

CAPITULO 3. TECNOLOGÍA DEL DNA RECOMBINANTE Y GENÓMICA

**PRESENTADO POR
ING. MARIA CAMILA CELY GARCIA**

**DOCENTE
Dr. MARTHA FLOREZ**

BIOTECNOLOGIA I

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
MAESTRIA EN BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA
SAN JOSÉ DE CUCUTA**

2022

CUESTIONARIO

- 1. Distingue entre clonación de genes, tecnología del ADN recombinante e ingeniería genética describiendo cada proceso y discutiendo cómo están interrelacionados. Da ejemplos de cada método tal y como se describe en este capítulo.**

En realidad, estas técnicas son metodologías ligeramente diferentes que están interrelacionadas, en cuanto a la Clonación de genes es un proceso de duplicar un determinado gen, tejido o trozo de ADN con el fin de producir copias genéticamente idénticas de un ente biológico. La Tecnología del ADN recombinante implica la combinación de DNA de diversas fuentes utilizando enzimas para cortar y unir secuencias de ADN de interés y la Ingeniería Genética se basa en la tecnología del ADN recombinante y en la clonación de genes para modificar el genoma de un organismo.

Cohen y Bayer trabajaron con dos plásmidos bacterianos para clonar ADN con éxito creando el primer vector plásmido para fines de clonación denominado PSC101 y bautizado como SC este contenía un gen de resistencia a las tetraciclinas y sitios de restricción para varias enzimas incluyendo EcoRI y Hind III.

Un ejemplo claro es el realizado por Paul Berg el cual inició la tecnología de ADN recombinante cuando creó un trozo de ADN uniendo (empalmando) ADN del cromosoma de *E.coli* y ADN de un virus de primate denominado SV40 (Virus del simio 40). Consistió en aislar el ADN cromosómico de *E.coli* y el ADN de SV40 para posteriormente cortar ambas muestras de ADN con EcoRI (Enzima de restricción específica de *E.coli*). luego añadió ADN de *E.coli* y fragmentos de ADN viral en un tubo de reacción con la enzima ADN ligasa y tuvo éxito al crear una molécula híbrida de ADN de SV40 y de *E.coli*. Ya colocar este fragmento de DNA

recombinante en una célula bacteriana para crear una bacteria se considera ingeniería genética.

2. Describe la importancia de la DNA ligasa en un experimento de DNA recombinante. ¿Qué hace esta enzima y en qué se diferencia esta acción del funcionamiento de las enzimas de restricción?

La importancia del ADN ligasa en un experimento de ADN recombinante, se utiliza para unir los ejes de los dos fragmentos de ADN produciendo una molécula de ADN recombinante que contiene ADN humano y el plásmido, permitiendo catalizar la formación de enlaces fosfodiéster entre nucleótidos. Este es un paso importante en un experimento de clonación porque los enlaces de hidrógeno entre extremos cohesivos de los fragmentos de DNA no son lo suficientemente fuertes como para mantener unida una molécula de DNA recombinante de modo permanente.

Se diferencia de las enzimas de restricción ya que estas actúan cortando el ADN rompiendo el enlace fosfodiéster (en el eje azúcar-fosfato) en secuencias específicas de nucleótidos. Con frecuencia, el DNA se digiere con enzimas de restricción hasta dejarlo en fragmentos, lo cual es un paso importante en muchos experimentos de clonación, antes de utilizar DNA ligasa para unir los fragmentos.

3. Tu laboratorio acaba de determinar la secuencia del gen de una rata que se cree que está implicado en el control de la capacidad fertilizadora del esperma de la rata. ¿Crees que un gen similar podría controlar la fertilidad en los hombres? Describe brevemente cómo podrías utilizar lo que sabes acerca de este gen de rata combinado con PCR para clonar el gen humano complementario. Asegúrate de explicar tu método experimental y el material de laboratorio necesario. También explica en detalle cualquier procedimiento necesario para confirmar que tienes un gen humano que corresponde a tu gen de rata.

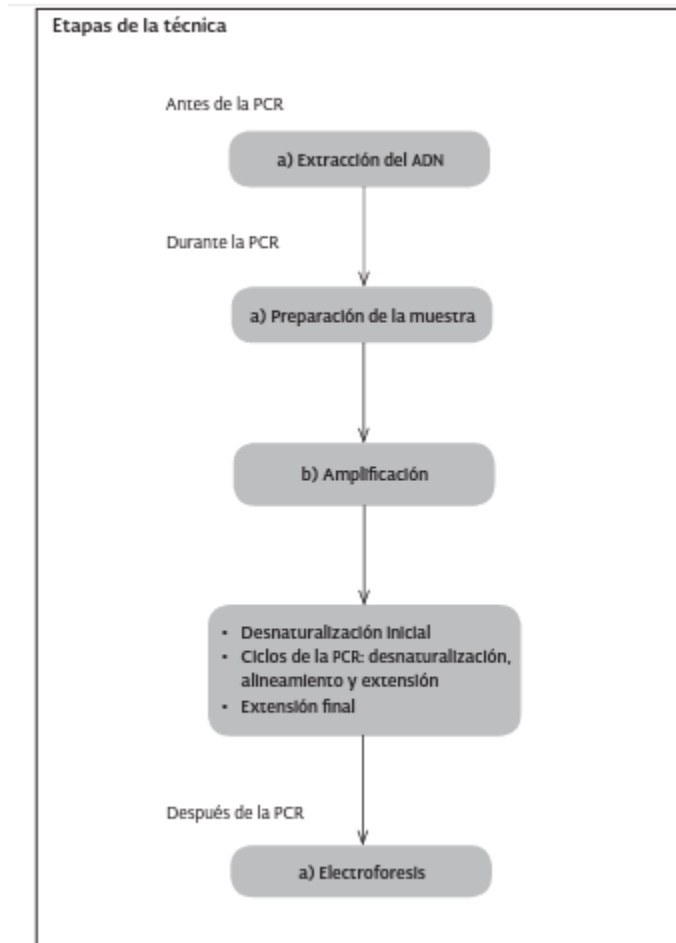
Si, un gen similar podría controlar la fertilidad de los hombres ya que se ha observado que la rata tiene aproximadamente el mismo número de genes que el hombre y el

ratón. Es más, casi todos los genes humanos conocidos que están asociados a enfermedades tienen su correspondiente gen en el genoma de la rata y parecen altamente conservados a través de la evolución de los mamíferos, lo que confirma que la rata es un excelente modelo de investigación en muchas áreas de la medicina.

La secuencia de un gen clonado de rata se podría utilizar para crear cebadores que se pudieran utilizar para amplificar DNA de células humanas en un esfuerzo por amplificar el gen complementario de los humanos. Si se tiene éxito en obtener productos de PCR de este experimento, éstos se podrían secuenciar y comparar con el gen de rata para buscar secuencias similares de nucleótidos.

Los productos de PCR se podrían utilizar en técnicas como la sonda de rastreo en donde con frecuencia es un gen clonado de otra especie. Un clon de ADN complementario (cDNA) de un gen de rata o ratón a menudo es una sonda muy efectiva para rastrear una biblioteca humana, sea genómica o de cDNA, porque muchas secuencias de genes en ratas y ratones son similares a las que se encuentran en los genes humanos. Si el gen de interés no ha sido clonado en otra especie, pero existe información sobre la secuencia de proteínas, se puede fabricar una serie de oligonucleótidos sintetizados químicamente basándose en una predicción de codones que pueden codificar para la secuencia de proteínas conocida con el fin de encontrar el gen humano en toda su longitud o como sondas para el análisis Northern blot para determinar si el mRNA de este gen se expresa en tejidos humanos, para luego ser evaluado y buscado en bibliotecas sean genómicas o de complementariedad.

Amplificación de ADN mediante PCR



Un ciclo de amplificación consta de tres etapas:

1. Separación de las hebras de ADN (desnaturalización)
2. Unión de los iniciadores a una secuencia complementaria del ADN molde (alineamiento)
3. La síntesis semiconservativa de una nueva cadena por adición de nucleótidos debido a la acción de la ADN polimerasa (extensión).

Cada una de las etapas está determinada por una temperatura. teóricamente el proceso permite generar en 30 ciclos de amplificación más de dos billones de copias de ADN a partir de una sola molécula.

EQUIPOS	MATERIALES	REACTIVOS
Termociclador	Guantes desechables de látex, vinil o nitrilo	Muestra de ADN que contenga la región(es) que se desea amplificar
Vortex	Tubos para PCR	Buffer o solución amortiguadora
Micropipetas de 2, 20, 100 y 200 µl	Puntas para micropipetas	Cloruro de Magnesio (MgCl ₂)
Microcentrífuga	Baño de hielo	Desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs)
Fotodocumentador	Gradilla	Iniciadores
		Taq polimerasa
		Agua destilada o desionizada estéril

4. ¿Qué características de los vectores plasmídicos de clonación los hace útiles para clonar el DNA? Da ejemplos de diversos tipos de vectores de clonación y discute sus aplicaciones en biotecnología.

Características de los Vectores Plasmídicos

- En su gran mayoría son de tamaño pequeño lo cual permite que se puedan separar fácilmente del ADN cromosómicos de la bacteria hospedadora.

- Contienen sitios de replicación los cuales permiten replicarse de forma separada del cromosoma de la célula hospedadora, generando cientos de miles de copias de plásmido por célula.
- Poseen sitios de clonación múltiple (MCS) los cuales aportan gran flexibilidad a los fragmentos de ADN que pueden ser clonados en un plásmido ya que permiten insertar fragmentos de ADN generados por cortes de enzimas diferentes.
- Las secuencias del promotor de RNA polimerasas permiten a las células bacterianas fabricar RNA a partir de genes clonados, lo que a su vez causa y/o permite la síntesis de proteínas.

Tipos de vectores de clonación

- 1) Vectores bacteriófagos
- 2) Vectores cósmidos
- 3) Vectores de expresión
- 4) Cromosomas artificiales bacterianos
- 5) Cromosomas artificiales de levaduras
- 6) Vectores Ti

Los vectores de clonación o vector molecular son moléculas transportadoras que transfieren y replican fragmentos de ADN que llevan insertados mediante técnicas de ADN recombinante. Para que sirva de vector, una molécula debe ser capaz de replicarse junto con el fragmento de ADN que transporta. Entre los tipos de vectores de clonación podemos encontrar los **Vectores de Bacteriófagos** de los cuales el ADN bacteriófago Lamba (λ) fue uno de los primeros vectores utilizados en la clonación, cada extremo del cromosoma λ se encuentran secuencias de 12 nucleótidos llamados sitios o extremos

cohesivos (COS) que puede emparejar sus bases unos con otros, su principal aplicación se basa en utilizar estos fagos para infectar *E.coli* allí el cromosoma utiliza estos sitios o extremos COS para circularizarse y replicarse, la ventaja de este es que estos vectores permiten la clonación de fragmentos más grandes de ADN de hasta aproximadamente 25Kb, muchos de estos vectores de bacteriófagos se pueden utilizar como vectores de expresión de proteínas, subclonación (desde un vector origen a un vector de destino), en las bibliotecas genómicas y como ADN complementario. Por otra parte se encuentran los **Vectores Cósmicos** el cual a diferencia del vector de Bacteriófago que también contiene extremos COS de ADN λ , poseen un origen plasmídico de replicación y genes de resistencia antibiótica, allí se clona ADN en un sitio de restricción y el cosmido se empaqueta en partículas virales como ocurre con los vectores de bacteriófagos que se utilizan para infectar *E.coli*. Estos permiten la clonación de fragmentos de ADN en el rango de los 20 a 45Kb, entre sus aplicaciones se encuentra en las bibliotecas genómicas, bibliotecas de expresión y como ADN complementario (cDNA), una de las ventajas principales de las bibliotecas de cDNA sobre las bibliotecas genómicas es que las primeras son colecciones de genes expresados activamente en las células o en el tejido del que se aisló el mRNA. No se clonan intrones en una biblioteca de cDNA, lo que reduce significativamente la cantidad total de DNA que se clona en comparación con una biblioteca genómica. También se encuentra los **Vectores de Expresión** el cual permite la síntesis de alto nivel de las proteínas eucariotas dentro de las células bacterianas ya que contienen una secuencia promotora procariota adyacente al sitio en el que se inserta el ADN en el plásmido, Sin embargo, no siempre es posible expresar una proteína funcional y hacer productos recombinantes en las bacterias ya que puede convertirse en un problema, debido a que *E. coli* a menudo no secreta proteínas, de modo que los vectores de expresión se utilizan con frecuencia en *Bacillus subtilis*, una cepa más adecuada para la secreción de proteínas. Entre sus principales aplicaciones se encuentra que han sido utilizadas en variaciones de vectores en terapia génica humana. En cuanto al **Vectores de Cromosomas Artificiales Bacterianos (BAC)** son plásmidos de bajo número de copias presentes, una a dos copias de células bacterianas los cuales contienen genes que codifican el factor F (conjunto de genes que controlan la replicación bacteriana). Los BAC pueden aceptar insertos de ADN entre 100 a 300 Kb, estos fueron muy utilizados

en el proyecto del genoma humano para clonar y secuenciar grandes fragmentos de cromosomas humanos. Entre sus principales aplicaciones está en las bibliotecas genómicas y en la clonación de grandes fragmentos de ADN. También se encuentra el **Vector de Cromosomas Artificiales de Levaduras (YAC)** estos ya son plásmidos que han crecido en *E.coli* y han sido introducidos en células de levadura como *Sacharomyces cerevisiae*, estos son la versión miniatura de un cromosoma eucariota, están compuestos por un origen de replicación, marcadores de selección, 2 telómeros y un centrómero los cuales permiten la replicación; a diferencia de los demás tipos de vectores mencionados anteriormente son útiles para clonar grandes fragmentos de ADN de 200 Kb hasta aproximadamente 2 Mb siendo similares a los BAC ya que también han desempeñado un papel importante en los esfuerzos de clonación del proyecto del genoma humano, entre sus aplicaciones se encuentra también en las bibliotecas genómicas y en la clonación de grandes fragmentos de ADN. Por último se encuentra los **Vectores Ti** los cuales son aislados de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* un patógeno vegetal que vive en el suelo y que causa una enfermedad en las plantas llamada tumor de cuello o agalla, estos vectores Ti se utilizan para transferir genes a plantas en este caso por métodos distintos a la fusión de gametos u otras células sin alterar su genotipo y fenotipo. La modificación introducida le otorga a la planta nuevas características beneficiosas como: resistencia a enfermedades, virus, bacterias, hongos, plagas, tolerancia a herbicidas y a estrés como pueden ser sequías, heladas y altas temperaturas.

5. Si realizaras un experimento de PCR que empezara con una sola copia de DNA de doble cadena, ¿aproximadamente cuántas moléculas se producirían después de 15 ciclos de amplificación?

Como el DNA diana se duplica después de cada ciclo de PCR, después de 15 ciclos de amplificación pueden haber aproximadamente 2^{15} o 32.768 copias.

- 6. Compara y contrasta las bibliotecas genómicas con las bibliotecas de cDNA. ¿Qué tipo de biblioteca utilizarías en primer lugar si intentaras clonar un gen en adipocitos (células grasas) que codifican una proteína que se cree implicada en la obesidad? Explica tu respuesta. ¿Qué tipo de biblioteca elegirías si quisieras clonar elementos reguladores de los genes como secuencias promotoras y secuencias potenciadoras?**

Para la clonación de un gen que codifica una proteína implicada en la obesidad en adipocitos lo mejor sería usar las bibliotecas cDNA (complementario) pues en este tipo de colecciones se pueden obtener los genes expresados activamente en las células del que se aisló el mRNA como es en este caso además, que se ahorraría el proceso de clonar todo el DNA cromosómico, incluyendo los intrones por tanto se reduce significativamente la cantidad total de DNA que se tiene que clonar en comparación con una biblioteca genómica.

Para el caso de la clonación de secuencias promotoras y secuencias potenciadoras podría usar una biblioteca genómica, puesto que son secuencias que no se transcriben. Con este tipo de biblioteca a partir el DNA cromosómico del organismo que posee esos elementos reguladores se pueden aislar y después digerir con una enzima de restricción, donde los fragmentos más pequeños se clonaran en plásmidos, de esta manera se podría realizar una búsqueda mucho más amplia para identificar y clonar este tipo de secuencias.

- 7. Visita la Online Mendelian Inheritance in Man Site (OMIM) que aparece en la página web adjunta, después haz clic en «Search the OMIMdatabase» (Buscar la base de datos OMIM). Escribe «diabetes» en el recuadro de búsqueda y haz clic en «Submit Search» (Enviar búsqueda). ¿Qué has encontrado? Escribe «114480» en el recuadro de búsqueda. ¿Qué ha pasado esta vez? Otra cosa que puedes hacer es buscar un gen que te interese y mirar lo que puedes encontrar en OMIM. Si los resultados de tu búsqueda en OMIM son demasiado técnicos,**

visita la sección «Genes & Disease» (Genes y enfermedades) del sitio web del NCBI de la página web adjunta y luego busca «diabetes».

1. Procedo con la búsqueda de la página Mendelian Inheritance in Man Site (OMIM)

2. Buscando con la palabra diabetes me arroja 1.167 resultados. En donde se observan las secuencias de genes implicados en el desarrollo de la diabetes mellitus insulino-dependiente y la no insulino-dependiente.

- Colocando el numero 114480 da como resultado los genes del cáncer de mama familiar.

#114480

índice

Título

Relaciones fenotipo-gen

Síntesis clínica

Texto

Descripción

Características clínicas

Otras características

Herencia

Diagnóstico

Gestión clínica

Cartografía citogenética

Genética molecular

Patogénesis

modelo animal

Historia

Ver también

Referencias

114480

CÁNCER DE MAMA

Títulos alternativos; símbolos

CÁNCER DE MAMA FAMILIAR

Otras entidades representadas en esta entrada:

CÁNCER DE MAMA, FAMILIAR MASCULINO, INCLUIDO

Relaciones fenotipo-gen

Ubicación	fenotipo	Fenotipo Número MIM	Herencia	Clave de mapeo de fenotipos	Gen/Locus	Número MIM de gen/locus
1p34.1	{Cáncer de mama, ductal invasivo}	114480	ANUNCIO , SMu	3	RAD54L	603615
2q33.1	{Cáncer de mama, protección contra}	114480	ANUNCIO , SMu	3	CASP8	601763
2q35	{Cáncer de mama, susceptibilidad a}	114480	ANUNCIO , SMu	3	BARDO1	601593

CIE+

▼ Enlaces externos

► Proteína

▼ Recursos Clínicos

Ensayos clínicos

EuroGentest

Reseñas de genes

Alianza Genética

GTR

GARDIA

OrphaNet

► modelos animales

► Líneas celulares

- Se observa un sin numero de ubicaciones del cáncer de a cuerdo al fenotipo, gen, locus.

Ubicación	fenotipo	Fenotipo Número MIM	Herencia	Clave de mapeo de fenotipos	Gen/Locus	Número MIM de gen/locus
1p34.1	{Cáncer de mama, ductal invasivo}	114480	ANUNCIO , SMu	3	RAD54L	603615
2q33.1	{Cáncer de mama, protección contra}	114480	ANUNCIO , SMu	3	CASP8	601763
2q35	{Cáncer de mama, susceptibilidad a}	114480	ANUNCIO , SMu	3	BARDO1	601593
3q26.32	Cáncer de mama, somático	114480		3	PIK3CA	171834
5q34	{Cáncer de mama, susceptibilidad a}	114480	ANUNCIO , SMu	3	HMMR	600936
6p25.2	{?Susceptibilidad al cáncer de mama} ⓘ	114480	ANUNCIO , SMu	1	NQO2	160998
6q25.1-q25.2	Cáncer de mama, somático	114480		3	ESR1	133430
8q11.23	Cáncer de mama, somático	114480		3	RB1CC1	606837
11p15.4	Cáncer de mama, somático	114480		3	SLC22A1L	602631
11q22.3	{Cáncer de mama, susceptibilidad a}	114480	ANUNCIO , SMu	3	Cajero automático	607585
12p12.1	Cáncer de mama, somático	114480		3	KRAS	190070
13q13.1	{Cáncer de mama, masculino, susceptibilidad a}	114480	ANUNCIO , SMu	3	BRCA2	600185
14q32.33	{Cáncer de mama, susceptibilidad a}	114480	ANUNCIO , SMu	3	XRCC3	600675

5. Luego realicé la búsqueda en NCBI colocando diabetes y se observan 5.222 resultados relacionados con las secuencias de genes implicados en el desarrollo de la diabetes mellitus insulino-dependiente y la no insulino-dependiente.

An official website of the United States government [Here's how you know](#)

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Log in

All Databases Search

NCBI Home
Resource List (A-Z)
All Resources
Chemicals & Bioassays
Data & Software
DNA & RNA
Domains & Structures
Genes & Expression
Genetics & Medicine
Genomes & Maps
Homology
Literature
Proteins
Sequence Analysis
Taxonomy
Training & Tutorials
Variation

Welcome to NCBI
The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information.
[About the NCBI](#) | [Mission](#) | [Organization](#) | [NCBI News & Blog](#)

Submit
Deposit data or manuscripts into NCBI databases

Download
Transfer NCBI data to your computer

Learn
Find help documents, attend a class or watch a tutorial

Develop
Use NCBI APIs and code libraries to build applications

Analyze
Identify an NCBI tool for your data analysis task

Research
Explore NCBI research and collaborative projects

Popular Resources
PubMed
Bookshelf
PubMed Central
BLAST
Nucleotide
Genome
SNP
Gene
Protein
PubChem

NCBI News & Blog
NCBI at 2022 Galaxy Community Conference
06 Jul 2022
Join NCBI's Nuala O'Leary, PhD at the

An official website of the United States government [Here's how you know](#)

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Log in

Gene DIABETES
Create RSS Save search Advanced Help

Gene sources
Genomic
Mitochondria
Organelles

Categories
Alternatively spliced
Annotated genes
Non-coding
Protein-coding
Pseudogene

Sequence content
CCDS
Ensembl
RefSeq
RefSeqGene

Status
✓ Current

clear

clear all
[Show additional filters](#)

Tabular 20 per page Sort by Relevance Send to:

See [Lepr \(DIABETES\) leptin receptor](#) in the Gene database

Search results
Items: 1 to 20 of 5222
[See also 9236 discontinued or replaced items.](#)

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases	MIM
<input type="checkbox"/> Lepr ID: 16847	leptin receptor [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Chromosome 4, NC_000070.7 (101574393..101676375)	LEPROTb, Modb1, OB-RGRP, Obr, db, diabetes, obese-like, obl, Lepr	
<input type="checkbox"/> CTLA4 ID: 1493	cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 [<i>Homo sapiens</i> (human)]	Chromosome 2, NC_000002.12 (203867771..203873965)	ALPS5, CD, CD152, CELIAC3, CTLA-4, GRD4, GSE, IDDM12	123890
<input type="checkbox"/> VEGFA ID: 7422	vascular endothelial growth factor A [<i>Homo sapiens</i> (human)]	Chromosome 6, NC_000006.12 (43770209..437864)	MVCD1, VEGF, VPF INTRODUCCION A LA BIOTECNOLOGIA copia.pdf - Adobe Acrobat Reader DC (64-bit)	192240

Filters: [Manage Filters](#)

Results by taxon
Top Organisms [Tree](#)
[Homo sapiens \(2301\)](#)
[Mus musculus \(1297\)](#)
[Rattus norvegicus \(780\)](#)
[Danio rerio \(237\)](#)
[Caenorhabditis elegans \(168\)](#)
[All other taxa \(439\)](#)
More...

Find related data
Database:

Search details

8. El análisis de las secuencias de DNA utilizando programas informáticos (*software*) ha simplificado mucho a los biólogos moleculares el estudio de la estructura de los genes. Esta actividad está diseñada para que puedas experimentar las aplicaciones del *software* de análisis del DNA. Imagina que la siguiente secuencia corta de nucleótidos, GGATCCGGCCGGAATTCGTA, representa una hebra de un gen importante que te han enviado por correo electrónico para tu proyecto de investigación. Antes de que puedas continuar tu investigación, has de descubrir qué enzimas de restricción, si es que hay alguna, cortan este fragmento de DNA. Ve al sitio Webcutter de la página web adjunta. Avanza la página hasta que veas un cuadro de texto titulado «Paste the DNA sequence into the Box Below» (Pega la secuencia de DNA en el recuadro inferior). Escribe la secuencia de tu fragmento de DNA en ese recuadro. Avanza la página, dejando todos los parámetros por defecto hasta que veas «Please Indicate Which Enzymes to include in the Analysis» (Por favor, indica qué enzimas hay que incluir en el análisis). Haz clic en «Only the following enzymes:» (Sólo las enzimas siguientes:) después utiliza el menú desplegable y selecciona *Bam*HI. Avanza hasta el final de la página y haz clic en el botón «Analyze sequence» (Analizar secuencia). ¿Qué has descubierto? ¿Puede *Bam*HI cortar tu secuencia? Analiza esta secuencia en otros sitios de corte para contestar las preguntas siguientes. ¿Puede *Eco*RI cortar esta secuencia? ¿Y *Sma*I? ¿Qué ocurre si haces una búsqueda y escaneas sitios de corte con todas las enzimas que hay en la base de datos?



There are two ways to input your sequence:

1. You can copy-and-paste it or type it into the box below
2. You can upload a sequence file from your computer by clicking the "Browse..." button below:

Seleccionar archivo Ninguno archivo selec. Upload Sequence File

Please enter a title for this sequence:

Untitled sequence

Paste the DNA sequence into the box below

GGATCGGCCGGAATTCGTA

Please select the type of analysis you would like

- ☒ Linear sequence analysis
- ☐ Circular sequence analysis
- ☐ Find sites which may be introduced by silent mutagenesis

Please indicate how you would like the restriction sites displayed

- ☒ Map of restriction sites
- ☒ Table of sites, sorted alphabetically by enzyme name
- ☐ Table of sites, sorted sequentially by base pair number

Please indicate which enzymes to include in the display

- ☒ All enzymes
- ☐ Enzymes not cutting
- ☐ Enzymes cutting once
- ☐ Enzymes cutting exactly times
- ☐ Enzymes cutting at least times, and at most times
- ☒ [Rainbow] highlights for enzymes from the [Standard] polylinker

Please indicate which enzymes to include in the analysis

- ☐ All enzymes in the database
- ☐ Only enzymes with recognition sites equal to or greater than bases long

☒ Only the following enzymes:

Use the command, control, or shift key to select multiple entries

Analyze sequence Clear sequence

Secuencia sin título

20 pares de bases

[Mapa gráfico](#) | [Tabla por nombre de enzima](#)

BamHI
ggatcc ggccggaattcgta pares de bases
cctagg cggccttaagcat 1 a 20

Tabla por nombre de enzima

Enzima No. Posiciones
Nombre de reconocimiento cortes de sitios secuencia
BamHI 1 1 g/gatcc

Cada enzima analizada corta esta secuencia.

BamHI sólo puede cortar este fragmento de DNA al comienzo de la secuencia.

Please indicate which enzymes to include in the analysis

- ☐ All enzymes in the database
☐ Only enzymes with recognition sites equal to or greater than bases long

EcoNI
EcoO109I
EcoO65I
EcoRI
EcoRII

- ☒ Only the following enzymes:

Use the command, control, or shift key to select multiple entries

Analyze sequence

Untitled sequence

20 base pairs

[Graphic map](#) | [Table by enzyme name](#)

EcoRI
ggatccggccggaattcgta base pairs
cctaggcggccttaagcat 1 to 20

Table by Enzyme Name

Enzyme name	No. cuts of sites	Recognition sequence
EcoRI	1 12	g/aattc

Every enzyme analyzed cuts this sequence.

EcoRI sólo puede cortar al final de la secuencia.

Please indicate which enzymes to include in the analysis

- ☐ All enzymes in the database
- ☐ Only enzymes with recognition sites equal to or greater than bases long

SmaI

Smil

SnaBI

SpeI

SphI

- ☒ Only the following enzymes:

Use the command, control, or shift key to select multiple entries

Analyze sequence

Untitled sequence

20 base pairs

[Graphic map](#) | [Table by enzyme name](#)

Table by Enzyme Name

Enzyme name	No. Positions cuts of sites	Recognition sequence
-------------	-----------------------------	----------------------

The following endonucleases were selected but don't cut this sequence:

SmaI

No hay sitios de corte para SmaI en esta secuencia.

Please indicate which enzymes to include in the analysis

- ☒ All enzymes in the database
- ☐ Only enzymes with recognition sites equal to or greater than bases long

SmaI

Smil

SnaBI

SpeI

SphI

- ☐ Only the following enzymes:

Use the command, control, or shift key to select multiple entries

Analyze sequence

Firefox

Untitled sequence

20 base pairs

[Graphic map](#) | [Table by enzyme name](#)

NdeII BstI DpnI AluI EclXI CviJI MpaII AcsI
HflII DpnII NlaIV BsiSI Eco52I BstHCI BsiSI ApoI
Sau3AI Kzo9I MpaII CfrI EaeI Bsh1285I HspI Tsp509I
ggatccggcgggaattcgta base pairs
cctaggccggccttaagcat 1 to 20
BstX2I Bsp143I AclWI BstZI Pali HapII TspEI
XhoII BstVI HapII HspI EagI BsuRI BsaOI EcoRI
MboI BamHI Psp14I XmaIII HaeIII BsiFI Sse9I

Table by Enzyme Name

Enzyme name	No. Positions cuts of sites	Recognition sequence
AclWI	1 5	ggatc
AcsI	1 12	r/aatty
AluI	1 5	ggatc
ApoI	1 12	r/aatty
BamHI	1 1	g/gatcc
BsaOI	1 9	cgry/cg
Bsh1285I	1 9	cgry/cg
BsiFI	1 9	cgry/cg
BsiSI	2 5 9	c/cgg
Bsp143I	1 1	/gatc
BstI	1 1	g/gatcc
BstHCI	1 9	cgry/cg
BstX2I	1 1	r/gatcy
BstVI	1 1	r/gatcy
BstZI	1 6	c/ggccg
BsuRI	1 8	ga/cc

Se utilizan todas las enzimas de la base de datos encontrando que aproximadamente 42 enzimas de restricción que pueden cortar esta secuencia.

9. Ve a la sección de biología molecular de la página web del Proyecto de Biología de la Universidad de Arizona (http://www.biology.arizona.edu/molecular_bio/problem_sets/Recombinant_DNA_Technology/recombinant_dna.html). Entra en «Recombinant DNA Technology» (Tecnología del DNA recombinante) y pon a prueba tus conocimientos sobre la tecnología del DNA recombinante contestando a las preguntas que te proponen en este sitio web.

THE BIOLOGY PROJECT • MOLECULAR BIOLOGY

Recombinant DNA Technology Problem Set

Problem 1 PCR primers

Correct!

Which of the following primers would allow copying of the single-stranded DNA sequence 5' ATGCCTAGGTC?

- A. 5' ATGCC
- B. 5' TACGG
- C. 5' CTGGA
- D. 5' GACCT

The 3' end of the template strand starts the 5' of the newly synthesized DNA.

- E. 5' GGCAT

◀ PROBLEM 1 TUTORIAL PROBLEM 2 ▶

Problem 2 Recombinant DNA 1

Correct!

Which of the following tools of recombinant DNA technology is INCORRECTLY paired with one of its uses?

- A. restriction endonuclease - production of DNA fragments for gene cloning.
- B. DNA ligase - enzyme that cuts DNA, creating sticky ends.

Yes, DNA ligase joins adjacent nucleotides in a covalent linkage. Restriction endonucleases cut DNA at specific sites creating sticky ends.

- C. DNA polymerase - copies DNA sequences in the polymerase chain reaction.
- D. reverse transcriptase - production of cDNA from mRNA.
- E. electrophoresis - RLFP analysis.

Problem 3 Southern Technique

Correct!

The "Southern" technique involves:

- A. the detection of RNA fragments on membranes by specific radioactive antibodies.
- B. the detection of DNA fragments on membranes by a radioactive DNA probe.

Yes, the Southern technique detects fragments of DNA using a radioactive DNA probe.

- C. the detection of proteins on membranes using a radioactive DNA probe.
- D. the detection of proteins on membranes using specific radioactive antibodies.
- E. the detection of DNA fragments on membranes by specific radioactive antibodies.

Problem 4 Recombinant DNA 2

Correct!

DNA from a eukaryotic organism is digested with a restriction endonuclease and the resulting fragments cloned into a plasmid vector. Bacteria transformed by these plasmids collectively contain all of the genes of the organism. This culture of bacteria is referred to as a:

- A. restriction map
- B. RFLP profile
- C. F⁺ factor
- D. library

Yes, a library is a culture of bacteria where each cell has one or a few DNA sequences from another organism, but the whole culture contains the majority of the DNA fragments from an organism.

- E. lysogenic phage

Problem 5 Recombinant DNA 3

Correct!

Which of the following is not part of the normal process of cloning recombinant DNA in bacteria?

- A. restriction endonuclease digestion of cellular and plasmid DNAs.
- B. production of recombinant DNA using DNA ligase and a mixture of digested cellular and plasmid DNAs.
- C. separation of recombinant DNAs by electrophoresis using the Southern technique to determine where the desired recombinant migrates.

Yes, the Southern technique is used to detect where fragments of DNA migrate on a gel during electrophoresis.

- D. transformation of bacteria by the recombinant DNA plasmids and selection using ampicillin.
- E. probing blots of bacteria clones with radioactive DNA complementary to the desired gene.

Problem 6 Applications

Correct!

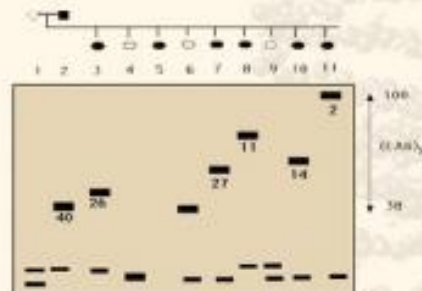
Restriction endonuclease generated DNA fragments separated by gel electrophoresis and blot transferred onto a membrane filter are probed with a radioactive DNA fragment. This procedure is called:

- A. Gene cloning
- B. The Southern technique

Yes, the Southern technique detects the location of DNA fragments on gel electrophoresis.

- C. The polymerase chain reaction
- D. Recombinant DNA
- E. Gene mapping

The data below shows the results of electrophoresis of PCR fragments amplified using probes for the site which has been shown to be altered in Huntington's disease. The male parent, as shown by the black box, got Huntington's disease when he was 40 years old. His children include 6 (3,5,7,8,10,11) with Huntington's disease, and the age at which the symptoms first began is shown by the number above the band from the PCR fragment.



What is the prognosis for the normal children 4, 6, and 9?

- A.** 4 and 9 do not have the trait, and will not get Huntington's disease, but 6 is likely to start the disease when he reaches his father's age of 40.

Yes, children 4 and 9 do not have an amplified CAG repeat, and their PCR product migrates with control normals. Child 6 is currently normal, but has an allele with approximately the same number of repeats as the father. Thus, you could expect the child to develop Huntington's disease when he/she reaches 40.

- B.** 4, 6, and 9 are lucky and have not inherited the defect causing Huntington's disease.
- C.** 4, 6, and 9 will still develop Huntington's disease at some point in their lives, since the disease is inherited as a dominant trait.
- D.** Two of the three will develop the disease, since it is inherited as a dominant trait, but the data does not allow you to predict which two.
- E.** 4, 6, and 9 must be children of a different father, and thus do not carry the trait for Huntington's disease.

In the Figure showing data on Huntington's disease, which of the following conclusions is valid:

- A.** No relationship between age of onset of disease and the migration rate of PCR fragments.
- B.** A shorter PCR fragment predicts early onset of Huntington's disease.
- C.** Increased length of the amplified PCR fragment predicts early onset of Huntington's disease.

There is an inverse relationship between the number of CAG repeats and the age at which Huntington's disease begins.

- D.** Huntington's disease must be contagious since many of the children have the disease.
- E.** None of the above.

Problem 9 Recombinant DNA 4

Correct!

"Gene library" is a term used to describe:

- A. a computerized listing of known DNA sequences.
- B. bacteria with plasmids containing DNA fragments representing the majority of the genetic information from a plant or animal.

Yes, a library is a culture of bacteria where each cell has one or a few DNA sequences from another organism, but the whole culture contains the majority of the DNA fragments from an organism.

- C. a collection of books about recombinant DNA technology.
- D. a compilation of the amino acid sequences of protein coding genes.
- E. a store that specializes in the sale of Levis.

Problem 10 Recombinant DNA 5

Correct!

One of the most significant discoveries which allowed the development of recombinant DNA technology was:

- A. the discovery of antibiotics used for selecting transformed bacteria.
- B. the identification and isolation of restriction endonucleases permitting specific DNA cutting.

Yes, prior to the discovery of these enzymes, there was no reproducible way to fragment DNA.

- C. the discovery of DNA and RNA polymerase allowing workers to synthesize any DNA sequence.
- D. the development of the polymerase chain reaction.
- E. the Southern technique for separation and identification of DNA sequences.

Problem 11 Identifying recombinants

A key feature of insertional mutagenesis for the identification of plasmids containing recombinant DNA is:

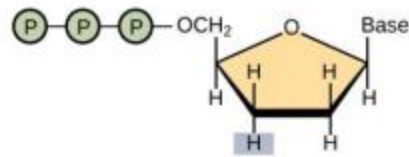
- A. the production of nutritional auxotrophs.
- B. the DNA sequencing of recombinant plasmids.
- C. the production of restriction endonuclease maps of recombinant plasmids.
- D. introns can be moved to new locations within the gene.
- E. the disruption of a gene on the plasmid by the inserted recombinant DNA.

Yes, for example, β -galactosidase on the plasmid can be disrupted by the inserted gene.

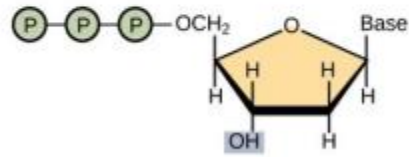
10. Busca en la web la empresa Sciona, que comercializa el equipo de evaluación Cellf DNA para nutrigenómica. ¿Piensas que se deberían utilizar equipos como éste, aunque estén mayormente basados en información sin pruebas?

La nutrigenética se refiere a la interacción entre los genes, la dieta y el estilo de vida. El ensayo Cellf Genetic Assessment no está basado en información sin pruebas, es una prueba de evaluación de ADN, haciendo un perfil genético de cada individuo, tomando como referencia, la dieta y estilo de vida. Y según esta información ayuda a identificar y potencialmente ayudar a controlar los riesgos asociados con la salud del corazón, la salud ósea, los antioxidantes y la desintoxicación, la inflamación y la resistencia a la insulina.

11. ¿Cuál es la diferencia estructural entre un desoxirribonucleótido (dNTP) y un didesoxirribonucleótido (ddNTP) utilizado en la secuenciación del DNA?



Dideoxynucleotide (ddNTP)



Deoxynucleotide (dNTP)

La diferencia estructural se encuentra en la ribosa, a los didesoxirribonucleótidos les falta un oxígeno en el carbono 3' de la ribosa.

Un ddNTP se diferencia de un desoxirribonucleótido normal (dNTP) en que tiene un grupo hidrógeno unido al carbono 3' del azúcar desoxirribosa en lugar de un grupo hidroxilo OH. Cuando se incorpora un ddNTP en una cadena de DNA, la cadena no puede alargarse porque la ausencia de un 3'-OH evita la formación de un enlace fosfodiéster con un nucleótido nuevo; de ahí se dice que la cadena está terminada.

12. Describe varios de los hallazgos del Proyecto del Genoma Humano.

- El genoma humano está compuesto por 3.272.116.950 pares de bases, es decir, corresponden a 6.544.233.900 letras totales o nucleótidos.
- En XX, 6.429.762.501 pares de bases y en XY 6.330.949.021 pares de bases
- El genoma es aproximadamente el mismo en un 99,9 por ciento en personas de todas las nacionalidades y orígenes.
- Menos del 2 por ciento del genoma codifica para los genes.
- La gran mayoría de nuestro DNA no codifica proteínas, solo el DNA que se transcribe en ARNm codifica proteínas, hay otros tipos de ARN que no codifican como el incRNA, rRNA, snRNA, tiRNA, tRNA, RNAi.

- El genoma contiene aproximadamente entre 19.951 a 21.306 genes codificadores de proteínas.
- El número de genes entre genes codificadores de proteínas, genes no codificadores de proteínas, pseudogenes entre otros varían entre 42.611 y 60.651 genes.
- Muchos genes humanos son capaces de fabricar más de una proteína.
- El cromosoma 1 es el que contiene el mayor número de genes y también es el que contiene mayor número de pares de bases 248.956.422 pb.
- El cromosoma Y es el que contiene menos genes y el menor número de pares de bases 57.227.415pb.