XTART
FP SALUD

UF8

Clonación de ácidos nucleicos

Biología molecular y citogenética

ÍNDICE

Mapa conceptual 03

1. La clonación y sus componentes 04

1.1. Los vectores de clonación 06

1.2. Las células huésped 09

2. Fases del procedimiento de clonación 11

2.1. Creación del vector de ADN recombinante 13

A. Fragmentación del ADN que se desea clonar 13

B. Ligación del vector al fragmento de ADN 14

2.2. Transferencia del ADN a la célula huésped 16

2.3. Selección e identificación de clones recombinantes 17

A. Genes de resistencia a antibióticos 17

B. Estrategia cromogénica 18

C. Proteínas fluorescentes 18

3. Genotecas y mapas del genoma 20

A. Extracción del ADN 21

B. Fragmentación del ADN 21

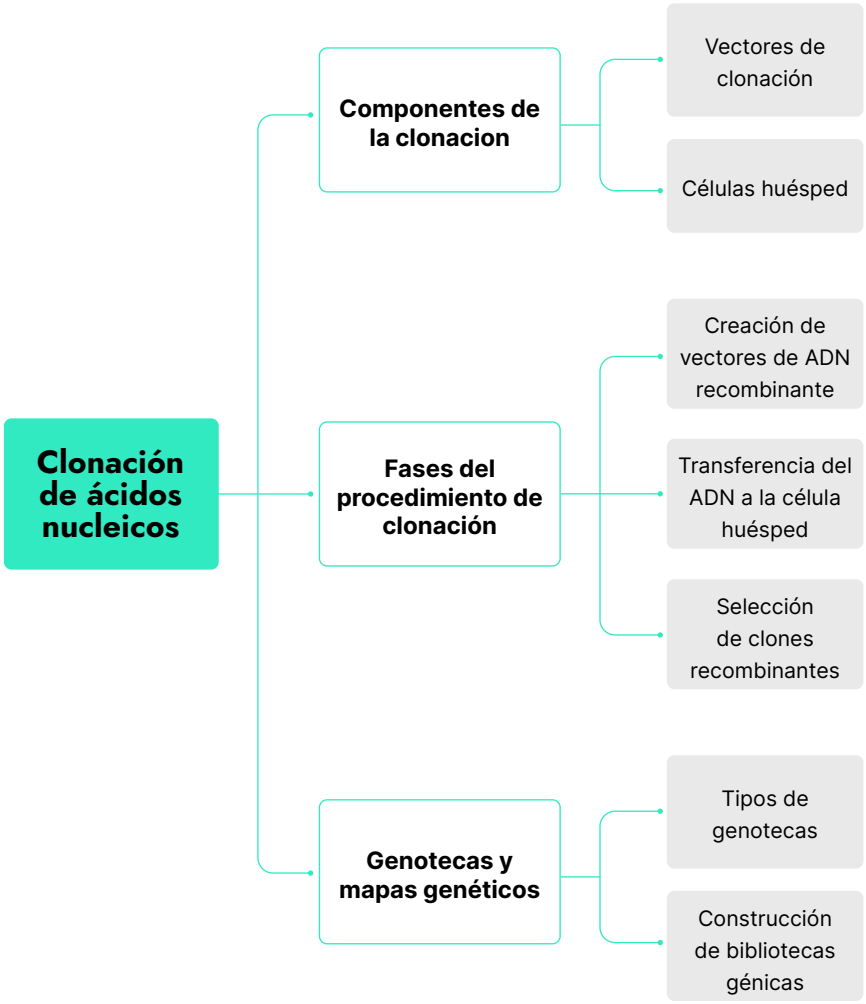
C. Construcción de la genoteca mediante clonación 22

D. Almacenamiento de la genoteca 22

E. Clonación de ácidos nucleicos 23

Anexo 26

Mapa conceptual

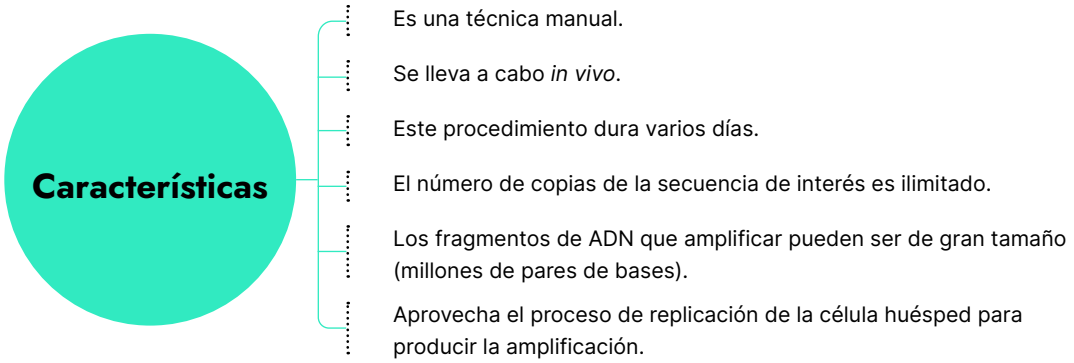


01 La clonación y sus componentes

DEFINICIÓN

Clonar consiste en hacer copias genéticamente exactas. El conjunto de elementos idénticos entre sí e idénticos al elemento original desde el punto de vista genético es un **clon**.

La metodología del ADN recombinante (también denominada **clonación genética**) permite unir ADN de diferentes fuentes biológicas con el fin de realizar múltiples copias idénticas de un fragmento (gen), determinar su secuencia o manipular su expresión.



Esquema 1. Características de la técnica de clonación molecular que permiten diferenciarla de la técnica de PCR.

Algunos objetivos de la tecnología del ADN recombinante son: expresar y obtener proteínas recombinantes, proporcionar o eliminar características únicas en el organismo receptor o almacenar información genética de interés en un microorganismo para poder utilizarla con posterioridad (biblioteca genómica; véase la Tabla 1).

OBJETIVOS DE LA CLONACIÓN

Amplificación	• Secuenciación. • Estudio de la estructura de los ácidos nucleicos. • Estudio de la homología genética entre especies. • Identificación de mutaciones.
Expresión	• Estudio del proceso de transcripción y traducción. • Producción de la proteína o ARN: - Identificación y estudio. - Producción comercial. - Ingeniería de proteínas con alteración de sus propiedades.

Tabla 1. Objetivos de la clonación.

Se lleva a cabo en cuatro pasos fundamentales:

1. Un ADN concreto se fragmenta en trozos más pequeños.
2. El ADN fragmentado se une a otro ADN, denominado «vector», que contiene los elementos genéticos necesarios para la replicación en el interior de la célula.
3. La molécula recombinante (ADN exógeno + vector) se introduce en una célula huésped donde puede replicarse y producir múltiples copias del fragmento de ADN clonado.
4. Las moléculas que contienen los clones recombinantes se identifican y propagan.

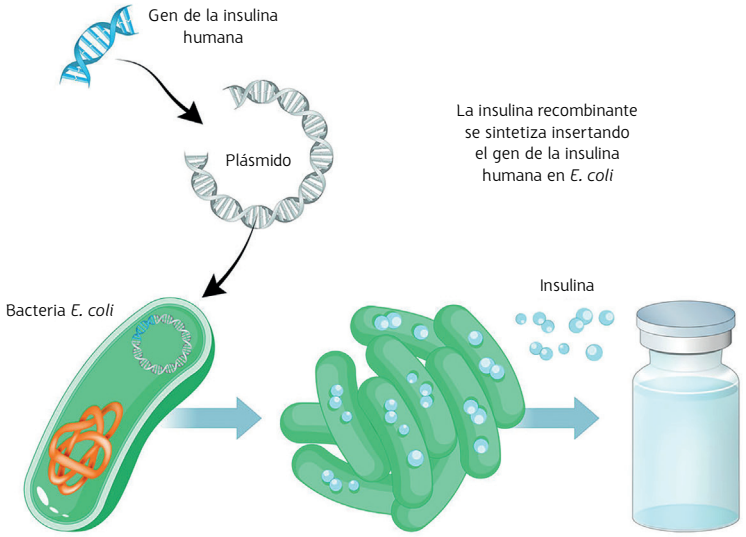


Fig. 1. La insulina humana recombinante se sintetiza en el laboratorio insertando el gen de la insulina humana en un plásmido de bacterias.

Los componentes necesarios para una clonación son: ADN exógeno, vector de clonación, célula huésped y dos tipos de enzimas (véase la Esquema 2).

ADN exógeno	Molécula de ADN que se quiere clonar. Puede tener orígenes muy diversos.
Vector de clonación	Molécula de ADN cuya misión es facilitar la entrada del ADN exógeno y su replicación en la célula huésped. Puede tener una procedencia diversa: plásmidos, bacteriófagos, cósmidos, fagéminos y cromosomas artificiales.
Célula huésped	Célula que recibe el ADN recombinante y que le facilita su mantenimiento, amplificación y expresión. Pueden ser células eucariotas o procariotas.
Enzimas	Proteínas con función biológica capaces de catalizar reacciones químicas. La nucleasa corta el vector y el inserto y la ligasa une los fragmentos resultantes.

Esquema 2. Componentes de la clonación.

1.1. Los vectores de clonación

Un vector de clonación es una molécula de ADN de doble cadena que le sirve de vehículo a un fragmento de ADN exógeno y que permite su amplificación, ya que posee capacidad de replicación autónoma.

Un vector de clonación tiene tres elementos esenciales:

- **Origen de replicación**. Lo podemos encontrar indicado como ORI o Ori. Necesario para propagarse en la célula huésped junto con el inserto (fragmento de ADN) que porta.
- **Sitio para clonación o restricción**. Son una o varias secuencias de reconocimiento para endonucleasas de restricción. Es el sitio de inserción del ADN exógeno. Los vectores de clonación de última generación incorporan un sitio múltiple de clonación o sitio de restricción múltiple. Se conoce como *polylinker,* SMC o MCS.
- **Gen marcador de selección**. Permite la selección de células que contienen el vector de clonación o una versión recombinante del mismo. Son, generalmente, genes que confieren resistencia a diferentes antibióticos o que codifican enzimas que no se encuentran en condiciones normales en la célula huésped. Existen, también, marcadores como el gen de la proteína verde fluorescente que permite que la célula transformada emita fluorescencia cuando se expone a luz ultravioleta.
- **Gen marcador de identificación.** Tiene como función que se puedan distinguir las células que se han transformado con el vector recombinante. Pueden ser genes de resistencia de forma que las bacterias se pueden diferenciar al cultivarlas en medios que contengan antibióticos.

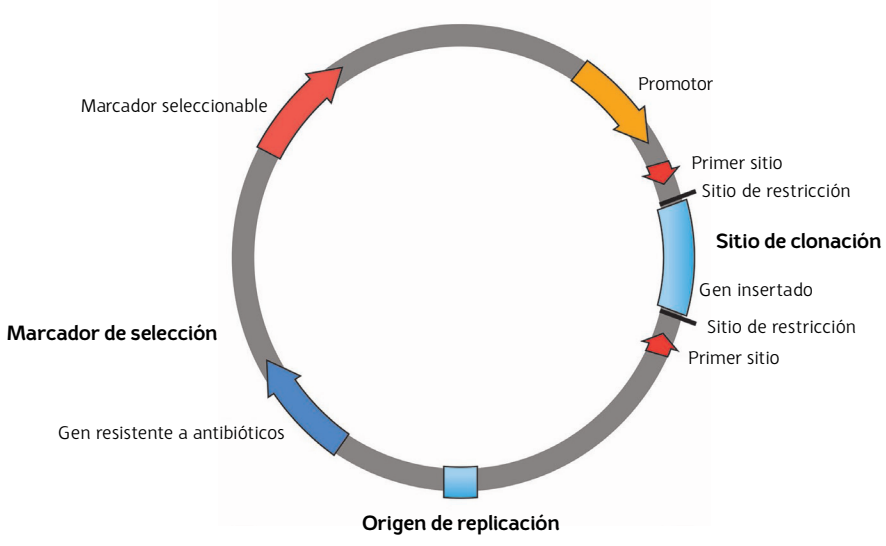
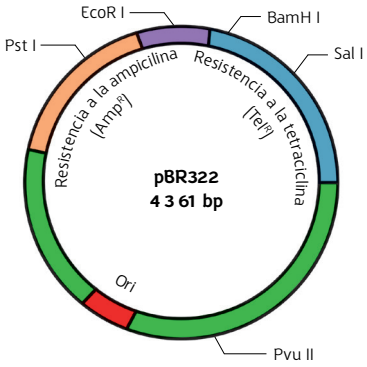
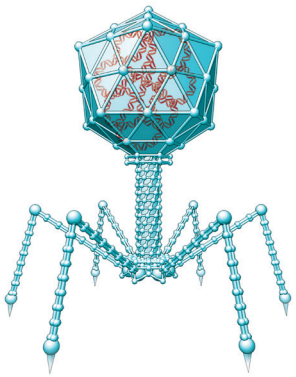


Fig. 2. Componentes esenciales de un plásmido como vector de clonación.

Los vectores utilizados para la clonación de ADN son: plásmidos, bacteriófagos, cósmidos, fagémidos y cromosomas artificiales (véase la Tabla 2).

VECTORES	CARACTERÍSTICAS	ESQUEMA
Plásmidos	• Son los vectores de clonación más utilizados. • Son secuencias circulares de ADN que se encuentran de manera natural en las bacterias. • Tienen capacidad para replicarse de forma autónoma, con independencia del cromosoma bacteriano. • Son de pequeño tamaño, lo que permite aislarlos y manipularlos con mayor facilidad. • Cuentan con genes de resistencia a los antibióticos que actúan como marcadores y facilitan la detección y la selección de las células huésped que los contienen. • El tamaño de los insertos que se pueden clonar puede ser considerable, pero, si son mayores de 10 kb, el plásmido se vuelve, por lo general, inestable.	
Bacteriófagos	Los bacteriófagos son virus que infectan de forma natural bacterias. El bacteriófago silvestre se modifica genéticamente para convertirlo en un vector de clonación. El *bacteriófago lambda* es el fago más utilizado como vector de clonación. Se trata de un vector de clonación útil por estos motivos: • Se conoce su estructura, su secuencia y su funcionamiento. • Permite insertos de mayor cantidad de ADN que la mayoría de los plásmidos (entre 10 y 20 Kb). • Las partículas del fago son mucho más eficientes en la infección de las células huésped.	

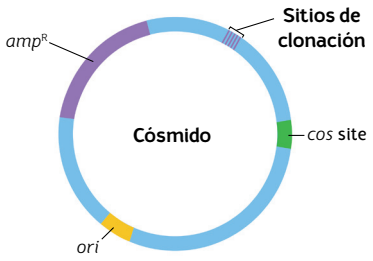
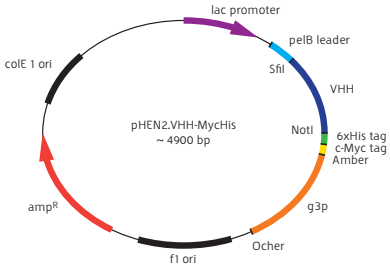
Cósmidos	Son vectores de clonación híbridos que combinan las características ventajosas de los plásmidos y del bacteriófago λ. Tienen habilidad para replicarse autónomamente y contienen genes de resistencia a los antibióticos como los plásmidos. Su principal ventaja es la posibilidad de insertar fragmentos de ADN de 35 a 45 kb.		
Fásmidos (fagémidos)	Son vectores de clonación que combinan las características de un bacteriófago filamentoso y un plásmido. Los fásmidos son plásmidos que contienen secuencias de naturaleza vírica, como el origen de replicación del fago M13. Esto les permite comportarse tanto como plásmidos como fagos. Los fásmidos pueden transportar fragmentos de ADN más grandes que cuando se usa el fago lambda.		
Cromosomas artificiales	Se denominan vectores de alta capacidad, ya que pueden alojar insertos de gran tamaño. Contienen un origen de replicación, un marcador seleccionable y un sitio múltiple de clonación.	Cromosomas artificiales bacterianos (BAC)	Se basan en el plásmido F de *E. coli* y pueden llevar insertos de 300 kb, aunque el promedio es de 100 kb.
		Cromosomas artificiales de levaduras (YAC)	Son minicromosomas de levaduras creados por ingeniería genética para contener insertos de ADN muy grandes (200-500 kb).
Vectores lanzadera	Son moléculas híbridas que contienen orígenes de replicación de dos hospedadores diferentes. Se conocen también como vectores bifuncionales o transbordadores porque permiten pasar de un huésped a otro. Lo más habitual es que contengan dos orígenes de replicación, uno bacteriano o de levadura para generar un elevado número de copias y otro de planta o de animal para expresar la proteína codificada en el inserto. Además, contienen marcadores de selección para todos los sistemas hospedadores.		

Tabla 2. Tipos de vectores más utilizados para la clonación de ADN (continuación).

1.2. Las células huésped

DEFINICIÓN

La célula **hospedadora** es aquella que recibe el vector de ADN recombinante para su mantenimiento, amplificación y expresión, al poner a disposición de este ADN sus sistemas genéticos y bioquímicos.

Pueden ser células **procariotas** o **eucariotas**, y su elección depende del vector de clonación elegido. Además, deben ser competentes, es decir, comportarse como células temporalmente permeables al ADN extracelular para poder introducir en ellas el vector de clonación con el fragmento genómico de interés.

Células hospedadoras procariotas

Las bacterias son las células más utilizadas. Se pueden utilizar para clonar bacteriófagos y plásmidos. Presentan un crecimiento rápido y resultan sencillas de manipular.

Se usan cepas especiales que no tengan enzimas con capacidad para degradar los vectores, como por ejemplo la cepa K12 de E. coli o Bacillus subtilis. En el caso de E. coli no es una bacteria competente de forma natural, es decir, que no se transforma con facilidad incorporando plásmidos u otros vectores. Pero debido a que es un organismo modelo bacteriano que ha sido muy estudiado, se modifica artificialmente para convertirla en una célula competente.

Células hospedadoras eucariotas

Levaduras

Aunque son células eucariotas, las levaduras crecen de forma similar a las bacterias. Algunos ejemplos de levaduras utilizadas como células huésped en las técnicas de clonación son: *S. cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

Células vegetales y animales

Son las células utilizadas en experimentos de clonación dirigidos a obtener organismos transgénicos (OMG). En el caso de las células vegetales, se usa como vector de clonación el plásmido Ti de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens,* y para las células de mamíferos se infectan con retrovirus.

Esquema 3. Células hospedadoras utilizadas en la clonación de ADN.

VÍDEOLAB

Para consultar el siguiente video sobre purificación del ADN plasmídico utilizado como vector de clonación, escanea el código QR o pulsa aquí.

1 CASO PRÁCTICO



PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA APLICACIONES TERAPÉUTICAS

Actualmente las proteínas recombinantes utilizadas para aplicaciones terapéuticas están aumentando de forma espectacular.

Un ejemplo de la utilidad de esta tecnología para la producción a gran escala de proteínas es la insulina. Se utiliza para el control del metabolismo de la glucosa circulante en sangre como parte del tratamiento de la diabetes mellitus.

¿Qué otros ejemplos de proteínas recombinantes conoces y cuál es su indicación terapéutica?

SOLUCIÓN

Son ejemplos de proteínas recombinantes y su acción terapéutica las siguientes:

Proteína recombinante	Indicación terapéutica
• Vacuna contra la hepatitis B	• Inmunización contra la hepatitis B.
• Hormona foliculoestimulante	• Infertilidad, anovulación.
• Somatostatina	• Déficit y disminución de hormona de crecimiento.
• Interferones	• Infecciones virales y cáncer.
• Interleucinas	• Infecciones por VIH, cáncer e inmunodeficiencias.

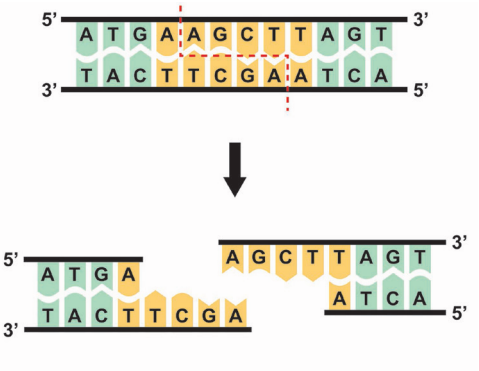
02 Fases del procedimiento de clonación

La metodología del ADN recombinante (también denominada **clonación genética**) permite unir ADN de diferentes fuentes biológicas con el fin de realizar múltiples copias idénticas de un fragmento (gen), determinar su secuencia o manipular su expresión.

Fases del procedimiento de clonación

La clonación de un fragmento de ADN, ya sea procariota o eucariota, incluye los siguientes **procedimientos**:

1. **Tratamiento** del ADN que contiene el fragmento que se desea clonar: corte con enzimas de restricción.
2. **Selección** de la molécula de ADN con capacidad de autorreplicarse (vector de clonación) y su tratamiento con las mismas enzimas de restricción que el paso anterior.
3. **Unión** de los fragmentos de ADN (ADN ligasa) para formar el vector de ADN recombinante.
4. **Introducción** del vector de clonación en una célula huésped que disponga de la maquinaria enzimática para la replicación de ese ADN.
5. **Identificación** de las células huésped que contienen el vector de ADN recombinante.



Preparación del fragmento de ADN que se va a clonar.

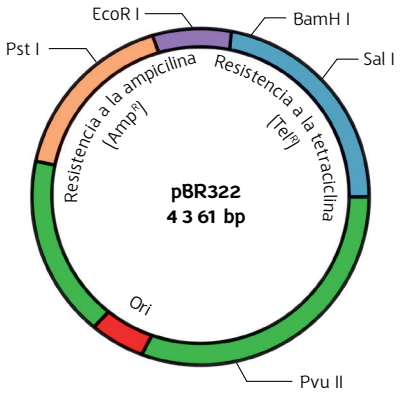
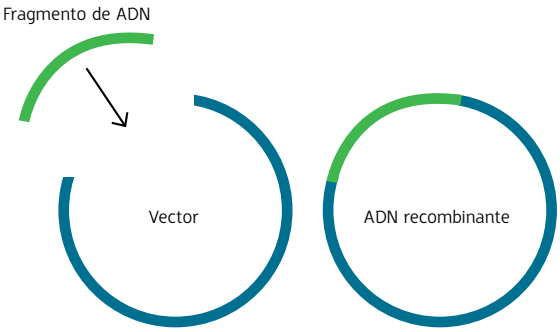
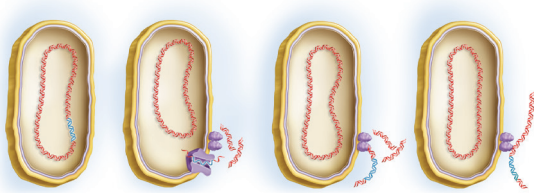
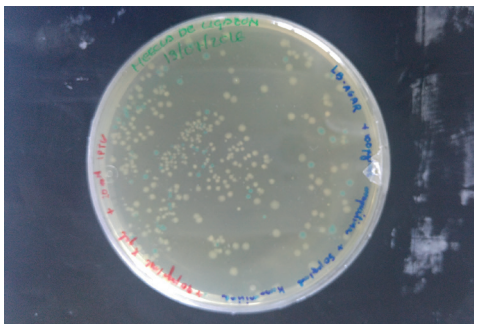
	Preparación del vector de clonación.
	Ligación del vector con el inserto de ADN.
	Preparación de las células competentes.
	Transformación celular.
	Identificación de las células que contienen el vector recombinante.

Tabla 3. Fases del proceso de clonación de cualquier fragmento de ADN.

2.1. Creación del vector de ADN recombinante

Una molécula de ADN de origen bacteriano, vírico, etc. al que se le une un fragmento de ADN exógeno es un ***vector*** de ***ADN recombinante*** que se utiliza como molécula transportadora en el proceso de clonación.

Para la creación de un vector recombinante, es necesario preparar el vector de clonación y el fragmento de ADN que se va a clonar.

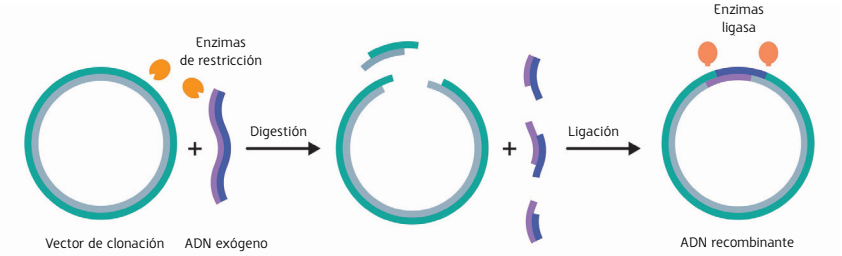


Fig. 3. Formación de un vector de ADN recombinante a partir de plásmidos.

A. Fragmentación del ADN que se desea clonar

Para la obtención de fragmentos de ADN para clonar se utilizan las enzimas de restricción de tipo II. Las endonucleasas de restricción, conocidas como *tijeras moleculares,* tienen capacidad para reconocer secuencias específicas de nucleótidos (de cuatro a ocho pares de bases) dentro de una molécula de ADN y cortarla en ese sitio llamado **«diana de restricción»**.

El corte realizado por una enzima de restricción puede ser de dos formas, según los **extremos** generados: romos o cohesivos.

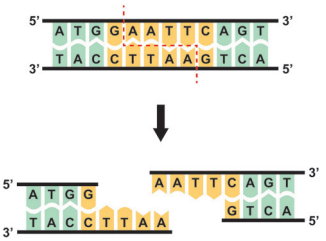
Extremos romos	El corte se encuentra en el mismo punto en ambas cadenas (en el centro de la diana de restricción). Este corte no genera bases desapareadas y por tanto no son cohesivos.	
Extremos cohesivos	El corte se produce en puntos distintos en ambas cadenas (en los extremos de la diana de restricción). Cuando se produce este tipo de corte van a quedar bases desapareadas, y este tipo de extremos se conocen como cohesivos. En este caso, los fragmentos resultantes son reactivos, ya que al tener bases desapareadas si se encuentran con una secuencia de bases no apareadas, se podrían unir mediante enlaces de puentes de hidrógeno siguiendo el principio de complementariedad.	

Tabla 4. Tipos de genotecas: genoteca genómica y genoteca de expresión.

El vector y el inserto deben tratarse con la misma enzima de restricción, que además debe ser una enzima que tras su corte genere **extremos cohesivos**. Si se dan estas condiciones, las bases desapareadas en cada nuevo extremo que aparece, tendrán **secuencias complementarias,** por lo que pueden reaccionar entre sí y unirse para formar una molécula recombinante, cuando esta unión se produzca entre fragmentos del vector y del inserto.

El inserto obtenido por digestión enzimática se **separa** y se **purifica** (Figura 4).

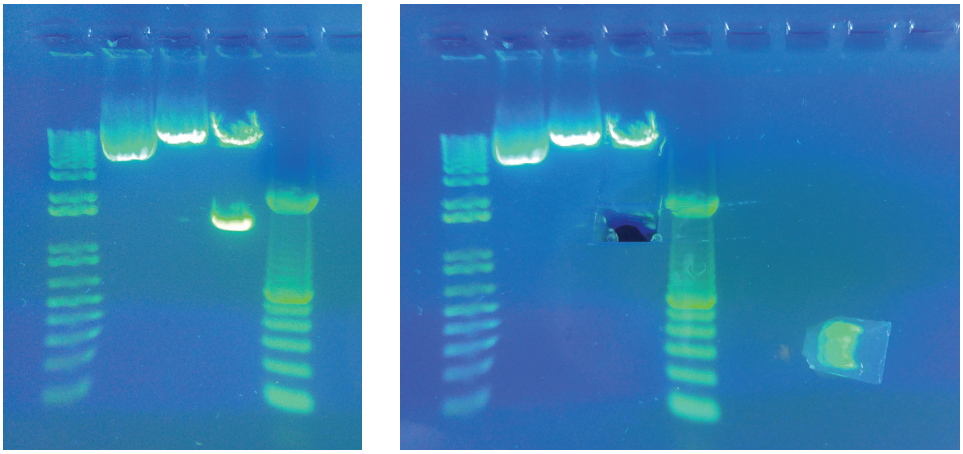


Fig. 4. Electroforesis en gel para separar los diferentes fragmentos de ADN obtenidos por digestión enzimática y separación del inserto de interés para su purificación.

B. Ligación del vector al fragmento de ADN

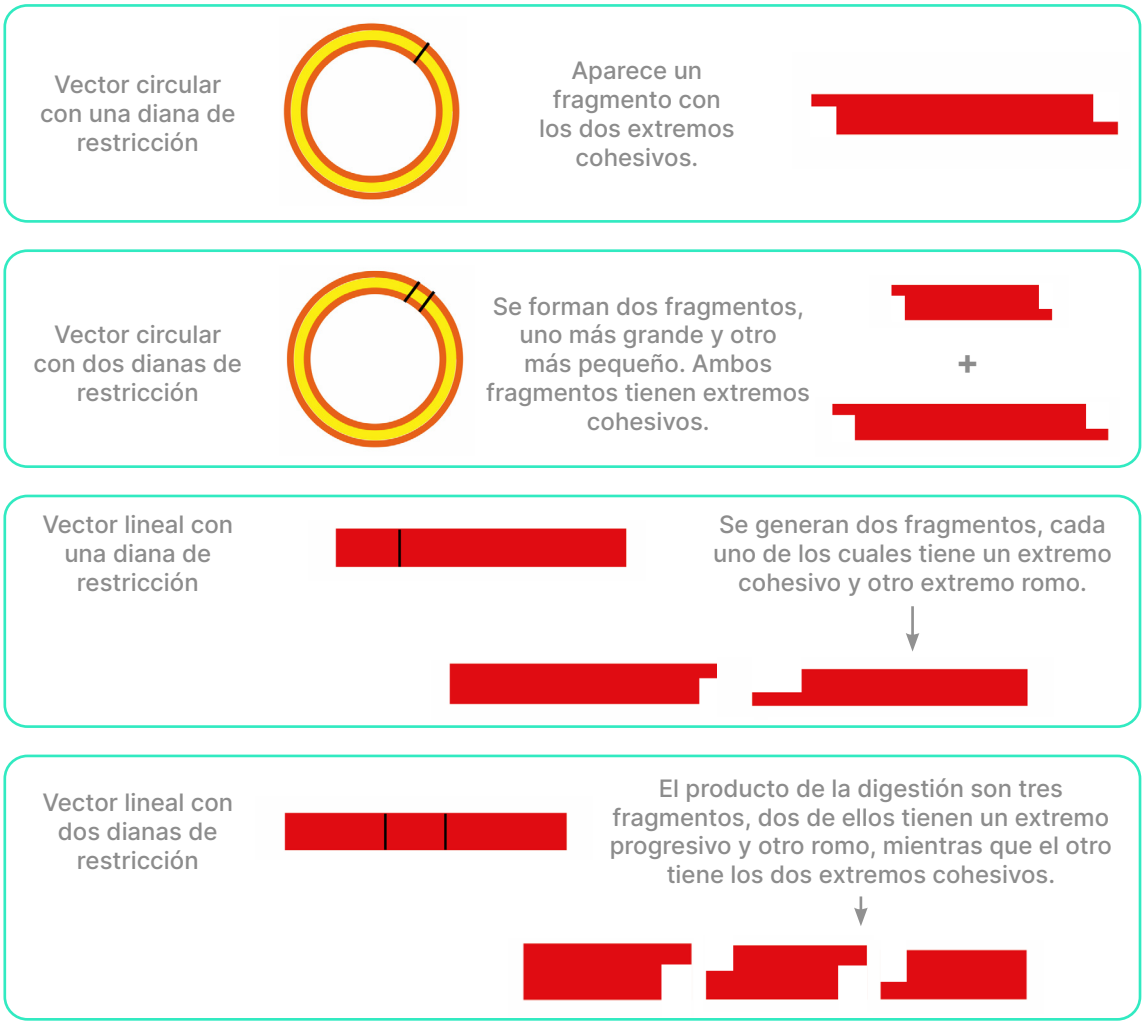
Es necesario **seleccionar** el vector de clonación que se va a utilizar para introducir en él el fragmento de ADN que se desea clonar (puedes consultar los diferentes vectores de clonación en el epígrafe 1 de esta Unidad).

La preparación del vector seleccionado para la clonación incluye estos pasos:

1. **Corte con enzimas de restricción**. Las endonucleasas de restricción utilizadas deben ser las mismas con las que se digirió el inserto, ya que los extremos del vector y del inserto deben ser complementarios.

2. **Desfosforilación del vector**. La incubación con fosfatasa alcalina bovina de origen intestinal o fosfatasa bacteriana elimina los grupos de fosfato 5’ de la cadena de ADN para impedir la autoligación del vector.

3. **Purificación del vector**. Se deben eliminar todas las enzimas y sales procedentes de la reacción de digestión mediante alguna de las técnicas de purificación.



Esquema 4. Corte con enzimas de restricción.

Una vez que el vector de clonación está preparado, el inserto de ADN se une con la ayuda de una enzima *ADN ligasa* que tiene la capacidad de formar **enlaces fosfodiéster** entre el fragmento de ADN exógeno y el vector. Esta nueva molécula creada recibe el nombre de *ADN recombinante*, ya que está formada por fragmentos de ADN de **organismos diferentes**.

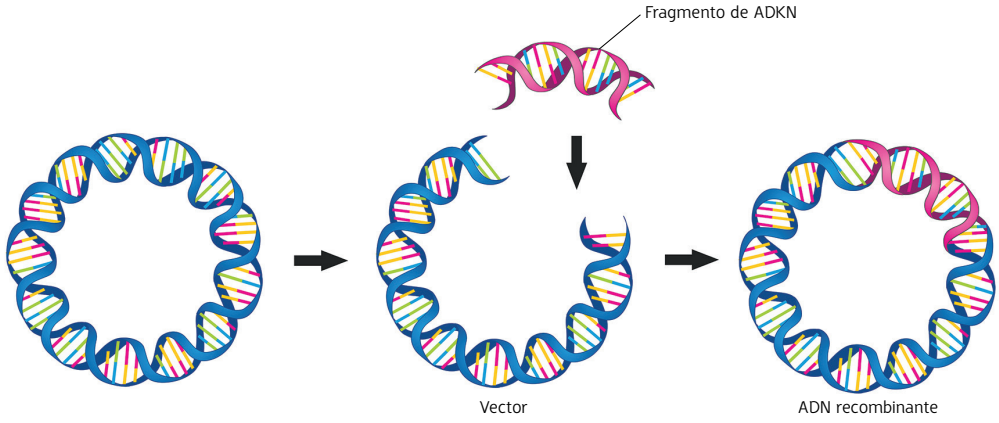


Fig. 5. Proceso de creación de un vector de ADN recombinante mediante la ligación del ADN del vector con ADN exógeno (enzima ADN ligasa).

2.2. Transferencia del ADN a la célula huésped

La transferencia del vector de clonación a la célula huésped es un paso clave en la clonación del ADN después de los tratamientos de digestión con enzimas de restricción y ligación. Existen diferentes métodos para incorporar una molécula de ADN al interior de la célula (Esquema 4):

CÉLULA	MÉTODO		CARACTERÍSTICAS
Procariota	Transformación	Por choque térmico	Se agregan moléculas de $CaCl_2$, y los **iones calcio** neutralizan las cargas de las moléculas y disipan las fuerzas de repulsión. Luego se aplica un **choque térmico** que fomenta la formación de poros y el ADN penetra con mayor facilidad. Al volver a condiciones normales la membrana se regenera. La capacidad de penetración es limitada.
		Por Electroporación	Al aplicar **choques eléctricos** a las bacterias se provoca la formación de poros en la membrana por los que puede penetrar el ADN. El problema es que muchas células no soportan el choque eléctrico y mueren.
	Transducción		Los **virus** que contienen el ADN recombinante pueden **infectar** a las células hospedadoras. Después de que el virus la infecta, el ADN extraño se incorpora al ADN genómico de la célula.
Eucariota	Transducción		
	Transfección	Con fosfato cálcico	Si se añade Ca3(PO4)2 el ADN exógeno forma un **precipitado** al contactar con los iones calcio, lo que provoca que la célula lo introduzca por endocitosis. Aunque la eficacia del proceso es baja y el gen se expresa poco no provoca toxicidad en las células.
		Por liposomas	Los **liposomas** son vesículas huecas rodeadas de membrana lipídica que son capaces de introducir ADN exógeno en una célula. Son capturados por la célula mediante endocitosis y el tamaño de ADN introducido no tiene límite. Generan cierto grado de toxicidad celular y pueden ser inhibidos por componentes séricos.
		Por microinyección	Se inserta mecánicamente material genético en una célula usando una **aguja muy fina** en el núcleo celular. Es una técnica laboriosa y compleja que necesita células aisladas.
		Por electroporación	Es igual que en las procariotas con la diferencia de que se usan **soluciones que contienen sales y nutrientes** para mantener la viabilidad celular durante y después del proceso.

Tabla 5. Métodos de introducción del vector en la célula hospedadora.

2.3. Selección e identificación de clones recombinantes

DEFINICIÓN

La **identificación** de las que se han transformado con el vector recombinante es necesaria tras la incubación de las células con los vectores para lo que se recurre a los **marcadores de identificación.** En algunos casos, se requiere un paso previo de **selección** de las células que han incorporado el vector (sea recombinante o no) usando **marcadores de selección**.

A. Genes de resistencia a antibióticos

Una estrategia para poner de manifiesto la presencia de colonias transformadas consiste en usar vectores que contengan genes de resistencia a antibióticos. Cuando las bacterias se cultivan en un medio con antibióticos, solamente podrán crecer aquellas que contengan el vector puesto que les confiere la resistencia para poder desarrollarse.

Por otro lado, si un gen de resistencia tiene un sitio de inserción, cuando la enzima de restricción lo corta y se incorpora en ese punto del ADN extraño, el gen quedará inactivado y se perderá la resistencia al antibiótico volviéndose sensibles al mismo las bacterias.

Los antibióticos más usados son la **ampicilina** y la **tetraciclina,** y una forma de aplicar estos genes marcadores es introducir los dos genes en el vector, y que uno de los dos tenga una diana de restricción para la enzima que se use para el experimento de clonación.

Estos procedimientos se pueden utilizar para **seleccionar** o **identificar** las bacterias de interés.

Tras incubar la célula hospedadora con el vector de clonación podemos distinguir entre los siguientes tipos de células:

- **células no transformadas:** no han incorporado el vector de clonación y son sensibles a los dos antibióticos.
- **células transformadas no recombinantes:** han incorporado el vector de clonación no recombinante, que no lleva el inserto, y por tanto los genes que confieren la resistencia a los antibióticos por lo que son resistentes a los dos antibióticos.
- **células transformadas recombinantes:** han incorporado el vector de clonación recombinante, que sí lleva el inserto, por lo que un gen de resistencia se ha inactivado por el ADN extraño, de forma que no es operativo, no confiere resistencia.

B. Estrategia cromogénica

Se basa en el uso de plásmidos que contienen dos genes:

- gen de resistencia a antibióticos que permite la selección, porque sirve para conocer qué bacterias se han transformado (han incorporado) el plásmido.
- gen LacZα que codifica para la enzima β-galactosidasa y tiene un contiene un *polylinker*. Este gen sirve para identificar las colonias recombinantes.

Cuando el vector plasmídico se trata con una enzima de restricción que reconoce la diana en el *polylinker* y luego se inserta el ADN extraño que se quiere clonar, se interrumpe la secuencia del gen LacZα y la bacteria no puede degradar el sustrato cromogénico, por lo que no se produce el producto coloreado.

El reactivo cromogénico que se usa es el **X-Gal,** de color blanco, que es transformado por la β-galactosidasa en una sustancia de color azul, y el sistema se conoce como **Blue-White Screening.**

Las células recombinantes son resistentes a un antibiótico y además no pueden degradar el X-Gal, por lo que dan lugar a colonias de color blanco, no generan el pigmento azul.

C. Proteínas fluorescentes

La síntesis de proteínas fluorescentes es un recurso para los experimentos de clonación. En este caso se emplean plásmidos que tienen dos genes:

- gen de resistencia antibióticos que permite la selección de los clones transformados, que se hacen resistentes y pueden crecer en medios con antibióticos.
- gen **GFP** que codifica para una proteína fluorescente de color verde, que sirve para identificar las colonias gracias a que contiene un *polylinker*.

Si una célula se transforma con el vector de clonación se vuelve resistente a un antibiótico, y además será capaz de producir colonias fluorescentes gracias a la GFP. Esto ocurre cuando el vector que ha captado la bacteria no es recombinante, ya que si el inserto está presente se rompe la secuencia del gen GFP lo que hace imposible producir la proteína GFP y las colonias resultantes de las bacterias transformadas recombinantes no serán fluorescentes. Por lo tanto, las bacterias transformadas recombinantes (que llevan el ADN extraño) serán resistentes a un antibiótico y sus colonias no producirán fluorescencia.

2 CASO PRÁCTICO



CÁLCULO DE LA CANTIDAD DE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Para un experimento de clonación en nuestro laboratorio, necesitamos digerir una muestra de ADN con una enzima de restricción. Tenemos 100µL de disolución de ADN a una concentración de 275 µg/mL y vamos a usar 20µL de la misma, para tratarla con un reactivo que contiene 2500 u/mL de *HindIII*. Sabiendo que se deben usar 5 10 unidades de enzima por cada µg ¿Qué volumen de enzima deberíamos utilizar?

SOLUCIÓN

Primero debemos calcular la cantidad de ADN necesaria. Como la concentración de la disolución de ADN es 275 µg/mL Cantidad de ADN = (volumen de disolución de ADN) x(concentración de la disolución ADN)=20 µLx275 µg/mL=5500 µg.

Luego tenemos que saber qué cantidad de enzima necesitamos en µg. Dado que necesitamos 10 unidades por cada 5 µg de ADN y tenemos 5500 µg de ADN tenemos que hacer el siguiente cálculo:

Cantidad de enzima=(5500 µg/5 µg) 10 unidades=1100 unidades

Finalmente calculamos el volumen de enzima sabiendo que la concentración de la misma son 25000 u/mL:

Volumen enzima=(1100 u/(2500 u/mL))=4,4µL

03 Genotecas y mapas del genoma

Una **genoteca** es una colección desordenada de clones de una célula huésped en la que hemos introducido, mediante vectores de clonación adecuados, el genoma del organismo de interés en forma de trozos aleatorios.
En la Figura 6 se representa el proceso de **construcción** de una biblioteca genómica.

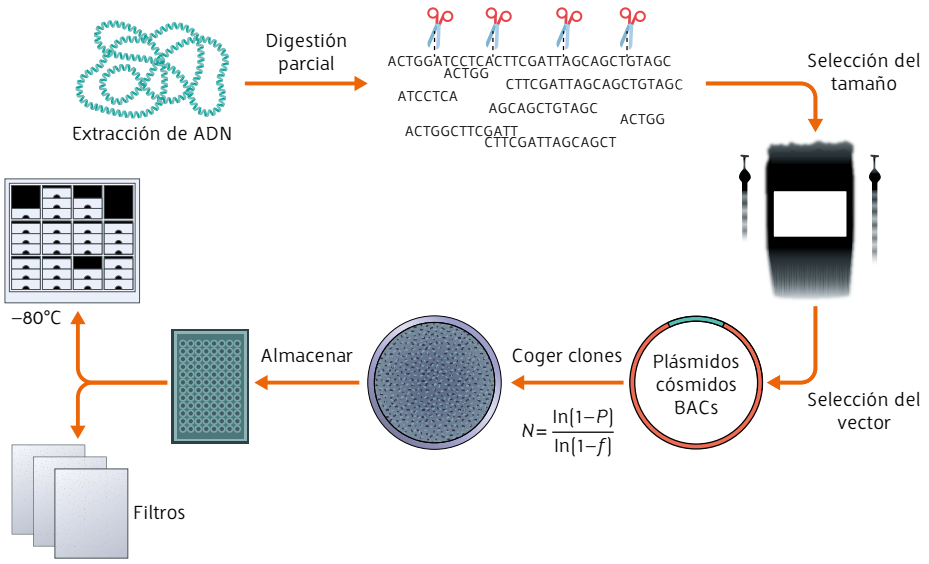


Fig. 6. Construcción de una biblioteca genómica.

Se distinguen dos tipos fundamentales de genotecas: genoteca genómica y genoteca de expresión (véase la Esquema 5).

Genoteca genómica

Está construida con el ADN genómico **total** de un organismo, es decir, contiene **todos** los genes de ese organismo.
Se suelen utilizar vectores de alta capacidad como fagos, cósmidos, BAC o YAC.

Genoteca de expresión

Contiene todos los ADN **complementarios** obtenidos a partir del ARNm que se está expresando en un tipo celular y en un estado metabólico concreto.
Es decir, representan solo **una parte** de los genes de un organismo.
Se parte del ARNm de unas células determinadas y se realiza una transcripción inversa con una enzima retrotranscriptasa.

Genoteca cromosómica	Una **genoteca cromosómica** contiene fragmentos de ADN derivados de un solo cromosoma específico del organismo. Se utiliza para estudiar genes y secuencias específicas de ese cromosoma en particular. Es útil cuando el interés se centra en una región cromosómica específica o en genes localizados en un solo cromosoma. Son convenientes cuando se conoce en qué cromosoma se encuentra el gen.

Esquema 5. Tipos de genotecas: genoteca genómica y genoteca de expresión.

IMPORTANTE

Para la **construcción** de genotecas se necesita realizar diferentes técnicas de genética molecular vistas en otras Unidades, como la extracción de ácidos nucleicos, la digestión con enzimas de restricción, la clonación y la electroforesis.

Los pasos que se deben seguir para la construcción de bibliotecas génicas son los siguientes.

A. Extracción del ADN

El primer paso es la **obtención** de ADN de calidad. Es importante la **purificación** para evitar la presencia de contaminantes que puedan inhibir las reacciones enzimáticas. Se comprobará la calidad de ADN tanto en el espectrofotómetro como en gel de agarosa y se determinará su concentración (véase la Unidad 5).

B. Fragmentación del ADN

Es necesaria la fragmentación de ADN genómico en trozos más pequeños. El tamaño de estos fragmentos dependerá del vector que se vaya a utilizar.

Para la fragmentación, el método que se utiliza son **enzimas de restricción** de tipo II con dianas conocidas.

La fragmentación enzimática presenta el inconveniente de que, como las dianas de corte no están repartidas equitativamente por todo el genoma, se pierde parte del genoma. Para evitar esto, es necesario utilizar diferentes enzimas de restricción.

C. Construcción de la genoteca mediante clonación

Las primeras genotecas utilizadas para la secuenciación de genomas se basaban en el uso de **vectores de clonación**. Aunque con el avance de las técnicas de biología molecular cada vez se utilizan menos, todavía siguen siendo clave para la obtención de genomas con gran cantidad de secuencias repetitivas.

La **elección** del vector utilizado depende de:

- El tamaño total del genoma del organismo.
- La capacidad de carga del vector.
- El tamaño de la genoteca que se desea construir.

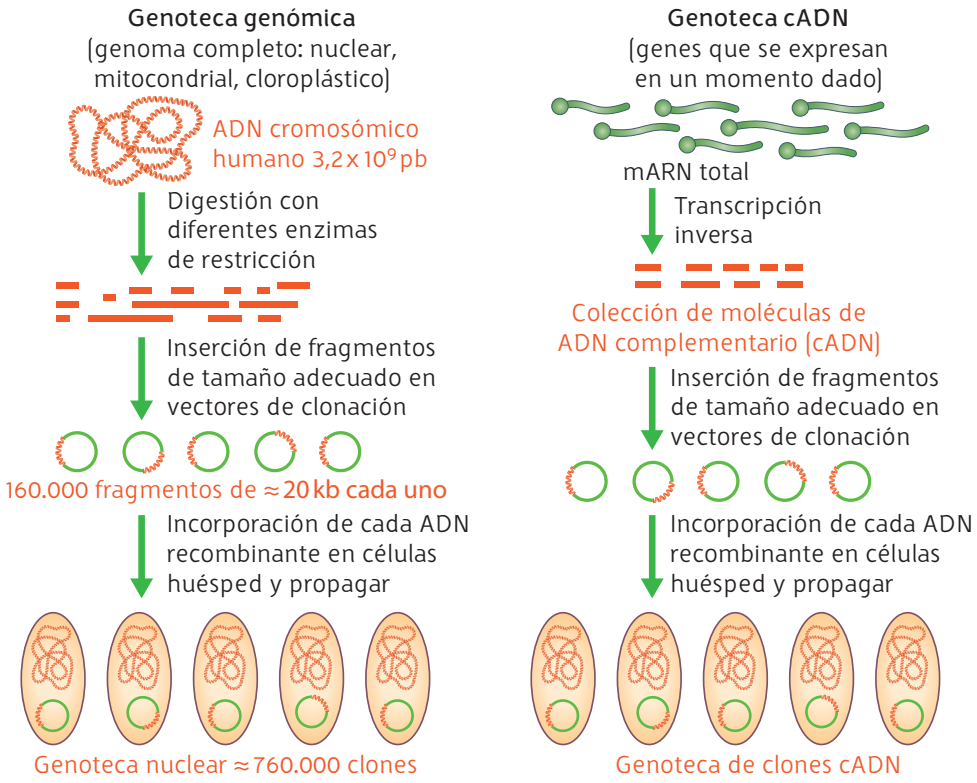


Fig. 7. Tipos de genotecas y procedimiento de creación.

D. Almacenamiento de la genoteca

Se almacenan los clones de manera independiente después de determinar el número de clones que formarán la genoteca.

Si las células huésped son bacterias, se pueden almacenar de **dos formas** diferentes:

- Seleccionar un número determinado de bacterias y cultivarlas en el medio adecuado en placas *microtiter* de 96 o 384 pocillos. De esta forma, se puede identificar la posición de cada fragmento en la placa, aunque se desconozca el orden concreto de cada fragmento dentro del genoma. Las placas con los clones se almacenan a una temperatura de −80°C.

- Copiar la genoteca en un filtro para identificar fragmentos de ADN mediante hibridación. Consiste en imprimir las bacterias en un *macroarray* de *nylon* con ayuda de robots especializados.

  La genoteca se puede almacenar en un **macroarray de nylon**. Una vez que han crecido las bacterias transformadas, estas se cultivan en placas de agar donde cada colonia representa un clon con un fragmento de ADN diferente del cromosoma original. Posteriormente las colonias se transfieren a una membrana de nylon permitiendo que las bacterias se adhieran a la membrana en posiciones específicas. Una vez adheridas las colonias se lisan mediante agentes químicos o calor para liberar el ADN clonado. Este ADN se debe desnaturalizar usando una solución alcalina para permitir la hibridación posterior. Los diferentes genes o fragmentos cromosómicos se identifican usando sondas marcadas.

E. Clonación de ácidos nucleicos

La clonación de ácidos nucleicos tiene actualmente múltiples aplicaciones en distintas áreas de conocimiento tan diversas como la **investigación aplicada** (en biotecnología o agricultura), la **medicina**, la **ciencia forense**, los **estudios antropológicos y evolutivos.**

En **investigación aplicada,** la clonación en vectores de expresión es especialmente interesante, ya que facilita la producción a nivel industrial de proteínas recombinantes, tales como:

- Proteínas de interés médico como la insulina, la hormona del crecimiento y el factor VIII.
- Proteínas de la industria química, como enzimas y catalizadores.
- Proteínas de interés medioambiental, como microorganismos capaces de metabolizar sustancias como el mercurio o el petróleo.

¿SABÍAS QUE...?

En el ámbito de la medicina, hay dos aplicaciones de la clonación molecular de especial interés:

- **Creación de ratones transgénicos:** estos ratones han tenido su ADN modificado, ya sea mediante la introducción de un nuevo gen o la eliminación de uno propio. Son cruciales para comprender enfermedades y desarrollar tratamientos. Hay dos tipos principales:
  - *Ratones knockout:* en ellos se desactiva un gen específico, ya sea eliminándolo o insertando otro gen que interrumpe su secuencia codificante.
  - *Ratones knockin:* son animales en los que un gen normal es reemplazado por otro mutado, permitiendo estudiar desde mutaciones en un solo aminoácido hasta sustituciones de cadenas polipeptídicas completas.
- **Terapia génica:** consiste en transferir genes normales a células somáticas para corregir enfermedades genéticas, con el objetivo de que las células tratadas produzcan el producto génico normal y eviten la necesidad de un tratamiento farmacológico continuo. Al igual que los OMG, la terapia génica está sujeta a un estricto control regulatorio.

3 CASO PRÁCTICO



ELECCIÓN DEL VECTOR Y DEL NÚMERO DE CLONES EN LA CONSTRUCCIÓN DE UNA GENOTECA

Una de las preguntas que te formulas antes de iniciar la construcción de una genoteca es: «¿qué vector de clonación debo utilizar?». Si, por ejemplo, vas a realizar una genoteca de un organismo con un tamaño de genoma muy grande y utilizas un plásmido como vector de clonación, necesitas un tamaño de genoteca muy grande que te va a resultar difícil de manejar.

Revisa la bibliografía e identifica los parámetros que tendrías en cuenta a la hora de elegir el vector de clonación a utilizar.

Si quieres construir una genoteca que contenga el genoma del *E. coli* (tamaño 4×10^6) representado dentro de un vector (plásmido, lambda, cósmido y BAC), ¿cuál será el número de clones de la genoteca?

SOLUCIÓN

Puedes ayudarte del siguiente artículo: Herramientas preliminares para la secuenciación de genomas: genotecas con vectores de clonación (https://bit.ly/3GQx616). Los parámetros principales que hay que tener en cuenta cuando se elige el vector de clonación son:

- El **tamaño total del genoma** del organismo.
- La **capacidad de carga del vector**.
- El **tamaño de la genoteca** que se necesita construir.

Según puedes ver en la tabla 1 en la página 7 del artículo, podemos localizar el genoma que queremos clonar, que tiene un tamaño de $4x10^6$ pb, para el cual podemos usar varios tipos de vectores. El tipo de vector deberá permitir que se cree una genoteca que tenga un número de clones no demasiado grande que no la haría manejable, ni demasiado pequeño ya que estaría repartido en pocos clones dificultando la localización de una región concreta, al estar junto con otras.

En el caso de *E. coli* (con un genoma de 4×10^6 pb), necesitaremos vectores que puedan contener fragmentos de diferentes tamaños para cubrir todo el genoma, así que podríamos considerar usar plásmidos para fragmentos más pequeños y cósmidos o BACs para fragmentos más grandes de forma que podamos construir una genoteca que contenga una amplia gama de fragmentos de ADN que cubran todo el genoma.

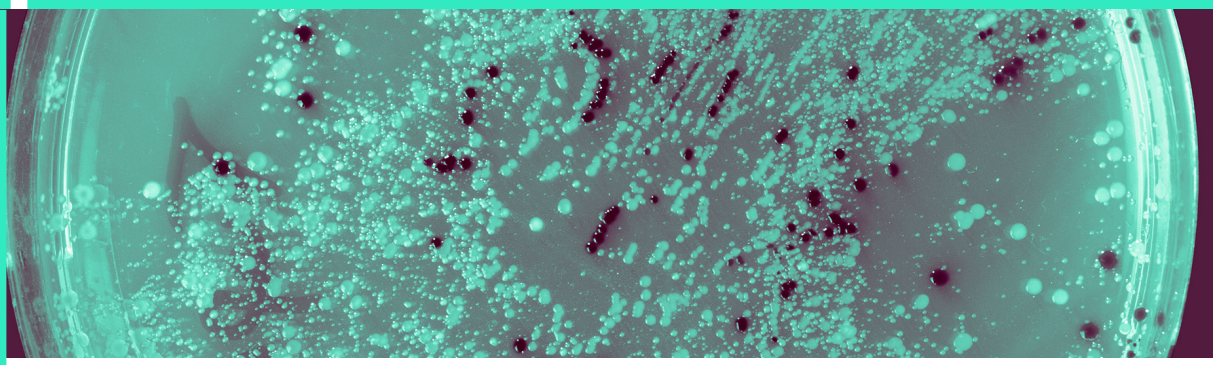
En cualquier caso, la elección del vector dependerá de factores como el tamaño del fragmento de ADN que deseas clonar, la facilidad de manipulación, la estabilidad y otros requisitos específicos para nuestro experimento.

Por otro lado, si solamente pudiésemos elegir solamente un tipo de vector, el más recomendable sería un cósmido, formando una genoteca de 450 clones, con un tamaño medio de inserto de 40 kb. Así podemos clonar una amplia variedad de fragmentos de ADN lo que garantizará una representación más completa del genoma.

Organismo	Tamaño del genoma (pb)	Vector	Tamaño medio del inserto (kb)	P	N.° de clones de la genoteca
E. coli	4 × 106	Plásmido	4	0,99	4.600
		Lambda	18	0,99	1.000
		Cósmido	40	0,99	458
		BAC	150	0,99	120

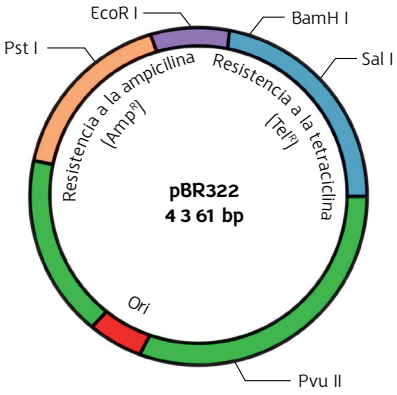
Anexo

1 CASO PRÁCTICO ADICIONAL



TIPOS DE BACTERIAS

Para un experimento de clonación usamos el vector pBR322. Tratamos el ADN extraño con la enzima *Sall* y el vector con la misma enzima, luego los incubamos y después los inoculamos en una cepa bacteriana que no es resistente a la ampicilina ni a la tetraciclina. A continuación sembramos una placa sin antibióticos, y las colonias que han crecido en esta placa las sembramos en otras dos placas, una con ampicilina y otra con tetraciclina. Explica qué tipo de bacterias crecen en cada una de las placas.



SOLUCIÓN

En la primera placa (sin antibióticos) crecen todas las bacterias. En la segunda placa (con ampicilina) crecen las bacterias transformadas porque el vector les confiere el gen de resistencia a la ampicilina. Y en la tercera (con tetraciclina) crecen las bacterias transformadas con vector no recombinante porque cuando se inserta el ADN extraño corta la secuencia del gen y se vuelve no funcional.

2 CASO PRÁCTICO ADICIONAL



EL PROCESO DE CLONACIÓN

En un proceso de clonación, se empleó el plásmido pGEM-GFP-URA3-GFP. El marcador yeGFP produce una proteína fluorescente. El ADN molde y el vector se trataron cada uno con *HpaI* por separado, luego se incubaron juntos y por último con una cepa bacteriana que no era resistente a la tetraciclina. Se sembró una primera placa con medio de cultivo sin antibiótico, y tras crecer en ella se sembraron en una segunda placa de Petri con tetraciclina.

¿Qué tipo de bacterias crecerá en cada placa?, ¿cómo podemos identificar las bacterias con el inserto de interés?

SOLUCIÓN

Necesitamos consultar en internet información sobre el plásmido para saber cuáles son las enzimas de restricción que tienen diana en el marcador, como por ejemplo esta web: https://bit.ly/4cLZaQ3

La enzima *HpaI* tiene una diana en el gen yeGFP.

En la primera placa crecerán todas las bacterias tanto transformadas como no transformadas.

En la segunda placa, las bacterias no transformadas no crecen porque no son resistentes al antibiótico que contiene. Se podrán distinguir dos tipos de colonias, unas fluorescentes formadas por bacterias no recombinantes que tienen íntegro el gen yeGFP y otras colonias no fluorescentes que han desarrollado las bacterias recombinantes que han perdido su capacidad de producir fluorescencia porque el gen yeGFP se ha interrumpido por el inserto.

3 CASO PRÁCTICO ADICIONAL



CLONACIÓN DE UN GEN

Se quiere clonar un gen que codifica para una proteína humana usando como vector de clonación el plásmido pUC18 y la cepa k12 de la *E. coli,* que es sensible a la ampicilina. Se sometieron a digestión con *BamHI* por separado el vector y el ADN problema. Los productos resultantes se incubaron posteriormente durante 2 horas a 25ºC y finalmente con las células competentes. Tras la última incubación, las bacterias se sembraron en dos placas simultáneamente, una sin antibióticos y otra con X-Gal y ampicilina. ¿Qué utilidad tiene la primera placa sin antibióticos que se sembró?, ¿Qué tipo de colonias deberían haber crecido en la segunda placa?

SOLUCIÓN

Sirven de control para comprobar que hay bacterias funcionales en la suspensión bacteriana de transformación.

Crecen solamente las bacterias transformadas porque el vector les confiere la resistencia al antibiótico ampicilina. Las bacterias transformadas con vector recombinante producen colonias blancas porque la inserción del ADN extraño interrumpe la secuencia del gen LacZα que sintetiza la enzima que degrada el X-Gal a un compuesto coloreado azul.

XTART

FP SALUD