



PASIÓN POR EDUCAR

NOMBRE DEL ALUMNO: Juan Carlos
López Gómez

NOMBRE DEL PROFESOR: Q.F.B Alberto
Alejandro Maldonado López

NOMBRE DEL TRABAJO: Esquemas
técnicas moleculares.

MATERIA: Biología Molecular.

GRADO: Cuarto semestre grupo A

Comitán de Domínguez Chiapas a 30 de Junio de 2022

Electroforesis

Definición

Técnica mediante la cual se separan las biomoléculas en disolución cuando se ven sometidas a un campo eléctrico.

Tipo

De frente móvil: los componentes de la muestra están presentes en toda la disolución y se determina ópticamente la posición del frente de avance o frontera con el disolvente.

Zonal: la muestra se aplica como una mancha o banda y sus componentes migran a través de un disolvente, utilizando además un medio que da soporte a éste. En este caso no se determina la movilidad, sino que el único objetivo de la técnica es separar los componentes de la muestra.

Continua: la muestra se aplica también en una zona, pero se suministra continuamente a lo largo del proceso.

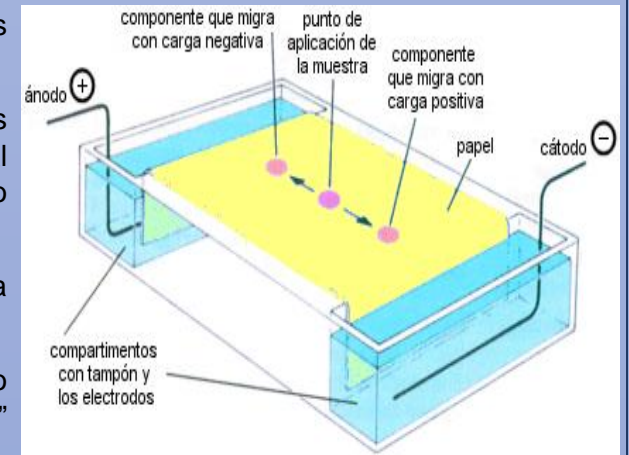
Horizontal

En papel, para aminoácidos u otras moléculas pequeñas; en soportes similares (especialmente, acetato de celulosa), para proteínas.

En gel de almidón o de agarosa, para proteínas y especialmente para ácidos nucleicos. Casi siempre el tampón cubre el gel (para evitar que se seque debido al calentamiento sufrido al pasar la corriente), denominándose por ello "electroforesis submarina".

El soporte se impregna por capilaridad de disolución tampón, que disuelve la muestra y mantiene el contacto eléctrico.

Se aplica la muestra depositándola (con pipeta o un aplicador específico) como una gota sobre el soporte (papel, acetato de celulosa) o dentro de un "pocillo" creado en el gel.



Modos de disposición

Vertical

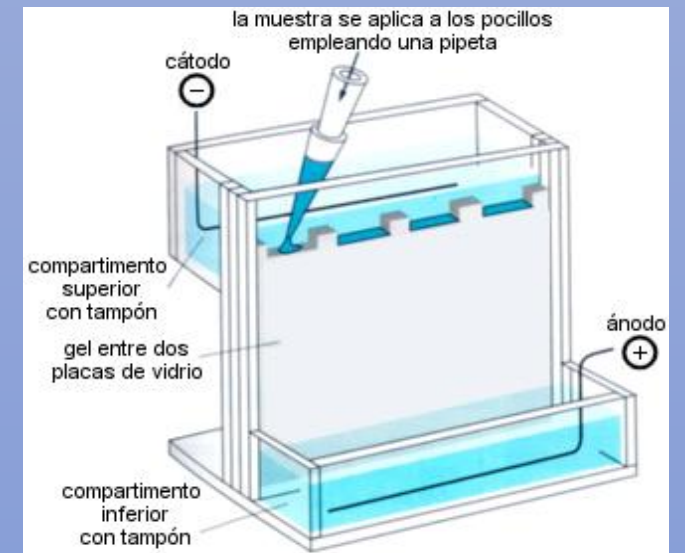
Se usa casi exclusivamente con gel de poliacrilamida (más resistente físicamente, no se desliza), para proteínas o para ácidos nucleicos de pequeño tamaño.

El gel puede rellenar tubos de vidrio (este formato ya apenas se usa) o estar contenido entre 2 placas rectangulares.

Contacto eléctrico y disolvente gracias al tampón que embebe el gel y llena las cubetas o compartimentos del ánodo y cátodo.

La muestra se deposita con micropipeta llenando un "pocillo" creado al polimerizar el gel.

En cuanto a la composición del gel hay dos variantes: electroforesis continua (un solo tipo de gel) y electroforesis discontinua (2 tramos de gel de composición ligeramente diferente).



Hibridación

Definición

proceso en el que dos moléculas complementarias de una sola hebra de ADN y/o ARN se unen y forman una molécula de doble cadena.

SOUTHERN BLOT

Técnica de hibridación que permite identificar fragmentos de ADN separados por electroforesis en gel y transferidos a una membrana de nitrocelulosa o nailon.

Extracción del ADN

Escisión del ADN con endonucleasas de restricción.

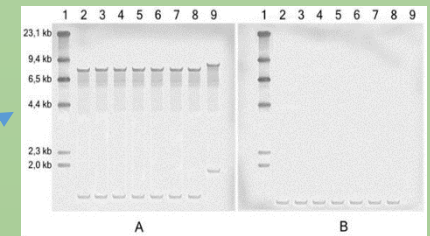
Fragmentos de ADN pasan a la electroforesis los

fragmentos de ADN se separa con gel de agarosa.

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

Hibridación se añade la muestra de ADN marcado radioactivamente se incuba con sonda y se lava.

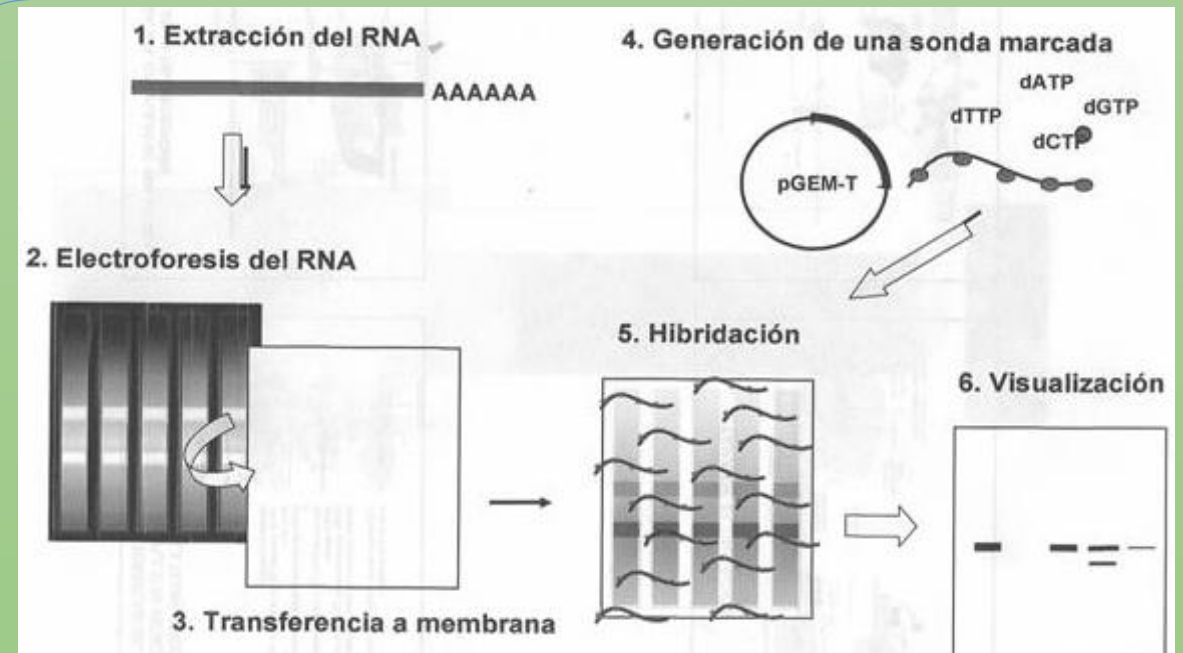
Visualización se expone la película en rayos X.



Tipos y pasos

Northern blot

Método de análisis de laboratorio que se utiliza para estudiar el ARN.



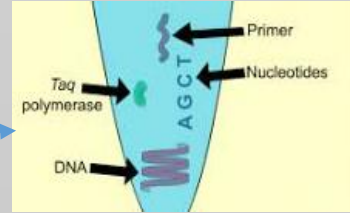
PCR

Definición

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.

Elementos

Termociclador



Pasos

Antes de la PCR

a) Extracción del ADN

Durante la PCR

a) Preparación de la muestra

b) Amplificación

- Desnaturalización inicial
- Ciclos de la PCR: desnaturalización, alineamiento y extensión
- Extensión final

Después de la PCR

a) Electroforesis

Tipos

En tiempo real: La detección se realiza al mismo tiempo que sucede la amplificación, mediante intercalados en el producto de PCR.

En punto Real: Se analiza después de 25 a 35 ciclos en el punto previo a la saturación de la reacción.

Desnaturalización. Se conseguiría elevando la temperatura del tubo de reacción hasta 94°C, durante, por ejemplo, un minuto (este tiempo puede variar entre ½ minuto y 2 minutos)

2. Alineamiento. Se desciende la temperatura hasta una temperatura que puede oscilar entre 40 °C y 60 °C (dependiendo de diversos parámetros como la secuencia de los primers, su especificidad,...). La duración de este paso puede oscilar entre ½ minuto y 2 minutos.

3. Extensión. Se vuelve a aumentar la temperatura hasta los 72 °C y se deja actuar a la Taq polimerasa durante 1 ó 2 minutos.

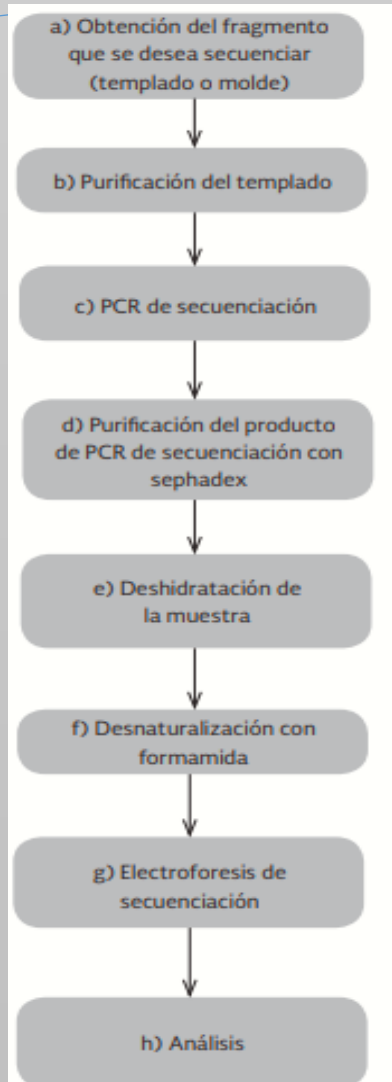


La secuenciación del ADN significa determinar el orden de los cuatro componentes básicos químicos, llamados "bases", que forman la molécula de ADN

Definición

Secuenciación

Etapas de la técnica



Método de secuenciación de Sanger

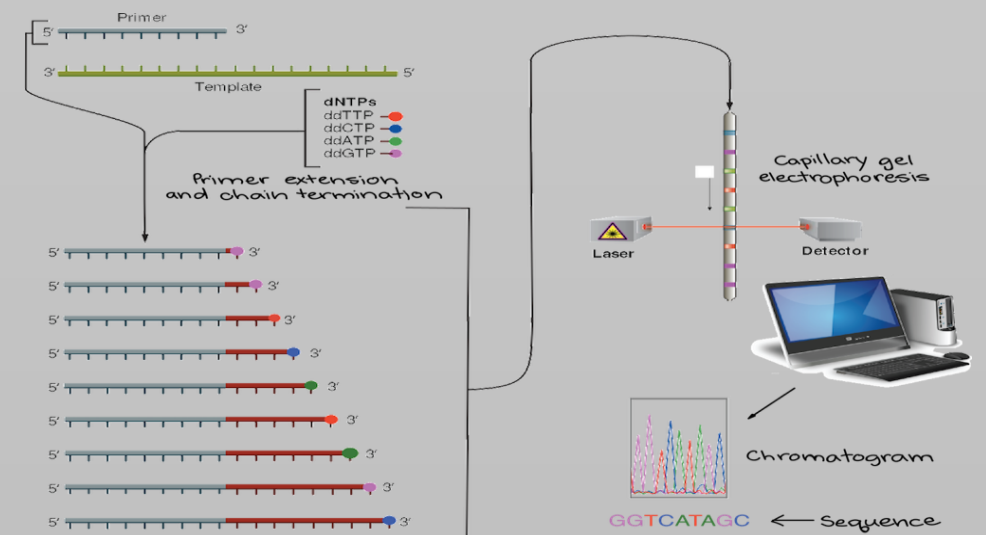
La muestra de ADN que se secuenciará se combina en un tubo con el cebador, la ADN polimerasa y los nucleótidos del ADN.

Primero se calienta la mezcla para desnaturalizar el molde de ADN (separar las cadenas) y luego se enfría para que el cebador pueda unirse al molde de cadena sencilla.

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

Cuando la reacción termina, los fragmentos se hacen pasar a través de un tubo largo y delgado que contiene una matriz de gel en un proceso llamado electroforesis capilar en gel.

Los datos registrados por el detector consisten en una serie de picos en la intensidad de la fluorescencia, como se muestra en el cromatograma anterior. La secuencia del ADN se lee a partir de los picos en el cromatograma.



Elisa

Definición

Se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto

Fases de un ensayo ELISA

- Conjugación del anticuerpo o del antígeno con un enzima
- Unión del antígeno
- Formación de una o más capas de inmunocomplejos.
- Revelado de la reacción enzimática.

Directa

Se preparan recubriendo los pocillos con las soluciones en las que se sospecha se encuentra el antígeno. Se incuban con anticuerpos marcados. Indican la presencia de antígeno en la solución analizada. Es necesario incluir controles negativos que serán muestras del mismo tipo de las analizadas (sangre, orina,) pero en las que se tenga la certeza de la ausencia del antígeno buscado. Asimismo, se incluyen controles positivos (soluciones donde se encuentra el antígeno buscado, o bien se le ha añadido).

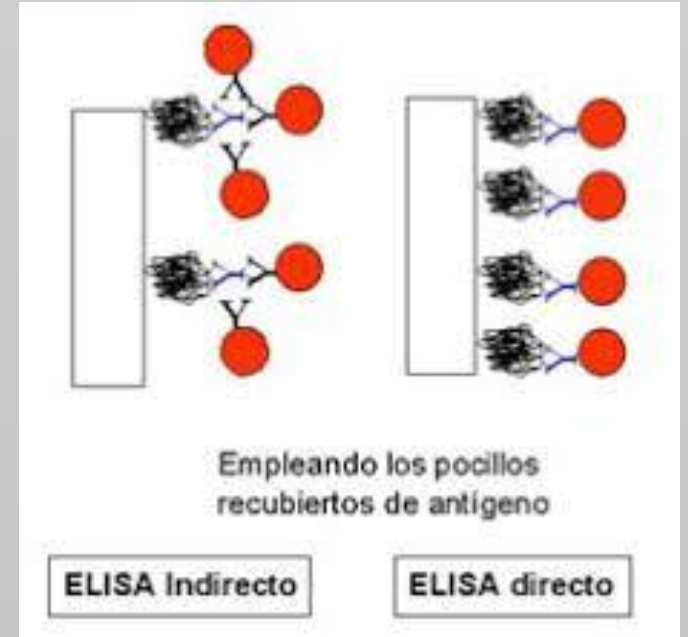
Indirecta

Se preparan de una forma idéntica a la anterior. Los controles positivos y negativos son los mismos. El sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno, y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario. Es el ensayo más popular, como lo es la inmunofluorescencia indirecta, pues un mismo secundario marcado y un mismo sistema enzimático permite cuantificar una gran cantidad de antígenos.

Tipos

Sándwich

Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así pues cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.



	Sensibilización	Muestra	Segundo anticuerpo	Anticuerpo conjugado a la enzima	Sustrato
ELISA sándwich de doble anticuerpo					
ELISA sándwich triple anticuerpo					
	37°C	37°C	37°C	37°C	ambiente
Temperatura					

Citometría de flujo.

Definición

Es una Tecnología estándar basada en láser que se utiliza en la detección y medición de características físicas y químicas de células o partículas

Principio de citometría de flujo

La dispersión de la luz se produce cuando una partícula desvía la luz del láser incidente. La medida en que esto sucede depende de las propiedades físicas de una partícula, a saber, su tamaño y complejidad interna.

La luz de dispersión frontal (FSC) indica tamaño y La luz de dispersión lateral (SSC) indica la granularidad celular.

Marcadores fluorescentes utilizados para detectar la expresión de moléculas celulares como proteínas o ácidos nucleicos en un sistema.

Sistema Fluido.

Es transportar partículas en una corriente de fluido al rayo láser. Para lograr esto, la muestra se inyecta en una corriente de fluido envolvente (generalmente una solución salina tamponada) dentro de la cámara de flujo.

Sistema Óptico

La óptica de excitación consta del láser y lentes que se utilizan para dar forma y enfocar el rayo láser al flujo de la muestra.

La óptica de recolección consiste en una lente de recolección para recolectar la luz emitida después de que la partícula interactúa con el rayo láser y un sistema de espejos ópticos que desvían las longitudes de onda especificadas de la luz recolectada a detectores ópticos desianados.

Sistema electrónico

El sistema electrónico convierte las señales de los detectores en señales digitales que pueden ser leídas por una computadora.

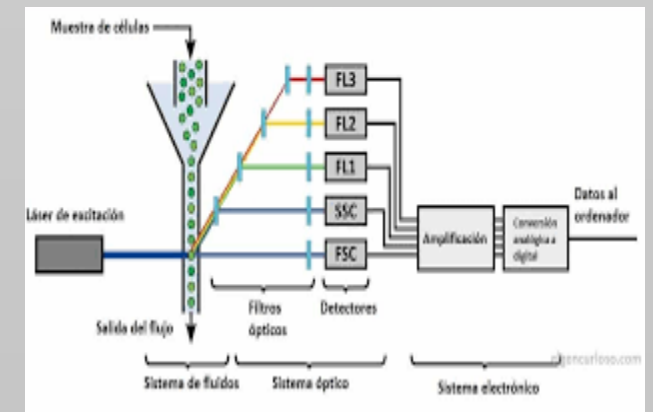
Pasos

Preparación de la muestra

Tinción de anticuerpos

Ejecución de muestras

Aplicaciones: biología molecular, patología, inmunología, virología, biología vegetal y biología marina.



Bibliografía

Adriana María Salazar Montes, A. S. (2013). *BIOLOGÍA MOLECULAR Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES.

Diz Mellado, O. M. (2018). *Técnicas moleculares*. Obtenido de <https://www.npunto.es/revista/30/tecnicas-de-biologia-molecular-en-el-diagnostico-de-enfermedades-infecciosas>

Farfán, B. M. (s.f.). *BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA AL DIAGNÓSTICO CLÍNICO*. Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-medica-clinica-las-condes-202-articulo-biologia-molecular-aplicada-al-diagnostico-S0716864015001546>

Mexico, U. A. (2018). *Protocolos Moleculares: PCR y Secuenciación de DNA*. Obtenido de <http://www.educontinua.fciencias.unam.mx/SiteNuevo/Cursos/ProtocolosMoleculares/Intro.php>