



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

ASIGNATURA:	Biología Molecular (código 3250)			
TITULACION:	Ingeniero Agrónomo			
PLAN:	1999	CURSO:	4	SEMESTRE: B
ORIENTACION:	Biotecnología y mejora			
CARGA DOCENTE	Total por grupo según el Plan de Estudios en créditos.			
	TEORIA	LECCION MAGISTRAL		3.5
		SEMINARIO		1.0
	PRACTICAS	AULA		1.0
		LABORATORIO		3.5
		CAMPO		
TITLE:	Molecular Biology			
CONTENTS:	Breve descripción de su contenido en ingles.			
	<p>The course starts with a presentation of the approach to biological problems of Molecular Biology, based on the search for proteins and genes behind the phenomena and the novel possibilities of manipulation of these macromolecules. The basic techniques of recombinant DNA (genetic engineering) will follow, with emphasis during the practicals on plasmid construction, PCR and DNA hybridization. Finally, the study of the molecular biology of the gene (replication, reparation, transcription and translation) will end the course.</p>			
DEPARTAMENTO:	Biotecnología			
PROFESOR RESPONSABLE:	Ramon Serrano (CU)			
PROFESOR PREVISTO:	Ramon Serrano (CU) (12.5 credits impartidos por 2 grupos de practicas)			
	Oscar Vicente (TEU) (1 credito impartido)			

Valencia, 11 de junio de 2007

Fdo.: Ramón Serrano Salom



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

ASIGNATURA: BIOLOGÍA MOLECULAR

OBJETIVOS

La Biología Molecular ha revolucionado las ciencias biológicas en las dos últimas décadas de nuestro siglo XX y se ha introducido en todas las carreras de orientación biológica, tanto básicas (Biología, Genética, Bioquímica, Química) como aplicadas (Agronomía, Biotecnología, Medicina, Farmacia, Veterinaria, Tecnología de Alimentos).

La Biología Molecular pretende explicar los fenómenos biológicos mediante el conocimiento de las estructuras y funciones de las proteínas y de los genes implicados, es decir, mediante el llamado "nivel molecular". La consideración de "molecular" en este contexto hay que restringirla pues al de las dos macromoléculas clave de los seres vivos: proteínas y ácidos nucleicos, "hardware" y "software", respectivamente, de las máquinas biológicas. Las otras moléculas que forman parte de los seres vivos (carbohidratos, lípidos, metabolitos, productos secundarios), aunque esenciales para la vida, ocupan un papel pasivo, siendo "dirigidas" por las proteínas y, en último término, por los ácidos nucleicos. Todas estas moléculas son objeto de estudio de la Bioquímica, que se ocupa también de las proteínas y ácidos nucleicos pero desde un aspecto más químico. Podría decirse que la Biología Molecular es la Bioquímica moderna de proteínas y ácidos nucleicos, que hace hincapié en su papel como máquinas moleculares (las proteínas) y archivos informáticos (los ácidos nucleicos).

El desarrollo de este abordaje "reduccionista" en biología no solo permite fundamentar todos los conocimientos biológicos a nivel de mecanismos moleculares sino que permite analizar y modificar los seres vivos a niveles impensables hasta ahora. Esta capacidad de análisis y modificación suministrada por la Biología Molecular es el origen de la moderna Biotecnología, basada en los marcadores moleculares y en la construcción de organismos transgénicos con nuevas e interesantes propiedades para las empresas farmacéuticas, la agricultura y la ganadería. Desde las bacterias productoras de insulina hasta el maíz resistente a insectos y el arroz enriquecido en vitamina A, los logros de estas nuevas tecnologías han llegado ya a la calle. Asimismo, el estudio de los seres vivos con técnicas de la Biología Molecular ha beneficiado enormemente las ciencias básicas (biología fundamental) y aplicadas (mejora genética, ciencias forenses, medicina preventiva etc.).

Una consecuencia de este potencial de la Biología Molecular ha sido el lanzamiento de los llamados "proyectos genoma", en los que se pretende descifrar toda la información genética de determinados organismos incluido el hombre. Se trata de proyectos multidisciplinarios con un alto contenido en ingeniería (robótica) e informática. Frente a la simplicidad de los genomas de los virus (5-200 kilobases, kb, 10-100 genes), conocidos desde hacía tiempo, se han completado recientemente las secuencias de los genomas de muchas bacterias (0.5-5 megabases, Mb, 300-3.000 genes) así como de organismos modelo como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (12 Mb, 6.000 genes), la mosca *Drosophila melanogaster* (180 Mb, 14.000 genes), el nematodo *Caenorhabditis elegans* (97 Mb, 19.000 genes) y la planta *Arabidopsis thaliana* (100 Mb, 25.000 genes). El pasado año han sido descifrados en su totalidad los genomas del hombre (3000 Mb, 30.000 genes) y del arroz (500 Mb, 25.000 genes). Toda esta información (salvo la



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

secuencia del arroz obtenida por una empresa privada) está disponible públicamente en internet para que distintos profesionales puedan establecer correlaciones entre mutaciones y genes (enfermedades genéticas en humanos y modificaciones genéticas en variedades de plantas), diseñar nuevos marcadores moleculares, profundizar en el estudio de los seres vivos etc.

El objetivo de esta asignatura es introducir a los futuros ingenieros agrónomos en el abordaje molecular en Biología, con énfasis en las técnicas experimentales que permiten el análisis molecular (marcadores moleculares), la modificación genética (Ingeniería Genética o Tecnología del DNA Recombinante) y el uso de la información de los proyectos genoma. La agricultura del siglo XXI va a estar dominada por el uso de marcadores moleculares en identificación y mejora de variedades así como en la generación de plantas transgénicas y en el uso aplicado de la información genómica. Las técnicas de mejora clásica basadas en selección de mutantes y en cruces con parientes silvestres serán complementadas por la utilización de marcadores moleculares asociados al carácter útil que se quiere transferir. Además la Ingeniería Genética permitirá transferir genes de otros organismos (otras plantas o incluso microorganismos o animales) incapaces de cruzarse sexualmente con las plantas cultivadas.

Aunque las aplicaciones de la Biología Molecular en medicina no han generado ninguna alarma social, actualmente existe un movimiento irracional de rechazo de las plantas transgénicas en Europa, aunque no en América y Asia. Este ambiente hostil pasará en cuanto los ciudadanos europeos se den cuenta de la inocuidad de las plantas transgénicas tanto para el medio ambiente como para el hombre. Y sobre todo cuando comprendan la manipulación informativa a que han sido sometidos por los extremistas verdes, fanáticos fundamentalistas sin ninguna base científica pero que por desgracia son necesarios para formar gobierno actualmente en Francia y Alemania. Ello les ha concedido un poder desmedido en los Ministerios de Agricultura y de Medio Ambiente, poder que han utilizado para intentar destruir la biología molecular de plantas en Europa. Algo parecido ocurrió en la Rusia de Stalin, cuando su protegido Lysenko persiguió con saña a los genetistas y mejoradores de plantas, llevando al país a una situación de hambre por falta de producción agrícola. Aún se está recuperando Rusia de este crimen intelectual. Confiemos que Europa sepa reaccionar antes de que se produzca un daño científico y tecnológico irremediable porque las plantas transgénicas van a ser necesarias para alimentar a la humanidad y reducir la degradación del medio ambiente. La superficie cultivada con transgénicas no cesa de aumentar en América (USA, Canada, Argentina) y en China y por tanto la irracional oposición europea tendrá que ceder al sentido común y a la razón científica. Si no tendremos que soportar la vergüenza de decir que los europeos rechazan a las plantas transgénicas por motivos de "religión" ecologista, de la misma forma que musulmanes y judíos rechazan la carne de cerdo por imperativos religiosos irracionales.

Los futuros Ingenieros Agrónomos deberán conocer el marco científico en que se basa esta nueva tecnología que va a dominar la agricultura del futuro. Podemos decir que la Biología Molecular representa para la ingeniería agronómica el mismo papel que la Mecánica representa para la Ingeniería de obras y construcciones y la Electrónica para la ingeniería informática y de telecomunicaciones. Finalmente, un número muy elevado de alumnos realizan todos los años su Trabajo Fin de Carrera en Biología Molecular de Plantas, por lo que esta asignatura les sirve de entrenamiento básico para dicho Trabajo.



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

En el marco del plan de estudios actual (1999), los Principios de Biología Molecular se apoyan en los conocimientos adquiridos en las asignaturas previas de Bioquímica (troncal, 1), Biología Vegetal (troncal, 2), Microbiología (troncal, 2), Ampliación de Bioquímica (obligatoria de especialidad, 4A), Genética y Mejora Vegetal (obligatoria de especialidad, 3A) y Complementos de Fisiología Vegetal (obligatoria de especialidad, 3B). Asimismo, sus aplicaciones a la agronomía serán completadas por la asignatura posterior de Biología Molecular de Plantas (5A, obligatoria de especialidad).

ASIGNATURA: BIOLOGÍA MOLECULAR

SISTEMA DE EVALUACIÓN

Un 20% de la calificación final vendrá determinada por 4 test rápidos realizados a lo largo del curso para facilitar a los alumnos el seguimiento de la asignatura.

Un 20% de la calificación final corresponderá a los resúmenes de los seminarios.

Un 60% de la calificación final corresponderá al examen final, basado en un gran número (30-40) de preguntas

ASIGNATURA: BIOLOGÍA MOLECULAR

PROGRAMA DE TEORÍA

Parte I: Introducción a la Biología Molecular

Tema 1: La última revolución de la Agricultura: los marcadores moleculares, las plantas transgénicas y los proyectos genoma

La "Revolución Verde" y la necesaria "Era Molecular" de la Agricultura

Los marcadores moleculares: identificación de individuos, razas, variedades y especies

Las plantas transgénicas I. Desarrollos científicos y tecnológicos

Las plantas transgénicas II. Peligros inexistentes y campañas hostiles irracionales

El proyecto del Genoma Humano como gran iniciativa movilizadora de la Biotecnología

Los genomas de otros organismos: bacterias varias, levadura *Saccharomyces cerevisiae*,

nematodo *Caenorhabditis elegans*, mosca *Drosophila melanogaster*, planta *Arabidopsis*

thaliana, arroz *Oryza sativa*

Tema 2. Desarrollo histórico de la Biología Molecular, Ingeniería Genética y Biotecnología

Orígenes de la Biología Molecular: cristalografía de macromoléculas y genética de fagos.

Reduccionismo

El nacimiento de la Ingeniería Genética o Tecnología del DNA recombinante

Los riesgos de la Ingeniería Genética fueron debidamente considerados: Conferencia de Asilomar

El octavo día de la creación: los organismos transgénicos

La correspondencia entre genes y funciones

El diseño racional de fármacos y plaguicidas

Los límites de la manipulación genética: línea germinal humana

Las nuevas empresas de biotecnología y la evolución de las multinacionales del sector



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

químico-farmacéutico

Concepto de Biología Molecular, Bioquímica, Biotecnología e Ingeniería Genética

Las ventajas de los organismos transgénicos: genética reversa por ganancia y pérdida de función y mejora genética dirigida

Métodos para introducir DNA en células eucarióticas: electroporación, tratamientos químicos, pistola de genes, virus animales, microinyección, sistema de Agrobacterium

Marcadores seleccionables: resistencia a drogas y antibióticos y biosíntesis de nutrientes y vitaminas

La recombinación homóloga y la integración al azar del DNA exógeno. Disrupciones génicas ("knock-outs") en levaduras y ratones

Los promotores específicos como base de genes quiméricos

La metodología de los genes antisentido

Mutantes marcados de colecciones al azar por integración y por transposición: la identificación de genes responsables de funciones complejas

Aplicaciones de los animales transgénicos en Ganadería y Medicina. Terapia Génica

Tema 3. Las estructuras y funciones de los seres vivos desde la perspectiva de la Biología Molecular

Funciones de los seres vivos: metabolismo, expresión génica, replicación génica, biogénesis organelos, mitosis, respuesta al medio, diferenciación, integración

Trabajos moleculares: información, químico, mecánico, osmótico, ensamblaje, regulación

La información del DNA y RNA y la acción del RNA y de las proteínas

La dotación de genes y proteínas de un organismo

Objetivos de la mejora

Tema 4. Estructura y funciones de los ácidos nucleicos

Estructura del DNA: características de la doble hélice

Conversión "in vivo" de fagos en plásmidos

Cósmidos

Vectores para clonaje de grandes fragmentos de DNA: YACs y BACs

Tema 8. Las enzimas utilizadas en Ingeniería Genética

Las endonucleasas de restricción: origen, nomenclatura, tipos de extremos generados, compatibilidad de extremos, efecto de metilaciones, condiciones de reacción

DNA ligasas: tipos, condiciones de reacción, teoría de los ligamientos (reacciones inter- e intramoleculares)

DNA polimerasas: DNA polimerasa I, fragmento Klenow, DNA polimerasas termofílicas, DNA polimerasa T4, transcriptasa reversa

Secuenciación, marcaje de sondas, relleno de extremos, reacción de PCR, síntesis de cDNA

RNA polimerasas: transcripción "in vitro"

Miscelaneos: fosfatasa, polinucleotido kinasa, transferasa de deoxinucleotidos terminales, nucleasas Bal31, nucleasa S1, exonucleasa VII

Tema 9. Purificación, electroforesis e hibridación de ácidos nucleicos



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

Preparación de DNA genómico
Preparación de RNA total
Purificación de mRNA con oligo-dT inmovilizado
Electroforesis horizontal en geles de agarosa: tampones, tinción fluorescente, rangos de separación, preparación de muestras, preparación de geles, patrones, condiciones de electroforesis
Electroforesis vertical en geles de poliacrilamida: rangos de separación, preparación de geles, patrones
Electroforesis de campo pulsante
Aislamiento de fragmentos de DNA separados en geles de agarosa: "freeze-squeeze" y "ioduro-polvo de vidrio".
Agarosa de bajo punto de fusión
Teoría de la hibridación de ácidos nucleicos: efecto de la temperatura, concentración salina, % (G+C), emparejamientos malos y tamaño de sonda
Transferencia de ácidos nucleicos a filtros especiales ("blotting")
Preparación de sondas marcadas con radiactividad, biotina, digoxigenina ("random priming") o fosfatasa alcalina termoestable
Hibridación, lavados y desarrollo de la señal

Tema 10. La reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)

La idea feliz de Kary Mullis: amplificación exponencial acotada
DNA polimerasas termofílicas: fidelidad y procesividad
Artefactos por contaminación de aerosoles: precauciones
Termocicladores basados en el efecto Peltier
Diseño de oligonucleótidos "primers" (cebadores)
Modificación del DNA mediante PCR: modificación de extremos y mutagénesis dirigida y al azar
Detección de secuencias específicas en genomas: marcadores moleculares
RT-PCR: la amplificación de mRNA
Capítulo más próximo del Stryer: 6

Parte III: Biología Molecular del Gen

Tema 11. Replicación, reparación, recombinación y transposición del DNA

Componentes de la maquinaria de replicación del DNA
Tipos de DNA polimerasas: dominios funcionales y subunidades
La síntesis simultánea de las dos cadenas del DNA
Mutación y reparación del DNA: mutágenos químicos y radiaciones
El test de Ames para detectar mutágenos y cancerígenos
La recombinación homóloga como sistema de reparación y de variación genética
Transposones, retrotransposones y evolución de genomas

Tema 12. Transcripción y procesamiento de RNA

Componentes de la maquinaria de transcripción
Inhibidores de transcripción
Tipos de RNA polimerasa eucariótica



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

Promotores bacterianos y eucarióticos: caja TATA, UASs (Upstream Activating Sequences o "enhancers") y
URSS (Upstream Repressing Sequences)
Mecanismos simples de regulación de transcripción en bacterias y complicaciones en eucariotas
El operón de la lactosa en Escherichia coli y la regulación del fago lambda
Factores de transcripción generales y específicos: "helix-loop-helix", homeobox, "dedos de zinc", "cremalleras de leucina"
Regulación de la transcripción por la estructura de la cromatina: modificación de histonas por acetilación
Terminadores de transcripción y poliadenilación
Procesamiento del RNA: "splicing", recortes por exonucleasas y modificación de bases snRNPs y RNA catalítico en "splicing"
Transporte de mRNA y de factores de transcripción a través de los poros nucleares

Tema 13. Biosíntesis de proteínas

La degeneración del código genético y la interacción codón- anticodón
Activación de los aminoácidos: aminoacil-tRNA sintetasas
Los ribosomas y los factores de traducción
Iniciación, ciclo de elongación y terminación de proteínas
Antibióticos inhibidores de la función ribosomal
Regulación de los factores de traducción por proteína kinasas y por toxinas bacterianas
Plegamiento de proteínas asistido por "chaperonas", disulfuro isomerasas y prolil-cis-transisomerasas
Localización de proteínas: solubles, de membrana, secretadas y de organelos
Canales conductores de proteínas y camino de secreción y endocitosis
La degradación de las proteínas celulares: proteosoma y ubiquitina

Capítulos más próximo del Stryer: 31, 32, 33, 34, 35, 36 y 37

ASIGNATURA: BIOLOGÍA MOLECULAR

PROGRAMA DE PRÁCTICAS

CALENDARIO DE CLASES PRACTICAS DE LABORATORIO

PARTE I: CONSTRUCCION DE UN PLASMIDO RECOMBINANTE

Practica 1. Preparación del plásmido Bluescript SK- a partir de un cultivo bacteriano
Practica 2. Preparación por PCR del gen TPS1 de levadura. Comprobación por digestión y electroforesis del plásmido de la practica 1
Practica 3. Purificación y comprobación por electroforesis del fragmento con el gen TPS1 de la practica 2. Digestión con Bam HI del plásmido y del fragmento
Practica 4. Purificación del plásmido y fragmento digeridos. Reacción de ligamiento
Practica 5. Preparación de células competentes de Escherichia coli y transformación con reacciones de ligamiento de la practica 4

PARTE II: ANALISIS SOUTHERN DE UN PLÁSMIDO



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRONOMOS

Práctica 6. Digestión del plásmido, electroforesis y transferencia a filtro de nylon
Práctica 7. Marcaje de la sonda con digoxigenina y montaje de la hibridación
Práctica 8. Lavados y detección de los híbridos

ASIGNATURA: BIOLOGÍA MOLECULAR

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Las técnicas básicas de Biología Molecular están compiladas en dos libros enciclopédicos:

J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis
Molecular Cloning. A Laboratory Manual
Cold Spring Harbor Laboratory Press
1989, ISBN: 0-87969-309-6 (vols. 1, 2 and 3)

F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl
Current Protocols in Molecular Biology
John Wiley and Sons
1994, ISBN: 0-471-50338-X (vols. 1 and 2)

Estos libros están disponibles en la biblioteca general de la UPV así como en la biblioteca particular del área de Bioquímica y Biología Molecular (Despacho 1 del Laboratorio 3 del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV). Se están confeccionando manuales en español de "Métodos Básicos de Ingeniería Genética" y de "Principios de Biología Molecular para Ingenieros Agrónomos" para facilitar el estudio de los alumnos y se les entregarán por partes conforme vayan completándose. Un libro muy útil específico de plantas es el siguiente:

R.J. Henry
Practical Applications of Plant Molecular Biology
Chapman & Hall, London
1997, ISBN: 0-412-73220-3

La parte básica de la Biología Molecular seguirá fundamentalmente la obra:

L. Stryer
Biochemistry
Freeman, New York
1995, ISBN 0-7167-2009-4

(existe traducción al español de Editorial Reverté en dos tomos, ISBN 84-291-7575-X) todas ellas disponibles en las bibliotecas indicadas anteriormente. El texto de Stryer ya fue recomendado para las asignaturas previas de Bioquímica y resultara familiar para los alumnos.



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

Un pequeño libro de divulgación de lectura obligada es la magistral obra:

F. García Olmedo

La Tercera Revolución Verde

Temas de Debate, Editorial Debate, Madrid

1998, ISBN 84-8306-083-3