

**FICHA IDENTIFICATIVA****Datos de la Asignatura**

Código	43460
Nombre	Técnicas de análisis y cuantificación
Ciclo	Máster
Créditos ECTS	4.5
Curso académico	2021 - 2022

Titulación(es)

Titulación	Centro	Curso	Periodo
2210 - M.U. en Investig. Biología Molecular, Celular Genética	Facultad de Ciencias Biológicas	1	Primer cuatrimestre
3102 - Biomedicina y Biotecnología	Escuela de Doctorado	0	Primer cuatrimestre

Materias

Titulación	Materia	Caracter
2210 - M.U. en Investig. Biología Molecular, Celular Genética	5 - Técnicas de análisis y cuantificación	Obligatoria
3102 - Biomedicina y Biotecnología	1 - Complementos de Formación	Optativa

Coordinación

Nombre	Departamento
ARTERO ALLEPUZ, RUBEN DARIO	194 - Genética

RESUMEN

La biología molecular y la bioquímica modernas se ocupan de desentrañar las funciones de los sistemas biológicos. Para ello, utilizan sofisticados métodos que permiten obtener imágenes y datos precisos sobre el funcionamiento celular, sobre la expresión y la estructura de los genes, y sobre las interacciones entre macromoléculas. Técnicas de Análisis y Cuantificación (TAC) es una asignatura multidisciplinar que pretende proporcionar una sólida base a los estudiantes de IBMCG con una selección de cuatro bloques metodológicos: técnicas avanzadas de PCR, citometría de flujo, detección in situ de ácidos nucleicos y splicing alternativo, y técnicas microscópicas y de análisis de imagen. La asignatura se imparte de forma conjunta entre los departamentos de microbiología, genética y biología celular.



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

2210 - M.U. en Investig. Biología Molecular, Celular Genética

- Que los/las estudiantes sepan aplicar los conocimientos adquiridos y su capacidad de resolución de problemas en entornos nuevos o poco conocidos dentro de contextos más amplios (o multidisciplinares) relacionados con su área de estudio.
- Que los/las estudiantes sean capaces de integrar conocimientos y enfrentarse a la complejidad de formular juicios a partir de una información que, siendo incompleta o limitada, incluya reflexiones sobre las responsabilidades sociales y éticas vinculadas a la aplicación de sus conocimientos y juicios.
- Que los/las estudiantes sepan comunicar sus conclusiones y los conocimientos y razones últimas que las sustentan a públicos especializados y no especializados de un modo claro y sin ambigüedades.
- Que los/las estudiantes posean las habilidades de aprendizaje que les permitan continuar estudiando de un modo que habrá de ser en gran medida autodirigido o autónomo
- Ser capaces de trabajar en equipo con eficiencia en su labor profesional o investigadora.
- Ser capaces de realizar una toma rápida y eficaz de decisiones en su labor profesional o investigadora.
- Poseer y comprender conocimientos que aporten una base u oportunidad de ser originales en el desarrollo y/o aplicación de ideas, a menudo en un contexto de investigación.
- Ser capaces de acceder a herramientas de información en otras áreas del conocimiento y utilizarlas apropiadamente.
- Ser capaces de valorar la necesidad de completar su formación científica, histórica, en lenguas, en informática, en literatura, en ética, social y humana en general, asistiendo a conferencias o cursos y/o realizando actividades complementarias, autoevaluando la aportación que la realización de estas actividades supone para su formación integral.
- Capacidad para preparar y gestionar proyectos de investigación en el ámbito de la biología molecular celular y genética.
- Conocer los avances recientes en las técnicas microscópicas y de análisis de imagen, PCR cuantitativa y citometría de flujo comprendiendo su utilidad en distintos campos y las limitaciones de su aplicación.



- Conocer desde un punto de vista práctico los métodos más actuales de marcaje e hibridación de ácidos nucleicos y su aplicación al estudio de la expresión génica in situ.
- Capacidad para interpretar los resultados obtenidos de las técnicas más avanzadas de análisis y cuantificación en biología molecular, celular y genética.

RESULTADOS DE APRENDIZAJE

Ser capaz de diseñar experimentos, entender sus aplicaciones en distintos campos y sus limitaciones, e interpretar los resultados obtenidos mediante técnicas avanzadas de PCR (incluyendo PCR cuantitativa), citometría de flujo, técnicas microscópicas y de análisis de imagen, marcaje e hibridación in situ de ácidos nucleicos y detección por PCR semiquantitativa de variantes de splicing.

Ser capaz de coordinar distintas tecnologías para resolver problemas irresolubles con técnicas aisladas.

Ser capaz de extrapolar entre los ámbitos conceptuales de técnicas o métodos desarrollados en otros contextos.

Desarrollo de la capacidad analítica y del uso de la lógica para la comprensión de fenómenos complejos. Esta es una destreza que se practicará también en las sesiones de laboratorio.

DESCRIPCIÓN DE CONTENIDOS

1. Fundamentos de la PCR a tiempo real

Bases químicas de la reacción: tipos de sondas. Diseño y puesta a punto de la reacción: condiciones de reacción y especificidad. Análisis de la curva de disociación. PCR múltiple. Control de amplificación

2. Cuantificación mediante PCR a tiempo real: PCR cuantitativa (qPCR).

Curva estándar como base para cuantificación. Parámetros de cuantificación. Eficiencia de la reacción. Límite de cuantificación. Cuantificación absoluta: método de la curva patrón. Cuantificación con curva patrón relativa. Cuantificación por comparación de CT (CT)

3. Aplicaciones de qPCR en cuantificación.

RT-qPCR: Análisis de expresión. NASBA-qPCR. LAMP-qPCR. Cuantificación % G+C y % hibridación DNA/DNA (DDH). Cuantificación de células viables (v-qPCR). PCR digital

4. Fundamentos de citometría de flujo.

Principales sistemas y componentes de un citómetro; tipo de información multiparamétrica obtenida. Fluorocromos y fluorescencia. Preparación de las células para su análisis por citometría de flujo. Diseño experimental y análisis de los datos. Ventajas e inconvenientes de la citometría de flujo.

**5. Principales aplicaciones de la citometría de flujo.**

Medida de parámetros superficiales: inmunofenotipado. Análisis por multifuorescencia. Analisis de parámetros citoplasmáticos: marcaje intracelular. Análisis de la ploidía del DNA y del ciclo celular. Estudio del crecimiento celular. Medida de la apoptosis. Medida de la actividad fagocítica y del estallido respiratorio. Medida de citocinas intracelulares y secretadas.

6. Separación celular por citometría de flujo.

Fundamento. Características de las células separadas por citometría de flujo. Pureza y rendimiento.

7. Bases generales de microscopía óptica. Microscopía de fluorescencia: microscopía confocal y microscopía multifotónica.

Fundamentos teóricos y aplicaciones biológicas.

8. Fundamentos de la microscopía electrónica. Técnicas de marcaje a nivel subcelular.

Fundamentos teóricos y aplicaciones biológicas. Marcaje inmunocitoquímico en preinclusión y en postinclusión combinado con microscopía electrónica.

9. Detección in situ del reportero lacZ y de dpp en embriones de Drosophila.

En moscas transgénicas se detectará la expresión de construcciones en las que a un gen reportero (lacZ) se ha fusionado distintas secuencias reguladoras en cis bien normales, mutadas, o en combinación con otras. En paralelo, se detectarán los cambios en la expresión del gen decapentaplegic en mutantes de falta de función del gen cabut y en embriones que sobreexpresan este gen. Se discutirá el trabajo en condiciones libres de RNasas, métodos de marcaje radiactivos y no radiactivos, sondas de RNA y de DNA, consideraciones sobre la hibridación de ácidos nucleicos, métodos de detección, sistemas de amplificación de señales. Aprovecharemos los ejercicios prácticos de este tema y el siguiente para presentar una ejemplo de ELN (Electronic Laboratory Notebook).

10. Cuantificación del splicing alternativo del gen Fhos de Drosophila

El objetivo de la práctica es determinar el efecto de las expansiones CTG sobre el splicing alternativo de los transcritos de Fhos y de shot (short stop), sirviendo este último como control. Para ello, amplificaremos mediante RT-PCR los fragmentos relevantes de Fhos y shot partiendo de RNA total de moscas adultas que expresan repeticiones CTG en la musculatura y moscas control que no expresan las repeticiones



VOLUMEN DE TRABAJO

ACTIVIDAD	Horas	% Presencial
Clases de teoría	20,00	100
Prácticas en laboratorio	12,00	100
Otras actividades	8,00	100
Tutorías regladas	3,00	100
Prácticas en aula informática	2,00	100
TOTAL	45,00	

METODOLOGÍA DOCENTE

La metodología docente que utilizaremos está basada en la teoría del aprendizaje conocida como constructivismo. En síntesis, esta teoría está basada en la idea de que el aprendizaje tiene lugar cuando el estudiante construye nuevo conocimiento a partir de la reflexión sobre la información que se le suministra. Por ello, el papel del profesor en esta asignatura será el de promotor de un aprendizaje activo intelectualmente por parte del estudiante, incluyendo la reflexión del estudiante sobre los conceptos y principios expuestos por el profesor o estudiados de manera autónoma.

Clases teóricas y tutorías grupales: La asignatura se estructura en tres sesiones semanales de una hora de duración. En cada sesión el profesor expondrá los contenidos de los temas del programa por espacio de 50-55 min. Estas exposiciones servirán como base teórica para la discusión de artículos y resolución de problemas y casos prácticos por parte de los estudiantes que se discutirán, principalmente, en las sesiones de tutorías. También se realizarán visitas guiadas a los servicios centrales de apoyo a la investigación para mostrar en funcionamiento los equipos relevantes para cada técnica.

Clases prácticas: Las clases prácticas se realizarán en el laboratorio. En las sesiones del laboratorio se realizan tres experimentos reales bajo la supervisión del profesor. Al inicio el profesor realiza una breve introducción teórica y de presentación de los objetivos perseguidos y metodología empleada, tras la cual cada estudiante realiza independientemente las tareas asignadas. Como ayuda se dispone de un manual con las introducciones teóricas, objetivos, metodología y distintas cuestiones a resolver para asegurar el aprovechamiento de las prácticas. Las prácticas son intensivas y constan de cuatro sesiones de 4 h diarias.

EVALUACIÓN

La evaluación de los contenidos teóricos se realizará mediante pruebas escritas las cuales, de manera conjunta, constituirán un 65% de la nota final.



Las sesiones prácticas se evaluarán con el aprovechamiento de las sesiones de laboratorio y la respuesta a un breve cuestionario sobre las mismas. Todo ello constituirá el restante 35% de la nota de la asignatura.

Para aprobar la asignatura será necesario conseguir una puntuación de al menos 5 puntos sobre un total de 10 y asistir a las sesiones prácticas y visitas guiadas. La nota final se obtendrá al sumar las notas de los apartados de contenidos teóricos y sesiones prácticas, exigiéndose una puntuación mínima de 4 puntos en los contenidos teóricos para superar la asignatura.

REFERENCIAS

Básicas

- 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.- Flow cytometry: principles and applications. 2007. Marion G Macey. Humana Press.
- 5.- Practical Flow Cytometry. Howard M. Shapiro. 4ª ed. John Wiley and Sons Inc. Wiley-Liss.
- 6.- O'Neil, J.W., Bier, E. (1994). Double-label in situ hybridization using biotin, digoxigenin-tagged RNA probes. *Biotechniques* 17, 870, con modificaciones.
- 7.- 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.

ADENDA COVID-19

Esta adenda solo se activará si la situación sanitaria lo requiere y previo acuerdo del Consejo de Gobierno

La docencia se impartirá de manera presencial siguiendo las instrucciones de la Facultad de Biología y la Universitat de València, preservando las medidas sanitarias correspondientes. Si se promulga alguna normativa posterior, se procederá a adaptar la docencia para cumplir con la normativa vigente en cada momento.

En caso de limitaciones a la presencialidad, la evaluación del alumnado en primera o segunda convocatoria se realizara de alguna de las siguientes maneras, de manera alternativa o complementaria.

- a) Evaluación continua: trabajos, exposiciones que detallará el equipo docente de la asignatura



- b) Evaluación telemática: mediante examen oral utilizando la plataforma oficial de la UV (Aula Virtual-Blackboard) u otras aplicaciones oficiales. En ese caso, el profesorado grabará el examen para futuras consultas o reclamaciones
- c) Examen mediante las utilidades de Aula Virtual (Cuestionario)

Cualquier otra modalidad aprobada *ad hoc* por la CCA

