



Programa sinóptico de la unidad curricular: **INGENIERÍA GENÉTICA**

Unidad Curricular: Ingeniería Genética					Unidad Responsable: Dpto. de Biología				
Datos Unidad Curricular		Modalidad			Tipo Dedicación		Dedicación Total Unidad Curricular		
Código	Semestre	T	P	L	HTSP	HTSNP	CA	Total Horas por Semana (HS=CA X 3)	Total Horas por Semestre (HS X 16)
191403	9	2	0	6	2	6	4	12	192

Prelaciones: Haber aprobado el séptimo semestre, es decir 117 CA

HSTP: Horas semanales de trabajo que se realiza en el aula o laboratorio y requiere preparación y trabajo adicional

HTSNP: Horas semanales que se realizan en el aula o laboratorio y no requieren de preparación o trabajo adicional

CA: créditos académicos

Justificación

La ingeniería genética o molecular se define con el conjunto de técnicas, herramientas y estrategias que permiten modificar directamente el material genético con objetivos precisos, bien sean relacionados con una investigación básica, comprensión de las bases moleculares de un fenómeno biológico, o aplicada, obtención de un servicio o producto útil (incluido un ser vivo) y, por tanto, de interés comercial. El objetivo de esta Unidad curriculares profundizar en algunas metodologías que nos permiten modificar genéticamente células, organismos diversos o plantas mediante la manipulación del ADN.

En el presente curso se pretende explicar la base conceptual de éste conjunto de técnicas y dar a conocer las aplicaciones más inmediatas. Aprenderemos a combinar moléculas de ADN de distinta procedencia, amplificarlos y transferirlos de un ser a otro rompiendo la barrera de las especies como unidades genéticamente inmiscibles. Se hará un repaso de las propiedades fisicoquímicas de los ácidos nucleicos, organización genómica de virus, plásmidos, bacterias y eucariotas. Se abordarán las técnicas más actualizadas de secuenciación de ADN, amplificación en tiempo real y microarreglos. Finalmente se estudiarán las técnicas y estrategias para la obtención de organismos eucariotas genéticamente modificados o clones y se estudiarán sus aplicaciones en investigación básica y biotecnología. Estos conocimientos tienen como fin último incentivar en el futuro investigador el emprendimiento de nuevas tecnologías, la generación conocimientos y de productos de interés biotecnológico.

Requerimientos

Bioquímica (teoría y laboratorio), genética (teoría y laboratorio) y biología celular.

Objetivo General



Ayudar a lograr una comprensión de los sistemas biológicos en función de las estrategias de modificación molecular y su aplicación en el campo de la biotecnología, así como en el estudio de los procesos fisiológicos de la célula u organismo.

Objetivos Específicos

- Comprender la organización del genoma eucariota, las propiedades fisicoquímicas de los ácidos nucleicos: analizar las técnicas de purificación de ADN genómico, plasmídico, ARN total y ARNm.
- Integrar las técnicas Bioquímicas para el análisis de ácidos nucleicos a nivel molecular: analizar los métodos de fragmentación de ADN por métodos físicos y enzimáticos y su uso en el desarrollo de sistemas de diagnóstico e identificación molecular. Comprender y aplicar las estrategias para la unión de fragmentos de ADN y obtención de quimeras moleculares. Analizar cronológicamente el avance de las técnicas de secuenciación y amplificación de ácidos nucleicos. Aplicación en el campo de la medicina forense y filogenia molecular.
- Comprender las estrategias de amplificación génica y obtención de ADN recombinante: analizar técnicas básicas de clonaje, vectores, hospederos e introducción de material genético foráneo en organismos procariontes y eucariotas. Integrar los métodos de construcción de librerías genómica y de ADN complementario. Comprender las técnicas de mutagénesis dirigida y su aplicación en el estudio de proteínas.
- Identificar y comprender los métodos moleculares para estudiar la función génica: aplicar las técnicas de transferencia génica en organismos procariontes y eucariotas. Aplicar las herramientas para expresar y purificar proteínas recombinantes en sistemas heterólogos y homólogos. Analizar las estrategias para la generación de organismos transgénicos. Integrar los métodos para regular la expresión génica mediante Interferencia por ARN. Discutir las aplicaciones en el campo de la terapia génica y estudios de biología celular.

Contenido

UNIDAD I: Organización del genoma eucariota, estructura y propiedades fisicoquímicas de los ácidos nucleicos

Tema 1. Organización del genoma eucariótico. El ADN es el material genético hereditario. La organización de los genes interrumpidos: exones, intrones. Clasificación del genoma: genes únicos y repetidos. Genómica, genoma, gen. Número de genes. Homologías y diferencias entre los genes de distintos organismos. Redundancia génica y redundancia funcional. Organización de las secuencias altamente repetidas.

Tema 2. Métodos de extracción y purificación de ADN (plasmídico, de bacteriófagos, genómico) y ARN (ARN total, ARNm, poli(A)+). Cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría. Electroforesis en geles de agarosa y acrilamida; factores que influyen en el resultado de una electroforesis. Electroforesis de



ácidos nucleicos en condiciones nativas y desnaturalizantes.

Tema 3. Desnaturalización y renaturalización de estructuras bicatenarias.

Hibridación entre ácidos nucleicos, transferencia de cadenas de ácidos nucleicos a soportes sólidos, transferencia del ADN de colonias bacterianas y de halos de lisis, marcaje e hibridación de ácidos nucleicos inmovilizados en soportes, aplicación de la hibridación, Microchips de ADN.

UNIDAD II: Técnicas bioquímicas básicas para el análisis genético a nivel molecular.

Tema 4. Enzimas de restricción. Métodos de restricción de ácidos nucleicos, sistemas de restricción – modificación bacterianos, endonucleasas de restricción tipo II (nomenclatura, sitios de restricción), endonucleasas de especificidad relajada, isosquízómeros, actividad estrella, Análisis de fragmentos de restricción, elaboración de mapas de restricción, Análisis de polimorfismos de restricción (RFLPs), diagnóstico de enfermedades y la huella genética individual.

Tema 5. Unión enzimática de fragmentos de ADN. DNA-ligasas, extremos protuberantes y romos, terminales compatibles obtenidos por digestión con enzimas diferentes, modificación de extremos, linkers y adaptadores, consideraciones del proceso de ligado, orientación en la unión de los fragmentos.

Tema 6. Secuenciación de ADN y Análisis de datos. Marco histórico de los métodos de secuenciación, métodos de secuenciación: secuenciación termocíclica, secuenciación automática. Pirosecuenciación y métodos de segunda y tercera generación. Bases de datos de nucleótidos: genes, secuencias codificantes CDS. Bases de datos del proyecto genoma de diversos organismos de interés: patógenos de humanos, ganado y plantas.

Tema 7: Reacción en cadena de la polimerasa. Descripción del método. Variaciones de la técnica básica: Retro-PCR; PCR inversa; PCR interna; PCR asimétrica; PCR *in situ*; adición de secuencias en los extremos; PCR múltiple; PCR arbitraria. Algunas de las aplicaciones de la PCR: prediagnóstico de enfermedades; diagnóstico de enfermedades; amplificación de regiones hipervariables en investigaciones forenses; aplicaciones en estudios evolutivos.

UNIDAD III: Amplificación génica por métodos de ingeniería genética y obtención de ADN recombinante.

Tema 8. Panorámica general de la tecnología del clonaje de ADN. EL ADN vector, el ADN blanco o pasajero, el ADN recombinante, la célula hospedadora, Análisis de clones, expresión de genes clonados, logros y aplicaciones de la tecnología de ADN recombinante. Plásmidos para clonamiento y secuenciación, métodos de transferencia de ADN plasmídico a *Escherichia coli*, estirpes bacterianas utilizadas con vectores plasmídicos.

Tema 9. Tipos de clonaje: librerías genómicas, subclonaje y paseo cromosómico; Librerías de cDNA. Detección del clon deseado. Vectores procarióticos: plásmidos, bacteriófagos, cósmidos y M13. Cromosomas artificiales de bacterias. Elección del



vector más idóneo al tipo de clonaje. Clonaje de productos de la PCR y amplificación de secuencias clonadas. Obtención de sondas para rastrear librerías. Expresión y métodos de identificación de los productos clonados.

Tema 10. Mutagénesis dirigida y sus aplicaciones: Inducción enzimática de deleciones a nivel de gen. Mutaciones a nivel de nucleótido (oligonucleótido y M13), mutaciones por PCR. Mutagénesis por recombinación homóloga (dianas génicas).

UNIDAD IV. Métodos moleculares para estudiar la función génica.

Tema 11: Transferencia génica en *E. coli*, levaduras, insectos y otros eucariotas. Las bacterias como hospederos para expresión, características de los vectores de expresión, principales etiquetas y fusiones a proteínas, métodos de purificación de proteínas recombinantes. Las levaduras como hospedadores de clonaje y expresión, Vectores de expresión y cromosomas artificiales. Transferencia génica en insectos: los baculovirus como sistema de expresión alternativo al de levaduras. *Leishmania tarentolae* como sistema de expresión y vectores de expresión. Productos de interés biotecnológico. Interferencia por ARN, definición mecanismo, vectores y estrategias para generar líneas celulares que expresen ARNs cortos de interferencia.

Tema 12: Transferencia génica a células de mamíferos. Métodos de transfección: transfección de expresión transitoria y transfección estable. Métodos de selección y genes señal para transformaciones estables y transitorias. Tipos de vectores: virus animales como vectores: retrovirus, lentivirus, SV40, adenovirus, adenoasociados, herpes y virus de la vacuna. Cromosomas artificiales de mamíferos CAMs (MACs).

Tema 13. Transferencia génica germinal y aplicaciones biotecnológicas. Transplante de núcleos e individuos genéticamente idénticos (clónicos). Animales transgénicos: microinyección de DNA a huevos fecundados, transfección/transducción a embrioblastos. Expresión génica en ratones transgénicos: eliminación de la función de un gen (knock out), incorporación de un nuevo gen (knock in). Expresión génica específica de tejidos. Aplicación de animales clónicos y transgénicos en investigación básica, biotecnología y animales de granja. Producción de compuestos de interés farmacológico en la leche de mamíferos. Órganos de animales transgénicos para trasplantes en el hombre.

UNIDAD V. Proyecto de laboratorio

1. Purificación de ADN genómico a partir de células eucariotas

- Aislamiento y purificación con fenol:cloroformo
- Visualización en geles de agarosa
- Cuantificación espectrofométrica

2. Extracción y purificación de ARN total de células eucariotas

- Aislamiento y purificación por el método de Trizol
- Visualización en geles de agarosa en condiciones desnaturizantes
- Cuantificación espectrofotométrica

3. Amplificación de los genes blanco por RT-PCR



- Síntesis de ADNc, amplificación por PCR, programación del termociclador.
 - Cuantificación del amplificado de PCR.
- 4. Clonaje en vectores plasmídicos**
- Purificación del amplificado de PCR, purificación de ADN plasmídico a través del método de lisis alcalina.
 - Visualización del producto de amplificación por PCR en geles de agarosa.
 - Determinación del peso molecular del amplificado, debe usar una escalera de peso molecular.
 - Purificación del amplificado de PCR (Kit Promega).
 - Cuantificación espectrofotométrica del ADN plasmídico y visualización del mismo en geles de agarosa.
 - Unión del fragmento de PCR al vector plasmídico usando ADN ligasa del fago T4
- 5. Ensayos de expresión de proteínas recombinantes**
- Medio de autoinducción. Discusión del método.
 - Preparación de los materiales, soluciones y tampones para electroforesis, acrilamida etc.
 - Ensayos de expresión
 - Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Estrategias metodológicas

Se desarrollaran en el dictado de la unidad curricular diferentes estrategias metodológicas, entre las que se proponen aplicación del: Modelo deductivo de enseñanza directa. Modelo inductivo y Modelo deductivo (amplio interactivo). El alumno contará con todo el programa de la unidad curricular y material de apoyo del curso con anticipación a las clases teóricas y prácticas del curso. Durante las horas de clase el profesor expondrá los temas del programa descrito previamente. Además, el alumno recibirá una hoja resumen de cada tema, con referencias a los textos que se citan en esta guía, direcciones de interés en “Internet”, etc. Las ilustraciones empleadas por el profesor estarán disponibles para el alumno a través de la carpeta Ingeniería Genética de Dropbox del curso.

1. El trabajo práctico consistirá en la ejecución, por parejas de alumnos, de todos los pasos posibles de un experimento de clonación de un gen en un vector bacteriano, su introducción en la bacteria hospedadora y el análisis del resultado obtenido. Se establecerán dos grupos de prácticas, cada uno de los cuales trabajará durante media jornada dos días a la semana. Presentación de seminarios impartidos por grupos de un máximo de 2 alumnos. Consistirá en la exposición durante un máximo de 20 minutos de una publicación científica original relacionada con algún tema del curso, seguida de un debate de 5 minutos. Serán publicaciones que hoy consideramos históricas o pioneras en el campo de la Ingeniería genética molecular, o publicaciones recientes especialmente novedosas. En principio, el profesor ofrecerá una lista de publicaciones a



distribuir al azar entre los distintos grupos. No obstante, los grupos que estuvieran interesados en alguna publicación no incluida en la lista pueden utilizarla para su orden y claridad de la exposición. A esa valoración se añadirá la de los propios alumnos asistentes y no implicados en cada exposición. Tendrá un valor de 10%. (5% del profesor y 5% de los alumnos). Seminario, previa consulta con el profesor.

Estrategias de evaluación

2. Exámenes de teoría: Habrá 3 exámenes escritos, con un valor de 20% cada uno. Se evaluará una unidad por examen y corresponderán a las tres primeras unidades.
3. Prácticas: Se valorará la asistencia, interés y dedicación al trabajo (10%) y la preparación de un breve informe escrito realizado por parejas al final del trabajo práctico, este último tiene un valor de 20%.
4. Seminarios: El profesor valorará el grado de comprensión del tema, así como el Para aprobar la unidad curriculares preciso haber obtenido un mínimo de 10 puntos en el conjunto de las actividades evaluadas.

Bibliografía

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, J. y Maniatis T. Digital Dropbox Curso Current protocols, 2008. Digital Dropbox curso
Bioinformatics For Dummies, Claverie, J., Notredame, C. (2003). Wiley Publishing, Inc. Indianapolis, Indiana, USA. Digital Dropbox curso
Ingeniería Genética y transferencia génica M. Izquierdo. Ed. Pirámide. Madrid 2001.
Genetics a conceptual approach: Benjamín A. Pierce. Freeman & Co. New York 2002.
Ingeniería Genética J. Perera, A. Tormo y J.L. García . Editorial Síntesis 2002.
Genes VIII B. Lewin. Oxford University Press 2004.
Biochemistry and Molecular Biology W.H. Elliot, D.C. Elliot Oxford University press. Oxford. 2005
Glick, Pasternak y Patten: MOLECULAR BIOTECHNOLOGY: Principles and Applications of Recombinant DNA, 4ª edición. ASM Press (2010).
Brown: Genomas 3, Ed. Panamericana (2008).
Watson, Myers, Caudy y Witkowski: Recombinant DNA: genes and genomes, a short course, 3ª edición. Freeman and Company (2007).
Strachan y Read, Human Molecular Genetics, 4ª edición Garland Science (2011).
En determinados temas se incluirán referencias a otros textos o artículos originales.

WEB

Introduciendo en un buscador términos como genetic engineering o similares aparecen centenares de páginas webs con información, publicaciones, videos, etc. relacionados con la Ingeniería genética molecular.

- National Center for Biotechnology Information (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Genetic engineering & biotechnology news (GEN): <http://www.genengnews.com/>

Revista gratuita "on line" de gran prestigio que incluye novedades científicas y empresariales, al nivel internacional, relacionadas con la Biotecnología en general, pero con abundantes referencias a aspectos de la Ingeniería genética molecular.