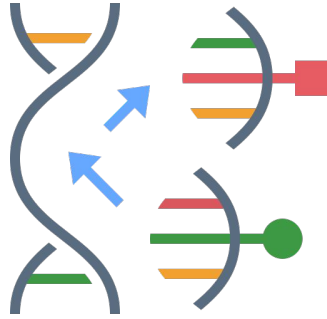
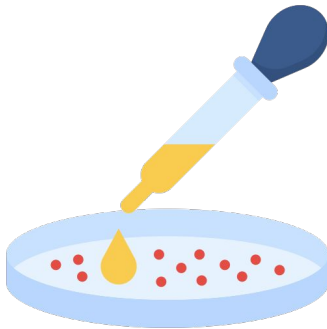


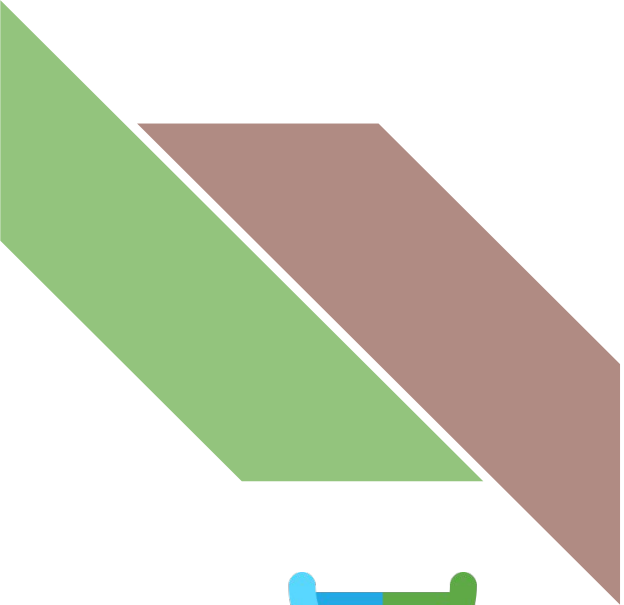


BLOC V

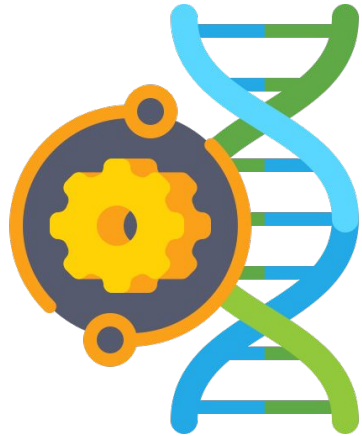
BIOTECNOLOGIA



Biologia II
2n de Batxillerat
2023-24
Jaume Benet i Bertran



Unitat 10. Biotecnologia



1. L'enginyeria genètica
2. Clonació molecular
3. Amplificació de DNA: *PCR*
4. Edició genètica: *CRISPR-Cas*
5. Aplicacions de la biotecnologia
6. Biotecnologia i ètica



1. L'enginyeria genètica

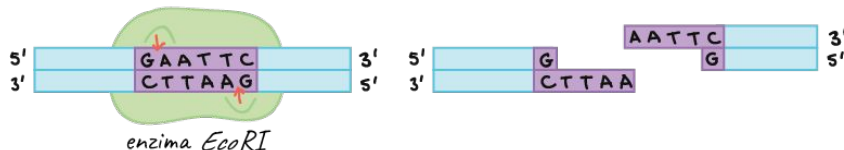
Biotecnologia ➡ Aprofitament dels **sistemes biològics** i les propietats dels **éssers vius** per **obtenir productes i serveis** beneficiosos pels humans (enginyeria genètica, agricultura i ramaderia, producció industrial...)

- **Enginyeria genètica** ➡ És una de les branques de la biotecnologia que consisteix en la **manipulació directa de gens** per **controlar-ne l'expressió**

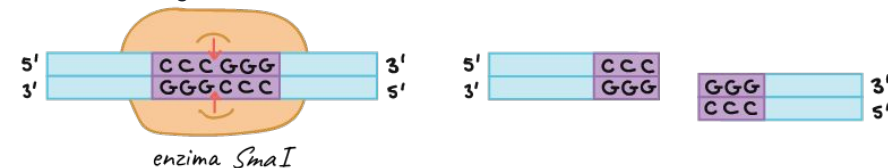
- **Enzims de restricció: endonucleases** que **reconeixen seqüències** concretes de DNA i la **tallen**, trencant un enllaç fosfodièster ➡

Reconeixen seqüències **palindròmiques** (es llegeixen igual en una cadena i en sentit invers en l'altra)

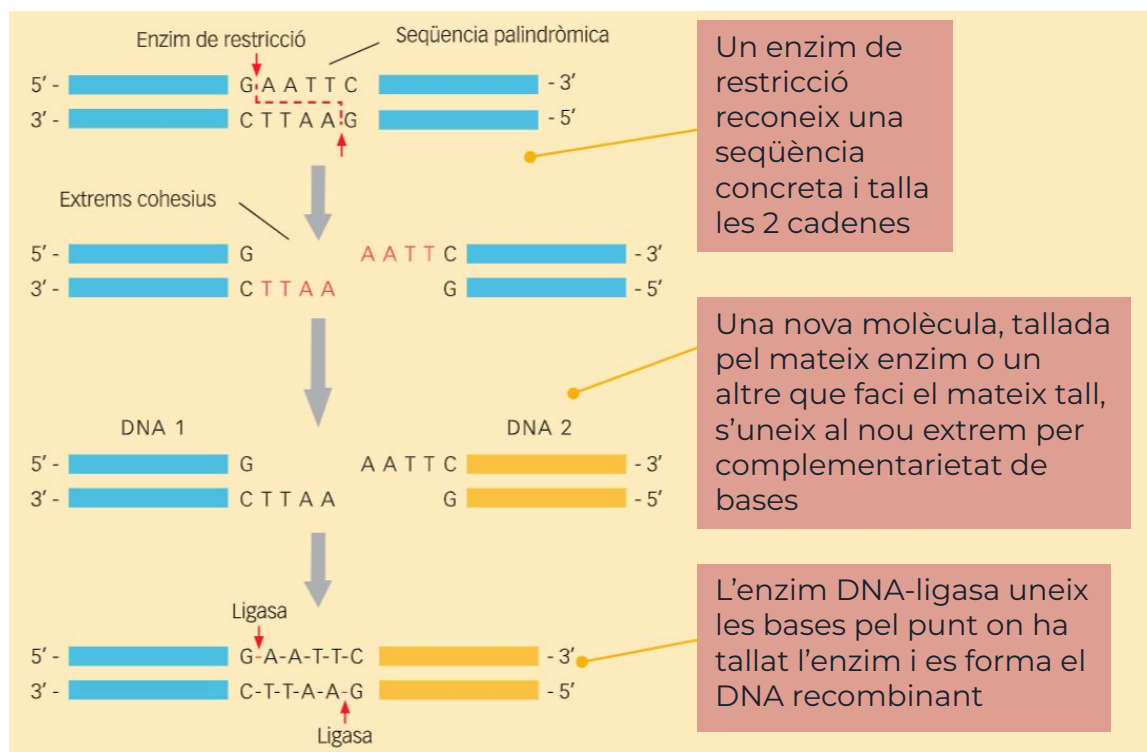
- **DNA recombinant: combinació de DNA** creat artificialment a partir de **dues o més seqüències** que no es trobaven juntes



Enzim que talla formant **extrems cohesius**



Enzim que talla formant **extrems roms**



Microorganisme on s'ha trobat l'enzim: **E. coli**

Soca del microorganisme: **RY13**

Ordre de descobriment en aquesta soca: **1r**

Enzim	Organisme productor	Lloc de restricció
TaqI	<i>Thermus aquaticus</i>	5' T C G A 3' 5' A G C T 5'
Eco RI	<i>Escherichia coli</i>	5' G A A T T C 3' 3' C T T A A G 5'
Eco RV	<i>Escherichia coli</i>	5' G A T A T C 3' 3' C T A T A G 5'

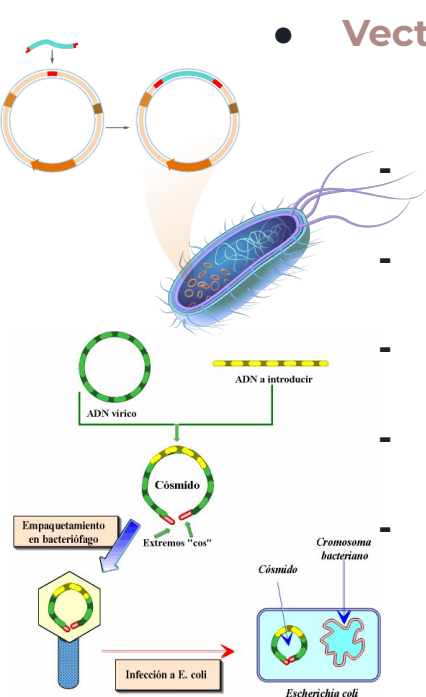


2. Clonació molecular

Consisteix en **crear còpies d'un gen**, utilitzant **microorganismes recombinants** per obtenir molècules idèntiques de DNA o expressar proteïnes en gran quantitat.

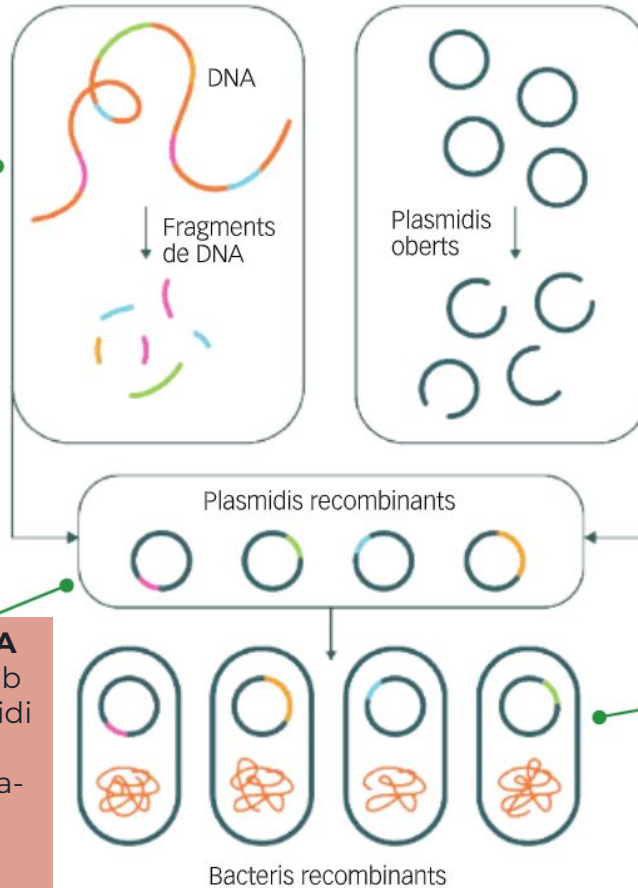
- **Vector de clonació** ➡ Agent biològic utilitzat per **introduir el material genètic** en el microorganisme encarregat de la clonació. Poden ser:

- **Plasmidis**: molècula petita de DNA circular (transmet fins a 10 kpb)
- **Bacteriòfags**: virus que injecta DNA a la cèl·lula (fins a 15 kpb)
- **Cosmidis**: plasmidi que conté gens de bacteriòfag (fins a 45 kpb)
- **BAC (Cromosma artificial bacterià)**: plasmidi F modificat (fins a 500 kpb)
- **YAC (Cromosma artificial de llevat)**: cromosoma eucariota artificial (fins a 1000 kpb)



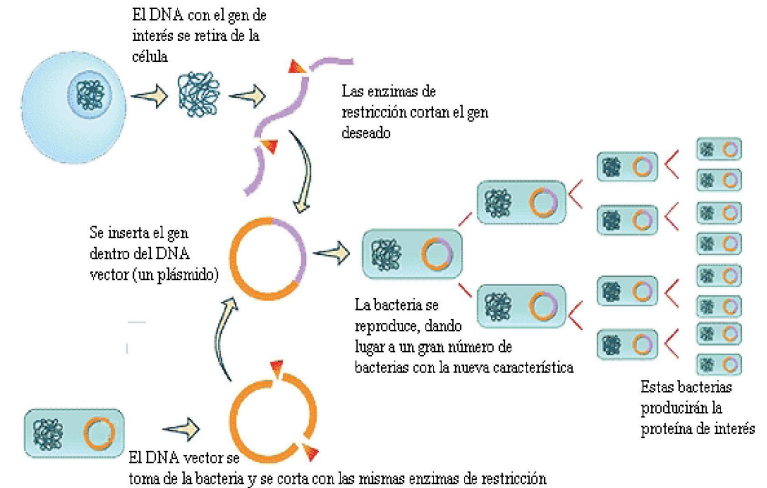


Ús d'un **enzim de restricció** concret per aïllar el gen que es vol clonar

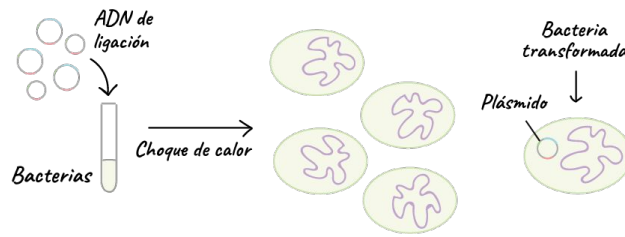


Formació del **DNA recombinant** amb la unió del plasmidi i el gen d'interès per complementarietat de bases i DNA-ligasa

Ús del mateix enzim de restricció en el **vector de clonació**

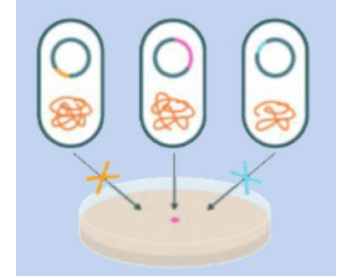


Introducció del DNA recombinant en un microorganisme, creant **microorganismes recombinants**

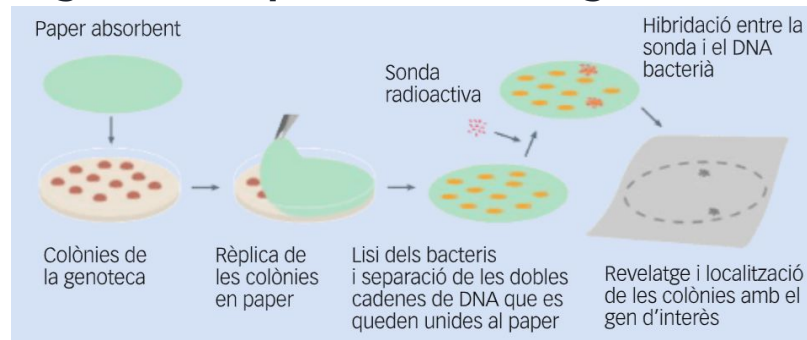


- **No tots els microorganismes hauran incorporat el DNA recombinant**, per això és molt important la **selecció dels gens clonats**, que pot ser:

- **Mètode directe**: es cultiven els bacteris recombinants en un **medi on només puguin créixer aquells que contenen el gen** (no sempre és possible)



- **Mètode indirecte**: s'utilitza una **sonda** (fragment de **DNA monocatenari complementari al gen d'interès i marcat radioactivament**) que és **detectada en els microorganismes que contenen el gen**



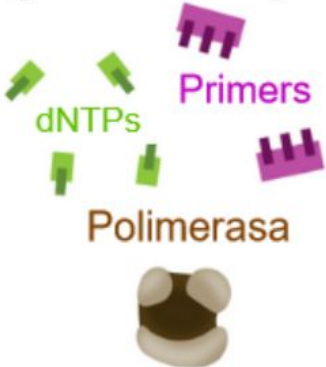


3. Amplificació de DNA: PCR

- **Reacció en cadena de la polimerasa o Polymerase Chain Reaction (PCR)** ➡
Procediment **ràpid i senzill** per crear **grans quantitats de còpies de DNA in vitro**
- Per realitzar una PCR és necessari:



- **Mostra de DNA:** on es troba el **gen o genoma a amplificar**
- **DNA-polimerasa:** ha de ser **resistent a la calor** per treballar a la màxima velocitat possible, es sol utilitzar Taq (*Thermus aquaticus*) que treballa a 74 °C
- **dNTPs:** (desoxi) **nucleòtids** trifosfats **lliures** que formaran les noves cadenes
- **Primers** o **cebadors:** **complementaris a les seqüències extremes** d'una cadena i altra del DNA a amplificar

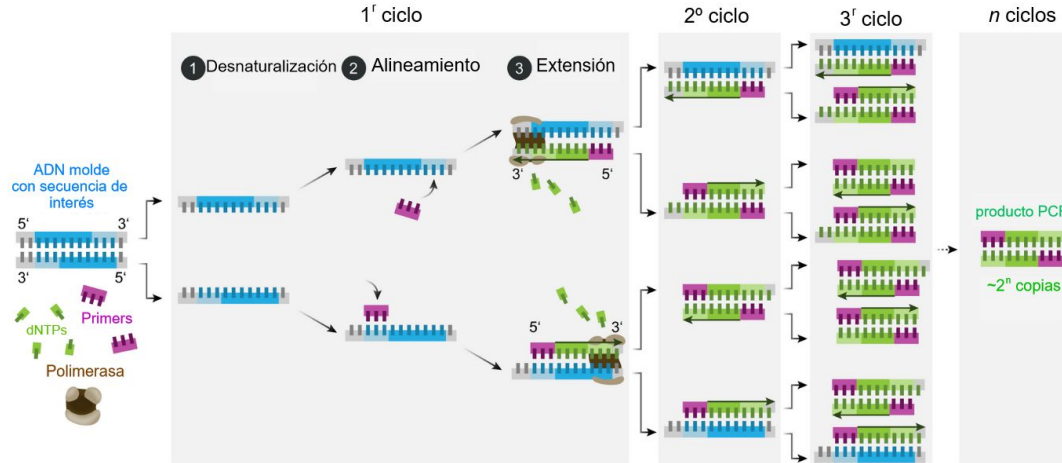


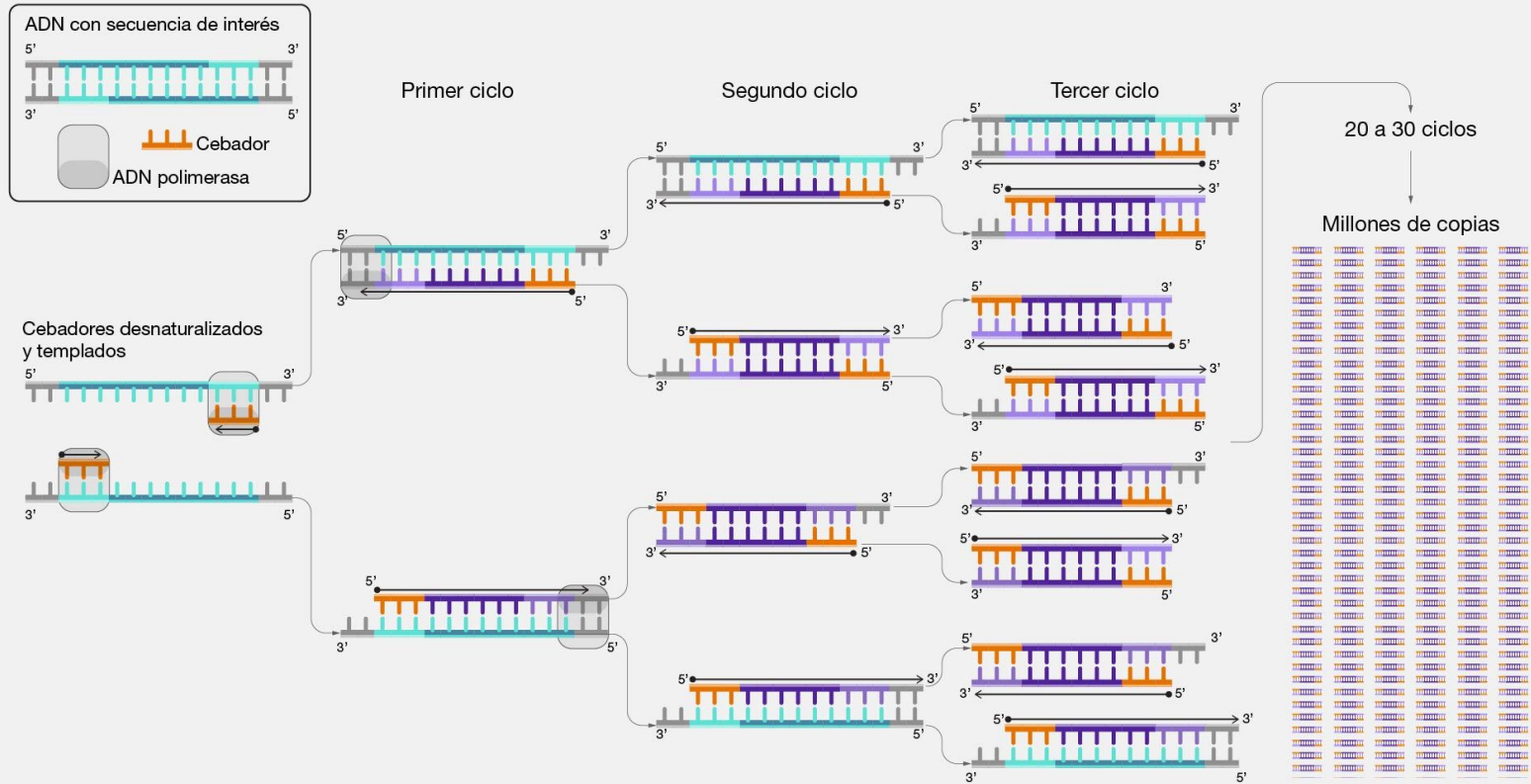
Termociclador
o màquina de
PCR





- Consisteix en la **repetició de cicles** on es **varia la temperatura** per induir 3 etapes:
 - **Desnaturalització** ➡ S'escalfa a 95 °C per **separar la doble cadena de DNA** de la mostra
 - **Alineament** ➡ Es refreda fins a 55 °C perquè els **primers s'uneixin als extrems 3' de les cadenes senzilles**
 - **Extensió** ➡ S'escalfa a 74 °C perquè la **polimerasa sintetitzi les cadenes complementàries** en direcció 5' → 3'



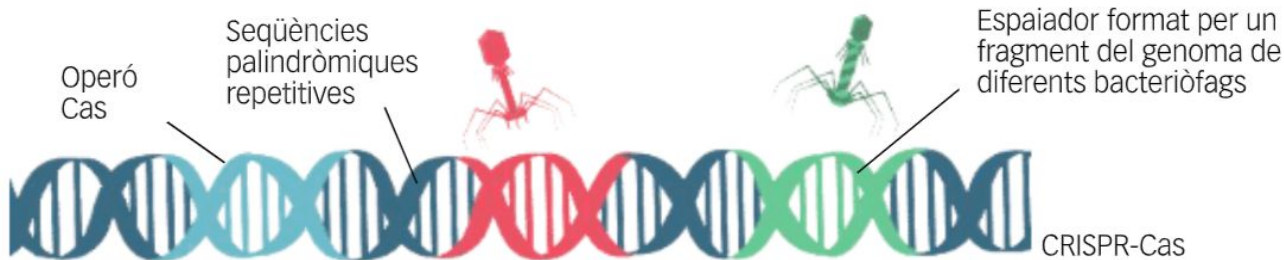




4. Edició genètica: *CRISPR-Cas*

L'**edició genètica** consisteix en la **inactivació** o **modificació de gens**.

- El 2005 el grup d'investigació del microbiòleg **Francesc Joan Martínez Mojica** va descobrir un **sistema d'immunitat adaptativa i adquirida en procariotes** al que va anomenar ***CRISPR-Cas*** ("*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*", Agrupació de Repeticions Palindròmiques Curtes Regularment Interespaiades, i proteïna Cas9)
- CRISPR-Cas*** ➡ Regió del **DNA procariota** on hi ha l'operó per l'**endonucleasa Cas9** proper a una regió formada per **seqüències curtes palindròmiques** espaiades per fragments de DNA víric

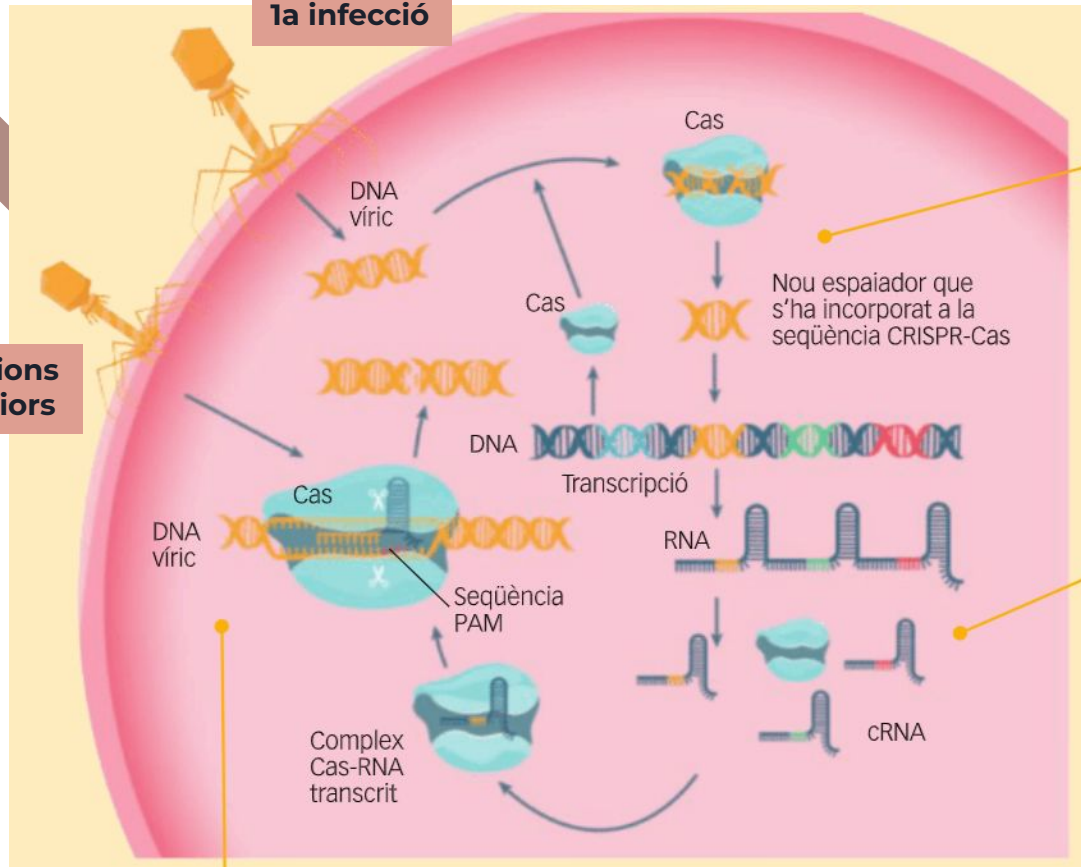


Si el procariota té un fragment de determinat virus, ja no pot ser infectat per aquest



1a infecció

Infeccions posteriors



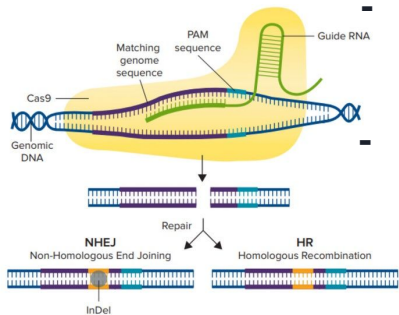
Endonucleases **Cas** del procariota **tallen** un fragment de DNA víric i **s'incorpora** com a espaïador entre les repeticions palindròmiques de **CRISPR**

Quan hi torna a haver infecció, es sintetitzen varies **còpies de RNAm de CRISPR** i **Cas talla per les repeticions palindròmiques**

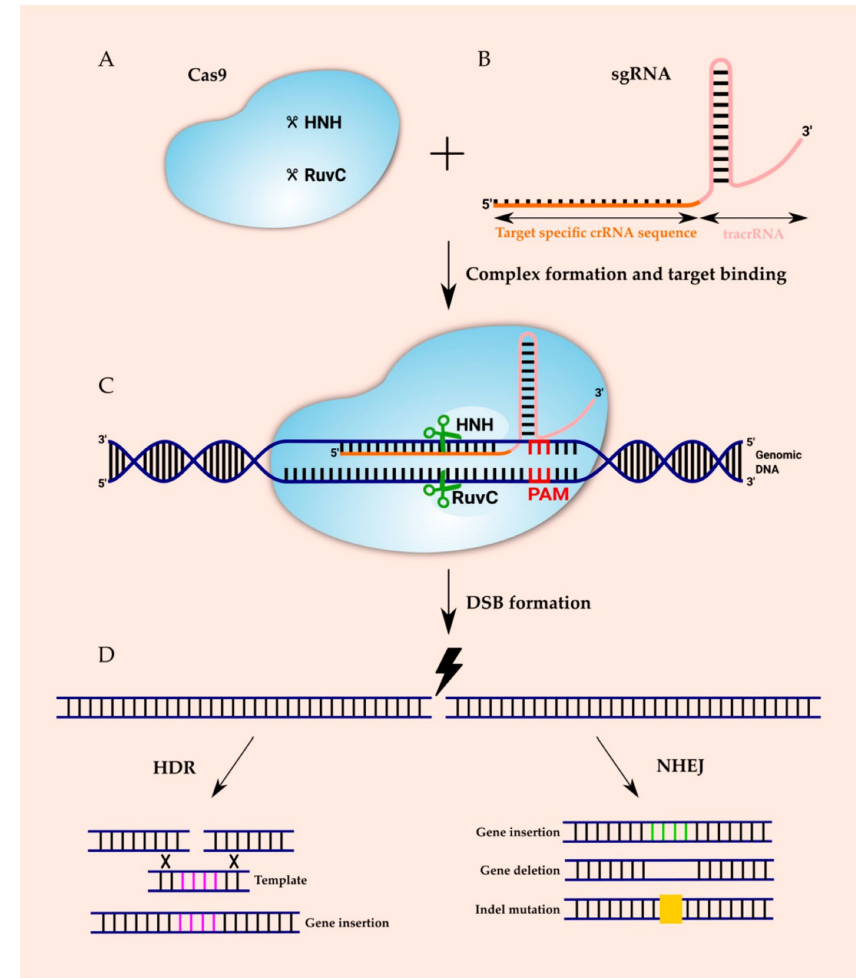
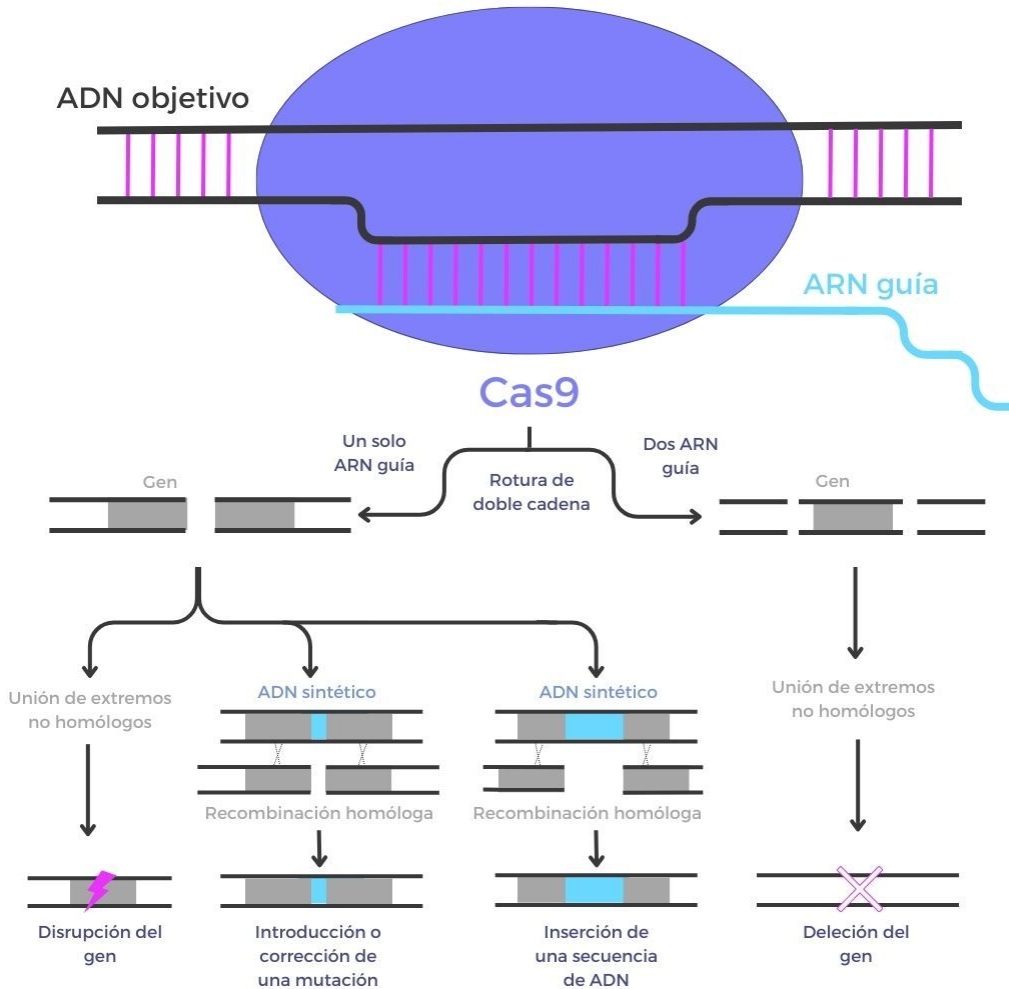
El fragment de **RNAm amb l'espaïador** del DNA víric en qüestió passa a ser el **RNAg (RNA guia)** que **s'uneix a Cas** i **reconeix la seqüència PAM del genoma víric** per hibridar-s'hi i que **Cas talli el DNA**



- El 2012 un grup liderat per les bioquímiques **Emmanuelle Marie Charpentier** i **Jennifer Doudna** va demostrar l'ús del sistema *CRISPR-Cas* com una **eina d'edició genètica** molt potent (Premi Nobel de Química 2020)
- Construint un **RNAg** amb un fragment del gen que es vol editar es pot dirigir el **complex Cas-RNAg** per tallar una regió molt específica del genoma
- Gràcies als **mecanismes de reparació del DNA** es poden **editar els gens** en la zona tallada per Cas de dues maneres:



- **Reparació d'extrems no homòlegs:** s'afegeixen nucleòtids per unir el segment trencat amb **molta possibilitat de mutació** ➡ **inactivació del gen**
- **Reparació per recombinació homòloga:** s'afegeix un **fragment de DNA** amb **extrems homòlegs a les regions adjacents al tall** però amb algun **canvi a la zona central**, es donarà la **recombinació** entre els extrems del fragment i les regions adjacents al tall **per incorporar al genoma el fragment amb el canvi** ➡ **modificació del gen**



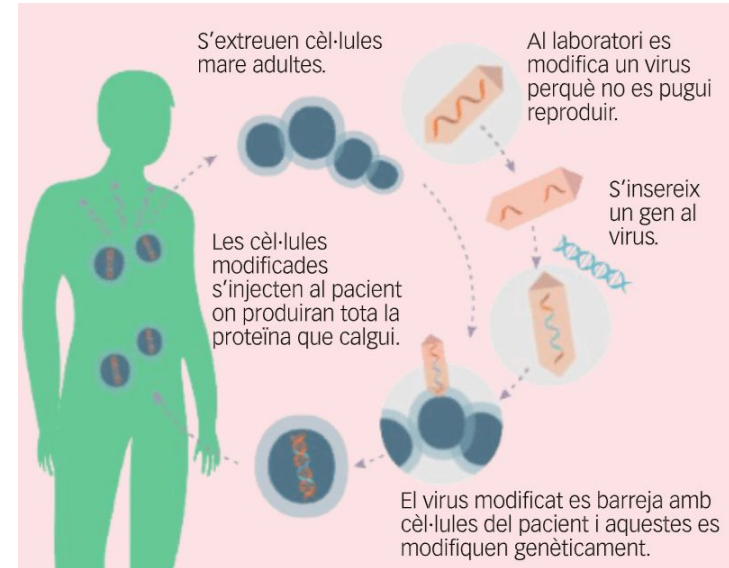


5. Aplicacions de la biotecnologia

5.1. Salut

Teràpia gènica

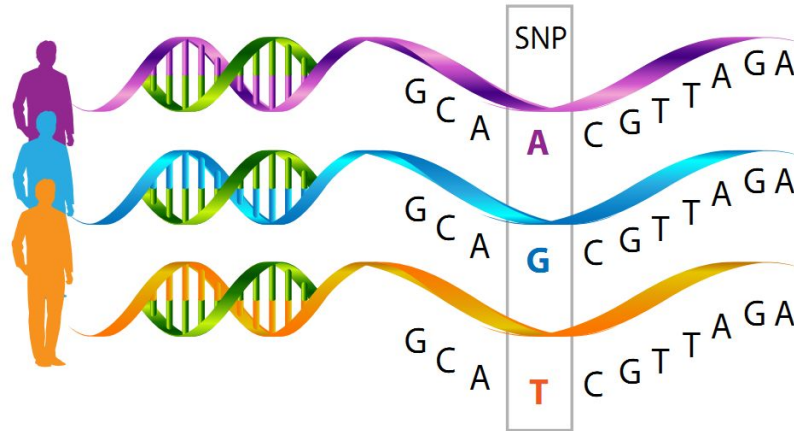
- **Introducció** al pacient de **cèl·lules mare adultes modificades *in vitro*** perquè expressin correctament el gen malmès que provoca certa malaltia
- S'utilitzen les tècniques esmentades per **editar el gen**, amb un **vector de clonació s'incorpora a les cèl·lules** extretes i s'introdueixen al pacient les **cèl·lules recombinants** perquè es **reprodueixin i expressin la proteïna** correcta





Seqüenciació genètica

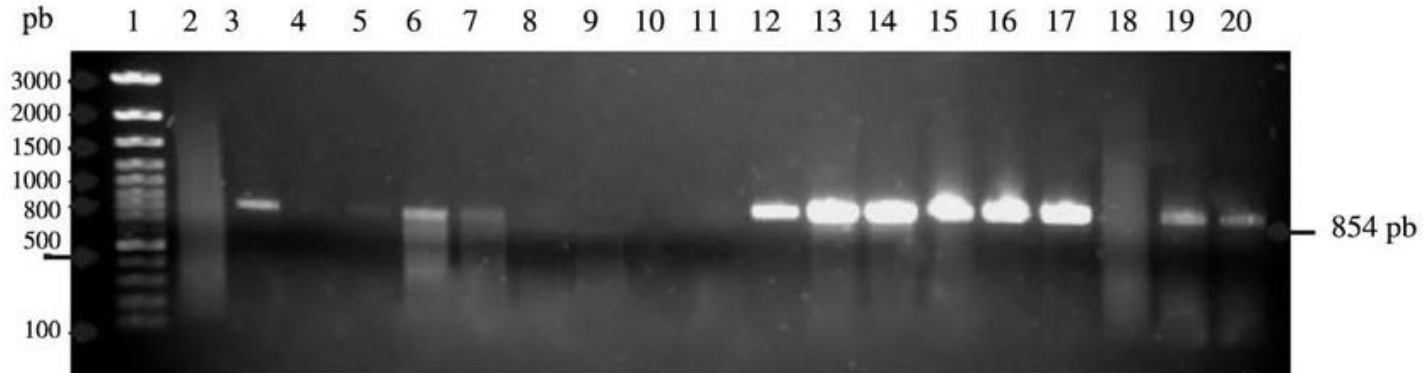
- Es determina la seqüència del genoma per **establir relacions** entre **mutacions puntuals** i **malalties** o predisposició a patir-les
- Els **SNP** (*Single Nucleotide Polymorphism*) són **seqüències comunes** en una espècie però que presenten **varis al·lels on només canvia un nucleòtid**, es pot relacionar un nucleòtid concret amb l'estat de salut





PCR

- L'amplificació de gens permet **detectar** més fàcilment si una persona presenta **gens associats a alguna malaltia**
- També pot servir per **localitzar gens** que presenten alguns **agents infecciosos** com els virus

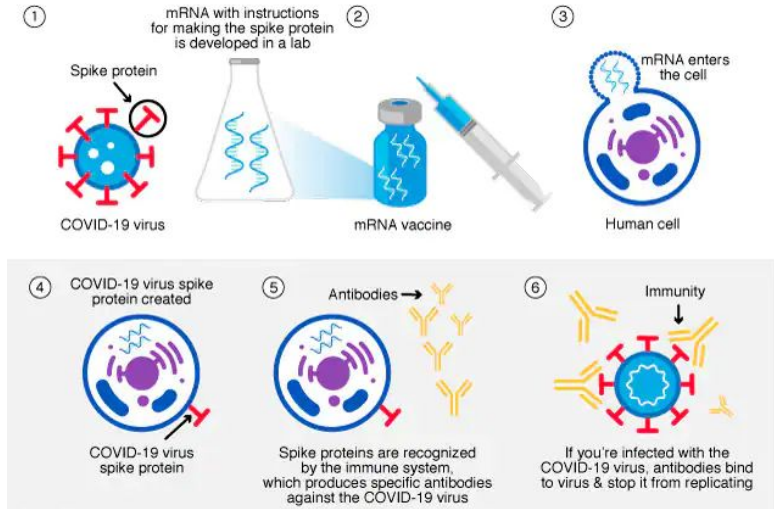
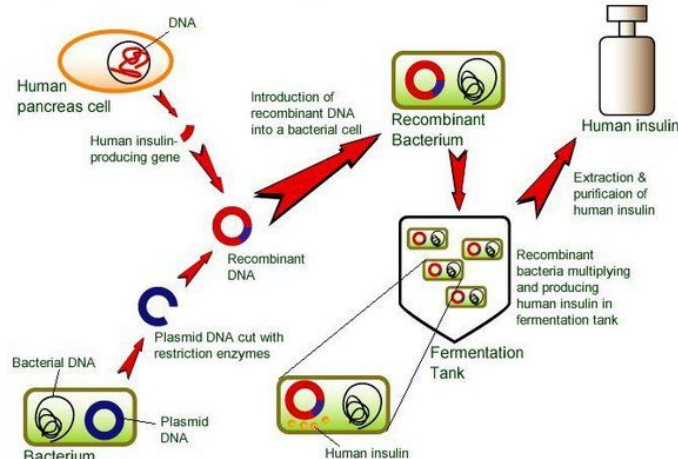




Producció de fàrmacs

- Creació de **microorganismes recombinants** que **sintetitzen proteïnes humanes** (insulina, hormona de creixement, factor VIII antihemofílic...)
- Creació de **vacunes de RNA** on **s'edita un gen del patògen** per **incorporar-lo al pacient** i que les seves **cèl·lules sintetitzin només la proteïna** en qüestió, desencadenant una **reacció immune**

Human Insulin Production





Recerca biomèdica

- Es creen **organismes recombinants** (**microorganismes** o **animals**) als quals se'ls fa expressar gens humans per utilitzar-los com a **models per a l'estudi** del funcionament de **malalties**
- Treballar amb animals modificats genèticament pot suposar un **dilema ètic**, ja que es treballa amb éssers que senten dolor

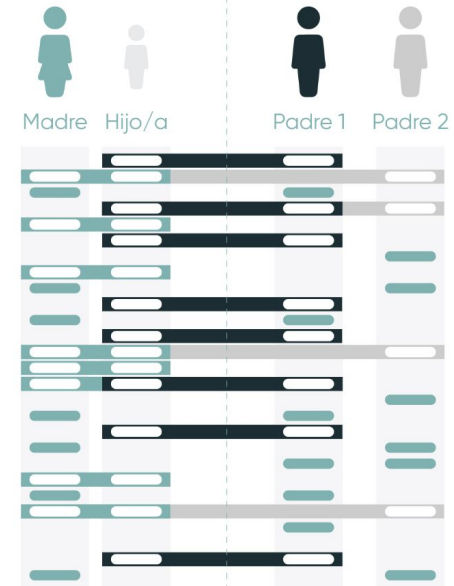
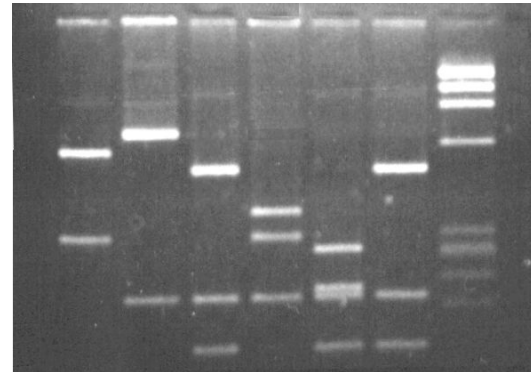
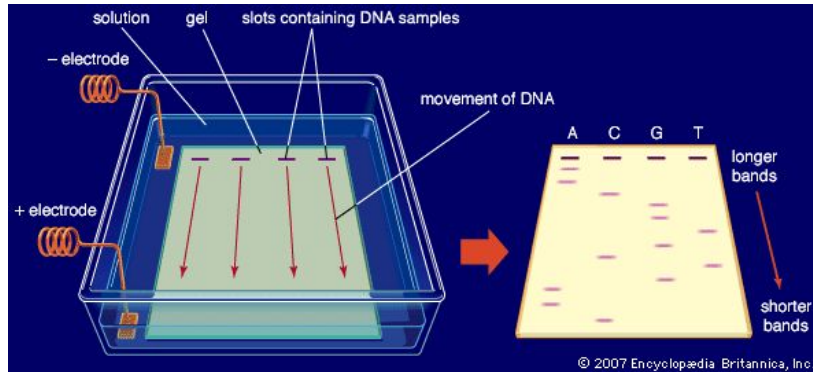




5.2. Altres àmbits

Reconeixement d'individus

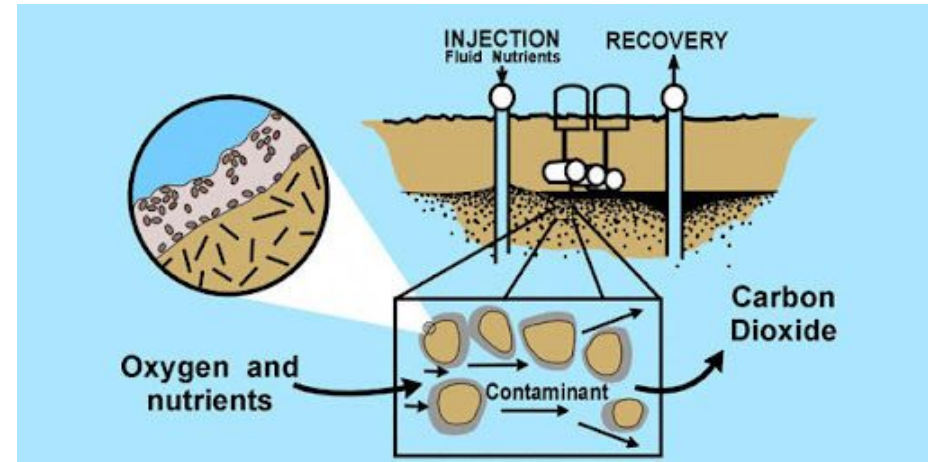
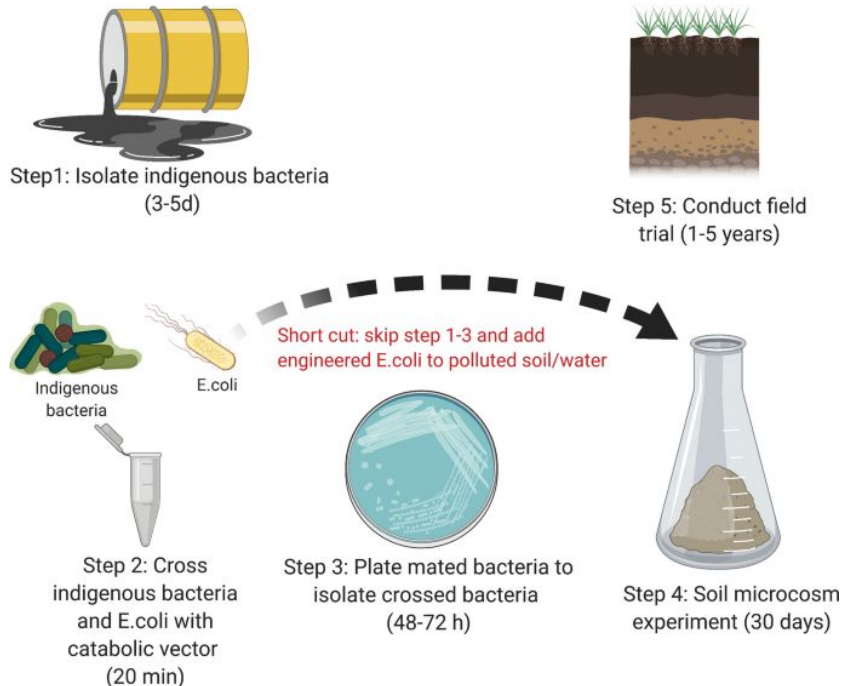
- A partir de **mostres biològiques** podem **amplificar el seu DNA** per **comparar la similitud** amb altres mostres
- Aquesta tècnica s'utilitza **reconèixer restes humanes**, **estudiar restes històriques** o l'**origen genètic** dels individus (anàlisi **SNPs**), fer **proves de consanguinitat**





Medi ambient

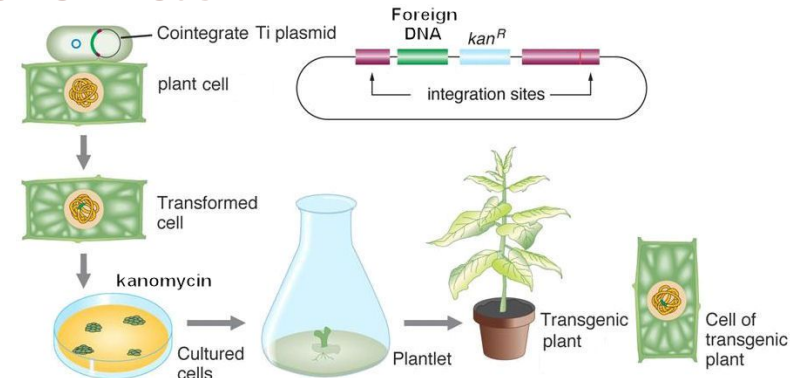
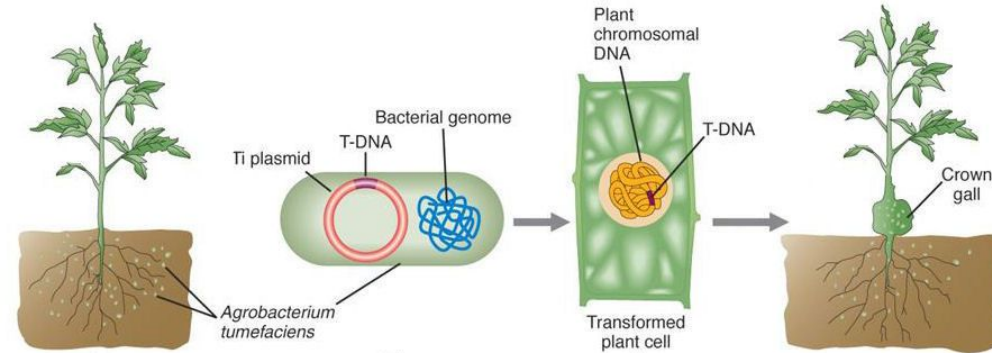
- Ús de **microorganismes recombinants** per realitzar processos de **bioremediació**, s'incorporen gens per **degradar contaminants**





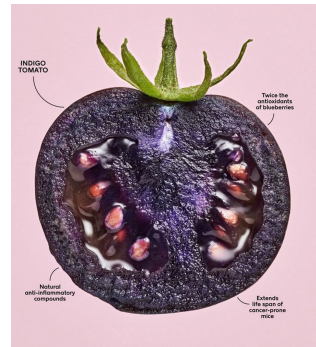
Agricultura i ramaderia

- **Organismes transgènics** ➡ Organisme al qual se li ha **incorporat** al genoma un o diversos **gens d'una espècie diferent**
- **Organismes modificats genèticament (OMG/GMO)** ➡ Organisme al qual se li ha **modificat el genoma** utilitzant la biotecnologia
- En agricultura s'utilitzen **plantes transgèniques** i **GMO** a les quals se'ls modifica el genoma mitjançant la **infecció pel bacteri *Agrobacterium tumefaciens***, que conté el **plasmidi Ti** al qual se li **incorpora el gen** que ha d'expressar la planta, o amb l'ús de **CRISPR-Cas**





- A les plantes transgèniques se'ls afegeixen gens que els confereixen **resistència a la sequera** i condicions adverses, **resistència a paràsits** i plagues, **tolerància a herbicides** o **millor qualitat** nutricional i organolèptica
- En ramaderia s'utilitza sobretot en l'**elaboració de pinso** a partir de **microorganismes recombinants** o el **diagnòstic de malalties** i l'**elaboració de fàrmacs** i vacunes pels animals
- També s'utilitzen **animals transgènics** o **GMO**, però per qüestions de benestar animal el seu **ús és bastant limitat**





Producció industrial

- S'utilitzen **microorganismes recombinants** per **sintetitzar productes** com **aliments, substàncies químiques, materials, combustibles, cosmètics...**
- **S'introdueix el gen** d'interès en alguna **espècie de fàcil i ràpid creixement** que es cultiva en **tancs de fermentació** per produir grans quantitats





6. Biotecnologia i ètica

6.1. Els perills dels *GMO*

- L'ús de GMO planteja **qüestions ètiques** a diferents nivells:
 - *GMO* poden **alliberar-se a la natura** i formar híbrids que **alterin els ecosistemes**
 - **Competició deslleial** de les grans empreses biotecnològiques contra els **petits agricultors**
 - Possibles **efectes adversos** sobre la **salut**
 - Compliment de **benestar animal** i **estalviar patiment innecessari**





6.2. L'edició genètica en humans

- La modificació genètica en humans està **molt restringida** i s'utilitza només en **algunes teràpies gèniques** o **modificacions d'embrions** en casos molt concrets per diverses raons:
 - L'intent de modificació d'un gen pot comportar **alteracions en altres parts del genoma**, apareixent **malalties** i **patologies**
 - La creació de **persones a la carta** i plantejar-se conceptes com els d'una **raça superior** comporta **qüestions ètiques**
 - Són **processos costosos** que només la **gent més rica** es podria permetre, creant més **desigualtat social** entre rics i pobres
 - Treballar amb **embrions** i **cèl·lules germinals** comporta **conseqüències per a les següents generacions**, que poden ser negatives ja que són tècniques encara molt noves

