



Universidad  
Nacional  
de Quilmes

- 1- **CARRERA/DIPLOMA: Licenciatura en Biotecnología**
- 2- **NOMBRE DE LA ASIGNATURA: Ingeniería Genética**

**Aplicada**

- 3- **NÚCLEO AL QUE PERTENECE LA ASIGNATURA:  
Obligatorio de Orientación**
- 4- **AREA DE CONOCIMIENTO: Biología Celular y Molecular**
- 5- **TIPO DE ASIGNATURA: Teórico-experimental**
- 6- **CRÉDITOS: 16**
- 7- **CARGA HORARIA TOTAL: 144 hs**
- 8- **PROGRAMA ANALÍTICO (incluyendo programa de laboratorio si correspondiera)**

**UNIDAD 1**

Organización del genoma eucariótico. Componentes de un vector de expresión eucariótico. Preparación de fragmentos y vectores. Construcción de plásmidos. Análisis de restricción. Selección de recombinantes por hibridación de colonias.

Aislamiento de RNA de células eucarióticas. Purificación de RNA total y RNA mensajero. Síntesis de cDNA. Alternativas en la síntesis. RT-PCR. Técnicas de clonado del cDNA. Cuantificación de ácidos nucleicos por PCR cuantitativa. PCR cuantitativa competitiva. PCR cuantitativa no competitiva con estándar interno. PCR cuantitativa no competitiva con estándar externo. Real time PCR.

**UNIDAD 2**

Análisis de transcritos. DNA substractivo. Síntesis de la primera cadena de cDNA e hibridación a RNA mensajero. Separación de cadenas simples y dobles mediante cromatografía en hidroxapatita. Selección positiva y generación de cDNA de doble cadena. Amplificación por PCR de cDNA substractivo. Generación de Sondas Substractivas

*Differential Display*, SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*). RAGE (*Rapid Analysis of Gene Expression*). cDNA-AFLP (*cDNA amplified fragment length polymorphism*). iAFLP (*introduced amplified fragment length polymorphism*). RC4D (*Restriction fragment-coupled differential display*). DDRT-PCR (*differential display reverse transcription PCR*)

*Microarrays* de ácidos nucleicos y proteínas. Nociones elementales de la técnica. Importancia de su empleo en los proyectos genomas y en el análisis de transcriptomas y proteomas. APEX (*Arrayed primer extensión*), método y aplicaciones.

### **UNIDAD 3**

Baculovirus. Expresión en baculovirus. Vectores baculovirales. Vectores de transferencia. Clonado en los vectores de transferencia. Recombinación homóloga *in vitro*. Selección y optimización de la obtención de recombinantes. Cultivo *in vitro* de baculovirus, en monocapa y en suspensión. Expresión de proteínas recombinantes, análisis de los productos. Optimización de la expresión.

Sistema "Bac to Bac" como herramienta mixta para expresión en eucariotas.

### **UNIDAD 4**

Otros sistemas virales utilizados para la expresión de genes heterólogos. Vectores virales. SV40 y células COS. *Vaccinia virus*. *Semliki Forest Virus*. Lentivirus. Adenovirus. Vectores retrovirales. Vectores de clonado eucariota. Estudio de promotores eucariotas. Ensayo CAT. Ensayo luciferasa.

Selección de virus recombinantes y líneas celulares transgénicas. Selección por Tk, análogos de bases y G418.

### **UNIDAD 5**

Transfección de células de mamífero. Transfección estable versus transfección transiente. Construcciones de fusión promotor-reportador. Marcadores de selección. Métodos de Transfección *in vitro* e *in vivo*. Fosfato de calcio. DEAE dextrano. Liposomas catiónicos. Electroporación. Biolística. Microinyección. Construcción de vectores para expresión eucariótica estable. Selección mediante genética.

### **UNIDAD 6**

Levaduras. Ciclo celular en levaduras. Levaduras como sistemas de expresión heterólogos. Sistema de expresión *Pichia Pastoris*. Vectores de expresión. Métodos de selección. Recombinación homóloga. Estrategias de complementación. Alternativas para la expresión de genes eucarióticos en el sistema de levaduras. Estudio de interacciones proteína-proteína. Sistema de doble híbrido. Sistema de triple híbrido.

Cromosomas artificiales de levaduras (YACs). Propiedades de los vectores YAC. Propiedades de los hospedadores YAC. Construcción de una biblioteca YAC. Vectores para la construcción YAC. Tratamiento del DNA. Fraccionamiento del DNA por PFGE. Generación de esferoplastos. Transformación

### **UNIDAD 7**

Ácidos nucleicos antisense. Oligonucleótidos: modificaciones, métodos de estabilización, utilidad biológica. Ribozimas: tipos, estructuras, métodos de estabilización, generación de ribozimas tipo *hammerhead in vivo*, utilidad biológica. *Small interfering RNAs* (siRNA).

### **UNIDAD 8**

Hibridación *in situ*. Pretratamiento de los tejidos. Uso de sondas de ARN. Sondas oligonucleotídicas. Parámetros de hibridación. Uso de emulsión autoradiográfica. Prevención de contaminación con ribonucleasas. PCR *in situ*.

### **UNIDAD 9**

Traducción *in vitro*. Preparación de lisados de reticulocitos. Lisados de reticulocitos de Conejo. Germen de Trigo. Microsomas de Páncreas de Perro. Microinyección en ovocitos de *Xenopus*. Obtención de Oocitos. Análisis de proteínas. Caracterización de los productos.

## **UNIDAD 10**

Animales transgénicos. Generación de animales transgénicos. Equipo. Preparación de hembras para la recolección de huevos. Microinyección. Implantación de huevos. Optimización de construcciones de ADN para la expresión *in vivo*. Identificación de progenie transgénica. Optimización de la endocría a partir de los animales fundadores. Aislamiento de células *stem* para la generación de animales quiméricos. Recombinación homóloga en células *stem*. Gen *Knockouts*.

### **Programa de Laboratorio**

#### **Trabajo Práctico N° 1: Cuantificación de DNA mediante PCR Cuantitativa.**

El objetivo del trabajo práctico consistirá en determinar el número de moléculas de un DNA presente en muestras problema mediante PCR cuantitativa competitiva y PCR cuantitativa con estándar externo. Los resultados obtenidos en ambas PCRs deberán analizarse comparativamente y evaluar los posibles errores de cada método.

Técnicas realizadas: PCR y electroforesis en gel de agarosa.

#### **Trabajo Práctico N° 2: Determinación del número de partículas virales por titulación y por cuantificación de genomas.**

El objetivo del trabajo práctico es comparar métodos de cuantificación de partículas virales presentes en un stock viral. Por un lado, se determina el número de partículas infectivas, para lo que se infectan células de insecto y se cuantifican los virus brotantes mediante ensayo de plaqueo. Por el otro, se determina el número total de partículas virales presentes en el stock viral, mediante la cuantificación de los genomas por PCR cuantitativa. Ambas metodologías se comparan teniendo en cuenta la especificidad de detección de cada una.

*Técnicas realizadas:* trabajo en flujo laminar, manipulación de células eucariotas, infección con baculovirus, titulación, purificación de DNA viral,

*Otras técnicas adicionales:* PCR y electroforesis en gel de agarosa.

#### **Trabajo Práctico N° 3: RNA de interferencia en *Caenorhabditis elegans***

El objetivo del trabajo práctico es producir el silenciamiento génico en *C. elegans* (cepa SJ4005), mediante alimentación de los nematodos ("*RNAi feeding*") con bacterias modificadas mediante ingeniería genética (cepa HT115DE3) que expresan dsRNA.

*Técnicas realizadas:* manipulación de los nematodos, plaqueo y microscopía de fluorescencia. clonado en vector de iRNA,

*Otras técnicas adicionales:* transformación, *screening* de colonias por PCR, electroforesis en gel de agarosa,

#### **Trabajo Práctico N°4: Expresión de genes heterólogos utilizando el sistema Bac to Bac.**

El objetivo del trabajo práctico consistirá en clonar y expresar los genes indicadores (DSRED, GFP, EYFP) en células de insecto, utilizando el sistema comercial de expresión baculoviral *Bac to Bac*.

*Técnicas realizadas:* trabajo en flujo laminar, manipulación de células eucariotas, transfección de DNA viral, infección con baculovirus, purificación de DNA viral, microscopía de contraste de fase y de fluorescencia

*Otras técnicas adicionales:* clonado en vector de transferencia, transformación, *screening* de colonias por PCR, electroforesis en gel de agarosa y SDS-PAGE.

## 9- BIBLIOGRAFÍA OBLIGATORIA:

Debido a que las metodologías que se estudian en ésta asignatura son de reciente diseño e implementación es muy difícil encontrarlas en libros de textos. Por ello se entregan a los estudiantes una síntesis de las teorías, apuntes de la asignatura y una serie de *papers* que funcionan como bibliografía obligatoria entre ellos:

1. **Apunte de PCR cuantitativa (REAL TIME PCR)**
2. **Ekkehard Kuhn. 2001.** From library screening to microarray technology: strategies to determine gene expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants. *Annals of Botany* **87**, 139–155. **(Review Análisis de transcritos) PDF**
3. **Gilles, P. Research and Development Invitrogen Corporation 2001.** Generating a Genome-Wide Expression Profile with SAGE Technology. *Focus* **23**, 12-13. **(SAGE)**
4. **Shui Qing Ye, et al. 2000.** MiniSAGE: Gene Expression Profiling Using Serial Analysis of Gene Expression from 1 µg Total RNA. *Analytical Biochemistry* **287**, 144-152. **(SAGE) PDF**
5. **Wang, A. et al. 1999.** Rapid analysis of gene expression (RAGE) facilitates universal expression profiling. *Nucleic Acids Research*. **27**, 4609-4618. **(RAGE) PDF**
6. **Shoko Kawamoto, et. al. 1999.** Expression Profiling by iAFLP: A PCR-Based Method for Genome-Wide Gene Expression Profiling. *Methods* **9**, 1305-1312. **(iAFLP) PDF**
7. **Templin, M. et al 2002.** Protein microarray technology. *TRENDS in Biotechnology*, **20**, N°4, 160-166. **(Review Microarrays de proteínas) PDF**
8. **Lopez, M. and Pluskal M. 2003.** Protein micro- and macroarrays: digitizing the proteome. *Journal of Chromatography B*, **787**, 19-27. **(Microarrays de proteínas). PDF**
9. **Seminars in VIROLOGY-** Animal Virus Expression Vectors. Saunders Scientific Publications/ Academic Press v 3-I 4 1992.
10. **DiCiommo, D.P. and Bremner, R. 1998.** Rapid, high level protein production using DNA-based Semliki Forest virus vectors. *The Journal of Biological Chemistry*. **273**, 18060-18066. **(Semliki Forest virus) PDF**
11. **M. Mackett, g. L. Smith, and b. Moss. 1982.** Vaccinia virus: A selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc. NatL Acad. Sci. USA* Vol. **79**, pp. 7415-7419. **PDF**
12. **S Chakrabarti, K Brechling, and B Moss. 1985.** Vaccinia Virus Expression Vector: Coexpression of 1-Galactosidase Provides Visual Screening of Recombinant Virus Plaques. *Molecular and Cellular Biology* **5 N°12**, 3403-3409. **PDF**
13. **Savvas C. Makrides. 1999.** Components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells. *Protein Expression and Purification* **17**, 183-202. **PDF**

14. **Michael T Lotze, and Thomas A Kost. 2002.** Viruses as gene delivery vectors: Application to gene function, target validation, and assay development. *Cancer Gene Therapy* **9**, 692-699. **PDF**
15. **Apunte de Levaduras**
16. **D.S. Bernstein et al. 2002.** Analyzing mRNA–protein complexes using a yeast three-hybrid system. *Methods* **26** 123–141. **PDF**
17. **Stanley T Crooke. 2000.** Potential roles of antisense technology in cancer chemotherapy. *Nature-Oncogene* **19**, 6651-6659. **(Antisense). PDF**
18. **Teresa Golden, et al. 2002.** Use of Antisense Oligonucleotides: Advantages, Controls, and Cardiovascular Tissue. *Nature –Microcirculation* **9**, 51-54. **(Antisense). PDF**
19. **InvivoGen 2002.** SMALL INTERFERING RNAs: A revolution in functional genomics
20. **Apunte de oocitos de Xenopus**
21. **Apunte de Stem Cell**
22. **Apunte de Animales transgénicos**

#### 10- BIBLIOGRAFIA DE CONSULTA:

- 1- Recombinant DNA. 2<sup>nd</sup> edition. J.D. Watson; M. Gilman; J. Witkowski and M. Zoller. 1992. Scientific American Books. W.H. Freeman and Company. New York. USA.
- 2- Experiments in molecular biology. R.J. Slater. 1986. The Humana Press Inc. Clifton. USA.
- 3- DNA Cloning - Volumen I, a practical approach. D.M. Glover. 1986. IRL Press Limited. Oxford. England.
- 4- DNA Cloning - Volumen II, a practical approach. D.M. Glover. 1986. IRL Press Limited. Oxford. England.
- 5- Plasmids, a practical approach. K.G. Hardy. 1987. IRL Press Limited. Oxford. England.
- 6- Basic methods in molecular biology. 2<sup>nd</sup> edition. L. Davis. M. Kuehl. J Battey. Appleton & Lange, Norwalk. Connecticut.
- 7- Molecular Cloning, a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. J. Sambrook; E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, USA.
- 8- DNA Science: a first course in Recombinant DNA technology. D.A. Micklos and G.A. Freyer. 1990. Cold Spring Harbor Laboratory Press and Carolina Biological Supply Company. Cold Spring Harbor. USA.
- 9- Short Protocols in Molecular Biology. 3rd edition. F Ausubel, R. Brent. Harvard Medical School.
- 10- PCR Technology. Principles and Applications for DNA amplification. H. Erlich. Stocckton Press.
- 11- Baculovirus expression vectors: A laboratory manual. D.R. O'Reilly, L.K. Miller and V.A. Luckow. 1992. W.H. Freeman and Company.