



Mi Universidad

Nombre del Alumno: Maricruz Elizama Méndez Pérez

Nombre del tema: Electroforesis, Hibridación, PCR, ELISA, Citometría de flujo

Parcial: 4ro

Nombre de la Materia: Biología Molecular

Nombre del profesor: Alberto Alejandro Maldonado López

Nombre de la Licenciatura: Medicina Humana

Semestre: 4

Electroforesis

La electroforesis es una técnica de laboratorio que se usa para separar moléculas de ADN, ARN o proteínas en función de su tamaño y carga eléctrica. Se usa una corriente eléctrica para mover las moléculas a través de un gel o de otra matriz.

¿Cuándo se pide una electroforesis?

Las pruebas de electroforesis se solicitan con mayor frecuencia cuando un médico sospecha una enfermedad o condición que causa la producción de una proteína monoclonal.

¿Qué mide la electroforesis?

La electroforesis de proteínas es una prueba que mide proteínas específicas en la sangre. La prueba separa las proteínas en la sangre según su carga eléctrica. La prueba de electroforesis de proteínas a menudo se usa para encontrar sustancias anormales llamadas proteínas M.

Técnicas

Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida. Electroforesis vertical

La **electroforesis en geles de poliacrilamida** es uno de los métodos más utilizados para la purificación, análisis y caracterización de **proteínas**.

La técnica permite separar moléculas cargadas y explota diferencias en movilidad cuando se les somete a la acción de un campo eléctrico. La electroforesis se lleva a cabo sobre un soporte inerte, generalmente sobre geles de poliacrilamida (PAGE)

Electroforesis de proteínas en gel de agarosa. Electroforesis horizontal

La **electroforesis en geles de agarosa** es uno de los métodos más empleados para separar **ácidos nucleicos**, como por ejemplo, fragmentos de ADN.

Esta técnica se basa en el hecho de que los **ácidos nucleicos** se encuentran cargados negativamente debido a los grupos fosfato. Como consecuencia, cuando se aplica un campo eléctrico se desplazan desde el polo negativo hacia el polo positivo.

Esta separación se llevará a cabo en una matriz sólida, el gel de agarosa. Existen distintos factores que influyen en la velocidad con que el ácido nucleico migra en el gel, entre ellos, podemos citar:

- El tamaño de la molécula
- La concentración de agarosa
- La conformación del ADN

Hibridación

Al revelar los numerosos métodos mediante los cuales las células procesan, añaden, eliminan y transfieren información genética, los biólogos moleculares abrieron el camino para el desarrollo de sus propias manipulaciones genéticas.

Electroforesis de ácidos nucleicos

La electroforesis es una técnica analítica de separación de macromoléculas. La separación tiene lugar debido a la diferente movilidad que presentan las macromoléculas cargadas cuando se someten a la influencia de un campo eléctrico como consecuencia de su relación carga/masa. Los ácidos nucleicos son moléculas cargadas negativamente, debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura

Sondas

Las sondas son segmentos de ADN o ARN de cadena sencilla marcados con moléculas reporteras, como enzimas o radioisótopos, que permiten su fácil detección. El diseño de la sonda, es decir, su secuencia nucleotídica, es lo que le permitirá, entre miles de fragmentos que forman parte del genoma de un ser humano, identificar "un solo aen" o "el fraamento de un aen"

Aplicaciones

La técnica de Southern blot ha sido de gran utilidad para identificar genes asociados con enfermedades de transmisión genética, e identificar mutaciones, como rearrreglos, deleciones y dosis génica en caso de portadores

Southern blot

Esta técnica se utiliza para determinar la presencia de un gen o fragmentos del ADN específicos en una mezcla de ácidos nucleicos previamente extraídos.

Se basa en la aplicación de dos procesos fundamentales: la desnaturalización o separación de las cadenas complementarias del ADN y la hibridación o unión de dos cadenas complementarias.

Procedimiento técnico

En este procedimiento, primero se aísla el ADN de cualquier célula del organismo excepto de glóbulos rojos, ya que carecen de núcleo. Para el análisis molecular de un paciente, el ADN puede obtenerse de linfocitos. Sin embargo, la extracción puede hacerse también de otras fuentes: cultivos celulares, células de líquido amniótico, vellosidades coriónicas o cualquier órgano biopsiado. Una vez extraído el ADN, se digiere con enzimas de restricción y los fragmentos se separan por electroforesis en geles de agarosa, de acuerdo con su carga/masa. En algunas ocasiones se utilizan geles de acrilamida cuando los fragmentos que se van a separar son muy pequeños.

Northern blot

Diferencias con Southern blot

Es la contraparte del Southern blot y como ácido nucleico se utiliza ARN en lugar de ADN. A diferencia del Southern blot, con esta técnica no se utilizan enzimas de restricción, ya que las moléculas de ARN son más pequeñas y para su análisis no requieren su fraccionamiento.

Prácticamente comparten todos los demás pasos, como son la electroforesis, la desnaturalización (aunque el ARN es de cadena sencilla, puede formar estructuras secundarias), la transferencia y la hibridación con una sonda.

Aplicaciones

Es una herramienta muy útil para el estudio de los productos de la transcripción génica (ARNm) y de su regulación, ya que se pueden estudiar las potenciales variaciones en la abundancia de especies del ARN en diferentes condiciones experimentales o comparar condiciones clínicas normales o patológicas.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

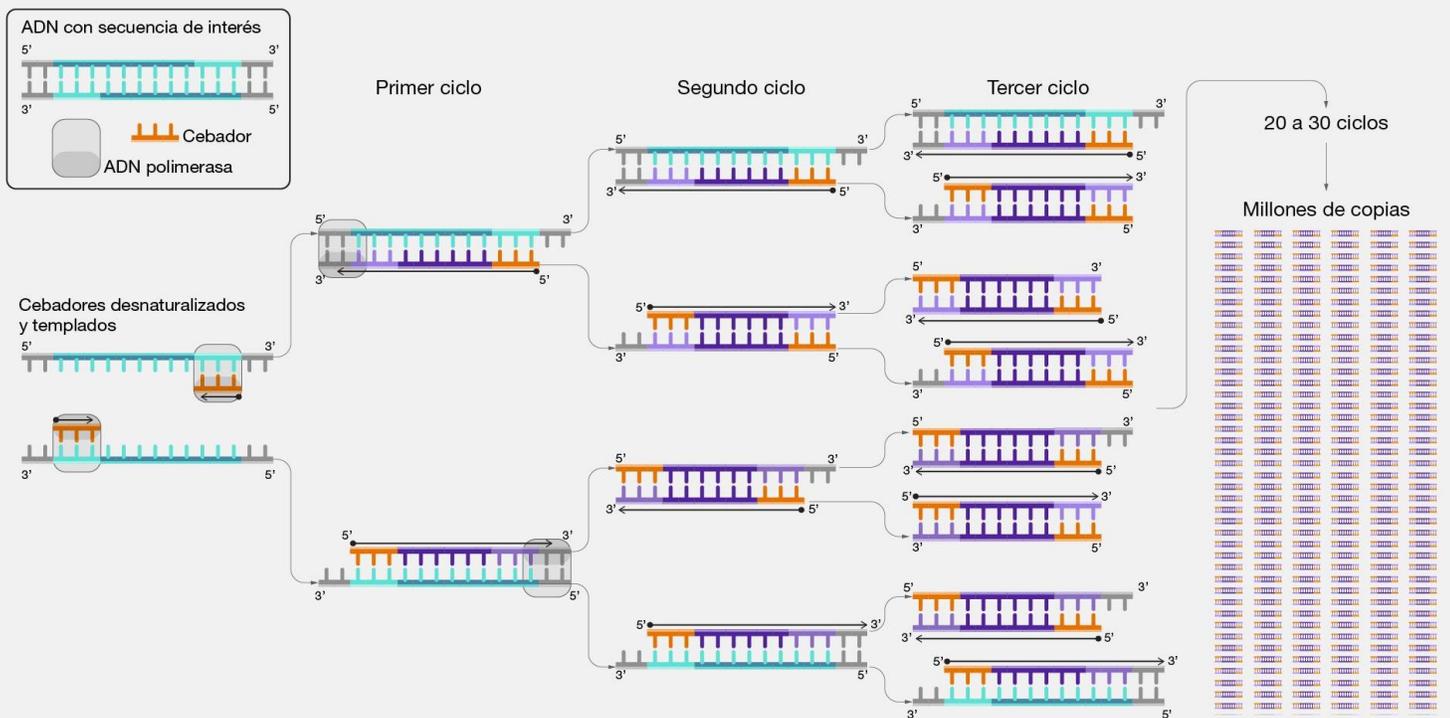
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio que permite la producción (amplificación) rápida de millones a miles de millones de un segmento específico de ADN, que así se podrá estudiar en mayor detalle.

La PCR implica el uso de fragmentos cortos de ADN sintético, denominados cebadores, para seleccionar un segmento del genoma que se amplificará, y luego múltiples sesiones de síntesis de ADN para amplificar ese segmento.

PCR, o la reacción en cadena de la polimerasa, es una reacción química que los biólogos moleculares utilizan para amplificar (crear copias) fragmentos de ADN

Esta reacción permite que unos pocos fragmentos de ADN se repliquen en millones o miles de millones de copias

La amplificación del ADN nos permite estudiar la molécula del ADN en detalle en el laboratorio.



ELISA

ELISA es el acrónimo en inglés para **enzimoinmunoanálisis de adsorción**. Se trata de un examen de laboratorio comúnmente usado para detectar anticuerpos en la sangre. Un anticuerpo es una proteína que el sistema inmunitario del cuerpo produce cuando detecta sustancias dañinas, llamadas **antígenos**.

ELISA directo: El ELISA directo es el ensayo ELISA más simple y rápido de todos, donde un anticuerpo primario marcado con una enzima se unirá directamente al antígeno de interés permitiendo la detección y/o cuantificación del mismo.

El **procedimiento simplificado** sería el siguiente:

- 1º El antígeno se inmoviliza sobre una placa
- 2º Se añade un **anticuerpo primario marcado** con una enzima que se unirá al antígeno de interés
- 3º Se añade el sustrato que al reaccionar con la enzima proporcionará una señal visible que permitirá la detección y/o cuantificación del antígeno de interés.

ELISA indirecto: ELISA indirecto

Es un ensayo parecido al ELISA directo pero en dos pasos, lo que permite amplificar la señal obtenida. En este caso se utilizan dos anticuerpos, uno primario y otro secundario, y es este último el que irá conjugado a una enzima.

ELISA competitivo: El ELISA competitivo es una variante más compleja de la técnica ELISA, también conocido como ELISA de inhibición debido al uso de un antígeno de referencia que competirá con el antígeno de la muestra por unirse al anticuerpo primario.

ELISA tipo sándwich

En el **ELISA tipo sándwich**: el antígeno queda inmovilizado entre dos anticuerpos, uno de captura y otro de detección también conocidos como **pares de anticuerpos**, que se unirán a dos epítopos distintos de un mismo antígeno. El **procedimiento simplificado** sería el siguiente:

- 1º El **anticuerpo de captura** se inmoviliza sobre la placa
- 2º Se añade la muestra que contiene el antígeno de interés que se unirá al anticuerpo de captura
- 3º Se añade el **anticuerpo de detección** que se unirá al antígeno unido a su vez al anticuerpo de captura.
- 4º En caso de que el anticuerpo de detección vaya conjugado a una enzima, procederemos directamente con el 5º paso. En caso contrario (que es lo más habitual en los ELISA tipo sándwich), será necesario añadir un **anticuerpo secundario marcado** con una enzima que se unirá al anticuerpo de detección.

Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica muy potente que permite analizar múltiples parámetros en una célula. Las poblaciones celulares se pueden caracterizar mediante el uso de combinaciones de antígenos tanto de superficie como intracelulares.

La tecnología de citometría de flujo se basa en la medición de la fluorescencia asociada a las células que han sido previamente marcadas con anticuerpos monoclonales ligados a fluorocromos, como por ejemplo CD3-FITC

Existen diversos láseres de uso común, y se nombran en función de la longitud de onda, o color, que emiten: 488nm (láser de argón azul), 633nm (láser rojo HeNe), 405nm (láser violeta), 532nm (láser verde) y 360nm (láser UV).

CFSE como un marcador de la división celular.

Las células T CD4+ son marcadas con CFSE y estimuladas in vitro con anti-CD3/anti-CD28. Después fueron analizadas por citometría de flujo en el día

Producción intracelular de citocinas. Dot plot de células periféricas de la sangre humana seleccionando células T CD3+. La producción de IL-17 está restringida a la población CD4+