



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES. FACULTAD DE MEDICINA
II CÁTEDRA DE MICROBIOLOGÍA, PARASITOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA I

CLASE TEÓRICA 7

***EL DNA RECOMBINANTE: ESTRATEGIAS BÁSICAS
DE CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES.
APLICACIONES EN MICROBIOLOGÍA***

Profesor Regular Titular: Dr. Norberto Sanjuan

Doctor en Medicina (UBA)

LA NATURALEZA MANTIENE LA IDENTIDAD DE LAS ESPECIES



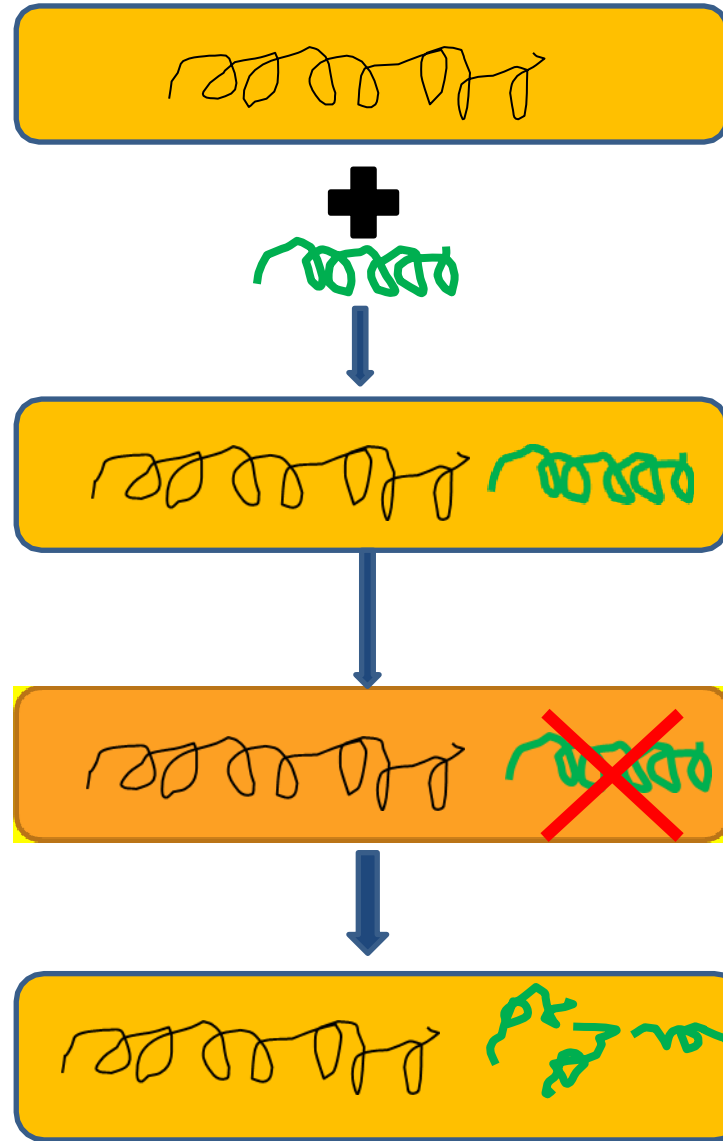
+



=



DESTRUCCIÓN DEL DNA FORÁNEO EN UNA BACTERIA



ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

GAATTC
CTTAAG**G**

A diagram showing the recognition sequence for the EcoRI restriction enzyme. The top strand is 5'-GAATTC-3' and the bottom strand is 3'-CTTAAG-5'. A red vertical line is drawn through the 'G' of the top strand, and a red horizontal line connects this 'G' to the 'A' of the bottom strand. Another red vertical line is drawn through the 'A' of the bottom strand, and a red horizontal line connects this 'A' to the 'T' of the top strand. These lines form a rectangular box around the GAATTC sequence, indicating the recognition site.

EcoRI

GGATCC
CCTAGG**G**

A diagram showing the recognition sequence for the BamHI restriction enzyme. The top strand is 5'-GGATCC-3' and the bottom strand is 3'-CCTAGG-5'. A red vertical line is drawn through the 'G' of the top strand, and a red horizontal line connects this 'G' to the 'G' of the bottom strand. Another red vertical line is drawn through the 'G' of the bottom strand, and a red horizontal line connects this 'G' to the 'C' of the top strand. These lines form a rectangular box around the GGATCC sequence, indicating the recognition site.

BamHI

DNA «A»



DNA «B»

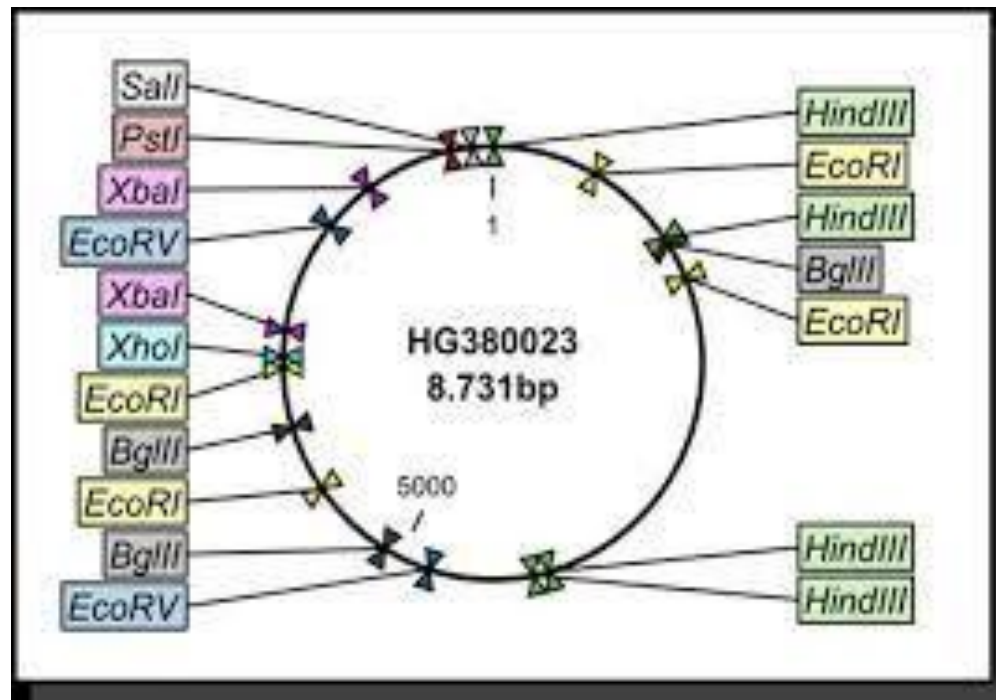


CORTE, MEZCLA Y LIGACIÓN

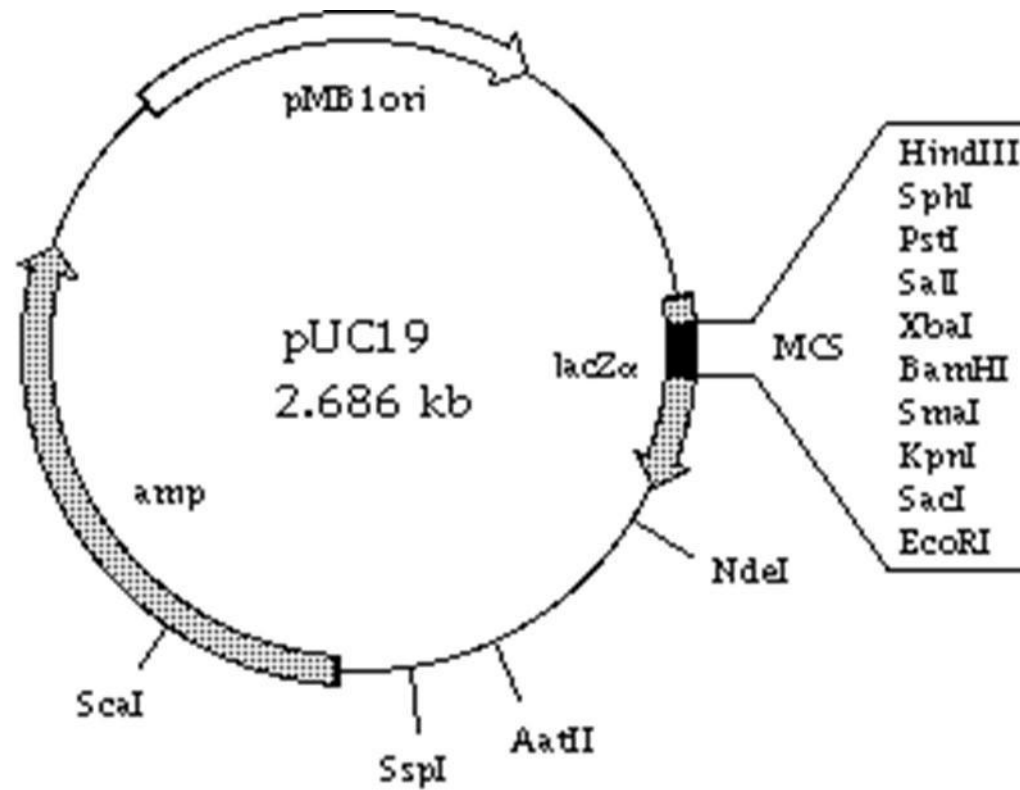


DNA RECOMBINANTE

PLÁSMIDOS NATURALES BACTERIANOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS



PLÁSMIDO ARTIFICIAL pUC19

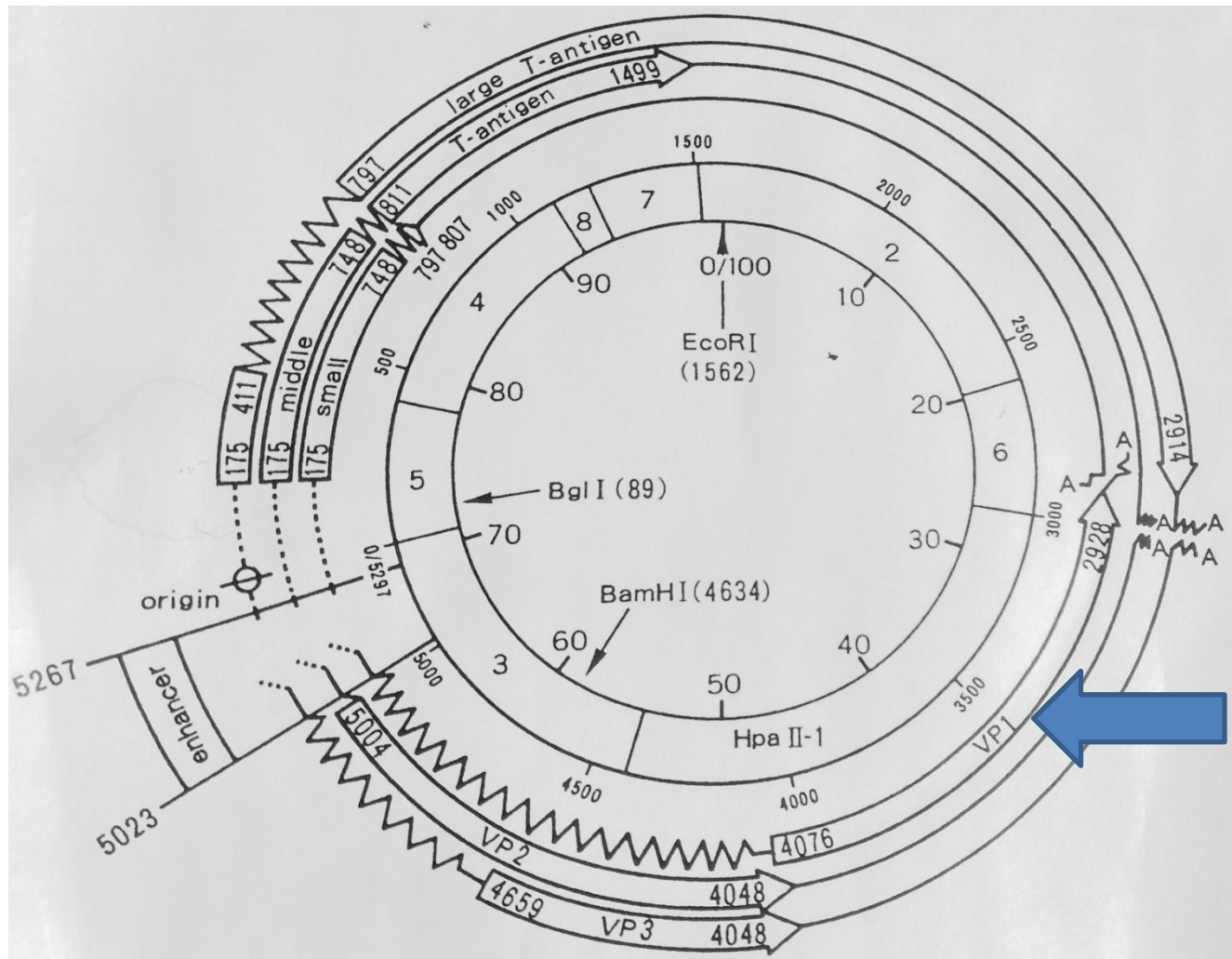


COMPONENTES DE LA CLONACIÓN

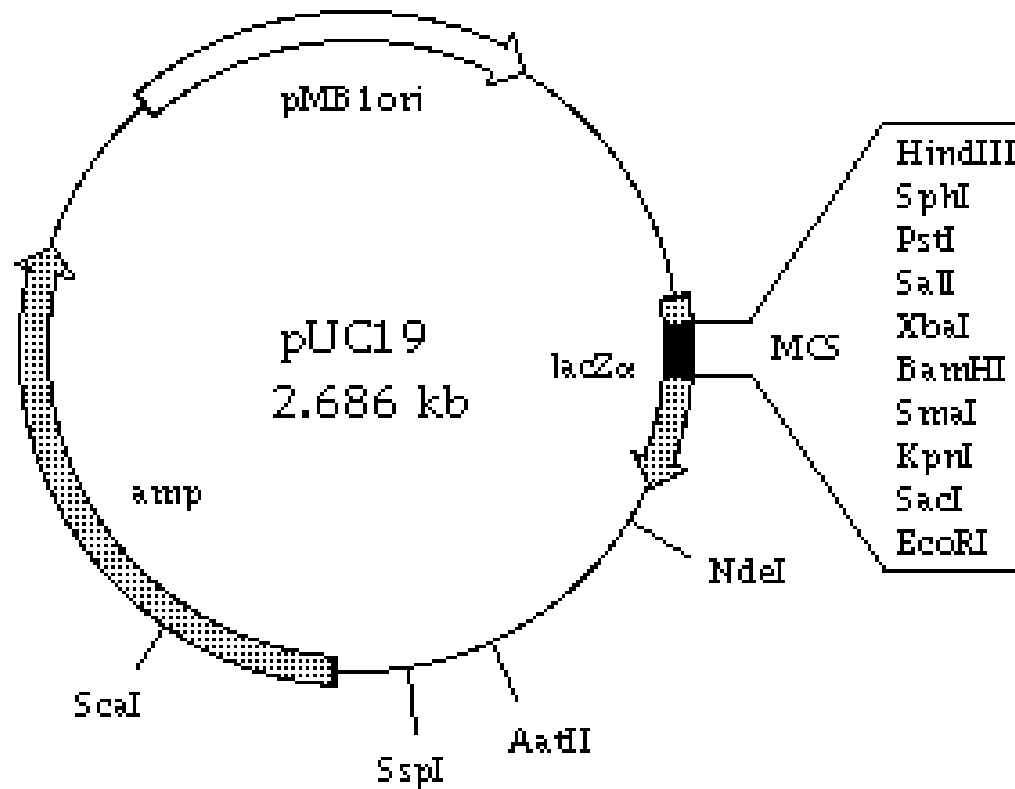
- **VECTORES**
- **INSERTOS**
- **CÉLULAS HUÉSPED**

**¿CÓMO CLONAR A LA PROTEÍNA VIRAL VP-1 EN UN
PLÁSMIDO?**

1. CONOCER EL MAPA GÉNICO Y DE RESTRICCIÓN DEL VIRUS



2. ELEGIR UN VECTOR (Puc19)



3. PURIFICAR EL VIRUS



4. DESNATURALIZAR Y EXTRAER LAS PROTEÍNAS VIRALES

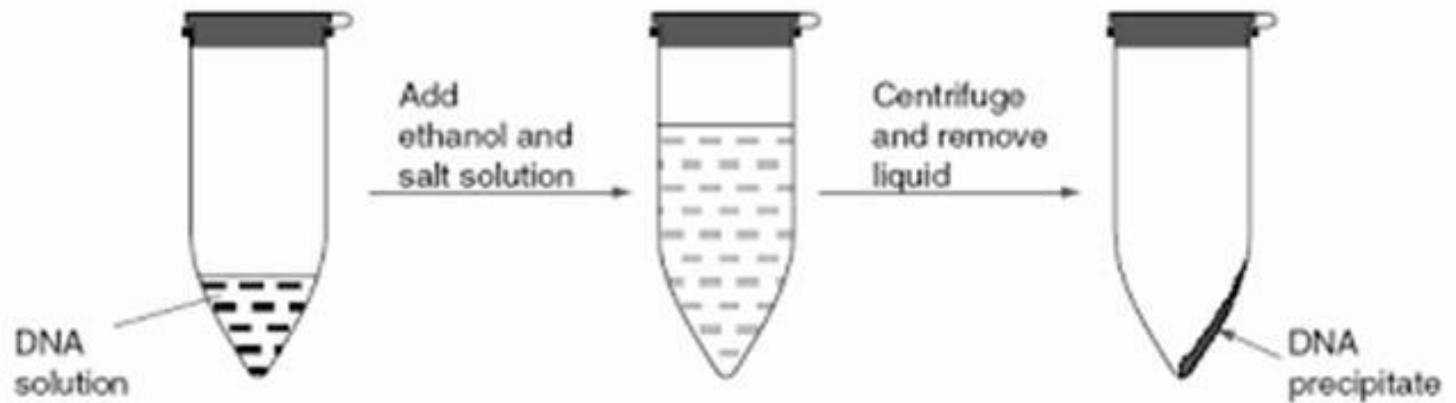


MEZCLAR EL VIRUS CON FENOL-CLOROFORMO Y AGITAR



CENTRIFUGAR Y OBTENER EL DNA VIRAL DE LA FASE ACUOSA

5. PRECIPITAR EL DNA VIRAL CON ACETATO DE SODIO Y ETANOL



SE HA OBTENIDO DNA VIRAL PURO

6. CORTAR EL DNA VIRAL Y EL PLÁSMIDO CON LAS MISMAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (EcoRI / BamHI)

7. SEPARAR LOS FRAGMENTOS DE DNA VIRAL POR ELECTROFORESIS EN UN GEL DE AGAROSA

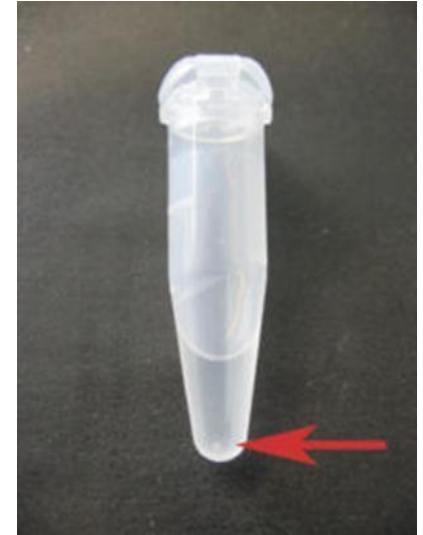
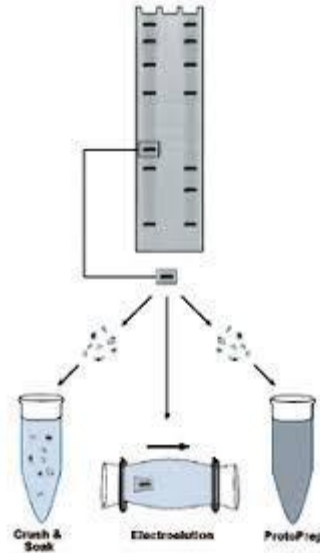
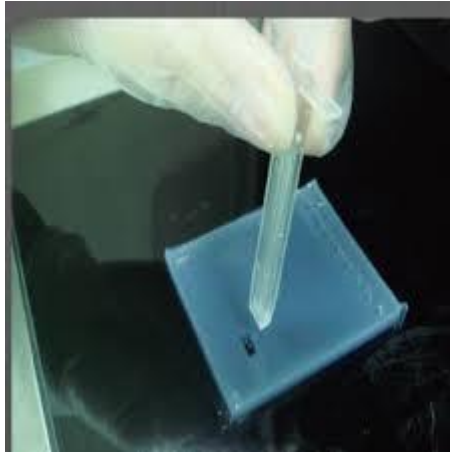


FUENTE DE PODER

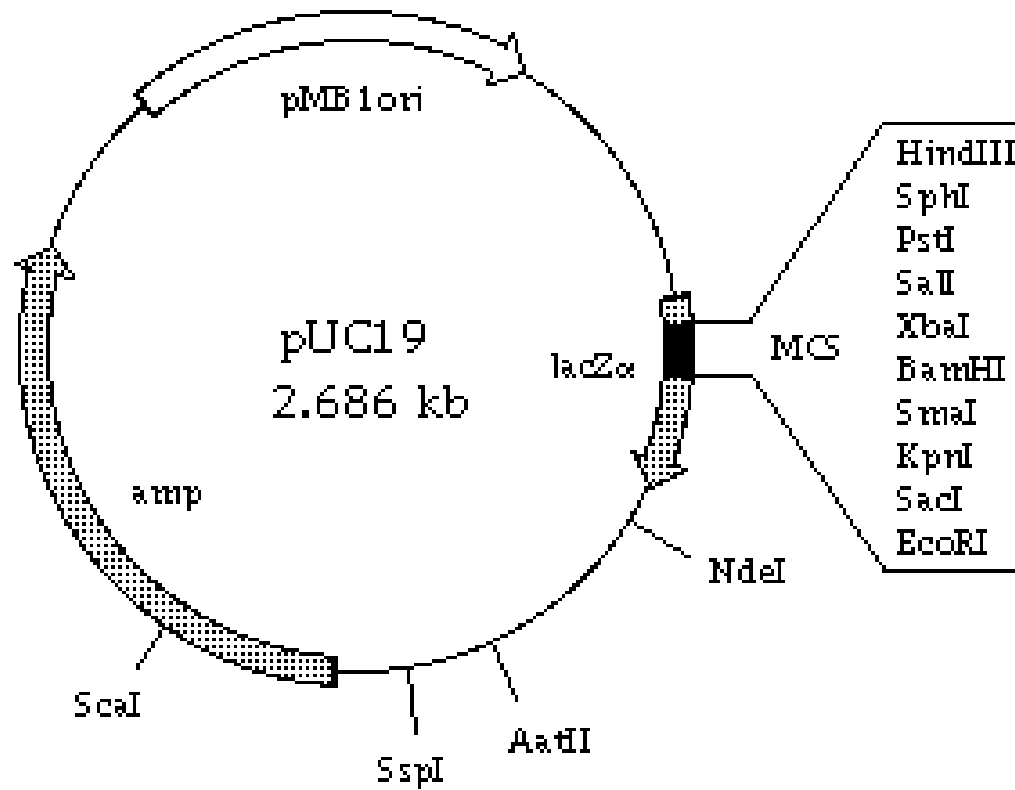


BANDAS DE DNA VISTAS CON UV

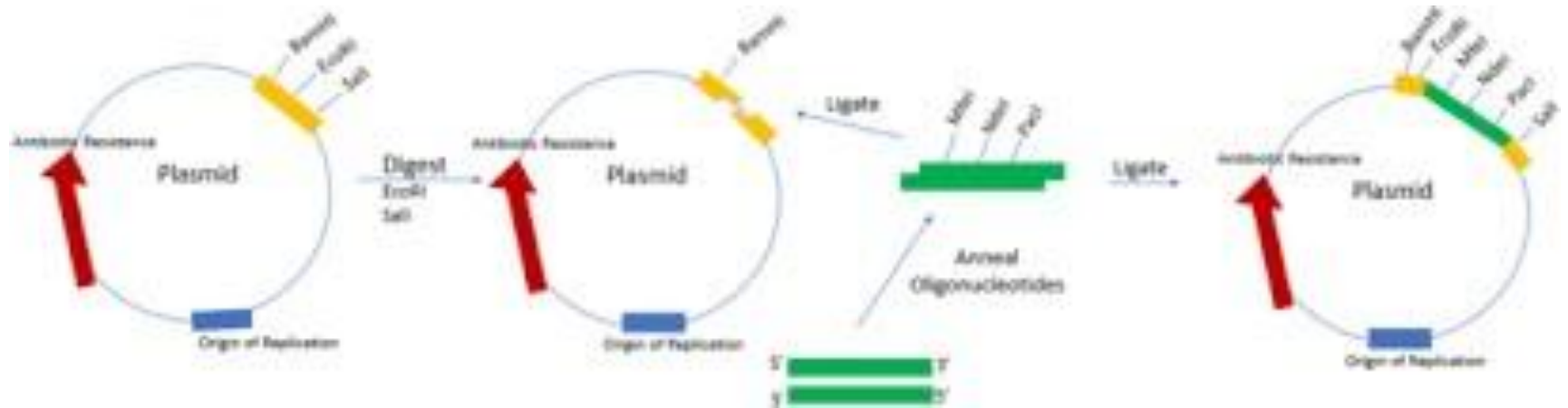
8. CORTAR LA BANDA DESEADA DE DNA VIRAL, COLOCARLA EN UN TUBO DE DIÁLISIS Y ELUÍR EL DNA VIRAL POR CORRIENTE ELÉCTRICA, DENTRO DE UNA CUBA. LUEGO DE PRECIPITADO SE HA OBTENIDO EL DNA VIRAL CORTADO ENTRE LOS SITIOS EcoRI y BamHI



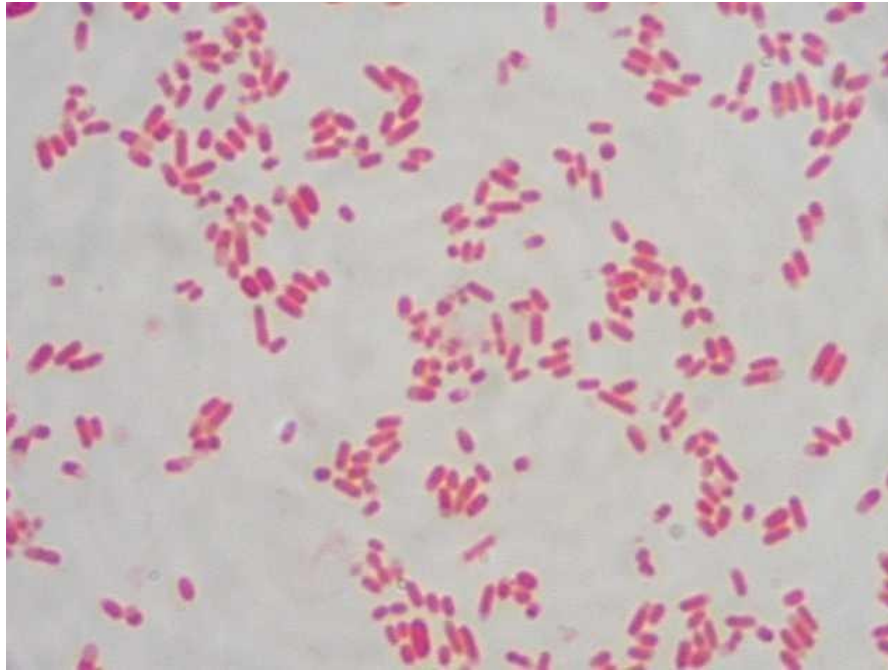
9. LIGAR EL INSERTO CON EL VECTOR



RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

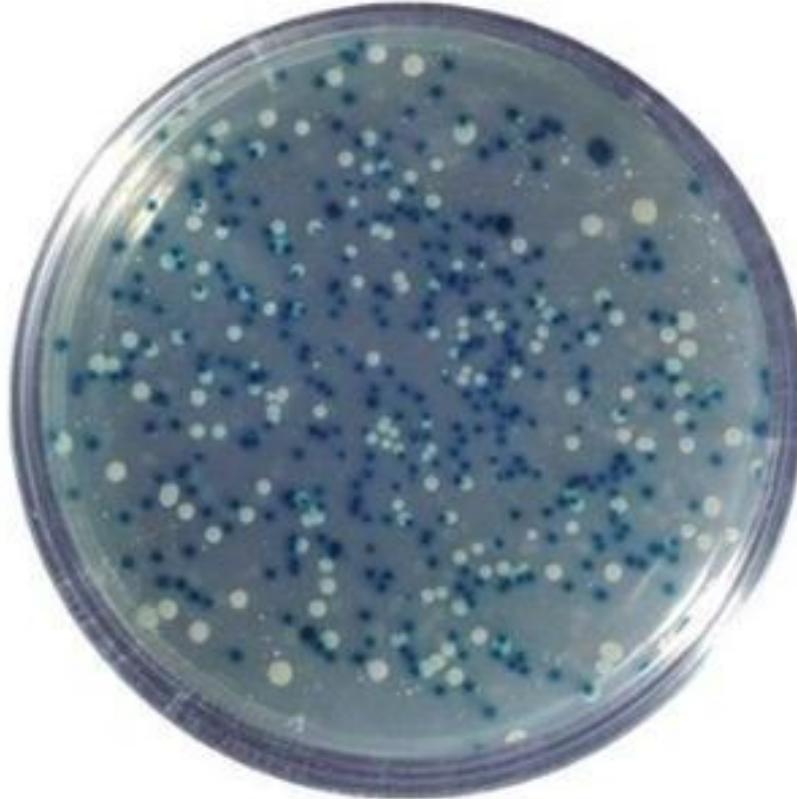


10. TRANSFORMAR BACTERIAS (MÉTODO DEL CLORURO DE CALCIO)



Escherichia coli

11. CULTIVAR LAS BACTERIAS CONTENIENDO AL VECTOR Y AL INSERTO EN UNA PLACA CON AMPICILINA, IPTG Y X-GAL. SE OBTENDRÁN COLONIAS BLANCAS (CON EL INSERTO) Y AZULES (SIN ÉL)



SE HA CLONADO EL GEN VP-1

12. PICAR UNA COLONIA BLANCA Y CULTIVARLA EN UN VOLUMEN GRANDE DE CALDO CON AMPICILINA



LUEGO, OBTENER EL DNA PLASMÍDICO CON EL INSERTO DE DNA VIRAL DESTRUYENDO LAS PROTEINAS. MAXIPREP.

EXTRAER EL DNA PLASMÍDICO CONTENIENDO EL GEN VIRAL DESDE UN GRAN VOLUMEN DE BACTERIAS (MAXIPREPARADOS, GRADIENTE DE CLORURO DE CESIO O KITS COMERCIALES DE EXTRACCIÓN). SE HA OBTENIDO UNA GRAN CANTIDAD DE DNA VIRAL.



RESERVA, MUTAGÉNESIS O PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA VP-1 EN VECTORES DE ALTA EXPRESIÓN

OTROS VECTORES DE CLONACIÓN

- **CROMOSOMAS ARTIFICIALES EN LEVADURAS (YAC)**
- **BACULOVIRUS EN CÉLULAS DE INSECTOS**
- **RETROVIRUS EN CÉLULAS ANIMALES**
- **CÉLULAS VEGETALES.**