

ENSAYOS DE HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

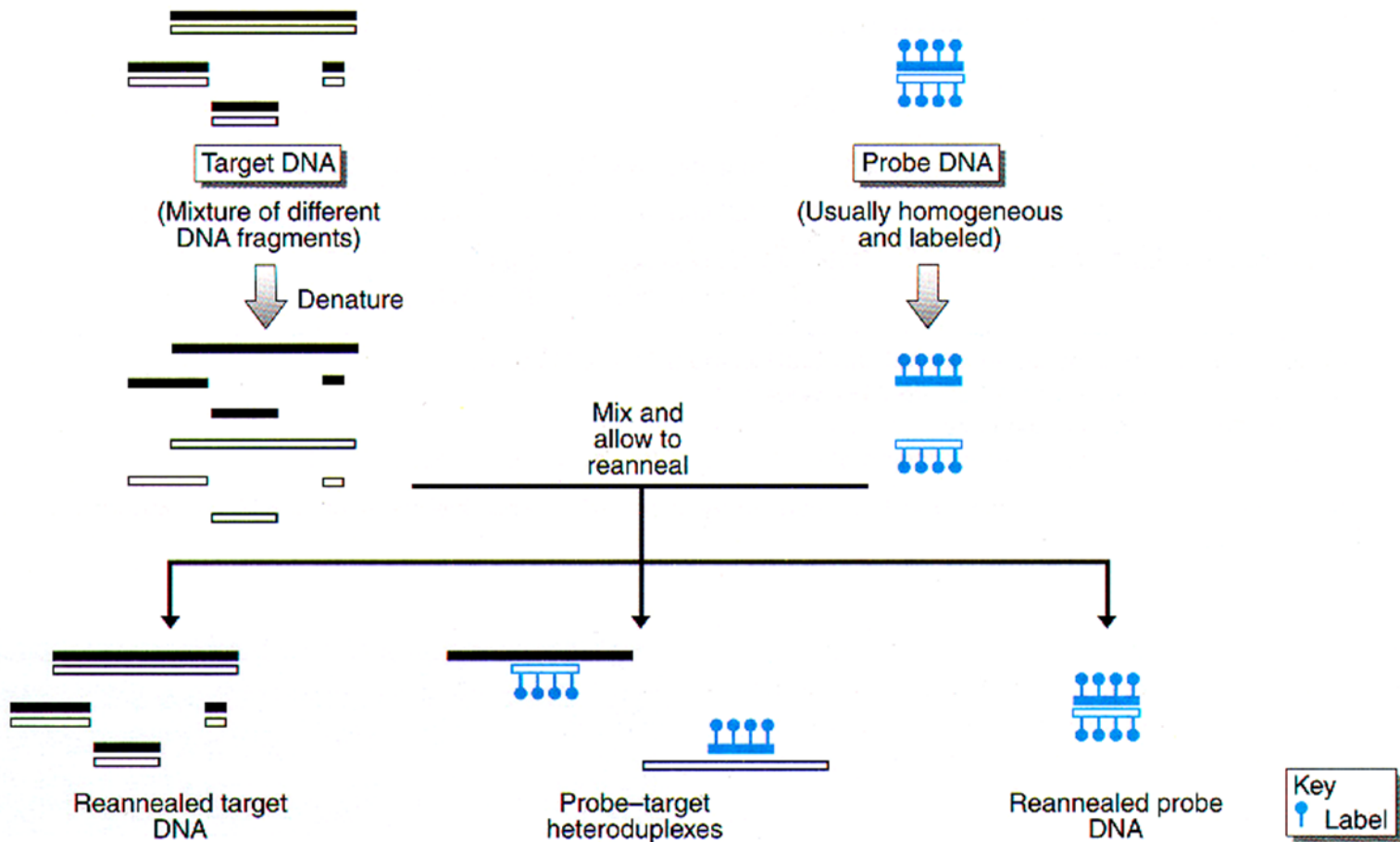


Figure 5.8: A nucleic acid hybridization assay requires the formation of heteroduplexes between labeled single-stranded nucleic acid probes and complementary sequences within a target nucleic acid.

DETECCION DE ACIDOS NUCLEICOS

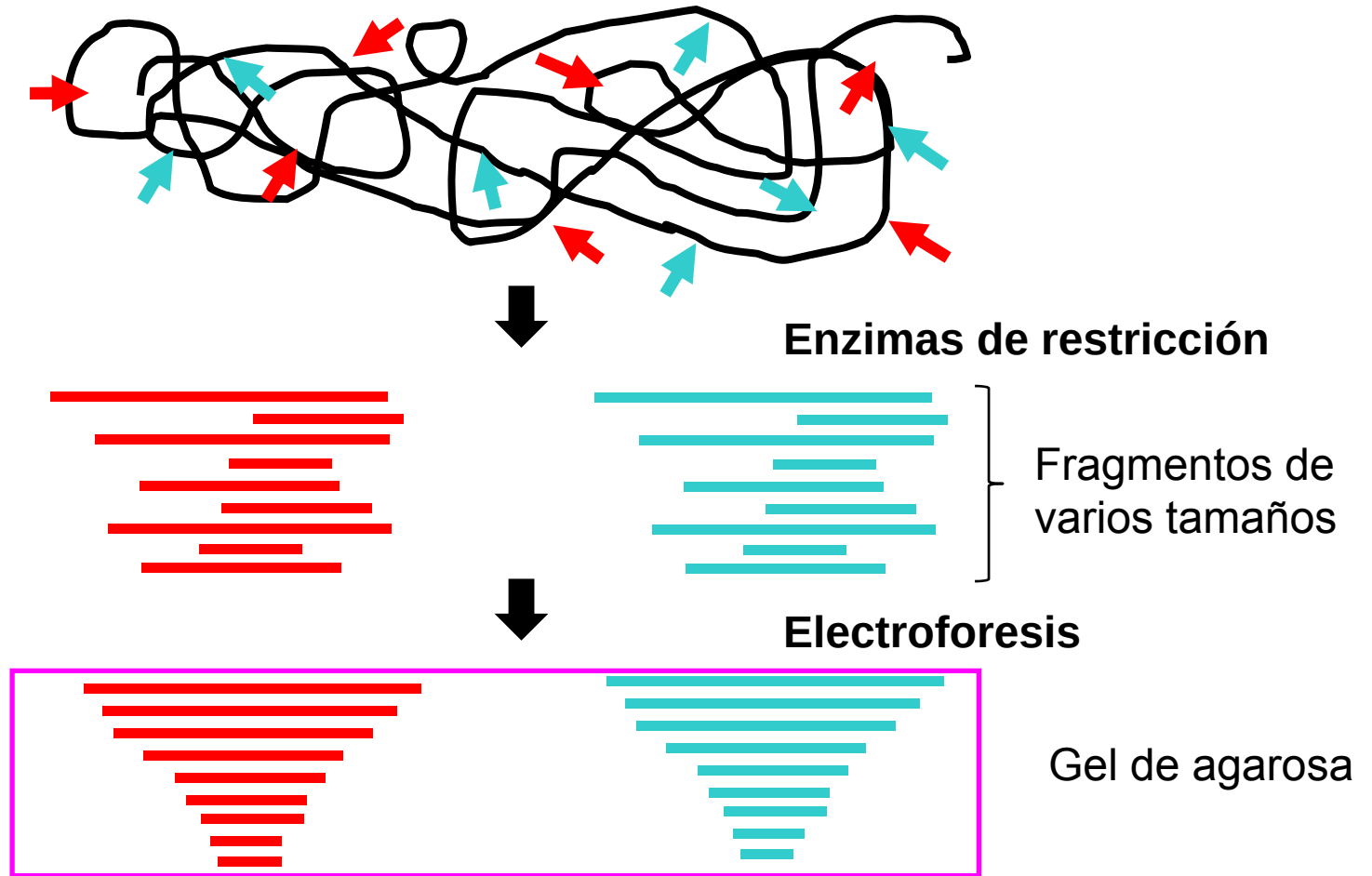
❖ SOUTHERN BLOT

- PERMITE DETECTAR LA PRESENCIA Y EL NUMERO DE COPIAS DE UN GEN EN UN GENOMA.
- CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA DEL DNA

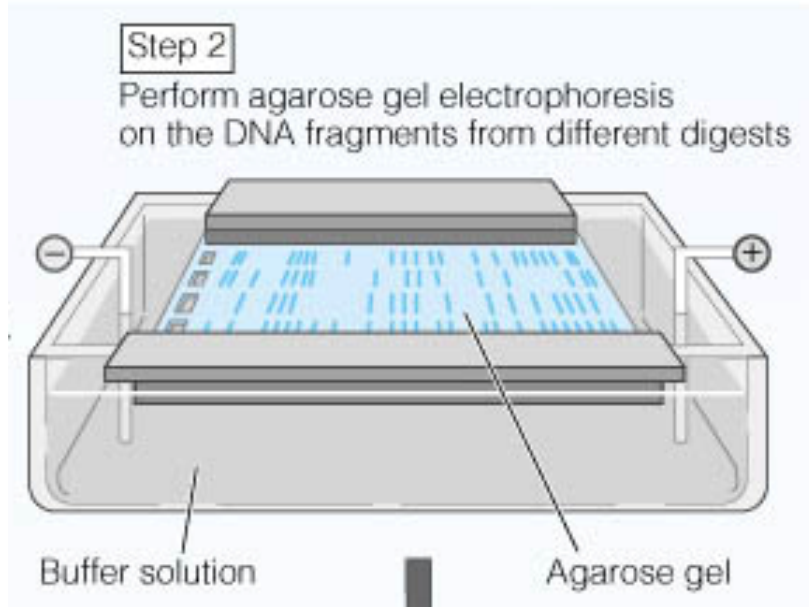
SOUTHERN BLOT

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

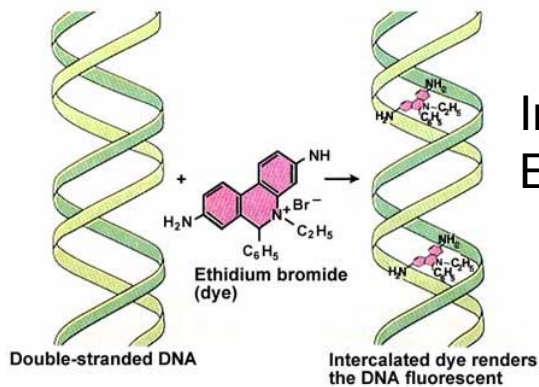
SOUTHERN BLOT



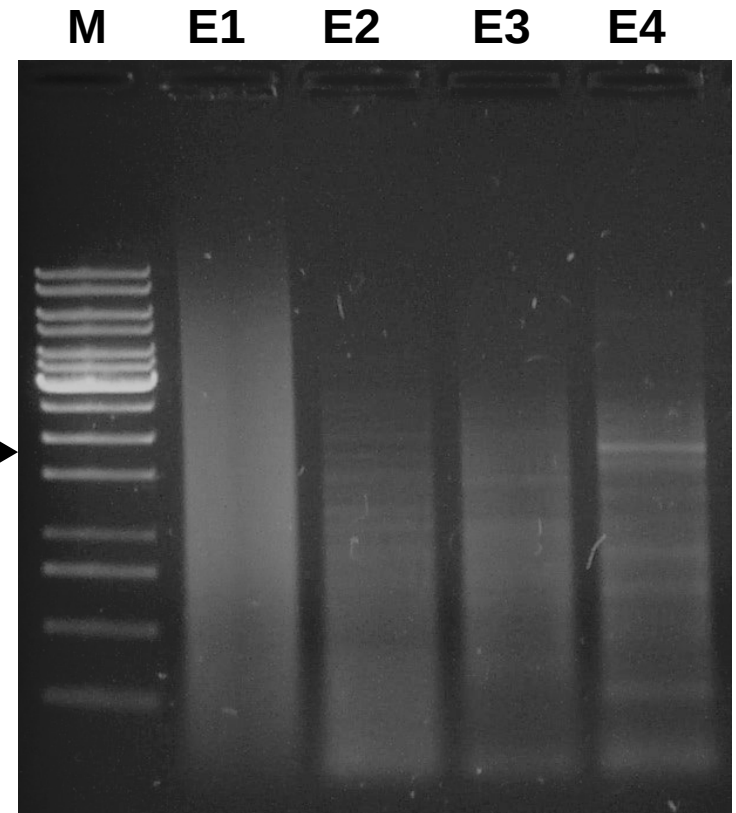
SOUTHERN BLOT



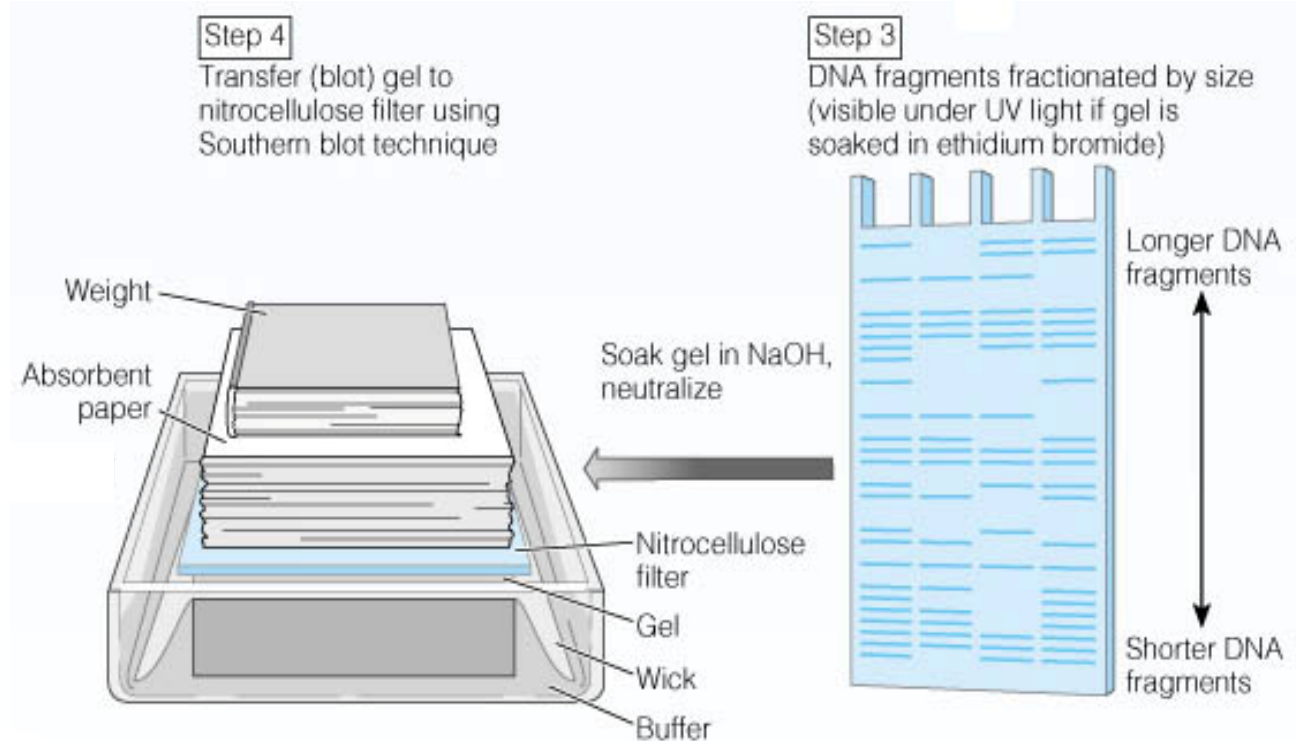
Tinción con Br.Et.



Irradiación UV
Emisión fluorescencia



SOUTHERN BLOT



1. Los fragmentos de DNA en el gel son desnaturados en un buffer alcalino.
 - 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).

SOUTHERN BLOT

Step 5

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

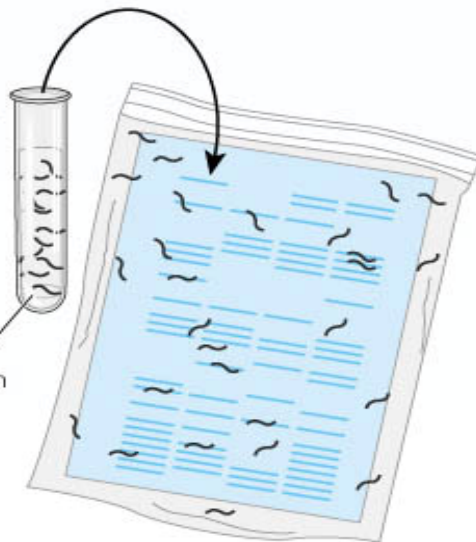


Luz UV

Step 6

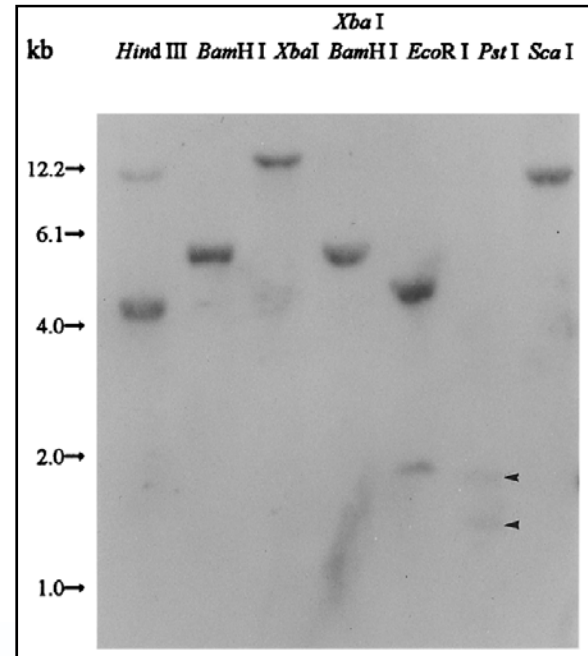
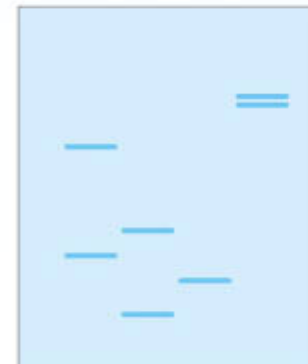
Hybridize filter with radioactively labeled probe.

Radioactive probe solution



Step 7

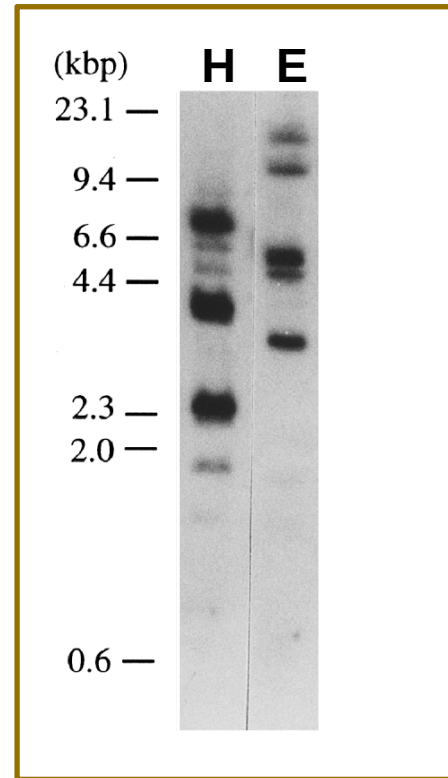
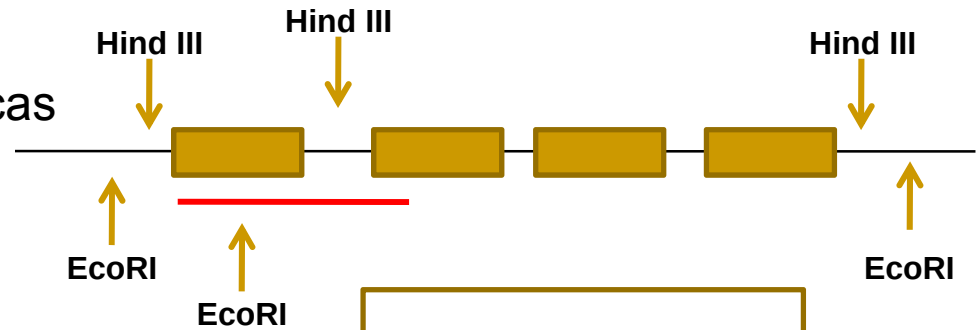
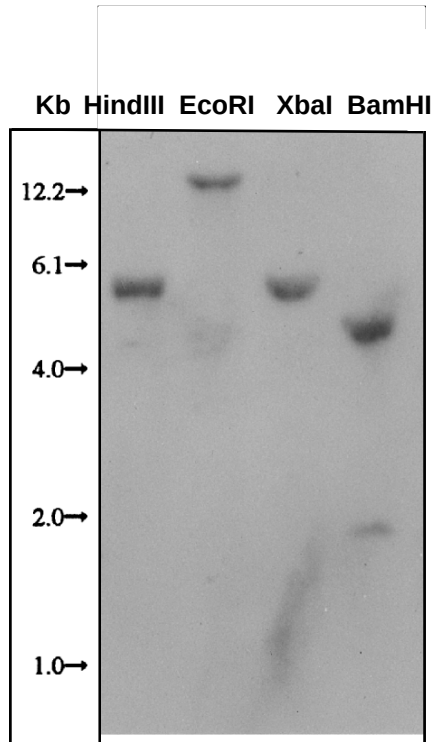
Expose filter to X-ray film. Resulting autoradiograph shows hybridized DNA fragments



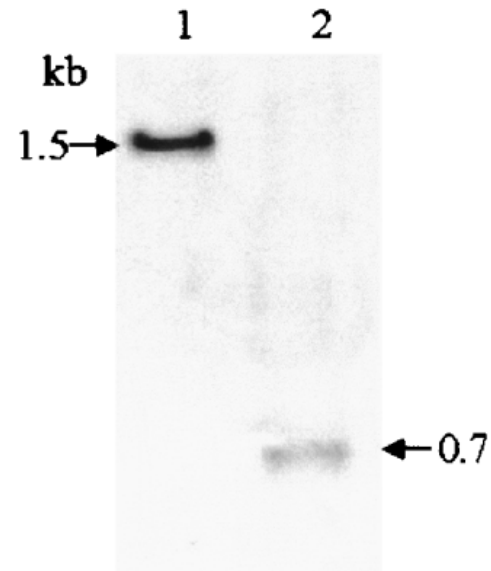
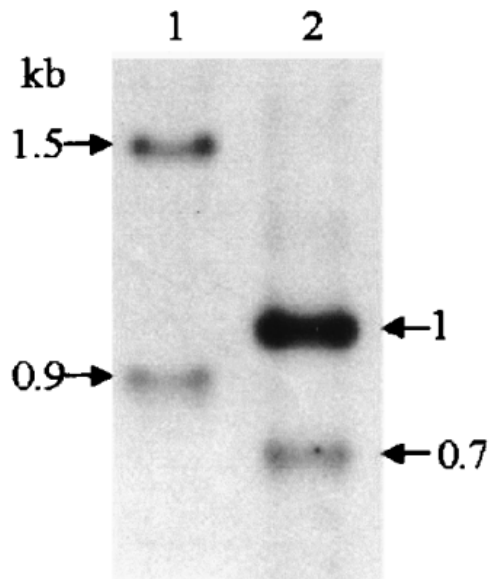
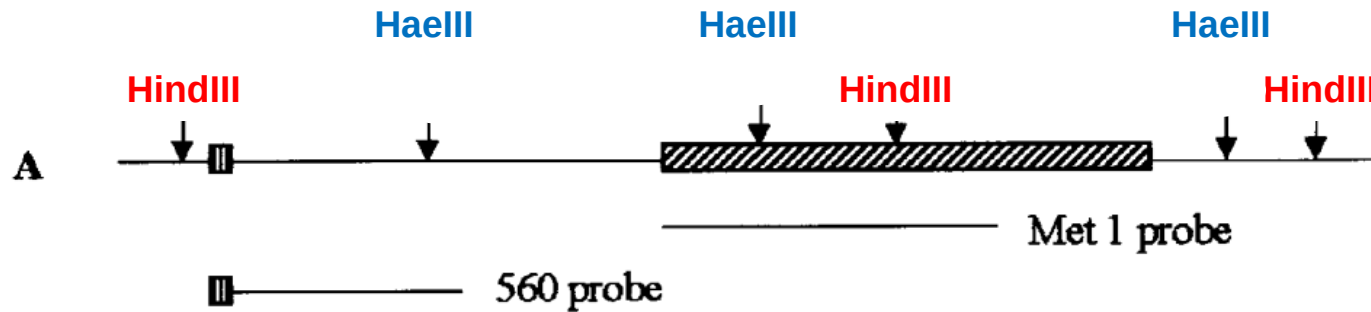
SOUTHERN BLOT

Aplicaciones.

- ❖ Identificación de familias multigénicas



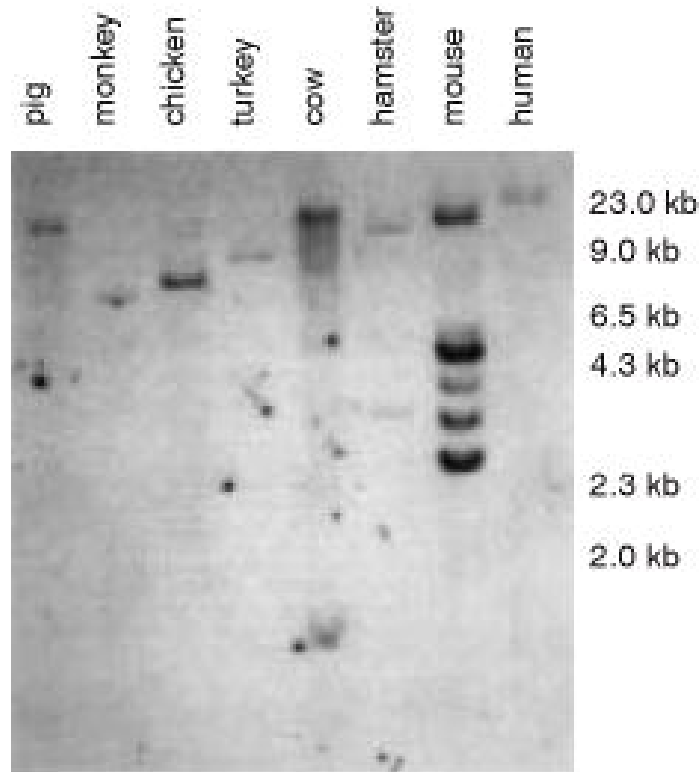
SOUTHERN BLOT



SOUTHERN BLOT

Aplicaciones.

- ❖ Identificación de secuencias relacionadas en otras especies.



Zoo blot hybridization.

Sonda → cDNA del gen *NF2* de ratón (neurofibromatosis type 2) hibridizado en un Southern blot contra muestras de DNA genómico de diferentes especies.

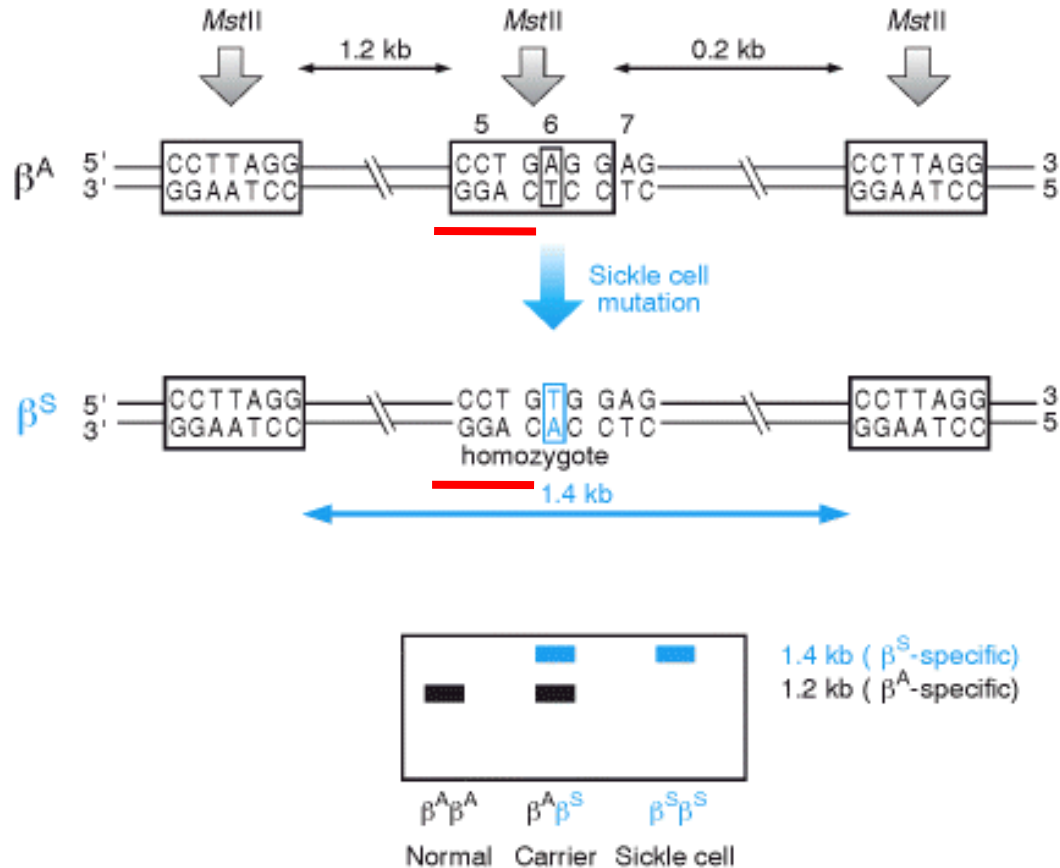
SOUTHERN BLOT

Aplicaciones.

- ❖ Ensayos de RFLPs → Restriction fragment length polymorphisms.
- ❖ Cuando una mutación cambia el tamaño de secuencias específicas en el genoma ella puede ser detectada a través de cambios en el tamaño de un fragmento previa digestión con enzimas de restricción y ensayos de Southern blot.
- ❖ RFLPs – permiten el diagnóstico de enfermedades genéticas.

SOUTHERN BLOT

❖ Detección de mutaciones puntuales mediante RFLPs



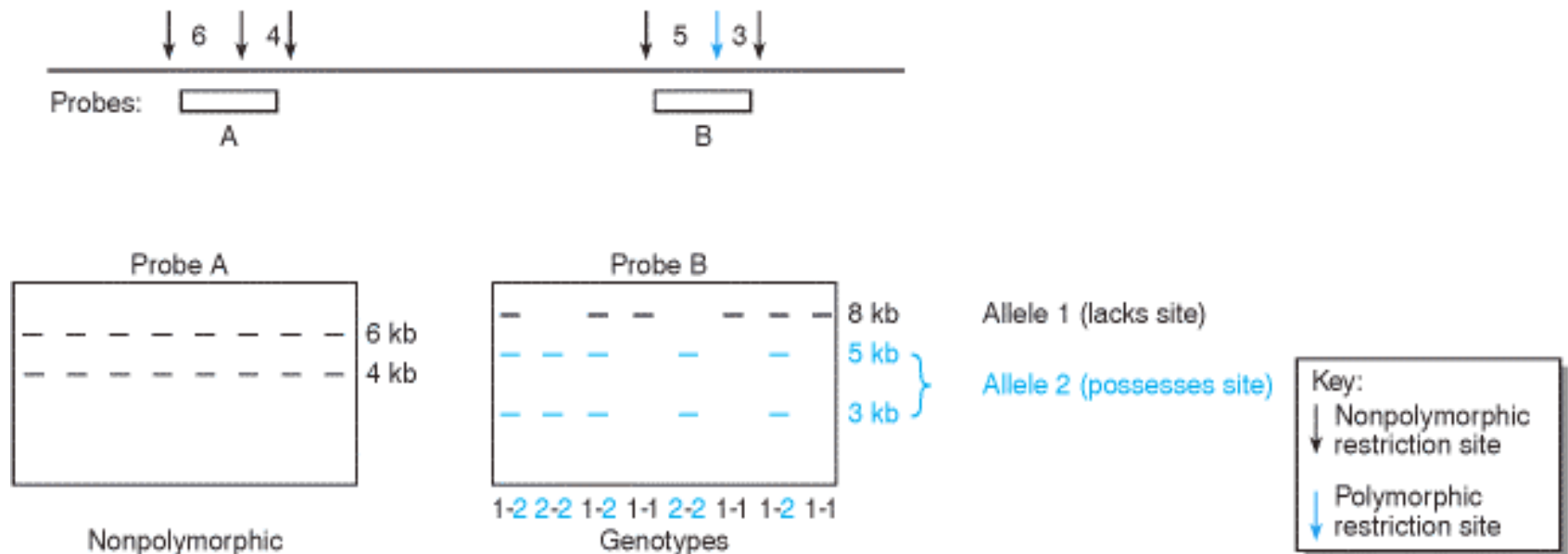
Anemia de células falciformes.

- Sustitución de 1 nucleótido (A → T) en el gen de β -globina causa una mutación (Glu → Val).
- La mutación destruye un sitio de restricción *Mst*II.
- *Mst*II reconoce la secuencia CCTNAGG.

SOUTHERN BLOT

Aplicaciones.

- ❖ Detección de *restriction site polymorphism* (RSP).



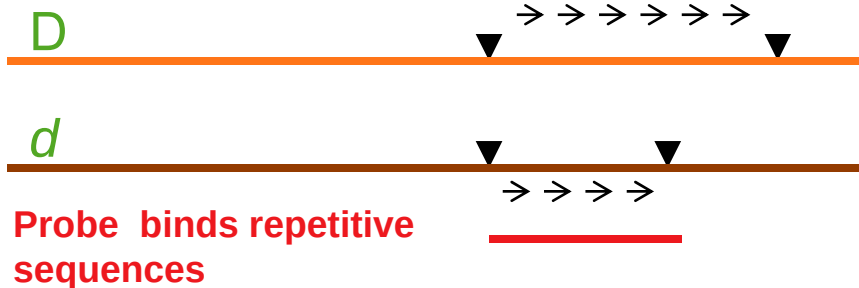
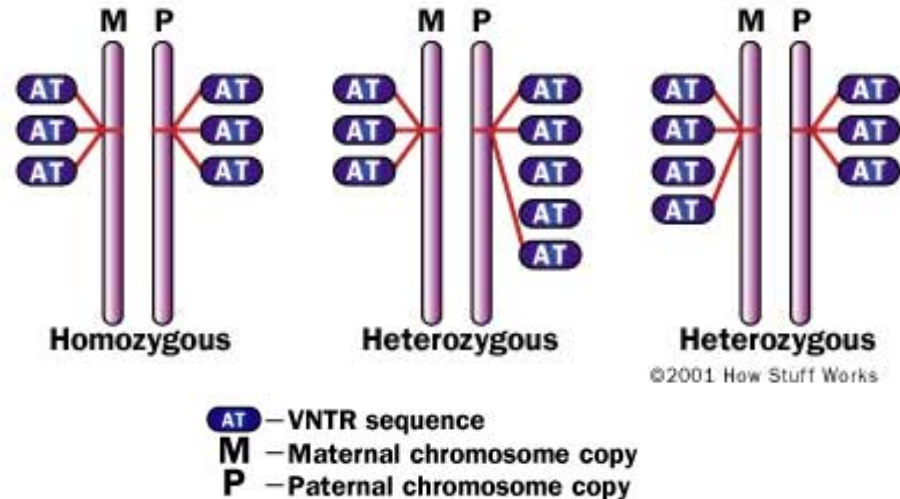
Muchas mutaciones puntuales pueden ser caracterizadas por alelos que poseen o carecen de un sitio de restricción para una ER específica y por lo tanto exhiben *restriction site polymorphism* (RSP).

SOUTHERN BLOT

Aplicaciones.

❖ *Genetic fingerprinting.*

Algunas regiones no-codificantes del gDNA llamadas VNTRs (Variable Number Tandem Repeats) son muy variables en largo y pueden ser utilizadas en ensayos de *fingerprint*.



Restriction target sites are outside the VNTR sequence

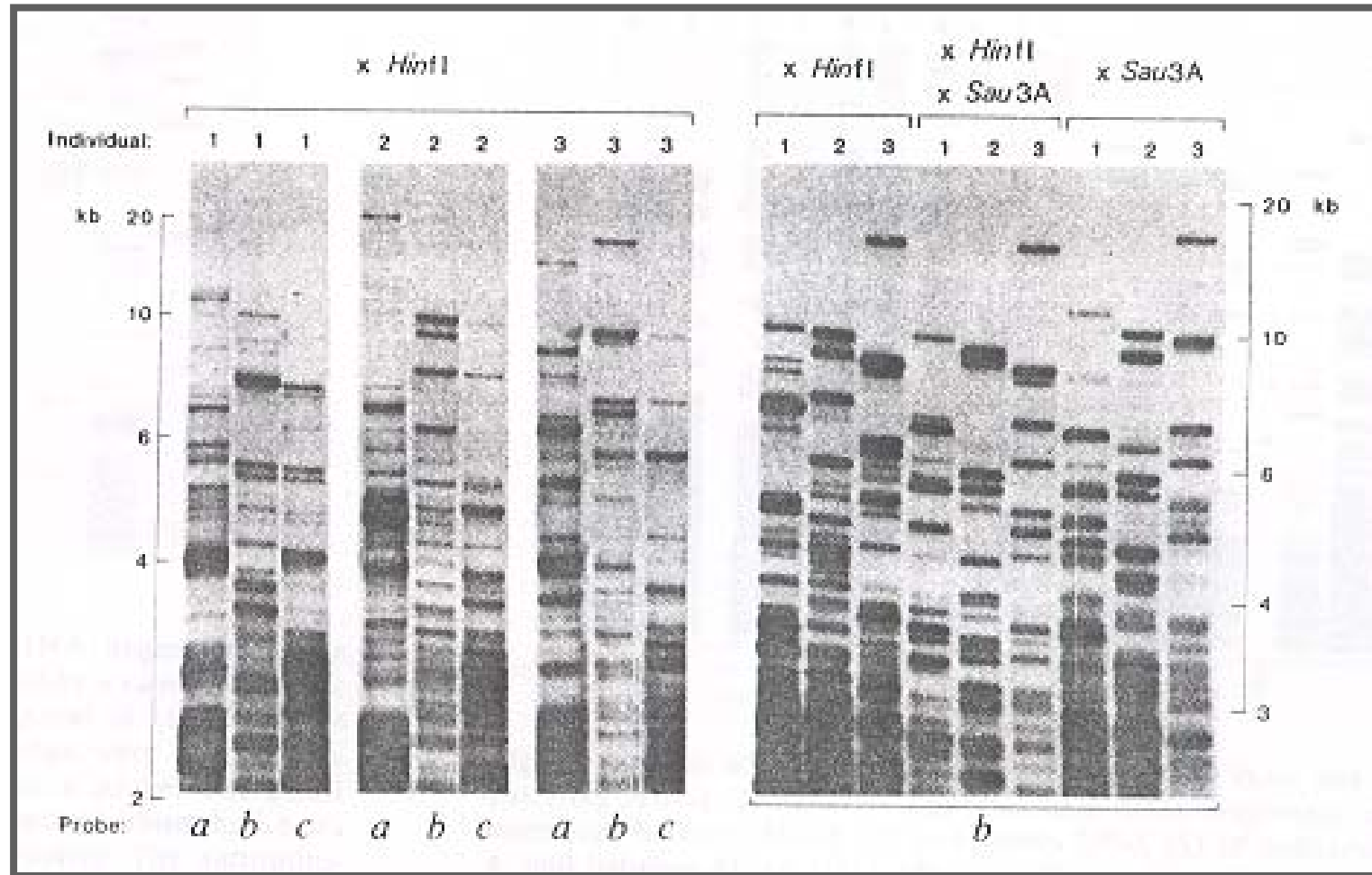
SOUTHERN BLOT

Ejemplo.

- La víctima tenía tejido humano bajo sus uñas.
- Tres sospechosos tenían rasguños en sus caras.



SOUTHERN BLOT

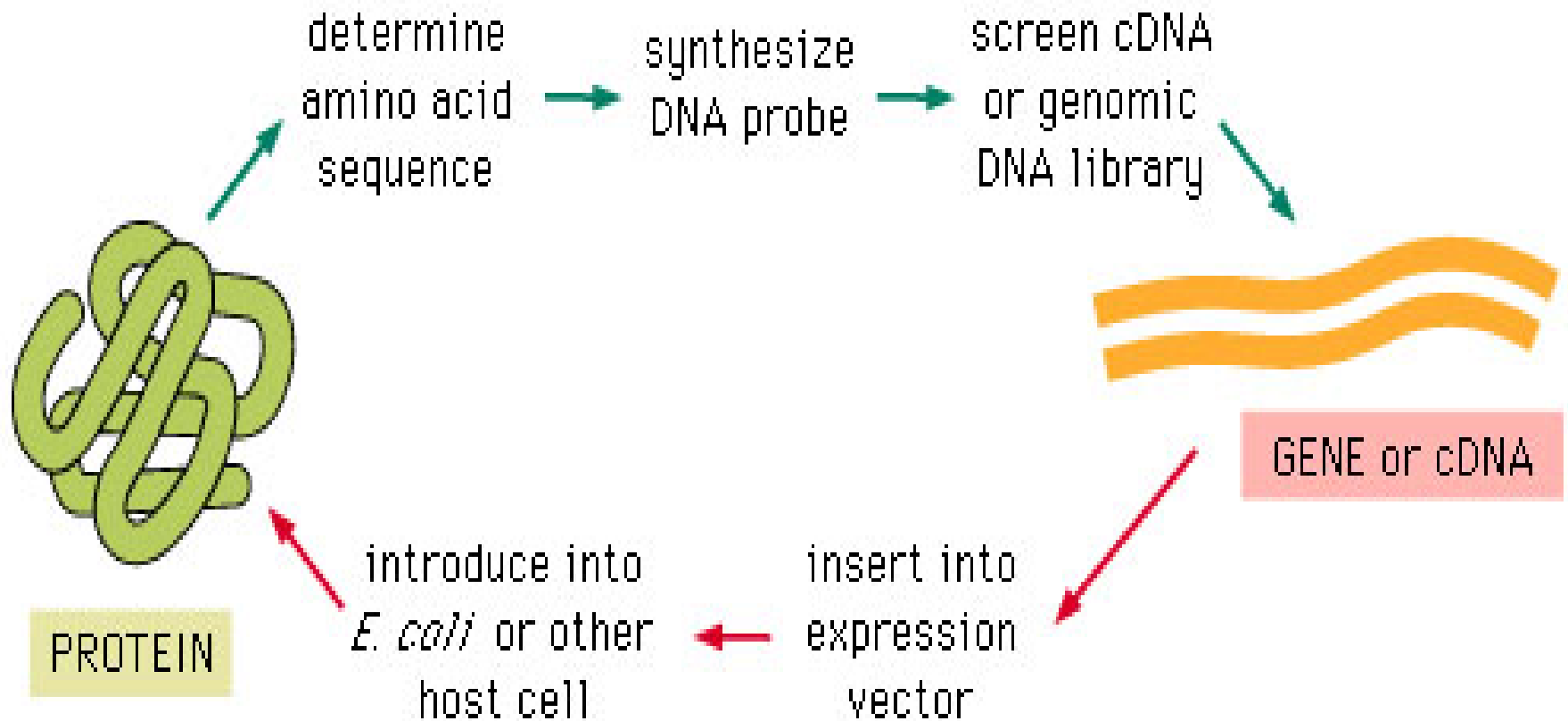


DETECCION DE ACIDOS NUCLEICOS

❖ ANALISIS DE GENOTECAS

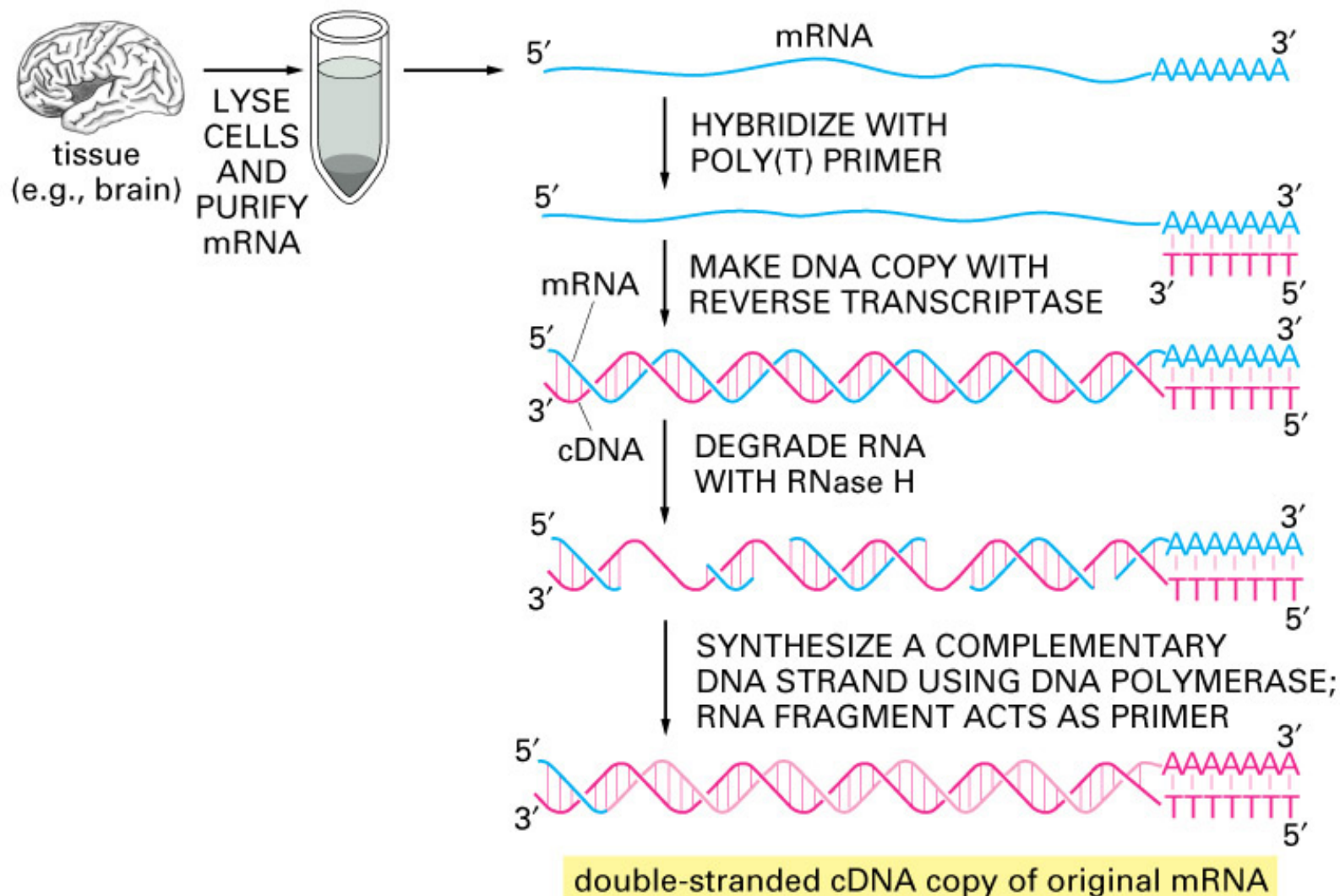
PERMITE IDENTIFICAR Y AISLAR UN GEN

¿Cómo aislar un gen?

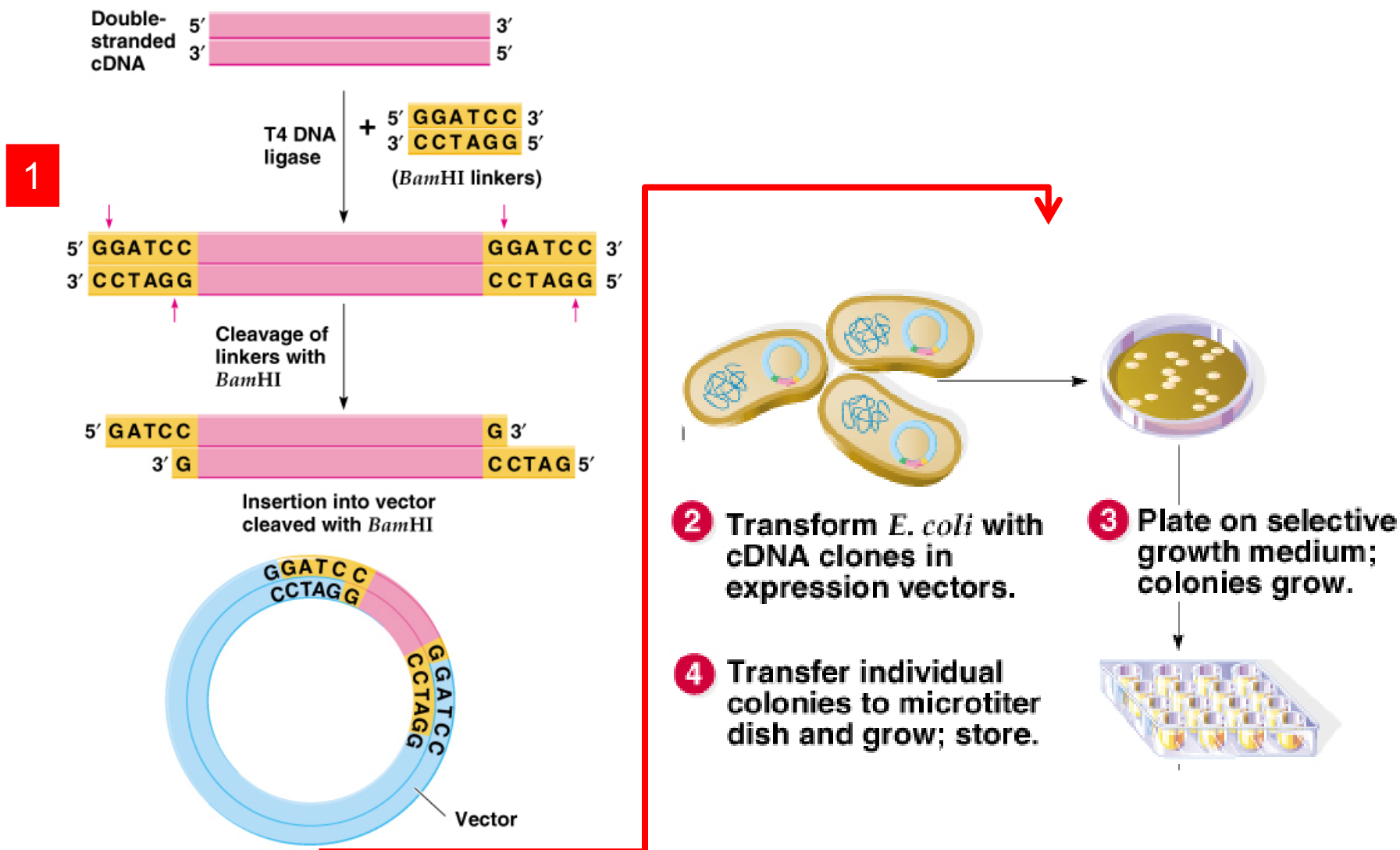


©1998 GARLAND PUBLISHING

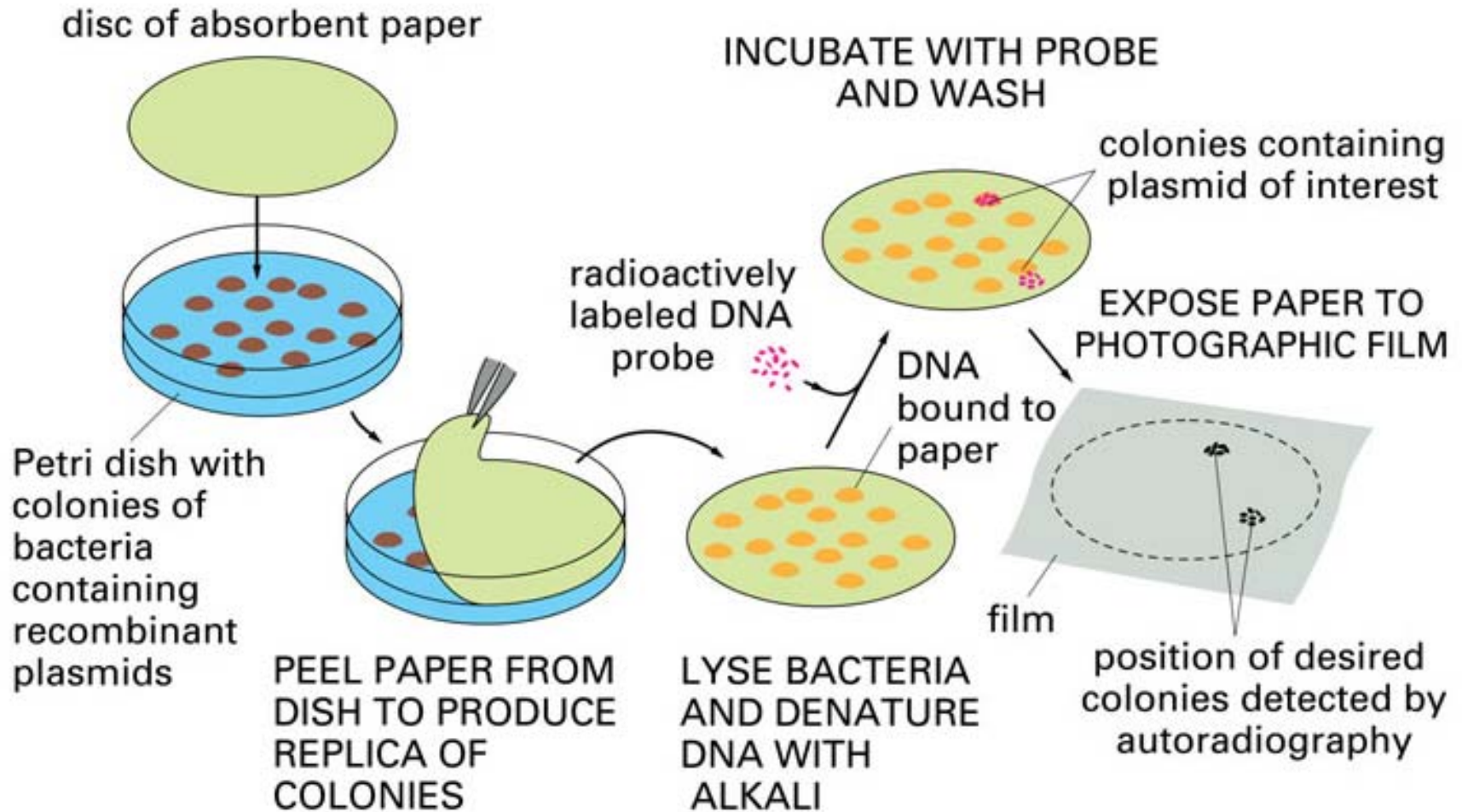
Generación de una genoteca de cDNA



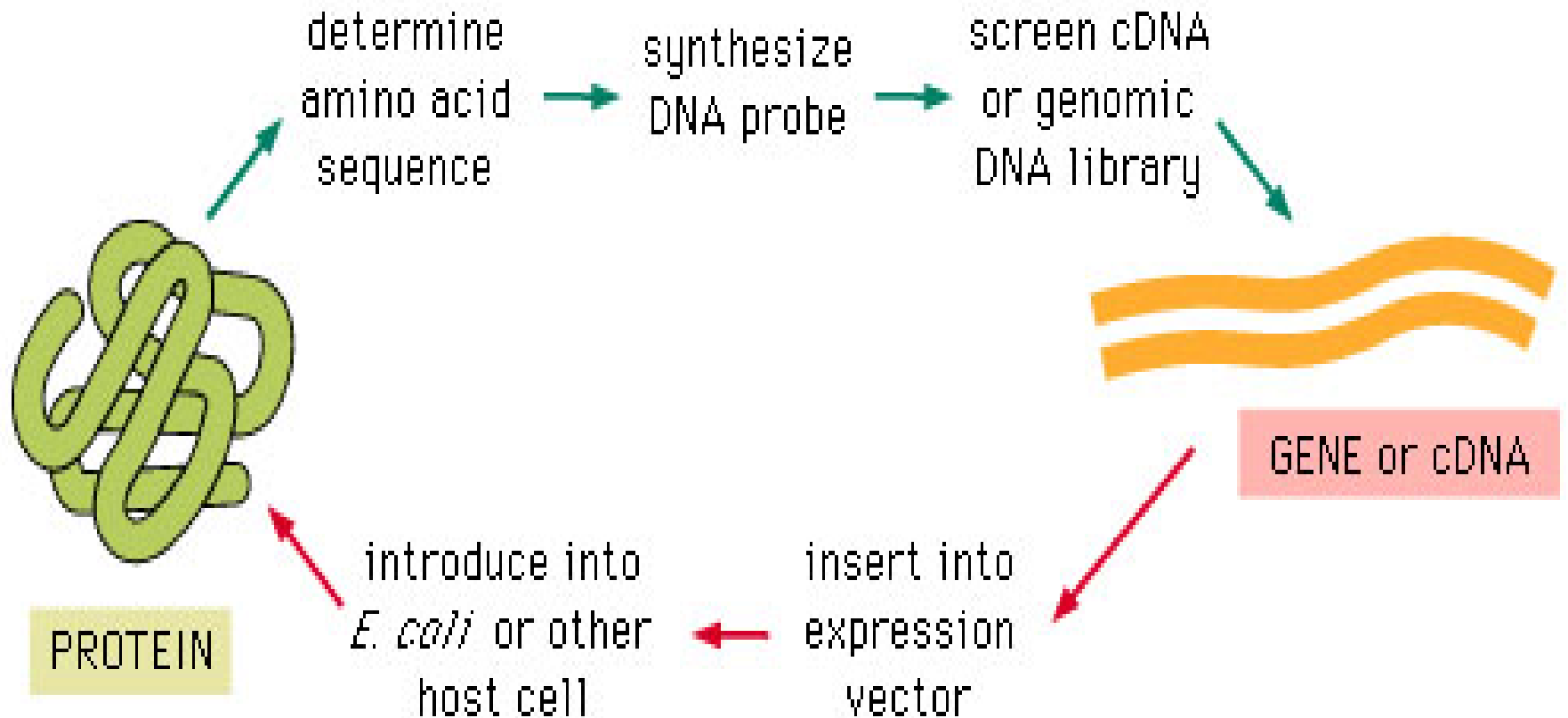
Generación de una genoteca de cDNA



Análisis de la genoteca



Análisis de la genoteca



©1998 GARLAND PUBLISHING

Análisis de la genoteca

Purify peptide fragment



Determine amino acid
sequence by Edman degradation

NH₂ - M C K V F F K RAV E G Q H N Y LC - COOH

Triplet
codons

TGC	AAA	GTA	TTC	TTC	AA_		GAA	GGA	CAA	CAC	AAC	TA_
TGT	AAG	GTG	TTT	TTT			GAG	GGG	CAG	CAT	AAT	
		GTC						GGC				
		GTT						GGT				

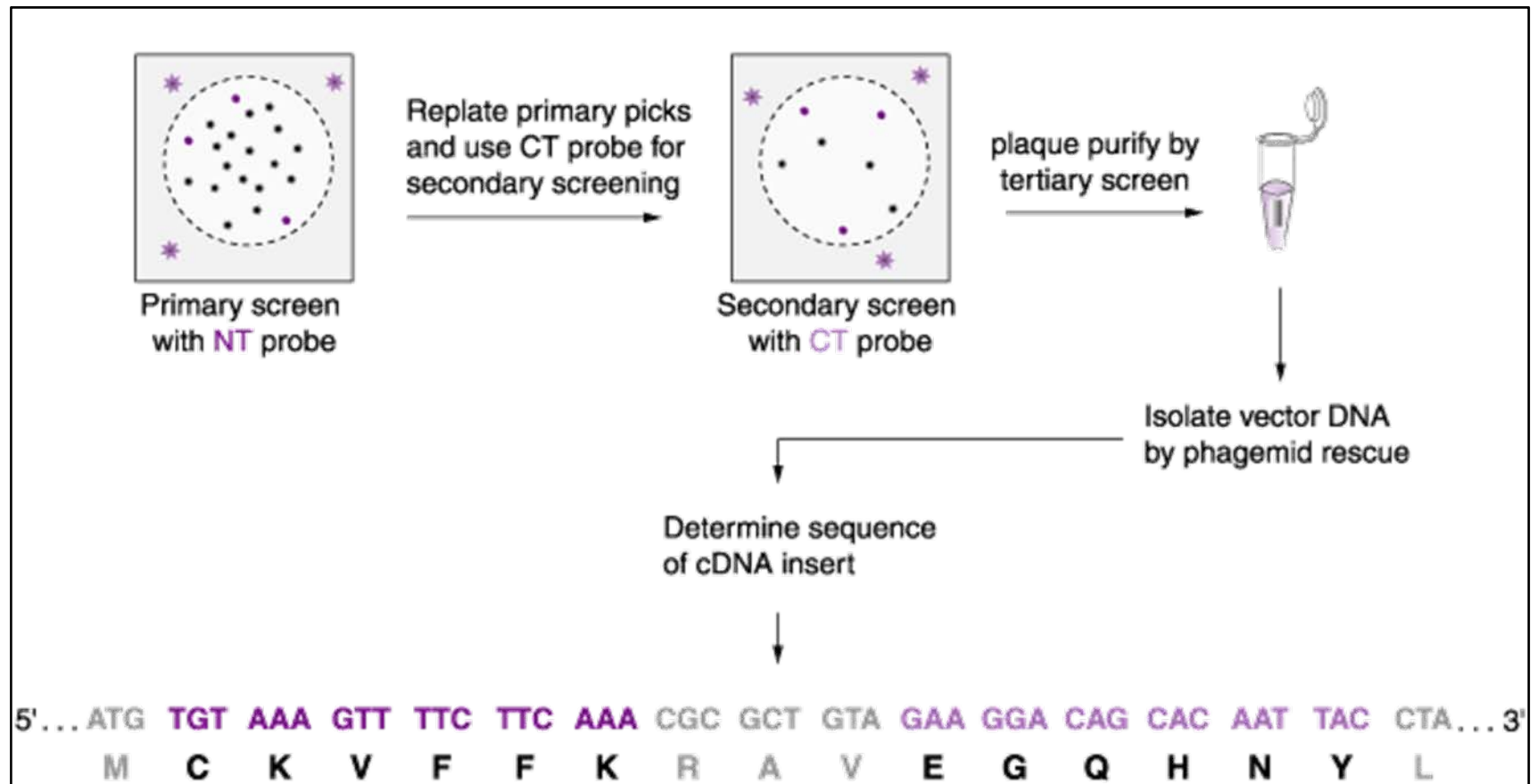
TG ^C _T	AA ^A _G	GT ^A _G	TT ^C _T	TT ^C _T	AA_
------------------------------	------------------------------	------------------------------	------------------------------	------------------------------	-----

NT oligo probe

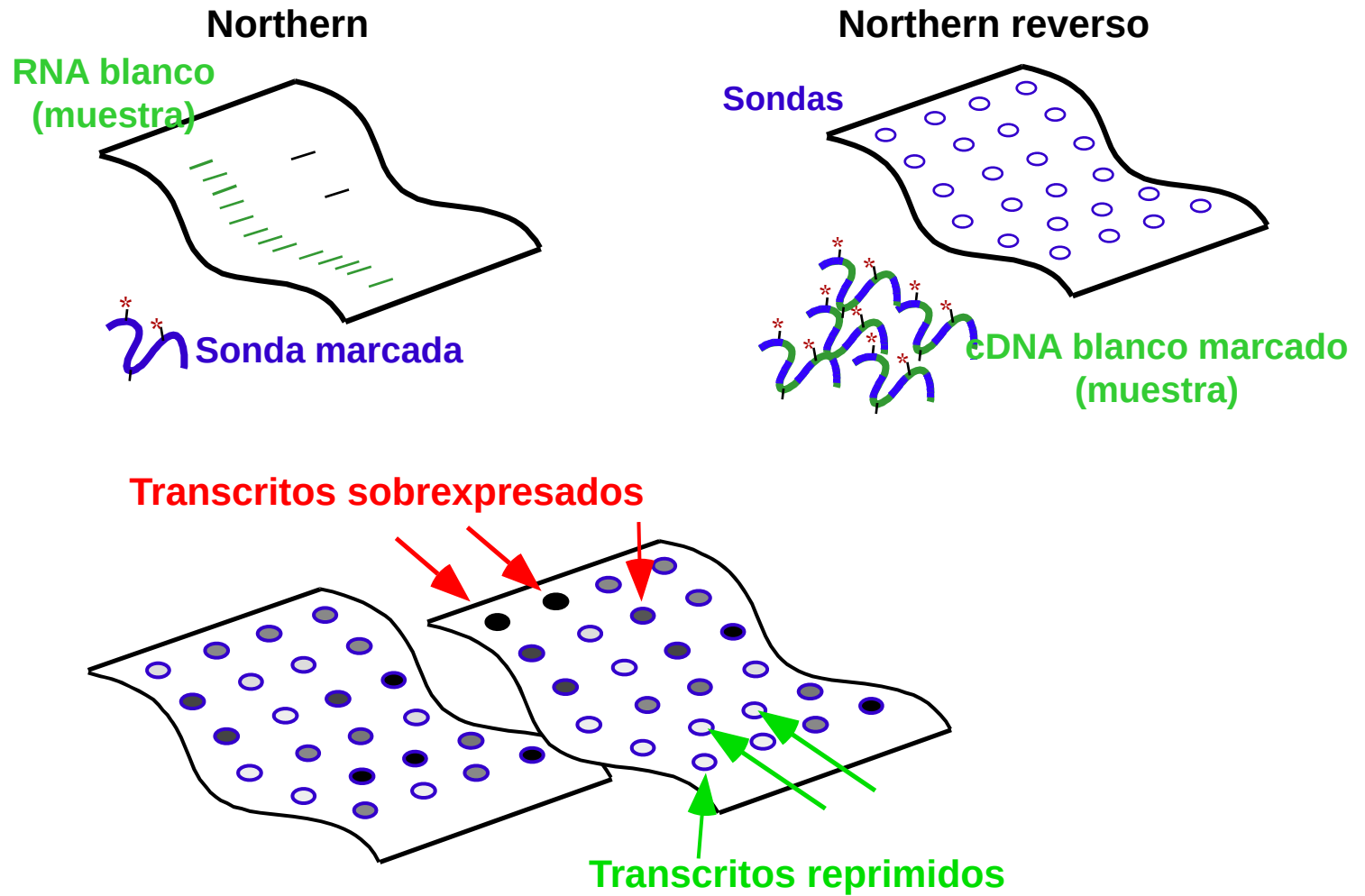
GA ^A _G	GG ^A _G	CA ^A _G	CA ^C _T	AA ^C _T	TA_
------------------------------	------------------------------	------------------------------	------------------------------	------------------------------	-----

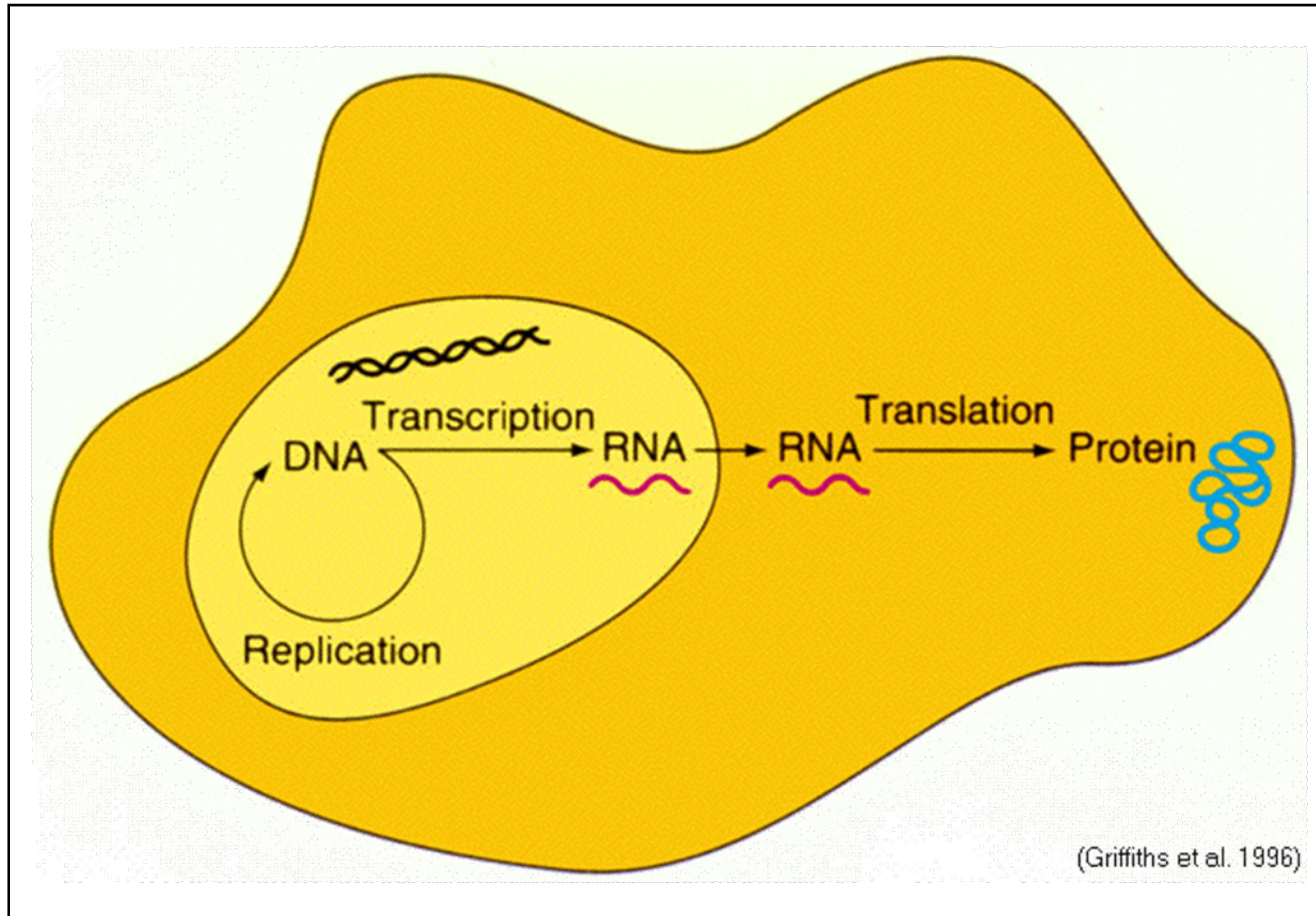
CT oligo probe

Análisis de la genoteca



NORTHERN BLOT REVERSO





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

Hibridación en microarrays

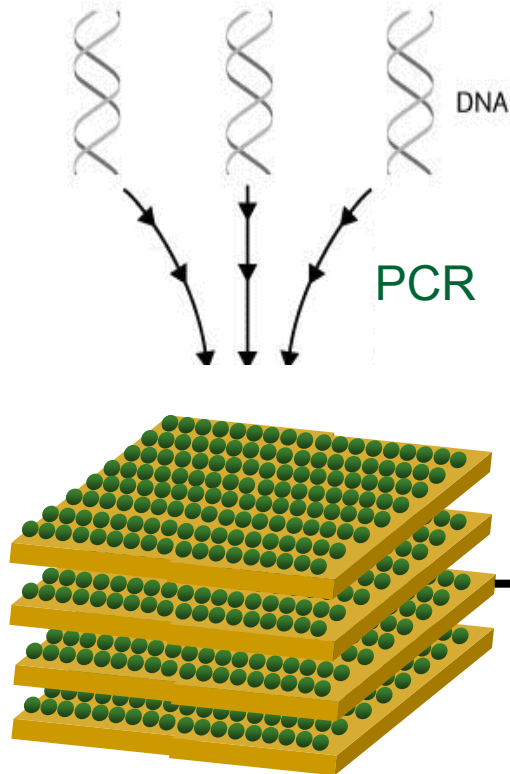
En un experimento tipo:

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 de arrays

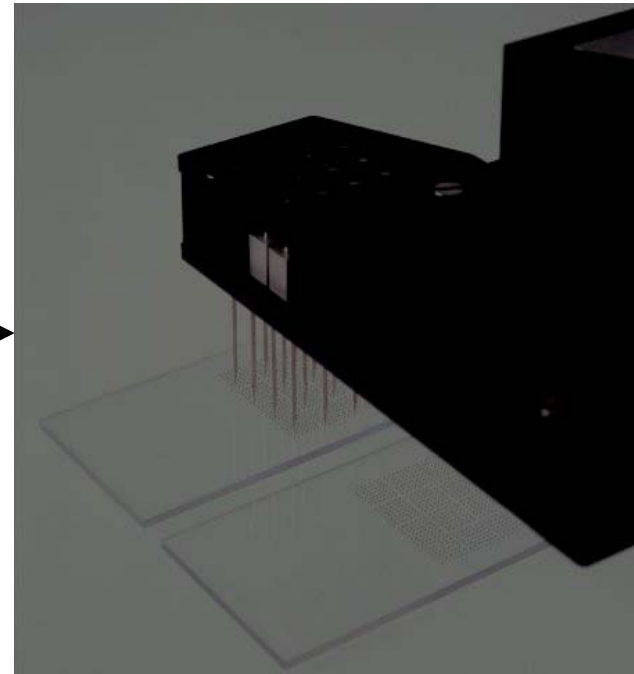
1. Colecciones de Expressed Sequences Tags (EST)
2. Genotecas de cDNAs

(a)



Colección de productos de PCR
en placas de 96 pocillos

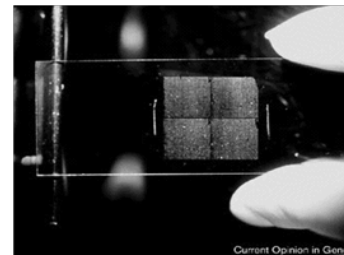
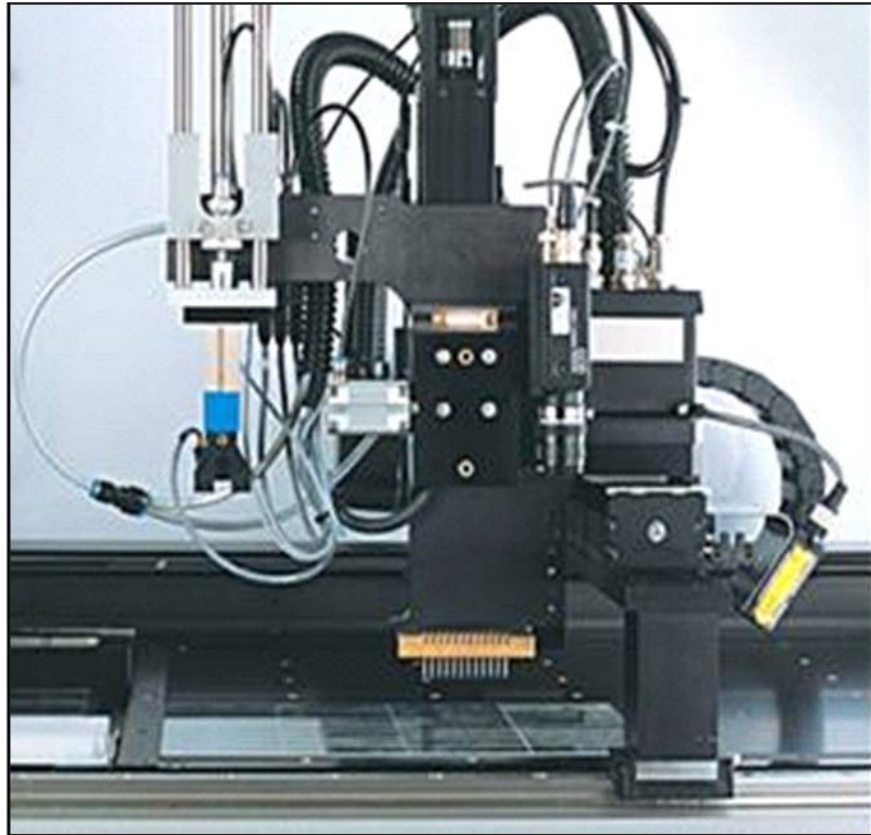
Sembrado: En cada spot se
siembra el producto de PCR de
un único gen.



Confección de arrays

MICROARRAYS

Siembra 0,25-1 nL/spot
generando *spots* de 100-
150 μm de diámetro.



Confección de arrays

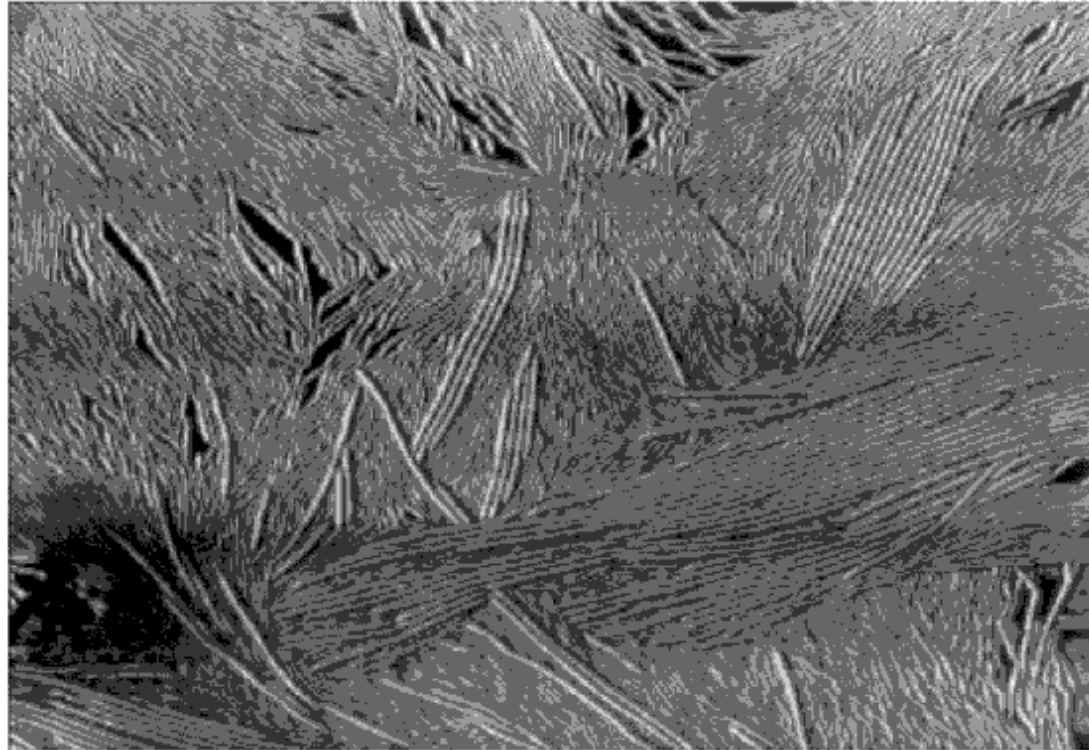
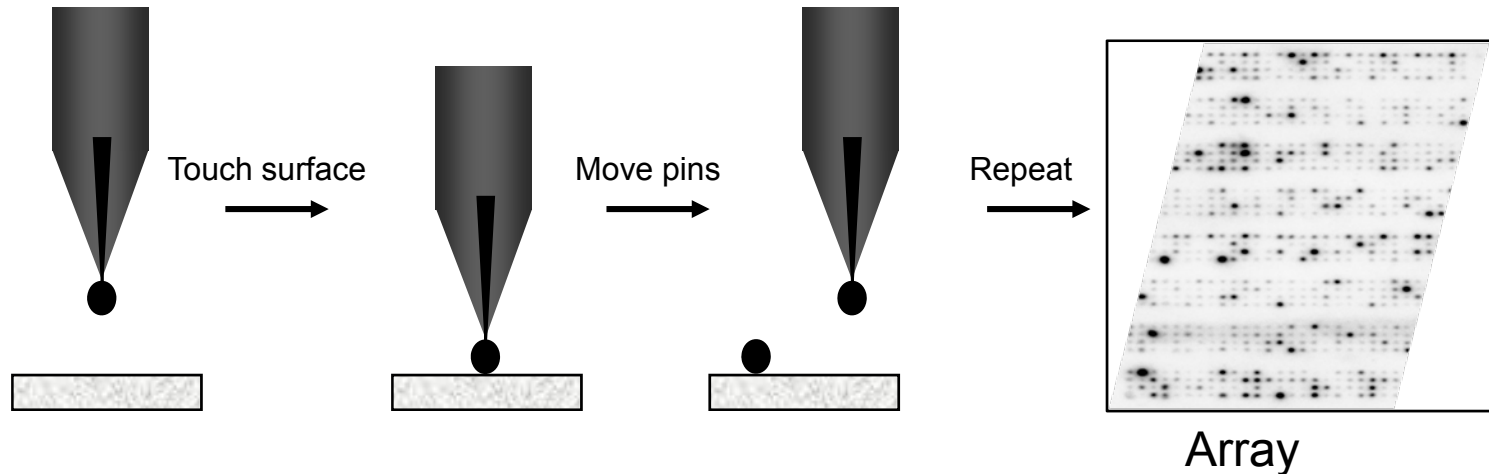


Figure 3: Atomic force microscopy of DNA on a microarray. This is a micrograph of a portion of a hybridization probe from a yeast microarray, taken after the array was subjected to hybridization. The DNA is clearly deposited at a sufficient density to allow many kinds of strand-to-strand interactions.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

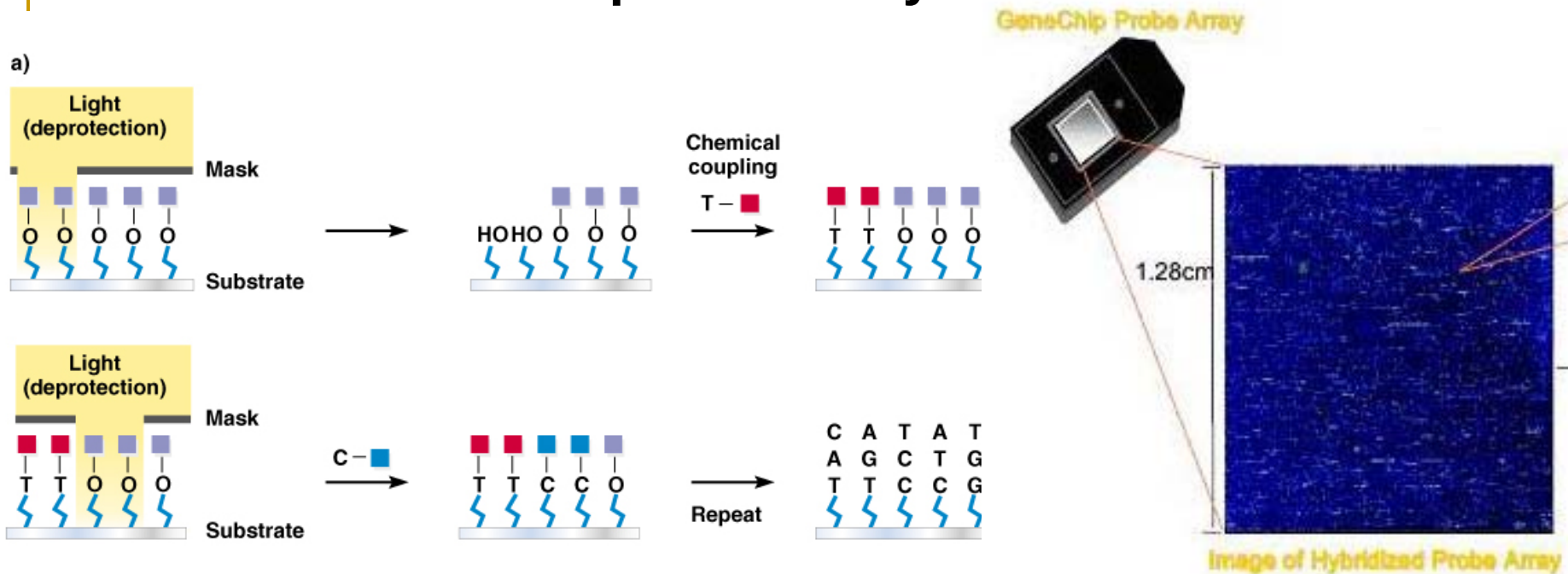
Tipos de arrays



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:

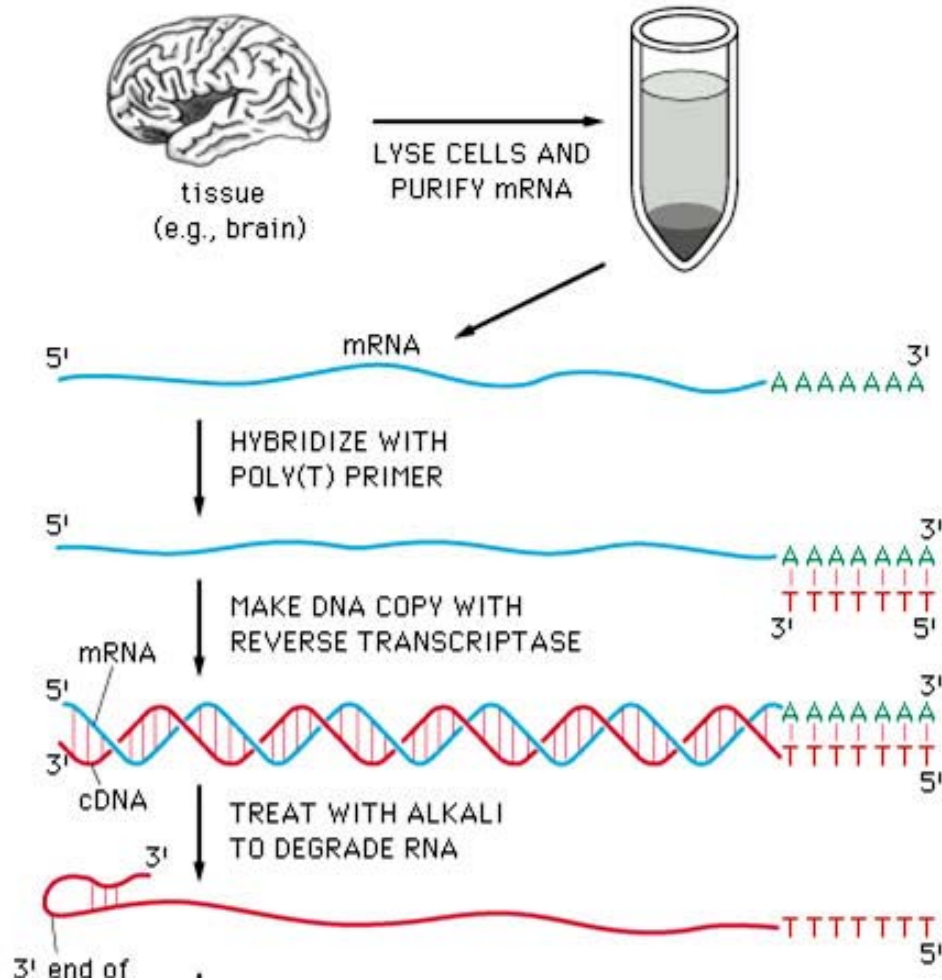
- Oligonucleotidos (25 pb) son sintetizados sobre una matriz de vidrio o plástico.
- >500.000 secuencias inmovilizadas (10^7 copias/punto de siembra).
- La muestra a hibridar es marcada con derivados fluorescentes.

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



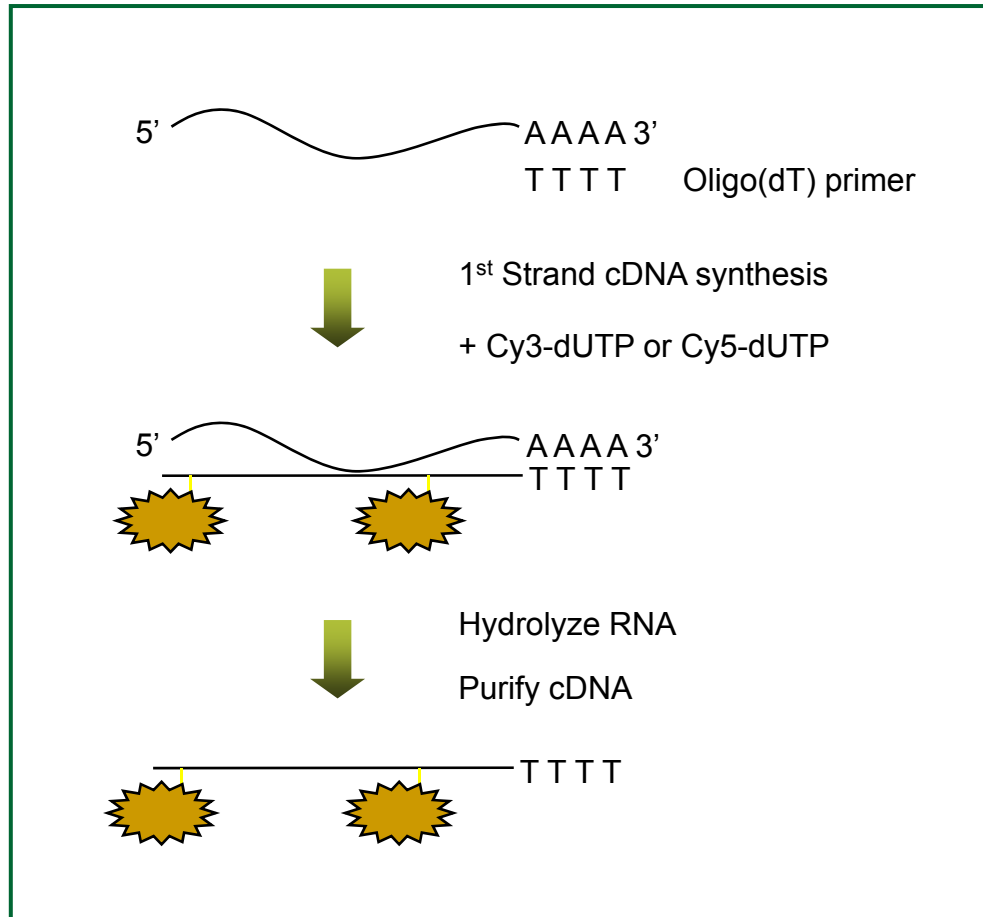
Purificación de RNA

Hibridación con poly(dT)

Copia del DNA con RT

Degradación del RNA

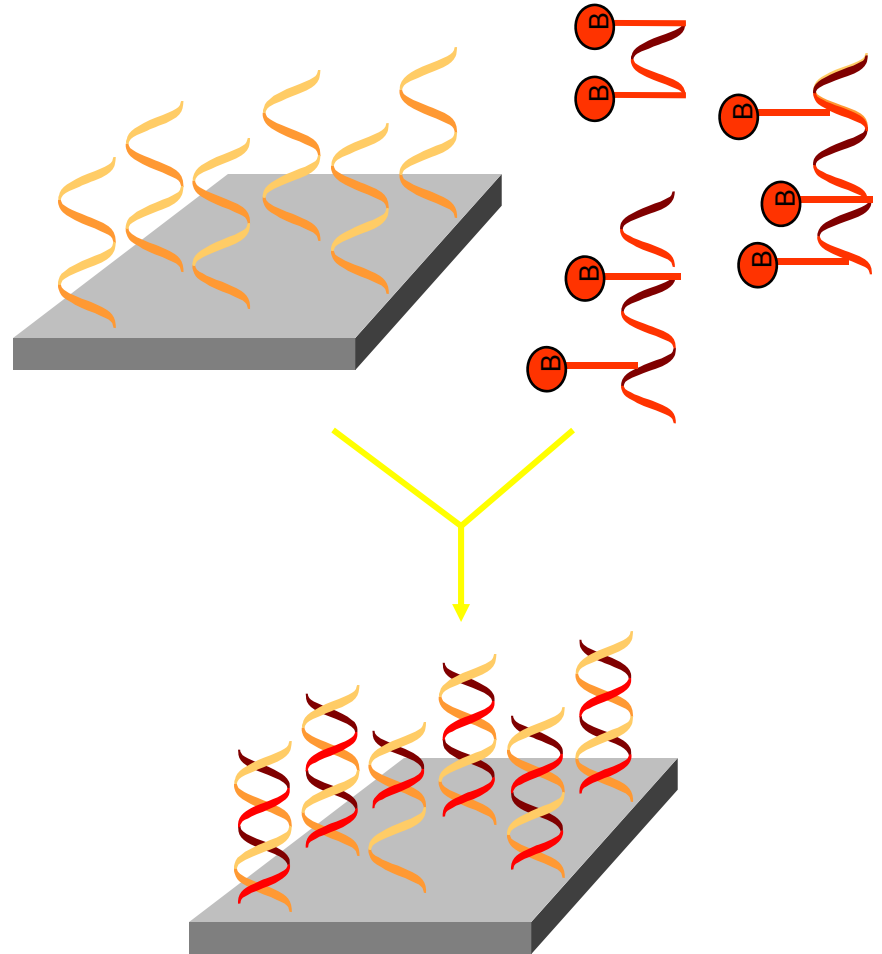
Síntesis de cDNA marcado



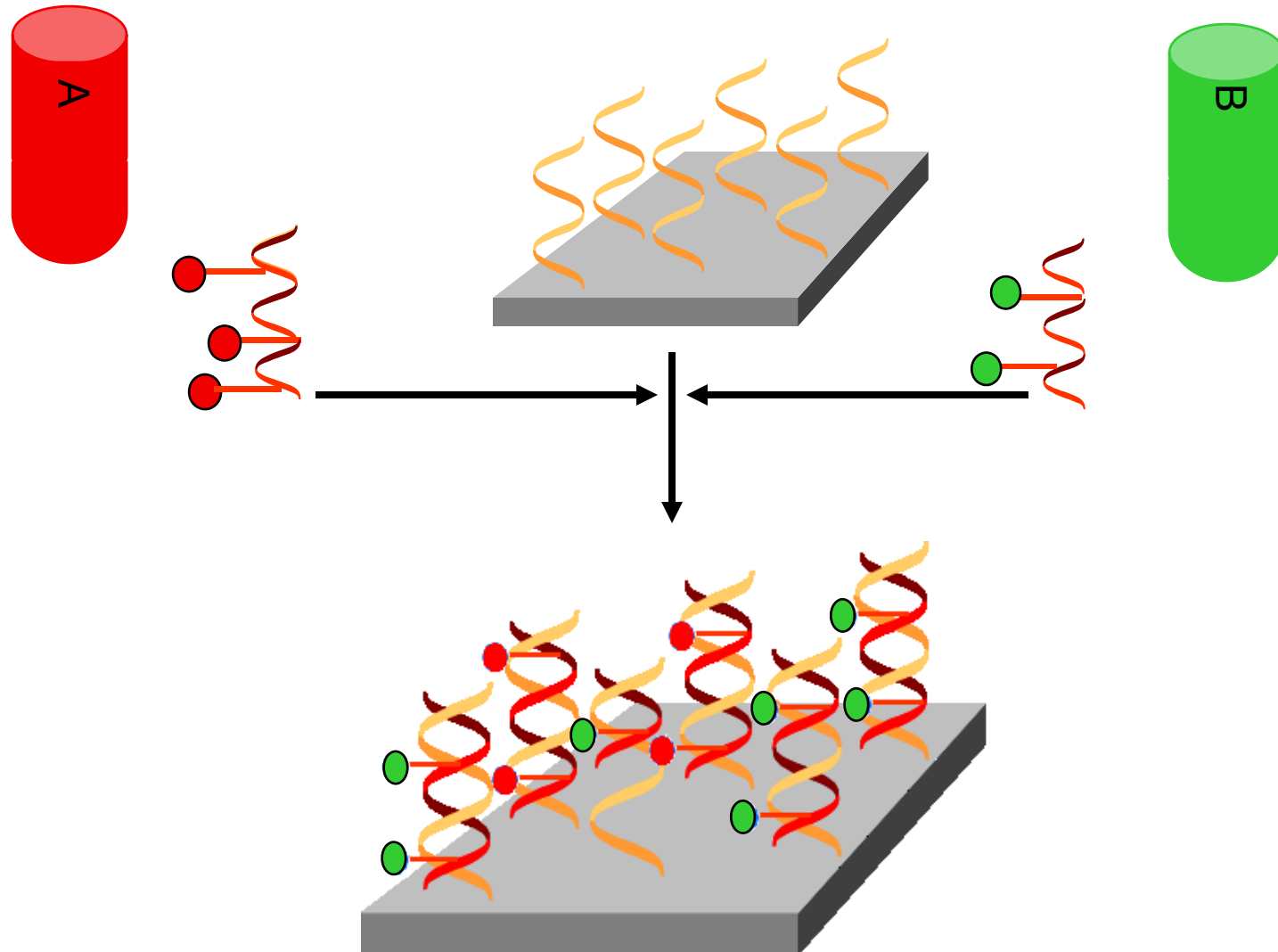
Hibridación en microarrays

El cDNA marcado se une de manera selectiva a su sonda complementaria.

La ubicación de cada sonda en el vidrio es conocida.



Hibridación competitiva



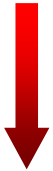
Hibridación en microarrays

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



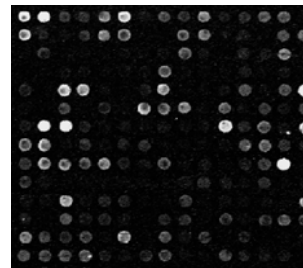
Scanner

Cy3: 532nm

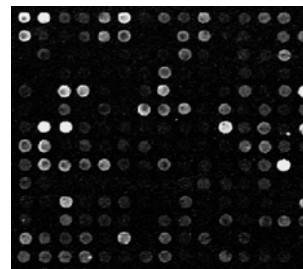
Excitación

Cy5: 635nm

Cy3: 550 - 600nm



Emisión



Cy5: 655 - 695nm

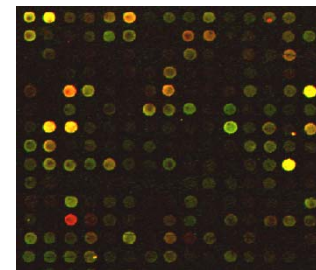


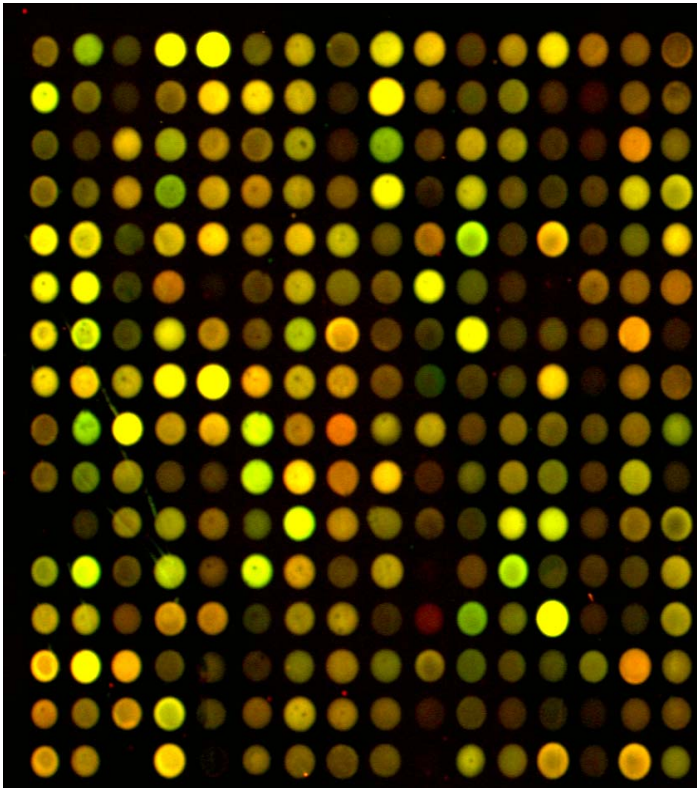
Imagen
sobrepuesta



Array	Meta Column	Column	Signal	Background	Signal/Background
1	1	1	10000	1000	10
2	1	1	10000	1000	10
3	1	1	10000	1000	10
4	1	1	10000	1000	10
5	1	1	10000	1000	10
6	1	1	10000	1000	10
7	1	1	10000	1000	10
8	1	1	10000	1000	10
9	1	1	10000	1000	10
10	1	1	10000	1000	10
11	1	1	10000	1000	10
12	1	1	10000	1000	10
13	1	1	10000	1000	10
14	1	1	10000	1000	10
15	1	1	10000	1000	10
16	1	1	10000	1000	10
17	1	1	10000	1000	10

Detección de fluorescencia

Cada punto corresponde a la hibridación del cDNA marcado con secuencias de DNA que representan a un gen único.



Ejemplo:

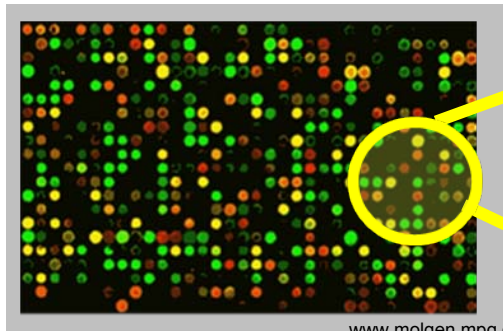
cDNA experimental: **rojo Cy5**

cDNA control: **verde Cy3**

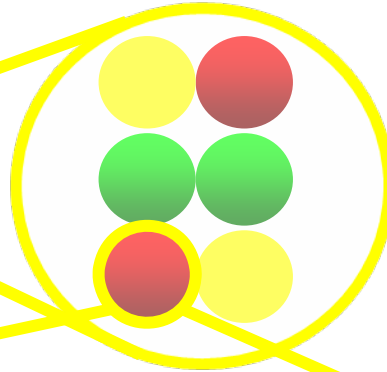
Amarillo: Experimental = Control

Rojo: Experimental > Control

Verde: Experimental > Control



www.molgen.mpg.de



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

gen

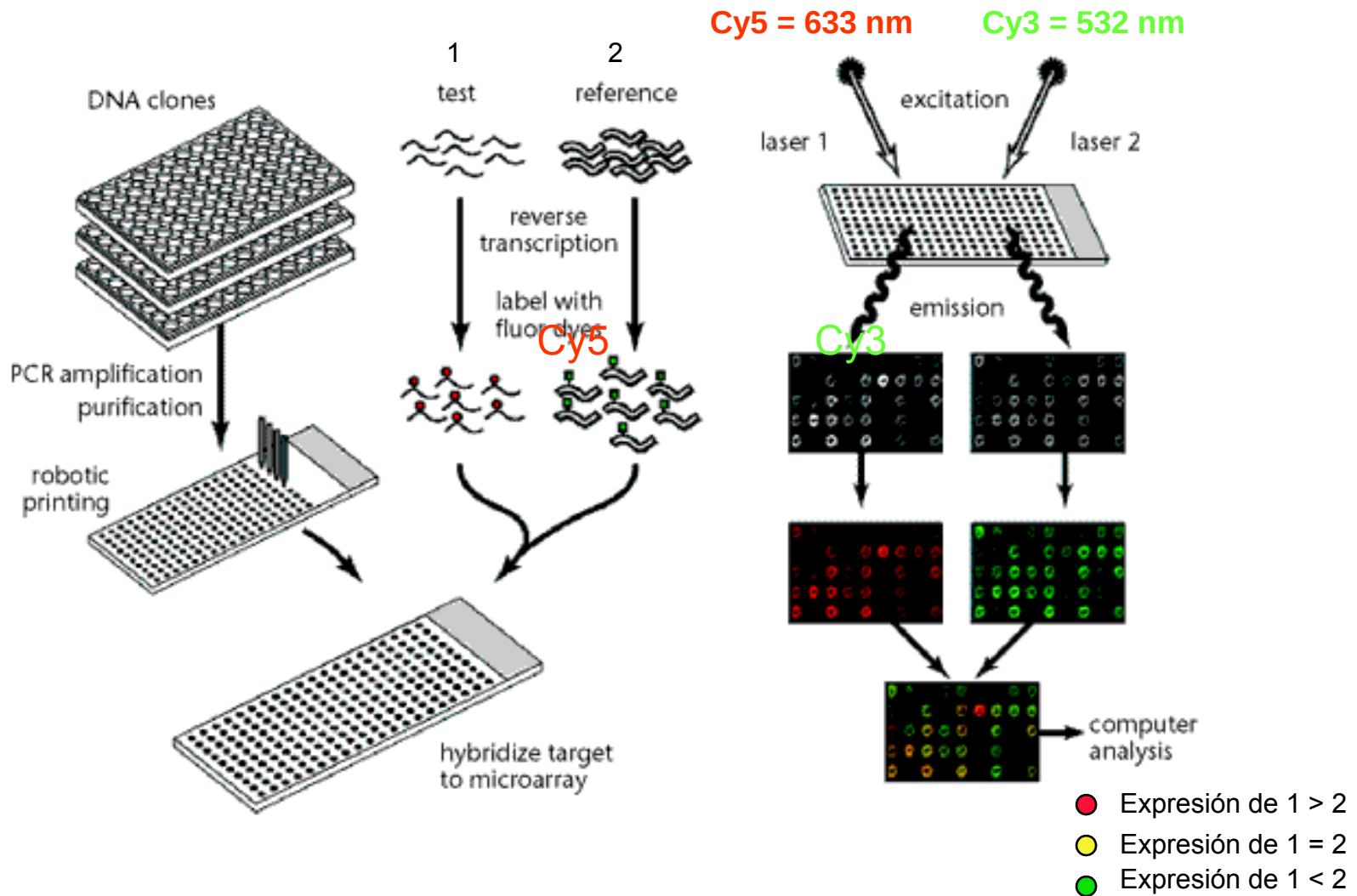


cDNA

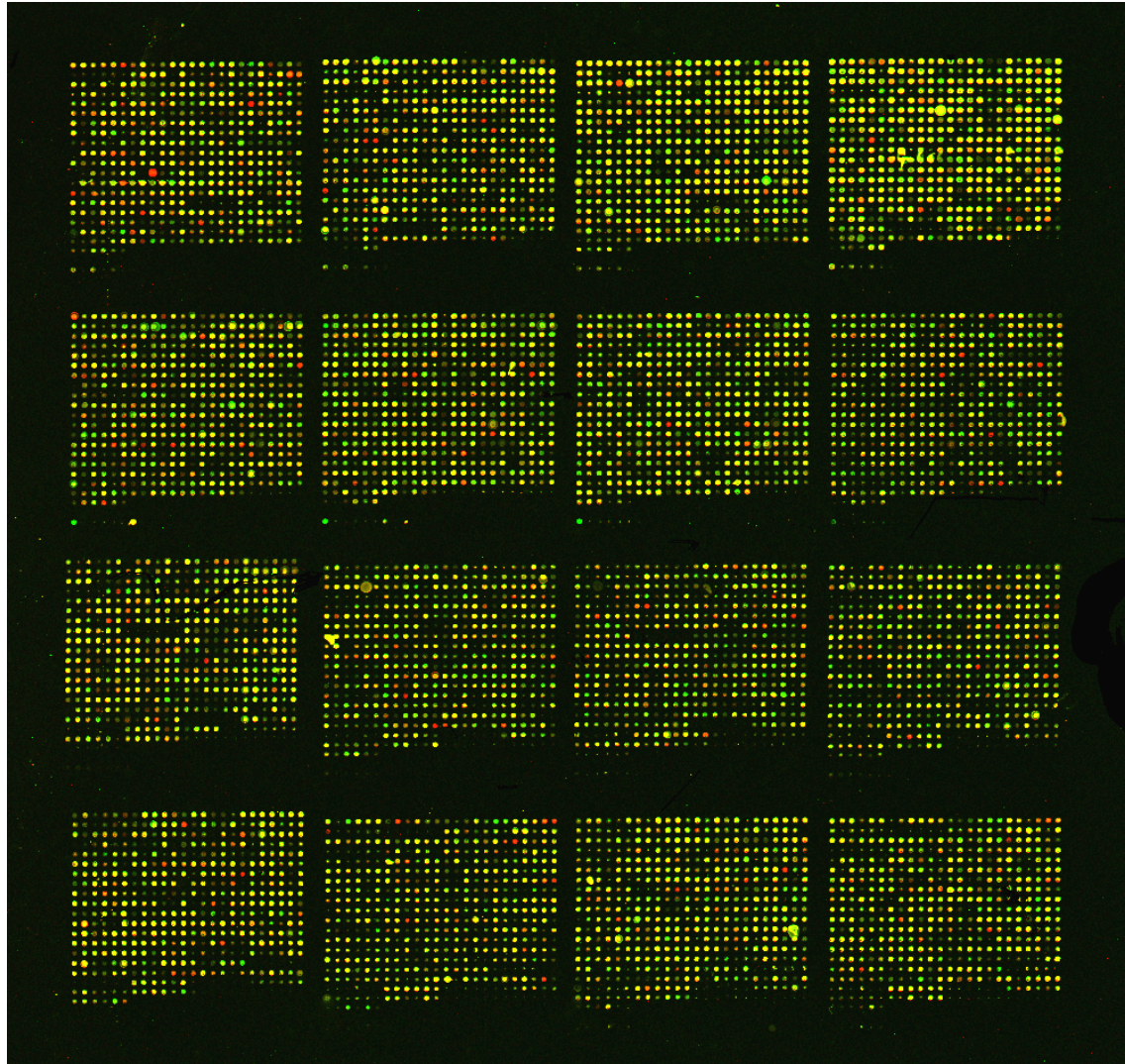


- La intensidad de la señal fluorescente es medida para cada spot en cada una de las longitudes de onda.
- La intensidad de la señal representa la cantidad de transcrito presente en la muestra original.
- La razón de las señales de hibridación Cy3/Cy5 representa el cambio relativo de expresión de un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

Hibridación en microarrays



Microarray de levadura



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.