



BIOLOGIA MOLECULAR EN LA CLINICA.

CUADRO SINOPTICO CORRESPONDIENTE AL TEMA DE TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR INCLUYENDO LA PCR, SOUTHERN BLOT, NORTHERN BLOT.

DOCENTE: QFB. HUGO NÁJERA MIJANGOS.

PRESENTA: XIMENA ALEJANDRA GOMEZ BRIONES

COMITÁN DE DOMÍNGUEZ CHIAPAS, 27 DE OCTUBRE DEL 2020.

TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

PCR

Reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (polymerase chain reaction) o como RCP, es una técnica de la biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis.

Su objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una sola copia de ese fragmento original, o molde.

sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar, con una probabilidad muy alta, virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado.

El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2-3 pasos a diferentes temperaturas.

Inicio

Este paso consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de 94-96 °C (ó 98 °C si se está usando una polimerasa termoestable extrema), que se mantiene durante 1-9 minutos. Esto solo es necesario para ADN polimerasas que requieran activación por calor.

Desnaturalización

En primer lugar, se desnaturaliza el ADN (se separan las dos cadenas de las cuales está constituido). Este paso puede realizarse de diferentes modos, siendo el calentamiento (94-95 °C) de la muestra la forma más habitual. La temperatura a la cual se decide realizar la desnaturalización depende, por ejemplo, de la proporción de G+C que tenga la cadena, como también del largo de la misma. Otros métodos, raramente empleados en la técnica de la PCR, serían la adición de sales o agentes químicos capaces de realizar la desnaturalización.

Alineamiento o unión del cebador

Se producirá la hibridación del cebador, es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a 40-68 °C durante 20-40 segundos (según el caso), permitiendo así el alineamiento.

Elongación final

Etapa única que se lleva a cabo a una temperatura de 70-74 °C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente ampliado

SOUTHERN BLOT

Es una técnica de laboratorio utilizada para detectar una secuencia específica de ADN en una muestra de sangre o tejido.

Una enzima de restricción se utiliza para cortar una muestra de ADN en fragmentos que se separan mediante electroforesis en gel. Los fragmentos de ADN son transferidos del gel a la superficie de una membrana.

La membrana se expone a una sonda de ADN marcada con un marcador radiactivo o químico. Si la sonda se une a la membrana, entonces la secuencia de la sonda está presente en la muestra.

Los fragmentos más grandes, migran a la parte superior y los fragmentos más pequeños se van a encontrar en la parte inferior. Cuando se termina de correr el gel, se realiza la transferencia a una membrana. Es como hacer un sandwich: gel, membrana en la parte superior y muchas toallas de papel. Lo que se busca es permitir que una solución haga que el ADN que se encuentra en el gel pase a la membrana.

NORTHERN BLOT.

Es una técnica de detección de moléculas de ácido ribonucleico (ARN) de una secuencia dada dentro de una mezcla compleja (por ejemplo, un ARN mensajero para un péptido dado en una muestra de ARN total).

Se toma la mezcla de ARN y se somete a una electroforesis en gel a fin de separar los fragmentos de acuerdo con su tamaño

El procedimiento general comienza con la extracción del ARN total de una muestra de tejido homogeneizado. El ARNm se puede aislar mediante cromatografía para retener solamente los ARN con colas de poli(A).

Las muestras de ARN se separan entonces mediante electroforesis en gel. Dada la fragilidad de los gels y la dificultad para que las sondas penetren en la matriz, las muestras de ARN, separadas por tamaño tras la electroforesis, se transfieren a una membrana de nailon, bien por capilaridad o empleando un sistema de vacío.

Bibliografía

Alejandra Serrato Díaz¹, L. F. (2018). PCR: reacción en cadena. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*, 45-67.

Fernández, P. L. (5 de AGOSTO de 2017). Técnicas de hibridación. *Hospital Clínic/IDIBAPS/ Universidad de Barcelona*, págs. 67-98.