

PROGRAMA DE METODOLOGIA I EXPERIMENTACIÓ

BIOQUÍMICA II

CURS 2006/2007

L'assignatura consta de 8 crèdits pràctics. El programa que s'adjunta és una reproducció de l'índex dels protocols experimentals.

INDEX GENERAL

Part I

Fraccionament del fetge de rata: caracterització de les fraccions subcel·lulars	4
Aïllament de teixits i fraccionament del fetge de rata	7
Estimació del contingut de proteïnes	16
Distribució d'enzims a la cèl·lula	18
Glucosa-6-fosfatasa	19
Lactat deshidrogenasa	22
Glutamat deshidrogenasa	23
Purificació de la lactat deshidrogenasa de múscul	29
Preparació de l'extracte	32
Cromatografia d'afinitat	32
Assaig de l'activitat	33
Determinació de la quantitat de proteïna pel mètode de Bradford	34
Electroforesi no desnaturalitzant en gels de poliacrilamida	36
Tinció per activitat enzimàtica	38
Cromatografia d'alta resolució (HPLC). Obtenció d'un mapa tríptic de RNasaA	41
Digestió de la proteïna	43
Separació per HPLC del digerit tríptic	43
Detecció immunològica de proteïnes immobilitzades: Western Blot	45
Electroforesi	48
Transferència	50
Bloqueig , incubació amb anticòs i detecció	52
Anàlisi de les mostres acumulades per electroforesi en poliacrilamida-SDS	54

Part II

Metodologies bàsiques de manipulació i anàlisi de DNA	55
Transformació de cèl·lules competents d' <i>Escherichia coli</i>	56
Preparació de cel·lules competents	62
Transformació de cèl·lules competents	62
Rèplica de transformants	63
Lectura de les rèpliques	64
Minipreparacions de DNA plasmídic	66
Minipreparació de DNA genòmic de <i>E. coli</i>	69
Anàlisi espectrofotomètrica del DNA	71
Digestió amb enzims de restricció i anàlisi de la restricció	72
Extracció de RNA total	75
Electroforesi en gel d'agarosa	77

Part III

Mètodes bàsics en bioquímica de lípids	82
Introducció	82
Purificació de la fosfatidilcolina d'ou.	83
Caracterització de la fosfatidilcolina purificada	85
Determinació del grau d'oxidació dels fosfolípids	86
Quantificació dels fosfolípids	86
Preparació de suspensions de liposomes	87
Liposomes multilamel·lars grans	87
Incorporació d'una substància acolorida en liposomes multilamel·lars grans (MLV) i oligolamel·lars grans (OLV)	88
Discussió dels resultats	89

Avaluació de l'assignatura

L'avaluació de l'assignatura de Metodologia i Experimentació Bioquímica II es farà en base a la qualificació de la memòria de pràctiques i de l'examen de l'assignatura i d'una valoració de l'actitud, el treball de l'alumne i la qualitat dels seus resultats feta pel professor/a durant la realització del treball experimental