

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.**

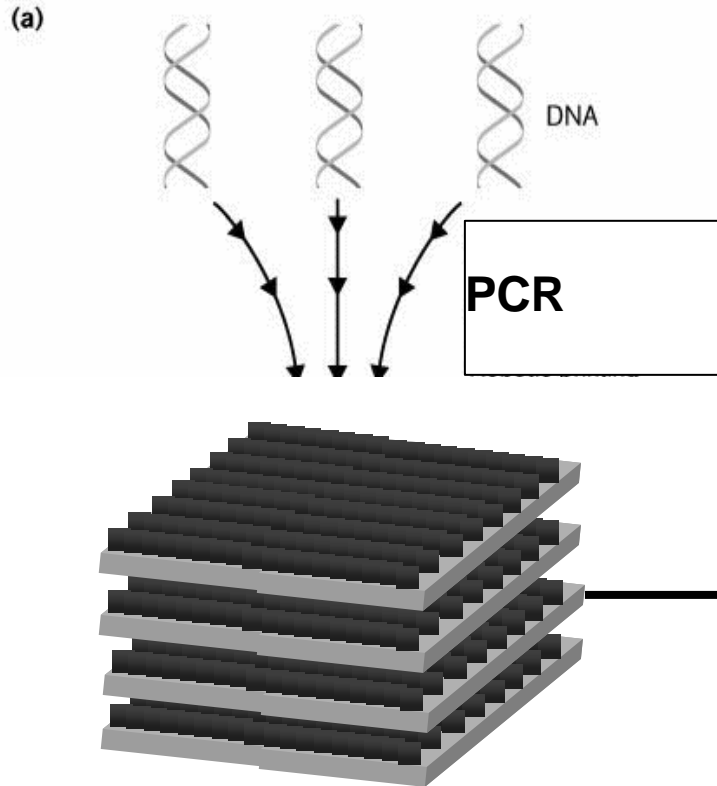
Hibridación en microarrays

En un experimento tipo:

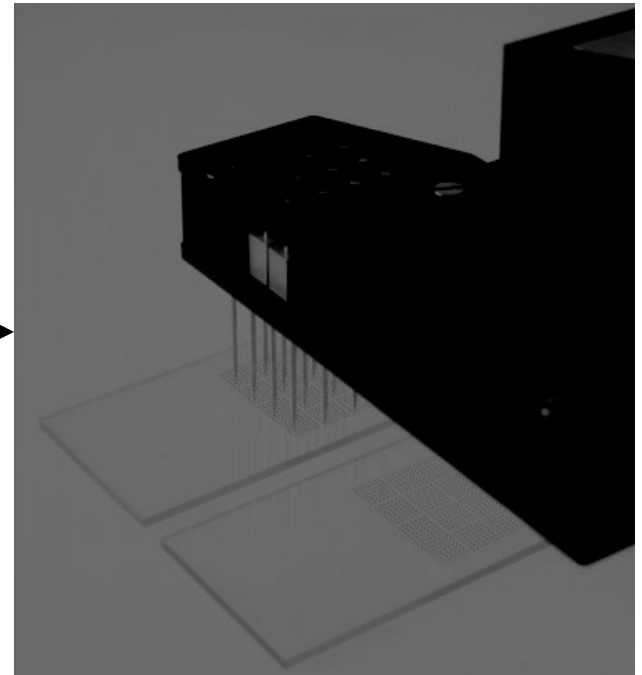
1. Generar sondas (fragmentos de PCR).
2. Depositarlas en un soporte sólido (vidrio o membrana de nylon).
3. Aislar RNA (total o mRNA) a partir de una muestra biológica.
4. Convertir el RNA en cDNA utilizando una transcriptasa reversa.
5. Marcar el cDNA con nucleótidos radioactivos o fluorescentes
6. 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.

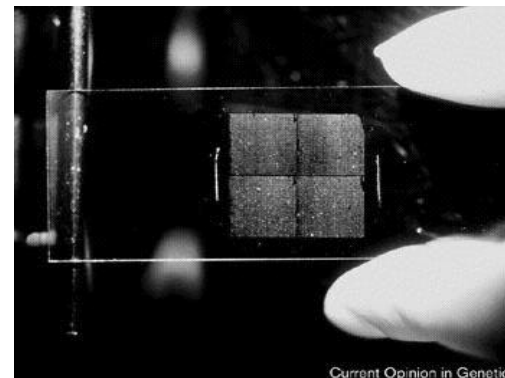
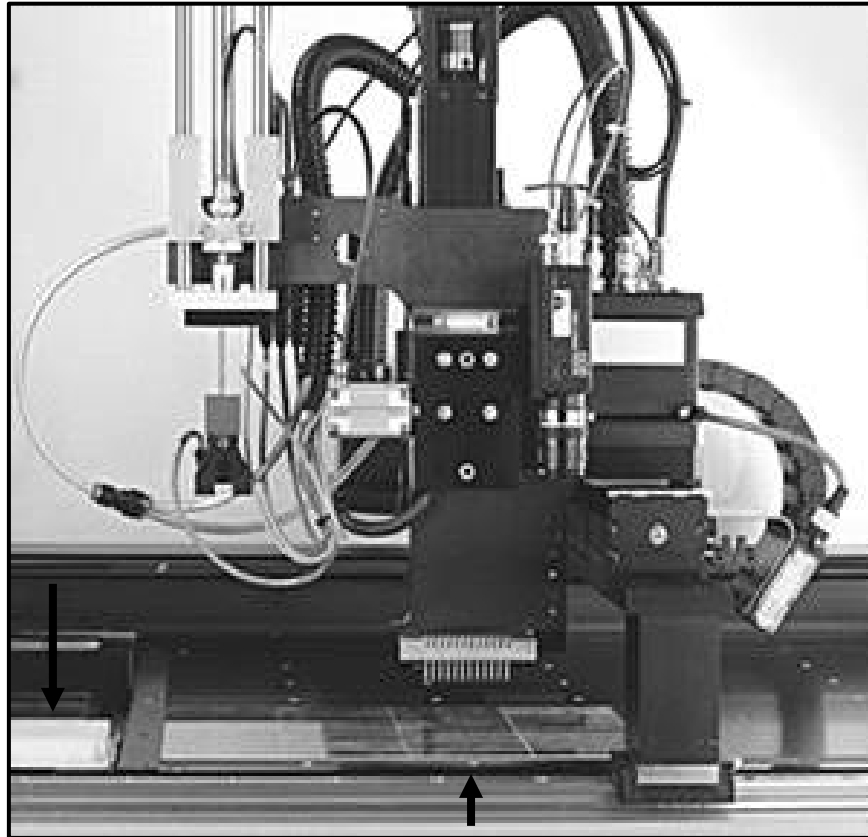


Colección de productos de PCR en placas de 96 pocillos

Confección de arrays

MICROARRAYS

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



Confección de arrays

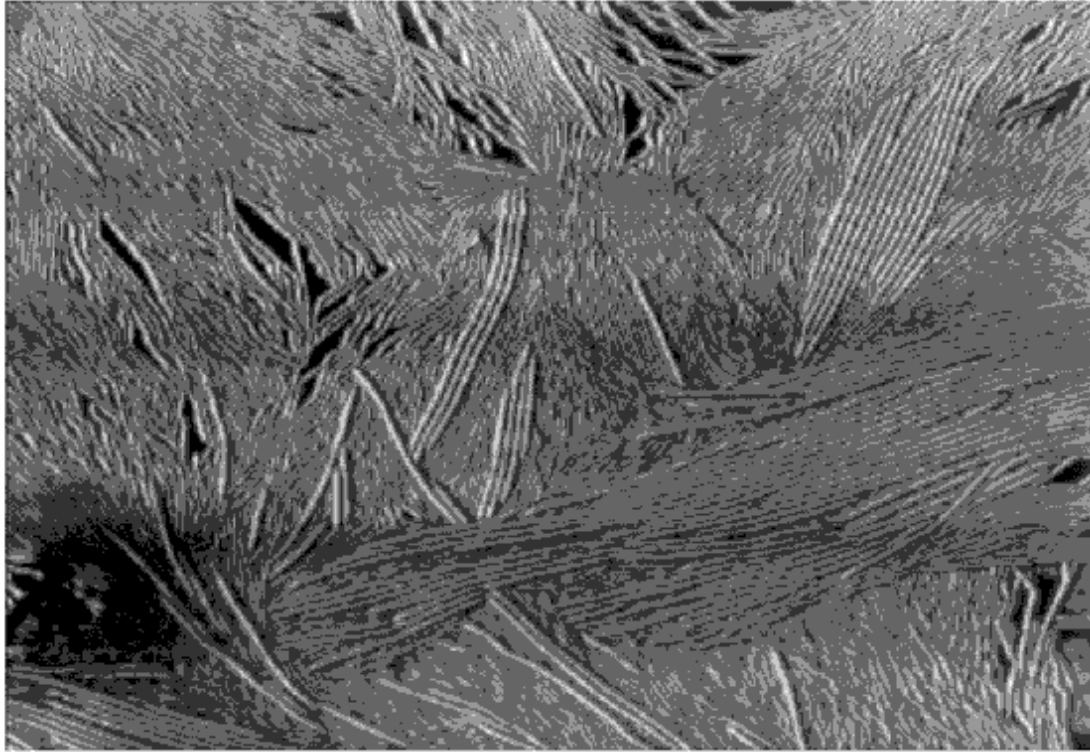
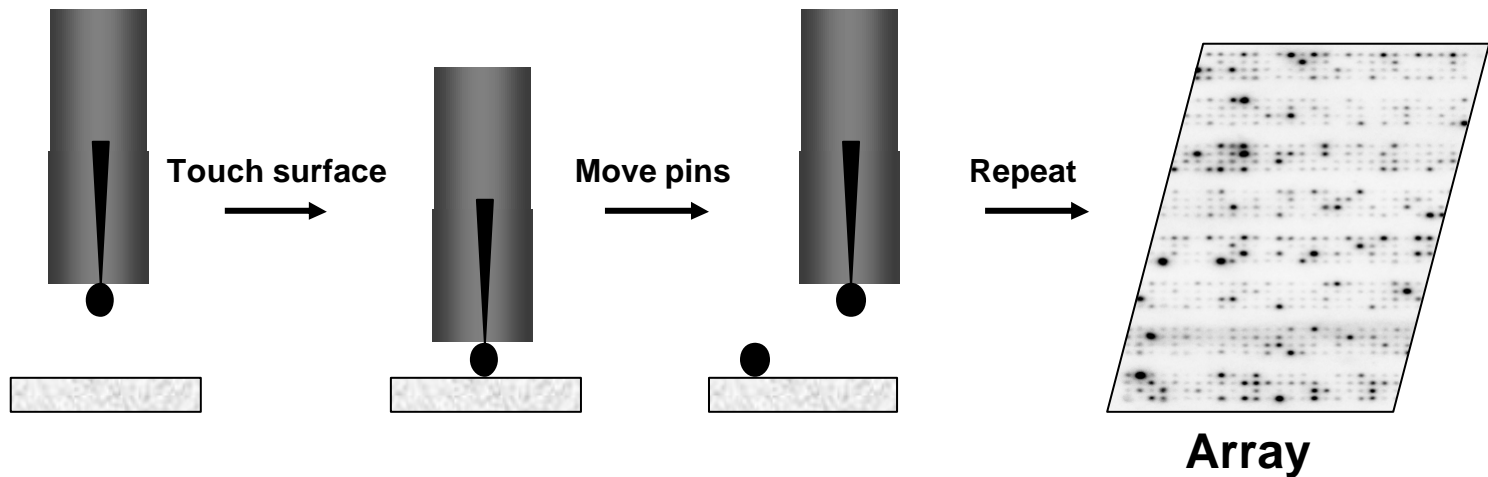


Figure 3: Atomic force microscopy of DNA on a microarray. This is a micrograph of a portion of a hybridization probe from a yeast microarray, taken after the array was subjected to hybridization. The DNA is clearly deposited at a sufficient density to allow many kinds of strand-to-strand interactions.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

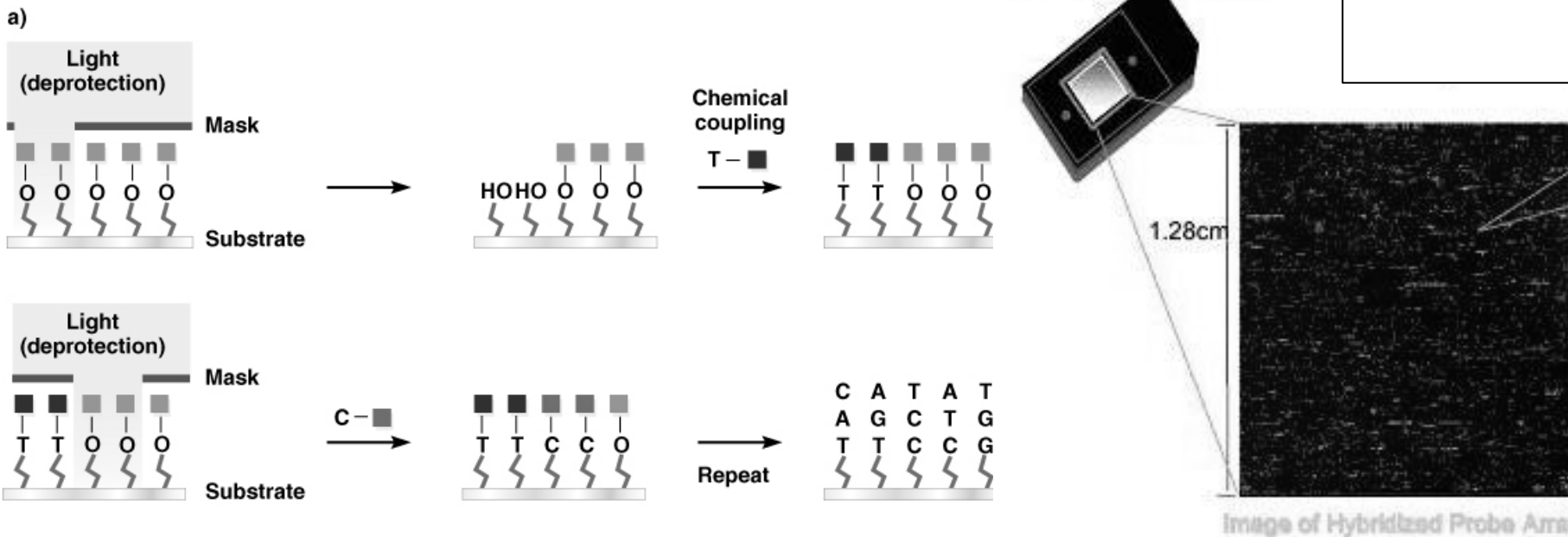
Tipos de arrays



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:

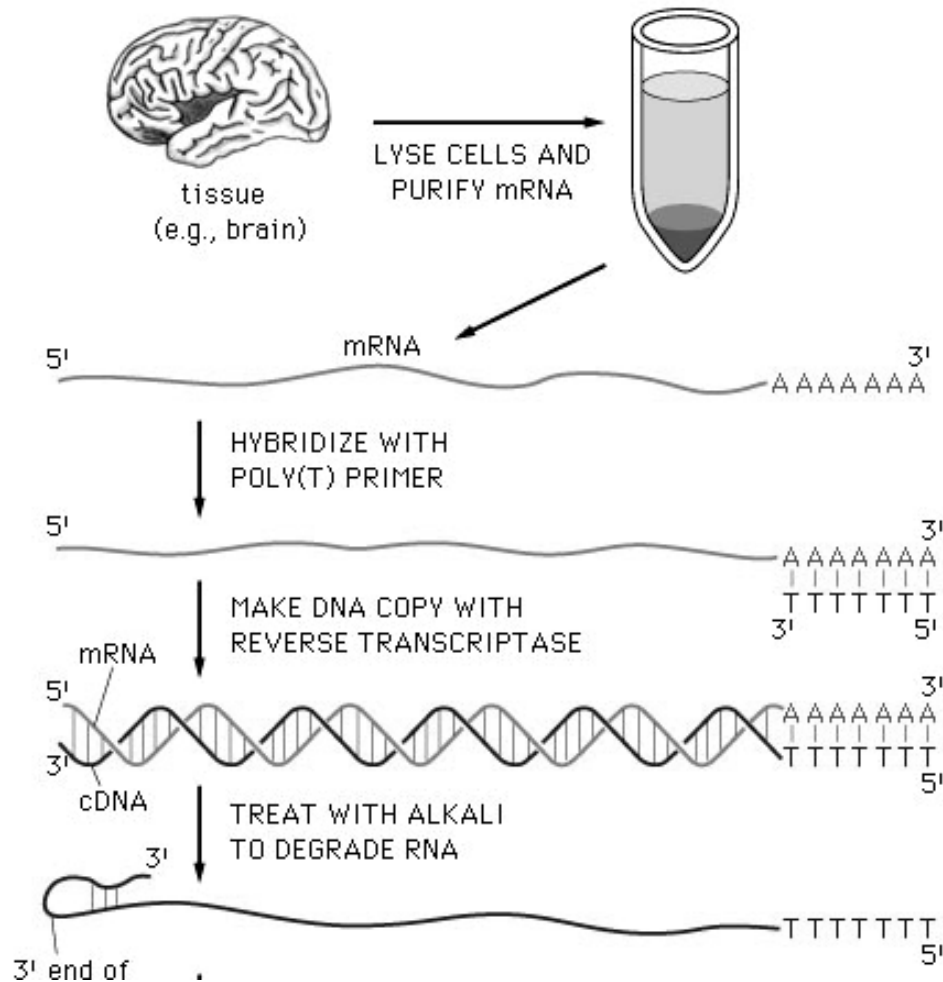
- Oligonucleotidos (25 pb) son sintetizados sobre una matriz de vidrio o plástico.
- >500.000 secuencias inmovilizadas (10^7 copias/punto de siembra).
- La muestra a hibridar es marcada con derivados fluorescentes.

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



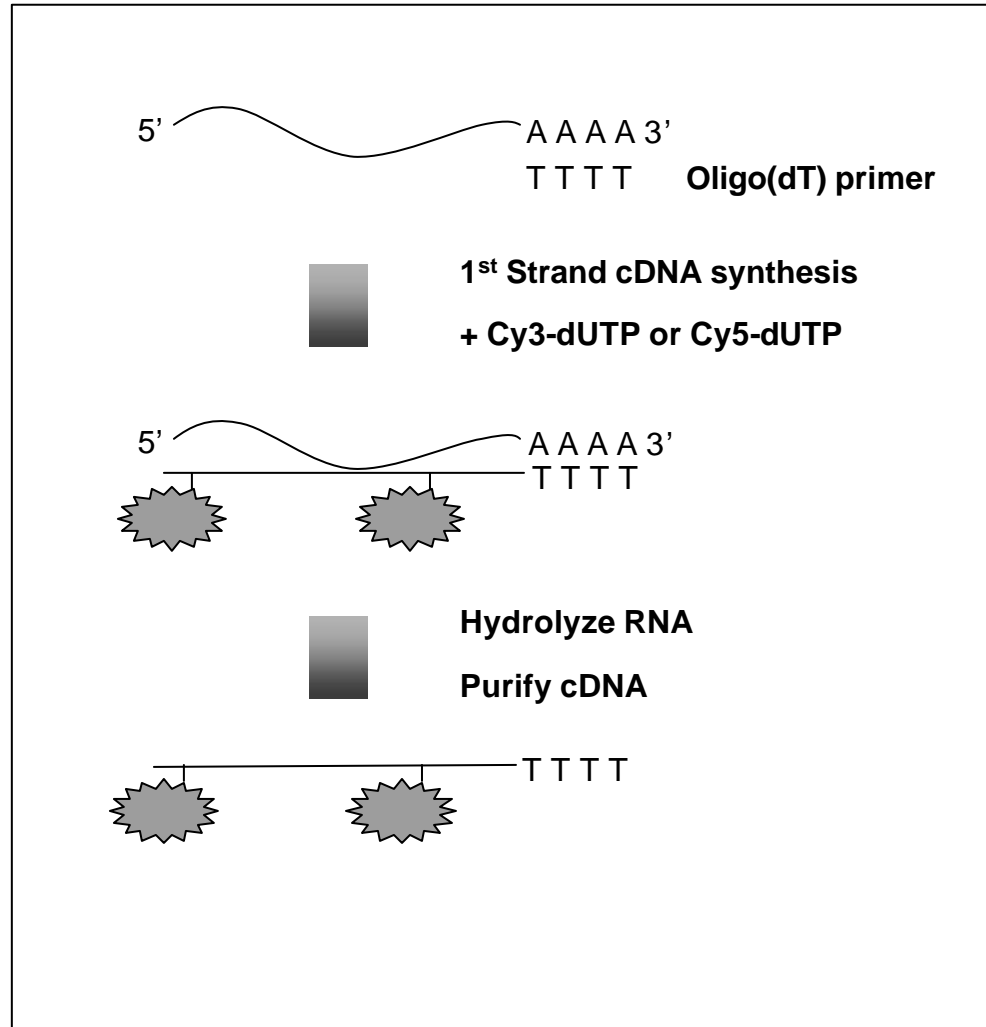
Purificación de RNA

Hibridación con poly(dT)

Copia del DNA con RT

Degradación del RNA

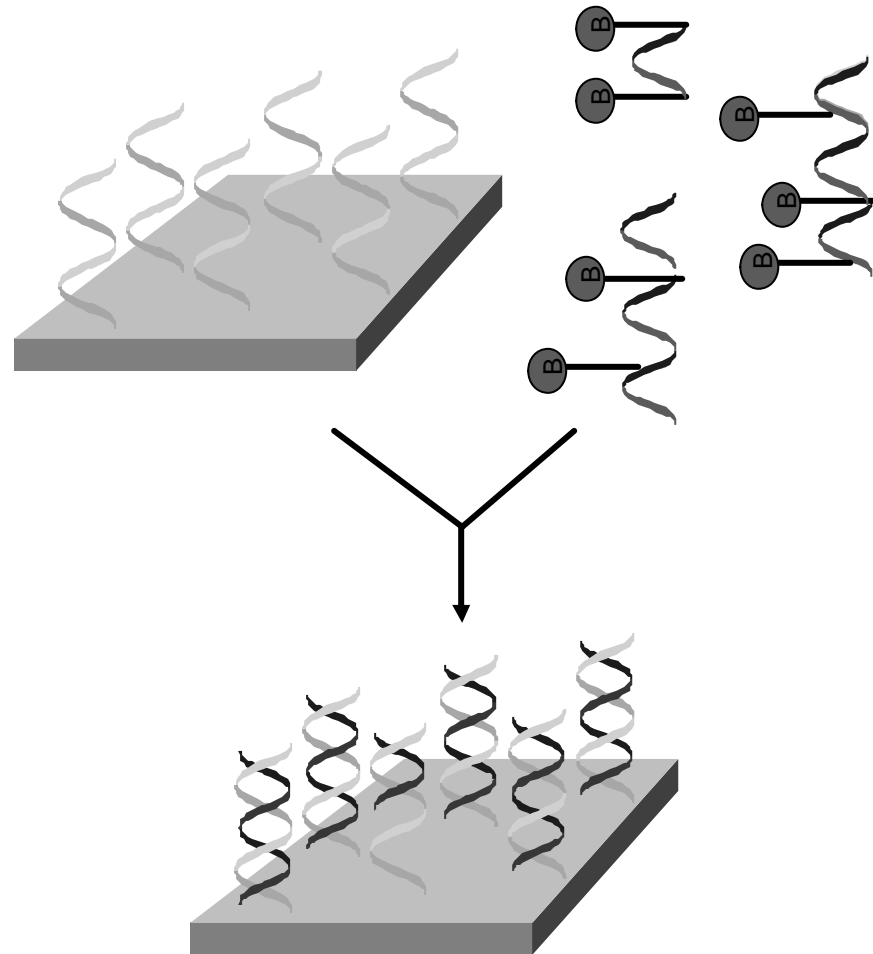
Síntesis de cDNA marcado



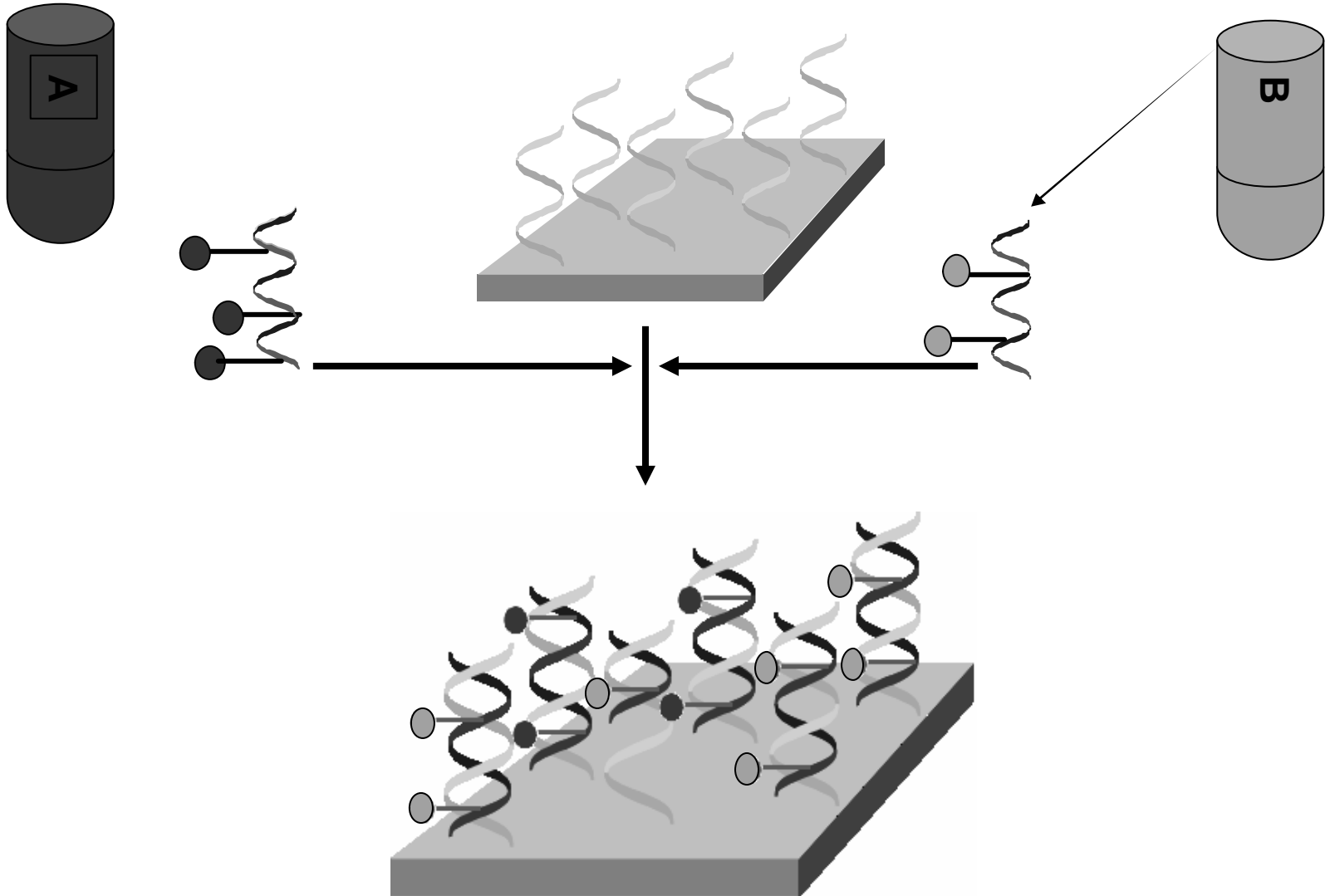
Hibridación en microarrays

El cDNA marcado se une de manera selectiva a su sonda complementaria (*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 nucleotidos 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



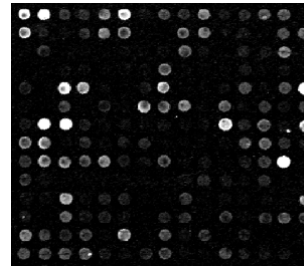
Scanner

Cy3: 532nm

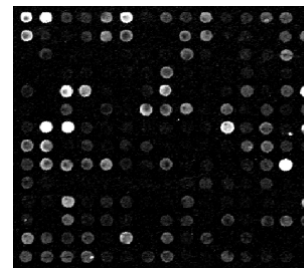
Excitación

Cy5: 635nm

Cy3: 550 - 600nm



Emisión



Cy5: 655 - 695nm

Meta Row	Meta Column	Row	Column	Gene ID	Flag	Signal Mean	Background Mean	Signal Stdev	Background Stdev
1	1	1	1	1-H3126A06-3	0	8847.91034	280.59434	2786.53066	84.2104504
2	1	1	1	2-H3126A06-3	0	10984.98962	277.92945	1261.70243	78.4029272
3	1	1	1	3-H3126C06-3	0	533.124138	275.834999	124.240751	63.8678668
4	1	1	1	4-H3126C06-3	0	895.613798	303.528302	126.477611	81.5341933
5	1	1	1	5-H3126C06-3	0	717.517241	295.769866	212.457398	72.0199817
6	1	1	1	6-H3126C06-3	0	707.846279	262.127358	143.311213	92.5203588
7	1	1	1	7-H3126C06-3	0	778.588105	261.259434	272.799042	73.5189002
8	1	1	1	8-H3126C06-3	2	305.652778	344.034884	84.0471362	654.939993
9	1	1	1	9-H3126A12-3	2	434.846279	268.174528	120.623743	91.8820811
10	1	1	1	10-H3126A12-3	2	784.665212	325.413783	1883.53007	503.469888
11	1	1	1	11-H3126C12-3	0	677.010363	264.773333	295.127653	100.579155
12	1	1	1	12-H3126C12-3	2	666.262069	1410.39891	418.133752	5977.15473
13	1	1	1	13-H3126E12-3	2	497.744828	267.127358	254.99376	183.589048
14	1	1	1	14-H3126E12-3	2	281.772414	260.613095	77.317772	69.3279753
15	1	1	1	15-H3126C12-3	0	512.029807	245.140704	128.064728	72.6175381
16	1	1	1	16-H3126C12-3	2	561.430052	321.182243	143.92725	643.613847

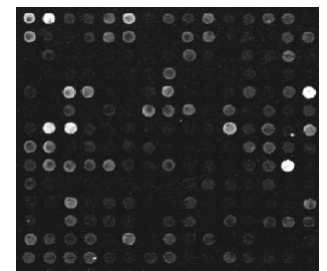
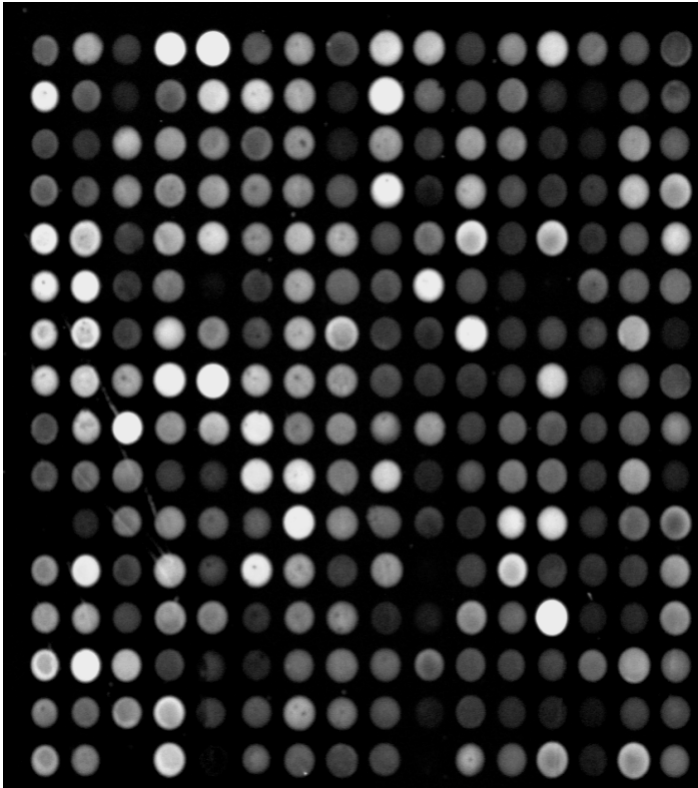


Imagen
sobrepuesta

Detección de fluorescencia

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



Ejemplo:

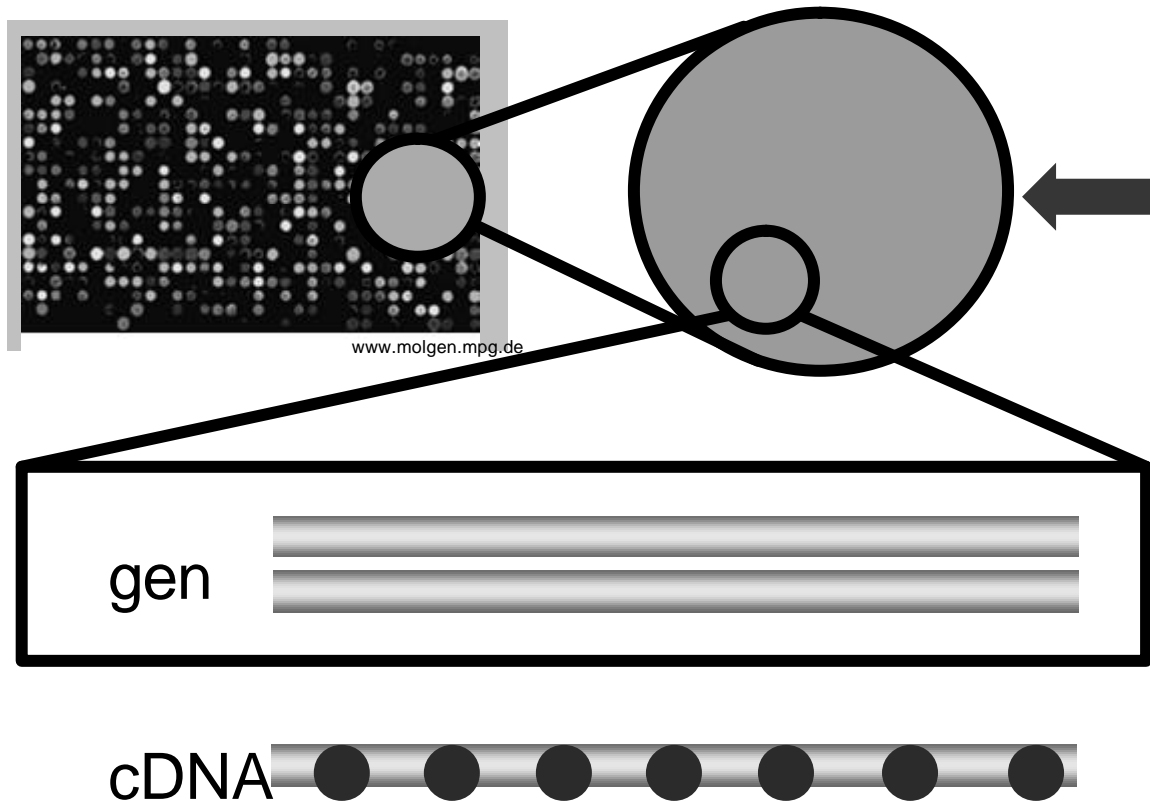
cDNA experimental: rojo Cy5

cDNA control: verde Cy3

Amarillo: **Experimental = Control**

Rojo: **Experimental > Control**

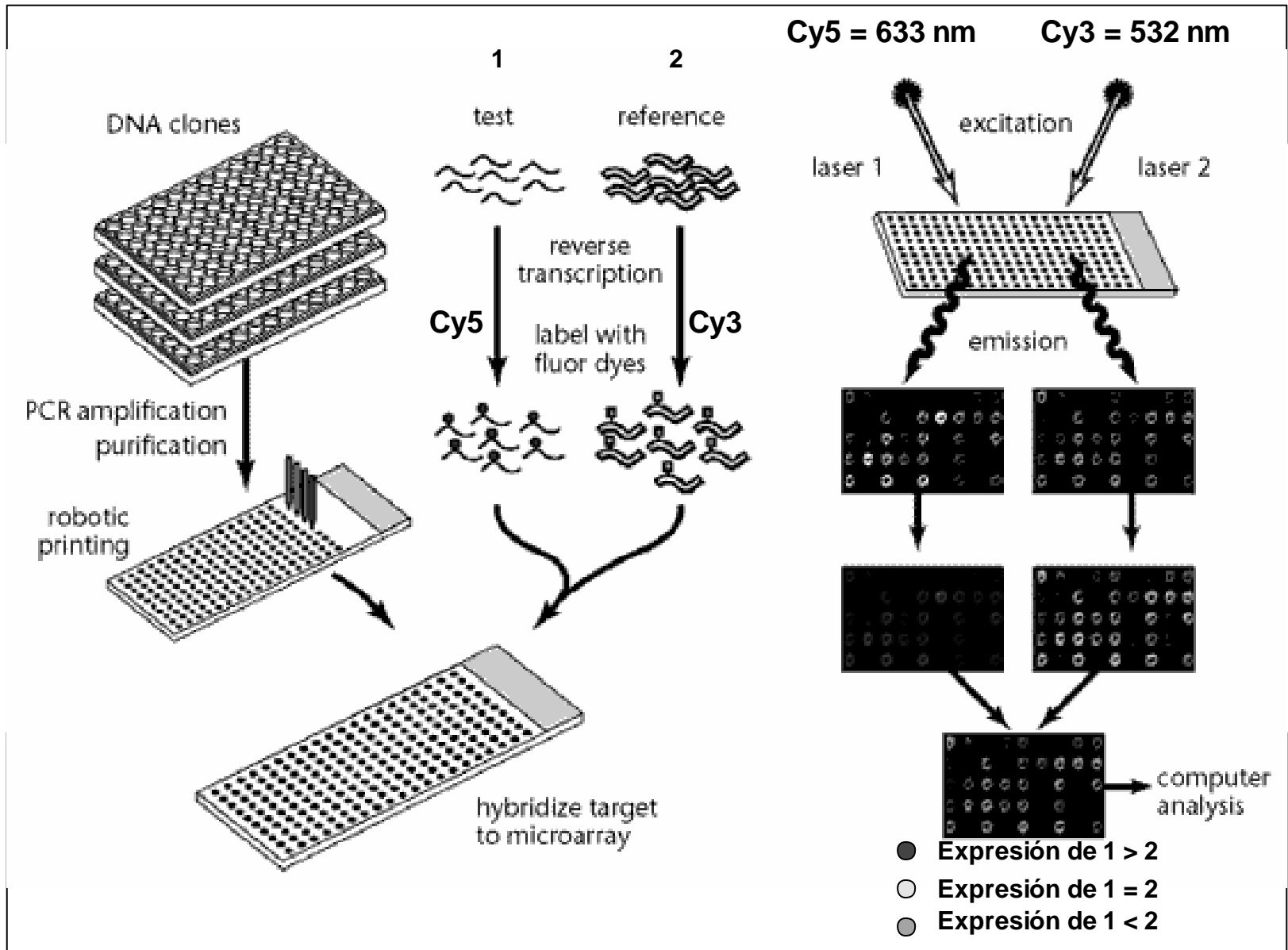
Verde: **Experimental > Control**



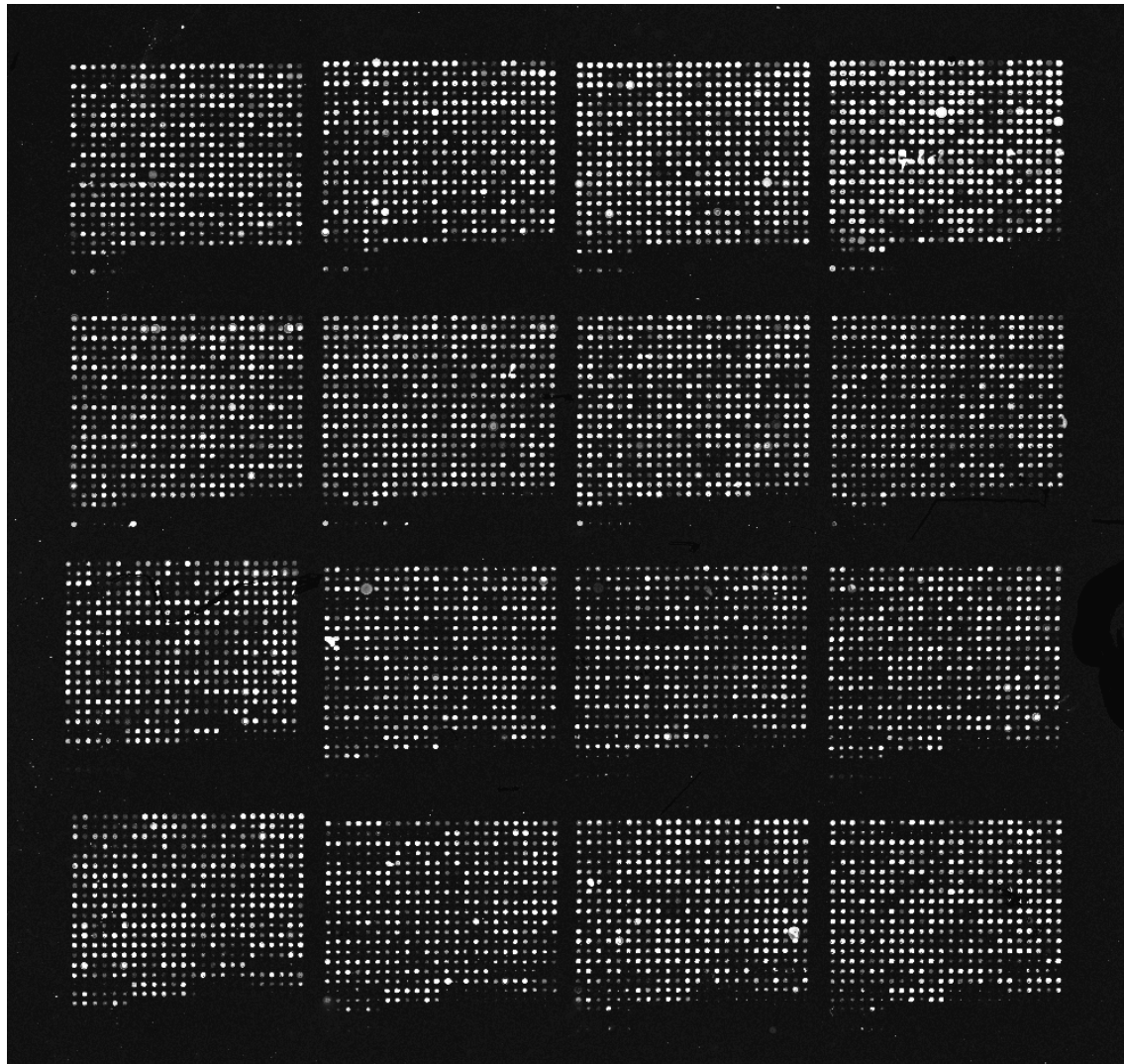
Cada *spot* representa un gen o un fragmento de un gen.

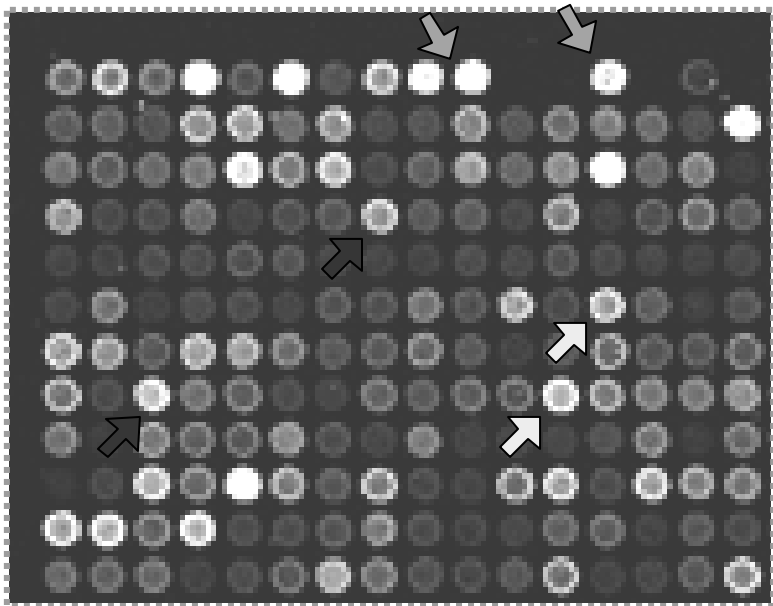
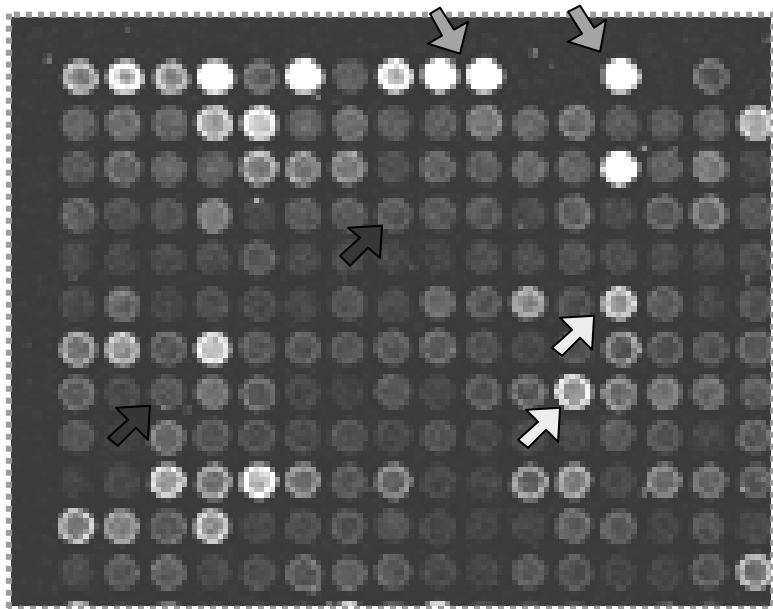
- La intensidad de la señal fluorescente es medida para cada spot en cada una de las longitudes de onda.
- La intensidad de la señal representa la cantidad de transcrito presente en la muestra original.
- La razón de las señales de hibridación Cy3/Cy5 representa el cambio relativo de expresión de un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

Hibridación en microarrays

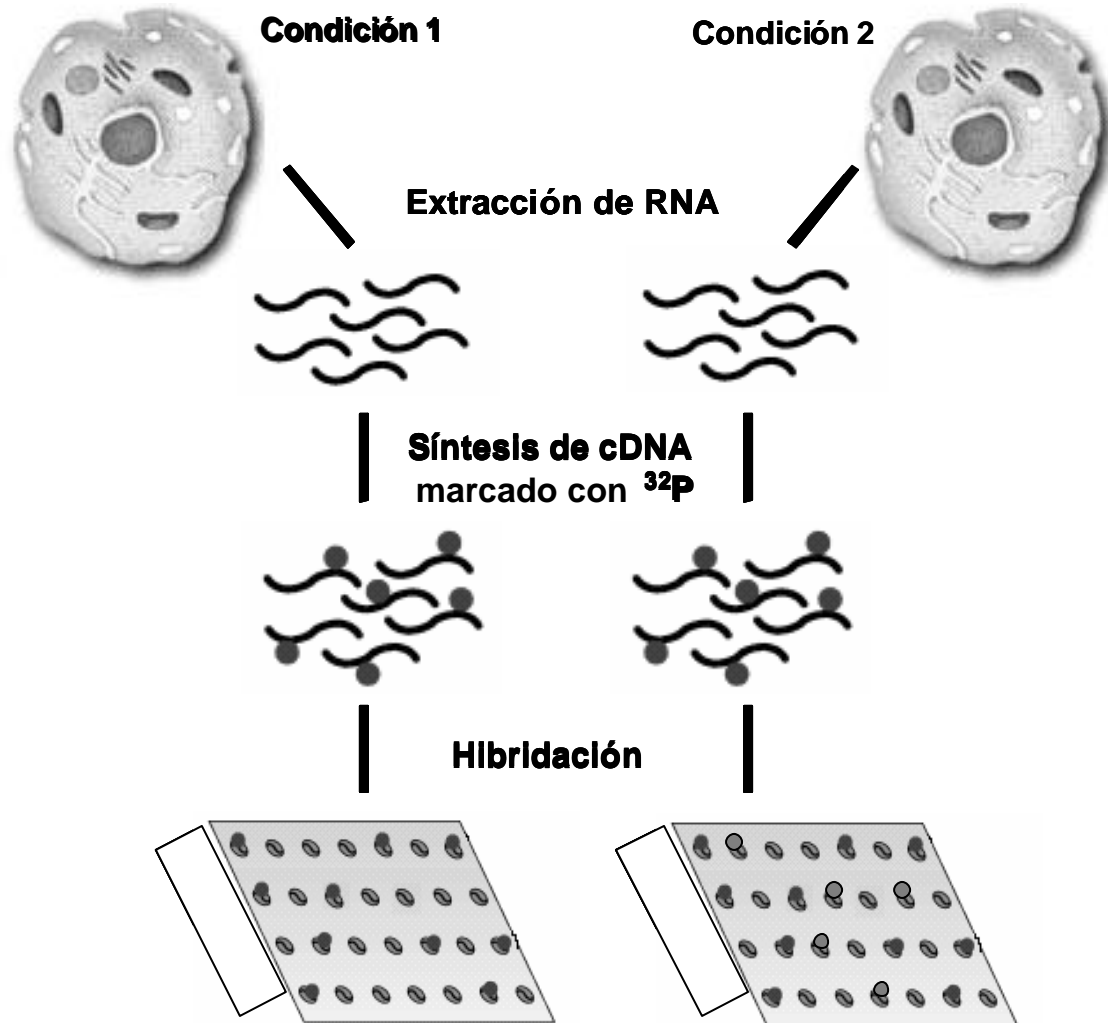


Microarray de levadura





Hibridación en macroarrays



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?

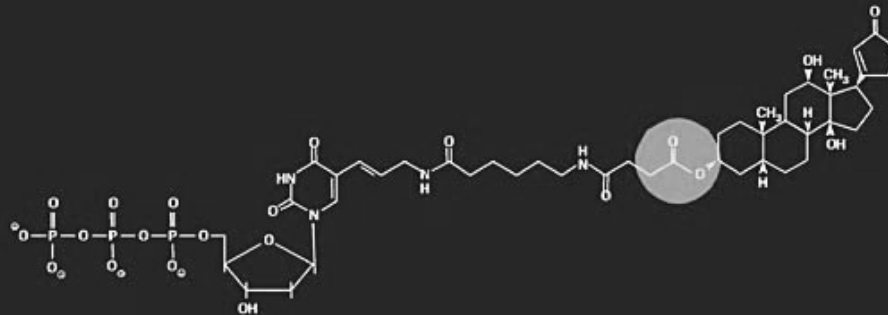


UTP-Fluoroforo



UTP-Digoxigenina

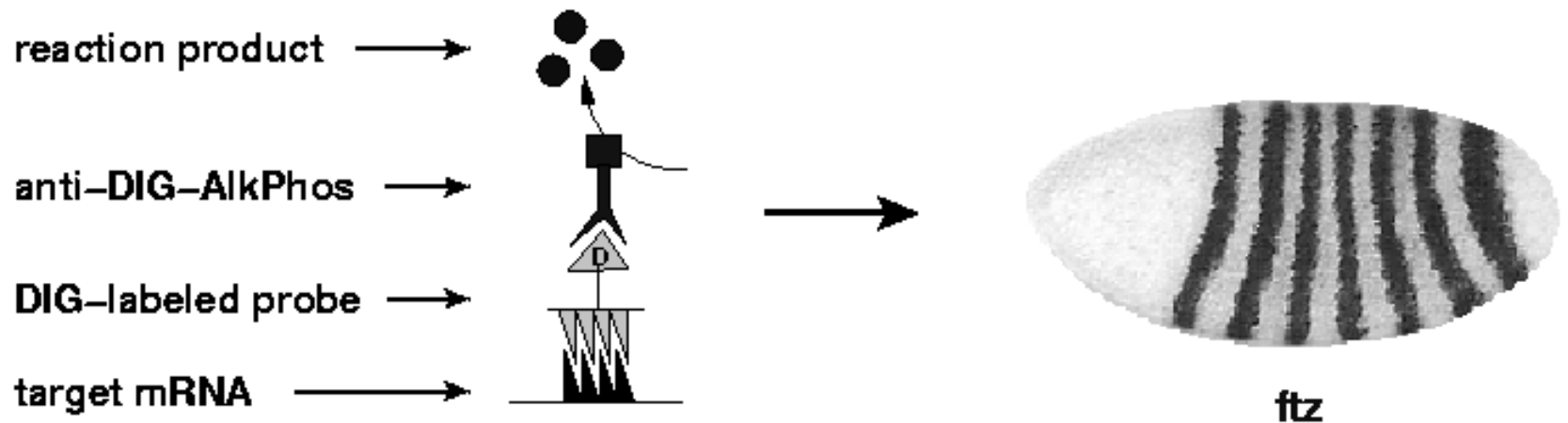
Structure of DIG-dUTP Coupled via Alkali-Labile Ester Bond



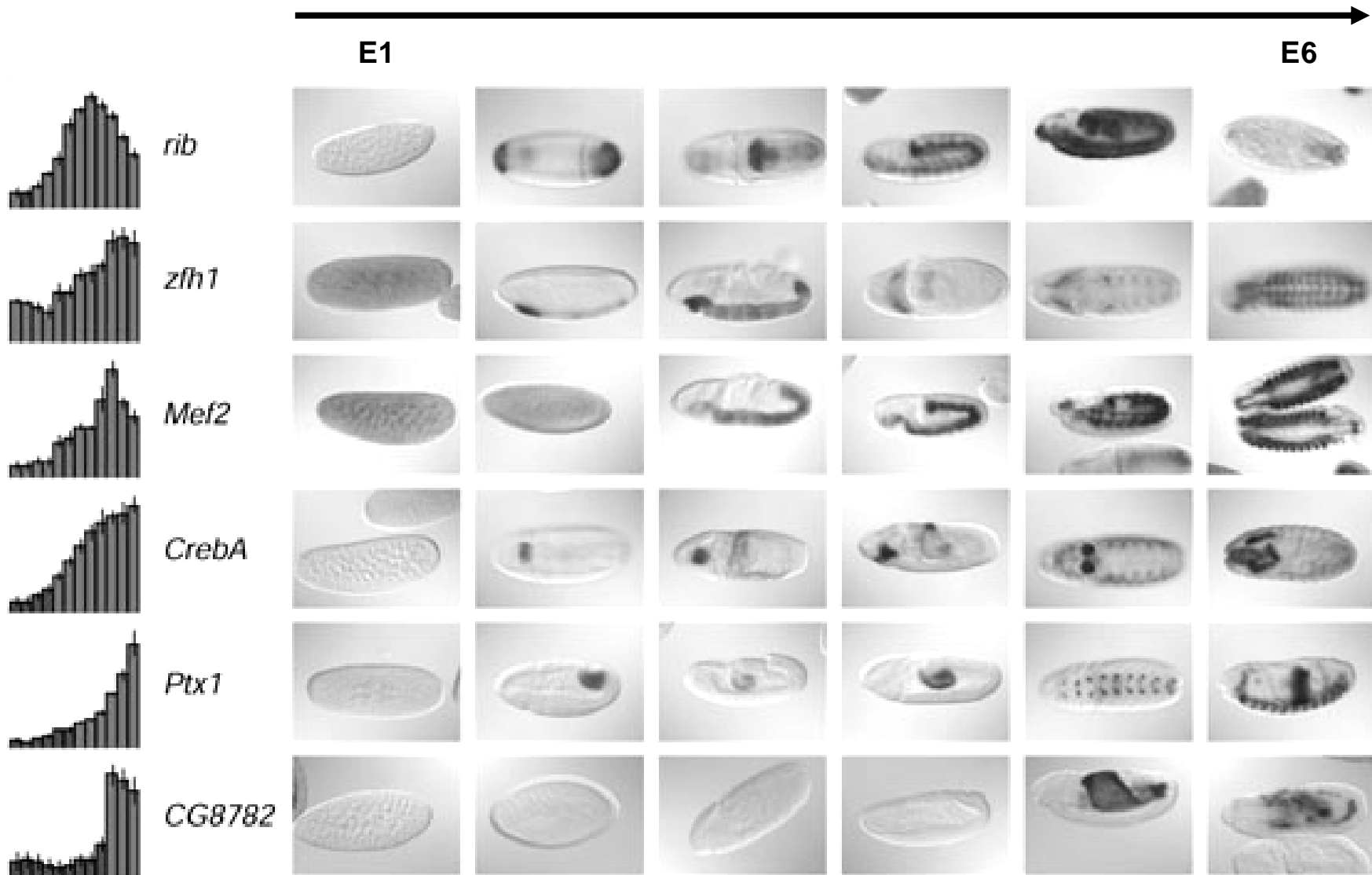
Formula: $C_{45}H_{63}N_4O_{22}P_3Li_4$ Molecular Weight: 1132.7

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

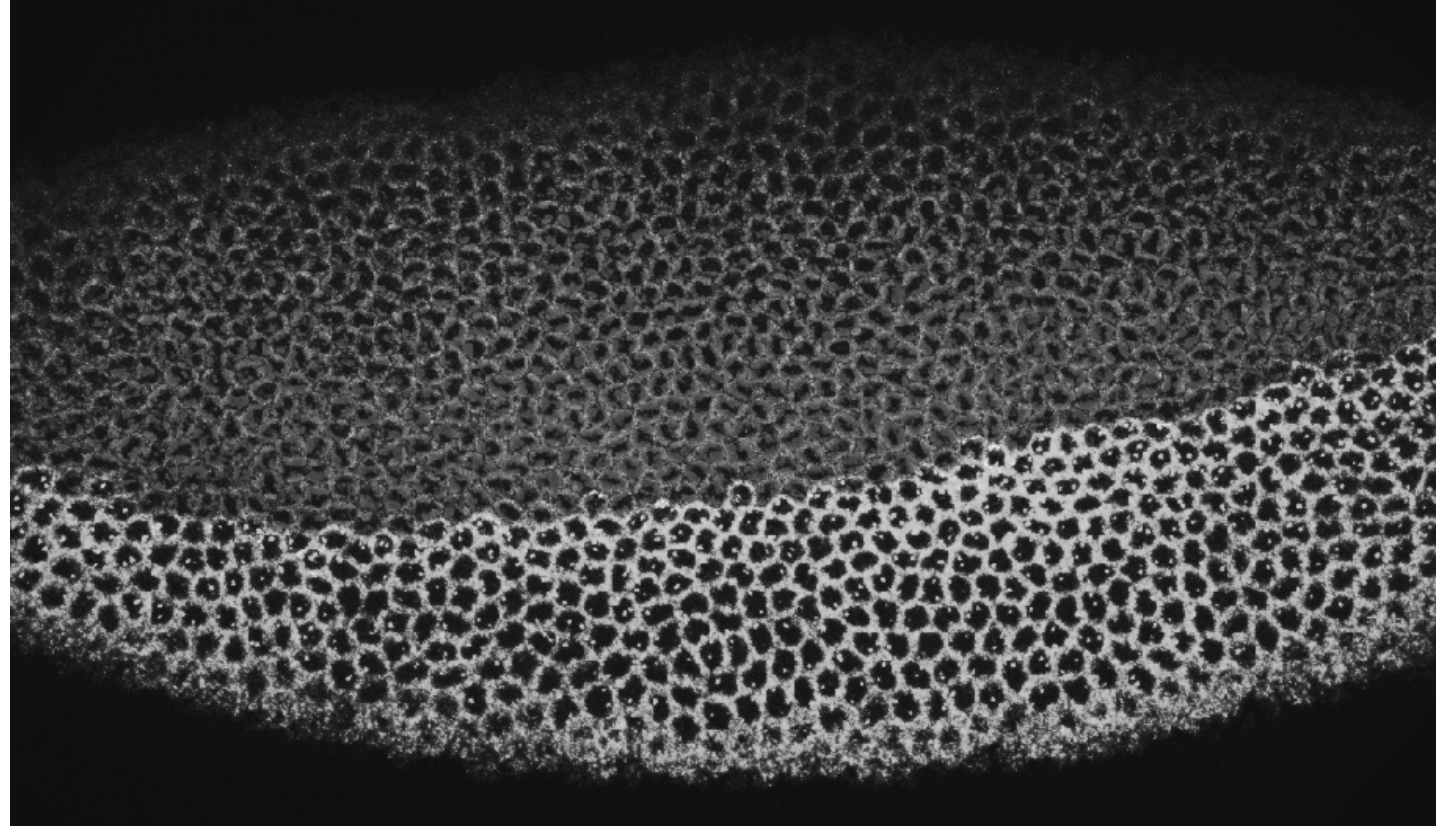
UTP-Digoxigenina



Estados del desarrollo embrionario

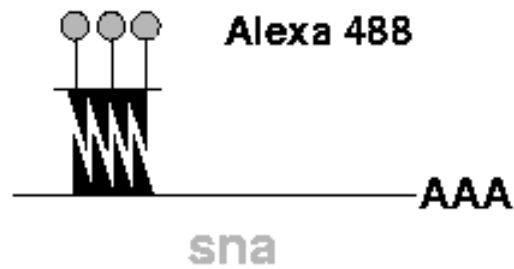


Fluctuaciones relativas de las señales de intensidad durante el desarrollo



Fluorescently
Labeled
Riboprobes

Target
Transcripts



Alexa 488



Alexa 568

DETECCION DE ACIDOS NUCLEICOS

- SOUTHERN BLOT

PERMITE DETECTAR LA PRESENCIA Y EL
NUMERO DE COPIAS DE UN GEN EN UN
GENOMA.

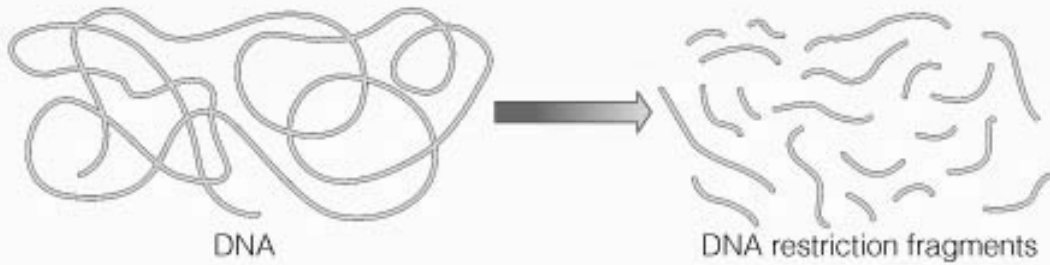
SOUTHERN BLOT

- 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

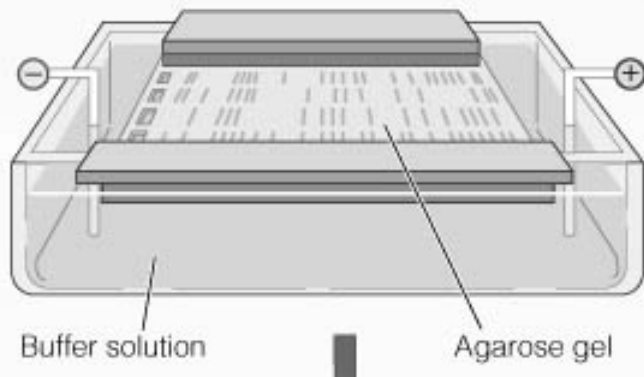
Step 1

Digest DNA with
restriction endonucleases



Step 2

Perform agarose gel electrophoresis
on the DNA fragments from different digests



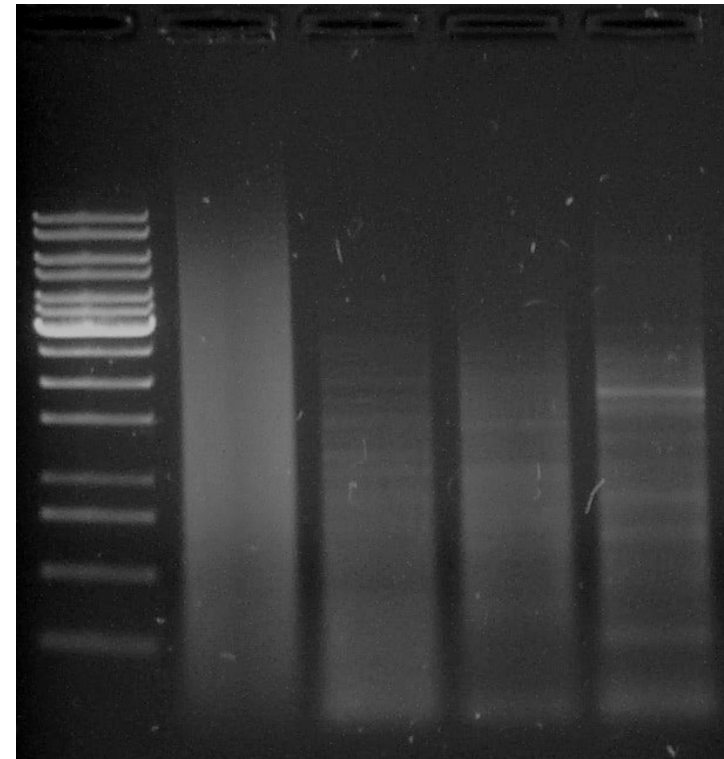
Std
1Kb

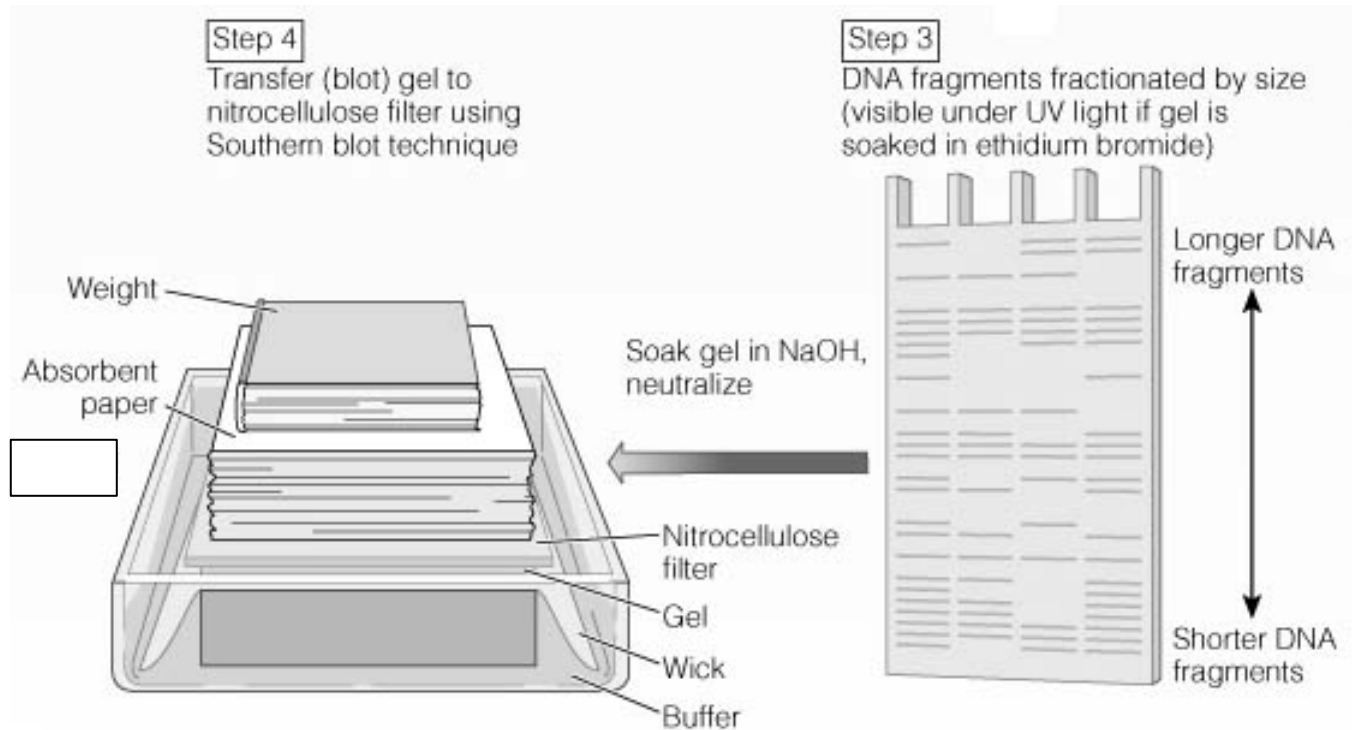
Dra I

EcoRV

PvuII

Stu I





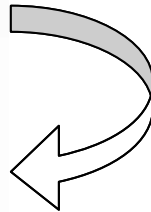
1. Los fragmentos de DNA en el gel son desnaturados en un buffer alcalino.
 - pH alcalino desnatura el DNA a la forma de hebra simple
2. El DNA es transferido a una membrana de nylon en buffer SSC (standard saline citrate)
 - Alta concentración de sal regula la estrictez (especificidad de unión de la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

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

