

## Bioquímica Experimental II

MÓDULO	MATERIA	CURSO	SEMESTRE	CRÉDITOS	TIPO
Integración Fisiológica y aplicaciones de la Bioquímica y Biología Molecular	Bioquímica experimental II	3º	6º	6	Obligatoria
<b>PROFESORES</b>			<b>DIRECCIÓN COMPLETA DE CONTACTO PARA TUTORÍAS</b>		
Dra. Mª José Alejandre Pérez ( <a href="#">responsable de la asignatura</a> ) Dra. Sonia Perales Romero Dr. Fernando Reyes Zurita			Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I, Edif. Biología (4ª planta), Facultad de Ciencias. Mª José Alejandre. Despacho 6, <a href="mailto:malejand@ugr.es">malejand@ugr.es</a> Sonia Perales. Despacho 11, <a href="mailto:sopero@ugr.es">sopero@ugr.es</a> Fernando Reyes. Despacho 13, <a href="mailto:ferjes@ugr.es">ferjes@ugr.es</a>		
			<b>HORARIO DE TUTORÍAS</b>		
			Dra. Mª José Alejandre: L, M y J de 11:30-13:30h Dra. Sonia Perales: L y X de 11-14h Dr. Fernando Reyes: J y V de 10-13h		
<b>GRADO EN EL QUE SE IMPARTE</b>			<b>OTROS GRADOS A LOS QUE SE PODRÍA OFERTAR</b>		
Grado en Bioquímica					
<b>PRERREQUISITOS Y/O RECOMENDACIONES</b>					
Tener cursadas las asignaturas: Métodos Instrumentales cuantitativos; Bioquímica experimental I; Regulación del metabolismo; Inmunología y Genética molecular e ingeniería genética.					
<b>BREVE DESCRIPCIÓN DE CONTENIDOS</b>					
-Fraccionamiento subcelular. - Determinación experimental de parámetros bioenergéticos. - Purificación y caracterización de ácidos nucleicos. -Técnicas básicas de manipulación de ácidos nucleicos. -Técnicas inmunológicas básicas. -Cultivo y transformación de microorganismos					



## COMPETENCIAS

- CG2.- Saber **aplicar los conocimientos en Bioquímica y Biología Molecular** al mundo profesional, especialmente en las áreas de investigación y docencia, y de actividades biosanitarias, incluyendo la capacidad de resolución de cuestiones y problemas en el ámbito de las Biociencias Moleculares utilizando el método científico.
- CG3.- Adquirir la **capacidad de reunir e interpretar datos** relevantes dentro del área de la Bioquímica y Biología Molecular, así como de extraer conclusiones y reflexionar críticamente sobre las mismas en distintos temas relevantes en el ámbito de las Biociencias Moleculares.
- CG5.- Haber desarrollado las habilidades de aprendizaje necesarias para emprender estudios posteriores de especialización con un alto grado de autonomía, incluyendo la **capacidad de asimilación de las distintas innovaciones científicas y tecnológicas** que se vayan produciendo en el ámbito de las Biociencias Moleculares.
- GB2.- Que los estudiantes sepan **aplicar sus conocimientos** a su trabajo o vocación de una forma profesional y posean las competencias que suelen demostrarse por medio de la elaboración y defensa de argumentos y la resolución de problemas dentro de su área de estudio
- GB3.- Que los estudiantes tengan la capacidad de reunir e interpretar datos relevantes (normalmente dentro de su área de estudio) para **emitir juicios** que incluyan una reflexión sobre temas relevantes de índole social, científica o ética.
- GB5.- Que los estudiantes hayan desarrollado aquellas **habilidades de aprendizaje necesarias para emprender estudios posteriores** con un alto grado de autonomía.
- CT1.- Adquirir la **capacidad de razonamiento crítico y autocrítico**.
- CT4.- Tener **capacidad de aprendizaje y trabajo autónomo**.
- CT5.- Saber **aplicar los principios del método científico**.
- CT6.- Saber **reconocer y analizar un problema**, identificando sus componentes esenciales, y planear una estrategia científica para resolverlo.
- CT7.- **Utilizar las herramientas informáticas básicas** para la comunicación, la búsqueda de información, y el tratamiento de datos en su actividad profesional.
- CT8.- Saber **leer de textos científicos en inglés**.
- CE18.- Conocer las técnicas básicas de cultivos celulares, así como las de procesamiento de células y tejidos para obtener preparaciones de orgánulos subcelulares.
- CE20.- Conocer los principios de manipulación de los ácidos nucleicos, así como las principales técnicas que permiten el estudio de la expresión y función de los genes.
- CE23.- Saber aplicar protocolos experimentales de laboratorio dentro del área de la Bioquímica y Biología Molecular.
- CE26.- Tener capacidad para plantear y resolver cuestiones y problemas en el ámbito de la Bioquímica y Biología Molecular a través de hipótesis científicas que puedan examinarse empíricamente.
- CE27.- Comprender los aspectos básicos del diseño de experimentos en el área de la Bioquímica y Biología Molecular, entendiendo las limitaciones de las aproximaciones experimentales.

## OBJETIVOS

Los alumnos serán capaces de

### SABER:

- Demostrar buen conocimiento de los criterios de pureza de ácidos nucleicos.
- Cuantificación de parámetros bioenergéticos: medidas de la Fosforilación oxidativa y cómo afectan distintos compuestos a estos parámetros.
- Demostrar buenos conocimientos de los criterios de validación del estudio cuantitativo y semi-cuantitativo de proteínas por inmunoprecipitación, immunoblot, ELISA y radioinmunoensayo, e inmunofluorescencia.

### SABER HACER:

- Analizar experimentalmente de forma correcta, o sobre datos publicados, el procesamiento de proteínas y su localización en diferentes compartimentos subcelulares (núcleo, mitocondria, lisosomas, membrana plasmática). Fraccionamiento subcelular utilizando centrífugas, ultracentrífugas y rotores. Desarrollar una centrifugación diferencial



y en gradiente discontinuo de sacarosa para aislar fracciones subcelulares. Evaluar la pureza de las fracciones subcelulares mediante determinación de proteínas enzimáticas marcadoras.

- Determinar la concentración de ácidos nucleicos totales de una muestra biológica.
- Diseñar y ejecutar bien los diferentes pasos de un protocolo de purificación de DNA y de RNA de una muestra biológica determinando el rendimiento y la pureza final.
- Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos: Digestión de DNA con enzimas de restricción. Ligado de un vector plasmídico con un inserto de DNA.
- Preparación de células competentes. Transformación de bacterias Cultivo y análisis de bacterias recombinantes.
- Técnicas de aislamiento y cuantificación de ácidos nucleicos de diferentes orígenes.

#### TEMARIO DETALLADO DE LA ASIGNATURA

##### TEMARIO TEÓRICO: (0,36 ECTS, 9h)

- Tema 1. Métodos de aislamiento de ácidos nucleicos y cuantificación.
- Tema 2. Interpretación de los parámetros de la centrifugación. Pautas para el diseño experimental de fraccionamiento subcelular.
- Tema 3. Técnicas inmunológicas: “enzimoinmunoensayo” (ELISA) e “inmunofluorescencia”.
- Tema 4. Cuantificación de parámetros bioenergéticos. Electrodo de oxígeno tipo Clark. Componentes de la cadena de transporte electrónico, su ordenación según los potenciales redox. Significado y cálculo de la razón P/O.
- Tema 5. Pautas para el diseño experimental de manipulación de ácidos nucleicos: subclonaje de un cDNA.

##### TEMARIO PRÁCTICO: (1,72 ECTS, 43h)

#### PRÁCTICAS

- Práctica 1. Aislamiento y cuantificación de ácidos nucleicos. Estudio comparativo de las metodologías existentes para el aislamiento de ácidos nucleicos de diferentes orígenes.
- Práctica 2. Diseño de fraccionamiento subcelular para separar partículas independientemente de su origen. Fraccionamiento subcelular y determinación de enzimas marcadoras de fracciones subcelulares.
- Práctica 3-Taller 1. Estudio de protocolos experimentales para ELISA, inmunofluorescencia y otras técnicas de biología Molecular en la que se emplean anticuerpos.
- Práctica 4. Estudio de la respiración celular mediante electrodo de oxígeno tipo Clark. Medidas de fosforilación oxidativa. Presentación y discusión de los resultados obtenidos en la práctica.
- Práctica 5. Diseño experimental de subclonaje. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos: Digestión de DNA con enzimas de restricción. Ligado de un vector plasmídico con un inserto de DNA. Preparación de bacterias competentes. Transformación de bacterias. Cultivo y análisis de las bacterias recombinantes.

#### BIBLIOGRAFÍA

##### Fundamental:

- “Basic Biochemical Methods”. Alexander, R.R. y Griffiths, M. Ed. Wiley-Liss. 1993.
- “Modern Experimental Biochemistry”. 2ª ed. Boyer Rodney F. Ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company. 1993.
- “Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular”. Freifelder, D. Editorial Reverté, S. A. 1991.
- “Analytical Biochemistry”. Second edition. Holme, D.J. & Peck, H. Ed. Longman Scientific & Technical. 1993.
- “Principles and Techniques of Practical Biochemistry”. Fourth Edition. Wilson, K. y Walker, J. Ed. Cambridge University Press. 1994..
- “Biotecnología. Curso de Prácticas de Laboratorio”. Becker, J.M. Editorial Acribia, S. A. 1996



- "Análisis Instrumental". K. A. Rubinson and J. F. Rubinson. 2000. Prentice may.
- "Molecular Biology Labfax. I: Recombinant DNA". Brown, T.A. 2ª Edición Academic Press. 1998
- "Molecular Biology Labfax. II: Gene Analysis". Brown, T.A. Academic Press. 1998
- "Bioquímica Genética, Biología Molecular". Etienne, J., 2001. Barcelona: Masson.
- "Current protocols in molecular biology". Ausubel, Frederick M. Vol. 1 y 2. Ed. John Wiley & Sons, Inc. Actualizado desde 1994

#### Complementaria:

- Diferentes Casa Comerciales (Quiagen, Invitrogen, Promega, Roche, TermoFisher, etc. que se indicarán al estudiante)

#### ENLACES RECOMENDADOS

##### Bioenergética:

<http://www.bmb.leeds.ac.uk/illingworth/oxphos/>  
<http://themedicalbiochemistrypage.org/oxidative-phosphorylation.html> ?  
<http://www.jove.com/video/2452/mitochondrial-isolation-from-skeletal-muscle>  
<http://www.jove.com/video/2431/respirometric-oxidative-phosphorylation-assessment-saponin>  
<http://www.jove.com/video/52350/preparation-respirometric-assessment-mitochondria-isolated-from>

##### Indispensables en investigación bioquímica:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>  
<http://www.ebi.ac.uk/>  
<http://expasy.org/>  
<http://www.jove.com/>

##### Protocolos

<http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/CurPro3Title/isbn-0471142727.html>  
<https://www.qiagen.com/es/resources/molecular-biology-methods/>  
<http://encorbio.com/protocols/protocols-2/>  
<http://www.protocol-online.org/prot/Biochemistry/>  
<http://www.springerprotocols.com/>  
<http://userpages.umbc.edu/~jwolf/method1.html>

##### Software

<http://www.idtdna.com/SciTools/SciTools.aspx>  
<http://molbiol-tools.ca/>

#### METODOLOGÍA DOCENTE

**Teoría:** **lección magistral** sobre los principios y/o pautas a tener en cuenta para las técnicas propuestas.

- *Competencias a desarrollar*
- CE18.- Conocer las técnicas básicas de cultivos celulares, así como las de procesamiento de células y tejidos para obtener preparaciones de orgánulos subcelulares.
- CE20.- Conocer los principios de manipulación de los ácidos nucleicos, así como las principales técnicas que permiten el estudio de la expresión y función de los genes.
- CE27.- Comprender los aspectos básicos del diseño de experimentos en el área de la Bioquímica y Biología Molecular, entendiendo las limitaciones de las aproximaciones experimentales.

**Prácticas:** incluye **resolución de problemas**, **estudio de casos prácticos** y **prácticas de laboratorio** donde se guía al estudiante en los experimentos a realizar en el laboratorio (objetivos, metodología, resultados previsibles, etc.). Finalmente deben elaborar una discusión de los resultados obtenidos.



- *Competencias a desarrollar:*
- CG2, CB2.- Saber aplicar los conocimientos a su trabajo.
- CG3, CB3- Adquirir y tener la capacidad de reunir e interpretar datos relevantes para emitir juicios que incluyan una reflexión.
- CG5, CB5- Haber desarrollado las habilidades de aprendizaje necesarias para emprender estudios posteriores de especialización con un alto grado de autonomía, incluyendo la capacidad de asimilación de las distintas innovaciones científicas y tecnológicas.
- CT1.- Adquirir la capacidad de razonamiento crítico y autocrítico.
- CT4.- Tener capacidad de aprendizaje y trabajo autónomo.
- CT5.- Saber aplicar los principios del método científico.
- CT6.- Saber reconocer y analizar un problema, identificando sus componentes esenciales, y planear una estrategia científica para resolverlo.
- CT8.- Saber leer de textos científicos en inglés.
- CE20.- Conocer los principios de manipulación de los ácidos nucleicos, así como las principales técnicas que permiten el estudio de la expresión y función de los genes.
- CE23.- Saber aplicar protocolos experimentales de laboratorio dentro del área de la Bioquímica y Biología Molecular

#### PROGRAMA DE ACTIVIDADES

SEMESTRE 6º	Tema	ACTIVIDADES PRESENCIALES				ACTIVIDADES NO PRESENCIALES	
		Teoría (horas)	Prácticas (horas)	Exámenes (horas)	Contenidos	Estudio de teoría (horas)	Preparación y Estudio de prácticas(horas)
SEMANA 1 13-17 febrero	1	2			Presentación de la asignatura. -Métodos de aislamiento de ácidos nucleicos y cuantificación.	4	4 (preparación prác. 1)
SEMANA 2 20-24 febrero	2	1	8	1	-Interpretación de los parámetros de la centrifugación. Pautas para el diseño experimental de fraccionamiento subcelular. <b>- Aislamiento de DNA cromosómico. Cuantificación y grado de pureza de DNA</b>	3	5 (preparación prác. 1) 3
SEMANA 3 27 feb-3 marzo	5	1	6	1	-Pautas para el diseño experimental, subclonaje. - Entrega resultados obtenidos aislamiento a. nucleicos y estudio crítico de metodologías de aislamiento de DNA y RNA de diferentes orígenes (en clase de teoría) <b>-Fraccionamiento subcelular y determinación de enzimas marcadoras.</b>	2	6 (preparación resultados pract.1, 2) 3
SEMANA 4 6-10 marzo	3	1			-Enzimoimmunoensayo e inmunofluorescencia -Trabajo sobre los resultados experimentales del fraccionamiento celular.	2	6 (preparación prác.2, 5) 3
SEMANA 5 13-17 marzo	4	2	5(taller)	1	-Componentes de la cadena de transporte electrónico, su ordenación según los potenciales redox. Significado y cálculo de la razón P/O. - Cuantificación de parámetros bioenergéticos. Electrodo de oxígeno tipo Clark. <b>- Estudio de protocolos experimentales para ELISA, inmunofluorescencia y otras técnicas de</b>	3	6 (preparación prác.4, 5) 3



					<b>biología Molecular en la que se emplean anticuerpos.</b>		
SEMANA 6 20-24 marzo			<b>6</b>		<b>Estudio de la respiración en mitocondrias aisladas mediante electrodo de oxígeno.</b>	3	<b>6</b> (preparación prác. 5) 2
SEMANA 7 27-31 marzo	5	1 día 28, 11h	<b>17/G-1</b>	1/G 1	- Aislamiento DNA plasmídico ..... - Aislamiento de DNA plasmídico. Digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa. Preparación de células competentes. Ligado del vector plasmídico con el inserto de DNA. Transformación de bacterias <i>E. coli</i> . Análisis de las bacterias recombinantes. - Análisis de distintos protocolos comerciales (G-1)	3	<b>2</b> (preparación problemas pract. 4) 6/ G-1
SEMANA 8 3-7 abril			<b>17/G-2</b>	1/G 2	- Aislamiento de DNA plasmídico. Digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa. Preparación de células competentes. Ligado del vector plasmídico con el inserto de DNA. Transformación de bacterias <i>E. coli</i> . Análisis de las bacterias recombinantes. -Análisis de distintos protocolos comerciales (G-2)	3	<b>2</b> (preparación problemas pract. 4) 6/ G-2
SEMANA 9 18-21 abril			<b>17/G-3</b>	1/G-3	-Presentación y discusión de reesultados del estudio de la respiración mitocondrial (en la clase de teoría) - Aislamiento de DNA plasmídico. Digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa. Preparación de células competentes. Ligado del vector plasmídico con el inserto de DNA. Transformación de bacterias <i>E. coli</i> . Análisis de las bacterias recombinantes. -Análisis de distintos protocolos comerciales (G-3)	1	<b>6/ G-3</b>
SEMANA 10 24-28 abril		1			Dudas	4	<b>3</b>
SEMANA 11 2-5 mayo				3h	<b>Prueba contenido teórico práctico (4 mayo, 11:30-14:30h)</b>	2	
SEMANA 12 8-12 mayo							
julio					<b>Examen (extraordinario Piloto ) (13 julio, mañana)</b>		
<b>Total hs</b>		<b>9</b>	<b>43</b>	<b>8</b>		<b>30</b>	<b>60</b>

## EVALUACIÓN

### • Evaluación ordinaria:

La asistencia a clase, seminarios y prácticas es obligatoria al menos en un 80% para poder ser evaluado.

- Evaluación de los contenidos teóricos y prácticos (competencias CG2, CB2 y 3). **65 %**.
- Resolución de problemas y casos prácticos (competencia CT6): **5 %**. Se evalúa la capacidad de resolución de cuestiones y problemas en el ámbito de la bioenergética.



c) Asistencia y comportamiento en el laboratorio, trabajos realizados (protocolos diseñados, resultados obtenidos y discusión) **30 %**. Se evalúan las competencias CB3 y 5, CT1-6, CE23, 26 y 27.

• **Evaluación extraordinaria:**

Para aquellos estudiantes que no hayan superado la asignatura en la convocatoria ordinaria existirá una evaluación de todos los contenidos de la asignatura, con un valor del 70% de la nota final. Se mantendrá la calificación obtenida en la convocatoria ordinaria para el apartado c.

**INFORMACIÓN ADICIONAL**

