TEMA 3. TECNOLOGÍA DE CLONACIÓN DEL ADN RECOMBINANTE.

- 3.1. Metodología para la creación de moléculas recombinantes: Vectores de clonación, insertos y adaptadores. Tipos de vectores de clonación según su origen: plásmidos, virus, cósmidos y otros. Características de la secuencia del vector de clonación.
- 3.2. Hospedadores para vectores de clonación. Sistemas de introducción del ADN exógeno en células procariotas y eucariotas. Factores que afectan a la expresión de genes clonados. Métodos de selección de clones recombinantes.
- 3.3. Estrategias de clonación. Construcción y rastreo de bibliotecas genómicas y de ADNc.

Clonar un ADN recombinante significa aislar y disponer de un clon de células que sean portadoras de esa molécula. Donde "clon" hacer referencia al conjunto de células derivadas de una única célula progenitora (comparten el material genético).

Uno de los objetivos principales de la clonación del ADN recombinante es que la molécula de ADN se mantenga el tiempo suficiente para poder ser expresado adecuadamente en un determinado tipo celular. Para que esto ocurra será necesario utilizar los vehículos adecuados y seguir procedimientos de transferencia adaptados a cada tipo celular.

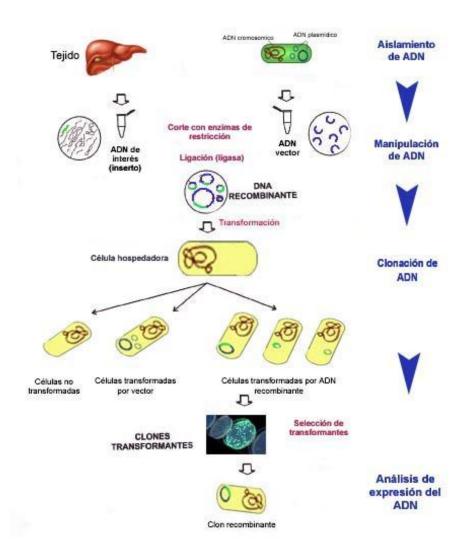
Existe una gran oferta de vectores, secuencias, hospedadores y otras herramientas y procedimientos de clonación que no debe suponer un inconveniente a la hora de diseñar nuestros experimentos de clonación, sino que deben facilitarnos la configuración del sistema más adecuado en cada caso. Para poder diseñar adecuadamente estos experimentos debemos tener en cuenta los siguientes criterios fundamentales:

- Objetivo final.
- Material de partida.
- Tiempo disponible.
- Características peculiares de aquellos sistemas que se ajustan a las 3 condiciones anteriores.

3.1. Metodología para la creación de moléculas recombinantes: Vectores de clonación, insertos y adaptadores. Tipos de vectores de clonación según su origen: plásmidos, virus, cósmidos y otros. Características de la secuencia del vector de clonación.

METODOLOGÍA PARA LA CREACIÓN DE MOLÉCULAS RECOMBINANTES

Como ya vimos en el tema 1 los procesos de clonación de ADN recombinantes pueden esquematizarse en la siguiente figura:



Por lo tanto, como vemos en la figura los elementos fundamentales del proceso de clonación de un ADN recombinante son básicamente los siguientes:

- ADN recombinante: Que procede de la unión (mediante el uso de enzimas de restricción y ligasas) de un vector de ADN y un fragmento exógeno de interés o inserto.
- Célula hospedadora: Que acoge el ADN recombinante exógeno para su mantenimiento, amplificación y/o expresión. Aporta por tanto, todos los sistemas genéticos y bioquímicos para ello (podríamos decir que actua como una factoría especializada).

Siguiendo este esquema, veremos en este apartado 3.1 los distintos tipos y características más importantes de los vectores. La información relativa a la célula hospedadora y los mecanismos de transformación/transfección celular se verán en el apartado 3.2. Posteriormente, en el tema 4, veremos los mecanismos de análisis de los clones transfectados/transformados.

Analicemos ahora el papel de los distintos componentes del ADN recombinante:

1. <u>Inserto:</u>

Es en realidad el objeto central del proceso de clonación, por eso se le llama también fragmento de interés. Así el objetivo de realizar un proceso de clonación puede ser simplemente aislar un inserto, o amplificar su cantidad, o analizarlo, o expresarlo en un determinado tipo celular. Recibe el nombre de inserto porque irá integrado en el interior del vehículo o vector. También se le llama ADN exógeno o foráneo debido a su origen ajeno a la célula hospedadora.

El inserto o bien se extrae de su fuente natural biológica (que puede ser de cualquier naturaleza biológica, virus, bacterias o cualquier organismo eucariota - en el ejemplo tejido hepático-) mediante el empleo de las técnicas de aislamiento y purificación estudiadas en el tema 2 o bien se genera por PCR o por mecanismos de síntesis química. Posteriormente el ADN/ARN aislado podrá ser modificado adecuadamente para permitir su ligación con el vector utilizando las enzimas pertinentes de la biología molecular (vistas en el tema 2). En estas modificaciones será fundamental el empleo de las enzimas de restricción y las ligasas para finalizar con la producción de un ADN recombinante compuesto por nuestro inserto y un vector elegido según nuestro propósito final.

Tras su introducción en un microorganismo hospedador, que amplifique su número por replicación, podremos recuperar el inserto del cultivo celular y separarlo de nuevo del vector o podremos introducirlo en otro tipo celular u organismo para producir organismos modificados genéticamente (transgénicos si portan un inserto exógeno).

Los fragmentos de ADN o ARN que actúan como insertos no necesitan cumplir grandes exigencias. Quizás la única limitación pueda ser el tamaño, ya que a mayor tamaño del ADN recombinante, mayor dificultad para la transfección/transformación, sin embargo esto suele compensarse con la utilización de vectores más pequeños. Respecto a su secuencia esta suele ser indiferente ya que se pueden utilizar linkers y adaptadores (que veremos enseguida) tanto para unirlos al inserto como al vector para favorecer la complementariedad y por tanto la ligación de extremos o incluso ligar insertos y vectores romos, si bien la eficiencia de ligación es mucho menor. Habrá que tener ciertas consideraciones especiales con genes cuyos productos sean deletéreos para las células hospedadoras, en cuyo caso se deberá limitar el número de insertos que podemos introducir en ellas.

2. <u>Vector:</u>

Es el principal responsable del éxito de la clonación. Ya que de él depende tanto el mantenimiento y la replicación o propagación del ADN recombinante en el cultivo de células hospedadoras como la expresión del inserto en el mismo. Además, es el encargado de portar secuencias que sirvan de marcadores fenotípicos para la selección de células recombinantes.

Hoy en día, los vectores utilizados en ingeniería genética son moléculas quiméricas producto de la unión de fragmentos naturales o sintéticos, de distinta procedencia, unidas siguiendo un determinado orden y sentido. Estos vectores se "crecen" o mantienen en células hospedadoras adecuadas para el trabajo de laboratorio hasta que se aíslan y se modifican adecuadamente para utilizarlos en ingeniería genética.

Podemos clasificar los tipos de vectores según la fuente principal de la que proceden (de la cual deriva el origen de replicación) en:

- Vectores derivados de plásmidos bacterianos.
- Vectores derivados de plásmidos de levaduras.
- Vectores derivados de bacteriófagos.
- Vectores derivados de virus eucariotas.
- Vectores lanzadera o de origen mixto (poseen más de un origen de replicación).
- Vectores integrativos (cuya replicación ocurre tras integrarse en un cromosoma).

Otro tipo de clasificación que puede englobar a los vectores utilizados en ingeniería genética hace referencia a su función, así distinguimos, de forma más específica, entre los vectores de clonación:

- Vectores de clonación (propiamente dicha): Destinados a la mera replicación o amplificación del ADN recombinante.
- Vectores de expresión: Destinados a favorecer la transcripción y/o traducción del inserto.

Veamos las características generales de los vectores utilizados en ingeniería genética:

- Contienen al menos un origen de replicación (Ori) activo en la célula hospedadora.
- Contienen al menos un sitio único de restricción (una restrictasa corta solamente en un punto de la secuencia del vector).
- Contienen un marcador fenotípico de selección (por ejemplo, resistencia a un antibiótico).
- Han de ser lo más pequeños posible (cuanto mayor es el ADNr menor es la eficiencia de transfección).

Existen además otro tipo de propiedades que pueden resultar muy ventajosas para el procedimiento de clonación y que son muy habituales:

- Poseer marcadores de selección alternativos y complementarios.
- Poseer señales de regulación de la expresión génica (en los vectores de expresión).
- Poseer sitios múltiples de clonación o *polylinkers* (para permitir la unión con distintos extremos en los insertos).

Modificación del vector para generar un recombinante [4]:

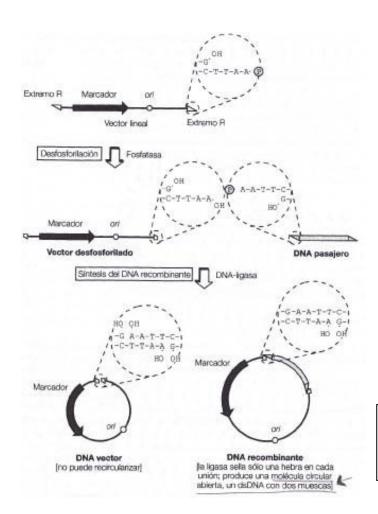
Como ya se ha señalado el vector puede incorporar *polylinkers* que le permitan incorporar distintos insertos compatibles, sin embargo, en ocasiones es necesario modificar los componentes del ADN recombinante para poder ligarlos eficazmente. Habitualmente es el vector, por ser el vehículo, el que sufre estas modificaciones.

Para unir los dos fragmentos (vector e inserto) es necesario antes de nada, abrir el vector (convertirlo en una molécula lineal). Esto se hace digiriéndolo con una enzima de restricción que tenga un único sitio de reconocimiento en la secuencia del vector. Tras esta digestión se pueden realizar distintas modificaciones que favorezcan la unión con el inserto y minimicen la recircularización del vector vacío (sin incorporar el inserto).

La recircularización del vector puede reducirse ajustando la concentración relativa de ambos tipos de ADN durante la ligación, pero la solución más efectiva es impedir la posibilidad de formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos del vector. Esto se logra eliminando los fosfatos terminales de los extremos 5' del vector por incubación con fosfatasas alcalinas. En estas condiciones, tras la ligación, se forma una molécula recombinante bicatenaria circular abierta, con dos muescas, pero que es suficientemente estable como para ser incorporado por las células hospedadoras, las cuales llevarán a cabo su reparación por fosforilación y ligación.

Otras alternativas para evitar la recircularización implican la síntesis de regiones incompatibles terminales. Esto se consigue mediante reacciones de *tailing* utilizando la transferasa terminal a partir de un único tipo de dNTP o mediante la digestión del vector con dos endonucleasas distintas (del *polylinker*) y que generen extremos incompatibles. Este último caso además permite realizar la llamada "clonación direccional" donde el inserto sólo puede introducirse en la secuencia del vector en un sentido único (ya que los extremos del

inserto han de ser también incompatibles entre sí, pero compatibles con los del vector en un único sentido).



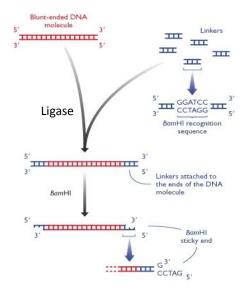
Desfosforilación de un vector durante el proceso de generación del ADN recombinante. Adaptado de Perera $et\ al^{[3]}$.

3. Linkers y adaptadores:

Como vimos en el tema anterior estos fragmentos sintéticos de ADN nos permiten modificar los extremos tanto del inserto como del vector para favorecer su unión o aportar propiedades de utilidad para el proceso de clonación o su procesamiento.

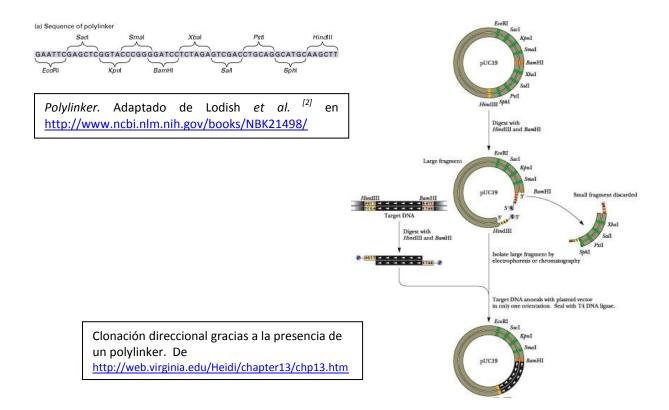
Veamos las aplicaciones de estas secuencias complementarias del proceso de clonación:

 <u>Linker</u>: Es un pequeño fragmento sintético bicatenario y romo de ADN con estructura palindrómica que porta el sitio de reconocimiento de una enzima de restricción. Nos permite transformar un extremo romo de una molécula de ADN en uno cohesivo tras ser digerido con la enzima de restricción adecuada.

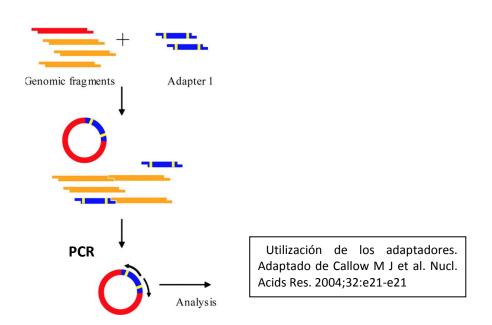


Utilización de *linkers* para generar extremos protuberantes en un fragmento de ADN. Adaptado de Brown *et al.* [1] disponible en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21128/

- Hay que destacar el papel de los <u>polylinkers</u>, que resultan de la unión de varios linkers que posteriormente se ligan a la secuencia del vector. Estas secuencias o "sitios de clonación múltiple" (MCS), incluyen por tanto, "sitios únicos de reconocimiento" para distintas enzimas de restricción dentro del vector (no existen estas dianas en el resto de la secuencia del vector). Esto permite al vector la posibilidad de poder integrar o unir distintos insertos generados con distintas enzimas de restricción (con distintos extremos cohesivos).



- Adaptador: Es una pieza corta de ADN bicatenario con al menos un extremo protuberante. Normalmente tienen ambos extremos cohesivos de secuencia incompatible. Pueden generarse químicamente o a partir de la unión de al menos dos linkers distintos que posteriormente se digieren con las enzimas de restricción correspondientes. Se utilizan para "pegar" cualquier pareja de moléculas de ADN bicatenario, sean cual sean sus extremos. Se utilizan también para introducir secuencias conocidas que sirvan para el apareamiento con cebadores, por ejemplo en las reacciones de PCR.



TIPOS DE VECTORES

Como hemos dicho, actualmente, los vectores desarrollados para y por ingeniería genética son moléculas quiméricas, artificiales y sintéticas adaptadas a las diversas necesidades experimentales de los procesos de clonación. Si tenemos en cuenta el principal tipo de molécula de ácido nucleico utilizado para su construcción (aquella que contiene la región de ADN que dirige la replicación del vector) y el tipo de célula en el se transfectan los vectores más comunes, podemos distinguir entre:

- 1. Vectores derivados de plásmidos para la clonación en bacterias (E. coli y otras spp).
- **2.** Vectores derivados del bacteriófago λ (de inserción, de reemplazamiento y cósmidos).
- 3. Vectores derivados del bacteriófago P1 (PACs).

- 4. Vectores derivados de fagos filamentosos (M13 y fagémidos).
- 5. Vectores derivados de secuencias de levaduras (YIp, YEp, YRp, YCp, YACs y Ty).
- **6.** Vectores de transferencia a células vegetales (plásmido Ti y vectores derivados de virus).
- **7.** Vectores de transferencia a células animales (vectores derivados de virus de animales, MACs y vectores transitorios (plasmídicos)).

Webs donde puedes encontrar información práctica sobre vectores y sus secuencias:

http://genome-www.stanford.edu/vectordb/

https://www.lablife.org/.

1. <u>Vectores derivados de plásmidos para la clonación en bacterias.</u>

Los plásmidos bacterianos fueron las primeras moléculas de ADN que se utilizaron como vectores en los experimentos de clonación ^[5]. Los estudios genéticos y microbiológicos mostraron que estas moléculas naturales de ADN se comportan de forma independiente al cromosoma bacteriano, pero contienen las señales precisas para que la maquinaria celular bacteriana lleve a cabo su replicación y reparto, además de la expresión de sus genes. Por lo tanto, este conocimiento abría las puertas para poder utilizar los plásmidos como vectores para vehicular, amplificar y expresar un inserto en células procariotas.

Los primeros vectores basados en plásmidos bacterianos que se desarrollaron fueron los destinados a la clonación en *E. coli*. Esto fue debido a su versatilidad y alto grado de conocimiento de la biología de esta bacteria.

La mayoría de los plásmidos bacterianos son moléculas de ADN de doble cadena, circulares y cerradas covalentemente (CCC). Los plásmidos son en última instancia responsables del número de copias presentes en la célula hospedadora así como de la replicación y reparto entre las células hijas. Esto es debido a la presencia en su secuencia del llamado "replicón". Los plásmido con replicón igual o relacionado son "incompatibles" dentro de una misma célula, ya que compiten por la maquinaria celular de replicación. El replicón incluye el "origen de replicación", "ori", donde comienza el proceso de replicación y el resto de elementos de control de la replicación. Existen distintos replicones pero algunos de los más empleados en ingeniería genética son el pMB1 y ColE1 que provocan la presencia de 15 a 20 copias del ADN recombinante por célula. Diversas mutaciones en estos replicones da como resultado la presencia de un número de copias mucho mayor (este es el caso del pMB1 mutado de los vectores pUC). Además, con este tipo de replicones el uso de agentes químicos como el cloranfenicol permite el aumento del número de copias del plásmido hasta en varios miles. Otros replicones como el pSC101 son de bajo número de copias, entre 1 y 5.

Algunos plásmidos, además, pueden ser transferidos de unas células a otras por conjugación. Para ello necesitan portar al menos las secuencias *oriT* o sitio *nic*. Este tipo de

reproducción parasexual permite la dispersión del ADN entre un amplio rango de bacterias ("transferencia horizontal" o intercambio de genes entre distintas especies).

Como hemos visto en el tema 2 los plásmidos bacterianos pueden aislarse de los cultivos celulares siguiendo distintos procedimientos (actualmente los más utilizados se realizan mediante el empleo de kits comerciales tipo minipreps, midipreps o maxipreps).

Construcción de un vector derivado de plásmidos bacterianos [6]:

Las regiones de un plásmido natural que no son necesarias para los experimentos de clonación, son prescindibles y se eliminan durante la construcción de los vectores. Esto es muy relevante, ya que se pretende lograr vectores lo más pequeños posible para que puedan incorporar insertos de distintos tamaños y a la vez facilitar el proceso de incorporación y mantenimiento en la célula hospedadora.

Los vectores plasmídicos actuales son capaces de integrar insertos de pocas pb hasta 10 ó 20 Kb (a excepción de los BACs que acogen como veremos más de 300 Kb).

Para que estos vectores sean versátiles y puedan unirse por ligación a distintos insertos (con distintos extremos cohesivos) se les incorpora un polylinker que genera un "sitio múltiple de clonación".

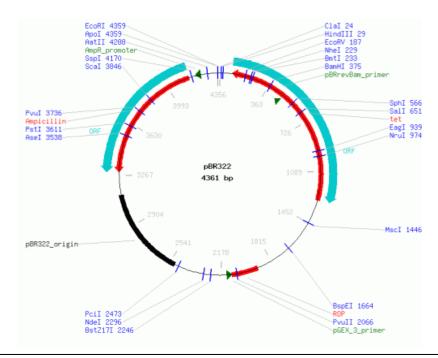
Además como veíamos en las características generales de los vectores, se suele añadir un marcador fenotípico de selección, esto es un gen que permita la detección de clones que hayan incorporado el ADN recombinante, por ejemplo a través del uso de un medio selectivo (por ejemplo, antibióticos) o en presencia de sustratos cromogénicos (por ejemplo, X-gal).

Veamos algunas de las series de vectores plasmídicos más empleadas en ingeniería genética:

Serie de vectores *pBR*:

Todos los miembros de estos vectores (pBR320, pBR322, pBR325, etc) llevan el origen de replicación pMB1 de alto número de copias, dos o tres genes de resistencia a antibióticos y varios sitios únicos de restricción.

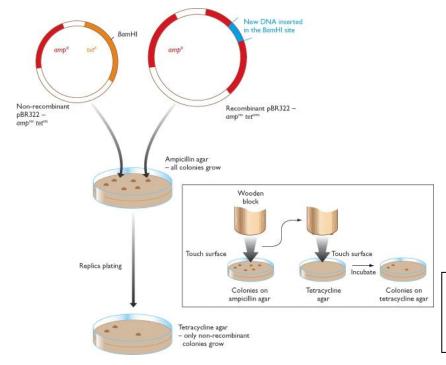
※ pBR322



Mapa físico del plásmido pBR322. Las coordenadas marcan la distancia a la posición 4361/0 localizada en el centro del sitio *EcoRI*. Obtenido de http://www.lablife.org/p?a=vdb view&id=g2%2eGKXpkJPHcxeYIWwaJG6jN6Lfnpo-

Es el vector de serie pBR más utilizado. Tiene un buena capacidad de transporte puede incorporar insertos de hasta 10Kb).

Contiene los genes de resistencia a tetraciclina (Tc^R) y a ampicilina (Ap^R). Además estos genes contienen en su interior algunos sitios de restricción, lo que permite diseñar una estrategia de selección por inactivación de la resistencia al incorporar el inserto (selección por "inactivación por inserción").

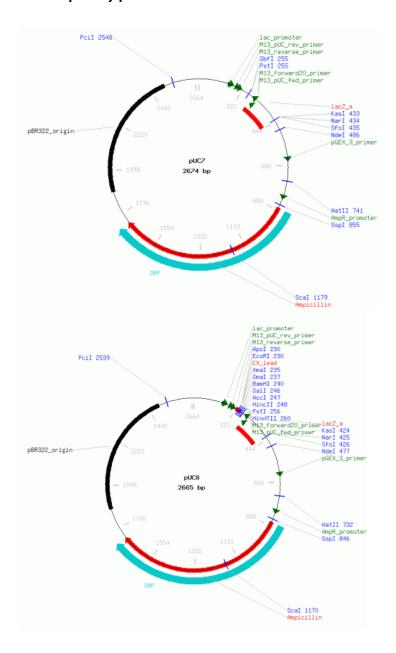


Selección por inactivación por inserción del vector pBR322. Adaptado de Brown *et al* 2002^[1].

Serie de vectores pUC:

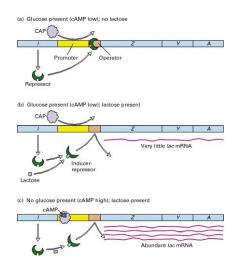
Se consideran vectores de segunda generación por varios motivos:

- En ellos se ha reducido el tamaño por eliminación de secuencias dispensables. Tienen tamaños entre 2,6 y 3,2 Kb por lo que pueden transportar insertos de más de 12 Kb.
- Además contienen un *ori* pMB1 modificado por lo que consigue que en la célula se mantengan cientos de copias del vector.
- Contienen un mayor número de sitios únicos de restricción para las endonucleasas más comunes (incorporación de un *polylinker* sintético y eliminación mediante mutagénesis dirigida de las dianas repetidas en el resto de la secuencia del plásmido).

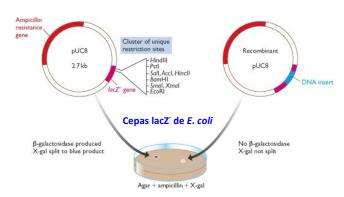


Mapa físico de los plásmidos pUC7 y pUC8. Obtenido de http://www.lablife.org

La principal característica de estos vectores es que llevan la unidad génica del operón Lac del cromosoma de E. coli [promotor P_{Lac} – Operador O_{Lac} - gen lacZ']. Además el polylinker está al comienzo del gen lacZ (la incorporación del polylinker no afecta a la pauta de lectura y los pocos aminoácidos que cambian no alteran sustancialmente la actividad del péptido). Esto permite realizar una selección del ADN recombinante por reacción cromogénica. El gen lacZ codifica para la enzima β-galactosidasa encargada de la hidrólisis del disacárido lactosa. Esta enzima es capaz de hidrolizar también análogos de este azúcar como el 5-bromo-4cloro-3-indolil-β-D-galactósido (X-gal), compuesto incoloro cuya hidrólisis produce una sustancia de color azul. La transcripción del gen LacZ puede estar regulado negativamente (gen lacl cromosómico) por lo que es necesario incorporar inductores positivos del sistema como la lactosa o análogos de la misma, como el isopropil-tio-β-D-galactósido (IPTG). Hay que tener en cuenta que además este sistema está inhibido por glucosa, por lo que para utilizar este tipo de vectores se requieren medios libres del monosacárido. En el caso de los vectores pUC7 y 8 presentan el gen LacZ' o LacZ α que codifica para una subunidad del complejo enzimático β-galactosidasa. Necesitan ser transfectados en ciertas estirpes lacZ de E.coli (que producen el resto del complejo enzimático) para producir colonias azules en presencia de IPTG y X-gal. Por tanto, como se muestra en la figura, la presencia de un inserto en la zona del polylinker impide la correcta síntesis del gen LacZ'.



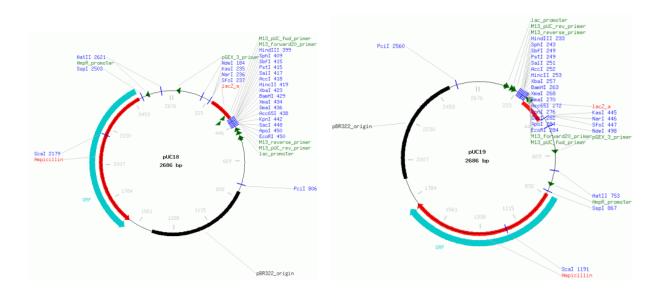
Sistema del operon Lac. Adaptado de Lodish *et al* 1999 ^[2].



Selección de recombinante con pUC8 (aplicable al resto de vectores del sistema pUC). Adaptado de Brown *et al* 2002 ^[1].

※ pUC18 y pUC19

Estos vectores son iguales que los anteriores excepto por la estructura del *polylinker* (llevan muchos más sitios de restricción). Se distinguen entre sí por la orientación de estos sitios de restricción respecto al gen $lacZ\alpha$.



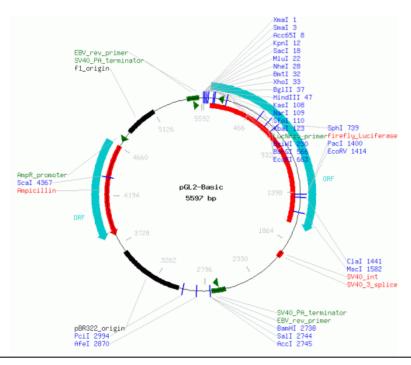
Mapa físico de los plásmidos pUC18 y pUC19. Obtenido de http://www.lablife.org

Otros vectores derivados de plásmidos:

El desarrollo de nuevos vectores plasmídicos sigue hasta hoy en día con el objetivo de seguir mejorando sus propiedades para la clonación y expresión *in vitro* e *in vivo*. La gran mayoría contienen secuencias plasmídicas que van acompañadas del ADN de otras de otras fuentes (fagos, levaduras, virus eucariotas).

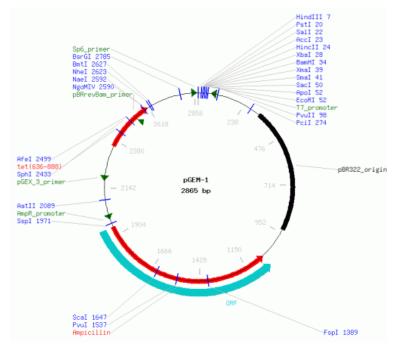
Veamos algunos de estos nuevos vectores plasmídicos.

- Vectores de bajo número de copias: Es el caso del vector pSC101 que permite la existencia de 1 a 5 copias en el interior celular. Este tipo de vectores están indicados cuando el producto del inserto es una sustancia tóxica para el hospedador. Esta circunstancia también se controla con el empleo de derivados del fago λ que incorpora una única copia del inserto en el cromosoma del hospedador (lo veremos más adelante).
- Vectores para la clonación de promotores: Incorporan genes desprovistos de su promotor y cuyo producto es fácilmente valorable o cuantificable (es un gen testigo o reporter), como el gen lacZ, gen luciferasa, green fluorescent protein (GFP), etc. En este caso el inserto es una secuencia promotora que se incorpora upstream (en el extremo 5' de la hebra codificadora) del gen reporter para que regule su expresión. Delante del sitio de clonación (upstream) suelen llevar un sito de terminación de la transcripción fuerte (normalmente procedente de virus) para asegurar que la expresión del reporter solo se debe a la influencia del inserto (y no a otras regiones reguladoras en posiciones más upstream). A este tipo de vectores pertenecen los de la serie pGL entre otros.



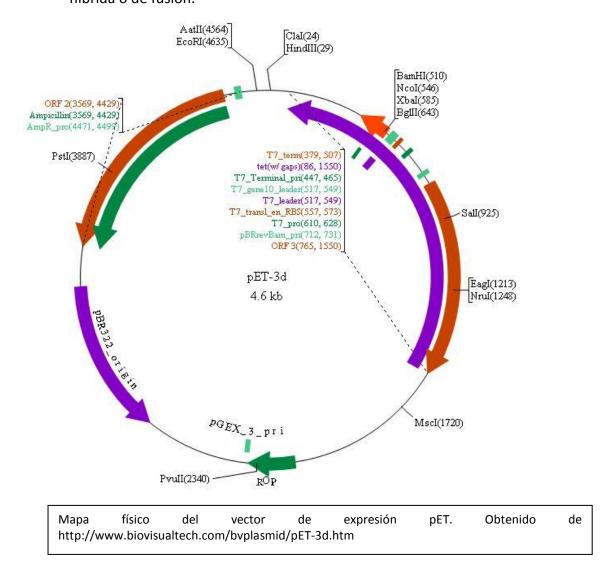
Mapa físico de los plásmidos pGL2-Basic. Obtenido de http://www.lablife.org

Vectores para la transcripción in vitro: Incorporan promotores específicos de alguna ARN polimerasa concreta (por ejemplo los de las polimerasas de los fagos SP6, T3 y T7). Al incubar in vitro el ADN recombinante de estos vectores con las ARN polimerasas adecuadas se pueden obtener grandes cantidades de ARN (por ejemplo para la producción de sondas). Algunos de los plásmidos que pertenecen a este grupo son los de las series pSP y pGEM y pBluescript (algunos miembros de estas familias pueden ser considerados fagémidos al contener también el origen de replicación de un fago filamentosos).



Mapa físico de los plásmidos pGEM-1. Obtenido de http://www.lablife.org

- <u>Vectores para la expresión in vivo:</u> Existen numerosísimos vectores de expresión en bacterias, muchos de los cuales además contienen secuencias funcionales de otros organismos (secuencias víricas normalmente). Se pueden agrupar en función de la naturaleza de las señales de expresión y la posición del sitio de clonación:
- Vectores con señales de transcripción: Incluyen en este orden, promotores fuertes y regulados, un sitio de clonación y en algunos casos, una señal de terminación de la transcripción. Se incluyen aquí los vectores de la serie pUC (promotor Lac) y otros como el pKC30.
- Vectores con señales de expresión de proteína: Existen múltiples variantes de este tipo de vectores. Algunos de estos vectores tienen las señales de transcripción en fase (manteniendo el ORF (open reading frame) con una secuencia codificadora (como el lacZ u otra) acoplada a una secuencia RBS (Ribosome Binding Site) que permita la unión de los ribosomas bacterianos para que comience la traducción (esencial cuando se trata de expresar un inserto eucariota). La incorporación del inserto debe ser manteniendo el ORF de los genes. Dentro de este tipo vectores se encuentran los de las series pUR, pEX y pET. Este tipo de vectores son los que sirven para obtener las llamadas "proteínas de fusión", donde dos secuencias génicas se traducen conjuntamente (a partir de un ARNm híbrido) para dar una única proteína híbrida o de fusión.



Otros vectores de expresión tiene el sitio de clonación inmediatamente después de un ATG iniciador de la traducción. Se utilizan para la producción de proteínas nativas idénticas a las originales. Contienen todas las secuencias necesarias para la transcripción. El inserto debe incorporar una ORF intacta en su comienzo para ser fusionado en fase con el triplete iniciador ATG. Algunos de los más utilizados son el pAS1, pKK240-11 y pTrc99A.

- Vectores BACs (Bacterial Artificial Chromosomes): Son vectores bastante distintos a los vistos, derivan del plásmido F (plásmido de fertilidad) de E. coli. Se trata de grandes vectores (en torno a las 7 Kb) con elevada capacidad para aceptar un inserto de gran tamaño (de 300 Kb o más). Contienen un replicón de bajo número de copia. Al ser tan grandes deben ser introducidos en el hospedador mediante técnicas como la electroporación (se verá más adelante).
- Vectores mixtos: Son vectores plasmídicos que llevan al menos dos orígenes de replicación uno bacteriano y otro vírico. De modo que pueden replicarse en más de un tipo de hospedador. Se incluyen aquí los "fagémidos" que tienen un origen de replicación procedente de un fago filamentoso además del de origen bacteriano. Se verán en detalle más adelante.
- <u>Vectores integrativos:</u> Son vectores que se utilizan con el objetivo de que el inserto se integre en el cromosoma del organismo hospedador. Estos plásmidos contienen las secuencias específicas de integración del ADN del fago λ (sitio attP) y el gen de la integrasa específica que cataliza el proceso de integración. Para que la integración tenga lugar el cromosoma del hospedador debe contener la región integrativa attB (los veremos más adelante).

Otros vectores derivados de plásmidos para otras bacterias:

Los vectores plasmídicos vistos hasta ahora se han perfeccionado para su replicación en cepas de *E. coli*, sin embargo existen otros vectores que derivan del ADN de otros microorganismos de gran importancia ecológica e industrial. Así, existen vectores para *Pseudomonas* (utilizadas en biorremedación), *Bacillus subtilis* (producciones industrial de enzimas), Actinomicetes (productores de antibióticos) y Corineformes (producción de aminoácidos). Algunos de los vectores desarrollados para estas *spp* son específicos, sin embargo, los avances más prometedores se están realizando en la creación de "vectores de amplio espectro", es decir, aquellos que son capaces de funcionar en distintas *spp* bacterianas. Algunos de estos vectores son los de las familias RSF1010, RP4, pHP, etc.

- 2. <u>Vectores derivados del bacteriófago λ</u>
- 3. Vectores derivados del bacteriófago P1
- 4. <u>Vectores derivados de fagos filamentosos</u>
- 5. Vectores derivados de secuencias de levaduras
- 6. Vectores de transferencia a células vegetales
- 7. Vectores de transferencia a células animales
- 1. Brown, T.A., Genomes. 2nd ed. ed. 2002, Oxford: BIOS. xxvii, 572 p.
- 2. Lodish, H.F., *Molecular cell biology*. 4th ed. ed. 1999, New York; Basingstoke: W.H. Freeman. xxxvi, 1084, G-17, I-36 p.
- 3. Perera González, J., Tormo Garrido, A., and García, J.L., *Ingeniería genética. Vol. 1, Preparación, análisis, manipulación y clonaje de DNA*. Ciencias biológicas. Serie Genética; 6. 2002, Madrid: Síntesis. 527 p.
- 4. Luque Cabrera, J. and Herráez Sánchez, Á., *Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética : conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. Re-edicion 2010 ed. 2001, Amsterdam ; Madrid [etc.]: Elsevier. XIX, 469 p.
- 5. **Cohen, S.N.,** *et al.*, *Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. 70(11): p. 3240-4. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC427208/?tool=pubmed
- 6. Glick, B.R., Pasternak, J.J., and Patten, C.L., *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*. 4th ed. ed. 2010, Washington, D.C.: ASM; Oxford: Blackwell [distributor]. xvii, 1000 p.