

INGENIERÍA GENÉTICA – 2022

PROGRAMA ANALÍTICO

PRIMERA PARTE

UNIDAD 1

Metodología del DNA recombinante. Objetivos generales del uso de estas metodologías. Panorama general de las estrategias más comunes utilizadas en ingeniería genética.

UNIDAD 2

Enzimas utilizadas en el clonado molecular. Enzimas de restricción y enzimas metilantes. DNA polimerasas. RNA polimerasa-DNA dependiente. Ligasas, quinasas, fosfatasas. Proteínas de unión a DNA.

UNIDAD 3

Características esenciales de los plásmidos. Los plásmidos como vectores de clonado. Desarrollo de nuevos plásmidos. Plásmidos comúnmente usados.

UNIDAD 4

Extracción y purificación de ácidos nucleicos. Manipulación de DNA plasmídico. Preparación en pequeña escala (*miniprep*). Preparación en gran escala (*maxiprep*).

UNIDAD 5

Electroforesis de ácidos nucleicos. Electroforesis en geles de agarosa. Electroforesis en geles de poliacrilamida. Electroforesis en condiciones nativas y en condiciones desnaturalizantes. Purificación de ácidos nucleicos a partir de geles de agarosa.

UNIDAD 6

Amplificación *in vitro* de DNA por PCR. Diseño de oligonucleótidos para actuar como *primers*. Optimización de una reacción de PCR. Variantes técnicas de la PCR. Reacciones de transcripción reversa para la generación de cDNA.

UNIDAD 7

Estrategias de clonado en plásmidos. Estrategias de ligación. Defosforilación de DNA plasmídico linealizado. Reacciones de ligación.

UNIDAD 8

Metodologías para la introducción de DNA plasmídico en hospedadores adecuados. Preparación y transformación de *Escherichia coli* competentes. Electroporación.

UNIDAD 9

Identificación de colonias bacterianas que contienen plásmidos recombinantes. Análisis de restricción. Análisis por α -complementación. Inactivación insercional.

UNIDAD 10

Preparación de bibliotecas de clones. Extracción, purificación y análisis de DNA genómico. Construcción y análisis de bibliotecas de DNA genómico. Bibliotecas transcriptómicas. Proyectos genoma.

UNIDAD 11

Metodologías para la preparación de sondas de ácidos nucleicos. Técnicas basadas en el uso de isótopos radiactivos y técnicas basadas en reacciones colorimétricas o de luminiscencia (métodos no radiactivos). Sondas oligonucleotídicas sintéticas.

UNIDAD 12

Metodologías para el rastreo y detección de recombinantes en bibliotecas de clones. Uso de anticuerpos y sondas de ácidos nucleicos. Búsqueda por hibridación: *Colony Blot*, *Dot Blot*, *Southern Blot*. Secuenciamiento de ácidos nucleicos.

UNIDAD 13

Metodologías para la caracterización transcripcional de genes. Estudios de regiones promotoras. Caracterización de extremos de los mRNA. Detección de mRNAs mediante *Northern Blot*. Análisis de mRNAs mediante reacciones de RT-PCR. Caracterización de proteínas de unión a ácidos nucleicos.

UNIDAD 14

Características esenciales de los bacteriofagos. Fagos con genoma de DNA de doble y simple cadena como vectores de clonado. Bacteriófago lambda. Fagos filamentosos: M13. Hospedadores bacterianos. Crecimiento, purificación y extracción de DNA. Clonado en *phagemids*. Identificación y análisis de recombinantes.

UNIDAD 15

Características esenciales de los cósmidos. Cósmidos como vectores de clonado. Clonado en cósmidos. Construcción de bibliotecas de DNA genómico en cósmidos, fósidos, PACs y BACs. Amplificación y almacenamiento de las bibliotecas.

SEGUNDA PARTE

UNIDAD 16

Vectores de expresión. Expresión de genes clonados en *E. coli*. Detección y análisis de proteínas expresadas a partir de genes clonados. Optimización de la expresión de proteínas recombinantes.

UNIDAD 17

Características de las inteínas. Utilización de inteínas para la expresión de proteínas. Desarrollo de plásmidos de expresión conteniendo secuencias que codifican para inteínas.

UNIDAD 18

Mutagénesis *in vitro*. Generación de moléculas quiméricas por PCR. Mutagénesis de sitio dirigida mediante PCR. Mutagénesis al azar mediante PCR. Generación de bibliotecas de mutantes para un gen.

UNIDAD 19

Mutagénesis genómica. Estudio de la función génica mediante generación de *Knock outs* y *Knock down*. Búsqueda de genes mediante mutagénesis genómica. Utilización de transposones.

UNIDAD 20

Mapeo genómico. Técnicas basadas en genética clásica. FISH. Generación de paneles de células híbridas.

UNIDAD 21

Metodologías de tipificación y diagnóstico. Técnicas basadas en RFLP. Técnicas basadas en hibridación. Técnicas basadas en PCR. *Multiplex* PCR. AFLP. Análisis filiatorios.

UNIDAD 22

Metodologías actualizadas para la búsqueda de genes específicos en bibliotecas de genomas complejos. *Microarrays*. *Proteomics*. Nuevos sistemas de clonado. Introducción a metodologías y aplicaciones orientadas a emprendimientos.

BIBLIOGRAFIA

- Molecular Cloning, a laboratory manual. Volume I – II. 2nd edition. J. Sambrook; E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, USA.
- Recombinant DNA. 2nd edition. J.D. Watson; M. Gilman; J. Witkowski and M. Zoller. 1992. Scientific American Books. W.H. Freeman and Company. New York. USA.
- Molecular genetics of Bacteria. Larry Snyder and Wendy Champness. 1997. American Society for Microbiology. Washington DC. USA.
- Genome Analysis. A laboratory manual. Volume 3. Cloning systems. 1999. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- Mapping Genomics. A laboratory manual. Volume 4. Cloning systems. 1999. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA. 3rd edition. 2003. B.R. Glick and J.J. Pasternak. ASM Press. Washington, USA.
- Plasmid Biology. 2004. Barbara E. Funnell and Gregory J. Phillips. American Society for Microbiology. Washington DC. USA.
- Plasmids, a practical approach. 1987. K.G. Hardy. IRL Press Limited. Oxford. England.
- Basic methods in molecular biology. 2nd edition. L. Davis. M. Kuehl. J. Battey. Appleton & Lange, Norwalk. Connecticut.
- DNA Science: a first course in Recombinant DNA technology. 1990. D.A. Micklos and G.A. Freyer. Cold Spring Harbor Laboratory Press and Carolina Biological Supply Company. Cold Spring Harbor. USA.
- Recombinant DNA and Biotechnology. 2nd edition. 2001. ASM Press. Washington, USA.
- PCR Cloning protocols. Methods in Molecular Biology, vol. 57. 1997. B.A. White. Humana Press. Totowa, New Jersey, USA.
- Papers listados en: "Seminarios".
- Biología Celular y Molecular. Lodish. C571.6 BIO
- Biología Molecular de la Célula. Alberts. C571.6 BIO
- PCR. Carl. W. Dieffenbach, C547.84 PCR
- Exp. In molecular Biology. Slater C572.8 EXP
- Biología Molecular e Ingeniería Genética. C 572.8 LOQ
- Producción de Proteínas Recombinantes. C572.8 PRO
- DNA Finger printing. Kirby. C572.86