

Curso de PCR INTENSIVO

DOCENTES

Lic. Daniela González

Lic. en Biotecnología y Biología Molecular, UNLP, Argentina

Posgrado en Metabolismo oxidativo y nitrosativo en sistemas biológicos, UBA, Argentina

Doctorando en Ciencias de la salud, mención epidemiología.

Co-directora Técnica empresa de reactivos de diagnóstico para uso in vitro

Lic. Silvana Sawostjanik Afanasiuk

Lic. en Genética, UNaM, Argentina

Doctorando en Ciencias Aplicadas, UNaM

Investigación, desarrollo y control de calidad empresa de bioinsumos microbiológicos

MODALIDAD

Clases virtuales y asincrónicas. Consultas a las docentes de manera virtual a demanda de los estudiantes en cualquier instancia del cursado. Orientación en las instancias de evaluación.

DURACIÓN Y CARGA HORARIA

8 módulos que constan de 4 clases cada uno. En total, suman 28 lecciones.

Carga horaria: 40 horas

DESCRIPCIÓN

El curso intensivo de PCR brinda una formación teórico-práctica completa sobre la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variantes. Se abordan desde los fundamentos básicos de extracción de material genético, de la técnica de PCR hasta aplicaciones avanzadas, incluyendo el diseño de *primers*, sistemas de detección, variantes de PCR, qPCR en tiempo real, RT-qPCR para diagnóstico de SARS-COV-2. Está diseñado para que los participantes comprendan los principios y aplicaciones de la técnica, así como el uso de equipamiento y reactivos en laboratorios de biología molecular.

OBJETIVOS

- Comprender los fundamentos teóricos y prácticos de la PCR convencional y sus variantes.
- Aprender el uso y optimización de polimerasas en la amplificación de ácidos nucleicos.
- Diseñar *primers* eficientes para diferentes aplicaciones de PCR.
- Analizar e interpretar resultados de electroforesis y secuenciación de productos amplificados.
- Conocer las aplicaciones de la PCR en diagnóstico molecular, filogenia, e investigación biomédica.
- Familiarizarse con las técnicas avanzadas como qPCR, PCR digital y LAMP.
- Aplicar protocolos de PCR para detección de SARS-CoV-2 y otras aplicaciones clínicas.

CONTENIDOS

Módulo 1. Fundamentos de la PCR

PCR convencional, fundamentos. Función y termoestabilidad de las ADN-polimerasas. *Primers*, estructura y función. Tipos de nucleótidos. Estructura del ADN. Técnica de la PCR en un laboratorio. Equipamiento y reactivos necesarios. Obtención, preparación (cálculo de las concentraciones) y almacenamiento de los reactivos. Preparación de la *master mix*. Características, función y seteo

del termociclador. Ciclado estándar. ADN y ARN, estructuras químicas, características, funciones, diferencias. Genomas de ADN y ARN. Uso del ADN y ARN como moldes. Extracción de ácidos nucleicos, fundamentos, etapas del protocolo, consideraciones, reactivos necesarios. Preparación de las soluciones tamponadas. Extracción manual, con *kits* y automatizada, ventajas y desventajas. Protocolos para la extracción de diversas muestras.

Módulo 2. Enzimas polimerasas

Generalidades y clasificación de las polimerasas. Dominio catalítico. Corrección de errores, actividad 3' exonucleasa y mutaciones. Conceptos de fidelidad, procesividad y progresividad. ADN polimerasas eucariotas y procariotas. Flujo de la información genética. Genomas virales y descubrimiento de las retrotranscriptasas, ejemplos. Complementariedad de bases. Síntesis de ADNc. Historia y evolución de las polimerasas. Microorganismos termofílicos y sus polimerasas. Taq, Pfu, Vent, KOD, características. Polimerasas de nuevas generaciones. Polimerasas recombinantes. Evolución dirigida e ingeniería de proteínas. Polimerasas comerciales, mejoras en cada nueva generación.

Módulo 3. Primers

Características de los *primers*: secuencia, longitud, inicio, terminación, cálculo del porcentaje de GC y su importancia. Temperatura de *melting* y temperatura de hibridación, cómo calcular. Diseño de *primers*. Formato de secuencias. Bases de datos de secuencias. Consideraciones para el diseño a mano, ejemplos. *Primers* específicos y degenerados. Herramientas bioinformáticas para el diseño de *primers*: Primer3, BLAST-primer, CODEHOP. Características y usos de cada una de las herramientas.

Módulo 4. Sistemas de detección

Fundamentos de la electroforesis. Soporte para la electroforesis: geles, acetato de celulosa o líquida. Equipos para electroforesis: tipos y usos de cubas, fuentes de poder, potencial eléctrico. Importancia del buffer de corrida. Ejemplos de electroforesis de acuerdo al soporte y muestra. Electroforesis en geles de agarosa. Importancia de la concentración del gel. Poder resolutivo. Preparación de la muestra. *Buffer* de carga, composición. *Buffer* de corrida composición. Seteo de la corrida el equipo: amperaje, voltaje. Revelado con GelRed y bromuro de etidio. Interpretación de una corrida de producto de PCR. Electroforesis en geles de poliacrilamida PAGE. Acrilamida bisacrilamida, características. Catalizadores, APS, TEMED. PAGE no desnaturizante para ADNds. Diferencias entre geles para proteínas y para ADN. Valores T y C. Poder resolutivo. *Buffer* de corrida y de carga. Revelado y análisis con nitrato de plata, bromuro de etidio. Ventajas y desventajas del uso de poliacrilamida. Secuenciación y análisis bioinformático. Secuenciación por SANGER. Preparación de las muestras y de los *primers* para secuenciación. Análisis de las secuencias, programas de edición y análisis bioedit, blast. Interpretación de un cromatograma.

Módulo 5. Variantes de la PCR

Colony PCR, procedimiento y aplicaciones. PCR inversa, diseño de primers inversos, aplicaciones. *Long range* PCR, aplicaciones y consideraciones técnicas. PCR-*in situ*, aplicaciones y requerimientos. PCR *multiplex*, importancia y aplicaciones. *Nested* PCR, procedimiento e importancia. Rt-PCR, procedimiento, importancia del ADNc. Q-PCR, equipamiento, sondas y colorantes fluorescentes. PCR digital, fundamentos, equipos y análisis. *Droplet* PCR, fundamentos, comparación con digital, análisis y aplicaciones. LAMP: Amplificación isotérmica mediada por bucle, fundamentos, ejemplos y aplicaciones.

Módulo 6. PCR en tiempo real (qPCR)

Generalidades, aplicaciones, gráficos. Equipos y fluoróforos, ejemplos de equipos en el mercado. Protocolo modelo: aplicación de protocolo y seteo de equipo para detección de OGM. Métodos de

análisis: cuantificación absoluta, relativa. Parámetros.

Módulo 7. Termocicladores

Cuantificación absoluta con SYBR. Cuantificación absoluta con TAQMAN. Cuantificación relativa.

Módulo 8. PCR para el SARS-COV-2

RT-qPCR. Proceso de diagnóstico. Extracción y análisis de la muestra. Resultados e interpretación en el laboratorio. Sistemas automatizados. Mecanismo y fundamento. Equipos en el mercado. Detecciones moleculares a temperatura constante (LAMP). Aplicación en detección del SARS-COV-2. Toma de muestra hisopado oro y nasofaríngeas.

EVALUACIÓN Y CERTIFICACIÓN

Certificación de aprobación con aval de la Fundación de Químicos de Argentina: para lo cual, los estudiantes deberán aprobar evaluaciones tipo cuestionarios de opción múltiple con hasta tres intentos al final de cada módulo.

RECURSOS Y MATERIALES

Se incluyen clases en video, lecciones en .pdf, material de lectura, cuestionarios de autoevaluación y consultas virtuales con los docentes durante las clases y las evaluaciones.

DESTINATARIOS Y REQUISITOS PREVIOS

Este curso está dirigido a biólogos, genetistas, bioquímicos, médicos, investigadores, y otros profesionales del área de la salud y del ámbito científico interesados en el uso de la PCR en investigación, diagnóstico y aplicaciones biotecnológicas.

Se recomienda tener conocimientos básicos de biología molecular.

INFORMACIÓN DE CONTACTO Y CONSULTAS:

Correo electrónico: cursos@biocealab.com

Web: <https://biocealab.com/courses/curso-de-pcr-intensivo/>

Whatsapp: [+54 9 376 438-0065](tel:+5493764380065)

[+54 9 376 423-3743](tel:+5493764233743)