

Ingeniería Genética

Mercedes Goin

Laboratorios Denver Farma S.A.



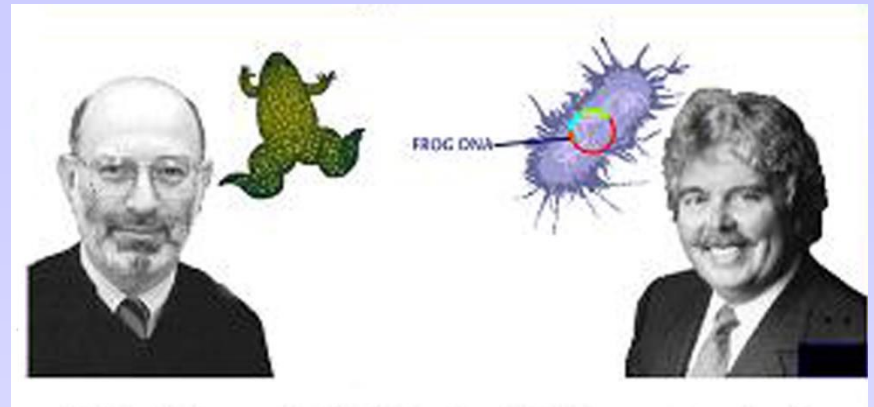
¿Qué es la Ingeniería Genética?

La ingeniería genética es una ciencia que manipula directamente el genoma de un ser vivo, por medio de un conjunto de técnicas que aíslan, multiplican y modifican los genes del individuo con el fin de su estudio y beneficio.

Área de la biológica molecular que trabaja sobre la manipulación de los genes

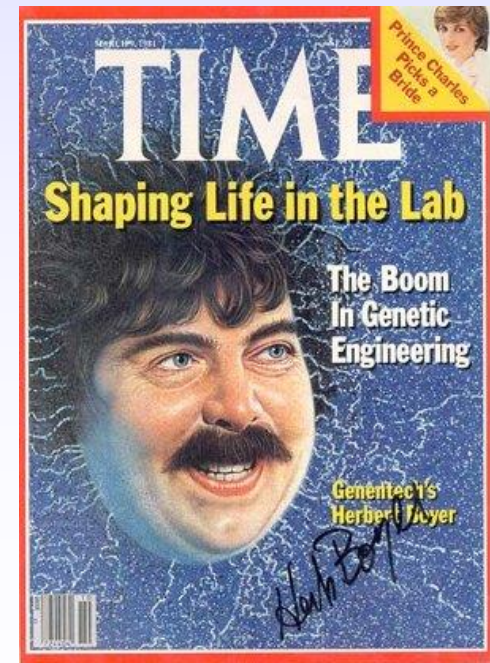
Posibilita transferir genes de un organismo a otro y expresarlos (producir las proteínas para las cuales estos genes codifican) en organismos diferentes al de origen.

1973: Herbert Boyer y Stanley Cohen



1976: H. Boyer y R. Swanson fundan Genentech

1977: Genentech produce **somatostatina humana** en bacterias



Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*

(R factor/restriction enzyme/transformation/endonuclease/antibiotic resistance)

STANLEY N. COHEN*, ANNIE C. Y. CHANG*, HERBERT W. BOYER†, AND ROBERT B. HELLING†

* Department of Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305; and † Department of Microbiology, University of California at San Francisco, San Francisco, Calif. 94122

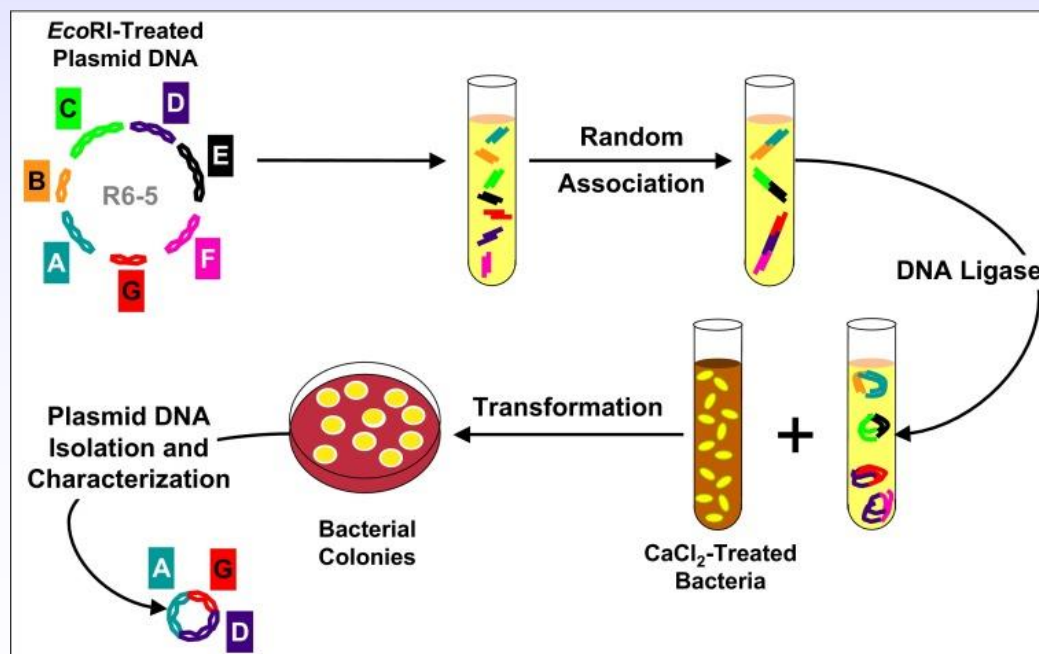
Communicated by Norman Davidson, July 18, 1973

ABSTRACT The construction of new plasmid DNA species by *in vitro* joining of restriction endonuclease-generated fragments of separate plasmids is described. Newly constructed plasmids that are inserted into *Escherichia coli* by transformation are shown to be biologically functional replicons that possess genetic properties and nucleotide base sequences from both of the parent DNA molecules. Functional plasmids can be obtained by reassociation of endonuclease-generated fragments of larger replicons, as well as by joining of plasmid DNA molecules of entirely different origins.

*Eco*RI-generated fragments have been inserted into appropriately-treated *E. coli* by transformation (7) and have been shown to form biologically functional replicons that possess genetic properties and nucleotide base sequences of both parent DNA species.

MATERIALS AND METHODS

E. coli strain W1485 containing the RSF1010 plasmid, which carries resistance to streptomycin and sulfonamide, was obtained from S. Falkow. Other bacterial strains and R



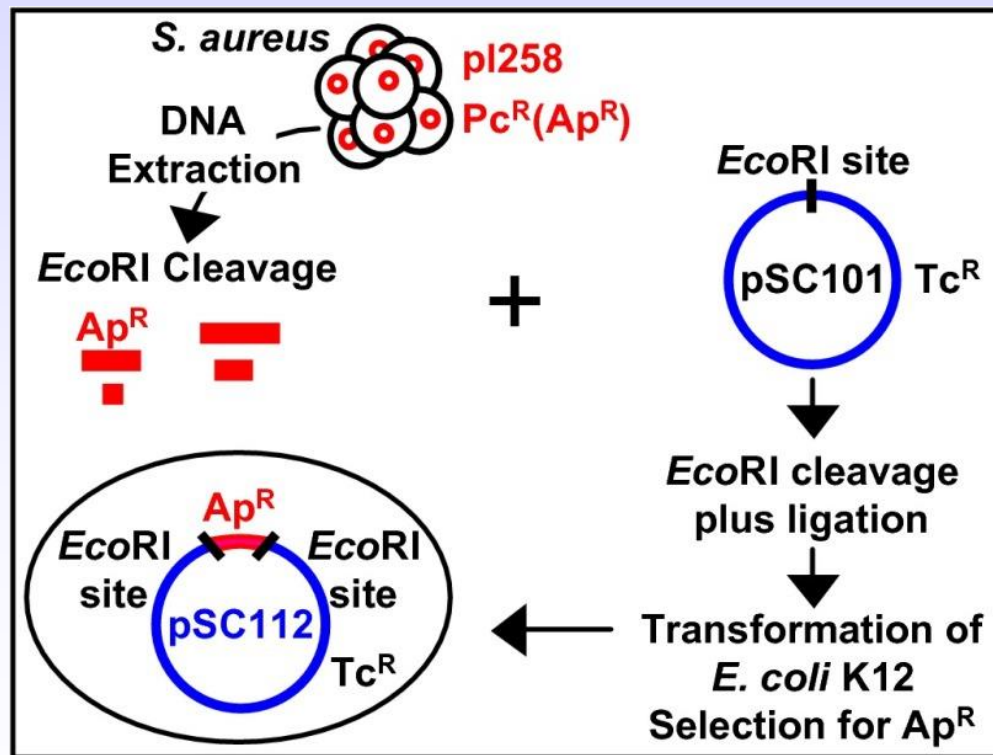
Genome Construction Between Bacterial Species *In Vitro*: Replication and Expression of *Staphylococcus* Plasmid Genes in *Escherichia coli*

(transformation/R plasmid/antibiotic resistance/restriction endonuclease/recombination)

ANNIE C. Y. CHANG AND STANLEY N. COHEN

Department of Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305

Communicated by Joshua Lederberg, November 27, 1973



Replication and Transcription of Eukaryotic DNA in *Escherichia coli*

(restriction/plasmid/transformation/recombination/ribosomal DNA)

JOHN F. MORROW*†‡, STANLEY N. COHEN†, ANNIE C. Y. CHANG†, HERBERT W. BOYER§, HOWARD M. GOODMAN¶, AND ROBERT B. HELLING§||

Departments of *Biochemistry and †Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305; and Departments of §Microbiology and ¶Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, Calif. 94143

Communicated by Joshua Lederberg, January 4, 1974

ABSTRACT Fragments of amplified *Xenopus laevis* DNA, coding for 18S and 28S ribosomal RNA and generated by *EcoRI* restriction endonuclease, have been linked *in vitro* to the bacterial plasmid pSC101; and the recombinant molecular species have been introduced into *E. coli* by transformation. These recombinant plasmids, containing both eukaryotic and prokaryotic DNA, replicate stably in *E. coli*. RNA isolated from *E. coli* minicells harboring the plasmids hybridizes to amplified *X. laevis* rDNA.

by an adaptation of a NaCl-sodium dodecyl sulfate cleared-lysate procedure (12, 13). Transformation of *E. coli* by plasmid DNA (7), isolation of *E. coli* minicells (14), heteroduplex analysis by electron microscopy (15), DNA-RNA hybridization (16, 17), and analysis of fragments generated by *EcoRI* endonuclease by agarose gel electrophoresis (refs. 1, 6, and 18; Helling, Goodman and Boyer, in preparation) have been described elsewhere. Molecular weights of fragments were

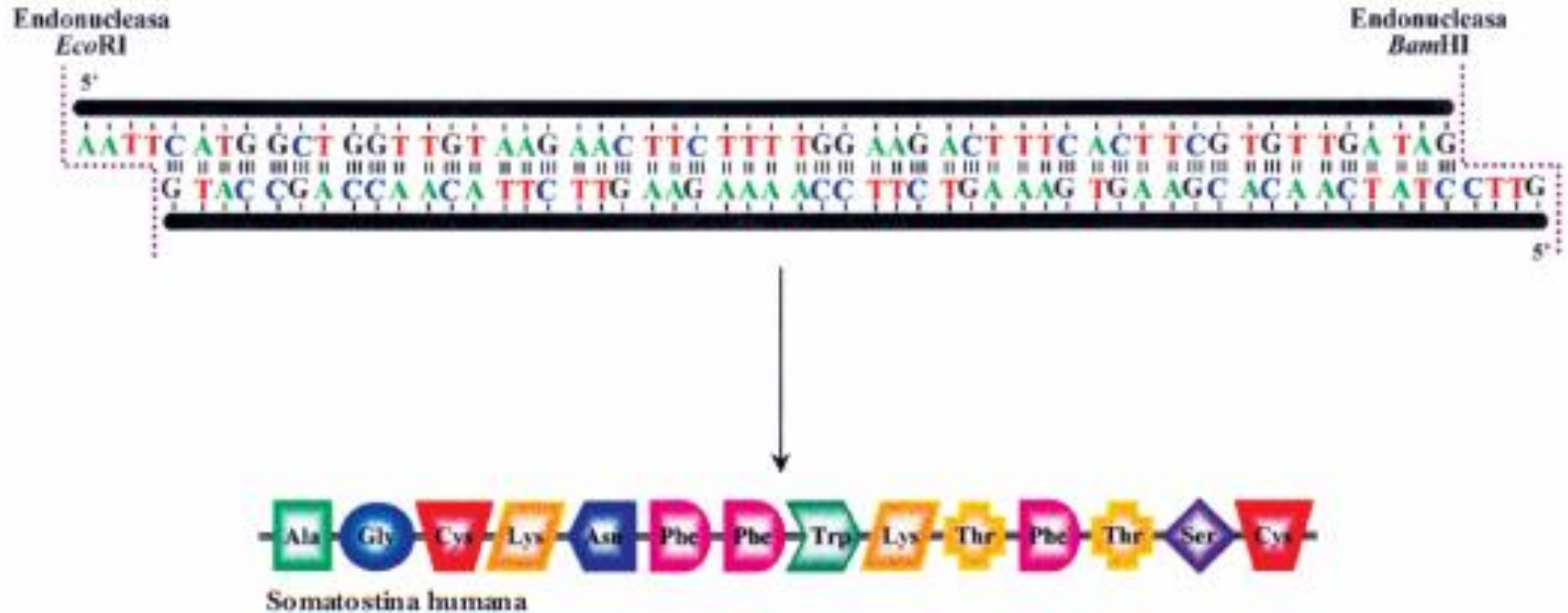
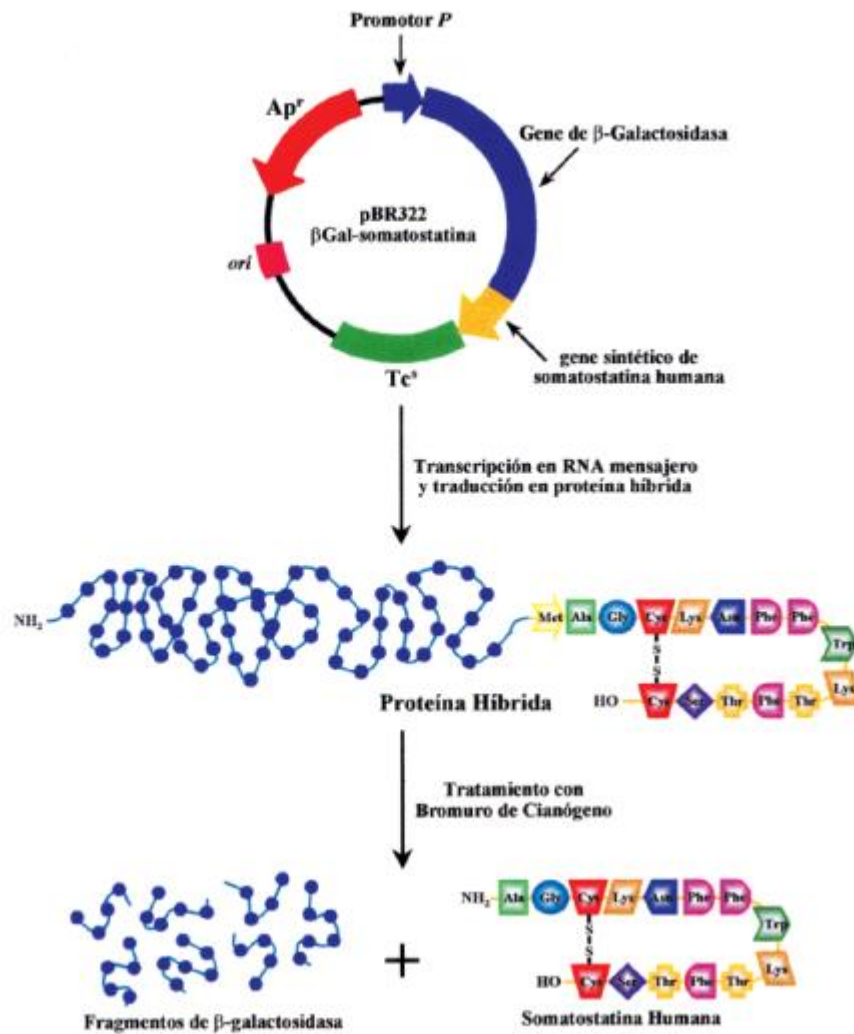


Figura IV.1

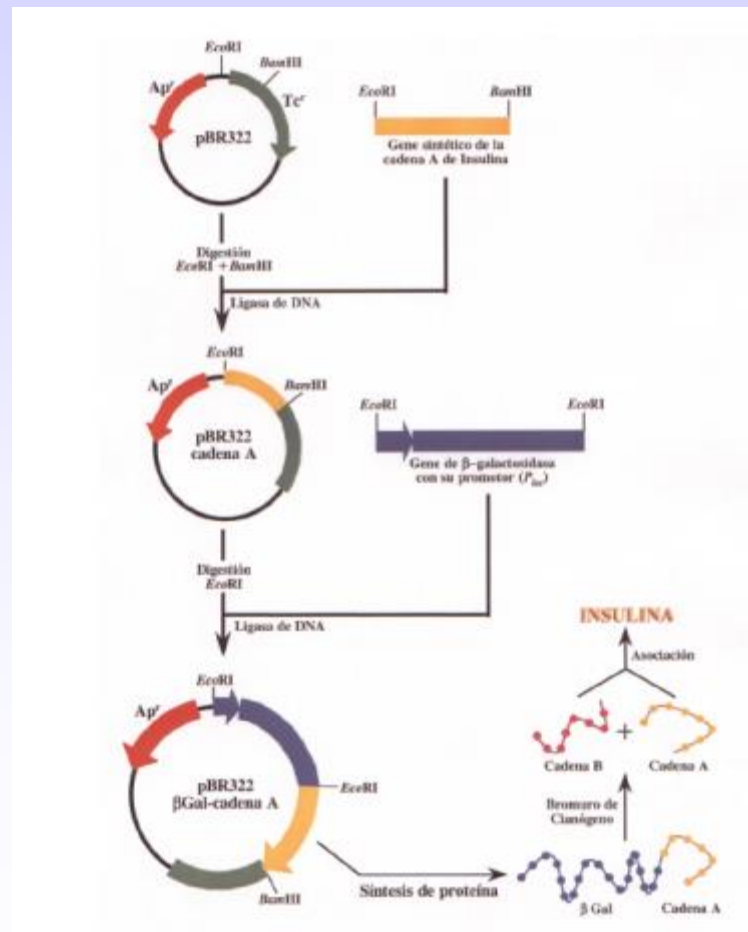
EL GENE SINTÉTICO QUE CODIFICA PARA LA HORMONA SOMATOSTATINA HUMANA

Este gene fue construido uniendo ocho fragmentos de DNA sintéticos. Estos fragmentos fueron clonados posteriormente en un derivado del vehículo pBR322 para su eventual expresión, lo que permitió la producción de esta hormona humana. Éste fue el primer gene sintético construido a partir de fragmentos de DNA que codifica para esta proteína humana que está compuesta por 14 residuos de aminoácidos.



1978: Genentech produce **Insulina humana**. Sale al mercado en 1983 (Eli Lilly)

La insulina humana es el primer producto recombinante producido industrialmente autorizado por la FDA (1982) para uso clínico en seres humanos





Páncreas



Extracción y
purificación

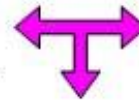


Insulina de cerdo o vaca

Bacterias



Plásmido de expresión en
bacterias



Gen de la
insulina humano

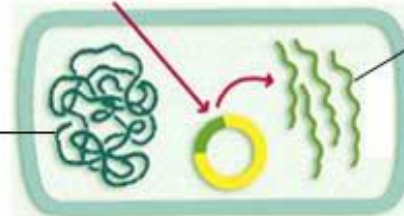


Escherichia coli



Gen de la insulina humano
inserto en el plásmido
bacteriano

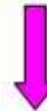
ADN bacteriano



insulina

Bacteria E. coli
recombinante

Multiplicación de
las bacterias



Producción de insulina
en gran cantidad



Extracción y
purificación



Insulina
humana

- 1- Obtención del gen de interés
- 2- Clonación del gen
- 3- Obtención de la cepa productora
- 4- Producción de la proteína de interés (POI)
- 5- Purificación / procesamiento de la POI
- 6- Formulación

Productos farmacéuticos aplicados a la salud humana y que provienen de organismos genéticamente modificados

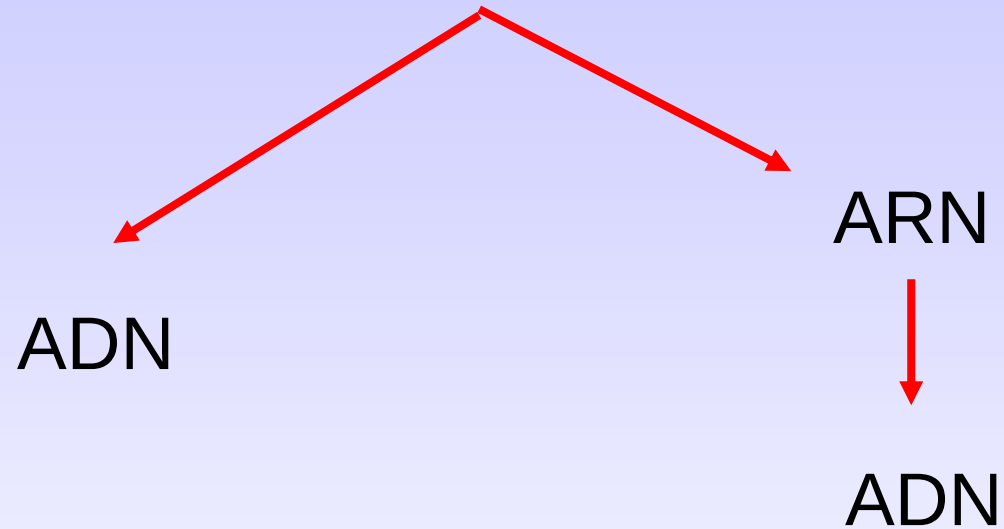
PRODUCTO	SISTEMA DE PRODUCCIÓN	INDICACIÓN TERAPÉUTICA
Factores de coagulación		
Factor VIII	Cultivo de células de mamífero	Hemofilia A
Factor IX	Cultivo de células de mamífero	Hemofilia B
Factor VIIa	Cultivo de células de mamífero	Ciertas formas de hemofilia
Anticoagulantes		
Activador del plasminógeno tisular	Cultivo de células de mamífero	Infarto de miocardio
Activador del plasminógeno tisular	E. coli	Infarto de miocardio
Hirudina	Levaduras	Trombocitopenia y prevención de trombosis

Hormonas		
Insulina	Levaduras	Diabetes mellitus
	E. coli	
Hormona de crecimiento	E. coli	Deficiencia de la hormona en niños, acromegalia, síndrome de Turner
Folículo-estimulante	Cultivo de células de mamífero	Infertilidad, anovulación y superovulación
Paratiróidea	E. coli	Osteoporosis
Gonadotrofina coriónica	Cultivo de células de mamífero	Reproducción asistida
Tirotrofina	Cultivo de células de mamífero	Detección /tratamiento de cáncer de tiroides
Luteinizante	Cultivo de células de mamífero	Ciertas formas de infertilidad
Calcitonina	E. coli	Enfermedad de Paget
Glucagon	Levaduras	Hipoglucemia
Factores hematopoyéticos		
Eritropoyetina (EPO)	Cultivo de células de mamífero	Anemia
Factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF)	E. coli	Netropenia, trasplante autólogo de médula
Interferón e interleuquinas		
Interferón alfa (IFN alfa)	E. coli	Hepatitis B y C, distintos tipos de cáncer
Interferón beta (IFN beta)	Cultivo de células de mamífero	Esclerosis múltiple
Interferón gamma (IFN gamma 1b)	E. coli	Enfermedad granulomatosa crónica
Interleuquina 2 (IL-2)	E. coli	Cáncer de riñón

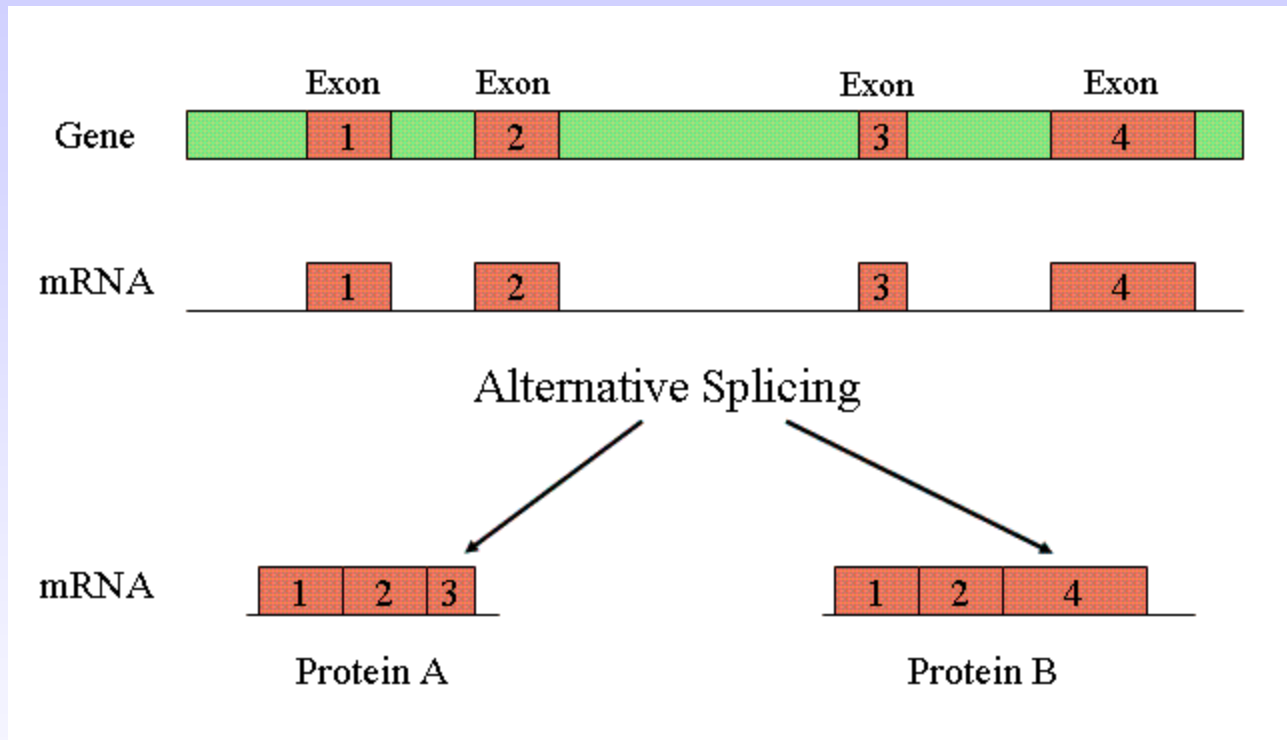
Vacunas		
Anti-hepatitis B	Levaduras	Inmunización contra la hepatitis B
Anti-hepatitis A	Levaduras	Inmunización contra la hepatitis A
Anti-enfermedad de Lyme	E. coli	Inmunización contra la enfermedad de Lyme
Anticuerpos monoclonales recombinantes		
Anti-IgE (recombinante)	Cultivo de células de mamífero	Asma
Anti-TNF (recombinante)	Cultivo de células de mamífero	Arthritis reumatoidea
Anti-IL2	Cultivo de células de mamífero	Prevención del rechazo agudo de transplante de riñón
Otros productos recombinantes		
Proteína morfogénica del hueso-2	Cultivo de células de mamífero	Fractura de tibia
Galactosidasa	Cultivo de células de mamífero	Enfermedad de Fabry (deficiencia en alfa-galactosidasa)
Iaronidasa	Cultivo de células de mamífero	Mucopolisacaridosis
Proteína C	Cultivo de células de mamífero	Sepsis severa
Beta-glucocerebrosidasa	E. coli	Enfermedad de Gaucher
DNAsa	Cultivo de células de mamífero	Fibrosis quística

Fuente: Nature Biotechnology, 2003, vol. 21 N°8- Cuadernillo 49
de PorqueBiotecnología

Obtención del material genético



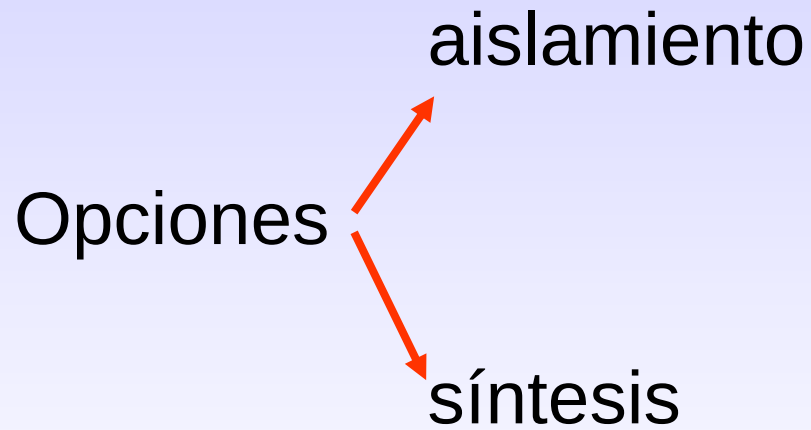
¿Por qué ARN y no ADN?



¿Cuál es la fuente del ARN?

¿Cuándo ADN?

¿Fuente?



- Ruptura celular: ruptura mecánica o enzimática
- Remoción de lípidos: detergente
- Remoción de proteínas: proteasas, fenol cloroformo
- Precipitación del ADN: sal + etanol
- Agentes quelantes (EDTA): remoción de Ca^{2+} , Mg^{2+} , para inhibir DNasas

Elección de la sal

Acetato de Na^+ (0,3 M)

NaCl (0.2 M): muestras con SDS

LiCl (0,8 M): para ARN (inhibe síntesis proteica y ADN polimerasa)

Acetato de NH_4^+ : para remoción de dNTPs (inhibe T4 PNK)

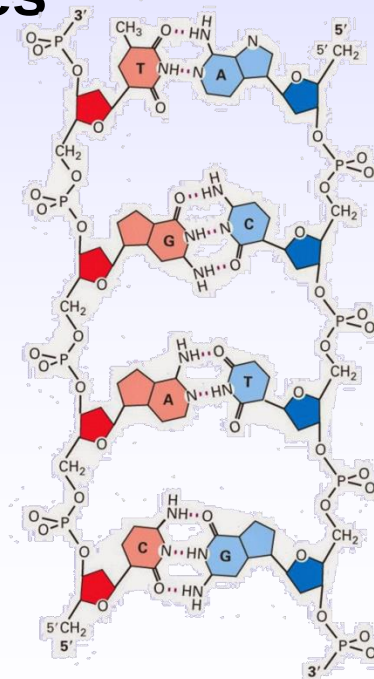


Separación de fragmentos de ácidos nucleicos: Electroforesis de ADN y ARN

La carga neta de los ácidos nucleicos es
negativa

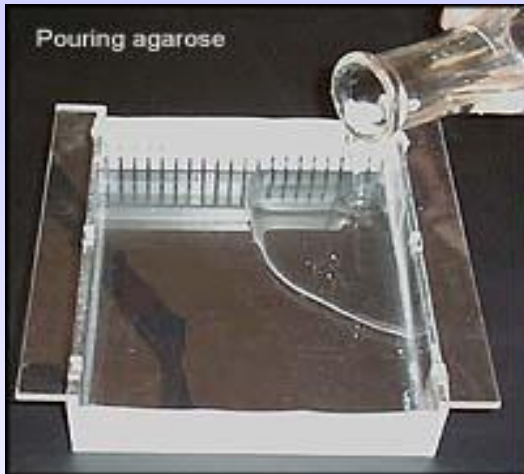


Migración : de cátodo a ánodo

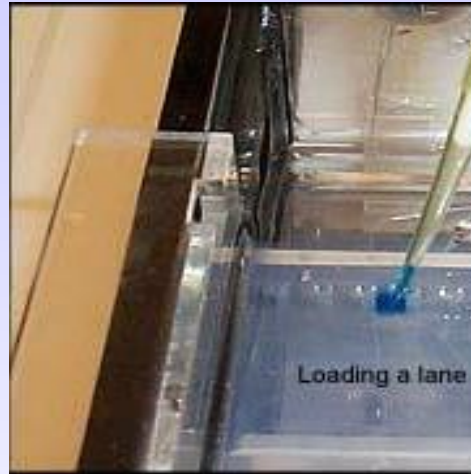


Separación de fragmentos de ácidos nucleicos: Electroforesis de ADN y ARN

Electroforesis en gel de agarosa



Fabricación del gel



Siembra de las muestras

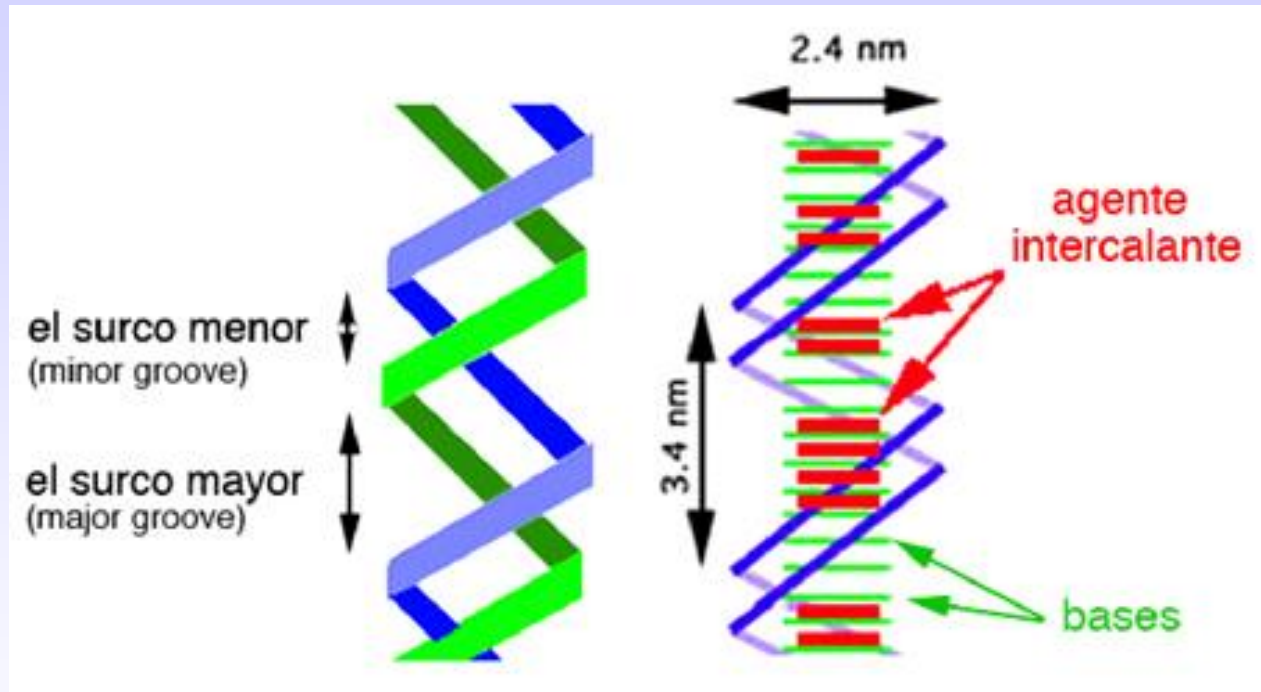


Transcurso de la electroforesis
(30-60 min)

Electroforesis en gel de poliacrilamida

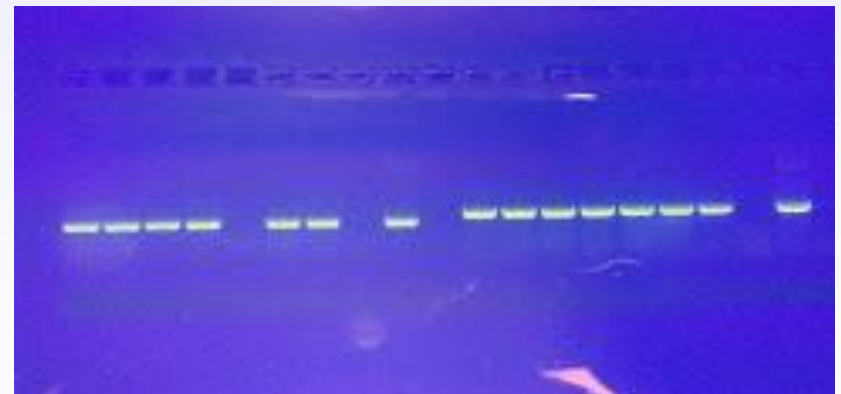
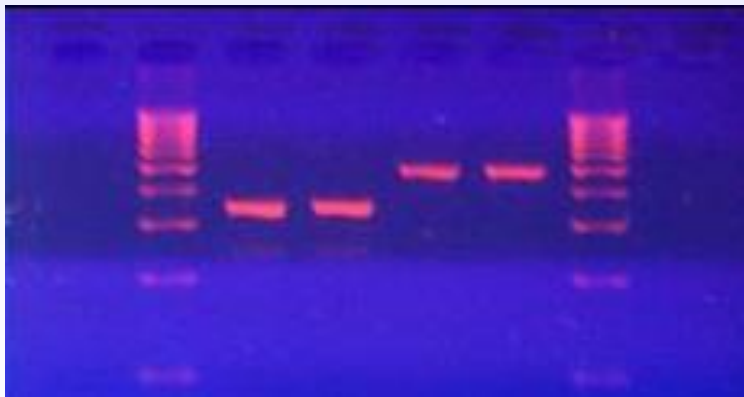
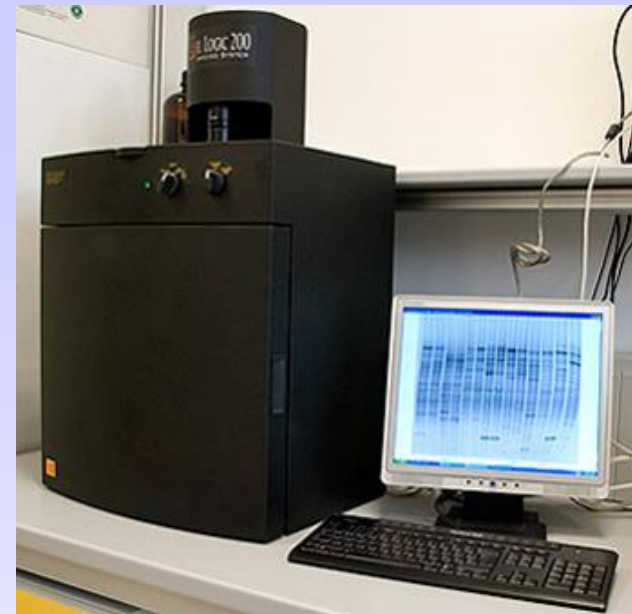
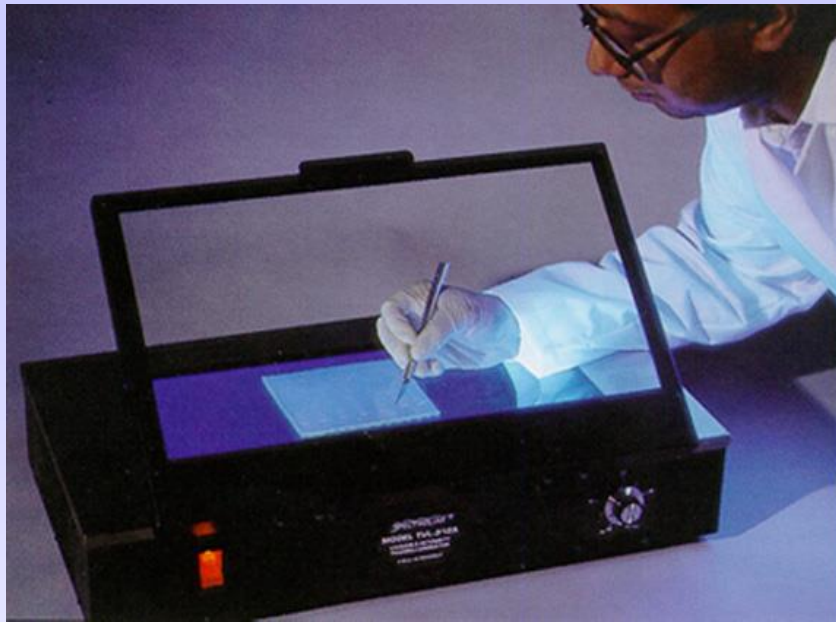
* **Menor rango** de separación pero **mayor resolución** que los geles de agarosa.

¿Cómo vemos lo que hay en el gel?



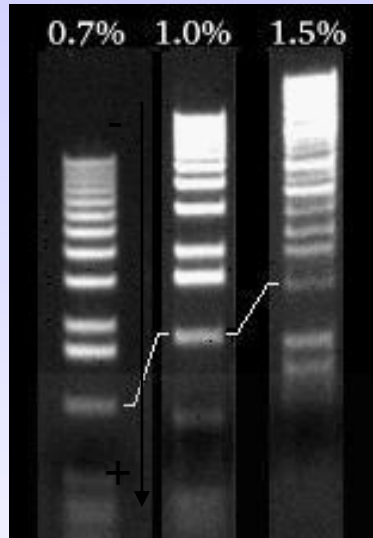
Bromuro de etidio: agente intercalante

SYBR Gold, SYBR Green, SYBR safe



Electroforesis de ADN

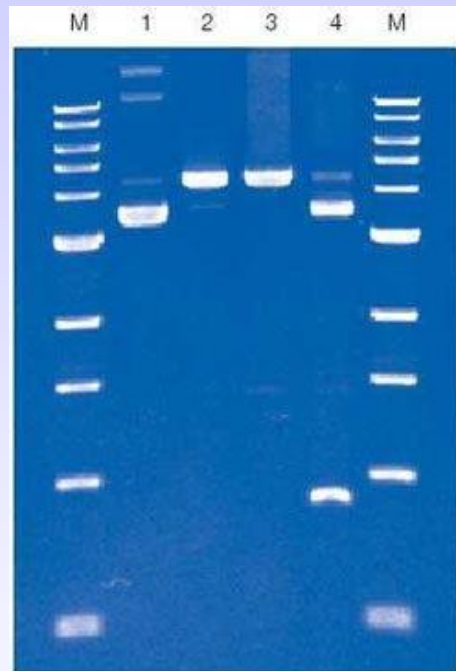
Electroforesis en gel de agarosa



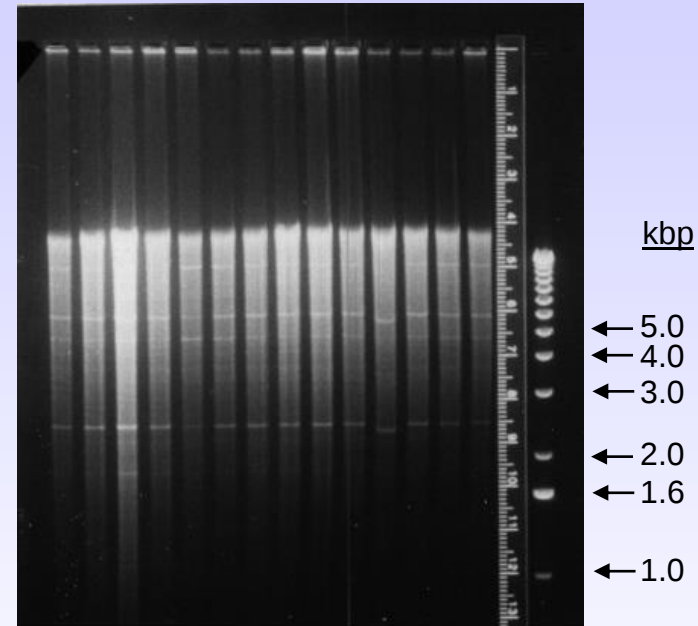
Efecto de la concentración de agarosa en la migración



< % de garosa >PM

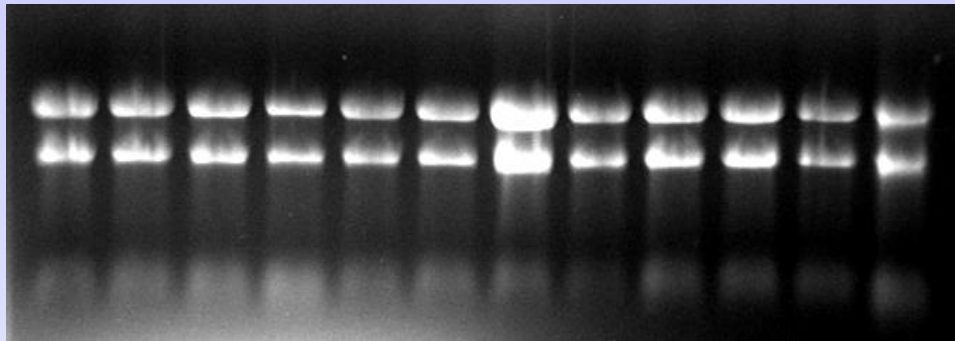


DNA plasmídico digerido con diferentes enzimas de restricción



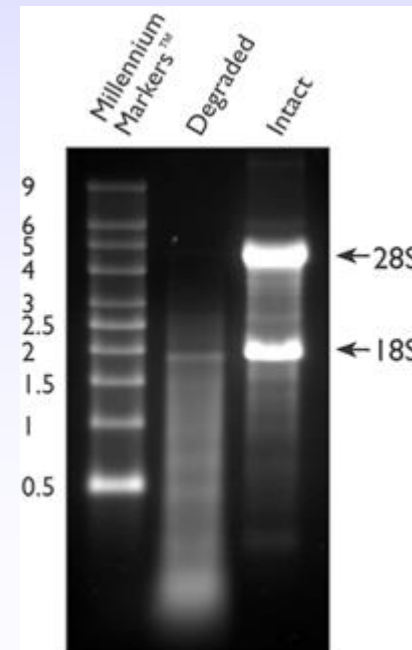
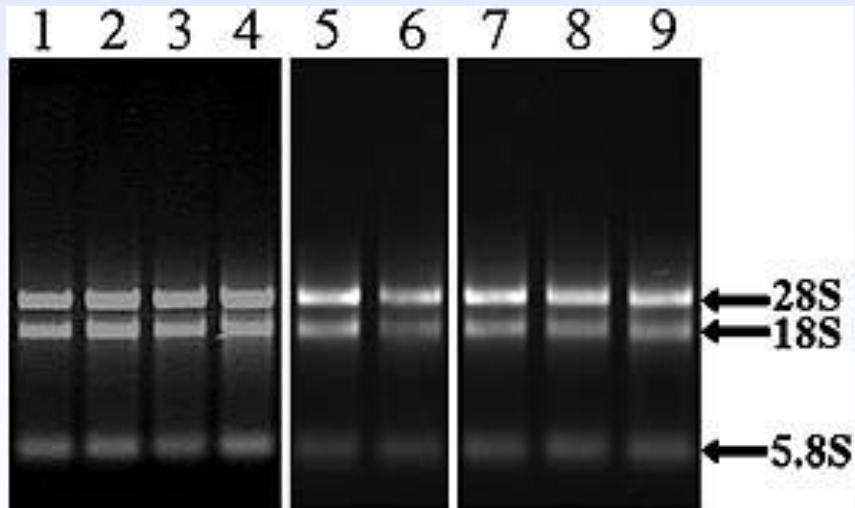
DNA cromosómico digerido con EcoRI

Electroforesis de ARN

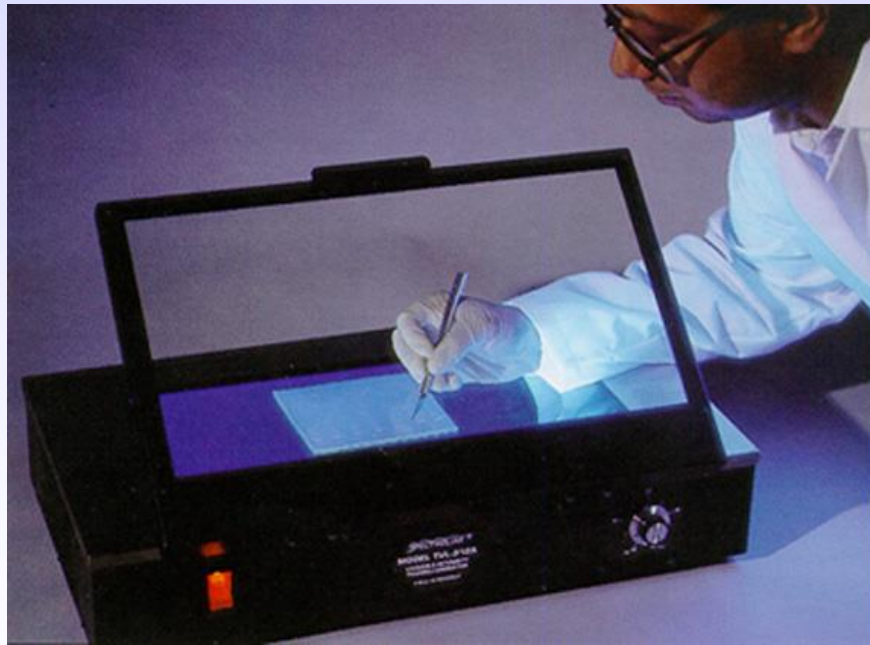


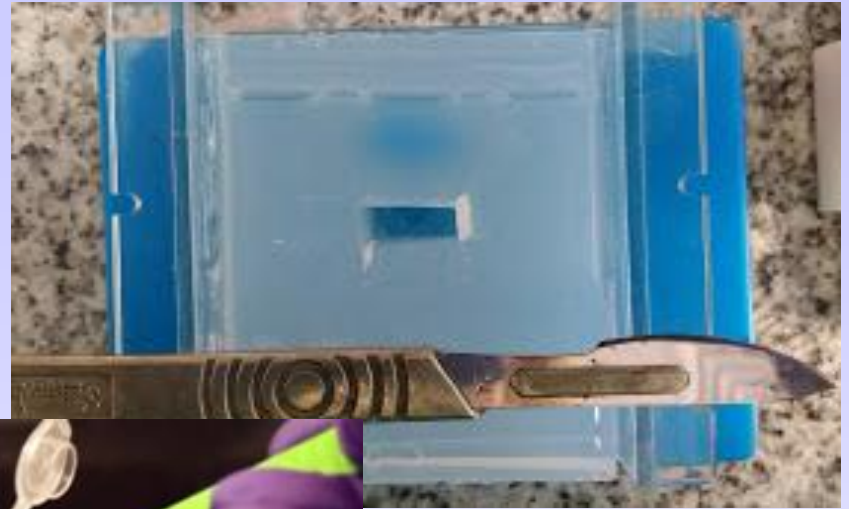
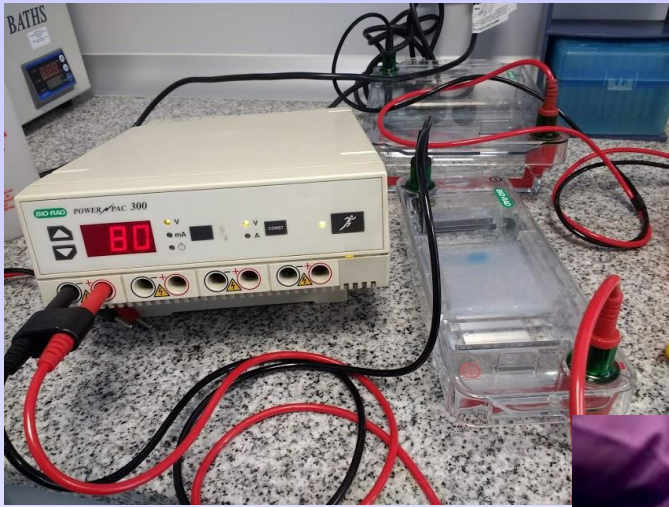
← 28S
← 18S

Resolución de muestras de
ARN total en un gel
de agarosa al 0,8%.



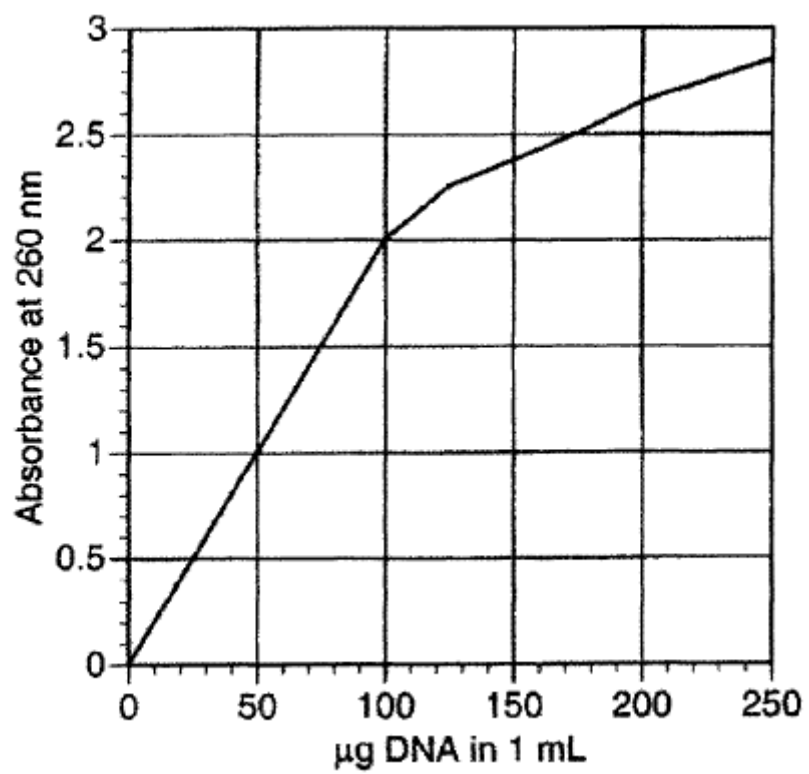
A partir del gel podemos aislar el
fragmento de interés

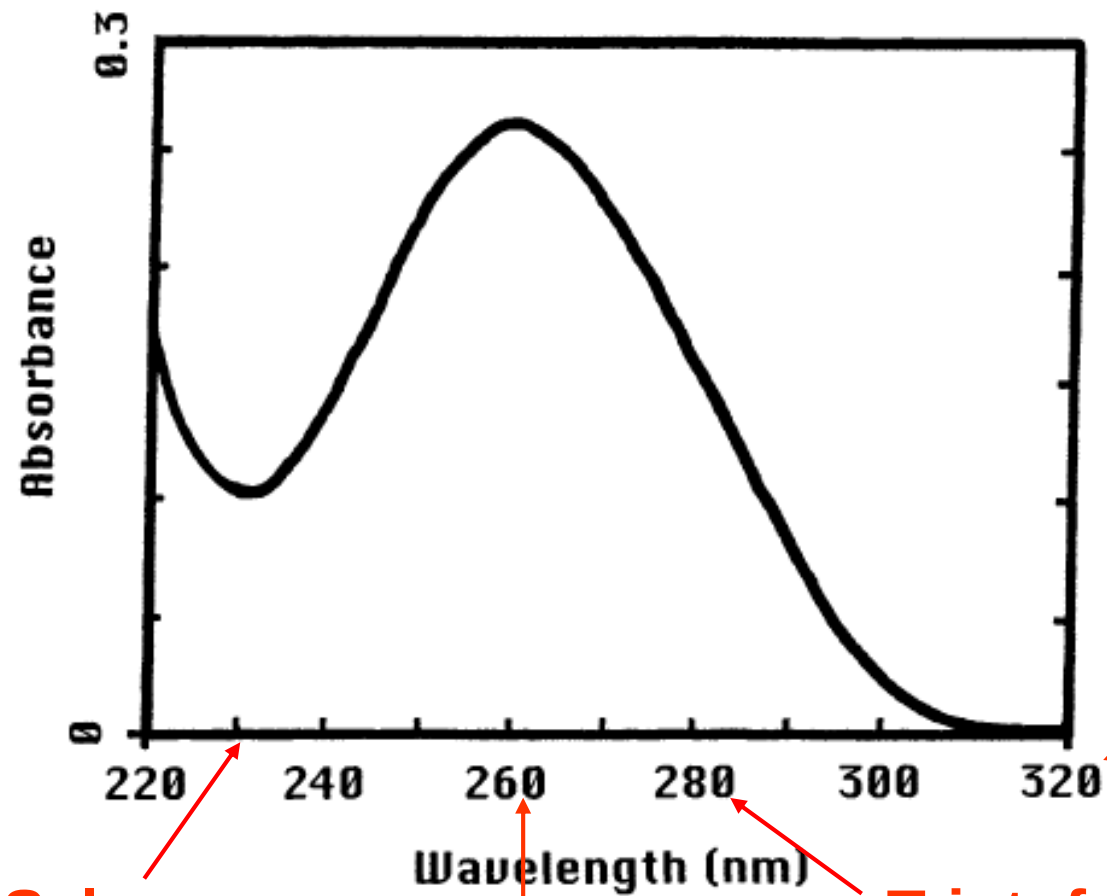




CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

ESPECTROFOTOMETRÍA UV: λ 260 nm





Sales

Max. Abs ADN

Triptofano

Insolubles

$$A_{260}/A_{280} = 1,8$$

$A_{260}/A_{280} > 1,8 \dots \text{ARN?}$ ($A_{260}/A_{280} = 2$ - ARN puro)

$A_{260}/A_{280} < 1,8 \dots \text{Fenol? Proteínas?}$

ESPECTROSCOPIA UV: λ 260 nm

ADNdc: $A_{260} = 1 \rightarrow 50 \mu\text{g/ml}$



Una solución de ADN tiene una $A_{260} = 0,40$

¿Cuál es la concentración de ADN en $\mu\text{g/ml}$?

$$\frac{50 \mu\text{g/ml}}{1 \text{ OD}} = \frac{X \mu\text{g/ml}}{0.4 \text{ OD}} \quad \longrightarrow \quad X = 20 \mu\text{g/ml}$$

Coeficiente de extinción de ADNdc: E o ϵ

= constante de absorción = coeficiente de absorción

Abs. 260 nm de una sc. 1 mg/ml de ADNdc = 20 = E

(pH neutro, G+C 50%, paso de luz 1 cm)

Ley de Beer: $A_{260} = E_{260} \cdot l \cdot c$.

$l = 1 \text{ cm}$  $A_{260} = E_{260} \cdot c$

$C = A_{260} / E_{260}$

E: Medida de cantidad de luz absorbida por unidad de concentración



Una solución de ADN tiene una $A_{260}=1$

¿Cual es la concentración de ADN en $\mu\text{g/ml}$?

$$C = \frac{A_{260}}{E_{260}} \quad C = \frac{1}{20} = 0.05 \text{ mg/ml} = 50 \mu\text{g/ml}$$

Coeficiente de extinción, E_{260} , para una solución de ADNdc 1 mM

$$A_{260} \text{ nm de una sc. 1 mM de ADNdc} = 6,7 = E_{260}$$



Una solución de ADN tiene una $A_{260}=0.212$.

¿Cuál es la concentración expresada en milimolar?

$$\frac{1 \text{ mM}}{6,7 \text{ OD}} = \frac{x \text{ mM}}{0.212 \text{ OD}} \quad x = 0.03 \text{ mM}$$

ESPECTROSCOPIA UV: λ 260 nm

ADN simple cadena

ADNsc: Abs. 1 = 33 $\mu\text{g/ml}$

E_{260} ADNsc 1 mM = 8,5



Cuantificación de oligonucleótidos

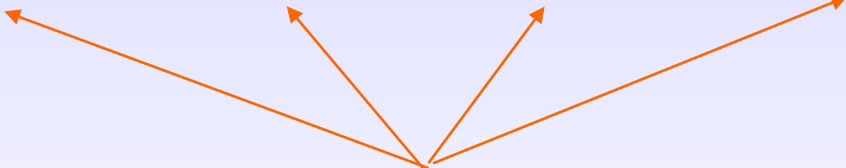
Unidades de densidad óptica (OD u)

1 ODu = cantidad de oligonucleótido disuelto en 1 ml con $A_{260} = 1$ en cuveta de 1 cm de paso de luz

$$\text{OD u} = A_{260} \times \text{vol. Oligonucleótido} \times \text{factor de dilución}$$

$$\text{Abs}_{260}=1 = 1 \text{ OD u} = 33 \mu\text{g/ml ADN sc}$$

Concentración de oligonucleótido expresada en pmol/μl

$$C = \frac{A_{260} \times 100}{(1,54 \times nA) + (0,75 \times nC) + (1,17 \times nG) + (0,92 \times nT)} \times \text{factor de dilución}$$


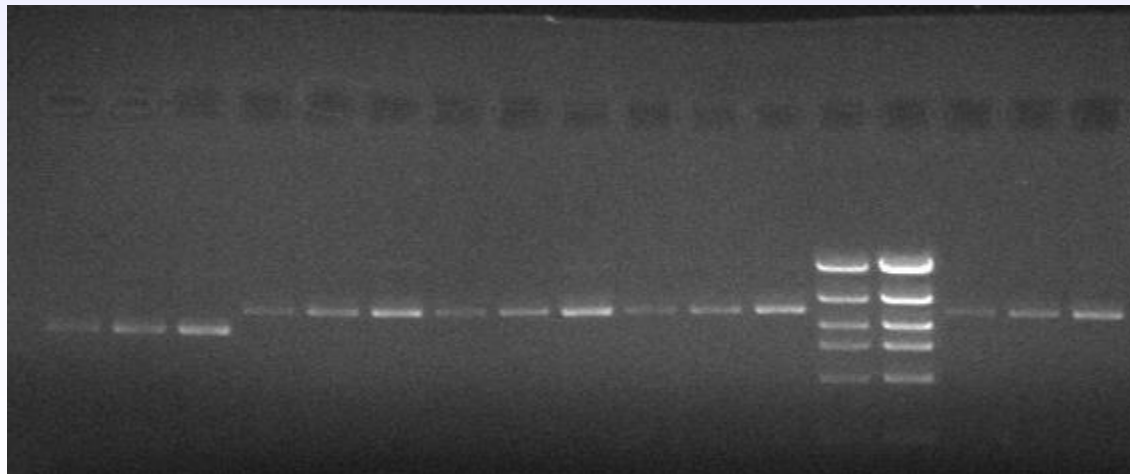
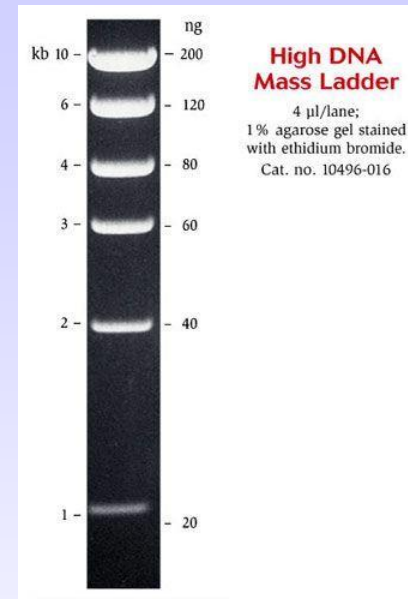
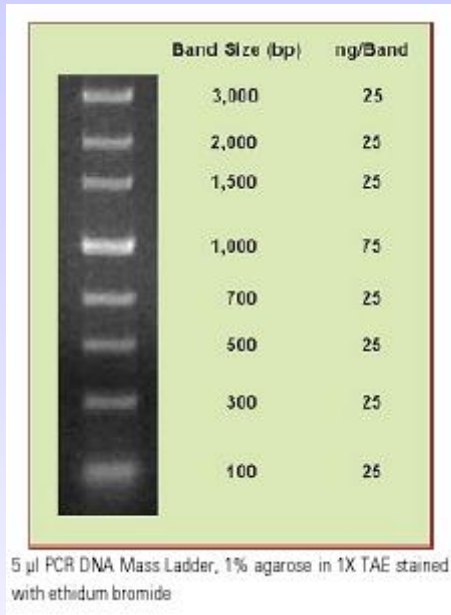
Coeficiente de extinción de cada base

Una solución 1M de dATP tiene $A_{260} = 15400 \rightarrow E_{260} 15400 \text{ L/mol} = 0,00154 \text{ μl/pmol}$

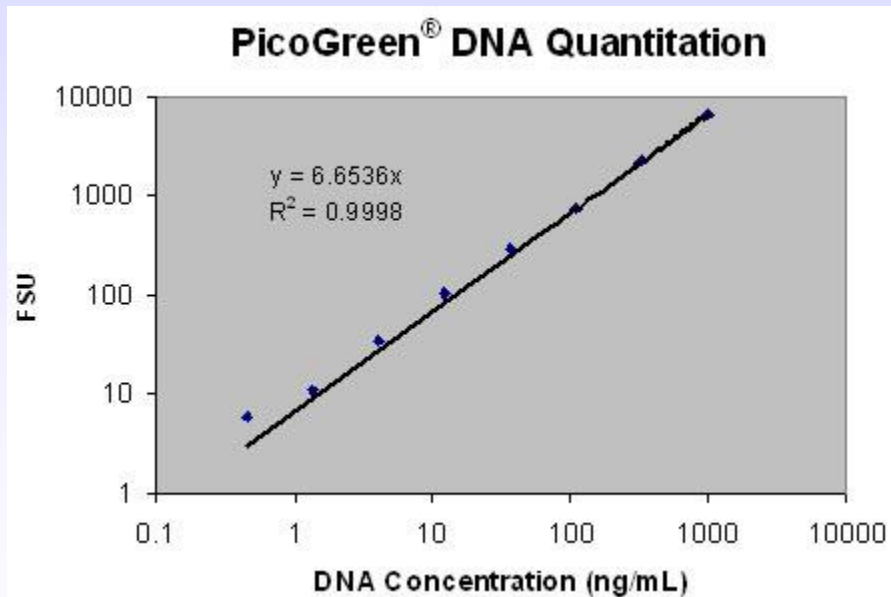
Medida de la concentración de ARN

$$A_{260} = 1 \Rightarrow 40 \mu\text{g/ml ARN}$$

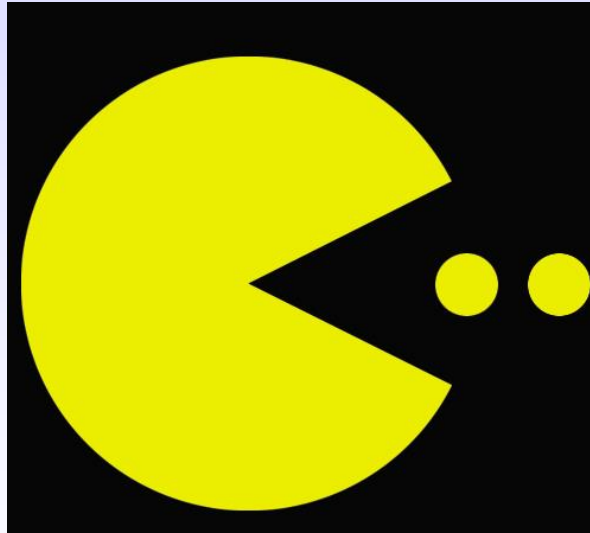
Estimación de la concentración de ADN en geles teñidos con bromuro de etidio



Cuantificación de ADN por fluorometría



ENZIMAS DE RESTRICCIÓN



Endonucleasas de restricción.

- * Enzimas producidas de manera natural por microorganismos cuya función es la de degradar el ADN exógeno.
- * Se unen específicamente a secuencias concretas de ADN de **doble cadena** y la rompen (endonucleasas).

Tipo I: poseen actividad metilasa y de restricción. ATP-dependientes. Rompen el ADN lejos del sitio que reconocen (>1Kbp) de manera aleatoria → carecen de interés práctico.

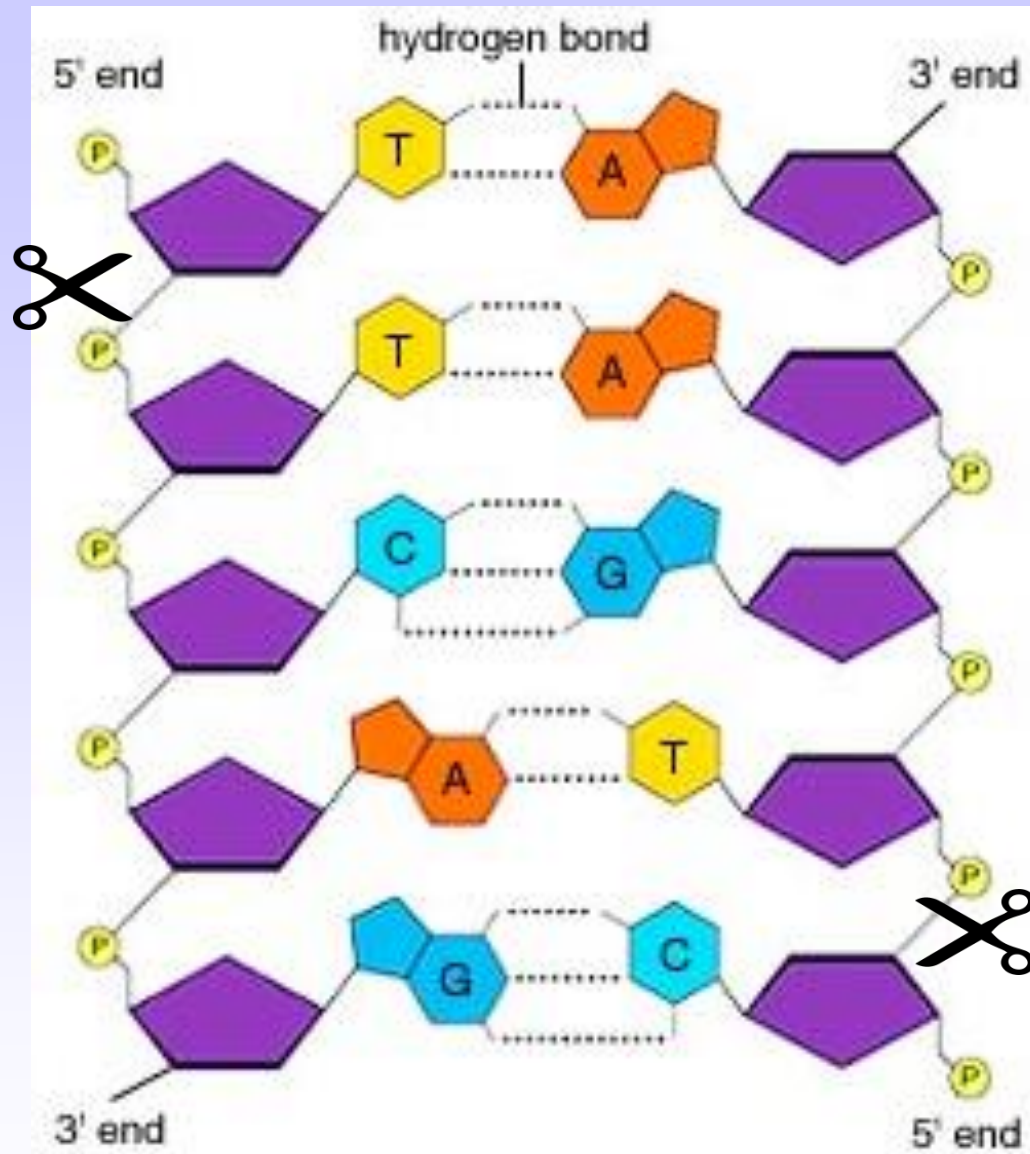
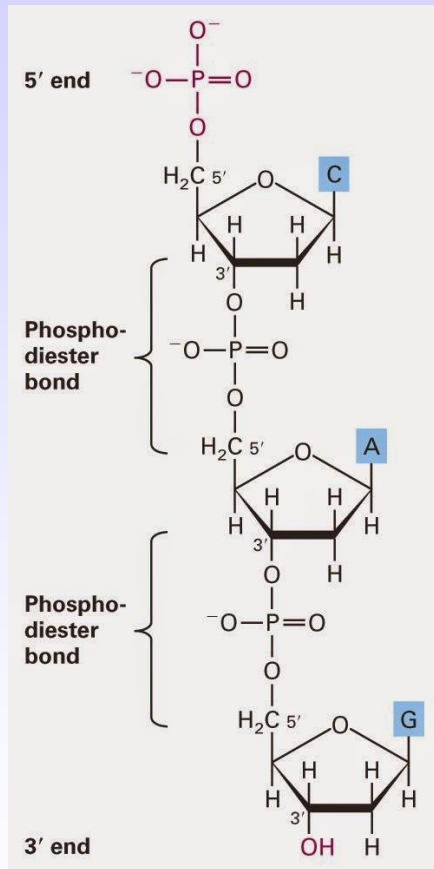
Tipo III: poseen actividad de restricción y modificación. Cortan fuera de la Secuencia que reconocen. Requieren dos secuencias de reconocimiento en orientación opuesta en la misma cadena de DNA. Son ATP-dependientes.

Tipo II: sólo actividad de restricción. No ATP-dependientes. Reconocen secuencias específicas de ADN (de 4 a 8 bp, muchas de ellas palindrómicas). Punto de rotura **característico** para cada una y próximo a la secuencia reconocida → fragmentos **discretos**. Hay cientos comercialmente disponibles.

Palindromo:

Palabra o frase que se lee igual de izquierda a derecha que de derecha a izquierda , ej. RADAR, ANILINA, DÁBALE ARROZ A LA ZORRA EL ABAD

TTAGCACGTGCTAA
AATCGTGACGATT



Corte del enlace fosfodiéster

Toman el nombre de las bacterias que las producen. Ej.

EcoRI

E: género *Escherichia*

co: especie *coli*

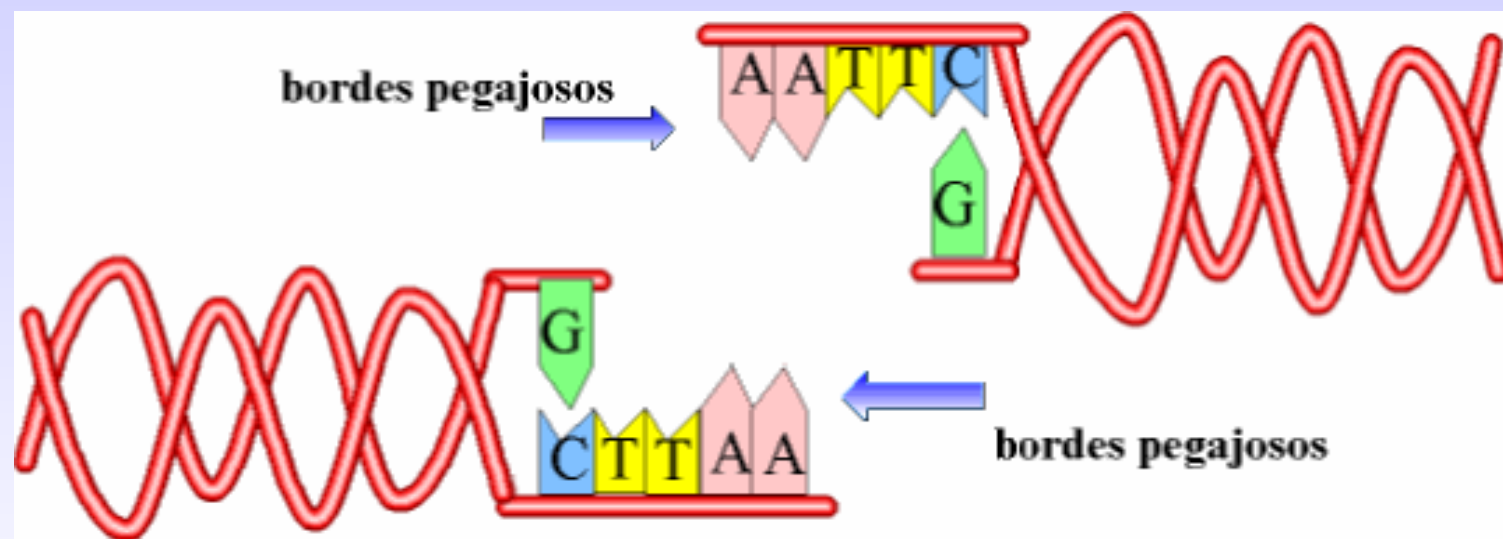
R: cepa RV 13

I: primera endonucleasa aislada de esta cepa



ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Enzima	Fuente	Secuencia de reconocimiento	Corte
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	5'GAATTC 3'CTTAAG	5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5'
Pvu II	<i>Proteus vulgaris</i>	5'CAGCTG 3'GTCGAC	5'---CAG CTG---3' 3'---GTC GAC---5'
KpnI	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5'GGTACC 3'CCATGG	5'---GGTAC C---3' 3'---C CATGG---5'



extremos pegajosos o cohesivos (sticky ends)

saliente 5'
(sitio de restricción de Eco RI)



Eco RI hidroliza los enlaces
fosfodiéster del ADN entre G y A (▼)



saliente 3'
sitio de restricción de Pst I



Pst I hidroliza los enlaces
fosfodiéster del ADN entre G y A (▼)



cortes con extremos romos

sitio de restricción de Pvu II

5'-CAG|CTG-3'
3'-GTC|GAC-5'

eje de simetría

5' ——— CAGCTG ——— 3'
3' ——— GTCGAC ——— 5'

5' ——— CAG 3'
3' ——— GTC 5'

5' CTG ——— 3'
3' GAC ——— 5'

ISOESQUISÓMEROS

Endonucleasas de restricción que reconocen la misma secuencia

SmaI CCCGGG
 GGGCCC

BspDI ATCGAT
 TAGCTA

XmaI CCCGGG
 GGGCOC

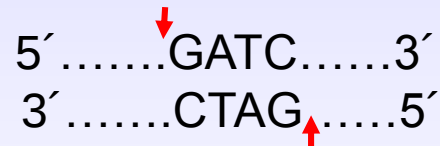
ClaI ATCGAT
 TAGCTA

Neoisoesquisómeros

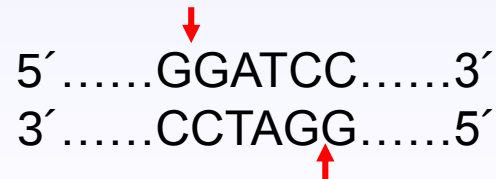
Hay enzimas que reconocen secuencias tetranucleotídicas

En algunos casos esas secuencias están dentro de una secuencia de 6 nucleótidos, blanco de otra enzima. Ej.

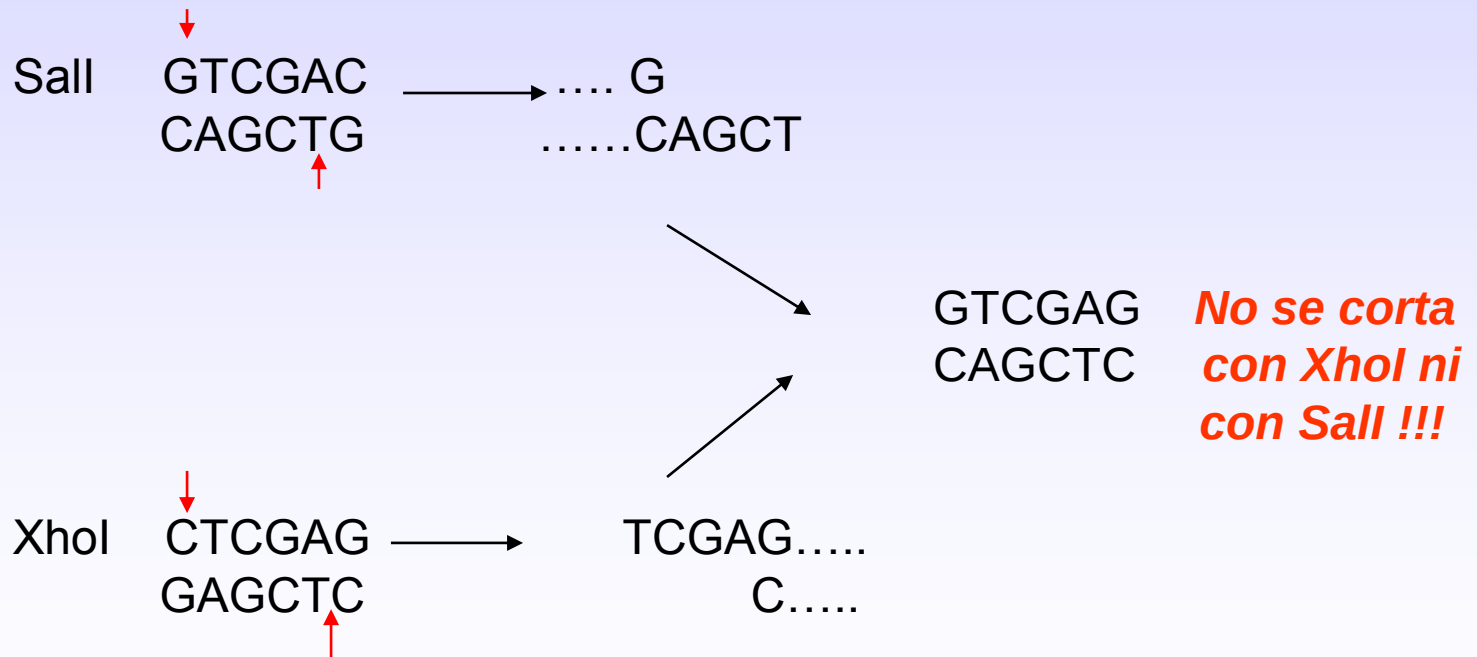
MboI y Sau3AI



BamHI

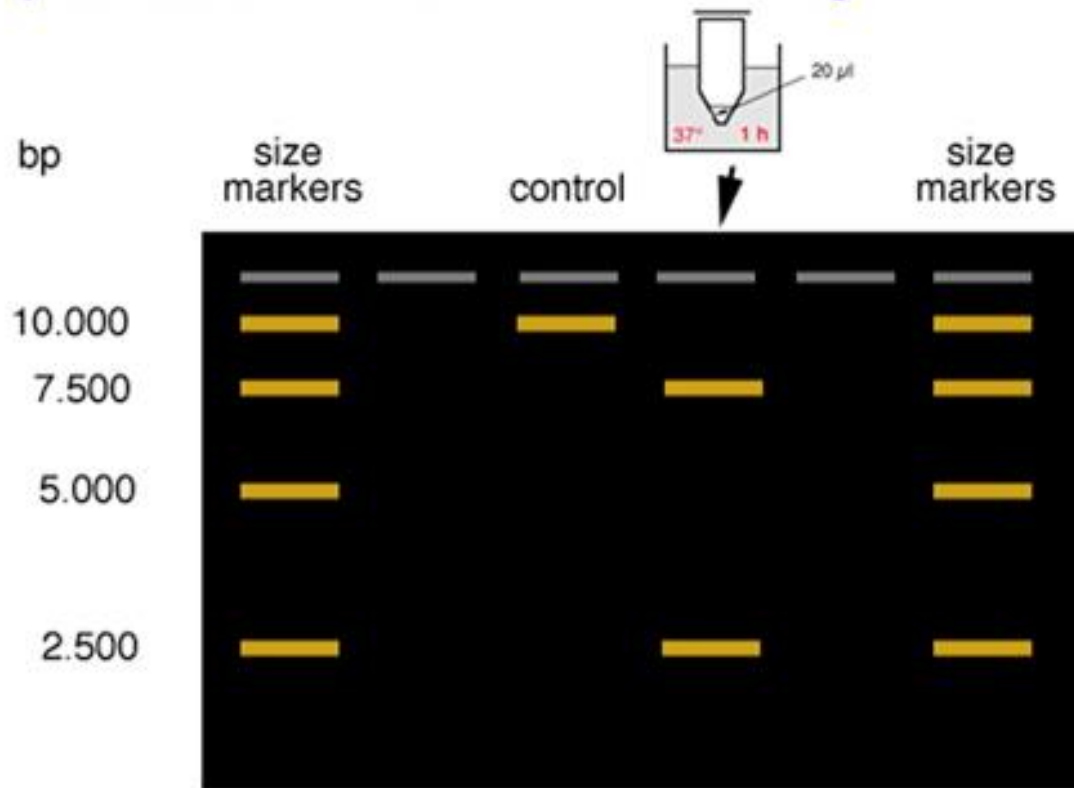


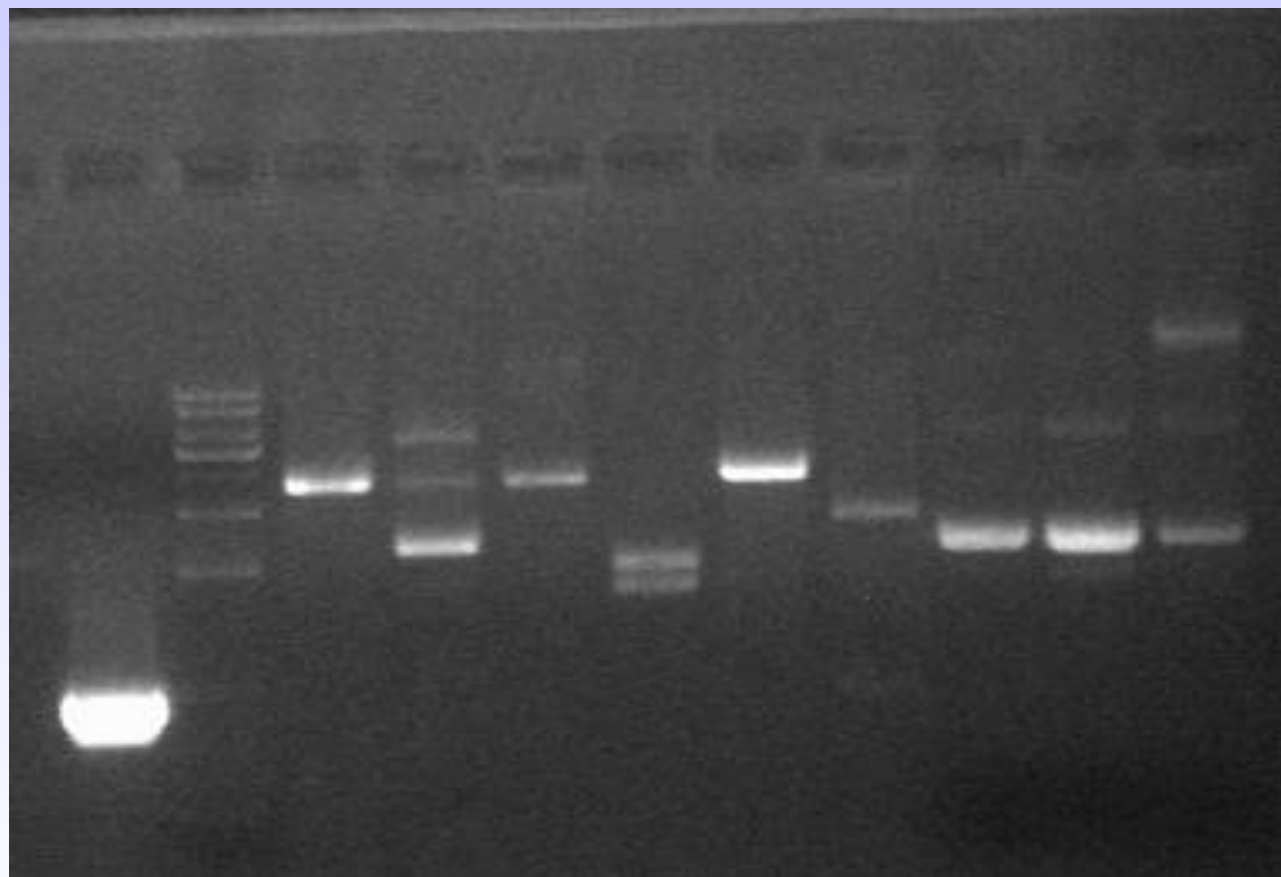
Ligación de fragmentos generados por 2 enzimas de restricción

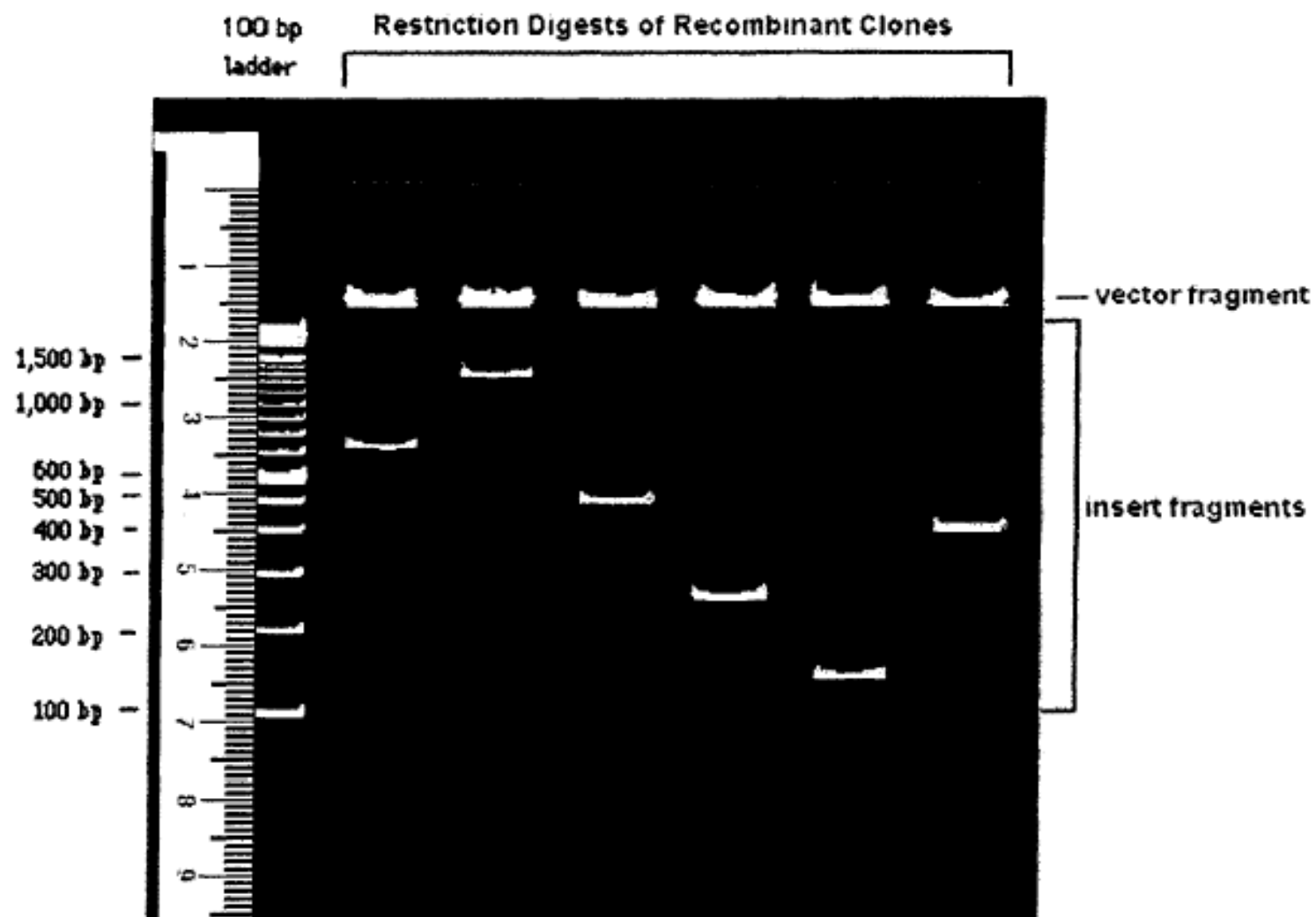


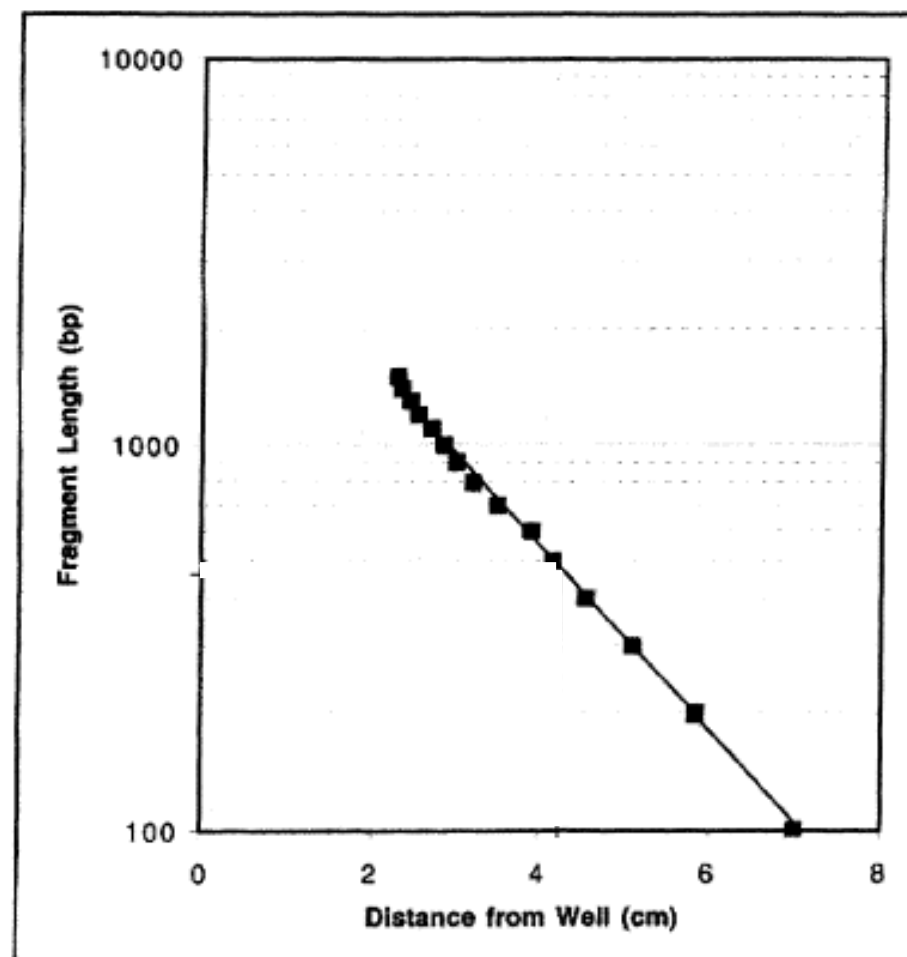
MAPEO DE RESTRICCIÓN

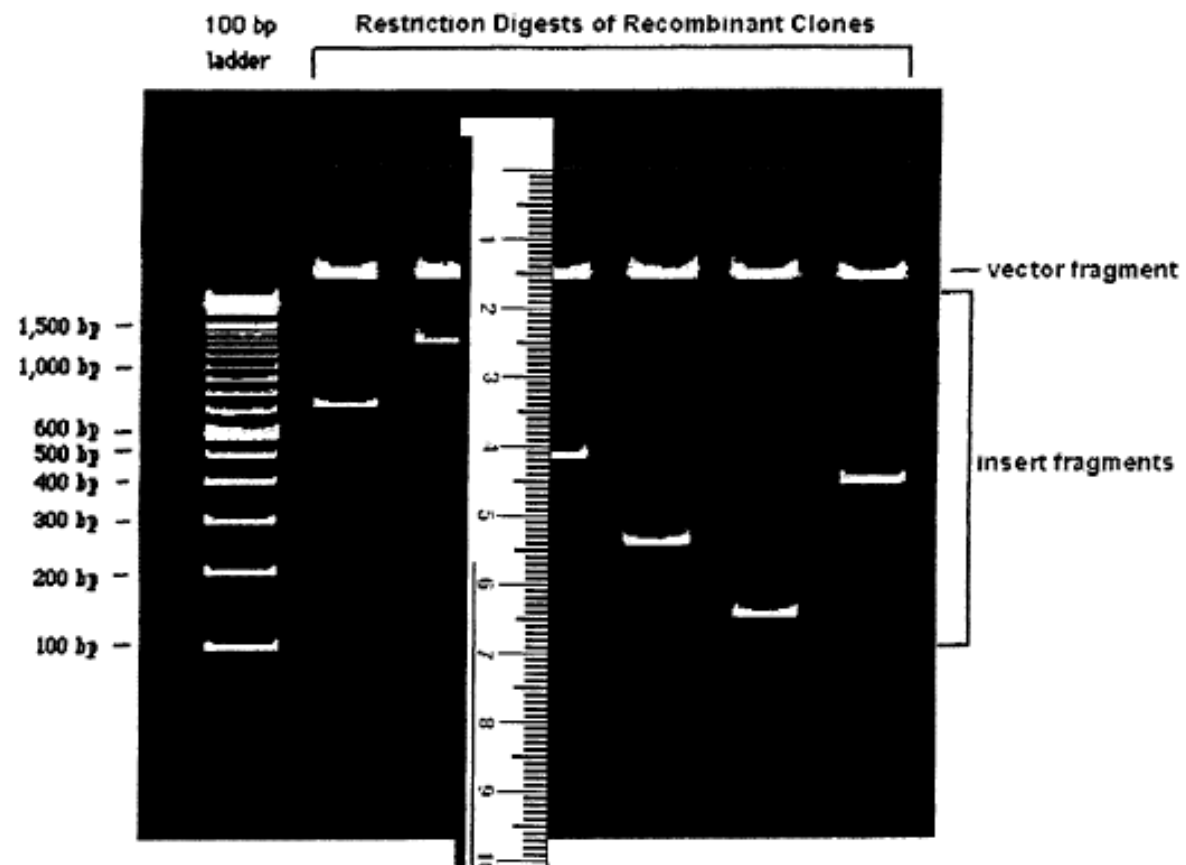
separación mediante electroforesis de los fragmentos

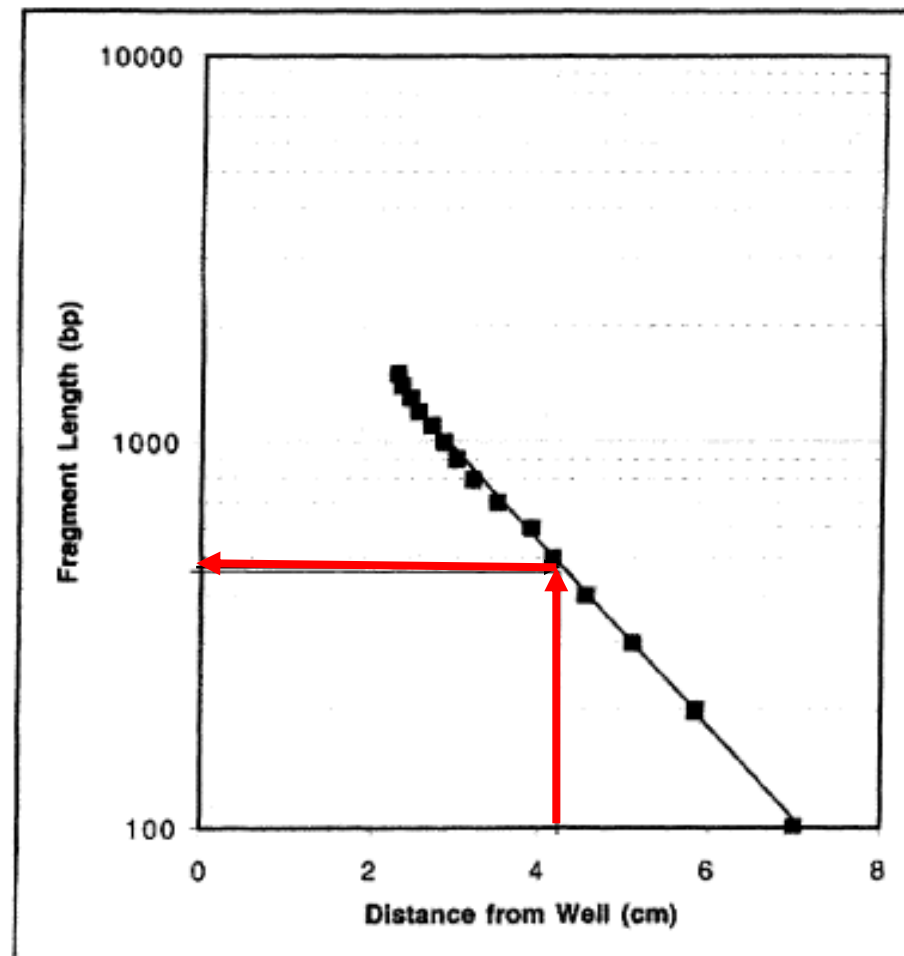












METILACIÓN

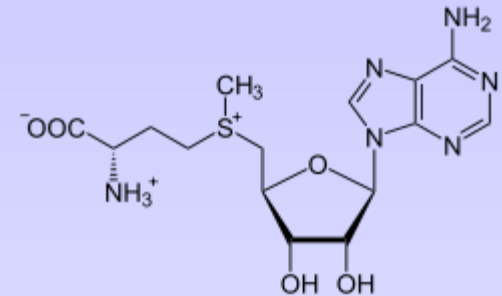
Procariontes

Dam metilasa.....G^mATC

Dcm metilasa.....C^mCAGG y C^mCTGG

EcoKI Metilasa.....metila A en AAC(N₆)GTGC o GCAC(N₆)GTT

La mayoría de las cepas que se usan para clonado son Dam⁺ y Dcm⁺



S-adenosilmetionina

METILACIÓN

Eucariontes:

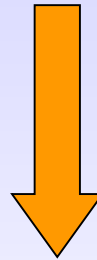
Metilasas de sitios mCG .

Los patrones son tejido específicos, heredables y correlacionan con la expresión de genes.

Los patrones de metilación CpG no se mantienen cuando el ADN es clonado en bacterias

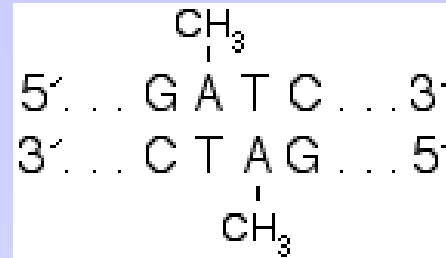


La metilación de los sitios de restricción puede impedir la acción de la enzima de restricción

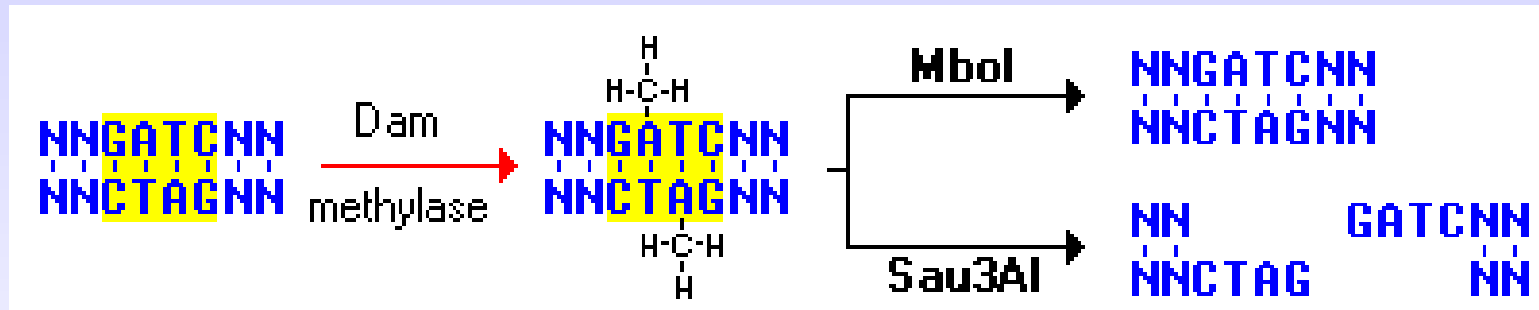


Los sitios se pueden desmetilar usando cepas de E coli *dam-* *dcm-*

Dam metilasa



No corta!!!!



Corta!!!!



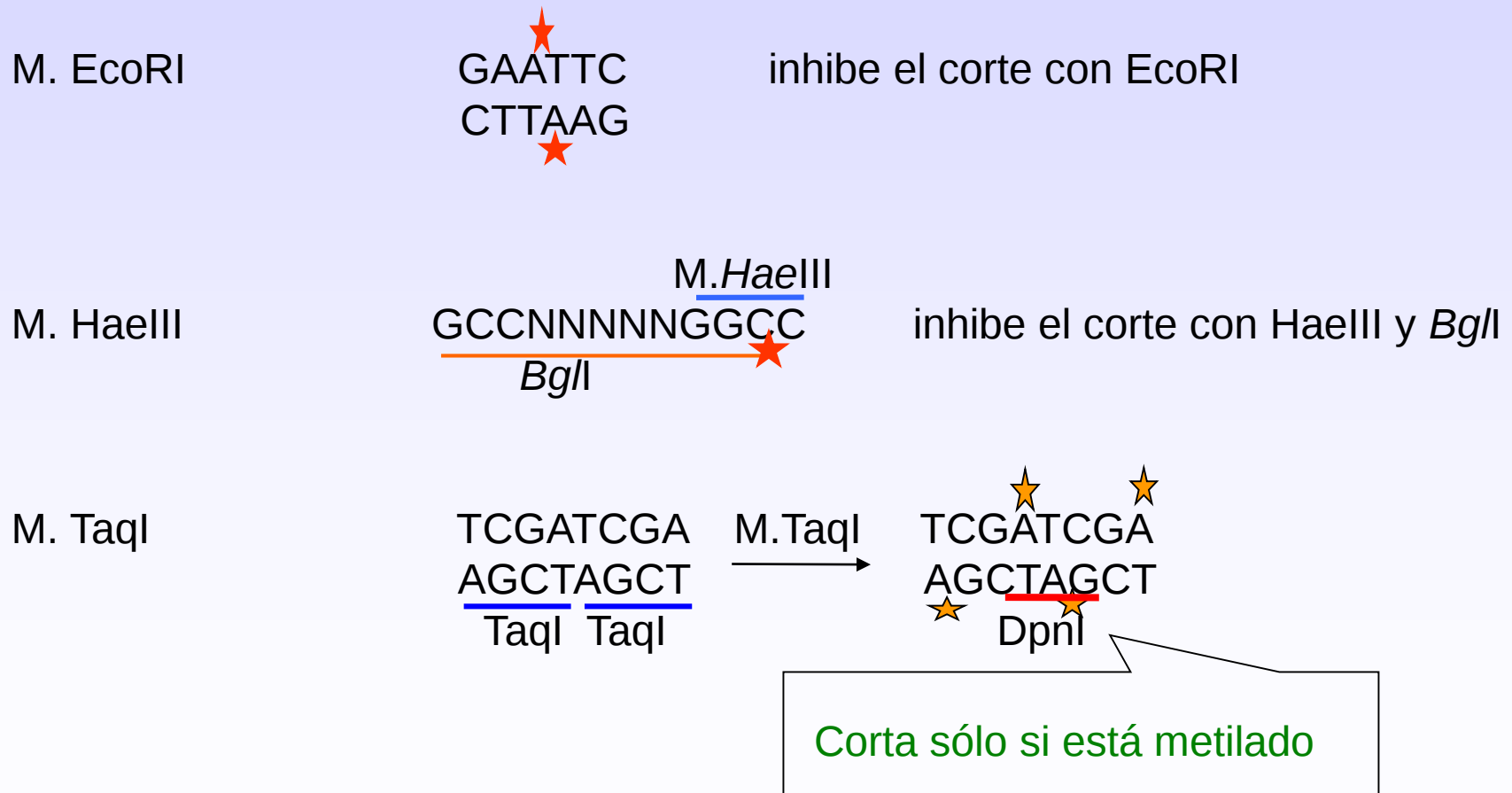
Legend

- Not Sensitive
- Blocked
- ol Blocked by Overlapping
- scol Blocked by Some Combinations of Overlapping
- ◆ Impaired
- ◆ ol Impaired by Overlapping
- ◆ scol Impaired by Some Combinations of Overlapping

A | B | C | D | E | F | H | I | K | M | N | P | R | S | T | X | Z | single letter code

Enzyme	Sequence	Dam	Dcm	CpG
AatII	GACGT/C	●	●	■
Acc65I	G/GTACC	●	□ scol	□ scol
AccI	GT/MKAC	●	●	□ ol
AciI	CCGC(-3/-1)	●	●	■
AclI	AA/CGTT	●	●	■
AcuI	CTGAAG(16/14)	●	●	●
AfeI	AGC/GCT	●	●	■
AflII	C/TTAAG	●	●	●
AflIII	A/CRYGT	●	●	●
AgeI	A/CCGGT	●	●	■
AhdI	GACNNN/NNGTC	●	●	◆ scol
AleI	CACNN/NNGTG	●	●	◆ scol
AluI	AG/CT	●	●	●
AluII	AG/CT	■	■	■

Modificación de sitios de restricción por metilación del ADN



Sistemas de restricción dependientes de la metilación en E. coli

EcoKI :genes hdsRMS, ataca ADN **NO protegido por metilación** en A en sitio: AA[N₆]GTGC o GCAC[N₆]GTT

McrA, McrBC y Mrr: genes mcrA, mcrB y mrr, atacan ADN **metilado** en ciertas posiciones

Para clonar usar preferentemente cepas defectuosas en loci hds, mcrA, mcrBC y mrr

FACTORES QUE INFLUENCIAN LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Composición del buffer

Temperatura de incubación

Metilación del ADN

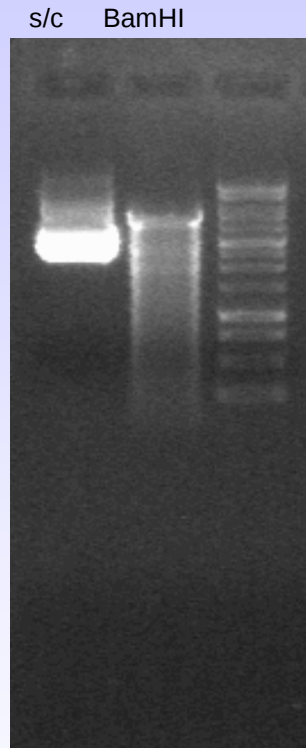
“Star activity”pH alto (>8) , baja fuerza iónica (ej. olvido de buffer)
Cc de glicerol $>5\%$
Cc muy alta de enzima (> 100 U/ug de ADN)
Solventes orgánicos (ej. Etanol, DMSO)

Digestión con múltiples enzimas

Variabilidad en la digestión de diferentes ADNs



Digestión de un plásmido, preparado con kit Wizard plus midipreps Promega, con BamHI



ADN sin precipitar



ADN precipitado



NEBcutter V2.0

[Program Guide](#)

[Help](#)

[Comments](#)

This tool will take a DNA sequence and find the large, non-overlapping open reading frames using the E.coli genetic code and the sites for all Type II and commercially available Type III restriction enzymes that cut the sequence just once. By default, only enzymes available from NEB are used, but other sets may be chosen. Just enter your sequence and "submit". Further options will appear with the output. **The maximum size of the input file is 1 MByte, and the maximum sequence length is 300 KBases.**

[What's new in V2.0](#) [Citing NEBcutter](#)

Local sequence file: Seleccionar archivo Ningún archivo seleccionado		Standard sequences:
GenBank number: [Browse GenBank]		# Plasmid vectors ▾
or paste in your DNA sequence: <i>(plain or FASTA format)</i>		# Viral + phage ▾
aaattgggtcccgtccacgttgcatgtgtcaccat gctgtcatgccctg		Submit
The sequence is: ☒ Linear ☐ Circular	Enzymes to use:	More options
	☒ NEB enzymes ☐ All commercially available specificities ☐ All specificities ☐ All + defined oligonucleotide sequences ☐ Only defined oligonucleotide sequences [define oligos]	Set colors
Minimum ORF length to display: 100 a.a.		
Name of sequence: <i>(optional)</i>		
Earlier projects:		

