

TECNICAS DE DIAGNOSTICO MOLECULAR

técnicas que nos permiten determinar mutaciones o polimorfismos

pretende la determinación de la causa de una enfermedad pudiendo ser de origen genético o bien infeccioso

TECNICAS

PCR

técnica para hacer muchas copias de una determinada región de ADN in vitro

aplicación

- clínica: detección enfermedades humanas
- genética: secuenciación molecular y clonación y mutagénesis
- industrias alimentarias: la determinación de toxinas y patógenos
- sector agrícola: desarrollo de productos y semillas de calidad, procesamiento de granos y clonación de genes.

procedimiento

Desnaturalización

84°C durante 5 minutos

temperatura

para

rompe los enlaces de hidrógeno del ADN

Recocido

Imprimaciones

a través

cuando

la temperatura se reduce a 52-65 °C

Extensión

taq polimerasa

se une

imprimación y los nucleótidos de ADN

cuando

temperatura se eleva de nuevo a 72 °C durante 5 minutos.

obtiene

nuevas hebras dobles de ADN

pasan a métodos

electroforesis

NORTHERN BLOT

técnica de separación de ARN

aplicación

- sobreexpresión de genes causantes de cáncer
- expresión génica en caso de rechazo de trasplante
- detección de microARNs virales

procedimiento

aislamiento de ARN

- lisis celular
- interrupción de la membrana
- inhibición de la ribonucleasa
- desprotección
- recuperación de ARN intacto

separación de ARN por electroforesis

gel de agarose con el propósito de la separación del ácido nucleico

transferencia ARN a membrana

membrana de nylon

mecanismos de acción

acción capilar

interacción física

1 hibridación

1 radio o sonda etiquetada fluorescentemente para identificar la inmovilización específica del ARN,

2 lavado

2 amortiguador que contiene una menor concentración de sal para eliminar el exceso de sondas

visualización

detención

autoradiografía

membranas

película de rayos X

resultado

bandas oscuras = sondas radiactivas

SOUTHERN BLOT

técnica analítica para identificar secuencias específicas de ADN

aplicación

- Identificar ADN
- Infecciones virales y bacterianas.
- estudio de la mutación genética, la eliminación y los reordenamientos.
- Huellas dactilares de ADN
- enfermedades neonatales y genéticas como el cáncer.
- Descubrimiento de RFLP.

procedimiento

Extraer y purificar el ADN

- Separamos el ADN
- incubamos detergente (libera proteínas celulares y ADN)
- eliminan proteínas extracción orgánica y no orgánica
- purificar el ADN con alcohol
- fibras visibles de ADN se eliminan y suspenden en buffer

Fragmentación

enzima endonucleasa

para

purificación o identificación de nucleótidos

Electroforesis

eflujo

tubo PCR

peles agarose o poliacrilamida

están manchados con bromuro de etidio para permitir la fotografía bajo luz UV.

evitar la re-hibridación

mediante

después

NaCl para que el ADN sea neutralizado

denata

es para

desnaturar los fragmentos

con los alcalis

hinchazón

se transfiere

ADN del gel al soporte sólido (membrana portadora)

para

secar mancha y radiación UV para hacerla permanente.

hibridación

se

incuba la membrana deslizada con ADN

después

la sonda se une con ADN complementario en la membrana con la ayuda de BSA o caseína

lavado

elimina

el exceso de sonda

con

NaCl y detergente

Autoradiografía

se exponen

partículas a una película de rayos X

cuando

sonda radiactiva o sonda fluorescente

ELECTROFORESIS

técnica de separar moléculas de acuerdo con su tamaño y carga eléctrica

para

diagnóstico de enfermedades, se verifica la expresión de proteínas o se puedan identificar microorganismos.

aplicación

Identificar microorganismos

Pruebas de paternidad.

Verificar la expresión de proteínas. Identificar mutaciones.

Analizar los tipos de hemoglobinas circulantes.

Evaluar la cantidad de proteínas presentes en la sangre.

procedimiento

Medios de soporte

sin

Papel: sencillo hidróxido de la celulosa

Acetato de celulosa

Amidón

Agarosa

Poliacrilamida

Agarosa poliacrilamida

Poliacrilamida con SDS

Modos de disposición del soporte

Horizontal

Vertical

aplicado

para aminoácidos u otras moléculas pequeñas

especialmente

acetato de celulosa

para

proteínas o para ácidos nucleicos de pequeño tamaño

gel de agarosa

gel de amidón o de agarosa, para proteínas y especialmente para ácidos nucleicos

es necesario ungel (poliacrilamida o agarosa) dependiendo del objetivo, tampón y cubeta de electroforesis, marcador de peso molecular coloreado fluorescente, equipo de luz UV o LED (transiluminador)

paso 1: preparación del gel

colocarse un objeto específico llamado peine

colocar un marcador de peso molecular en una de las cavidades, un control positivo

mezclarse con un colorante fluorescente

paso 5

el gel es colocado bajo la luz UV o LED, es posible visualizar el patrón de bandas