



PASIÓN POR EDUCAR

Nombre del alumno:

Nancy Paulina Arguello Espinosa

Nombre del profesor:

Alberto Alejandro Maldonado

Nombre del trabajo:

Metodologías

Materia:

Biología Molecular

Grado:

4to Sem, Grupo "A" Medicina Humana

Comitán de Domínguez Chiapas a 30 de Junio del 2022

ELECTROFORESIS

¿Qué es?

Dispersión de partículas tras ser sometidas a un campo eléctrico

Elementos

Metodología

Aplicación

- Cámara de electroforesis
- Peine para pocillos
- Gel
- Transiluminador
- Fuente de poder
- Buffer de corrimiento
- Marcador de peso molecular
- Buffer de carga

Preparación del gel de agarosa

Pesar la cantidad necesaria, calentar en un matraz el gel en un microondas, dejar enfriar el gel (Mientras esto ocurre se prepara el molde sellando perfectamente sus extremos con masking), colocar el peine en la posición deseada por último se vierte el gel sobre el molde con mucho cuidado.

Preparación de las muestras

Mezclar las muestras de ADN con el marcador de tamaño y el Buffer de carga

Medicina forense
Proyecto del genoma humano
Investigación de proteínas y mutaciones
Pruebas de Dx clínico

Carga de las muestras y corrida del gel

Una vez que el gel se solidifico, se coloca el molde en la cámara de electroforesis, se añade el Buffer de electroforesis, se retira el peine para dejar libre a los pocillos, se colocan las muestras en ellos y se conectan los cables de energía aplicando su respectivo voltaje

Tinción del gel y visualización de ADN

Se saca el gel del molde y se sumerge en la solución BrET (15min), se coloca el gel sobre el trasluminador encendiendo la lampara de luz ultravioleta, fotografiar e gel con el sistema que se encuentre disponible.

Técnicas de hibridación

¿Qué es?

Estudio de secuencias específicas del DNA o RNA, tanto para su identificación como para su eventual cuantificación

Tipos

Southern blot

Para

ADN

Metodología

Extracción del ADN: Semen, sangre, células del folículo capilar, saliva o cualquier otro tejido.

Endonucleasa de restricción: el ADN se corta de secuencia 5' a 3'

Electroforesis en gel de agarosa: Moléculas con carga – migran al electrodo +, las moléculas menores avanzan con mayor rapidez, se consigue una separación del ADN por tamaño

Ensayo de southern: Moléculas de ADN separadas se desnaturalizan mientras permanecen en el gel de agarosa, impregnando éste con una disolución alcalina. El ADN monocatenario resultante se transfiere a la superficie de una membrana de nailon, realizando así una copia

ARN

Para

Northern blot

Metodología

Extracción del ARN: Se lleva a cabo la separación por medio de gel de poliacrilamida

Separación del ARN: el RNA separado fue transferido a una membrana de Nylon cargada positivamente, se hizo un montaje tipo sándwich con 3 hojas de papel Whatman cromatográfico 3MM (Whatman), se inmovilizó el RNA en la membrana, para lo cual se humedeció una hoja de papel cromatográfico Whatman con solución EDC.

Pre-hibridación e hibridación de sonda: Transcurrida la hora de inmovilización la membrana se lavó con Agua desionizada. Se precalentó a 65°C el tampón de hibridación Ultrahyb (Ambion), a cada botella de hibridación se adicionó 15ml, Las sondas marcadas con Digoxigenina y Estreptavidina, para detectar el miRNA y el marcador de peso molecular, respectivamente, se desnaturalizaron

Hibridación de sonda radioactiva: formar un dúplex ADN-ADN o ADN-ARN, se incuba en una disolución que contiene una sonda radiactiva de locus único, bajo condiciones de temperatura y concentración de sales que favorezcan la hibridación

Autorradiografía: La membrana de nailon se coloca, una vez lavada, junto a una película de rayos X dentro de una caja que las aísla de la luz. La película registra las posiciones donde hay desintegración radiactiva

Detección de ARN: Se extrajo la membrana, posteriormente se realizó un lavado y la agitación correspondiente, se llevó a incubación, se agregó anticuerpos, paso por proceso de lavado nuevamente y se reveló.

PCR

¿Qué es?

Estudio de secuencias específicas del DNA o RNA, tanto para su identificación como para su eventual cuantificación

Metodología

1. Inicio de la desnaturalización:

Temperatura de 95°C para la desnaturalización de la doble cadena de ADN (5min)

2. Ciclos de amplificación:

95°C: desnaturalización por unos 30 segundos.

55 a 60°C: alineación por 30 a 40 segundos.

72°C extensión, según la longitud del producto que se va a amplificar, considerando la adición de 1000 nucleótidos en 60 segundos.

3. Desnaturalización:

95°C y tiene como objetivo desnaturalizar la doble cadena de ADN, permite el acceso de los primers a la cadena molde en sus secuencias complementarias (30 seg)

4. Alineación:

Temperatura se encuentra en un rango 55-60°C, la mayoría de los iniciadores hibridan, se genera la energía cinética necesaria para que los iniciadores busquen en las cadenas de ADN su secuencia complementaria y formen los puentes de hidrógeno con la cadena molde, dejando el extremo 3'OH disponible y listo para la adición de los nucleótidos consecutivos por la ADN polimerasa.

5. Extensión:

Temperatura óptima para el funcionamiento de la ADN polimerasa

6. Amplificación final:

Terminados los ciclos, la temperatura de extensión (72°C) se mantiene (5min), permite que la polimerasa termine la extensión de los productos a los cuales se encuentra unida.

Secuenciación

¿Qué es?

Romper ADN de cadena sencilla marcada radiactivamente con reacciones químicas cadenas específicas para cada una de las cuatro bases.

Metodología

1. Obtención del fragmento:

Se puede obtener mediante PCR o por clonación en algún vector

2. Purificación del templado: Con el método que se elija, luego Cuantificar el templado purificado en un espectrofotómetro para asegurarse de tener la cantidad necesaria para la reacción

3. PCR de secuenciación:

Preparar la reacción de secuenciación con: 2 μ l de big dye, 2 μ l de buffer 2.5X, la cantidad de templado determinada, 1 μ l del iniciador y se completa la reacción a 10 μ l con agua bidestilada esterilizada o inyectable.

4. Purificación del producto PCR de secuenciación:

Pueden emplearse los micro-concentradores Centricon- 100 de Amicon, que son columnas de ultracentrifugación que permiten separar los cebadores y dNTPs del producto de PCR que es de mayor tamaño.

5. Deshidratación de la muestra:

Secar las muestras en un concentrador de vacío o dejando destapados los tubos en un lugar completamente oscuro hasta que no quede nada de agua

6. Desnaturalización con formamida:

Agregar a cada microtubo, con la muestra seca, 15 μ l de formamida. Centrifugar por 5 minutos a 13 000 rpm.

7. Electroforesis de secuenciación.

8. Análisis: Al terminar la electroforesis analizar los resultados en el programa

ELISA

¿Qué es?

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

Metodología

ELISA directo

1. Ag se inmoviliza en una placa

2. Se añade un Ac primario marcado con una enzima que se unirá al Ag de interés

3. Se añade el sustrato que al interactuar con la enzima proporcionará una señal visible que permitirá la detección y/o cuantificación del Ag

ELISA indirecto

1. Ag se inmoviliza en una placa

2. Se añade un Ac primario sin marcar que se une al Ag de interés

3. Se añade un Ac secundario marcado con una enzima que se unirá al Ac primario

3. Se añade el sustrato que al interactuar con la enzima proporcionará una señal visible que permitirá la detección y/o cuantificación del Ag

ELISA sandwich

1. Ac de captura se inmoviliza en una placa

2. Se añade la muestra que contiene el Ag de interés que se unirá al Ac de captura

3. Se añade el Ac de detección que se unirá al Ag unido a su vez al Ac de captura

4. Se añade un Ac secundario marcado con una enzima que se unirá al Ac de detección

5. Se añade el sustrato que al interactuar con la enzima proporcionará una señal visible que permitirá la detección y/o cuantificación del Ag

Citometría de Flujo

¿Qué es?

determinar el número de células, el porcentaje de células vivas y ciertas características de las células (como el tamaño y la forma) en una muestra de sangre, médula ósea u otro tejido.

Metodología

Sistema de fluidos: alinear y transportar a las células dentro de una cámara de flujo hacia el haz de luz, se aplica una propiedad hidrodinámica, que consiste en la inyección de la muestra en el centro de una corriente de fluido envolvente, el cual puede ser agua o un buffer de fosfatos.

Sistema electrónico: Una vez que la señal luminosa es generada cuando el haz de luz incide en la célula, ésta debe traducirse en señales electrónica, consta de sensores luminosos como fotodiodos y fotomultiplicadores, que convierten los fotones en electrones y éstos en corriente eléctrica, la señal eléctrica es recibida por la computadora y traducida en gráficos e histogramas

Sistema óptico: compuesto por láseres y filtros, que se encargan de iluminar a las células y dirigir las señales resultantes hacia los detectores apropiados. Las células, al ser incididas por el láser, tendrán la capacidad de dispersar la luz de acuerdo con su tamaño y su granularidad.

Referencias

Biología molecular Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. (s.f.).

Karp. Biología celular y molecular conceptos y experimentos (8th ed) by Janet Iwasa Wallace Marshall. (s.f.).