

METODOLOGIA I EXPERIMENTACIÓ BIOQUÍMICA I (20154) Curs 2004/05

1. Microscòpia òptica

Introducció a la teoria de la microscòpia. Parts del microscopi. Microscòpia de camp fosc. Microscòpia de contrast de fases. Microscòpia d'interferència. Microscòpia de polarització. Microscòpia de fluorescència. Microscòpia confocal.

2. Microscòpia electrònica

Funcionament del microscopi electrònic. Mètodes de preparació de les mostres. Mètodes de producció de contrast. Procediments especials de formació d'imatges: microscopi de camp fosc, microscopi de Crewe, microscopi d'escombrat, microscopi d'efecte túnel. Microscòpia electrònica molecular.

3. Mètodes potenciomètrics

Elèctrodes indicadors metàl·lics. Elèctrodes de membrana. Instruments per a la mesura dels potencials de pila. Aplicacions de la mesura potenciomètrica directa. Aplicacions de les titulacions potenciomètriques.

4. Autorradiografia

Emulsions utilitzades en estudis biològics. Isòtops habitualment utilitzats en bioquímica. Fluorografia. Autorradiografia d'alta resolució.

5. Marcat i comptatge radioactius

Tipus de radiació emprats en bioquímica. Propietats de la desintegració radioactiva. Detecció de raigs γ . Detecció de partícules β . L'ús del comptador de centelleig. Eficiència de comptatge. Comptatge simultani de dos isòtops. Preparació de les mostres per a comptatge per centelleig líquid. L'estadística de comptatge. Procediments i formats de marcat.

6. Filtració per membrana i diàlisi

Filtres de nitrocel·lulosa. Filtres de fibra de vidre. Aplicacions dels filtres de nitrocel·lulosa. Els anàlisis de transferència Southern, Northern i Western. Diàlisi i filtració molecular. L'equilibri de diàlisi.

7. Cromatografia de repartiment i d'adsorció

Cromatografia en paper. Cromatografia en capa fina. Cromatografia de gasos. Cromatografia líquida d'alta pressió. Aplicacions.

8. Cromatografia de filtració en gel

Principi de la filtració en gel. Medis per a la filtració. Preparació del medi. Preparació de la columna. Determinació del volum buit. Aplicació de la mostra i cromatografia. Determinació del pes molecular per cromatografia de filtració en gel. Aplicació a l'estudi de l'estructura en subunitats de les proteïnes.

9. Cromatografia d'intercanvi iònic

Principi del intercanvi iònic. Medis per l'intercanvi iònic. Preparació del medi d'intercanvi. Factors que intervenen en la cromatografia d'intercanvi iònic.

10. Cromatografia d'afinitat

Principi de la cromatografia d'afinitat. Selecció del lligant. Principi d'eficiència creixent. Vida mitja dels complexos. Aplicacions de la cromatografia d'afinitat.

11. Electroforesi

Moviments dels ions en un camp elèctric. El procés electroforètic. Suports per a l'electroforesi. Electroforesi zonal. Electroforesi de SDS. Determinació del pes molecular per electroforesi de SDS. Detecció de proteïnes separades per electroforesi. Electroforesi preparativa. Electroforesi de Triton X-100. Electroforesi de baixa força iònica. Electroforesi d'àcids nucleics. Determinació del pes molecular dels àcids nucleics per electroforesi. Detecció de molècules marcades amb radioactivitat. Electroforesi de camp polsant. Electroforesi de gradient tèrmic

12. Tècniques immunològiques

Estructura dels anticossos. Aspectes pràctics de l'obtenció d'anticossos. Reacció d'antígens macromoleculars i anticossos en solució. Reacció antigen-anticòs en gels. Immunolectroforesi. Utilització dels anticossos per a la determinació de proteïnes. Immunoprecipitació directa d'antígens. La prova del complement. El radioimmunoassaig. L'assaig immunoradiomètric. Assaigs immunoenzimàtics. Els anticossos monoclonals. Detecció d'anticossos específics. Preparació d'anticossos monoclonals a gran escala. Aplicacions dels anticossos monoclonals.

13. Orientació de molècules en un camp elèctric

Moments dipolars permanents i induïts. Dicroisme elèctric. Birrefringència elèctrica. Difusió rotacional. Aparells utilitzats per a l'estudi del dicroisme elèctric.

14. Introducció als processos de transport

Trets generals dels processos de transport. Difusió macromolecular. Mesura de la difusió. Propietats friccionals de les macromolècules en solució.

15. Sedimentació

Disseny de la ultracentrífuga analítica. Velocitat de sedimentació. El coeficient de sedimentació. Difusió. Coeficient de difusió. Càlcul del pes molecular per velocitat de sedimentació. L'equilibri de sedimentació. L'experiment de Perrin. Càlcul del pes molecular per equilibri de sedimentació. Càlcul del volum específic parcial. Sedimentació en gradient de densitat: gradients preformats i autoformats.

16. Espectrometria de masses

Càlcul del pes molecular per espectrometria de masses. Tècniques per a biopolímers.

17. Viscositat

Flux viscos. Viscositat de solucions macromoleculars. Orientació en el flux viscos. Mesura de la viscositat.

18. La radiació electromagnètica i la seva interacció amb la matèria

Propietats de la radiació electromagnètica. Interacció de la radiació amb la matèria. Emissió de radiació.

19. Espectroscòpia absorció electrònica

Principis bàsics. Aspectes quantitatius de les mesures d'absorció. Disseny dels instruments per a les mesures d'absorció. Anàlisi espectroscòpica de biopolímers. Efectes de la conformació sobre l'absorció.

20. Dicroïsme circular i dispersió rotatòria òptica

Polarització de la radiació. Dicroïsme circular i rotació òptica. Base molecular de la capacitat rotatòria. Comportament rotatori de les macromolècules.

21. Espectroscòpia de fluorescència

Principis bàsics de la fluorescència. Factors que determinen la intensitat de la fluorescència. Mesures experimentals. Transferència d'energia. Mesura de la distància entre cromòfors a partir de l'eficiència de la transferència d'energia, Polarització de fluorescència.

22. Espectroscòpia d'absorció vibracional

Moments de transició. Aplicació a molècules biològiques.

23. Espectrocòpia de ressonància magnètica nuclear

Principis bàsics. Interaccions spin-spin. El NOE. Mesura del espectre. RMN unidimensional. NMR bidimensional.

24. Cristallografia de raigs X

Cristalls. Creixament de cristalls. Principis fonamentals de la difracció de raigs X per cristalls. Difracció per fibres.

25. Aïllament de proteïnes i d'àcids nucleics

Fraccionament cel·lular. Mètodes de solubilització. Estabilització. Aïllament i concentració. Criteris de puresa. La reacció en cadena de la polimerasa. La reacció en cadena de la lligasa.