



UNIVERSIDAD DE SONORA
POSGRADO EN BIOCIENCIAS



MICROBIOLOGÍA MOLECULAR (2442)

Material Didáctico

Elaboró: Dra. Kadiya Calderón Alvarado

kadiya.calderon@unison.mx

MICROBIOLOGÍA MOLECULAR (2442)

Unidad: Centro

División: Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento: Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS)

Eje Temático: Optativa / especialización

Créditos: 8

Teoría: 3 horas a la semana por semestre

Dra. Kadiya del Carmen Calderón Alvarado

kadiya.calderon@unison.mx

TEMARIO DEL CURSO

Unidad 1. Conceptos básicos en Biología Molecular y Microbiología

Unidad 2. Extracción y Manipulación de ácidos nucleicos (AN)

- 2.1 Etapas básicas de un procedimiento general para Extracción y Purificación de AN
- 2.2 Métodos de fragmentación y lisis
- 2.3 Eliminación de restos celulares
- 2.4 Desproteínización
- 2.5 cromatografía de intercambio aniónico
- 2.6 Extracción de DNA desde un gel de agarosa
- 2.7 Extracción fenólica de proteínas
- 2.8 Análisis espectrofotométrico y criterios de pureza
- 2.9 Factores que afectan el rendimiento, calidad y pureza de los AN purificados
- 2.10 Métodos específicos

Unidad 3. Endonucleasas o enzimas de restricción

- 3.1 Tipos de enzimas de restricción
- 3.2 Nomenclatura y ejemplos de enzimas de restricción
- 3.3 Mecanismos de acción de las enzimas de restricción
- 3.4 Usos de las enzimas de restricción
- 3.5 Manipulación de DNA y RNA con enzimas de restricción

Unidad 4. Técnicas de hibridación

4.1 Marcaje de oligonucleótidos

4.2 Selección y marcaje de sondas

4.3 Ejemplos y aplicaciones: southern blot, northern blot, hibridación in situ, microarreglos, PCR

Unidad 5. Reacción en cadena de la polimerasa

5.1 Fundamentos de la técnica

5.2 Tipos más usuales de PCRs

5.3 Mezcla de reacción

5.4 Aplicaciones en las ciencias médico biológicas

5.5 DGGE y TGGE como técnicas dependientes de PCR

Unidad 6. Bibliotecas genómicas (genotecas)

6.1 Aislamiento y digestión parcial de DNA total de alto peso molecular

6.2 Evaluación del tamaño de los insertos

6.3 Llenado parcial de los fragmentos y ligación con el vector

6.4 Empaquetamiento y título del fago empaquetado

6.5 Caracterización de la biblioteca genómica

6.6 Aplicaciones de una genoteca

Unidad 7. Secuenciación de DNA

7.1 Estrategias de secuenciación

7.2 Preparación de moldes

7.3 Método dideoxi o de Sanger

7.4 Nuevas plataformas (pirosecuenciación, Illumina, Solid)

7.5 Aplicaciones

Unidad 8. Citogenética Molecular

8.1 Hibridación fluorescente in situ (FISH)

8.2 Hibridación genómica comparativa (CGH)

Unidad 9. El fundamento de la tecnología empleada en microarrays

9.1 Componentes de un experimento de microarrays

9.2 Diseño experimental

9.3 Muestras biológicas

9.4 Tipos de microarrays

9.5 Consideraciones técnicas

9.6 Análisis de los datos

9.7 Métodos de Agrupamiento y Visualización de los datos

9.8 Interpretación de los datos: data mining

9.9 Reporte de los datos

Conducción de los procesos enseñanza-aprendizaje: El curso constará de exposición del maestro e investigadores invitados y exposición de los estudiantes sobre temas selectos, discusión grupal de artículos científicos recientes de alto impacto.

Criterios de evaluación del curso: Examen parcial 1: 20%. Examen parcial 2: 20%. Examen parcial 3: 20%. Exposición 10%, Discusión de artículos. 30%

REFERENCIAS

- Lewin B., Genes X- XII. , Oxford University Press., , 2009 - 2017.
- Rabinow P., Making PCR. A Story of Biotechnology, The University of Chicago Pres, , 2006.
- Strachan T., The Human Genome, Bios Scientific Publishers, , 2004.
- Watson J, y , et_al., Recombinant DNA. , Scientific American Books. Second Edition, , 1993.
- Ausubel F, y , et_al., Expression of Cloned Receptors in Mammalian Cell Lines, Current Protocols in Molecular Biology., , 1993.

CALENDARIO DE ACTIVIDADES

Sesión 1. Intro y conceptos básicos (Unidad 1)

Sesión 2. Extracción y manipulación de AN (Unidad 2)

Sesión 3. Reacción en cadena de la polimerasa (Unidad 5)

Sesión 4. Examen 1 (unidades 1,2 y 5)

Sesión 5. Sesión especial Investigador invitado externo

Sesión 6. Endonucleasas y enzimas de restricción (Unidad 3)

Sesión 7. Técnicas de hibridación (Unidad 4)

Sesión 8. Bibliotecas genómicas (unidad 6)

Sesión 9 Examen 2 (unidades 1-6)

Sesión 10. Secuenciación de ADN (Unidad 7)

Sesión 11. Citogenética molecular (Unidad 8)

Sesión 12. Microarrays (Unidad 9)

Sesión 13. Exámen 3 (unidades 7-9)

Sesión 14. Calificaciones finales



UNIVERSIDAD DE SONORA



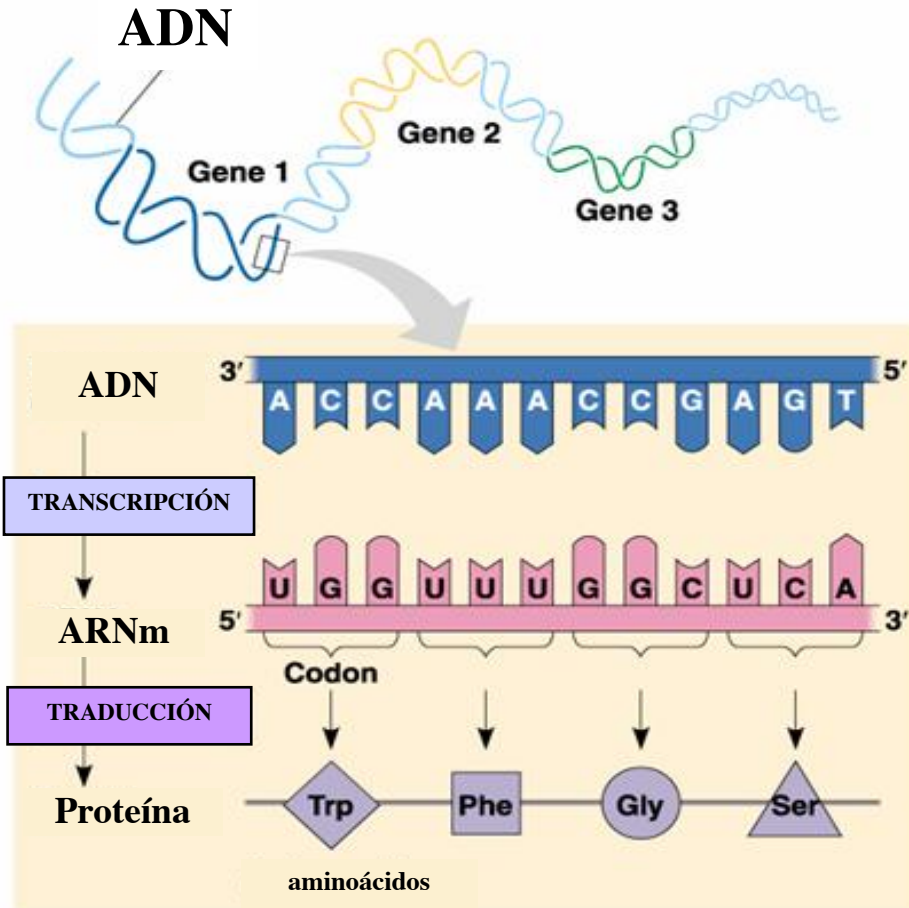
POSGRADO EN BIOCIENCIAS

MICROBIOLOGÍA MOLECULAR (2442)

UNIDAD 1. Introducción y conceptos básicos

Elaboró: Dra. Kadiya del C. Calderón Alvarado

1. Dogma central de la biología molecular

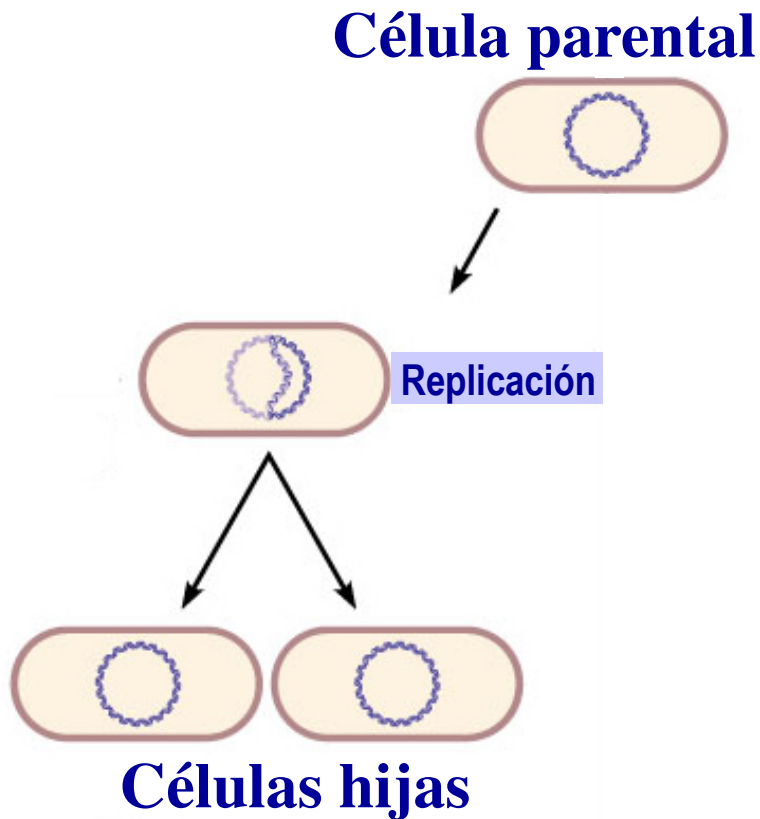


Biología Molecular:

Conjunto de procesos básicos que llevan al mantenimiento de la información genética (replicación) y a su expresión (transcripción y traducción).

©1999 Addison Wesley Longman, Inc.

Bases moleculares de la genética



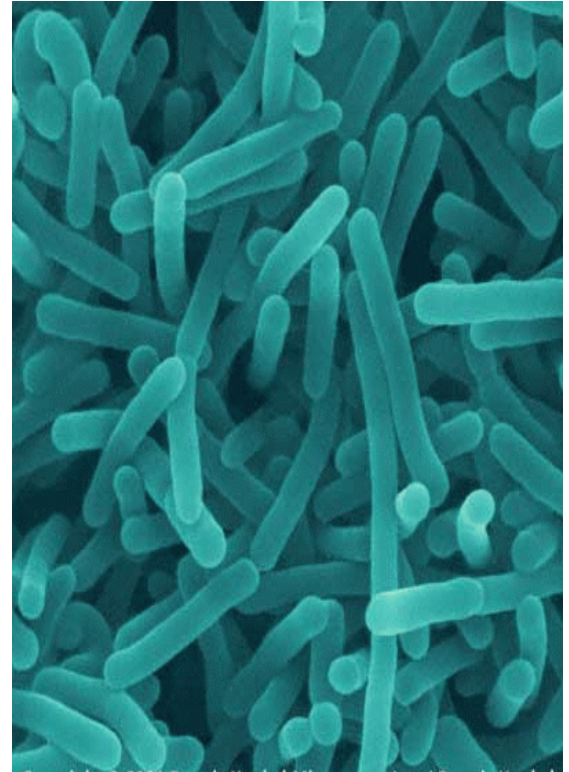
Mantenimiento de la información genética

La **replicación del ADN** posibilita el flujo de la información genética de una generación a la siguiente. Cada célula fruto de una división celular recibe una copia del cromosoma **idéntica** a la de la célula progenitora.

HERRAMIENTAS MOLECULARES

Son las técnicas de laboratorio que se usan para aislar o extraer ácidos nucleicos en alta pureza para su posterior manipulación.

- a) Amplificar una región de interés
- b) Clonación de fragmentos en bacterias u otros vectores como virus
- c) Utilizar enzimas de restricción para ver si por una mutación se gana o se pierde un sitio de restricción.
- d) Perfiles de biodiversidad
- e) Análisis de metagenómica, transcriptómica o proteómica.

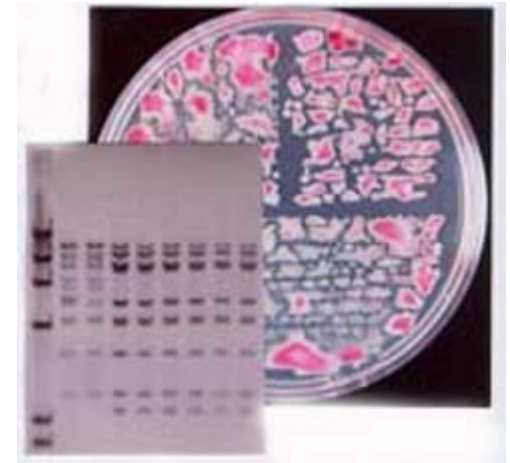


Viables pero no cultivables

*** Métodos tradicionales:**

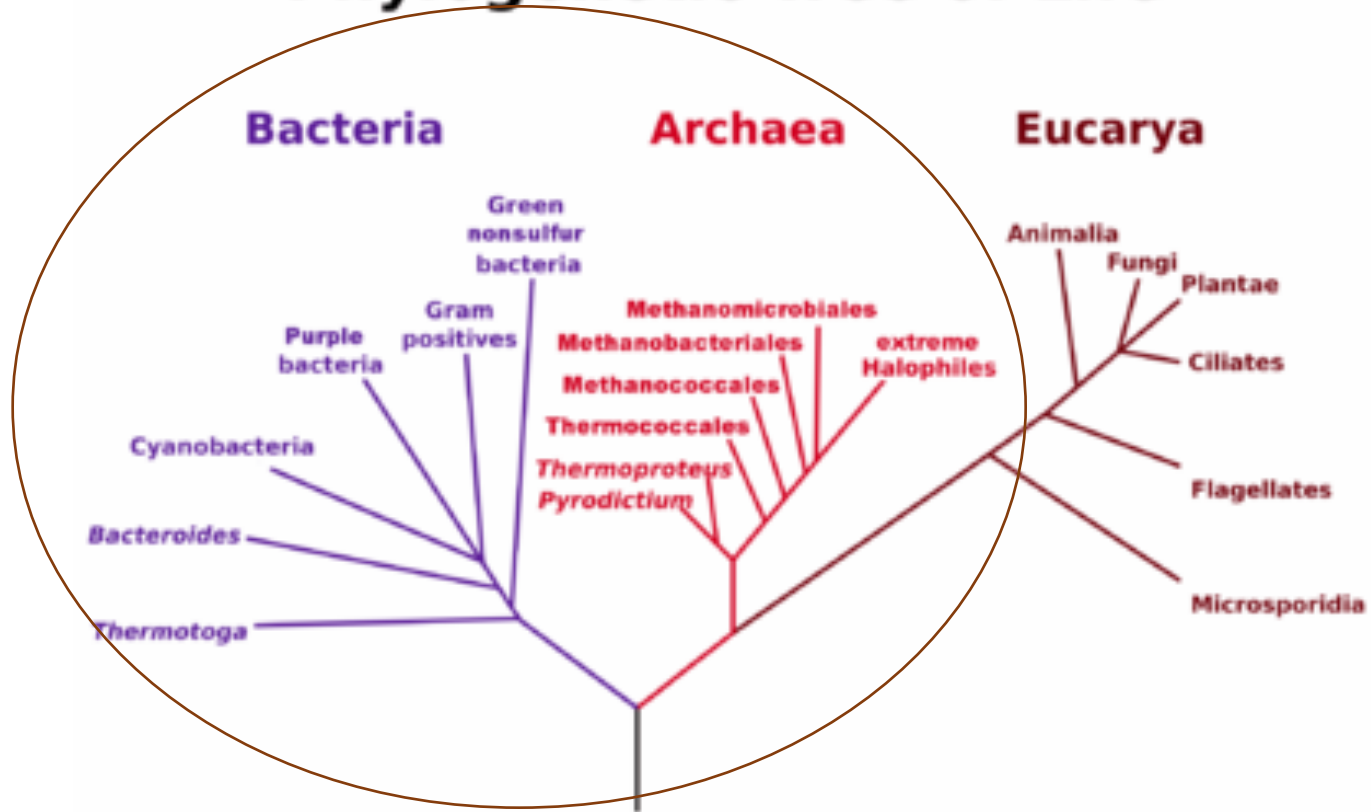
- * Siembra en medios de cultivo selectivos ó diferenciales.**
- * Pruebas bioquímicas.**
- * Tinciones, etc.**

*** Métodos moleculares**



¿Qué es la microbiología?

Phylogenetic Tree of Life



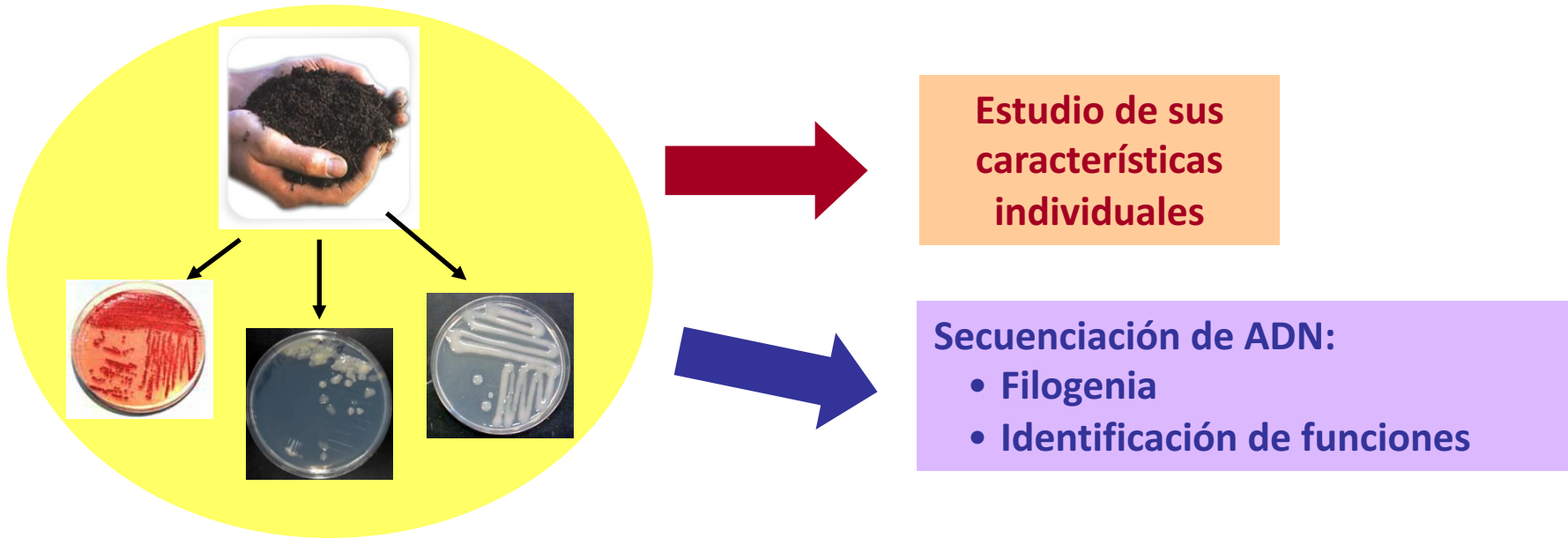
Woese, C., & Fox, G. (1977)

¿Porqué estudiar microbiología?

Enfoques en el estudio de los microorganismos:

Microbiología tradicional:

Se fundamenta en el estudio de los **microorganismos aislados en cultivo puro**.



Genómica (1970):

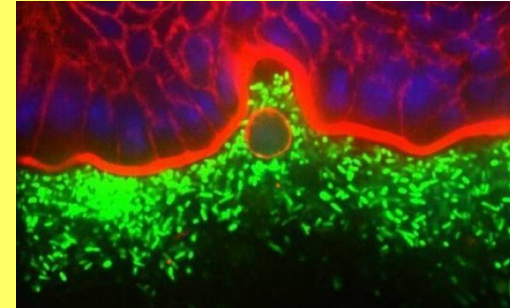
Análisis del **material genético** de los **organismos**. A partir de la secuencia de genes es posible:

- Comprender las **relaciones evolutivas** (filogenia)
- Conocer las **capacidades metabólicas** de los microorganismos

Microbiología tradicional y genómica:

Limitaciones en microbiología ambiental:

- Los microorganismos **no** funcionan **individualmente**
- Los **microorganismos** interactúan:
 - Entre sí
 - Asociándose con otros seres vivos
 - Con el entorno físico en el que habitan



Muchos microorganismos han evolucionado creciendo juntos en **comunidades**, altamente estructuradas y con división de roles.

Sus **actividades colectivas** son vitales para el funcionamiento de la biosfera, e influyen la vida y salud humanas.

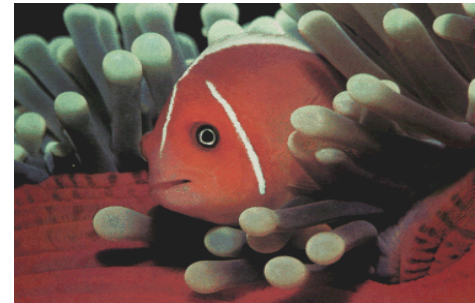
Por lo tanto, es **importante** estudiar la **estructura** de las comunidades microbianas para entender su **dinámica** y así descubrir la **función** de los microorganismos en los sistemas ambientales → METAGENÓMICA.

Metagenómica (J. Handelsman, 1998)

Handelsman, J. et al. 1998. *Chemistry & Biology* 5 (10): R245–R249

Meta (griego) = que trasciende

- Rama de las **ciencias biológicas**, que trata de **comprender la biología a nivel de comunidad en su entorno natural**, trascendiendo a los organismos individuales.
- Rama de la **metodología científica**, que **desarrolla herramientas** que permiten comprender la composición genética y su función en comunidades microbianas complejas.



Las comunidades complejas
NO pueden ser totalmente caracterizadas

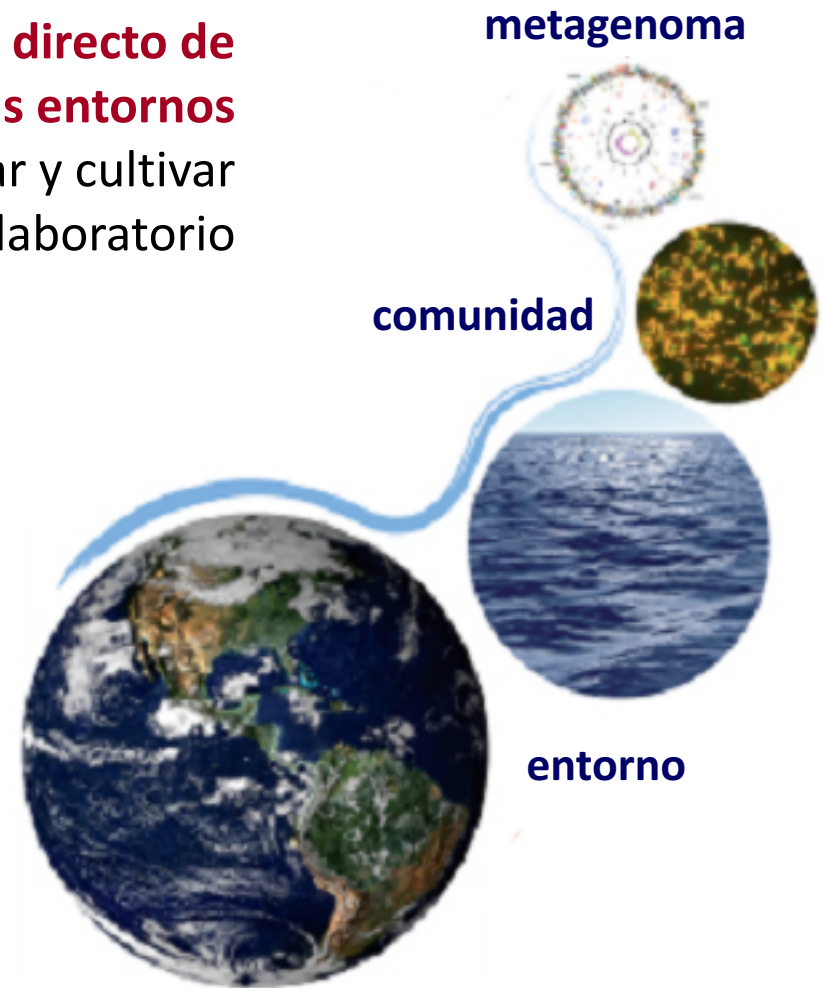
Metagenómica en la ecología microbiana

Aplicación de técnicas para el **estudio directo de las comunidades microbianas en sus entornos naturales**, sin necesidad de aislar y cultivar individualmente las especies en el laboratorio

Basadas en la recuperación de los **ácidos nucleicos** (ADN/ARN) a partir de muestra ambientales



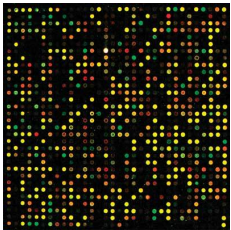
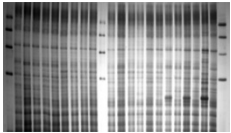
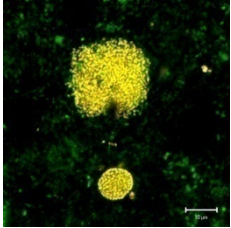
Conjunto de los genomas de un entorno = **METAGENOMA**



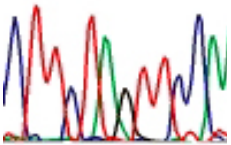
Aplicaciones de la microbiología molecular en la ecología microbiana

- Estudios de la **diversidad filogenética** de las comunidades de microorganismos, usando fundamentalmente el 16S rRNA como marcador → **estructura**
- Monitorizar y predecir **cambios en los patrones de diversidad** de las comunidades de microorganismos, en función de las condiciones ambientales → **dinámica**.
- Examinar genes/operones en busca de **enzimas de interés**, con aplicaciones médicas, industriales, etc.
- Examinar **mecanismos de secreción, regulación, y transducción de señales**, asociados a genes de interés.

Metagenómica aplicada a la evaluación de la diversidad microbiana



CTTCTAGTTCCA



Técnicas que no requieren extracción de ácidos nucleicos:

- Hibridación in situ con fluorescencia (FISH)

Técnicas basadas en la extracción de ácidos nucleicos (ADN/ARN):

- Construcción de bibliotecas metagenómicas.

- Fingerprinting:

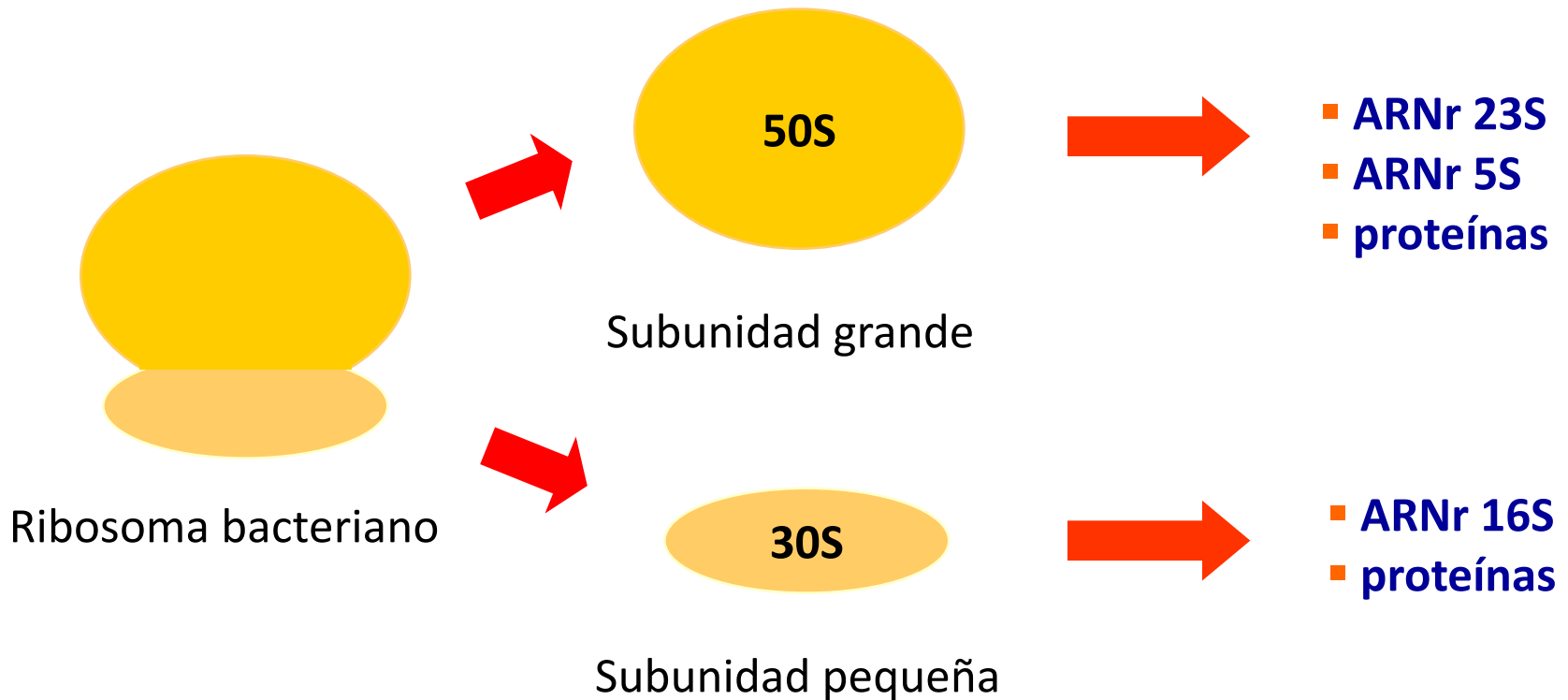
- Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante o de temperatura (DGGE/TGGE)
- Polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP)
- Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción terminales (T-RFLP)

- PCR y RT-PCR en tiempo real (*Real Time PCR*) (cuantitativas).

- Microarrays (Chips de ADN)

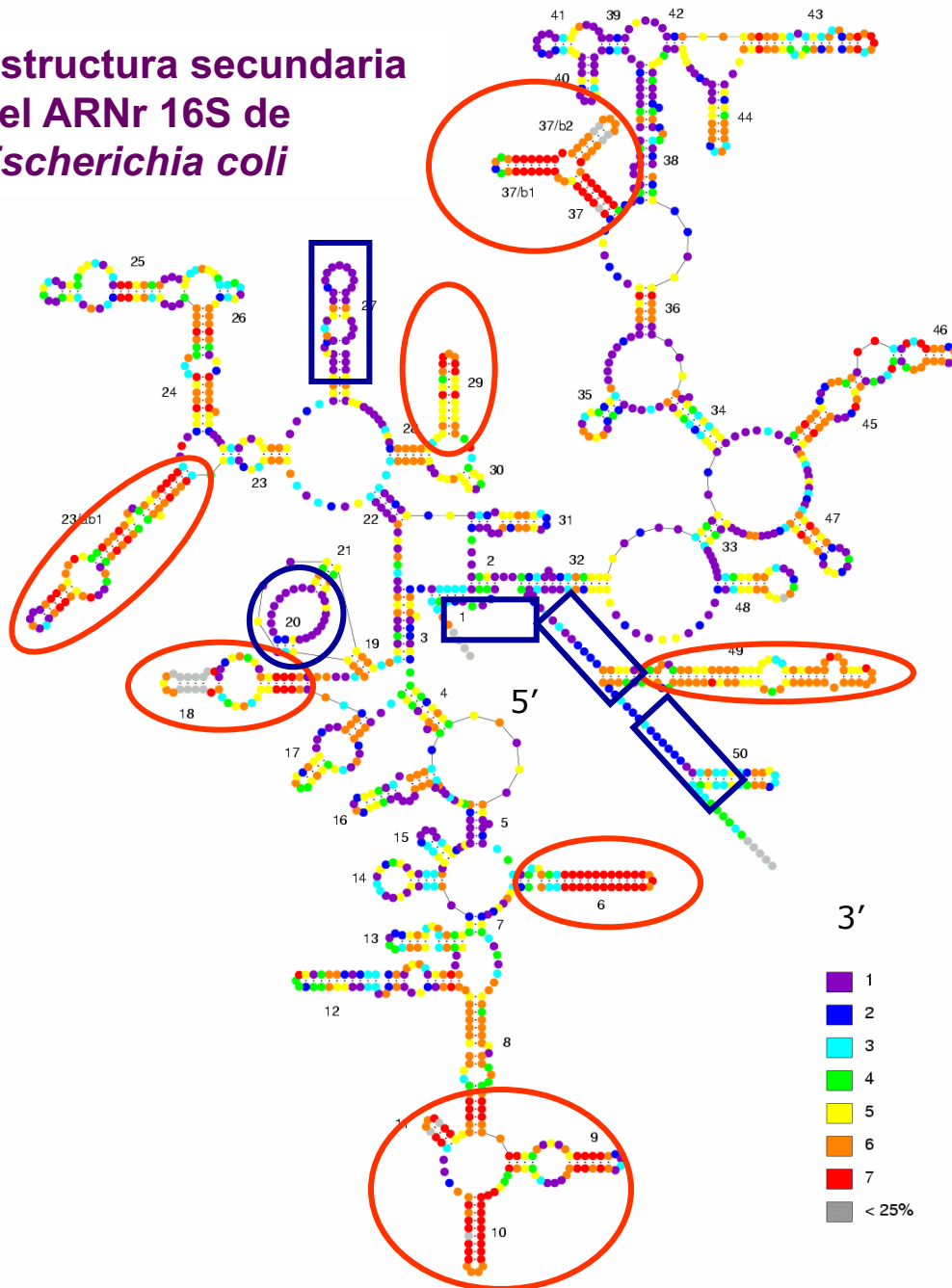
- Secuenciación masiva (*High-throughput sequencing, Deep sequencing, Next Generation Sequencing*).

ARN ribosómico bacteriano.



- La secuencia de bases del gen del ARNr 16S tiene interés filogenético (cronómetro molecular).
- Se pueden diferenciar e identificar bacterias a partir de la secuencia de su gen del ARNr 16S.

Estructura secundaria del ARNr 16S de *Escherichia coli*



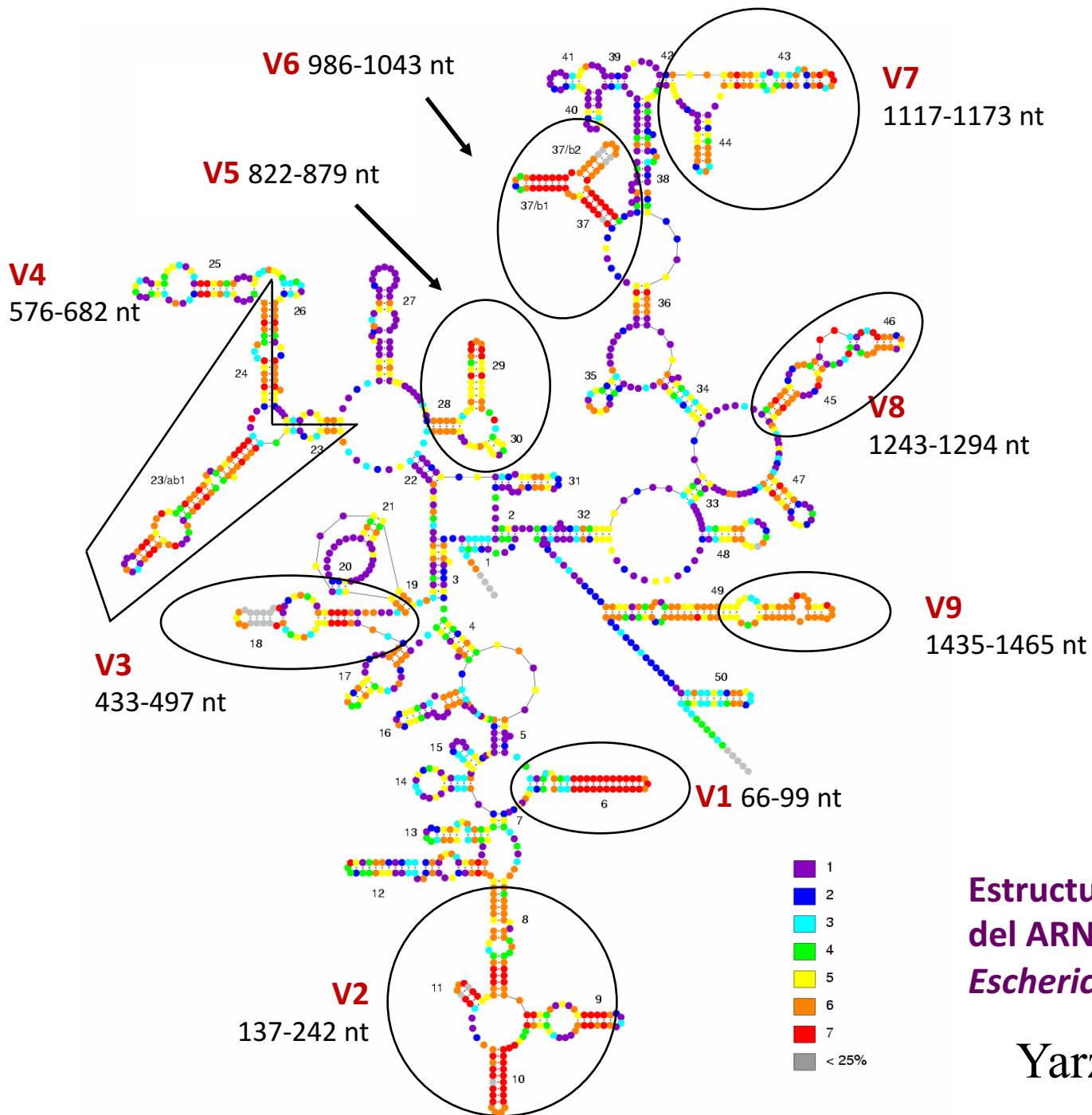
Zonas conservadas

Zonas hipervariables

Regiones específicas de grupo:

- división
- reino
- familia
- género
- especie

Diseño de cebadores (*primers*) y sondas (*probes*)

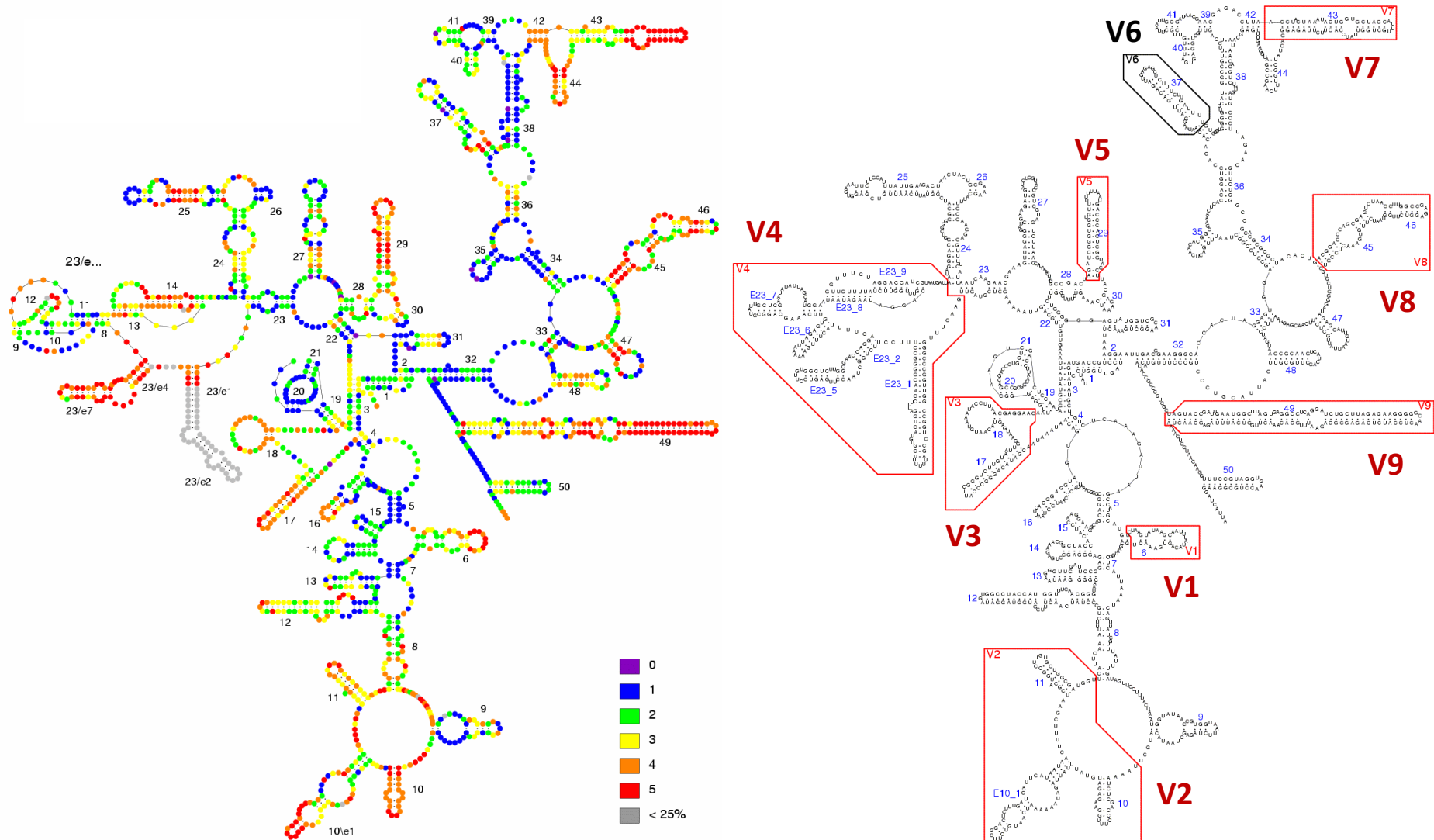


Hay 9 regiones consideradas hipervariables en la secuencia del 16S rRNA de bacterias (V1 a V9)

Estructura secundaria del ARNr 16S de *Escherichia coli*

Yarza et al., (2014).

Estructura secundaria del ARNr 18S eucariota (*Saccharomyces cerevisiae*)

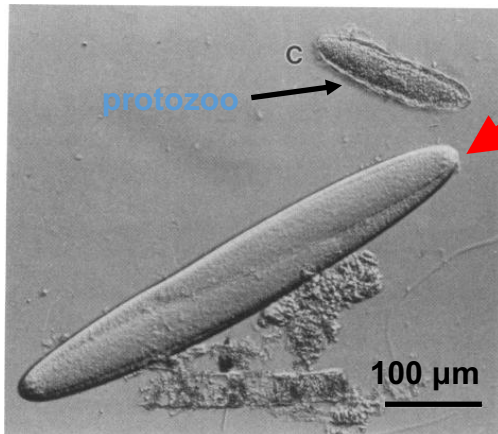


doi: 10.1093/nar/30.1.183 *Nucleic Acids Res* January 1, 2002 vol. 30 no. 1 183-185

<http://nar.oxfordjournals.org/content/suppl/2001/12/18/30.1.183.DC1/varmaps.html>

Tamaño, forma y asociaciones.

Tamaño de los procariotas: muy variable



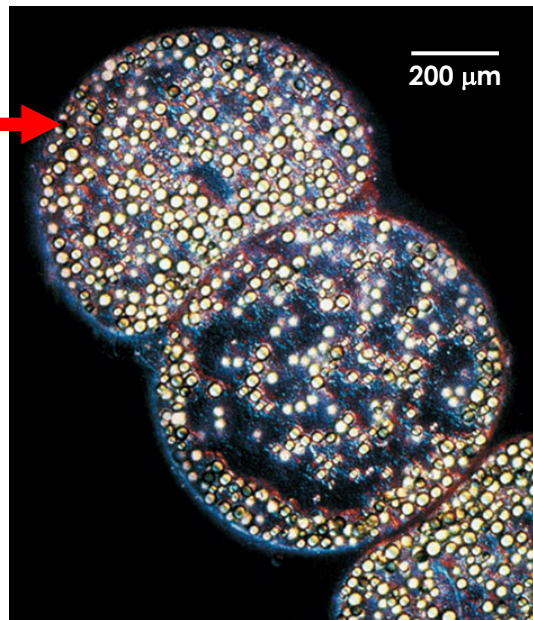
500 μm de longitud
Epulopiscium fishelsoni

Wolffia globosa

Planta con flores,
400 μm diámetro



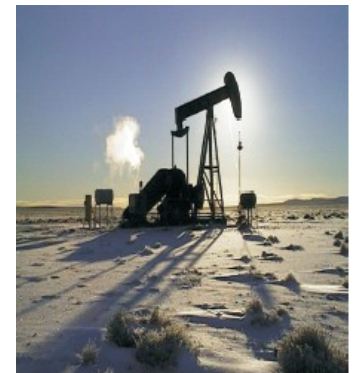
750 μm de diámetro
Thiomargarita namibiensis



Importancia industrial de los productos microbiológicos

Industria farmacéutica y cosmética, industria alimentaria:

- Expansores del plasma (dextrano)
- Espesantes y emulgentes de alimentos, cosméticos, fármacos, pinturas, agroquímicos (xantano, alginato, otros)
- Aditivos de la industria de extracción del petróleo (xantano)

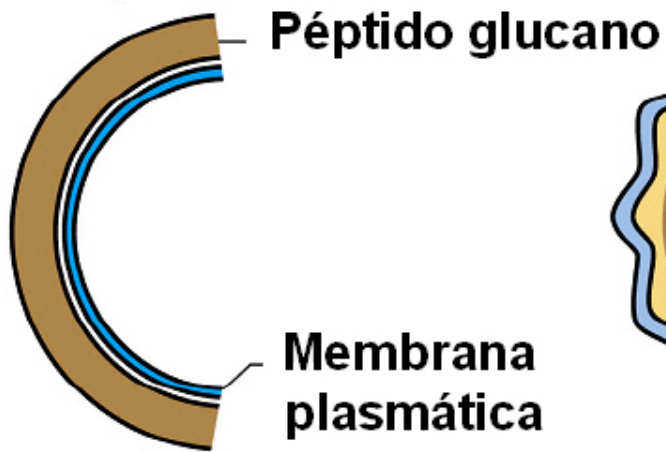


Recordatorio..... La envuelta celular

Pared celular

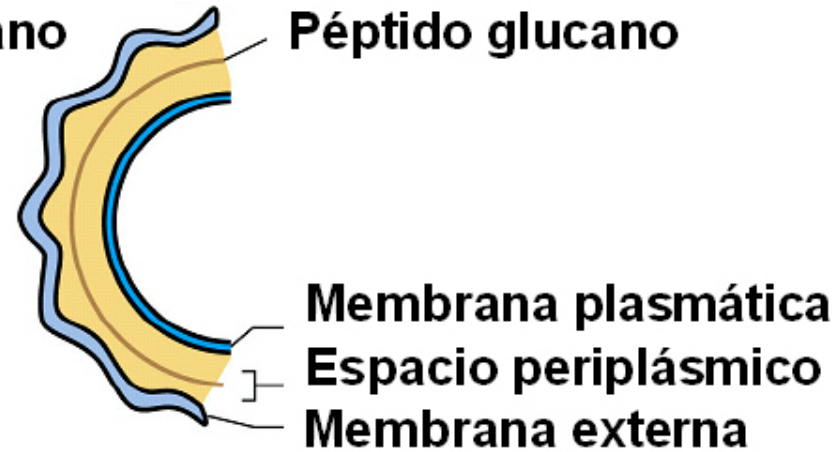
Bacterias Gram positivas y Gram negativas

Gram-positiva

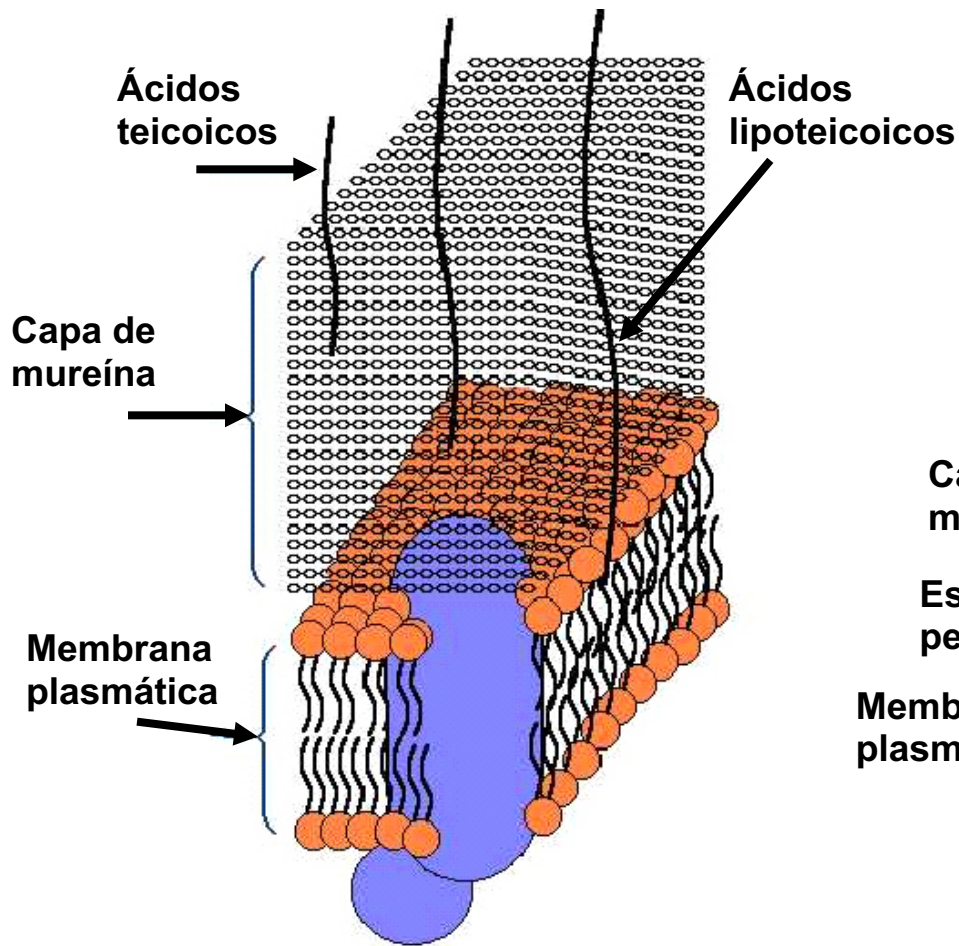


(a)

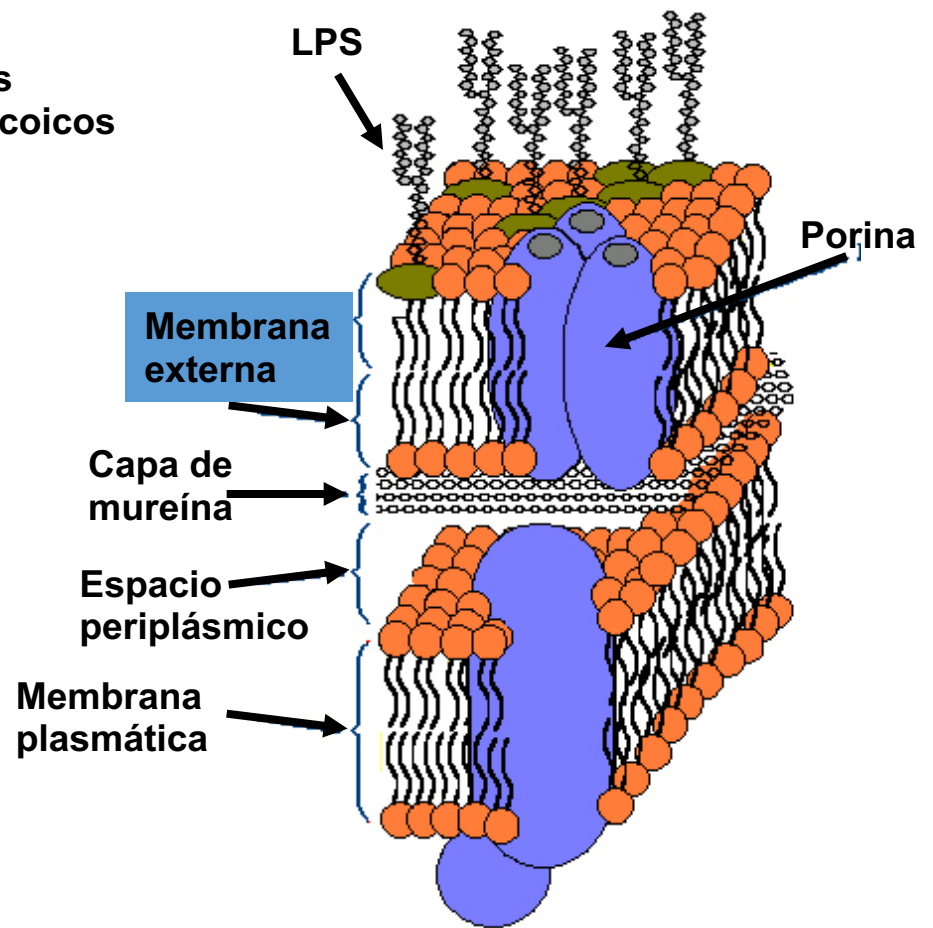
Gram-negativa



(b)



Gram positivas

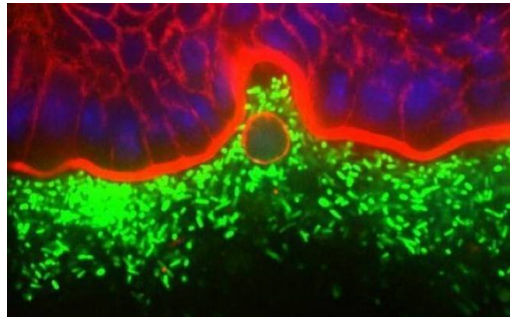
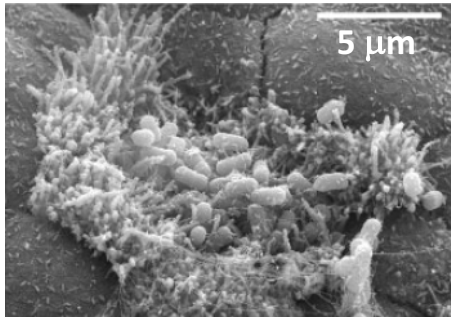


Gram negativas

Pili o fimbrias.

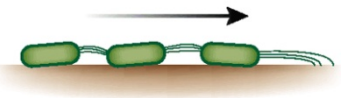
Importancia y funciones de los pili adhesivos

- Adhesinas** →
- Fijación sobre superficies sólidas (**vivas o inertes**)
 - Formación de **biopelículas**
 - **Evasión** de las **defensas inmunes**



Importantes factores de virulencia de los microorganismos patógenos

• Todos los pili adhesivos en Gram positivas y Gram negativas son responsables de la **adhesión específica** de los patógenos a los **tejidos** de su hospedador, facilitando la colonización e invasión.



Fermentaciones

Aplicaciones:

Industria de lácteos y quesos, embutidos



F. láctica



F. butírica

queso suizo



F. propiónica

Fabricación de pan y bebidas alcohólicas



F. alcohólica

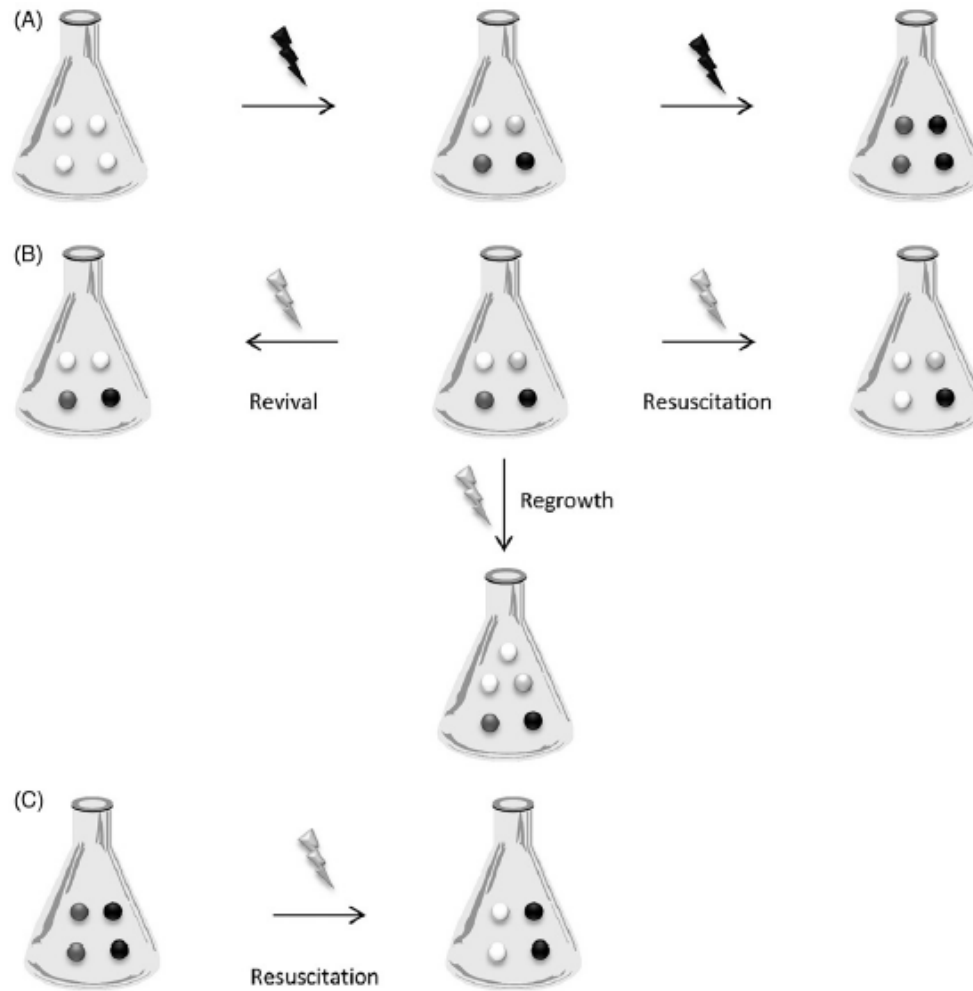


Disolventes y explosivos

F. butanólica

Viables pero no cultivables (VBNC)
Artículo para discusión

¿Cómo distinguir entre Resucitación, sobrevivencia y recrecimiento?





Current Perspectives on Viable but Non-culturable State in Foodborne Pathogens

Xihong Zhao¹, Junliang Zhong¹, Caijiao Wei¹, Chii-Wann Lin² and Tian Ding^{3*}

¹ Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, Key Laboratory for Hubei Novel Reactor and Green Chemical Technology, School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan, China,

² Institute of Biomedical Engineering, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ³ Department of Food Science and Nutrition, Zhejiang Key Laboratory for Agro-Food Processing, Zhejiang University, Hangzhou, China

The viable but non-culturable (VBNC) state, a unique state in which a number of bacteria respond to adverse circumstances, was first discovered in 1982. Unfortunately, it has been reported that many foodborne pathogens can be induced to enter the VBNC state by the limiting environmental conditions during food processing and preservation, such as extreme temperatures, drying, irradiation, pulsed electric field, and high pressure stress, as well as the addition of preservatives and disinfectants. After entering the VBNC state, foodborne pathogens will introduce a serious crisis to food safety and public health because they cannot be detected using conventional plate counting techniques. This review provides an overview of the various features of the VBNC state, including the biological characteristics, induction and resuscitation factors, formation and resuscitation mechanisms, detection methods, and relationship to food safety.

Keywords: VBNC, foodborne pathogens, induction, detection method, resuscitation

INTRODUCTION

The viable but non-culturable (VBNC) state, a special physiological state, was first discovered

OPEN ACCESS

Edited by:

Lanming Chen,
Shanghai Ocean University, China

Reviewed by:

Weili Liang,
Chinese Center for Disease Control
and Prevention, China
Thandavarayan Ramamurthy,
Translational Health Science
and Technology Institute (DBT), India
Antonio Valero,
Universidad de Córdoba, Spain