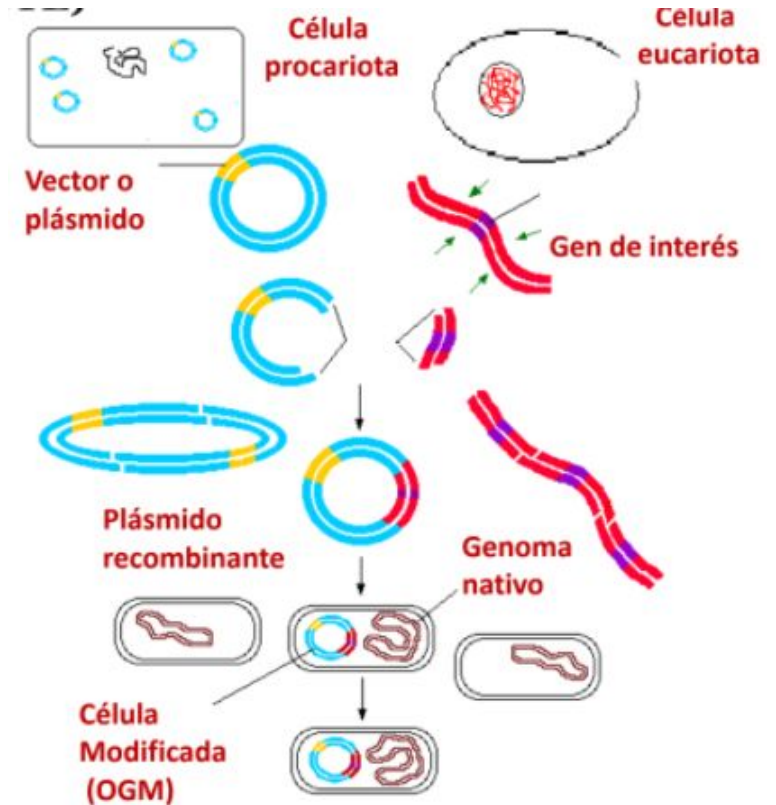


2. Edició del DNA

**M02. Tècniques complementàries als cultius
cel·lulars**

ADN RECOMBINANT

→ Combinació *in vitro* de material genètic de diferents fonts que es pot transferir a un organisme receptor per generar organismes modificats genèticament (OGM)





Ovella Dolly - 1996

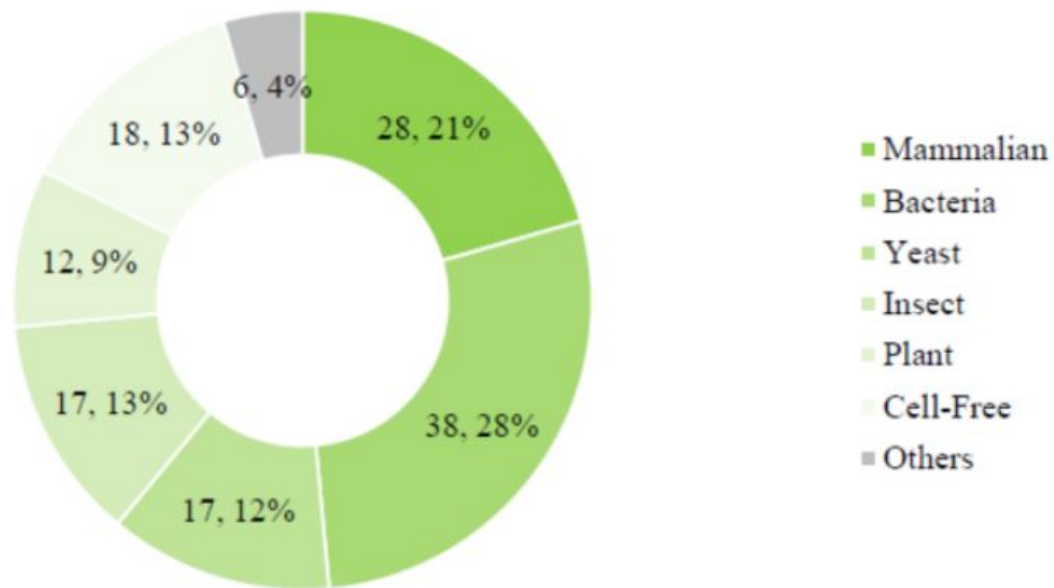
Clonatge

Sistemes d'expressió

- **Hoste:** organisme receptor que serà modificat per produir la proteïna recombinant o observar canvis en el seu fenotip en expressar el gen exògen.
- **Vector d'expressió:** molècula d'ADN que transporta la seqüència codificant de la proteïna i les seqüències que regulen l'expressió
 - Plasmidis
 - PCR
 - CRISPR

HOSTES

DISTRIBUCIÓN DE USO DE HOSPEDEROS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTE



ETAPES

1. Preparació vector de clonació
2. Preparació de la seqüència del ADN
 - a. Enzims de restricció
 - b. PCR
3. Formació ADN recombinant
4. Introducció de l'ADN recombinant a una cèl·lula hoste
5. Cultiu
6. Detecció i selecció de clons
7. Extracció proteïnes

1. Vectors d'expressió

Plasmidis

Fag λ

BACs

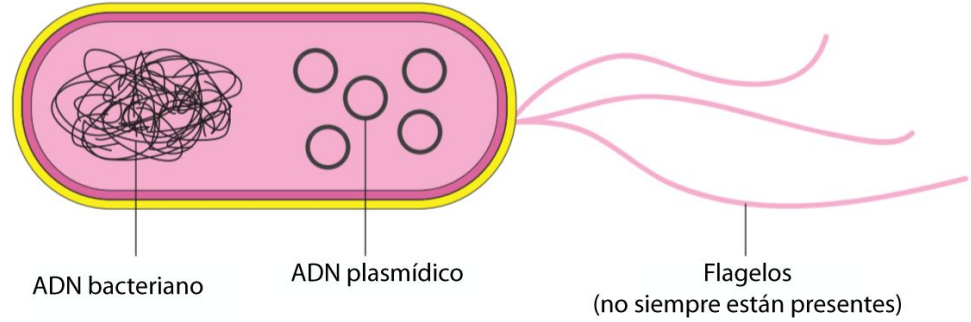
YACs

PLASMIDI

Petites molècules de DNA circular que contenen el seu propi origen de replicació.

Quan són utilitzats com a vector es tracta de versions simplificades als presents en bacteris.

Pot arribar a carregar 10Kb



Created with SnapGene®

Què han de contindre (com a mínim)?

- Origen de replicació
- Gen de resistència a antibiòtics
- ER sites que tallin per un sol lloc
- **gen reporter**

Plasmids 101

What is a Plasmid?

Altres vectors

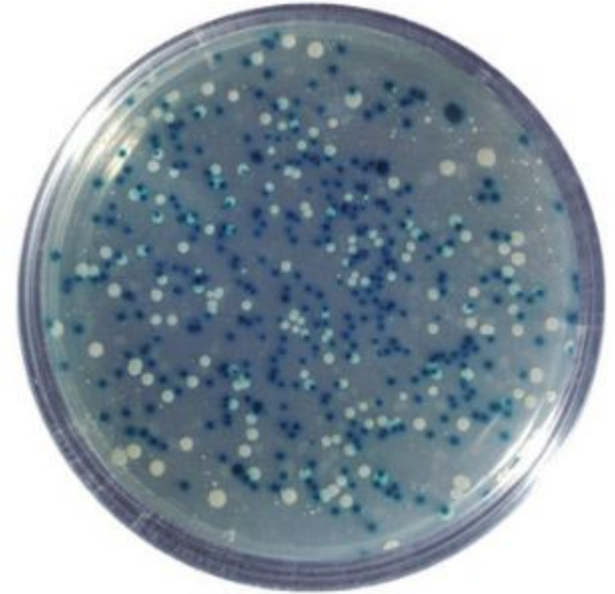
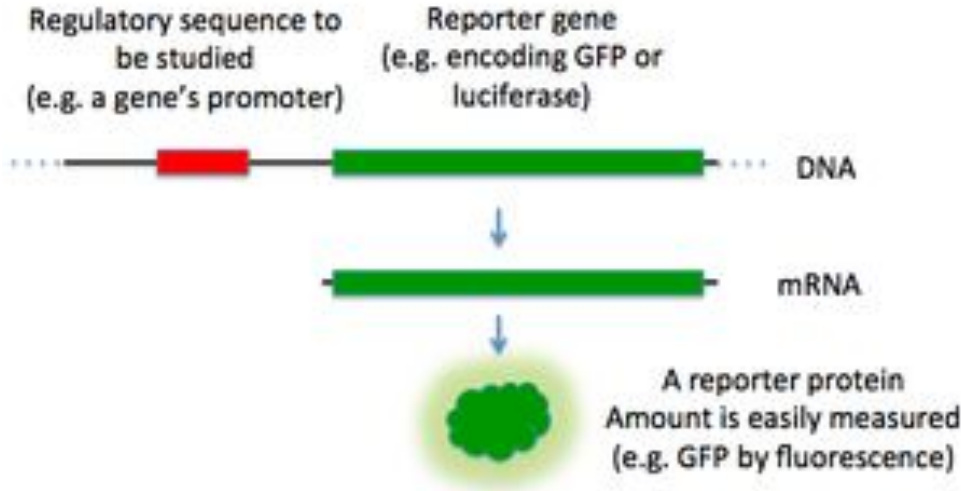
- a) Fag λ : utilitzen ER, es lliguen els fragmenrs i s'empaqueten en partícules virals. Fragments de 20kb

- b) BAC (bacterial artificial chromosome): s'utilitzen per clonar grans fragments de genoma (150kb)

- c) YAC (Yeast artificial chromosome): pot arribar a carregar 2 Mb

Gens reporter →

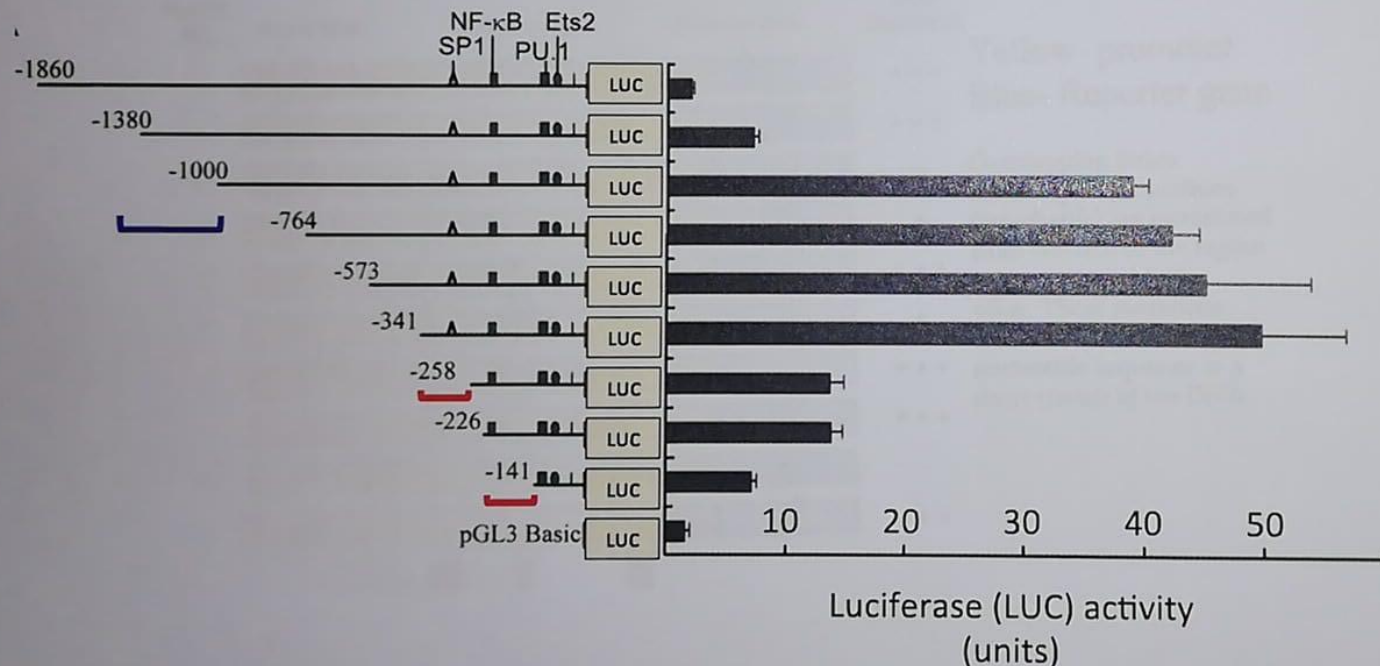
Gen el producte del qual és fàcilment detectable o mesurable i, per tant, pot usar-se com un indicador de si una construcció d'ADN s'ha transferit amb èxit o com a instrument per seleccionar aquelles cèl·lules que han incorporat el gen.



β -galactosidasa

GEN	PRODUCTE	FUNCIÓ
lacZ	beta-galactosidasa	tinció blava (+ Xgal)
CAT	Chloramphenicol acetyltransferase	radioactivitat
gus	beta-glucuronidase	productes amb color o fluorescents
LUC	Luciferase	Llum
GFP	Green Fluorescent Protein	Fluorescència
ampR		Resistència a l'ampicilina

Identification of promoter *cis*-acting regulatory elements using reporter genes



2. Obtenció DNA

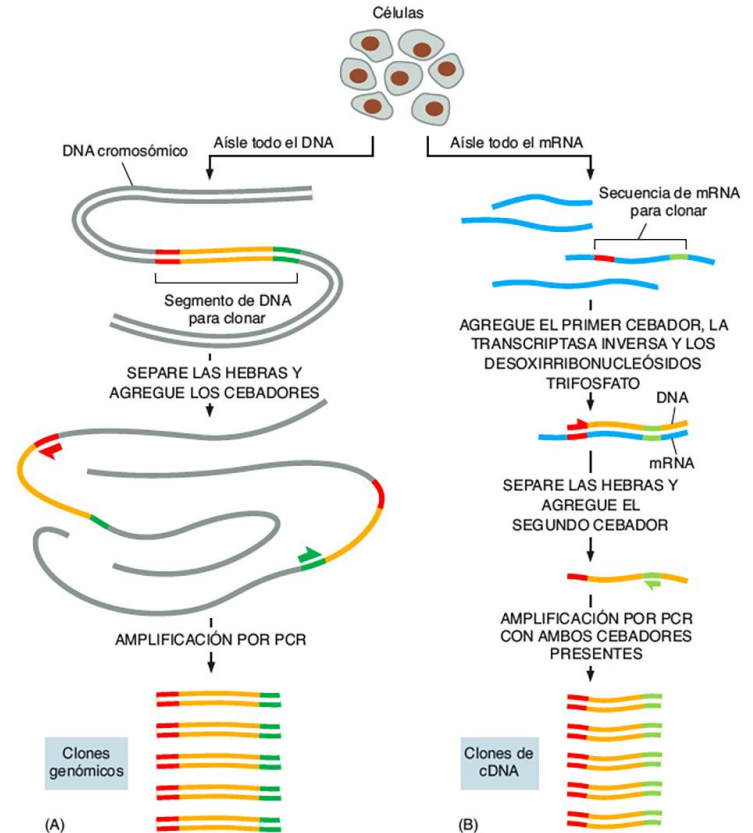
Preparar el DNA a insertar
i el vector hoste per la
inserció del gen a
estudiar

1. Preparació seqüència de l'ADN

a) Aïllar DNA

- Lisar cells
- Purificació DNA
- **PCR:** disseny seqüències

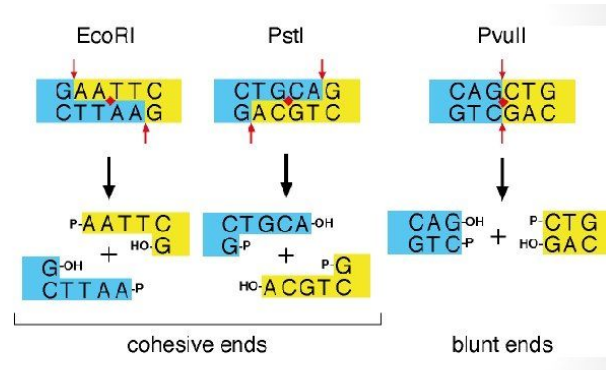
L'**splicing** és exclusiu de les cèl·lules eucariotes



1. Preparació seqüència de l'ADN

- a) Aïllar DNA
- b) Concentrar i fragmentar → Enzims de restricció

Els enzims de restricció són molècules que tallen el DNA en reconèixer una seqüència concreta (d'entre 4 i 12nt). Aquestes endonucleases poden actuar de dues maneres diferents:



Enzims de restricció

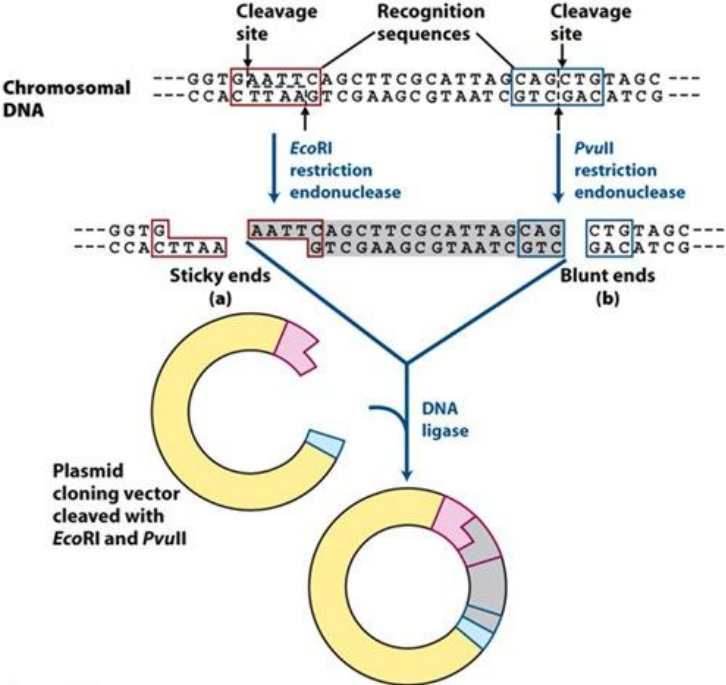
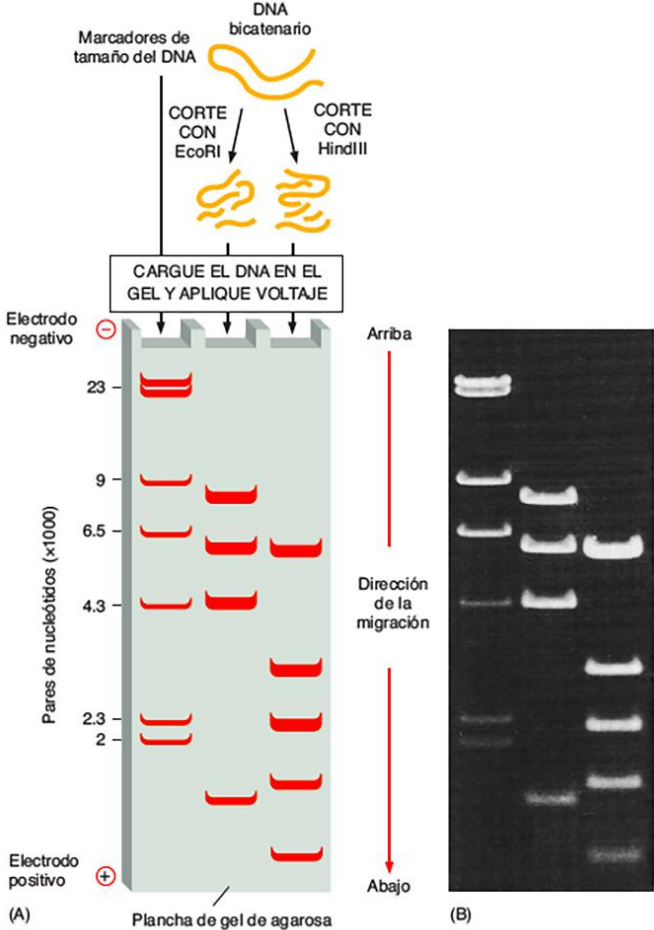
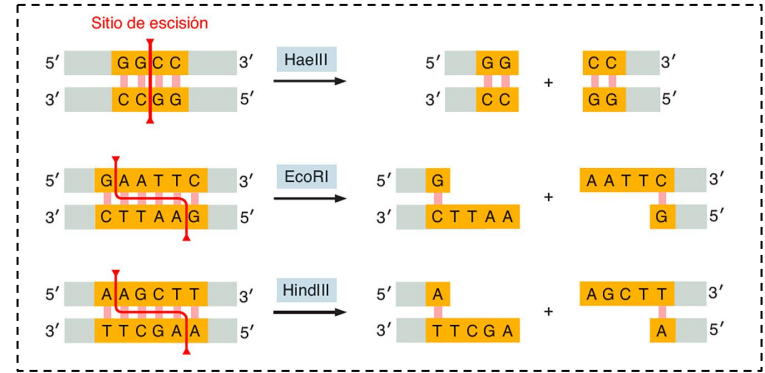


Figure 9-2ab
 Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

Els enzims de restricció em permeten verificar el resultat del nostre vector recombinant. Es realitza mitjançant la comparació dels fragments esperats i els resultant en realitzar una digestió.



PREGUNTA 10-2

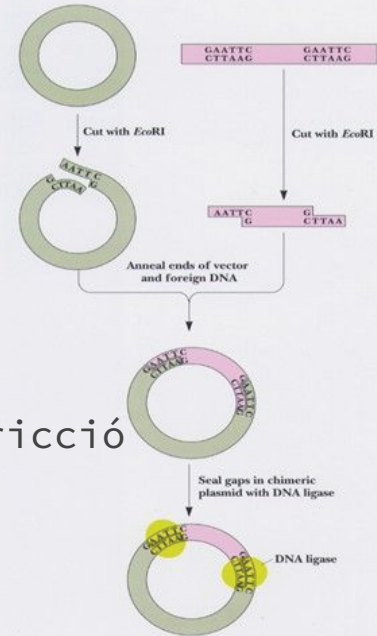
¿Qué productos se forman cuando la molécula de DNA bicatenario de abajo es digerida con (A) EcoRI, (B) HaeIII, (C) HindIII o (D) estas tres enzimas juntas?

5'-AAGAATTGCGGAATTCGGGCCTTAAGCGCCGCGTCGAGGCCTTAAA-3'
 3'-TTCTTAACGCCTTAAGCCCGGAATTCGCGGCGCAGCTCCGGAATTT-5'

SIMULADOR ENZIMS DE RESTRICCIÓ

3. Formació ADN recombinant

Garrett & Grisham: Biochemistry, 2/e
Figure 13.3



Enzim de restricció

TA cloning

TOPO cloning

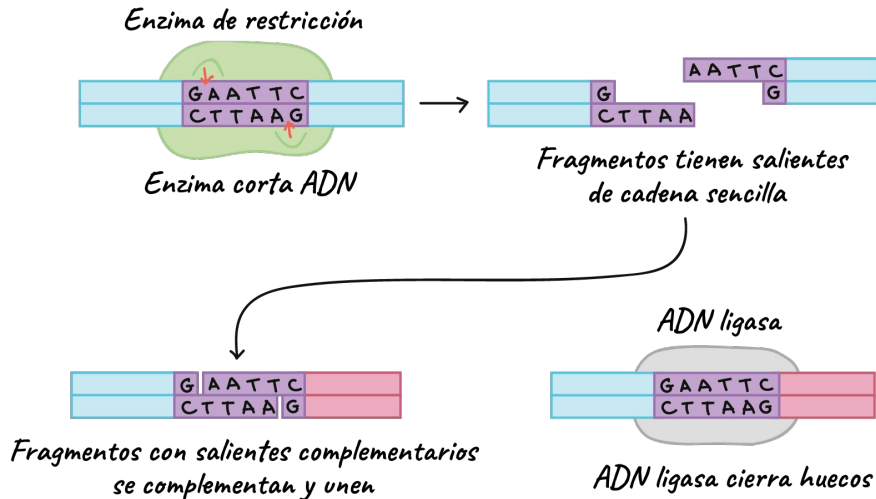
Gateway cloning

Recombinació homòloga

ADN lligasa

És la responsable d'unir fragments d'ADN en la replicació per formar una cadena contínua

Necessària per unir els fragments complementaris prèviament tallats amb ER.



Utilitza ATP per catalitzar la reacció en que el grup fosfat de l'extrem 5' d'una cadena s'uneix al grup hidroxil 3' de l'altre. → enllaç fosfodiester covalent

T4 lligase: s'utilitza quan
tenim BLUNT ENDS.

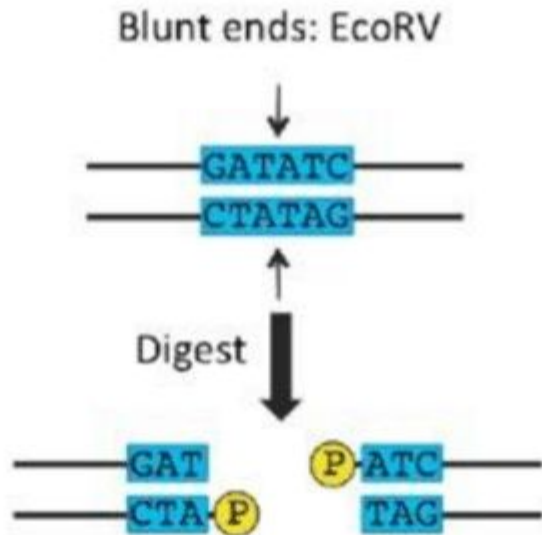
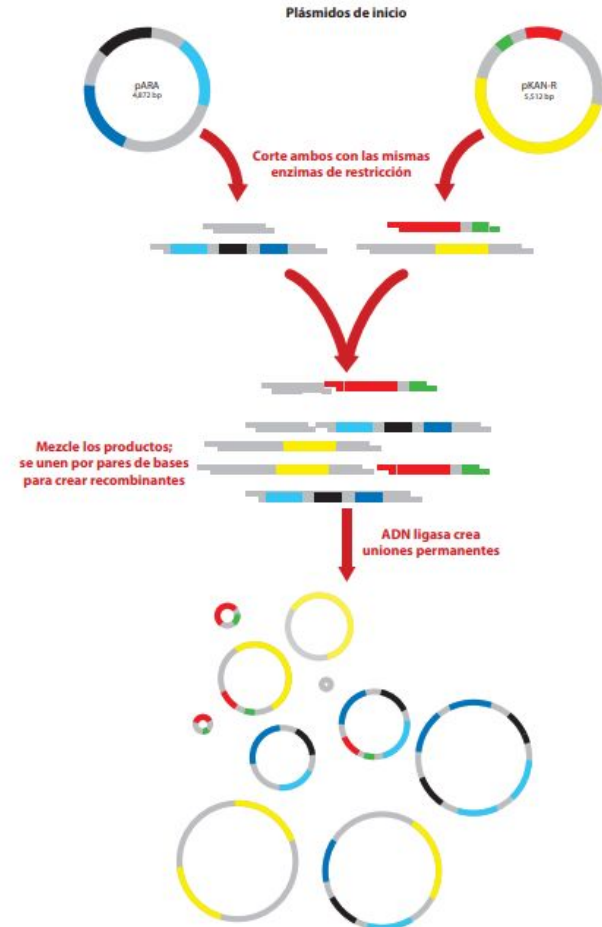
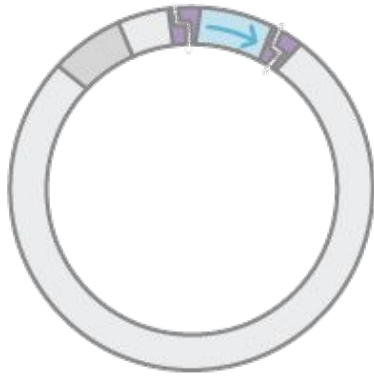


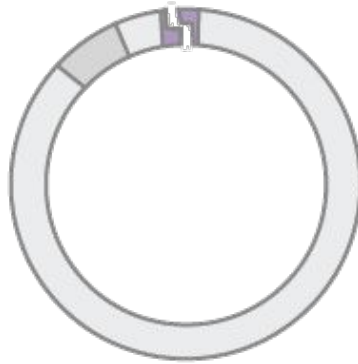
Figura 3.3: Proceso de ligación



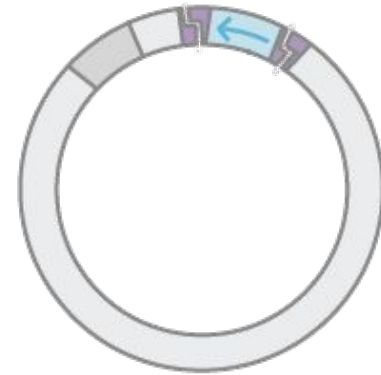
Possibles resultats



✓ Gen entra
hacia adelante



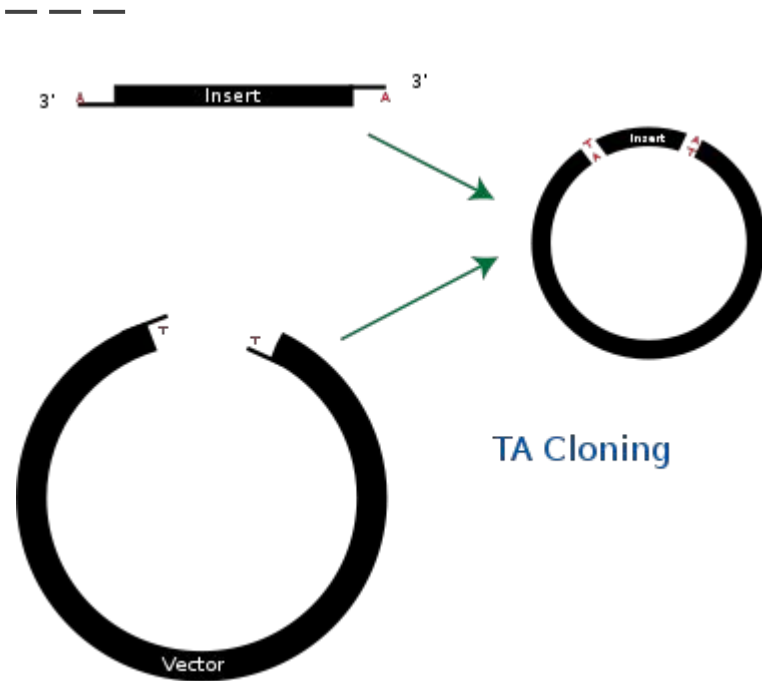
✗ Plásmido se cierra



✗ Gen entra en
sentido inverso

Les **fosfatases alcalines** ajuden a evitar la “self-recombination”, evitant la unió dels extrems cohesius.

TA Cloning



TA Cloning

Utilitza la capacitat de la Taq polimerasa per afegir una dA en l'extrem 3' (terminal transferase activity).

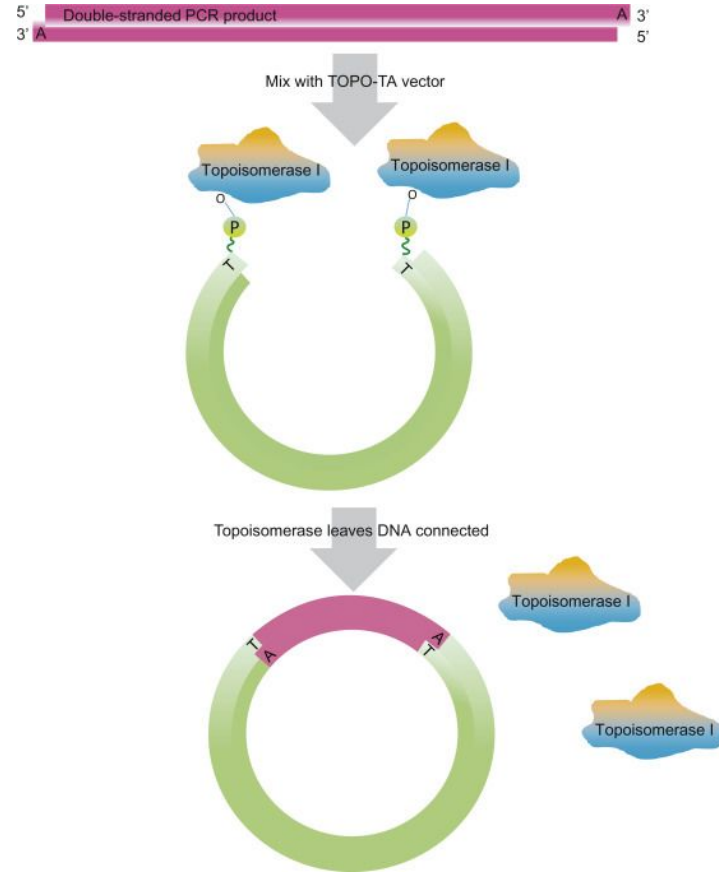
- Aquesta tecnologia no depen de la seqüència del vector

1. PCR de l'insert → insert + 3'dA
2. S'uneix amb un vector que té extrems 3'dT
3. Unió amb la DNA lligasa

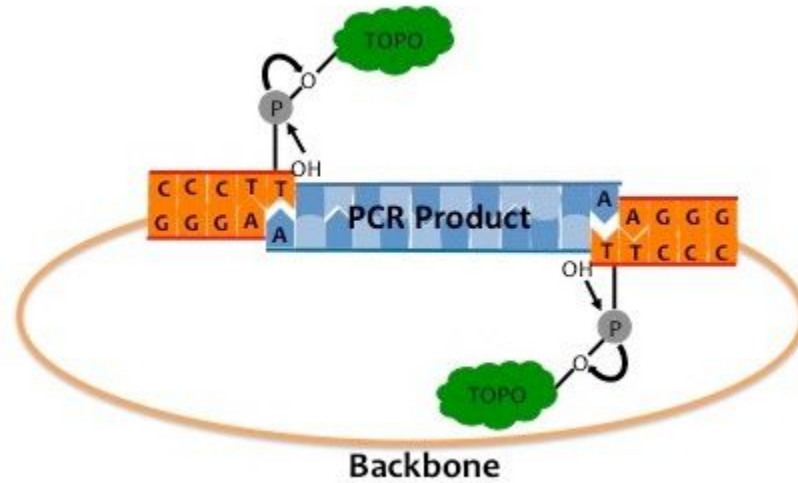
TOPO cloning

Topoisomerase based cloning (TOPO cloning) is a DNA cloning method that does not use restriction enzymes or ligase, and requires no post-PCR procedures.

El vector té unit als extrems 3' Timina l'enzim **topoisomerasa I**. Aquest enzim és el responsable de la unió entre el vector i l'insert (té activitat lligasa), i quan això succeeix, es desenganxa de l'ADN.

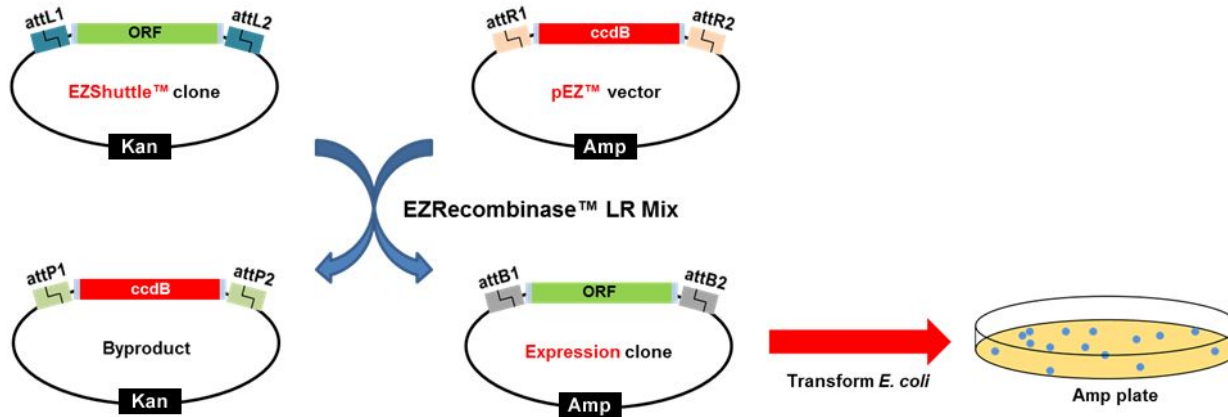


TOPO-TA Cloning

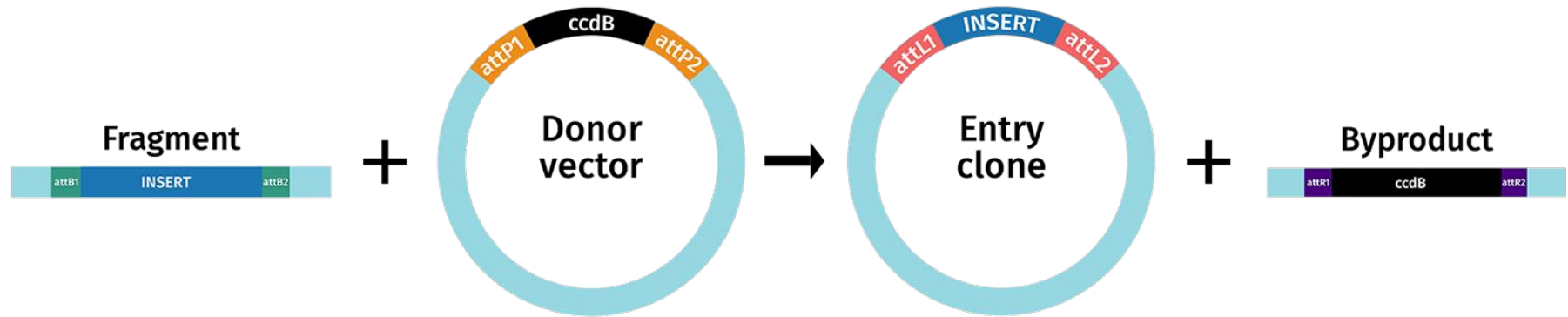


Gateway Cloning

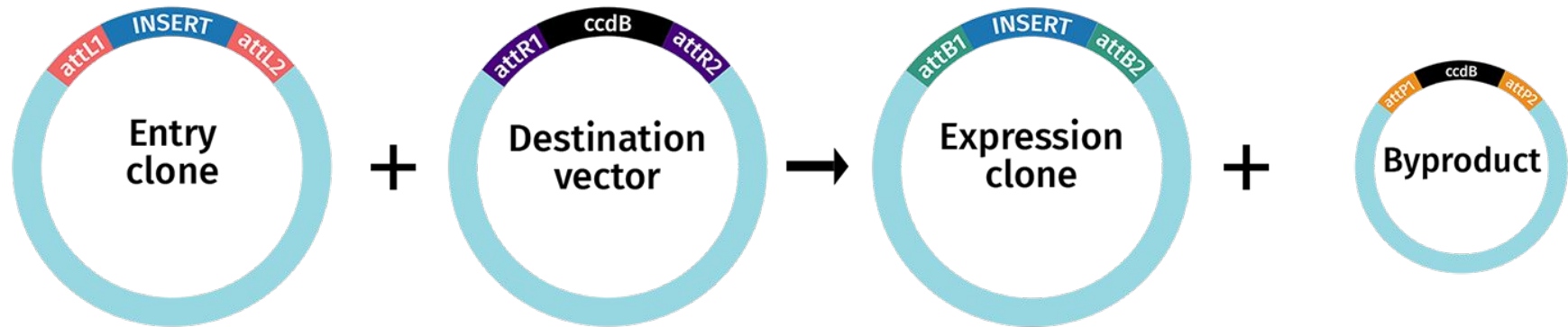
It is a universal cloning method that provides a rapid and highly efficient way to move DNA sequences into multiple vector systems. It is based on the site-specific recombination properties of bacteriophage lambda (att sites) and two proprietary enzymes mixes, called “LR clonase” and “BP clonase”.



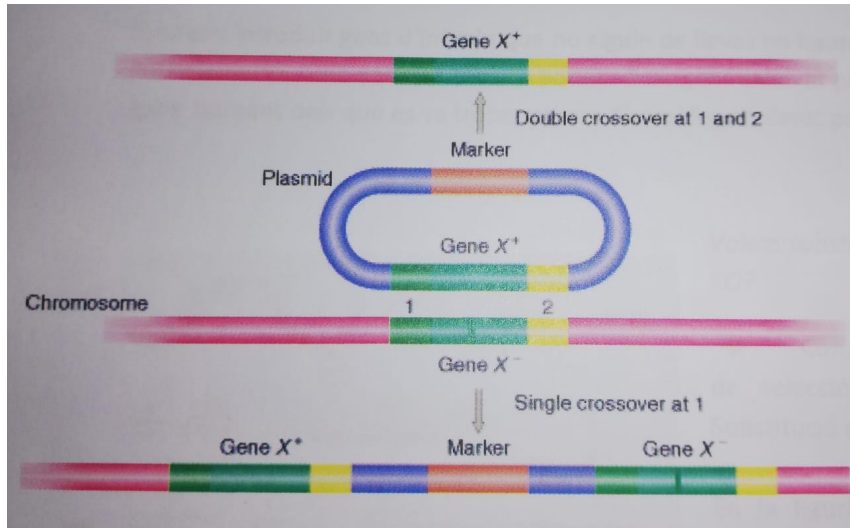
Step 1: BP Reaction



Step 2: LR Reaction



Recombinació homòloga - llevats



Crossover (entrecreuament) entre regions homòlogues, que permet la integració del plasmidi complert.

Remember!

Edició DNA

- A) Quines són els elements per editar el DNA?
- B) Quines són les característiques que han de tenir els vectors?
- C) Que són els ER i quin paper tenen?

Pràctica clonació DNA

0. Creixement cultiu procariota (*E.coli*)
1. Lligació T4 - Inserció gen kanR
2. comprovació de la lligació
3. Transformació
4. Coomprovació èxit transformació en placa
5. Extracció del DNA plasmídic recombinant
6. Anàlisi via electroforesi

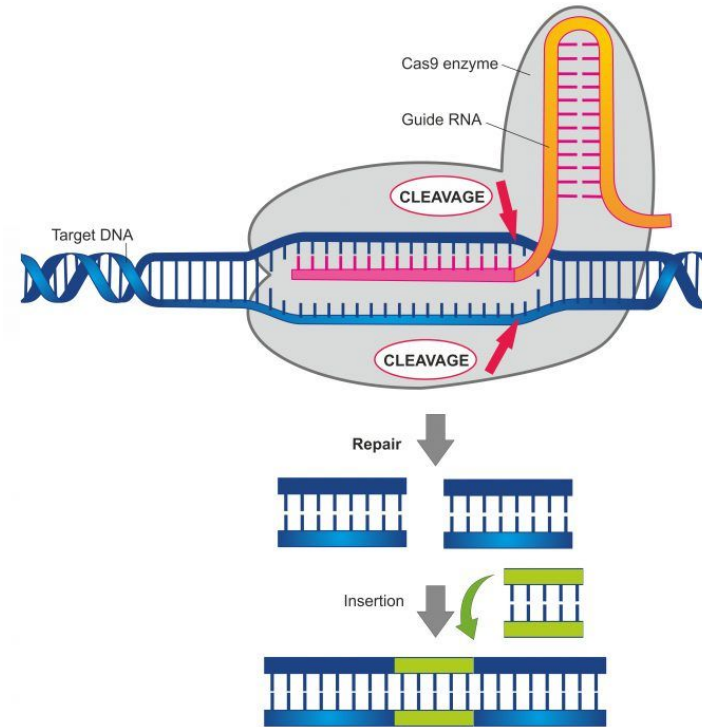
Tècniques d'edició genètica

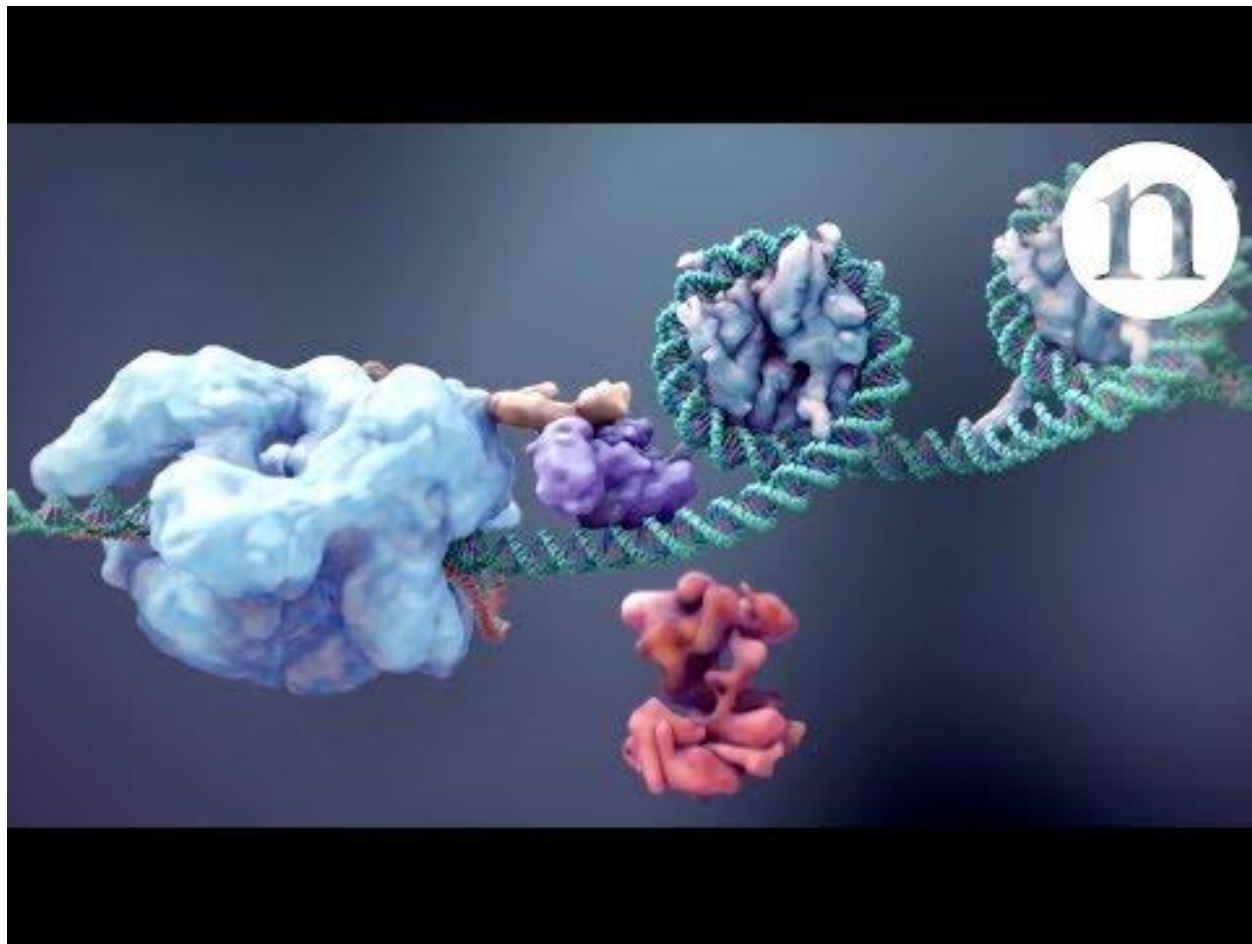
1. PCR
2. Clonació
3. Mutacions induïdes via dany del DNA
4. Zinc Finger
5. TALEN
6. **CRISPR- Cas9**

Tecnologies que en permeten modificar l'ADN d'un organisme: treient o agregant material genètic en certs punt del genoma.

CRISPR

Repeticiones Palindrómicas
cortas agrupadas
regularmente
interespaciadas asociada a
la proteína 9





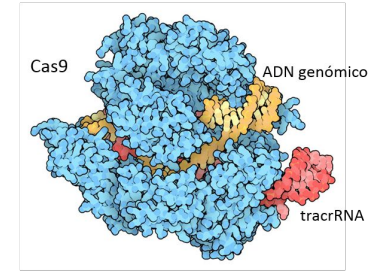
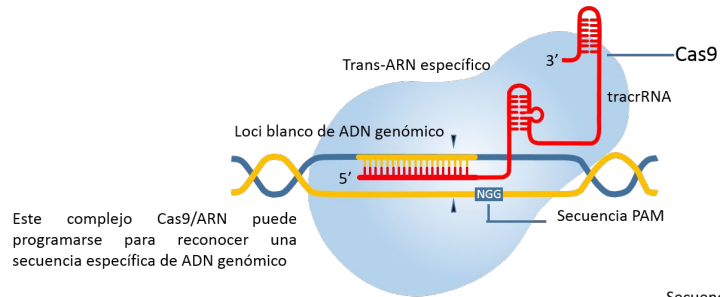
[VIDEO LA HIPERACTINA](#)

CRISPR - Cas9 (Premi Nobel 2020)

conogasi

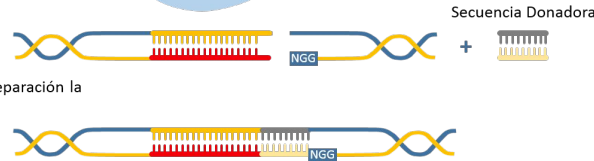
Components:

- Proteïna Cas9
- sgRNA (guide RNA)



Se puede insertar una secuencia nueva de ADN en este sitio de corte.

Mediante mecanismos de reparación la célula detectan el corte.



El sistema de reparación celular inserta un ADN complementario, llamado templado para reparar el corte.

Modificado de: <http://www.thermofisher.com/mx>
PDB: <http://pdb101.rcsb.org/motm/181>

Procediment

1. Unió per complementarietat del fragment de RNA (gRNA)
2. Trencament de la doble cadena del DNA mediat per l'enzim Cas

En aquest punt la cellula intenta reparar el dany causat en el genoma

Usos:

1. Knockout de gens
2. Modificació seqüència
3. Inserció gens
4. Alteracions d'unúnic gen



10/01/23

Curs UPF



Introduction to Research Integrity and Good Scientific Practices.(Second Edition)

★★★★★ (No hay valoraciones aún.)

0,00€

In this course, participants will learn some basic concepts about scientific integrity and good scientific practice, **particularly in the biomedical field**. The course consists on 6 different modules: 1. Introduction to research integrity 2. Data Management 3. Conflict of interest 4. Animal research 5. Human research 6. Practice and politics of publication

Taught by:



CATEGORÍA NUEVAS FORMAS DE TRABAJO

CRISPR



Científicos resucitan proteínas

Un cop tenim el vector
amb el gen d'interès,
hem d'introduir-lo a la
cèl·lula hoste i
comprovar quina és la
seva funció o extreure
la proteïna d'interès

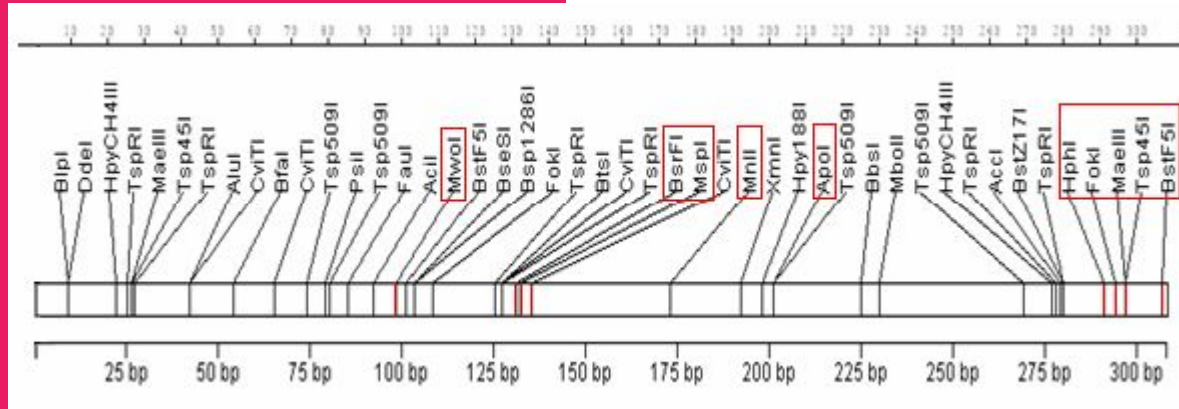


TRANSFECCIÓ
I
TRANSDUCCIÓ
(Bloc 5)

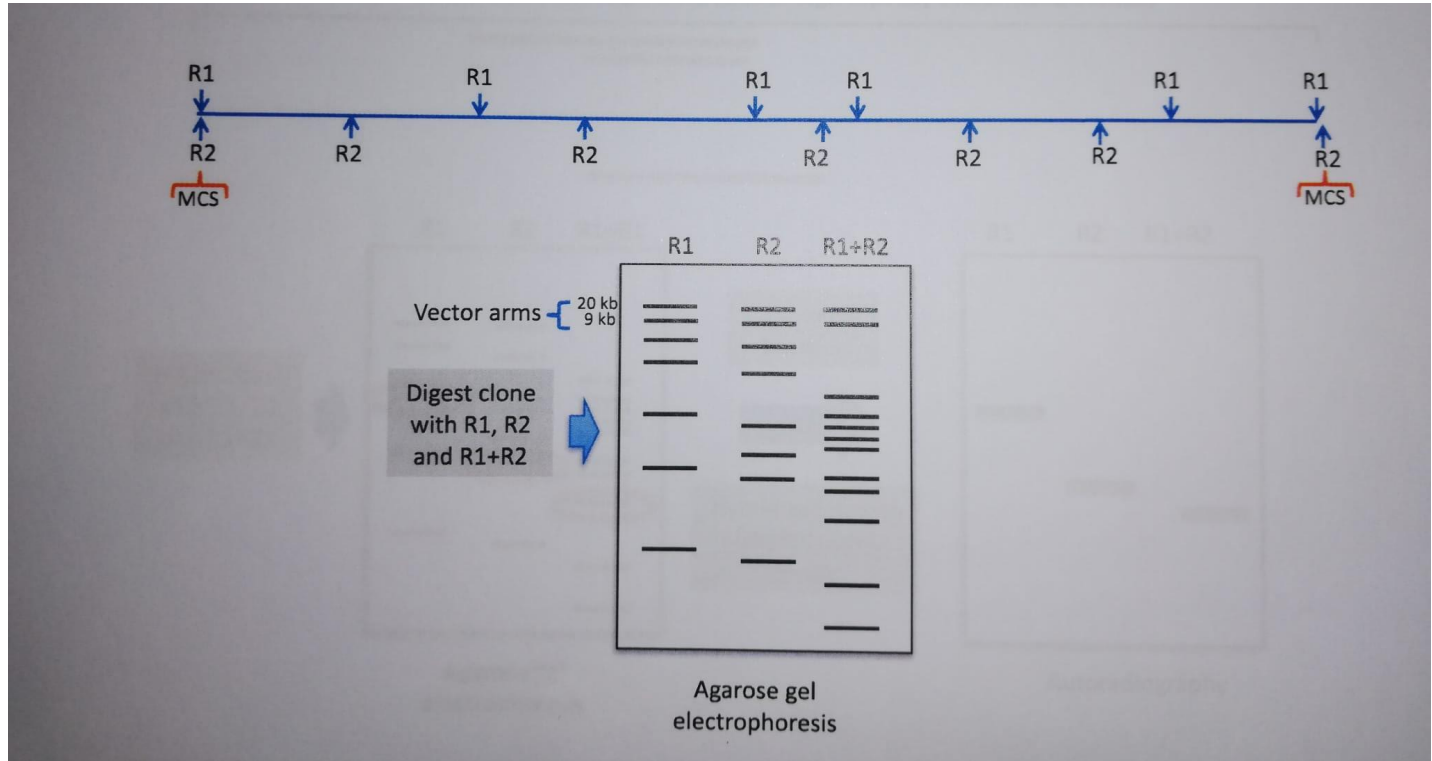
Per comprovar que el vector que hem generat és correcte, es sol seqüenciar el seu genoma.

Però també podem fer un mapa de restricció

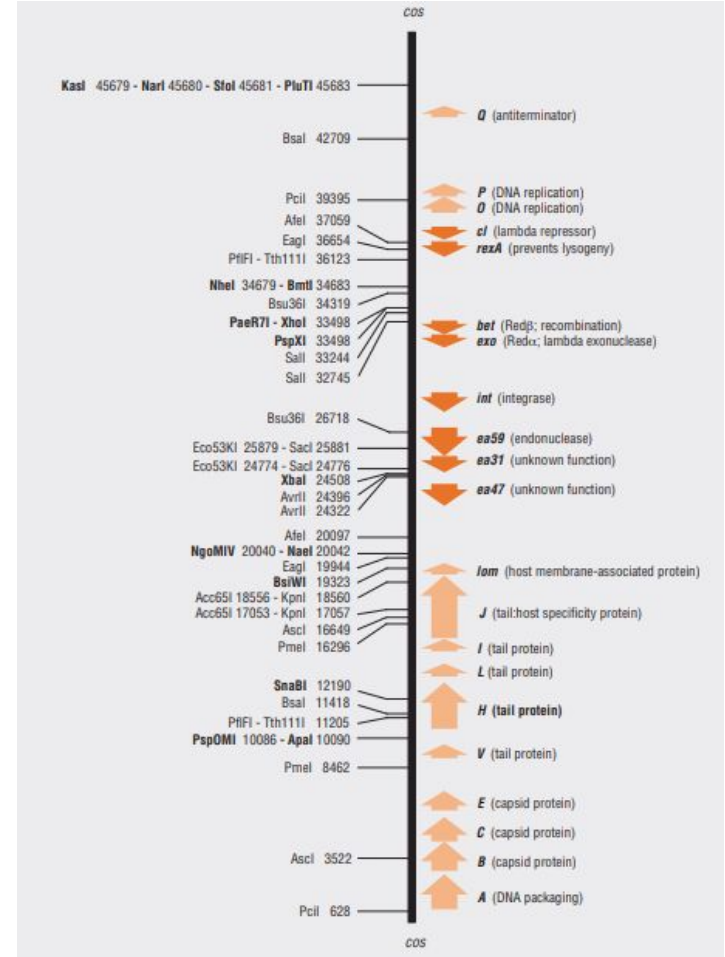
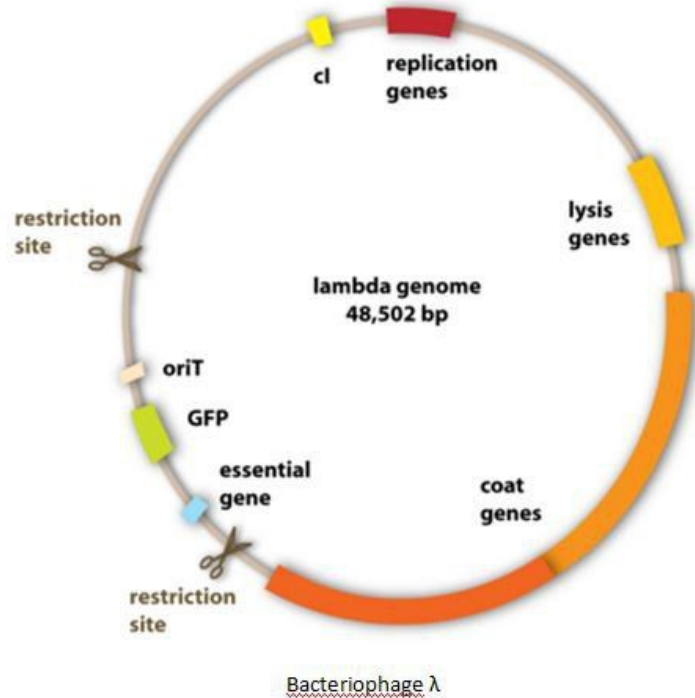
Determina la posició relativa dels llocs de tall amb un altre en la molècula d'ADN. Això es realitza determinant les grandàries dels fragments generats per diferents combinacions de ER.



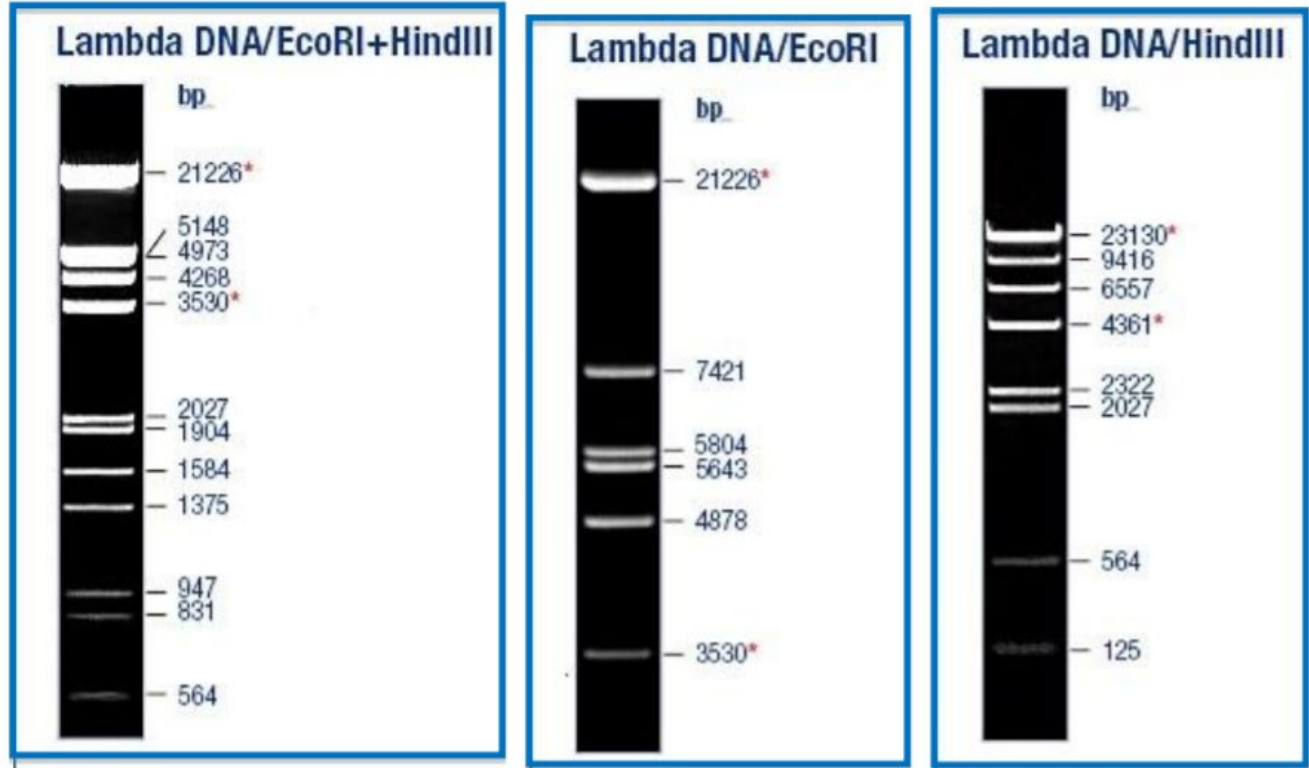
Mapa de restricció



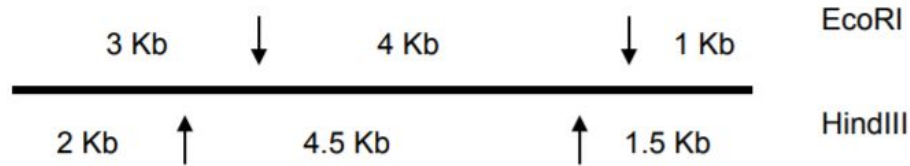
Mapa restricció Fag λ



Mapa restricció Fag λ - Digestió

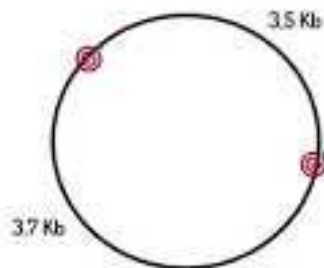


Problema 1. Un gen clonado muestra el siguiente mapa de restricción para las enzimas EcoRI y HindIII:

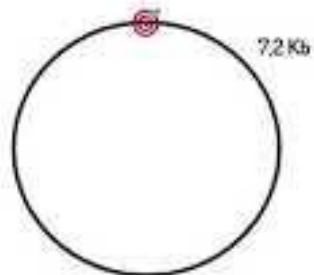


- Dibujar los patrones de los fragmentos de ADN esperados con cada enzima al separar los fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa. Hacer lo mismo para el caso de la digestión doble.
- Dibujar el patrón esperado para una copia mutante del gen que ha perdido el primero de los cortes de EcoRI
- Dibujar el patrón esperado para una copia mutante del gen en la que ha aparecido una nueva diana para HindIII en el centro del fragmento de 2Kb.

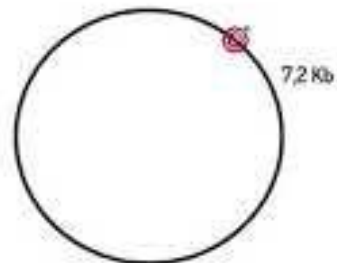
El plásmido pAI21 se cortó con diferentes enzimas de restricción y se observaron las siguientes bandas en un gel de agarosa: BamHI (3,7 Kb, 3,5Kb), PvuII (7,2Kb), HindIII (7,2Kb), BamHI+PvuII (3,5Kb, 2,4Kb, 1,3Kb), PvuII+HindIII (3,6Kb). Dibuja el mapa de restricción del plásmido.



Bam HI



Pvu II



Hind III