

INGENIERÍA GENÉTICA

VOLUMEN I

Preparación, análisis, manipulación
y clonaje de DNA

PROYECTO EDITORIAL
CIENCIAS BIOLÓGICAS

Directores:
Benjamín Fernández
Juan-Ramón Lacadena

INGENIERÍA GENÉTICA

VOLUMEN I

Preparación, análisis, manipulación
y clonaje de DNA

Julián Perera

*Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, I,
de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense*

Antonio Tormo

*Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, I,
de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense*

José Luis García

*Profesor de Investigación del Centro de Investigaciones Biológicas
del Consejo Superior de Investigaciones Científicas*



**EDITORIAL
SINTESIS**

Consulte nuestra página web: www.sintesis.com
En ella encontrará el catálogo completo y comentado

© Julián Perera
Antonio Tormo
José Luis García

© EDITORIAL SÍNTESIS, S. A.
Vallehermoso, 34 - 28015 Madrid
Tel.: 91 593 20 98
<http://www.sintesis.com>

Reservados todos los derechos. Está prohibido, bajo las sanciones penales y el resarcimiento civil previstos en las leyes, reproducir, registrar o transmitir esta publicación, íntegra o parcialmente por cualquier sistema de recuperación y por cualquier medio, sea mecánico, electrónico, magnético, electroóptico, por fotocopia o por cualquier otro, sin la autorización previa por escrito de Editorial Síntesis, S. A.

Depósito Legal: M-15.379-2002
ISBN: 84-7738-964-0
ISBN Obra completa: 84-7738-966-7

Impreso en España - Printed in Spain

ÍNDICE

Prólogo	15
<hr/>	
1. Ingeniería Genética: una panorámica general	17
<hr/>	
1.1. Aislamiento y caracterización de ácidos nucleicos	19
1.2. Los ácidos nucleicos como soporte de la información genética	19
1.3. Manipulación <i>in vitro</i> de ácidos nucleicos	20
1.4. Las enzimas como herramientas para el trabajo con ácidos nucleicos	22
1.5. Clonaje de DNA en sistemas celulares	22
1.6. Papeles de la célula en la Ingeniería Genética. Sistemas hospedadores	23
1.6.1. <i>Escherichia coli</i> y otros hospedadores procariotas	24
1.6.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y otras levaduras	25
1.6.3. Líneas celulares	25
1.7. Expresión <i>in vivo</i> de DNA en células heterólogas	26
1.8. Mecanismo de la expresión génica	26
1.9. Un caso real: "La prehistoria de la Ingeniería Genética"	28
1.10. Más sobre el tema: "Desde el genoma humano hasta la vida en su mínima expresión"	29
Resumen	30
Problemas	31
<hr/>	
2. Procedimientos preparativos de ácidos nucleicos	39
<hr/>	
2.1. Definición del experimento: objetivo y material de partida	39
2.2. Estrategia general y etapas del procedimiento de preparación	40
2.2.1. Homogeneización	40
2.2.2. Separación y purificación	41
2.3. Precauciones generales	44
2.4. Procedimientos preparativos particulares	45
2.4.1. Preparación de DNA de plásmidos bacterianos en pequeña escala (<i>miniprep</i>)	45
2.4.2. Preparación de DNA de bacteriófagos a partir de un lisado celular	47
2.4.3. Preparación de DNA total a partir de un cultivo celular	47
2.4.4. Preparación de RNA celular total	47
2.4.5. Preparación de diferentes fracciones de RNA (poli (A) ⁺ , mRNA, etc.)	47
2.5. Un caso real: "El secreto de la momia"	48
2.6. Más sobre el tema: "Aislamiento de DNA de muestras difíciles"	50
Resumen	52
Problemas	52

3. Métodos generales de análisis de ácidos nucleicos 57

3.1. Niveles analíticos	57
3.2. Espectrofotometría ultravioleta	58
3.3. Fluorescencia	60
3.4. Electroforesis: generalidades	61
3.5. Electroforesis en gel de agarosa	63
3.5.1. Preparación de un gel de agarosa, desarrollo de la electroforesis y visualización de bandas	63
3.5.2. Concentración y tipos de agarosa	66
3.5.3. Factores que influyen en el resultado de la electroforesis	67
3.6. Otros tipos de electroforesis en geles de agarosa	69
3.6.1. Electroforesis en geles desnaturizantes de agarosa	69
3.6.2. Electroforesis en campo pulsado (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE</i>)	70
3.6.3. Electroforesis preparativa	70
3.7. Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>PAGE</i>)	71
3.8. Un caso real: “Los polvos mágicos o si no lo veo, no lo creo”	73
3.9. Más sobre el tema: “Haciendo mapas”	74
Resumen	76
Problemas	76

4. Técnicas de hibridación de ácidos nucleicos 83

4.1. Desnaturalización y renaturalización de estructuras bicatenarias	84
4.2. Hibridación entre ácidos nucleicos	88
4.3. Transferencia de cadenas de ácidos nucleicos a soportes sólidos	91
4.3.1. Transferencia del DNA de colonias bacterianas y de halos de lisis	92
4.3.2. Transferencia de DNA o RNA de bandas electroforéticas	94
4.4. Marcaje e hibridación de sondas a ácidos nucleicos inmovilizados en soportes	96
4.5. Aplicaciones de la hibridación	99
4.6. Microchips de DNA	100
4.7. Un caso real: “Los puntos cardinales”	101
4.8. Más sobre el tema: “Los chips bioelectrónicos”	102
Resumen	104
Problemas	105

5. Fragmentación de ácidos nucleicos. Endonucleasas de restricción 115

5.1. Fragmentación de ácidos nucleicos. Especificidad y objetivos	116
5.2. Métodos de rotura de ácidos nucleicos	117
5.3. Sistemas de restricción-modificación bacterianos (sistemas R-M)	120
5.4. Endonucleasas de restricción tipo II: dianas o sitios de restricción	123
5.4.1. Nomenclatura	123
5.4.2. Dianas de restricción	123

5.4.3. Puntos de rotura en la diana	125
5.4.4. Endonucleasas de especificidad relajada	126
5.4.5. Isosquizómeros	128
5.4.6. Actividad “estrella”	128
5.5. Digestión con enzimas de restricción: restricción <i>in vitro</i> de DNA	128
5.6. Un caso real: “Las tijeras del DNA”	131
5.7. Más sobre el tema: “Otras enzimas de restricción”	132
Resumen	133
Problemas	134

6. Análisis de restricción **143**

6.1. Análisis de fragmentos de restricción	144
6.2. Mapas de restricción	145
6.2.1. Digestión doble	146
6.2.2. Digestión parcial	148
6.2.3. Digestión progresiva con Bal31	150
6.2.4. Digestión parcial de un DNA marcado en un extremo	151
6.2.5. Solapamiento de fragmentos por hibridación	153
6.2.6. Problemas y ambigüedades	155
6.2.7. Aplicaciones	156
6.3. Análisis de polimorfismos de restricción (RFLPs)	156
6.3.1. Diagnóstico de enfermedades genéticas	157
6.3.2. Análisis genético de hemoglobinopatías	157
6.3.3. Diagnóstico de la anemia falciforme por RFLP	159
6.4. Análisis de la localización de secuencias repetidas (<i>huella genética</i>)	160
6.5. Un caso real: “Tras la huella”	162
6.6. Más sobre el tema: “El registro de los análisis de restricción”	164
Resumen	165
Problemas	166

7. Modificación *in vitro* de ácidos nucleicos **181**

7.1. Actividades para el recorte o degradación de secuencias: nucleasas	182
7.2. Actividades para la construcción o síntesis de secuencias: polimerasas	191
7.3. Otras actividades enzimáticas	202
7.4. Síntesis de cDNA	207
7.4.1. Síntesis de la primera cadena del cDNA	208
7.4.2. Síntesis de la segunda hebra del cDNA	208
7.5. Un caso real: “El fin del dogma”	211
7.6. Más sobre el tema: “Nuevas enzimas”	213
Resumen	214
Problemas	215

8. Amplificación de secuencias de DNA. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	223
<hr/>	
8.1. Fundamento de la técnica	223
8.2. Condiciones de la reacción	226
8.3. Componentes de la reacción	227
8.3.1. Cebadores	227
8.3.2. DNA-polimerasa termoestable	229
8.3.3. Secuencia a amplificar o secuencia blanco (<i>target sequence</i>)	229
8.4. Limitaciones de la técnica	230
8.5. Clonaje de los productos de PCR	230
8.6. Aplicaciones de la amplificación de secuencias por PCR	231
8.6.1. Detección de secuencias	231
8.6.2. Producción de grandes cantidades de una región específica de DNA	232
8.6.3. Producción de sondas	233
8.6.4. Producción de fragmentos de DNA monohebra por PCR asimétrica	233
8.6.5. Reconstrucción y amplificación de DNA a partir de muestras parcialmente degradadas	234
8.6.6. Síntesis de genes	234
8.6.7. Producción de secuencias con incorporación de modificaciones	235
8.6.8. Aislamiento de secuencias adyacentes mediante PCR inversa	239
8.6.9. Amplificación de secuencias de RNA por retrotranscripción y PCR (RT-PCR)	239
8.6.10. Amplificación de secuencias al azar con cebadores arbitrarios	243
8.6.11. Valoración de DNA mediante detección por PCR cuantitativa	244
8.7. Otros sistemas de amplificación	245
8.8. Un caso real: "La posición 16169 o el caso de la familia Romanov"	245
8.9. Más sobre el tema: "Mejoras de la técnica: LA-PCR y el <i>Hot Start</i> "	247
Resumen	248
Problemas	249
9. Unión enzimática de fragmentos de DNA	257
<hr/>	
9.1. Unión enzimática de fragmentos de DNA	258
9.2. DNA-ligasas	260
9.3. Extremos de los fragmentos a unir	261
9.3.1. Extremos protuberantes iguales obtenidos por digestión con la misma enzima	261
9.3.2. Terminales compatibles obtenidos por digestión con enzimas diferentes	261
9.3.3. Extremos romos	262
9.4. Modificación de extremos	263
9.4.1. Modificación del estado de fosforilación de los extremos	263

9.4.2. Conversión de terminales protuberantes en terminales romos	264
9.4.3. Conversión de terminales romos en extremos protuberantes	265
9.4.4. Relleno parcial (<i>partial filling</i>) de terminales protuberantes en 5'	266
9.5. <i>Linkers</i> y adaptadores	267
9.6. Consideraciones del proceso de ligado	268
9.6.1. Factores que afectan al rendimiento del proceso	269
9.6.2. Orientación en la unión de los fragmentos	271
9.7. Un caso real: "El primer gen sintético"	271
9.8. Más sobre el tema: "El sistema LIC"	273
Resumen	275
Problemas	276
10. Clonaje de DNA recombinante. Esquema general	283
<hr/>	
10.1. Panorámica general de la tecnología del clonaje de DNA	283
10.2. El DNA pasajero	285
10.3. El DNA vector	287
10.3.1. Tipos de DNA vector	287
10.3.2. Condiciones de un vector	288
10.4. El DNA recombinante	289
10.5. La célula hospedadora	289
10.5.1. Características de un hospedador	290
10.6. Transferencia de DNA a la célula hospedadora	291
10.7. Análisis de clones	292
10.7.1. Selección de transformantes	292
10.7.2. Detección de recombinantes	293
10.7.3. Identificación de clones (<i>screening</i> de bibliotecas)	294
10.8. Expresión de genes clonados	294
10.9. Logros y aplicaciones generales de la tecnología del clonaje de DNA	295
10.10. Un caso real: "El nacimiento de la Ingeniería Genética"	296
10.11. Más sobre el tema: "La electroporación"	298
Resumen	299
Problemas	300
11. Vectores derivados de plásmidos para el clonaje de DNA en <i>Escherichia coli</i>	307
<hr/>	
11.1. Plásmidos bacterianos	308
11.1.1. Replicación plasmídica: grupos de incompatibilidad	308
11.1.2. Replicación plasmídica: número de copias del plásmido	309
11.1.3. Transmisión horizontal y rango de hospedador	310
11.2. Aspectos prácticos del trabajo con plásmidos	311
11.3. Vectores derivados de plásmidos para el clonaje en <i>E. coli</i>	312
11.4. Métodos de transferencia de DNA plasmídico a células de <i>E. coli</i>	313
11.5. Procedimientos de selección de clones transformados	314
11.6. Replicación y mantenimiento de plásmidos	315

11.7.	Clonaje en vectores plasmídicos	316
11.7.1.	Preparación del vector y síntesis del recombinante	316
11.7.2.	Estirpes bacterianas utilizadas con vectores plasmídicos	319
11.8.	Serie pBR de vectores	320
11.8.1.	Inactivación por inserción	321
11.9.	Serie pUC de vectores	323
11.9.1.	Identificación cromogénica de clones recombinantes	327
11.10.	Otros vectores derivados de plásmidos	333
11.10.1.	Vectores con bancos de sitios de restricción	333
11.10.2.	Vectores de bajo número de copias	333
11.10.3.	Vectores de muy alto número de copias	334
11.10.4.	Vectores con sistemas para la selección positiva del recombinante	334
11.10.5.	Vectores para el clonaje de promotores	335
11.10.6.	Vectores para la transcripción <i>in vitro</i> de DNA clonado	335
11.10.7.	Vectores de expresión <i>in vivo</i>	335
11.10.8.	Vectores mixtos	336
11.10.9.	Vectores integrativos	336
11.11.	Un caso real: "Un plásmido para la historia o la historia de un plásmido"	338
11.12.	Más sobre el tema: "Vectores curiosos"	340
	Resumen	341
	Problemas	342

12. Vectores derivados del bacteriófago λ **349**

12.1.	Biología molecular del fago λ	350
12.1.1.	Primeras fases de la infección y genoma del fago λ	350
12.1.2.	El ciclo lítico y la regulación "en cascada" de la expresión génica en λ	351
12.1.3.	Replicación del DNA de λ , producción de viriones y lisis celular	353
12.1.4.	Ciclo lisogénico	356
12.2.	Trabajo con el bacteriófago λ y derivados	357
12.2.1.	Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas en el trabajo de clonaje con fagos λ	357
12.2.2.	Síntesis del recombinante y encapsidación de DNA	357
12.2.3.	Empaquetamiento <i>in vitro</i> de fagos	359
12.2.4.	Infección de células de <i>E. coli</i>	360
12.2.5.	Aislamiento de fagos a partir de placas de lisis	362
12.3.	Vectores de clonaje derivados del DNA del fago λ . Capacidad de transporte	363
12.3.1.	Sitios de clonaje	363
12.3.2.	Capacidad de clonaje	364
12.3.3.	Tipos de vectores	364
12.4.	Vectores de inserción	365
12.5.	Vectores de remplazamiento	368
12.6.	Cósmidos	377

12.6.1. Clonaje en cósmidos	379
12.6.2. Cósmidos para el clonaje en bacterias	381
12.6.3. Cósmidos lanzadera (<i>shuttle</i>) para el trabajo en células eucariotas	385
12.6.4. Carómidos	386
12.7. Un caso real: "La combinatoria"	386
12.8. Más sobre el tema: "Minitransposones"	388
Resumen	390
Problemas	392

13. Biotecas, bancos génicos y aislamiento de secuencias **399**

13.1. Objetivos de la construcción de una biblioteca	401
13.2. Tipos de bibliotecas o bancos génicos	401
13.3. Bibliotecas genómicas	402
13.3.1. Fragmentación de un DNA para la preparación de una genoteca	403
13.3.2. Vectores usados en la construcción de bibliotecas genómicas	404
13.3.3. Amplificación y conservación de una biblioteca	406
13.4. Estudio de grandes regiones genómicas	407
13.4.1. Paseo cromosómico (<i>chromosome walking</i>)	408
13.4.2. Salto cromosómico (<i>chromosome jumping</i>)	408
13.5. Bibliotecas de cDNA	410
13.5.1. Representatividad y enriquecimiento de bibliotecas de cDNA	411
13.5.2. Preparación del cDNA pasajero	411
13.5.3. Vectores utilizados en la construcción de bibliotecas de cDNA	412
13.6. Bibliotecas de expresión	413
13.6.1. Vectores utilizados en la construcción de bibliotecas de expresión	413
13.6.2. Bibliotecas de expresión genómicas y de cDNA	414
13.7. Análisis de una biblioteca (<i>screening</i>)	414
13.8. Análisis de una biblioteca por hibridación con una sonda marcada	415
13.8.1. Selección de cDNAs específicos de tejido por hibridación sustractiva	416
13.8.2. Estudio de la expresión de genes por hibridación diferencial	417
13.9. Análisis de una biblioteca con anticuerpos (<i>immunoscreening</i>)	418
13.10. Análisis de una biblioteca por detección de la actividad del producto codificado	419
13.10.1. Aislamiento de genes por complementación de mutantes bacterianos	419
13.10.2. Aislamiento de genes de resistencia	419
13.10.3. Aislamiento por ensayos de actividad	420
13.11. Análisis de una biblioteca con sondas de unión específica a proteínas (<i>southwestern</i>)	420

13.12. Aislamiento de clones por subdivisión de la biblioteca	420
13.12.1. Aislamiento de clones por selección con híbrido (<i>hybrid selection o hybrid released translation;</i> <i>hybrid arrested translation</i>)	421
13.12.2. Aislamiento de clon por detección de actividad biológica	421
13.13. Confirmación del recombinante aislado	422
13.14. Un caso real: “La primera genoteca”	423
13.15. Más sobre el tema: “Desde la proteína al gen”	424
Resumen	426
Problemas	427

14. Vectores derivados de fagos filamentosos **443**

14.1. Ciclo biológico de los bacteriófagos filamentosos	443
14.2. Aspectos prácticos del trabajo con el fago M13 y sus derivados	446
14.3. Líneas generales para el diseño de vectores derivados del fago M13	449
14.4. Vectores de la serie mp	449
14.5. Estirpes hospedadoras para vectores derivados de M13	451
14.6. Clonaje en estirpes de <i>E. coli</i> con vectores derivados del fago M13	452
14.6.1. Preparación del DNA del fago M13 y de sus vectores derivados	452
14.6.2. Manipulación del DNA de vectores derivados de M13	453
14.6.3. Transfección de bacterias competentes y aislamiento de placas de M13	453
14.6.4. Detección y análisis de recombinantes	453
14.6.5. Problemas que pueden aparecer en el clonaje con fagos M13	454
14.7. Fagómidos	454
14.7.1. Ciclo infectivo	455
14.7.2. Aspectos prácticos	456
14.7.3. Ventajas, inconvenientes y aplicaciones	456
14.7.4. Ejemplo de algunos fagómidos	457
14.7.5. Fagos ayudantes	458
14.8. Un caso real: “M13, un bacteriófago con nombre de servicio secreto”	459
14.9. Más sobre el tema: “Los fagos como sistemas de presentación de péptidos y proteínas (<i>phage display</i>)”	462
Resumen	463
Problemas	464

15. Secuenciación de DNA y análisis de datos **471**

15.1. Determinación de la secuencia de nucleótidos de un DNA	472
15.2. Método de secuenciación basado en la rotura química del DNA	472
15.3. Método de secuenciación basado en el uso de terminadores de cadena	475

15.3.1. Elementos de la reacción	477
15.3.2. Secuenciación termocíclica	480
15.4. Estrategias de secuenciación	480
15.4.1. Secuenciación <i>de novo</i>	480
15.4.2. Secuenciación para la confirmación de datos	483
15.4.3. Otros factores a tomar en consideración	483
15.5. Secuenciación automática de DNA	485
15.6. Aplicación de programas y sistemas informáticos al manejo y gestión de datos de secuencia	486
15.7. Confirmación experimental de predicciones	488
15.7.1. Confirmación de la funcionalidad de una ORF	489
15.7.2. Estudio de unidades transcripcionales mono o policistrónicas	489
15.7.3. Definición del comienzo de una unidad transcripcional (sitio +1)	489
15.7.4. Estudio de la región promotora	491
15.7.5. Estudios de interacción proteína-DNA	492
15.8. Un caso real: "Secuenciación a partir del DNA celular total"	494
15.9. Más sobre el tema: "Nuevas técnicas de secuenciación; la pirosecuenciación"	495
Resumen	496
Problemas	498

16. Mutagénesis de un fragmento de DNA clonado **505**

16.1. Mutagénesis simple dirigida sobre un fragmento de DNA clonado	506
16.2. Mutagénesis dirigida por oligonucleótidos	506
16.2.1. Etapas del procedimiento	507
16.2.2. Eficacia del método	510
16.3. Mutagénesis dirigida mediante PCR	512
16.4. Supresión de mutaciones ámbar	513
16.5. Construcción de un conjunto progresivo de mutantes de delección	513
16.6. Mutagénesis por inserción aleatoria de un <i>linker</i>	517
16.7. Mutagénesis al azar	519
16.8. Un caso real: "Una enzima destinada a ser modificada"	519
16.9. Más sobre el tema: "Barajando el DNA"	520
Resumen	522
Problemas	522