

Técnicas descritas en el curso 7.28

Técnica:

Experimento:

Clase 1

Experimento de incorporación de dNTPs

Síntesis del ADN (rápida; cuantitativa por la cantidad de la síntesis).

Ensayo de extensión del cebador

Síntesis del ADN (lenta; cuantitativa por la duración de la síntesis).

Ensayo de unión en filtro

Método para separar dNTPs incorporados de los no incorporados.

Electroforesis en gel

Método para separar ADN en función de la longitud.

Análisis de ADN Helicasa

Actividad de ADN Helicasa *in vitro*.

Polaridad de helicasa

Analiza el direccionamiento del movimiento de la helicasa; utilizado para estudiar la función de las secuencias de la terminación de la replicación.

Ensayo de desafío del molde

Analiza la procesividad.

Clase 2

Ensayo de topoisomerasa

Analiza los cambios en la topología del ADN; distingue formas de ADN superenrollado, relajado, cortado, lineal y mide la catenación / decatenación.

Autorradiografía EM

Analiza la presencia de orígenes de replicación (incapaz de identificar las secuencias de ADN de los orígenes).

Geles de agarosa 2D

Analizan los orígenes de replicación (es necesario tener una idea de dónde se encuentra el origen que se va a analizar).

Transferencia *Southern* (genómica)

Identifica moléculas de ADN específicas transferidas a la membrana.

Clase 3

Ensayo del replicador del plásmido

Identifica la región de ADN suficiente para la actividad del replicador.

Análisis de mapeo mutacional

Identifica las regiones de ADN necesarias para la actividad del replicador.

Fraccionamiento bioquímico

Mecanismo para purificar la actividad bioquímica que se puede analizar *in vitro*.

Selección genética de los mutantes de replicación del ADN

Clase 4

Complementación bioquímica

Combina los extractos mutantes con el fraccionamiento bioquímico para identificar las proteínas necesarias para el ensayo (en este caso, la replicación del ADN).

Ensayo de protección de DNasa I

Analiza la secuencia de unión específica del ADN (más lenta y no cuantitativa; proporciona información acerca de la secuencia de ADN enlazado).

Ensayo de cambio de movilidad en gel

Analiza la secuencia de unión específica del ADN (rápido y cuantitativo, pero proporciona menos información acerca de la secuencia de ADN enlazado).

Ensayo de desenrollamiento del ADN

Analiza la formación de ADN monocatenario mediante el uso de una nucleasa específica para éste.

Ensayo de asociación de molde

Utiliza la filtración en gel para separar las moléculas unidas a un plásmido de las moléculas que no están unidas a él (véase el Trabajo de lectura 1).

Clase 5

Digestión de nucleasa micrococcal

Analiza la formación de nucleosomas.

Clase 6

Análisis de ADN heterodúplex

Analiza la reparación de ADN *in vivo*.

Análisis de restricción

Analiza el estado de metilación del ADN.

Reparación del sitio de restricción

Analiza la reparación de ADN *in vitro*; utilizado también como ensayo de incorporación.

Clase 7

Test de Ames

Analiza sustancias químicas y otros factores que aumentan la frecuencia de las mutaciones.

Corte de ADN circular

Analiza el mecanismo de tipo escisión de la reparación del ADN.

Síntesis de ADN propensa a error	Analiza la capacidad de las proteínas de replicación / reparación para sintetizar ADN a partir de un molde dañado.
Clase 8	
Ensayo de intercambio de cadena	Analiza el apareamiento y la migración de rama de ADN homólogo.
Clase 9	
ATP-gamma-S	Utilizado para determinar si la unión de ATP o la hidrólisis de ATP son necesarias para una reacción.
Lectura DMN (<i>footprinting</i>)	Analiza la protección de las bases del ADN, en lugar del esqueleto fosfodiéster.
Unión cooperativa de ADN	Ensayo de retardo en gel para medir la unión de ADN cooperativa frente a la no cooperativa.
Clase 10	
Secuencias de consenso	Identificación de elementos importantes mediante conservación.
Gel 2D nativo / desnaturizante	Detección de cortes frente a DSBs en el ADN.
Clase 11	
Ensayo de plegamiento del ADN	Analiza si una proteína pliega el ADN al unirse a él y la posición de plegamiento.
Clase 12	
<i>Southern</i> genómica	Identifica las moléculas de ADN específicas transferidas a la membrana (utilizadas, en este caso, para la transposición).
Apareamiento del plásmido	Analiza la transposición <i>in vivo</i> determinando el movimiento de la resistencia a los fármacos ante un nuevo plásmido.
Clase 13	
Ensayo de protección con S1	Analiza la transcripción. Localiza el sitio de iniciación.
Transferencia <i>Northen</i>	Analiza la transcripción. Localiza ARN en estado estacionario <i>in vivo</i> .
Ensayo de incorporación	Analiza la transcripción <i>in vitro</i> .
Ensayo de desenrollamiento del ADN	Analiza la formación de complejos abiertos.

Clase 14

Selecciones genéticas

Para identificar y caracterizar los activadores y los represores.

Fusiones del promotor

Ensayo para determinar, indirectamente, la actividad del promotor.

Clase 15

Ensayo de prueba de transcripción
(no iniciada)

Ensayo de incorporación *in vitro* que crea transcritos de tamaño conocido sin terminación. Importante para ensayos de incorporación en los que se utilizan ARN polimerasas eucarióticas.

Ensayo “supershift” de anticuerpos

Ensayo para determinar los componentes del complejo ADN-proteína.

Hibridación de una matriz de ADN

Ensayo para determinar los niveles de transcripción lo largo de muchos genes simultáneamente.

Clase 16

Localización del dominio de unión del ADN al factor de transcripción.

Localización del dominio de activación del factor transcripcional.

Ensayo entrecruzamiento (*cross-linking*) para la multimerización de proteínas.

Clase 17

Formación del bucle R (R-loop)

Analiza las regiones del ARNm que se fija a diferentes fragmentos de ADN.

Ensayo de electroforesis en gel

Para los intermediarios y productos formados durante la eliminación de intrones *in vitro* (realizada con ARN marcado o mediante una hibridación *Northern*).

Clase 18

Cálculo y digestión con RNasa

Determinación de las estructuras secundarias del ARN.

Clonaje de ADNc

Determina la secuencia y estructura del ARNm; expresión de proteína.

Captura de exones (*trapping*)

Encuentra exones en los fragmentos de ADN de las regiones que se cree contienen genes.

Clase 19

Ninguna.

Clase 20

Ninguna.

Clase 21

Ensayo de incorporación para la traducción

Análisis de la unión de proteínas por filtración en gel

Ensayo de unión en filtro

Ensayo de interferencias por modificación

Mide la unión de las moléculas pequeñas a las moléculas grandes (p. ej.: unión al ribosoma).

Mide la unión del ARN a la proteína.

Identifica las regiones de ARN protegidas por una proteína o por la unión del ARN.

Clase 22

Ninguna.

Clase 23

Ensayo de fosforilación de proteínas.

Ensayo de procesamiento de proteínas.