

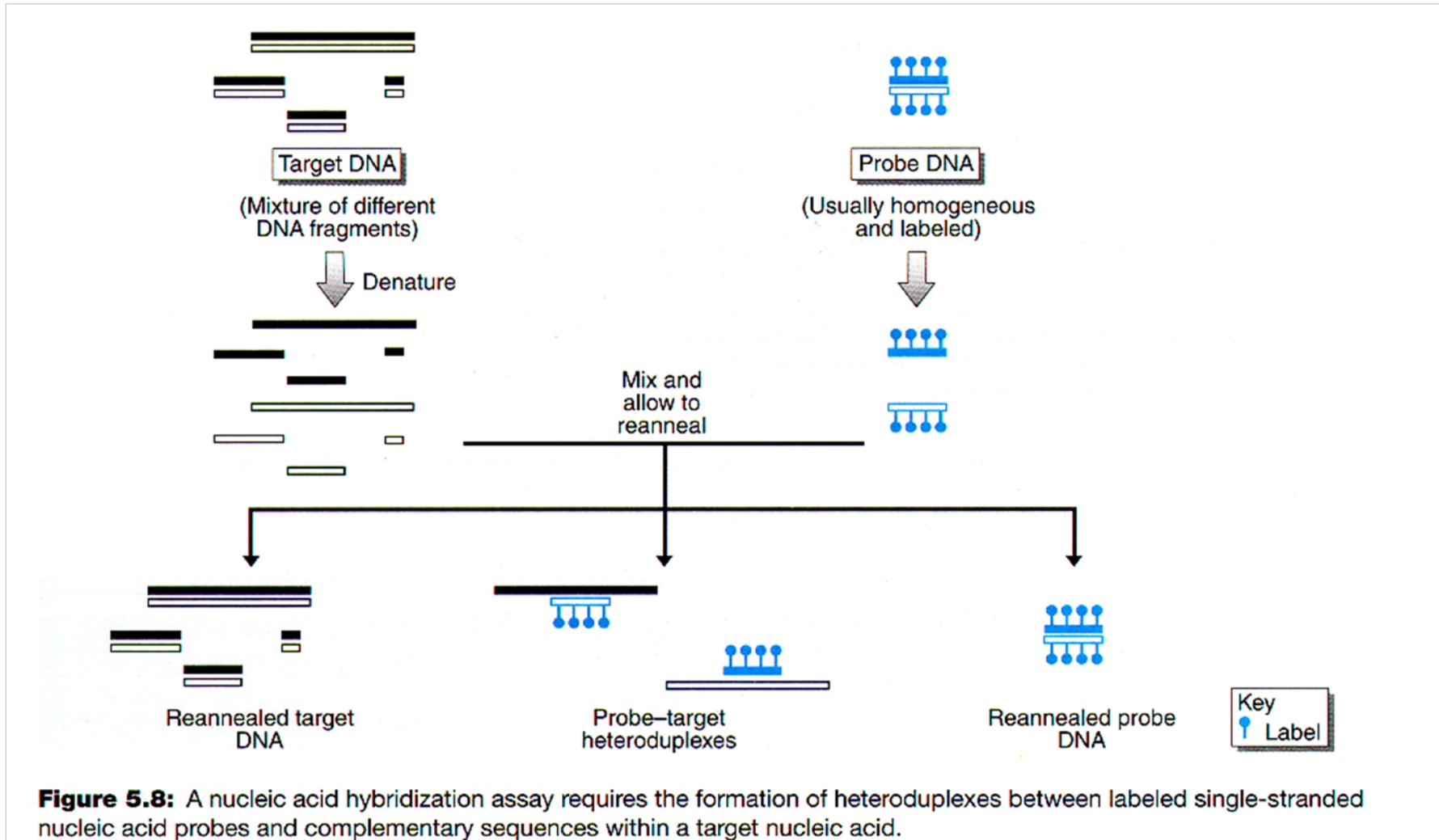
# ENSAYOS DE HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

- ❖ Acidos nucleicos de hebra simple pueden hibridizar y formar moléculas de doble hebra, si existe suficiente complementariedad de bases entre ellos.
- ❖ Utilizan un acido nucleico marcado – sonda – para identificar moléculas de DNA o RNA en una mezcla compleja de ácidos nucleicos no marcados.
- ❖ La sonda corresponde a una población homogénea de moléculas de secuencia conocida (DNA clonados u oligos sintetizados) que posee suficiente complementariedad de bases con las moléculas que se intenta identificar.
- ❖ En el ensayo, tanto la sonda como los DNA o RNA a identificar deben ser de hebra simple.
- ❖ La utilidad de estos ensayos depende de la capacidad de formar híbridos sonda-DNA/RNA (heteroduplex) en vez de homoduplex.
- ❖ Apareamiento complementario de bases entre dos ácidos nucleicos de hebra simple → DNA/DNA, RNA/RNA, DNA/RNA

## Bibliografía:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=hmg.chapter.457>

# ENSAYOS DE HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS



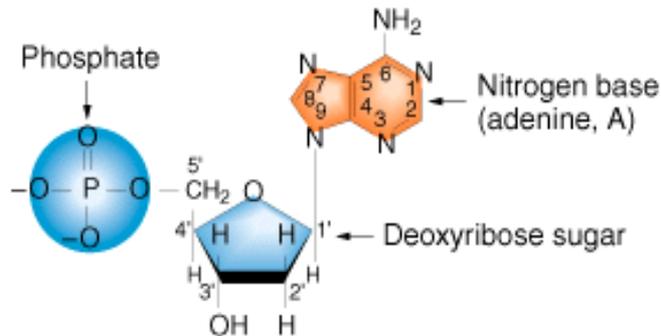
---

# ENSAYOS DE HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

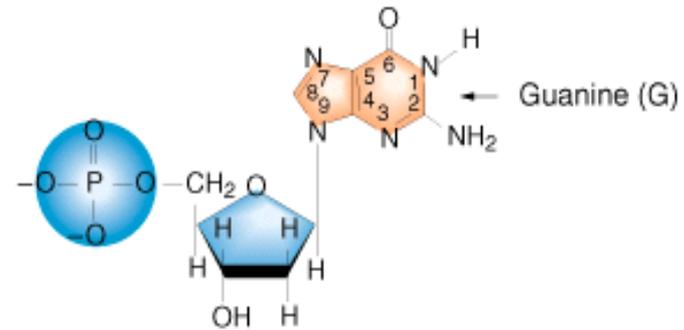
- 1. RNA
  - *NORTHERN BLOT* CONVENCIONAL
  - *NORTHERN BLOT* REVERSO
  - HIBRIDACION *IN SITU*
  
- 2. DNA
  - *SOUTHERN BLOT*
  - ANALISIS DE GENOTECAS

# Estructura de los nucleótidos

## Purine nucleotides

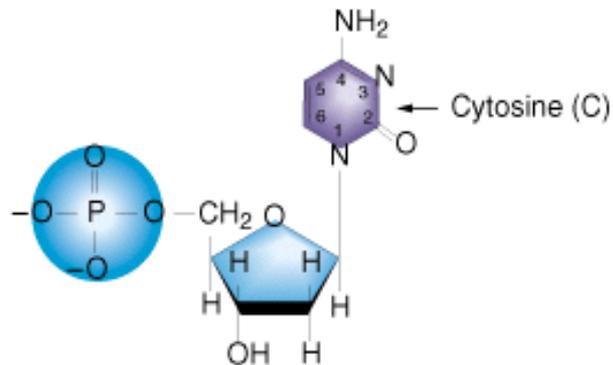


Deoxyadenosine 5'-phosphate (dAMP)

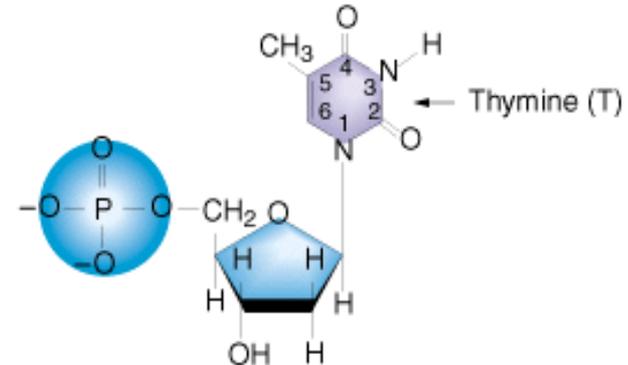


Deoxyguanosine 5'-phosphate (dGMP)

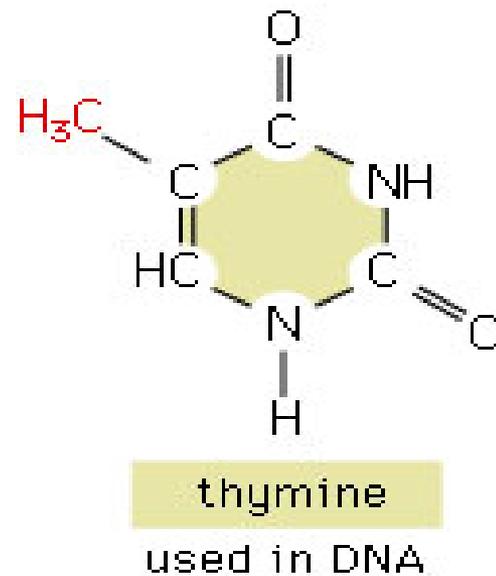
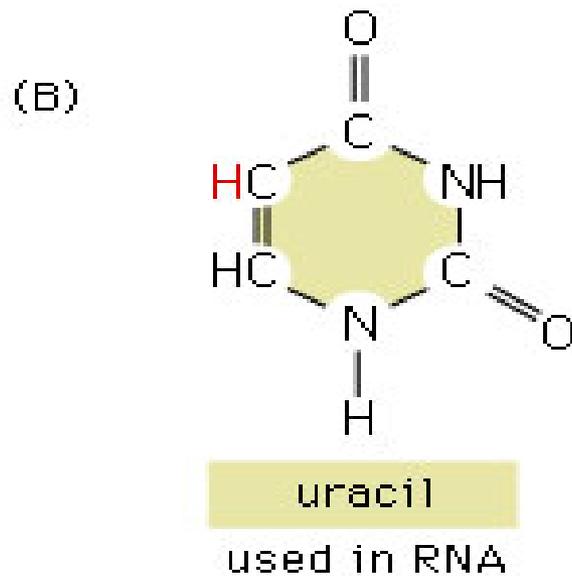
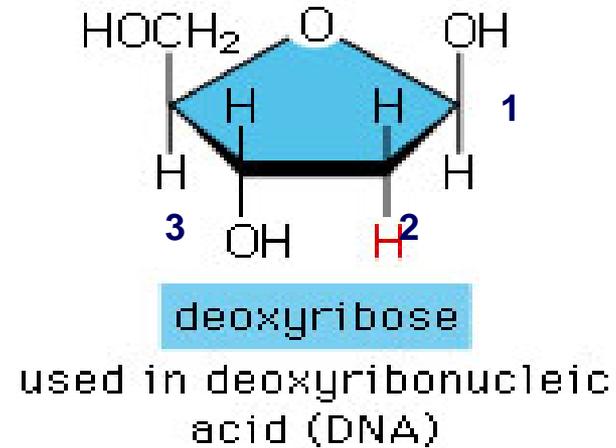
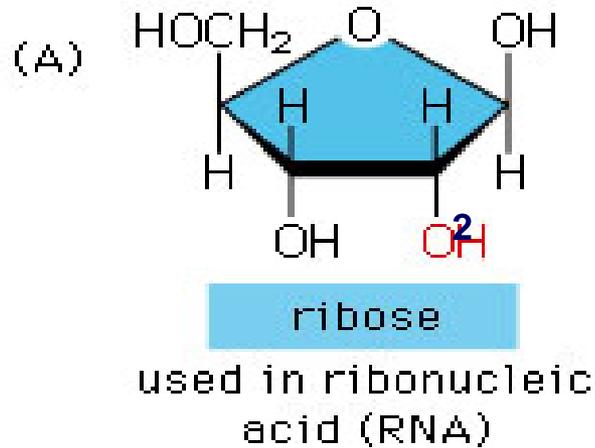
## Pyrimidine nucleotides



Deoxycytidine 5'-phosphate (dCMP)



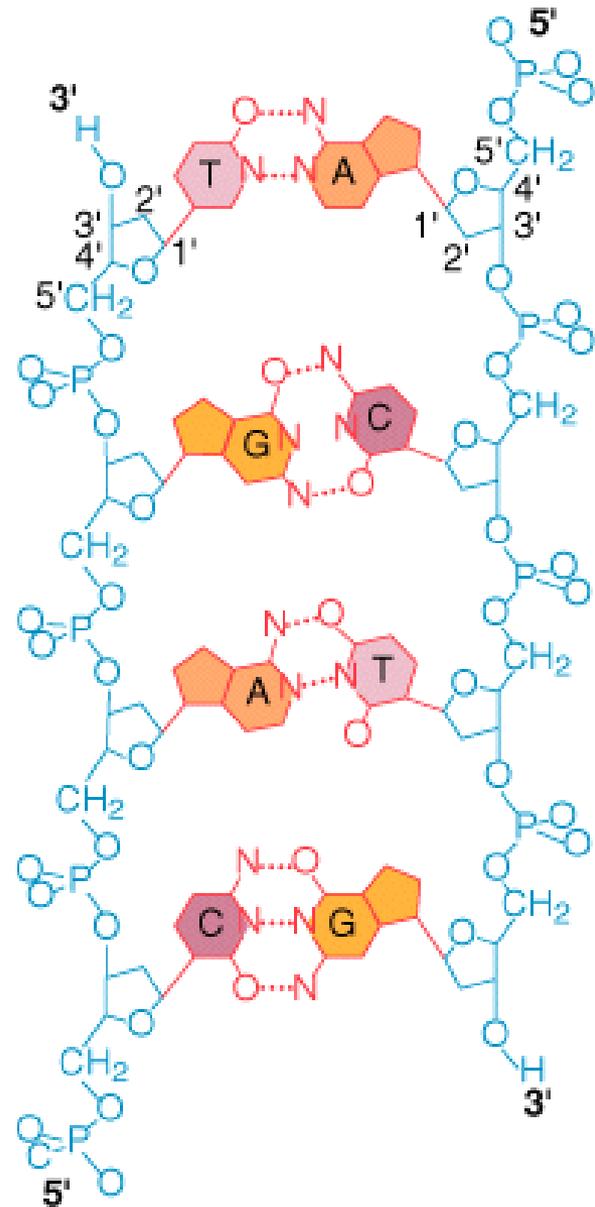
Deoxythymidine 5'-phosphate (dTMP)



©1998 GARLAND PUBLISHING

# Estructura del DNA

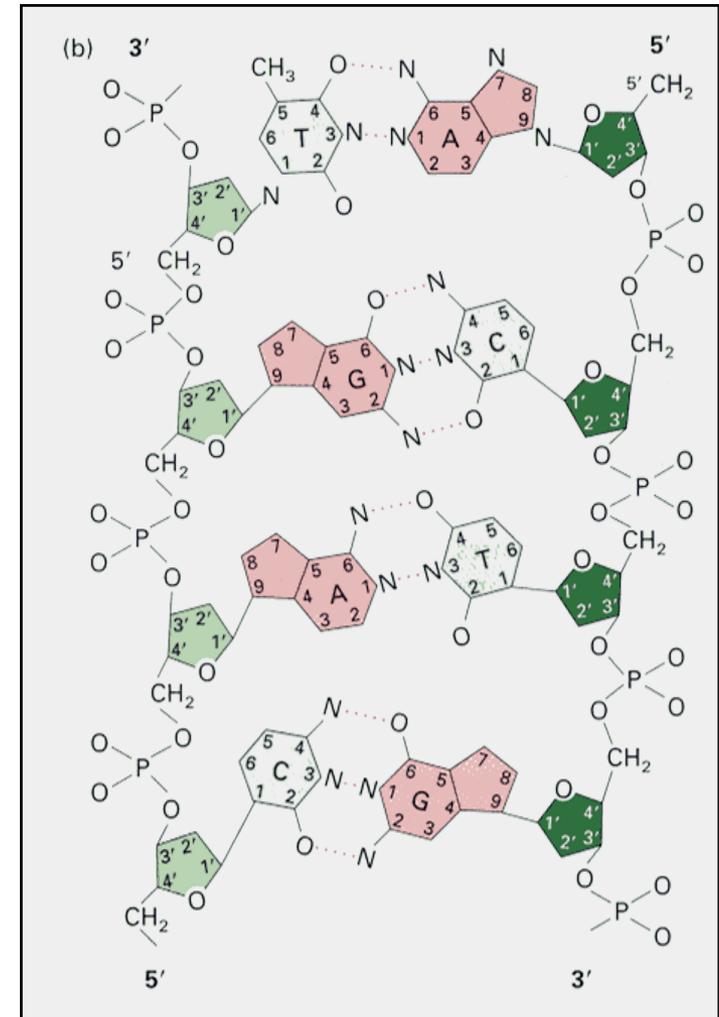
- Las moléculas de azúcar se unen a través de grupos fosfato formando enlaces fosfodiéster entre los átomos de carbono tercero (3') y quinto (5') de dos anillos adyacentes.
- Uniones asimétricas → cadenas antiparalelas con las bases nitrogenadas enfrentadas y unidas por puentes de hidrogeno.
- Apareamiento de pirimidinas con purinas.  
T : A  
C : G



# Estructura del DNA

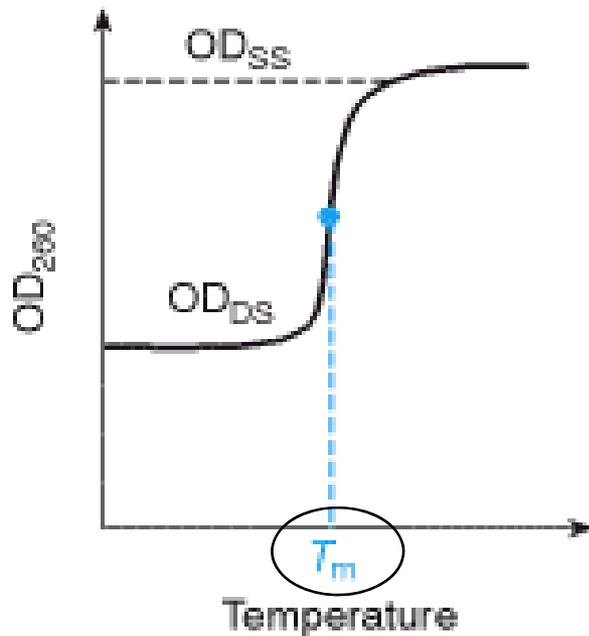
¿Cómo se mantienen unidas las dos hebras?

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



# Desnaturación del DNA de doble hebra

- Al aumentar la temperatura de una solución de DNA a  $\sim 90$  °C la energía cinética es suficiente para separar las dos hebras.
- La separación de las hebras (desnaturación) puede ser detectada midiendo la absorbancia de la luz a 260 nm. Las bases del DNA absorben menos luz en la molécula de doble hebra que en la de hebra simple  $\rightarrow$  efecto hipocrómico.



$T_m$  = temperatura de *melting*.

La  $T_m$  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. Depende de la estructura del ácido nucleico.

---

# Desnaturación del DNA de doble hebra

- La energía requerida para separar dos moléculas complementarias depende de varios factores:
  1. Largo de las hebras
  2. Composición de bases
  3. Composición química de la solución.
- Ensayos de hibridación → condiciones que promuevan la formación del heteroduplex, la temperatura de hibridación suele ser menor (25 °C) que la  $T_m$ .
- Varias otras condiciones pueden ser manejadas durante la hibridación para favorecer la formación del heteroduplex.

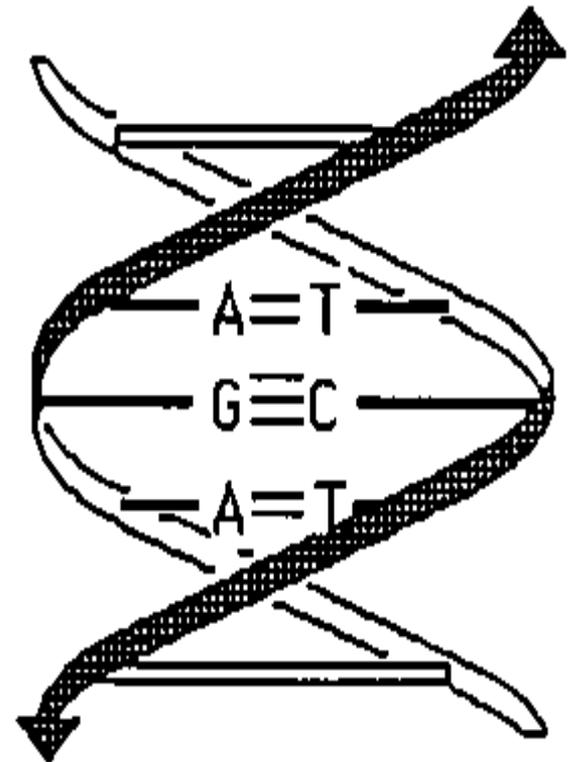
---

# Factores que afectan la formación del heteroduplex

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

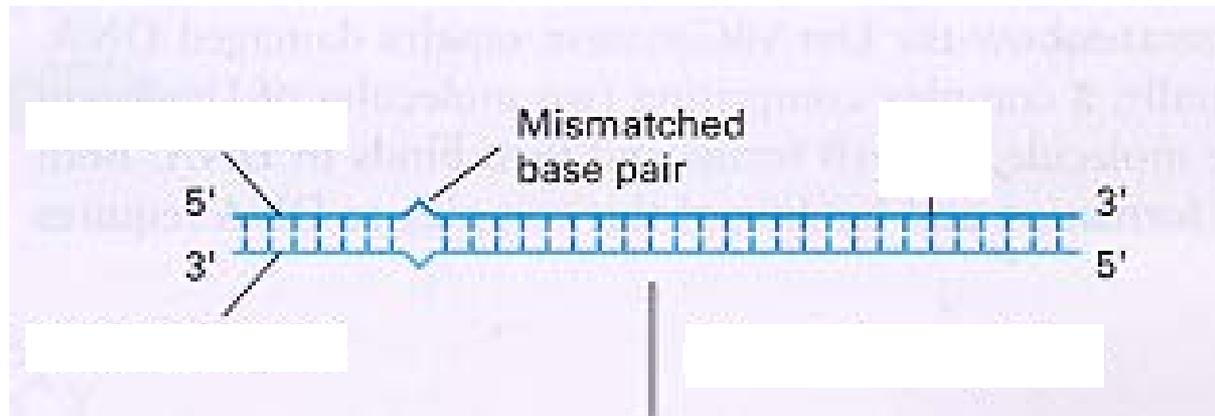
# Factores que afectan la formación del heteroduplex

- Número de pares GC v/s 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 formación del heteroduplex

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



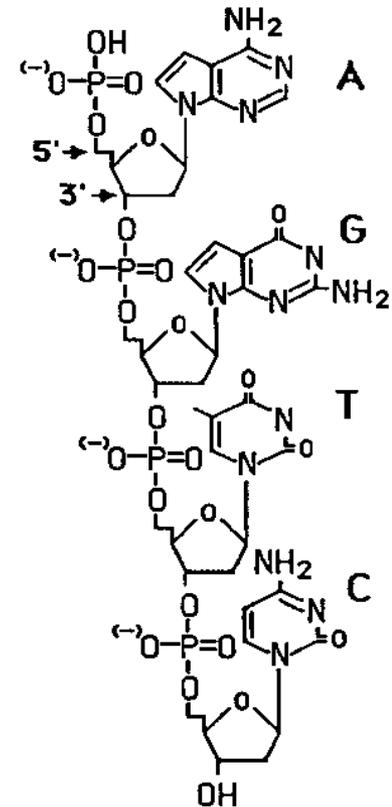
---

# Factores que afectan la formación del heteroduplex

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

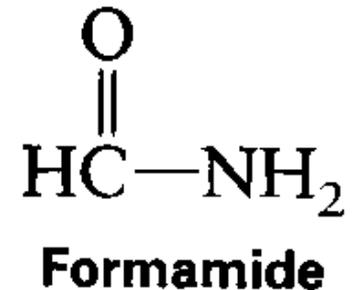
# Factores que afectan la formación del heteroduplex

- 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 ( $\text{Na}^+$ ) o divalentes ( $\text{Mg}^{++}$ )



# Factores que afectan la formación del heteroduplex

- 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



# Factores que afectan la formación del heteroduplex

- 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  $T^{\circ}$  → aumenta la energía cinética de las hebras y desestabiliza la estructura de los ácidos nucleicos.  
→ las hebras se separan.

**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+**

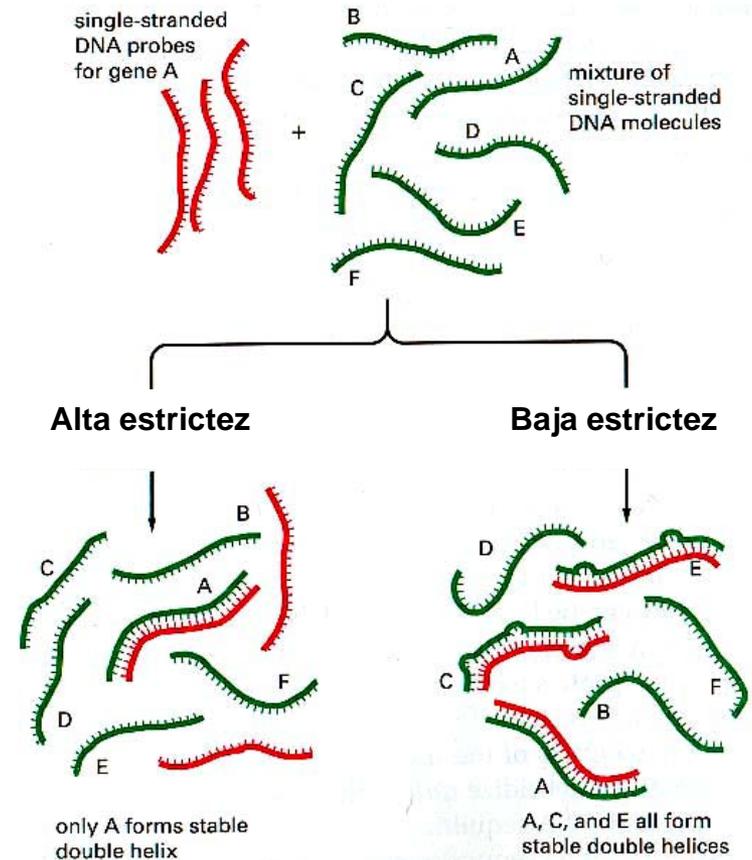
$$T_m (\text{°C}) = 4 (G+C) + 2 (A+T)$$

# 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



# CINÉTICA DE RE-ASOCIACIÓN

- Cuando el DNA de hebra doble es desnaturado por calor la velocidad a la cual se vuelve 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.

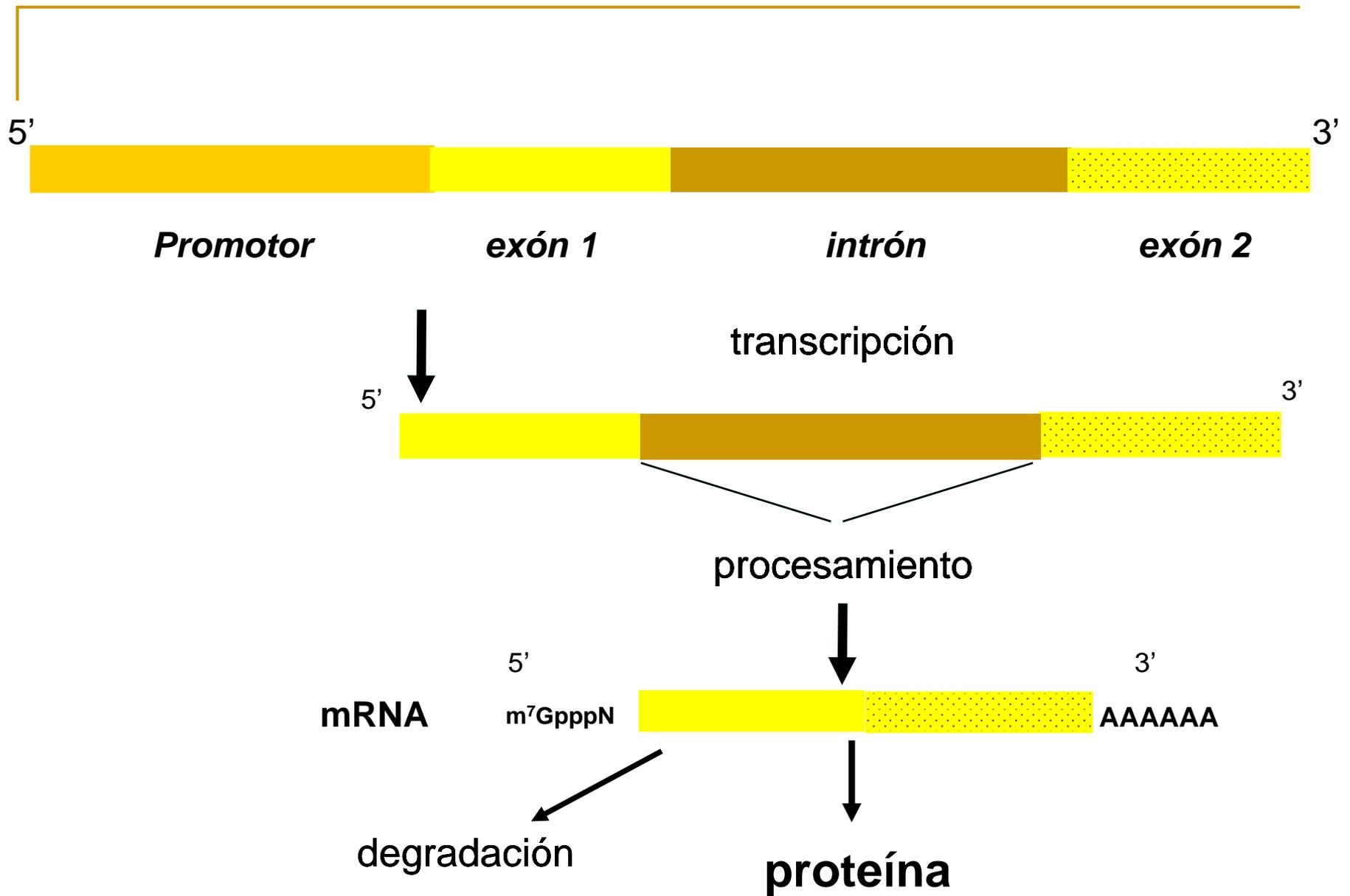
---

# ENSAYOS DE HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

- **NORTHERN BLOT**

**PERMITE DETECTAR LA PRESENCIA DE UN TRANSCRITO.**

**PROPORCIONA INFORMACION DE SU TAMAÑO, ABUNDANCIA Y POSIBLE PROCESAMIENTO.**

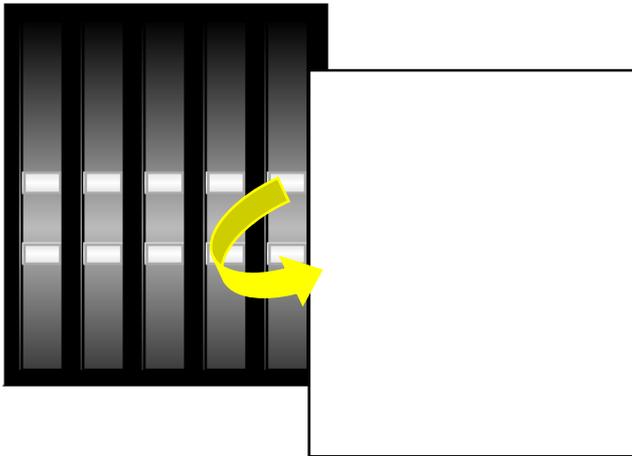


# NORTHERN BLOT

## 1. Extracción del RNA



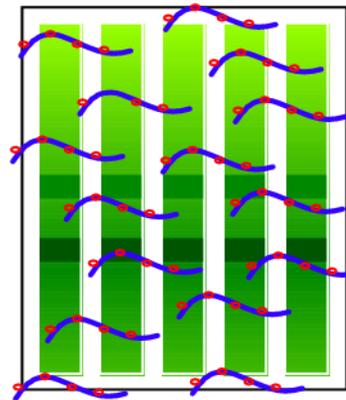
## 2. Electroforesis del RNA



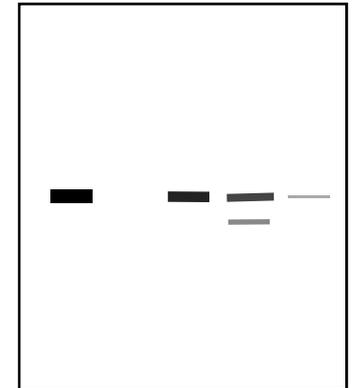
## 3. Transferencia a membrana



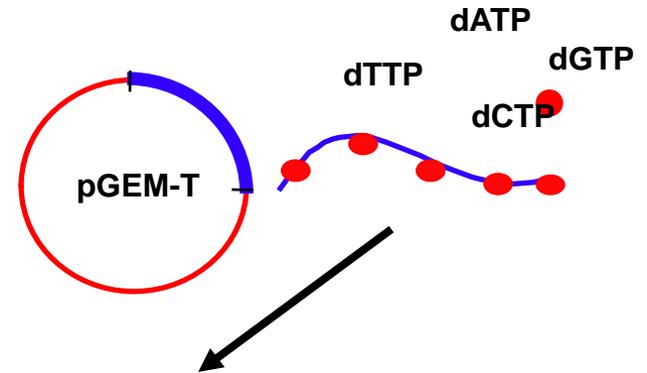
## 5. Hibridación



## 6. Visualización

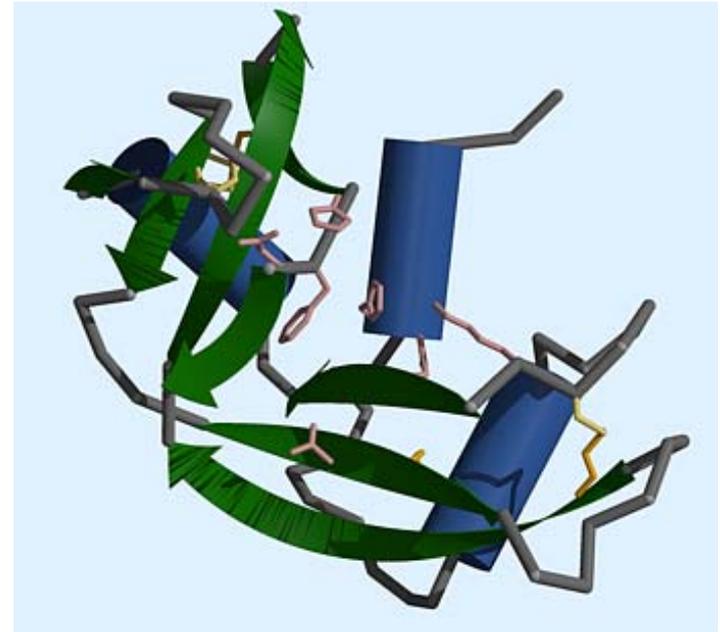


## 4. Generación de una sonda marcada



# Problemas con RNasas

## Pancreatic RNase A



RNasas endoribonucleasa:

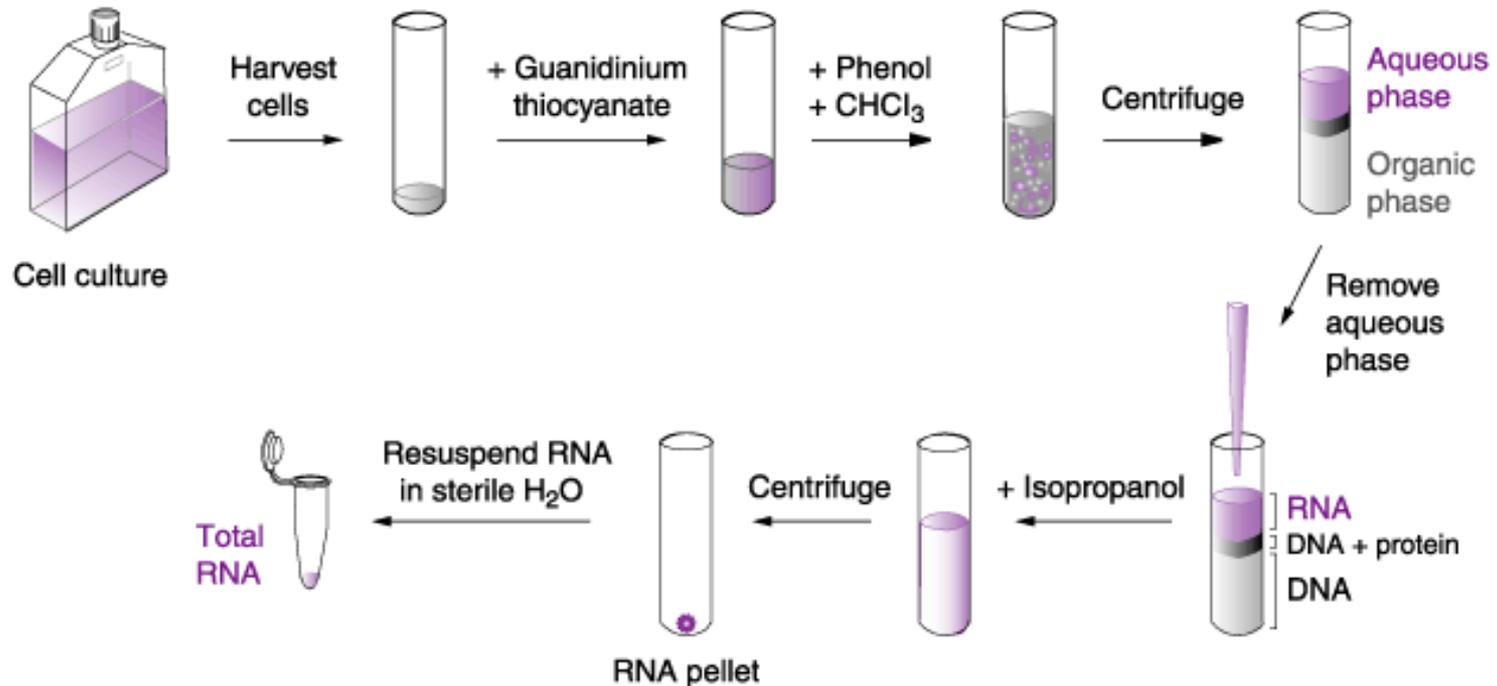
resistentes a agentes quelantes de metales

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

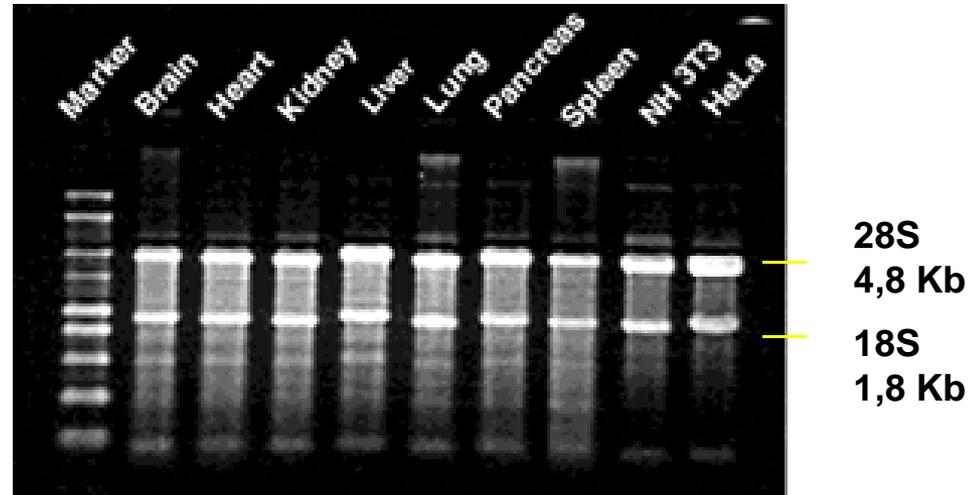
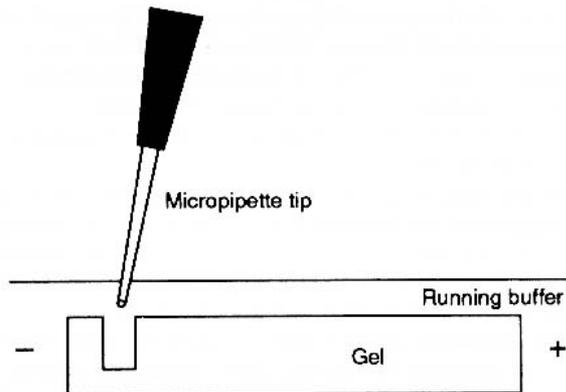
## Extracción del RNA



Lisis con tiocianato de guanidina → inactivación de RNAsas.  
Partición de DNA, RNA y proteínas en fenol ácido (pH 5-6).  
Precipitación con isopropanol + LiCl<sub>2</sub>.

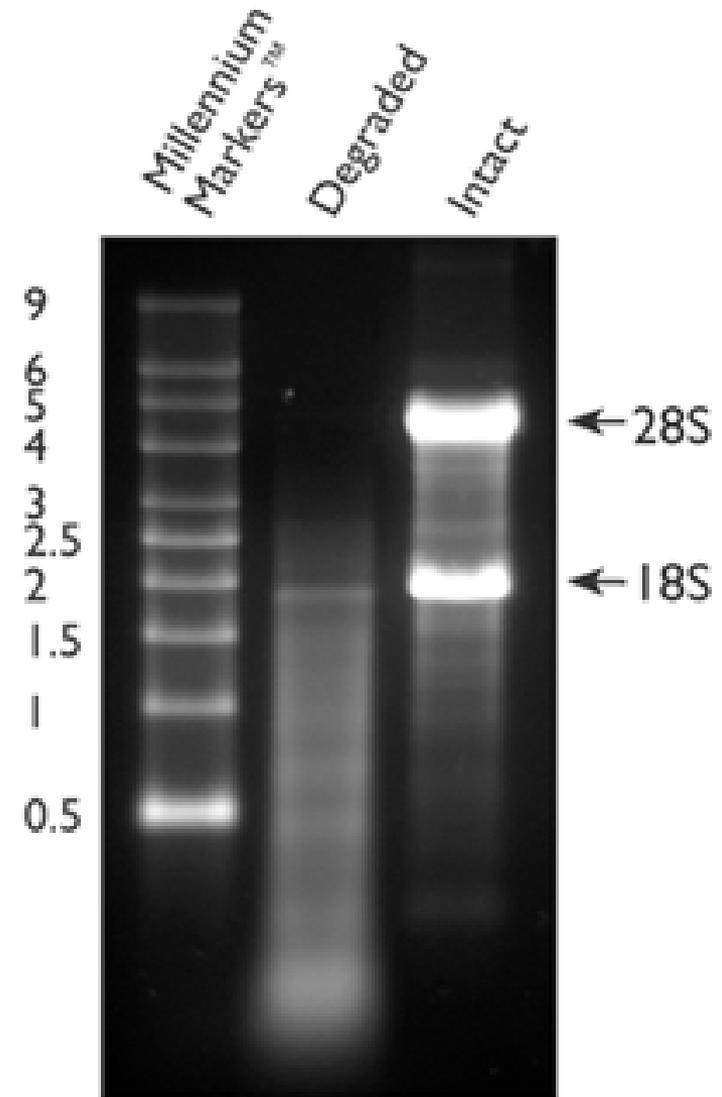
# Electroforesis del RNA

- En geles de agarosa
- En condiciones desnaturizantes (formaldehído/formamida)



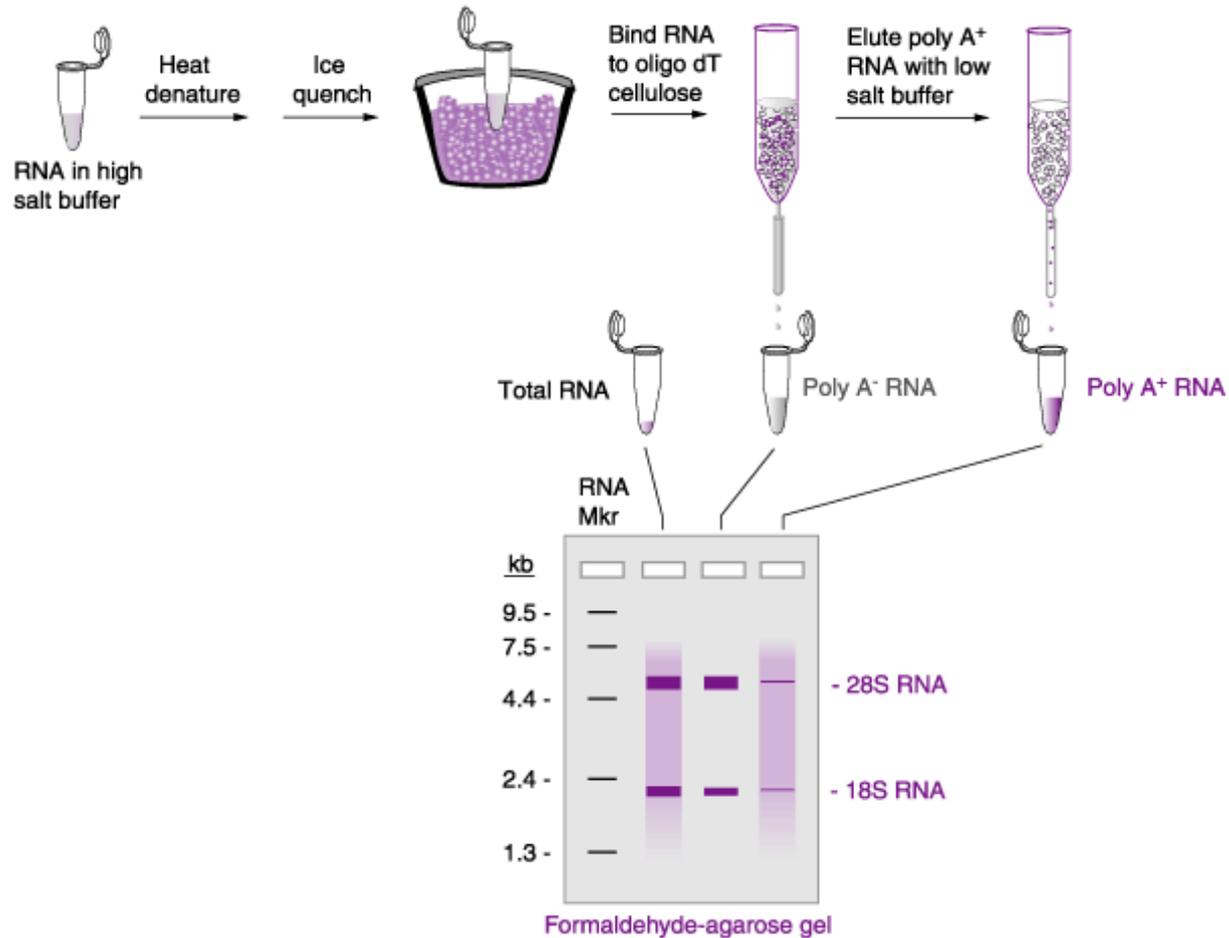
- El gel es teñido con bromuro de etidio y el RNA visualizado en un transiluminador UV.

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



# Purificación de mRNA

mRNA: 1 a 5% del RNAtotal

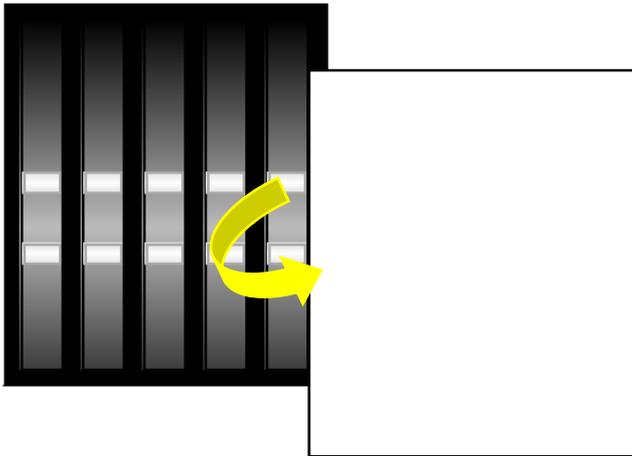


# NORTHERN BLOT

## 1. Extracción del RNA



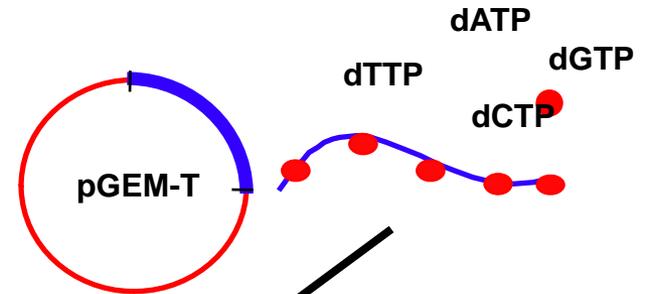
## 2. Electroforesis del RNA



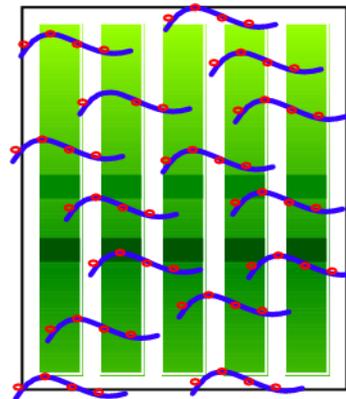
## 3. Transferencia a membrana



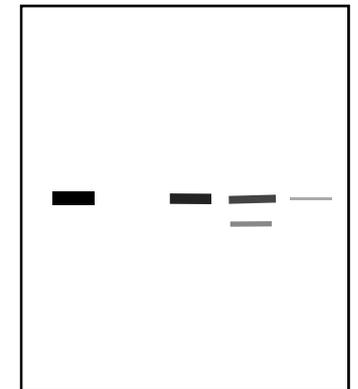
## 4. Generación de una sonda marcada



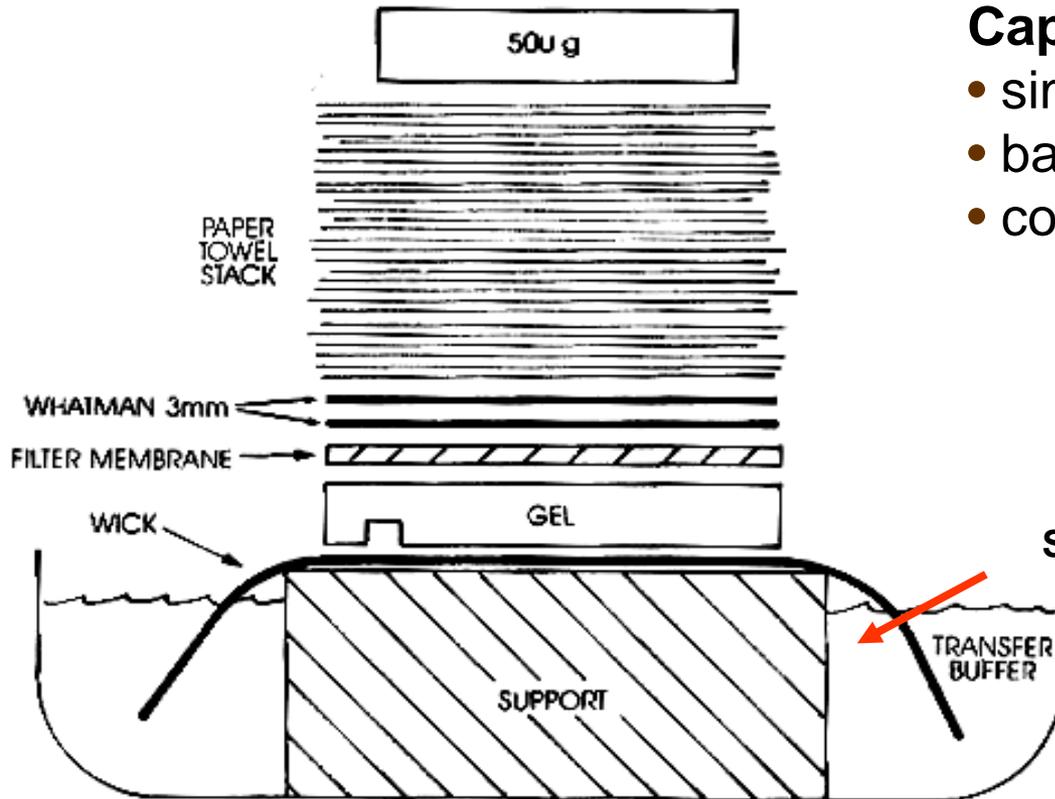
## 5. Hibridación



## 6. Visualización



# Transferencia a una membrana



## Capilaridad

- simple, bajo costo
- baja eficiencia
- consume tiempo

---

# Transferencia 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

# Transferencia 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

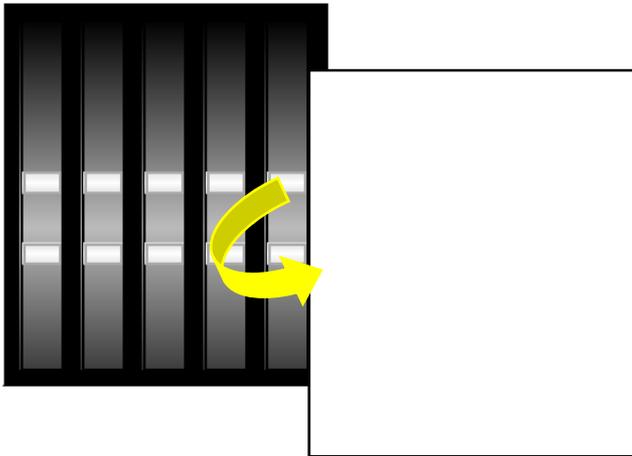
La exposición a la luz UV activa las bases T/U haciéndolas altamente reactivas con los grupos amino de la superficie de la membrana y formando enlaces covalentes. Aumenta la estabilidad y permanencia de los ácidos nucleicos en la membrana.

# NORTHERN BLOT

## 1. Extracción del RNA



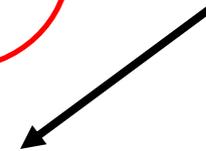
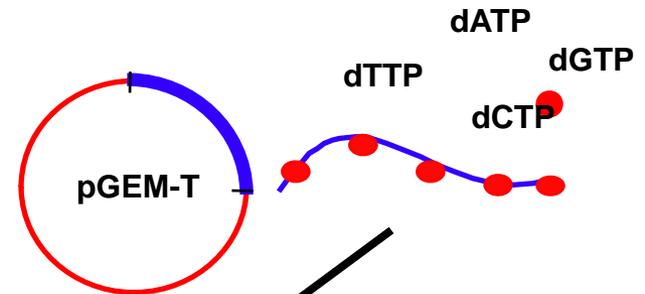
## 2. Electroforesis del RNA



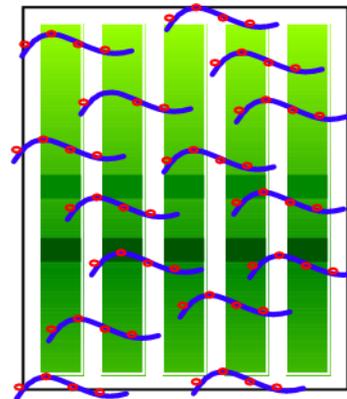
## 3. Transferencia a membrana



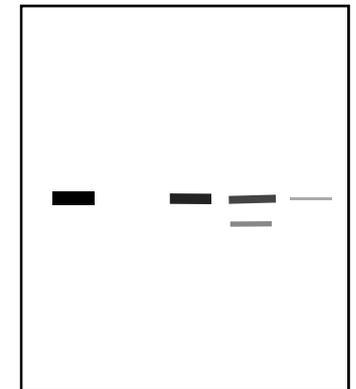
## 4. Generación de una sonda marcada



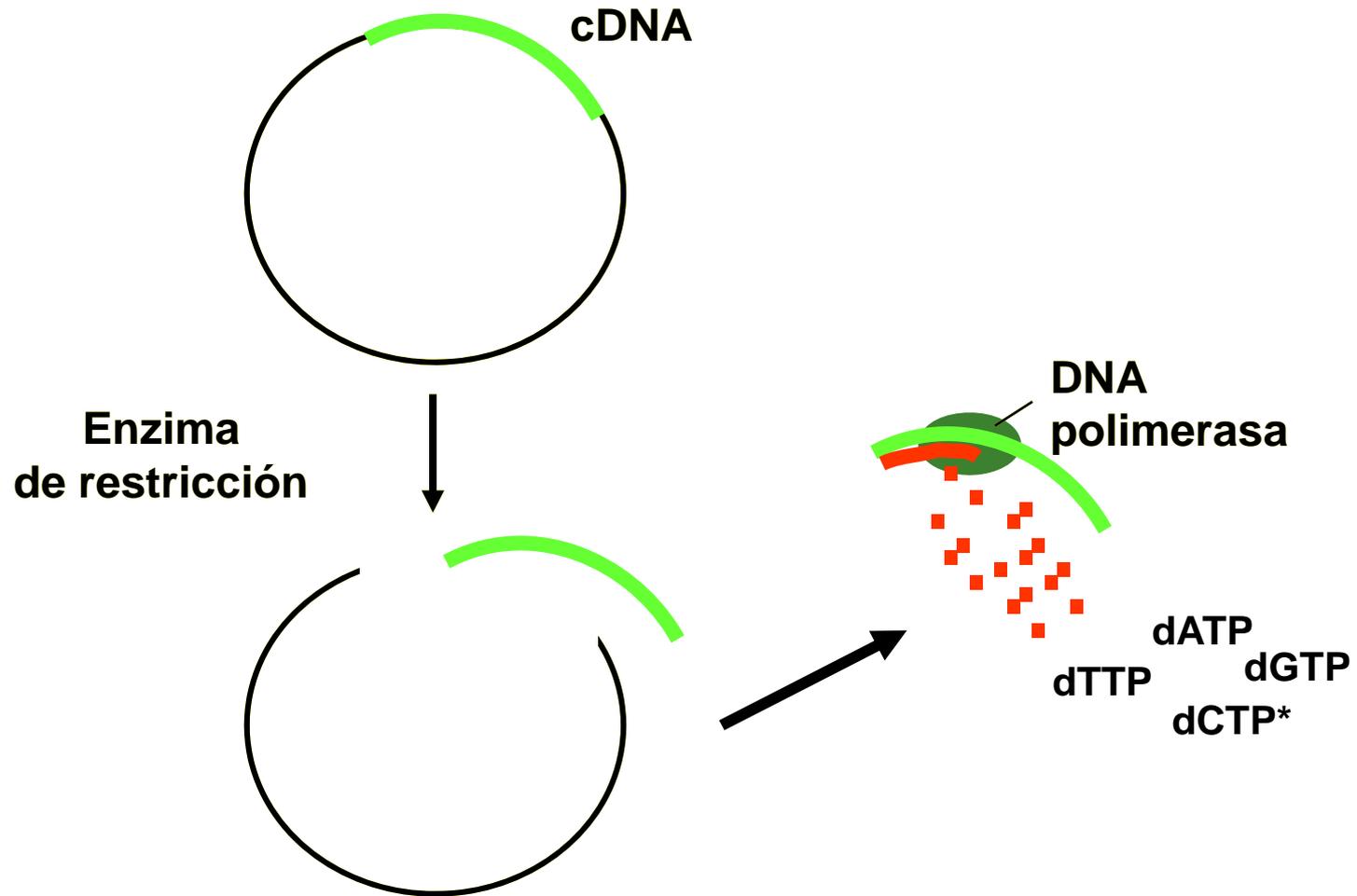
## 5. Hibridación



## 6. Visualización



# Generación de la sonda marcada



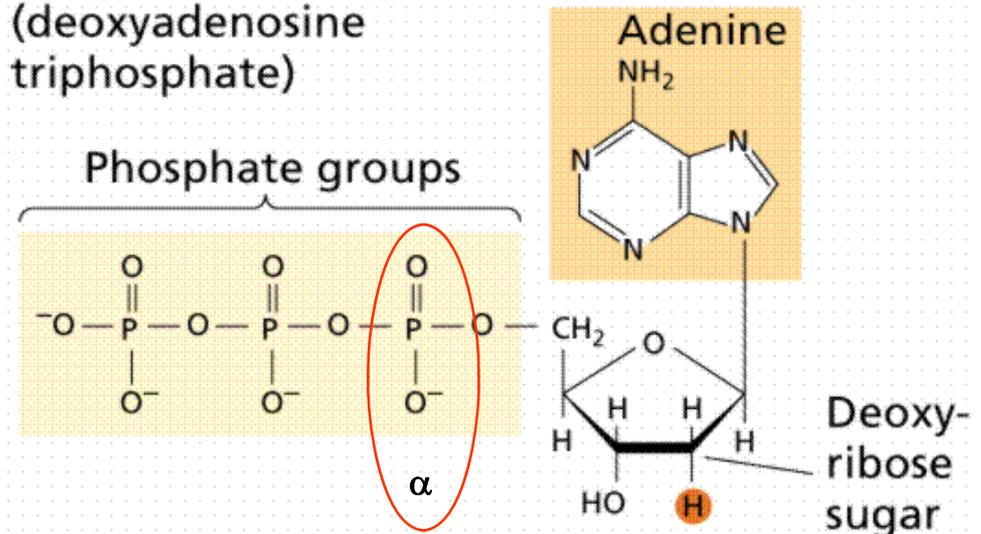
# Generación de la sonda marcada

## TIPOS DE MARCA

### 1. Radioactiva:

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

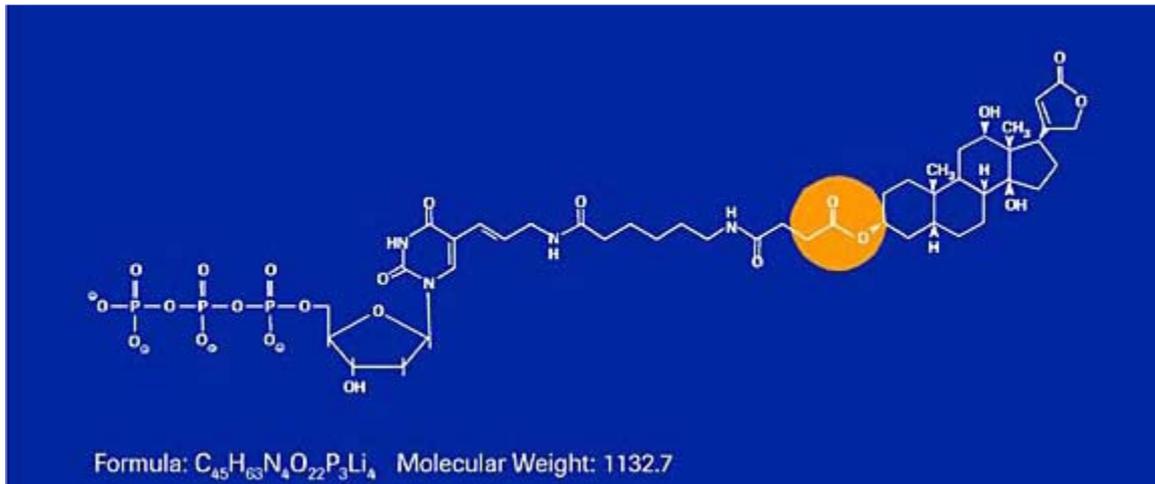
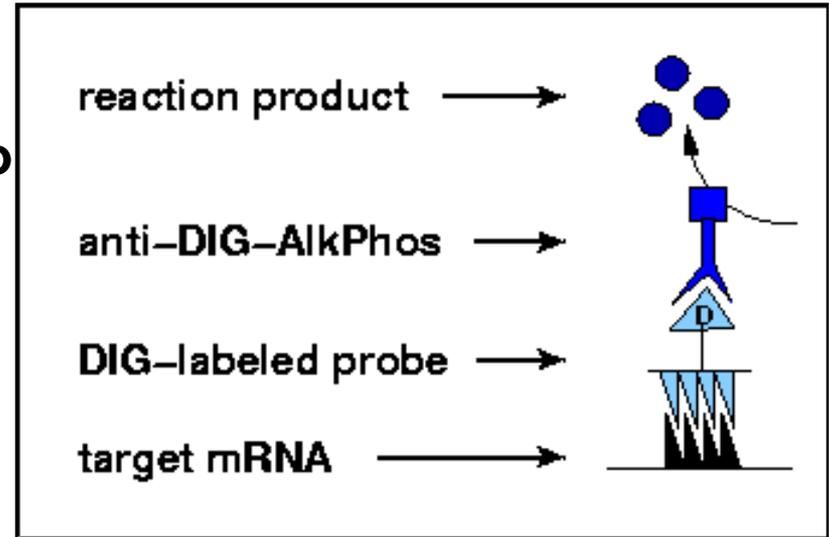
Deoxy-ATP  
(deoxyadenosine  
triphosphate)



# Generación de la sonda marcada

## 2. No radioactiva:

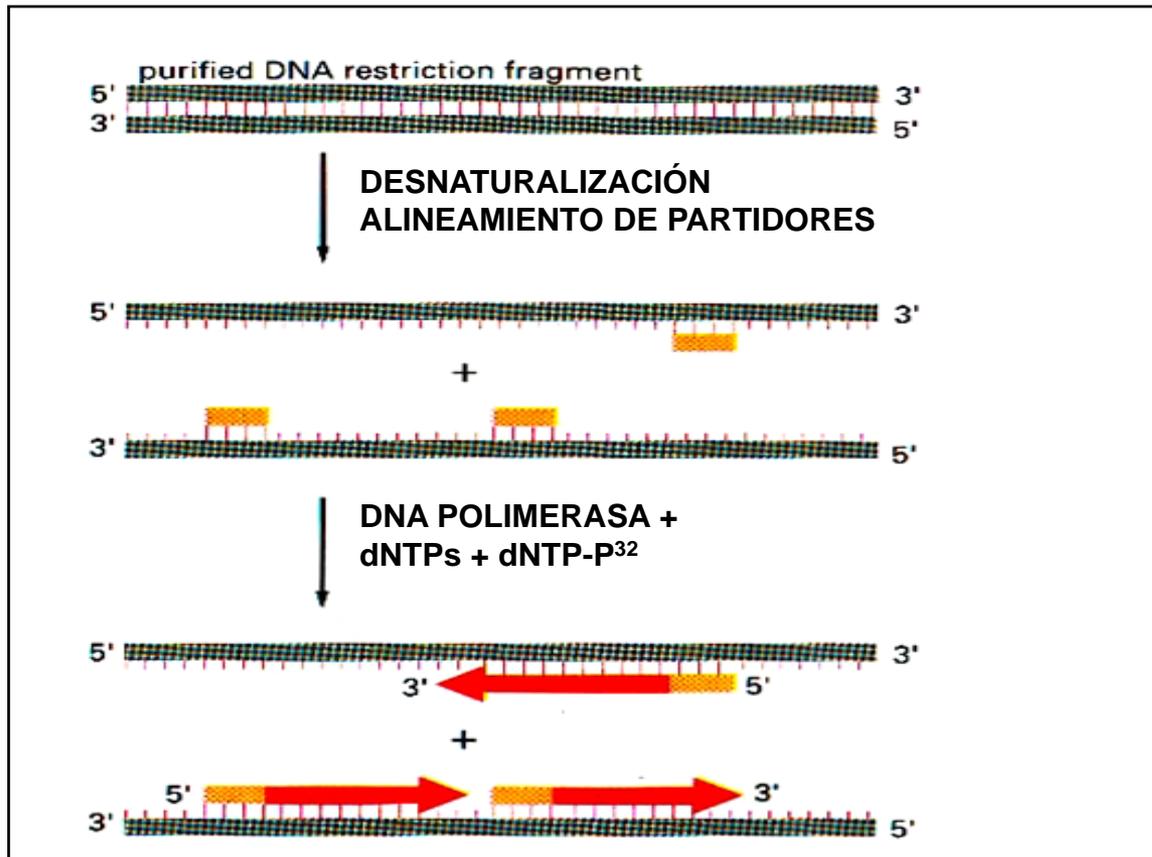
- dNTPs marcados con biotina o digoxigenina
- menor sensibilidad
- menor razón señal/ruido



# Generación de la sonda marcada

## Métodos de síntesis de una sonda marcada

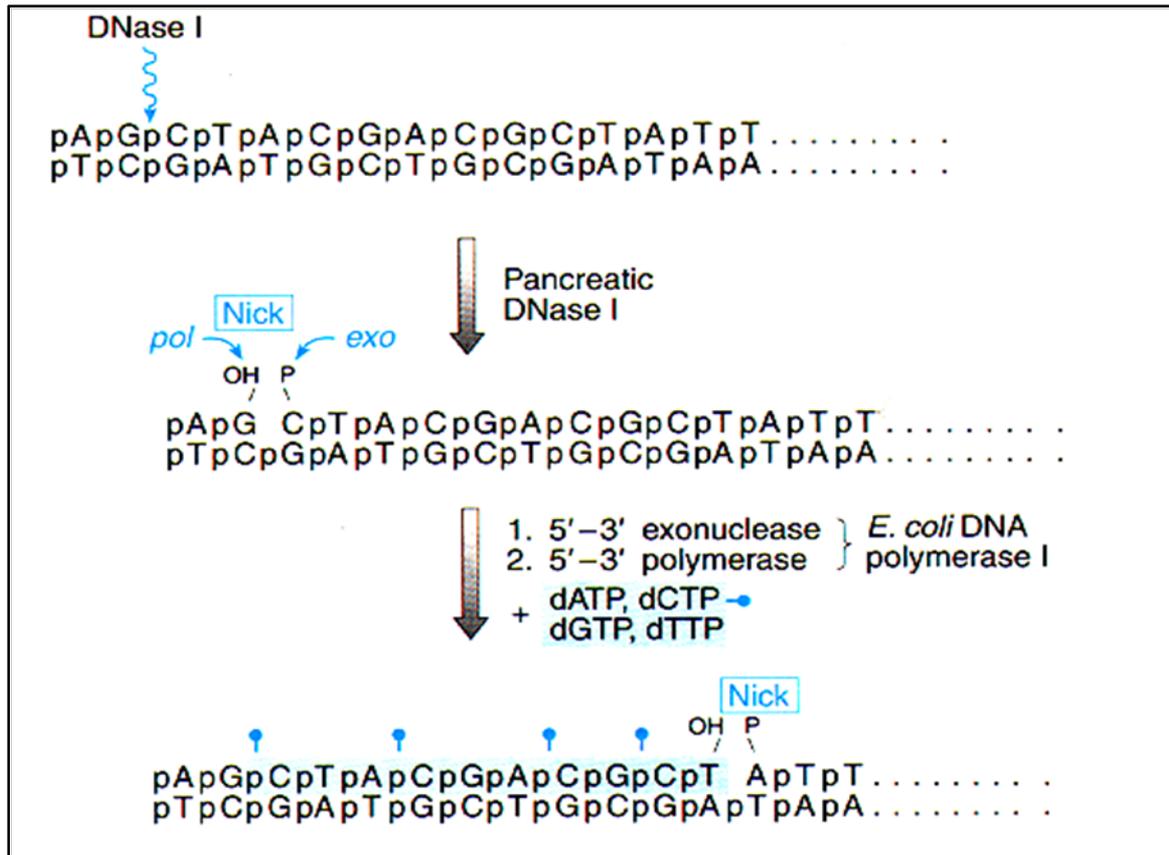
### ❖ *Random priming*



# Generación de la 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

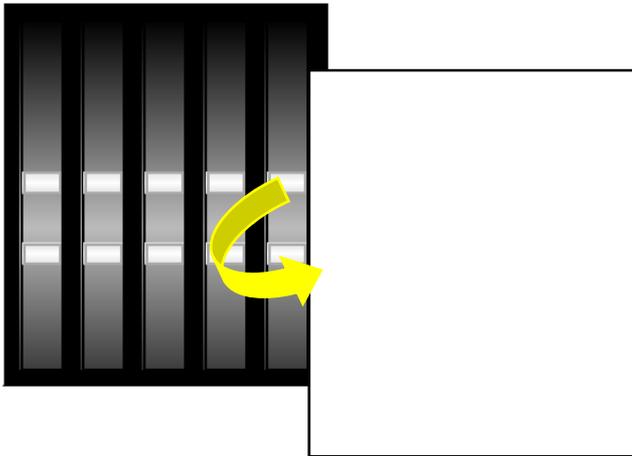
Key:  
• Labeled nucleotide

# NORTHERN BLOT

## 1. Extracción del RNA



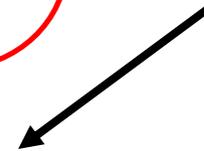
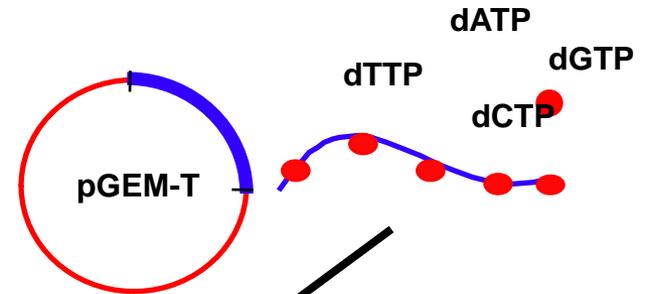
## 2. Electroforesis del RNA



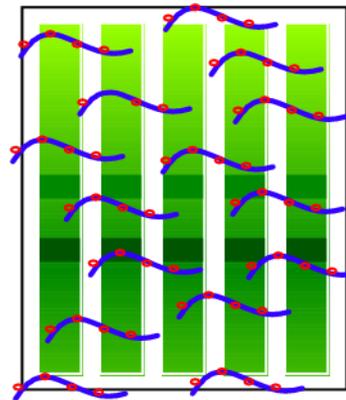
## 3. Transferencia a membrana



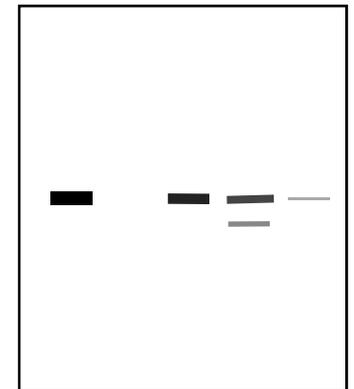
## 4. Generación de una sonda marcada



## 5. Hibridación



## 6. Visualización



---

# Hibridación

## ETAPAS

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

# 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 a la membrana y previenen la unión inespecífica de la sonda.

# 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 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  $T_m$

# Lavados

- ¿Por qué?
  - Para remover la sonda que está:
    - En exceso
    - Unida de manera inespecífica
    - Unida, pero es poco complementaria

## ¿Cómo?

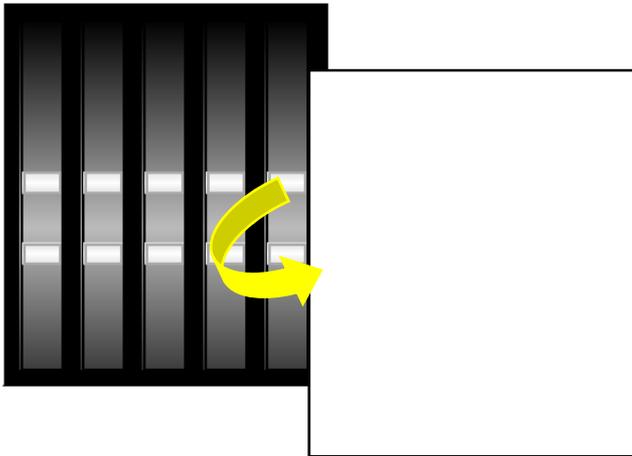
- Incubando la membrana en una solución que carece de sonda marcada
- Utilizando condiciones que minimizan la hibridación inespecífica.
  - Estrictez

# NORTHERN BLOT

## 1. Extracción del RNA



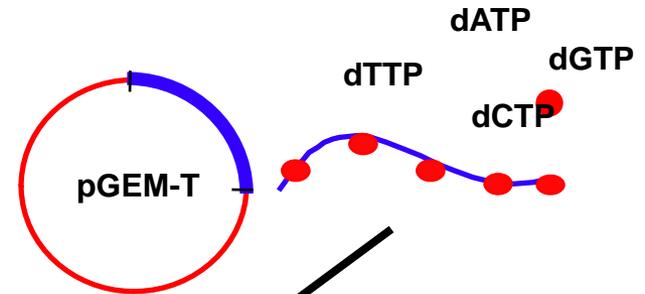
## 2. Electroforesis del RNA



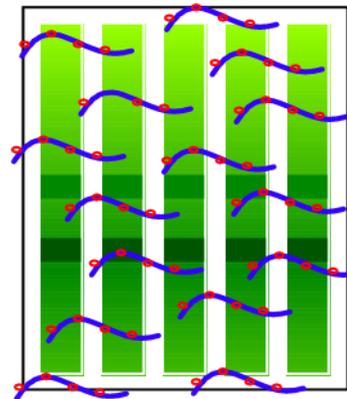
## 3. Transferencia a membrana



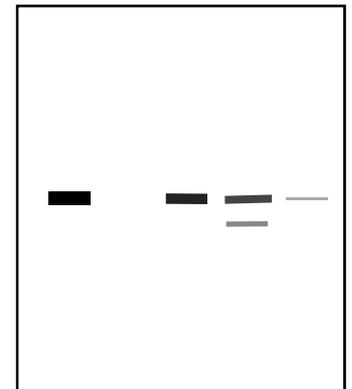
## 4. Generación de una sonda marcada



## 5. Hibridación

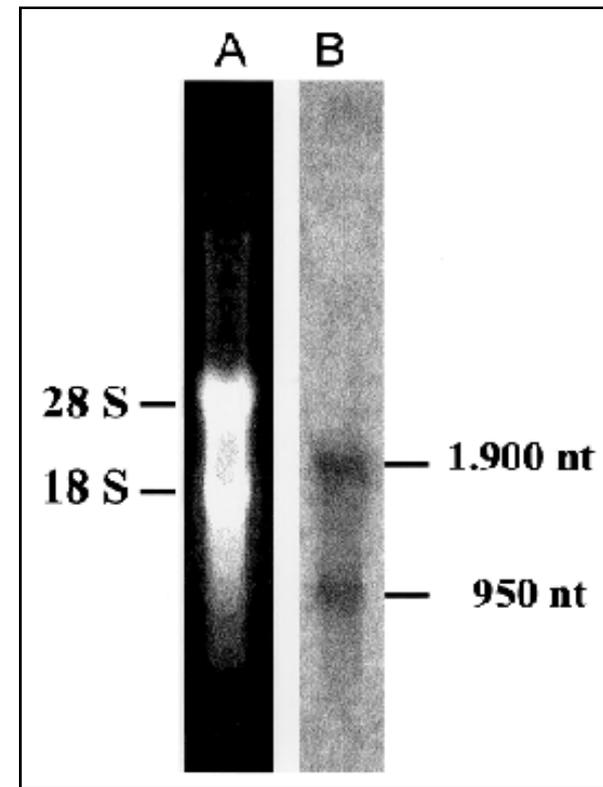
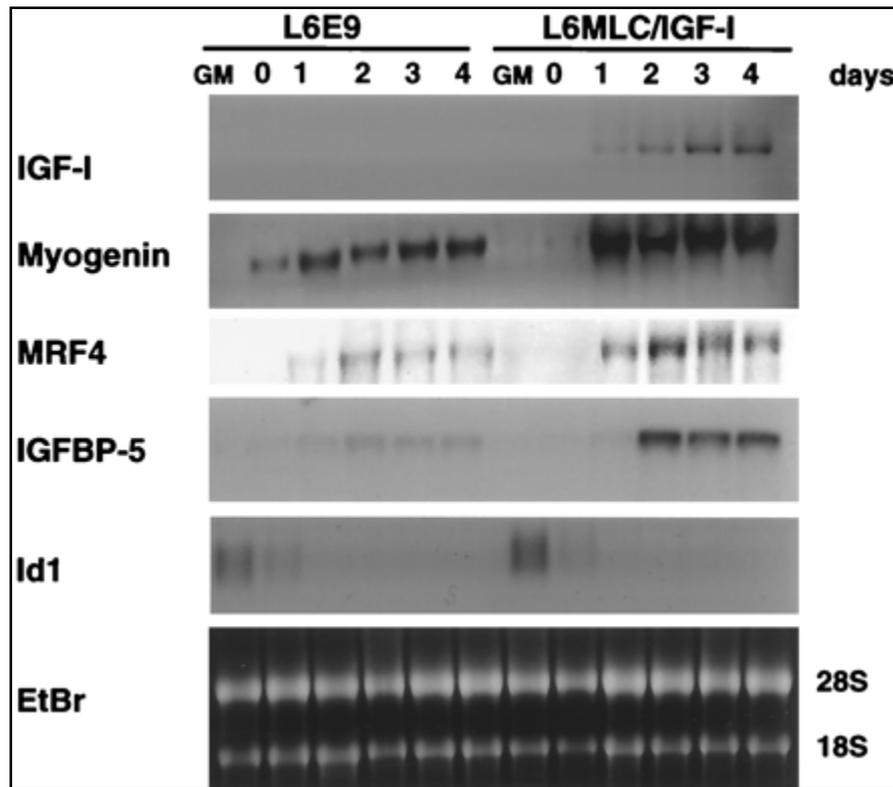


## 6. Visualización



# 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

