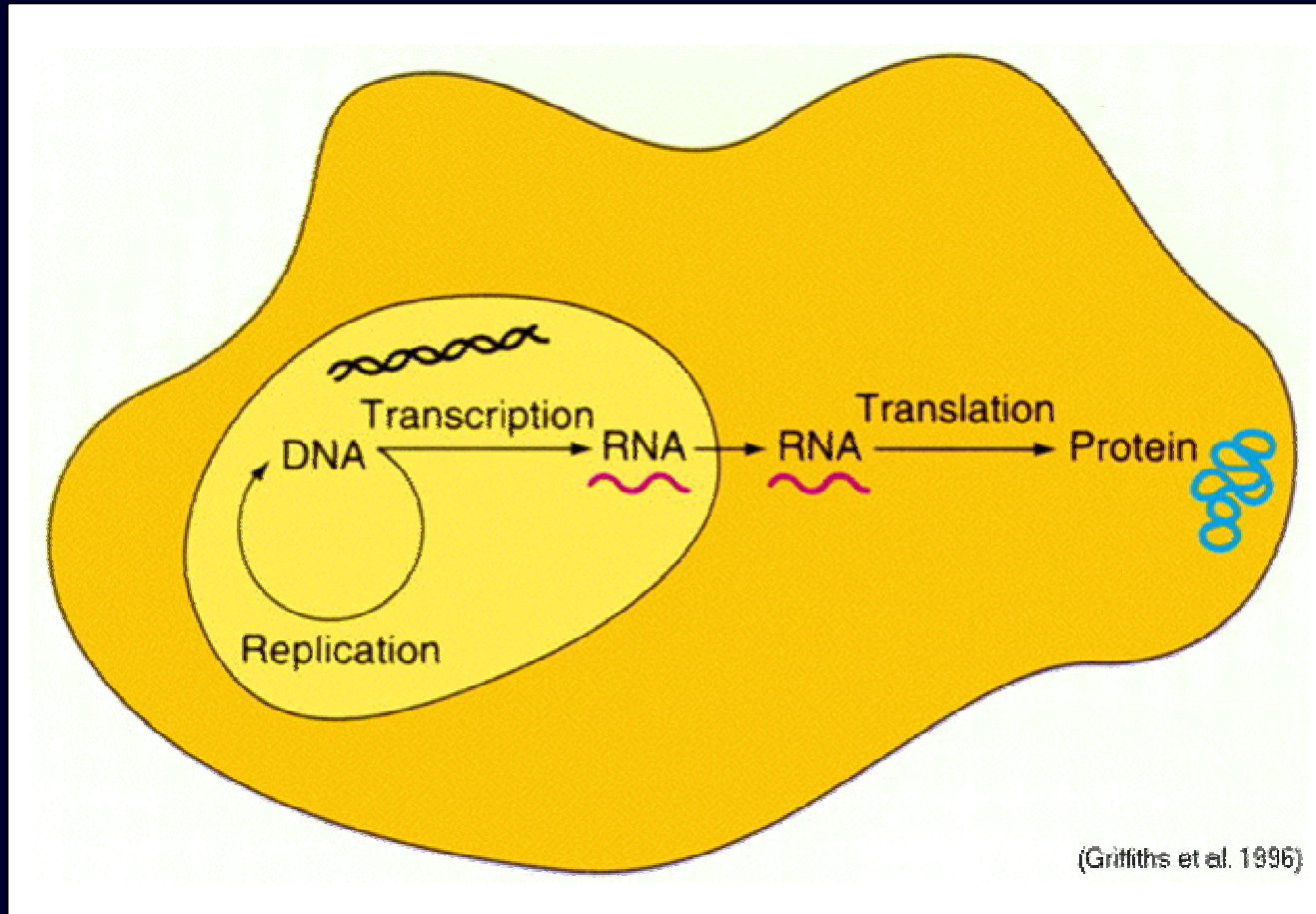


## ***Microarrays/Macroarrays***

- **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.**



**Idea: Medir la cantidad de mRNA para detectar que genes son expresados (utilizados) por la célula.**

# Hibridación en microarrays

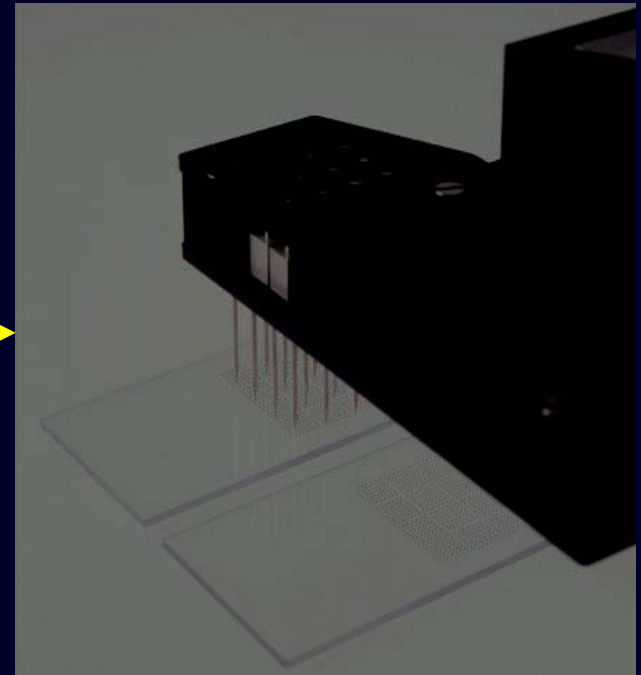
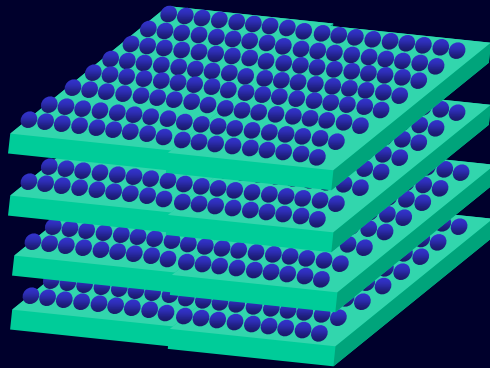
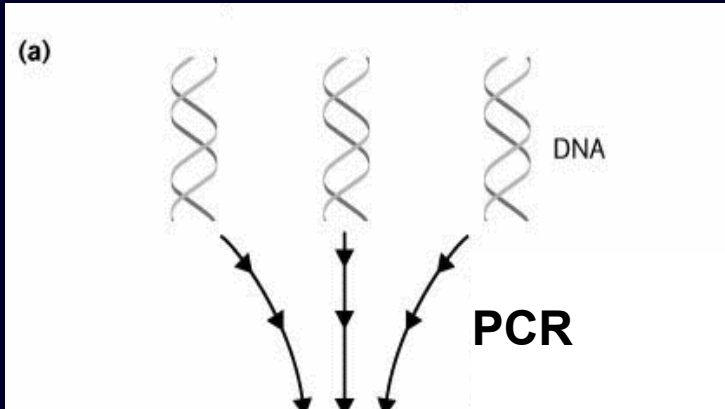
## En un experimento tipo:

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

# Confección del array

1. Colecciones de Expressed Sequences Tags (EST)
2. Genotecas de cDNAs

**Sembrado:** En cada spot se siembra el producto de PCR de un único gen.

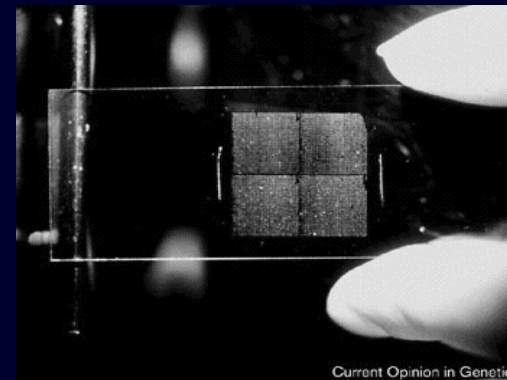
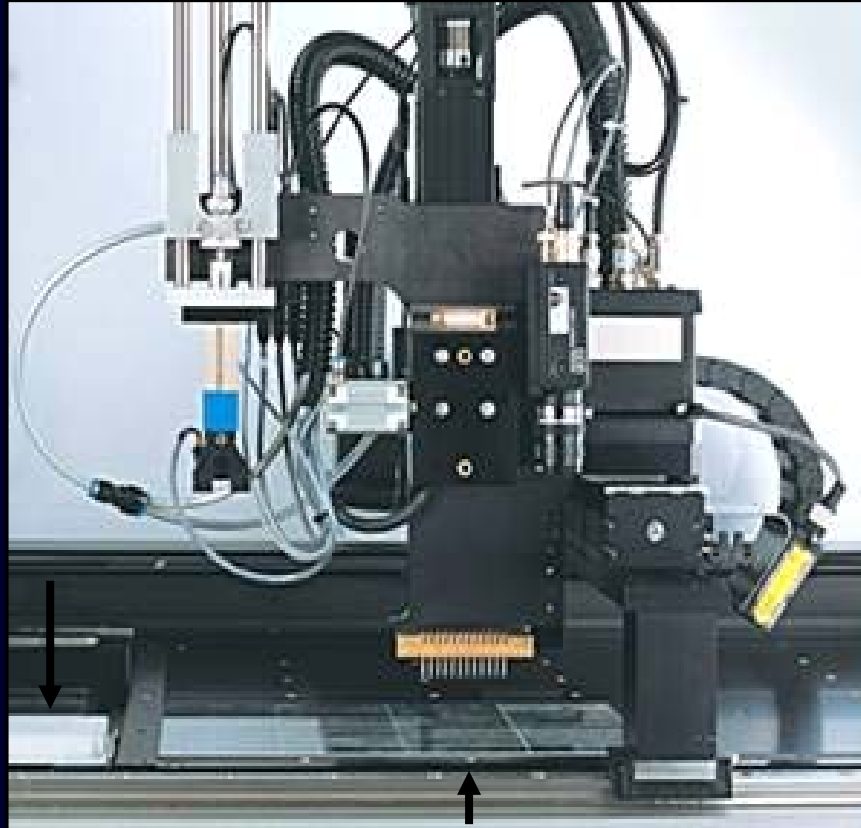


**Colección de productos de PCR en placas de 96 pocillos**

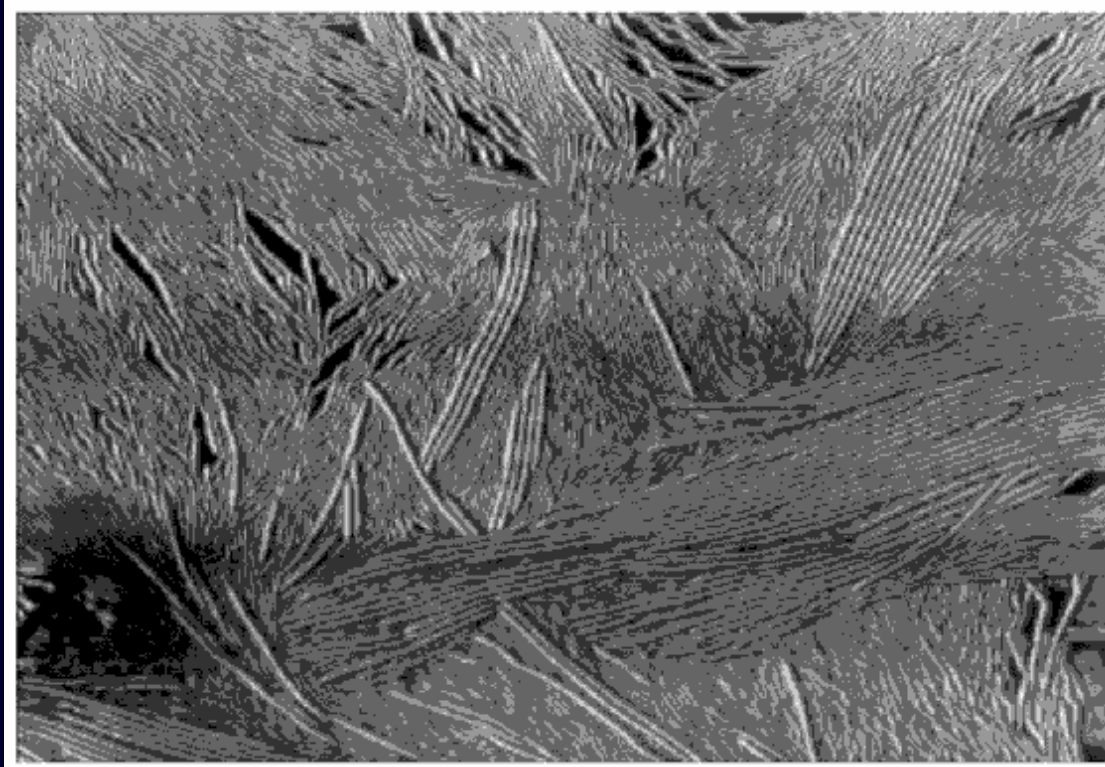
# Confección de arrays

## MICROARRAYS

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

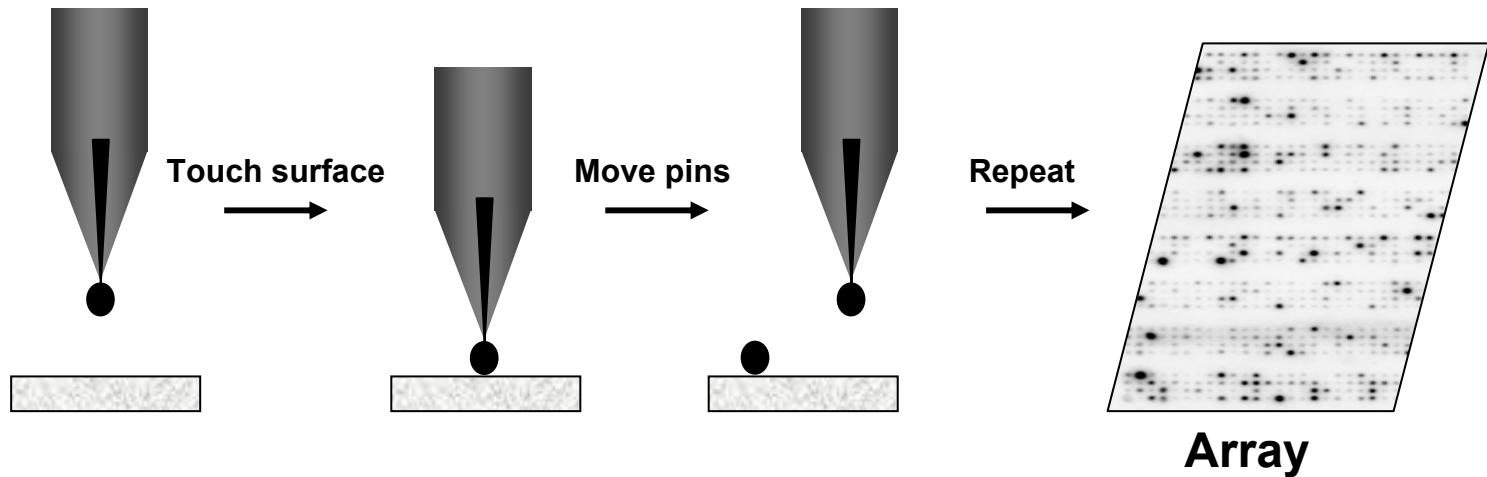


# Confección de arrays



**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).**

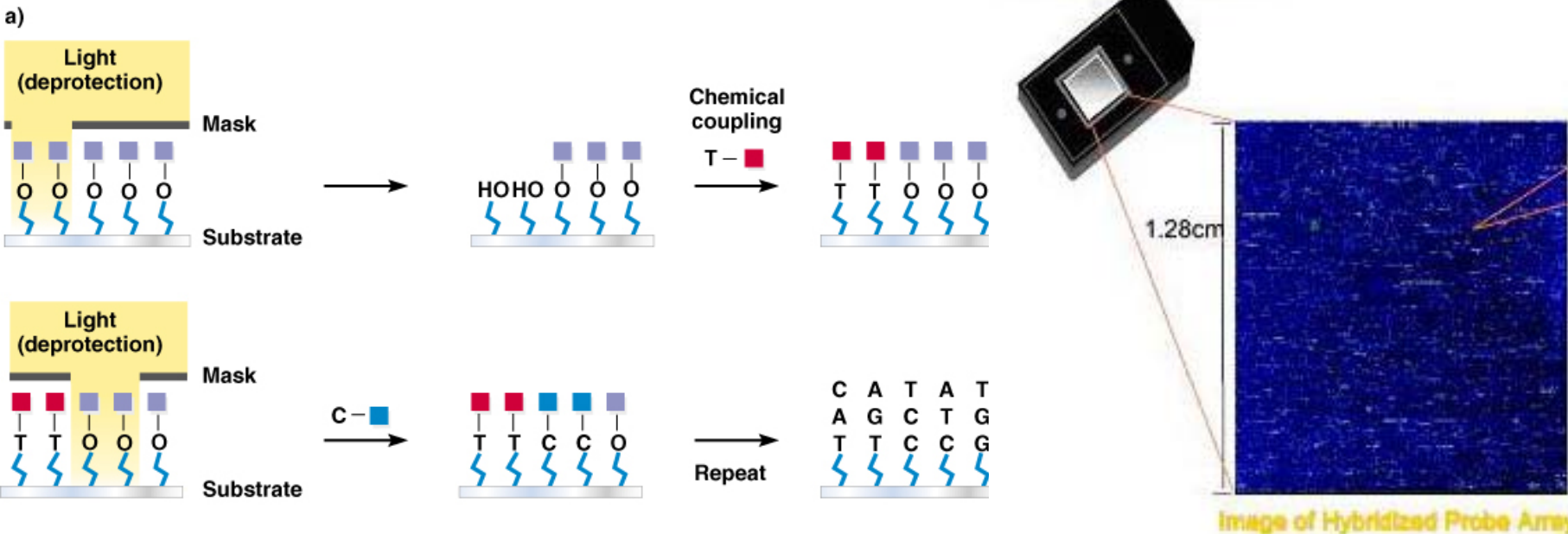
# Tipos de arrays



## Microarrays de cDNA:

- DNAs (cDNA o productos de PCR 0,6-2,4 Kb) son inmovilizados en una membrana de nylon o vidrio.
- >10.000 secuencias inmovilizadas.
- La muestra a hibridar es marcada con derivados fluorescentes o  $^{33}\text{P}/^{32}\text{P}$ .

# Tipos de arrays



## Microarrays de oligonucleotidos:

- Oligonucleotidos (25 pb) son sintetizados sobre una matriz de vidrio o plástico.
- >500.000 secuencias inmovilizadas ( $10^7$  copias/punto de siembra).
- La muestra a hibridar es marcada con derivados fluorescentes.

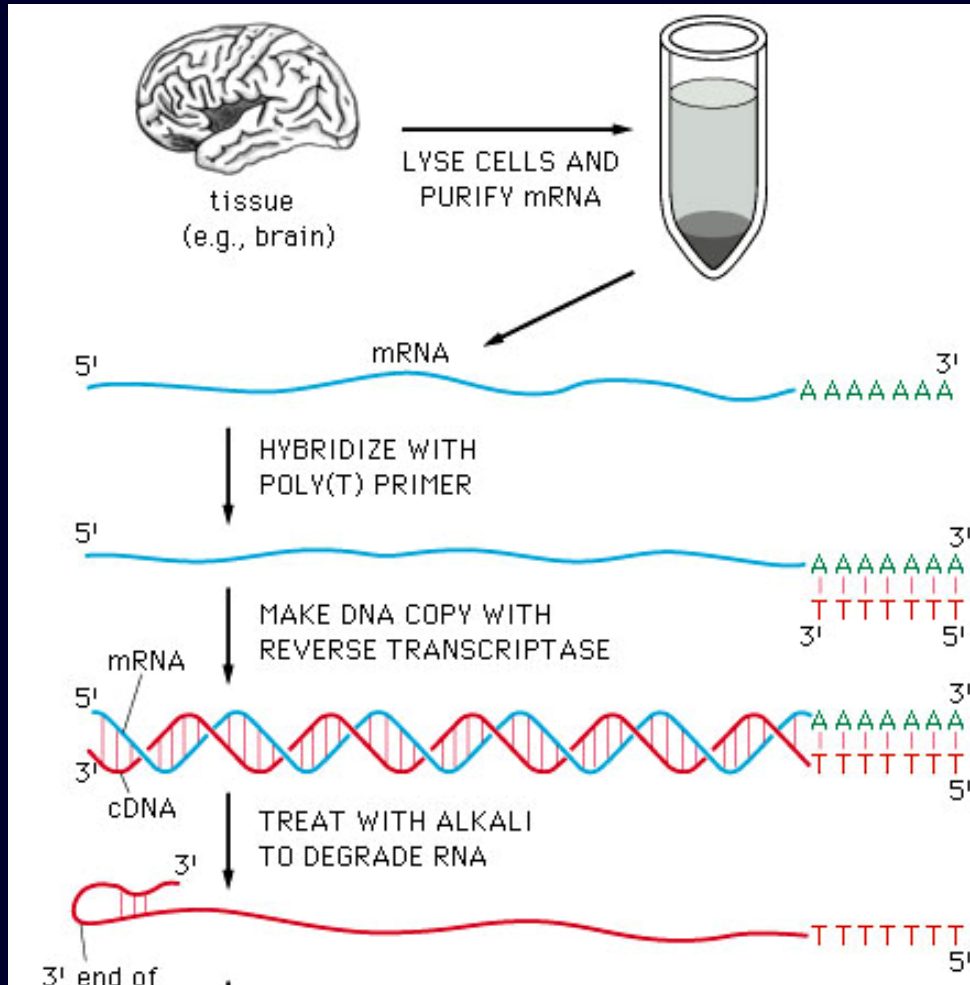


# Hibridación en microarrays

## En un experimento tipo:

1. Generar sondas (fragmentos de PCR).
2. Depositarlas en un soporte sólido (vidrio o membrana de nylon).
3. **Aislar RNA (total o mRNA) a partir de una muestra biológica.**
4. **Convertir el RNA en cDNA utilizando una transcriptasa reversa.**
5. **Marcar el cDNA con nucleótidos radioactivos o fluorescentes**
6. Hibridar el cDNA marcado en el array.
7. Detectar y cuantificar la fluorescencia o la radioactividad. utilizando un confocal laser scanner o un phosphoimager.
8. Analizar los resultados.

# Síntesis de cDNA



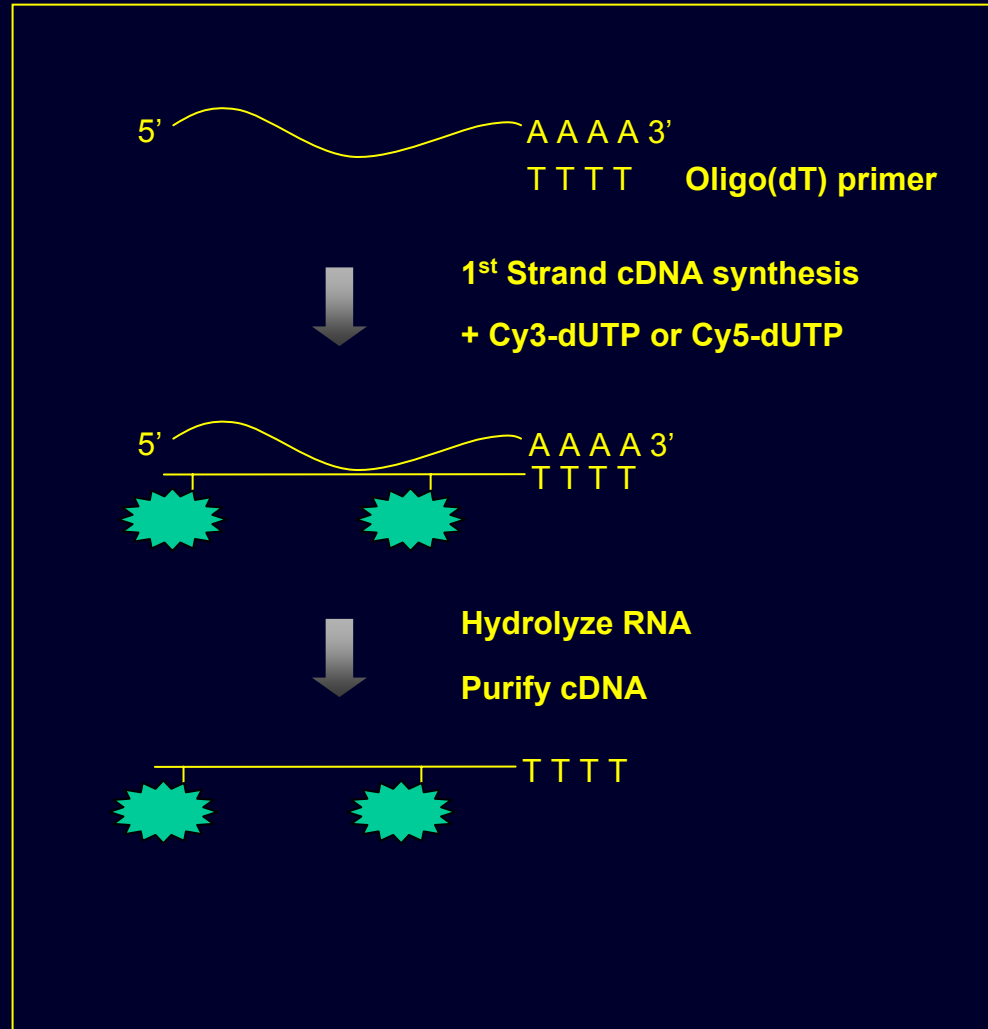
**Purificación de RNA**

**Hibridación con poly(dT)**

**Copia del DNA con RT**

**Degradación del RNA**

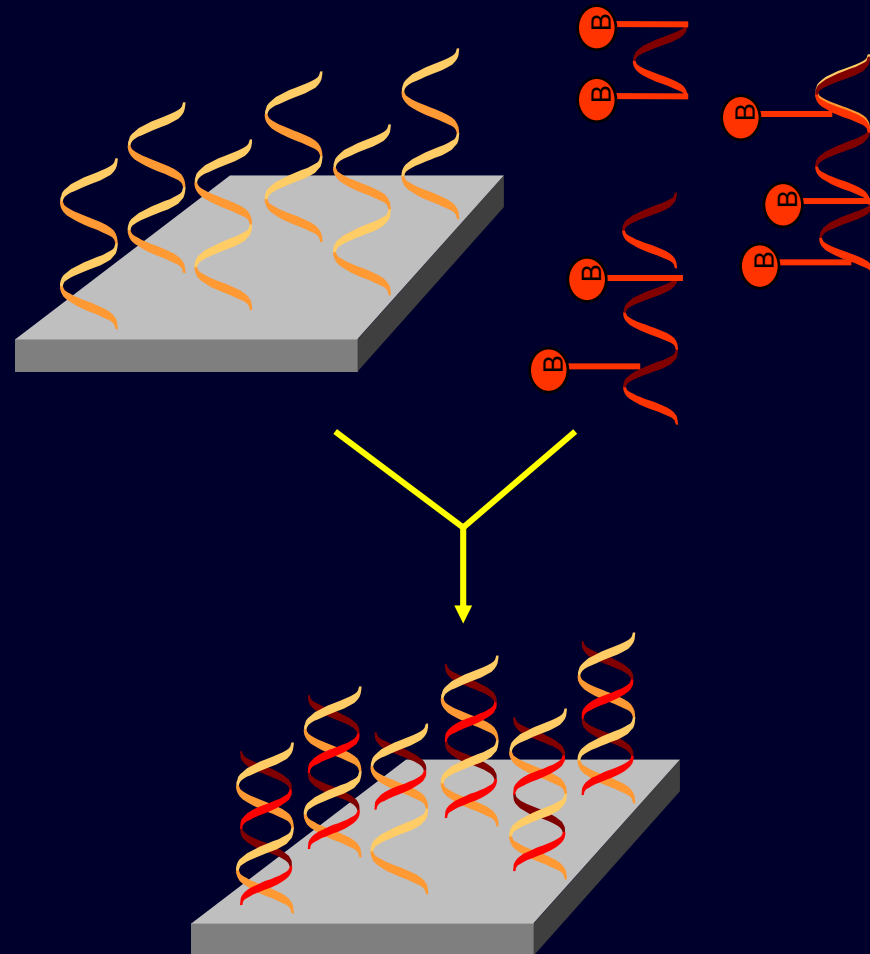
# Síntesis de cDNA marcado



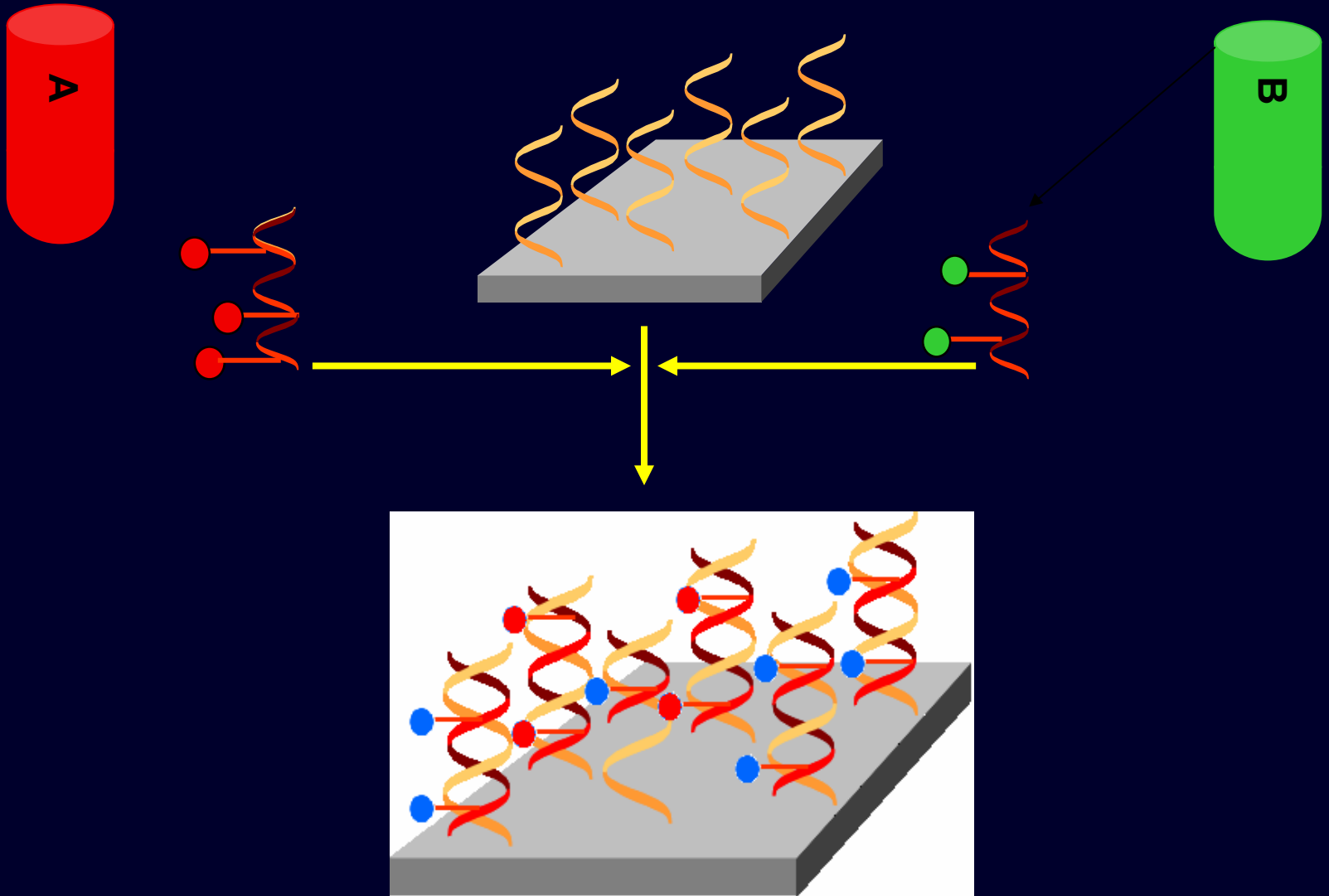
# Hibridación en microarrays

El cDNA marcado (*target*) se une de manera selectiva a su sonda complementaria (*probe*)

La ubicación de cada sonda en el vidrio es conocida.



# Hibridación competitiva



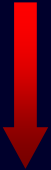
# Hibridación en microarrays

## En un experimento tipo:

1. Generar sondas (fragmentos de PCR).
2. Depositarlas en un soporte sólido (vidrio o membrana de nylon).
3. Aislar RNA (total o mRNA) a partir de una muestra biológica.
4. Convertir el RNA en cDNA utilizando una transcriptasa reversa.
5. Marcar el cDNA con nucleótidos radioactivos o fluorescentes
6. Hibridar el cDNA marcado en el array.
- 7. Detectar y cuantificar la fluorescencia o la radioactividad. utilizando un confocal laser scanner o un phosphoimager.**
8. Analizar los resultados.

# Detección de fluorescencia

Array



Scanner

Cy3: 532nm

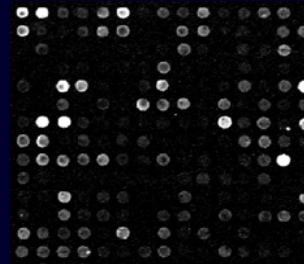


Excitación

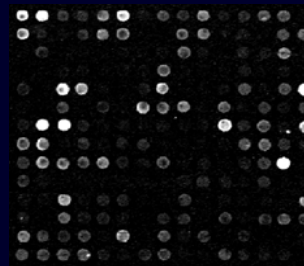


Cy5: 635nm

Cy3: 550 - 600nm



Emisión



Cy5: 655 - 695nm

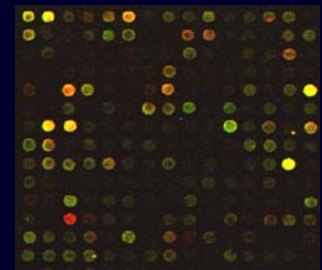
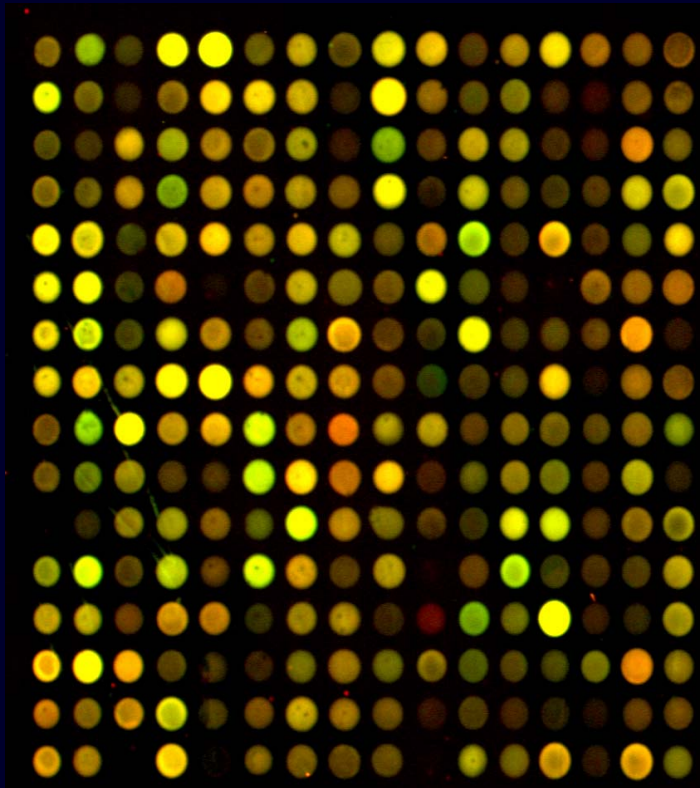


Imagen  
sobrepuesta

Meta Row	Meta Column	Row	Column	Gene ID	Flag	Signal Mean	Background S	Signal Stdev	Background Stdev
1	1	1	1	1	1	8847.81034	280.59434	2786.53069	84.2104594
2	1	1	2	2	1	10894.9892	277.625045	1261.70243	78.2029272
3	1	1	3	3	1	553.124139	275.834999	324.24079	83.6676669
4	1	1	4	4	1	995.813339	203.526302	194.437511	31.5541093
5	1	1	5	5	1	717.572841	265.768889	225.437386	72.6199612
6	1	1	6	6	1	707.648076	262.127956	143.311213	80.5005689
7	1	1	7	7	1	779.58103	261.254034	222.799043	78.5186002
8	1	1	8	8	1	305.652779	344.034804	84.0473962	854.939993
9	1	1	9	9	1	434.848076	269.174520	120.623743	81.8826811
10	1	1	10	10	1	784.663212	325.413793	1889.53007	503.469889
11	1	1	11	11	1	677.010863	264.773333	295.127953	100.579155
12	1	1	12	12	1	666.262069	1410.39691	416.133752	6977.15473
13	1	1	13	13	1	497.744628	267.127358	254.99376	183.588048
14	1	1	14	14	1	781.772414	260.813695	77.317772	69.3279752
15	1	1	15	15	1	512.05907	245.140704	120.064728	72.6175381
16	1	1	16	16	1	561.430052	321.182243	343.92725	643.613847
17	1	1	17	17	1	1433333.333	1433333.333	1433333.333	1433333.333

# Detección de fluorescencia

Cada punto corresponde a la hibridación del cDNA marcado con una secuencia específica de DNA que representa a un gen único.



Ejemplo:

cDNA experimental: **rojo** Cy5

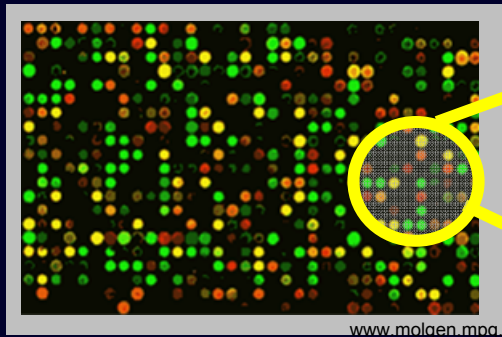
cDNA control: **verde** Cy3

**Amarillo:** Experimental = Control

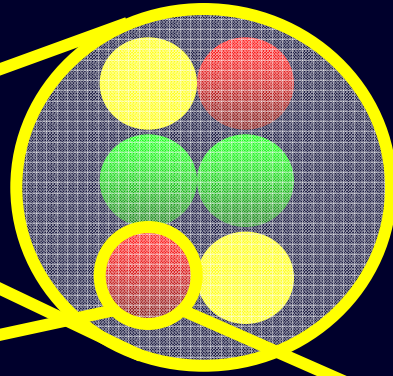
**Rojo:** Experimental > Control

**Verde:** Experimental > Control

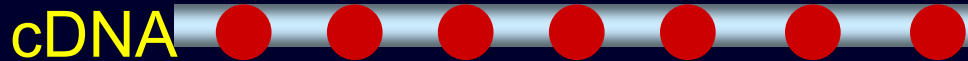
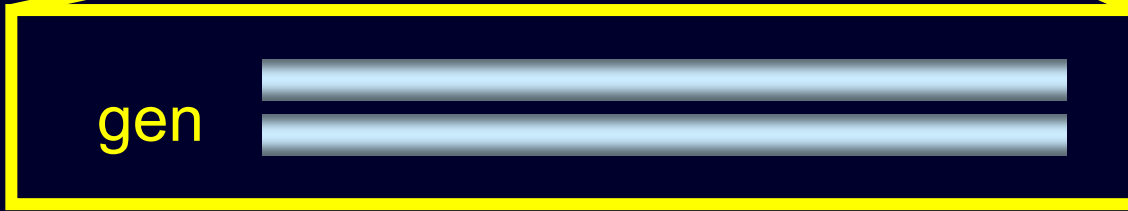




www.molgen.mpg.de

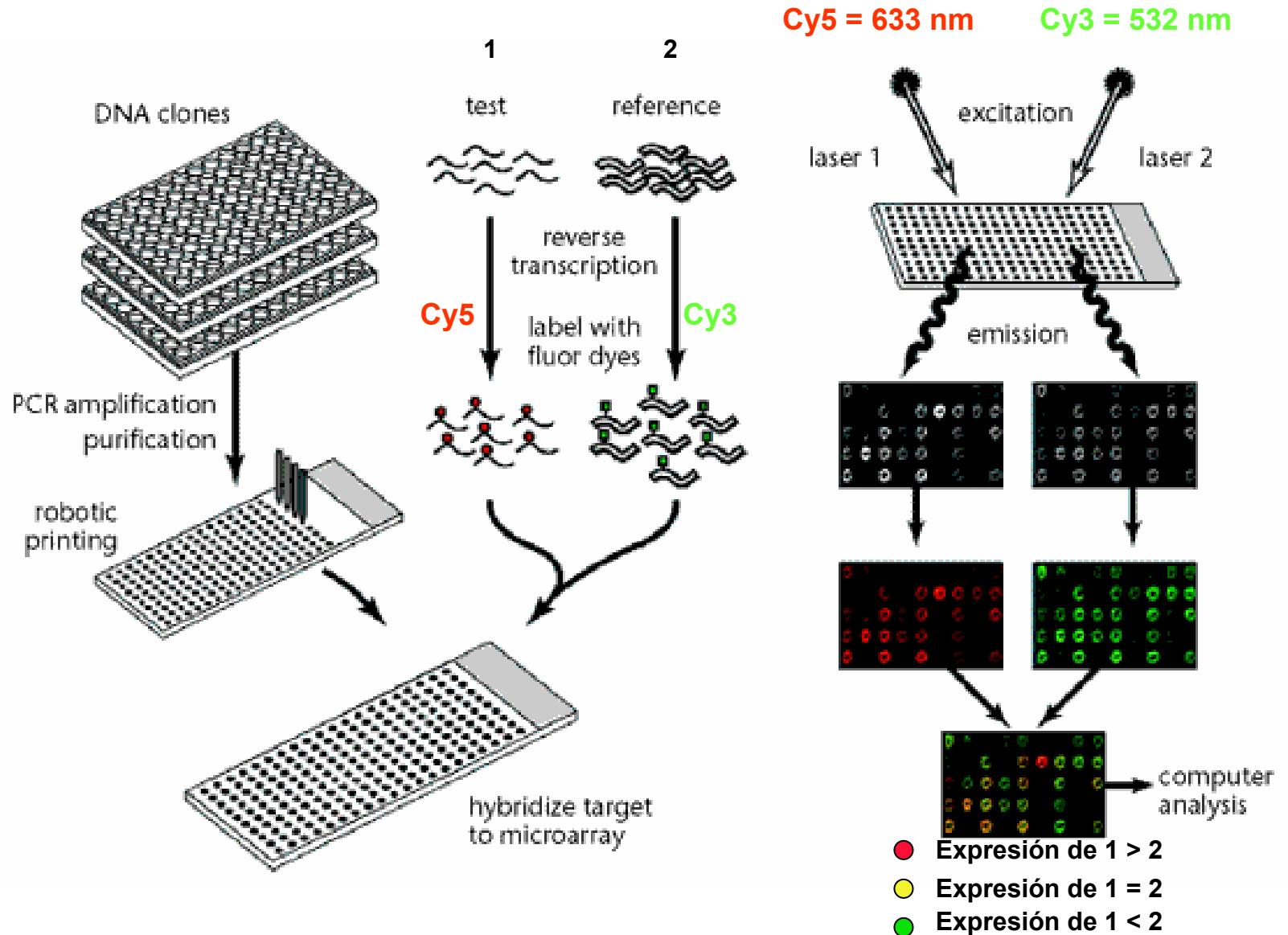


Cada *spot* representa un gen o un fragmento de un gen.

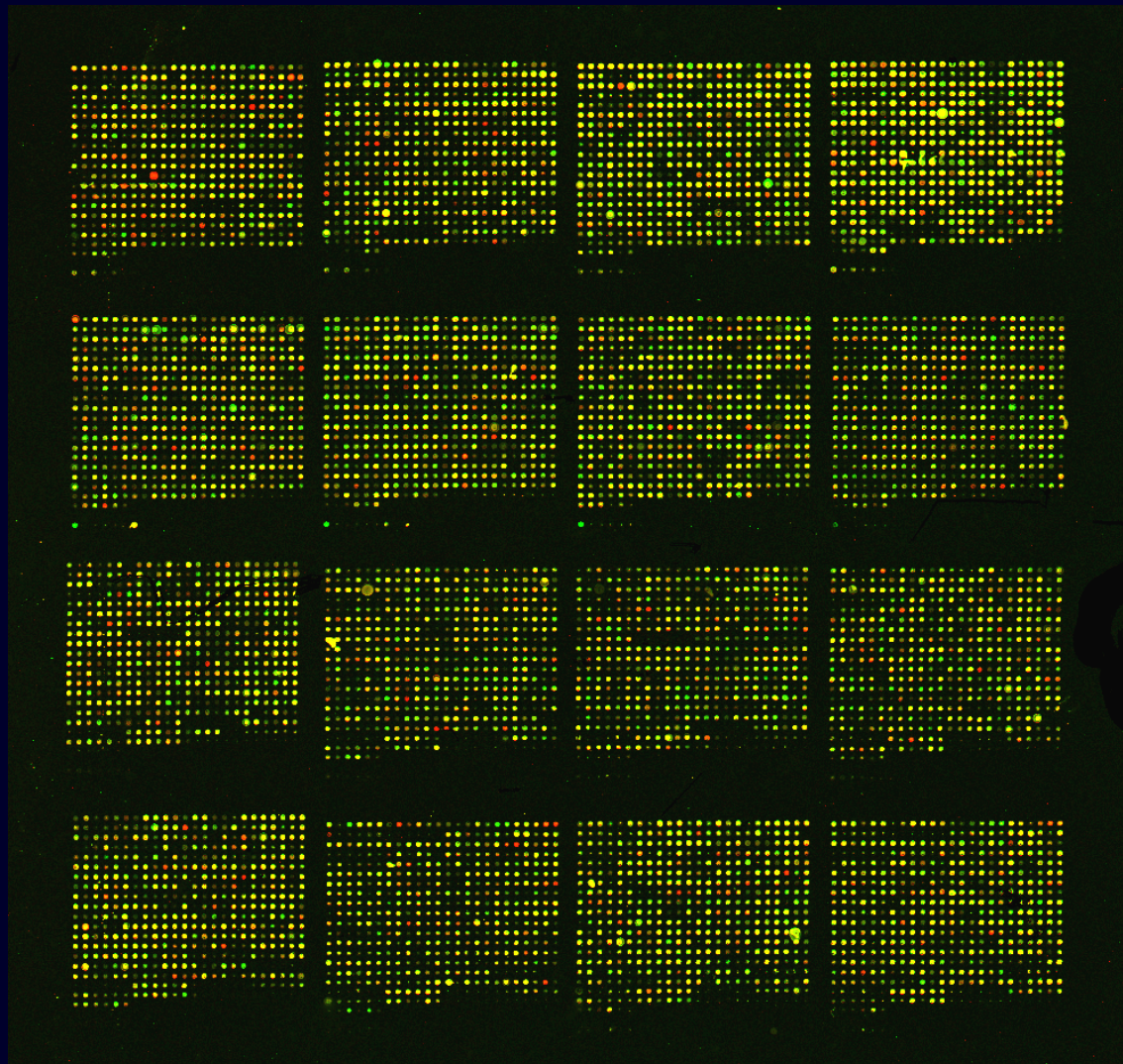


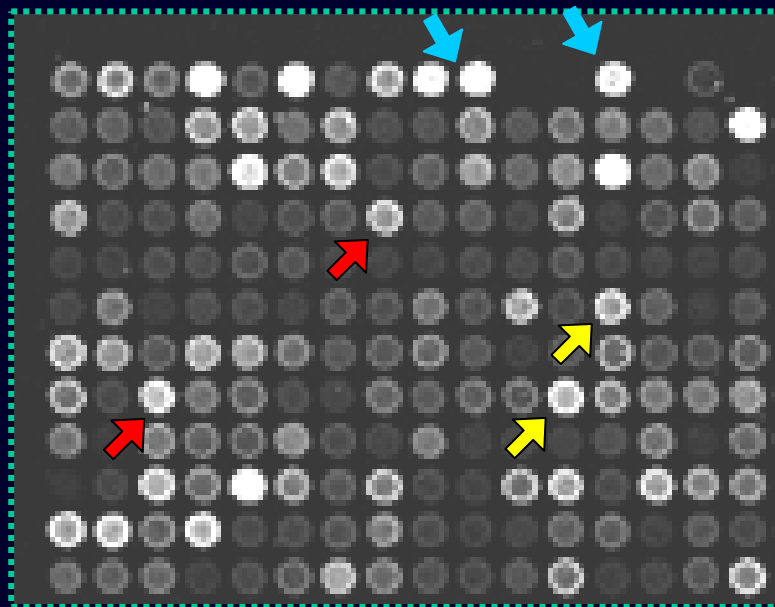
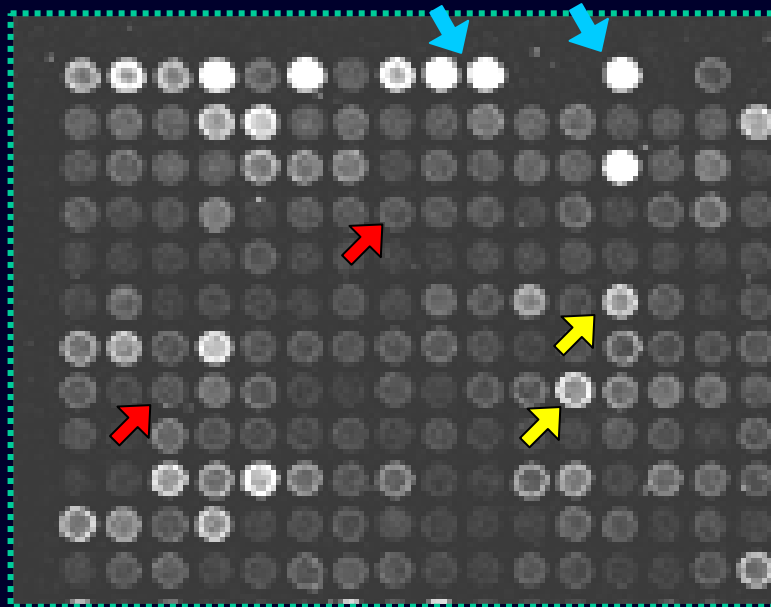
- La intensidad de la señal fluorescente es medida para cada spot en cada una de las longitudes de onda.
- La intensidad de la señal representa la cantidad de transcrito presente en la muestra original.
- La razón de las señales de hibridación Cy3/Cy5 representa el cambio relativo de expresión de un gen entre las muestras.

# Hibridación en microarrays

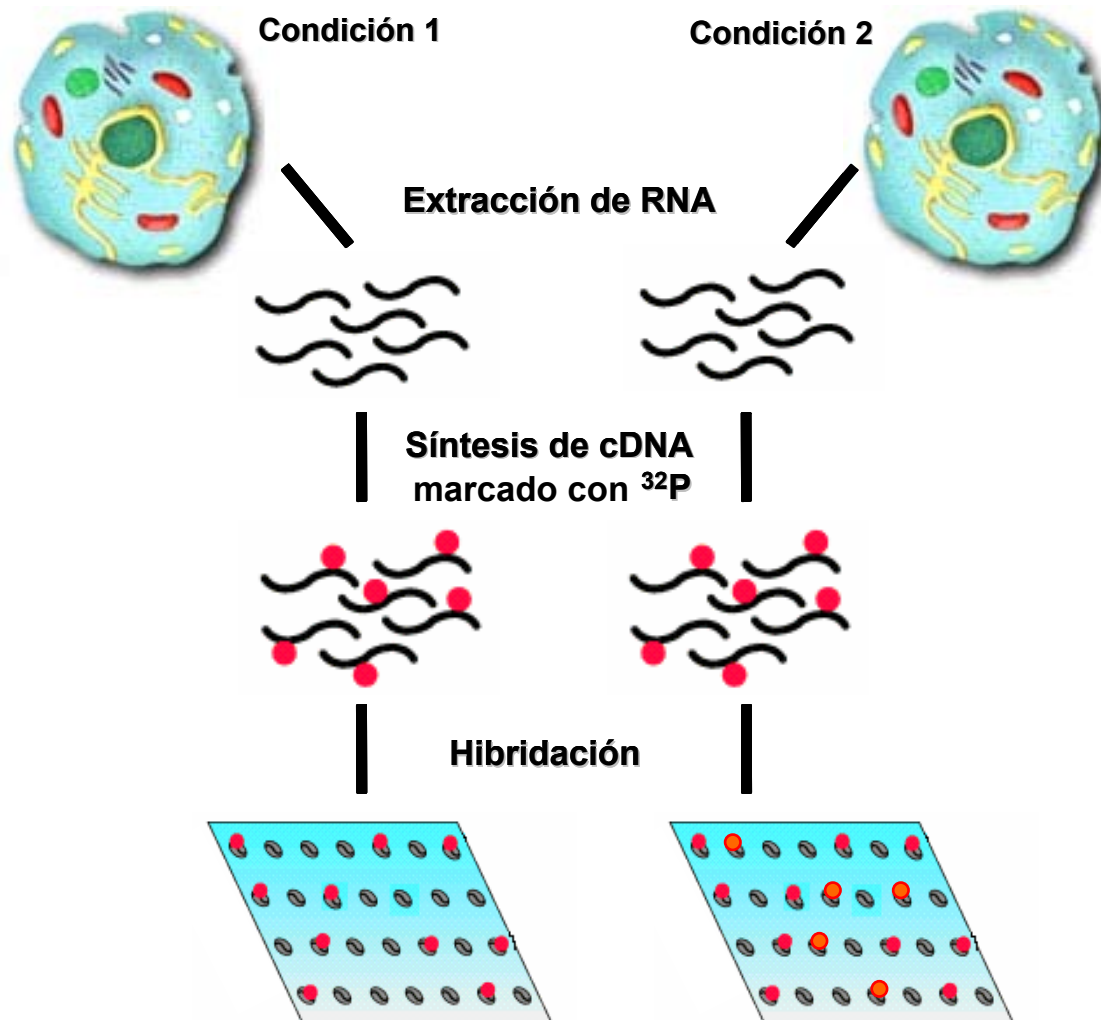


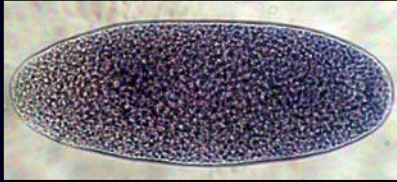
# Microarray de levadura



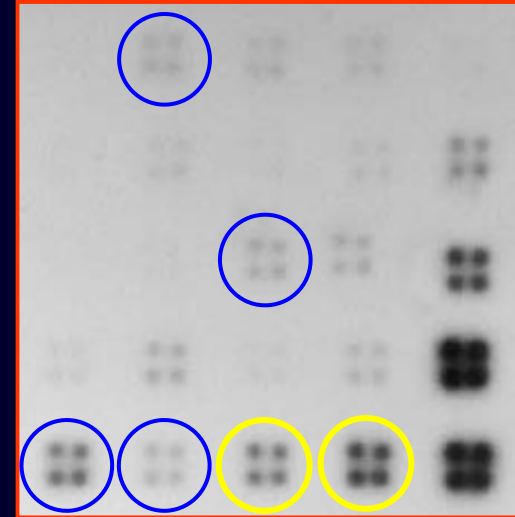
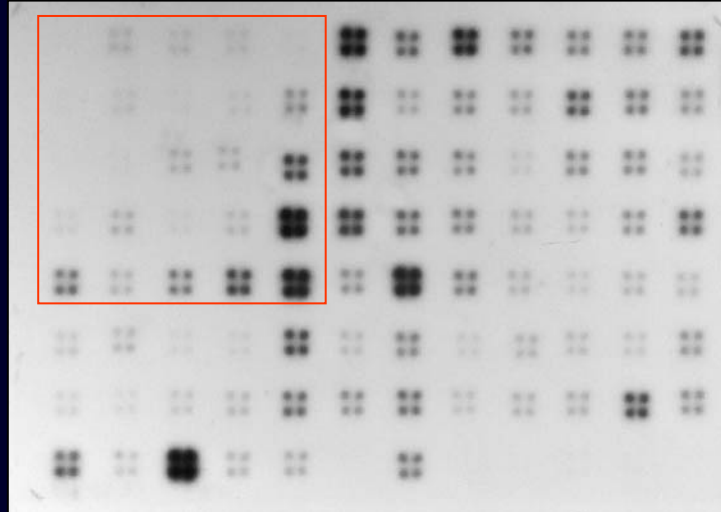


# Hibridación en macroarrays

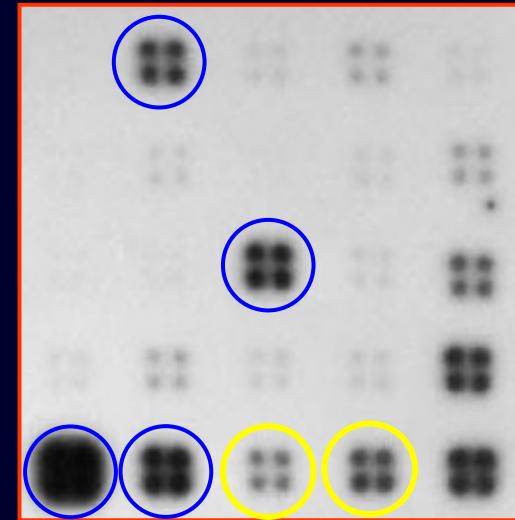
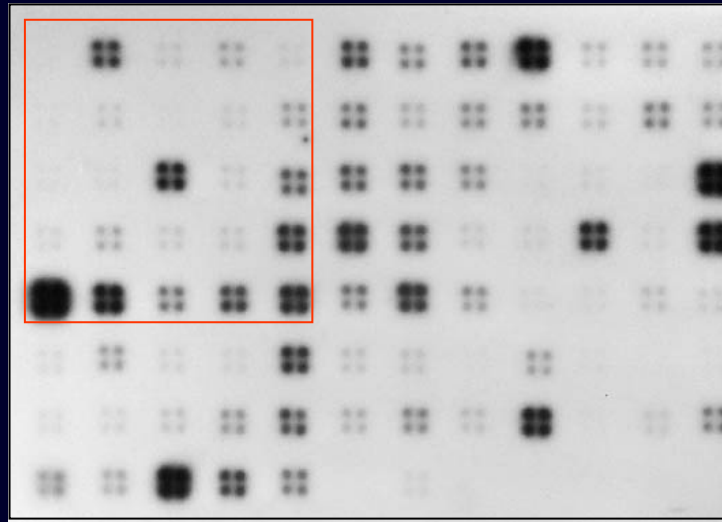




**blastodermo sincicial (Bs)**



**Gástrula temprana (G)**



# Hibridación en microarrays

## En un experimento tipo:

1. Generar sondas (fragmentos de PCR).
2. Depositarlas en un soporte sólido (vidrio o membrana de nylon).
3. Aislar RNA (total o mRNA) a partir de una muestra biológica.
4. Convertir el RNA en cDNA utilizando una transcriptasa reversa.
5. Marcar el cDNA con nucleótidos radioactivos o fluorescentes
6. Hibridar el cDNA marcado en el array.
7. Detectar y cuantificar la fluorescencia o la radioactividad. utilizando un confocal laser scanner o un phosphoimager.
- 8. Analizar los resultados.**

# 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

- Transcripción *in vitro* de un RNA marcado

### DNA

- Hebra complementaria al mRNA blanco

# ¿Cómo visualizar la sonda?

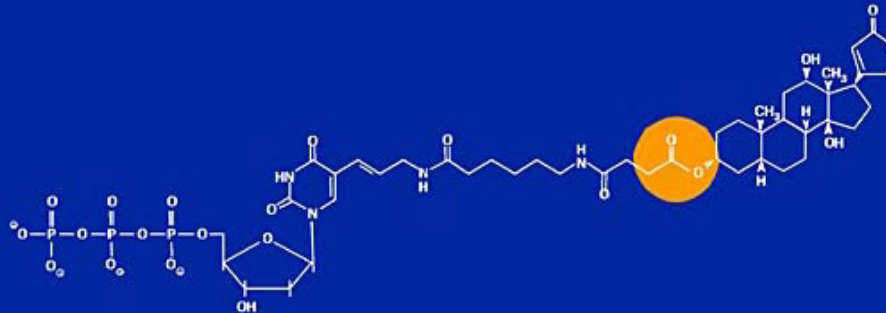
    
**ATCCGATGCATCCGA**

**UTP-Fluoroforo**

**DIG** **DIG** **DIG**  
**ATCCGATGCATCCGA**

**UTP-Digoxigenina**

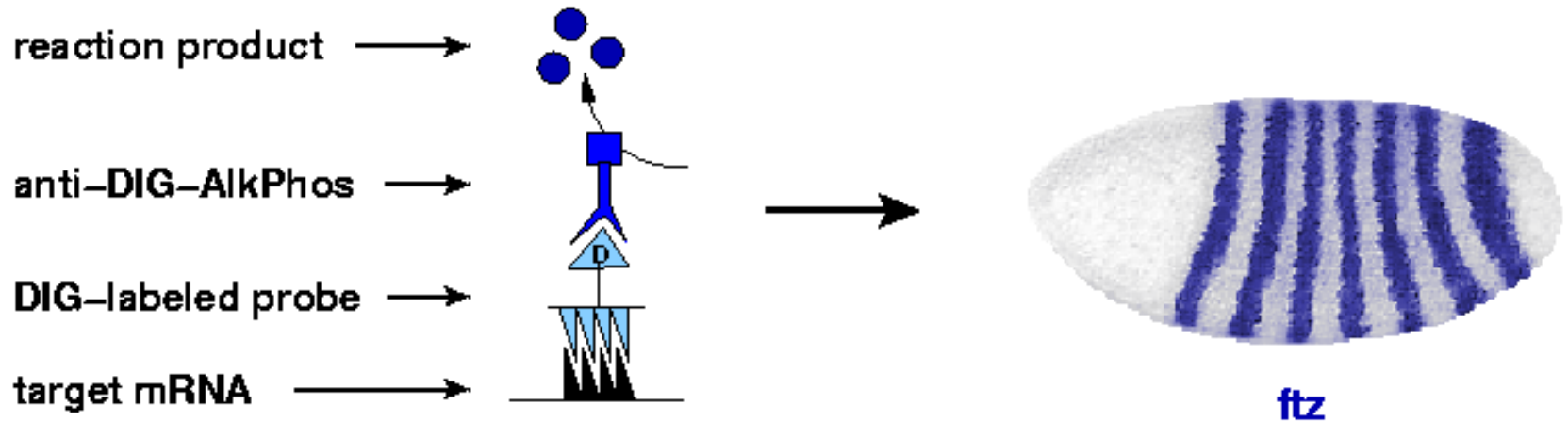
**Structure of DIG-dUTP Coupled via  
Alkali-Labile Ester Bond**

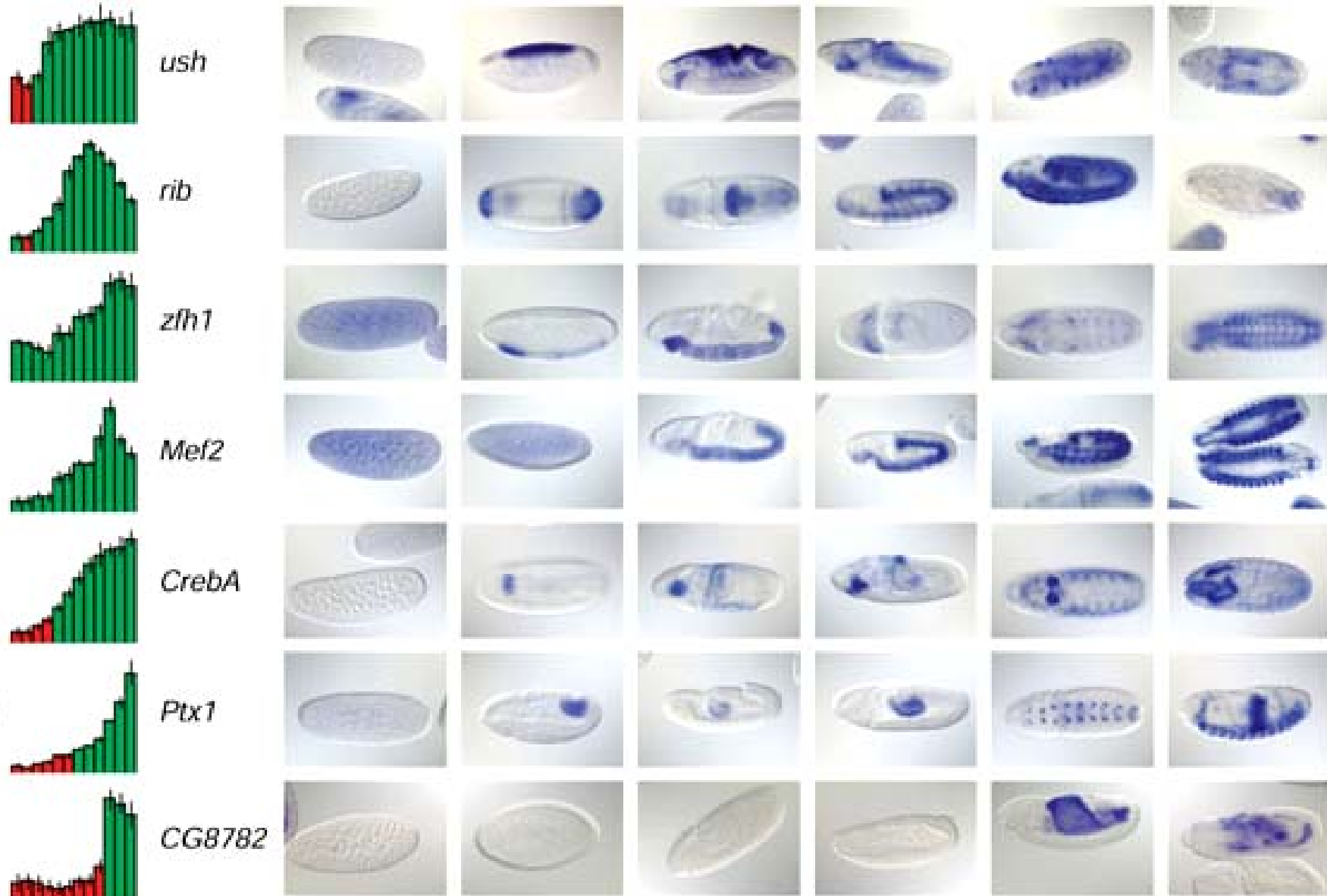


Formula:  $C_{45}H_{63}N_4O_{22}P_3Li_4$  Molecular Weight: 1132.7

DIG DIG DIG  
**ATCCGATGCATCCGA**

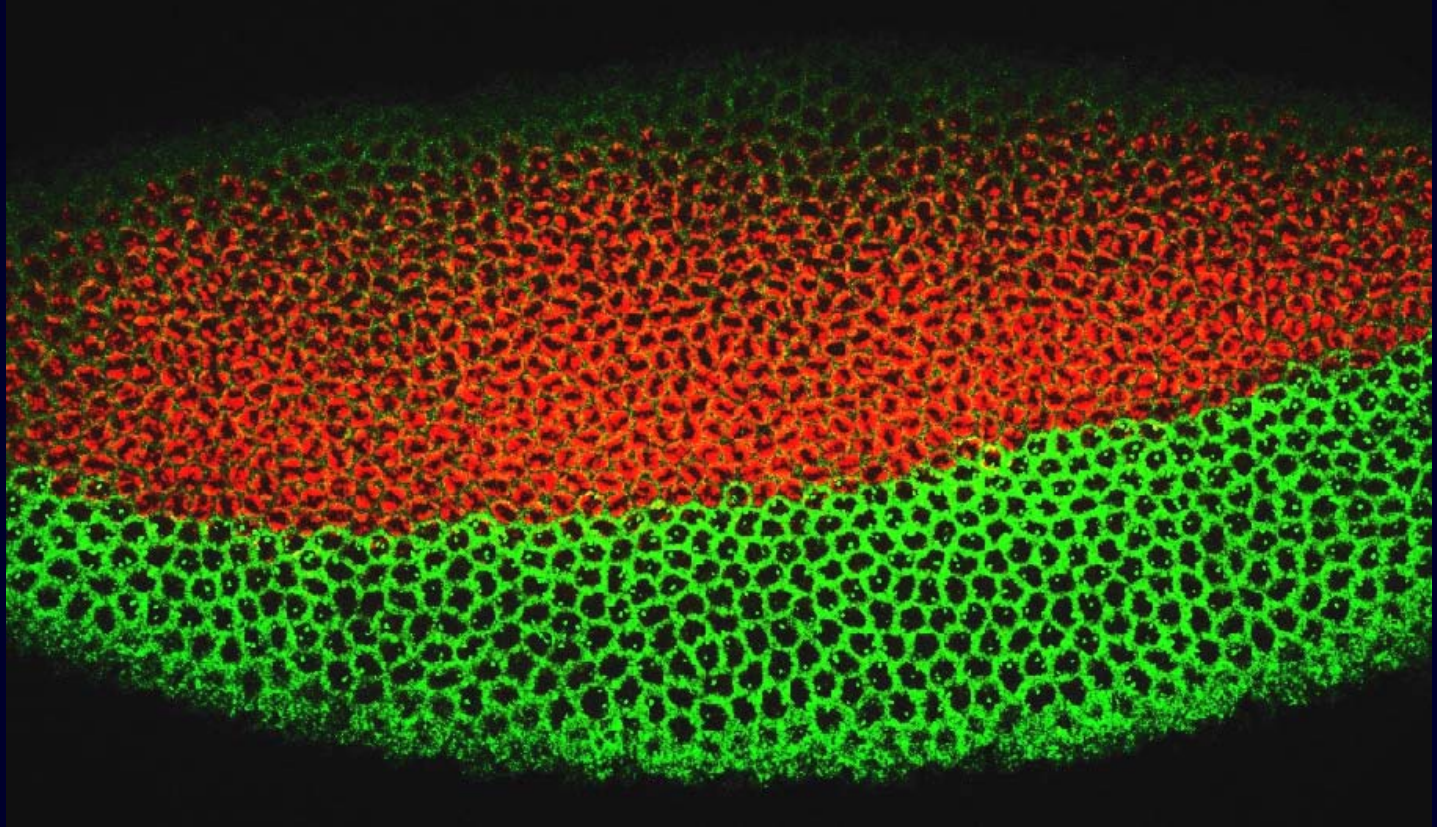
**UTP-Digoxigenina**





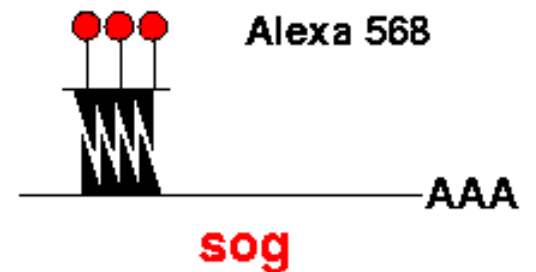
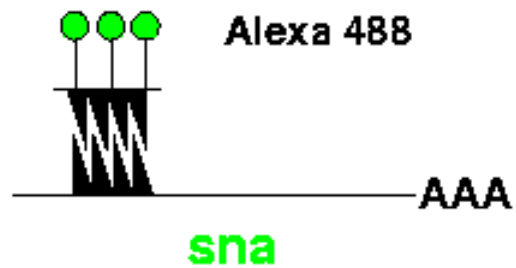
*Correlación entre imágenes y datos de microarrays*

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.

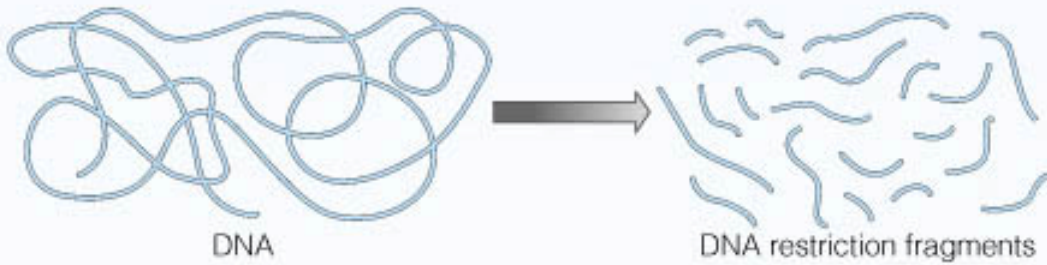
# **SOUTHERN BLOT**

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

# SOUTHERN BLOT

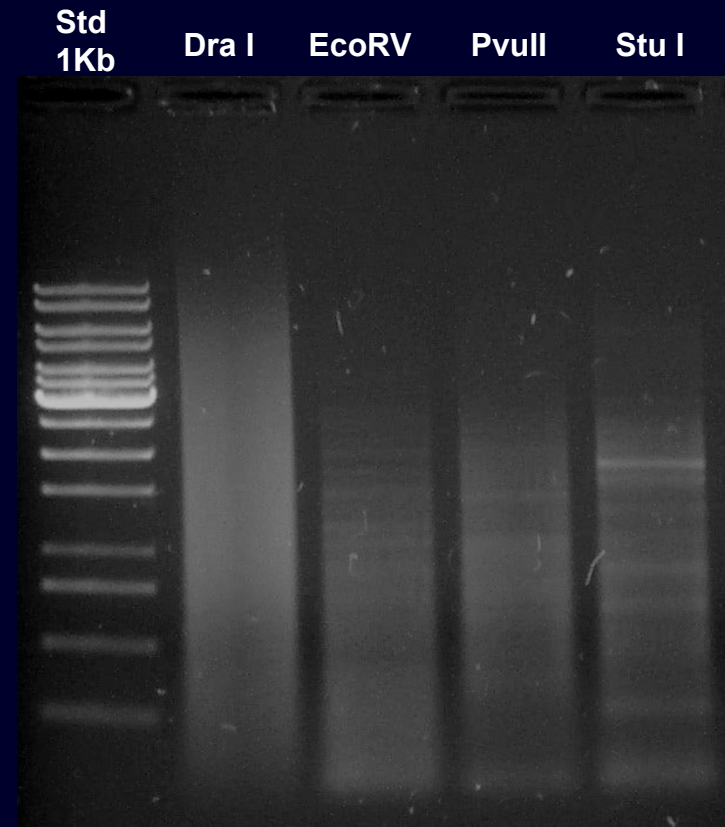
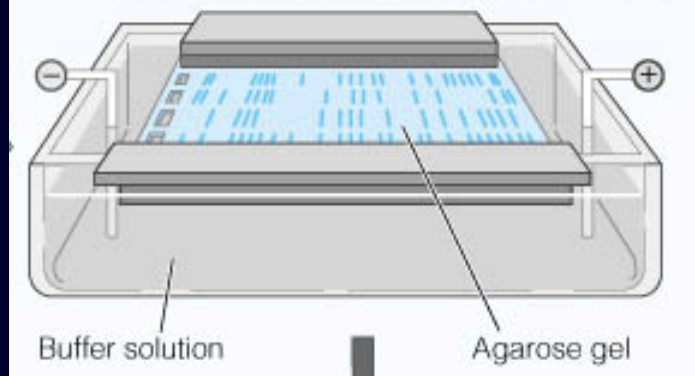
Step 1

Digest DNA with  
restriction endonucleases

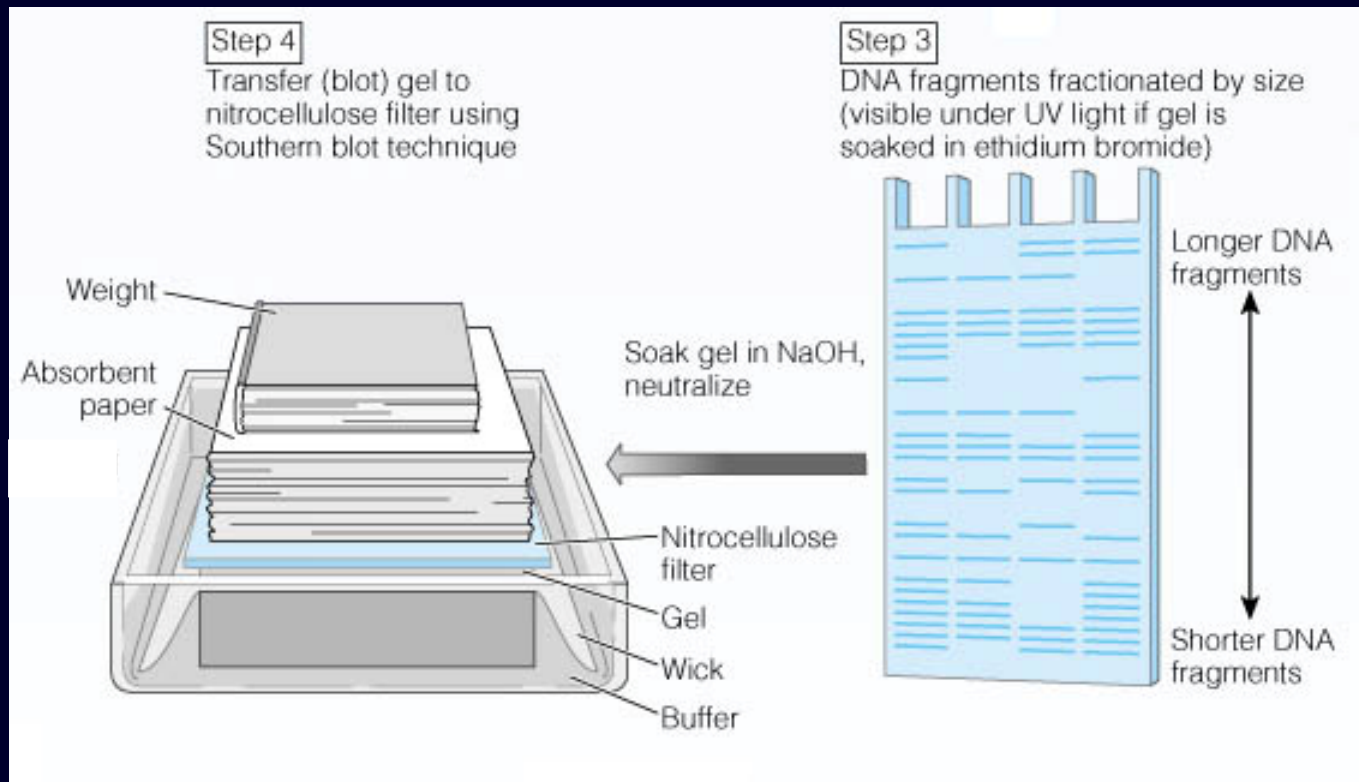


Step 2

Perform agarose gel electrophoresis  
on the DNA fragments from different digests







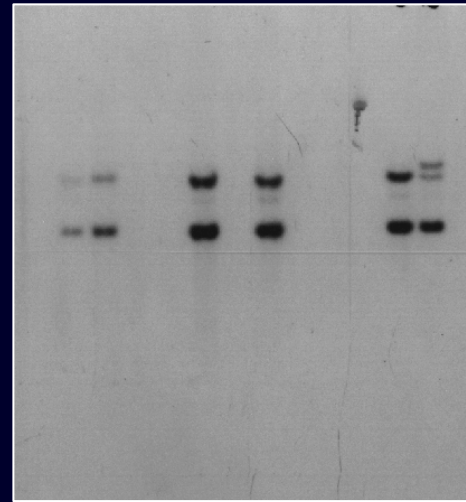
1. Los fragmentos de DNA en el gel son desnaturados en un buffer alcalino.
  - Ph alcalino abre los anillos de las purinas e hidroliza el DNA
  - Ph alcalino desnatura el DNA a la forma de hebra simple
2. El DNA es transferido a una membrana de nylon en buffer SSC (standard saline citrate)
  - Alta concentración de sal regula la estrictez (especificidad de unión de la sonda)
  - Citrato, quelante de cationes divalentes requeridos para la actividad de las nucleasas (previene degradación del DNA))

**Step 5**

DNA fragments are bound to filter in positions identical to those on the gel

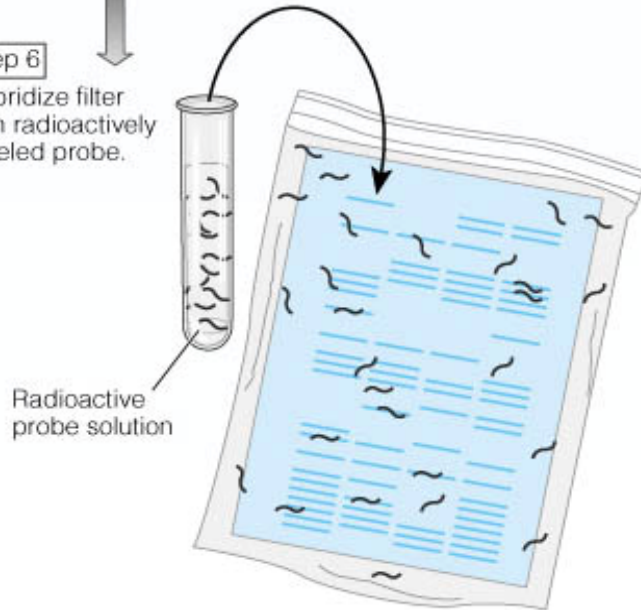


**Luz UV**



**Step 6**

Hybridize filter with radioactively labeled probe.



**Step 7**

Expose filter to X-ray film. Resulting autoradiograph shows hybridized DNA fragments

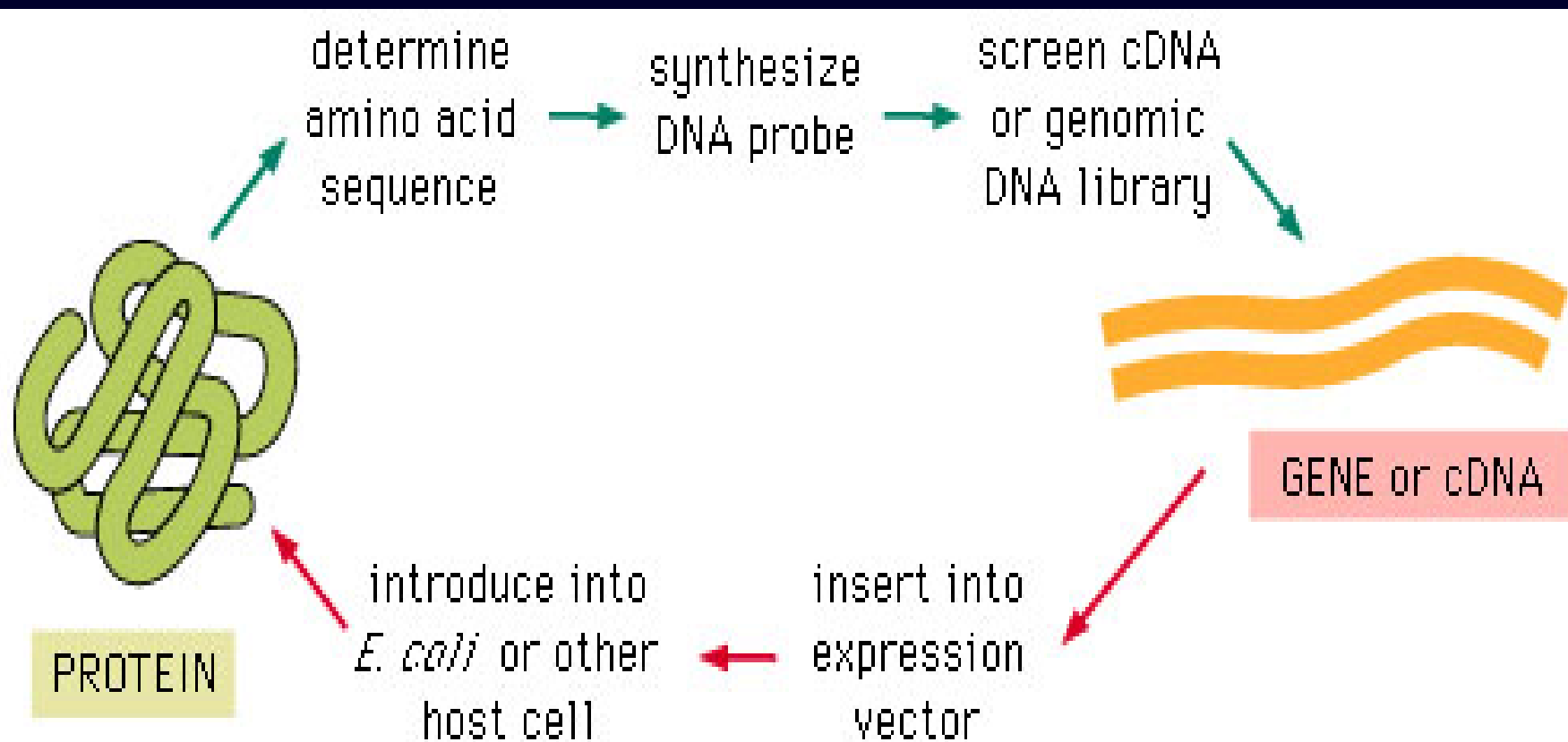


# DETECCION DE ACIDOS NUCLEICOS

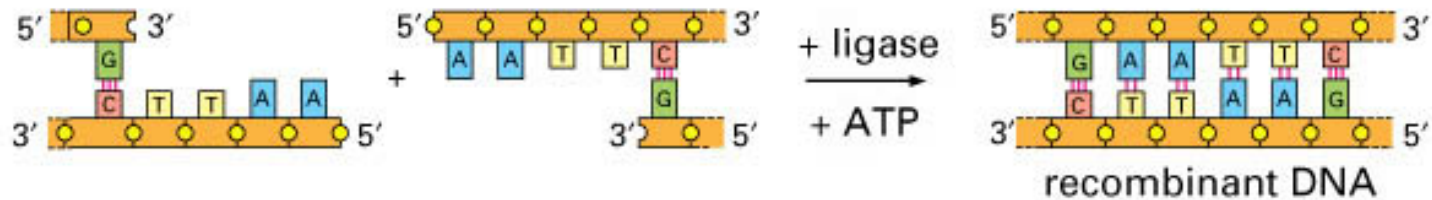
- ANALISIS DE GENOTECAS

PERMITE IDENTIFICAR Y AISLAR UN GEN

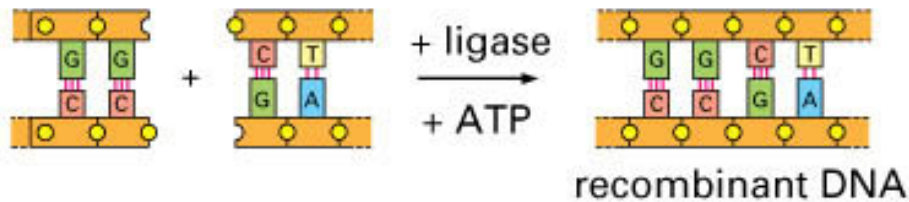
# ¿Cómo aislar un gen?



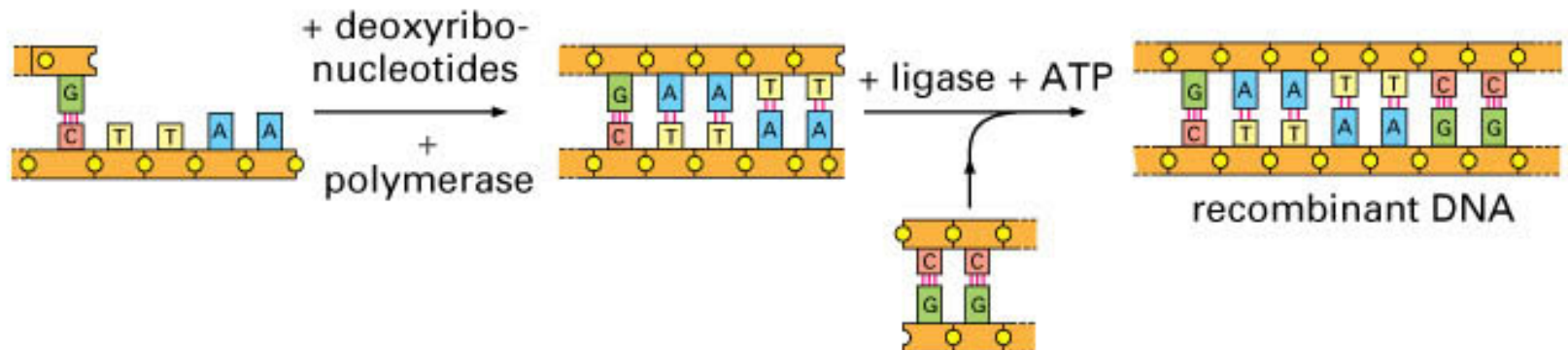
### (A) JOINING TWO COMPLEMENTARY STAGGERED ENDS



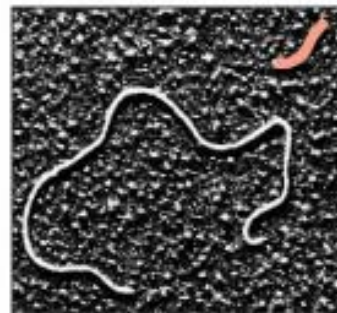
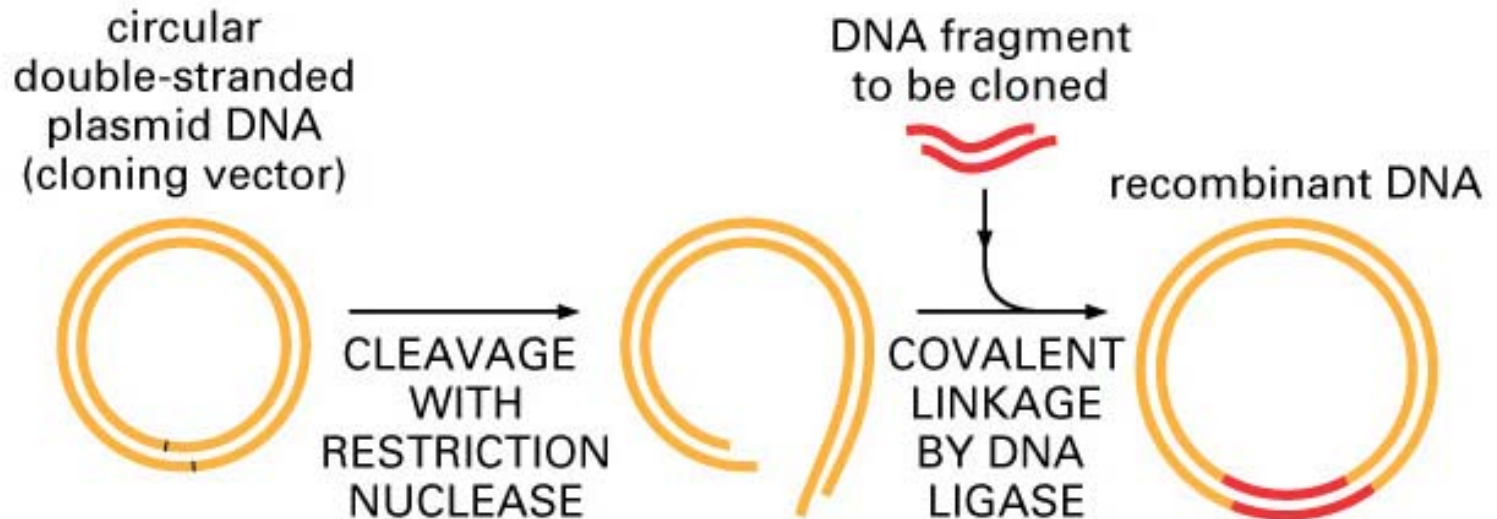
### (B) JOINING TWO BLUNT ENDS



### (C) JOINING A BLUNT END WITH A STAGGERED END



# Construcción de un vector recombinante



200 nm



200 nm

Gen Amp<sup>r</sup>

2,686 bp  
pUC 18

Gen *lac Z*

Origen  
de replicación

aagcttgcatagcctgcaggtcgactctagaggatccccgggtaccgagctcgaattc

HindIII SphI PstI SalI XbaI BamHI XmaI KpnI SstI EcoRI

AccI

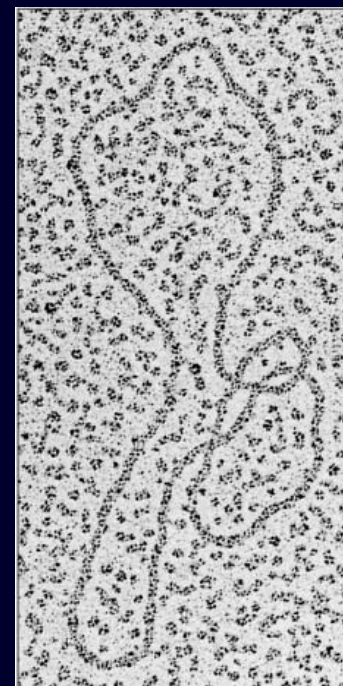
SmaI

BanII

HincII

BspMI

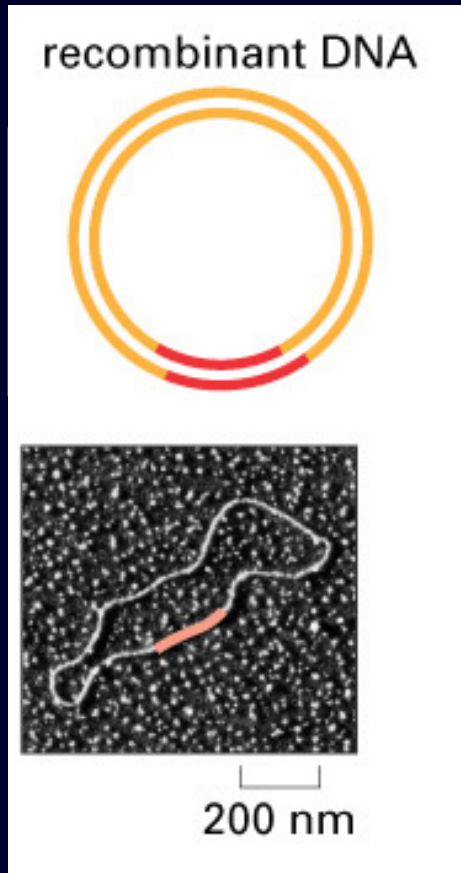
Multiple Cloning  
Site



100 nm



# Transformación



El DNA recombinante puede ser introducido en bacterias mediante transformación, utilizando  $\text{CaCl}_2$  para perturbar la membrana bacteriana.



Las bacterias son sembradas en medio sólido y los transformantes (portadores del inserto) son seleccionados.



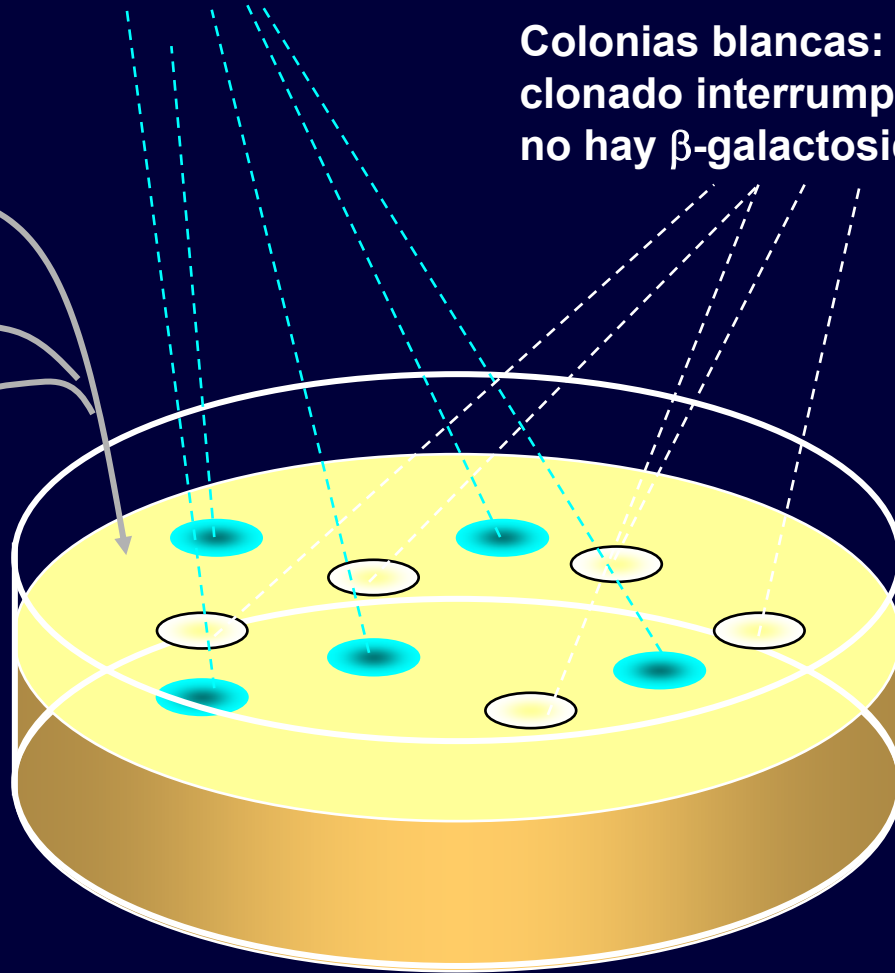
**Colonias azules: Expresan  $\beta$ -galactosidasa**

**Colonias blancas: El fragmento clonado interrumpe al gen *lacZ*, no hay  $\beta$ -galactosidasa.**

**IPTG: Induce la expresión de *lacZ*.**

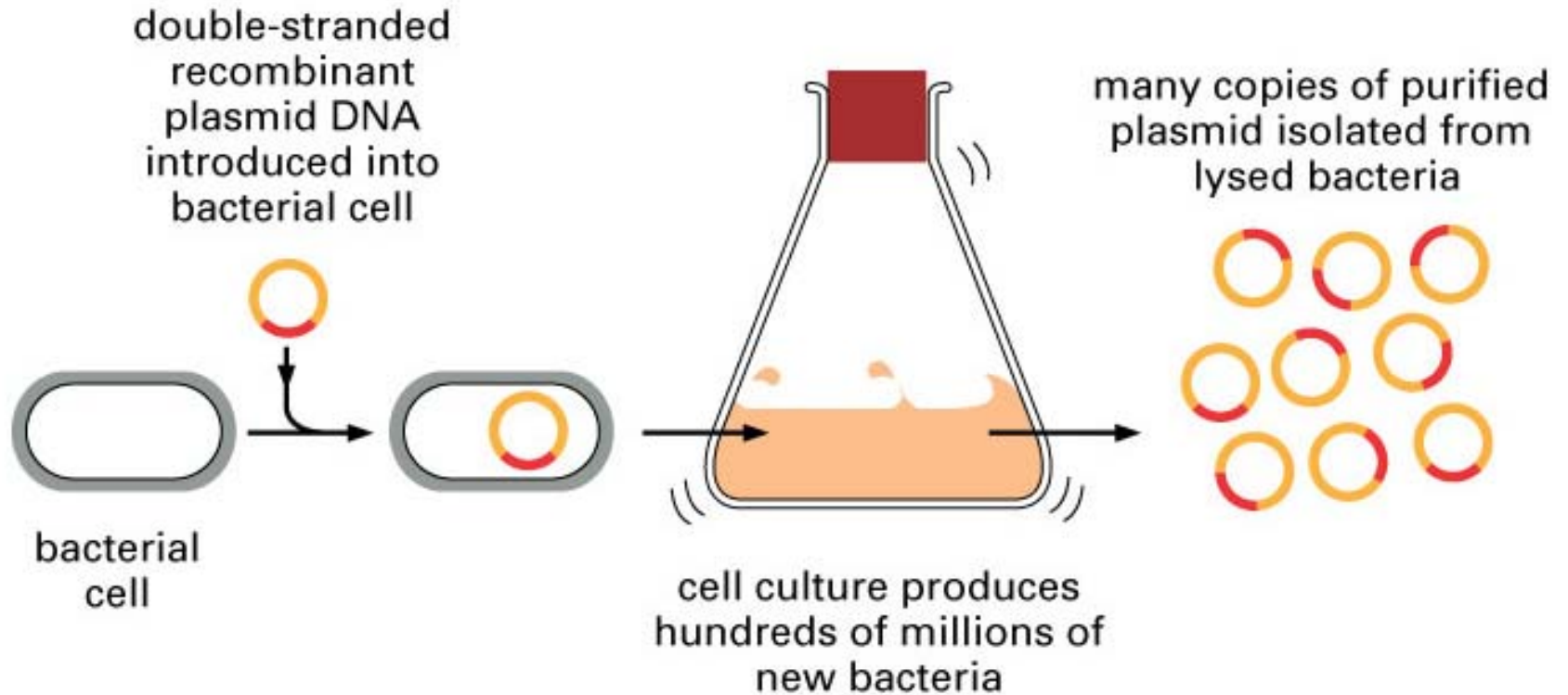
**X-Gal : Análogo a lactosa – color azul cuando es metabolizado por la  $\beta$ -galactosidase.**

**Ampicilina: Antibiótico**

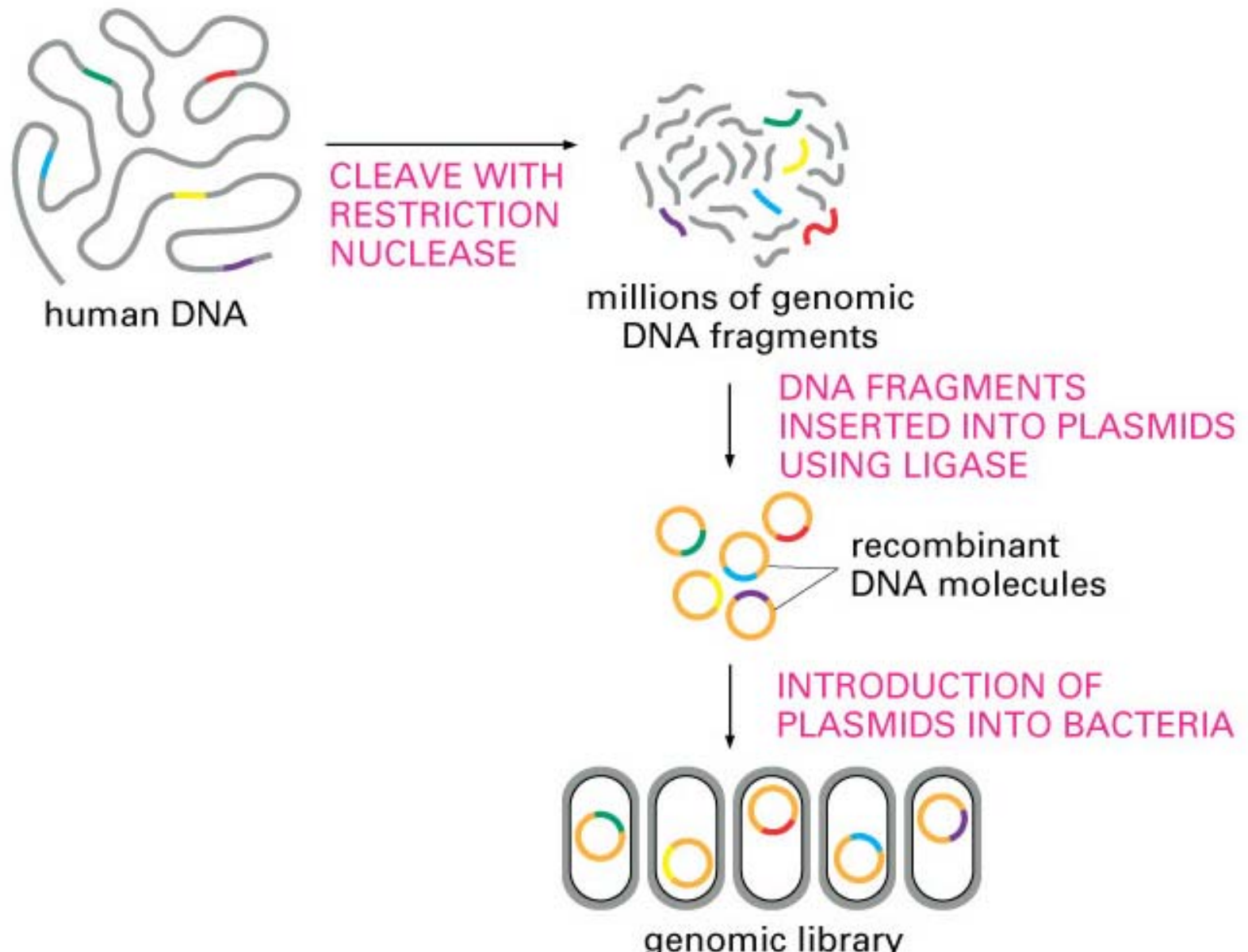


# El fragmento clonado puede ser replicado en una bacteria

10.22 cloned DNA fragments

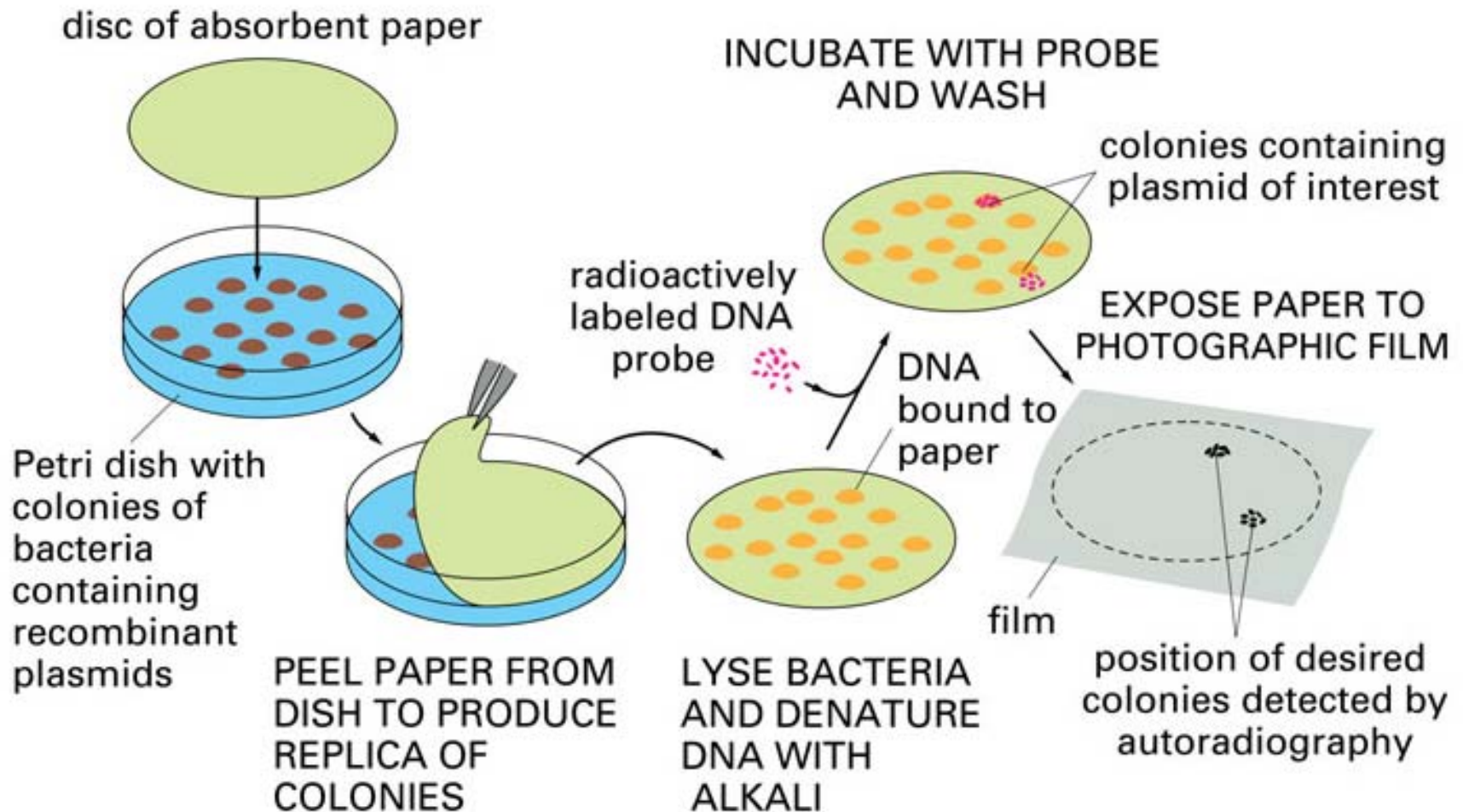


# Construcción de una genoteca genómica



# Análisis de la genoteca

10.24 hybridization in



# Generación de una genoteca de cDNA

