

# TECNOLOGÍA DEL DNA RECOMBINANTE.

- Generalidades de la tecnología del DNA recombinante.
- Fabricación del DNA recombinante.
  - Enzimas de restricción.
  - Vectores.
    - ↳ Plásmidos.
    - ↳ Bacteriófagos.
    - ↳ Cósmidos.
    - ↳ Cromosomas artificiales bacterianos.
  - Transformación del DNA.
  - Clonación de DNA en *Escherichia coli*.
  - Clonación en huéspedes eucarióticos.
    - ↳ Vectores de levadura.
    - ↳ Cromosomas artificiales de levadura.
- Construcción de bibliotecas de DNA.
  - Bibliotecas genómicas.
    - ↳ Mutagénesis dirigida.
  - Bibliotecas cromosómicas.
  - Bibliotecas de cDNA.
- Identificación de secuencias clonadas específicas.
  - Sondas para rastrear clones específicos.
  - Rastreo de una biblioteca.
  - Paseo cromosómico.
- Métodos de análisis de secuencias clonadas.
  - Mapas de restricción.
  - Transferencia de Southern y Northern
  - Secuenciación de DNA.
- Transferencia de DNA a eucariotas.
  - Células vegetales.
  - Células de mamífero.
- Aplicaciones de la tecnología del DNA recombinante.
  - Aplicaciones en investigación y medicina
    - ↳ Modelos animales de enfermedades genéticas humanas: ratones *knockout*.
    - ↳ Terapia génica.
  - Aplicaciones industriales
  - Aplicaciones en agricultura

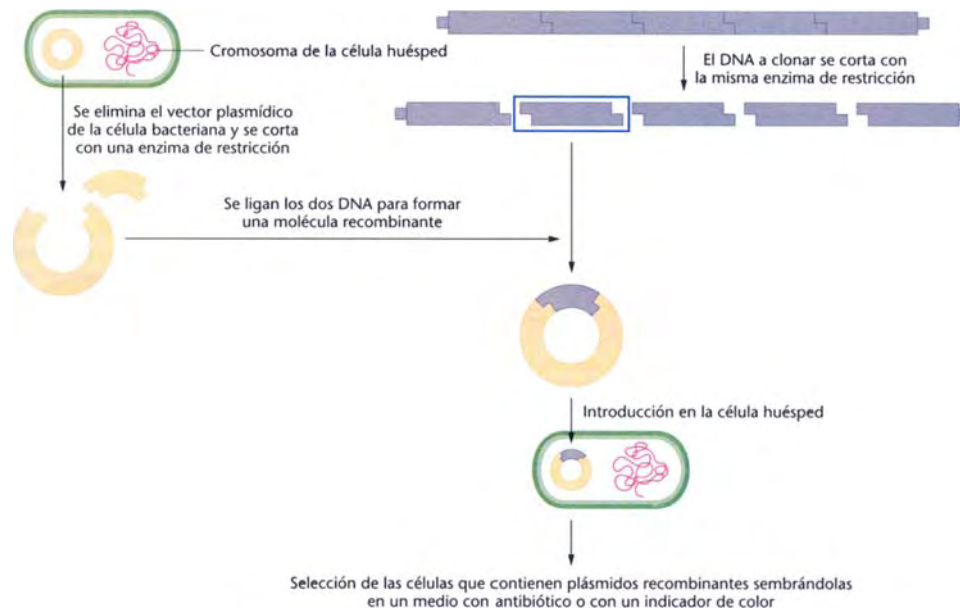
# TECNOLOGÍA DEL DNA RECOMBINANTE.

## Generalidades de la tecnología del DNA recombinante.

El término DNA recombinante hace referencia a la creación de nuevas combinaciones de segmentos o de moléculas de DNA que no se encuentran juntas de manera natural. Aunque el proceso genético de la recombinación produce DNA recombinante, este término se reserva a las moléculas de DNA producidas por la unión de segmentos que provienen de diferentes fuentes biológicas.

La tecnología del DNA recombinante utiliza técnicas que provienen de la bioquímica de los ácidos nucleicos unidas a metodologías genéricas desarrolladas originalmente para la investigación de bacterias y de virus. La utilización del DNA recombinante es una herramienta poderosa para el aislamiento de poblaciones puras de secuencias específicas de DNA a partir de una población de secuencias mezcladas. Los procedimientos básicos incluyen una serie de pasos:

1. Los fragmentos de DNA se generan utilizando unas enzimas denominadas **endonucleasas de restricción**, que reconocen y cortan las moléculas de DNA por secuencias nucleotídicas específicas.
2. Los fragmentos producidos mediante la digestión con **enzimas de restricción** se unen a otras moléculas de DNA que sirven de **vectores**. Los **vectores** pueden replicarse autónomamente en una célula huésped y facilitan la manipulación de la molécula de DNA recombinante recién creada.
3. La molécula de DNA recombinante, formada por un vector que lleva un segmento de DNA insertado, se transfiere a una **célula huésped**. Dentro de esta célula, la molécula de DNA recombinante se replica, produciendo docenas de copias idénticas conocidas como "clones".
4. Al replicarse las **células huésped**, las células descendientes heredan el DNA recombinante, creándose una población de células idénticas, que llevan todas la secuencia clonada.
5. Los segmentos de DNA clonados pueden recuperarse de las células huésped, purificarse y analizarse.
6. Potencialmente, el DNA clonado puede transcribirse, su mRNA puede traducirse, y el producto génico puede aislarse y examinarse.



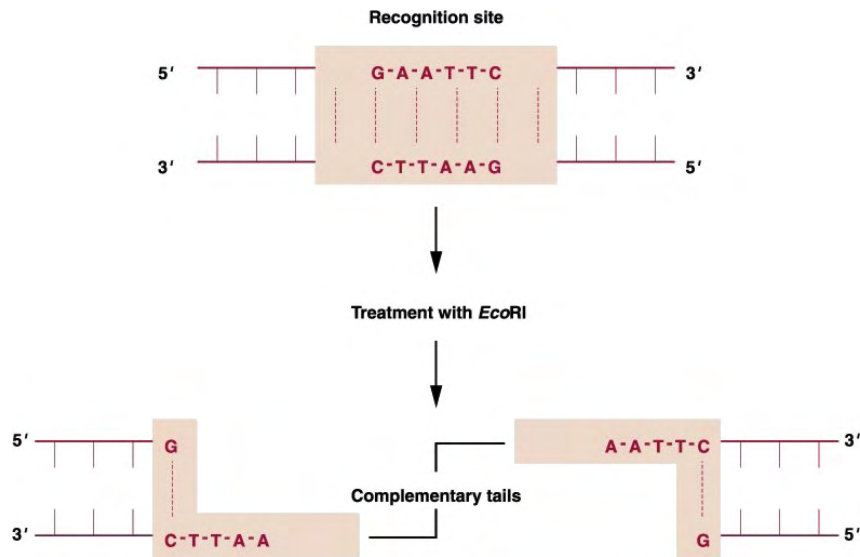
## Fabricación del DNA recombinante.

El desarrollo de las técnicas de DNA recombinante ofrece nuevas oportunidades para la investigación, ya que simplifica la obtención de grandes cantidades de DNA que codifican genes específicos, y facilita las investigaciones de la organización, estructura y expresión génicas.

Esta metodología también ha dado un impulso al desarrollo de la naciente industria biotecnológica, que está suministrando un número creciente de productos al mercado. El DNA recombinante produce grandes cantidades de copias de segmentos de DNA específicos, incluyendo genes.

### Enzimas de restricción.

La piedra angular de la tecnología del DNA recombinante es un tipo de enzimas denominadas **endonucleasas de restricción**. Estas enzimas, aisladas en bacterias, reciben este nombre debido a que limitan o previenen las infecciones víricas degradando el ácido nucleico invasor. Las enzimas de restricción reconocen una secuencia específica de nucleótidos (denominada sitio de restricción) de una molécula de DNA de doble cadena, y cortan el DNA por esa secuencia. El premio Nobel de 1978 se otorgó a Werner Arber, Hamilton Smith y Daniel Nathans por su investigación sobre las enzimas de restricción. Hasta la fecha, se han aislado y caracterizado casi 200 tipos de enzimas de restricción diferentes.

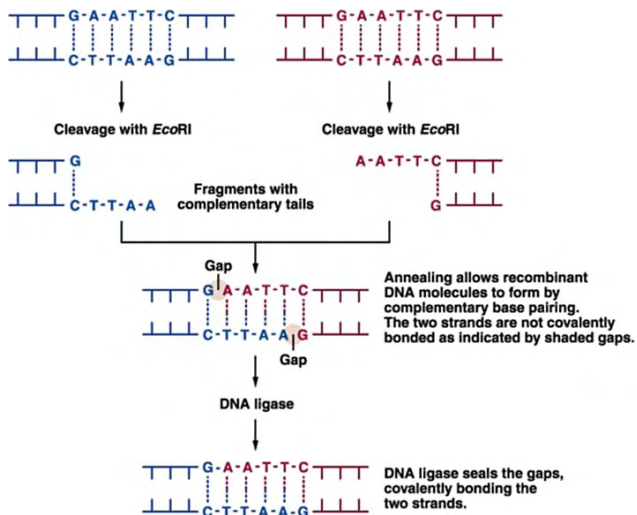


La enzima de restricción *EcoRI* reconoce y se une a la secuencia palindrómica GAATTC. El corte del DNA en este sitio produce colas de cadena sencilla complementarias. La colas de cadena sencilla resultantes pueden unirse con colas complementarias de otros fragmentos de DNA para formar moléculas de DNA recombinante.

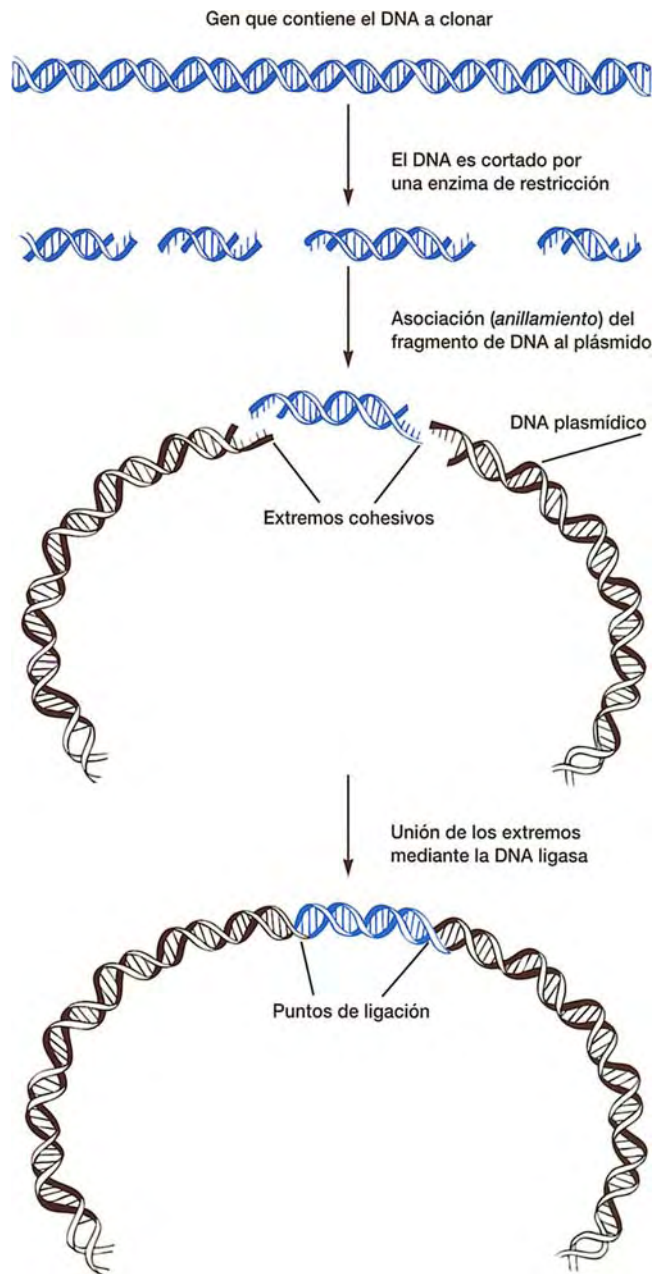
Las enzimas de restricción se denominan según el organismo en el que se descubrieron, utilizando un sistema alfanumérico. La enzima *EcoRI* proviene de *Escherichia coli*; *HindIII* se descubrió en *Hemophilus influenzae*. Hay dos tipos de enzimas de restricción:

- Las enzimas de Tipo I cortan las dos cadenas del DNA en una posición aleatoria a cierta distancia del sitio de restricción. No se utilizan normalmente en la investigación de DNA recombinante ya que el sitio de corte no es preciso.
- Las enzimas de Tipo II reconocen una secuencia específica y cortan las dos cadenas de la molécula de DNA con absoluta precisión dentro de la secuencia reconocida. Se usan ampliamente en investigación de DNA recombinante puesto que cortan en sitios específicos. Las secuencias reconocidas por las enzimas de Tipo II son simétricas ("palindrómicas"), es decir, la secuencia de una de las cadenas leída en dirección 5' ⇒ 3' es la misma que la secuencia de la cadena complementaria leída también en dirección 5' ⇒ 3'.

La enzima *EcoRI* corta las cadenas de manera escalonada dentro del sitio de reconocimiento, dejando extremos de cadena sencilla. Estas colas, que tienen secuencias nucleotídicas idénticas, son "pegajosas" (cohesivas), ya que pueden unirse a colas complementarias de otros fragmentos de DNA mediante puentes de hidrógeno. Si moléculas de DNA de diferente origen comparten los mismos sitios de reconocimiento palindrómicos, ambas tendrán colas complementarias de cadena sencilla cuando se traten con una endonucleasa de restricción. Si estos fragmentos se ponen juntos bajo determinadas condiciones, los fragmentos de DNA de distinto origen pueden formar moléculas recombinantes estableciendo puentes de hidrógeno entre los extremos cohesivos. Luego se utiliza la enzima DNA ligasa para unir covalentemente los esqueletos azúcar-fosfato de los dos fragmentos, produciéndose así una molécula de DNA recombinante.



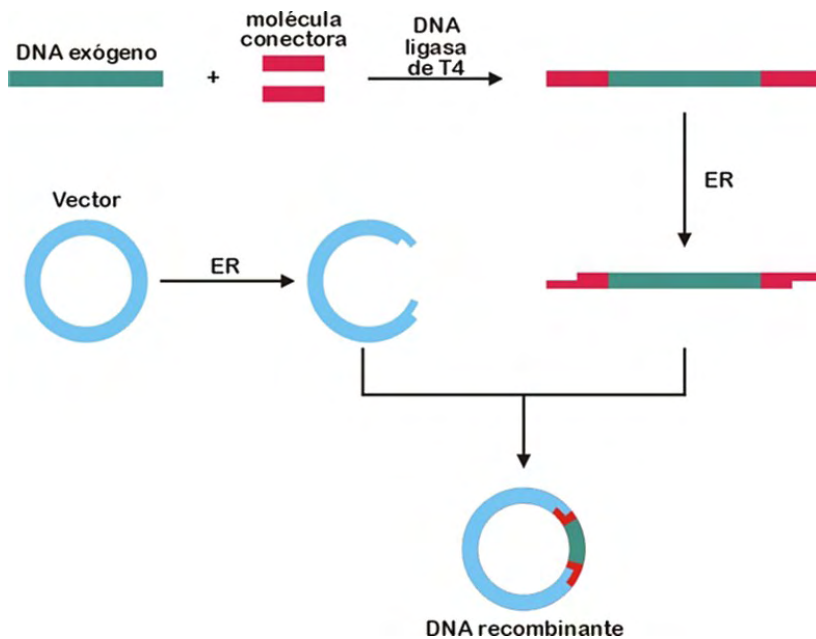
Para formar moléculas de DNA recombinante, se corta DNA de distintas fuentes con *EcoRI* y se mezcla para que se unan formando moléculas recombinantes. Después se utiliza la enzima DNA ligasa para unirlos covalentemente en moléculas de DNA recombinante.



Enzyme	Recognition, cleavage sequence	Cleavage pattern	Source
<i>EcoRI</i>	$\begin{array}{c} \text{G-A-A-T-T-G} \\ \text{C-T-T-A-A-G} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{G} \quad \text{A-A-T-T-C} \\ \text{C-T-T-A-A} \quad \text{G} \end{array}$	<i>E. coli</i>
<i>HindIII</i>	$\begin{array}{c} \text{A-A-G-C-T-T} \\ \text{T-T-C-G-A-A} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{A} \quad \text{A-G-C-T-T} \\ \text{T-T-C-G-A} \quad \text{A} \end{array}$	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>BamHI</i>	$\begin{array}{c} \text{G-G-A-T-C-G} \\ \text{C-C-T-A-G-G} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{G} \quad \text{G-A-T-C-C} \\ \text{C-C-T-A-G} \quad \text{G} \end{array}$	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<i>TaqI</i>	$\begin{array}{c} \text{T-C-G-A} \\ \text{A-G-C-T} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{T} \quad \text{C-G-A} \\ \text{A-G-C} \quad \text{T} \end{array}$	<i>Thermus aquaticus</i>

Algunas enzimas de restricción comunes, con sus sitios de reconocimiento y de corte, el patrón de corte y la fuente de origen.

Otras enzimas de restricción de Tipo II, como *SmaI*, cortan el DNA formando fragmentos romos. Los fragmentos de DNA con extremos romos también pueden unirse y formar moléculas recombinantes, pero primero deben modificarse. La enzima desoxinucleotidil transferasa terminal se utiliza para crear extremos de cadena sencilla mediante la adición de «colas» de nucleótidos. Si a uno de los DNA se le añade una cola de poli-dA, y al otro DNA se le añade una cola de poli-dT, se forman colas complementarias, y los fragmentos pueden unirse mediante puentes de hidrógeno. Entonces, por ligación, pueden formarse moléculas recombinantes.



Las moléculas de DNA recombinante pueden formarse a partir de DNA cortado con enzimas que dejan extremos romos. En este método se utiliza la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal para crear colas complementarias mediante la adición de fragmentos de poli-dA y de poli-dT. Estas colas sirven para unir el DNA de diferentes fuentes y para crear moléculas de DNA recombinante, que son unidas covalentemente por tratamiento con la DNA ligasa.

## Vectores

Después de unirse a un vector o vehículo de clonación, un segmento de DNA puede llegar a entrar en una célula huésped y replicarse o clonarse. Los [vectores](#) son, esencialmente, moléculas de DNA transportadoras. Para servir de vector, una molécula de DNA debe tener unas determinadas características:

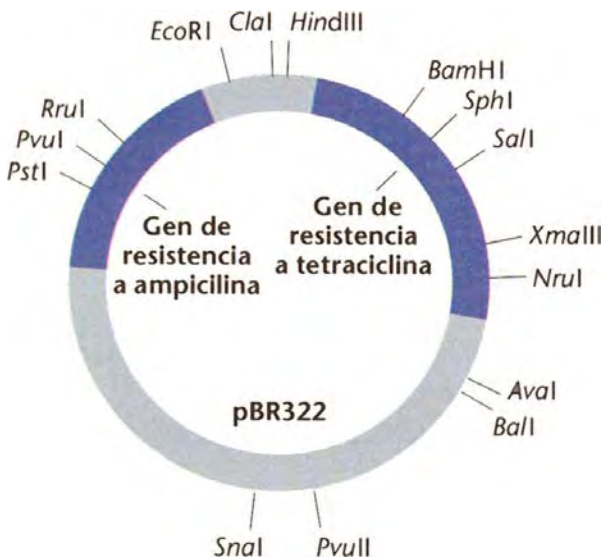
1. Debe poder replicarse independientemente junto con el segmento de DNA que transporta.
2. Debe contener algunos sitios de corte para enzimas de restricción, presentes sólo una vez en el vector. Estos sitios de restricción se cortan con una enzima de restricción y se utilizan para insertar segmentos de DNA cortados con la misma enzima.
3. Debe tener algún marcador de selección (normalmente genes de resistencia a antibióticos o genes de enzimas que la célula huésped no tiene) para poder distinguir las células huésped que transportan el vector de las que no lo contienen.
4. El vector de la célula huésped debe ser fácil de recuperar.

Actualmente se utilizan tres tipos principales de [vectores](#): los plásmidos, los bacteriófagos y los cósmidos.

### • Plásmidos.

Los plásmidos son moléculas de DNA de doble cadena extracromosómicas de origen natural que tienen un origen de replicación (*ori+*) y que se replican autónomamente en las células bacterianas. Para poder utilizarlos en ingeniería genética, se han modificado o diseñado muchos plásmidos de manera que contengan un número limitado de sitios de restricción y genes de resistencia a antibióticos específicos.

El vector pBR322 fue uno de los primeros plásmidos diseñados que se utilizó en DNA recombinante. Este plásmido tiene un origen de replicación (*ori+*), dos genes de selección (resistencia a los antibióticos ampicilina y tetraciclina), y algunos sitios de restricción únicos.



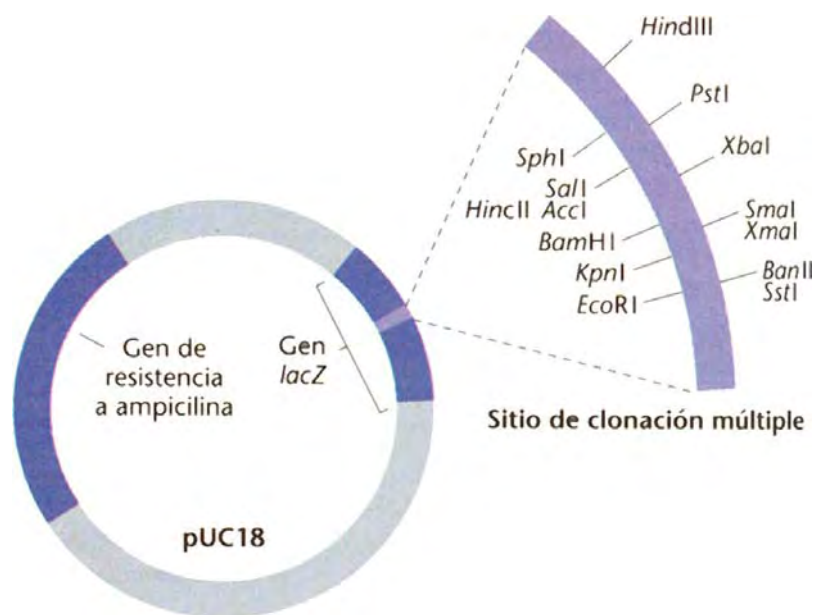
Mapa de restricción del plásmido pBR322, que muestra las localizaciones de los sitios de las enzimas de restricción que cortan el plásmido por un solo sitio. Estos sitios pueden utilizarse para insertar los fragmentos de DNA a clonar. También se muestran las localizaciones de los genes de resistencia a antibióticos.

Dentro del gen de resistencia a tetraciclina hay sitios de restricción únicos para las enzimas *Bam*HI, *Sph*I, *Sal*I, *Xma*III y *Nru*I, y dentro del gen de resistencia a ampicilina hay sitios de restricción únicos para las enzimas *Rru*I, *Pvu*I y *Pst*I. Si se introduce pBR322 en una célula bacteriana sin plásmidos y sensible a antibióticos, la célula se convertirá en resistente a la tetraciclina y a la ampicilina. Si se inserta un fragmento de DNA en los sitios de restricción *Rru*I, *Pvu*I, o *Pst*I, se inactivará el gen de resistencia a ampicilina, pero el gen de resistencia a tetraciclina seguirá activo. Si este plásmido recombinante se transfiere a una célula bacteriana que no contenga plásmidos, las células que contengan el plásmido recombinante podrán identificarse, ya que serán resistentes a tetraciclina y sensibles a ampicilina.

Con el paso del tiempo se han desarrollado [vectores](#) plasmídicos más sofisticados, que ofrecen diversas características útiles. Uno de estos plásmidos, que deriva de pBR322, es el pUC18, que tiene las siguientes características:

1. El plásmido tiene la mitad de tamaño que pBR322, lo que permite insertar fragmentos de DNA más largos.
2. pUC18 se replica produciendo unas 500 copias por célula, lo que significa unas 5 ó 10 veces más que las que produce pBR322.
3. Tiene un gran número de sitios de restricción únicos, agrupados en una región denominada sitio de clonación múltiple (polylinker).
4. El plásmido contiene un fragmento de un gen bacteriano denominado *lacZ*, y el sitio de clonación múltiple está insertado dentro de éste fragmento del gen. El gen *lacZ* normal codifica la  $\beta$ -galactosidasa, enzima que corta moléculas de azúcar. Cuando pUC18 se introduce en una célula huésped bacteriana que tiene el gen *lacZ* mutante, se produce  $\beta$ -galactosidasa funcional. La presencia de  $\beta$ -galactosidasa funcional en una colonia bacteriana puede detectarse mediante un ensayo colorimétrico. Las células bacterianas que contienen pUC18 forman colonias de color azul cuando crecen en un medio que contiene una sustancia denominada X-gal. Si hay DNA insertado en el sitio de clonación múltiple, se interrumpe el gen *lacZ* y se forman colonias blancas. Las colonias blancas, resistentes a ampicilina, contienen plásmidos con DNA insertado.

El plásmido pUC18 ofrece varias ventajas como vector de clonación. Debido a su pequeño tamaño, puede aceptar fragmentos de DNA relativamente grandes; se replica hasta un alto número de copias, y tiene un gran número de sitios de restricción en el sitio de clonación múltiple, localizado dentro del gen *lacZ*. Las bacterias que contienen pUC18 producen colonias de color azul si crecen en un medio que contenga X-gal. El DNA insertado en el sitio de clonación múltiple interrumpe el gen *lacZ*, resultando en colonias blancas, lo que permite la identificación directa de las colonias que tienen insertos de DNA clonados.

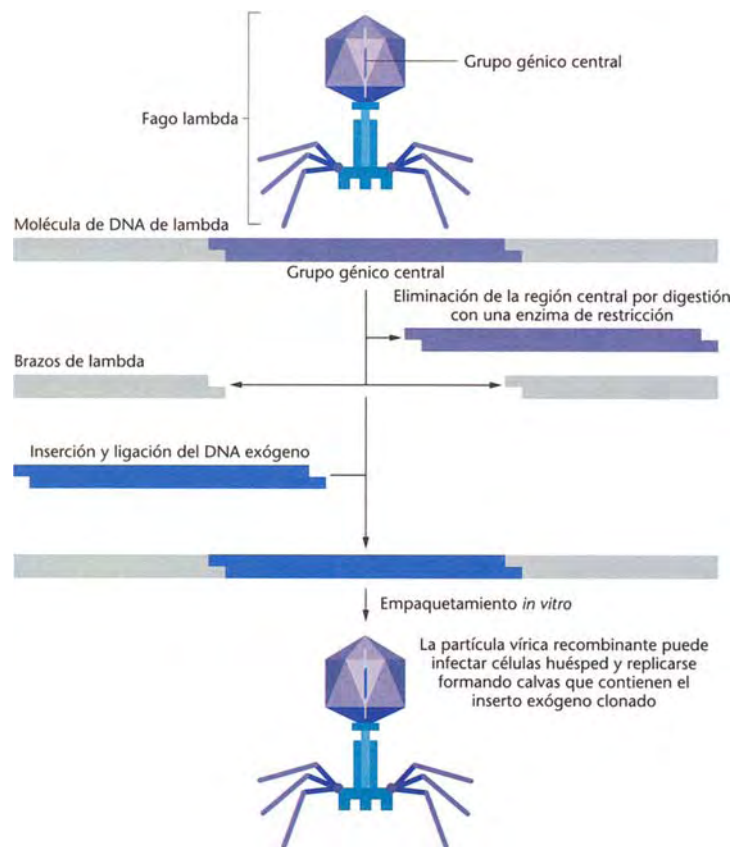


- **Bacteriófagos lambda (fago  $\lambda$ ) y M13.**

Lambda es un bacteriófago muy utilizado en experimentos de DNA recombinante. Se han identificado y cartografiado todos los genes de lambda, y se conoce toda la secuencia nucleotídica de su genoma. El tercio central de su cromosoma es prescindible, y puede reemplazarse por DNA exógeno sin afectar la capacidad del fago para infectar células y formar calvas. Se han desarrollado más de 100 [vectores](#) basados en el fago lambda, eliminando diversas porciones del grupo génico central.

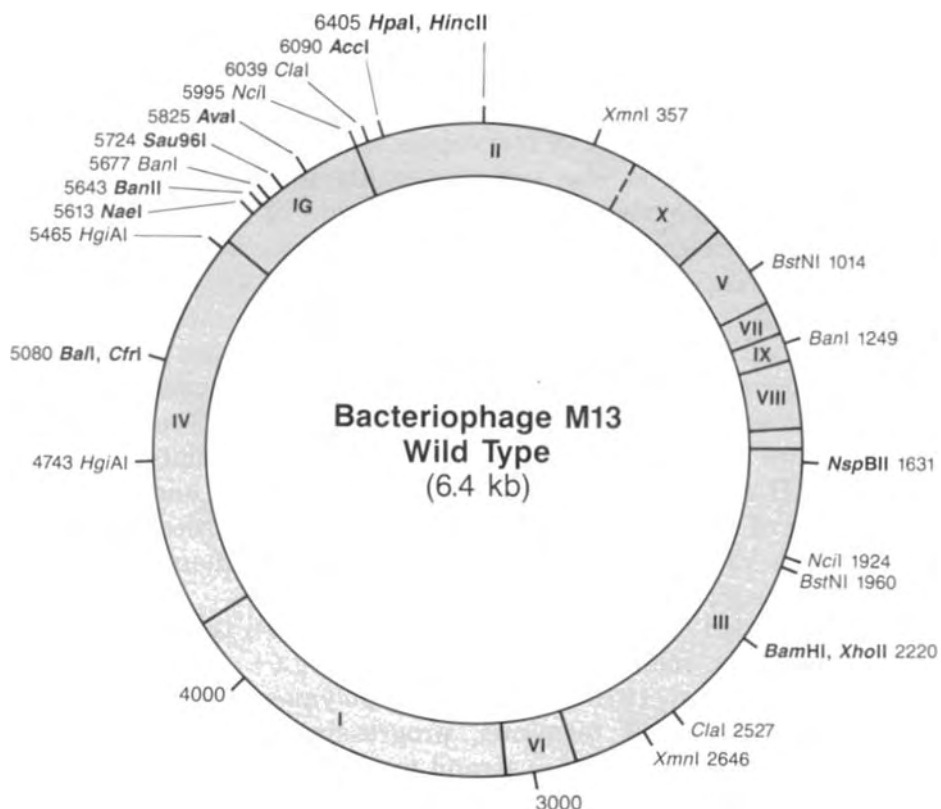
Para clonar utilizando el fago lambda, se corta el DNA del fago con una enzima de restricción (por ejemplo, *Eco*RI), lo que produce un brazo izquierdo, un brazo derecho y una región central. Se aíslan los brazos y se ligan (utilizando la DNA ligasa) a un segmento de DNA obtenido tras cortar DNA genómico con la misma enzima de restricción (en este ejemplo, con *Eco*RI).

Las moléculas recombinantes resultantes pueden introducirse en células huésped bacterianas por [transfección](#). Primero, se permeabilizan las células huésped mediante un tratamiento químico, y se mezclan con las moléculas ligadas. Los [vectores](#) que contienen el inserto entran en las células huésped, donde dirigen la síntesis de fagos infectivos, llevando cada uno de ellos el inserto de DNA. Como alternativa, se mezcla el DNA de lambda que contiene el inserto con los componentes proteicos del fago; de esta mezcla se forman partículas fágicas infectivas. Los fagos pueden amplificarse haciéndolos crecer en placas sembradas con bacterias, donde se formarán calvas, o bien infectando células en un medio líquido y recogiendo las células lisadas.



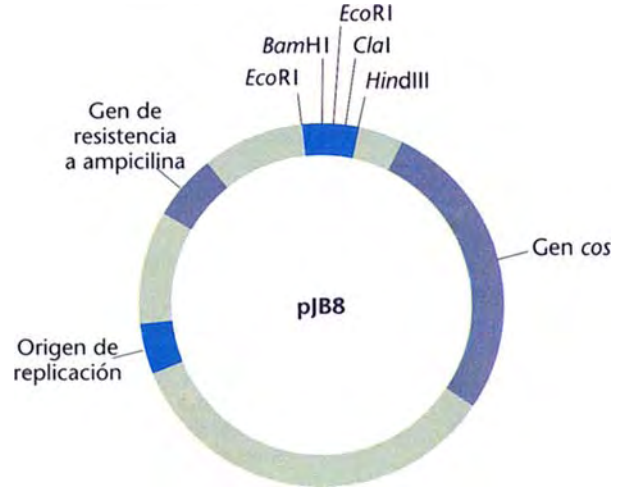
Pasos en la clonación utilizando el fago lambda como vector. Se extrae el DNA de una preparación de fago lambda y se elimina el grupo central de genes por tratamiento con una enzima de restricción. El DNA a clonar se corta con la misma enzima y se liga entre los brazos del cromosoma de lambda. Luego se empaqueta el cromosoma recombinante dentro de las proteínas del fago para formar un virus recombinante. Este virus puede infectar células bacterianas y replicar su cromosoma, incluido el inserto de DNA.

También se utilizan otros bacteriófagos como vectores, entre los que destaca el fago de cadena sencilla M13. Cuando M13 infecta a una célula bacteriana, la cadena sencilla (cadena +) se replica y produce una molécula de doble cadena denominada forma replicativa (RF). Las moléculas RF pueden considerarse similares a los plásmidos, pudiéndose insertar DNA exógeno en sitios de restricción únicos presentes en el DNA del fago. Cuando se reinsertan en células bacterianas, las moléculas RF se replican y producen cadenas sencillas (+), en las que hay una cadena del DNA insertado. La célula hace salir los clones de DNA de cadena sencilla que produce M13, que pueden recuperarse y utilizarse directamente para su secuenciación, o como molde para alteraciones mutacionales de la secuencia clonada.



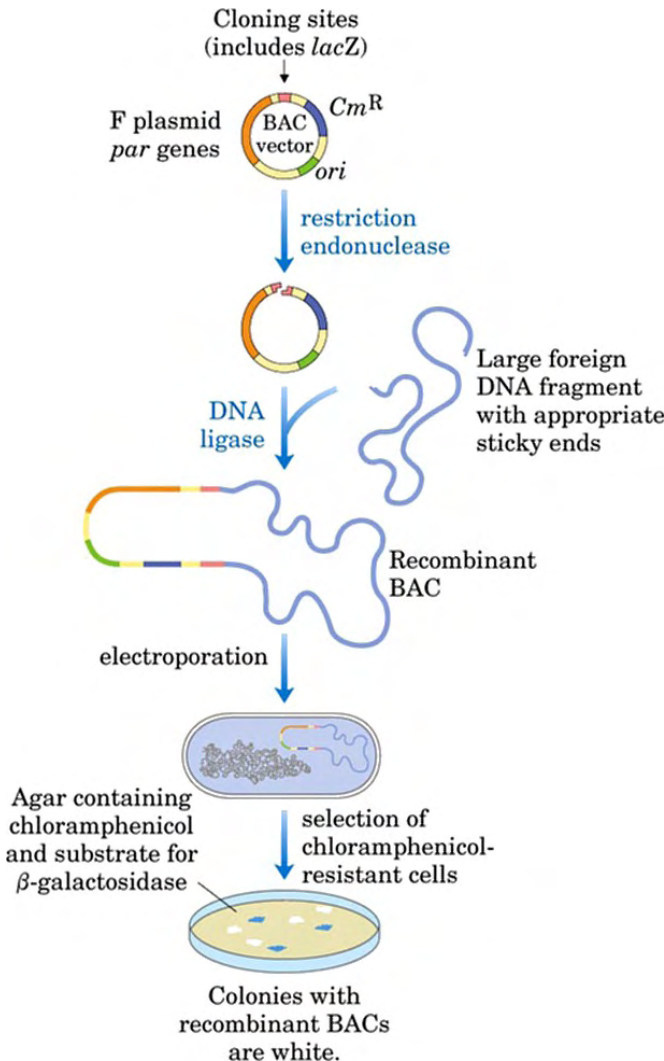
• **Los cósmidos y los vectores transbordadores**

Los cósmidos son **vectores** híbridos contruidos utilizando partes del cromosoma del fago lambda y de DNA plasmídico. Los cósmidos contienen la secuencia "cos" del fago lambda, necesaria para el empaquetamiento del DNA del fago dentro de su cubierta proteica, y secuencias plasmídicas de replicación y de genes de resistencia a antibióticos, que permiten identificar las células huésped que los contienen. El DNA de los cósmidos que contiene insertos de DNA se empaqueta en la cápside proteica de lambda para formar partículas fágicas infectivas. Una vez el cósmido entra en la célula huésped, se replica como un plásmido. Puesto que la mayoría del genoma de lambda se ha delecionado, los cósmidos pueden transportar insertos de DNA mucho más grandes que los que lambda puede llevar. Los cósmidos pueden transportar casi 50kb de DNA insertado, mientras que los **vectores** fágicos pueden acomodar insertos de DNA de unas 15kb y los plásmidos generalmente están limitados a insertos de 5-10kb.



El cósmido pJB8 contiene un origen de replicación bacteriano (ori), un solo sitio cos, un gen de resistencia a ampicilina (amp<sup>R</sup>, para seleccionar las colonias que han incorporado el cósmido), y una región que contiene cuatro sitios de restricción para la clonación (*Bam*HI, *Eco*RI, *Cla*I y *Hind*III). Puesto que el vector es pequeño (5,4kb de longitud), puede aceptar segmentos de DNA exógeno de 33 a 46kb de longitud. El sitio cos permite que el cósmido que contenga un inserto grande se empaquete con proteínas de cubierta vírica de lambda como si fuesen cromosomas víricos. Las cubiertas víricas que contienen un cósmido pueden utilizarse para infectar células huésped adecuadas, y el vector, que transporta el inserto de DNA, se transferirá a la célula huésped. Una vez dentro, la secuencia "ori" permite que el cósmido se replique como un plásmido bacteriano.

Existen otros **vectores** híbridos, contruidos con orígenes de replicación provenientes de distintas fuentes (por ejemplo, plásmidos y virus animales como SV40), que pueden replicarse en más de un tipo de célula huésped. Generalmente, estos **vectores** transbordadores contienen marcadores genéticos que permiten su selección en los dos sistemas huésped, y pueden utilizarse para transportar insertos de DNA entre *E.coli* y otras células huésped, como levadura, y viceversa. A menudo, estos **vectores** se emplean para investigar la expresión génica.

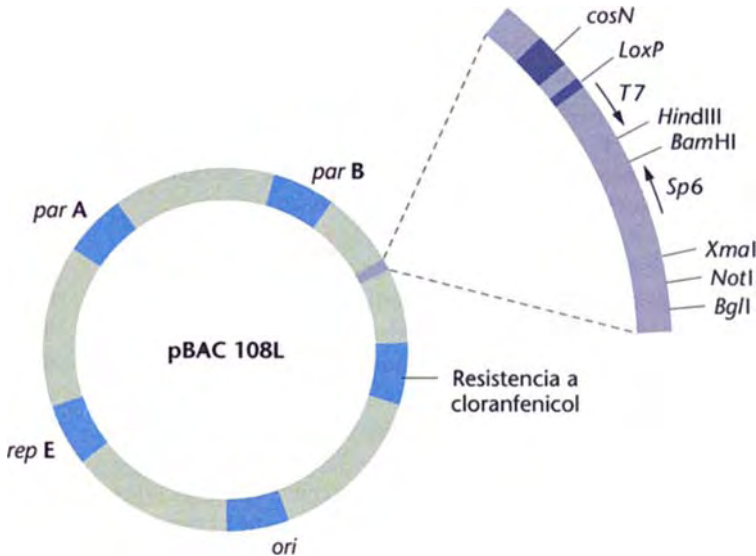


Pasos en la clonación utilizando cósmidos como **vectores**.



### • Cromosomas artificiales bacterianos.

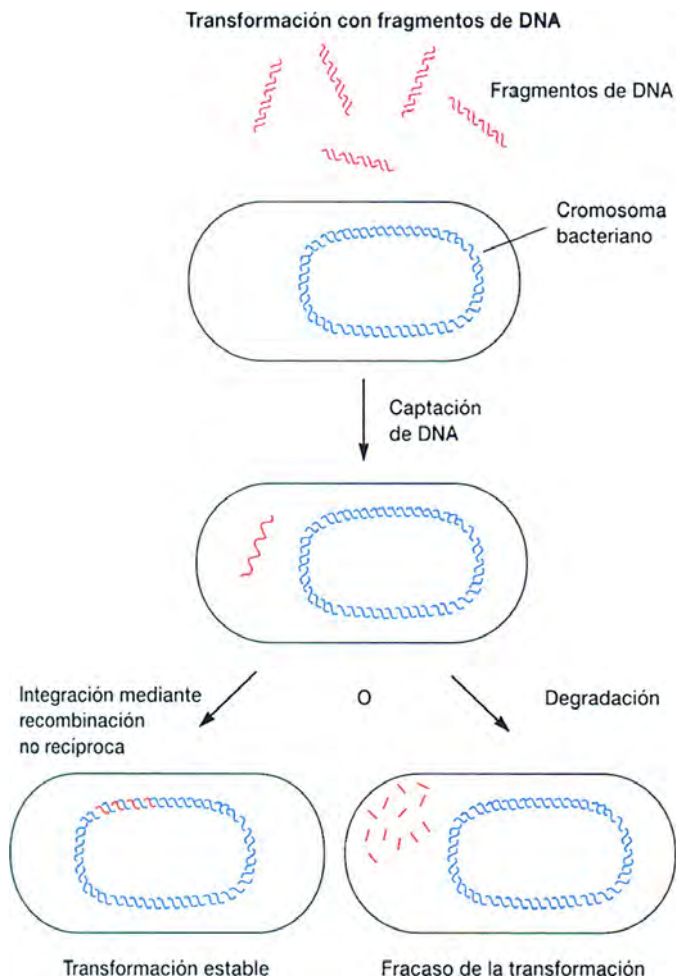
Para cartografiar y analizar genomas eucarióticos complejos, se ha desarrollado un vector multiuso denominado cromosoma artificial bacteriano (BAC) basado en el factor F de bacterias. El factor F es un plásmido que se replica independientemente y que está implicado en la transferencia de información genética durante la conjugación bacteriana. Puesto que los factores F pueden transportar fragmentos del cromosoma bacteriano de hasta 1Mb, han sido diseñados para que funcionen como [vectores](#) de DNA eucariótico. Los [vectores](#) BAC tienen los genes de replicación y de número de copias del factor F, e incorporan un marcador de resistencia a un antibiótico y sitios de restricción para insertar el DNA exógeno que se desea donar. Además, el sitio de donación está flanqueado por regiones promotoras que pueden utilizarse para generar moléculas de RNA y expresar así el gen donado, o para utilizadas como sonda para paseo cromosómico, y para secuenciar el DNA del inserto clonado.



Cromosoma artificial bacteriano (BAC). El sitio de clonación múltiple tiene diversos sitios de restricción únicos para la inserción de DNA exógeno. Las flechas marcadas como T7 y Sp6 son regiones promotoras que permiten la expresión de los genes clonados entre estas regiones.

### Transformación del DNA.

Uno de los mecanismos por el cual el DNA puede movilizarse entre las bacterias es la transformación, descubierta por Fred Griffith en 1928. La transformación consiste en la captación por parte de una célula receptora de una molécula o fragmento de DNA desnudo y la incorporación de esta molécula al cromosoma del receptor en una forma heredable. En la transformación natural, el DNA procede de una bacteria donadora. Es un proceso aleatorio, y puede transferirse cualquier porción del genoma entre bacterias.



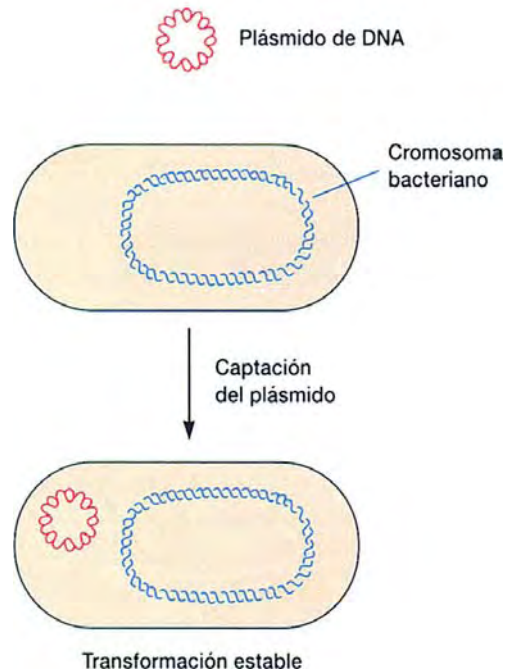
Cuando las bacterias se lisan, liberan unas cantidades considerables de DNA al medio que las rodea. Estos fragmentos liberados pueden ser relativamente grandes y contener diversos genes. Si un fragmento establece contacto con una célula competente, es decir, una célula capaz de captar DNA y ser transformada, dicho fragmento puede unirse a la célula y ser transportado a su interior. La frecuencia de transformación de las células muy [competentes](#) cuando se utiliza un exceso de DNA es de alrededor de  $10^{-3}$  para la mayoría de los géneros. Es decir, aproximadamente una célula de cada mil toma e integra el gen. La competencia es un fenómeno muy complejo y depende de diversas condiciones. Es preciso que las bacterias se encuentren en una determinada fase de crecimiento, por ejemplo, *S.pneumoniae* se vuelve competente durante la fase exponencial, cuando la población alcanza las  $10^7$  ó  $10^8$  células/mL. Cuando una población se vuelve competente, las bacterias del tipo de los neumococos segregan una pequeña proteína denominada "factor de competencia" que estimula la producción de 8 a 9 nuevas proteínas necesarias para el proceso de transformación. La transformación natural sólo se ha descubierto hasta la fecha en ciertos géneros de bacterias grampositivas y gramnegativas: *Streptococcus*, *Bacillus*, *Thermoactinomyces*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Azotobacter* y *Pseudomonas*, aunque otros géneros también pueden ser capaces de experimentar transformación. La transferencia de genes mediante este proceso ocurre en medios terrestres y marinos, y puede constituir una importante ruta de intercambio genético en la naturaleza.

Transformación natural con fragmentos de DNA.

La transformación en *Haemophilus influenzae*, una bacteria gramnegativa, difiere de la de *S.pneumoniae* en diversos aspectos. *Haemophilus* no produce un factor de competencia para estimular el desarrollo de competencia, y sólo capta el DNA procedente de especies estrechamente relacionadas. El DNA bicatenario forma complejos con proteínas y es captado por vesículas de membrana. La especificidad de la transformación de *Haemophilus* se debe a una secuencia especial de pares de bases (5'-AAGTGGGTCA-3') que se repite unas 1.400 veces en el DNA de *H.influenzae*. El DNA debe contener esta secuencia para que una célula competente se una a él.

La transformación artificial se lleva a cabo en el laboratorio mediante diversas técnicas, entre ellas el tratamiento de las células con cloruro cálcico, que aumenta la permeabilidad de sus membranas al DNA. Este enfoque tiene éxito incluso con especies que no son [competentes](#) de forma natural, como *E.coli*. Para aumentar la frecuencia de transformación se utilizan concentraciones relativamente más altas de DNA, superiores a las que están presentes en condiciones normales en la naturaleza. Cuando se utilizan para la transformación fragmentos lineales de DNA, suele hacerse que *E.coli* pierda la actividad de una o más exonucleasas con el fin de proteger los fragmentos transformantes. Resulta más sencillo transformar bacterias con DNA de plásmido, ya que los plásmidos no se degradan con tanta facilidad como los fragmentos lineales y son capaces de replicarse dentro del huésped. Éste es un método habitual para introducir DNA recombinante en las células bacterianas. Puede introducirse DNA de cualquier fuente en las bacterias insertándolo en un plásmido antes de la transformación.

#### Transformación con un plásmido



Transformación artificial con plásmidos.

#### Transducción.

Los virus bacterianos o bacteriófagos participan en otra modalidad de transferencia génica bacteriana. Estos virus tienen estructuras relativamente sencillas en las que el material genético del virus está incluido dentro de una cubierta externa, compuesta principalmente o exclusivamente de proteínas. La cubierta protege el genoma y lo transmite entre células huésped.

Después de infectar la célula huésped, un bacteriófago a menudo toma el control y obliga al huésped a fabricar numerosas copias del virus. Finalmente la bacteria huésped estalla o se lisa y libera los nuevos fagos. Este ciclo reproductor se denomina ciclo lítico porque concluye con la lisis del huésped. Consta de cuatro fases:

- En la primera, la partícula viral se fija a un sitio receptor específico de la superficie bacteriana.
- En la segunda, el material genético del virus que con frecuencia es DNA bicatenario, penetra entonces en la célula. Tras la adsorción y la penetración, el cromosoma viral obliga a la bacteria a fabricar ácidos nucleicos y proteínas del virus.
- La tercera fase comienza tras la síntesis de los componentes virales. Se ensamblan fagos a partir de estos componentes. El proceso de ensamblaje puede ser complejo, pero en todos los casos el ácido nucleico se introduce ("se empaqueta") en la cápside proteica viral.
- Finalmente, los virus maduros son liberados al medio mediante la lisis de la célula huésped.

Los virus bacterianos que se reproducen mediante un ciclo lítico a menudo se denominan bacteriófagos virulentos porque destruyen la célula huésped. Muchos fagos DNA, como el fago lambda, también son capaces de establecer una relación diferente con su huésped. Tras la adsorción y la penetración, el genoma viral no toma el control de su huésped ni lo destruye, al tiempo que produce nuevos fagos. En cambio, el genoma permanece en el interior de la célula huésped y se reproduce junto con el cromosoma bacteriano. Se origina un clon de células infectadas que puede crecer durante un largo periodo con apariencia totalmente normal. Cada una de estas células infectadas es capaz de producir fagos y lisarse bajo las condiciones ambientales apropiadas. Esta relación entre el fago y el huésped se denomina "lisogenia". La forma latente del genoma viral que permanece en el interior de la célula huésped sin destruirla se denomina "profago" y suele estar integrado en el genoma bacteriano. En ocasiones, la producción de fagos se activa en un cultivo de bacterias lisógenas mediante la exposición a radiación UV u otros factores. Las células lisógenas son destruidas y se liberan nuevos fagos. Este fenómeno se denomina "inducción".

Por lo tanto, la transducción natural es la transferencia de genes bacterianos por medio de virus. Se produce la incorporación de genes bacterianos al interior de la cápside de un fago a consecuencia de errores cometidos durante el ciclo vital del virus. El virus que contiene estos genes los inyecta a continuación en otra bacteria, completando de esta forma la transferencia. La transducción es el mecanismo más frecuente de intercambio y recombinación génica en las bacterias.

Se distinguen dos tipos muy diferentes de transducción:

- Generalizada. Ocurre durante el ciclo lítico de fagos virulentos y atemperados, y es capaz de transferir cualquier parte del genoma bacteriano. Durante la fase de ensamblaje, cuando los cromosomas virales son empaquetados en el interior de cápsides proteicas pueden quedar encapsidados fragmentos del cromosoma bacteriano parcialmente degradado. Puesto que la cápside sólo puede contener una cantidad limitada de DNA, el DNA del virus no se incorpora a la cápside, y sólo queda incluido en ella el DNA bacteriano. La cantidad de DNA bacteriano transportada depende principalmente del tamaño de la cápside.
- Especializada. En ella la partícula transductora transporta sólo porciones específicas del genoma bacteriano. La transducción especializada es posible a consecuencia de un error durante el ciclo vital lisogénico. Cuando se induce a un fago a abandonar el cromosoma de la célula huésped, en ocasiones la escisión se realiza de forma incorrecta. El genoma del fago resultante contiene porciones del cromosoma bacteriano (aproximadamente, entre el 5 y el 10 % del DNA bacteriano) adyacentes al sitio de integración. El genoma del fago originado en la transducción suele ser defectuoso y carece de alguna parte de su sitio de fijación. La partícula transductora inyecta los genes virales a otra bacteria, aunque el fago defectuoso no es capaz de reproducirse sin ayuda. Los genes bacterianos pueden quedar incorporados de forma estable en las condiciones adecuadas. El ejemplo mejor estudiado de transducción especializada es el fago lambda.

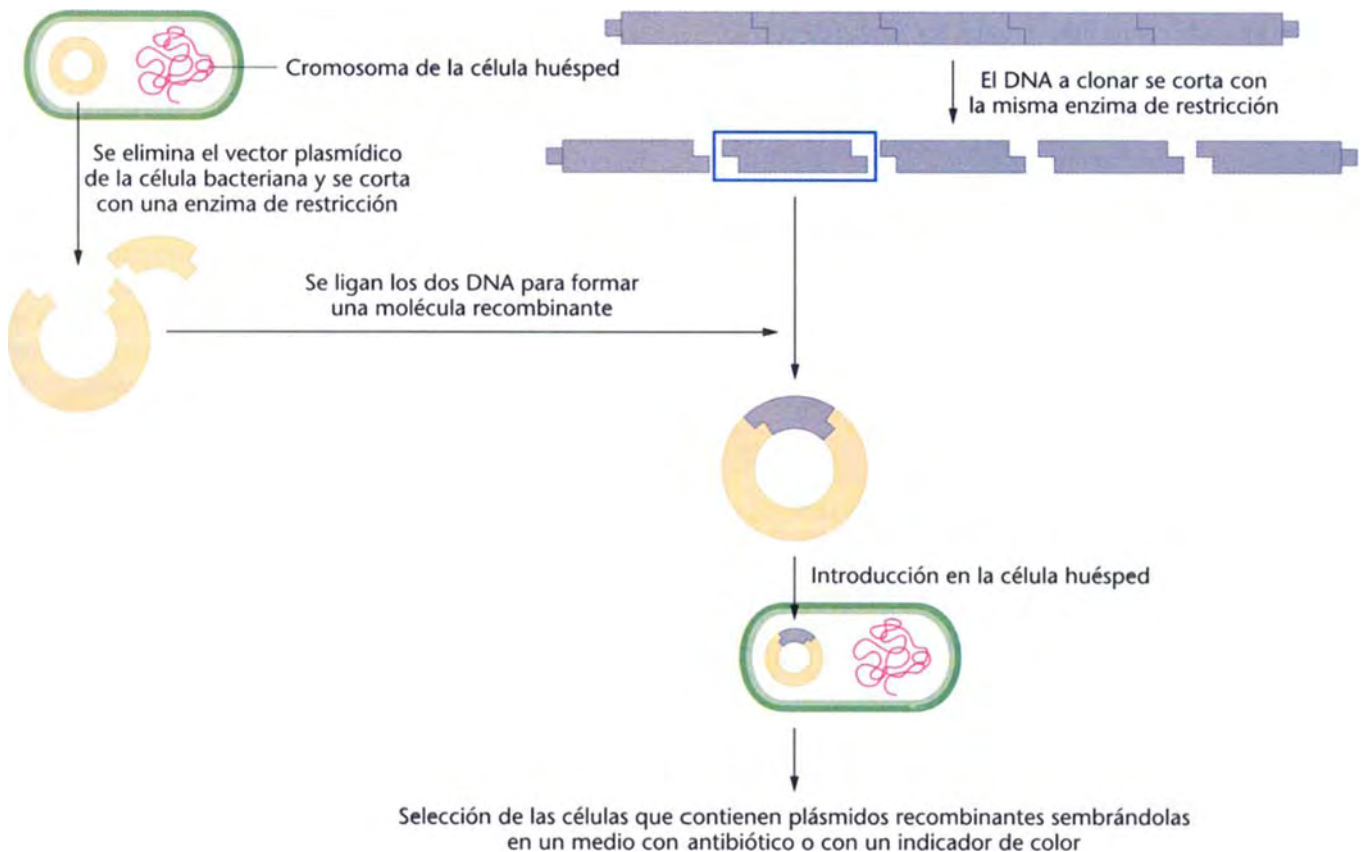
### Clonación de DNA en *Escherichia coli*.

Para replicar el DNA clonado se pueden utilizar distintos tipos de célula huésped. Uno de los huéspedes más utilizados es la cepa de laboratorio K12 de *E.coli*. Ésta y otras cepas de *E.coli* se utilizan como huésped ya que están bien caracterizadas genéticamente y pueden aceptar un amplio espectro de [vectores](#), incluyendo los plásmidos, los fagos y los cósmidos.

Para crear moléculas de DNA recombinante se precisan varios pasos. Si se utiliza un plásmido como vector, el procedimiento es el siguiente:

1. El DNA que se va a clonar se aísla y se trata con una enzima de restricción para crear fragmentos que acaben en secuencias específicas.
2. Estos fragmentos se ligan a moléculas de plásmido que han sido cortadas con la misma enzima de restricción, obteniéndose un vector recombinante.
3. El vector recombinante se transfiere a células huésped bacterianas, generalmente por transformación, un proceso en el que las moléculas de DNA cruzan la membrana de la célula huésped transfiriéndose a su interior.
4. La célula huésped se hace crecer en una placa de cultivo, donde formará colonias. Puesto que las células de cada una de las colonias provienen de una sola célula inicial, todas las células de la colonia, y los plásmidos que contienen, son genéticamente idénticas, o clones. Se rastrean las colonias para identificar las que han incorporado el plásmido recombinante.

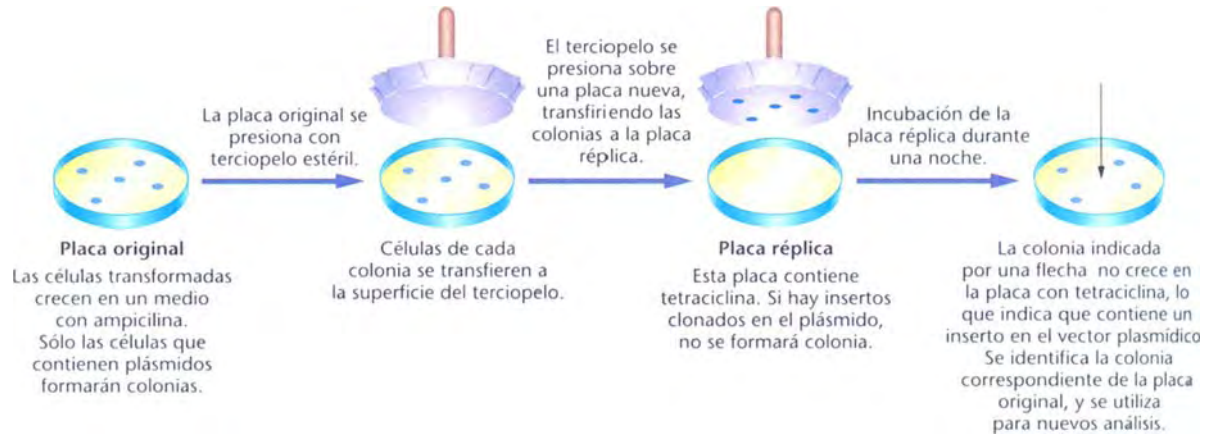
La cepa de *E.coli* huésped carece de enzimas de restricción y es *recA*<sup>-</sup> (carece del gen que codifica la proteína RecA, una ATPasa necesaria para los procesos de recombinación genética), con objeto de reducir las posibilidades de que el DNA recombinante sufra recombinación con el cromosoma de la célula huésped. *Bacillus subtilis* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* también pueden actuar de huéspedes. Como se volverá a mencionar a lo largo de este documento, los [vectores](#) plasmidicos penetran en las células de *E.coli* mediante un proceso de transformación inducido por cloruro cálcico o mediante [electroporación](#) a 3-24 kV /cm, que es eficaz en bacterias tanto grampositivas como gramnegativas.



Resumen de los pasos seguidos en la clonación de un vector plasmídico. Los vectores plasmídicos se aíslan y se cortan con una enzima de restricción. El DNA a clonar se corta con la misma enzima de restricción, produciendo una colección de fragmentos. Estos fragmentos se reparten entre los vectores y se transfieren a huéspedes bacterianos para su replicación. Las células bacterianas que contienen plásmidos pueden identificarse por crecimiento en un medio selectivo, y pueden aislarse. El DNA clonado puede recuperarse del huésped bacteriano para nuevos análisis.

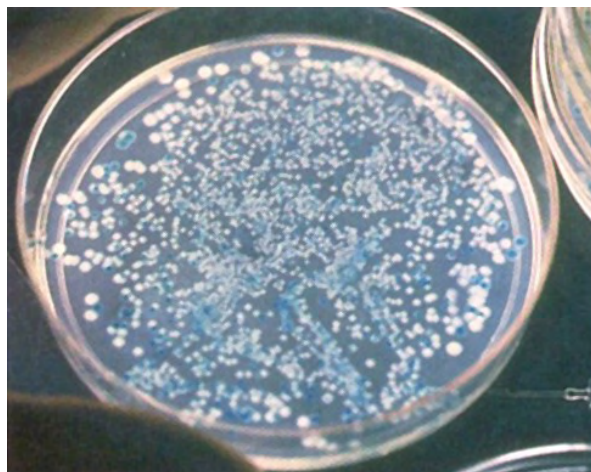
Se utilizan varios métodos para seleccionar las colonias que contienen plásmidos con el inserto de DNA. Este proceso se denomina "rastreo" (o "cribado"). Para [vectores](#) como pBR322, el rastreo es un proceso que consiste en dos etapas:

- Por ejemplo, si el DNA que se desea clonar se inserta dentro del gen de resistencia a tetraciclina, este gen se inactivará. Después de transformar células huésped con el plásmido recombinante, éstas se hacen crecer en placas de cultivo que contienen el antibiótico ampicilina. Todas las células que hayan incorporado un plásmido (con o sin inserto) crecerán y formarán colonias, mientras que las células que no lo hayan incorporado morirán ya que son sensibles a la ampicilina.
- En el segundo paso, se identifican las colonias que contienen plásmidos con el inserto de DNA. En este paso, se transfieren las colonias de la placa que contiene ampicilina a una placa que contiene tetraciclina mediante un procedimiento denominado "réplica". Las colonias que contienen el plásmido con el inserto no crecerán en la placa con tetraciclina, debido a que el inserto ha inactivado el gen de resistencia a tetraciclina. Entonces, el patrón de colonias de la placa con tetraciclina se compara con el de la placa con ampicilina, y se identifican las colonias de la placa con ampicilina que no han crecido en la placa con tetraciclina. Las células de estas colonias contienen [vectores](#) con el inserto de DNA, y se transfieren a un medio de crecimiento para nuevos análisis.



Selección de colonias que contienen un vector plasmídico que tiene dos genes de resistencia a antibióticos, uno para tetraciclina y otro para ampicilina. En este experimento, la presencia del inserto de DNA en el plásmido inactivará el gen de resistencia a la tetraciclina. Primero, se hacen crecer las células transformadas con el plásmido recombinante en un medio que contiene ampicilina. Como las células huésped son sensibles a ampicilina y el plásmido tiene un gen de resistencia a ampicilina, sólo crecerán aquellas células que hayan incorporado el plásmido. Se prepara una réplica de las colonias con un trozo de terciopelo estéril. Al presionar el terciopelo sobre la placa, algunas células de cada colonia se pegarán a él. Luego se presiona el terciopelo sobre la superficie de una placa que contiene tetraciclina. Las células que contienen los plásmidos con inserto no crecerán ya que se ha inactivado el gen de la tetraciclina. Comparando el patrón de colonias de la placa con tetraciclina con el de la placa original, las colonias que contienen el inserto pueden identificarse y recuperarse de la placa original, y pueden hacerse crecer para nuevos análisis.

Otros [vectores](#), como pUC18, tienen construcciones que producen colonias azules cuando están en células bacterianas sembradas en un medio que contiene una sustancia denominada "X-gal". Los sitios de restricción del sitio de clonación múltiple de pUC18 están dentro del gen *lac*, el gen responsable de la capacidad de formar colonias azules, y la inserción de DNA en el sitio de clonación múltiple interrumpe esta capacidad. Como se ha expuesto anteriormente, los plásmidos que contienen segmentos de DNA insertados producen colonias blancas, mientras que los que no tienen insertos producen colonias azules.



De igual modo, los fagos que contengan DNA exógeno también pueden utilizarse para infectar células huésped de *E. coli*, y cuando se siembran en un medio sólido, cada una de las calvas resultantes representa los descendientes clonados de un solo fago inicial. Los cósmidos infectan a las células bacterianas como los fagos, pero luego se replican como los plásmidos dentro de la célula huésped. Las células que contienen cósmidos con DNA clonado pueden identificarse y recuperarse de la misma manera que los plásmidos.

### Clonación en huéspedes eucarióticos

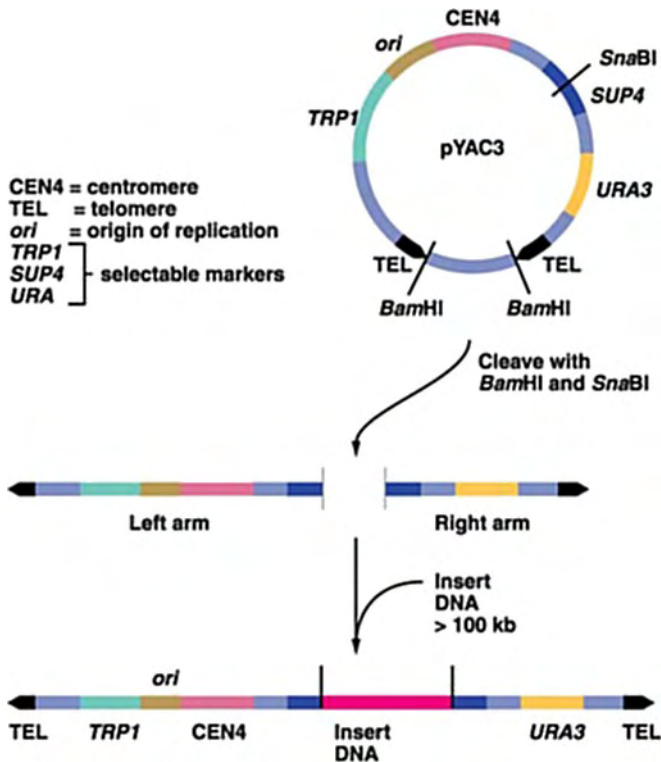
Hemos descrito la utilización de *E. coli* como huésped para la clonación. También pueden utilizarse otras especies de bacterias como huéspedes, como *B. subtilis* y *Streptomyces*. Estos sistemas huésped bacterianos y sus [vectores](#) son parecidos a los descritos para *E. coli*. Sin embargo, para estudiar la expresión y regulación de los genes eucarióticos, a menudo es conveniente e incluso necesario utilizar huéspedes eucarióticos. Se han desarrollado varios sistemas de clonación utilizando huéspedes eucarióticos.

- **Vectores de levadura.**

Aunque la levadura es un organismo eucariótico, puede manipularse y crecer de manera parecida a las células bacterianas. Además, la genética de las levaduras se ha investigado exhaustivamente, lo que ha proporcionado un gran catálogo de mutaciones y unos mapas genéticos altamente detallados de sus cromosomas. En levadura hay un plásmido de origen natural, denominado "plásmido 2 micras" (o "plásmido 2 $\mu$ "), que se ha utilizado para construir varios [vectores](#) de clonación para levadura. Combinando secuencias de plásmidos bacterianos con secuencias del plásmido 2 micras, se pueden producir [vectores](#) con muchas propiedades útiles.

- **Cromosomas artificiales de levadura.**

Un segundo tipo de vector de levadura es el cromosoma artificial de levadura (YAC, del inglés "*yeast artificial chromosome*"). De tipo lineal, un YAC contiene telómeros de levadura en cada extremo, un origen de replicación (denominado secuencia de replicación autónoma o ARS), y un centrómero de levadura que permite la distribución del YAC replicado a las células hija durante la división celular. El YAC también contiene un marcador de selección en cada brazo (TRP1 y URA3), y un grupo de sitios de restricción únicos para insertar DNA.



Clonación en un cromosoma artificial de levadura (YAC). El cromosoma contiene secuencias teloméricas (TEL) provenientes de un protozoo ciliado, *Tetrahymena*, un centrómero (CEN), y un origen de replicación (ARS). Estos elementos dan al vector de clonación las propiedades de un cromosoma. TRP1 y URA3 son genes de levadura que son marcadores de selección para los brazos izquierdo y derecho del cromosoma, respectivamente. Cerca del centrómero hay una región que contiene varios sitios de restricción. Si se corta esta región con una enzima de restricción se rompe el cromosoma en dos brazos. El DNA a clonar se trata con la misma

enzima, produciendo una colección de fragmentos. Los brazos y los fragmentos pueden ligarse juntos, y el cromosoma artificial puede insertarse en células huésped de levadura. Como los cromosomas de levadura son grandes, el cromosoma artificial puede aceptar insertos de hasta varios millones de pares de bases.

En los YAC pueden insertarse segmentos de DNA de más de 1 megabase de longitud (1 Mb). La capacidad de clonar grandes trozos de DNA en estos [vectores](#) los ha convertido en herramientas importantes para construir mapas físicos de genomas eucarióticos, incluyendo el genoma humano. Muchas de las investigaciones del Proyecto Genoma Humano han dependido de la utilización de [vectores](#) YAC.

Aunque la clonación en levaduras es uno de los sistemas actuales de huésped eucariótico más avanzado, también se están desarrollando otros huéspedes fúngicos. Además, otros sistemas huésped eucarióticos, entre los que se incluyen cultivos tisulares de células de plantas y de mamíferos, son muy prometedores.

## Construcción de bibliotecas de DNA

Puesto que cada segmento de DNA clonado es relativamente pequeño, deben construirse muchos clones diferentes para incluir todas las pequeñas porciones del genoma de un organismo. El conjunto clonado de todas las secuencias genómicas de un sólo individuo se denomina **biblioteca**. Las bibliotecas clonadas pueden provenir del genoma completo de un individuo, del DNA de un solo cromosoma, o del conjunto de genes transcricionalmente activos en un único tipo celular.

### Bibliotecas genómicas.

Las bibliotecas genómicas (o genotecas) suelen construirse utilizando [vectores](#) fágicos, que pueden contener grandes fragmentos cromosómicos. Para preparar una biblioteca en el fago lambda, se corta el DNA de lambda con una enzima de restricción para eliminar el grupo génico central, tal y como se ha comentado anteriormente. El DNA genómico que se desea clonar se corta con la misma enzima, y se purifican los fragmentos cortados de tamaño óptimo para el empaquetamiento (de 15 a 17kb) mediante una [electroforesis](#) en gel o por centrifugación. Estos fragmentos de DNA se ligan con los brazos del cromosoma de lambda para formar la biblioteca.

En una biblioteca genómica están representados todos los genes de un organismo. La biblioteca es un medio para recuperar cualquier gen del genoma del organismo, pudiéndose estudiar con detalle junto con sus secuencias reguladoras adyacentes. Teóricamente, una biblioteca genómica contiene al menos una copia de todas las secuencias representadas en el genoma. Sin embargo, cada molécula de vector puede contener sólo unas relativamente pocas kilobases de DNA insertado, por lo que una de las primeras tareas al preparar una biblioteca genómica es seleccionar el vector más adecuado para contener el genoma completo en el menor número posible de clones. El número de clones necesarios para contener todas las secuencias de un genoma depende del tamaño medio de los insertos clonados y del tamaño del genoma a clonar. Este número puede calcularse con la siguiente fórmula:

donde "N" es el número de clones necesarios, "P" es la probabilidad de recuperar una secuencia determinada, y "f" representa la fracción del genoma presente en cada clon.

Supongamos que deseamos preparar una biblioteca del genoma humano utilizando como vector al fago lambda. El genoma humano tiene  $3,0 \times 10^6$  kb; si el tamaño medio de los insertos clonados en el vector es de 17 kb, y queremos tener una probabilidad del 99% ( $P = 0,99$ ) de que cualquier gen humano esté representado al menos en una copia, precisaremos una biblioteca de:

$$N = \frac{\ln(1-0,99)}{\ln\left(1 - \frac{17 \times 10^3}{3,0 \times 10^9}\right)} = 8,1 \times 10^5 \text{ clones}$$

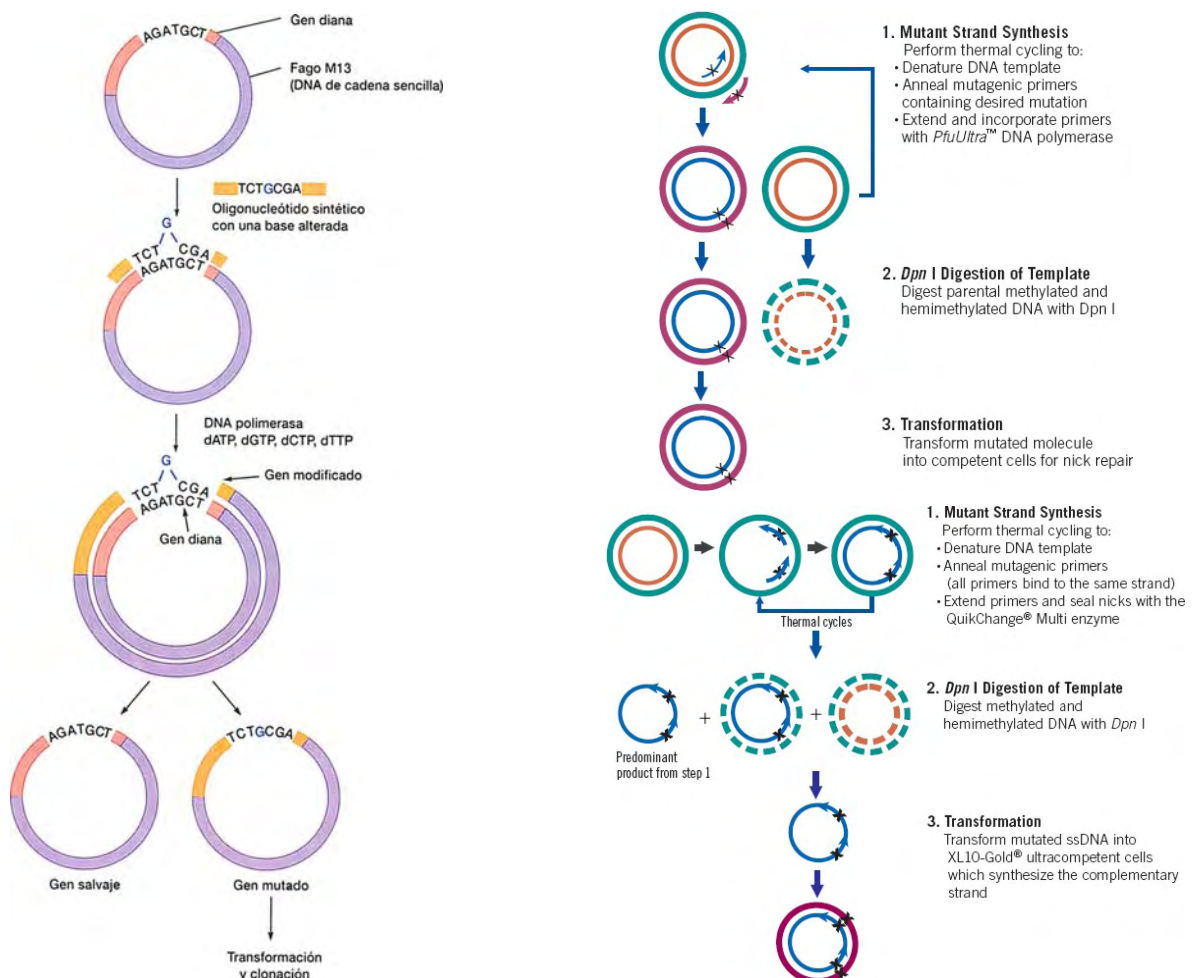
y si hubiésemos seleccionado a pBR322 como vector, con un tamaño medio de insertos de 5 kb, la biblioteca necesaria contendría:

$$N = \frac{\ln(1-0,99)}{\ln\left(1 - \frac{5 \times 10^3}{3,0 \times 10^9}\right)} = 2,8 \times 10^6 \text{ clones}$$

• **Mutagénesis dirigida.**

Los avances en las técnicas de síntesis de DNA han acelerado los progresos experimentados en el estudio de las funciones de las proteínas y de la expresión génica. Una de las formas más efectiva de estudiar la relación entre la estructura y la función proteicas consiste en alterar una porción determinada de la proteína y observar los cambios funcionales que se producen. Hasta hace unos años, esto se realizaba mediante la modificación química de aminoácidos individuales o mediante inducción de mutaciones en el gen que codifica la proteína objeto de estudio. Sin embargo, la modificación química de una proteína no siempre es específica, ya que pueden verse alterados varios aminoácidos y no sólo el que se desea alterar; por otro lado, hasta hace unos años no siempre era posible producir la mutación adecuada en la localización del gen que se deseaba.

Estas dificultades han sido superadas en los últimos años gracias a la técnica de la **mutagénesis dirigida**; en ella se sintetiza un oligonucleótido de unas 20 bases que contiene el cambio de secuencia deseado. Posteriormente se permite que dicho oligonucleótido alterado con la mutación objeto de estudio hibride con una copia monocatenaria del gen salvaje original completo; posteriormente se amplifica el complejo mediante **PCR**, con lo que la polimerasa extiende el oligonucleótido y copia el resto del gen diana para producir una nueva copia del gen con la mutación deseada. Si unimos el gen a un fago de DNA monocatenario como es el caso del fago M13, puede introducirse el gen mutado en una bacteria huésped y clonarse, con lo que obtendremos grandes cantidades de una proteína mutante para el estudio de su función.



### Bibliotecas cromosómicas.

Una biblioteca construida a partir de una fracción genómica, como un cromosoma, puede ser muy valiosa para seleccionar genes específicos y para examinar la organización del cromosoma. Por ejemplo, se aisló por microdissección por láser un pequeño segmento del cromosoma X de *Drosophila* correspondiente a una región de unas 50 bandas politénicas. Se extrajo el DNA de este fragmento cromosómico, se cortó con una endonucleasa de restricción, y se clonó en un vector lambda. Esta región del cromosoma contiene los genes *white*, *zeste* y *Notch*, así como el sitio original de un elemento transponible que puede transponer un segmento cromosómico a más de un centenar de otros loci. Aunque puede ser técnicamente difícil, este procedimiento produce una biblioteca que contiene sólo los genes que nos interesan y sus secuencias adyacentes.

Las bibliotecas provenientes de cromosomas individuales humanos se han preparado utilizando la citometría de flujo. Los cromosomas de células mitóticas se tiñen con dos colorantes fluorescentes, uno que se une a los pares A – T, y otro a los pares G – C. Los cromosomas teñidos pasan por un rayo láser que estimula la fluorescencia, y un fotómetro clasifica y fracciona los cromosomas según las diferencias de unión de los colorantes y de dispersión de la luz. Utilizando esta técnica, diferentes laboratorios han preparado bibliotecas de cada uno de los cromosomas humanos. Esto ha facilitado enormemente el cartografiado y el análisis de cromosomas individuales como parte del Proyecto Genoma Humano.

Una modificación de la [electroforesis](#) conocida como electroforesis de campo pulsátil se ha utilizado para aislar cromosomas de levadura con el fin de construir bibliotecas cromosómicas de este organismo. El aislamiento y la construcción de bibliotecas del cromosoma III de levadura (315 kb) fue el punto de partida para la formación de un consorcio de 35 laboratorios para determinar la secuencia nucleotídica de este cromosoma. Uno de los resultados inesperados de este proyecto fue el descubrimiento de que aproximadamente la mitad de las secuencias codificantes de proteínas de este cromosoma eran desconocidas. Para muchos genéticos, fue difícil aceptar que los métodos convencionales de [mutagénesis](#) sistemática y de cartografiado de genes no fuesen tan eficientes como pensaban. Sin embargo, este descubrimiento se confirmó y se amplió en 1994 con la publicación de la secuencia del cromosoma XI (664 kb), y en 1996 con la secuenciación del resto del genoma de levadura. Estos resultados indican que las bibliotecas cromosómicas pueden utilizarse para acceder a los loci génicos a los que los métodos convencionales como la [mutagénesis](#) y el análisis genético no han podido acceder, o de los que no se dispone o no se conocen otras sondas como el mRNA o los productos génicos. Además, las bibliotecas cromosómicas proporcionan un medio para investigar la organización molecular y la secuencia nucleotídica en una región definida del genoma.

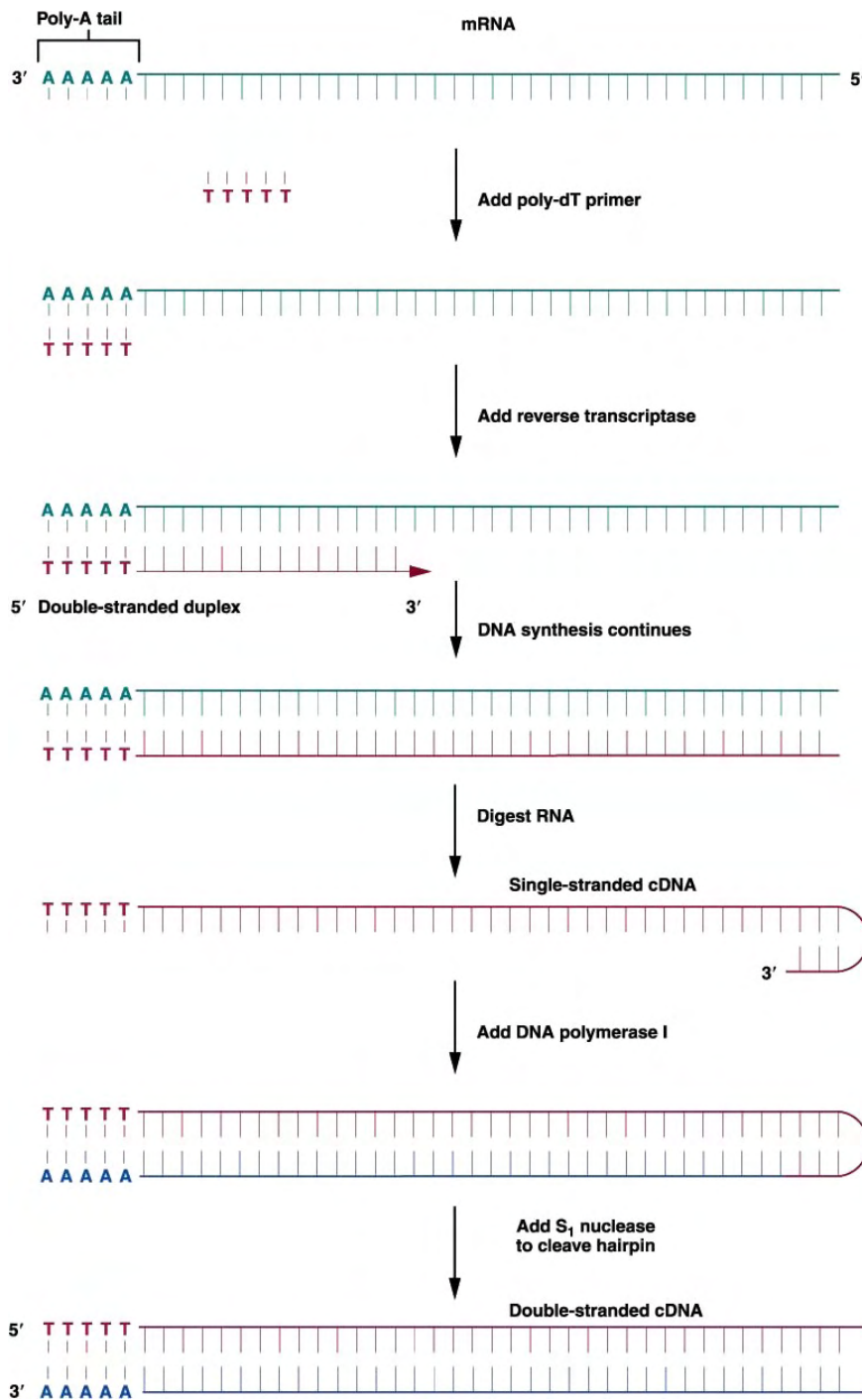
### Bibliotecas de cDNA.

Se puede construir una biblioteca que represente los genes que se están transcribiendo en una célula eucariótica en un momento dado, utilizando el mRNA aislado de esa célula. Casi todas las moléculas de mRNA eucariótico tienen una cola de poli-A en su extremo 3'. Primero, se hibrida la población de moléculas de mRNA que tienen colas de poli-A 3' con oligo-dT (DNA corto de cadena sencilla formado sólo por desoxitimidina).

La secuencia de oligo-dT hibrida con la cola de poli-A, y sirve de cebador para la síntesis de una cadena complementaria de DNA utilizando la enzima retrotranscriptasa. Esta enzima es una DNA polimerasa dependiente de RNA que copia un molde de RNA de cadena sencilla en un DNA de cadena sencilla. El resultado es un dúplex RNA – DNA de doble cadena. La cadena de RNA se elimina tratándola con la enzima ribonucleasa H. Entonces, la cadena sencilla de DNA se utiliza como molde para sintetizar la cadena complementaria de DNA, utilizando la DNA polimerasa I. El extremo 3' de la cadena sencilla de DNA se dobla sobre sí mismo formando una horquilla (un lazo), por lo que puede servir de cebador para sintetizar la segunda cadena. El resultado es un DNA dúplex con las cadenas unidas por un extremo. La horquilla puede abrirse utilizando la enzima nucleasa S<sub>1</sub> obteniéndose una molécula de DNA de doble cadena (denominada DNA complementario o cDNA), cuya secuencia nucleotídica deriva de una molécula de RNA.

Si se añade un trozo corto de DNA con sitios de restricción en cada uno de sus extremos, el cDNA puede clonarse. Este sitio de clonación puede cortarse con la enzima de restricción adecuada, produciendo extremos cohesivos, lo que permite que el cDNA se inserte en el sitio de restricción de un vector plasmídico o fágico.

Una biblioteca de cDNA es diferente a una biblioteca genómica ya que representa sólo un subconjunto de todos los genes del genoma, no contienen las secuencias promotoras adyacentes al gen y tampoco contienen los intrones, ya que éstos han sido eliminados del pre-mRNA durante la maduración del mismo. Las bibliotecas de cDNA utilizan mRNA como punto de partida, de manera que sólo representan a las secuencias que se están expresando en un tipo celular, en un tejido, o en un estadio concreto del desarrollo embrionario. La decisión de construir una biblioteca genómica o de cDNA depende del problema planteado. Si se está interesado en un gen particular, podría ser más fácil preparar una biblioteca de cDNA del tejido en el que se expresa dicho gen. Por ejemplo, los glóbulos rojos producen grandes cantidades de hemoglobina, y la mayoría del mRNA de estas células es mRNA de la  $\beta$ -globina. Una biblioteca de cDNA preparada utilizando mRNA aislado de glóbulos rojos permite aislar con facilidad un gen de la globina. Si nos interesasen las secuencias reguladoras adyacentes al gen de la globina, necesitaríamos construir una biblioteca genómica, ya que estas secuencias reguladoras no se encuentran en el mRNA de la globina, y por lo tanto no estarían representadas en la biblioteca de cDNA.



Producción de cDNA a partir de mRNA. Puesto que muchos mRNA eucarióticos tienen una cola poliadenilada de longitud variable, en su extremo 3', un oligonucleótido poli-dT corto puede hibridarse a ella. El poli-dT actúa de cebador de la enzima retrotranscriptasa, que utiliza al mRNA como molde para sintetizar una cadena de DNA complementaria. Se forma una horquilla característica al terminarse la síntesis de la cadena de DNA. Se elimina el mRNA por tratamiento alcalino del complejo, y se utiliza la DNA polimerasa para sintetizar la segunda cadena de DNA. La nucleasa  $S_1$  se utiliza para abrir la horquilla; el resultado es una molécula de cDNA de doble cadena que puede clonarse en un vector adecuado, o utilizarse como sonda para rastrear una biblioteca.

## Identificación de secuencias clonadas específicas.

Una biblioteca genómica puede contener varios cientos de miles de clones. El problema ahora es identificar y seleccionar sólo el clon o clones que contienen el gen que nos interesa, y determinar si un clon determinado contiene todo el gen o sólo una parte de él. Hay varias maneras de hacerlo, y la elección depende de las circunstancias y de la información disponible. Los métodos que se describen a continuación utilizan diversos enfoques para encontrar una secuencia específica de DNA en una biblioteca.

### Sondas para rastrear clones específicos.

Muchos de los protocolos utilizan una sonda para rastrear la biblioteca e identificar el clon que contiene el gen de interés. A menudo, las sondas son polinucleótidos radioactivos que contienen una secuencia de bases complementaria a todo o a parte del gen de interés. Otros métodos utilizan sondas que dependen de reacciones químicas o colorimétricas para indicar la localización de un clon específico. Las sondas pueden provenir de distintas fuentes; genes relacionados aislados de otras especies pueden servir de sonda si la secuencia se ha conservado suficientemente. Por ejemplo, se aislaron copias extracromosómicas de genes ribosómicos de la rana *Xenopus laevis* por centrifugación, se cortaron con enzimas de restricción, y se clonaron en [vectores](#) plasmídicos. Como las secuencias de los genes ribosómicos se han conservado enormemente durante la evolución de los eucariotas, estos genes clonados de *Xenopus* se marcaron con radioisótopos y se utilizaron como sonda para aislar los genes ribosómicos humanos de una biblioteca genómica.

Si el gen que se quiere seleccionar de la biblioteca es transcripcionalmente activo en determinados tipos celulares, se puede utilizar una sonda de cDNA para encontrarlo. Esta técnica es especialmente útil cuando puede obtenerse el mRNA purificado o enriquecido. Como se ha citado anteriormente, el mRNA de la  $\beta$ -globina es el RNA mensajero predominante en determinados estadios del desarrollo de los glóbulos rojos. Para hacer una sonda, se aísla el mRNA de estas células, se purifica, y se copia con la retrotranscriptasa en una molécula de cDNA. Este cDNA puede



utilizarse como sonda para recuperar el gen de la  $\beta$ -globina de una biblioteca genómica, incluyendo los intrones y las regiones de control adyacentes.

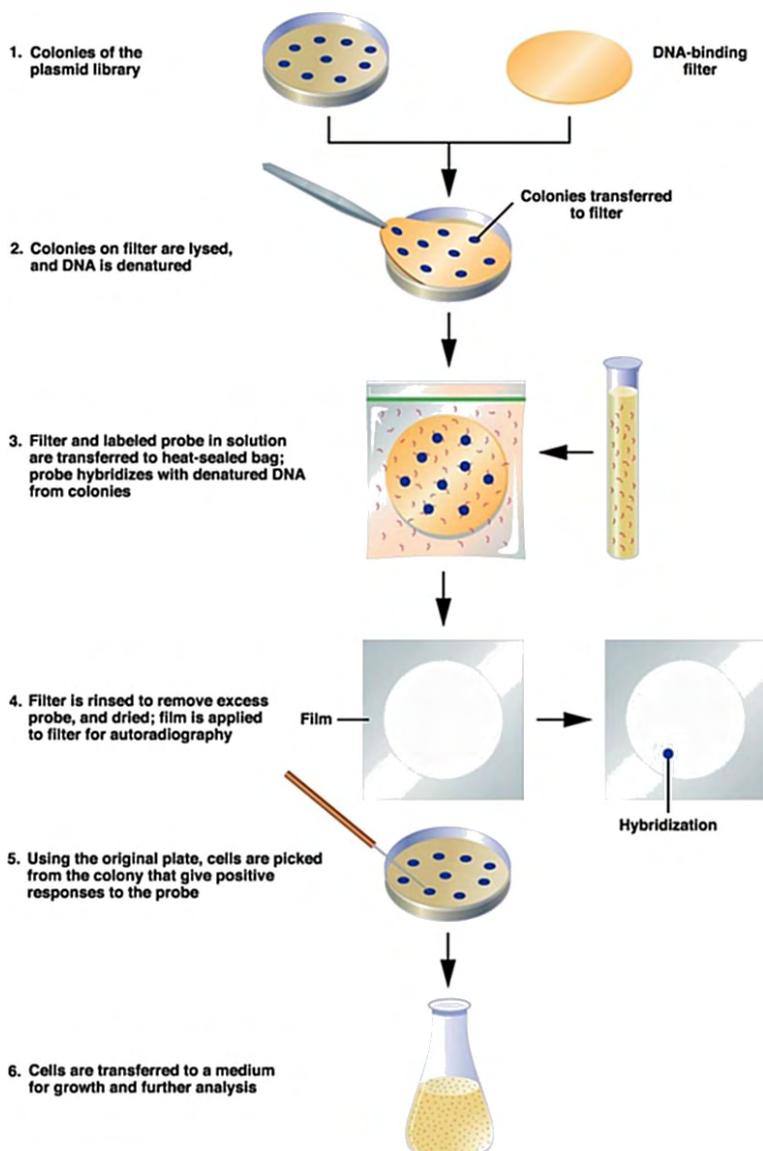
Un enfoque diferente para generar sondas utiliza una técnica denominada genérica reversa. Este método va de la proteína al gen. Si se dispone del producto proteico del gen, y se conoce parte de su secuencia aminoacídica, puede construirse una sonda polinucleotídica. Teniendo la secuencia de aminoácidos, puede deducirse la secuencia nucleotídica que los codifica. Debido a que el código genético es degenerado (un aminoácido puede estar especificado por hasta seis codones), hay varias secuencias nucleotídicas posibles. Posteriormente, se sintetiza químicamente cada uno de estos oligonucleótidos utilizando nucleótidos radioactivos. Para identificar el clon que codifica el gen de interés se utiliza una mezcla de estas sondas. Es importante destacar que no es preciso saber la secuencia aminoacídica completa de la proteína ni sintetizar una secuencia nucleotídica del gen completo. Normalmente, un oligonucleótido de unos 18 a 21 nucleótidos (equivalentes a 6 o 7 aminoácidos), es suficiente para producir una sonda.

### Rastreo de una biblioteca.

Para rastrear una biblioteca construida en plásmidos, se hacen crecer los clones en placas de cultivo, formándose cientos o miles de colonias. Se hace una réplica de las colonias de la placa poniendo sobre su superficie un filtro de nitrocelulosa o de nylon, de manera que algunas células bacterianas de las colonias se transfieran al filtro. Éste se trata para lisar las bacterias, se desnaturaliza el DNA de doble cadena que se convierte en cadenas sencillas, y finalmente dichas cadenas se unen al filtro.

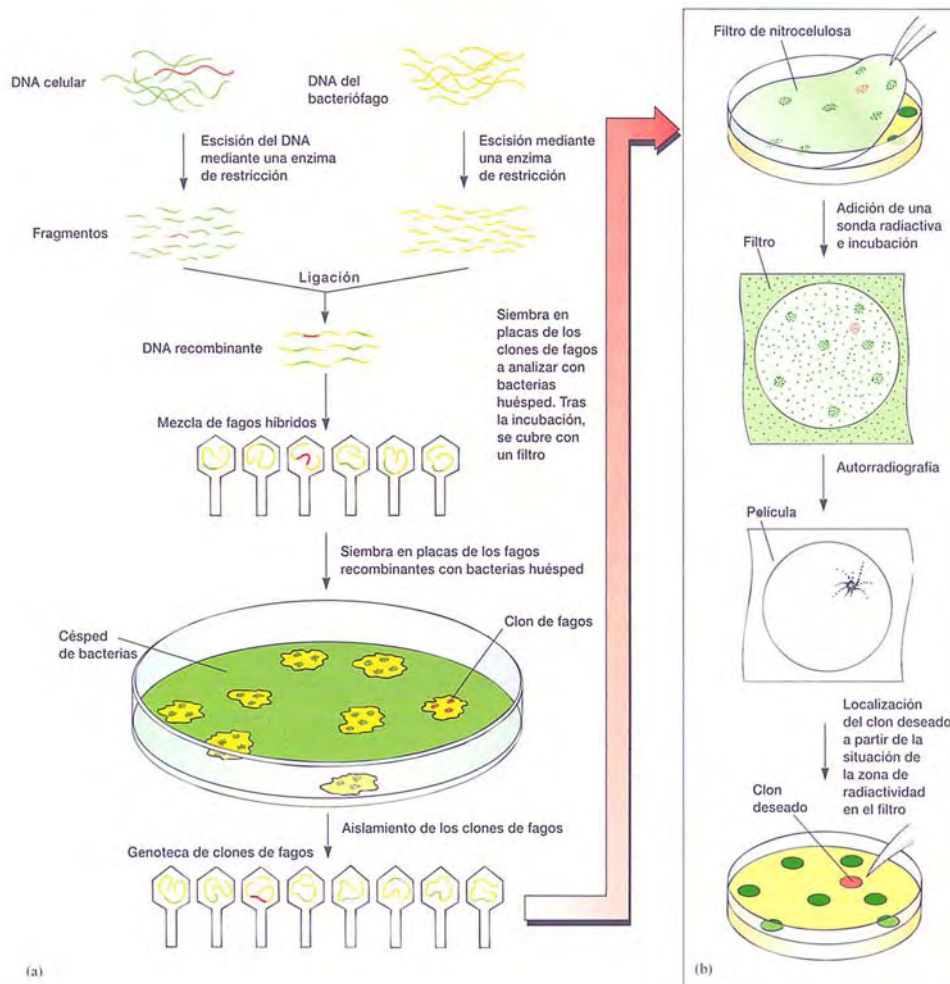
Las réplicas de las colonias del filtro se rastrean incubando el filtro con la sonda de ácido nucleico. Este método precisa que se conozca parte de la secuencia del gen o del DNA que se está rastreando. Si se utiliza una sonda radioactiva para rastrear la biblioteca, la sonda de DNA se desnaturaliza para formar moléculas de cadena sencilla y se añade a la solución en la que el filtro está sumergido. Si la secuencia de la sonda es complementaria a cualquiera de las secuencias clonadas de las colonias, se formará un híbrido DNA-DNA entre la sonda y el inserto. Después de lavar la sonda no unida, se cubre el filtro con un trozo de película fotográfica. Si la sonda es complementaria al DNA de una de las colonias lisadas, la radioactividad con que está marcada expondrá parte de la película, y la colonia hibridada se identificará como una mancha oscura en la película revelada. Esta colonia puede recuperarse de la placa inicial, y el DNA clonado que lleva puede utilizarse para nuevos experimentos. Las sondas no radioactivas utilizan métodos quimioluminiscentes o colorimétricos para detectar el clon (o clones) de interés.

Hay otra técnica interesante para rastrear bibliotecas de cDNA. Estas bibliotecas provienen de colecciones de mRNA; por lo tanto, provienen de moléculas de mRNA que, bajo las condiciones adecuadas, pueden traducirse en proteínas. La mayoría de [vectores](#) utilizados para construir estas bibliotecas tienen promotores que permiten expresar el producto proteico del gen clonado (esto hace que también se las conozcan como bibliotecas de expresión). Si se induce la expresión de la proteína codificada por el gen clonado, ésta se puede detectar mediante técnicas inmunológicas. De esta manera, si se dispone de un anticuerpo específico de una proteína, se puede aislar el gen que codifica para ella.



Rastreo de una biblioteca de plásmidos para recuperar un gen clonado. Se cubre la biblioteca, que está en placas de cultivo, con un filtro que une DNA, y se transfieren las colonias al filtro. Se lisan las colonias del filtro, y el DNA se desnaturaliza en cadenas sencillas. Se coloca el filtro en una bolsa de hibridación junto con tampón y una sonda de DNA de cadena sencilla marcada. Durante la incubación, la sonda forma un híbrido de doble cadena con las secuencias complementarias del filtro. Se saca el filtro de la bolsa y se lava para eliminar el exceso de sonda. Los híbridos se detectan poniendo un trozo de película de rayos X sobre el filtro y exponiéndola por un corto periodo de tiempo. Se revela la película, y los sucesos de hibridación se visualizan como manchas en la película. Por la posición de las manchas en la película, pueden identificarse las colonias que contienen el inserto que ha hibridado con la sonda. Se toman células de esta colonia y se hacen crecer para nuevos análisis.

Para rastrear una biblioteca construida en fagos, se utiliza un método ligeramente diferente denominado hibridación de calvas. Se siembra una solución del fago que lleva el inserto de DNA en una placa en la que está creciendo un césped de bacterias. Entonces el fago se replica, formando calvas, que aparecen en la placa como manchas claras. Cada calva representa la progenie de un sólo fago, es decir son clones del fago. Las calvas se transfieren poniendo un filtro en la superficie de la placa, y posteriormente se lisan. El DNA se desnaturaliza a cadena sencilla y se rastrea con una sonda marcada como se ha descrito para una biblioteca de plásmidos. Las calvas de los fagos son mucho más pequeñas que las colonias bacterianas, por lo que pueden obtenerse muchas más calvas creciendo en una misma placa. En consecuencia, se pueden rastrear más calvas en un sólo filtro, lo que hace a este método mucho más eficiente para el rastreo de bibliotecas genómicas de gran tamaño.



### Paseo cromosómico.

En algunos casos, cuando se conoce la localización aproximada de un gen, es posible clonar dicho gen clonando primero las secuencias vecinas. A menudo, las secuencias vecinas se identifican por análisis de ligamiento. Estas secuencias sirven de punto de partida para el paseo cromosómico, el aislamiento de clones adyacentes de la biblioteca genómica. En un paseo cromosómico, se subclona el fragmento final del DNA clonado, y se utiliza como sonda para recuperar clones solapados de la biblioteca genómica. Los clones solapados se analizan por mapas de restricción para determinar la extensión del solapamiento. Un fragmento de uno de los extremos de este clon solapante se utiliza como sonda para recuperar un nuevo conjunto de clones solapados, repitiéndose el proceso de análisis. De esta manera, es posible "pasear" por el cromosoma, clon a clon. El gen en cuestión puede identificarse secuenciando los nucleótidos del clon recuperado y buscando una fase abierta de lectura (ORF), un trecho de nucleótidos que empieza con un codón de iniciación y que tiene una serie de codones que codifican aminoácidos, seguido de uno o más codones de terminación. Aunque es laborioso y lento, el paseo cromosómico se ha utilizado para recuperar genes asociados a enfermedades genéticas humanas; los genes de la fibrosis quística y de la distrofia muscular se aislaron con esta técnica.

En los complejos genomas eucarióticos, hay varias limitaciones al paseo cromosómico. Si una sonda contiene una secuencia repetitiva, hibridará con muchos otros clones de la biblioteca genómica, muchos de los cuales no serán segmentos adyacentes, terminándose el paseo. En estos casos puede utilizarse una técnica relacionada denominada salto cromosómico, que pasa por alto la región que contiene secuencias repetitivas y continúa el paseo.

### Métodos de análisis de las secuencias clonadas.

La identificación y recuperación de secuencias de DNA clonadas específicas es una herramienta poderosa para analizar la estructura y la función de los genes. Las técnicas que se describen en las próximas secciones se utilizan para responder a preguntas experimentales de la organización y de la expresión de las secuencias clonadas.

### Mapas de restricción.

Un mapa de restricción es la recopilación del número, del orden y de la distancia entre los sitios de corte de enzimas de restricción en un segmento clonado de DNA.

Los mapas de restricción proporcionan información que puede utilizarse para subclonar fragmentos de un gen, o bien para comparar la organización de un gen y de su cDNA con el fin de identificar los exones y los intrones en la copia genómica del gen.

Los fragmentos generados tras cortar el DNA con enzimas de restricción pueden separarse mediante [electroforesis](#) en gel, método que separa los fragmentos por su tamaño, y en el que los fragmentos más pequeños se mueven más rápidamente. Los fragmentos aparecen como una serie de bandas que pueden visualizarse tiñendo el DNA con bromuro de etidio e iluminándolo con luz ultravioleta. El tamaño de los fragmentos individuales puede determinarse corriendo un conjunto de fragmentos marcadores de tamaño conocido en otro carril del mismo gel.

La siguiente figura muestra los pasos que deben seguirse para construir el mapa de restricción de un segmento de DNA clonado que contiene sitios de corte para dos enzimas de restricción. Para construir el mapa, se parte de un segmento de DNA clonado de 7 kb de longitud. Tres muestras del DNA clonado se digieren con enzimas de restricción: una con *Hind*III; otra con *Sa*I; y la última con las dos enzimas, *Hind*III y *Sa*I. Los fragmentos generados por la digestión con las enzimas de restricción se separan por [electroforesis](#). El tamaño de estos fragmentos se estima por comparación con un conjunto de patrones de tamaño separados electroforéticamente en carriles adyacentes del mismo gel. Para construir el mapa, se analizan los fragmentos generados con las enzimas de restricción.

☒ Cuando el DNA se corta con *Hind*III, se producen dos fragmentos, uno de 0,8 kb y otro de 6,2 kb, indicando que sólo hay un sitio de restricción para esta enzima (y que está localizado a 0,8 kb de uno de los extremos).

☒ Cuando el DNA se corta con *Sa*I, se producen dos fragmentos, uno de 1,2 kb y otro de 5,8 kb, lo que significa que hay un único sitio de restricción localizado a 1,2 kb de uno de los extremos.

En conjunto, estos resultados muestran que hay un sitio de restricción para cada enzima, pero se desconoce la relación existente entre estos dos sitios. Con esta información, hay dos mapas posibles. En un modelo, el sitio *Hind*III está a 0,8 kb de uno de los extremos (modelo 1), y el sitio *Sa*I está a 1,2 kb del mismo extremo. En el modelo alternativo (modelo 2), el sitio *Hind*III está localizado a 0,8 kb de un extremo, y el sitio *Sa*I está localizado a 1,2 kb del otro extremo.

El modelo correcto puede determinarse si se consideran los resultados de la digestión con ambas enzimas, *Hind*III y *Sa*I. El modelo 1 predice que la digestión con ambas enzimas generará tres fragmentos de 0,4, 0,8 y 6,2 kb; el segundo modelo predice que la digestión con ambas enzimas generará tres fragmentos de 0,8, 1,2 y 5,0 kb. El patrón real de fragmentos observado después de la digestión con ambas enzimas indica que el modelo correcto es el modelo 1.

**1. A population of cloned DNA fragments is prepared**

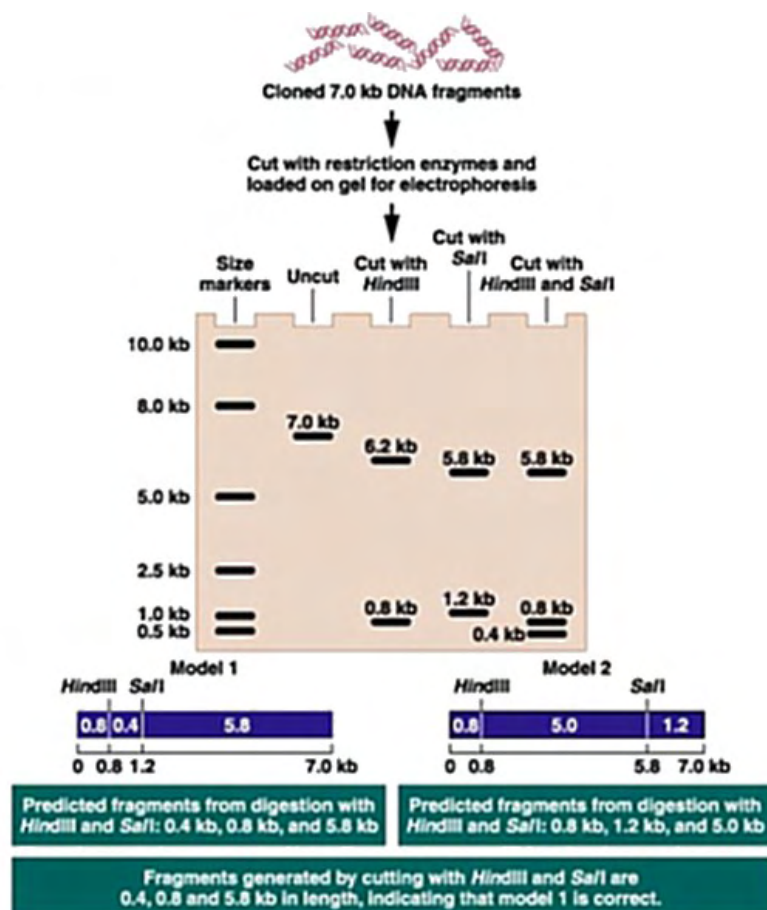
**2. DNA fragments are cut with restriction enzymes**

**3. The restriction fragments are separated by gel electrophoresis**

**4. Theoretical models are constructed that are consistent with initial results**

**5. Models are tested against results of double enzyme digests**

**6. Conclusion: model 1 is correct**



En la mayoría de casos, los mapas de restricción son más complejos e implican un mayor número de enzimas y un mayor número de sitios para cada enzima. Los mapas de restricción proporcionan una manera importante de caracterizar un segmento de DNA, y pueden construirse sin tener ninguna información de la capacidad codificadora ni de la función del DNA cartografiado. Junto con otras técnicas, los mapas de restricción pueden utilizarse para definir los extremos de un gen, y proporcionan una manera de diseccionar la organización molecular de un gen y de sus regiones flanqueantes. Los mapas también puede servir de punto de partida para analizar un gen intacto de segmentos clonados de DNA, y proporcionan una manera de localizar sitios de mutación en los genes.

Los mapas de restricción también pueden utilizarse para refinar los mapas genéticos. En la mayoría de los casos, la exactitud de los mapas construidos por análisis genético se basa tanto en la frecuencia de recombinación entre marcadores genéticos como en el número de marcadores genéticos utilizados en la construcción del mapa.

Si hay una gran distancia entre los marcadores y/o variación en la frecuencia de re combinación, el mapa genético puede no corresponder al mapa físico de esa región cromosómica. Por ejemplo, el genoma humano es grande ( $3,2 \times 10^9$  pb), y el número de genes mapeados es pequeño (unos pocos millares), lo que significa que cada unidad del mapa está compuesta por millones de pares de bases de DNA. El resultado es una correlación baja entre los mapas genético y físico de los cromosomas. Los sitios de corte de las enzimas de restricción pueden utilizarse como marcadores genéticos, reduciendo así la distancia entre los distintos sitios del mapa, incrementando la fidelidad de los mapas, y proporcionando puntos de referencia para la correlación de los mapas genético y físico.

Los sitios de restricción han desempeñado una función importante en el mapeado de genes en cromosomas humanos específicos y en regiones definidas de cromosomas concretos. Además, si un sitio de restricción está cerca de un gen mutante, puede utilizarse como marcador en diagnóstico. Estos sitios, son conocidos como polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, ó RFLPs; la utilización de los RFLPs ha demostrado ser especialmente útil, ya que los genes mutantes que provocan muchas enfermedades genéticas humanas están muy poco caracterizados a nivel molecular, y los sitios de restricción cercanos se han utilizado con éxito en la detección de los individuos afectados y de los heterocigotos con riesgo de tener hijos afectados.

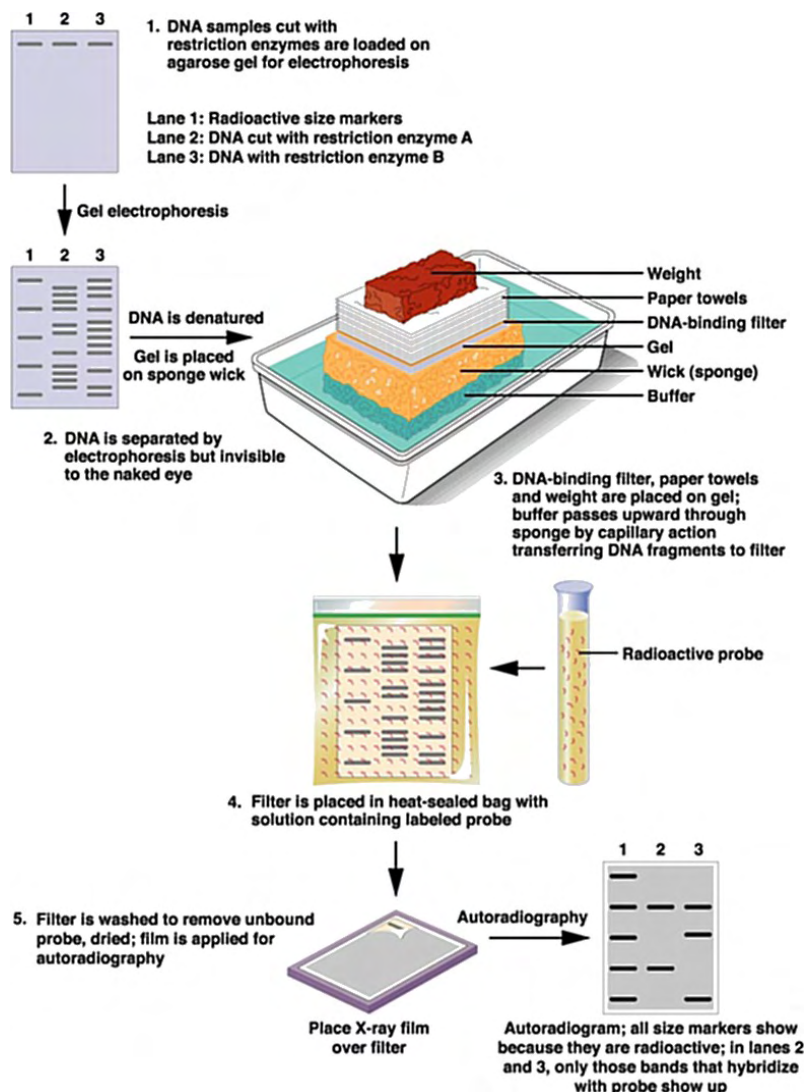
### Transferencia de Southern y Northern.

Los insertos de DNA clonados en [vectores](#) pueden utilizarse en experimentos de hibridación para caracterizar la identidad de genes específicos, para localizar regiones codificantes o regiones reguladoras flanqueantes en secuencias clonadas y para investigar la organización molecular de las secuencias genómicas.

Edward Southern desarrolló la utilización de segmentos de DNA clonado, separados por [electroforesis](#), transferidos a filtros, y rastreados con sondas. Conocido como transferencia de Southern ("Southern blot"), este procedimiento tiene muchas aplicaciones.

En Southern blot, el DNA clonado se corta en fragmentos con una o más enzimas de restricción, y estos fragmentos se separan por [electroforesis](#) en gel. El DNA se desnaturaliza dentro del gel en fragmentos de cadena sencilla, y éstos se transfieren a un filtro de un material, normalmente nitrocelulosa o un derivado del nylon, que une el DNA. La transferencia se hace colocando la hoja de la membrana encima del gel, y provocando que el tampón pase por el gel y por la hoja de nitrocelulosa o de nylon por capilaridad. El tampón pasa por el gel y por la membrana, arrastrando al DNA fuera del gel e inmovilizándolo en la membrana.

En la práctica, esto se hace poniendo el gel con el DNA desnaturalizado sobre una gruesa esponja que actúa de mecha. La esponja está parcialmente sumergida en una cubeta con tampón. Se pone una membrana encima del gel, y se cubre con hojas de papel secante o absorbente y un peso. La acción capilar arrastra el tampón de la cubeta a través de la esponja, del gel, de la membrana, y del montón de papel secante. Al pasar el tampón por el gel, los fragmentos de DNA se transfieren a la membrana, a la que se unen. Después de la transferencia, el DNA de cadena sencilla se fija a la membrana calentándola a  $80^{\circ}\text{C}$  o exponiéndola a luz ultravioleta para que se hagan uniones entre los fragmentos y la membrana.



Entonces, los fragmentos de DNA del filtro se hibridan con una sonda. Sólo formarán híbridos los fragmentos de DNA de cadena sencilla presentes en la membrana que sean complementarios a la secuencia nucleotídica de la sonda. Se lava la sonda no unida, y se visualizan los fragmentos hibridados. Si se utiliza una sonda radioactiva, la posición de la sonda se determina por autorradiografía, utilizando película fotográfica.

Además de para caracterizar DNA clonado, el Southern blot se utiliza para muchos otros fines, como el mapeo de sitios de restricción en un gen o cerca de él, la identificación de fragmentos de DNA que contienen un gen determinado de entre una mezcla de muchos fragmentos, y la identificación de genes relacionados en diferentes especies. También se utiliza para detectar reorganizaciones y duplicaciones en genes asociados a enfermedades genéticas humanas y a cánceres.

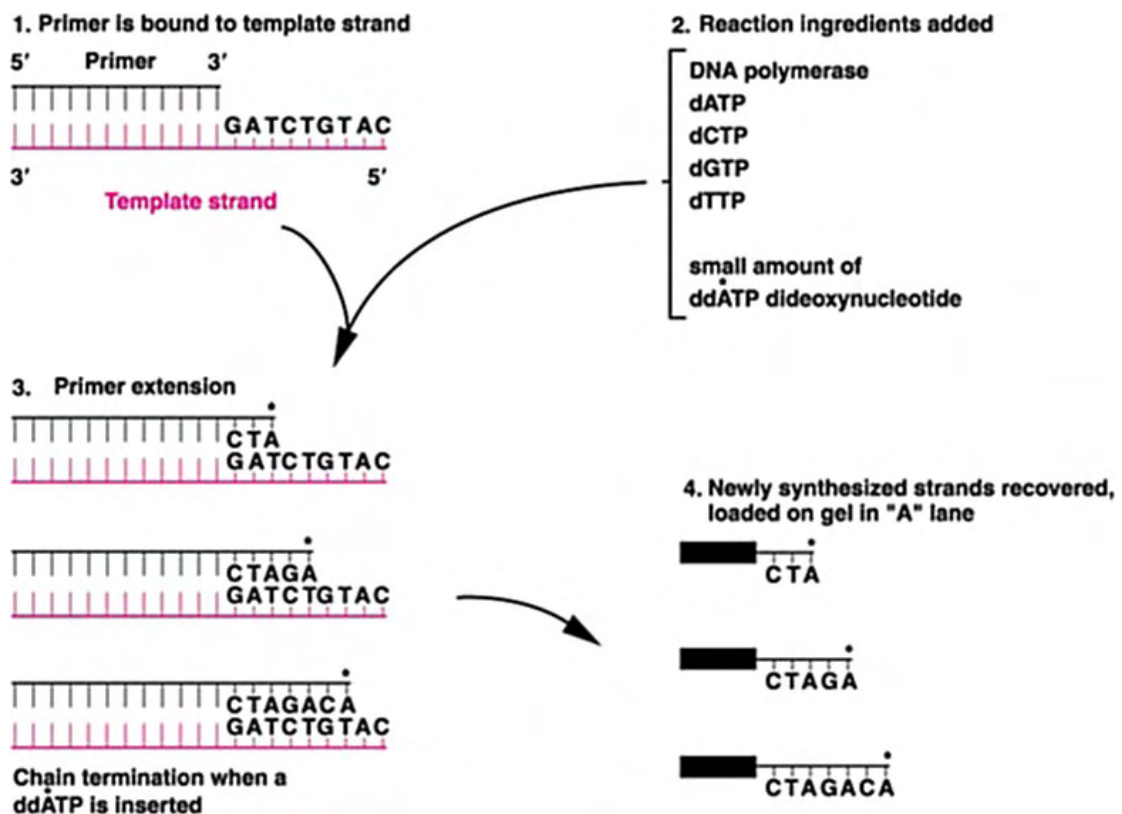
Existe una técnica de transferencia relacionada que puede utilizarse para determinar si un gen clonado es transcripcionalmente activo en un tipo celular o en un tejido dado. Esta técnica detecta la presencia de RNA que sea complementario al segmento de DNA clonado. Esto se lleva a cabo extrayendo RNA de uno o varios tipos celulares o tejidos. Se fracciona el RNA por [electroforesis](#) en gel, y el patrón de bandas se transfiere a una membrana que una el RNA como en el Southern blot. El filtro se hibrida con una sonda de DNA de cadena sencilla, proveniente de DNA genómico clonado o de cDNA. Si hay RNA complementario a la sonda de DNA, éste se detectará por autorradiografía como una banda en la película fotográfica. Como el protocolo original que utiliza DNA unido a un filtro se conoce como Southern blot, el protocolo que utiliza RNA unido al filtro se denominó transferencia Northern (Northern blot).

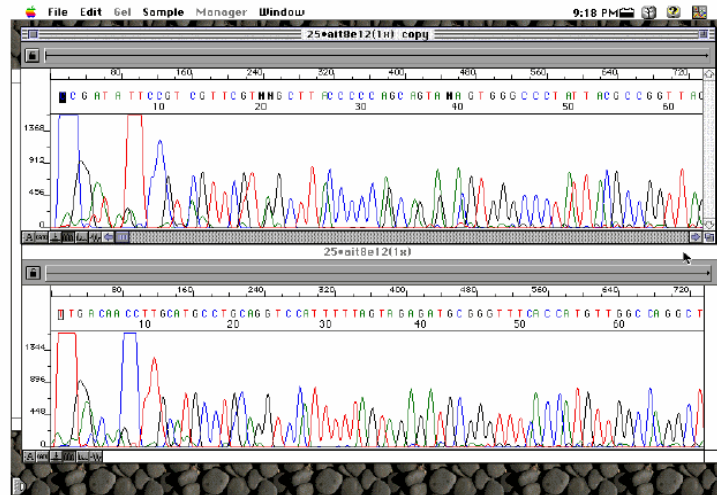
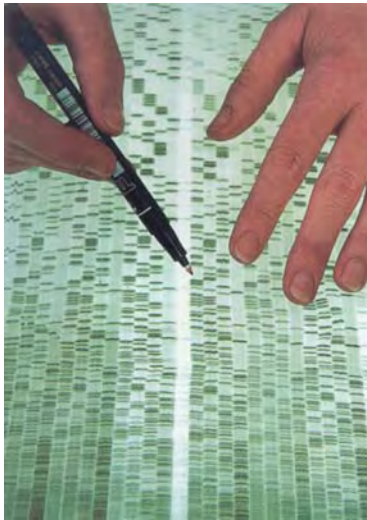
El Northern blot proporciona información de la presencia de un transcrito de RNA complementario a un gen clonado en una célula o en un tejido determinado, y se utiliza para examinar patrones de expresión génica en tejidos embrionarios y adultos. El Northern blot también puede utilizarse para detectar cortes y empalmes alternativos del mRNA, y para detectar múltiples tipos de transcritos provenientes de un solo gen. El Northern blot también proporciona otras informaciones de los mRNA transcritos. Si se corre un RNA marcador en un carril adyacente, se puede calcular el tamaño del mRNA de un gen de interés. Además, la cantidad de RNA transcrito presente en una célula o en un tejido está relacionado con la densidad de la banda de RNA del film de autorradiografía. Se puede semicuantificar la cantidad de RNA midiendo la densidad (intensidad) de la banda, lo que proporciona una medida relativa de la actividad transcripcional. De esta manera, el Northern blot puede utilizarse para caracterizar y cuantificar la actividad transcripcional de un gen determinado en distintas células, tejidos, u organismos.

## Secuenciación de DNA.

En cierto sentido, la caracterización definitiva de un segmento de DNA clonado es la determinación de su secuencia de nucleótidos. La capacidad de secuenciar DNA clonado ha permitido grandes avances en el conocimiento de la estructura génica y de los mecanismos de regulación. Aunque desde la década de los 40 hay técnicas que permiten determinar la composición de bases del DNA, fue en la década de los 60 cuando se desarrollaron los métodos para determinar la secuencia de los nucleótidos. En 1965, Robert Holley determinó la secuencia de una molécula de tRNA que contenía 74 nucleótidos. Se necesitó un año de esfuerzo para realizar este trabajo. En la década de los 70 se desarrollaron métodos más eficientes de secuenciación y, actualmente, en un laboratorio de Biología Molecular, es posible secuenciar más de 1.000 bases en una semana.

Un método de secuenciación de DNA diseñado por Alan Maxam y Walter Gilbert utiliza productos químicos para cortar el DNA. Este método se utilizó para determinar la secuencia de bases de los 4.362 nucleótidos del plásmido pBR322. El segundo método, que es el que generalmente se utiliza, lo desarrollaron Frederick Sanger y sus colaboradores. El método de Sanger se basa en la elongación 5'  $\rightarrow$  3' de las moléculas de DNA por la DNA polimerasa. Ambas estrategias generan un conjunto de moléculas de DNA de cadena sencilla de diferentes longitudes. Para determinar la secuencia de los nucleótidos en un segmento de DNA, ambos métodos utilizan una serie de cuatro reacciones, realizadas en tubos separados. Estas secuencias, cuya diferencia en tamaño es de un solo nucleótido, se separan por [electroforesis](#) en gel en cuatro carriles adyacentes. El resultado es una serie de bandas que forman un patrón parecido a una escalera. La secuencia puede leerse directamente del patrón de bandas de los cuatro carriles. Los secuenciadores automáticos de DNA utilizan colorantes fluorescentes en vez de sondas radioactivas. Se utilizan cuatro colorantes, produciendo un patrón de picos de colores que, al leerlos, proporcionan la secuencia de DNA.





La secuenciación de DNA proporciona información de la organización de los genes y de los sucesos mutacionales que alteran a los genes y a los productos génicos, confirmando la conclusión de que los genes y las proteínas son moléculas colineares. La secuenciación también se ha utilizado para examinar la organización de las regiones reguladoras que flanquean los genes procarióticos y eucarióticos, y para deducir la secuencia de aminoácidos de las proteínas. El gen de la fibrosis quística (CF), una enfermedad genética humana autosómica recesiva, se identificó clonando y secuenciando el DNA de una región del brazo largo del cromosoma 7. Como no se conocía el producto proteico de este gen, se utilizó la secuencia de DNA para identificar una región codificadora. Se utilizó la secuencia de DNA de esta región para generar una probable secuencia de 1.480 aminoácidos.

Esta secuencia se utilizó para buscar secuencias aminoacídicas de proteínas conocidas en las bases de datos, lo que permitió inferir que la proteína CF tiene características similares a las proteínas de membrana que desempeñan una función en el transporte de iones. Nuevos experimentos confirmaron que el producto del locus de la fibrosis quística es una proteína de membrana que regula el transporte de iones cloro por la membrana plasmática. En la mayoría de casos de CF, el gen mutante tiene una secuencia de DNA alterada que causa la producción de una proteína defectuosa.

Además de identificar los defectos del DNA que causan los fenotipos mutantes, la secuenciación de DNA también se utiliza para examinar la organización de un gen (el número de intrones y de exones y sus límites), para proporcionar información de la naturaleza y de la función de las proteínas codificadas por los genes, como el tamaño, el número y tipo de dominios (región transmembrana, de unión al DNA), y de la relación con proteínas similares y con proteínas de otros organismos.

## Transferencia de DNA a eucariotas.

Tanto las células animales como las vegetales pueden incorporar DNA del medio ambiente, proceso denominado [transfección](#). Además, los [vectores](#), incluyendo los YAC, pueden utilizarse para transferir DNA a células eucarióticas.

### Células vegetales.

En los últimos años, se ha conseguido clonar utilizando plantas superiores como huésped y plásmidos bacterianos. La bacteria infecciosa *Agrobacterium tumefaciens*, presente en el suelo, produce tumores (denominados agalla de la corona) en muchas especies de plantas. La infección de las células normales por esta bacteria las transforma en células tumorales, y en las plantas dicotiledóneas del tipo de la uva y las plantas decorativas se desarrollan "tumorações en forma de agallas". Normalmente, el tumor se localiza cerca de la unión de la raíz con el tallo de la planta. El tumor se origina debido a que los genes de la bacteria se insertan en el genoma de las células de la planta. Sólo son patógenas las cepas de *A. tumefaciens* que contienen un plásmido conjugativo de gran tamaño, denominado plásmido Ti.

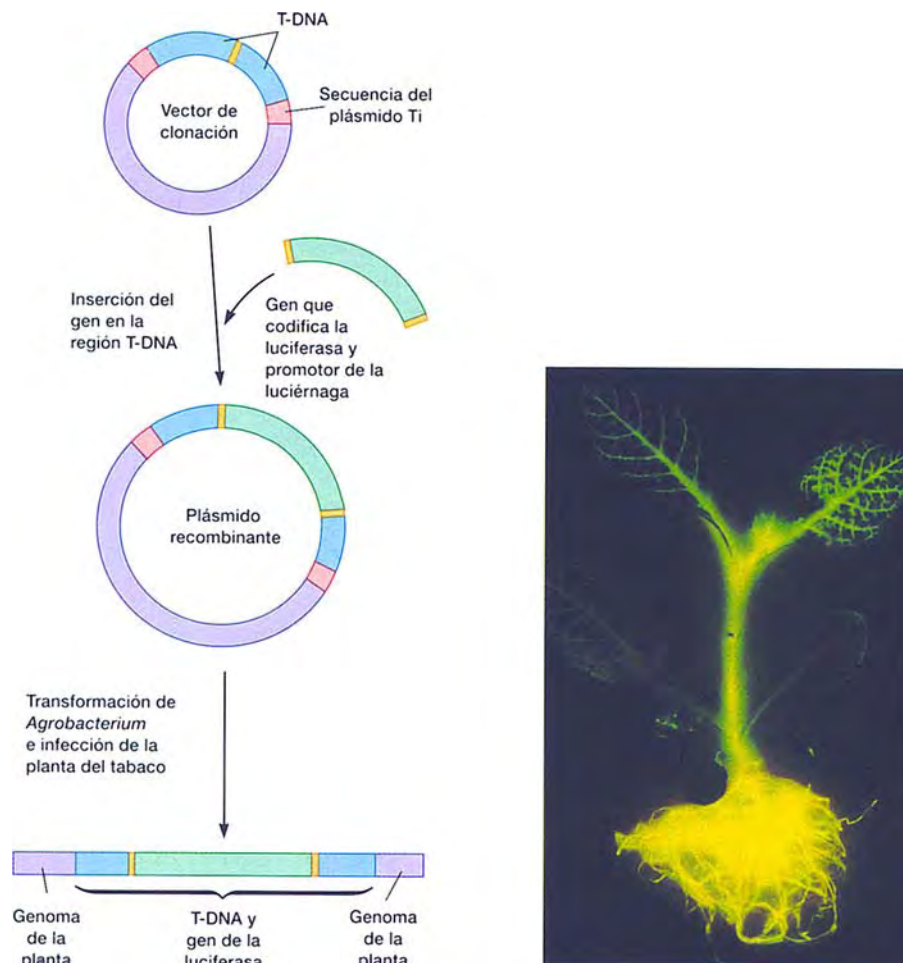
Cuando estas bacterias infectan células vegetales, un segmento del plásmido Ti, conocido como T-DNA, se transfiere al DNA cromosómico de la célula vegetal huésped. La región T-DNA contiene genes que codifican la síntesis de hormonas del crecimiento de la planta (una auxina y una citoquinina) y de un derivado de aminoácidos denominado "opina", que son necesarias para el crecimiento de la bacteria infecciosa. Se pueden insertar genes exógenos en el segmento T-DNA de Ti, y la bacteria infecciosa puede transferir el Ti alterado a la célula vegetal. El DNA exógeno se inserta en el genoma de la planta cuando el T-DNA se integra en el cromosoma de la célula huésped. El crecimiento de esta célula genéticamente alterada puede inducirse en un medio de cultivo, formando una masa celular denominada callo. Manipulando el medio de cultivo, puede inducirse la formación de raíces y de brotes en el callo, y que éste se desarrolle eventualmente como plantas adultas que contengan el gen exógeno.

Cuando se identificó la naturaleza molecular de la "tumorción en forma de agallas", se hizo evidente que el plásmido Ti y su T-DNA tenían un gran potencial como vector para la inserción de DNA recombinante en los cromosomas de plantas. En uno de los primeros experimentos, se añadió el gen que codifica la alcohol deshidrogenasa de las levaduras a la región T-DNA del plásmido Ti. La infección subsiguiente de células de plantas cultivadas condujo a la transferencia del gen de la levadura. Desde entonces, se han realizado numerosas modificaciones en el plásmido Ti con objeto de mejorar sus características como vector. Habitualmente se añade uno o más genes de resistencia a antibióticos, y se elimina el T-DNA no esencial, incluidos los genes que codifican el desarrollo del tumor. Se mantienen los genes necesarios para la infección de la célula vegetal por el plásmido. También se ha insertado el T-DNA en el plásmido pBR322 de *E. coli* y en otros plásmidos para producir [vectores](#) de clonación capaces de desplazarse entre bacterias y plantas.

El gen o los genes de interés se empalman en la región T-DNA entre las repeticiones directas. A continuación, se devuelve el plásmido a *A. tumefaciens*, se infectan con la bacteria células en cultivo de la planta, y se seleccionan los transformantes en función de su resistencia a antibióticos (u otro rasgo codificado por el T-DNA). Finalmente, se generan plantas completas a partir de las células del cultivo. Este mecanismo ha permitido desarrollar diversas plantas resistentes a herbicidas.

Por desgracia, *A. tumefaciens* no produce la "tumorción en forma de agallas" en plantas monocotiledóneas del tipo del maíz, el trigo y otros granos; sólo se ha utilizado para modificar plantas tales como la patata, el tomate, el apio, la lechuga y la alfalfa. Sin embargo, existen datos

que indican que el T-DNA se transfiere a plantas monocotiledóneas y se expresa en ellas, aunque no produce tumores. Este descubrimiento, asociado al desarrollo de nuevos procedimientos de inserción del DNA en células vegetales, bien podría conducir a la aplicación de las técnicas del DNA recombinante en numerosas e importantes plantas de cultivo.

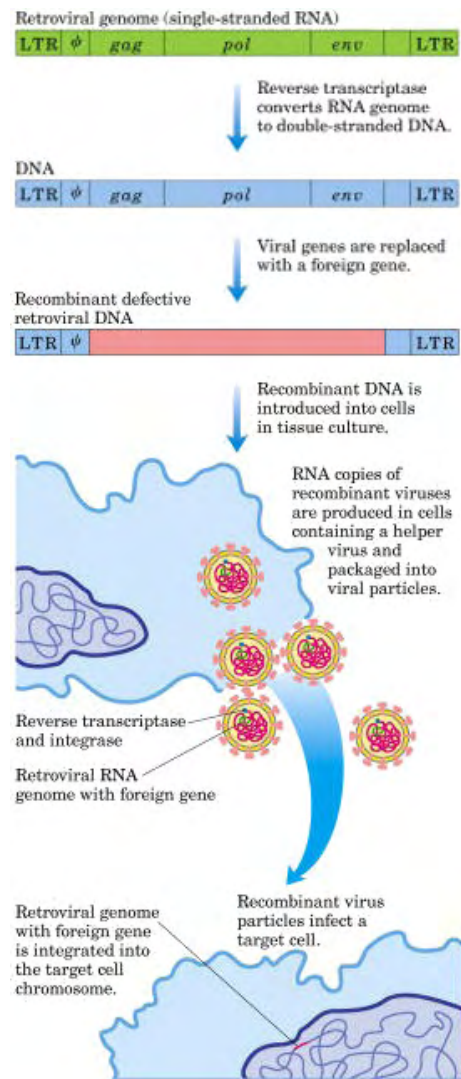


Utilización del vector plasmídico Ti para producir plantas transgénicas. A la izquierda, formación de un vector de clonación y su utilización en la transformación. A la derecha, una planta del tabaco, *Nicotiana tabacum*, convertida en bioluminiscente mediante transfección con un vector plasmídico Ti especial que contiene el gen que codifica la luciferasa de la luciérnaga. Cuando se riega la planta con una solución de luciferina, el sustrato de la enzima luciferasa, la planta emite luz.

## Células de mamífero.

Las células de mamífero pueden incorporar DNA por distintos métodos, como:

- **Electroporación.**  
Si se mezcla un conjunto de células con una preparación de DNA y a continuación se las expone brevemente a pulsos (de aproximadamente 250 a 4.000 V/cm para las células de mamífero), las células captan el DNA a través de poros temporales creados en su membrana plasmática. Algunas de estas células sufrirán el proceso de transformación.
- **Coprecipitación con fosfato cálcico y endocitosis.**
- **Microproyectiles.**  
Una de las técnicas más eficaces consiste en disparar microproyectiles revestidos con DNA al interior de células vegetales y animales. La pistola de genes, desarrollada inicialmente en la Universidad de Cornell (Nueva York), opera de forma similar a una pistola. Una ráfaga de aire comprimido dispara al interior de las células una salva de microproyectiles metálicos revestidos de DNA. Este dispositivo se ha utilizado para transformar maíz y producir plantas de maíz fértil que contienen genes foráneos. Otras pistolas utilizan descargas eléctricas o gas a alta presión para propulsar los proyectiles revestidos de DNA. Estas pistolas se han utilizado para transformar microorganismos (levaduras, el moho *Aspergillus* y el alga *Chlamydomonas*), células de mamífero y diversas células vegetales (maíz, algodón, tabaco, cebolla y chopo).
- **Encapsulación del DNA en membranas artificiales (liposomas) seguido de su fusión con membranas celulares.**
- **Retrovirus.**  
Los virus se utilizan cada vez con mayor frecuencia para insertar los genes deseados en células eucariotas. Por ejemplo, pueden insertarse genes en un retrovirus, que a continuación infecta la célula diana e integra una copia de DNA de su genoma RNA en el cromosoma de la célula huésped. Los adenovirus también pueden transferir genes a células animales. Los baculovirus recombinantes infectan las células de insectos y promueven la producción de numerosas proteínas.



Clonación de células de mamífero con vectores retrovíricos.

Generalmente, el DNA introducido en una célula de mamífero por cualquiera de estos métodos se integra en el genoma del huésped. Los métodos de transferencia de DNA se han utilizado para: transferir genes a óvulos fecundados, produciendo así animales transgénicos; para investigar los aspectos moleculares de la expresión génica; y para replicar los genes clonados utilizando células de mamífero como huéspedes.

Los YAC pueden utilizarse para incrementar enormemente la eficiencia de la transferencia de genes a la línea germinal de ratón. La transferencia de genes depende de la introducción de secuencias de DNA en el núcleo de una célula de ratón adecuada, como una célula huevo fecundada o una célula madre embrionaria, seguido de la integración del DNA en un sitio del cromosoma.

Experimentos iniciales de transgénesis en ratón no funcionaron debido a la longitud relativamente corta de DNA que puede introducirse utilizando [vectores](#) de clonación plasmídicos. En muchos casos, los genes de mamífero eran más largos que la capacidad de clonación del vector, y en otros casos, en los que se pudo transferir el gen, no se produjo su expresión o ésta era inadecuada debido a que no se habían transferido las secuencias reguladoras adyacentes o distantes.

Los YAC pueden transferirse a ratón de diversas maneras. La primera implica la microinyección de DNA de YAC purificado en el pronúcleo de un cigoto de ratón.

Los cigotos se transfieren entonces al útero de madres adoptivas para que se desarrollen normalmente. Otras técnicas utilizan células madres embrionarias de ratón (células ES, del inglés "embryonic stem cell") como huéspedes. Uno de estos métodos fusiona una célula de levadura que contiene un YAC con una célula ES, transfiriéndose el YAC a la célula ES, junto con todo o una parte del genoma de levadura. Las células ES transgénicas se transfieren entonces a embriones de ratón en el estadio de blastocisto, donde participan en la formación de los tejidos del adulto, incluyendo los que formarán la línea germinal. La capacidad de transferir segmentos largos de DNA a ratones tiene aplicaciones en muchas áreas de investigación.

Se han desarrollado [vectores](#) para la transferencia de genes funcionales a células de mamífero utilizando retrovirus de ave y de ratón. El genoma de estos retrovirus es un RNA de cadena sencilla que, mediante la retrotranscriptasa, se transcribe en un DNA de doble cadena. Este DNA se integra en el genoma del huésped y pasa a las células hija como parte de su propio cromosoma. El genoma del retrovirus debe diseñarse para eliminar algunos genes víricos, creando [vectores](#) que aceptan DNA exógeno, incluyendo genes estructurales humanos. Estos [vectores](#) se están utilizando en el tratamiento de enfermedades genéticas mediante terapia génica.

El desarrollo de las técnicas para producir millones de copias de segmentos de DNA por clonación ha abierto el camino a investigaciones sobre la estructura y la función del DNA en vegetales y en animales. También ha conducido al aislamiento de genes específicos de organismos, incluyendo la especie humana; a la generación de diversas aplicaciones científicas y comerciales que han revolucionado las ciencias de la vida, la medicina y la biotecnología; y al esfuerzo internacional para analizar el genoma humano a nivel nucleotídico, conocido como el Proyecto Genoma Humano.



## Aplicaciones de la tecnología del DNA recombinante.

La ingeniería genética y la biotecnología están contribuyendo y contribuirán aún mucho más en el futuro a la medicina, la industria y la agricultura, además de al campo de la investigación básica.

### Aplicaciones en investigación y medicina.

Es evidente que la producción de proteínas de utilidad médica como la somatostatina, la insulina, la hormona del crecimiento humana y los interferones, es de gran importancia práctica. Por ejemplo, en el pasado, la hormona del crecimiento humana para el tratamiento del enanismo hipofisario se extraía de hipófisis obtenidas durante las autopsias y estaba disponible sólo en cantidades limitadas. La interleucina-2 (una proteína que ayuda a regular la respuesta inmunitaria) y el factor VIII de la coagulación se han clonado con éxito, y sin duda en el futuro se producirán otros importantes péptidos y proteínas. Un avance especialmente interesante es el uso de maíz y soja transgénicos para producir anticuerpos monoclonales para uso médico. También puede ser posible utilizar plantas desarrolladas mediante ingeniería genética para producir vacunas orales.

#### Algunos péptidos y proteínas humanas sintetizadas mediante ingeniería genética.

Péptido o proteína	Uso potencial
$\alpha_1$ -antitripsina	Tratamiento del enfisema
$\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -interferones	Agentes antivirales, antitumorales y antiinflamatorios
Factor VIII de la coagulación	Tratamiento de la hemofilia
Calcitonina	Tratamiento de la osteomalacia
Factor de crecimiento epidérmico	Tratamiento de las heridas
Eritropoyetina	Tratamiento de la anemia
Hormona del crecimiento	Promoción del crecimiento
Insulina	Tratamiento de la diabetes
Interleucinas 1, 2 y 3	Tratamiento de trastornos inmunitarios y tumores
Factor estimulante de colonias de macrófagos	Tratamiento contra el cáncer
Relaxina	Auxiliar al parto
Albúmina sérica	Suplemento del plasma
Somatostatina	Tratamiento de la acromegalia
Estreptoquinasa	Anticoagulante
Activador del plasminógeno tisular	Anticoagulante
Factor de necrosis tumoral	Tratamiento contra el cáncer

Los ratones manipulados mediante ingeniería genética pueden producir anticuerpos monoclonales humanos. También se están desarrollando vacunas sintéticas (por ejemplo, vacunas contra el paludismo y la rabia) mediante técnicas recombinantes. Ya se encuentra disponible también una vacuna recombinante contra la hepatitis B.

Podría estudiarse cualquier individuo para detectar la presencia de genes mutantes con sondas y técnicas de hibridación (incluso antes del nacimiento si se utilizaran en conjunción con la amniocentesis). Puede ser posible aplicar a sujetos enfermos un tipo de cirugía genética denominada terapia génica de células somáticas. Por ejemplo, sería posible retirar las células de un sujeto con una enfermedad genética, cultivarlas y transformarlas con DNA clonado que contuviera una copia normal del gen o los genes defectuosos. Estas células podrían entonces volver a introducirse en el paciente; si se establecieran, la expresión de los genes normales podría curar al sujeto. Recientemente un paciente con una enfermedad inmunodeficiente, que carecía de la enzima adenosina desaminasa, responsable de la destrucción de los subproductos tóxicos del metabolismo ha recibido este tipo de tratamiento. Se extrajeron algunos de los linfocitos del paciente, se les introdujo el gen que codifica la adenosina desaminasa utilizando un retrovirus modificado y se volvieron a introducir en el paciente.

Puede ser posible utilizar un retrovirus defectivo u otro virus para insertar directamente los genes adecuados en células huésped, quizá incluso en órganos o tejidos específicamente preseleccionados. Las toxinas de fusión proporcionan un tercer ejemplo de aplicaciones de ingeniería genética potencialmente importantes. Las primeras toxinas desarrolladas han sido proteínas recombinantes en las que se han combinado los dominios catalítico y de translocación de membrana de la toxina diftérica con proteínas que se unen específicamente a los receptores de superficie de la célula diana.

Se están llevando a cabo ensayos clínicos con una toxina de fusión que contiene interleucina-2. La IL-2 se une a la célula, y el dominio enzimático de la toxina diftérica penetra y bloquea la síntesis de proteínas. Se han obtenido resultados alentadores en el tratamiento de la leucemia, los linfomas y la artritis reumatoide.

El ganado parece estar destinado a desempeñar un papel importante en la biotecnología de orientación médica mediante el uso de un enfoque que en ocasiones ha recibido el nombre de ganadería molecular. Los embriones de cerdo en los que se inyectan genes que codifican la hemoglobina humana se convierten en cerdos transgénicos que sintetizan hemoglobina humana. Los planes actuales consisten en purificar la hemoglobina y utilizarla como sustitutivo de la sangre. Un solo cerdo podría aportar 20 unidades de sangre humana al año. Técnicas relativamente similares a ésta han producido cabras transgénicas cuya leche contiene hasta 3 g/L de activador tisular del plasminógeno humano. El activador tisular del plasminógeno (TPA) disuelve los coágulos sanguíneos y se utiliza en el tratamiento de los pacientes con cardiopatías.

Las técnicas de DNA recombinante están desempeñando un papel de importancia creciente en la investigación de las bases moleculares de la enfermedad. La transferencia de la investigación a la aplicación práctica a menudo es un proceso lento, debido a que no resulta fácil tratar la enfermedad de forma eficaz si se desconoce su mecanismo molecular. Por este motivo la ingeniería genética puede participar en la lucha contra una enfermedad aportando nueva información sobre su naturaleza, además de contribuir al diagnóstico y a tratamiento.

- **Modelos animales de enfermedades genéticas humanas: ratones *knockout*.**

Los ratones *knockout* están alterados genéticamente de manera que un gen concreto (un gen diana) se ha inactivado y se ha convertido en no funcional. Es una técnica compleja que utiliza una combinación de la tecnología del DNA recombinante, de cultivos celulares, y de manipulaciones de embriones. Construir un ratón *knockout* requiere aproximadamente un año, y analizar los efectos del *knockout* puede precisar incluso más tiempo. Este método fue desarrollado en 1989 por varios grupos, como el de Mario Capecchi en la Universidad de Utah, el de Oliver Smithies en la Universidad de Carolina del Norte, y el de Elizabeth Robertson en la Harvard Medical School; hasta la fecha, se han hecho más de 100 *knockout* génicos en ratón.

Esta técnica empieza con la clonación de un gen diana de un ratón normal. Se inserta un gen de resistencia a antibióticos dentro de este gen, lo que interrumpe su función y proporciona un marcador para seguir el gen durante las posteriores manipulaciones. El gen alterado se transfecta a cultivos de células madres embrionarias (ES). En algunas de estas células, el gen alterado habrá reemplazado al gen normal por un suceso de recombinación. Se seleccionan las células que contienen una copia del gen recombinante y un alelo normal, y se las hace crecer en cultivo. Estas células ES genéticamente alteradas se inyectan a un embrión de ratón, en el que participarán en la formación de los tejidos y órganos adultos.

Se transfiere el embrión quimera a una madre adoptiva para que complete su desarrollo. Utilizando genes del color del pelaje como marcadores, es posible seleccionar un ratón quimera que tenga células germinales provenientes de las células ES genéticamente alteradas. Los ratones heterocigóticos pueden utilizarse, mediante cruzamientos, para producir ratones homocigóticos para el gen inactivado; estos homocigotos se denominan ratones *knockout* ya que se ha mutado o suprimido la funcionalidad de un solo gen.



Construcción de un ratón *knockout*. Se inactiva un gen normal donado de ratón mediante la inserción de un gen de resistencia a un antibiótico, que sirve de marcador. El gen alterado se transfiere a células madres embrionarias de ratón (células ES) en cultivo. En algunas células, el gen alterado reemplazará el gen normal del genoma de las células ES por un suceso de recombinación. Las células que contienen el gen alterado se seleccionan mediante la resistencia al antibiótico y se las hace crecer en cultivo. Se inyectan estas células a un embrión de ratón normal en el estadio de blastocisto, en el que participarán en la formación de los tejidos y órganos del adulto. El embrión quimera se transfiere a una hembra huésped para que complete su desarrollo. Para seleccionar los ratones quimera provenientes de las células ES alteradas se utilizan genes del color del pelaje. Los ratones heterocigóticos se aparean con ratones normales para producir, con el tiempo, ratones que sean homocigotos para el gen interrumpido. Entonces, pueden estudiarse en la progenie homocigota los efectos funcionales y del desarrollo producidos por ser homocigoto para esa mutación.

Este método permite crear modelos de enfermedades genéticas humanas en ratón. Por ejemplo, se han construido ratones *knockout* a los que les falta RAG-1 y RAG-2, dos genes importantes para la recombinación de los genes de los anticuerpos en el sistema inmunitario, y que son la base para generar la diversidad de anticuerpos. Estos ratones se están analizando en ambientes estériles y en ambientes normales para obtener una visión más clara de cómo funcionan estos genes durante la maduración y el funcionamiento del sistema inmunitario.

Esta técnica también es importante para la comprensión y el tratamiento de las enfermedades genéticas humanas. Por ejemplo, se ha creado un modelo en ratón de la enfermedad de Gaucher (una enfermedad autosómica recesiva progresiva y fatal de las enzimas de los lisosomas). Puede sorprender que el fenotipo homocigoto recesivo en ratones es más grave y conduce a la muerte a las pocas horas del nacimiento. Este descubrimiento condujo a ver que algunos seres humanos afectados también mueren al cabo de pocas horas de su nacimiento, lo que proporciona nuevas ideas de esta enfermedad. Mediante técnicas de *knockout* se ha creado un modelo en ratón de la fibrosis quística, que demostrará su utilidad para ensayar los métodos de terapia génica antes de que sean aplicados a humanos.

Sin embargo, también se producen algunas sorpresas en la investigación de ratones *knockout*. Un ratón *knockout* al que le falta la enzima HGPRT, responsable del síndrome de Lesch-Nyhan (una enfermedad humana mortal ligada al cromosoma X), es perfectamente normal y no tiene alteraciones del comportamiento detectables. Investigaciones adicionales muestran que estos ratones utilizan más otra vía silvestre de las purinas, que utiliza la enzima adenina fosforribosiltransferasa (APRT), y son por lo tanto más tolerantes a la deficiencia de HGPRT que los humanos. Si los ratones deficientes para HGPRT se tratan con un inhibidor de APRT, muestran un patrón de comportamiento autoagresivo. Otras investigaciones con ratones *knockout* reflejan descubrimientos similares; es posible interrumpir un solo gen sin que se produzcan efectos fenotípicos o que éstos sean leves, aunque dos copias del gen mutante tengan graves consecuencias fenotípicas en humanos. Estos descubrimientos sugieren que hay vías bioquímicas y del desarrollo alternativas, específicas de cada especie, que pueden compensar la pérdida de un solo gen.

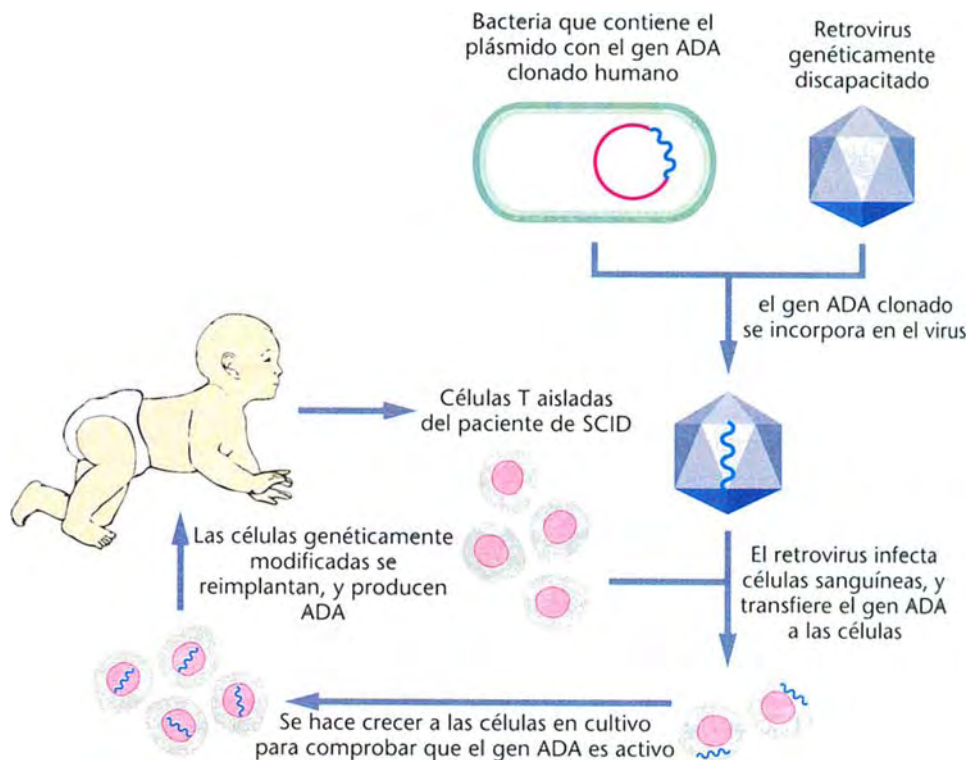
Actualmente se está desarrollando una segunda generación de ratones *knockout* que tienen múltiples genes inactivados implicando a varios genes de una vía bioquímica, y de ratones *knockout* que tienen genes inactivados en determinados tejidos o que contienen genes discapacitados en vez de inactivados.

#### • Terapia génica.

Los métodos de aislamiento y clonación de genes específicos desarrollados originalmente como una herramienta de investigación se están utilizando actualmente para tratar enfermedades genéticas mediante transferencia de alelos normales humanos en un proceso denominado terapia génica. Durante décadas se han utilizado algunos productos genéticos, como la insulina, para tratamientos terapéuticos. La terapia génica lleva este proceso un paso más adelante, y persigue modificar el genoma de las células somáticas transfiriendo copias normales de genes para que produzcan cantidades adecuadas del producto génico normal, cuya acción corregiría la enfermedad genética. La expedición de estos genes estructurales y de sus secuencias reguladoras se consigue utilizando [vectores](#) o sistemas de transferencia de genes.

Pueden utilizarse diversos métodos para transferir genes y sus secuencias reguladoras a células humanas. Estos métodos incluyen la utilización de [vectores](#) víricos, las transferencias asistidas químicamente que fomentan la transferencia de genes por las membranas celulares, y la fusión de células con vesículas artificiales que contienen secuencias clonadas de DNA.

Actualmente, el método más común de transferencia de genes utiliza el virus de la leucemia murina de Maloney como vector para transportar los genes a transferir. Se eliminan los genes *gag*, *pol* y *env* del virus, y se inserta el gen humano clonado. La construcción resultante se empaqueta en las proteínas de la cubierta del virus; el vector retrovítico puede infectar células, pero no puede replicarse debido a los genes víricos que le faltan. El vector se mezcla con una suspensión de células diana, y entra en la célula por medio de un receptor de la superficie celular. Una vez en el citoplasma, el genoma vírico que transporta el gen humano clonado se integra en uno de los cromosomas de la célula diana.



Terapia génica para el tratamiento de la inmunodeficiencia combinada grave (SCID), una enfermedad mortal del sistema inmunitario causada por la falta de la enzima adenosina desaminasa (ADA). El gen ADA donado humano se transfiere a un vector vírico, que se utiliza para infectar glóbulos blancos extraídos del paciente. El gen ADA transferido se incorpora en un cromosoma, donde es activo. Después de hacer crecer estas células para incrementar su número, éstas se reimplantan en el paciente, en el que producen ADA, lo que permite el desarrollo del sistema inmunitario.

Esta forma experimental de tratamiento no se utiliza sin una extensa inspección. A nivel local, una comisión de inspección del centro médico o del hospital en el que se realizará la terapia génica debe inspeccionar y aprobar la propuesta, y seguir el proceso para proteger los intereses del paciente. A nivel nacional, hay varios niveles de inspección en el National Institute of Health (NIH). Un comité formado por científicos, abogados, expertos en ética, etc., especialmente designados, inspeccionan y dan el visto bueno a los ensayos. Finalmente, el director del NIH debe aprobar el tratamiento.

Las normas para recibir terapia génica están bien establecidas e incluyen varios requisitos. Primero, el gen debe estar aislado y debe estar disponible para la transferencia, normalmente por clonación. Segundo, debe haber un medio efectivo para transferir el gen. Por el momento, muchos ensayos utilizan [vectores](#) retrovíricos, aunque también se emplean otros métodos, como los [vectores](#) adenovíricos y las técnicas físicas y químicas. Tercero, el tejido diana debe ser accesible para la transferencia génica. La primera generación de procesos de terapia génica utilizaba glóbulos blancos o sus precursores como tejido diana. Cuarto, no debe haber ninguna otra forma de terapia efectiva disponible, y la terapia génica no debe dañar al paciente.

Actualmente se están tratando varias enfermedades hereditarias con terapia génica, como la inmunodeficiencia combinada grave (SCID), la hipercolesterolemia familiar, la fibrosis quística y la distrofia muscular, y se están desarrollando procesos para tratar otras enfermedades.

#### Aplicaciones industriales.

Entre las aplicaciones industriales de la tecnología del DNA recombinante se encuentra: la fabricación de productos proteicos utilizando bacterias, hongos y células de mamíferos cultivadas como verdaderas factorías; la mejora de cepas para bioprocesos ya existentes; y el desarrollo de nuevas cepas para bioprocesos adicionales. Como se ha mencionado anteriormente, la industria farmacéutica ya está produciendo

diversos polipéptidos de importancia médica mediante esta tecnología. Además, existe interés en sintetizar con bacterias recombinantes enzimas caras e importantes desde el punto de vista industrial. Se han desarrollado bacterias que metabolizan petróleo y otros materiales tóxicos. Estas bacterias pueden construirse ensamblando los genes catabólicos necesarios en un único plásmido y a continuación transformando el microorganismo adecuado. También existen muchas aplicaciones potenciales en las industrias química y alimentaria.

### Aplicaciones en agricultura.

También es posible evitar los métodos tradicionales de mejora genética y transferir directamente las características deseables a animales y plantas importantes desde el punto de vista de la agricultura. Estas técnicas tienen la capacidad de aumentar las tasas de crecimiento y la producción global de proteínas de los animales de granja. El gen que codifica la hormona del crecimiento ya ha sido transferido de ratas a ratones, y los métodos de fertilización *in vitro* e implantación de embriones han alcanzado un nivel de desarrollo relativamente alto. Recientemente, se ha utilizado la hormona del crecimiento bovina para aumentar la producción de leche al menos un 10%. Es posible que también puedan mejorarse la resistencia a la enfermedad y la tolerancia a condiciones ambientales extremas de los animales de granja.

Se ha invertido un esfuerzo considerable en la transferencia a otras plantas de cultivo de las capacidades fijadoras de nitrógeno de las bacterias asociadas a las leguminosas. Los principales genes responsables de este proceso se han clonado y transferido al genoma de las células de plantas; sin embargo, las células receptoras no han sido capaces de fijar el nitrógeno. Si se tuviera éxito en este proyecto, los beneficios potenciales para plantas de cultivo tales como el maíz serían importantes. No obstante, existe cierta preocupación en torno al hecho de que las nuevas variedades fijadoras de nitrógeno pudieran propagarse de forma indiscriminada como malas hierbas o alterar el ciclo de nitrógeno del suelo.

Los intentos de conferir a las plantas resistencia a las condiciones ambientales adversas han tenido más éxito. Por ejemplo, se aislaron de *Salmonella* los genes responsables de la detoxificación de los herbicidas basados en el glifosato, y se introdujeron en células de la planta del tabaco utilizando el plásmido Ti. Las plantas regeneradas a partir de las células recombinantes eran resistentes al herbicida. También se han desarrollado variedades de algodón y de maíz fértil transgénico resistentes a los herbicidas. Este hecho tiene una importancia considerable, ya que numerosas plantas sufren efectos adversos al ser tratadas con herbicidas. Las plantas de cultivo resistentes no sufrirían ningún efecto derivado de los agentes químicos empleados para el control de las malas hierbas, y las cosechas probablemente serían mucho mayores.

Se están explorando muchas otras aplicaciones en agricultura. Un buen ejemplo lo constituye una cepa alterada de *Pseudomonas syringae* que protege a las plantas de los daños por congelación porque no puede producir la proteína que induce la formación de cristales de hielo. Se está invirtiendo un gran esfuerzo en la protección de las plantas frente a plagas sin el uso de pesticidas químicos y se está estudiando una cepa de *Pseudomonas fluorescens* que contiene el gen que codifica la toxina de *Bacillus thuringiensis*. Esta toxina destruye muchas plagas de insectos, como la mariposa de la col y el gusano barrenador del maíz. También se ha desarrollado una variedad de maíz que contiene el gen de la toxina de *B. thuringiensis*. Existe un interés considerable por los virus destructores de insectos, y en particular por los baculovirus. Se ha insertado un gen que codifica la toxina del escorpión en el virus multicápside de la polihedrosis nuclear (AcMNPV). Este virus, desarrollado mediante ingeniería genética, mata a la mariposa de la col con mayor rapidez que el virus normal, y reduce de forma significativa los daños en el maíz. Finalmente, se están desarrollando cepas de soja, patata, calabacín, arroz y otras plantas, resistentes frente a virus.