

Tecnología del DNA recombinante

Código: 100856
Créditos ECTS: 3

Titulación	Tipo	Curso	Semestre
2500252 Bioquímica	OB	3	1

Contacto

Nombre: Inmaculada Ponte Marull

Correo electrónico: Inma.Ponte@uab.cat

Uso de idiomas

Lengua vehicular mayoritaria: español (spa)

Algún grupo íntegramente en inglés: No

Algún grupo íntegramente en catalán: No

Algún grupo íntegramente en español: Sí

Prerequisitos

No hay prerrequisitos oficiales. Sin embargo, se supone que el estudiante ha adquirido los conocimientos básicos de Biología Molecular impartidos en asignaturas previas del grado de Bioquímica.

Objetivos y contextualización

La tecnología del DNA recombinante incluye un conjunto de metodologías desarrolladas a partir de 1970-1980. Estas metodologías son hoy una herramienta básica en muchos laboratorios de Bioquímica y han permitido en los últimos años un avance muy importante en el conocimiento de la estructura y la función de las biomoléculas. En esta asignatura se presentarán los fundamentos de esta tecnología. El objetivo general de la asignatura es dar los conocimientos necesarios para el seguimiento de otras asignaturas del grado de Bioquímica así como el de proporcionar una base sólida que permita al alumno iniciarse en estas metodologías durante su futuro profesional.

Objetivos concretos de la asignatura:

- Conocer y saber aplicar las técnicas básicas del DNA recombinante: Marcaje de acidos nucleicos, Southern y Northern blots, hibridación in situ, arrays, secuenciación, uso de enzimas de restricción, reacción de PCR, tecnología basada en els sistema CRISPR.
- Describir los principales vectores de clonación en Escherichia coli, conocer sus características y saber cómo aplicarlas en las diferentes estrategias para la clonación de fragmentos de DNA.
- Comprender las estrategias para la construcción de genotecas y su utilización para el estudio de genes y genomas. Entender los conceptos básicos para la construcción de genotecas: representatividad (genoma), complejidad y abundancia (cDNA). Diferencias entre las genotecas clásicas y las diseñadas para la secuenciación masiva. Descirure algunas de las tecnologías de secuenciación masiva.
- Conocer la metodología para la expresión de proteínas recombinantes y para la mutagénesis dirigida.

Contenido

Tema 1.- Técnicas básicas en la tecnología del DNA recombinante. Enzimas utilizados en DNA recombinante: enzimas de restricción, polimerasas, exonucleasas, ligasas, transcriptasa inversa y síntesis de cDNA. Secuenciació de DNA (Sanger). Tecnologías basadas en el sistema del CRISPR.

Tema 2. Técnicas de hibridación. Desnaturalización del DNA y hibridación molecular. Concepto de T_m y severidad de hibridación. Tipos de marcaje. Southern, Northern blot y sus aplicaciones. Técnicas de hibridación sin separación electroforética: Dot-Blot, hibridación in situ, Fish. Técnicas de hibridación masiva: Microarrays.

Tema 3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Introducción. Diseño y optimización de la reacción. Aplicaciones. RT-PCR. PCR cuantitativa (PCR en tiempo real).

Tema 4.-Clonación. Esquema general de la clonación. Compatibilidad de extremos adaptadores y "linkers". Ligación. Transformación bacteriana. Detección de clones recombinantes. Características generales de los vectores de clonaje: plásmidos y bacteriófagos. Algunos ejemplos de los vectores tipo plásmidos. Vectores específicos por sistemas alternativos de clonación: sistemas de integración por recombinación, sistemas de clonación basados en la topoisomerasa.

Tema 5: Librerías de cDNA. Estrategias para la construcción de librerías de cDNA. Concepto de abundancia y complejidad de mRNA. Síntesis de cDNA. Principales vectores utilizados en la construcción de librerías de cDNA. Rastreo de bancos de cDNA. RT-PCR/ RNA-seq como alternativa a las librerías de cDNA. Otros métodos para la detección y estudio de los mRNA: "Expressed sequence tags (ESTs)"y /o RNAseq.

Tema 6: Librerías de DNA genómico vs proyectos genoma (secuenciación masiva del DNA). Concepto de Representatividad. Estrategias para la obtención de librerías de DNA genómico. Vectores utilizados en las librerías de DNA genómico: lambda de sustitución, cósmidos, BACS y YACS. "Walking" y obtención de sondas (PCR inverso). Estrategias y técnicas para la secuenciación masiva de ácidos nucleicos (NGS).

Tema 7.- Expresión de proteínas recombinantes a E. coli. Factores que afectan la expresión de los genes clonados en E. coli. Principales vectores de expresiones. Optimización de la expresión de proteínas recombinantes. "Phage display". Proteínas de fusión. Sistemas de traducción in vitro. Mutagenesis dirigida concepto y principales técnicas para su realización.

Tema 8.- Clonaje en levaduras. Clonaje en S. cerevisiae: transformación, tipología de vectores y expresiones de proteínas recombinantes. Método del "doble-híbrido" para detectar interacciones proteína-proteína.