



## Annex 3.2. Taula comparativa de resultats entre grups

### LABORATORI INTEGRAT.

#### Cultiu cel·lular

		G1	G2	G3	G4	G5
Font de Carboni		glucosa	glucosa	glicerol	glicerol	lactosa
[Font carboni] inicial	g/l					
Inducció		glicerol+IPTG	lactosa	glicerol+IPTG	lactosa	lactosa
Temperatura	(°C)	30	30	30	30	30
Taxa de creixement màxima	(1/h)					
Temps de duplicació	(h)					
Pes sec final	g/l					
[Acetat] màx	g/l					
Base total afegida	ml					
<i>Conc. abans d'induir de:</i>						
[Font carboni]	(g/l)					
[Acetat]	(g/l)					
<i>Rendiments etapa fase exp:</i>						
Yx/s	(g/g)					
Yacetat/s	(g/g)					
<i>Estabilitat plasmídica</i>						
Pre-inducció	(%)					
Post-inducció	(%)					
<i>Rendiments post inducció</i>						
Yx/s	(g/g)					
Yacetat/s	(g/g)					

#### Cromatografia d'afinitat

		G1	G2	G3	G4	G5
<b>proteïna total</b>						
mg lisat						
mg rentat t. unió						
mg rentat t. rentat						
mg eluït						
mg sortida / mg entrada						
mg eluït / mg entrada						
<b>activitat DHFR (micromol/min)</b>						
UA lisat						
UA rentat t. unió						
UA rentat t. rentat						
UA eluït						
UA sortida / UA entrada						
UA eluït / UA entrada						
(sortida = rentat + eluït)						

#### Procés global

		G1	G2	G3	G4	G5
mg DHFR produïts (en 0,8 L)*						
mg DHFR lisat						
mg DHFR eluïts						

\*Considerant que el 50% del pes sec correspon a proteïna total

## Annex 3.3. Preguntes guia per a l'anàlisi dels resultats experimental

*Amb les dades experimentals recollides dels seguiments del vostre cultiu:*

- Representeu l'evolució de les variables següents respecte al temps:
  - Densitat òptica a 550 nm i concentració de pes sec (g/l) (recta de calibratge a l'apèndix 1).
  - Concentració del substrat principal (glucosa, glicerol o lactosa) i subproducte principal (acetat) al fermentador.
  - Percentatge de cèl·lules amb plasmidi.
  
- Calculeu la velocitat específica de creixement màxima ( $\mu_{\text{màx}}$ ).
- Calculeu els rendiments (g de biomassa) / (g de substrat) obtinguts. També calculeu els rendiments acètic/substrat.
- A partir de l'SDS-PAGE, estimeu els nivells d'expressió de DHFR (és a dir, la intensitat de la banda de proteïna corresponent a DHFR relativa al total de proteïna cel·lular), abans i després de la inducció de l'expressió del gen DHFR amb IPTG. Observeu els nivells basals de DHFR (és a dir, en condicions de no-inducció). Estimeu el rendiment producte/biomassa, producte/substrat.
- Compareu les vostres dades experimentals amb les dels altres grups. Per això, us caldrà construir una taula comparativa que permeti avaluar la incidència de les condicions de cultiu (font de carboni, protocol d'inducció) sobre els paràmetres clau del procés ( $\mu_{\text{màx}}$ , biomassa final, % DHFR respecte al total de proteïna cel·lular, rendiments substrat/biomassa, substrat acètic, producte/biomassa, producte/substrat, estabilitat plasmídica, etc.)
  - Veieu alguna coincidència i/o diferència entre els valors trobats? Quina explicació trobeu a aquestes observacions?
  - D'acord amb l'anàlisi de la taula comparativa, quina combinació de condicions de cultiu sembla que és més adequada per a un procés de producció de DHFR recombinant en cultius en *batch*?
  - D'acord amb els resultats obtinguts i la informació donada en els articles científics esmentats en l'apartat de bibliografia (Lee, 1996; Hanning i Makkrides, 1998; Eiteman i Altman, 2006), com milloraríeu el procés?
  - IMPORTANT: En cas que hàgiu tingut algun incident experimental, raoneu/expliqueu l'efecte que ha pogut tenir sobre el procés de cultiu.

CAMPUS VIRTUAL: TOTES LES VOSTRES DADES EXPERIMENTALS, AIXÍ COM LA TAULA COMPARATIVA HAURÀ D'ESTAR ACCESSIBLE AL CAMPUS VIRTUAL (EN ACABAR LA PRÀCTICA O COM A MÀXIM SET DIES DESPRÉS D'HAVER FINALITZAT LA PRÀCTICA). ES PENALITZARÀ EL GRUP QUE NO DIPOSITI LES SEVES DADES AL CAMPUS VIRTUAL, JA QUE AIXÒ IMPEDIRÀ L'ANÀLISI COMPARATIVA.

Amb les dades experimentals recollides durant el procés de recuperació i purificació del vostre producte (proteïna):

- Comenteu els resultats obtinguts de la lisi cel·lular: 1) A partir dels resultats obtinguts en l' SDS-PAGE, estimeu el tant per cent de DHFR respecte al total de proteïnes del lisat cel·lular (és a dir, quantitat relativa de DHFR en la fracció soluble del lisat). 2) Compareu-lo amb la quantitat relativa de DHFR present en les cèl·lules induïdes al final del cultiu (estimada també a partir de l' SDS-PAGE. 3) Calculeu el rendiment de l'etapa de lisi cel·lular (assumiu que el contingut proteic de cèl·lules d' *E. coli* és del 50% relatiu al pes sec).
- Feu un gràfic el cromatograma de la purificació de DHFR, representant l'absorbància a 280 nm davant del volum eluat durant l'etapa de cromatografia d'afinitat.
- Feu un balanç de la proteïna total en l'etapa de la cromatografia d'afinitat. Compareu la proteïna injectada vs. la proteïna total eluada en cada una de les principals etapes de la cromatografia (proteïnes no retingudes, elució de la DHFR).
- Feu un balanç d'activitat enzimàtica en l'etapa de la cromatografia d'afinitat. Compareu l'activitat injectada/proteïna total eluada en cada una de les principals etapes de la cromatografia (proteïnes no retingudes, elució de la DHFR).
- Compareu els rendiments de les etapes de lisi cel·lular i de la cromatografia d'afinitat emprant les dades de mg de DHFR i unitats d'activitat DHFR (és a dir, compareu els mg de DHFR del pic d'elució amb els mg de DHFR del lisat i les UA de DHFR del pic d'elució amb les UA del lisat).
- Estimeu el grau de puresa de la DHFR purificada (% de DHFR respecte al total de proteïnes) a partir del gel de SDS-PAGE.
- Estimeu si les dimensions de la columna han estat adequades per purificar tota la DHFR que hi hem injectat, tenint en compte que la capacitat d'unió màxima [estàtica] de la reïna utilitzada a la columna és de 40 mg de proteïna/ml de reïna.
- Analitzeu i discutiu globalment els resultats obtinguts en el procés de recuperació (disrupció cel·lular, centrifugació, filtració) i purificació (cromatografia d'afinitat). Dibuixeu un diagrama del procés global de recuperació i purificació de la DHFR, i indiqueu en cada etapa la quantitat de DHFR obtinguda, rendiment de l'etapa, activitat específica de la DHFR i factor de purificació.

- Considerant el rendiment i el grau de puresa de la DHFR obtingut després d'aquests processos, com milloraríeu l'eficiència (el rendiment i/o grau de puresa) obtinguts en les etapes de recuperació i purificació?
- Per tal d'augmentar la quantitat de DHFR obtinguda en el procés, es podria utilitzar un sistema d'expressió d'*E. coli* diferent de l'utilitzat en aquesta pràctica (sistema basat en la soca M15 i vector d'expressió pQE40, amb el promotor induïble per IPTG T5, de la casa Qiagen). Resultats obtinguts en cursos anteriors amb aquest sistema i condicions de cultiu semblants a les que heu utilitzat han permès obtenir millors nivells d'expressió de la DHFR (fins al 25-30% de proteïna cel·lular total). No obstant això, el 90% de la DHFR s'expressava en forma insoluble (cossos d'inclusió). Quines modificacions haureu d'introduir en el procés de recuperació i purificació que heu utilitzat per tal d'obtenir la DHFR almenys en el mateix grau de puresa i d'activitat específica?

#### Consideracions generals a l'hora d'elaborar l'informe de pràctiques:

- Nombre màxim de pàgines: 20
- Termini d'entrega: un mes
- Forma d'avaluació:

Forma d'avaluació	Pes relatiu en la nota final	Aspectes que avaluem
Informe (grup)	30%	<p><b>Científics i tecnològics</b></p> <p><b>Resolució de problemes:</b> pràctiques plantejades com a resolució (experimental) d'un problema/pregunta: quines condicions de cultiu són millors? Com milloraríeu el procés? Per tant, valorem capacitat d'analitzar, sintetitzar, plantejar hipòtesis, (fer recerca).</p> <p><b>Tractament de dades (qualitatives i quantitatives):</b> lectura, interpretació, organització i presentació de dades, realització de càlculs.</p> <p><b>Capacitat de verificar aplicacions realitzades</b> (autoavaluació).</p> <p><b>Aplicació i integració de principis dels diferents camps de la biotecnologia per descriure la informació obtinguda experimentalment: saber com, quan i on.</b></p> <p><b>Comunicació:</b> llenguatge científic, presentació de dades, etc.</p> <p>Treball en equip i gestió de la informació.</p>

Examen (individual)	60%	Valoració individual dels conceptes i de les habilitats bàsiques desenvolupades en l'informe realitzat en grup.
Actitud al laboratori i en les tutories	10%	<p>Autoaprenentatge, autoavaluació, Interpersonals (treball en equip, treball en xarxa —Campus Virtual—, gestió del temps). Exemple d'aspectes que es valoren:</p> <p><b>Gestió de la informació:</b> recerca i utilització d'informació per a la discussió de resultats de les pràctiques:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Campus Virtual (articles científics seleccionats, informació suplementària, etc.).</li> <li>▪ Accés autònom a fonts d'informació (revistes científiques, bases de dades, etc.).</li> </ul> <p><b>Gestió del treball i del temps:</b> organització del temps de realització d'experiments, realització d'informe de pràctiques en els terminis establerts.</p> <p><b>Preocupació per la qualitat:</b> autoavaluació resultats durant les pràctiques.</p>

Com avaluem l'actitud al laboratori en el vostre informe?

- Expliqueu els problemes que heu trobat.
- Feu autocrítica del vostre treball en grup.
- Expliqueu què milloraríeu de la pràctica.