

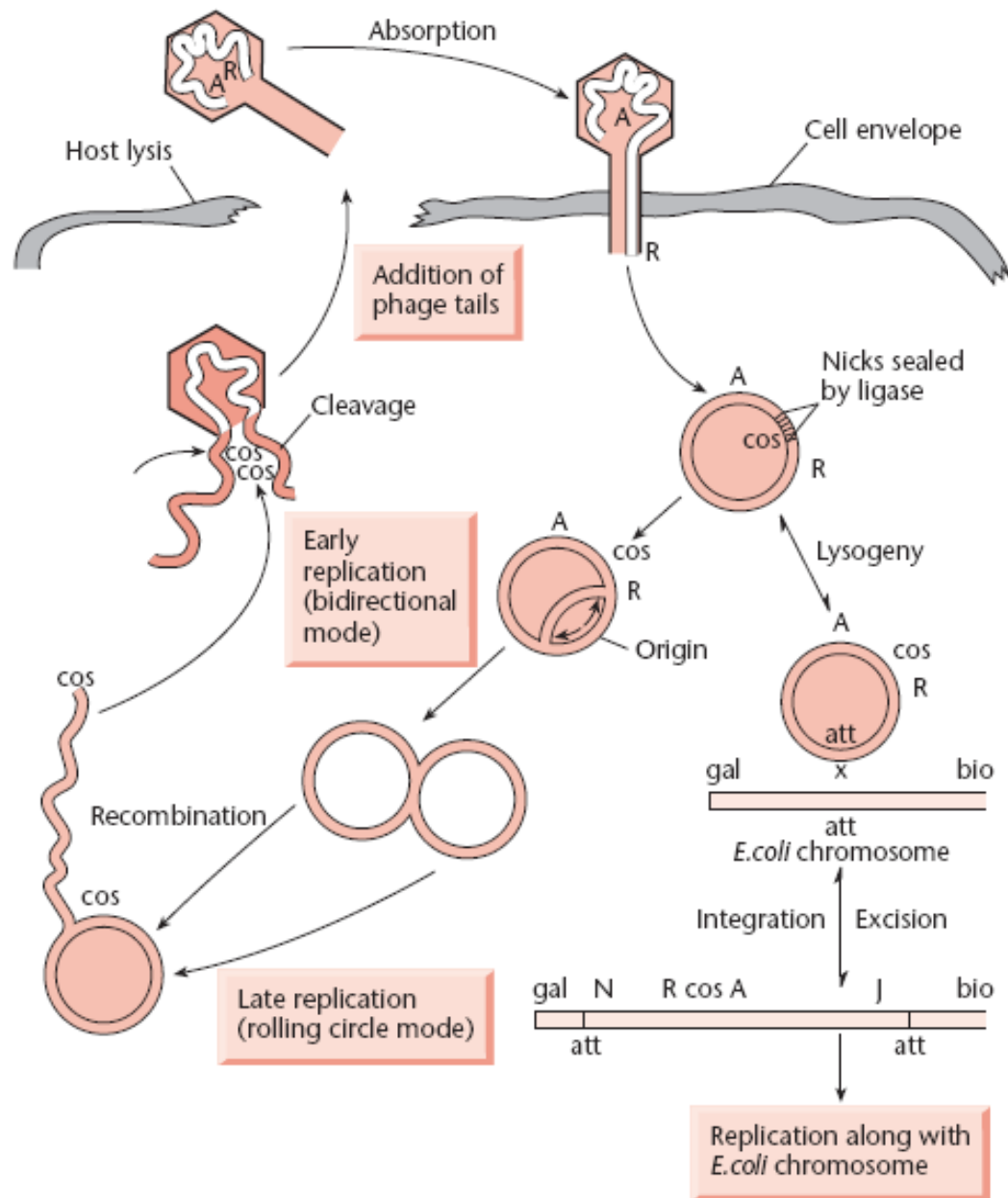


Fig. 4.11 Replication of phage-λ DNA in lytic and lysogenic cycles.

Vectores derivados del fago lambda -Se basan en usar el ciclo lítico del fago para propagar el ADN recombinante. **La región central no esencial (fragmento stuffer) se puede reemplazar por ADN exógeno.** El ADN total empaquetado en la cabeza del fago no puede ser mayor al 105% o menor al 78% de la longitud del ADN del fago. Los vectores disponibles tienen distintas características para permitir la selección.

-Las partículas de fagos recombinantes se preparan in vitro (empaquetamiento en la cabeza y agregado de colas para formar la partícula infecciosa). La eficiencia de **transfección** es muy alta (1/1) a diferencia de la transformación con plásmidos (1/1000 a 1/100). **Se usan para construir bibliotecas de ADN genómico o cDNA.**

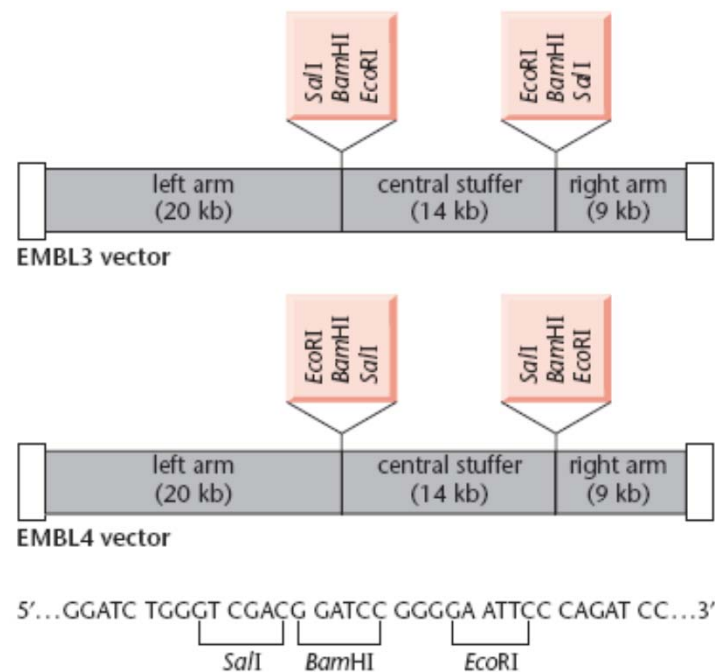


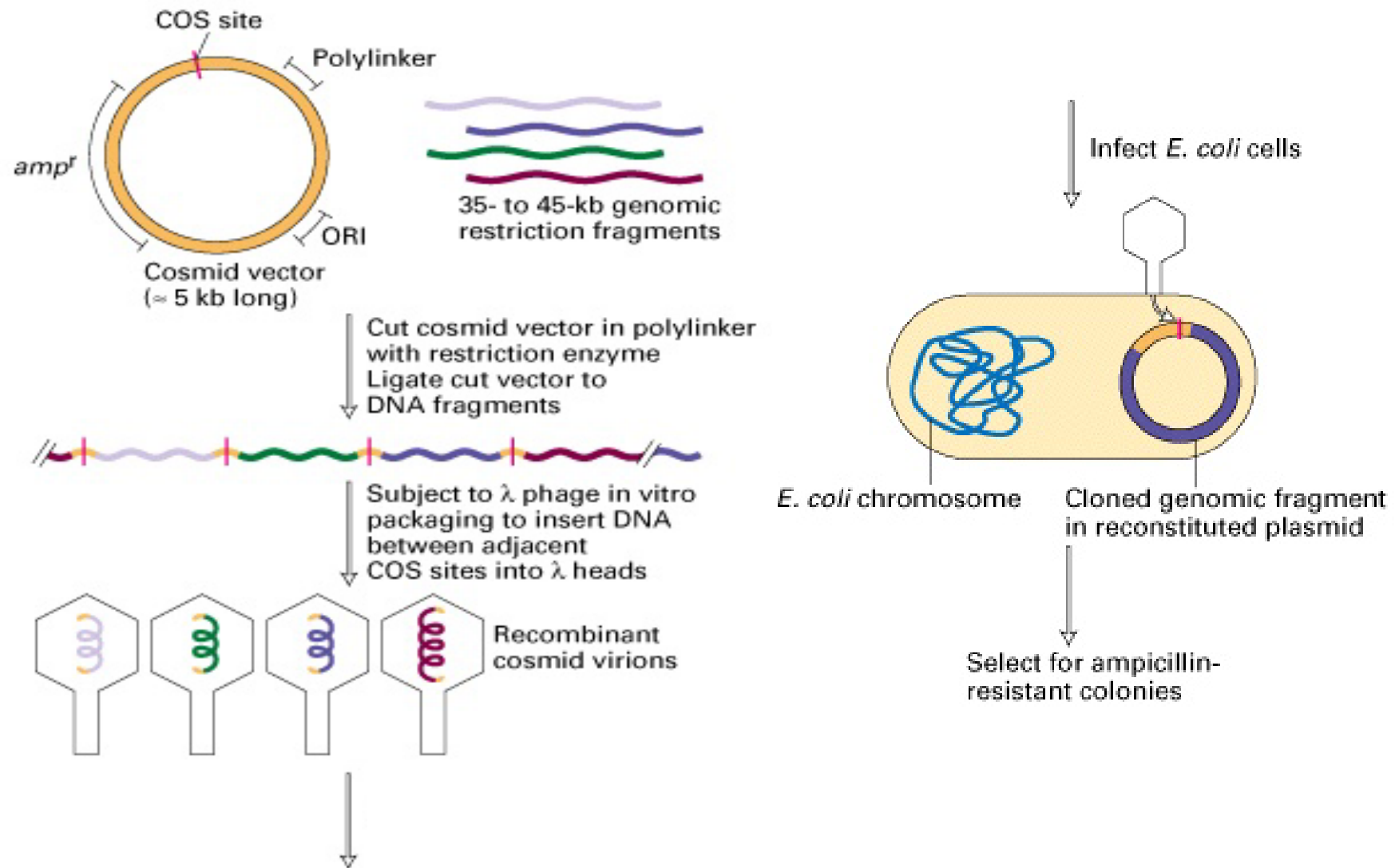
Fig. 4.13 The structure of bacteriophage λ cloning vectors EMBL3 and EMBL4. The polylinker sequence is present in opposite orientation in the two vectors.

Insercionales: les falta un 20% de ADN del fago, insertando fragmentos de **5-11 Kb** se recupera la capacidad de generar una partícula infecciosa.

De reemplazo: se saca el fragmento stuffer y se reemplaza por ADN exógeno. Fragmentos de **8-24 Kb** dependiendo del vector.

De expresión: **λ gt11 o λ ZAP**, tienen el promotor *Lac* (y parte del gen de la B-gal) lo que permite expresar una proteína a partir del gen clonado. Se pueden crecer como lisógenos a 30° y obtener placas de lisis a 42° (en los que poseen el represor del crecimiento lítico termosensible *cI*). A 42°C forman placas porque se inactiva el *cI*. Este vector nos permite identificar el clon en una placa de lisis, (se puede investigar con anticuerpos si expresa una proteína particular), y luego trabajar con ese clon como lisógeno, o sea que exprese la proteína sin lisar la célula.

CÓSMIDOS



BACs permiten insertos de hasta 300 Kb

- **Bacterial artificial chromosomes (BACs)** are circular DNA molecules that carry an antibiotic resistance marker, a stringently controlled replicon derived from the F factor (fertility factor) of *Escherichia coli* (Shizuya et al. 1992), an ATP-driven helicase (*repE*) to facilitate DNA replication, and three loci (*parA*, *parB*, and *parC*) to ensure accurate partitioning of low-copy-number plasmids to daughter cells. Segments of foreign genomic DNA are ligated to the ~7-kb BAC vector in vitro, and the ligation mixture is introduced by electroporation into well-characterized recombination-deficient strains of *E. coli*, where they become established as single-copy plasmids.

The first generation of BAC vectors (Shizuya et al. 1992) carried no markers that could be used to distinguish between antibiotic-resistant bacterial colonies carrying recombinants and those carrying empty vectors. Newer BAC vectors allow screening by α -complementation to identify recombinants with inserts and are equipped with sites to facilitate recovery and manipulation of cloned DNAs (see Figure 4-2) (Kim et al. 1996; Asakawa et al. 1997). BACs, like YACs and PACs (P1 artificial chromosomes), have no packaging constraints and there is no fixed limit to the size of genomic DNA that they can accept. The median size of clones in most BAC libraries is ~120 kb, whereas the largest individual recombinant BACs contain ~300 kb of genomic DNA.

YACs: cromosomas artificiales de levaduras, hasta 2 Mb

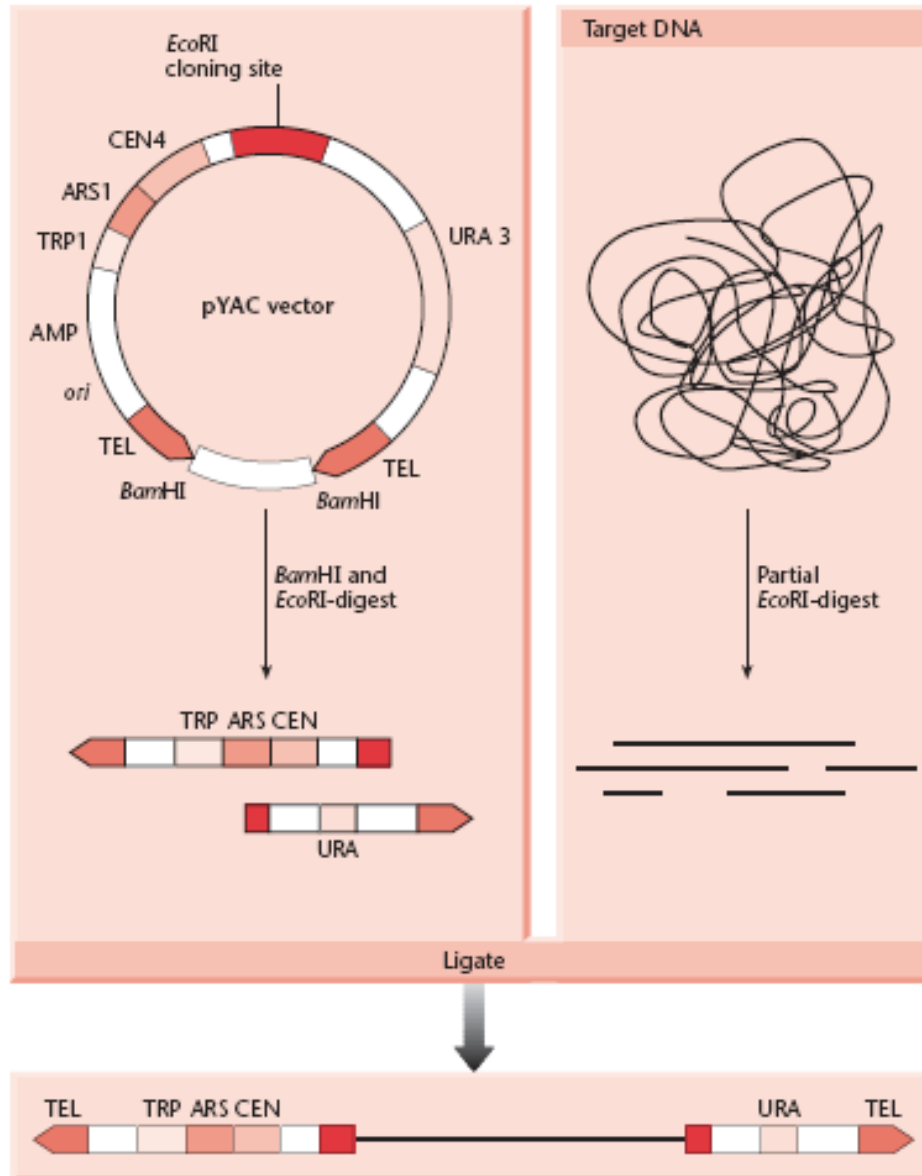


Fig. 9.3 Construction of a yeast artificial chromosome containing large pieces of cloned DNA. Key regions of the pYAC vector are as follows: TEL, yeast telomeres; ARS 1, autonomously replicating sequence; CEN 4, centromere from chromosome 4; URA3 and TRP1, yeast marker genes; Amp, ampicillin-resistance determinant of pBR322; ori, origin of replication of pBR322.

There are five major types of high-capacity vectors. Because physical maps of eukaryotic chromosomes are built by linking together overlapping clones, it might seem that the vector with the largest capacity would be preferred for construction of framework maps. However, it turns out that each vector has its own set of advantages and disadvantages (please see below and Table 4-1), and, in consequence, physical maps of chromosomal regions are typically constructed from a mosaic of DNA fragments cloned in different vectors.

- ***Yeast artificial chromosomes (YACs)*** are linear DNA molecules whose architecture mimics that of authentic yeast chromosomes (Burke et al. 1987). Recombinant YACs are created by ligating large fragments of genomic DNA to two “arms” of a YAC vector, and the ligation mixture is then introduced into yeast by transformation. Each of the arms carries a selectable marker, as well as appropriately oriented DNA sequences that function as telomeres. In addition, one of the two arms carries centromeric DNA segments and an origin of replication (also called an autonomously replicating sequence or ARS). In recombinant YACs, therefore, a segment of foreign genomic DNA becomes flanked on one side by a centromere, an origin of replication, and a selectable marker and on the other side by the second selectable marker. Yeast transformants that have taken up and stably maintained an artificial chromosome are identified as colonies on selective agar plates.

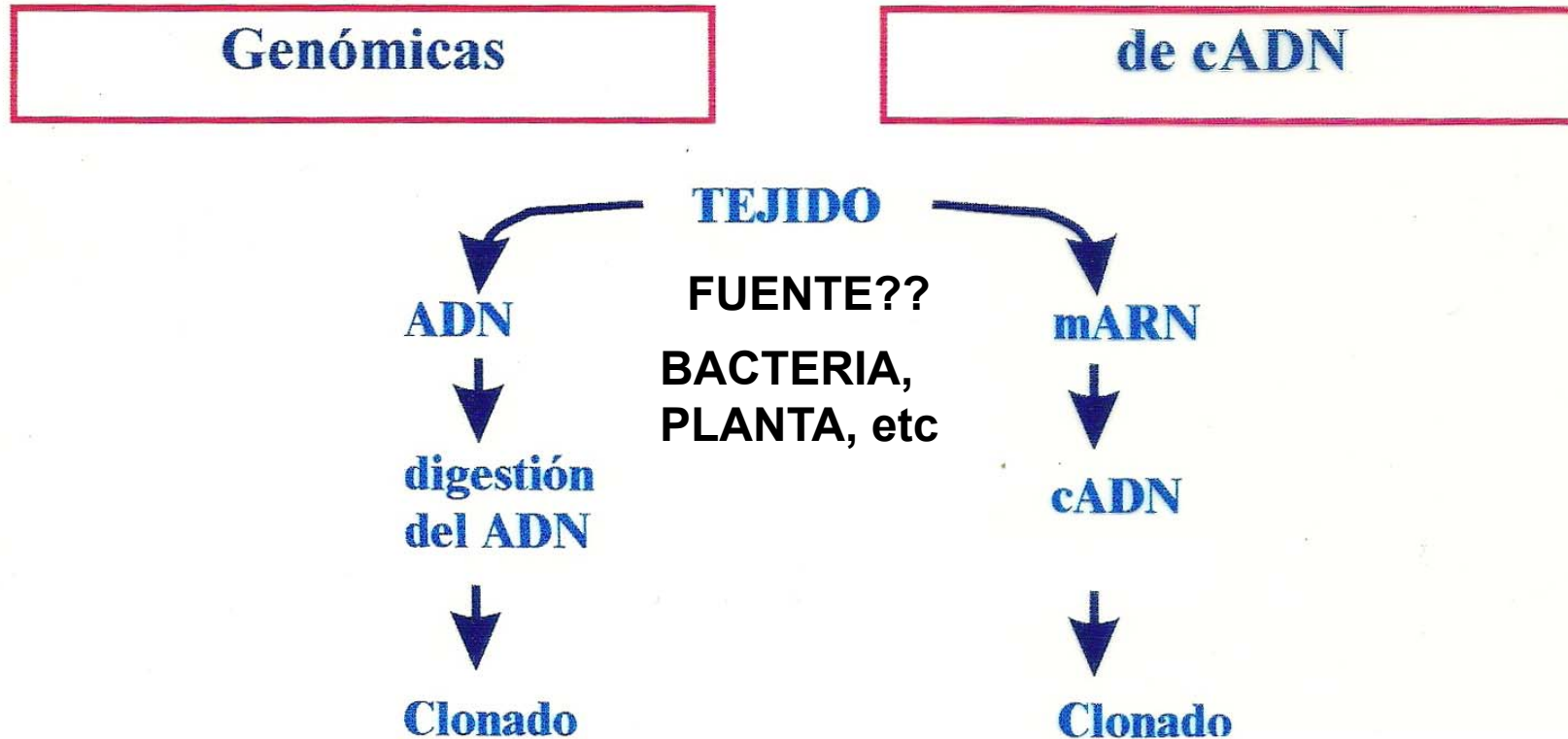
Most YAC vectors in current use are designed to allow facile distinction between clones that are empty and those that carry inserts of genomic DNA (please see Figure 4-1). For example, in several YAC vectors, insertion of DNA into the cloning site interrupts a suppressor tRNA gene and results in the formation of red rather than white colonies by yeast strains that carry an ochre mutation in the *ade2* gene. Because YACs have no packaging constraints that limit their cloning capacity, the average size of the inserts is determined chiefly by the quality of the preparation of genomic DNA. Most YAC libraries contain between 250 kb and 400 kb of foreign DNA per clone. However, libraries of mammalian genomic DNA have been constructed containing clones whose size exceeds 1 Mb.

Qué tamaño de ADN podemos clonar?

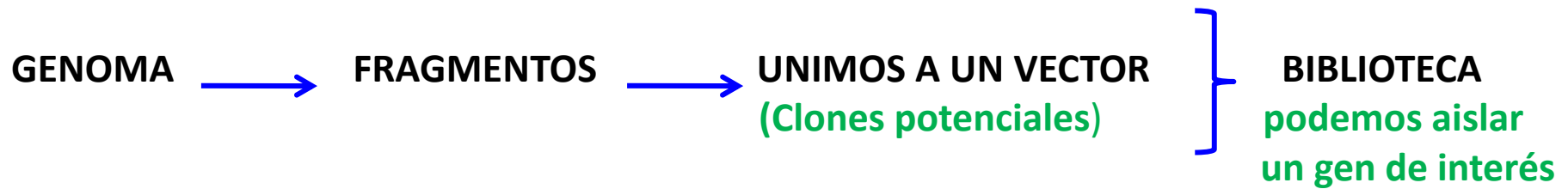
- Plásmidos: insertos de hasta 10 Kb
- Fagos: 25 Kb
- Cósmidos: 45 Kb
- BACS (Cromosomas artificiales de bacterias): 300 Kb
- YACS (Cromosomas artificiales de levaduras): 2000 Kb

Los vectores han permitido clonar el DNA genómico de organismos superiores. Una **colección de clones del genoma** de un organismo dado constituye una **biblioteca genómica** y en ella podemos identificar cualquier gen de interés.

Las bibliotecas de ADN recombinante pueden dividirse en dos grandes grupos:



CLONAR SIGNIFICA AISLAR UNA SECUENCIA DE ADN DISCRETA Y OBTENER MUCHAS COPIAS.



Genoma humano: $2,8 \times 10^9$ bases = $2,8 \times 10^6$ Kilobases (Kb) = 2800 Megabases (Mb) (haploide).

¿CUANTOS CLONES TENEMOS QUE EXAMINAR??

Dependerá: Tamaño de los fragmentos ¿? que vector?

Si lo cortamos **al azar en fragmentos de 20 Kb**, los clones potenciales **serían $n = 1,4 \times 10^5$** ($n = \text{tamaño del genoma "G" / tamaño del inserto "I"} = G/I$)

Para tener una buena probabilidad de aislarlo necesitamos un número mayor de clones. Clarke y Carbon (1976) crearon una fórmula que relaciona la probabilidad (**P**) con el N° de clones necesarios (**N**) para que esa secuencia particular esté incluida (tiene en cuenta la variación en el muestreo, clonado preferencial de ciertas secuencias).

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-1/n)}$$

Supongamos que deseamos tener una probabilidad del 95% con fragmentos de 20 Kb



$1/n =$ fracción proporcional del genoma en un clon

$$\frac{1}{G/I} = \frac{1}{G}$$

$$N = \frac{\ln(1-0,95)}{\ln(1-1/1,4 \times 10^5)} = 4,2 \times 10^5$$

- **P= 99 % N= $6,5 \times 10^5$** Aumenta el tamaño (size) de la biblioteca (library)
- **¿Cómo generamos los fragmentos de tamaño similar cortados al azar?**
Obteniendo ADN en forma cuidadosa p.ej con ClCe. Cortando con una endonucleasa que reconozca un sitio de 4 nt (**frecuente**) y en forma **parcial (algunos sitios se cortan y otros no)**. (P.ej: *Sau3AI* o *Mbol*, y dejan extremos compatibles con *BamHI*).
-
- **Obtenemos un set de fragmentos superpuestos (overlapping) cortados al azar, se fraccionan de acuerdo al tamaño por electroforesis, cromatografía, centrifugación** (relativamente grandes, pueden incluir un gen completo y sus secuencias flanqueantes). Opcional: tratar con fosfatasa alcalina para evitar que se unan entre sí.
- **Se insertan en un vector** p.ej. λ , se empaqueta in vitro y se infecta la cepa adecuada (recA-)
- **Se siembra en placas con medio de cultivo** y se obtienen placas de lisis. **Podemos buscar el clon deseado** con una sonda. Esta es la biblioteca “primaria”. Si alguno de los clones crece más rápido se ve reflejado en el tamaño de la placa de lisis. **Para una bacteria o levadura se puede tener la biblioteca en unas 20 placas.**
- **Se puede “amplificar” o sea obtener una réplica de cada clon:** se cubre la superficie de la placa con caldo LB o buffer y se deja unas horas y luego se guarda esa suspensión líquida con fagos durante años. **Se puede titular (unidades formadoras de placas/ ul)**

Screening de bibliotecas: como seleccionar un clon particular

1) Hibridización: se plaquea la biblioteca de acuerdo al título tratando de no llegar a confluencia. Cuando se ven las placas de lisis (o colonias) se transfieren a filtros de nitrocelulosa, se desnaturaliza con HONa, se hornean los filtros, se hibrida con la sonda, se lava (ver la astringencia), se hace autoradiografía.

2) PCR: diseñando **oligos** (degenerados, buscar en bases de datos de secuencias) y luego estudiar el fragmento obtenido

3) Anticuerpos: la biblioteca se debe preparar en un vector de expresión como λ gt11 (el inserto se clona como fusión a β -galactosidasa) y si entra en fase se expresa la proteína. Las placas de lisis se transfieren a filtros embebidos con IPTG. Se investiga con los anticuerpos (similar al western blot)

4) Complementación: con los clones de la biblioteca preparada en un vector que tenga un promotor que permita expresar la proteína, se transforma alguna mutante en el gen que deseamos aislar. Crecerán solamente los clones que complementan la mutación.

Si queremos buscar el clon de un gen que se transcribe tenemos que usar una biblioteca de cDNA. Porque?? Porque el cDNA se obtiene a partir del RNAm

BIBLIOTECA DE ADN

- **Es esencialmente igual** para un organismo cualquiera sea el tipo de célula o el estadio de desarrollo



BIBLIOTECA DE cDNA

- **Distinta para cada tipo de célula y estadio**, o condiciones particulares. Rica en los clones de RNAs abundantes en el tejido y pobre en clones de los RNAm raros. Un RNA puede tener diferentes clones que representan splicing alternativo

RNAm abundante: 100.000 moléculas/cell

RNAm moderadamente abundante: 4.000 moléculas/cell

RNAm raro: 5-20 moléculas/cell

El número de clones a ser analizado dependerá de la frecuencia o abundancia del RNAm en la célula, y esto determina el tamaño de la biblioteca de cDNA que necesitamos para aislarlo.

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1 - \text{Fracción del RNAm en el total de ARNms})}$$



Va a haber muchos clones de los RNAs abundantes y pocos de los raros!!!!

Trabajar con una Biblioteca completa de cDNA sería impráctica si queremos aislar un RNAm raro

N de clones >1 millón conviene hacer un enriquecimiento de los RNA raros.

i) Tejido: obtener RNA total o aislar el RNAm eucariota a partir de su cola de poliA

ii) **Fraccionamiento en gradiente de centrifugación por tamaño** (o alguna otra estrategia que permita bajar la proporción de abundantes)

iii) Convertir el RNA en cDNA. Después ya se trabaja con el cDNA (es menos susceptible a la degradación que el RNA).

iv) Opcional hacer un clonado sustractivo para enriquecer la preparación en el RNAm que estamos buscando

PREPARACION Y SCREENING DE UNA BIBLIOTECA DE cDNA



Células o tejidos conteniendo el gen o proteína de interés



Aislar RNA (RNAm)



**Síntesis de la primera hebra (first strand) de cDNA
con transcriptasa reversa**



**Sintetizar cDNA doble hebra
con una polimerasa**

Metilar el cDNA (si fuera necesario)



Unir linkers o adaptadores al cDNA



**Preparar la biblioteca de cDNA
con bacteriófago lambda o un vector de clonado plasmídico**

Los fagos infectan *E. coli* con eficiencia = 1
Si es un plásmido se debe transformar por electroporación.



Investigar en la biblioteca si se encuentra el clon deseado



Validar la identidad del clon