



Universitat de Lleida

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

Coordinació: BASSIÉ , LUDOVIC

Any acadèmic 2019-20

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 assignatura (ECTS)	6			
Tipus d'activitat, crèdits i grups	Tipus d'activitat	PRALAB	TEORIA	
	Nombre de crèdits	5	1	
	Nombre de grups	1	1	
Coordinació	BASSIÉ , LUDOVIC			
Departament/s	PRODUCCIÓ VEGETAL I CIÈNCIA 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@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 6 sessions teòriques de 50 minuts, 2 sessions dedicades a la preparació del miniprojecte (4 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 que s'utilitzen en biotecnologia vegetal i els diferents sistemes de transformació incloent els mètodes d'integració d'un transgèn van ser ja explicats en l'assignatura de BVEG.

Per començar es veurà la metodologia la més optimitzada pel 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.

Recomanació: haver superat l'assignatura Biotecnologia Vegetal-101621

Objectius acadèmics de l'assignatura

OBJECTIUS

Objectius de coneixement:

L'estudiant que superi l'assignatura ha de :

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

Objectius de capacitat:

L'estudiant que superi l'assignatura ha de ser capaç :

- saber organitzar-se en la planificació de la metodologia aplicada
- utilitzar tècniques eficients i fiables per l'anàlisi de l'expressió gènica
- integrar-se de manera bastant autònom a un equip de recerca

Competències

- Conèixer bé el propòsit i les possibilitats de les tècniques bàsiques en enginyeria genètica i molecular.
- Comprendre 'reviews' i articles de recerca en el camp de la biotecnologia vegetal o d'altres camps relacionats.
- Utilitzar de manera eficient diverses fonts d'informació.
- Integrar-se activament en un grup de recerca.
- Proporcionar plantejaments per a la proposta d'un projecte de recerca en l'àmbit de la biotecnologia vegetal.

Continguts fonamentals de l'assignatura

CONTINGUT:

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 de origen 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: productes químics, llum ultraviolada, manteniment general del laboratori, comentaris importants de seguretat, respostes d'emergència. 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

Ús d'equips: Comentaris generals-Micro pipetes- pH metre- Procediments operatiu d'autoclau. Preparació de medi per al cultiu bacterià E. coli. Treball en condicions estèrils. Treballar amb E. coli: cultius a petita escala/emmagatzematge permanent.

Capítol II. Clonatge mitjançant PCR i subclonatge

Tema 3. Clonatge de gens

- Tria del tipus d'àcid nucleic 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-like.
- 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 de la seqüència d'interès mitjançant el mètode estàndard de seqüenciació (Sanger).

Tema 4. Subclonatge molecular

- Elecció del vector d'expressió (amb el promotor adequat).
- Elecció dels enzims de restriccions compatibles per la inserció de la seqüència codificant del gen (insert) en el vector.
- Aïllament dels fragments d'interès digerits (si cal): separació per electroforesis i purificació per columna.
- Reacció de lligatge entre l'insert i el vector.
- Avantatges del sistema de clonació Anza
- Metodologia clàssica de transformació bacteriana/ purificació del plasmidi.

Capítol III. Mètodes d'anàlisi de l'expressió d'un (trans)gèn

Tema 5. Anàlisi histoquímica

GUS staining assay: visualització de l'expressió del gen marcador codificant per la β -glucuronidase en teixits no diferenciats i diferenciats.

Tema 6. RNA blot analysis

- Recordatori de les condicions de treball amb ARN
- Mètodes d'aïllament de l'ARN total: Trizol-like, silica-membrane based kits; LiCl precipitation.
- Comprovació de la integritat de l'ARN.
- Precipitació de les mostres d'ARN.
- Preparació del material per la electroforesis.
- Preparació del gel d'agarosa-formaldehíd.
- Preparació de les mostres d'ARN: tampó de desnaturalització i etapa de desnaturalització.
- Separació electroforètica i control de qualitat.
- Incubació del gel dins una solució de força salina baixa i transferència de les mostres a un suport sòlid.
- Fixació de l'ARN per exposició ultraviolada (UV-crosslinking).
- Síntesis de la sonda mitjançant el marcatge DIG via PCR.

- Pre-hibridació i hibridació amb una sonda específica.
- Rentats seqüencials d'astringència variable.
- Procés de detecció de la sonda (sistema DIG).

Tema 7. Western blotting

- Extracció de proteïnes (teixit vegetal)
- Anàlisi quantitatiu de proteïnes: mètode de Bradford.
- Preparació de les solucions requerides per el gel i la transferència.
- Electroforesis PAGE-SDS: preparació del gel d'acrilamida en condició de desnaturalització i mode discontinu (mètode de Laemmli).
- Tinció del gel amb blau de Coomassie.
- Transferència de tipus 'semi-dry' (membrana de PVDF) i etapa de blocatge de la membrana.
- Tipus i propietat dels anticossos utilitzats per la immunodetecció.
- Etapes d'incubació amb els anticossos primari i secundari.
- Detecció de l'activitat de la fosfatasa alcalina (AP-conjugated secondary antibodies)/ detecció de luminescència (HRP-conjugated antibody antibodies).

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. S'analitza mostres de plantes d'arròs que sobreexpressen el gen marcador *gus* controlat pel promotor constituït 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). A més a més, com a activitat complementària, es farà un Southern blot per identificar les línies transgèniques.

La segona activitat es consagra a algunes etapes claus dels processos de clonatge de gens 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 mitjançant diferents quantitats d'un plasmidi i a més a més s'utilitzarà un mètode fiable de cribratge dels clons bacterians positius (lisis cel·lular seguida d'una 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 de moro i es verificarà la qualitat de les mostres mitjançant una electroforesi adaptada per mostres d'ARN.

S'ha de mencionar que el procediment de les diferents activitats es fa de manera discontinua, al llarg del dia s'efectuen unes etapes en paral·leles de diferents protocols. Per tant s'aprofita el temps eficientment; la gestió del temps és una habilitat important que l'estudiant ha de desenvolupar.

Dia1: Aïllament de proteïnes

- Collita de les mostres de fulles d'arròs, ponderació i conservació en nitrogen líquid.
- Preparació de buffers que es requereixen durant aquestes dues setmanes de pràctiques.
- Procediment d'extracció de proteïnes .

- Digestió d'ADN genòmic a partir de línies transgèniques (transgèn *gus*)

Dia2: Western blot-I

- Anàlisi quantitatiu de proteïnes amb el mètode de Bradford.
- Preparació dels gels d'acrilamida (SDS-PAGE).
- Preparació del 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
- Muntatge del material per la electroforesis (Mini-PROTEAN, Biorad)
- Transferència a la membrana (blotting)
- Bloatge de la membrana
- Sembrament de cèl·lules estoc DH5 α sobre medi sòlid sense selecció

Dia 4: Western blot-III

- Preparació de les solucions 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.
- Southern blot: preparació del gDNA digerit per l'electroforesi+ migració.

Dia 5: PAGE-SDS+ Southern blotting

- Preparació dels gels PAGE-SDS (repetició)
- Preparació de les solucions TfbI i TbfII (per a la preparació de cèl·lules competents)
- Southern blot: tinció de gel amb bromur d'etidi; desnaturalització; neutralització i transferència.

Dia 6: Aïllament de l'ARN-I / Preparació de cèl·lules competents

- Collida de mostres de fulles de blat, ponderació i conservació en nitrogen líquid
- Extracció d'ARN segons el mètode del LiCl.
- Preparació de cèl·lules competents (Hanahan protocol).

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

- Continuació del protocol d'aïllament d'ARN.
- Transformació de les cèl·lules DH5 α competents amb dues condicions plasmídica diferents.
- Southern blot: prehibridació i hibridació amb la sonda

Dia 8: Southern blot detection / Subcultiu de colònies

- Subcultiu de les colònies obtingudes en medi de selecció

-PAGE-SDS running

-Coomassie blue staining i destaining

-Southern blot: passos de rentat i procediment per a la detecció de sonda

Dia 9: Cribratge de clons bacterians via PCR / Anàlisi qualitativa de l'ARN

- Lisi cel·lular dels clons bacterians

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

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

Dia 10: Comprovació de la PCR

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

-Revisió de tots els resultats obtinguts durant les practiques.

-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	6	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)	4	Realitzar un treball bibliogràfic, pràctic, etc.			
Altres							
Totals			60				

Sistema d'avaluació

Lliurament de memòries:

Informe de practiques (50%): L'avaluació de l'informe es fa en funció del punts següents:

- Organització general i coherència
- Detalls dels càlculs i volums utilitzats
- Explicació dels punts delicats
- Explicació dels incidents encontrats
- Obtenció dels resultats esperats
- Descripció i interpretació dels resultats obtinguts
- Participació, motivació i interacció entre alumnes

Mini projecte d'enginyera de les vies metabòliques en plantes (50%)

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

L'objectiu és descriure els punts clau que són necessaris per a la generació de plantes transgèniques que expressen proteïnes d'interès (enzims i/o altres) implicades en l'enginyeria d'una via metabòlica específica (endogen o afegida).

Descriure els següents punts amb exemples i / o informació tècnica recolzada amb les referències associades.

- 1- Objectiu: Expliqueu la finalitat de la vostra idea: espècie vegetal elegida; estudi de la via metabòlica (enzims claus)
2. Construcció/ns molecular/s: anàlisi de seqüència del(s) gen(s) d'interès necessaris; Estratègia de clonatge dels gen/s d'interès; sub-clonatge en vector d'expressió apropiat.
3. El mètode de transformació.
4. Els punts claus per la regeneració de les plantes transformades.
5. Anàlisi d'expressió (transcrit d'ARN / proteïna): Amb la finalitat de caracteritzar les plantes, descriu breument quins mètodes d'expressió del(s) transgèn(s) i/o d'uns gens endògens relacionats es poden utilitzar.
- 6-Bibliografia

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 (protocols i fòrums)