

Tecnología Gateway

Invitrogen, 1990s.

Esta tecnología se basa en recombinasas modificadas del bacteriófago lambda. El sistema de clonación Gateway usa la utilidad para lograr una **recombinación** altamente eficiente en sitios específicos.



El sistema emplea dos mezclas de enzimas diferentes, cada una con una reacción de recombinación distinta.

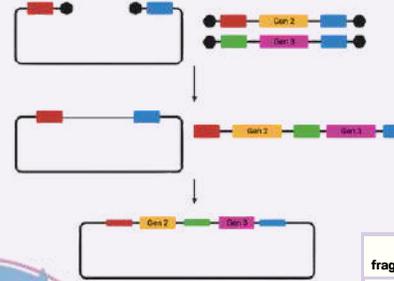


La mezcla BP clonasa recombina los sitios att B y att P, generando attL y attR. La mezcla LR clonasa cataliza la reacción inversa.

La recombinación ocurre entre regiones homólogas en los sitios, pero se requieren secuencias circundantes que contengan los sitios de unión para las proteínas de recombinación.

Tamaño del fragmento que acepta	25 pb a 10 kpb
Velocidad de reacción	Reacciones de clonación en 1 hora a temperatura ambiente
Eficacia	> 95 %
Versatilidad	Transporte sencillo de DNA/insertos

Se utiliza para el ensamblaje de **múltiples fragmentos de DNA** en un orden lineal definido en un vector receptor.



Sitios de la enzima BsaI
(Escinden el DNA fuera de la secuencia de reconocimiento).

Tamaño del fragmento que acepta	0.3 a 1.8 kpb por fragmento
Velocidad de reacción	30 minutos
Eficacia	> 98 %
Escalabilidad	Extremos únicos de 4 bases para ensamblar múltiples fragmentos

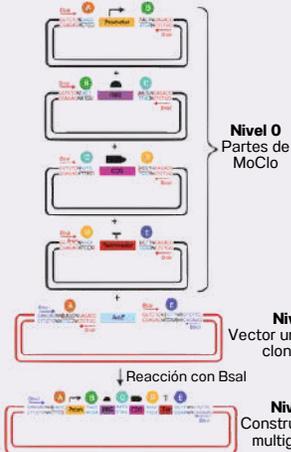
Clonación Golden Gate

Carola Englear, *et al.*, 2008.

Utiliza enzimas de restricción **tipo IIS** que reconocen regiones palindrómicas y cortan en el sitio de reconocimiento, esto permite digerir el DNA y el vector. Es importante asegurarse de que no haya más sitios de reconocimiento para facilitar la incorporación del fragmento en el vector en la región deseada.

Clonación modular

Ernst Weber, *et al.*, 2011.



Utiliza enzimas de restricción **tipo IIS**. Después de diseñar el módulo del gen, se procede al tratamiento con la enzima. Al utilizarla correctamente, se corta el sitio de reconocimiento, eliminando dicho sitio en el producto final.

MoClo es un sistema de **construcción de bloques** para el ensamblaje de DNA, generando un gen funcional.

Tamaño del fragmento que acepta	9 a 23 kb por fragmento
Nivel 0	94 % de fidelidad
Nivel 1	93 % de fidelidad
Nivel 2	95 % de fidelidad

Técnicas de clonación molecular

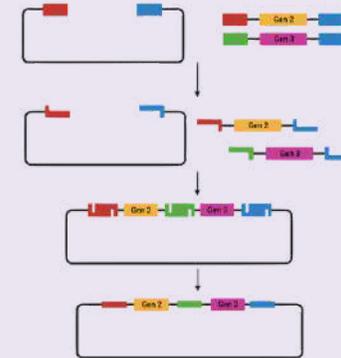
Conjunto de procedimientos con la finalidad de obtener quimeras de DNA de doble cadena, con la capacidad de multiplicarse dentro de organismos vivos.

Tres enzimas (exonucleasa T5, DNA polimerasa Phusion y DNA ligasa Taq) procesan diferentes partes de los extremos del DNA.

Tamaño del fragmento que acepta	500 pb a 32 kb
Velocidad de reacción	15 minutos a 1 hora
Eficacia	Hasta del 95 %
Capacidad de ensamblaje	De 1 a 15 fragmentos

La exonucleasa T5 crea extremos complementarios entre las inserciones. Estos extremos se hibridan e insertan nucleótidos faltantes en el DNA bicatenario. Finalmente, la ligasa cierra la cadena y fusiona los fragmentos de DNA.

Esta técnica no requiere sitios de restricción y se basa en **regiones homólogas** en los extremos del DNA.



Clonación Gibson

Daniel Gibson, *et al.*, 2009.



Facultad de Química

PROYECTO PAPIPE PE202023

"Introducción a la enseñanza de la biología sintética a nivel teórico y experimental en asignaturas impartidas en la Facultad de Química".

Elaborado por:
M. en C. Andrés Burgos Palacios
Q.F.B. Donaji Azucena García Ortiz