

ASSIGNATURA: **MÈTODES MOLECULARS PER A L'ESTUDI DELS MICROORGANISMES**

CRÈDITS: 5

COORDINADOR: Dra. Rosa M. Pintó Solé

PROFESSORS: Dr. José M. Nieto y Dra. Rosa M. Pintó Solé

1. OBJECTIUS

L'objectiu global d'aquesta assignatura és donar la base tècnica d'aquelles metodologies emprades en l'estudi molecular dels microorganismes així com la seva aplicació en la detecció de microorganismes. Els objectius específics, doncs, són que l'alumne adquireixi no solament els coneixements d'aquestes tècniques sinó també la destresa necessària per a dur-les a terme. Concretament cursar aquesta assignatura li ha de permetre a l'alumne poder manipular tan àcids nucleics com proteïnes.

2. COMPETÈNCIES

Habilitat en les metodologies moleculars bàsiques en Microbiologia.

Habilitat en les metodologies moleculars per a la identificació dels microorganismes.

Habilitat en les metodologies moleculars per l'estudi dels components cel·lulars dels microorganismes.

Conèixer, entre d'altres, les tècniques de "microarrays"

3. CONTINGUTS

3. 1: Introducció. Extractes cel·lulars. Fraccionament de la cèl·lula microbiana.

Fonaments de la manipulació d'àcids nucleics i proteïnes. Genòmica i proteòmica.

3. 2. Anàlisis d'àcids nucleics. Extracció d'àcids nucleics a partir de cultius de microorganismes. Extracció d'àcids nucleics a partir de mostres naturals. Extracció de DNA procariota: plasmídic i cromosòmic. Extracció de DNA eucariota: cromosòmic i mitocondrial. Extracció de RNA: total i mRNA. Extracció d'àcids nucleics vírics. Quantificació de la concentració d'àcids nucleics. Electroforesi d'àcids nucleics. Electroforesi de camp polsant.

3. 3. Tècniques de detecció d'àcids nucleics. Hibridació d'àcids nucleics. Concepte i

manipulació de l'estringència de la reacció d'hibridació d'àcids nucleics. Disseny de sondes. Concepte de conservació genètica. Localització dels desaparellaments i especificitat i sensibilitat de la hibridació. Hibridació colonial, "Southern blot" i "Northern blot". Marcatge de sondes i lectura de la hibridació.

3. 4. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR). Polimerases termoestables i capacitat correctora. PCR: del disseny estàndard a la optimització. Disseny de primers: especificitat i sensibilitat de la PCR. Amplificació de RNA: RT-PCR. Estandardització de la PCR i la RT-PCR: controls externs afegits i controls interns ("house keeping genes"). Control dels falsos positius: contaminacions. Altres mètodes d'amplificació d'àcids nucleics. Aplicació de la PCR, la RT-PCR i altres al món del diagnòstic microbià. PCR i RT-PCR quantitatives. PCR i RT-PCR a temps real: disseny de primers i sonda, tipus de marcatge de sonda i lectura estandarditzada. Quantificació molecular de microorganismes com a mètode de diagnòstic: relació entre còpia genòmica i unitat infecciosa.

3. 5. Seqüenciació d'àcids nucleics. Tècniques de seqüenciació. Seqüenciació automàtica. Ribotipat. Anàlisi de ARNr 16S. Anàlisi de DNA mitocondrial. Anàlisi de seqüències: bioinformàtica i filogenia. Aplicació de la seqüenciació al diagnòstic microbià.

3. 6. Control de l'expressió gènica a procariotes, eucariotes i virus. Quantificació de l'expressió gènica global: "microarrays". Desenvolupament d'un "array": tipus de suport, tipus de sondes i sistemes de detecció i tractament informàtic de les dades. Quantificació de l'expressió gènica individual: RT-PCR a temps real; assaig de protecció de la RNAsa. Aplicació dels microarrays al diagnòstic microbià. Quantificació de l'expressió gènica *in vivo*: gens reporter.

3. 7. Clonatge de DNA. Vectors plasmídics, vectors vírics. Cromosomes artificials. Clonatge a partir de RNA. Plasmidis i transposons com a eines de manipulació genètica.

3. 8. Anàlisi de proteïnes. Anàlisi electroforètica de proteïnes desnaturalitzades (SDS-PAGE) i natives (PAGE). Electroforesi en dos dimensions. Identificació immunològica de proteïnes: "Western blot" i ELISA. Obtenció d'anticossos específics.

3. 9. Tècniques per a la purificació de proteïnes. Cromatografia d'afinitat i proteïnes híbrides. Aplicació a l'estudi de les interaccions proteïna-proteïna. Estudi de la interacció proteïna-proteïna *in vivo*: el sistema "two-híbrid". Estudi *in vitro* de la interacció proteïna-

àcids nucleics: alteració de la mobilitat electroforètica.

3. 10. Anàlisi de proteïnes. Detecció i estudi *in situ*: immuno-localització cel·lular. Microscòpia de fluorescència confocal. Immunomicroscòpia electrònica. Citometria de flux: anàlisi de poblacions i "cell sorting". Estudi de la interacció proteïna-àcids nucleics: colocalització per tècniques de immunolocalització i hibridació *in situ*.

3. 11. Anàlisi estructural de proteïnes. Estructura primària: seqüenciació. Estructura secundària i terciària: RMN, dicroisme circular, raigs X i crioultramicroscòpia.

3. 12. Anàlisi de lípids, lipopolisacàrids, peptidoglicà i altres molècules cel·lulars diferents dels àcids nucleics i proteïnes.

4. RECURSOS D' APRENTATGE I MÈTODES D'ENSENYAMENT

4.1 Ensenyament presencial: 42 hores

Classes teòriques: 22 hores

Esta previst dur a terme classes de tipus magistral. Material docent relatiu a l'assignatura estarà disponible a dossiers electrònics o plataformes similars. Es reserva alguna classe per a seminaris impartits per professionals especialitzats.

Sessions formatives addicionals:

Es podran dedicar fins a 3 sessions a la lectura i discussió d'articles i altres activitats presencials.

Ensenyament pràctic:

Corresponen a aquesta assignatura 15 hores de pràctiques integrades.

1.- Detecció de microorganismes en mostres amb tècniques moleculars.

2.- Obtenció de proteïnes a partir d'extracte bacterià:

(i) Expressió recombinant del gen codificant

(ii) Detecció i purificació de la proteïna fent servir diferents tècniques analítiques.

4.2 Treball no presencial: 83 hores

Tasques a desenvolupar: Lectura i comprensió d'articles d'investigació relacionats amb els continguts de l'assignatura. Els alumnes podran preparar treballs monogràfics sobre algun tema d'actualitat de microbiologia molecular que poden exposar en forma de seminaris.

Estudi individual: Es contemplarà el temps de dedicació per l'estudi de l'alumne, resposta dels qüestionaris d'avaluació i preparació de seminaris. Es preveu que l'alumne inverteixi un nombre d'hores de treball no presencial a l'estudi de l'assignatura.

5. AVALUACIÓ

5.1 Criteris d'avaluació:

Es farà una avaluació continuada dels aprenentatges, coneixements, habilitats i actituds contemplats en els objectius i en els continguts de la matèria. El criteri de valoració més important serà l'adquisició dels coneixements dels diferents aspectes de les temàtiques analitzades en l'assignatura. La participació activa serà també criteri de valoració.

(En cas que l'alumne sol·liciti una avaluació única en substitució de l'avaluació continuada, ho haurà de fer mitjançant un document únic, signat per ell i pel professor. Aquesta sol·licitud es farà durant el període fixat per la Facultat i serà definitiva i irreversible. Tot i que l'alumne s'aculli a avaluació única, el professor li pot exigir que realitzi activitats presencials).

5.2 Procediments de l'avaluació:

La participació i contribució al comentari d'articles i seminaris suposarà el 50% de la qualificació.

Es proporcionaran als alumnes qüestionaris o materials docents (papers) referents a les matèries tractades. Els qüestionaris resoltos o els materials docents comentats s'hauran de retornar al professor i constituiran el 50% restant de la qualificació.

La realització d'un seminari pot constituir el 50% de la qualificació.

6. BIBLIOGRAFIA

Antibodies, a laboratory manual. Harlow, E.; Lane, David. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1988.

Methods for General and Molecular Bacteriology. Gerhardt, P. Editor in Chief. Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R., editors. ASM Press. 1994.

Modern Genetic Analysis. Griffiths, Anthony J.F.; Gelbart, William M.; Miller, Jeffrey H.; Lewontin, Richard C. W. H. Freeman & Co. 1999.

Molecular Biology of the Cell 4th ed. Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter. Garland Science. 2002.

Molecular Cloning a laboratory manual. 3rd. ed. Sambrook, J., Russell, D.W. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

Addicionalment es donarà a l'alumnat bibliografia específica dels temes tractats i recursos d'internet.

7. TUTORIES

La docència no presencial serà objecte de tutorització per part del professor. Es realitzarà un seguiment continuat del grau d'adquisició de competències de l'alumne, amb una dedicació setmanal de 1h per professor durant el període lectiu.