

Laboratori integrat 5

Codi: 100924
Crèdits: 3

2024/2025

Titulació	Tipus	Curs
2500253 Biotecnologia	OB	3

Professor/a de contacte

Nom: Jaume Piñol Ribas

Correu electrònic: jaume.pinyol@uab.cat

Equip docent

Pau Ferrer Alegre

Idiomes dels grups

Podeu consultar aquesta informació al [final](#) del document.

Prerequisits

Es recomana 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 i Processos de Separació i Purificació.

Per poder assistir a les sessions pràctiques cal que l'estudiantat 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 bacteries portadores de vector més insert.
- Conèixer els paràmetres determinants per a l'expressió heteròloga de proteïnes en bacteris, així com el disseny d'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.

Resultats d'aprenentatge

1. CM22 (Competència) Prioritzar la instrumentació necessària per a les diferents tècniques de separació i caracterització de biomolècules.
2. CM22 (Competència) Prioritzar la instrumentació necessària per a les diferents tècniques de separació i caracterització de biomolècules.
3. CM23 (Competència) Proposar estratègies per a la purificació de biomolècules de mesclures complexes.
4. CM23 (Competència) Proposar estratègies per a la purificació de biomolècules de mesclures complexes.
5. CM24 (Competència) Revisar les normes generals de seguretat d'un laboratori de biotecnologia.
6. KM24 (Coneixement) Descriure el fonament teòric i les tècniques adequades per a la caracterització estructural i funcional de proteïnes i àcids nucleics.
7. SM20 (Habilitat) Utilitzar les tècniques bàsiques de manipulació, separació, detecció i anàlisi de proteïnes i àcids nucleics.
8. SM20 (Habilitat) Utilitzar les tècniques bàsiques de manipulació, separació, detecció i anàlisi de proteïnes i àcids nucleics.
9. SM21 (Habilitat) Utilitzar les tècniques de cultiu de cèl·lules procariotes i eucariotes i de manipulació de sistemes biològics.
10. SM21 (Habilitat) Utilitzar les tècniques de cultiu de cèl·lules procariotes i eucariotes i de manipulació de sistemes biològics.
11. SM22 (Habilitat) Utilitzar les metodologies analítiques per a l'assaig de l'activitat biològica dels components cel·lulars.
12. SM22 (Habilitat) Utilitzar les metodologies analítiques per a l'assaig de l'activitat biològica dels components cel·lulars.

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. Confirmació de la identitat de la hDHFR per empremta peptídica (I). 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 (II). 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, pO₂, 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 espectrofotomètriques. 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.

Activitats formatives i Metodologia

Títol	Hores	ECTS	Resultats d'aprenentatge
Tipus: Dirigides			
Classes pràctiques de laboratori	56	2,24	
Tipus: Supervisades			
Tutories	3	0,12	
Tipus: Autònomes			
Estudi	6	0,24	
Redacció d'informes de pràctiques	6	0,24	

L'assistència a les classes d'aquesta assignatura és obligatòria atès que implica adquisició de competències basades en el treball pràctic.

Per a la realització de les activitats pràctiques, els alumnes es distribueixen en quatre torns d'aproximadament 20 estudiants. Per a les sessions experimentals de les parts A i B, els alumnes realitzaran el treball en grups de dos. Per a les parts C i D, els grups seran de quatre-cinc alumnes. Totes les sessions de pràctiques estaran supervisades per un o dos professors o professores responsables.

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

En el cas que aquesta assignatura sigui enquestada i que el període de contestació d'enquestes coincideixi amb alguna sessió de pràctiques, l'estudiantat disposarà de quinze minuts per respondre l'enquesta d'avaluació del professorat.

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.

Nota: es reservaran 15 minuts d'una classe, dins del calendari establert pel centre/titulació, per a la complementació per part de l'alumnat de les enquestes d'avaluació de l'actuació del professorat i d'avaluació de l'assignatura/mòdul.

Avaluació

Activitats d'avaluació continuada

Títol	Pes	Hores	ECTS	Resultats d'aprenentatge
Actitut i qualitat del treball al laboratori	10%	0	0	CM24
Examen escrit corresponent a les sessions 1 a 7	30%	2	0,08	CM22, CM23, KM24, SM20, SM21, SM22
Examen escrit corresponent a les sessions 8 a 14	25%	2	0,08	CM22, CM23, KM24, SM20, SM21, SM22
Informe corresponent a les sessions 1 a 7	15%	0	0	CM22, CM23, KM24, SM20, SM21, SM22
Informe corresponent a les sessions 8 a 14	20%	0	0	CM22, CM23, KM24, SM20, SM21, SM22

Aquesta assignatura/mòdul no preveu el sistema d'avaluació única. 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%

Per a les sessions 1 a 7, la valoració de l'actitut estarà basada en la següent rúbrica: a) Puntualitat, 20%; b) Respondre adequadament preguntes sobre el guió de pràctiques, 20%; c) Atenció durant les explicacions del professor, 20%; d) Participació equitativa en el treball dels diferents alumnes de cada grup, 20%; d) Participació en la interpretació i discussió dels resultats, 20%.

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 globalde 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.

El calendari d'exàmens i les diferents activitats a realitzar dins del mòdul seran anunciats a l'inici del curs. Una vegada fixats, en cap cas es realitzaran exàmens en dates i horaris diferents.

Per a la revisió dels resultats de les avaluacions, es fixarà el moment i la manera dins dels 10 dies hàbils següents a la comunicació dels mateixos mitjançant la plataforma virtual. Si l'estudiantat no es presenta a aquesta revisió, no es revisarà posteriorment aquesta activitat.

Matricules d'honor (MH). Atorgar una qualificació de matrícula d'honor es decisió del professorat responsable de l'assignatura. La normativa de la UAB indica que les MH només es podran concedir als alumnes o les alumnes ue hagin obtingut una qualificació final igual o superior a 9.00. Es pot atorgar fins a un 5% de MH del nombre tota de l'estudiantat matriculat.

Sense perjudici d'altres mesures disciplinàries que s'estimin oportunes, es qualificaran amb un zero les irregularitats comeses per l'estudiantata que puguin conduir a una variació de la qualificació d'un acte d'avaluació. Per tant, la copia, el plagi, l'engany, deixar copiar, etc. en qualsevol de les activitats d'avaluació implicarà suspendre-la amb un zero.

Bibliografia

La bibliografia que apareix a continuació està disponible en format PDF al Campus Virtual de l'assignatura:

- 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.

Programari

Durant la realització de les pràctiques no s'utilitzarà cap programari específic a excepció del software propietari de control d'algun dels fermentadors.

Per al processament de dades i redacció dels l'informes l'alumne haurà d'utilitzar un programari estàndard d'ofimàtica.

Llista d'idiomes

Nom	Grup	Idioma	Semestre	Torn
(PLAB) Pràctiques de laboratori	431	Català/Espanyol	primer quadrimestre	tarda
(PLAB) Pràctiques de laboratori	432	Català/Espanyol	primer quadrimestre	tarda
(PLAB) Pràctiques de laboratori	433	Català	primer quadrimestre	tarda

PROVISIONAL