Universitat Autònoma de Barcelona

**2023/2024**

# 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

## Idiomas de los grupos

Puede consutarlo a través de este enlace. Para consultar el idioma necesitará introducir el CÓDIGO de la asignatura. Tenga en cuenta que la información es provisional hasta el 30 de noviembre del 2023.

## Equipo docente

Pau Ferrer Alegre

## Prerrequisitos

Se recomienda estar cursando de forma simultanea o ya haver cursado las assignaturas de teoria relacionadas con los contenodos de estas prácticas de laboratorio: Tecnología del DNA recombionante, Química e Ingeniería de Proteínas, Fundamentos de Ingeniería de Bioprocesos, Bioreactores y Procesos de separación y purificación.

Para asistir a las sesiones prácticas es imprescindible que el estudiantado 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 microroganismes 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.

## Competencias

- Actuar con responsabilidad ética y con respeto por los derechos y deberes fundamentales, la diversidad y los valores democráticos.
- Actuar en el ámbito de conocimiento propio evaluando las desigualdades por razón de sexo/género.
- Actuar en el ámbito de conocimiento propio valorando el impacto social, económico y medioambiental.
- Aplicar las normas generales de seguridad y funcionamiento de un laboratorio y las normativas específicas para la manipulación de diferentes sistemas biológicos.
- Aplicar las principales técnicas asociadas a la utilización de sistemas biológicos: DNA recombinante y clonación, cultivos celulares, manipulación de virus, bacterias y células animales y vegetales, técnicas inmunológicas, técnicas de microscopía, proteínas recombinantes y métodos de separación y caracterización de biomoléculas.
- Aplicar los recursos informáticos para la comunicación, la búsqueda de información, el tratamiento de datos y el cálculo.
- Aprender nuevos conocimientos y técnicas de forma autónoma.
- Buscar, obtener e interpretar la información de las principales bases de datos biológicos, bibliográficos y de patentes y usar las herramientas bioinformáticas básicas.
- Describir las bases del diseño y funcionamiento de biorreactores y calcular, interpretar y racionalizar los parámetros relevantes en fenómenos de transporte y los balances de materia y energía en los procesos bioindustriales.
- Diseñar experimentos de continuación para resolver un problema.
- Diseñar y ejecutar un protocolo completo de obtención y purificación de un producto biotecnológico.
- Interpretar resultados experimentales e identificar elementos consistentes e inconsistentes.
- Liderar y dirigir equipos de trabajo y desarrollar las capacidades de organización y planificación.
- Obtener información de bases de datos y utilizar el software necesario para establecer correlaciones entre estructura, función y evolución de macromoléculas.
- Pensar de una forma integrada y abordar los problemas desde diferentes perspectivas.
- Tomar decisiones.
- Trabajar de forma individual y en equipo.
- Utilizar las metodologías analíticas para el ensayo de la actividad biológica de los componentes celulares, en especial enzimas, in vivo e in vitro.
- Utilizar los fundamentos de matemáticas, física y química necesarios para comprender, desarrollar y evaluar un proceso biotecnológico.

## Resultados de aprendizaje

1. Actuar con responsabilidad ética y con respeto por los derechos y deberes fundamentales, la diversidad y los valores democráticos.

2. Actuar en el ámbito de conocimiento propio evaluando las desigualdades por razón de sexo/género.
3. Actuar en el ámbito de conocimiento propio valorando el impacto social, económico y medioambiental.
4. Aplicar correctamente los diferentes procesos de eliminación de residuos.
5. Aplicar las normas generales de seguridad de un laboratorio de Biotecnología.
6. Aplicar las técnicas fundamentales para el análisis, purificación y caracterización de biomoléculas.
7. Aplicar los principios de esterilidad a procesos de manipulación y recuento de microorganismos.
8. Aplicar los recursos informáticos para la comunicación, la búsqueda de información, el tratamiento de datos y el cálculo.
9. Aprender nuevos conocimientos y técnicas de forma autónoma.
10. Describir el fundamento teórico y aplicar las técnicas adecuadas para la caracterización estructural y funcional de proteínas y ácidos nucleicos.
11. Describir los fundamentos teóricos de las técnicas básicas y avanzadas de obtención y caracterización de biomoléculas.
12. Diseñar experimentos de continuación para resolver un problema.
13. Ejecutar en el laboratorio protocolos de obtención y purificación de productos industriales de aplicación biotecnológica.
14. Extraer de las bases de datos información complementaria y de soporte para el análisis de los resultados y la elaboración de las memorias resultantes del trabajo experimental.
15. Interpretar resultados experimentales e identificar elementos consistentes e inconsistentes.
16. Liderar y dirigir equipos de trabajo y desarrollar las capacidades de organización y planificación.
17. Obtener datos experimentales relevantes para el cálculo de los fenómenos de transporte y el cálculo de balances de materia y energía.
18. Pensar de una forma integrada y abordar los problemas desde diferentes perspectivas.
19. Proponer estrategias para la purificación de biomoléculas de mezclas complejas.
20. Tomar decisiones.
21. Trabajar de forma individual y en equipo.
22. Utilizar la instrumentación necesaria para las distintas técnicas de separación y caracterización de biomoléculas.
23. Utilizar la metodología adecuada para el estudio de los diferentes tipos de muestras biológicas.
24. Utilizar las herramientas informáticas básicas para el cálculo de parámetros cinéticos.
25. Utilizar las herramientas informáticas para la comparación de secuencias y para el cálculo de parámetros cinéticos.
26. Utilizar las técnicas básicas de análisis de la actividad enzimática.
27. Utilizar las técnicas básicas de manipulación, separación, detección y análisis de proteínas y ácidos nucleicos.
28. Utilizar las técnicas básicas de un laboratorio de Química para el estudio de biomoléculas.
29. Utilizar las técnicas de cultivos de células procariotas, eucariotas y de manipulación de sistemas biológicos.

## 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 (yII) 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 dela 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. Identificación de la hDHFR mediante análisis de huella peptídica (I). 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 (II). Discusión de los resultados obtenidos durante la purificación y caracterizaciónde 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 cielo• lular mediante técnicas enzimáticas y mecánicas. Recuperación de la fracción soluble del lisado cielo • lular 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 crotatografia de afinidad de metal quelado. Operación y seguimiento de la cromatografía mediante técnicas espetrefotomètriques. 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 términosdeproteína 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.

## Metodología

La asistencia a las clases de esta asignatura es obligatoria dado que implican una adquisición de competencias basadas en el trabajo práctico.

Para la realización de las actvidades prácticas, los alumnos se distribuyen en cuatro turnos de aproximadamente 20 estudiantes.Todas las sesiones de prácticas estarán supervisadas por uno o dos profesores o profesoras responsables.

Los guiones de prácticas con los protocolos y otras informaciones necesarias para la realización del trabajo experimental estarán disponibles en el Campus Virtual de la asignatura. Antes de empezar una sesión de prácticas el alumno debe haber leído el protocolo y conocer por tanto, los objetivos de la sesión práctica, los fundamentos y los procedimientos que debe realizar. En su caso, debe conocer también las medidas de seguridad específicas y de tratamiento de residuos.

En caso de que esta asignatura sea encuestada y período de contestación de encuestas coincida con alguna sesión de prácticas, los estudiantes dispondrán de quince minutos para responder la encuesta de evaluación del profesorado.

En las sesiones de prácticas es necesario llevar:

- Guión de prácticas.
- Una libreta para recoger la información del trabajo experimental.
- Bata de laboratorio.
- Gafas de protección.
- Rotulador permanente.

Nota: se reservarán 15 minutos de una clase dentro del calendario establecido por el centro o por la titulación para que el alumnado rellene las encuestas de evaluación de la actuación del profesorado y de evaluación de la asignatura o módulo.

## Actividades

| Título | Horas | ECTS | Resultados de aprendizaje |
|---|---|---|---|
| Tipo: Dirigidas | | | |
| Classes prácticas de laboratorio | 56 | 2,24 | 4, 7, 8, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 27, 29 |
| Tipo: Supervisadas | | | |
| Totorías | 3 | 0,12 | 8, 12, 15, 16, 18, 20, 19, 21, 24, 25 |
| Tipo: Autónomas | | | |
| Estudio | 6 | 0,24 | 9, 8, 11, 12, 14, 15, 18, 20, 19, 24, 25 |
| Redacción de informes de prácticas | 6 | 0,24 | 9, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 19, 21, 24, 25, 26 |

## Evaluación

Esta assignatura no prevé el sistema de evaluación única. La asignatura se evaluará en base a las calificaciones obtenidas por el alumno en dos exámenes, en los diferentes informes que deberá redactar una vez finalizadas las prácticas y finalmente en una apreciación por parte de los diferentes profesores de la actitud y el trabajo de cada alumno durante la realización de las prácticas. El peso de cada una de estas partes será el siguiente:
- Examen escrito correspondiente a las sesiones 1-7: 30%
- Examen escrito correspondiente a las sesiones 8-14: 25%
- Informe de las sesiones 1-7: 15%. Este informe constará de dos partes. La primera en la que básicamente se tratarán los temas relacionados con la Tecnología del DNA recombinante y la segunda en la que de forma preferente se tratarán los temas relacionados con la Química e Ingeniería de Proteínas.
- Informe de las sesiones 8-14: 20%
- Valoración de la actitud y el trabajo: 10%

Para las sesiones 1 a 7, la valoración de la actitud estará basada en la siguiente rúbrica: a) Puntualidad, 20%; b) Responder adecuadamente preguntas sobre el guión de prácticas, 20%; c) Atención durante las explicaciones del profesor, 20%; d) Participación equitativa en el trabajo de los diferentes alumnos de cada grupo, 20%; d) Participación en la interpretación y discusión de los resultados, 20%.

La no asistencia a una sesión de prácticas sin justificar conllevará la reducción de la nota media de los informes en un 50%. En caso de no asistir a más de una sesión práctica sin justificar, esta nota se reducirá a 0.
Al tratarse de una asignatura práctica es necesario asistir al menos al 80% de las sesiones programadas (11 sesiones) para poder superar la asignatura, con independencia desi las ausencias están justificadas o no. Para superar la asignatura también hay que obtener una calificación final igual o superior a 5.

Un o una estudiante obtendrá la calificación final de No Evaluable cuando haya asistido a menos del 50% de las sesiones prácticas o cuando la valoración de todas las actividades de evaluación realizadas no permita alcanzar la calificación globalde 5 en el supuesto de que hubiera obtenido la máxima nota en todas ellas. En el caso de repetir la asignatura sólo se deberán realizar y evaluar de los grupos de contenidos que no hubieran sido superados (calificación inferior 5) en la primera matrícula. Para los grupos de contenidos superados se guardará la nota durante un periodo máximo de dos matrículas adicionales de la asignatura.

El calendario de exámenes y las diferentes actividades a realizar dentro del módulo serán anunciados al inicio del curso. Una vez fijados, en ningún caso se realizarán exámenes en fechas y horarios diferentes.

Para la revisión de los resultados de las evaluaciones, se fijará el momento y la manera dentro de los 10 días hábiles siguientes a la comunicación de los mismos mediante la plataforma virtual. Si el alumnado no se presenta en esta revisión, no se revisará posteriormente esta actividad.

Matriculas de Honor (MH). Otorgar una calificación de matrícula de honor es decisión del profesorado responsable de la asignatura. La normativa de la UAB indica que las MH sólo se podrán conceder a las o los estudiantes que hayan obtenido una calificación final igual o superior a 9.00. Se puede otorgar hasta un 5% de MH del total del estudiantado matriculado.

Sin perjuicio de otras medidas disciplinarias que se estimen oportunas, se calificarán con uncero las irregularidades cometidas por el estudiante que puedan conducir a una variación de la calificación de un acto de evaluación. Por lo tanto, la copia, el plagio, el engaño, dejar copiar, etc. en cualquiera de las actividades de evaluación implicará suspender la assignatura con un cero.

## Actividades de evaluación continuada

| Título | Peso | Horas | ECTS | Resultados de aprendizaje |
|---|---|---|---|---|
| Actitud y calidad del trabajo en el laboratorio | 10% | 0 | 0 | 1, 2, 3, 4, 5, 16, 18, 20, 21, 28 |
| Examen escrito correspondiente a las sesiones 1 a 7 | 30% | 2 | 0,08 | 7, 6, 11, 12, 15, 18, 20, 19, 22, 23, 26, 27, 29 |
| Examen escrito correspondiente a las sesiones 8 a 14 | 25% | 2 | 0,08 | 7, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 20, 19, 22, 29 |
| Informe correspondiente a las sesiones 1 a 7 | 15% | 0 | 0 | 9, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 19, 21, 24, 25, 26 |
| Informe correspondiente a las sesiones 8 a 14 | 20% | 0 | 0 | 9, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 19, 21, 24, 25, 26 |

## Bibliografía

La bibliografía que aparece a continuación está disponible en formato PDF en el Campus Virtual de la asignatura:

- Affinity Chromatography. Principles and Methods. Amersham

- pET system manual. Novagene

- Eiteman, Altman (2006) Overcoming acetate in Escherichia coli recombinant protein fermentations. Trends in Biotechnology 24530-536 .

- Lee (1996). High cell density culture of E. coli. Trends in Biotechnology 14:98-105.

- Lund et al (2020). Understanding How Microorganisms Respond to Acid pH Is Central to Their Control and Successful Exploitation. Frntiers in Microbiology, Review. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.556140

- Protein Purification Handbook Amersham.

## Software

Durante la realització de les prácticas no se utilizara ningun programa específico a excepción del software propietario de control de alguno de los fermentadores.

Para el procesado de datos y redacción de los informes de prácticas el alumno tendrá que utilizar un paquete estándar de ofimática.