



Universitat de Lleida

GUIA DOCENT
**TÈCNIQUES DE LABORATORI
DE BIOTECNOLOGIA DE
PLANTES**

Coordinació: BASSIÉ , LUDOVIC

Any acadèmic 2017-18

Informació general de l'assignatura

Denominació	TÈCNiques DE LABORATORI DE BIOTECNOLOGIA DE PLANTES			
Codi	101629			
Semestre d'impartició	2N Q(SEMESTRE) AVALUACIÓ CONTINUADA			
Caràcter	Grau/Màster	Curs	Caràcter	Modalitat
	Grau en Biotecnologia	4	OPTATIVA	Presencial
Nombre de crèdits ECTS	6			
Grups	1GG,1GM			
Crèdits teòrics	0			
Crèdits pràctics	0			
Coordinació	BASSIÉ , LUDOVIC			
Departament/s	PRODUCCIO VEGETAL I CIENCIA FORESTAL			
Distribució càrrega docent entre la classe presencial i el treball autònom de l'estudiant	60 hores presencials 90 hores no presencials			
Informació important sobre tractament de dades	Consulteu aquest enllaç per a més informació.			
Idioma/es d'impartició	Català 90% Anglès 10%			
Horari de tutoria/lloc	Centre: ETSEA Departament: Producció Vegetal i Ciència Forestal Despatx: 2a planta Edifici principal Telèfon: 973702543			

Professor/a (s/es)	Adreça electrònica professor/a (s/es)	Crèdits impartits pel professorat	Horari de tutoria/lloc
BASSIÉ , LUDOVIC	ludovic.bassie@pvcf.udl.cat	6	

Informació complementària de l'assignatura

L'assignatura de Tècniques de laboratori de biotecnologia de plantes (TLBP) és una assignatura optativa que s'imparteix durant el primer quadrimestre del quart curs del Grau de Biotecnologia. La càrrega docent de l'assignatura és de 6 crèdits que es distribueixen entre classes teòriques i pràctiques amb 1 i 5 crèdits respectivament. L'assignatura s'estructura en 8 sessions teòriques de 50 minuts, 1 seminari de 2 hores i 50 hores per a la realització d'un set de pràctiques de laboratori.

L'assignatura TLBP és complementària de l'assignatura de BVEG. Les eines en biotecnologia vegetal i els diferents sistemes de transformació incloent els mètodes d'integració d'un transgèn van ser ja estudiats en l'assignatura de BVEG. L'assignatura TLBP es basa sobre la teoria i la pràctica de tècniques elementals en biotecnologia vegetal.

Per començar es veurà la metodologia estratègica involucrada en el procés de clonatge de gens i en les etapes de subclonage. Aquestes tècniques pertanyen a la primera gran fase en la creació d'un organisme vegetal enginyat genèticament.

El segon grup de tècniques es dedica als mètodes d'anàlisi de l'expressió d'un transgèn, procediment post-transformació fonamental per comprovar si el gen introduït al genoma de la planta hoste és actiu.

Prerequisits: **Biotecnologia Vegetal-101621**

Objectius acadèmics de l'assignatura

L'estudiant que superi l'assignatura ha de : (Objectius de coneixement)

- tenir coneixements de nocions elementals en el funcionament bàsic del laboratori
- tenir coneixements complementaris en enginyeria genètica general i adaptats al sistema vegetal
- tenir coneixements avançats en les tècniques d'anàlisi de l'expressió gènica

L'estudiant que superi l'assignatura ha de ser capaç de: (Objectius de capacitat)

- saber organitzar-se en la planificació de la metodologia
- utilitzar tècniques eficients i fiables en l'anàlisi de l'expressió gènica
- integrar-se en un equip de recerca

Competències

No s'especifiquen.

Continguts fonamentals de l'assignatura

Les classes de teòrica es basen sobre l'aspecte pràctica i estratègic per tal donar a l'usuari la possibilitat d'evolucionar ràpidament en l'aprenentatge de les tècniques aplicades i proveir-li consells i explicacions de procediment clars perquè pugui aplicar aquestes metodologies de manera eficient.

El programa s'estructura en 3 parts. En la primera part, el capítol-I tracta de les 'nocions elementals' que s'han d'aplicar i de seguir al laboratori. El tema s'aborda de manera recordatori però amb insistència sobre els punts essencials i delicats . A continuació en el capítol-II, s'explica les estratègies involucrades en les diferents etapes per aïllar gens tant d'origini vegetal com bacterial. Es veuen els estratagemes i les astúcies de procediment que es poden fer servir per iniciar un experiment de clonatge de gen i prosseguir-lo eficaçment amb èxit. En la tercera part i última es tracta de les mètodes d'anàlisi per comprovar l'expressió dels gens al nivell transcripcional i translacional. Encara que són metodologies clàssiques, s'utilitzen de manera sistemàtica i estan considerades endemés proveir resultats molt fiables. Són tècniques que s'han d'aplicar per tal confirmar resultats obtinguts després una aproximació transcriptòmica i proteòmica.

Capítol I. Nocions elementals

Tema 1. Generalitats

Principals mesures de seguretat al laboratori: chemicals, ultraviolet light, general housekeeping- protective equipment, important safety messages, emergency responses. Preparació i propietat dels tampons i de les solucions mare els/les més utilitzats/des. Esterilització per filtració i per autoclau. Manteniment de l'informe de laboratori. La importància de seguir un protocol.

Tema 2. Ús del equipament basic

Use of Equipment: General Comment- Micropipettors- pH Meter- Autoclave operating procedures. Preparació de medi per al cultiu bacterià de tipus *E.coli*. Treball en condicions estèrils. Working with *E. coli*: Small Scale Cultures- Permanent Storage

Capítol II. Clonatge mitjançant PCR i subclonatge

Tema 3. Clonatge de gens

- Tria del tipus d'àcid nucleic implicat per a l'amplificació: cDNA o ADN genòmic.
- Disseny de 'primers' específics de la seqüència diana mitjançant les informacions de les bases de dades.
- Reacció de la síntesi de cDNA.
- Reacció de l'amplificació de la seqüència d'interès via PCR.
- Separació, aïllament i mètodes de purificació del/s producte/s de PCR.
- Reacció de lligació en un vector de clonatge amb l'ús del sistema de TA-cloning: pGEM (Promega) o Topo cloning (Invitrogen).
- Preparació de les cèl·lules bacterianes competents de alta competència segon el mètode de

Hanahan.

- Transformació de les cèl·lules bacterianes competents amb els productes de lligació. Cultiu en medi de selecció.
- Mètodes de cribratge dels clons bacterians positius:
- Aïllament del plasmidi recombinant. Anàlisi quantitatiu.
- Anàlisi de la seqüència d'interès mitjançant mètodes estàndard de seqüenciació.

Tema 4. Subclonatge molecular

- Tria del vector d'expressió que contingui el promotor adequat en l'estratègia.
- Tria dels enzims de restriccions compatibles per la inserció de la seqüència codificant del gen (insert) en el vector.
- Metodologia clàssica d'aïllament dels fragments d'interès digerits: separació per electroforèsis i purificació per columna.
- Reacció de lligatge entre l'insert i el vector.
- Metodologia clàssica de transformació bacteriana/ purificació del plasmidi recombinant.

Capítol III. Mètodes d'anàlisi de l'expressió d'un transgèn

Tema 5. Anàlisi histoquímica

Assaig GUS: expressió del gen marcador codificant per la β -glucuronidase en teixits no diferenciats i diferenciats.

Tema 6. Northern blotting: anàlisi de blot d'ARN

- Recordatori de les condicions de treball amb l'ARN
- Mètodes d'aïllament de l'ARN total: TrizolTm (Invitrogen), RNAeasy kit (Qiagen)
- Comprovació de la integritat de l'ARN. Anàlisi quantitatiu per espectrofotometria
- Preparació del tampó d'electroforesi
- Precipitació de les mostres d'ARN
- Preparació del material electroforètic
- Preparació del gel d'agarosa-formaldehíd
- Preparació de les mostres d'ARN: tampó de desnaturalització i etapa de desnaturalització tèrmica
- Separació electroforètica. Control de qualitat.
- Rentats de força salina baixa
- Transferència de les mostres a un suport sòlid
- Fixació de l'ARN per exposició ultraviolada
- Preparació de la sonda mitjançant el marcatge DIG via PCR

- Pre-hibridació i hibridació amb una sonda específica
- Rentats successius en condicions d'alta astringència
- Procés de detecció del sistema DIG

Tema 7. Western blotting

- Composició del tampons per a l'extracció de les proteïnes totals des de teixits vegetals
- Procés d'extracció proteica
- Anàlisi quantitatiu de proteïnes: mètode de Bradford
- Preparació de les solucions requerides per el gel i la transferència
- Preparació per l'electroforesi PAGE-SDS: gel d'acrilamida en condicions de desnaturalització i mode discontinus (mètode de Laemmli)
- Tenyició del gel amb blau de Coomassie
- Transferència de tipus mig sec sobre membrana de natura PVDF
- Blocatge de la membrana
- Natura i propietat dels anticossos utilitzats en el sistema de detecció immunològic
- Etapes d'incubació amb els anticossos primari i secundari
- Detecció colorimètrica de l'activitat de la fosfatasa alcalina lligada a l'anticòs secundari

Activitats pràctiques

El programa de pràctiques s'organitza en diferents tipus d'activitats.

La primera es dedica a l'anàlisi proteic mitjançant el mètode del western blot de plantes d'arròs que sobreexpressen el gen marcador *gus* controlat pel promotor constitutiu 35S CAMV. S'efectuen totes les etapes de la metodologia des de l'extracció proteic total aïllat de teixit de fulls, passant per la preparació del material fins a la fase final de detecció de la proteïna β -glucuronidase (GUS) via l'ús d'un anticòs específic. A més a més es farà una localització histoquímica de l'activitat de la proteïna GUS amb mostres de fulles d'arròs de plantes transgèniques.

La segona activitat es consagra a algunes etapes claus dels processos de clonatge de gens via PCR i de subclonatge. Es preparen cèl·lules de la soca DH5 α d'E. coli de alta competència segon el mètode de Hanahan. A continuació es comprovarà l'eficiència d'aquelles amb l'ús de dos plasmidi independents i a més a més s'utilitzarà el mètode fiable de cribratge dels clons bacterians positius a un dels dos plasmidi introduïts mitjançant lisis cel·lular seguit de PCR.

En la tercera activitat, l'alumne es dedica a aprendre el maneigament de mostres d'ARN en condicions especials i adaptades per la conservació de la seva integritat. Es farà l'extracció d'ARN total de fulles de blat transformat amb el cDNA de l'arginina descarboxilasa (aïllat de la civada) controlat pel promotor de l'ubiquitina (aïllat del blat de moro). A continuació es verificarà la qualitat de les mostres mitjançant una electroforesi adaptada per mostres d'ARN.

S'ha de mencionar que no totes les etapes de la segona activitat es fan de manera continua, algunes d'entre elles es fan quan hi ha temps d'espera els dies previs de practiques. D'aquesta manera es pot optimitzar eficientment el temps, és un habilitat important que l'estudiant ha de desenvolupar.

Dia1: Aïllament de proteïnes

- Collita dels mostres de fulles d'arròs, ponderació i conservació en nitrogen líquid
- Preparació dels tampons per a l'extracció de les proteïnes totals des de teixits vegetals
- Procés d'extracció proteica

Dia2: Western blot-I

- Anàlisi quantitatiu de proteïnes amb el mètode de Bradford
- Preparació de les solucions requerides pel gel i la transferència
- Muntatge del material
- Preparació del gels d'acrilamida (SDS-PAGE)
- Preparació de medi de cultiu LB sòlid i líquid, amb i sense agent de selecció, per E.coli DH5 α

Dia3: Western blot-II

- Preparació de les mostres per l'electroforesi; procediment de separació
- 'Blotting': transferència a la membrana
- Blocatge de la membrana
- Sembrament de cèl·lules estoc DH5 α sobre medi sòlid sense selecció

Dia 4: Western blot-III

- Preparació de solucions estocs pel procediment d'incubacions i de rentats
- Etapes d'incubació amb els anticossos primari i secundari
- Detecció colorimètrica de l'activitat de la fosfatasa alcalina lligada a l'anticòs secundari
- Interpretacions dels resultats
- Mini cultiu de cèl·lules DH5 α : sembrament de cèl·lules, prèviament crescudes en medi sòlid sense selecció, en medi líquid sense selecció tota la nit

Dia 5: Preparació de cèl·lules competents

- Subcultiu cèl·lules DH5 α en medi líquid sense selecció
- Preparació de les cèl·lules DH5 α competents
- Preparació de la solució pel l'assaig GUS

-Preparació de mostres de fulles de plantes d'arròs i procediment de l'assaig GUS

Dia 6: Aïllament d'ARN-I

-Collida de mostres de fulles de blat, ponderació i conservació en nitrogen líquid

-Extracció d'ARN amb el mètode del TrizolTM

Dia 7: Aïllament d'ARN-II/ Transformació de cèl·lules competents

- Continuació del protocol d'aïllament d'ARN

- Quantificació de les mostres d'ARN via NanoDrop

- Transformació de les cèl·lules DH5 α competents amb dues condicions plasmídics diferents

- Sembrament de les cèl·lules sobre medi de selecció

Dia 8: Anàlisi qualitatiu d'ARN/ Subcultiu de colònies

- Preparació del material pel maneigament de mostres d'ARN

- Gel d'electroforesi per comprovar la integritat de l'ARN

- Subcultiu en línies, sobre medi sòlid amb selecció, de les colònies obtingudes després l'etapa de transformació

Dia 9: Cribratge de clons bacterians via PCR

- Lisi cel·lular

- Càlculs i preparació del 'mastermix' per la PCR amb primers específics per la detecció dels clons bacterians transformats amb el plasmidi d'interès

- Procediment de la PCR

Dia 10: Comprovació de la PCR

-Preparació d'un gel agarosa i separació electroforètica dels productes de PCR

-Interpretacions dels resultats

-Preguntes i dubtes sobre les practiques

Eixos metodològics de l'assignatura

Tipus d'activitat	Descripció	Activitat presencial alumne		Activitat no presencial alumne		Avaluació	Temps total
		Objectius	Hores	Treball alumne	Hores	Hores	Hores

Lliçó magistral	Classe magistral (Aula. Grup gran)	Explicació dels principals conceptes	10	Estudi: Conèixer, comprendre i sintetitzar coneixements			
Problemes i casos	Classe participativa (Aula. Grup gran)	Resolució de problemes i casos		Aprendre a resoldre problemes i casos			
Seminari	Classe participativa (Grup mitjà)	Realització d'activitats de discussió o aplicació		Resoldre problemes i casos. Discutir			
Laboratori	Pràctica de Laboratori (Grup mitjà)	Execució de la pràctica: comprendre fenòmens, mesurar...	50	Estudiar i realitzar Examen			
Aula d'informàtica	Pràctica d'aula d'informàtica (Grup mitjà)	Execució de la pràctica: comprendre fenòmens, mesurar...		Estudiar i Realitzar memòria			
Pràctiques de camp	Pràctica de camp (Grup mitjà)	Execució de la pràctica: comprendre fenòmens, mesurar...		Estudiar i Realitzar memòria			
Visites	Visita a explotacions o indústries	Realització de la visita		Estudiar i Realitzar memòria			
Activitats dirigides	Treball de l'alumne (individual o grup)	Orientar a l'alumne en el treball (en horari de tutories)		Realitzar un treball bibliogràfic, pràctic, etc.			
Altres							
Totals			60				

Sistema d'avaluació

Avaluació:

.50% Informe de practiques: Lliurament de memòries:

Organització general

Explicació dels procediments realment realitzats

Detalls dels càlculs

Explicació dels incidents encontrats i com es van arreglar

Obtenció dels resultats esperats

Interpretació dels resultats

Participació, motivació i interacció entre alumnes

.50% Mini projecte

-Buscar una idea original, en el marc de la biotecnologia vegetal, per una aplicació dedicada a l'agricultura o a la indústria .

-L'estratègia ha de ser relacionada a l'enginyeria de les vies metabòliques (modificació d'una via endògena o creació d'una via nova, i que sigui un cas diferent dels que vam veure a les classes de l'assignatura de Biotecnologia Vegetal)

-Descriure totes les etapes implicades:

- Explicar la raó de l'especie vegetal elegida i el mètode de transformació associat
- L'estudi de la via metabòlica
- L'anàlisi de seqüència del(s) gen(s) necessaris
- L'estratègia de clonatge dels gens d'interès i sub-clonatge en vector(s) d'expressió apropiat(s)
- Els punts claus per la regeneració de les plantes transformades
- Els anàlisis moleculars (DNA; RNA) per caracteritzar les plantes
- Els anàlisis bioquímics (Western blot; ...) o químics (metabòlits) per caracteritzar les plantes

-Bibliografia (vigileu amb el format!)

Bibliografia i recursos d'informació

Bibliografia bàsica

-Molecular Cloning- A Laboratory Manual. Vol 1,2,3. (Third Edition). 2001. J. Sambrook, DW. Russell. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

-Molecular Plant Biology Volume1, A practical approach. 2002. Philip M. Gilmartin and Chris Bowler. Oxford University Press.

[-www.protocol-online.org](http://www.protocol-online.org) (protocols i fòrums)