



Ministerio de Cultura y Educación  
Universidad Nacional de San Luis  
Facultad de Química Bioquímica y Farmacia  
Departamento: Bioquímica  
Area: Química Biológica

(Programa del año 2020)

### I - Oferta Académica

Materia	Carrera	Plan	Año	Período
(OPTATIVA I(L.B.11/10)) TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS EN BIOQUÍMICA CLÍNICA	LIC. EN BIOQUÍMICA	11/10	2020	1° cuatrimestre

-CD

### II - Equipo Docente

Docente	Función	Cargo	Dedicación
VARAS, SILVIA MABEL	Prof. Responsable	P.Adj Exc	40 Hs
FERRAMOLA, MARIANA LUCILA	Responsable de Práctico	JTP Exc	40 Hs
LACOSTE, MARIA GABRIELA	Responsable de Práctico	JTP Semi	20 Hs

### III - Características del Curso

Credito Horario Semanal				
Teórico/Práctico	Teóricas	Prácticas de Aula	Práct. de lab/ camp/ Resid/ PIP, etc.	Total
Hs	10 Hs	Hs	20 Hs	30 Hs

Tipificación	Periodo
E - Teoría con prácticas de aula, laboratorio y campo	1° Cuatrimestre

Duración			
Desde	Hasta	Cantidad de Semanas	Cantidad de Horas
13/04/2020	24/04/2020	2	60

### IV - Fundamentación

Las técnicas de biología molecular, en la actualidad, son esenciales en el laboratorio clínico. Representan una herramienta para el diagnóstico, confirmación y seguimiento de numerosas patologías neonatales, metabólicas y proliferativas. El dictado del Curso se fundamenta en la necesidad del estudiante de la Licenciatura en Bioquímica de adquirir mayores destrezas en la realización de técnicas de biología molecular aplicables al diagnóstico de distintas enfermedades humanas.

### V - Objetivos / Resultados de Aprendizaje

General: brindar al alumno práctica en técnicas moleculares realizables en un laboratorio clínico, que sirvan para la detección molecular de alteraciones a nivel de ADN y/o proteínas que sean origen de distintas patologías humanas.

Particulares:

- Conocer y manejar el equipamiento mínimo necesario para un laboratorio molecular.
- Diseñar y llevar a cabo un protocolo molecular en su laboratorio de bioquímica clínica.
- Detectar y resolver los problemas prácticos del uso de técnicas moleculares: reactivos, contaminación, controles, etc.
- Entrenamiento en la interpretación de geles e informe de resultados.
- Resaltar el uso de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico clínico de cáncer, enfermedades hereditarias y

metabólicas.

## VI - Contenidos

### Tema N° 1

Genoma Humano. Proyecto Genoma Humano. Controversias Éticas. Mutaciones más comunes según HGMD (Human Gene Mutation Database). Deleciones y Mutaciones puntuales. Nomenclatura internacional. Polimorfismos (SNPs). Estrategias de laboratorio. Material e instrumental usado en un laboratorio de biología molecular.

### Tema N° 2

Reacción de PCR: Historia, definición, ventajas y desventajas. Eficiencia de una PCR: equilibrio entre especificidad, rendimiento y fidelidad. Requisitos para una amplificación selectiva. Variables que afectan el rendimiento. Tipos de ADN polimerasas: Taq, Tli, Pfu orígenes y características. Optimización de una reacción de PCR: elección de los iniciadores o cebadores, temperatura de annealing, concentración de magnesio y nucleótidos y número de ciclos. Fase plateau: causas.

### Tema N°3

Técnicas usadas para la determinación de deleciones e inserciones. Otras variantes de PCR: SSCP, RFLP-PCR, RT-PCR. PCR de tiempo real: bases. Usos en bioquímica clínica.

### Tema N° 4:

Conceptos básicos de Bioinformática. Diseño de oligos. Uso de herramientas del Internet para la búsqueda de secuencias de un gen en particular y diseño de oligos o iniciadores. Uso del BLAST.

### Tema N° 5

Técnicas usadas para la determinación de mutaciones puntuales. MAS-PCR, ARMS, mutagénesis mediada por PCR, Dot blot y Dot Blot reverso.

### Tema N° 6

Nuevas plataformas diagnosticas usadas en screening moleculares: Dot Blot-r (reverse dot blot hybridization), OLA (oligonucleotide ligation assay), Tepnel (Elucigene), xTAG, MOL-PCR (assay multiplex oligonucleotide ligation-PCR). Fundamentos. Discusión de seminarios.

## VII - Plan de Trabajos Prácticos

### TRABAJOS PRACTICOS DE LABORATORIO

#### Tema 1:

TP1: Diseño de oligonucleótidos: uso de programas para diseño de oligos. Chequeo de secuencias. Búsqueda de secuencias de cortes específicas de enzimas de restricción.

TP2: Extracción de sangre por punción venosa. Extracción de ADN. Determinación de índice de pureza y cuantificación.

#### Tema 2:

TP3: PCR-I: Identificación de mutaciones por mutagenesis mediada por PCR. Preparación y armado de geles de poliacrilamida no desnaturalizantes.

TP4: Siembra y revelado de PCR-I. Detección de portadores de la mutación en el gen CFTR.

PCR- ER I (RFLP-PCR) Corte con enzima de restricción del producto amplificado. Armado y corrida de geles de poliacrilamida no desnaturalizantes. Tinción de geles. Detección de enfermos fibroquísticos. Informe.

#### Tema 3:

TP5: PCR-II: MAS-PCR: detección de 4 mutaciones con primers alelo específicos. Armado y corrida de geles de agarosa. Tinción de geles. Observación de resultados e informe.

TP6: PCR-III:ARMS-PCR. Genotipificación de Apo E.

#### Tema4:

TP7: ARMS-PCR. Genotipificación por PCR. Alelos de Apo E. Armado y corrida de geles de agarosa. Tinción de geles.

Observación de resultados e informe. Polimorfismos detectados.

TP8: PCR-IV: RFLP-PCR II: Amplificación de un fragmento del exón 10, del gen GALT (Galactosa 1- Fosfato Uridil Transferasa).

Tema5:

TP9: Armado y corrida de geles de agarosa. Tinción de geles. Observación de resultados e informe. Determinación Polimorfismo N314D para detección del Alelo Duarte en Galactosémicos.

TP10: Integración final y discusión de los resultados hallados. Exposición de seminarios.

## VIII - Regimen de Aprobación

La evaluación se lleva a cabo en forma continua a través de exposición de seminarios sobre conceptos teóricos y discusión de técnicas realizadas.

Alumnos Regulares:

1-El alumno estará en condiciones de cursar “Técnicas moleculares usadas en bioquímica clínica”, cuando haya regularizado Química Biológica Patológica.

El alumno deberá aprobar el 70% del plan de Trabajos Prácticos del Curso (Ord. N° 13/03 CS Régimen Académico).

2-El alumno deberá aprobar con un 70% un único parcial final integral para regularizar.

Alumnos Promocionales:

El alumno estará en condiciones de promocionar cuando:

1- Haya asistido y aprobado el 80% de los TP.

2- Aprobado con el 80% un único parcial final integral.

## IX - Bibliografía Básica

[1] Molecular Biology Techniques: A Classroom Laboratory Manual. 3° EDITION. Susan Carson; Heather B. Miller and Scott Witherow. 2012. ISBN: 978-0-12-385544-2

[2] Book: Molecular Diagnostics. Techniques and application for the clinical laboratory. 2010. Grody WW y col. ISBN : 978-0-12-369428-7

[3] Clinical Applications for Next-Generation Sequencing. Urszula Demkow & Rafał Płoski. ISBN: 978-0-12-801739-5

[4] Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments Publisher: Wiley; 7 edition (2013) ISBN-13: 978-1118206737

[5] Benjamin A. Pierce: Genética. Un enfoque conceptual. 5° Edición. EAN: 9788498353921. Editorial Medica Panamericana.

[6] Harvey Lodish, Arnold Berk, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Anthony Bretscher, Hidde Ploegh, Angelika Amon, Matthew P. Scott Biología Celular y Molecular. EAN: 9789500606264 Edición. 7ª Edición. Editorial Medica Panamericana.

[7] Molecular Diagnostics: Current Technology and Applications (Horizon Bioscience) by Juluri R. Roa, Colin C. Fleming, John E. Moore. 2006. ISBN-13: 978-1904933199

[8] Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. By Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, David E. Bruns. 2012. ISBN 978-1-4160-6164-9

[9] Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory. 2010. Edited by Wayne W. Grody, Robert M. Nakamura, Frederick L. Kiechle, Charles. ISBN 978-1-12-369428-7

[10] BRS Biochemistry, Molecular Biology, and Genetics, Fifth Edition, By Todd A. Swanson M.D. Ph. D, Sandra I. Kim MD PhD, Marc J. Glucksman PhD. 2009. ISBN-13: 978-0781798754

[11] JD Watson, TA Baker, JP Bell, A Gann, M Levine & R Losick: Molecular Biology of the gene. Fifth Edition. Benjamin Cummings & Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2004.

[12] Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T: Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Tomo 1, 2 y 3. 1989 Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2nd edition. Language: English. ISBN-10: 0879693096

[13] Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015 May ; 17(5): 405–424.

## X - Bibliografía Complementaria

- [1] Ying Liu, Alpa Sidhub, Lora H. Bean, Robert L. Conway, Judith L. Fridovich-Keil. Genetic and functional studies reveal a novel noncoding variant in GALT associated with a false positive newborn screening result for galactosemia. *Clinica Chimica Acta* 446 (2015) 171–174.
- [2] Coren A. Milbury, Jin Li and G. Mike Makrigrigorgos. PCR-Based Methods for the Enrichment of Minority Alleles and Mutations. *Clinical Chemistry* (2009) 55:4 632–640
- [3] Sharon Marsh: Chapter 8: Pyrosequencing. Book: *Molecular Diagnostics*. 2010 Elsevier Ltd.
- [4] Hartmut Peters and Peter N. Robinson: Chapter 6: Temperature and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Book: *Molecular Diagnostics*. 2010 Elsevier Ltd.
- [5] Garry R. Cutting: Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nature reviews. Genetics*. Published online 18 November 2014
- [6] Ruan Felipe Vieira Medrano, Camila Andrea de Oliveira: Guidelines for the Tetra-Primer ARMS-PCR Technique Development. *Mol Biotechnol* DOI 10.1007/s12033-014-9734-4
- [7] Nur Fatimah Mohd Yatim, Masitah Abd. Rahim, Kavitha Menon, Faisal Muti Al-Hassan, Rahimah Ahmad, Anita Bhajan Manocha, Mohamed Saleem and Badrul Hisham Yahaya. Molecular Characterization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Thalassaemia among Malay Patients *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 8835-8845; doi:10.3390/ijms15058835
- [8] Fang Zhao, Bharati Bapat. Chapter: The Role of Methylation-Specific PCR and Associated Techniques in Clinical Diagnostics. Book: *Epigenetic Biomarkers and Diagnostics*. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801899-6.00008-5>
- [9] Sara Goodwin<sup>1</sup>, John D. McPherson and W. Richard McCombie: Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature reviews. Genetics*, volume 17, 2016, 333-351
- [10] Jian Ye, George Coulouris, Irena Zaretskaya, Ioana Cutcutache, Steve Rozen and Thomas L Madden. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134: 1-11
- [11] Liliana C. Rossetti, Karen G. Scheps, Amanda Binaghi, María S. Abreu, Mariana T. Mansilla, Viviana Varela. 2010. Diagnóstico molecular de mutaciones beta talasémicas, genotipos complejos. *HEMATOLOGIA*, Vol. 14 N° 2: x-x Abril-Junio.
- [12] Umair Mahmood, Muhammad Imran, Salma Iqbal Naik, Huma Arshad Cheema, Anjum Saeed, Muhammad Arshad, Saqib Mahmood: Detection of common mutations in the GALT gene through ARMS. 2012. *Gene* 509, 291–294
- [13] Michael R. Knowles and Mitchell Drumm: The Influence of Genetics on Cystic Fibrosis Phenotypes. 2012. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1-13.
- [14] Panayiotis G. Menounos and George P. Patrinos. 2010. Mutation Detection by Single Strand Conformation Polymorphism and Heteroduplex Analysis. Book: *Molecular Diagnostics*. Chapter 4. Second Edition, 45-58.
- [15] Graham R. Taylor and Carol A. Delaney. 2010. Detection of Genomic Duplications and Deletions. Book: *Molecular Diagnostics*. Chapter 12. Second Edition, 1715-182
- [16] David M. Holtzman, Joachim Herz and Guojun Bu. 2012. Apolipoprotein E and Apolipoprotein E Receptors: Normal Biology and Roles in Alzheimer Disease *Cold Spring Harb Perspect Med.*; 1-23.
- [17] E. Castellanos-Rizaldos, Pingfang Liu, Coren A. Milbury, Minakshi Guha, Angela Brisci, Laura Cremonesi, Maurizio Ferrari, Harvey Mamon, and G. Mike Makrigrigorgos. 2012. Temperature-Tolerant COLD-PCR Reduces Temperature Stringency and Enables Robust Mutation Enrichment. *Clinical Chemistry* 58:7; 1130–1138
- [18] Lap-Chee Tsui and Ruslan Dorfman. 2013. The Cystic Fibrosis Gene: A Molecular Genetic Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Med*; 1-16
- [19] Ramandeep Singh, Babu R. Thapa, Gurjit Kaur, Rajendra Prasad. 2012. Biochemical and molecular characterization of GALT gene from Indian galactosemia patients: Identification of 10 novel mutations and their structural and functional implications. *Clinica Chimica Acta* 414; 191–196
- [20] Gerard T. Berry et al. The adult galactosemic phenotype. 2012. *J Inherit Metab Dis.* 35:279–286
- [21] Swee Lay Thein. 2013. The Molecular Basis of  $\beta$ -Thalassemia. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*; 1-24
- [22] 2008- Single tube optimisation of APOE genotyping based on melting curve analysis.
- [23] 2009- Apolipoprotein E genotyping method by Real Time PCR, a fast and cost-effective alternative to the TaqMan and FRET assays
- [24] 2010- Sequencing technologies —the next generation.
- [25] 2010- Newborn Screening for Galactosemia: A Review of 5 Years of Data and Audit of a Revised Reporting Approach.
- [26] 2013- Allele-specific polymerase chain reaction for the detection of Alzheimer's disease-related single nucleotide polymorphisms
- [27] 2013- Cost-Effective and Scalable DNA Extraction Method from Dried Blood Spots
- [28] 2013- Detection of MPL Mutations by a Novel Allele-Specific PCR-Based Strategy

[29] 2013-The Cystic Fibrosis Gene: A Molecular Genetic Perspectiva

[30] 2014-APOE and BDNF Val66Met polymorphisms combine to influence episodic memory function in older adults

[31] 2014-Genomic Technologies and the New Era of Genomic Medicine.

[32] 2014- Multiplexed, lateral flow, PCR techniques for biological identification

### **XI - Resumen de Objetivos**

Brindar al alumno de la Licenciatura en Bioquímica practicas en técnicas moleculares realizables en un laboratorio clínico; en particular PCR y sus numerosas variantes.

### **XII - Resumen del Programa**

Tema 1:Genoma Humano: constitución. Mutaciones. Estrategias de diagnóstico molecular.

Tema 2:Reacción en cadena de la Polimerasa. Cinética. Componentes.

Tema 3: Técnicas moleculares para la detección de mutaciones deleciones e inserciones.

Tema 4:Diseño de oligos. Uso de Programas.

Tema 5:Técnicas moleculares para la detección de mutaciones puntuales.

Tema 6:Nuevas plataformas diagnósticas moleculares

### **XIII - Imprevistos**

No corresponde

### **XIV - Otros**