



Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Medicina

Instituto de Genética Humana



# TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

© 2002 ` Derechos Reservados Pontificia Universidad Javeriana Instituto de Genética Humana Bogotá COLOMBIA



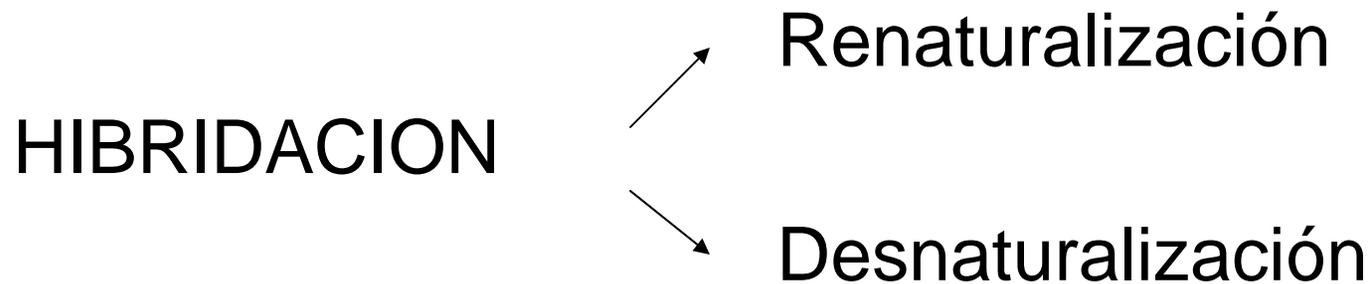
© Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Medicina

Instituto de Genética Humana



# TECNICAS DE FRAGMENTACIÓN Y MARCACIÓN DEL DNA



## *Desnaturalización*

- Agentes Químicos: Urea, formamida Formaldehído
- Agentes Físicos: Temperaturas y cambios de pH



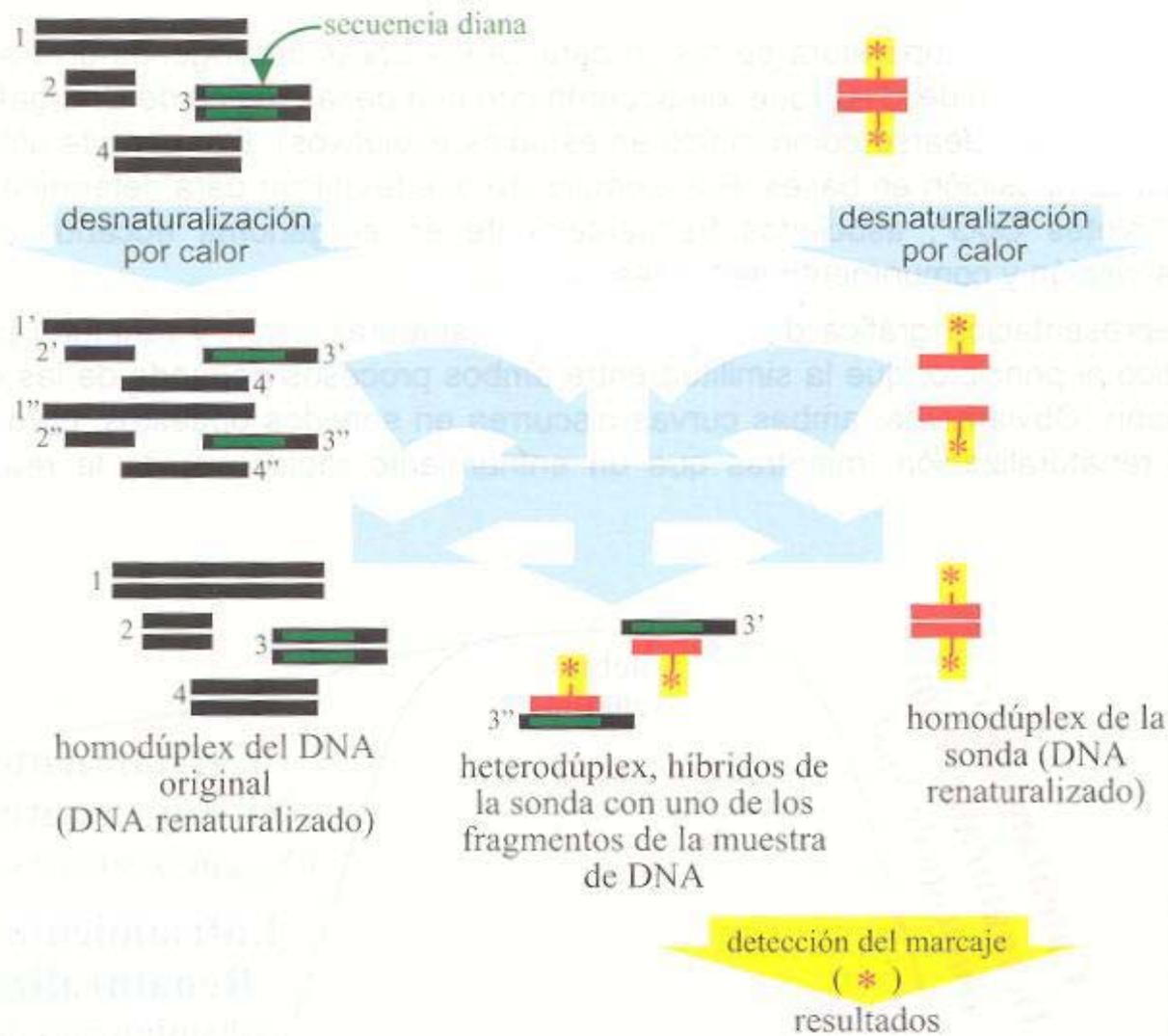
# ENSAYO DE HIBRIDACION

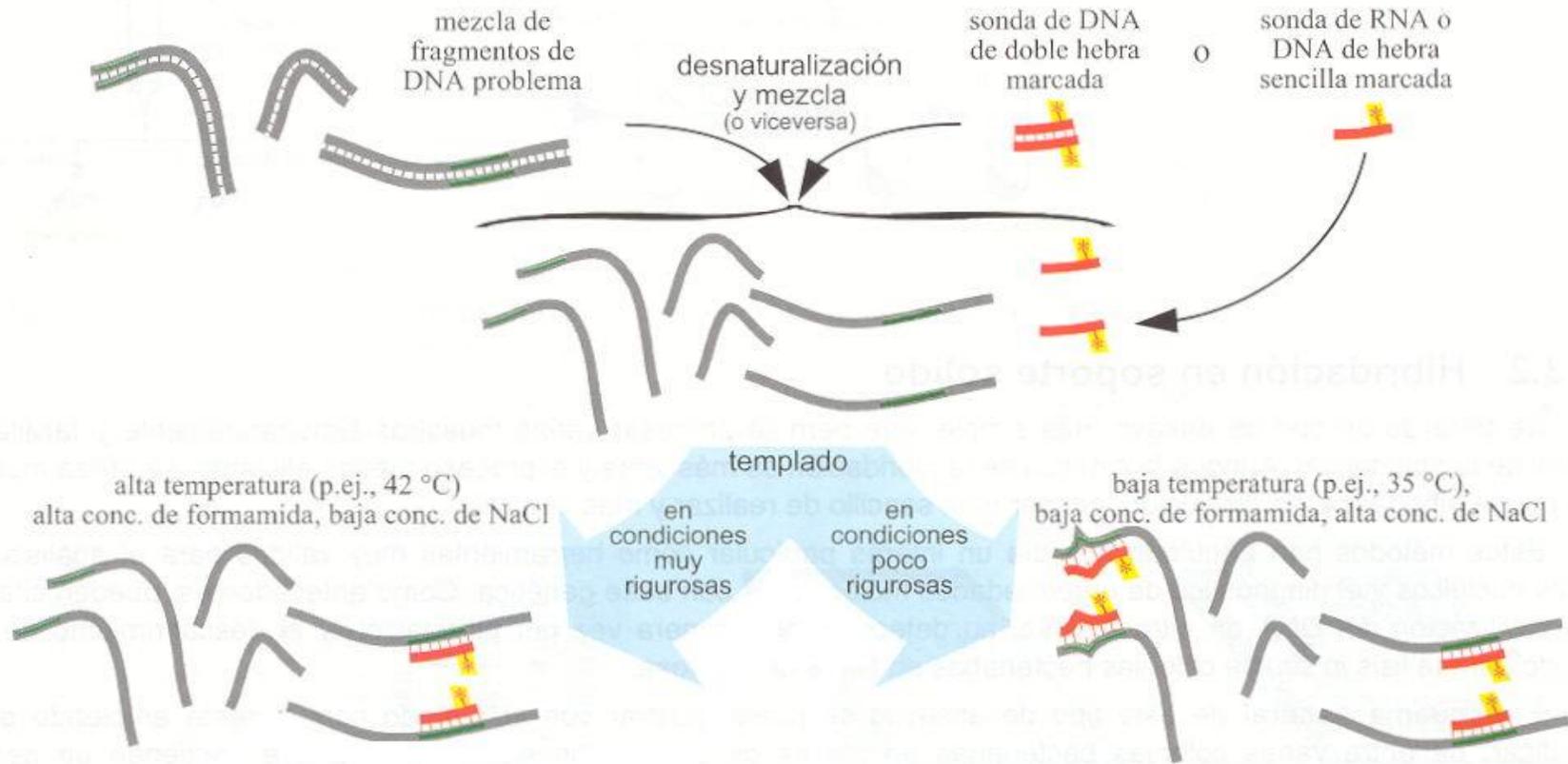
- Secuencia molde o diana
- Sonda
- Especificidad

## *Parámetros que afectan la renaturalización*

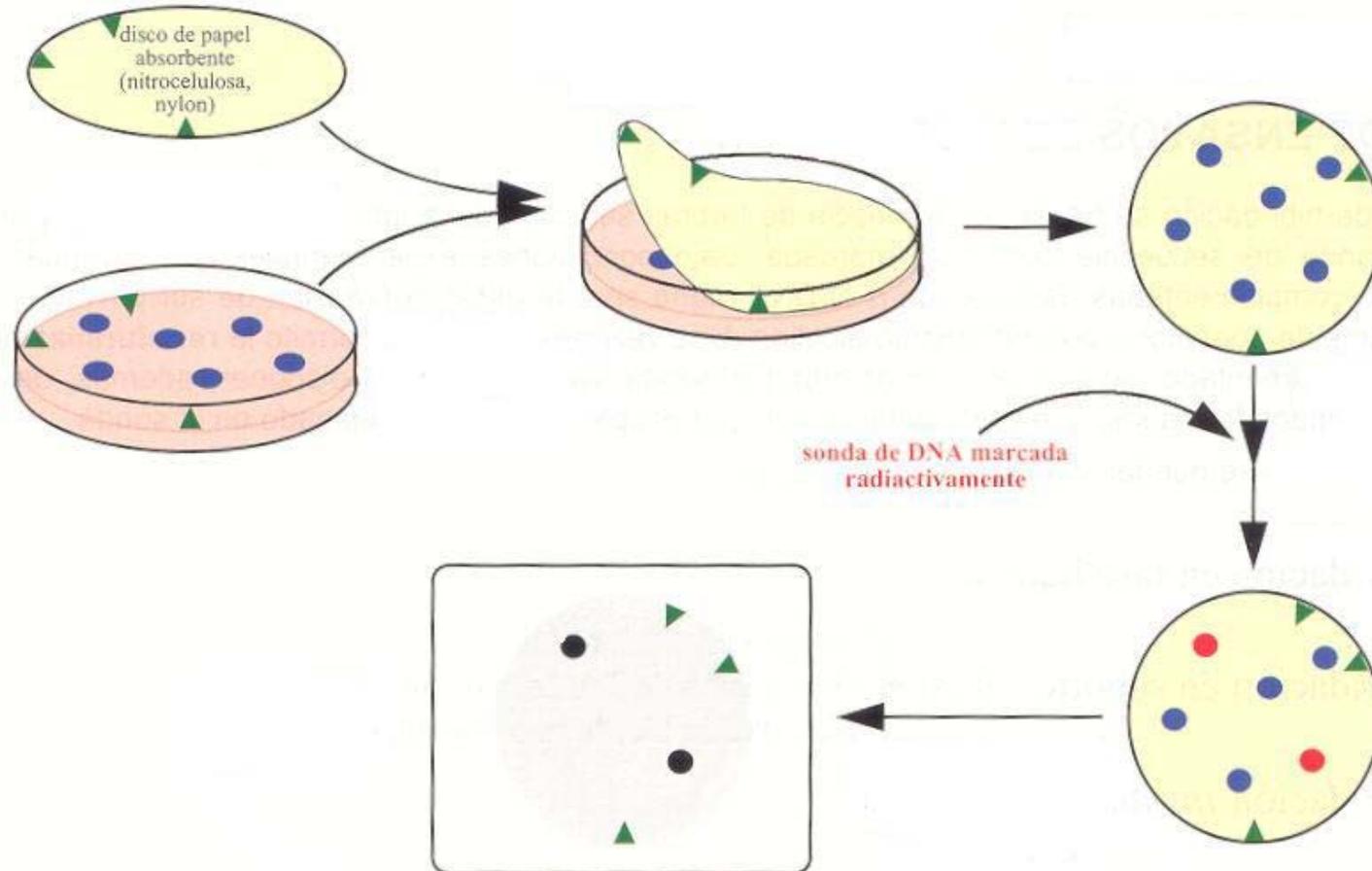
- Concentración del DNA
- Concentración y tamaño de la sonda
- Temperatura y tiempo de hibridación
- Características del medio de reacción



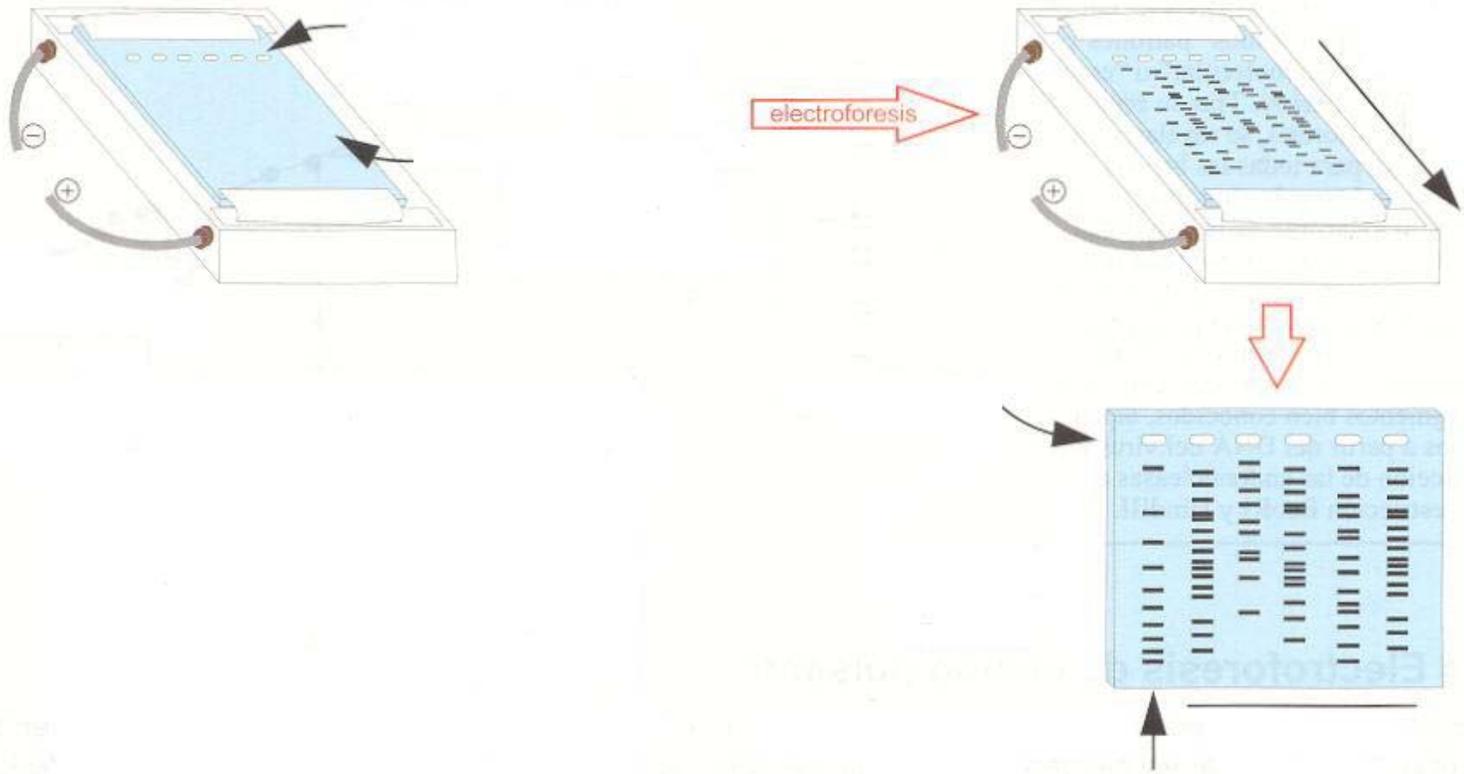




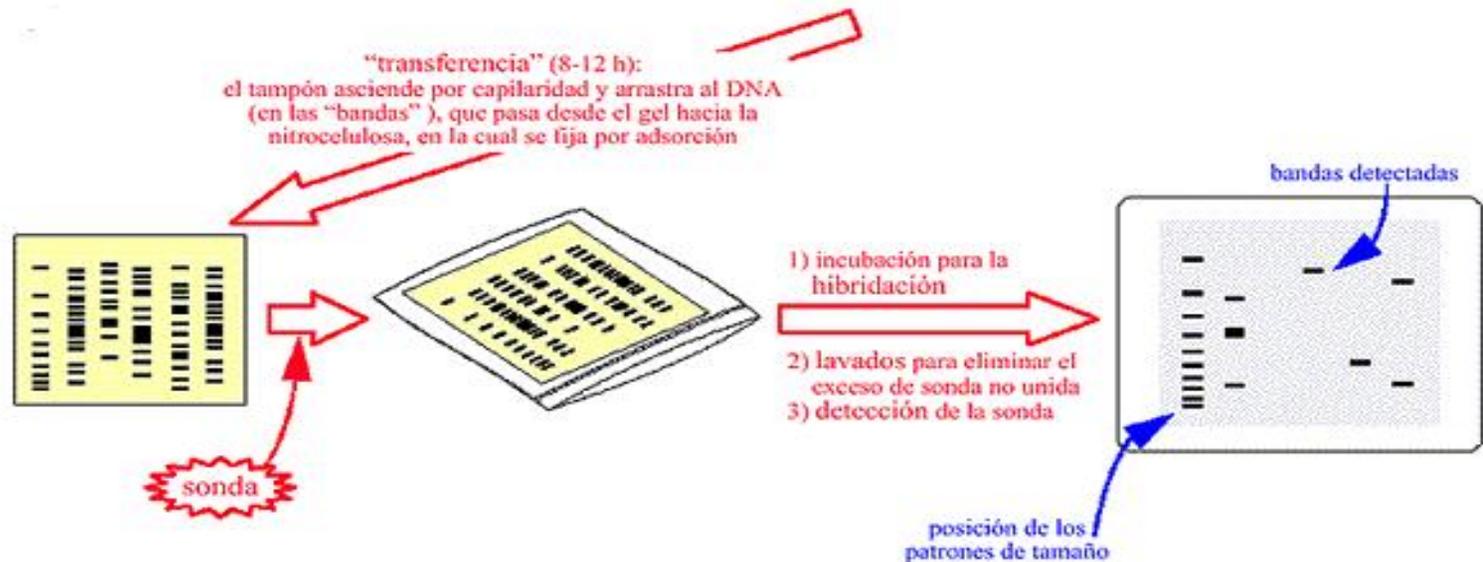
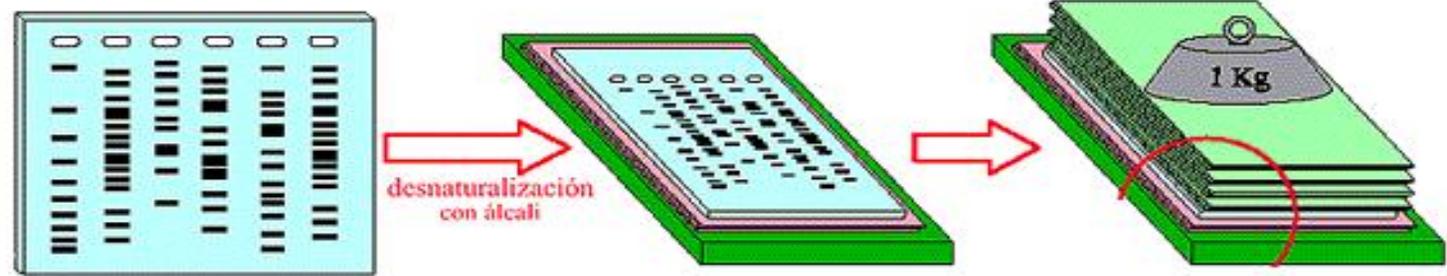
# METODOS DE ENSAYO DE HIBRIDACION



# ELECTROFORESIS



# SOUTHERN BLOT



secuencias reconocidas por dos sondas diferentes A y B

A B

puntos de corte con una endonucleasa de restricción determinada

tamaño de los fragmentos resultantes

0,7 kb 1,3 kb 4,9 kb 1,0 kb

HIBRIDACIÓN  
con sondas marcadas  
radiactivamente

sonda  
A

sonda  
B

escala de  
tamaño (kb)  
obtenida  
con los  
marcadores  
de DNA

5  
4  
3  
2  
1



escala de  
tamaño (kb)  
obtenida  
con los  
marcadores  
de DNA

5  
4  
3  
2  
1



## *Utilidades*

- Caracterización de fragmento de DNA
- Mapas de restricción
- Identificación de genes relacionados entre especies
- Detección de reorganizaciones y duplicaciones

**Northern Blot** : RNA. Actividad transcripcional y expresión génica

**Western Blot**: Proteínas



# SONDAS

## *Clasificación :*

- Longitud o tamaño de la secuencia
- Método de marcaje y detección
- Método de preparación

## *Método de preparación*

- Métodos convencionales
- Métodos de síntesis química





# PCR

## Reacción en cadena de la Polimerasa



# PCR

Karry Mullis (1985)

## *Requisitos:*

- Obtención material genético
- Secuencia específica

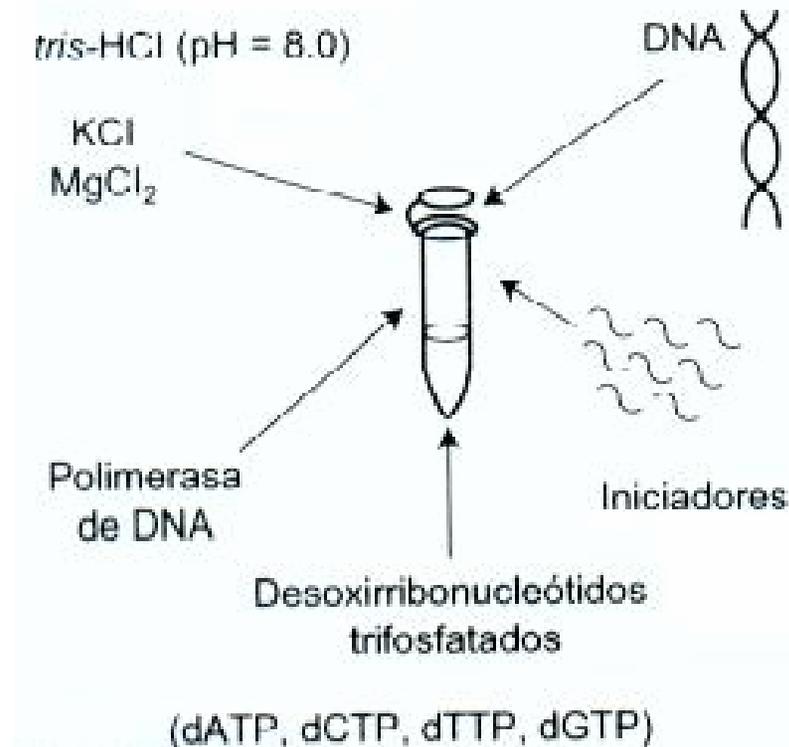
## *Elementos:*

- Primers (15 a 25 nucleótidos)
- DNA polimerasa
- dNTPs
- $MgCl_2$



# Elementos:

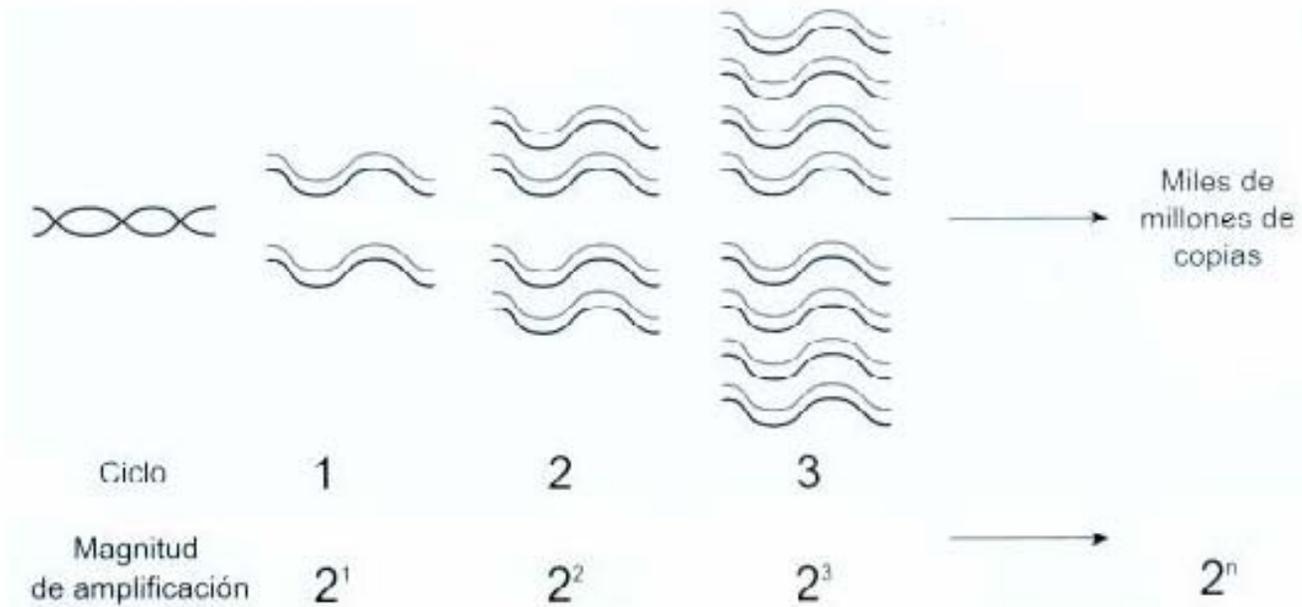
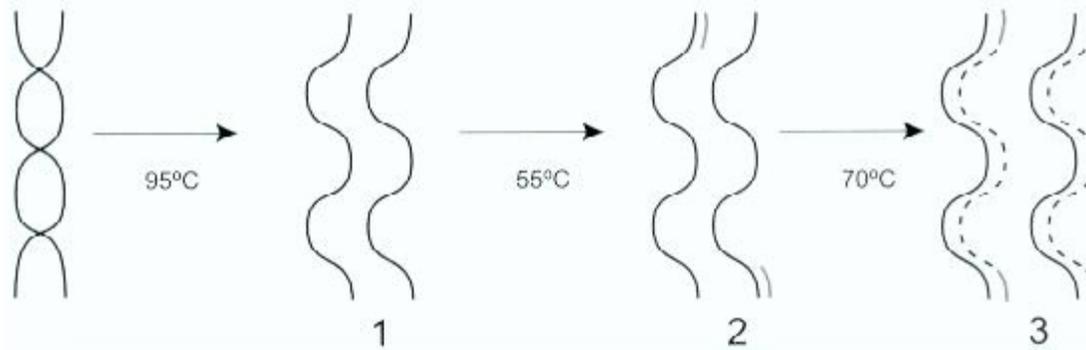
- Primers (15 a 25 nucleótidos)
- DNA polimerasa
- dNTPs
- $MgCl_2$

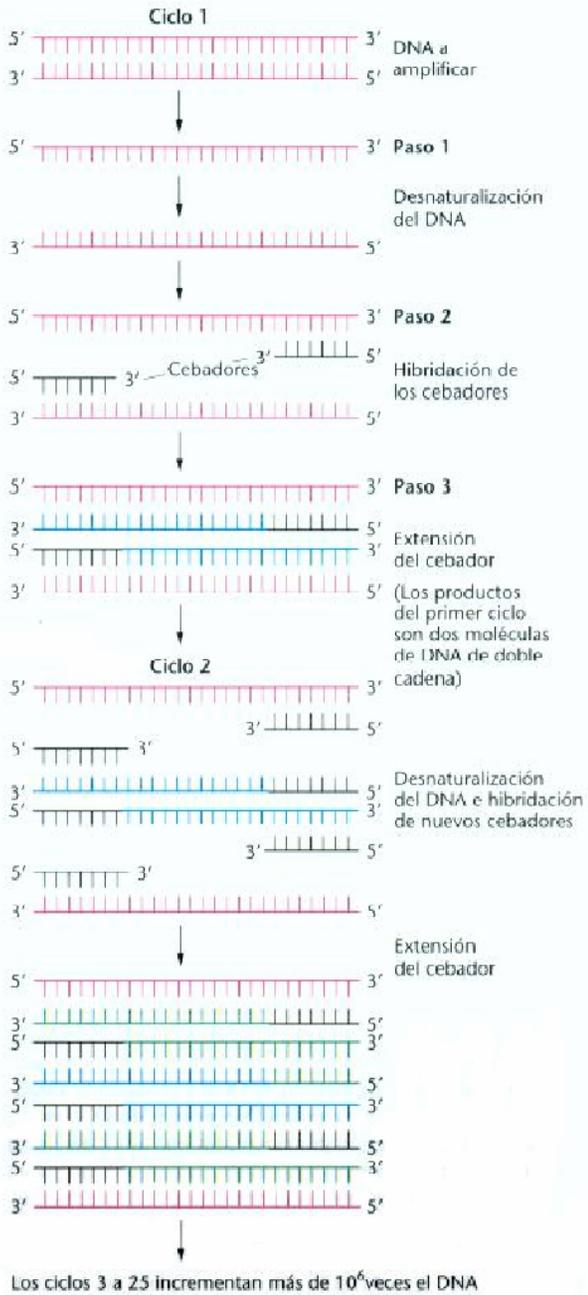


## *Pasos:*

- Denaturación
- Anillamiento
- Elongación





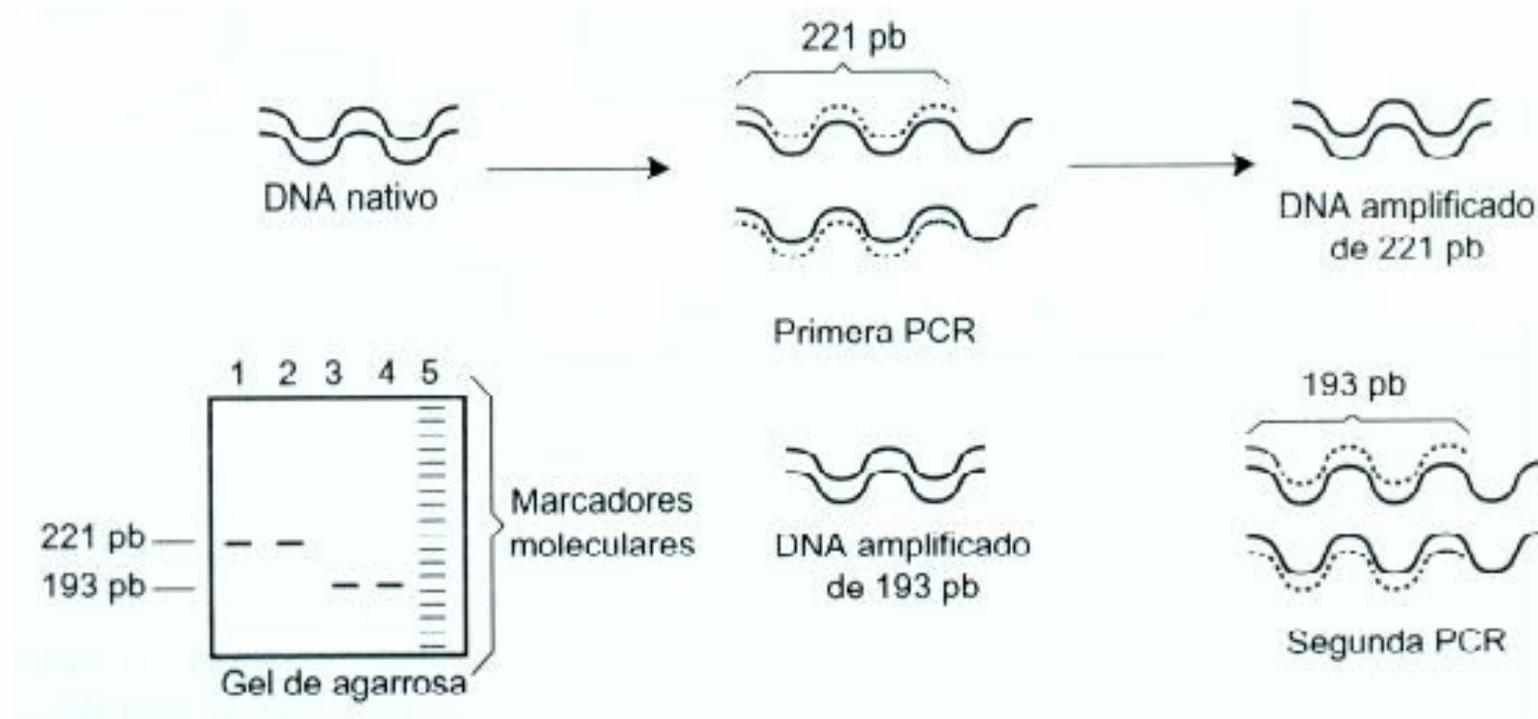


- PCR



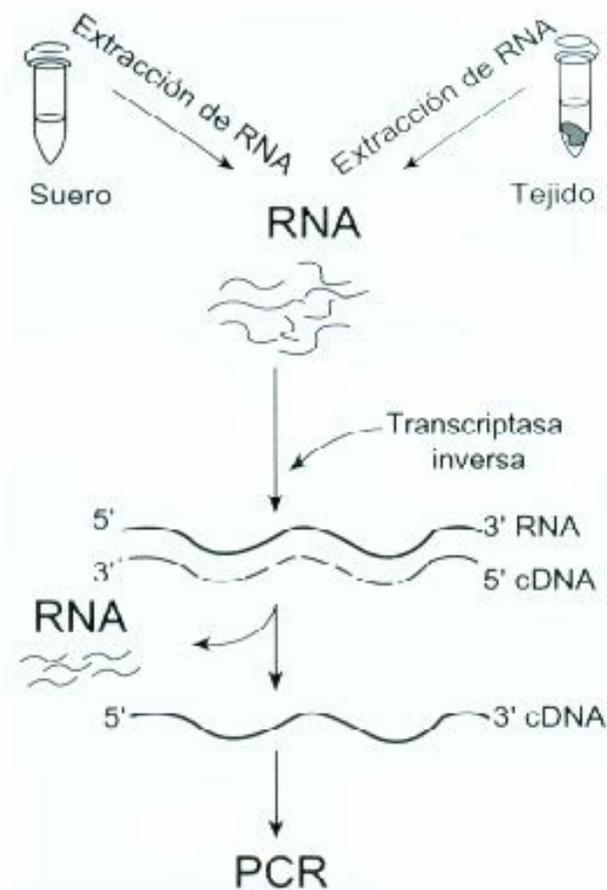
# Nested-PCR

Evita amplificar secuencias inespecíficas



# RT-PCR

## Secuencias específicas de RNA



## VENTAJAS:

- Rápido
- Fácil
- Menor cantidad de muestra
- Alta sensibilidad

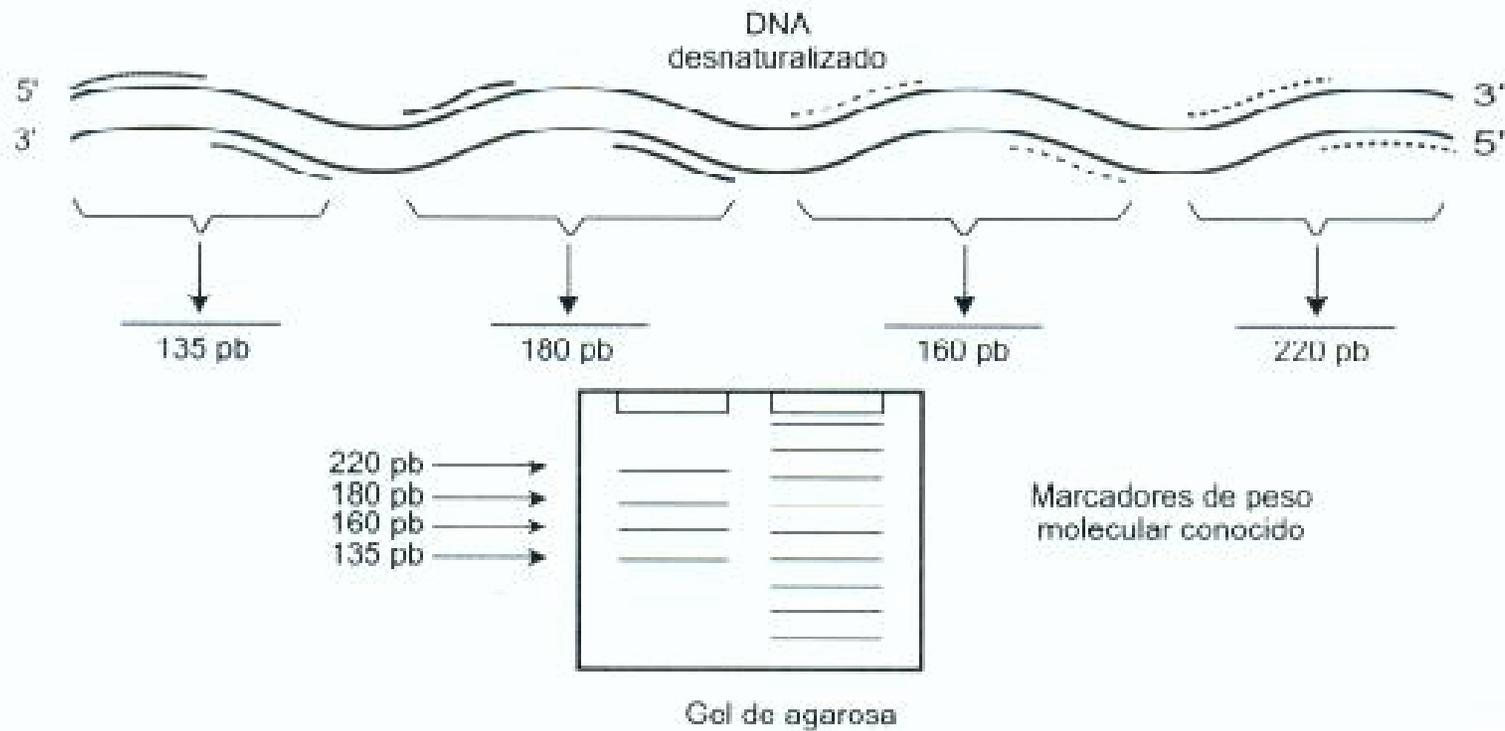
## DESVENTAJA:

- Susceptible a la contaminación



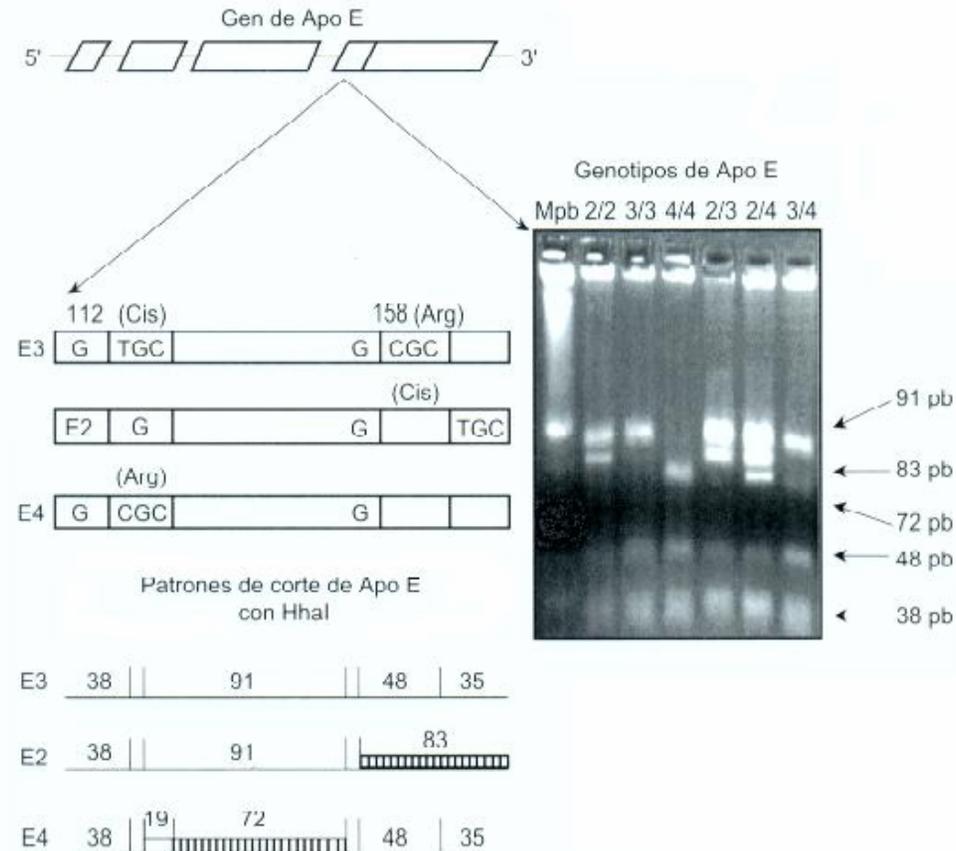
# Modalidades de la PCR

- **PCR múltiple**

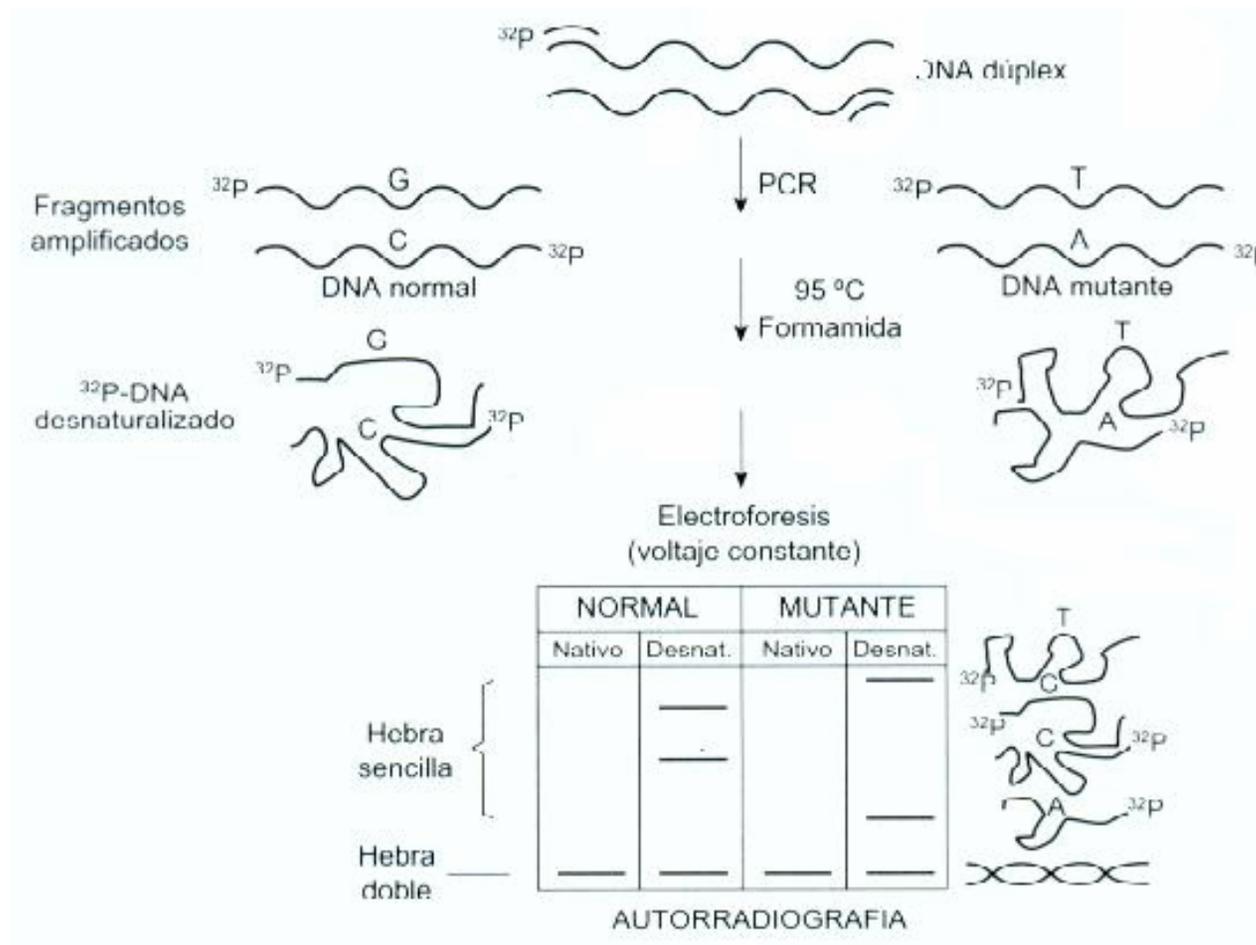


- **PCR RFLPs (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción)**

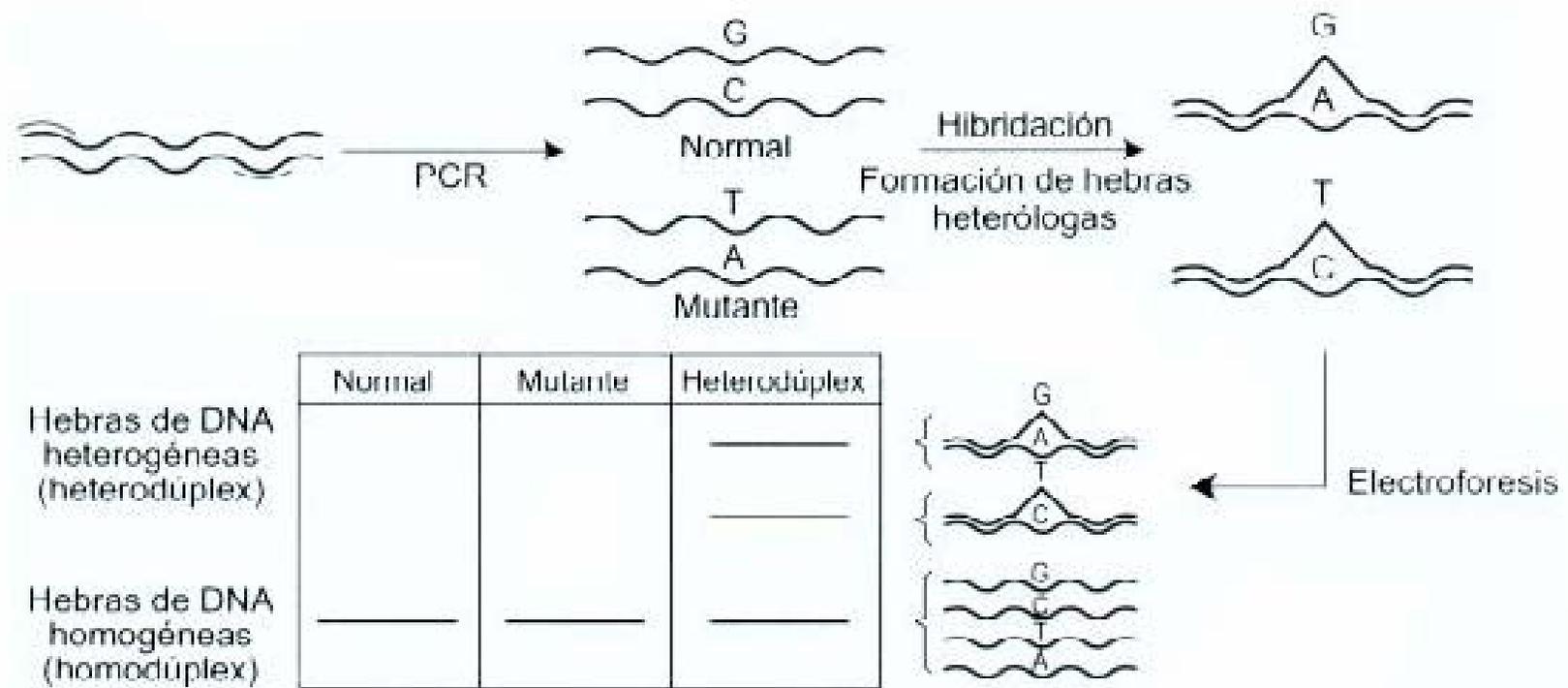
PCR-RFLP EN EL ANALISIS DEL POLIMORFISMO DE APO E



- ***SSCPs (polimorfismo conformacional de cadena sencilla).***



- Análisis de heteroduplex**



# SECUENCIACIÓN

- **Metodo químico**

Método de Maxam y Gilbert

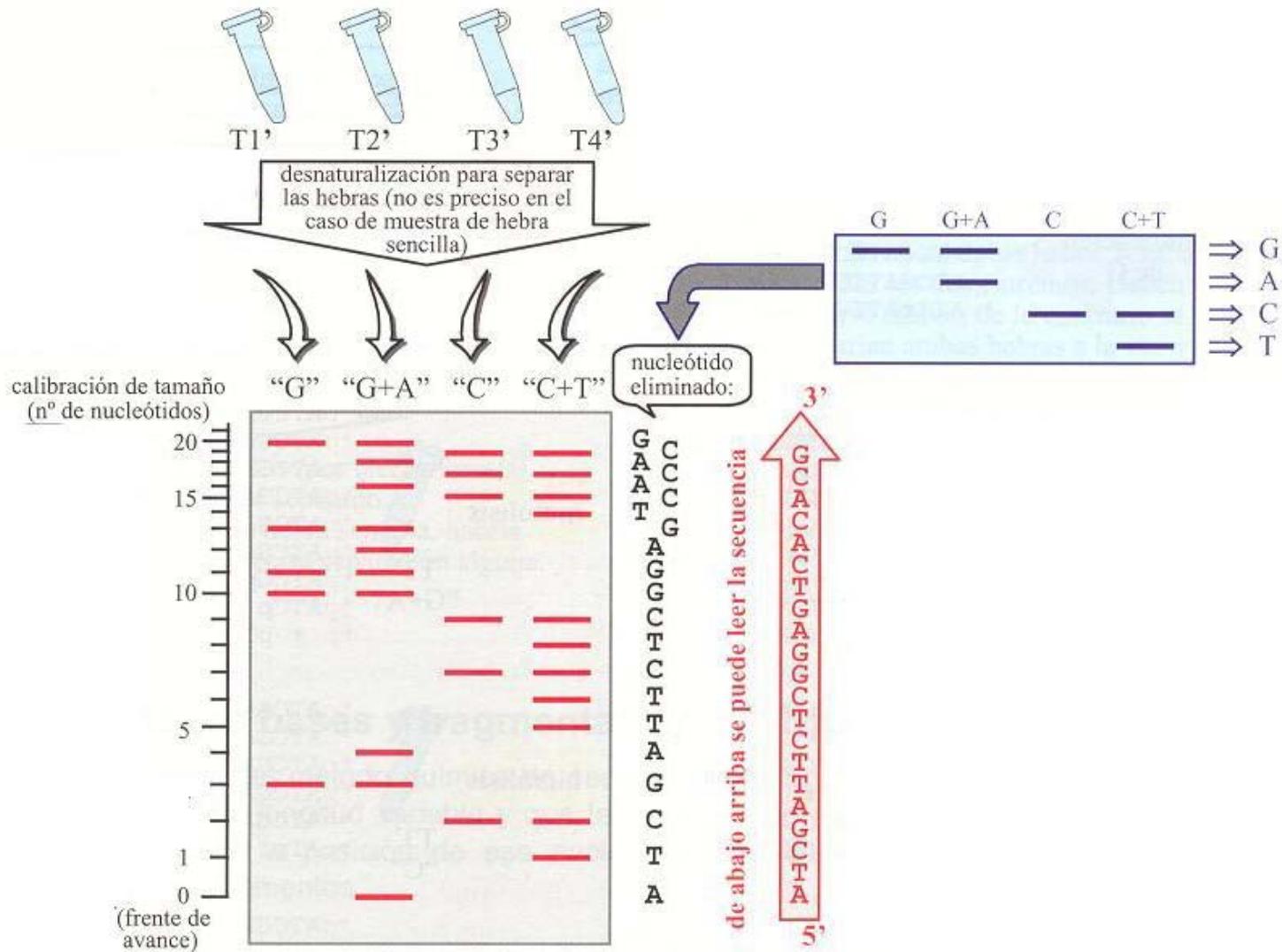
*Etapas :*

Marcaje del DNA

Hidrólisis química

Análisis



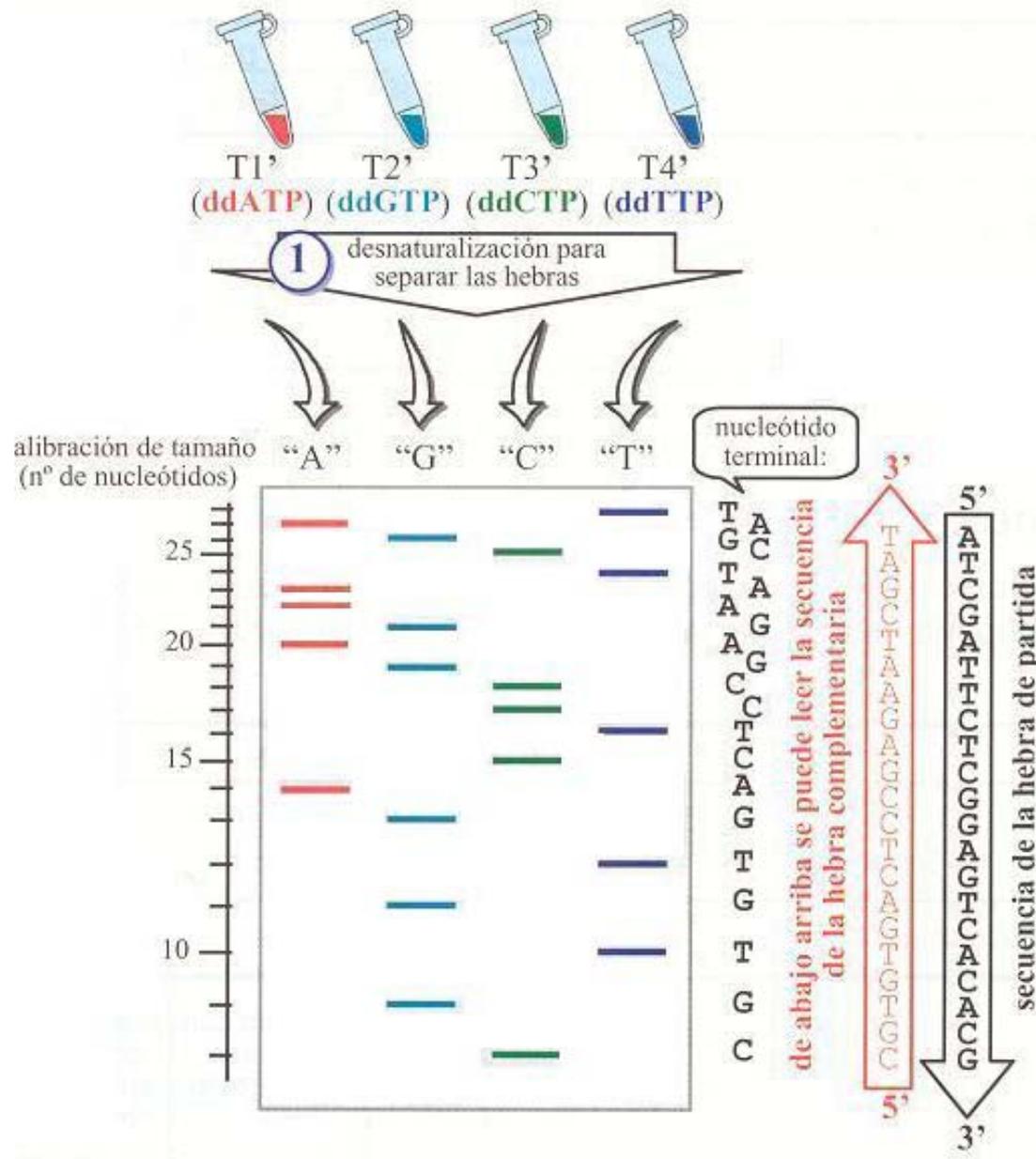


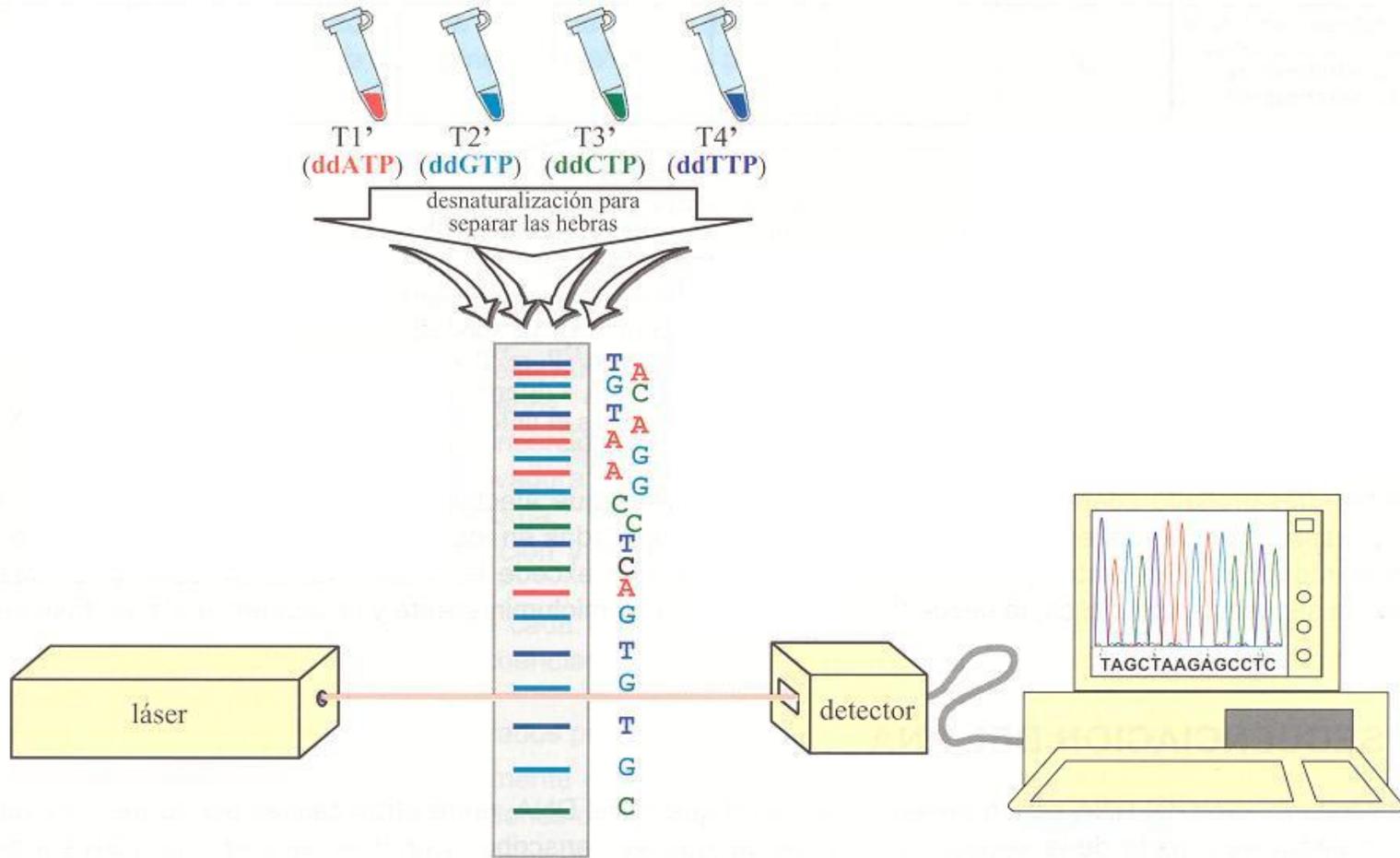
- **Método enzimático.** Método de Sanger.  
Interrupción controlada de la síntesis de la hebra de DNA.

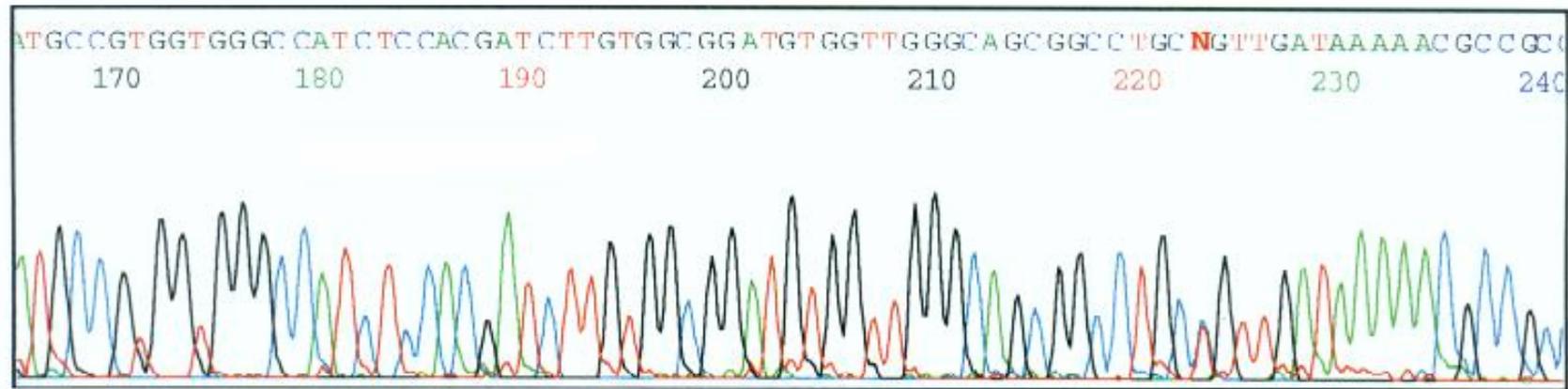
## *Elementos*

- DNA Polimerasa
- Cebador
- Didesoxinucleótidos









# SECUENCIACIÓN





Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Medicina

Instituto de Genética Humana



# APLICACIONES DE LAS TECNICAS MOLECULARES

© 2002 ` Derechos Reservados Pontificia Universidad Javeriana Instituto de Genética Humana Bogotá COLOMBIA



© Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Medicina

Instituto de Genética Humana



# DETECCIÓN DE MUTACIONES EN LOS GENES PAX3 Y MITF EN PACIENTES COLOMBIANOS CON SINDROME DE WAARDENBURG

**Gelvez N., Rodríguez M., Lattig M.C., Prieto  
JC., Tamayo ML.**

**Instituto de Genética Humana  
Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.**



# SINDROME DE WAARDENBURG

Petrus Waardenburg (1948).

Autosómica dominante

Prevalencia: cercana al 5%

Heterogeneidad clínica y genética.



# HALLAZGOS CLINICOS

- Distopia cantorum
- Sordera neurosensorial
- Anormalidades pigmentarias en:
  - Piel (hipopigmentación)
  - Ojos (heterocromía del iris)
  - Cabello (poliosis y/o canas prematuras)

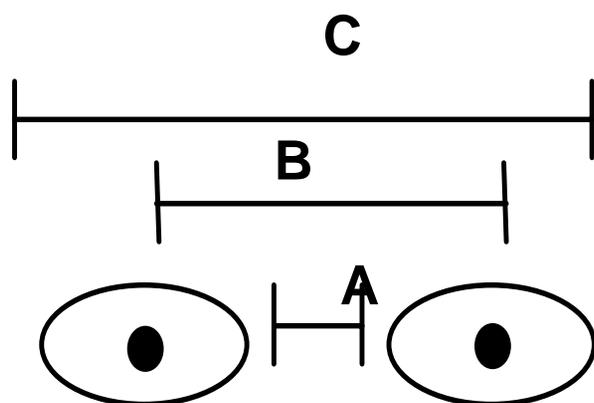


# CLASIFICACION

- WS 1 : presencia de distopia cantorum
- WS 2 : ausencia de distopia cantorum
- WS 3 : Anomalías musculoesqueléticas
- WS 4: Enfermedad de Hirschsprung



# Índice de Waardenburg



$$WI = X + Y + (A/B)$$

$$X = [2A - (0.2119C + 3.909)]/C$$

$$Y = [2A - (0.2497B + 3.909)]/B$$

$WI > 2.07$  Síndrome de Waardenburg tipo 1

$WI < 1.87$  Síndrome de Waardenburg tipo 2

Newton VE. Waardenburg's syndrome: a comparison of biometric indices used to diagnose lateral displacement of the inner canthi. Scand. Audiol. 18: 221-223, 1989



# GENETICA DEL SINDROME DE WAARDENBURG

## WS tipo 1 y 3:

Localización: 2q 35

Gen: Pax 3 (8 exones), Piltz y Cols 1993

Factor de transcripción.

Expresión en tubo neural.

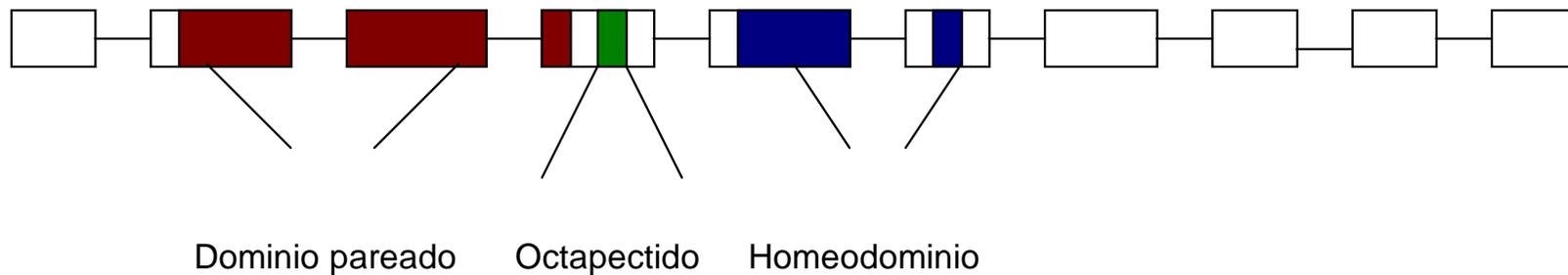
Migración de melanocitos.

44 mutaciones descritas

WS3 : Zlotogora y cols (1995) homocigosidad



# Localización de los dominios al DNA en el Gen PAX3



## WS tipo 2:

Localización: 3p12.3-p14.1

Gen: MITF (9 exónes) Hughes y Cols. (1994).

Gen microftalmia (mi) en ratón.

Diferenciación de melanocitos.

11 mutaciones descritas

## WS tipo 4:

Localización: 13q22

Gen: EDN3 Waardenburg -Shah

Autosómica recesiva.



## Estudios moleculares PCR y análisis de SSCP:

PAX 3: Exón 2 (4%),  
Exón 4 (2%),  
Exón 5 (4%)  
Exón 6 (4%)  
Exón 7 (4%).

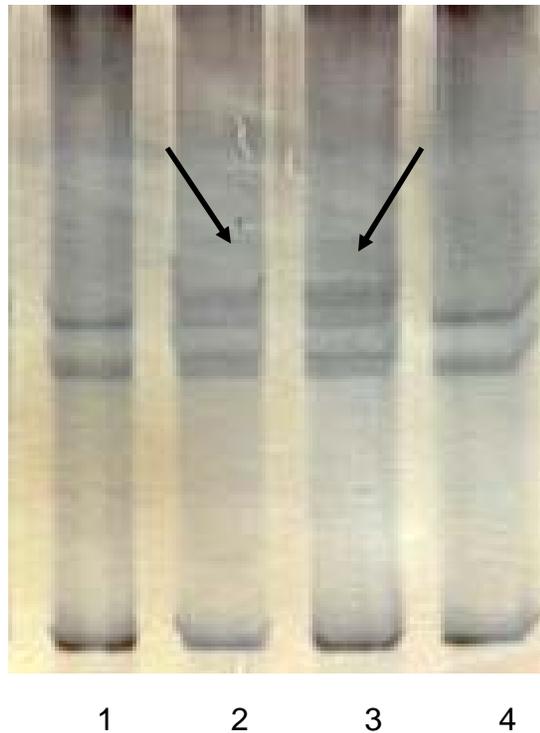
MITF: Exón 1 (1.9 %)  
Exón 9 (15.5%)

## Secuenciación



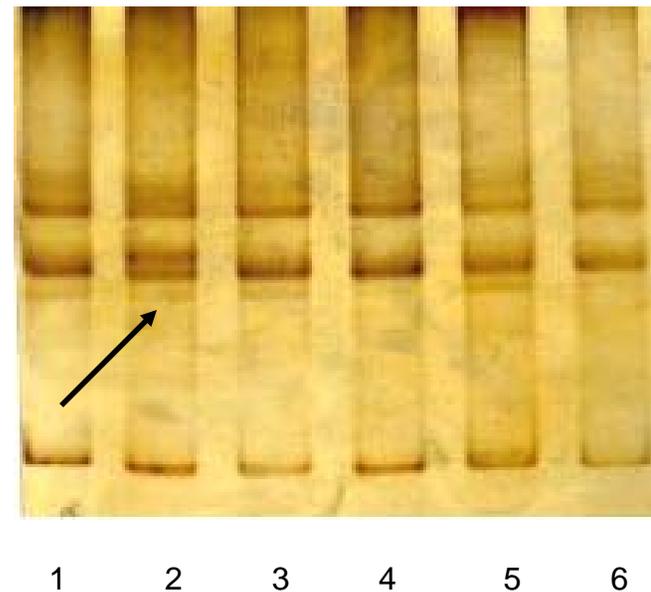
# ANALISIS DE SSCP

## SSCP Exon 2, gen PAX3



Patrones de SSCP en exón 2 gen PAX3.  
(Carril 1, control normal. Carriles 2 y 3, individuos afectados con patrón de migración diferente. Carril 4, individuo afectado con patrón de migración normal.

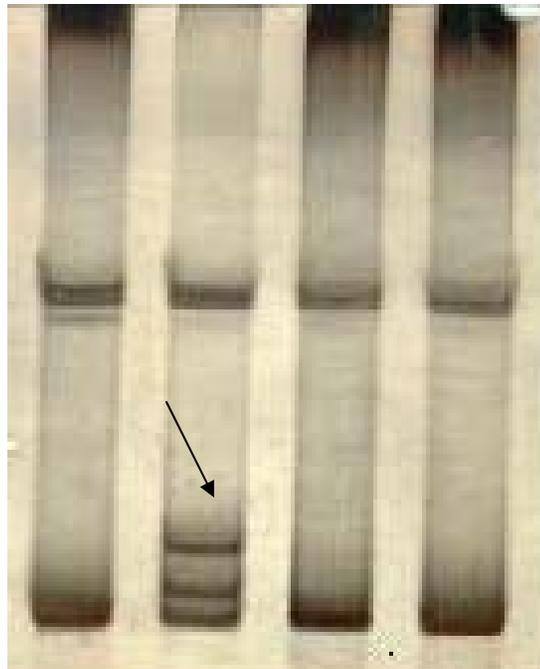
## SSCP Exon 4 , gen PAX3



Patrones de SSCP en exón 4 gen PAX3. (Carril 1, control normal. Carril 2, individuo afectado con patrón de migración diferente. Carriles 3,4,5 y 6, individuos afectados con patrón de migración normal.



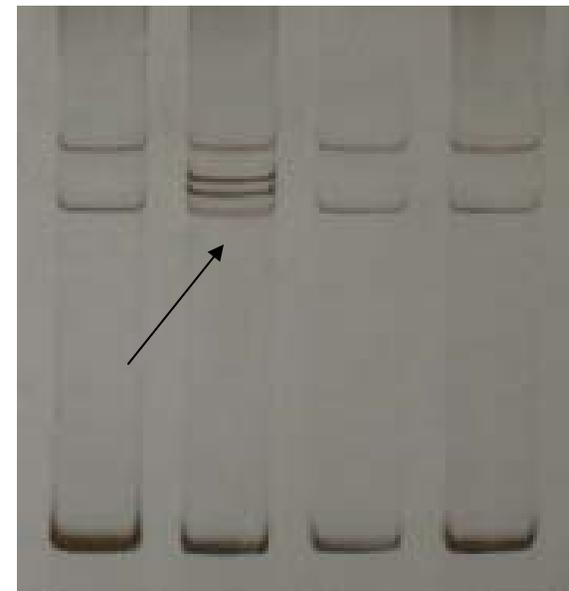
## SSCP Exon 5, gen PAX3



1 2 3 4

Patrones de SSCP en exón 4 gen PAX3. (Carril 1, control normal. Carril 2, individuo afectado con patrón de migración diferente. Carriles 3 y 4, individuos afectados con patrón de migración normal.

## SSCP Exon 7, gen PAX3

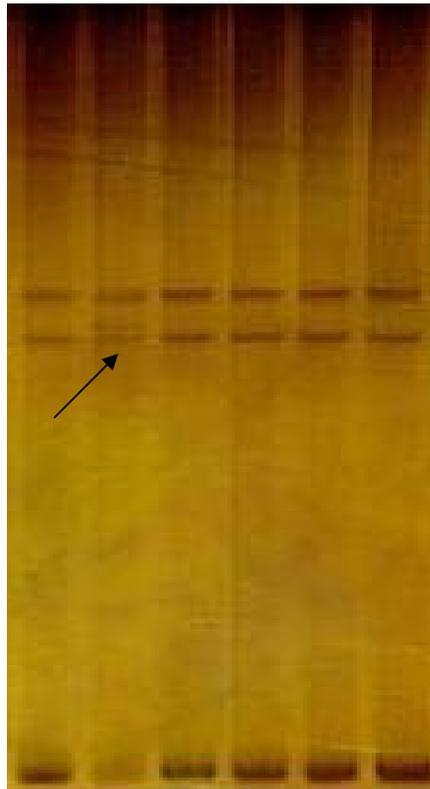


1 2 3 4

Patrones de SSCP en exón 7 gen PAX3. (Carril 1, control normal. Carril 2, individuo afectado con patrón de migración diferente. Carriles 3 y 4, individuos afectados con patrón de migración normal.



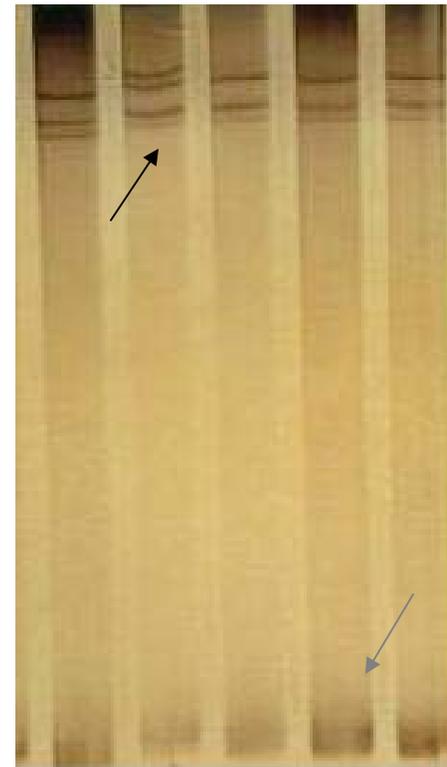
## SSCP Exon 1, gen MITF



1 2 3 4 5 6

Patrones de SSCP en exón 1 gen MITF.  
(Carril 1, control normal. Carril 2, individuo afectado con patrón de migración diferente. Carriles 3, 4, 5 Y 6 individuos afectados con patrón de migración normal.

## SSCP Exon 9, gen MITF



1 2 3 4 5

Patrones de SSCP en exón 9 gen MITF.  
(Carril 1, control normal. Carriles 2 y 4 individuo afectado con patrón de migración diferente. Carriles 3 y 5 individuos afectados con patrón de migración normal

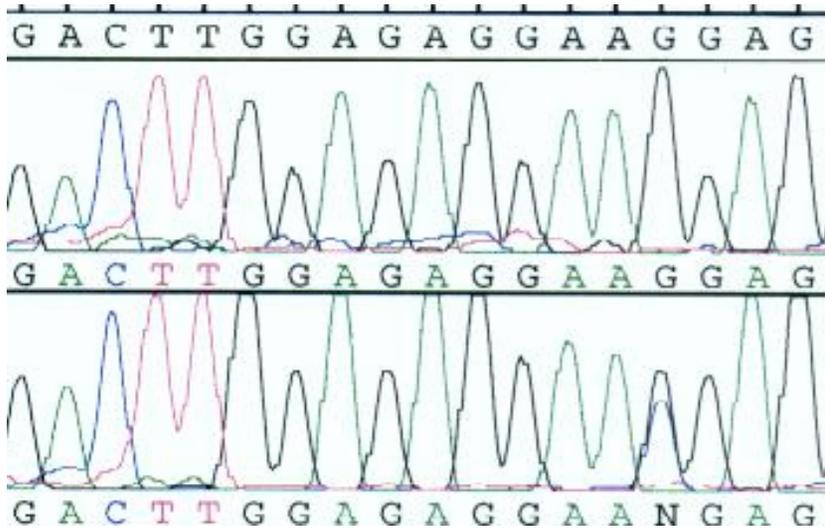


## ANALISIS DE SECUENCIACION MUTACIONES NUEVAS EN EL GEN PAX3

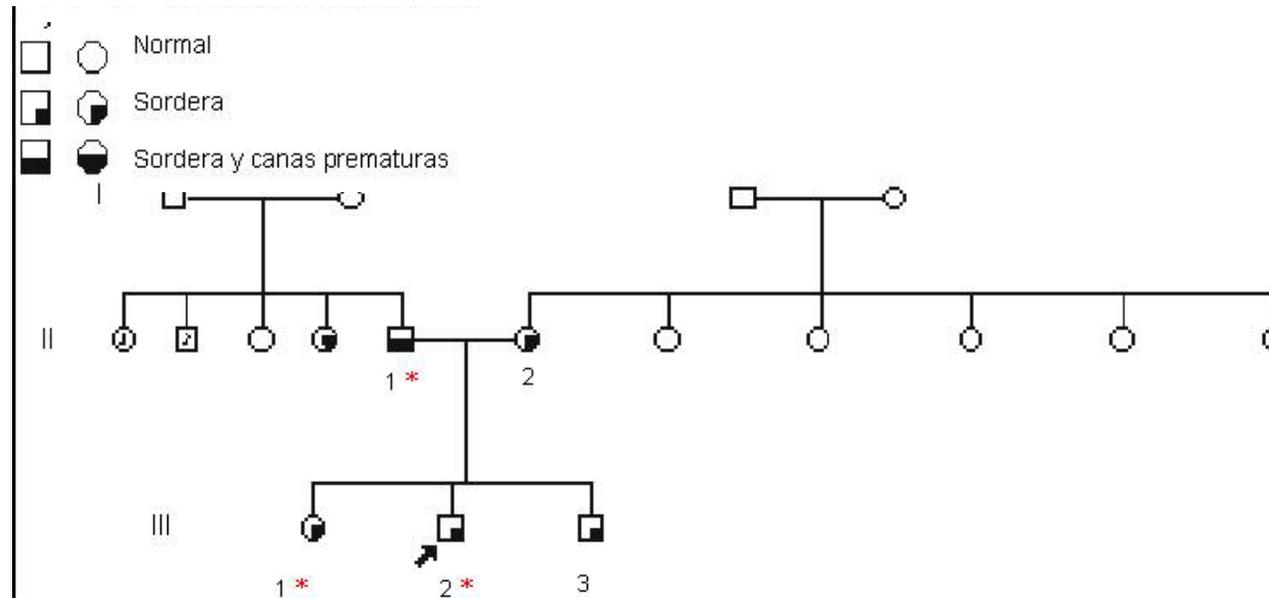
Codón	Exón	Nucleótido	Tipo de Mutación	Aminoácido
48	Exon 2	<b>GGC-AGC</b>	Transición	Gly- Ser
174	Exon 4	<b>AAG-AAC</b>	Transversión	Lys-Asn
242	Exon 5	<b>Del AT</b>	Delección AT (frameshift)	Crea 2 codones más y un codon de parada

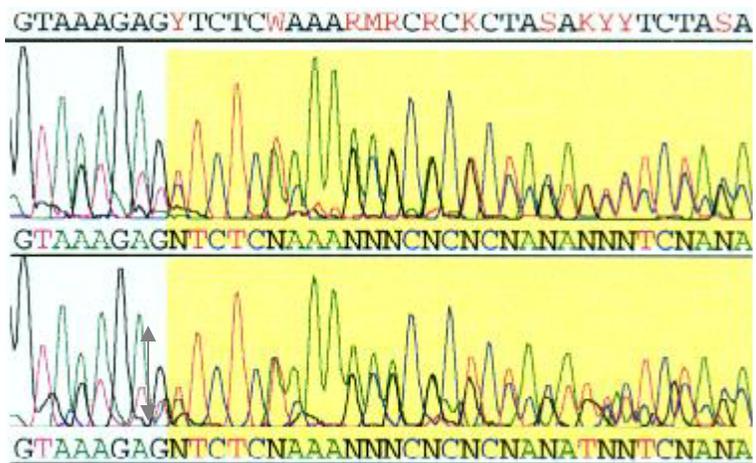






Secuencia exón 4, gen PAX 3.    ⇕    Individuos con mutación K174N en el exón 2 del gen PAX3

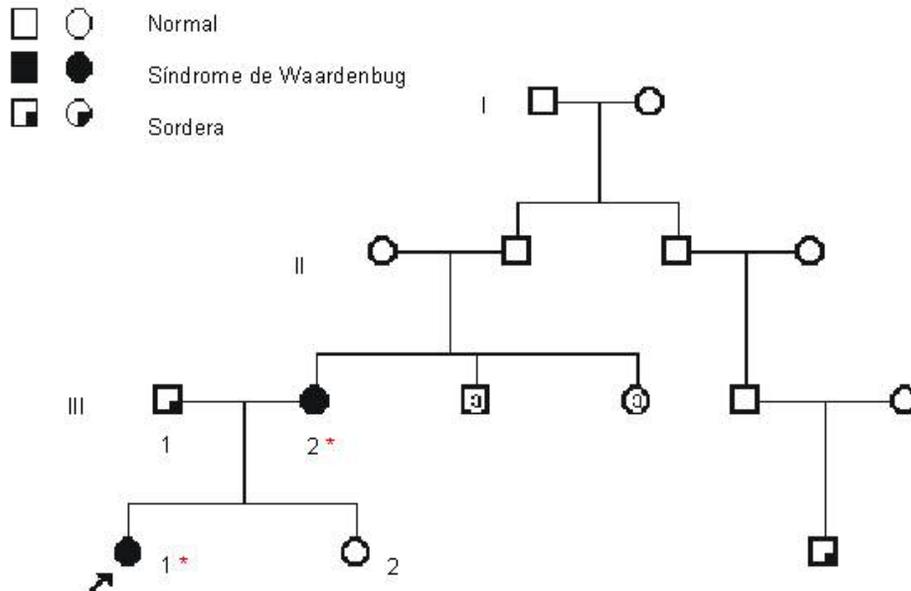




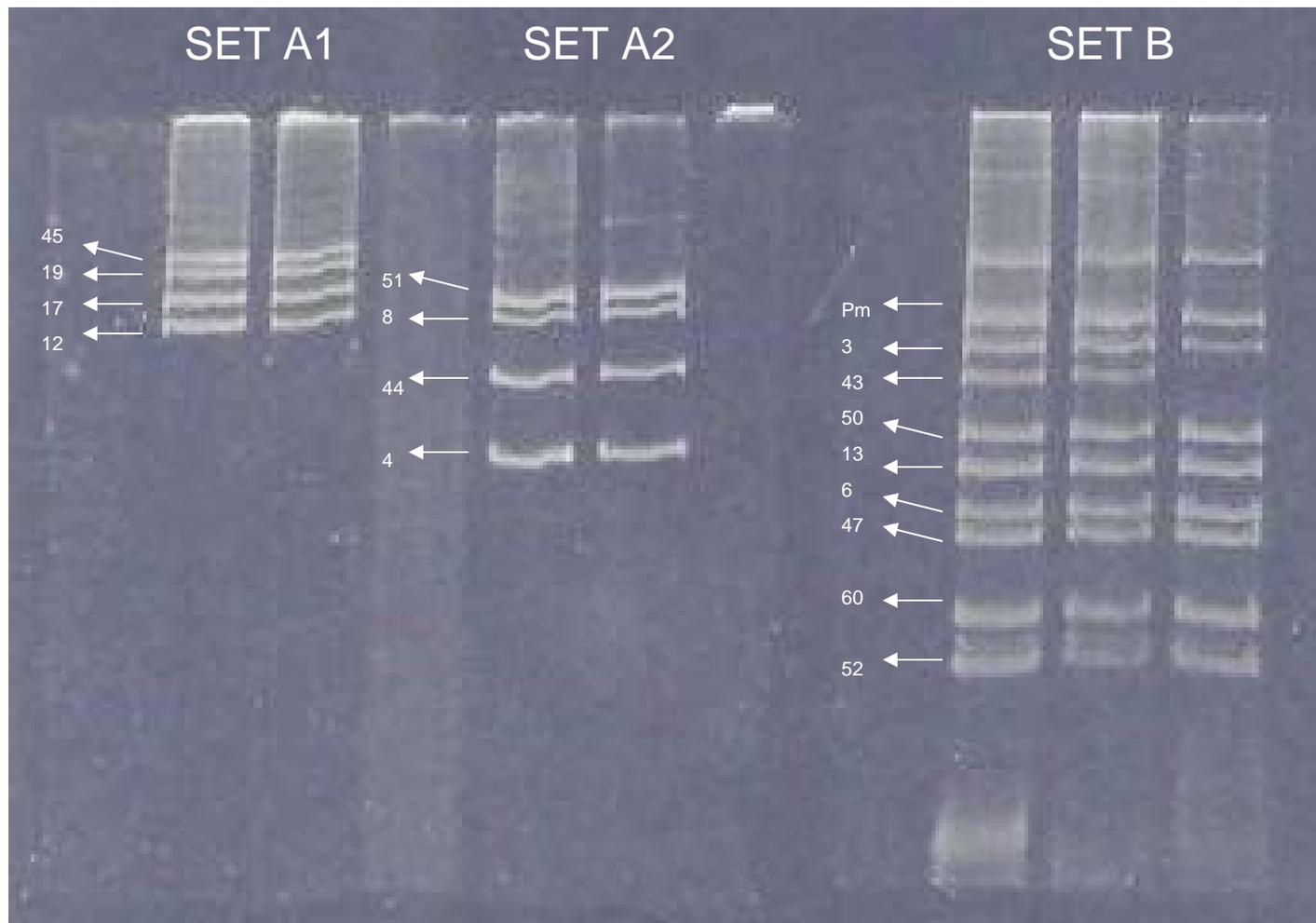
Secuencia exón 5, gen PAX 3.



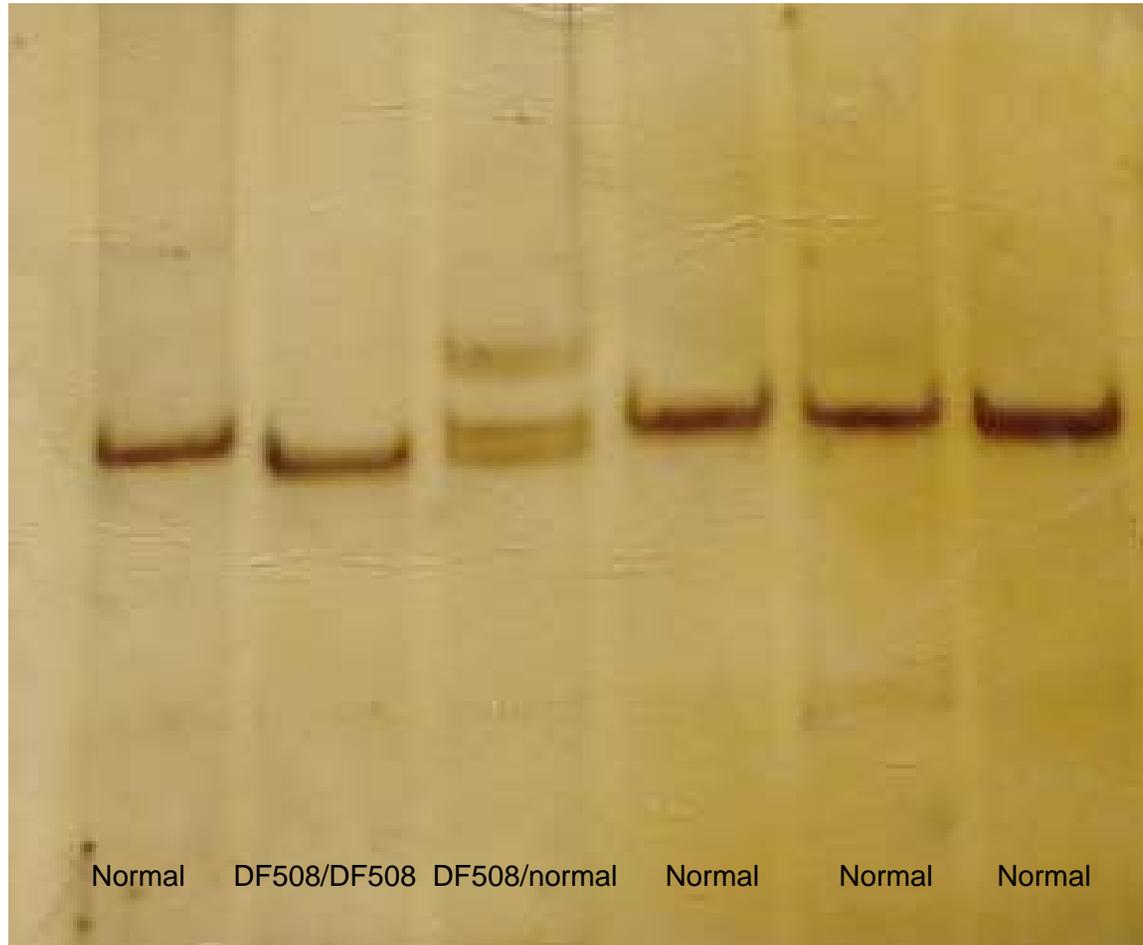
Familia con mutación 248delAT en el exón 5 del gen PAX3



# DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE



# FIBROSIS QUISTICA



# Síndrome de Usher Tipo II- Subtipo USH2A

## Cromosoma 1

