

Guía Docente

DATOS DE IDENTIFICACIÓN

Titulación:	Biología		
Rama de Conocimiento:	Ciencias		
Facultad/Escuela:	Ciencias Experimentales		
Asignatura:	Tecnología del DNA Recombinante		
Tipo:	Obligatoria	Créditos ECTS:	6
Curso:	3	Código:	2037
Periodo docente:	Sexto semestre		
Materia:	Tecnologías Avanzadas de Formación Biotecnológica		
Módulo:	Herramientas Biotecnológicas		
Tipo de enseñanza:	Presencial		
Idioma:	Castellano		
Total de horas de dedicación del alumno:	150		

Equipo Docente	Correo Electrónico
Águeda Mercedes Tejera	agueda.tejera@ufv.es
Miguel de Vega José	mdevega@cbm.uam.es

DESCRIPCIÓN DE LA ASIGNATURA

La tecnología del DNA recombinante alberga un conjunto de metodologías encaminadas a manipular el DNA, amplificarlo, secuenciarlo, transferirlo entre organismos genéticamente diferentes y a hacer nuevas combinaciones entre moléculas de DNA que normalmente proceden de especies diferentes y cuya expresión en un organismo hospedador dará lugar a un producto con valor en medicina, agricultura, ciencia básica e industria. En el presente curso se explicarán las bases moleculares de las diferentes técnicas de manipulación del DNA y su aplicación, haciendo especial hincapié en las metodologías de clonaje para la expresión de proteínas recombinantes tanto en bacterias como en organismos eucariotas, así como para la obtención de librerías

genómicas. Igualmente se explicarán las técnicas para la obtención de organismos transgénicos y clónicos y sus aplicaciones en investigación básica y biotecnológica.

Hasta el principio de los años 70, el DNA era la molécula biológica más difícil de analizar para los bioquímicos. Debido a su gran longitud y a su monotonía química, la cadena polinucleotídica que forma el material genético de un organismo sólo podía ser examinada indirectamente por secuenciación de proteínas y/o RNA o bien mediante análisis genéticos. Hoy en día la situación ha cambiado totalmente y en muchos laboratorios de todo el mundo, es una práctica rutinaria aislar un fragmento específico de DNA del genoma de un organismo para producir un número virtualmente ilimitado de copias, determinar su secuencia nucleotídica y ensayar su función. Mediante técnicas de manipulación del DNA, un gen aislado se puede modificar y devolver a una célula bacteriana o a una célula germinal de un animal o planta de tal forma que llegue a ser parte funcional y heredable del genoma del organismo (ingeniería genética). Esos avances técnicos en la ingeniería genética, la habilidad para manipular el DNA con precisión en un tubo de ensayo o en un organismo, han tenido un impacto espectacular en todos los aspectos de la biología celular, facilitando el estudio de las células y sus macromoléculas de formas inimaginables hasta hace pocos años. Las técnicas de manipulación del DNA han supuesto un desarrollo exponencial en diferentes áreas como la biología, generando la aparición de nuevas áreas de investigación como la genómica funcional y la proteómica, han dado lugar a la biotecnología moderna mediante la cual se pone a trabajar al gen en la producción de proteínas y otros compuestos útiles a nivel industrial y se generan animales y plantas transgénicos. Estas técnicas están revolucionando la medicina mediante la producción de fármacos recombinantes, están permitiendo avances en diagnóstico clínico gracias a la identificación de genes responsables de enfermedades y al desarrollo de la terapia génica así como han llegado a ser una herramienta imprescindible en las ciencias forenses actuales. Es predecible que en los próximos años, la tecnología del DNA recombinante impacte incluso la forma en la que vivimos.

En el presente curso se explicarán las bases moleculares de las diferentes técnicas de manipulación del DNA y su aplicación, haciendo especial hincapié en las metodologías de clonaje para la expresión de proteínas recombinantes tanto en bacterias como en organismos eucariotas, así como para la obtención de librerías genómicas. Igualmente se explicarán las técnicas para la obtención de organismos transgénicos y clónicos y sus aplicaciones en investigación básica y biotecnológica.

La asignatura corresponde al módulo Herramientas Biotecnológicas, integrada dentro de la materia Tecnologías Avanzadas de Formación Biotecnológica y supone 150 horas de actividad por parte del alumno. Esta asignatura permitirá al los alumnos obtener el conocimiento y dominio de las técnicas de ingeniería Genética y les proporcionará la base necesaria para la comprensión de otras asignaturas de la titulación como son la Genómica y Proteómica, también pertenecientes al mismo módulo, así como las asignaturas de Organismos modificados genéticamente, Agrobiotecnología y Microbiología industrial.

Una vez completada de manera exitosa la asignatura Tecnología del DNA recombinante, el alumno habrá adquirido los conocimientos teóricos necesarios para la resolución práctica de los problemas más comunes que se le presentarán en el futuro en el desarrollo de su profesión. Asimismo, la asignatura contribuirá al desarrollo del método científico del futuro profesional, inculcándole hábitos rigurosos de investigación, de sentido crítico, de inquietud por saber y de creatividad que favorecerán sus capacidades de adaptación intelectual a situaciones profesionales nuevas, así como su maduración profesional y personal.

OBJETIVO

El objetivo fundamental de la asignatura es que el alumno conozca la tecnología del DNA recombinante y sus aplicaciones más frecuentes en investigación básica, biotecnológica y biosanitaria.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

Para el correcto desarrollo de la asignatura el alumno debe poseer una sólida formación en Genética Molecular, más específicamente en lo referente a la estructura y propiedades de los ácidos nucleicos así como a los mecanismos de replicación, transcripción y traducción en organismos procariontes y eucariotes.

CONTENIDOS

Los primeros temas de la asignatura (temas 1-5) tratan sobre las técnicas bioquímicas y enzimológicas utilizadas en la tecnología del DNA recombinante, así como en las tecnologías de amplificación y secuenciación de los ácidos nucleicos.

Tema 1. Introducción.

Tema 2. Técnicas básicas de análisis de ácidos nucleicos.

Tema 3. Enzimas utilizados en la Tecnología del DNA recombinante.

Tema 4. Amplificación de secuencias de DNA y RNA.

Tema 5. Secuenciación.

En un segundo bloque (temas 6-11) se describen las técnicas de clonaje tanto en bacterias, levaduras, plantas y animales así como los mecanismos de expresión de proteínas heterólogas en estos sistemas y sus aplicaciones biotecnológicas y biosanitarias.

Tema 6. Clonaje en bacterias.

Tema 7. Clonaje en levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*.

Tema 8. Transgénesis vegetal.

Tema 9. Transferencia génica a células animales.

Tema 10. Manipulación génica de animales.

Tema 11. Genome Editing

PROGRAMA TEÓRICO

TEMA 1. Introducción.

- o Contenido y organización de la asignatura.
- o Concepto de la Tecnología del DNA Recombinante.
- o Aplicaciones de la Tecnología del DNA Recombinante

TEMA 2. Técnicas básicas de análisis de ácidos nucleicos.

- o Esquema general del proceso de clonación.
- o Purificación de ácidos nucleicos.
- o Electroforesis en geles de agarosa y acrilamida.
- o Técnicas de hibridación de ácidos nucleicos.

TEMA 3. Enzimas utilizados en la Tecnología del DNA Recombinante.

- o Endonucleasas de Restricción: Sistemas de Modificación-Restricción, nomenclatura de las endonucleasas de restricción, tipos, sitios de reconocimiento, rotura del DNA, aplicaciones de las endonucleasas de restricción.
- o DNA Ligasas, estrategias de ligación, utilización de linkers y adaptadores.
- o Fosfatasa alcalina.
- o Polinucleótido kinasa.
- o Nucleasas de DNA: Exonucleasas 5'-3' de dsDNA, exonucleasas 5'-3' de ssDNA y dsDNA, endonucleasas, nucleasas de RNA.
- o DNA polimerasas dependientes de DNA, DNA polimerasas independientes de DNA, DNA polimerasas dependientes de RNA, RNA polimerasas.
- o Poli(A)-polimerasas, Guanilil-transferasas, Metil transferasas.

TEMA 4. Amplificación de secuencias de DNA y RNA.

- o Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- o Componentes de la reacción.
- o Aplicaciones de la PCR.
- o Variantes de la PCR: Hot Start PCR, Touch Down PCR, RT-PCR, RACE, PCR asimétrica, PCR multiplex, PCR inversa, RAPD- y AP-PCR, RFLP-PCR.
- o PCR cuantitativa y en tiempo real.
- o Análisis de los productos de amplificación.
- o Otros sistemas de amplificación.

TEMA 5. Secuenciación.

- o Secuenciación química.
- o Secuenciación enzimática.
- o Secuenciación cíclica.
- o Estrategias de secuenciación.
- o Tecnologías de secuenciación de segunda y tercera generación.

TEMA 6. Clonaje en bacterias.

- o Esquema general del clonaje
- o Características de los vectores de clonaje.
- o Etapas de clonaje en bacterias: Digestión del DNA heterólogo, digestión del vector, ligación, introducción del DNA recombinante en bacterias, selección de transformantes, identificación de recombinantes.
- o Plásmidos, características generales.
- o Derivados de plásmidos.
- o Vectores de clonaje derivados de los fagos lambda, M13 y P1
- o Cósmidos.
- o PACs.
- o BACs.
- o Expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*.
- o Generación de librerías genómicas.

TEMA 7. Clonaje en levaduras: *Saccharomices cerevisiae*.

- o Vectores de clonaje en levaduras: YIPs, YEPs, YRPs, YCPs, YACs
- o Transformación en levaduras.
- o Marcadores de selección: auxotrofia y resistencia a antibióticos.
- o Producción de proteínas recombinantes en levaduras.
- o Estudio de las interacciones proteína-proteína mediante el doble híbrido y sus variantes. Estudio de las

interacciones proteína-DNA mediante la técnica del híbrido simple

- o Expresión de proteínas en *Pichia pastoris*.

TEMA 8. Transgénesis vegetal.

- o Cultivo de tejidos vegetales.
- o Vectores de clonaje en plantas.
- o Transferencia de DNA a células vegetales.
- o Marcadores de selección.

TEMA 9. Transferencia génica a células animales.

- o Métodos biológicos, químicos y físicos de transfección.
- o Marcadores de transfección y selección.
- o Expresión del transgen.
- o Vectores de clonaje derivados de plásmidos.
- o Vectores de clonaje derivados de virus.
- o Virus como vectores de clonaje.
- o Bacterias como vectores de clonaje.
- o Transformación de células animales. Transfección.
- o Marcadores de transfección y selección.
- o Expresión de proteínas recombinantes en células animales.

TEMA 10. Manipulación génica de animales.

- o Producción de animales transgénicos: microinyección pronuclear, transfección de células stem.
- o Sustitución dirigida de genes (gene targeting).
- o Clonaje de animales.

TEMA 11. Genome Editing.

- o Zinc fingers nucleases
- o TALENS
- o CRISPR/Cas

PROGRAMA PRÁCTICO

Clonaje de genes en plásmidos bacterianos: construcción del plásmido recombinante, transformación y selección de clones.

ACTIVIDADES FORMATIVAS

Durante las clases presenciales de teoría se dará a conocer al alumno el contenido de la asignatura, de acuerdo con el programa de la misma.

- Clases teóricas: Las clases teóricas serán magistrales en las que se expondrán sinópticamente los temas, utilizando como recursos didácticos la pizarra y la videoproyección de presentaciones estáticas y animadas. Se alentará al alumnado a que participe activamente en las clases, preguntando sus dudas al profesor. Este último realizará frecuentemente preguntas al alumnado a lo largo de la clase, a fin de mantener su atención y comprobar el grado de seguimiento de la exposición. El profesor entregará a los alumnos las presentaciones en formato electrónico a fin de facilitar su seguimiento y posterior estudio. Se dará la opción a los alumnos de la realización de un trabajo monográfico voluntario acerca de temas relacionados con la asignatura.

- Realización de problemas: Al finalizar cada bloque del temario se plantearán y resolverán ejercicios prácticos relacionados con el bloque dado.

- En cada curso académico se podrá invitar a uno o dos investigadores relevantes en campos relacionados con la asignatura para que den una clase magistral relacionada con su investigación.

- Tutorías: mediante las tutorías el profesor, a requerimiento del alumno y en el horario establecido para ello, resolverá dudas o discutirá las cuestiones que le plantee el alumno, con el fin de orientarle en el aprendizaje de la asignatura.

DISTRIBUCIÓN DE LOS TIEMPOS DE TRABAJO

ACTIVIDAD PRESENCIAL	TRABAJO AUTÓNOMO/ACTIVIDAD NO PRESENCIAL
67 horas	83 horas
Clases expositivas 35h Clases prácticas 25h Tutorías 1h Evaluación 6h	Estudio teórico 60h Estudio práctico 9h Estudio y preparación de ejercicios y casos prácticos 13h Preparación de tutorías 1h

COMPETENCIAS

Competencias básicas

Que los estudiantes hayan demostrado poseer y comprender conocimientos en un área de estudio que parte de la base de la educación secundaria general, y se suele encontrar a un nivel que, si bien se apoya en libros de texto avanzados, incluye también algunos aspectos que implican conocimientos procedentes de la vanguardia de su campo de estudio

Que los estudiantes sepan aplicar sus conocimientos a su trabajo o vocación de una forma profesional y posean las competencias que suelen demostrarse por medio de la elaboración y defensa de argumentos y la resolución de problemas dentro de su área de estudio

Que los estudiantes tengan la capacidad de reunir e interpretar datos relevantes (normalmente dentro de su área de estudio) para emitir juicios que incluyan una reflexión sobre temas relevantes de índole social, científica o ética

Que los estudiantes puedan transmitir información, ideas, problemas y soluciones a un público tanto especializado como no especializado

Que los estudiantes hayan desarrollado aquellas habilidades de aprendizaje necesarias para emprender estudios posteriores con un alto grado de autonomía

Competencias generales

Conocer las aplicaciones de la biotecnología en los campos sanitario, alimentario, agrobiotecnológico, medioambiental y químico.

Adquirir la capacidad de pensamiento analítico, sintético, reflexivo, crítico, teórico y práctico.

Capacidad para la resolución de problemas y la toma de decisiones.

Adquirir las habilidades requeridas para el trabajo experimental: diseño, realización, recogida de resultados y obtención de conclusiones, entendiendo las limitaciones de la aproximación experimental.

Adquirir los conocimientos de bioquímica y biología molecular necesarios para el desarrollo de procesos y productos biotecnológicos.

Aplicar los conocimientos teóricos, prácticos y humanos adquiridos en la Universidad a la realización de prácticas en centros de investigación y empresas biotecnológicas.

Competencias específicas

Definir y saber aplicar las técnicas de ingeniería genética al estudio de la expresión y función génica en distintos sistemas, así como la manipulación y modulación de la expresión génica.

Saber describir, cuantificar, analizar y evaluar críticamente los resultados obtenidos del trabajo experimental realizado en laboratorio.

Desarrollar hábitos de pensamiento riguroso.

Saber aplicar los conocimientos teóricos adquiridos a la resolución de problemas y casos prácticos relacionados con las distintas materias.

RESULTADOS DE APRENDIZAJE

RA1. Decide la estrategia adecuada para llevar a cabo las manipulaciones básicas del DNA

RA2. Resuelve de manera razonada problemas característicos derivados de la asignatura mediante planteamiento de estrategias experimentales.

RA3. Decide las estrategias experimentales más adecuadas para la resolución de problemas.

RA4. Diseña protocolos de clonaje encaminados a la expresión heteróloga de proteínas y a la creación de librerías genómicas.

RA5. Diseña estrategias experimentales para la consecución de animales y plantas transgénicos.

RA6. Conoce y aplica adecuadamente las bases teóricas fundamentales de la tecnología del ADN recombinante.

SISTEMA DE EVALUACIÓN DEL APRENDIZAJE

Examen de teoría: El examen tendrá como objetivo principal comprobar que se han asimilado y comprendido los conceptos básicos expuestos en las clases teóricas, así como la capacidad de razonamiento de los alumnos para resolver problemas sobre la tecnología del DNA recombinante. Por consiguiente, el examen constará de una parte teórica basada en preguntas tipo test y/o preguntas cortas, y otra parte que consistirá en la resolución de problemas. Los exámenes también contendrán preguntas relacionadas con las posibles charlas magistrales impartidas por los investigadores invitados. La nota teórica final supondrá un 85% de la nota final.

Preparación de trabajos: La realización del trabajo monográfico voluntario acerca de temas relacionados con la asignatura supondrá hasta un máximo de 0,5 puntos que se añadirán a la nota final del examen de teoría.

Realización del trabajo práctico en laboratorio: La asistencia a prácticas será obligatoria e indispensable para poder presentarse al examen de teoría. Las prácticas supondrán un 15% de la nota total de la asignatura.

Para poder promediar las diferentes partes es indispensable obtener una valoración superior a 5 en cada una de ellas. En caso de suspender una de las partes en la convocatoria ordinaria, se guardará la nota de la parte aprobada para la convocatoria extraordinaria.

BIBLIOGRAFÍA Y OTROS RECURSOS

Básica

Watson, Myers and Caudy. Recombinant DNA: Genes and Genomes-A short course. 3rd edition. 2006. Freeman W.H. and Company.

Glick, B.R. and Pasternak, J.J. Molecular biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA. 3rd ed. ASM Press, 2003

Primrose, SB and Twyan RM. Principles of gene manipulation and genomics. 7th edition. Blackwell Science, 2006.

Perera, J. Tormo, A., García, JL. Ingeniería Genética (2 tomos). Editorial Síntesis. Madrid, 2002.

Brown, T.A. Gene cloning and DNA analysis. An introduction. 7th edition. Ed. Wiley-Blackwell 2015.

Rastogi, S. and Pathak, N. Genetic engineering (2009). Oxford University Press.

Complementaria

Campbell, A.M., Heyer, J., College, D. Discovering Genomics, Proteomics, and Bioinformatics Benjamin Cummings, 2003.

Dale J.W., Schantz, M. From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology. 3rd edition. Wiley and Sons, 2012

Reece, R.J. Analysis of Genes and Genomes. Wiley, 2004.

Hartl, D.L. and Jones, E.W. Genetics. Principles and analyses. 4th edition. Jones and Bartlett Publishers.

Clark, D.P. Molecular Biology. 2010. Elsevier

Lewin, B. Genes X. Jones and Bartlett Publishers, 2011

Strachan, T. and Read, A.P. Human Molecular Genetics. 4rd edition. Garland Science, 2010