



TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DEL ADN CON DIFERENTES FINES

En 1973 los investigadores Stanley Cohen y Herbert Boyer producen el primer organismo recombinando partes de su ADN en lo que se considera el comienzo de la ingeniería genética. En 1997 se clona el primer mamífero, la Oveja Dolly.

La **ingeniería genética** podría definirse como el conjunto de técnicas que permiten la manipulación y transferencia de ADN de un organismo a otro, posibilitando la modificación de especies, la corrección de defectos genéticos y la fabricación de numerosas sustancias químicas por seres vivos a partir de las modificaciones en sus genomas. Sus métodos de trabajo son también conocidos como **técnicas del ADN recombinante**.

Un campo muy relacionado con el anterior es el de la **biotecnología** que puede definirse como la utilización de seres vivos para la obtención de productos: "*toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos*" Cuando se habla de creación de productos hay que entender que no nos referimos a que un manzano dé manzanas o una vaca dé leche. Pero si una semilla contiene, por ejemplo, una vitamina en gran proporción porque la planta ha sido modificada introduciéndole genes de esa vitamina, o si la leche lleva una hormona humana como la del crecimiento porque fue introducido el gen de dicha hormona en un preembrión de vaca, entonces sí podemos hablar de biotecnología. En realidad, la biotecnología lleva haciéndose desde el neolítico: cuando se deja la leche en manos de bacterias para que hagan yogur, o cuando se utilizan levaduras para hacer crecer el pan o para fabricar vino. Hay que decir que la biotecnología actual aprovecha los avances de la ingeniería genética para que los organismos (mayoritariamente microbios) trabajen para nosotros fabricando nuevos productos o mejorando en algún aspecto los que de forma natural ya sintetizaban.

Las técnicas de ingeniería genética consisten en tomar fragmentos de ADN de distintos organismos que codifiquen alguna proteína de interés (genes) y unirlos fuera de ellos a otro ADN de un **vector** (se definirá más adelante), proceso denominado como «recombinación in vitro», y conociéndose como **ADN recombinante** al así formado. Este ADN es introducido (por el vector) y colocado en una célula receptora, en la cual, dada la universalidad del código genético, se logra la expresión de los genes contenidos en ese fragmento manipulado e insertado. Hay veces en que la proteína producida por la célula a partir de información extraña cobra valor por sí misma, como es el caso de una hormona en una aplicación médica (insulina por ejemplo), mientras que otras veces modifica el metabolismo de la célula receptora, produciendo efectos positivos para la misma (mayor productividad en una planta por ejemplo) [El primer caso puede ser el de la bacteria *Escherichia coli*, modificada genéticamente y empleada a escala industrial como productora de insulina humana y el segundo ejemplo puede ser el del maíz transgénico, que contiene un gen bacteriano que codifica una toxina insecticida].

La ingeniería genética tiene muchos campos de actuación, pero para cualquiera de ellos es importante conseguir los siguientes objetivos:

- **Obtención de fragmentos de ADN.**
- **Obtención de copias de estos fragmentos de ADN**, en cantidad suficiente para poder ser estudiados o manipulados (clonación génica).
- **Identificación de determinados fragmentos de ADN** o mejor dicho: poder saber si en un ADN (por ejemplo el genoma de una persona) hay un determinado gen defectuoso o no.

- **Determinación de la secuencia de nucleótidos** de fragmentos de ADN. (No es lo mismo que el caso anterior). En este caso se trata de conocer el orden de los nucleótidos en una molécula de ADN. En el año 2000 se descifró la secuencia del genoma humano y desde entonces son múltiples los organismos analizados.

Antes de empezar hay que decir que la ingeniería genética emplea aparatos muy sofisticados sin los cuales no sería posible llevar a cabo la manipulación del ADN, pero la base fundamental no son estas herramientas y máquinas artificiales sino las que podríamos llamar "bioherramientas": las enzimas. Hay enzimas de muchos tipos, unas cortan el ácido nucleico (nucleasas), otras pegan fragmentos (ligasas), otras unen nucleótidos (polimerasas)... sin la ayuda de la naturaleza, no servirían de nada las máquinas más complejas construidas por los humanos.

OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

Para muchas aplicaciones puede resultar de utilidad contar con fragmentos de ADN. Desde trabajar con ellos para secuenciarlos a conseguir sólo algunos genes para poder luego insertarlos en otro organismo. Hay diferentes maneras de conseguirlos:

1. Por enzimas de restricción

El ADN de cualquier organismo puede ser cortado en fragmentos lo suficientemente cortos para ser analizados y manipulados, simplemente empleando ultrasonidos, o también empleando enzimas endonucleasas, pero hay un método más sofisticado que utiliza las llamadas **enzimas de restricción o restructasas**. Estas enzimas son endonucleasas presentes en muchas bacterias y que tienen la función de cortar el ADN extraño que penetra en la célula. Pero lo más llamativo de estas enzimas es que cortan el ácido nucleico por sitios específicos denominados **secuencias de reconocimiento**, formadas por secuencias de cuatro a ocho pares de bases, que, en la bacteria original, están protegidas [metilación] para evitar que se destruya el ADN propio. Estas enzimas, que actúan como auténticas «tijeras biológicas», cortan el ADN de forma que en cada extremo queda un trozo de hebra monocatenaria formada por las bases de la secuencia de reconocimiento. Estos, se denominan **extremos adherentes o cohesivos**, ya que es por ellos por donde se pueden unir a otros fragmentos de ADN cortados por la misma enzima de restricción, al ser sus bases complementarias.

[Los fragmentos obtenidos se pueden separar por tamaños, es decir, según el número de pares de nucleótidos que llevan mediante la técnica de **electroforesis**, y así estudiarlos. Según donde se hallen las secuencias de reconocimiento, un gen determinado puede estar fragmentado en varios trozos, o bien un trozo puede contener varios genes, posibilidades que hay que confirmar. La electroforesis se tratará al final del tema].

Las restructasas se supone que son auténticas armas defensivas frente a las infecciones víricas a las que están expuestas las bacterias, pero también les sirven para incorporar ADN del medio procedente de otras bacterias. Los extremos cohesivos permiten incluir fragmentos dentro del propio genoma bacteriano. Estas enzimas son exclusivamente de origen bacteriano, se han aislado ya unas 800 diferentes y algunas de ellas se producen y comercializan industrialmente.

No dejes de echar un vistazo a esta página, te venden lo que quieras:

<http://www.jenabioscience.com/>

Todas ellas tienen además en común que reconocen secuencias que se leen igual de izquierda a derecha en una cadena que de dcha. a izda., en la cadena complementaria. Estas secuencias tan particulares se denominan **palíndromos**.

5'.....GAATTC.....3' ANA; ANILINA.

3'.....CTTAAG.....5' "DÁBALE ARROZ A LA ZORRA EL ABAD"

<http://www.juegosdepalabras.com/palindromo.htm>



2. Por retrotranscriptasas

Normalmente es muy difícil localizar y aislar dentro de una molécula de ADN un gen en concreto en el que estemos interesados. Hay sin embargo una manera elegante y “sencilla” de conseguirlo:

Si deseamos obtener el gen que codifica una proteína, conociendo la secuencia de aminoácidos de ésta se puede sintetizar «in vitro» el ARNm correspondiente (actualmente también existen técnicas para esto: sólo hay que enlazar nucleótidos en el orden adecuado).

También se puede aislar de la célula el ARNm deseado (Por ejemplo, en una célula pancreática que segrega insulina hay miles de copias del ARN mensajero que la codifica). A partir de este ARNm, y mediante una **retrotranscriptasa** o **transcriptasa inversa** se sintetiza el ADN correspondiente. Estas enzimas se llaman transcriptasas inversas porque realizan una síntesis de ADN a partir de un modelo de ARN, al revés de cómo sucede en la transcripción típica. Nuevamente hay que buscar esta “herramienta” de precisión en el mundo de los seres vivos, o casi vivos: los virus de ARN o retrovirus, además de su material genético, contienen dentro de su cápsida estas enzimas retrotranscriptasas, necesarias para que la célula parasitada haga una copia en ADN de ese ARN y la pueda incluir en su genoma. Si esto no ocurriera, el virus no se reproduciría.

Esta técnica tiene importancia cuando el ADN que se va a manipular introduciéndolo en una célula procariota procede de un organismo eucariota. Hay que recordar que en el ADN eucariota hay secuencias de nucleótidos que dan lugar a los intrones, no codificables en la síntesis de proteínas, y que son eliminados por un proceso de maduración del ARNm. En los procariotas no existen estos intrones. (Ej: la introducción del gen de la insulina humana en la bacteria *E. coli*).

[Un ARNm eucariota recién sintetizado tiene fragmentos sin información que deben ser eliminados para que los ribosomas sepan leer el ARN maduro. La maduración o **splicing** se lleva a cabo dentro del citoplasma y gracias a, como siempre, enzimas específicas].

OBTENCIÓN DE MÚLTIPLES COPIAS DE ADN

Los trabajos de Ingeniería Genética requieren gran cantidad de fragmentos de ADN idénticos para poder manipularlos (conseguir siquiera un microgramo de un fragmento supone tener varias decenas de miles de copias del mismo). Para conseguir éstos se pueden utilizar dos métodos, a cual más ingenioso: la **clonación molecular** y la **reacción en cadena de la polimerasa** o **PCR**.

La primera de las técnicas se utiliza más para conseguir una estirpe de células transgénicas con nuevas propiedades que para clonar o multiplicar un fragmento de ADN. El segundo método, por su rapidez y sencillez es hoy día el más empleado con el fin de hacer muchas copias de una molécula inicial.

1. La clonación molecular

Denominada también **clonación génica**, consiste en la formación de múltiples copias de un determinado fragmento de ADN, mediante organismos vivos. Como este ácido nucleico no puede introducirse directamente en una célula hospedadora, se recurre a un mecanismo natural: para ello es necesario unir el fragmento de ADN que nos interese, a otro ADN llamado **vector de clonación** y seguidamente introducir el ADN resultante (recombinante) en células hospedadoras donde se replicará formando nuevas copias a la vez que se replica el ADN original de la célula.

Los vectores de clonación, sean del tipo que sean, tienen la capacidad de introducir en las células material genético. Se trata de los **plásmidos**, ciertos **virus** y los **cósmidos** principalmente.

Para realizar la unión del fragmento deseado al vector escogido, éste deberá ser fragmentado por la misma enzima de restricción empleada para obtener el fragmento. Ello origina que los extremos de uno y otro fragmento tengan los extremos cohesivos formados por bases complementarias, lo que provoca la hibridación, es decir, la unión de esas zonas de ADN por complementariedad de bases uniéndose luego los extremos mediante una ADN-ligasa. Se consigue así que el fragmento de ADN deseado (ADN pasajero) se una al ADN del vector, formando un **ADN recombinante**.

Como vectores se emplean, principalmente:

1- Plásmidos. Son moléculas circulares de ADN, de pequeño tamaño, presentes en muchas bacterias e independientes del cromosoma bacteriano. Son excelentes vectores ya que su tamaño es manejable; su replicación es independiente del cromosoma, pudiéndose copiar numerosas veces dentro de cada célula. Otra ventaja que presentan muchos plásmidos es la de poseer genes de resistencia a los antibióticos, lo cual les permite comportarse como auténticos marcadores selectivos, sirviendo para comprobar si el plásmido ha pasado a una célula, o no. En un medio con antibiótico sólo las bacterias que han incorporado el plásmido de resistencia sobrevivirán y serán también las que posean el gen que interesaba clonar [Se matan dos pájaros de un tiro: sabemos cuáles son las bacterias que nos interesan y además eliminamos las que no deseamos]. Por último, aunque son estructuras bacterianas, los plásmidos presentan capacidad de penetrar también en ciertas células eucariotas como algunas levaduras y en plantas.

Para introducir o transferir los plásmidos de ADN recombinante formados «in vitro» a las células hospedadoras, se emplean técnicas de **transformación** y **conjugación bacterianas** y de **electroporación**. La transformación consiste nada más que en poner en contacto plásmidos y bacterias, ya que éstas tienen facilidad para capturar ADN del medio. La conjugación es una unión entre dos bacterias de la misma especie en la que se intercambian copias de plásmidos o bien una da a la otra una copia de un plásmido que posea. Por último, la electroporación consiste en someter a las células hospedadoras a campos eléctricos intermitentes que abren poros en la membrana plasmática por donde penetran los plásmidos.

2- Bacteriófagos. Desde hace tiempo se ha utilizado con éxito el bacteriófago lambda (λ) que puede transferir los fragmentos de ADN a bacterias mediante **transducción**. En la bacteria se puede multiplicar el virus y de esa forma se replica el genoma deseado. Se emplea cuando el fragmento de ADN que se quiere clonar es de mayor tamaño que el de los plásmidos. Hoy día las técnicas permiten aislar genomas víricos, añadir mediante enzimas de restricción genes de interés y rearmar o ensamblar los componentes de un virus modificado y que éste infecte la bacteria que nos interese. La transducción es el proceso natural en el cual, un fago arrastra con él un fragmento de cromosoma de la célula en la que se formó. (Debe recordarse el ciclo lisogénico y lítico de los fagos).

3- Cósmidos. Son plásmidos que contienen el fragmento de ADN deseado y el extremo cohesivo procedente del genoma del fago λ (extremo cos). Se construye uniendo los tres elementos génicos, lo que permite que el plásmido resultante al final pueda ser «empaquetado in vitro» dentro de viriones, como en el caso anterior. Se utilizan para clonar fragmentos grandes de ADN. (Se introducen por un vector vírico, pero actúan dentro de la bacteria independientemente como plásmidos y contienen información de utilidad, que es la que se quería introducir realmente. Resumiendo: son estructuras mixtas formadas por un plásmido, un virus (incompleto) y un gen de interés. Del virus se aprovecha su capacidad como vector y del plásmido su independencia dentro de la célula hospedadora).

En los tres casos, cuando las células que contienen el ADN de interés se reproducen, también lo hará ese ácido nucleico. Mediante otras técnicas se podrán sacar de esas células las copias que deseábamos.



Existen otras técnicas de introducción de ADN, que en ciertos casos también tienen éxito. En estos casos no se trata de vectores biológicos sino artificiales. Son la **electroporación** (ya mencionada), la **microinyección** y los “**micro proyectiles**”.

2- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Gracias a esta técnica se pueden replicar pequeños fragmentos de ADN «in vitro», a una velocidad muy superior a la lograda por sistemas celulares mediante la clonación vista anteriormente. Comparándola con la anteriormente explicada es de una sencillez asombrosa.

Este proceso, llamado abreviadamente PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) requiere el conocimiento de las secuencias de nucleótidos del fragmento de ADN que se quiere replicar.

Para poner en marcha la reacción, se introducen en un recipiente en el que hay una disolución que contiene el fragmento o fragmentos de ADN a replicar una serie de moléculas de la enzima **ADN-polimerasa**. Se añaden **desoxirribonucleótidos trifosforilados** de las cuatro bases en cantidad suficiente y unas pequeñas moléculas de **cebador**.

¿Qué es el cebador?: la naturaleza ha conseguido cosas maravillosas, pero no es perfecta. La enzima ADN polimerasa es capaz de unir nucleótidos de ADN en el orden exacto teniendo una cadena de ADN que le sirva de modelo y siempre que esos nucleótidos estén trifosforilados (como el ATP). Así, con la energía desprendida al eliminar dos de los grupos fosfato se consigue el enlace éster-fosfórico entre dos nucleótidos. Pero el defecto de la ADNpol es que no puede comenzar su trabajo si no hay ya colocados algunos nucleótidos en la que será la nueva cadena. Los seres vivos (lo veremos en otro tema) lo solucionan porque una ARN polimerasa sí puede comenzar a poner nucleótidos, pero de ARN, y fabrica un pequeño polinucleótido (de unos 20 nucleótidos) complementario de la cadena de ADN. Después se retira y ahora sí que la ADNpol puede empezar. A esta secuencia inicial que permite a la ADNpol copiar una cadena de ADN se le llama **cebador** o **primer**.

Volviendo a nuestra “receta” para copiar ADN, lo último que nos faltaba en la “olla” eran los cebadores. Éstos, se fabrican artificialmente (los venden por Internet) y suelen ser secuencias muy cortas de ADN y que casi siempre encajarán por complementariedad de bases en muchas de las cadenas que queramos copiar (Se suelen añadir varios tipos diferentes para asegurarnos de que nos servirán).

Calentando la mezcla, se separan las hebras complementarias de los fragmentos de ADN por rotura de los puentes de hidrógeno (desnaturalización del ADN). Enfriando poco a poco, se unen los cebadores a las hebras simples de nucleótidos, lo que es reconocido por la ADN-polimerasa que empieza a añadir nucleótidos, formando la hebra complementaria a la que sirvió de molde. Calentando nuevamente, las dos cadenas se separan y cada una servirá de modelo para sintetizar otras tantas cadenas. Y así, calentando y enfriando a ciertas temperaturas, se pueden obtener millones de copias de ADN en tiempos relativamente breves.

Esta técnica se emplea para obtener copias en la secuenciación o determinación del orden de bases del genoma humano, por ejemplo, para la detección precoz o prenatal de enfermedades congénitas, para medicina forense (“prueba del ADN”), etc. Todos ellos son trabajos que requieren cantidades notorias de ADN, partiendo de muestras mínimas, y en un espacio de tiempo breve.

El protocolo de la PCR es complejo ya que se requiere un gran control en los cambios de temperatura para producir la desnaturalización y renaturalización de las moléculas de ADN. El aparato utilizado se denomina **termociclador**. Como se lleva a cabo a alta temperatura, por encima de los 50°C, cualquier enzima no vale puesto que el calor, como sabemos, desnaturaliza las proteínas. Otra vez la naturaleza nos ofrece la solución: la ADN polimerasa empleada ha sido obtenida de una bacteria habitante de las aguas termales llamada Thermus aquaticus (TAC o **Taq**).

Cada ciclo de amplificación (o de copia) del ADN comprende 3 pasos: elevación de la Tª a 96°C para que la doble hélice se separe en sus dos hebras; descenso a 50º para que los cebadores se unan a los extremos correspondientes de cada hebra a copiar y nueva subida de temperatura, a 72°C para que la ADNpol comience a trabajar, produciéndose dos moléculas de ADN. Se vuelve a empezar el ciclo subiendo hasta 96°C.... pero con la diferencia de que en el 2º ciclo contamos con el doble de ADN que al principio. Como vemos, el proceso repetido hace aumentar exponencialmente la cantidad de material (1,2,4,8,16,32...) de ahí que se hable también de amplificación. Con 30 amplificaciones consecutivas se obtienen un millón de copias a partir de una sola.

LOCALIZACIÓN DE SEGMENTOS DE ADN

Uno de los trabajos importantes en Ingeniería Genética es la localización de un determinado segmento o fragmento de ADN. Tal localización se puede referir bien a:

- I. Fragmentos que se pretenden clonar y a los que es necesario seguir la pista.
 - II. Genes o secuencias de nucleótidos en el genoma de un organismo.
- I. Si queremos saber si se ha conseguido introducir en una bacteria un plásmido con un gen que deseamos que ella nos clone, la técnica más empleada es la que consiste en la selección de células que contengan dichos plásmidos (no todas las células del medio de cultivo habrán captado los plásmidos). Para ello, los plásmidos elegidos como vectores, debían tener de modo natural genes de resistencia a un antibiótico. Una vez que se ha realizado la transferencia del vector (el propio plásmido) con el ADN recombinante a las células bacterianas hospedadoras, se siembran en placa y se incuban para que se formen colonias. Después sólo hay que añadir al cultivo el antibiótico al cual presenta resistencia el plásmido elegido. Las bacterias sin plásmido morirán y las colonias supervivientes serán aquellas que sin duda posean el gen que deseamos clonar. (Ya se ha visto que muchos plásmidos tenían la ventaja de poseer genes de resistencia a antibióticos).
- II. Otro modo de actuación es la localización de segmentos de ADN mediante **sondas de hibridación**: este método se basa en el fenómeno de **hibridación del ADN**. Cuando el ácido nucleico es calentado, se rompen los enlaces de hidrógeno, separándose las dos cadenas de nucleótidos que lo forman (decimos que el ADN se ha desnaturalizado). Al enfriarse, estas cadenas volverán a unirse.

Cuando se mezclan moléculas de ADN diferentes, las cadenas se separan al calentarse y, al enfriarse se producirán colisiones entre las hebras de nucleótidos al azar. Si dos hebras con secuencias más o menos complementarias se ponen en contacto, a medida que se produce el enfriamiento podrán formar una doble hélice híbrida, constituida por las dos cadenas de nucleótidos de origen diferente. El grado en el que los dos segmentos se unen, así como la rapidez en llevarse a cabo la unión, dan una medida de la similitud entre las dos secuencias de nucleótidos.

Para detectar un determinado fragmento de ADN es necesario preparar un "molde" que lo identifique, llamado **sonda**. Consiste en un segmento de ADN o ARN de cadena sencilla, que sea complementario a la secuencia de nucleótidos del fragmento a localizar. [Esta sonda podrá ser sintetizada en su totalidad en el laboratorio, o ser de un ADN complementario obtenido por síntesis a partir del ARNm mediante transcriptasa inversa, o ser directamente un ARNm o ser un fragmento ya identificado y obtenido por restricción...].

A la sonda, cualquiera que sea, se le une una **molécula indicadora o reporter** para poder ser identificada. Puede ser algún **isótopo radiactivo** constituyente de la misma sonda (fósforo radiactivo presente en alguno de sus nucleótidos por ejemplo), o bien una **enzima** determinada, o bien un **compuesto fluorescente**. Posteriormente se podrá identificar su presencia por algún método específico: una autoradiografía si el reporter es radiactivo; por la formación de un metabolito si era una enzima y por fluorescencia en el último caso.



La sonda en cuestión se pone en contacto con el ADN problema [o bien con las células portadoras del mismo, en cuyo caso habrá que tratarlas con NaOH para lisarlas y desnaturalizar su material genético]. Posteriormente se procederá para determinar con qué fragmentos se hibrida o con qué células de determinadas colonias se hibrida, quedando así localizado el ADN deseado.

[Por ejemplo, si se quiere clonar el gen de la insulina y posteriormente identificarlo en la bacteria hospedadora, la sonda se preparará a partir de células del páncreas productoras de insulina. Seguidamente se aislará el ARNm de esta hormona; mediante una transcriptasa inversa se sintetizará, con nucleótidos radiactivos, la cadena de ADN complementaria; mediante ADN-polimerasa y ADN-ligasa y con nucleótidos también marcados, se formará ya la cadena de ADN complementaria. Este ADN formado actuará como sonda en el proceso de hibridación para la identificación del gen de la insulina. Se utiliza en un principio ARNm porque una célula secretora de una proteína como la insulina tendrá muchas copias en su citoplasma y será por lo tanto fácil de aislar, mientras que buscar el gen original de ADN en el núcleo no es un proceso sencillo].

En la actualidad uno de los usos más difundidos de las sondas es el que se hace en medicina para diagnóstico de enfermedades: existen en el mercado sondas de ADN, preparadas por algunos laboratorios, para detectar una treintena de bacterias patógenas, así como algunos hongos, virus y protozoos, todos ellos causantes de enfermedades en la especie humana. Buscan determinadas zonas genéticas de estos microorganismos y así la identificación del agente causante de una enfermedad es más rápida que los cultivos de sangre o exudados del enfermo, practicados habitualmente. La fiabilidad es total y basta con pequeñas muestras del enfermo, ya que con este método se pueden detectar cantidades ínfimas del ADN en cuestión si está presente en dicha muestra.

Las famosas “pruebas de ADN” para mostrar parentesco entre personas o para identificar posibles delincuentes a partir de una muestra de materia orgánica (pelo, sangre, semen....) a veces también emplean sondas.

Son también una realidad y se están desarrollando día a día para el diagnóstico de ciertos cánceres y defectos congénitos los llamados **biochips o microarrays**, que son pequeñas placas en las que hay pegados varios miles de sondas. Estas sondas actúan como anzuelos que sirven para “pescar” moléculas específicas. Los nuevos métodos de diagnóstico de enfermedades congénitas van por esta línea: se están analizando las secuencias de los genes mutados defectuosos para elaborar sondas con las que analizar el genoma de los individuos. Se acerca el día en que podremos saber para qué sirven todos nuestros genes y toda persona sabrá si padece o padecerá en el futuro o si simplemente tiene probabilidades de desarrollar ciertas enfermedades congénitas.....De momento en Gran Bretaña las compañías de seguros ya exigen las pruebas de diagnóstico de la enfermedad llamada Corea de Huntington y del mal de Alzheimer prematuro para asegurar a un posible cliente.

DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

Otra técnica propia de la Ingeniería Genética es la determinación de la secuencia de nucleótidos de un ADN, conocida también como **secuenciación de ADN**.

Como trabajar con moléculas completas de ADN es imposible dada su gran longitud, mediante técnicas de las que ya se han comentado podemos cortarlas para secuenciarlas y luego recomponer los fragmentos sabiendo en qué orden estaban situados originalmente.

El **método de secuenciación de Sanger**, se denomina también de los **didesoxirribonucleótidos**, por ser necesarios dichos compuestos, es decir, 2'desoxinucleótidos (los “normales”) que también han perdido su grupo alcoholico en el carbono 3'. Debido a esta característica, no se puede unir el siguiente nucleótido de la cadena que esté sintetizando la ADN-pol. Abreviadamente, éste sería el método a seguir:

- Se preparan cuatro recipientes en los que se van a llevar a cabo reacciones de polimerización de nucleótidos, para formar cadenas complementarias del fragmento que queremos secuenciar.
- Las cuatro reacciones de secuenciación toman como partida una de las cadenas del fragmento de ADN que se va a determinar (molde o modelo), un cebador (fragmento de ADN pequeño y complementario del extremo de la cadena) y desoxirribonucleótidos trifosforilados de las cuatro bases (normales). Pero a cada uno de los cuatro recipientes se les añadirá una cierta cantidad de uno de los cuatro didesoxinucleótidos posibles (de A, T, C y G). Bien los cebadores o bien los nucleótidos llevarán fósforo radiactivo para poder ser identificados posteriormente.
- Al añadir la ADN-polimerasa, comienza la polimerización a partir del cebador, pero cesa al incorporarse un didesoxinucleótido. Si la proporción de didesoxirribonucleótidos y desoxirribonucleótidos es la adecuada, se produce un conjunto de cadenas dobles en las que la longitud de la cadena recién sintetizada dependerá de la situación del didesoxirribonucleótido incorporado respecto al extremo del ADN.
- Los fragmentos resultantes (de las cuatro reacciones) se disponen en una placa de gel y se separan por tamaño mediante electroforesis, se autorradiografían, y la sucesión de bandas de cada una de las cuatro reacciones, comparándolas entre sí, dan la secuencia del ADN. La electroforesis permite la separación de cadenas que se diferencian en un solo nucleótido. La interpretación de la autorradiografía permite la "lectura" de la secuencia (ver esquemas: es imprescindible entender el mecanismo en los dibujos).

Este método de los didesoxinucleótidos ha sido mejorado de tal manera que hoy ya no hacen falta átomos radiactivos ni placas fotográficas y además el proceso lo desempeñan máquinas de secuenciación automática.

El proceso básico es el mismo pero los marcadores son moléculas fluorescentes de diferentes colores: el fluorocromo rojo se añade al didesoxinucleótido de la timina; verde para la adenina; azul citosina y marrón guanina. Ya no hay que hacer cuatro reacciones sino que todos los componentes van a un mismo recipiente. Tras formarse los fragmentos de diferentes tamaños, se separan por electroforesis y obtendremos una serie de puntos de colores que irán desde el fragmento que tiene un solo nucleótido hasta el que tiene la cadena completa. Sólo hay que ir viendo los colores para saber qué nucleótido va detrás de otro y eso la máquina puede hacerlo sola, imprimiendo el resultado.

LA ELECTROFORESIS

La **electroforesis** es una técnica que permite la separación de moléculas (proteínas o ácidos nucleicos) según la movilidad de éstas en un campo eléctrico a través de una matriz o soporte poroso, la cual finalmente las separa por tamaños moleculares y carga eléctrica, dependiendo de la técnica que se use. Los ácidos nucleicos ya disponen de una carga eléctrica negativa, que los dirigirá al polo positivo, mientras que a las proteínas "son cargadas" añadiéndoles ciertas sustancias que incorporan cargas negativas. La matriz o soporte puede ser un gel de agarosa o de poliacrilamida (en ambos casos, estas sustancias son fibras que se entrelazan como una malla dejando huecos por los que circularán con más o menos dificultad las moléculas que deseamos separar). Al poner la mezcla de moléculas y aplicar un campo eléctrico, éstas se moverán y deberán ir pasando por la malla, desplazándose más rápidamente las más pequeñas y con más dificultad las grandes. Así, al cabo de un tiempo determinado, las más pequeñas habrán avanzado más y las más grandes, por el contrario, quedarán cerca del lugar de partida.

Gracias a la electroforesis se pueden separar fragmentos de ADN que se diferencian en un solo nucleótido.



Gracias a que los cebadores, sintetizados artificialmente, están marcados con algunos isótopos radiactivos (fósforo por ejemplo), Poniendo la lámina de electroforesis sobre un papel fotográfico y dejando un tiempo, la radiación produce una mancha en el papel, de modo que los fragmentos separados se hacen visibles como manchas alineadas: es una **autorradiografía** de la muestra.

Pero hoy día es más cómodo y más seguro emplear otro tipo de marcadores que los isótopos radiactivos. Se trata de marcadores coloreados llamados **fluorocromos**, que son moléculas que al ser iluminadas con luz ultravioleta emiten luz visible. Los hay de distintos colores.

EJEMPLOS DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN:

Enzima	Especie bacteriana de origen	Secuencia de reconocimiento	Corte
<u>EcoRI</u>	<u>Escherichia coli</u>	5'GAATTC 3'CTTAAG	5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5'
<u>EcoRII</u>	<u>Escherichia coli</u>	5'CCWGG 3'GGWCC	5'--- CCWGG---3' 3'---GGWCC ---5'
<u>BamHI</u>	<u>Bacillus amyloliquefaciens</u>	5'GGATCC 3'CCTAGG	5'---G GATCC---3' 3'---CCTAG G---5'
<u>HindIII</u>	<u>Haemophilus influenzae</u>	5'AAGCTT 3'TTCGAA	5'---A AGCTT---3' 3'---TTCGA A---5'
<u>TaqI</u>	<u>Thermus aquaticus</u>	5'TCGA 3'AGCT	5'---T CGA---3' 3'---AGC T---5'
<u>NotI</u>	<u>Nocardia otitidis</u>	5'GCGGCCGC 3'CGCCGGCG	5'---GC GGCCGC---3' 3'---CGCCGG CG---5'
<u>HinfI</u>	<u>Haemophilus influenzae</u>	5'GANTC 3'CTNAG	5'---G ANTC---3' 3'---CTNA G---5'
<u>Sau3A</u>	<u>Staphylococcus aureus</u>	5'GATC 3'CTAG	5'--- GATC---3' 3'---CTAG ---5'
<u>PovI*</u>	<u>Proteus vulgaris</u>	5'CAGCTG 3'GTCGAC	5'---CAG CTG---3' 3'---GTC GAC---5'
<u>SmaI*</u>	<u>Serratia marcescens</u>	5'CCCGGG 3'GGGCC	5'---CCC GGG---3' 3'---GGG CCC---5'

<u>HaellI</u> *	<u>Haemophilus aegyptius</u>	5'GGCC 3'CCGG	5'---GG CC---3' 3'---CC GG---5'
<u>AluI</u> *	<u>Arthrobacter luteus</u>	5'AGCT 3'TCGA	5'---AG CT---3' 3'---TC GA---5'
<u>EcoRV</u> *	<u>Escherichia coli</u>	5'GATATC 3'CTATAG	5'---GAT ATC---3' 3'---CTA TAG---5'
<u>KpnI</u> ^[31]	<u>Klebsiella pneumoniae</u>	5'GGTACC 3'CCATGG	5'---GGTAC C---3' 3'---C CATGG---5'
<u>PstI</u> ^[31]	<u>Providencia stuartii</u>	5'CTGCAG 3'GACGTC	5'---CTGCA G---3' 3'---G ACGTC---5'
<u>SacI</u> ^[31]	<u>Streptomyces achromogenes</u>	5'GAGCTC 3'CTCGAG	5'---GAGCT C---3' 3'---C TCGAG---5'
<u>SaI</u> ^[31]	<u>Streptomyces albus</u>	5'GTCGAC 3'CAGCTG	5'---G TCGAC---3' 3'---CAGCT G---5'
<u>Scal</u> ^[31]	<u>Streptomyces caespitosus</u>	5'AGTACT 3'TCATGA	5'---AGT ACT---3' 3'---TCA TGA---5'
<u>SphI</u> ^[31]	<u>Streptomyces phaeochromogenes</u>	5'GCATGC 3'CGTACG	5'---G CATGC---3' 3'---CGTAC G---5'
<u>StuI</u> ^{[32][33]}	<u>Streptomyces tubercidicus</u>	5'AGGCCT 3'TCCGGA	5'---AGG CCT---3' 3'---TCC GGA---5'
<u>XbaI</u> ^[31]	<u>Xanthomonas badrii</u>	5'TCTAGA 3'AGATCT	5'---T CTAGA---3' 3'---AGATC T---5'