

METODOLOGIA I EXPERIMENTACIÓ BIOQUÍMICA I (20154)

Licenciatura de Bioquímica
Curso 2007_2008

Teoría: Pere Suau (C2-215; pere.suau@uab.es)

Aula: C5-012, lunes, miércoles, jueves y viernes de 13h a 14h

Prácticas: Irantzu Pallares (Irantzu.Pallares@uab.es)

Laboratorio prácticas 4º piso torre C2-423

TEMARIO

Tema 1. Microscopía

- El microscopio electrónico.
- Métodos de preparación de las muestras. Mejora del contraste.
- Procedimientos especiales de formación de imágenes: microscopio de barrido, microscopio de fuerzas.

Tema 2. Centrifugación (Sedimentación)

- Introducción y fundamentos físicos: Velocidad de sedimentación. Coeficiente de sedimentación (S). Difusión.
- Instrumentación: centrífugas, ultracentrífugas preparativas ultracentrífuga analítica, tipos de rotores
- Modos de centrifugación: diferencial, zonal, analítica
- Aplicaciones Fraccionamiento subcelular. Determinación del coeficiente de sedimentación de las proteínas. Cálculo del peso molecular por velocidad de sedimentación y equilibrio de sedimentación. Sedimentación en gradiente de densidad: gradientes preformados y de autoformación.

Tema 3. Técnicas cromatográficas.

- Introducción. Concepto general. Tipos. Clasificación.
- Cromatografía de filtración en gel,
- Cromatografía de reparto y adsorción: papel, capa fina, gases.
- Cromatografía de intercambio iónico.
- Cromatografía hidrofóbica.
- Cromatografía de afinidad.
- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Tema 4: Electroforesis.

- Introducción. Movimiento de los iones en un campo eléctrico. El proceso electroforético. Soportes para la electroforesis.
- Proteínas: Inmunolectroforesis. Nativas. Detergentes no iónicos. SDS-PAGE. Determinación del peso molecular. Electroenfoco. Electroforesis bidimensional.
- Electroforesis de ácidos nucleicos. Movilidad electroforética del DNA.
- Tipos: nativa / desnaturalizante, DNA / RNA, acrilamida / agarosa. Electroforesis de campo pulsante. Electroforesis de gradiente térmico.
- Electroforesis capilar
- Tinciones y métodos de detección.

Tema 5 Transferencia de macromoléculas a diferentes soportes: Western

- Southern, Northern, South-western DOT blot, micro arrays

Tema 6: Técnicas inmunológicas.

- Estructura de los anticuerpos. Obtención de anticuerpos monoclonales y policlonales. Reacción antígeno-anticuerpo. Reacción de equivalencia
- Técnicas: Inmunolectroforesis. Inmunoprecipitación. Radioinmunoensayo. Ensayo Inmunoradiométrico. RIA. Elisa.
- Detección: Anticuerpos secundarios. Amplificación de señal. Sistemas enzimáticos de detección. Sistemas quimioluminiscentes de detección.

Tema 7: Isótopos radioactivos.

- Introducción. Cinética de desintegración. Isótopos utilizados en Bioquímica.
- Procedimientos y métodos de marcaje. Marcaje in vivo. Marcaje de ácidos nucleicos. Marcaje de proteínas.
- Detección de la radiación β . Detectores de ionización. Contadores de centelleo. Eficiencia de contaje. Contaje simultáneo de dos isótopos. Detección de radiación γ .
- Autorradiografía. Fluorografía. Métodos alternativos a la autorradiografía (phosphorimaging).
- Protección en el uso de isótopos radioactivos. Sistemas quimioluminiscentes como alternativa a los isótopos radioactivos

Tema 8. Reacción en cadena de la polimerasa: PCR.

- Introducción. Fundamentos de la técnica. Especificidad y rendimiento. Diseño de los cebadores (programas informáticos).
- Optimización de la reacción.

- Variantes de la técnica: mutagénesis, PCR in situ, RT PCR, Rapid amplification of cDNA ends (RACE), PCR cuantitativo (Real Time PCR), Ligation mediated PCR (LM PCR).
- Aplicaciones clínicas: diagnosis de infecciones víricas, detección de RFLP y enfermedades hereditarias. Aplicaciones legales.

Tema 9. Espectrometría de masas.

- Calculo del peso molecular por espectrometría de masas.
- Técnicas para biopolímeros.

Tema 10 . La radiación electromagnética.

- Propiedades de la radiación electromagnética. Interacción de la radiación con la materia.

Tema 11. Espectroscopía de absorción electrónica.

- Principios básicos. Aspectos cuantitativos de las medidas de absorción.
- Diseño de los instrumentos para la medida de absorción.
- Análisis espectroscópica de biopolímeros.
- Efectos de la conformación sobre la absorción.
- Dicroísmo circular (DC). Base molecular de la capacidad rotatoria. DC de proteínas y ácidos nucleicos.

Tema 12. Espectroscopía de absorción vibracional.

- Momento de transición.
- Espectroscopia de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR).
- Aplicación a moléculas biológicas.
- Espectroscopia de infrarrojo de diferencia.

Tema13. Espectroscopía de emisión.

- Principios básicos de la emisión de fluorescencia.
- Factores que determinen la intensidad de la fluorescencia.
- Medidas experimentales.
- Transferencia de energía. Polarización de fluorescencia.

Tema 14. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

- Principios básicos.
- Interacciones spin-spin.
- El NOE.

- Media del espectro.
- NMR unidimensional de macromoléculas.
- NMR bidimensional.

Tema 15. Cristalografía de rayos X.

- Cristales.
- Crecimientos de cristales.
- Principios de la difracción de rayos X por cristales.
- Determinación de estructuras macromoleculares por difracción de rayos X.
- Difracción por fibras.

Bibliografía:

Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular. D. Freifelder. Ed. Reverté. 1991.

Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica. J.M. García-Segura et al. Ed. Síntesis. 1996.

Principles of Physical Biochemistry. K. Van Holde et al. Prentice Hall. 1998.

Cromatografia i electroforesi. Edicions UPC. Barcelona. Olivé, J., Casas, J.M., Garcia, J., Guadayol, J.M.1994

Introducció a la Bioquímica Pràctica. Publicacions UB. Plummer, D.T.1994

Principios de Análisis Instrumental. 5ª ed. McGraw-Hill. Skoog, D.A., Holler, F.J.,

Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. Nieman, T.A. 2001

PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. 1990.

HPLC of Macromolecules. Oxford University Press. Oxford. Oliver, R.W 1998

Direcciones de interés relacionadas con diferentes técnicas instrumentales:

BioROM2007 ayudas en el aprendizaje de la biotecnología, bioquímica y biología molecular

<http://sebbm.bq.ub.es/BioROM/contenido/index.html>

University of Akron. Información sobre:espectrometria de masas

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

The Analytical Chemistry Springboard. Información sobre técnicas instrumentales y enlaces relacionados

<http://www.anachem.umu.se/jumpstation.htm>

Evaluación:

Examen teoría: un 85 % de la nota final.

Prácticas: la nota (obtenida a partir de la valoración del informe de prácticas y de un examen) representa el 15% de la nota final.