA** con roles particulares.

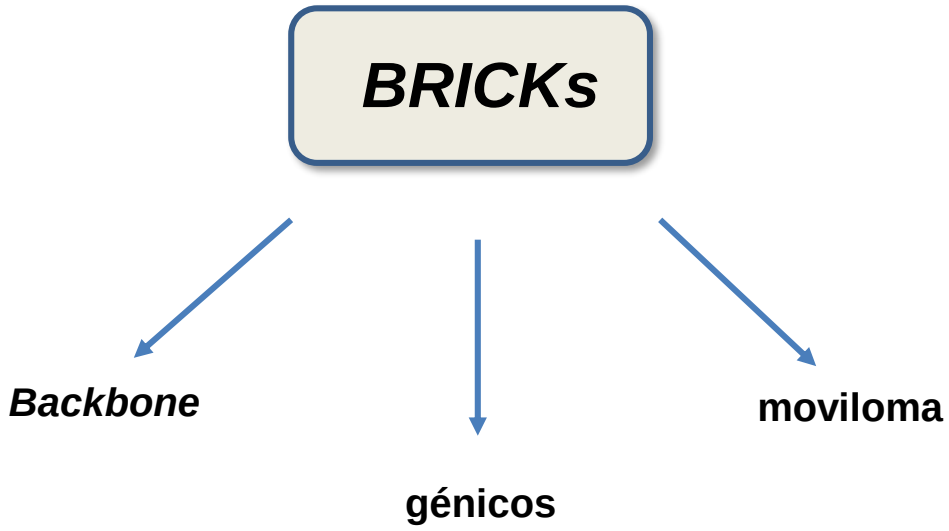
CARACTERIZACIÓN

Caracterizar el rol de los **segmentos de DNA** abstraídos.

ESTANDARIZACIÓN

Generar variantes de los **segmentos de DNA** abstraídos y caracterizados.

Secuencias estandarizadas (*bricks*) y sintaxis



Métodos de ensamblado de *bricks*

CLONADO MOLECULAR

El **clonado molecular** es un **conjunto de procedimientos** que permiten generar **quimeras de fragmentos de dsDNA estandarizados** con capacidad de **multiplicación dentro de materia viva,** racionalmente construidas con el objetivo de **producir bienes y/o servicios biotecnológicos**.

Métodos de ensamblado de *bricks*

CLONADO MOLECULAR

El **clonado molecular** es un **conjunto de procedimientos** que permiten generar **quimeras de fragmentos de dsDNA estandarizados** con capacidad de **multiplicación dentro de materia viva,** racionalmente construidas con el objetivo de **producir bienes y/o servicios biotecnológicos**.

*El **clonado molecular** posibilita la **creación o recreación** de **genotipos**.*

Clonado Molecular tradicional

10 etapas del clonado molecular tradicional

- **Identificar objetivo**
- **Diseño *in silico***

In silico

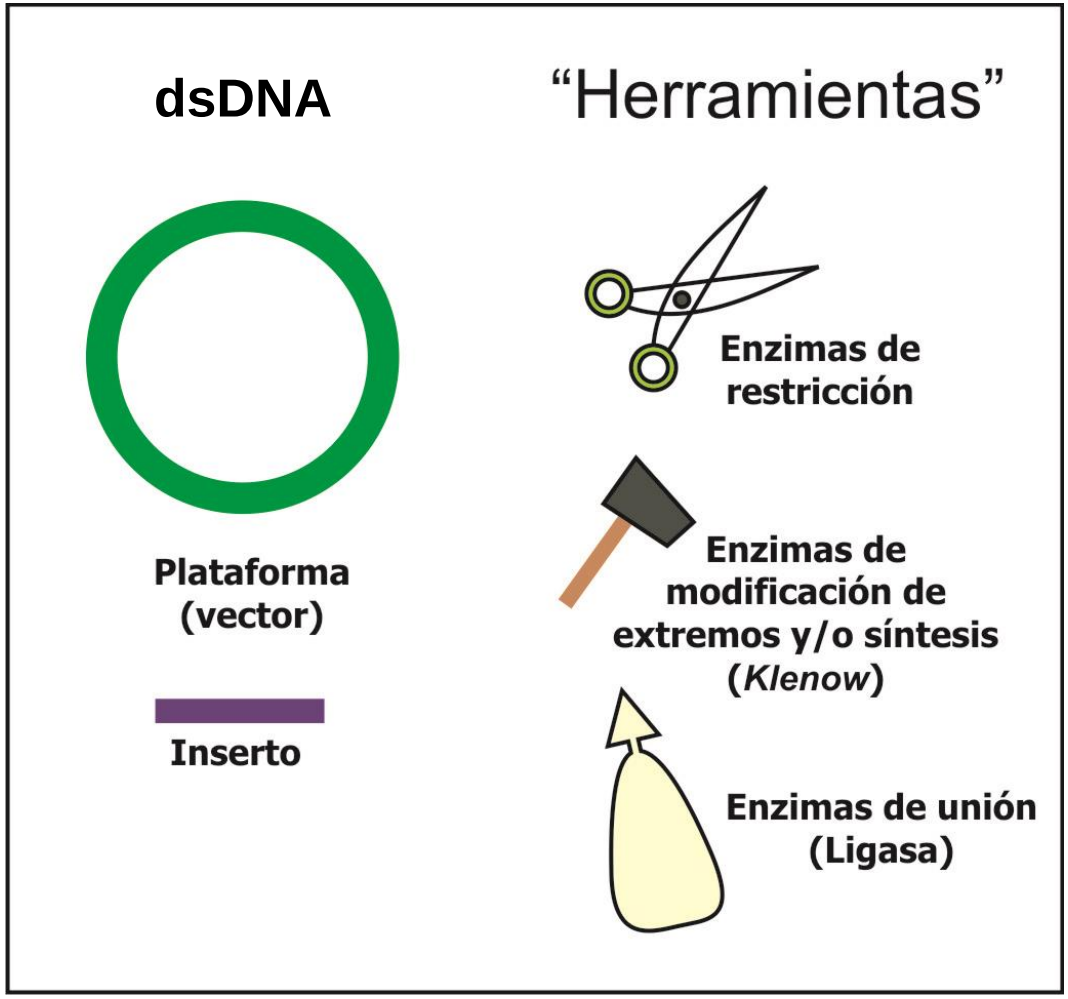
- **Aislar el vector (*backbone*)**
- **Aislar el inserto**
- **Apertura del vector**
- **Compatibilización de extremos**
- **Ligación**

In vitro

- **Transferencia horizontal a *Escherichia coli***
- **Selección de Bact/vector**
- **Selección de Bact/construcción**

In vivo

Clonado molecular



Clonado molecular

- Identificar objetivo
- Diseño *in silico*

In silico

- Aislar el vector
- Aislar el inserto
- Apertura del vector
- Compatibilización de extremos
- Ligación

In vitro

- Transferencia horizontal
- Selección de Bac/vector
- Selección de Bac/construcción Recombinante

In vivo

Clonado molecular

- **Identificar objetivo**
- **Diseño *in silico***

In silico

- *Formulación de objetivos*
- *Boceto*
- *Selección de bricks en acuerdo con boceto*
- *Mapa de la construcción con software (incluyendo el diseño de todos los primers necesarios)*

Clonado molecular

- Identificar objetivo
- Diseño *in silico*

In silico

- **Aislar el vector**
- Aislar el inserto
- Apertura del vector
- Compatibilización de extremos
- Ligación

In vitro

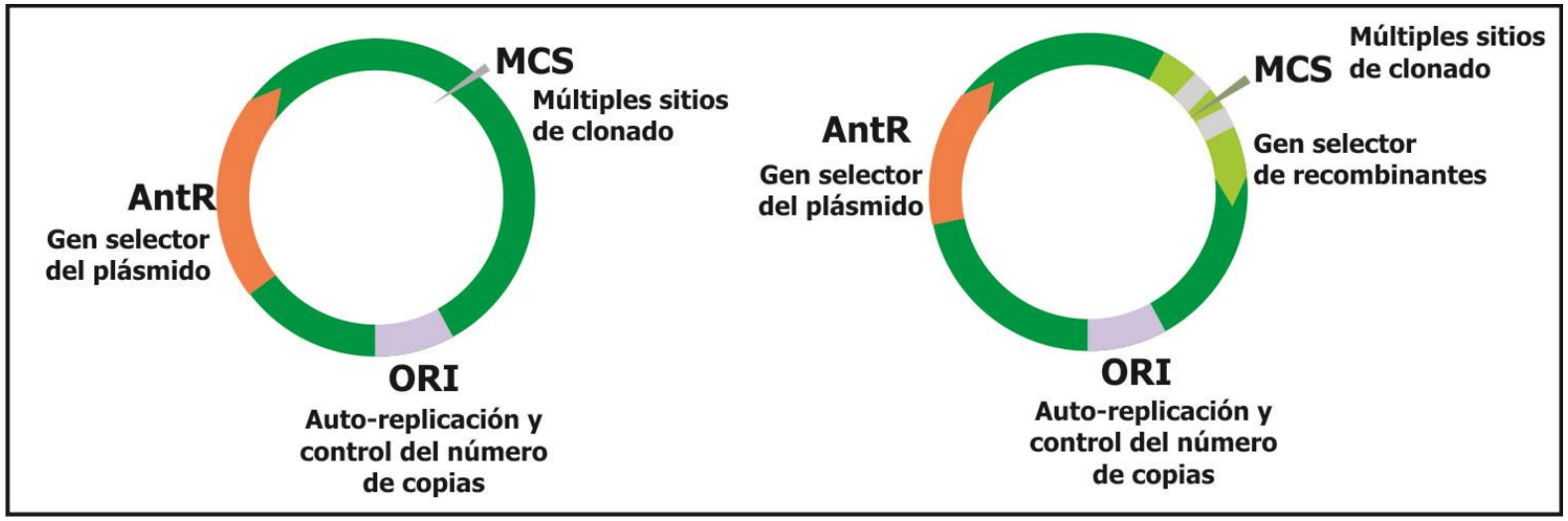
- Transferencia horizontal
- Selección de Bac/vector
- Selección de Bac/construcción Recombinante

In vivo

Clonado molecular

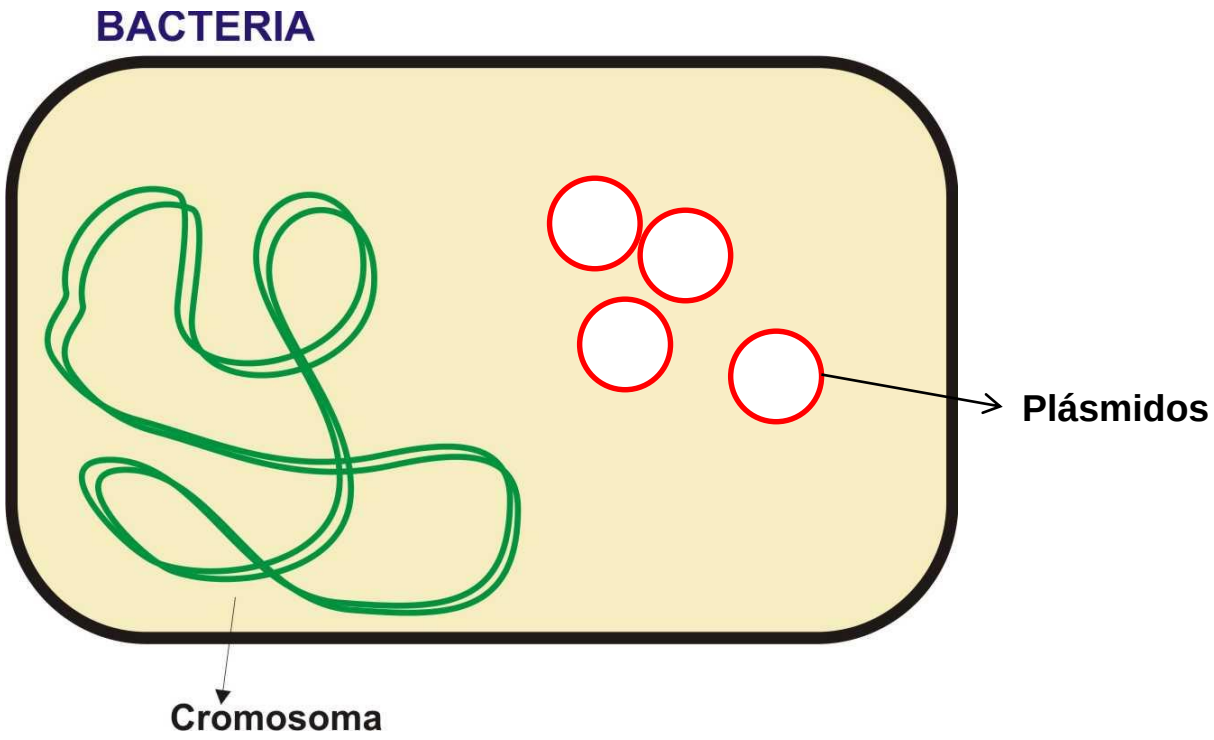
Aislamiento del vector

- Los vectores más utilizados en las construcciones genéticas son los plásmidos.
- Recordemos como es la constitución básica de los plásmidos de clonado…



Clonado molecular

Aislamiento del vector



Clonado molecular

Aislamiento del vector

Aislamiento de una macromolécula biológica

A Obtención de BIOMASA (fuente de la macromolécula)

B Disgregamiento/Disrupción celular

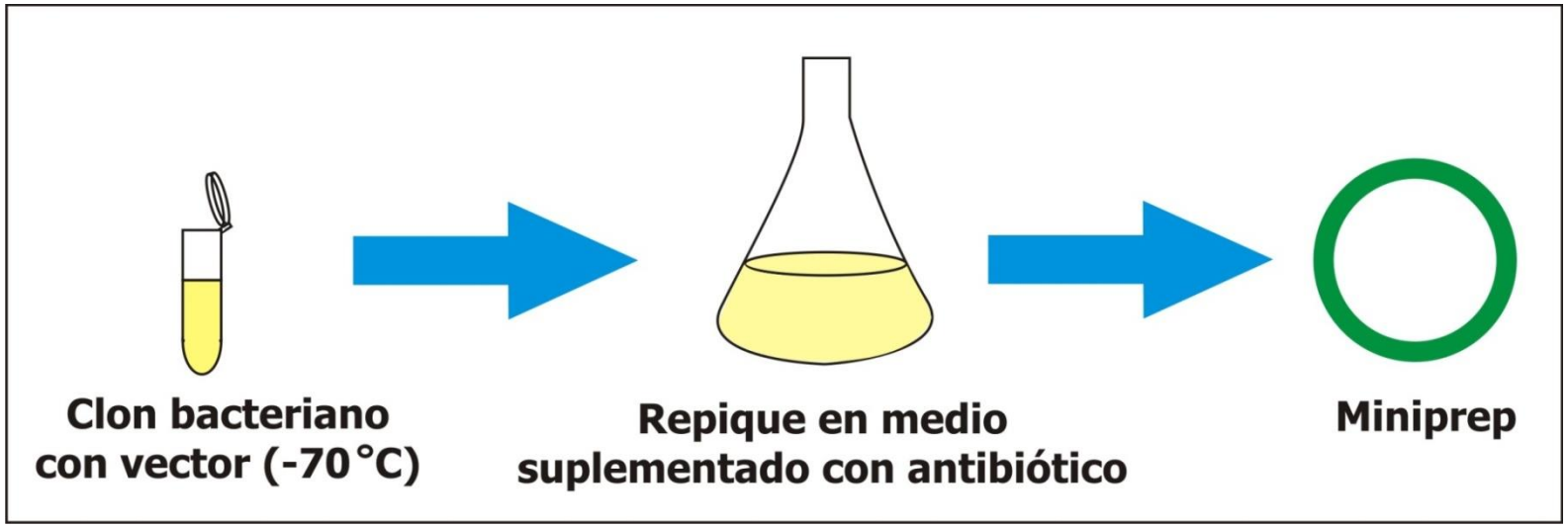
C Separaciones diferenciales

D Concentración

Clonado molecular

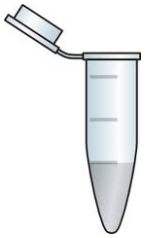
Aislamiento del vector

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



Clonado molecular

Aislamiento del vector



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 disolver en 20 ul de agua.

Clonado molecular

Aislamiento del vector

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.

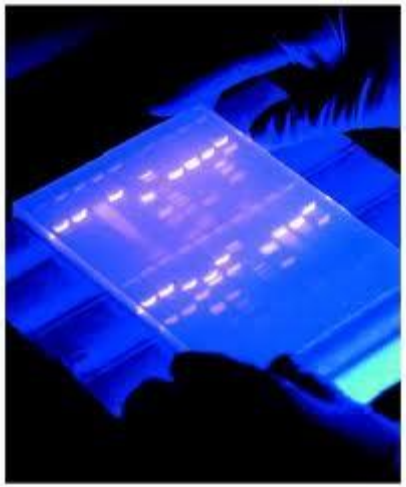
Clonado molecular

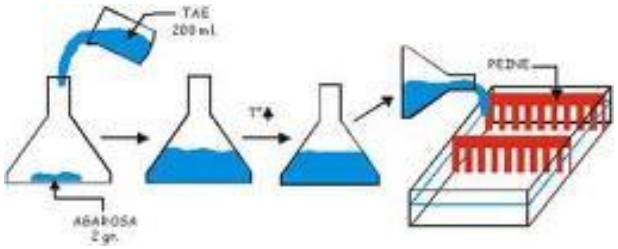
Aislamiento del vector

Diagnóstico analítico del aislamiento de plásmido

ELECTROFORESIS
(gel de agarosa)

CUANTIFICACIÓN
(DO 260 nm)

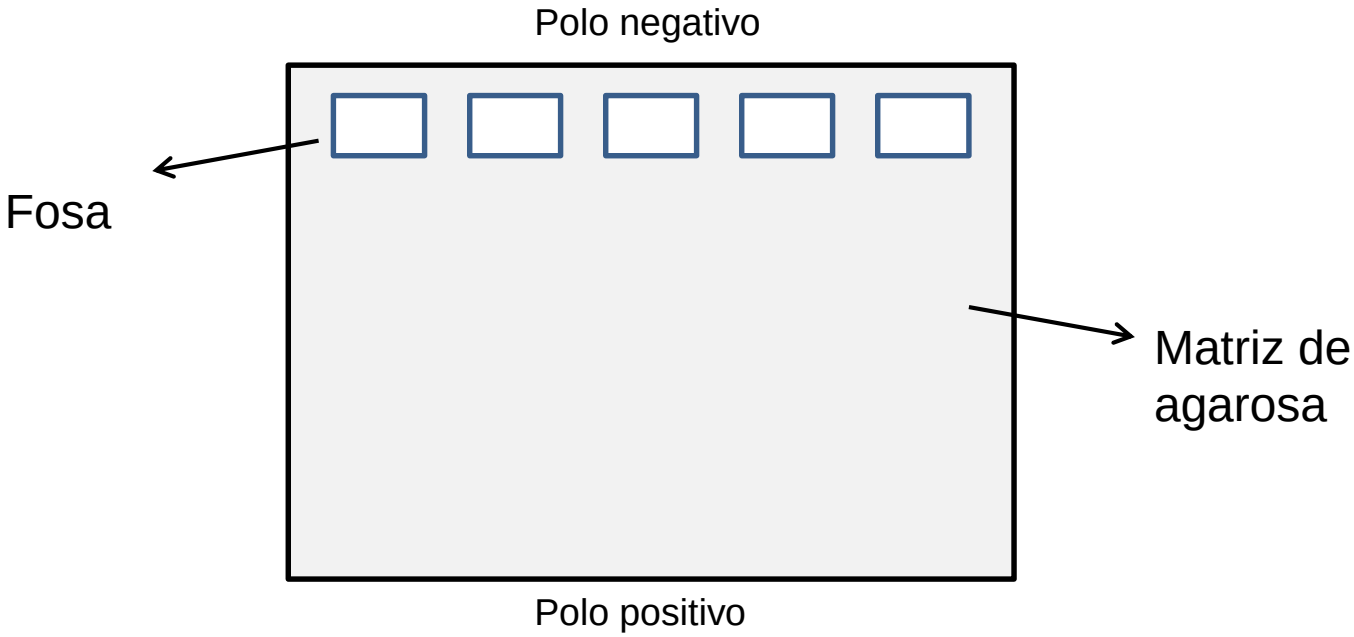




Clonado molecular

Aislamiento del vector

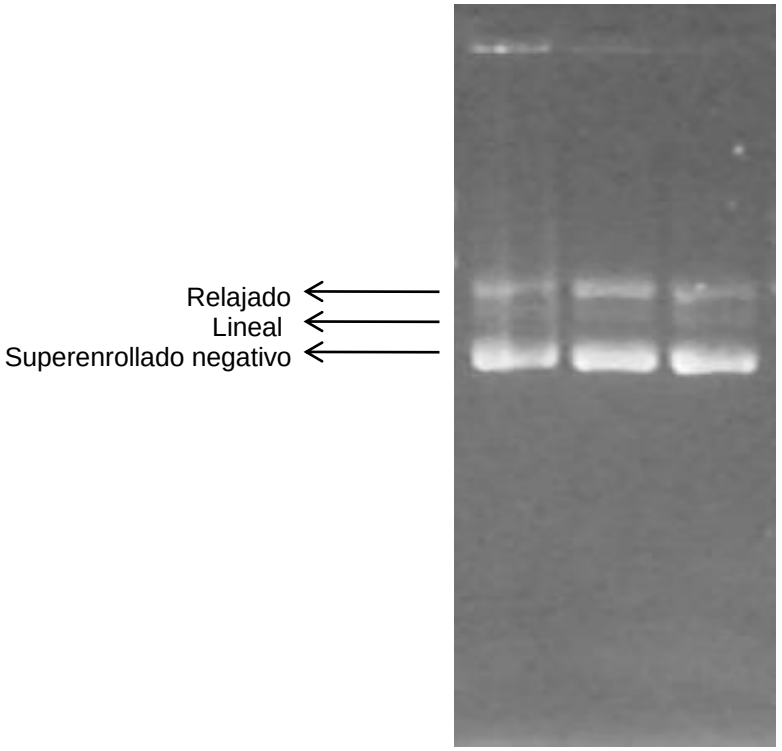
ELECTROFORESIS
(gel de agarosa 0,8%)



Clonado molecular

Aislamiento del vector

ELECTROFORESIS
(gel de agarosa 0,8%)



Electroforesis en gel de agarosa 0,8%,
teñido con Bromuro de Etidio y exposición a UV

Clonado molecular

- Identificar objetivo
- Diseño *in silico*

In silico

- Aislar el vector
- **Aislar el inserto**
- Apertura del vector
- Compatibilización de extremos
- Ligación

In vitro

- Transferencia horizontal
- Selección de Bac/vector
- Selección de Bac/construcción Recombinante

In vivo

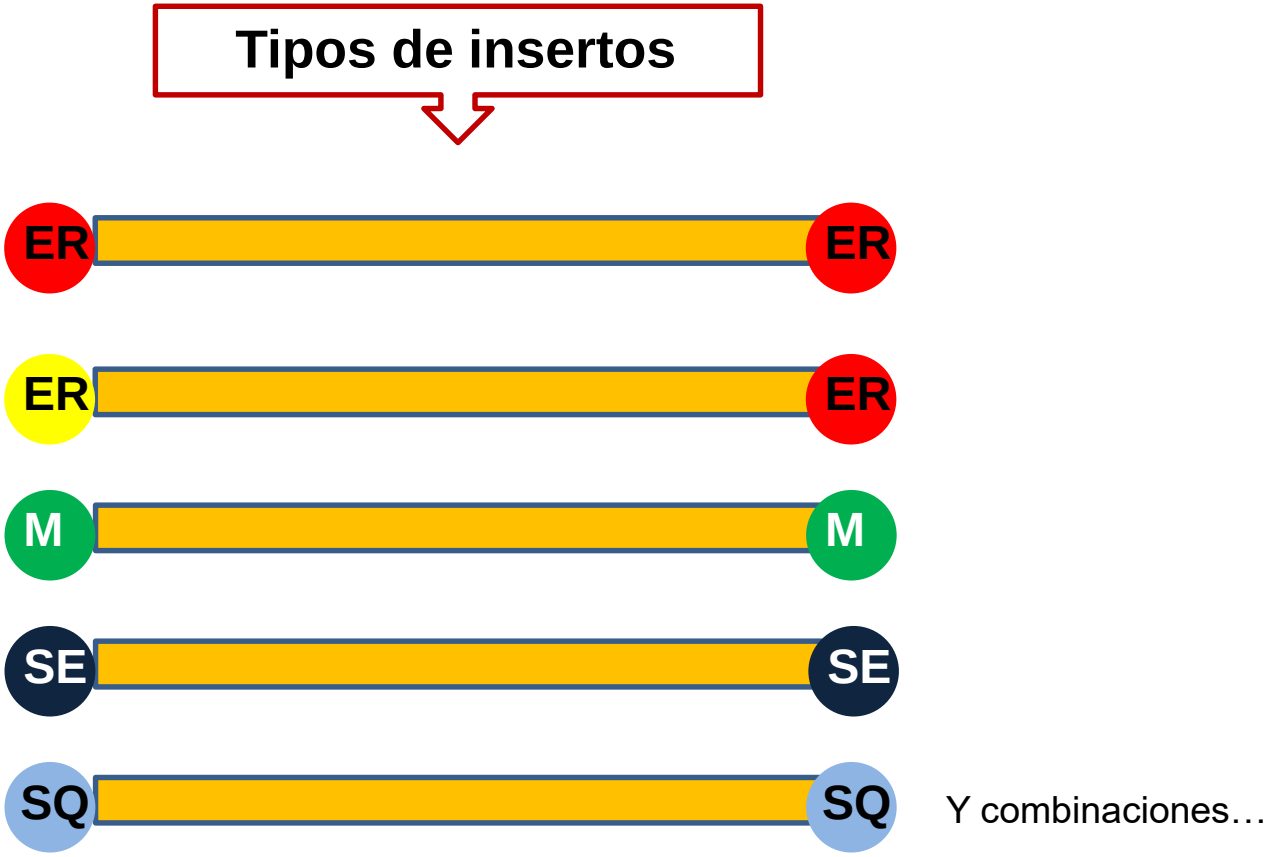
Clonado molecular

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 sintético.**
- Es muy importante considerar la fuente del inserto para identificar el tipo de extremos que tiene la molécula.

Clonado molecular

Aislamiento del inserto

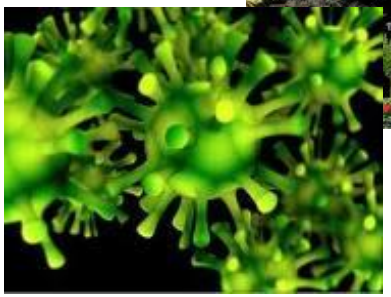


ER: extremo de digestión con endonucleasas; **M:** extremo de fragmentación mecánica; **SE:** Extremo de síntesis enzimática: **SQ:** Extremo de síntesis

Clonado molecular

Aislamiento del inserto: Fuentes naturales

organismos



virus

organelas

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

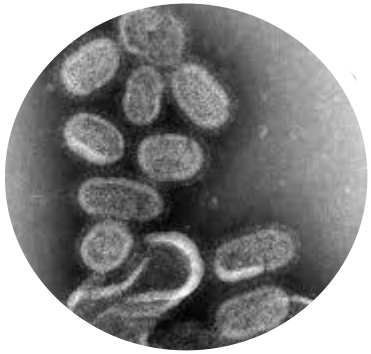
C Separaciones diferenciales

D Concentración

Clonado molecular

Aislamiento del inserto: Fuentes naturales

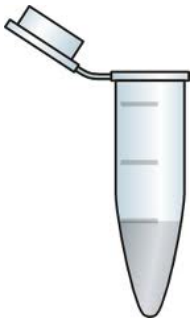
BIOMASA



Virus

Células libres

Órganos o partes

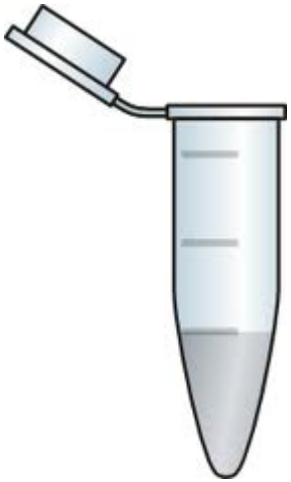


Disgregamiento (enzimático y/o mecánico)

Disrupción o lisis (detergentes, proteinasas)

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

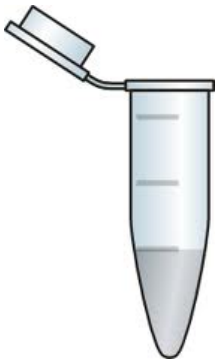
Fraccionamiento

Enzimático

Mecánico

Fraccionamiento con Endonucleasas de Restricción

Fraccionamiento con métodos físicos



Reacción enzimática

Pasaje por jeringa

nebulizador

vortex

sonicador

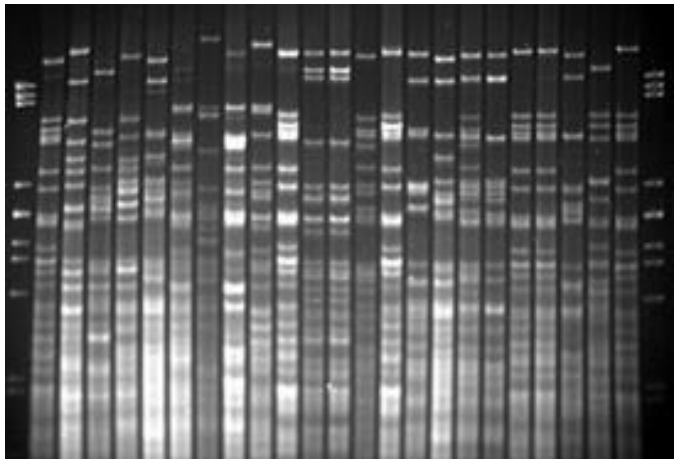
Clonado molecular

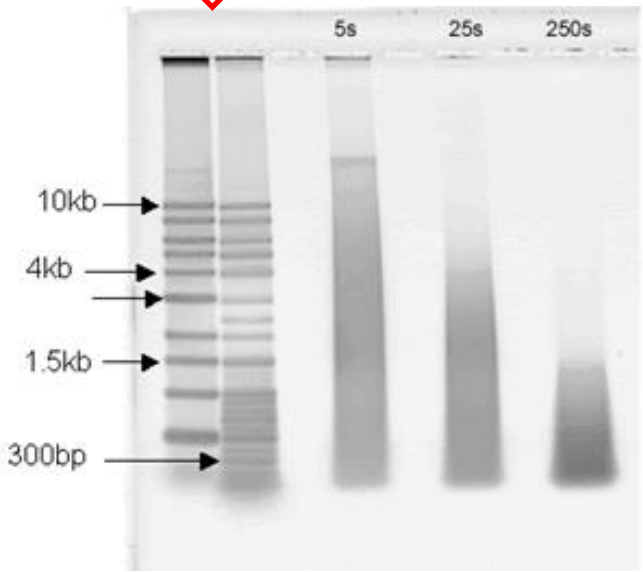
Aislamiento del inserto: Fuentes naturales

Fraccionamiento

Enzimático | **Mecánico**

Electroforesis preparativa





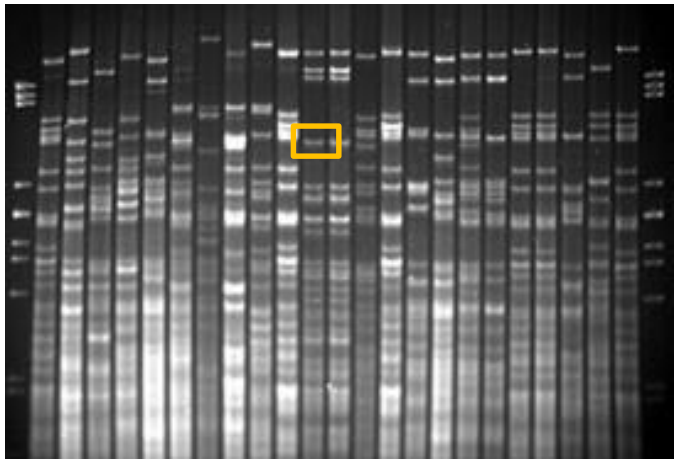
Clonado molecular

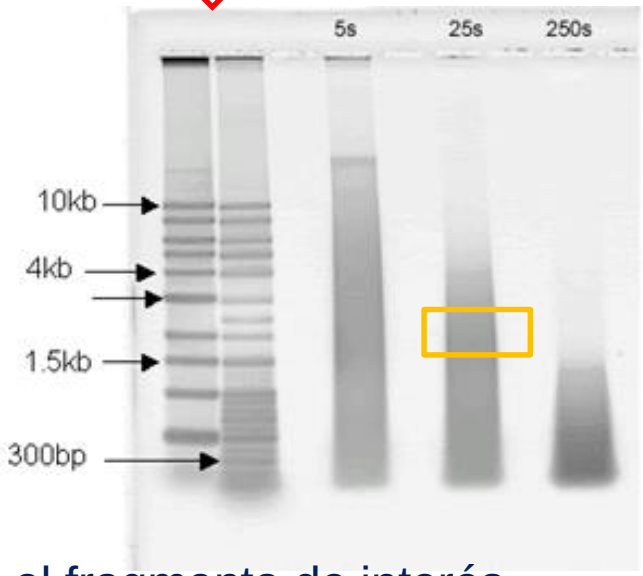
Aislamiento del inserto: Fuentes naturales

Fraccionamiento

Enzimático | **Mecánico**

Electroforesis preparativa



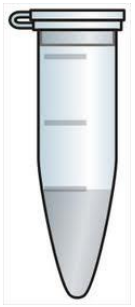


Se cortan los tacos de agarosa con el fragmento de interés

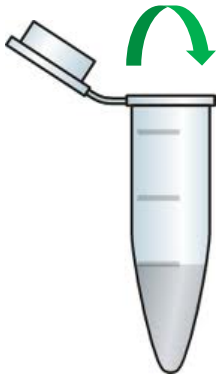
Clonado molecular

Aislamiento del inserto: Fuentes naturales

Taco de agarosa con fragmentos

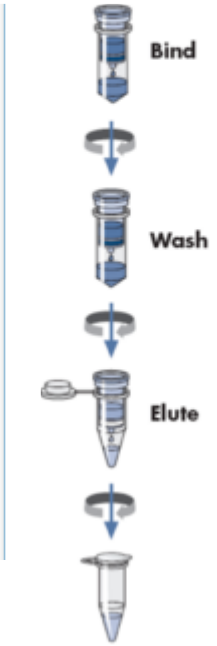


Tubo con taco



Solución caótropo

Tubo con taco + caótropo + calor



microcentrífuga

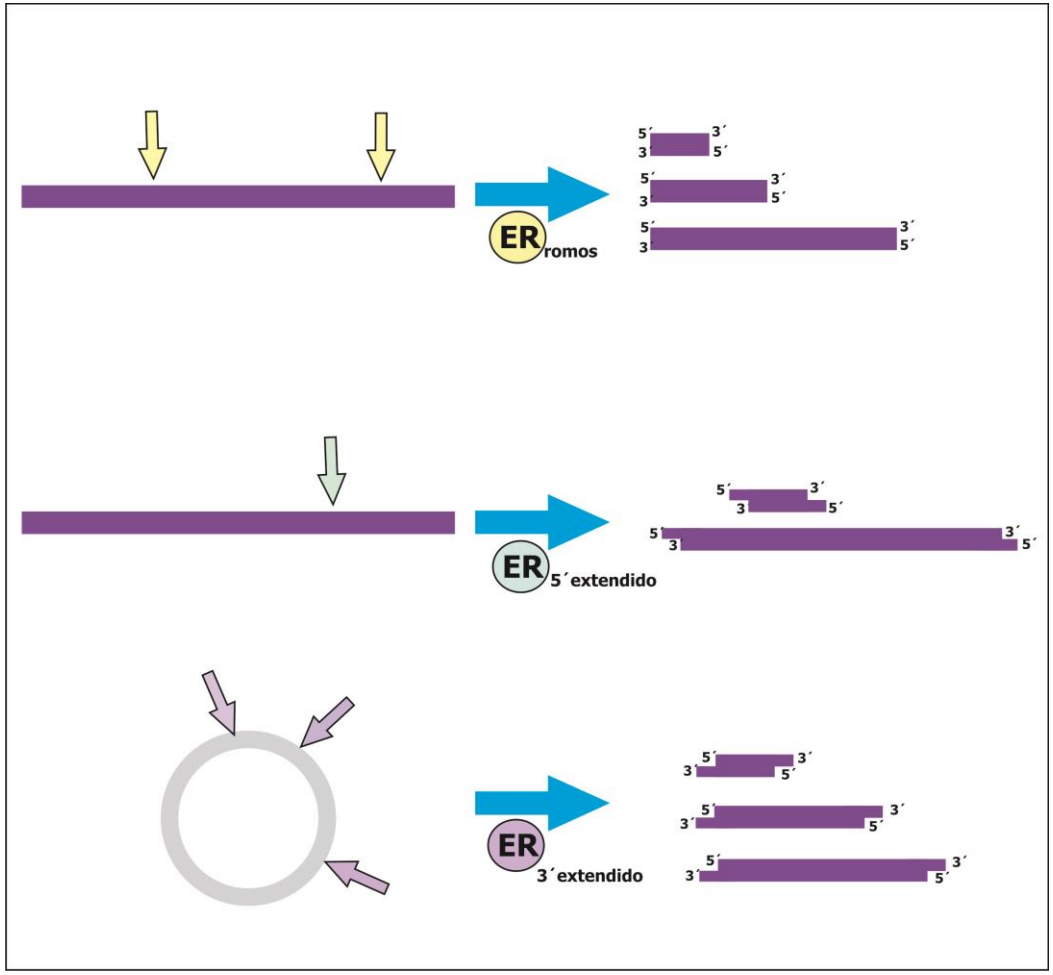
espectrofotómetro

Solución caótropo

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

Clonado molecular

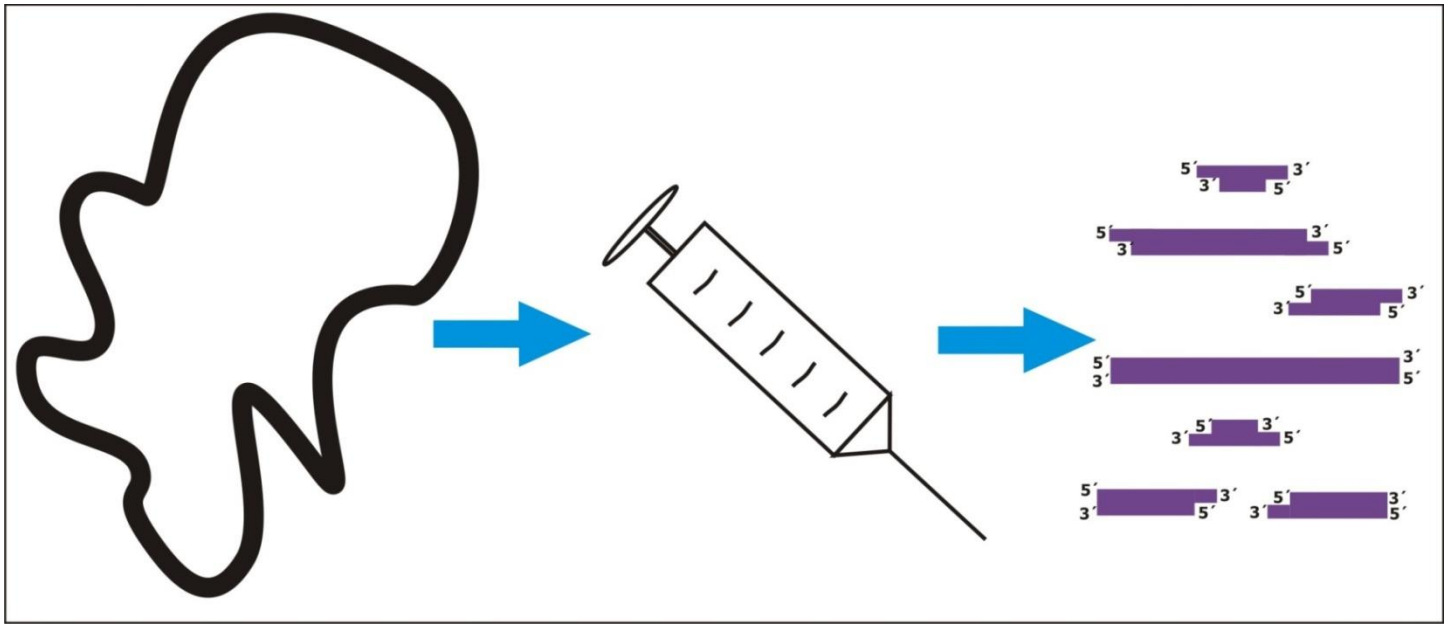
Aislamiento del inserto: Fuentes naturales



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

↙ ↘

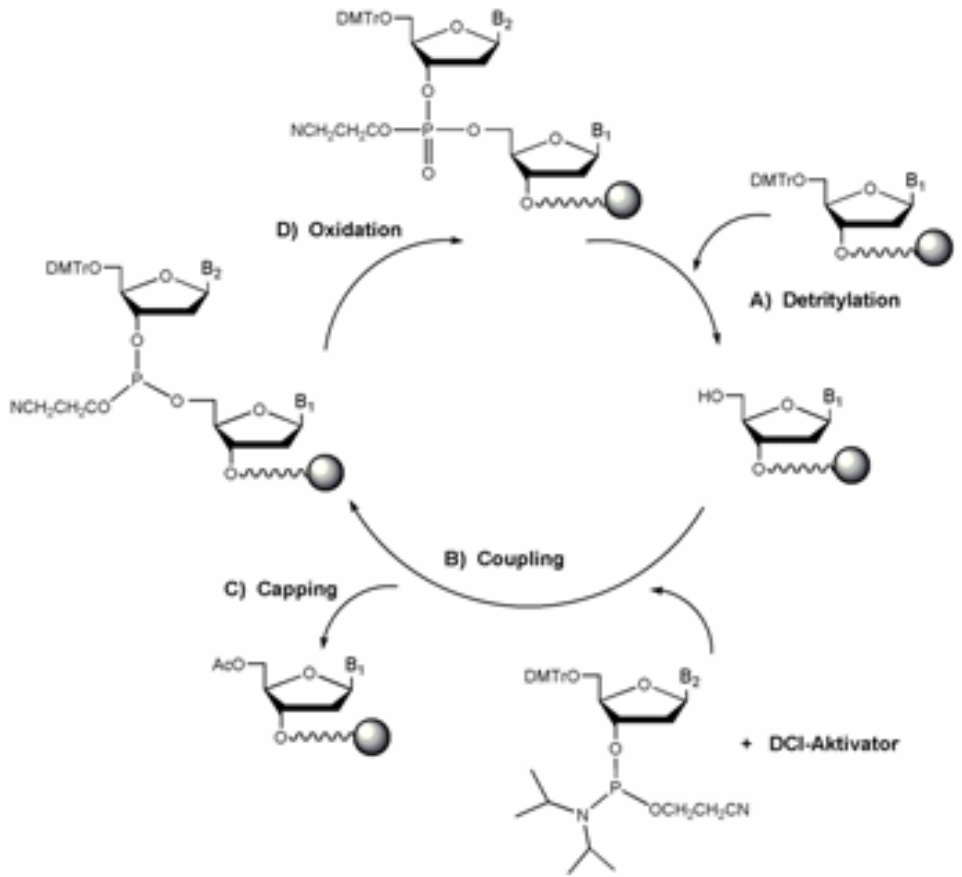
Replicación *in vitro* (PCR)

Necesidad de DNA original como molde de reacción

Hibridación *in vitro*

Clonado molecular

Aislamiento del inserto: Fuentes artificiales

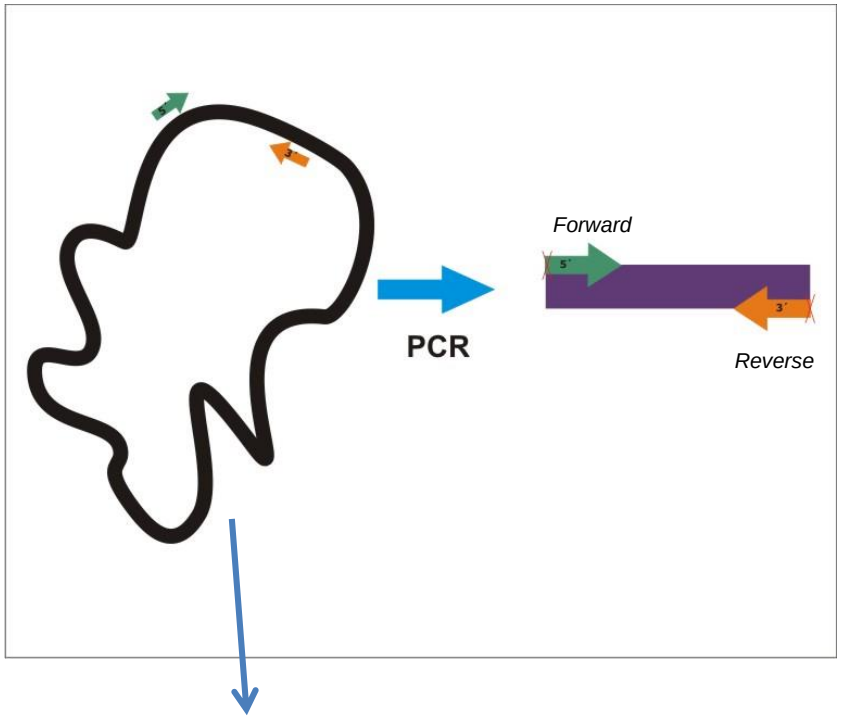


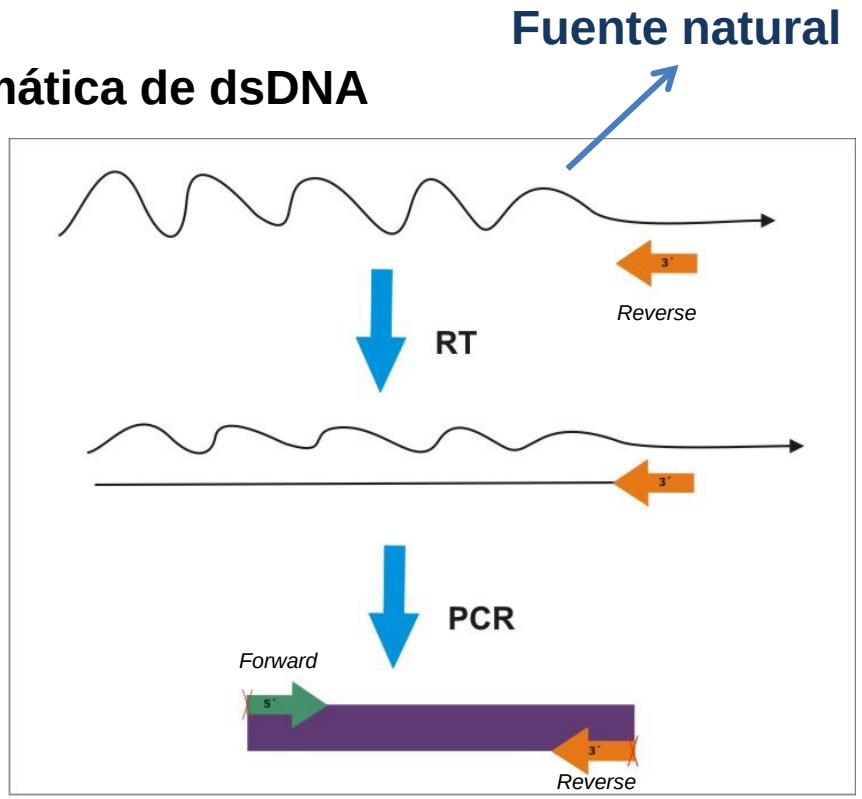
Síntesis química de oligonucleótidos

Clonado molecular

Aislamiento del inserto: Fuentes artificiales

Generación enzimática de dsDNA



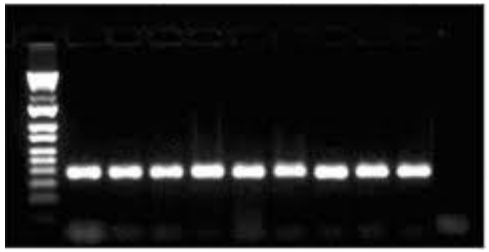


Clonado molecular

Aislamiento del inserto: Fuentes artificiales

PCR

termociclador



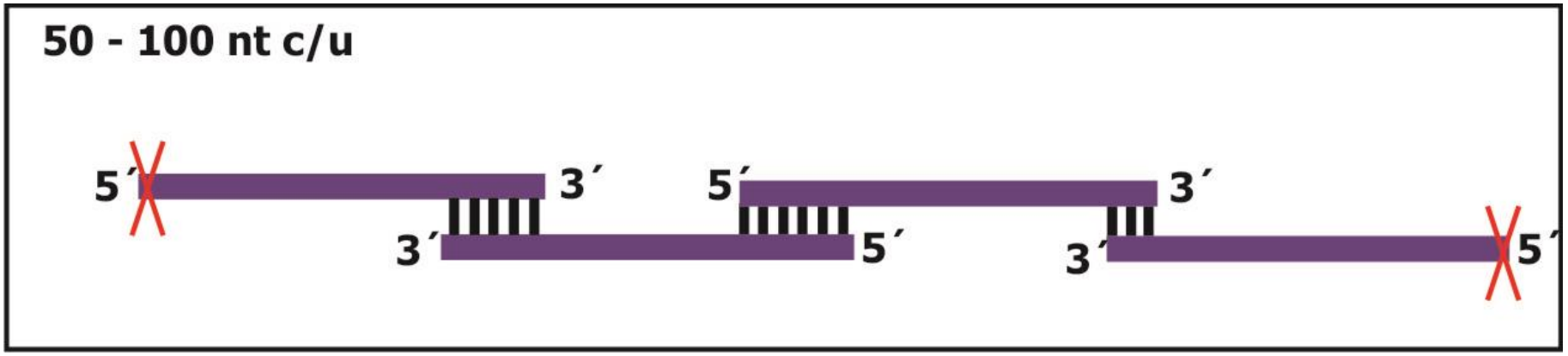
Electroforesis

Amplicón aislado
a partir de gel

Clonado molecular

Aislamiento del inserto: Fuentes artificiales

Síntesis enzimática en ausencia de fuente natural



Incubar a 95 °C

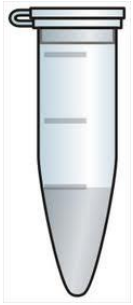
↓

Incubar a 60 °C

↓

Incubar con *Taq* pol y *Taq* ligasa

→



dsDNA
en solución

Clonado molecular

- Identificar objetivo
- Diseño *in silico*

In silico

- Aislar el vector
- Aislar el inserto
- **Apertura del vector**
- **Compatibilización de extremos**
- Ligación

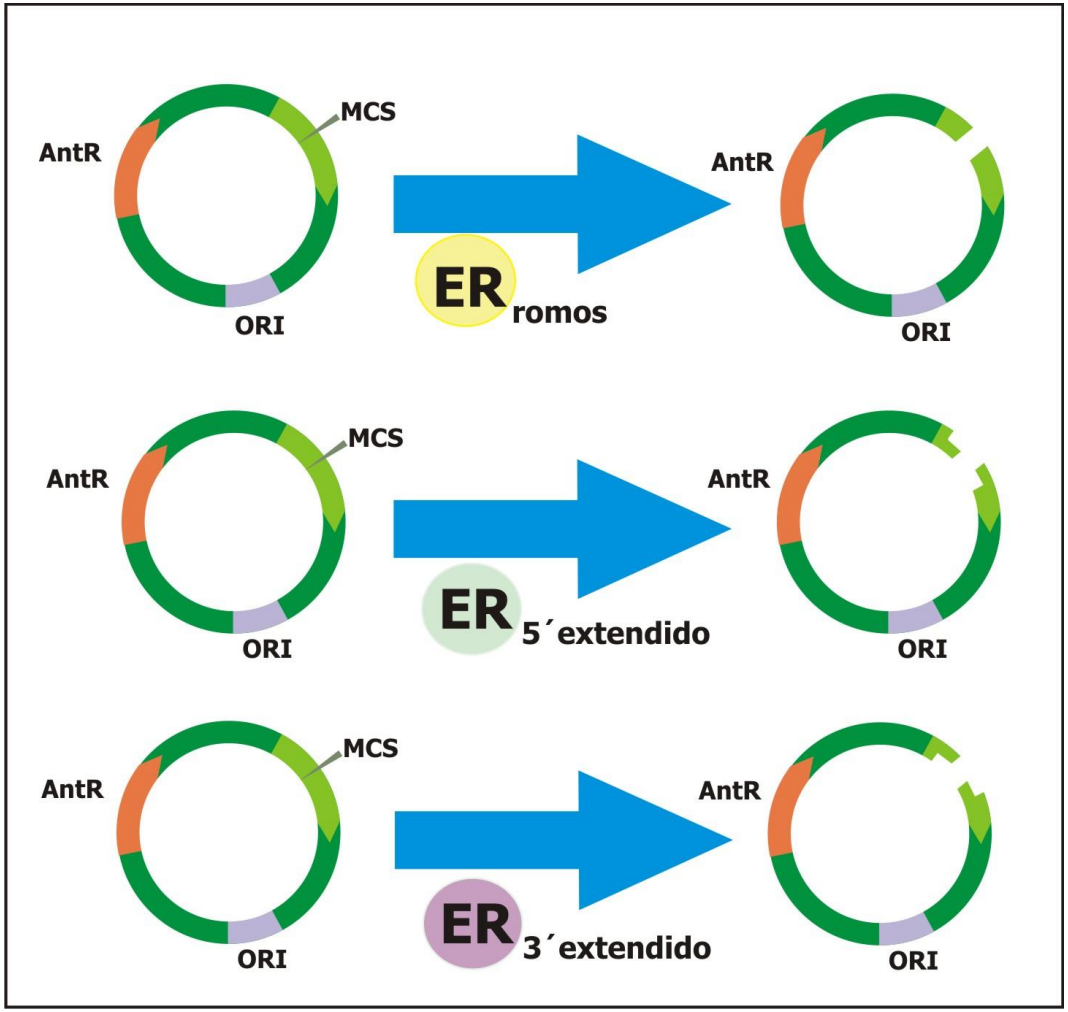
In vitro

- Transferencia horizontal
- Selección de Bac/vector
- Selección de Bac/construcción Recombinante

In vivo

Clonado molecular

Apertura del plásmido y compatibilización de extremos



Clonado molecular

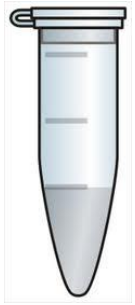
Apertura del plásmido y compatibilización de extremos

Reactivo	Volumen
Buffer Reacción 10X	1 µl
Plásmido	1 µg (vol. necesario)
ER (10 U/µl)	2-5 unidades
H_2O	c.s.p.
Vf	**10 µl**

Incubar a temperatura de reacción: 1-4 horas
Inactivar 20 minutos a 75°C

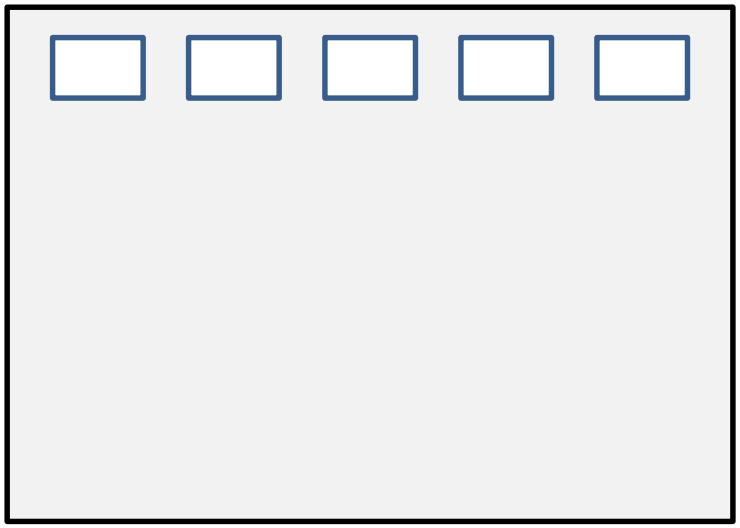
Clonado molecular

Apertura del plásmido y compatibilización de extremos



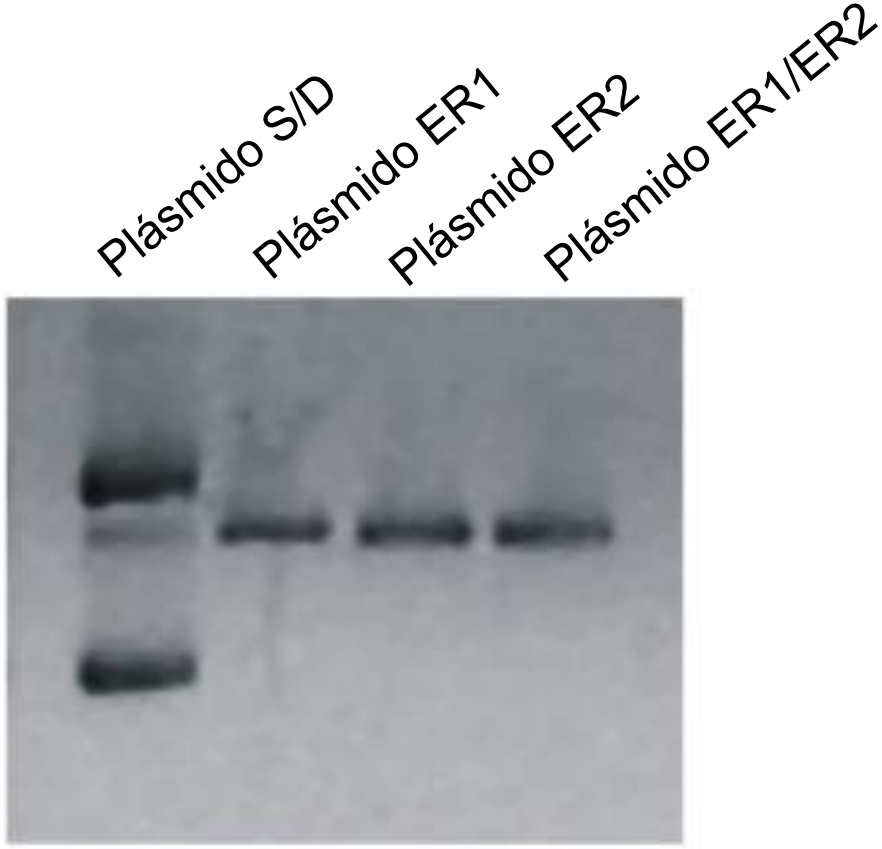
10 µl
Digestión enzimática
plásmido

Electroforesis
Analítica
(1-2 µl)



Clonado molecular

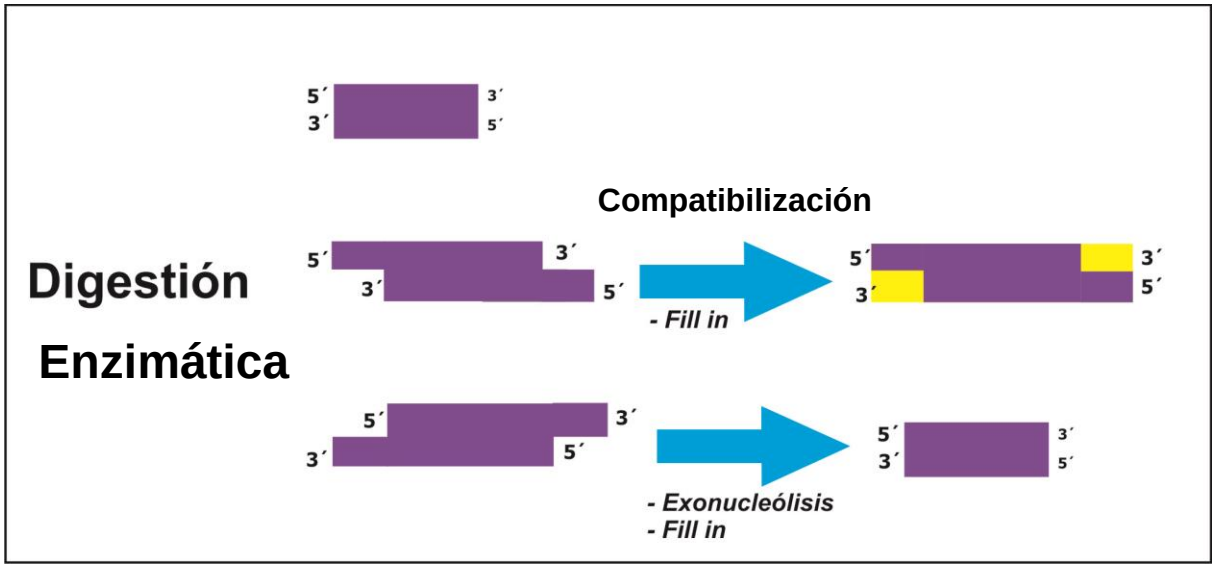
Apertura del plásmido y compatibilización de extremos



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 *Fill in*	**Volumen**
Buffer Reacción 10X	1 µl
Plásmido lineal	100 ng (vol. necesario)
dNTP´s	100 µM $_{final}$
Klenow (1 u/µl)	1 unidad
H_2O	c.s.p.
Vf	**10 µl**

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

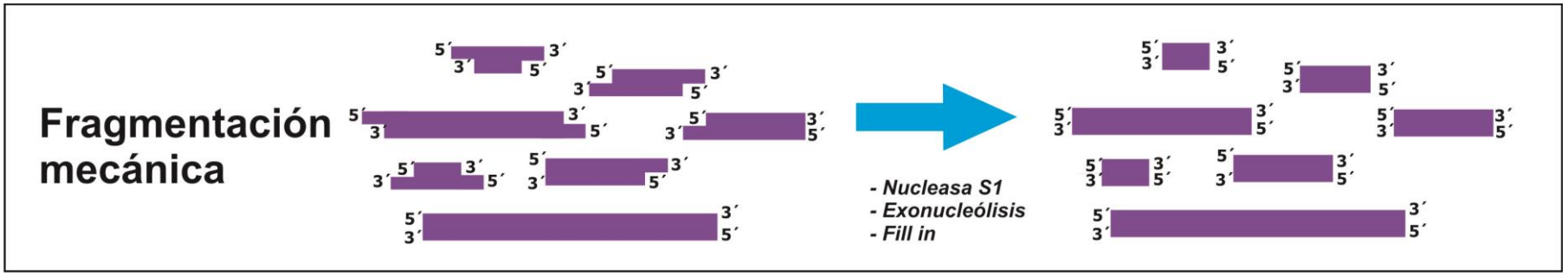
Apertura del plásmido y compatibilización de extremos

- 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 puede modificarse a la molécula plasmídica, como corregir los extremos de las moléculas inserto para facilitar su posterior clonado.

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

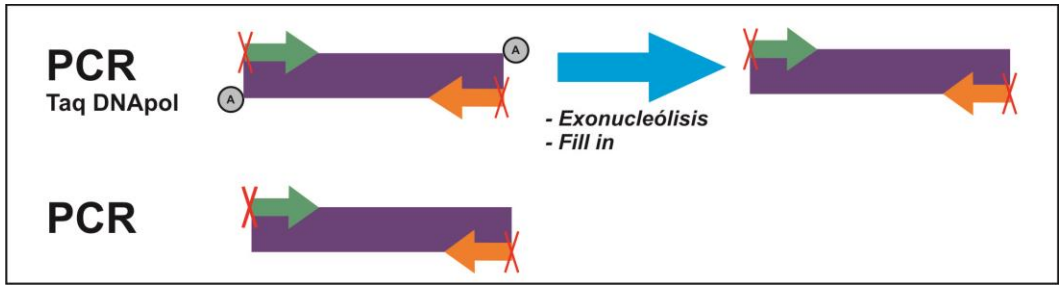
dsDNA con extremos romos

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

Apertura del plásmido y compatibilización de extremos

Modificación de extremos de los fragmentos de dsDNA obtenidos por PCR, cuando se incorporaron secuencias de reconocimiento a Enzimas de Restricción en los *primers*

Tratar al producto de amplificación con las endonucleasas de restricción adecuadas

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*

In silico

- Aislar el vector
- Aislar el inserto
- Apertura del vector
- Compatibilización de extremos
- **Ligación**

In vitro

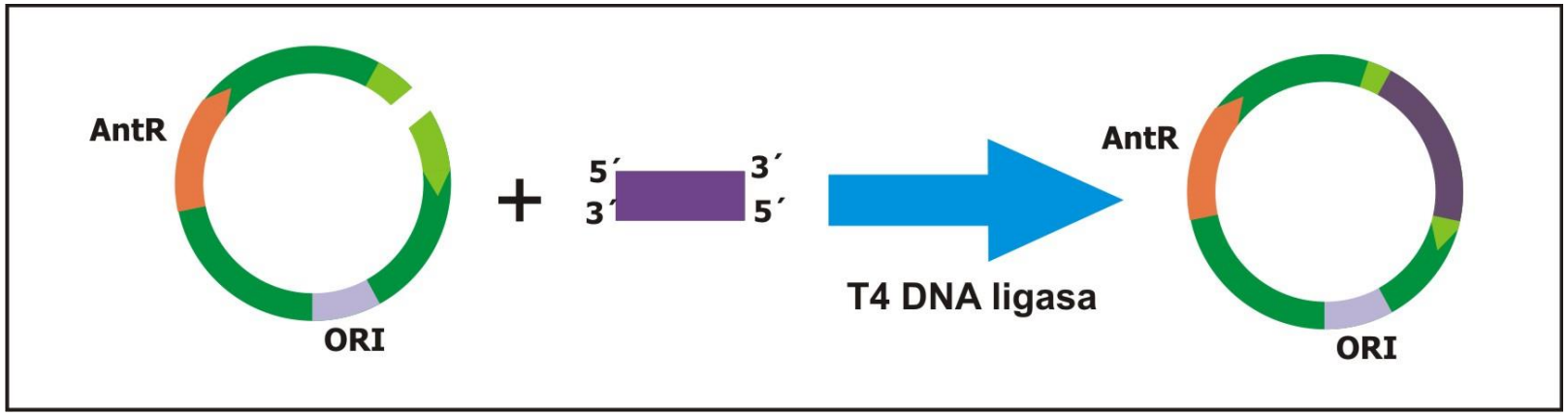
- Transferencia horizontal
- Selección de Bac/vector
- Selección de Bac/construcción Recombinante

In vivo

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.

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

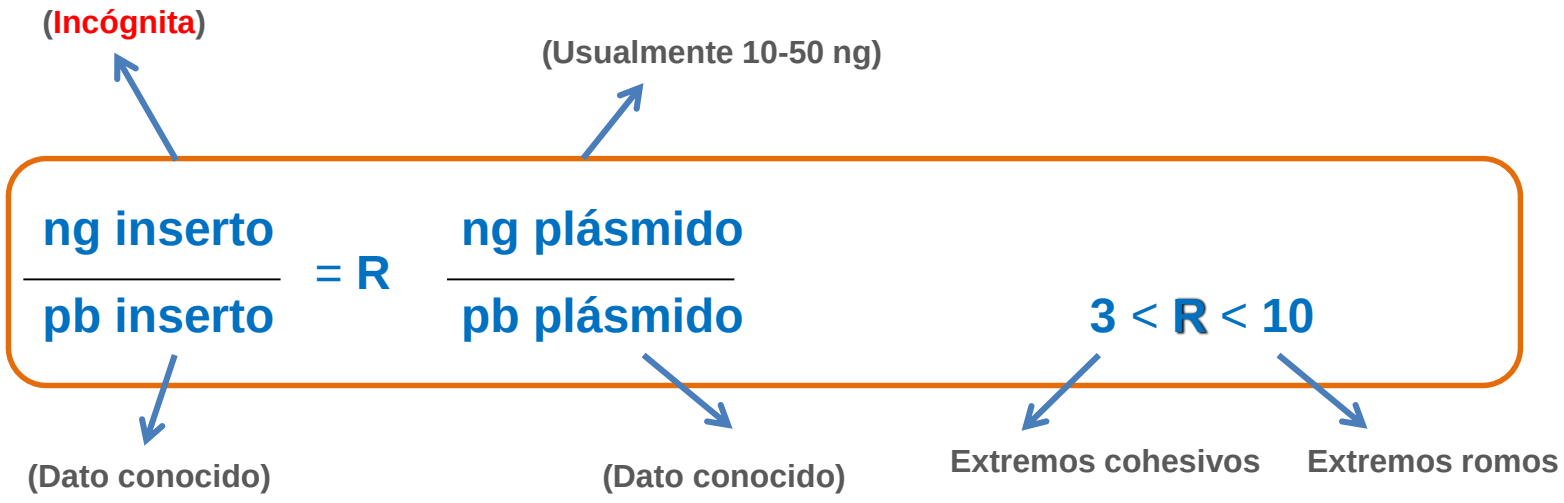
$$3 < R < 10$$

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.



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

Clonado molecular

Ligación entre el vector lineal y el inserto

Reactivo *Ligación*	**Volumen**
Buffer Reacción 10X	1 µl
Plásmido lineal	10 ng (vol. necesario)
Inserto	Ver fórmula anterior
DNA ligasa (1 U/µl)	1 unidad
H_2O	c.s.p.
Vf	**10 µl**

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.

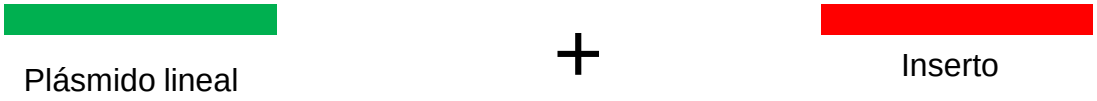
- A su vez, para optimizar aún más la ligación, es posible adicionar PEG_{8000} al 15% para disminuir la movilidad de las moléculas.

- 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*

In silico

- Aislar el vector
- Aislar el inserto
- Apertura del vector
- Compatibilización de extremos
- Ligación

In vitro

- **Transferencia horizontal**
- Selección de Bac/vector
- Selección de Bac/construcción Recombinante

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 aislamiento y multiplicación.

- 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.

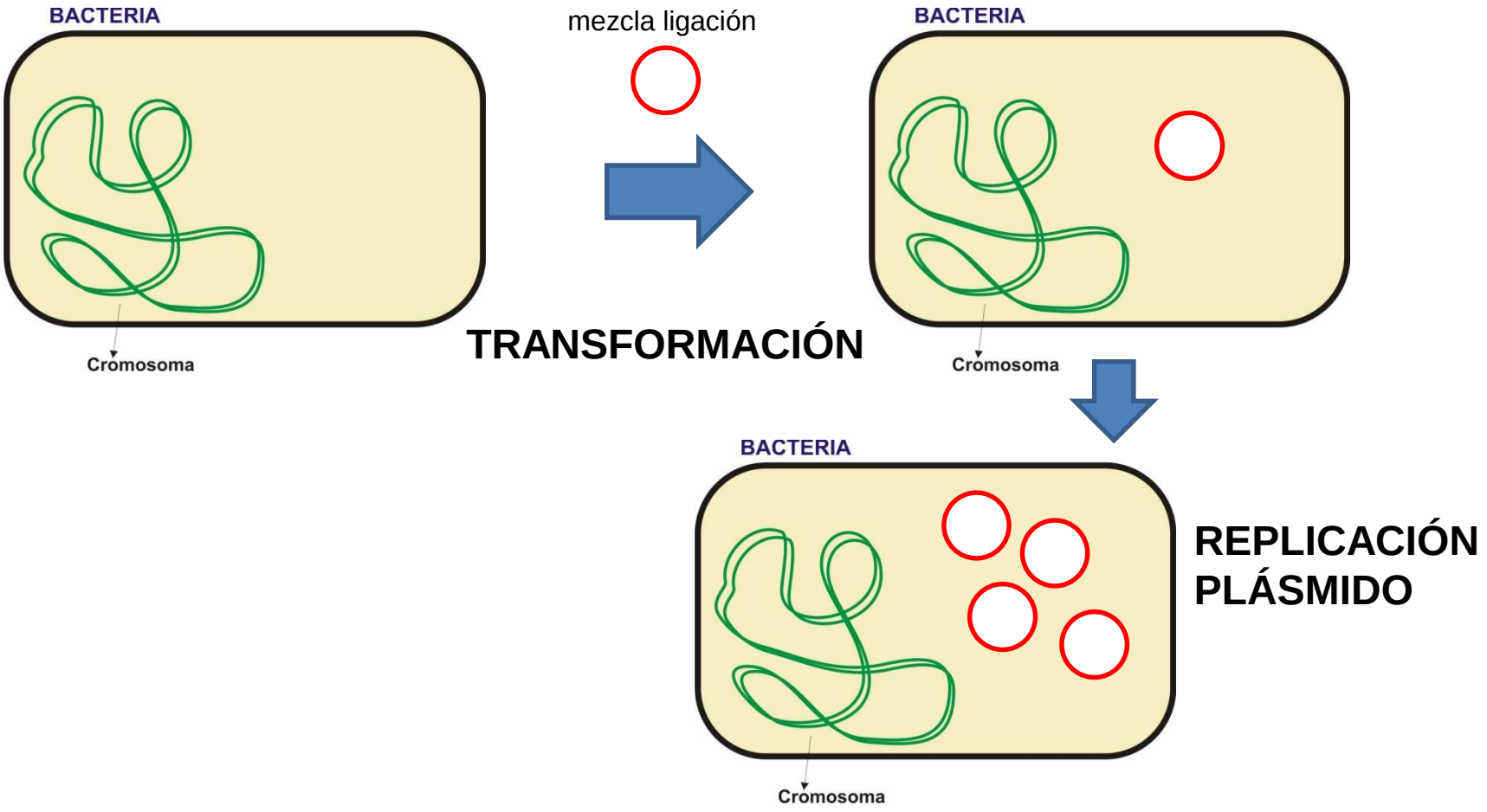
- El mecanismo de ingreso del DNA a la bacteria se denomina **Transformación**, fenómeno natural que es mimetizado en condiciones de laboratorio.

Clonado molecular

Transferencia horizontal a bacterias

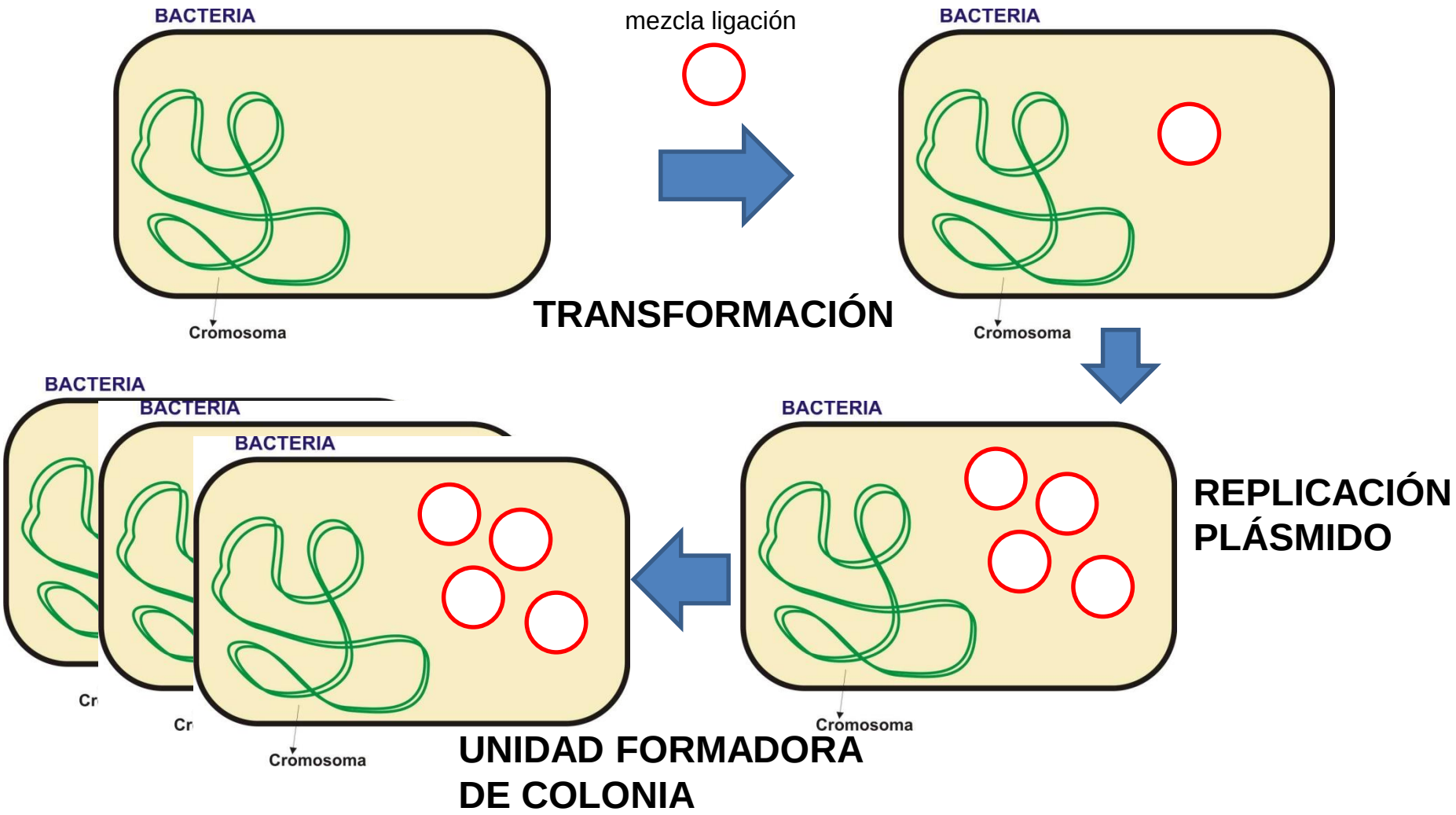
Clonado molecular

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
Top10	-	-	ND
DH5α	-	+	ND
XL1-Blue	-	Lac I^q	ND
BL21	-	+	Muy bajo
LE392	+	+	ND

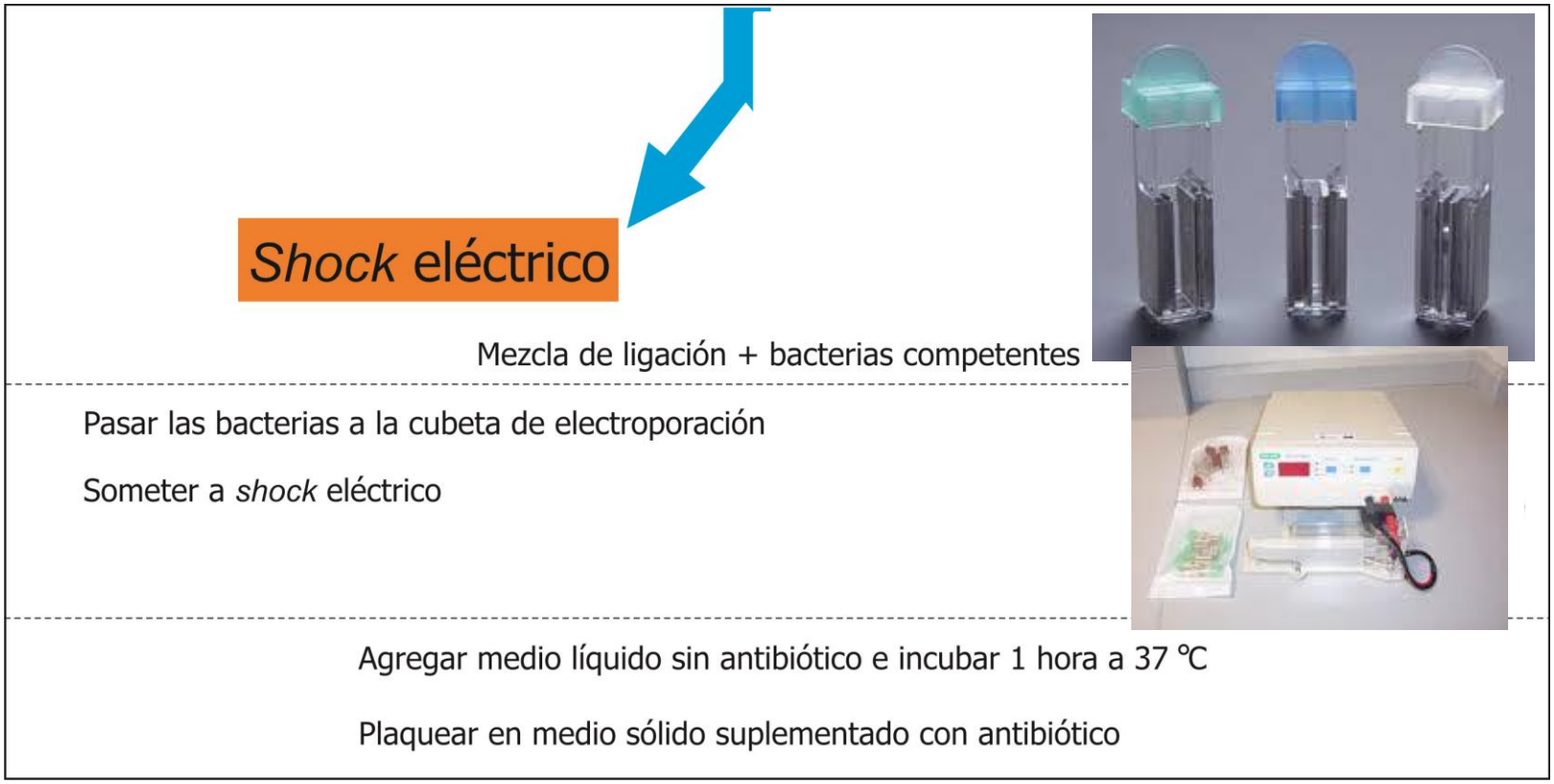
Clonado molecular

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



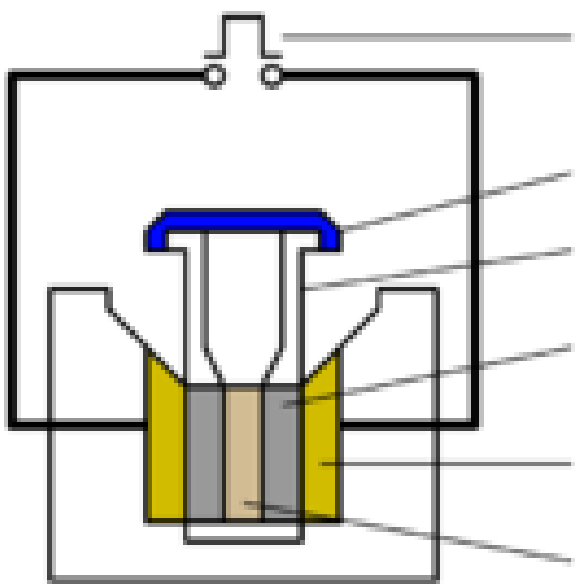
Clonado molecular

Transferencia horizontal a bacterias

Electroporación

Electroporador

Cuvetas



Clonado molecular

Transferencia horizontal a bacterias

Shock térmico

Mezcla de ligación + bacterias competentes

Incubar 30 minutos en hielo

Incubar 1 minuto a 42 °C

Incubar 1 minuto en hielo

Shock térmico

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

Plaquear en medio sólido suplementado con antibiótico

Clonado molecular

- Identificar objetivo
- Diseño *in silico*

In silico

- Aislar el vector
- Aislar el inserto
- Apertura del vector
- Compatibilización de extremos
- Ligación

In vitro

- Transferencia horizontal
- **Selección de Bac/vector**
- **Selección de Bac/construcción Recombinante**

In vivo

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

Diagnóstico genotípico

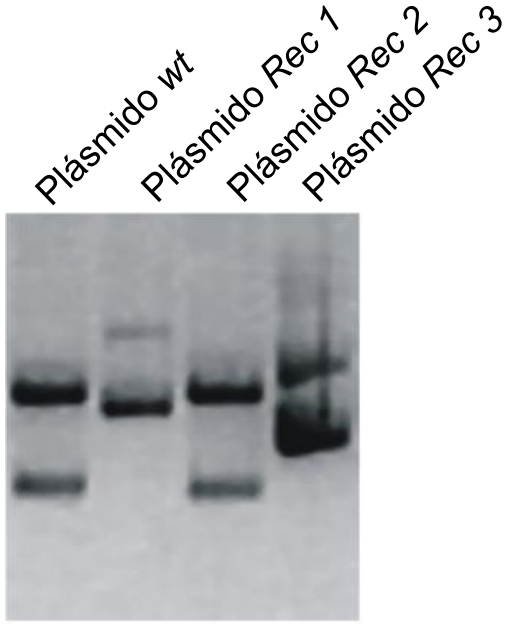
- Aislamiento de plásmidos mediante *miniprep* por lisis alcalina.
- Verificación de tamaños de plásmidos mediante electroforesis.
- Reacciones de PCR con *primers* específicos del inserto.
- Mapas físicos de restricción para corroborar identidad.
- Hibridación con sondas específicas para corroborar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

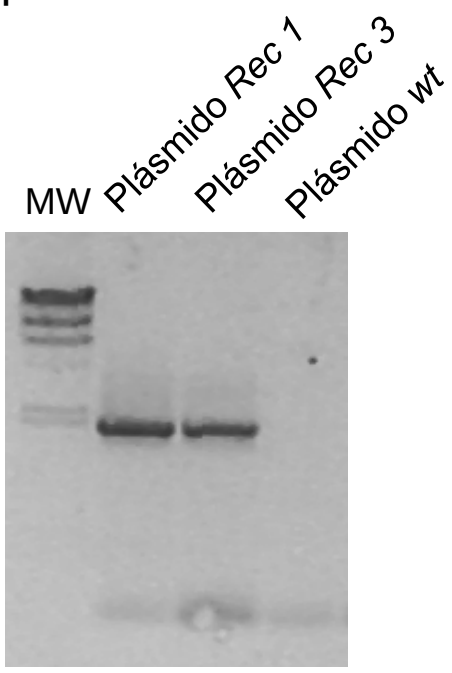


Clonado molecular

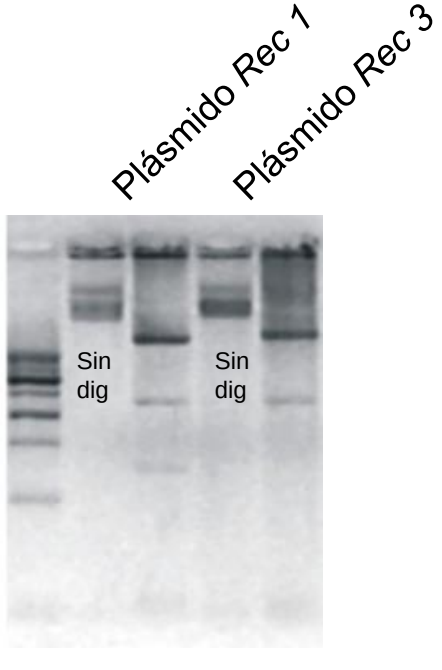
Selección de la construcción recombinante

Diagnóstico genotípico

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



PCR



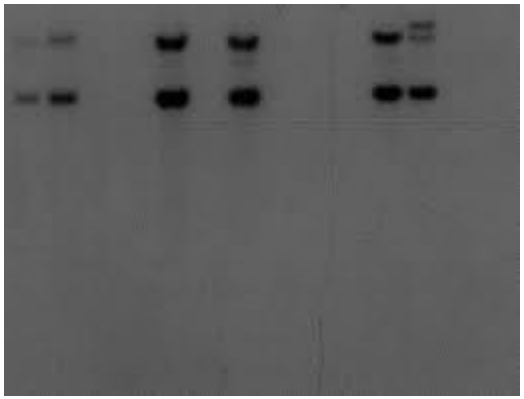
Mapa físico

Clonado molecular

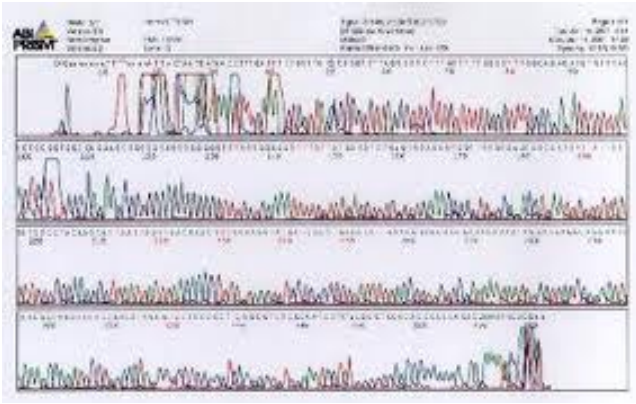
Selección de la construcción recombinante

Diagnóstico genotípico

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

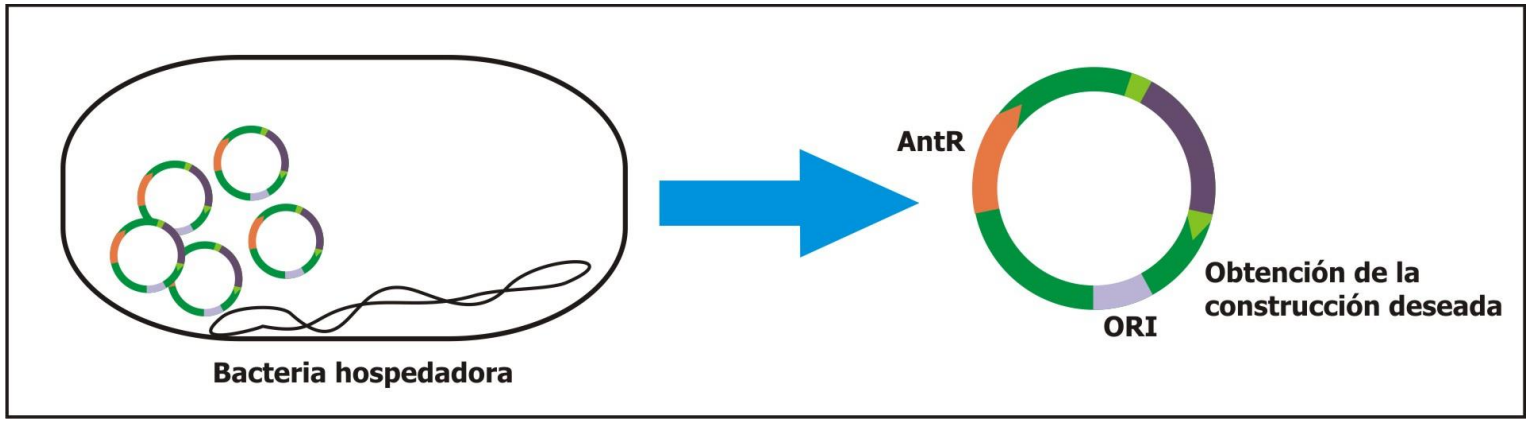


Southern Blot



Reacciones de secuenciación

Clonado molecular



CUMPLIR OBJETIVO