



TÉCNICAS MOLECULARES

Mgs. Gisnella Cedeño

¿Qué son las Técnicas Moleculares?

- Son procedimientos basados en la caracterización física de moléculas de ácidos nucleicos.
- Permiten llegar al diagnóstico rápido de las enfermedades infecciosas en aquellos casos donde el diagnóstico convencional no pueda ser utilizado.



Esquema General

Obtención y preparación de la muestra

Liberación del material genético

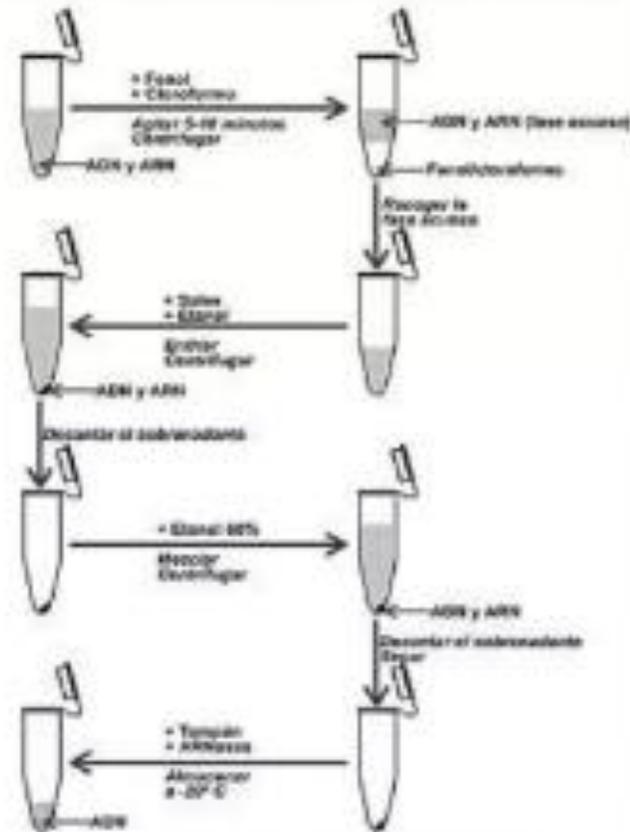
Purificación del material extraído

Cuantificación y amplificación del material genético

Aplicación de técnicas moleculares

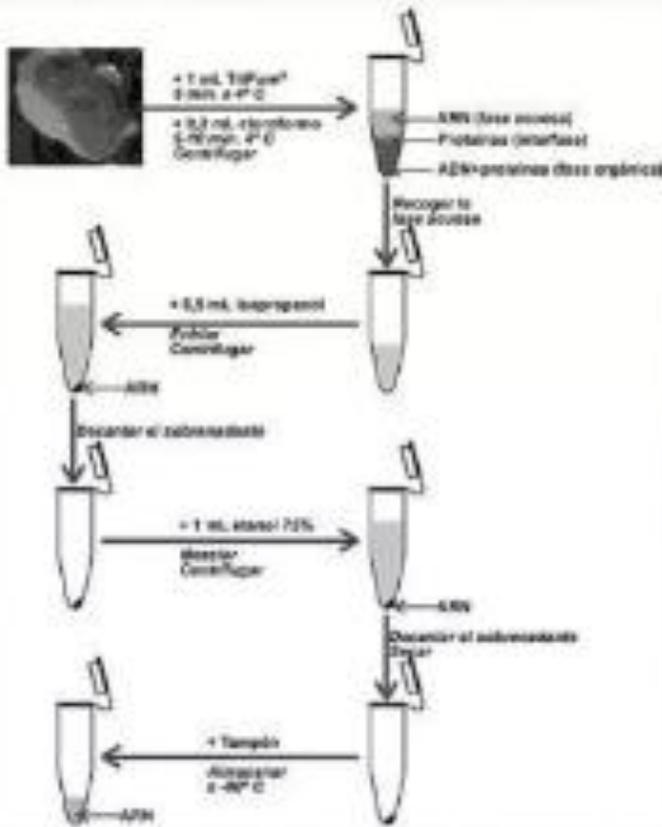


Aislamiento y purificación de ADN



- ✓ Un procedimiento suave de lisis de las células y de solubilización del ADN.
- ✓ Una segunda fase con uno o varios métodos enzimáticos o químicos de eliminación de contaminantes (proteínas, ARN y otras macromoléculas).

Purificación de ARN



La lisis de las células se produce por:

- ✓ La utilización de detergentes.
- ✓ La lisis celular utilizando tiocianato de guanidinio, que es el método más utilizado para la extracción de ARN de tejidos.

Cuantificación de Ácidos Nucleicos

- ✓ **Determinación por espectrofotometría**

ADN y ARN: Absorción de Luz UV 260 nm.

Utilizar cubetas de cuarzo.

ADN: 50 µg/mL; ARN: 40 µg/mL.

- ✓ **Método de tinción con Bromuro de etidio**

Bromuro de etidio → Compuesto fluorescente.

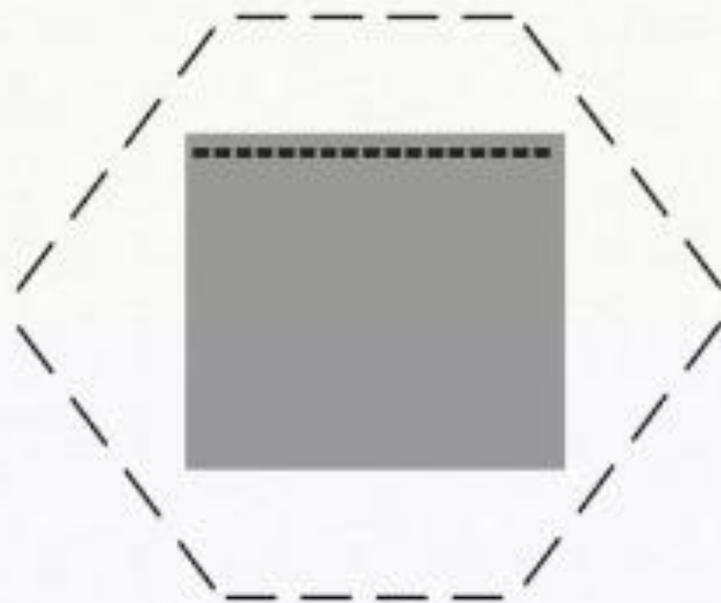
Al unirse al ADN su fluorescencia aumenta.

La fluorescencia obtenida es proporcional a la cantidad de ADN presente.

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR



Electroforesis en campo pulsante (PFGE)



Fundamento

- Consiste en la separación electroforética de grandes moléculas de DNA inmersas en gel de agarosa, alternando la orientación del campo eléctrico.
- El tiempo de activación de cada campo → *Pulso*.
- El tiempo de reorientación es D.P. al tamaño de la molécula.



Electroforesis en campo pulsante (PFGE)

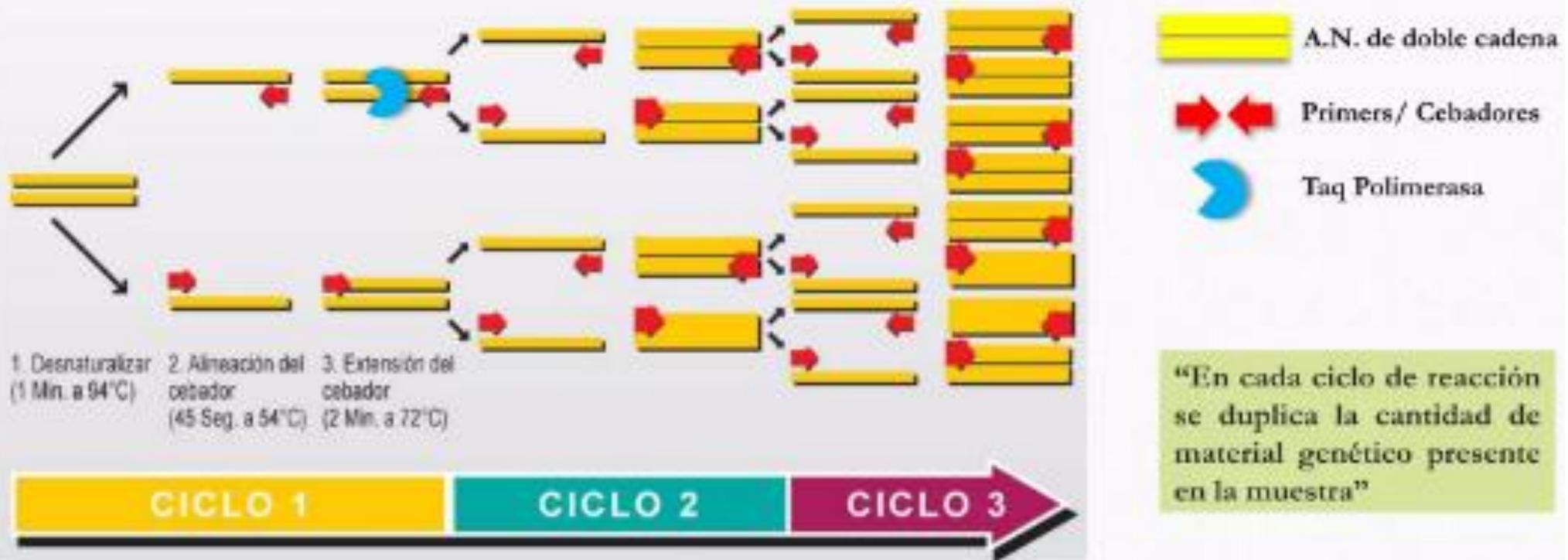
Características

- ✓ Arma epidemiológica para comparar genéticamente cepas pertenecientes a una misma especie.
- ✓ Diferenciar cepas pertenecientes a especies distintas.
- ✓ Requiere una preparación muy elaborada de la muestra y equipamiento especializado.





Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

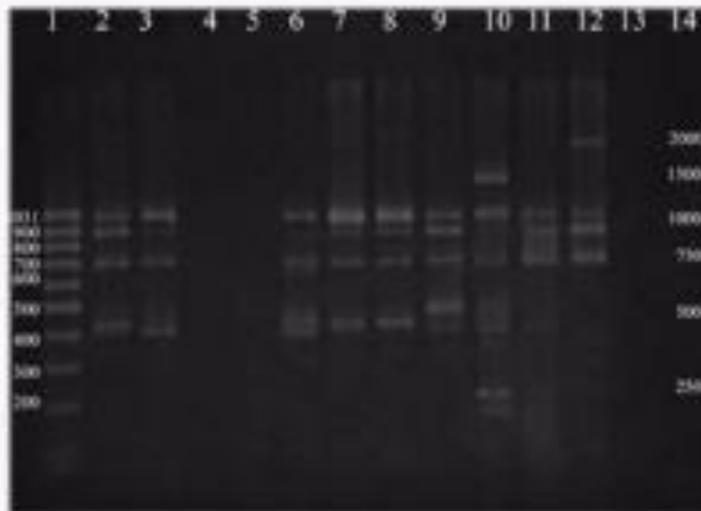


Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Características

- ✓ Alta sensibilidad y especificidad.
- ✓ Producto final: ácido nucleico de doble cadena.
- ✓ El producto final puede ser analizado en tamaño, secuencia y cantidad.
- ✓ Útil para la búsqueda de material genético de un agente infeccioso en una muestra clínica.
- ✓ Útil para la identificación de aislamientos.

Amplificación aleatoria (RAPD)



Patrón RAPD para *E. coli*

Fundamento

- Su fundamento es similar al del la PCR, pero utiliza **Cebadores aleatorios** para la amplificación arbitraria del ADN.
- Los fragmentos de DNA generados se separan mediante electroforesis en gel de agarosa.
- Se obtienen patrones y mediante comparación permite la identificación de patógenos.

Amplificación aleatoria (RAPD)

Características

- Aplicación en estudios epidemiológicos.
- Útil para la comparación de aislamientos pertenecientes a una misma especie.
- Útil para discriminar entre variedades y aislamientos de patógenos.



Polimorfismo de Longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)



Fundamento

- Se fundamenta en la utilización de **Restricciones** que rompen el DNA en dianas o secuencias específicas.
- La molécula de ADN es digerida en diferentes sitios y da lugar a fragmentos de diferente longitud, que dan lugar a **Patrones de restricción**.

Polimorfismo de Longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

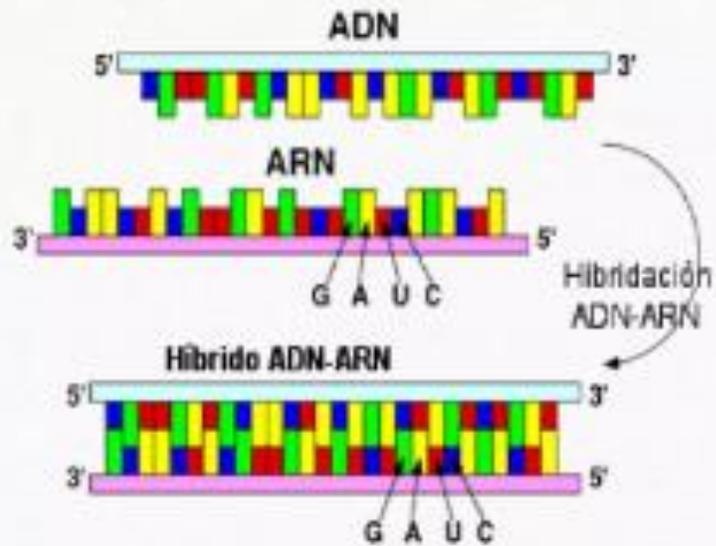
Características

- Utilizada para generar patrones electroforéticos (marcadores genéticos) de aislamientos pertenecientes a una misma especie o a especies diferentes.
- Utilidad en Epidemiología molecular.



Hibridación

Hibridación de ácidos nucleicos



Fundamento

- Se fundamenta en la formación de moléculas de doble cadena, cuyas hebras tienen distinto origen.
- Requieren dos elementos básicos: *La secuencia diana de ácido nucleico* y un fragmento corto de ácido nucleico conocido como *Sonda*.

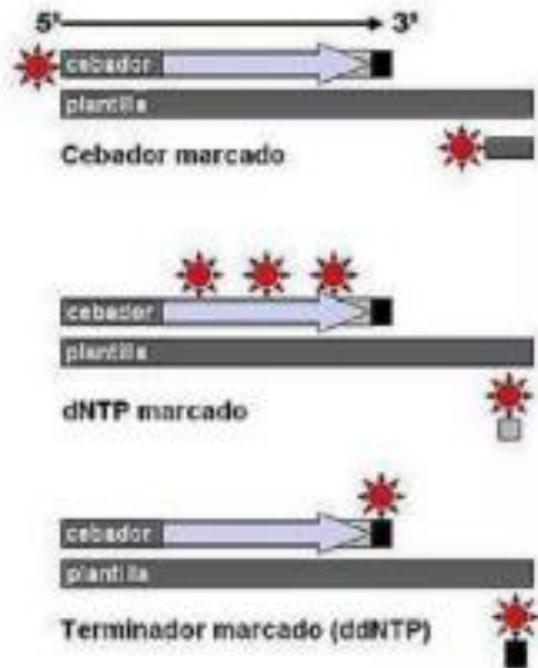
Hibridación

Características

- Encontramos diferentes tipos, siendo las más comunes: *Southern blot* y *Dot blot*.
- El Southern blot permite la transferencia de fragmentos de ADN originados por endonucleasas de restricción y posterior hibridación con una sonda marcada, permitiendo la comparación de patrones genéticos.
- El Dot blot permite la detección cualitativa de una agente infeccioso en muestra de sangre, heces, esputos, etc.



Secuenciación



Fundamento

- Se fundamenta en la interrupción controlada de la síntesis de una hebra complementaria durante una replicación in vitro.
- La principal característica de este método es el uso de **didexosinucleótidos** que provocan la detención de la reacción de la síntesis de ADN.

Gracias por su atención.

