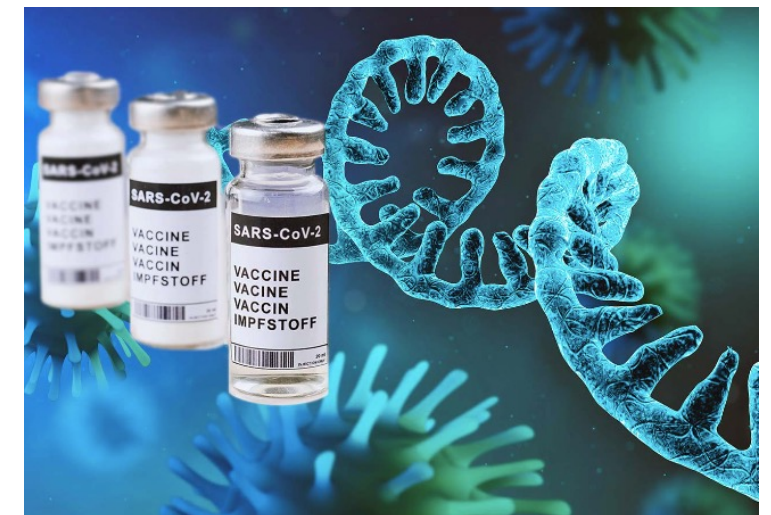
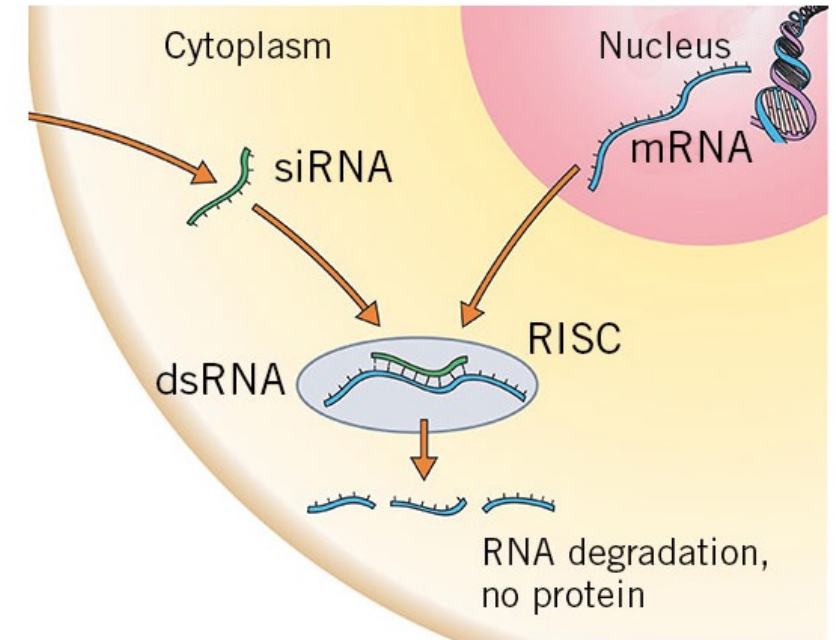
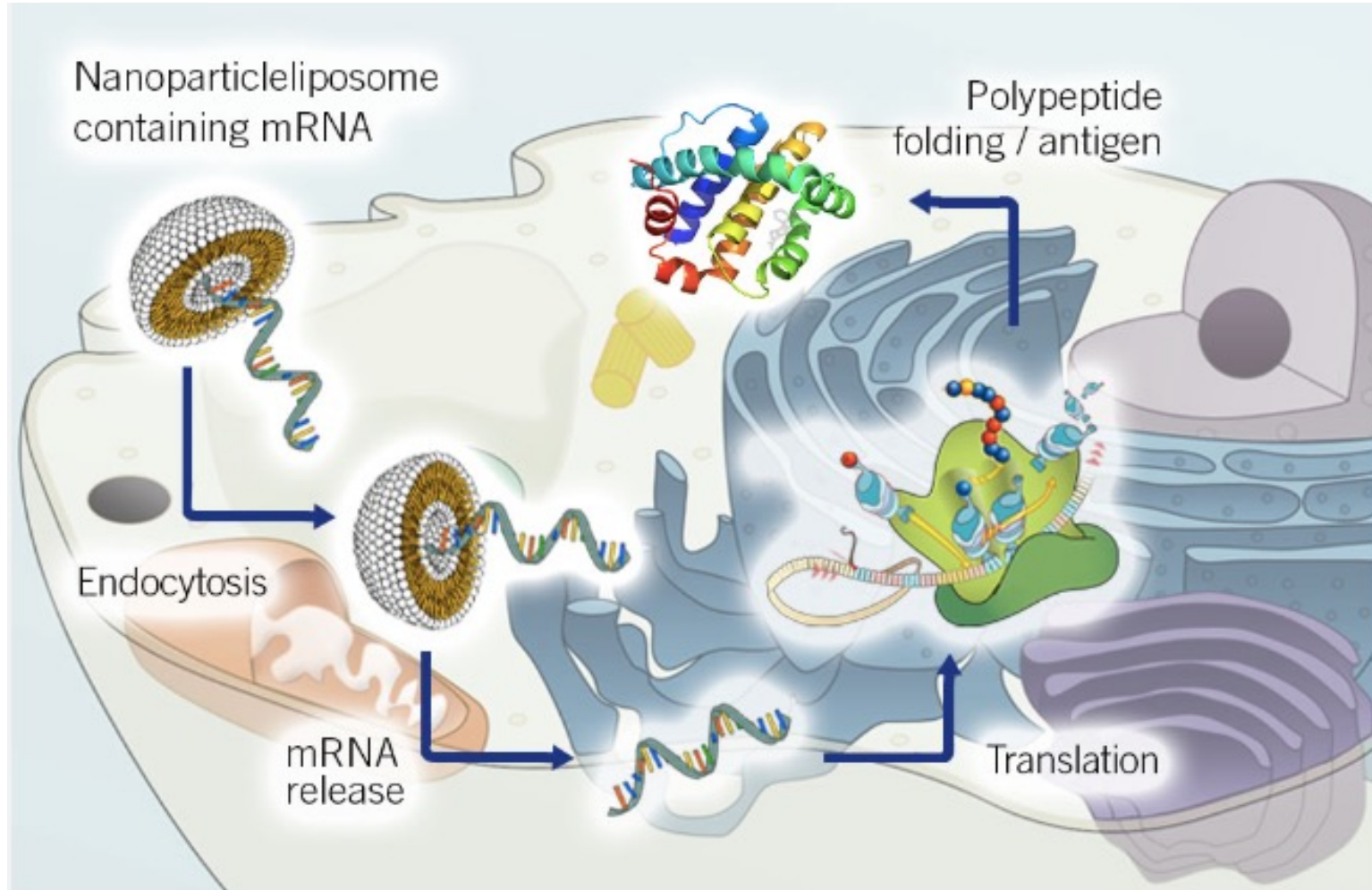


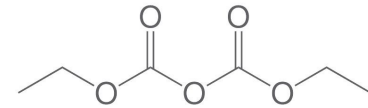
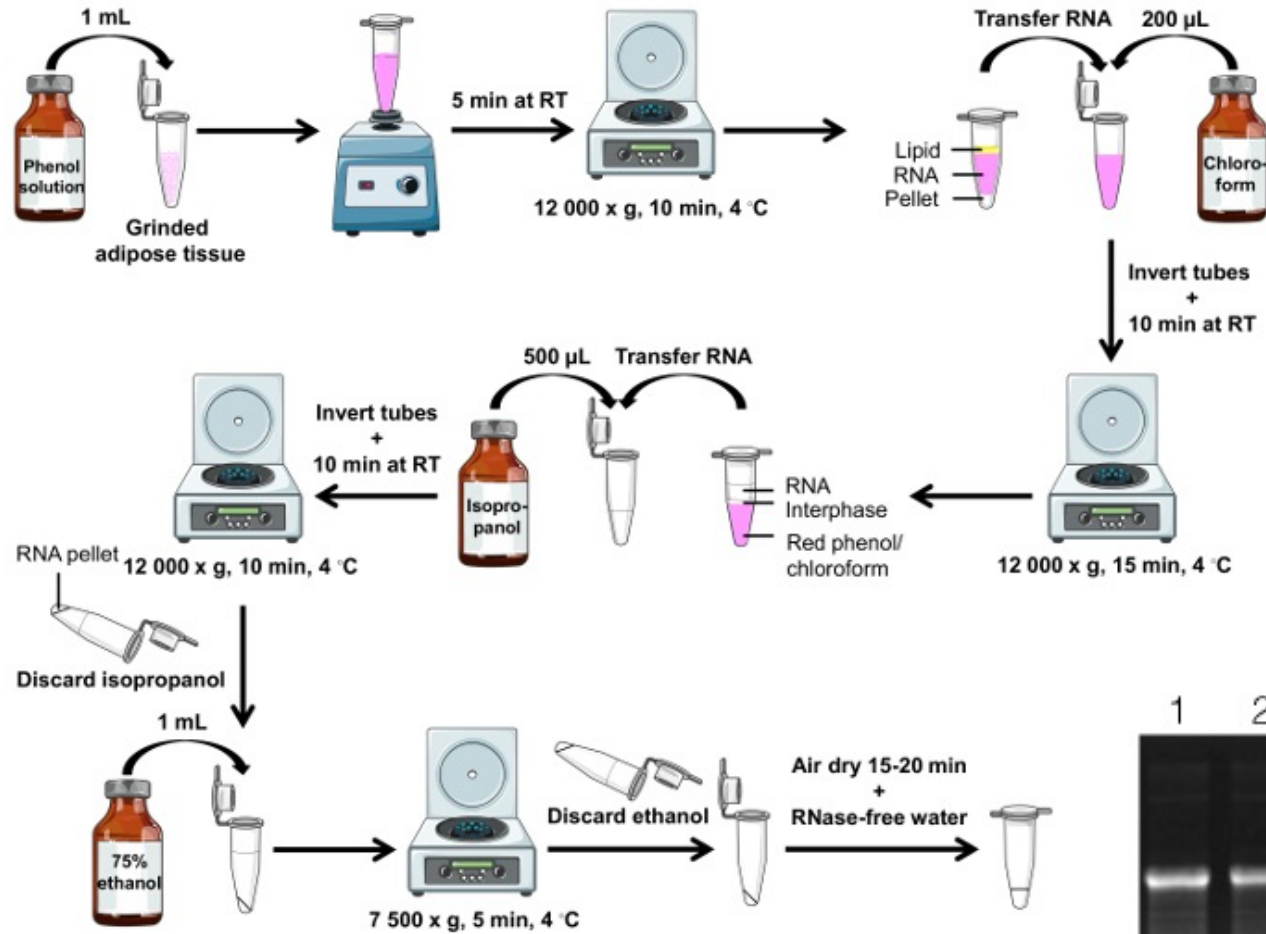
Aplicaciones de la Biología Molecular

Parte II. RNA y proteínas



Propiedades y Extracción de RNA

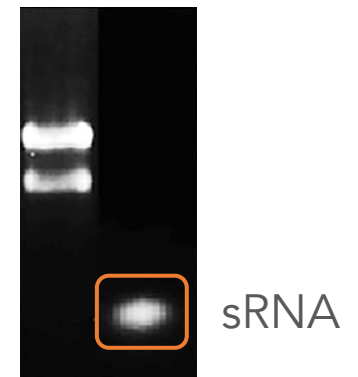
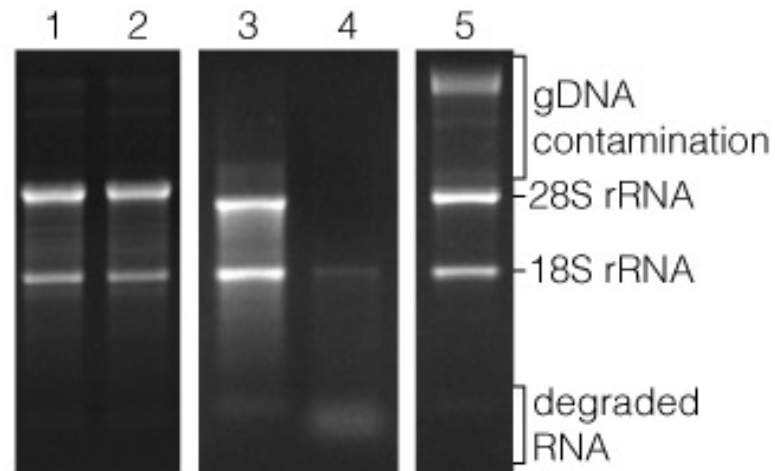
- Usualmente de cadena sencilla
- Ribosa (2'-OH) altamente reactivo
- Lábil y susceptible de degradación
- Cargado negativamente
- Precipitación en isopropanol



DEPC

Agua destilada tratada con dietil pirocarbonato (DEPC)

Columna de purificación

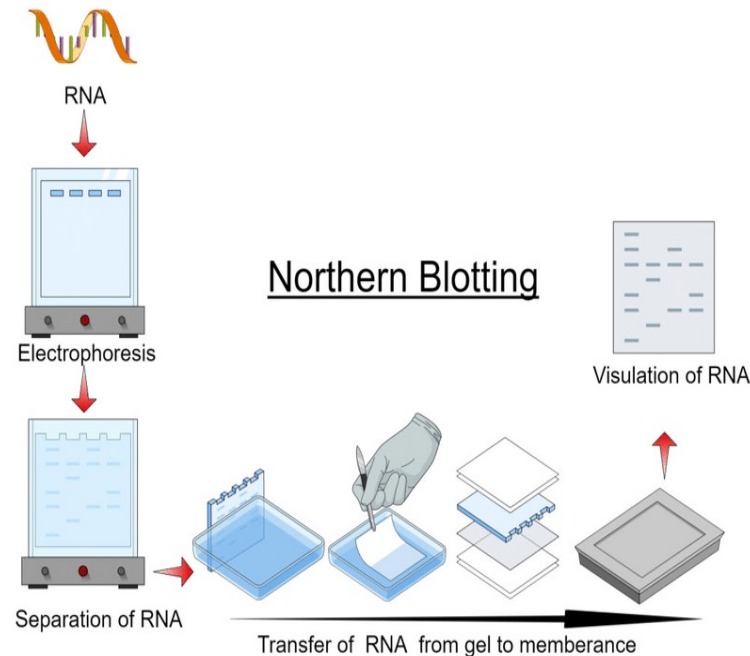


Al estudiar el mRNA evaluamos la EXPRESIÓN de genes

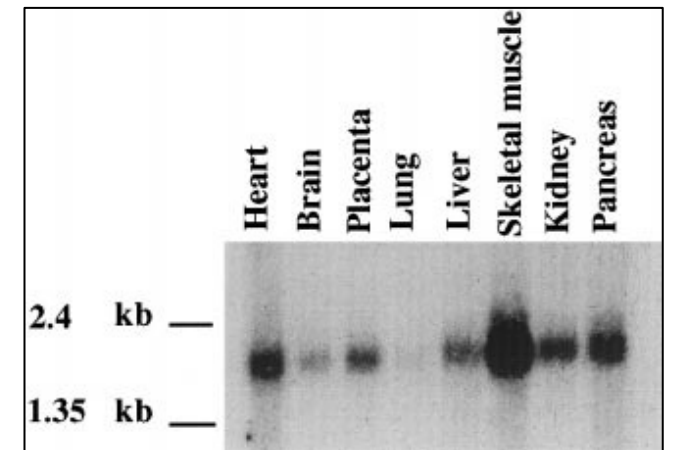
Northern Blot

(detección de secuencias específicas en muestras de RNA)

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



Resultado:

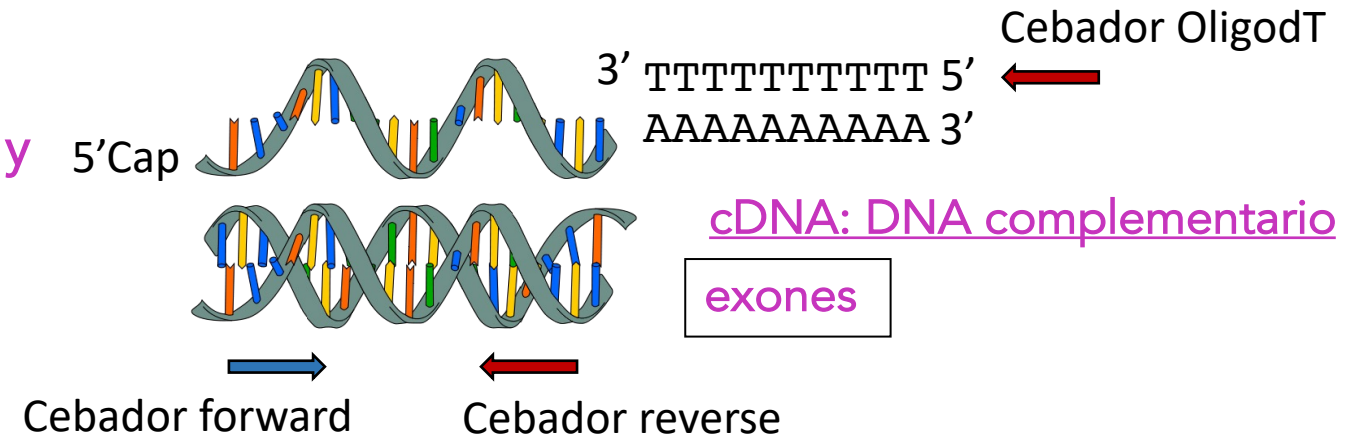


Expresión del gen TTC4 en diferentes tejidos

RT-PCR: Reverso transcripción seguida de PCR (EXPRESIÓN)

(amplificación de secuencias específicas a partir de muestras de RNA)

1. Aislamiento de **RNA**
2. Transcripción reversa con OligodT y RT (obtención de cDNA)
3. Amplificación por PCR

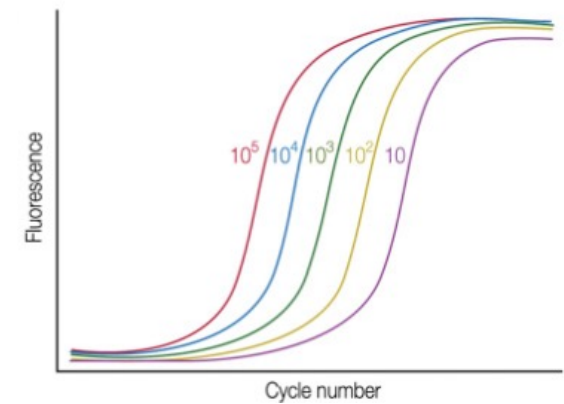


PCR de punto final (p.ej. 35 ciclos)
Método semi-cuantitativo



Gen de expresión control (actina)

RT-qPCR (método cuantitativo)

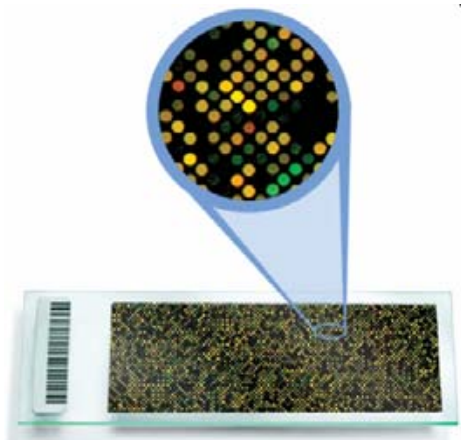


Análisis GLOBAL de RNA (Transcriptoma)

Microarreglos

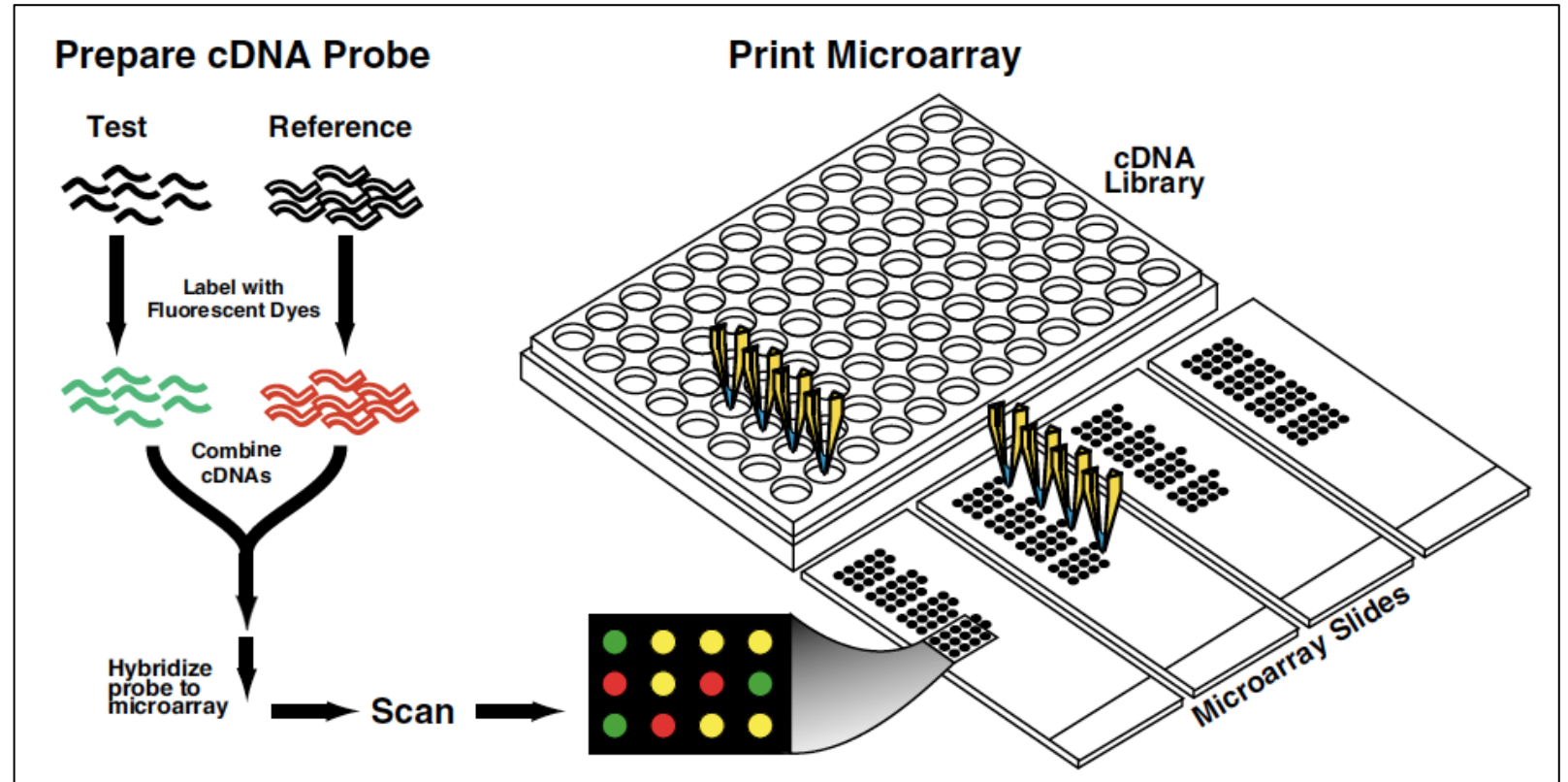


Contienen secuencias de DNA de cada GEN del genoma (25,000)



1. Aislamiento de RNA
2. Transcripción reversa con OligodT y RT (obtención de cDNA)
3. Hibridación con el microarreglo de DNA

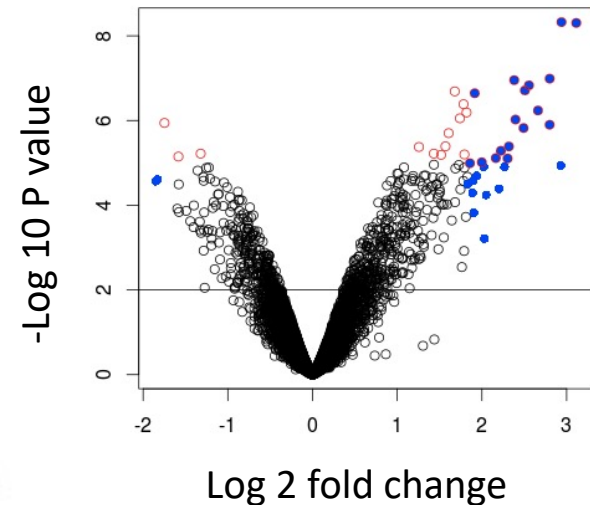
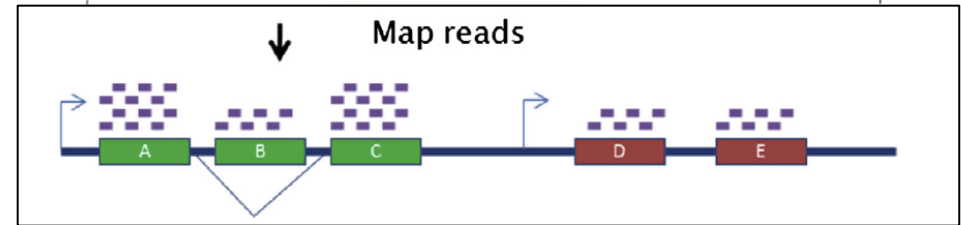
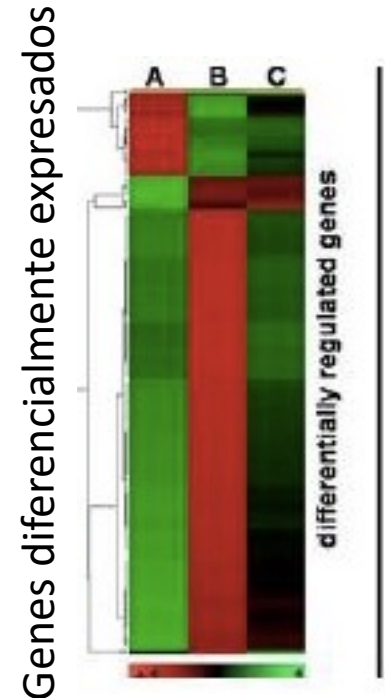
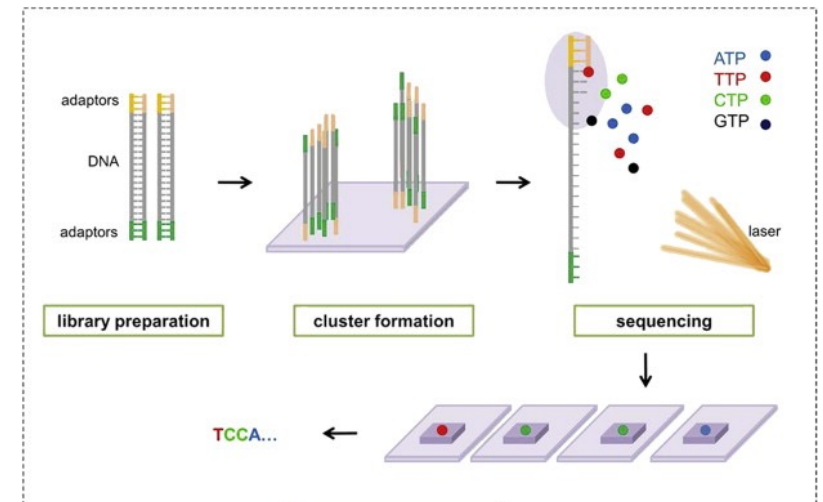
- Sólo hay señal para los genes expresados
- La intensidad de la señal representa la abundancia del cDNA correspondiente



Análisis GLOBAL de RNA (Transcriptoma)

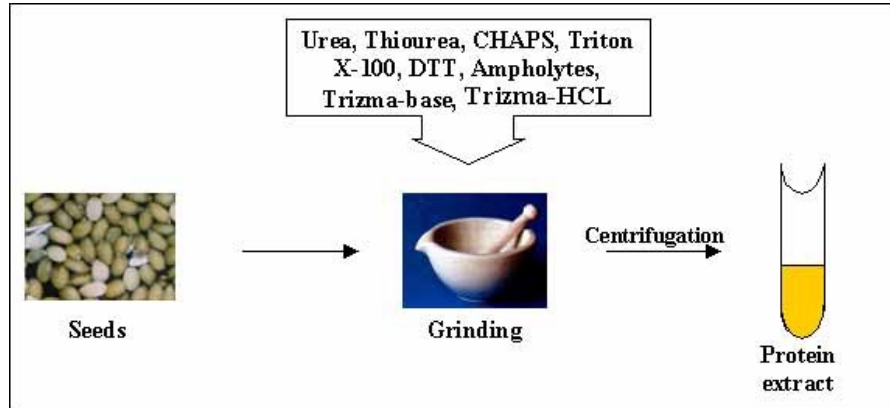
Secuenciación Masiva

1. Aislamiento de RNA
2. Transcripción reversa con OligodT y RT (obtención de cDNA)
3. Ligar adaptadores específicos/muestra
4. PCR
5. Secuenciar DNA
6. Análisis bioinformático



Análisis de Proteínas

Proteínas Celulares



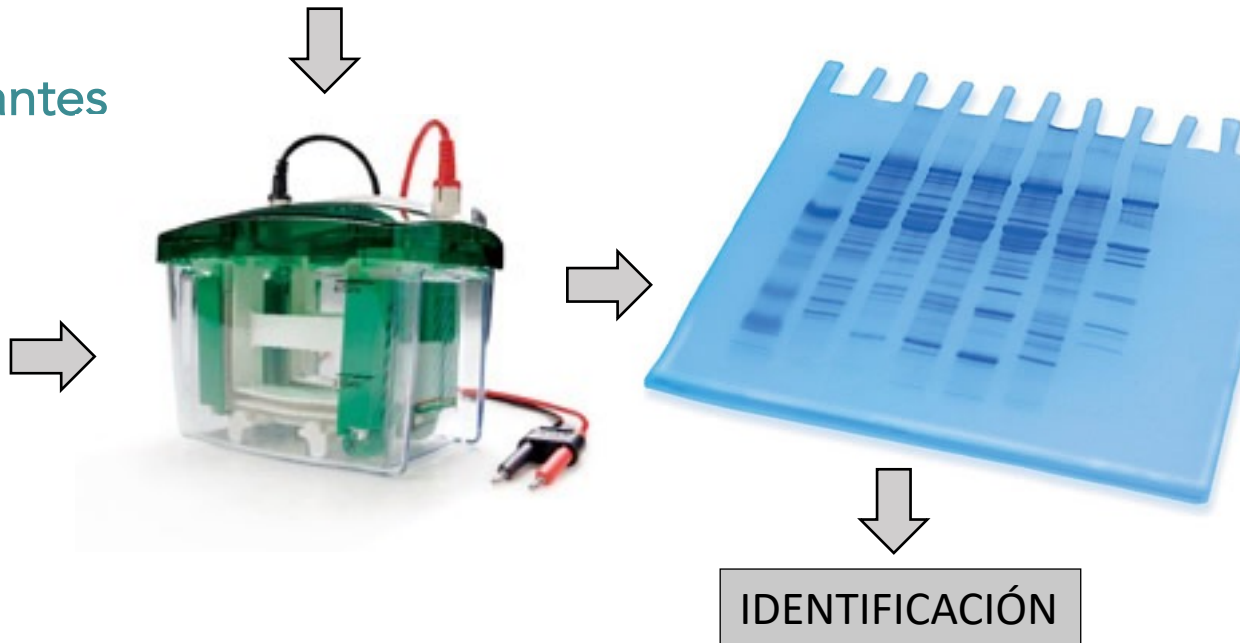
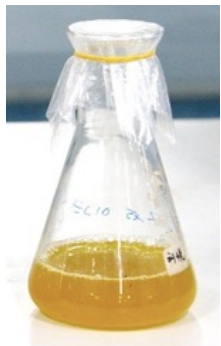
Mezcla compleja

- Extracción
- Purificación
- Separación
- Identificación

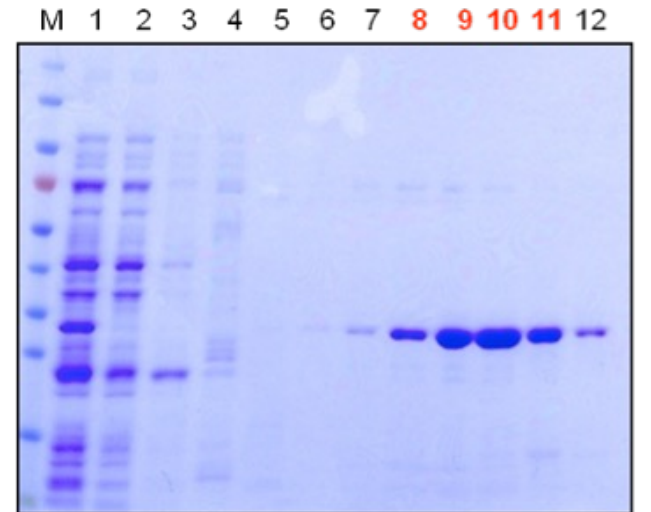


Proteínas Recombinantes

inducción

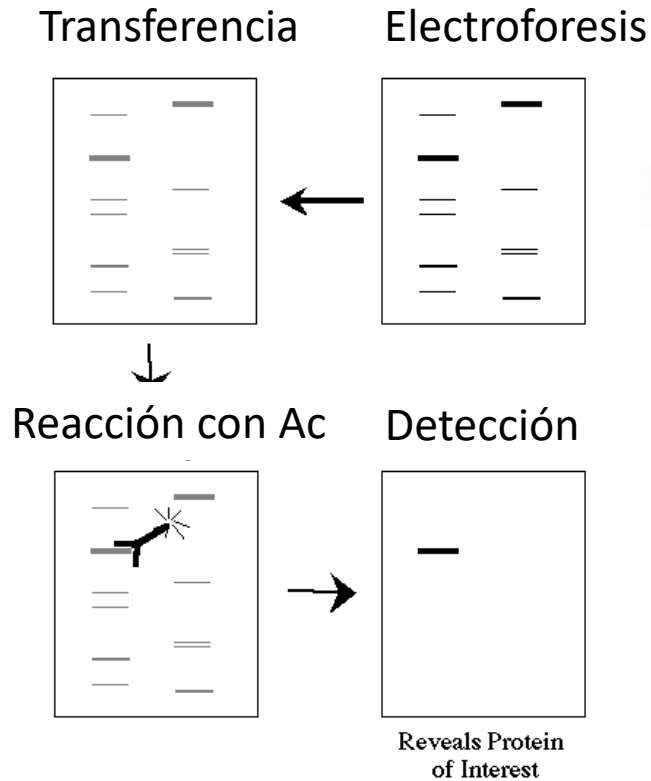


Proteína Pura

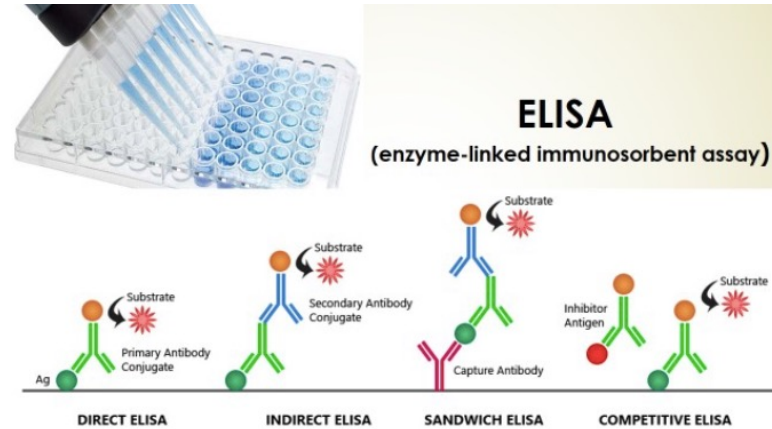


Identificación de proteínas específicas

Western blot (detección de proteína en membrana mediante anticuerpos)



ELISA

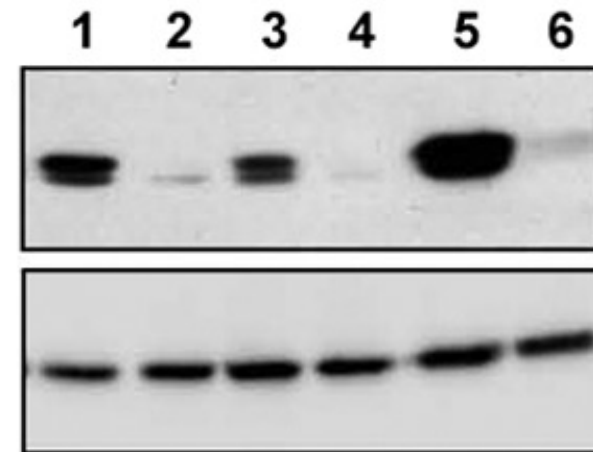


Inmunolocalización



Conocer:

1. Niveles de expresión
2. Isoformas
3. Modificaciones postraduccionales
4. Tiempo de vida media y degradación
5. Localización subcelular (si realizo fraccionamiento celular)



Anticuerpo-P-Ser (fosforilación)

Anticuerpo-proteína

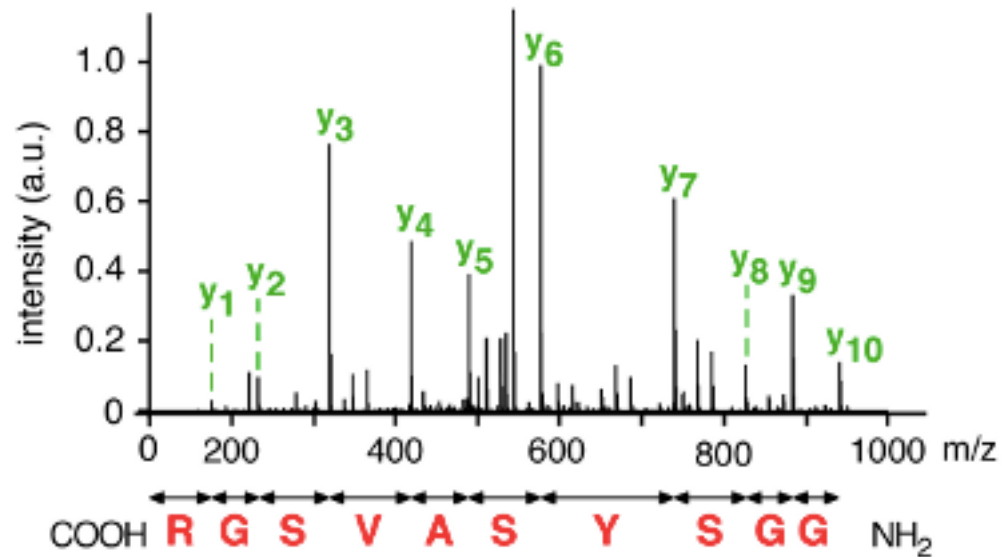
Análisis de PROTEOMAS (Espectrometría de masas nano-LC-MS)

Las proteínas se digieren con Proteasa
 Ionización de la muestra (suave)
 Tiempo de vuelo



Masa exacta de péptidos

fragment ion spectrum of peptide GGSYSAVSGR



Análisis bioinformático en Bases de Datos

```

1 MKQLKLLIGS TLFMSIISVQ AADWSSFSIP AQAGAGKSWQ LQSVSDEFNY
51 IAQPNNKPA A FNNRWNASYI NAWLPGDTE FSAGHSYTTG GALGLQATEK
101 AGTNKVLSGI ISSKATFTYP LYLEAMVKPT NNTMANAVWM LSADSTQEID
151 AMESYGSDRI GQEWFDQRMH VSHHIFIRDP FQDYQPKDAG SWVYNNGETY
201 RNKFRRYGVH WKDAWNLDYY IDGVLVRSVS GPNIIDPENY TNGTGLNKPM
251 HIILDMEHQP WRDVKPNASE LADPNKSIFW VDWIRVYKAQ
  
```

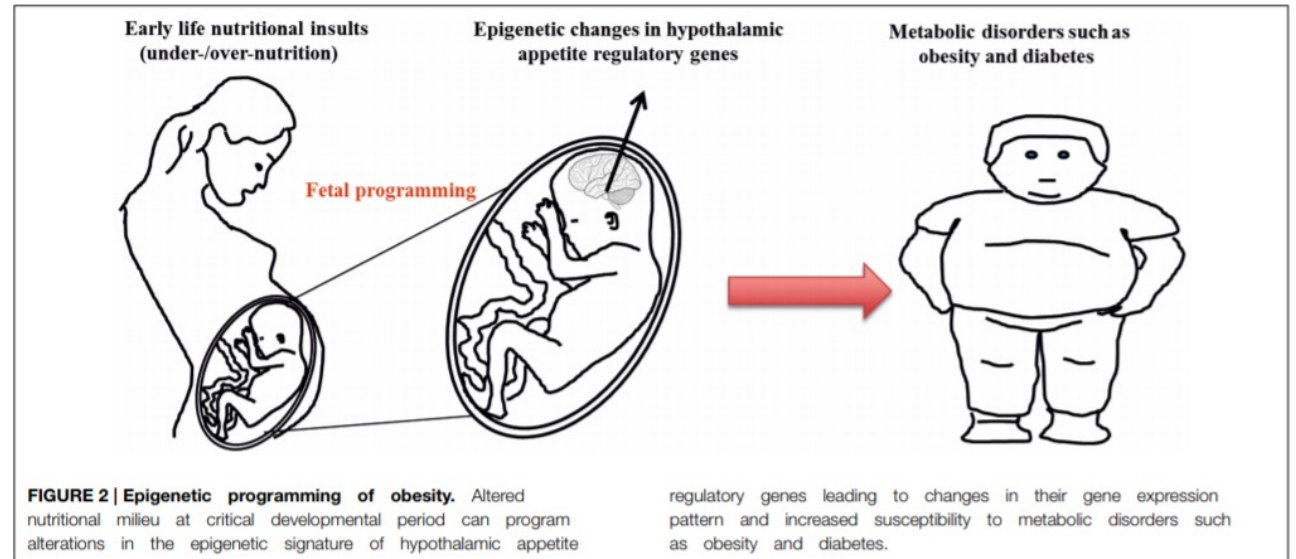
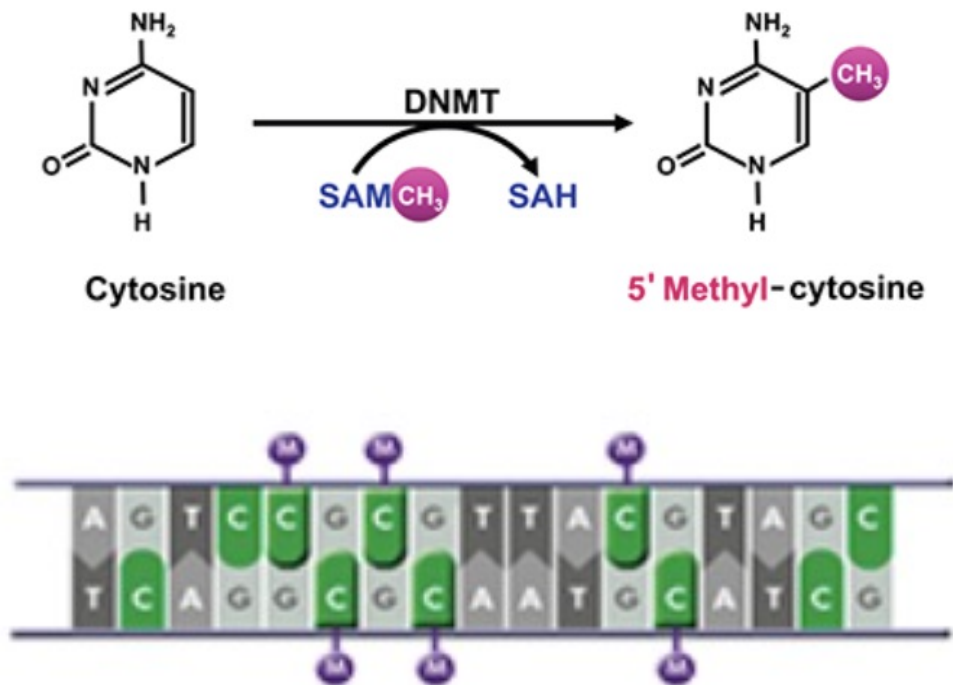
Cobertura: Define qué porción de la proteína se identificó

Score: Toma en cuenta varios parámetros para indicar qué tan confiable es la identificación

Accession No.	Protein	M (dalton)	pI	Sequence coverage (%)	Score
gi 4501885	beta actin	41710.7	5.29	8	30
gi 13786847	L-Lactate Dehydrogenase	36485.1	5.72	20	90
gi 91199540	dihydrolipoamide dehydrogenase	54144	7.95	9	60
gi 7657381	pre-mRNA processing factor 19 homolog	55147.4	6.14	15	70
gi 4757810	ATP synthase	59714.6	9.16	24	218
gi 825635	Calmodulin	17153	4.06	21	40
gi 895845	p64 CLCP	23592.1	5.12	65	328
gi 542991	Ran-specific GTPase-activating protein	23439.7	5.21	12	30
gi 833999	P43	49503.1	7.69	31	200
gi 4757900	calreticulin	48112.8	4.29	55	898

Importancia de la metilación de DNA en la herencia epigenética

Equipo 7



Aplicaciones RNA interferente

Equipo 2

