

# L'ENGINYERIA GENÈTICA i LA BIOTECNOLOGIA



At harvest time Ted's ethical objections to the use of frog genes in potato breeding were conveniently forgotten.

# L'enginyeria genètica i la biotecnologia

- Tècniques per introduir gens en cèl·lules.
- Producció de còpies de DNA.
- Obtenció de la proteïna que codifica el gen.
- Introducció de gens en cèl·lules humanes.
- Obtenció de vacunes recombinants.
- Obtenció d'un animal transgènic.
- Obtenció d'una planta transgènica.
- La clonació reproductiva.
- Medicina regenerativa. Clonació terapèutica. Cèl·lules mare.

# Vocabulari específic

- **Genoma**: material genètic d'un individu.
- **Enginyeria genètica**: conjunt de tècniques que permeten la manipulació del DNA d'una cèl·lula.
- **Clonació**: generació de còpies de gens, cèl·lules o individus.
- **DNA recombinant**: DNA que s'obté en intercalar un segment de DNA estrany en un DNA receptor.
- **DNA passatger**: fragment de DNA que conté el gen d'interès i que és vol introduir en una cèl·lula receptora.
- **Enzims de restricció**: enzims que reconeixen i tallen el DNA per seqüències concretes. S'han aïllat de bacteris.
- **Vector**: plasmidi bacterià o virus que transporta el DNA passatger fins al DNA receptor.
- **Organisme transgènic**: organisme modificat genèticament.

- **Teràpia gènica**: consisteix en la curació de malalties hereditàries degudes a la presència d'un gen no funcional inserint el gen correcte al pacient.
- **Biotecnologia**: manipulació o ús d'organismes o dels seus components per obtenir productes d'interès.
  - Algunes pràctiques que es realitzen des de fa molts anys representen formes de biotecnologia: us de microorganismes per a l'elaboració de vi, formatges, pa...i obtenció per encreuaments de noves varietats de plantes i animals.
  - La biotecnologia moderna, basada en la manipulació del DNA in vitro, difereix de la clàssica perquè permet modificar gens específics i desplaçar-los entre els diferents organismes.
- La biotecnologia té aplicacions en les ciències de la salut, l'agricultura, la ramaderia, l'alimentació i les ciències mediambientals

Introducció:  
visió general del tema

Per estudiar i manipular un gen cal prèviament obtenir moltes còpies d'aquest gen:  
cal clonar-lo

i com es clona un gen?

Introduint-lo en una cèl·lula que s'encarregarà de fer les còpies:  
**clonació en cèl·lules**

mitjançant la **tècnica de la PCR**  
(sense necessitat de cèl·lules)

i com s'introdueix un gen d'interès en una cèl·lula per poder clonar-lo?

mitjançant  
mecanismes biològics  
(inserir-lo en un **vector  
de clonació**)

Plasmidis

Virus

mitjançant  
mecanismes no biològics

Electroporació

Microinjecció

Tret de microbales

Com podem inserir un gen en un vector?

Mitjançant tècniques que ens permeten tallar i unir fragments de DNA entre si usant **enzims de restricció**



# Per a què pot servir clonar un gen?

## Algunes de les aplicacions poden ser...

- **Estudiar** el gen.
- **Obtenció** en gran quantitats **de la proteïna que el gen codifica** (insulina, hormona del creixement...)
- Introduir-lo en un animal o en una planta per obtenir un **animal transgènic** o una **planta transgènica**
- Obtenir **vacunes** a partir de les proteïnes víriques que codifica el gen.
- Introduir-lo en cèl·lules humanes per a **teràpia gènica**

## Altres aplicacionns de l'enginyeria genètica:

- Clonació reproductiva
- Clonació terapèutica

# Formes d'introducció de gens en cèl·lules

## Mecanismes biològics (vectors de clonació)

- Plasmidis
- Virus

## Mecanismes no biològics:

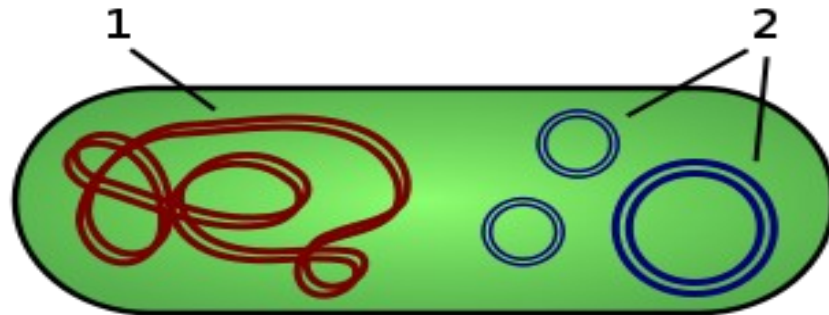
- Electroporació
- Microinjecció
- Tret de microbales.

# PLASMIDIS bacterians

Són molècules de DNA, circular i bicatenari, separades físicament del cromosoma bacterià, que es troben en alguns bacteris.

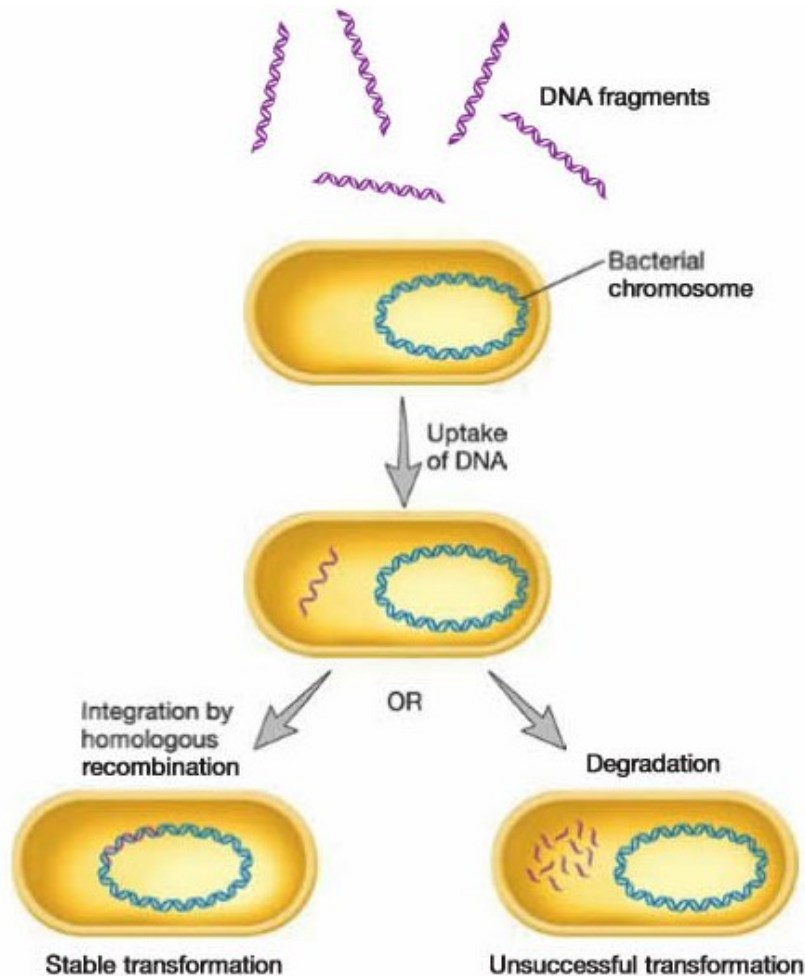
No són necessaris per al creixement normal de la cèl·lula, i **es repliquen independentment del cromosoma**.

Alguns contenen gens que doten al bacteri de certs avantatges, com per exemple, **gens de resistència a antibiòtics** que fan augmentar la capacitat de la cèl·lula de sobreviure en un medi amb antibiòtic.

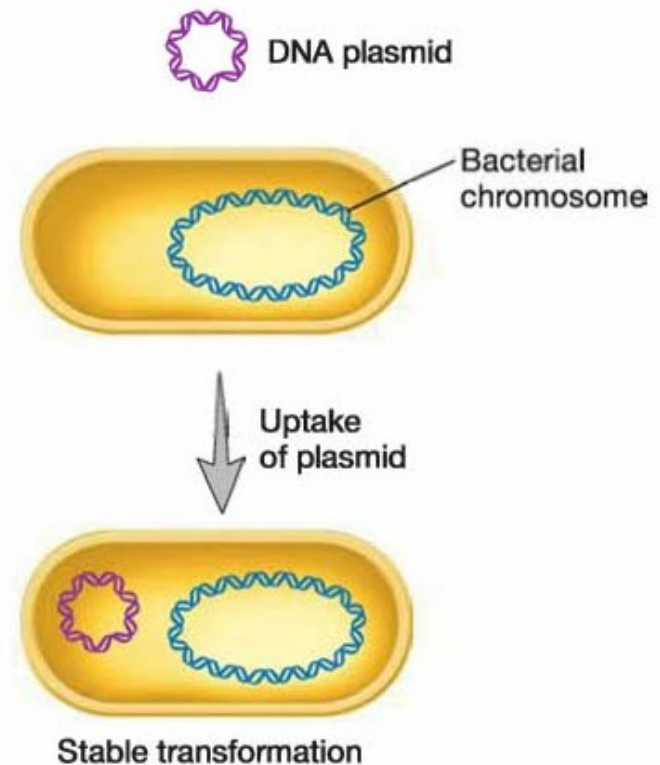


Dibuix esquemàtic del material genètic d'un bacteri. 1. DNA del cromosoma bacterià. 2. Plasmidis.

Si, per la lisi dels bacteris, els plasmidis queden lliures al medi, poden penetrar dins d'altres bacteris mitjançant un procés anomenat **transformació**. Els bacteris receptors adquireixen així les propietats dels gens que hi ha al plasmidi.



**(a) Transformation with DNA fragments**

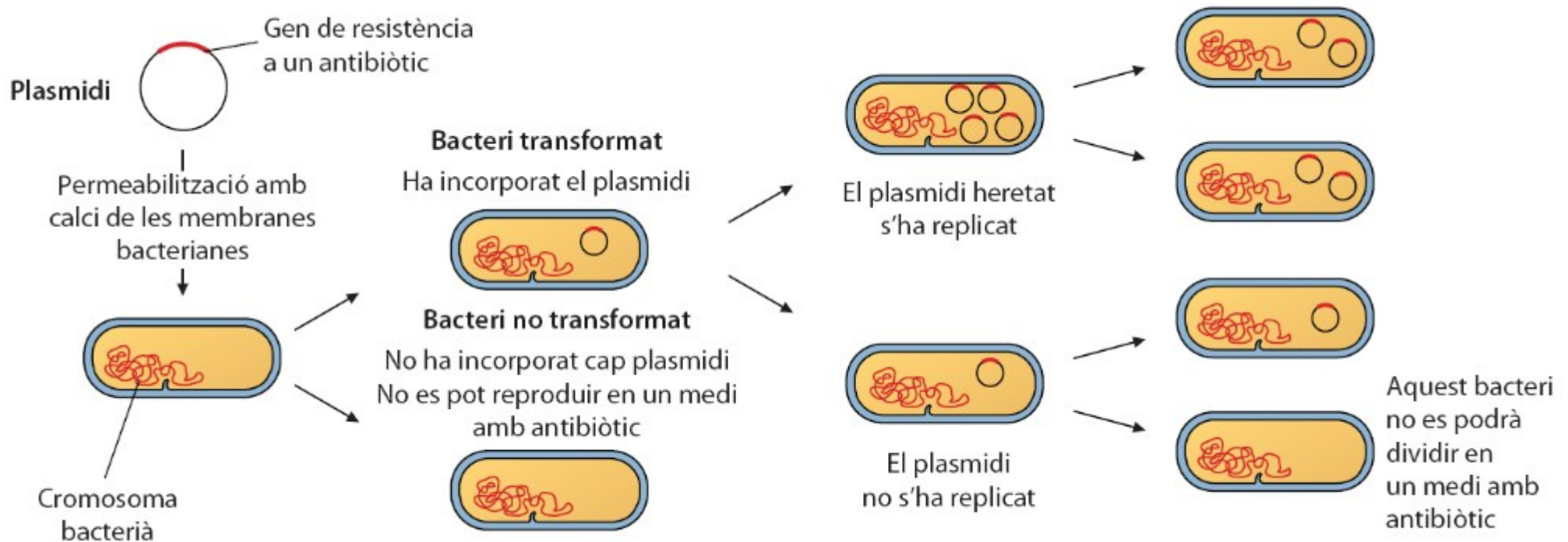


**(b) Transformation with a plasmid**

**La transformació és un procés que es dona de forma natural en bacteris**

Els plasmidis que s'utilitzen com a vectors són portadors de **gens de resistència a antibiòtics** (gens que codifiquen proteïnes degradadores d'antibiòtics).

- D'aquesta manera es poden **seleccionar** els **bacteris** que han estat **transformats**: només els bacteris que han integrat el plasmidi sobreviuen en un medi amb l'antibiòtic.



La transformació només es dona entre bacteris, els plasmidis bacterians **no penetren de forma natural** en cèl·lules eucariotes.

Excepció: **el plasmidi Ti d'*Agrobacterium tumefaciens***

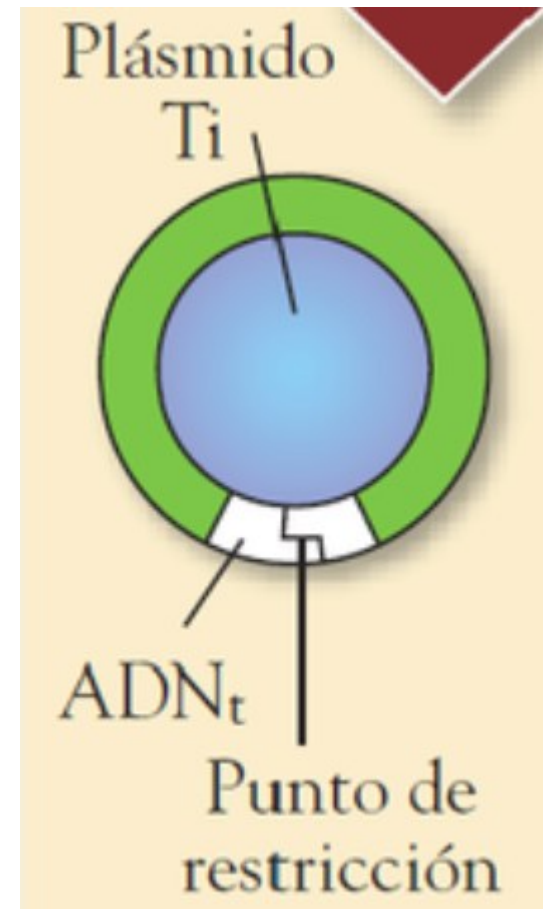
## El plasmidi Ti

El bacteri *Agrobacterium tumefaciens* és un bacteri del terra que infecta les plantes a través de les ferides i els hi provoca tumors.

Presenta un plasmidi, el **plasmidi Ti** (*tumor inducing*) amb un sector, anomenat T-DNA, que conté els gens responsables del tumor.

El plasmidi penetra en cèl·lules vegetals, s'hi integra en un dels seus cromosomes i els hi provoca el tumor.

Aquest **plasmidi Ti** és utilitzat pels investigadors com a **vector de clonació en plantes** (prèviament però cal eliminar els gens que causen el tumor)

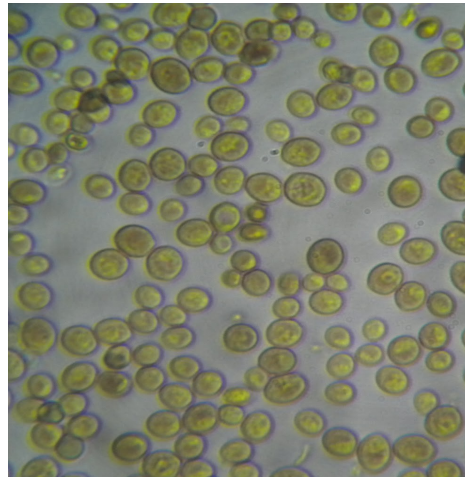
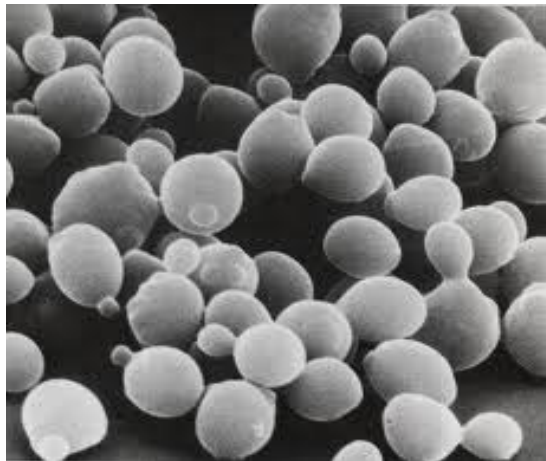




# Els plasmidis de llevats

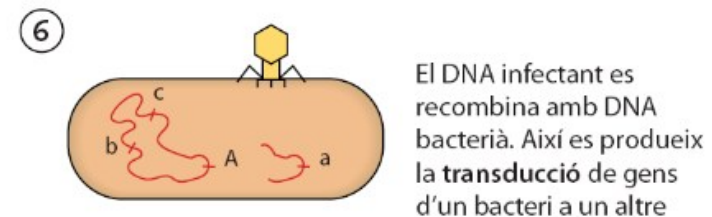
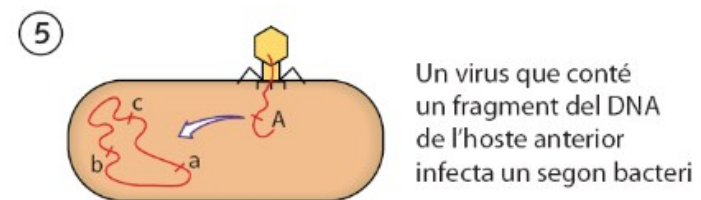
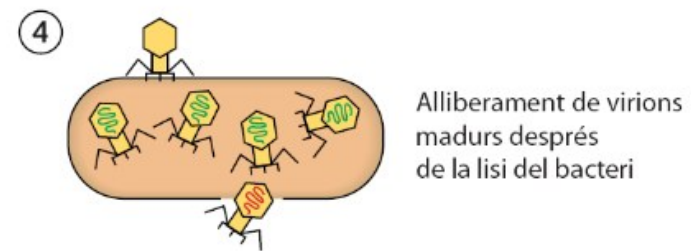
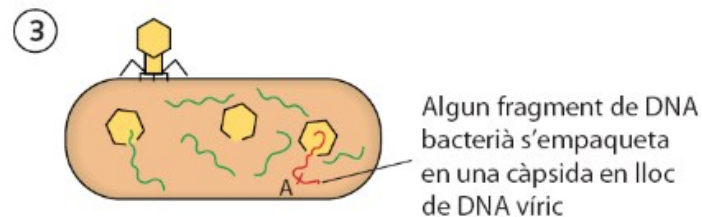
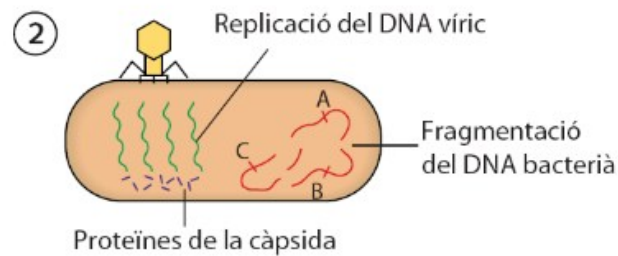
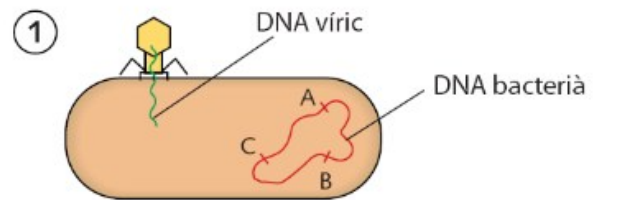
Els **llevats** també presenten **plasmidis** que es poden fer servir com a **vectors de clonació** en cèl·lules eucariotes.

A més, com a cèl·lules eucariotes que són, presenten aparell de Golgi i per tant processos de glicosilació, cosa que és important tenir en compte quan es volen obtenir glicoproteïnes.



# Els VIRUS

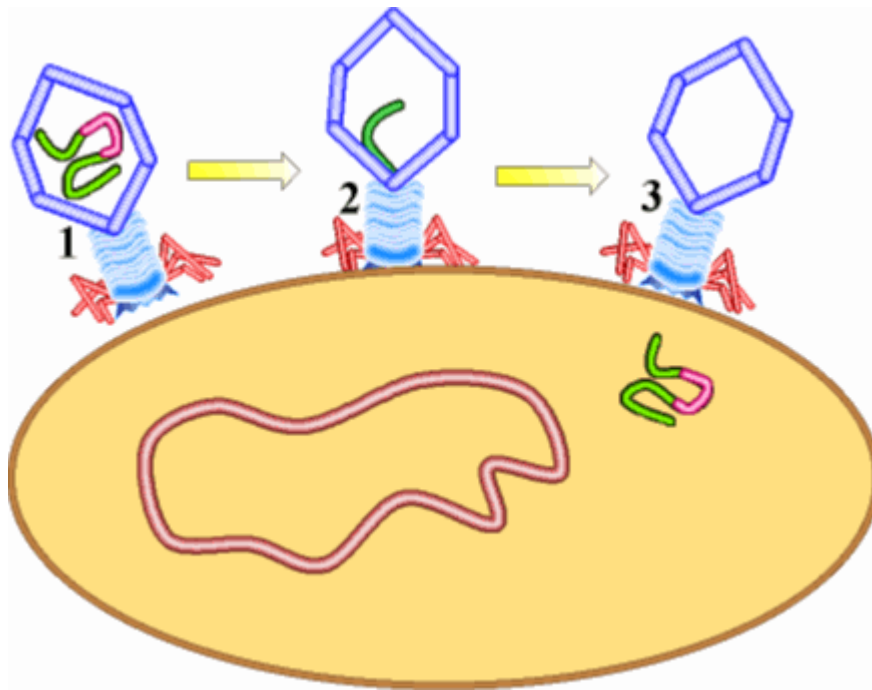
Els virus presenten mecanismes que els permeten reproduir-se dintre de les cèl·lules a les que infecten. Injecten el seu material genètic (DNA o RNA) a l'interior de la cèl·lula i utilitzen els enzims de l'hoste per fer-ne múltiples còpies. Els nous virus creats produeixen la lisi de la cèl·lula, quedant lliures per poder infectar noves cèl·lules i continuar multiplicant-se.

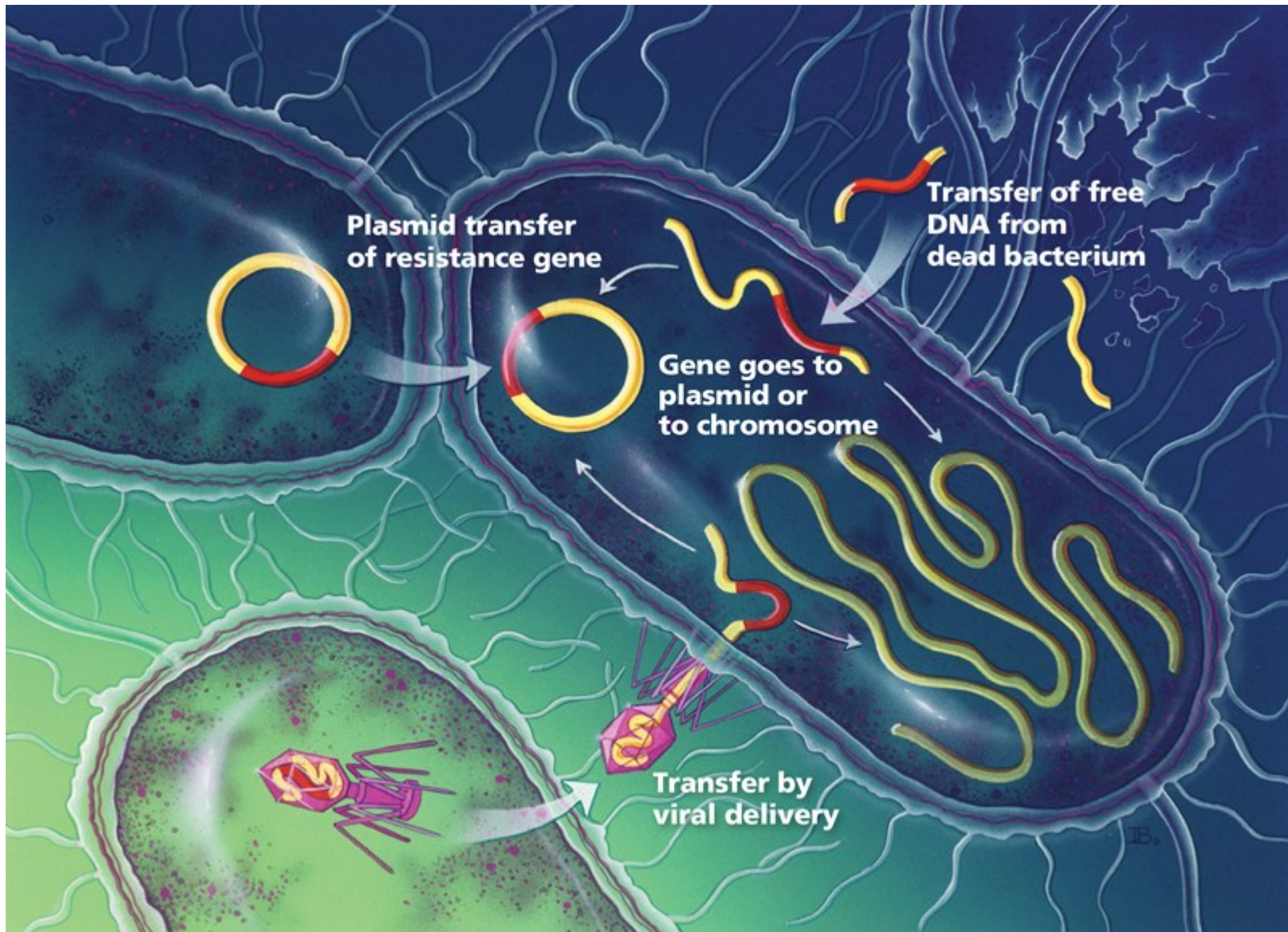


La **transducció** és un mecanisme natural de transferència de gens entre bacteris que té un virus com a vehicle.

**Els virus** s'utilitzen com a **vectors de clonació**.

S'inserta el gen d'interès en el DNA del virus i es deixa que aquest infecte una cèl·lula hoste. El virus replica el seu material genètic, inclòs el gen introduït, obtenint així múltiples còpies del gen.





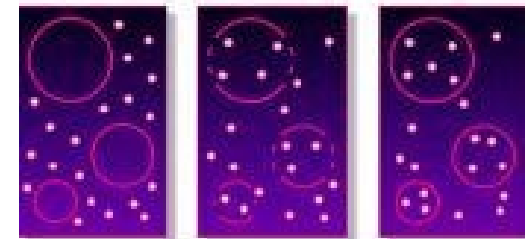
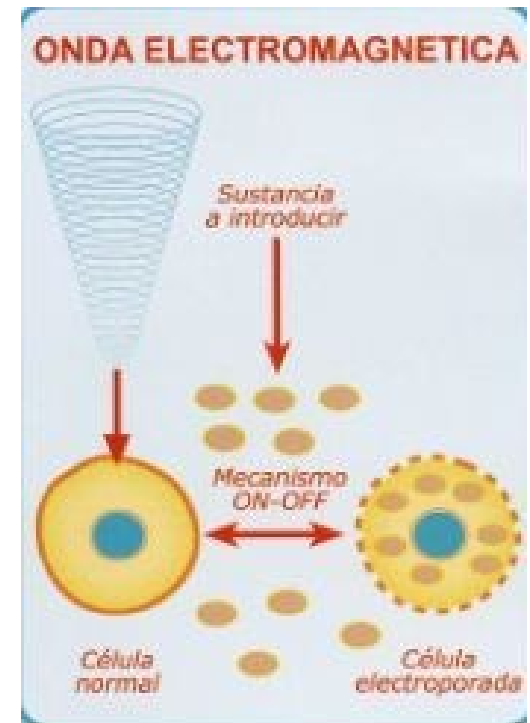
Plasmidis i bacteriòfags com a vectors de clonació



# Mecanismes no biològics:

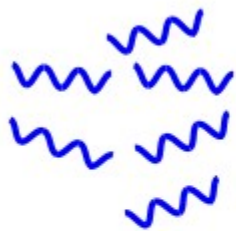
## Electroporació:

Es sotmet la cèl·lula a un alt voltatge originant orificis temporals sobre la membrana plasmàtica per on s'introduirà el DNA passatger.

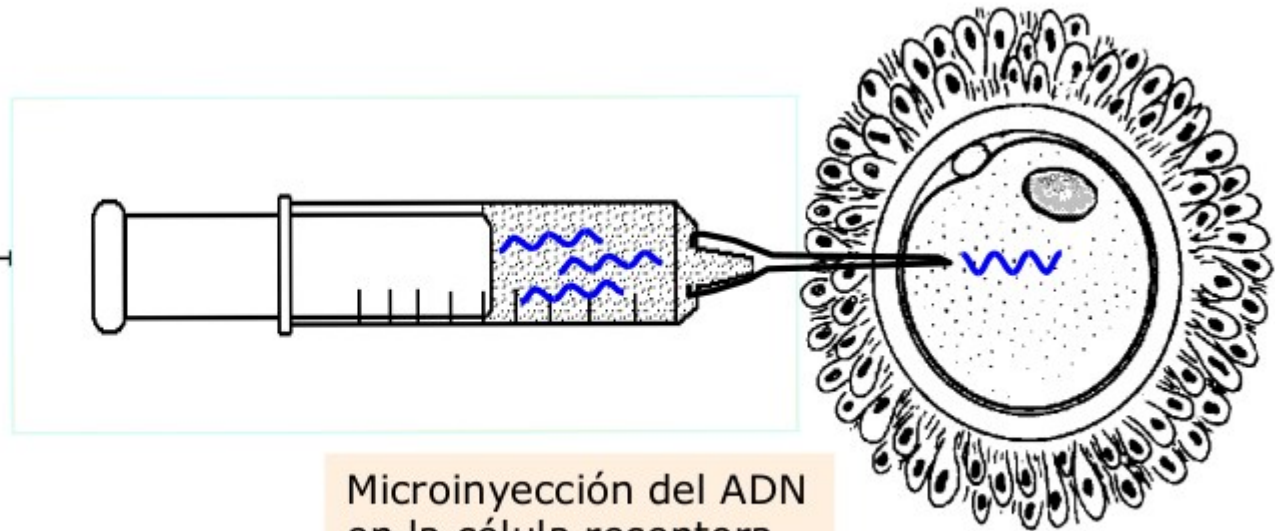


## Microinjecció:

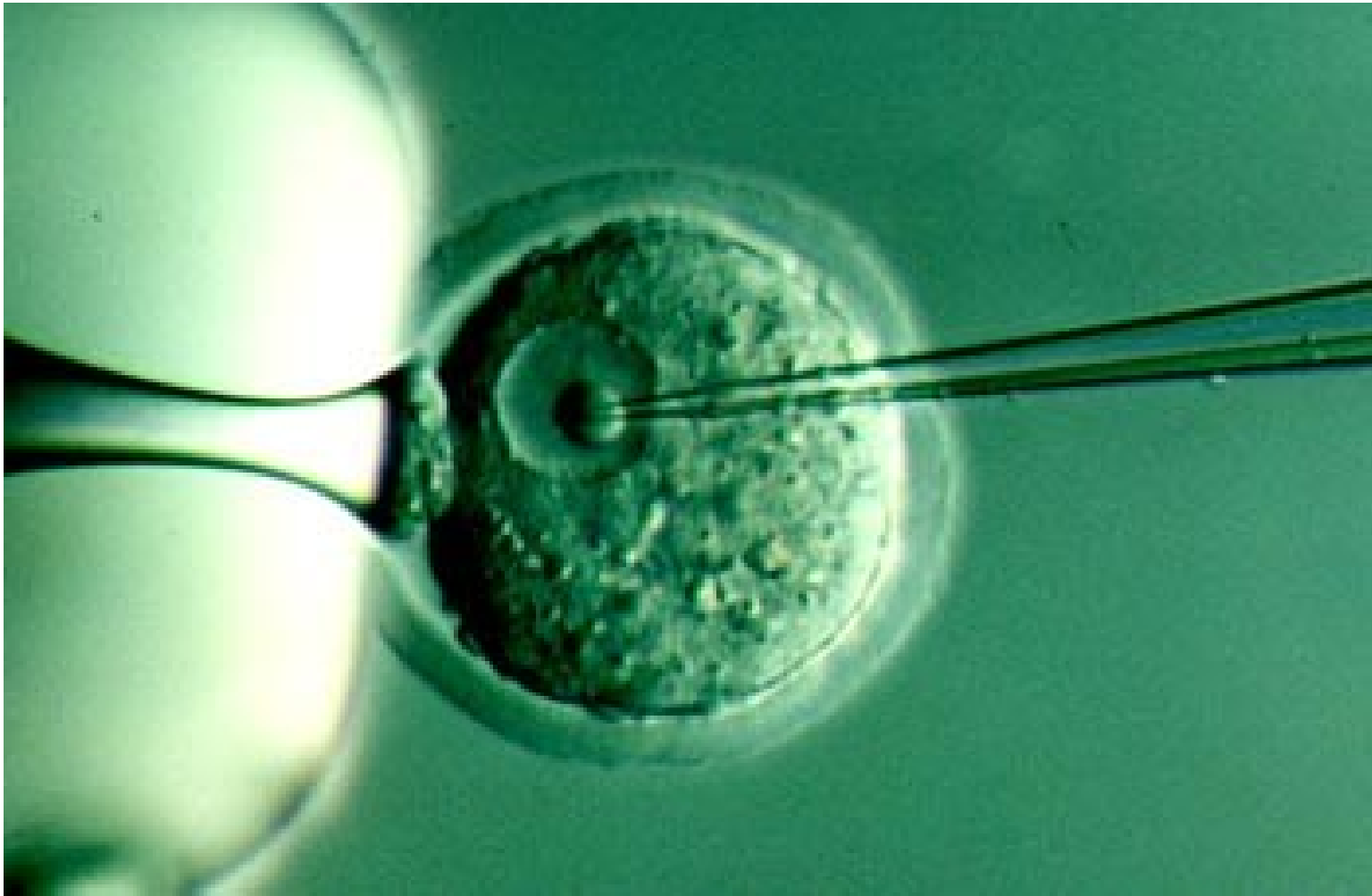
Injecció del DNA a la cèl·lula mitjançant un capil·lar ( $1,5\mu\text{m}$ ).



ADN a transferir.

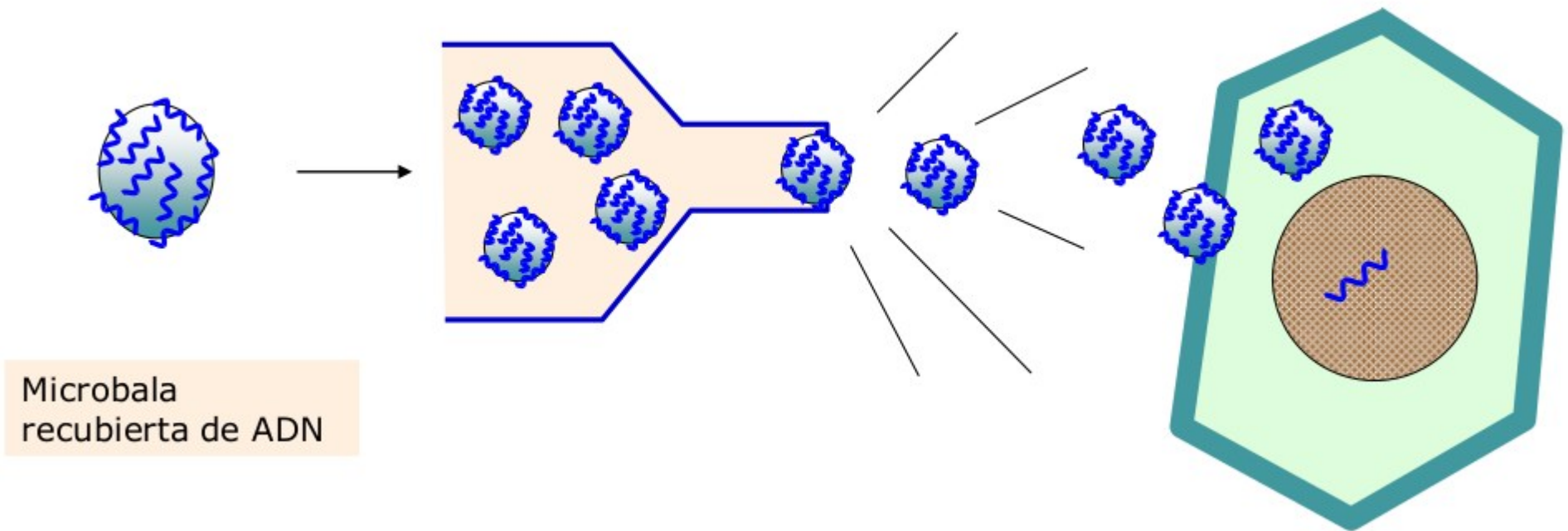


Microinyeccción del ADN en la célula receptora.



## Tret de microbales:

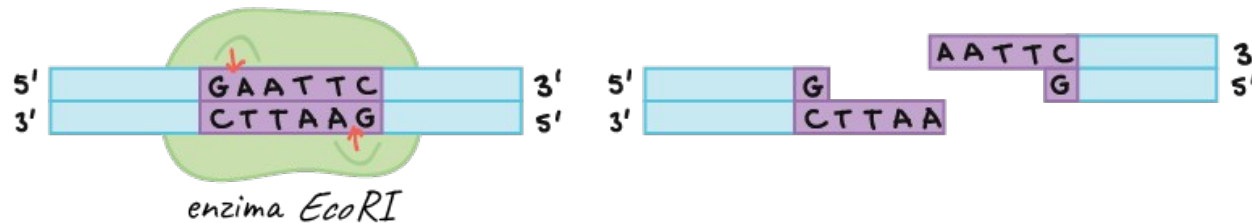
Microbales de metall recobertes de DNA.



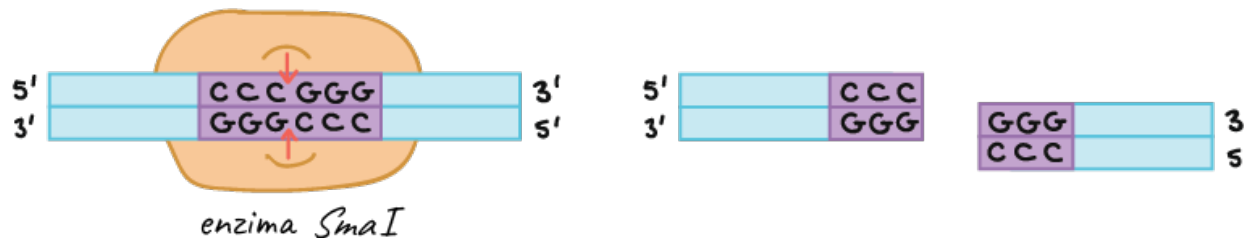


# Inserció de gens en un vector

- Es produeix mitjançant la utilització d'**endonucleases de restricció**.
- Aquests enzims tallen el DNA per unes seqüència específiques anomenades **dianes de restricció**.
- Les dianes de restricció són seqüències palindròmiques de pocs nucleòtids, normalment entre quatre i vuit, i poden ser de dos tipus:
  - Dianes que originen un tall situat en una posició diferent de cada cadena; en aquest cas s'obtenen uns extrems monocatenaris, anomenats **extrems cohesius**.







- Dianes que originen un tall situat en el mateix punt de les dues cadenes de la doble hèlix; en aquest cas s'obtenen uns extrems de doble cadena anomenats **extrems roms**.



## ACTUACIÓN DE LAS ENZIMAS RESTRICTASAS



-  NUCLEÓTIDO DE ADENINA
-  NUCLEÓTIDO DE GUANINA
-  NUCLEÓTIDO DE CITOSINA
-  NUCLEÓTIDO DE TIMINA

Si no veus la imatge en moviment, ves a l'enllaç..

[http://cosmolinux.no-ip.org/recursos\\_aula/BIO1erBAT/Enginyeria\\_genetica/actuacio\\_enzims\\_resrtriccio.gif](http://cosmolinux.no-ip.org/recursos_aula/BIO1erBAT/Enginyeria_genetica/actuacio_enzims_resrtriccio.gif)

Es coneixen més de 100 enzims de restricció, els quals es comercialitzen per a utilitzar-los en enginyeria genètica.

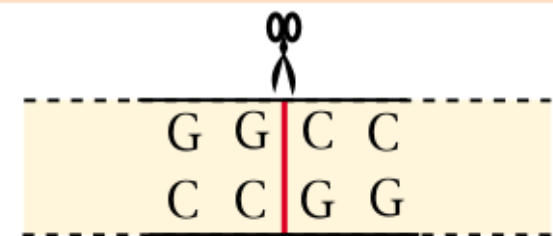
Els enzims de restricció es troben de forma natural en nombrosos grups de microorganismes, en els quals acompleixen una funció defensiva: destrueixen molècules de DNA estranyes que s'incorporen a la cèl·lula per mecanismes diversos.

Les seqüències del genoma bacterià que podrien ser reconegudes com a dianes per un enzim de restricció del mateix bacteri estan modificades perquè l'enzim no les reconegui i, per tant, el DNA del bacteri no és atacat.

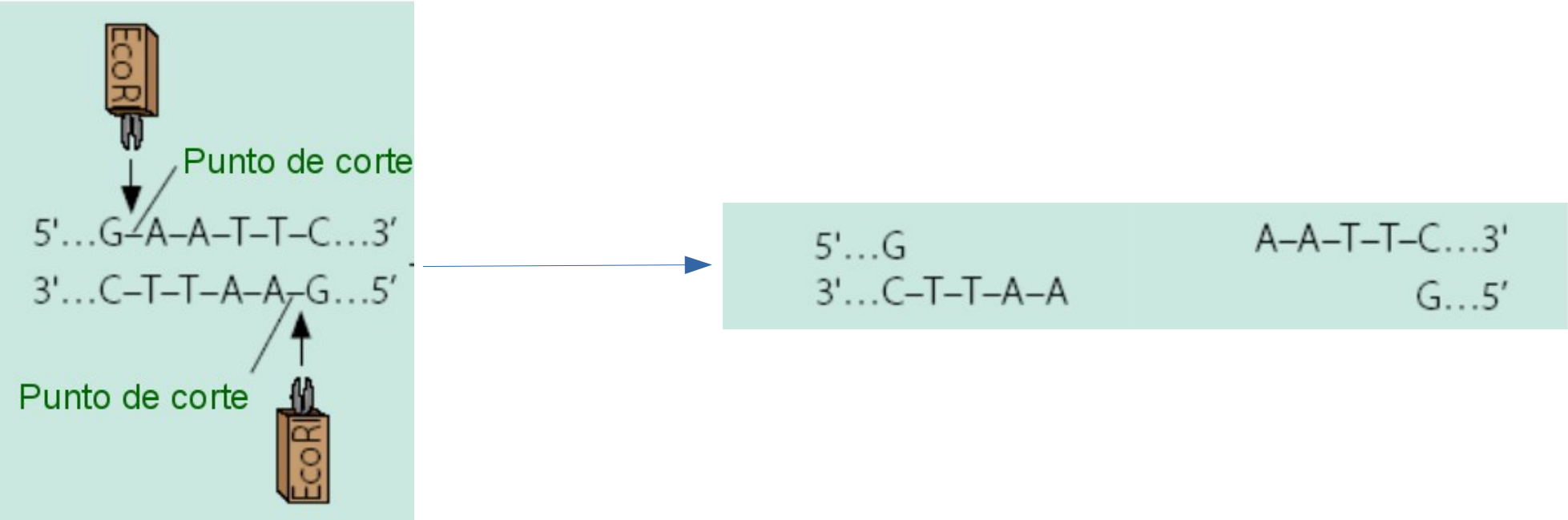
**Eco RI** és una endonucleasa de restricció d'*Escherichia coli*. La seva diana de restricció i el tall que origina es representen a continuació.



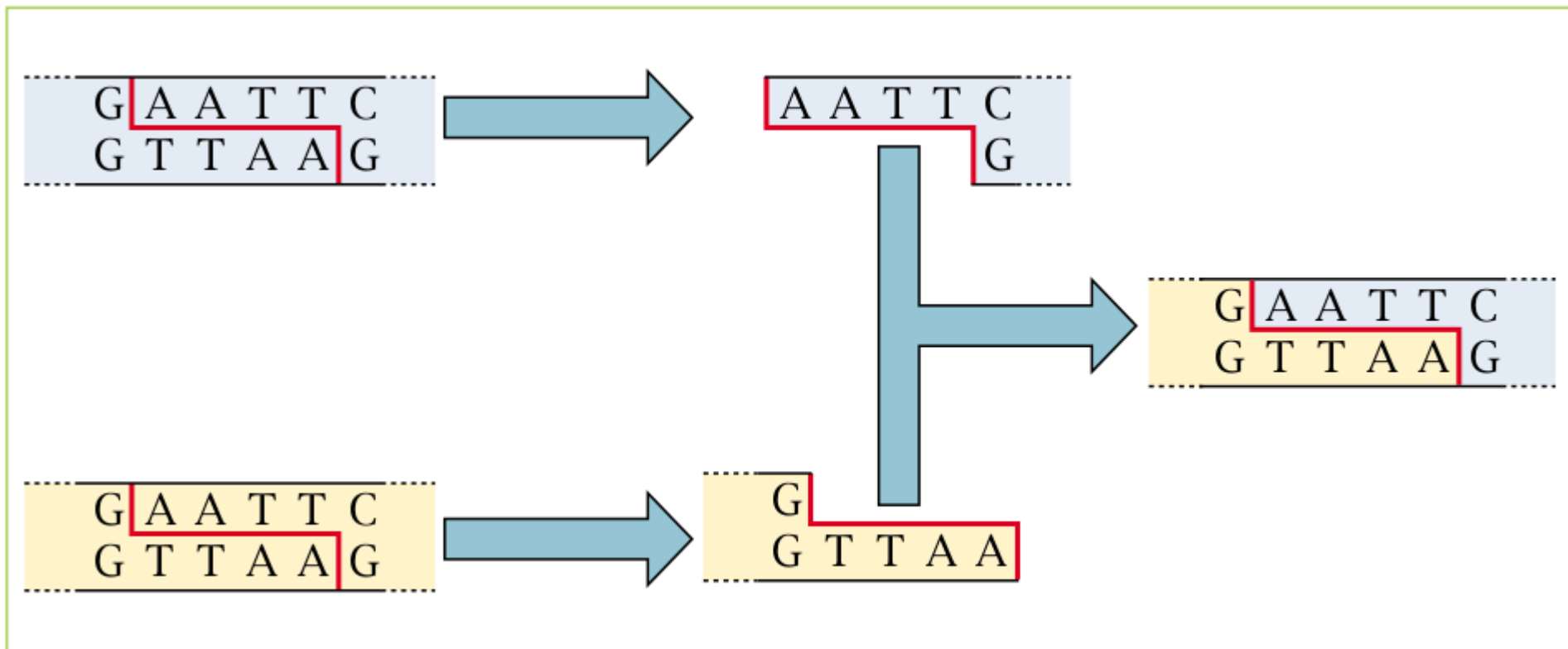
**Hae III** és una endonucleasa de restricció d'*Haemophilus aegyptius*, que origina talls en la diana de restricció següent.

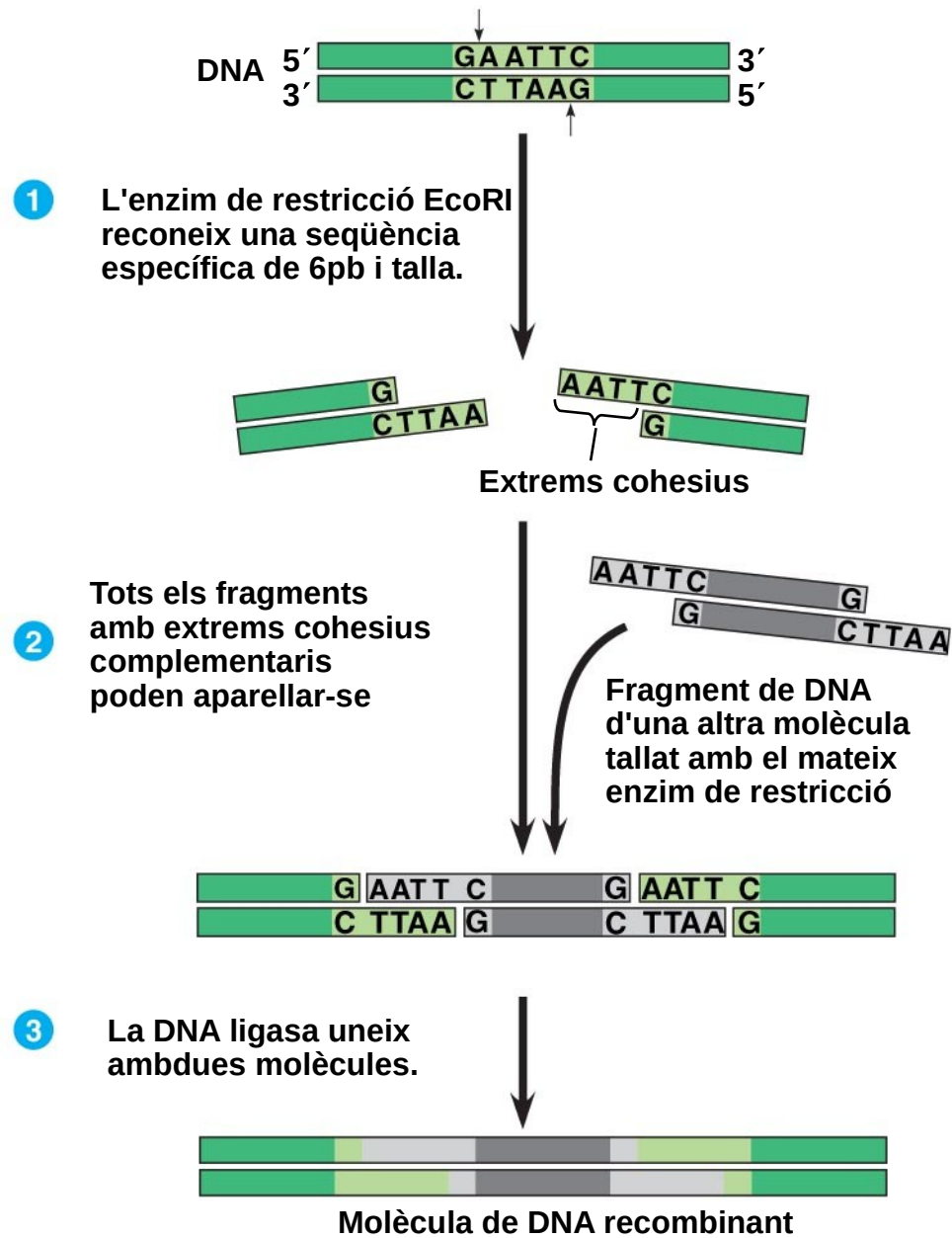


### Acción de la enzima de restricción EcoRI

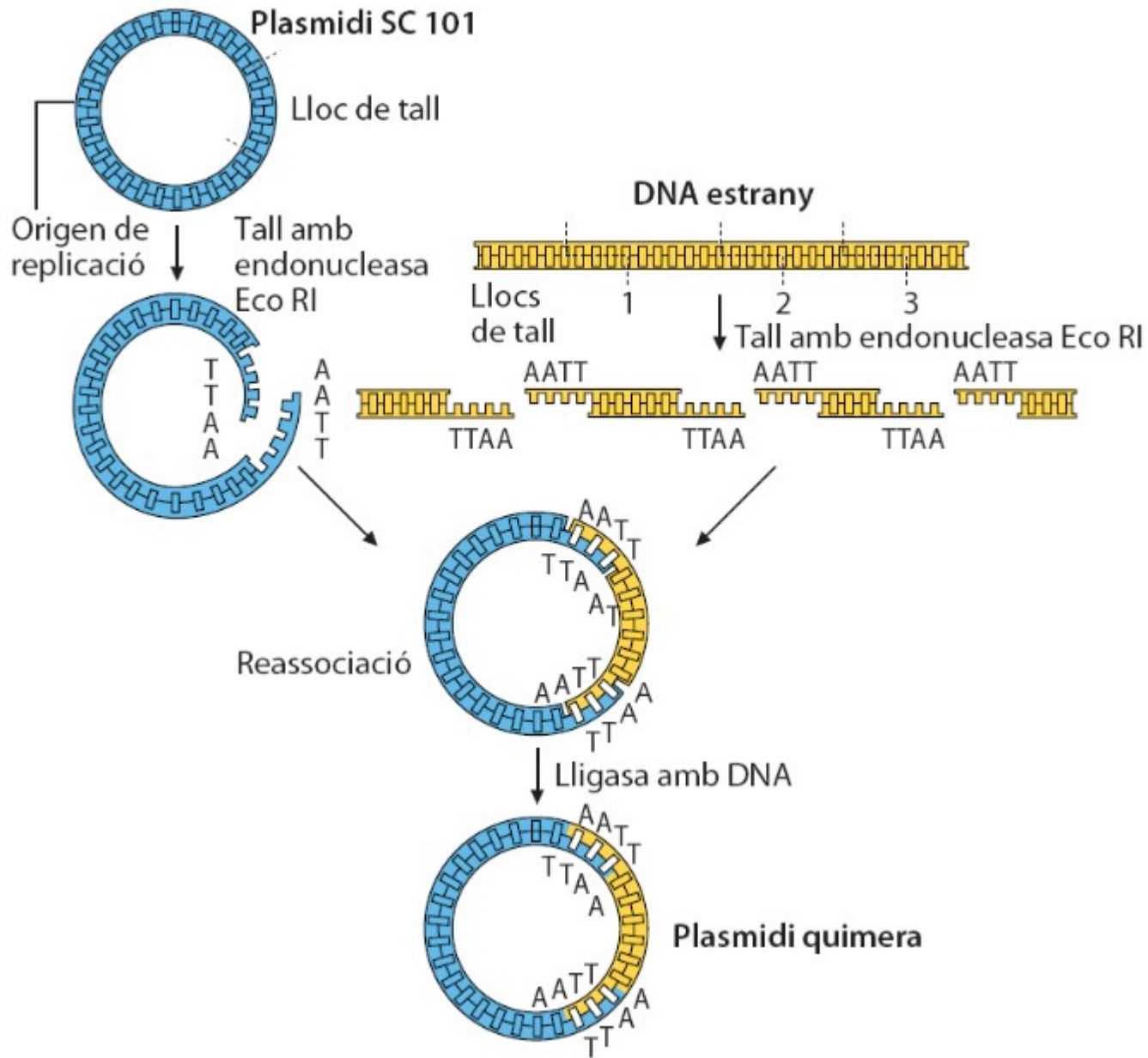


Per inserir un gen en un vector cal tallar el DNA del vector i el DNA passatger amb el mateix enzim de restricció.

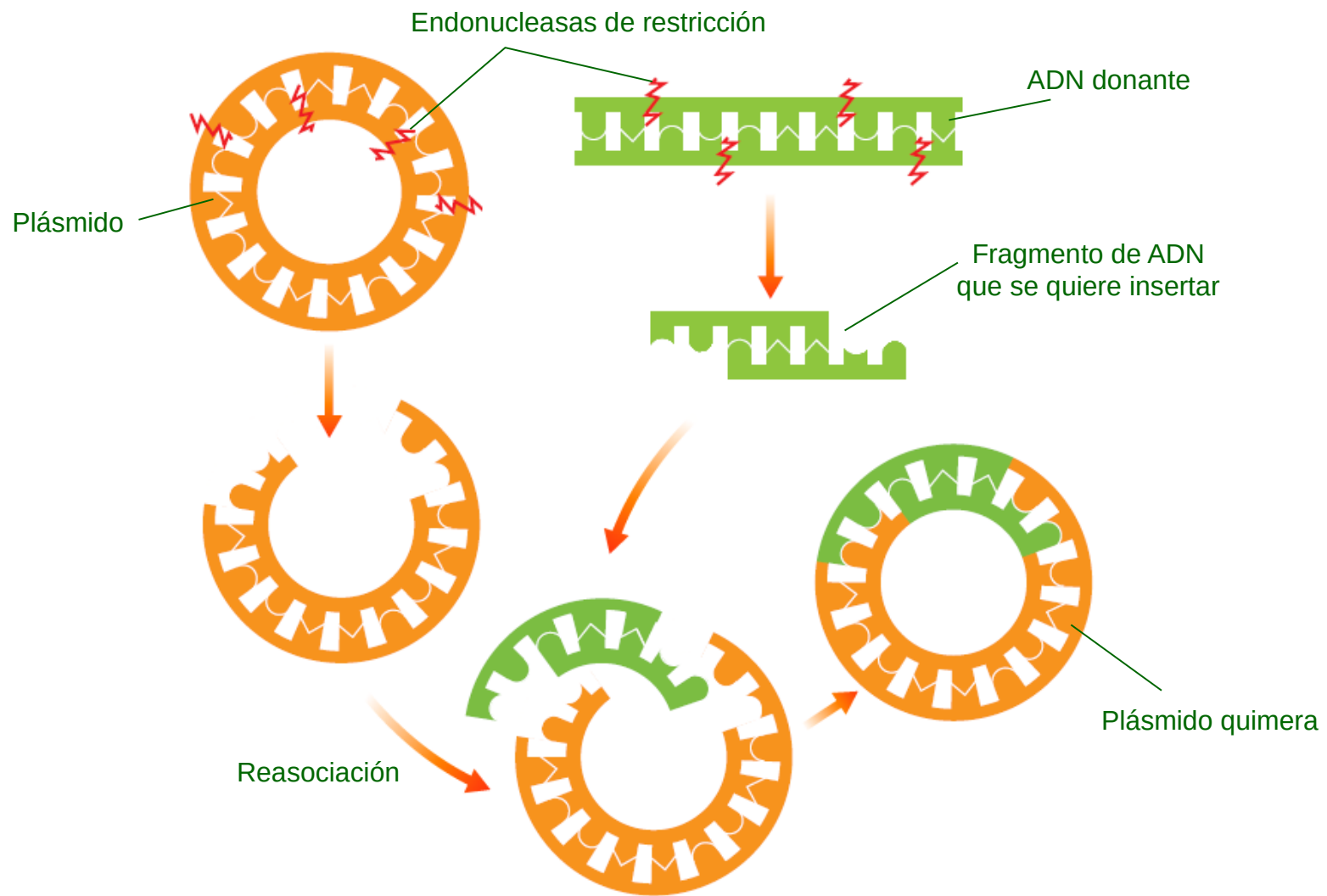




## Obtenció d'una molècula de DNA recombinant

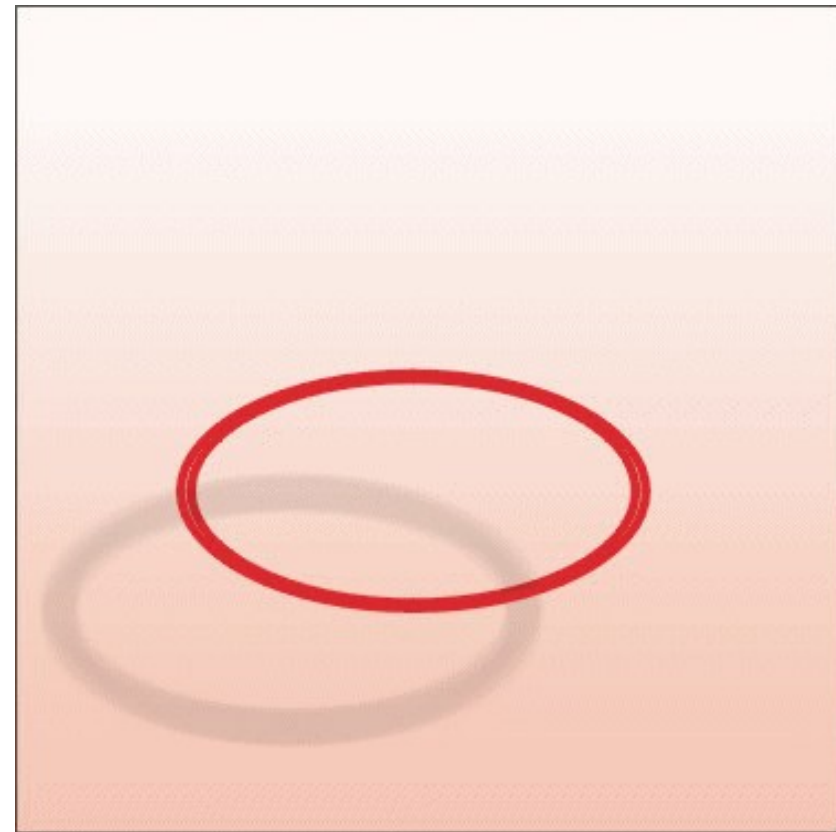


Formació d'un DNA recombinant a partir d'un plasmidi i d'un DNA lineal estrany tallats pel mateix enzim de restricció.





L'enzim DNA-ligasa uneix els fragments del DNA passatger amb el DNA vector.

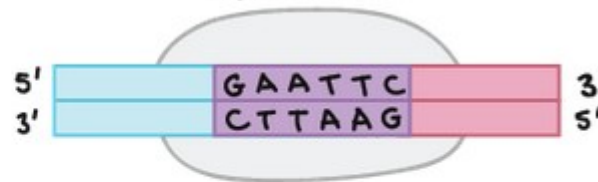


Si no veus la imatge en moviment, [clica aquí](#)

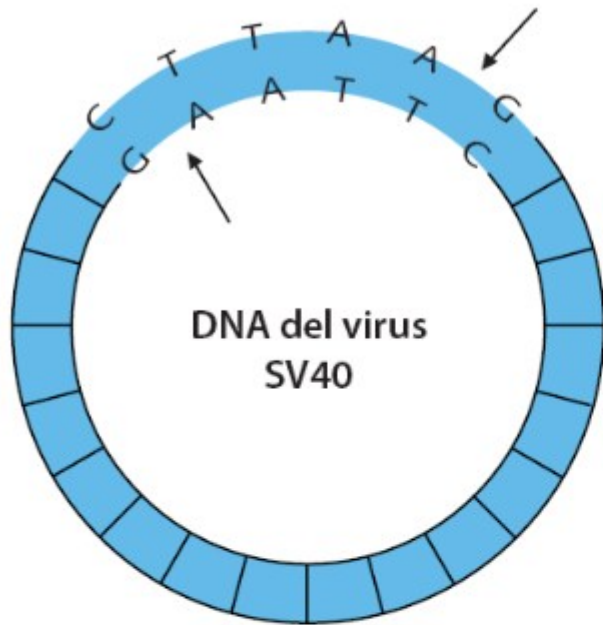


*"Extremos cohesivos" se juntan,  
pero quedan huecos*

*Ligasa ADN*



*Ligasa sella los huecos*



Enzim  
de restricció  
Eco RI



DNA lineal

Ruptura del DNA del virus SV40 per l'enzim de restricció Eco RI, que origina un DNA lineal amb segments cohesius.

# Clonació en cèl·lules

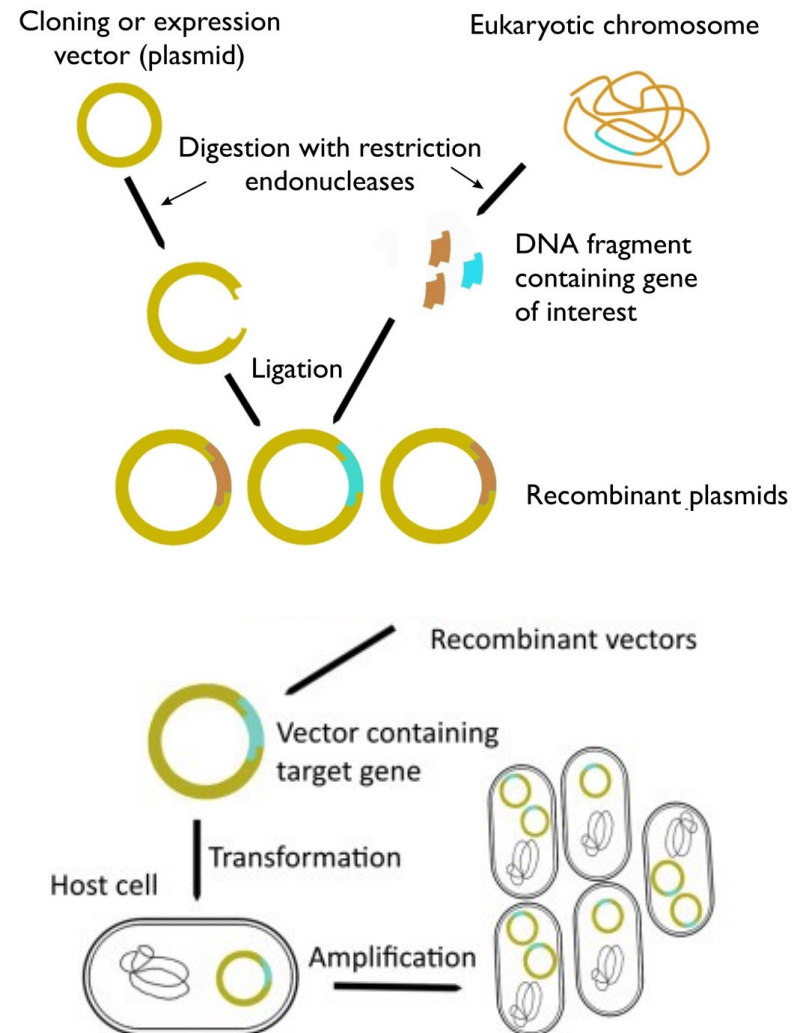
# La clonació d'un gen en cèl·lules

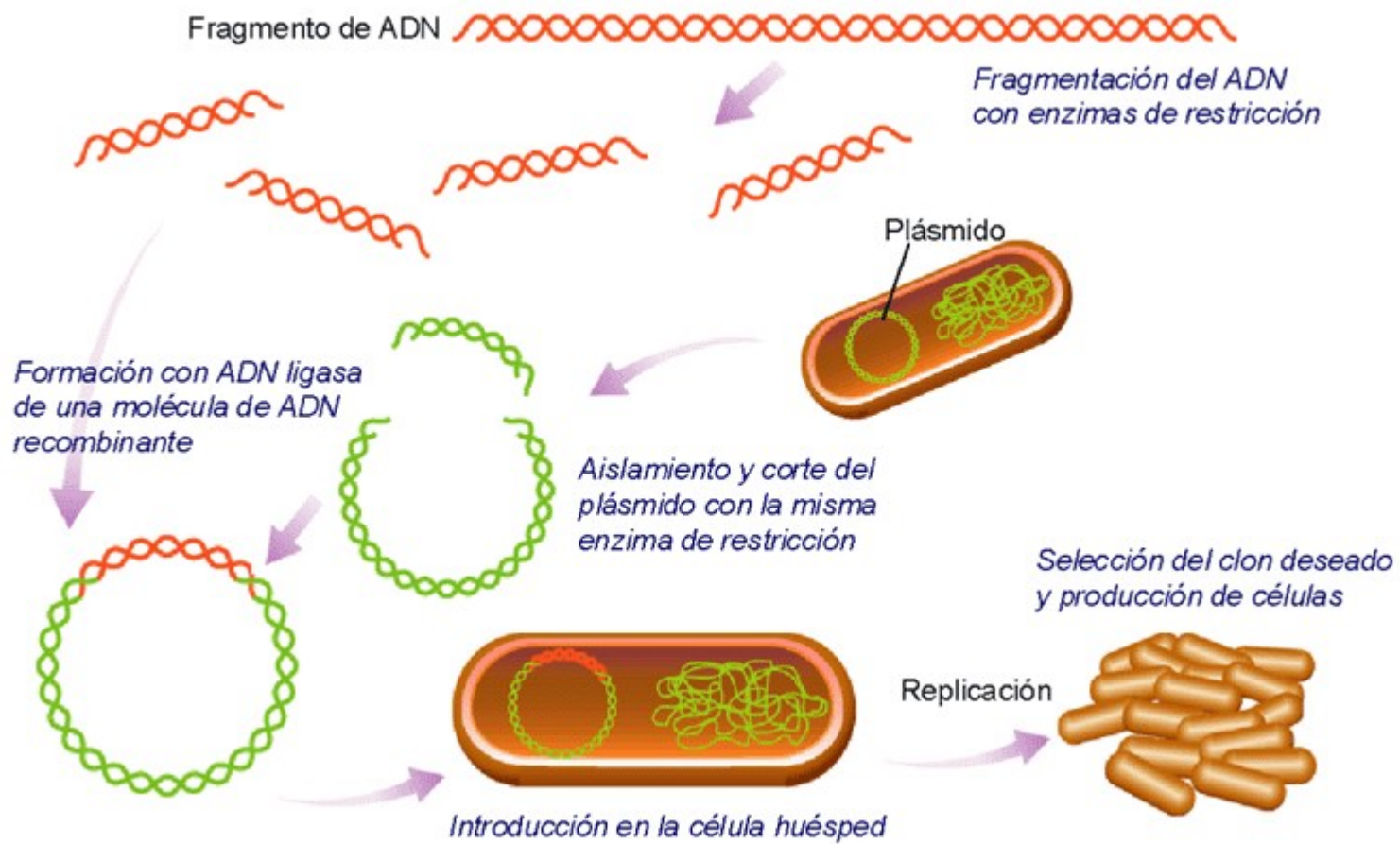
La clonació d'un gen en cèl·lules consisteix a inserir el gen d'interès en un vector de clonació, introduir-lo en una cèl·lula hoste, en la que serà copiat i mantingut.

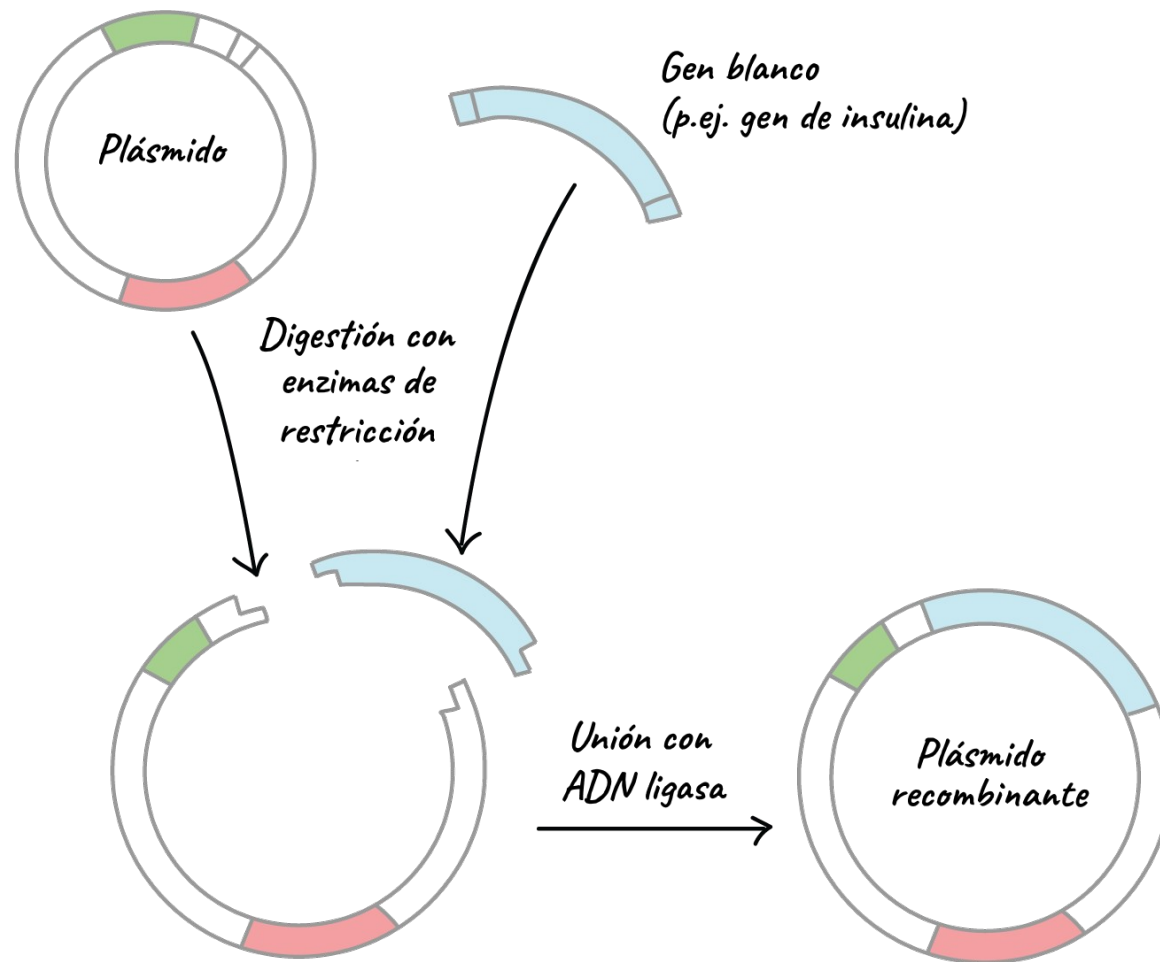
La clonació en cèl·lules és una bona manera d'obtenir còpies del gen, ara bé, si la quantitat inicial és molt petita o impura, la clonació no es pot fer.

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

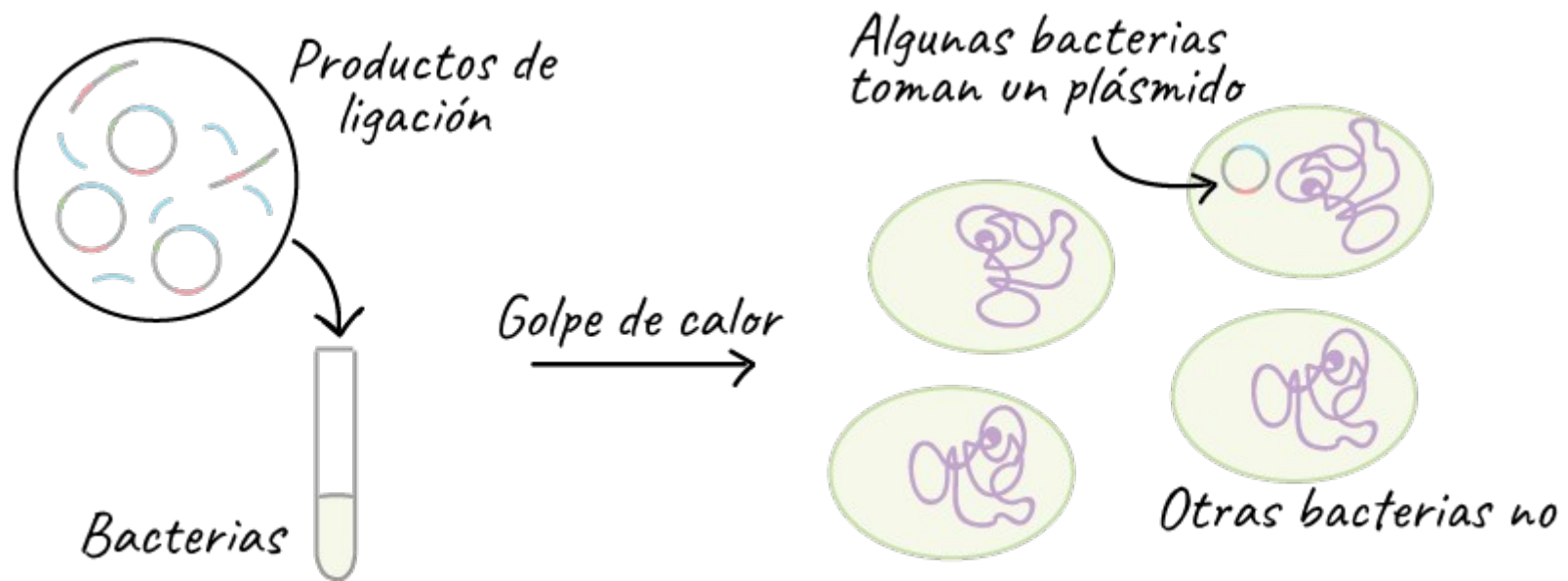
- S'aïlla el DNA de la cèl·lula que conté el gen d'interès (DNA passatger)
- S'aïlla un plasmidi bacterià (aquest plasmidi ha de contenir un gen marcador que li doni resistència a un antibiòtic)
- Es tallen ambdós mostres de DNA amb el mateix enzim de restricció.
- Es combinen els plasmidis tallats amb 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.





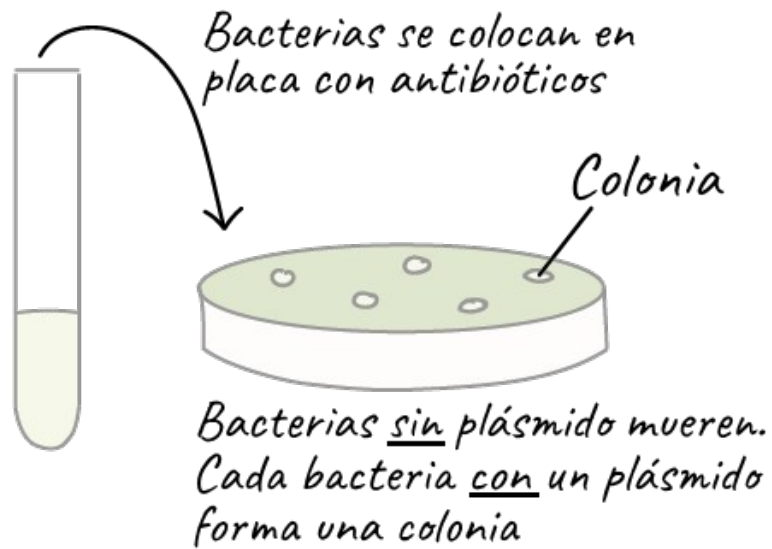


El plasmidi i el gen d'interés es tallen amb el mateix enzim de restricció. Es combinen tots dos i s'obté un plasmidi recombinant. La DNA ligasa segella la unió.

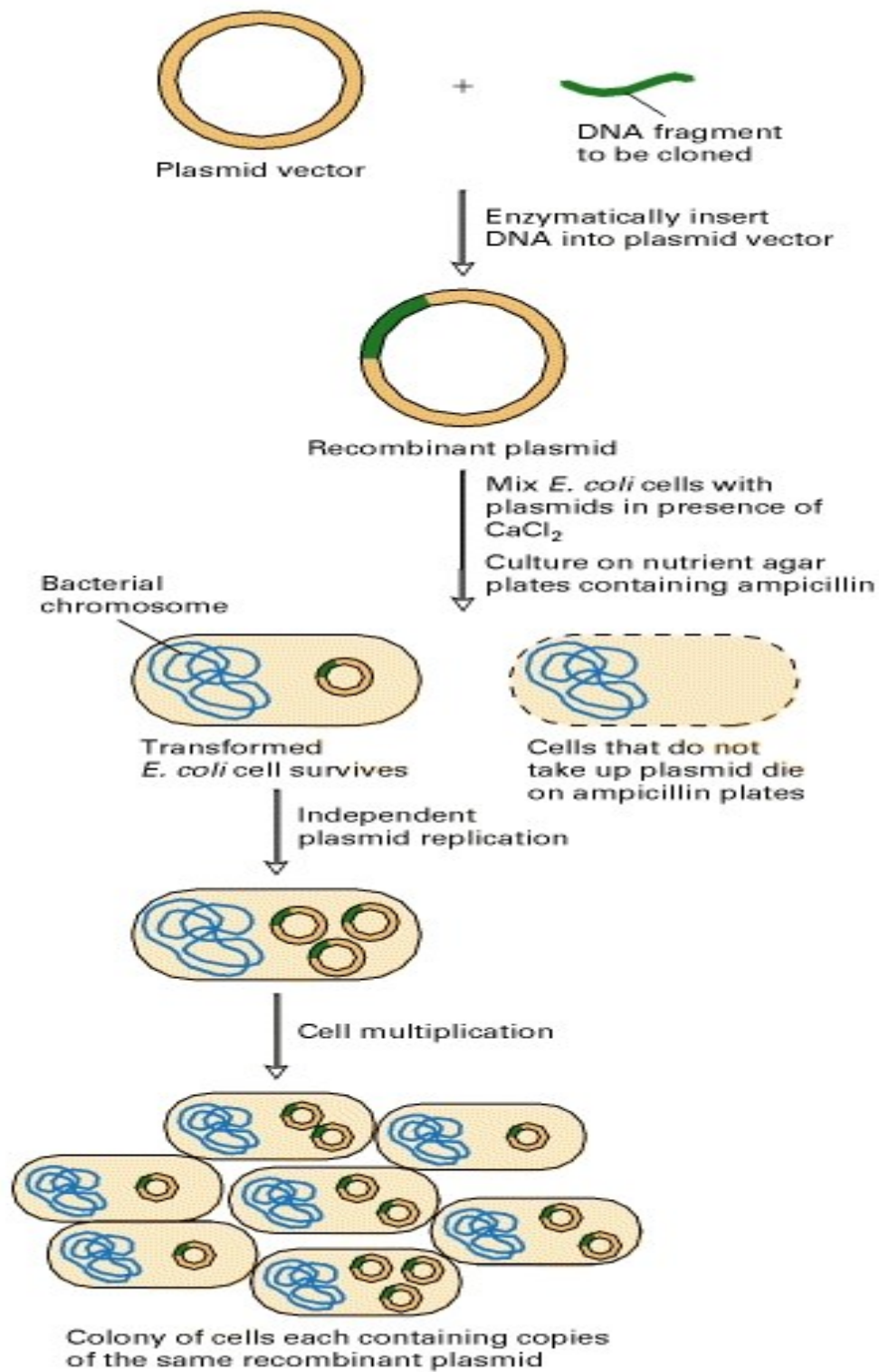


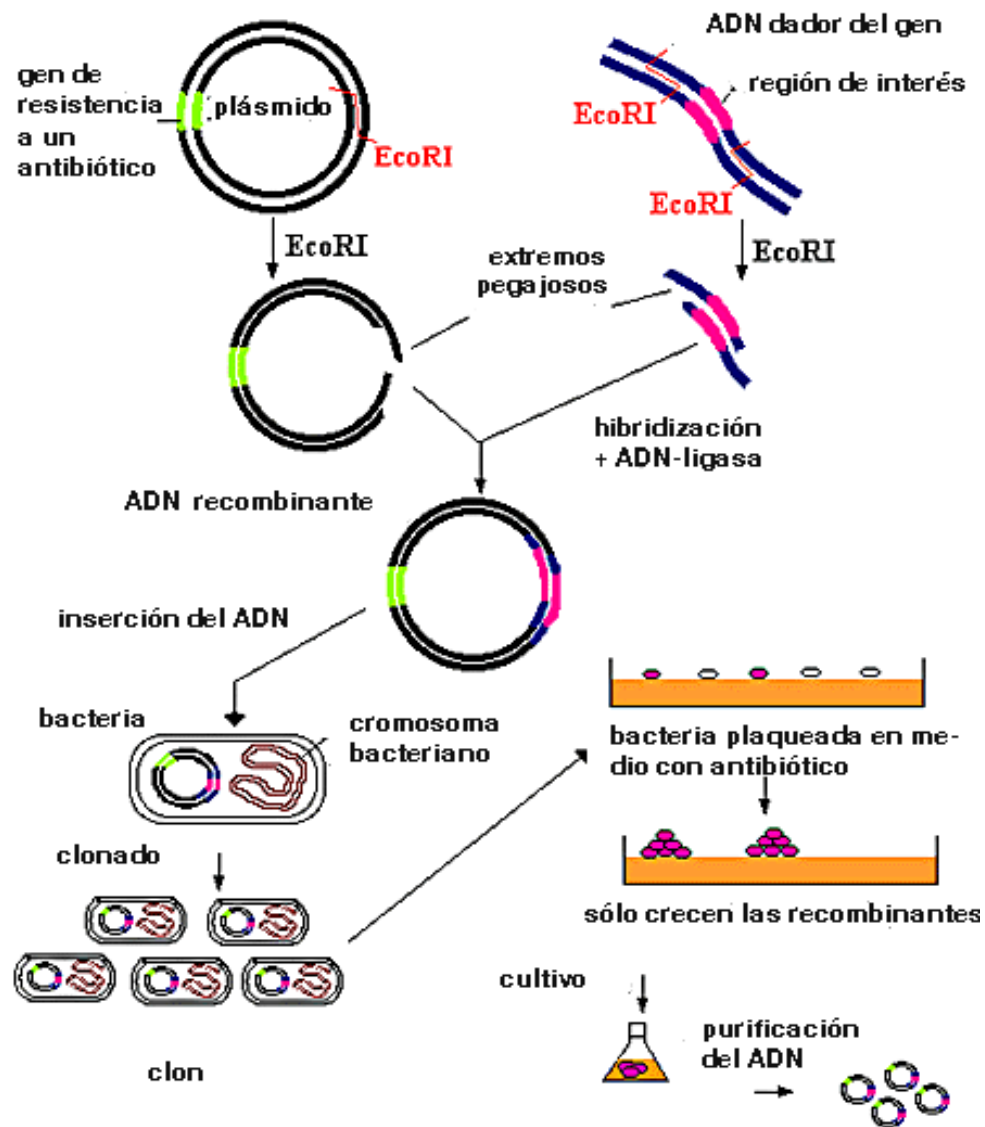
Introducció dels plasmidis recombinants en cèl·lules bacterianes per mitjà de la transformació.





Cultiu de bacteris en un medi amb antibiòtic. Només els bacteris que han incorporat el plasmidi creixen i es reproduueixen.







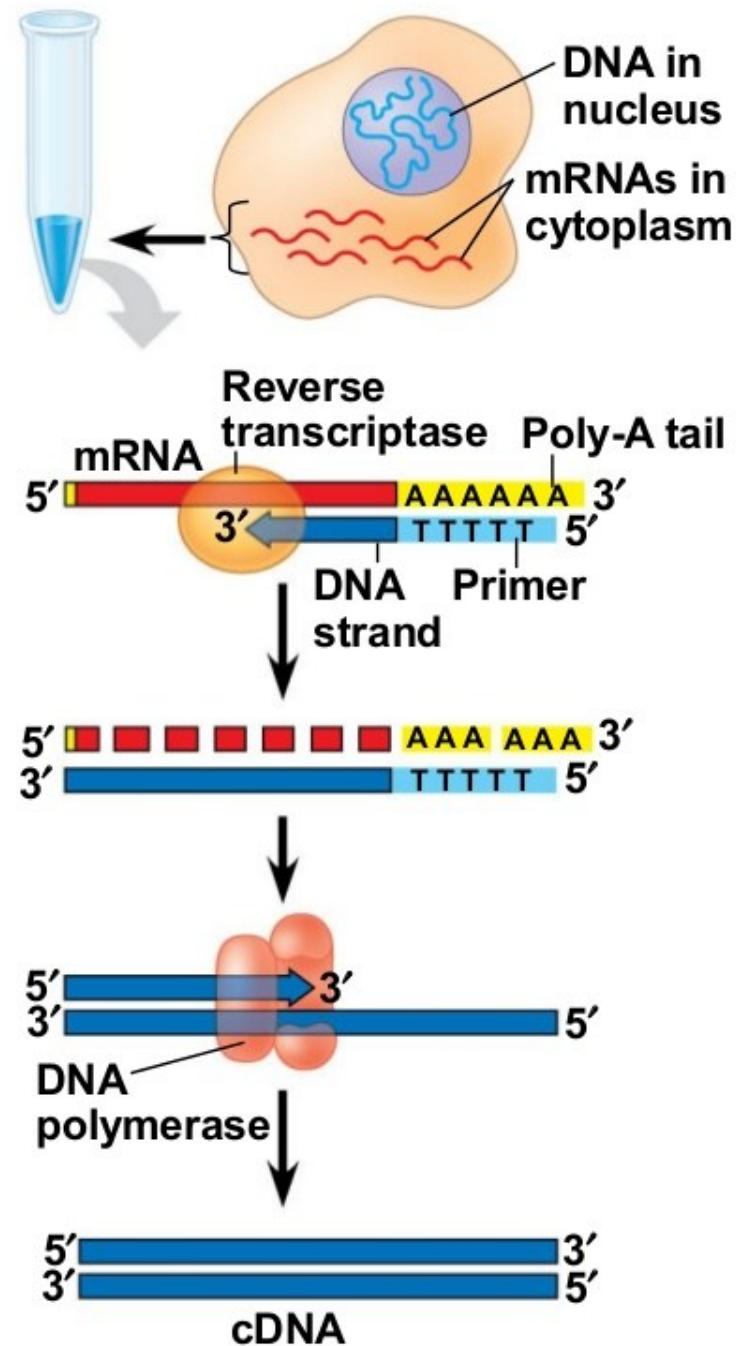
# Cloning in a Plasmid Vector

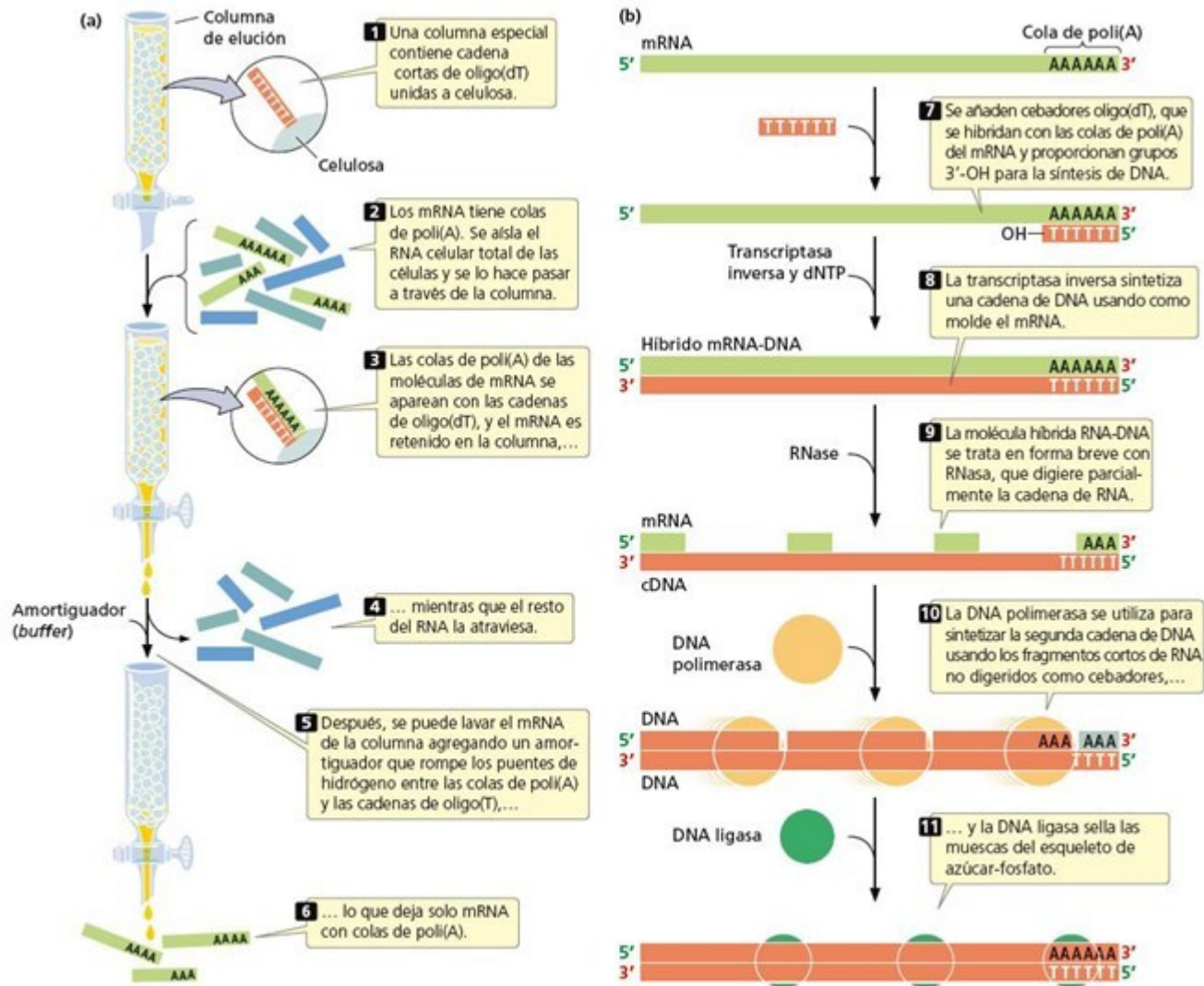
Si vols veure l'animació ves a l'enllaç...

[http://cosmolinux.no-ip.org/recursos\\_aula/BIO1erBAT/Enginyeria\\_genetica/ch7anim1.mov](http://cosmolinux.no-ip.org/recursos_aula/BIO1erBAT/Enginyeria_genetica/ch7anim1.mov)

Si el que es preten és **intercalar un gen eucariòtic en un bacteri**, per tal d'obtenir la proteïna que codifica el gen, no es pot introduir el segment de DNA amb introns i exons tal qual, ja que en els procariotes no hi ha procés de maduració de mRNA.

**Prèviament s'ha d'aïllar el mRNA madur del gen d'interès i fer una transcripció inversa** (mitjançant l'enzim anomenat *transcriptasa inversa* o *retrotranscriptasa*) per tal d'obtenir un DNA sense introns que, un cop duplicat (DNAc) ja podrà ser combinat amb el plasmidi i introduït posteriorment al bacteri.





Genética. Un enfoque conceptual. 5ª ed. B.A. Pierce

© W.H. Freeman and Co.

© Traducción Editorial Médica Panamericana.

### Síntesi d'un cDNA mitjançant la transcriptasa inversa:

S'afegeix al medi un encebador d'oligodT que s'aparellarà amb la cua poli A de l'extrem 3'OH del mRNA, proporcionant un extrem 3'OH per a que la transcriptasa inversa comenci la síntesi de DNA a partir del motlle de RNA i de desoxinucleòtids. Resulta així una molècula híbrida RNA-DNA que s'ha de convertir en una molècula de cDNA bicatenària. Un mètode molt comú per fer-ho és tractar l'híbrid amb una RNAasa que digereix parcialment el RNA. La digestió parcial deixarà petits fragments de RNA que serviran d'encebadors per a que una DNA polimerasa sintetitzi una segona cadena de DNA utilitzant la primera cadena com a motlle. Finalment, una altra DNA polimerasa reemplaçarà els fragments de RNA per DNA i una DNA ligasa tancarà les unions.

# Clonació per PCR

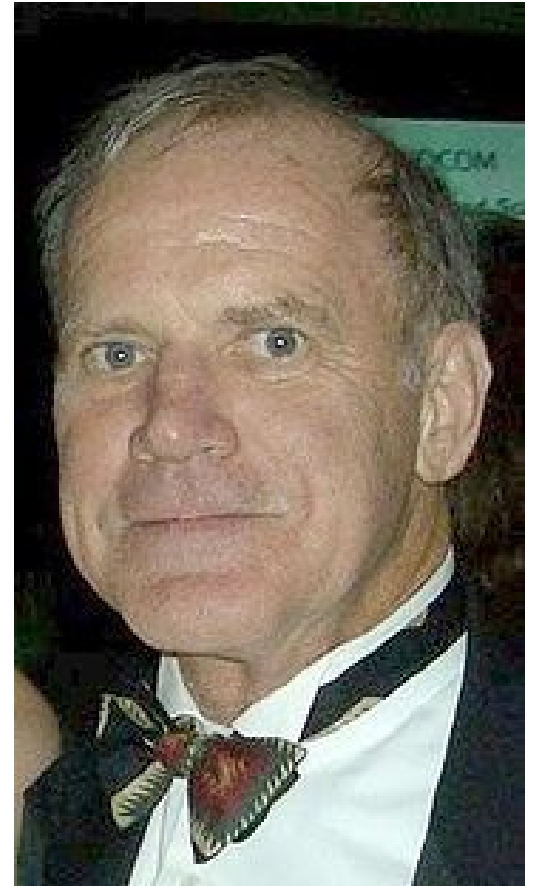
La clonació del DNA en cèl·lules és una tècnica molt laboriosa.

El 1983, Kary Mullis va desenvolupar una nova tècnica anomenada reacció en cadena de la polimerasa (PCR), que permet amplificar un fragment de DNA milers de milions de vegades, en unes quantes hores, en un tub d'assaig.



Clonació d'un gen mitjançant la tècnica de la PCR:  
Reacció en Cadena de la Polimerasa.

- PCR: tècnica de biologia molecular que té per objectiu obtenir un gran nombre de còpies d'un fragment de DNA (clonació de DNA) partint d'una quantitat mínima.
- És una forma de clonació purament enzimàtica sense necessitat de cèl·lules.
- Inventada per Mullis el 1985.

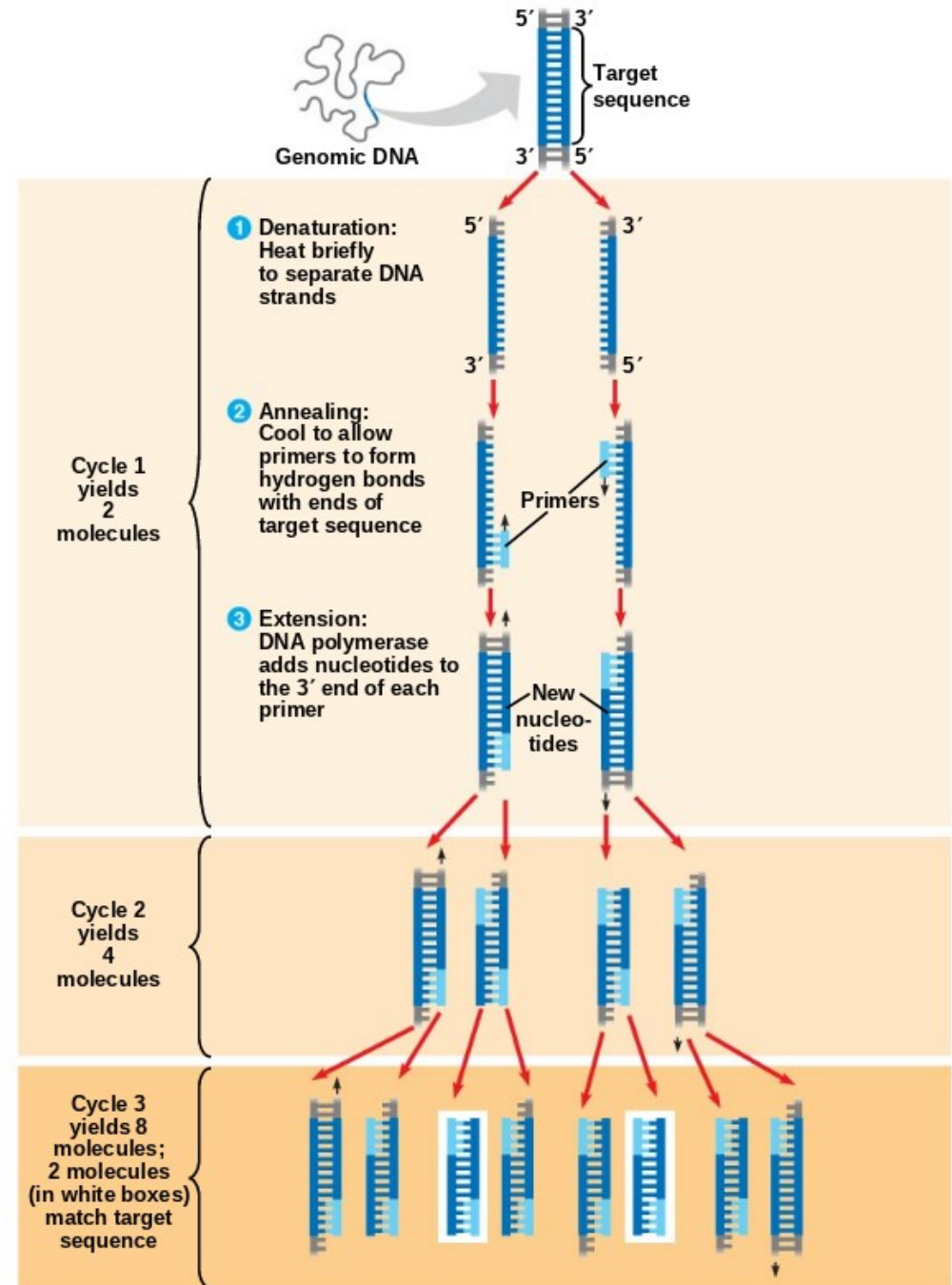


## Es necessita:

- DNA que es vol clonar
- DNA polimerasa resistent al calor
- Desoxiribonucleòtids trifosfat
- “Primers” de DNA

## Procés:

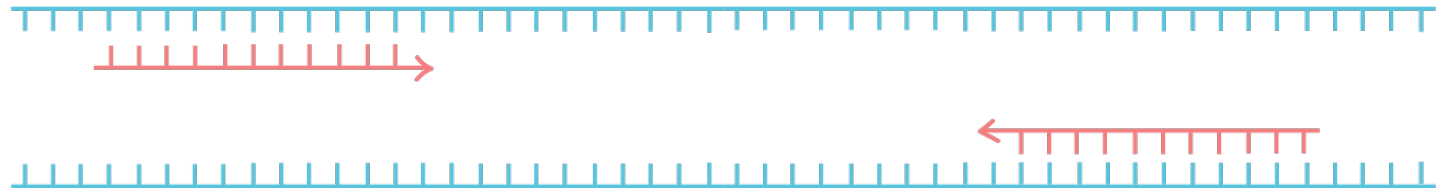
- Temperatura 95°C per separar les dues cadenes de DNA a clonar (desnaturalització).
- Disminució de la temperatura (50°C): els “primers” s’uneixen al DNA.
- Augment de la temperatura fins a 80°C: a partir dels “primers”, síntesi de les cadenes complementàries del DNA per la DNA pol.
- Repetició de tot procés amb tot el DNA i obtenció de 1 milió de còpies després de 20 cicles.



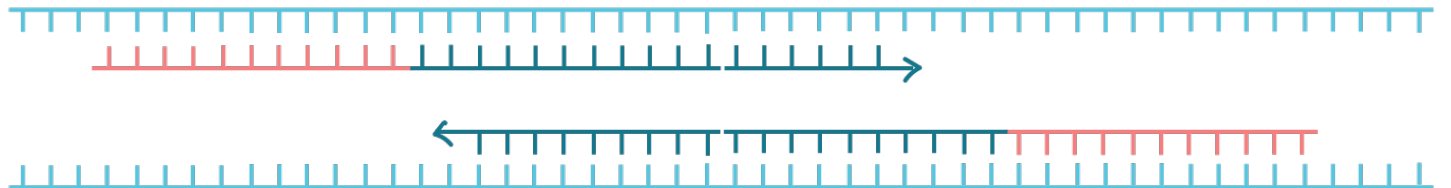
ADN molde

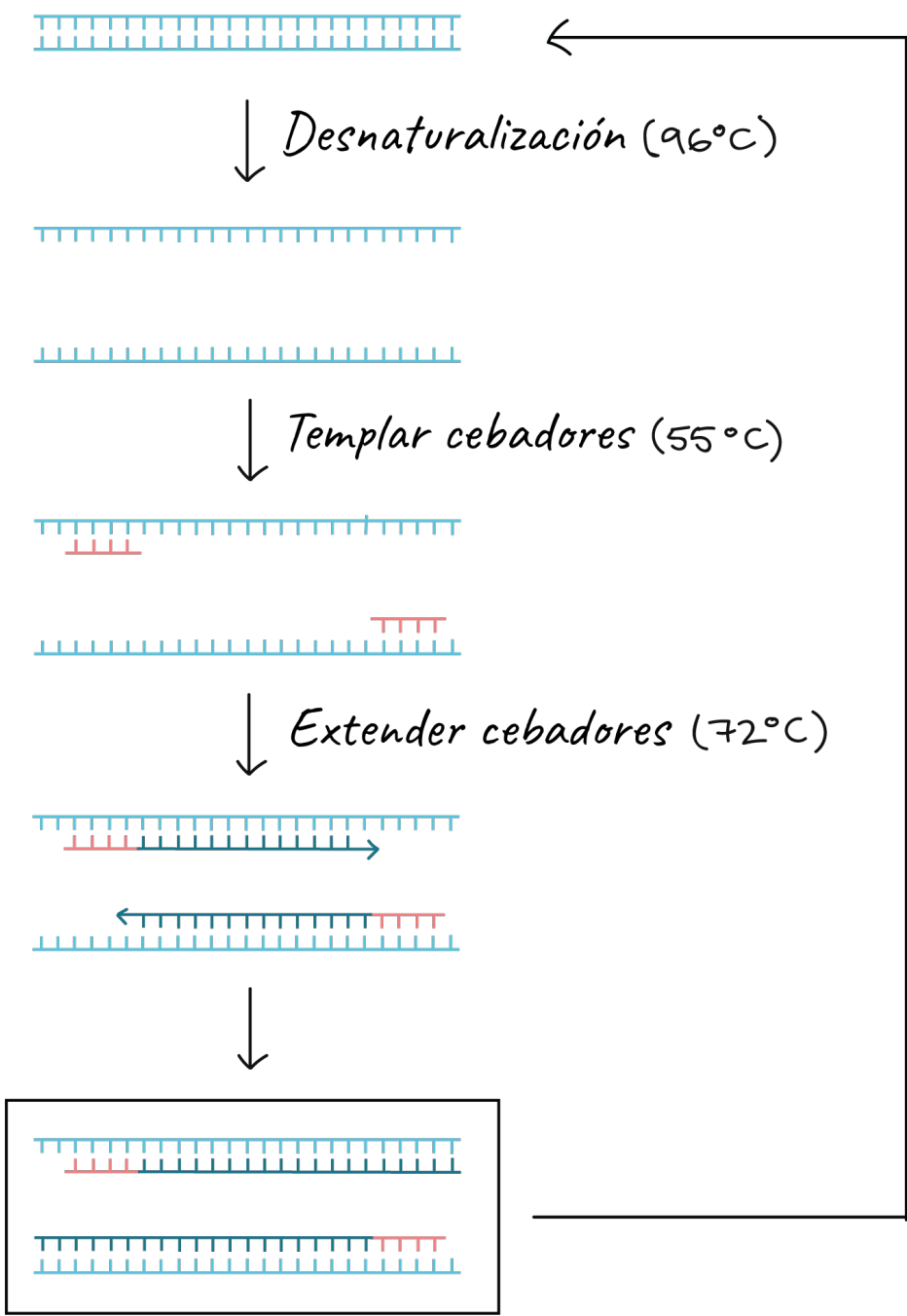


Cebadores se unen al molde



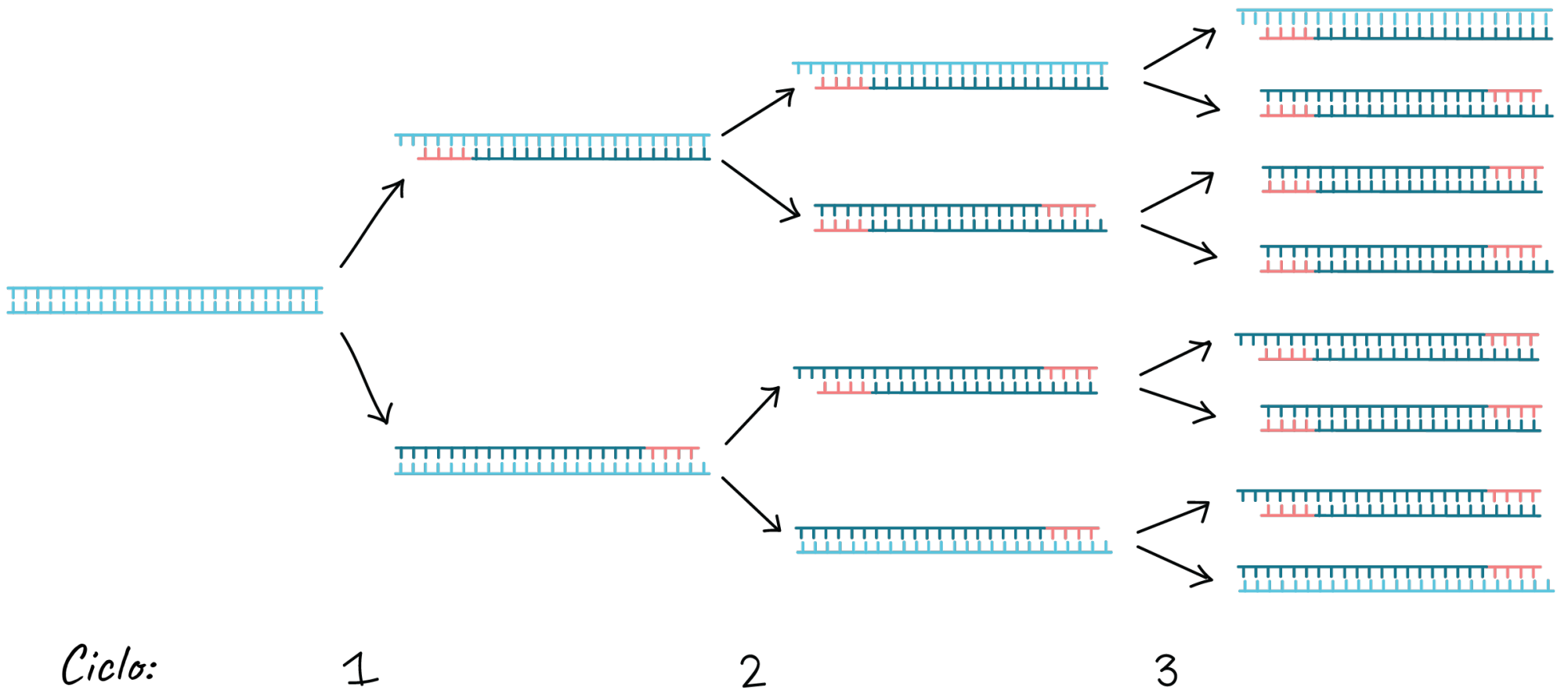
Taq polimerasa extiende cebadores



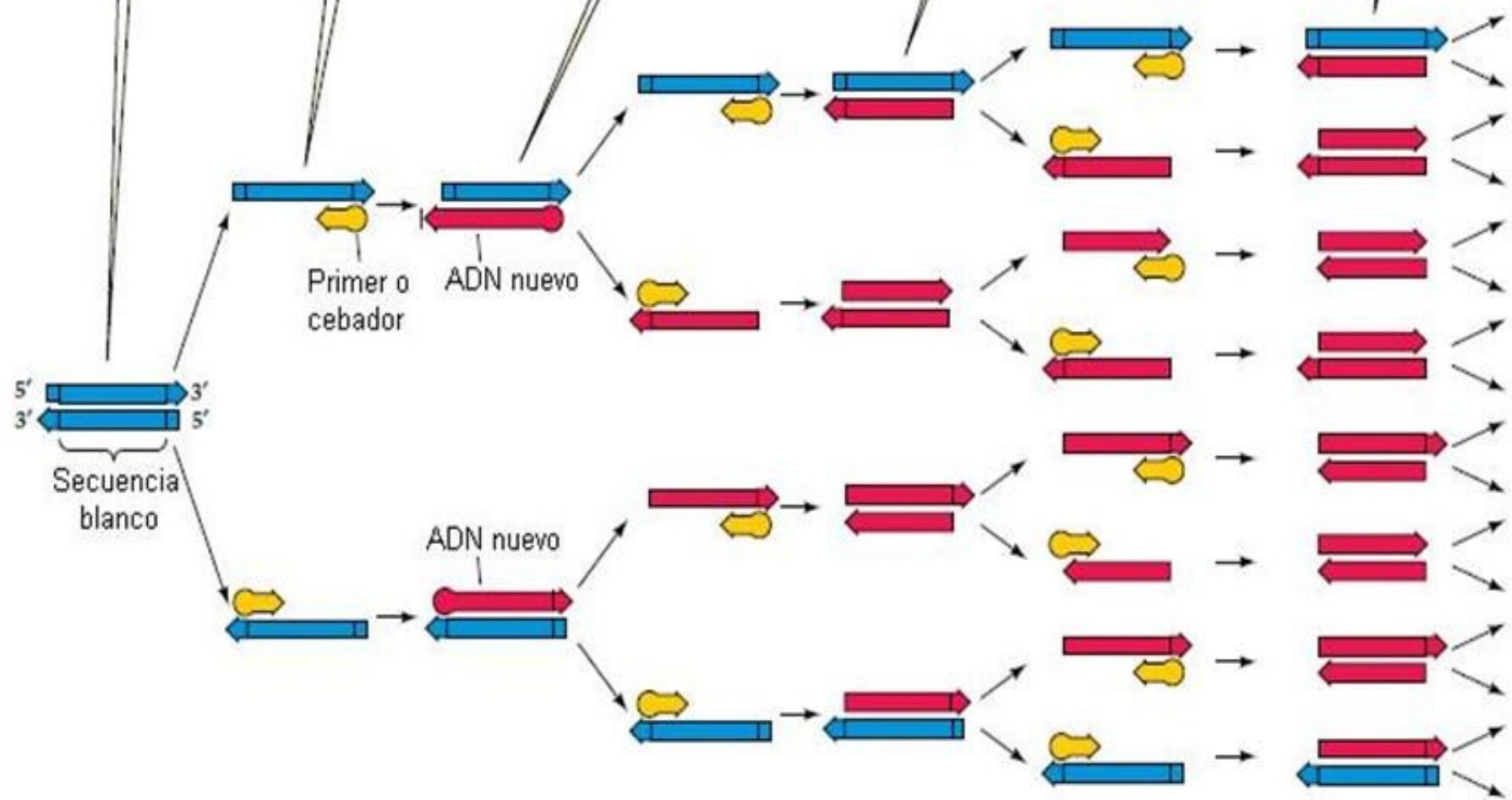


Repetir  
25-35 X

Resultado después de un ciclo  
# de moléculas de ADN duplicado



- 1 Una molécula de ADH con una secuencia blanco calentada es copiada por desnaturalización.
- 2 Cuando la mezcla se enfría, los primers se unen a una hebra simple de ADH.
- 3 Los dNTPs y la ADH polimerasa son agregadas para sintetizar dos nuevas cadenas de ADH.
- 4 El proceso es repetido, doblando la cantidad de ADH.
- 5 Por repetición del proceso, muchas copias del ADH original pueden ser producidos en corto tiempo.







## Limitacions de la PCR:

Tot i que és una tècnica molt usada té algunes limitacions:

- Requereix el coneixement previ d'alguna part del DNA que es vol clonar per poder sintetitzar els encebadors.
- L'exactitud. La polimerasa que es fa servir (polTaq) no té capacitat de correcció d'errors o al menys no tanta.
- Contaminació. Com que permet clonar DNA ha partir de mostres extremadament petites, restes de la pell del personal de laboratori o partícules presents a l'aire de l'habitacle, podrien entrar al vial que conte la mostra problema i clonar-se juntament, contaminant els resultats.



## Aplicacions de la PCR:

- Obtenir moltes còpies DNA per introduir en cèl·lules hostes.
- En **medicina forense** per identificar persones a partir de petites mostres de sang, cabell, saliva, semen, pell...
- En proves de paternitat
- En **estudis evolutius** i taxonòmics per deduir el grau de parentiu entre espècies
- En **estudis d'història** per deduir la proximitat entre poblacions humanes, malalties genètiques, etc a partir de restes en fòssils, mòmies, roques..
- Detectar material genètic d'un bacteri o virus present en el cos d'un pacient.