

Assignatura

Genètica aplicada Curs 2001/2002

llicenciatura: Biologia

crèdits: 6 : 4.5 teòrics i 1.5 pràctics

professor/s:

Teoria:

Noel Xamena (C3/241.4)

Hores de tutoria: dimarts i dijous
de 9,30h a 11,00h

Pràctiques:

M^aJosé Ramírez (C3/239)

Martí Badal (C3/213)

La genètica és una ciència que està lligada, des del seu naixement, a aspectes aplicats de gran interès econòmic i social, com la producció agrícola i ramadera, la indústria, la farmàcia, la medicina o la salut pública. Aquesta assignatura pretèn apropar l'alumne a aquesta realitat donant-li una visió general de les aplicacions més immediates de la genètica, de la qual ha vist els seus aspectes bàsics (Genètica, primer cicle) i moleculars (Genètica molecular, segon cicle).

El programa de l'assignatura s'ha estructurat en torn a algunes de les principals aplicacions de l'anàlisi del DNA i la manipulació dels genomes en els camps de la medicina i la millora agrícola i ramadera.

[Temari](#) [Bibliografia](#) [Pràctiques](#) [Exàmens](#) [Links](#) [Material](#)

CURS 2001/2002

1. Mutacions, polimorfismes i malalties genètiques

Principals tipus de mutacions i polimorfismes de DNA. Canvis genètics i canvis epigenètics. Mutacions en el genoma d'òrgans cel·lulars. Malalties familiars malalties genètiques. Malalties monogèniques i malalties multifactorials. Diagnòstic directe i indirecte.

2. Sondes d'àcids nucleics

Formació de molècules híbrides d'àcids nucleics. Hibridacions en solució i en suport sòlid. Factors que determinen la especificitat i la estabilitat dels híbrids. Tipus de sondes. Marcat de les sondes. Mètodes de detecció de les sondes.

3. Hibridació in situ fluorescent (FISH)

Bases de la tècnica. Aplicacions de l'ús de sondes centromèriques en el diagnòstic clínic i en toxicologia genètica. Tandem labeling. FISH multicolor. Pintat de cromosomes. Hibridació genòmica comparativa (CGH). PRINS.

4. La tècnica del Southern blot en l'anàlisi directe de mutacions

Principis bàsics del Southern blot. Aplicacions del Southern blot al diagnòstic directe de malalties genètiques. Detecció de mutacions puntuals: substitucions i mutacions frameshift. Delecions i insercions.

5. Tècnica d'amplificació per PCR

Components d'una reacció de PCR. Disseny d'encebadors. Components del buffer. DNA polimerases emprades en la PCR. Descripció de la tècnica de la PCR. Factors que afecten al resultat de l'anàlisi per PCR.

6. Detecció directe de mutacions per PCR

RFLP-PCR. Detecció de insercions, amplificacions i petites delecions. Ús de seqüències control. PCR múltiple. PIRA. ARMS. Variacions de les amplificacions específiques d'al·lel. Miniseqüenciació. PCR a temps real.

7. Altres tècniques de detecció de mutacions

Detecció de mutacions mitjançant l'ús de lligases. RT-PCR. Hibridació específica d'al·lel (ASOH). Dot blot directe i dot blot invers. Microarrays de DNA i d'oligonucleòtids: anàlisi d'expressió i detecció de mutacions i polimorfismes.

8. Usos dels polimorfismes de DNA

Aplicacions en el diagnòstic indirecte. VNTR i DNA fingerprinting. STR i ús de la PCR per a l'obtenció de patrons de bandes. Altres polimorfismes de DNA. Ús del DNA mitocondrial.

9. Detecció de noves mutacions en gens d'interès

Tècniques basades en el comportament electroforètic. SSCP. Heterodúplex. DGGE. CGGE. Tècniques basades en el reconeixement químic o enzimàtic dels falsos aparellaments. CCM. CDI. RNases. Altres tècniques.

10. Ús de les proteïnes recombinants amb finalitat terapèutica

Teràpia de malalties genètiques. Interès de l'ús de les proteïnes recombinants amb finalitat terapèutica. Sistemes d'expressió in vitro.

11. Teràpia gènica de malalties hereditàries

La teràpia gènica com una alternativa a la teràpia convencional de les malalties genètiques. Vectors emprats en la teràpia gènica. Teràpia ex vivo. Manipulació de les cèl·lules in vitro mitjançant recombinació homòloga. Teràpia in vivo.

12. Teràpia gènica del càncer

Alternatives de la teràpia gènica del càncer. Modificació de la resposta immunològica. Ús d'oligonucleòtids antisentit. Sistemes de transfecció ex vivo in situ. Altres tipus de teràpies.

13. Animals transgènics en la millora i producció

Mètodes més emprats en l'obtenció de mamífers, aus i peixos transgènics. Animals transgènics per a hormones de creixement. Lluita contra les malalties. Millora de caràcters productius.

14. Aplicacions dels animals transgènics en el camp de la salut

Obtenció de sistemes d'assaig en toxicologia i toxicologia genètica. Models de malalties genètiques. Ús dels animals transgènics com a biorreactors. Xenotransplantaments.

15. Producció d'híbrids vegetals

Obtenció d'híbrids per encreuaments interespecífics. Obtenció d'híbrids per fusió de protoplasmes. Variació somaclonal. Híbrids asimètrics. Cíbrids.

16. Obtenció de plantes transgèniques

Utilització d'*Agrobacterium*. Co-integració. Sistemes binaris. El plasmidi Ri. Utilització de virus com a vectors. Mètodes d'obtenció directe de plantes transgèniques. Biolística.

17. Alguns aplicacions de les plantes transgèniques a la millora vegetal

Ús d'oligonucleòtids antisentit per canviar característiques dels aliments. Lluita contra plagues. Tolerància als herbicides. Millora en plantes ornamentals.

Bibliografia

Al llarg del curs s'ofereix a l'alumne la possibilitat d'accedir a bibliografia específica per a cada un dels temes. A més, es recomana la consulta d'alguns llibres que poden ser interessants per tal de complementar la informació impartida a les classes teòriques. Aquests llibres són els següents:

- **Hawkins, J.R.**, 1997, *Finding mutations. The basics*, Oxford University Press
- **Hayward, G.**, 1991, *Applied Genetics*, Thomas Nelson & Sons Ltd.
- **Houdebine, L.M.**, 1997, *Transgenic animals generation and use*, Harwood Academic Publishers
- **Strachan, T. & A.P. Read**, 1999, *Human Molecular Genetics*, 2a edició, BIOS Scientific Publishers Limited
- **Watson, J.D., M. Gilman, J. Witkowski & M. Zoller**, 1992, *Recombinar. DNA*, 2a edició, W.H. Freeman and Co.

Pràctiques

Les pràctiques es realitzen totes les tardes, de dilluns a divendres, al llarg d'una setmana.

1. Factors a considerar en dissenyar una reacció de PCR
2. Anàlisi molecular de mutacions
3. Comprovació per *Southern blot*
4. Extracció de DNA de mostres de sang
5. Genotipatge mitjançant PCR

1. Quina o quines de les següents característiques augmenten la estabilitat d'una molècula híbrida de DNA?
 - A. Una major temperatura.
 - B. Una major concentració salina.
 - C. Una major proporció de guanines i citosines..
 - D. Una major llargada de la molècula.

2. ¿Quina o quines tècniques podries emprar per diagnosticar una substitució de parells de bases coneguda que afecta a un intró i que no altera cap diana de restricció coneguda?
 - A. Hibridació específica d'al·lel (ASO).
 - B. Anàlisi de RFLP per Southern blot.
 - C. Amplificació específica d'al·lel (ASA o ARMS).
 - D. RT-PCR.

3. Quin o quins tipus d'alteracions podem detectar mitjançant hibridació genòmica comparativa (CGH)?
 - A. Reordenacions genòmiques equilibrades (ex. translocacions recíproques).
 - B. Reordenacions genòmiques desequilibrades estructurals (ex. delecions).
 - C. Reordenacions genòmiques desequilibrades numèriques (ex. aneuploidies).
 - D. Mutacions puntuals (ex. substitucions de nucleòtids).

4. De quin o quins tipus de cadenes de DNA s'espera que no augmenti el seu nombre en una reacció de PCR al llarg dels diferents cicles?
 - A. Les cadenes del DNA motlle que s'introdueixen al principi de la reacció.
 - B. Les cadenes de DNA, de llargada variable, producte de la còpia directa del DNA motlle.
 - C. Les cadenes de DNA específiques limitades en els seus extrems pels encebadors.
 - D. Tots els tipus de molècules de DNA que intervenen en la reacció de PCR augmenten al llarg dels cicles.

5. ¿Quin o quins jocs d'encebadors poden ser útils per a realitzar una RT-PCR, tenint en compte que hem de poder distingir entre el producte d'amplificació de seqüències del RNA i d'un possible DNA genòmic contaminant?
 - A. Els dos encebadors reconeixen seqüències del mateix exó.
 - B. Un encebador reconeix una seqüència d'un exó i l'altre la d'un exó diferent.
 - C. Un encebador reconeix una seqüència d'un intró i l'altre la d'un intró diferent.
 - D. Un encebador reconeix una seqüència d'un intró i l'altre la d'un exó.

6. Quina és la freqüència teòrica en la que podem trobar, aleatòriament, una seqüència de tres nucleòtids en una molècula de DNA?
 - A. 1 cada 4 nucleòtids.
 - B. 1 cada 16 nucleòtids.

- C. 1 cada 32 nucleòtids.
- D. 1 cada 64 nucleòtids.

7. Quina o quines de les següents afirmacions sobre l'ús de patrons de DNA generats per sondes multiloci són correctes?

- A. En els casos de reconeixement de la paternitat d'una persona respecte del seu suposat fill, la no coincidència d'una banda de les que no es poden assignar a la mare és una prova inequívoca de la exclusió de paternitat.
- B. En els casos d'identificació de cossos mutilats, els patrons de bandes de membres d'un mateix individu han de coincidir
- C. La quantitat i qualitat del DNA disponible per a l'anàlisi quan s'utilitzen sondes multiloci ha de ser major que quan s'utilitzen sondes de locus únic
- D. Els fills han de presentar la meitat de les bandes que no es poden assignar a la mare coincidents amb bandes del seu pare.

8. En quin o quins dels següents casos la RT-PCR pot ser una tècnica útil per a l'anàlisi de la mutació?

- A. Una substitució de nucleòtids en un exó que afecta a una diana de restricció.
- B. Una translocació que fusiona dos gens diferents a nivell d'introns.
- C. Una deleció d'un únic nucleòtid en un intró de 100 bp que impedeix la eliminació d'aquest intró del precursor del missatger.
- D. Una deleció de 100 bp d'un intró sense que afecti al processat del mateix.

9. En l'anàlisi de mutacions per CCM, emprant hidroxilamina i tetròxid d'osmi, podem reconèixer les C i T desaparellades. ¿Podem detectar per CCM un heterocigot portador d'una substitució de A=T a T=A o a G°C?

- A. En els dos casos es poden detectar els falsos aparellaments de l'heterocigot.
- B. Únicament en el primer cas (T=A) es poden detectar els falsos aparellaments de l'heterocigot.
- C. Únicament en el segon cas (G°C) es poden detectar els falsos aparellaments de l'heterocigot.
- D. En cap dels dos casos es poden detectar els falsos aparellaments de l'heterocigot.

10. Quina o quines de les següents modificacions podrien millorar el rendiment de l'amplificació de fragments grans de DNA en una PCR?

- A. Allargar el temps d'extensió.
- B. Augmentar la temperatura d'hibridació.
- C. Augmentar la concentració de Mg²⁺
- D. Disminuir la concentració de dNTP.

11. Quina o quines de les següents afirmacions són correctes?

- A. Les mostres a analitzar per FISH es fixen després de la hibridació.
- B. L'antifade s'afegeix per tal d'evitar el ràpid esmoreïment del senyal fluorescent.
- C. Per FISH podem reconèixer anomalies cromosòmiques en nuclis interfàsics.
- D. Per FISH podem reconèixer anomalies estructurals en cromosomes metafàsics.

12. Quina de les següents tècniques és la base de l'anàlisi dels àcids nucleics per microarrays de DNA?

- A. Dot blot directe.
- B. Dot blot invers.
- C. Southern blot.
- D. Northern blot.

13. Mitjançant quina o quines tècniques cal emprar protoplasts per tal de transferir gens a cèl·lules vegetals?

- A. Agrobacterium.
- B. Electroporació.
- C. Microinjecció.
- D. Biolística.

14. ¿Quin o quins són els mètodes més usats emprats per a visualitzar els pronúclis dels cigots de mamífers, per tal de microinjectar-los, en el cas de no poder observar-los al microscopi òptic?

- A. Microscopia de contrast interferencial.
- B. Centrifugació dels cigots.
- C. Ecografia.
- D. Microinjecció directa al citoplasma.

15. Si volem tractar un càncer de cervell sensibilitzant les cèl·lules tumorals a ganciclovir per l'expressió del gen tk del virus herpes simplex, quin és el tipus de vector que aconsellaries emprar?

- A. Retrovirus.
- B. Adenovirus.
- C. Virus adeno-associats.
- D. Plasmidis bacterians.

16. Quin és el mètode més emprat en l'obtenció d'aus transgèniques?

- A. Microinjecció de pronúclis de cigots.
- B. Transfecció amb retrovirus.
- C. Transfecció de cèl·lules embrionàries primordials (Embryonic stem cells).
- D. Biolística.

17. Quina diferència podem trobar entre la estratègia terapèutica antígen i la antisentit?

- A. La primera depèn de la utilització de mètodes basats en la recombinació homòloga, mentre que la segona depèn de la utilització de mètodes basats en l'ús d'oligonucleòtids.
- B. La primera utilitza oligodesoxirribonucleòtids i la segona, oligorribonucleòtids.
- C. En el primer cas, el "blanc" objecte de l'acció de l'oligonucleòtid és el DNA; en el segon, el RNA.
- D. En la primera, s'indueix la mutació dirigida del gen objecte de teràpia, i en la segona, es transfecten les cèl·lules amb vectors que porten clonat un gen que codifica per una proteïna que anul·la l'efecte del producte del gen objecte de teràpia.

18. Quina o quines de les següents afirmacions són correctes?

- A. La tècnica de reemplaçament gènic per gene targeting és aplicable tant en teràpies in vivo com ex vivo.
- B. La tècnica de reemplaçament gènic per gene targeting és aplicable únicament en els casos en que es vulgui suprimir l'expressió d'un gen específic.

C. La teràpia gènica persegueix exclusivament introduir un al·lel d'un gen que en el genoma del pacient presenta una mutació que implica pèrdua de funció (ex. hemofílies), o suprimir o bloquejar l'expressió d'un gen del genoma del pacient que se sobreexpressa (ex. oncogens).

D. La teràpia ex vivo implica la manipulació in vitro de cèl·lules extretes del pacient que es vol tractar.

19. Si volem aconseguir canviar la composició proteica de la llet de vaca per tal de destinar-la al consum humà, quin o quins dels següents factors és aconsellable tenir en compte?

A. Acompanyar el transgen amb un promotor d'un gen que s'expressi en la glàndula mamària.

B. Introduir un transgen corresponent a un RNA antisentit, ja que aquesta és l'única possibilitat que tenim d'alterar la composició de la llet.

C. Evitar que el canvi previst, degut a l'expressió del transgen, pugui interferir amb el procés de producció de llet.

D. Evitar l'ús de cDNA en el transgen ja que aquest no es pot transcriure en mamífers.

20. Per tal d'obtenir un híbrid somàtic asimètric cal emprar cèl·lules:

A. nues.

B. monocotiledònies.

C. meristemàtiques.

D. haploides o monoploides.

21. Quina o quines de les següents condicions són precises per tal d'emprar el plasmidi Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* com a vector per a l'obtenció de plantes transgèniques?

A. El transgen ha d'estar clonat entre les repeticions dels extrems del DNA-T.

B. Els gens de la regió vir han d'estar en el mateix plasmidi que porta el transgen.

C. El plasmidi Ti que compta el transgen no pot contenir cap dels elements que constitueixen el DNA-T.

D. El DNA-T del plasmidi en el que es troba el transgen no ha de contenir els gens de les fitohormones.

22. Quina o quines de les següents afirmacions són correctes?

A. Els ratolins knock-out són portadors d'un transgen que els confereix una nova funció.

B. El sistema de recombinació específica Cre-loxP permet aconseguir ratolins knock-out condicionals.

C. Les seqüències loxP permeten l'eliminació de seqüències específiques del genoma, així com la inserció de noves seqüències en punts específics del genoma.

D. Per tal d'eliminar seqüències específiques mitjançant el sistema Cre-loxP, cal que estiguin delimitades per seqüències loxP en la mateixa orientació.

23. Quina o quines de les següents frases són correctes?

A. La única possibilitat de teràpia gènica del càncer és in vivo.

B. Actualment, els únics gens manipulats en els protocols de teràpia gènica del càncer són oncogens i supressors de tumors.

C. La vacunació contra les cèl·lules canceroses mitjançant teràpia gènica es pot aconseguir aplicant teràpies tant ex vivo com in vivo.

D. Els protocols de teràpia gènica ex vivo del càncer contemplen tant la

manipulació de tumors com de no tumors.

24. Quina o quines de les següents tècniques permeten la manipulació de genomes de mamífers mitjançant gene targeting?

- A. Microinjecció de pronúclis de cigots.
- B. Electroporació de cèl·lules embrionàries totipotents (stem cells).
- C. Transfecció amb retrovirus de cèl·lules fetals i posterior transferència dels seus núclis a cigots anucleats.
- D. Lipofecció d'embrions de 4 a 8 cèl·lules.

25. Quina o quines de les següents afirmacions són correctes?

- A. Els oligonucleòtids antisentit usualment emprats amb finalitat terapèutica consten d'un mínim de 40 nucleòtids fins uns 500 nucleòtids.
- B. Per tal d'aprofitar l'activitat de la RNasa H en la teràpia basada en l'ús de oligonucleòtids antisentit, s'utilitzen oligodesoxirribonucleòtids i no oligorribonucleòtids.
- C. Els oligonucleòtids emprats en una teràpia antisentit estan dissenyats per hibridar amb el DNA.
- D. Els oligonucleòtids antisentit es poden administrar als pacients com un medicament.

Links

Material per l'alumne

Última actualización 11/10/2001