

DETECCION DE ACIDOS NUCLEICOS

1. RNA

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

2. DNA

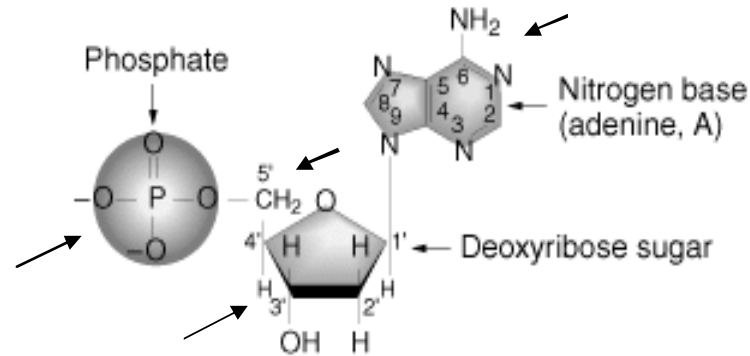
- ***SOUTHERN BLOT***
- **ANALISIS DE GENOTECAS**

HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

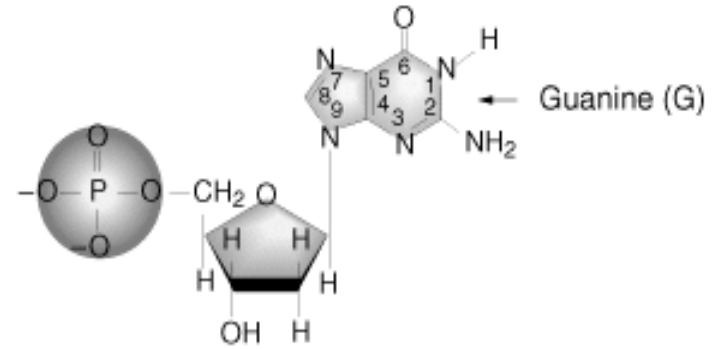
- **APAREAMIENTO COMPLEMENTARIO DE BASES ENTRE DOS ACIDOS NUCLEICOS DE HEBRA SIMPLE ® PRODUCTO DE HEBRA DOBLE.**
 - **DNA/DNA**
 - **RNA/RNA**
 - **DNA/RNA**

Estructura de los nucleótidos

Purine nucleotides

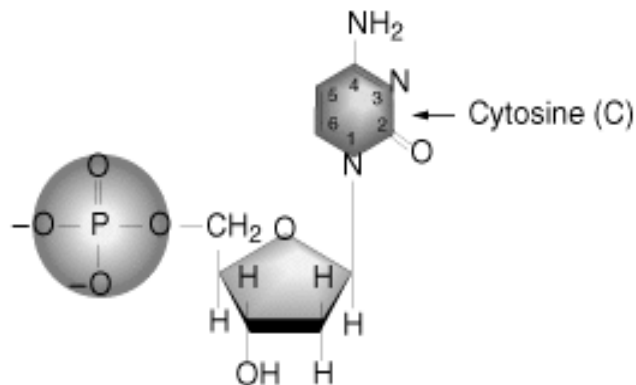


Deoxyadenosine 5'-phosphate (dAMP)

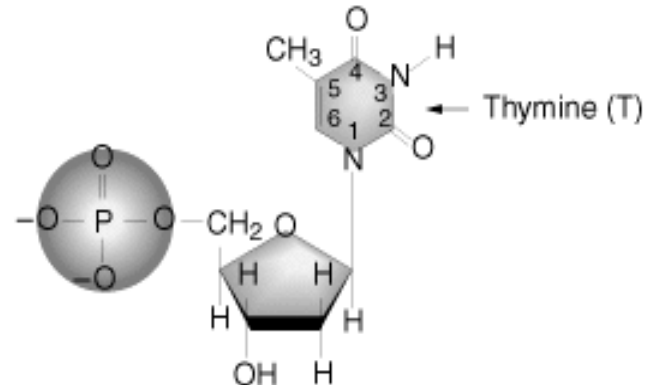


Deoxyguanosine 5'-phosphate (dGMP)

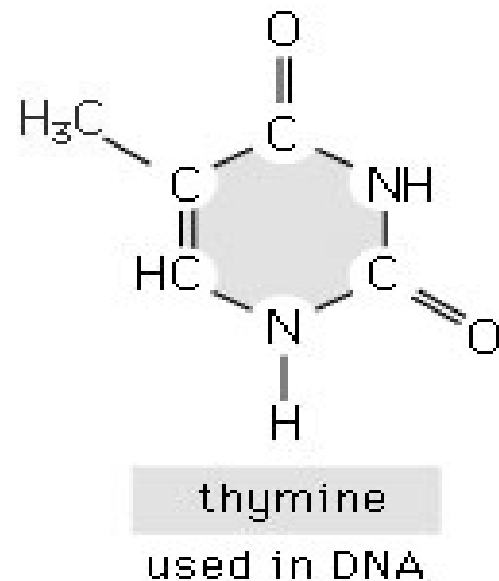
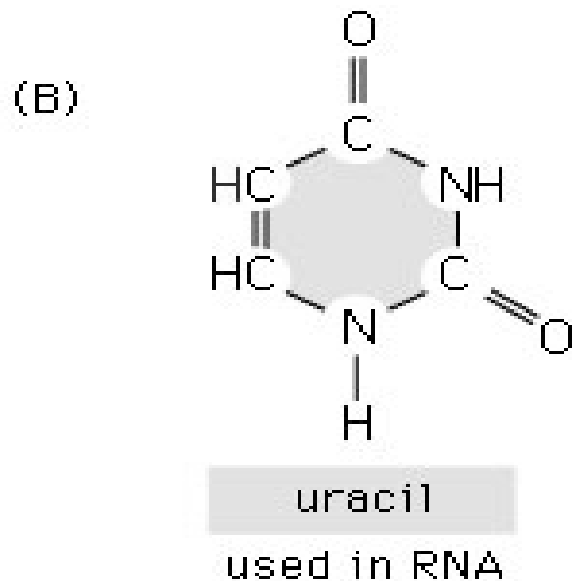
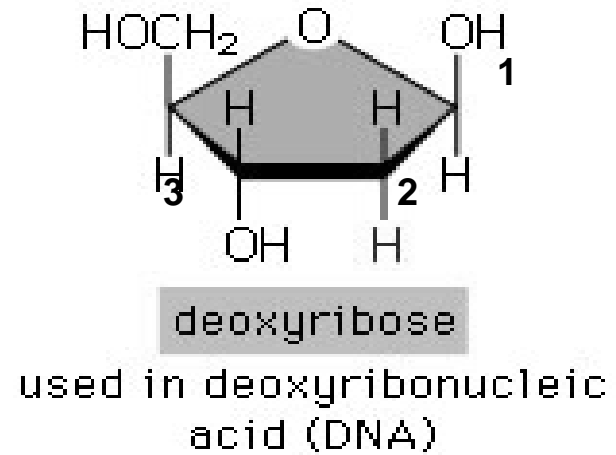
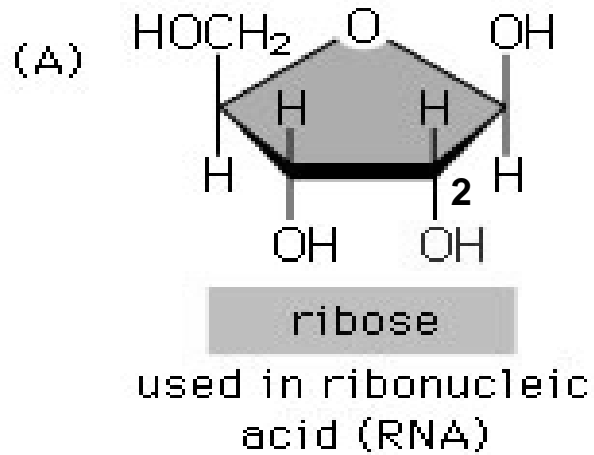
Pyrimidine nucleotides



Deoxycytidine 5'-phosphate (dCMP)



Deoxythymidine 5'-phosphate (dTMP)



Estructura del DNA

hydrogen bonded nucleotides
on opposite helices

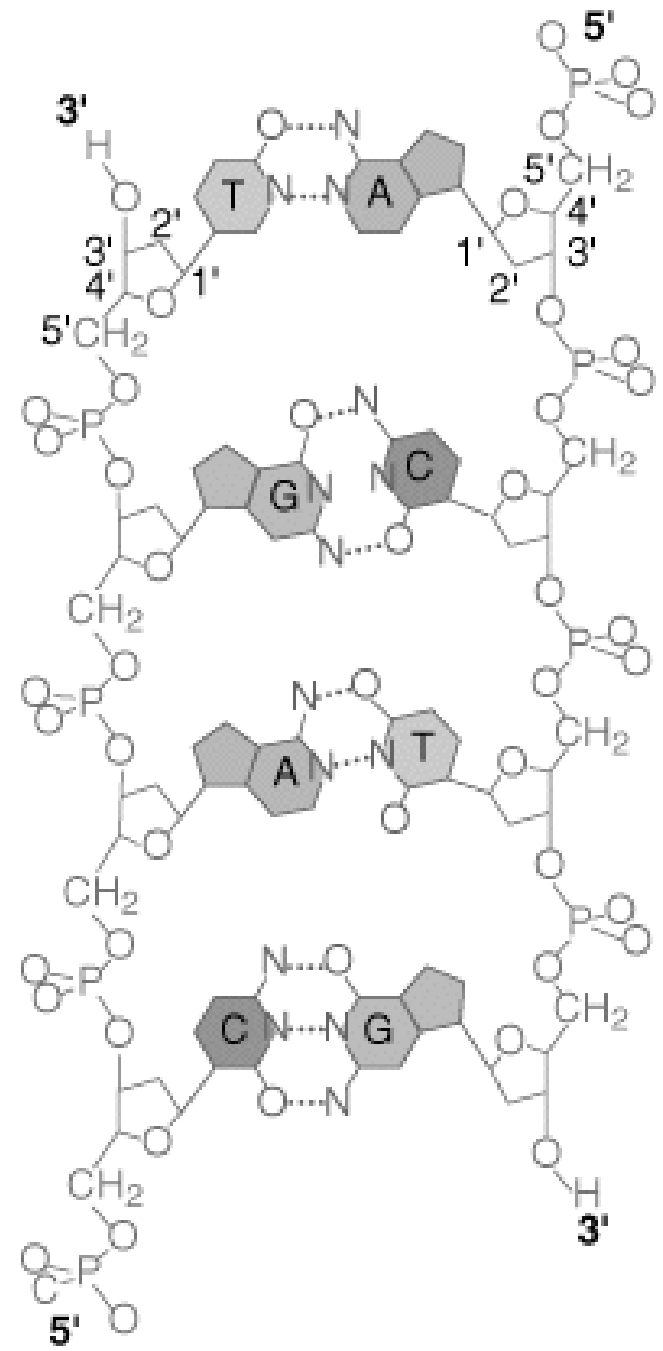
DNA helices are antiparallel

carbons on sugar define ends:
5' and 3'

pyrimidines bond with purines

T : A

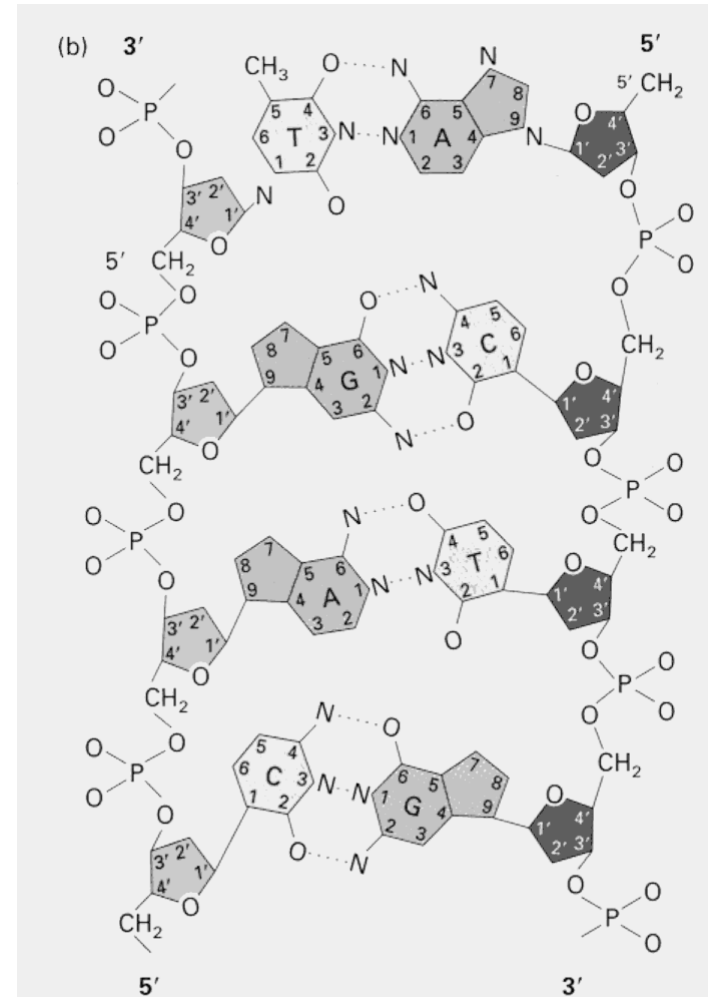
C : G



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.

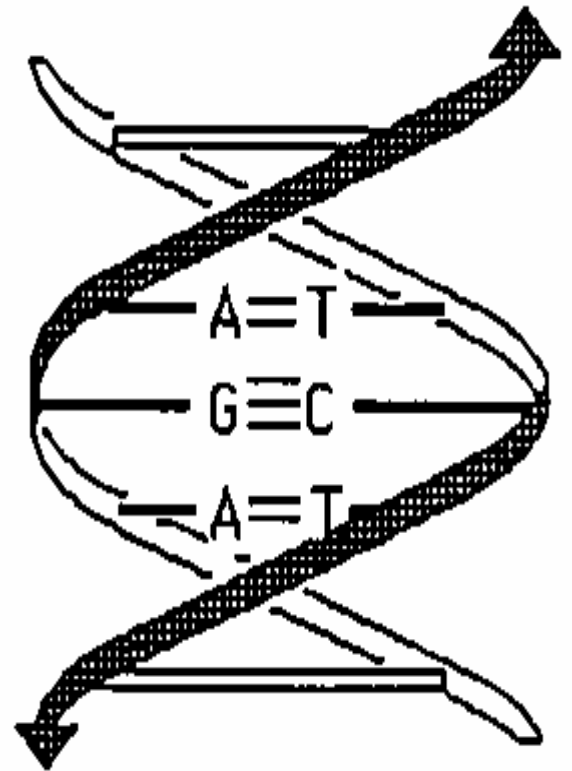


FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LA HIBRIDACION ENTRE ACIDOS NUCLEICOS

- 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

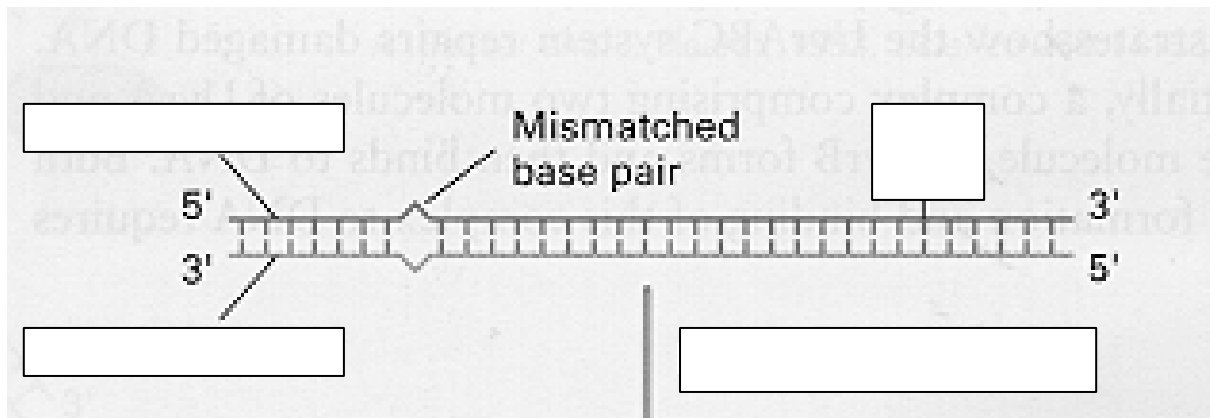
FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LA HIBRIDACION ENTRE ACIDOS NUCLEICOS

- 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

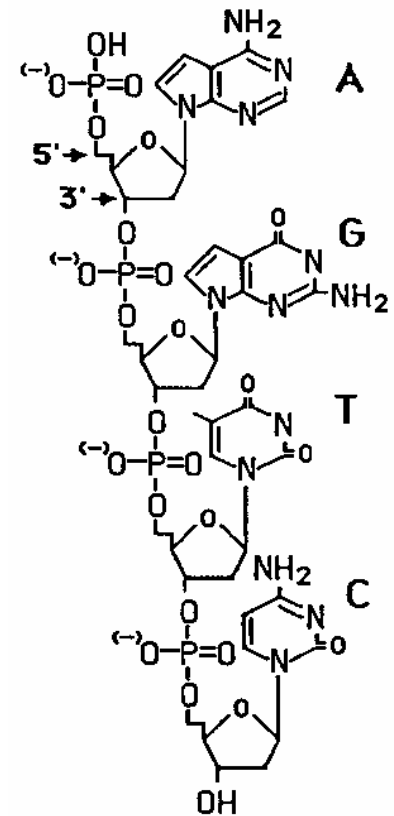


FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LA HIBRIDACION ENTRE ACIDOS NUCLEICOS

- 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
- $\uparrow [\text{sal}] \rightarrow \uparrow$ 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 (Na^+) o divalentes (Mg^{++})

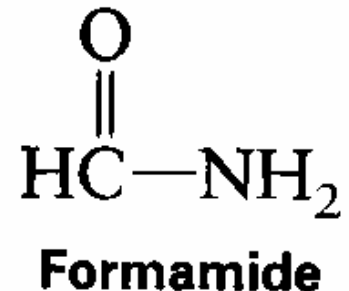


FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LA HIBRIDACION ENTRE ACIDOS NUCLEICOS

- Temperatura
 - La energía libre de las interacciones no covalentes que mantienen la estructura de los ácidos nucleicos no es 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

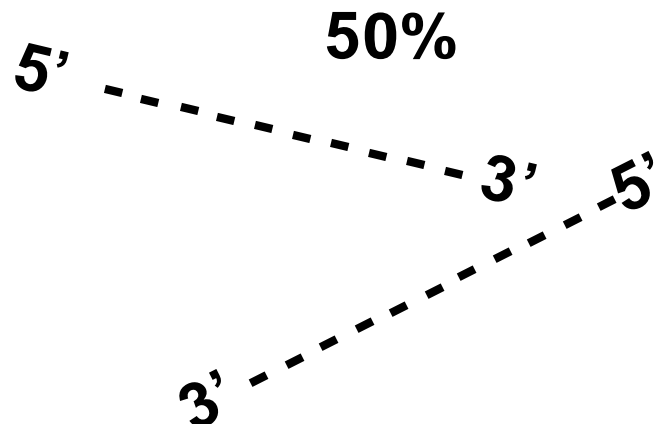
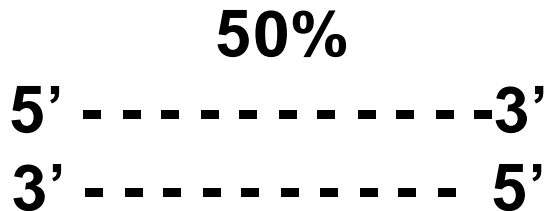


El efecto combinado de estos factores puede ser expresado en una ecuación para el calculo de la Tm

- ¿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

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

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⁺

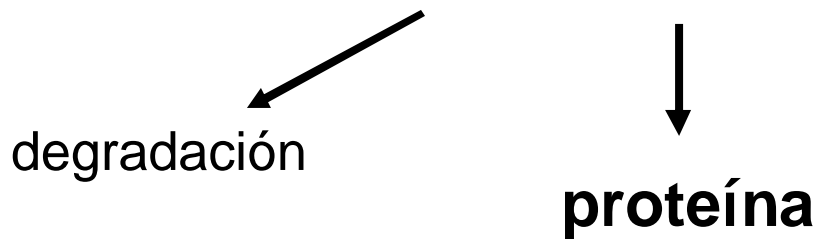
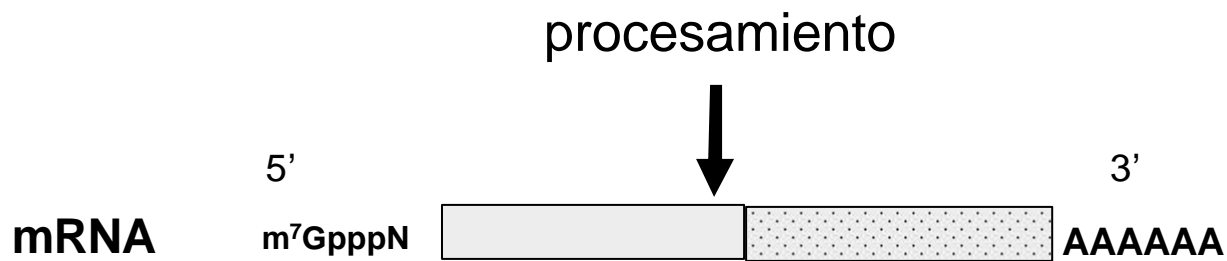
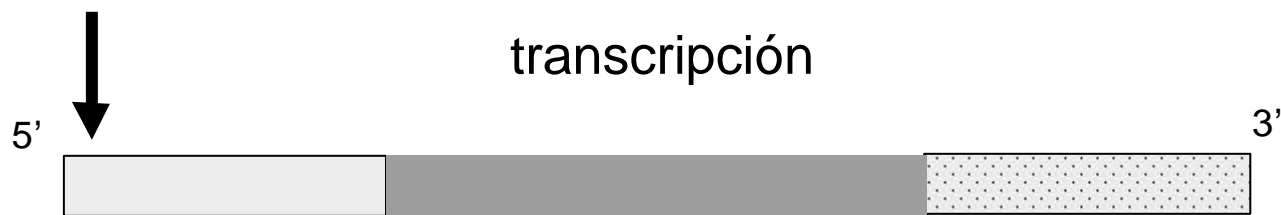
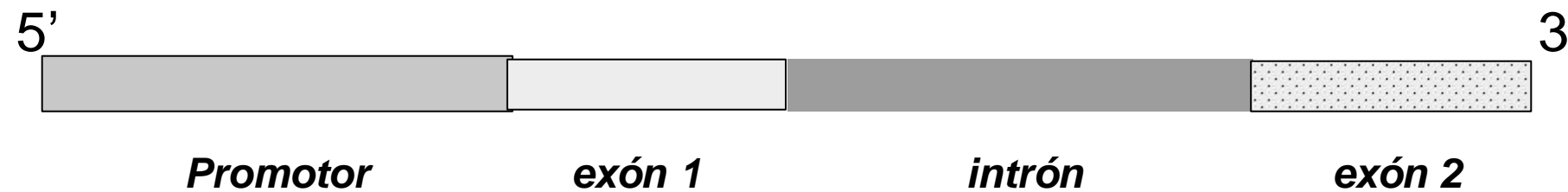
$$T_m \text{ (}^{\circ}\text{C)} = 4 (G+C) + 2 (A+T)$$

DETECCION DE ACIDOS NUCLEICOS

- NORTHERN BLOT

PERMITE DETECTAR LA PRESENCIA DE UN TRANSCRITO.

PROPORCIONA INFORMACION DE SU TAMAÑO, ABUNDANCIA Y POSIBLE PROCESAMIENTO.



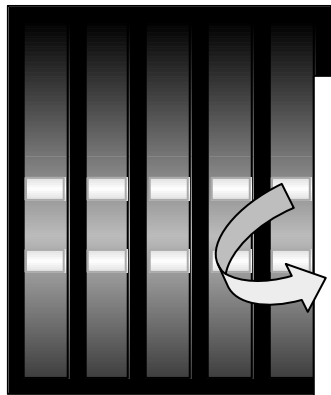
NORTHERN BLOT

1. Extracción del RNA

AAAAAA



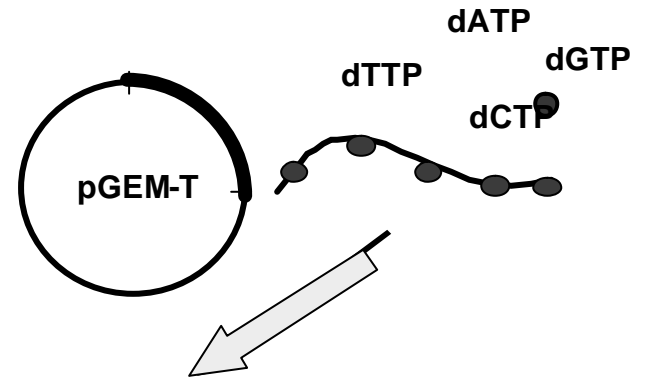
2. Electroforesis del RNA



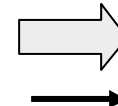
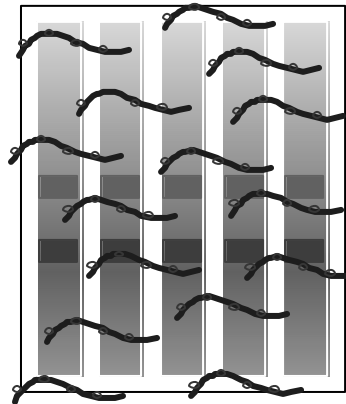
3. Transferencia a membrana



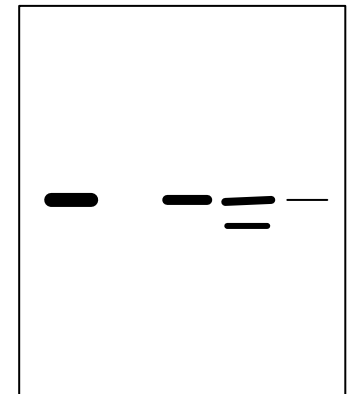
4. Generación de una sonda marcada



5. Hibridación



6. Visualización



Problemas con RNasas

Pancreatic RNase A



RNasas endoribonucleasa:

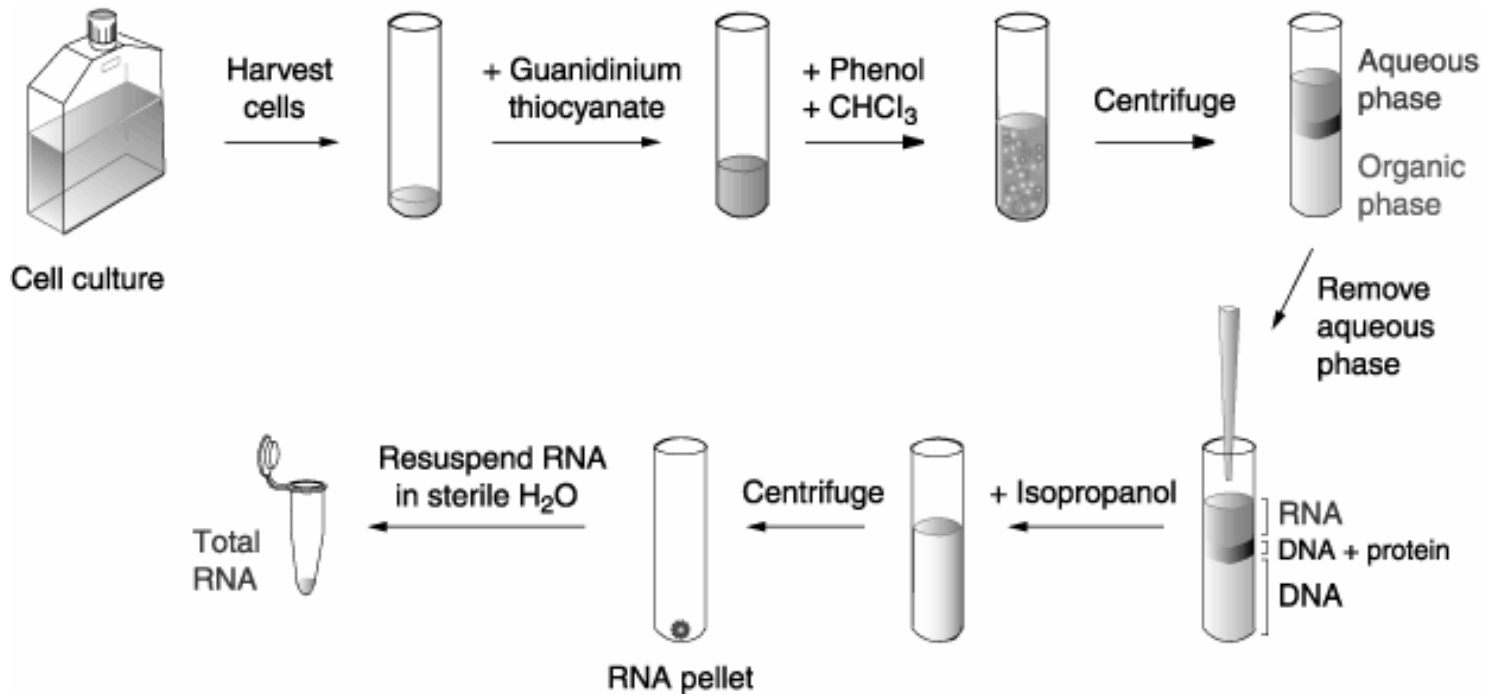
- resistentes a agentes quelantes de metales

- sobreviven ebullición y autoclave

- dependen para su actividad de residuos de histidina presentes en su sitio activo, de manera que puede ser inactivadas con un agente alquilante de histidinas: dietilpirocarbonato (DEPC).

Extracción del RNA y purificación de mRNA

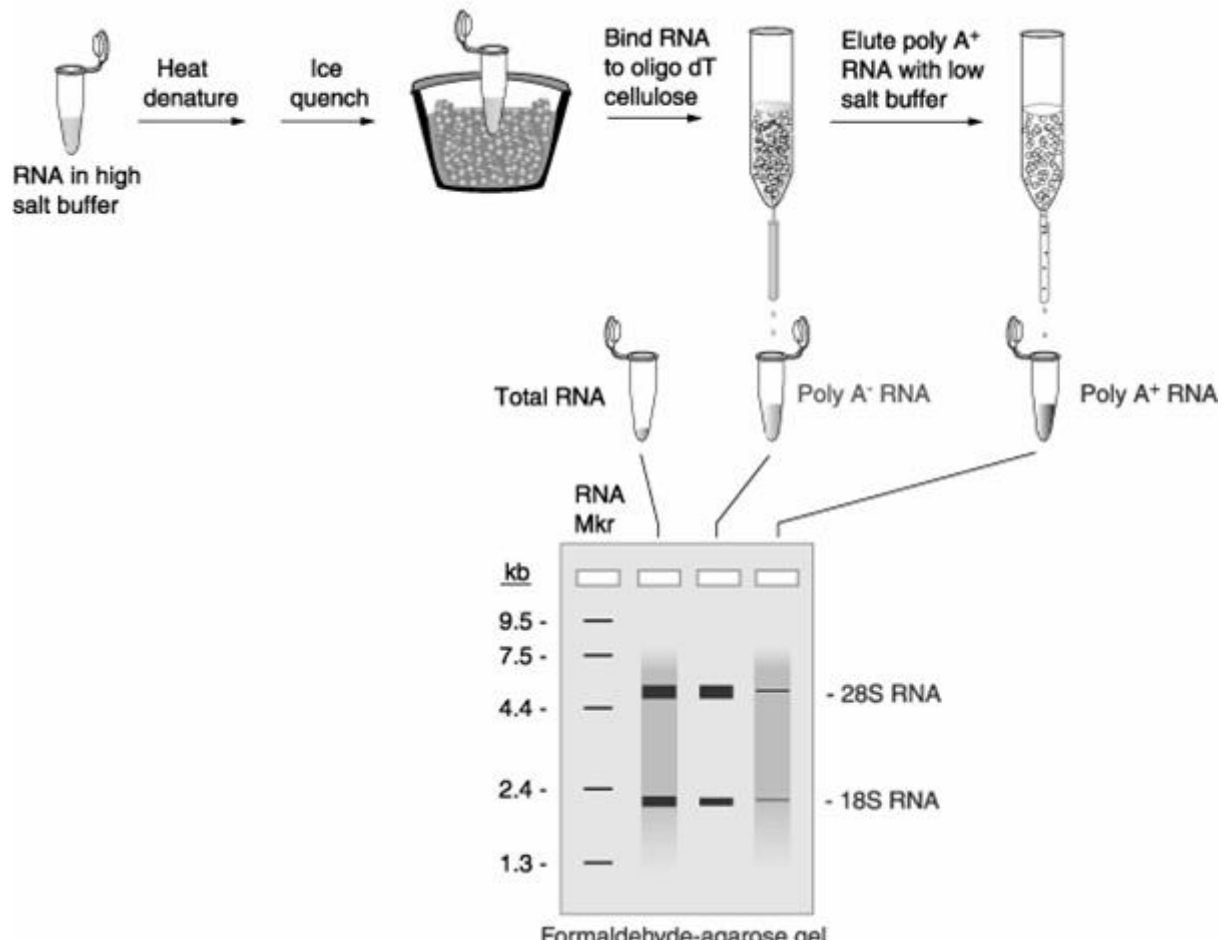
Extracción del RNA



Lisis con tiocianato de guanidina ? inactivación de RNasas.
Partición de DNA, RNA y proteínas en fenol ácido (pH 5-6).
Precipitación con isopropanol + LiCl_2 .

Extracción del RNA y purificación de mRNA

Purificación de mRNA



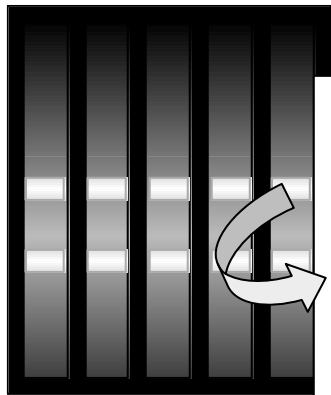
NORTHERN BLOT

1. Extracción del RNA

AAAAAA



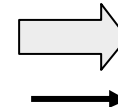
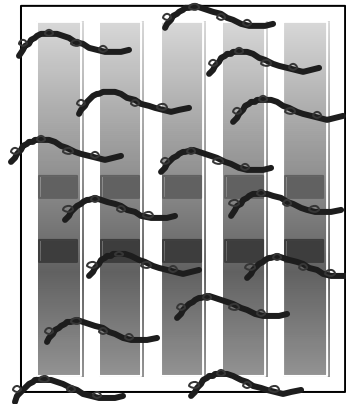
2. Electroforesis del RNA



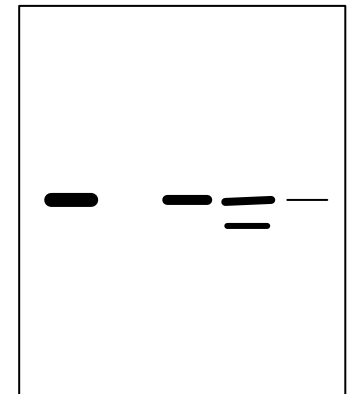
3. Transferencia a membrana



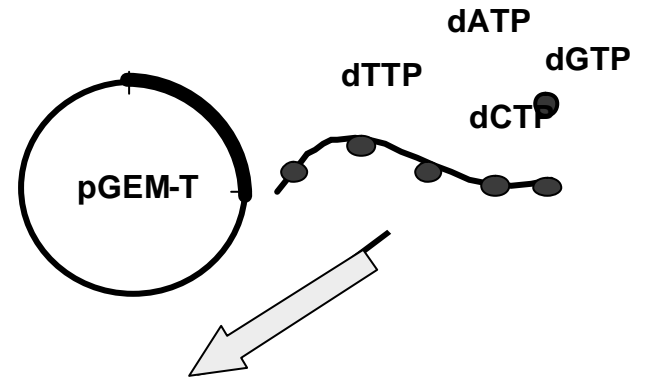
5. Hibridación



6. Visualización



4. Generación de una sonda marcada

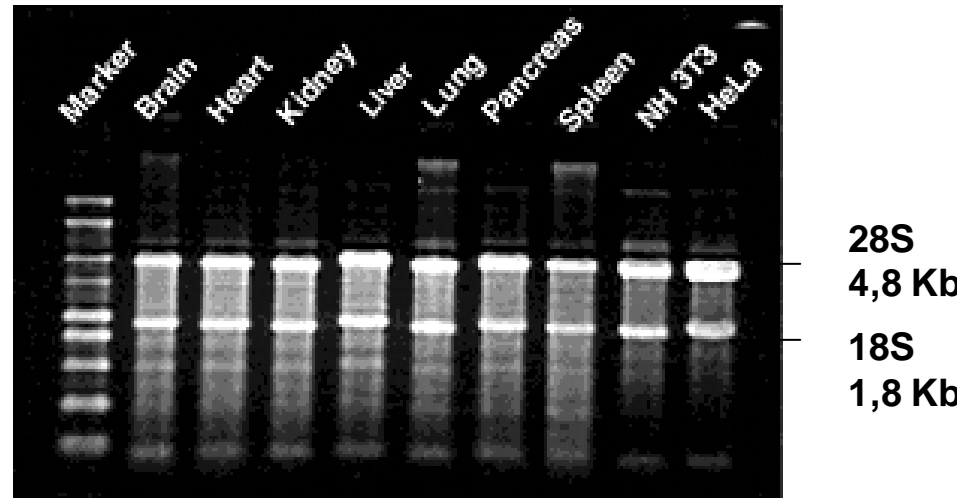
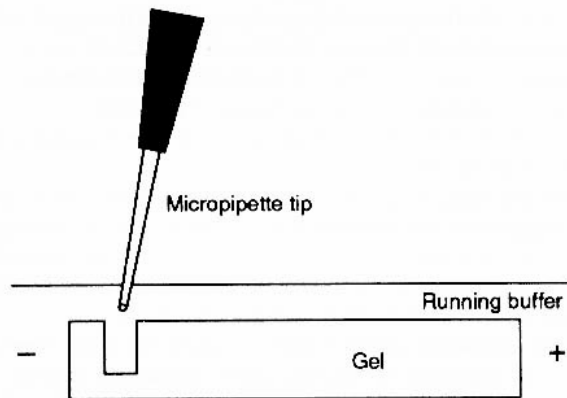


NORTHERN BLOT

2. ELECTROFORESIS DEL RNA

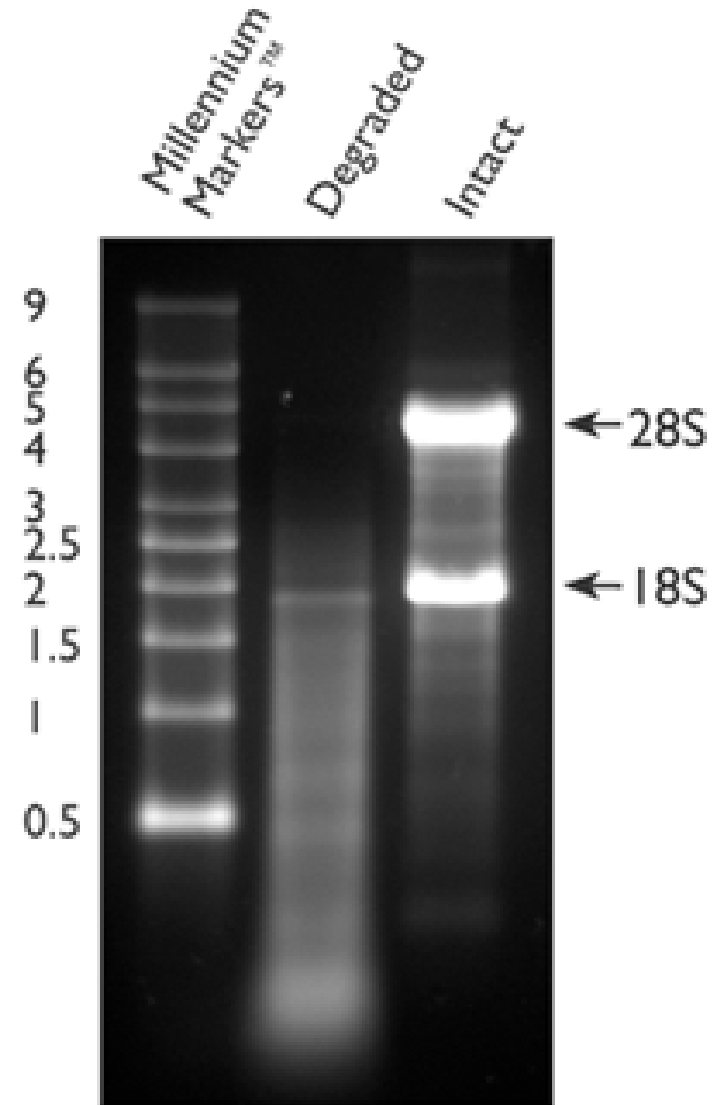
En geles de agarosa

En condiciones desnaturalizantes (formaldehído/formamida)



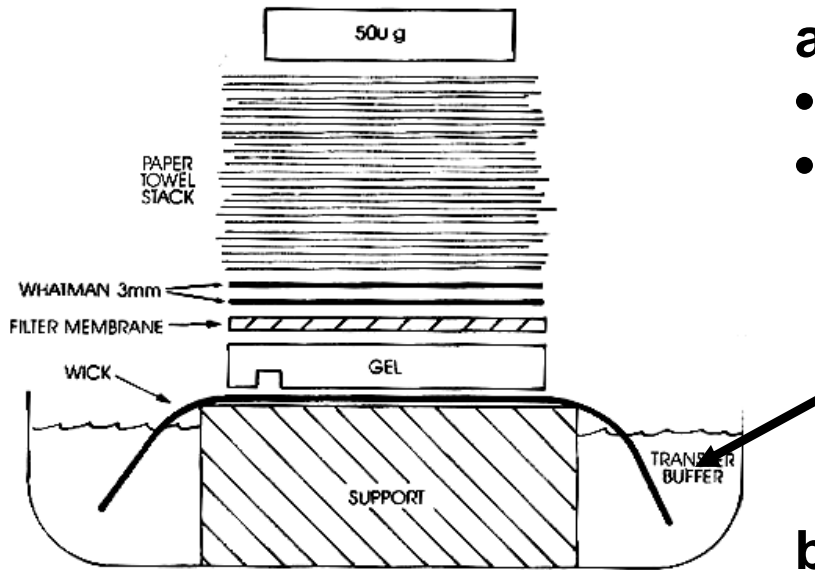
- El gel es teñido con bromuro de etidio y el RNA visualizado en un transiluminador UV

- 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



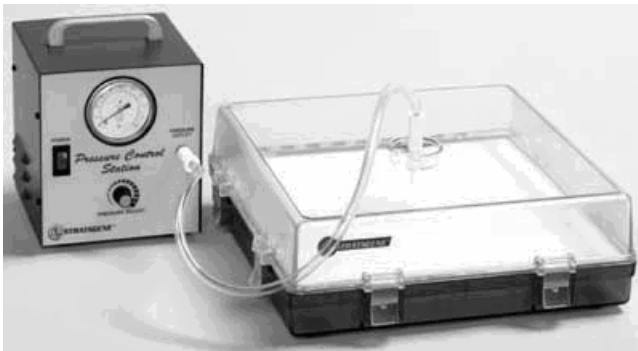
a) Capilaridad

- 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) *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.

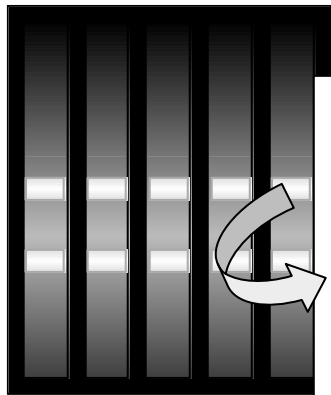
NORTHERN BLOT

1. Extracción del RNA

AAAAAA



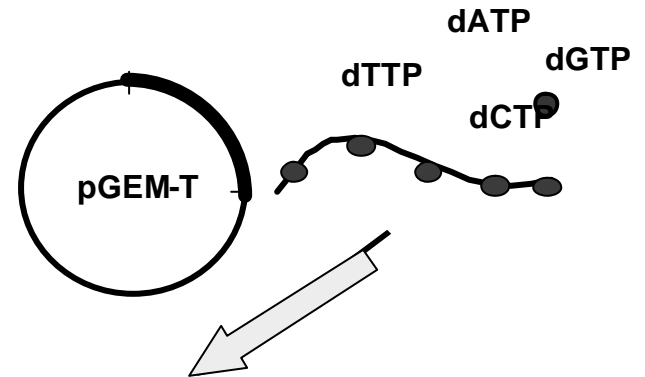
2. Electroforesis del RNA



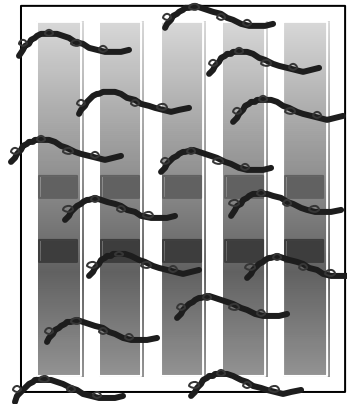
3. Transferencia a membrana



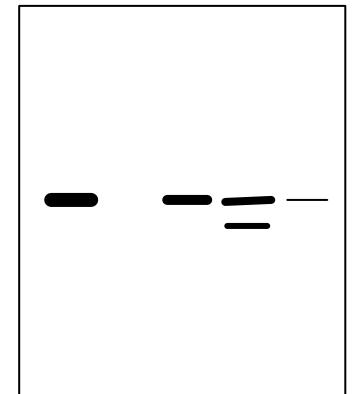
4. Generación de una sonda marcada



5. Hibridación

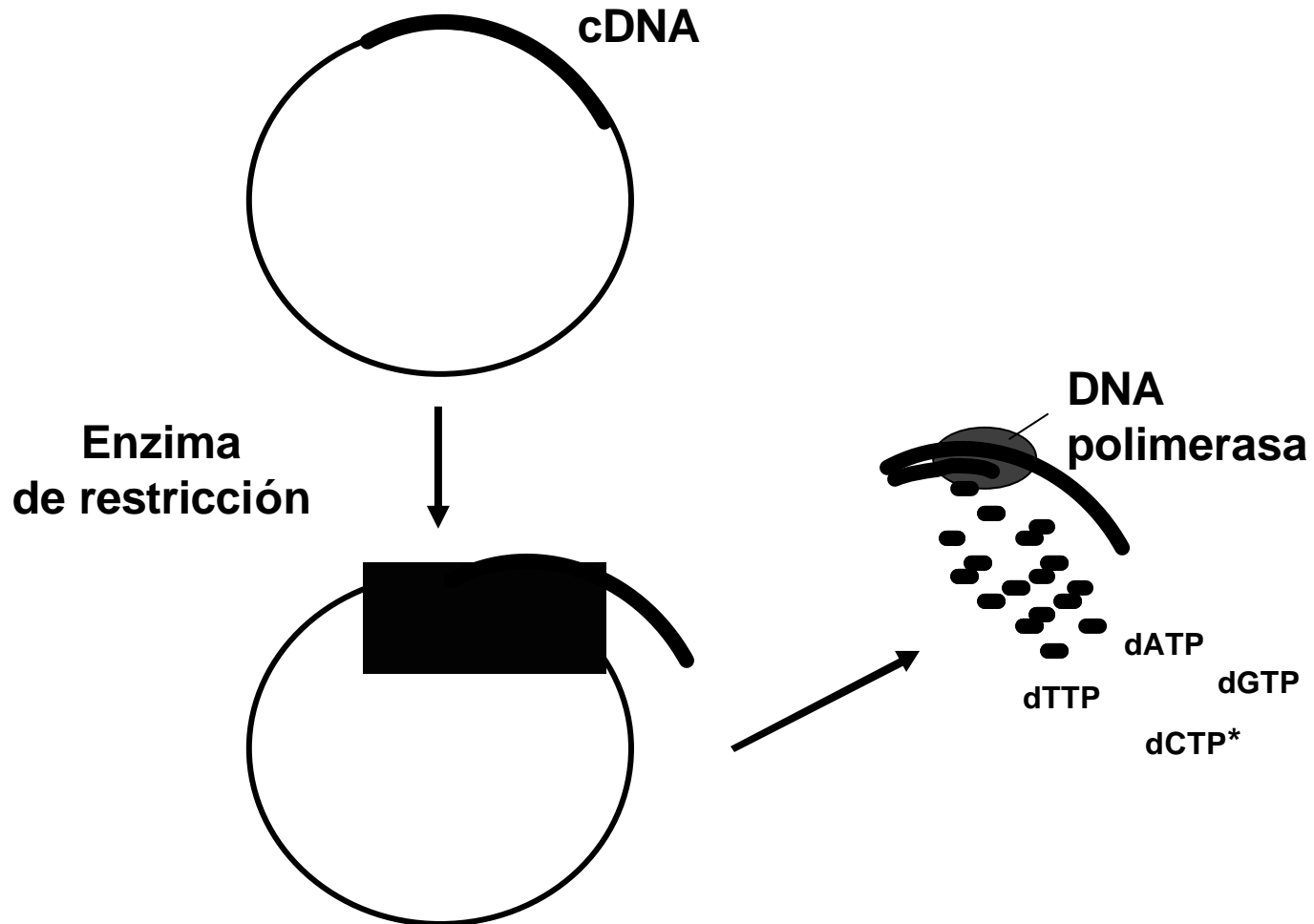


6. Visualización



NORTHERN BLOT

4. GENERACION DE UNA Sonda MARCADA



NORTHERN BLOT

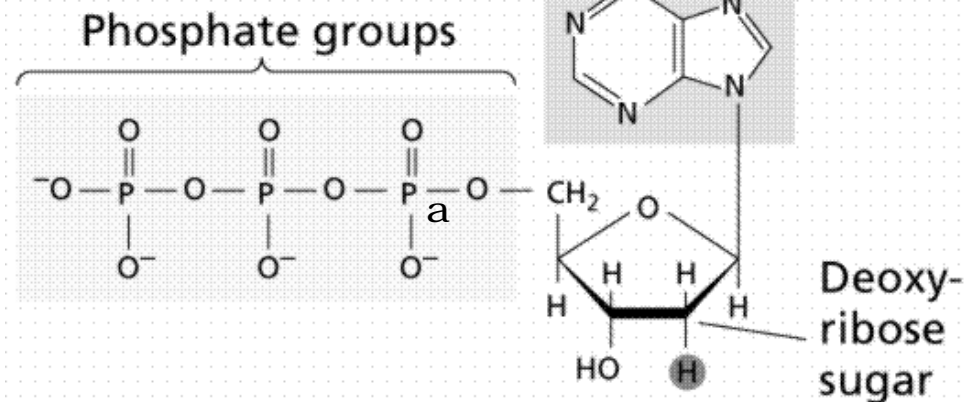
4. GENERACION DE UNA SONDA MARCADA

TIPOS DE MARCA

1. Radioactiva:

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

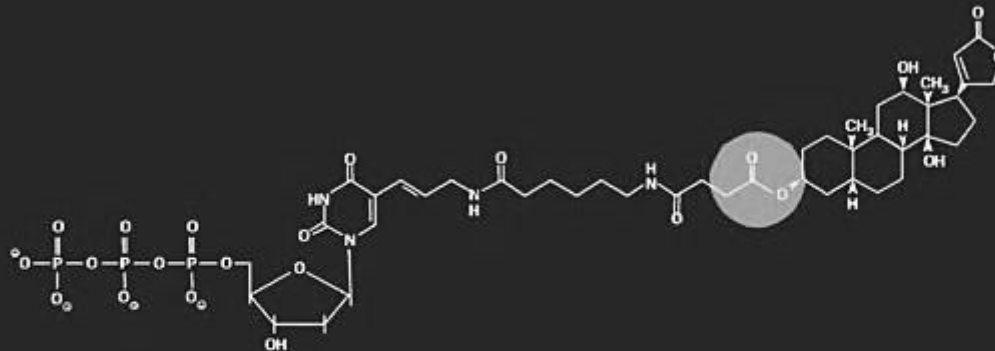
Deoxy-ATP
(deoxyadenosine triphosphate)



NORTHERN BLOT

2. No radioactiva:

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



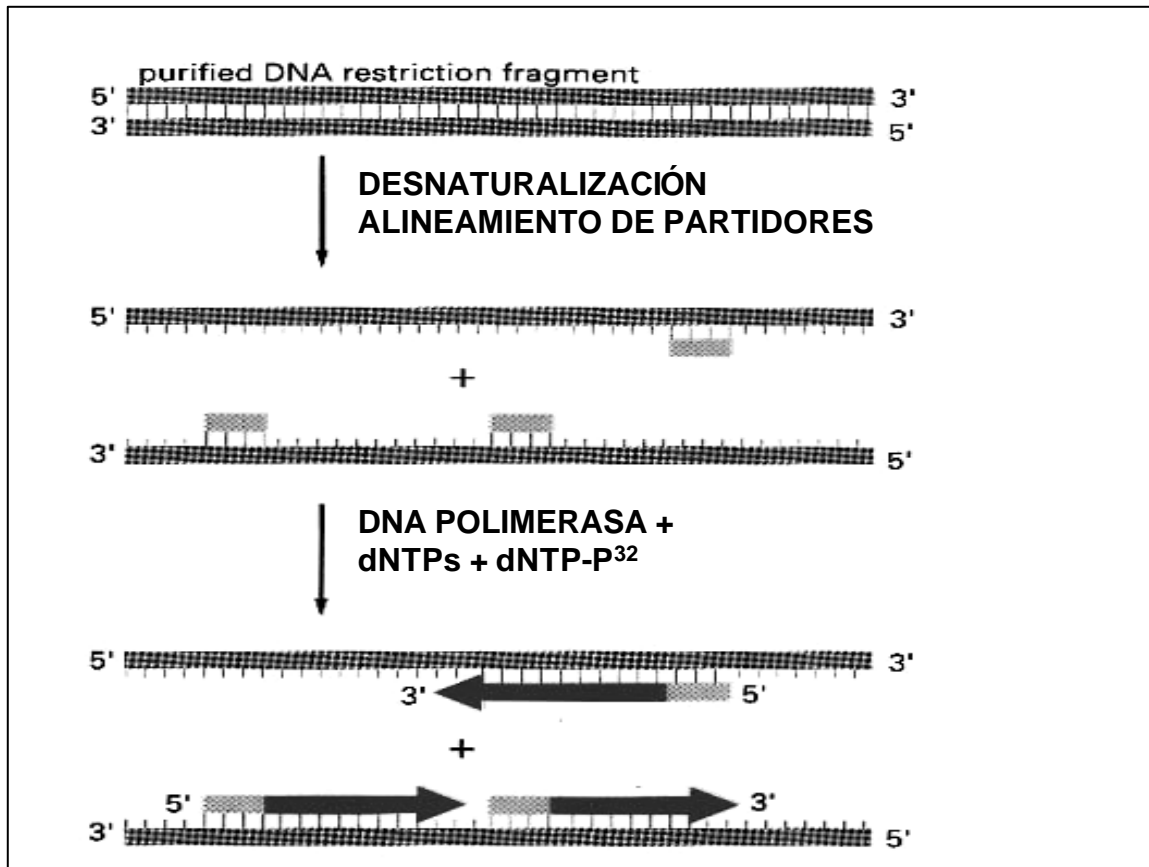
Formula: $C_{45}H_{63}N_4O_{22}P_3Li_4$ Molecular Weight: 1132.7

NORTHERN BLOT

4. GENERACION DE UNA Sonda MARCADA

Métodos de síntesis de una sonda marcada

- *Random priming*



NORTHERN BLOT

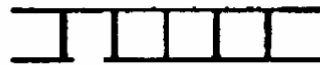
4. GENERACION DE UNA Sonda MARCADA

Métodos de síntesis de una sonda marcada

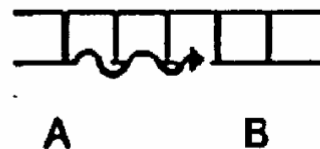
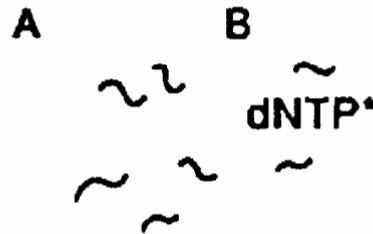
- *Nick-translation*



ds DNA



DNase I rompe el DNA al azar



DNA polimerasa I
agrega nucleótidos



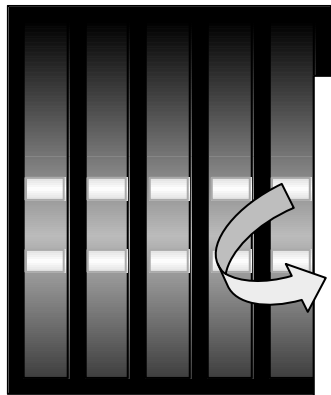
NORTHERN BLOT

1. Extracción del RNA

AAAAAAAA



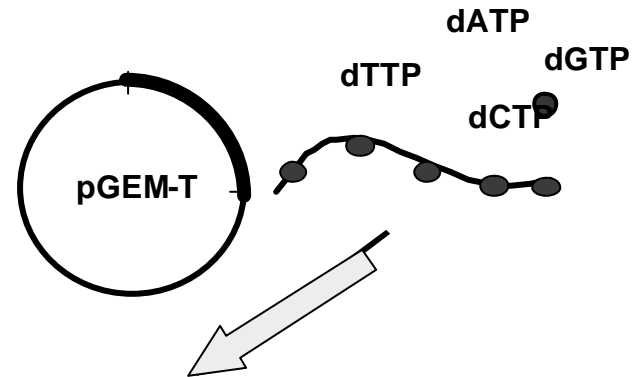
2. Electroforesis del RNA



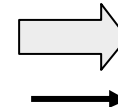
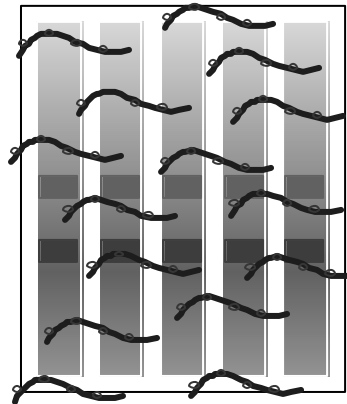
3. Transferencia a membrana



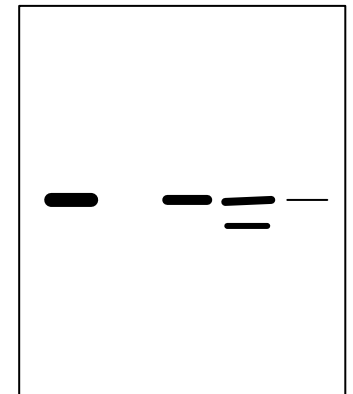
4. Generación de una sonda marcada



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

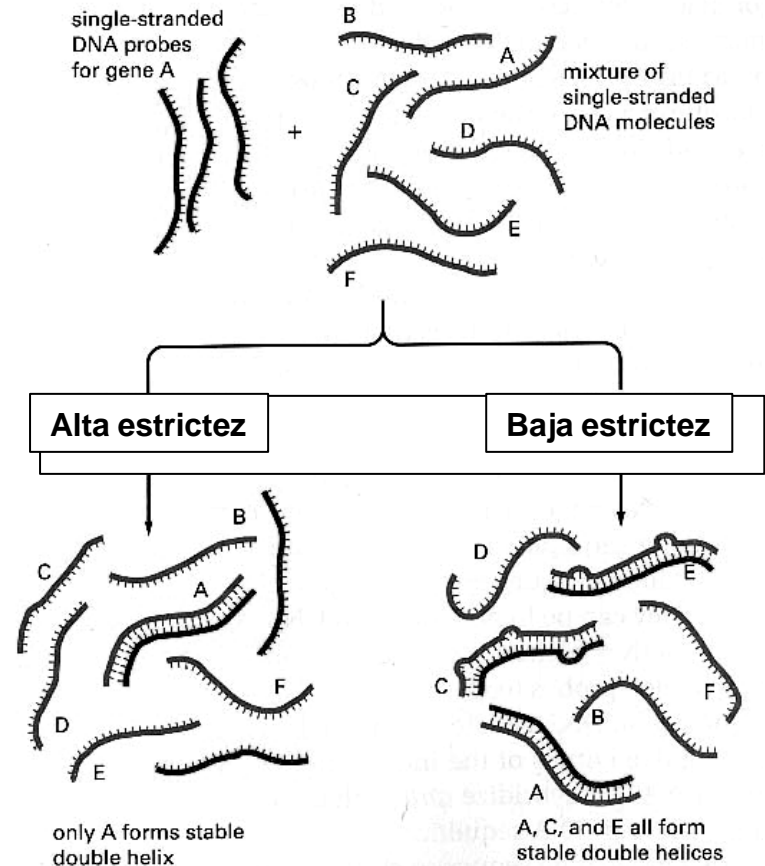
NORTHERN BLOT

C) Lavados

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^0
- Incluir formamida



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

Cinética de re-asociación

- Cuando el DNA de hebra doble es desnaturado por calor la velocidad a la cual las hebras vuelven a formar la hebra doble depende de la concentración inicial de DNA.
- Si la concentración de DNA complementario es elevada, el tiempo necesario para la formación del híbrido es menor.
- La cinética de reasociación es la velocidad a la cual hebras simples complementarias forman híbridos de doble hebra.
- Dos parámetros gobiernan esta cinética: Concentración (C_0) tiempo (t) en segundos (Cot). Esto implica que transcritos o genes presentes en una copia hibridizan mas lentamente que aquellos presentes en múltiples copias y por lo tanto generan señales más débiles en un ensayo de hibridación (Northern o Southern blot).

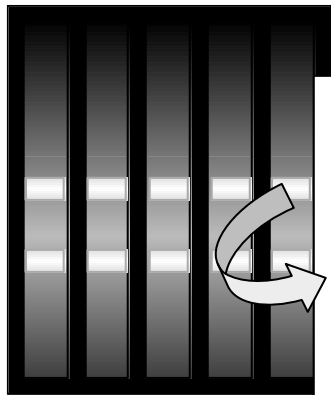
NORTHERN BLOT

1. Extracción del RNA

AAAAAA



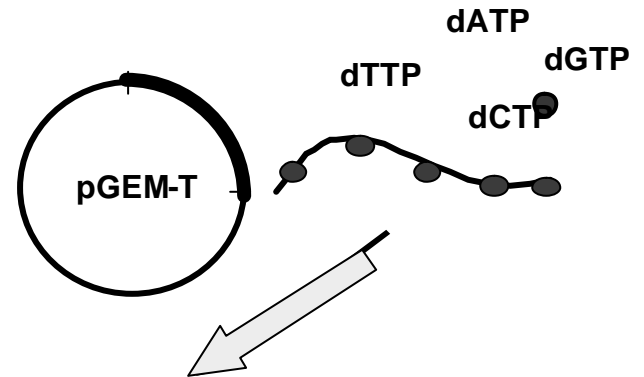
2. Electroforesis del RNA



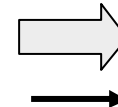
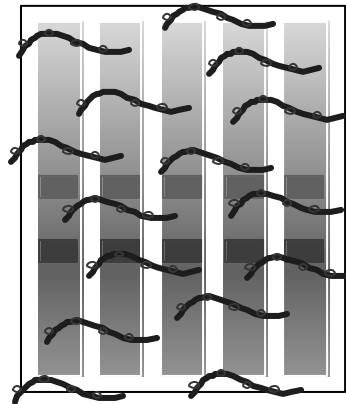
3. Transferencia a membrana



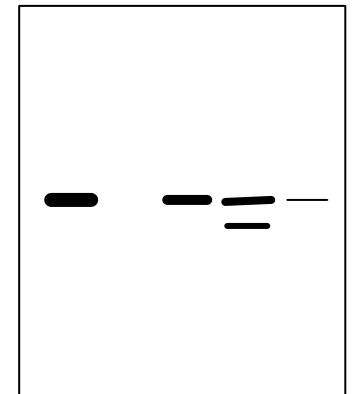
4. Generación de una sonda marcada



5. Hibridación



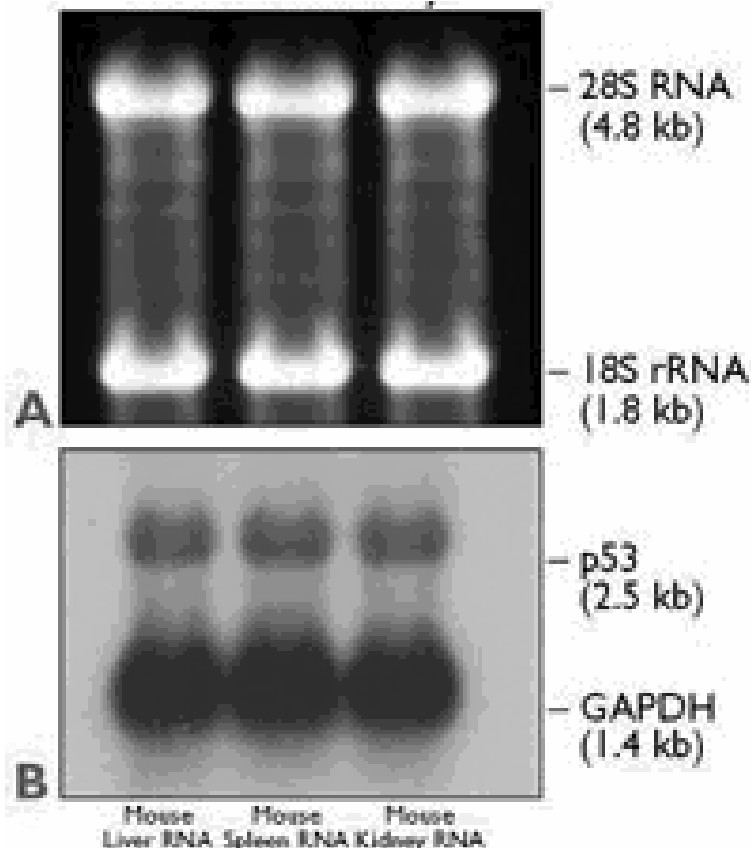
6. Visualización



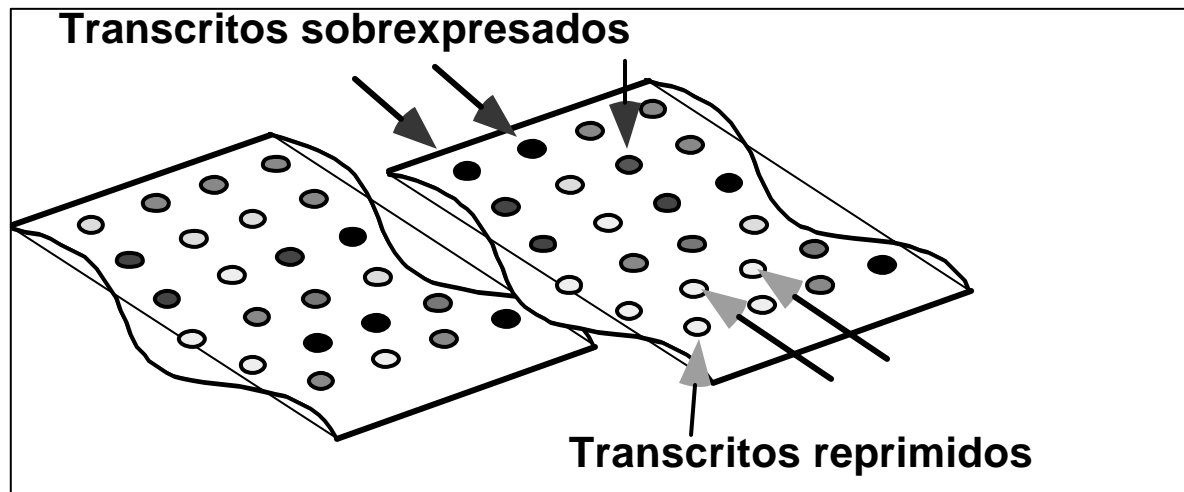
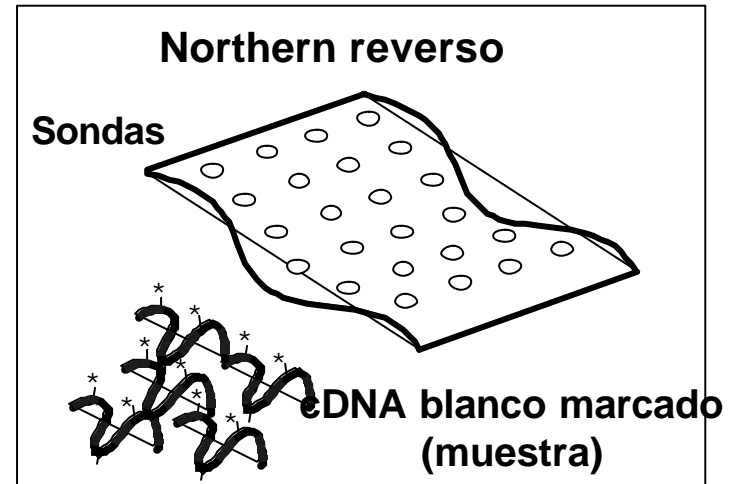
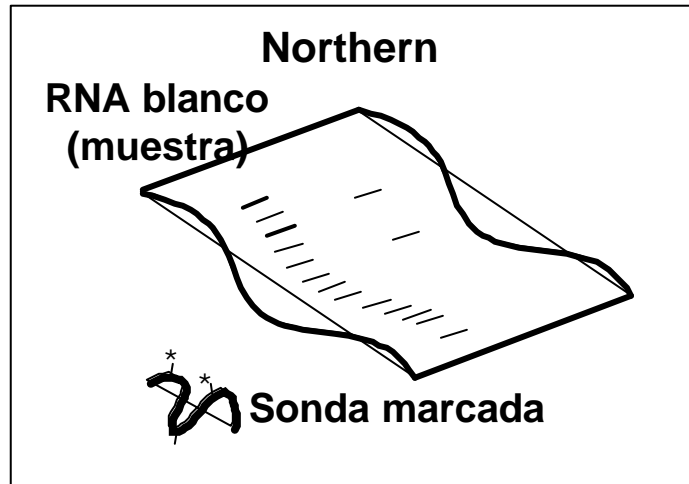
NORTHERN BLOT

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.