

BIOTECNOLOGIA Curs 2006-07

TÈCNiques INSTRUMENTALS BàSIQUES

PROGRAMA

Objetivo

El objetivo general es que el alumno conozca las principales técnicas instrumentales que se desarrollan en el laboratorio y que pueden necesitar a lo largo de sus estudios y actividad profesional.

Tema 1: Técnicas cromatográficas.

- 1.1 Introducción. Concepto general. Tipos. Clasificación.
- 1.2 Cromatografía sobre soporte horizontal. Cromatografía de reparto en papel y en capa fina.
- 1.3 Cromatografía en columna. Fundamentos. Operaciones básicas en la cromatografía convencional.

Tema 2: Cromatografía de filtración en gel.

- 2.1 Principio de la filtración en gel.
- 2.2 Características de los medios cromatográficos.
- 2.3 Aplicaciones. Determinación del peso molecular. Ejemplos.

Tema 3: Cromatografía de intercambio iónico.

- 3.1 Principios. Equilibrio del intercambio iónico.
- 3.2 Métodos de elución: continuo (por gradiente), discontinuo (por escalas).
- 3.3 Tipos de medios cromatográficos.
- 3.4 Aplicaciones. Ejemplos.

Tema 4: Cromatografía hidrofóbica.

- 4.1 Principio de la cromatografía hidrofóbica. Factores que afectan la interacción.
- 4.2 Tipos de medios cromatográficos.
- 4.3 Aplicaciones. Ejemplos.

Tema 5: Cromatografía de afinidad.

- 5.1 Principio de la cromatografía de afinidad.
- 5.2 Preparación de la fase estacionaria.
- 5.3 Vida media de los complejos. Métodos de elución por tandas.
- 5.4 Aplicaciones de cromatografía de afinidad.
- 5.5 Cromatografía sobre hidroxiapatito.

Tema 6: Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

6.1 Fundamentos y características.

6.2 Instrumentación.

6.3 Tipos de fases estacionarias: fase inversa, exclusión por tamaño, intercambio iónico. Aplicaciones.

Tema 7: Cromatografía de gases.

7.1 Cromatografía de gases. Fundamentos.

7.2 Instrumentación. Detectores.

7.3 Aplicaciones.

Tema 8: Estrategias de purificación de macromoléculas por técnicas cromatográficas.

8.1 Factores a considerar, rendimiento, pureza, rapidez, coste, etc..

8.2 Etapas de purificación. Optimización de cada etapa. Cromatografías típicas de cada etapa. Enlaces lógicos entre cromatografías. Ejemplos.

Tema 9: Electroforesis.

9.1 Introducción. Movimiento de los iones en un campo eléctrico. El proceso electroforético.

9.2 Soportes para la electroforesis.

9.3 Tipos de electroforesis.

Tema 10: Electroforesis de proteínas.

10.1 Soportes no restrictivos. Inmunolectroforesis.

10.2 Soportes restrictivos. Tipos de electroforesis: desnaturizante / nativa, continua / discontinua. Electroforesis SDS-PAGE. Transferencia a membrana (Western)

10.3 Determinación del peso molecular por electroforesis.

10.4 Electroforesis bidimensional. Electroenfoco.

10.5 Tinciones y métodos de detección.

Tema 11: Electroforesis de ácidos nucleicos.

11.1 Movilidad electroforética del DNA.

11.2 Tipos: nativa / desnaturizante, DNA / RNA, acrilamida / agarosa.

11.3 Determinación del peso molecular.

- 11.4 Transferencia a membrana (Southern, Northern).
- 11.5 Electroforesis de campo pulsante. Electroforesis de gradiente térmico. Electroforesis capilar. Electroforesis bidimensional.
- 11.6 Tinciones y métodos de detección.

Tema 12: Técnicas basadas en el análisis electroforético.

- 12.1 Determinación de la estructura terciaria de las proteínas. Análisis conformacionales de las proteínas. Análisis de la homogeneidad y pureza de una preparación proteica.
- 12.2 Análisis de la curvatura de fragmentos de DNA. Análisis de topoisómeros. Geles de retardo. Footprinting.

Tema 13: Técnicas inmunológicas.

- 13.1 Estructura de los anticuerpos.
- 13.2 Aspectos prácticos de la obtención de anticuerpos. Preparación de anticuerpos monoclonales.
- 13.3 Reacción antígeno-anticuerpo. Reacción de antígenos macromoleculares y anticuerpos en disolución. Inmunoprecipitación.
- 13.4 Reacción antígeno / anticuerpo sobre soporte sólido. Elisa. Inmunoelectroforesis.
- 13.5 Utilización de anticuerpos para la determinación de macromoléculas en membrana y en cortes histológicos. Anticuerpos secundarios. Amplificación de señal. Sistemas enzimáticos de detección. Sistemas quimioluminiscentes de detección.

Tema 14: Isótopos radioactivos.

- 14.1 Introducción. Cinética de desintegración. Isótopos utilizados en Bioquímica.
- 14.2 Procedimientos y métodos de marcaje. Marcaje in vivo. Marcaje de ácidos nucleicos. Marcaje de proteínas.
- 14.3 Detección de la radiación. Detectores de ionización. Contadores de centelleo. Autoradiografía. Métodos alternativos a la autoradiografía (phosphorimaging).
- 14.4 Protección en el uso de isótopos radioactivos. Sistemas quimioluminiscentes como alternativa a los isótopos radioactivos

Tema 15: Reacción en cadena de la polimerasa: PCR.

- 15.1 Introducción. Fundamentos de la técnica. Especificidad y rendimiento. Diseño de los cebadores (programas informáticos). Efecto "plateau". Factores que afectan la PCR. Optimización de la reacción.
- 15.2 Aplicaciones en investigación: aplicaciones en investigación: amplificación de DNA, secuenciación, mutagénesis, PCR in situ, RT PCR,

Rapid amplification of cDNA ends (RACE), PCR cuantitativo, Ligation mediated PCR (LM PCR).

15.3 Aplicaciones clínicas: diagnóstico de infecciones víricas, detección de RFLP y enfermedades hereditarias. Aplicaciones legales.

Tema 16: Filtración por membrana y diálisis.

16.1 Diálisis y filtración molecular. Equilibrio de diálisis.

16.2 Tipos de filtros o membranas: nitrocelulosa, acetato, fibra de vidrio, nylon. Aplicaciones.

Tema 17: Citometría de flujo.

17.1 Principio de la citometría de flujo. Instrumentación. Aplicaciones. Ejemplos.

Tema 18: Métodos potenciométricos.

18.1 Principio de los métodos potenciométricos. Electrodo indicadores, metálicos o de membrana.

18.2 Instrumentos para la medición de los potenciales de pila. Aplicación de la medición potenciométrica directa. Aplicaciones de las titulaciones potenciométricas.

18.3 Aplicaciones. Ejemplos. pHmetros. Conductímetros. Oxímetros.

BIBLIOGRAFIA

- Olivé, J., Casas, J.M., Garcia, J., Guadayol, J.M.
Cromatografía i electroforesi. Edicions UPC. Barcelona. 1994
- Cooper, T.G.
Instrumentos y Técnicas de Bioquímica. Editorial Reverté. Barcelona. 1984
- Freifelder, D.
Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular. Editorial Reverté. Barcelona. 1991
- García-Segura, J.M.
Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica. Editorial Síntesis. Madrid. 1996
- Plummer, D.T.
Introducció a la Bioquímica Pràctica. Publicacions UB. 1994

- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A.
Principios de Análisis Instrumental. 5ª ed. McGraw-Hill. 2001
- Skoog, D.A., Leary, J.J.
Análisis Instrumental. McGraw-Hill. 1994
- Brock, T.D.
Membrane Filtration. Springer-Verlag. Berlin. 1983
- Givan, A.L.
Flow Cytometry: First Principles. 2a ed. Wiley-Liss. 2001
- Harlow, E., Lane, D.
Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 1988
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J.
PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press. 1990.
- Liddell, E., Weeks, I.
Antibody Technology. Oxford Bios Scientific Publishers. 1995
- Oliver, R.W.
HPLC of Macromolecules. Oxford University Press. Oxford. 1998
- Ormerod, M.G.
Flow Cytometry. A Practical Approach. Oxford IRL Press. 1994
- Slater, R.J.
Radioisotopes in Biology. IRL Press. Oxford. 1990
- Westermeier, R.
Electrophoresis in Practice. 3ª ed. Wiley-VCH. 2001
- White B. A.
PCR Protocols. Current Methods and Applications. Humana Press. 1993

Direcciones de interés relacionadas con diferentes técnicas instrumentales:

Instituto de Química Orgánica General. CSIC. Información sobre técnicas instrumentales y enlaces relacionados

<http://www.iqo.csic.es/tecnicas.html>

RedIRIS - Foro sobre Físicoquímica y Técnicas Instrumentales

<http://www.rediris.es/list/info/FISICOQUIMICA.html>

Roolpi. Tutorial explicativo de la PCR

<http://palou.uib.es/roolpi/docencia/docencia.html>

University of Akron. Información sobre: Separaciones químicas; Extracción mediante solventes; Teoría cromatográfica; Análisis cualitativo; Análisis cuantitativo; Cromatografía de gases; Cromatografía líquida; Fluidos supercríticos; Electroforesis; Electroquímica; Potenciometría; Valoraciones ácido/base.

<http://ull.chemistry.uakron.edu/chemsep>

PROFESORES DE LA ASIGNATURA

Teoría

Dra. I Ponte Marull (C2/241)

Prácticas

Dra. Rosario Fernández (C2/339) (coordinadora de prácticas)

Sr. Albert Rosell (C2/335)

PRÁCTICAS

Se dividirá a los alumnos en 4 grupos, cada uno de ellos asistirá a 5 sesiones de prácticas.

EVALUACIÓN DE LA ASIGNATURA

Teoría: nota sobre 8

Prácticas: nota sobre 2

Para aprobar la asignatura es necesario tener aprobadas ambas partes independientemente.

Campus Virtual <https://www.interactiva.uab.es/cv/>