



UNIVERSIDAD DEL SURESTE



ESCUELA DE MEDICINA

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA CLÍNICA

CATEDRÁTICO: HUGO MIJANGOS NAJERA

ALUMNO: MARIANA CATALINA SAUCEDO DOMINGUEZ

8° SEMESTRE GRUPO "A"

**COMITÁN DE DOMÍNGUEZ, CHIAPAS, 27 DE OCTUBRE DEL
2020**

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Técnicas comunes

Electroforesis en gel

Es una técnica utilizada para separar el ADN, ARN o proteínas en base a su tamaño y carga eléctrica.

Proceso

El gel tiene muescas en forma de ranuras en donde se coloca las muestras de ADN, antes de eso, en el gel se coloca una cámara y cada extremo se conecta a un electrodo + y -, el cuerpo principal de la cámara se llena de solución amortiguadora. Una vez que el gel está en la cámara cada una de las muestras de ADN que se quiere analizar se transfiere a uno de los pozos, se aplica la energía eléctrica a la cámara y empieza a fluir la corriente a través del gel, cuando se separan los fragmentos se examina el gel, cuando el gel se tiñe con pigmento que se une al ADN y se coloca bajo la luz UV, los fragmentos brillan (banda), y cada una contiene fragmentos de ADN.

Aplicaciones

Comparación de muestras biológicas distintas en personas sanas/enfermos.

Ventajas y desventajas

Tiene la ventaja de ser una técnica sencilla, y como inconvenientes es que necesita comparar datos con otros conocidos, se tiende a la miniaturización.

Técnicas para ADN

PCR

Es una técnica desarrollada en 1986 por Kary Mullis, es la amplificación de ADN in vitro por medio de la polimerización de cadena de ADN usando un termociclador

Proceso

Incluye 3 pasos que se repiten 25 veces o más; -desnaturalización: separación de la doble hebra de ADN a una temp de 25°C-95° por 15-40 segs .Apareamiento: los cebadores "primers" reaccionan con la hebra sencilla del ADN y se pega a lugares específicos (se baja la temperatura) Polimerización: una polimerasa de ADN extiende los primers y coloca dinucleótidos trifosfatados de 5' a 3'

Aplicaciones

detección de agentes infecciosos; hepatitis B y C, VIH, VPH, y otros, análisis de ADN de cualquier organismo vivo o muerto, mutagénesis dirigida, investigación forense, etc.

Ventajas y desventajas

Tiene la ventaja de que a partir de una muestra pequeña de ADN se puede hacer, desventaja es que se necesitan primers específicos, contaminarse con otro ADN.

Southern blot

Es un método de BM, que permite detectar la presencia de ADN en una mezcla compleja y para ello se usa la electroforesis en gel de agarosa

Proceso

Para realizarlo primero es la purificación del ADN, tratar con la enzima de restricción, luego es la electroforesis en gel de agarosa, desnaturalización con solución alcalina, transferencia a membrana de nitrocelulosa, incubación con sonda marcada, lavado del exceso de sonda y por ultimo el revelado con placa fotográfica.

Aplicaciones

Detección del tamaño y cantidad de un fragmento de ADN de interés.

Ventajas y desventajas

Tiene la ventaja de que permite cuantificar tamaño y abundancia y la desventaja es que es lenta y requiere grandes cantidades de ADN

Técnicas para ARN

Notherrn blot

Es una técnica utilizada para patrones de expresión de un tipo específico de molécula de ARN como comparación relativa entre un conjunto de diferentes muestras de ARN.

Proceso

El procedimiento comienza con la extracción del RNA de una muestra, son separadas por electroforesis en gel y son transferidas a una membrana de Nailon por capilaridad o un sistema de transferencia al vacío, después del marcaje de la sonda esta se hibrida con el RNA en la membrana y esta se lava para asegurar que la sonda se ha unido específicamente.

Aplicaciones

Detección del tamaño y numero de transcripcion es

Ventajas y desventajas

La ventaja es que es sensible para detectar expresiones de ARNm y el inconveniente es que es lenta y requiere grandes cantidades de ARN

hibridación in situ

Es una técnica que consiste en marcar una hebra sencilla de ARN o ADN denominada sonda y permitir que se empareje con su secuencia complementaria en el ARN o el ADN

Proceso

Se utiliza una sonda, que debe de estar hecha de ADN o ARN, una molécula de cadena sencilla con una porción química o radiactiva puede ser detectada, la zona de cadena sencilla es hibridada y ahí comienza el proceso. La sonda se mezcla con la muestra de tejido buscando que la zona de cadena sencilla se una con el ARNm expresado con el ADN que se quiere localizar, después se lava la sonda no unida y se ve donde se expresa el gen o el fragmento de ADN en la célula.

Aplicaciones

Analizar la presencia y/o distribución de ADN o RNA transcrito de interés en tejidos o células

Ventajas y desventajas

La ventaja es que las sondas mas sensibles y especificas de ADN y la desventaja es que las sondas de ARN son más lábiles que las de ADN

Técnicas para proteínas

Western blot

Es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada.

Proceso

Las proteínas se separan mediante electroforesis en gel, son transferidas a una hoja de papel especial de nitrocelulosa (blotting). Las proteínas retienen el mismo patrón de separación que tenían en el gel, se agrega un Ac a la solución para que se una con su proteína específica, este tiene unida una enzima o un colorante. La localización del Ac se revela mediante la incubación con sustrato que modifica al colorante o que la enzima transforma en un producto coloreado.

Aplicaciones

Examinar cambios a niveles proteicos

Ventajas y desventajas

Tiene como ventaja que es muy sensible, detecta el peso molecular de las proteínas y como desventaja es que es poco específica.

ELISA

Es una técnica que usa anticuerpos ligados a enzimas para detectar y medir la cantidad de sustancia en una solución.

Proceso

Tiene cuatro fases; conjugación del Ac o Ag con una enzima, unión del Ag a los pocillos, formación de una o mas capas de inmunocomplejos y revelado de la reacción enzimática.

Aplicaciones

Cuantificación de moléculas

Ventajas y desventajas

Tiene la ventaja de ser sencilla, rápida, económica la desventaja es que requiere visualización

Referencias bibliográficas

- Tomas, K. (2011). “Manual de biología molecular; técnicas de laboratorio”. Research gate.
- Duran, L., Trapero, C., Sánchez, C., Pérez, D & Martínez, B. (2010). “Aplicación de las técnicas de biología molecular en oncología”. Madrid, España.
- Franco, V. (2013). “Técnicas de biología molecular”. Universidad Rafael Núñez; Colombia.