



## Métodos moleculares en microbiología aplicada

---

### Asignatura de Libre Elección Curricular (2º Ciclo)

Asignatura programada para el curso 2005-2006 como experiencia piloto para la adaptación al Espacio Europeo de Educación Superior

4,5 Créditos (3 teóricos + 1,5 prácticos)

### Descriptor

---

Estudio de los fundamentos básicos de los métodos basados en tecnología de DNA recombinante, Biología Molecular y Tecnología Genómica y sus posibles aplicaciones al diagnóstico de infecciones microbianas, a la detección de contaminantes microbianos en alimentos, a estudios epidemiológicos y de evolución microbiana, y a la resolución de problemas relacionados con la explotación industrial de microorganismos.

### Requisitos para cursar esta asignatura:

---

Ser alumno de 2º ciclo de una Licenciatura biosanitaria o de ciencias experimentales, con conocimientos previos de Microbiología y de Biología Molecular.

**Número de alumnos totales: 40**

### Programa de la asignatura

---

- 1. Introducción.** Fundamentos de la manipulación de ácidos nucleicos y proteínas. Aplicaciones a la identificación de microorganismos (de origen clínico, industrial o ambiental), a la epidemiología y al estudio de la evolución. Genómica y proteómica: concepto y potencial.
- 2. Análisis de ácidos nucleicos de origen microbiano.** Extracción de ácidos nucleicos a partir de microorganismos: muestras clínicas, industriales y ambientales. Extracción de DNA plasmídico, cromosómico y mitocondrial. Electroforesis de ácidos nucleicos.
- 3. Técnicas de hibridación de ácidos nucleicos.** Diseño y preparación de sondas genéticas. Hibridación *in situ*, sobre colonias (*colony blotting*) y sobre membranas (*Southern blotting*). Factores que afectan el rigor de la hibridación.
- 4. Métodos de detección de hibridación.** Marcaje radiactivo, enzimático, fluorescencia, quimioluminiscencia.
- 5. Aplicaciones de las técnicas de hibridación a la identificación de microorganismos.** Búsqueda de secuencias específicas. Sensibilidad y especificidad. Detección de genes de resistencia a antimicrobianos.
- 6. Tecnología de *microarrays* y *microchips* de DNA.** Fundamento. Tipos de soporte. Fabricación. Tipos de sondas. Sistemas de detección y análisis informático de datos. Aplicaciones de los *microarrays* y *chips* de DNA.
- 7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Fundamento. DNA-polimerasas. Diseño de los cebadores. Condiciones de la amplificación. Detección de productos de PCR: métodos de visualización.



8. **PCR cuantitativa en tiempo real:** Concepto. Diseño experimental.
9. **Aplicaciones de la PCR a la identificación de microorganismos.** PCR aleatoria. PCR anidada y RT-PCR. Uso de la PCR para el estudio de poblaciones microbianas complejas en ambientes naturales, muestras clínicas y procesos industriales. Cuantificación de la carga microbiana.
10. **Otras técnicas de identificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos** Reacción en cadena de la ligasa (LCR). Reacción de la Q $\square$ -replicasa. Técnica de la sonda cíclica (CPT). Amplificación basada en la transcripción: TAS y replicación de secuencia autosostenida (3SR).
11. **Estudio del polimorfismo de ácidos nucleicos.** Análisis de restricción (RFLP y AFLP). Análisis de DNA mitocondrial. Electroforesis de campo pulsado (OFAGE, CHEF, etc.). Ribotipia.
12. **Secuenciación de DNA.** Técnicas de secuenciación. Equipos de secuenciación automática. Análisis y comparación de secuencias: Bioinformática.
13. **Aplicaciones del análisis del polimorfismo y variabilidad genética.** Identificación de cepas industriales. Seguimiento de fermentaciones microbianas. Epidemiología molecular.
14. **Análisis de proteínas de origen microbiano.** Extracción de proteínas. Análisis electroforético. Electroforesis bidimensional. Tinciones.
15. **Inmunodetección de proteínas y sus aplicaciones a la identificación de microorganismos.** *Western blotting*. Inmunolocalización celular: inmunofluorescencia directa e indirecta. Microscopía de fluorescencia y confocal.

Cuantificación y análisis de imagen. Análisis informático.

16. **Citometría de flujo.** Fundamentos y equipos. Análisis multiparamétrico. Detección de antígenos. Análisis de poblaciones microbianas. Separación de poblaciones. Aplicaciones de la citometría de flujo en Microbiología.

#### **Temario de clases prácticas**

---

1. Análisis de restricción: Tipaje de levaduras de interés industrial.
2. Amplificación de genes de utilidad en tipaje e identificación de microorganismos mediante PCR.
3. Purificación, manipulación y secuenciación de DNA.
4. Análisis bioinformático de secuencias de DNA. Realización de árboles filogenéticos

#### **Metodología Docente y Evaluación:**

---

En el marco de la **experiencia piloto para la adaptación al Espacio Europeo de Educación Superior**. Los fundamentos básicos de las técnicas que el alumno debe comprender se impartirán como lección magistral por parte de los profesores. No obstante, se dedicará al menos un tercio de las clases presenciales a discusión dirigida, a modo de mesa redonda en la cual se discutirán aplicaciones de dichas técnicas propuestas y diseñadas por los alumnos durante los créditos no presenciales. La elaboración de dichas propuestas por parte de los alumnos será coordinada por los profesores tanto durante dicha fracción del horario de clases presenciales como en horario de tutorías. La realización y superación de las prácticas serán esenciales para aprobar la asignatura. La evaluación se basará en el desarrollo de casos prácticos por parte del alumno.



### **Bibliografía recomendada**

---

- **Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA.** (3ª Edición). *B.R. Glick y J.J. Pasternak.* ASM Press. 2003.
- **Biología Molecular y Biotecnología.** (2ª Edición). *J.M. Walker y E. B. Gingold.* Acribia. 1997.
- **Gene Cloning.** (4ª Edición). *T.A. Brown,* Blackwell Publishers. 2001.
- **Cell Biology (Molecular and Cell Biochemistry Series).** (2ª edición) *C. A. Smith and E. J. Wood,* Kluwer Academic Publishers. 1996.
- **Manual of Clinical Microbiology.** (7ª edición) *P.R. Murray, E J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover y R. H. Tenover.* 1999.
- **Molecular Methods for Microbial Identification and Typing.** *K. J. Towner, A. Cockayne .* Chapman & Hall, 1993
- **DNA Methods in Clinical Microbiology** *P. Singleton.* Springer, 2000.