

**FICHA IDENTIFICATIVA****Datos de la Asignatura**

Código	33178
Nombre	Métodos en Biología Molecular e Ingeniería Genética
Ciclo	Grado
Créditos ECTS	4.5
Curso académico	2022 - 2023

Titulación(es)

Titulación	Centro	Curso	Periodo
1102 - Grado de Biotecnología	Facultad de Ciencias Biológicas	3	Segundo cuatrimestre

Materias

Titulación	Materia	Caracter
1102 - Grado de Biotecnología	86 - Metodología Celular y Molecular	Obligatoria

Coordinación

Nombre	Departamento
ALEPUZ MARTINEZ, ELIA PAULA	30 - Bioquímica y Biología Molecular
OLMO MUÑOZ, MARCEL.LI DEL	30 - Bioquímica y Biología Molecular

RESUMEN

Con esta asignatura se pretende que los alumnos puedan adquirir los conocimientos conceptuales y metodológicos básicos relativos a:

- (1) Las herramientas básicas para el análisis de ácidos nucleicos.
- (2) Desarrollo de las herramientas básicas para la clonación.
- (3) Caracterización y modificación de secuencias de DNA y manipulación del DNA a gran escala.
- (4) Secuenciación genómica. Combinación de métodos de secuenciación automatizados masivos y técnicas bioinformáticas para abordar la secuenciación de genomas completos.
- (5) Otras técnicas de amplio uso en Biología Molecular como fusiones génicas, métodos de análisis de interacción entre proteínas y entre proteínas y ácidos nucleicos, etc..



CONOCIMIENTOS PREVIOS

Relación con otras asignaturas de la misma titulación

No se han especificado restricciones de matrícula con otras asignaturas del plan de estudios.

Otros tipos de requisitos

Los estudiantes deberían haber cursado en el cuatrimestre anterior (o en cursos anteriores) la asignatura de Biología Molecular, para poder entender adecuadamente los contenidos de esta materia.

COMPETENCIAS

1102 - Grado de Biotecnología

- Manejar adecuadamente los equipos y el material propio de un laboratorio de bioquímica y biología molecular.
- Saber realizar análisis de expresión génica.
- Ser capaz de diseñar protocolos y utilizar las técnicas del DNA recombinante.

RESULTADOS DE APRENDIZAJE

Se pretende que los después de haber cursado esta asignatura sepan las técnicas básicas que se utilizan para los estudios de expresión génica y para la manipulación del material genético.

DESCRIPCIÓN DE CONTENIDOS

1. Tema 1. ¿Qué es la tecnología del DNA recombinante?

Introducción histórica. Concepto de DNA recombinante. Concepto de clonación. El impacto de la tecnología del DNA recombinante: emergencia de la biotecnología molecular.

2. Temas 2,3. Técnicas generales

Tema 2. TÉCNICAS GENERALES I. Enzimología básica utilizada en la manipulación del DNA. Enzimas de restricción y mapas de restricción. DNA-polimerasas, ligasas, recombinasas y otras enzimas de interés. Precipitación y purificación del DNA. Obtención de plásmidos y otros DNAs.

Tema 3. TÉCNICAS GENERALES II. Hibridación de ácidos nucleicos: Factores que afectan; Etapas del proceso; Métodos de hibridación. Marcaje de sondas: Directo e indirecto; tipos de marca; Métodos de síntesis de una sonda marcada. Síntesis automática de oligonucleótidos. Aplicaciones de los oligonucleótidos sintéticos. Síntesis de genes completos.

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

Características de la PCR: amplificación y especificidad. Reacción básica: diseño de cebadores. Análisis del producto de PCR: clonación y secuenciación directa. PCR reverso. Amplificación de cDNA: RT-PCR. El PCR como herramienta en Ingeniería Genética. PCR cuantitativo. Aplicaciones del PCR en otros campos. Otros sistemas de amplificación.

4. Temas 5-8. Ingeniería Genética

Tema 5. CONSTRUCCIÓN DEL DNA QUIMERA. Estrategias de clonación. Unión de moléculas de DNA: unión de extremos cohesivos, unión por adición de prendedores, adaptadores y colas de homopolímeros. Introducción del DNA en células de bacteria: métodos de transformación y transfección. Tema 6. VECTORES DE CLONACIÓN EN E. coli. Características generales de un vector. Plásmidos. Vectores de clonación basados en plásmidos. Fagos. Vectores de clonación basados en el fago M13: vectores de simple cadena. Faguémidos. Vectores de clonación basados en el fago . Cósmidos y vectores para grandes insertos. Vectores de expresión en E. coli: promotores bacterianos. Tema 7. CONSTRUCCIÓN DE GENOTECAS. Genotecas genómicas. Genotecas para proyectos de secuenciación. Métodos de síntesis de cDNA. Clones con extremos 3 o 5 de mRNAs. Genotecas de cDNA. Genotecas de cDNA sustraído. Tema 8. SELECCIÓN DE CLONES. Niveles de selección. Identificación de clones recombinantes. Identificación de un clon específico. Selección directa. Selección mediante técnicas inmunológicas. Selección mediante hibridación con sondas de ácidos nucleicos. Selección por recombinación.

5. Tema 9. Secuenciación del DNA

Métodos de secuenciación. Secuenciación automática. Estrategias para la secuenciación de un fragmento de DNA.

6. Tema 10. Modificación de la secuencia del DNA

Mutagénesis in vitro del DNA pasajero: deleciones, inserciones y sustituciones. Mutagénesis aleatoria. Mutagénesis dirigida mediante el uso de oligonucleótidos. Técnicas de mutagénesis dirigida basada en la PCR. Mutagénesis insercional al azar y dirigida.

7. Tema 11. Técnicas de estudio de la expresión génica

Detección y cuantificación del transcrito. Uso de genes reporteros. Identificación de elementos reguladores de la transcripción. Mapeo de mensajeros. Métodos para el análisis individual de la expresión génica. Análisis de la expresión diferencial de genes. Transcripción in vitro e in vivo Traducción in vitro.

**8. Tema 12. Estudio de la interacción entre macromoléculas**

Técnicas de estudio de interacciones DNA-proteína: Cambios de movilidad en gel; Protección al ataque de nucleasas y agentes químicos in vitro e in vivo; Interferencia por metilación; Entrecruzamiento con luz UV. Inmunoprecipitación de cromatina. Purificación de proteínas que se unen al DNA. Técnicas de estudio de interacciones RNA-proteína: Ensayo de retardo en gel; Ensayo de protección a modificaciones químicas; Métodos de afinidad; Entrecruzamiento por luz UV; Triple híbrido. Técnicas de estudio de interacciones Proteína-proteína: Purificación de complejos proteicos; Doble híbrido; Coimmunoprecipitación; Pull-down de proteínas etiquetadas; Aplicación de proteínas fluorescentes para la detección de interacciones proteicas in vivo.

9. Prácticas de laboratorio

- 1) Construcción de una genoteca en Escherichia coli
- 2) Purificación de una proteína de fusión con GST
- 3) Construcción del mapa de restricción de un plásmido
- 4) Obtención de sondas específicas de un gen mediante PCR

VOLUMEN DE TRABAJO

ACTIVIDAD	Horas	% Presencial
Clases de teoría	29,00	100
Prácticas en laboratorio	16,00	100
Preparación de actividades de evaluación	30,00	0
Preparación de clases de teoría	20,00	0
TOTAL	95,00	

METODOLOGÍA DOCENTE

El desarrollo de la asignatura se estructura en base a sesiones teóricas, tutorías personales y sesiones prácticas.

1. Sesiones teóricas:

En el apartado de trabajo presencial, se incluyen un total de 26 sesiones de clases teóricas correspondientes a lecciones magistrales, seminarios o clases de cuestiones, de una hora de duración.

Con anterioridad a cada clase, los estudiantes dispondrán de todo el material gráfico significativo que vaya a ser presentado, incluido en la correspondiente página web del *Aula Virtual* de la Universitat de València. De esta forma, se pretende que el estudiante pueda preparar con antelación las clases y pueda seguir las con comodidad, tomando solamente las notas necesarias para su apropiada comprensión.



1. Tutorías personales:

La función de las tutorías es ayudar y guiar de forma personal al estudiante en todos los problemas que surjan al enfrentarse con el estudio de la asignatura. Facilitan el intercambio de opiniones entre el profesor y el estudiante, en un esfuerzo de aproximación a la enseñanza individualizada.

1. Actividades prácticas:

Se han programado 4-5 sesiones de 2-4 horas de duración cada una (total de 16 h) sobre diversos aspectos de las técnicas de Biología Molecular y DNA recombinante que no se contemplan en otras asignaturas relacionadas y son adaptables a un laboratorio de prácticas.

EVALUACIÓN

La asistencia a las prácticas es obligatoria y también lo son la resolución de un cuestionario previo a su realización y la presentación de una memoria al final de las mismas. Al final del curso se realizará un examen para valorar los conocimientos adquiridos en las clases teóricas y prácticas. Sobre la nota final la parte teórica de este examen tendrá un valor del 70%. 20% corresponderá a la valoración de las clases prácticas mediante la memoria de prácticas (1.6 sobre 2) y la resolución del cuestionario previo (0.4 sobre 2). El 10% restante corresponde a actividades que se plantearán a lo largo del curso. Para superar la asignatura es necesario aprobar el examen de teoría, las prácticas y las actividades programadas. Si se aprobaran las prácticas o las actividades pero se suspendiera la teoría, las notas correspondientes se guardarían durante el curso siguiente al que han sido realizadas; a partir de ese momento se tendrían que repetir las prácticas y/o actividades de la evaluación continua.

REFERENCIAS

Básicas

- 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 volúmenes).
- 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.



Complementarias

- 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 ediction. 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.