

LABORATORI II

Codi: 234011

Tipus d'assignatura: obligatòria

Crèdits: 6 Pràctics

Departament responsable: Bioquímica i Biologia Molecular

Professorat: Narciso Campos, Joan Carles Ferrer i Josefa Mallo

Semestre: Segón

OBJECTIUS

Laboratori II és una assignatura de pràctiques integrades corresponents a les matèries generals impartides en l'ensenyament de Bioquímica durant el primer i segon semestre.

Inclou un conjunt de pràctiques de laboratori i un recull de temes d'introducció teòrica a determinades tècniques que s'utilitzen als laboratoris de Bioquímica, en general, i en les pràctiques d'aquesta assignatura, en particular.

L'objectiu de l'assignatura és adquirir un conjunt d'hàbits de treball al laboratori de Bioquímica i Biologia Molecular. Les pràctiques han estat dissenyades per tal d'aplicar tècniques i mètodes generals a problemes concrets en cada cas: extracció de biomolècules de medis complexos, manipulació de dissolucions de proteïnes i d'àcids nucleics, utilització de cultius bacterians, caracterització funcional i fisicoquímica de proteïnes i d'àcids nucleics, etc.

L'estudiant s'ha de distribuir el temps per dur a terme una sèrie d'experiments que ha de plantejar, fer i discutir-ne els resultats, seguint les directrius dels guions de les pràctiques i comptant amb l'ajut del professorat.

METODOLOGIA

L'assistència a les diferents sessions pràctiques i teòriques és obligatòria.

- Per tal de facilitar i optimitzar el treball, l'alumnat es distribuirà en 3 grups de pràctiques de 20 a 24 estudiants.
- Dins de cada grup, les pràctiques es desenvoluparan per parelles.
- Prèviament a la realització de les pràctiques, cada alumne disposarà d'un guió detallat que li permeti la preparació prèvia i li faciliti la realització i la comprensió de les pràctiques.
- Cada alumne tindrà el seu quadern personal de pràctiques, on anotarà els diferents processos efectuats, amb atenció especial als resultats obtinguts, càlculs realitzats i discussió de resultats, de forma concisa i clara.
- El professorat explicarà el fonament teòric de les diferents pràctiques i tècniques que es desenvoluparan al laboratori, aclarirà tots els dubtes que puguin sorgir, i guiarà l'estudiant al llarg de les diferents sessions.
- En finalitzar les sessions de pràctiques caldrà posar en comú els resultats obtinguts pels diferents grups, com també discutir-los per posar de manifest el possible significat que puguin tenir.
- Les sessions d'explicació dels fonaments de les diferents pràctiques i tècniques es faran de forma intercalada amb les sessions pràctiques.

- En una mateixa sessió pràctica, les diferents parelles d'alumnes duran a terme pràctiques diferents per tal d'optimitzar la utilització del material i aparells disponibles

CRITERIS D'AVALUACIÓ CONTINUADA

L'assistència a les sessions pràctiques i teòriques és obligatòria i requisit indispensable per a l'avaluació de l'assignatura.

L'avaluació constarà de:

- Avaluació **quantitativa del seguiment individualitzat de cada alumne al laboratori** pel que fa a l'assistència (obligatòria) i puntualitat, l'interès mostrat davant les pràctiques, la capacitat de treballar en equip i la destresa mostrada en la planificació i l'execució de cada pràctica. El fet que els grups de pràctiques siguin relativament poc nombrosos permetrà fer el seguiment. Aquesta avaluació **constituirà el 15% de la nota final (imprescindible aprovar aquesta avaluació)**
- També es farà una avaluació dels resultats obtinguts, els càlculs efectuats i la discussió dels resultats, a partir del quadern de laboratori personal de cada alumne; **l'avaluació del quadern constituirà el 15% de la nota final (imprescindible aprovar aquesta avaluació)**
- La **prova se síntesi** consistirà en un examen de tipus test sobre els conceptes teòrics i pràctics treballats al llarg de l'assignatura; aquesta prova **constituirà el 70% de la nota final (imprescindible aprovar aquesta avaluació)**

PROGRAMA DE TEORIA

Introducció

- Presentació dels programa del curs. Mètode d'avaluació i estratègia docent
- Organització del curs, distribució de pràctiques i grups
- Tècniques de DNA recombinant
- Aïllament de DNA i RNA
- "Llibreries" de DNA (DNA *Libraries*). Tipus de "llibreries". Construcció de "llibreries"
- Fonaments de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR)
- Mutagènesi dirigida
- Seqüenciació d'àcids nucleics

Expressió de proteïnes en sistemes heteròlegs

- Sistemes d'expressió recombinant
- Expressió en procariotes. Transformació d'*E. coli*

- Vectors d'expressió procariota. Proteïnes de fusió. Nanses de purificació
- Extracció de proteïnes recombinants.
- Problemes i optimització dels resultats.

Tècniques cromatogràfiques II

- Cromatografia d'afinitat
- *Metal-chelate affinity chromatography*
- Cromatografia d'interacció hidrofòbica (HIC)

Tècniques electroforètiques II

- Electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions nadiues (PAGE) i en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE). Revelatge general i específic
- Isoelectroenfocament
- Electroforesi bidimensional
- Electroforesi d'àcids nucleics en gels d'agarosa
- Gels de seqüenciació d'àcids nucleics

Tècniques espectroscòpiques II

- Aplicació de l'espectrofotometria d'UV/VIS a l'anàlisi cinètica de sistemes enzimàtics
- Caracterització d'enzims. Determinació del tipus d'inhibició
- Mètodes de regressió no lineal per obtenir els valors de les constants cinètiques. Anàlisi d'errors
- Fonaments d'Espectrometria de masses. Tècniques bàsiques i instruments

PROGRAMA DE PRÀCTIQUES

- Expressió del cDNA de la malat-deshidrogenasa citosòlica de porc en *E.coli*. Determinació de la grandària molecular per revelatge general de proteïnes en SDS-PAGE
- Electroforesi en gels de poliacrilamida dels isoenzims de la lactatdeshidrogenasa: revelatge específic de l'activitat enzimàtica
- Caracterització del tipus d'inhibició de la catàlisi enzimàtica per inhibidors reversibles. Avaluació de la K_i del sistema piruvat-NADH-lactatdeshidrogenasa per oxamat. Càlcul de la IC_{50}
- Expressió recombinant i purificació cromatogràfica de la proteïna verda fluorescent (GFP)
- Determinació del grup sanguini humà Rh (*Rhesus*) per amplificació i anàlisi del DNA

BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER, R. R.; GRIFFITHS, J. M. Basic biochemical methods. 2nd ed. Wiley-Liss, 1993.
- AUSUBEL, F. M. [et al.] (ed.). Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology. 2nd ed. New York: Greene Wiley and Sons, 1992.
- BECKER, J. M.; CALDWELL, G. A.; ZACHGO, E. A. Biotechnology: a laboratory

course. San Diego: Academic Press, 1990.

BOYER, R. F. Modern experimental biochemistry. 2nd ed. Redwood City (Calif.) Benjamin/Cummings, 1993.

COOPER, T. G. Instrumentos y técnicas de bioquímica. Barcelona. Reverté, 1984.

DIXON, M.; WEBB, E. C. Enzymes. 3rd ed. London: Longman, 1979.

WILSON, K.; WALKER, J. Principles and Techniques of Practical Biochemistry. 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.