



Métodos en biología molecular

Nombre del alumno: Edwin Dionicio Coutiño Zea

Nombre del tema: METODOS EN BIOLOGIA MOLECULAR

Nombre de la materia: Biología Molecular

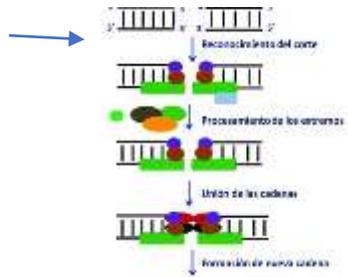
Nombre del profesor: ALBERTO ALEJANDRO MALDONADO LOPEZ

Nobre de la licenciatura: Medicina Humana

Semestre: Cuarto

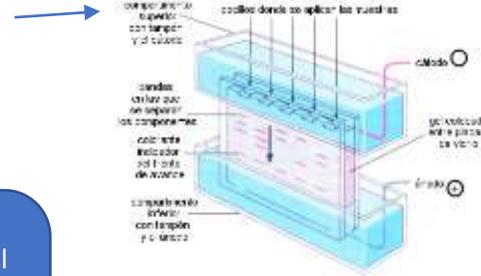
Comitán de Domínguez Chiapas a 30 de junio del 2022

Se extrae ADN cromosómico como muestra.



Escisión de ADN.

Se debe escindir el ADN con ayuda de endonucleasas de restricción.



Electroforésis.

Se deben separar los fragmentos mediante electroforesis en gel agarosa.

SOUTHERN BLOT.

Visualización.



Se expone la película de rayos X a la membrana.

Hibridación.

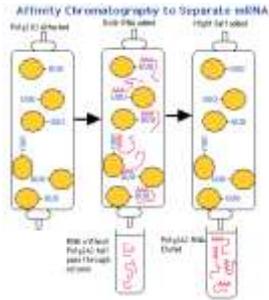
Se añade la muestra de ADN marcado radiactivamente para hacer la hibridación con el ADN complementario, luego se incuba con sonda y se lava.

Transferencia.

Se desnaturaliza el ADN y es transferido a una membrana de nylon.

NORTHERN BLOT

Separación del RNA.

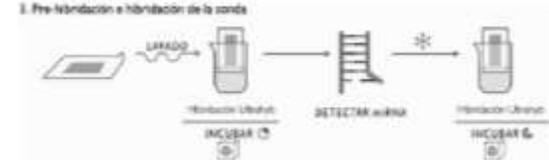


Transferencia e inmovilización del RNA.



Una vez finalizado el corrido electroforético, el RNA separado fue transferido a una membrana de Nylon cargada positivamente, utilizando el equipo Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, en este equipo se hizo un montaje tipo sándwich con 3 hojas de papel Whatman cromatográfico 3MM, la membrana de Nylon, el gel y finalmente 3 hojas más de papel cromatográfico.

Pre-hibridación e hibridación

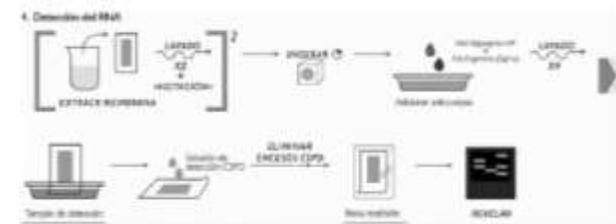


Transcurrida la hora de inmovilización la membrana se lavó con Agua desionizada.

Se hizo un corrido electroforético en gel de poliacrilamida 15% utilizando el sistema Mini-protean y el marcador de peso molecular para miRNAs.

Detección del RNA.

Para realizar el proceso de detección se retiró la membrana de la botella de hibridación, se lavó dos veces con tampón de baja astringencia a 37°C con agitación durante 15 min.



CITOMETRÍA DE FLUJO.

Método de laboratorio

Determinar el número, el porcentaje y ciertas características de las células

Las células se tiñen con un tinte sensible a la luz, se colocan en un líquido, se pasa una a una por un haz de luz. La citometría de flujo se usa en investigación básica y para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, como el cáncer.

Determinar el marcador intracelular

Fijación previa para provocar que las proteínas se entrecruzen y se estabilice la membrana celular y la permeabilización celular para que los anticuerpos puedan tener acceso a los componentes intracelulares.

Determina que marcador nuclear te conviene más utilizar

Los factores de transcripción son proteínas que se unen al DNA y regulan la expresión génica, modulando la síntesis de RNA mensajero.

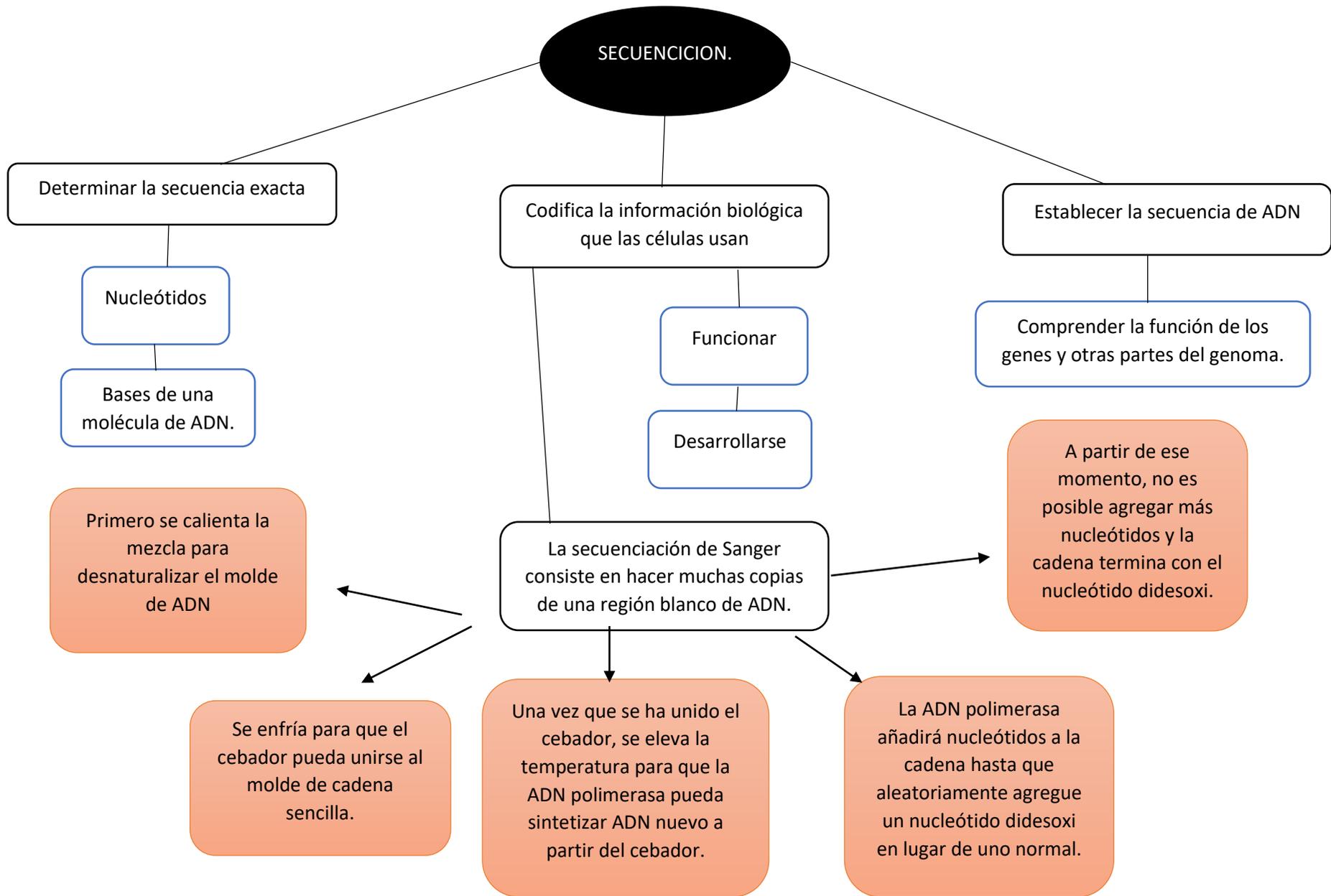
Selección del tampón de marcaje intracelular

Cuando realizamos un marcaje intracelular seguido de un análisis por citometría de flujo, la selección de los tampones de fijación y permeabilización son esenciales y tienen un gran impacto en la calidad y la precisión del resultado final.

Citometría de flujo para el estudio de señalización celular

- Análisis marcadores específicos de vías de señalización.
- Análisis de marcaje célula-específico.
- Dependiendo de la aplicación: Western blot, ELISA o inmunohistoquímica (IHC).
- Utilizando diferentes tipos de tampones intracelulares de fijación y de permeabilización.
- Reactividad cruzada entre ratón y humano.

Añade a tu flujo de trabajo las bolitas de compensación UltraComp™ eBeads



SECUENCION.

Determinar la secuencia exacta

Nucleótidos

Bases de una molécula de ADN.

Primero se calienta la mezcla para desnaturalizar el molde de ADN

Se enfría para que el cebador pueda unirse al molde de cadena sencilla.

Una vez que se ha unido el cebador, se eleva la temperatura para que la ADN polimerasa pueda sintetizar ADN nuevo a partir del cebador.

La ADN polimerasa añadirá nucleótidos a la cadena hasta que aleatoriamente agregue un nucleótido didesoxi en lugar de uno normal.

Codifica la información biológica que las células usan

Funcionar

Desarrollarse

La secuenciación de Sanger consiste en hacer muchas copias de una región blanco de ADN.

Establecer la secuencia de ADN

Comprender la función de los genes y otras partes del genoma.

A partir de ese momento, no es posible agregar más nucleótidos y la cadena termina con el nucleótido didesoxi.

ELISA

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas utiliza como sus siglas lo indican una enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo.

Existen diversas variaciones al método de ELISA para detectar y cuantificar ligandos de alto peso molecular, el marcador enzimático que se emplea en estos análisis se conjuga con un ligando

TIPOS DE PRUEBAS DE ELISA

ELISA directo

- 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

Indirecto

- 1º El antígeno se inmoviliza sobre una placa
- 2º Se añade un anticuerpo primario sin marcar que se une al antígeno de interés
- 3º Se añade un anticuerpo secundario marcado con una enzima que se unirá al anticuerpo primario
- 4º 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

Tipo sándwich

- 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).
- 5º 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.

Competitivo

- 1º El antígeno de referencia se inmoviliza sobre la placa
- 2º Por otro lado, un exceso de anticuerpo primario sin marcar se incubó con la muestra que contiene el antígeno de interés, dando lugar a la formación de complejos antígeno-anticuerpo
- 3º Se añade la mezcla antígeno-anticuerpo a la placa, donde el antígeno de referencia competirá con el antígeno de la muestra por unirse al anticuerpo
- 4º Se lava la placa eliminando los complejos antígeno-anticuerpo solubles
- 5º Se añade a la placa un anticuerpo secundario marcado con una enzima que se unirá al anticuerpo primario anclado al antígeno de referencia.
- 6º Se añade el sustrato que al reaccionar con la enzima proporcionará una señal visible que será inversamente proporcional a la cantidad de antígeno de interés presente en la muestra.

ELECTROFORESIS

La electroforesis se define como el movimiento o dispersión de partículas tras ser sometidas a un campo eléctrico. generalmente se realiza en una matriz o gel y suele utilizarse para separar fragmentos de ADN, ARN, moléculas o proteínas en base a su tamaño y carga eléctrica.

Moléculas cargadas se mueven a través de un gel cuando pasa una corriente eléctrica a través de él

Se aplica corriente eléctrica a través del gel para que un extremo del gel tenga una carga positiva y el otro extremo tenga una carga negativa

Moléculas migran hacia la carga opuesta.

Gel consiste en una matriz permeable, un poco como un tamiz, a través del cual las moléculas pueden viajar cuando pasa una corriente eléctrica a través de él.

Moléculas más pequeñas migran a través del gel más rápidamente y, por lo tanto, viajan más lejos que los fragmentos más grandes que migran más lentamente y, por lo tanto, recorrerán una distancia más corta. como resultado, las moléculas se separan por tamaño.