

## Programa de INGENIERÍA GENÉTICA I

**Carrera:** *Licenciatura en Biotecnología*

**Asignatura:** *Ingeniería Genética I*

**Núcleo al que pertenece:** *Obligatorio (Ciclo Superior)*<sup>1</sup>

**Profesores/as:** *C. Facundo Temprana; Marcos Bilén; Cecilia Turco; Cristina Boro; Romina Armando.*

**Correlatividades previas:** *Genética Molecular*

### Objetivos:

Se espera que las/os estudiantes sean capaces de desarrollar diferentes habilidades, estrategias y actitudes propias de un abordaje con aspiraciones científicas. Se espera que la/os estudiantes:

- busquen nuevos conocimientos y desarrollen capacidades para vincularlos, integrarlos y transferirlos a diferentes ámbitos;
- desarrollen un trabajo colaborativo entre pares;
- generen posturas críticas y creativas para la resolución de las diferentes situaciones problemáticas planteadas;
- comuniquen la información relevante de manera efectiva, a través del lenguaje oral y escrito;
- manejen:
  - diversas técnicas básicas de Biología Molecular e Ingeniería Genética;
  - diversas fuentes de información (búsqueda; análisis; síntesis; comunicación);
  - protocolos técnicos (búsqueda, interpretación y ejecución) asociados a las drogas y los reactivos utilizados en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

### Contenidos mínimos:

---

<sup>1</sup> En plan vigente, Res CS N° 125/19. Para el plan Res CS N° 277/11, pertenece al Núcleo Básico. Para el Plan Res CS N° 181/03 pertenece al Núcleo Obligatorio.

Estructura y función de genes procariotas y eucariotas. Tecnología del ADN recombinante, clonado molecular, bancos genómicos y de ADNc. Vectores. Sondas moleculares. Amplificación enzimática de ácidos nucleicos. Caracterización de ácidos nucleicos mediante técnicas de ingeniería genética. Análisis y tipificación de genomas. Estudios filiatorios. Expresión de genes clonados. Cultivos celulares *in vitro*. Ingeniería de proteínas. Edición de genomas y clonación. Transgénesis y otras mutaciones genómicas. Genómica funcional. Introducción a tecnologías ómicas para ácidos nucleicos y proteínas.

**Carga horaria semanal:** 8 horas

### **Programa analítico:**

#### **Unidad 1**

Genes y genomas de procariotas y eucariotas. Reglas de composición sintáctica genética. Metodología del ADN 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. ADN polimerasas. ARNA polimerasa-ADN dependiente. Ligasas, quinasas, fosfatasas. Proteínas de unión a ADN.

#### **Unidad 3**

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

#### **Unidad 4**

Cultivos de células *in vitro*. Manipulación de ADN plasmídico. Extracción y purificación de plásmidos. Preparación en pequeña escala (*miniprep*). Preparación en gran escala (*maxiprep*). Parámetros de calidad.

#### **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**

Estrategias de clonado molecular en plásmidos. Estrategias de ligación. Defosforilación de ADN plasmídico linealizado. Reacciones de ligación. Otros métodos de clonado molecular.

## **Unidad 7**

Metodologías para la introducción de ADN en hospedadores adecuados. Preparación y transformación de bacterias competentes. Electroporación. Transferencia horizontal de ADN en distintos organismos.

## **Unidad 8**

Identificación de colonias bacterianas que contienen plásmidos recombinantes. Análisis de restricción. Análisis por  $\alpha$ -complementación. Inactivación insercional. Búsqueda por hibridación.

## **Unidad 9**

Preparación de bibliotecas de clones. Extracción, purificación y análisis de ADN genómico. Construcción y análisis de bibliotecas de ADN genómico. *Southern Blot*. Proyectos genoma. Proyecto genoma humano.

## **Unidad 10**

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 11**

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

## **Unidad 12**

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

## **Unidad 13**

Características esenciales de los bacteriófagos. Fagos con genoma de ADN de doble cadena como vectores de clonado. Bacteriófaga lambda. Hospedadores bacterianos. Crecimiento, purificación y extracción de DNA. Clonado en lambda. Identificación y análisis de recombinantes.

## **Unidad 14**

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

## **Unidad 15**

Amplificación *in vitro* de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Diseño de oligonucleótidos para actuar como *primers*. Optimización de una reacción de PCR. Variantes técnicas de la PCR. Aplicaciones.

#### **Unidad 16**

Evolución *in vitro*. Mutagénesis de fragmentos de ADN *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 17**

Edición genómica y procedimientos. Nucleasas secuencia específicas. Transgénesis, cisgénesis y otras mutaciones. Recombinación homóloga y sitio específica. Estudio de la función génica mediante generación de *Knock outs*. Búsqueda de genes mediante mutagénesis genómica. Utilización de transposones y otras variantes. Clonación de organismos. Aplicaciones.

#### **Unidad 18**

Reacciones de transcripción reversa para la generación de ADNc. Análisis de ARNm mediante reacciones de RT-PCR. Bibliotecas transcriptómicas. Introducción a los métodos actuales de análisis de transcriptomas.

#### **Unidad 19**

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

#### **Unidad 20**

Producción de proteínas recombinantes. Vectores de expresión para diferentes sistemas: bacterias, levaduras, células de insecto, células de mamífero y plantas. Cultivos de células *in vitro*. Detección y análisis de proteínas expresadas a partir de genes clonados. Expresión de genes clonados en *E. coli*. Optimización de la expresión de proteínas recombinantes.

#### **Unidad 21**

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

#### **Unidad 22**

Introducción a las nuevas tecnologías de secuenciación (NGS, *Next Generation Sequencing*), *microarrays* y proteómica.

## Trabajos prácticos de laboratorio

El *Objetivo General* del trabajo práctico consiste en el clonado y expresión de una proteína recombinante utilizando el sistema pET-22b/*Escherichia coli* BL21. Para llegar a cumplir dicha meta, se plantean como Objetivos específicos del trabajo práctico los siguientes:

- 1) Aislamiento de los vectores pZErO (Invitrogen), pBlueScript (Stratagen) y pET-22b (Novagen).
- 2) Amplificación y purificación del ORF de la proteína a expresar con *primers* específicos mediante PCR.
- 3) Clonado del producto de amplificación obtenido en vectores de clonado (pBlueScript y pZErO).
- 4) Clonado del ORF en el vector de expresión pET-22b.
- 5) Ensayo de expresión de la proteína recombinante en *E. coli* BL21.

A continuación, se mencionan las actividades propuestas para los trabajos prácticos en función de los objetivos antes planteados.

### Actividades particulares

Discusión del trabajo práctico: Se introduce a los estudiantes en el estado del arte respecto al origen y la potencialidad de la proteína a ser expresada.

**TP1:** Diseño *in silico* de las diferentes construcciones necesarias y discusión de las estrategias posibles para generarlas.

**TP2:** Purificación de los diferentes plásmidos a utilizar mediante *miniprep* por lisis alcalina a partir de cultivos *in vitro* bacterianos. Electroforesis analítica en gel de agarosa de los plásmidos purificados.

**TP3:** Amplificación mediante PCR del ORF correspondientes a la proteína recombinante a ser expresada.

**TP4:** Electroforesis preparativa en gel de agarosa de los productos amplificados en el TP 3. Purificación del fragmento a partir del gel de agarosa mediante kit comercial. Digestión enzimática del fragmento purificado y de los plásmidos obtenidos en el TP2.

**TP5:** Control de digestión de los plásmidos digeridos en el TP4 mediante electroforesis analítica en gel de agarosa y ligación con el fragmento digerido en TP4.

**TP6:** Transferencia horizontal mediante electroporación de los productos de ligación a cepas adecuadas de *E. coli* electrocompetentes. Plaqueo en medio sólido.

**TP7:** Selección de clones recombinantes (obtenidos en TP6) mediante PCR de colonias utilizando *primers* específicos del inserto.

**TP8:** Optimización de las condiciones de expresión de la proteína recombinante (variación de las concentraciones de inductor y densidad celular al momento de la inducción). SDS-PAGE de las diferentes muestras obtenidas en el ensayo de inducción. Análisis y discusión de los resultados.

Todo este trabajo se presenta como un proyecto que atraviesa toda la asignatura, dándosele un contexto biotecnológico a la/s proteína/s que se expresen (como antígeno de diagnóstico, como antígeno para generar anticuerpos, una enzima de utilidad, etc.). Al final, la/os estudiantes deben construir un informe de laboratorio en formato de artículo científico recopilando todas las actividades y resultados que se obtengan.

### **Bibliografía:**

- Basic methods in molecular biology. 2<sup>nd</sup> edition. Davis. L., Kuehl. M., Battey J. 1994. Appleton & Lange, Norwalk. Connecticut, USA.
- DNA Science: a first course in Recombinant DNA technology. Micklos D.A. and Freyer. G.A. 1990. Cold Spring Harbor Laboratory Press and Carolina Biological Supply Company. Cold Spring Harbor. USA.
- Molecular Cloning: A laboratory manual. Green MR, Sambrook J. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 4ta Edición. 2012.
- Molecular Cloning, a laboratory manual. 3<sup>rd</sup> edition. Volume I – II. Sambrook J. and Russell D.W.. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, USA.
- Molecular genetics of Bacteria. Snyder L. and Champness W. 1997. American Society for Microbiology. Washington DC. USA.
- PCR primer: a laboratory manual. Dieffenbach C. W. and Dveksler G. S.1995. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.
- Recombinant DNA. 2<sup>nd</sup> edition. Watson J.D., Gilman M., Witkowski J., Zoller M.. 1992. Scientific American Books. W.H. Freeman and Company. New York. USA.
- Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud. Luque J. y Herráez A. 2011. Elsevier, Barcelona, España.
- Desai M., Tanna A., Efstratiou A., George R., Clewley J., Stanley J. Extensive genetic diversity among clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* serotype M5. *Microbiology*, 1998,144, 629-637.
- Dougherty. B.A. and Smith H.O. Identification of *Haemophilus influenzae* Rd transformation genes using cassette Mutagenesis. *Microbiology*, 1999, 145, 401-409.
- Lee P.J. and Stock A.M. Characterization of the Genes and Proteins of a Two-Component System from the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima*. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(19), 5579-5585.
- Lei G.S. and Hu S.T. Functional Domains of the InsA Protein of IS2. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(20), 6238-6243.
- Lewa B.M. and Paulus H. An in vivo screening system against protein splicing useful for the isolation of non-splicing mutants or inhibitors of the RecA intein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene*, 2002, 282, 169-177.
- Milcamps A., Ragatz D.M., Lim P., Berger K.A., Bruijn F.J. Isolation of carbon- and nitrogen-deprivation-induced loci of *Sinorhizobium meliloti* 1021 by Tn5–*luxAB* mutagenesis. *Microbiology*, 1998, 144, 3205-3218.

- Ohura T., Kasuya K.I., Doi Y. Cloning and Characterization of the Polyhydroxybutyrate Depolymerase Gene of *Pseudomonas stutzeri* and Analysis of the Function of Substrate-Binding Domains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(1), 189-197.
- Techkarnjanaruk S. and Goodman A. E. Multiple genes involved in chitin degradation from the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain S91. *Microbiology*, 1999, 145, 925–934.
- Wilhelm S., Tommassen J., Jaeger K.E. A Novel Lipolytic Enzyme Located in the Outer Membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(22), 6977-6986.
- Yu Z.B. and Jin J.P. Removing the regulatory N-terminal domain of cardiac troponin I diminishes incompatibility during bacterial expression. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 461(1), 138-145.

La bibliografía que no se encuentra en la Biblioteca de la UNQ es suministrada por los docentes, ya sea porque se dispone de las versiones electrónicas y/o se dispone del ejemplar en el grupo de investigación asociado.

### **Organización de las clases:**

La asignatura Ingeniería Genética está dividida en clases teóricas, seminarios de publicaciones científicas (*papers*), jornadas de resolución de situaciones problemáticas y trabajos prácticos de laboratorio.

Durante la primera etapa se dictan el mayor número de clases teóricas que constituyen la base para poder realizar los ensayos de laboratorio, los cuales se concentran en la segunda mitad del cuatrimestre.

En las jornadas de Seminarios, cada estudiante debe exponer trabajos científicos publicados en revistas científicas, cuya temática está relacionada a los temas en discusión.

Las clases teóricas se complementan con jornadas de resolución de situaciones problemáticas, con problemas similares en formato y resolución a aquellos que aparecen en los exámenes de la asignatura.

Como trabajo práctico de laboratorio se realizan una serie de mini-proyectos cuya resolución depende de la utilización de herramientas de Ingeniería Genética, los cuales son asignados a grupos de no más de 5 personas, y se desarrollan a lo largo de todo el cuatrimestre. Finalizado tal período, no importando cuales hayan sido los resultados obtenidos, se debe presentar un informe final en formato *paper* (resumen, introducción, materiales y métodos, resultados, discusión, agradecimientos y bibliografía).

### **Modalidad de evaluación:**

Las evaluaciones de la asignatura Ingeniería Genética comprenden dos exámenes parciales y un coloquio o integrador (según se detalla más adelante). Además, al comenzar cada jornada de laboratorio se tomará un pequeño examen (parcialito) relacionado con la temática experimental a desarrollar. También se evalúa el informe final del laboratorio y la exposición de los Seminarios.

### **Aprobación de la asignatura según Régimen de Estudios vigente de la Universidad Nacional de Quilmes:**

La aprobación de la materia bajo el régimen de regularidad requerirá: Una asistencia no inferior al 75 % en las clases presenciales previstas, y cumplir con al menos una de las siguientes posibilidades:

- (a) la obtención de un promedio mínimo de 7 puntos en las instancias parciales de evaluación y de un mínimo de 6 puntos en cada una de ellas.
- (b) la obtención de un mínimo de 4 puntos en cada instancia parcial de evaluación y en el examen integrador, el que será obligatorio en estos casos. Este examen se tomará dentro de los plazos del curso.

Los/as alumno/as que obtuvieron un mínimo de 4 puntos en cada una de las instancias parciales de evaluación y no hubieran aprobado el examen integrador mencionado en el Inc. b), deberán rendir un examen integrador, o en su reemplazo la estrategia de evaluación integradora final que el programa del curso establezca, que el cuerpo docente administrará en los lapsos estipulados por la UNQ.

### **Modalidad de evaluación exámenes libres:**

En la modalidad de libre, se evaluarán los contenidos de la asignatura con un examen escrito, un examen oral e instancias de evaluación similares a las realizadas en la modalidad presencial. Los contenidos a evaluar serán los especificados anteriormente incluyendo demostraciones teóricas, laboratorios y problemas de aplicación.

Anexo II

**CRONOGRAMA TENTATIVO**

Semana	Tema/unidad	Actividad*			Evaluación
		Teórico	Práctico		
			Res Prob.	Lab.	
1	Repaso. Unidades 1 y 2.	X	X		
2	Unidades 3, 4 y 5.	X	X		
3	Unidades 6, 7 y 8.	X			
4	Unidades 9, 10 y 11.	X			
5	Unidad 12. Discusión del Trabajo Práctico (TP) y TP.	X		X	
6	Unidades 13 y 14. TP.	X		X	X
7	Resolución de problemas. Exposición de seminarios ( <i>papers</i> ). Consulta		X		X
8	1 <sup>er</sup> Parcial. Unidad 15.	X			X
9	Unidades 16 y 17. TP.	X		X	X
10	Unidades 18 y 19. TP.	X		X	X
11	Resolución de problemas. TP.		X	X	X
12	Unidades 19 (continuación) y 20. TP.	X		X	
13	Unidad 21. Resolución de problemas. TP.	X	X	X	X
14	Resolución de problemas. Exposición de seminarios ( <i>papers</i> ).TP.		X	X	X
15	Resolución de problemas. Consulta.		X		X
16	2 <sup>do</sup> Parcial. Unidad 22.	X			X
17	Recuperatorio de Parciales. TP.			X	X
18	Consulta. Coloquio/Integrador.				X

\*INDIQUE CON UNA CRUZ LA MODALIDAD