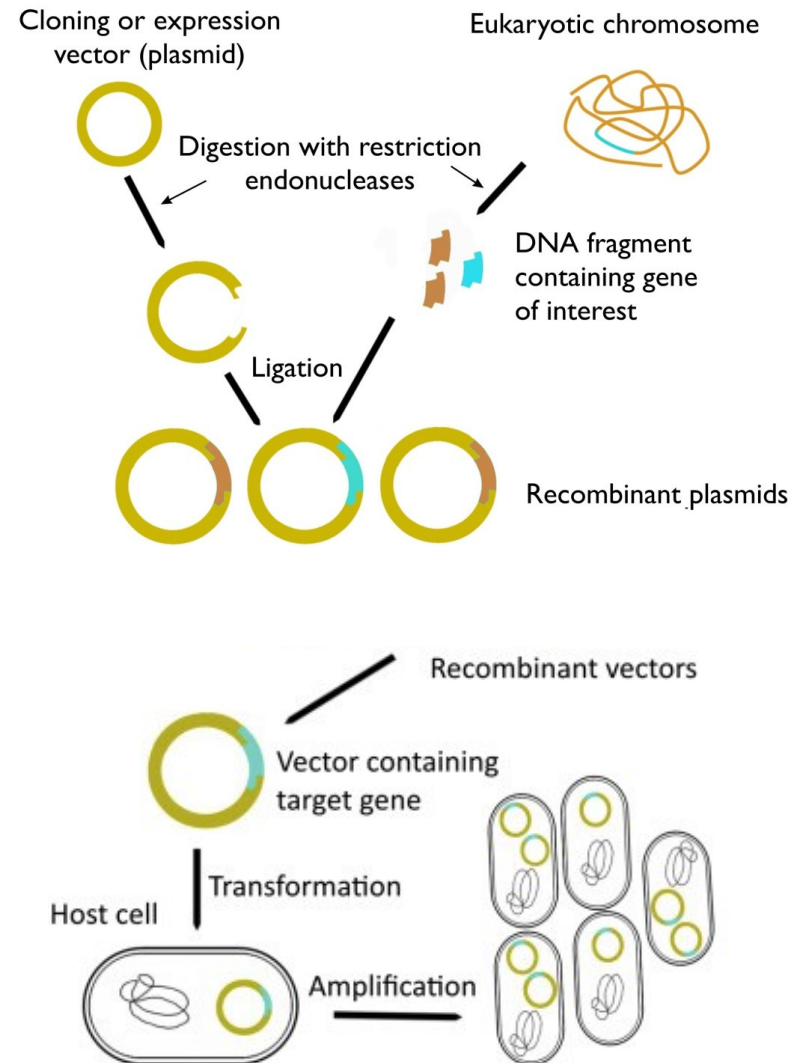


Clonació d'un gen d'interès en un plasmidi bacterià d'*Escherichia coli*

GENS MARCADORS DE SELECCIÓ

Clonació d'un gen d'interès en un bacteri. Mètode general.

- S'aïlla el DNA de la cèl·lula que conté el gen d'interès (DNA passatger)
- S'aïlla un plasmidi bacterià (aquest plasmidi ha de contenir un gen marcador que li doni resistència a un antibiòtic)
- Es tallen ambdós mostres de DNA amb el mateix enzim de restricció.
- Es combinen els plasmidis tallats amb els fragments de DNA passatger. Alguns s'uniran per aparellaments de bases. S'afegeix l'enzim DNA-ligasa per segellar les unions: s'obtenen d'aquesta manera plasmidis recombinants o híbrids.
- S'introdueixen els plasmidis recombinants en cèl·lules bacterianes per mitjà de la transformació.
- Es cultiven els bacteris en un medi que contingui l'antibiòtic. Només els bacteris que han incorporat el plasmidi creixeran i es reproduiran formant una colònia. Amb la reproducció dels bacteris s'obtenen moltes còpies del gen d'interès.



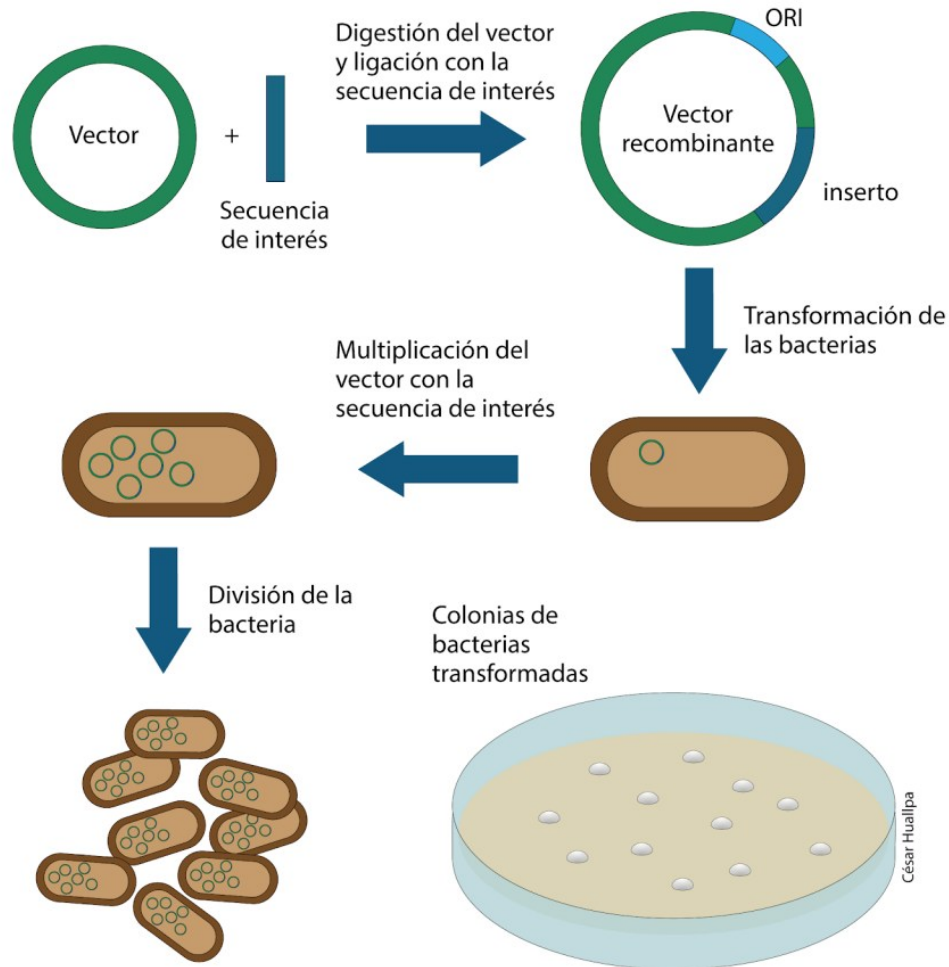
Pasos del Clonado

1) Fragmento a Clonar de ADN

2) Ligación del ADN al vector

3) Transformación

4) Selección de Recombinantes

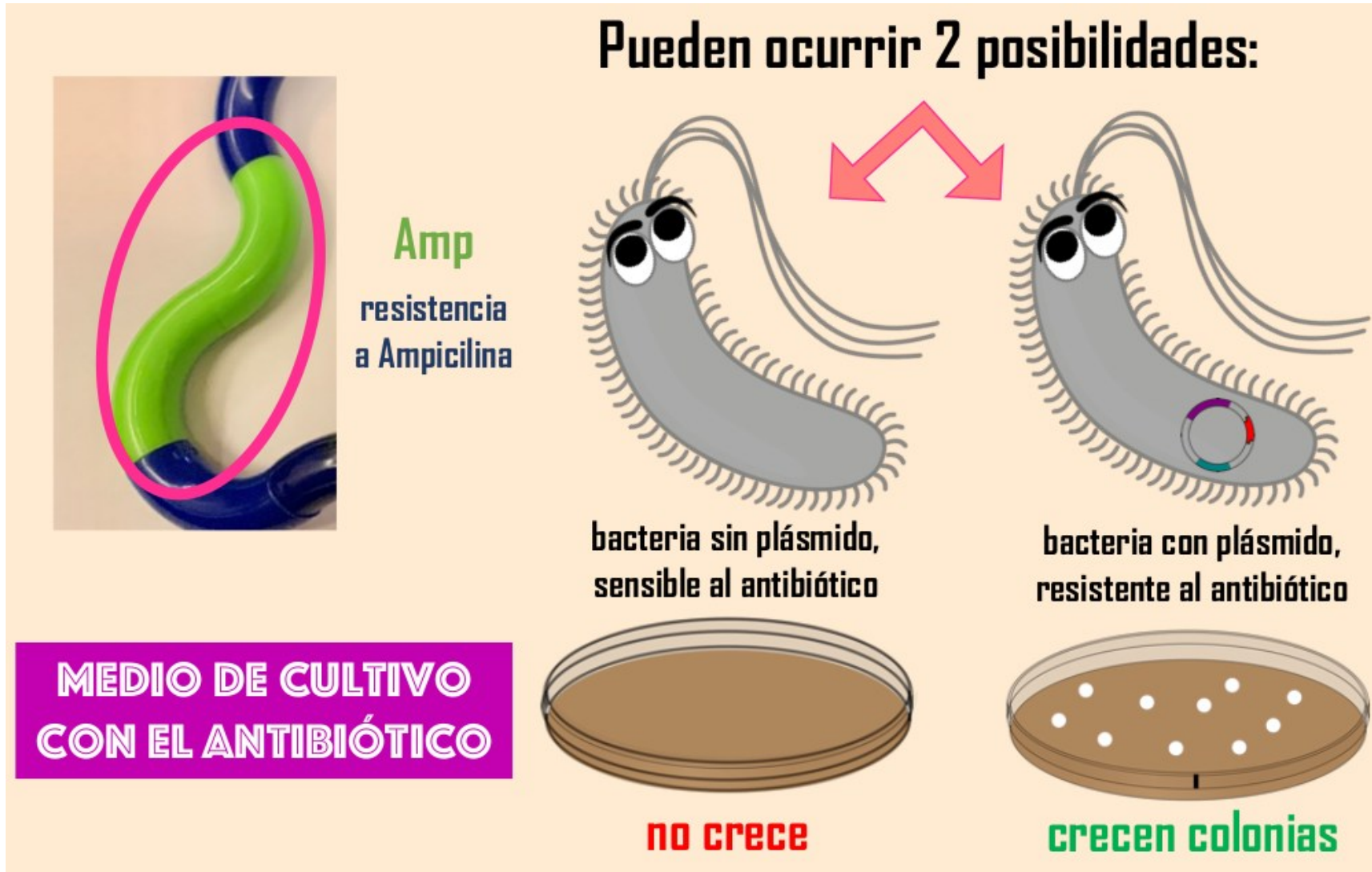


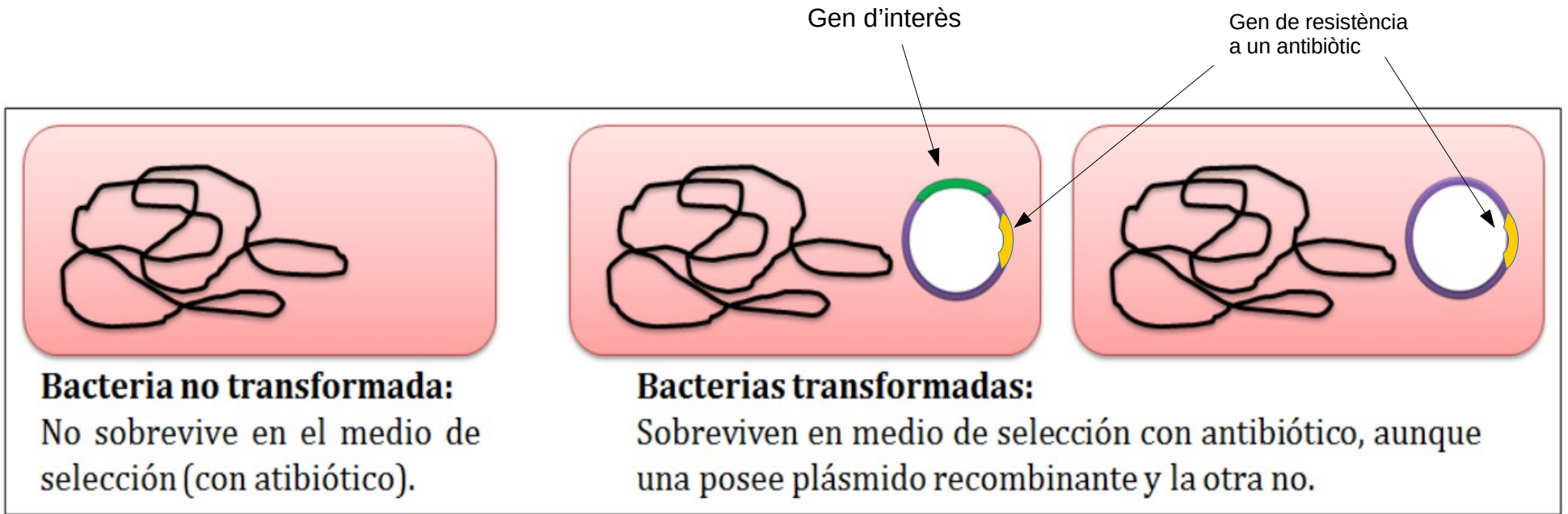
Selecció dels bacteris que han incorporat un fragment de DNA passatger

Després de la transformació s'han de poder seleccionar aquells bacteris que han incorporat el plasmidi que conté el fragment d'interès amb el gen. Per això s'han de fer créixer els bacteris en un **medi de cultiu que ens permeti fer la selecció.**

1. Marcador de resistència a un antibiòtic

El plasmidi utilitzat, conté un gen que li confereix resistència a un antibiòtic, com per exemple l'ampicilina. Si el medi de cultiu conté aquest antibiòtic, els bacteris transformats amb el plasmidi, sobreviuran i es reproduiran formant una colònia.



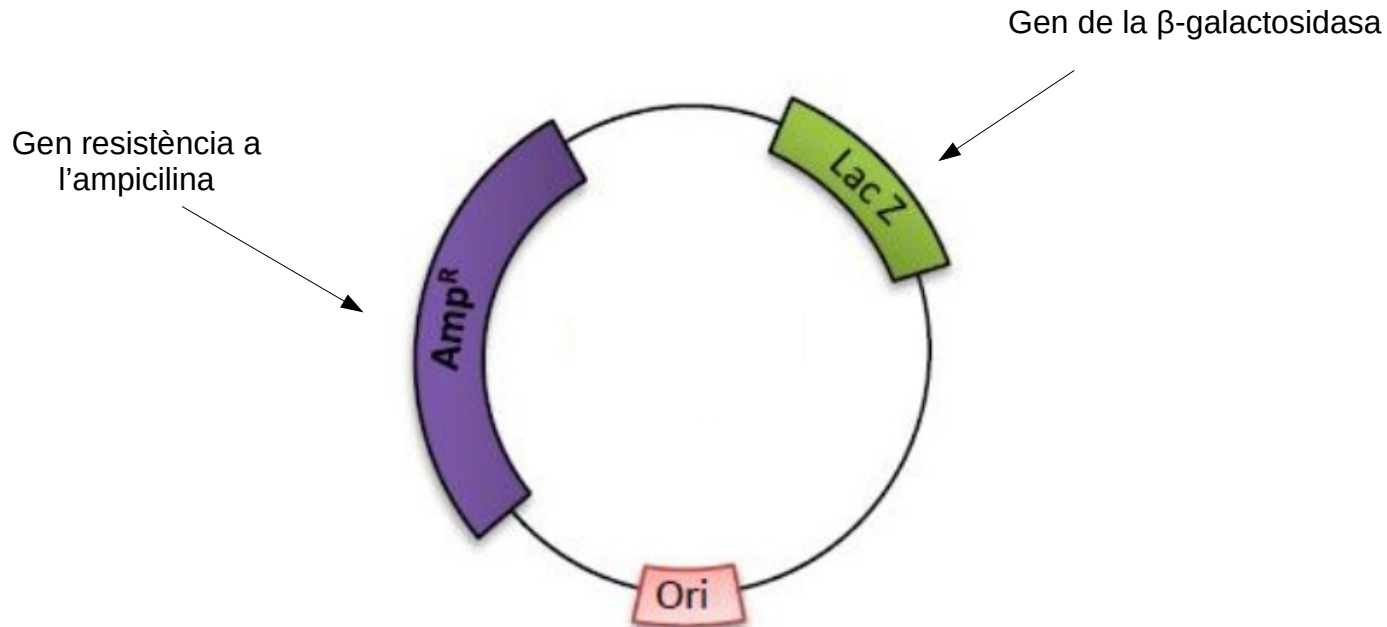


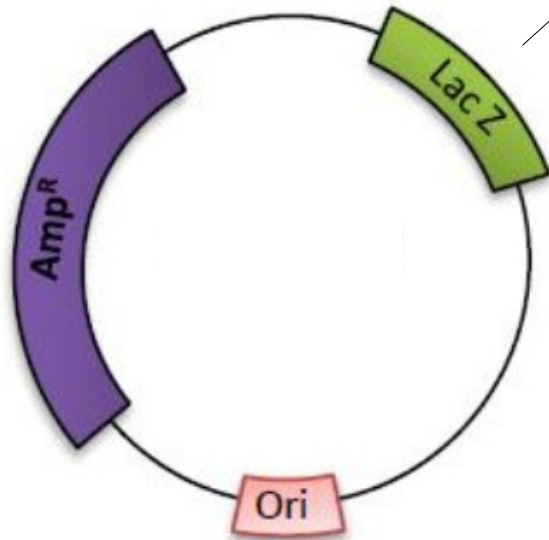
Com podem seleccionar els bacteris que han incorporat un plasmidi híbrid dels que han incorporat un plasmidi no híbrid?



El plàsmidi utilitzat com a vector ha de tenir un sistema que permeti discriminar entre els bacteris que han incorporat el vector amb el fragment d'interès de les que han incorporat el vector buit (sense el fragment d'interès).

Un sistema molt usat és el que utilitza la seqüència del gen de la β -galactosidasa (**gen LacZ**, de l'operó lac d'*Escherichia coli*)



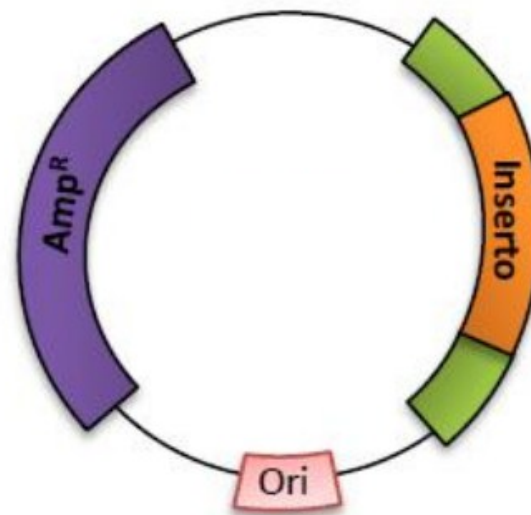


El gen *lacZ* codifica per a l'enzim **β -galactosidasa**.

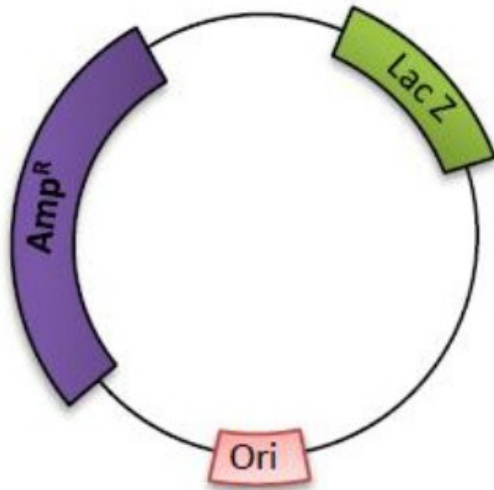
La β -galactosidasa és responsable de la hidròlisi de la lactosa però també d'una substància anomenada **X-gal** que quan es hidrolitzada dona lloc a un producte de **color blau**.

Dins del gen *lacZ*, a més, hi ha la diana de restricció reconeguda per l'enzim de restricció usat en el procés.

El gen d'interès quedarà insertat a l'interior del gen *lacZ*.



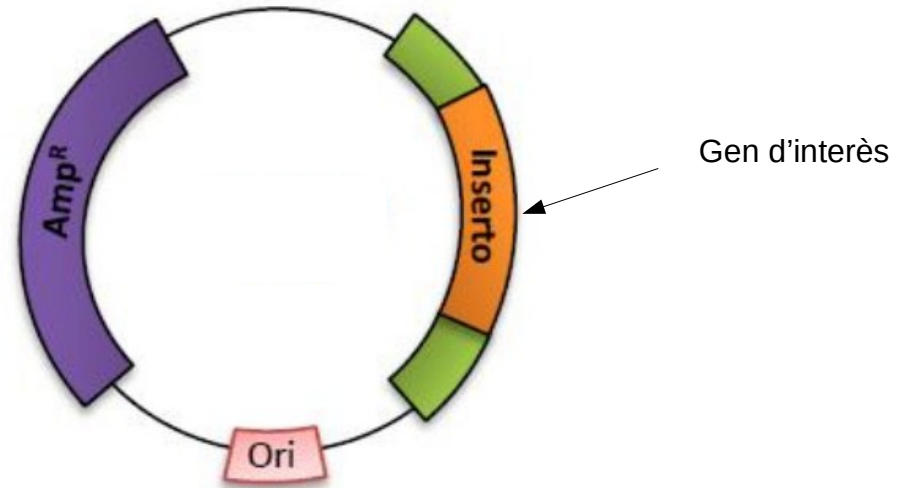
Gen d'interès



Plasmidi buid
(sense el fragment d'interès)

Si el plasmidi no ha incorporat el fragment d'interès, el gen lacZ s'expressarà i donarà lloc a la β -galactosidasa.

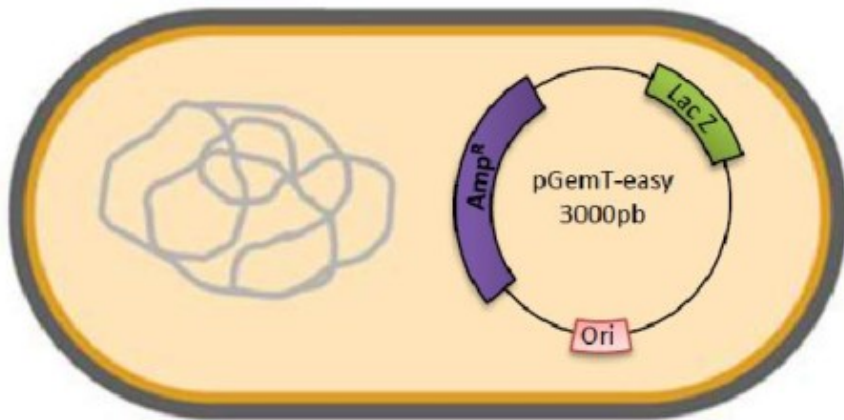
Si al medi de cultiu hi posem Xgal, els **bacteris no híbrids** podran hidrolitzar-lo i es formarà un producte de **color blau**..



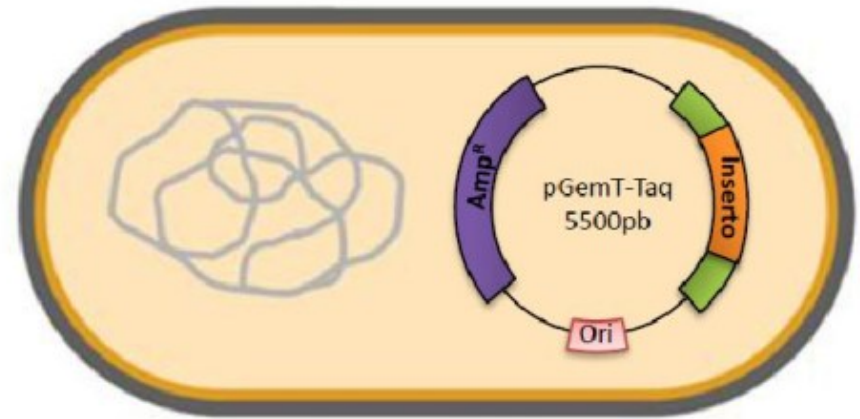
Plasmidi híbrid
(amb el fragment d'interès)

Si el plasmidi ha incorporat el fragment d'interès, el gen lacZ no s'expressarà i **no** donarà lloc a la β -galactosidasa.

Si al medi de cultiu hi posem Xgal, els bacteris híbrids no podran hidrolitzar-lo i no es formarà el producte de color blau..



Colonia Azul: Plásmido Recircularizado



Colonia Blanca: Plásmido recombinante

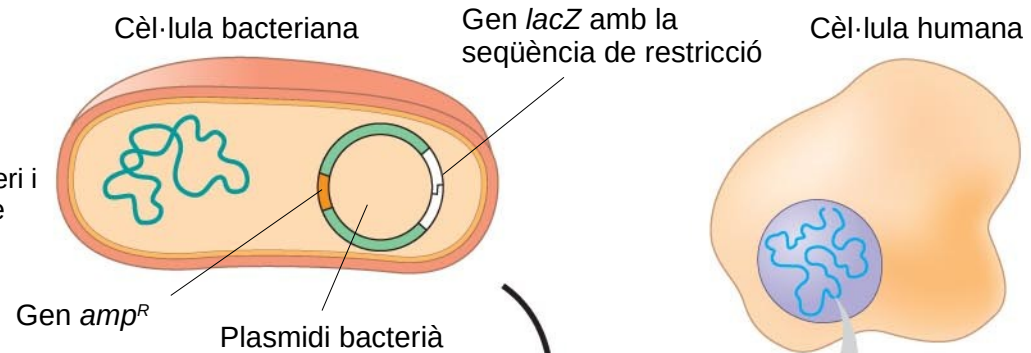


2. Marcador LacZ: enzima β -galactosidasa.

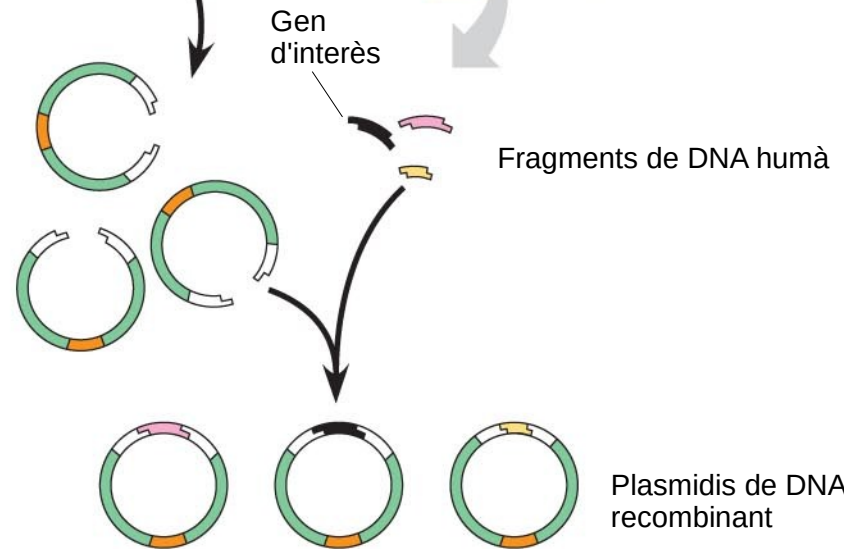


En definitiva, així es clona un gen...

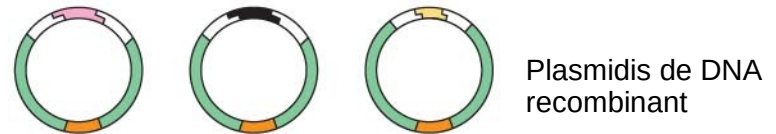
1. S'aïlla el plasmidi del bacteri i el DNA que conté el gen que es vol clonar.



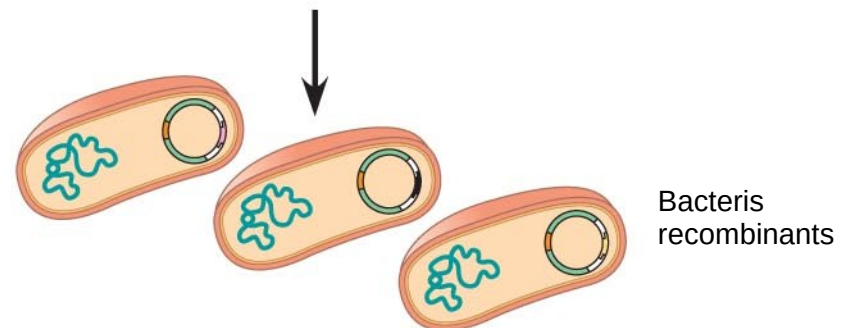
2. Es tallen ambdues mostres amb el mateix enzim de restricció (aquest enzim només ha de tenir una diana dintre del gen *lacZ*). Quedaran extrems cohesius.



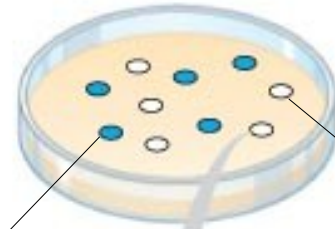
3. Es mesclen els plasmidis tallats amb els fragments de DNA. Alguns s'uniran per complementarietat de bases. S'hi afegeix una DNA ligasa. El resultat són plasmidis recombinants i plasmidis no recombinants.



4. S'indueix la transformació. Alguns bacteris, incorporen plasmidis recombinants, altres bacteris plasmidis no recombinants, altres no incorporen plasmidis.



Es fan créixer els bacteris sobre una placa amb agar que conté Ampicilina i X-gal.



Colonia portadora d'un plasmidi no recombinant amb el gen *lacZ* intacte

Colonia portadora d'un plasmidi recombinant amb el gen *lacZ* alterat



Clon bacterià

RESULTATS

Només les cèl·lules que adquireixen un plasmidi es reproduïxen i formen una colònia. Les colònies amb un plasmidi recombinant són de color blanc.

Posteriorment i mitjançant un procés d'hibridació amb una sonda de DNA es poden detectar entre les colònies de color blanc les que presenten un gen concret.

La part més difícil de la clonació d'un gen específic és identificar la colònia que conte el gen d'interès entre milers de colònies portadores d'altres fragments de DNA.

Mitjançant un **procés d'hibridació amb una sonda de DNA** es poden detectar entre les colònies de color blanc les que presenten el gen d'interès.

Identificació de colònies portadores d'un gen d'interès: **hibridació amb una sonda d'àcid nucleic**

Es detecta el DNA d'un gen concret gràcies a la capacitat de formar parells de bases amb una seqüència complementària d'una altra molècula d'àcid nucleic.

Aquesta molècula complementària, un àcid nucleic curt de cadena senzilla (de DNA o de RNA), s'anomena **sonda de l'àcid nucleic**.

Si es coneix una part de la seqüència nucleotídica del gen que volem identificar es pot sintetitzar una sonda complementària.

Per exemple, si part del gen que volem indentificar és:

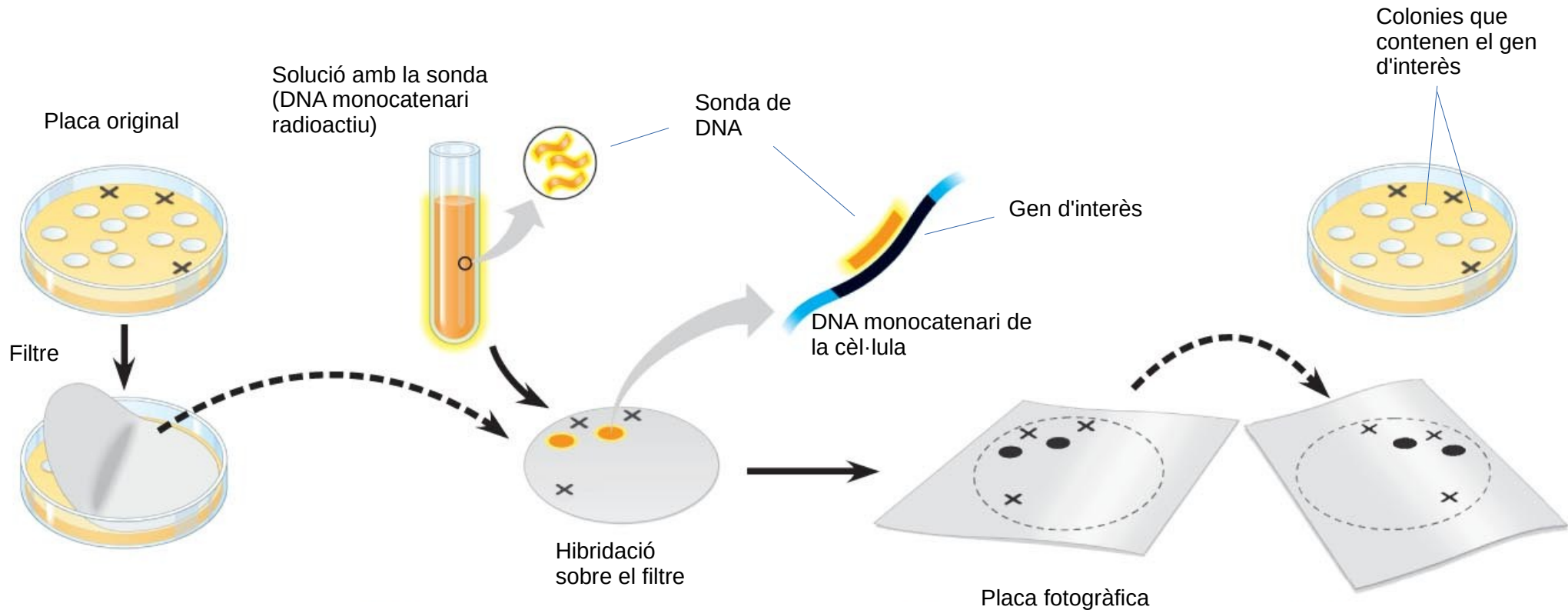
5' GGCTAACTTAGC 3'

S'hauria de sintetitzar la sonda:

3'CCGATTGAATCG5'

Aquesta sonda es marca amb un isòtop radioactiu o amb un colorant fluorescent per després seguir-li la pista.

Hibridació amb una sonda d'àcid nucleic



Amb un paper de filtre especial es pressiona contra la placa que conté les colònies per transferir les cèl·lules a la part inferior del filtre. Es fan marques (x) tan en el paper com en l'agar per establir, al final, la posició de les colònies que ens hagin donat positiu.

Es tracta el filtre amb solucions adequades per tal d'obrir les cèl·lules i desnaturalitzar el seu DNA així com per permetre que els filaments monocatenaris resultants quedin adherits al paper.

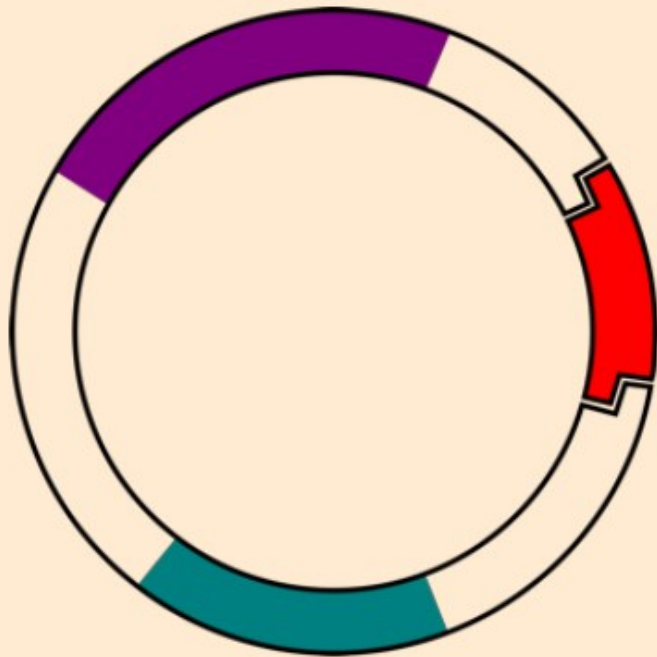
Les sondes radioactives, complementàries amb part del gen d'interès, s'incuben amb el filtre. Per complementarietat de bases quedaran unides sobre el filament que contingui el gen buscat (les colònies amb híbrids de sonda radioactiva i DNA es mostren en color taronja en el dibuix). Es fa un rentat per eliminar les sondes que no s'hagin unit.

La radioactivitat després de les sondes impressionarà una placa fotogràfica (autoradiografia). Els punts negres revelen la ubicació del DNA que s'ha hibridat amb la sonda. Només cal fer coincidir les marques (x) realitzades amb la placa original per localitzar les colònies portadores del gen d'interès.

Genoteca de gens

- La clonació de gens, ja sigui mitjançant cèl·lules ("in vivo") o mitjançant la PCR ("in vitro") ens permet crear una llibreria de gens clonats.
- Una **genoteca** és el conjunt de tots els fragments de DNA clonats a partir d'un genoma complet .
- Una **genoteca de cDNA** conté només seqüències de DNA que s'han copiat a partir dels mRNA madurs eucariotes.

¿Qué cosas debe tener un PLÁSMIDO para poder usarse como un VECTOR de CLONACIÓN?



ORI
ORIGEN DE REPLICACIÓN

Si no tiene ORI, el plásmido no podrá replicarse, y por tanto, al no poder multiplicarse, no pasará a las bacterias hijas cuando se dividan.

AL MENOS 2 MARCADORES

Pueden ser genes de alguna resistencia a antibiótico o para sintetizar alguna enzima que permita distinguir:



Si en el plásmido se ha insertado el gen de interés

Si la bacteria se ha transformado y tiene el plásmido en su interior

Un únic punt de tall per a l'enzim de restricció que es fa servir.