

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

Codi	33177
Nom	Pràctiques integrades de mètodes
Cicle	Grau
Crèdits ECTS	4.5
Curs acadèmic	2022 - 2023

Titulació/titulacions

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

Matèries

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

Coordinació

Nom	Departament
MARIN NAVARRO, JULIA VICTORIA	30 - Bioquímica i Biologia Molecular
PEÑARRUBIA BLASCO, DOLORES	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 pretén que l'alumne conega, entre en contacte i arribe a familiaritzar-se amb aquelles tècniques experimentals de bioquímica i biologia molecular més comunes en l'actualitat. S'intentarà a més que l'estudiant desenvolupe habilitats pràctiques específiques indispensables en una disciplina científica empírica. L'assignatura introdueix als estudiants en el maneig d'instrumental bàsic del laboratori de bioquímica i biologia molecular, en l'obtenció de paràmetres físic-químics de biomolècules i en la interpretació d'aquelles dades resultants.

L'objectiu del programa és complementar els coneixements sobre les tècniques i metodologia emprades en laboratoris de bioquímica, explicades en l'assignatura teòrica (Mètodes en Bioquímica i Biologia Molecular). Per a açò es proposen una sèrie d'experiments lligats amb l'ordre temàtic de la majoria de les lliçons del programa teòric. En l'assignatura Pràctiques Integrades de Mètodes, de tipus exclusivament pràctic, el programa no és estàtic ja que l'aparició de noves tècniques, mètodes o procediments experimentals poden aconsellar la incorporació d'aquestes innovacions al programa.



Les classes pràctiques consistiran en 11 sessions amb un total de 42 hores que es realitzaran en dos blocs (de 21 hores cadascun). El primer d'ells, consistent en 6 sessions a realitzar en diferents setmanes (de forma no intensiva), inclou experiments d'espectrofotometria, espectrofluorimetria i diverses de les seues aplicacions. Les experiències a realitzar en aquest primer bloc es corresponen amb els continguts teòrics explicats en el primer quadrimestre en l'assignatura de teoria, Mètodes en Bioquímica i Biologia Molecular. El segon bloc (5 sessions més) a realitzar de forma intensiva en una setmana, inclou experiments i tècniques separatives i de purificació, els fonaments teòrics de la qual s'explica en el segon quadrimestre en l'assignatura de teoria, Mètodes en Bioquímica i Biologia Molecular.

Les sessions pràctiques inclouran una breu introducció dels fonaments del mètode o grup de mètodes que s'empraran, el seu maneig experimental i de com processar les dades obtingudes. Cada pràctica pot abastar una tècnica o un grup de tècniques afins i diverses de les seues aplicacions. Els experiments a realitzar són senzills, de fàcil realització de manera que resulten pedagògics i puguen ser interpretats pels estudiants després de processament de resultats.

L'assistència a totes les sessions de laboratori és obligatòria i indispensable perquè l'assignatura siga avaluada.

CONEXIMENTS 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

Per cursar aquesta assignatura es necessita haver cursat o estar cursant l'assignatura de Mètodes en Bioquímica i Biologia Molecular

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.

RESULTATS DE L'APRENENTATGE

- Manejar adequadament els equips i el material bàsic propi d'un laboratori de bioquímica i biologia molecular
- Comprendre i seguir correctament protocols de separació, caracterització i anàlisi de molècules biològiques.
- Interpretar i discutir els resultats experimentals i elaborar correctament una memòria tècnica sobre ells.
- Capacitat de preparar, dissenyar, realitzar, interpretar i discutir experiments en equip amb altres alumnes.



-Capacitat de comunicació amb la resta d'estudiants en la discussió de la metodologia utilitzada en la realització de les experiències.

DESCRIPCIÓ DE CONTINGUTS

1. Part 1. Mètodes espectroscòpics: Espectroscopia d'absorció i fluorescència.

Realització de quatre pràctiques a desenvolupar en dos sessions de 4,5 hores, dos sessions de 4 hores i dos sessions de 2 hores, en diferents setmanes (no intensiu)

Pràctica 1: Introducció a lespectrofotometria UV-visible: Colorimetria i espectrofotometria. Mesures d'absorbància de cromòfors en dissolució. Càlcul del coeficient d'extinció. Llei de Lambert-Beer. Limitacions de la llei. Càlcul de concentracions de soluts en barreges. Estudi de l'efecte hipercròmic.

Pràctica 2: Quantificació de metabòlits per espectrofotometria i anàlisi cinètica d'un enzim per turbidimetria. Determinació enzimàtica i espectrofotomètrica de la concentració d'etanol. Determinació de l'activitat lipasa mitjançant un assaig turbidimètric.

Pràctica 3: Interacció proteïna-ligant seguida per fluorimetria. Maneig del espectrofluorímetre. Espectres d'excitació i emissió. Utilització del ANS com fluoròfor sensor de polaritat. Anàlisi de la interacció proteïnalligant.

Pràctica 4: Sondes fluorescents: Determinació de Ca^{2+} i pH en dissolucions. Anàlisi de la variació dels espectres d'excitació dels fluoròforos QUIN2 i 5-carboxi-4,5-dimetilfluoresceïna amb la concentració de Ca^{2+} i amb el pH, respectivament. Determinació de Ca^{2+} i pH en dissolucions problema.

2. Part 2. Mètodes de separació i purificació de biomolècules.

Realització d'una pràctica a desenvolupar al llarg de cinc sessions (4 de 4.5 hores i 1 de 3 hores, intensiu 1 setmana), utilitzant mètodes cromatogràfics, electroforètics i de centrifugació bàsica. Aplicació a la purificació, caracterització i anàlisi de la proteïna RuBisCO.

Pràctica 5: estudi de la ribulosa-1,5-bisfosfat carboxilasa-oxigenasa de fulles de taronger. Tècniques separatives. Extracció i purificació d'una proteïna (RuBisCO) utilitzant precipitació diferencial, centrifugació, diàlisi, cromatografia i electroforesi en gel de poliacrilamida. Anàlisi del rendiment i factor de purificació.

**VOLUM DE TREBALL**

ACTIVITAT	Hores	% Presencial
Pràctiques en laboratori	42,00	100
Pràctiques en aula	3,00	100
Estudi i treball autònom	12,00	0
Preparació d'activitats d'avaluació	18,00	0
Preparació de classes pràctiques i de problemes	15,00	0
TOTAL	90,00	

METODOLOGIA DOCENT

Prèviament a les classes pràctiques els estudiants disposaran d'informació bibliogràfica i de material a través del Aula Virtual. El professor proporcionarà a l'alumne un quadern/guia que contindrà no solament els protocols a seguir sinó també referències bibliogràfiques i unes qüestions d'autoavaluació per a resoldre al llarg de les pràctiques.

Les sessions pràctiques es plantejaran de manera que els estudiants participen en la realització dels experiments, incloent el desenvolupament de la pràctica, l'obtenció de dades i el procés d'elaboració i interpretació dels resultats per a proporcionar finalment unes conclusions de l'experiment. Tot açò en el laboratori docent i sota la supervisió del professor i treballant en equip amb els companys. En finalitzar les pràctiques (després de 15 dies de cada part), els alumnes presentaran un qüestionari de resultats, amb els resultats obtinguts i les conclusions extretes, per a posar de manifest també la seua capacitat de formalitzar i comunicar dades científiques.

AVALUACIÓ

Es realitzarà una prova escrita (examen) sobre els continguts i activitats realitzades durant les sessions pràctiques de les dues parts de l'assignatura: Part I (Pràctiques 1-4) i Part II (Pràctica 5). Cada part tindrà un valor d'un 40% de la qualificació final. Serà necessari obtenir una puntuació com a mínim de 1,8 / 4 (o de 4,5 / 10) en cadascuna de les parts i un 5 en total per aprovar l'assignatura. Les notes compensables es guardaran només durant el curs acadèmic. El 20% restant de la qualificació provindrà de la valoració de la participació de l'estudiant i de les respostes a les qüestions plantejades durant i després de la realització de les pràctiques, mitjançant l'avaluació de les contestacions als qüestionaris presentats al finalitzar les sessions pràctiques de les dues parts.



En cas d'haver suspès l'examen, la nota del qüestionari es guardarà fins al curs acadèmic següent i l'assistència a les pràctiques serà voluntària. Per optar a una nova qualificació del qüestionari de resultats caldrà assistir a totes les sessions pràctiques.

REFERÈNCIES

Bàsiques

- Primera parte (prácticas 1-4)

- Bergmeyer, U. (1984) "Methods in enzymatic analysis" 3rd ed. Verlag Chemie
- Cornell, N.W. y Veech, R. (1983) "Enzymatic measurement of ethanol or NAD in acid extracts of biological samples". *Anal. Biochem.*, 132, 418-423
- Cuatrecasas, P., Fuchs, S. y Anfinsen, C.B. (1967) "Catalytic properties and specificity of the extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*". *J. Biol. Chem.* 242, 1541-1547.
- Díaz, P., y Daban, J.-R. (1986) "Enzymatic probes for histone-DNA complexes: micrococcal nuclease activity under conditions useful for the investigation of chromatin structure". *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 13, 57-59.
- Instructions for the analysis using test-combinations de Boehringer Mannheim Bioquímica (1995) "Methods of enzymatic bioanalysis and food analysis". Boehringer Mannheim Biochemicals
- Moller, M. y Denicola, A. (2002) Study of protein-ligand binding by fluorescence *Biochem. Mol. Biol. Edu.* 30, 309-312.
- Sugihara, A. et al. (1986) *Biochemistry* 25, 3430
- Stryer, L. (1968) "Fluorescence spectroscopy of proteins" *Science*, 162, 526-533
- von Tiersdorf, R.G. y Stelmachuk, S. (1989) The use of Tween 20 in a sensitive turbidometric assay of lipolytic enzymes *Can. J. Microbiol.* 35, 512-514.
- Walker, J.R.L. (1992) "Spectrophotometric determination of enzyme activity: alcohol dehydrogenase (ADH)". *Biochem. Educ.*, 20, 42-43.

- Segunda parte (práctica 5)

- Andersson, I. (2008): Catalysis and regulation in Rubisco, *J. Exp. Bot.*, 59, 1555-1568 (hemeroteca de ciencias).
- Andersson, I. y Backlund, A. (2008): Structure and function of Rubisco. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 275-291 (hemeroteca de ciencias).
- Atha, D. H. y Ingham, K.C. (1981): Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. *J. Biol. Chem.*, 256, 12108-12117 (hemeroteca de ciencias).
- Deutscher, M.P. (ed.) (1990): Guide to protein purification, Academic press, San Diego (biblioteca del departamento).
- Gutteridge, S. y Gatenby, A. A. (1995): RuBisCO synthesis, assembly, mechanism and regulation. *Plant Cell* 7, 809-819 (hemeroteca de ciencias).
- Peñarrubia, L., Moreno, J. y Carrasco, P. (1988): A visual-electrophoretic method for following the purification of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase. *Biochem. Educ.*, 16, 234-236 (hemeroteca de ciencias).



Peñarrubia, L. y Moreno, J. (1988): Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from citrus leaves. *Phytochemistry*, 27, 1999-2005 (hemeroteca de ciencias).

Schneider, G., Lindqvist, Y. y Brändén, C.I. (1992): RuBisCO: structure and mechanism. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 21, 119-143 (hemeroteca de ciencias).

Spreitzer, R.J. y Salvucci, M.E. (2002): Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 449-475 (hemeroteca de ciencias).

