

**FITXA IDENTIFICATIVA****Dades de l'Assignatura**

Codi	33178
Nom	Mètodes en biologia molecular i enginyeria genètica
Cicle	Grau
Crèdits ECTS	4.5
Curs acadèmic	2024 - 2025

Titulació/titulacions

Titulació	Centre	Curs	Període
1102 - Grau Biotecnologia	Facultat de Ciències Biològiques	3	Segon quadrimestre

Matèries

Titulació	Matèria	Caràcter
1102 - Grau Biotecnologia	86 - Metodologia Cel·lular i Molecular	Obligatòria

Coordinació

Nom	Departament
ALEPUZ MARTINEZ, ELIA PAULA	30 - Bioquímica i Biologia Molecular
OLMO MUÑOZ, MARCEL·LI DEL	30 - Bioquímica i Biologia Molecular

RESUM

Amb aquesta assignatura es pretén que els alumnes puguin adquirir els coneixements conceptuals i metodològics bàsics relatius a:

- (1) Les eines bàsiques per a l'anàlisi d'àcids nucleics.
- (2) Desenvolupament de les eines bàsiques per a la clonació.
- (3) Caracterització i modificació de seqüències de DNA i manipulació del DNA a gran escala.
- (4) Seqüenciació genòmica. Combinació de mètodes de seqüenciació automatitzats massius i tècniques bioinformàtiques per abordar la seqüenciació de genomes complets.
- (5) Altres tècniques d'ampli ús en Biologia Molecular com fusions gèniques, mètodes d'anàlisi d'interacció entre proteïnes i entre proteïnes i àcids nucleics, etc ..



CONEXIMENTS PREVIS

Relació amb altres assignatures de la mateixa titulació

No heu especificat les restriccions de matrícula amb altres assignatures del pla d'estudis.

Altres tipus de requisits

Els estudiants haurien d'haver cursat durant el quadrimestre anterior (o en cursos anteriors) l'assignatura de Biologia Molecular, per tal d'entendre adequadament els continguts d'aquesta matèria.

1102 - Grau Biotecnología

- Manejar adequadament els equips i el material propi d'un laboratori de bioquímica i biologia molecular.
- Saber realitzar anàlisis d'expressió gènica.
- Ser capaç de dissenyar protocols i utilitzar les tècniques del DNA recombinant.

Es pretén que després d'haver cursat aquesta assignatura, els estudiants coneguen les tècniques bàsiques que s'utilitzen per als estudis d'expressió gènica i per a la manipulació del material genètic.

DESCRIPCIÓ DE CONTINGUTS

1. Tema 1. Què és la tecnologia del DNA recombinant?

Introducció històrica. Concepte de DNA recombinant. Concepte de clonació. L'impacte de la tecnologia del DNA recombinant: emergència de la biotecnologia molecular.

2. Temes 2,3. Tècniques generals

Tema 2. TÈCNIQUES GENERALS I. Enzimologia bàsica utilitzada en la manipulació del DNA. Enzims de restricció i mapes de restricció. DNA-polimerases, lligases, recombinases i altres enzims d'interès. Precipitació i purificació del DNA. Obtenció de plasmidis i altres DNAs.

Tema 3. TÈCNIQUES GENERALS II. Hibridació d'àcids nucleics: Factors que afecten; Etapes del procés; Mètodes d'hibridació. Marcatge de sondes: Directe i indirecte; tipus de marca; Mètodes de síntesi d'una sonda marcada. Síntesi automàtica d'oligonucleòtids. Aplicacions dels oligonucleòtids sintètics. Síntesi de gens complets.

**3. Tema 4. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)**

Característiques de la PCR: amplificació i especificitat. Reacció bàsica: disseny d'encebadors. Anàlisi del producte de PCR: clonació i seqüenciació directa. PCR revers. Amplificació de cDNA: RT-PCR. El PCR com a eina en enginyeria genètica. PCR quantitatiu. Aplicacions del PCR en altres camps. Altres sistemes d'amplificació.

4. Temes 5-8. Enginyeria Genètica

Tema 5. CONSTRUCCIÓ DEL DNA QUIMERA. Estratègies de clonació. Unió de molècules de DNA: unió d'extrems cohesius, unió per addició de prendedors, adaptadors i cues d'homopolímers. Introducció del DNA en cèl·lules de bacteris: mètodes de transformació i transfecció.

Tema 6. VECTORS DE CLONACIÓ EN *E. coli*. Característiques generals d'un vector. Plasmidis. Vectors de clonació basats en plasmidis. Fags. Vectors de clonació basats en el fag M13: vectors de simple cadena. Faguèmids. Vectors de clonació basats en el fag. Còsmids i vectors per a grans inserts. Vectors d'expressió en *E. coli*: promotors bacterians.

Tema 7. Construcció de genoteques. Genoteques genòmiques. Genoteques per a projectes de seqüenciació. Mètodes de síntesi de cDNA. Clons amb extrems 3' o 5' dmRNAs. Genoteques de cDNA. Genoteques de cDNA subret.

Tema 8. SELECCIÓ DE CLONS. Nivells de selecció. Identificació de clons recombinants. Identificació d'un clon específic. Selecció directa. Selecció mitjançant tècniques immunològiques. Selecció mitjançant hibridació amb sondes d'àcids nucleics.

5. Tema 9. Seqüenciació del DNA

Mètodes de seqüenciació. Seqüenciació automàtica. Estratègies per a seqüenciar un fragment de DNA.

6. Tema 10. Modificació de la seqüència del DNA

Mutagènesi in vitro del DNA passatger: delecions, insercions i substitucions. Mutagènesi aleatòria. Mutagènesi dirigida mitjançant l'ús d'oligonucleòtids. Tècniques de mutagènesi dirigida basades en la PCR. Mutagènesi insercional a l'atzar i dirigida.

7. Tema 11. Tècniques de estudi de l'expressió gènica

Detecció i quantificació del transcrit. Ús de gens reporters. Identificació d'elements reguladors de la transcripció. Mapeig de missatgers. Mètodes per a l'anàlisi individual de l'expressió gènica. Anàlisi de l'expressió diferencial de gens. Transcripció in vitro i in vivo. Traducció in vitro.



8. Tema 12. Estudi de la interacció entre macromolècules

Tècniques d'estudi d'interaccions DNA-proteïna: Canvis de mobilitat en gel; Protecció a l'atac de nucleases i agents químics in vitro i in vivo; Interferència per metilació; Entrecruament amb llum UV. Immunoprecipitació de cromatina. Purificació de proteïnes que s'uneixen al DNA. Tècniques d'estudi d'interaccions RNA-proteïna: Assaig de retard en gel; Assaig de protecció a modificacions químiques; Mètodes d'afinitat; Entrecruament per llum UV; Triple híbrid. Tècniques d'estudi d'interaccions Proteïna-proteïna: Purificació de complexos proteics; Doble híbrid; Coimmunoprecipitació; Pull-down de proteïnes etiquetades; Aplicació de proteïnes fluorescents per a la detecció d'interaccions proteiques in vivo.

9. Pràctiques de laboratori

- 1) Construcció d'una genoteca en *Escherichia coli*
- 2) Purificació d'una proteïna de fusió amb GST
- 3) Construcció del mapa de restricció d'un plasmidi
- 4) Disseny d'una estratègia d'edició genètica mitjançant CRISPR per a la disrupció del gen ADE2 del llevat

VOLUM DE TREBALL

ACTIVITAT	Hores	% Presencial
Classes de teoria	29,00	100
Pràctiques en laboratori	16,00	100
Preparació d'activitats d'avaluació	30,00	0
Preparació de classes de teoria	20,00	0
TOTAL	95,00	

METODOLOGIA DOCENT

El desenvolupament de l'assignatura s'estructura en base a sessions teòriques, tutories personals i sessions pràctiques.

1. Sessions teòriques:

En l'apartat de treball presencial, s'inclouen un total de 26 sessions de classes teòriques corresponents a lliçons magistrals, seminaris o classes de qüestions, d'una hora de durada.

Amb anterioritat a cada classe, els estudiants disposaran de tot el material gràfic significatiu que haja de ser presentat, inclòs en la corresponent pàgina web de l'Aula Virtual de la Universitat de València.

D'aquesta manera, es pretén que l'estudiant pugui preparar amb antelació les classes i seguir-les amb comoditat, prenent només les notes necessàries per a la seua apropiada comprensió.

2. Tutories personals:

La funció de les tutories és ajudar i guiar de forma personal l'estudiant en tots els problemes que puguin



sorgir en enfrontar-se a l'estudi de l'assignatura. Faciliten l'intercanvi d'opinions entre el professor i l'estudiant, en un esforç d'aproximació a l'ensenyament individualitzat.

3. Activitats pràctiques:

S'han programat 4-5 sessions de 2-4 hores de durada cadascuna (total de 16 h) sobre diversos aspectes de les tècniques de Biologia Molecular i DNA recombinant que no es contemplen en altres assignatures relacionades i són adaptables a un laboratori de pràctiques.

AVALUACIÓ

L'assistència a les pràctiques és obligatòria i també ho són la resolució d'un qüestionari previ a la seua realització i la presentació d'una memòria al final de les mateixes. Al final del curs es realitzarà un examen per valorar els coneixements adquirits en les classes teòriques i pràctiques. Sobre la nota final la part d'aquest examen corresponent a teoria valdrà un 70%. 20% correspondrà a la valoració de les classes pràctiques mitjançant la memòria de pràctiques (1.6 sobre 2) i el qüestionari previ (0.4 sobre 2). L'altre 10% correspon a activitats que es plantejaran al llarg del curs. Per tal d'aprovar l'assignatura és necessari aprovar l'examen de teoria, les pràctiques i les activitats programades. Si s'aproven les pràctiques o les activitats però se suspengués la teoria, les notes corresponents es guardarien durant el curs següent al qual han sigut realitzades, però a partir d'aquest moment s'hauria de repetir les pràctiques i/o activitats de l'avaluació contínua.

REFERÈNCIES

Bàsiques

- PRIMROSE S.B. y TWYMAN R.M. (2006). "Principles of gene manipulation and Genomics." 7ª ed. Blackwell Publishing.
- GREEN, M.R. y SAMBROOK, J. (2012). Molecular Cloning. A laboratory manual. 4ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (3 volumenes).
- IZQUIERDO, M. (1999). Ingeniería genética y transferencia génica. Ed. Pirámide
- JAIN, M. (2012) Recombinant DNA techniques. Alpha Science International Ltd. Oxford, U.K.
- CLARK, D.P., PAZDERNIK, N.J., MCGEHEE, M.R. (2019) "Molecular Biology". Third Edition. Academic Press (Elsevier), London.

Complementàries

- AUSUBEL, F.M. et al. (1987-). Current protocols in Molecular Biology. John Wiley & sons.
- BROWN, T.A. (2011). Gene cloning and DNA analysis. An introduction. 4ª edició. Ed Blackwell Science
- GLICK, B.R. y PASTERNAK, J.J. (2010). Molecular Biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA. 4ª Ed. ASM Press.



- GLOVER D. M. y HAMES B.D. (1995). DNA cloning (vol 1, 2, 3, 4). A practical approach. IRL Perss
- KREUZER, H. y MASSEY, A. (1996). Recombinant DNA and Biotechnology. A guide for teachers. ASM Press.
- LUQUE, J. y HERRAEZ, A. (2001) Biología Molecular e Ingeniería Genética. Harcourt.
- PERERA, J., TORMO, A. y GARCIA J.L. (2002). Ingeniería genética. Vol.I. y Vol II. Ed. Síntesis.
- WATSON, J.D.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J. y ZOLLER, M. (1992). "Recombinant DNA". 2a ed. Scientific American Books.
- WINNACKER E.L. (ed.) (1987). "From genes to clones". VCH.
- AUSUBEL, F.M. et al. (1987-97). Current protocols in Molecular Biology. John Wiley & sons.
- BIRREN ET AL. (1999). Genome analysis. 4 Volúmenes. Cold Spring Harb. Lab.Press
- DIEFFENBACH, C.W. y DVEKSLER, G.S. (1995). PCR primer. A laboratory manual. Cold Spring Harbor.
- MINGARRO, G., DEL OLMO, M. (2023). Improvements in the genetic editing technologies: CRISPR-Cas and beyond. Gene 852:147064. doi: 101016/j.gene.2022.147064
- SEHGAL, N., SYLVES, M.E., SAHOO, A., CHOW, J., WALKER, S.E., CULLEN, P.J., BERRY, J.O.(2018). CRISPR gene editing in yeast: An experimental protocol for an upper-division undergraduate laboratory course. Biochem. Mol. Biol. Educ. 46:592-601. doi: 10.1002/bmb.21175
- SHORTT, C., KRIPPAEHNE, E., WASKO, B.M. (2023). A simple and accessible CRISPR genome editing laboratory exercise using yeast. microPublication Biology. doi:10.17912/micropub.biology.000699.