

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

Codi	33139
Nom	Enginyeria genètica
Cicle	Grau
Crèdits ECTS	6.0
Curs acadèmic	2022 - 2023

Titulació/titulacions

Titulació	Centre	Curs	Període
1109 - Grau de Bioquímica i Ciències Biomèdiques (2015)	Facultat de Ciències Biològiques	3	Primer quadrimestre

Matèries

Titulació	Matèria	Caràcter
1109 - Grau de Bioquímica i Ciències Biomèdiques (2015)	10 - Mètodes instrumentals	Obligatòria

Coordinació

Nom	Departament
ESTRUCH ROS, FRANCISCO	30 - Bioquímica i Biologia Molecular

RESUM

L'objectiu d'aquesta assignatura és donar les bases teòriques dels mètodes utilitzats en la biologia molecular i en la tecnologia del DNA recombinant, i les seves aplicacions a les àrees de la Biologia Animal i Humana. La part pràctica de l'assignatura pretén familiaritzar l'alumne amb les tècniques d'ús més freqüent en laboratoris que fan servir tècniques de Biologia Molecular i d'Enginyeria Genètica.

CONEIXEMENTS 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

COMPETÈNCIES

1101 - Grau de Bioquímica y Ciències Biomèdiques

- Capacitat per treballar correctament als laboratoris de bioquímica, genètica, biologia molecular i cel·lular, incloent-hi seguretat, manipulació, eliminació de residus i registre anotat d'activitats.
- Capacitat per utilitzar la instrumentació bàsica experimentació molecular i cel·lular.
- Tenir una visió integrada de les tècniques i dels mètodes utilitzats en biociències moleculars i biomedicina.
- Capacitat per dissenyar experiments i aproximacions multidisciplinàries per a la resolució de p r o b l e m e s c o n c r e t s .
- Capacitat per presentar, discutir i traure conclusions dels resultats dels experiments científics.

RESULTATS DE L'APRENTATGE

- Adquisició i comprensió dels coneixements en les tècniques en bioquímica, genètica, biologia molecular i cel·lular.
- Resoldre exercicis teòrics i pràctics.
- Interpretar, presentar i discutir dades i resultats experimentals.
- Disseny d'experiments per resoldre problemes concrets.

DESCRIPCIÓ DE CONTINGUTS

1. Introducció.

Enginyeria Genètica: definicions. Eines de l'Enginyeria Genètica. El DNA recombinant. Desenvolupament històric. Ús responsable de l'Enginyeria Genètica.

2. Obtenció i purificació d'àcids nucleics.

Mètodes ràpids d'obtenció d'àcids nucleics: Obtenció de DNA per PCR de colònia i per adsorció a discos de nitrocel·lulosa. Mètodes clàssics d'obtenció d'àcids nucleics. Etapes. Extracció orgànica. Procediments per a la purificació i / o concentració d'àcids nucleics. Obtenció de plasmidis: la lisi alcalina. Anàlisi quantitativa i qualitativa dels àcids nucleics.



3. Enzimologia bàsica utilitzada en la manipulació del DNA.

Enzims de restricció. Mapes de restricció. Enzims de restricció tipus IIA i IIS. DNA ligases DNA polimerases. Transcriptasa reversa. Polinucleòtido quinasa. Endo i exo-nucleases. Mapeig dels llocs d'inici de transcripció. Fosfatasa alcalina.

4. Vectors bàsics de clonació.

Tipus de vectors de clonació. Plàsmids: tipus i característiques. Els plasmidis com a vectors de clonació. Plàsmids basats en pBR322 i pUC. La complementació alfa. Bacteriòfags. El fag lambda i el fag M13. Fagèmids. Cósmidos. Cromosomes artificials. Vectors bi-funcionals o llançadora. Plàsmids de llevat. Transformació de bacteris i llevats. Transfecció i transducció. Expressió transitòria i permanent. Principals vectors vírics. Adenovirus. Virus adenoassociats. Retrovirus i lentivirus. Elements funcionals en els vectors de transformació / transducció. Mètodes de selecció. Exemples.

5. Obtenció i/o síntesi de fragments específics de DNA.

Generació i unió de fragments de restricció. Generació d'extrems roms jo protuberants. Clonació no-direccional i direccional. Restriccions completes i parcials. Construcció i caracterització de genoteques de DNA genòmic. Síntesi de cDNA. Obtenció de cDNAs complets. Síntesi d'oligonucleòtids. La reacció en cadena de la polimerasa (PCR). Etapes. DNA polimerases termoestables. Tipus de PCR. Amplificació isotèrmica d'àcids nucleics.

6. Estratègies de clonació.

Clonació de fragments de restricció. Clonació de productes de PCR. TA cloning. Addició de seqüències en els extrems d'un fragment de PCR. Genoteques. Tècniques especials de clonació: User assembly. Gibson assembly. Golden Gate. Gateway cloning. Clonació mitjançant recombinació: clonació per recombinació homòloga en llevat: TAR (transformation-associated recombination) cloning. Genòmica sintètica.

7. Producció de proteïnes heteròlogues.

Optimització de l'expressió de gens forans en Escherichia coli. Proteïnes recombinants expressades en cèl·lules eucariotes. Transcripció i traducció in vitro.

8. Seqüenciació de DNA.

Mètodes de seqüenciació. Estratègies per a la seqüenciació d'un fragment de DNA. Nous mètodes d'alta capacitat de seqüenciació (NGS): segona i tercera generació.



9. Identificació de seqüències específiques d'àcids nucleics en mesclcs complexes.

Tècniques d'hibridació. Southern blot.

10. Tècniques d'estudi de l'expressió gènica

Northern blot. Quantificació de transcrits mitjançant PCR. PCR semiquantitativa. PCR a temps real. Sondes. Matrius (arrays) de DNA. RNA seq. Selecció de RNAs poliadenilados. Fragmentació de RNAs. Obtenció de cDNAs. RNA seq de cèl·lules individuals.

11. Modificació de la seqüència de DNA part 1.

Obtenció de col·leccions de mutants. Mutació a l'atzar. Mutagènesi química i mutagènesi insercional. Mutagènesi en llevats i ratolins. Transposons i "Gene Trap". Mutagènesi dirigida. Canvis específics en la seqüència. Disrupcions gèniques. Tècniques de mutagènesi dirigida basada en la PCR. Intercanvi de seqüències silvestres per seqüències mutades in vitro mitjançant recombinació homòloga. Evolució dirigida.

12. Modificació de la seqüència de DNA part 2.

Edició genòmica en organismes complexos. Endonucleases d'alta especificitat. Nucleases dirigides per dits de zinc. TALS. CAS9 / CRISPR.

13. Anàlisi funcional part 1. Anàlisi genètica.

Ús de les genoteques per a la identificació i clonació de gens. Clonació per complementació. Identificació de gens per seqüenciació massiva a partir de col·leccions de mutants generats per RNA d'interferència i CRISPR per la tècnica CRISP / CAS9. Perturb-seq. Identificació i caracterització d'interaccions genètiques. Supressors i modificadors. Letalitat sintètica. Identificació d'interaccions genètiques en llevats i mamífers.

14. Anàlisi funcional part 2. Identificació i caracterització d'interaccions físiques entre macromolècules.

Interaccions proteïna-proteïna: Co-immunoprecipitació de proteïnes. La tècnica TAP. El mètode del doble híbrid. Interaccions proteïna-DNA: Canvis de mobilitat en gel. Protecció a l'atac de nucleases i agents químics in vitro i in vivo. Interferència per metilació. Immunoprecipitació de cromatina (ChIP). Chlp-exo.

**15. Aplicacions.**

Aplicacions terapèutiques. Teràpia Gènica. Gene Drive

16. Transgènesi en animals.

Animals transgènics: obtenció i aplicacions. Manipulació de cèl·lules embrionàries. Micro injecció. Proves de transfecció. Obtenció d'animals clònics.

17. SESSIONS PRÀCTIQUES

Pràctica 1. - Construcció d'una genoteca.

Pràctica 2. - Expressió de proteïnes en Escherichia coli.

Pràctica 3. - Construcció del mapa de restricció d'un plasmidi.

Pràctica 4. - Detecció i caracterització de llevats transgènics.

VOLUM DE TREBALL

ACTIVITAT	Hores	% Presencial
Classes de teoria	40,00	100
Pràctiques en laboratori	16,00	100
Tutories reglades	4,00	100
Preparació de classes de teoria	76,00	0
Preparació de classes pràctiques i de problemes	14,00	0
TOTAL	150,00	

METODOLOGIA DOCENT

El desenvolupament de l'assignatura s'estructura sobre la base de sessions teòriques, tutories personals o a través del correu electrònic.

Sessions teòriques: En l'apartat de treball presencial, s'inclouen un total de 35 sessions de classes teòriques corresponents a lliçons magistrals, seminaris o classes de qüestions, d'una hora de durada. Abans de cada lliçó, els estudiants disposaran de tot el material gràfic significatiu que hagi de ser presentat. Aquest material estarà inclòs en la corresponent pàgina web de l'Aula Virtual de la Universitat de València. D'aquesta manera, es pretén que l'estudiant pugui seguir les classes amb comoditat, prenent solament les notes necessàries per a la seva apropiada comprensió.

Tutories personals: La funció de les tutories és ajudar i guiar de forma personal l'estudiant en tots els problemes que sorgeixin en enfrontar amb 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. Les tecnologies de la informació i de la comunicació també poden utilitzar-se per potenciar la interacció professor-estudiant. En tot cas es prefereix la tutoria presencial, molt més adequada per a l'explicació dels dubtes i qüestions.



Activitats pràctiques: S'han programat 5 sessions de 2 a 4 hores (total 17 h) sobre diversos aspectes de les tècniques de Biologia Molecular i DNA recombinant que són adaptables a un laboratori de pràctiques.

AVALUACIÓ

Es realitzarà un examen per valorar els coneixements adquirits en les classes teòriques i pràctiques.

A la part teòrica li correspon un valor del 85% de la nota final mentre que les pràctiques representaran el 15% (repartides entre la memòria, 7,5%, i una o varies preguntes relacionades amb les pràctiques que s'inclouran en l'examen de l'assignatura, que representaran el 7,5% de la nota). Per aprovar l'assignatura es necessitarà una puntuació mínima de 4,5 punts sobre els 9,25 punts de l'examen (8,5 punts de la part de teoria i 0,75 punts de les qüestions de pràctiques).

Es valoraran addicionalment (fins 0.5 punts) les presentació voluntària de les respostes a les qüestions plantejades pel professor en sessions de tutories.

L'assistència a les pràctiques és obligatòria i també ho és la presentació de la memòria. En cas de no aprovar l'assignatura, la nota de pràctiques corresponent a la memòria i a les qüestions de l'examen es podrà conservar per la convocatòria o el curs següent.

REFERÈNCIES

Bàsiques

- En este apartado se incluyen únicamente aquellos textos que se pueden considerar como de uso general en la asignatura, con un comentario crítico de cada uno de ellos. Se ha considerado conveniente dividir los textos generales en dos grupos.

Libros de texto.

Estos libros están escritos para explicar las metodologías desde un punto de vista docente y bastante teórico. Son lo más apropiados para la asignatura.

BROWN, T.A. (2020). Gene cloning and DNA analysis. An introduction. 8ª edición. Ed. Blackwell Science. ISBN: 978-1-119-64078-3

Un excelente libro de texto de un nivel más sencillo que otros, pero muy bien explicado y actualizado.

REAL GARCÍA, M. D.; RAUSELL SEGARRA, C. Y LATORRE CASTILLO, A. (2017). Técnicas de ingeniería genética. Editorial Síntesis.

Un texto en castellano que trata de forma detallada las principales técnicas de la Ingeniería Genética

- LEWIN, B. (2010). "Genes X". Jones & Bartlett.

Es el libro más conocido como texto de Biología Molecular. Para Métodos no es muy apropiado pero, aún así, tiene algunos capítulos de utilidad. Existe una traducción de la 7ª edición inglesa del 2000 y una portal de internet (www.ergito.com) donde se actualizan los contenidos periódicamente.



LUQUE, J. y HERRAEZ, A. (2001) Biología Molecular e Ingeniería Genética. Harcourt.
Muy amplio de contenidos pero tiene buenos esquemas para algunos capítulos de esta asignatura.

-

Complementàries

- Libros de protocolos.

Estos libros han sido escritos para el uso de los investigadores en los laboratorios. Contienen recetas de los distintos protocolos así como escuetas explicaciones teóricas de los fundamentos de los métodos y posibles artefactos. No son muy apropiados para aprender los principios básicos de las metodologías pero pueden ayudar a aclarar algunos puntos concretos y conviene familiarizarse con ellos pues son los que se usarán después en el laboratorio.

AUSUBEL, F.M. et al. (1987-97). Current protocols in Molecular Biology. John Wiley & sons.
Quizá el libro más completo de protocolos. Además, debido a su formato de hojas recambiables, se actualiza de forma periódica.

BIRREN ET AL. (1999). Genome analysis. 4 Volúmenes. Cold Spring Harb. Lab.Press
Uno de los más completos libros de protocolos, considerando los 4 volúmenes. Incluye aplicaciones de metodología de Ingeniería Genética.

SAMBROOK, J. y RUSSELL, D.W. (2001). Molecular Cloning. A laboratory manual. 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (3 volúmenes).

El más famoso libro de protocolos de Biología Molecular. Es uno de los más populares y la actualización del mismo es muy reciente.

DIEFFENBACH, C.W. y DVEKSLER, G.S. (1995). PCR primer. A laboratory manual. Cold Spring Harbor.

Un manual específico sobre PCR.