

Genética Molecular, laboratorios.

Turno noche: 17 hs (puntual)

Laboratorio 007

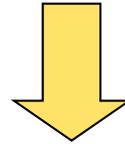
Patricia Agostino pagostino@gmail.com

<http://genmol.blog.unq.edu.ar>

Genética Molecular, laboratorios.

Extracción de ADN de tejidos humanos

Uds. y sus familiares



Amplificación por PCR y análisis de RFLP



ADN nuclear



Gen Amelogenina
Identificación
sexual

Deleciones en
el cromosoma Y



ADN mitocondrial

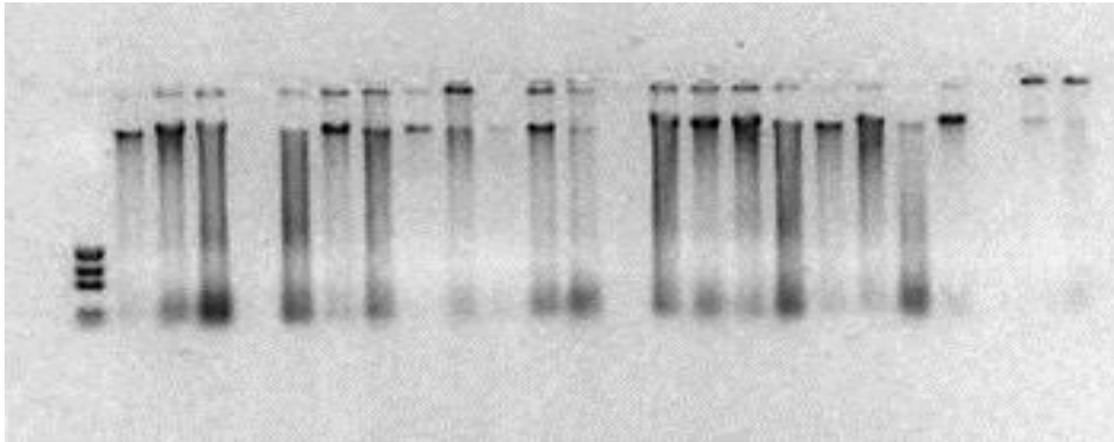


Herencia Materna

Total: 5 trabajos prácticos

TP 1: Extracción de ADN a partir de muestras de mucosa bucal

Se realizará la técnica de extracción y procesamiento de ADN humano para su posterior amplificación utilizando la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa).



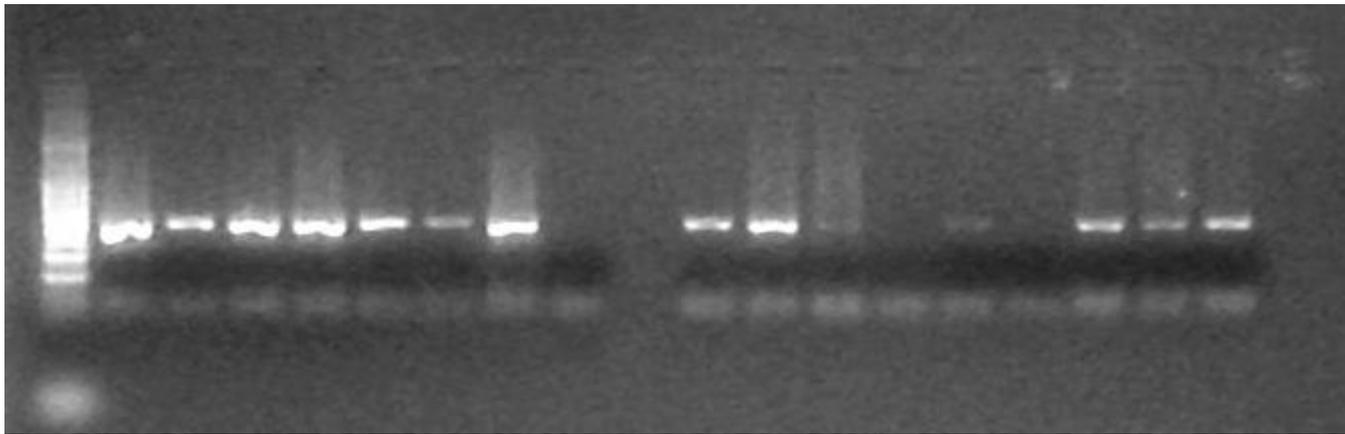
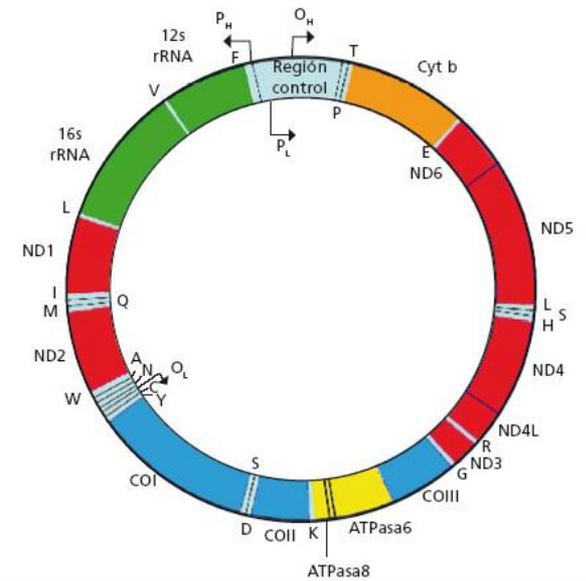
Extracción con cloroformo-isoamílico. Semi-cuantificación mediante electroforesis en gel de agarosa.

2 clases

TP 2: Amplificación por PCR de un fragmento de ADN mitocondrial.



Se realizará la amplificación por PCR de una región del ADN mitocondrial de 312 pb.



1 clase

TP 3: Detección de RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) en el ADN mitocondrial.

Luego de la amplificación por PCR de una región del ADN mitocondrial de 312 pb, se realizará su posterior digestión enzimática para poder visualizar el patrón de RFLPs característico de cada muestra.

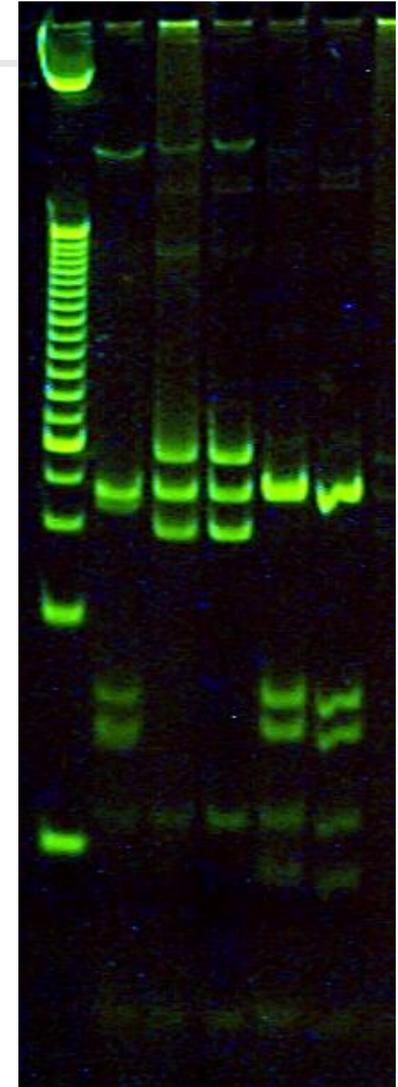
Fragmento de ADNmit de 312 pb



Digestión con enzima MnlI



Visualización patrones RFLP



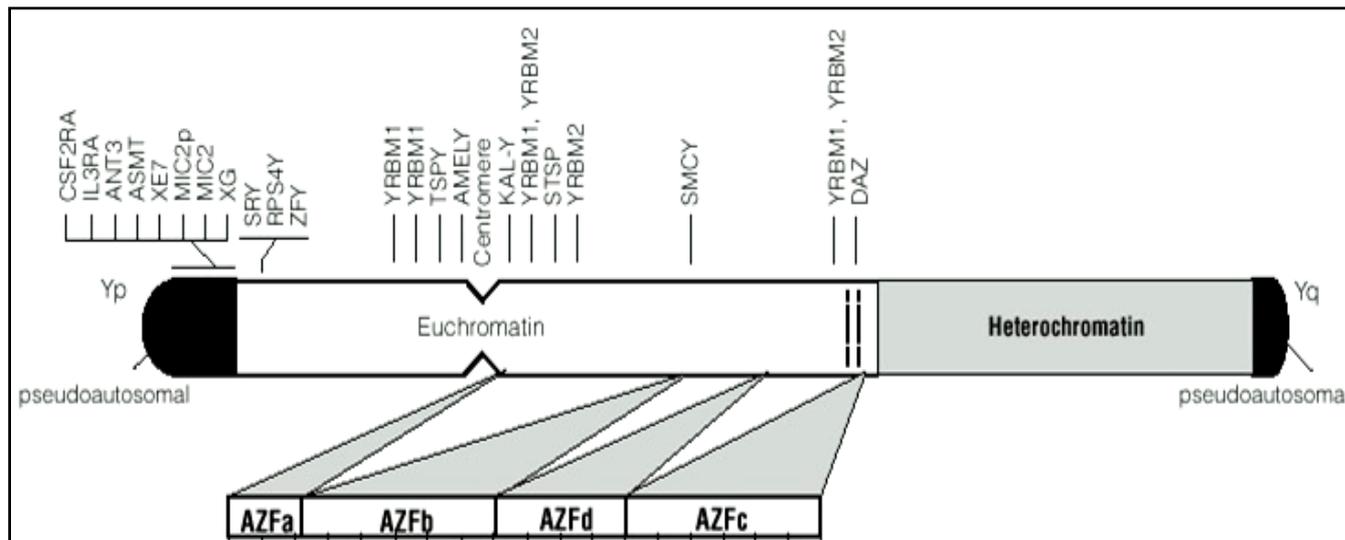
2 clases

(Exp papers la 2º clase, lunes 7-11)

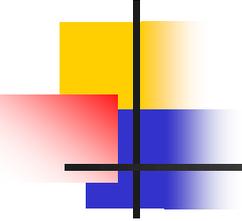
TP 4: Detección de deleciones en el cromosoma Y asociadas con infertilidad masculina.

Existen grandes regiones en el cromosoma Y asociadas con la producción de células espermáticas, conocidas como AZF (*azoospermia factor*). Deleciones en algunas de estas regiones se asocian a infertilidad masculina.

Se utilizarán los conceptos aprendidos (como PCR multiplex) para el estudio de microdeleciones correspondientes a la región de los genes AZF y su correlación con infertilidad y cáncer testicular. Clase teórica.



Forma de evaluación.



Trabajos prácticos:

- 80% de asistencia y aprobación de parcialitos
- Informe de TPs
- Exposición de trabajos
- Examen de TPs

REGIMEN DE ESTUDIOS DE LA UNQ

<http://www.unq.edu.ar/advf/documentos/5006e6bcefbf8.pdf>

ARTICULO 11 °: Se considerará ausente a aquel alumno que no se haya presentado a las instancias de evaluación pautadas en el Programa de la asignatura.

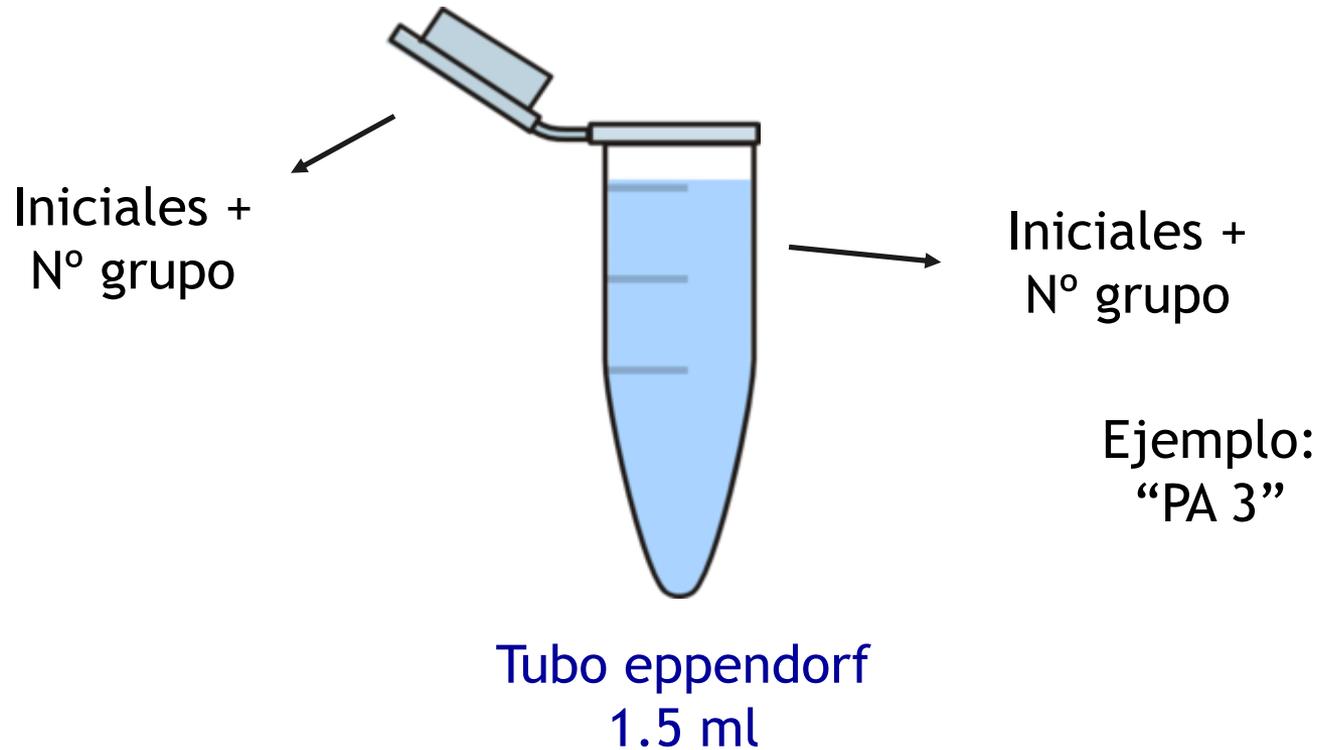
Micropipetas



Pipeta	Rango	Tips*
p1000	100 a 1000 μ l	azules
p200	20 a 200 μ l	amarillos
p20	2 a 20 μ l	amarillos
p10	1 a 10 μ l	blancos
p2	0.5 a 2 μ l	blancos

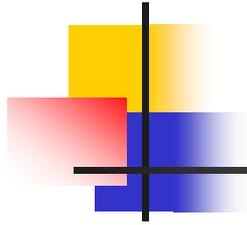
*Código de colores que usaremos en clase

Rótulo de sus muestras



Para la muestra del familiar: Iniciales (alumno) + Nº grupo + letra F.
Ejemplo: “PA 3F”

Consejos para trabajar en la mesada de laboratorio



Dejar la mesada lo más despejada posible, con una sola guía de TPs por grupo

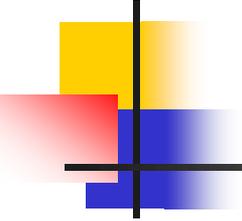
Utilizar siempre guantes y tener en cuenta no contaminar las muestras, ya que trabajaremos con **DNA humano**

Rotular bien los tubos! Siempre con el mismo código: iniciales, número de grupo y la letra F para familiares

Tener en cuenta los rangos de volumen de cada pipeta

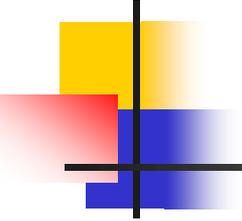
Revisar los cálculos antes de comenzar a trabajar con las soluciones

Preguntar hasta comprender... no tengan vergüenza.



GENETICA MOLECULAR

**Clase de extracción
de ADN**



Extracción de ADN

Punto de partida para una
multitud de análisis
genéticos

Investigación

Paternidad

Enfermedades Hereditarias

Criminalística

Casos
Medicina Forense

Hay más de un tipo de ADN

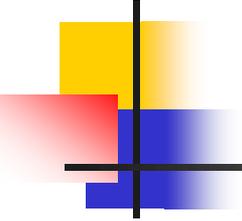
ADN nuclear



ADN mitocondrial

ADN cloroplástico
en plantas

ADN plasmídico,
ADN viral



Clasificación según su patrón de herencia

- Herencia biparental:
Autosomas, cromosoma X
- Herencia uniparental:
ADN mitocondrial, cromosoma Y

Fuentes de ADN



Diferentes Tejidos

Sangre ↗ Líquida
↘ Manchas secas

Tejidos embebidos en parafina

Fluidos corporales

Saliva · Semen · Orina

Células en Cultivo

Muestras Forenses

Pelo -del bulbo capilar
-sin bulbo: ADNmt

Uñas -células epiteliales-
Colillas de Cigarrillos
(restos de células)

Huesos

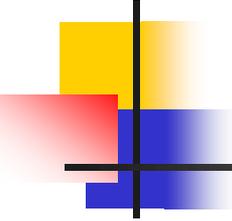
Dientes

Momias

Animales - Plantas

Hongos - Levaduras

Bacterias-Virus



Objetivo de una buena extracción

↑ Cantidad

↑ Calidad (integridad)

↑ Pureza

(ausencia de contaminaciones)

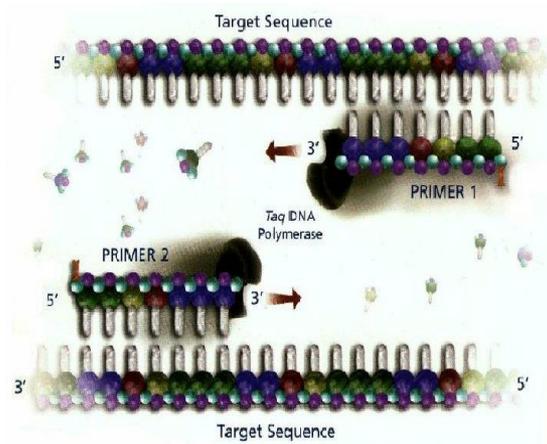
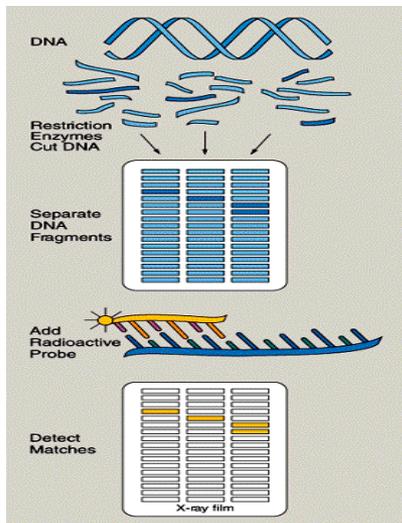
Técnicas de biología molecular que utilizan ADN

ADN

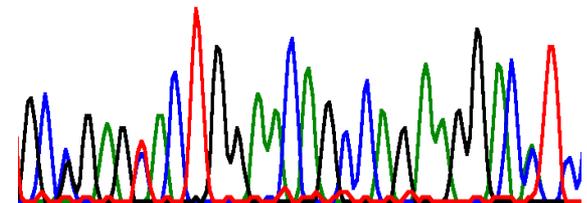
"Southern blot"

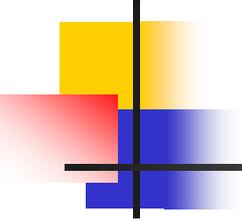
PCR

Secuenciación



GC S GAG Y ACT GGA ACA GCCA GAAGG ACM T C
140 150 160





Método de extracción de ADN genómico *(alto peso molecular)*

Pre-tratamiento *(en caso de ser necesario)*

Neutralización

Tratamiento con solventes orgánicos

Lisis celular

Disrupción mecánica

Agentes químicos

Purificación de ADN

Precipitación

Matrices (kits comerciales)

Pre-tratamiento

Tratamiento con solventes orgánicos

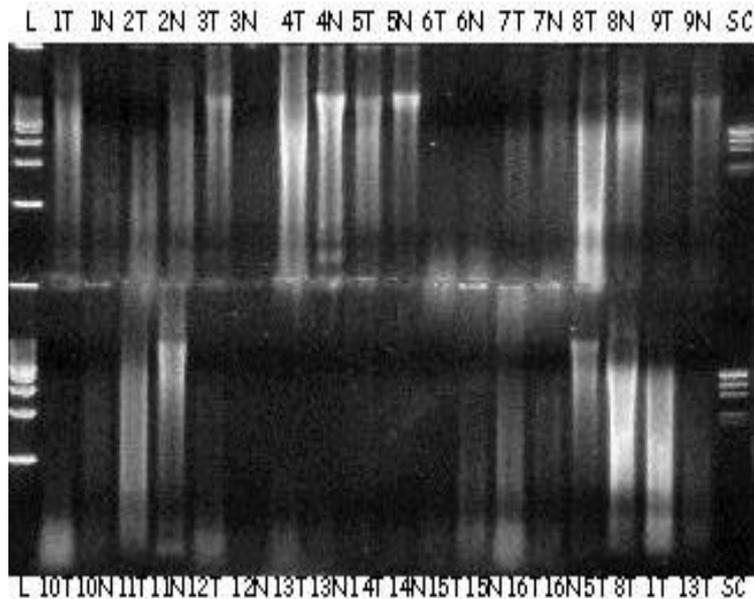
Muestras de tejidos fijados e incluidos en parafina

Sucesivos lavados con xileno

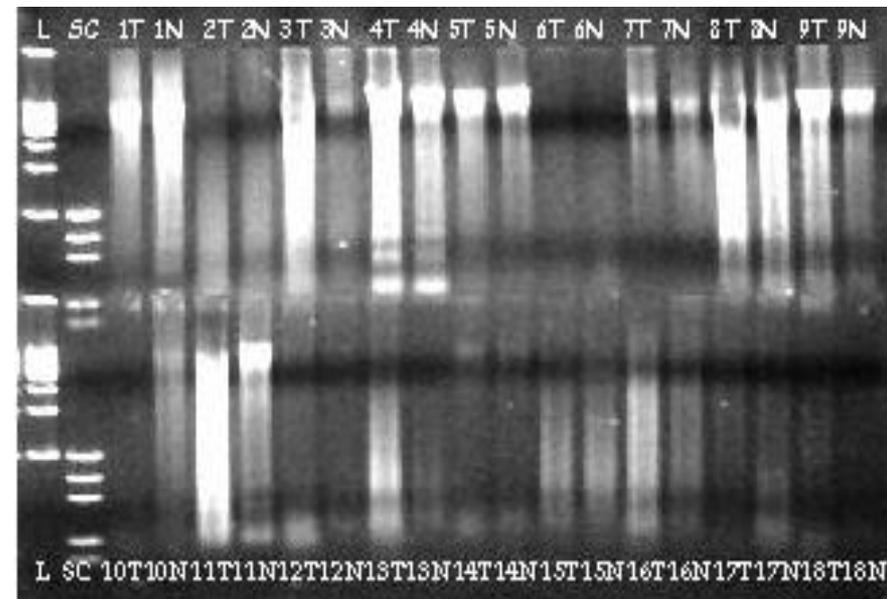
Lavados con Etanol absoluto



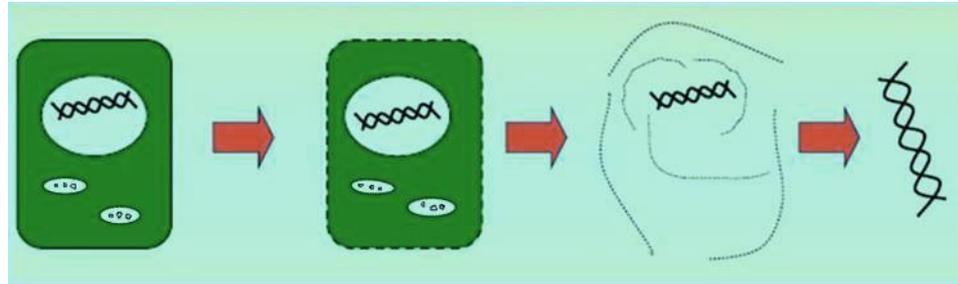
Xileno



Calor



Lisis celular



Métodos físicos

- Disrupción mecánica
 - Homogeneizadores
 - Tijeras
- Sonicación

Agentes químicos

- Detergentes: SDS (*sodium dodecyl sulfate*), CTAB (*hexadecyltrimethylammonium bromide*)
- EDTA: quelante iones
- Digestión enzimática: Proteinasa K
- Otras: RNAsas, Amilasas, etc

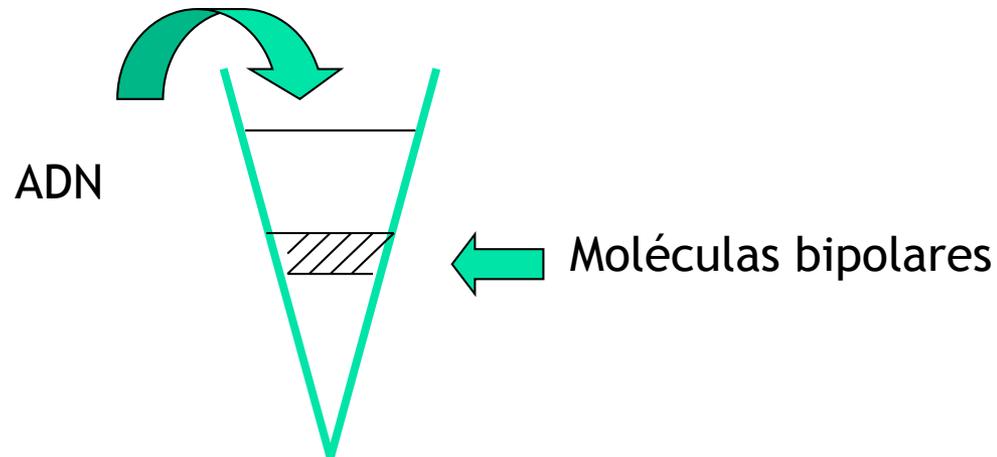
Purificación de ADN

Agregado de sales LiCl , NaCl , NaClO_4

Extracción orgánica, separación de fases

Fenol-cloroformo

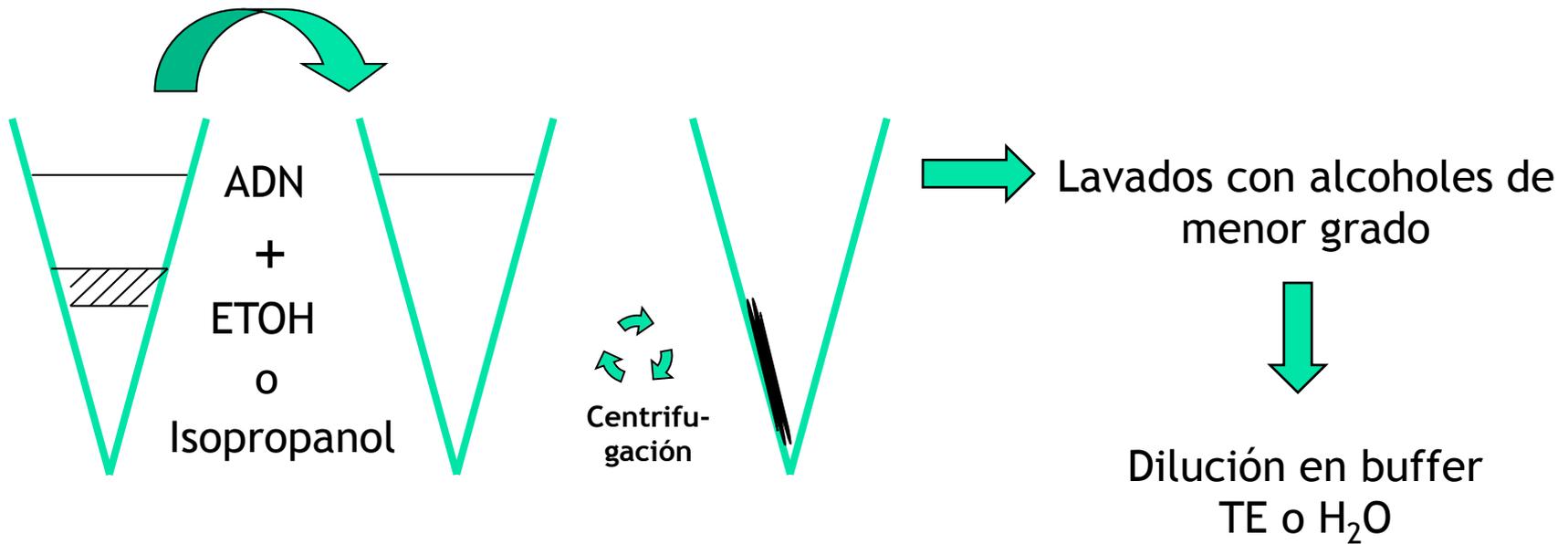
SEVAG: Isoamílico-Cloroformo



Proteínas, restos
de membranas,
lípidos

Purificación de ADN

Precipitación

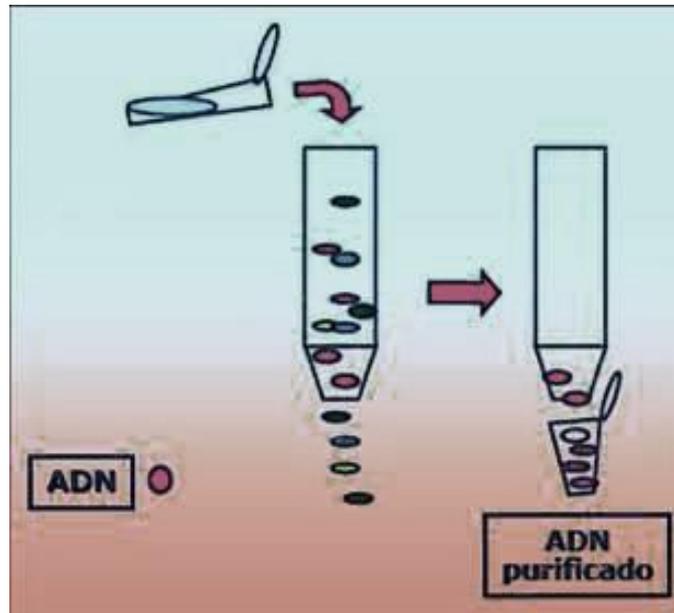


Kits comerciales

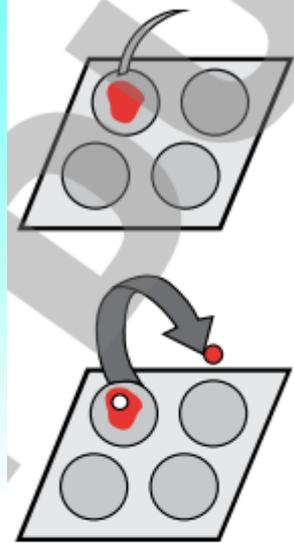


Columnas con Matriz de Sílica

Las columnas unen selectivamente el ADN, en presencia de sales caotrópicas. El ADN es recuperado a partir de la matriz de sílica mediante lavado con TE o agua.



Tarjetas FTA- Whatman



Papel de filtro especialmente impregnado:
Muestras: sangre, saliva u otros fluidos corporales.

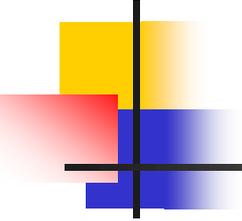
Provoca: lisis celular, inactivación enzimática,
bacteriana y viral

PCR sobre el papel:

FTA-purification reagent: elimina fácilmente los inhibidores de la PCR. El DNA queda atrapado y estabilizado en la matriz permitiendo realizar la PCR sobre el mismo.



- Fácil Transporte y Almacenamiento
- Pueden conservarse a temp. ambiente indefinidamente en condiciones de sequedad.



Selección del método

Tipo de muestra

Target a detectar

Grado de pureza

Cantidad de ADN

Rendimiento

Integridad

Presencia de inhibidores

Capacidades del laboratorio

Cantidad de muestras

Facilidades

Repetitividad

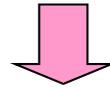
Aplicaciones

Tiempo de análisis

Costos

Visualización y cuantificación de los resultados

¿ Qué Cantidad y Calidad obtenemos ?



Fluorometría



Fluorómetro
(ej: Qubit™)

Cuantificación
por fluorocromo



← 3 Metodologías

Espectrofotometría



■ Cuantificación

Abs 260 nm

■ Pureza

Rel. Abs 260 nm / Abs 280nm

Gel



■ Semi-cuantificación

Standard de cuantificación

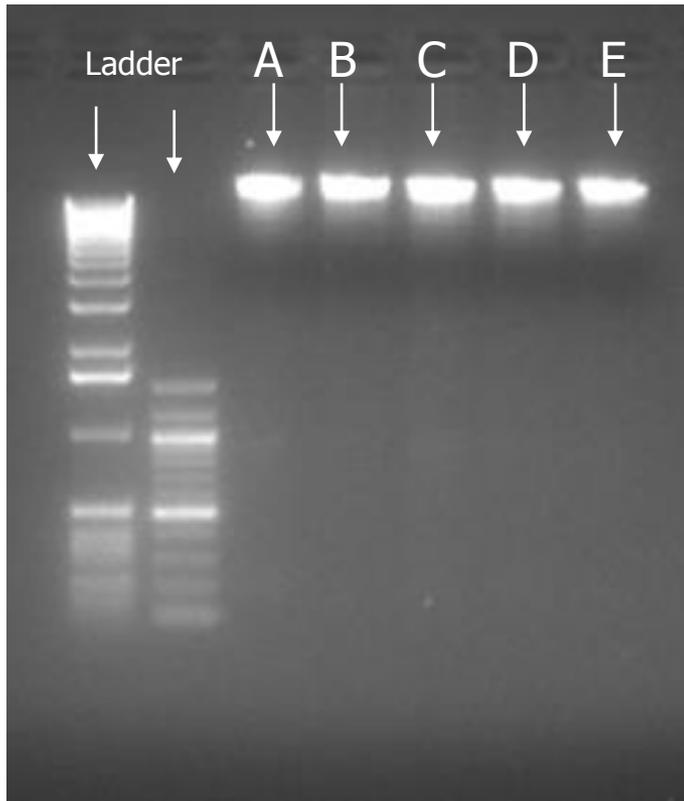
■ Calidad ⇒ Degradación

PM del ADN

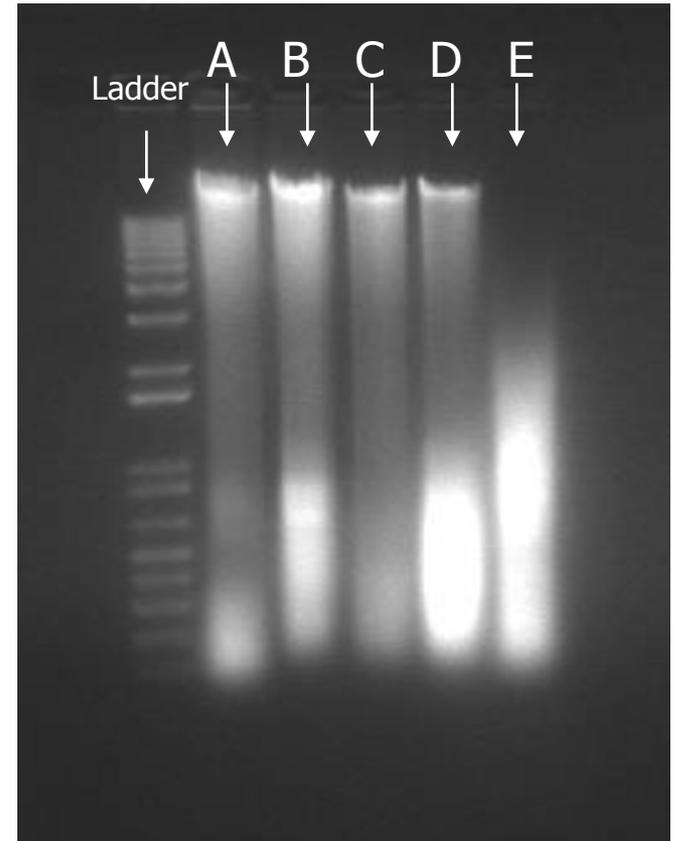
Visualización en gel de agarosa

Extracción de ADN genómico

Resultado esperado en un laboratorio de investigación

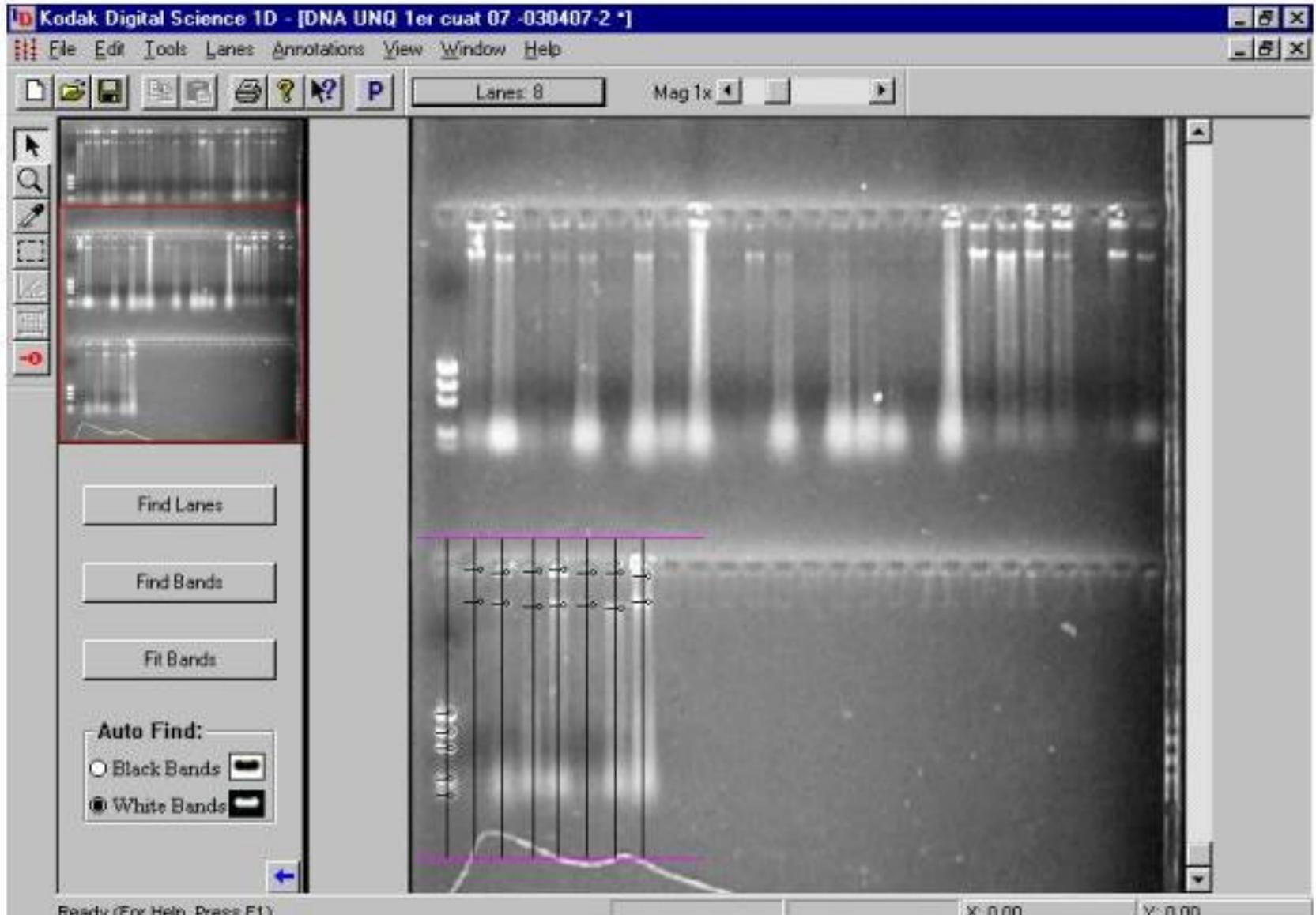


Resultado esperado en una clase de TP



Visualización en gel de agarosa

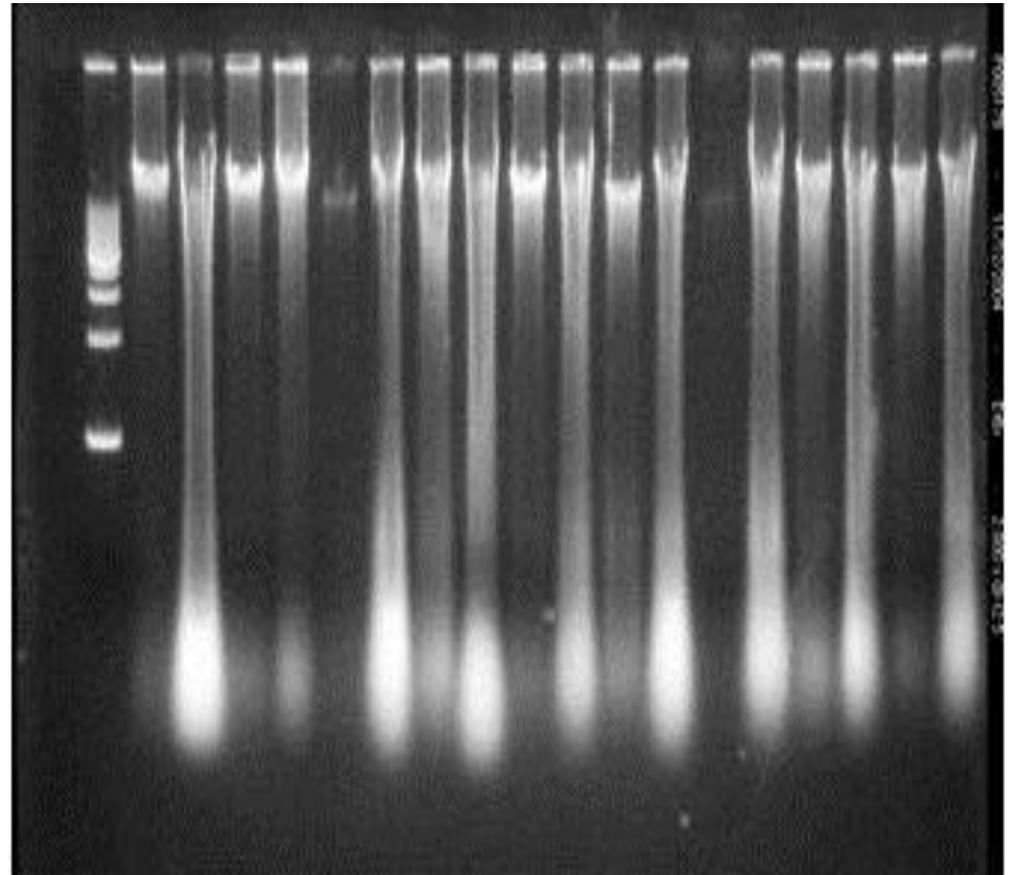
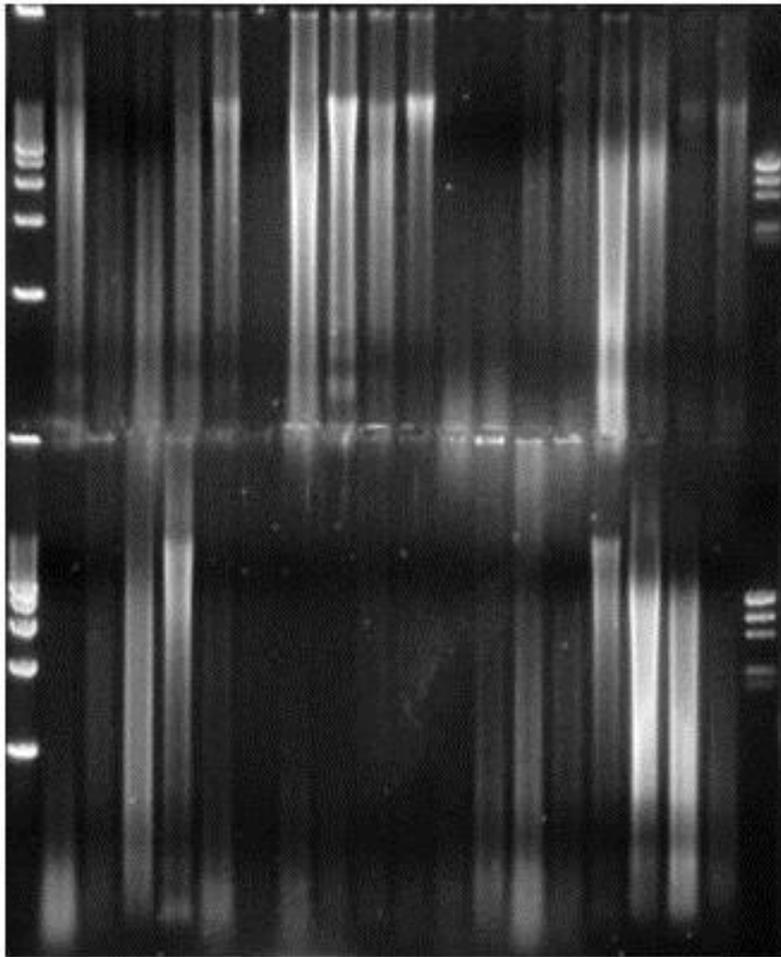
Semi-cuantificación de ADN



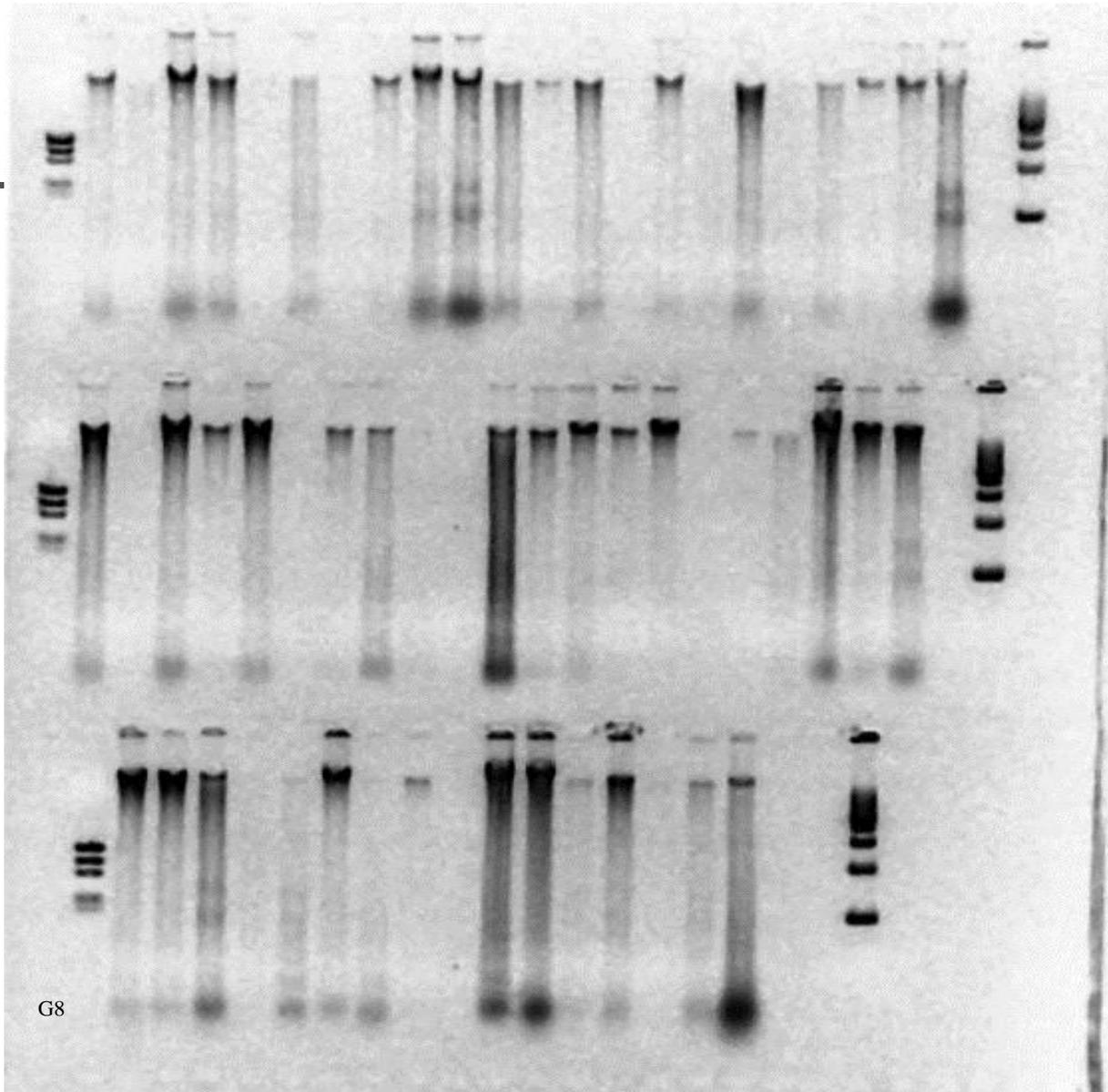
Visualización en gel de agarosa

Extracción
Parafina

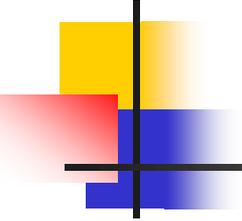
Extracción
Fenol - Cloroformo



Extracción con LiCl a partir de muestras de saliva



G8



Extracción de RNA

Consideraciones especiales:

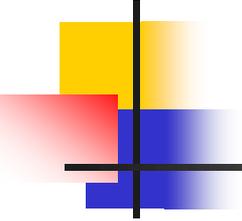
RNAsas

(uso de inhibidores de RNAsas)

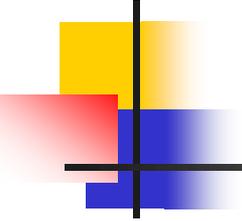
pH

(pH 5-6 para RNA, pH 8 para DNA)

Tipos principales de RNA en la célula



- RNA mensajero (mRNA): ~ 1-5%
(sirve como molde para la síntesis de proteínas)
- RNA ribosomal (rRNA): ~ 80%
(componente estructural de los ribosomas)
- RNA de transferencia (tRNA): ~ 10-15%
(participa en la síntesis de proteínas)

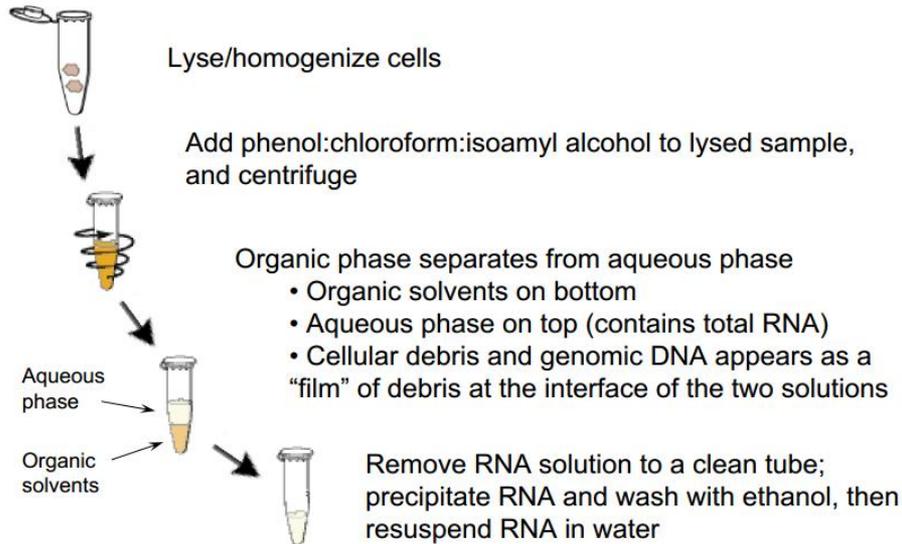


¿Para qué extraer RNA?

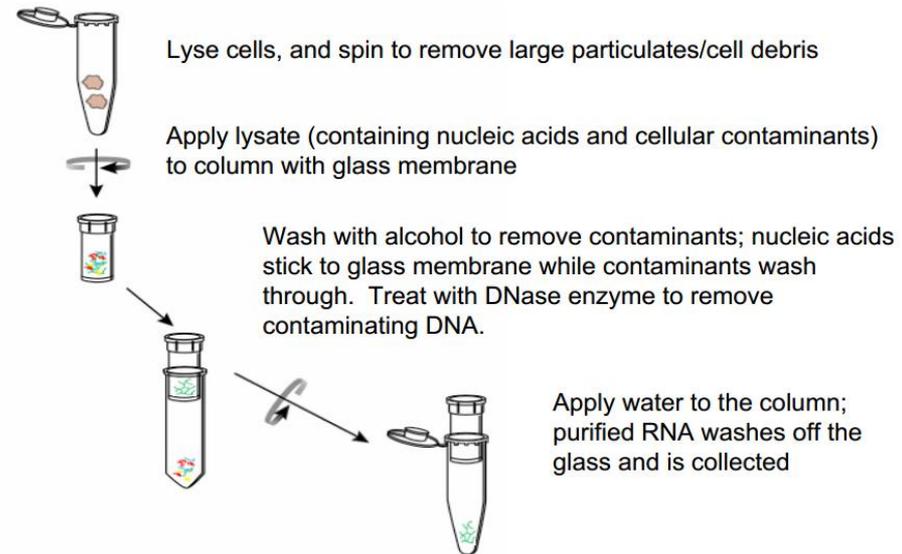
- **Tamaño** (estudiar distintas formas de *splicing*)
- **Secuencia** (predecir un producto proteico)
- **Abundancia** (medir los niveles de expresión)
- **Dinámica de expresión** (temporal, tejido-específica, etc).

Protocolos de extracción de RNA

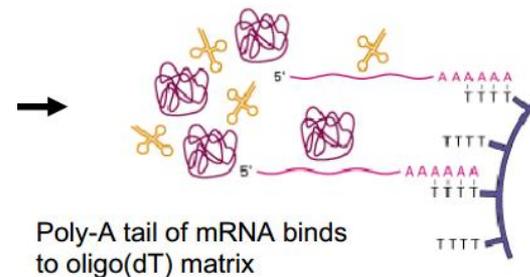
Extracción orgánica (solventes orgánicos)



Extracción por afinidad (columnas)

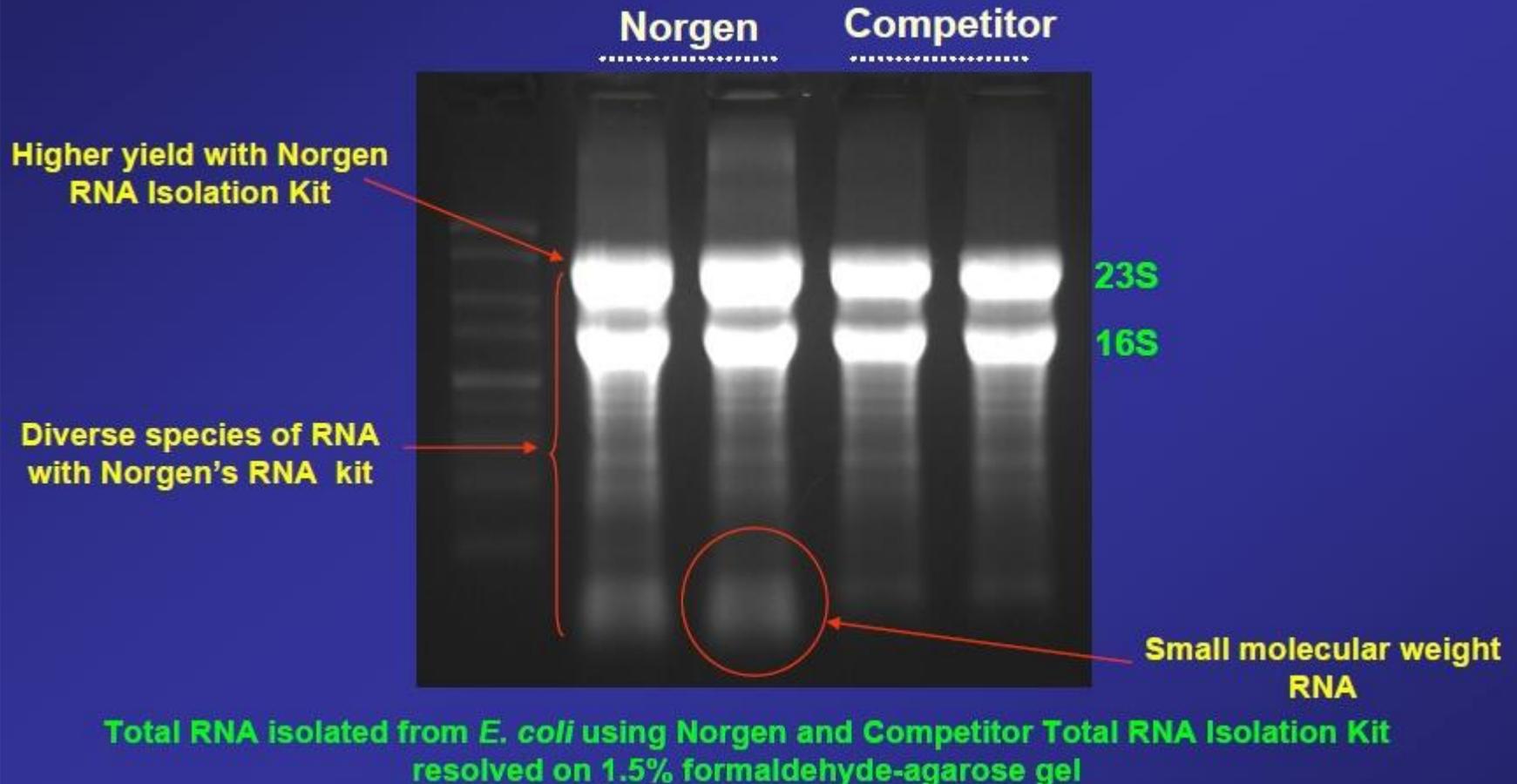


Extracción con oligo(dT) (para mRNA)



Visualización de RNA en gel

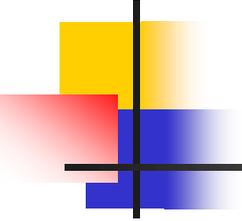
- Geles desnaturalizantes
- Condiciones libres de RNAsas



Resumen

Vimos:

- Tipos de ADN
- Fuentes de ADN
- Técnicas moleculares que utilizan ADN
- Protocolos de extracción de ADN
- Visualización y cuantificación de ADN
- Extracción de ARN



¿Preguntas?

