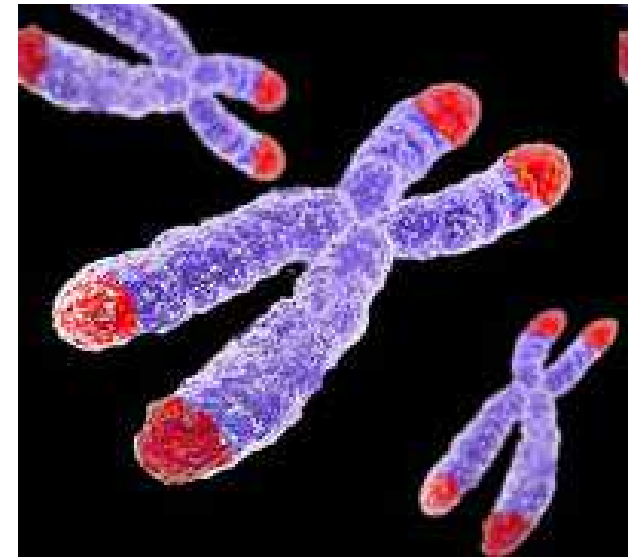
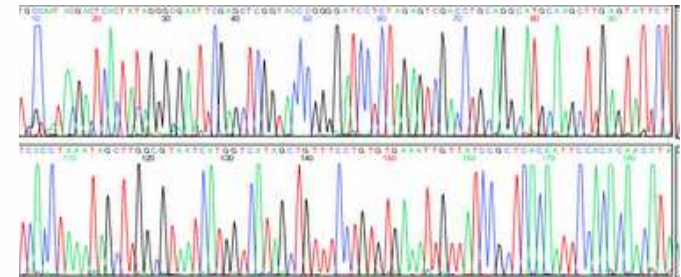
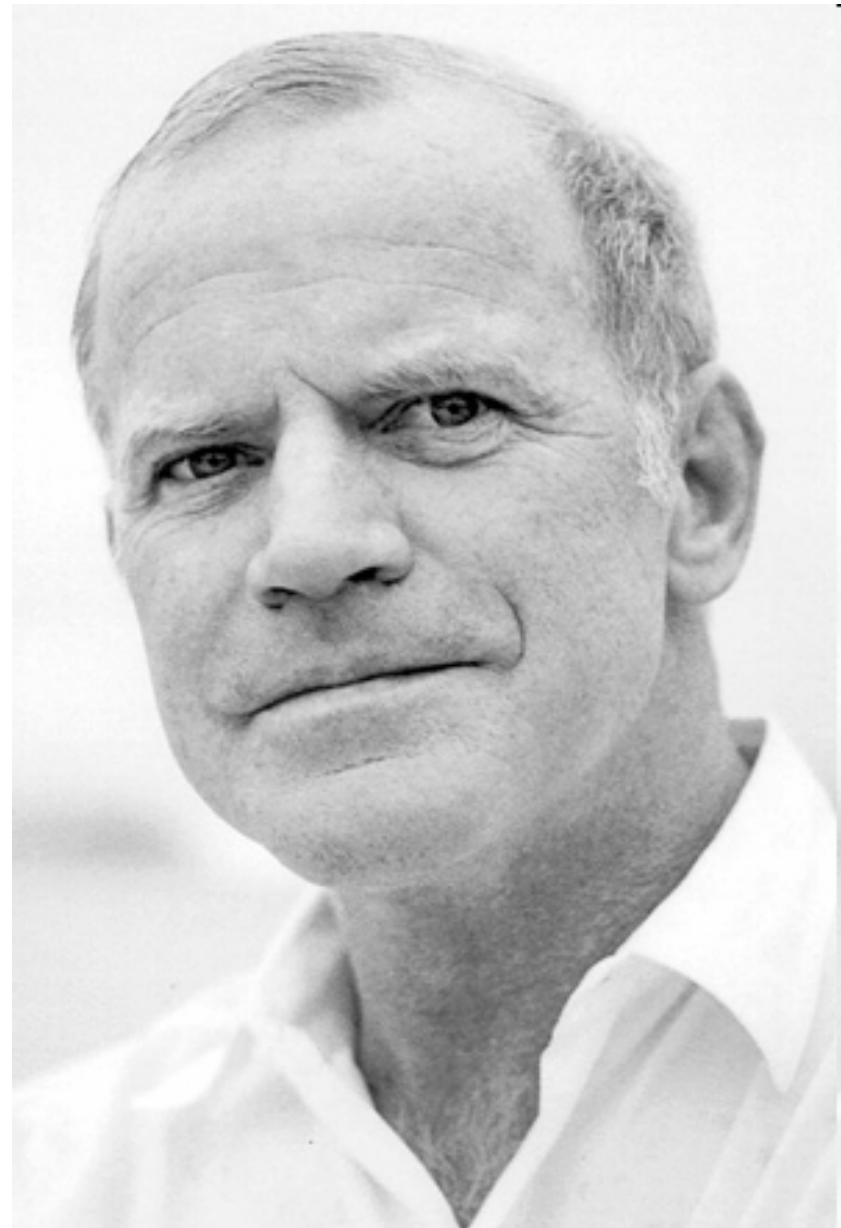
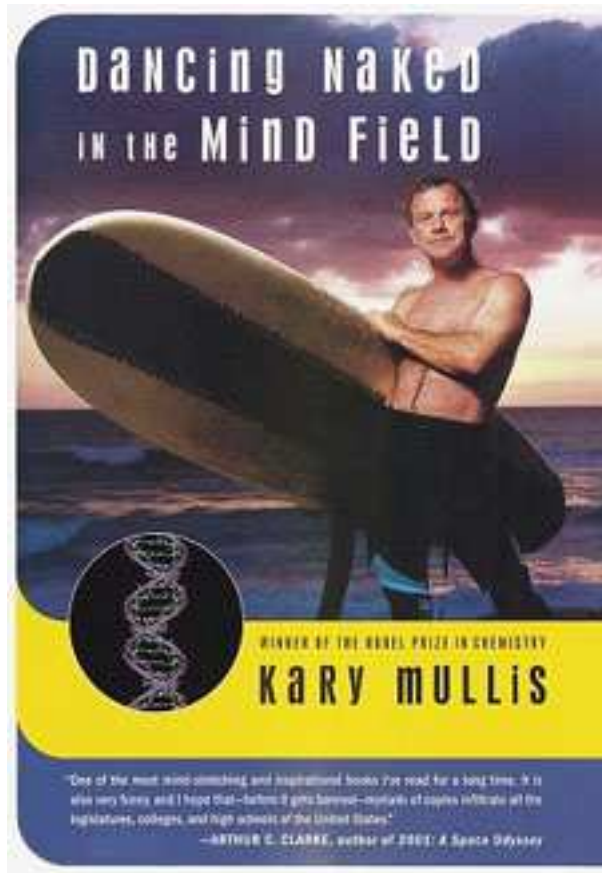


TEMA 1: INGENIERÍA GENÉTICA



- PCR
- Digestión con enzimas de restricción
- Electroforesis
- Clonación
- Secuenciación
- Marcadores Moleculares

Kary Mullis, inventor de la PCR. Premio Nobel de Química en 1993



“One Friday night I was driving, as was my custom, from Berkeley up to Mendocino where I had a cabin far away from everything off in the woods. My girlfriend, Jennifer Barnett, was asleep. I was thinking“

“In about a mile it occurred to me [...] that I could make an arbitrarily large number of copies of any sequence”

“Afternoon came, including new bottles of celebratory red fluids from Jack's Valley Store, but I was still puzzled, alternating between being absolutely pleased with my good luck and clever brain, and being mildly annoyed at myself and Jennifer Barnett, for not seeing the flaw that must have been there”

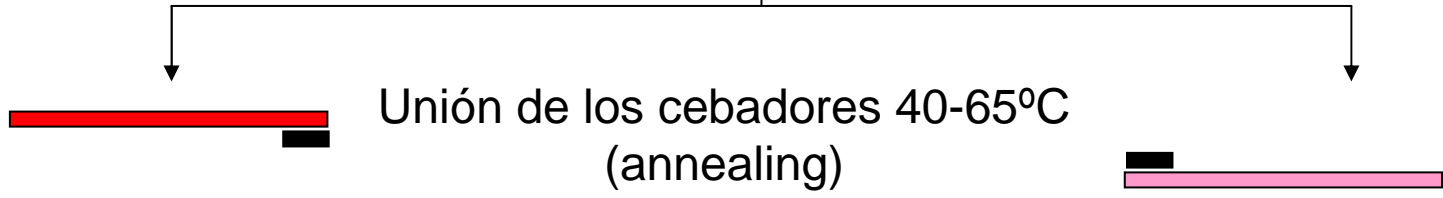
http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html

Reacción en cadena de la polimerasa PCR

- **ADN** monocatenario **molde**
- Un **cebador** (fragmentos monocatenarios de 17 a 25 pb, complementarios a una región conocida)
- **Nucleótidos**
- **Polimerasa**
- **Iones magnesio** y otras sales



Desnaturalización 90°C



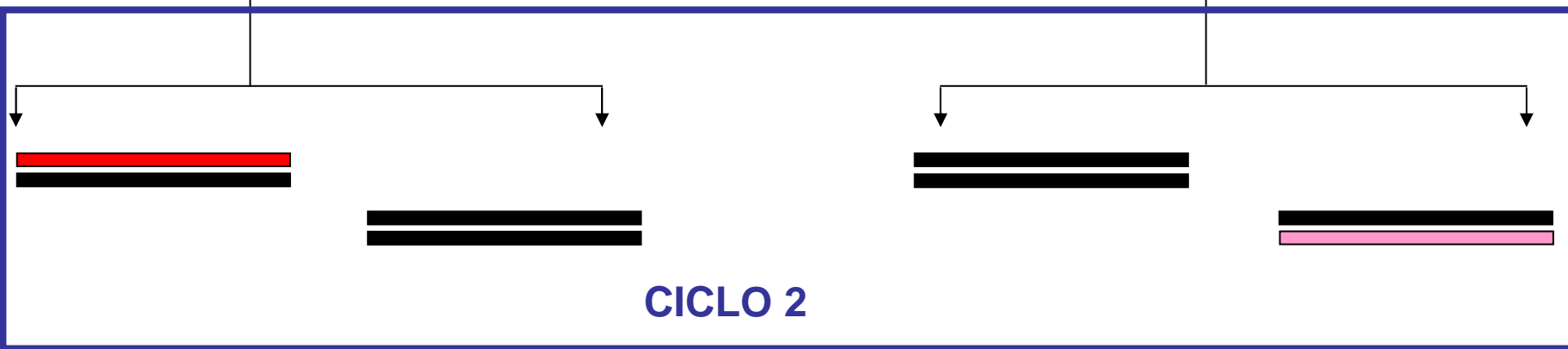
Unión de los cebadores 40-65°C
(annealing)



Extensión

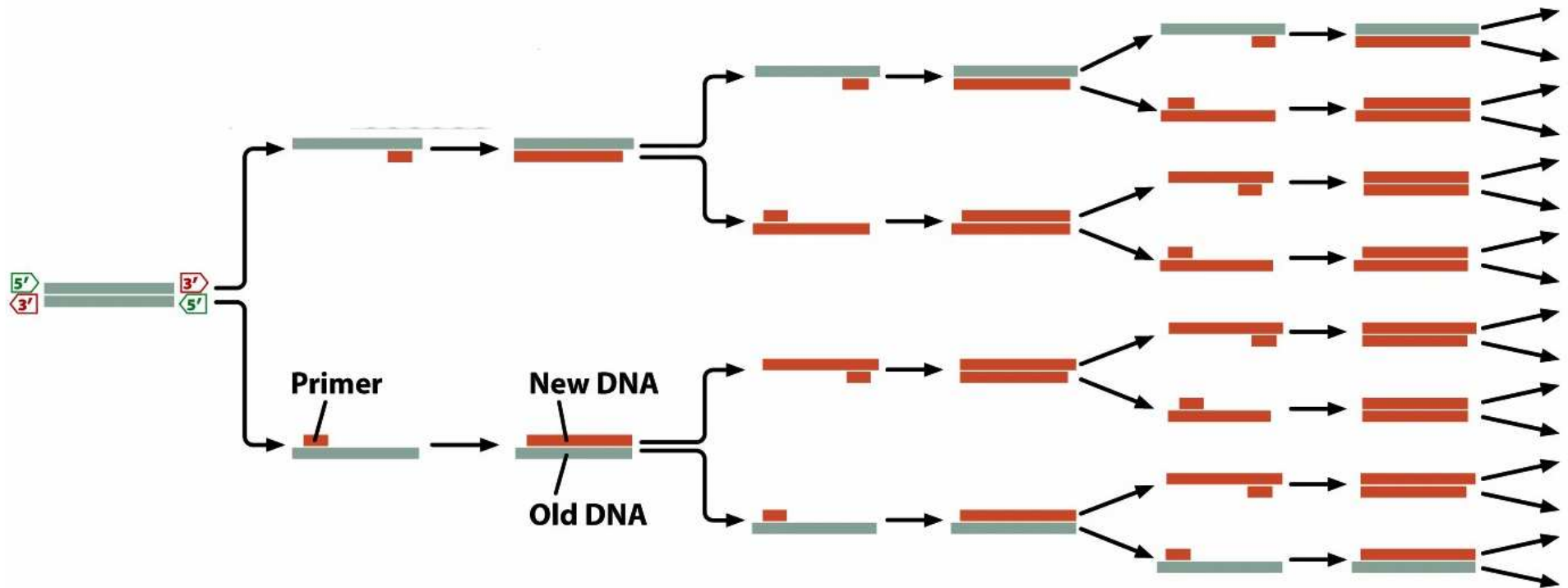


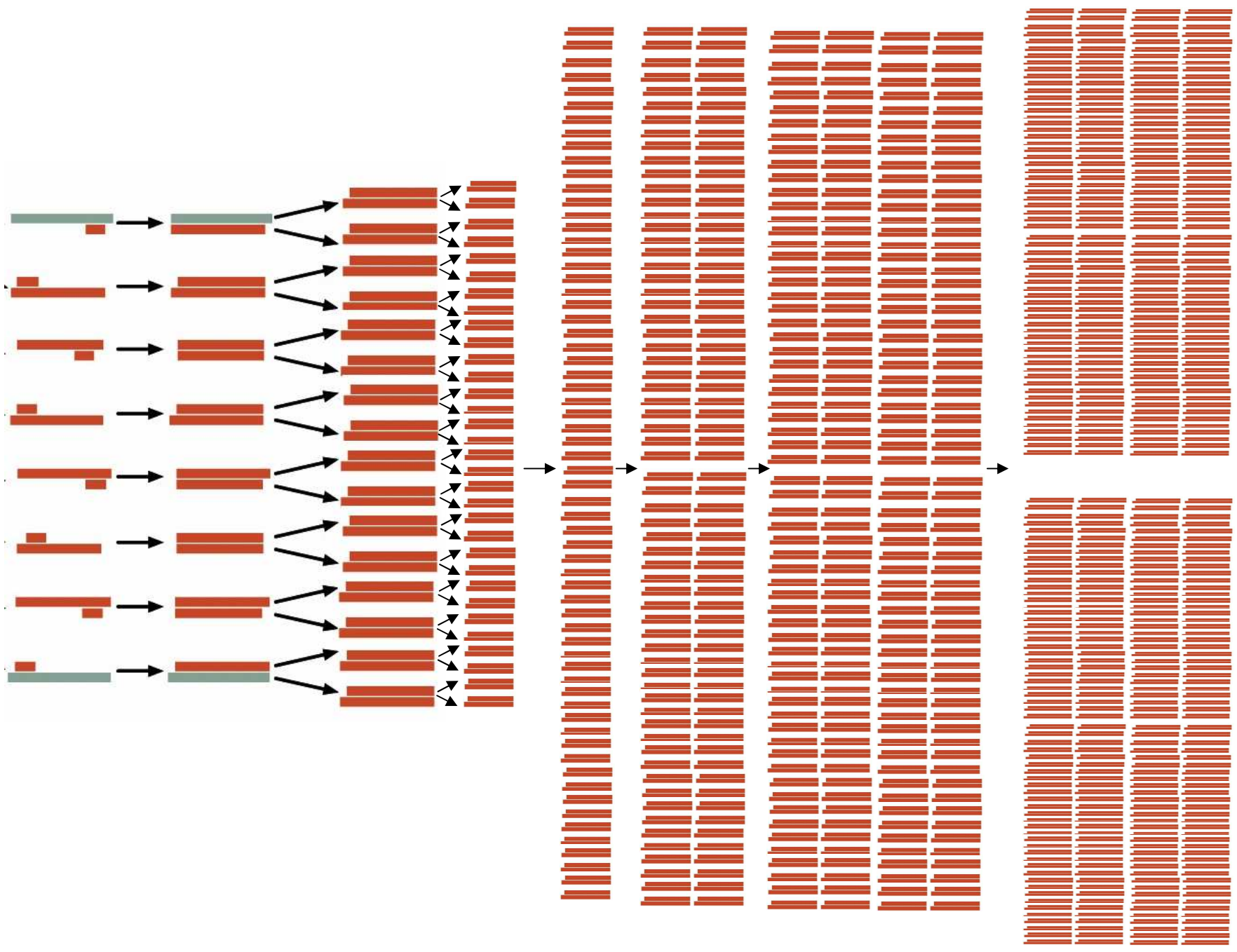
CICLO 1



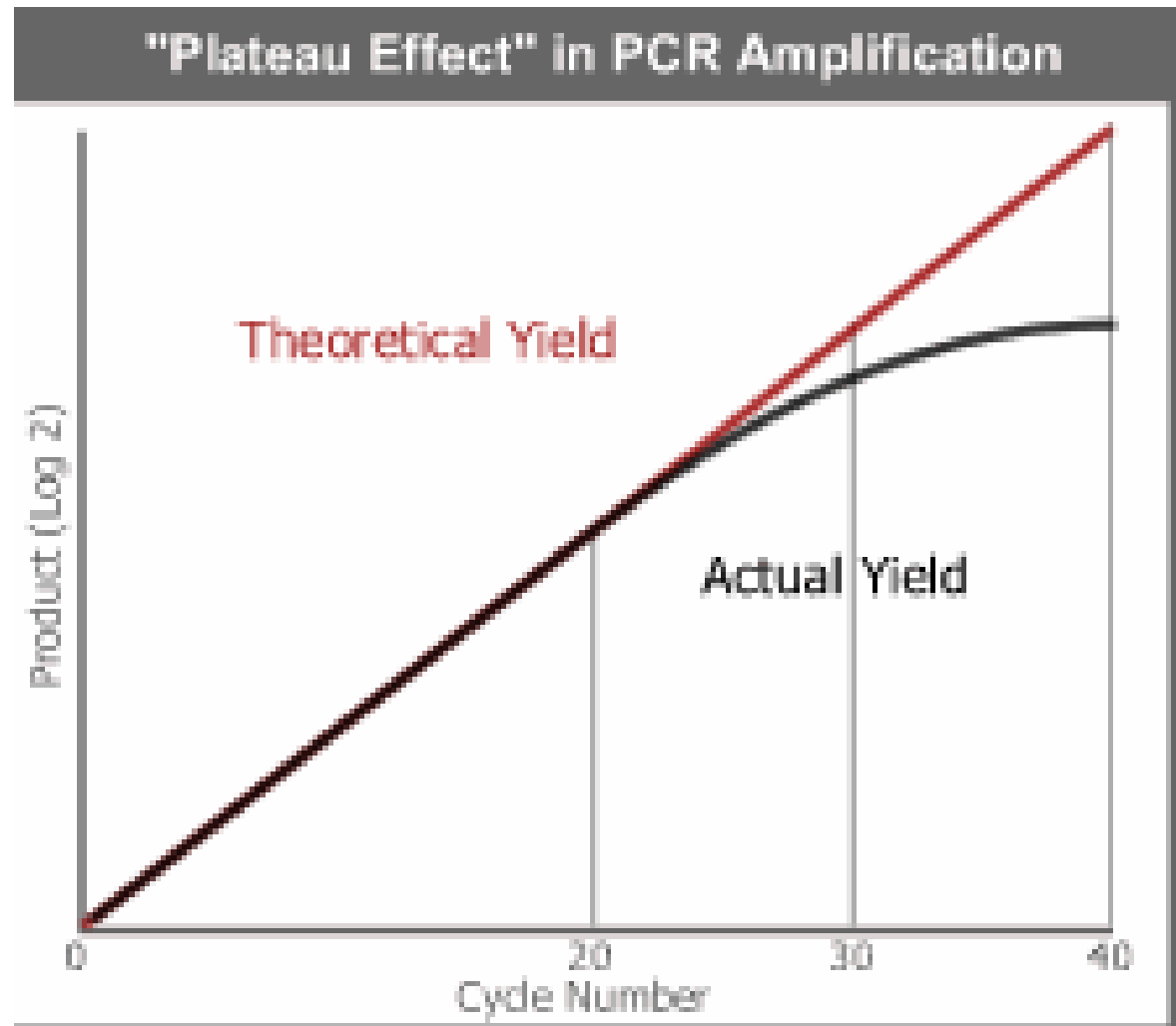
CICLO 2

Reacción en cadena de la polimerasa PCR

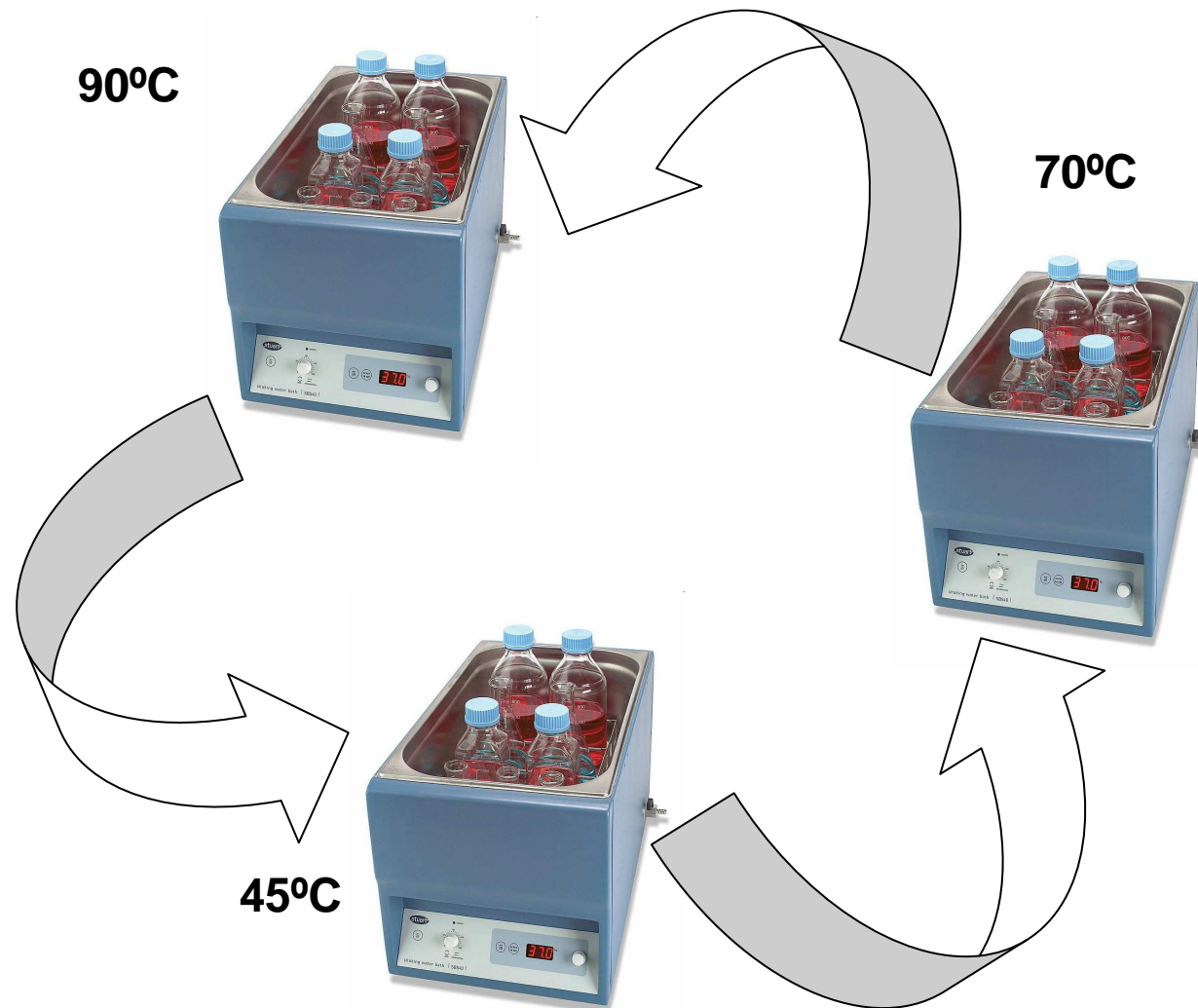




Reacción en cadena de la polimerasa PCR



Reacción en cadena de la polimerasa PCR



Reacción en cadena de la polimerasa PCR

Termociclador
automático



Reacción en cadena de la polimerasa PCR

- Aislamiento de fragmentos concretos (filogenia, análisis,...)
- Diagnóstico de enfermedades hereditarias
- “Huella Genética” (Genética forense)
- Diagnóstico de enfermedades infecciosas

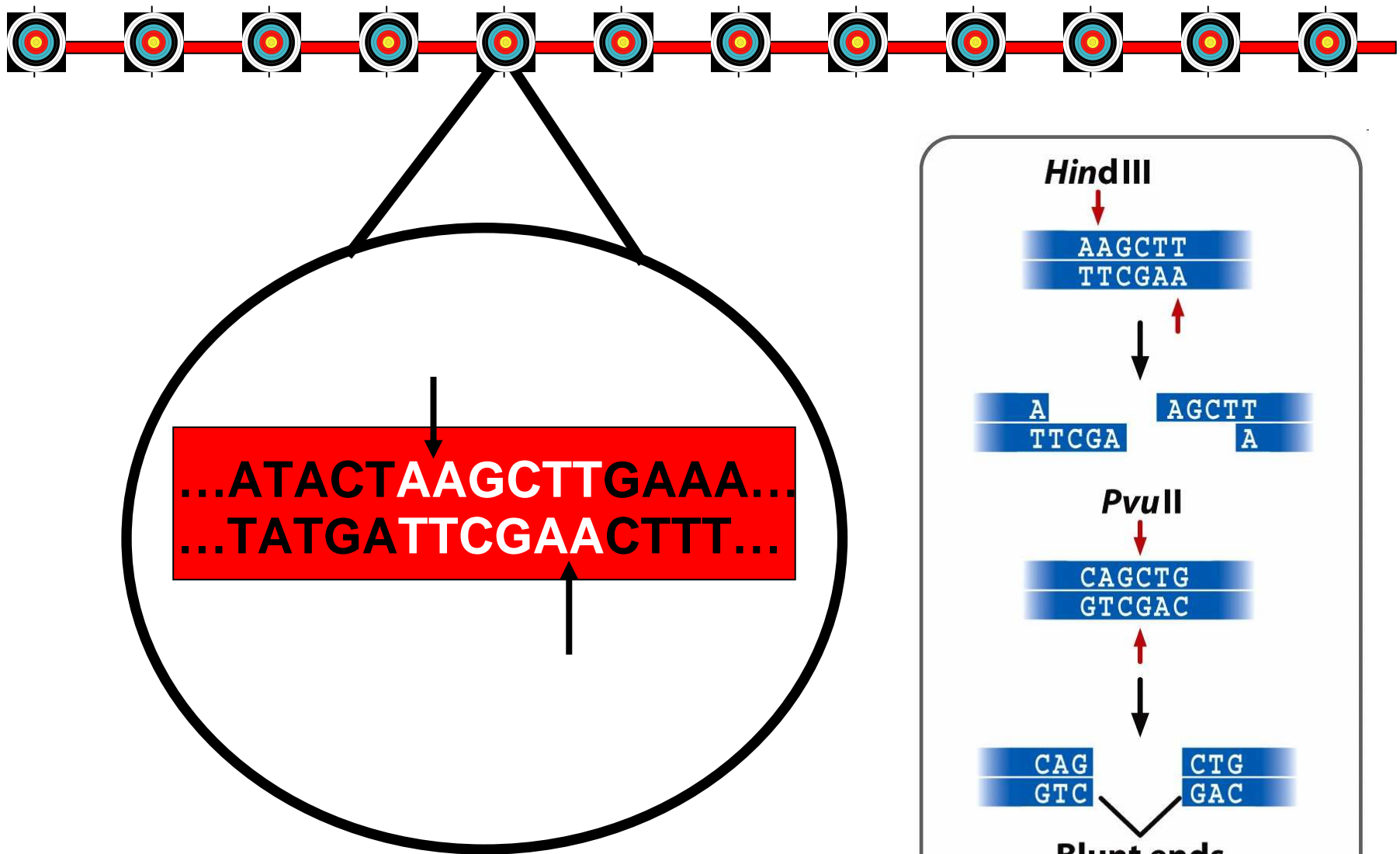
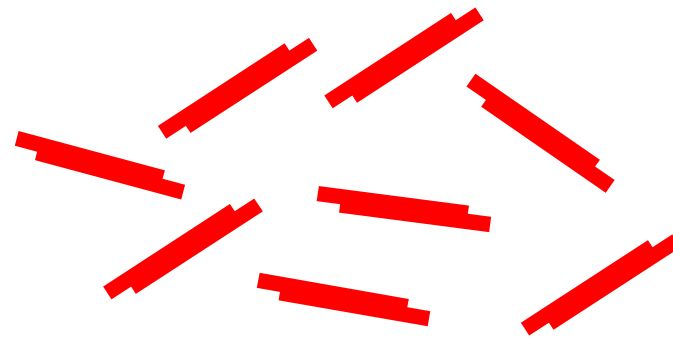
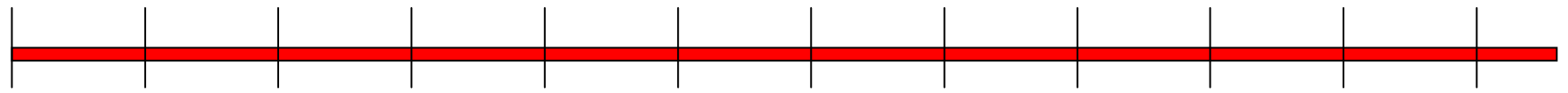
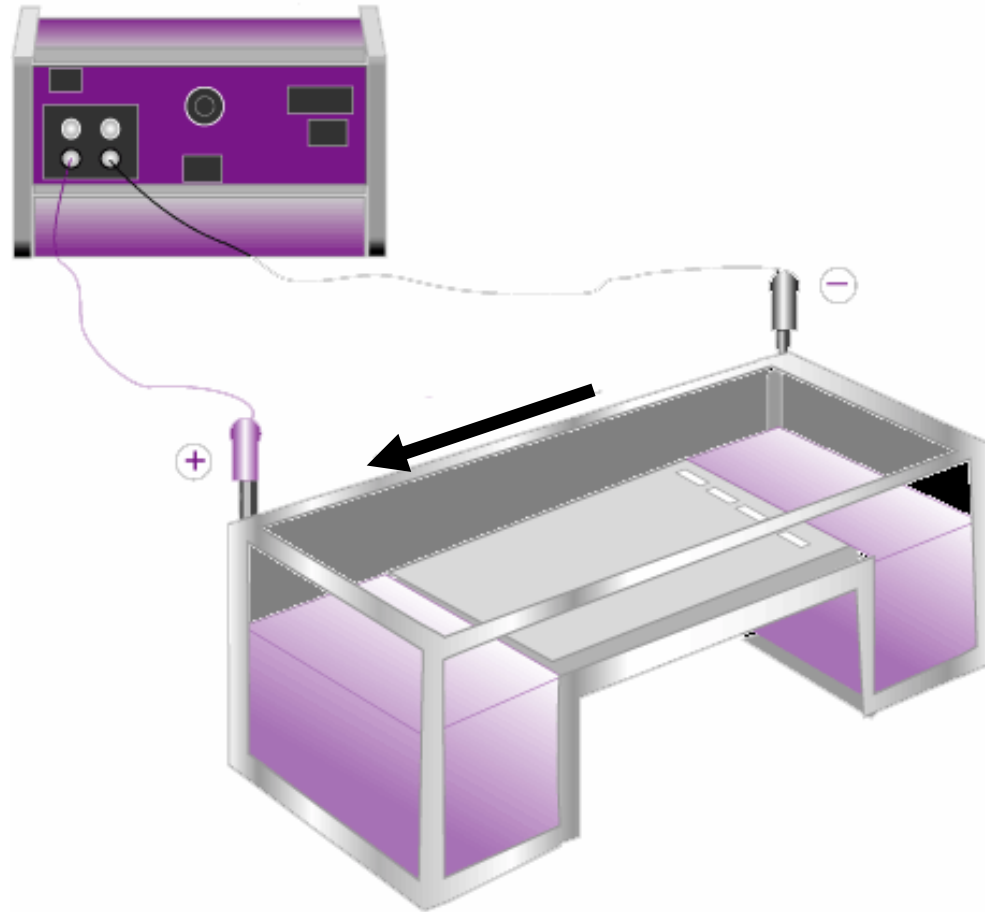


Figure 19-2a
Genetics: A Conceptual Approach, Third Edition
 © 2009 W.H. Freeman and Company



Digestión con enzimas de restricción

Electroforesis en gel de agarosa



Electroforesis en gel de agarosa

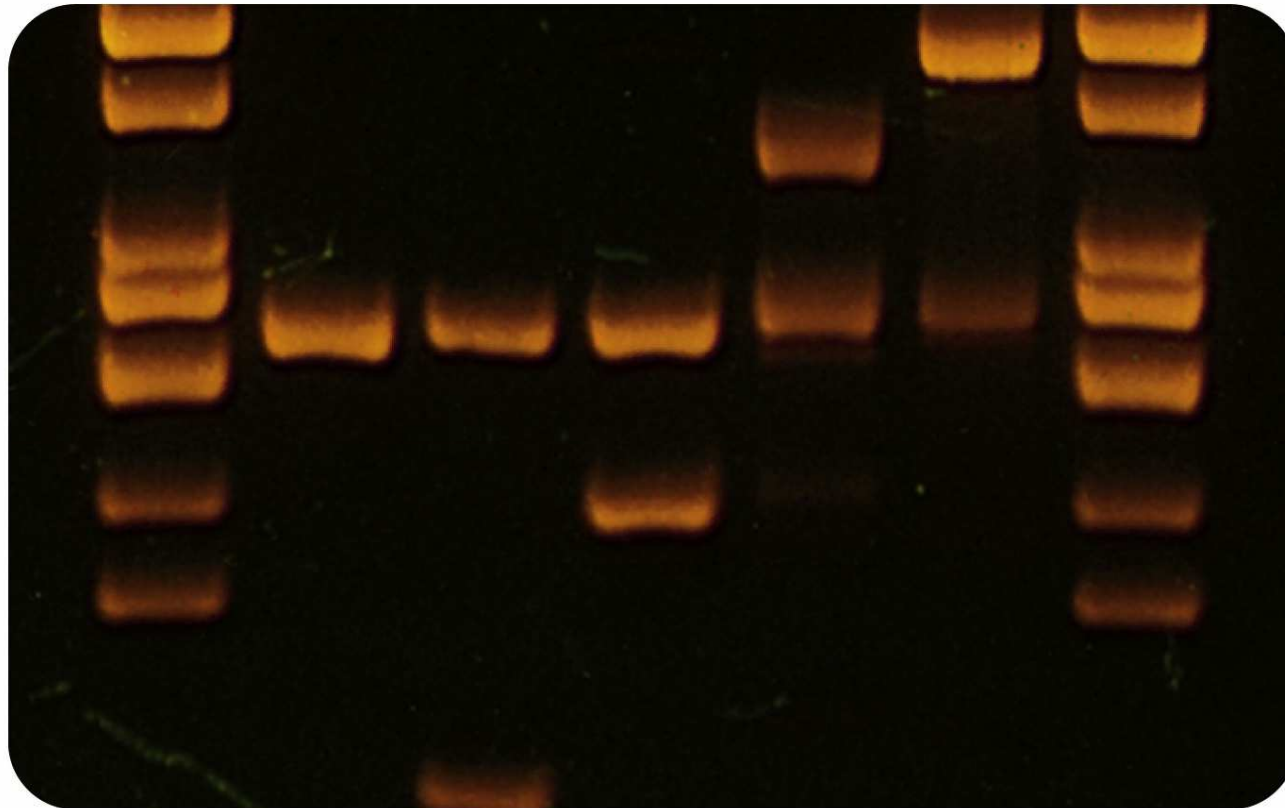
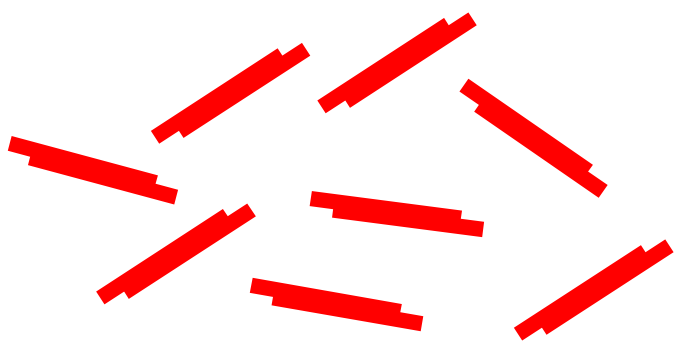
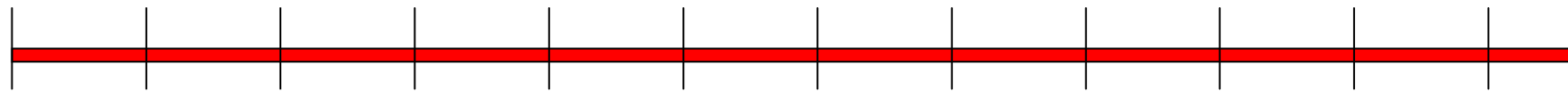
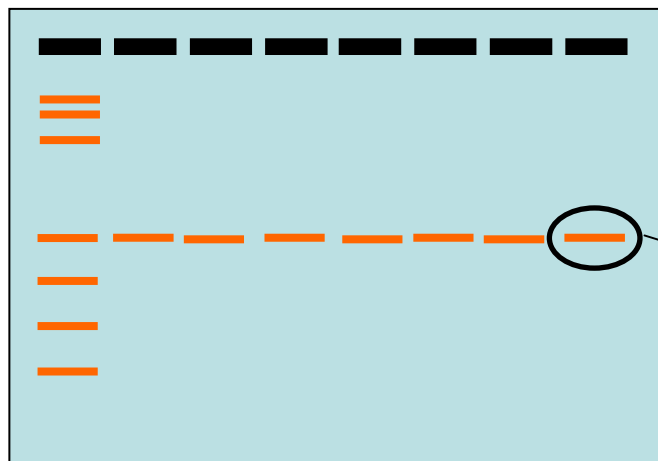


Figure 19-3d
Genetics: A Conceptual Approach, Third Edition
© 2009 W.H. Freeman and Company



Digestión con enzimas de restricción



Separación de fragmentos mediante electroforesis

Aislo y purifico la banda

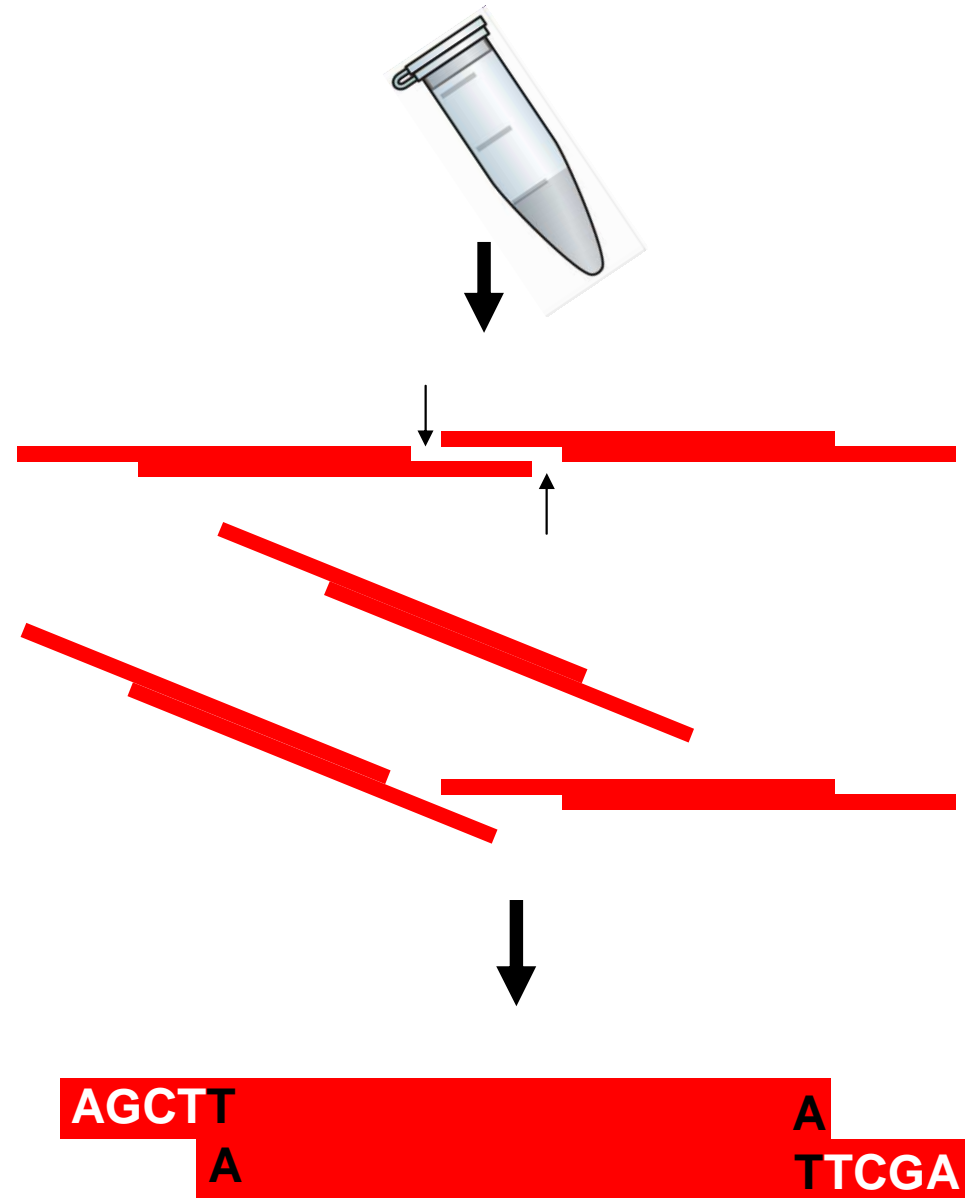
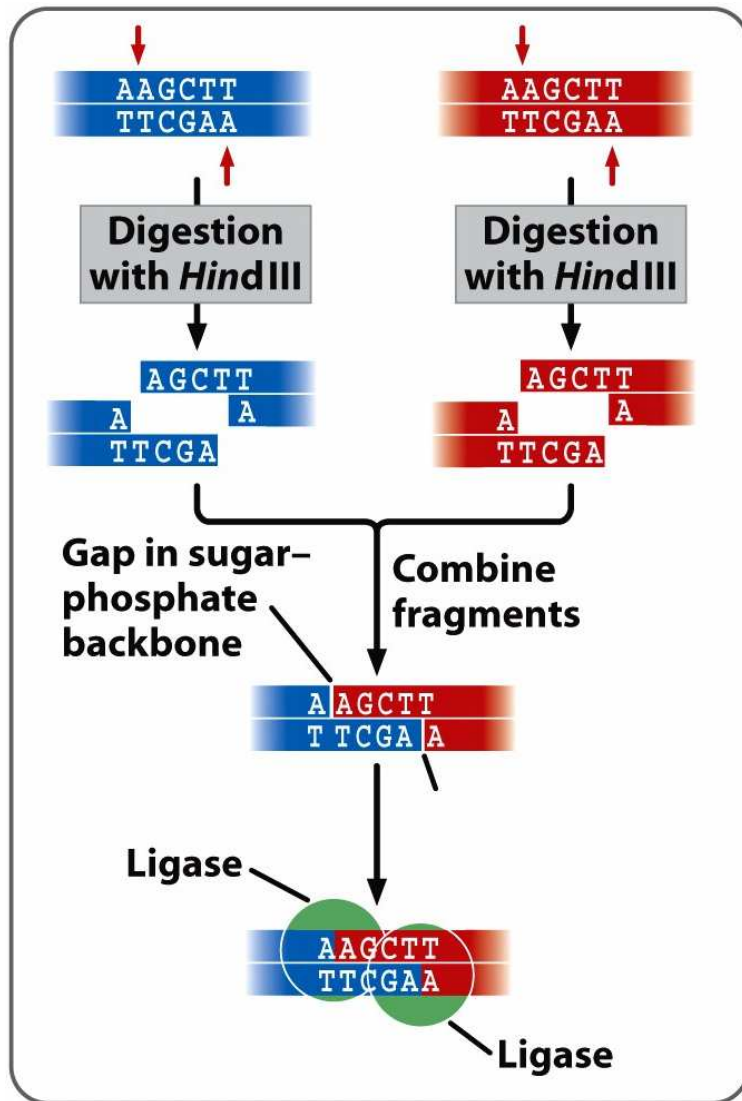
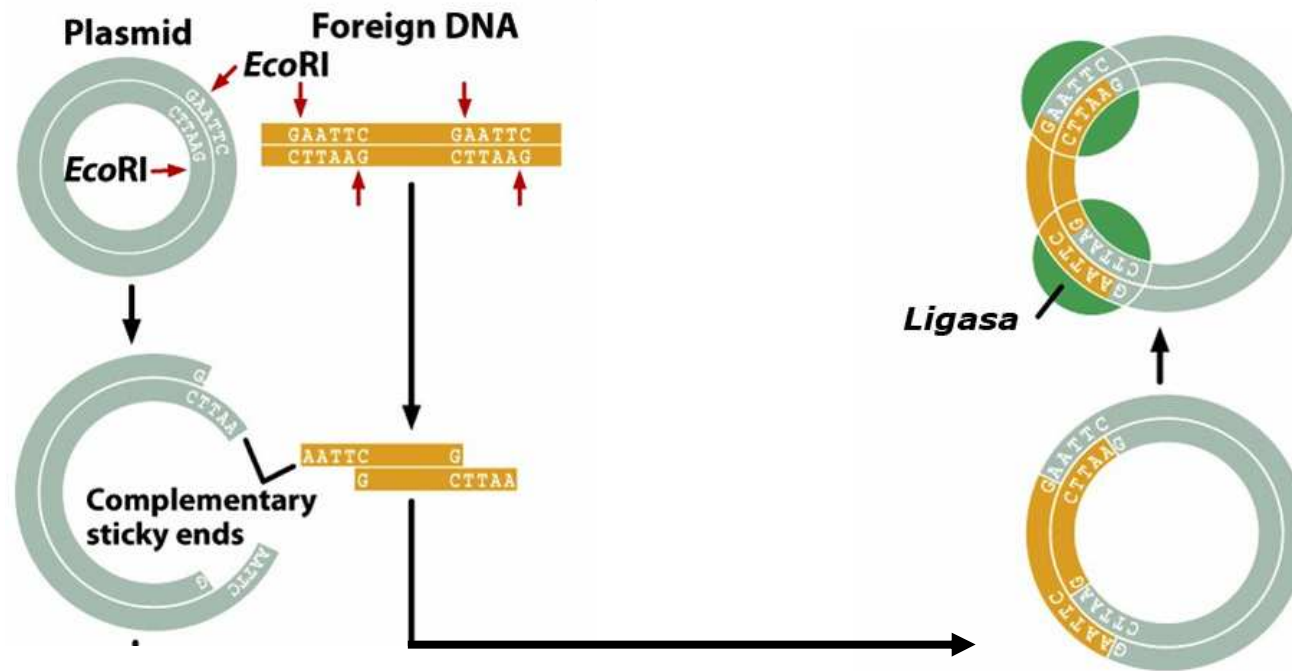
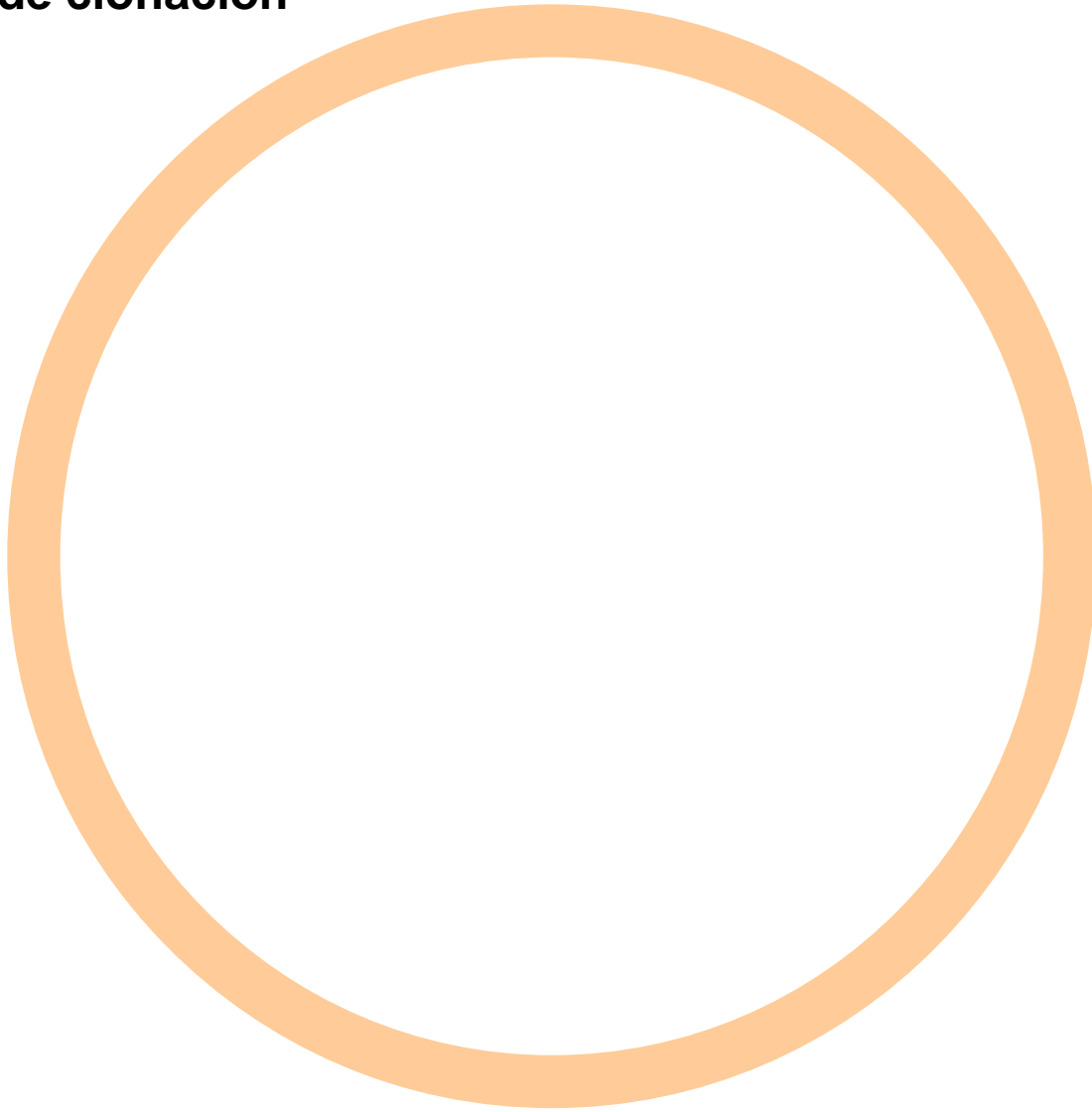


Figure 19-2b
Genetics: A Conceptual Approach, Third Edition
 © 2009 W. H. Freeman and Company

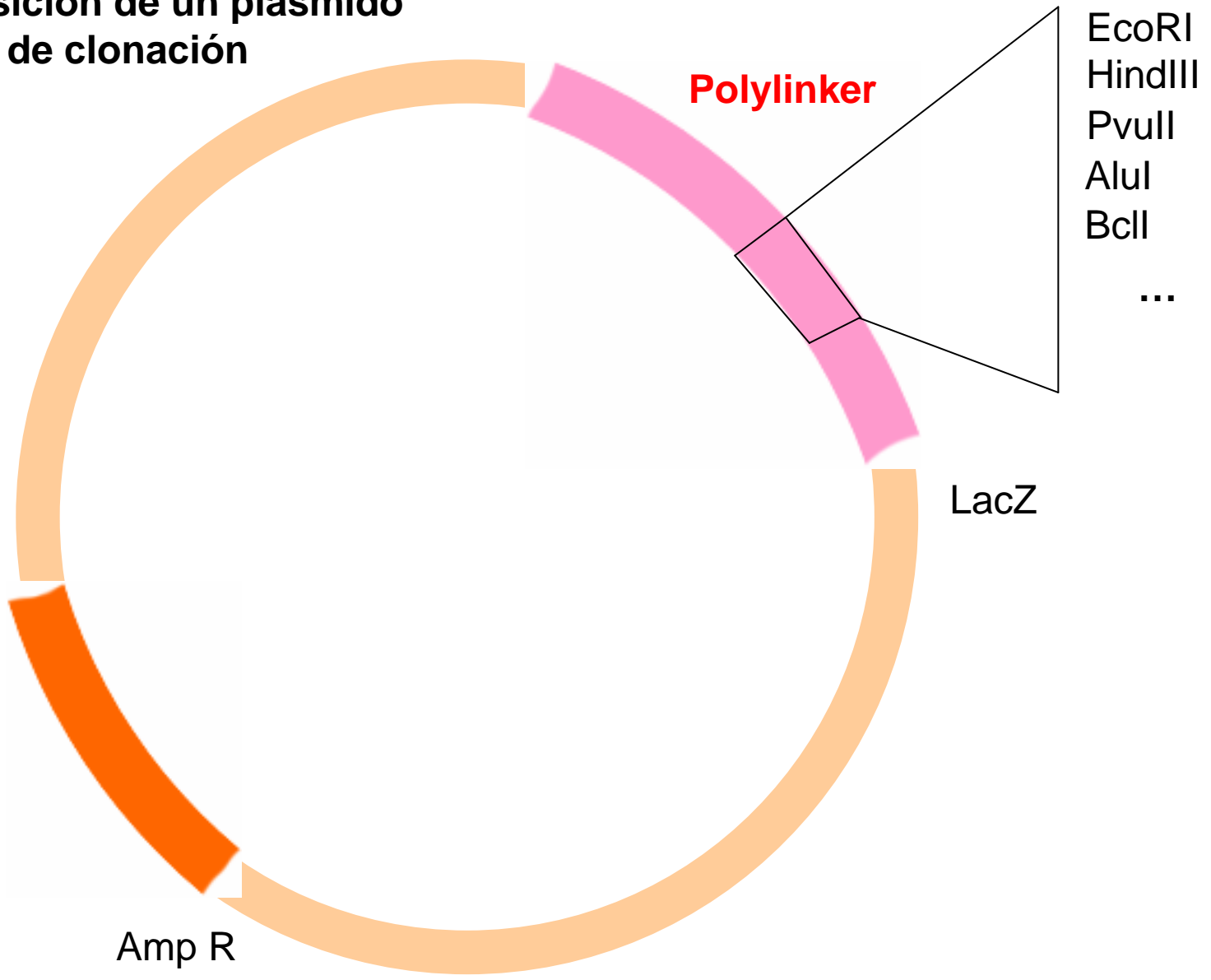
Clonación de fragmentos



Composición de un plásmido de clonación

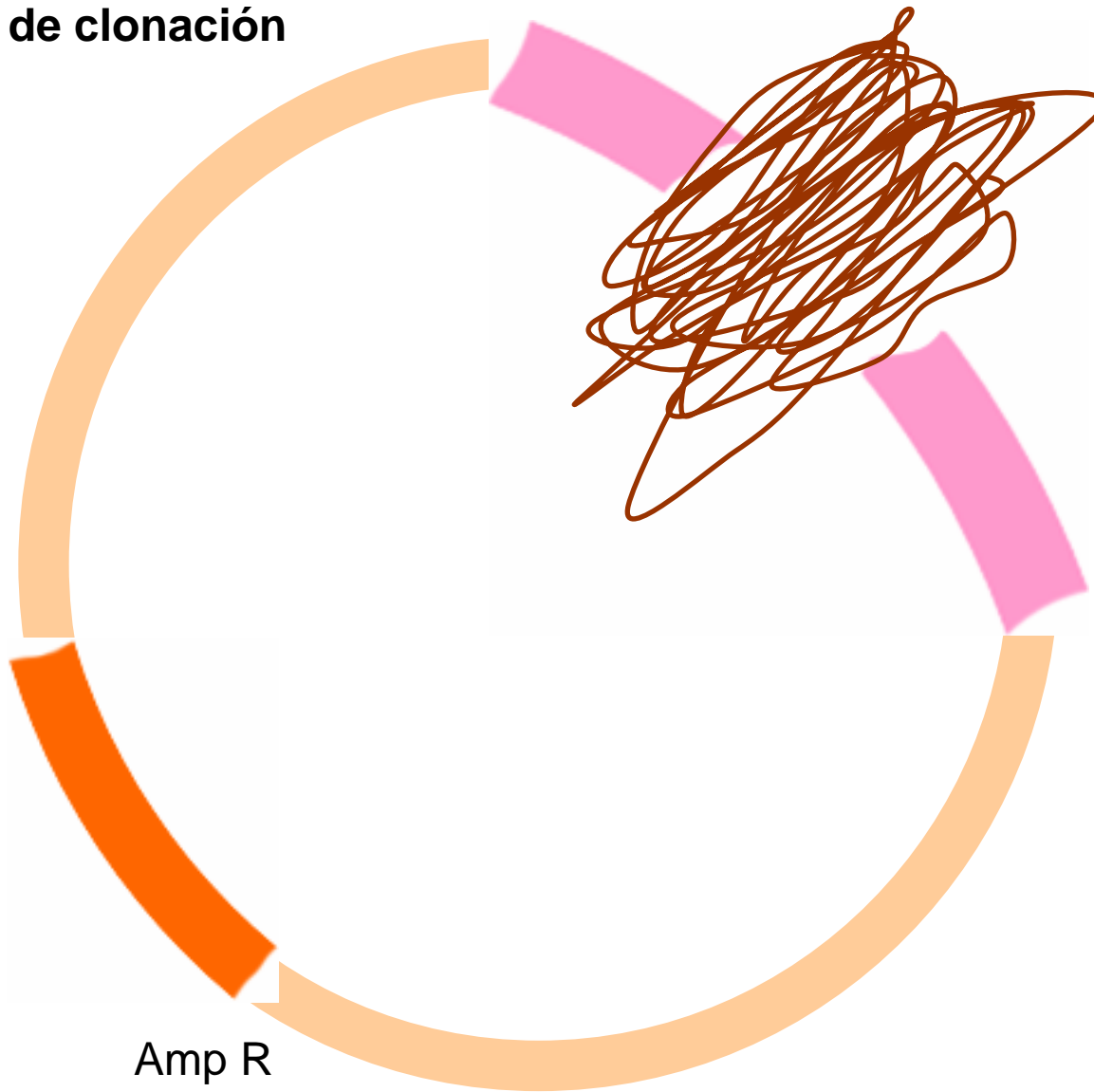


Composición de un plásmido de clonación



Composición de un plásmido de clonación

Ligación de Fragmentos



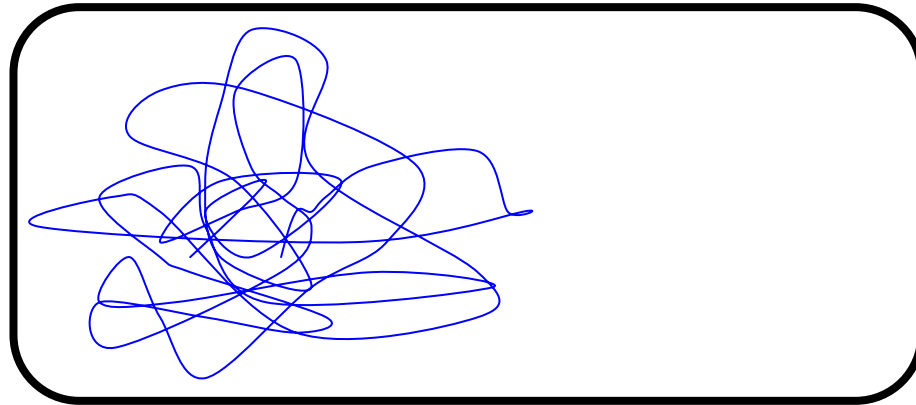
LacZ interrumpido
plásmido
recombinante



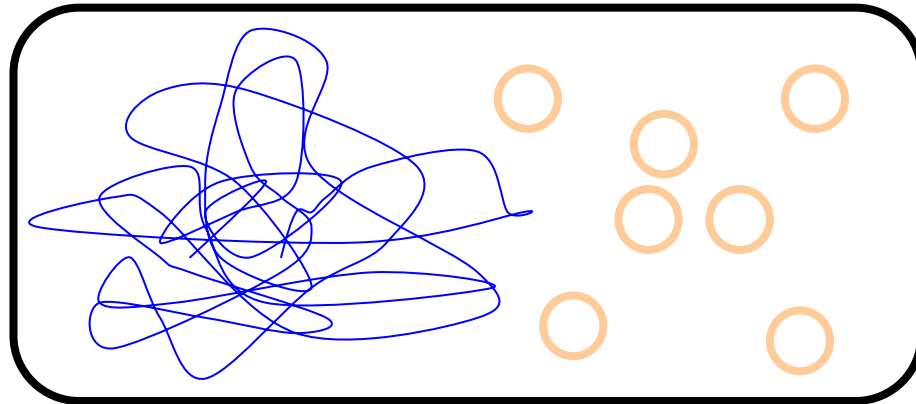
Transformación

Amp R

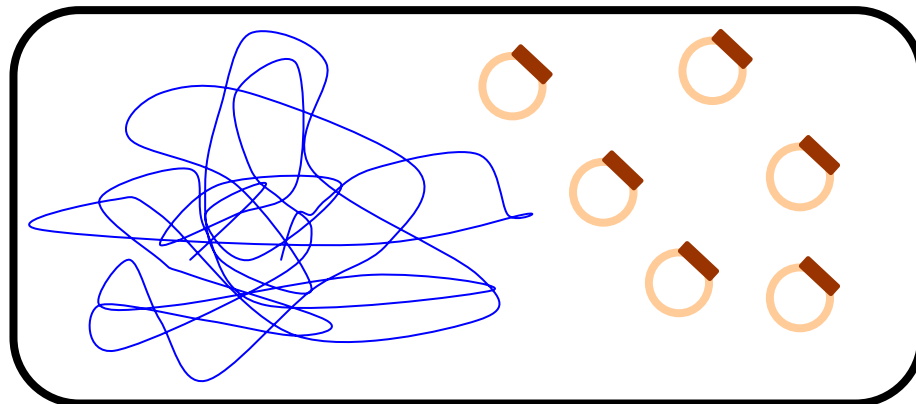
Medio con IPTG, X-gal y Ampicilina



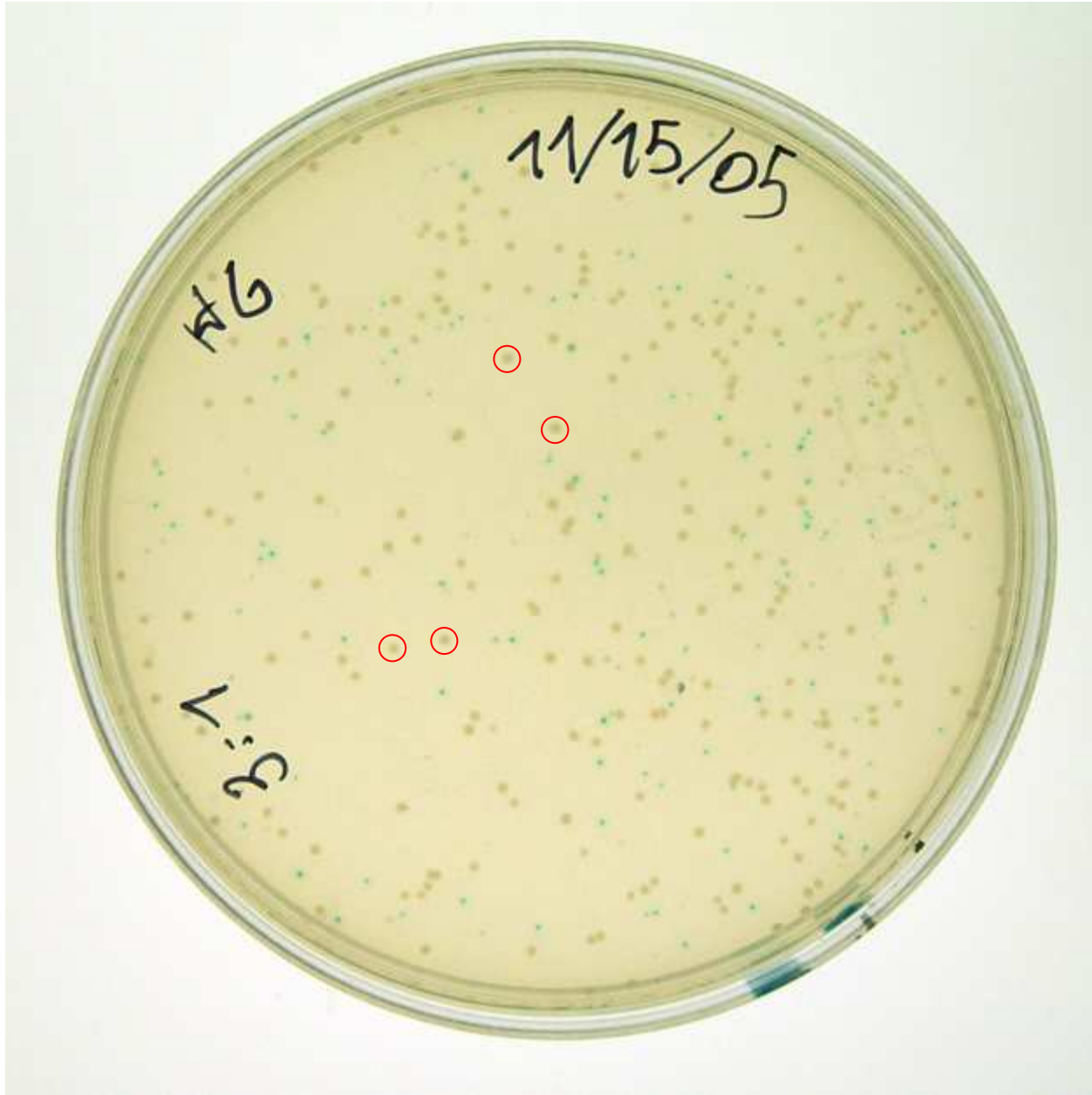
No son resistentes a la ampicilina y mueren



Son resistentes a la ampicilina y además poseen el gen lacZ intacto. Crecen y producen una coloración azul



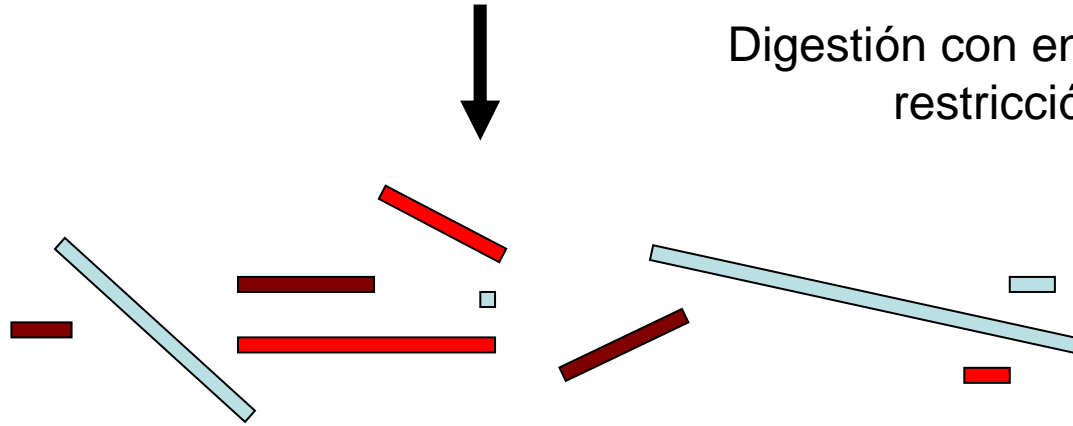
Son resistentes a la ampicilina, pero su gen lacZ está roto. Crecen produciendo colonias blancas



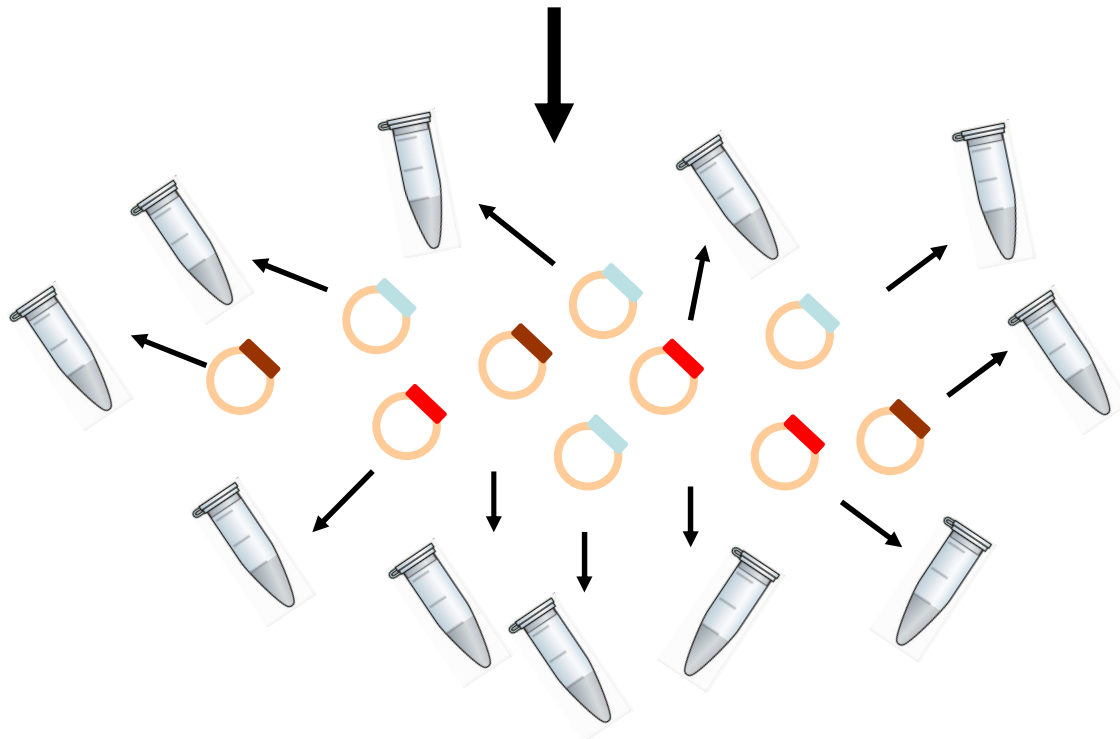
Genotecas de ADN



Digestión con enzimas de restricción



Clonación de fragmentos



Vectores de clonación

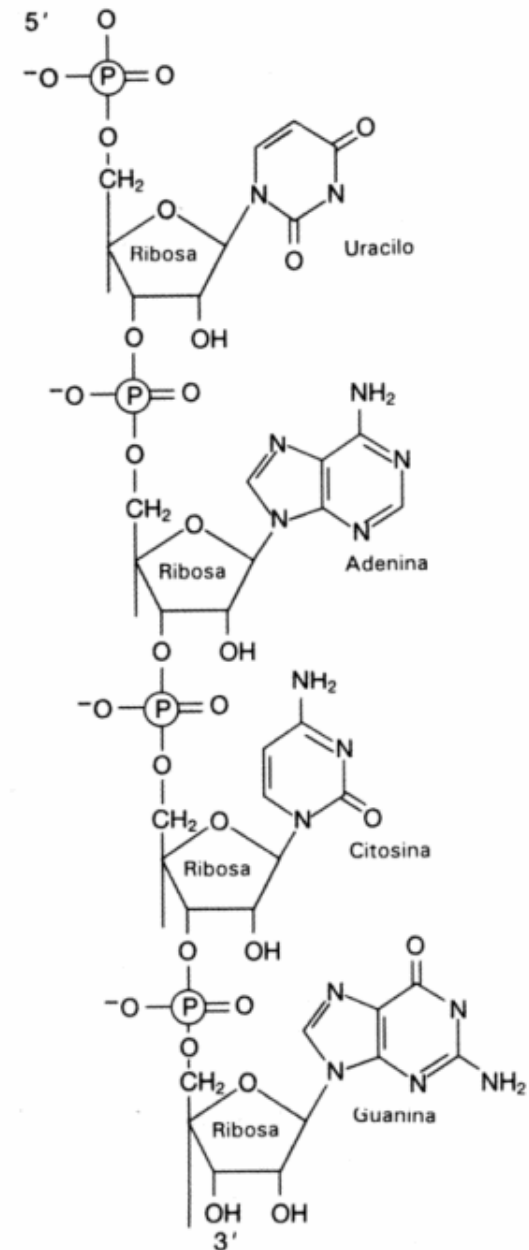
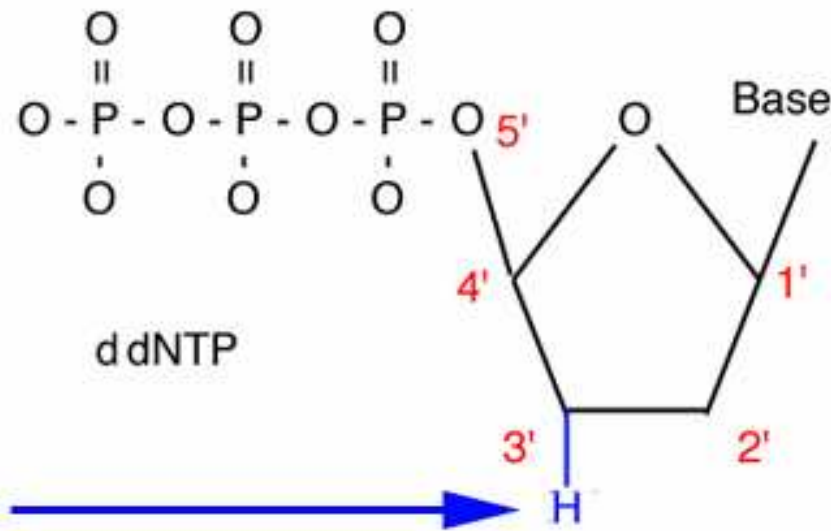
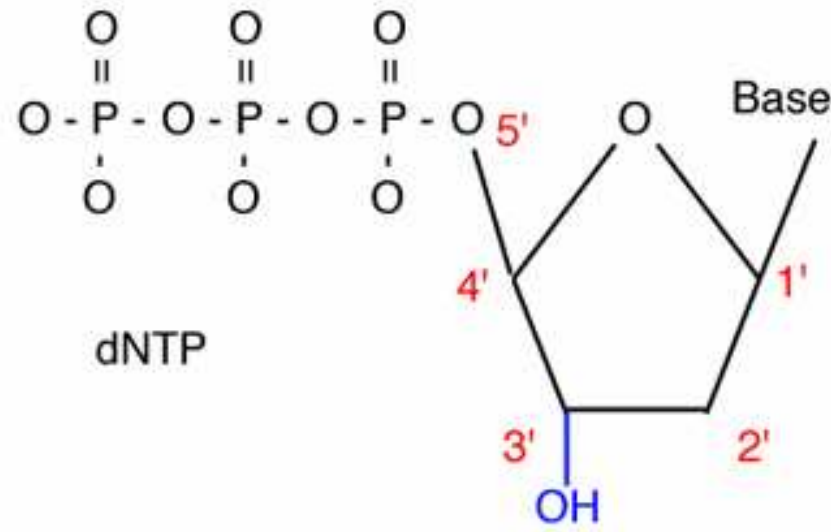
- Plásmidos (hasta 15kb)
- Bacteriófago λ (hasta 23kb)
- Cósmido (hasta 44kb)
- BAC (hasta 300kb)
- YAC (hasta 1000kb)
- HAC (>kb)



Vectores de expresión (!)

Método de Sanger

MÉTODOS DE SECUENCIACIÓN



TACGTTATXXXX

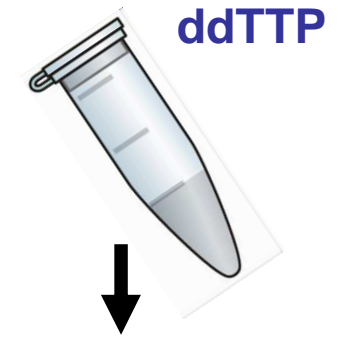
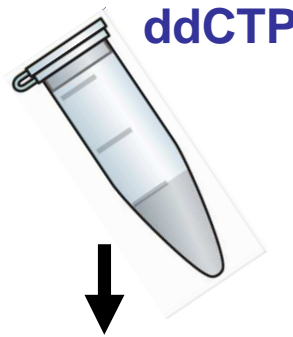
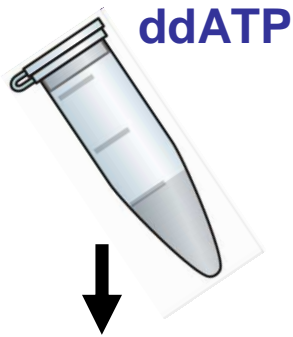
TACGTTATCATGA
 |||||
 ATGCAATA

ADN molde

Nucleótidos

ADN polimerasa

Cebador (ATGCAATA)



TACGTTATCATGA
 |||||
 ATGCAATAGTACT

TACGTTATCATGA
 |||||
 ATGCAATAGTACT

TACGTTATCATGA
 |||||
 ATGCAATAGTACT

TACGTTATCATGA
 |||||
 ATGCAATAGTACT

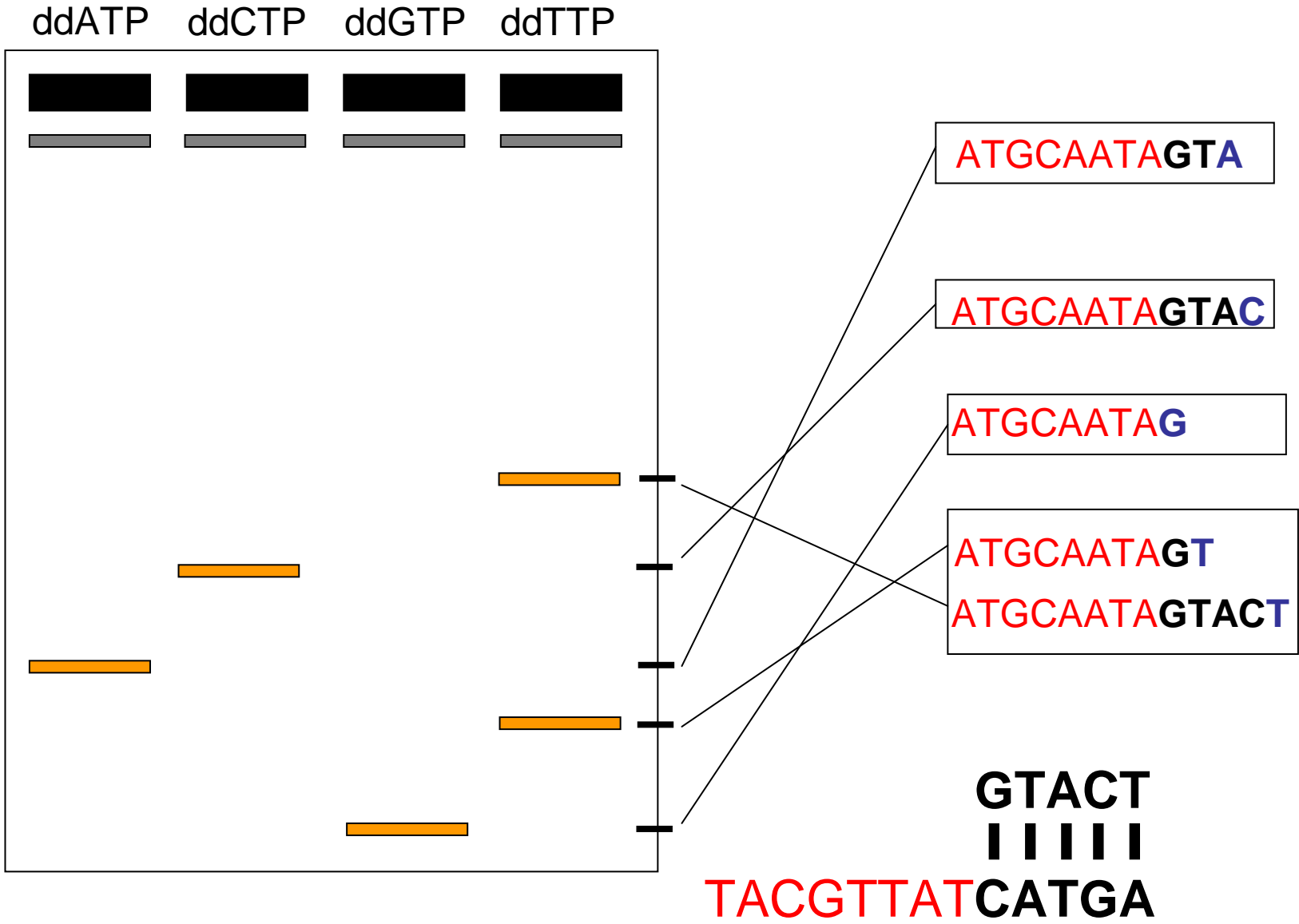
TACGTTATCATGA
 |||||
 ATGCAATAGTA **3**

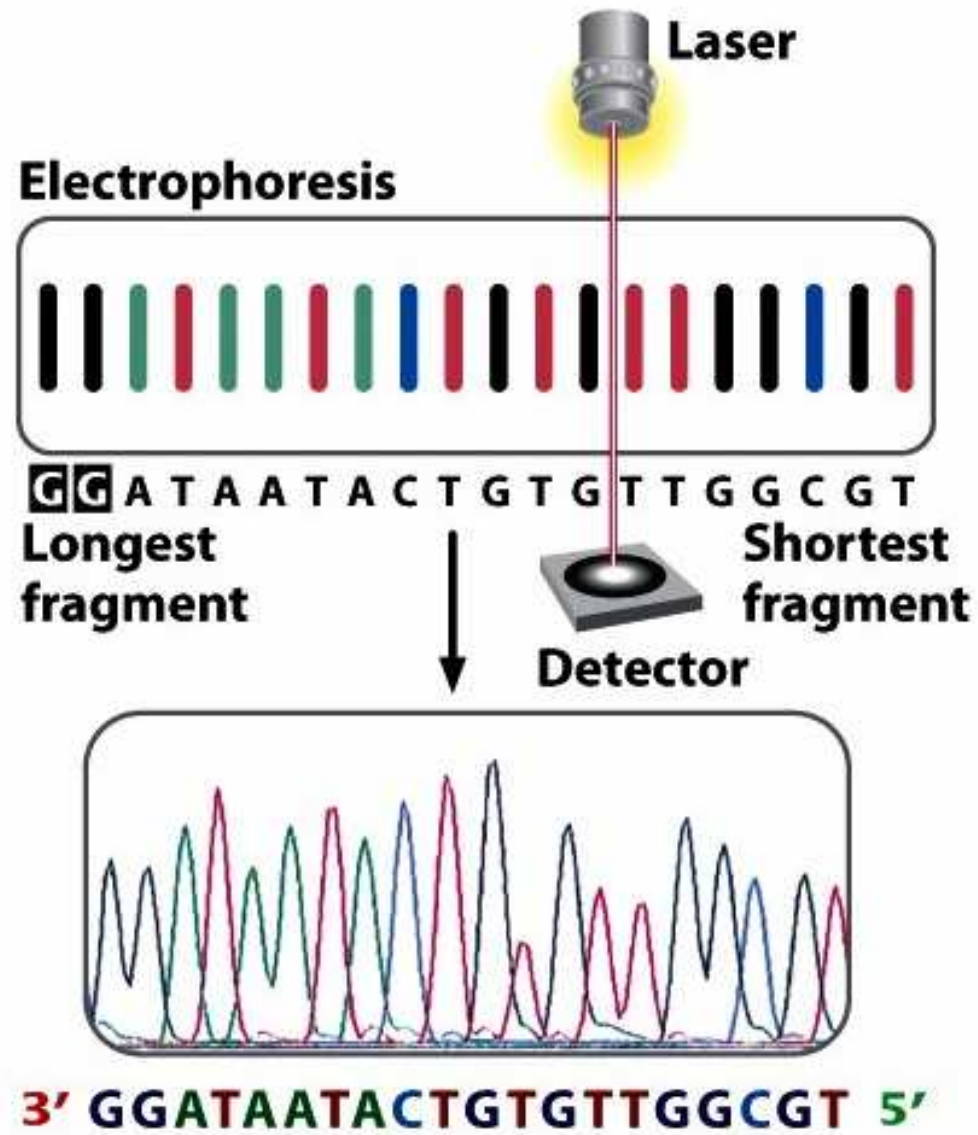
TACGTTATCATGA
 |||||
 ATGCAATAGTAC **4**

TACGTTATCATGA
 |||||
 ATGCAATAG **1**

TACGTTATCATGA
 |||||
 ATGCAATAGT **2**

TACGTTATCATGA
 |||||
 ATGCAATAGTACT **5**





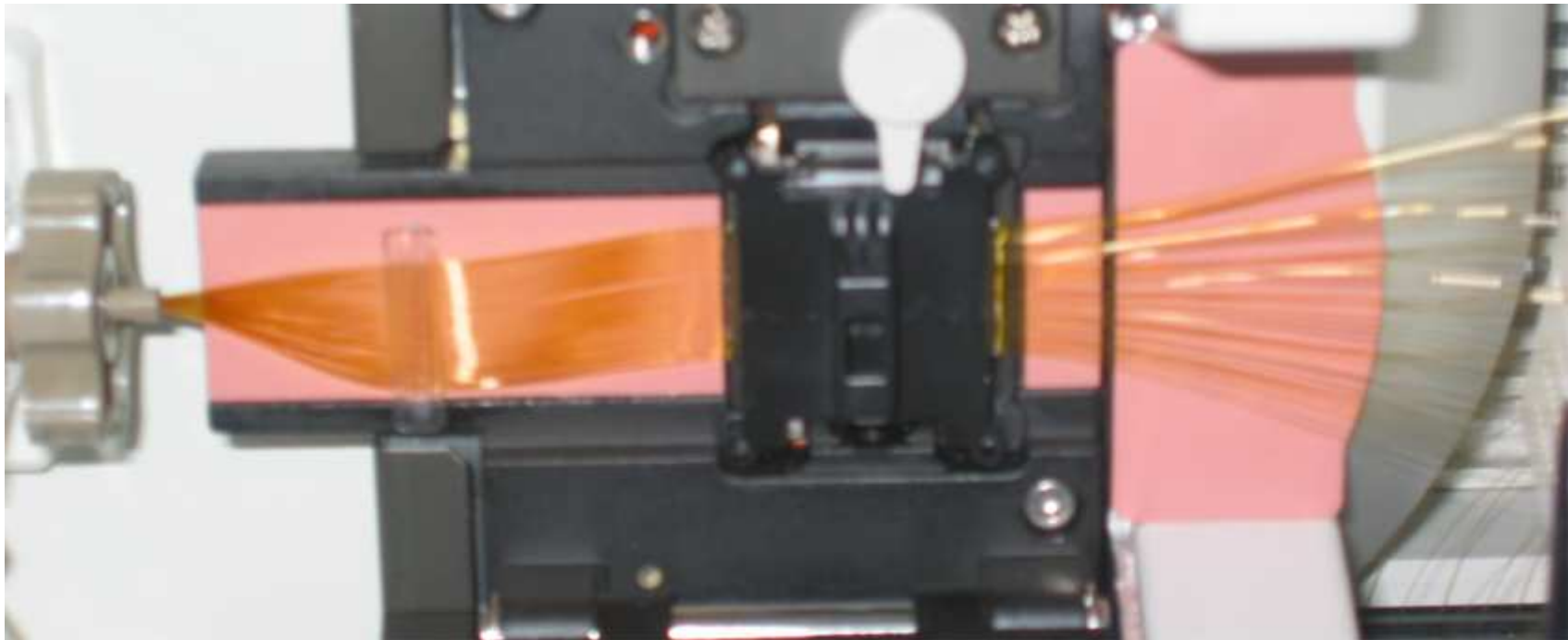
Secuenciadores de ADN



Secuenciadores de ADN

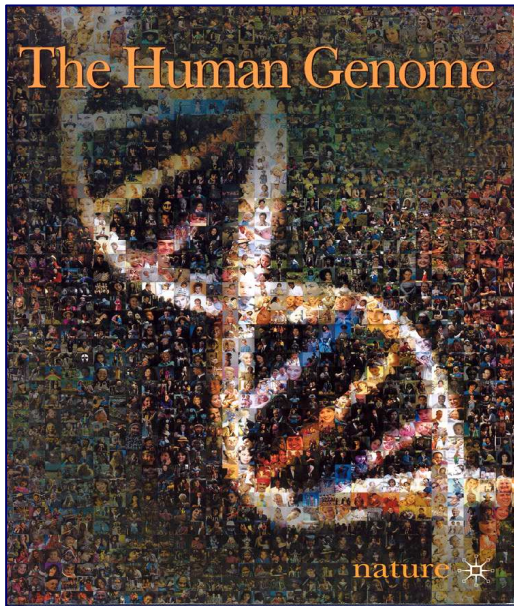


Secuenciadores de ADN



Secuenciación de ADN

- Secuenciación de fragmentos o regiones concretas
- Secuenciación de grandes porciones de ADN o genomas



Marcador

4. m. Átomo o sustancia detectables con facilidad que permiten identificar procesos físicos, químicos o biológicos.

Marcador Molecular (Genético)

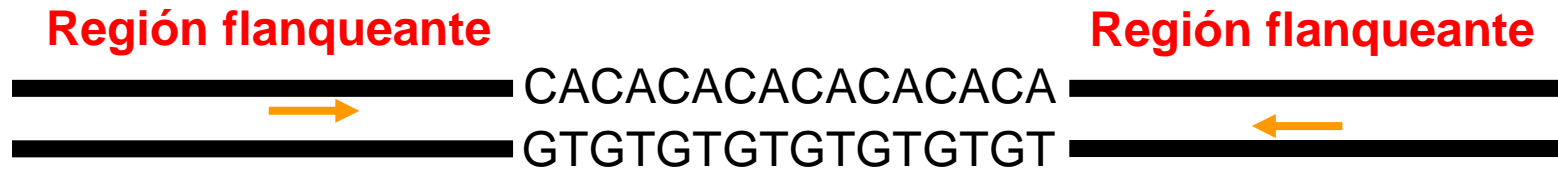
Es un segmento de ADN cuya localización física en el genoma se puede identificar y su herencia rastrear a lo largo de las generaciones. El marcador molecular puede ser un gen que confiere una característica en cuestión, o más a menudo, fragmentos que se encuentran próximos al mismo. Dado que dos segmentos próximos en un cromosoma tienden a heredarse en conjunto, éstos se utilizan a menudo para rastrear de forma indirecta el patrón hereditario de un gen que todavía no ha sido identificado, pero cuya ubicación aproximada se conoce. En un cruzamiento genético, las características de interés seguirán generalmente unidas a los marcadores moleculares. Por lo tanto, se pueden seleccionar individuos en los que el marcador molecular esté presente, ya que el marcador debería indicar la presencia de la característica deseada.

Características Principales de los Marcadores Moleculares

- Fácil aislamiento e identificación
- Herencia predecible (Mendeliana)
- Polimorfismo
- Específicos

Microsatélites o SSRs

(simple sequence repeats)



Repeticiones de 2 a 6 pb
en número variable

Características Principales de los Microsatélites

- Alto grado de polimorfismo (numerosas repeticiones en tándem)
- Específicos
- Distribuidos al azar por todo el genoma
- Herencia co-dominante
- Cálculo de frecuencias
- Neutrales

DNA Fingerprinting o “*Huella Genética*”





EQUIPO DE INVESTIGACIÓN 1

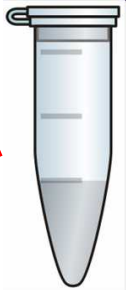


Control

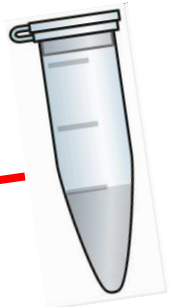
Muestra 1



Muestra 3



Muestra 2



Muestra 4

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN 2



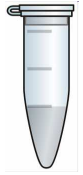
Control



Muestras de Semen



EQUIPO DE INVESTIGACIÓN 3



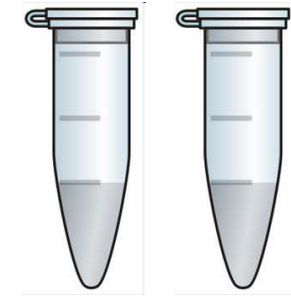
Control



Muestras de Tejido



Pero... ¿Quién es la víctima?



Muestras de posibles Padres y Madres



Control

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN 1

Procedencia de la Muestra	ADN DE LA VÍCTIMA		Sospechoso 1		Sospechoso 2		ADN de la Víctima		Sospechoso 1	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
Locus 1	134	134	127	140	130	140	134	134	127	140
Locus 2	256	260	250	265	256	265	256	260	250	265
Locus 3	140	144	130	130	141	145	140	144	130	130
Locus 4	185	187	181	185	185	188	185	187	181	185

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN 2

Procedencia de la Muestra	ADN de la Víctima		MUESTRA DE SEMEN 1		MUESTRA DE SEMEN 2		MUESTRA DE SEMEN 3		MUESTRA DE SEMEN 4	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
Locus 1	134	134	134	134	127	140	135	135	135	135
Locus 2	256	260	256	260	250	265	280	260	280	260
Locus 3	140	144	140	144	130	130	155	145	155	145
Locus 4	185	187	185	187	181	185	182	188	182	188

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN 3

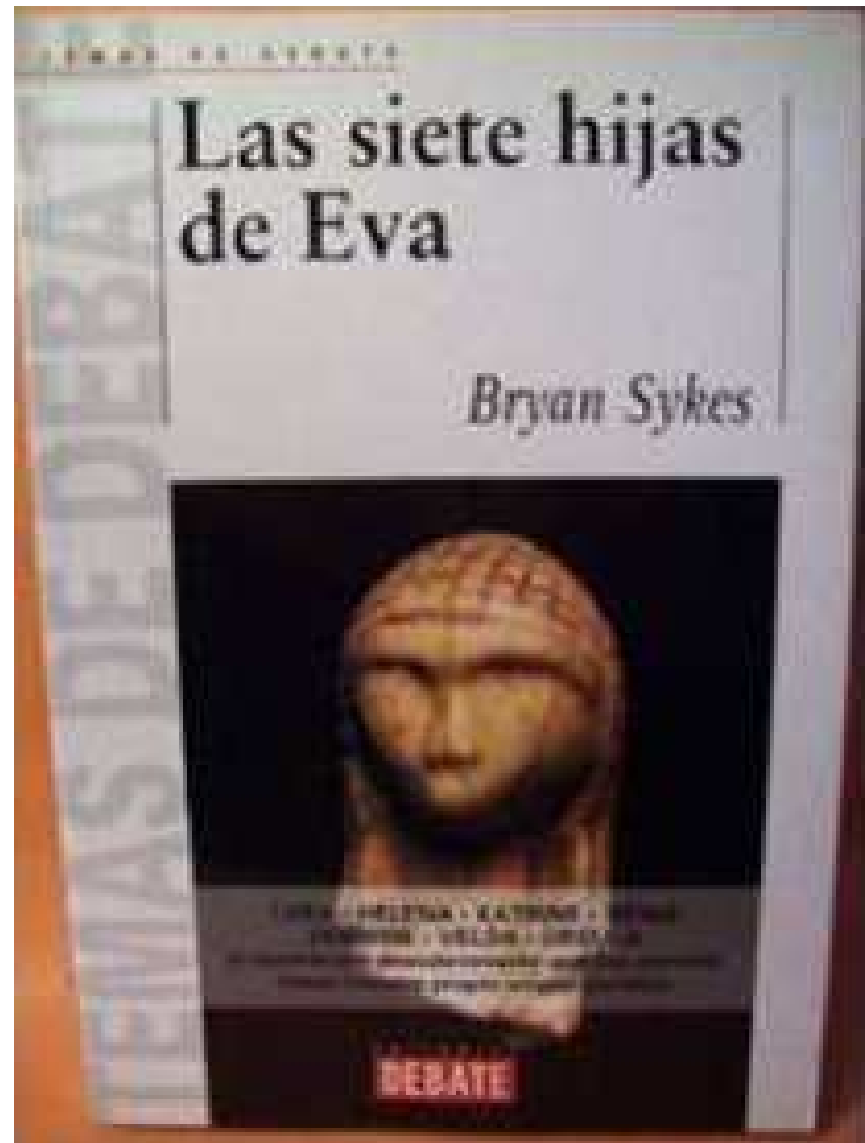
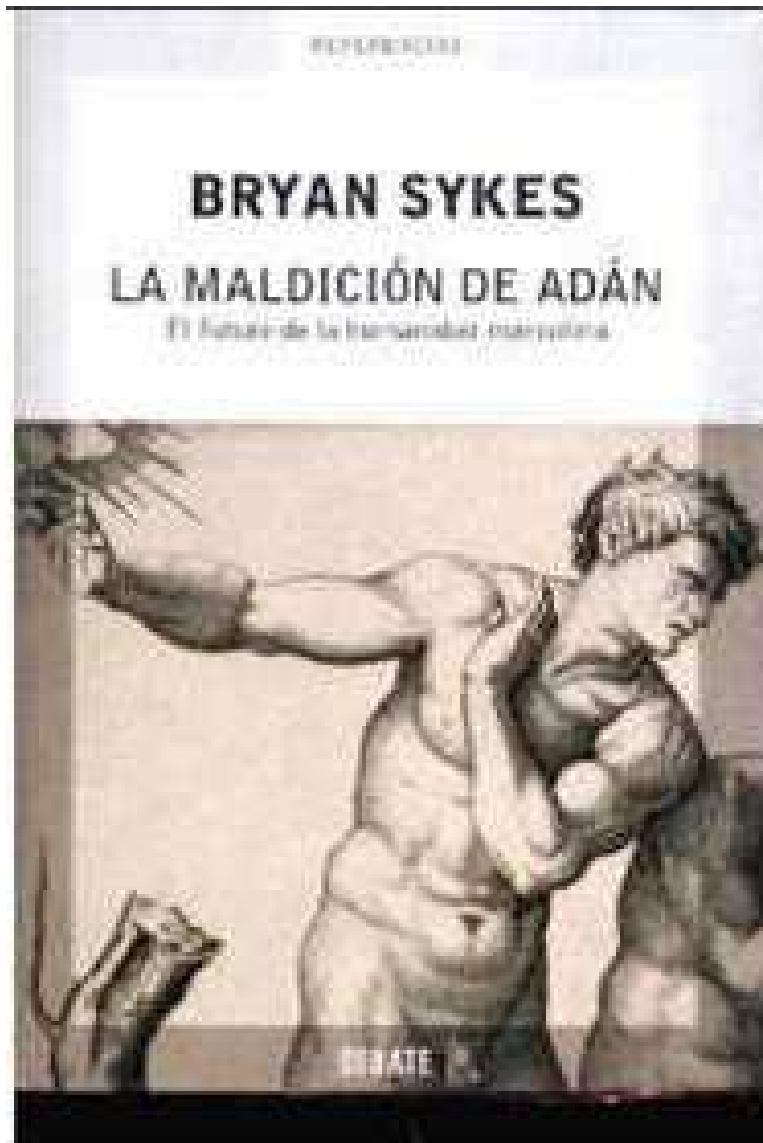
Procedencia de la Muestra	ADN de la Víctima		MUESTRA DE PIEL 1		Sospechoso 1		Sospechoso 2		Sospechoso 3	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
Locus 1	134	134	134	134	127	140	130	140	135	135
Locus 2	256	260	256	260	250	265	256	265	280	260
Locus 3	140	144	140	144	130	130	141	145	155	145
Locus 4	185	187	185	187	181	185	185	188	182	188

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN 4

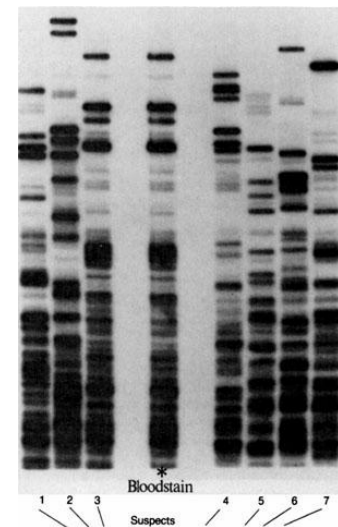
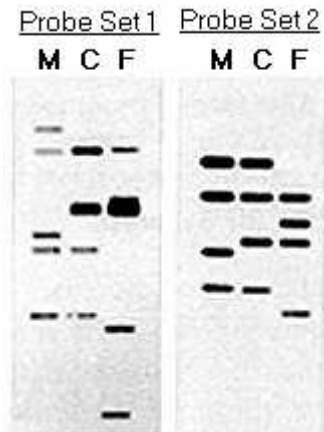
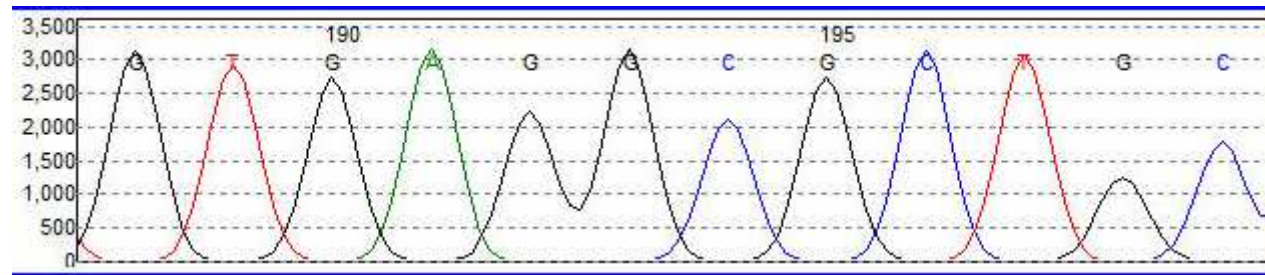
Procedencia de la Muestra	ADN DE LA VÍCTIMA		ADN PADRE 1		ADN MADRE 1		ADN PADRE 2		ADN MADRE 2	
	<i>Alelo 1</i>	<i>Alelo 2</i>	<i>Alelo 1</i>	<i>Alelo 2</i>	<i>Alelo 1</i>	<i>Alelo 2</i>	<i>Alelo 1</i>	<i>Alelo 2</i>	<i>Alelo 1</i>	<i>Alelo 2</i>
Locus 1	134	134	134	132	134	134	134	134	134	134
Locus 2	256	260	260	260	256	260	252	258	256	260
Locus 3	140	144	140	145	144	144	140	140	140	145
Locus 4	185	187	185	180	182	187	187	187	180	189

¡CRIMEN RESUELTO!

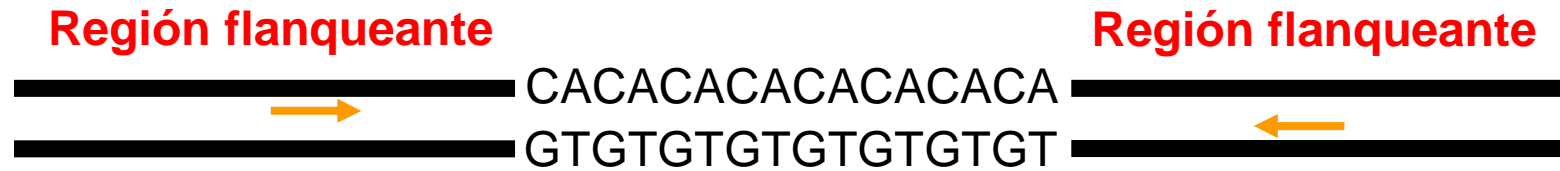




MARCADORES MOLECULARES



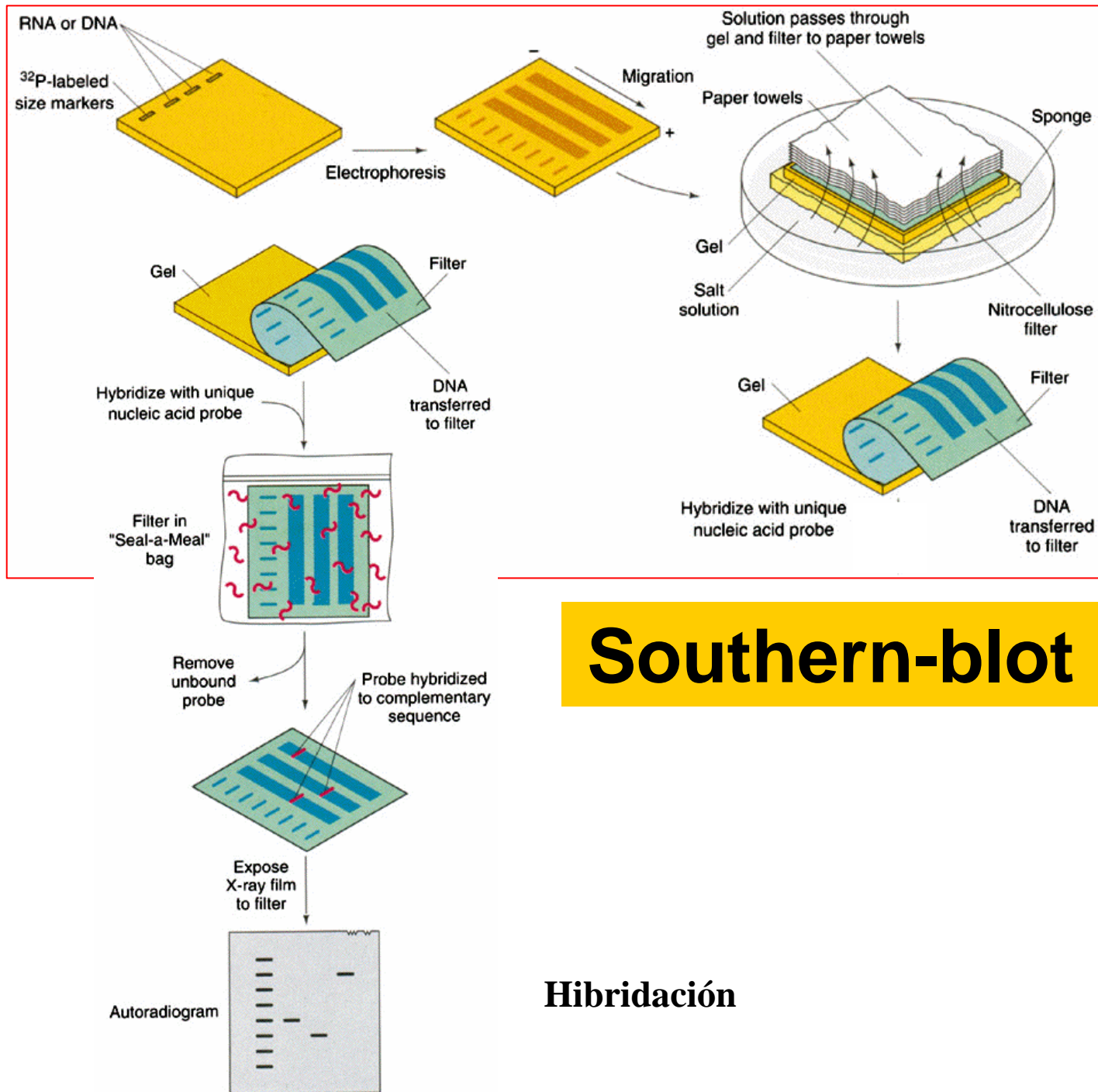
Microsatélites o SSRs (Simple Sequence Repeats)



**Repeticiones de 2 a 6 pb
en número variable**

Características Principales de los Microsatélites

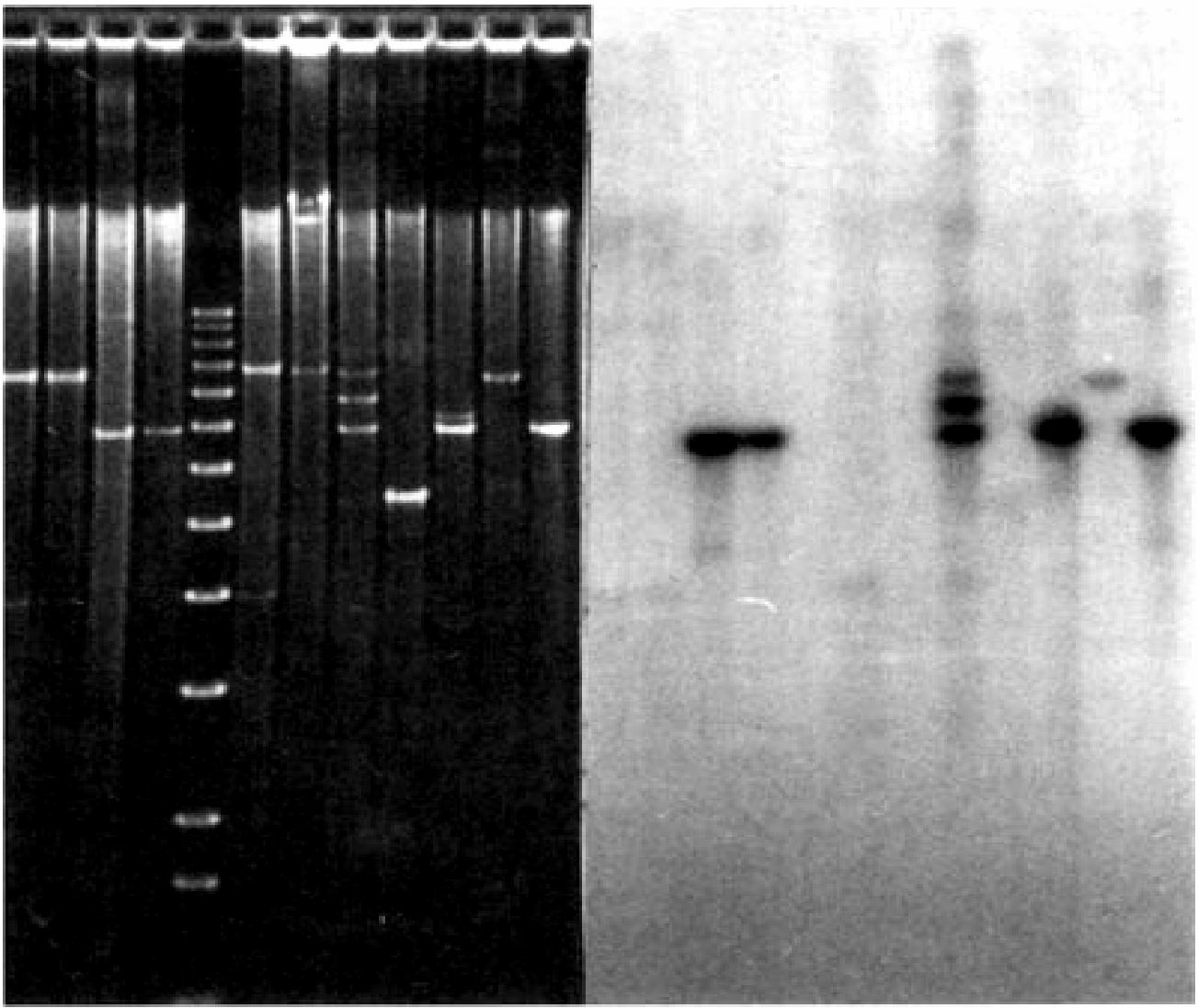
- Alto grado de polimorfismo (numerosas repeticiones en tándem)
- Específicos
- Distribuidos al azar por todo el genoma
- Herencia co-dominante
- Cálculo de frecuencias
- Neutrales



Southern-blot

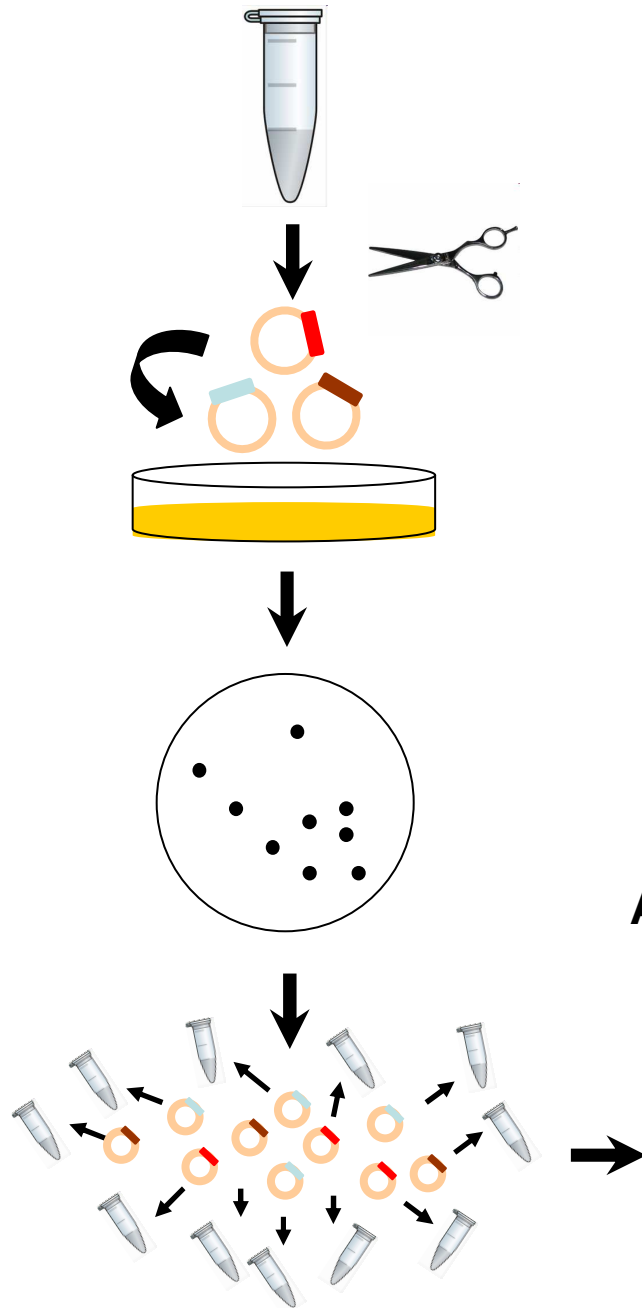
Hibridación

1 2 3 4 (L) 5 6 7 8 9 10 11 1 2 3 4 (L) 5 6 7 8 9 10 11



Electrophoretic

Autoradiogram



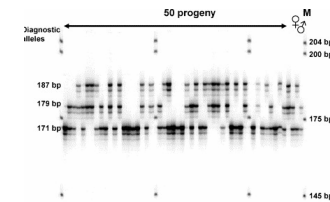
Extracción de ADN

Digestión con Enzimas de Restricción

Ligación, Transformación, Clonación

Detección de Clones Enriquecidos en Microsatélites (*p.ej. transferencia a membrana e hibridación*)

Análisis de la Genoteca y Genotipado de Individuos

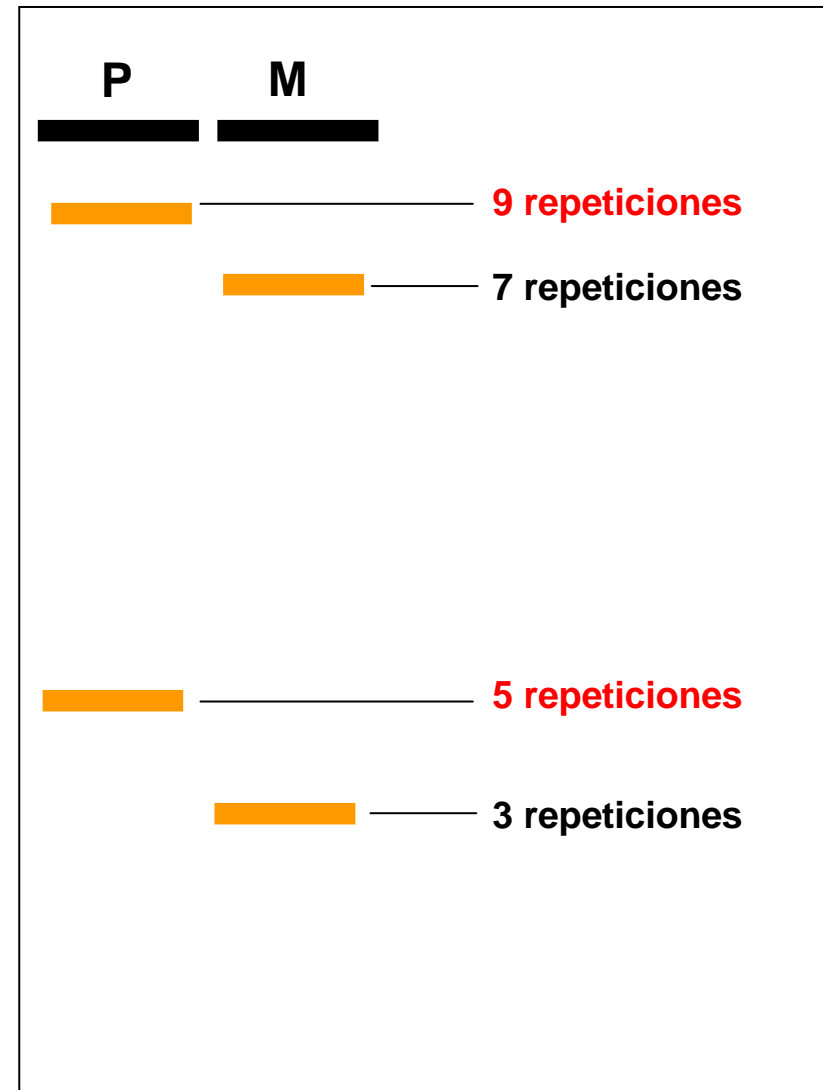
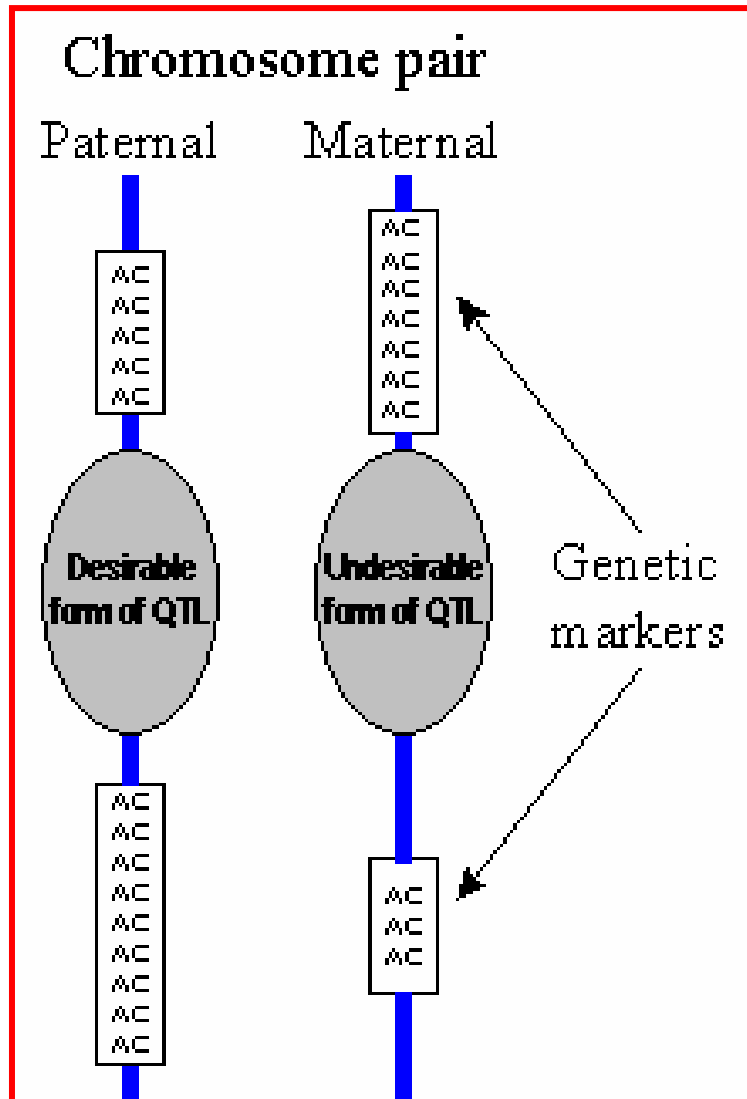


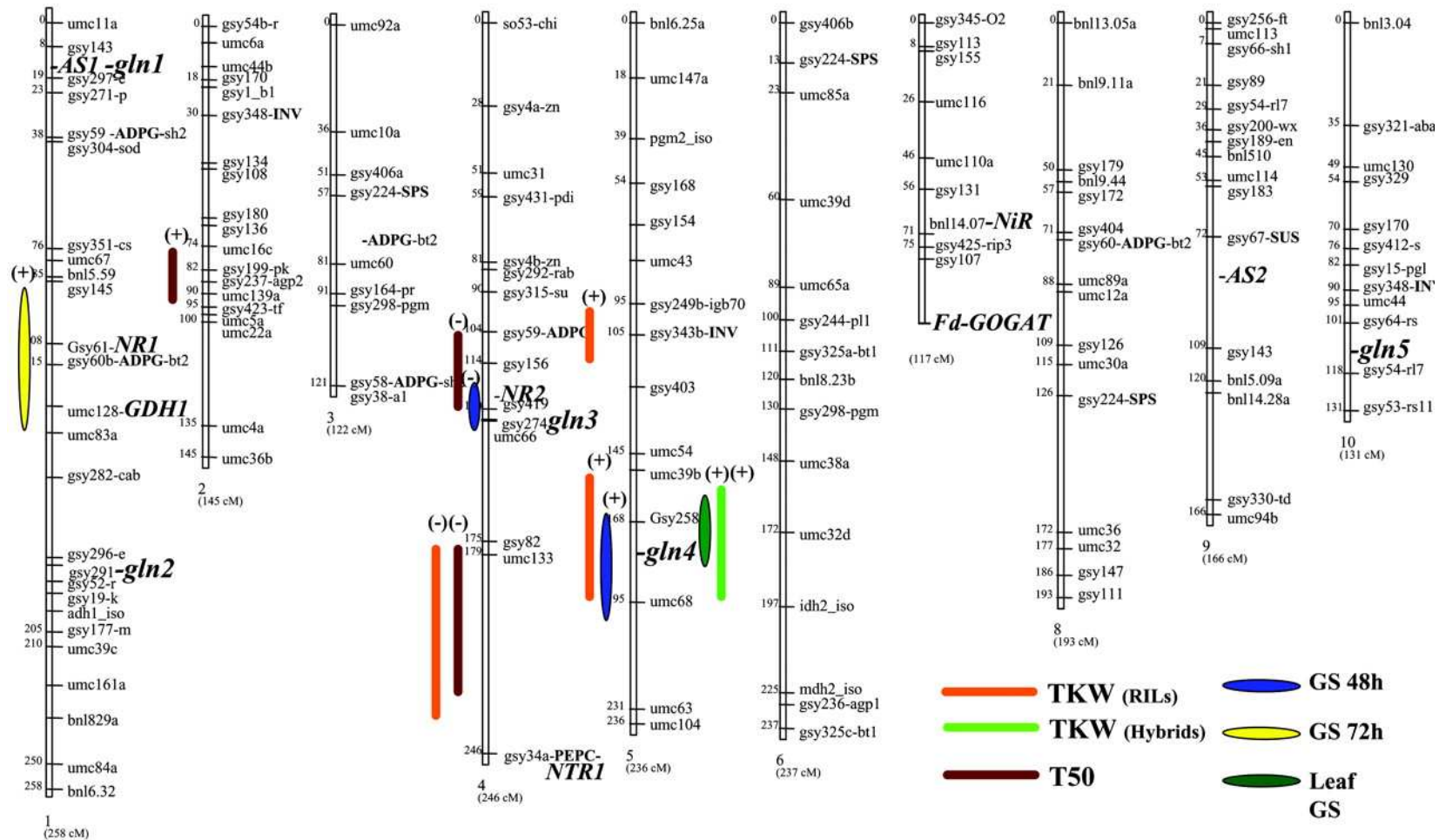
DNA Fingerprinting o “*Huella Genética*”



	Locus 1		Locus 2		Locus 3		Locus 4		
Individuo	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Producción de leche (litros/mes)
1	250	255	134	145	137	137	100	98	5000
2	248	246	122	122	140	142	102	94	1000
3	238	242	123	122	142	142	102	102	1500
4	250	255	123	124	137	137	98	94	6500
5	250	238	145	145	137	142	94	94	2500
6	238	232	123	150	140	124	94	102	1000
7	238	238	145	126	124	124	102	102	1800
8	252	242	145	120	137	124	98	100	2000
9	250	255	123	123	137	137	94	102	5700
10	252	252	134	123	124	120	98	94	950

Loci de rasgos cuantitativos (QTLs: Quantitative Traits Loci)

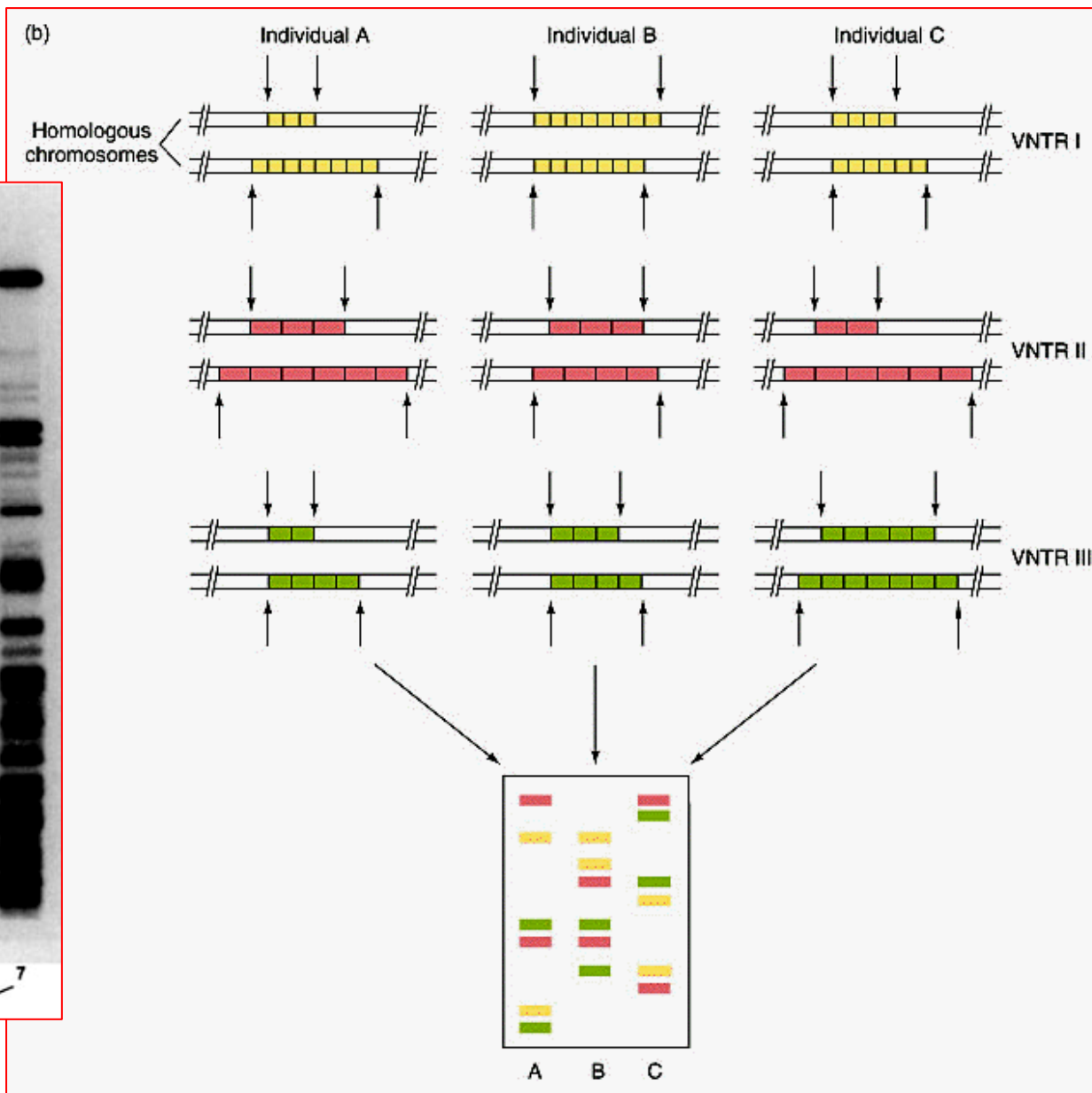
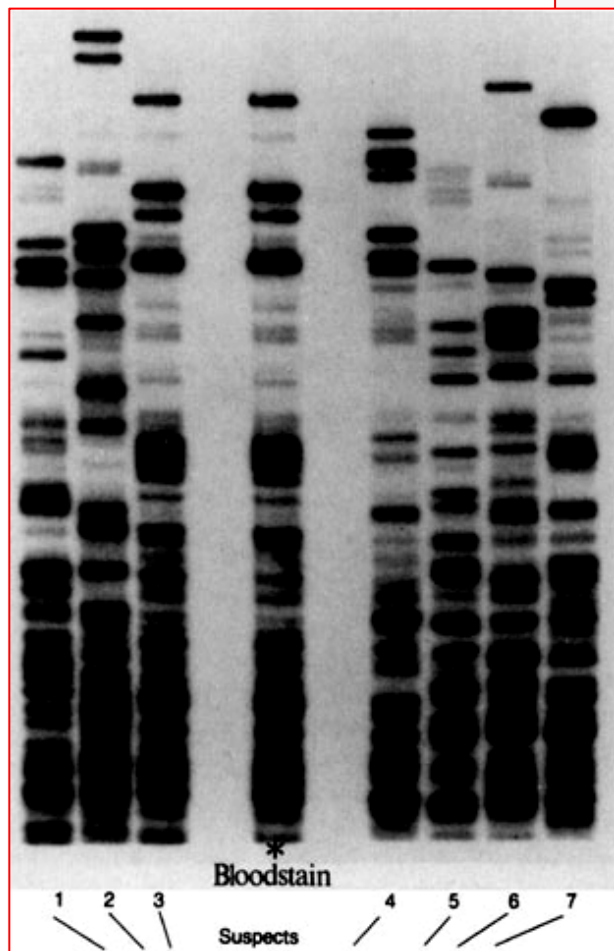




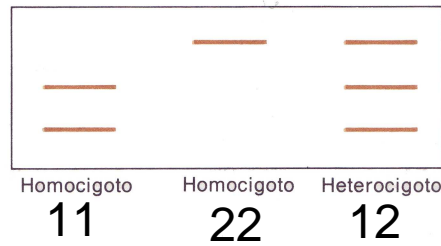
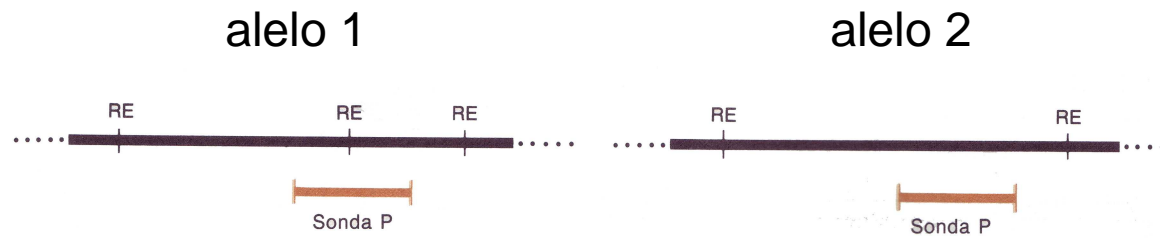
Limami A M et al. Plant Physiol. 2002;130:1860-1870



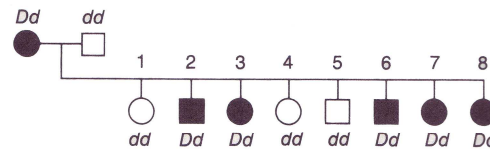
Minisatélites o VNTRs (Variable Number Tandem Repeats)



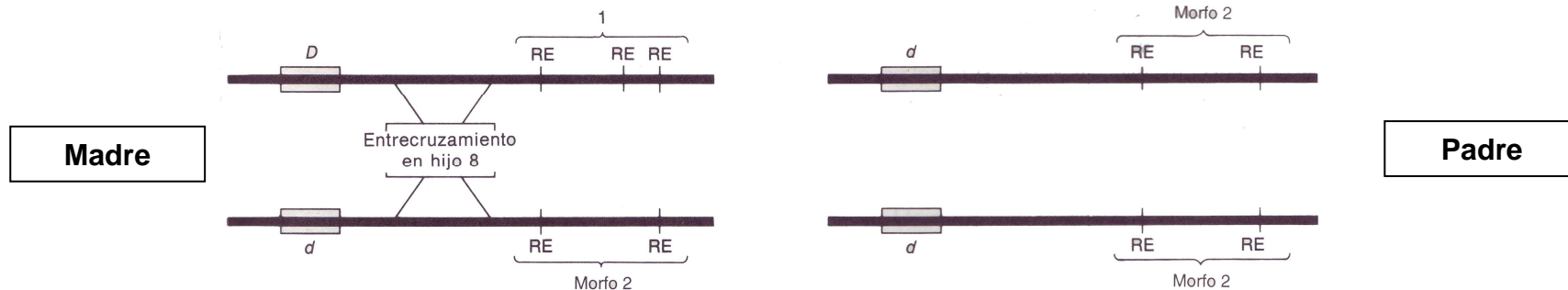
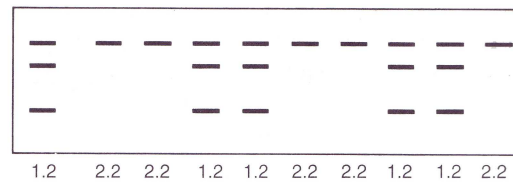
RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms)



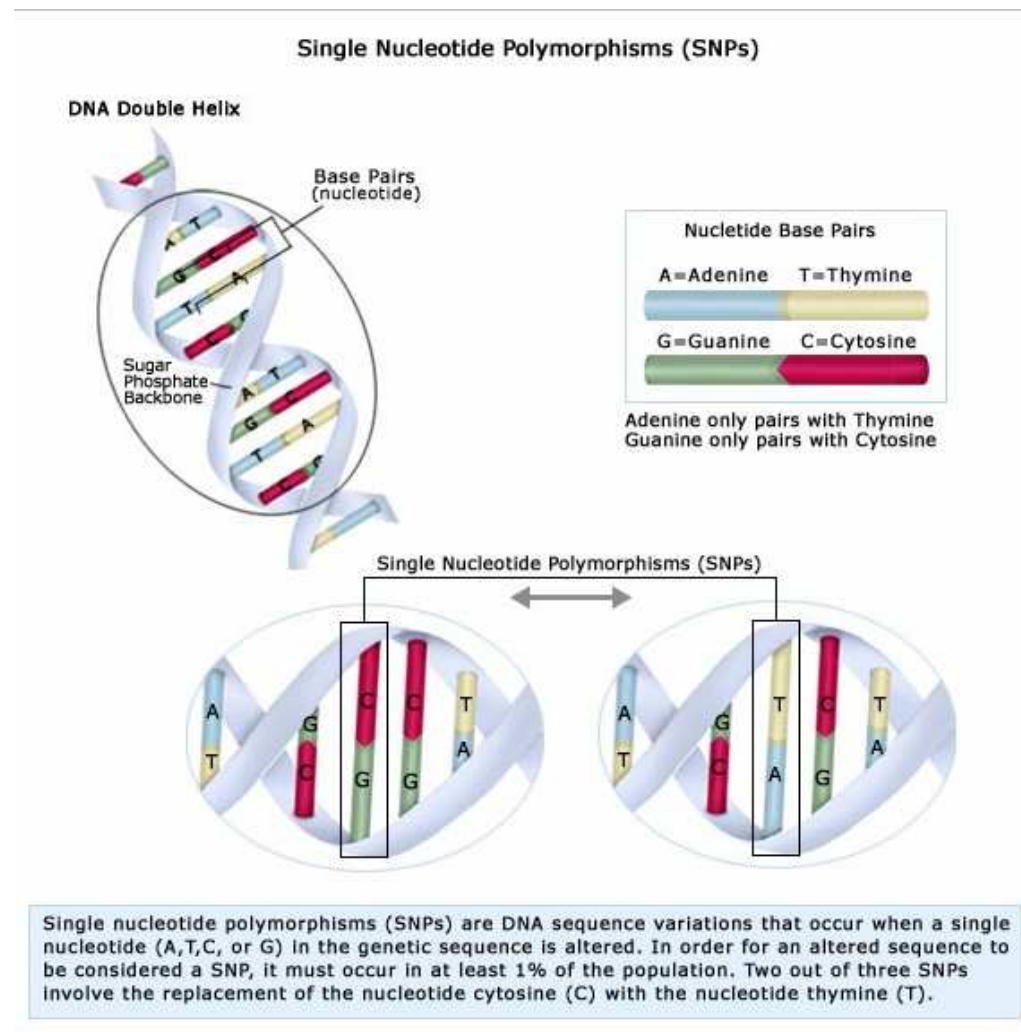
Southern-blot



Análisis del ligamiento al locus D

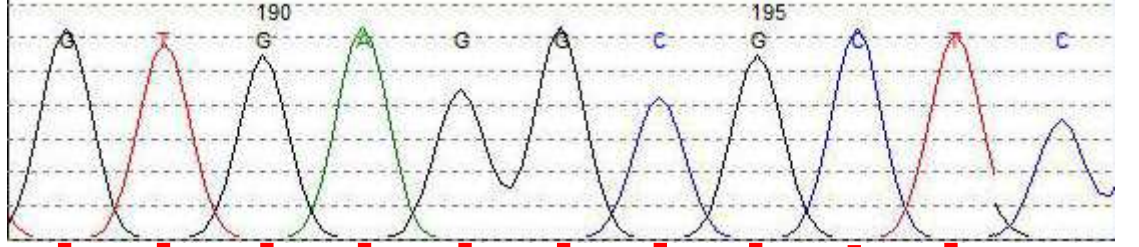
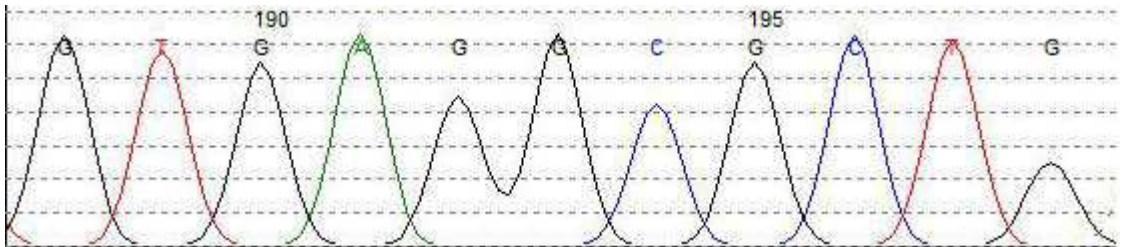
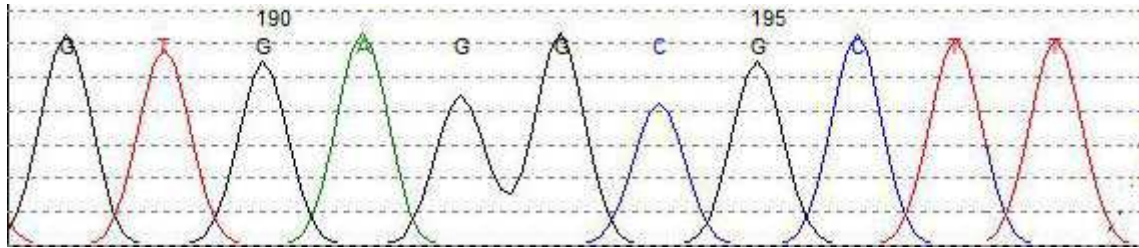
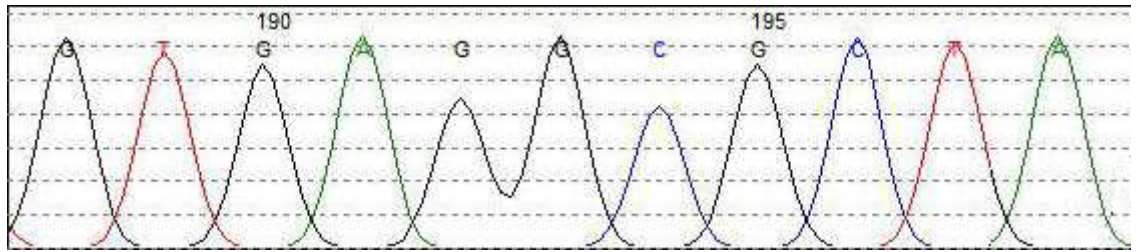


SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)



Detección de un SNP

GTGAGGCGCT**N**TCGCATTC
| | | | | | | | | |
CACTCCGCGA



Transgénesis

(Organismos Modificados Genéticamente)

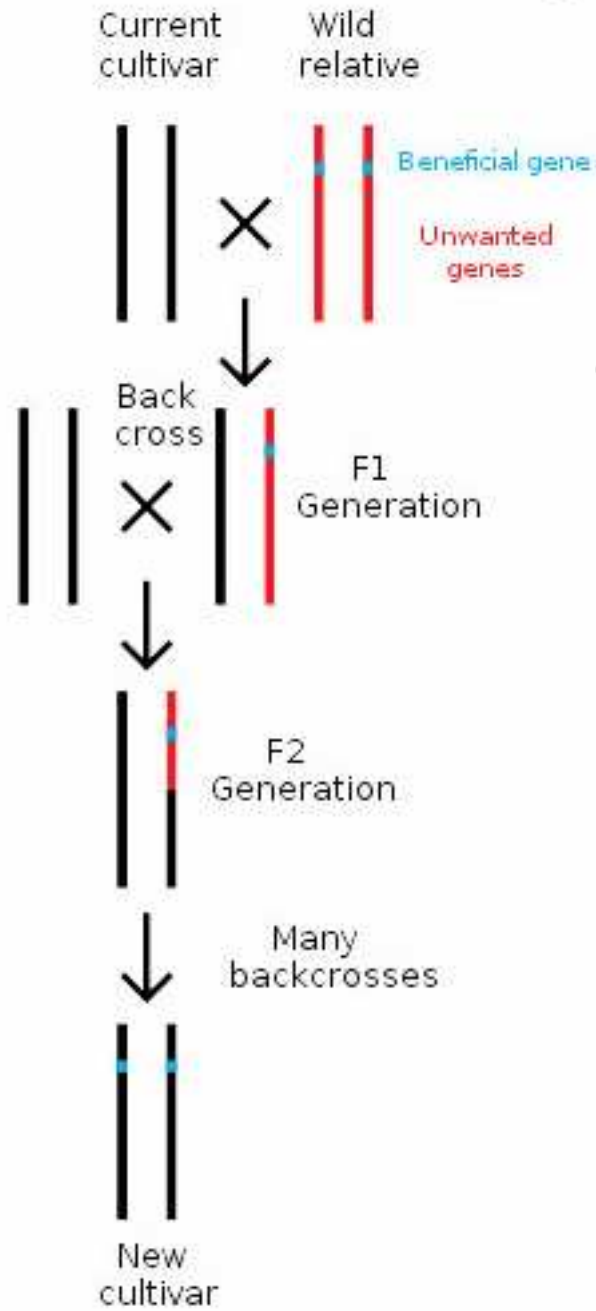


Dr. Epstein, me parece que se ha ido un poco lejos con su ingeniería genética

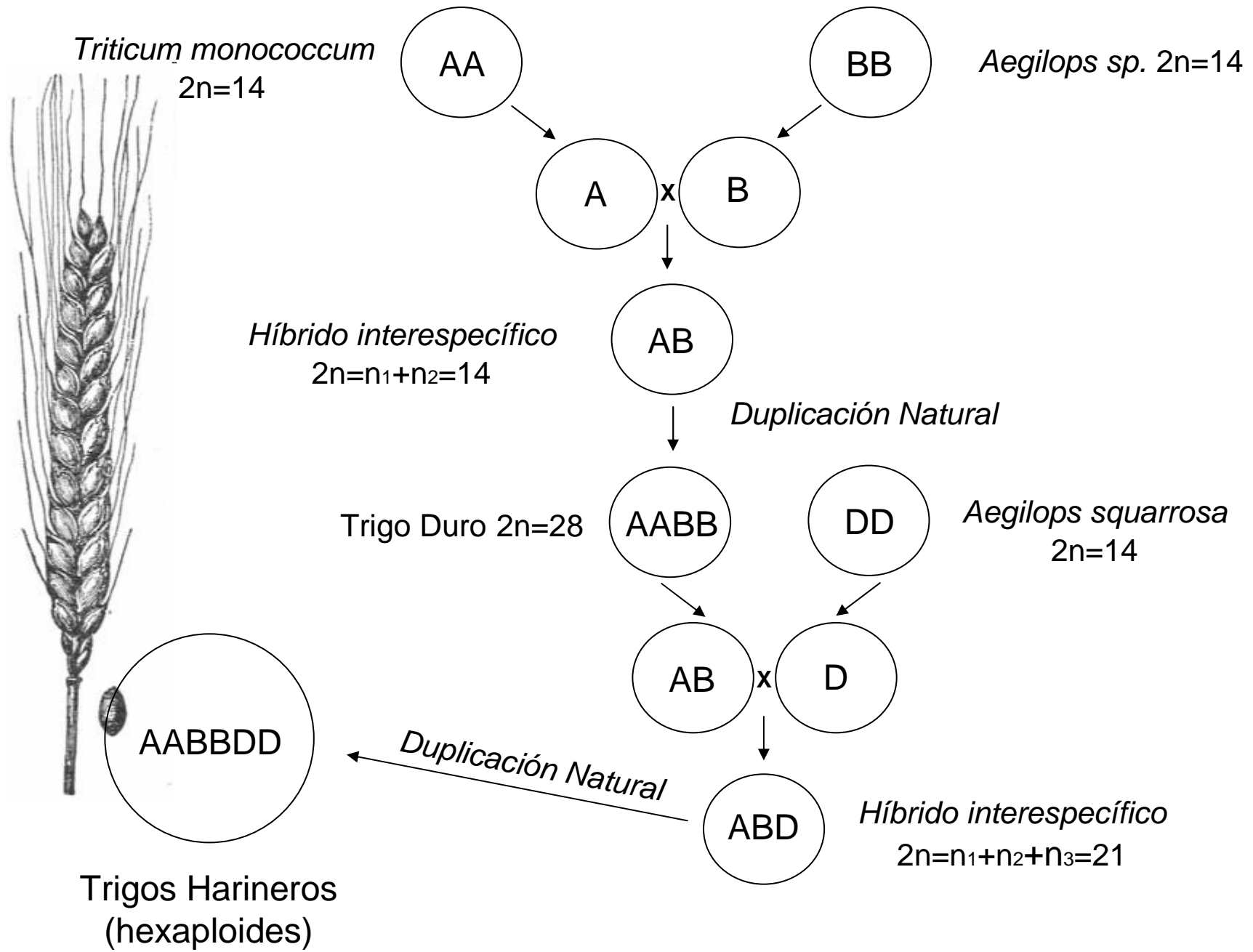
según la **RAE**,
transgénico, ca.

1. adj. *Biol.* Dicho de un organismo vivo:
Que ha sido modificado mediante la
adición de genes exógenos para lograr
nuevas propiedades.

Conventional breeding



Ciclos de cruzamiento y selección







según la **RAE**,
transgénico, ca.

1. adj. *Biol.* Dicho de un organismo vivo:
Que ha sido modificado mediante la
adición de genes exógenos para lograr
nuevas propiedades.

según la **Directiva 90/220/CEE**,

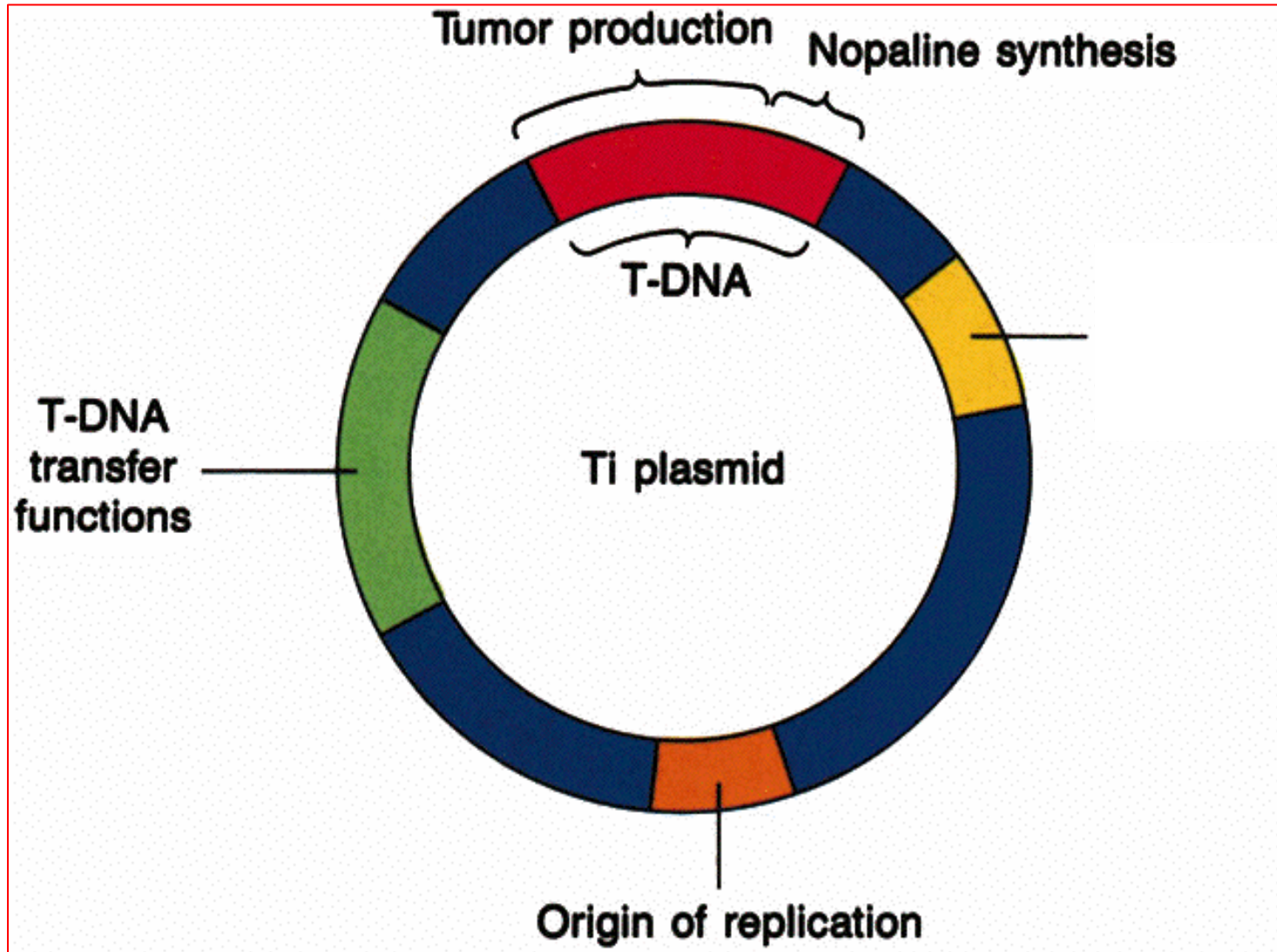
Organismo Modificado Genéticamente (OMG).

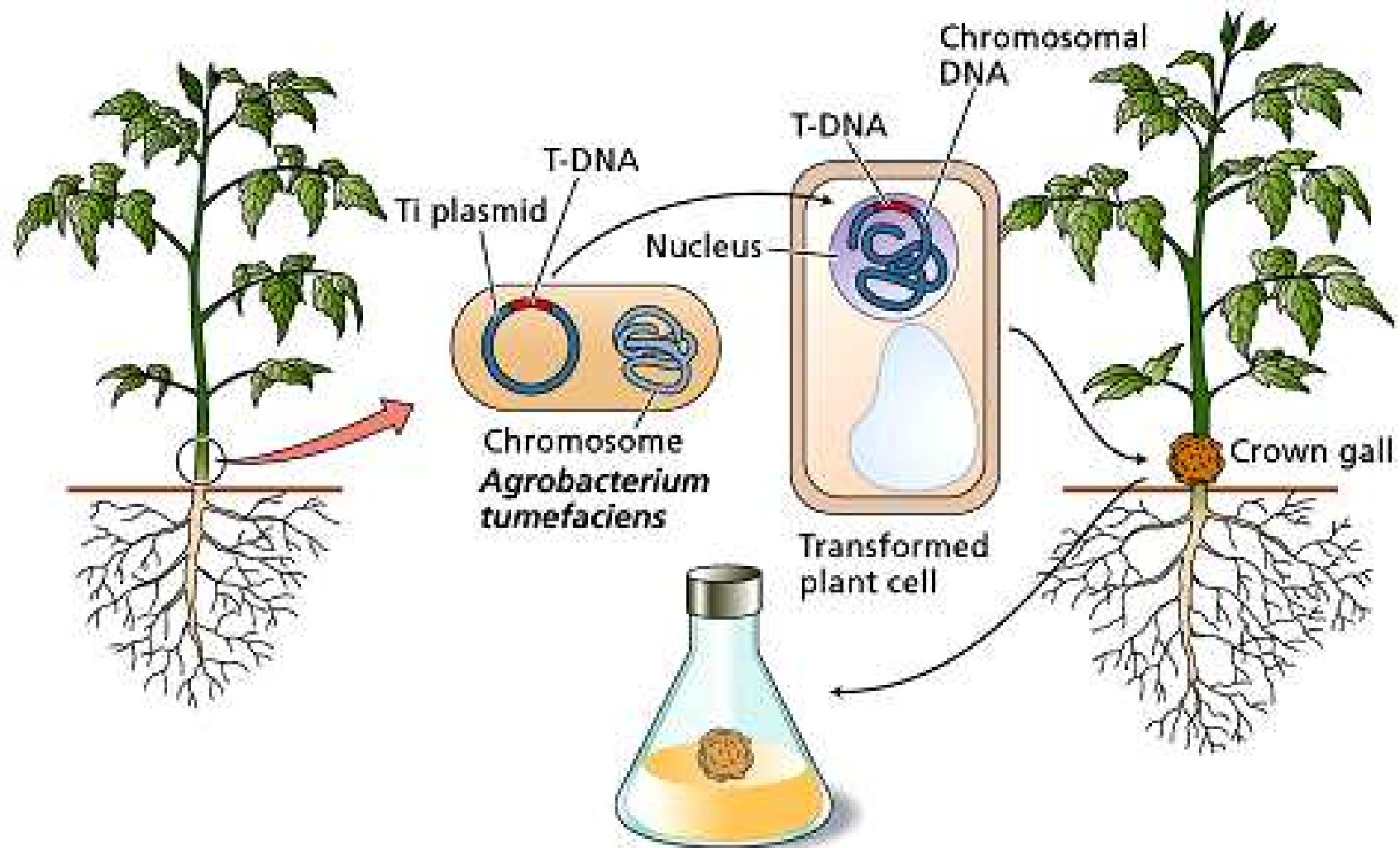
1. Un organismo cuyo material genético ha sido modificado de una manera que no acaece en el apareamiento y/o recombinación naturales.

- 1) la obtención de moléculas de ADN recombinante mediante la utilización de **vectores**,
- 2) la incorporación directa en un organismo de ADN extraño, incluyendo las técnicas de **microinyección**, **macroinyección** y **microencapsulación**,
- 3) técnicas de **fusión o hibridación celular**, incluyendo la fusión de protoplastos.

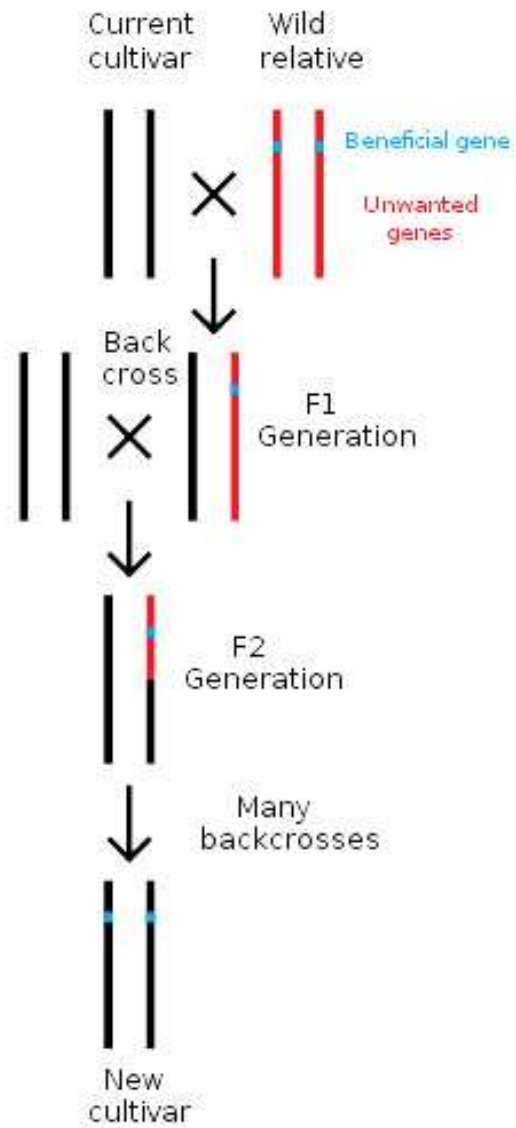
- 1) la obtención de moléculas de ADN recombinante mediante la utilización de **vectores**,
- 2) la incorporación directa en un organismo de ADN extraño, incluyendo las técnicas de **microinyección**, **macroinyección** y **microencapsulación**,
- 3) técnicas de **fusión o hibridación celular**, incluyendo la fusión de protoplastos.

Plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*

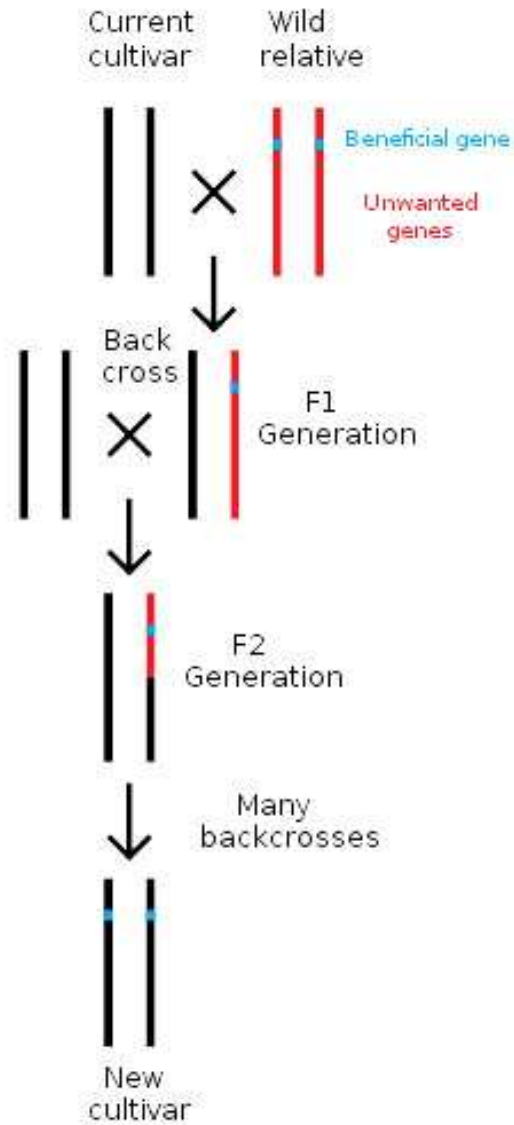




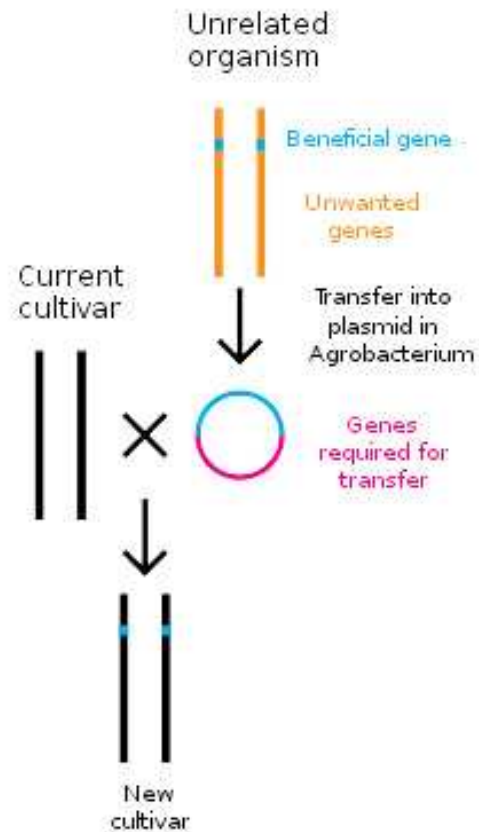
Conventional breeding



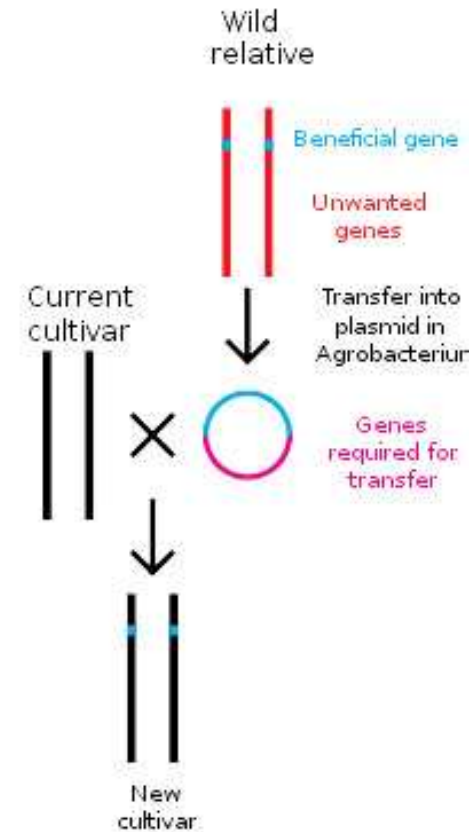
Conventional breeding



Transgenesis



Cisgenesis



- 1) la obtención de moléculas de ADN recombinante mediante la utilización de **vectores**,
- 2) la incorporación directa en un organismo de ADN extraño, incluyendo las técnicas de **microinyección**, **macroinyección** y **microencapsulación**,
- 3) técnicas de **fusión o hibridación celular**, incluyendo la fusión de protoplastos.



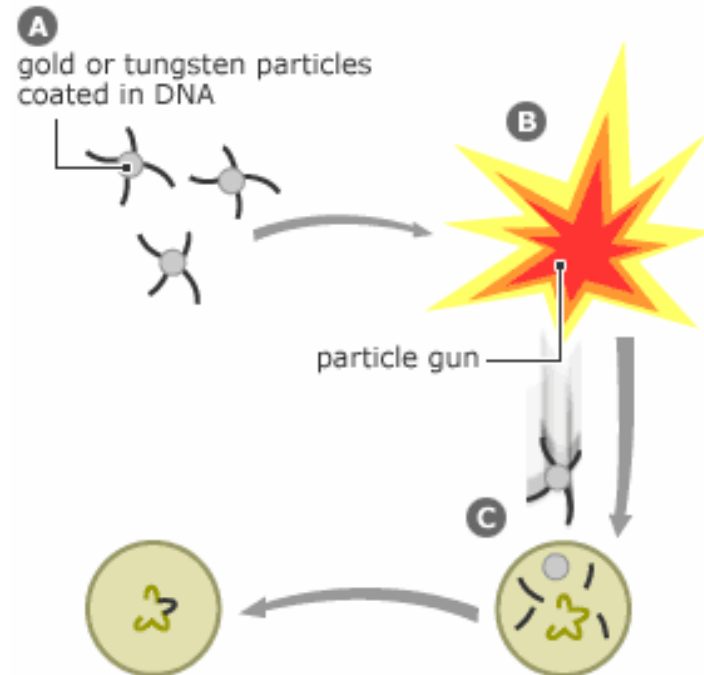
Insertión del ADN deseado en células embrionarias o directamente en tejidos

- 1) la obtención de moléculas de ADN recombinante mediante la utilización de **vectores**,
- 2) la incorporación directa en un organismo de ADN extraño, incluyendo las técnicas de **microinyección**, **macroinyección** y **microencapsulación**,
- 3) técnicas de **fusión o hibridación celular**, incluyendo la fusión de protoplastos.

“Gene Gun”: Pistola de Genes



Transferring a gene using a particle gun



- 1) la obtención de moléculas de ADN recombinante mediante la utilización de **vectores**,
- 2) la incorporación directa en un organismo de ADN extraño, incluyendo las técnicas de **microinyección**, **macroinyección** y **microencapsulación**,
- 3) técnicas de **fusión o hibridación celular**, incluyendo la fusión de protoplastos.



Clasificación de Organismos Transgénicos



Resistencia a **Enfermedades** o **Condiciones Ambientales**



Taladro del Maíz

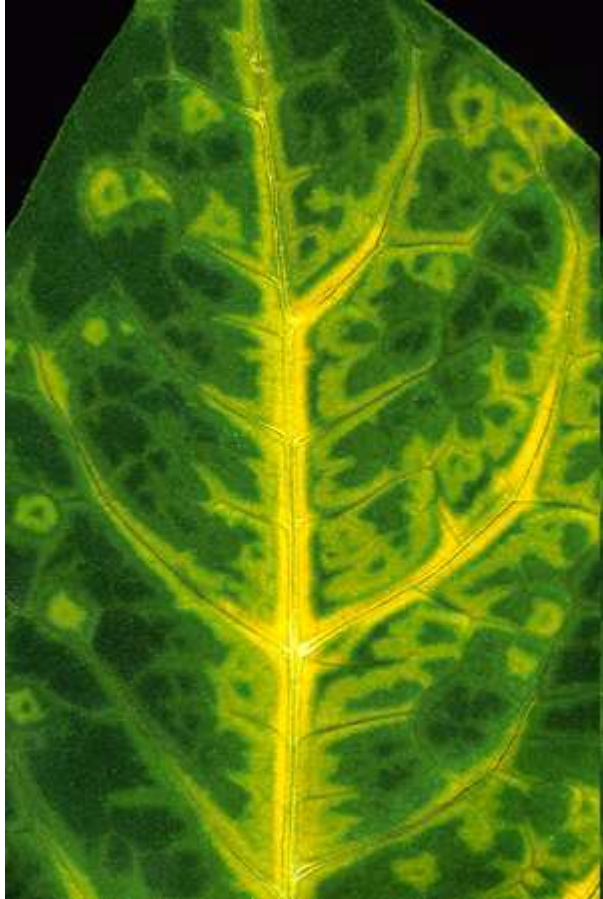


Sesamia nonagrioides

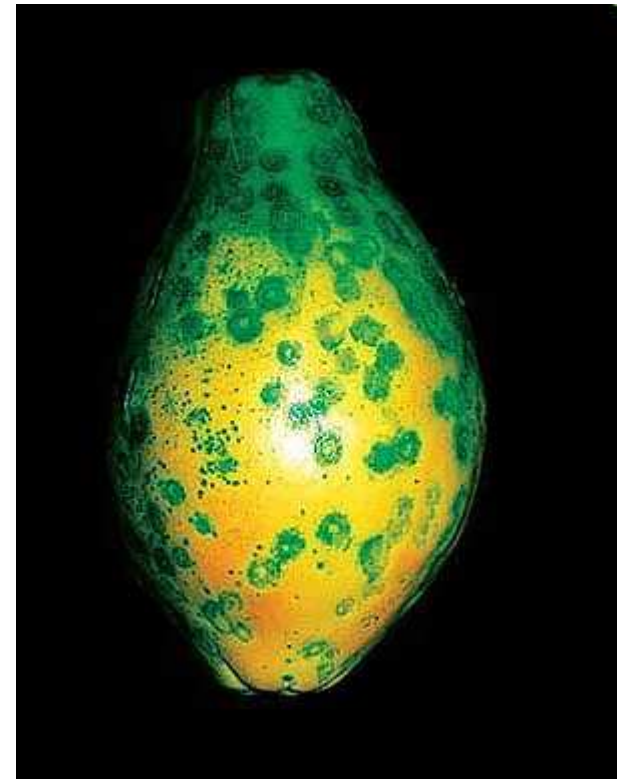
Trasgen procedente de *Bacillus turingensis* (proteína tóxica para insectos).



Virus de la Mancha Anular (*Ringspot Virus*)



Trasgen de coliflor
que codifica para
dos genes que
confieren
resistencia al virus



Resistencia a **Enfermedades** o **Condiciones Ambientales**



Mejora **Calidad** del producto o de las **Propiedades Productivas**



El Arroz Dorado

Dos genes que promueven la
acumulación de β -caroteno en el
grano.



<http://www.goldenrice.org/>

Resistencia a **Enfermedades** o **Condiciones Ambientales**



Mejora **Calidad** del producto o de las **Propiedades Productivas**



Resistencia a **Herbicidas**



Resistencia al herbicida Glufosinato

**Gen que
confiere
resistencia
al
Glufosinato
de Amonio**



<http://www.youtube.com/watch?v=o-BQq2aBdYo>

Resistencia a **Enfermedades** o **Condiciones Ambientales**



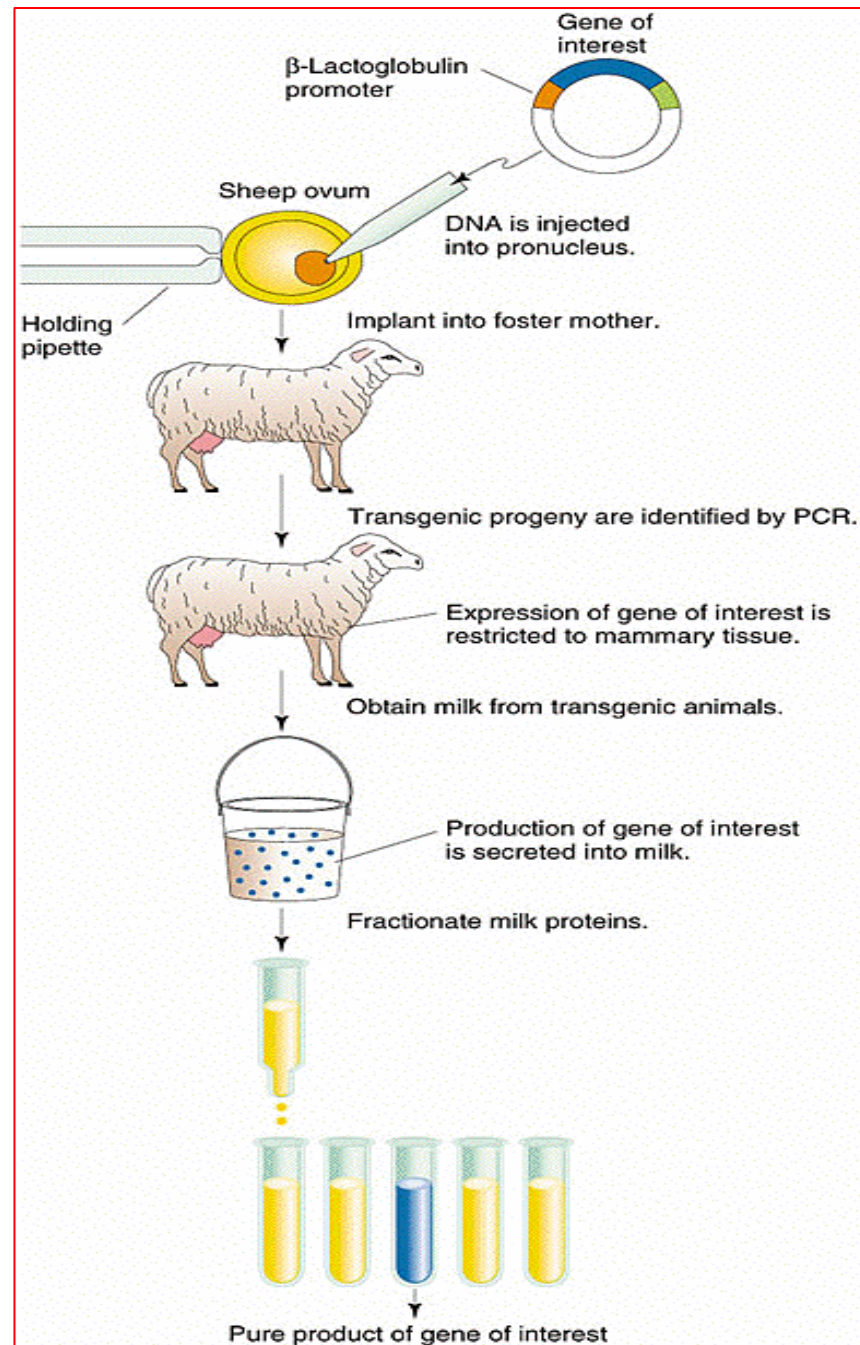
Mejora **Calidad** del producto o de las **Propiedades Productivas**



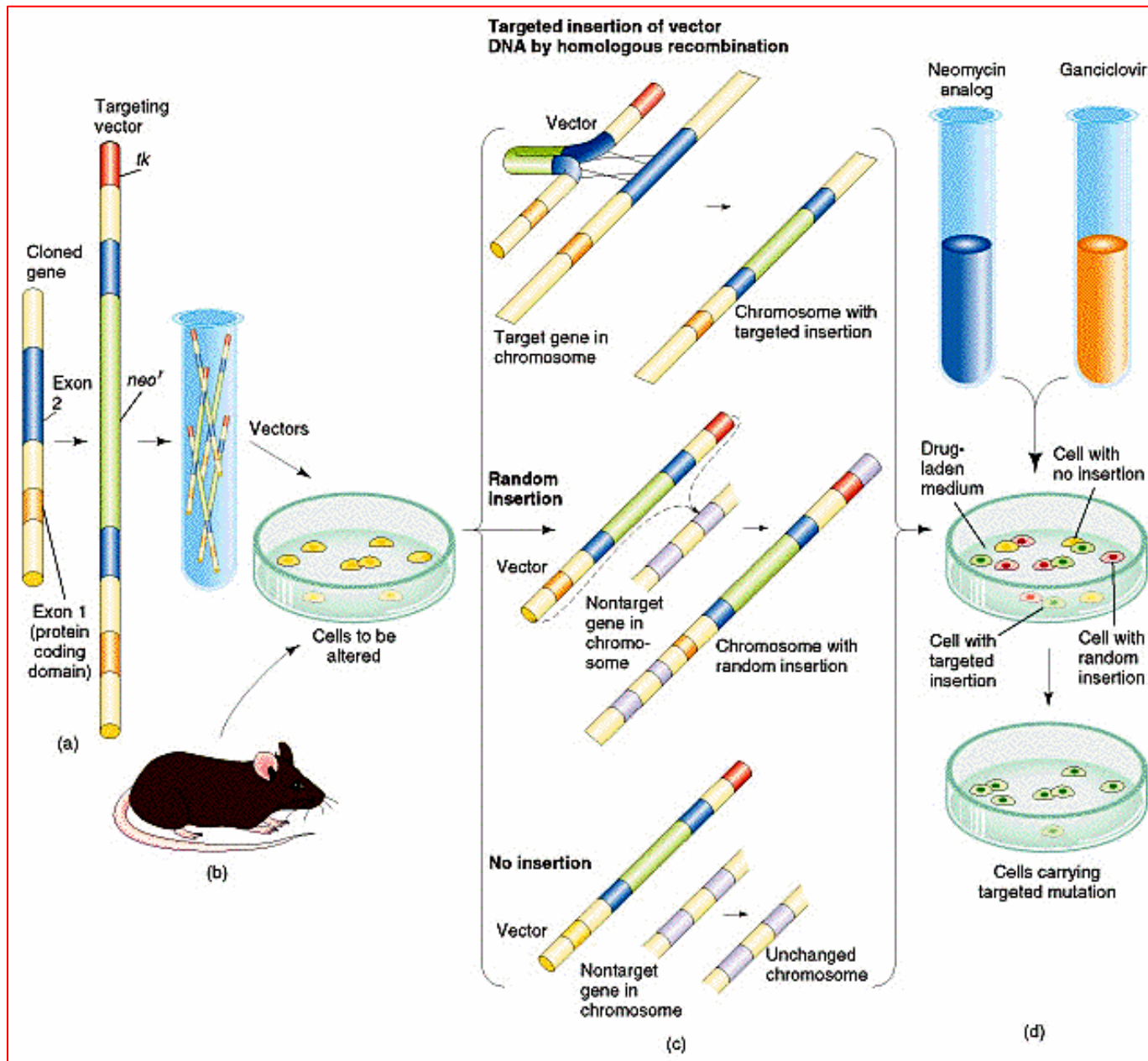
Resistencia a **Herbicidas**



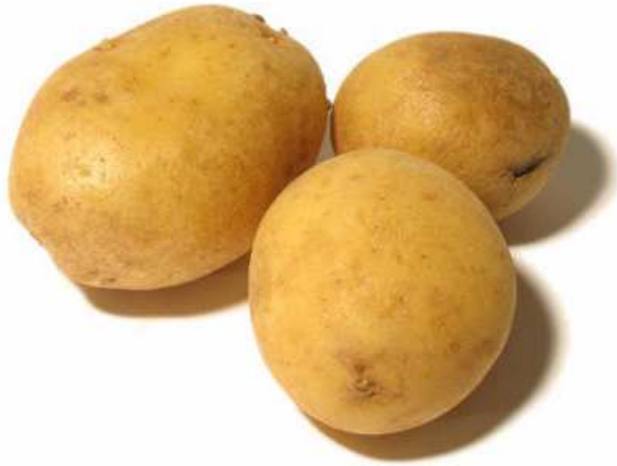
Biorreactores



Ratones Knockout

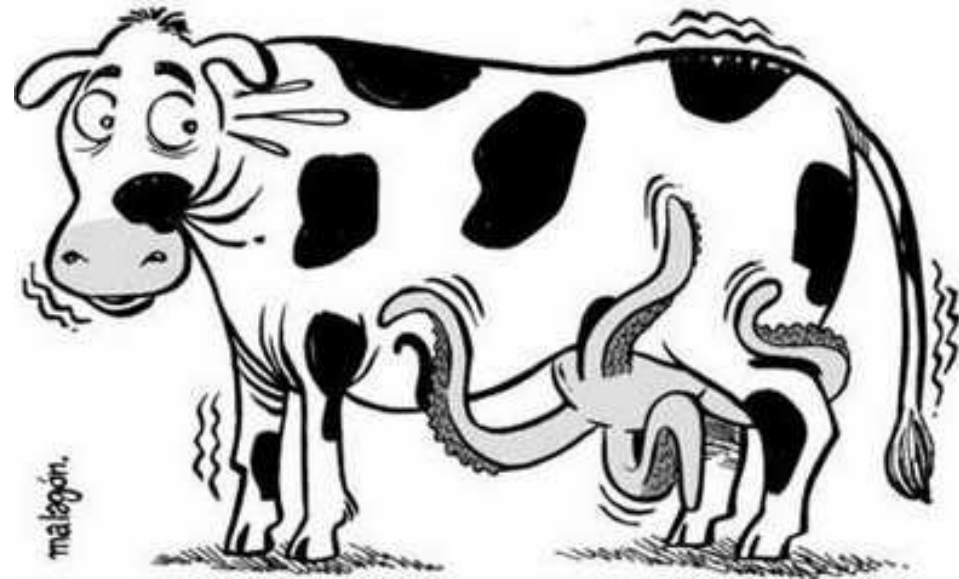
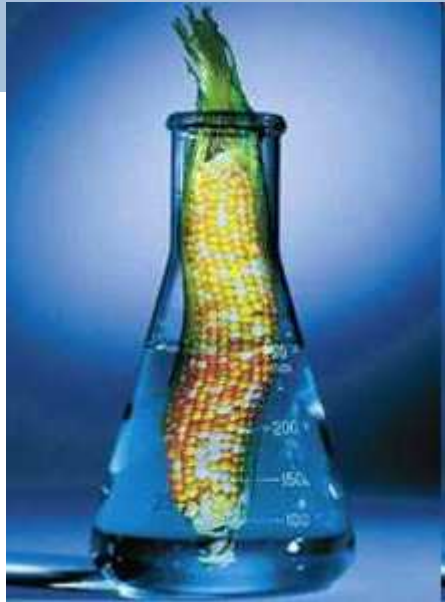


¿Qué es **Natural**? ¿Qué es **Ecológico**?
¿Qué es **Modificado**?



-**No todo lo Natural es Inocuo**: ribotoxinas fúngicas, neurotoxinas, toxina antrácica, botulínica,...

-**No todo lo Artificial es Nocivo**: *“Ninguno de los conservantes autorizados llega a ser tan peligroso como las toxinas que pueden producir las bacterias y los hongos que el conservante evita”*



Algunas **DES**informaciones aparecidas en la prensa...

*“Si los científicos se obcecaban en modificar el equilibrio y la biodiversidad de la flora y la fauna del planeta, caminamos hacia un horizonte de consecuencias imprevisibles: para obtener un solo ejemplar en óptimas condiciones muchos de los experimentos genéticos en el mundo animal han dado como resultado **miles de seres amorfos y enfermizos**”.*

*“Iniciar investigaciones genéticas puede tener también una vertiente más positiva en su utilización para erradicar o ralentizar el proceso destructivo de una enfermedad, como es el caso del cáncer, y es la línea por la que deberíamos discurrir los avances en un campo ennoblecido por ilustres figuras que han ido desarrollando sus estudios con posterioridad a Mendel, **el padre del gen**”.*