Ciências ULisboa

Engenharia Genética

Código: 461117
Ano Letivo: 2015/16
Departamento: Biologia Vegetal
ECTS:
Carga horária:
Área Científica: Biologia;

Objetivos da Unidade Curricular

A tecnologia do DNA recombinante projetou o mundo da investigação biológica para além dos limites da bioquímica tradicional, permitindo o estudo da expressão génica ao nível mais fundamental. Na realidade, a capacidade inerente a esta tecnologia é tal, que abrange todos os domínios das ciências da vida. Consequentemente tornou-se necessário, quase obrigatório para os cientistas, conhecerem a metodologia do DNA recombinante. Esta é desenvolvida de modo a incluir áreas mais complexas de caracterização, tais como a clonagem génica e produção de bibliotecas, mapeamento e expressão, bem como áreas mais aplicadas como a transgénese, expressão proteica in vitro, mutagénese etc.. O principal objetivo da disciplina de Engenharia Genética é a familiarização com a metodologia do DNA recombinante através da aprendizagem de técnicas, dos seus fundamentos e aplicações, que possibilitam utilizar e explorar o enorme potencial desta tecnologia.

Pré-requisitos

Sem pré-requisitos

Conteúdos

Clonagem molecular
Clonagem de expressão
PCR
Hibridação de ácidos nucleicos
Técnicas de análise de DNA e RNA
Técnicas de análise de proteínas
Aplicações da engenharia genética

Mutagénese in vitro

Engenharia genética de plantas

Descrição detalhada dos conteúdos programáticos

Componente Teórica

1.Clonagem molecular geral; Breve resumo histórico do desenvolvimento da clonagem molecular. Clonagem molecular: significado, objectivos e etapas. O papel dos ácidos nucleicos na clonagem molecular. Enzimologia do DNA recombinante. Aplicações das principais enzimas utilizadas em clonagem molecular. Enzimas de restrição de tipo II. Sistemas de restrição/modificação. DNase I. RNase A. Nuclease S1. Ligases de DNA. Polimerases. Fosfatases e cinase de

polinucleótido do fago T4. Preparação de DNA vector e DNA dador. Métodos de produção de fragmentos de DNA e de modificação de extremidades. Características fundamentais dos vectores de clonagem. Plasmídios, fagos, cosmídios, e fagemídios para clonagem em E. coli. Vectores shuttle. Vectores PACs, BACs e YACs. Construção de moléculas de DNA recombinante. Estratégias de ligação de DNA vector e DNA dador. Clonagem dirigida e clonagem não dirigida. Sistemas de introdução de DNA em células hospedeiras. Selecção e identificação de clones recombinantes. Estratégias de clonagem. Construção de bibliotecas genómicas. A técnica de chromosome walking e o estabelecimento de contigs. Construção de bibliotecas de cDNA. 2. Clonagem de expressão: Sistemas de expressão homóloga e heteróloga de genes. Vantagens e desvantagens da expressão heteróloga em E. coli. Configuração de vectores procarióticos de expressão. Fusões transcricionais e fusões traducionais. Expressão citoplasmática. Corpos de inclusão. Proteínas de fusão. Tags de afinidade para detecção e purificação de proteínas recombinantes. Fusões traducionais para expressão periplasmática ou secreção extracelular. Vectores eucaróticos de expressão. Vantagens da expressão heteróloga em Saccharomyces cerevisiae. Marcas eucarióticas de seleção. Vectores de células de inseto e de células animais. Promotores constitutivos e indutivos. Expressão transiente e expressão estável. 3. Técnica de PCR. Metodologia da técnica de PCR. Análise dos produtos de PCR. Características das polimerases de DNA utilizadas em PCR. Estratégias de clonagem de produtos de PCR. Variantes da técnica de PCR: RT-PCR, RT-PCR modificado (primer oligo-dT modificado), 3'; RACE-PCR, 5'; RACE-PCR, Nested-PCR, PCR alelo-específico, Linker-primed PCR, PCR inverso, Meta-PCR (PCR de ligação de DNAs), PCR mutagénico, PCR multiplex e PCR em tempo real. Aplicações da técnica de PCR. 4. Hibridação de ácidos nucleicos: Origem e caracterização das sondas de hibridação. Marcação de DNA por nick-translation. Marcação de DNA por primers aleatórios. Marcação de extremidades 5' do DNA. Marcação de extremidades 3' do DNA. Sondas de RNA (ribossondas). Sondas homólogas, heterólogas e degeneradas. Marcação radioactiva de DNA. Marcação não-radioativa de DNA e sistemas de deteção. Temperatura de desnaturação (Tm) temperatura de hibridação. Tipos de sondas e condições de hibridação. Hibridação ASO. 5. Análise dos genes clonados e dos seus produtos. Análise de DNA: electroforese convencional em gel de agarose; electroforese em campo pulsado (PFGE); hibridação Southern; hibridação dot-blot; hibridação in situ; sequenciação; técnica de footprinting; técnica de retardação em gel para detecção de interações DNA/proteína. Análise de RNA: electroforese de RNAs; hibridação Northern; hibridação em dot-blot; mapeamento das extremidades 5' e 3' do mRNA com nuclease S1; mapeamento das extremidades 5 do mRNA por extensão de primer; transcrição in vitro. Análise de proteínas: electroforese de proteínas (SDS-PAGE); imunodetecção por Western; electroforese bidimensional (2-D PAGE); sistemas de tradução in vitro e in vivo; sistemas acoplados de transcrição/tradução; técnicas de detecção de interacções proteicas: imunoprecipitação pelo método do duplo anticorpo, sistema do duplo híbrido em leveduras. A engenharia genética na era pró-genómica. Genómica estrutural e funcional. Sequenciação de genomas, transcritómica e proteómica. Comparação de transcritomas. 6. Obtenção de mutantes por mutagéneses in vitro. 7. Engenharia genética no contexto da biotecnologia. Técnicas moleculares de caracterização de plantas e de pesquisa de genes de interesse. Vectores naturais para transformação de plantas. Estratégias de transformação genética mediadas por Agrobacterium e métodos alternativos de transformação: vantagens e desvantagens. Regeneração e análise de plantas transgénicas. Hibridação somática. Algumas técnicas para estudar e isolar genes de plantas e para controlar a sua expressão. A engenharia genética na manipulação do metabolismo e na resistência a doenças: resistência/tolerância a stresses bióticos e abióticos; melhoramento da qualidade das plantas. 8. Aplicações e implicações da engenharia genética. Aplicações ambientais e aplicações humanas. Engenharia genética e sociedade (legislação, ética e opinião pública).

Componente Prática

Formação teórica e prática essenciais para o uso da tecnologia do DNA recombinante. • Fundamentação teórica e prática necessárias para a correta articulação das problemáticas da clonagem molecular. • Desenvolvimento da compreensão e da capacidade de aplicação de conhecimentos a situações práticas variadas. • Compreensão dos aspetos importantes a ter em conta quando se planeia ou se conduz uma estratégia de transformação genética. • Capacidade de identificação de problemas que podem surgir no desenvolvimento da metodologia e capacidade para delinear estratégias alternativas. • Capacidade para entender a importância da engenharia genética e para ter uma opinião crítica informada.

Bibliografia

Recomendada

Correia MC, Zilhão R. 2011. Engenharia Genética. Manual de Problemas. Abdul's Angels FCUL, (ISBN-978-972-8973-33-9).

Correia MC, Zilhão R. 2012. Engenharia Genética. Uma experiência de clonagem – Fundamento e protocolos. Abdul's Angels, FCUL (ISBN-978-972-8973-43-8).

Glick, B.R., Pasternack J.J. e Patten C.L. 2009. Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA, 4rdedition. American Society for Microbiology Press, Washington, DC.

Nicholl, D.S.T. 2002. An Introduction to Genetic Engineering, 2nd edition. Cambridge University Press.

Videira A. 2011. Engenharia genética: princípios e aplicações. 2nd ed. Lidel, Lisboa.

Watson, J.D., Caudy, A.A., Myers, R.M. e Witkowski, J.A. 2007. Recombinant DNA. Genes and Genomes – A Short Course, 3rd edition . W. H. Freeman and Company, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.

Outros elementos de estudo

Scientific papers

Molecular Biology Laboratory Catalogs

Métodos de Avaliação

Exame escrito, final, compreendendo questões sobre a matéria da teórica e da prática.

Língua de ensino

Português