

Guía Docente

DATOS DE IDENTIFICACIÓN

Titulación:	Experto en Metodología en Investigación Biotecnológica (Título Propio asociado a Biotecnología)		
Facultad/Escuela:	Ciencias Biosanitarias		
Asignatura:	Técnicas Instrumentales Avanzadas		
Tipo:	Propia Obligatoria	Créditos ECTS:	4
Curso:	3	Código:	20114
Periodo docente:	Quinto semestre		
Tipo de enseñanza:	Presencial		
Idioma:	Castellano		
Total de horas de dedicación del alumno:	100		

Equipo Docente	Correo Electrónico
Ana Bonnin Bioslada Armando Albert de la Cruz	a.bonnin@ufv.es

DESCRIPCIÓN DE LA ASIGNATURA

Esta asignatura obligatoria que se imparte en tercer curso del Título propio de Experto en Metodología en Investigación Biotecnológica pretende formar a los alumnos en cuatro técnicas avanzadas de uso común en el ámbito biotecnológico de gran utilidad para el desarrollo de sus trabajos de investigación o en el ámbito i+D: Fluorescencia, Microscopía electrónica, Difracción de RayosX, Resonancia Magnética Nuclear

Se pretende que el alumno adquiera los conocimientos para llevar a cabo el estudio del comportamiento y caracterización de moléculas biológicas utilizando diferentes técnicas. Tiene un enfoque teórico-práctico incorporando casos prácticos y ejemplos reales.

Técnicas Instrumentales Avanzadas se constituye en un complemento para el futuro profesional dedicado a la biotecnología que ya ha recibido una formación en técnicas básicas (ultravioleta y otras técnicas espectroscópicas).

OBJETIVO

Comprender los fundamentos teóricos y la aplicabilidad de la técnicas instrumentales basadas en fenómenos de fluorescencia, en las técnicas de difracción de Rayos X, de microscopía electrónica y de resonancia magnética nuclear en la resolución de problemas clave en la práctica diaria de la bioquímica y biotecnología.

Los fines específicos de la asignatura son:

Comprender los fundamentos teóricos y la aplicabilidad de la técnicas instrumentales basadas en fenómenos de fluorescencia, en las técnicas de difracción de Rayos X, de microscopía electrónica y de resonancia magnética nuclear en la resolución de problemas clave en la práctica diaria de la bioquímica y biotecnología

Interpretar la información que pueden proporcionar distintas técnicas basadas en fenómenos de fluorescencia sobre la estructura e interacción de moléculas biológicas tanto en sistemas in vitro como en células vivas.

Conocer los principios básicos de las medidas de fluorescencia en estado estacionario y con resolución temporal.

Conocer los fundamentos básicos de la instrumentación utilizada para dichas mediciones.

Conocer el alcance y las limitaciones que la utilización de las técnicas fluorescentes tienen para estudiar el comportamiento y la estructura de moléculas biológicas.

Que el alumno conozca la aplicabilidad de la microscopía electrónica y el análisis digital de imágenes en la investigación básica y aplicada.

Entender los fundamentos del microscopio electrónico.

Conocer las posibilidades y limitaciones de la microscopía electrónica tridimensional en el área de la biología estructural.

Comprender los fundamentos de la cristalografía como técnica de resolución estructural de macromoléculas.

Comprender los conceptos de Desplazamiento químico, Constante de acoplamiento y efecto nuclear Overhauser.

Conocer la técnica de pulsos y la transformada de Fourier.

Toma de contacto con programas de procesado y análisis de espectros de RMN.

Entender los protocolos de asignación de espectros bidimensionales.

Conocer los campos de aplicación de la RMN desde la química a la medicina.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

Matemáticas, Química general, química orgánica, bioquímica, física, técnicas instrumentales básicas.

CONTENIDOS

UNIDAD DIDÁCTICA I - FLUORESCENCIA

TEMA 1. Repaso de conceptos básicos de fluorescencia. Excitación mono y multi-fotónica. Espectroscopia de fluorescencia en estado estacionario y con resolución temporal de picosegundos: medidas en el dominio de tiempos y de frecuencias. Instrumentación

TEMA 2. Anisotropía de fluorescencia. Estado estacionario y resolución temporal. Ejemplos de aplicación

TEMA 3. Transferencia de energía resonante FRET y BRET. Estado estacionario y resolución temporal. Ejemplos de aplicación

TEMA 4. Métodos de Microespectroscopía de Fluorescencia. Aplicación a estudios de moléculas individuales,

biomateriales, células vivas y tejidos

- Microscopía de fluorescencia de campo amplio, Epifluorescencia, Microscopía confocal de fluorescencia, Microscopía de fluorescencia multifotónica, Microscopía de fluorescencia de reflexión total interna TIRF, Microscopía de generación de segundo armónico SHG. Instrumentación
- Recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo FRAP
- Espectroscopía de correlación de fluorescencia FCS
- Imágenes de tiempos de vida media FLIM. Análisis de fasores
- Imágenes FRET-FLIM. Análisis de fasores
- Imágenes de anisotropía de fluorescencia y Polarización generalizada GP

UNIDAD DIDÁCTICA II – MICROSCOPIA ELECTRÓNICA:

TEMA 1. Microscopía Electrónica. Radiación electromagnética y difracción. Resolución. Lentes electromagnéticas. Diseño del microscopio electrónico.

TEMA 2. Preparación de muestras biológicas para su análisis por microscopía electrónica de transmisión. Contraste. Tinción negativa. Sombreado metálico. Inclusión y secciones. Inmunodetección en microscopía electrónica.

TEMA 3. Crio-microscopía electrónica. Vitrificación de muestras biológicas. Contrastes de fase y de amplitud. Función de transferencia del contraste (CTF). Dosis mínima de electrones.

TEMA 4. Conceptos y bases de la Transformada de Fourier. Digitalización de micrografías. El teorema de la sección central.

TEMA 5. Análisis digital de imágenes I. Análisis bidimensional y Reconstrucción Tridimensional de cristales bidimensionales, estructuras con simetría helicoidal e icosaédrica, y estructuras asimétricas. Tomografía electrónica.

TEMA 6. Análisis digital de imágenes II. Estudios dinámicos de máquinas macromoleculares. Combinación de mapas atómicos y de crio-microscopía electrónica. Análisis de elementos de estructura secundaria. Integración de metodologías. Líneas futuras.

UNIDAD DIDÁCTICA III - DIFRACCIÓN DE RAYOS X

TEMA 1. Fundamentos de la difracción de rayos-x. Introducción a la cristalografía como técnica de resolución estructural y concepto de estructura. Concepto de cristal y de simetría. Difracción de rayos-x.

TEMA 2. Resolución cristalográfica de macromoléculas biológicas. Cristalización de macromoléculas. Toma de datos de difracción. Resolución estructural. Obtención de la estructura atómica de las macromoléculas.

TEMA 3. Interpretación de la estructura obtenida por difracción de rayos-x. Información contenida en el modelo. Formas de representación.

TEMA 4. Aplicaciones de la técnica a sistemas de interés biotecnológico. Ingeniería de enzimas. Diseño de fármacos. Fundamentos para la generación de plantas genéticamente modificadas.

UNIDAD DIDÁCTICA IV – RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

TEMA 1. Introducción: Desarrollo de la RMN: desde el núcleo atómico a la imagen de cuerpo entero

TEMA 2. Fundamentos físicos. Espín Nuclear y magnetización. Desplazamientos Químicos. Acoplamiento de espines nucleares. Relajación y efecto nuclear Overhauser. Intercambio químico

TEMA 3. Obtención de Espectros: La técnica de pulsos. El pulso. La FID “ Free Induction Decay” (decaimiento libre de la inducción). La transformada de Fourier

TEMA 4. Resonancia Magnética en medio líquido. Espectroscopía multidimensional. Espectros 1D, monodimensionales. Espectros 2D, bidimensionales. Espectros 3D y superiores

TEMA 5. Resonancia Magnética en estado sólido. El ángulo mágico

TEMA 6. Resonancia Magnética de imagen. Gradientes de campo

TEMA 7. Aplicaciones de la RMN. Química Orgánica: Elucidación estructural de compuestos orgánicos. Biología estructural: Determinación de la estructura y dinámica de las macromoléculas biológicas. Bioquímica: Estudios cinéticos y metabólicos. Química Médica: Cribado (“screening”) de colecciones de compuestos. Medicina: Diagnóstico por imagen

ACTIVIDADES FORMATIVAS

Clases teóricas impartidas por el profesor para el estudio y consolidación de conocimientos necesarios para el entendimiento y correcta aplicación de las técnicas estudiadas.

- Cada tema teórico vendrá acompañado de las correspondientes sesiones de resolución de supuestos prácticos, de forma individual o en grupos.

- Tutorías individuales y grupales. Mediante las tutorías el profesor, a requerimiento del alumno y en el horario establecido para ello, resolverá dudas o discutirá las cuestiones que le plantee el alumno, con el fin de orientarle en el aprendizaje de la asignatura

DISTRIBUCIÓN DE LOS TIEMPOS DE TRABAJO

ACTIVIDAD PRESENCIAL	TRABAJO AUTÓNOMO/ACTIVIDAD NO PRESENCIAL
48 horas	52 horas
Clases presenciales 37h Presentación de problemas y casos prácticos en grupo 3h Tutorías 3h Exámenes 5h	Estudio de los contenidos teóricos 33h Preparación de casos prácticos 8h Preparación de tutorías 1h Preparación de exámenes 10h

COMPETENCIAS

Comprender los fundamentos teóricos y la aplicabilidad de las técnicas instrumentales basadas en fenómenos de fluorescencia, en las técnicas de difracción de Rayos X, de microscopía electrónica y de resonancia magnética nuclear en la resolución de problemas clave en la práctica diaria de la bioquímica y biotecnología.

Conocer la información que pueden proporcionar distintas técnicas basadas en fenómenos de fluorescencia sobre la estructura e interacción de moléculas biológicas tanto en sistemas in vitro como en células vivas

Conocer los principios básicos de las medidas de fluorescencia en estado estacionario y con resolución temporal. Conocer los fundamentos básicos de la instrumentación utilizada para dichas mediciones.

Conocer el alcance y las limitaciones que la utilización de las técnicas fluorescentes tienen para estudiar el comportamiento y la estructura de moléculas biológicas.

Conocer los fundamentos del microscopio electrónico y comprender la aplicabilidad de la microscopía electrónica y el análisis digital de imágenes en la investigación básica y aplicada.

Conocer las posibilidades y limitaciones de la microscopía electrónica tridimensional en el área de la biología estructural.

Comprender los fundamentos de la cristalografía como técnica de resolución estructural de macromoléculas.

Saber interpretar la información de interés biotecnológico contenida en la estructura de proteínas determinada por técnicas cristalográficas.

Comprender los conceptos de Desplazamiento químico, Constante de acoplamiento y efecto nuclear Overhauser.
Conocer la técnica de pulsos y la transformada de Fourier. Aprender a interpretar espectros de RMN de protón monodimensionales y conocer los campos de aplicación de la RMN desde la química a la medicina.

RESULTADOS DE APRENDIZAJE

Comprende los principios básicos de las medidas de fluorescencia en estado estacionario y con resolución temporal.

Interpreta distintas técnicas basadas en fenómenos de fluorescencia aplicadas al estudio de la estructura e interacción de moléculas biológicas tanto en sistemas in vitro como en células vivas.

Conoce los fundamentos básicos de la instrumentación utilizada para dichas mediciones.

Explica correctamente el alcance y las limitaciones que la utilización de las técnicas fluorescentes tienen para estudiar el comportamiento y la estructura de moléculas biológicas.

Conoce la aplicabilidad de la microscopía electrónica en el estudio de los sistemas y moléculas biológicas

Conoce la aplicabilidad del análisis digital de imágenes en la investigación básica y aplicada.

Comprende las posibilidades y limitaciones de la microscopía electrónica tridimensional en el área de la biología estructural.

Interpretar la información de interés biotecnológico contenida en la estructura de proteínas determinada por técnicas cristalográficas.

Interpreta espectros de RMN de protón monodimensionales.

Maneja programas básicos de procesamiento y análisis de espectros de RMN.

SISTEMA DE EVALUACIÓN DEL APRENDIZAJE

Cada módulo supondrá un 25% de la calificación.
Realización de las propuestas de ejercicios y casos prácticos 10%
Examen final 90% .

Al finalizar cada bloque se podrá realizar un examen teórico parcial que eliminará materia con una calificación a criterio de cada profesor participante.

El examen final incluirá la cuatro unidades didácticas. Será necesario obtener una calificación mínima de 4 en las unidades didácticas de forma independiente para poder hacer la media de las calificaciones.

Si la calificación de alguno de los módulos es inferior a 4 no se podrá realizar la media quedando ese módulo suspenso hasta septiembre. Se guardará la calificación de las unidades aprobadas en febrero únicamente hasta septiembre del mismo curso académico.

BIBLIOGRAFÍA Y OTROS RECURSOS

Básica

<http://www.biophysics.org/AboutUs/Committees/Education/EducationalResources/tabid/471/Default.aspx>

Principles of Fluorescence Spectroscopy (second edition) . Joseph Lakowicz Kluwer Academic/ Plenum Publishers. 1999. ISBN 0-306-46093-9

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>

Introduction to Fluorescence. David M. Jameson. CRC Press

Principles of Fluorescence Spectroscopy. JR Lakowicz. Springer

Electron Microscopy. Principles and techniques for biologists. John J. Bozzola & Lonnie D. Russell. Jones and Bartlett Publishers. Boston, 1992. ISBN 0-86720-126-6

Negative staining and cryo-electron microscopy: the thin film techniques. J. Robin Harris. Bios Scientific Publishers, Oxford, 1997 ISBN 1-85996-120-7

Biophysical electron microscopy. Basic concepts and modern techniques. Ed por P.W. Hawkes & U. Valdré. Academic press, San Diego, 1990. ISBN 0-12-333355-5

Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies. Joachim Frank. Oxford University Press, New York 2006. ISBN 0-19-518218-9

k, H. & Luhrmann, R. (2006). Cryo-electron microscopy of spliceosomal components. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 35, 435-457.

Baker, T. S., Olson, N. H., and Fuller, S. D. (1999). Adding the Third Dimension to Virus Life Cycles: Three-Dimensional Reconstruction of Icosahedral Viruses from Cryo-Electron . Micrographs. Microbiol Mol Biol Rev 63, 862-922.

Sali A, Glaeser R, Earnest T, Baumeister W. (2003). From words to literature in structural proteomics. Nature. 422:216-25.

Lucic V, Forster F, Baumeister W. (2005). Structural studies by electron tomography: from cells to molecules. Annu Rev Biochem. 74:833-65.

Chiu W, Baker ML, Jiang W, Dougherty M, Schmid MF. (2005). Electron cryomicroscopy of biological machines at subnanometer resolution. Structure 13(3):363-72.

Llorca O. (2005). Introduction to 3D reconstruction of macromolecules using single particle electron microscopy. Acta Pharmacol Sin. 26(10):1153-64.

Baumeister W, Steven AC. (2000). Macromolecular electron microscopy in the era of structural genomics. Trends Biochem Sci. 25(12):624-31.

Outline of Crystallography for Biologists. David Blow. Oxford University press. ISBN 0 19851051 9.

Introduction to protein structure. Carl Branden and John Tooze. Garland publishing Inc. ISBN 0 8153 2305 0

RMN para químicos orgánicos. Juan José Giménez Martínez y Juan Miguel Expósito López. Universidad de Almería, Servicio de Publicaciones ISBN: 84-8240-124-6

Química Física. (Capítulo 18: Espectroscopia 3 : Resonancia magnética.) P. W. Atkins. Barcelona 1999 : Ediciones Omega, S.A. ISBN: 84-282-1181-7

Modern NMR Techniques for Chemistry Research, A . E. Derome, 1989. Pergamon Press, ISBN: 0-02-946167-7

Métodos espectroscópicos en química orgánica, (Capítulo 3) M. Hesse, H. Meier y B. Zeech, Madrid 2005. Editorial Síntesis SA, ISBN: 84-7738-522-X

Essential NMR: For Scientists and Engineers B. Blumich Berlin 2005. Springer Verlag , ISBN 3-540-23605-8

Estructura de Proteínas (Capítulos 12 y 13) C. Gomez-Moreno y J. Sancho, Barcelona 2003. Editorial Ariel ISBN: 84-344-8061-6

Cursos NMR en la web: The Basics of NMR. Joseph P. Hornak, Ph.D <http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/>

Cursos NMR en la web: The Basics of MRI. Joseph P. Hornak, Ph.D <http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/>

Cursos NMR en la web: NMR Lectures. Guillermo Moyna Ph D http://tonga.usip.edu/gmoyna/NMR_lectures/NMR_lectures.html

Página web relacionada con Espectroscopia de RMN <http://www.spectroscopynow.com/coi/cda/home.cda?chId=5>