

Pràctiques de Laboratori integrat de biotecnologia.

Curs 2004/05

Objectius generals

Experimentació de laboratori en la que s'utilitzen de forma integrada conceptes i tècniques dels diferents camps que intervenen en la biotecnologia. Concretament, es contempla la combinació de la tecnologia del DNA recombinant i química de proteïnes i bioenginyeria (incluint els processos de cultiu d'organismes en bioreactors, recuperació i purificació de proteïnes) en el desenvolupament de processos biotecnològics.

- **Objectius de la primera part:**

Conèixer les diferents etapes de les quals consta l'extracció de RNA total a partir de teixits eucariotes, així com els punts claus de la reacció de RT-PCR per amplificar la seqüències específiques de cDNA, inclosos els criteris bàsics utilitzats en el disseny d'oligonucleòtids per la reacció de RT-PCR.

Apendre les característiques principals dels vectors d'expressió utilitzats per la producció de proteïnes recombinants.

Conèixer les diferents passes de les quals consta un procés standard de clonatge molecular: digestió amb enzims de restricció, reacció de lligació i transformació en un hoste bacterià, així com els criteris utilitzats per al reconeixement de bacteries portadores de vector més insert.

Conèixer els paràmetres determinants per a l'expressió heteròloga de proteïnes en bacteris, així com el disseny experiments d'expressió recombinant en funció de les característiques de la proteïna a expressar.

Dissenyar i aplicar protocols de purificació de proteïnes recombinants.

Caracteritzar des d'el punt de vista estructural/funcional les proteïnes expressades

- **Objectius de la segona part:**

Apendre la seqüència bàsica d'operacions, la seva distribució en el temps, i els punts claus associats al cultiu de microrganismes en bioreactors i a la purificació de proteïnes recombinants a escala laboratori.

Veure les interaccions entre les diferents etapes d'un procés de producció de proteïnes recombinants, des de les característiques de la proteïna a produir i del sistema d'expressió emprat en el procés de fermentació, fins a la recuperació i purificació de la proteïna recombinant.

Caracterització a escala laboratori dels paràmetres clau del procés de producció - cultiu en bioreactor, recuperació i purificació - de la proteïna recombinant d'interès.

Integració amb els resultats obtinguts a la primera part de la pràctica, avaluació global del sistema de producció de la proteïna recombinant, i discussió/disseny d'estratègies per a optimitzar-lo.

Temari

Primera Part. Tecnologia del DNA recombinant i enginyeria de proteïnes.

Tema 1. Obtenció de la seqüència codificant del gen de la dihidrofolat reductasa humana (dhfr). Purificació de RNA total a partir d'una petita mostra de sang humana. Reacció de transcripció inversa a partir del RNA obtingut i diferents encebadors utilitzats en aquesta reacció. Amplificació per PCR del cDNA del gen dhfr. Purificació del producte obtingut.

*Tema 2.- Clonatge molecular del gen dhfr en un vector d'expressió procariota. Preparació dels extrems del insert i del vector de clonatge i lligació dels mateixos. Transformació en *E. coli* del producte de la lligació. Identificació dels clons portadors de vectors recombinants.*

*Tema 3.- Expressió heteròloga de proteïnes. Cultiu de *E. coli* a nivell analític. Característiques del sistema de expressió. Inducció de l'expressió d'una proteïna recombinant (r-proteïna). Localització de la proteïna expressada i solubilitat de la mateixa.*

Tema 4, Purificació i caracterització de proteïnes recombinants. Obtenció d'un extracte cel·lular. Purificació mitjançant cromatografia d'afinitat de la proteïna recombinant. Quantificació del rendiment obtingut. Anàlisi de la puresa de la proteïna recombinant i caracterització enzimàtica i biofísica de la mateixa. Determinació de la seqüència N-terminal i del seu pes molecular mitjançant seqüenciació automàtica i espectrometria de masses.

Segona part. Processos de producció de proteïnes recombinants en *Escherichia coli*

*Tema 5. Tecnologia de la fermentació: Cultiu en bioreactor d'una soca recombinant d'*Escherichia coli* que expressa intracel·lularment la DHFR humana, prèviament construïda en la primera part de la pràctica. Seguiment i control de diversos paràmetres ambientals i fisiològics del cultiu.*

Tema 6. Processos de purificació: Posta en pràctica de metodologies i tècniques de recuperació (centrifugació, lisi cel·lular, solubilització, concentració) i de purificació (separació cromatogràfica) de proteïnes.

Sessió final: Avaluació integrada del procés de producció (cultiu més purificació). Identificació dels paràmetres clau del procés i estratègies d'optimització del mateix.

Pràctiques: Divisió en torns de 25 persones màxim. Per cada una de les parts, es realitzaran 7 sessions seguides de 4 hores per dia cada una, i sessió final de 2 hores. Es realitzaran durant el segon semestre, segons dates del calendari establert.

La nota final tindrà en compte l'informe de pràctiques (30%) i examen (70%)

En cas que l'alumne suspengui l'assignatura després de les dues convocatòries de l'any acadèmic en el qual es realitzen les pràctiques, i si l'alumne així ho desitja, es conservarà la nota obtinguda en l'informe de pràctiques. Aquesta nota només es conservarà durant l'any acadèmic immediatament posterior al de la realització de les pràctiques. Si l'alumne no aconsegueix superar l'assignatura després de dos anys acadèmics es veurà obligat a realitzar novament les pràctiques.

BIBLIOGRAFIA

1^a PART

a) Enginyeria genètica molecular

- Sambrook J. & Russell D.W., Molecular cloning. A laboratory manual 3rd Ed. (2001). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York
- Ausubel F.M. i altres, Current Protocols in Molecular Biology (1999). John Wiley and Sons, Inc. Canada.
- Old R.W. & Primrose S.B. Principles of gene manipulation. An introduction to genetic engineering. 6th Ed.(2000) Blackwell Science Ltd. Oxford.
- Glick BR, and Pasternak, JJ. (1994) Molecular Biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA. AMS Press, Washington DC, USA
- Baneyx F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Current Opinion in Biotechnology **10**:411-421.

b) Química i Enginyeria de proteïnes

- Creighton T.E., **Proteins. Structures and Molecular Properties**. (1993) (segona edic.) Freeman W.H. and Co., New York.
- Glick, B.R. & Pasternak, J.J. **Molecular Biotechnology** (1998) ASM Press, Washington
- Bradshaw R.A. i Purton M., **Proteins: Forms and Function** (1990) Elsevier, Cambridge.
- Buckel, P. (ed), **Recombinant Protein Drugs** (2001), Birkhäuser Verlag, Basel

- Cleland J.L. & Craik C.S., **Protein Engineering. Principles and Practice.** (1996) John Wiles & Sons Ltd., Chichester.
- Rees A.R., Sternberg M.J.E. & Wetzel R., **Protein Engineering. A Practical Approach.** (1992). IRL Press, Oxford.
- Wrede P. Schneider G., **Concepts in Protein Engineering and Design.** (1994) Walter de Gruyter, Berlin.

2^a PART

- Bailey JE and Ollis DF. (1987). Biochemical Engineering Fundamentals Mc Graw-Hill Book Co, USA
- Glick BR, and Pasternak, JJ. (1994) Molecular Biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA. AMS Press, Washington DC, USA
- Hanning, G., and Makrides, S.C. (1998) Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. Trends in Biotechnology 16:54-60.
- Lee, S.-Y. (1996) High cell-density culture *Escherichia coli*. Trends in Biotechnology 14:98-105.
- Current Protocols in Protein Science (1995-2001). Coligan JE, Dunn BM, Splicher DW, Wingfield PT (eds.) John Wiley & Sons. Volum 1, capítols 5 i 9.
- Protein Purification Handbook. (1999) Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suècia.