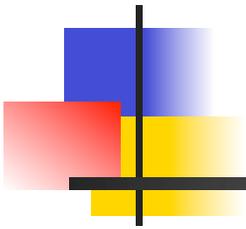
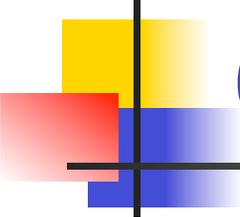


Transferencia de material genético II



Transferencia de material genético II
Transformación
13.Octubre.2009

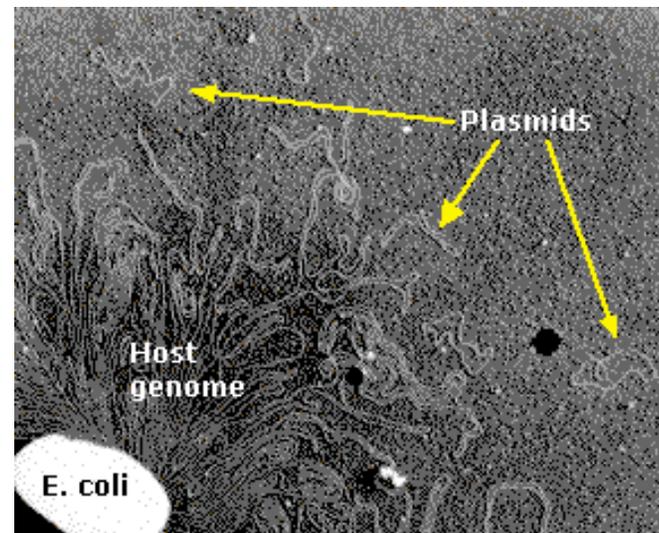
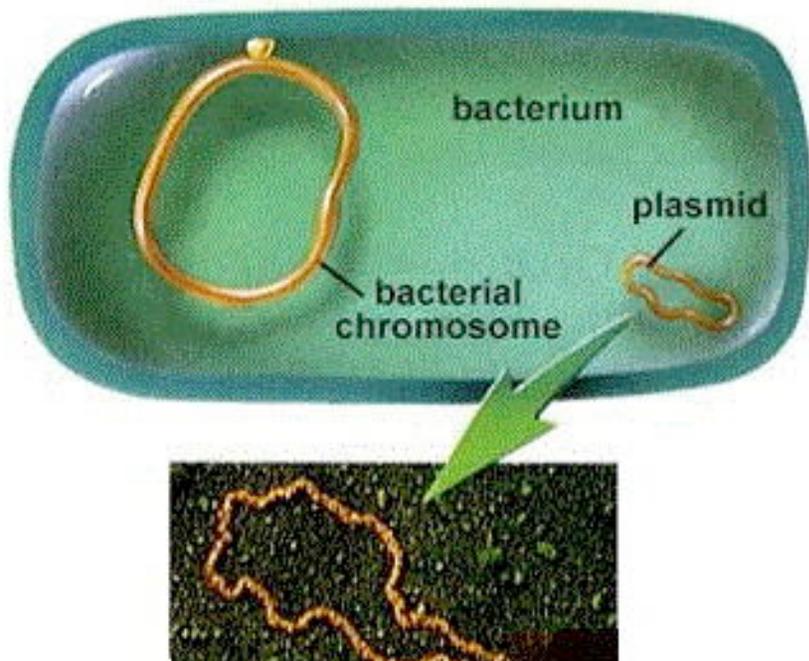


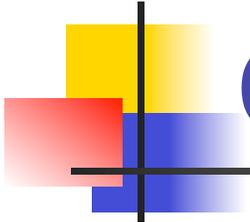
Objetivos

- Conocer el fundamento para transformar células bacterianas
- Realizar la técnica de transformación bacteriana
- Aprender a identificar células transformadas mediante su fenotipo
- Conocer la definición de organismo transgénico

Plásmido

Son cadenas dobles de DNA circular de 1 kb a 200 kb que se pueden encontrar en las bacterias.





Características

1. ORIGEN DE REPLICACIÓN

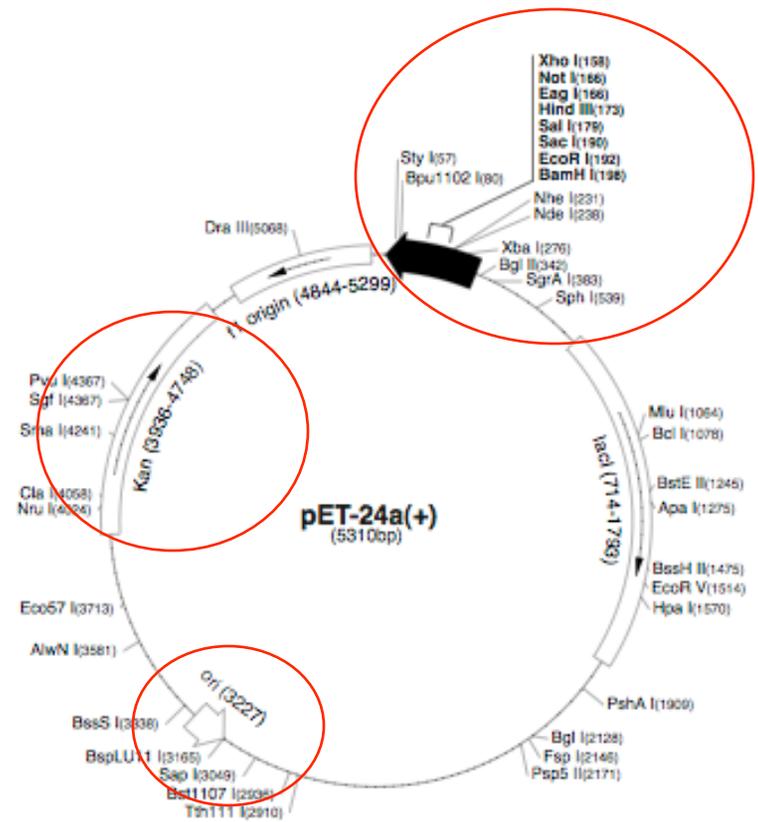
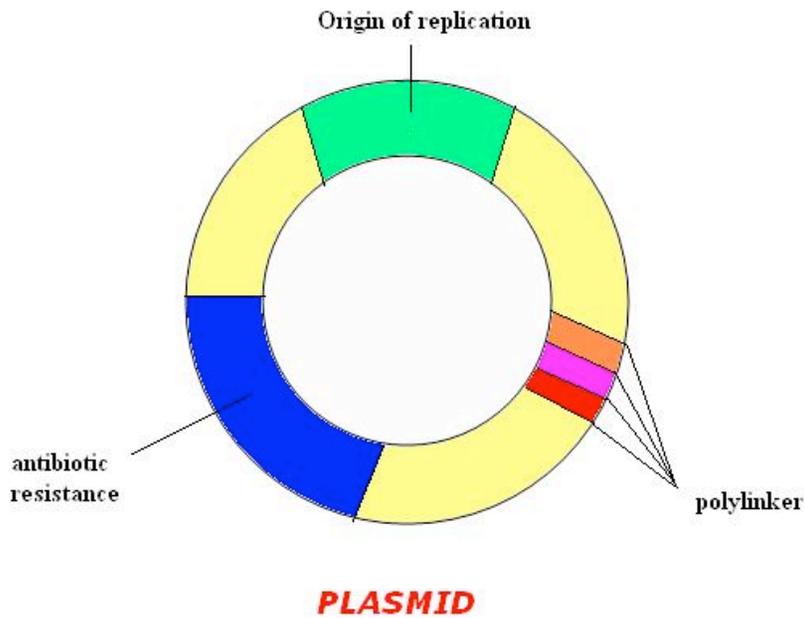
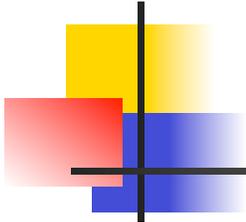
Capaz de hacer copias exactas de si mismo independiente del cromosoma del hospedero

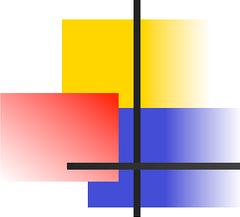
2. MARCADORES DE SELECCIÓN

Permite aislar a las células que poseen el gen deseado, generalmente resistencia a un antibiótico

3. SITIO DE CLONACIÓN MULTIPLE (SCM)

Sitios de enzimas de restricción en regiones no esenciales. Permite abrir al plásmido e insertar DNA.

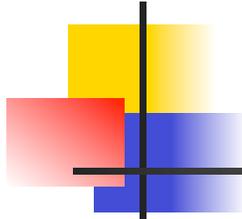




Enzimas de restricción

- Las enzimas de restricción, también conocidas como endonucleasas, son enzimas que cortan los enlaces fosfodiéster del material genético a partir de una secuencia que reconocen.

Permiten cortar DNA de hebra doble, donde reconocen secuencias palindrómicas (secuencias que se leen igual en ambas



Enzimas de restricción

Nomenclatura

E
co
R
I

coli

La primera enzima identificada

Ejemplo

Escherichia
RY13

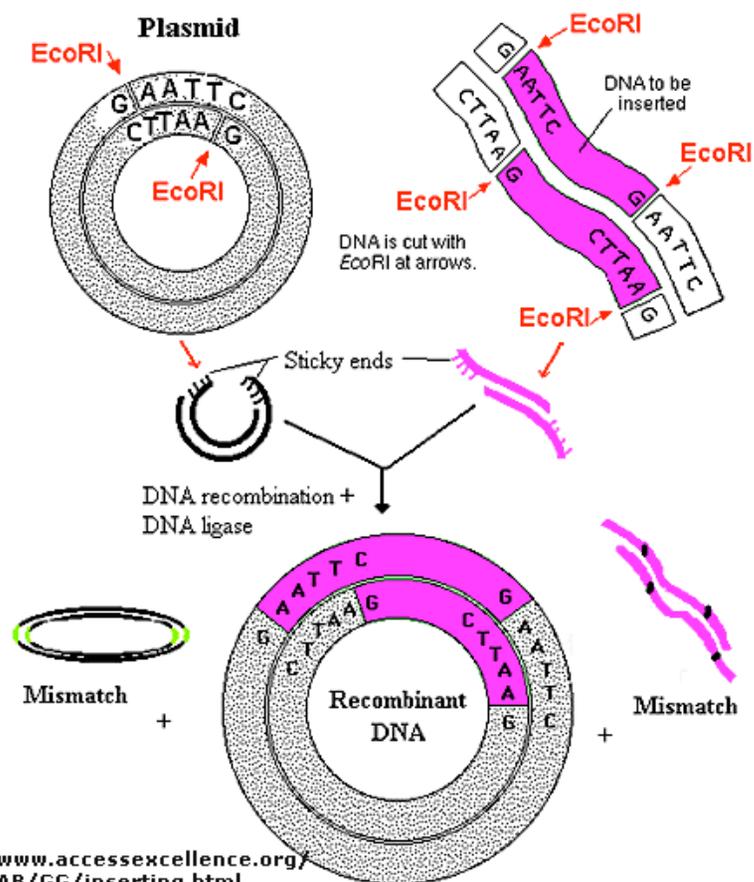
Corresponde a:

Género de la bacteria
Especie de la bacteria
Cepa de la bacteria

Orden de identificación de la enzima

<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<pre> 5' GGATCC 3' CCTAGG </pre>	<pre> 5' ---G GATCC---3' 3' ---CCTAG G---5' </pre>
<i>Dpn</i> I*	<i>Diplococcus pneumoniae</i>	<pre> CH₃ 5' GATC 3' CTAG CH₃ </pre>	<pre> CH₃ 5' ---GA TC---3' 3' ---CT AG---5' CH₃ </pre>
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i>	<pre> 5' AAGCTT 3' TTCGAA </pre>	<pre> 5' ---A AGCTT---3' 3' ---TTCGA A---5' </pre>
<i>Taq</i> I	<i>Thermus aquaticus</i>	<pre> 5' TCGA 3' AGCT </pre>	<pre> 5' ---T CGA---3' 3' ---AGC T---5' </pre>

Plásmido



www.accessexcellence.org/AB/GG/inserting.html

Inserting a DNA Sample into a Plasmid

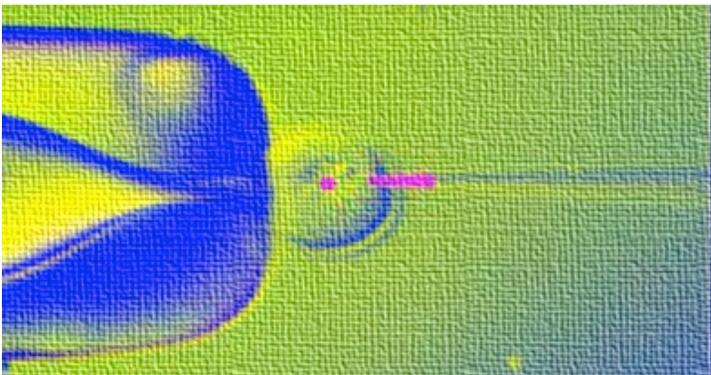
Tipos de vectores de clonación utilizados en *E. coli*

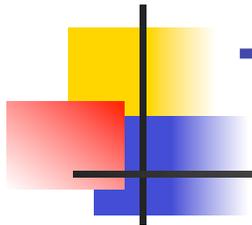
Tipo de vector	Método de introducción en <i>E. coli</i>	Método de propagación	Tamaño del fragmento de DNA que se puede clonar
Plásmidos: modificados por técnicas de DNA recombinante	Transformación; las células se vuelven competentes para incorporar el plásmido recombinante; una vez transformadas, las células se seleccionan mediante un marcador seleccionable	Replicación del plásmido	Hasta 15.000 pb
Bacteriófago λ	Infección con fagos; posterior al empaquetamiento in vitro del vector recombinante en partículas de fago	Replicación del fago	Hasta 23.000 pb
Cósmidos, contruidos a partir de los plásmidos y de genes de λ	Cualquiera de los métodos anteriores, dependiendo del tamaño del fragmento del DNA insertado; los fragmentos largos necesitan el empaquetamiento en λ in vitro	Replicación a modo de plásmido	Hasta 45.000 pb

TRANSFORMACIÓN

Es la introducción y expresión de material genético externo (DNA)

Microinyección permite introducir ADN en el núcleo celular (Ej. microinyección de DNA en óvulosfecundados para obtención de animales transgénicos)



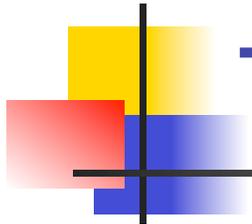


TRANSFORMACIÓN

En el caso de transformación de bacterias, generalmente se introduce mediante un choque térmico o por electroporación.

CHOQUE TÉRMICO

Las bacterias (hospederas) son tratadas con agentes como como CaCl_2 y temperatura que ocasiona un incremento en la permeabilidad membranal. (CELULAS COMPETENTES)

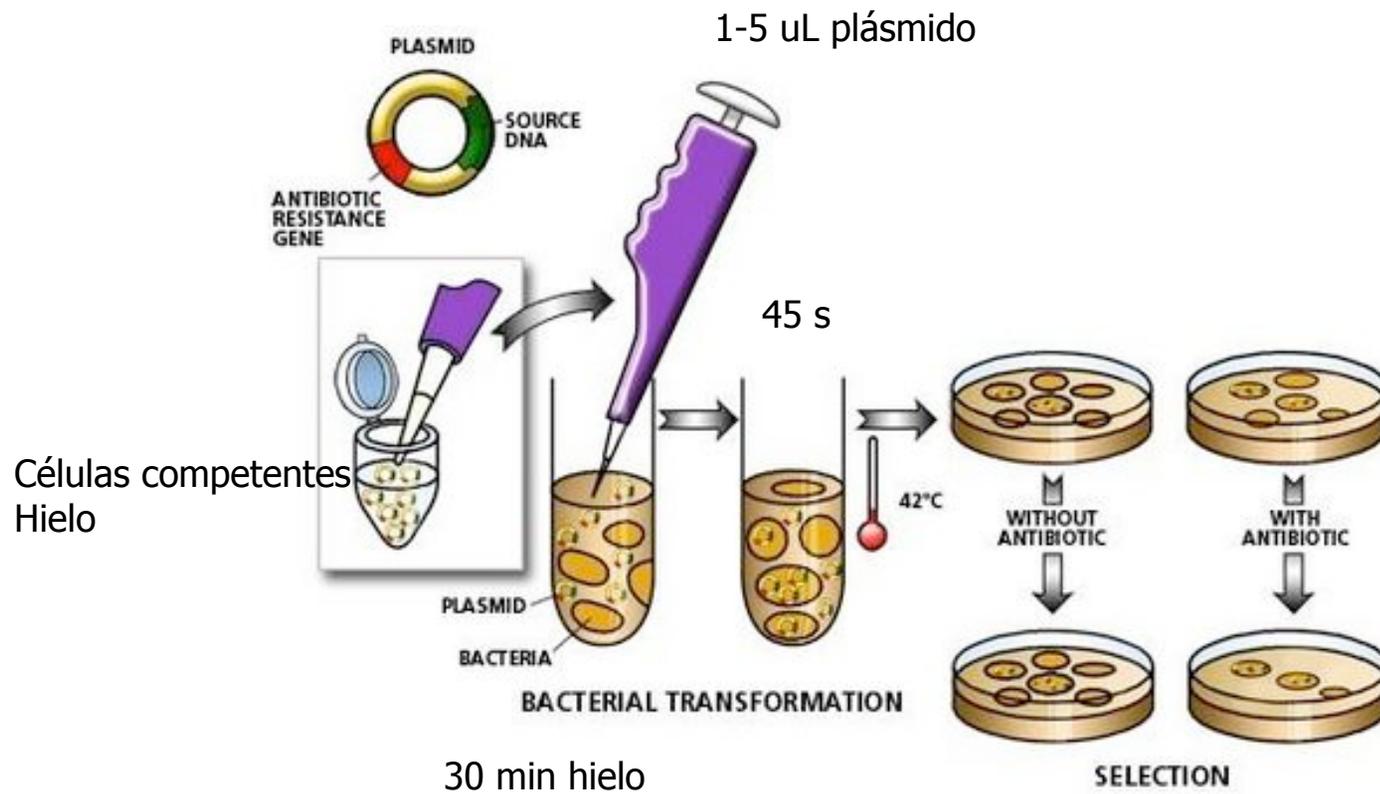


TRANSFORMACIÓN

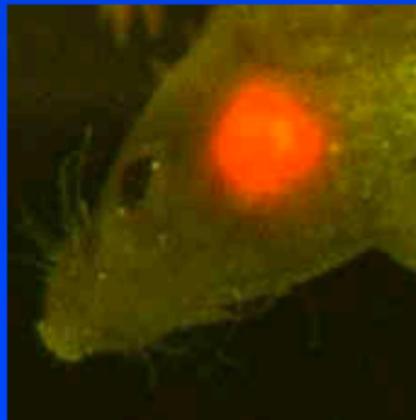
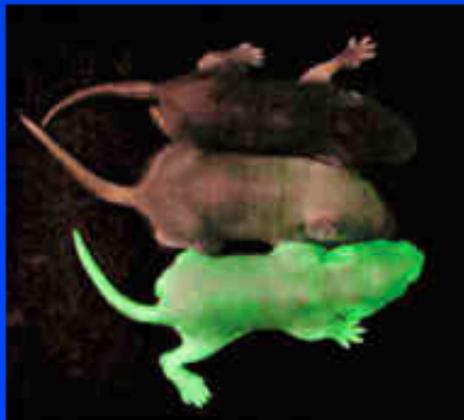
ELECTROPORACIÓN

Aumento de la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana causado por un campo eléctrico aplicado externamente, formando poros.

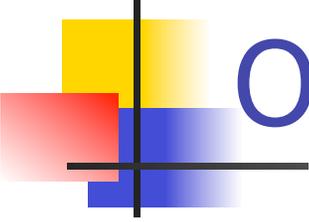
TRANSFORMACIÓN



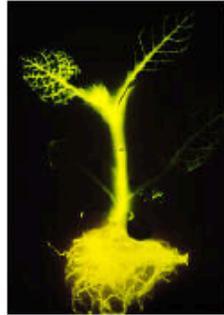
ORGANISMO TRANSGÉNICO



Células tumorales marcadas con RFP



ORGANISMO TRANSGÉNICO

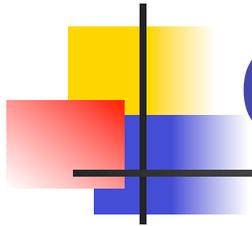


Planta de tabaco que expresa el gen de la luciferasa de luciérnaga

Plantas de tomate manipuladas genéticamente para ser resistentes a algunas larvas de insectos

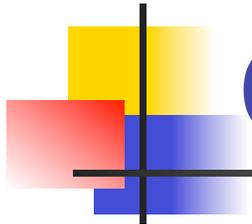


Clonación en ratones. Ratón que se le ha introducido el gen de la hormona de crecimiento humana



ORGANISMO TRANSGÉNICO

Cualquier planta, animal o bacteria que tiene información genética de otra especie introducida mediante ingeniería genética.



ORGANISMO TRANSGÉNICO

Producción de Proteínas Recombinantes de uso médico

- Insulina: para diabéticos
- Factor VIII: para pacientes con hemofilia A
- Factor IX: para hemofilia B
- Hormona del crecimiento humana: enanismo
- Eritropoyetina: para el tratamiento de anemias
- Interferón: defensa contra infecciones
- Antígeno de superficie de hepatitis B: vacunas
- Activador del plasminógeno tisular: disolución de coágulos