



Programa sinóptico de la unidad curricular: **TÉCNICAS ANALÍTICAS**

Unidad Curricular: <b>Técnicas Analíticas</b>					Unidad Responsable: Dpto. de Biología				
Datos Unidad Curricular		Modalidad			Tipo Dedicación		Dedicación Total Unidad Curricular		
Código	Semestre	T	P	L	HTSP	HTSNP	CA	Total Horas por Semana (HS=CA X 3)	Total Horas por Semestre (HS X 16)
181414	8	2	0	6	2	6	4	12	192
Prelaciones: Haber aprobado el séptimo semestre, es decir 117 CA									

HSTP: Horas semanales de trabajo que se realiza en el aula o laboratorio y requiere preparación y trabajo adicional

HTSNP: Horas semanales que se realizan en el aula o laboratorio y no requieren de preparación o trabajo adicional

CA: créditos académicos

**Justificación**

El curso de técnicas analíticas busca dar a conocer al estudiante las diversas técnicas que se emplean en el laboratorio así como los principios en los que se fundamentan, haciendo énfasis en los aspectos físico-químicos de los mismos. El curso está planteado en el orden lógico de cómo debería proceder experimentalmente el investigador a la hora de caracterizar una proteína presente en un organismo determinado. La unidad curricular permite al estudiante de la Licenciatura de Biología integrar y aplicar los conocimientos teórico-prácticos adquiridos en la unidad curricular a problemas experimentales reales.

**Requerimiento**

El estudiante de la Licenciatura en Biología que opte por esta electiva, debe tener conocimientos previos de Bioquímica, Genética y Biología Celular, como requisito leer Inglés técnico científico para la interpretación de la bibliografía.

**Objetivo General**

Esta unidad curricular tiene como objetivo fundamental, la introducción de conceptos básicos de diversas técnicas empleadas en el estudio de proteínas, ácidos nucleicos y metabolitos.

**Objetivos específicos**

- Impartir un conocimiento más o menos profundo de los términos y conceptos de diversas técnicas básicas y de mayor complejidad empleadas en un laboratorio.
- Enseñarle a usar algunas de las herramientas necesarias para la obtención de información de muestras biológicas.
- Obligar al estudiante a razonar posibles estrategias experimentales a ser empleadas a fin de resolver algún problema del laboratorio.



## **Contenido**

### **UNIDAD I: Métodos de ruptura celular.**

**Tema 1: Métodos de ruptura mecánicos.** Manejo de principios físicos de: Shock osmótico, sonicación, congelamiento-descongelamiento, prensa francesa, sustancias abrasivas.

**Tema 2: Métodos de ruptura Enzimáticas.** Reacciones catalizadas por enzimas: lisozima, glucanasa, mananasa.

**Tema 3: Métodos de ruptura Químicos.** Principio físico de detergentes iónicos y no iónicos. Ejemplos de experimentos donde son empleados estos detergentes.

### **UNIDAD II: Centrifugación.**

**Tema 4: Principios físicos de la centrifugación.** Descripción matemática de los principios de centrifugación, tipos de centrifugas y rotores.

**Tema 5: Centrifugación Diferencial.** Principio de la centrifugación diferencial, ejemplos de experimentos donde se emplean la centrifugación diferencial para determinar la ubicación subcelular de proteínas.

**Tema 6: Centrifugación Zonal.** Principio de la centrifugación Zonal, ejemplos de experimentos donde se emplean la centrifugación zonal para determinar la ubicación subcelular de proteínas.

**Tema 7: Centrifugación Isopícnica.** Principio de la centrifugación isopícnica, ejemplos de experimentos donde se emplean la centrifugación isopícnica para determinar la ubicación subcelular de proteínas. Fabricación de gradientes continuos y discontinuos.

### **UNIDAD III: Espectrofotometría.**

**Tema 8: Principios físicos de la espectrofotometría.** Manejo de conceptos como: espectro electromagnético, longitud de onda, frecuencia, desarrollo de la ecuación de Lambert-Beer y su significado. Espectrofotometría de UV/visible. Tipos de espectrofotómetros.

**Tema 9: Determinación de actividades enzimáticas.** Determinaciones enzimáticas por métodos no colorimétrico y colorimétrico. Determinación de actividades enzimáticas continuas y discontinuas. Determinaciones de actividades enzimáticas acopladas.

**Tema 10: Cuantificación de proteínas y ADN.** Métodos no colorimétrico para la determinación de concentración de proteínas y Ácidos nucleicos. Métodos colorimétrico para la determinación de proteínas. Método de Biuret, Método de Lowry, Método de Bradford, Método del Ácido Biscinconinico.

### **UNIDAD IV: Cromatografía**

**Tema 11: Principios físicos de la cromatografía.** Manejo de conceptos como: fase móvil, fase estacionaria, coeficiente de partición, Volumen muerto, volumen de elución, capacidad, resolución, efectividad, platos teóricos.

**Tema 12: Cromatografía de exclusión molecular.** Principio físico de la cromatografía de exclusión molecular. Radio de Stoke. Tipos de resina. Uso de la cromatografía de exclusión molecular para la purificación de proteínas, determinación de peso molecular,



determinación de estados de asociación de una proteína, desalinización de muestras, determinación de la constante de disociación de ligandos.

**Tema 13: Cromatografía de intercambio iónico.** Principio físico de la cromatografía de intercambio iónico. Tipos de intercambiadores catiónicos y aniónicos. Conceptos de intercambiadores fuertes y débiles. Principios de elución. Gradientes continuos. Lineales, cóncavos, convexos. Gradientes discontinuos.

**Tema 14: Cromatografía de interacción hidrofóbica.** Principio físico de la cromatografía de interacción hidrofóbica. Tipos de resinas hidrofóbicas. Principios de elución. Gradientes lineales inversos.

**Tema 15: Cromatografía afinidad.** Principio físico de la cromatografía de afinidad. Tipos de ligandos y sus usos. Tipos de brazos. Principios de elución. Gradientes lineales.

**Tema 16: Cromatografía de gases.** Principio físico de la cromatografía de gases. Fase móvil y fase estacionaria, columnas sólidas, WCOT y SCOT. Solventes empleados. Sistemas de detección de conductividad térmica y Celda de ionización de flama. Uso de la cromatografía de gases para la separación e identificación de sustancias biológicas.

#### **UNIDAD V: Electroforesis.**

**Tema 17: Principios físicos de la electroforesis.** Principio físico-químico de la separación de proteínas en base a su masa en un campo eléctrico. Geles continuos y discontinuos.

**TEMA 18: Geles en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).** Principio físico-químico de la separación de proteínas desnaturizadas en base a su masa. Modelo químico de polimerización de acrilamida-bisacrilamida. Importancia del gel concentrador, gel de resolución, buffer de carga. Visualización de proteínas con Azul de Coomassie, Amido Black, tinción con plata.

**Tema 19: Geles nativos.** Principio físico-químico de la separación de proteínas nativas. Técnicas de visualización. Sales de tetrazolium: cloruro de trifenil tetrazolium, cloruro de iodo-nitrotrifenil tetrazolium, TMB.

**Tema 20: Zimografías.**

#### **UNIDAD VI: Técnicas de Inmunoensayos.**

**Tema 21: Western blot.** Transferencia de proteínas, revelados inespecíficos (rojo Ponceau, Amido Black), revelados específicos (uso de anticuerpos monoclonales y policlonales), peroxidasa y fosfatasa alcalinas.

**Tema 22: Otras técnicas de transferencia de proteínas a membranas.** Principio y utilidad de Ligand-blotting, dot blot, Slot-blot, cromatografía de flujo lateral, MABA.

**Tema 23: ELISA.** Dispositivos empleados en ELISA. Tipos de ensayos ELISA: ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA sándwich. Revelado: peroxidasa de rábano, TMB, DAB, BCIP, OPD, etc.

**Tema 24: Southern blot, Northern blot.** Transferencia de ácidos nucleicos, soportes, métodos de visualización.



**UNIDAD VII: Determinación de estructura de proteínas.**

**Tema 25: Secuenciamiento de proteínas.** Uso de Ninhidrina, Fenil isotiocianato, Cloruro de Dansyl, Cloruro de Dabsyl, Isotiocianato de fluoresceína (Método de Edman), Digestión con endopeptidasas y exopeptidasas.

Espectrometría de masa: Principios físico. Fuente de ionización (Ionización-desorción asistida por laser, Electrospray, Bombardeo rápido de iones). Analizadores de masa (Cuadrupolo, Tiempo de vuelo, orbitrap). Espectrometría de masa en tandem. Detector. Procesamiento de datos, espectros de masa.

**Tema 26: Determinación de estructura de proteínas.** Resonancia Magnética Nuclear. Principios físicos. Spin nuclear. Acoplamiento escalar y bipolar. RMN unidimensional. RMN en dos dimensiones: Homonucleares (COSY, TOCSY, NOESY), Heteronucleares (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation, Heteronuclear Simple Quantum Correlation, Heteronuclear Multiple Bond Correlation).

**UNIDAD VIII: Cinética enzimática.**

**Tema 27: Conceptos básico de cinética enzimática.** Desarrollo de ecuaciones de velocidad considerando la hipótesis del equilibrio rápido (Henri-Michaelis-Menten) y el estado estacionario (Briggs-Haldane). Definición de  $E_S$ ,  $K_S$ ,  $K_M$ ,  $K_p$ ,  $V_{max}$ . Sistemas de graficación: Lineweaver-burk, Eadie-Hoftee, Hanes-Wolf.

**Tema 28: Cinética enzimática en presencia de inhibidores.** Desarrollo de ecuaciones de velocidad en presencia de inhibidores competitivos, no competitivos, mixtos, incompetitivos. Determinación de  $K_I$  por Lineweaver-burk.

**Tema 29: Cinética enzimática para dos sustratos.** Desarrollo de ecuaciones de velocidad para dos sustratos. Mecanismo secuencial ordenado, secuencial al azar y ping-pong.

**UNIDAD IX: Proteómica**

**Tema 30: Isoelectroenfoque.** Principio físico-químico, empleo de anfolitos, Electroforesis bidimensional.

**Tema 31: Espectrometría de masa.** Fundamentos de MALDI, Electrospray. Mapas peptídico. Artefactos más comunes (Carbamilación, desaminación, oligomerización, desulfuración).

**Tema 32: Identificación de péptidos.** Huella digital de la masa de los péptidos, empleo de programas ALDENTE, MasCot, Protein Prospector, Pep Ident.

**UNIDAD X: Array.**

**Tema 33: Macro array y microarray.** Principios físico-químicos.

**Tema 34: Tipos de microarray.** ADN, proteínas y tejidos. Soportes. Tecnologías de inmovilización de sondas. Métodos de detección de hibridación: Espectrometría de masa, Resonancia de plasmón, detección cromogénica, detección quimioluminiscente, detección fluorescente, detección por desintegración radiactiva. Otros formatos: CDs de centrifugación, Microcanales, 3D sobre superficie de silicio.

**UNIDAD XI: Interacciones proteína-proteína.**



**Tema 35: Interacciones homólogas y heterólogas.** Interacciones no covalentes, interacciones electrostáticas, Interacciones de Van der Waals, Interacciones hidrofóbicas (puntos calientes).

**Tema 36: Métodos de detección de interacciones proteína-proteína.** Reactivos bifuncionales de entrecruzamiento. Inmunoprecipitación, Doble híbrido, cromatografía de afinidad, Ligand blot, Biosensores (resonancia del plasmón).

#### **UNIDAD XII: Técnicas de biología Molecular.**

**Tema 37: Secuenciación de ADN.** Métodos clásicos de secuenciación: Método químico de Maxam y Gilbert. Método enzimático de Sanger. Secuenciación automática empleando el método enzimático: Secuenciación con cebadores fluorescentes. Secuenciación con terminadores fluorescentes.

**Tema 38: PCR.** Fundamento de la técnica. Reactivos, ciclos de amplificación.

**Tema 39: Vectores.** Características generales. Plásmidos, Fago lambda, cosmidos, M13.

**Tema 40: Librería de expresión y genómica.** Características generales.

#### **Sesiones Prácticas**

Las sesiones de prácticas contemplan el estudio de *T. cruzi* como modelo, en este sentido el estudiante se familiarizará con las siguientes técnicas:

- Ruptura con Carburo de silicio y por sonicación.
- Centrifugación diferencial e isopícnica.
- Permeabilización con digitonina.
- Determinación de actividades enzimáticas (Hexokinasa, Malato deshidrogenasa, Fosfoglucoasa isomerasa).
- Determinación de proteínas por Lowry.
- Purificación de glucokinasa recombinante por cromatografía de afinidad.
- Caracterización cinética de glucokinasa de *T. cruzi* (Determinación de KM para glucosa y ATP, Vmax.).
- Electroforesis en geles de poliacrilamida.
- Western blott.
- ELISA
- MABA.

#### **Estrategias metodológicas**

Se desarrollará en el dictado de la unidad curricular usando diferentes estrategias metodológicas, entre las que se proponen aplicación del: Modelo deductivo de enseñanza directa. Modelo inductivo y Modelo deductivo (amplio interactivo). El estudiante recibirá a través de clases magistrales los conceptos que le permitirán entender los diferentes objetos de estudios y analizar artículos científicos del tema, estos análisis serán expuestos en seminarios.



### **Estrategias de evaluación**

1. Exámenes escritos 75% (4 exámenes 25% c/u, se realizará un examen por cada 3 unidades).

2. Seminarios 25% (1 por cada estudiante)

Lo cual constituye el 60% de la nota.

La evaluación del laboratorio será continua y se tomara en cuenta: desenvolvimiento en el laboratorio, iniciativa, manejo de conceptos.

Al final del mismo se evaluará un informe de todo lo realizado durante las sesiones de práctica. Lo cual constituye el 40% de la nota final.

### **Bibliografía**

Centrifugation: a practical approach. David Rickwood. IRL Press, 1984

Electrophoresis in Practice, 4th, Revised and Updated Edition. Reiner Westermeier. 2005, Wiley-Blackwell.

Methods in molecular biology: microarrays. volume 1: synthesis methods. Second edition edited by Jang b. Rampil. 2007 Humana Press Inc.

Molecular Cell Biology 4th ed., Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E., New York: W. H. Freeman & Co.

Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. Irwin H. Segel. Wiley Classics Library. 1993

Protein Purification: Principles and Practice. Robert K. Scopes. Springer Advanced Texts in Chemistry. 1993.