

Marvin López Roblero

DR. Hugo Nájera Mijangos

Cuadro sinóptico

Genética

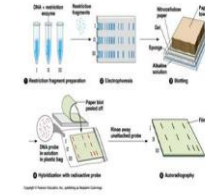
3

B

Southern Blot

El southern blot es una técnica empleada en los laboratorios de biología molecular que se usa para detectar secuencias de ADN específicas a partir de un preparado molecular.

SOUTHERN BLOT



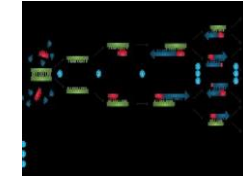
Antes de poder realizar el southern blot propiamente dicho hay que extraer y purificar el ADN. Esta puede ser tanto de tejido animal, vegetal, etc.

Una vez obtenido un ADN purificado se corta con enzimas de restricción para obtener fragmentos de diferentes tamaños

Si hay poco ADN muchas veces se aumenta el número de copias mediante una PCR

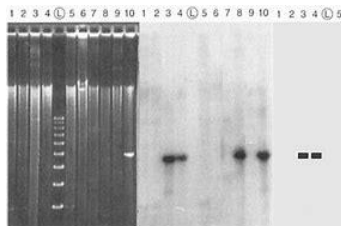
En este punto se baña el gen en un tratamiento alcalino

Una vez tenemos el ADN digerido con enzimas y en cantidad suficiente se corre una electroforesis en un gel de agarosa para separar los diferentes fragmentos de ADN según su tamaño. Ahora ya tenemos el ADN separado por tamaño de la doble hebra.



A partir de este momento empieza el southern blot propiamente dicho. En este momento se traspasa el ADN del gel a una membrana de nailon.

El paso de las banda de gel a las membranas se realiza gracias a la movilidad del ADN desde el gel a la membrana por polaridad del ADN que puede facilitar poniendo el "sándwich" en un campo eléctrico



Finalmente se revela con una película fotográfica, si la sonda es radioactiva o con luz fluorescente.

La membrana del nailon, que ahora contendrá el ADN, se incuba en una solución salina que contiene una sonda de ADN o ARN complementaria a una secuencia específica que queremos encontrar en la membrana.

Northern blot

Las RNAsas, enzimas capaces de degradar el ARN son altamente frecuentes



Para poder realizar un Northern blot es necesario el conocimiento previo de algunas técnicas de laboratorio. Para empezar la muestra biológica ha de ser sometida a un tratamiento de extracción de ARN, eliminando las proteínas y el ADN. El ARN es muy sensible a la degradación y por eso se ha de trabajar en condiciones de esterilidad mayores a los habituales.



Una vez extraído el ARN de la muestra, este queda en suspensión en agua. Después se carga en un gel de agarosa al que se ha añadido formaldehído para que el ARN pierda su estructura secundaria.



Una vez separados los ARNs según su tamaño es el momento de hacer el blot.



Para ello se utiliza una membrana de nailon u otro material capaz de retener fuertemente las moléculas de ARN.



Normalmente los enlaces que se establecen entre el ARN y la membrana son covalentes.



La membrana se coloca sobre el gel

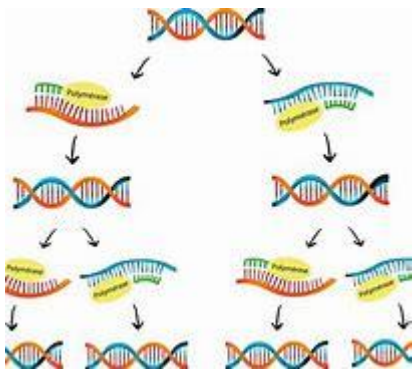


Mientras los ARN van del del gel hasta la membrana los ARN mantendrán su separación por peso



Northern blot tiene una baja sensibilidad en comparación con la RT-PCR, pero una alta especificidad que reduce los falsos positivos

PCR

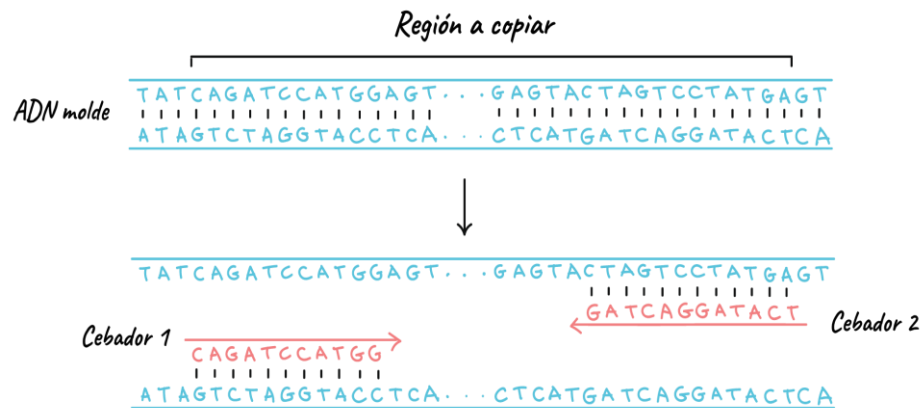


La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica para hacer muchas copias de una determinada región de ADN in vitro, (en un tubo de ensayo en lugar de un organismo).

La PCR depende de una ADN polimerasa termoestable, la Taq polimerasa y requiere de cebadores de ADN diseñados específicamente para la región

En la PCR, la reacción se somete repetidamente a un ciclo de cambios de temperatura que permiten la producción de muchas copias de la región blanco.

La PCR tiene muchas aplicaciones en la investigación y en la practica. Se utiliza de manera rutinaria en la clonación de ADN, el diagnostico medico y el análisis forense de ADN.



Esta región de ADN puede ser cualquier cosa que le interese al experimentador.

Por ejemplo podría ser un gen cuya función quiere entender un investigador o un marcador genético usado por científicos forenses para relacionar el ADN de la escena del crimen con los sospechosos.

Por lo general, el objetivo de la PCR es producir suficiente ADN de la región blanco para que pueda analizarse o curarse de alguna otra manera.

Al igual que la replicación de ADN en un organismo, la PCR requiere de una enzima ADN polimerasa que produzca nuevas cadenas de ADN mediante el uso de las cadenas existentes como molde.

La ADN polimerasa que normalmente se utiliza en la PCR se llama Taq polimerasa, por la bacteria tolerante al calor de la que se aisló (*Thermus aquaticus*).

Al igual que otras ADN polimerasas, la Taq polimerasa solo puede ser ADN si hay un cebador, una corta secuencia de nucleótidos que proporciona un punto de partida para la síntesis de ADN.