Universitat de Lleida

GUÍA DOCENTE

TÉCNICAS DE LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Coordinación: BASSIÉ , LUDOVIC RENÉ BERTIL

Año académico 2023-24

TÉCNICAS DE LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA... 2023-24

Información general de la asignatura

<table>
<tr><td>Denominación</td><td>TÉCNICAS DE LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS</td></tr>
<tr><td>Código</td><td>101629</td></tr>
<tr><td>Semestre de impartición</td><td>2o Q(SEMESTRE) EVALUACIÓN CONTINUADA</td></tr>
<tr><td>Carácter</td><td>
<table>
<tr><th>Grado/Máster</th><th>Curso</th><th>Carácter</th><th>Modalidad</th></tr>
<tr><td>Grado en Biotecnología</td><td>4</td><td>OPTATIVA</td><td>Presencial</td></tr>
</table>
</td></tr>
<tr><td>Número de créditos de la asignatura (ECTS)</td><td>6</td></tr>
<tr><td>Tipo de actividad, créditos y grupos</td><td>
<table>
<tr><th>Tipo de actividad</th><th>PRALAB</th><th>TEORIA</th></tr>
<tr><td>Número de créditos</td><td>5</td><td>1</td></tr>
<tr><td>Número de grupos</td><td>1</td><td>1</td></tr>
</table>
</td></tr>
<tr><td>Coordinación</td><td>BASSIÉ , LUDOVIC RENÉ BERTIL</td></tr>
<tr><td>Departamento/s</td><td>CIENCIA E INGENIERÍA FORESTAL Y AGRÍCOLA</td></tr>
<tr><td>Información importante sobre tratamiento de datos</td><td>Consulte este enlace para obtener más información.</td></tr>
<tr><td>Idioma/es de impartición</td><td>Català 90%
Anglès 10%</td></tr>
</table>

TÉCNICAS DE LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA... 2023-24

Profesor/a (es/as)	Dirección electrónica\nprofesor/a (es/as)	Créditos impartidos por el profesorado	Horario de tutoría/lugar
BASSIÉ , LUDOVIC RENÉ BERTIL	ludovic.bassie@udl.cat	6	

Información complementaria de la asignatura

La asignatura de **Técnicas de laboratorio de biotecnología de plantas** (TLBP) es una asignatura optativa que se imparte durante el primer cuatrimestre del cuarto curso del Grado de Biotecnología. La carga docente de la asignatura es de 6 créditos que se distribuyen entre clases teóricas y prácticas con 1 y 5 créditos respectivamente. La asignatura se estructura en 4 sesiones teóricas de 50 minutos, 3 sesiones dedicadas a la preparación del mini proyecto (6 horas) y 50 horas para la realización de un set de prácticas de laboratorio.

La asignatura TLBP es complementaria de la asignatura de BTV. Las herramientas que se utilizan en biotecnología vegetal y los diferentes sistemas de transformación incluyendo los métodos de integración de un transgén fueron ya explicados en la asignatura de BTV.

Para empezar se verá la metodología más optimizada por el proceso de clonación de genes y en las etapas de sub-clonage. Estas técnicas pertenecen a la primera gran fase en la creación de un organismo vegetal ingeniado genéticamente.

El segundo grupo de técnicas se dedica a los métodos de análisis de la expresión de un transgén, procedimiento fundamental post transformación para comprobar si el gen introducido en el genoma de la planta huésped es activo.

Recomendación: haber superado la asignatura Biotecnología Vegetal (BTV)-101621

Objetivos académicos de la asignatura

Objetivos de conocimiento:

El estudiante que supere la asignatura debe:

- tener conocimientos de nociones elementales en el funcionamiento básico de un laboratorio de biotecnología

- tener conocimientos complementarios en ingeniera genética y adaptados al sistema vegetal

- tener conocimientos avanzados en técnicas de análisis de la expresión génica

Objetivos de capacidad:

El estudiante que supere la asignatura debe ser capaz:

- saber organizarse en la planificación de la metodología aplicada

- utilizar técnicas eficientes y fiables para el análisis de la expresión génica

- integrarse de manera bastante autónomo a un equipo de investigación

Competencias

CG1 Ser capaz de buscar y utilizar selectivamente fuentes de información necesarias para alcanzar los objetivos formativos.

CG3 Trabajar en equipo, con una visión multidisciplinar y con capacidad para hacer una distribución racional y eficaz de tareas entre los miembros del equipo.

CG4 Conocer y utilizar adecuadamente el vocabulario científico y técnico propio de los diferentes ámbitos de la Biotecnología.

CG5 Trabajar en el laboratorio aplicando criterios de calidad y buena práctica.

CG6 Conocer y saber utilizar el programario y las bases de datos específicas en los diferentes ámbitos de la Biotecnología.

CG7 Utilizar el método científico para analizar datos y diseñar estrategias experimentales con aplicaciones biotecnológicas.

CG11 Adquirir criterios de elección de las técnicas analíticas más adecuadas para cada caso práctico concreto.

CE34 Ser capaz de diseñar el protocolo de un proceso biotecnológico específico con los requisitos prácticos necesarios para llevarlo a cabo y los parámetros de evaluación de éste.

Contenidos fundamentales de la asignatura

TÉCNICAS DE LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA... 2023-24

Las clases de teórica se basan sobre el **aspecto práctico y estratégico** para dar al usuario la posibilidad de evolucionar rápidamente en el aprendizaje de las técnicas aplicadas y proveerle consejos y explicaciones de procedimiento claros para que pueda aplicar estas metodologías de modo eficiente.

El programa se estructura en 4 partes:

-En la primera parte, el tema-1 trata de las 'nociones elementales' que deben aplicarse y seguir en el laboratorio. El tema se aborda de forma recordatoria pero con insistencia sobre los puntos esenciales y delicados.

-A continuación, en el tema 2, se explica las estrategias involucradas en las diferentes etapas para aislar genes tanto de origen vegetal como bacterial. Se ven las estratagemas y las astucias de procedimiento que se pueden utilizar para iniciar un experimento de clonación de gen y proseguirlo eficazmente con éxito. Es un tema clave para la elaboración del mini-proyecto.

-En la tercera parte (tema 3 y tema 4), se ve de forma muy breve los métodos de análisis de expresión de los genes al nivel transcripcional y translacional. Aunque son metodologías clásicas, se utilizan de forma sistemática y están consideradas además proveer resultados muy fiables. Son técnicas que deben aplicarse para confirmar los resultados obtenidos después de una aproximación transcriptómica y proteómica. Sólo enfocamos en los puntos críticos de los protocolos, puesto que previamente se han visto estos métodos.

-Por último, dedicamos unas sesiones a la preparación del mini-proyecto (40% de la evaluación de la asignatura). Se buscan **ideas originales**, en el marco de la biotecnología vegetal, por **aplicaciones dedicadas a la agricultura o la industria**. El objetivo es describir los puntos claves que son necesarios para la generación de plantas transgénicas que expresan moléculas de interés (enzimas y/u otras) implicadas en la **ingeniería de una vía metabólica** específica (endógeno o añadida).

Tema 1. Generalidades

Principales medidas de seguridad en el laboratorio: productos químicos, luz ultravioleta, mantenimiento general del laboratorio, comentarios importantes de seguridad, respuestas de emergencia. Preparación y propiedad de los tampones y de las soluciones madre los / las más utilizados / as. Esterilización por filtración y por autoclave. Mantenimiento del informe de laboratorio. La importancia de seguir un protocolo.

Tema 2. Clonaje de genes y subclonación molecular

-Gene cloning:

Elección del tipo de ácido nucleico por la amplificación: ADNc o ADN genómico. Diseño de los primeros por la secuencia diana mediante bases de datos. Síntesis de ADNc: la forma más sencilla es realizar la reacción en 2 etapas. Amplificación de la secuencia de interés mediante PCR. Productos de PCR: separación, extracción y purificación. Clonación TA: reacción de ligación en un vector de clonación. Transformación de células competentes: cribado de clones. Obtención de la secuencia de interés mediante el método de secuenciación estándar (Sanger). ¿Cómo diseñar primeros degenerados?

-Subclonación de insertos en un vector de expresión:

Añadir vía PCR un sitio de restricción adecuado a las extremidades del inserto. Digestión del vector y del inserto con las respectivas enzimas. Purificación de los fragmentos. Cuantificación de los fragmentos/ Paso de ligación/ Transformación celular.

-Gibson assembly- Gibson cloning

-Hairpin construct for producing a long dsRNA [iRNA strategy]

Tema 3. RNA blot analysis

Recordatorio de las condiciones de trabajo con ARN. Métodos de aislamiento del ARN total: Trizol-like, silica-membrane based kits; LiCl precipitation. Comprobación de la integridad del ARN. Precipitación de las muestras de ARN. Preparación del material para la electroforesis. Preparación del gel de agarosa-formaldehído. Preparación de las muestras de ARN: tampón de desnaturalización y etapa de desnaturalización. Separación electroforética y control de calidad. Incubación del gel en una solución de fuerza salina baja y transferencia de las muestras a un soporte sólido. Fijación del ARN por exposición ultravioleta (UV-crosslinking). Síntesis de la sonda mediante la marcación DIG vía PCR. Pre-hibridación e hibridación con una sonda específica. Lavados secuenciales de astringencia variable. Proceso de detección de la sonda (sistema DIG)

Tema 4. Western blotting

Extracción de proteínas (tejido vegetal). Análisis cuantitativo de proteínas: método de Bradford. Preparación de las soluciones requeridas por el gel y la transferencia. Electroforesis PAGE-SDS: preparación del gel de acrilamida en condición de desnaturalización y modo discontinuos (método de Laemmli). Tinción del gel con azul de Coomassie. Transferencia de tipo 'semi-dry' (membrana de PVDF) y etapa de bloqueo de la membrana. Tipo y propiedad de los anticuerpos utilizados para la inmunodetección. Etapas de incubación con los anticuerpos primario y secundario. Detección de la actividad de la fosfatasa alcalina (AP-conjugated secondary antibodies) / detección de luminiscencia (HRP-conjugated antibody antibodies).

Actividades prácticas

El programa de prácticas se organiza en diferentes tipos de actividades.

La primera se dedica al análisis proteico mediante el método del western blot. Se analiza muestras de plantas de arroz que sobreexpresan el gen marcador *gus* controlado por el promotor constitutivo 35S CAMV. Se efectúan todas las etapas de la metodología desde la extracción proteico total aislado de tejido de hojas, pasando por la preparación del material hasta la fase final de detección de la proteína β- glucuronidase (GUS). Además, como actividad complementaria, se hará un Southern blot para identificar las líneas transgénicas.

La segunda actividad se consagra en algunas etapas claves de los procesos de clonación de genes y de sub-clonación. Se preparan células de la cepa DH5α de E. coli de alta competencia segundo el método de Hanahan. A continuación, se comprobará la eficiencia de aquellas mediante diferentes cantidades de un plásmido y además se utilizará un método fiable de cribado de los clones bacterianos positivos (lisis celular seguida de una PCR).

En la tercera actividad, el alumno se dedica a aprender el manejo de muestras de ARN en condiciones especiales y adaptadas para la conservación de su integridad. Se hará la extracción de ARN total de hojas de maíz y se verificará la calidad de las muestras mediante una electroforesis adaptada para muestras de ARN.

Se debe mencionar que el procedimiento de las diferentes actividades se hace de manera discontinua, a lo largo del día se efectúan unas etapas en paralelas de diferentes protocolos. Por lo tanto, se aprovecha el tiempo eficientemente; la gestión del tiempo es una habilidad importante que el estudiante debe desarrollar.

Dia1: Aislamiento de proteínas

- Cosecha de las muestras de hojas de arroz, ponderación y conservación en nitrógeno líquido.

- Preparación de buffers que se requieren durante estas dos semanas de prácticas.

- Procedimiento de extracción de proteínas.

- Digestión de ADN genómico a partir de líneas transgénicas (trasngèn *gus*)

Día2: Western blot-I

- Análisis cuantitativo de proteínas con el método de Bradford.

- Preparación de los geles de acrilamida (SDS-PAGE).

- Preparación del medio de cultivo LB sólido y líquido con y sin agente de selección para E. coli DH5α.

Dia3: Western blot-II

- Preparación de las muestras para la electroforesis

- Montaje del material para la electroforesis (Mini-Protean, Biorad)

- Transferencia a la membrana (blotting)

- Bloqueo de la membrana

- Sembrar células stock DH5α sobre medio sólido sin selección

- Preparación de semillas transgénicas para la germinación

Día 4: Western blot-III

- Preparación de las soluciones por el procedimiento de incubaciones y de lavados.

- Etapas de incubación con los anticuerpos primario y secundario.

- Detección colorimétrica de la actividad de la fosfatasa alcalina ligada al anticuerpo secundario

- Interpretaciones de los resultados

- Mini cultivo de células DH5α: sembrar células (previamente crecidas en medio sólido sin selección) en medio líquido sin selección.

- Southern blot: preparación del gDNA digerido por la electroforesis + migración.

Día 5: PAGE-SDS + Southern blotting

-Preparación de los geles PAGE-SDS (repetición)

-Preparación de las soluciones TfbI y TbfII (para la preparación de células competentes)

-Southern blot: tinción de gel con bromuro de etidio; desnaturalización; neutralización y transferencia.

Día 6: Aislamiento del ARN-I / Preparación de células competentes

-Cosechada de muestras de hojas de trigo, ponderación y conservación en nitrógeno líquido

-Extracción de ARN según el método del LiCl.

-Preparación de células competentes (Hanahan protocolo).

Día 7: Aislamiento de ARN-II / Transformación de células competentes

-Continuación del protocolo de aislamiento de ARN.

-Transformación de las células DH5α competentes con dos condiciones de plasmídos diferentes.

-Southern blot: pre-hibridación e hibridación con la sonda.

Día 8: Southern blot detection / sub-cultivo de colonias

-Sub cultivo de las colonias obtenidas en medio de selección

-PAGE-SDS running

-Coomassie blue staining y destaining

-Southern blot: pasos de lavado y procedimiento para la detección de sonda

Día 9: Cribado de clones bacterianos vía PCR / Análisis cualitativo del ARN

- Lisis celular de los clones bacterianos

- Cálculos y preparación del 'mastermix' para la PCR para la detección de los clones bacterianos transformados con el plásmido de interés.

- Gel de electroforesis para comprobar la integridad del ARN

Día 10: Comprobación de la PCR

-Preparación de un gel de agarosa y separación electroforético de los productos de PCR.

-Revisión de todos los resultados obtenidos durante las prácticas.

-Preguntas y dudas sobre las prácticas

Plan de desarrollo de la asignatura

Ver apartado 'Contenidos'

Sistema de evaluación

Entrega de memorias:

▪**Informe de prácticas (60%):** La evaluación del informe se hace en función de los puntos siguientes:

-Organización general y coherencia

-Detalles de los cálculos y volúmenes utilizados

-Explicación de los puntos delicados

-Explicación de los incidentes

-Obtención de los resultados esperados

-Descripción y interpretación de los resultados obtenidos

-Participación, motivación e interacción entre alumnos

Mini proyecto de ingeniera de las vías metabólicas en plantas (40%)

Proyecto: tener una idea original, en el marco de la biotecnología vegetal, para una aplicación dedicada a la agricultura o la industria.

El objetivo es describir los puntos claves que son necesarios para la generación de plantas transgénicas que expresan proteínas de interés (enzimas y / u otros) implicadas en la ingeniería de una vía metabólica específica (endógeno o añadida).

Describir los puntos siguientes con ejemplos y / o información técnica con las referencias asociadas.

1- Objetivo: Explicar la finalidad de su idea: especia vegetal elegida; estudio de la vía metabólica (enzimas claves)

2. Construcción/es molecular/s: análisis de secuencia de interés ; estrategia de clonación y de sub-clonación.

3. El método de transformación.

4. Los puntos claves para la regeneración de las plantas transformadas.

5. Análisis de expresión (transcrito de ARN / proteica): Con el fin de caracterizar las plantas, describe brevemente qué métodos de expresión se pueden utilizar (transgene ; genes endógenos).

6-Bibliografía

Bibliografía y recursos de información

-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)