

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: català (cat)
Grup íntegre en anglès: No
Grup íntegre en català: No
Grup íntegre en espanyol: No

Equip docent

Josep Antoni Perez Pons

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 d'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

- Actuar amb responsabilitat ètica i amb respecte pels drets i deures fonamentals, la diversitat i els valors democràtics.
- Actuar en l'àmbit de coneixement propi avaluant les desigualtats per raó de sexe/gènere.
- Actuar en l'àmbit de coneixement propi valorant l'impacte social, econòmic i mediambiental.
- 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...
- Interpretar resultats experimentals i identificar elements consistents i inconsistents.
- Introduir canvis en els mètodes i els processos de l'àmbit de coneixement per donar respostes innovadores a les necessitats i demandes de la societat.
- Llegir textos especialitzats tant a llengua anglesa com a les llengües pròpies.

Resultats d'aprenentatge

1. Actuar amb responsabilitat ètica i amb respecte pels drets i deures fonamentals, la diversitat i els valors democràtics.
2. Actuar en l'àmbit de coneixement propi avaluant les desigualtats per raó de sexe/gènere.
3. Actuar en l'àmbit de coneixement propi valorant l'impacte social, econòmic i mediambiental.
4. Aplicar els recursos informàtics per a la comunicació, la recerca d'informació, el tractament de dades i el càlcul.
5. Aplicar les tècniques bàsiques de la tecnologia del DNA recombinant
6. Dissenyar el clonació d'un cDNA partint de mRNA per a l'expressió de proteïna recombinant
7. Dissenyar un protocol bàsic per a l'obtenció de mutants d'una proteïna recombinant, la seva expressió i la seva purificació
8. Interpretar resultats experimentals i identificar elements consistents i inconsistents.
9. Introduir canvis en els mètodes i els processos de l'àmbit de coneixement per donar respostes innovadores a les necessitats i demandes de la societat.
10. Llegir textos especialitzats tant a llengua anglesa com a les llengües pròpies.

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 d'hibridació. Tipus de marcatge. Southern i Northern blot i les seves aplicacions. Tècniques d'hibridació sense separació electroforètica: Dot-Blot, hibridació *in situ*, Fish. Tècniques d'hibridació massiva: Microarrays.

Tema 3. Reacció en cadena de la polimerasa (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 en 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 a alternativa a les llibreries de cDNA.

Tema 6. Llibreries per la seqüenciació genòmica. Construcció i rastreg de llibreries genòmiques versus la seqüenciació massiva de genomes (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. Rastreig 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. Sistemes de traducció *in vitro*. Mutagènesi dirigida (Conceptes i mètodes) vs Evolució Molecular ("Phage display").

Tema 8. Clonatge i expressió de proteïnes 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. Per aquestes sessions, el grup de teoria es dividirà en dos subgrups (A i B), les llistes dels quals es faran públiques a començaments de curs. Els estudiants assistiran a les sessions programades per al seu grup. A començaments de semestre es lliurarà a través del Campus Virtual un dossier amb els enunciats dels problemes, que seran resolts pel professor de forma raonada i, si s'escau, complementant part de la matèria impartida a les classes de teoria.

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

Nota: es reservaran 15 minuts d'una classe, dins del calendari establert pel centre/titulació, per a la complementació per part de l'alumnat de les enquestes d'avaluació de l'actuació del professorat i d'avaluació de l'assignatura/mòdul.

Activitats formatives

Títol	Hores	ECTS	Resultats d'aprenentatge
Tipus: Dirigides			
Classes de Problemes	8	0,32	4, 5
Classes teòriques	16	0,64	5, 6, 7, 8, 10
Tipus: Autònomes			

Estudi autònom de problemes	15	0,6	4, 5, 6, 7, 8
Estudi individual (teoria)	32	1,28	5, 6, 7, 10

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 (70%): 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 o proposar les tècniques més adients per arribar als objectius plantejats a la pregunta (35%)

No hi haurà nota mínima per fer la mitjana 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 en 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 (30%).

Avaluació individual mitjançant una prova escrita. Consistirà en la resolució de 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 en 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. Aquesta mitjana ponderada 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 realitzades 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 dia. 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	35%	1,5	0,06	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
Prova escrita de teoria de tipus test	35 %	1	0,04	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
Prova escrita individual de problemes	30 %	1,5	0,06	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10

Bibliografia

1) [Gene Cloning and DNA Analysis : An Introduction](#) T. A. Brown;T. A. Brown eBook | 2016

<https://login.are.uab.cat/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsebk&AN=1081525>

2) [MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, PRINCIPLES AND APPLICATIONS OF RECOMBINANT DNA](#) Harris, Bernadette;Harris, BernadetteeBook | 2018

<https://login.are.uab.cat/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsebk&AN=2267894>

3) Nicholl, Desmond S. T. An Introduction to genetic engineering eBook | 2008

<https://login.are.uab.cat/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsebk&AN=304648&>

4) S. B. Primrose and R. M. Twyman Principles of gene manipulation and genomics /, SEVENTH EDITION, eBook | 2006

<https://login.are.uab.cat/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsebk&AN=274676&>

5) H. Freeman. Recombinant DNA : genes and genomes - a short course, 2007

6) J. Perera, Julián. Ingeniería genética 2002

Programari

Microsoft Word, PowerPoint, Excel

Disney Primers: Serial Cloner 2.6, NetPrimer, Primer3Plus, Primer-BLAST, PrimerX.