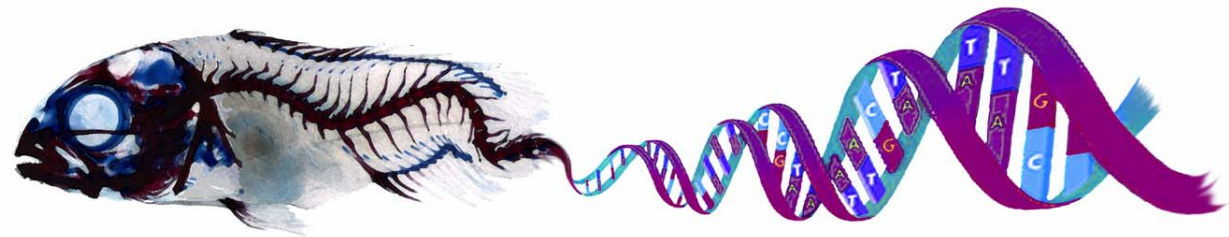


**IRTA**

RECERCA | TECNOLOGIA  
AGROALIMENTÀRIES

# Guía para Principiantes de Biología Molecular Aplicada a la Acuicultura



Karl Andree

IRTA – Sant Carles de la Rapita

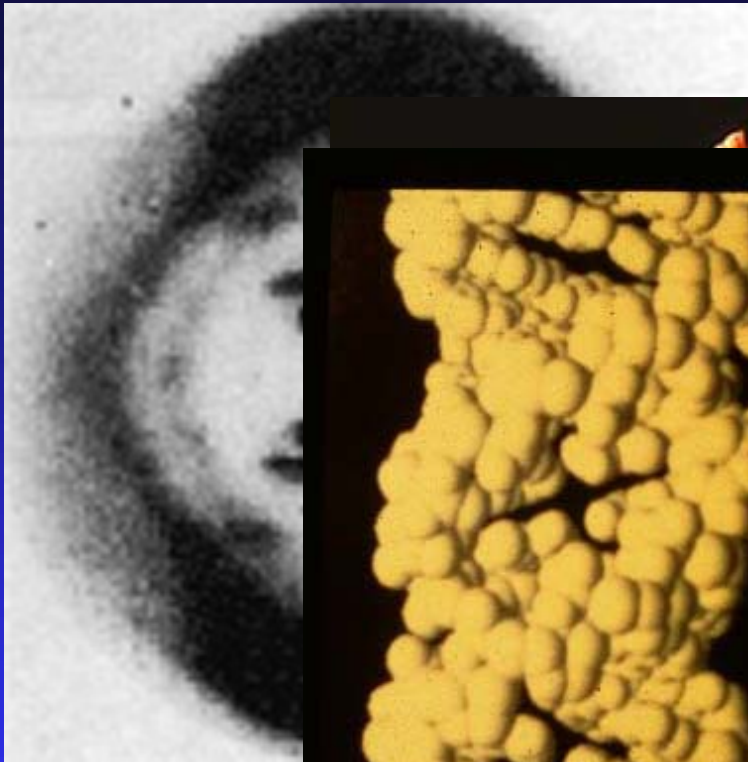


Generalitat de Catalunya  
Departament d'Agricultura,  
Ramaderia i Pesca

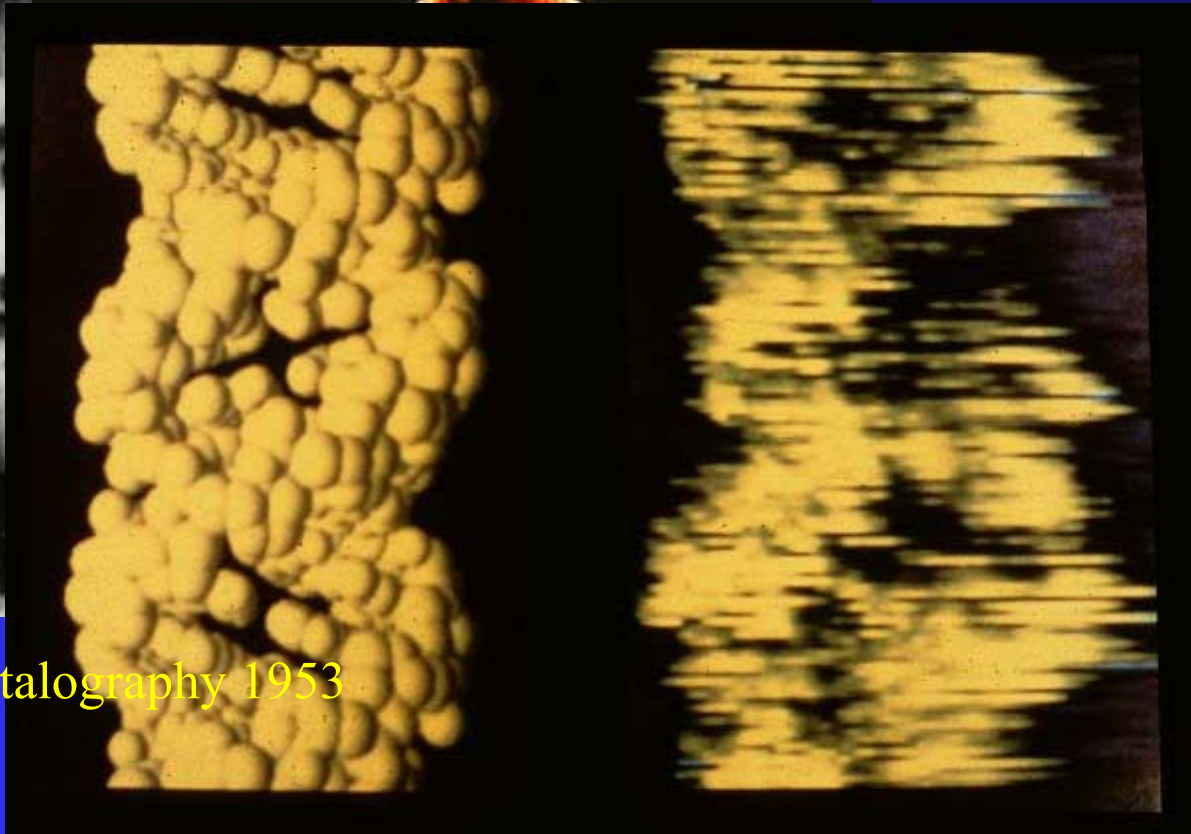
*“Investigant el present, apropant el futur”* [www.irta.es](http://www.irta.es)

# Introducción

- Estructura del ADN y Terminología
- Metodología Básica
  - ◆ Clonación / Secuenciación
  - ◆ Marcadores Génica
  - ◆ Detección Génica
    - ☞ Southern / northern blots
    - ☞ Microarray
    - ☞ PCR y RFLP
  - ◆ Expresión Génica
    - ☞ qPCR (PCR a tiempo real)
    - ☞ northern blots
- PCR: Cómo y Porqué Funciona
  - ◆ Diferentes “sabores” de PCR
  - ◆ Componentes del “cocktail” de PCR
  - ◆ Importancia de la Cuantificación de ADN
  - ◆ Higiene en el Laboratorio

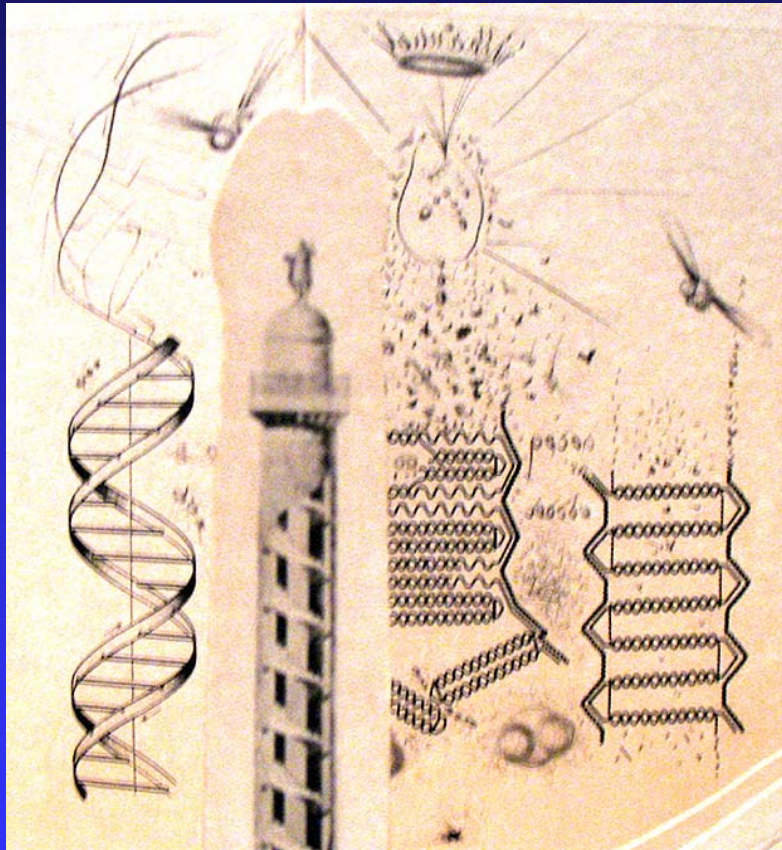


X-ray Crystallography 1953



Scanning Tunneling Microscopy 2003

# DNArt



Detalle de una litografía de Salvador Dalí- 1960's



Póster del Festival de Cine de Los Angeles 2007



## DNA Swarovski crystal entwined champagne flutes.

A set of two delightful champagne flutes with your DNA and your partners DNA profiles wrapped around the stem. A truly stunning wedding or anniversary gift.

**Price £293.74**

Price shown includes VAT

Order Code DGN-0027

USD & EURO prices are calculated based on the current exchange rate.

1

DesigNA product • Questions and answers • Privacy

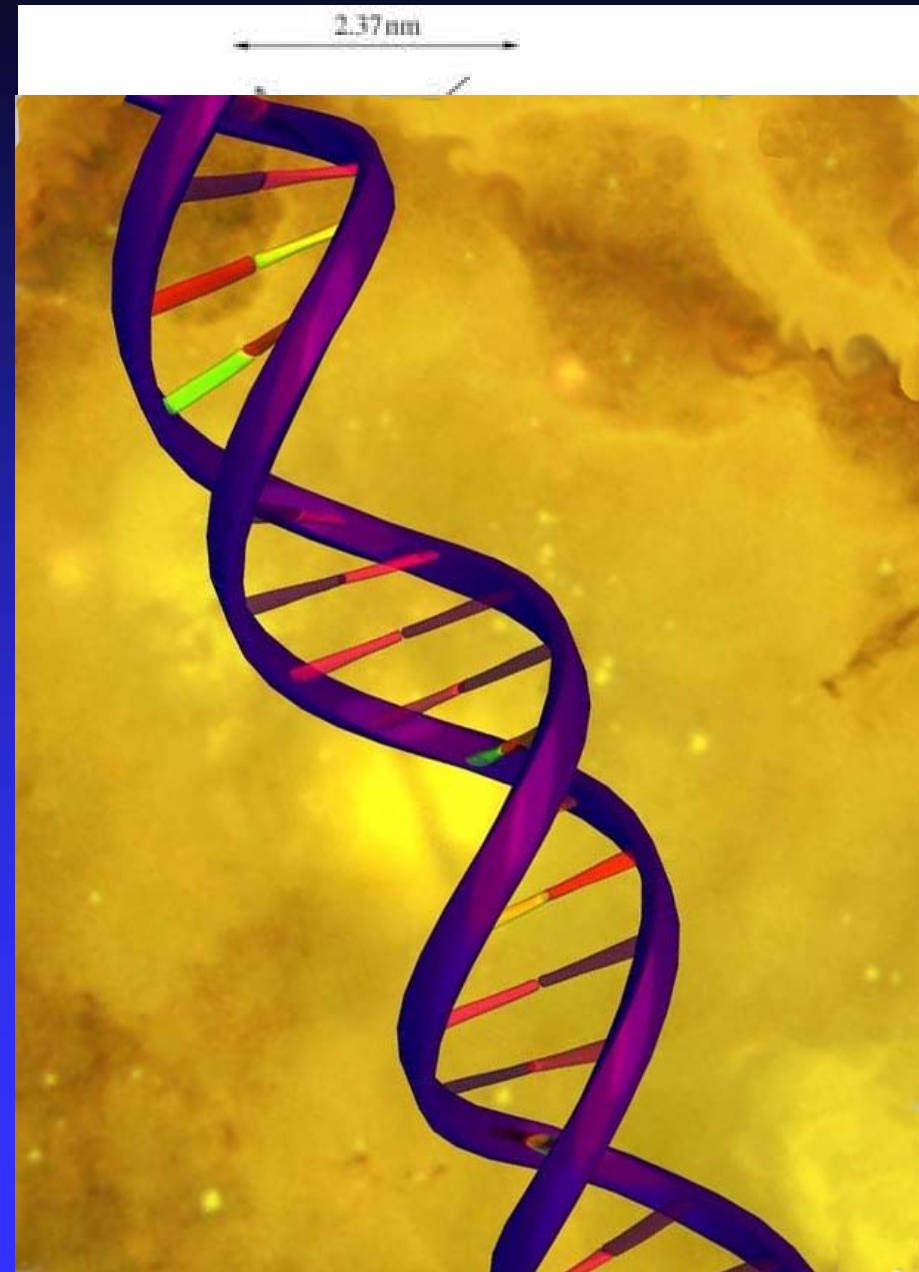
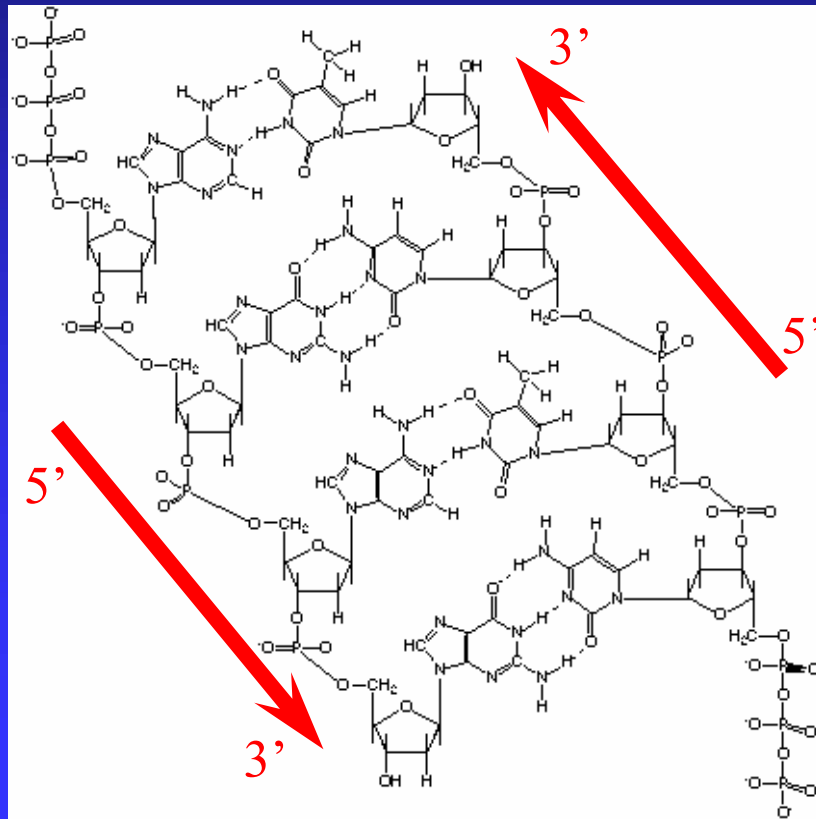


x 147 = €587!!!

A set of two delightful champagne flutes with your DNA and your partners DNA profiles wrapped around the stem. A truly stunning

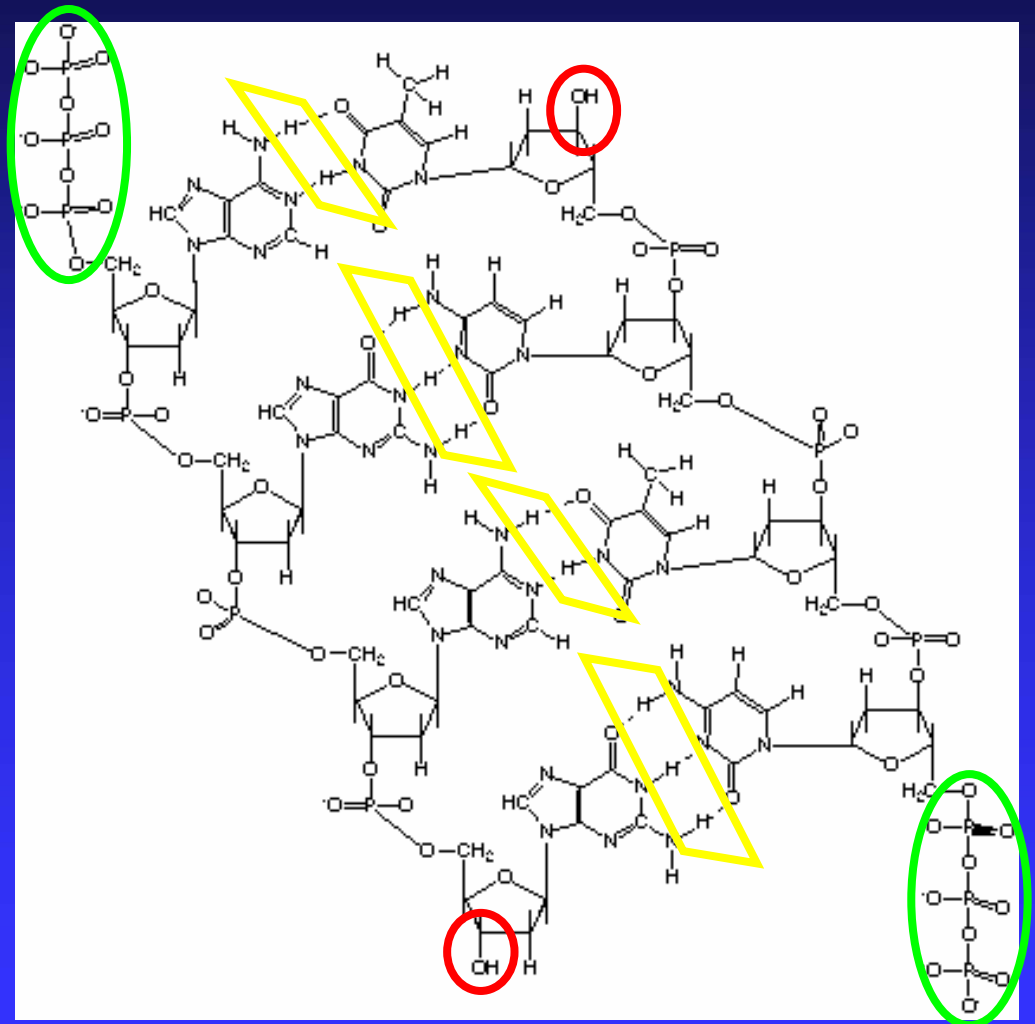
# Estructura del ADN

- Hélice alfa de doble cadena en configuración antiparalela.



# Estructura del ADN

- **Extremo 5'** - grupo fosfato
- **Extremo 3'** - grupo hidroxilo
  - ◆ Necesario para la extensión de la molécula de ADN.
- **Puentes de H** en forma de “cremallera”
  - ◆ Las dos hebras se mantienen unidas por puentes de H.
  - ◆ T/A = 2 enlaces
  - ◆ G/C = 3 enlaces
- Purinas: Adenina, Guanina
  - ◆ Anillo doble
- Pirimidinas: Citosina, Timina
  - ◆ Anillo sencillo



# Terminología Básica

- **Coding Strand (sentido)** - la secuencia se muestra de izquierda a derecha de 5' a 3'
- **Non-coding Strand (antisentido)** - la secuencia normalmente se representa de izquierda a derecha de 3' a 5', aunque puede mostrarse en sentido contrario
  - ◆ El ARNm se copia a partir de esta cadena de forma que la secuencia final del ARNm es la misma que la de la cadena codificante
  - ◆ El ADNc se sintetiza a partir del ARNm, usando transcriptasa inversa, por tanto es un duplicado de la cadena no codificante

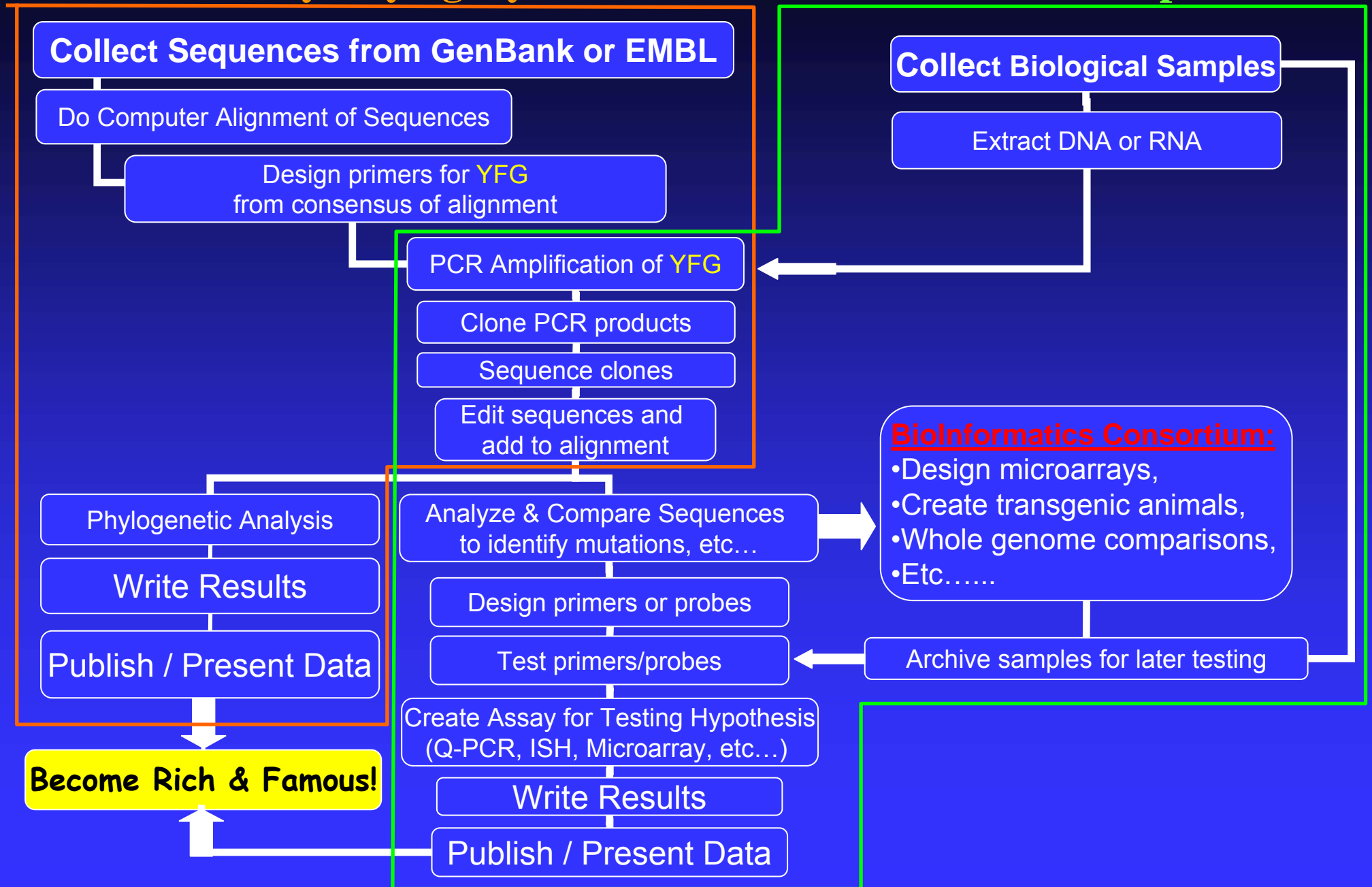
```
5'- CAATGATGGTATGGAATTCCTGCAGGGGCCCCTAG -3'  
3'- GTTAC TACCATACCTTAAGGACGTCCCCGGGATC -5'
```

- **Reverse Complement Strand (o Complement Strand)** es la secuencia opuesta que se aparea a la cadena de referencia, mientras que la **Reverse Strand** es la misma secuencia que la cadena de referencia escrita con la polaridad opuesta...

```
5'- CTAGGGCCCCTGCAGGAATTCATACCATCATTG -3'
```

## Taxonomy/Phylogeny

## Gene Detection/Expression





# Clon

- Def.: - una célula, producto celular u organismo que es genéticamente idéntico a la unidad o individuo del que procede.
- Los clones se pueden guardar en genotecas que representan la totalidad o una fracción del genoma de un organismo.
- Las técnicas de PCR o *DNA splicing* son métodos para el aislamiento de fragmentos específicos de ADN clonado.
- Los plásmidos, los virus, y cromosomas artificiales (YACs, BACs) se usan como vectores para la duplicación de ADN clonado y para asegurar un archivo estable de la secuencia.
  - ◆ *DNA splicing* (mediante enzimas de restricción) es un método común para la inserción de ADN clonado en un vector.
  - ◆ también los vectores “TA”, basados en la actividad polimerasa no específica de la polimerasa de ADN Taq, son comunes.

# Enzimas de Restricción

(la “R” en RFLP)

- Aisladas a partir de bacterias que las usan como una forma de sistema inmunológico molecular para destruir ADN vírico
  - ◆ El Premio Nobel de Medicina de 1978 fué concedido por su descubrimiento
  - ◆ Inició la época del ADN recombinante
- El nombre de cada enzima proviene del de la bacteria a partir de la que se aísla (ej. – Sex AI → Streptomyces exfoliata)
- Las enzimas más comunes en biología molecular son las que reconocen secuencias de nucleótidos palindrómicas de 4-6 pb (ej. – Eco RI  $\begin{matrix} 5'-G AATTC-3' \\ 3'-CTTAA G-5' \end{matrix}$  )
- Cada enzima sólo corta en su sitio de reconocimiento específico
  - ◆ Restriction Fragment Length Polymorphism .....más después

# Felicidades! Ya Tienes Clones!

- Después de la clonación → Secuenciación
- La secuencia de ADN se puede emplear para:
  - ◆ Localizar regiones de ADN distintivas tales como:



- Secuencias microsatélite
- **SNP's** (*single nucleotide polymorphisms*)
- Sitios de restricción
- or identificar **YFG**

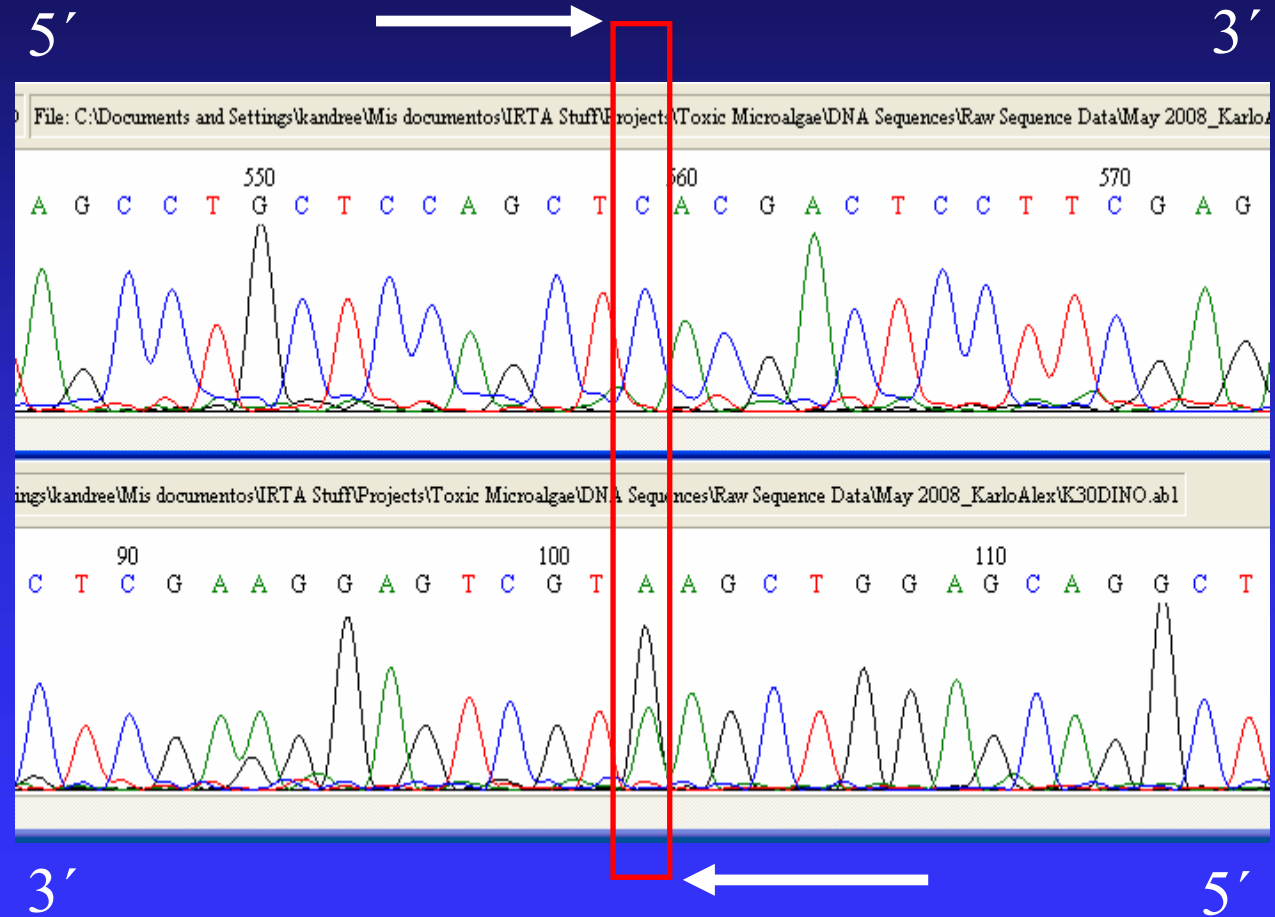
- Todo ello es útil para diseñar sondas / cebadores (*primers*) para northern blots, southern blots, PCR o microarrays

# Bibliotecas de Genes y Secuencias de ADN

- Diferentes tipos de genotecas de ADN...
  - ◆ genoteca genómica— muchos clones, cada uno contiene un fragmento de ADN genómico de un organismo
  - ◆ genoteca de cDNA—ADN complementario derivado de ARN
    - ☞ genoteca EST — expressed sequence tag, a partir de una genoteca de cDNA
  - ◆ genoteca de microsatélites— (más después....)
- La secuenciación puede ser de una cadena o de doble cadena
  - ◆ Secuencia consenso - Se secuencian ambas cadenas y el consenso consiste en aquellas bases que se leen por igual en ambas cadenas
  - ◆ ESTs son ejemplos de lectura de una sola cadena
  - ◆ **CDS** (coding sequence) — ADN transcrito a proteína
    - ☞ **ORF** (open reading frame) — igual a CDS pero incluye porciones del gen que no son traducidas

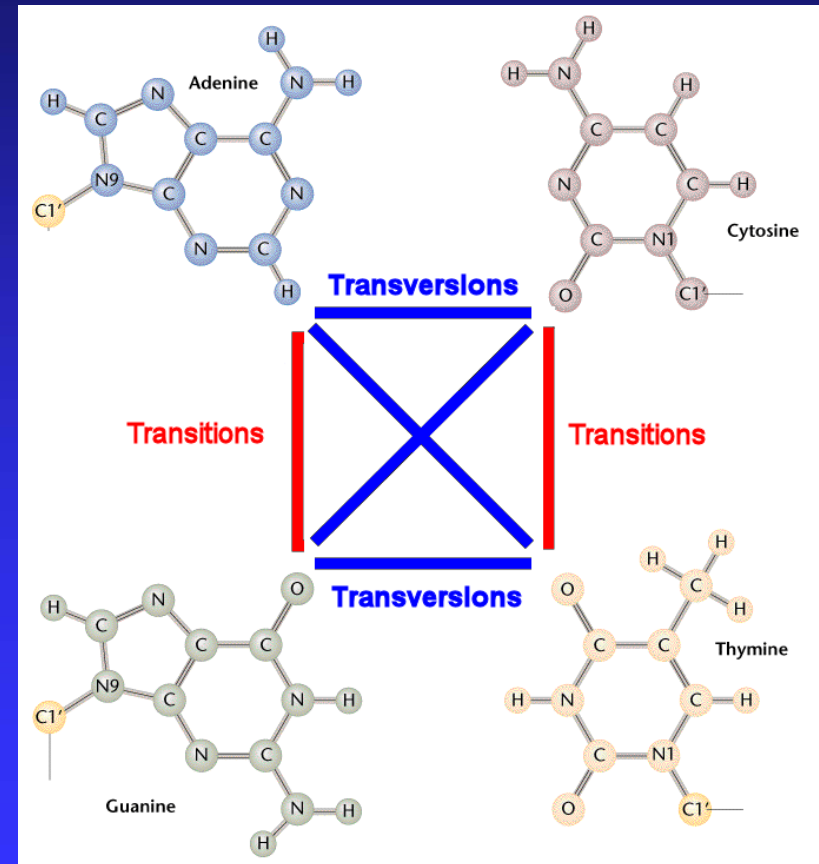
# Secuenciación de ADN

- Las secuencias de ADN son generadas por máquinas
  - ◆ Las máquinas también cometen errores
  - ◆ Lee ambas cadenas y comprueba visualmente tus datos!



# Filogenia y Secuenciación de ADN

- Identificar la secuencia – **BLAST**  
(**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool)  
GenBank del NCBI
  - ◆ Usa la secuencia consenso
- Alinear la secuencia - Clustal W
- Corregir manualmente
  - ◆ transición vs. transversión
  - ◆ Huecos extras
- Análisis Filogenéticos
  - ◆ *Neighbor Joining*
  - ◆ *Maximum Parsimony*
  - ◆ *Maximum Likelihood*
  - ◆ *Bayesian Method*





# I. Detección de Genes

## ■ Southern Blot & Northern Blot

- ◆ Hoy qPCR prácticamente ha reemplazado a los northern blots

## ■ Microarray

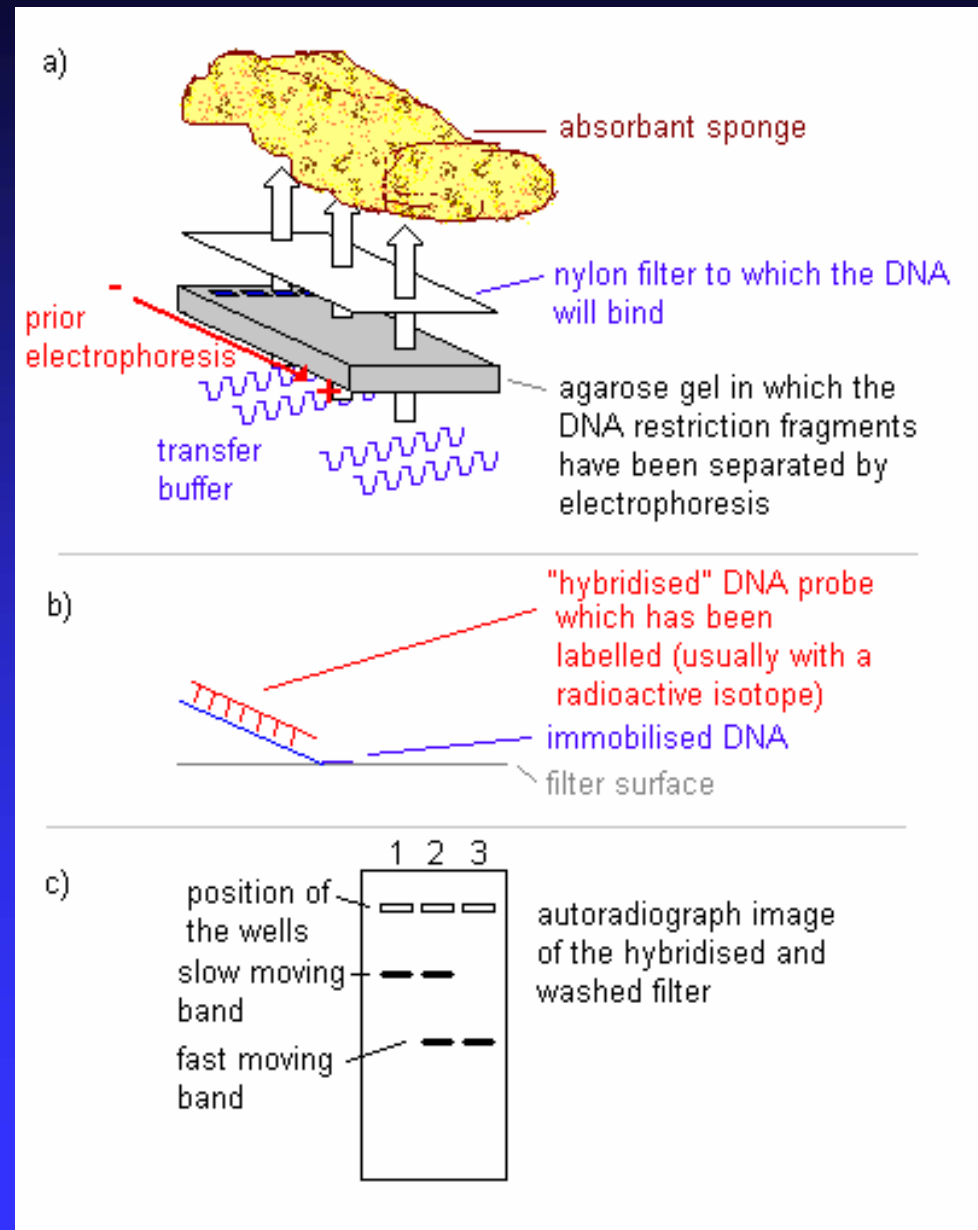
- ◆ puede detectar diferencias grandes de expresión génica entre muestras a baja resolución
- ◆ a menudo se usa para identificar genes de interés para experimentos de alta resolución o estudios de expresión génica con qPCR

## ■ PCR y Marcadores de Genes

- ◆ muchos tipos: anidada (*nested*), RT (*reverse transcription*), cuantitativa (qPCR), inversa, etc...
- ◆ Puede estar seguida por análisis RFLP, secuenciación o transferencia (*blotting*)

# Southern y Northern Blots

- Southern - ADN (Edwin Southern:1975)
- northern - ARN
- Ambos métodos:
  - ◆ separación electroforética
  - ◆ transferencia mediante absorción a una membrana cargada para blotting
  - ◆ Hibridación de sonda marcada para la detección de YFG
- Hibridación *In Situ* (ISH)
  - ◆ Emplea tejidos enteros en lugar de ácidos nucleicos separados en un gel



# Microarrays - DNA Chips

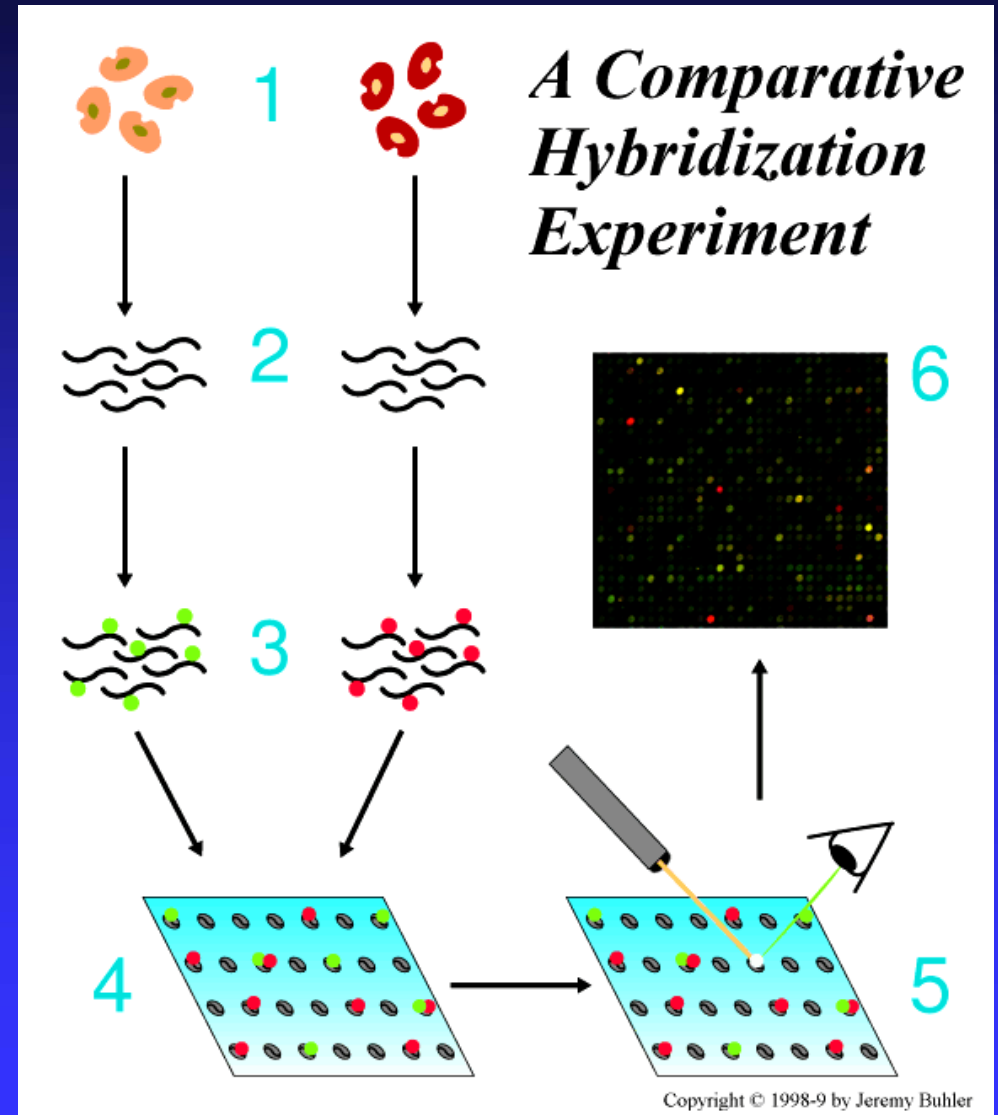
- Matrices de alta densidad para genoma completo
  - ◆ Dos matrices (*chips*) son suficientes para el genoma humano ⇒ (70,000 ESTs /chip)
- Usados para la identificación de genes que se expresan de forma diferente
- Caro de desarrollar porque requiere:
  - ◆ Equipo especializado
  - ◆ Conocimiento previo sobre todo el genoma, o una genoteca de ADNc completa



# Diseño Experimental del Microarray

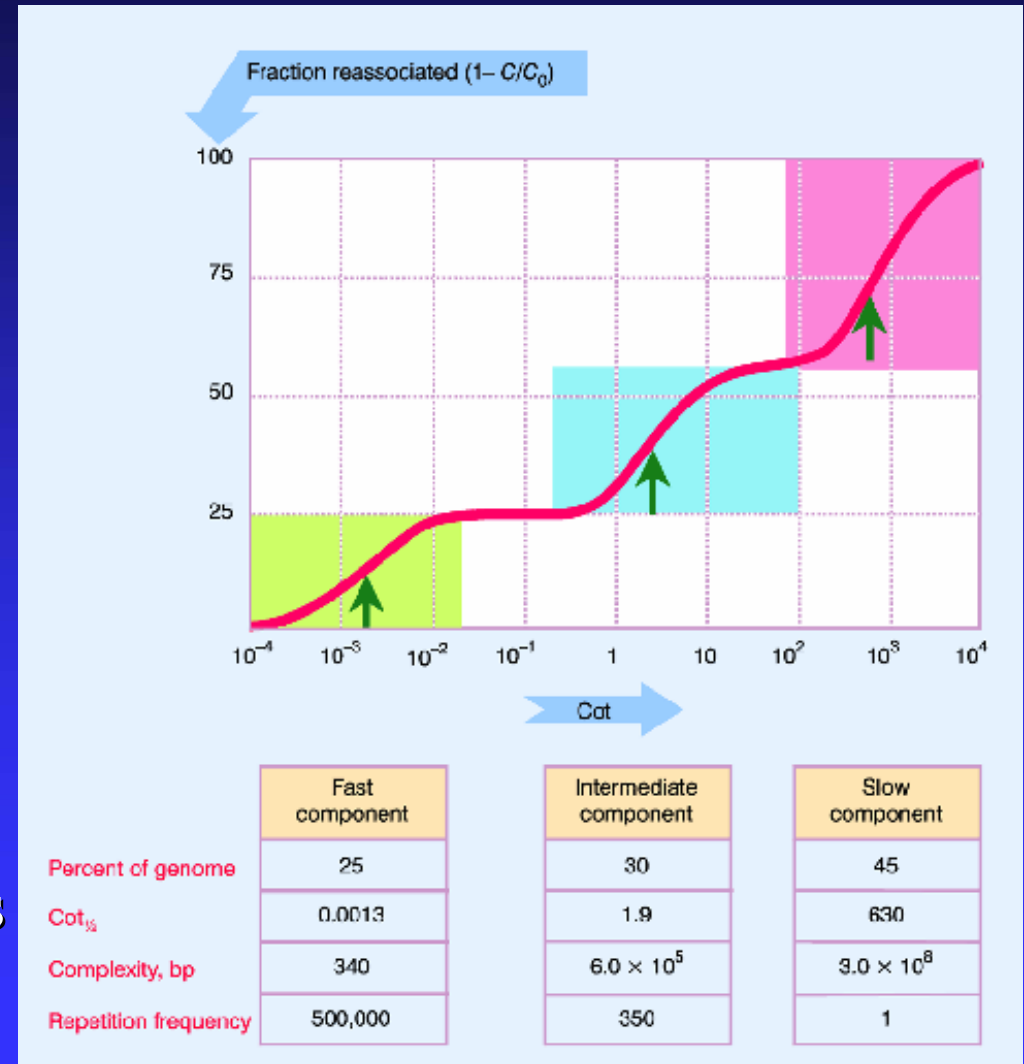
- Purificación del ARN de cada población celular o grupo de tratamiento
- Obtención de ADNc mediante transcripción inversa usando marcaje fluorescente
- Hibridación al chip que contiene 70,000 fragmentos de genes
- Inspección mediante excitación por láser de “tags” fluorescentes y una cámara CCD de alta resolución
- Análisis asistido por ordenador de los resultados (eg: Bio-LIMS)

Biological Laboratory Information Management System

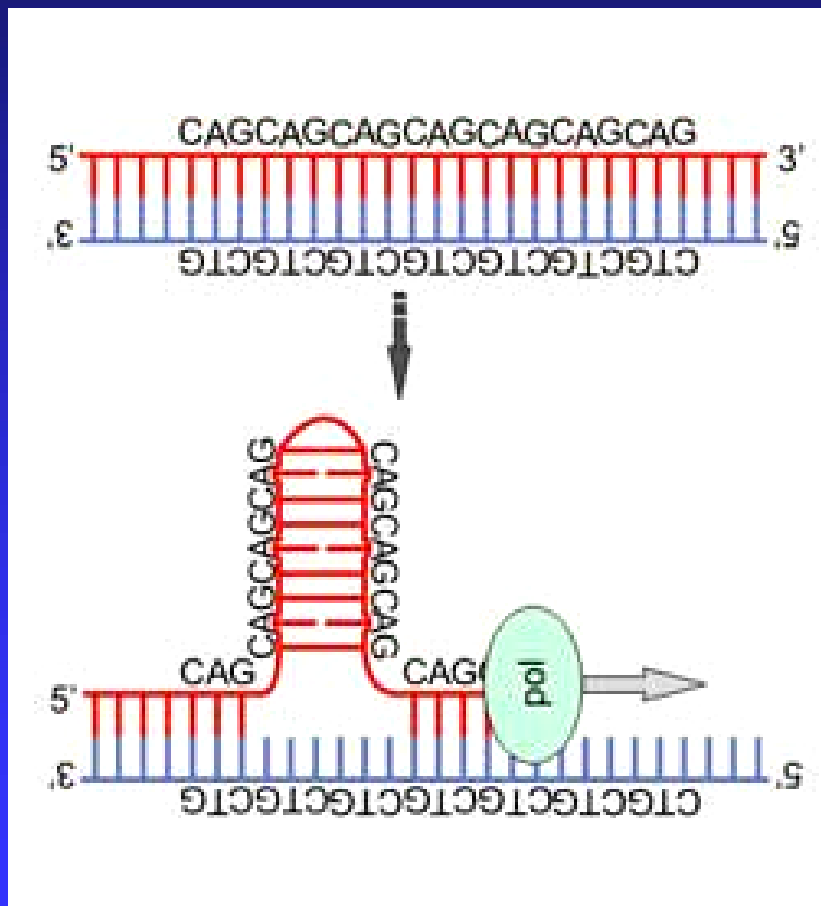


# ADN Microsatélite

- Secuencias de ADN altamente repetitivas descubiertas usando “curvas Cot” (Britten & Davidson 1960’s)
  - ◆ Romper el ADN en fragmentos de 400 - 500 pb
  - ◆ Calentar el ADN para desnaturalizarlo y obtener cadenas sencillas
  - ◆ Enfriar lentamente y tomar muestras a distintos tiempos
- Sólo una inflexión en una curva Cot creada con ADN bacteriano—no microsatélites!
- Debido a la alta incidencia de mutación y la multiplicidad de los alelos



# Mecanismo para la Diversificación de Alelos: "Slip-strand Mispairing"



Antes: 9 copias

5' CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG 3'  
3' GTCGTCGTCG TCGTCG TCGTC GTCGTC 5'



Después: 13 copias

5' CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG 3'  
3' GTCGTCGTCG TCGTCG TCGTC GTCGTC GTCGTCGTC GTC 5'

# Microsatélites

- también llamados Simple Sequence Repeats (SSRs) o Variable Number Tandem Repeats (VNTRs), son loci polimórficos presentes en ADN nuclear y organelar que consisten en unidades repetidas de 1-4 pares de bases de longitud
- debido a la alta incidencia de mutación y la multiplicidad de los alelos son útiles para realizar comparaciones genéticas intra-especies de alta precisión
- los ensayos pueden resultar caros de desarrollar si no se conoce la secuencia genómica
- constituyen una herramienta relativamente barata de usar para estudios de poblaciones o de paternidad
- Son útiles como marcadores en Quantitative Trait Loci (QTL) para reproducción selectiva

Forward Primer →

0 - GAATTCCGGGGTCCTTCCCAGACACG TGTGTGTGTGTGAGTGTGTGTGTG -50

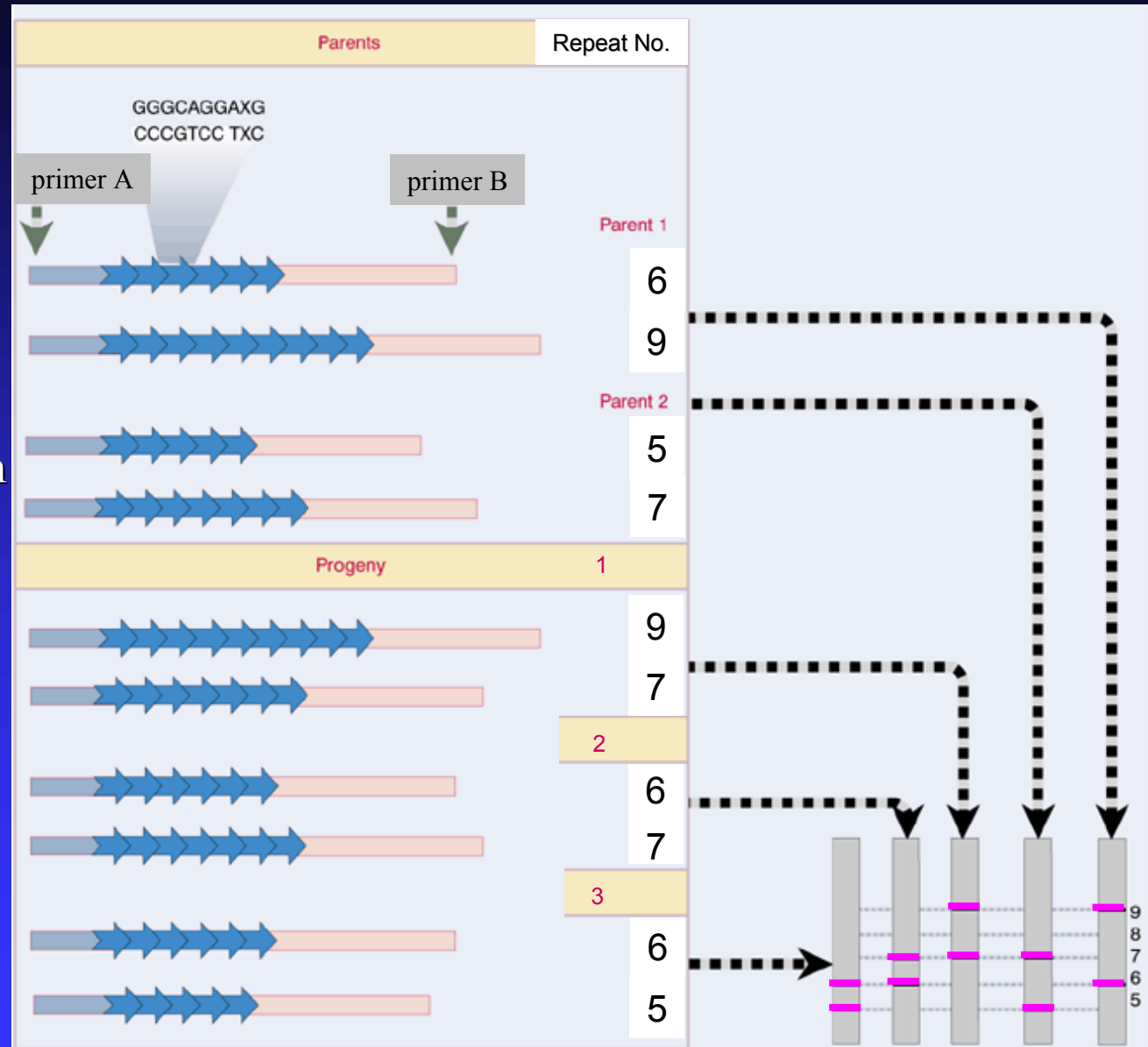
51- TGTGAGTGTGGTGGTTTGCCTTATTCAGTGGTGCCACTCCATCATGCGAG -100

← Reverse Primer

# Alelos

## Microsatélite

- el tamaño de los alelos es normalmente pequeño: 50-500 pb
- la existencia de un número alto de alelos hace que sean muy útiles en estudios de poblaciones
- la técnica analítica se basa en PCR
- fácilmente adaptable a la mayoría de laboratorios, también puede ser subcontratada a través de diversas compañías de biotecnología





# Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

- Las secuencias génicas pueden ser inferidas mediante el uso de enzimas de restricción y sus secuencias de restricción correspondientes
- Se comparan fragmentos de ADN procedentes del ADN genómico completo o fragmentos amplificados mediante PCR
  - ◆ se compara ADN cortado vs. ADN sin cortar, y se compara entre especies realizando digestiones con diferentes enzimas de restricción

Diferenciación de *Maja spp.* – M.b. contiene el sitio Ase I, pero no M.sq.

	200	210	220
Msquinado CO1	CCATAAGAACGTA	TGTTAATCACAGTAGTTAAA	
Mbrachydactyla	CCATAAGAACGTA	ATTAATCACGGTAGTTATA	

M.b. CO1 fragment: 680 bp ÷ Ase I = 210 bp + 470 bp

Ase I

# Whole Genome RFLP

- Limitado a virus y bacterias

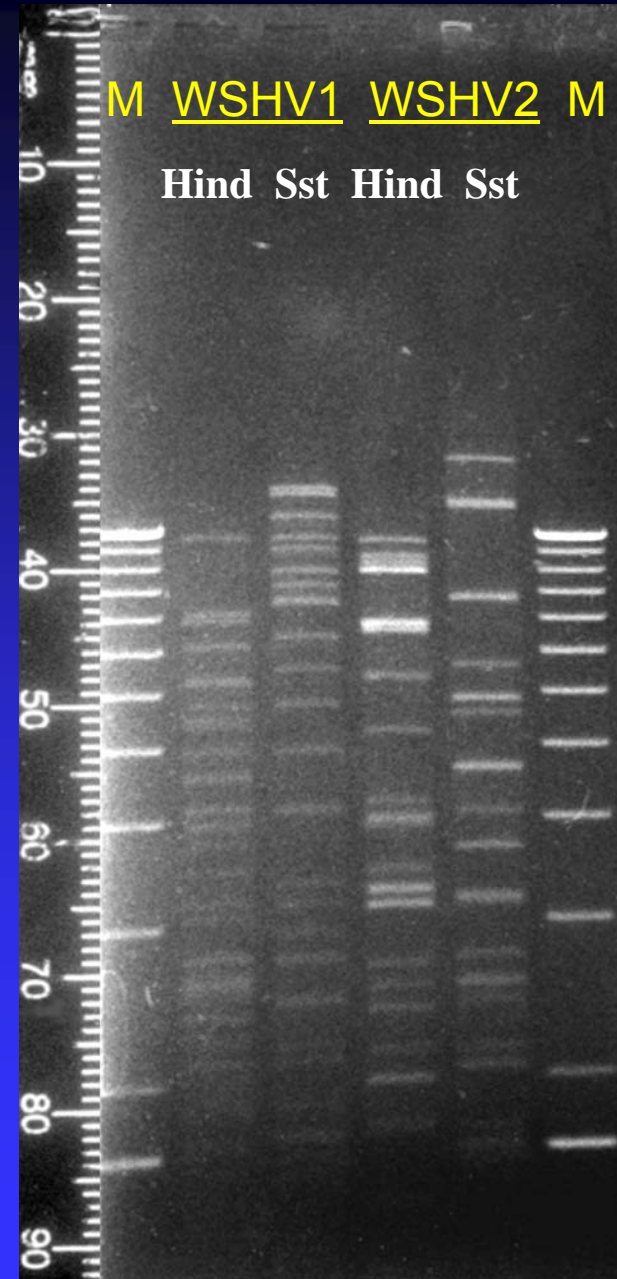
## White Sturgeon Herpes Virus

### ◆ WSHV 1 & WSHV 2

- ☞ 1 µg ADN para cada digestión
- ☞ Cortado con Hind III & Sst I

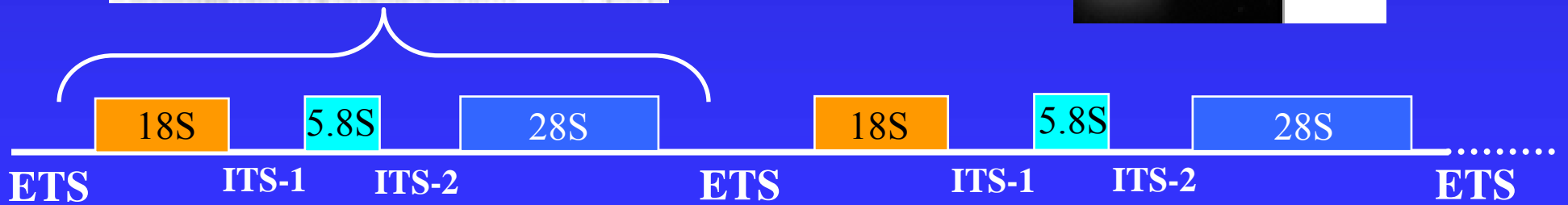
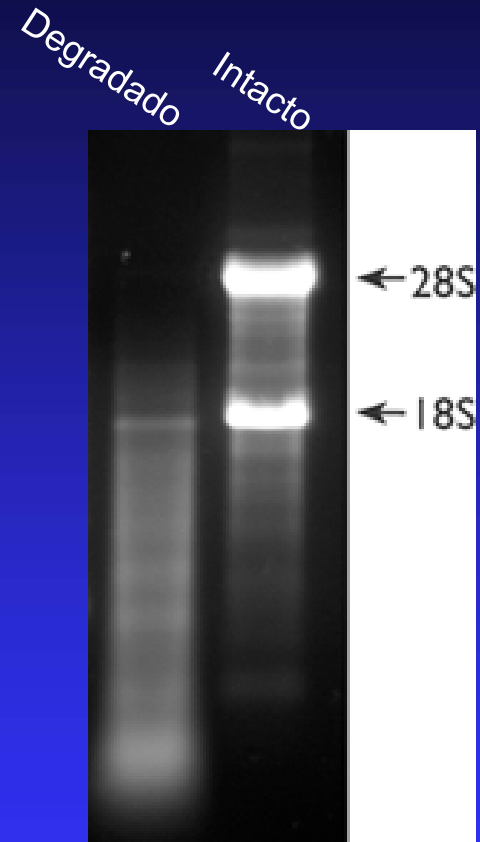
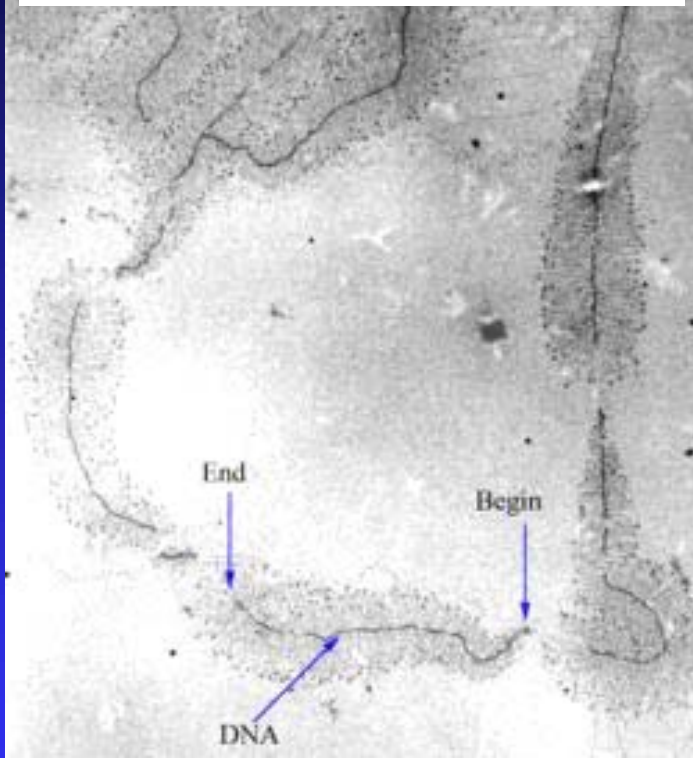
### ◆ Estimación del tamaño genómico:

- ☞ WSHV 1 = 132,770 pb
- ☞ WSHV 2 = 123,590 pb



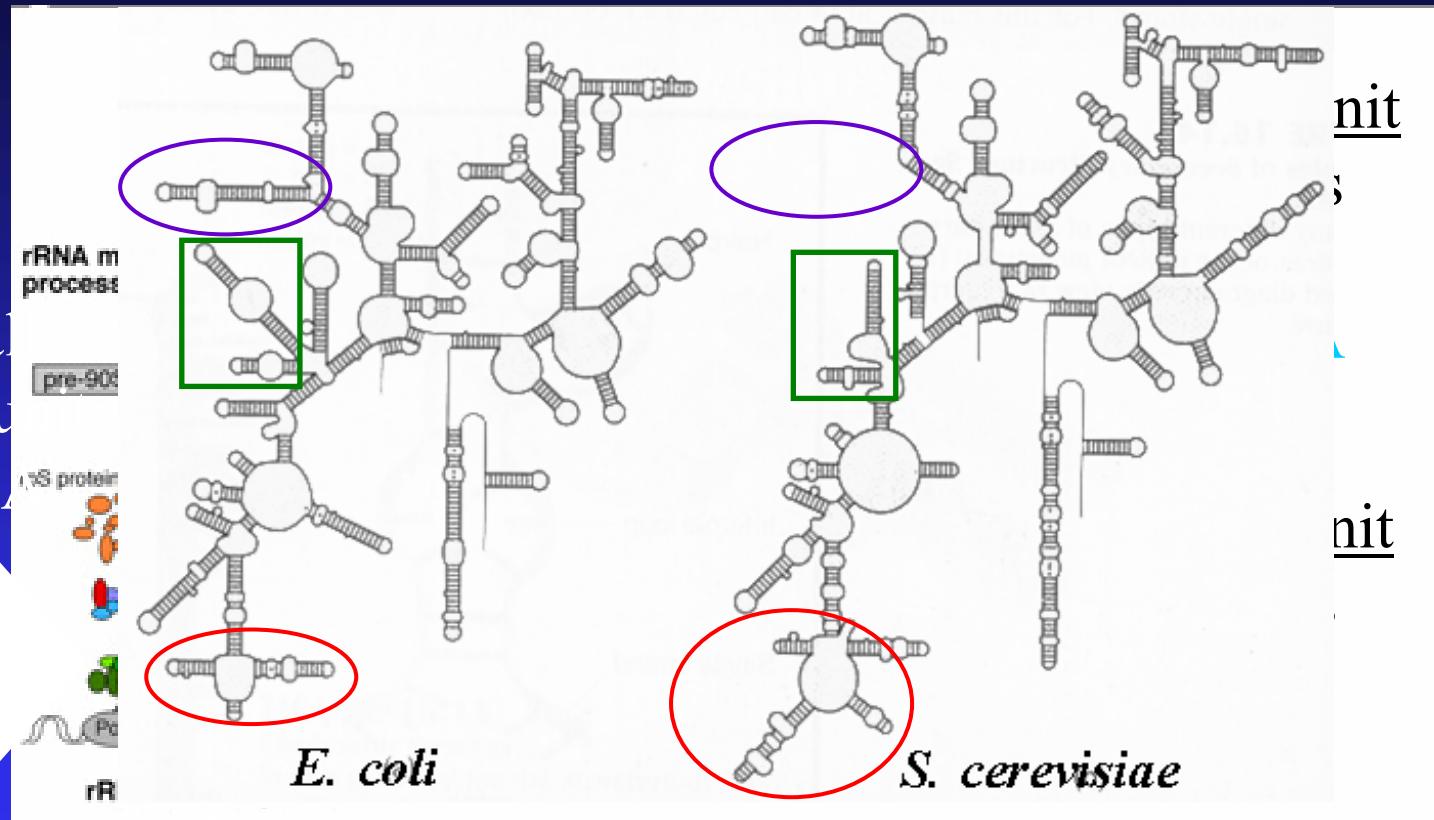
# ADN Ribosomico

TEM Imagen de transcripción



# ADN Ribosomico

Small  
Subunit  
rRNA

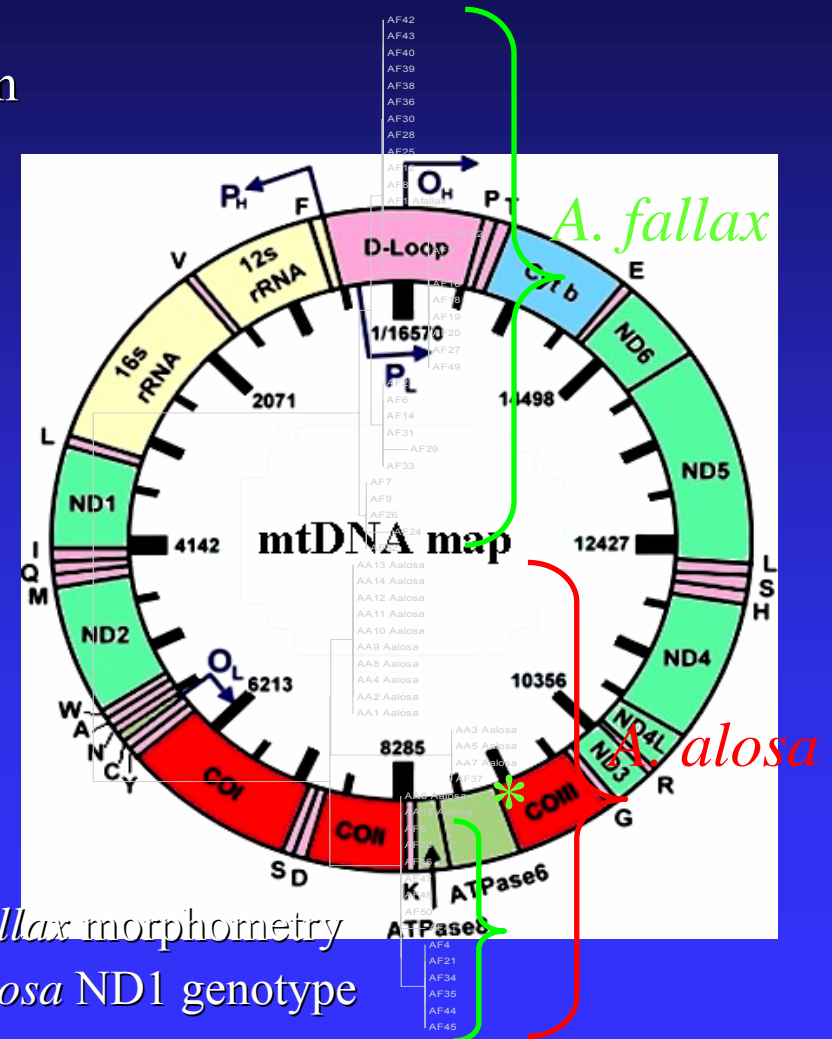


# Secuenciación Mitocondrial

- Heredado sólo a través de la línea materna
  - ◆ secuencias altamente conservadas, pero también alta tasa de mutación dentro de linajes
- <http://mitofish.ori.u-tokyo.ac.jp/>
  - ◆ base de datos de ADN mitocondrial para especies de peces

## *Alosa fallax* del Río Ebro

- ◆ Demostrada la hibridación con *Alosa alosa* usando secuenciación ND1



# II. Expresión de Génes

- Medida del gen target y del gen control endógeno (“house-keeping”) para su comparación
- Diferentes tipos de análisis:
  - ◆ Cuantificación absoluta
  - ◆ Cuantificación relativa

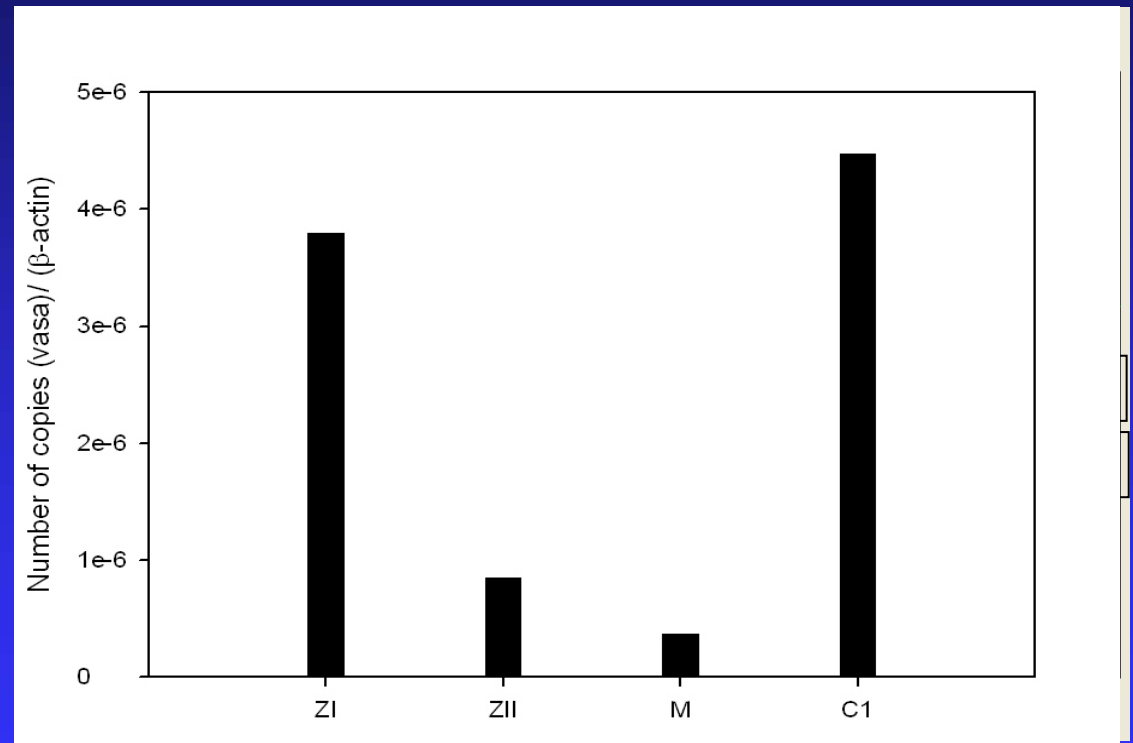
☞ Diferentes métodos para cálculos de expresión relativa:

- $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$
- Método de la Curva Standard Relativa:

$$R = \frac{(E_T) \Delta Ct_T}{(E_R) \Delta Ct_R}$$

## Centollo (*Maja brachydactyla*)

- Expresión de vasa asociada con el inicio de la diferenciación de la línea de células germinales y el desarrollo gonadal
- La expresión varía desde la eclosión hasta la primera juvenil

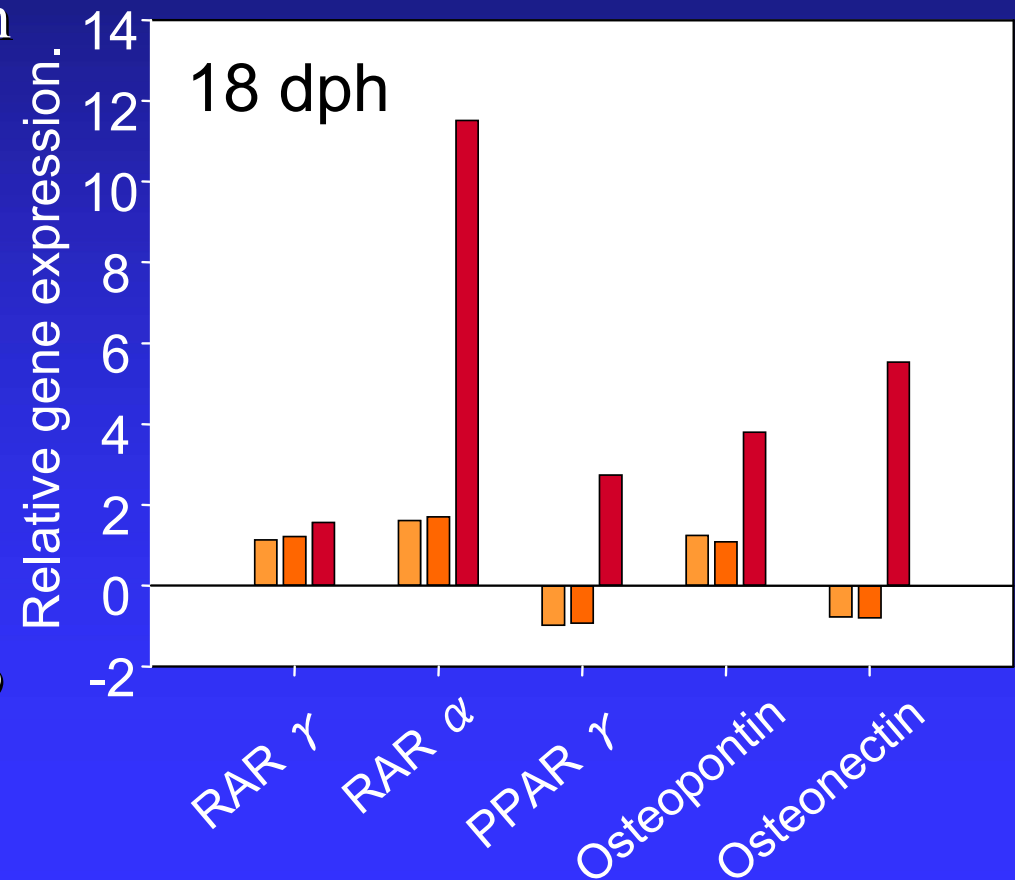


Cycle number

ZI = zoea I      M = megalopa  
ZII = zoea II    C1 = first crab

# Expresión Génica Relacionada con la Formación del Esqueleto en Dorada

- La expresión relativa muestra varios genes bajo la influencia de los niveles de vitamina A en la dieta
- Muestras de larvas a los 18 dph
- Comparación de 3 dietas con concentraciones diferentes de vitamina A y dieta “normal”
  - = R450 (dieta control normal)
  - = R900
  - = R2250
  - = R4500
- Aumento de 11.5 veces en la expresión del receptor de ácido retinoico alfa



# Resumen

## ■ Aislamiento y Secuenciación de ADN

- ◆ Estudios de historia vital: - identificación de fases del desarrollo
- ◆ Filogenética / Sistemática
- ◆ Descubrimiento / descripción de genes
- ◆ Detección de mutaciones

YFG

## ■ Detección / expresión génica

- ◆ Detección de patógenos YFG
- ◆ Estudios de paternidad y de poblaciones
  - ☞ **microsatélites, mitocondrial, genes ribosómicos, etc...**
- ◆ Respuestas fisiológicas (estrés, nutrición, estado del desarrollo, interacciones hésped/parásito, etc...)
  - ☞ Microarray – detectar diferencias grandes de expresión génica entre muestras a baja resolución
  - ☞ Expresión de genes – alta resolución de estados de expresión génica alterada
  - ☞ Manipulación de genes – RNAi, genes anti-sentido, mutagénesis dirigida, gene knock-outs usando animales transgénicos

# Resources

- GenBank – NCBI (National Center for Biotechnology Information)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- ◆ también EMBL (European Molecular Biology Laboratory) & DDBJ (DNA Data Bank of Japan)
- ◆ Búsqueda y descarga de secuencias de ADN y proteínas
- ◆ Análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para comparación de secuencias

- New England Biolabs – NEB

<http://www.neb.com/>

- ◆ mucha información sobre enzimas de restricción

- Barcode of Life Initiative - BOLI

<http://www.dnabarcodes.org/>

- ◆ Información sobre sistemática molecular con enlaces muy útiles

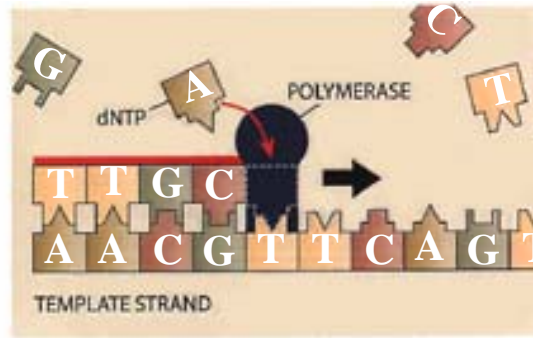
- Freeware for Windows

[http://molbiol-tools.ca/molecular\\_biology\\_freeware.htm](http://molbiol-tools.ca/molecular_biology_freeware.htm)

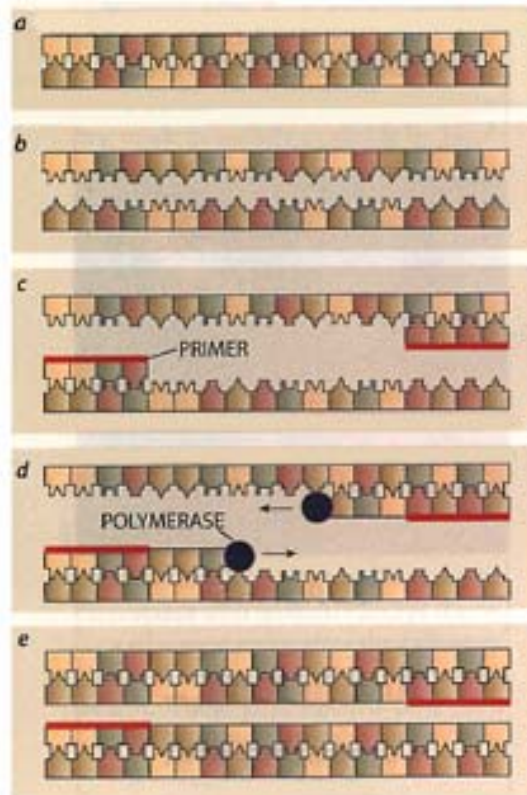
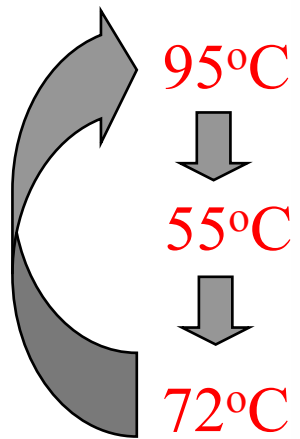
- ◆ ejemplos:

- ☞ Bioedit – análisis de secuencias
- ☞ MEGA – análisis filogenéticos
- ☞ Tree-Puzzle – composición de árboles filogenéticos

# Polymerase Chain Reaction

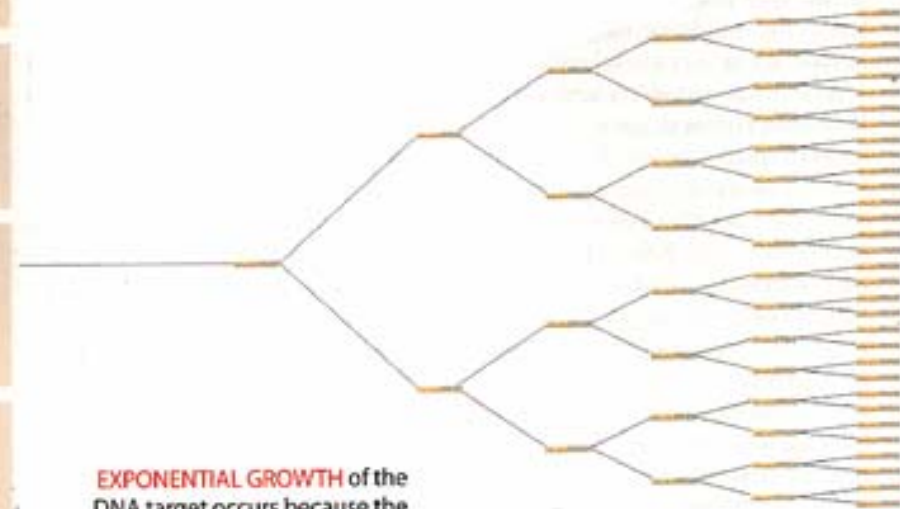


**POLYMERASE ENZYME** extends a bound primer. From the surrounding medium, it extracts a free-floating deoxynucleotide triphosphate (dNTP) that will complement the next unpaired position in the template strand of DNA. The enzyme then joins the dNTP to the end of the primer and moves on to the next position.



Número de ciclo

0 1 2 3 4 5

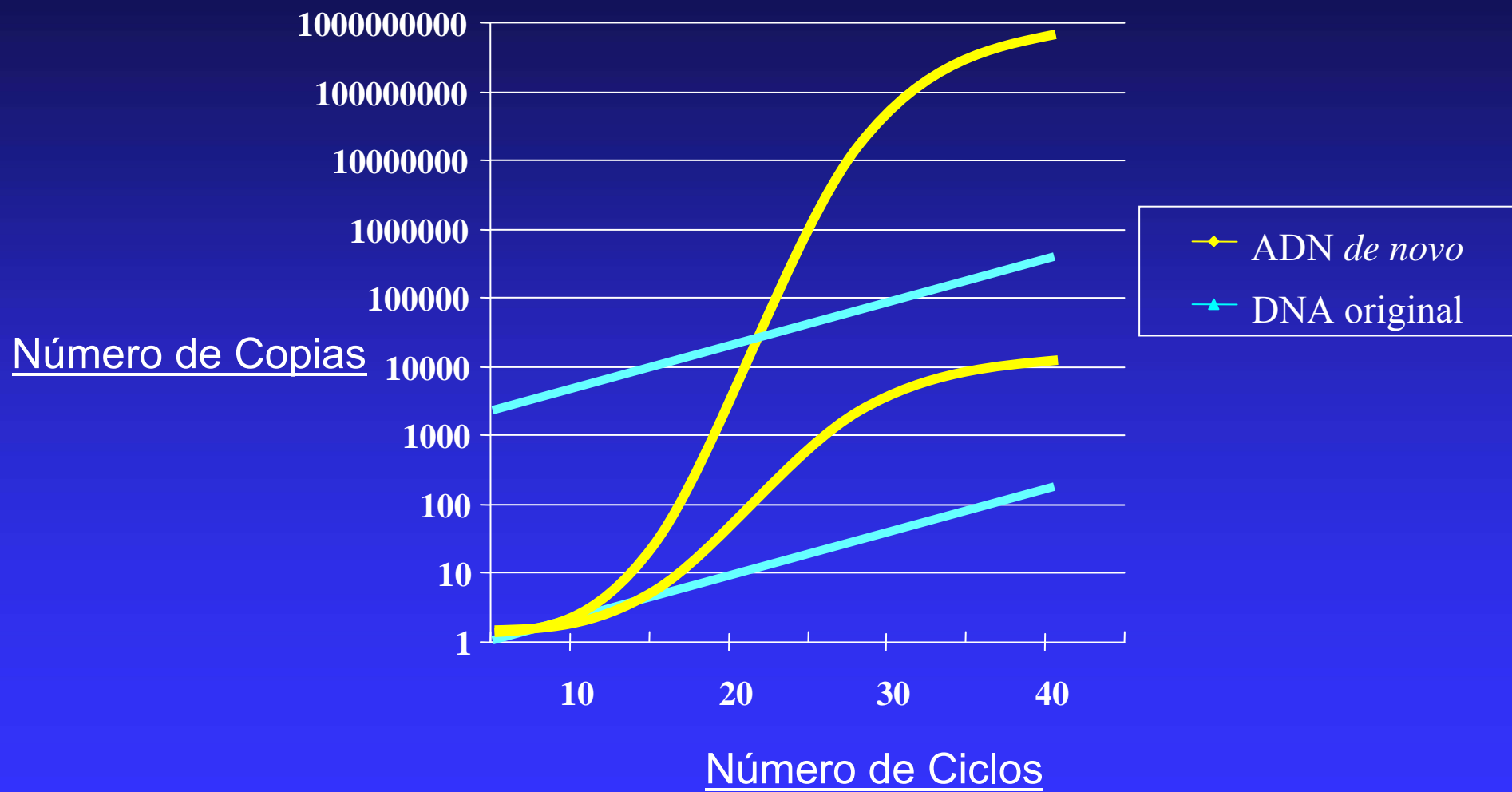


**EXPONENTIAL GROWTH** of the DNA target occurs because the products of each cycle become the templates for the next cycle.

# Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

- Amplificación logarítmica de un segmento específico de ADN genómico
  - ◆ Dos subconjuntos de moléculas se amplifican a diferentes velocidades
    - ☞ “Signal” = amplificación logarítmica
      - obtenida a partir de moléculas de nueva síntesis (moléculas de tamaño específico formadas sólo después del segundo ciclo)
    - ☞ “Noise” = amplificación lineal
      - obtenida a partir de la muestra original (tamaño variable)

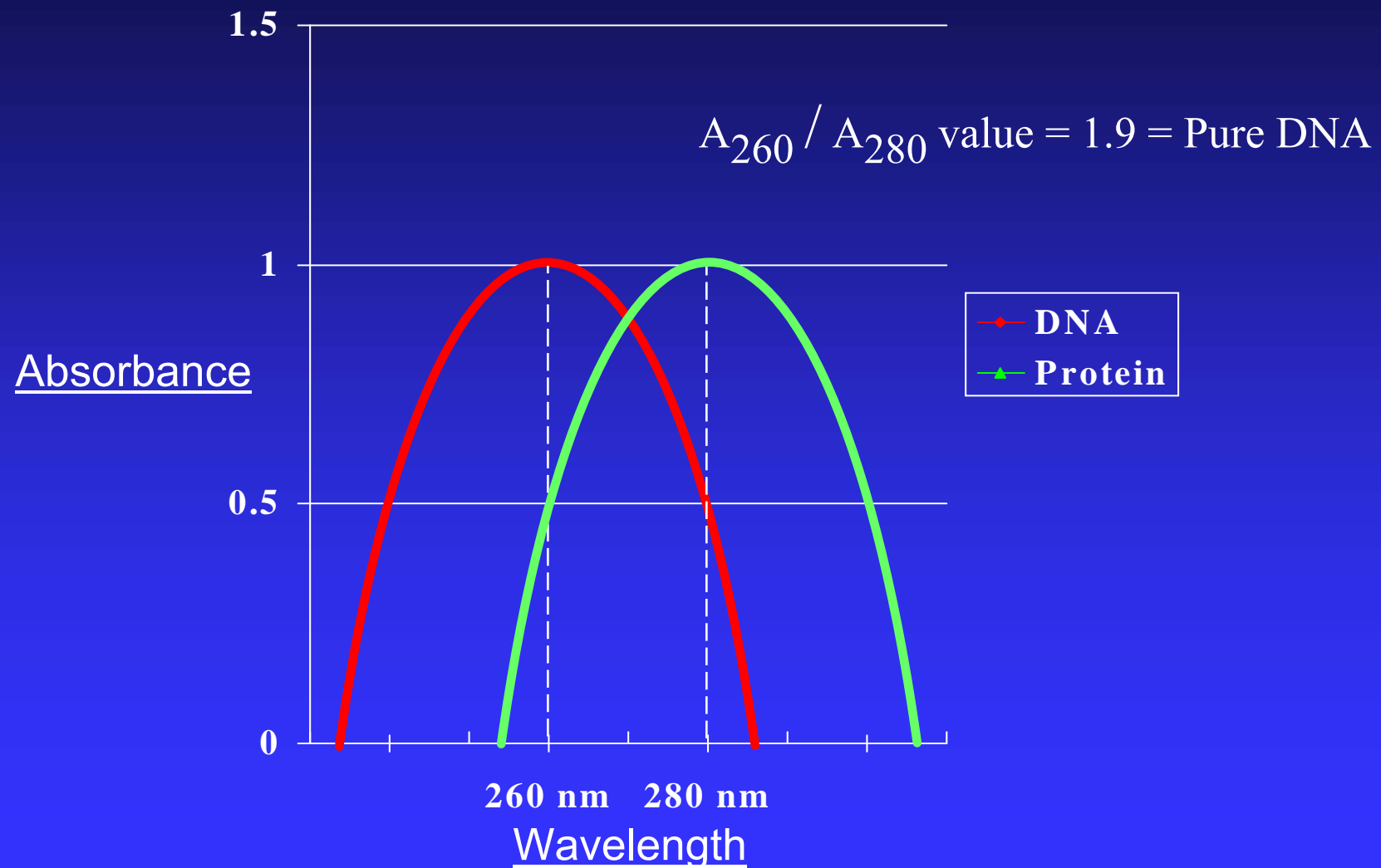
# Amplificación Lineal y Logarítmica



# Cuantificación del ADN

- Demasiado ADN puede tener un efecto inhibitorio
- La cantidad de ADN usada en la PCR depende de la secuencia target
  - ◆ Las secuencias ricas en G/C pueden ser más difícil de amplificar
  - ◆ Genes de alto número de copia requieren menos ADN  
(eg. - genes ribosómicos, ADN mitocondrial)
- El uso de espectrofotometría
  - ◆  $A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$  de AND genómico; o  $\left\{ \begin{array}{l} 33 \mu\text{g/ml primers} \\ 40 \mu\text{g/ml RNA} \end{array} \right.$ 
    - ↳  $[\text{DNA}] = A_{260} \times \text{Dilución} \times 50 \mu\text{g/ml}$
  - ◆  $0.1 < A_{260} < 1$
  - ◆  $A_{260} / A_{280} \sim 1.9$

# Cuantificación de ADN por Espectrofotometría



# Componentes de PCR - Primers

- ADN corto sintético de cadena sencilla
  - ◆ llamados oligonucleótidos, primers, o sondas según la aplicación
- Esenciales para el inicio de la amplificación
- Define los extremos finales para rondas de amplificación sucesivas
- Los primers son:
  - ◆ De cadena sencilla
  - ◆ normalmente 15 - 30 pb de longitud
  - ◆ ~50 % G/C → estabiliza la unión del primer
  - ◆ Acabado en el extremo 3' con una G/C → estabiliza el inicio de la polimerización
- Existen muchos proveedores comerciales de primers, incluido SIGMA
  - ◆ Simplemente envía la secuencia que necesitas

# Componentes de PCR - Primers (cont.)

- Diseño del Primer : evita la autocomplementariedad
  - ◆ INTRA-molecular: formación de “hair pin” & primer- dimer

5' GCTAGCATGACCTCGTGAATGGGCTAG 3'



5' GCTAGCAT GACCTC  
3' GGTGAATGGGCTAG

- ◆ INTER-molecular: formación de primer- dimer

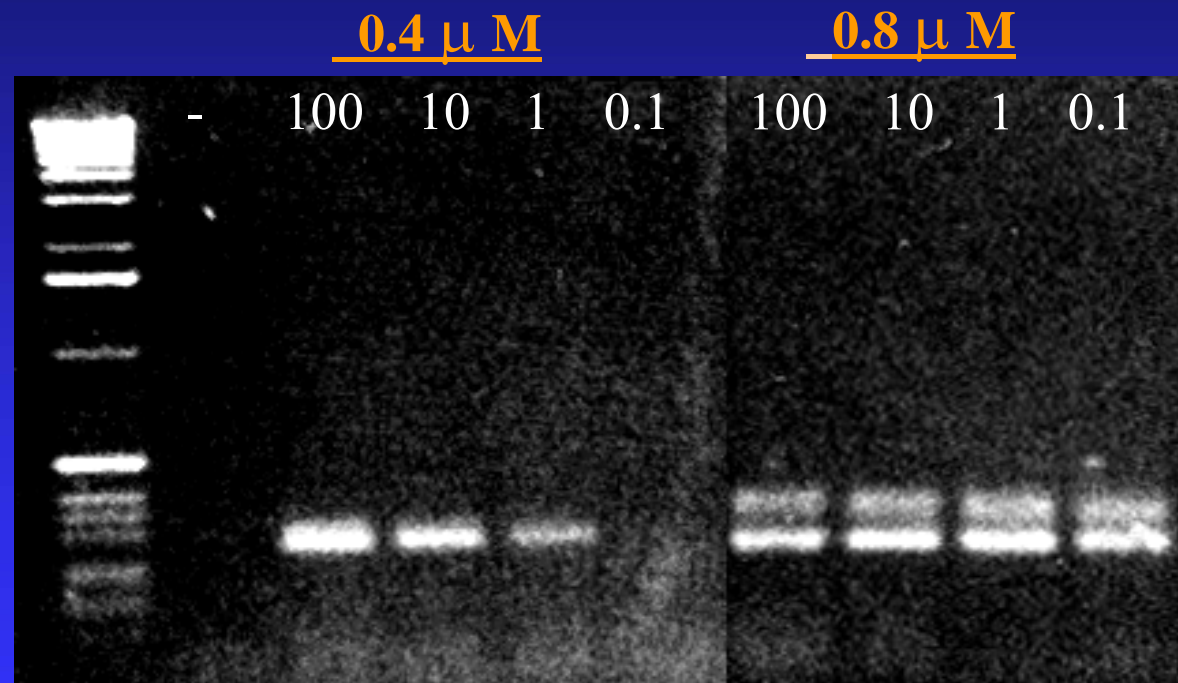
5' GTGTATCATGACGTAGATTCCGGGCC 3'

# Componentes de PCR - Primers (cont.)

- Temperatura de Desnaturalización del Primer (*Primer Melting Temperature, T<sub>m</sub>*)
  - ◆ Temperatura a la que el primer “se cae”
  - ◆ Se calcula así:  $[G/C] \times 4 + [T/A] \times 2 = T_m$
- Temperatura de desnaturalización vs. Temperatura de apareamiento
  - ◆ La temp. de apareamiento es de 5 a 15°C por debajo de la temp. de desnaturalización.
- Hay que usar el espectrofotómetro para comprobar los stocks del primer
  - ◆  $A_{260} = 1 = 33 \mu\text{g/ml}$
  - ◆  $[\text{primer}] = A_{260} \times \text{Dilución} \times 33 \mu\text{g/ml}$

# Efectos de la Concentración - Primers

- Titrate [DNA]
- Change [primer]



# RT-PCR

- **Reverse Transcription PCR** (PCR con Transcripción inversa)
  - ◆ Requiere síntesis previa de ADN a partir de un ARN plantilla (*template*).
  - ◆ La transcriptasa inversa es una ADN-polimerasa dependiente de ARN.
  - ◆ La polimerización de ADN puede tener lugar en el mismo tubo de reacción o separadamente.
- ¡La Higiene en el Laboratorio es MUY importante!
  - ◆ El ARN se degrada rápidamente por nucleasas que hay en tu piel, la poyata, partículas de polvo, etc..
  - ◆ La RNAsa A es muy estable y ubicua.
    - ☞ Usar reactivos libres de RNAsa en todos los pasos previos a la síntesis de ADN
  - ◆ “RNase - Away” para limpiar gradillas, tubos, pipetas, etc...

# PCR Cuantitativa (qPCR)

- Con frecuencia llamada RT- PCR (aunque se puede confundir Real Time con Reverse Transcription PCR)
- Permite la cuantificación de moléculas de una secuencia específica de ADN o ARN en una muestra
  - ◆ Expresión de genes → purificar ARN y convertirlo en ADNc
    - ☞ tomar muestras biológicas en nitrógeno líquido, hielo seco o “RNAlater”
  - ◆ Detección de genes → purificar ARN o ADN según el organismo
    - ☞ tomar muestras en etanol par la purificación de ADN
- Se puede realizar usando colorante de unión a ADNds (SyberGreen), o formas diversas de sondas fluorogénicas como “Taqman”.
- Probabilidad reducida de falsos positivos puesto que los tubos de ADN amplificado nunca se abren para realizar geles de agarosa.
- Los resultados se obtienen en menos tiempo - no hay geles de agarosa.
- Rango dinámico amplio - cuantificación precisa con más de 7 órdenes de magnitud.

# qPCR con Colarante SYBER Green

Permite el análisis de la curva de disociación

## Cebadores específicos

para:

*Pseudo-nitzschia fraudulenta*

*P. multistriata*

*P. pungens*

*Protoceratium reticulatum*

Análisis cruzado usando

## ADN genómico:

*P. calliantha*

*P. delicatissima*

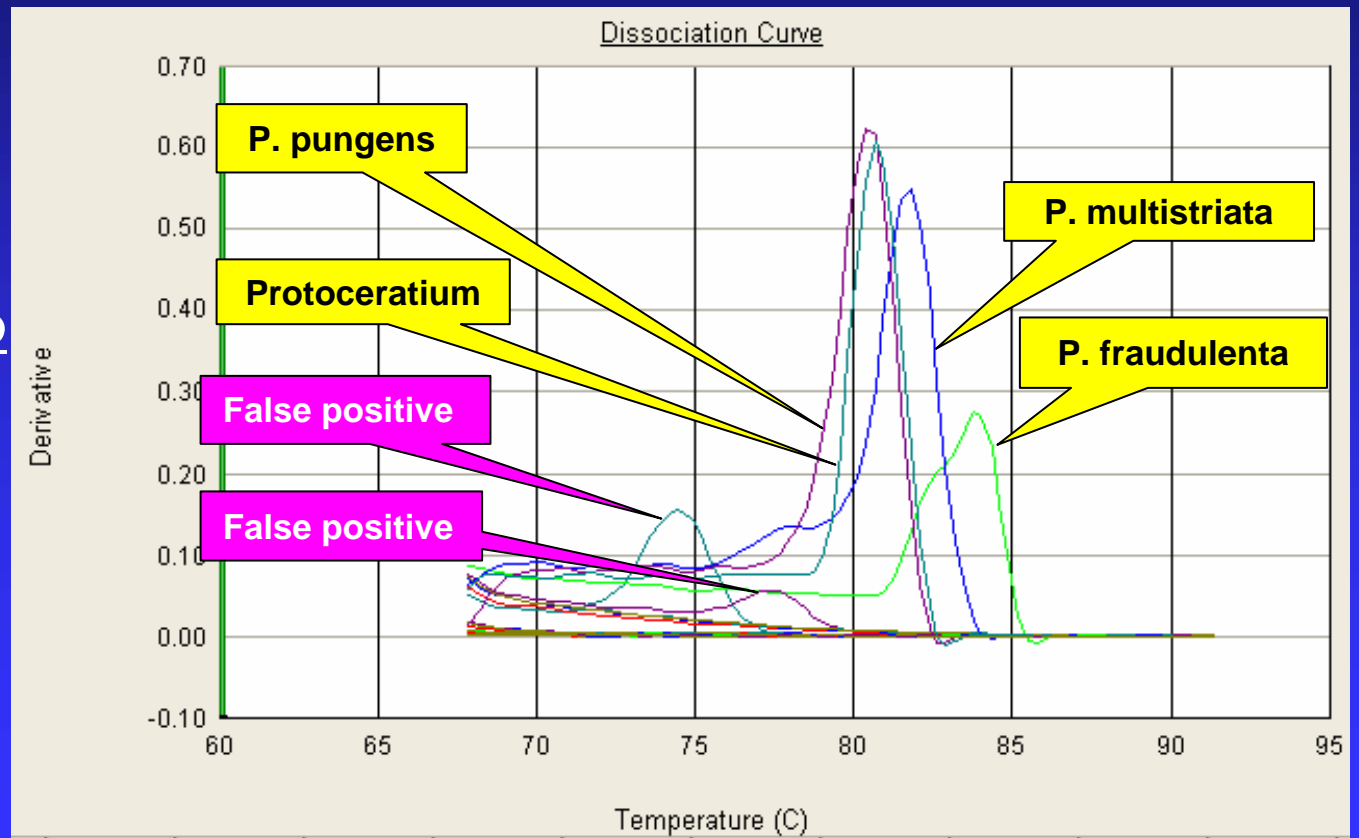
*P. fraudulenta*

*P. multistriata*

*P. pungens*

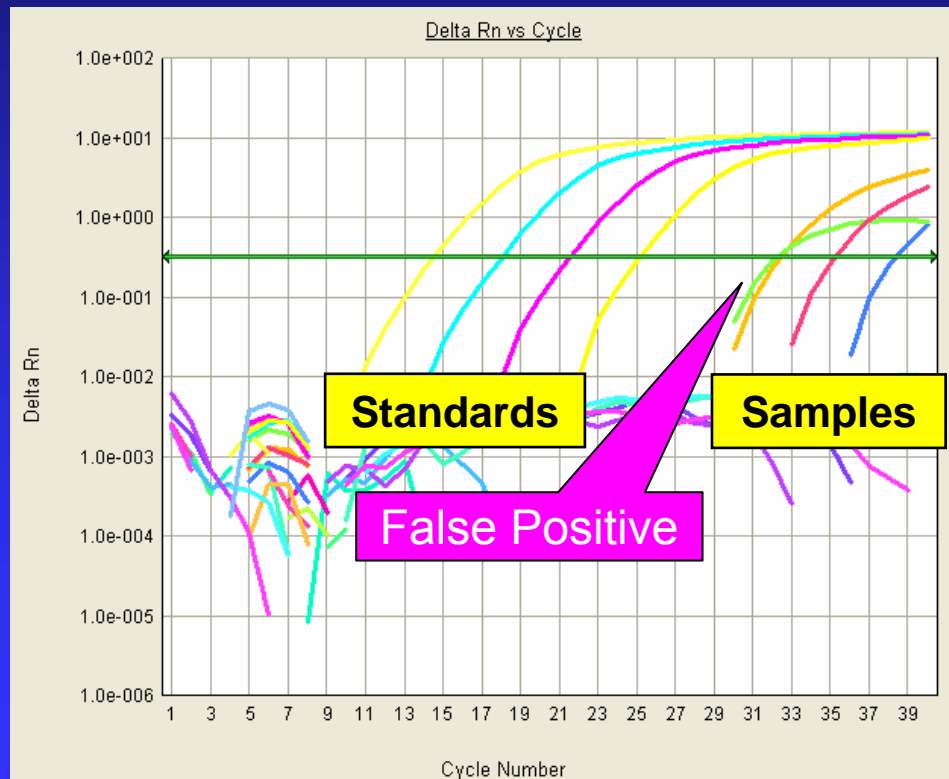
*Protoceratium reticulatum*

*Alexandrium peruvianum*

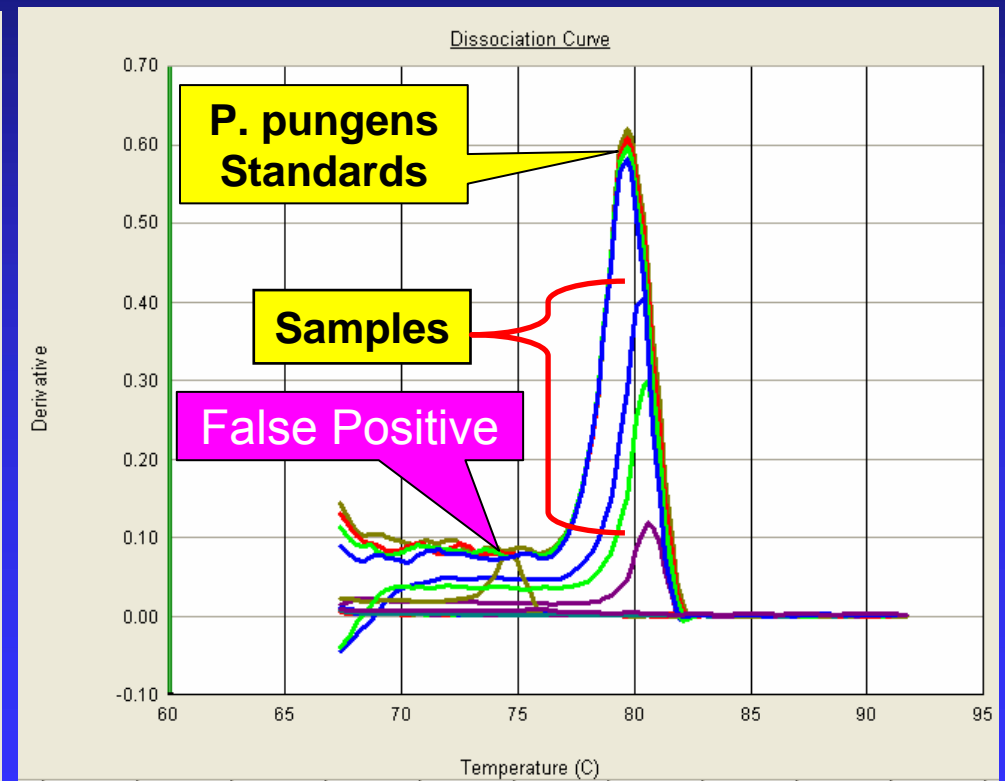


# Detección por qPCR de Microalgas Tóxicas de Agua Marina de la Bahía Alfaques

Cebadores específicos para el análisis de *Pseudo-nitzschia pungens* en 16 muestras de agua



Amplification Plot



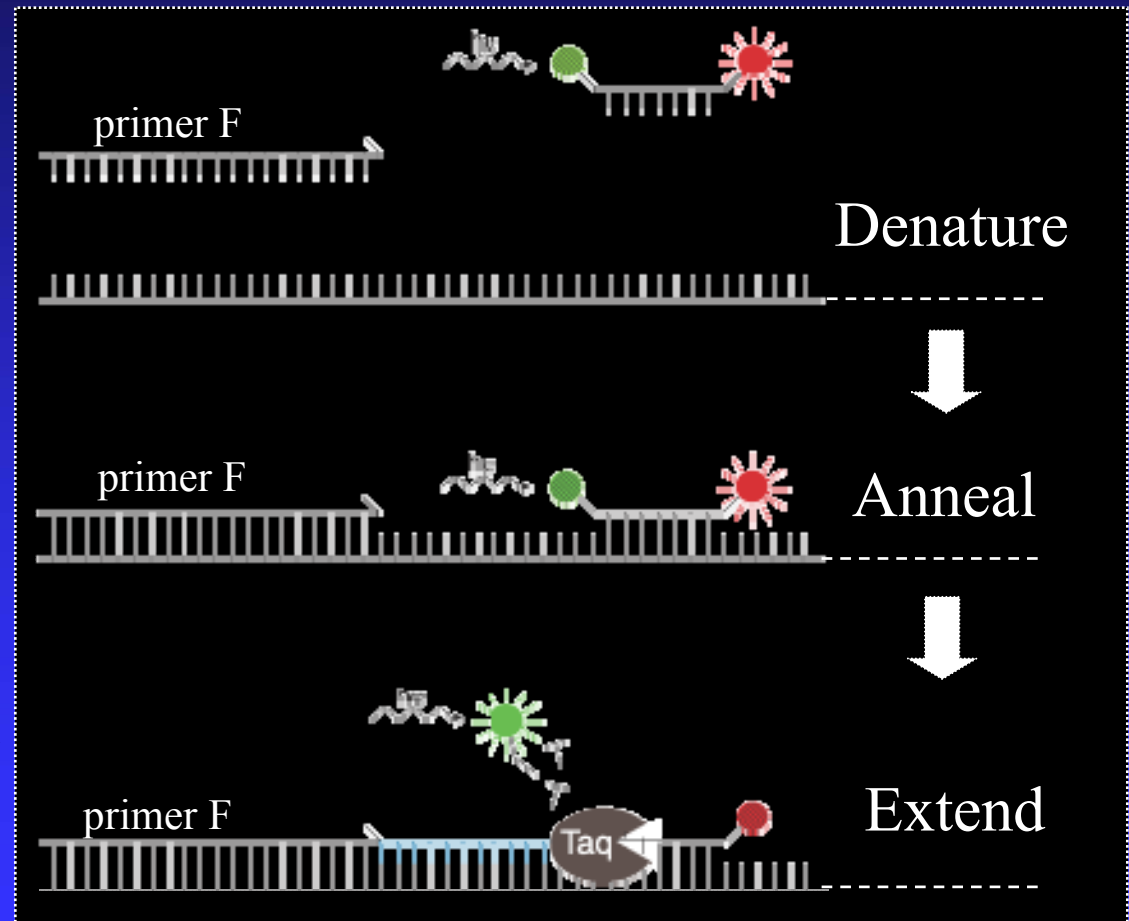
Dissociation Curve

# Ensayos de qPCR TaqMan

- Utiliza dos cebadores y una sonda doblemente marcada para detección fluorescente
  - ◆ las dos marcas fluorescentes en la sonda se llaman “detector” y “quencher”
    - ☞ el quencher absorbe energía emitida via FRET (Fluorescence Resonant Energy Transfer)
    - ☞ La sonda sólo se une al ADN amplificado en una secuencia específica
  - ◆ Se puede “*multiplexed*” usando diferentes marcas fluorescentes
- Altamente específico y preciso sobre siete órdenes de magnitud
- Puedes disponer de un juego entero diseñado para tí si se conoce la secuencia
  - ◆ [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)
- El análisis de las curvas de desnaturalización para la detección de falsos positivos no es posible con los ensayos Taqman
- Siempre que sea posible diseña la sonda de manera que cubra una unión exon/exon para evitar la detección de ADN genómico

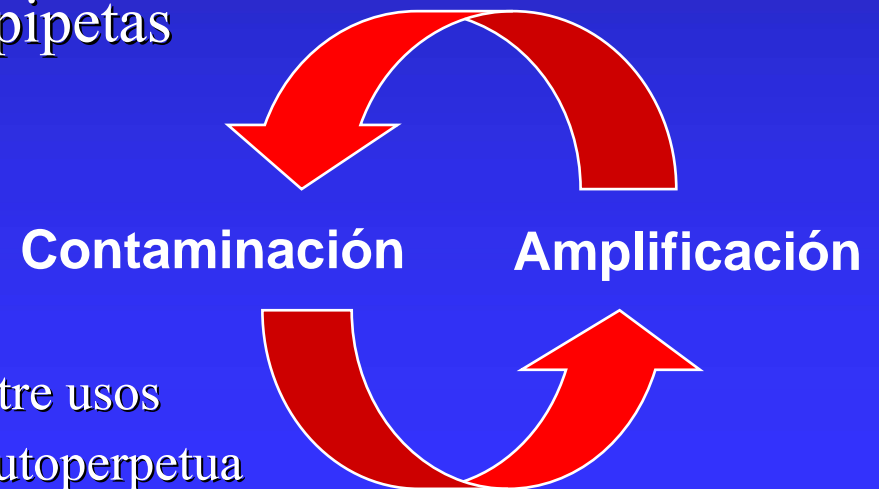
# Componentes de TaqMan PCR

- Taq ADN Polimerasa
- Primers
- Sonda marcado doblemente (Taqman probe)
- dNTP's
  
- Energía de excitación transferida del fluoróforo verde al rojo
- Tras la hidrólisis de la sonda mediante la actividad exonucleasa 5' - 3' de la polimerasa de ADN Taq, el fluoróforo verde emite luz



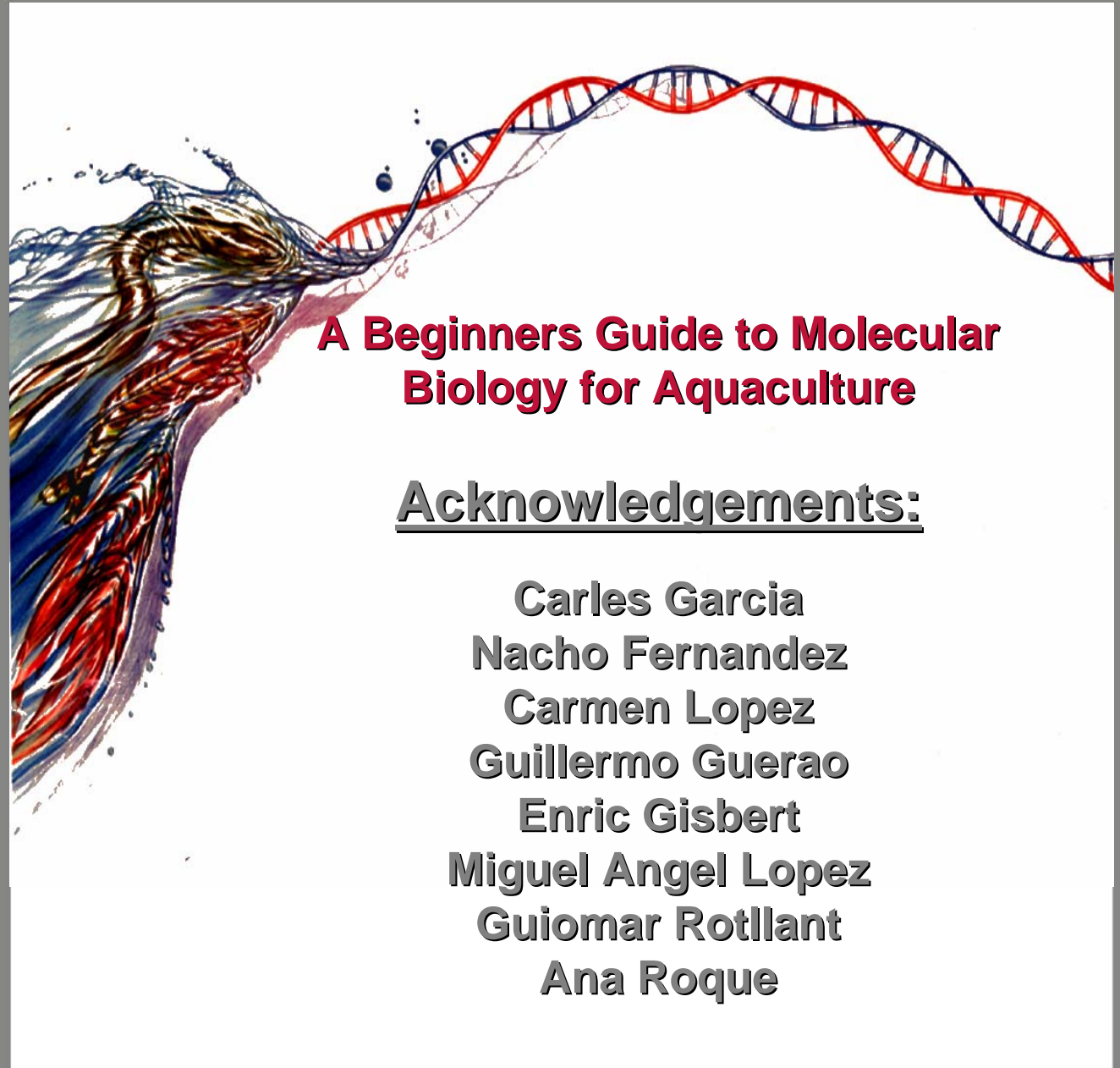
# Higiene en el Laboratorio de Diagnóstico

- Realiza cada operación por separado y en áreas separadas
  - ◆ Preparación del cocktail
  - ◆ Preparación de la muestra de ADN
  - ◆ Adición del ADN a la PCR
  - ◆ Ejecución de la PCR
  - ◆ Carga del gel de agarosa / documentación del gel
- Cambia de guantes entre tareas
- Siempre incluye un control de “sólo reactivo”
- Asigna tareas específicas a las pipetas
  - ◆ Preparación del cocktail
  - ◆ Preparación de ADN
  - ◆ Carga del gel
- **Rompe el ciclo!**
  - ◆ Limpia gradillas & superficies entre usos
  - ◆ La contaminación de la PCR se autoperpetua



# IRTA

RECERCA | TECNOLOGIA  
AGROALIMENTÀRIES

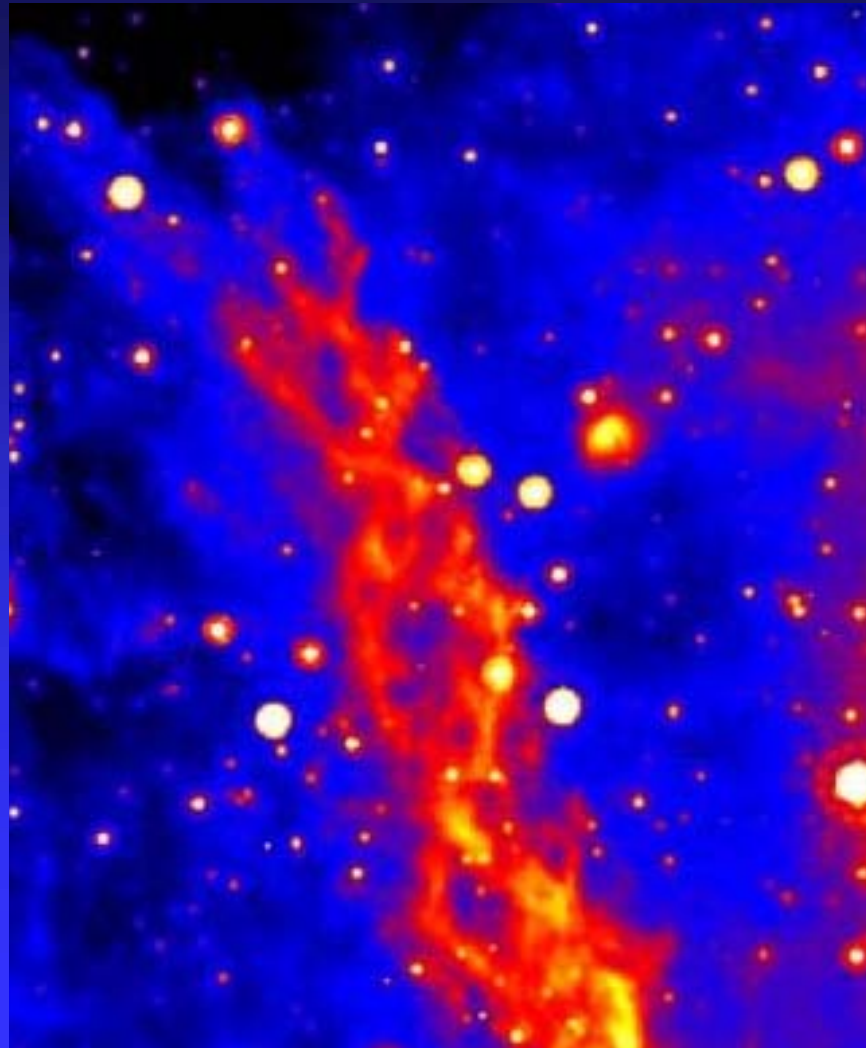


## **A Beginners Guide to Molecular Biology for Aquaculture**

### **Acknowledgements:**

**Carles Garcia  
Nacho Fernandez  
Carmen Lopez  
Guillermo Guerao  
Enric Gisbert  
Miguel Angel Lopez  
Guiomar Rotllant  
Ana Roque**

# Telescopio Espacial Hubble 2006: Nébulas en Doble Hélice



Esta obra está bajo la licencia Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 2.5 España de Creative Commons. Puede copiarla, distribuirla y comunicarla públicamente siempre que especifique su autor y la institución que la publica (IRTA); no la utilice para fines comerciales; y no haga con ella obra derivada. La licencia completa se puede consultar en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/es/deed.es>.