

# DETECCION DE ACIDOS NUCLEICOS

## 1. RNA

- *NORTHERN BLOT CONVENCIONAL*
- *NORTHERN BLOT REVERSO*
- *HIBRIDACION IN SITU*

## 2. DNA

- *SOUTHERN BLOT*
- *ANALISIS DE GENOTECAS*

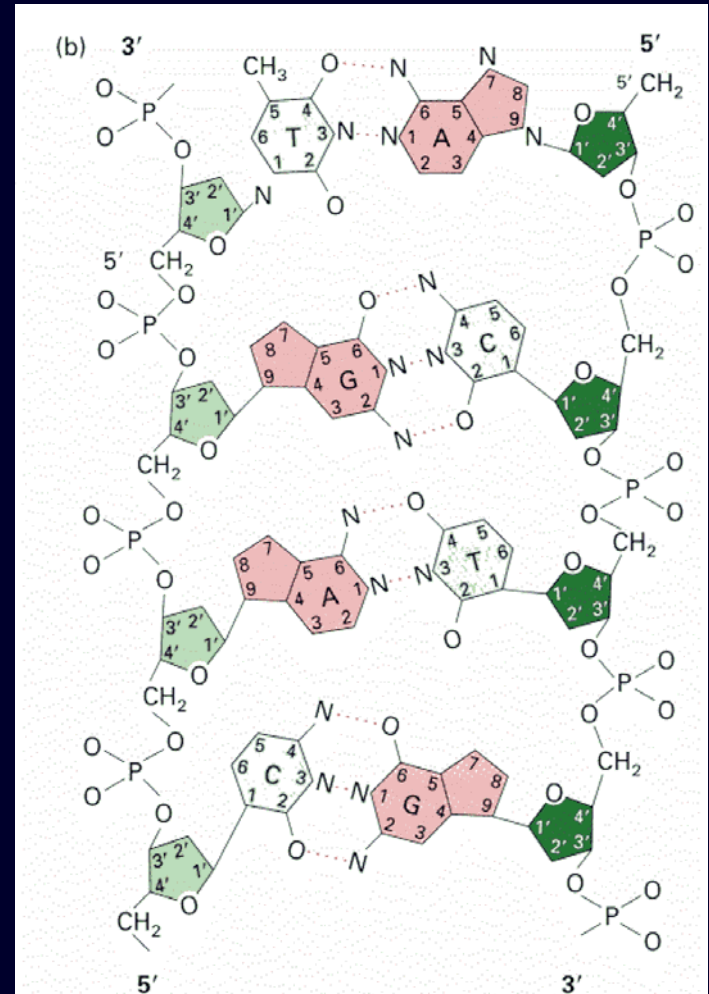
# HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

- APAREAMIENTO COMPLEMENTARIO DE BASES ENTRE DOS ACIDOS NUCLEICOS DE HEBRA SIMPLE → PRODUCTO DE HEBRA DOBLE.
  - DNA/DNA
  - RNA/RNA
  - DNA/RNA

# HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

¿Cómo se mantienen unidas las dos hebras?

- Puentes de hidrógeno entre las bases.
- Interacciones hidrofóbicas entre las bases adyacentes de una misma hebra.

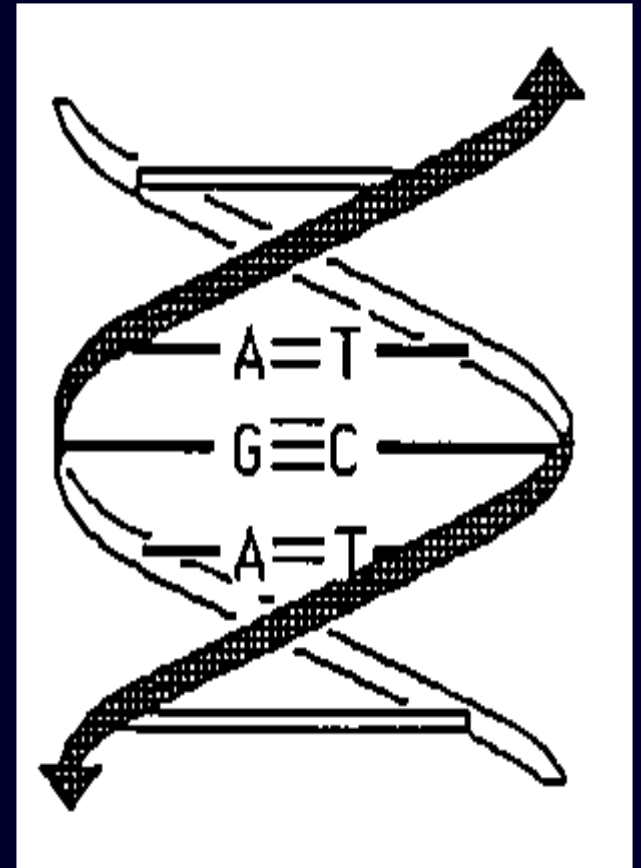


# FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LA HIBRIDACION ENTRE ACIDOS NUCLEICOS

- Número de pares GC v/s pares AT
- Grado de complementariedad
- Largo de las hebras
- Concentración de sal en la solución
- Temperatura
- pH
- Concentración de formamida

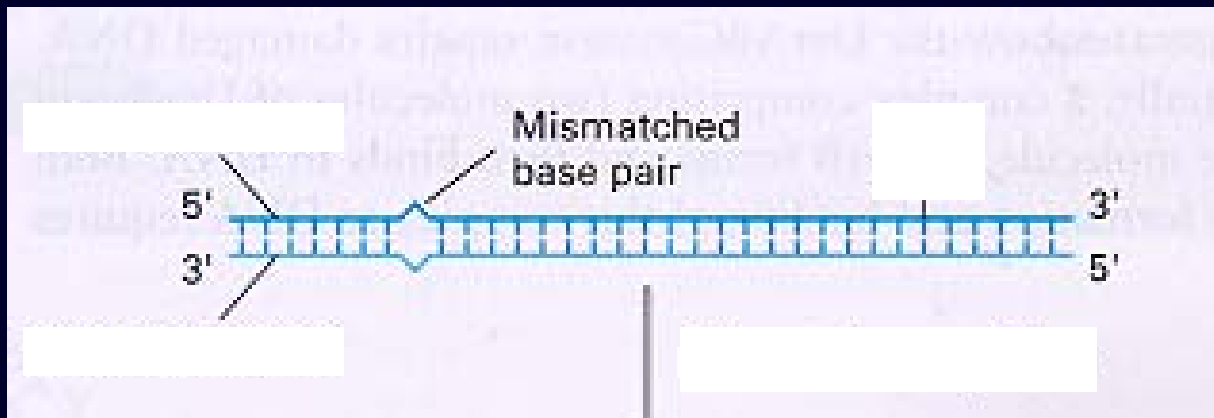
# FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LA HIBRIDACION ENTRE ACIDOS NUCLEICOS

- Número de pares GC v/s pares AT
  - Mayor número de enlaces de H entre la hebras → mayor estabilidad de los híbridos.
    - 3 enlaces de H entre G y C
    - 2 enlaces de H entre A y T



# FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LA HIBRIDACION ENTRE ACIDOS NUCLEICOS

- Grado de complementariedad
  - Menor complementariedad de bases,
    - menos enlaces de H formados
    - menor estabilidad

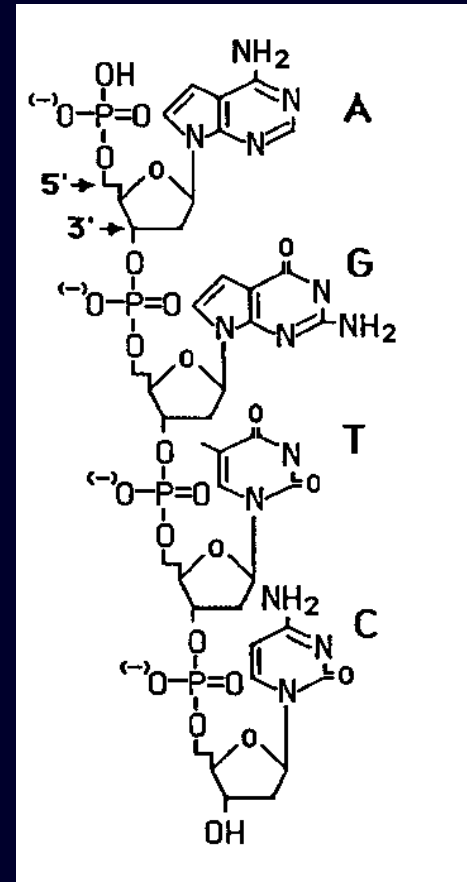


# FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LA HIBRIDACION ENTRE ACIDOS NUCLEICOS

- Largo de las hebras
  - Mayor largo de las hebras,
    - más enlaces de H
    - más interacciones hidrofóbicas entre las bases
    - mayor estabilidad del híbrido.

# FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LA HIBRIDACION ENTRE ACIDOS NUCLEICOS

- Concentración de sal en la solución
- $\uparrow [\text{sal}] \rightarrow \uparrow$  estabilidad del híbrido
  - Las cargas negativas de los grupos fosfato se repelen unas a otras.
  - Los iones positivos en solución reducen la repulsión electrostática entre las hebras.
  - Cationes monovalentes ( $\text{Na}^+$ ) o divalentes ( $\text{Mg}^{++}$ )



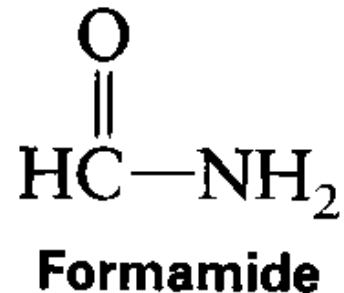


# FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LA HIBRIDACION ENTRE ACIDOS NUCLEICOS

- Temperatura
  - La energía libre de las interacciones no covalentes que mantienen la estructura de los ácidos nucleicos no es muy superior a la energía de los movimientos térmicos a temperatura ambiente.
  - Mayor  $T^{\circ}$  → aumenta la energía cinética de las hebras y desestabiliza la estructura de los ácidos nucleicos.
    - las hebras se separan.

# FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LA HIBRIDACION ENTRE ACIDOS NUCLEICOS

- pH
  - $\uparrow [\text{OH}^-]$ 
    - $\uparrow$  ionización de los grupos fosfatos favoreciendo la repulsión electrostática entre las hebras.
- Concentración de formamida
  - Probablemente forma enlaces de H con los ácidos nucleicos.
  - Desestabiliza la formación de híbridos

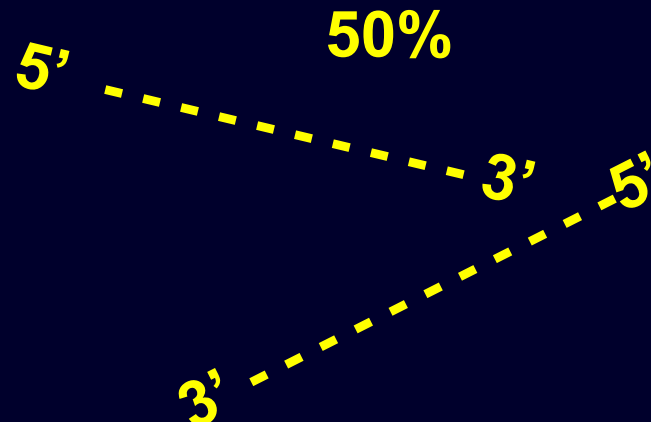


## El efecto combinado de estos factores puede ser expresado en una ecuación para el calculo de la Tm

- ¿Qué es la Tm?

Tm = temperatura de *melting* o de separación de las hebras.

La Tm es una medida de la estabilidad de los híbridos definida como la temperatura a la cual 50% de los híbridos se encuentran formados y 50% permanecen disociados.



**El efecto combinado de estos factores puede ser expresado en una ecuación para el calculo de la Tm**

**Para DNA:DNA**

$$T_m = 81,5 \text{ }^{\circ}\text{C} + 16,6\log[\text{Na}] + 41(\%G+C) - 0,63(\%\text{formamida}) - (500/L)$$

**Para DNA:RNA**

$$T_m = 79,8 \text{ }^{\circ}\text{C} + 18,5\log[\text{Na}] + 58,4(\%G+C) + 11,8(\%G+C)^2 - 0,5(\%\text{formamida}) - (820/L)$$

**Para oligonucleotidos en 1 M Na<sup>+</sup>**

$$T_m \text{ (}^{\circ}\text{C)} = 4 (G+C) + 2 (A+T)$$

# DETECCION DE ACIDOS NUCLEICOS

- NORTHERN BLOT

PERMITE DETECTAR LA PRESENCIA DE UN TRANSCRITO.

PROPORCIONA INFORMACION DE SU TAMAÑO Y PROCESAMIENTO.

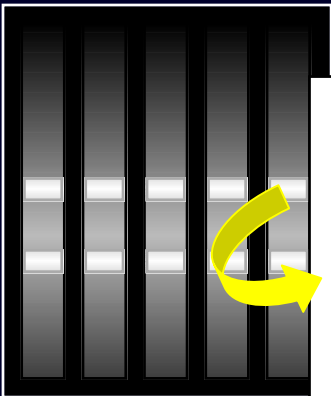
# NORTHERN BLOT

## 1. Extracción del RNA

 AAAAAA



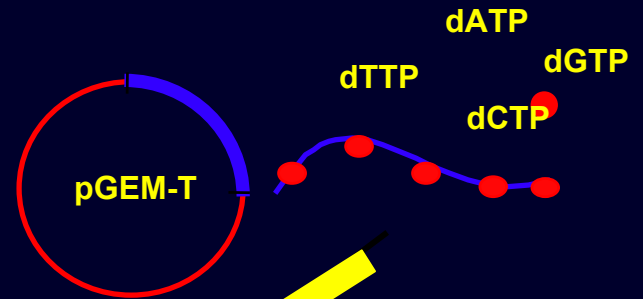
## 2. Electroforesis del RNA



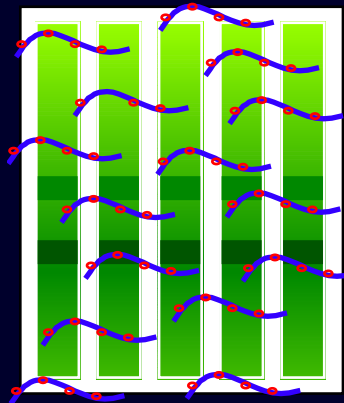
## 3. Transferencia a membrana



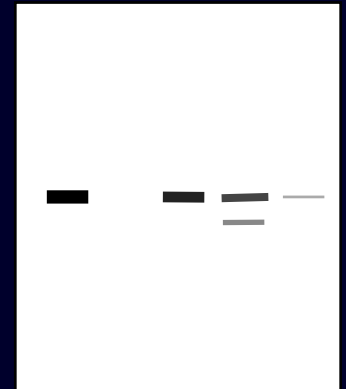
## 4. Generación de una sonda marcada



## 5. Hibridación



## 6. Visualización

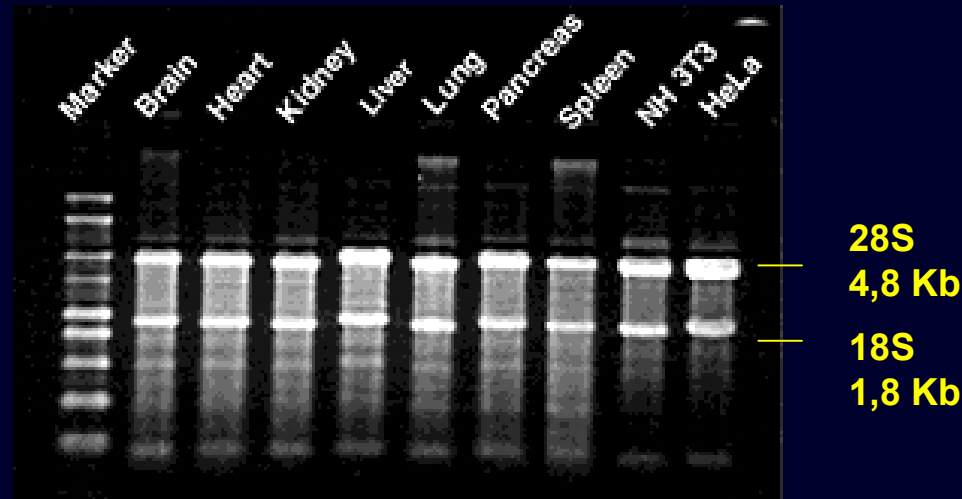
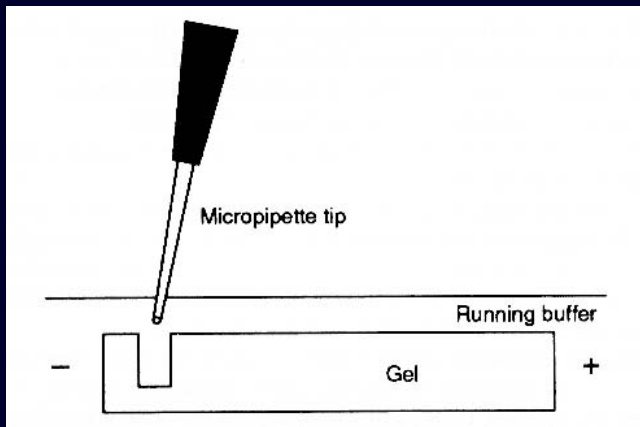


# NORTHERN BLOT

## 2. ELECTROFORESIS DEL RNA

En geles de agarosa

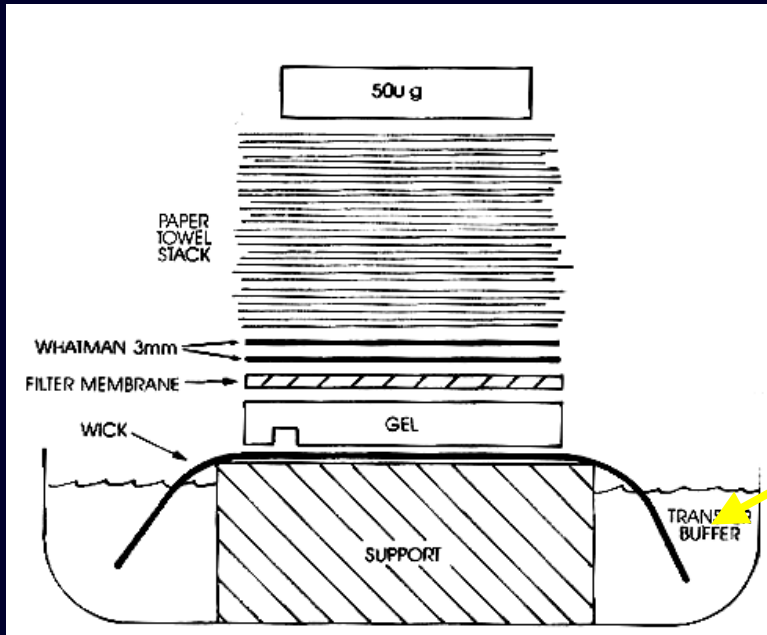
En condiciones desnaturizantes (formaldehído/formamida)



- El gel es teñido con bromuro de etidio y el RNA visualizado en un transiluminador UV
- Integridad del RNA: presencia y proporción de los RNA (28 y 18S)
- Concentración del RNA:  $A_{260} \times \text{dilución} \times 40 = \mu\text{g/mL}$

# NORTHERN BLOT

## 3. TRANSFERENCIA DEL RNA A UNA MEMBRANA



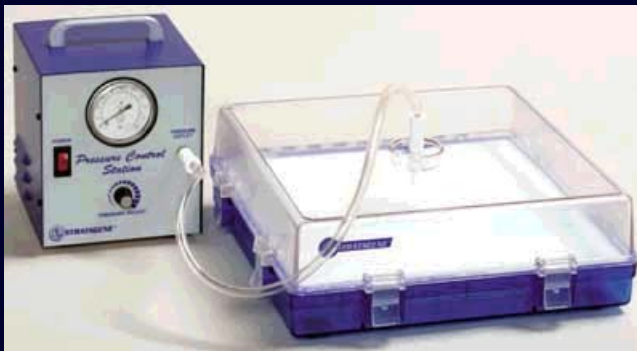
### a) Capilaridad

- simple, bajo costo
- menor eficiencia, mayor tiempo

SSC 20X (3M NaCl, 0,3M Citrato de Na)

### b) Vacuum blotting

- disminuye tiempo transferencia
- aumenta definición



### c) Electroblotting

- requiere geles de poliacrilamida



# NORTHERN BLOT

## 3. TRANSFERENCIA DEL RNA A UNA MEMBRANA

### TIPOS DE MEMBRANAS

#### a) NITROCELULOSA

- baja capacidad de unión de ácidos nucleicos ( $80 \mu\text{g}/\text{cc}^2$ )
- frágil
- carga negativa

#### b) NYLON

- mayor capacidad de unión ( $400\text{-}500 \mu\text{g}/\text{cc}^2$ )
- mayor resistencia
- carga neutra o positiva

# NORTHERN BLOT

## 3. TRANSFERENCIA DEL RNA A UNA MEMBRANA

### INMOBILIZACION DEL RNA EN LA MEMBRANA

#### a) Horno de vacío

Aplicable sólo a membranas de nitrocelulosa

La membrana es tratada por 2 horas a 80 °C. Al parecer el RNA forma enlaces hidrofóbicos con la membrana.

#### b) Irradiación UV

Aplicable sólo a membranas de nylon

La exposición a la luz UV activa las bases T/U haciéndolas altamente reactivas con los grupos amino de la superficie de la membrana y formando enlaces covalentes. Aumenta la estabilidad y permanencia de los ácidos nucleicos en la membrana.

# NORTHERN BLOT

## 4. GENERACION DE UNA SONDA MARCADA

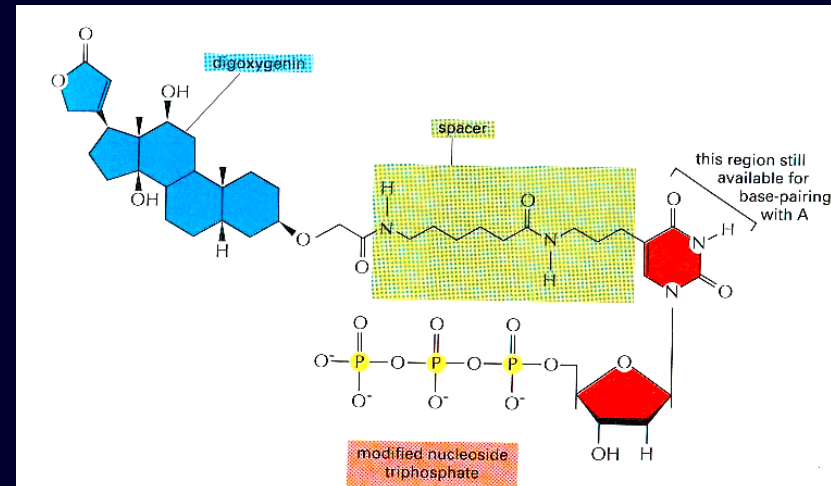
### TIPOS DE MARCA

#### 1. Radioactiva:

- dNTPs marcados en posición  $\gamma$  con  $^{32}\text{P}/^{33}\text{P}$
- muy sensible
- contaminante
- vida media del isotopo

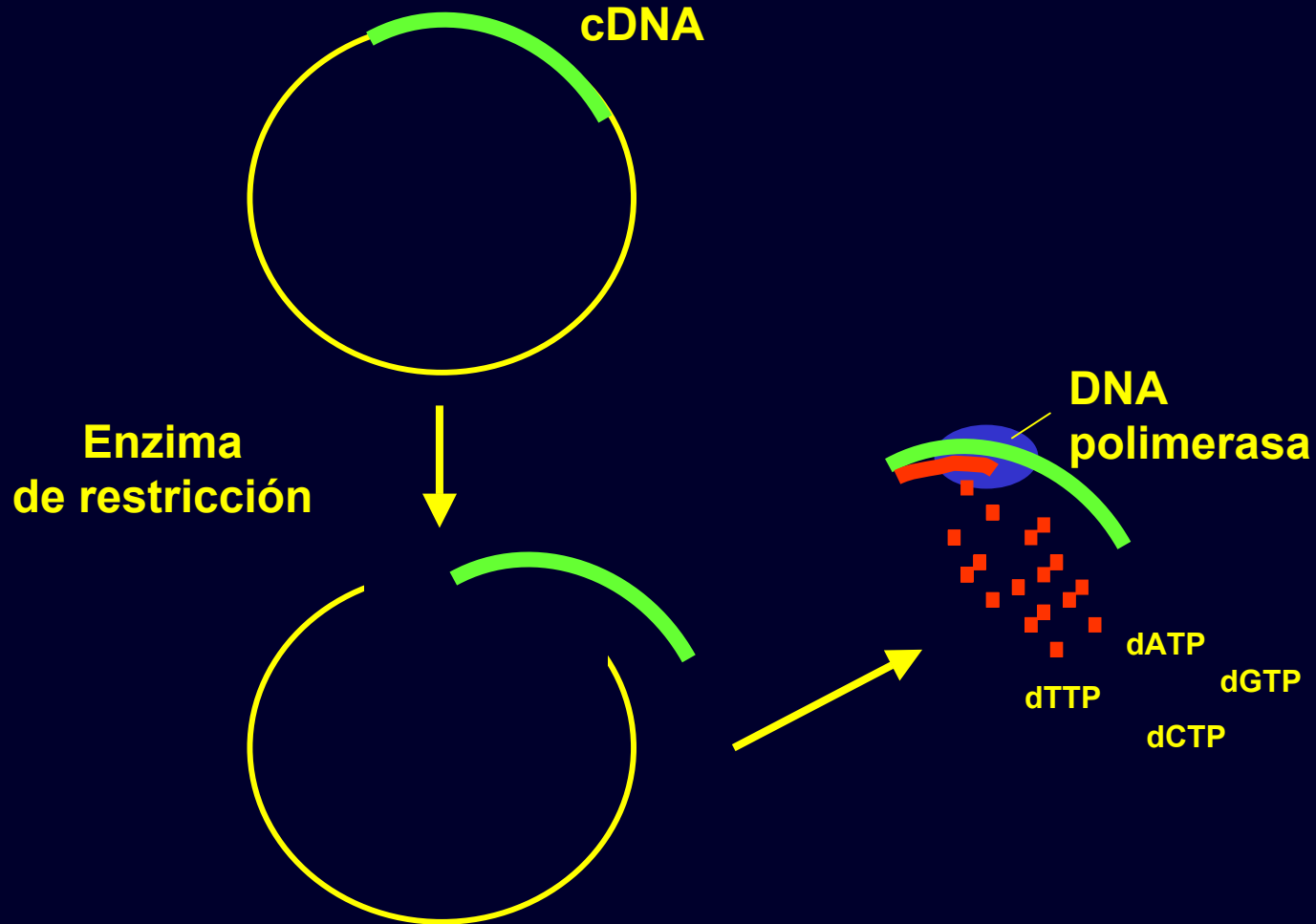
#### 2. No radioactiva:

- dNTPs marcados con biotina o digoxigenina
- menor sensibilidad
- menor razón señal/ruido



# NORTHERN BLOT

## 4. GENERACION DE UNA SONDA MARCADA

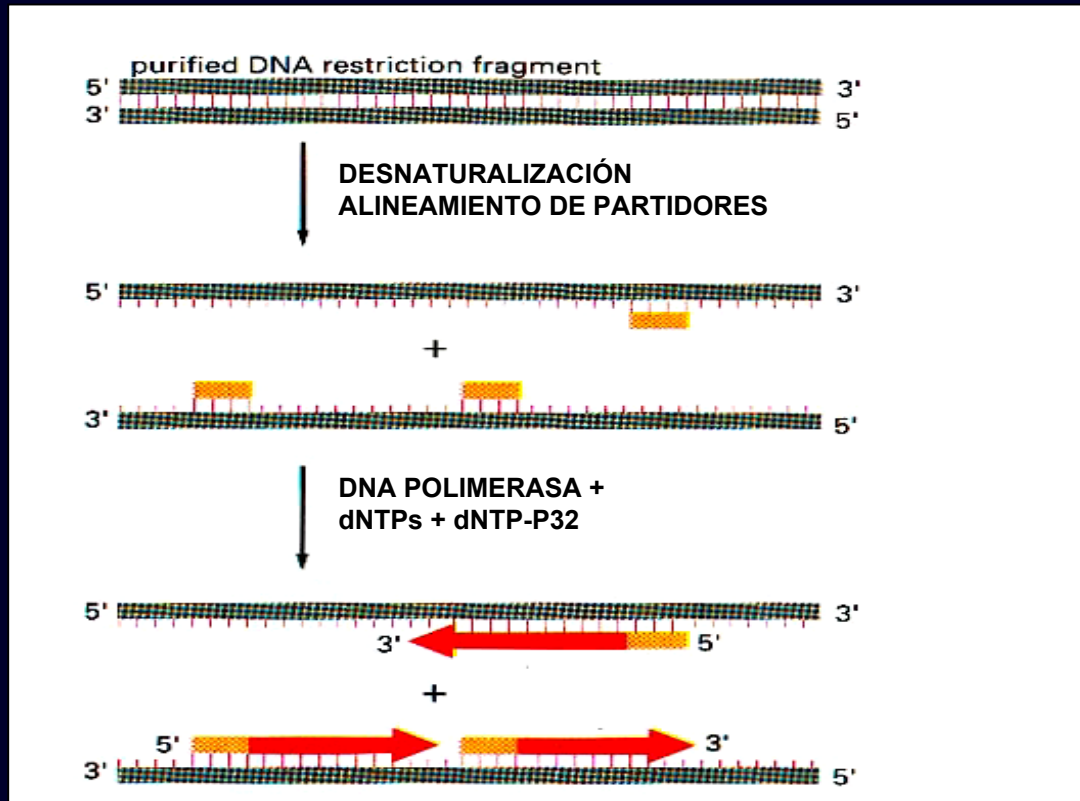


# NORTHERN BLOT

## 4. GENERACION DE UNA Sonda MARCADA

### Métodos de síntesis de una sonda marcada

- *Random priming*

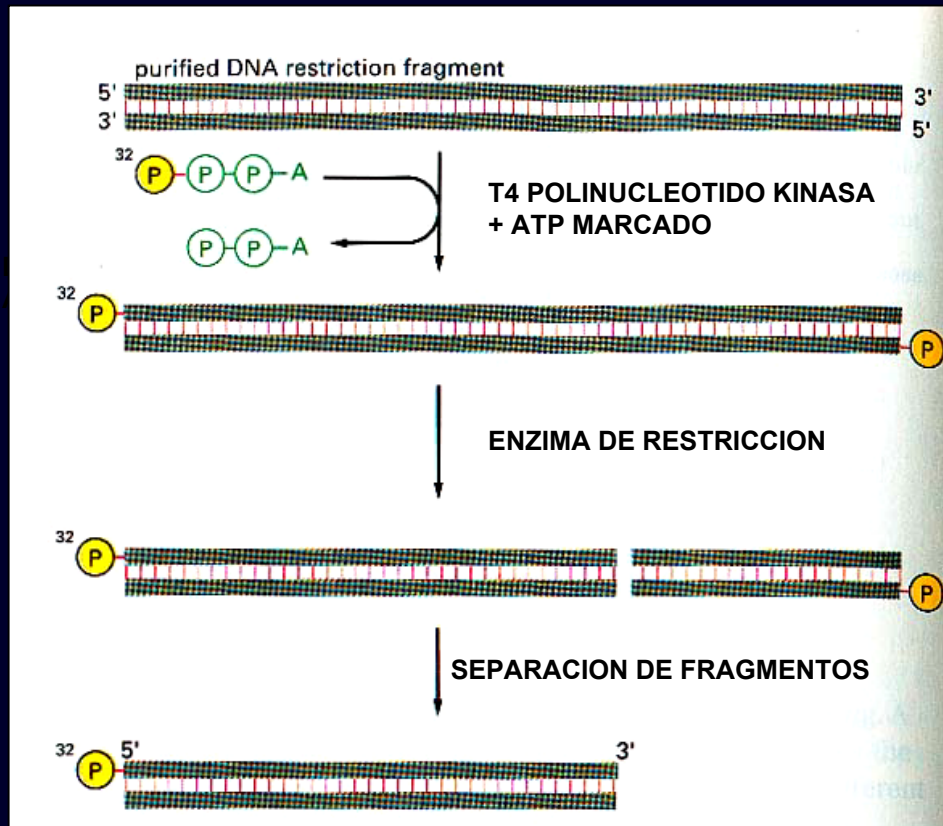


# NORTHERN BLOT

## 4. GENERACION DE UNA Sonda MARCADA

### Métodos de síntesis de una sonda marcada

- *End-labeling*

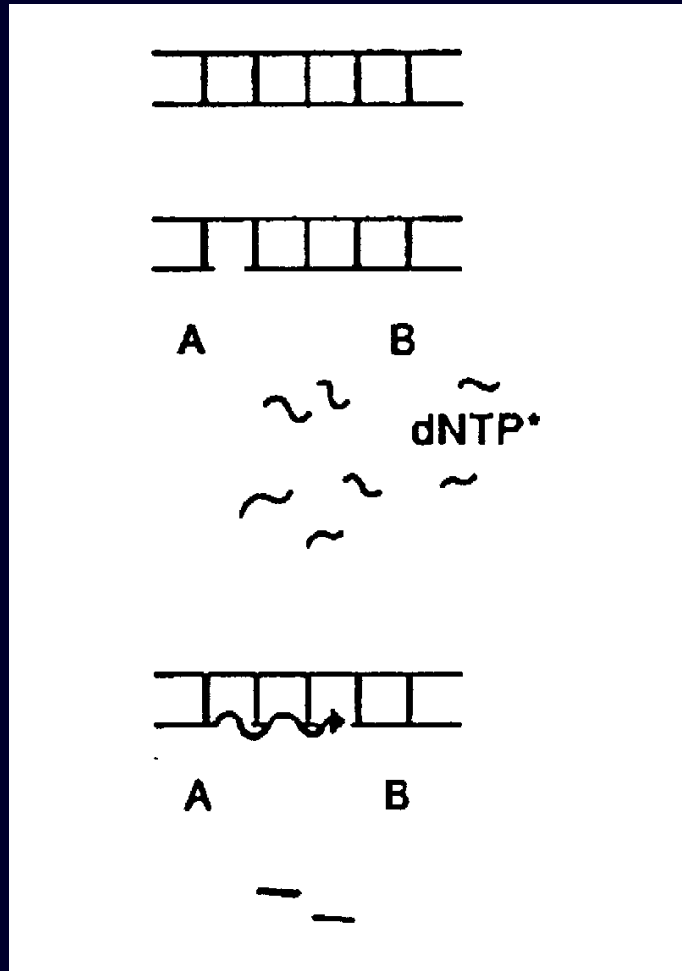


# NORTHERN BLOT

## 4. GENERACION DE UNA Sonda MARCADA

### Métodos de síntesis de una sonda marcada

- *Nick-translation*



ds DNA

DNase I rompe el DNA  
al azar

DNA polimerasa I  
agrega nucleótidos

# NORTHERN BLOT

## 5. HIBRIDACION

### ETAPAS

- A) Pre-hibridación o bloqueo
- B) Hibridación
- C) Lavados



# NORTHERN BLOT

## A) Pre-hibridación o bloqueo

- ¿Por qué?
  - La membrana une ácidos nucleicos
  - La sonda marcada puede unirse de forma inespecífica y aumentar el ruido
- ¿Cómo?
  - La membrana es incubada con una solución de pre-hibridación a la temperatura de hibridación.
  - La solución de pre-hibridación contiene compuestos que se unen inespecíficamente a la membrana previniendo la unión de la sonda a regiones de la membrana que no contienen su hebra complementaria.

# NORTHERN BLOT

## B) Hibridación

- La sonda marcada se aparea en solución con su hebra complementaria, inmovilizada en la membrana.
- Condiciones
  - Deben ser determinadas empíricamente
    - factores que afectan la hibridación de ácidos nucleicos
  - La solución de hibridación incluye:
    - 5x SSC (3M NaCl, 0,3M Citrato de Na)
    - 50% Formamida
    - 1% SDS
    - 5x Denhardt
    - DNA heterólogo (ssDNA espermio de salmón).
  - Temperatura bajo la  $T_m$  para optimizar la velocidad de la hibridación
    - En presencia de formamida: 15-20 °C bajo la  $T_m$

# NORTHERN BLOT

## C) Lavados

- ¿Por qué?
  - Para remover la sonda que está:
    - En exceso
    - Unida de manera inespecífica
    - Unida, pero es poco complementaria
- ¿Cómo?
  - Incubando la membrana en una solución que carece de sonda marcada
  - Utilizando condiciones que minimizan la hibridación inespecífica.
    - Estrictez

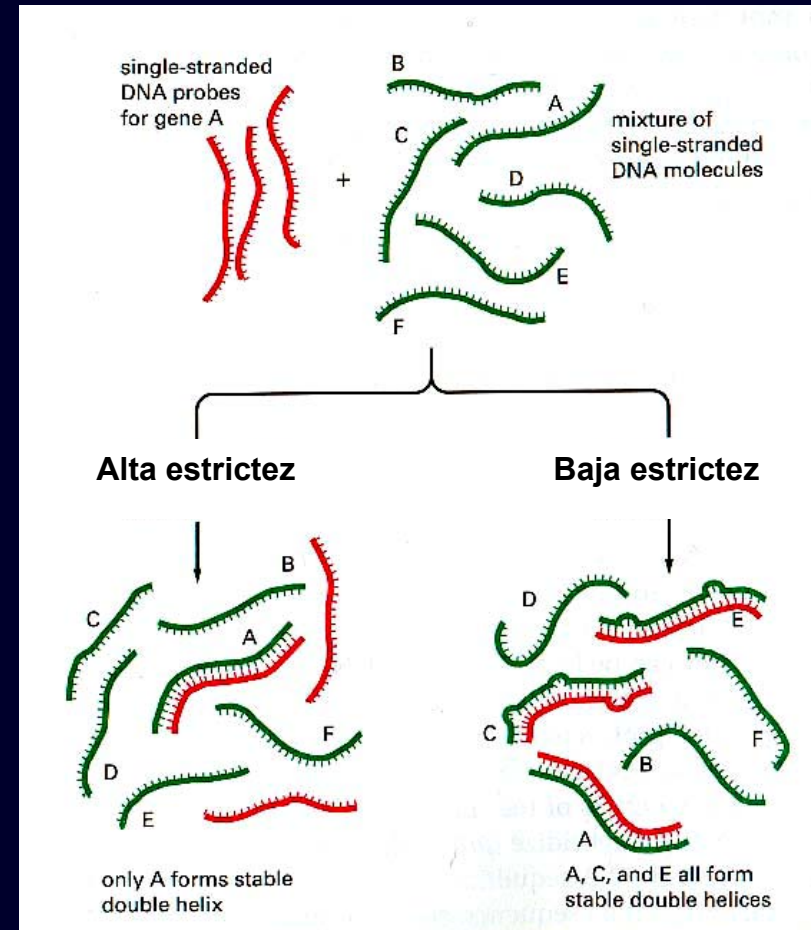
# NORTHERN BLOT

## C) Lavados

**ESTRICTEZ:** Una medida de la probabilidad de separar dos hebras de ácidos nucleicos.

—↑ estrictez → ↑ probabilidad de separar dos hebras

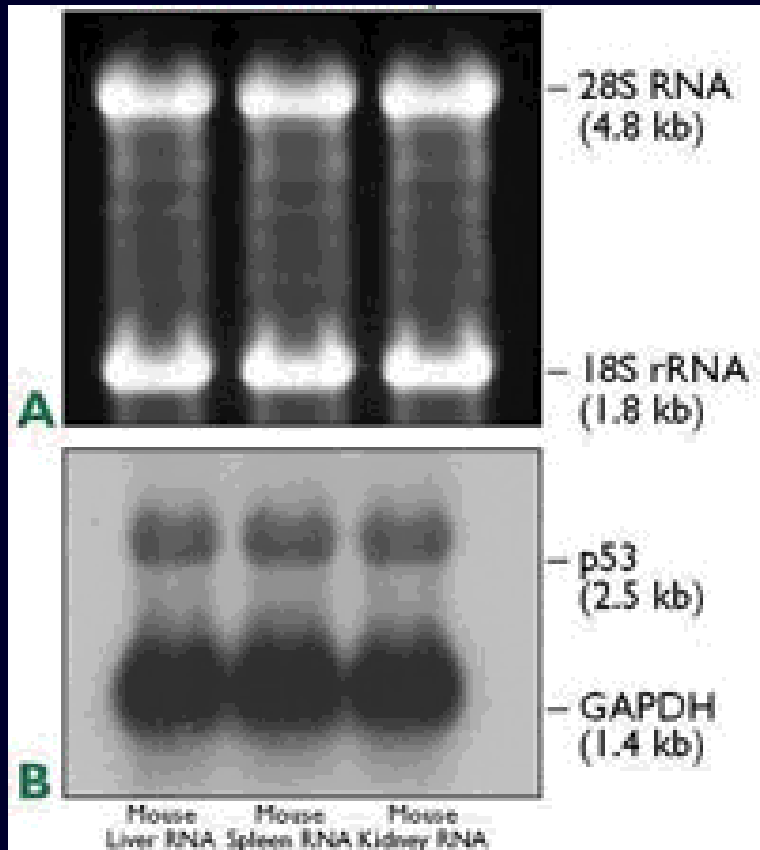
- Bajar la [sal]
- Aumentar la  $T^\circ$
- Incluir formamida



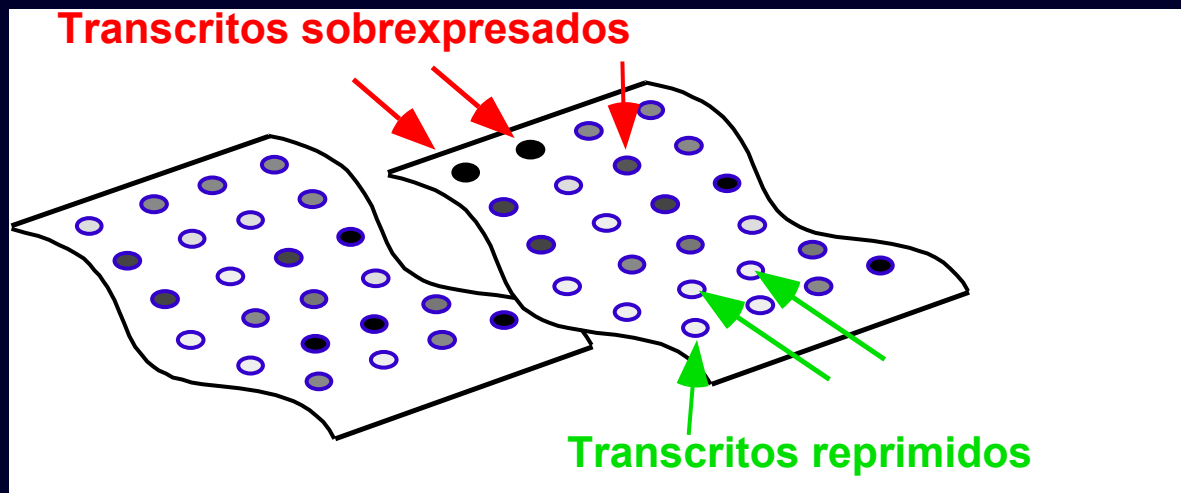
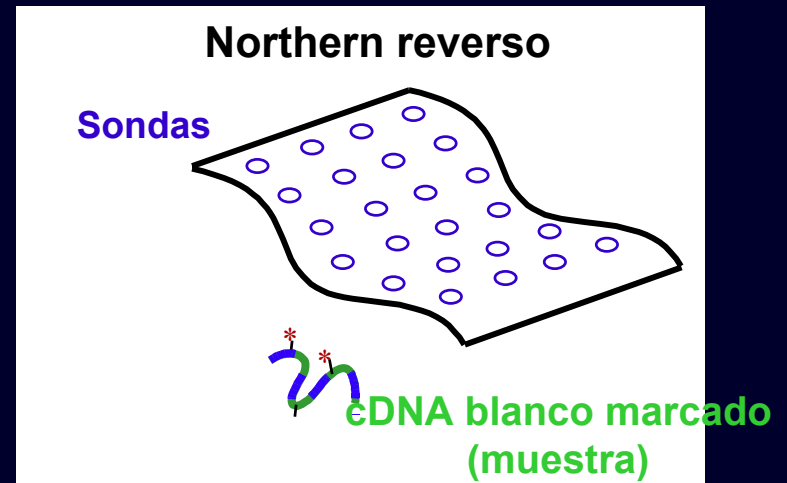
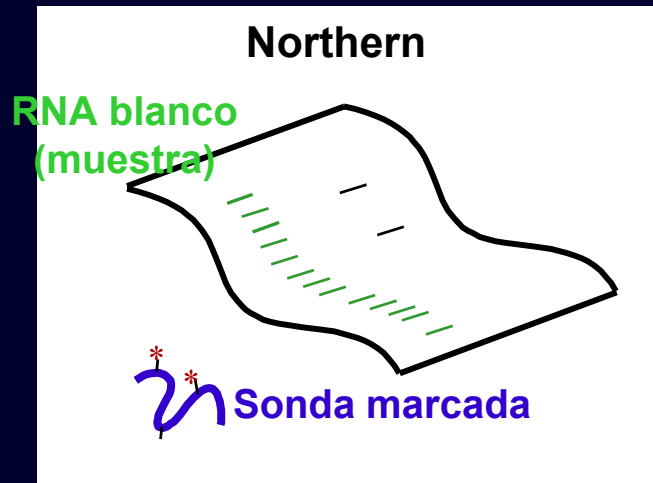
# NORTHERN BLOT

## 6. Visualización

- Captura de la radiación ionizante por una emulsión fotográfica
- La membrana es expuesta a un film por tiempos variables
- El film es revelado y analizado



# NORTHERN BLOT REVERSO



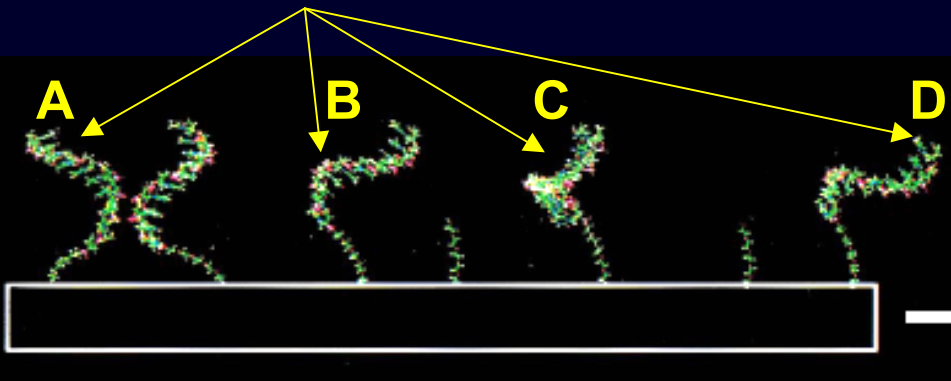
**Intensidad de la señal de hibridación proporciona información de la abundancia relativa de cada transcrito en la muestra.**

## ***Microarrays/Macroarrays***

- **Determina el nivel de expresión de múltiples genes → abundancia relativa de sus transcritos.**
- **Revela la respuesta transcripcional del genoma frente a una alteración ambiental, en diferentes tipos celulares, a lo largo de periodos secuenciales de tiempo, etc.**
- **Permite agrupar diferentes genes sobre la base de sus perfiles de expresión → estudiar sus relaciones y jerarquías funcionales.**

# NORTHERN BLOT REVERSO

## Sondas

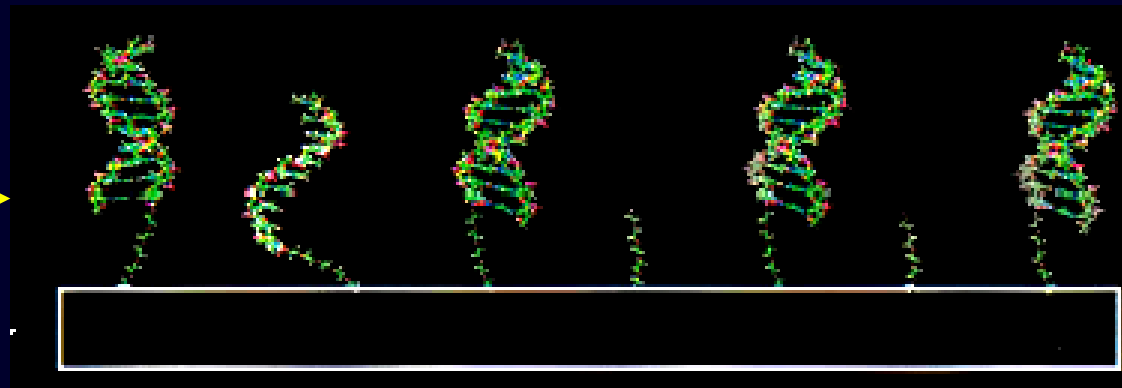
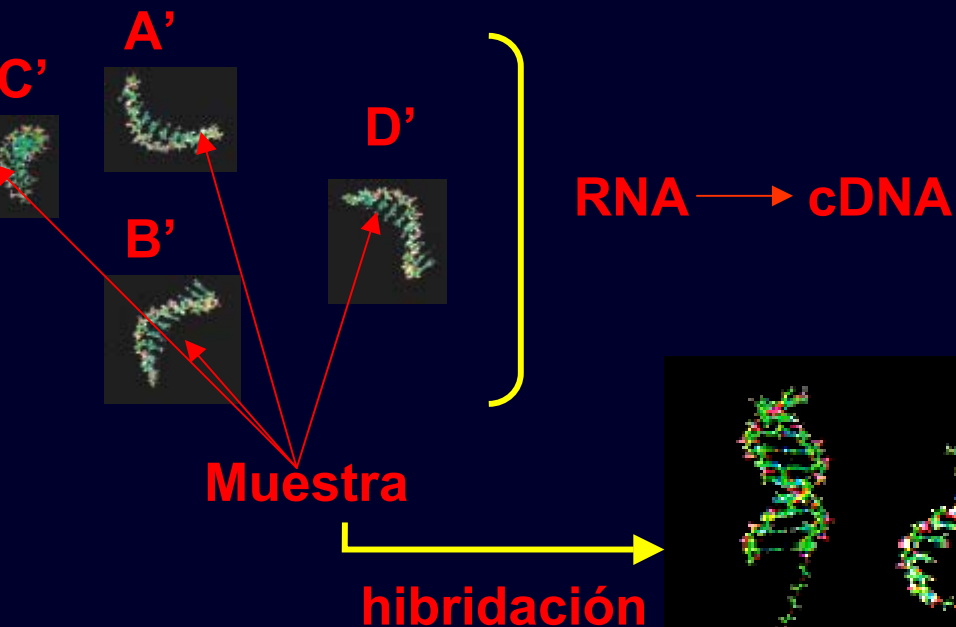


## Origen de las sondas

1. Colecciones de Expressed Sequences Iags (EST)
2. Genotecas de cDNAs
3. Secuencias genómicas

## Origen del cDNA blanco

- Cultivos celulares
- Organismos completos
- Tejidos
- Biopsias





# Tipos de arrays

## 1. Macroarrays:

- DNAs (cDNA o productos de PCR 0,6-2,4 Kb) son inmovilizados en una membrana de nylon.
- Contienen 200-5000 sondas.
- Baja densidad de las sondas inmovilizadas.
- La muestra a hibridar es marcada con radioactividad.

## 2. Microarrays:

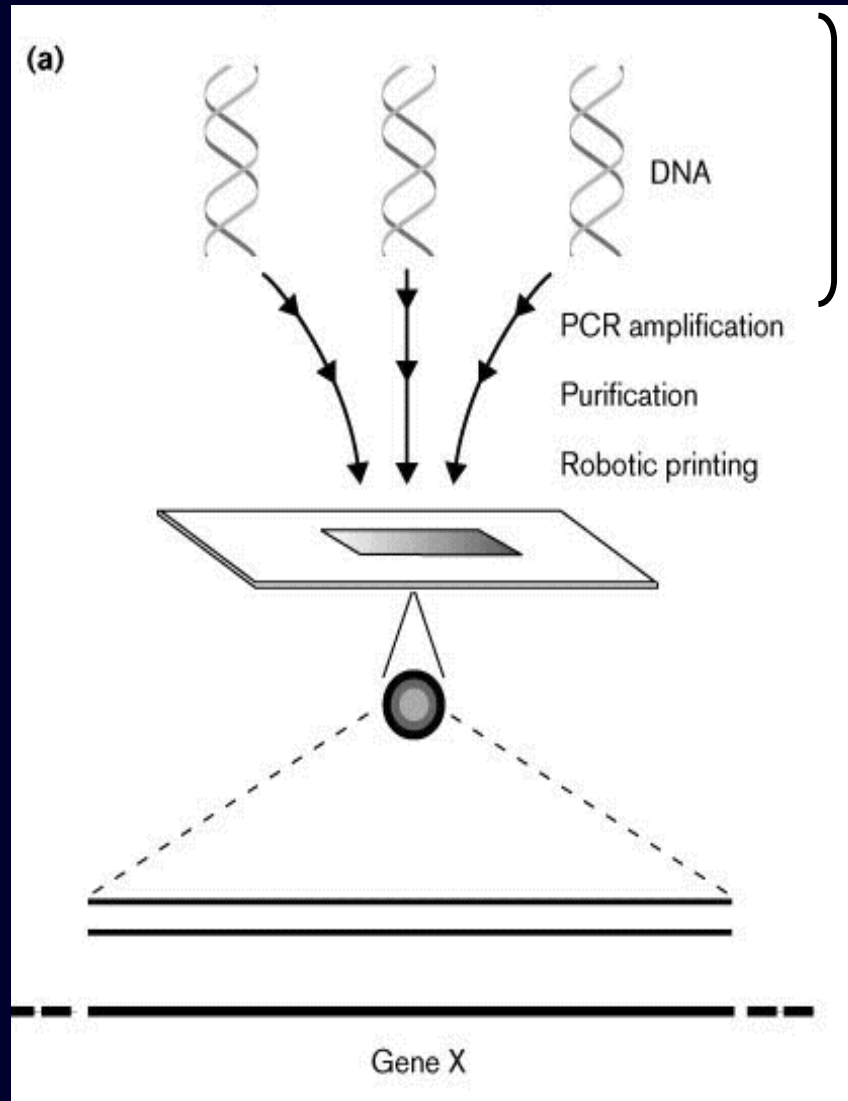
- DNAs son sembrados en vidrio o plástico.
- Contienen >2000 sondas.
- Alta densidad de sondas inmovilizadas.
- La muestra a hibridar es marcada con derivados fluorescentes.

# Tipos de arrays

## 2. Microarrays de oligonucleotidos:

- Oligonucleotidos (25 pb) son sintetizados sobre una matriz de vidrio o plástico.
- Contienen 40.000-60.000 sondas.
- Alta densidad de sondas inmovilizadas ( $10^7$  copias/punto de siembra).
- La muestra a hibridar es marcada con derivados fluorescentes.

# Confección del array

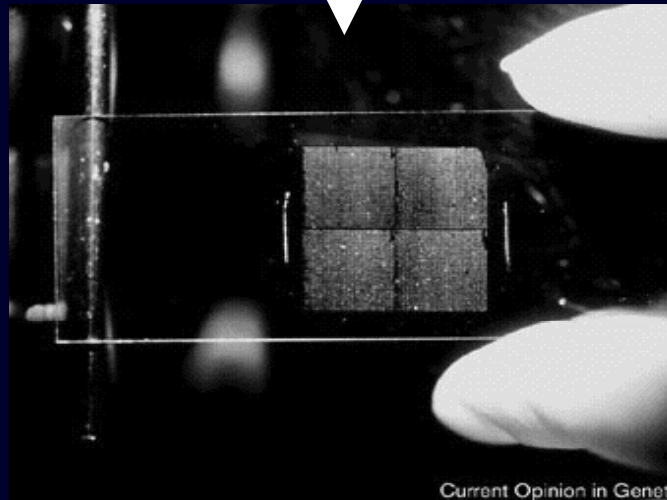
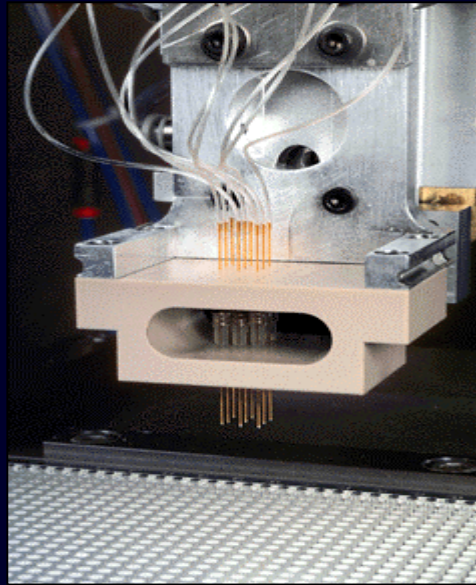


1. Colecciones de Expressed Sequences Tags (EST)
2. Bibliotecas de cDNAs
3. Secuencias genómicas

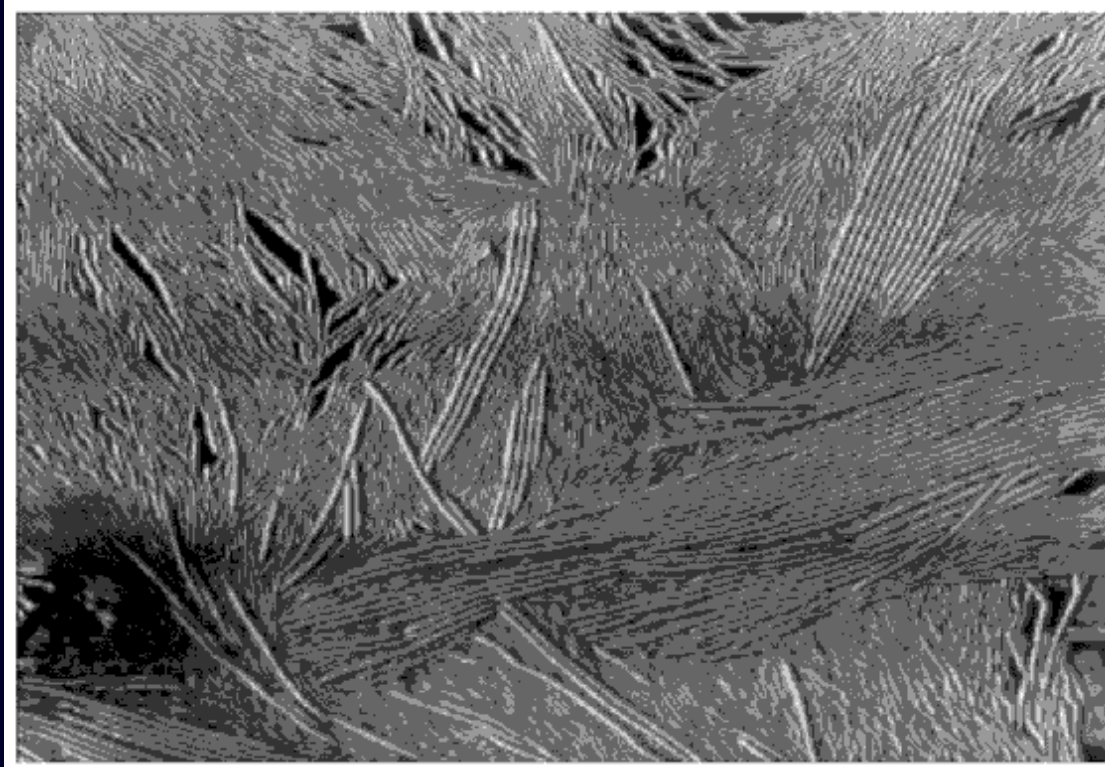
# Confección de arrays

## MICROARRAYS

Siembra 0,25-1 nL/spot  
generando spots de  
100-150  $\mu\text{m}$  de  
diámetro.



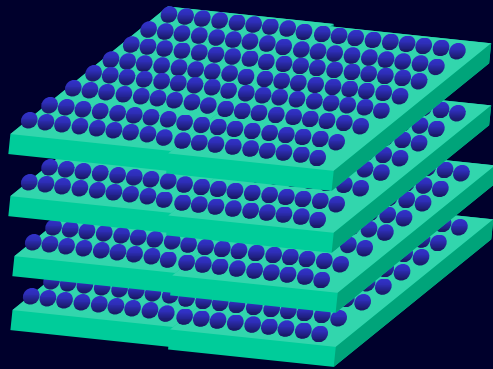
# Confección de arrays



**Figure 3: Atomic force microscopy of DNA on a microarray. This is a micrograph of a portion of a hybridization probe from a yeast microarray, taken after the array was subjected to hybridization. The DNA is clearly deposited at a sufficient density to allow many kinds of strand-to-strand interactions. The width of the picture represents a scanned distance of 2 m. Image kindly provided by J. DeRisi (Stanford) and E. Carr (Hewlett-Packard).**

# Confección de arrays

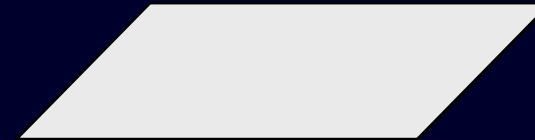
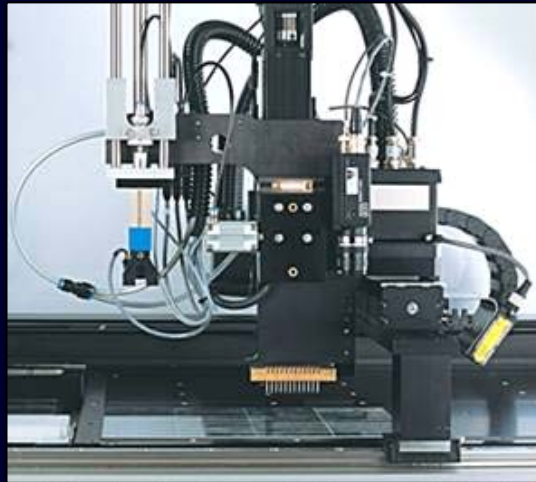
## Macroarrays



**Colección de genes  
blanco: DNA's o  
Productos de PCR**

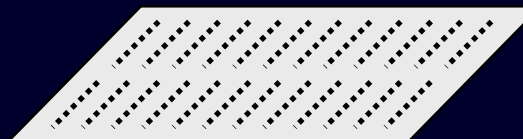
5.000 ESTs Genoteca de cDNAs  
prunus (secuenciada)

## Robot sembrador



**Membrana de nylon**

**Siembra 7 nL/spot  
generando spots de 400-  
800  $\mu$ m de diámetro.**



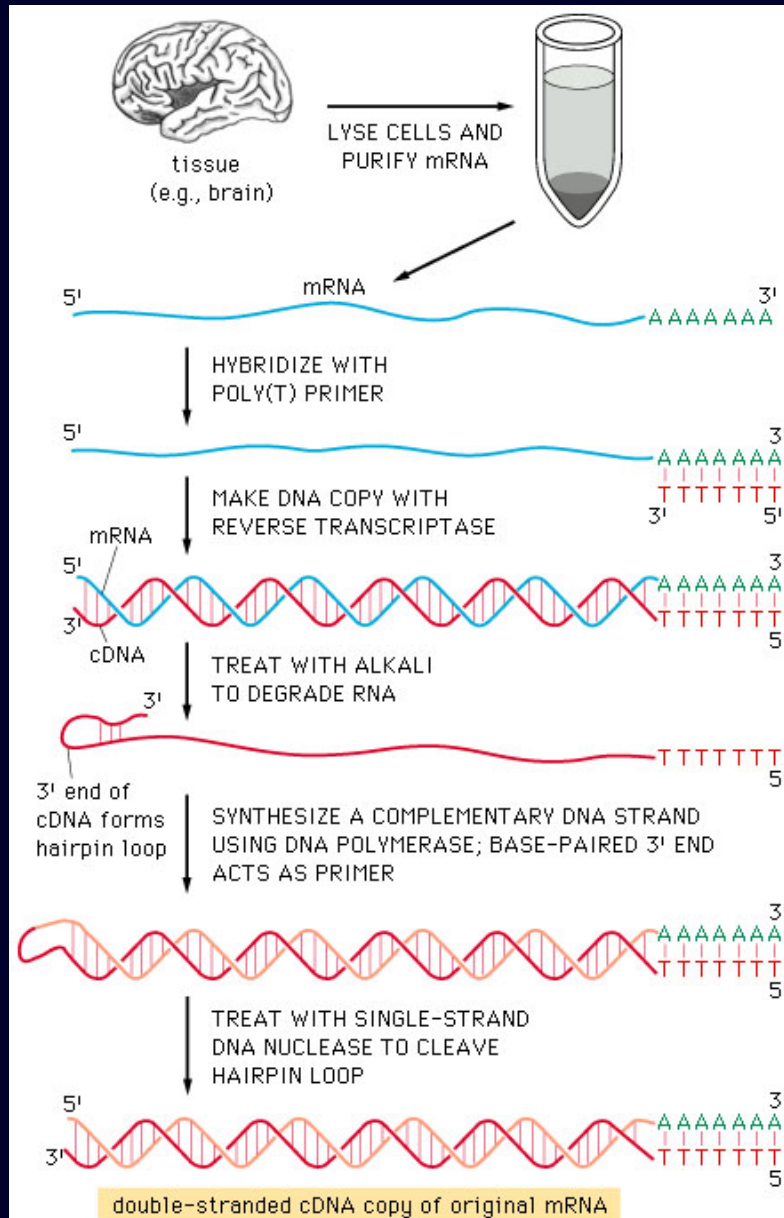
**Membrana sembrada**

# Hibridación en macro/microarrays

## En un experimento tipo:

1. Aislar RNA (total o mRNA) a partir de una muestra biológica.
2. Convertir el RNA en cDNA utilizando una transcriptasa reversa.
3. Marcar el cDNA con nucleótidos radioactivos o fluorescentes
4. Hibridar el cDNA marcado en el array.
5. Detectar y cuantificar la fluorescencia o la radioactividad. utilizando un confocal laser scanner o un phosphoimager.
6. Analizar los resultados.

# Síntesis de cDNA



**Purificación de RNA**

**Hibridación con poly(dT)**

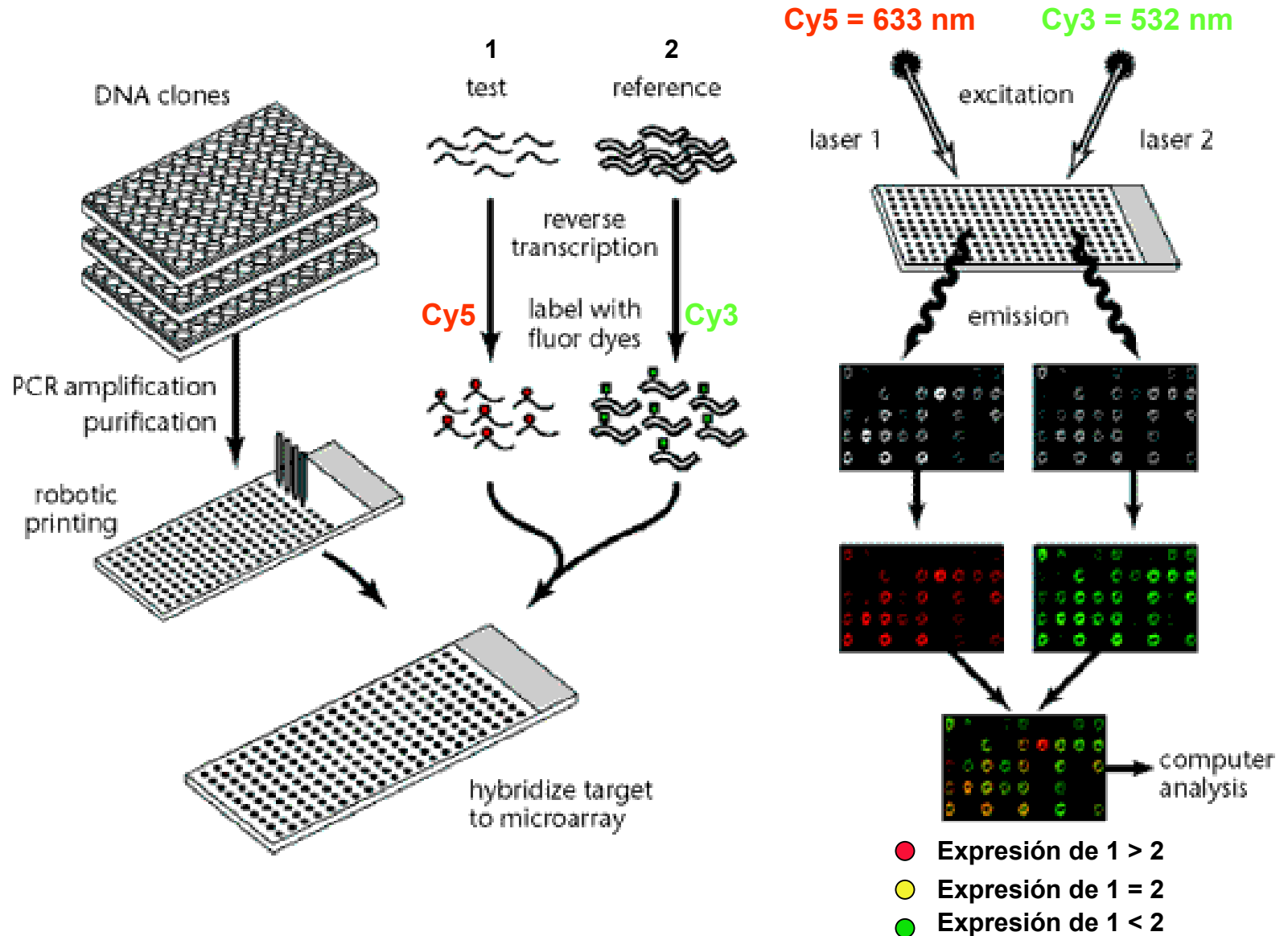
**Copia del DNA con RT**

**Degradación del RNA**

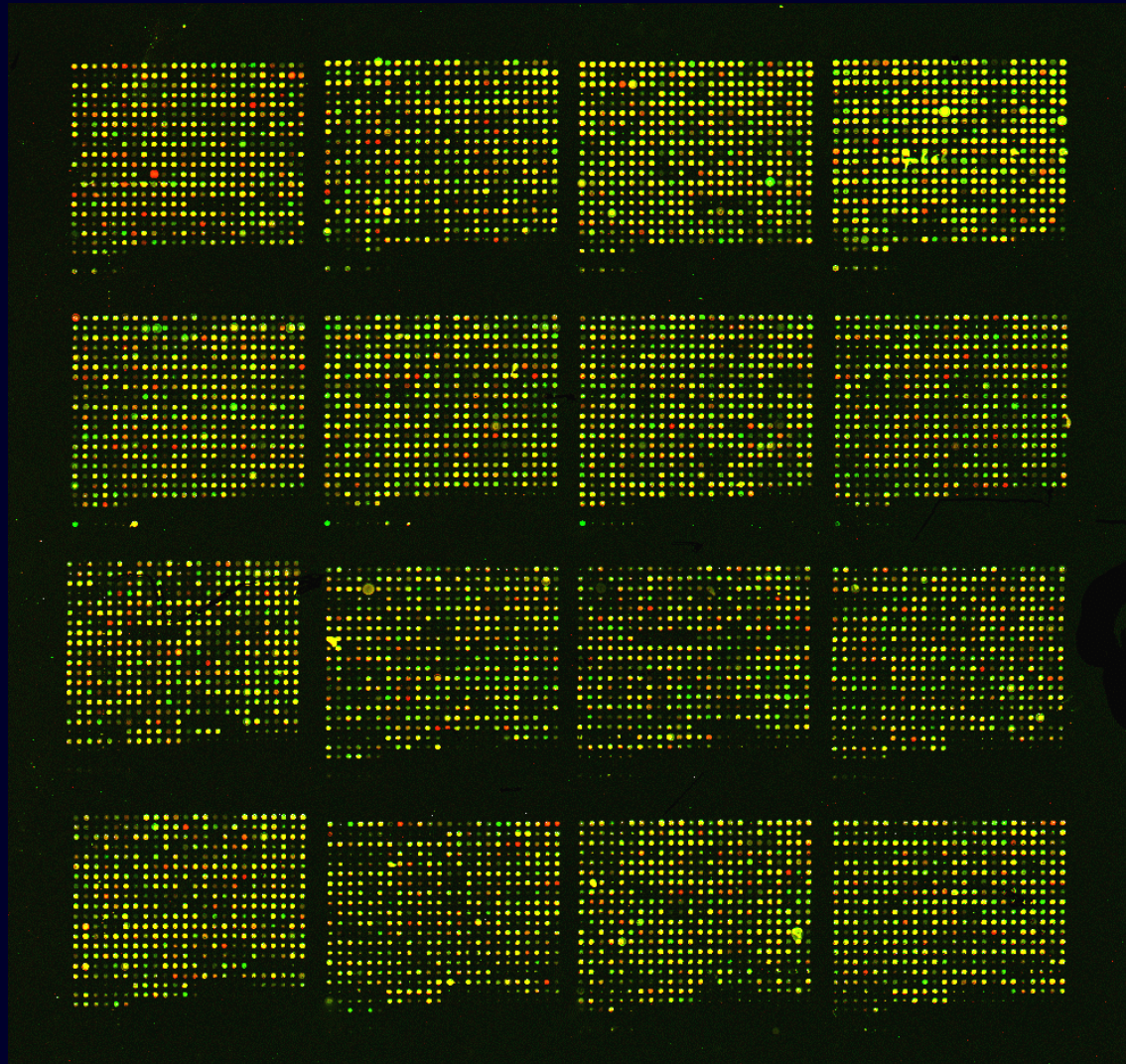
**Síntesis de la hebra complementaria**

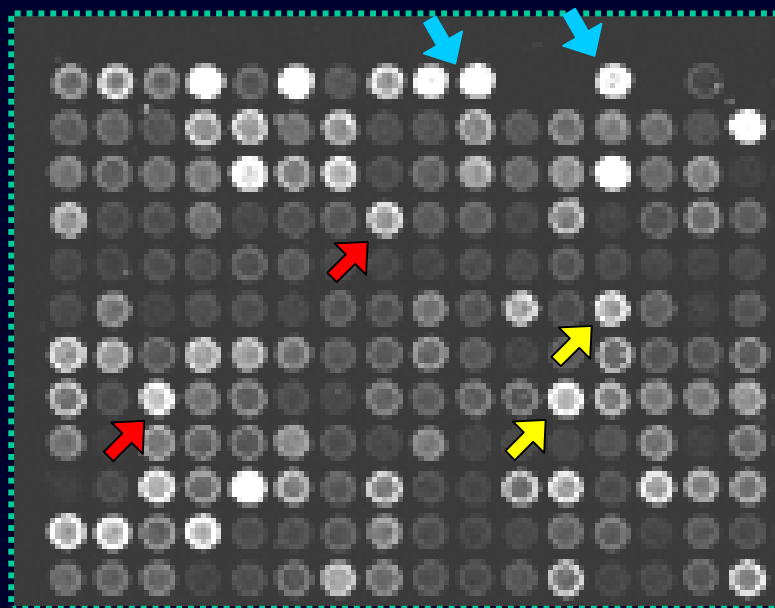
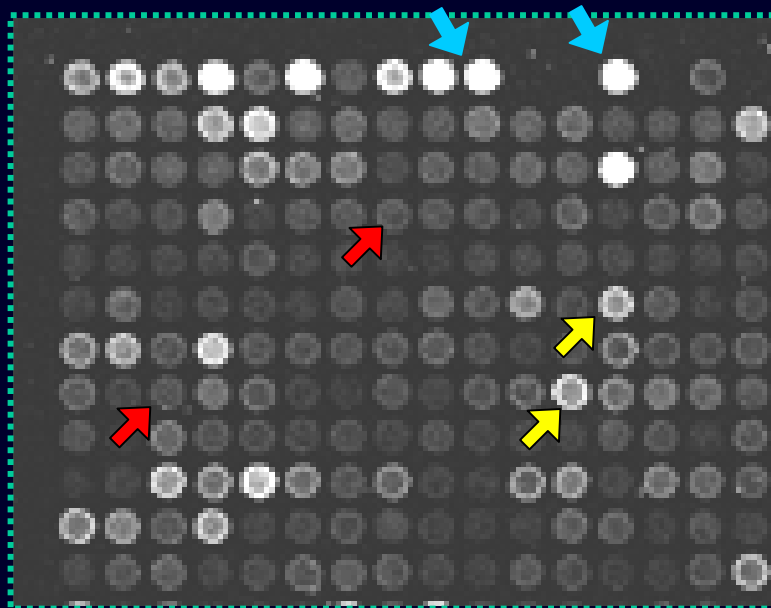


# Hibridación en microarrays

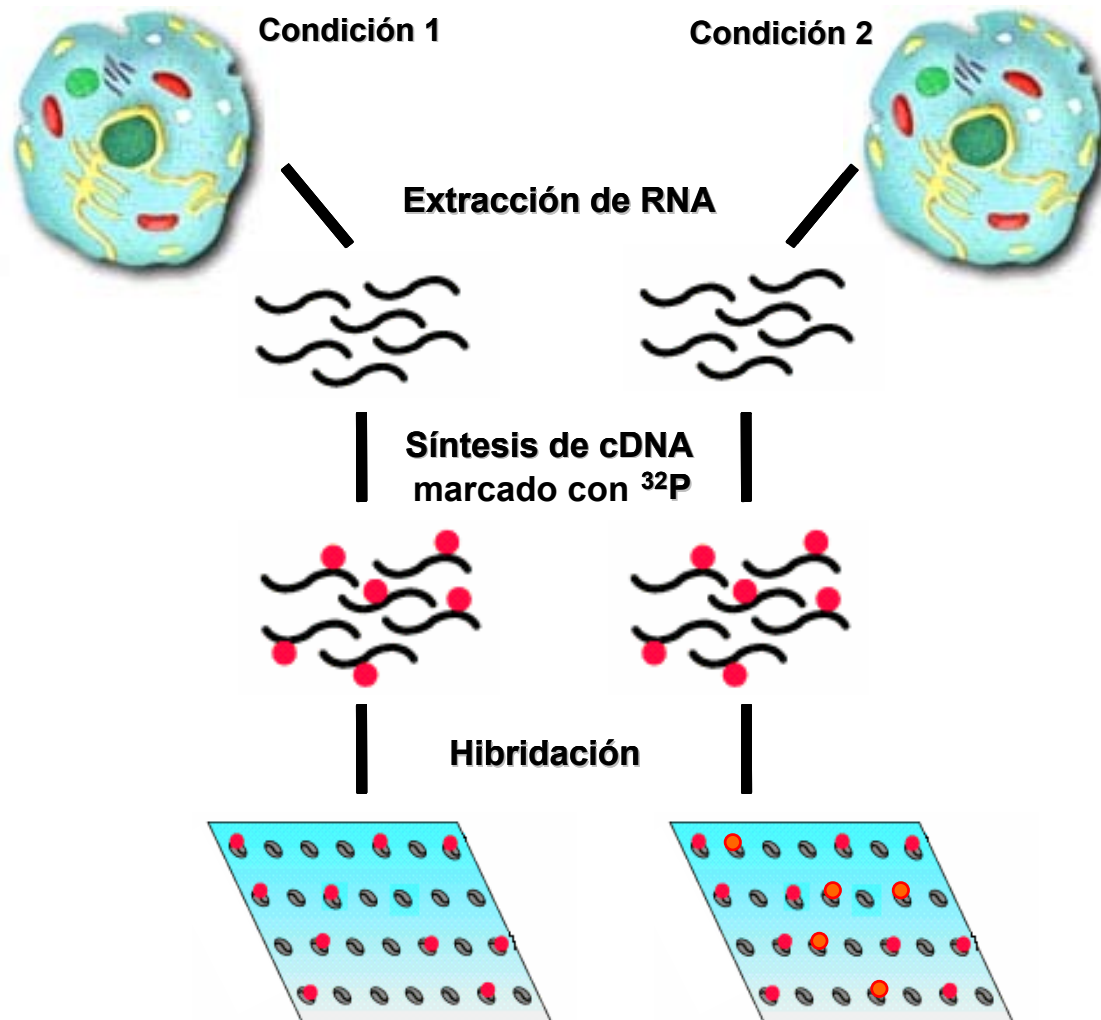


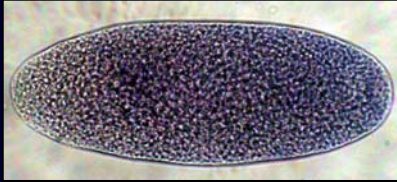
# Microarray de levadura



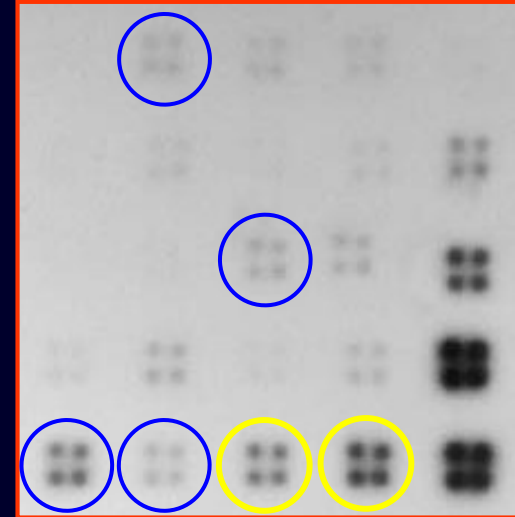
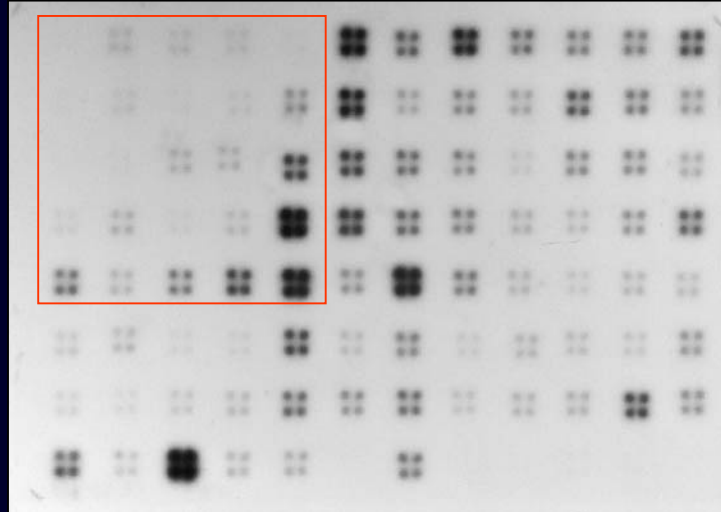


# Hibridación en macroarrays

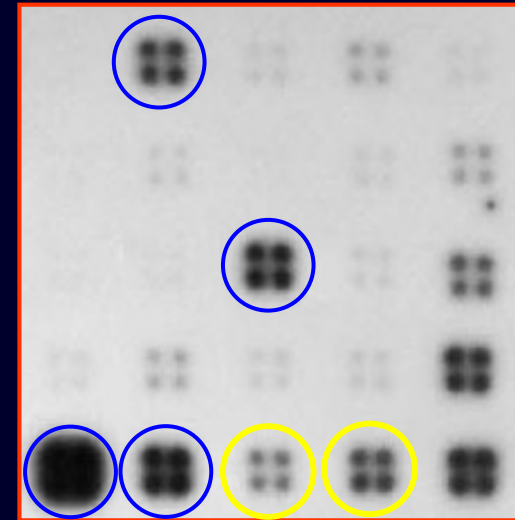
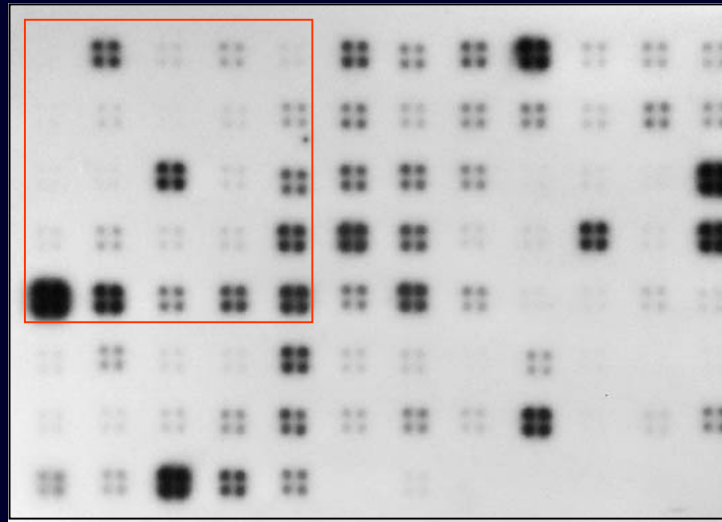




**blastodermo sincicial (Bs)**

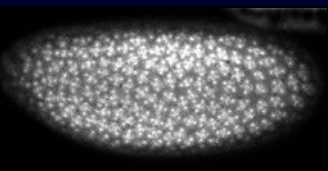


**Gástrula temprana (G)**

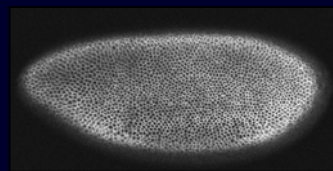




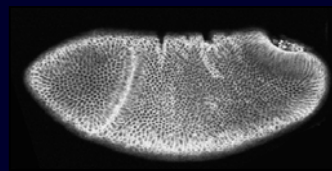
150



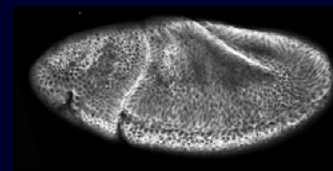
195



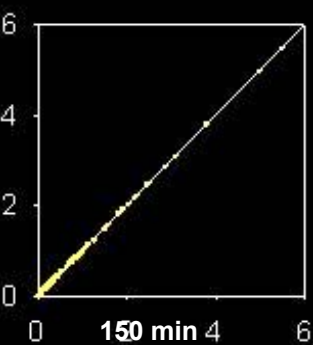
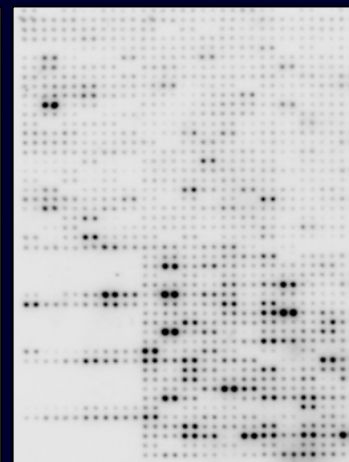
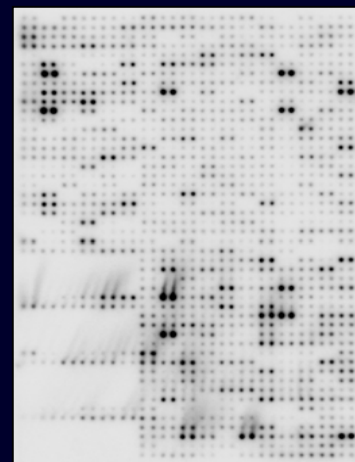
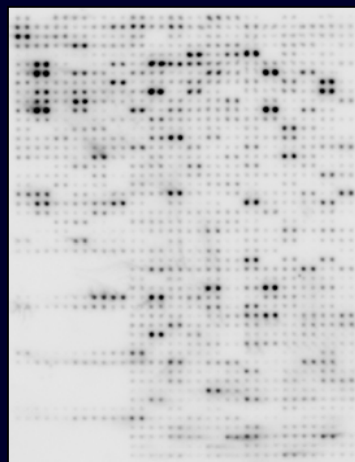
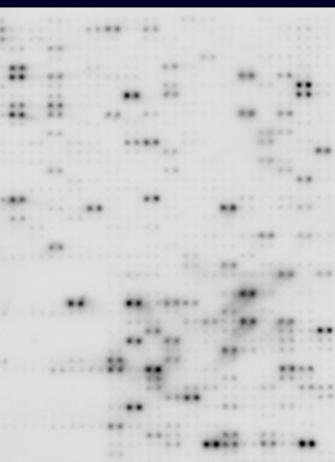
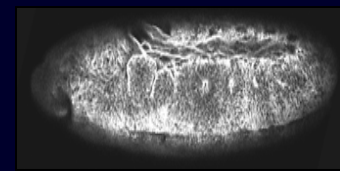
225



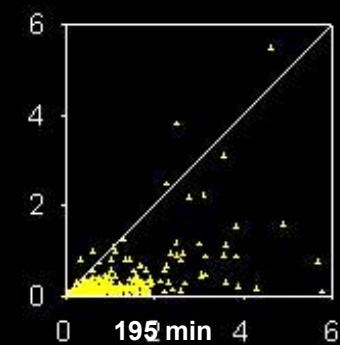
310



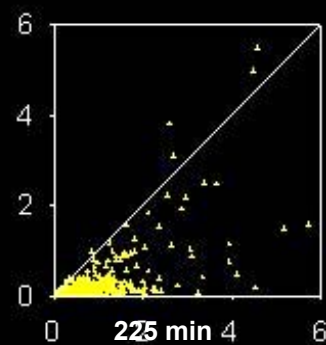
630 min



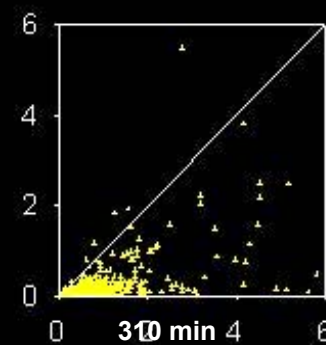
A



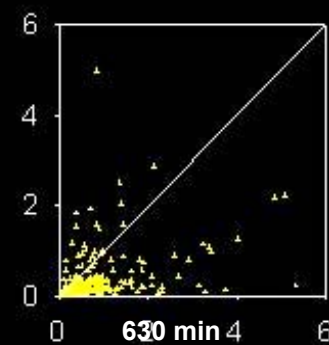
B



C



D



E

# DETECCION DE ACIDOS NUCLEICOS

- HIBRIDACIÓN *IN SITU*

PERMITE DETECTAR LA DISTRIBUCION ESPACIAL Y TEMPORAL DE UN TRANSCRITO EN UNA CELULA, TEJIDO U ORGANISMO ENTERO.

# HIBRIDACION *IN SITU*

## Tipos de sondas

### RNA

- Hebra complementaria al mRNA blanco
- Transcripción *in vitro* de un RNA marcado

### DNA



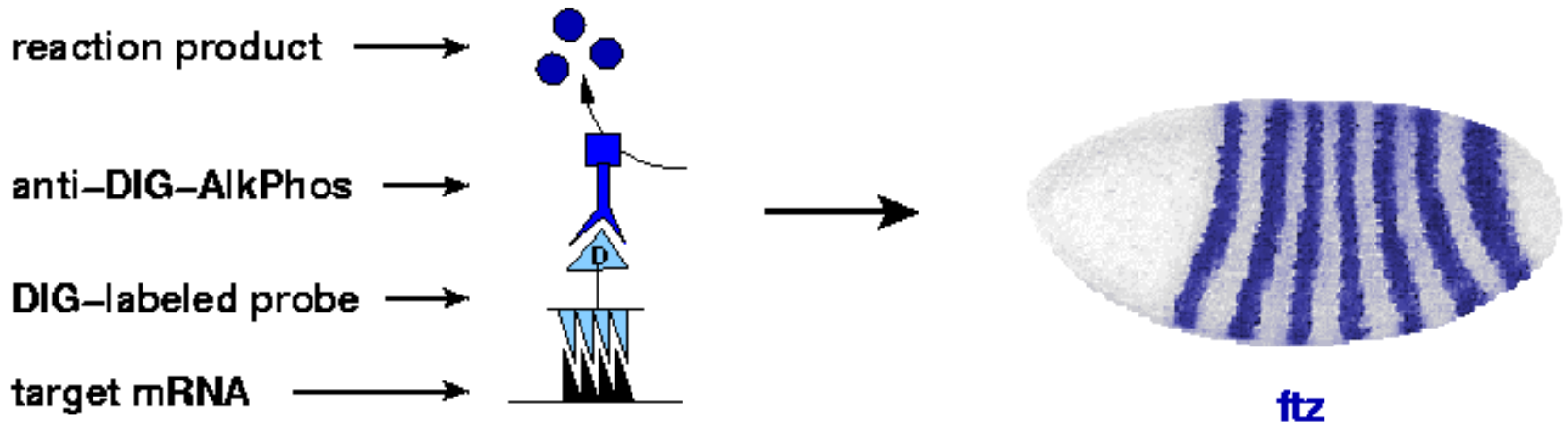
# ¿Cómo visualizar la sonda?

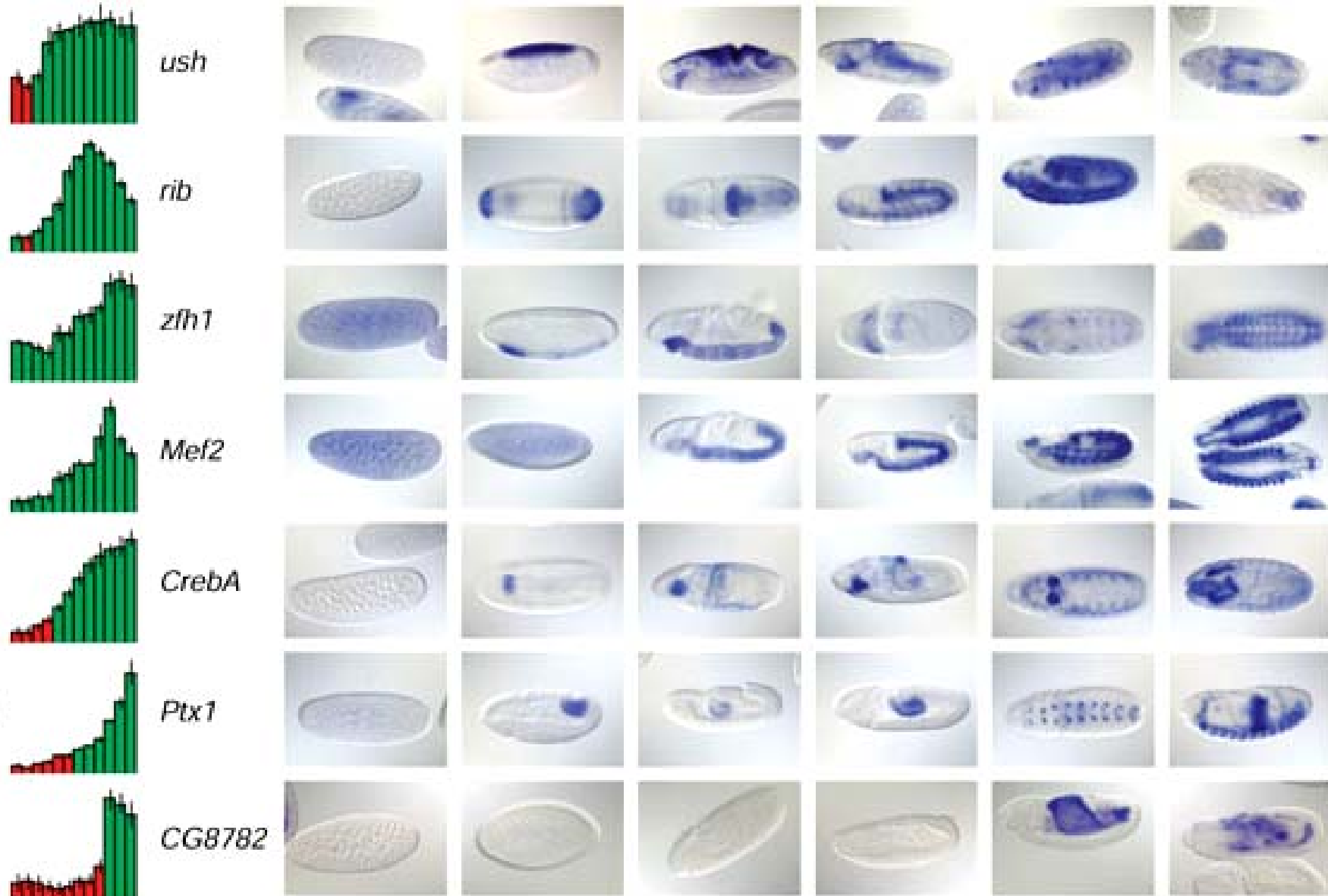
ATCCGATGCATCCGA

UTP-Fluoroforo

DIG DIG DIG  
ATCCGATGCATCCGA

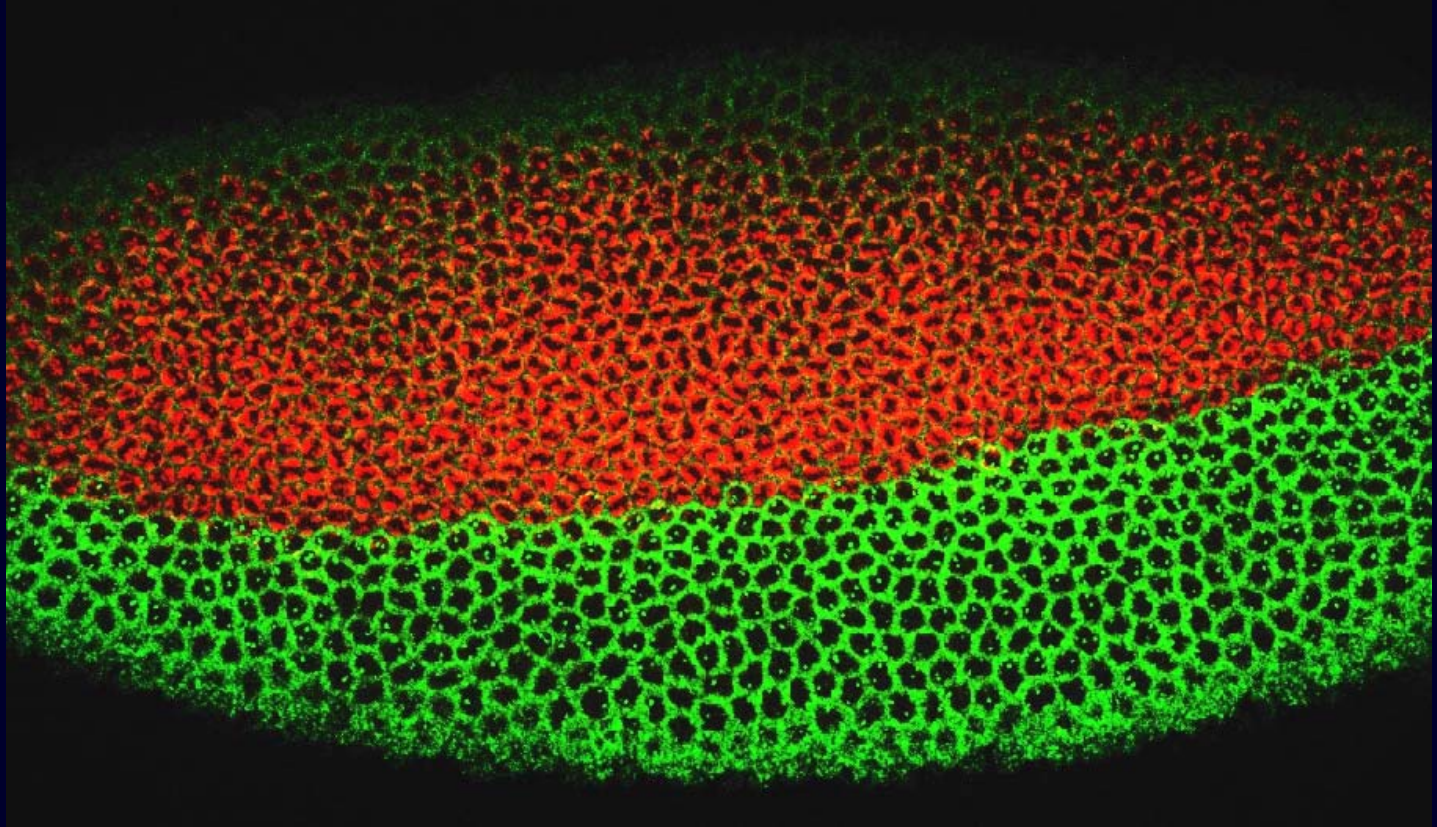
UTP-Digoxigenina





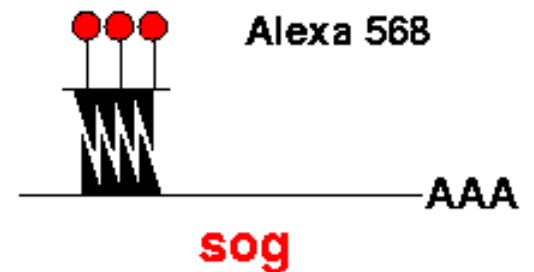
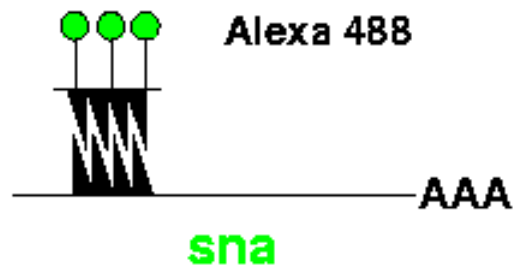
*Correlación entre imágenes y datos de microarrays*

Fluctuaciones relativas de las señales de intensidad durante el desarrollo



Fluorescently  
Labeled  
Riboprobes

Target  
Transcripts



# DETECCION DE ACIDOS NUCLEICOS

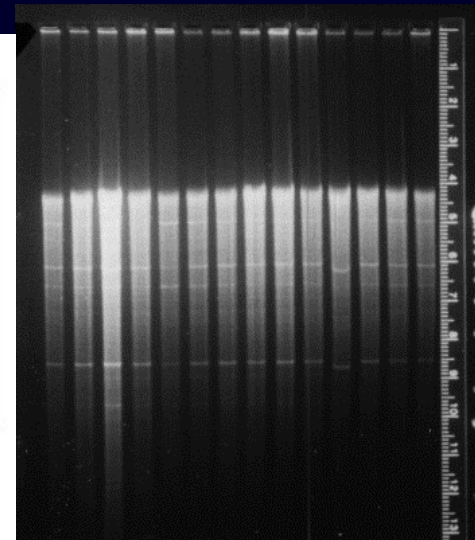
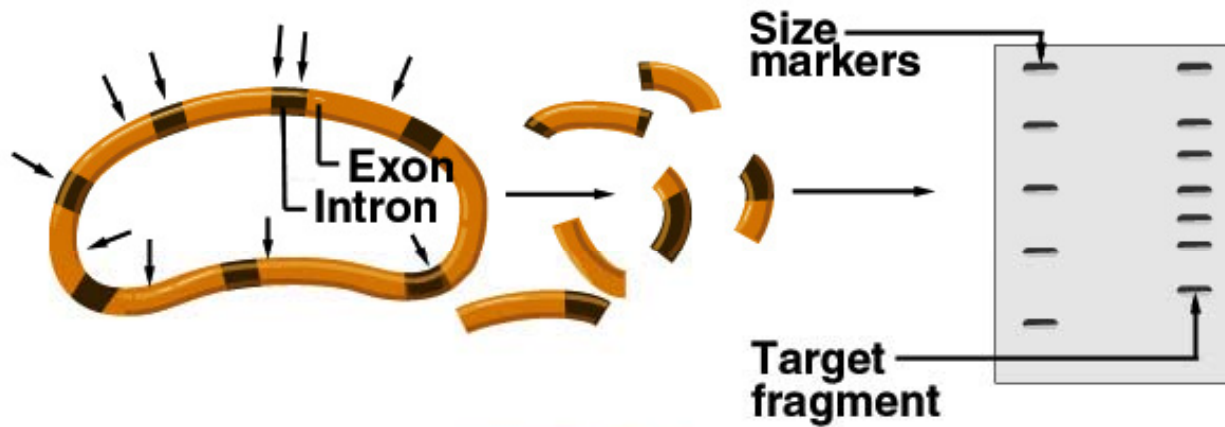
- SOUTHERN BLOT

PERMITE DETECTAR LA PRESENCIA Y EL  
NUMERO DE COPIAS DE UN GEN EN UN  
GENOMA.

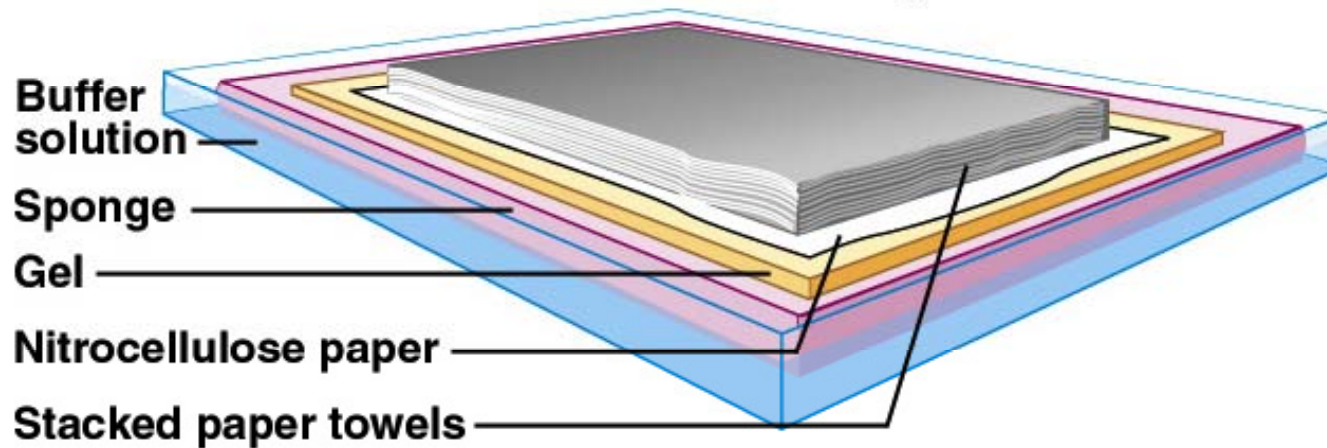
# **SOUTHERN BLOT**

- 1. OBTENCION DE DNA GENOMICO**
- 2. DIGESTION CON ENZIMAS DE RESTRICCION**
- 3. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA**
- 2. TRANSFERENCIA DEL DNA A UNA MEMBRANA**
- 3. HIBRIDACION**
- 4. VISUALIZACIÓN**

# SOUTHERN BLOT

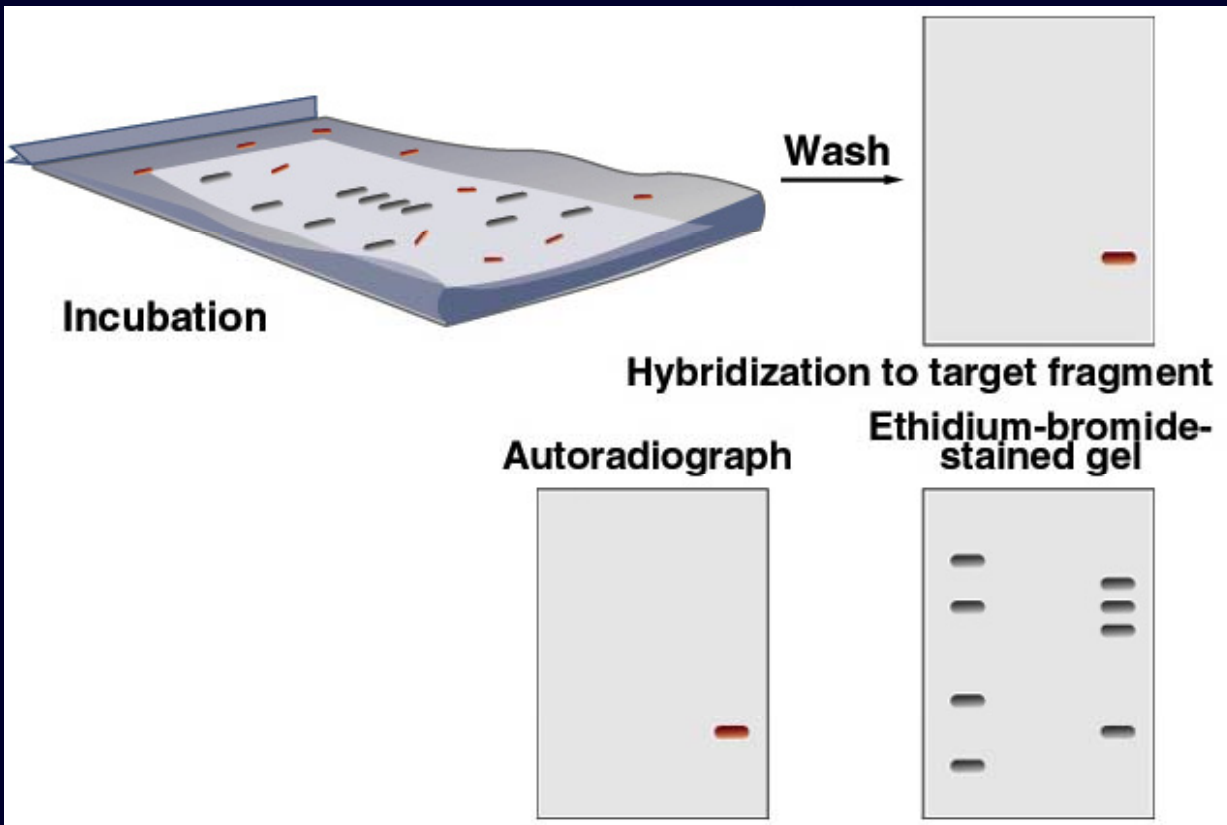


**BROMURO DE ETIDIO**





# SOUTHERN BLOT



SOUTHERN BLOT

Fig. 8.19

# DETECCION DE ACIDOS NUCLEICOS

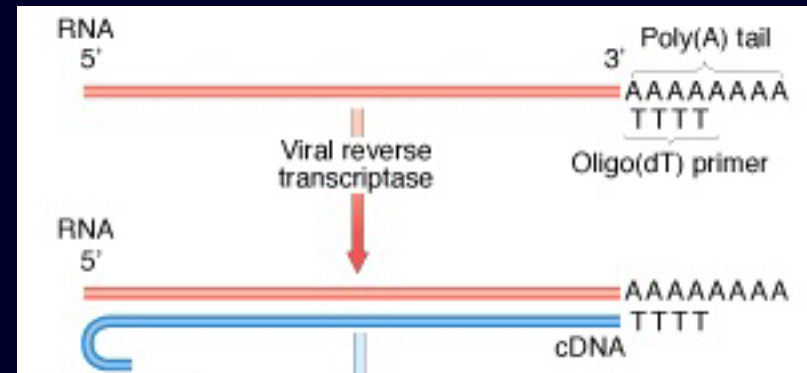
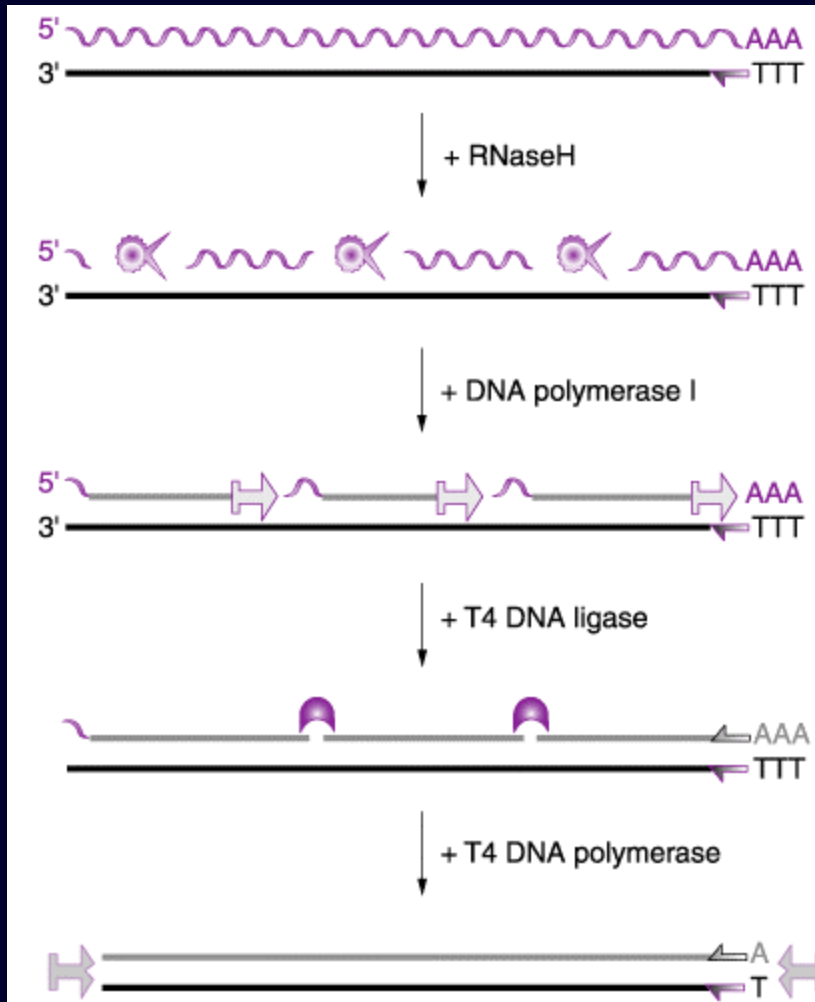
- ANALISIS DE GENOTECAS

PERMITE IDENTIFICAR Y AISLAR UN GEN



# Generación de una genoteca de cDNA

1. Extracción de mRNA
2. Síntesis de cDNA de hebra doble



**Hibridación con poly(dT)**

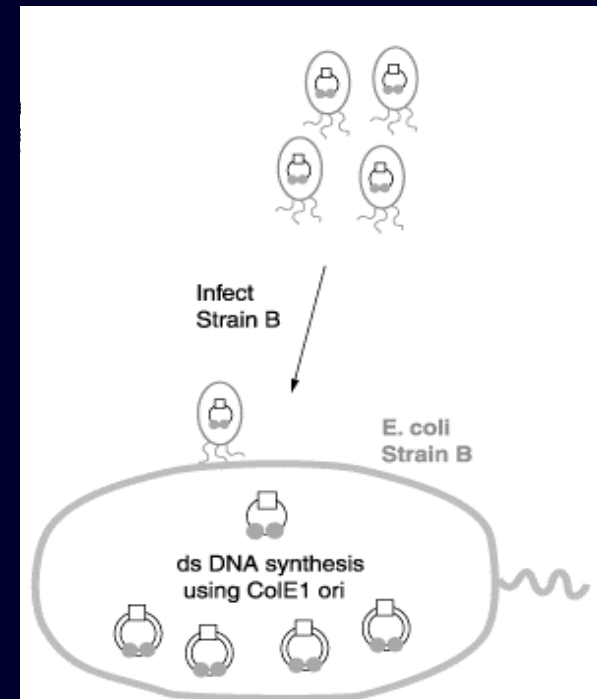
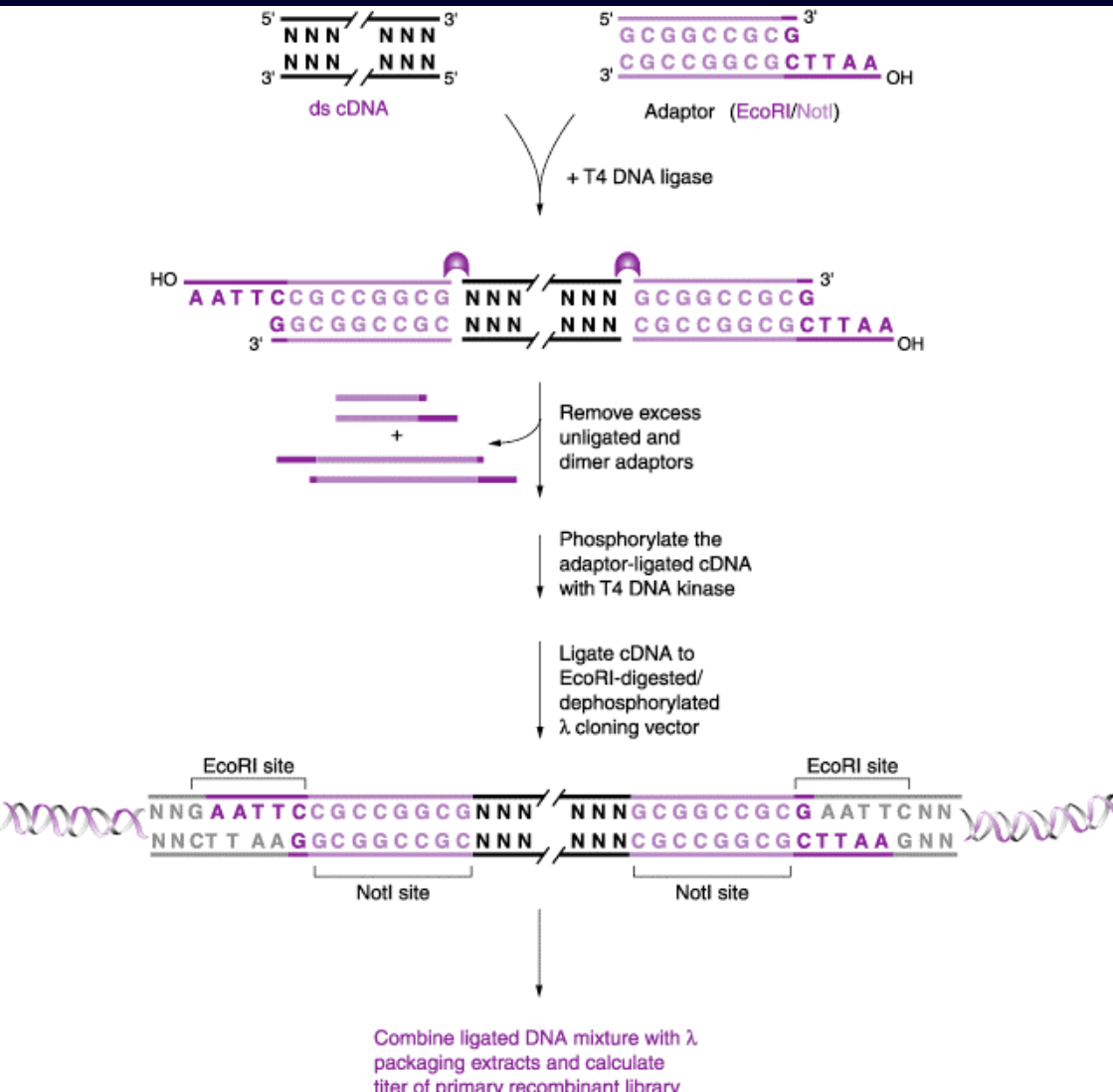
**Copia del DNA con RT**

**Degradación del RNA (RNasa H)**

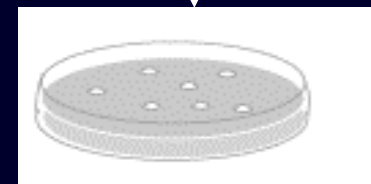
**Síntesis de la hebra complementaria (polimerasa)**

# Generación de una genoteca de cDNA

## 3. Ligación en un vector

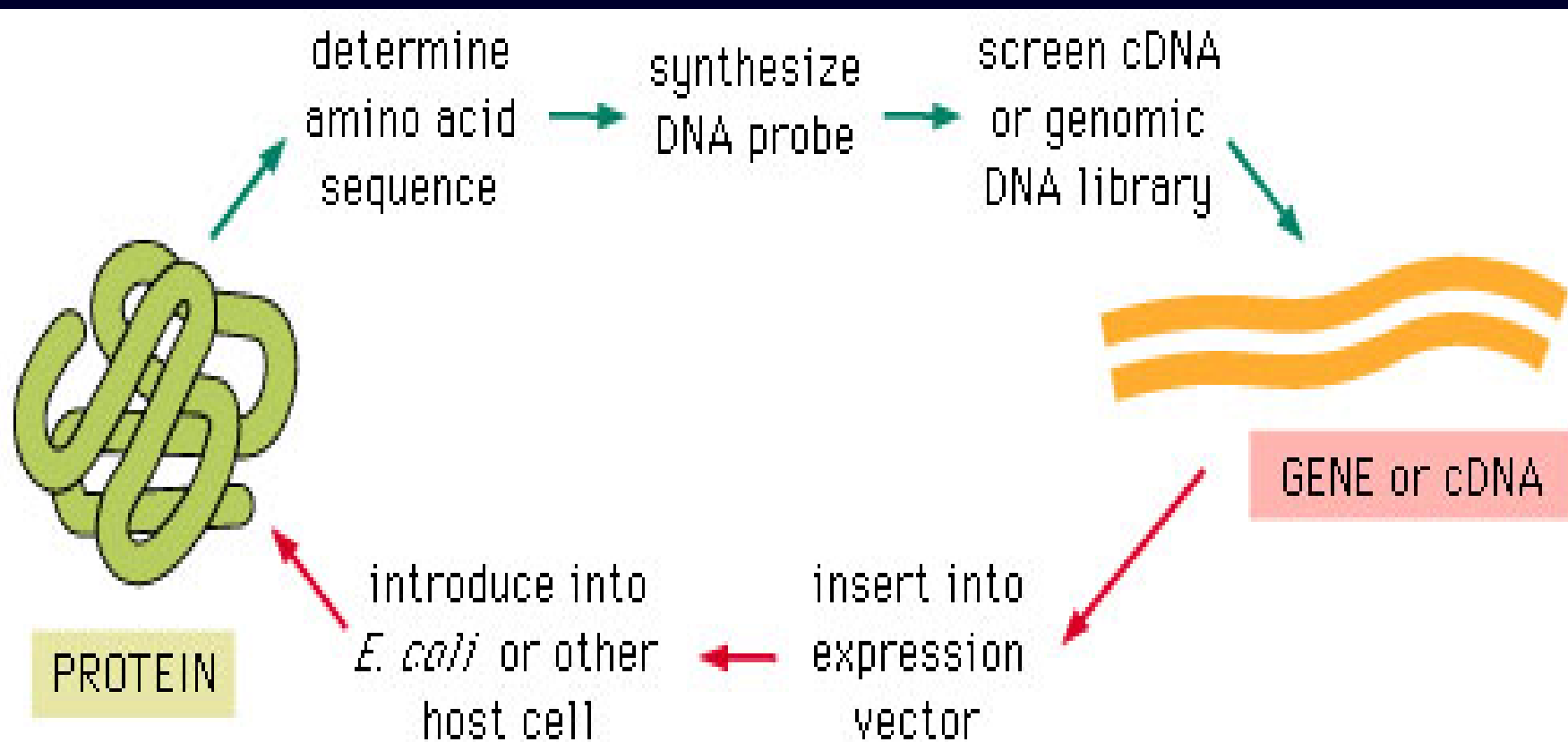


Colonias en placa



## 4. Genoteca de cDNA

# ¿Cómo aislar un gen?



# Análisis de una genoteca

