

TECNOLOGÍA DEL DNA RECOMBINANTE. PROGRAMA (curs 2002/03)

Profesores: Dra. M. Carmen Martínez y Dr. Jaume Piñol
Prof. contacte: Carmen Martínez: carmen.martinez@uab.es

- Introducción. Técnicas básicas de la tecnología del DNA recombinante: electroforesis, Northern y Southern blot, transformación, secuenciación. Enzimas utilizados en la tecnología del DNA recombinante. Corte y unión de moléculas de DNA. Adaptadores y linkers. Mapas de restricción. Reacción de PCR.
- Características generales de los vectores de clonaje. Vectores basados en plásmidos. Vectores basados en fago ?. Vectores basados en fagos filamentosos. Cósmidos.
- Construcción y rastreo de bancos de cDNA. Síntesis del cDNA. Vectores utilizados en la construcción de bancos de cDNA. Bancos de sustracción de cDNA. Representatividad. Rastreo de bancos de cDNA.
- Bancos de DNA genómico. Vectores de sustitución. Cósmidos. Cepas huésped. Estrategias para la obtención de bancos de DNA genómico. Representatividad. Rastreo de bancos de DNA genómico. Walking. Jumping.
- Estrategias de clonaje en E. coli. Plásmidos como vectores de clonaje en E. coli. Principales métodos de transformación. Uso de colifagos filamentosos. Fagémidos. Utilización de genes "reporter". Sistemas de integración por recombinación. Síntesis in vitro de RNA. Principales cepas huésped.
- Clonaje en bacterias diferentes de E. coli. Vectores de amplio rango de huésped para el clonaje en bacterias gram negativas. Grupos de incompatibilidad y uso de los mismos. Transformación. Los transposones como vectores de amplio rango de huésped. Vectores suicidas. Clonaje en B. subtilis y otras bacterias gram positivas. Vectores lanzadera.
- Clonaje en levaduras. Clonaje en S. cerevisiae: transformación, tipos de vectores, expresión de proteínas recombinantes, método de los "dos híbridos" para detectar interacciones proteína-proteína. Clonaje en otros tipos de levaduras.
- Clonaje en eucariotas superiores. Vectores y métodos de transformación. Factores de selección. Genes "reporter". Recombinación homóloga. Sistema de expresión en oocitos de Xenopus. Obtención de plantas transgénicas. Obtención de animales transgénicos.
- Mutagénesis in vitro. Concepto y usos. Mutaciones silenciosas. Mutagénesis dirigida y principales técnicas para su realización: mutagénesis por cassette, extensión de un cebador o mediante PCR. Deleciones unidireccionales. Mutaciones aleatorias. DNA shuffling. Análisis mutacionales sistemáticos.
- Expresión de proteínas recombinantes. Factores que afectan a la expresión de los genes clonados en E. coli. Optimización de la expresión de proteínas recombinantes. Genes sintéticos. Proteínas de fusión. Phage display. Sistemas de integración en el cromosoma huésped. Principales vectores de expresión. Expresión de proteínas recombinantes en microorganismos diferentes de E. coli.
- Identificación y caracterización de genes. Transposon tagging. RFLPs y clonaje posicional. Deleción por reemplazo génico: "knock out". Sistemas de traducción in vitro

BIBLIOGRAFÍA

- Recombinant DNA. 2ª Ed. JD Watson, M Gilman, J Witkowski, and M Zoller. Ed. Freeman 1992
- Principles of gene manipulation 5ª Ed. RW Old and SB Primrose. Ed. Blackwell 1994
- Molecular Biotechnology 2ª Ed. Glick y Pasternak. ASM Press 1998
- Genes VI. B Lewin. Ed. Wiley
- Molecular cloning. A laboratory manual. 2ª Ed. Sambrook, Fritsch and Maniatis. CSHL Press 1989
- Current Protocols in Molecular Biology. Ausubel et al. J. Wiley 1998