

Tecnologia del DNA recombinant**2015/2016**

Codi: 100934

Crèdits: 3

Titulació	Tipus	Curs	Semestre
2500253 Biotecnologia	OB	2	2

Professor de contacte

Nom: Jaume Piñol Ribas

Correu electrònic: Jaume.Pinyol@uab.cat

Utilització de llengües

Llengua vehicular majoritària: català (cat)

Prerequisites

No hi ha prerequisites oficials.

Objectius

En aquesta assignatura es pretén donar les eines bàsiques del conjunt de metodologies que es coneixen amb el nom de Tecnologia del DNA recombinant. Aquestes metodologies, que es van començar a desenvolupar a finals del segle passat, són un dels pilars de la biotecnologia moderna. L'objectiu general de l'assignatura és donar una base sòlida que permeti a l'alumne aplicar aquestes metodologies en el disseny de processos biotecnològics i per altre part, donar els coneixements necessaris pel seguiment d'assignatures més especialitzades dels últims cursos del grau de biotecnologia. Els aspectes pràctics d'aquesta assignatura es tracten en els Laboratoris integrats 4 i 5, que inclouen en els seus temaris pràctics parts substancials dels continguts de la Tecnologia del DNA recombinant.

Objectius concrets

- Conèixer i saber aplicar les tècniques bàsiques del DNA recombinant: sondatge, Southern i Northern blots, hibridació, arrays, seqüenciació, ús d'enzims de restricció i reacció de PCR.
- Descriure els principals vectors de clonatge a *Escherichia coli*, conèixer les seves característiques i saber com aplicar-les en les diferents estratègies per a la clonació de fragments de DNA.
- Comprendre les estratègies per a la construcció de genoteques i la seva utilització per a l'estudi de gens i genomes.
- Coneixer els fonaments i principals aplicacions de les noves tecnologies per a la seqüenciació massiva d'àcids nucleics.
- Conèixer la metodologia per a l'expressió de proteïnes recombinants i per a la mutagènesi dirigida.

Competències

- Aplicar les principals tècniques associades a l'ús de sistemes biològics: DNA recombinant i clonació, cultius cel·lulars, manipulació de virus, bacteris i cèl·lules animals i vegetals, tècniques immunològiques, tècniques de microscòpia, proteïnes recombinants i mètodes de separació i caracterització de biomolècules.
- Llegir textos especialitzats tant a llengua anglesa com a les llengües pròpies.
- Pensar d'una forma integrada i abordar els problemes des de diferents perspectives.

- Treballar de forma individual i en equip.

Resultats d'aprenentatge

1. Descriure i aplicar els diferents mètodes per a l'obtenció de mutants d'una proteïna recombinant i la seva purificació.
2. Descriure les estratègies utilitzades per a la modificació del genoma de diferents organismes.
3. Dissenyar estratègies per a la seqüenciació de genomes.
4. Dissenyar i executar el clonatge de cDNAs per a l'anàlisi de l'expressió gènica i per a l'expressió de proteïnes recombinants.
5. Dominar els mètodes bàsics de la tecnologia del DNA recombinant.
6. Llegir textos especialitzats tant a llengua anglesa com a les llengües pròpies.
7. Pensar d'una forma integrada i abordar els problemes des de diferents perspectives.
8. Treballar de forma individual i en equip.

Continguts

TEORIA

Tema 1. Tècniques bàsiques de la Tecnologia del DNA recombinant.

Objectius de la Tecnologia del DNA recombinant. Enzims utilitzats en DNA recombinant: enzims de restricció, polimerases, lligases. Mapes de restricció de DNA. Adaptadors i "linkers". Mètode de Sanger per a la seqüenciació de DNA. Desnaturalització del DNA i hibridació molecular. Reacció de PCR. Southern blot, Northern blot i les seves aplicacions.

Tema 2. Clonatge a Escherichia coli.

Plasmidis i fags com a vectors de clonatge a E. coli. Principals mètodes de transformació. Fagèmids i principals soques hoste. Sistemes d'integració per recombinació. Clonatge de productes de PCR.

Tema 3. Construcció i rastreig de bancs de cDNA. Síntesi de cDNA. Estratègies per a la construcció de bancs de cDNA. Representativitat. Principals vectors utilitzats en la construcció de bancs de cDNA. Sistema de excisió in vivo en fag lambda. Rastreig de bancs de cDNA. RT-PCR com alternativa als bancs de cDNA. Amplificació ràpida dels extrems del cDNA. Bancs de subtracció de cDNA. "Expressed sequence tags (ESTs)". Arrays: classes i quantificació dels resultats.

Tema 4. Bancs de DNA genòmic. Concepte general. Representativitat. Estratègies per a l'obtenció de bancs de DNA genòmic. Vectors de substitució. Còsmids i Fòsmids, BACS i YACS. Rastreig de bancs de DNA genòmic. Walking i obtenció de sondes. Ordenació de contigs. Tecnologies per a la seqüenciació massiva d'àcids nucleics (NGS). Principals aplicacions de les tecnologies NGS.

Tema 5. Mutagènesi in vitro.

Concepte i usos. Mutacions silencioses. Mutagènesi dirigida i principals tècniques per a la seva realització: mutagènesi per "cassette", extensió d'un encebador o mitjançant PCR. Mutagènesi a l'atzar. Evolució molecular dirigida: "DNA shuffling" i tècniques relacionades.

Tema 6. Expressió de proteïnes recombinants.

Factors que afecten l'expressió dels gens clonats a E. coli. Principals vectors d'expressió. Optimització de l'expressió de proteïnes recombinants. Gens sintètics. Proteïnes de fusió. "Phage display". Sistemes de traducció in vitro.

Tema 7. Clonatge en llevats.

Clonatge en Saccharomyces cerevisiae: transformació, tipus de vectors i expressió de proteïnes recombinants. Mètode del "two-hybrid" per detectar interaccions proteïna-proteïna. Altres llevats d'interès biotecnològic.

PROBLEMES

El contingut d'aquest apartat, que es lliurarà en forma de dossier al començament del semestre, consisteix en una quantitat determinada d'enunciats de problemes relacionats amb els temes desenvolupats a Teoria.

Metodologia

Les activitats formatives consten de classes de teoria i de classes de problemes. Cadascuna d'elles té la seva metodologia específica

Classes de teoria

El professor explicarà el contingut del temari amb el suport de material audiovisual que estarà a disposició dels estudiants al Campus Virtual de l'assignatura, amb antelació. Aquestes sessions expositives constituïran la part més important de l'apartat de teoria. És recomanable que els estudiants disposin del material publicat al CV en forma impresa per tal de poder seguir les classes amb més comoditat.

Sota el guiatge del professor, els coneixements d'algunes parts del temari hauran de ser objecte de aprofundiment per part dels estudiants, mitjançant aprenentatge autònom. Per tal de facilitar aquesta tasca es proporcionarà informació sobre localitzacions a llibres de text, pàgines web, etc.

Classes de problemes

Hi haurà 8 sessions de problemes, en les dades anunciades en el calendari. Per aquestes sessions, el grup de teoria es dividirà en dos subgrups de la mateixa mida, les llistes dels quals es faran públiques a començaments de curs. Els estudiants assistiran a les sessions programades pel seu grup. A començaments de semestre es lliurarà a través del Campus Virtual un dossier d'enunciats de problemes de l'assignatura que s'aniran resolent al llarg de les sessions. En aquestes sessions el professor de problemes exposarà els principis experimentals i de càlcul necessaris per treballar els problemes, explicant les pautes per la seva resolució i reforçant mateix temps els coneixements de diferents parts de la matèria de les classes de teoria.

Activitats formatives

Títol	Hores	ECTS	Resultats d'aprenentatge
Tipus: Dirigides			
classes de problemes	8	0,32	1, 4, 5, 7, 8
classes magistrals	17	0,68	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8
Tipus: Autònomes			
estudi i resolució de exercicis pautats	44	1,76	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8

Avaluació

L'avaluació de l'assignatura es durà a terme mitjançant una prova escrita que tindrà dues parts. La primera part consistirà en respondre un qüestionari amb preguntes tipus test i també podrà incloure preguntes escrites que relacionin diferents parts del temari de l'assignatura. La segona part consistirà en la resolució de problemes. Per superar aquesta prova, l'alumne haurà de tenir una qualificació global (veure més abaix) igual o superior a 5. Aquells alumnes que no hagin superat aquesta prova hauran de presentar-se a l'examen de recuperació. Aquesta prova de recuperació també estarà oberta a qualsevol estudiant que desitgi millorar la nota obtinguda. La presentació a l'examen de recuperació per millorar nota no suposa la renúncia de la nota prèvia.

La nota obtinguda es calcularà de la següent manera:

- 70% de la primera part de la prova final (o la de recuperació si s'escau).
- 30% de la segona part de la prova final (o la de recuperació si s'escau).

L'alumne obtindrà la qualificació de "No Avaluable" quan no hagi realitzat cap de les activitats de avaluació programades.

Activitats d'avaluació

Títol	Pes	Hores	ECTS	Resultats d'aprenentatge
Prova Final	100	3	0,12	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
Recuperació	100	3	0,12	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8

Bibliografia

Bibliografia bàsica

TEORIA

- **Principles of gene manipulation** 6^a Ed. RW Old, RM Twyman and SB Primrose. Ed. Blackwell 2003
- **Molecular Biotechnology** 2^a Ed. Glick y Pasternak. ASM Press 1998
- **Recombinant DNA**. 2^a Ed. JD Watson, M Gilman, J Witkowski, and M Zoller. Ed. Freeman 1992
- **Genes VIII**. B Lewin. Ed. Pearson Prentice Hall 2004.
- **Molecular cloning. A laboratory manual**. 3^a Ed J Sambrook i DW Russell. CSHL Press 2001
- **Gene cloning and DNA analysis. An introduction**. T.A. Brown. Ed. Wiley-Blackwell 2010