



Universidad del Sureste
Escuela de Medicina

Título del trabajo: Mapas conceptuales

Nombre del alumno: Luis David Cano Hernández

Nombre de la asignatura: Biología Molecular En
La Clínica

Semestre y grupo: 8 B

Nombre del profesor: Hugo Nájera Mijangos

PCR

Inicia

Definición

Etapas de la técnica

Con la desnaturalización o separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96 °C para romper los puentes de hidrógeno que las unía

Es replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde.

Antes de la PCR:

A) Extracción del ADN

Posterior

Se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura entre 40 y 60 °C lo que permite la unión de los iniciadores.

La enzima más importante en la replicación es la polimerasa del ADN dependiente de ADN, comúnmente conocida como ADN polimerasa, porque es la encargada de incorporar nucleótidos durante la síntesis de las nuevas cadenas de ADN

Durante la PCR

- 1) Preparación de la muestra
- 2) Amplificación
- 3) Desnaturalización inicial
- 4) Etapas de la PCR
- 5) Extensión final

Finalmente

Se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72 °C, porque es la temperatura óptima a la cual la ADN polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación.

Para llevar a cabo la PCR, únicamente se necesita mezclar en microtubos el ADN molde, la ADN polimerasa; los desoxirribonucleótidos; una solución amortiguadora; un co-factor de la polimerasa (regularmente se usa magnesio) y los iniciadores

Después de la PCR

a) Electroforesis

Equipo

- Termociclador
- Vortex
- Micropipetas de 2, 20, 100 y 200 µl,
- Microcentrífuga
- Fotodocumentador

Etapas de la PCR

1) Desnaturalización,

2) Alineamiento

3) Extensión del ADN

Material

- Guantes desechables de látex, vinil o nitrilo
- Tubos para PCR
- Puntas para micropipetas
- Baño de hielo
- Gradilla

ELECTROFORESIS

Es una

Herramienta de importancia primordial en el desarrollo de las técnicas del ADN recombinante o ingeniería genética

Etapas de la técnica

1. Obtención de la muestra
2. Preparación del gel
3. Preparación de las muestras con el buffer de carga
4. Carga de las muestras
5. Corrida del gel
6. Teñido del gel
7. Visualización del gel con luz ultravioleta y análisis de los resultados

Equipo

- Cámara horizontal de electroforesis con los accesorios correspondientes.
- Fuente de alimentación o de poder.
- Transiluminador (fuente de luz ultravioleta)
- Equipo fotográfico que permita tomar fotos del gel

Definición

Es una técnica de separación muy usada en las investigaciones de proteínas y ácidos nucleicos (ADN y ARN), que se basa en la movilización de las moléculas disueltas en una solución de electrolitos a través de un gel por la acción de la corriente eléctrica.

Tipos de geles

AGAROSA

Es el método estándar para separar y purificar fragmentos de ADN cuando no requerimos un alto poder de resolución

POLIACRILAMIDA

Posee un poder de resolución mucho mayor, permitiendo la separación de moléculas que difieren en un sólo par de bases

Material

- ✓ Micropipetas
- ✓ Puntas para micropipeta
- ✓ Tubos tipo eppendor
- ✓ Un matraz, probetas y vasos de precipitados para la preparación de soluciones
- ✓ Espátulas
- ✓ Guantes impermeables para el manejo del bromuro de etidio

Las técnicas de electroforesis de ADN son hoy en día básicas e insustituibles para cualquier trabajo en biología molecular con ácidos nucleicos, por lo que seguirán utilizándose previsiblemente durante mucho tiempo

NORTHERN BLOT

Normalmente

Se aísla el conjunto de moléculas de ARN de una muestra de células o de tejido, y después se facilita la migración del ARN en un gel por electroforesis

Después

Se colocan los fragmentos más pequeños en la parte inferior y los fragmentos más grandes en la parte superior. A esto se le llama correr el gel. Después se aplica una membrana sobre el gel y se transfieren, bien por un gradiente salino o por transferencia electroforética.

Finalmente

Este producto será transferido a nitrocelulosa se va a ver como un pedazo de papel blanco. Pero va a hacer que seamos capaces de estudiar a continuación las diferencias en las muestras de ARN.

Definición

Es una técnica de laboratorio que se utiliza para detectar una secuencia de ARN específica en una muestra de sangre o de tejido.

Las

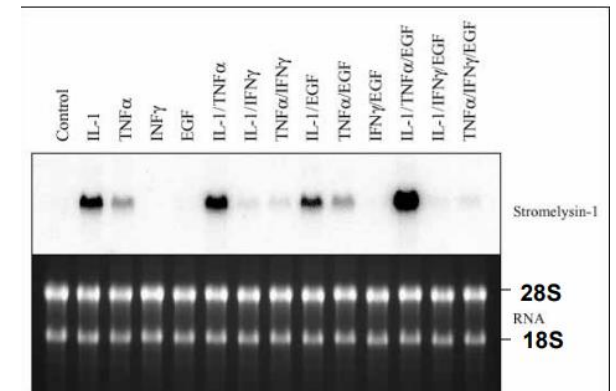
Moléculas de ARN en una muestra se separan por tamaño mediante electroforesis en gel. Los fragmentos de ARN son transferidos del gel a la superficie de una membrana.

Esta

Membrana se expone a una sonda de ADN marcada con una etiqueta radiactiva o química. Si la sonda se une a la membrana, entonces la secuencia complementaria de ARN está presente en la muestra.

Etapas de la técnica

1. Aislar el ARN
2. Desnaturalizar el ARN
3. Separar por electroforesis desnaturalizante
4. Transferir a membrana de nitrocelulosa o nylon
5. Hibridar con sonda específica
6. Revelar con placa de rayos X o pantalla de fosforimager



SOUTHERN BLOT

Definición

Etapas de la técnica

Su nombre procede de la persona que lo diseñó Edwin Southern y permite la detección simultánea de varias secuencias diana de distintos tamaños con una única hibridación. Típicamente se utilizan sondas radiactivas

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

- ✓ Aislar el ARN
- ✓ Cortar con enzimas de restricción
- ✓ Separar fragmentos por electroforesis
- ✓ Desnaturalizar el ADN
- ✓ Transferir a membrana de nitrocelulosa o nylon
- ✓ Hibridar con sonda específica
- ✓ Revelar con placa de rayos X o pantalla de fosforimager

Etapas

Se utiliza

EL material de partida es el ADN purificado, el cual es sometido a una **DIGESTIÓN ENZIMÁTICA**, los enzimas más utilizados son el Hae III y Hinf I

Una enzima de restricción para cortar una muestra de ADN en fragmentos que se separan mediante electroforesis en gel.

Estos

El ADN digerido se somete a una electroforesis en gel de agarosa para separar los fragmentos producidos según su tamaño

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.

1. Aparato de electroforesis horizontal
2. Fuente de energía para la electroforesis.
3. Sistema de visualización del ADN
4. Bandeja para la tinción.
5. Baño de agua.
6. Estufa o incubador 80°C (OPCIONAL).
7. Micropipetas automáticas y puntas.
8. Microtubos y tubos de 10 ml.
9. Placa calefactora o microondas.
10. Agua destilada
11. NaCl.
12. NaOH
13. HCl concentrado.
14. Plástico para envolver y papel secante.

SE TRANSFIERE el ADN a una membrana de nylon o nitrocelulosa para obtener una réplica exacta del patrón de bandas de ADN que hay en el gel.

LA HIBRIDACIÓN se realiza incubando la membrana con diferentes reactivos en un tubo de hibridación, entre ellos la sonda o sondas marcadas específicamente y diluidas en una solución de hibridación adecuada.

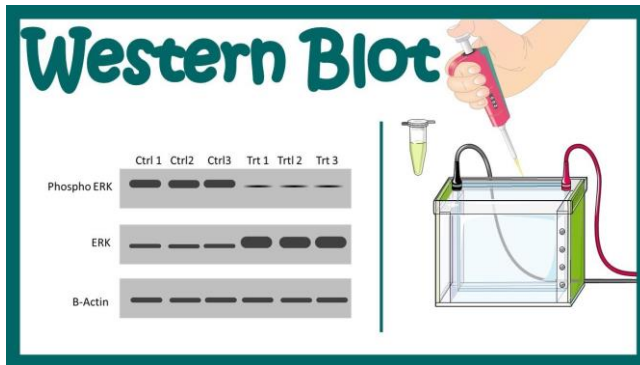
TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

WESTERN BLOT

Detección de proteínas específicas con anticuerpos

Conocer:

- ✓ Niveles de expresión
- ✓ Isoformas
- ✓ Modificaciones postraduccionales
- ✓ Tiempo de vida media y degradación
- ✓ Localización subcelular

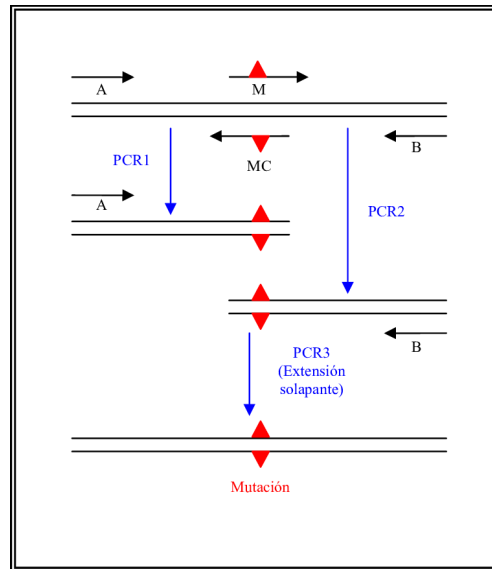


MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Se puede generar proteínas mutadas manipulando su ADN

Generalmente se hace por PCR:

- Introducción de mutación puntual (cambio de aminoácido por otro)
- Deleciones



METODO DE SANGER

No acepta elongación de la cadena de nucleótidos por ADN polimerasa

- ADN molde
- 4 desoxirribonucleótidos
- Cebador de ADN
- ADN polimerasa

