

**LICENCIATURA EN MEDICINA HUMANA**

**NOMBRE DE ALUMNO: KARLA BEDOLLA FERNANDEZ**

**NOMBRE DEL DOCENTE: Q.f.b HUGO NÁJERA MIJANGOS**

**NOMBRE DEL TRABAJO: TECNICAS MOLECULARES**

**MATERIA: GENETICA HUMANA**

**GRADO: 3° SEMESTRE**

**GRUPO: "B"**

# Técnicas moleculares

Ensayo

## Introducción}

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.

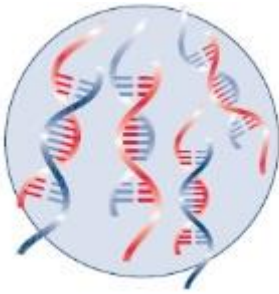
La extracción del ADN es el paso más crucial en todo el proceso relacionado con la biología molecular. Se suelen utilizar kits comercializados que incluyen el protocolo específico para la extracción. Los métodos de extracción de ADN se caracterizan por la lisis de la célula, la inactivación de las enzimas 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.

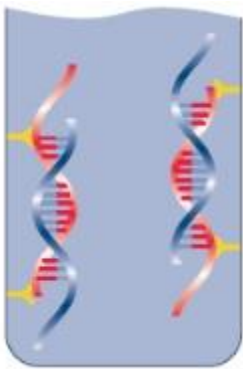
## Desarrollo

Las muestras clínicas se preparan mediante un reactivo que rompe el virus y libera su ADN, al cual se le denomina ADN diana o blanco. Posteriormente se realizan los siguientes pasos:

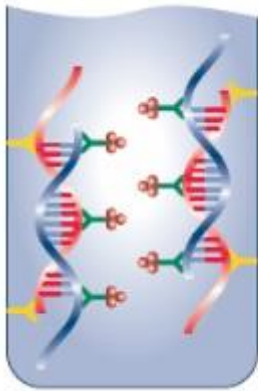
1. *Hibridar una sonda de ARN con el ADN diana.* El ADN diana se une con sondas de ARN específica formándose híbridos ARN: ADN.



2. *Captura de híbridos.* Los híbridos ARN: ADN son capturados en una fase sólida recubierta con anticuerpos de captura que son específicos para los híbridos ARN:ADN.



3. *Amplificación de la señal.* Los híbridos ARN:ADN capturados son detectados por múltiples anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina, una enzima que al actuar forma un anión emisor de luz. La señal resultante puede ser amplificada al menos 3,000 veces. El resultado se lee e interpreta en un luminómetro.



3. *Amplificación de la señal.* Los híbridos ARN:ADN capturados son detectados por múltiples anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina, una enzima que al actuar forma un anión emisor de luz. La señal resultante puede ser amplificada al menos 3,000 veces. El resultado se lee e interpreta en un luminómetro.

### REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una técnica de biología molecular que en pocas horas permite la producción de millones de copias a partir de una cantidad mínima de ADN o ARN extraída de una muestra. Estas copias permiten identificar y cuantificar el tipo de ADN o ARN presente en la muestra y asociarlo con un organismo o individuo.

#### LOS PASOS EN LA PCR

La PCR está diseñada según el principio natural de replicación del ADN. Es un proceso de tres pasos, designado como un ciclo, que se repite un número específico de veces.

Un ciclo de PCR consiste en los siguientes pasos:

1. *Desnaturalización*
2. *Alineación*
3. *Extensión*

Este proceso tiene lugar en un termociclador, un instrumento que automáticamente controla y alterna las temperaturas durante períodos programados de tiempo para el número apropiado de ciclos de PCR (generalmente entre 30 y 40 ciclos).

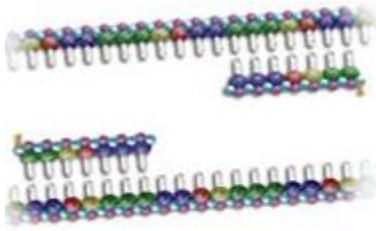
*Paso 1º PCR: Desnaturalización por calor:* El calor (generalmente  $> 90^{\circ}\text{C}$ ) separa la doble hebra de ADN en dos filamentos, esto se conoce como “desnaturalización”.



Ciclo PCR - Paso 1º: Desnaturalización por calor

*Paso 2º PCR: Alineación – unión de la sonda a la secuencia diana:* El objetivo no es replicar la hebra entera de ADN sino replicar una secuencia específica de aproximadamente 100-600 pares de bases que es única en un organismo.

Los iniciadores o “primers” son secuencias sintéticas cortas (de 20 a 30 bases) que se unen a cada una de las dos hebras simples del ADN desnaturalizado. La alineación generalmente ocurre entre  $40^{\circ}\text{C}$  y  $65^{\circ}\text{C}$ , dependiendo de la longitud y la secuencia de bases de los iniciadores. El control preciso de la temperatura y el adecuado diseño de los iniciadores permite que éstos se unan a la secuencia diana con alta especificidad.



Ciclo PCR - Paso 2º: Un par de iniciadores se unen a la secuencia diana.

*Paso 3º PCR: Extensión:* Una vez que los iniciadores se han unido a las secuencias complementarias de ADN, la temperatura se eleva aproximadamente a 72°C y una enzima, la taq polimerasa, comienza a unir los nucleótidos que faltan para sintetizar la región marcada por los iniciadores y producir dos nuevas hélice de ADN de doble hebra, ambas idénticas al original.



Ciclo PCR - Paso 3º: Una polimerasa de ADN incorpora los nucleótidos necesarios para la extensión de la cadena complementaria de ADN.

Este ciclo se repite numerosas veces. Al final de cada ciclo cada una de las secuencias de ADN recién sintetizadas sirve como patrón para el siguiente ciclo, por lo que después de 30 ciclos se han creado millones de copias del ADN original. El resultado es la acumulación de productos específicos de la PCR.

La detección de los productos amplificados puede realizarse mediante: la electroforesis de los productos en un gel de agarosa, un formato de inmunoensayo

utilizando una detección colorimétrica basada en una sonda o la tecnología de emisión de fluorescencia, entre otros.

### PCR MULTIPLEX

La PCR Multiplex consiste en realizar simultáneamente en una sola reacción la detección, mediante PCR, de varias distintas secuencias de ADN. Esto se logra poniendo en la mezcla los iniciadores o “primers” para todas las distintas secuencias que se quieren detectar, después la detección de los productos de la PCR se diseña para poder distinguir cual de las moléculas blanco se amplificó. Esto puede hacerse mediante electroforesis, si cada uno de los distintos productos tiene un tamaño distinto o mediante una detección con sondas específicas para cada uno de las secuencias blanco. También se puede realizar mediante PCR en tiempo real, se utiliza un fluoróforo distinto para cada sonda y así identificar el producto específico amplificado

### SONDAS MLPA

Esta metodología sirve para detectar eliminaciones o amplificaciones de la secuencia a estudiar en el genoma del paciente. Se puede utilizar en el diagnóstico de síndromes genéticos causadas por microdeleciones o aneuploidías.

Consiste en primero hibridar dos sondas a la secuencia blanco, luego estas dos sondas son unidas una a la otra con el uso de la enzima ligasa, la nueva molécula generada tras ligar las dos sondas es amplificada mediante PCR y luego detectada mediante electroforesis. Si la secuencia blanco esta ausente en el genoma del paciente la sondas no pueden ser ligada una con la otra pues solo pueden ligarse si primero hibridaron con la secuencia blanco y consecuentemente no pueden ser amplificadas por PCR, de esta forma se hace evidente la deleción.

Además, la intensidad de la banda detectada en la electroforesis, es proporcional a la cantidad de ADN blanco en la muestra de manera que con esta técnica no solo se detectan deleciones sino también amplificaciones, pudiendo detectar síndromes como los causados por trisomías, cuando se tiene tres copias de un cromosoma en lugar de dos.

## HIBRIDACIÓN REVERSA

La hibridación es la unión complementaria de ácidos nucleicos (ADN o ARN). Las técnicas de hibridación se utilizan a menudo para detectar una molécula diana (la que nos interesa conocer) partiendo de una sonda complementaria a ella.

En las técnicas de hibridación se parte de dos poblaciones de ácidos nucleicos: un conjunto homogéneo de ácidos nucleicos de secuencia conocida que actúa como sonda y otro conjunto heterogéneo de ácidos nucleicos de secuencia desconocida donde queremos detectar la secuencia diana.

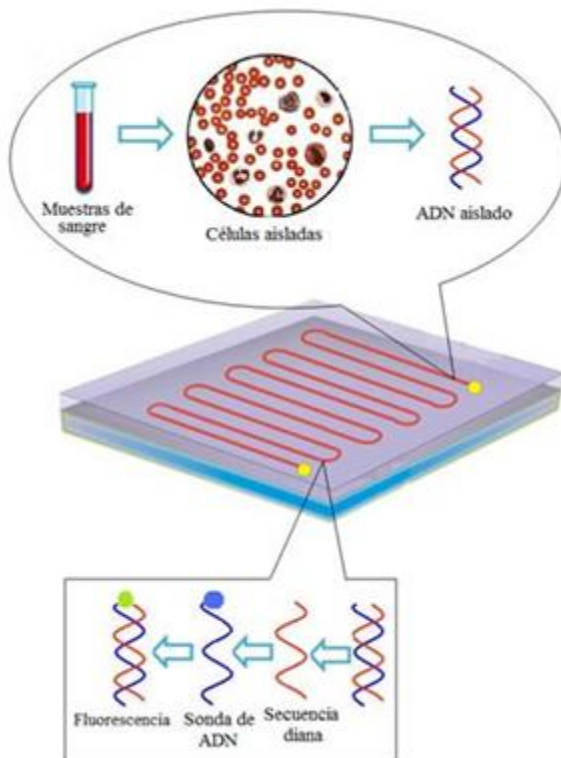
La hibridación puede producirse en medio líquido o sobre un soporte sólido, como nitrocelulosa o un microchip de cristal, al que se encuentra unida una de las dos poblaciones de ácidos nucleicos. En la hibridación reversa es la sonda la que se encuentra unida al soporte.

En términos generales el proceso es el siguiente:

1. El ADN se desnaturaliza, la hélice de doble cadena del ADN blanco o diana es separada mediante un proceso físico (calor) o químico (con una base fuerte, como la sosa cáustica). Esto rompe los enlaces por puente de hidrógeno que mantienen unidas las dos hebras del ADN.



2. Las hebras de cadenas simples (o desnaturalizadas) se mezclan con una muestra de cadenas simples de secuencia conocida (sonda) que se encuentra unida a un soporte sólido (como nitrocelulosa).
3. La muestra combinada se enfría lentamente, las moléculas sencillas se van emparejando por las zonas complementarias y se va formando una nueva molécula hibridada. Durante la hibridación se produce la unión de las moléculas diana con las moléculas sonda.
4. El ADN blanco o diana está marcado con una molécula (biotina) que al unirse a la sonda produce una reacción química. Esta reacción produce un color característico y este color es señal de que el ADN diana o blanco corresponde al microorganismo o gen buscado.



## SECUENCIACIÓN POR TERMINACION DE LA SINTESIS CON DIDEOXINUCLEOTIDOS (SANGER)

La secuenciación de ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es determinar el orden de los nucleótidos (A, C, G y T) que forman una cadena específica de ADN. La secuencia de ADN constituye la información genética heredable de un ser vivo.

El proceso de secuenciación más utilizado consiste en los siguientes pasos:

1. Se preparan una mezcla que contiene cada uno de los nucleótidos (A, C, G y T), una enzima que une estos nucleótidos (ADN polimerasa), un iniciador o “primer”, que es una cadena pequeña de nucleótidos a partir de la cual la enzima comienza la síntesis de las nuevas moléculas y terminadores de la reacción (nucleótidos modificados llamados nucleótidos dideoxi, los cuales están marcados con moléculas fluorescentes diferentes para cada uno de los nucleótidos).
2. Se agrega el ADN desnaturalizado (separado en cadenas simples), que nos interesa conocer, en la mezcla de reacción para que la ADN polimerasa lo utilice como molde y empiece a unir nucleótidos, produciendo así una serie de fragmentos de ADN de diferente longitud marcadas fluorescentemente.
4. Los fragmentos de ADN sintetizados y marcados son separados por tamaño mediante electroforesis en un capilar con poliacrilamida. La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico. Esta movilidad depende del peso de la molécula. El tamaño de las moléculas se diferencia solamente por un nucleótido, y estas son detectadas por un láser, dependiendo del nucleótido incorporado se

detecta una emisión de luz a una longitud de onda diferente según el fluoróforo unido al nucleótido.

5. La aparición de una señal de luz en una posición concreta del histograma nos indica que en ese punto de la secuencia del ADN está la base correspondiente al nucleótido marcado según la emisión de luz detectada para el fluoróforo unido al mismo.

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 eluidas 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.

## Conclusión

Las técnicas de diagnóstico molecular representan una alternativa prometedora en el campo de los alimentos, debido a su rapidez, elevada sensibilidad y eficiencia para la detección temprana de microorganismos patógenos. La PCR destaca como el método de diagnóstico molecular más aplicado en el área de alimentos. Las variaciones de PR han sumado ventajas a esta técnica, entre las que destacan mayor velocidad en la obtención de resultados. Los equipos y reactivos resultan más costosos que aquellos empleados en los métodos tradicionales de cultivo. La estandarización y normalización de estos métodos son un requisito indispensable para lograr la aplicación práctica y rutinaria de estas técnicas.

## Referencias:

<http://pendientedemigracion.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/secuencia/Secuencia.htm>

<http://www.iib.uam.es/servicios/seq/otros/SecuenciaADN/SecuencaciaADN.html>