

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

Codi	33176
Nom	Mètodes en bioquímica i biologia molecular
Cicle	Grau
Crèdits ECTS	12.0
Curs acadèmic	2023 - 2024

Titulació/titulacions

Titulació	Centre	Curs	Període
1102 - Grau de Biotecnologia	Facultat de Ciències Biològiques	2	Anual

Matèries

Titulació	Matèria	Caràcter
1102 - Grau de Biotecnologia	85 - Metodologia Bioquímica	Obligatòria

Coordinació

Nom	Departament
CARRASCO SORLI, PEDRO MIGUEL	30 - Bioquímica i Biologia Molecular
MARTINEZ PASTOR, M TERESA	30 - Bioquímica i Biologia Molecular
SENDRA PEREZ, RAMON	30 - Bioquímica i Biologia Molecular

RESUM

El desenvolupament dels mètodes d'anàlisi en Bioquímica i Biologia Molecular ha tingut, i continuarà tenint, un gran impacte en el desenvolupament de la Biotecnologia. Aquesta Assignatura respon a la necessitat de desenvolupar eines i habilitats específiques en una disciplina científica experimental com és la Biotecnologia. L'assignatura introdueix als estudiants en els fonaments i aplicacions de les metodologies bàsiques a utilitzar en qualsevol tipus de tècnica més especialitzada. El programa de Mètodes en Bioquímica i Biologia Molecular que es presenta s'ha confeccionat per als ensenyaments de segon curs del grau en Biotecnologia i no pretén ser una proposta definitiva doncs l'aparició de noves tècniques o la modificació de les existents poden aconsellar la seua incorporació al temari.

Els temes estan orientats de manera que després d'una breu introducció dels fonaments del mètode o grup de mètodes objecte del tema, es discuteix la seua utilització experimental i les seues aplicacions. Cada tema abasta una tècnica o un conjunt de tècniques afins. Es pretén discutir el màxim nombre d'exemples de naturalesa diferent seleccionats sobre la base de la seua importància pràctica i al seu interès pedagògic.



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

COMPETÈNCIES

1102 - Grau de Biotecnologia

- Dissenyar protocols de separació, purificació i caracterització de molècules biològiques.
- Manejar adequadament els equips i el material propi d'un laboratori de bioquímica i biologia molecular.
- Ser capaç de realitzar una anàlisi integrada d'expressió gènica a nivell de transcriptoma, proteoma i metaboloma.

RESULTATS DE L'APRENTATGE

- Dissenyar protocols de separació, purificació i caracterització de molècules biològiques
- Manejar adequadament els equips i el material propi d'un laboratori de bioquímica
- Adquirir coneixement de les bases metodològiques de les tècniques utilitzades en estudis moleculars
- Coneixement bàsic de les principals tècniques i mètodes d'investigació
- Familiarització amb les fonts bibliogràfiques, que permeti a l'estudiant trobar, seleccionar, entendre i analitzar la informació
- Entendre i valorar la metodologia bàsica utilitzada en treballs científics relacionats amb la Bioquímica
- Discussió pública d'articles científics
- Capacitat d'analitzar la informació proporcionada en la bibliografia
- Capacitat de comunicació amb la resta d'estudiants de la metodologia utilitzada en un article d'investigació
- Capacitat de participació en classe

DESCRIPCIÓ DE CONTINGUTS

1. Tema 1. Caracterització de Molècules d'Interès Biològic

1. L'estudi dels fenòmens vitals. Experiències in vivo i in vitro
2. Extracció i purificació de molècules biològiques
 - 2.1. Desorganització de la matèria viva
 - 2.1.1. Homogeneïtzació total i limitada
 - 2.1.2. Característiques del medi d'extracció. Agents protectors



2.2. Purificació de macromolècules

2.2.1. Separacions preliminars. Precipitació i diàlisi.

2.2.2. Mètodes de separació preparatius i analítics. Resolució

2.2.3. Rendiment i factor de purificació.

3. Nivells de caracterització de biomacromolècules

3.1. Nivells de caracterització de proteïnes

3.2. Nivells de caracterització d'àcids nucleics

3.3. Mètodes d'identificació i informatius. Especificitat, exactitud, precisió i sensibilitat

2. Tema 2. Espectroscopia d'Absorció

1. Interacció radiació-matèria

1.1. Naturalesa de la radiació electromagnètica

1.2. Formes d'energia molecular. Restriccions quàntiques i distribució de Boltzmann

1.3. Absorció de radiació. Grups cromòfors

2. Espectroscopia d'absorció. Generalitats

2.1. Mesura de l'absorció. Components fonamentals d'un espectrofotòmetre

2.2. Llei de Lambert-Beer

2.2.1. Absorbància i coeficient d'extinció

2.2.2. Desviacions. Punt isosbèstic

2.2.3. Estudi de mescles de cromòfors.

3. Espectroscopia en la regió d'infraroig (IR)

3.1. Espectres de vibració d'enllaç

3.1.1. Els enllaços com a oscil·ladors harmònics

3.1.2. Espectrofotometria IR. Preparació de mostres

3.2. Aplicacions bioquímiques

3.2.1. Bandes d'absorció típiques d'àcids nucleics i proteïnes

3.2.2. Intercanvi deuteri-proteïna

3.3.3. Dicroïsme IR

3.3. Altres formes de espectroscopia vibracional (FTIR i Raman)

4. Espectroscopia en la regió ultraviolada-visible (UV-V)

4.1. Espectres electrònics

4.1.1. Salts electrònics. Grups cromòfors en la regió UV-V

4.1.2. Espectrofotometria UV-V. Característiques

4.2. Aplicacions bioquímiques

4.2.1. Absorció de les proteïnes en l'UV-V. Espectroscopia diferencial de pertorbació

4.2.2. Absorció dels àcids nucleics en l'UV-V. Efecte hipercròmic

4.2.3. Valoració d'activitats enzimàtiques. Reaccions acoblades. Substrats artificials

4.2.4. Colorimetria. Quantificació de proteïnes



3. Tema 3. Espectroscopia de Fluorescència

1. Dissipació d'energia per molècules excitades
 - 1.1. Processos radiants i no radiants. Fluorescència i fosforescència
 - 1.2. Característiques estructurals dels compostos fluorescents
2. Espectroscopia de fluorescència. Generalitats
 - 2.1. Paràmetres que caracteritzen l'emissió fluorescent
 - 2.1.1. Vida mitjana en l'estat excitat i rendiment quàntic
 - 2.1.2. Desplaçament de Stokes. Efecte de l'entorn
 - 2.2. Mesura de la fluorescència
 - 2.2.1. Aparell. Espectres d'excitació i emissió. Correcció d'espectres
 - 2.2.2. Relació entre intensitat i concentració
 - 2.2.3. Extinció. Tipus d'extintors. Equació de Stern-Volmer
 - 2.2.4. Resolució temporal de la fluorescència
 - 2.3. Utilitat comparada amb la espectroscopia d'absorció
3. Aplicacions bioquímiques
 - 3.1. Fluorescència intrínseca i extrínseca de proteïnes, àcids nucleics i membranes
 - 3.2. Valoració d'activitats enzimàtiques. Luminescència
 - 3.3. Polarització de la fluorescència. Aplicació a l'estudi de membranes
 - 3.4. Transferència d'energia induïda per ressonància (FRET). Mesura de distàncies moleculars
 - 3.5. Estudis cel·lulars
 - 3.5.1. Microscopia de fluorescència. Immunofluorescència
 - 3.5.2. Citòmetres i classificadors cel·lulars activats per fluorescència
 - 3.5.3. Mesura de Ca^{2+} i pH intracel·lulars

4. Tema 4. Espectroscopia de Ressonància Magnètica Nuclear

1. Ressonància magnètica nuclear (RMN). Generalitats
 - 1.1. Moment magnètic del nucli. Quantització sota un camp extern
 - 1.2. L'experiment de RMN. Aparell
 - 1.3. Espectres RMN. Característiques
 - 1.3.1. Desplaçament químic
 - 1.3.2. Acoblament espín-espín.
 - 1.3.3. Relaxació longitudinal i transversal. Amplària i intensitat de bandes
 - 1.3.4. Seqüències de polsos. RMN multidimensional.
2. Aplicacions
 - 2.1. Estudis in vitro
 - 2.1.1. Estructura i dinàmica de macromolècules i membranes
 - 2.1.2. Valoració d'activitats enzimàtiques i unió de lligands
 - 2.2. Estudis in vivo
 - 2.2.1. Determinació de pH i metabòlits intracel·lulars
 - 2.2.2. Estudi de rutes metabòliques
 - 2.2.3. Formació d'imatges



5. Tema 5. Espectrometria de masses

1. Introducció. Fonament físic.
2. Espectròmetre de masses
 - 2.1. Volatilització i ionització de mostres.
 - 2.1.1. Volatilització directa
 - 2.1.1.1. Ionització per impacte electrònic (EI)
 - 2.1.1.2. Ionització química (CI)
 - 2.1.2. Volatilització i ionització assistida per matriu
 - 2.1.2.1. Bombardeig atòmic (FAB)
 - 2.1.2.2. Desorció per plasma (PDI) i per làser (MALDI)
 - 2.1.2.3. Electrospray (ESI) i spray iònic (ISI)
 - 2.2. Acceleració, enfocament i detecció de ions
 - 2.2.1. Aparells de trajectòria guiada
 - 2.2.2. Aparells de ressonància de ciclotró (ICRMS)
 - 2.2.3. Aparells de temps de vol (TOF)
 - 2.3. Espectres de masses
 - 2.3.1. Intensitat, exactitud i resolució.
 - 2.3.2. Variabilitat isotòpica. Massa monoisotòpica i mitjana.
3. Aplicacions bioquímiques:
 - 3.1. Identificació de compostos orgànics de massa molecular xicoteta
 - 3.2. Estudi de proteïnes
 - 3.2.1. Identificació de proteïnes
 - 3.2.2. Seqüenciació de proteïnes i pèptids
 - 3.2.3. Detecció de modificacions postraduccionals
 - 3.2.4. Experiments de marcatge isotòpic en proteòmica.

6. Tema 6. Cromatografia

1. Introducció. Definicions, generalitats i nomenclatura
2. Fonament i Classificació dels mètodes cromatogràfics
3. Cromatografia en paper
4. Cromatografia en capa fina (TLC)
5. Cromatografia en columna: fonament i operacions bàsiques
 - 5.1. Paràmetres cromatogràfics
 - 5.2. Capacitat i resolució
 - 5.2.1. Selectivitat
 - 5.2.2. Eficiència, concepte de plat teòric
6. Cromatografia d'adsorció
 - 6.1. Cromatografia d'intercanvi iònic
 - 6.1.1. Tipus de bescanviadors de ions
 - 6.1.2. Formes d'elució
 - 6.1.3. Aplicacions de la cromatografia d'intercanvi de ions
 - 6.1.4. Cromatoenfocament
 - 6.2. Cromatografia de hidrofobicitat



- 7. Cromatografia d'afinitat
 - 7.1. Preparació de la fase estacionària
 - 7.2. Mecanismes d'elució
 - 7.3. Cromatografia d'afinitat artificial
 - 7.3.1. Cromatografia sobre metalls immobilitzats-IMAC
 - 7.3.2. Cromatografia sobre colorants immobilitzats
- 8. Altres tipus de cromatografia d'afinitat. Cromatografia sobre hidroxiapatit
- 9. Cromatografia d'exclusió molecular
 - 9.1. Fonament: principi de separació
 - 9.2. Aplicacions
- 10. Cromatografia líquida d'alta resolució-HPLC
 - 10.1. Instrumentació
 - 10.2. Fases estacionàries: tipus de columnes
 - 10.3. HPLC de fase reversa HPLC-RP
 - 10.4. Altres tipus de HPLC.
 - 10.4.1. UPLC.
 - 10.4.2. HPLC monolítica
- 11. Cromatografia sobre matrius magnètiques

7. Tema 7. Centrifugació

- 1. Introducció:
 - 1.1. Fonament i definicions
 - 1.2. Teoria de la centrifugació
- 2. Instrumentació
 - 2.1. Tipus de centrífugues
 - 2.2. Tipus de rotors
 - 2.3. Ultracentrífugues preparatives i analítiques
- 3. Modalitats de centrifugació
 - 3.1. Centrifugació diferencial: Aplicacions
 - 3.2. Centrifugació zonal
 - 3.2.1. Centrifugació en gradient de densitat
 - 3.2.2. Centrifugació isopícnica
 - 3.2.3. Fraccionament de gradient
 - 3.2.4. Aplicacions
 - 3.3. Rotors especials preparatius
- 4. Ultracentrifugació analítica
 - 4.1. Ultracentrífugues, rotors i cèl·lules de centrifugació analítica
 - 4.2. Aplicacions
 - 4.2.1. Determinació de coeficient de sedimentació
 - 4.2.2. Determinació de masses moleculars



8. Tema 8. Electroforesi

1. Introducció: Fonament i definicions
 - 1.1. Paràmetres electroforètics: mobilitat
 - 1.2. Electroforesi lliure i electroforesi zonal
2. Electroforesi en suports no restrictius
3. Electroforesi de proteïnes en suports restrictius
 - 3.1 Electroforesi en gels de poliacrilamida (PAGE)
 - 3.1.1. Tinció de gels de poliacrilamida
 - 3.1.2. Estimació de masses moleculars: representació de Ferguson
 - 3.1.3. PAGE en sistema discontinu
 - 3.2 PAGE en condicions desnaturalitzant
 - 3.2.1. SDS-PAGE
 - 3.2.2. Estimació de masses moleculars de proteïnes per SDS-PAGE
4. Isoelectroenfocament
5. Electroforesi bidimensional
6. Electroforesi d'àcids nucleics
 - 6.1. Gels d'agarosa
 - 6.2. Mètodes de tinció d'àcids nucleics. Transferència a membranes
 - 6.3. Electroforesi de camp pulsant
7. Electroforesi capil·lar

9. Tema 9. Mètodes Isotòpics

1. Principis fonamentals de l'ocupació d'isòtops en bioquímica
 2. Desintegració radioactiva
 - 2.1. Tipus d'emissió. Espectres β
 - 2.2. Cinètica de la desintegració
 - 2.3. Unitats de radioactivitat. Radioactivitat específica
 3. Detecció i quantificació de radioactivitat
 - 3.1. Ionització de gasos
 - 3.1.1. Cambres d'ionització
 - 3.1.2. Comptadors proporcionals
 - 3.1.3. Comptadors Geiger-Muller
 - 3.2. Comptadors d'excitació o de centelleig
 - 3.2.1 Centelleig de líquids
 - 3.2.1.1. Analitzadors d'altura de pols
 - 3.2.1.2. Extinció
 - 3.3.1.3. Contaje Cerenkov
 - 3.2.2. Comptador de centelleig sòlid
 - 3.2.3. Estadística del contaje radioactiu
 - 3.3. Generació de Reaccions químiques: Detecció fotogràfica.
4. Autoradiografia
 - 4.1. Generalitats
 - 4.1.1. Emulsió autoradiogràfica. Característiques dels rastres autoradiogràfics.



- 4.1.2. Resolució, eficiència, fons
- 4.2. Mètodes autorradiogràfics
 - 4.2.1. Mètodes de contacte temporal. Pantalles amplificadores. Fluorografia
 - 4.2.2. Mètodes de contacte permanent.
- 4.3. Autoradiografia molecular
- 4.4. Autoradiografia per a microscòpia electrònica
- 4.5. Alternatives de la autoradiografia: Detectors d'imatge en superfície
 - 4.5.1. Detectors electrònics de superfície (InstantImager)
 - 4.5.2. Detectors d'imatge fotoestimulada (FosforImager)
- 5. Ocupació de radioisòtops en investigació bioquímica
 - 5.1. Estudis in vivo
 - 5.1.1. Velocitat i temps de recanvi d'un metabòlit. Dilució isotòpica
 - 5.1.2. Estudi de seqüències metabòliques. Polsos de radioactivitat. Relacions precursor-producte
 - 5.1.3. Estudi del transport a través de membrana
 - 5.1.4. Mètodes de doble marca
 - 5.2. Estudis in vitro
 - 5.2.1. Valoracions enzimàtiques i estudi de mecanismes de reacció
 - 5.2.2. Canvi isotòpic
- 6. Isòtops pesats no radioactius
 - 6.1. Percentatge a l'excés d'un isòtop pesat. Detecció
 - 6.2. Isòtops pesats en proteòmica quantitativa

VOLUM DE TREBALL

ACTIVITAT	Hores	% Presencial
Classes de teoria	86,00	100
Pràctiques en aula	30,00	100
Tutories reglades	4,00	100
Preparació d'activitats d'avaluació	34,00	0
Preparació de classes de teoria	86,00	0
Preparació de classes pràctiques i de problemes	60,00	0
TOTAL	300,00	

METODOLOGIA DOCENT

L'assignatura està plantejada per a potenciar l'aprenentatge actiu dels estudiants. Per aquest motiu les classes teòriques es conceben com a introduccions generals a cada tema on es presentaran les tècniques d'investigació i s'intentarà donar una visió global i interrelacionada de les mateixes. Prèviament a les classes teòriques els estudiants disposaran d'informació bibliogràfica i de material proporcionat pel professor. Es pretén que en aquestes classes hi haja una participació molt activa per part dels alumnes. Les classes de problemes es plantejaran de manera que els estudiants resolguen part dels mateixos en l'aula sota la supervisió del professor i treballant en equip amb els companys. En les classes de discussió d'articles, els alumnes participaran en una discussió dirigida pel professor que



facilitarà als estudiants un article d'investigació relacionat amb el tema i una sèrie de qüestions sobre els objectius, metodologia, resultats i conclusions de l'article.

AVALUACIÓ

Es realitzarà dues proves escrites (parcials) sobre els continguts i activitats de l'assignatura. Cada examen parcial constarà de dues parts: teoria (5,5 punts) i problemes (4,5 punts). Les dues parts han de ser superades independentment per aprovar l'assignatura encara que la qualificació del parcial s serà compensable si és superior a 4,5.

REFERÈNCIES

Bàsiques

- 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