

Guia Docent de Tècniques de Laboratori de Biotecnologia de Plantes
LLICENCIATURA DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSITAT DE LLEIDA

1. DADES D'IDENTIFICACIÓ DE L'ASSIGNATURA

Nom de l'assignatura: Tècniques de Laboratori de Biotecnologia de Plantes	
Nombre de crèdits Pla 2003: 6	Nombre de crèdits ECTS: 5
Caràcter: Op	
Titulació: Llicenciatura de Biotecnologia	Departament: Producció Vegetal i Ciència Forestal
Quadrimestre: quart curs	Idioma: català, anglès
Pàgina web:	Dossier electrònic: Si
Professor coordinador: Ludovic Bassié	e-mail: ludovic.bassie@pvcf.udl.cat
Altres professors:	e-mail:

2. INTRODUCCIÓ

L'assignatura Tècniques de Laboratori de Biotecnologia de Plantes és complementària de l'assignatura de Biologia Molecular de Plantes. 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 Biologia Molecular de Plantes.

Aquesta assignatura es basa sobre la teoria i la pràctica de tècniques essencials en biotecnologia vegetal.

Es veuran els diferents protocols involucrats en el procés de clonatge de gens i de subclonage. Aquestes tècniques pertanyen a la primera fase en la creació d'una planta transgènica.

El segon grup de tècniques es dedica als mètodes d'anàlisi de l'expressió d'un transgèn. En biotecnologia es fonamental comprovar si hi ha expressió del transgèn introduït al genoma de la planta hoste; una planta transformada amb silenciament del transgèn no té gran utilitat.

3. OBJECTIUS

Els objectius de l'assignatura són :

- tenir coneixements de nocions elementals al laboratori
- tenir coneixements complementaris en biologia molecular de plantes
- utilitzar tècniques d'enginyeria genètica eficaçes en estratègies de clonatge de gens
- utilitzar tècniques d'enginyeria genètica clàssics en el procés de subclonatge
- utilitzar tècniques eficients i fiables en l'anàlisi de l'expressió genètica

4. TEMARI TEÒRIC I PRÀCTIC

TEMARI TEÒRIC

.Tema-1: Generalitats

Preparació i propietat dels tampons i de les solucions mare els/les més utilitzats/des. Esterilització per filtració i per autoclau. Principals mesures de seguretat al laboratori. Manteniment de l'informe de laboratori. Importància de seguir un protocol.

.Tema-2: Clonatge de gens

- Disseny de 'primers' específics de la seqüència diana mitjançant les informacions de les bases de dades
- Tria del tipus d'àcid nucleic implicat per a l'amplificació: cDNA o ADN genòmic
- 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)
- Transformació de les cèl·lules bacterianes competents amb els productes de lligació. Cultiu en medi de selecció
- Mètodes de cribratge dels clons bacterians positius: lisis cel·lular seguit d'electroforèsis o lisis cel·lular seguit de PCR
- Aïllament del plasmid recombinant. Anàlisi quantitativa
- Anàlisi de la seqüència d'interès via mètodes estàndard de seqüenciació

.Tema-3: Subclonatge

- 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 plasmid recombinant

.Tema-4: Mètodes d'anàlisi de l'expressió d'un transgèn

Expressió transitoria

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

Anàlisi mitjançant northern blot

- 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 quantitativa per espectrofotometria
- Preparació del tampó d'electroforèsis
- Precipitació de les mostres d'ARN
- Preparació del material electroforètic
- Preparació del gel d'agarosa-formaldehí
- Preparació de les mostres d'ARN: tampó de desnaturalització i 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

Anàlisi mitjançant western blot

- Composició dels tamps per a l'extracció de les proteïnes totals des de teixits vegetals
- Procés d'extracció proteica
- Anàlisi quantitativa de proteïnes: mètode de Bradford i mètode de Lowry
- Preparació de les solucions requerides per el gel i la transferència
- Preparació per l'electroforèsis PAGE-SDS: gel d'acrilamida en condicions de desnaturalització i mode discontinu (mètode de Laemmli)
- Tenyició del gel amb blau de Coomassie
- Transferència de tipus mig sec sobre membrana de natura PVDF
- Bloatge 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

TEMARI PRÀCTIC

El programa de pràctiques es divideix en dos tipus de procés. La primera part consisteix en la anàlisi del nivell d'expressió del/s transgen/s en plantes de blat transformades amb gens heteròlegs que pertanyen a la via de biosíntesis de les poliamines. L'expressió serà analitzada a nivell de l'ARNm i també a nivell proteic. La segona part es dedica a l'ús de protocols d'enginyeria genètica en l'objectiu de fer una construcció molecular dissenyada per a la transformació de plantes de tipus cereals.

5. PLANIFICACIÓ TEMPORAL

Tipus activitat	Descripció resumida de l'activitat	Dedicació (hores)	Setmana	Objectiu formatiu
TEO		8-10h		
PRA		3-4 setmanes	Intensives	

6. BIBLIOGRAFIA DE REFERÈNCIA

.Principles of Gene manipulation. (sixth edition). 2001. SB. Primrose, RM. Twyman, RW. Old. Blackwell Sciences Ltd. Oxford.

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

7. METODOLOGIA

L'assignatura s'estructura en 8-10 sessions teòriques d'una hora, i de 3-4 setmanes per a la realització de set pràctiques de laboratori. Aquestes darreres son d'assistència obligatòria, es realitzaran intensivament.

8. AVALUACIÓ DE L'APRENTATGE

L'avaluació de l'alumne es farà relacionat amb la manera de treballar i d'interactuar amb els companys al laboratori. També l'avaluació es farà sobre la realització d'un informe de pràctiques individual que reflecteixi l'activitat de l'alumne al llarg de les pràctiques.

9. VOLUM DE TREBALL

D'acord amb el que s'especifica a les taules següents, el volum de treball previst en aquesta assignatura és el següent:

Activitat	Hores alumne	Grups	Hores professor
Sessions teòriques	8-10h		
Pràctiques de laboratori	3-4 setmanes		
Seminaris			
Estudi i assentament de coneixements			
Treball tutorat			
Examen			
Total			

TAULA 2. VOLUM DE TREBALL I DEDICACIÓ REAL DE L'ESTUDIANT de Plantes

ASSIGNATURA: Tècniques de Laboratori de Biotecnologia

Data	Setmana 1		Setmana 2		Setmana 3		Setmana 4		Setmana 5		Setmana 6		Setmana 7		Setmana 8		Setmana 9		Setmana 10		Setmana 11	
	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP
Teoria																						
Problemes																						
Seminari																						
Laboratori																						
Aula informàtica																						
Pràctiques de camp																						
Visites																						
Activitats																						
	Setmana 12		Setmana13		Setmana14		Setmana15		Setmana16		Setmana17		Setmana18		Setmana19		Setmana20		Setmana 21		TOTAL	
	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP
Teoria																						
Problemes																						
Seminari																						
Laboratori																						
Aula informàtica																						
Pràctiques de camp																						
Visites																						
Exàmens																						

P: Nombre d'hores Presencials a classe de teoria, pràctiques, etc..

NP: Nombre d'hores de Treball No Presencials. Treball personal previ i posterior a les classes, passar apunts, recerca bibliogràfica, elaboració de memòries, estudi individual o en grup, assistència a tutories, preparació i realització d'exàmens, etc.

Cada alumne realitzarà intensivament les pràctiques de laboratori

Tabla 3.- FITXA TÈCNICA ASSIGNATURA:

Nom de l'assignatura: Tècniques de Laboratori de Biotecnologia de Plantes	
Nombre de crèdits Pla 2003: 6	Nombre de crèdits ECTS: 5
Caràcter: Op	
Titulació: Llicenciatura de Biotecnologia	Departament: : Producció Vegetal i Ciència Forestal
Quadrimestre:	Idioma: català, anglès
Pàgina web:	Dossier electrònic: Si
Professor coordinador: Ludovic Bassié	e-mail: ludovic.bassie@pvcf.udl.cat
Altres professors:	e-mail:

OBJECTIUS

- tenir coneixements de nocions elementals al laboratori
- tenir coneixements complementaris en biologia molecular de plantes
- utilitzar tècniques d'enginyeria genètica eficaces en estratègies de clonatge de gens
- utilitzar tècniques d'enginyeria genètica clàssics en el procés de subclonatge
- utilitzar tècniques eficients i fiables en l'anàlisi de l'expressió genètica

METODOLOGIA DOCENT

L'assignatura s'estructura en 8-10 sessions teòriques d'una hora, i de 3-4 setmanes per a la realització de set pràctiques de laboratori. Aquestes darreres son d'assistència obligatòria, es realitzaran intensivament.

METODOLOGIA D'AVUACIÓ

L'avaluació de l'alumne es farà relacionat amb la manera de treballar i d'interactuar amb els companys al laboratori. També l'avaluació es farà sobre la realització d'un informe de pràctiques individual que reflecteixi l'activitat de l'alumne al llarg de les pràctiques.

PROGRAMA DE CONTINGUT**Teòric**

Tema-1: Generalitats. Tema-2: Clonatge de gens. Tema-3: Subclonatge. Tema-4: Mètodes d'anàlisi de l'expressió d'un transgèn: expressió transitoria - anàlisi mitjançant northern blot - anàlisi mitjançant western blot.

Pràctic

El programa de pràctiques es divideix en dos tipus de procés. La primera part consisteix en la anàlisi del nivell d'expressió del/s transgen/s en plantes de blat transformades amb gens heteròlegs que pertanyen a la via de biosíntesis de les poliamines. L'expressió serà analitzada a nivell de l'ARNm i també a nivell proteic. La segona part es dedica a l'ús de protocols d'enginyeria genètica en l'objectiu de fer una construcció molecular dissenyada per a la transformació de plantes de tipus cereals.

OBSERVACIONS

