

PROGRAMA PROPIO DE CALIDAD EN LA ENSEÑANZA
Planes de formación, innovación y mejora
Curso 2012-13

MEMORIA del proyecto de innovación y mejora docente

(Código proyecto ID2012/098)

“Aproximación a la experimentación en Biología Molecular mediante el desarrollo de una sucesión de prácticas concatenadas e integradas para la investigación de un proceso biológico”

MIEMBROS DEL EQUIPO DE TRABAJO

NIF	Nombre y apellidos	E-mail	Extensión
06568691-Y	José Antonio CALERA ABAD, coordinador	jacalera@usal.es	4891
07857934-F	Pedro Miguel COLL FRESNO	fresno@usal.es	5419
03434689-F	M ^º Henar VALDIVIESO MONTERO	henar@usal.es	5441
35557899-Z	Nieves RODRÍGUEZ COUSIÑO	nievesrc@usal.es	5414
11709426-B	Ramón SANTAMARÍA SÁNCHEZ	santa@usal.es	4899

LÍNEAS DE ACTUACIÓN:

1. Incorporación de recursos para actividades prácticas de laboratorio.
2. Implantación de metodologías docentes en el ámbito del diseño de estrategias para facilitar la adquisición de competencias y la implantación de metodologías activas de enseñanza-aprendizaje.

FECHA: 25 de junio de 2013

ANTECEDENTES

La solicitud y desarrollo de este proyecto de innovación docente se realizó con el fin de **perfeccionar la docencia práctica de la asignatura** “Técnicas Moleculares Generales” del Master en “Biología Funcional de Microorganismos Eucariotas” y, por tanto, se basa en la experiencia previa adquirida por los profesores implicados en esta materia durante el curso 2011-12. Además, a este propósito nos animó el hecho de que esta materia fue una de las mejores valoradas del máster por los estudiantes.

OBJETIVO

El **objetivo global** de este proyecto fue **determinar la viabilidad del desarrollo de una sucesión de prácticas concatenadas e integradas para la docencia práctica** de la materia “Técnicas Moleculares Generales” del Master en “Biología Funcional de Microorganismos Eucariotas” o de una materia con el mismo objetivo y de la misma naturaleza de otra titulación. Los créditos asignados a la asignatura y su grado de presencialidad a efectos de determinar las semanas necesarias para impartir la materia y la carga lectiva de cada profesor ha sido de 15 ECTS y un 50% de presencialidad (equivalentes a 187,5 horas presenciales distribuidas en 15 semanas).

El **requisito para la consecución del objetivo global planteado** es que la materia en la que se implementen los resultados derivados de este proyecto deberá estar orientada a la enseñanza del desarrollo experimental de una investigación lo más completa posible, teniendo en cuenta que se trata de una asignatura de un plan de estudios y que como tal está sujeta a limitaciones temporales.

DESARROLLO DEL PROYECTO

Para realizar la investigación propuesta se utilizó la levadura del pan *Saccharomyces cerevisiae*. Se utilizó este microorganismo eucariota porque tiene varias particularidades que le hacen ser uno de los mejores candidatos para experimentación y, en particular, cuando **la experimentación se hace con fines docentes**: (i) es un microorganismo “dócil” que crece muy bien y rápido en medios de laboratorio, (ii) existen una gran cantidad de cepas, procedimientos y herramientas moleculares que funcionan muy bien en este microorganismo lo que permite realizar una gran diversidad de manipulaciones genéticas y, (iii) tiene un ciclo sexual que se puede explotar con fines experimentales.

Para el desarrollo de la materia se **diseñó una secuencia experimental predeterminada diseñada para aprender a desarrollar los protocolos más importantes en biología molecular de una manera perfectamente integrada**, teniendo en cuenta tanto las necesidades impuestas por la propia investigación como la lógica docente.

1. Definición de la estrategia general de trabajo

El diseño del desarrollo estratégico de esta práctica se ha basado en: (i) la experiencia investigadora del profesor coordinador sobre el tema seleccionado y, (ii) en la experiencia adquirida durante el curso 2011-12 por todos los profesores implicados en el desarrollo de la misma en una situación real con alumnos.

La secuencia experimental predeterminada desarrollada podría ser la respuesta a dos planteamientos completamente diferentes de una investigación sobre cualquier aspecto de la fisiología de *S. cerevisiae* (en este caso concreto sobre la regulación de la homeostasis del zinc en este microorganismo):

- **Planteamiento #1:** ¿cuál es el factor regulador de la homeostasis del zinc y su mecanismo de acción en *S. cerevisiae*?
- **Planteamiento #2:** podemos fijar nuestra atención directamente en un determinado gen de *S. cerevisiae* de función desconocida e intentar descifrar la función de producto codificado por dicho gen. Por ejemplo, estudiar la función de la proteína codificada por la fase de lectura abierta YJL056C (*ZAPI*) de *S. cerevisiae*.

En el primer caso, sería preciso partir de una colección de mutantes que tiene afectada la homeostasis del zinc en cualquiera de sus facetas. A continuación se seleccionarían los mutantes que específicamente tengan alterado el control de la homeostasis del zinc. Una vez seleccionados los mutantes de interés, se procedería a identificar el gen que se encuentra alterado, se confirmaría la función del gen por mutagénesis dirigida y se realizarían otros estudios complementarios orientados a determinar el mecanismo de acción, para lo que es conveniente realizar previamente un análisis bioinformático del producto del gen identificado que nos ayude a perfilar y definir los estudios complementarios que son necesarios realizar para descifrar la actividad y mecanismo de acción de la proteína en cuestión.

En el segundo caso, simplemente se seleccionaría la ORF de un gen que nos interesase por alguna razón (ej. para confirmar una predicción realizada por técnicas bioinformáticas), se investigaría su función por mutagénesis dirigida y, como en el caso anterior, tras un análisis bioinformático se procedería a realizar los estudios complementarios que se considerasen adecuados para determinar la actividad y mecanismo de acción de la proteína.

En nuestro caso, teniendo en cuenta que se pretende que **los alumnos aprendan diversas técnicas de biología molecular en un periodo muy limitado en el tiempo**, planteamos la investigación en el plano teórico de acuerdo a la primera aproximación para proceder

después a abordar experimentalmente la demostración de la función del gen identificado (*ZAPI*) y el mecanismo de acción de la proteína que codifica (*Zap1*), todo ello con el fin de justificar la lógica de la investigación propuesta.

2. Puesta a punto de la organización, distribución de las tareas y metodología docente.

Partimos de que acabamos de identificar el gen (*ZAPI*) aparentemente responsable de la regulación de la expresión génica por zinc en la levadura *S. cerevisiae*. El siguiente paso fue confirmar su función por mutagénesis dirigida y, tras realizar un análisis bioinformático de la proteína *Zap1*, se demostró la actividad y mecanismo de acción de la proteína codificada por *ZAPI*.

Para ello, el desarrollo de la materia se dividió en tres secciones o partes que se desarrollaron sucesivamente por los profesores incluidos en este proyecto:

- **Parte I.** Herramientas para el diseño y construcción de plásmidos.
- **Parte II.** Construcción de cepas modificadas por mutagénesis dirigida y análisis de la expresión génica.
- **Parte III.** Estudio de la actividad y/o mecanismo de acción de la proteína de interés.

La división de la materia en partes se hizo por **razones logísticas y de organización con el fin de explotar al máximo el tiempo** sobre el que se ha realizado nuestras estimaciones (187,5 horas presenciales en laboratorio). Esto no quiere decir que el desarrollo de una parte haya sido independiente de cualquier otra sino todo lo contrario: el desarrollo en orden cronológico de las distintas obedece a una secuencia experimental integrada de manera que no se podría continuar el desarrollo experimental preprogramado si cualquiera de las partes no se desarrollase correctamente en el momento y orden determinado.

De la experiencia previa adquirida con alumnos, se constató que para un aprovechamiento óptimo sería preciso que los estudiantes se impliquen a fondo (lo que facilitaría la evaluación continua) y que en ningún momento perdiesen el hilo conductor de la materia. De la misma manera, se concluyó que el desarrollo experimental pre-programado de los contenidos de este proyecto sólo sería viable con un número ideal de entre 4 y 6 parejas de alumnos. Un número inferior a 4 parejas justificaría que cada alumno realizase las prácticas individualmente. Sin embargo, aunque en teoría esto sería lo ideal, en la práctica esta situación comprometería la continuidad de la experimentación pre-programada de aquellos alumnos que no pudiesen asistir por razones justificadas, una circunstancia que se paliaría mediante el trabajo en parejas. Por el contrario, un número mayor de parejas de alumnos mermaría la capacidad del profesorado para atender a todas las parejas de alumnos adecuadamente e incrementaría los costes de material fungible.

3. Reparto de tareas, calendario previsto y sistema de evaluación

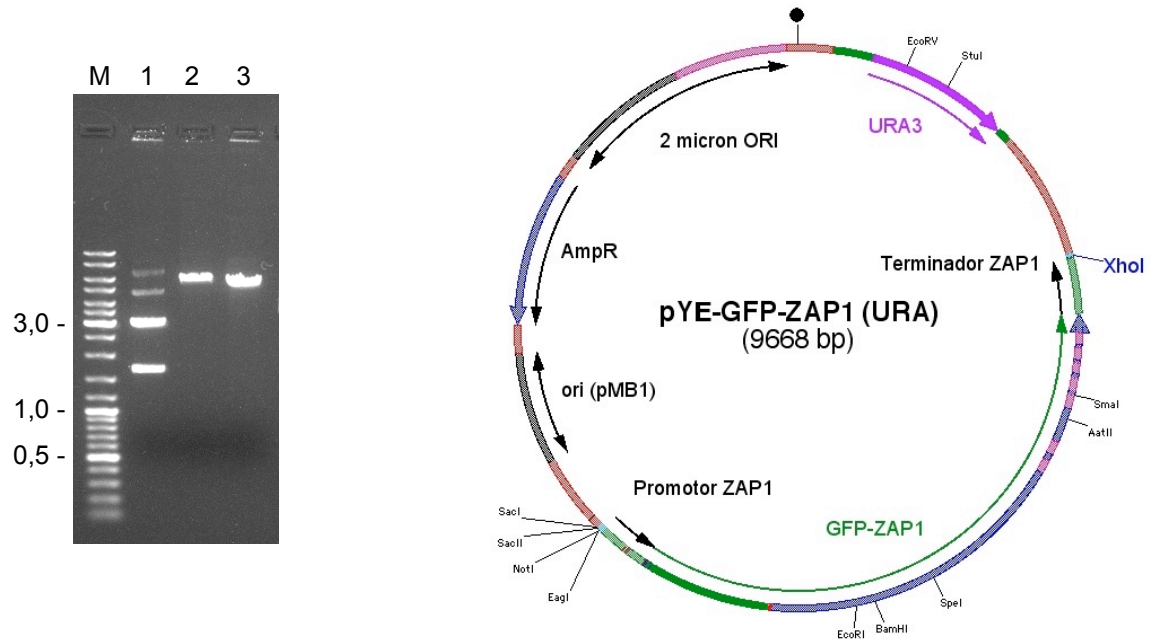
El reparto de tareas se realizó de acuerdo a lo descrito en la siguiente tabla:

Parte	Profesor	Tareas	Semanas (horas presenciales)
I. Herramientas para el diseño y construcción de plásmidos	José Antonio Calera Abad	1. Herramientas en biología molecular (plásmidos utilizados en investigación, cepas de <i>Escherichia coli</i> , enzimas de restricción, enzimas para modificar, sintetizar o degradar ácidos nucleicos. 2. Procedimientos básicos en biología molecular (digestiones con enzimas de restricción, purificación y precipitación de ácidos nucleicos y manipulación de oligonucleótidos). 3. Diseño y construcción de plásmidos para: ✓ Deleción de un gen de interés por mutagénesis dirigida. ✓ Etiquetado molecular de la proteína codificada por el gen de interés. ✓ Expresión de la proteína de interés como proteína recombinante en <i>Escherichia coli</i> .	Semanas 1-4 (45,5 horas)
II. Construcción de cepas modificadas por mutagénesis dirigida y análisis de la expresión génica	M ^a Henar Valdivieso Montero	4. Construcción y análisis genotípico y fenotípico de mutantes. ✓ Construcción y análisis de mutantes nulos por deleción completa del gen de interés (obtención de ADNg y análisis por PCR y Southern blot). ✓ Construcción de cepas que expresan la proteína de interés debidamente etiquetada con GFP y/o MYC3x para estudios <i>in vivo</i> . ✓ Análisis fenotípico y localización subcelular mediante microscopía de fluorescencia.	Semanas 5-8 (45,5 horas)
	Nieves Rodríguez Cousiño	5. Análisis de la expresión génica a nivel transcripcional. ✓ Purificación de ARN. ✓ Análisis por RT-PCR y northern blot.	Semana 9 (18,5 horas)
	Pedro Miguel Coll Fresno	6. Estudio de la expresión a nivel traduccional. ✓ Obtención de extractos de proteínas. ✓ Análisis de proteínas mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes. ✓ Detección de proteínas mediante western-blot.	Semanas 10-11 (32,5 horas)
III. Estudio de la actividad y/o mecanismo de acción de la proteína de interés	Ramón Ignacio Santamaría	7. Expresión y purificación de proteínas recombinantes. ✓ Producción y determinación de la solubilidad de proteínas recombinantes. ✓ Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad. 8. Estudios <i>in vitro</i> de la interacción ADN-proteína. 9. Análisis de complejos proteína:ADN por EMSA.	Semanas 12-15 (45,5 horas)
TOTAL semanas			15
TOTAL horas			187,5

Cada parte está precedida por la explicación de conocimientos teóricos básicos sobre cada uno de los métodos antes de ponerlos en práctica, comenzando por los más sencillos y/o básicos hasta llegar a los más elaborados y complejos. Las explicaciones prácticas se complementan con problemas teóricos que ayuden a comprender el fundamentos de las técnicas.

A modo de ejemplos, se muestran algunas imágenes que ilustran el trabajo realizado.

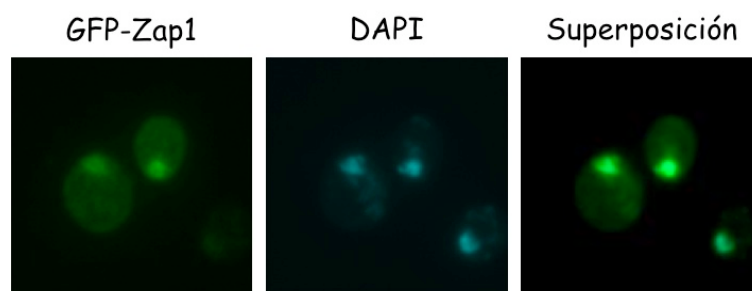
Ejemplo de plásmido construido



M. Marcadores (kpb)

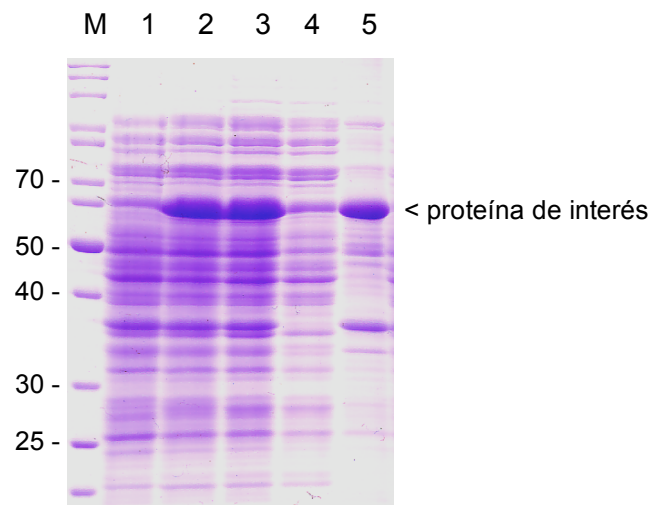
1. pZAP1-KO (TRP) digerido con EcoRI (1 μ l de 50 μ l)
2. pYI-GFP-ZAP1 (TRP) digerido con NheI (1 μ l de 50 μ l)
3. pYI-MYC3x-ZAP1 (URA) digerido con NheI (1 μ l de 50 μ l)

Ejemplo de cepas mutantes construidas



Cepa de *S. cerevisiae* transformada con pYE-GFP-ZAP1 (expresa la proteína ZAP1 fluorescente)

Ejemplo de análisis de producción de proteína recombinante mediante SDS-PAGE



- M. Marcadores de peso molecular (kDa)
1. Proteínas de cultivo de *E. coli* no inducido
 2. Proteínas de cultivo de *E. coli* inducido
 3. Extracto de proteínas de un lisado de cultivo inducido
 4. Fracción de proteínas insolubles
 5. Fracción de proteínas solubles.

JUSTIFICACIÓN ECONÓMICA DEL PROYECTO

Resulta difícil saber con exactitud el coste económico del trabajo realizado pero, tras realizar un cálculo aproximado, se estima que el coste de las mismas ha sido aproximadamente de 1300 euros. La mayoría de estos gastos (aproximadamente 1100 euros) han sido asumidos por los profesores participantes con proyectos de investigación vigentes que han destinado recursos de los mismos a este fin, mientras que la subvención asignada (200 euros) fue empleada para satisfacer el coste de materiales exclusivos para este proyecto.

CONCLUSIÓN

La práctica diseñada ilustra el desarrollo experimental de la investigación de un proceso biológico en laboratorio de acuerdo a una secuencia lógica. Esto es un gran ventaja respecto a las prácticas tradicionales de laboratorio que suelen estar diseñadas como paquetes cerrados y, en mucho casos, fuera del contexto normal en el que se desarrollan. Por tanto, esperamos que estas prácticas **incrementen el interés de los alumnos por la materia y contribuyan a despertar en ellos el interés y la pasión por la investigación científica.**