
CURSO: 2003/04
CENTRO: FAC. CC. EXPERIMENTALES
ESTUDIOS: LICENCIADO EN QUÍMICAS-2000
ASIGNATURA: **INGENIERIA DE ACIDOS NUCLEICOS**
CÓDIGO: 5008307
CICLO: 2º
CURSO: OPT
CUATRIMESTRE: 1º
CARÁCTER: OPTATIVA
CRÉD. TEÓ.: 3,00
CRÉD. PRÁC.: 3,00

ÁREA: BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR
DEPARTAMENTO: QUIMICA FISICA, BIOQUIMICA Y QUIMICA INORGANICA
DESCRIPTORES: TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE GENES. MODIFICACIÓN DE LA INFORMACIÓN BIOLÓGICA Y SU EXPRESIÓN. INGENIERÍA DE BIORREACCIONES Y BIOPROCESOS. CLONADO Y EXPRESIÓN DE GENES EN E. COLI Y OTROS ORGANISMOS. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA. APLICACIONES CLÍNICAS, INDUSTRIALES Y AGRÍCOLAS DE LA INGENIERÍA DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

TEMARIO DE TEORÍA

UNIDAD TEMÁTICA 1 : INTRODUCCIÓN A LA INGENIERIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

TEMA 1.- Planteamiento básico del clonado molecular

- 1.1. Objetivo de la manipulación del DNA
- 1.2. La implantación de genes heterólogos : limitaciones biológicas y técnicas
- 1.3. El experimento básico de clonación y su estrategia
- 1.4. La necesidad de vehicular el DNA : ¿Qué es un vector y qué características debe tener ?
- 1.5. Digestión del genoma de elección con endonucleasas
- 1.6. Preparación del vector
- 1.7. Construcción de moléculas de DNA recombinante
- 1.8. Introducción de las moléculas recombinantes en células bacterianas. Transformación genética
- 1.9. Identificación y selección de clones transformados
- 1.10. Identificación y selección de clones portadores del inserto específico
- 1.11. El problema de la expresión diferencial del gen exógeno
- 1.12. Purificación del producto génico foráneo

UNIDAD TEMÁTICA 2 : TECNICAS ESENCIALES EN CLONADO MOLECULAR

TEMA 2.- Manipulación de moléculas de ácidos nucleicos : métodos químicos.

- 2.1. Innovaciones metodológicas que permitieron el desarrollo de la Ingeniería Genética
- 2.2. Preparación de DNA : total y plasmídico
- 2.3. Preparación de RNA : total y Poli(A)+
- 2.4. Separación de DNA y RNA por electroforesis en gel
- 2.5. Purificación de moléculas desde los geles de electroforesis : electroelución
- 2.6. Hibridación de ácidos nucleicos y control de la especificidad y su rigor
- 2.7. Transferencia de Southern
- 2.8. Transferencia de Northern
- 2.9. Secuenciación del DNA por el método de Maxam y Gilbert
- 2.10. Síntesis química de ácidos nucleicos

TEMA 3.- Manipulación de moléculas de ácidos nucleicos : métodos enzimáticos.

- 3.1. Corte y unión de moléculas de DNA
- 3.2. Endonucleasas de restricción del tipo II : secuencias de corte, aplicaciones y mapas físicos
- 3.3. Unión de moléculas de DNA : DNA ligasa de T4, DNA ligasa de E. coli. El problema del bajo rendimiento

- 3.4. Modificación covalente de DNAs in vitro. Fosfatasa alcalina. Polinucleotido quinasa
- 3.5. Diseño y utilización de conectores
- 3.6. Desoxinucleotidil transferasa terminal. Uso de colas homopoliméricas
- 3.7. DNA polimerasa : DNA polimerasa I, DNA polimerasa III, fragmento Klenow, polimerasa T7 y Taq polimerasa
- 3.8. RNA polimerasas SP6 y T7
- 3.9. Reacción en Cadena de la Polimerasa. Aplicaciones
- 3.10. Secuenciación por el método de Sanger. Variantes
- 3.11. Transcriptasa inversa
- 3.12. Nucleasa S1

TEMA 4.- Descripción y preparación de vectores para el clonado en E. coli

- 4.1. Vectores. Elementos estructurales de un vector. Tipos de vectores. Marcadores genéticos, sitios de clonado, otros elementos
- 4.2. Los plásmidos como vectores de clonado
- 4.3. Propiedades útiles de los plásmidos como vehículos de clonado
- 4.4. Construcción y caracterización del plásmido PBR322
- 4.5. Utilización del plásmido PBR322. Ejemplo en la expresión de un gen artificial
- 4.6. Desarrollo de plásmidos derivados de PBR322
- 4.7. Vectores de origen viral
- 4.8. El fago lambda como vector de clonado. Modificaciones estructurales
- 4.9. Vectores de reemplazamiento frente a vectores de inserción
- 4.10. Vectores derivados del fago lambda : serie EMBL
- 4.11. Empaquetamiento in vitro del DNA clonado en el fago lambda
- 4.12. Vectores cósmidos
- 4.13. Vectores fásmidos
- 4.14. Biología de los colifagos filamentosos y su utilidad como vectores
- 4.15. M13 y sus aplicaciones

TEMA 5.- Expresión de genes clonados en E.coli

- 5.1. Vectores de expresión : características, tipos y secuencias (λ gt11, pUR)
- 5.2. Estabilidad de los vectores recombinantes en la célula hospedadora
- 5.3. ajuste del marco de lectura
- 5.4. Modelos de expresión
 - a) Expresión directa
 - b) Proteínas de fusión
 - c) Proteínas de secreción
- 5.5. Estabilidad de las proteínas foráneas
- 5.6. Expresión in vitro
- 5.7. Métodos de incrementar el rendimiento de la expresión de genes clonados en E. coli
 - a) Construcción de promotores más potentes
 - b) Optimización de la secuencia de unión al ribosoma
 - c) Optimización de la separación entre el promotor y el gen clonado
 - d) Incrementar el número de copias del vector recombinante
 - e) Ajuste de la terminación de la transcripción
- 5.8. Purificación de proteínas expresadas en E. coli
 - a) Técnicas de lisis celular
 - b) Purificación de proteínas insolubles
 - c) Purificación de proteínas solubles
 - d) Purificación de proteínas de fusión
- 5.9. Secreción de proteínas foráneas en E.coli
- 5.10. Sistemas de expresión inducibles
- 5.11. Control de la expresión de genes heterólogos

TEMA 6.- Genotecas

- 6.1. Composición y estabilidad de una genoteca
- 6.2. Genoteca genómica : Definición
- 6.3. Fraccionamiento del DNA genómico
- 6.4. ¿Qué tamaño debe tener la genoteca genómica ?
- 6.5. Genoteca de DNA complementario : Definición
- 6.6. Vectores para la construcción de una genoteca de cDNA

- 6.7. Síntesis de cDNA de cadena doble
- 6.8. Clonado de cDNA por unión de colas homopolímeras
- 6.9. Clonado de cDNA de longitud completa
- 6.10. Criterios que determinan la construcción de genotecas genómicas o de cDNA

TEMA 7.- Búsqueda, identificación y selección de clones recombinantes en una genoteca

- 7.1 Definición y tipos de sondas : DNA, RNA, sondas radiactivas y no radiactivas, sondas homólogas y degeneradas, los anticuerpos como sondas
- 7.2 Métodos para el marcado de ácidos nucleicos : Marcado directo, nick translation, primer extensión, métodos basados en la RNA polimerasa, marcado de los extremos
- 7.3 Criterios para la elección de la marca
- 7.4 Desarrollo de anticuerpos policlonales y monoclonales para detección de moléculas específicas
- 7.5 métodos inmunoquímicos de detección
- 7.6 ELISA
- 7.7 Sondas no radiactivas de ácidos nucleicos : biotiniladas, sulfonadas y digoxigeninadas
- 7.8 Aplicaciones generales de las sondas :
 - a) Detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos en organismos, genes, etc.
 - b) Detección de cambios en secuencias específicas
 - c) Las sondas como agentes terapéuticos
 - d) aplicaciones forenses
 - e) Paseo cromosómico
- 7.9. Técnicas de examen de genotecas
- 7.10. Selección de transformantes mediante marcadores genéticos
- 7.11. Selección de transformantes portadores de inserto, mediante inactivación de genes marcadores, por inserción de fragmentos de DNA
- 7.12. Uso del gen Lac Z
- 7.13. ¿Qué información debemos conocer sobre nuestro gen y como debemos utilizarla para elegir la sonda ?
- 7.14. Selección de colonias por examen inmunoquímico
- 7.15. Selección de colonias por hibridación con sondas de ácidos nucleicos
- 7.16. Técnicas de hibridación en membranas
- 7.17. Substracción de genotecas
- 7.18. utilización de vectores de selección directa

TEMA 8. Mutagénesis dirigida

- 8.1 Mutagénesis dirigida por oligonucleotidos
- 8.2 Estrategia experimental con un cebador
- 8.3 Métodos de selección de mutantes
 - a) tiónucleotidos
 - b) Duplex abiertos
 - c) Método Winter
- 8.4. Posibles mecanismos de la fijación de la mutación
- 8.5. Verificación de la mutación
- 8.6. Aplicaciones de la mutagénesis dirigida en la investigación básica y en la biotecnología

UNIDAD TEMÁTICA 3 : ESTUDIO DE SISTEMAS DE CLONADO Y EXPRESIÓN EN DIFERENTES ORGANISMOS

TEMA 9.- Clonado en Bacillus

- 9.1. Métodos de transformación de bacilos y protoplastos
- 9.2. Vectores plasmídicos
 - a) Plásmidos de amplio rango de hospedador
 - b) Replicones híbridos E.coli-B.subtilis
 - c) Vectores de selección directa para B. subtilis
- 9.3. Estudio de la expresión en B. subtilis
- 9.4. Problemas asociados con el clonado

TEMA 10.- Clonado en Streptomyces

- 10.1 Streptomyces y la posibilidad de la producción de antibióticos por clonado interespecífico de DNA
- 10.2 Estrategia de clonado en Streptomyces
- 10.3 Características fenotípicas a considerar en el hospedador
 - a) Actividad restrictiva
 - b) Actividad DNAsa

- c) Actividad recombinante
- 10.4. Vectores : plásmidos y fagos
- 10.5. Transformación de protoplastos y detección de transformantes

TEMA 11.- Clonado en levaduras

- 11.1. Importancia del ambiente eucarióticos en los estudios de clonado molecular de genes eucarióticos
- 11.2. Sistemas de expresión basados en levaduras no convencionales
- 11.3. Procedimientos de transformación en levaduras
- 11.4. Vectores
- 11.5. Cromosoma artificial de levadura (YAC)
- 11.6. Selección de clones recombinantes
- 11.7. Estabilidad de vectores de clonado
- 11.8. Expresión de genes eucarióticos. Vectores, promotores y procesamiento
- 11.9. Factores que afectan a la expresión
- 11.10. Secreción de proteínas
- 11.11. Expresión de genes procariotas

TEMA 12.- Clonado molecular en animales

- 12.1. Transferencia genética a células de animales
- 12.2. Vectores y marcadores genéticos
 - a) El elemento P de Drosophilla como vector
 - b) Obtención y propiedades de los vectores derivados del virus SV40
 - c) Virus del papiloma bovino
 - d) Retrovirus
 - e) Virus de la vacuna
 - f) Marcadores selectivos para la transferencia de genes
- 12.3. Métodos de transformación
 - a) Co-transformación
 - b) Microinyección de genes en células animales
- 12.4. Expresión de genes foráneos en células animales
- 12.5. Sistema de expresión con Baculovirus
- 12.6. aplicación del clonado molecular en animales
 - a) Mejora de las características del ganado
 - b) Resistencia a enfermedades
 - c) Terapia génica : vectores retrovirales

TEMA 13.- Transformación genética en plantas

- 13.1. Transferencia genética vía hibridación somática
- 13.2. Transferencia genética directa. Integración del DNA foráneo
 - a) Electroporación de protoplastos
 - b) Bombardeo génico
- 13.3. Transferencia genética mediante vectores derivados de virus de plantas
 - a) Caulinivirus y su desarrollo como vector de plantas
 - b) Organización del genoma de CaMV
 - c) Estrategia replicativa de CaMV
 - d) Geminivirus y sus posibilidades como vector
 - e) Virus del enanismo del trigo
 - f) Vectores basados en virus RNA de plantas
- 14.4. Uso de los elementos transponibles de Ingeniería Genética
- 14.5. Liposomas como transportadores de vectores

TEMA 15.- Sistema de transformación vegetal derivado de Agrobacterium

- 15.1. Inducción de tumores por Agrobacterium
- 15.2. Organización génica en el plásmido Ti de Agrobacterium tumefaciens
- 15.3. Activación de la región vir para la transferencia del T-DNA. Papel de las secuencias de los bordes
- 15.4. incorporación del T-DNA en el DNA nuclear de las células de la planta
- 15.5. Funciones codificadas por el T-Dna
- 15.6. Mecanismo molecular de expresión e inducción de tumores por el T-DNA del plásmido Ti
- 15.7. Derivados del plásmido Ti como vectores de plantas
 - a) Vectores cointegrados

- b) Vectores binarios
- 15.8. Inserción del DNA foráneo en el T-Dna
- 15.9. Marcadores de selección
- 15.10. Plásmidos extraídos de *Agrobacterium rhizogenes*, plásmido Ir

TEMA 16.- Expresión de genes clonados y regeneración en plantas

- 16.1. Expresión de genes foráneos en células de plantas
- 16.2. Evaluación de la transferencia genética. Genes marcadores de expresión
- 16.3. Control de la expresión de los genes transferidos
 - a) Genes inducibles : luz y hormonas
 - b) Genes específicos de tejido
 - c) Interacción con la expresión de los genes homólogos de la planta
- 16.4. regeneración de plantas transformadas

UNIDAD TEMÁTICA 4 : APLICACIONES DE LA INGENIERIA DE ACIDOS NUCLEICOS

TEMA 17.- Aplicaciones agrícolas del clonado molecular en plantas

- 17.1. Aislamiento de genes de plantas (transposones)
- 17.2. Clonado de proteínas relacionadas con la patogenicidad para su sobreexpresión
- 17.3. Ingeniería genética de la resistencia a enfermedades virales en plantas
 - a) Expresión de genes virales
 - b) Expresión de RNA viral antisentido
 - c) Expresión de satélites virales
 - d) Expresión de genes de resistencia de la planta
- 17.4. Ribozimas como agentes terapéuticos antivirales
- 17.5. Expresión de genes de la proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis*
- 17.6. Inducción de tolerancia a herbicidas
- 17.7. Ingeniería de proteínas para modificar la actividad biológica de la RUBISCO
- 17.8. Inducción de la tolerancia al estrés hídrico
- 17.9. Modificación de las características nutritivas de los productos agrícolas. Producción de péptidos, maduración
- 17.10. Producción de fármacos por células de plantas
- 17.11. Incremento del rendimiento de la fijación de N₂ en la simbiosis *Rhizobium-Leguminosa*
- 17.12. Técnicas de diagnóstico fitosanitario : Sondas específicas de ácidos nucleicos, PCR, ELISA

TEMA 18.- Aplicaciones industriales de la Ingeniería de Ácidos Nucleicos

- 18.1. Producción de proteínas de organismos unicelulares
 - a) Aumento de rendimiento en la asimilación de carbono
 - b) Modificación en la composición de aminoácidos
- 18.2. Clonado de genes de proteínas de especial utilidad en microorganismos para su superproducción.
 - a) Ejemplos : insulina, interferón, nuevas proteínas diseñadas específicamente
 - b) Mejora en los procesos de recuperación y purificación de proteínas mediante la aplicación de la Biología Molecular
 - c) Problemática : formación de agregados de células, eliminación de la formilmetionina, contaminación y acumulación de inhibidores del crecimiento
- 18.3. Producción de vacunas
 - a) Producción de péptidos inmunogénicos
 - b) atenuación de organismos (tosferina)
 - c) Virus de la vacuna
 - d) Consideraciones a tener en cuenta en el diseño de vacunas
- 18.4. Ingeniería de ácidos nucleicos aplicada a la producción de metabolitos secundarios y productos finales
 - a) Estrategia para el aislamiento de los genes de las enzimas implicadas
 - b) Modificación de rutas metabólicas
 - c) Sistemas multienzimáticos obtenidos por fusión de genes
 - d) Producción de antibióticos : ya existentes o de nueva síntesis
 - e) Utilización industrial de *Erwinia*
- 18.5. Manipulación genética de microorganismos para la recuperación de metales

TEMA 19.- Estabilidad del material genéticamente modificado en biorreactores

- 19.1. Modelos de la replicación en plásmidos
- 19.2. Mecanismos de herencia de los plásmidos
- 19.3. Modelo de cinética de pérdida de los plásmidos

- 19.4. Efecto de sobrecarga y plásmidos de alto número de copias
- 19.5. Factores que aceleran la pérdida de los plásmidos
 - a) Variación en el número de copias
 - b) Formación de oligómeros
 - c) Construcciones erróneas y sistemas asesinos de hospedadores
 - d) Interferencia entre la transcripción del promotor fuerte y la replicación del plásmido
- 19.6. Funciones de estabilidad codificadas por los plásmidos
- 19.7. Estrategias para construir vectores de clonado y expresión estables
- 19.8. Estrategias para aumentar la estabilidad de los plásmidos
 - a) Métodos selectivos
 - b) Métodos no-selectivos
- 19.9. Condiciones de cultivo que influyen en la estabilidad de los recombinantes. Bioquímica del hospedador

TEMA 20.- Aplicación de la Ingeniería de Ácidos Nucleicos a la descontaminación medio ambiental y a la degradación de compuestos tóxicos industriales

- 20.1. Oxidación de hidrocarburos por Pseudomonas oleovorans
- 20.2. El sistema alcano hidrolasa
- 20.3. Control genético del sistema de oxidación de hidrocarburos por P. oleovorans
- 20.4. Oxidación de compuestos aromáticos por Pseudomonas sp.
- 20.5. Descripción de rutas metabólicas
- 20.6. Caracterización de los genes implicados
- 20.7. Modificación y ensamblaje de rutas oxidativas por manipulación de los genes implicados
- 20.8. Estabilidad y transferencia de genes manipulados en sistemas naturales
- 20.9. Degradación bacteriana de herbicidas

UNIDAD TEMÁTICA 5 : APLICACIÓN DE LA INGENIERÍA DE ÁCIDOS NUCLEICOS A LA INVESTIGACIÓN BÁSICA

TEMA 21.- Aplicaciones de Ingeniería de Ácidos Nucleicos como herramienta de la Biología Molecular

- 21.1. Estudios del control de la expresión genética
- 21.2. Estudios de la función biológica de secuencias génicas específicas
- 21.3. Estudio de la maduración y procesamiento de proteínas
- 21.4. Estudio de los mecanismos de actividad biológica de proteínas
- 21.5. Estudio de la catálisis enzimática
- 21.6. Estudios de la especificidad de tejido de la expresión genética
- 21.7. Estudios de diferenciación y desarrollo celular
- 21.8. Estudio del mecanismo de producción de anticuerpos
- 21.9. Demostración de las mutaciones somáticas en la producción de anticuerpos
- 21.10. Estudio del mecanismo de ensamblaje de las subunidades de la RUBISCO
- 21.11. Estudio de características codificadas por múltiples genes

TEMA 23.- Implicaciones sociales y ecológicas de la Ingeniería de Ácidos Nucleicos

- 32.1. Interacción de los genes transformantes con los genes homólogos
- 32.2. utilidad real de los genes utilizados para transformar
- 32.3. Nuevos organismos y la propiedad intelectual
- 32.4. Posibilidades de la Ingeniería Genética en la agricultura
- 32.5. Control de los organismos transformantes en el medio ambiente
- 32.6. Consumo humano de productos transgénicos

TEMARIO DE PRÁCTICAS.

- Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de la enzima Glutathion S-transferasa con unos conectores específicos para su inserción en el plásmido pT-77

- Amplificación del gen por PCR y purificación del fragmento desde geles de agarosa

- Ligado del inserto en el plásmido pT77 y transformación de células competentes

BIBLIOGRAFÍA.

- ✓ Molecular Biotechnology. Principles & Applications of Recombinant DNA. Bernard R. Glick, Jack J. Pasternak. A.S.M. Press. I.S.B.N. 1-55581-071-3 (1994)
- ✓ Principios de Bioquímica. A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox. Editorial Omega S.A. 2ª Edición I.S.B.N. 84-282-0924-3 (1993)
- ✓ Molecular Cloning. A laboratory Manual. J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2ª Edición. I.S.B.N. 0-87969-309-6 (1989)
- ✓ Biotecnología: Curso de prácticas de laboratorio. J.M. Becker. Editorial Acribia S.A. I.S.B.N. 84-200-0873-7 (1996)

CRITERIOS DE EVALUACIÓN.

La nota final vendrá determinada en un 5% por el desarrollo del guión de prácticas y el 95% restante por la nota obtenida en un examen único que se realizará al finalizar el temario. Este examen constará de preguntas referentes tanto a la parte teórica como a la práctica de la asignatura.