



PASIÓN POR EDUCAR



Nombre del Alumno: Brenda Nataly Galindo Villarreal

Nombre del Docente: Hugo Nájera Mijangos

Nombre del Trabajo: Ensayo Técnicas moleculares

PASIÓN POR EDUCAR

Materia: Genética Humana

Carrera: Medicina Humana

Grado: 3er Semestre

Grupo: "B"

Comitán de Domínguez Chiapas a 29 de Octubre del 2021

TÉCNICAS MOLECULARES

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente la microbiología ha sido una disciplina muy manual.

Algunas de las razones son la gran diversidad de tipos de muestras que se reciben en el laboratorio de microbiología, el número de microorganismos existentes y el volumen de muestras.

En los últimos años la microbiología clínica ha cambiado rápidamente, la identificación de microorganismos hasta hace relativamente poco tiempo dependía de un cultivo, la realización de pruebas bioquímicas y la observación de características físicas (morfología de las colonias) y de tinción (tinción de Gram, Ziehl-Neelsen, tinta china, etc).

Posteriormente surgió la espectrometría de masas y esta se aplicó a la identificación de microorganismos (MALDI-TOF). Esta tecnología permite la identificación de bacterias y hongos en minutos, es económica y fiable en la mayoría de los microorganismos.

En la lucha contra las enfermedades infecciosas, se ha hecho necesaria la optimización de la especificidad, sensibilidad y rapidez de técnicas de diagnóstico tradicional, sin embargo, con el auge de la investigación y la necesidad de diagnósticos oportunos y eficaces, han surgido técnicas de laboratorio con fundamento en biología molecular aplicadas en programas de prevención, control y tratamiento.

TÉCNICAS MOLECULARES

Las técnicas de biología molecular sirven para analizar ácidos nucleicos y para detectar, e identificar tanto microorganismos, como diferentes genotipos dentro de una misma especie y genes de resistencia al tratamiento farmacológico.

Todas estas técnicas necesitan un paso previo de extracción de ADN o ARN. Una vez extraído debe purificarse de forma adecuada para evitar la presencia en la muestra de inhibidores o sustancias que contaminen y que impidan la correcta realización de la técnica posterior.

La extracción del ADN es el paso más crucial en todo el proceso relacionado con la biología molecular.

Se suelen utilizar kits comercializados que incluyen el protocolo específico para la extracción. Los métodos de extracción de ADN se caracterizan por la lisis de la célula, la inactivación de las enzimas nucleasas celulares y la separación de los ácidos nucleicos de los demás restos celulares.

Pueden ser de diferentes tipos: rotura mecánica (trituration, lisis hipotónica), por tratamiento químico (detergentes, agentes caotrópicos, reducción con tioles) o por digestión enzimática (proteínasa K).

Con los avances en la biología molecular se han desarrollado múltiples equipos que realizan la extracción de ADN de la muestra de forma totalmente automatizada en un corto periodo de tiempo, lo cual supone una gran ventaja en este primer paso del proceso.

Las técnicas de biología molecular se deben realizar en muestras de ADN totalmente puros, para obtener resultados correctos, evitando tanto falsos positivos como negativos.

Los métodos de purificación del ADN pueden basarse en diferentes acciones: extracción/precipitación, ultrafiltración, cromatografía, centrifugación y separación por afinidad. El uso de un tipo u otro dependerá de la muestra obtenida, la cantidad de esta, el tipo de ácido nucleico y la técnica posterior con la que se va a trabajar.

- ***Extracción/precipitación:***

Tiene lugar un primer paso en el que se extraen contaminantes como fenol y cloroformo de la muestra de ácidos nucleicos extraídos, y un segundo paso en el que se precipitan los ácidos nucleicos con isopropanol o etanol. Es un método laborioso y que utiliza productos tóxicos. El fenol y el cloroformo actúan como inhibidores de la reacción de la PCR, por lo que si se utiliza este método es necesario eliminar restos de estos productos para que la posterior reacción de PCR sea correcta.

- **Ultrafiltración:**

Se utiliza una membrana que actúa de filtro sobre la que se coloca la muestra de ácidos nucleicos extraídos y se somete a centrifugación. De esta forma, los ácidos nucleicos libres de sustancias contaminantes quedan retenidos en la membrana y posteriormente se recuperan añadiendo agua o un tampón específico.

- **Ultracentrifugación:**

Por diferencia de densidad se separan las partículas, las más densas sedimentan y las menos densas flotan. Para favorecer este proceso se lleva a cabo la centrifugación.

- **Cromatografía:**

Se utiliza una matriz con poros hidrofílicos que dejará pasar las moléculas más pequeñas. Las moléculas grandes quedarán diluidas en el volumen vacío por orden decreciente.

- **Electroforesis:**

Se basa en la separación de los ácidos nucleicos mediante gel de poliacrilamida. Las moléculas más pequeñas se moverán a mayor velocidad y las más grandes más despacio. Cuando las moléculas de ADN son muy grandes, se usan geles de agarosa. En función del tamaño de las moléculas, se pueden usar diferentes concentraciones de agarosa o poliacrilamida en el gel.

→ **REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR):**

La técnica de la PCR consiste en la amplificación de una región específica de ADN utilizando unos *primers* o cebadores (secuencias de ADN que delimitan la zona de amplificación, que tienen una longitud de 15-30 nucleótidos y son complementarios a la región del ADN que se quiere amplificar).

Se basa en la acción de diferentes enzimas, entre ellas la ADN polimerasa, que incorpora los nucleótidos en la síntesis de nuevas cadenas de ADN (amplificación).

En esta técnica se reproduce lo que tiene lugar en el interior de la célula. La muestra de ADN se añade en un tubo eppendorf junto con los *primers*, los desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), un ADN polimerasa termoestable y un cofactor de esta enzima (normalmente magnesio).

Una vez introducidos todos los reactivos necesarios para el desarrollo de la técnica, se someterán a una serie de ciclos (25-40 ciclos), con cambios de temperatura característicos y que permitirán amplificar la región concreta del ADN de la muestra.



Figura 1: Productos necesarios para la realización de la PCR.

Cada uno de estos ciclos que forman parte de la técnica de amplificación consta de tres fases, con sus respectivos cambios de temperatura:

- **Fase de desnaturalización:**

Tiene lugar la rotura de los puentes de hidrógeno que mantienen unidas ambas hebras del ADN. Se obtienen dos cadenas por separado de ADN que servirán de molde para que se unan los primers y se sintetice una nueva cadena de ADN complementario. Se caracteriza por tener una temperatura elevada (94-96°C).



Figura 3: Fase de desnaturalización: separación de ambas hebras de ADN.

- **Fase de apareamiento o annealing:**

En esta fase tiene lugar la unión de los primers a la secuencia concreta que ha quedado separada en la fase anterior. La temperatura en esta fase es mucho más baja y dependerá de los primers utilizados (45-55°C).

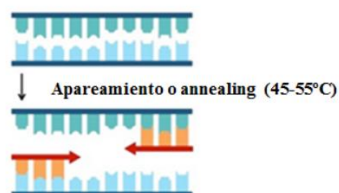


Figura 4: Fase de apareamiento o annealing.

- **Fase de extensión o elongación:**

Una vez unido el primer a su cadena complementaria de ADN, el ADN polimerasa realiza su función, añadir nuevos nucleótidos complementarios a la hebra molde obteniendo como resultado una molécula de ADN de doble cadena.

En esta fase la temperatura está sobre 72°C, temperatura de actuación de la Taq polimerasa. La duración de esta fase dependerá de la longitud del fragmento que se desea amplificar.

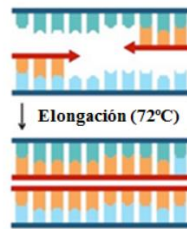


Figura 5: Fase de elongación.

Cada copia generada en un ciclo sirve de molde para los siguientes ciclos, por lo que la amplificación es exponencial, y el resultado es la obtención de millones de copias de un fragmento concreto.

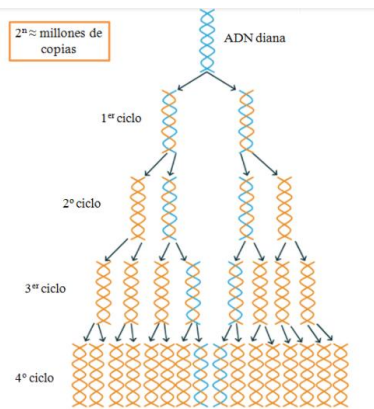


Figura 6: Amplificación del fragmento diana del ADN de forma exponencial.

Se trata de una técnica muy específica debido a que los primers son específicos de una región concreta. Estos son complementarios a la región del ADN que nos interesa (región diana). Además de ser muy específica, presenta una alta sensibilidad, ya que la cantidad de ADN requerida para que se inicie la amplificación es muy baja.

Esta técnica también presenta desventajas, es una técnica lenta y su realización requiere de un gran número de pasos, cada uno con riesgo de contaminación.

La PCR convencional se ha utilizado para la detección e identificación de patógenos presentes en alimentos (por ejemplo, *Arcobacter* spp en carne aviar), para la

identificación de los genes asociados a la virulencia de las diferentes especies y para identificar E. coli enterotoxigénica amplificando las enterotoxinas (LT y ST), entre otras aplicaciones.

→ Secuenciación del genoma

Es una técnica que determina la secuencia completa de ADN en el genoma de una persona; consiste en determinar el orden de las bases Adenina, Citosina, Guanina y Timina en un fragmento de ADN. Con esta técnica se logra obtener secuencias hasta 500 bases aproximadamente, estas son ensambladas a un genoma de referencia que secuencia un genoma completo. Este método ha cambiado la manera de entender la genética basándose en la identificación de las causas reales de la herencia, centrándose en estudios genéticos de individuos con un fenotipo definido y enfermedades de herencia mendeliana producida por genes conocidos, estas evalúan el fenotipo y la secuencia del gen que puede estar afectado y presentan una sensibilidad muy alta para detectar mutaciones.

Uno de los proyectos más famosos en la historia de la biología molecular, fue el Proyecto genoma Humano (PHG), el cual propuso determinar la secuencia completa (más de $3\ 000 \times 10^6$ pares de bases) del genoma humano, el método localiza con exactitud los 100 000 genes de ADN aproximadamente y el resto de material hereditario de los seres humanos, responsables de las instrucciones genéticas de todo lo que conforma a un ser humano desde el punto de vista biológico.³⁵

Con el decursar del tiempo, la secuencia ha venido experimentado una serie de modificaciones al método descrito inicialmente por Sanger, y generado otros tipos de secuencia con la NGS y la pirosecuencia, muy empleadas en la actualidad en investigación clínica y estudios epidemiológicos, los métodos mencionados se presentan a continuación.

Bibliografía

Diz Mellado, O. M. (septiembre 2020). TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS. 26.

Merchán, M. A. (2017). Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de. 11.