

# METODOLOGIA I EXPERIMENTACIÓ BIOQUÍMICA I (20154)

Licenciatura de Bioquímica  
Curso 2007\_2008

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

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

Prácticas: Irantzu Pallares ([Irantzu.Pallares@uab.es](mailto: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: Inmunoelectroforesis. Nativas. Detergentes no iónicos. SDS-PAGE. Determinación del peso molecular. Electroenfoque. 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: Inmunoelectroforesis. 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  $\beta$ . Detectores de ionización. Contadores de centelleo. Eficiencia de contaje. Contaje simultáneo de dos isótopos. Detección de radiación  $\gamma$ .
- 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.