

*Mutagénesis de
fragmentos aislados de
DNA*

Un poquitín de Historia...

- En el año 1927 Hermann J. Muller demostró los efectos mutagénicos de los rayos X en *Drosophila*.
- Años más tarde (1946) demostraban que el gas mostaza tenía un gran poder mutagénico, dando así paso a las sustancias químicas como otro grupo de agentes inductores de mutación, además de las radiaciones.
- Por años la mutagénesis experimental fue un proceso de azar donde se controlaba la eficacia de la técnica utilizada (tipo de radiación, dosis, sustancia química, concentración, etc.), pero escapaba a su control la posibilidad de dirigir la mutación.
- En la década del 60 se comienzan con las primeras síntesis química de oligonucleótidos y a partir de la década del 70 comienza la era del DNA recombinante, se generan varias herramientas para biología molecular y se desarrolla la primera técnica de secuenciación

A final de la década del 70, Michael Smith y colaboradores introdujeron la técnica de mutagénesis dirigida basada en la utilización de oligonucleótidos sintéticos

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Vol. 253, No. 18, Issue of September 25, pp. 6551-6560, 1978
Printed in U.S.A.

Mutagenesis at a Specific Position in a DNA Sequence*

(Received for publication, February 22, 1978)

Clyde A. Hutchison, III,[‡] Sandra Phillips, and Marshall H. Edgell[§]

From the Department of Bacteriology and Immunology and Curriculum in Genetics, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina 27514

Shirley Gillam, Patricia Jahnke, and Michael Smith[¶]

From the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada V6T 1W5

Michael Smith



Michael Smith

Born	26 April 1932 Blackpool, England
Died	4 October 2000 (aged 68) Vancouver, British Columbia, Canada
Nationality	Canada
Fields	Chemistry
Institutions	University of British Columbia
Alma mater	University of Manchester
Known for	mutagenesis
Notable awards	Nobel Prize in Chemistry (1993)

➤ Premio novel de química en 1993 compartido con Kary Mullis

"por su contribución fundamental al establecimiento de la mutagénesis dirigida mediante oligonucleótidos y su desarrollo para estudios de proteínas"

*Mutagénesis de
Fragmentos
aislados de DNA*

ó

*Mutagénesis
Genómica*

Mutagénesis al azar

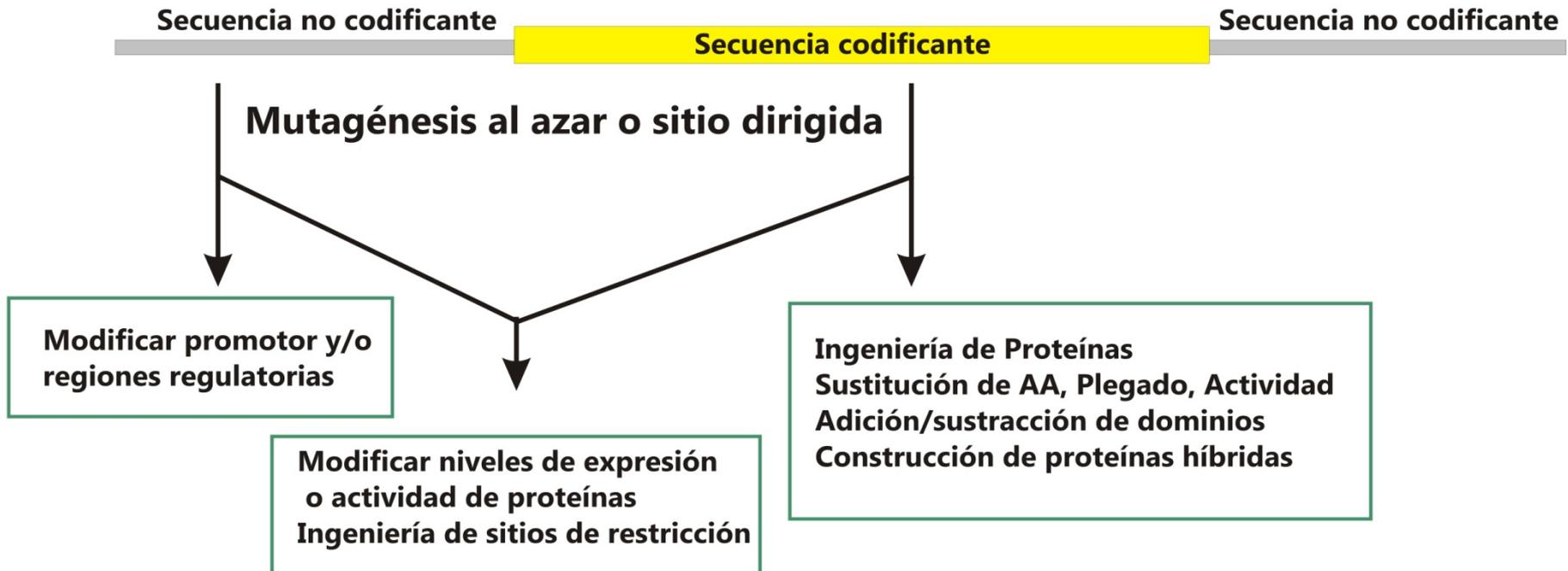
Sabemos lo que queremos obtener pero no sabemos lo que tenemos que modificar (Naturales, Sustancias Químicas, Radiaciones PCR al azar, Transposones, DNA *shuffling*)

Mutagénesis sitio dirigida

Sabemos lo que queremos obtener y lo que tenemos que modificar para lograrlo
Sabemos lo que queremos modificar para estudiar el efecto que esa modificación produce

En que casos se hace mutagénesis dirigida y en que casos al azar??

Mutagénesis de fragmentos - Aplicaciones



Mutagénesis sitio dirigida

Sabemos lo que queremos obtener y lo que tenemos que modificar para lograrlo
Sabemos lo que queremos modificar para estudiar el efecto que esa modificación produce

Técnicas basadas en PCR

Puntuales

Inserciones

Deleciones

Fusiones

(ligación por PCR)

Técnicas basadas en PCR

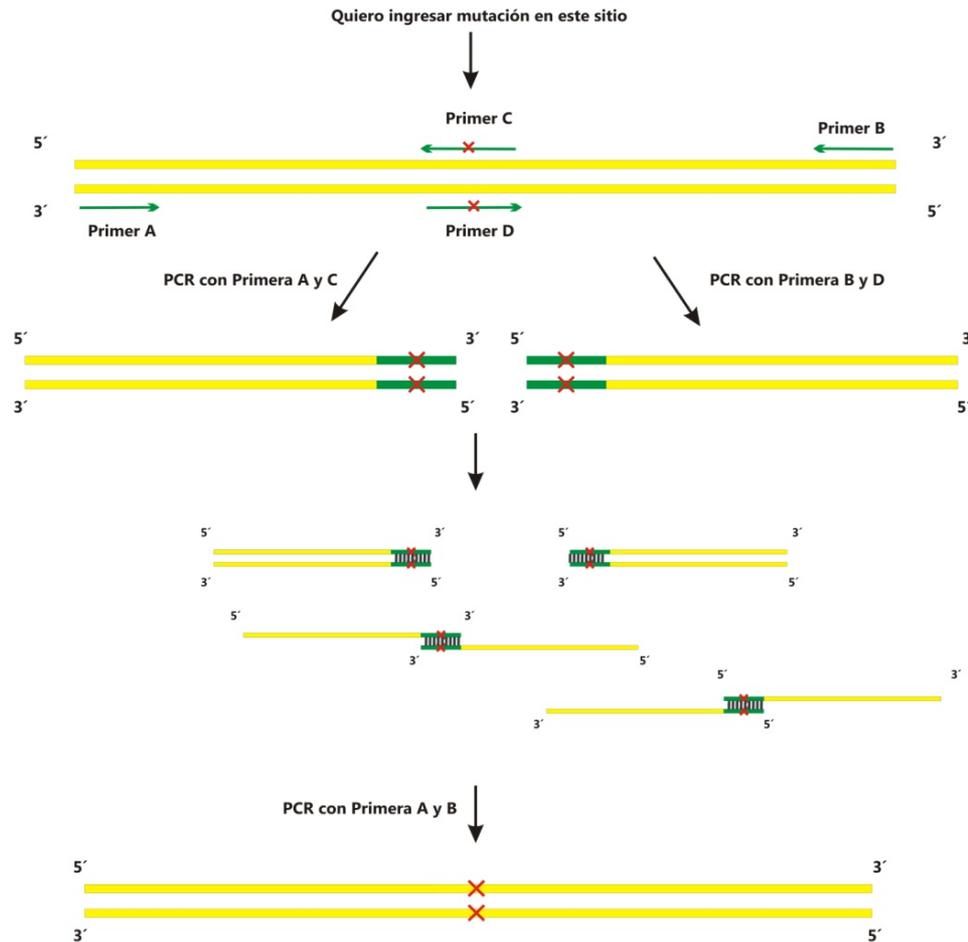
- ★ PCR solapada
- ★ PCR inversa
- ★ PCR inversa + DpnI
- ★ Megaprimer



Técnicas basadas en PCR

PCR solapada

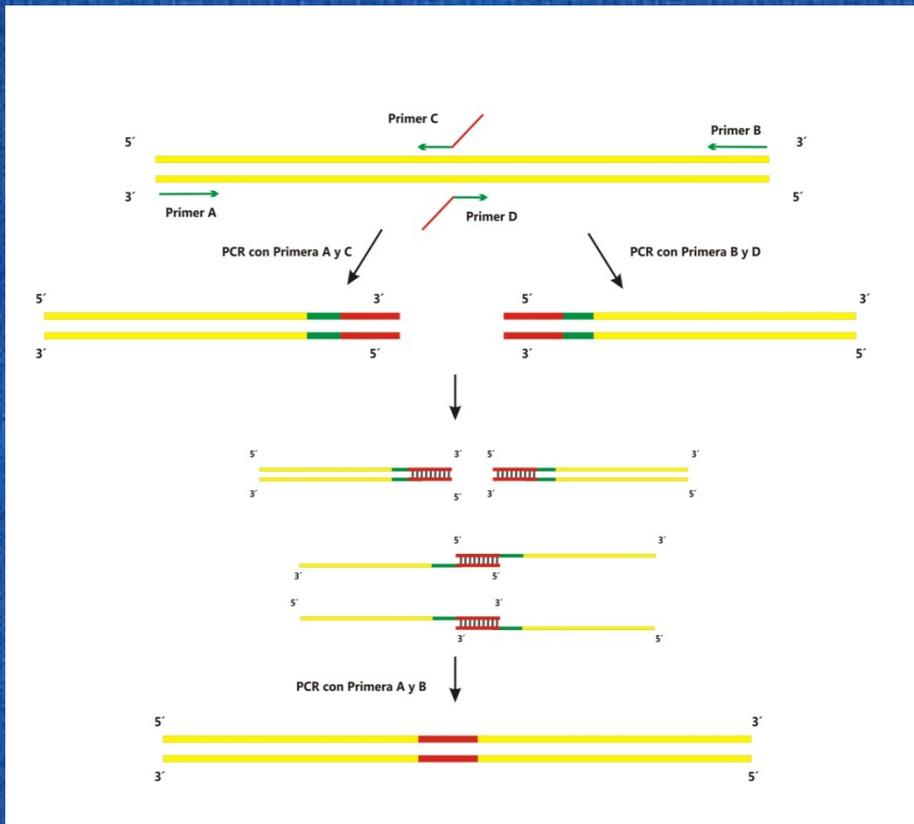
Mutación puntual



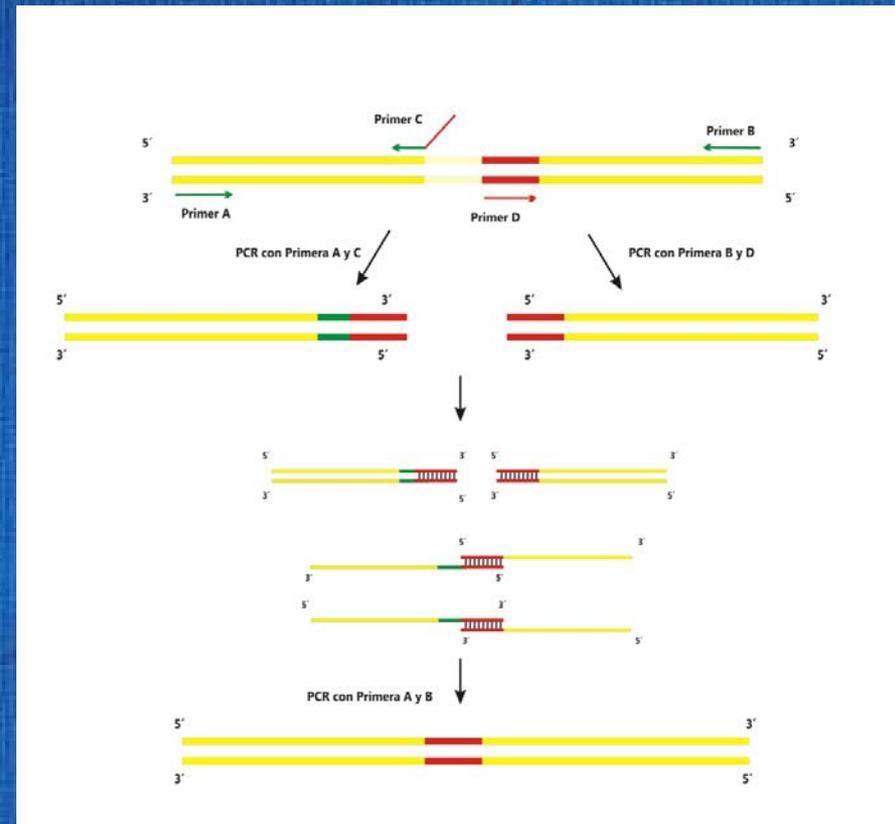
Técnicas basadas en PCR

PCR solapada

Inserciones



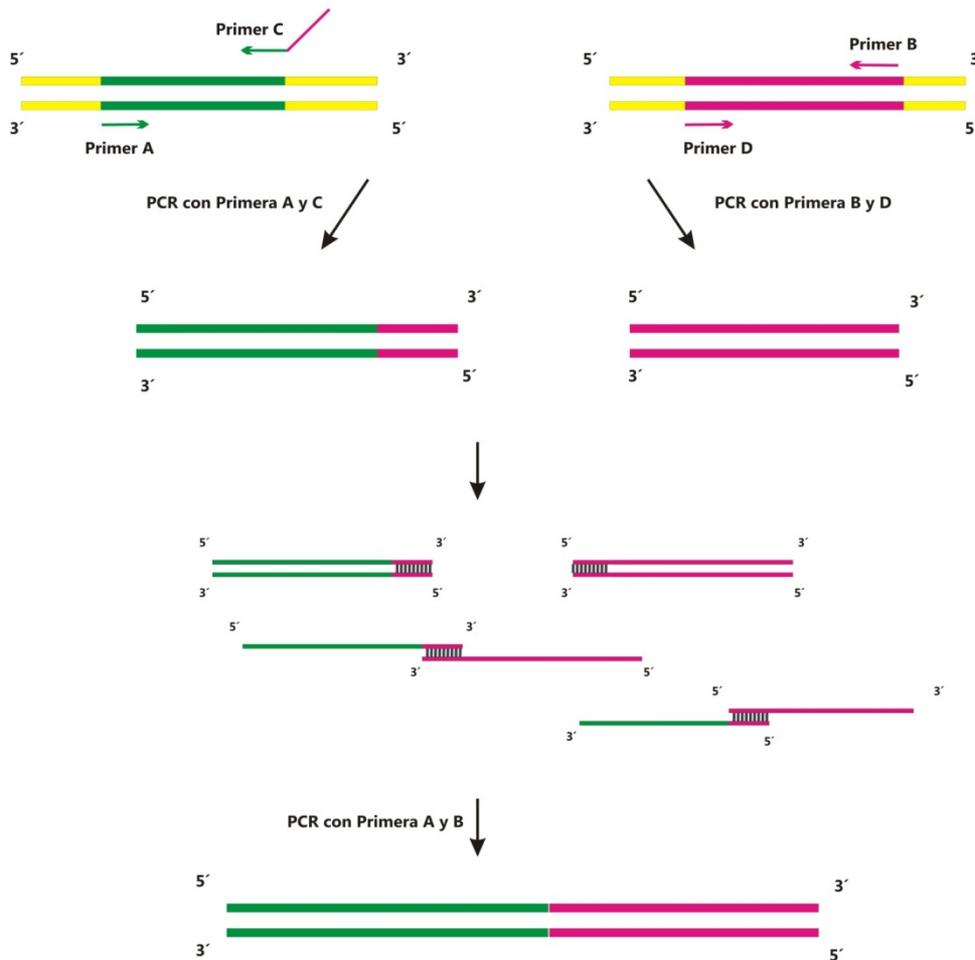
deleciones



Técnicas basadas en PCR

PCR solapada

Fusiones por PCR



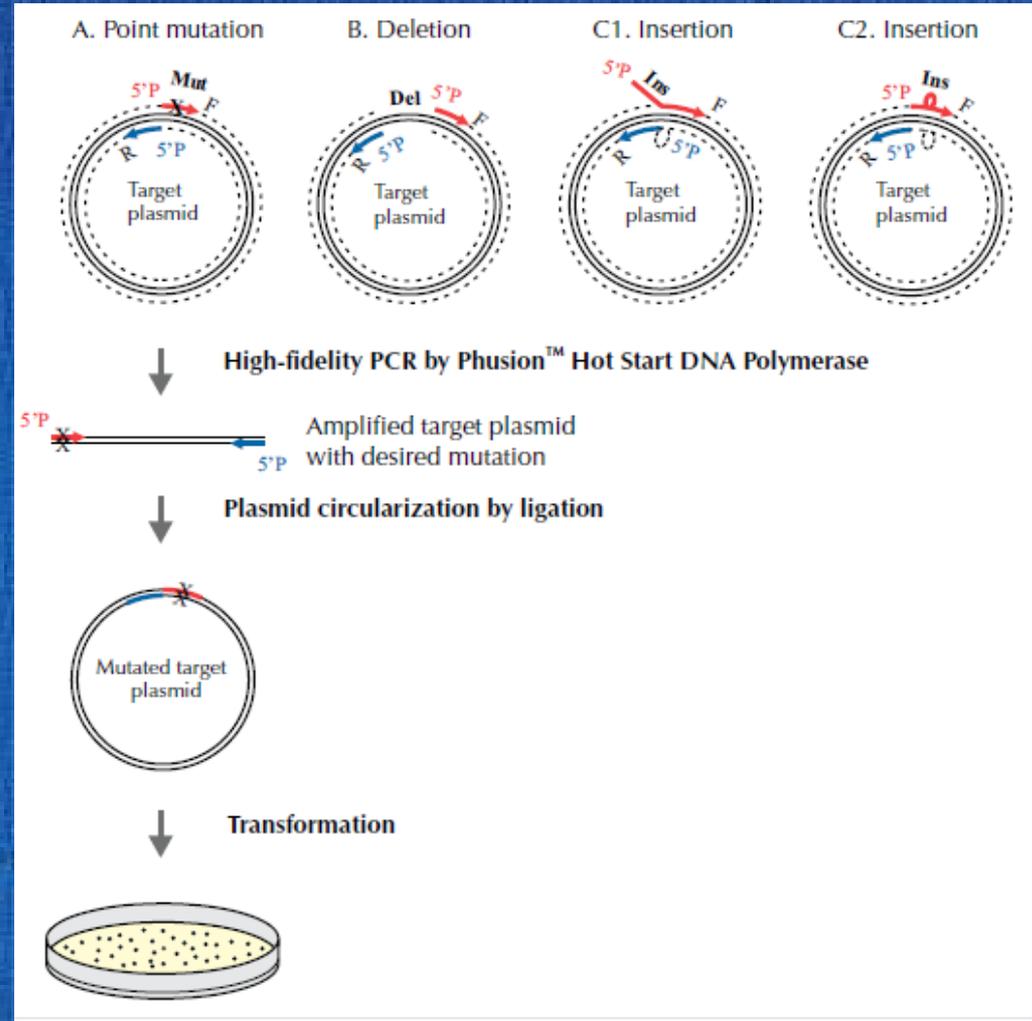
- No agrega secuencia extra entre los dos fragmentos



Técnicas basadas en PCR

PCR inversa

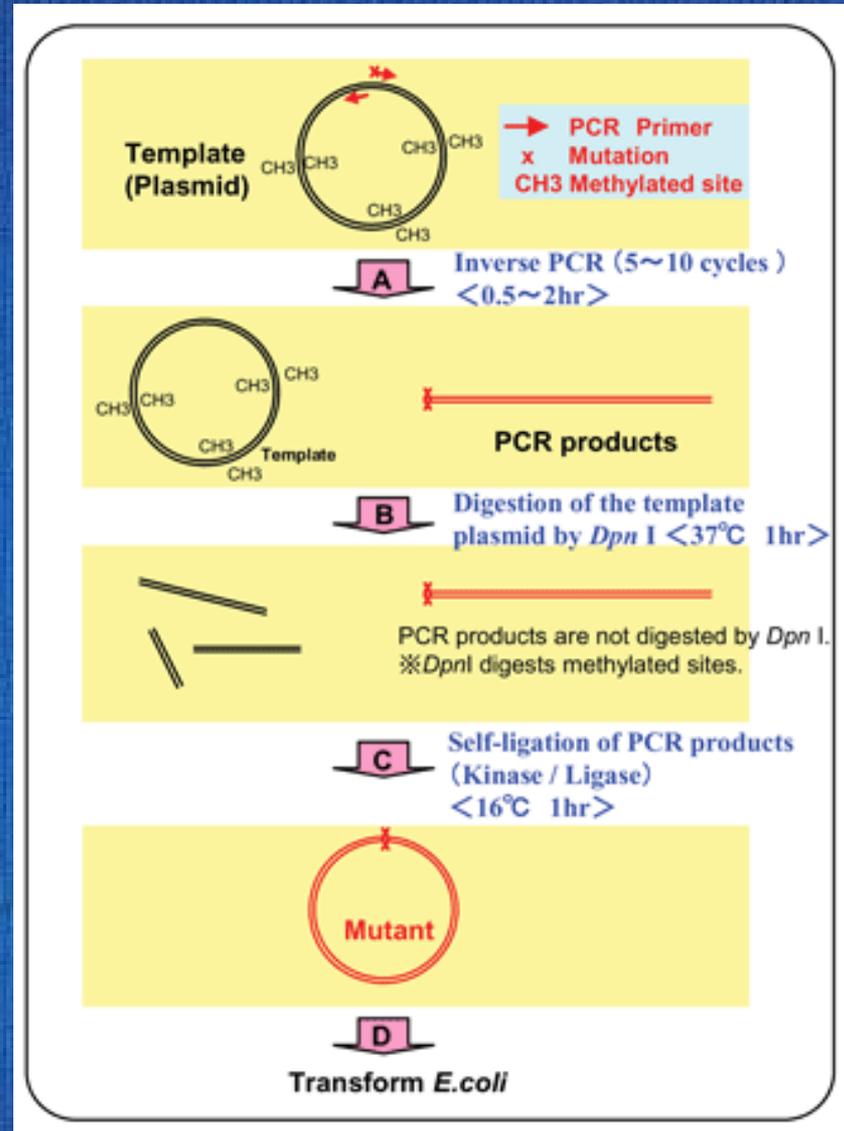
- Que hay que tener en cuenta en cuanto a los *primers* y la polimerasa??



Técnicas basadas en PCR

PCR inversa + DpnI

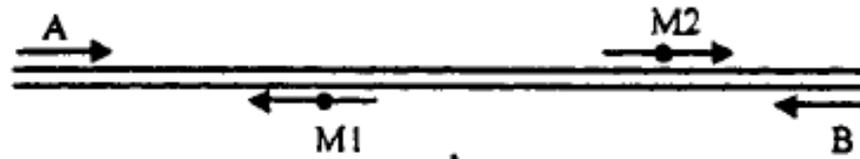
- DpnI reconoce dsDNA metilado o hemimetilado en la posición N6 de la Adenina en la secuencia GATC.



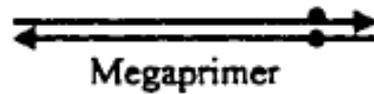
Técnicas basadas en PCR

Megaprimer

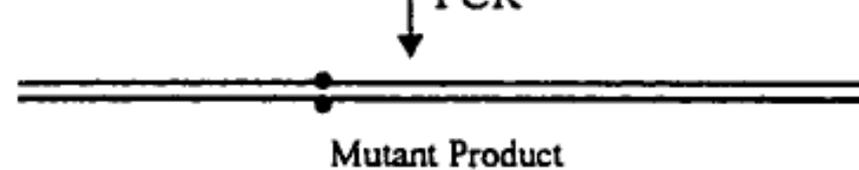
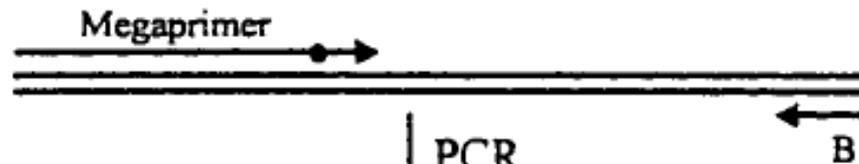
PCR 1:



PCR with
primers: A+ M1



PCR 2:



Mutagénesis al azar → Evolución molecular

Sabemos lo que queremos obtener pero no sabemos lo que tenemos que modificar para lograrlo

- Naturales
- Sustancias Químicas
- Radiaciones

Basadas en PCR

- PCR al azar (Error prone PCR ó EP-PCR)
- DNA *shuffling*

Mutagénesis in vivo

- Cepas especiales

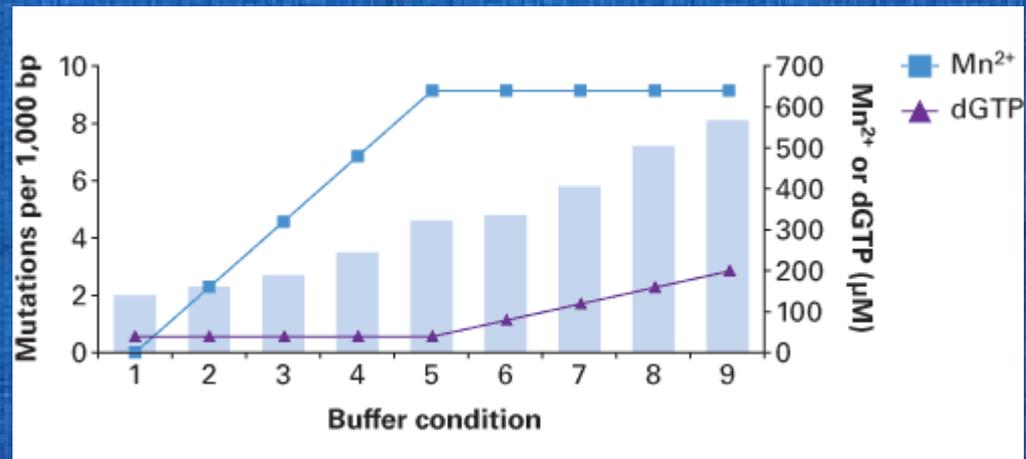
Generación de bibliotecas de mutantes ---→ Necesito buen método de screening

Parámetros

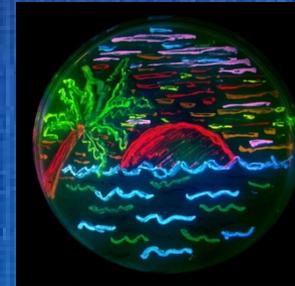
Frecuencia de mutación controlada
Distribución homogénea de mutaciones
Rendimiento
Polimerasa sin exo 3'→ 5'

Tenemos que disminuir la fidelidad de la Taq

- Modificar cofactor
- Desbalance de dNTP's
- Modificar Enzima



El primer ORF usado fue el de GFP, así se consiguieron RFP, YFP, BFP



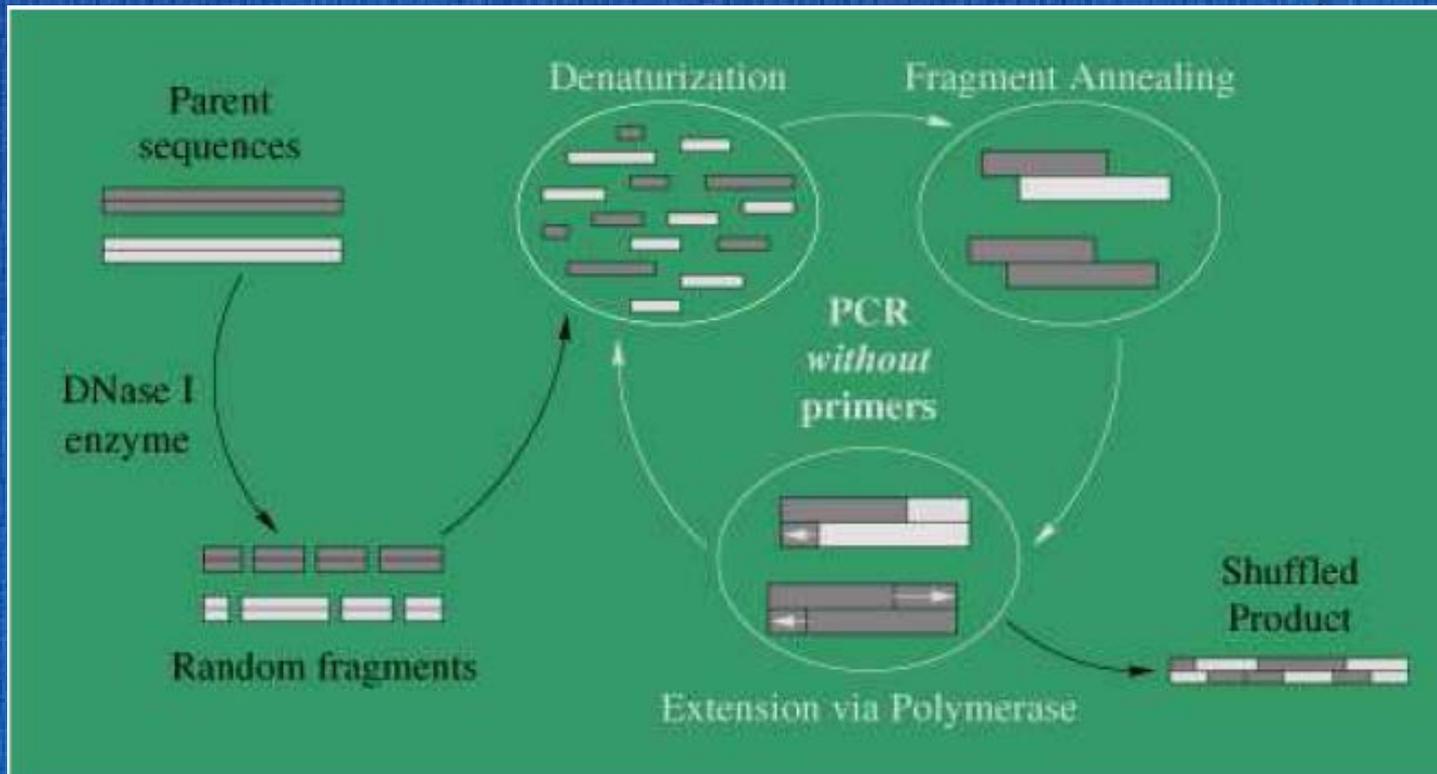
Luego se evolucionó la Taq polimerasa

Mutazyme

- Se obtuvo por EP-PCR
- Mayor tasa de error (8-10/kpb)
- Mayor rendimiento
- Regulación de mutaciones por molde y ciclos

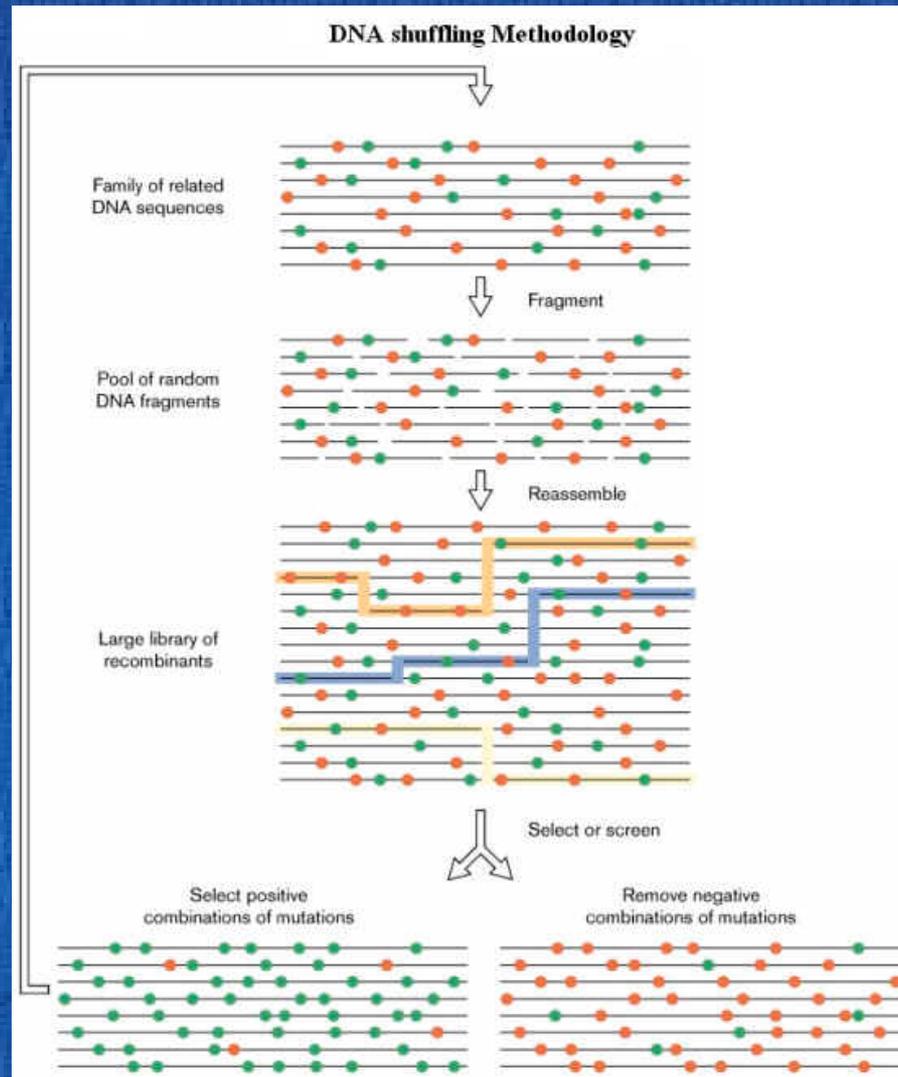
DNA shuffling

Simula la variabilidad que se genera por recombinación homóloga en la reproducción sexual (intervienen más de un alelo)



Generación de bibliotecas de mutantes ---> Necesito buen método de screening

DNA shuffling



Mutagénesis al azar

XL1-red

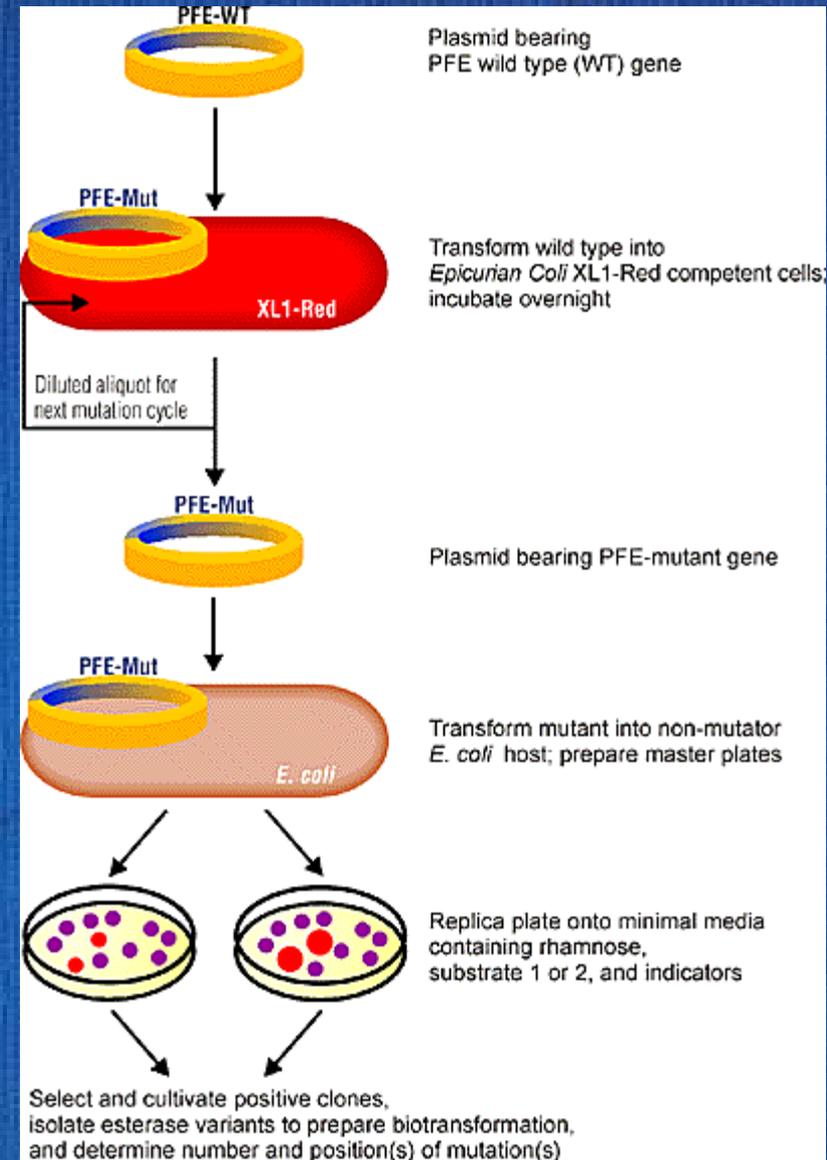
Es deficiente en tres de las rutas primarias de reparación del DNA.

Tiene el siguiente genotipo

mutS (reparación de mismatch propensa a errores)

mutD (deficiente en la exonucleasa 3'-5' de la DNA polimerasa III)

mutT (no puede hidrolizar 8-oxodGTP)



- Quick change (Stratagene)
- Gene-editor (Promega)
- Gene-tailor (Invitrogen)
- LA-PCR (Takara)

- Diversify® PCR Random Mutagenesis Kit (clontech)
- GeneMorph II Random Mutagenesis Kits (Stratagene)

Gene - editor

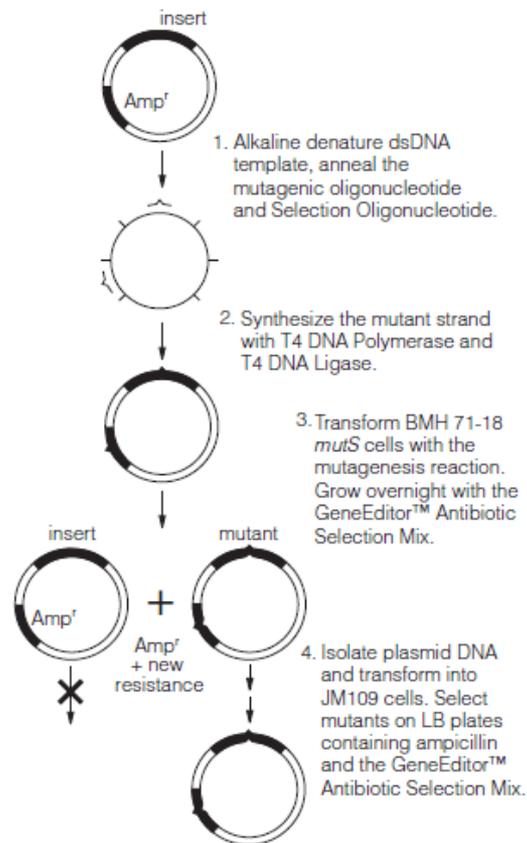


Figure 1. Schematic diagram of the GeneEditor™ in vitro mutagenesis procedure.

Quick change

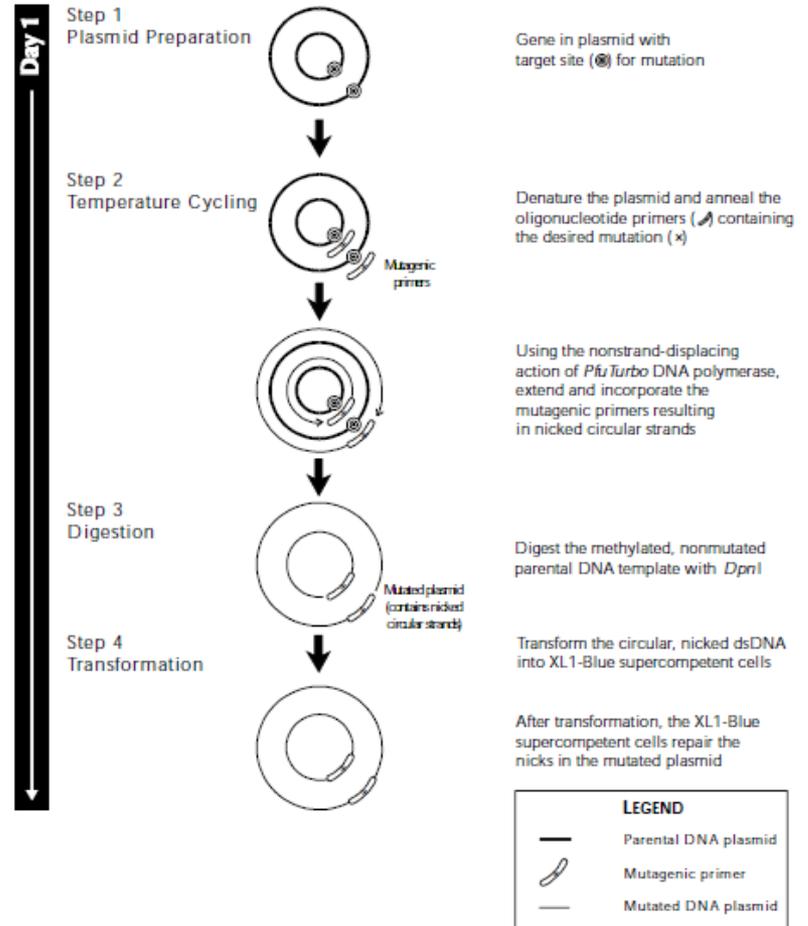
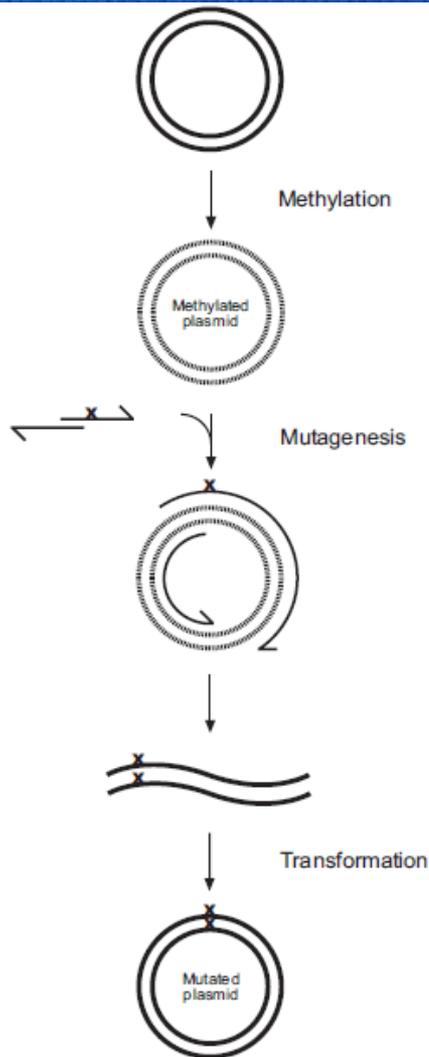


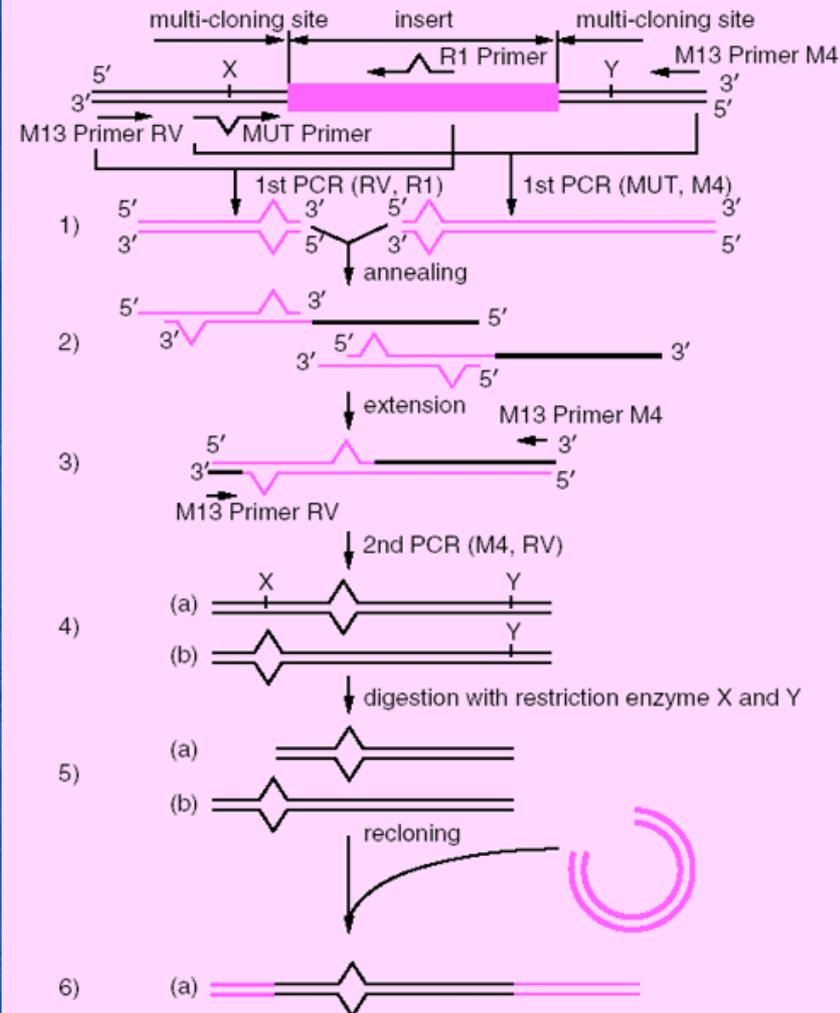
FIGURE 1 Overview of the QuickChange™ site-directed mutagenesis method.

Gene - tailor



1. Methylate plasmid DNA (isolated from any source) with DNA methylase at 37°C for 1 hour.
2. Amplify the plasmid in a mutagenesis reaction with two overlapping primers, one of which contains the target mutation. The product is linear, double-stranded DNA containing the mutation.
3. Transform the mutagenesis mixture into wild type *E. coli*. The host cell circularizes the linear mutated DNA, and *McrBC* endonuclease in the host cell digests the methylated template DNA, leaving only unmethylated, mutated product.

LA - PCR



Dudas?...

Gracias!!!