

Tecnologia del DNA recombinant

Codi: 100934

Crèdits: 3

Titulació	Tipus	Curs	Semestre
2500253 Biotecnologia	OB	2	2

Professor/a de contacte

Nom: Jaume Piñol Ribas

Correu electrònic: Jaume.Pinyol@uab.cat

Utilització d'idiomes a l'assignatura

Llengua vehicular majoritària: català (cat)

Grup íntegre en anglès: No

Grup íntegre en català: Sí

Grup íntegre en espanyol: No

Prerequisits

No hi ha prerequisits oficials.

Objectius

En aquesta assignatura s'introdueix tot un conjunt de metodologies i eines agrupades sota el nom comú de Tecnologia del DNA recombinant. Aquestes metodologies, que es van començar a desenvolupar a finals del segle passat, són ara un dels pilars de la Biotecnologia moderna. L'objectiu general de l'assignatura és donar una base sòlida que permeti l'alumne aplicar aquestes metodologies en el disseny de processos biotecnològics. D'altra banda, també s'introduiran els conceptes i coneixements necessaris per al seguiment d'assignatures més especialitzades dels últims cursos del grau de Biotecnologia. Els aspectes pràctics d'aquesta assignatura es tracten en els Laboratoris Integrats 4 i 5.

Objectius concrets

- Conèixer i saber aplicar les tècniques bàsiques del DNA recombinant i enginyeria d'àcids nucleics: eines enzimàtiques (restrictases, polimerases, quinases, fosfatases, lligases, topoisomerases, recombinases específiques de lloc i nucleases no específiques de seqüència), diferents tipus de reaccions de PCR, construcció de sondes, Southern i Northern blot.
- Descriure els principals vectors de clonatge, conèixer les seves característiques principals i saber com utilitzar-los en les diferents estratègies per al clonatge de fragments de DNA.
- Comprendre les estratègies per a la construcció de genoteques i la seva utilització per a estudi de gens i genomes.
- Conèixer els fonaments i principals aplicacions de les noves tecnologies per a la seqüenciació massiva d'àcids nucleics (Next Generation Sequencing).
- Descriure les principals aplicacions del DNA recombinant per a l'obtenció de mutacions: mutagènesi dirigida, mutagènesi a l'atzar i mètodes d'evolució molecular dirigida.
- Conèixer la metodologia per a l'expressió de proteïnes recombinants.

Competències

- Aplicar les principals tècniques associades a l'ús de sistemes biològics: DNA recombinant i clonació, cultius cel·lulars, manipulació de virus, bacteris i cèl·lules animals i vegetals, tècniques immunològiques, tècniques de microscòpia, proteïnes recombinants i mètodes de separació i caracterització de biomolècules.
- Llegir textos especialitzats tant a llengua anglesa com a les llengües pròpies.
- Pensar d'una forma integrada i abordar els problemes des de diferents perspectives.
- Treballar de forma individual i en equip.

Resultats d'aprenentatge

1. Descriure i aplicar els diferents mètodes per a l'obtenció de mutants d'una proteïna recombinant i la seva purificació.
2. Descriure les estratègies utilitzades per a la modificació del genoma de diferents organismes.
3. Dissenyar estratègies per a la seqüenciació de genomes.
4. Dissenyar i executar el clonatge de cDNAs per a l'anàlisi de l'expressió gènica i per a l'expressió de proteïnes recombinants.
5. Dominar els mètodes bàsics de la tecnologia del DNA recombinant .
6. Llegir textos especialitzats tant a llengua anglesa com a les llengües pròpies.
7. Pensar d'una forma integrada i abordar els problemes des de diferents perspectives.
8. Treballar de forma individual i en equip.

Continguts

TEORIA

Tema 1. Tècniques bàsiques de la Tecnologia del DNA recombinant.

Objectius de la Tecnologia del DNA recombinant. Enzims utilitzats en DNA recombinant: enzims de restricció, polimerases, lligases. Mapes de restricció de DNA. Adaptadors i "linkers". Mètode de Sanger per a la seqüenciació de DNA. Desnaturalització del DNA i hibridació molecular. Reacció de PCR. Southern blot, Northern blot i les seves aplicacions.

Tema 2. Clonatge a *Escherichia coli*.

Plasmidis i fags com a vectors de clonatge a *E. coli*. Principals mètodes de transformació. Fagèmids i principals soques hoste. Sistemes d'integració per recombinació. Clonatge de productes de PCR.

Tema 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. Sistema de excisió in vivo en fag lambda. Rastreig de bancs de cDNA. RT-PCR com alternativa als bancs de cDNA. Amplificació ràpida dels extrems del cDNA. Bancs de subtracció de cDNA. "Expressed sequence tags (ESTs)". Arrays: classes i quantificació dels resultats.

Tema 4. Bancs de DNA genòmic. Concepte general. Representativitat. Estratègies per a l'obtenció de bancs de DNA genòmic. Vectors de substitució. Còsmids i Fòsmids, BACS i YACS. Rastreig de bancs de DNA genòmic. Walking i obtenció de sondes. Ordenació de contigs. Tecnologies per a la seqüenciació massiva d'àcids nucleics (NGS). Principals aplicacions de les tecnologies NGS.

Tema 5. 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. Evolució molecular dirigida: "DNA shuffling" i tècniques relacionades.

Tema 6. Expressió de proteïnes recombinants.

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

Tema 7. Clonatge en llevats.

Clonatge en *Saccharomyces cerevisiae*: transformació, tipus de vectors i expressió de proteïnes recombinants. Mètode del "two-hybrid" per detectar interaccions proteïna-proteïna. Altres llevats d'interès biotecnològic.

PRÀCTIQUES D'AULA

El contingut d'aquest apartat, que es lliurarà en forma de dossier al començament del semestre, consisteix en una quantitat determinada d'enunciats d'exercicis i problemes relacionats amb els temes desenvolupats a Teoria.

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

El professor explicarà el contingut del temari amb el suport de material audiovisual que estarà a disposició dels estudiants al Campus Virtual de l'assignatura. 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 de aprofundiment per part dels estudiants, mitjançant aprenentatge autònom. Per tal de facilitar aquesta tasca es proporcionarà informació sobre localitzacions a llibres de text, pàgines web, etc.

Pràctiques d'aula

Hi haurà 8 sessions de pràctiques d'aula, en les dates 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 d'exercicis i problemes de l'assignatura que s'aniran resolent al llarg de les sessions. En aquestes sessions el professor de problemes exposarà els principis experimentals i de càlcul necessaris per treballar els problemes, explicant les pautes per la seva resolució i reforçant mateix temps els coneixements de diferents parts de la matèria de les classes de teoria. Per al bon funcionament de les pràctiques d'aula es requereix la participació activa de l'alumnat i que aquest intente preparar amb antelació els problemes de cada sessió.

Activitats formatives

Títol	Hores	ECTS	Resultats d'aprenentatge
Tipus: Dirigides			
Classes de teoria	17	0,68	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8
Pràctiques d'aula	8	0,32	1, 4, 5, 7, 8
Tipus: Autònomes			
Estudi i treball individual per a la resolució de exercicis pautats	44	1,76	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8

Avaluació

L'assignatura s'avaluarà de forma continuada durant el curs. El 10% de la qualificació global es calcularà a partir la quantitat i qualitat de les aportacions fetes per cada alumne al fòrum de l'assignatura. També es realitzaran dos exàmens. El primer tindrà un pes del 50% en la qualificació global i serà un prova tipus test que també podrà incloure preguntes curtes i que avaluarà fonamentalment els continguts de les classes de teoria. La segona prova, amb un pes del 40% en la qualificació global, serà un examen de pràctiques d'aula i l'alumne haurà de resoldre diferents exercicis i/o problemes similars als realitzats durant les classes de pràctiques.

En el cas que l'alumne no superi l'assignatura podrà presentar-se a les proves de recuperació. No obstant, 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. La primera prova de recuperació consistirà en un examen tipus test que també podrà incloure preguntes curtes i que avaluarà fonamentalment els continguts de les classes de teoria. La segona prova de recuperació serà un examen de pràctiques d'aula i l'alumne haurà de resoldre diferents exercicis i/o problemes similars als realitzats durant les classes de pràctiques d'aula. Les proves de recuperació estaran obertes a qualsevol estudiant que desitgi millorar la nota obtinguda. La presentació a l'examen de recuperació per millorar nota no suposa la renúncia de la nota prèvia. No es podrà recuperar la nota obtinguda en la participació al fòrum de l'assignatura.

La qualificació global de l'assignatura es calcularà de la següent manera:

- 50% de l'examen de teoria (o de la recuperació del mateix si s'escau).
- 40% de l'examen de pràctiques d'aula (o de la recuperació del mateix si s'escau).
- 10% de la participació al fòrum de l'assignatura.

No es demanaran notes mínimes per a poder promitjar cada una de les activitats d'avaluació. Per tal de superar l'assignatura, l'alumne haurà d'assolir al menys una qualificació global de 5,0. L'alumnat obtindrà la qualificació de "No Avaluable" quan les activitats d'avaluació realitzades tinguin una ponderació inferior al 67% en la qualificació final.

Activitats d'avaluació

Títol	Pes	Hores	ECTS	Resultats d'aprenentatge
Examen de pràctiques d'aula	40%	2,5	0,1	1, 3, 5, 6, 7, 8
Examen de teoria	50%	1	0,04	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
Participació al fòrum de l'assignatura	10%	2,5	0,1	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8

Bibliografia

La bibliografia es proporcionarà actualitzada al campus virtual de l'assignatura