

## ENGINYERIA GENÈTICA MOLECULAR. PROGRAMA CURS 2007-08.

Dra. M.C. Martínez y Dr. J. Pinyol. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

### TEMARI

**1.- Introducció.** Tècniques bàsiques de la tecnologia del DNA recombinant: electroforesi, Southern i Northern blot, hibridació, seqüenciació. Marcatge de sondes. Enzims utilitzats en DNA recombinant. Tall i unió de molècules de DNA. Adaptadors i "linkers". Mapes de restricció. Reacció de PCR.

**2.- Característiques generals dels vectors de clonatge.** Vectors basats en plàsmids. Grups d'incompatibilitat. Vectors basats en el fag lambda. Vectors basats en fags filamentosos.

**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. Rastreig de bancs de cDNA. Bancs de substracció de cDNA. Arrays.

**4.- Bancs de DNA genòmic.** Concepte general. Representativitat. Estratègies per a l'obtenció de bancs de DNA genòmic. Vectors de substitució. Còsmids. BACS, PACS i YACS. Rastreig de bancs de DNA genòmic. Walking i obtenció de sondes. Jumping.

**5.- Estratègies de clonatge a *E. coli*.** Plàsmids com a vectors de clonatge a *E. coli*. Utilització de gens "reporter". Principals mètodes de transformació. Fagèmids i principals soques hoste. Clonatge de productes de PCR. Sistemes d'integració per recombinació.

**6.- 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. DNA shuffling. Anàlisis mutacionals sistemàtics.

**7.- Expressió de proteïnes recombinants a *E. coli*.** Factors que afecten l'expressió dels gens clonats a *E. coli*. Optimització de l'expressió de proteïnes recombinants. Gens sintètics. Proteïnes de fusió. "Phage display". Principals vectors d'expressió. Sistemes d'integració en el cromosoma hoste. Sistemes de traducció *in vitro*.

**8.- Clonatge en bacteries diferents d'*E. coli*.** Vectors d'ampli rang d'hoste pel clonatge a bacteris Gram negatius. Grups d'incompatibilitat i utilització dels mateixos. Transformació per transposició i transformació per recombinació homòloga. Els transposons com a vectors d'ampli rang d'hoste. Vectors suïcides. "Transposon tagging". Marcadors de contraselecció. Clonatge en *B. subtilis* i altres bacteris Gram positius.

**9.- Clonatge en llevats.** Clonatge en *S. cerevisiae*: transformació, tipus de vectors i expressió de proteïnes recombinants. Mètode del "two hybrid" per detectar interaccions proteïna-proteïna. Clonatge en altres tipus de llevats.

**10.- Clonatge en eucariotes superiors.** Vectors i mètodes de transformació. Factors de selecció. Gens "reporter". Recombinació homòloga. Sistema d'expressió en oòcits de *Xenopus laevis*. Obtenció de plantes transgèniques. Obtenció d'animals transgènics.

## **BIBLIOGRAFIA**

- **Principles of gene manipulation** 6<sup>a</sup> Ed.

RW Old, RM Twyman and SB Primrose. Ed. Blackwell 2003

- **Molecular Biotechnology** 2<sup>a</sup> Ed

Glick y Pasternak. ASM Press 1998

- **Recombinant DNA.** 2<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> Ed

J Sambrook i DW Russell. CSHL Press 2001