

ENGINYERIA GENÈTICA

Codi:234008

Tipus d'assignatura: Obligatòria

Crèdits: 4.5 Teòrics

Departament responsable: Bioquímica i Biologia Molecular

Professorat: Manuel Palacín

Semestre: Segon

OBJECTIUS

La descripció inicial d'aquesta assignatura és "Tècniques d'estudi i modificació de les bases genètiques". És per aquest motiu que s'ha considerat que els objectius primordials són el desenvolupament de les tècniques bàsiques de manipulació genètica i el concepte de DNA recombinant. També es pretén desenvolupar tècniques habituals d'estudi d'àcids nucleics que seran aplicats en altres assignatures (com ara genètica molecular, regulació del metabolisme, etc.).

L'assignatura d'enginyeria genètica està estretament relacionada amb altres assignatures d'aquesta llicenciatura:

Genètica molecular (troncal, tercer quadrimestre) i les biotecnologies vegetal (optativa, tercer quadrimestre), animal (optativa, quart quadrimestre) i microbiana (optativa, quart quadrimestre). Enginyeria genètica precedeix a totes aquestes assignatures en el temps. És per aquest motiu que en aquesta assignatura (enginyeria genètica) hom pretén introduir i desenvolupar tècniques que seran utilitzades en desenvolupar els continguts d'aquelles assignatures.

Per altra banda, en les assignatures biosíntesi de macromolècules (troncal, segon quadrimestre) i estructura de macromolècules (troncal, primer quadrimestre) es suposa que es desenvoluparan els continguts d'estructura de polinucleòtids i biosíntesi d'àcids nucleics i proteïnes.

PROGRAMA

TEORIA

1.-Conceptes bàsics: Introducció d'informació genètica en bacteries (transformació, conjugació i transducció). Clonació. DNA recombinant. Descobriments de gran relevància: plasmidis bacterians i endonucleases de restricció.

2.-Recombinació de DNA *in vitro*: tall i unió de molècules de DNA. Enzims purificats, destralts per a la manipulació de DNA: nucleases, endonucleases de restricció (tipus, llocs de restricció, protecció), fosfomonoesterases, polinucleòtico quinasa, DNA ligasa, DNA polimerasa I, desoxinucleotidil transferasa terminal.

3.-Plasmidis: *E. Coli* com a cèl·lula hoste de diversos tipus de vectors. Estructura molecular dels plasmidis. Plasmidis "naturals" i "artificials". Vectors de selecció directa.

Vectors multicòpia, d'un baix nombre de còpia i de replicació controlada.

Plasmidi

pBR322 (construcció, caracterització, utilització com a vector d'expressió).

4.-Bacteriòfags: Bacteriòfag (proprietats, cicles lítics i lisogènics, vectors de substitució, expressió de gens, empaquetament *in vitro* del DNA del bacteriòfag. Cosmidis. Fasmidis.

5.-Clonació de DNA amb vectors de DNA de cadena senzilla i doble: colifags filamentosos: DNA circular de cadena senzilla (M13). Noves famílies de vectors de DNA de cadena senzilla/doble (pUC i pEMBL: clonació múltiple, ZAP i plasmidi pBluescript SK/KS: clonació i seqüenciació de cDNA i síntesi de cRNA; RNA polimerases T3 i T7).

6.-Sistemes vector-hoste eucariòtics: Clonació en llevats (vectors, transformació permanent). Transformació de cèl·lules animals (vectors SV40, papilomavirus boví i retrovirus). Plantes (*Agrobacterium*, plasmidis Ti, T-DNA, vectors virals).

7.-Estratègies de clonació de gens: Inserts (DNA genòmic, còpia d'RNA en DNA: transcriptases reverses, inserits sintètics; síntesi d'oligonucleòtids). Lligam de l'insert al vector. Clonació. Llibreries genòmiques: "Chromosome Walking", electroforesi en camp pulsant. Aïllament de cromosomes per "cell sorter". Llibreries de cDNA de cadena completa, selecció d'RNA (poli(A) + RNA, per volum, llibreries de sustracció). Amplificació de DNA per PCR.

8.-Recerca i selecció de recombinants en genoteques: mètodes genètics. Mètodes d'hibridació amb àcids nucleics (oligonucleòtids degenerats, amplificació per PCR). Mètodes d'expressió funcional (oòcits de *Xenopus*: síntesi de transcrits (cRNA *in vitro*). Aïllament de proteïnes que s'uneixen a DNA ("South-Western screening").

9.-Caracterització de gens clonats: Característiques generals (gruix, mapa de restricció, subclonació). Seqüenciació del DNA (mètode de Maxam i Gilbert, mètodes del "didesoxi"). Anàlisi per ordinador de seqüències de DNA. Localització de segments clonats en el genoma ("Southern blot"), determinació del nombre de còpies en el genoma, localització cromosòmica). Detecció d'RNA missatger del DNA clonat ("Northern blot"), hibridació *in situ*, protecció davant l'acció de nucleases específiques de cadena simple, ("primera extensió").

10.-Modificació i expressió de gens clonats: Mutagènesi *in vitro*. Traducció *in vitro*. Expressió en *E. coli* (proteïnes de fusió). Expressió en llevats. Transfecció de cèl·lules animals (promotors del SV40). Transfecció de gens en oòcits, ous i embrions animals transgènics). Plantes transgèniques dicotiledònies. Transferència gènica en cereals (injecció de plasmidis, microprojectils).

11.-Aplicacions de l'enginyeria genètica: perspectives actuals. Aplicacions a la investigació en altres zones científiques. Aplicacions a la agricultura. Aplicacions industrials. Aplicacions a la biomedicina. Aplicacions al medi ambient.

SEMINARIS

L'assignatura d'enginyeria genètica és eminentment tècnica. Per aquest motiu a les classes de seminaris es proposa assolir dos tipus d'objectius:

- desenvolupament de tècniques bàsiques i protocols bàsics necessaris per a la manipulació de DNA recombinant i àcids nucleics en general.
- estudi d'exemples il·lustratius d'algunes de les parts desenvolupades en les classes teòriques. Amb això es pretén combinar per un costat l'obtenció per part de l'alumne dels coneixements tècnics bàsics i per l'altre estimular a l'alumne a que copsi com és de fantàstica l'enginyeria genètica per al nostre món i el seu futur.

- 1.- Electroforesi en gel d'agarosa. Electroforesi en gel de poliàcrilamida. *Band shift*. *Foot printing*.
- 2.- Purificació de plasmidis (CsCl, altres). Purificació de DNA a partir de teixits o cèl·lules.
- 3.- Exemple de subclonació d'un segment de DNA en un plasmidi (protocols, controls, etc.).
- 4.- Expressió en *E. coli* de la somatostatina.
- 5.- Expressió directa del gen de l'hormona del creixement humà.
- 6.- Purificació d'RNA (poli (A)+ RNA) a partir de teixits o cèl·lules.
- 7.- Exemple de selecció d'un clon (cDNA) per detecció amb anticossos.
- 8.- Exemple de l'aplicació del PCR per a la clonació d'un gen.
- 9.- Exemple de clonació d'un cDNA per expressió funcional en oòcits de *Xenopus*.
- 10.- Exemple d'identificació de mutacions en un gen com a base molecular d'una malaltia.

BIBLIOGRAFIA

- Alberts B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M. Roberts, K. i Watson, J.D. (1989) Molecular Biology of the cell. 2nd edition. Garland Publishing Inc.
- Editorial Labor, Barcelona Ausubel et al. (1989) Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons. New York.
- Darnell, J., Lodish, H. i Baltimore, D. (1990) Molecular cell Biology. Scientific American Books.
- Kingsman, S.M. i Kingsman, A.J. (1988) Genetic Engineering. An Introduction to gene analysis and Exploitation in Eukaryotes. Blackwell Scientific Publication. Oxford.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. i Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- Singer, M. i Berg, P. (1991) Genes and Genomes. University Science Books. Mill Valley, California (USA).
- Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Steitz, J.A. i Weiner, A.M.

(1987) Molecular Biology of the gene. 4th edition. Benjamin/cummings Publishing Co.

- Watson, J.D., Tooze, J. i Kurtz, D.T. (1986) ADN Recombinante. Introducción a la Ingeniería Genética.

AVALUACIÓ

Avaluació mitjançant un examen final escrit.