



#### DATOS DE LA ASIGNATURA

**Denominación:** TÉCNICAS BÁSICAS DEL DNA RECOMBINANTE

**Código:** 15717

**Plan de estudios:** MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR Y GENÉTICA

**Curso:** 1

**Denominación del módulo al que pertenece:**

**Materia:**

**Carácter:**

**Créditos ECTS:** 4

**Porcentaje de presencialidad:** 40%

**Plataforma virtual:**

**Duración:**

**Horas de trabajo presencial:** 40

**Horas de trabajo no presencial:** 60

#### DATOS DEL PROFESORADO

**Nombre:** MOYANO CAÑETE, ENRIQUETA

**Departamento:** BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Área:** BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**e-Mail:** bb2mocae@uco.es

**Teléfono:** 957218895

**Nombre:** MICHAN DOÑA, CARMEN MARIA

**Departamento:** BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Área:** BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**e-Mail:** bb2midoc@uco.es

**Teléfono:** 957218082

**Nombre:** MORENO VIVIAN, CONRADO

**Departamento:** BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Área:** BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**e-Mail:** bb1movic@uco.es

**Teléfono:** 957218588

**Nombre:** ROLDAN RUIZ, MARIA DOLORES

**Departamento:** BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Área:** BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**e-Mail:** bb2rforum@uco.es

**Teléfono:** 957218318

**Nombre:** RUIZ ROLDÁN, MARÍA CARMEN

**Departamento:** GENÉTICA

**Área:** GENÉTICA

**e-Mail:** ge2rurom@uco.es

**Teléfono:** 957218981

**Nombre:** GONZALEZ RONCERO, MARIA ISABEL

**Departamento:** GENÉTICA

**Área:** GENÉTICA

**e-Mail:** ge1gorom@uco.es

**Teléfono:** 957218981

#### DATOS ESPECÍFICOS DE LA ASIGNATURA

**Requisitos previos establecidos en el plan de estudios**

Ninguno.

**Recomendaciones**

Tener conocimientos básicos de inglés.

**COMPETENCIAS**

CB12	Que los y las estudiantes sepan comunicarse con sus colegas, con la comunidad académica en su conjunto y con la sociedad en general acerca de sus áreas de conocimiento.
CB13	Que se les suponga capaces de fomentar, en contextos académicos y profesionales, el avance tecnológico, social o cultural dentro de una sociedad basada en el conocimiento.
CB6	Capacidad para comprender y aplicar la responsabilidad ética, la legislación y la deontología profesional de la actividad de la profesión de...
CB9	Que los las estudiantes hayan demostrado una comprensión sistemática de un campo de estudio y el dominio de las habilidades y métodos de investigación relacionados con dicho campo.
CE6	Capacidad para utilizar y desarrollar metodologías, métodos, técnicas, programas de uso específico, normas y estándares específicos de la materia correspondiente.
CE9	Ser capaz de comprender y aplicar los modelos y métodos avanzados de análisis cualitativo y cuantitativo en el área de la materia correspondiente.
CU1	Que los estudiantes sepan aplicar los conocimientos adquiridos y su capacidad de resolución de problemas en entornos nuevos o poco conocidos dentro de contextos más amplios (o multidisciplinares) relacionados con su área de estudio.
CU5	Fomentar en los estudiantes las siguientes capacidades y habilidades: análisis y síntesis, organización y planificación, comunicación oral y escrita, resolución de problemas, toma de decisiones, trabajo en equipo, razonamientos crítico, aprendizaje autónomo, creatividad, capacidad de aplicar los conocimientos teóricos en la práctica, uso de Internet como medio de comunicación y como fuente de información.

**OBJETIVOS**

Adquirir los conocimientos básicos, tanto a nivel teórico como práctico, para su iniciación en la utilización de las principales técnicas de genómica y de ingeniería genética.

Conocer las técnicas de clonación, hibridación de ácidos nucleicos, PCR y mutagénesis dirigida, expresión heteróloga de genes para proteínas recombinantes.

Adquirir la capacidad de aplicación de técnicas básicas en diferentes muestras biológicas.

**CONTENIDOS****1. Contenidos teóricos****Módulo 1: Clonación**

1. Qué es la clonación
2. Estrategias de clonación de ADN
  - 2.1. Obtención del ADN: Amplificación de fragmentos ADN genómico (PCR). Obtención de fragmentos mediante enzimas de restricción.
  - 2.2. Vectores de clonación
  - 2.3. Organismos hospedadores
  - 2.4. Métodos de transformación
  - 2.5. Selección de las células transformadas

### 3. Aplicaciones de la clonación

#### **Módulo 2: Hibridación de ácidos nucleicos**

1. Fundamentos de la hibridación de ácidos nucleicos
2. Tipos de técnicas de hibridación
3. Etapas y factores que afectan a la hibridación
4. Ventajas e inconvenientes de los diferentes tipos de membranas y de marcaje de la sonda
5. Kits comerciales

#### **Módulo 3: PCR y mutagénesis dirigida**

1. Fundamentos de la PCR
  - 1.1. Introducción y consideraciones generales
  - 1.2. Características de las DNA polimerasas termoestables
  - 1.3. Características de los oligonucleótidos cebadores
  - 1.4. Tipos de PCR: PCR convencional, PCR inversa, RACE-PCR, PCR en tiempo real, PCR in situ, otros tipos de PCR
  - 1.5. Aplicaciones de la PCR
2. Mutagénesis dirigida
  - 2.1. Introducción y consideraciones generales
  - 2.2. Tipos de mutagénesis
  - 2.3. Descripción de algunos sistemas comerciales de mutagénesis dirigida

#### **Módulo 4: Expresión de proteínas**

1. Introducción: Conceptos de expresión homóloga y heteróloga
2. Técnicas de análisis transcripcional
  - 2.1. Identificación de promotores y de secuencias reguladoras de unión DNA-proteína. Experimentos de huella y de retardo de la movilidad en gel
  - 2.2. Identificación del extremo 5 del transcrito. Experimentos de extensión de cebadores y de digestión con nucleasa S1
  - 2.3. Técnicas de identificación y cuantificación de transcritos
  - 2.4. Fusiones transcripcionales y traduccionales de genes informadores
3. Expresión heteróloga de proteínas
  - 3.1. Objetivos y problemática de la expresión de genes clonados
  - 3.2. Principales sistemas de expresión
  - 3.3. Tipos de expresión (proteínas de fusión, de secreción, etc.)
  - 3.4. Vectores de expresión y vectores lanzaderas
  - 3.5. Factores que afectan a la expresión y estrategias para su optimización
  - 3.6. Expresión y purificación de proteínas marcadas (6xHis, etc.)
  - 3.7. Descripción de algunos vectores y sistemas comerciales de expresión (pET, pQE, pMAL, pGEX, etc.)
  - 3.8. Cuantificación de la expresión
4. Análisis funcional de los genomas: genómica y proteómica
  - 4.1. Técnicas de análisis genómico de la expresión génica
  - 4.2. Identificación de proteínas y modificaciones post-transcripcionales
  - 4.3. Interacciones proteína-proteína
  - 4.4. Bioensayo

## **2. Contenidos prácticos**

### **1º-Clonación de un fragmento de ADN genómico de *Fusarium oxysporum* en *Escherichia coli*.**

1. Amplificación mediante PCR del fragmento de interés.
3. Ligación del fragmento en el vector pGEM-T.
4. Transformación de la bacteria *Escherichia coli*.
5. Selección y análisis de los transformantes

- a) Amplificación del fragmento mediante PCR de colonia
- b) Análisis de los tamaños de los plásmidos recombinantes mediante electroforesis en gel de agarosa.

### -Transformación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Clonación de un fragmento de ADN copia mediante recombinación homóloga "in vivo".
2. Transformación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Selección y análisis de los transformantes.

### 2º-Realización de un Southern blot.

1. Fraccionamiento de una muestra de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa.
2. Transferencia de la muestra de DNA a un filtro de nailon.
3. Preparación de una sonda de DNA marcada con digoxigenina.
4. Proceso de hibridación, lavados y detección de la señal.

### 3º-PCR y mutagénesis dirigida.

Utilización de la PCR y el DNA total de la bacteria alcalófila degradadora de cianuro y de cianato *Pseudomonas pseudoalgaligenes* CECT5344 junto con los cebadores cynLF9 y cynLR5 para introducir los sitios de corte para las enzimas de restricción *Pst*I y *Not*I en el gen *cynB* que codifica el componente transmembrana de un transportador de tipo ABC posiblemente de cianato.

### 4º-Análisis de la expresión en *E. coli* de una proteína recombinante.

1. Utilización de una estirpe de *E. coli* previamente transformada con una construcción que permite sobreexpresar la nitrorreductasa NprA de la bacteria *Rhodobacter capsulatus* fusionada a una secuencia marcadora de seis histidinas en el extremo N-terminal.
2. Inducción de la expresión con IPTG y detección de la proteína recombinante mediante Western-blot con anticuerpos frente a las oligohistidinas.

## METODOLOGÍA

### Aclaraciones generales sobre la metodología y adaptaciones metodológicas para los alumnos a tiempo parcial

Al comenzar la asignatura se entregará a cada alumno en forma de libro todo el material necesario (explicación y planificación del curso, bibliografía, contenido de explicaciones teóricas, protocolos prácticos, etc). Esta información estará disponible en el aula virtual de la UCO (<http://www3.uco.es/moodle>)

**Clases teóricas:** se impartirán en el aula mediante clases magistrales en las que se desarrollará los diferentes temas, profundizando en los conceptos básicos para la realización posterior de las prácticas correspondientes. Los alumnos completarán estas clases con la consulta de la bibliografía recomendada para cada tema en particular.

**Clases prácticas:** se impartirán en grupos reducidos en los laboratorios de prácticas de tercer ciclo del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y del Departamento de Genética de la UCO. Las prácticas de uno de los grupos del módulo 2 se impartirán preferentemente en inglés.

### Actividades presenciales

Actividad	Grupo completo	Grupo mediano	Total
<i>Actividades de evaluación</i>	3	-	3
<i>Laboratorio</i>	26	-	26
<i>Lección magistral</i>	9	-	9
<i>Tutorías</i>	2	-	2
<b>Total horas:</b>	<b>40</b>	<b>-</b>	<b>40</b>

## Actividades no presenciales

Actividad	Total
Consultas bibliográficas	12
Ejercicios	8
Estudio	40
<b>Total horas:</b>	<b>60</b>

## MATERIAL DE TRABAJO PARA EL ALUMNADO

Casos y supuestos prácticos  
Cuaderno de Prácticas  
Dossier de documentación  
Manual de la asignatura

## EVALUACIÓN

Competencias	Instrumentos		
	Pruebas de respuesta corta	Pruebas de respuesta larga (desarrollo)	Actitud y participación
CB12			
CB13			
CB6			
CB9			
CE6			
CE9			
CU1			
CU5			
<b>Total (100%)</b>	20%	60%	20%

**Periodo de validez de las calificaciones parciales:** *Se le guardará el porcentaje de las pruebas de respuesta corta y la correspondiente a la actitud y participación hasta que se supere la asignatura*

## BIBLIOGRAFÍA

### 1. Bibliografía básica:

- Ausubel FM, Brent R., Kingston RE, Moore DD, Seidman JG. Smith JA. Struhl K. eds. Current Protocols in Molecular Biology. Vol 1, 2 & 3. Green Publishing Associates & John Willey. 2004
- Sambrook J y Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed, Vols 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001
- Brown TA. Gene Cloning and DNA Analysis. An Introduction. Sixth Edition. Wiley-Blackwell Science. 2010
- Glick BR, Pasternak JJ, Pattern CL. Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA. 4th Edition. ASM Press. 2003
- Wilson K & Walker J. 2010. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 7th Edition. Cambridge University Press. 2010
- Tait RC. An Introduction to Molecular Biology. Horizon Scientific Press. 1997
- Newton CR y Graham A. PCR. 2nd ed. Bios. Sci. Publ., Springer-Verlag. 1997

## 2. Bibliografía complementaria:

-DIG DNA labelling and detection kit. Roche Molecular Biochemicals.

### CRITERIOS DE COORDINACIÓN

Ningún criterio introducido.