

DETECCION DE ACIDOS NUCLEICOS

1. RNA

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

2. DNA

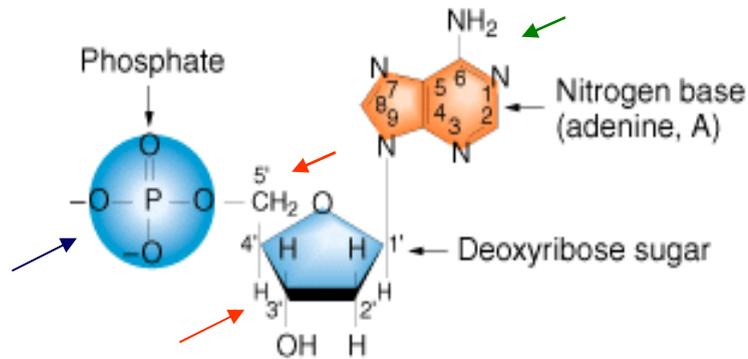
- *SOUTHERN BLOT*
- *ANALISIS DE GENOTECAS*

HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

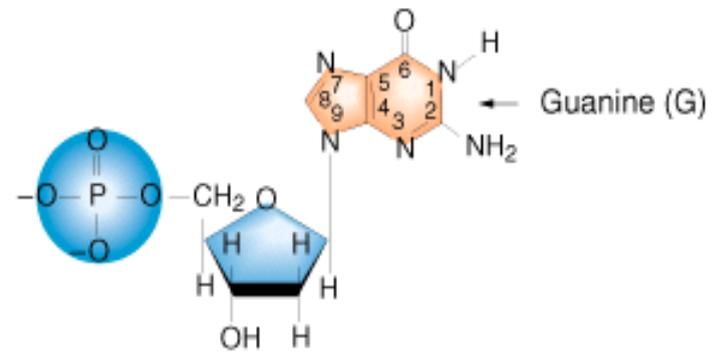
- APAREAMIENTO COMPLEMENTARIO DE BASES ENTRE DOS ACIDOS NUCLEICOS DE HEBRA SIMPLE → PRODUCTO DE HEBRA DOBLE.
 - DNA/DNA
 - RNA/RNA
 - DNA/RNA

Estructura de los nucleótidos

Purine nucleotides

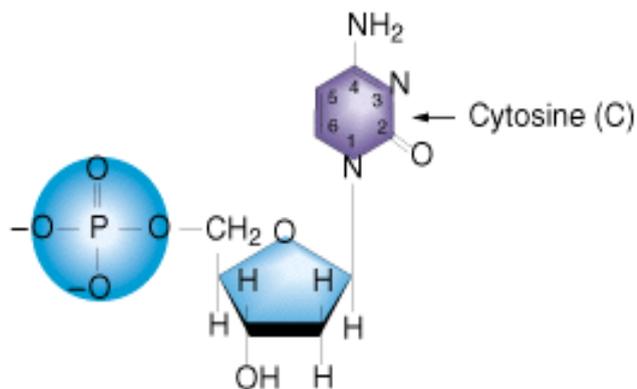


Deoxyadenosine 5'-phosphate (dAMP)

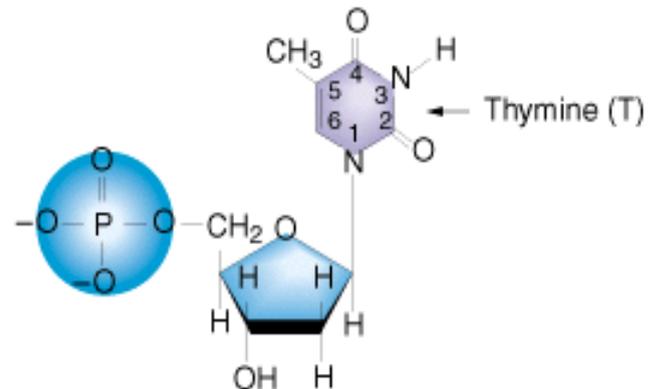


Deoxyguanosine 5'-phosphate (dGMP)

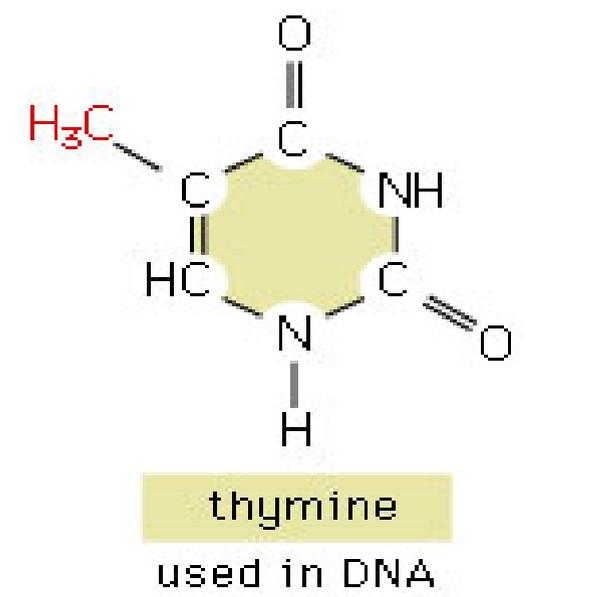
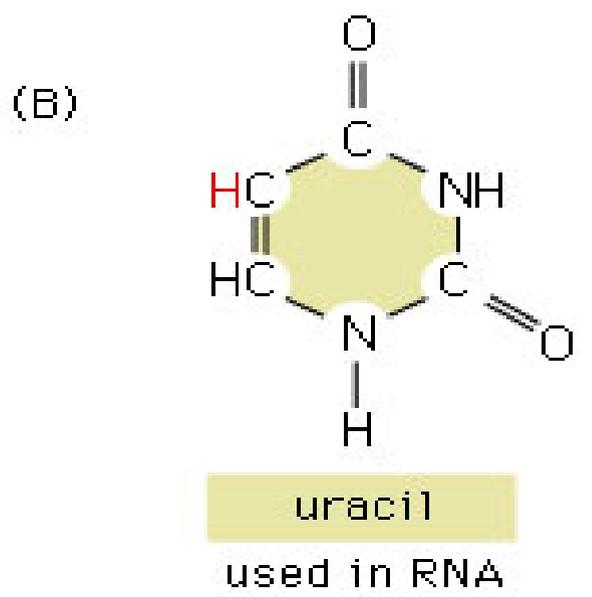
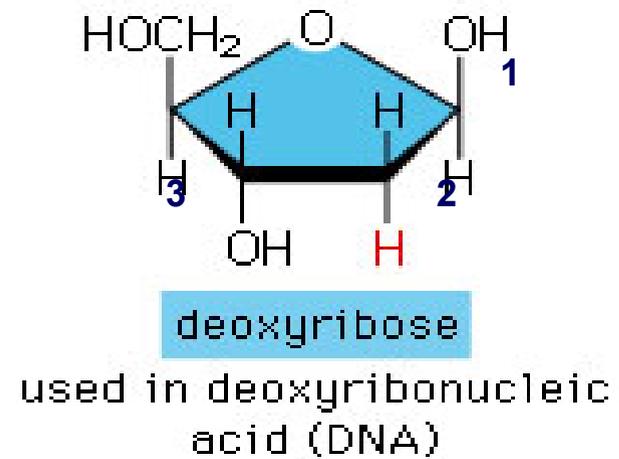
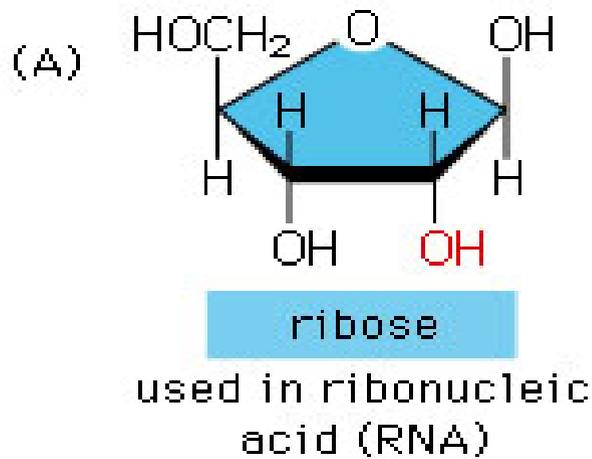
Pyrimidine nucleotides



Deoxycytidine 5'-phosphate (dCMP)



Deoxythymidine 5'-phosphate (dTMP)



DNA STRUCTURE

hydrogen bonded nucleotides
on opposite helices

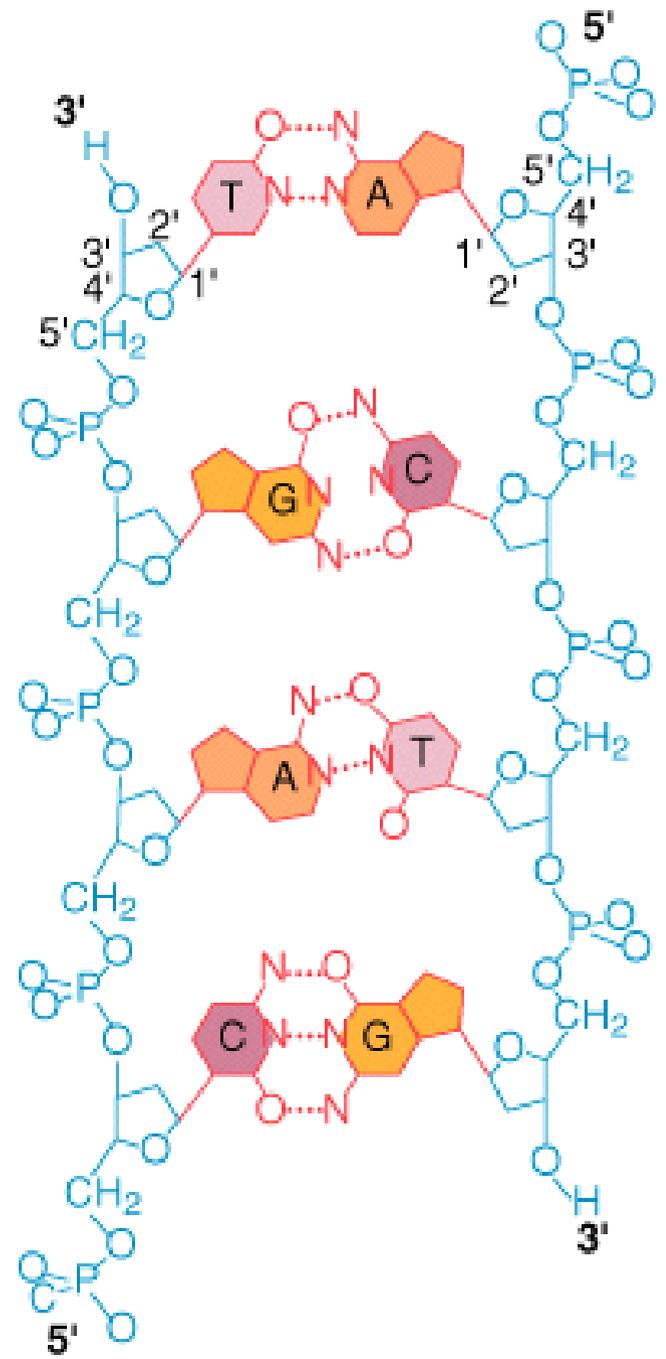
DNA helices are antiparallel

carbons on sugar define ends...
5' and 3'

pyrimidines bond with purines

T : A

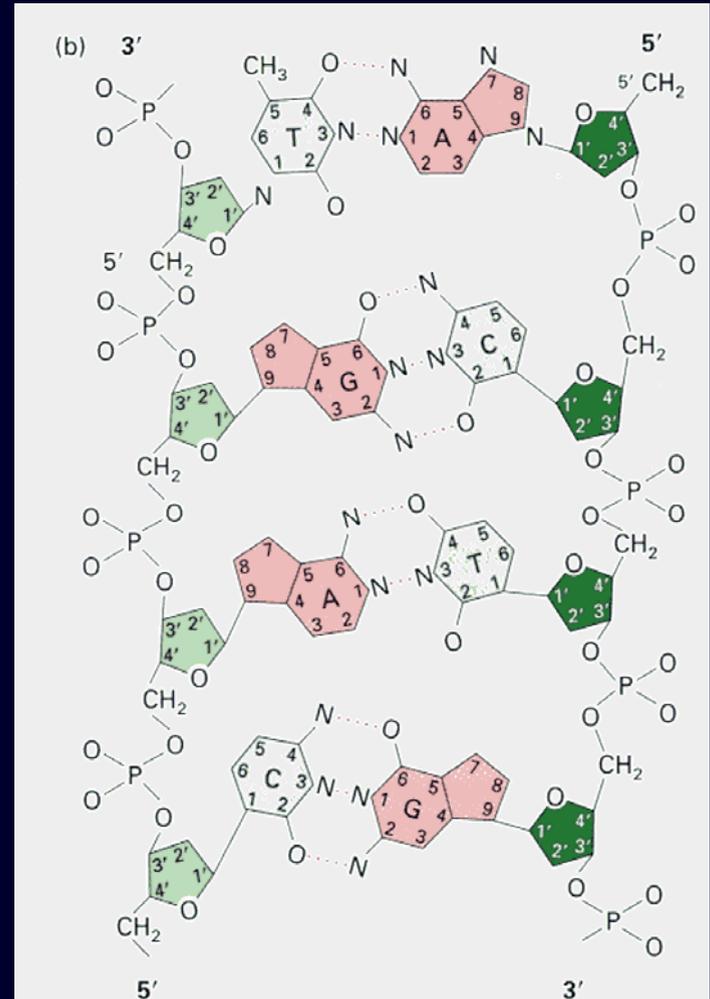
C : G



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.

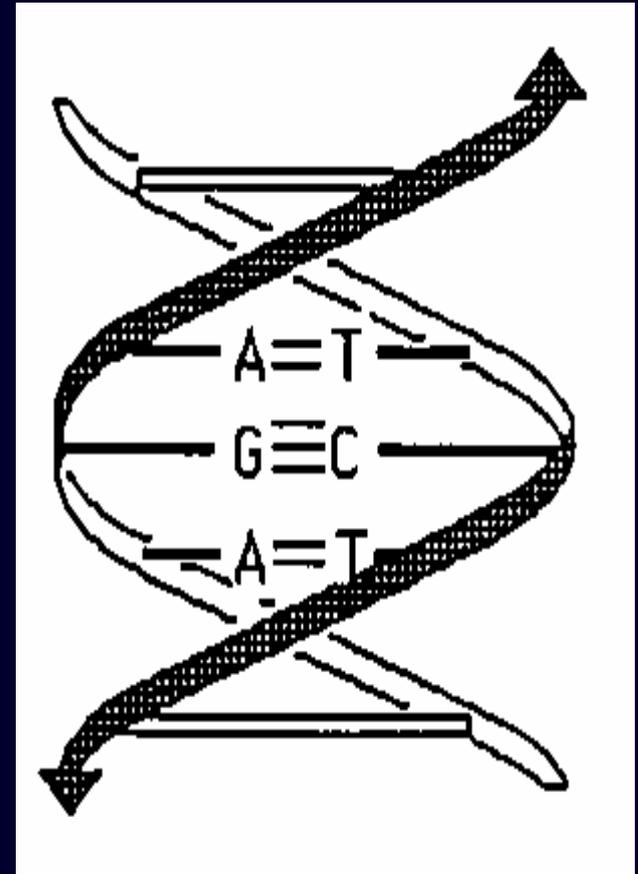


FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LA HIBRIDACION ENTRE ACIDOS NUCLEICOS

- 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

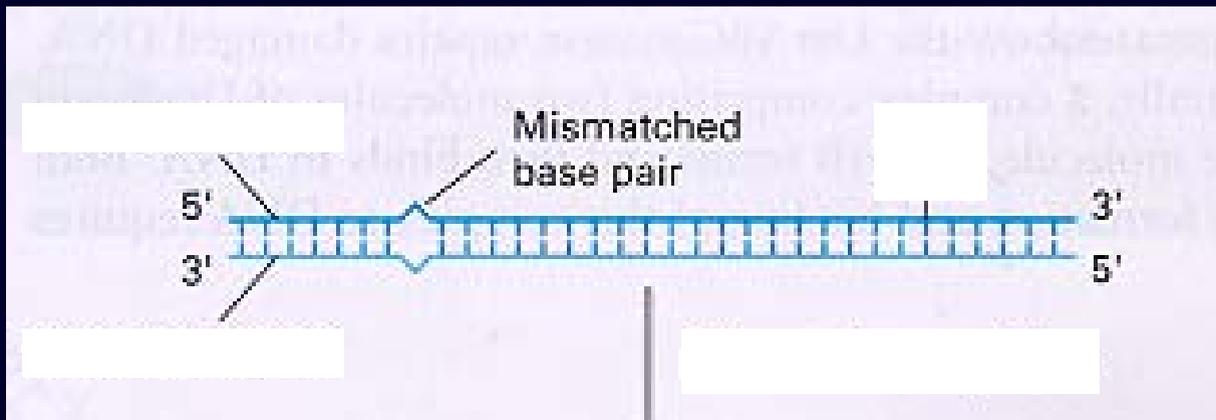
FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LA HIBRIDACION ENTRE ACIDOS NUCLEICOS

- 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

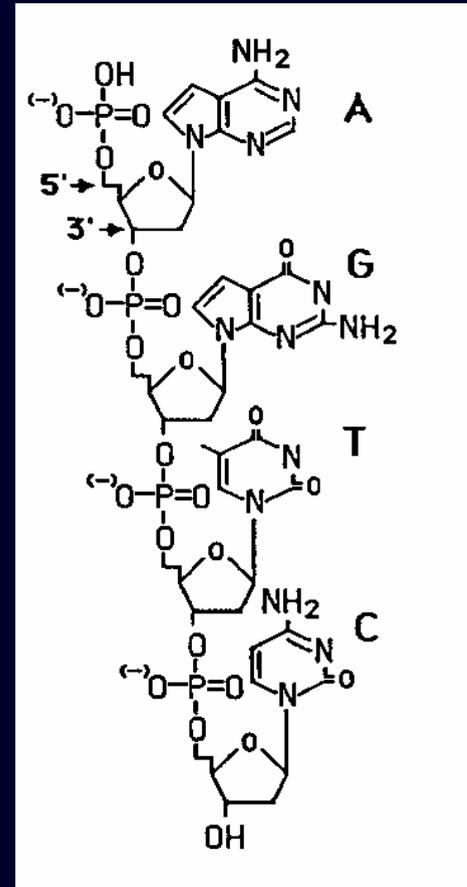


FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LA HIBRIDACION ENTRE ACIDOS NUCLEICOS

- 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 [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 (Na^+) o divalentes (Mg^{++})



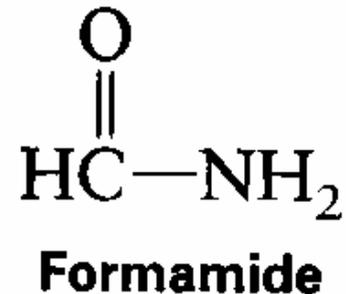
FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LA HIBRIDACION ENTRE ACIDOS NUCLEICOS

- 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° → 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

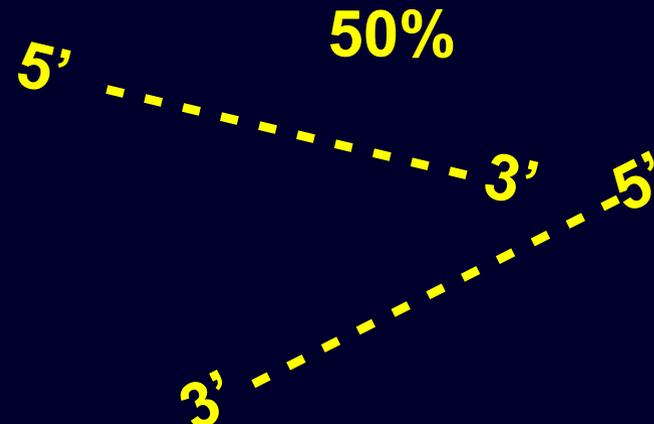


El efecto combinado de estos factores puede ser expresado en una ecuación para el calculo de la Tm

- ¿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

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

Para DNA:RNA

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

Para oligonucleotidos en 1 M Na+

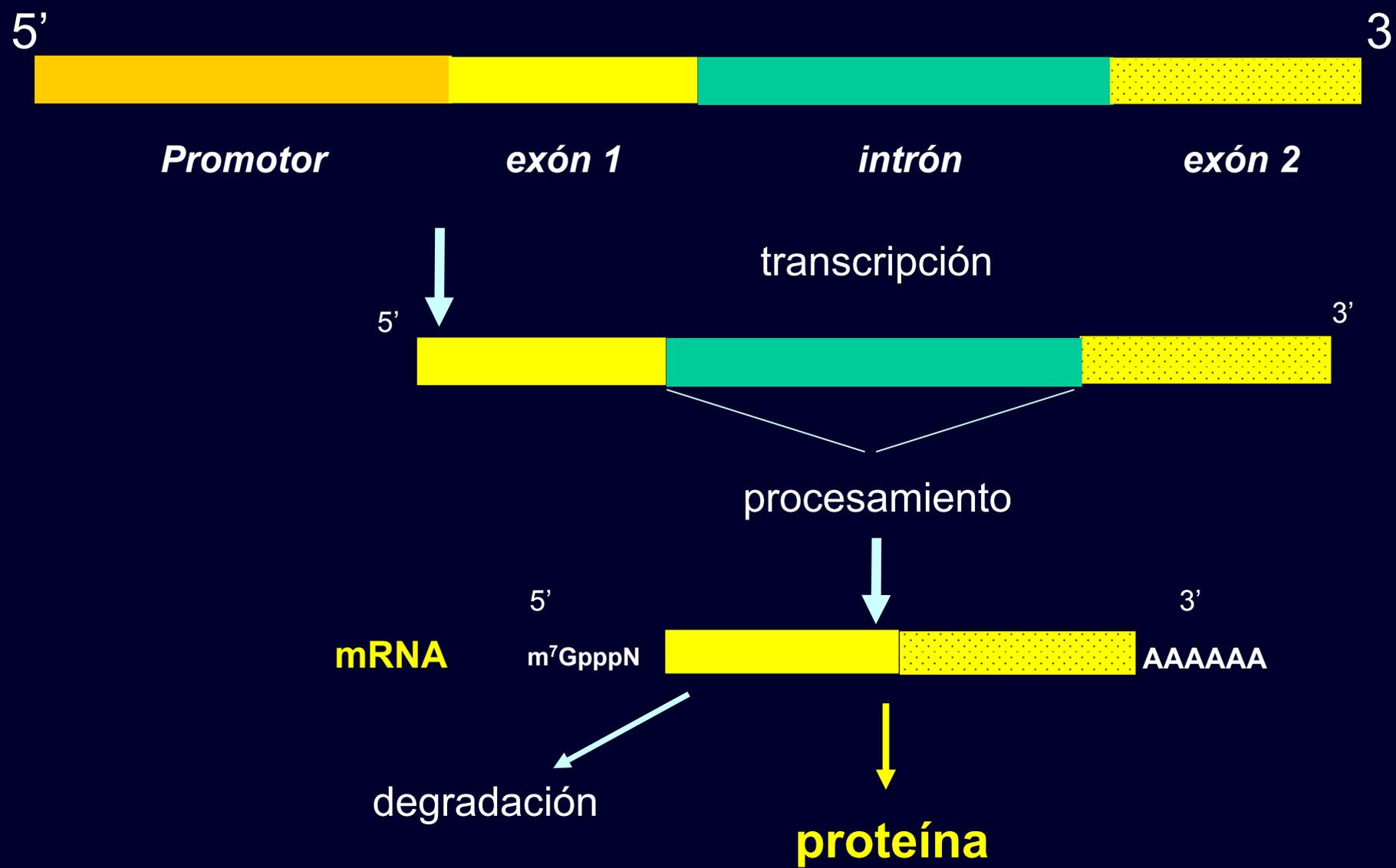
$$T_m (\text{°C}) = 4 (G+C) + 2 (A+T)$$

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



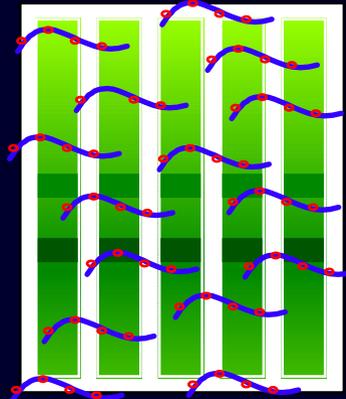
2. Electroforesis del RNA



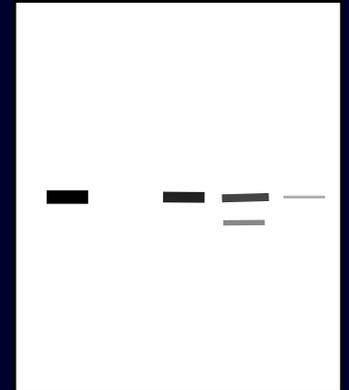
3. Transferencia a membrana



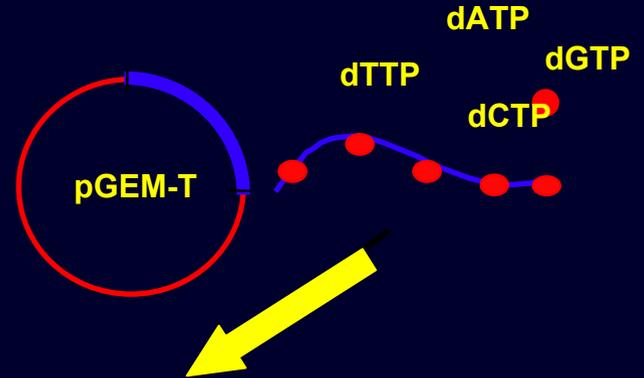
5. Hibridación



6. Visualización

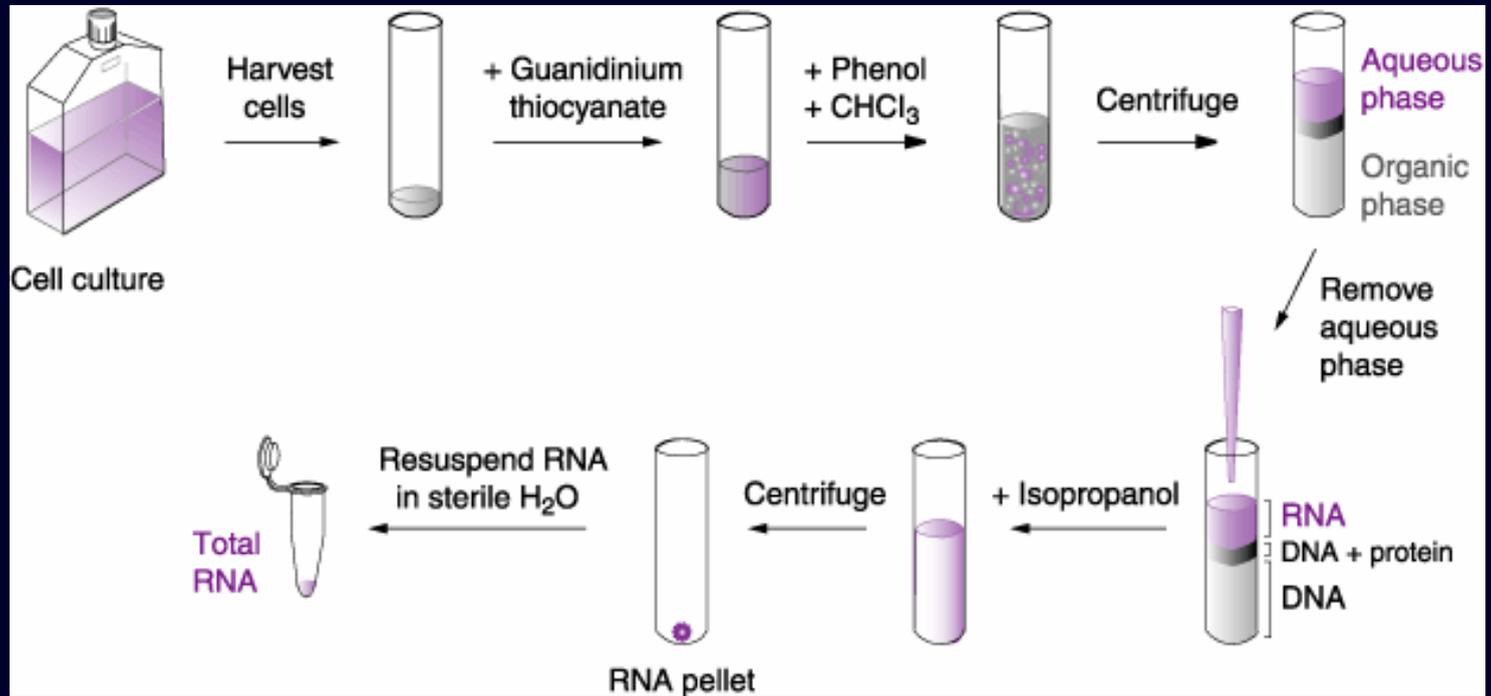


4. Generación de una sonda marcada



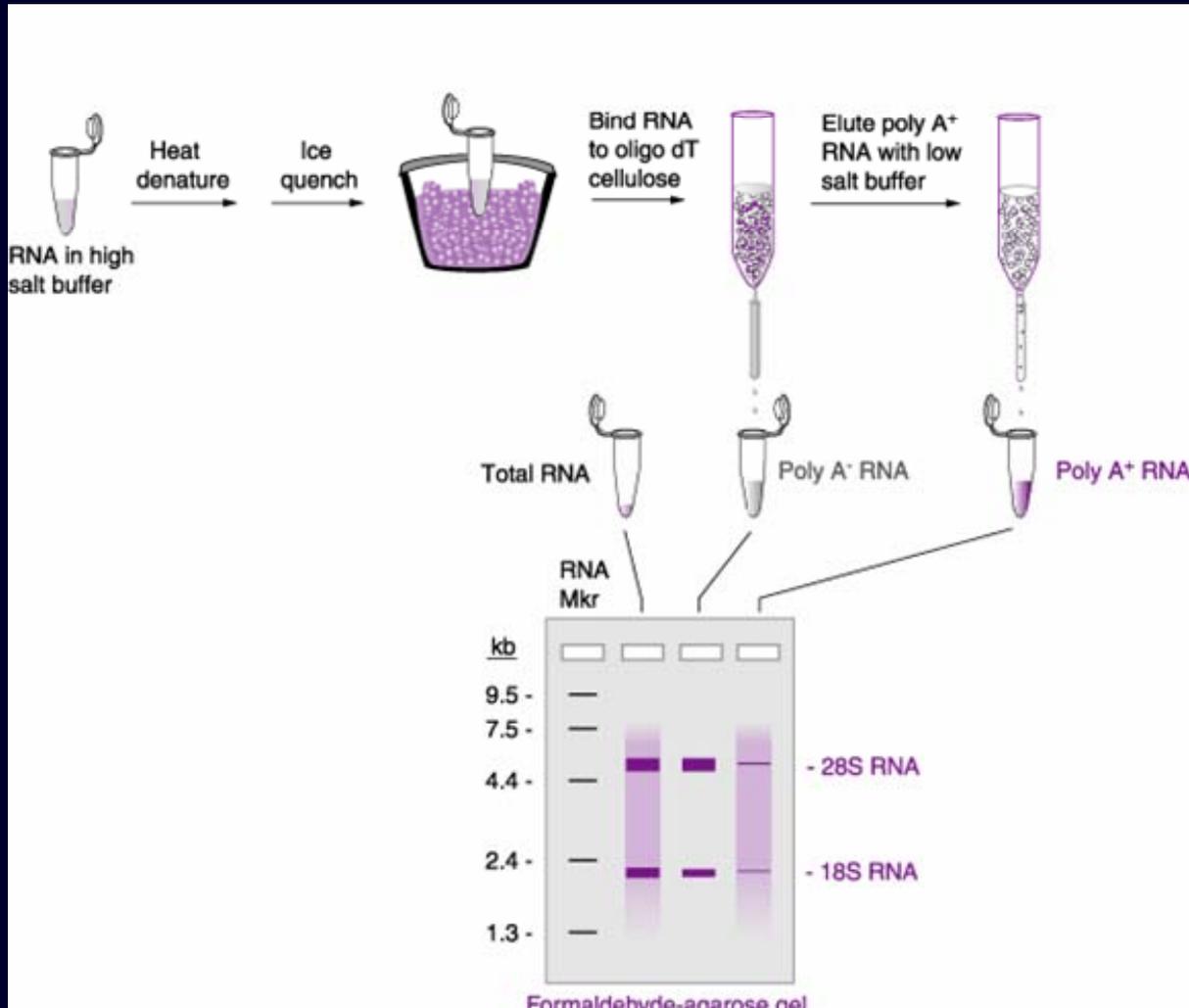
Extracción del RNA y purificación de mRNA

Extracción del RNA



Extracción del RNA y purificación de mRNA

Purificación de mRNA



NORTHERN BLOT

1. Extracción del RNA

AAAAAA



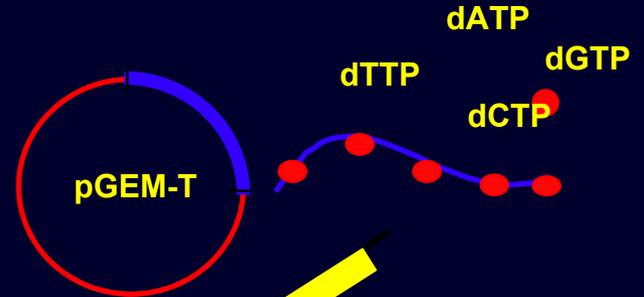
2. Electroforesis del RNA



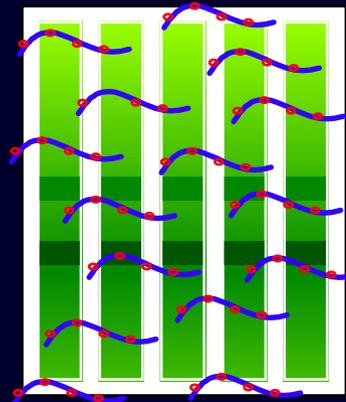
3. Transferencia a membrana



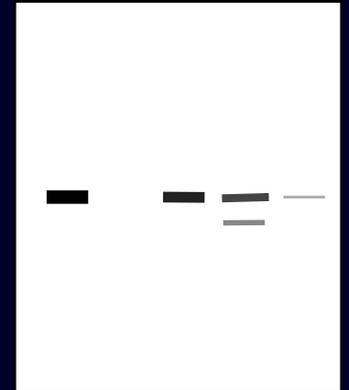
4. Generación de una sonda marcada



5. Hibridación



6. Visualización

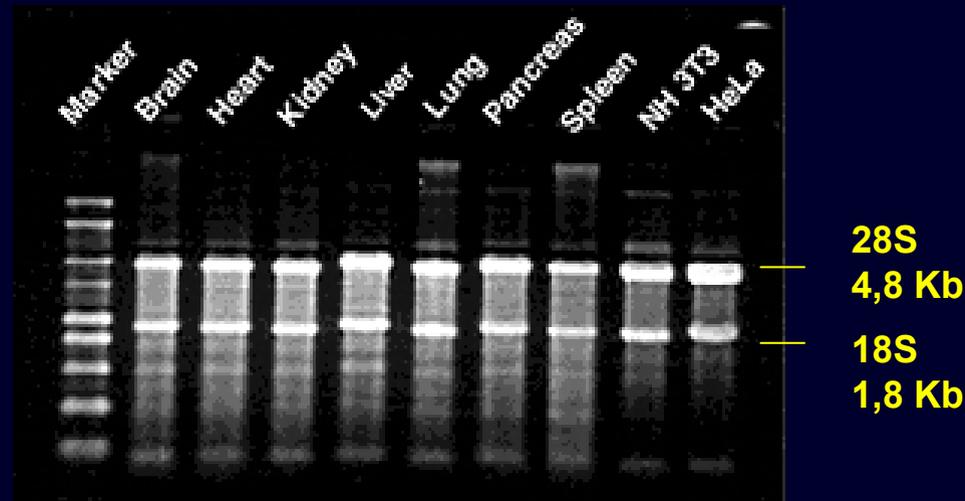
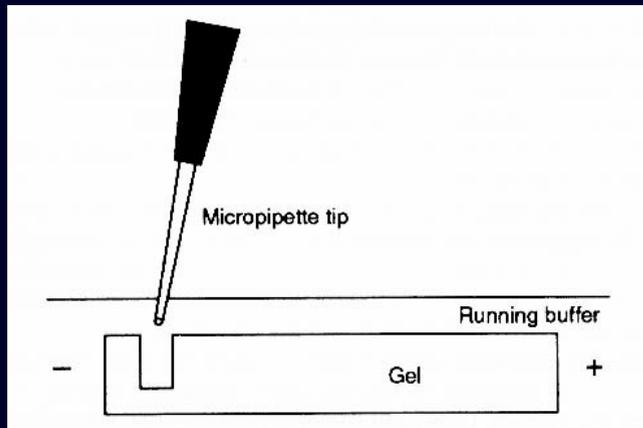


NORTHERN BLOT

2. ELECTROFORESIS DEL RNA

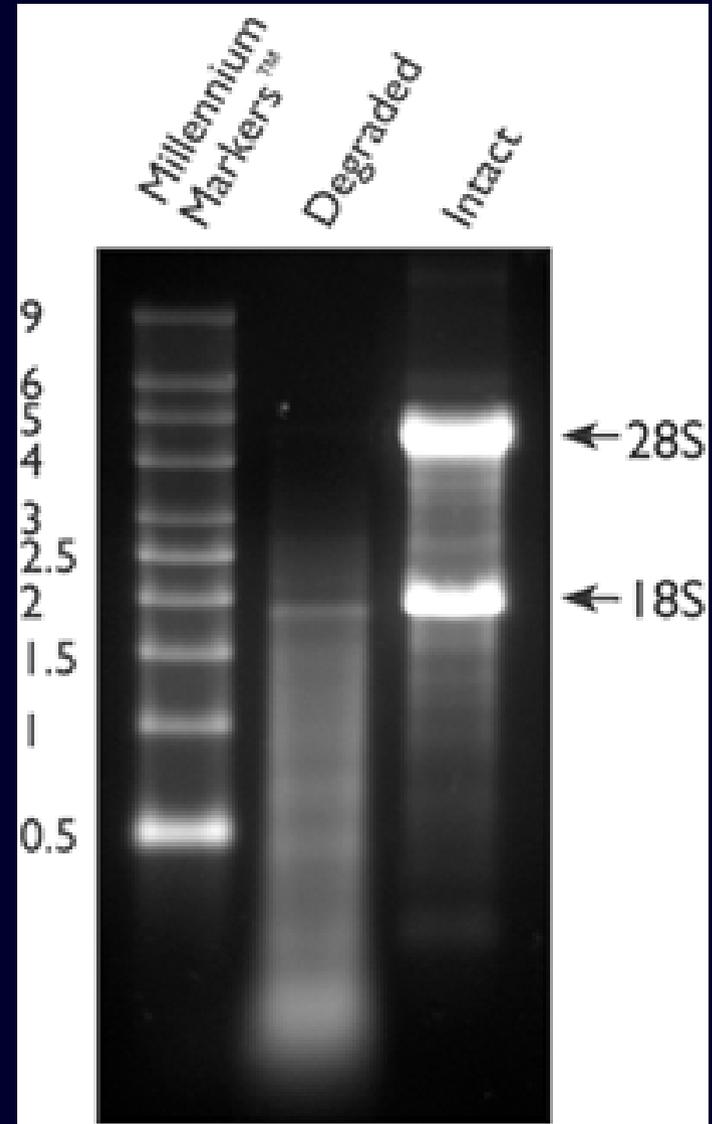
En geles de agarosa

En condiciones desnaturizantes (formaldehído/formamida)



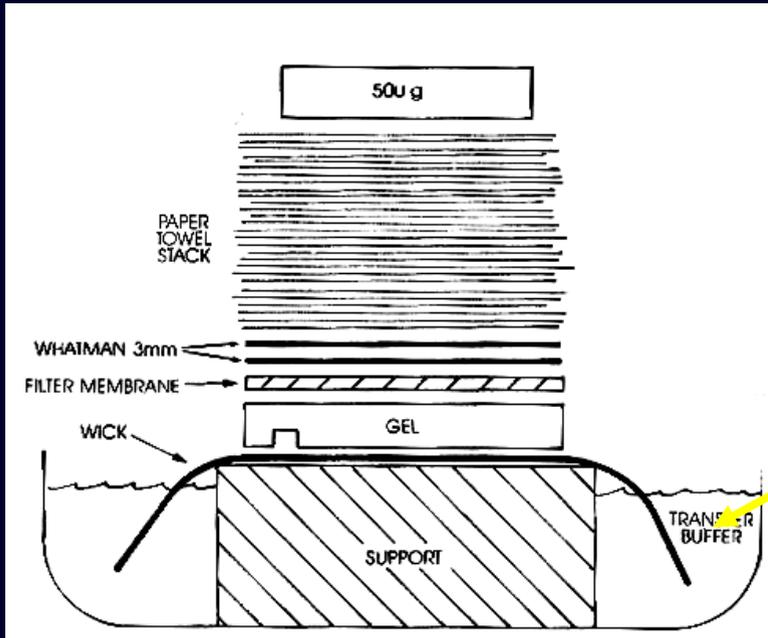
- El gel es teñido con bromuro de etidio y el RNA visualizado en un transiluminador UV

- Integridad del RNA: presencia y proporción de los RNA (28 y 18S).
- Razón A_{260}/A_{280}
- Concentración del RNA:
 $A_{260} \times \text{dilución} \times 40 = \mu\text{g/mL}$



NORTHERN BLOT

3. TRANSFERENCIA DEL RNA A UNA MEMBRANA



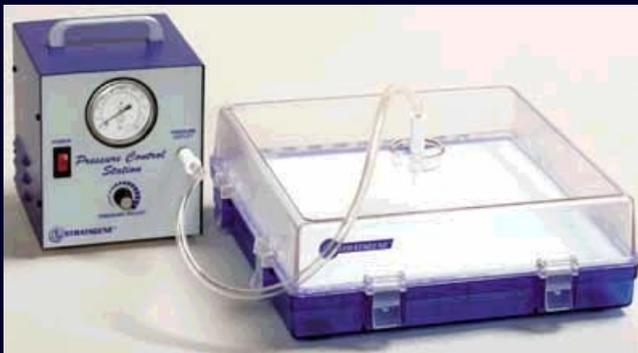
a) Capilaridad

- 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) Electroblothing

- 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

1. Extracción del RNA

AAAAAA



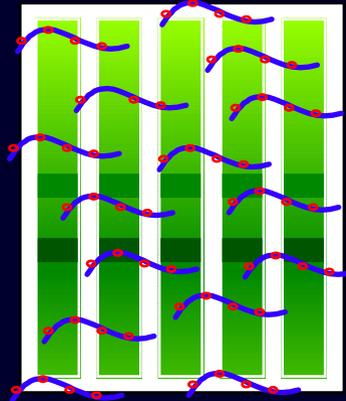
2. Electroforesis del RNA



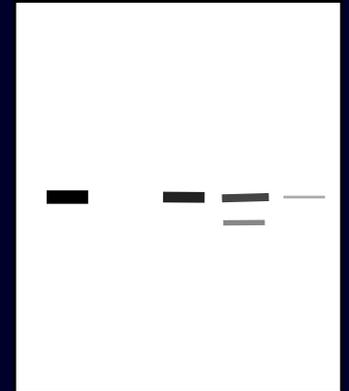
3. Transferencia a membrana



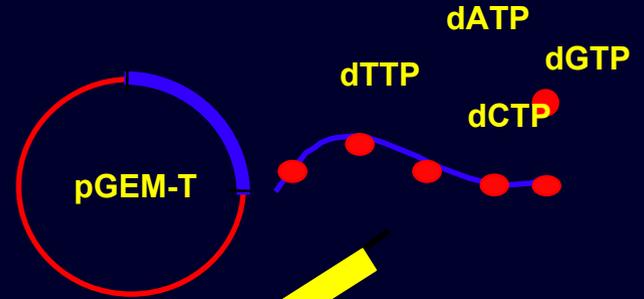
5. Hibridación



6. Visualización



4. Generación de una sonda marcada



NORTHERN BLOT

4. GENERACION DE UNA Sonda MARCADA

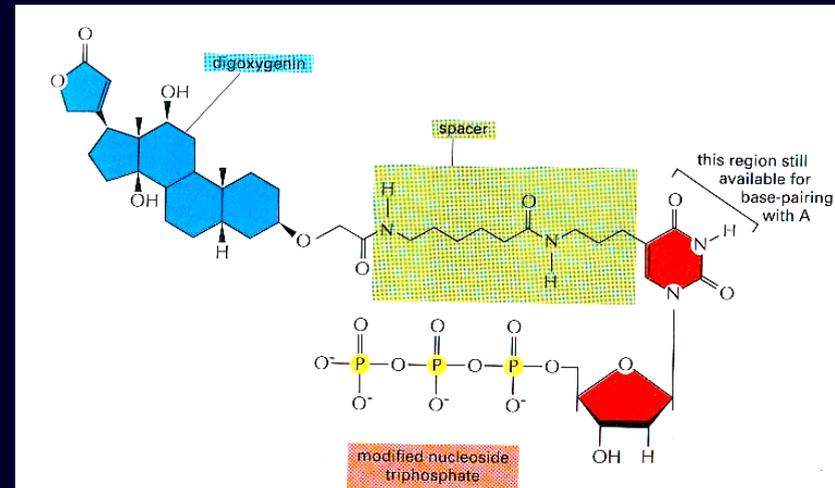
TIPOS DE MARCA

1. Radioactiva:

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

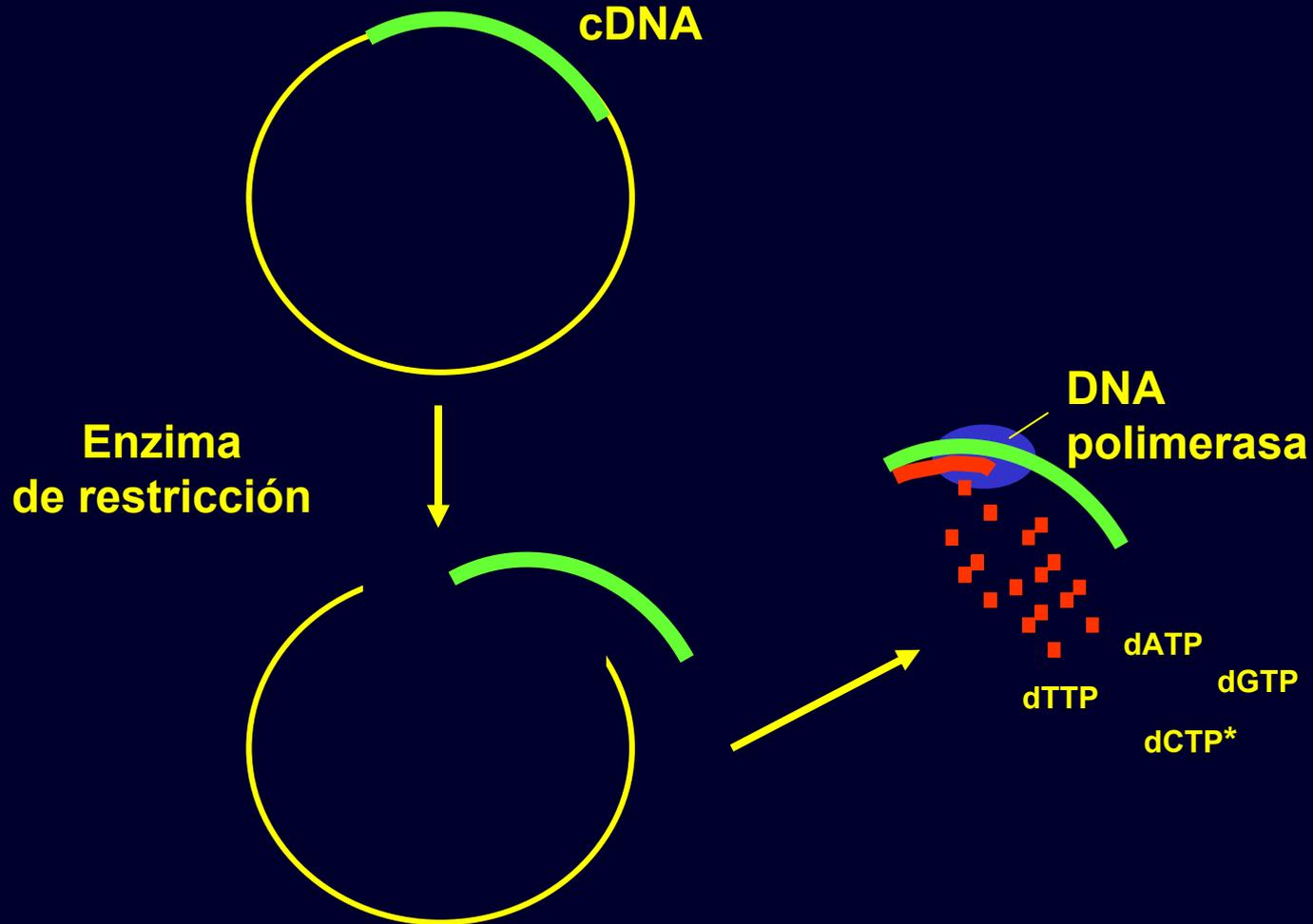
2. No radioactiva:

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



NORTHERN BLOT

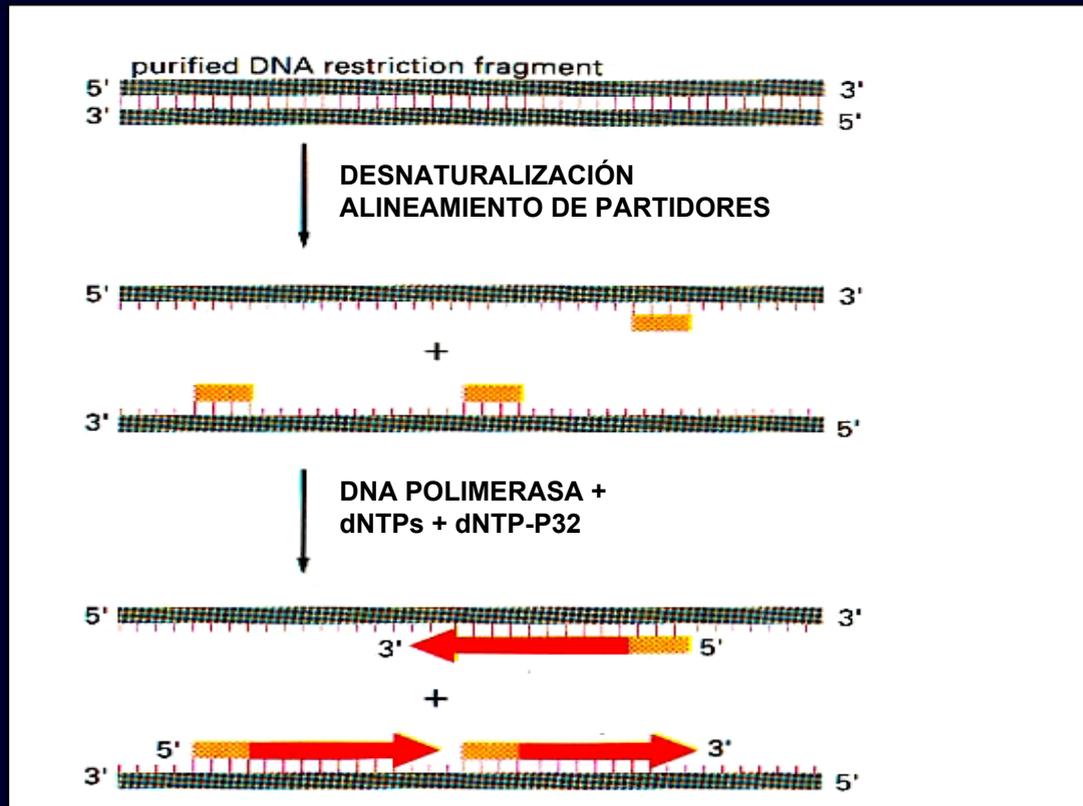
4. GENERACION DE UNA SONDA MARCADA



NORTHERN BLOT

4. GENERACION DE UNA SONDA MARCADA Métodos de síntesis de una sonda marcada

- *Random priming*

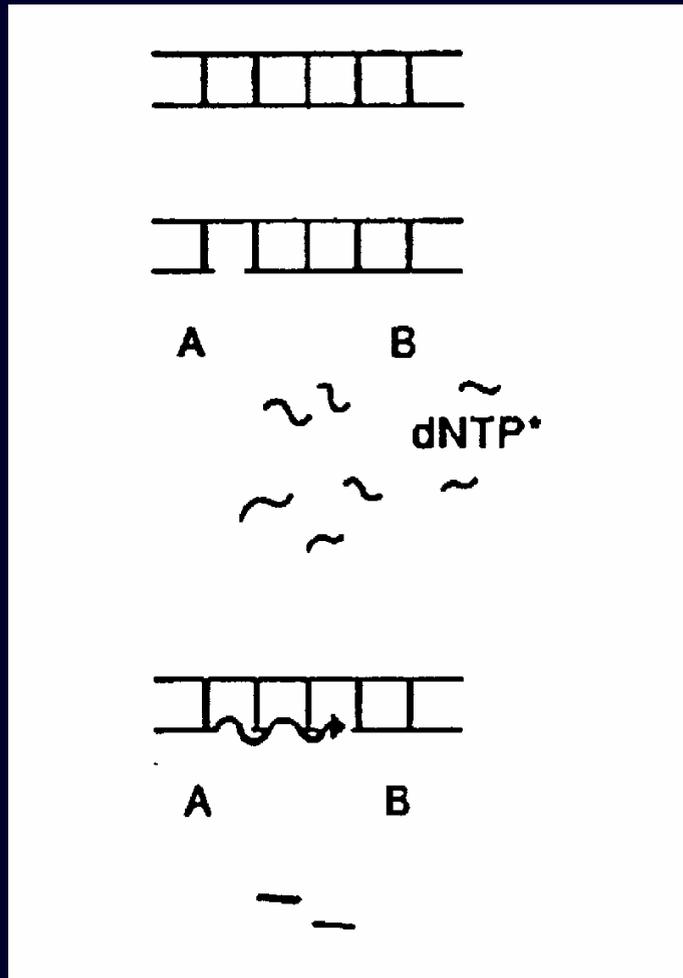


NORTHERN BLOT

4. GENERACION DE UNA SONDA MARCADA

Métodos de síntesis de una sonda marcada

- *Nick-translation*



ds DNA

DNase I rompe el DNA al azar

DNA polimerasa I agrega nucleótidos

NORTHERN BLOT

1. Extracción del RNA

AAAAAA



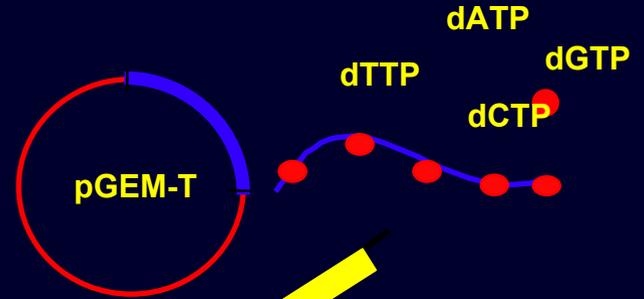
2. Electroforesis del RNA



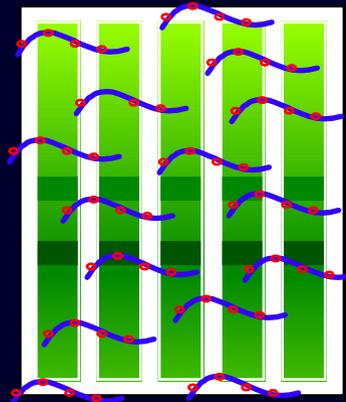
3. Transferencia a membrana



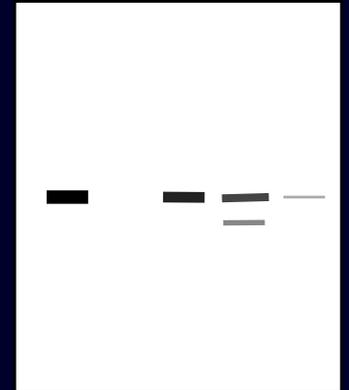
4. Generación de una sonda marcada



5. Hibridación



6. Visualización



NORTHERN BLOT

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 ($D = 500/L$)
 - La solución estándar de hibridación incluye:
 - 5x SSC (3M NaCl, 0,3M Citrato de Na)
 - 50% Formamida
 - 1% SDS
 - 5x Denhardt (↑viscosidad, concentra la sonda)
 - 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

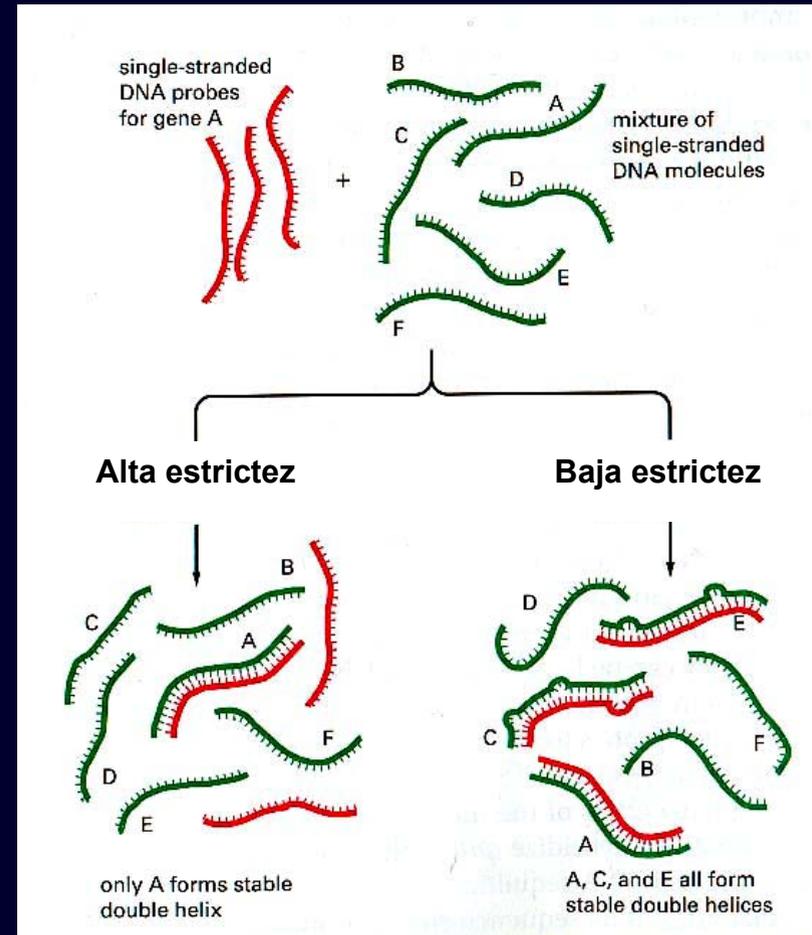
NORTHERN BLOT

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°
- Incluir formamida



NORTHERN BLOT

1. Extracción del RNA

AAAAAA



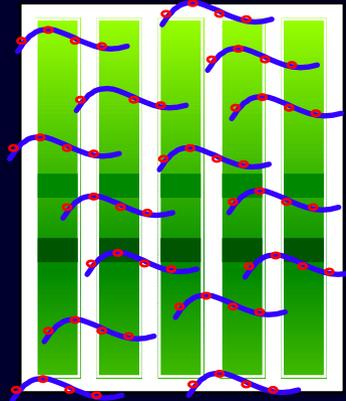
2. Electroforesis del RNA



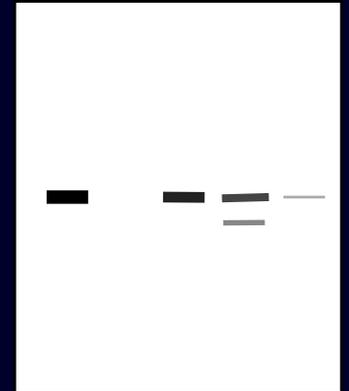
3. Transferencia a membrana



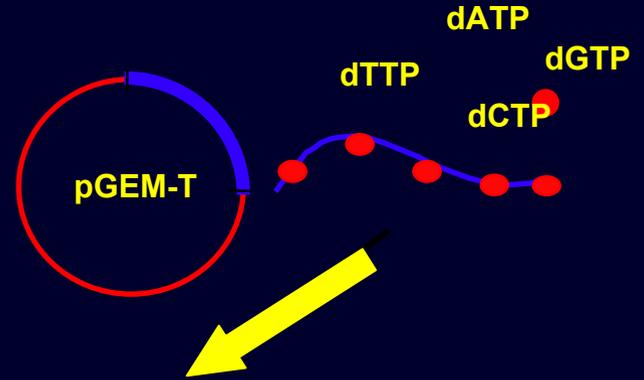
5. Hibridación



6. Visualización



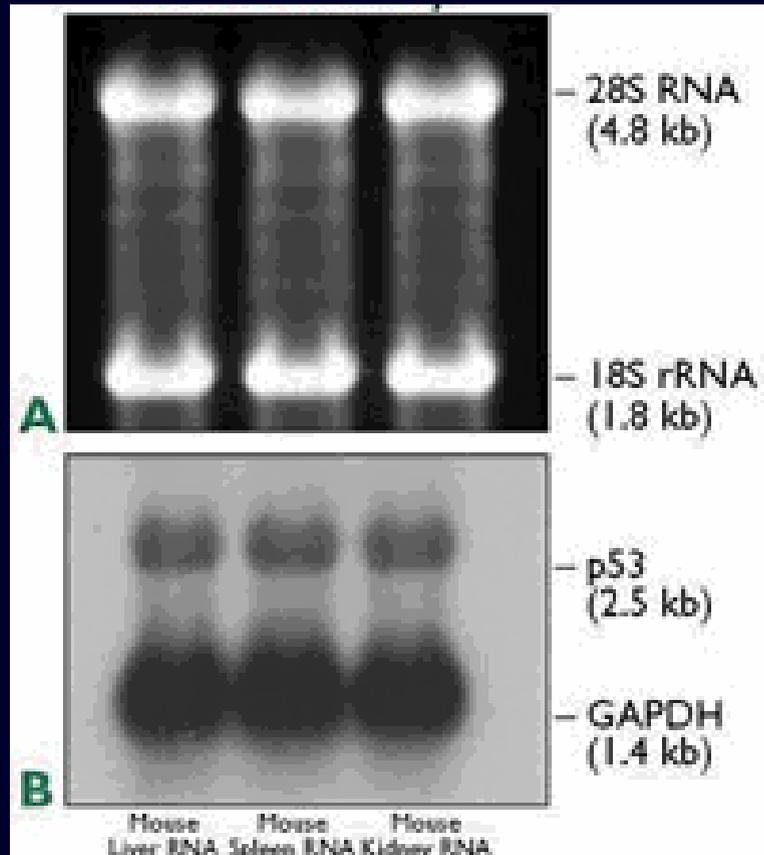
4. Generación de una sonda marcada



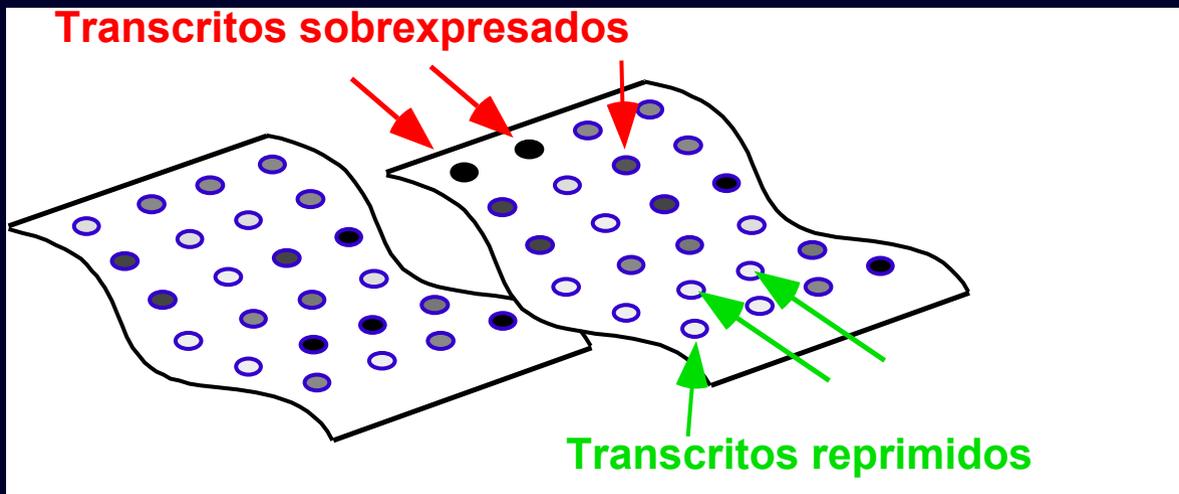
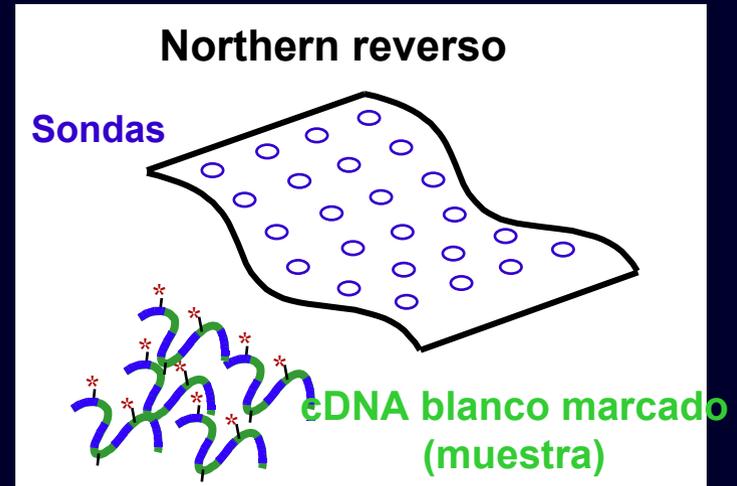
NORTHERN BLOT

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.