

Programa



CURSO : LABORATORIO BIOQUÍMICA II: GENÉTICA MOLECULAR
TRADUCCIÓN : BIOCHEMISTRY LABORATORY II: MOLECULAR GENETICS
SIGLA : BIO266E
CRÉDITOS : 10
MÓDULOS : 06
CARÁCTER : MÍNIMO
DISCIPLINA : BIOLOGÍA MEDICINA

I. DESCRIPCIÓN

Curso experimental orientado al desarrollo y manejo básico de las principales técnicas utilizadas en un laboratorio de bioquímica.

II. OBJETIVOS

1. Desarrollar capacidad crítica que permita analizar datos de las publicaciones.
2. Diseñar experimentos, resolver problemas y evaluar resultados.
3. Desarrollar rigurosidad metodológica.
4. Desarrollar capacidad de síntesis en el lenguaje.
5. Informar resultados en forma sucinta y precisa.

III. CONTENIDOS

1. Genotecas: Titulación de fagos en una genoteca de Cdna.
 - 1.1. Preparación de placas de cultivo.
 - 1.2. Manipulación de los fagos.
 - 1.3. Determinación de unidades formadoras de placa.
2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
 - 2.1. Amplificación de fragmentos de DNA con secuencias adyacentes conocidas.
 - 2.2. Determinación de la dirección de un inserto en un vector.
3. Transformación de bacterias competentes.
 - 3.1. Ligación de fragmentos en un vector de clonamiento.
 - 3.2. Incubación de las células competentes con DNA plasmidial.
 - 3.3. Plaqueo para seleccionar las bacterias que incorporaron el plásmido.
4. Purificación de DNA plasmidial bacteriano.
 - 4.1. Ruptura de las bacterias.
 - 4.2. Eliminación del DNA cromosomal.
 - 4.3. Eliminación de las proteínas.
 - 4.4. Concentración del DNA plasmidial.
 - 4.5. Análisis de su integridad por electroforesis en gel de agarosa.
5. Purificación de DNA cromosomal eucariótico.
 - 5.1. Ruptura de la fuente de DNA cromosomal.
 - 5.2. Eliminación de proteínas y DNA plasmidial.
 - 5.3. Concentración del DNA cromosomal purificado.

- 5.4. Análisis de su integridad por electroforesis en gel de agarosa.
- 5.5. Cuantificación de la cantidad de DNA cromosomal obtenido.

6. Digestión de DNA plasmidial con endonucleasas de restricción.
 - 6.1. Incubación del DNA con enzimas de restricción.
 - 6.2. Electroforesis de agarosa de los productos de digestión.
 - 6.3. Tinción con bromuro de etidio.
 - 6.4. Realización de mapas de restricción para cada enzima.

7. Digestión de DNA cromosomal con endonucleasas de restricción.
 - 7.1. Electroforesis en geles de agarosa.
 - 7.2. Separación de fragmentos de DNA.
 - 7.3. Cuantificación del fragmento
 - 7.4. Determinación del peso molecular de fragmentos de DNA.

8. Western blot.
 - 8.1. Fabricación de geles de poliacrilamida para proteínas.
 - 8.2. Polimerización del Gel concentrador.
 - 8.3. Polimerización del Gel de resolución.
 - 8.4. Tinción con Azul de Coomassie.
 - 8.5. Transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa.
 - 8.6. Bloqueo de la membrana.
 - 8.7. Incubación con 1er anticuerpo, lavado.
 - 8.8. Incubación con el segundo anticuerpo.
 - 8.9. Revelado.

9. Caracterización de una enzima.
 - 9.1. Curva de concentración de una enzima.
 - 9.2. Cinética de la actividad enzimática.
 - 9.3. Curva de saturación de sustrato (Michaelis-Menten).
 - 9.4. Curva de dobles recíprocos (Lineweaver-Burk).
 - 9.5. Determinación de velocidad máxima (V_{max}).
 - 9.6. Determinación de constante de Michaelis (K_m).
 - 9.7. Efecto del pH sobre la actividad enzimática.
 - 9.8. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.
 - 9.9. Efecto de un inhibidor competitivo sobre los parámetros K_m y $V_{máx}$ de una enzima.
 - 9.10. Efecto de un inhibidor no competitivo sobre los parámetros K_m y V_{max} de una enzima.

IV. METODOLOGÍA

- Seminarios bibliográficos.
- Desarrollo de experimentos.
- Realización de informes escritos.
- Análisis y discusión de los resultados obtenidos durante cada trabajo práctico.

V. EVALUACIÓN

- 2 Interrogaciones: 50%
- 5 Informes: 25%
 - Introducción: 10%
 - Materiales y Métodos: 10%
 - Resultados: 40%
 - Discusión: 30%

- Bibliografía: 10%
- Controles breves: 15%
- Seminarios bibliográficos: 10%

VI. BIBLIOGRAFÍA

Sambrook, J. Molecular Cloning: a laboratory manual. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Van Pelt-Verkuil, E. Principles and technical aspects of PCR amplification. [Dordrecht], Springer, 2008.

Watson, J. The Double Helix: A Personal Account of the Discovery of the Structure of DNA.

Watson, J. D. Molecular Biology of the gene. 6ª Edición.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS / Septiembre 2012