CAPITULO 8

CLONAMIENTO

- CONSTRUCCION DE GENOTECAS
- CLONAMIENTO DE GENES
- CARACTERIZACION DE CLONES

Bibliografía

Para esta parte

Recombinant DNA

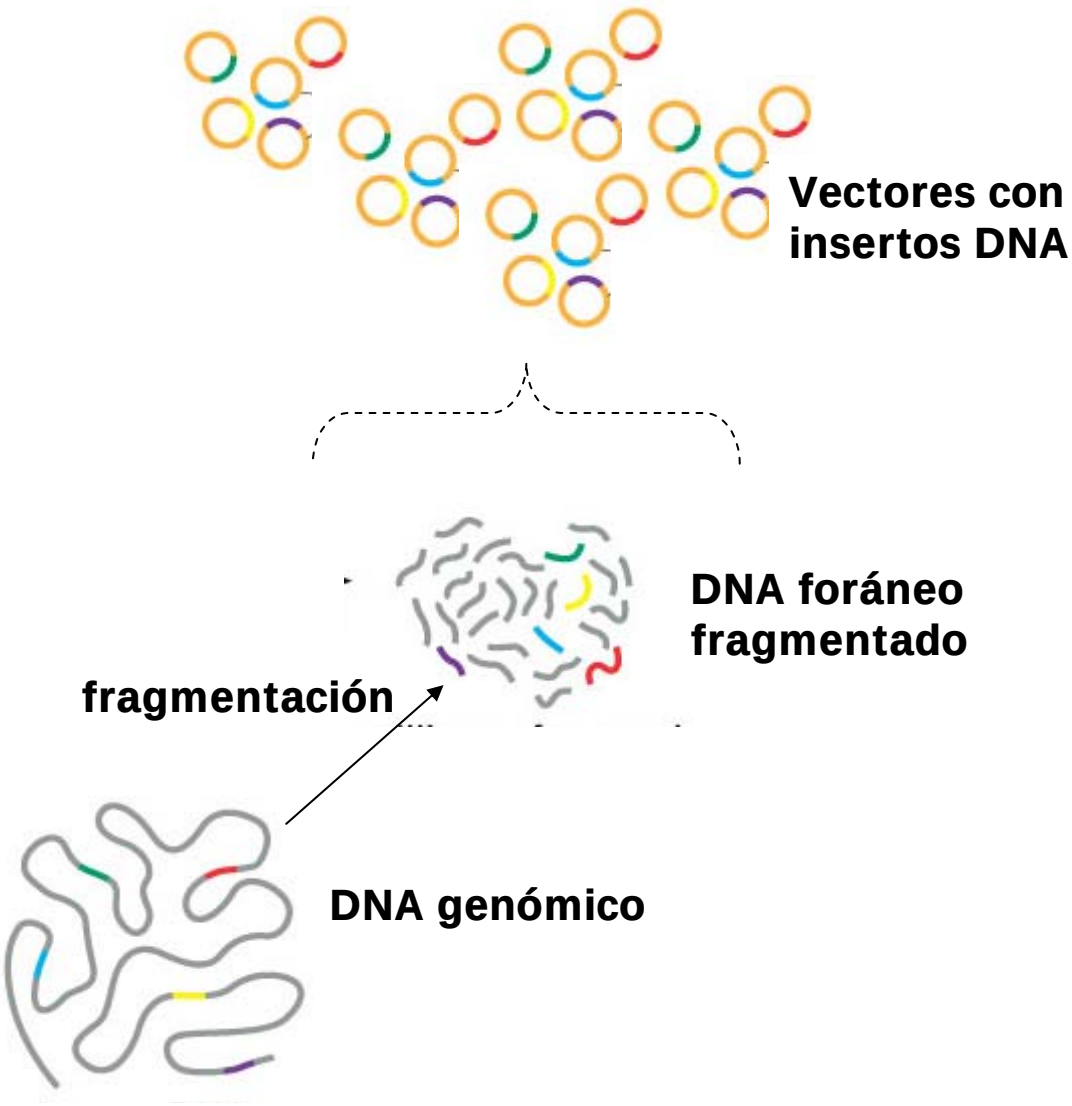
Watson JD, Gilman M, Witkowski JA , Zoller MJ

3º Edición (2007)

2º Edición

GENOTECA

Conjunto o colección de vectores recombinantes:



TIPOS DE GENOTECAS

Según la naturaleza del DNA foráneo que portan los vectores

- **DNA genómico (cromosómico)**
  El conjunto de recombinantes representa el genoma (cromosoma) completo de un individuo. Incluye DNA codificante y DNA no codificante

- **De cDNA**

  El conjunto de recombinantes representa sólo los genes expresados por un tipo celular o tejido, en una determinada circunstancia.

Genotecas de expresión (de uso restringido)

Los vectores permiten expresar la información genética "foránea" que portan los recombinantes (Obtención de productos génicos)

Inserto bajo el control de un promotor "apropiado"

Genotecas de DNA genómico (cromosómico)

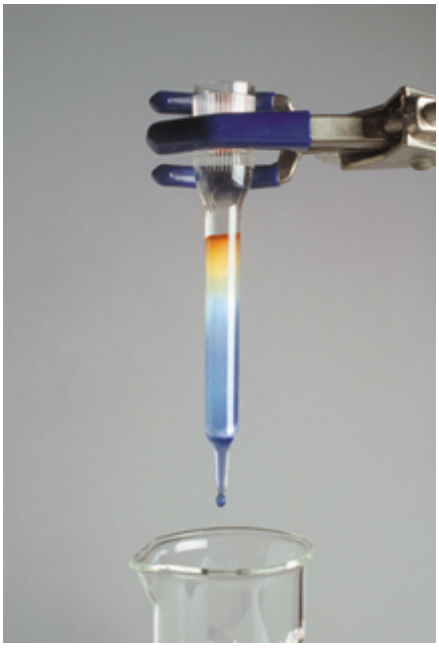
Insertos: fragmentos de DNA genómico (cromosómico)

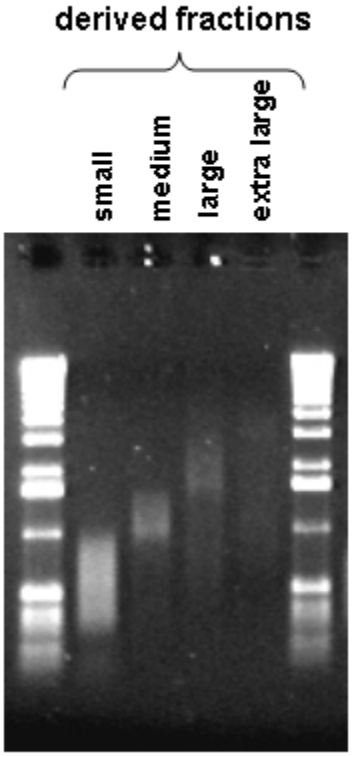
Generación de fragmentos: Endonucleasas de restricción

Mecánica (cizalla)

Sonicación

Selección de fragmentos según tamaño (tamices moleculares)



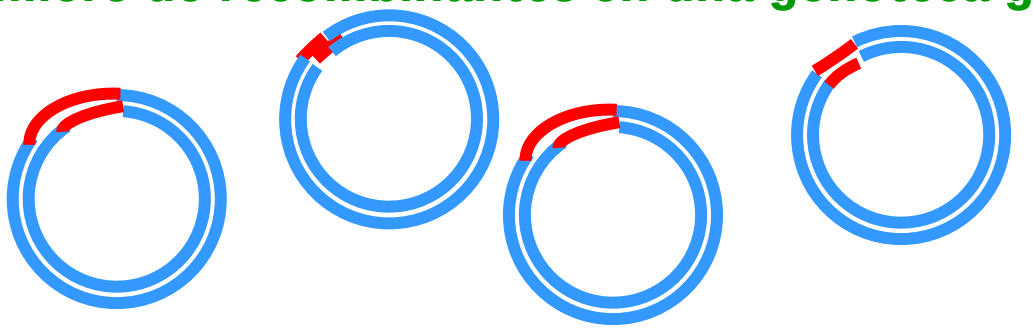


Vectores para construir una genoteca:

Elección acorde al tamaño de los insertos

Ej. Vectores lambda (Insertos hasta 17 Kpb)
Cosmidios (Insertos hasta 45 Kpb)

Número de recombinantes en una genoteca genómica:



Número de recombinantes necesarios para representar todo el genoma dependerá de:

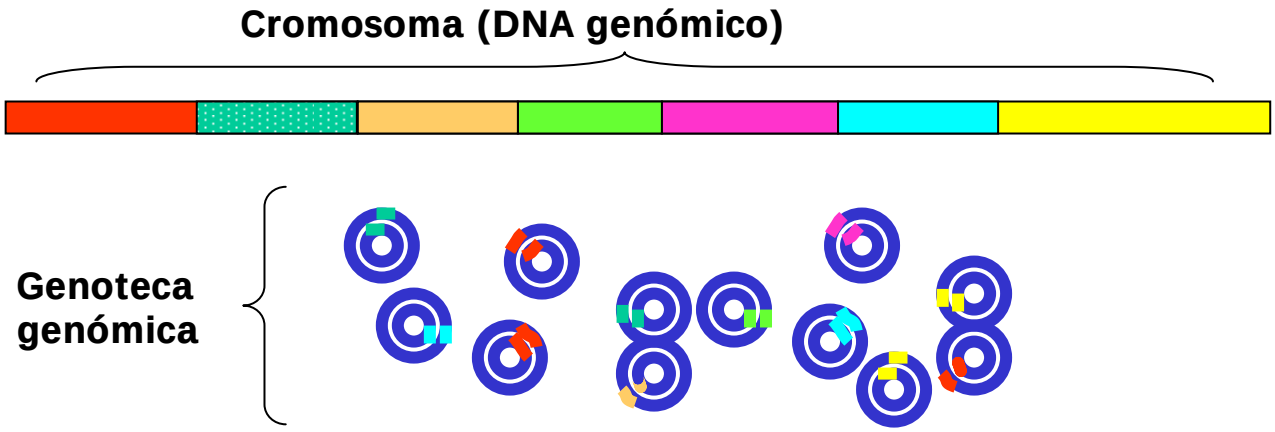
tamaño del genoma en cuestión

longitud promedio de los insertos

Probabilidad de encontrar un determinado segmento de DNA (una secuencia particular) en una genoteca que consta de N recombinantes independientes :

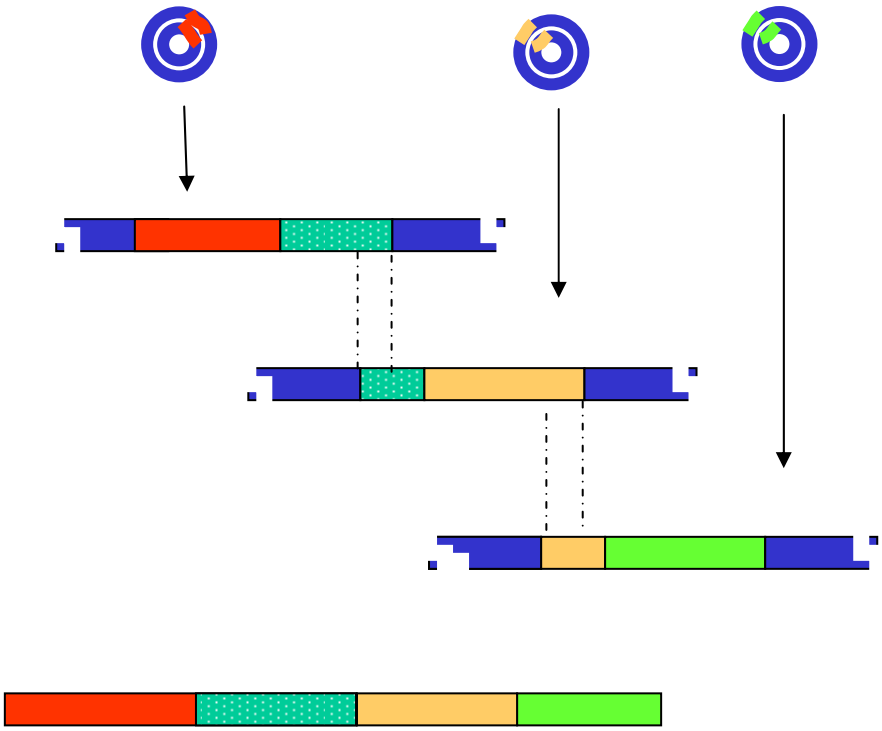
$$N = [\ln(1-P)] / [\ln(1-1/n)]$$

n= tamaño del genoma /tamaño promedio de los insertos

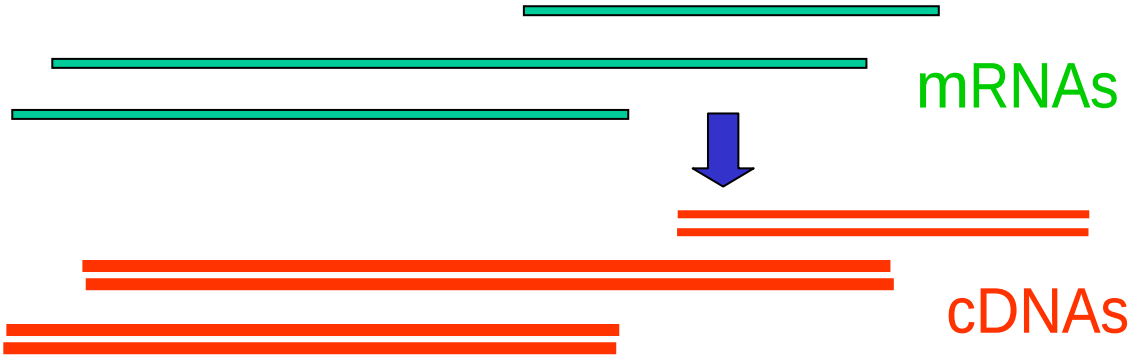


La secuencia del cromosoma se podría "reconstruir" a partir de los insertos de todos los recombinantes de la genoteca

.....se requiere cierto grado de superposición para alinear los insertos



Genotecas de cDNA



Obtención de los insertos:

Aislar transcritos (RNA que tiene poli A)

Sintetizar cDNA (partidores: oligo $dT_{15\text{-}18}$ o hexámeros de secuencia aleatoria)

Requisitos:

Preservar la integridad de los RNAs

Síntesis de cDNA completa

Adecuada representación de transcritos poco abundantes

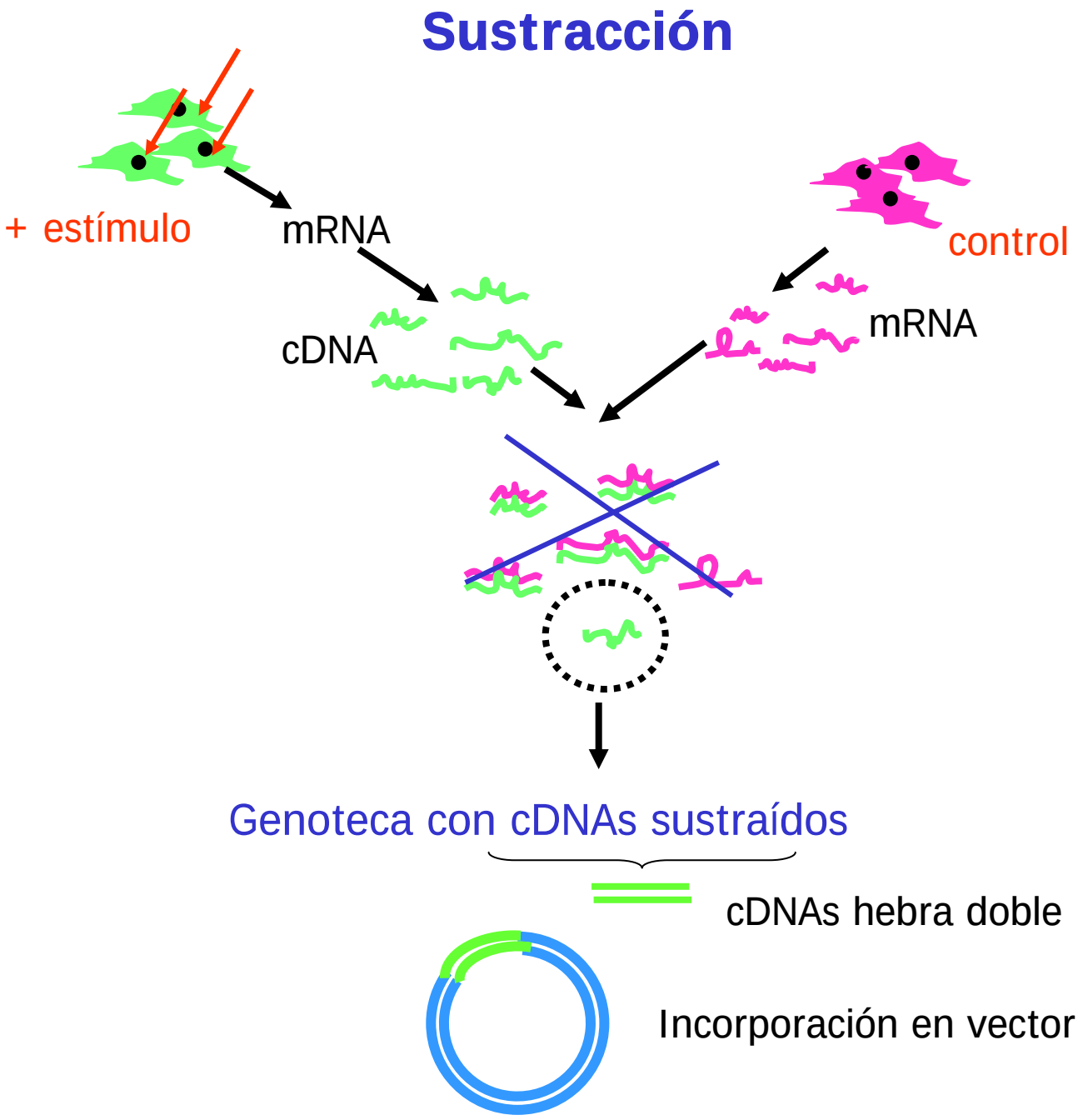
Vectores:

Frecuentemente, plasmidios o derivados del bacteriófago lambda (aceptan insertos hasta 10-17 Kpb)

Número de recombinantes: variable (impredecible)

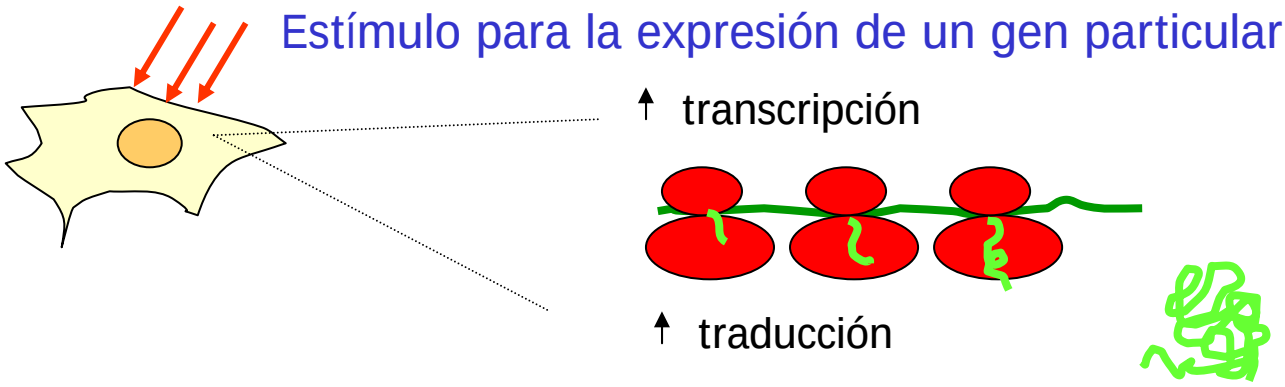
Según número de genes transcripcionalmente activos en un determinado tipo celular, en una condición particular.

Construcción de genotecas “enriquecidas” en un cDNA particular

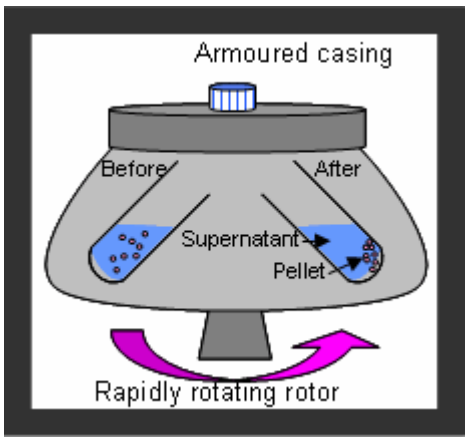


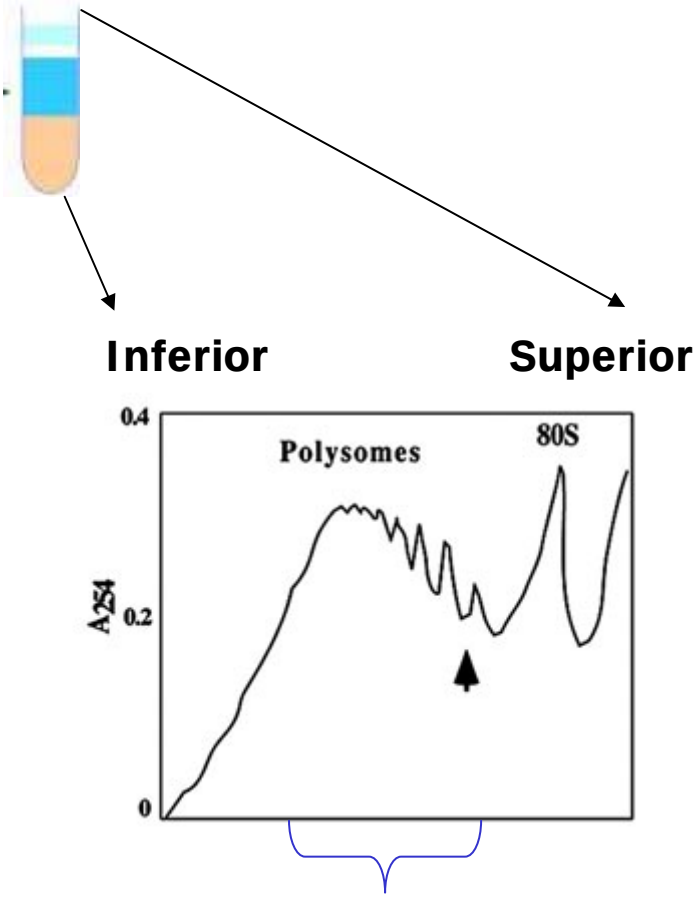
Genoteca enriquecida en los cDNAs que son poco abundantes en la célula

Construcción de genotecas “enriquecidas” en un cDNA particular



- **Aislar polisomas (centrifugación deferencial)**

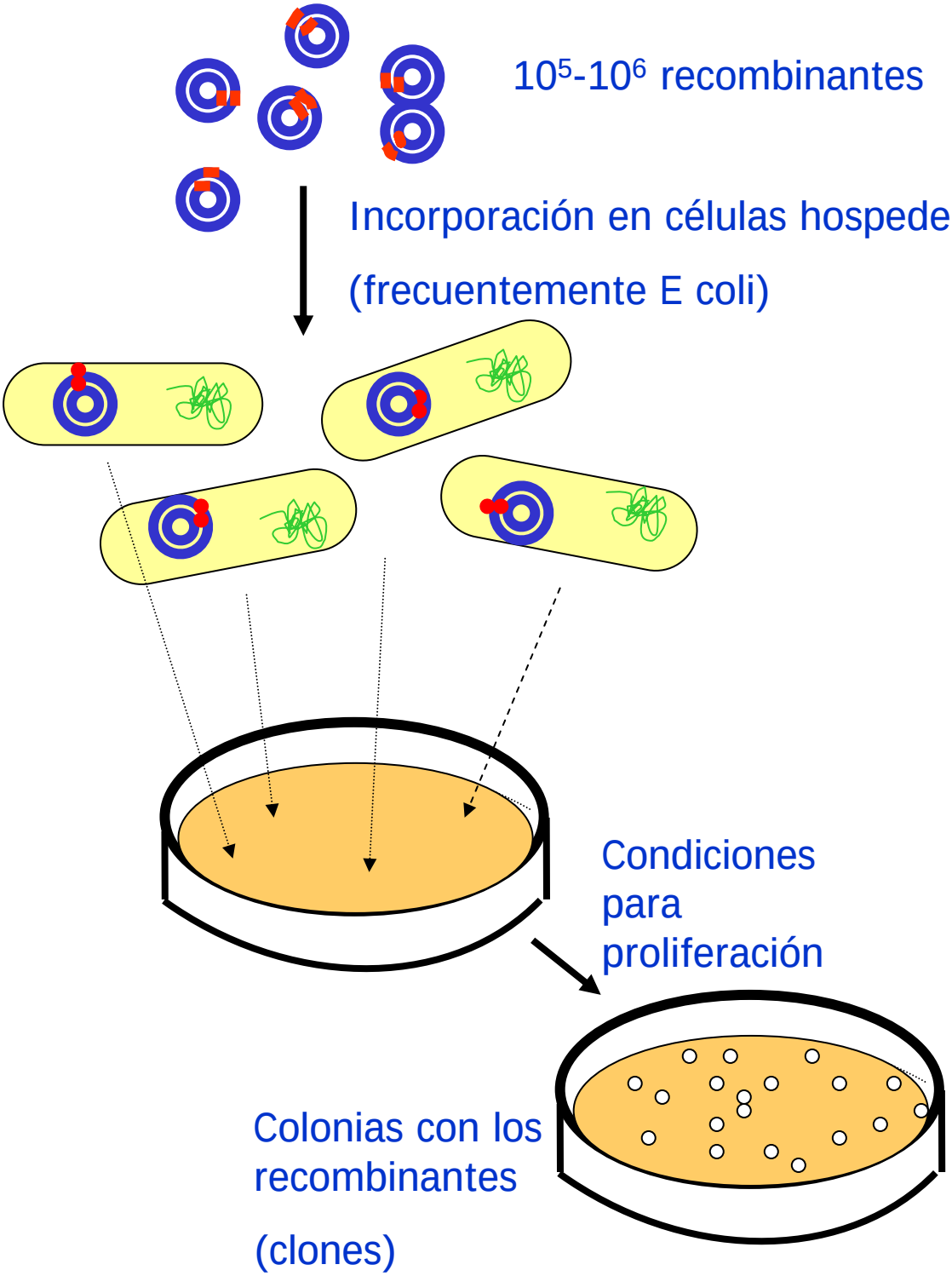




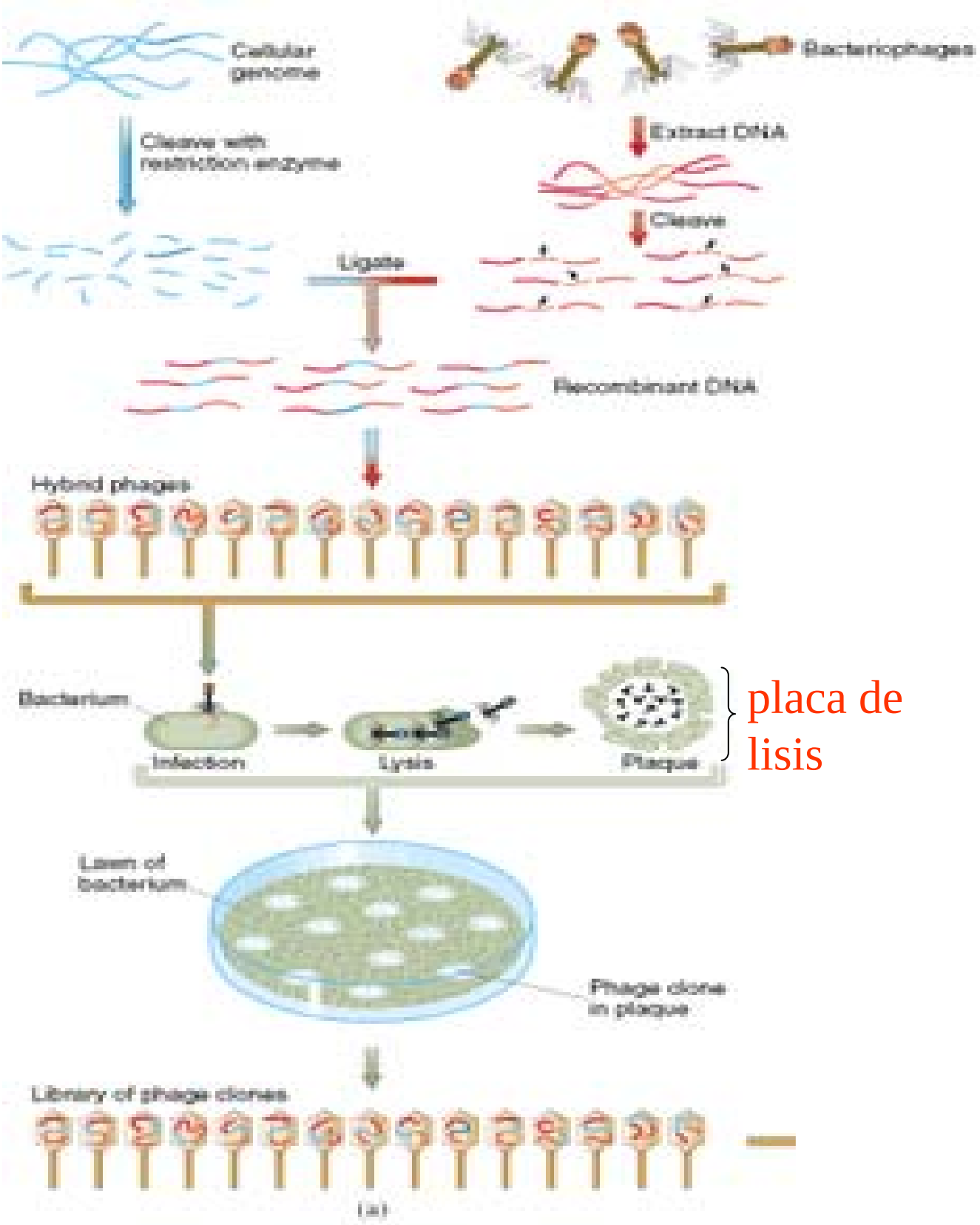
- **Extraer mRNA de fracción polisomal**
- **Síntesis de cDNA**
- **Construcción de genoteca “enriquecida”**

CLON: conjunto de células (individuos), genéticamente iguales, derivados de un progenitor único

Clonamiento de genes desde una genoteca

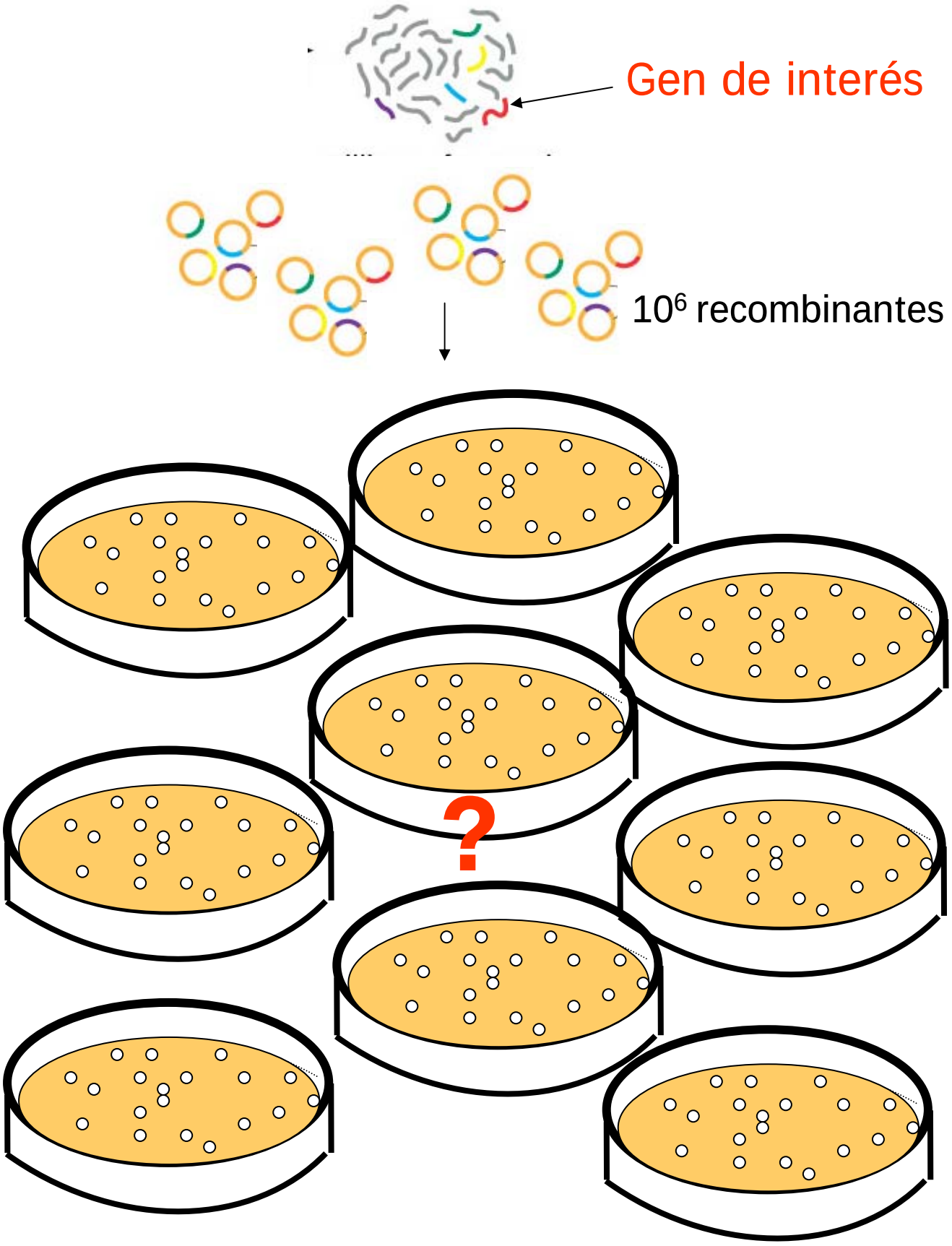


Genoteca en bacteriófago lambda



placa de lisis

Identificación del clon de interés en una genoteca

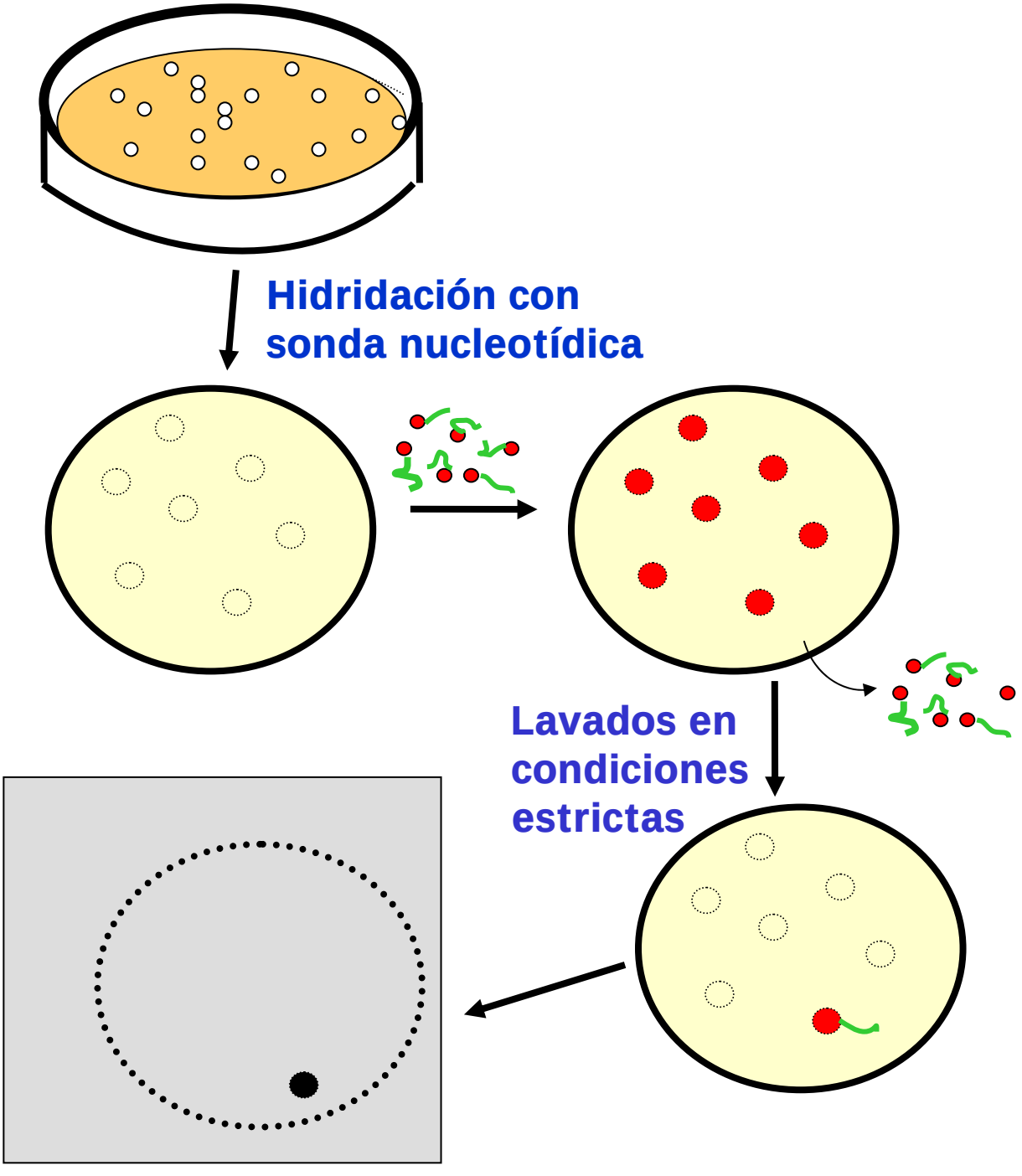


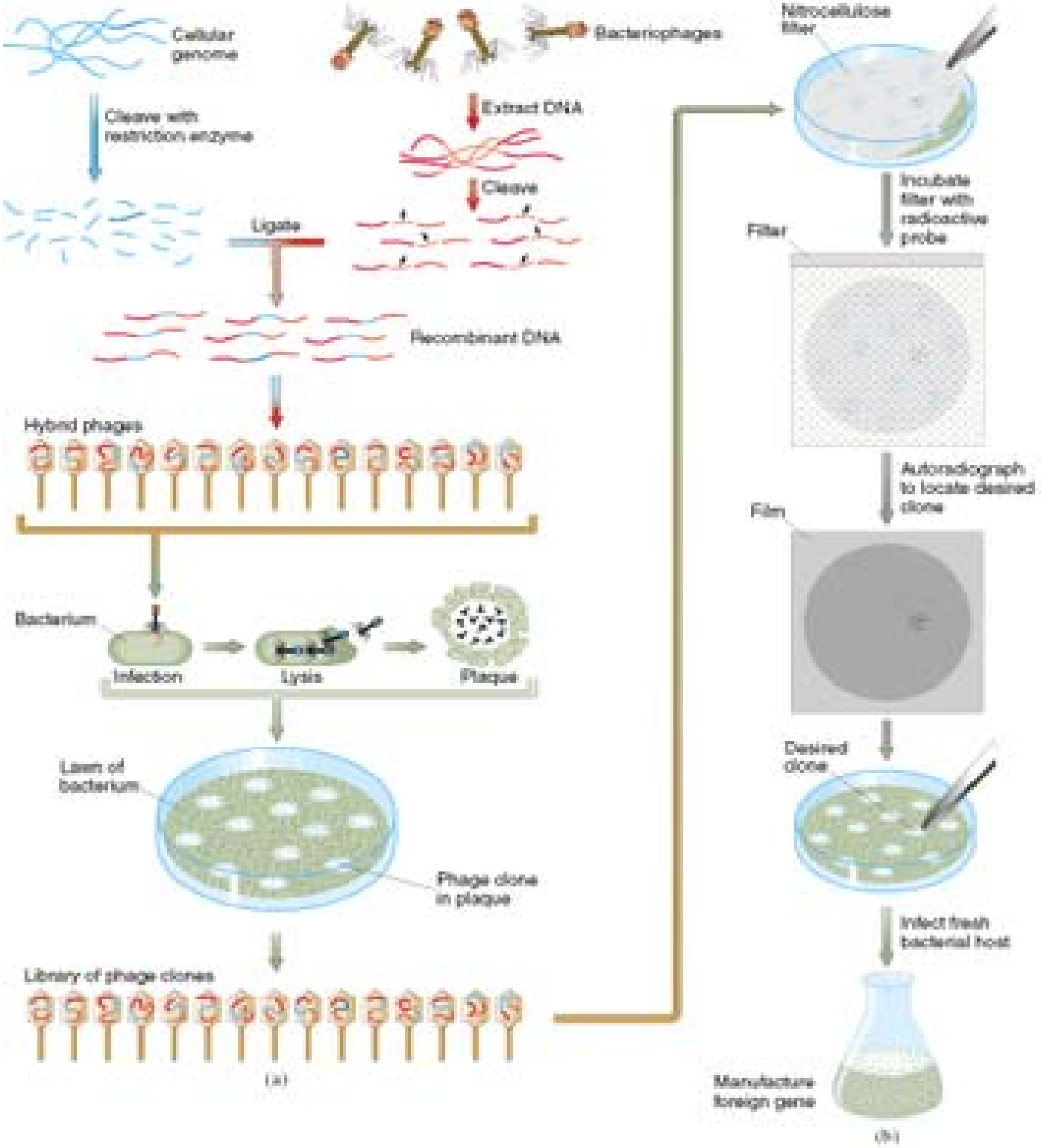
Identificación del clon de interés en una genoteca

Rastreo de una genoteca para identificar los clones de células que portan un DNA recombinante determinado

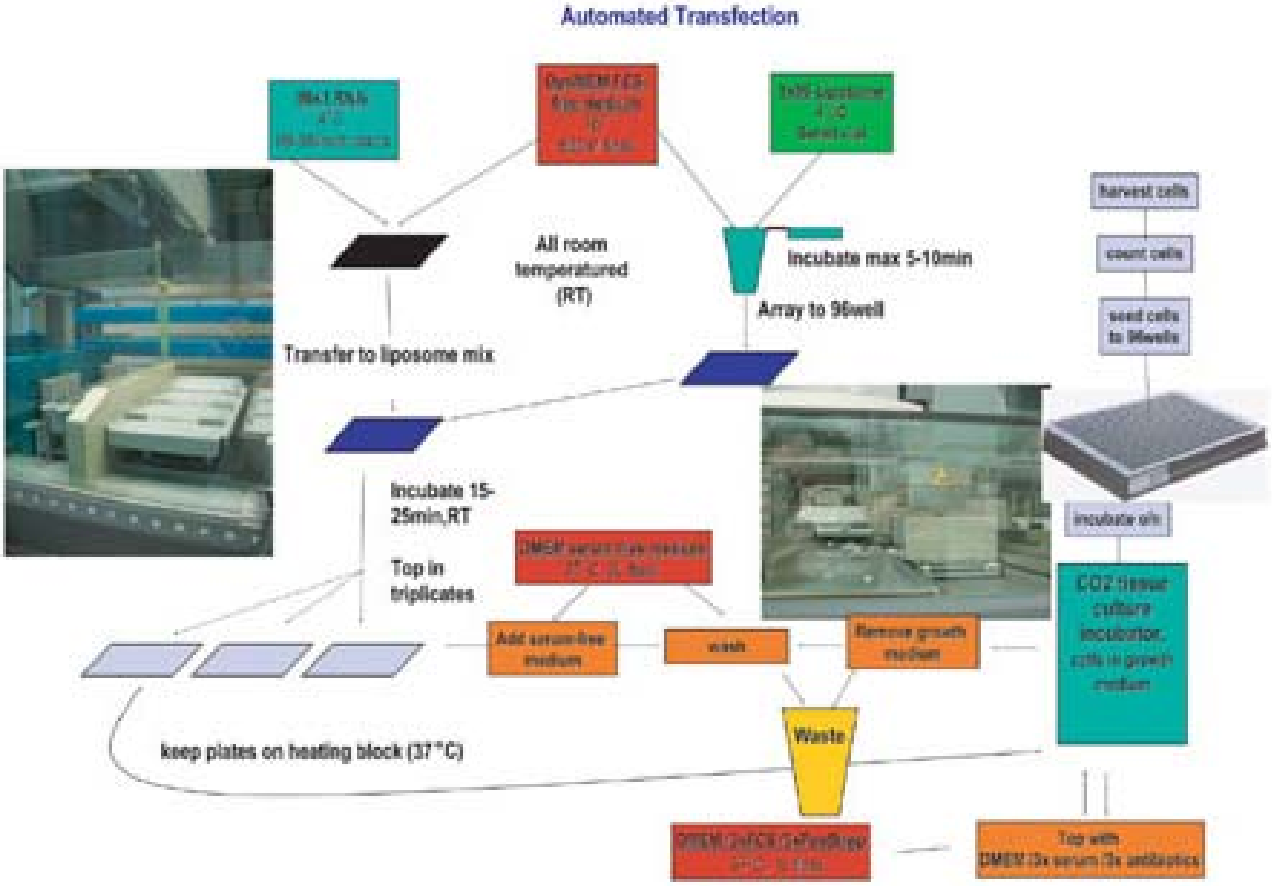
1.-Basado en secuencia nucleotídica de interés

(requiere conocimiento de la secuencia)




Cellular genome
Bacteriophages
Cleave with restriction enzyme
Extract DNA
Cleave
Ligate
Recombinant DNA
Hybrid phages
Bacterium
Infection
Lysis
Plaque
Lawn of bacterium
Phage clone in plaque
Library of phage clones
(a)
Nitrocellulose filter
Incubate filter with radioactive probe
Filter
Autoradiograph to locate desired clone
Film
Desired clone
Infect fresh bacterial host
Manufacture foreign gene
(b)

Automatización



Obtención de una sonda nucleotídica para rastreo de genotecas

- **Información: la proteína codificada por el gen**

……-Met - Gln - Lys - Phe - Asn-… secuencia prot.

```
                A     A     U     U
……AUG  CAG  AAG  UUC  AAC…
```

AUG CAA AAA UUU AAU
AUG CAG AAA UUU AAU
AUG CAG AAG UUU AAU
AUG CAA AAG UUU AAU
AUG CAG AAG UUU AAU
etc.

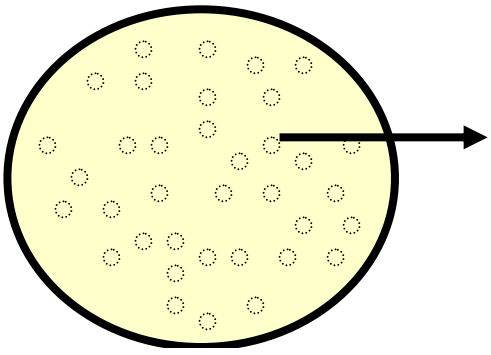
Guessmers: oligonucleotidos que codifican el polipéptido

↓

*** AUG CAA AAA UUU AAU**
*** AUG CAG AAA UUU AAU**
*** AUG CAG AAG UUU AAU**
*** AUG CAA AAG UUU AAU**
*** AUG CAG AAG UUU AAU**
*** n…**

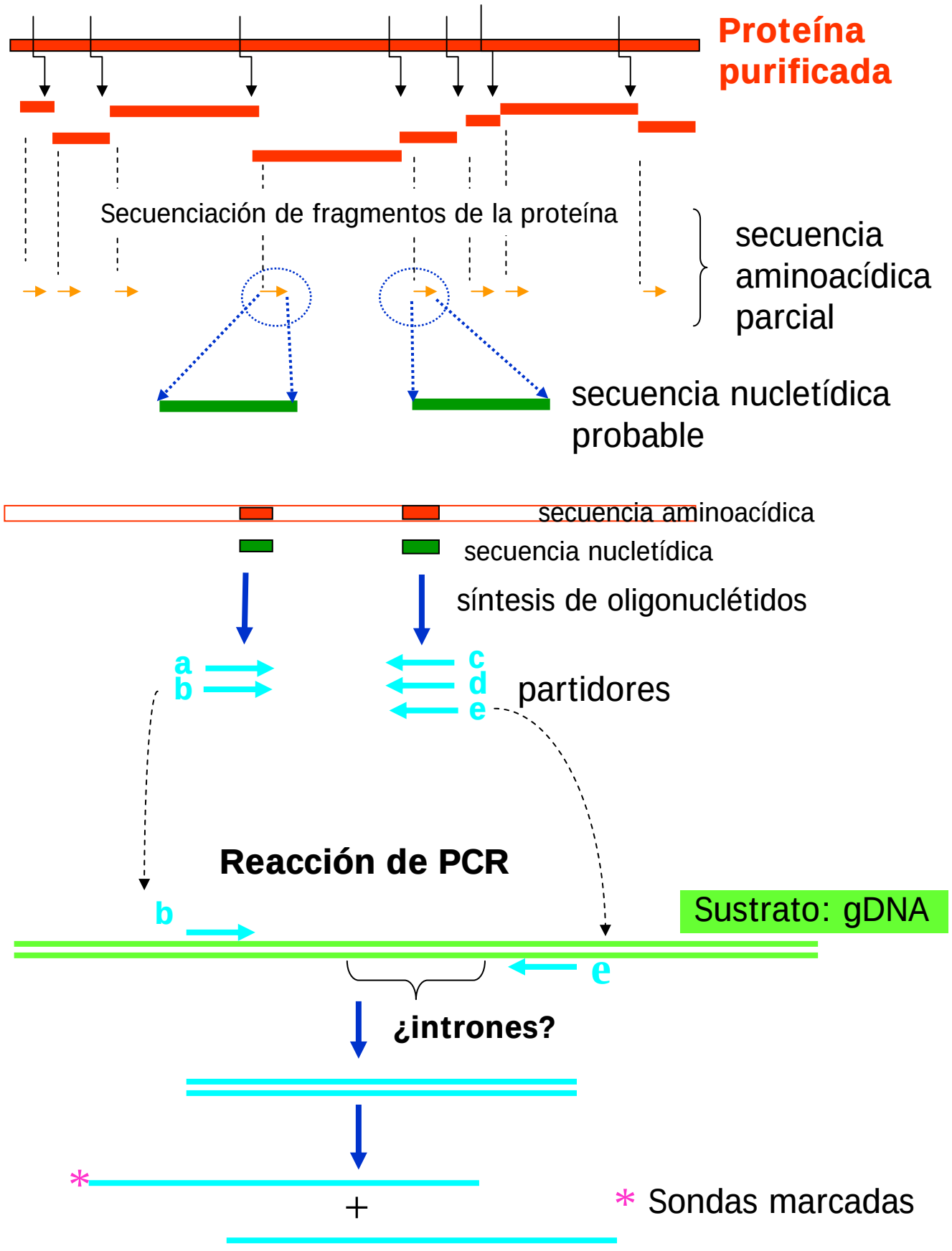
Síntesis química y marcación de los oligonucleótidos

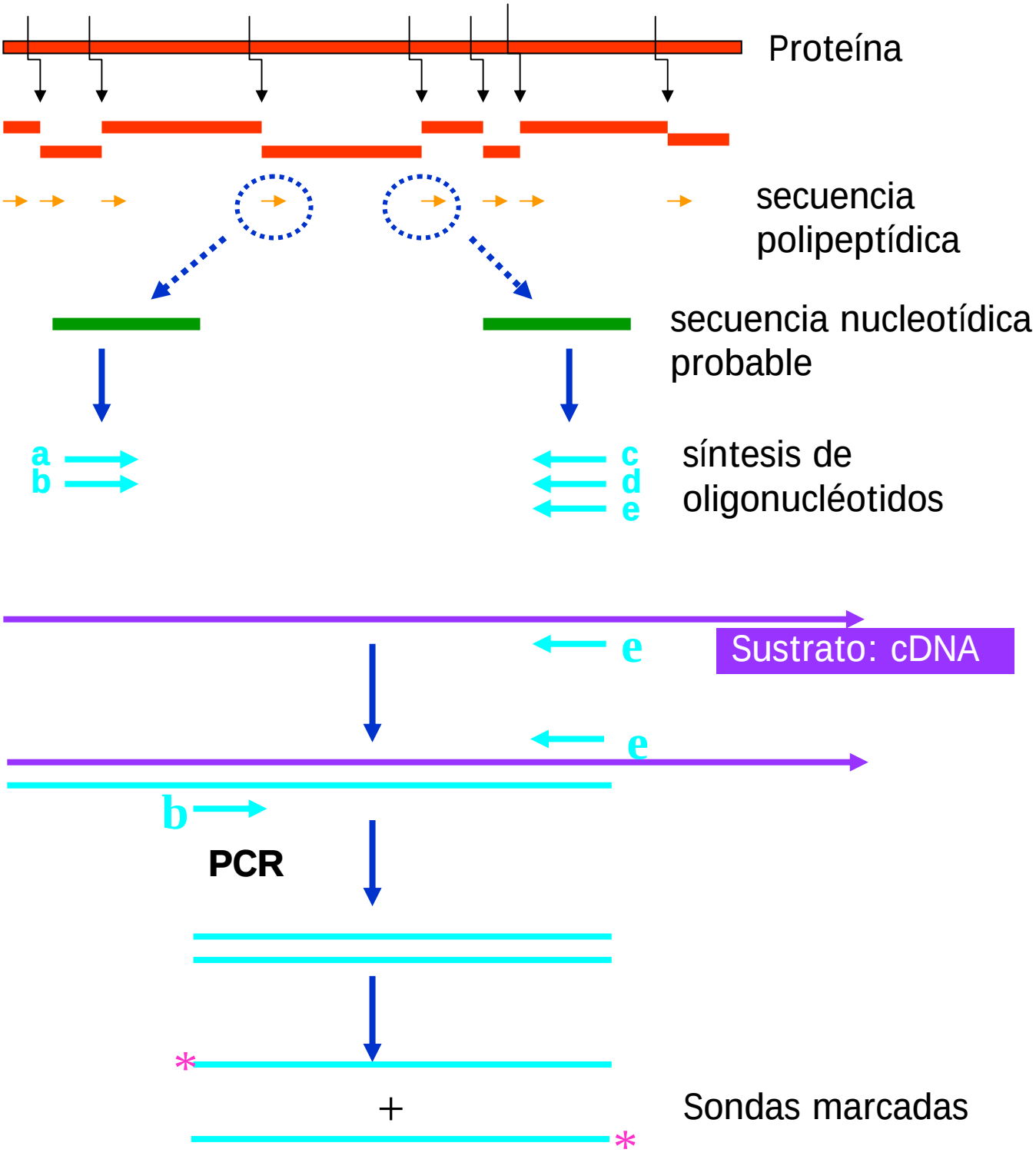
↓ sondas



*** AUG CAA AAG UUU AAU**

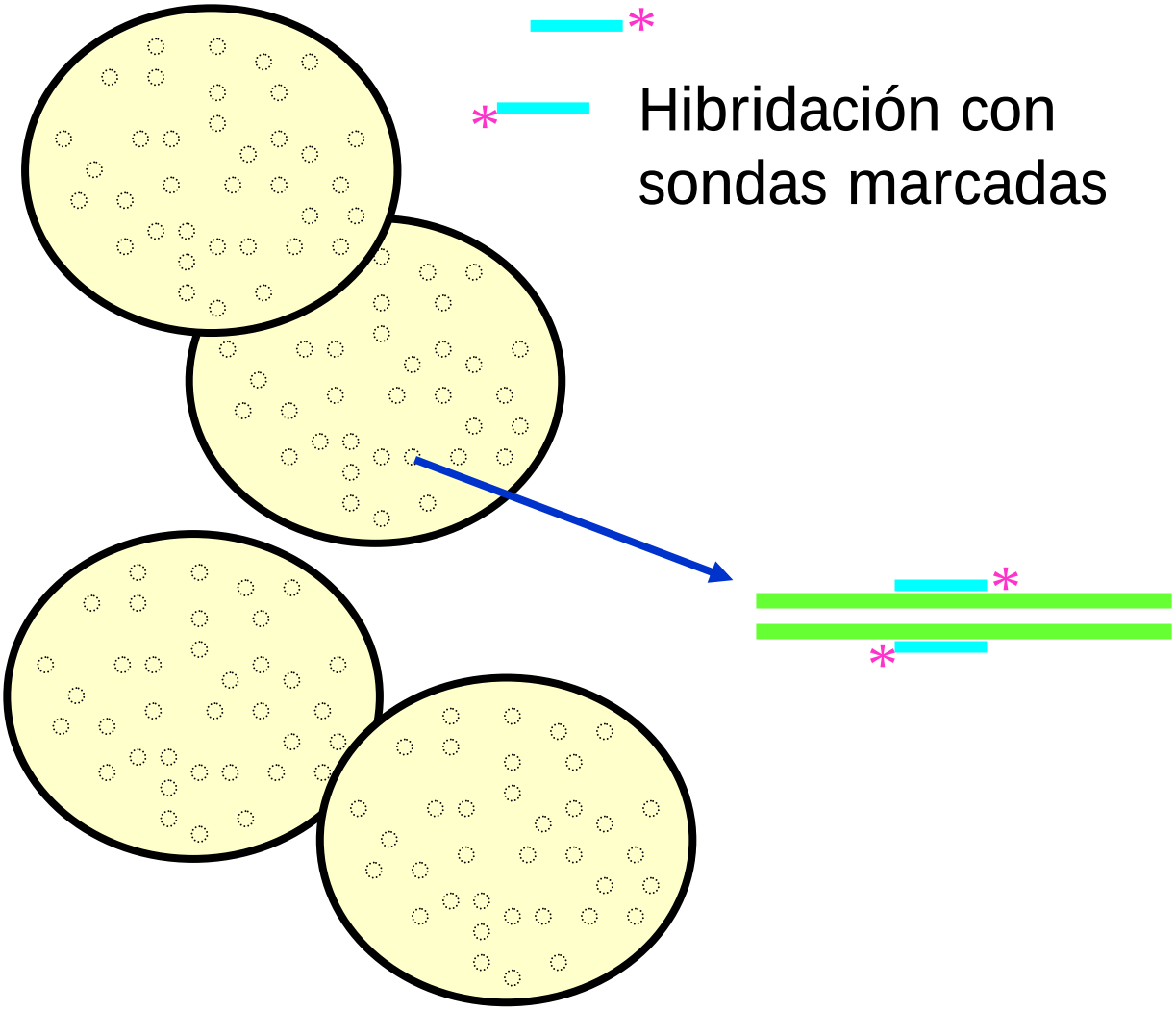
…TAC GTT TTC AAA TTA..
…ATG CAA AAG TTT AAT..


Proteína purificada
Secuenciación de fragmentos de la proteína
secuencia aminoacídica parcial
secuencia nucletídica probable
secuencia aminoacídica
secuencia nucletídica
síntesis de oligonuclétidos
a
b
c
d
e
partidores
Reacción de PCR
Sustrato: gDNA
b
e
¿intrones?
*
+
* Sondas marcadas

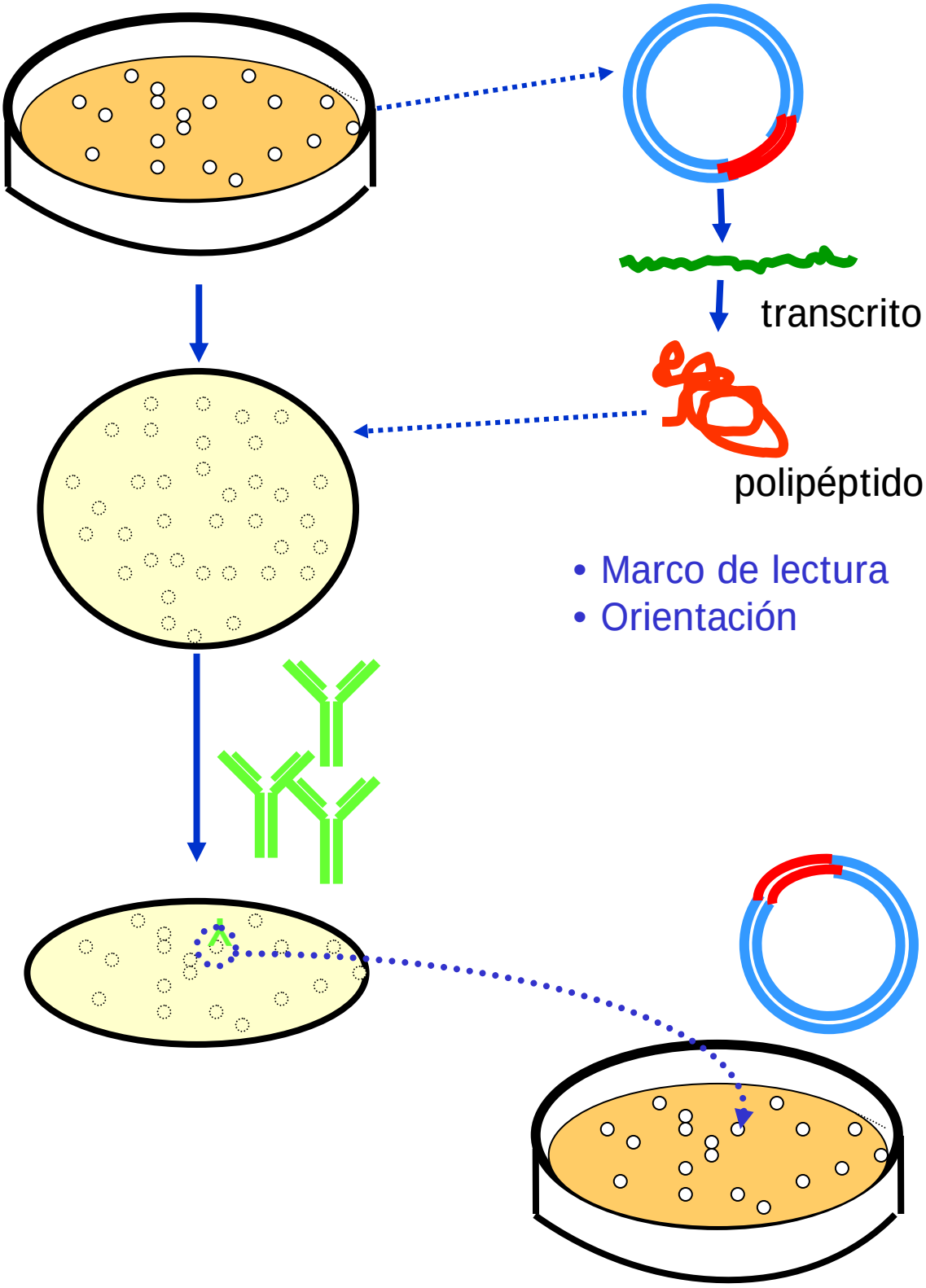

Proteína
secuencia polipeptídica
secuencia nucleotídica probable
a
b
c
d
e
síntesis de oligonucléotidos
e
Sustrato: cDNA
e
b
PCR
*
+
*
Sondas marcadas

Uso de las sondas:

rastreo de genoteca de cDNA o de gDNA para identificar el o los recombinantes que portan insertos que codifican la proteína de interés



Situación excepcional: Uso de anticuerpos como sonda para el rastreo de genotecas de expresión



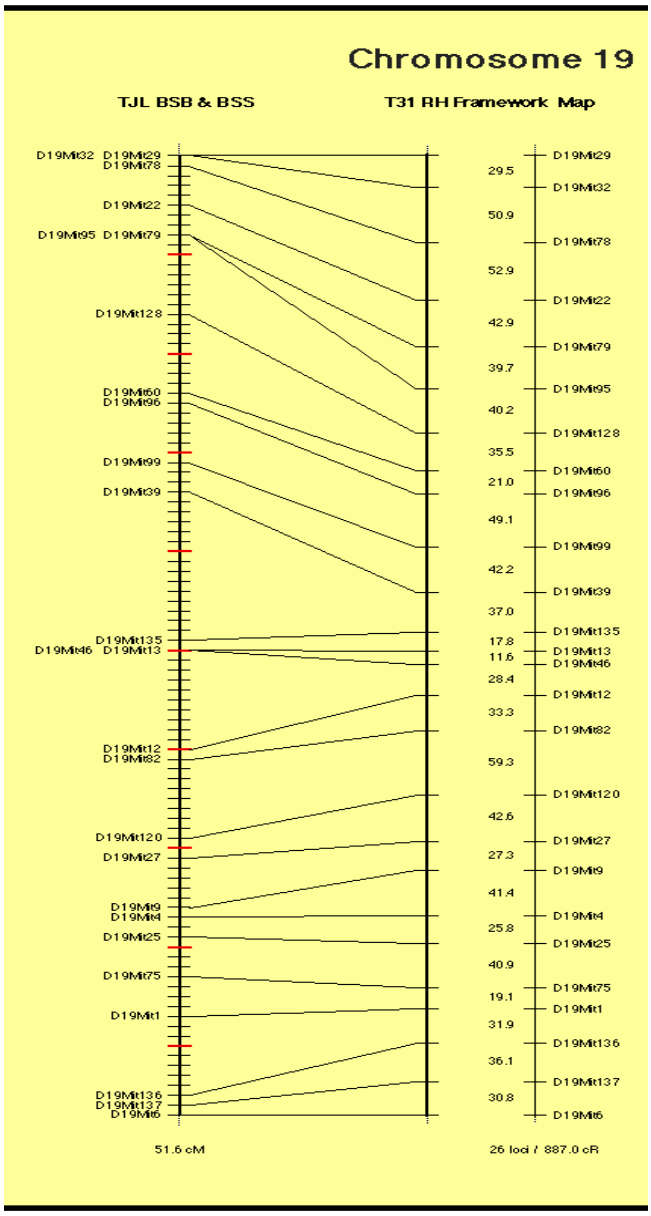
Clonamiento de genes mediante "chromosome walking" (caminata por el cromosoma)

Esta estrategia ha sido utilizada para identificar genes "responsables" de un fenotipo heredable
(Ej. enfermedades hereditarias).

Se requiere de un marcador[1] que esté ligado[2] al fenotipo en cuestión

Marcador genético

Secuencia de DNA que tiene una localización conocida en el cromosoma
Debe ser fácilmente identificable y trazable.

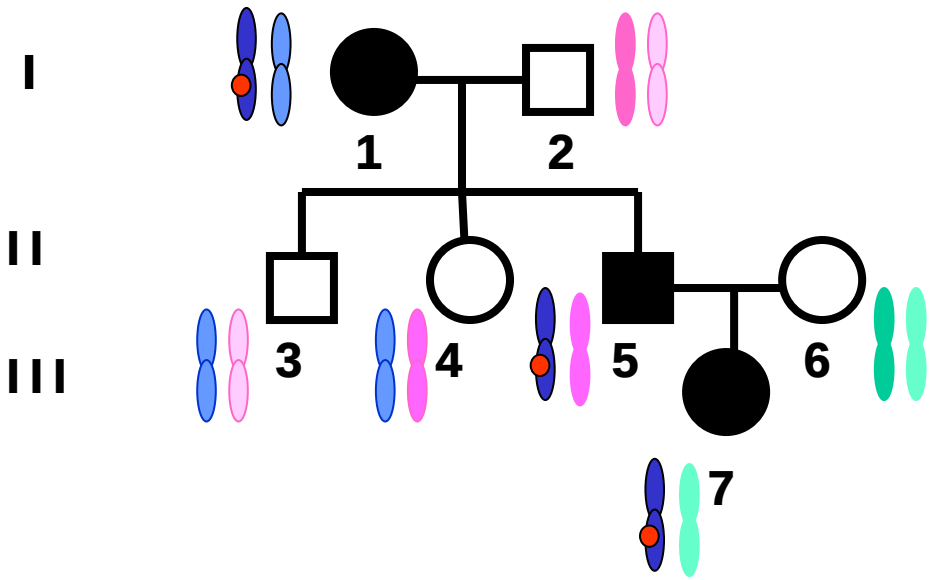


Permiten trazar la herencia de las regiones cromosómicas en generaciones sucesivas y los eventos de recombinación genética.

Ligamiento genético

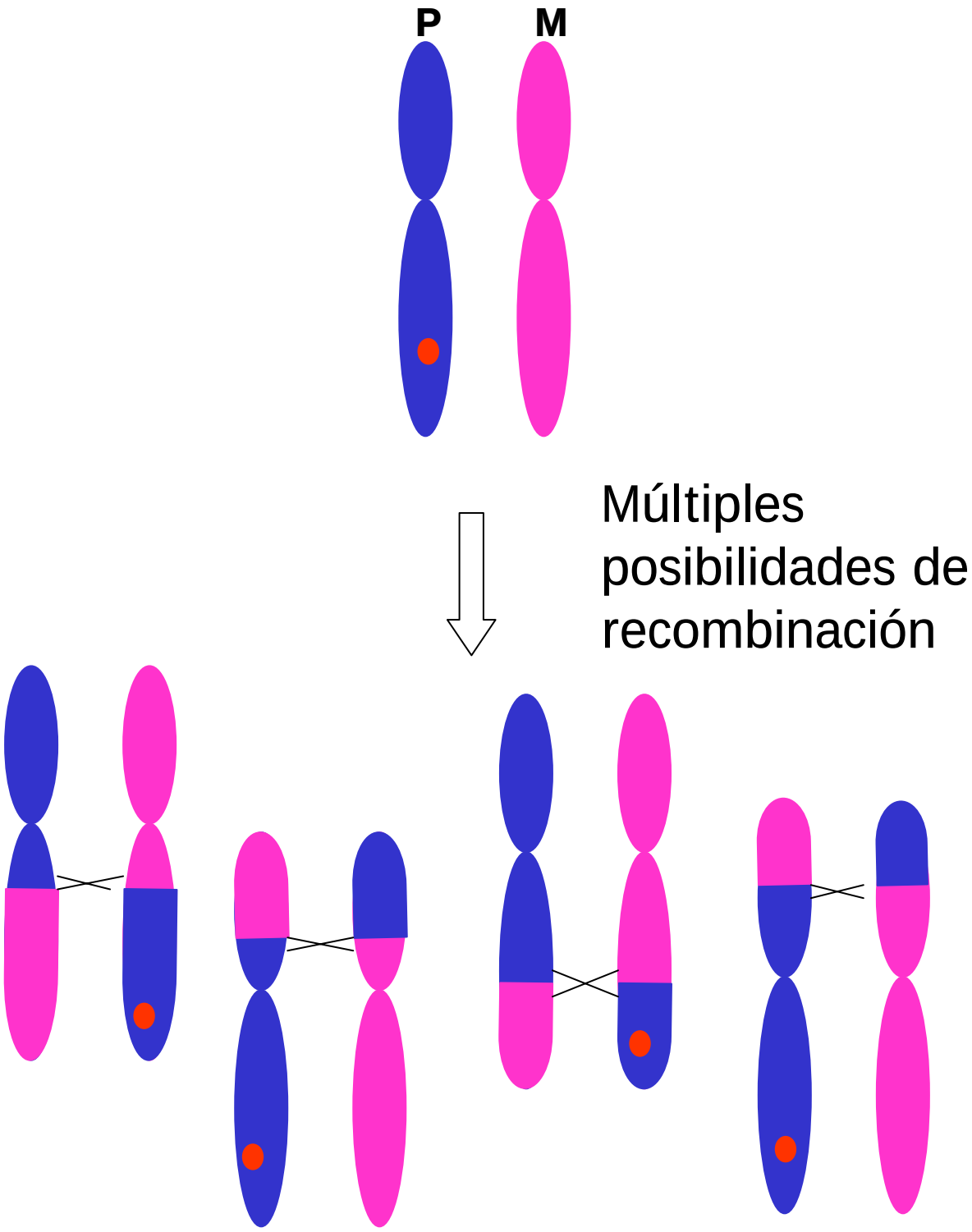
Asociación de un fenotipo y un cromosoma determinado

Segregación al azar de los cromosomas

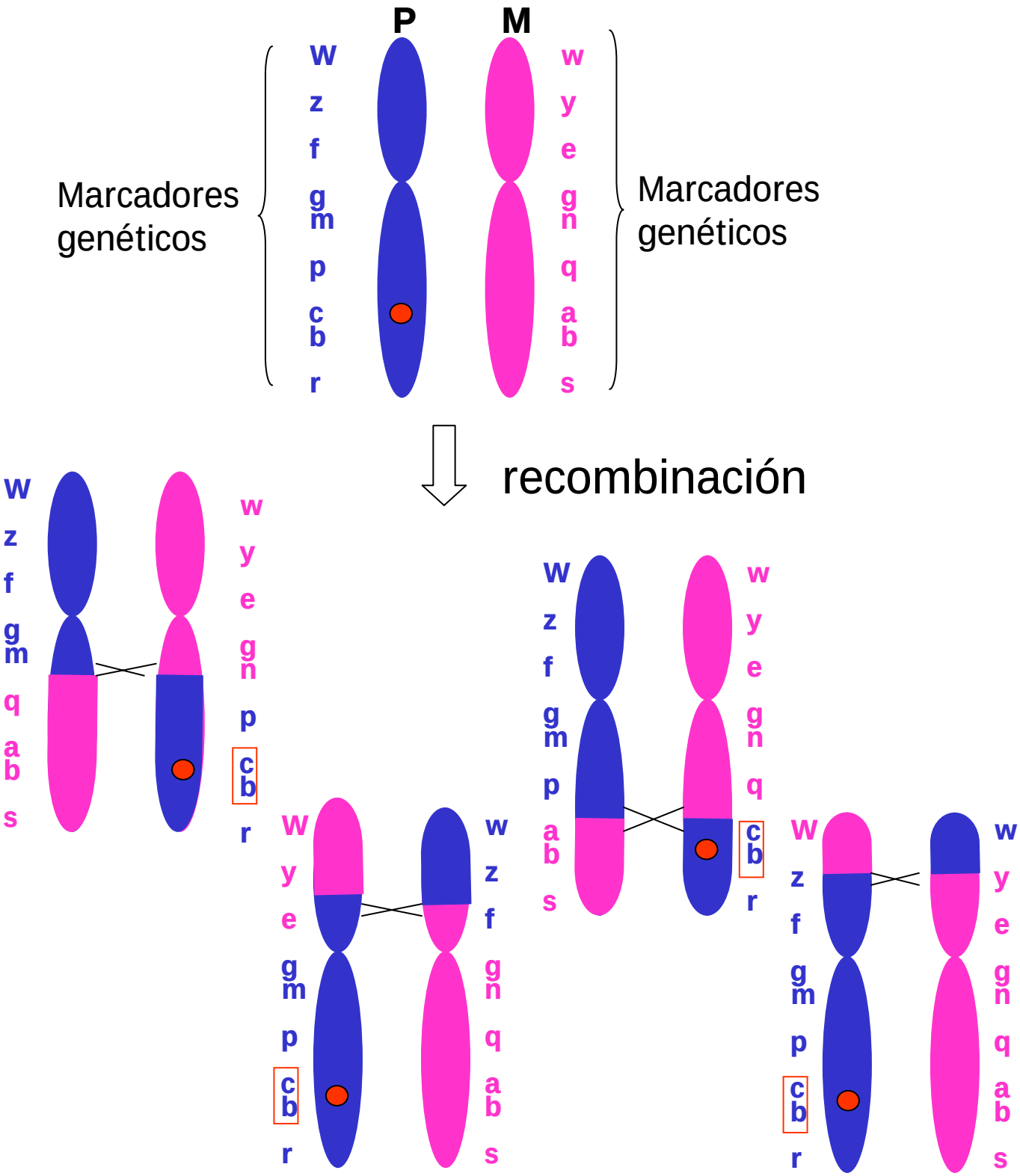


...La herencia del gen responsable del fenotipo parecería fácilmente trazable de generación en generación...

Sin embargo,.... dada recombinación genética que ocurre en la meiosis.....



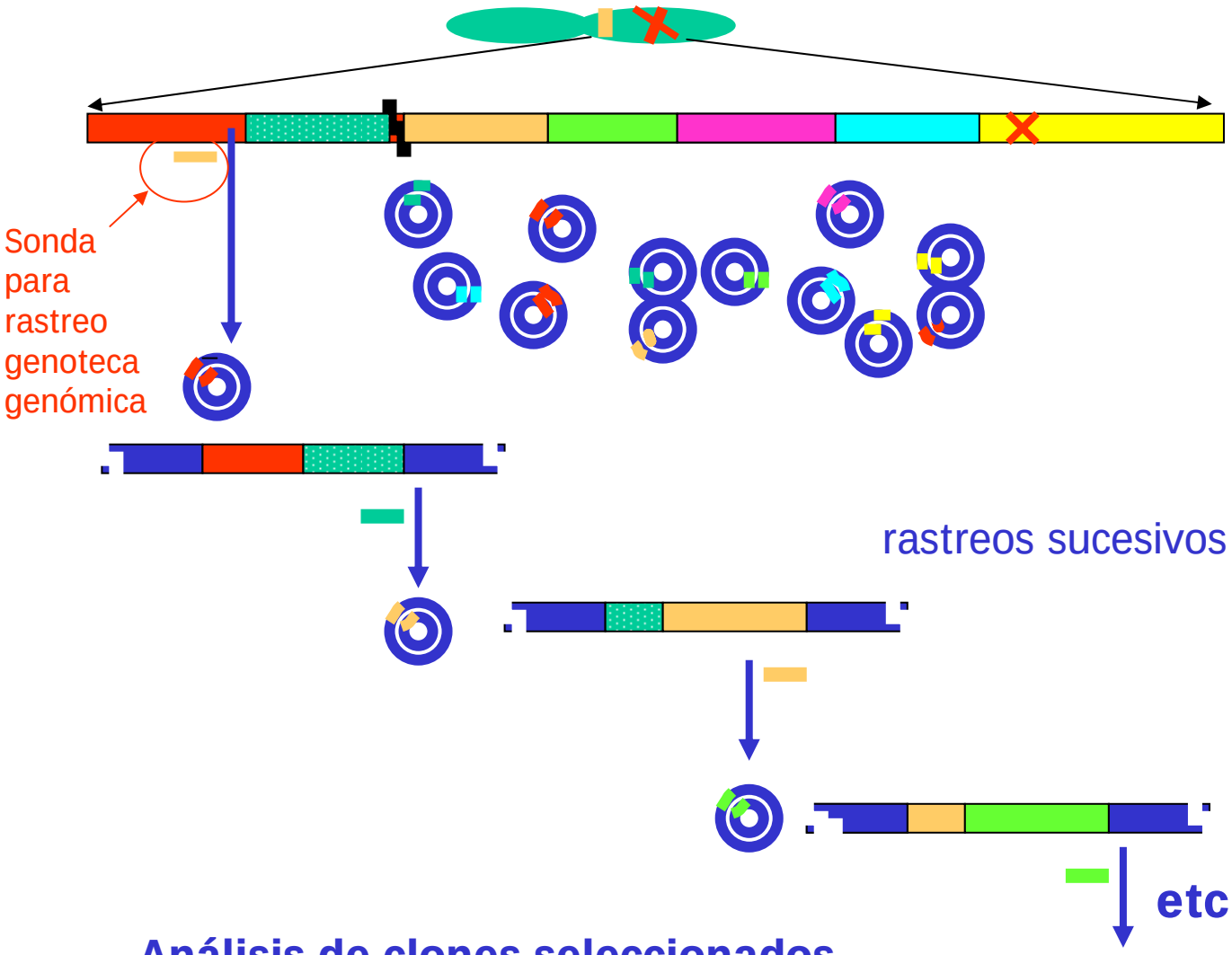
Etcétera, etcétera.....



Identificación de marcadores genéticos (cercanos), que estén ligados al fenotipo de manera estadísticamente significativa

“Chromosome walking”

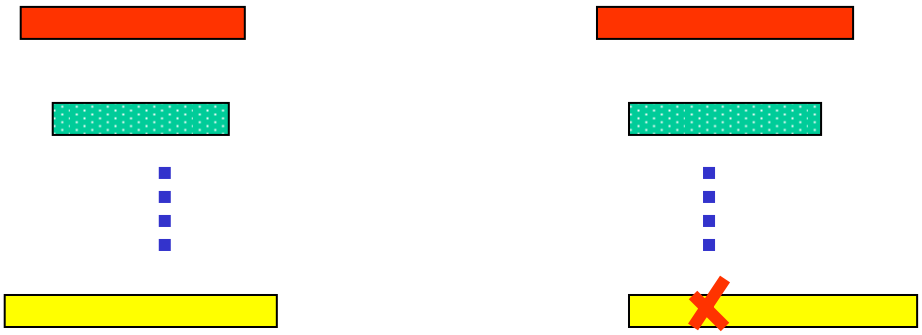
Identificación gen “responsable” de un fenotipo dado



Análisis de clones seleccionados

Indiv. con gen normal

Indiv. con gen mutado

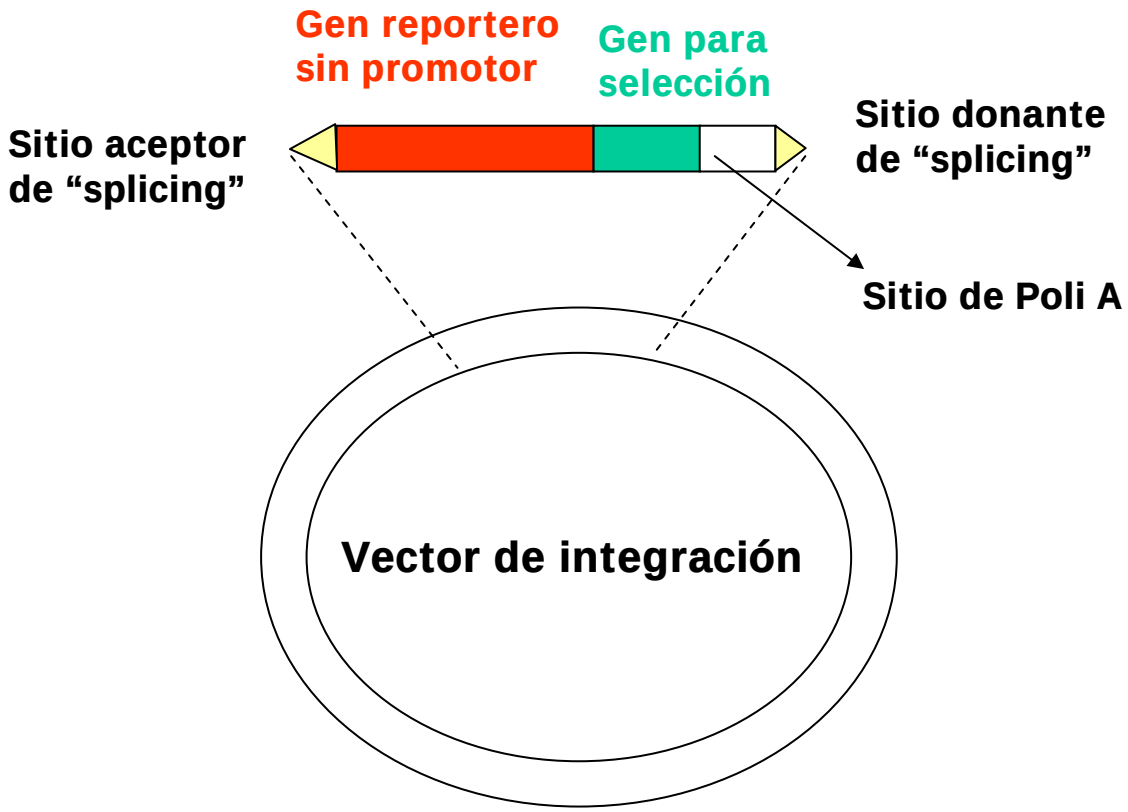


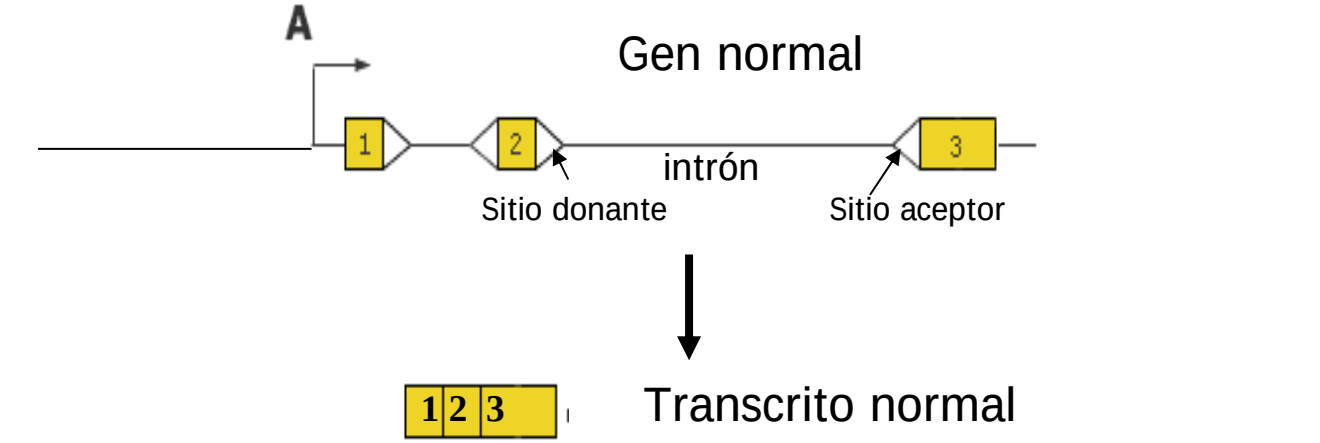
Estrategia de “Captura de Genes”

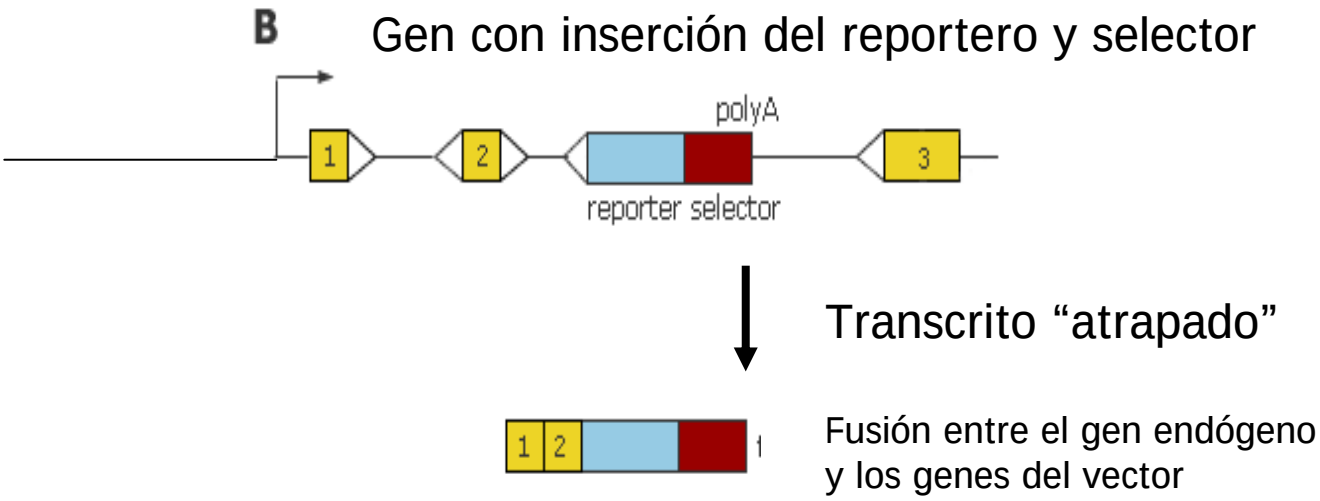
(“gene trapping”)

No está orientada a la búsqueda de un gen en particular

Basada en la integración al azar de un gen reportero y un marcador de selección en el genoma con en propósito de interrumpir un gen, alterar un fenotipo y conducir a su identificación







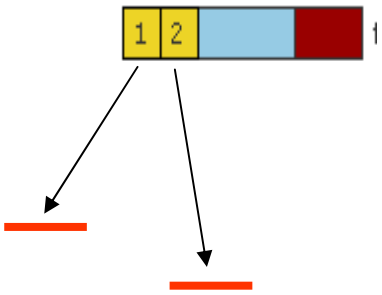
Expresión del reportero y del selector quedan bajo el control del promotor del gen “capturado” donde se incorporó la construcción

Consecuencias:

- Expresión del marcador de selección bajo el control del promotor endógeno
- Expresión del gen reportero bajo el control del promotor endógeno
- Supresión de la expresión del producto génico normal
- En algunos casos, alteración “detectable” del fenotipo

Posibilidades de la técnica:

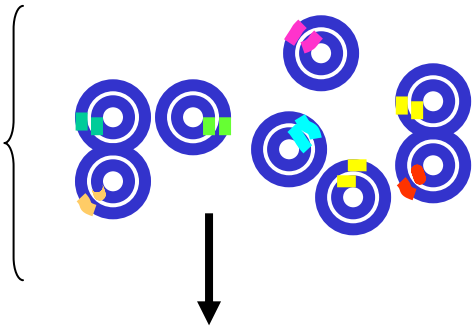
- Identificar un gen responsable de un fenotipo
- Aislar el gen
- Estudiar el patrón de expresión tisular del gen
- Generación de mutante con el gen inactivo



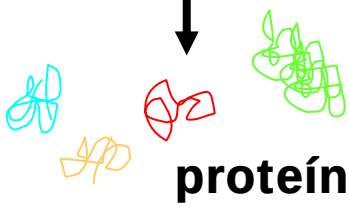
Sondas para rastreo de genoteca: clonamiento del gen de interés

Clonación de un gen basándose en la función del producto génico

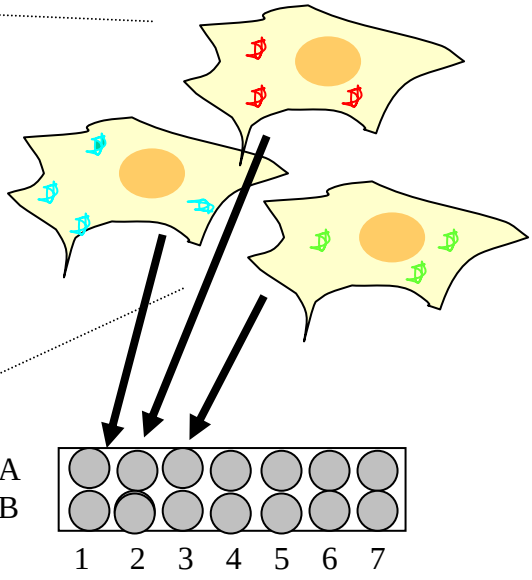
Insertos cDNA bajo el control transcripcional de promotor "apropiado"



mRNAs

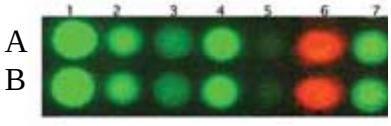


proteínas



Expresión de función

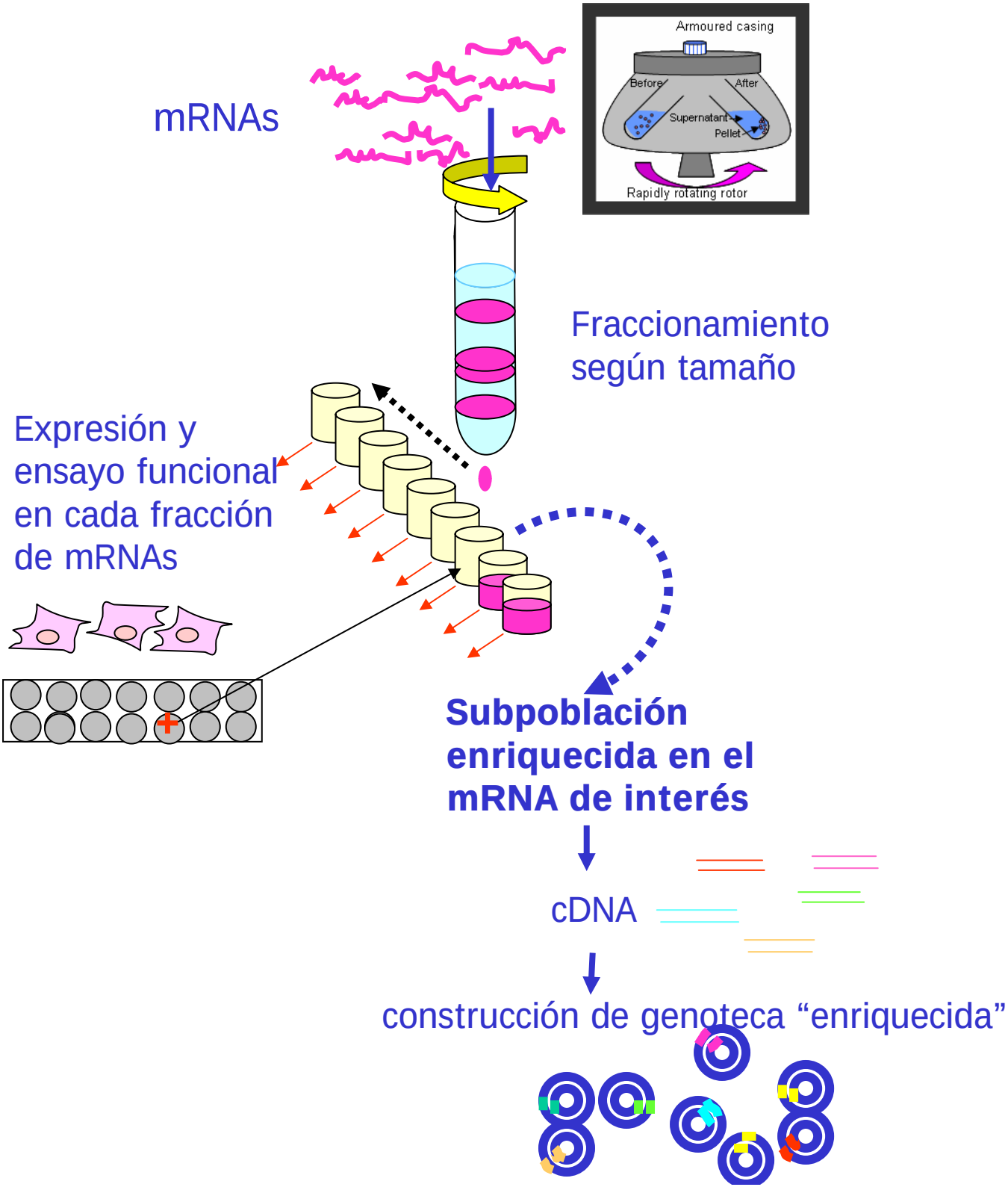
Ensayo de la "función"

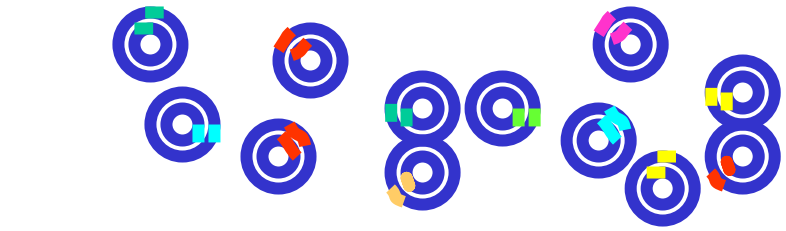


Ejemplo: expresión de proteína fluorescente

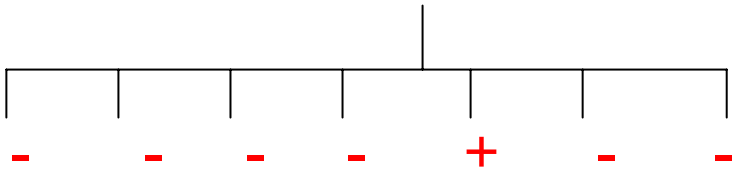
- Unión de ligando a receptor
- Transporte de moléculas o iones
- Actividad enzimática
- etc.

Clonación de un gen basándose en la expresión de la función

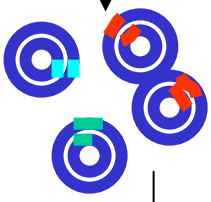


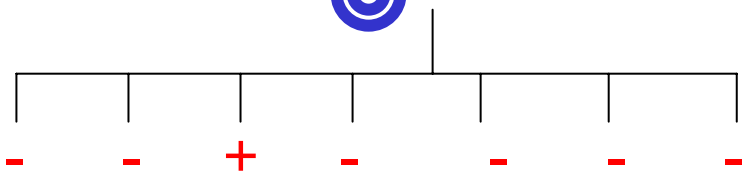


genoteca



Rastreo por expresión funcional





Rastreo funcional

Rastreos sucesivos

Ciclo de rastreo	N° clones
1	20.000
2	2.000
3	200
4	20
5	2
6	1

Identificación de 1 clon que expresa la función de interés

Caracterización física del DNA clonado

- Mapa de restricción
- Secuenciación
  - Predicción de secuencias regulatorias
  - Identificación de marco de lectura abierto
  - Predición de secuencia polipeptídica
  - Predicción de estructura secundaria
  - Análisis de homología (función probable)
- Número de copias por genoma

Caracterización funcional del DNA clonado

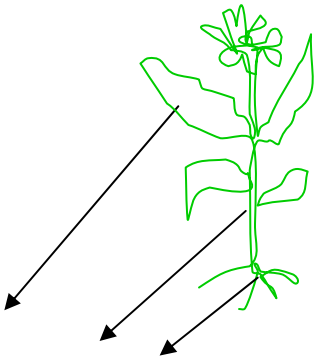
- Análisis de regulación transcripcional

  Identificación de promotores y otras secuencias reguladoras
- Análisis del transcrito codificado

  Transcripción (expresión génica)
- Expresión funcional in vitro e in vivo

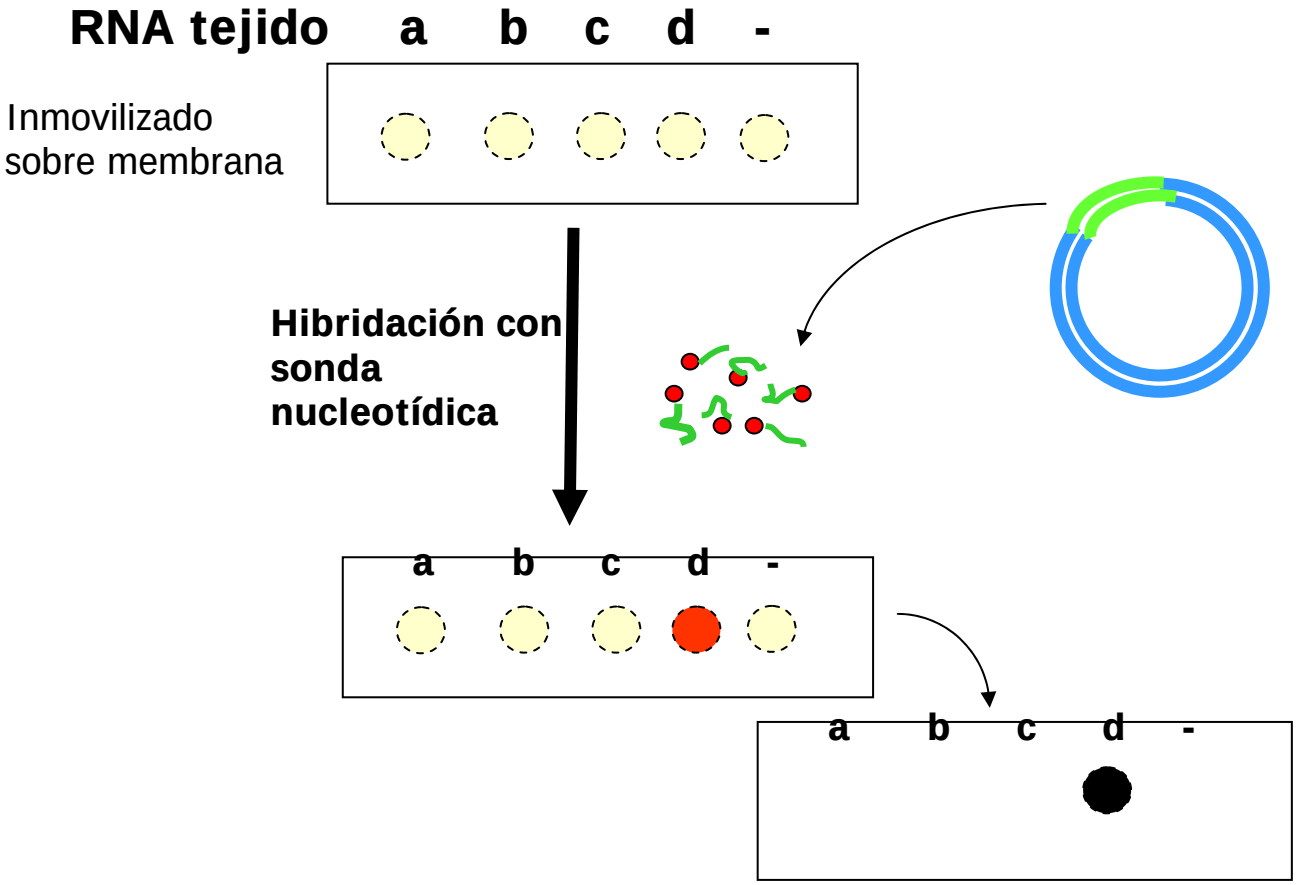
Detección de los transcritos intracelulares complementarios al DNA clonado

¿Dónde se expresa en gen de interés?

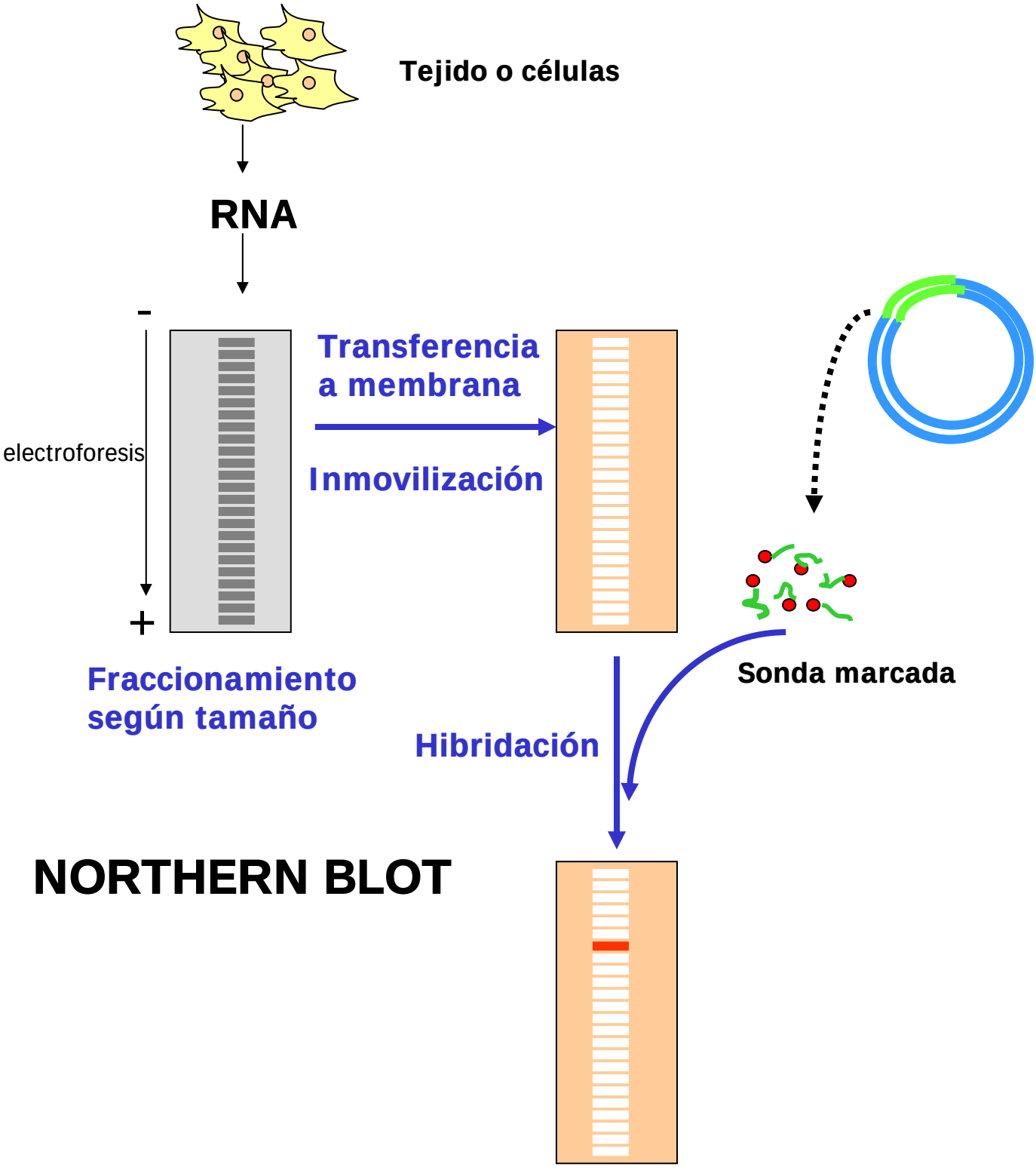


Extracción del RNA

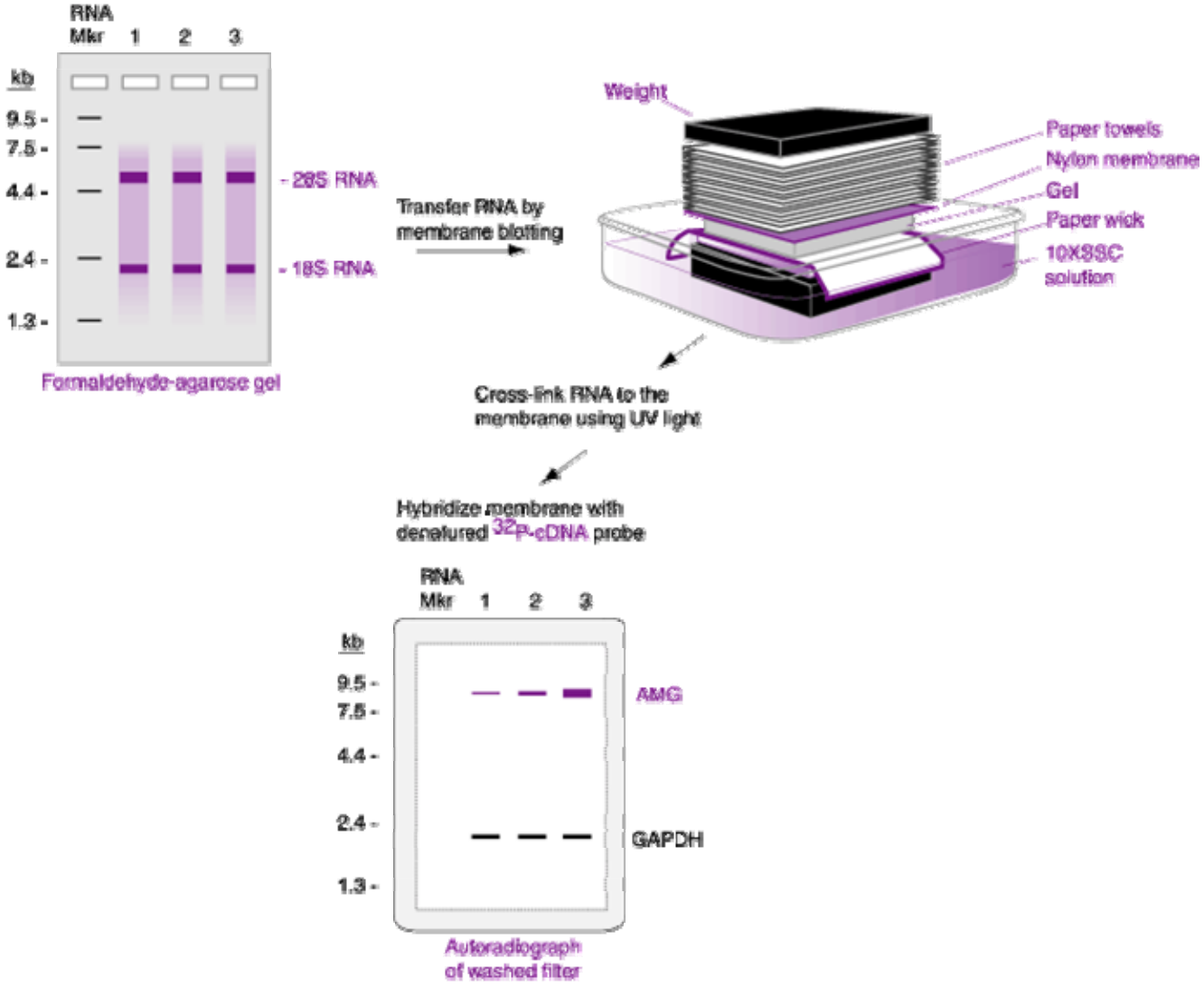
de distintos tejidos



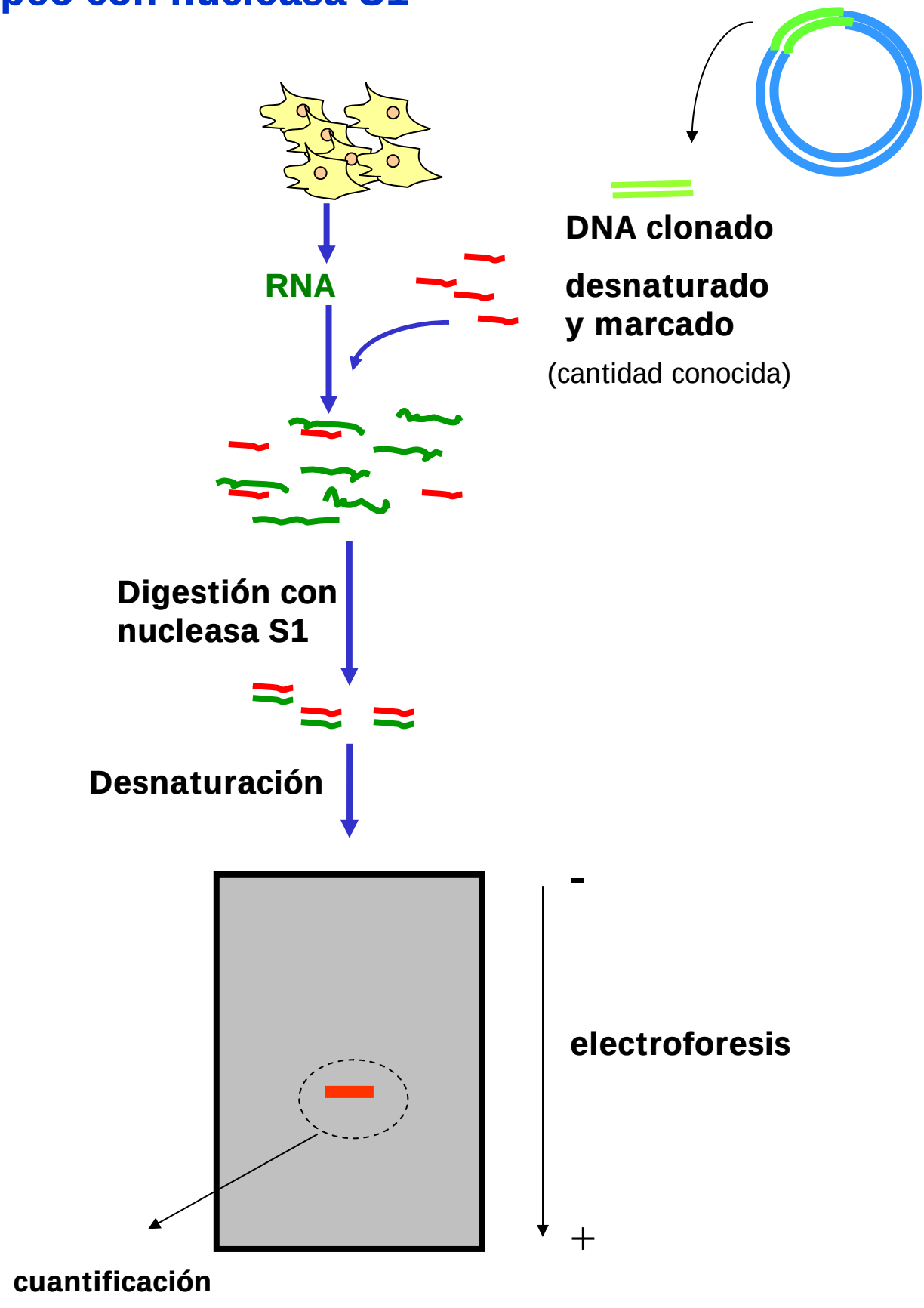
Detección de los transcritos intracelulares complementarios al DNA clonado



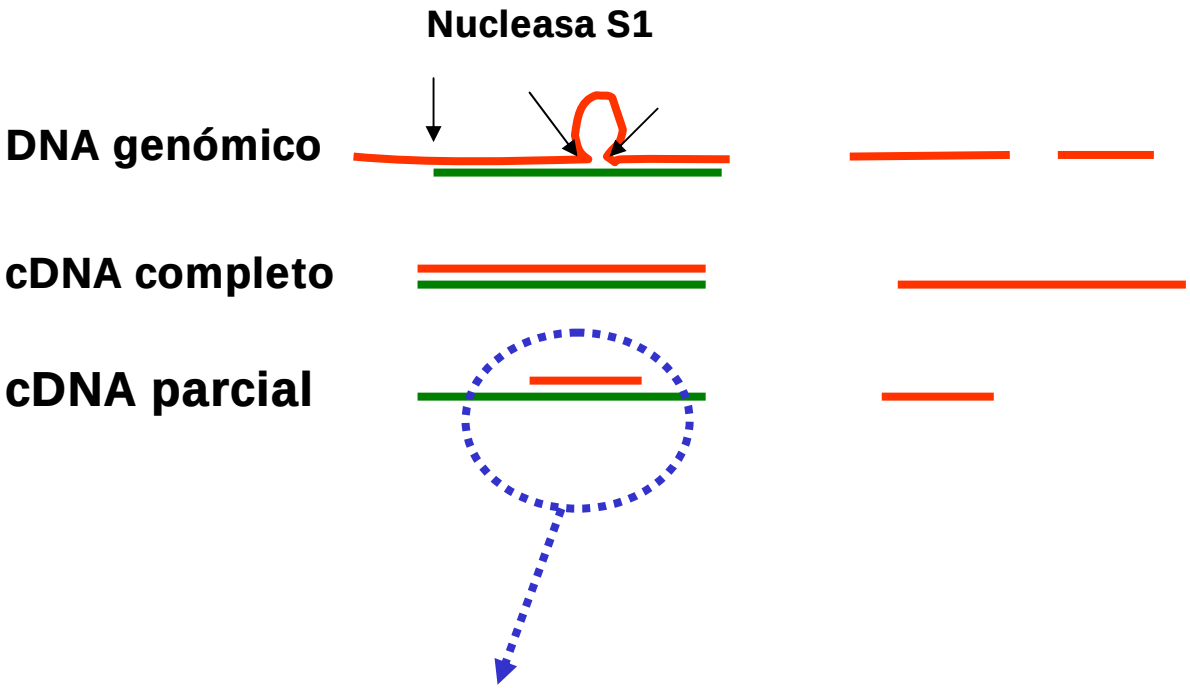
Northern blot



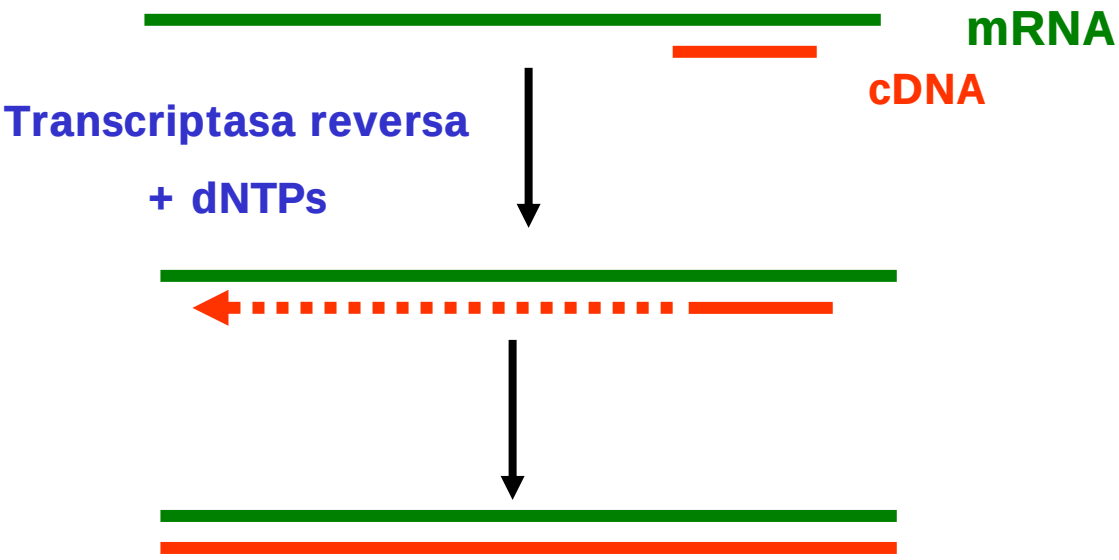
Cuantificación de transcrito mediante mapeo con nucleasa S1



Comparación del tamaño del DNA clonado y el transcrito respectivo



Extensión del cDNA clonado a partir del transcrito respectivo

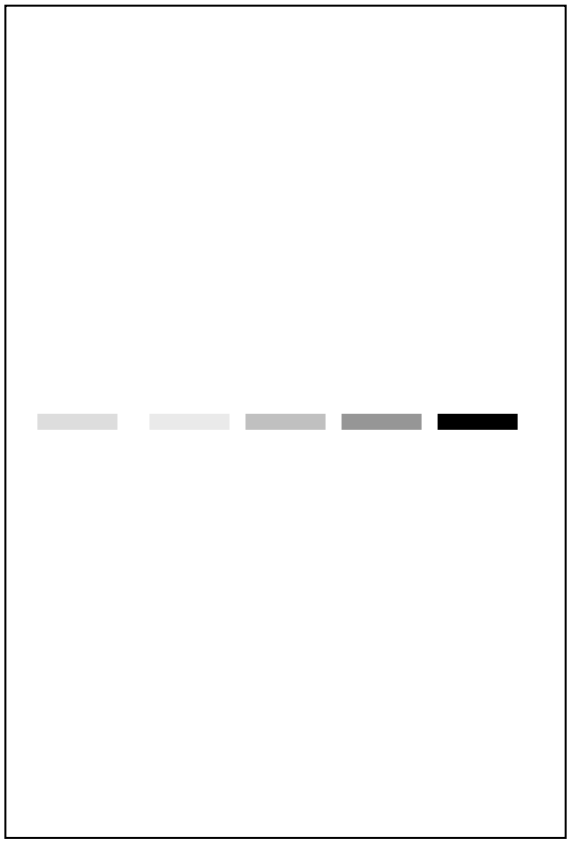


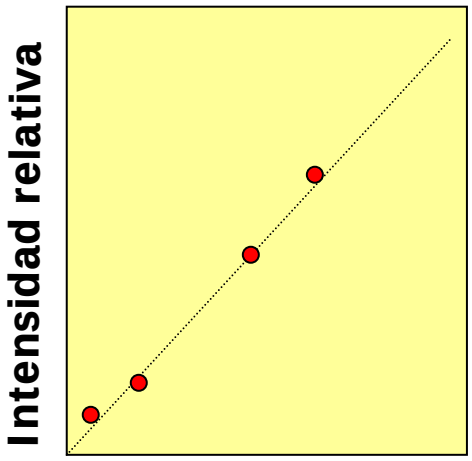
Número de copias por genoma del gen de interés

DNA genómico fragmentado

Copias del gen clonado

0.5 1.0 2.0 5.0

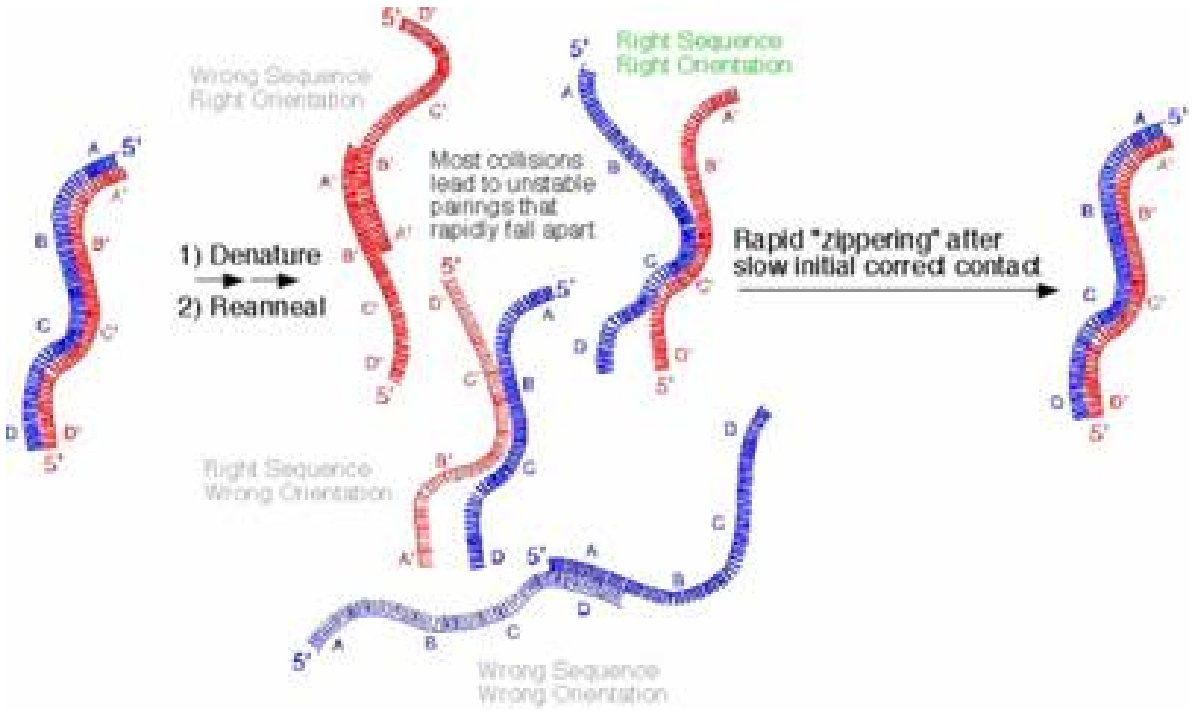




Desnaturación **Renaturación**

DNA Genómico fragmentado → **ss DNA** → **ds DNA**

Velocidad de renaturación



$dc/dt = -kC^2$

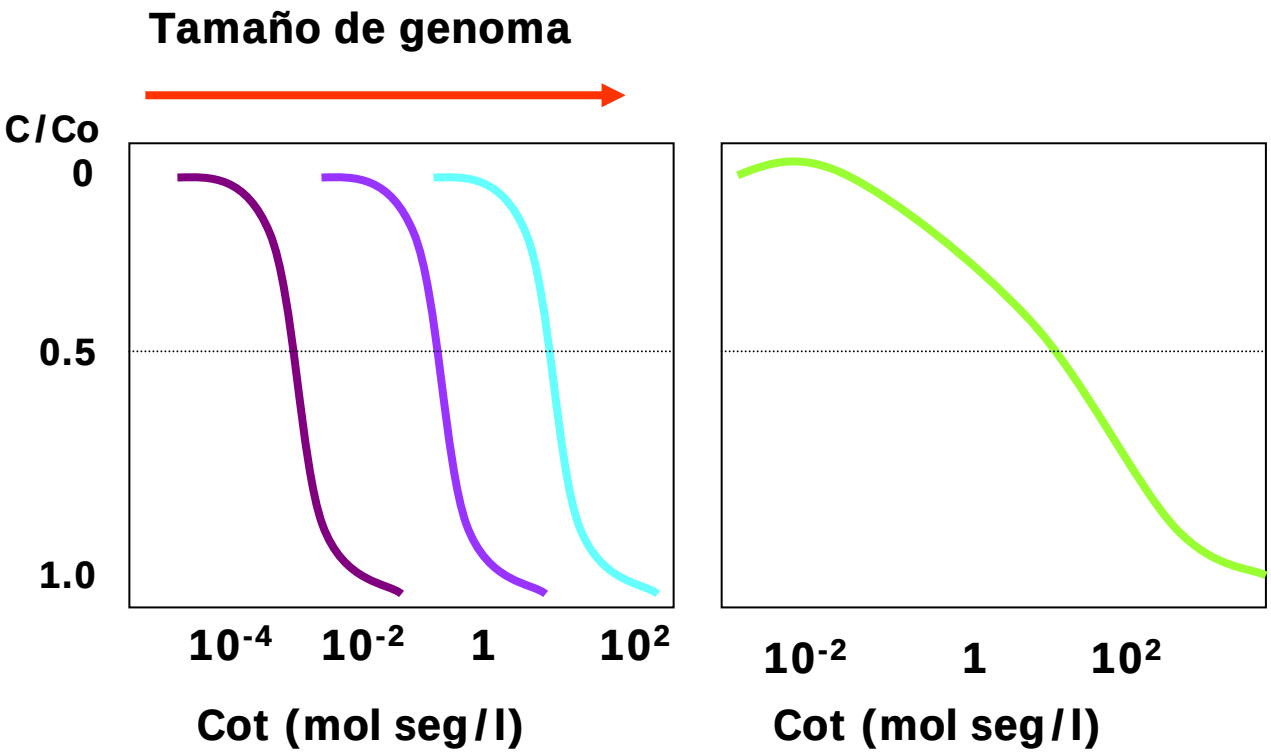
$C/Co = 1/kCot + 1$

C: conc. de DNA desnat. a tiempo t

Co: conc. de DNA desnat. a tiempo 0

Cuando el 50 % del DNA se ha renaturado

$C/Co = 0.5$ $\quad Cot_{0.5} = k^{-1}$



- Genomas simples
- cada fragmento presente una vez por genoma

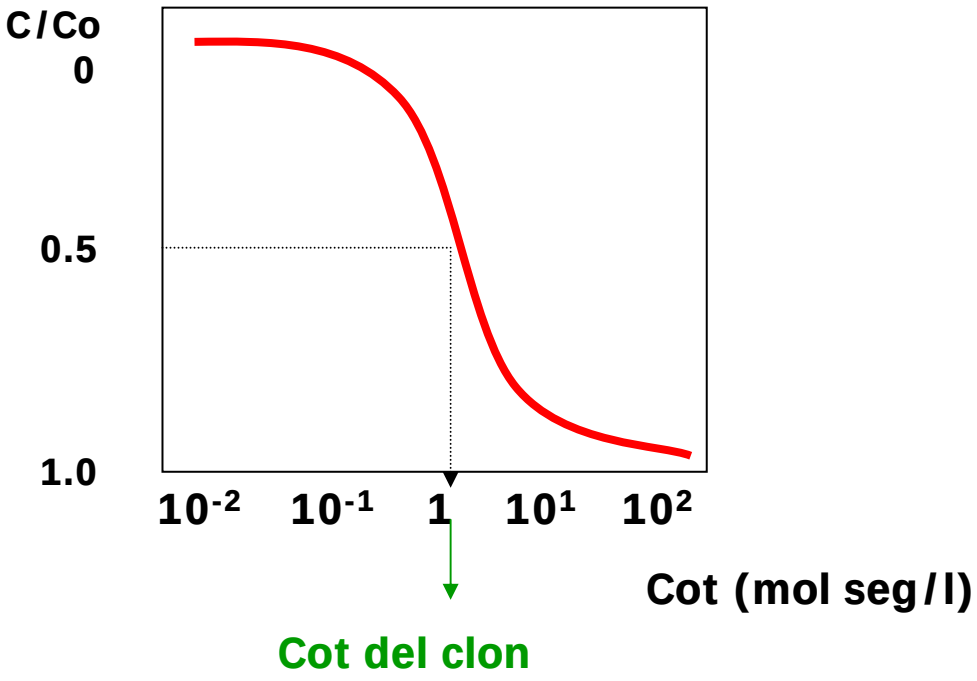
Genomas complejos

- fragmentos muy repetidos
- fragmentos poco repetidos
- fragmentos únicos

- **Número de copias de un gen clonado**

(cinética de hibridación)

- **Marcar el clon**
- **Hibridar con DNA genómico fragmentado y desnaturado**
- **Deterninar el valor de Cot**



$$\text{Número de copias} = \frac{\text{Cot gen único}}{\text{Cot del clon}}$$

Tiempo renaturación muy largos
genomas complejos y grandes
genes con bajo número de copias