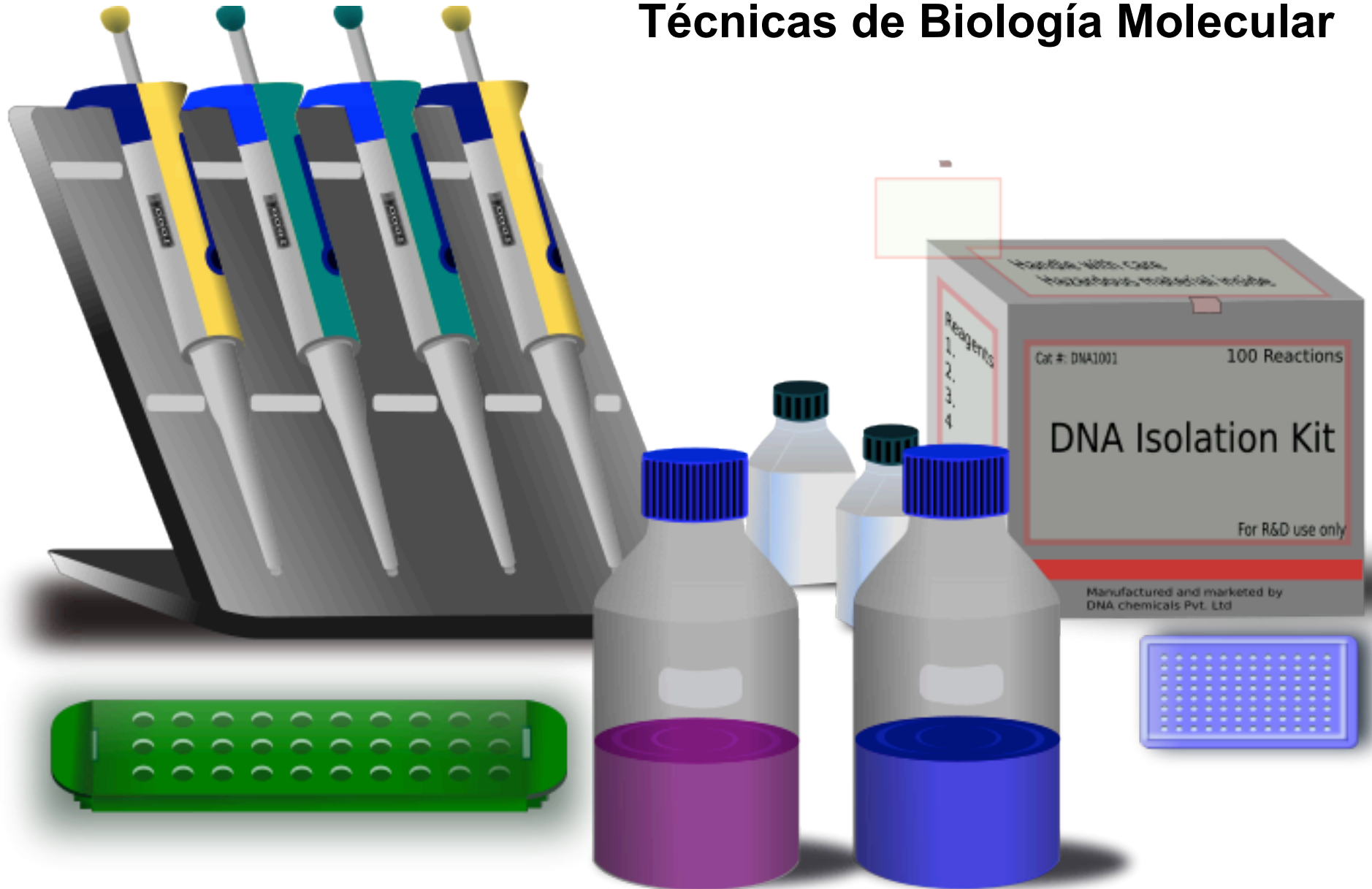
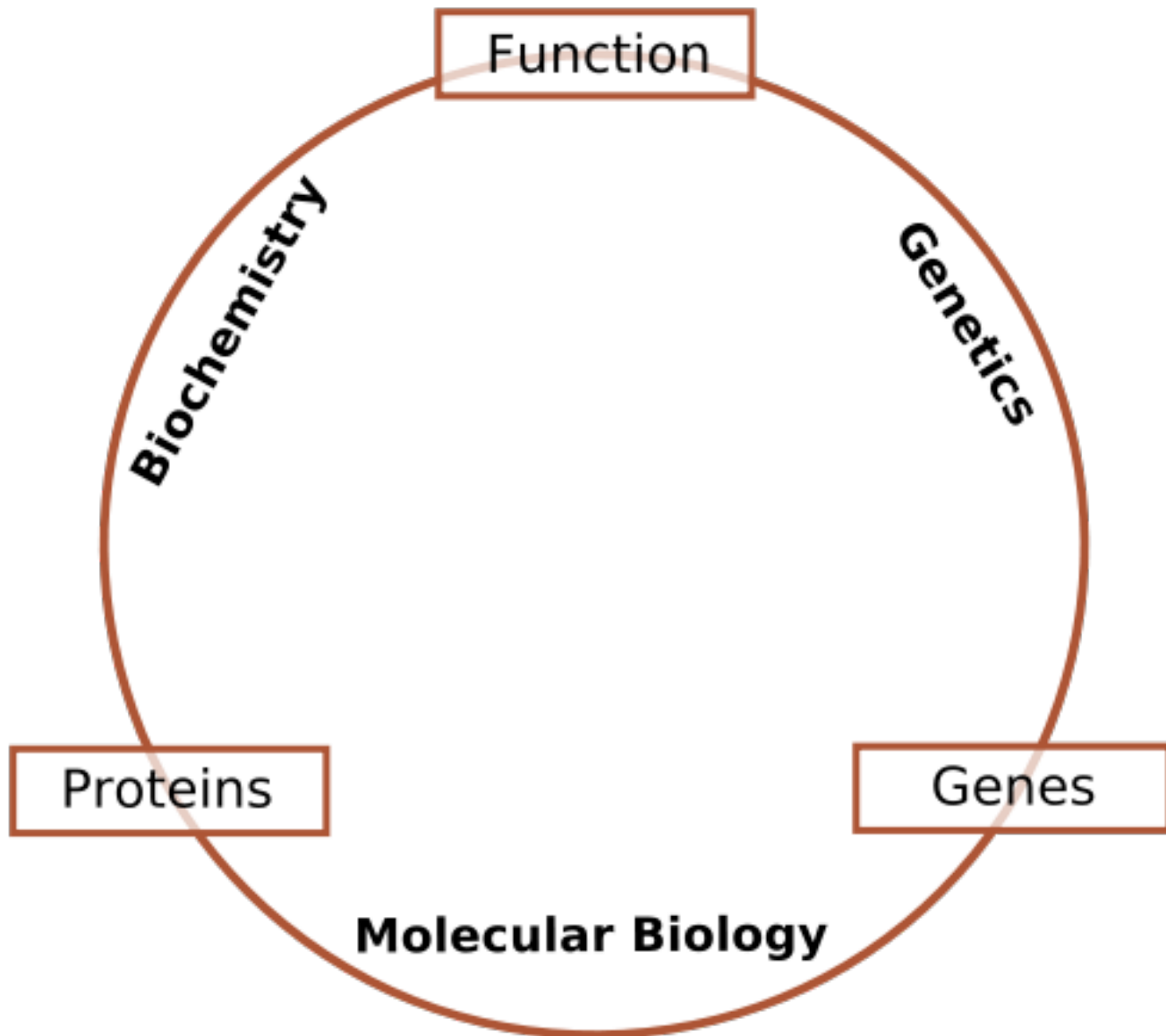


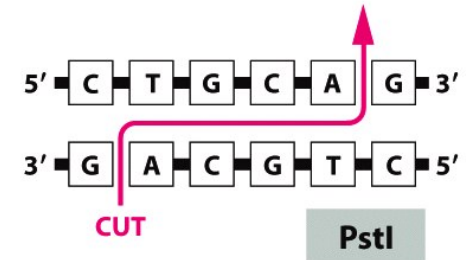
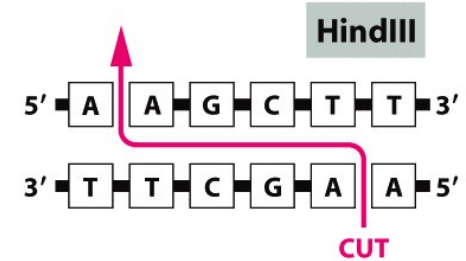
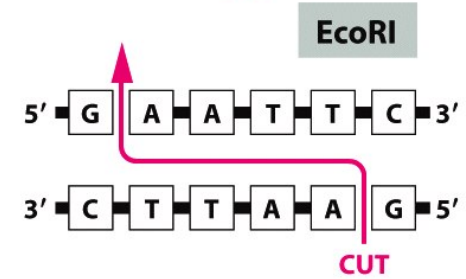
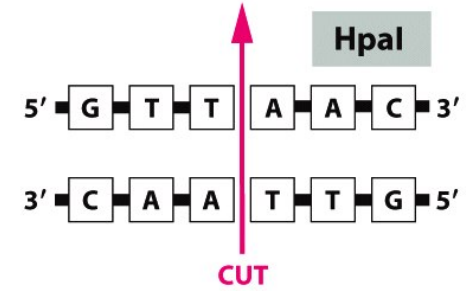
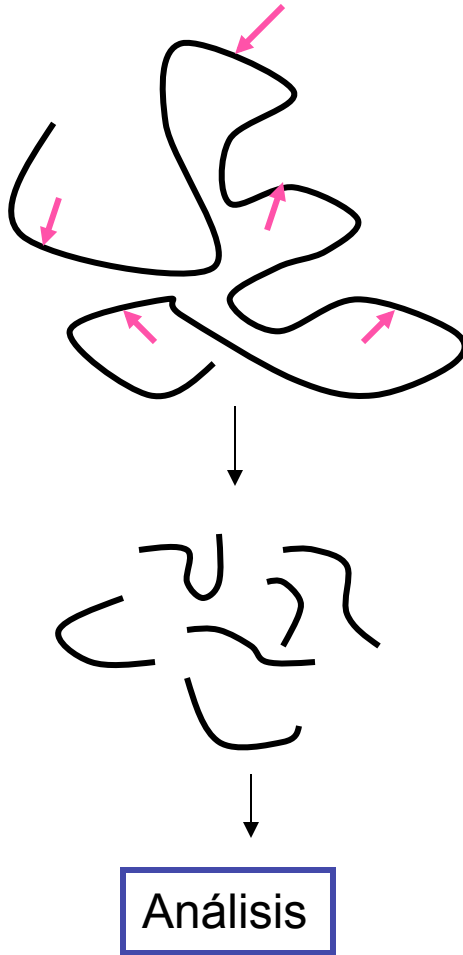
Técnicas de Biología Molecular



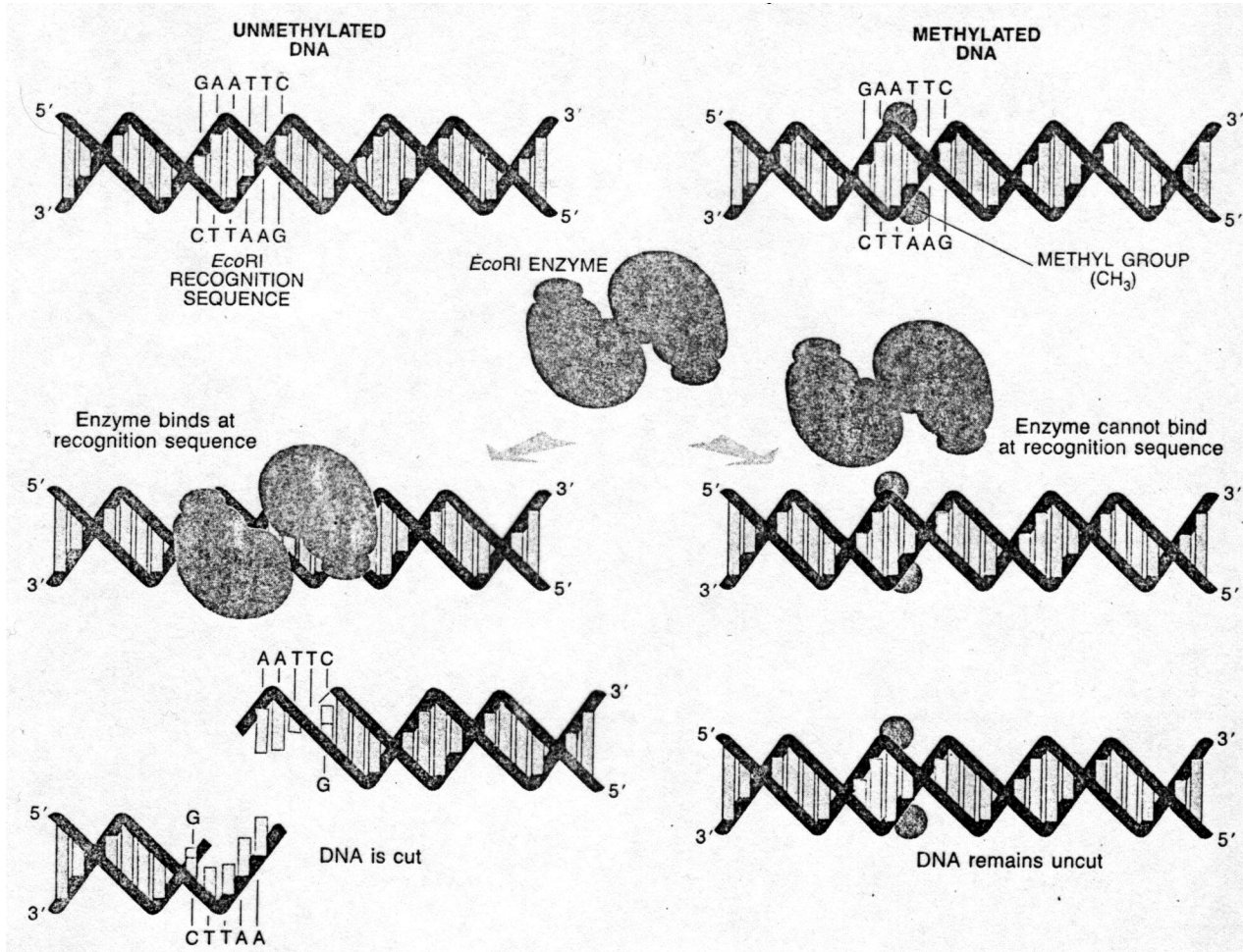


DNA

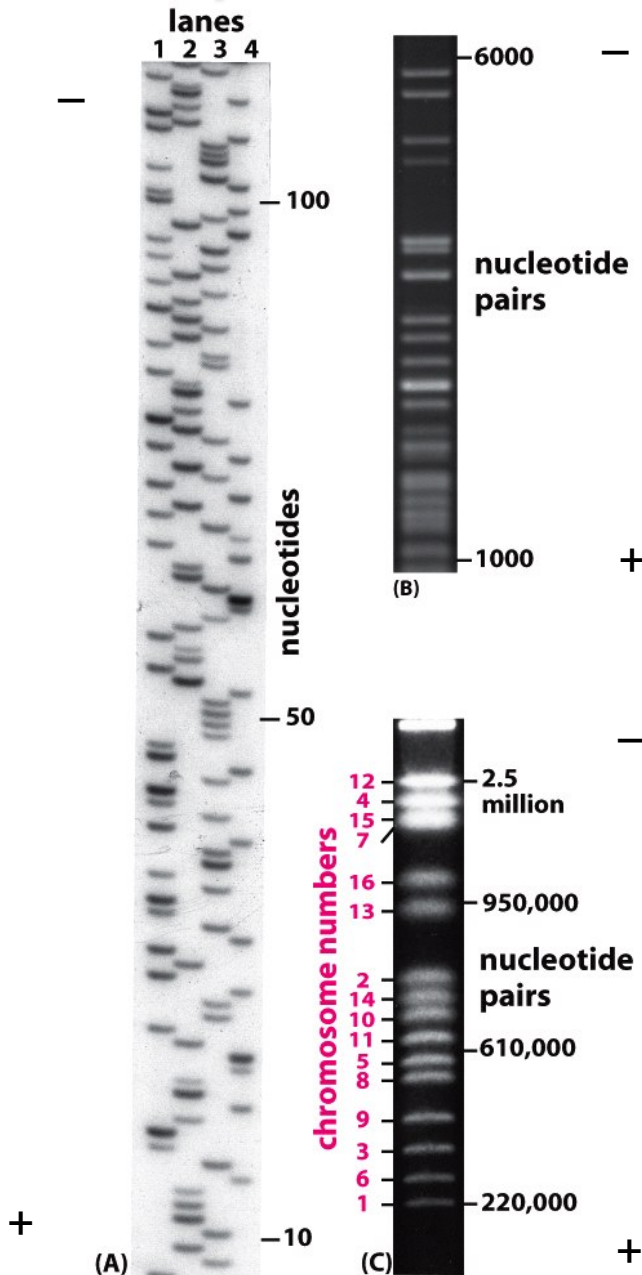
I. Enzimas de restricción



Las enzimas de restricción fueron aisladas de bacterias; su función natural es proteger contra DNA extraño



II. Separación electroforética de moléculas de DNA



(A) **Geles de secuenciación** (separación de bandas con 1 nt de diferencia)

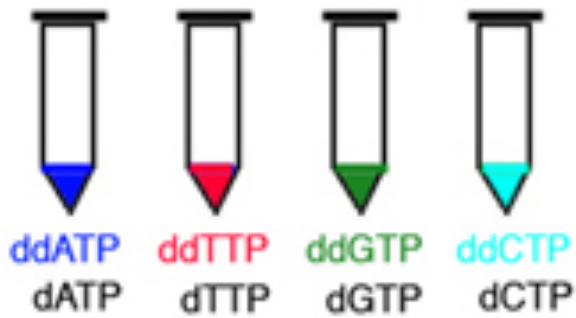
(B) **Electroforesis para RFLP** (separación entre 100 a 10000 nt)

(C) **Electroforesis de campo pulsante** (separación de DNA cromosomal)

III. Secuenciación de DNA por el método de Sanger



No acepta elongación de la cadena de nucleótidos por la DNA polimerasa



- dsDNA molde (¿secuencia?)
- 4 desoxiribonucleótidos (dNTPs)
- cebador de DNA
- DNA polimerasa



Fragmento de ADN molde



Cebador

Fragmento de ADN molde + cebador

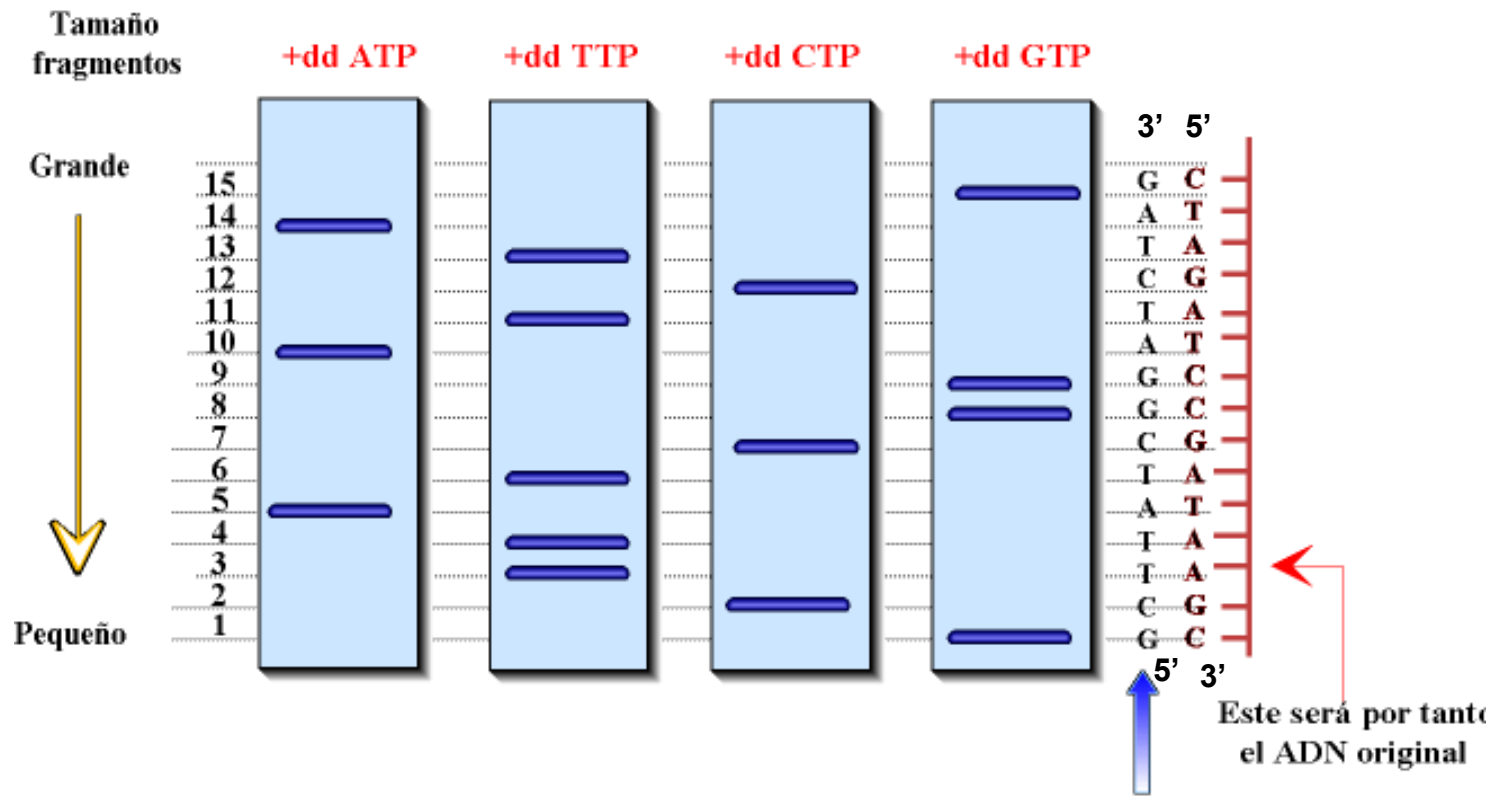


+ADN polimerasa,
los 4 tipos de nucleótidos
y **ddATP**



Fragmentos de ADN replicados con distintos tamaños. De menor a mayor 5 pb, 10 pb, 14 pb.

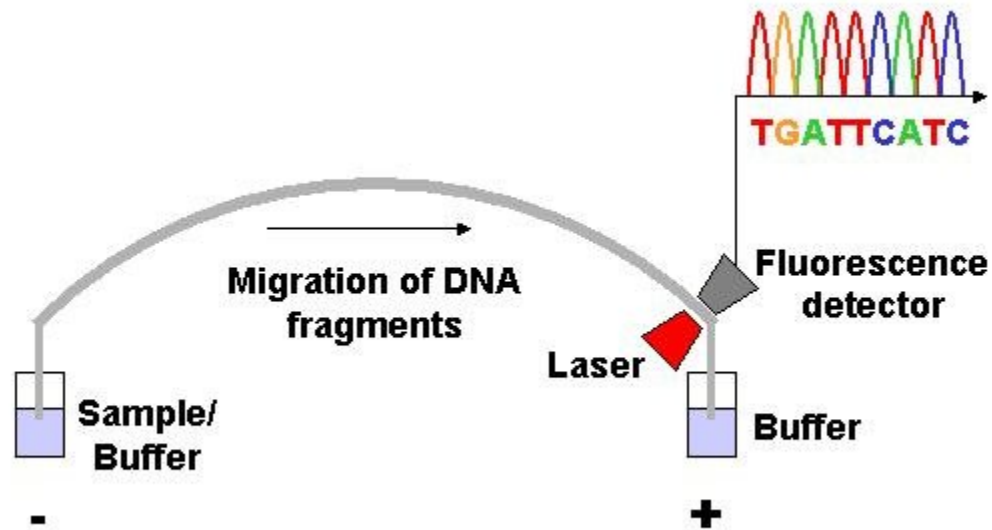
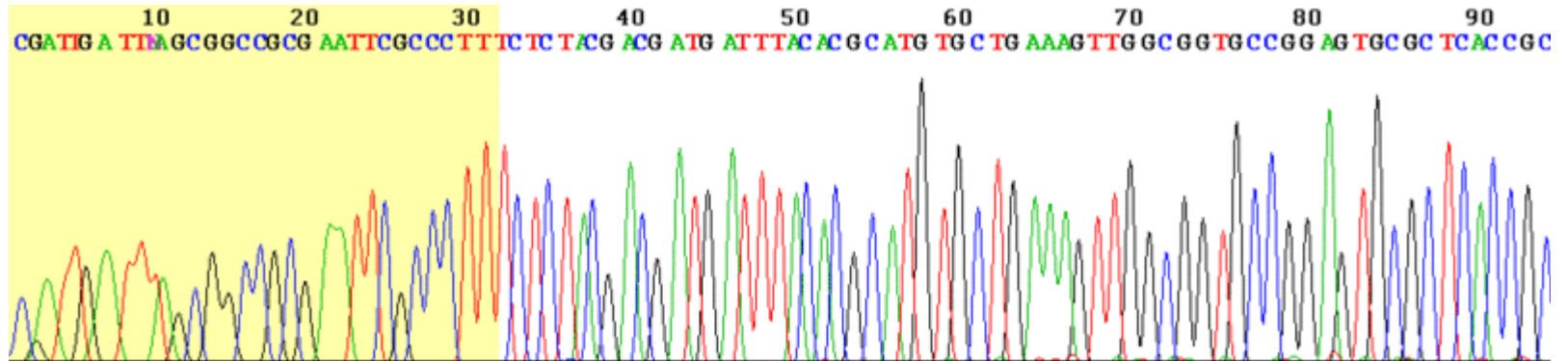




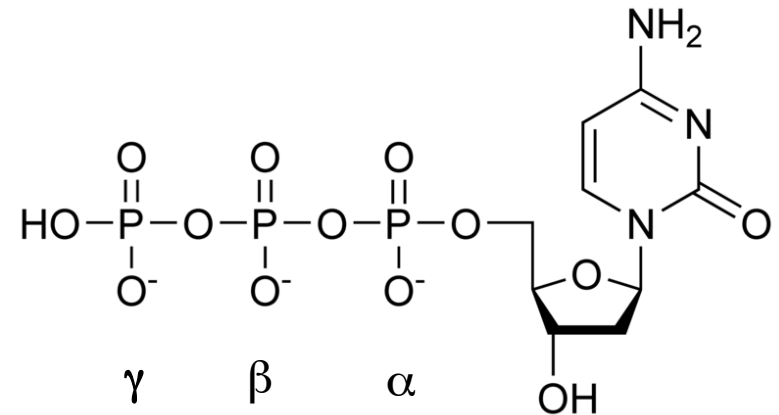
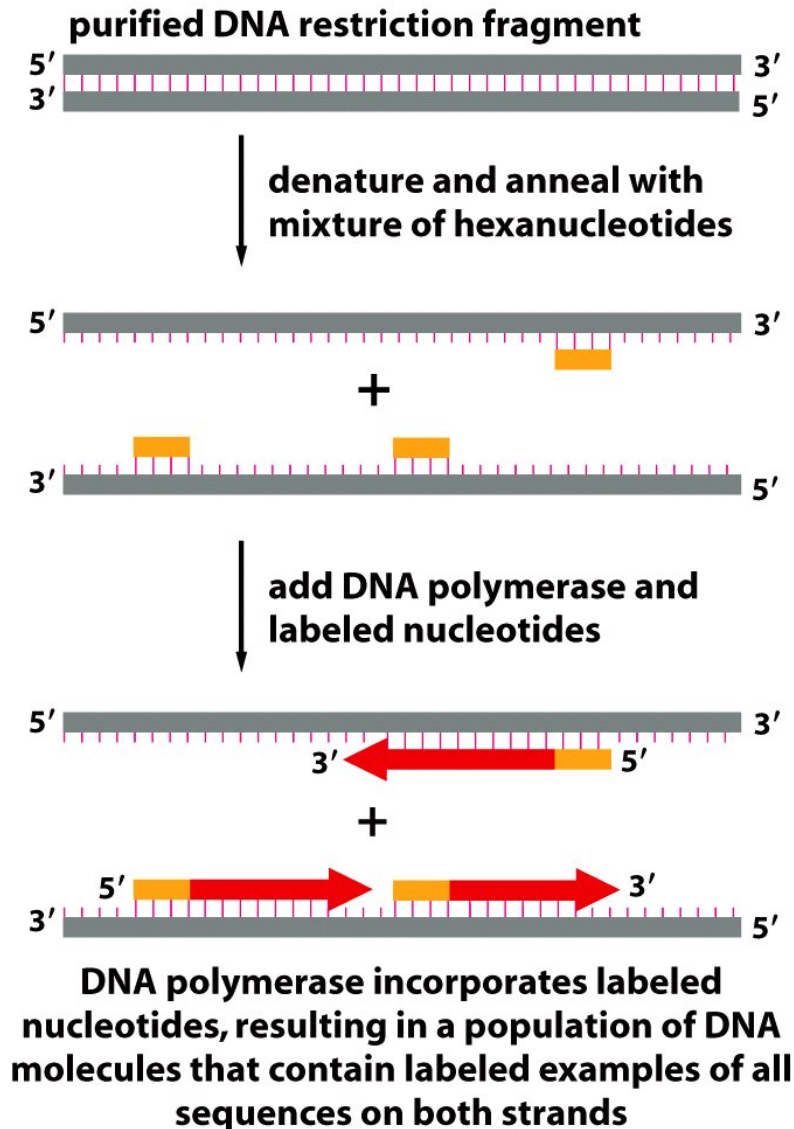
Este será por tanto el ADN original

Secuencia que puede deducirse para la cadena de nueva síntesis (complementaria de la original)

Secuenciación automatizada de DNA

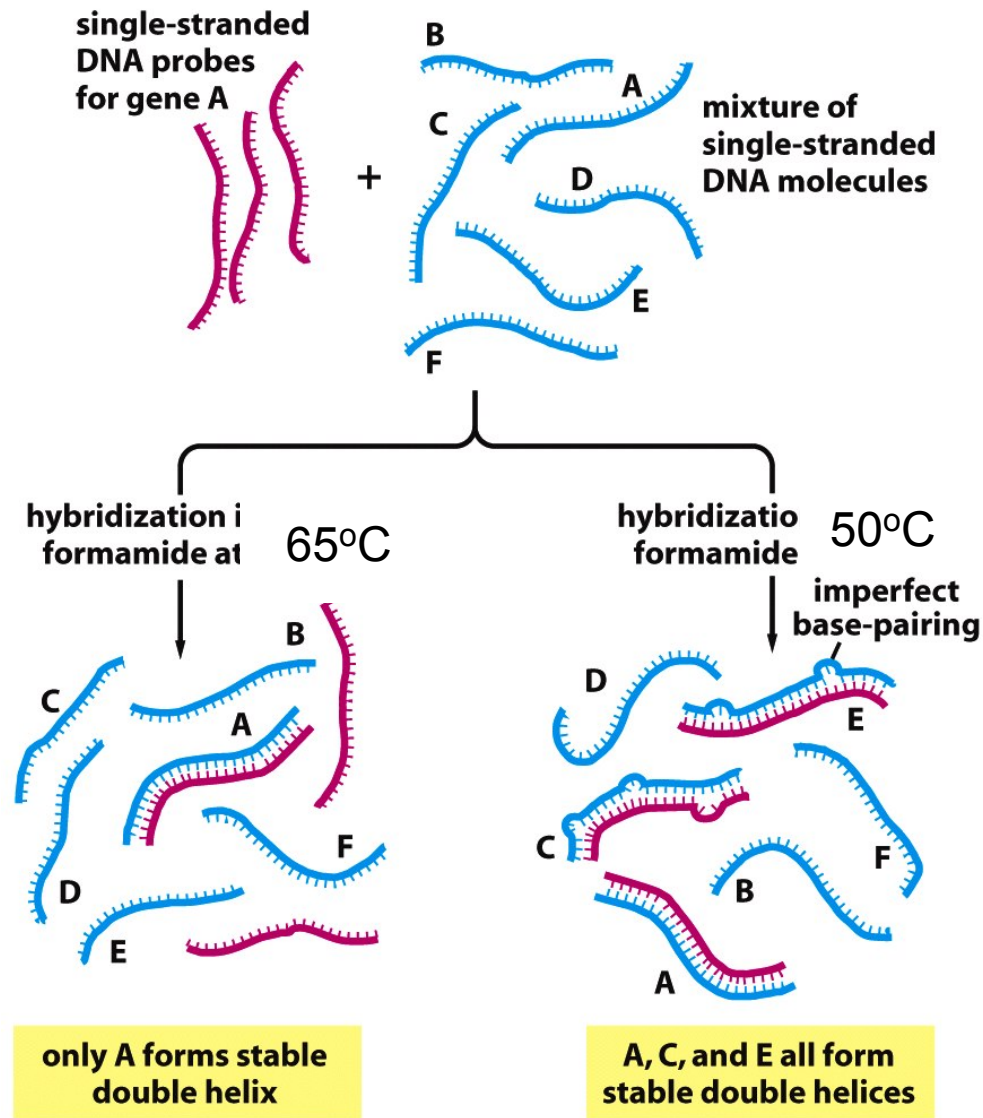


Marcaje de un fragmento de DNA (obtención de una sonda)



dCTP[α P³²]

Hibridación y reconocimiento de secuencias con alta homología



IV. Southern Blot (detección de secuencias específicas de DNA)

1. Aislamiento de DNA
2. Cortar con enzimas de restricción
3. Separar fragmentos por electroforesis
4. Desnaturalizar el DNA
5. Transferir a membrana de nitrocelulosa o nylon
6. Hibridar con sonda específica
7. Revelar con placa de Rayos X ó pantalla de fosforimager

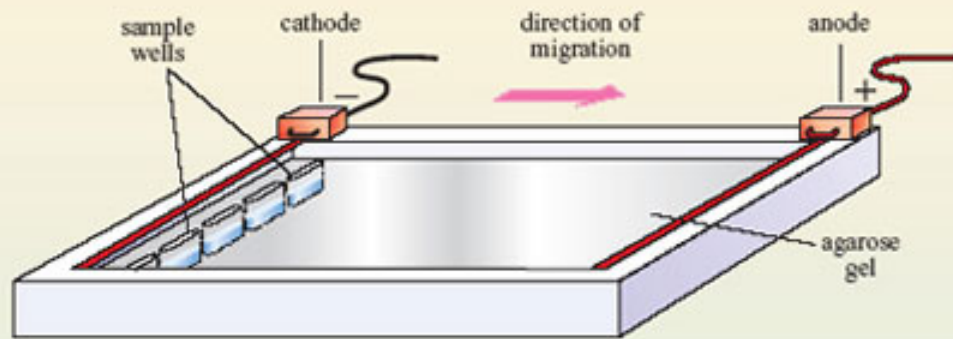
V. Northern blot (detección de secuencias específicas de RNA)

A nivel de transcriptoma (RNA)

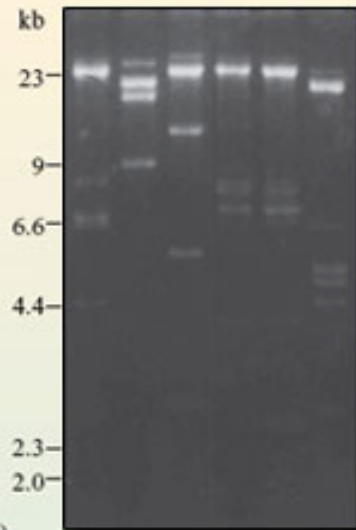
Northern Blot

1. Aislamiento de RNA
2. Desnaturalizar el RNA
3. Separar por electroforesis desnaturizante
4. Transferir a membrana de nitrocelulosa o nylon
5. Hibridar con sonda específica
6. Revelar con placa de Rayos X ó pantalla de fosforimager

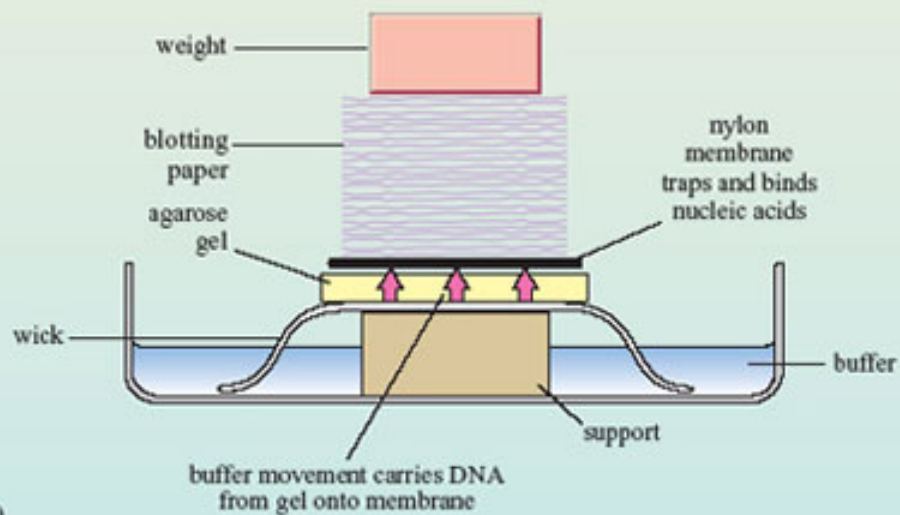
Expresión de genes



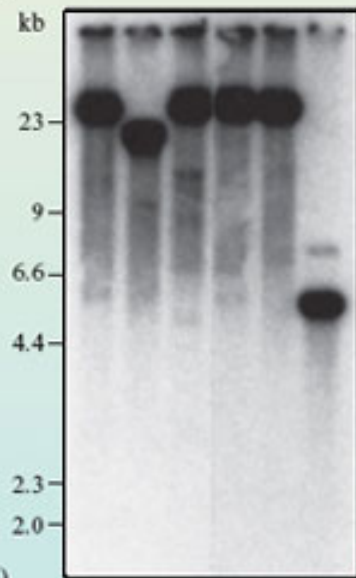
(a)



Bromuro de etidio



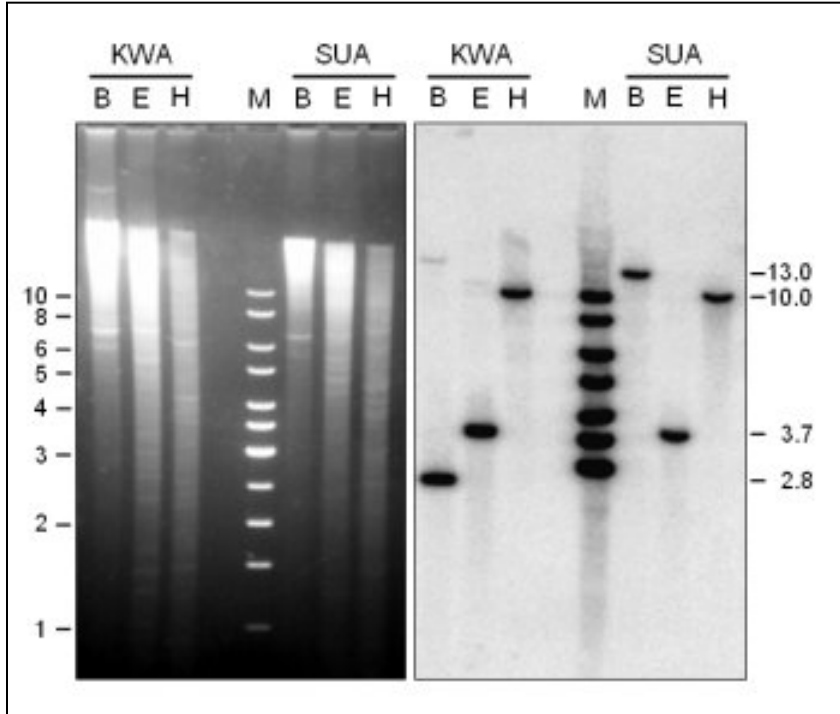
(c)



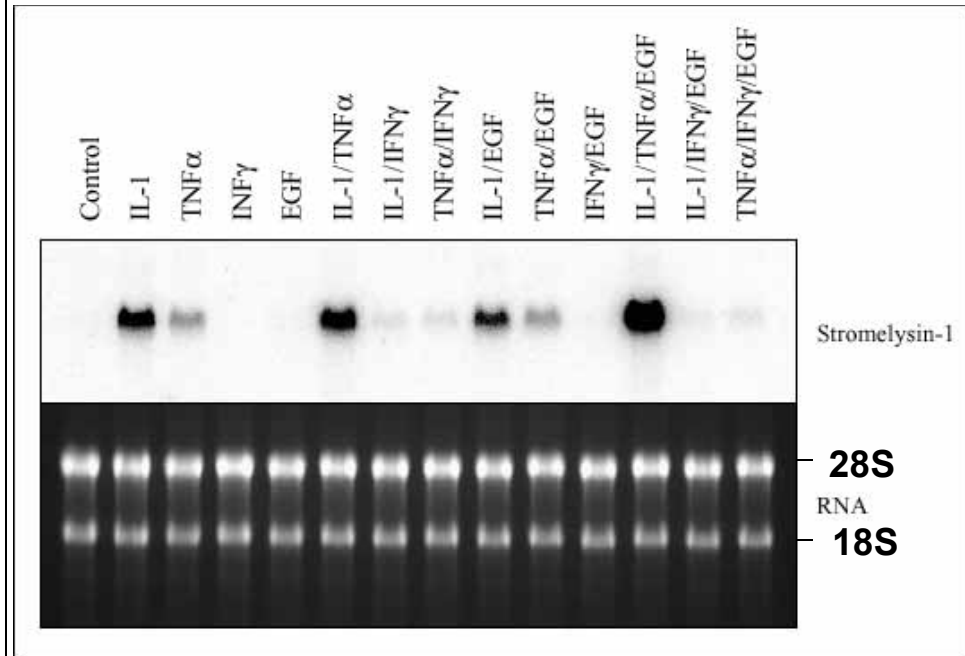
Sonda P³²

(d)

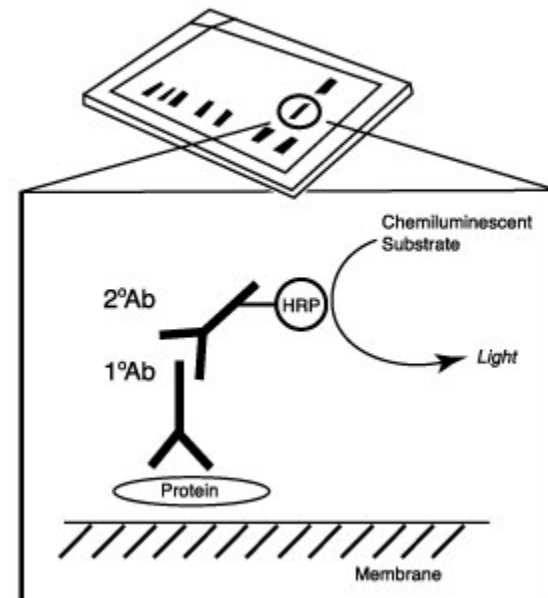
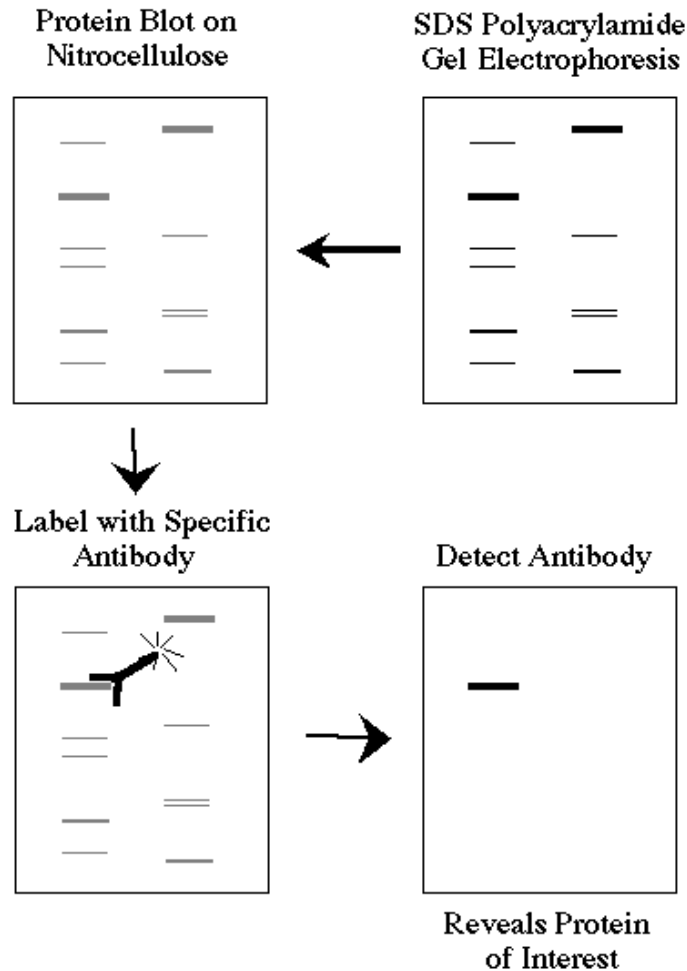
Southern Blot



Northern Blot

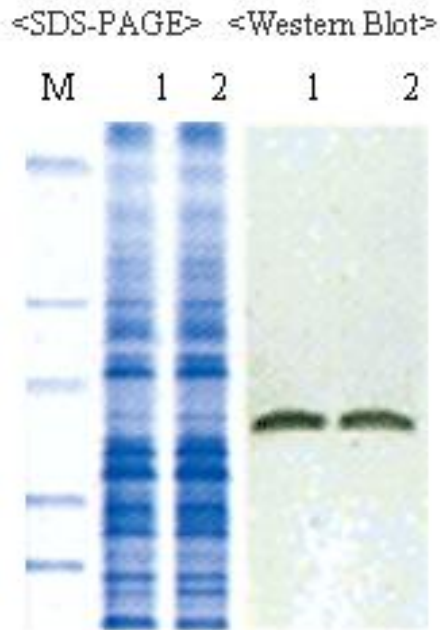


VI. Western Blot (detección de proteínas específicas con anticuerpos)

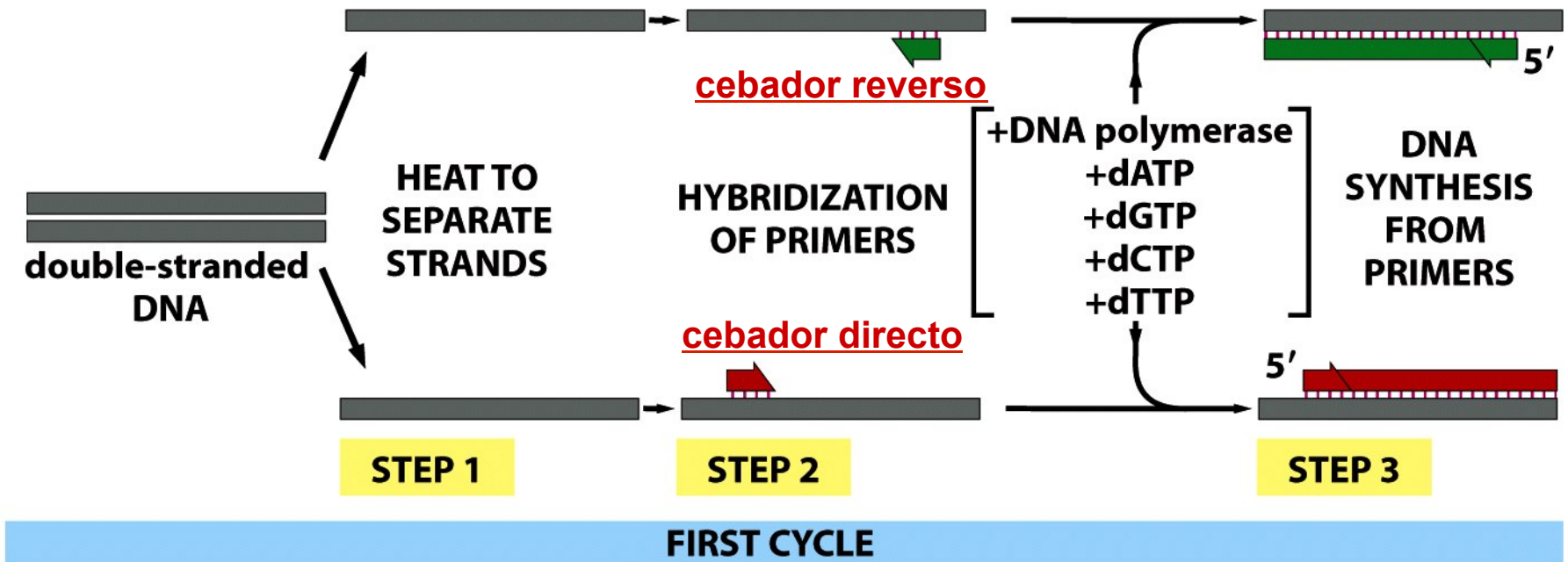


La detección de proteínas sirve para conocer:

1. Niveles de expresión
2. Isoformas
3. Modificaciones postraduccionales
4. Tiempo de vida media y degradación
5. Localización subcelular



VII. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

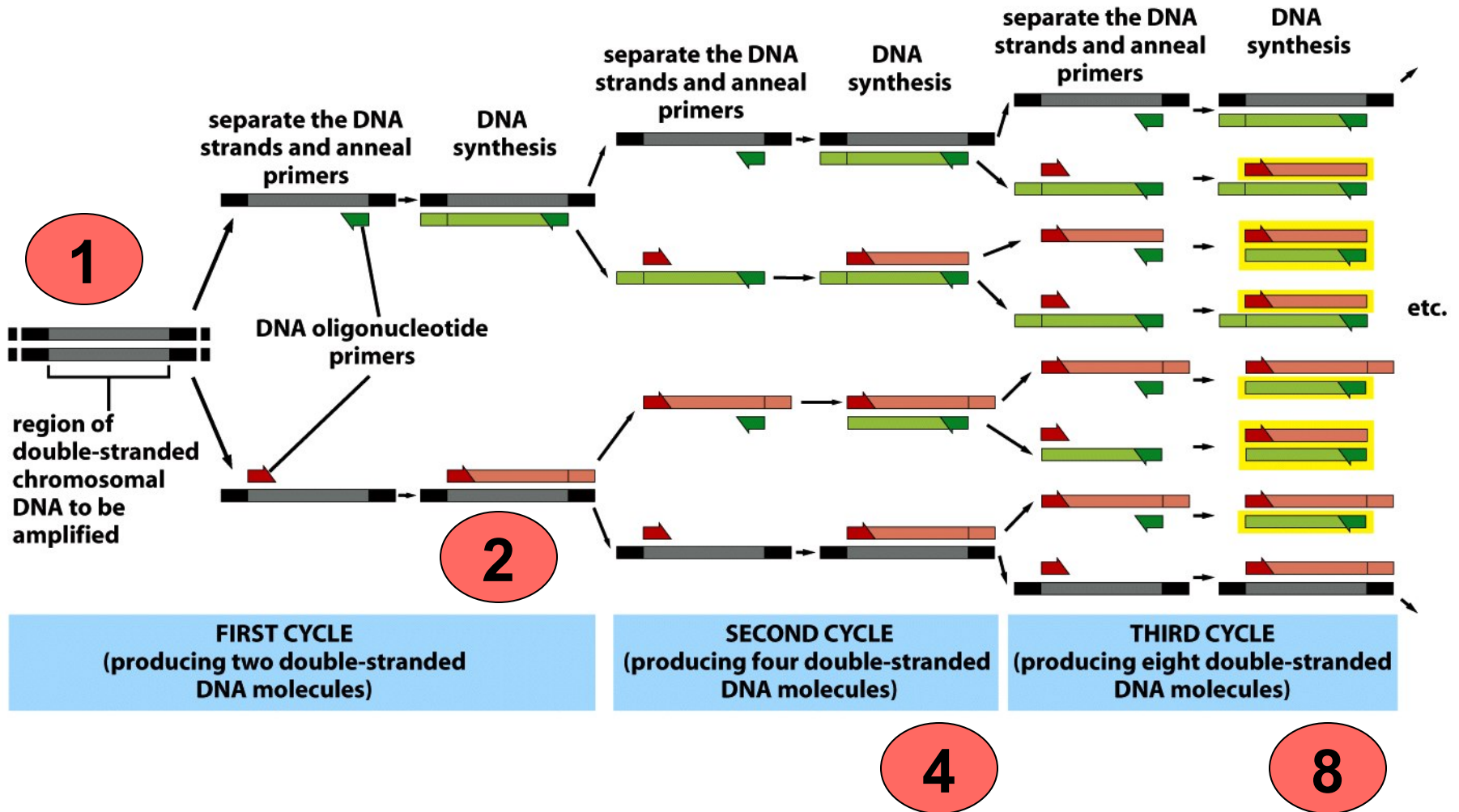


Desnaturalizar
94-95°C

Alineamiento
55-65°C

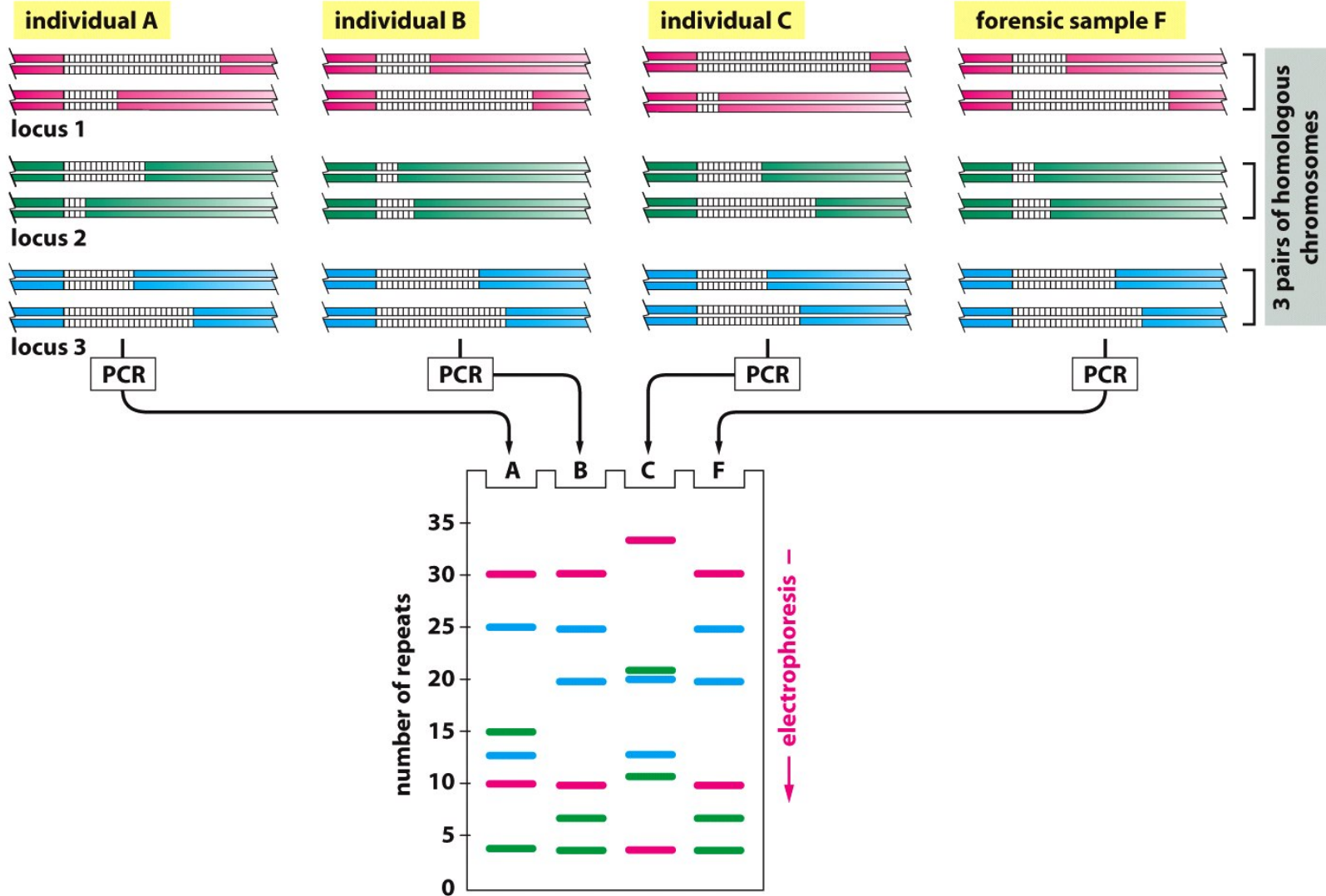
Polimerización
72°C

La amplificación es exponencial



En 40 ciclos se obtienen millones de copias del gen o fragmento particular de interés

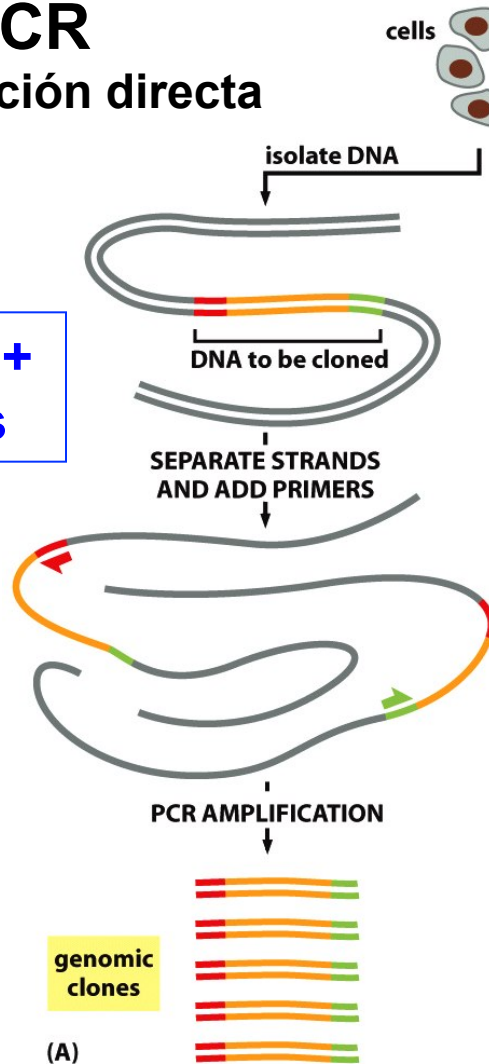
Pruebas de identidad (PCR a nivel de DNA)



El RT-PCR se puede utilizar como alternativa del Northern blot

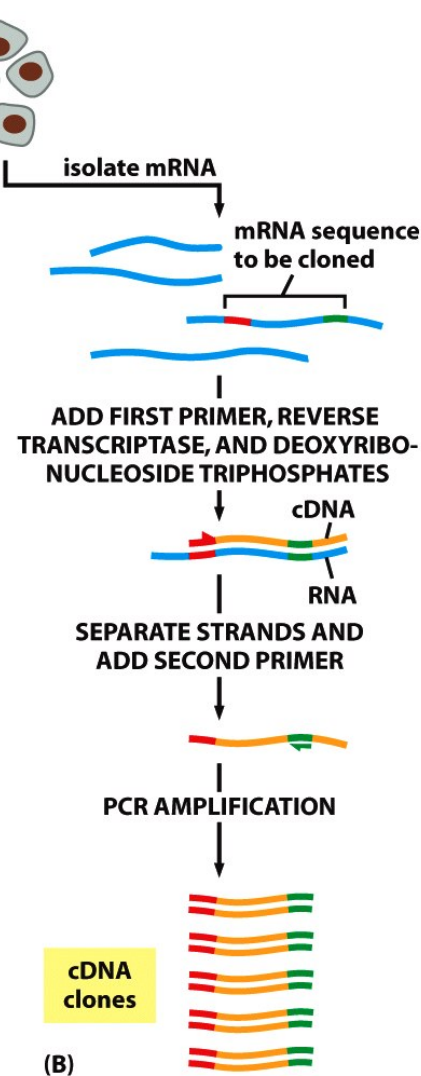
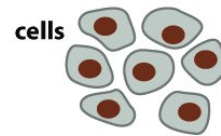
DNA: PCR

Amplificación directa



Exones + intrones

(A)



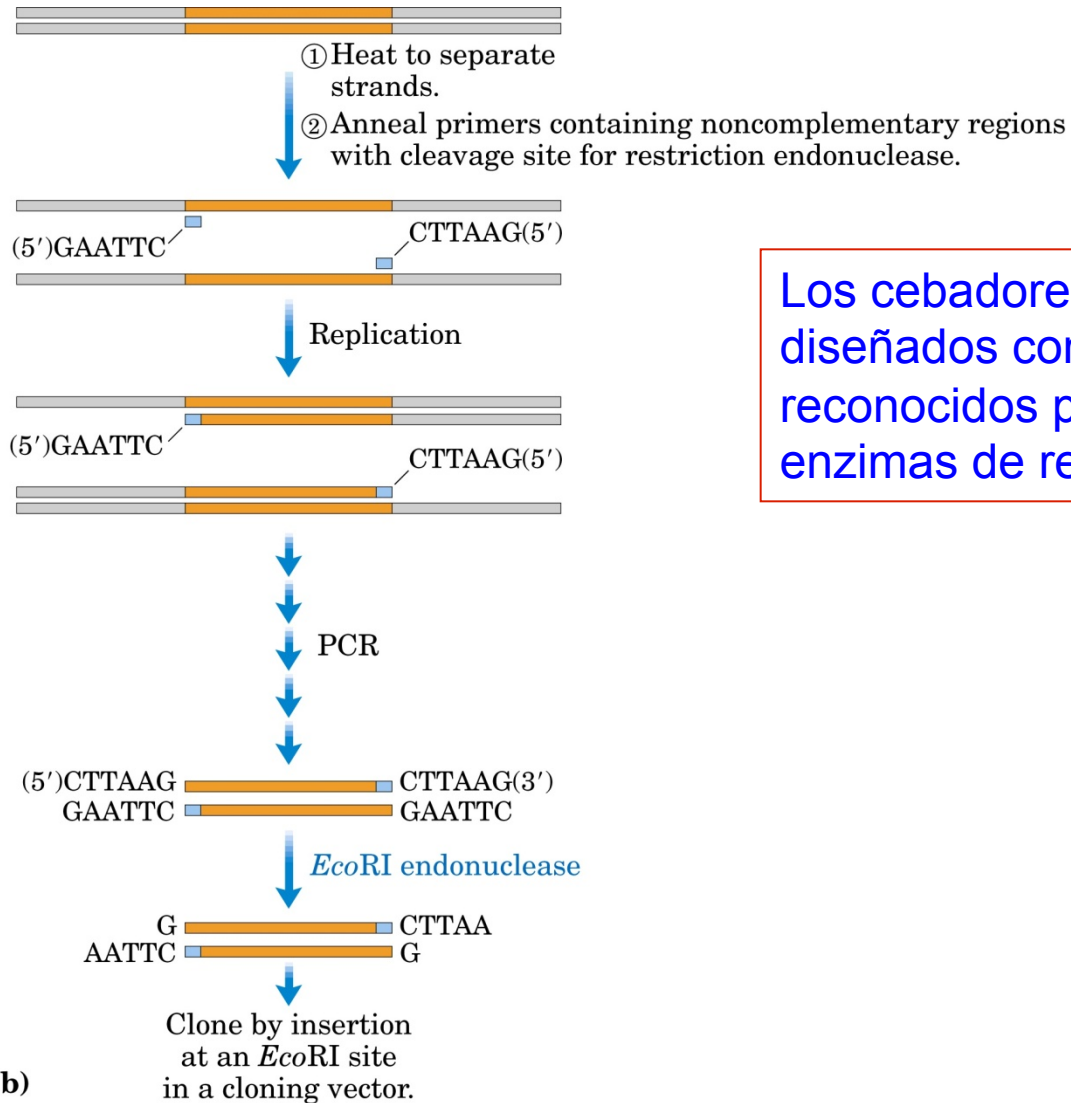
RNA: RT-PCR

1. Transcripción reversa (obtención de cDNA)
2. Amplificación por PCR

Solo exones

(B)

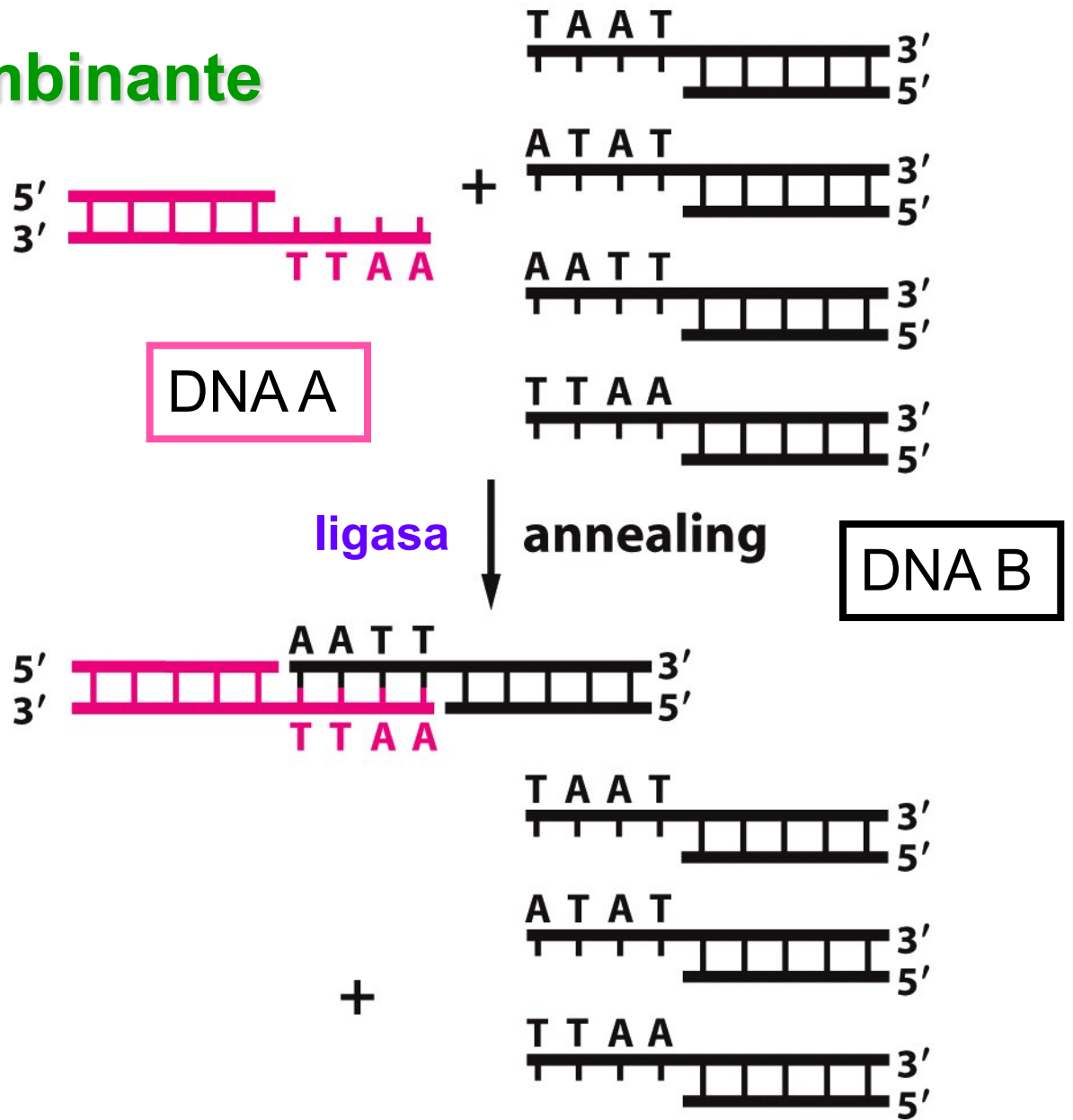
Después del PCR o RT-PCR los fragmentos se pueden clonar



Los cebadores son diseñados con extremos reconocidos por enzimas de restricción

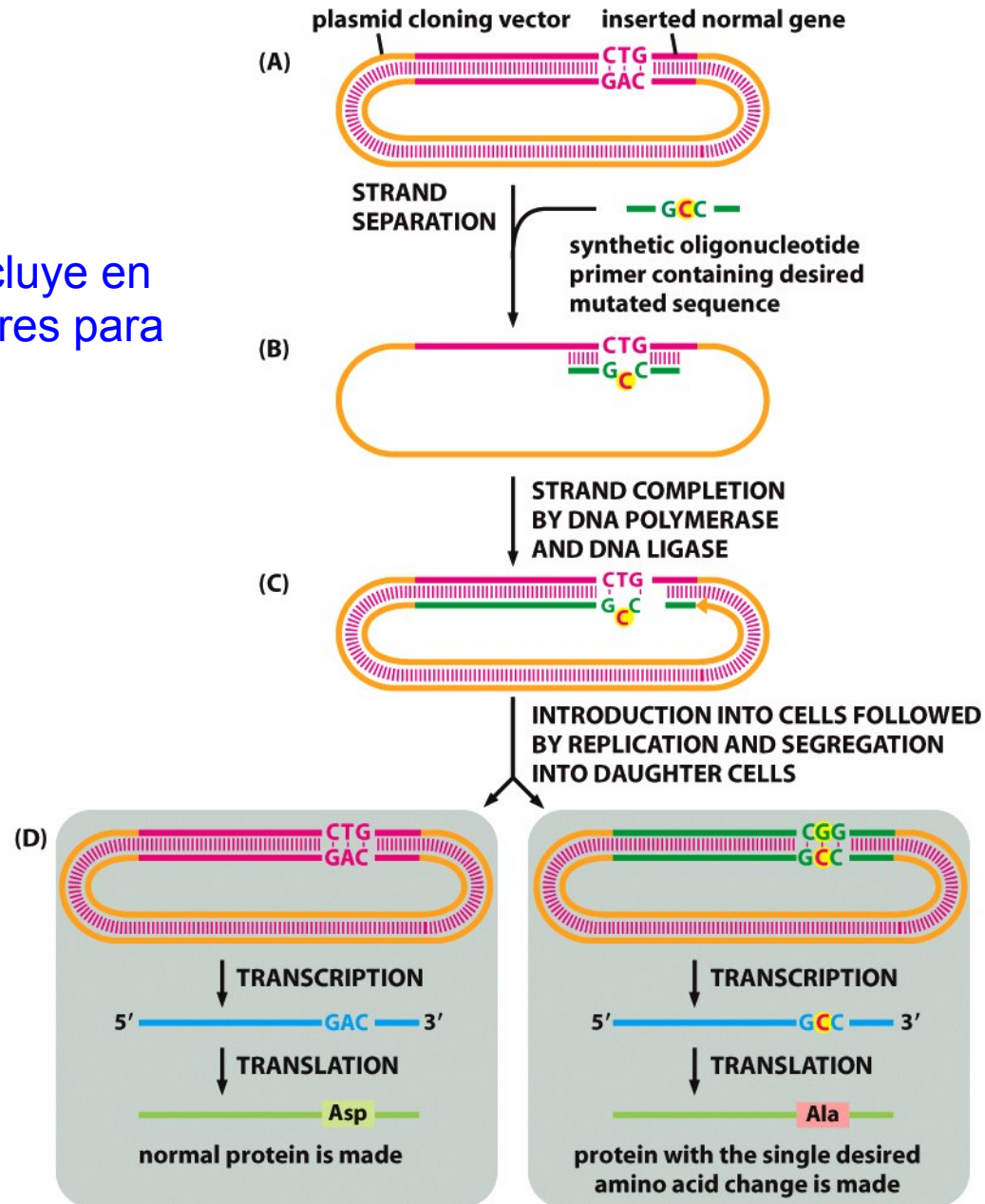
VIII. DNA recombinante

DNA AB

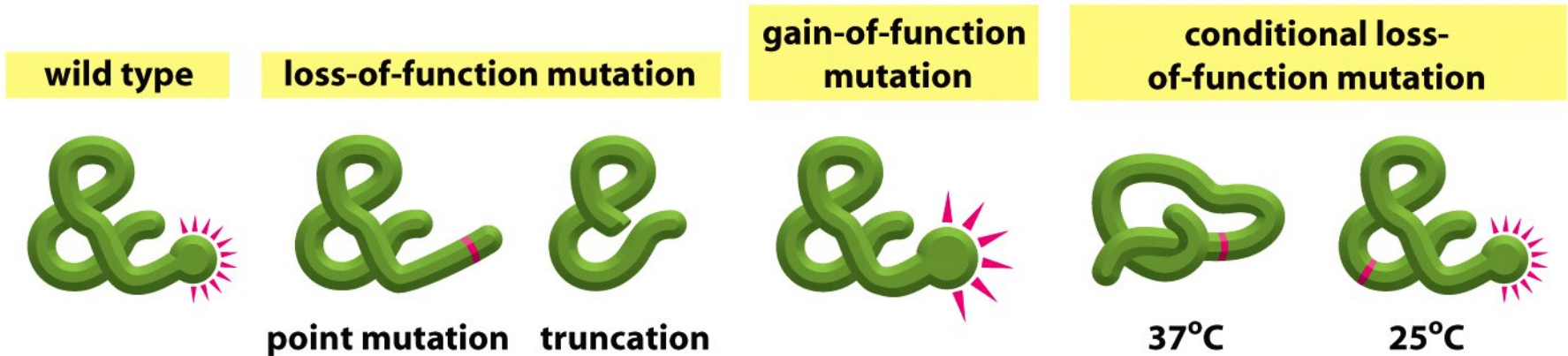


Mutagénesis sitio dirigida

La mutación se incluye en uno de los cebadores para el PCR



Mutagénesis dirigida



Se pueden generar proteínas mutadas manipulando su DNA

Generalmente la mutagenesis se hace por PCR:

- Introduccion de mutacion puntual (cambio de un aminoacido por otro)
- Delecciones

Vectores de clonación

1. Plásmidos
2. Fagos
3. Cósmidos
4. Cromosomas artificiales (bacteria, levadura, minicromosomas de maíz)

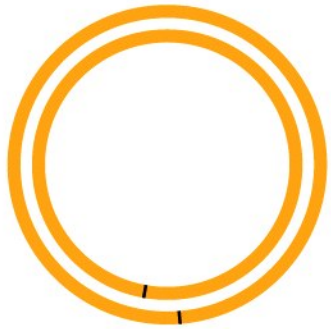
1. Plásmidos

**circular
double-stranded
plasmid DNA
(cloning vector)**

DNA doble cadena,
circular, origen propio
de replicación

**DNA fragment
to be cloned**

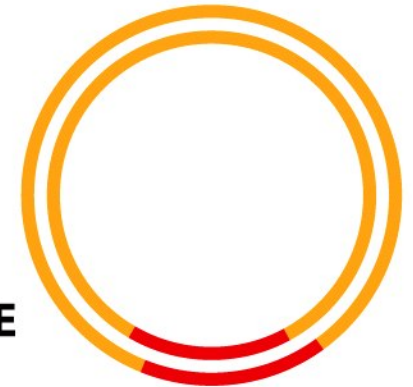
recombinant DNA



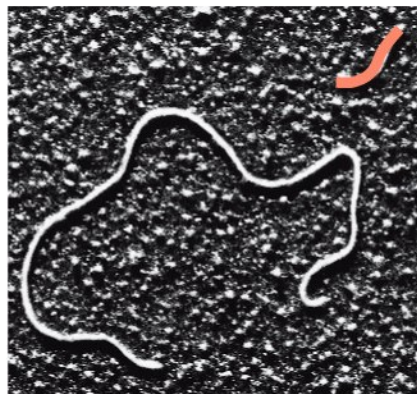
**CLEAVAGE WITH
RESTRICTION
NUCLEASE**



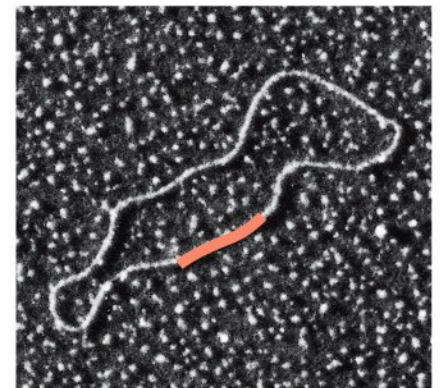
**COVALENT
LINKAGE
BY DNA LIGASE**



Se pueden clonar
fragmentos entre 1,000 y
10,000 nucleótidos



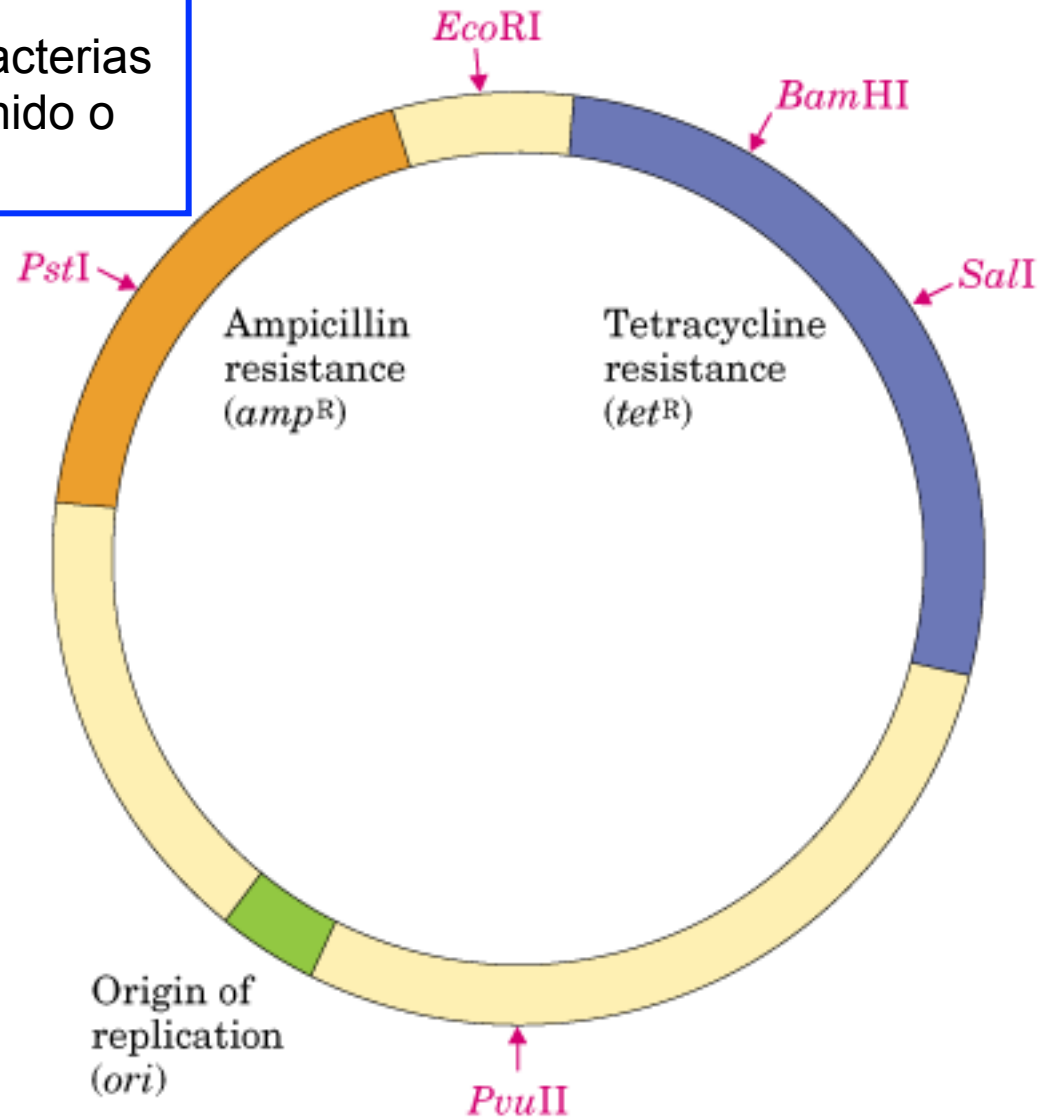
200 nm



200 nm

Marcadores de resistencia a antibióticos

Permiten la selección de bacterias transformadas con el plásmido o con el DNA recombinante



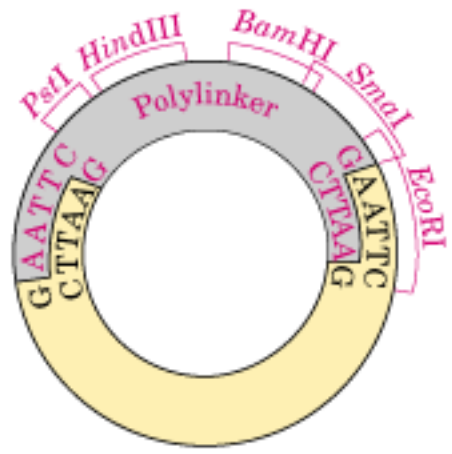
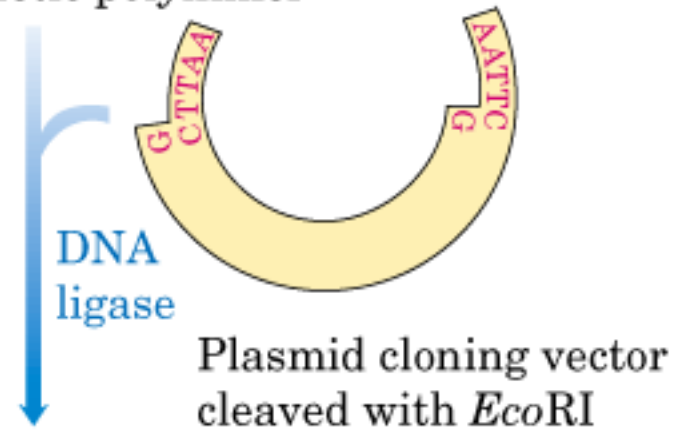
Otras características de los plásmidos



Synthetic polylinker

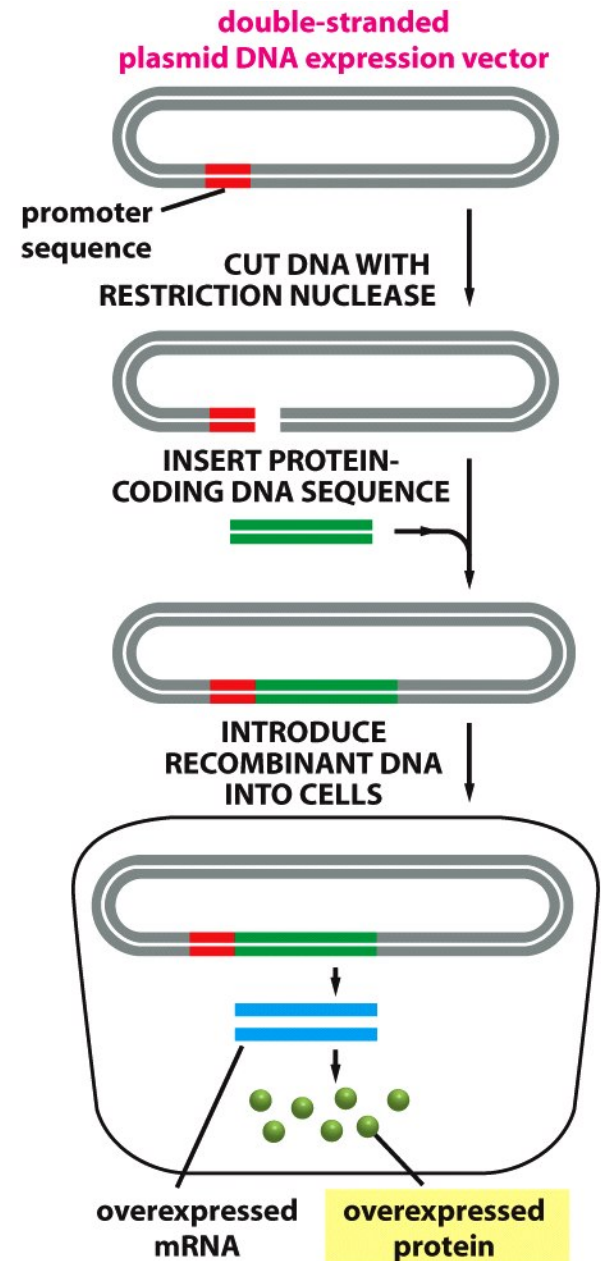
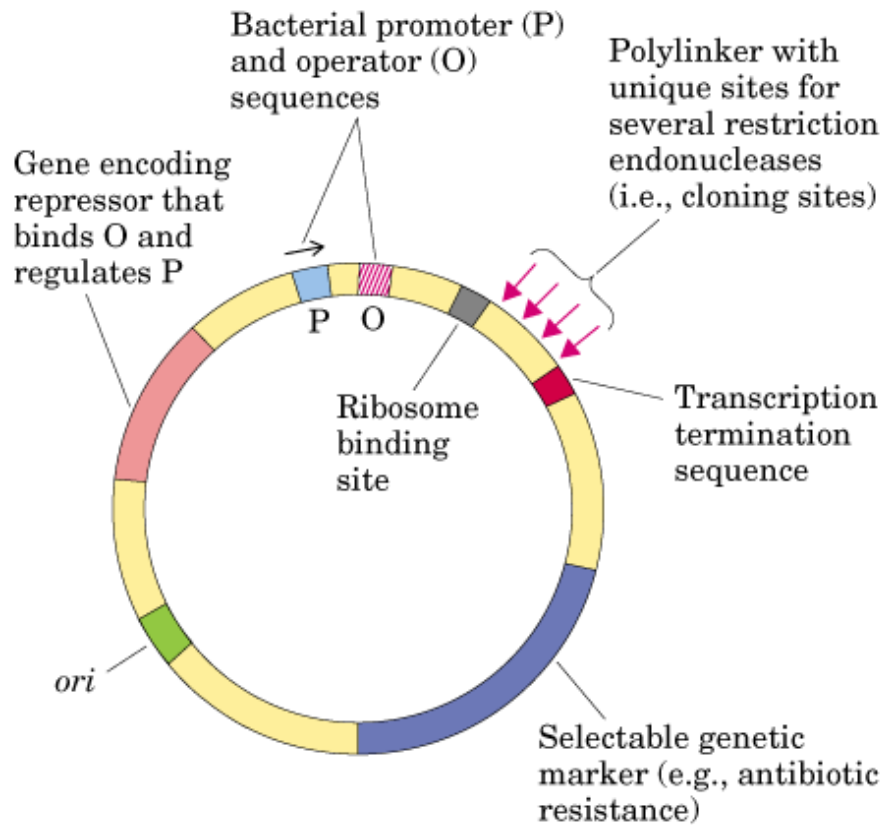
Sitios de clonación múltiples:

varias enzimas de restricción que solo cortan una vez en el plásmido



(c)

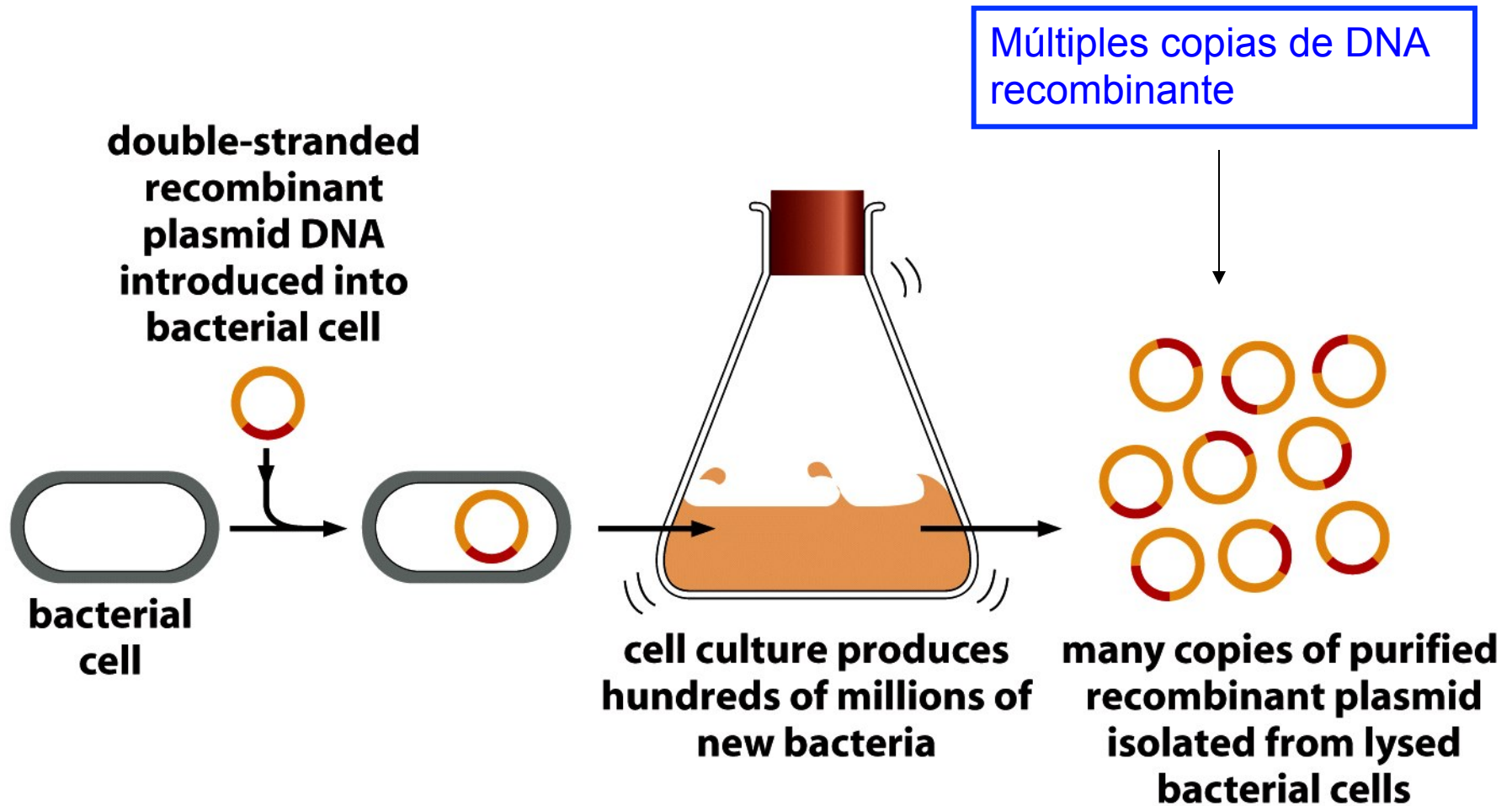
Plásmidos de expresión



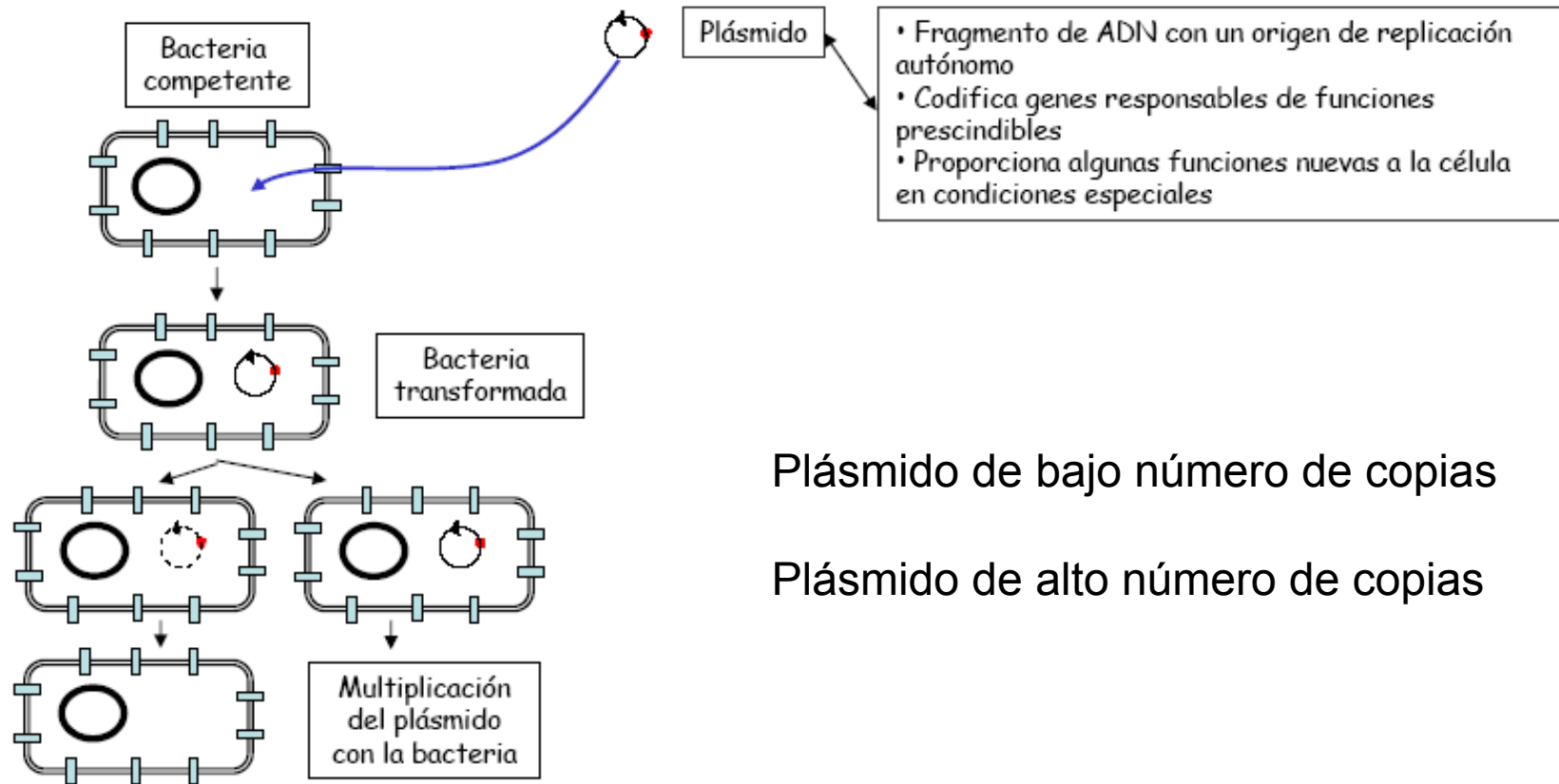
Características adicionales:

- Promotor regulable
- Terminador de la transcripción
- Sitio de reconocimiento por el ribosoma

Obtención de múltiples copias de la molécula recombinante



Transformación bacteriana



La transformación implica la introducción de DNA extraño a una célula hospedante