

Tècniques instrumentals

2012/2013

Codi: 100998

Crèdits: 6

Titulació	Pla	Tipus	Curs	Semestre
2500502 Graduat en Microbiologia	816 Graduat en Microbiologia	FB	2	1

Professor de contacte

Nom: Inmaculada Ponte Marull

Correu electrònic: Inma.Ponte@uab.cat

Utilització d'idiomes

Llengua vehicular majoritària: català (cat)

Algun grup íntegre en anglès: No

Algun grup íntegre en català: No

Algun grup íntegre en espanyol: No

Prerequisits

Es recomana repassar els conceptes bàsics de Bioquímica de primer curs, sobretot les característiques física-químiques de les macromolècules.

Es recomana cursar aquesta assignatura a la vegada que l'assignatura de laboratori integrat III que s'imparteix en el mateix semestre d'aquest grau.

Objectius

L'objectiu general és que l'alumne conegui les principals tècniques instrumentals que es desenvolupen en un laboratori de microbiologia i que poden necessitar a la llarg dels seus estudis i activitat professional.

Aquest objectiu es pot concretar en:

- Adquirir i comprendre el fonament teòric de les principals tècniques instrumentals
- Aplicació d'aquestes tècniques en l'àmbit de la Microbiologia.
- Potenciar la capacitat d'autoaprenentatge de l'alumne. L'alumne ha d'aprendre a obtenir informació i adquirir l'hàbit d'usar aquesta informació críticament.
- Augmentar l'interès de l'alumne per l'aspecte tècnic de la ciència.

Competències

- Aplicar les metodologies adequades per aïllar, analitzar, observar, cultivar, identificar i conservar microorganismes d'ambients, aliments i productes o objectes elaborats per l'home
- Identificar i resoldre problemes
- Utilitzar tècniques moleculars i immunològiques per a la caracterització de microorganismes i materials d'origen biològic

Resultats d'aprenentatge

1. Assimilar els principis bàsics de l'espectrometria de masses i les seves aplicacions
2. Conèixer el funcionament d'equips de microscòpia, cromatografia, filtració, diàlisi, citometria,

- espectroscòpia, electroforesi, amplificació i seqüenciació de DNA, entre d'altres
3. Conèixer les bases de les tècniques que s'utilitzen per a l'anàlisi dels components cel·lulars, dels virus i dels productes microbians
 4. Identificar els medis de cultiu, els tipus de cultiu i la separació i el clonatge de cèl·lules eucariotes i la generació d'anticossos monoclonals
 5. Identificar els principis i els mètodes de preparació de mostres en microscòpia electrònica
 6. Identificar i resoldre problemes
 7. Identificar les tècniques adequades per detectar, quantificar i purificar molècules biològiques i per determinar l'estructura de les proteïnes

Continguts

Tema 1: Espectroscòpia d'absorció electrònica. Propietats de la radiació electromagnètica. Interacció de la radiació amb la matèria. Absorció / dispersió. Principis bàsics Espectroscòpia d'absorció electrònica Aspectes quantitatius de les mesures d'absorció (Llei de Lambert-Beer). Espectrofotòmetres. Anàlisi espectroscòpic de biopolímers. Fonaments de la espectrofluorimetria. Espectrofluorímetre. Aplicacions.

Tema 2: Centrifugació. Fonaments. Coeficient de sedimentació. Factors de què depèn el coeficient de sedimentació. Equació de Svedberg. Instrumentació: ultracentrífuga preparativa i analítiques. Rotors de centrífuga preparativa: flotants, angulars, verticals. Ultracentrifugació diferencial (fraccionament cel·lular). Ultracentrifugació zonal en gradients de densitat.

Tema 3: Tècniques cromatogràfiques. Introducció. Fonaments i característiques. Tipus de cromatografia: de repartiment, de filtració en gel, d'intercanvi iònic, hidrofòbica, afinitat. Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). Cromatografia de gasos.

Tema 4: Estratègies de purificació de macromolècules. Etapes de purificació. Optimització de cada etapa. Tècniques preparatives de proteïnes. Tècniques preparatives d'àcids nucleics: DNA plasmídic, DNA de bacteriòfag, DNA genòmic, RNA total i RNA missatger.

Tema 5: Tècniques electroforètiques. Electroforesi de proteïnes: Electroforesi SDS-PAGE, Electroenfoc, Bidimensional, Nativa. Electroforesi d'àcidsnucleics: natives, desnaturalitzants, camp polsant, gradient tèrmic, electroelució. Tincions i mètodes de detecció.

Tema 6: Tècniques de hibridació i identificació específica de molècules: Western, Southern, Northern, Southwestern, Microarrays, FISH, hibridació *insitu*, etc.

Tema 7: Reacció en cadena de la polimerasa: PCR. Fonaments de la tècnica. Especificitat i rendiment. Disseny dels encebadors. Optimització de la reacció. Seqüenciació, Mutagènesi, PCR *in situ*, RT PCR, Real time PCR, Ligation mediated PCR (LM PCR), RACE.

Tema 8: Tecnologia del DNA Recombinant. Modificació *in vitro* d'àcids nucleics per diferents tipus d'enzims: endonucleases (nucleasa S1, Bal 31, enzims de restricció), exonucleases, polimerases, altres. Esquema general d'un clonatge. Característiques de l'hoste. Transferència del DNA a l'hoste. Tipus de vector. Llibreries genòmiques. Llibreries de c-DNA. Seqüenciació del DNA.

Tema 9: Espectrometria de masses. Càlcul del pes molecular per espectrometria de masses. Tècniques per biopolímers.

Tema 10: Isòtops radioactius. Cinètica de desintegració. Isòtops utilitzats en Bioquímica. Marcatge *in vivo*. Marcatge d'àcids nucleics. Marcatge de proteïnes. Detecció de la radiació. Detectors d'ionització. Comptadors de centelleig. Autoradiografia. Mètodes alternatius a la autoradiografia (phosphorimaging). Protecció en l'ús d'isòtops radioactius. Sistemes quimioluminiscència com a alternativa als isòtops radioactius.

Tema 11: Tècniques immunològiques. Preparació d'anticossos monoclonals i policlonals. Reacció antigen-anticòs. Sistemes de detecció. Immunolectroforesi. Immunoprecipitació. RIA, ChIP i ChIP on CHIP.

Tema 12: Microscòpica. Fonaments microscopi electrònic (TEM / SEM). Mètodes de preparació de les mostres. Millora del contrast.

Metodologia

Classes de Teoria:

Es faran classes magistrals (30 hores). Mitjançant aquest sistema s'introduiran els conceptes bàsics del temari. S'intentarà, sempre que sigui possible, utilitzar material audiovisual e interactiu que ajudi a la comprensió dels conceptes.

Classes de problemes:

Al llarg del curs es dedicaran 12 hores a sessions de classes de problemes. El grup es dividirà en dos subgrups, les llistes dels quals es faran públiques a començament de curs. Els estudiants assistiran a les sessions programades pel seu grup. A la vegada, cada subgrup es dividirà en equips de treball formats per 4 alumnes que es mantindran durant tot el curs.

A començament de semestre es lliurarà a través del Campus Virtual el dossier d'enunciats de problemes. Els equips d'alumnes resoldran els problemes fora de l'horari de classe. A cada una de les sessions de problemes, s'escolliran a l'atzar 2-3 equips. Dos representants de l'equip escollit exposaran a la pissarra la resolució d'un problema. En acabar l'exposició, el problema es discutirà i, si s'escau, es corregirà amb la participació de tots els alumnes. El professor/a vetllarà per a què tots els equips tinguin, al llarg del curs, l'oportunitat d'exposar públicament la resolució de problemes. Tal com s'indica en l'apartat d'avaluació, la resolució, exposició pública de problemes, discussió i correcció seran tingudes en compte en la qualificació final, de forma complementària a la nota obtinguda en l'avaluació individual.

Seminaris:

Aquesta activitat, és una activitat supervisada pel professor que es realitza en grups (3-4 persones) i consisteix en la lectura per part dels alumnes d'articles seleccionats prèviament pel professor. Els alumnes hauran de comprendre i analitzar les tècniques utilitzades en cada article. L'objectiu d'aquesta metodologia és que l'alumne vegi exemples reals de la utilització de les tècniques explicades a classe i sàpiga reconèixer-les i interpretar-les.

Els alumnes hauran de presentar per escrit un resum basat en la resposta a preguntes concretes formulades pel professor sobre les figures i taules de l'article. Una vegada s'hagi realitzat el lliurament pel Campus Virtual del resum escrit es faran algunes sessions (3 H) per discutir i debatre els articles treballats. Aquestes sessions tenen com objectiu facilitar el diàleg entre el professor i els alumnes, ajudant a la comprensió dels conceptes adquirits en les classes magistrals.

Activitats formatives

Títol	Hores	ECTS	Resultats d'aprenentatge
Tipus: Dirigides			
Classe de problemes	12	0,48	2, 6
Classes Teoria	30	1,2	1, 2, 3, 5
Seminaris	3	0,12	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
Tipus: Supervisades			
Seminaris i problemes	10	0,4	4, 5, 6, 7
Tipus: Autònomes			
Elaboració d'un treball escrit (seminari)	9	0,36	4, 5

Estudia de la matèria impartida	62	2,48	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
Resolució dels problemes plantejats	15	0,6	6

Avaluació

1. Mòdul de Teoria (65%). Consta de dues proves escrites. Les dues proves parcials contindran preguntes curtes que permetin relacionar conceptes, definicions i un bloc de preguntes tipus test. La nota final s'obté per la mitjana de la nota obtinguda en les dues proves. Aquest promig es podrà fer sempre i quan la nota sigui igual o superior a 5. Els alumnes que no superin cada una d'aquestes proves amb una nota igual o superior a 5 podran recuperar-les en la data programada per l'examen de recuperació al final del semestre.

2. Mòdul de Problemes (25%). Aquest mòdul consta de dues parts:

2.1. Avaluació en equip (10% del total): Es basa en la resolució dels problemes treballats en equip i exposats a classe. Cada vegada que un equip exposa un problema rebrà una qualificació. Si un equip no és present a l'aula o es nega a exposar un problema rebrà una qualificació de 0. La qualificació final es calcularà com la mitjana entre les qualificacions dels problemes exposats per un mateix equip. La nota obtinguda serà la mateixa per a tots els membres de l'equip, sempre i quan tots ells hagin preparat i exposat de forma equivalent. La implicació dels diferents membres de l'equip es comprovarà mitjançant una petita enquesta individual i confidencial.

2.2. Avaluació individual (15% del total) mitjançant dues proves escrites. Les dues proves parcials consistiran en la resolució de 2-3 problemes. La nota final s'obté per la mitjana de la nota obtinguda en les dues proves. Aquest promig es podrà fer sempre i quan la nota dels parcials sigui igual o superior a 4. Els alumnes que no superin cada una d'aquestes proves amb una nota igual o superior a 4 podran recuperar-les en la data programada per l'examen de recuperació al final del semestre.

3. Mòdul de Seminaris (10%). L'avaluació d'aquest mòdul serà en equip. S'obtindrà una única nota a partir de l'avaluació del treball escrit. La nota obtinguda serà la mateixa per a tots els membres de l'equip, sempre i quan tots ells hagin treballat de forma equivalent.

Consideracions generals sobre l'avaluació:

L'avaluació dels mòduls de Teoria i de Problemes són indestruïbles i per superar l'assignatura l'alumne ha de participar, i ser avaluat dels dos mòduls. En canvi, per superar l'assignatura NO és necessari ser avaluat del mòdul de seminaris.

La nota s'obté per la mitjana ponderada de cada un dels mòduls,

$0,65 \text{ (teoria)} + 0,25 \text{ (problemes)} + 0,10 \text{ (seminaris)} = \text{nota final}$

Aquest promig ponderat tan sols es podrà fer en el cas que en les avaluacions dels mòduls de teoria i de problemes s'hagi obtingut una nota igual o superior a 4. Si no es compleix aquesta condició, l'assignatura quedarà avaluada amb una qualificació final de com a màxim 4.

Les proves escrites de teoria i de problemes es faran conjuntament en les dates programades ja fixades en el calendari.

Els alumnes que vulguin millorar la seva nota podran presentar-se a l'examen de millora de nota al final del semestre, el qual tindrà lloc en la data programada per l'examen de recuperació. L'alumne que es presenti a millorar la nota renuncia a la nota obtinguda en els parcials efectuats al llarg del curs.

L'examen de recuperació i/o de millorar la nota, tindrà el mateix format que les proves parcials.

Per superar l'assignatura és necessari obtenir una qualificació final igual o superior a 5.

La revisió de les proves escrites es realitzarà en dia i lloc concertat, seguin la normativa d'avaluació de la Facultat de Biociències.

Es considerarà que un alumne obtindrà la qualificació de **No Presentat** si es donà el següent supòsit: "la valoració de totes les activitats d'avaluació realitzades no li hagués permès assolir la qualificació global de 5 en el cas que hagués obtingut la màxima nota en totes elles".

Els alumnes que no puguin assistir a una prova d'avaluació individual per causa justificada i aportin la documentació oficial corresponent al Coordinador de Grau, tindran dret a realitzar la prova en qüestió en un altre data. El Coordinador de Grau vetllarà per la concreció d'aquesta amb el professor de l'assignatura afectada.

Qualsevol aspecte que no estigui contemplat en aquesta guia seguirà la normativa d'avaluació de la Facultat de Biociències.

Activitats d'avaluació

Títol	Pes	Hores	ECTS	Resultats d'aprenentatge
proves escrites	75%	9	0,36	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

Bibliografia

Creighton, T.E., The biophysical chemistry of nucleic acids & proteins, Helvetian Press, 2010

Metzemberg, S., Working with DNA, Ed, Taylord & Francis Group. California, 2007

Sheehan, D., Physical biochemistry : principles and applications 2nd ed. Chichester: John Wilwy & Sons, 2008

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

Coope G. Instrumentos y Técnicas de Bioquímica. Editorial Reverté. Barcelona. 1984

Freifelder, D. Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular. Editorial Reverté. Barcelona. 1991

García-Segura, JL Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica. Editorial Síntesis. Madrid. 1999

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

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, A Principios de Análisis Instrumental. 5ª ed. McGraw-Hill. 2001

Skoog, D.A., Leary, J.J Análisis Instrumental. McGraw-Hill. 1994

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

Slater, R.J Radioisotopes in Biology. IRL Press. Oxford. 1990

Westermeier, RG Electrophoresis in Practice. 3ª ed. Wiley-VCH. 2001

White BA PCR Protocols. Current Methods and Applications. Humana Press. 1993

Direcciones de interés relacionadas con diferentes técnicas instrumentales:

Aula Virtual de la Autònoma Interactiva: <https://cv2008.uab.cat>

Biorom 2008: <http://www.um.es/bbmbi/AyudasDocentes/biOromDISCO/indices/index.html>

Roolpi. Tutorial explicativo de la PCR: <http://palou.uib.es/roolpi/docencia/docencia.html>

University of Akron: <http://ull.chemistry.uakron.edu/analytical/index.html>