

Tecnologia del DNA recombinant

Codi: 100856

Crèdits: 3

Titulació	Tipus	Curs	Semestre
2500252 Bioquímica	OB	3	1

Professor/a de contacte

Nom: Inmaculada Ponte Marull

Correu electrònic: Inma.Ponte@uab.cat

Utilització d'idiomes a l'assignatura

Llengua vehicular majoritària: espanyol (spa)

Grup íntegre en anglès: No

Grup íntegre en català: No

Grup íntegre en espanyol: Sí

Prerequisits

No hi ha prerequisits oficials. Tot i això, se suposa que l'estudiant ha adquirit els coneixements bàsics de Biologia Molecular impartits en assignatures prèvies del grau de Bioquímica.

Objectius

La tecnologia del DNA recombinant inclou un conjunt de metodologies desenvolupades a partir de 1970-1980. Aquestes metodologies són avui una eina bàsica en molts laboratoris de Bioquímica i han permès en els darrers anys un avenç molt important en el coneixement de l'estructura i la funció de les biomolècules. En aquesta assignatura es presentaran els fonaments d'aquesta tecnologia. L'objectiu general de l'assignatura és donar els coneixements necessaris per al seguiment d'altres assignatures del grau de Bioquímica així com el de proporcionar una base sòlida que permeti a l'alumne iniciar-se en aquestes metodologies durant el seu futur professional.

Objectius concrets de l'assignatura:

- Conèixer i saber aplicar les tècniques bàsiques del DNA recombinant: Marcatge de àcids nucleics, Southern i Northern blots, hibridació, arrays, seqüenciació, ús d'enzims de restricció, reacció de PCR, tecnologia basada en el sistema CRISPR.
- 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. Entendre els conceptes bàsics per la construcció de genoteques: representativitat (genoma), complexitat i abundància (cDNA). Diferències entre les genoteques clàssiques i les dissenyades per la seqüenciació massiva. Descriure algunes de les tecnologies de seqüenciació massiva.
- Conèixer la metodologia per a la expressió de proteïnes recombinants i per a la mutagènesi dirigida.

Competències

- Aplicar els recursos informàtics per a la comunicació, la recerca d'informació, el tractament de dades i el càlcul.

- Aplicar les tècniques principals d'utilització en sistemes biològics: mètodes de separació i caracterització de biomolècules, cultius cel·lulars, tècniques de DNA i proteïnes recombinants, tècniques immunològiques, tècniques de microscòpia...
- Col·laborar amb altres companys de treball.
- Interpretar resultats experimentals i identificar elements consistents i inconsistents.
- Llegir textos especialitzats tant a llengua anglesa com a les llengües pròpies.
- Saber fer una presentació oral, escrita i visual del seu treball a una audiència professional i no professional en anglès i entendre el llenguatge i propostes d'altres especialistes.

Resultats d'aprenentatge

1. Aplicar els recursos informàtics per a la comunicació, la recerca d'informació, el tractament de dades i el càlcul.
2. Aplicar les tècniques bàsiques de la tecnologia del DNA recombinant
3. Col·laborar amb altres companys de treball.
4. Dissenyar el clonació d'un cDNA partint de mRNA per a l'expressió de proteïna recombinant
5. Dissenyar un protocol bàsic per a l'obtenció de mutants d'una proteïna recombinant, la seva expressió i la seva purificació
6. Interpretar resultats experimentals i identificar elements consistents i inconsistents.
7. Llegir textos especialitzats tant a llengua anglesa com a les llengües pròpies.
8. Saber fer una presentació oral, escrita i visual del seu treball a una audiència professional i no professional en anglès i entendre el llenguatge i propostes d'altres especialistes.

Continguts

Tema 1.- Introducció a la tecnologia del DNA recombinant. Concepte general. Enzims utilitzats en DNA recombinant: enzims de restricció, polimerases, exonucleasas, ligases, transcriptasa inversa, Síntesis de cDNA. Sistema CRISPR.

Tema 2. Tècniques d'hibridació Desnaturalització del DNA i hibridació molecular. Concepte de T_m i severitat de hibridació. Tipus de marcatge. Southern i Northern blot i les seves aplicacions. Tècniques de hibridació sense separació electroforètica: Dot-Blot, hibridació in situ, Fish. Tècniques de hibridació massiva: Microarrays.

Tema 3. Reacció en cadena de la polimersa (PCR) Introducció. Disseny i optimització de la reacció. Aplicacions. Tipus: RT-PCR. PCR quantitativa (Real Time PCR).

Tema 4.-Clonació. Esquema general de la clonació. Compatibilitat d'extrems, adaptadors i "linkers". Lligació. Transformació bacteriana. Detecció de clons recombinants. Característiques generals dels vectors de clonatge a *Escherichia coli* : plasmidis i els bacteriòfags. Alguns exemples dels vectors tipus plasmidis. Vectors específics per sistemes alternatius de clonatge: sistemes d'integració per recombinació, sistemes de clonatge basats amb la topoisomerasa.

Tema 5: Llibreries de cDNA versus RT-PCR/RNA-seq. Estratègies per a la construcció de les llibreries, concepte d'abundància i complexitat dels mRNA. Principals vectors utilitzats en la construcció de llibreries de cDNA. Rastreg de llibreries de cDNA. RT-PCR/RNA-seq com alternativa a les llibreries de cDNA.

Tema 6: Llibreries per la seqüenciació genòmica. Construcció i rastreg de llibreries genòmiques versus la secuenciación masiva de genomas (High throughput sequencing). Concepte de representativitat. Estratègies per a l'obtenció de llibreries genòmiques. Vectors utilitzats en les llibreries de DNA genòmic: lambda de substitució, Còsmids, BACS i YACS. Rastreg de llibreries de DNA genòmic. "Walking" i obtenció de sondes (PCR invers). Tecnologies per a la seqüenciació massiva d'àcids nucleics (NGS).

Tema 7.- Expressió de proteïnes recombinants a *E. coli*. Factors importants per l'expressió dels gens clonats a *E. coli*. Principals vectors d'expressió. Optimització de l'expressió de proteïnes recombinants, Proteïnes de fusió. "Phage display". Sistemes de traducció *in vitro*. Mutagènesi dirigida concepte i principals tècniques per a la seva realització.

Tema 8.- Clonatge en llevats. Clonatge en *S. cerevisiae*: transformació, tipus de vectors i expressió de proteïnes recombinants. Mètode del "doble-híbrid" per detectar interaccions proteïna-proteïna.

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

La professora 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 d'aprofundiment per part dels estudiants, mitjançant aprenentatge autònom. Per tal de facilitar aquesta tasca es proporcionarà informació sobre localitzacions a llibres de text, articles, pàgines web, etc.

Classes de problemes

Hi haurà 8 sessions de problemes per grup, 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 un nombre limitat de sessions repartides al llarg del semestre, els professors de problemes exposaran els principis experimentals i de càlcul necessaris per treballar els problemes, explicant les pautes per la seva resolució, i impartint al mateix temps una part de la matèria complementària a les classes de teoria.

Els estudiants treballaran els problemes fora de l'horari de classe, en grups de treball de dos-tres persones que es mantindran durant tot el curs. En algunes de les sessions de problemes cada un dels grups presentarà la resolució de com a mínim un dels problemes treballats de manera autònoma.

Alguna de les sessions de problemes es faran a l'aula d'informàtica.

Activitats formatives

Títol	Hores	ECTS	Resultats d'aprenentatge
Tipus: Dirigides			
Classes de Problemes	8	0,32	1, 2, 3, 8
Classes teòriques	16	0,64	2, 4, 5, 6, 7
Tipus: Autònomes			
Estudi individual	32	1,28	2, 4, 5, 7
Estudi individual de problemes	15	0,6	1, 2, 4, 5, 6

Avaluació

Per tal d'avaluar el nivell d'assimilació dels coneixements així com la capacitat per relacionar conceptes, el raonament crític i altres competències transversals, com capacitat d'avaluar de manera crítica als companys, o capacitat de treballar amb equip, es realitzaran una sèrie d'activitats avaluatives de tipologies diferents que estaran distribuïdes al llarg del curs.

Avaluació mòdul de teoria (65%): Constarà de dues activitats avaluatives de tipologies diferents.

1) Avaluació individual mitjançant una prova escrita de preguntes tipus test (resposta múltiples) (35%)

2) Avaluació individual mitjançant una prova escrita basada en preguntes curtes formulades: (a) sobre aspectes individuals específics, (b) sobre aspectes de relació entre diversos apartats del programa i (c) utilització dels coneixements per interpretar resultats experimentals i/o proposar les tècniques més adients per arribar als objectius plantejats a la pregunta (30%)

No hi haurà nota mínima per promitjar entre les dues proves. Els alumnes que no superin el conjunt de les dues proves amb una nota igual o superior a 4 podran recuperar-les en la data programada per l'examen de recuperació al final del semestre. Per participar a la recuperació, l'alumnat ha d'haver estat prèviament avaluat en un conjunt d'activitats el pes de les quals equivalgui a un mínim de dues terceres parts de la qualificació total de l'assignatura o mòdul.

Avaluació mòdul de problemes (35%). Aquest mòdul consta també de dues activitats avaluatives de tipologies diferents:

1. Avaluació de la resolució dels problemes treballats en equip i exposats a classe (15% de la nota final). Cada vegada que un equip exposa un problema rebrà una qualificació per part del professor. Si un equip no és present a l'aula o es nega a exposar un problema rebrà una qualificació de 0. La qualificació final es calcularà com la mitjana entre les qualificacions dels problemes exposats per un mateix equip. La nota obtinguda serà la mateixa per a tots els membres de l'equip, sempre i quan tots ells hagin preparat i exposat de forma equivalent.

2. Avaluació individual mitjançant una prova escrita (20% del total). Consistirà en la resolució de 1-2 problemes plantejats pel professor de la mateixa tipologia que els treballats durant el desenvolupament de l'activitat formativa de problemes. Els alumnes que no superin aquesta prova amb una nota igual o superior a 4 podran recuperar-la en la data programada per l'examen de recuperació al final del semestre. Per participar a la recuperació, l'alumnat ha d'haver estat prèviament avaluat en un conjunt d'activitats el pes de les quals equivalgui a un mínim de dues terceres parts de la qualificació total de l'assignatura o mòdul.

Consideracions Generals

L'avaluació dels mòduls de Teoria i de Problemes són indestruïbles i per superar l'assignatura l'alumne ha de participar, i ser avaluat dels dos mòduls.

Les proves escrites de teoria i de problemes es faran conjuntament en les dates programades i ja fixades en el calendari.

La nota s'obté per la mitjana ponderada de cada un dels mòduls. Aquest promig ponderat tan sols es podrà fer en el cas que en les avaluacions dels mòduls de teoria i de problemes s'hagi obtingut una nota igual o superior a 4. Si no es compleix aquesta condició, l'assignatura quedarà avaluada amb una qualificació final de com a màxim 4.

Per superar l'assignatura és necessari obtenir una qualificació final igual o superior a 5

L'alumnat obtindrà la qualificació de "No Avaluable" quan les activitats d'avaluació realitzades tinguin una ponderació inferior al 67% en la qualificació final

Els alumnes que vulguin millorar la seva nota podran presentar-se a l'examen de millora de nota al final del semestre, el qual tindrà lloc en la data programada per l'examen de recuperació. L'alumne que es presenti a millorar la nota renuncia a la nota obtinguda les proves escrites que s'hauran realitzat al llarg del curs.

Els alumnes que no puguin assistir a una prova d'avaluació individual per causa justificada i aportin la documentació oficial corresponent al Coordinador de Grau, tindran dret a realitzar la prova en qüestió en un altre data. El Coordinador de Grau vetllarà per la concreció d'aquesta amb el professor de l'assignatura afectada.

Qualsevol aspecte que no estigui contemplat en aquesta guia seguirà la normativa d'avaluació de la Facultat de Biociències.

Activitats d'avaluació

Títol	Pes	Hores	ECTS	Resultats d'aprenentatge
Prova escrita de teoria de preguntes curtes de relacionar	30%	1	0,04	1, 2, 4, 5, 6, 7
Prova escrita de teoria de tipus test	35 %	1	0,04	2, 4, 5, 6, 7
Prova escrita individual de problemes	20 %	1	0,04	1, 2, 4, 5, 6, 7
Resolució dels problemes treballats en equip i exposats a classe	15 %	1	0,04	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8

Bibliografia

La bibliografia i els enllaços web estan actualitzats en l'apartat de Material Docent del Campus Virtual de l'assignatura.