

# Breves en Ciencia y Tecnología

---

**Clonación por simulación computacional como herramienta de trabajo en biología molecular**

**Cloning by computer simulation as a tool for working in molecular biology**

**Carmen D González L, David J Fernández S, Carla P Castillo D, Giovanny Angiolillo R.**

Dentro de la Biotecnología los protocolos experimentales juegan un papel clave en la práctica diaria. Sin embargo, dichos protocolos pueden ser fácilmente simulados y controlados *in silico* antes de ser llevados a cabo *in vitro*. En el caso particular de clonación de ADN, estos programas permiten una completa simulación del experimento de clonación. La simulación de estrategias como la clonación *in silico*, minimizan la probabilidad de error al momento de realizar la clonación *in vitro*, lo que se traduce en una optimización del tiempo, disminución de costos y conservación del marco abierto de lectura (siglas ORF del inglés *Open reading frame*) correcto del gen a clonar. En este artículo enseñaremos cómo realizar una clonación por simulación computacional utilizando como ejemplo el gen que codifica para la enzima Transcriptasa Reversa (TR). Para esto, usamos el programa Serial Cloner v2.6<sup>(1)</sup> como una aplicación de Biología Molecular, el cual nos permite de manera intuitiva escribir las secuencias del gen de interés y el vector para realizar la clonación y expresión. Serial Cloner dispone de una amplia gama de herramientas que permiten el análisis y visualización de las secuencias de ADN para su clonación y expresión, y los ficheros son compatibles con el formato universal FASTA<sup>(1)</sup>. La existencia y accesibilidad de estas herramientas hacen que la clonación esté a unos pocos clics de distancia. A través del ejemplo seleccionado, mostramos un diseño de la secuencia del gen de la TR y sitios de restricción adecuados que permiten dirigir la clonación para que el ORF quede en fase con el promotor del vector de clonación, con el fin de que la enzima se exprese correctamente.

## **¿QUE ES LA CLONACIÓN POR SIMULACIÓN COMPUTACIONAL?**

La clonación por simulación computacional o clonación *in silico* es una técnica basada en herramientas bioinformáticas, que permite predecir la inserción de un fragmento de ADN en un vector de clonación. Esta técnica ayuda a minimizar la probabilidad de error al momento de realizar la clonación *in vitro* y permite conservar del marco abierto de lectura (ORF) correcto del gen a clonar.

Para la realización de la clonación por simulación computacional del gen que codifica para la enzima Transcriptasa Reversa (TR) se usaron tres herramientas bioinformáticas:

- **NEBcutter:** Este es un programa disponible a través de un servidor web, que permite hacer análisis de restricción (o de digestión) *in silico* de moléculas lineales y/o circulares de ADN <sup>(2)</sup>.

**SerialCloner:** Este es una aplicación de biología molecular que permite leer y escribir ficheros de secuencias ADN compatibles con el formato universal FASTA. Dispone de una amplia gama de herramientas que permiten el análisis y visualización de secuencias de ADN, así como la clonación y expresión genética. Dispone de mapas genéticos, mapas de secuencias, visores de fragmentos de ADN, una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) virtual y mucho más <sup>(1)</sup>.

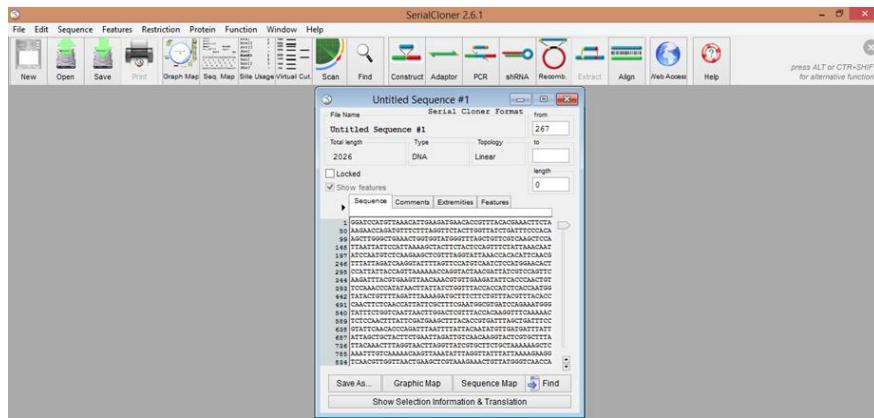
- **ExPASy:** ExPASy es el acrónimo del inglés Expert Protein Analysis System, Sistema Experto de Análisis de Proteínas. Es un servidor de proteómica del Instituto Suizo de Bioinformática (Swiss Institute of Bioinformatics, SIB) que analiza secuencias y estructuras de proteínas y 2D-PAGE <sup>(3)</sup>.

## ¿COMO CLONAR?

El primer paso que se debe llevar a cabo cuando se va a realizar una clonación *in silico* es asegurar que los sitios de corte elegidos para la clonación (*BamHI* y *SacI*) sean únicos, tanto en el vector como en el gen y que se encuentren en los extremos de dicho gen. Para esto usamos el programa **NEBcutter**.

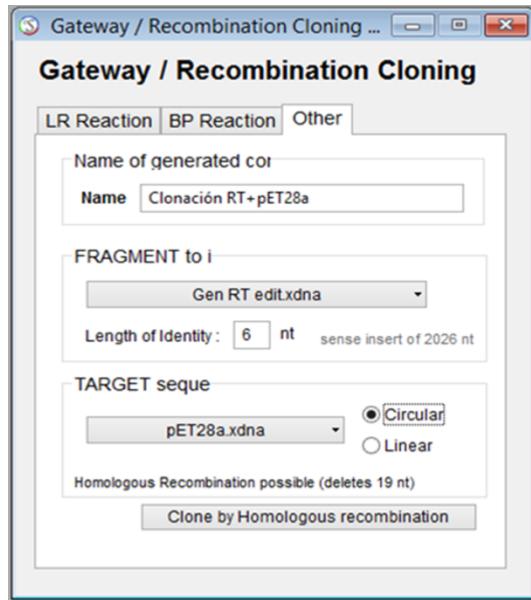
Una vez corroborados los sitios de corte tanto en el gen a clorar como en el vector de expresión, se procede a realizar la clonación *in silico*. Para esto se usó el programa **SerialCloner2.6** y se siguieron los siguientes pasos:

- En el menú del programa, se da clic en **New**. Esto le llevará a una ventana en la cual se debe a pegar la secuencia con el que se desea a trabajar. En este caso fue la secuencia de la RT polimerasa.
- Se da clic en **Save As** para guardar el documento en un formato compatible con el programa (.xADN). Se coloca el nombre de nuestra preferencia al archivo y se da clic en **guardar**. Esto se hace tanto con la secuencia del gen a clonar como con la secuencia del vector de expresión utilizado (figura 1).



**Figura 1: Conversión de la secuencia de ADN a formato .xADN.**

- Una vez guardadas las secuencias en formato xADN, se procede a hacer la construcción del plásmido recombinante. Para eso, se debe dar clic en el ícono **Recomb**. Se habrá una ventana y se da clic en **Other** (figura 2).
  - En **Name**, se coloca el nombre con el que desea guardar el archivo. Luego en **FRAGMENT to i** se debe cargar la secuencia del gen a clonar en formato xADN y en **TARGET sequ** se carga la secuencia del vector. Se coloca el número de nucleótidos necesarios en **length of identity** y se selecciona el ícono **Circular**. Por último, se hace Clic en **Clone by Homologous recombination** (figura 2).

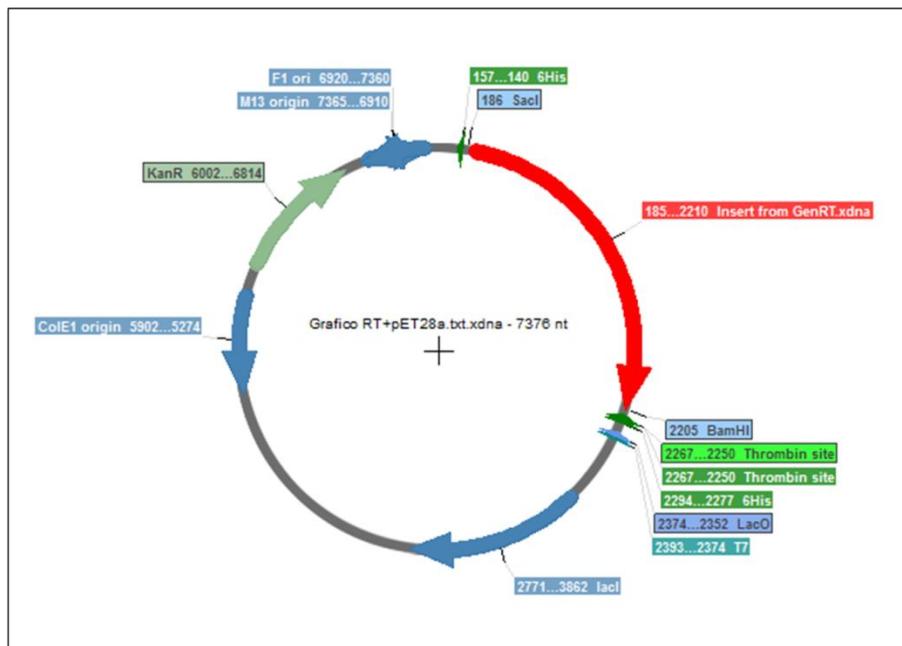


**Figura 2: Inserción de las secuencias del gen y del vector para la recombinación.**

- Luego se abrirá una ventana con la secuencia del gen ya clonada en el vector de expresión (figura 3). Se da clic en **Graphic Map** para que el programa muestre el mapa del plásmido con el inserto (figura 4). Finalmente, se guarda el archivo con la clonación haciendo clic en **Save**.

The screenshot shows a software window titled "Grafico RT+pET28a.txt.xdna". The "File Name" is "Grafico RT+pET28a.txt.xdna". The "Total length" is 7376 nt, "Type" is DNA, and "Topology" is Circular. A checkbox "Locked" is checked, and "Show features" is also checked. Below these settings is a sequence viewer with tabs for "Sequence", "Comments", "Extremities", and "Features". The sequence text area contains the DNA sequence from position 1 to 7376. At the bottom of the window are buttons for "Save", "Graphic Map", "Sequence Map", "Find", and "Show Selection Information & Translation".

**Figura 3:** Secuencia del gen ya clonado en el vector de expresión.



**Figura 4:** Mapa del plásmido con el inserto correspondiente al gen de la RT polimerasa.

Para corroborar que el marco abierto de lectura de nuestro gen está en fase con el promotor del vector de expresión y que se traduce correctamente, utilizamos el servidor **ExPASy**, el cual tiene una herramienta llamada **Translate**, que permite traducir nucleótidos a aminoácidos <sup>(4)</sup> (figura 5).

The screenshot shows a web browser window with the URL [web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna\\_aa](http://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa). The title bar says "3'5' Frame 1". The main content displays a long amino acid sequence. Several methionine (Met) residues are highlighted in red, including the first one and several others throughout the sequence. The sequence begins with "Met G S S H H H H H S S G L V" and ends with "Stop D P A".

**Figura 5: Secuencia de aminoácidos correspondiente a enzima la TR polimerasa.**

Como se puede apreciar, el uso de estas herramientas bioinformáticas permite una completa simulación *in silico* del experimento de clonación. A partir de una secuencia de ADN primaria, se pueden buscar sitios de restricción, marcos abiertos de lectura, secuencias de hibridación de los cebadores y varios dominios comunes. Además, permiten gestionar y representar gráficamente el resultado de la clonación antes de llevar el experimento a la fase *in vitro*. Esto permite minimizar la probabilidad de error al momento de realizar la clonación *in vitro*, lo que se traduce en una optimización del tiempo, disminución de costos y conservación del marco abierto de lectura (ORF) correcto del gen a clonar.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) Serial Cloner 2.6. Disponible en: [http://serialbasics.free.fr/Serial\\_Cloner.html](http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html). (Consultado el 15 de Marzo de 2015).
- (2) Vincze, T, Posfai J, Roberts RJ. (2003) NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes Nucleic Acids Res. 2003; 31: 3688-3691. Disponible en: <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>. (Consultado el 15 de Marzo de 2015).
- (3) Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, y Stockinger H. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. Nucleic Acids Res. 2012; 40(W1):W597-W603. Disponible en: <https://www.expasy.org/>. (Consultado el 16 de Marzo de 2015).
- (4) Herrera E., Ramos M., Roca P. y Viana M. Bioquímica Básica: Base molecular de los procesos fisiológicos. Barcelona: Elsevier; 2014.