VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Guía Docente
33176 Métodos en Bioquímica y Biología Molecular

FICHA IDENTIFICATIVA

Datos de la Asignatura

Código	33176
Nombre	Métodos en Bioquímica y Biología Molecular
Ciclo	Grado
Créditos ECTS	12.0
Curso académico	2017 - 2018

Titulación(es)

Titulación	Centro	Curso	Periodo
1102 - Grado de Biotecnología	Facultad de Ciencias Biológicas	2	Anual

Materias

Titulación	Materia	Caracter
1102 - Grado de Biotecnología	85 - Metodología Bioquímica	Obligatoria

Coordinación

Nombre	Departamento
MATALLANA REDONDO, EMILIA	30 - Bioquímica y Biología Molecular
MORENO MARIÑO, JOAQUIN	30 - Bioquímica y Biología Molecular
SENDRA PEREZ, RAMON	30 - Bioquímica y Biología Molecular

RESUMEN

El desarrollo de los métodos de análisis en Bioquímica y Biología Molecular ha tenido, y continuará teniendo, un gran impacto en el desarrollo de la Biotecnología. Esta Asignatura responde a la necesidad de desarrollar herramientas y habilidades específicas en una disciplina científica experimental como es la Biotecnología. La asignatura introduce a los estudiantes en los fundamentos y aplicaciones de las metodologías básicas a utilizar en este campo. El programa de Métodos en Bioquímica y Biología Molecular que se presenta se ha confeccionado para las enseñanzas de segundo curso del grado en Biotecnología y no pretende ser una propuesta definitiva pues la aparición de nuevas técnicas o la modificación de las existentes pueden aconsejar su incorporación al temario. cada tema abarca una técnica o grupo de técnicas afines. Los temas están orientados de forma que tras una breve introducción de los fundamentos del método o grupo de métodos, se discute su utilización experimental y sus aplicaciones. Se ha seleccionado un elevado número de ejemplos de aplicaciones a diferentes temáticas de investigación en base a su importancia práctica y a su interés pedagógico.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

Relación con otras asignaturas de la misma titulación

No se han especificado restricciones de matrícula con otras asignaturas del plan de estudios.

Otros tipos de requisitos

COMPETENCIAS

1102 - Grado de Biotecnología

- Diseñar protocolos de separación, purificación y caracterización de moléculas biológicas.
- Manejar adecuadamente los equipos y el material propio de un laboratorio de bioquímica y biología molecular.
- Ser capaz de realizar un análisis integrado de expresión génica a nivel de transcriptoma, proteoma y metaboloma.

RESULTADOS DE APRENDIZAJE

- Diseñar protocolos de separación, purificación y caracterización de moléculas biológicas
- Manejar adecuadamente los equipos y el material propio de un laboratorio de bioquímica.
- Adquirir conocimiento de las bases metodológicas de las técnicas utilizadas en estudios moleculares.
- Conocimiento básico de las principales técnicas y métodos de investigación.
- Familiarización con las fuentes bibliográficas, que permita al estudiante encontrar, seleccionar, entender y analizar la información.
- Entender y valorar la metodología básica utilizada en trabajos científicos relacionados con la Bioquímica.
- Discusión pública de artículos científicos
-
- Capacidad de analizar la información proporcionada en la bibliografía.
- Capacidad de comunicación con el resto de estudiantes de la metodología utilizada en un artículo de investigación.
- Capacidad de participación en clase.

DESCRIPCIÓN DE CONTENIDOS

1. Tema 1. Caracterización de Moléculas de Interés Biológico

1. El estudio de los fenómenos vitales. Experiencias in vivo e in vitro
2. Extracción y purificación de moléculas biológicas
2.1. Desorganización de la materia viva
2.1.1. Homogenización total y limitada
2.1.2. Características del medio de extracción. Agentes protectores
2.2. Purificación de macromoléculas
2.2.1. Separaciones preliminares. Precipitación y diálisis.
2.2.2. Métodos de separación preparativos y analíticos. Resolución
2.2.3. Rendimiento y factor de purificación.
3. Niveles de caracterización de biomacromoléculas
3.1. Niveles de caracterización de proteínas
3.2. Niveles de caracterización de ácidos nucleicos
3.3. Métodos de identificación e informativos. Especificidad, exactitud, precisión y sensibilidad

2. Tema 2. Espectroscopía de Absorción

1. Interacción radiación-materia
1.1. Naturaleza de la radiación electromagnética
1.2. Formas de energía molecular. Restricciones cuánticas y distribución de Boltzmann
1.3. Absorción de radiación. Grupos cromóforos
2. Espectroscopía de absorción. Generalidades
2.1. Medida de la absorción. Componentes fundamentales de un espectrofotómetro
2.2. Ley de Lambert-Beer
2.2.1. Absorbancia y coeficiente de extinción
2.2.2. Desviaciones. Punto isosbéstico
2.2.3. Estudio de mezclas de cromóforos.
3. Espectroscopía en la región de infrarrojo (IR)
3.1. Espectros de vibración de enlace
3.1.1. Los enlaces como osciladores armónicos
3.1.2. Espectrofotometría IR. Preparación de muestras
3.2. Aplicaciones bioquímicas
3.2.1. Bandas de absorción típicas de ácidos nucleicos y proteínas
3.2.2. Intercambio deuterio-protio
3.3.3. Dicroísmo IR
3.3. Otras formas de espectroscopía vibracional (FTIR y Raman)
4. Espectroscopía en la región ultravioleta-visible (UV-V)
4.1. Espectros electrónicos
4.1.1. Saltos electrónicos. Grupos cromóforos en la región UV-V
4.1.2. Espectrofotometría UV-V. Características
4.2. Aplicaciones bioquímicas
4.2.1. Absorción de las proteínas en el UV-V. Espectroscopía diferencial de perturbación
4.2.2. Absorción de los ácidos nucleicos en el UV-V. Efecto hipercrómico
4.2.3. Valoración de actividades enzimáticas. Reacciones acopladas. Sustratos artificiales

4.2.4. Colorimetría. Cuantificación de proteínas

3. Tema 3. Espectroscopía de Fluorescencia

1. Disipación de energía por moléculas excitadas
1.1. Procesos radiantes y no radiantes. Fluorescencia y fosforescencia
1.2. Características estructurales de los compuestos fluorescentes
2. Espectroscopía de fluorescencia. Generalidades
2.1. Parámetros que caracterizan la emisión fluorescente
2.1.1. Vida media en el estado excitado y rendimiento cuántico
2.1.2. Desplazamiento de Stokes. Efecto del entorno
2.2. Medida de la fluorescencia
2.2.1. Aparato. Espectros de excitación y emisión. Corrección de espectros
2.2.2. Relación entre intensidad y concentración
2.2.3. Extinción. Tipos de extintores. Ecuación de Stern-Volmer
2.2.4. Resolución temporal de la fluorescencia
2.3. Utilidad comparada con la espectroscopía de absorción
3. Aplicaciones bioquímicas
3.1. Fluorescencia intrínseca y extrínseca de proteínas, ácidos nucleicos y membranas
3.2. Valoración de actividades enzimáticas. Luminiscencia
3.3. Polarización de la fluorescencia. Aplicación al estudio de membranas
3.4. Transferencia de energía inducida por resonancia (FRET). Medida de distancias moleculares
3.5. Estudios celulares
3.5.1. Microscopía de fluorescencia. Inmunofluorescencia
3.5.2. Citómetros y clasificadores celulares activados por fluorescencia
3.5.3. Medida de Ca2+ y pH intracelulares

4. Tema 4. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

1. Resonancia magnética nuclear (RMN). Generalidades
1.1. Momento magnético del núcleo. Cuantización bajo un campo externo
1.2. El experimento de RMN. Aparato
1.3. Espectros RMN. Características
1.3.1. Desplazamiento químico
1.3.2. Acoplamiento espín-espín.
1.3.3. Relajación longitudinal y transversal. Anchura e intensidad de bandas
1.3.4. Secuencias de pulsos. RMN multidimensional.
2. Aplicaciones
2.1. Estudios in vitro
2.1.1. Estructura y dinámica de macromoléculas y membranas
2.1.2. Valoración de actividades enzimáticas y unión de ligandos
2.2. Estudios in vivo
2.2.1. Determinación de pH y metabolitos intracelulares
2.2.2. Estudio de rutas metabólicas
2.2.3. Formación de imágenes

5. Tema 5. Espectrometría de masas

1. Introducción. Fundamento físico.
2. Espectrómetro de masas
2.1. Volatilización e ionización de muestras.
2.1.1. Volatilización directa
2.1.1.1. Ionización por impacto electrónico (EI)
2.1.1.2. Ionización química (CI)
2.1.2. Volatilización e ionización asistida por matriz
2.1.2.1. Bombardeo atómico (FAB)
2.1.2.2. Desorción por plasma (PDI) y por láser (MALDI)
2.1.2.3. Electrospray (ESI) y spray iónico (ISI)
2.2. Aceleración, enfoque y detección de iones
2.2.1. Aparatos de trayectoria guiada
2.2.2. Aparatos de resonancia de ciclotrón (ICRMS)
2.2.3. Aparatos de tiempo de vuelo (TOF)
2.3. Espectros de masas
2.3.1. Intensidad, exactitud y resolución.
2.3.2. Variabilidad isotópica. Masa monoisotópica y promedio.
3. Aplicaciones bioquímicas:
3.1. Identificación de compuestos orgánicos de masa molecular pequeña
3.2. Estudio de proteínas
3.2.1. Identificación de proteínas
3.2.2. Secuenciación de proteínas y péptidos
3.2.3. Detección de modificaciones postraduccionales
3.2.4. Experimentos de marcaje isotópico en proteómica.

6. Tema 6. Métodos Isotópicos

1. Principios fundamentales del empleo de isótopos en bioquímica
2. Desintegración radiactiva
2.1. Tipos de emisión. Espectros ß
2.2. Cinética de la desintegración
2.3. Unidades de radiactividad. Radiactividad específica
3. Detección y cuantificación de radiactividad
3.1. Ionización de gases
3.1.1. Cámaras de ionización
3.1.2. Contadores proporcionales
3.1.3. Contadores Geiger-Muller
3.2. Contadores de excitación o de centelleo
3.2.1 Centelleo de líquidos
3.2.1.1. Analizadores de altura de pulso
3.2.1.2. Extinción
3.3.1.3. Contaje Cerenkov

3.2.2. Contador de centelleo sólido
3.2.3. Estadística del contaje radiactivo
3.3. Generación de Reacciones químicas: Detección fotográfica.
4. Autorradiografía
4.1. Generalidades
4.1.1. Emulsión autorradiográfica. Características de los rastros autoradiográficos.
4.1.2. Resolución, eficiencia, fondo
4.2. Métodos autorradiográficos
4.2.1. Métodos de contacto temporal. Pantallas amplificadoras. Fluorografía
4.2.2. Métodos de contacto permanente.
4.3. Autorradiografía molecular
4.4. Autorradiografía para microscopia electrónica
4.5. Alternativas de la autorradiografía: Detectores de imagen en superficie
4.5.1. Detectores electrónicos de superficie (InstantImager)
4.5.2. Detectores de imagen fotoestimulable (FosforoImager)
5. Empleo de radioisótopos en investigación bioquímica
5.1. Estudios in vivo
5.1.1. Velocidad y tiempo de recambio de un metabolito. Dilución isotópica
5.1.2. Estudio de secuencias metabólicas. Pulsos de radiactividad. Relaciones precursor-producto
5.1.3. Estudio del transporte a través de membrana
5.1.4. Métodos de doble marca
5.2. Estudios in vitro
5.2.1. Valoraciones enzimáticas y estudio de mecanismos de reacción
5.2.2. Cambio isotópico
6. Isótopos pesados no radiactivos
6.1. Porcentaje en exceso de un isótopo pesado. Detección
6.2. Isótopos pesados en proteómica cuantitativa

7. Tema 7. Electroforesis

1. Introducción: Fundamento y definiciones
1.1. Parámetros electroforéticos: movilidad
1.2. Electroforesis libre y electroforesis zonal
2. Electroforesis en soportes no restrictivos
3. Electroforesis de proteínas en soportes restrictivos
3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)
3.1.1. Tinción de geles de poliacrilamida
3.1.2. Estimación de masas moleculares: representación de Ferguson
3.1.3. PAGE en sistema discontinuo
3.2 PAGE en condiciones desnaturalizantes
3.2.1. SDS-PAGE
3.2.2. Estimación de masas moleculares de proteínas por SDS-PAGE
4. Isoelectroenfoque
5. Electroforesis bidimensional
6. Electroforesis de ácidos nucleicos

6.1. Geles de agarosa
6.2. Métodos de tinción de ácidos nucleicos. Transferencia a membranas
6.3. Electroforesis de campo pulsante
7. Electroforesis capilar

8. Tema 8. Cromatografía

1. Introducción. Definiciones, generalidades y nomenclatura
2. Fundamento y Clasificación de los métodos cromatográficos
3. Cromatografía en papel
4. Cromatografía en capa fina (TLC)
5. Cromatografía en columna: fundamento y operaciones básicas
5.1. Parámetros cromatográficos
5.2. Capacidad y resolución
5.2.1. Selectividad
5.2.2. Eficiencia, concepto de plato teórico
6. Cromatografía de adsorción
6.1. Cromatografía de intercambio iónico
6.1.1. Tipos de intercambiadores de iones
6.1.2. Formas de elución
6.1.3. Aplicaciones de la cromatografía de intercambio de iones
6.1.4. Cromatoenfoque
6.2. Cromatografía de hidrofobicidad
7. Cromatografía de afinidad
7.1. Preparación de la fase estacionaria
7.2. Mecanismos de elución
7.3. Cromatografía de afinidad artificial
7.3.1. Cromatografía sobre metales inmovilizados-IMAC
7.3.2. Cromatografía sobre colorantes inmovilizados
8. Otros tipos de cromatografía de afinidad. Cromatografía sobre hidroxiapatito
9. Cromatografía de exclusión molecular
9.1. Fundamento: principio de separación
9.2. Aplicaciones
10. Cromatografía líquida de alta resolución-HPLC
10.1. Instrumentación
10.2. Fases estacionarias: tipos de columnas
10.3. HPLC de fase reversa HPLC-RP
10.4. Otros tipos de HPLC.
10.4.1. UPLC.
10.4.2. HPLC monolítica
11. Cromatografía sobre matrices magnéticas

9. Tema 9. Centrifugación

1. Introducción:
1.1. Fundamento y definiciones
1.2. Teoría de la centrifugación
2. Instrumentación
2.1. Tipos de Centrífugas
2.2. Tipos de Rotores
2.3. Ultracentrífugas preparativas y analíticas
3. Modalidades de centrifugación
3.1. Centrifugación diferencial: Aplicaciones
3.2. Centrifugación zonal
3.2.1. Centrifugación en gradiente de densidad
3.2.2. Centrifugación isopícnica
3.2.3. Fraccionamiento de gradiente
3.2.4. Aplicaciones
3.3. Rotores especiales preparativos
4. Ultracentrifugación analítica
4.1. Ultracentrífugas, rotores y células de centrifugación analítica
4.2. Aplicaciones
4.2.1. Determinación de coeficiente de sedimentación
4.2.2. Determinación de masas moleculares

VOLUMEN DE TRABAJO

ACTIVIDAD	Horas	% Presencial
Clases de teoría	86,00	100
Prácticas en aula	30,00	100
Tutorías regladas	4,00	100
Preparación de actividades de evaluación	34,00	0
Preparación de clases de teoría	86,00	0
Preparación de clases prácticas y de problemas	60,00	0
TOTAL	**300,00**	

METODOLOGÍA DOCENTE

La asignatura está planteada para potenciar el aprendizaje activo de los estudiantes. Por este motivo las clases teóricas se conciben como introducciones generales a cada tema en donde se presentarán las técnicas de investigación y se intentará dar una visión global e interrelacionada de las mismas. Previamente a las clases teóricas los estudiantes dispondrán de información bibliográfica y de material proporcionado por el profesor. Se pretende que en estas clases haya una participación muy activa por parte de los alumnos.

Las clases de problemas se plantearán de forma que los estudiantes resuelvan parte de los mismos en el aula bajo la supervisión del profesor y trabajando en equipo con otros compañeros.

En las clases de discusión de artículos, los alumnos participarán en una discusión dirigida por el profesor que facilitará a los estudiantes un artículo de investigación relacionado con el tema y una serie de cuestiones acerca de los objetivos, metodología, resultados y conclusiones del artículo.

EVALUACIÓN

El planteamiento metodológico señalado anteriormente tiene, entre otros objetivos, el de favorecer un contacto frecuente y continuado del profesor con los alumnos, de manera que es posible a partir del mismo valorar el nivel de aprendizaje y la progresiva adquisición de competencias por parte de los estudiantes.

La evaluación del aprendizaje se realizará mediante pruebas escritas en las que se considerarán los dos objetivos planteados con la asignatura: el aprendizaje y la capacidad de análisis de información. Se realizarán dos exámenes parciales, el primero al final del primer cuatrimestre y el segundo junto con la recuperación del primer parcial al final del curso. Cada parcial consta de dos partes, teoría (6 puntos) y problemas (4 puntos). Es necesario superar cada uno de los parciales para aprobar la asignatura. La calificación final se obtendrá del promedio de las notas de los dos parciales.

REFERENCIAS

Básicas

- A. Textos que cubren la totalidad o la mayor parte de la asignatura

-Barceló, F. Técnicas Instrumentales en Bioquímica y Biología. Collecció materials didactics. Ed. Universitat de Les Illes Balears, 2003
-Creighton, T.E. The Physical and Chemical basis of Molecular Biology, Helvetian Press, 2010
-Cooper, T.G. "Instrumentos y técnicas de bioquímica" Ed. Reverté, 1984
-Freifelder, D. "Técnicas de bioquímica y biología molecular" Ed. Reverté, 1979
-García Segura, J.M., Gavilanes, J.G., Martínez del Pozo, A., Montero, F., Oñaderra, M. Y Vivanco, F. Técnicas instrumentales de análisis en Bioquímica. Ed. Síntesis, 1996
-García Segura, J.M. Espectroscopía in vivo por resonancia magnética Ed., 1991
-Holme, D.J. y Peck, H. "Analytical Biochemistry" 3th edition. Ed. Prentice Hall, 1998
-Roca, P., Oliver, J. y Rodriguez, A.M. Bioquímica: técnicas y métodos Ed Hélice. 2004.
-Scopes, R.K. "Protein purification" 2a ed. Springer Verlag, 1987
-Serdyuk, I.N., Zaccai, N. Zaccai, J. Methods in molecular biophysics Ed. Cambridge University Press, 2007.
-Sheeham, D. Physical biochemistry: Principles and applications 2nd edition. Ed. Wiley Blackwell, 2009.
-Wilson, K y John Walker, J. (Eds) Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. Ed. Cambridge University Press. 2006