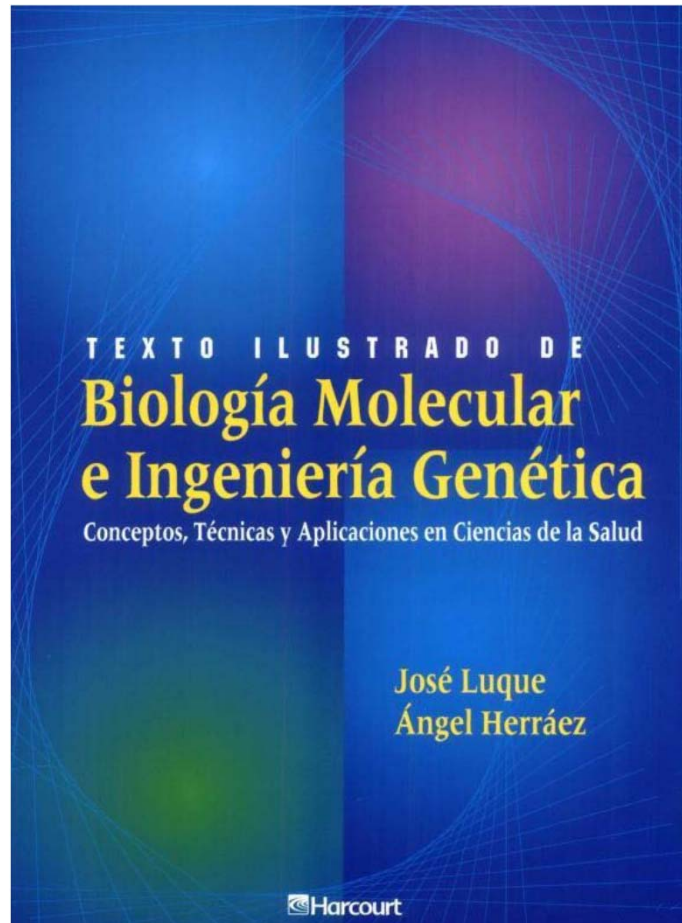




Docente: Adriana Krapp

Tema 16

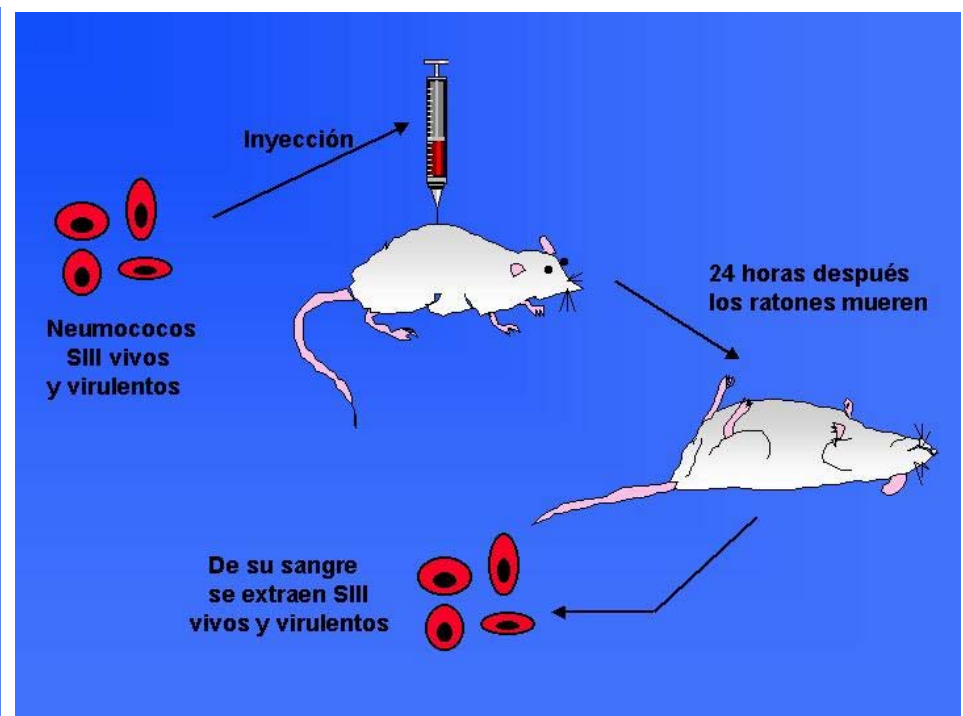
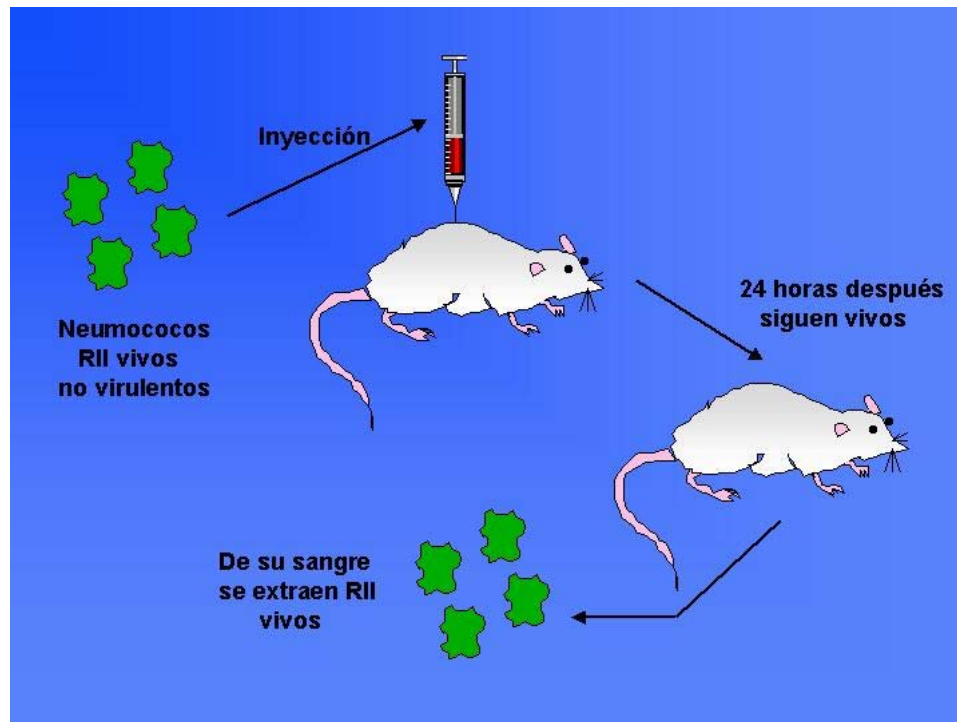
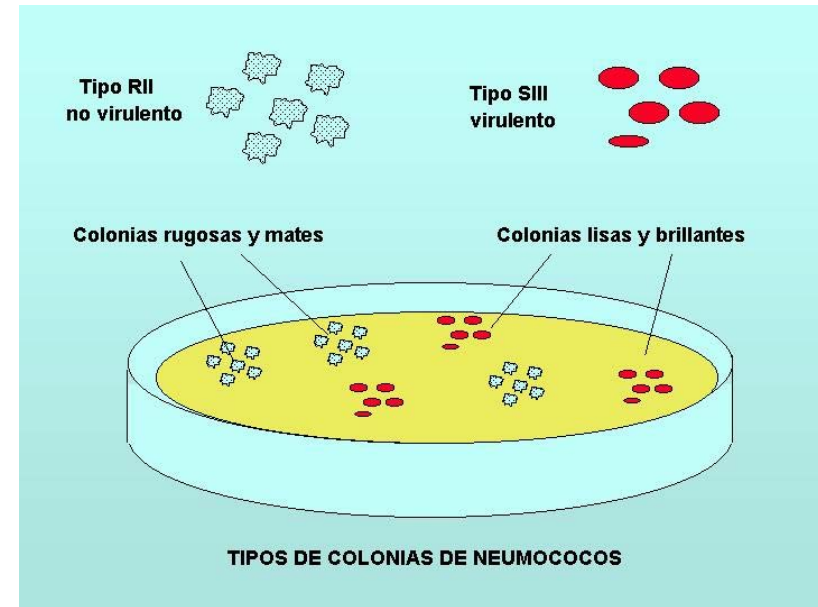
**Clonación celular: Tecnología
del DNA recombinante**

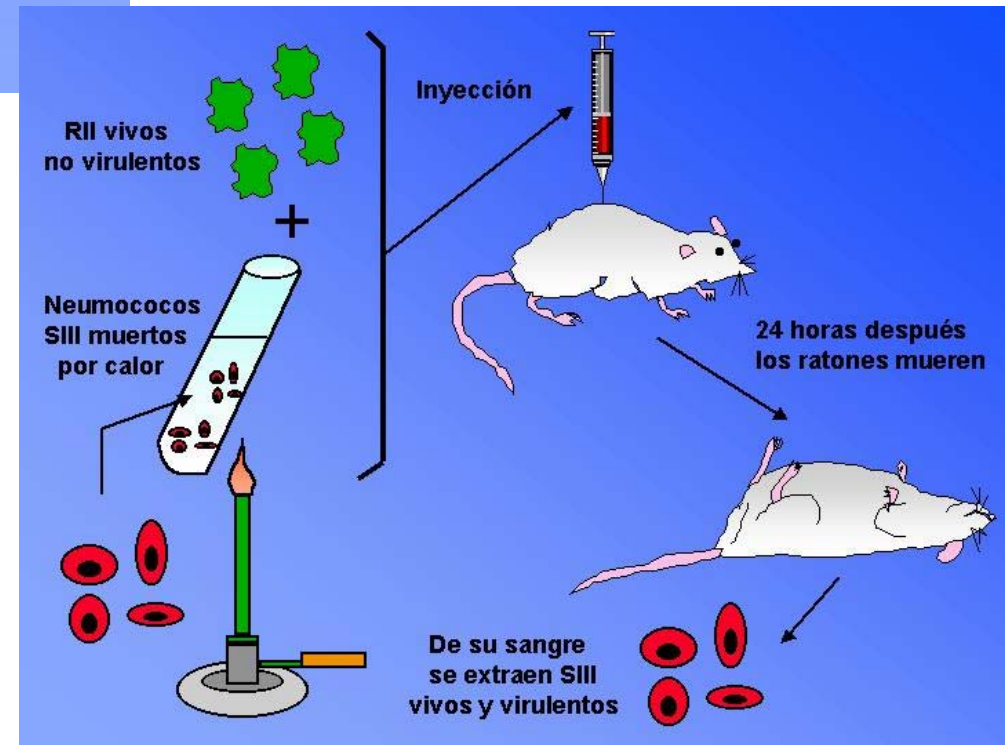
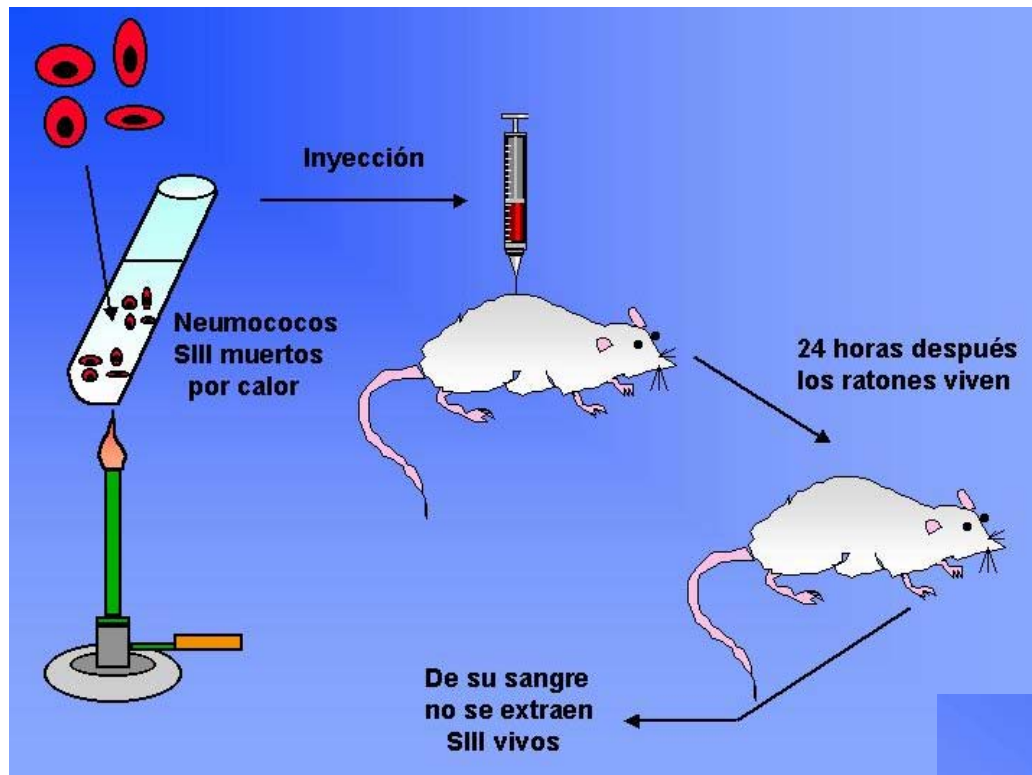
Biblioteca de FBIOYF

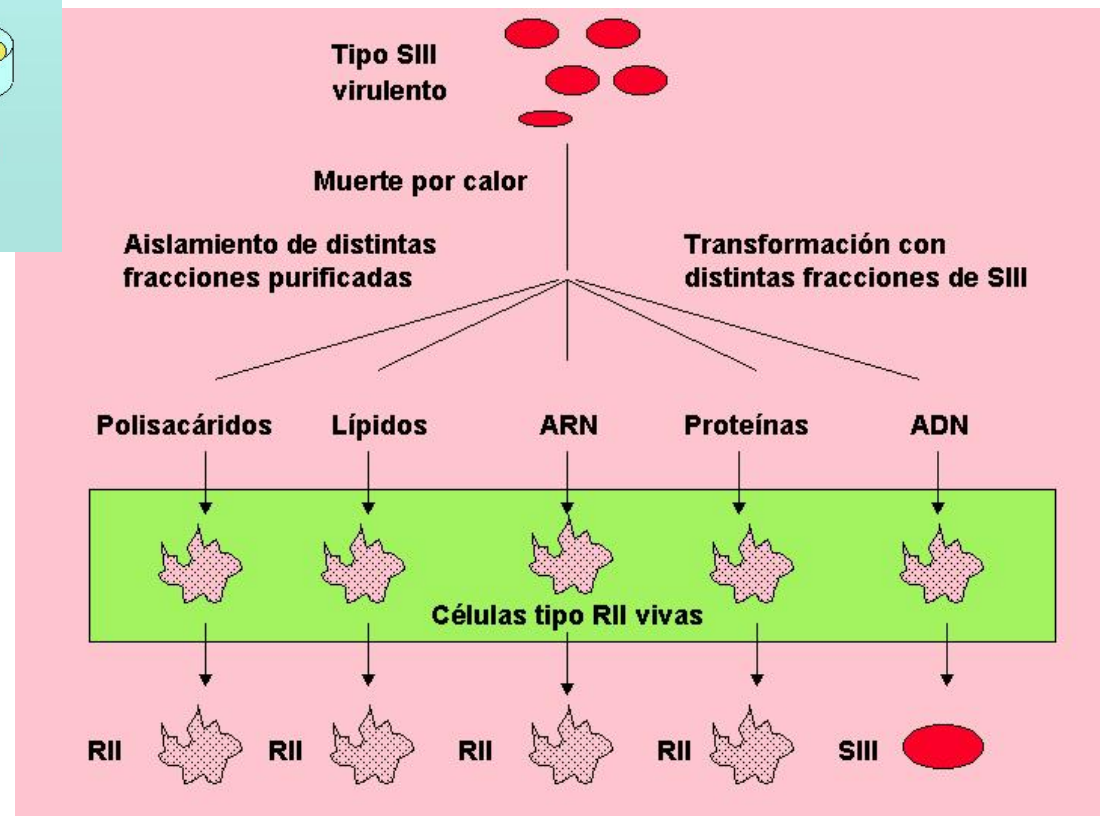
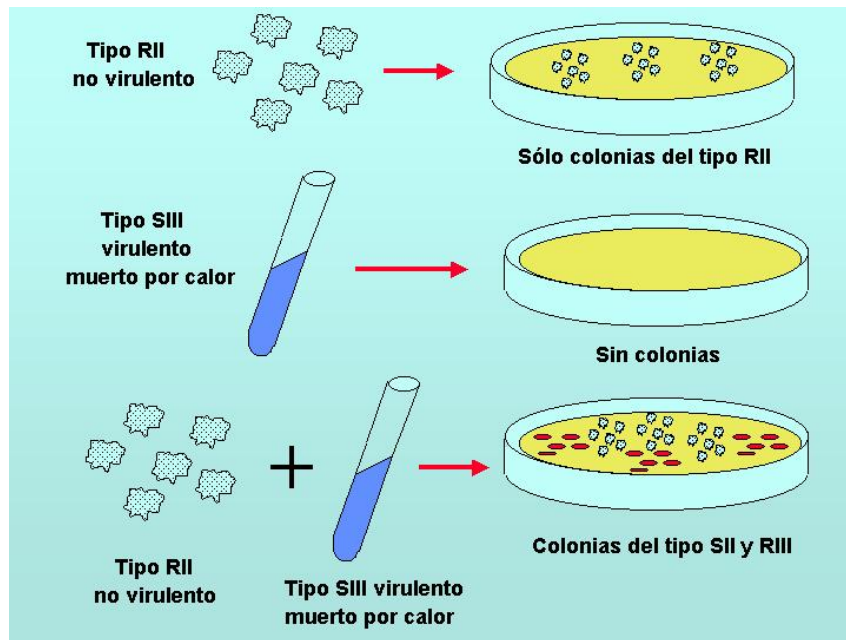
TRANSFORMACION BACTERIANA

1928: Griffith

Diplococcus pneumoniae







1944: Avery, Macleod y McCarty determinaron que el principio transformante era el DNA desnudo

TRANSFORMACION : Incorporación de ADN **desnudo** por una célula

Debemos distinguir la **transformación natural** de la **transformación artificial**

Transformación natural en bacterias: es la que sucede en la naturaleza, con las bacterias en estado de competencia: estado fisiológico especial, inducible, genes localizados en el cromosoma (genes *com*) expresados coordinadamente por condiciones particulares (densidad del cultivo, temperatura, nutrientes, etc). Mecanismo que sirve a las bacterias para aumentar su pool de genes creando nuevas combinaciones, como nutrientes, para reparación, etc. El ADN se integra al cromosoma **por recombinación homóloga**.

Gram positivos: *Bacillus, Streptococcus*

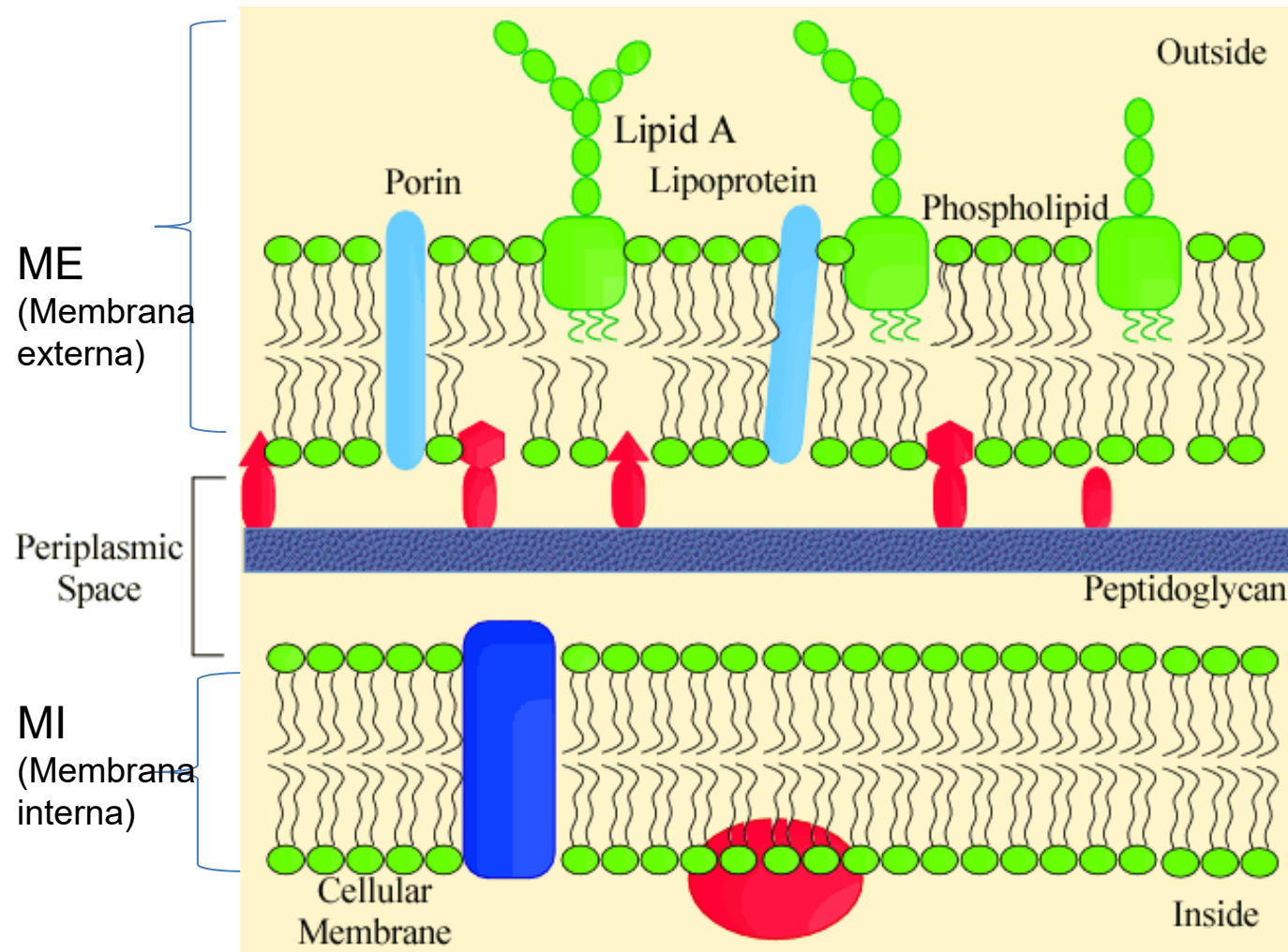
Se une ADN de cadena doble, una hebra se degrada y la otra entra.

Gram negativos: *Acinetobacter, Haemophilus, Neisseria*

Se une ADN doble hebra, entra al periplasma, y una hebra se degrada

Mandel e Higa 1970; Cohen y col. 1972 **Transformación Artificial:**
Escherichia coli, Salmonella, Pseudomonas

CLONADO DEL ADN RECOMBINANTE!



***E. coli*: 0,5 – 2 μm**

Bacterias creciendo en fase exponencial:

Cloruro de Calcio 0.1 M

y ADN plasmídico **Incubar 1 h hielo**

COMPETENCIA

Ca⁺⁺ permite que el ADN se adsorba sobre la superficie de la bacteria

Se forman de complejos de coordinación entre el ADN y el LPS (lipopolisacárido)

0 °C → 42 °C 90 seg → 0 °C

Heat shock

Heat shock: Despolariza la membrana

Libera lípidos y forma poros.

Disminuye el potencial de membrana
a un valor muy bajo

ADN pasa a través de los puntos de
contacto entre ME y MI

Volver a 0 ° C: Restablece el potencial
de membrana a su valor inicial

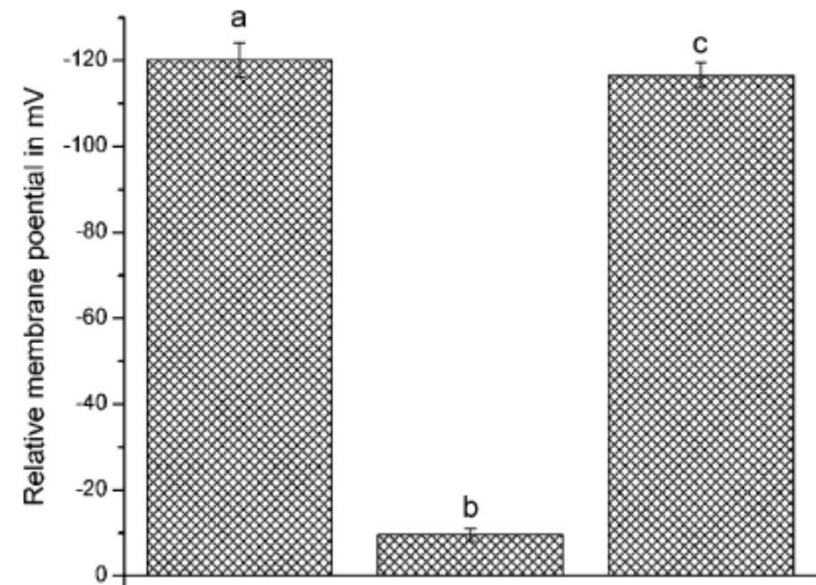


Fig. 2. Fluorimetric measurement of relative membrane potential of competent cells at different steps of transformation. (a) After generation of competence in cells kept in 100 mM CaCl₂ at 0 °C for 30 min; (b) 90 s after shifting the competent cells from 0 to 42 °C; (c) 5 min after shifting the heat-pulsed cells from 42 to 0 °C. This experiment was repeated for seven times.

Transformación artificial

Se parte de un cultivo de *E. coli* crecido hasta **fase exponencial de crecimiento.**

Método químico

- Presencia de iones Ca^{++}
- Agregar el plásmido e incubar 30-60 min
- **Shock térmico:** 42 °
- Incubar a 0 ° 3-5 min- Agregar medio de cultivo e incubar a 37 ° 1h para que las bacterias se dupliquen y el plásmido se replique
- Sembrar en placas con antibiótico para **seleccionar** las bacterias transformadas

Incubar a 0°

Electroporación

- **Abundante lavado de las células para eliminar iones**
- Se aplica una corriente eléctrica y ésta despolariza la membrana, se forman poros que permiten la entrada del ADN. Se incuban las bacterias a 37 ° y se siembran.

Estructura del ADN para transformar

ADN plasmídico circular (superenrollado o relajado) > tamaño < eficiencia. **Genotipo de la cepa receptora:** *hsdR*- *recA*-. **El plásmido se replica dando lugar a múltiples copias por célula.**

ADN lineal: mutantes en *recBCD* y *sbcB*- (mutantes en las subunidades de la exonucleasa V y exonucleasa I), pero *recA*+. **El ADN se integra al genoma por recombinación homóloga.**

Cómo evaluamos la transformación?

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\text{Nº de bacterias transformadas}}{\text{microgramo de ADN}}$$

Químico

10^6 - 10^8 UFC/ug de ADN

10-12% bacterias se vuelven competentes

0,1-1% de moléculas del plásmido dan lugar a una transformante

Electroporación

10^9 - 10^{10} UFC/ug de ADN

90% bacterias competentes

10% de moléculas de plásmido dan una transformante

TRANSFORMACION QUIMICA

- 1) Condiciones simples: Presencia de cationes divalentes o multivalentes Calcio, Manganeso, Bario, Cobalto
- 2) Condiciones complejas: Solventes orgánicos, reactivos SH, DMSO, DTT

ETAPAS DE LA TRANSFORMACION BACTERIANA

- 1) Asociación del DNA con la célula (**0º C: afecta la fluidez de la membrana estado “quasi-cristalino”**):
- 2) Entrada del DNA: por las zonas de contacto entre la ME (membrana externa) y MI (membrana interna) (transportador: complejo de polihidroxibutirato-polifosfato-Ca en la MI) (**42º C: relajación o reorganización transitoria de la envoltura y se completa la entrada**)
- 3) Establecimiento como episoma estable:

Si es un plásmido: se produce la replicación a partir de su propio *ori*.

Si es ADN lineal: se integra por recombinación homóloga y queda incorporado al genoma.

(37 ºC: para que se dupliquen las bacterias).

TRANSFORMACION DE LEVADURAS (*Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*) obtener proteínas recombinantes con modificaciones postraduccionales (glicosilaciones), sistema secretorio

Métodos:

Acetato de Litio o Cesio (metales alcalino térreos) y PEG seguido de shock térmico. Eficiencia: 400-500

Preparación de esferoplastos: es trabajoso y los esferoplastos deben regenerar la pared, produce poliploides.

Electroporación

Plasmidos de levaduras (Y= yeast): son vectores híbridos porque tienen secuencias bacterianas para propagarlos en *E. coli* y secuencias de levaduras.

Ylp (integrativo) tienen secuencias de levaduras para integrarse en el genoma por recombinación homóloga, no se replica. Propósito: introducir un gen de interés o provocar deleciones en un gen sustituyendo por una versión delecionada o mutagenizada.

YRp: tienen replicación autónoma porque tienen las ARS (sec. de rep. autónoma), pero son inestables y se pierden porque no hay segregación equitativa

YEp (episomales) tienen secuencias del plásmido de 2 μ (plásmido natural de levaduras) para mantenerse como episoma; promotor de levaduras inducible (gal1, gal10 inducibles por galactosa, pgk (fosfogliceratokinasa)).

YCp: son estables porque contienen segmentos del centrómero

YACS: vectores para clonar fragmentos de hasta 2 Mb (cromosoma artificial)