

# **INGENIERÍA GENÉTICA**

VOLUMEN II  
Expresión de DNA  
en sistemas heterólogos

PROYECTO EDITORIAL  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

Directores:  
*Benjamín Fernández*  
*Juan-Ramón Lacadena*

# **INGENIERÍA GENÉTICA**

## **VOLUMEN II** **Expresión de DNA** **en sistemas heterólogos**

**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  
SÍNTESIS**

Consulte nuestra página web: [www.sintesis.com](http://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-15.392-2002  
ISBN: 84-7738-965-9  
ISBN Obra completa: 84-7738-966-7

Impreso en España - Printed in Spain

# ÍNDICE

<b>Prólogo</b>	<b>13</b>
<hr/>	
<b>1. Elementos de la expresión génica en bacterias. Transcripción y traducción <i>in vitro</i> de genes clonados</b>	<b>15</b>
<hr/>	
1.1. Expresión génica en procariotas: moldes, señales y maquinaria molecular	16
1.1.1. Molécula molde, unidad transcripcional y región codificadora	16
1.1.2. Señales de expresión en procariotas	18
1.1.3. Maquinaria enzimática	20
1.1.4. Especificidad de los sistemas de expresión	20
1.1.5. Uso y manipulación de señales de expresión	21
1.1.6. Aplicaciones generales de la expresión de secuencias clonadas	21
1.2. Transcripción <i>in vitro</i> de genes clonados	22
1.2.1. Aplicaciones	26
1.3. Traducción <i>in vitro</i> de RNA	27
1.4. RNAs moldes para la traducción <i>in vitro</i>	29
1.4.1. mRNAs procariotas	29
1.4.2. mRNAs eucariotas	29
1.4.3. Traducción de mensajeros seleccionados por hibridación	30
1.5. Expresión de secuencias en sistemas celulares	32
1.5.1. Sistemas de maxicélulas y de minicélulas	33
1.5.2. Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	33
1.6. Un caso real: "La escuela de traductores"	33
1.7. Más sobre el tema: "El sistema Spirin"	35
Resumen	36
Problemas	37
<hr/>	
<b>2. Expresión <i>in vivo</i> de secuencias clonadas</b>	<b>43</b>
<hr/>	
2.1. Promotores utilizados para la expresión de secuencias clonadas en <i>E. coli</i>	44
2.2. Relación entre el número de copias del promotor y los niveles de represor	48
2.3. Terminadores de la transcripción	49
2.4. Sitio de unión al ribosoma ( <i>ribosome binding site</i> , RBS)	49

2.5. Tipos de secuencias a expresar	50
2.6. Vectores para la expresión de secuencias en <i>E. coli</i>	52
2.6.1. Vectores con señales de transcripción	52
2.6.2. Vectores con todas las señales de expresión y un sitio de clonaje interno en una ORF	53
2.6.3. Vectores de expresión con sitio de clonaje inmediato a un ATG iniciador	56
2.7. Producción de proteínas de fusión	58
2.8. Un caso real: "Esto es la guerra"	64
2.9. Más sobre el tema: "Proteasas específicas"	66
Resumen	68
Problemas	70

### **3. Producción de proteínas en cultivos de *E. coli*** **81**

---

3.1. Naturaleza del promotor	82
3.2. Número de copias del plásmido	82
3.3. Estabilidad del plásmido	83
3.4. Integración del DNA a expresar en el cromosoma celular	84
3.5. Estabilidad del mRNA	85
3.6. Estructura tridimensional del mRNA	87
3.7. Sitio de unión para el ribosoma (RBS)	87
3.8. Efecto del uso de codones	87
3.9. Plegamiento de la cadena polipeptídica	89
3.10. Estabilidad de la proteína sintetizada	89
3.11. Modificación post-traducciona	90
3.12. Secreción de proteínas	91
3.13. Sobrecarga metabólica	92
3.14. Otros factores que influyen en el rendimiento de la producción de proteínas	93
3.15. Producción de proteínas "recombinantes" en cultivos bacterianos	94
3.15.1. Agentes terapéuticos	94
3.15.2. Otros productos comerciales	95
3.16. Producción de "nuevas" proteínas. Ingeniería de proteínas	96
3.17. Un caso real: "Una hormona sintética"	97
3.18. Más sobre el tema: "Los otros promotores"	98
Resumen	100
Problemas	102

### **4. Ingeniería Genética en bacterias distintas a *E. coli*** **109**

---

4.1. Clonaje de DNA en bacterias diferentes a <i>E. coli</i>	109
4.2. Clonaje en bacterias Gram-negativas diferentes a <i>E. coli</i>	111
4.2.1. Vectores de amplio espectro de hospedador	111
4.2.2. Vectores derivados de RSF1010	112
4.2.3. Vectores derivados de RP4	113
4.2.4. Vectores derivados de transposones	114

4.2.5. Clonaje en <i>Pseudomonas</i>	114
4.3. Clonaje en bacterias Gram-positivas. Clonaje en <i>Bacillus subtilis</i>	116
4.3.1. Transferencia de DNA a <i>B. subtilis</i>	116
4.3.2. Vectores de clonaje en <i>B. subtilis</i>	117
4.3.3. Destino del DNA clonado	118
4.3.4. Vectores derivados de bacteriófagos	120
4.3.5. Vectores de expresión	120
4.4. Clonaje de DNA en bacterias Gram-positivas diferentes a <i>B. subtilis</i>	121
4.5. Un caso real: "La historia de un antibiótico azul"	122
4.6. Más sobre el tema: "Las LAB"	123
Resumen	124
Problemas	125

## **5. Modificación de bacterias por Ingeniería Genética. Construcción de nuevas cepas bacterianas** **133**

---

5.1. Construcción de cepas bacterianas productoras de compuestos de alto valor comercial	133
5.1.1. Construcción de cepas bacterianas productoras de índigo	133
5.1.2. Producción de ácido ascórbico a partir de cultivos bacterianos	135
5.1.3. Producción de aminoácidos	136
5.1.4. Síntesis de otros productos de alto valor comercial a partir de bacterias manipuladas	137
5.2. Construcción de bacterias de alta capacidad degradativa. Biodegradación	137
5.2.1. Manipulación genética puntual de rutas catabólicas	139
5.2.2. Complementación de rutas por transferencia de plásmidos	139
5.2.3. Complementación por transferencia de <i>cassettes</i> metabólicas. Ingeniería Metabólica	140
5.3. Construcción de microorganismos para la utilización de biomasa	141
5.3.1. Utilización de almidón	141
5.3.2. Utilización de celulosa	142
5.4. Construcción de bacterias insecticidas	143
5.5. Otros ejemplos de manipulación genética de microorganismos	144
5.6. Un caso real: "Creando una bacteria glotona"	145
5.7. Más sobre el tema: "Los microorganismos suicidas"	146
Resumen	148
Problemas	149

## **6. Clonaje y expresión de secuencias en levaduras** **159**

---

6.1. Clonaje en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	160
6.2. Procedimientos de transformación	161

6.3. Marcadores de selección	162
6.4. Vectores para el clonaje de DNA en <i>S. cerevisiae</i>	162
6.4.1. Vectores integrativos ( <i>yeast integrating plasmids, YIp</i> )	164
6.4.2. Integración por recombinación homóloga	164
6.4.3. Vectores plasmídicos derivados de episomas ( <i>yeast episomal plasmids, YEp</i> )	166
6.4.4. Vectores plasmídicos con secuencia ARS ( <i>yeast replicating plasmids, YRp</i> )	168
6.4.5. Vectores plasmídicos con secuencia CEN ( <i>yeast centromere plasmids, YCp</i> )	169
6.4.6. Cromosomas artificiales de levadura ( <i>yeast artificial chromosomes, YACs</i> )	169
6.4.7. Clonaje en YACs	169
6.4.8. Vectores pseudoretrovirales ( <i>retrovirus-like vectors</i> )	171
6.4.9. Elección de un vector de clonaje	173
6.5. Expresión en células de <i>S. cerevisiae</i>	173
6.5.1. Promotores de levadura	174
6.5.2. Efecto de la estructura primaria del mRNA	175
6.5.3. Estabilidad de proteínas	175
6.5.4. Secreción de proteínas	176
6.5.5. Modificación de proteínas	177
6.6. Clonaje en otras levaduras	177
6.7. Un caso real: "YACs, BACs, PACs y MACs"	178
6.8. Más sobre el tema: "El sistema del doble híbrido"	179
Resumen	181
Problemas	182

## **7. Ingeniería Genética en vegetales** **187**

---

7.1. La Ingeniería Genética aplicada a vegetales	187
7.2. Cultivo de tejidos vegetales	188
7.2.1. Cultivo de tejidos y obtención de callos	189
7.2.2. Cultivos líquidos en suspensión	190
7.2.3. Cultivos en medio sólido	190
7.2.4. Regeneración de una planta completa	190
7.2.5. Embriogénesis somática	191
7.3. Transferencia de DNA a células vegetales	191
7.3.1. Transformación de protoplastos	191
7.3.2. Transformación de discos de hojas	192
7.3.3. Infección con <i>Agrobacterium</i>	192
7.3.4. Transformación con precipitados de DNA	192
7.3.5. Electroporación	193
7.3.6. Transformación con microproyectiles (biolística)	193
7.4. Marcadores de selección	194
7.5. <i>Agrobacterium</i> como sistema de transferencia de DNA a células vegetales	194
7.5.1. <i>A. tumefaciens</i> y los tumores de agalla en corona	194
7.5.2. El plásmido Ti	195
7.5.3. El DNA T y los oncogenes	196



7.5.4. Los genes <i>vir</i> y la inducción del sistema	197
7.5.5. Transferencia e integración del DNA T	198
7.6. El plásmido Ti y el DNA T como sistema vector	199
7.6.1. Vectores desarmados de oncogenes y vectores intermediarios	199
7.6.2. Transferencia del DNA vector a la célula vegetal	200
7.6.3. Mecánica del proceso	202
7.6.4. El sistema de <i>A. tumefaciens</i> en monocotiledóneas	202
7.7. Otros sistemas vectores análogos	203
7.8. Vectores derivados de virus	203
7.8.1. Vectores derivados de geminivirus	204
7.8.2. Vectores derivados de caulimovirus	205
7.8.3. Vectores derivados de virus RNA	205
7.9. Transposones como mutágenos y marcadores para el clonaje de genes	206
7.10. Mutagénesis por DNA T	206
7.11. Expresión de secuencias clonadas en células vegetales	207
7.12. Aplicaciones comerciales de las plantas transgénicas	208
7.12.1. Construcción de plantas resistentes a herbicidas	209
7.12.2. Construcción de plantas resistentes a insectos	209
7.12.3. Construcción de plantas resistentes a virus	212
7.12.4. Construcción de plantas resistentes a bacterias y hongos patógenos	213
7.12.5. Plantas resistentes al estrés	213
7.12.6. Modificación del contenido nutricional de plantas	214
7.12.7. Modificación de la apariencia y el sabor de los alimentos vegetales	216
7.12.8. Manipulación de la pigmentación en flores	217
7.12.9. Obtención de plantas androestériles para la producción de semillas híbridas	218
7.12.10. Utilización de plantas para la síntesis de productos de valor comercial	218
7.13. Un caso real: "Aquí hay tomate"	219
7.14. Más sobre el tema: "Análisis de fragmentos"	220
Resumen	221
Problemas	222

## **8. Transferencia génica a células animales 233**

---

8.1. Cultivo de células animales: <i>líneas celulares</i>	233
8.2. Métodos de transferencia de DNA a células animales: <i>transfección</i>	234
8.2.1. Transfección con fosfato cálcico	235
8.2.2. Transfección con DEAE-dextrano	235
8.2.3. Fusiones celulares	236
8.2.4. Otros procedimientos	236
8.3. Cotransfección	237
8.4. Marcadores de transfección y de selección	237

8.4.1. El gen <i>tk</i> de la timidina-quinasa	238
8.4.2. El gen <i>XGPRT</i> de la xantina-guanina-fosforribosil-transferasa	241
8.4.3. El gen <i>apt</i> , Neo <sup>R</sup> o Km <sup>R</sup> de la aminoglicósido-fosfotransferasa	241
8.4.4. El gen <i>DHFR</i> de la dihidrofolato-reductasa	242
8.5. Destino del DNA exógeno: expresión transitoria	243
8.6. Destino del DNA exógeno: integración estable	244
8.7. Amplificación génica	245
8.8. Aislamiento (recuperación) de secuencias transfectadas	246
8.9. Sustitución dirigida de genes (reemplazamiento de alelos o <i>gene targeting</i> )	248
8.10. Uso de moléculas <i>antisentido</i> para apagar funciones	251
8.11. Un caso real: "Las bases moleculares del cáncer"	252
8.12. Más sobre el tema: "La importancia de la glicosilación de las proteínas"	254
Resumen	255
Problemas	257

## **9. Vectores para la transferencia de DNA a células animales** **263**

---

9.1. Vectores derivados de virus animales	263
9.2. Elementos funcionales en vectores para células animales	264
9.2.1. Secuencias procariotas	265
9.2.2. Señales de replicación en células eucariotas	265
9.2.3. Señales de expresión en células eucariotas	266
9.2.4. Marcadores de selección para células eucariotas	272
9.2.5. Genes testigo	272
9.2.6. Secuencias de DNA exógeno, extraño o pasajero	274
9.3. Sistemas de vectores para células de mamífero en cultivo	274
9.3.1. Vectores derivados de plásmidos bacterianos sin replicón eucariota	275
9.4. Vectores derivados del virus SV40	275
9.4.1. Vectores de reemplazamiento derivados de SV40	277
9.4.2. Vectores no infectivos derivados de SV40	279
9.4.3. Sistema SV40 / células COS	280
9.5. Vectores derivados de otros virus con DNA	282
9.5.1. Vectores derivados del virus del papiloma bovino	282
9.5.2. Derivados del virus Epstein-Barr	284
9.5.3. Derivados del virus de la vacuna	284
9.5.4. Derivados de baculovirus	285
9.5.5. Vectores derivados de adenovirus	286
9.6. Vectores retrovirales	287
9.6.1. Ciclo biológico de los retrovirus	287
9.6.2. Vectores derivados de retrovirus	289
9.6.3. Líneas celulares empaquetadoras	291
9.7. Un caso real: "El primer virus animal recombinante"	293

9.8. Más sobre el tema: "Nuevos vectores eucariotas"	294
Resumen	296
Problemas	297

## **10. Animales transgénicos. Terapia génica** **307**

---

10.1. Introducción de DNA en ovocitos y embriones de anfibios	308
10.1.1. Utilización de ovocitos de <i>Xenopus</i>	308
10.1.2. Inyección de mRNA y DNA en huevos fertilizados de <i>Xenopus</i>	309
10.2. Sistema de insectos	310
10.2.1. Elementos P de <i>Drosophila melanogaster</i>	310
10.2.2. Vectores derivados del elemento P	312
10.2.3. Mutagénesis y marcaje por transposón ( <i>transposon tagging</i> )	313
10.2.4. Vectores con trampa para potenciadores	314
10.3. Sistemas de mamíferos: animales transgénicos	315
10.3.1. Producción de animales transgénicos	315
10.3.2. Expresión de DNA en ratones transgénicos	319
10.4. Aplicaciones de los ratones transgénicos a la ciencia básica	321
10.4.1. Estudio del desarrollo	321
10.4.2. El ratón como sistema modelo de enfermedades humanas	321
10.4.3. El ratón transgénico como test	323
10.5. La transgénesis en la mejora animal	324
10.5.1. Mejora de la producción animal	324
10.5.2. Prevención de enfermedades	325
10.6. Los animales transgénicos como biorreactores para la producción de proteínas y otros compuestos de interés	326
10.6.1. Producción de proteínas exógenas en la leche	326
10.6.2. Producción de proteínas exógenas en la sangre	327
10.6.3. Producción de proteínas exógenas en el huevo de ave	327
10.6.4. Producción de órganos para transplantes	328
10.7. Nuevas terapias contra enfermedades humanas: terapia génica	328
10.7.1. Terapia génica en animales	331
10.7.2. Terapia génica de células somáticas en humanos	333
10.8. Terapia génica <i>ex vivo</i>	333
10.8.1. Célula vector	334
10.8.2. Células de la médula ósea	335
10.8.3. Otros tipos de células vectoras	336
10.8.4. Sistemas vectores no inmunogénicos	337
10.9. Terapia génica <i>in vivo</i>	337
10.9.1. Vectores retrovirales	338
10.9.2. Otros vectores virales	339
10.9.3. Sistemas no virales de liberación de genes	340
10.9.4. Terapia con genes suicidas	341
10.10. Ácidos nucleicos como agentes terapéuticos	341

10.10.1. Moléculas antisentido	342
10.10.2. Oligonucleótidos que se unen a proteínas	344
10.10.3. Ribozimas	344
10.11. Oligonucleótidos como herramientas para la corrección de errores genéticos	344
10.12. Un caso real: “La leche transgénica”	346
10.13. Más sobre el tema: “La oveja Dolly”	347
Resumen	349
Problemas	351
<b>11. Regulación de la experimentación en Ingeniería Genética. Bioseguridad y patentes. Bioética</b>	<b>361</b>
<hr/>	
11.1. La experimentación en Ingeniería Genética: breves apuntes históricos	361
11.2. Bioseguridad	363
11.2.1. Las normativas de bioseguridad	363
11.2.2. La legislación europea	364
11.2.3. La legislación española	367
11.3. Patentes	368
11.3.1. Las patentes biotecnológicas	368
11.3.2. Las patentes y el progreso	369
11.3.3. ¿Qué es una patente?	369
11.3.4. Tipos de patentes	371
11.3.5. Breves apuntes de historia	372
11.3.6. Requisitos de patentabilidad	373
11.3.7. Contenido y forma de una patente	374
11.3.8. Suficiencia de la descripción y reproducibilidad	374
11.3.9. Las patentes de productos naturales	375
11.3.10. Las patentes de microorganismos	375
11.3.11. Las patentes de plantas	375
11.3.12. Las patentes de animales	375
11.3.13. La patentabilidad del genoma humano	377
11.3.14. La Directiva europea 98/44 sobre patentes biotecnológicas	377
11.4. Un caso real: “El onco-ratón. Un conflicto entre las patentes y los derechos de los animales a la experimentación”	377
11.5. Más sobre el tema: “ <i>Manipulación genética y bioética</i> ”, por Juan-Ramón Lacadena	380
Problemas	390
<b>Apéndice</b>	<b>393</b>
<hr/>	