

Laboratori integrat 5

Codi: 100924
Crèdits: 3

Titulació	Tipus	Curs	Semestre
2500253 Biotecnologia	OB	3	1

Professor de contacte

Nom: Jaume Piñol Ribas

Correu electrònic: Jaume.Pinyol@uab.cat

Utilització d'idiomes a l'assignatura

Llengua vehicular majoritària: català (cat)

Grup íntegre en anglès: No

Grup íntegre en català: Sí

Grup íntegre en espanyol: No

Equip docent

Pau Ferrer Alegre

Prerequisits

Cal estar cursant simultàniament o haver cursat les assignatures de teoria relacionades amb els continguts d'aquestes pràctiques de laboratori: Tecnologia del DNA recombinant, Química i Enginyeria de Proteïnes, Fonaments d'Enginyeria de Processos, Bioreactors, Processos de Separació i Purificació.

Per poder assistir a les sessions pràctiques cal que l'estudiant justifiqui haver superat les proves de bioseguretat i de seguretat que trobarà en el Campus Virtual i ser coneixedor i acceptar les normes de funcionament dels laboratoris de la Facultat de Biociències.

Objectius

En aquesta assignatura es porta a terme una experimentació de laboratori en la qual s'utilitzen de forma integrada conceptes i tècniques de diferents camps que intervenen en la Biotecnologia. Concretament, es contempla la combinació de la Tecnologia del DNA recombinant, la Química de proteïnes i la Bioenginyeria (incloent els processos de cultiu d'organismes en bioreactors, recuperació i purificació de proteïnes) en el desenvolupament de processos biotecnològics. D'aquesta manera, l'objectiu general de l'assignatura es el d'obtenir una visió de conjunt sobre tres de les parts més importants de les quals consten els processos biotecnològics i es desglossa en els següents objectius específics:

- 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.
- Aprendre 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 bacteris 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
- Aprendre 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.
- Caracteritzar a escala laboratori dels paràmetres clau del procés de producció - cultiu en bioreactor, recuperació i purificació - de la proteïna recombinant d'interès.
- Integrar de tots els resultats obtinguts, avaluar de forma global el sistema de producció de la proteïna recombinant i discutir/dissenyar estratègies per a la seva optimització.

Competències

- Adquirir nous coneixements i tècniques de forma autònoma.
- Aplicar els recursos informàtics per a la comunicació, la recerca d'informació, el tractament de dades i el càlcul.
- Aplicar les normes generals de seguretat i funcionament d'un laboratori i les normatives específiques per a la manipulació de diferents sistemes biològics.
- Aplicar les principals tècniques associades a l'ús de sistemes biològics: DNA recombinant i clonació, cultius cel·lulars, manipulació de virus, bacteris i cèl·lules animals i vegetals, tècniques immunològiques, tècniques de microscòpia, proteïnes recombinants i mètodes de separació i caracterització de biomolècules.
- Buscar, obtenir i interpretar la informació de les principals bases de dades biològiques, bibliogràfiques i de patents i usar les eines bioinformàtiques bàsiques.
- Descriure les bases del disseny i del funcionament de bioreactors i calcular, interpretar i racionalitzar els paràmetres rellevants en fenòmens de transport i els balanços de matèria i energia en els processos bioindustrials.
- Dissenyar experiments de continuació per resoldre un problema.
- Dissenyar i executar un protocol complet d'obtenció i purificació d'un producte biotecnològic.
- Interpretar resultats experimentals i identificar elements consistents i inconsistents.
- Liderar i dirigir equips de treball, i desenvolupar les capacitats d'organització i planificació.
- Obtenir informació de bases de dades i utilitzar el programari necessari per a establir correlacions entre estructura, funció i evolució de macromolècules.
- Pensar d'una forma integrada i abordar els problemes des de diferents perspectives.
- Prendre decisions.
- Treballar de forma individual i en equip.
- Utilitzar els fonaments de matemàtiques, física i química necessaris per a comprendre, desenvolupar i avaluar un procés biotecnològic.
- Utilitzar les metodologies analítiques per a l'assaig de l'activitat biològica dels components cel·lulars, en especial enzims, in vivo i in vitro.

Resultats d'aprenentatge

1. Adquirir nous coneixements i tècniques de forma autònoma.
2. Aplicar correctament els diferents processos d'eliminació de residus.
3. Aplicar els principis d'esterilitat a processos de manipulació i recompte de microorganismes.
4. Aplicar els recursos informàtics per a la comunicació, la recerca d'informació, el tractament de dades i el càlcul.
5. Aplicar les normes generals de seguretat d'un laboratori de biotecnologia.
6. Aplicar les tècniques fonamentals per a l'anàlisi, purificació i caracterització de biomolècules.
7. Descriure el fonament teòric i aplicar les tècniques adequades per a la caracterització estructural i funcional de proteïnes i àcids nucleics.
8. Descriure els fonaments teòrics de les tècniques bàsiques i avançades d'obtenció i caracterització de biomolècules.
9. Dissenyar experiments de continuació per resoldre un problema.

10. Executar al laboratori protocols d'obtenció i purificació de productes industrials d'aplicació biotecnològica.
11. Extreure de les bases de dades informació complementària i de suport per a l'anàlisi dels resultats i l'elaboració de les memòries resultants del treball experimental.
12. Interpretar resultats experimentals i identificar elements consistents i inconsistents.
13. Liderar i dirigir equips de treball, i desenvolupar les capacitats d'organització i planificació.
14. Obtenir dades experimentals rellevants per al càlcul dels fenòmens de transport i el càlcul de balanços de matèria i energia.
15. Pensar d'una forma integrada i abordar els problemes des de diferents perspectives.
16. Prendre decisions.
17. Proposar estratègies per a la purificació de biomolècules de barreges complexes.
18. Treballar de forma individual i en equip.
19. Utilitzar la instrumentació necessària per a les diferents tècniques de separació i caracterització de biomolècules.
20. Utilitzar la metodologia adequada per a l'estudi dels diferents tipus de mostres biològiques.
21. Utilitzar les eines informàtiques bàsiques per al càlcul de paràmetres cinètics.
22. Utilitzar les eines informàtiques per a la comparació de seqüències i per al càlcul de paràmetres cinètics.
23. Utilitzar les tècniques bàsiques d'anàlisi de l'activitat enzimàtica.
24. Utilitzar les tècniques bàsiques de manipulació, separació, detecció i anàlisi de proteïnes i àcids nucleics.
25. Utilitzar les tècniques bàsiques d'un laboratori de Química per a l'estudi de biomolècules.
26. Utilitzar les tècniques de cultius de cèl·lules procariotes, eucariotes i de manipulació de sistemes biològics.

Continguts

Aquesta assignatura es desenvolupa en la seva totalitat al laboratori i comprén catorze sessions pràctiques.

Sessió 1. Introducció. Fonaments bàsics dels mètodes biotecnològics que s'utilitzaran en aquesta assignatura. Característiques generals dels vectors de clonatge per a l'expressió recombinant de proteïnes. Utilització de bases de dades per capturar la seqüència codificant de la dihidrofolat reductasa humana (hDHFR). Disseny dels oligonucleòtids necessaris per amplificar per RT-PCR el cDNA de la hDHFR.

Sessió 2. Obtenció de la seqüència codificant del gen de la hDHFR. Purificació d'RNA total a partir d'una petita mostra de sang humana. Reacció de transcripció inversa a partir de l'RNA obtingut. Amplificació per PCR del cDNA del gen dhfr.

Sessió 3. Clonatge molecular del gen dhfr en un vector d'expressió procariota (I) i producció recombinant de la hDHFR. Purificació de productes de PCR. Preparació dels extrems de l'insert i del vector de clonatge. Inactivació dels enzims de restricció. Reacció de lligació. Estratègies per maximitzar la incorporació d'inserts a vectors de clonatge. Preparació de cultius d'*Escherichia coli* per a la producció de proteïnes recombinants a petita escala. Inducció de l'expressió de la hDHFR recombinant.

Sessió 4. Clonatge molecular del gen dhfr en un vector d'expressió procariota (i II) i purificació de la hDHFR recombinant (I). Transformació a *E. coli* del producte de la lligació realitzada en la sessió 3. Preparació de cromatografies d'afinitat. Obtenció d'un extracte cel·lular. Localització de la proteïna expressada i solubilitat de la mateixa. Purificació mitjançant cromatografia d'afinitat de la hDHFR recombinant. Obtenció del perfil cromatogràfic i interpretació del mateix.

Sessió 5. Purificació de la hDHFR recombinant (II) i identificació de clons portadors de vectors recombinants (I). Anàlisi de la puresa de la hDHFR recombinant mitjançant gels d' SDS-poliacrilamida. Caracterització enzimàtica de les diferents fraccions obtingudes en la cromatografia d'afinitat. Quantificació del rendiment obtingut en la purificació. Interpretació dels resultats de la transformació realitzada en la sessió 4. Selecció de colònies i preparació de cultius d'*E. coli* per a la l'obtenció de DNA plasmídic a petita escala.

Sessió 6. Caracterització de la hDHFR recombinant (I) i identificació de clons portadors de vectors recombinants (II). Determinació del coeficient d'extinció molar de la hDHFR. Determinació de la seqüència

N-terminal mitjançant seqüenciació automàtica. Obtenció de mostres DNA plasmídic a partir de cultius d'E. coli a petita escala. Digestió amb enzims de restricció.

Sessió 7. Caracterització de la hDHFR recombinant (i II) i identificació de clons portadors de vectors recombinants (i III). Determinació de la massa de la hDHFR mitjançant espectrometria de masses MALDI-TOFF. Confirmació de la identitat de la hDHFR per empremta peptídica. Discussió dels resultats obtinguts durant la purificació i caracterització de la hDHFR recombinant. Electroforesi en gel d'agarosa de les diferents mostres de DNA obtingudes durant les sessions anteriors. Identificació dels clons positius. Discussió dels resultats obtinguts al llarg del clonatge molecular de la seqüència codificant de la hDHFR.

Sessió 8. Introducció al disseny de processos de producció de proteïnes recombinants. Operació de bioreactors a escala laboratori: preparació del cultiu-inòcul de la soca d'E. coli productora de hDHFR recombinant, preparació i esterilització del bioreactor. Proposta de disseny experimental de les condicions de cultiu com a eina per al redisseny i millora del procés de producció.

Sessió 9. Cultius en bioreactors (I): Inoculació del bioreactor i seguiment de l'evolució dels paràmetres del cultiu operat en discontinu (temperatura, pH, pO_2 , biomassa, substrat, subproductes, estabilitat plasmídica, producte-hDHFR). Càlcul de velocitats de creixement, consum de substrats, producció de subproductes, rendiments i productivitats a partir de les dades experimentals obtingudes. Inducció de l'expressió de la hDHFR recombinant.

Sessió 10. Cultius en bioreactors (i II) i procés de recuperació de la hDHFR recombinant (I). Aturada del bioreactor i recuperació de la biomassa mitjançant centrifugació. Neteja del bioreactor.

Sessió 11. Procés de recuperació de la hDHFR recombinant (i II). Selecció del sistema d'expressió: Implicacions/condicionants sobre la selecció de les etapes de recuperació i purificació de la proteïna recombinant. Disrupció cel·lular mitjançant tècniques enzimàtiques i mecàniques. Recuperació de la fracció soluble del lisat cel·lular mitjançant centrifugació i microfiltració.

Sessió 12. Procés de purificació de la hDHFR recombinant (I). Purificació a escala preparativa de la hDHFR recombinant a partir del lisat cel·lular mitjançant cromatografia d'afinitat de metall quelat. Operació i seguiment de la cromatografia mitjançant tècniques espectralfotomètriques. Recull de les diferents fraccions cromatogràfiques obtingudes.

Sessió 13. Procés de purificació de la hDHFR recombinant (i II). Anàlisi del lisat cel·lular injectat a la columna cromatogràfica i de les diferents fraccions cromatogràfiques en termes de proteïna total (tècnica Bradford), quantitat i grau de puresa de la hDHFR recombinant (SDS-PAGE) i activitat enzimàtica de l'enzim recombinant. Anàlisi de consistència dels resultats obtinguts: balanç de proteïna total i activitat enzimàtica de la cromatografia realitzada. Càlcul de rendiments de les etapes de recuperació i purificació, activitat específica de l'enzim recombinant i factor de purificació de cada etapa del procés.

Sessió 14. Anàlisi global dels resultats obtinguts durant el procés de producció i purificació de la hDHFR recombinant. Tractament de les dades experimentals i la seva avaluació i interpretació. Extracció d'informació a partir de les dades experimentals com a base per al re-disseny i l'optimització del procés global.

Metodologia

L'assistència a les classes d'aquesta assignatura és obligatòria atès que impliquen una adquisició de competències basades en el treball pràctic. En les sessions 1 a 7 els alumnes realitzen el treball experimental en grups de 2. Aquests grups seran de 4 persones en les sessions 8 a 14. Totes les sessions de pràctiques estaran supervisades per un o dos professors responsables.

Els guions de pràctiques amb els protocols i altres informacions necessàries per la realització del treball experimental estaran disponibles en el Campus Virtual de l'assignatura. Abans de començar una sessió de pràctiques l'alumne ha d'haver llegit el protocol i conèixer per tant, els objectius de la sessió pràctica, els fonaments i els procediments que ha de realitzar. Si és el cas, ha de conèixer també les mesures de seguretat específiques i de tractament de residus.

A les sessions de pràctiques cal portar:

- Guió de pràctiques.
- Una llibreta per a recollir la informació del treball experimental.
- Bata de laboratori.
- Ulleres de protecció.
- Retolador permanent.

Activitats formatives

Títol	Hores	ECTS	Resultats d'aprenentatge
Tipus: Dirigides			
Classes pràctiques de laboratori	56	2,24	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26
Tipus: Supervisades			
Tutories	3	0,12	4, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22
Tipus: Autònomes			
Estudi	6	0,24	1, 4, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 21, 22
Redacció d'informes	6	0,24	1, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23

Avaluació

L'assignatura s'avaluarà en base a les qualificacions obtingudes per l'alumne en dos examens, en els diferents informes que haurà de redactar un cop finalitzades les pràctiques i finalment en una apreciació per part dels diferents professors de l'actitut i el treball de cada alumne durant la realització de les pràctiques. El pes de cada una d'aquestes parts serà el següent:

- examen escrit corresponent a les sessions 1-7: 30%
- examen escrit corresponent a les sessions 8-14: 25%
- Informe de les sessions 1-7: 15%. Aquest informe constarà de dues parts. La primera en la qual bàsicament es tractaran els temes relacionats amb la Tecnologia del DNA recombinant i la segona en la qual de forma preferent es tractaran els temes relacionats amb la Química i Enginyeria de Proteïnes.
- Informe de les sessions 8-14: 20%
- Valoració de l'actitut i el treball: 10%

La no assistència a una sessió de pràctiques sense justificar comportarà la reducció de la nota mitjana dels informes en un 50%. En cas de no assistir a més d'una sessió pràctica sense justificar, aquesta nota es reduirà a 0.

En tractar-se d'una assignatura pràctica cal assistir com a mínim al 80% de les sessions programades (11 sessions) per poder superar l'assignatura, amb independència de si les absències estan justificades o no. Per superar l'assignatura també cal obtenir una qualificació final igual o superior a 5.

Un estudiant obtindrà la qualificació final de No Avaluable quan hagi assistit a menys del 50% de les sessions pràctiques o quan la valoració de totes les activitats d'avaluació realitzades no permeti assolir la qualificació global de 5 en el supòsit que hagués obtingut la màxima nota en totes elles. Els alumnes repetidors tan sols hauran de realitzar i ser avaluats dels grups de continguts que no haguessin estat superats (qualificació inferior a 5) en la primera matrícula. Per als grups de continguts superats es guardarà la nota durant un període màxim de dos matrícules addicionals de l'assignatura.

Activitats d'avaluació

Títol	Pes	Hores	ECTS	Resultats d'aprenentatge
Actitut i qualitat del treball al laboratori	10%	0	0	2, 5, 13, 15, 16, 18, 25
Examen escrit corresponent a les sessions 1 a 7	30%	2	0,08	3, 6, 8, 9, 12, 15, 16, 17, 19, 20, 23, 24, 26
Examen escrit corresponent a les sessions 8 a 14	25%	2	0,08	3, 6, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 26
Informe corresponent a les sessions 1 a 7	15%	0	0	1, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23
Informe corresponent a les sessions 8 a 14	20%	0	0	1, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23

Bibliografia

La bibliografia i els enllaços web estan actualitzats en l'apartat de Material Docent del Campus Virtual de l'assignatura.