



Universitat Autònoma de Barcelona

TITULACIÓ: Biotecnologia
NOM DE L'ASSIGNATURA: 26613 Laboratori integrat
CURS: 2002/2003
CRÈDITS: 6

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 els 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.

Avaluació

La nota final tindrà en compte l'informe de pràctiques (50%) i exàmen (50%).