



UDS

Mapa conceptual técnicas genéticas

Mi Universidad

Universidad del sureste
Medicina humana
Genética humana

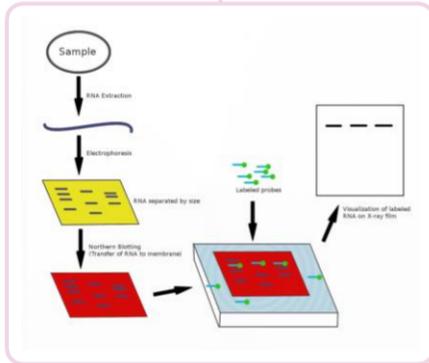
Químico. Hugo Nájera Mijangos
Ailyn Yamili Antonio Gómez

Comitán de Domínguez a 12 de noviembre del 2023

NORTHERN BLOT

utilidad

es una técnica analítica utilizada en biología y química para detectar ARN específicos a partir de una mezcla de ARN



¿quien o diseño?

La técnica fue desarrollada por James Alwine, David Kemp y George Stanken 1971 en la Universidad de Stanford.



desnaturalización

Los ARN se desnaturalizan rompiendo los enlaces H mediante la aplicación de formaldehído (no mediante la aplicación de una endonucleasa de restricción,

la muestra de ADN se divide o digiere en pequeños fragmentos utilizando una enzima de restricción. Tras la digestión, los fragmentos de ADN se separan mediante electroforesis en gel. Para ello se suele utilizar un gel de agarosa.

La electroforesis muestra varias bandas que parecen un blot debido a la presencia de varios fragmentos de restricción pequeños en el gel

se inmovilizan

los ARN se inmovilizan en una membrana de nailon o nitrocelulosa tras su separación por electroforesis

e utiliza NaOH para desnaturalizar el ADN y convertirlo en cadenas simples

estas bandas se transfieren a la superficie de una membrana utilizando un gradiente eléctrico que suele ser una hoja de papel llamada papel secante.

El patrón de los fragmentos de ADN en el gel sigue siendo el mismo tras la transferencia al papel secante.

se introduce en el papel secante una sonda formada por fragmentos de ADN monocatenario.

detección

La detección se realiza mediante sondas marcadas radiactivamente, por ejemplo P-32, bajo un autorradiograma o sondas no radiactivas (bioluminiscentes o ligadas a enzimas).

Las bases de la sonda de ADN se emparejarán con secuencias de ADN complementarias en el gel para formar el ADN de doble cadena

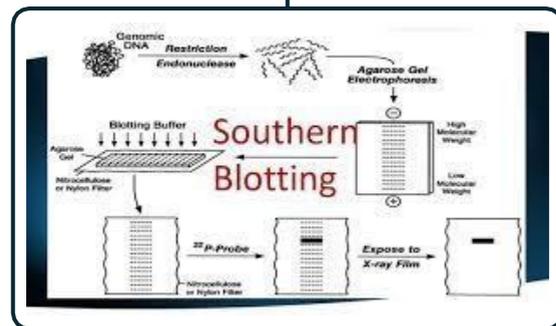
La sonda suele estar marcada con una etiqueta química o radiactiva para permitir el seguimiento de la sonda en el gel

Se utilizan sustratos químicos y películas de rayos X para localizar la sonda si la etiqueta es una enzima. Las etiquetas radiactivas pueden aparecer directamente en las películas de rayos X.

Southern Blot

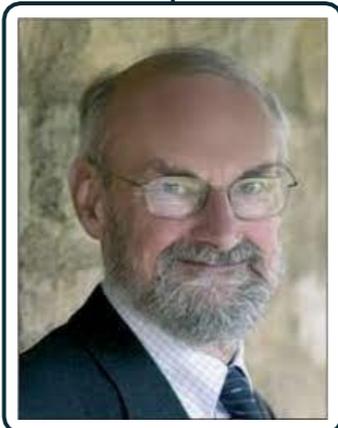
¿Qué es?

Técnica de análisis de genética molecular que se utiliza para detectar diferencias en la longitud de los fragmentos de ADN tras ser digeridos por enzimas de restricción



¿Quién lo diseñó?

Edwin Southern y permite la detección simultánea de varias secuencias diana de distintos tamaños con una única hibridación



se somete:

a una digestión enzimática, los enzimas más utilizados son el Hae III y Hinf I

I. El ADN digerido se somete a una electroforesis en gel de agarosa para separar los fragmentos producidos según su tamaño.

Cuando se trabaja con ADN genómico, tras la electroforesis se observa una estela fluorescente continua o "smear" debido a que la digestión produce un número muy elevado de fragmentos diferentes con múltiples tamaños

transferencia de ADN

se realiza la transferencia del ADN a una membrana de nylon o nitrocelulosa para obtener una réplica exacta del patrón de bandas de ADN que hay en el gel

incluyen la desnaturalización para separar las cadenas de ADN de forma que la sonda pueda hibridar

la transferencia desde el gel a la membrana por capilaridad; y por último anclaje del ADN a la membrana que se consigue mediante incubación de la membrana a 80°C, o irradiando con luz UV las membranas

se realiza:

se realiza incubando la membrana con diferentes reactivos en un tubo de hibridación, entre ellos la sonda o sondas marcadas específicamente y diluidas en una solución de hibridación adecuada

revelado:

que se realiza mediante autorradiografía con una película de rayos X, de manera que aparecerá una mancha oscura en los puntos de la membrana en que se localicen los híbridos sonda/secuencia diana

PCR

¿que es?

La reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, es una técnica para hacer muchas copias de una determinada región de ADN in vitro (en un tubo de ensayo en lugar de un organismo).

ingredientes

on Taq polimerasa, cebadores, ADN molde y nucleótidos (los bloques básicos del ADN).

Los ingredientes se colocan en un tubo, junto con los cofactores que necesite la enzima, y se someten a ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento que permiten la síntesis del ADN.

pasos

Desnaturalización ($[96\text{ }^{\circ}\text{C}]$): la reacción se calienta bastante para separar, o desnaturalizar, las cadenas de ADN. Esto proporciona los moldes de cadena sencilla para el siguiente paso.

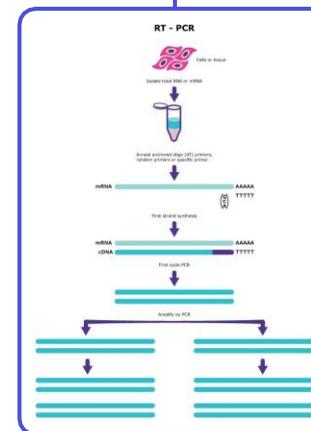
Templado la reacción se enfría para que los cebadores puedan unirse a sus secuencias complementarias en el molde de ADN de cadena sencilla.

Extensión la temperatura de la reacción se eleva para que la Taq polimerasa extienda los cebadores y sintetice así nuevas cadenas de ADN

Uso de la electroforesis en gel para visualizar los resultados de una PCR

Típicamente se incluye un estándar, o marcador de peso molecular, para que pueda determinarse el tamaño de los fragmentos en la muestra de PCR

Los fragmentos de ADN de la misma longitud forman una "banda" en el gel que se puede identificar a simple vista si el gel se tiñe con un pigmento que se una al ADN.



Bibliografía

<https://biotec.es/protocolos/SOUTHERN-BLOT-ANALISIS.pdf>

Presented with **xmind**