

Laboratorio integrado 5

Código: 100924
Créditos ECTS: 3

Titulación	Tipo	Curso	Semestre
2500253 Biotecnología	OB	3	1

Contacto

Nombre: Jaume Piñol Ribas

Correo electrónico: Jaume.Pinyol@uab.cat

Uso de idiomas

Lengua vehicular mayoritaria: catalán (cat)

Algún grupo íntegramente en inglés: No

Algún grupo íntegramente en catalán: Sí

Algún grupo íntegramente en español: No

Equipo docente

Francisco Valero Barranco

Prerequisitos

Es necesario estar cursando de forma simultanea o ya haber cursado las asignaturas de teoría relacionadas con los contenidos de estas prácticas de laboratorio: Tecnología del DNA recombinante, Química e Ingeniería de Proteínas y Fundamentos de Ingeniería de Bioprocesos, Bioreactores y Procesos de separación y purificación.

Para asistir a las sesiones prácticas es imprescindible que el estudiante pueda justificar que ha superado las pruebas de bioseguridad y seguridad que encontrará en Campus Virtual. Asimismo, el estudiante ha de ser conocedor y aceptar las normas de funcionamiento de los laboratorios de la Facultad de Biociencias.

Objetivos y contextualización

En esta asignatura se lleva a cabo una experimentación de laboratorio en la que se utilizan de forma integrada conceptos y técnicas de diferentes campos que intervienen en la Biotecnología. Concretamente, se contempla la combinación de la Tecnología del DNA recombinante, la Química de proteínas y la Bioingeniería (incluyendo los procesos de cultivo de organismos en biorreactores, recuperación y purificación de proteínas) en el desarrollo de procesos biotecnológicos. De este modo, el objetivo general de la asignatura es el de obtener una visión de conjunto sobre tres de las partes más importantes de las que constan los procesos biotecnológicos y se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

- Conocer las diferentes etapas de las que consta la extracción de RNA total a partir de tejidos eucariotas, así como los puntos claves de la reacción de RT-PCR para amplificar la secuencias específicas de cDNA, incluidos los criterios básicos utilizados en los diseño de oligonucleótidos para la reacción de RT-PCR.
- Aprender las características principales de los vectores de expresión utilizados para la producción de proteínas recombinantes.
- Conocer los diferentes pasos de las que consta un proceso estándar de clonación molecular: digestión con enzimas de restricción, reacción de ligación y transformación en un huésped bacteriano, así como los criterios utilizados para el reconocimiento de bacterias portadoras del vector más inserto.
- Conocer los parámetros determinantes para la expresión heteróloga de proteínas en bacterias, así como el diseño experimentos de expresión recombinante en función de las características de la proteína a expresar.

- Diseñar y aplicar protocolos de purificación de proteínas recombinantes.
- Caracterizar desde el punto de vista estructural / funcional las proteínas expresadas
- Aprender la secuencia básica de operaciones, su distribución en el tiempo, y los puntos claves asociados al cultivo de microrganismos en biorreactores y la purificación de proteínas recombinantes a escala laboratorio.
- Ver las interacciones entre las diferentes etapas de un proceso de producción de proteínas recombinantes, desde las características de la proteína a producir y del sistema de expresión empleado en el proceso de fermentación, hasta la recuperación y purificación de la proteína recombinante .
- Caracterizar a escala laboratorio de los parámetros clave del proceso de producción - cultivo en biorreactor, recuperación y purificación - de la proteína recombinante de interés.
- Integrar de todos los resultados obtenidos, evaluar de forma global el sistema de producción de la proteína recombinante y discutir / diseñar estrategias para su optimización.

Contenido

Esta asignatura se desarrolla en su totalidad en el laboratorio y comprende catorce sesiones prácticas.

Sesión 1. Introducción. Fundamentos básicos de los métodos biotecnológicos que se utilizarán en esta asignatura. Características generales de los vectores de clonación para la expresión recombinante de proteínas. Utilización de bases de datos para capturar la secuencia codificante de la dihidrofolato reductasa humana (hDHFR). Diseño de los oligonucleótidos necesarios para amplificar por RT-PCR el cDNA de la hDHFR.

Sesión 2. Obtención de la secuencia codificante del gen de la hDHFR. Purificación del RNA total a partir de una pequeña muestra de sangre humana. Reacción de transcripción inversa a partir del RNA obtenido. Amplificación por PCR del cDNA del gen DHFR.

Sesión 3. Clonación molecular del gen DHFR en un vector de expresión procariota (I) y producción recombinante de la hDHFR. Purificación de productos de PCR. Preparación de los extremos del inserto y del vector de clonación. Inactivación de las enzimas de restricción. Reacción de ligación. Estrategias para maximizar la incorporación de insertos en vectores de clonación. Preparación de cultivos de *Escherichia coli* para la producción de proteínas recombinantes a pequeña escala. Inducción de la expresión de la hDHFR recombinante.

Sesión 4. Clonación molecular del gen DHFR en un vector de expresión procariota (y II) y purificación de la hDHFR recombinante (I). Transformación en *E. coli* del producto de la ligación realizada en la sesión 3. Preparación de cromatografías de afinidad. Obtención de un extracto celular. Localización de la proteína expresada y solubilidad de la misma. Purificación mediante cromatografía de afinidad de la hDHFR recombinante. Obtención del perfil cromatográfico e interpretación del mismo.

Sesión 5. Purificación de la hDHFR recombinante (II) e identificación de clones portadores de vectores recombinantes (I). Análisis de la pureza de la hDHFR recombinante mediante geles de SDS-poliacrilamida. Caracterización enzimática de las diferentes fracciones obtenidas en la cromatografía de afinidad. Cuantificación del rendimiento obtenido en la purificación. Interpretación de los resultados de la transformación realizada en la sesión 4. Selección de colonias y preparación de cultivos de *E. coli* para la obtención de DNA plasmídico a pequeña escala.

Sesión 6. Caracterización de la hDHFR recombinante (I) e identificación de clones portadores de vectores recombinantes (II). Determinación del coeficiente de extinción molar de la hDHFR. Determinación de la secuencia N-terminal mediante secuenciación automática. Obtención de muestras ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli* a pequeña escala. Digestión con enzimas de restricción.

Sesión 7. Caracterización de la hDHFR recombinante (y II) e identificación de clones portadores de vectores recombinantes (y III). Determinación de la masa de la hDHFR mediante espectrometría de masas MALDI-toff. Identificación de la hDHFR mediante análisis de huella peptídica. Discusión de los resultados obtenidos durante la purificación y caracterización de la hDHFR recombinante. Electroforesis en gel de agarosa de las diferentes muestras de ADN obtenidas durante las sesiones anteriores. Identificación de los clones positivos. Discusión de los resultados obtenidos a lo largo de la clonación molecular de la secuencia codificante de la hDHFR.

Sesión 8. Introducción al diseño de procesos de producción de proteínas recombinantes. Operación de biorreactores a escala laboratorio: preparación del cultivo-inóculo de la cepa de E. coli productora de hDHFR recombinante, preparación y esterilización del biorreactor. Propuesta de diseño experimental de las condiciones de cultivo como herramienta para el rediseño y mejora del proceso de producción.

Sesión 9. Cultivo en biorreactores (I). Inoculación del biorreactor y seguimiento de la evolución de los parámetros del cultivo operado en discontinuo (temperatura, pH, pO₂, biomasa, sustrato, subproductos, estabilidad plasmídica, producto-hDHFR). Cálculo de velocidades de crecimiento, consumo de sustratos, producción de subproductos, rendimientos y productividades a partir de los datos experimentales obtenidos. Inducción de la expresión de la hDHFR recombinante.

Sesión 10. Cultivos en biorreactores (y II) y proceso de recuperación de la hDHFR recombinante (I). Parada del biorreactor y recuperación de la biomasa mediante centrifugación. Limpieza del biorreactor.

Sesión 11. Proceso de recuperación de la hDHFR recombinante (y II). Selección del sistema de expresión: Implicaciones / condicionantes sobre la selección de las etapas de recuperación y purificación de la proteína recombinante. Disrupción celular mediante técnicas enzimáticas y mecánicas. Recuperación de la fracción soluble del lisado celular mediante centrifugación y microfiltración.

Sesión 12. Proceso de purificación de la hDHFR recombinante (I). Purificación a escala preparativa de la hDHFR recombinante a partir del lisado celular mediante cromatografía de afinidad de metal quelado. Operación y seguimiento de la cromatografía mediante técnicas espectrofotométricas. Recopilación de las diferentes fracciones cromatográficas obtenidas.

Sesión 13. Proceso de purificación de la hDHFR recombinante (y II). Análisis del lisado celular inyectado en la columna cromatográfica y de las diferentes fracciones cromatográficas en términos de proteína total (técnica Bradford), cantidad y grado de pureza de la hDHFR recombinante (SDS-PAGE) y actividad enzimática de la enzima recombinante. Análisis de consistencia de los resultados obtenidos: balance de proteína total y actividad enzimática de la cromatografía realizada. Cálculo de rendimientos de las etapas de recuperación y purificación, actividad específica de la enzima recombinante y factor de purificación de cada etapa del proceso.

Sesión 14. Análisis global de los resultados obtenidos durante el proceso de producción y purificación de la hDHFR recombinante. Tratamiento de los datos experimentales y su evaluación e interpretación. Extracción de información a partir de los datos experimentales como base para el re-diseño y la optimización del proceso global.