

## DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

---

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

### *Utilización de Oligonucleótidos en Biosensores*

Docente a cargo: **Dr. Javier Montserrat**

Investigador Docente concursado (UNGS) nivel A. Investigador Independiente (CONICET)

Fechas de dictado: **chequear con el docente**

#### **Carga horaria:**

El curso se dictará en modalidad semestral distribuyendo las horas de cursado en: 6 horas semanales durante 17 semanas. La duración total del curso será de **100** (cien) horas. Todas las clases son presenciales e incluyen clases de teoría, práctica y seminarios.

#### **Puntaje:**

El curso otorgará **5 puntos** para los estudiantes admitidos del Doctorado en Ciencia y Tecnología.

#### **Vacantes disponibles:**

Como consecuencia de la limitación en el acceso de los trabajos de laboratorio, la cantidad de vacantes disponibles es 4 (cuatro).

#### **Destinatarios:**

El curso está destinado a alumnos de posgrado, egresados de carreras relativas a la licenciatura en química, bioquímicos, biotecnólogos, biólogos.

#### **Objetivos:**

El curso de "Utilización de Oligonucleótidos en Biosensores" tiene por objetivo hacer una presentación de algunos aspectos de la química de los oligonucleótidos (estructura y síntesis química) y desarrollar la temática de la aplicación de este tipo de moléculas en dispositivos de reconocimiento y cuantificación donde la capa de biorreconocimiento es una secuencia de ADN o ARN. Se prestará especial atención a los biosensores de base electroquímica.

#### **Metodología y actividades:**

- Presentación de conceptos generales y ejemplos seleccionados por los docentes, en clases teórico-prácticas.
- Preparación de seminarios por parte de los estudiantes basados en artículos científicos seleccionados por los docentes para cada unidad.
- Trabajos prácticos con entrega de un informe.

## DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

### Contenidos

#### Unidad I: Estructura de los ácidos nucleicos

Definición de términos básicos: bases, nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos, nomenclatura y símbolos. Esquema de numeración atómica. Ángulos de torsión: definición y sus rangos. Estados conformacionales del azúcar: el ciclo pseudorotacional. Orientaciones de la base alrededor del enlace glicosídico. Orientaciones del grupo fosfato. Parámetros básicos de las hélices.

Las fuerzas que estabilizan la asociación entre bases: el puente de H y el apilamiento.

Estructuras comunes del ADN: estructuras primaria y secundaria. Formas A, B y Z.

Estructura del ARN: estructura primaria y secundaria: buldges, hairpins, loops. Estructuras tipo A y A'.

#### Unidad II: Síntesis química de los ácidos nucleicos:

Síntesis de ADN: obtención de las fosforamiditas, el problema de la protección de las bases, "desprotección rápida vs desprotección normal", la protección de la posición 5'.

Síntesis de oligonucleótidos en fase sólida: fases tipo CPG, derivatización de la fase. El ciclo de síntesis, desprotección, acoplamiento, oxidación y capping. Requerimientos de los reactivos.

Síntesis de ARN: el problema de la protección de la posición 2', el ciclo de síntesis en fase sólida, condiciones de desililación.

Desprotección y purificación de los oligonucleótidos.

#### Unidad III: Selección molecular in-vitro de ácidos nucleicos

SELEX: el origen.

La diversidad estructural: espacio de secuencias, espacio de formas, redes neutrales.

Distintas metodologías de selección molecular in-vitro: sobre soportes de inmovilización y en solución (electroforesis capilar). Protocolos con "magnetic beads y marcadores fluorescentes" (Flu-Mag).

Aptámeros contra moléculas orgánicas pequeñas: nucleósidos, cofactores, aminoácidos, carbohidratos, productos naturales, colorantes y antibióticos.

Aptámeros contra macromoléculas: proteínas y estructuras de ácidos nucleicos.

Campo de aplicación de los aptámeros.

#### Unidad IV: Genosensores

Biosensores: principios básicos de funcionamiento de sensores microgravimétricos, ópticos y electroquímicos, discusión de ejemplos escogidos.

#### Unidad V: Aptasensores

Aptasensores microgravimétricos, aptasensores ópticos, aptasensores electroquímicos.

## DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

**Trabajo práctico:** en función de las disponibilidades experimentales se evaluará la realización de alguna de las siguientes opciones:

- 1) Síntesis y purificación de una secuencia de ADN utilizando un sintetizador de oligonucleótidos (MM6, BioAutomation) y un equipo de cromatografía líquida de alta presión.
- 2) Discusión y aplicación de los programas de análisis estructural de oligonucleótidos: RNA structure, RNA fold y el programa de visualización de macromoléculas VMD. Aplicación a una situación-problema.

**Cronograma:**

Semana	Tema/Actividad/Lectura
1	<b>Unidad I: Estructura de los ácidos nucleicos.</b> <b>Lectura:</b> Principles of Nucleic Acid Structure. W. Saenger. Springer-Verlag. <b>1984.</b> Capítulo 2 y 4
2	<b>Unidad I: Estructura de los ácidos nucleicos.</b> <b>Lectura:</b> Principles of Nucleic Acid Structure. W. Saenger. Springer-Verlag. <b>1984.</b> Capítulo 6 y 9.
3	<b>Unidad I: Estructura de los ácidos nucleicos.</b> <b>Lectura:</b> Principles of Nucleic Acid Structure. W. Saenger. Springer-Verlag. <b>1984.</b> Capítulo 10 y 11.
4	<b>Unidad I: Estructura de los ácidos nucleicos.</b> <b>Lectura:</b> Principles of Nucleic Acid Structure. W. Saenger. Springer-Verlag. <b>1984.</b> Capítulo 10 y 11.
5	<i>Presentación de los seminarios de Estructura de AN-Nucleótidos.</i> <i>Presentación de los seminarios de Estructura de AN-Dobles cadena.</i> <i>Distribución de los Trabajos Prácticos individuales.</i>
6	<b>Unidad II: Síntesis química de los ácidos nucleicos.</b> <b>Lectura:</b> a) Nucleic Acids in Chemistry and Biology. G. M. Blackburn, M. J. Gait. Oxford University Press. <b>1996.</b> b) Oligonucleotide synthesis. A practical approach. M. J. Gait (Ed). IRL Press. Oxford. <b>1984.</b>
7	<b>Unidad III: Selección molecular in-vitro de los ácidos nucleicos.</b> <b>Lectura:</b> a) The Aptamer Handbook. S. Klussman. Capítulos 1, 2 y 4. b) Aptamers in Bioanalysis. M. Mascini. Capítulos 1 y 2. <i>Presentación de los seminarios de Síntesis de AN.</i>
8	<b>Unidad III: Selección molecular in-vitro de los ácidos nucleicos..</b> <b>Lectura:</b> : a) The Aptamer Handbook. S. Klussman. Capítulos 1, 2 y 4. b) Aptamers in Bioanalysis. M. Mascini. Capítulos 1 y 2. <i>Presentación de los seminarios de SELEX.</i>
9	<b>Unidad IV: Genosensores.</b> Entrega de los trabajos prácticos individuales.
10	<b>Unidad IV: Genosensores.</b> <i>Presentación de los seminarios de genosensores.</i>

## DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

11	<b>Unidad V: Aptasensores.</b> <b>Lectura:</b> a) Aptamers in Bioanalysis. M. Mascini. Capítulos 3, 4, 7 y 8. b) Functional Nucleic Acids for Analytical Applications. Yingfu Li, Yi Lu. Capítulo 7.
12	<b>Unidad V: Aptasensores.</b> <b>Lectura:</b> a) Aptamers in Bioanalysis. M. Mascini. Capítulos 3, 4, 7 y 8. b) Functional Nucleic Acids for Analytical Applications. Yingfu Li, Yi Lu. Capítulo 7.
13	<b>Unidad V: Aptasensores.</b> <b>Lectura:</b> a) Aptamers in Bioanalysis. M. Mascini. Capítulos 3, 4, 7 y 8. b) Functional Nucleic Acids for Analytical Applications. Yingfu Li, Yi Lu. Capítulo 7.
14	<b>Unidad V: Aptasensores.</b> <b>Lectura:</b> a) Aptamers in Bioanalysis. M. Mascini. Capítulos 3, 4, 7 y 8. b) Functional Nucleic Acids for Analytical Applications. Yingfu Li, Yi Lu. Capítulo 7.
15	Presentación de los seminarios sobre Aptasensores. Distribución del final domiciliario.
16	<b>Libre:</b> consultas sobre final domiciliario.
17	<b>Evaluación final.</b> Entrega de final domiciliario

### Régimen de Aprobación:

Para monitorear el grado de avance de los estudiantes, los alumnos deberán presentar públicamente una serie de seminarios que serán acordados previamente con ellos. Los mismos deberán ser aprobados con una nota mínima de 4 (cuatro). En caso de no alcanzar esta calificación, se recuperará con un coloquio oral.

El curso, de 100hs de duración y con evaluación final, está estructurado sobre la base de clases teóricas, clases de discusión de bibliografía y trabajos prácticos. Se requiere una asistencia mínima a las clases del 75 %, siendo obligatorio cumplir con la entrega de un trabajo práctico.

Para aprobar la materia, los estudiantes deberán rendir un examen final. Estarán habilitados para rendir examen final aquellos estudiantes que hayan obtenido una nota mínima de 4 (cuatro) en los seminarios y asistido al menos al 75% de las clases.

### Bibliografía General:

- Principles of Nucleic Acid Structure. W. Saenger. Springer-Verlag. 1984.
- Principles of Nucleic Acid Structure. Stephen Neidle. Elsevier. 2008.
- Nucleic Acids in Chemistry and Biology. G. M. Blackburn, M. J. Gait. Oxford University Press. 1996.
- Understanding DNA. Third Edition. C. R. Calladine, H. Drew, B. Luisi, A. Travers. Academic Press. 2004.
- The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and their Applications. S. Klussman. Wiley-VCH. 2006.
- Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids. Z. Shabarova, A. Bogdanov. VCH. 1994.

## DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B".*

- Chemistry of Nucleosides and Nucleotides. L. Volume 1. Townsend (Ed.). Plenum Press. New York. 1988.
- Nucleic Acids. Structures, Properties and Functions. V. A. Bloomfield, D. M. Crothers, I. Tinoco. University Science Books. Sausalito, California. 2000.
- Aptamers in Bioanalysis. Marco Macini Eds. Wiley. 2009.
- Functional Nucleic Acids for Analytical Applications. Yinfu Li, Yi Lu Eds. Springer. 2009.

### Bibliografía por Unidad:

#### *Unidad I: Estructura de los ácidos nucleicos*

- a) Nucleic Acids in Chemistry and Biology. G. M. Blackburn, M. J. Gait. Oxford University Press. 1996. Capítulo 2.
- b) Understanding DNA. Third Edition. C. R. Calladine, H. Drew, B. Luisi, A. Travers. Academic Press. 2004.
- c) Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids. S. Shabarova, A. Bogdanov. VCH. 1994.

#### *Unidad II: Síntesis química de los ácidos nucleicos*

- a) Oligonucleotide synthesis. A practical approach. M. J. Gait (Ed). IRL Press. Oxford. 1984;
- b) Gel electrophoresis of nucleic acids. A practical approach. D. Rickwood, B. D. Hames (Eds) IRL Press, Oxford 1982.

#### *Unidad III: Selección molecular in-vitro de ácidos nucleicos*

##### SELEX: el origen

- a) D. L. Robertson, G. F. Joyce. Nature 1990, 344, 467-468.
- b) A. D. Ellington, J. W. Szostak. Nature 1990, 346, 818-822.
- c) C. Tuerk, L. Gold. Science 1990 249, 505-510.

##### La diversidad estructural

- a) The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and their Applications. S. Klussman. Wiley-VCH. 2006, capítulo 2.

##### Distintas metodologías de selección molecular in-vitro

- a) Methods developed for SELEX. S. Chandra, B. Gopinah. Anal. Bioanal. Chem. 387, 171-182, 2007; SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. Biomol. Eng. 24, 381-403, 2007.

##### Aptámeros contra macromoléculas

- a) Functional aptamers and aptazymes in biotechnology, diagnostics, and therapy. M. Famulok, J. S. Hartig, G. Mayer. Chem. Rev. 107, 3715-3743, 2007;

## DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). *Resolución N° 1178/11. Calificación "B"*.

b) Nucleic acid aptamers and enzymes as sensors. N. K. Navani, Y. Li. *Curr. Op. Chem. Biol.* 10, 1-10, 2006;

c) Aptamer-based assays for diagnostics, environmental and food analysis. S. Tomelli, M. Minunni, M. Mascini. *Biomol. Bioeng.* 24, 191-200, 2007.

### *Unidad IV: Genosensores:*

#### Biosensores microgravimétricos

Y. Okahata, M. Kasawe, K. Niidura, F. Ohtaka, H. Furusawa, Y. Ebara. *Anal. Chem.* 70, 1288-1296, 1998.

#### Biosensores ópticos

a) Fluorescence-based nucleic acid detection and microarrays. J. R. Epstein, Israel Biran, D. R. Walt. *Analytica Chimica Acta* 469, 3-36, 2002 (Review);

b) M. Sánchez-Carbayo, William Bornmann, and Carlos Cordon-Cardo. *DNA Microchips: Technical and Practical Considerations Current Organic Chemistry* 4, 945-971, 2000 (Review);

c) Molecular beacons. W. Tan, K. Wang and T. J Drake. *Curr. Op. Chem. Biol.* 8, 547, 2004 (review).

#### Biosensores electroquímicos

a) Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridization events. F. Lucarelli, S. Tombelli, M. Minunni, G. Marrazza, M. Mascini. *Anal. Chim. Acta.* 609, 139-159, 2008;

b) Electrochemical DNA sensors. T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton. *Nature Biotech.* 21, 1192-1199, 2003.

### *Unidad V: Aptasensores*

Electrochemic Aptamer-Based Sensors. I. Willmer, M. Zayats. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 6408-6414, 2007.