

**FITXA IDENTIFICATIVA****Dades de l'Assignatura**

Codi	43460
Nom	Tècniques d'anàlisi i quantificació
Cicle	Màster
Crèdits ECTS	4.5
Curs acadèmic	2024 - 2025

Titulació/titulacions

Titulació	Centre	Curs	Període
2210 - M.U. Invest. Biol.Mol.Cel	Facultat de Ciències Biològiques	1	Primer quadrimestre

Matèries

Titulació	Matèria	Caràcter
2210 - M.U. Invest. Biol.Mol.Cel	5 - Tècniques d'anàlisi i quantificació	Obligatòria

Coordinació

Nom	Departament
ARTERO ALLEPUZ, RUBEN DARIO	194 - Genètica

RESUM

La biologia molecular i la bioquímica modernes s'ocupen de desentranyar les funcions dels sistemes biològics. Per això, utilitzen sofisticats mètodes que permeten obtenir imatges i dades precises sobre el funcionament cel·lular, sobre l'expressió i l'estructura dels gens, i sobre les interaccions entre macromolècules. Tècniques d'Anàlisi i Quantificació (TAC) és una assignatura multidisciplinària que pretén proporcionar una sòlida base als estudiants de IBMCG amb una selecció de quatre blocs metodològics: tècniques avançades de PCR, citometria de flux, detecció d'àcids nucleics i splicing alternatiu, i tècniques microscòpiques i d'anàlisi d'imatge. L'assignatura s'imparteix de forma conjunta entre els departaments de microbiologia, genètica i biologia cel·lular.

CONEIXEMENTS PREVIS



Relació amb altres assignatures de la mateixa titulació

No heu especificat les restriccions de matrícula amb altres assignatures del pla d'estudis.

Altres tipus de requisits

2210 - M.U. Invest. Biol.Mol.Cel

- Que els estudiants sàpiguen aplicar els coneixements adquirits i la seua capacitat de resolució de problemes en entorns nous o poc coneguts dins de contextos més amplis (o multidisciplinaris) relacionats amb la seua àrea d'estudi.
- Que els estudiants siguen capaços d'integrar coneixements i afrontar la complexitat de formular judicis a partir d'una informació que, sent incompleta o limitada, incloga reflexions sobre les responsabilitats socials i ètiques vinculades a l'aplicació dels seus coneixements i judicis.
- Que els estudiants sàpiguen comunicar les conclusions (i els coneixements i les raons últimes que les sustenten) a públics especialitzats i no especialitzats d'una manera clara i sense ambigüitats.
- Que els estudiants posseïsquen les habilitats d'aprenentatge que els permeten continuar estudiant d'una forma que haurà de ser en gran manera autodirigida o autònoma.
- Ser capaços de treballar en equip amb eficiència en la seua tasca professional o investigadora.
- Ser capaços de realitzar una presa ràpida i eficaç de decisions en la seua tasca professional o investigadora.
- Posseir i comprendre coneixements que aportin una base o oportunitat de ser originals en el desenvolupament i / o aplicació d'idees, sovint en un context de recerca.
- Ser capaços d'accedir a ferramentes d'informació en altres àrees del coneixement i utilitzar-les apropiadament.
- Ser capaços de valorar la necessitat de completar la seua formació científica, històrica, en llengües, en informàtica, en literatura, en ètica, social i humana en general, assistint a conferències o cursos i / o realitzant activitats complementàries, autoavaluant l'aportació que la realització d'aquestes activitats suposa per a la seua formació integral.
- Capacitat per a preparar i gestionar projectes d'investigació en l'àmbit de la biologia molecular cel·lular i genètica.
- Conèixer els avanços recents en les tècniques microscòpiques i d'anàlisi d'imatge, PCR quantitativa i citometria de flux comprenent la seua utilitat en distints camps i les limitacions de la seua aplicació.
- Conèixer des d'un punt de vista pràctic els mètodes més actuals de marcatge i hibridació d'àcids nucleics i la seua aplicació a l'estudi de l'expressió gènica 'in situ'.
- Capacitat per a interpretar els resultats obtinguts de les tècniques més avançades d'anàlisi i quantificació en biologia molecular, cel·lular i genètica.



Ser capaç de dissenyar experiments, entendre les seves aplicacions en diferents camps i les seves limitacions, i interpretar els resultats obtinguts mitjançant tècniques avançades de PCR (incloent PCR quantitativa), citometria de flux, tècniques microscòpiques i d'anàlisi d'imatge, marcatge i hibridació in situ d'àcids nucleics i PCR semiquantitativa per a la detecció de variants de splicing.

Ser capaç de coordinar diferents tecnologies per resoldre problemes irresolubles amb tècniques aïllades. Ser capaç d'extrapolar entre els àmbits conceptuals de tècniques o mètodes desenvolupats en altres contextos.

Desenvolupament de la capacitat analítica i l'ús de la lògica per a la comprensió de fenòmens complexos. Aquesta és una destresa que es practicarà també a les sessions de laboratori.

DESCRIPCIÓ DE CONTINGUTS

1. Fonaments de la PCR a temps real.

Bases químiques de la reacció: tipus de sondes. Disseny i posada a punt de la reacció: condicions de reacció i especificitat. Anàlisi de la corba de dissociació. PCR múltiple. Control d'amplificació

2. Quantificació mitjançant PCR a temps real: PCR quantitativa (qPCR).

Corba estàndard com a base per a quantificació. Paràmetres de quantificació. Eficiència de la reacció. Límit de quantificació. Quantificació absoluta: mètode de la corba patró. Quantificació amb corba standard relativa. Quantificació per comparació de CT (CT)

3. Aplicacions de qPCR a quantificació.

RT-qPCR: Anàlisi d'expressió. NASBA-qPCR. LAMP-qPCR. Quantificació de cèl·lules viables (v-qPCR). PCR digital (dPCR): sistemes, avantatges i aplicacions.

4. Fonaments de citometria de flux.

Principals sistemes i components d'un citòmetre, tipus d'informació multiparamètrica obtinguda. Fluorocroms i fluorescència. Preparació de les cèl·lules per analitzar per citometria de flux. Disseny experimental i anàlisi de les dades. Avantatges i inconvenients de la citometria de flux.

5. Principals aplicacions de la citometria de flux.

Mesura de paràmetres superficials: immunofenotipado. Anàlisi per multifluorescència. Anàlisi de paràmetres citoplasmàtics: marcatge intracel·lular. Anàlisi de la ploidia del DNA i del cicle cel·lular. Estudi del creixement cel·lular. Mesura de l'apoptosi. Mesura de l'activitat fagocítica i l'esclat respiratori. Mesura de citocines intracel·lulars i secretades.



6. Separació cel·lular per citometria de flux.

Fonament. Característiques de les cèl·lules separades per citometria de flux. Puresa i rendiment.

7. Bases generals de microscòpia òptica. Microscòpia de fluorescència: microscòpia confocal i microscòpia multifotònica.

Fonaments teòrics i aplicacions biològiques.

8. Fonaments de la microscòpia electrònica. Tècniques de marcatge a nivell subcel·lular.

Fonaments teòrics i aplicacions biològiques. Marcatge immunocitoquímic en preinclusió i en postinclusió combinat amb microscòpia electrònica.

9. Detecció in situ del reporter lacZ i de dpp en embrions de Drosophila.

En mosques transgèniques es detectarà l'expressió de construccions en les que a un gen reporter (lacZ) s'ha fusionat diferents seqüències reguladores en cis bé normals o mutades. En paral·lel, es detectaran els canvis en l'expressió del gen Decapentaplegic en mutants de manca de funció del gen Cnab i en embrions que sobreexpressen aquest gen. Es discutirà el treball en condicions lliures de RNases, mètodes de marcatge radioactius i no radioactius, consideracions sobre la hibridació d'àcids nucleics, mètodes de detecció, sistemes d'amplificació de senyals.

10. Quantificació de l'splicing del gen Fhos de Drosophila

L'objectiu de la pràctica és determinar l'efecte de les expansions CTG sobre l'splicing alternatiu dels transcrits de Fhos i de shot (short stop), servint aquest últim com a control. Per a això, amplificarem mitjançant RT-PCR els fragments rellevants de Fhos i shot partint de RNA total de mosques adultes que expressen repeticions CTG en la musculatura i mosques control que no expressen les repeticions.



VOLUM DE TREBALL

ACTIVITAT	Hores	% Presencial
Classes de teoria	19,00	100
Pràctiques en laboratori	13,00	100
Altres activitats	8,00	100
Tutories reglades	3,00	100
Pràctiques en aula informàtica	2,00	100
TOTAL	45,00	

METODOLOGIA DOCENT

La metodologia docent que utilitzarem es basa en la teoria de l'aprenentatge coneguda com constructivisme. En síntesi, aquesta teoria està basada en la idea que l'aprenentatge té lloc quan l'estudiant construeix nou coneixement a partir de la reflexió sobre la informació que se li subministra. Per això, el paper del professor en aquesta assignatura serà el de promotor d'un aprenentatge actiu intel·lectualment per part de l'estudiant, incloent la reflexió de l'estudiant sobre els conceptes i principis exposats pel professor o estudiats de manera autònoma.

Classes teòriques i tutories grupals: L'assignatura s'estructura en tres sessions setmanals d'una hora de durada. A cada sessió el professor exposarà els continguts dels temes del programa per espai de 50-55 min. Aquestes exposicions serviran com a base teòrica per a la discussió d'articles i resolució de problemes i casos pràctics per part dels estudiants que es discutiran, principalment, en les sessions de tutories. També es realitzaran visites guiades als serveis centrals de suport a la investigació per mostrar en funcionament els equips rellevants per a cada tècnica.

Classes pràctiques: Les classes pràctiques es realitzen tres experiments reals sota la supervisió del professor. A l'inici el professor fa una breu introducció teòrica i de presentació dels objectius perseguits i metodologia emprada, després de la qual cada estudiant realitza independentment les tasques assignades. Com ajuda es disposa d'un manual amb les introduccions teòriques, objectius, metodologia i diferents qüestions a resoldre per assegurar l'aprofitament de les pràctiques. Les pràctiques són intensives i consten de quatre sessions de 4 h diàries.

AVALUACIÓ

Al final del curs es realitzaran proves escrites sobre els continguts dels temes teòrics, les quals constituiràn un 65% de la nota final.



Les sessions pràctiques s'avaluaran amb l'aprofitament de les sessions de laboratori i la resposta a un qüestionari sobre aquestes. L'assistència a pràctiques, almenys un 75% de les hores assignades, és obligatòria per aprovar en primera convocatòria, i no s'exigeix una nota mínima a la part pràctica de l'assignatura per superar-la. En cas de no assistir a pràctiques o fer-ho en un percentatge inferior al 75%, es podrà superar l'assignatura en segona convocatòria contestant un examen escrit sobre aquestes, bé conjuntament amb la part teòrica si també s'ha suspès o en solitari si la part teòrica ja està aprovada.

Per aprovar l'assignatura serà necessari aconseguir una puntuació d'almenys 5 punts sobre un total de 10 i assistir a les visites guiades. La nota final s'obtindrà en sumar les notes dels apartats d'examen teòric i avaluació contínua i s'exigeix una puntuació mínima de 4 punts en l'examen teòric per superar l'assignatura.

REFERÈNCIES

Bàsiques

- 1.- Real-time PCR: an essential guide. 2004. Kirstin Edwards, Julie Logan and Nick Saunders. (Eds). Wymondham (Norfolk). Horizon Bioscience, cop.
- 2.- Real-Time PCR: Current Technology and Applications. 2009. Julie Logan, Kirstin Edwards and Nick Saunders (Eds). Applied and Functional Genomics, Health Protection Agency, London. Caister Academic Press.
- 3.- Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology. 2012. Martin Fillion (Ed). Department of Biology, Université de Moncton, Canada. Caister Academic Press.
- 4.- Digital PCR. Methods and Protocols. 2018. George Karlin-Neumann and Francisco Bizouarn (Eds). Springer Protocols. Methods in Molecular Biology vol. 1768. Humana Press.
- 5.- Flow cytometry: principles and applications. 2007. Marion G Macey. Humana Press.
- 6.- Practical Flow Cytometry. Howard M. Shapiro. 4^a ed. John Wiley and Sons Inc. Wiley-Liss.
- 7.- O'Neil, J.W., Bier, E. (1994). Double-label in situ hybridization using biotin, digoxigenin-tagged RNA probes. *Biotechniques* 17, 870, con modificaciones.
- 8.- Llamusí B, Muñoz-Soriano V, Paricio N, Artero R. (2014). The use of whole-mount in situ hybridization to illustrate gene expression regulation. *Biochem Mol Biol Educ*. 2014 Jun 30. doi: 10.1002/bmb.20807.

Complementàries

- En cada tema se proporcionarà bibliografia específica, principalment articles de investigació o de revisió, que servirà para que los estudiantes puedan profundizar en algunos de los aspectos tratados. Dada su naturaleza, estos artículos se irán actualizando cada año.