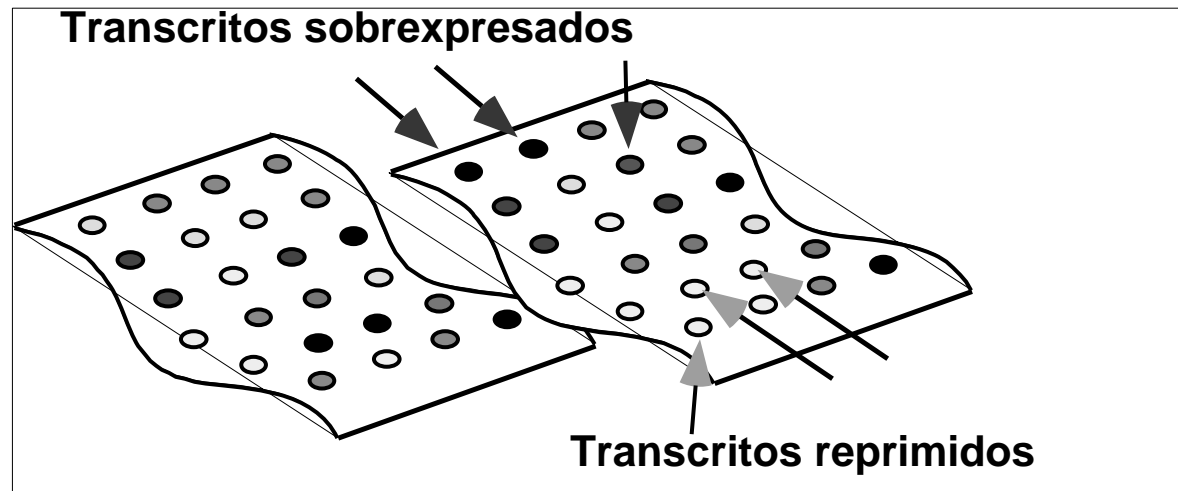
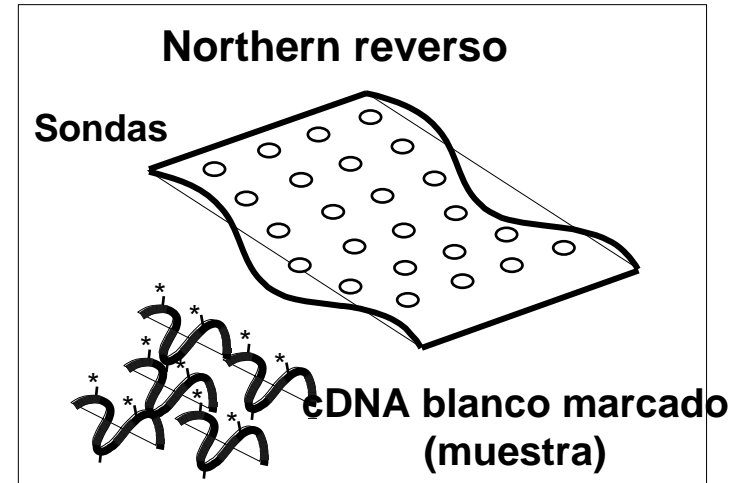
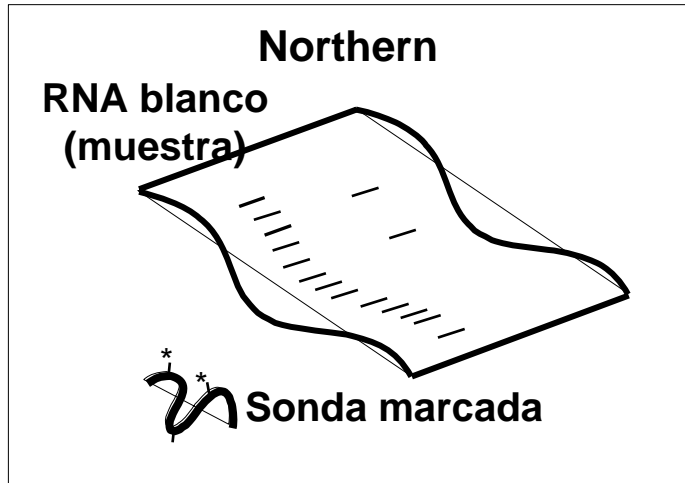


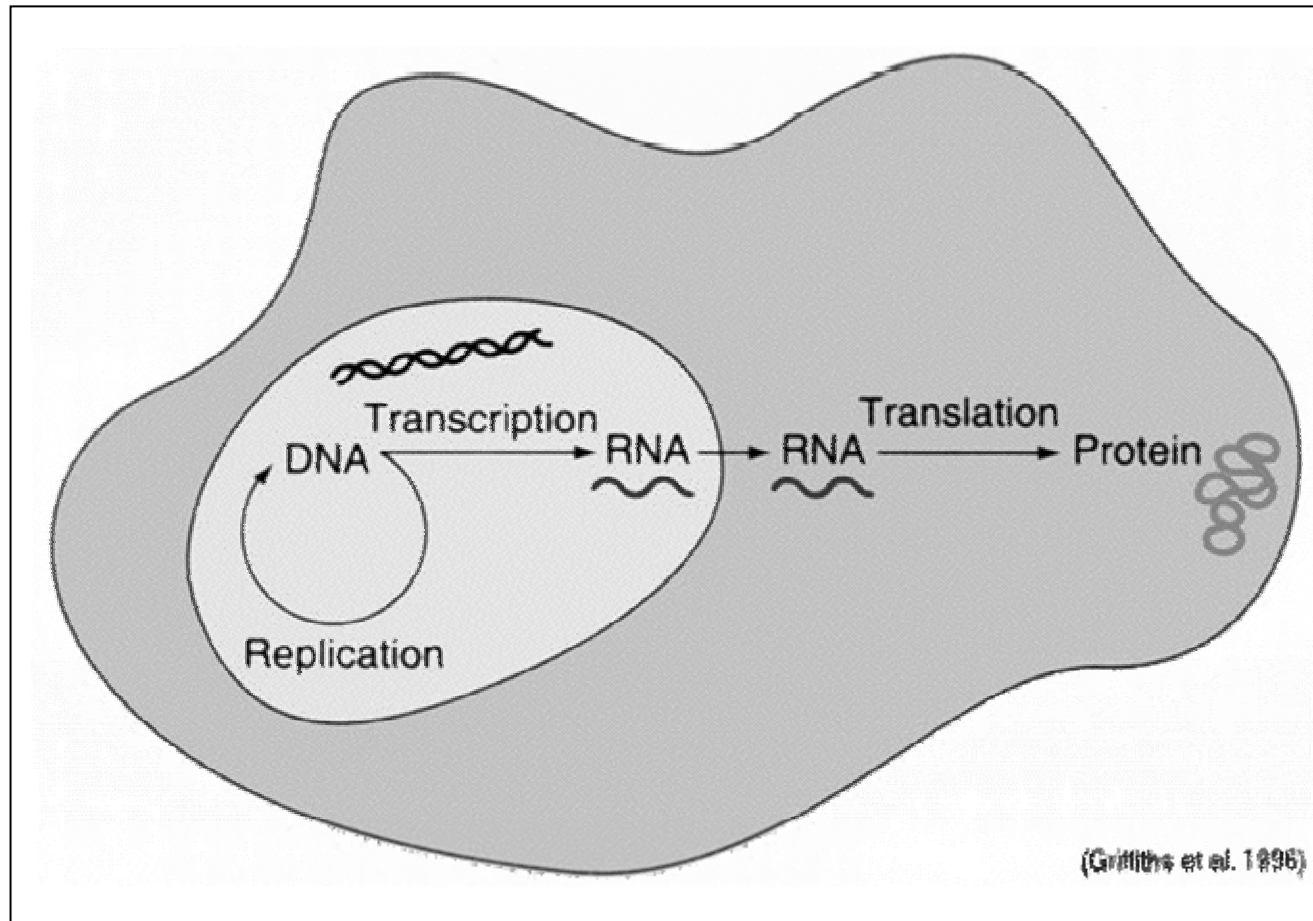
NORTHERN BLOT REVERSO



Intensidad de la señal de hibridación proporciona información de la abundancia relativa de cada transcrito en la muestra.

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

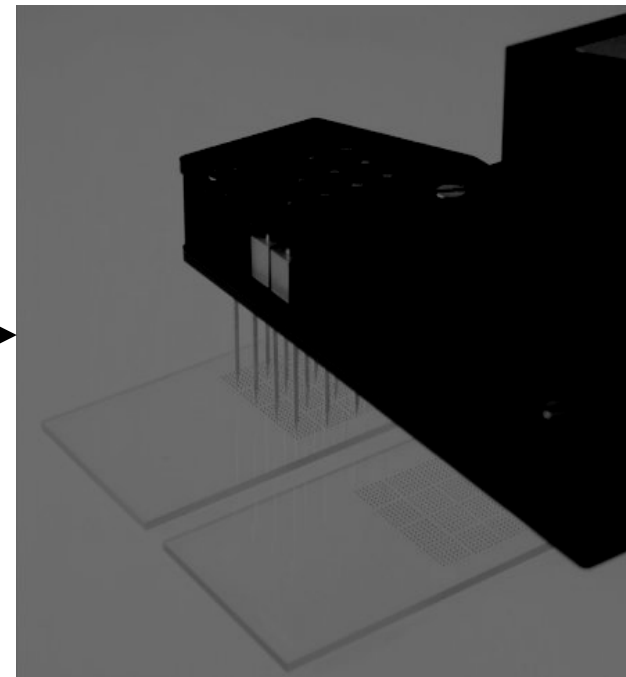
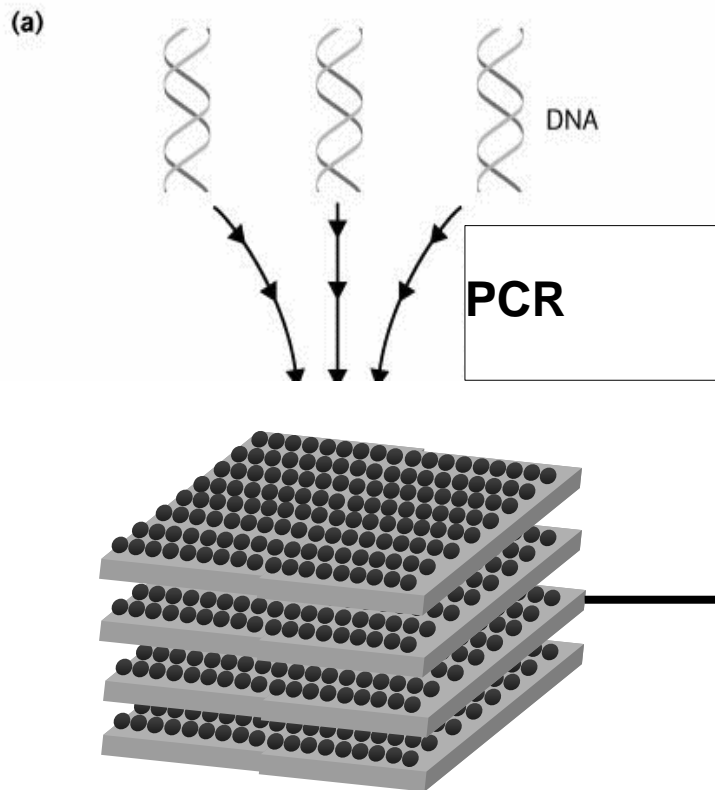
En un experimento tipo:

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 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.

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.

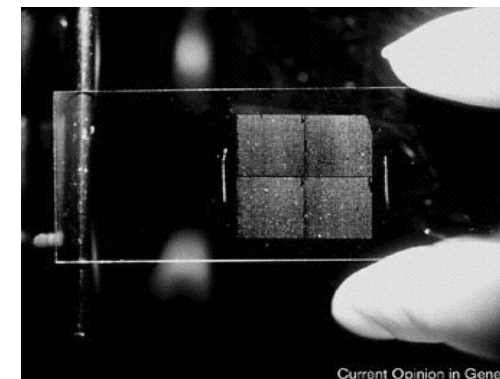
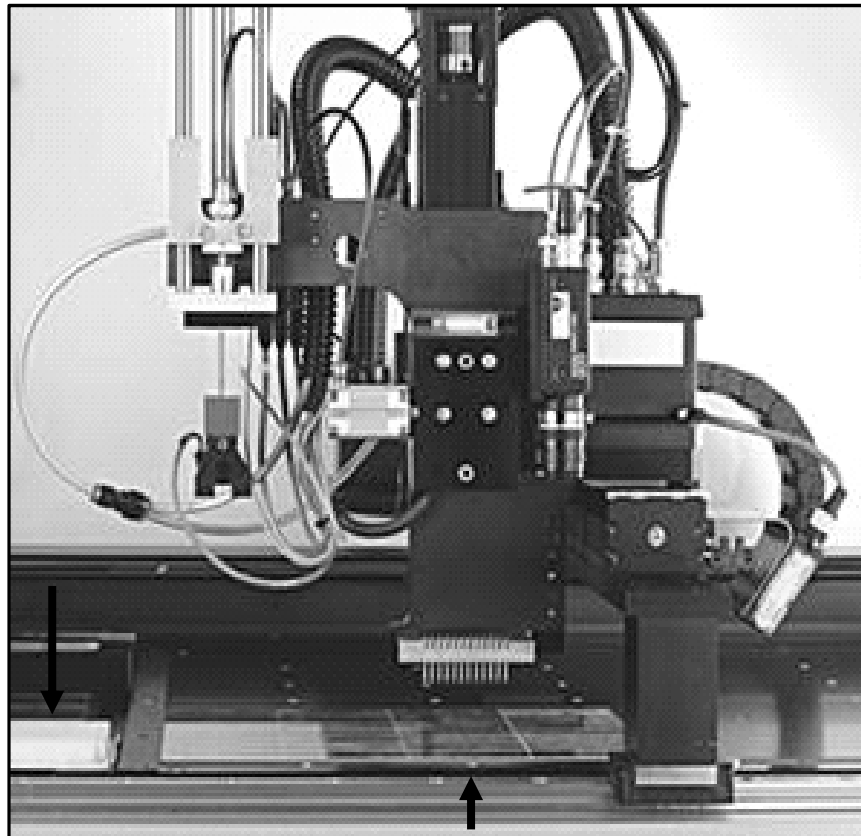


Colección de productos de PCR en placas de 96 pocillos

Confección de arrays

MICROARRAYS

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



Confección de arrays

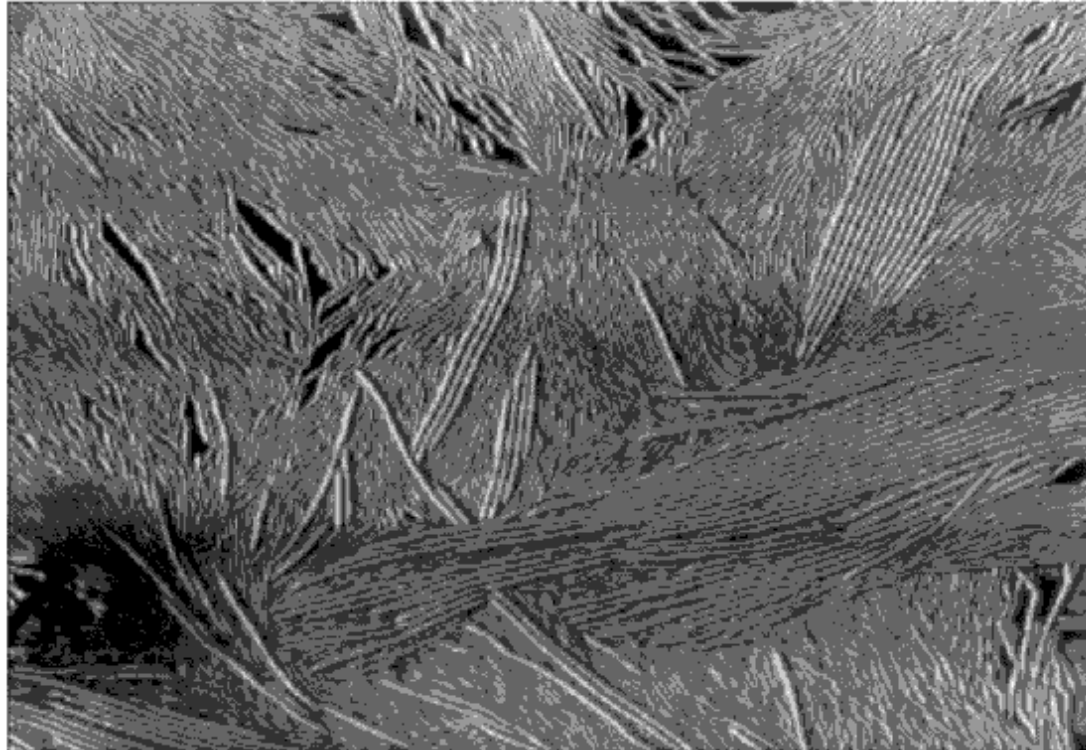
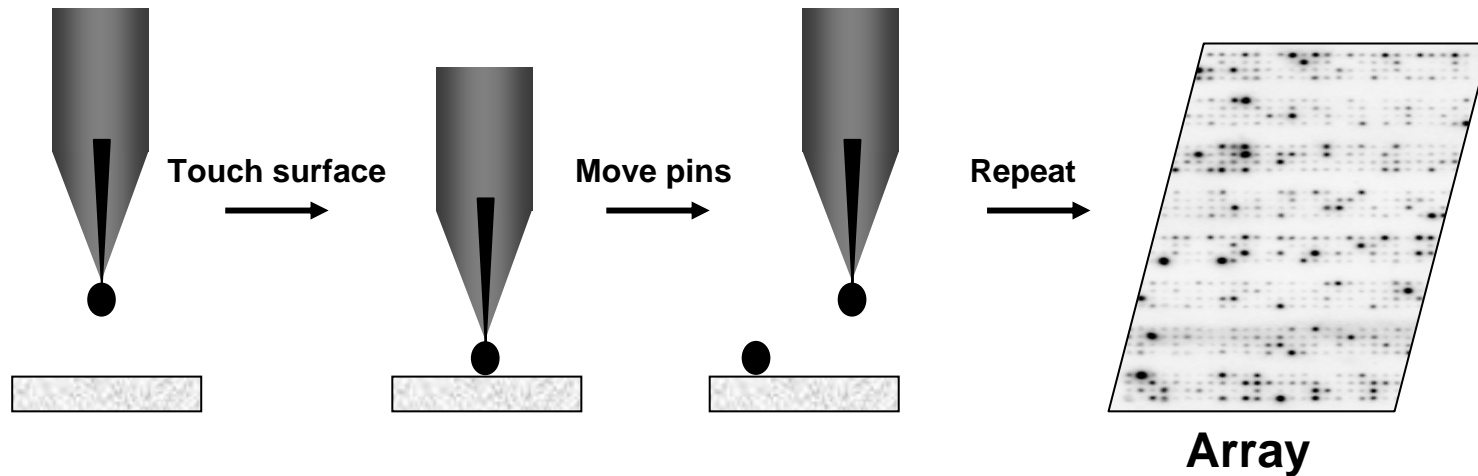


Figure 3: Atomic force microscopy of DNA on a microarray. This is a micrograph of a portion of a hybridization probe from a yeast microarray, taken after the array was subjected to hybridization. The DNA is clearly deposited at a sufficient density to allow many kinds of strand-to-strand interactions.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

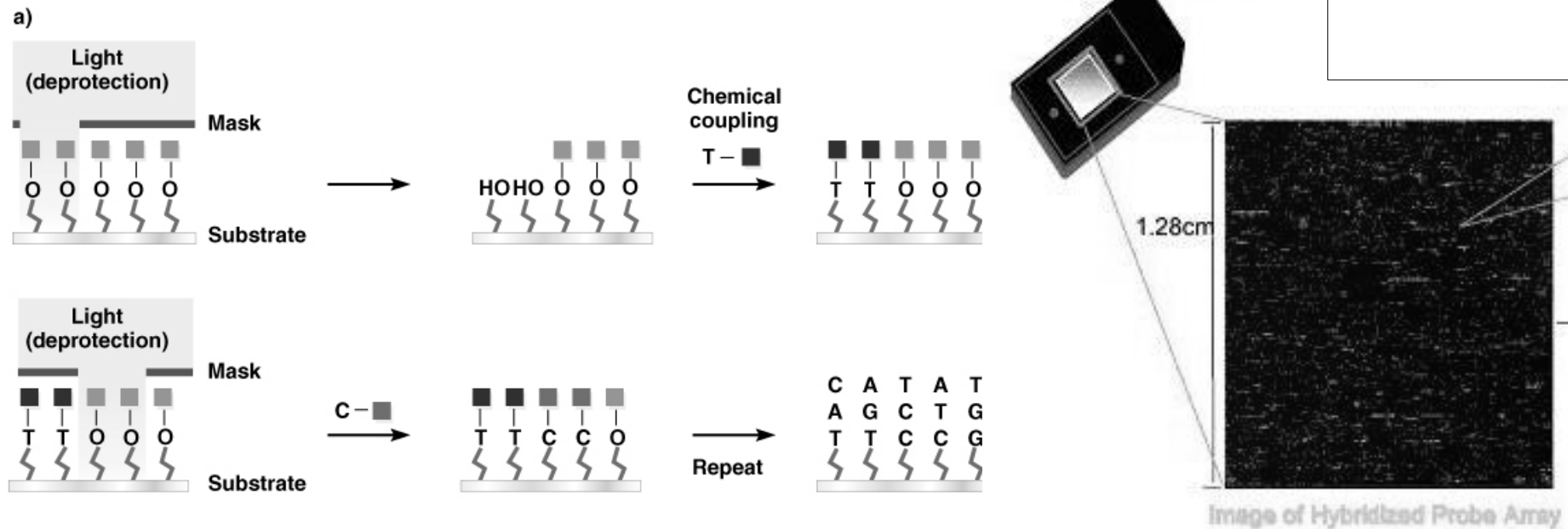
Tipos de arrays



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:

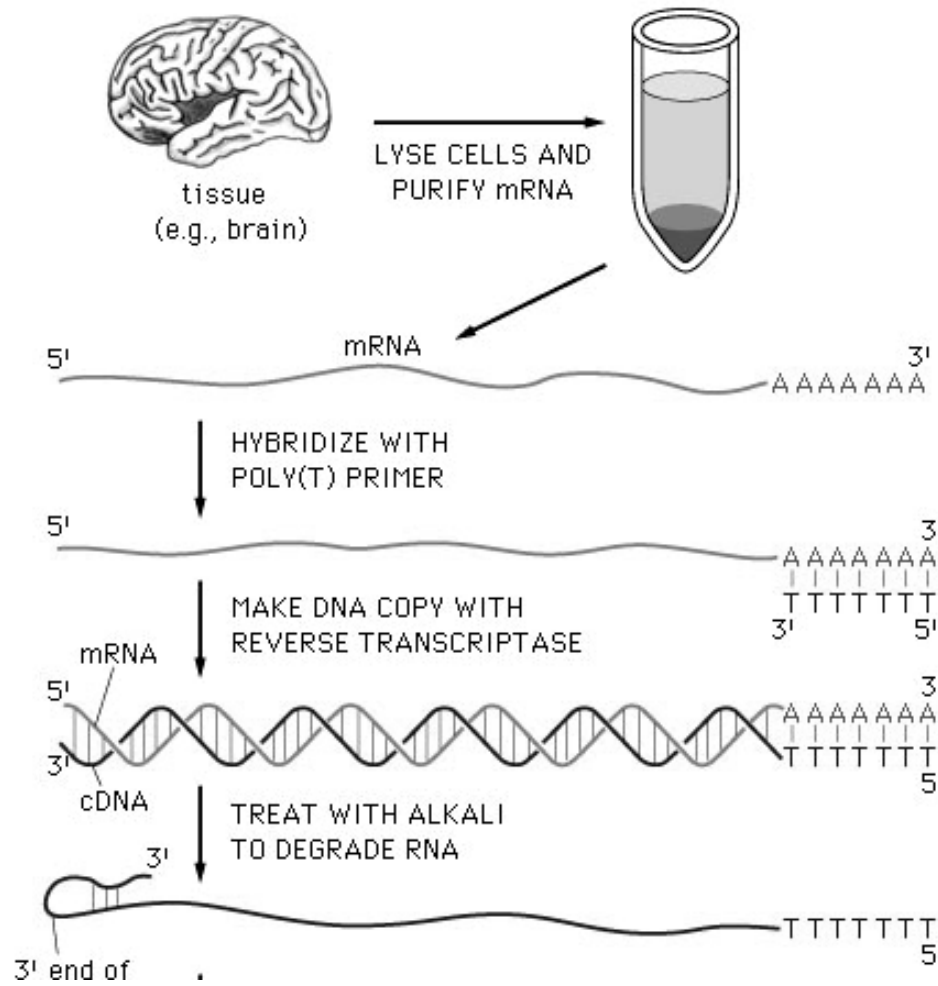
- Oligonucleotidos (25 pb) son sintetizados sobre una matriz de vidrio o plástico.
- >500.000 secuencias inmovilizadas (10^7 copias/punto de siembra).
- La muestra a hibridar es marcada con derivados fluorescentes.

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 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.

Síntesis de cDNA



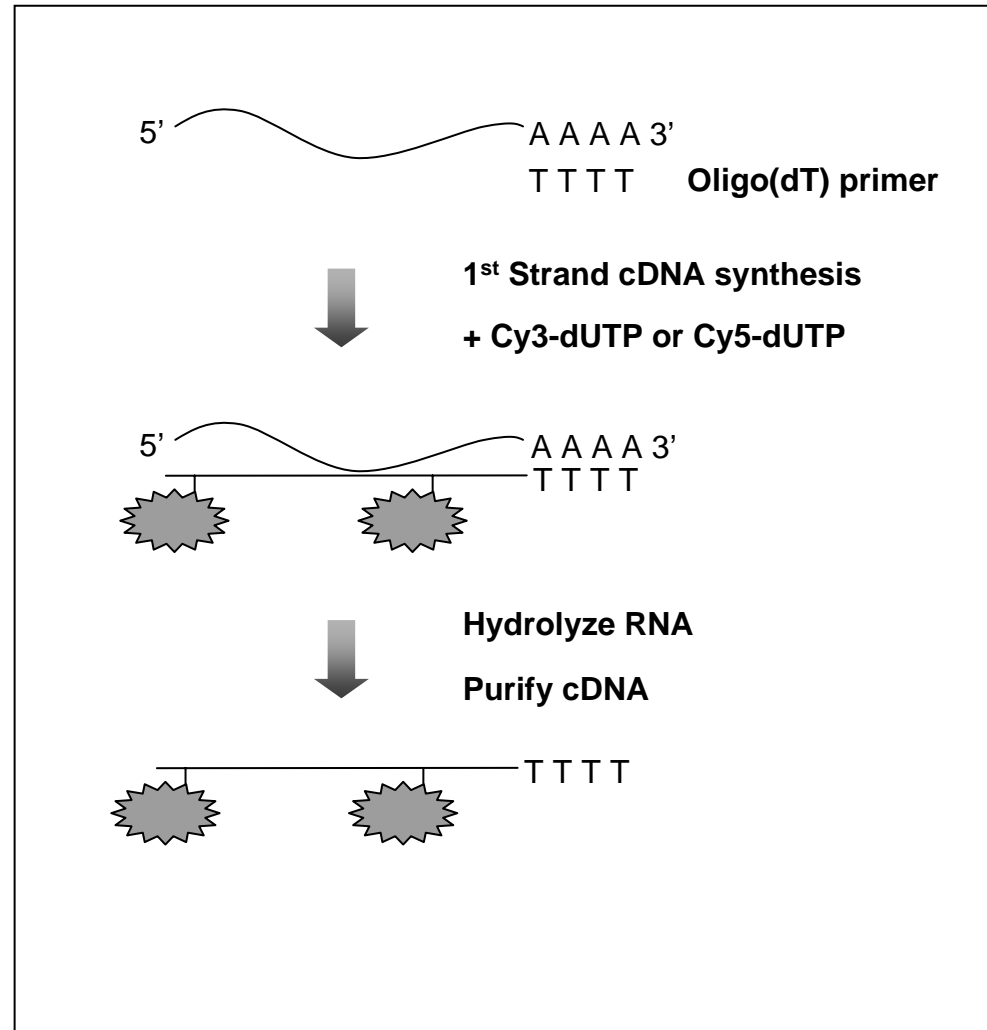
Purificación de RNA

Hibridación con poly(dT)

Copia del DNA con RT

Degradación del RNA

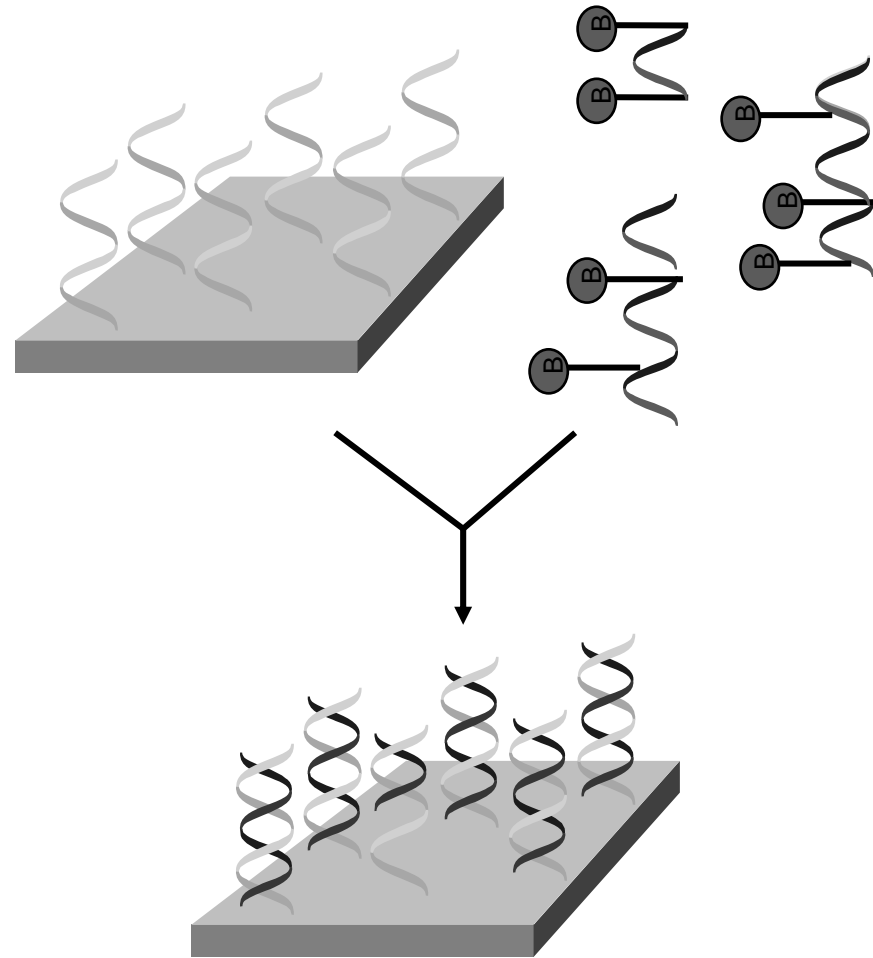
Síntesis de cDNA marcado



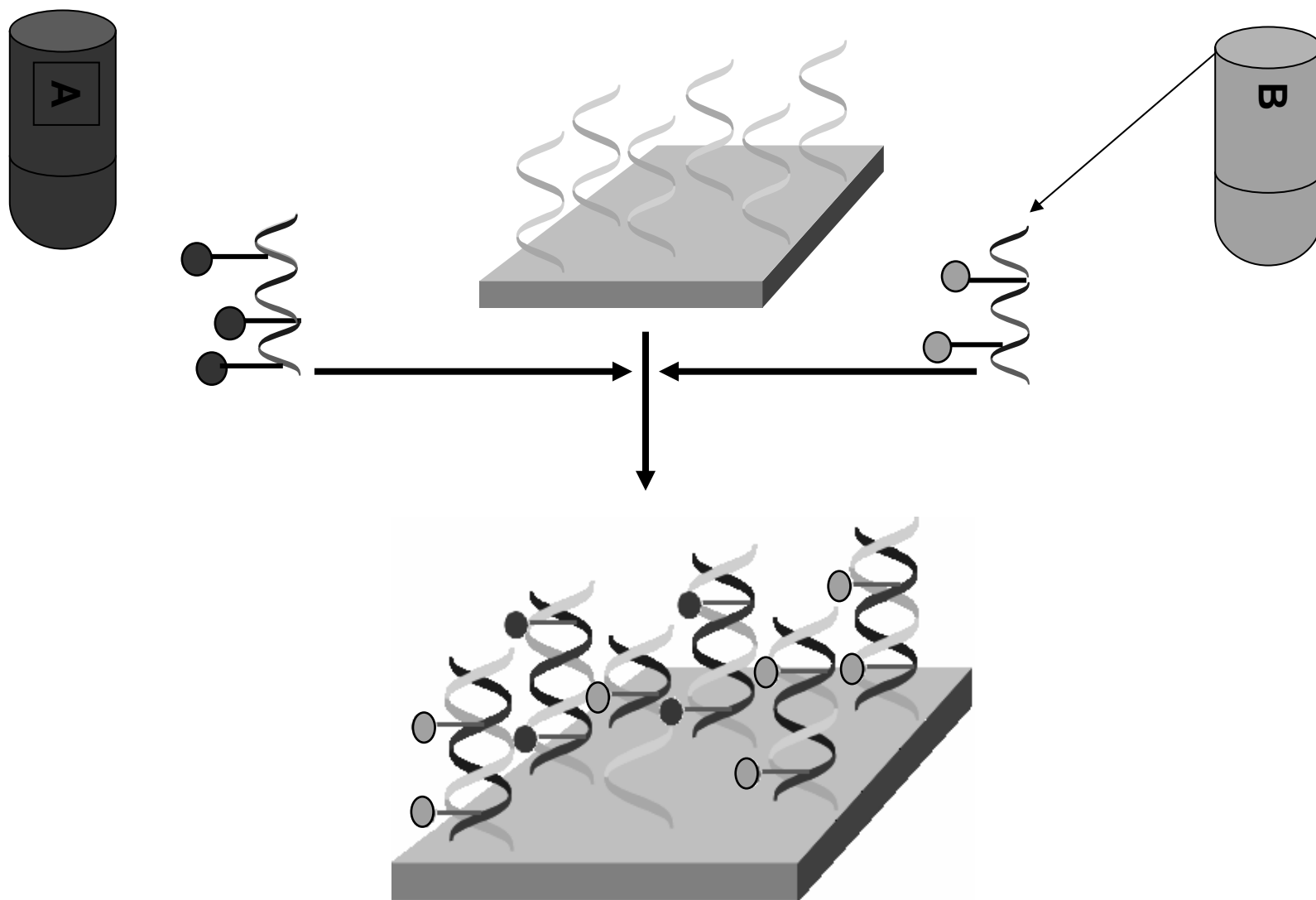
Hibridación en microarrays

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



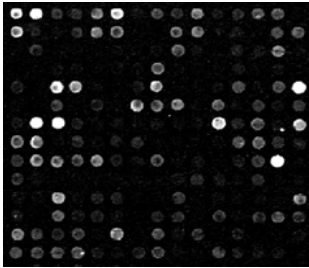
Scanner

Cy3: 532nm

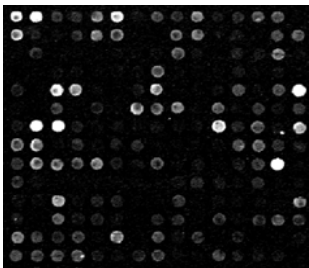
Excitación

Cy5: 635nm

Cy3: 550 - 600nm



Emisión



Cy5: 655 - 695nm

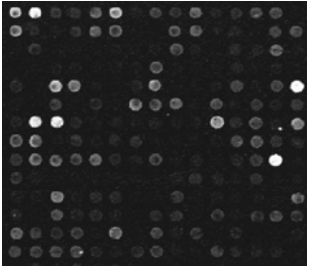
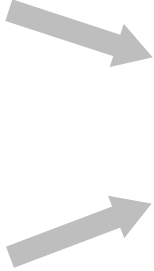
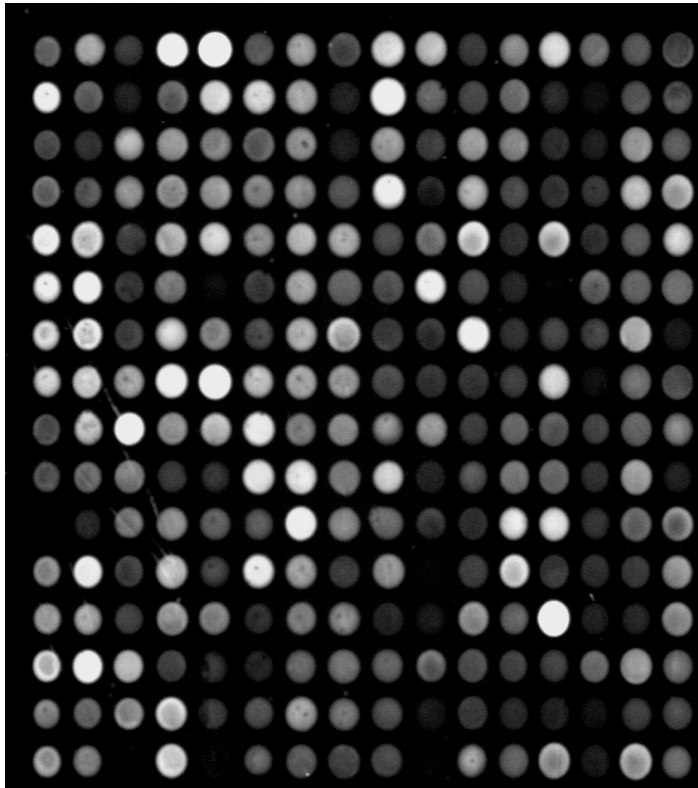


Imagen
sobrepuesta

Meta-Row	Meta-Column	Row	Column	Gene ID	Flag	Signal Mean	Background S	Signal Stdev	Background
1	1	1	1	h+3126A06.3	0	8847.91034	280.59434	2786.53068	84.2104594
2	1	1	1	h+3126A06.3	0	6964.9897	277.50245	1261.70243	78.2029272
3	1	1	1	h+3126C06.3	0	533.134198	275.83466	124.24075	63.6679668
4	1	1	1	h+3126C06.3	0	665.653798	303.520302	124.477511	81.5442003
5	1	1	1	h+3126E06.3	0	217.612241	265.768999	212.437389	72.8199812
6	1	1	1	h+3126E06.3	0	207.648276	262.127358	143.311213	92.5203588
7	1	1	1	h+3126C06.3	0	279.593103	261.259454	272.299942	73.5186002
8	1	1	1	h+3126C06.3	2	305.652778	344.038084	84.041392	854.939993
9	1	1	1	h+3126A12.3	2	434.848276	269.174526	120.623743	91.8826811
10	1	1	1	h+3126A12.3	2	784.663212	325.413793	1883.53007	503.469668
11	1	1	1	h+3126C12.3	0	677.010363	264.773333	295.127653	100.573155
12	1	1	1	h+3126C12.3	2	668.262059	549.39691	418.133752	5977.15473
13	1	1	1	h+3126E12.3	2	497.744928	267.127358	254.99376	183.598048
14	1	1	1	h+3126E12.3	2	281.772414	260.613095	77.317273	69.3279753
15	1	1	1	h+3126G12.3	0	512.025907	245.140704	128.064228	72.8175381
16	1	1	1	h+3126G12.3	2	561.480052	321.182243	143.92726	643.613847

Detección de fluorescencia

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



Ejemplo:

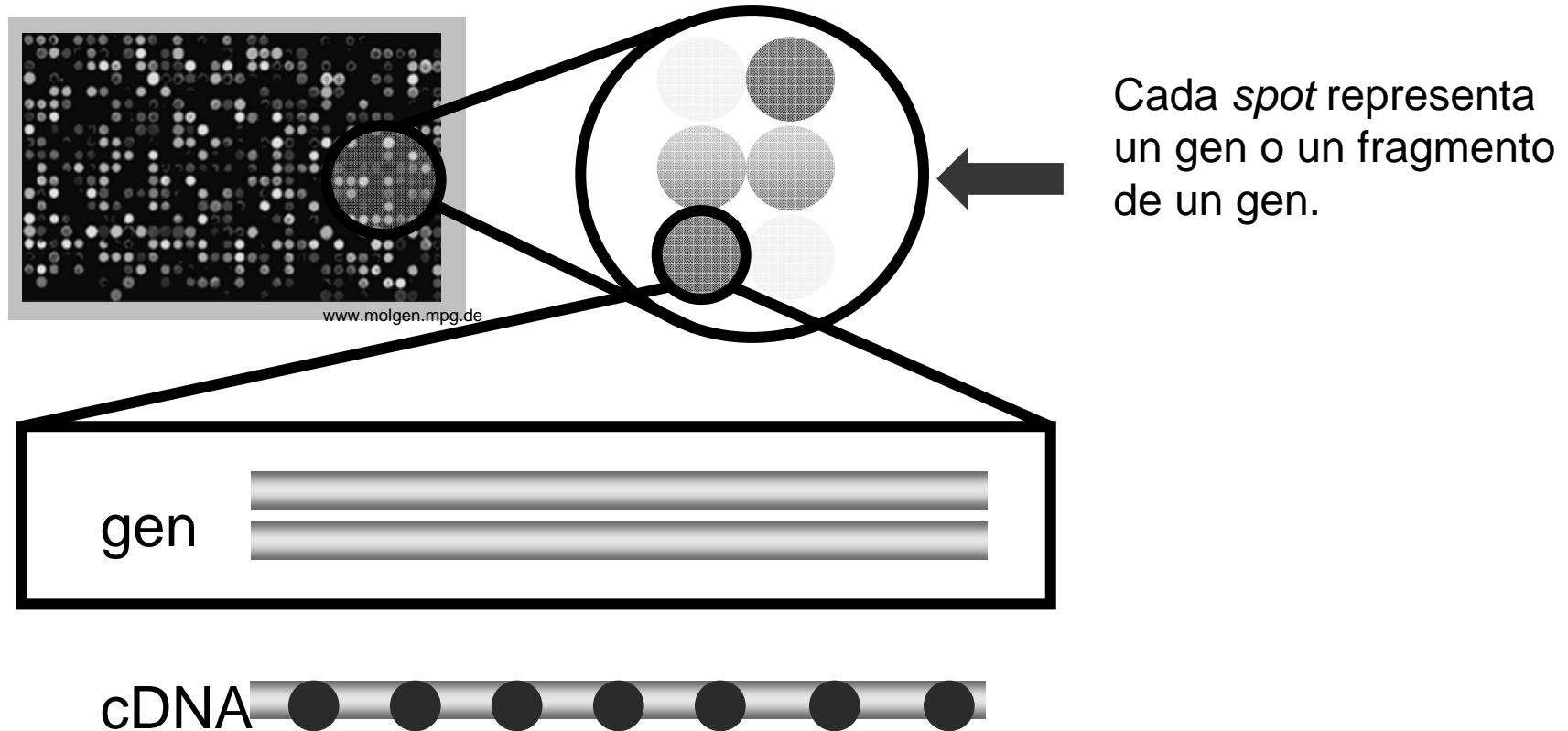
cDNA experimental: rojo Cy5

cDNA control: verde Cy3

Amarillo: **Experimental = Control**

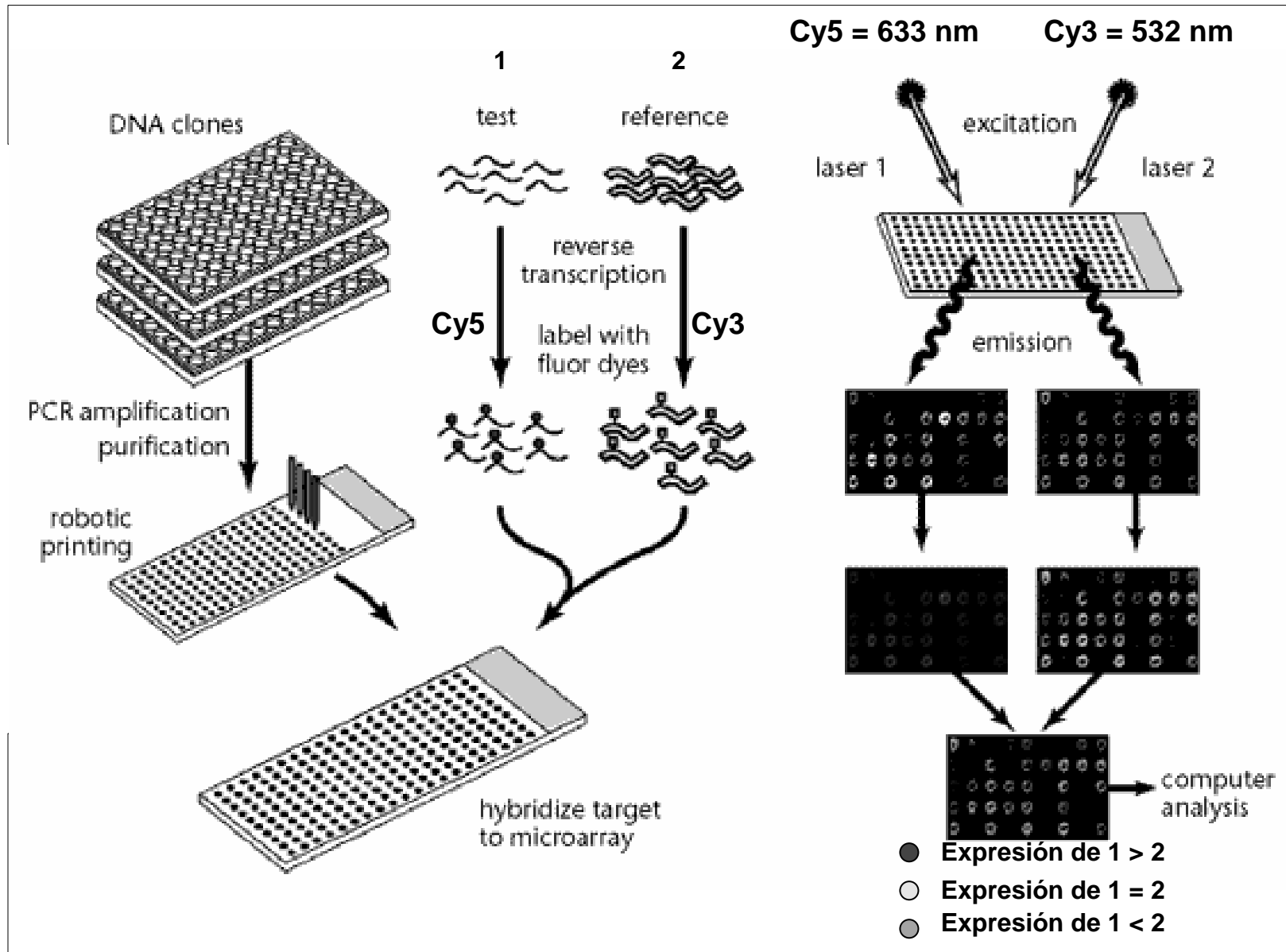
Rojo: **Experimental > Control**

Verde: **Experimental > Control**

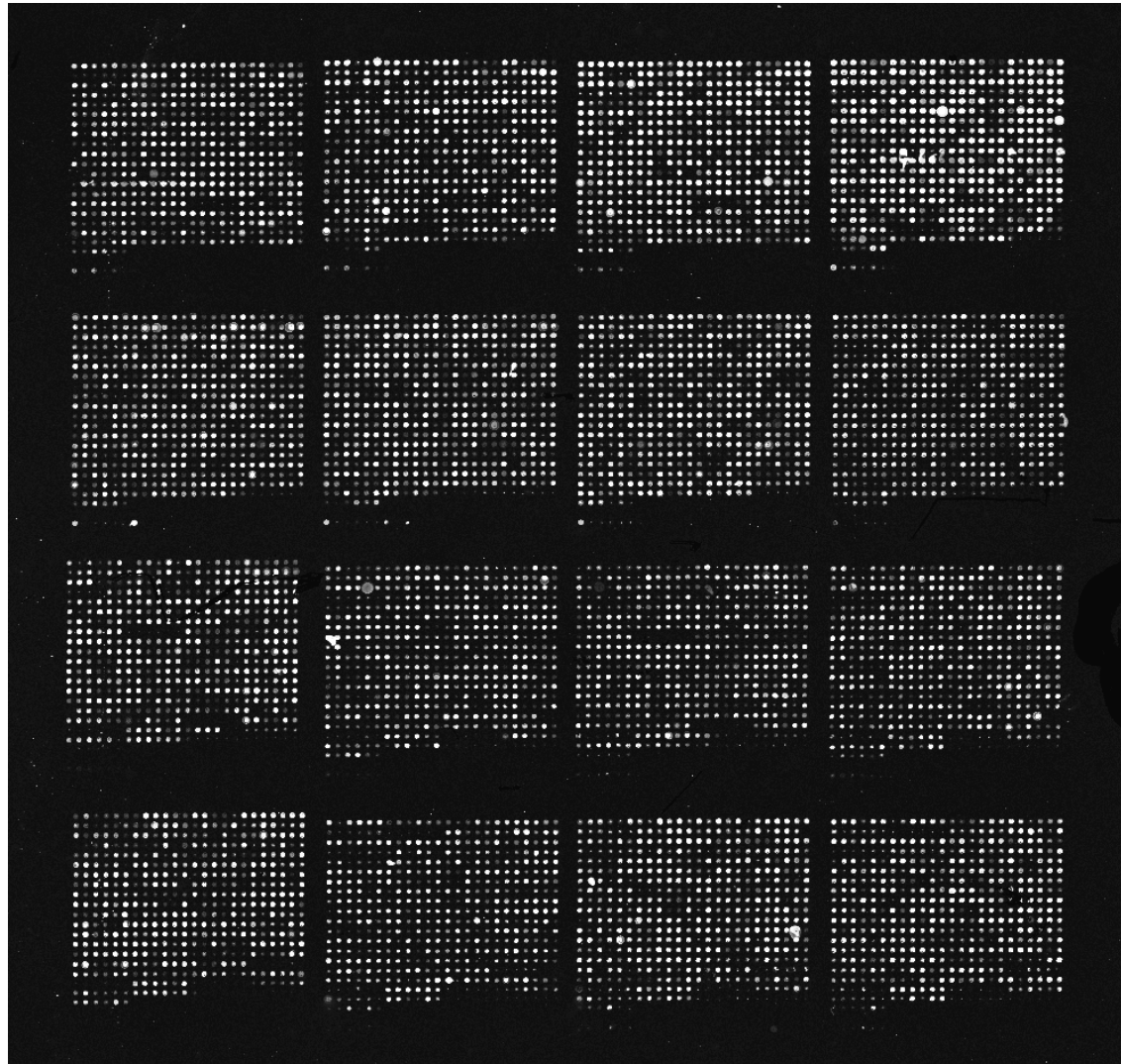


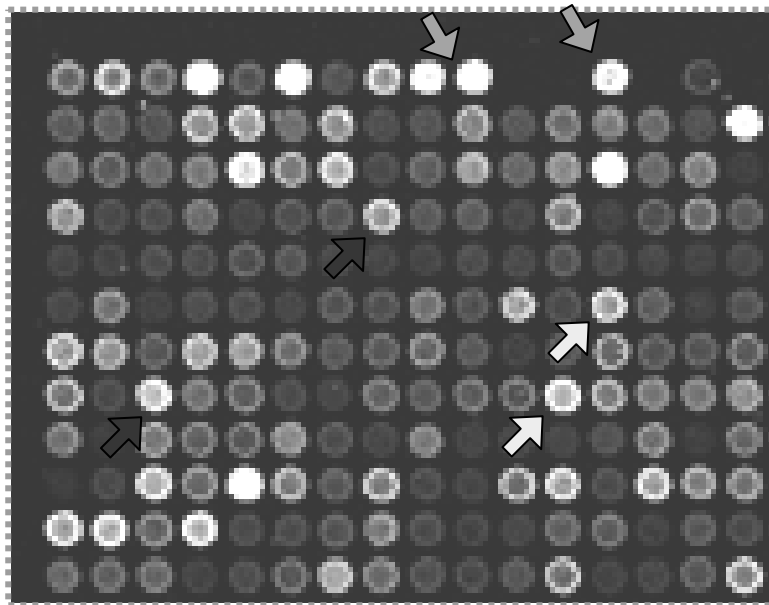
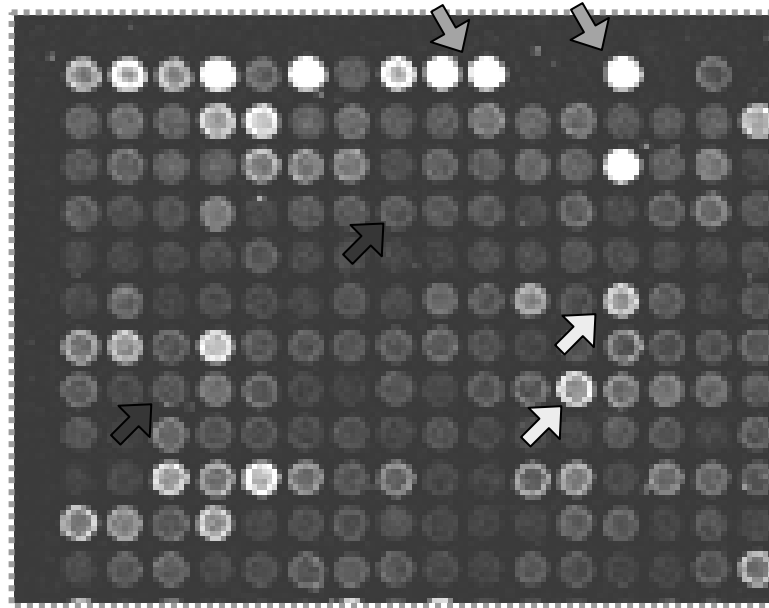
- La intensidad de la señal fluorescente es medida para cada spot en cada una de las longitudes de onda.
- La intensidad de la señal representa la cantidad de transcrito presente en la muestra original.
- La razón de las señales de hibridación Cy3/Cy5 representa el cambio relativo de expresión de un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

Hibridación en microarrays

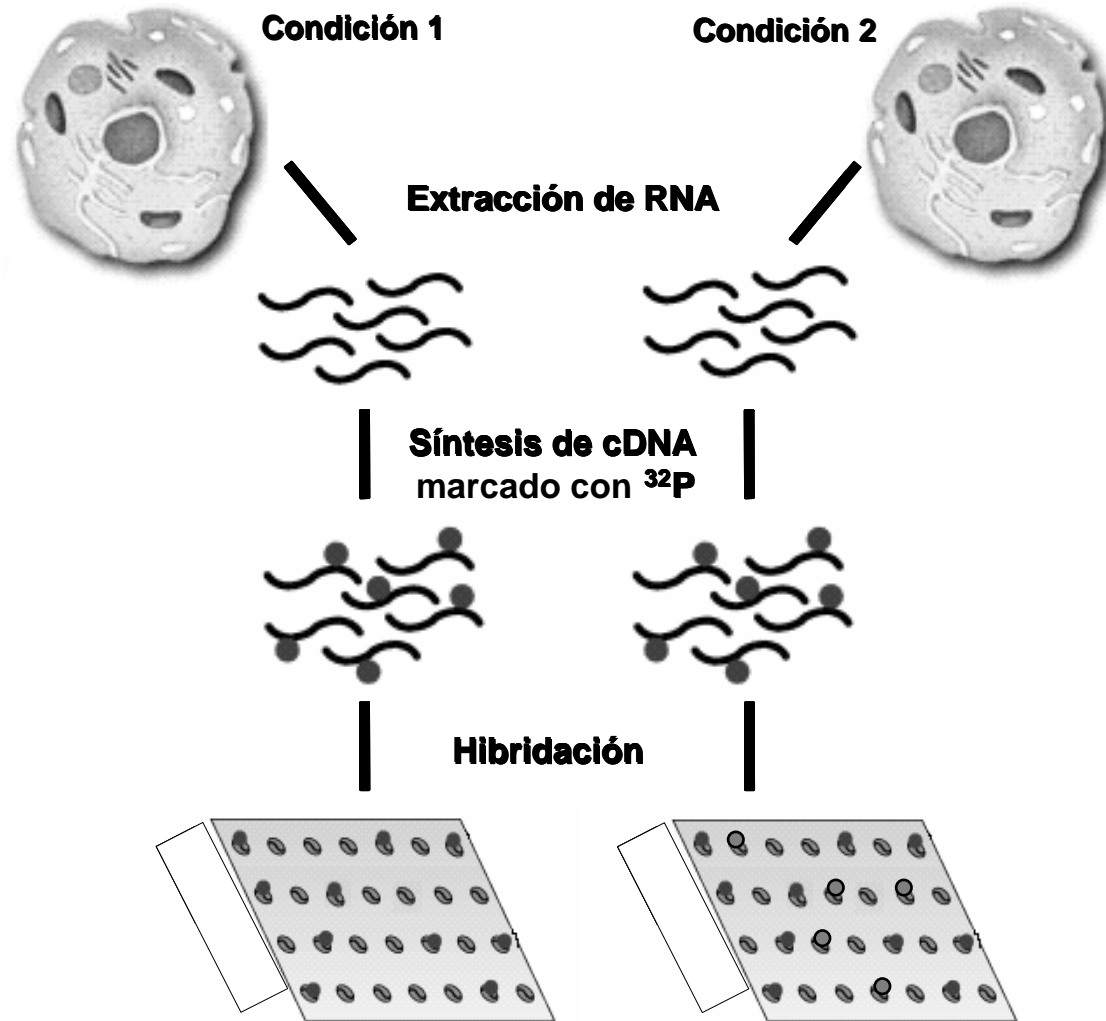


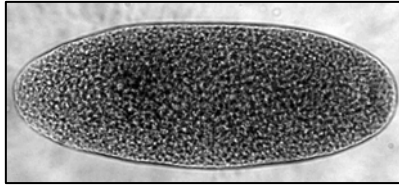
Microarray de levadura



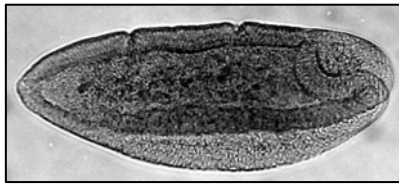
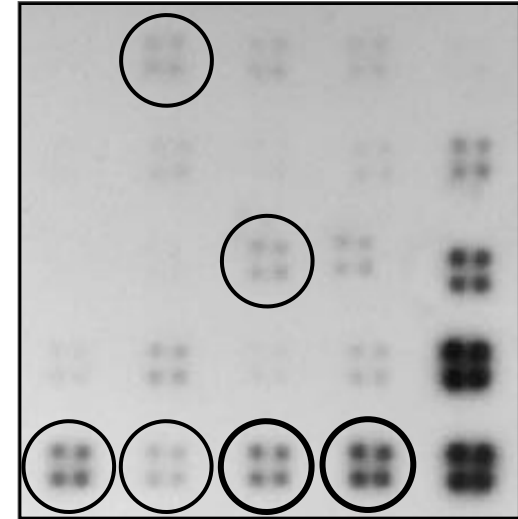
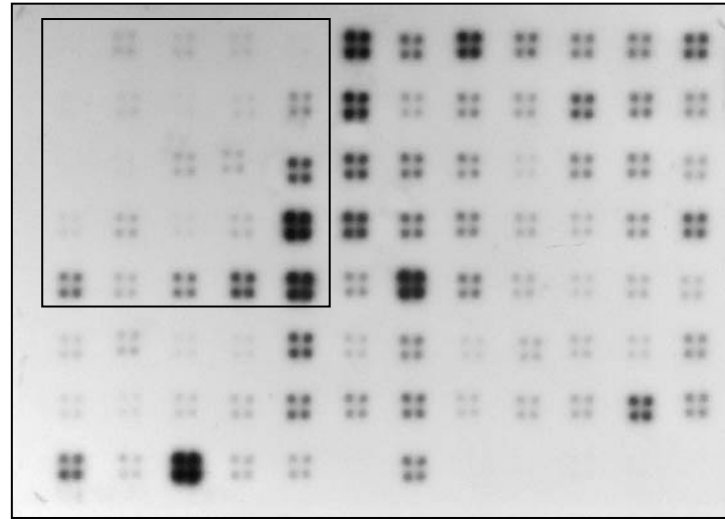


Hibridación en macroarrays

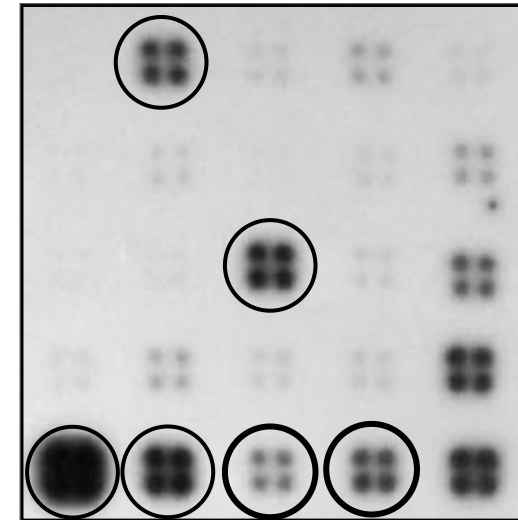
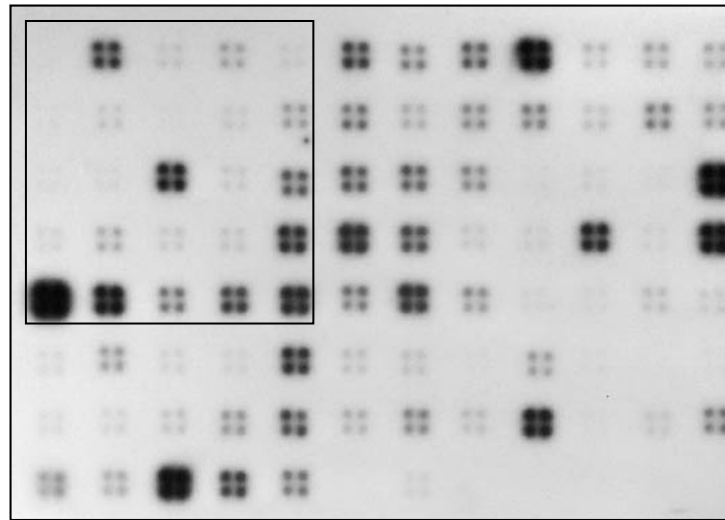




Blastodermo sincicial (Bs)



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 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.

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**

HIBRIDACION *IN SITU*

Síntesis de sonda de RNA

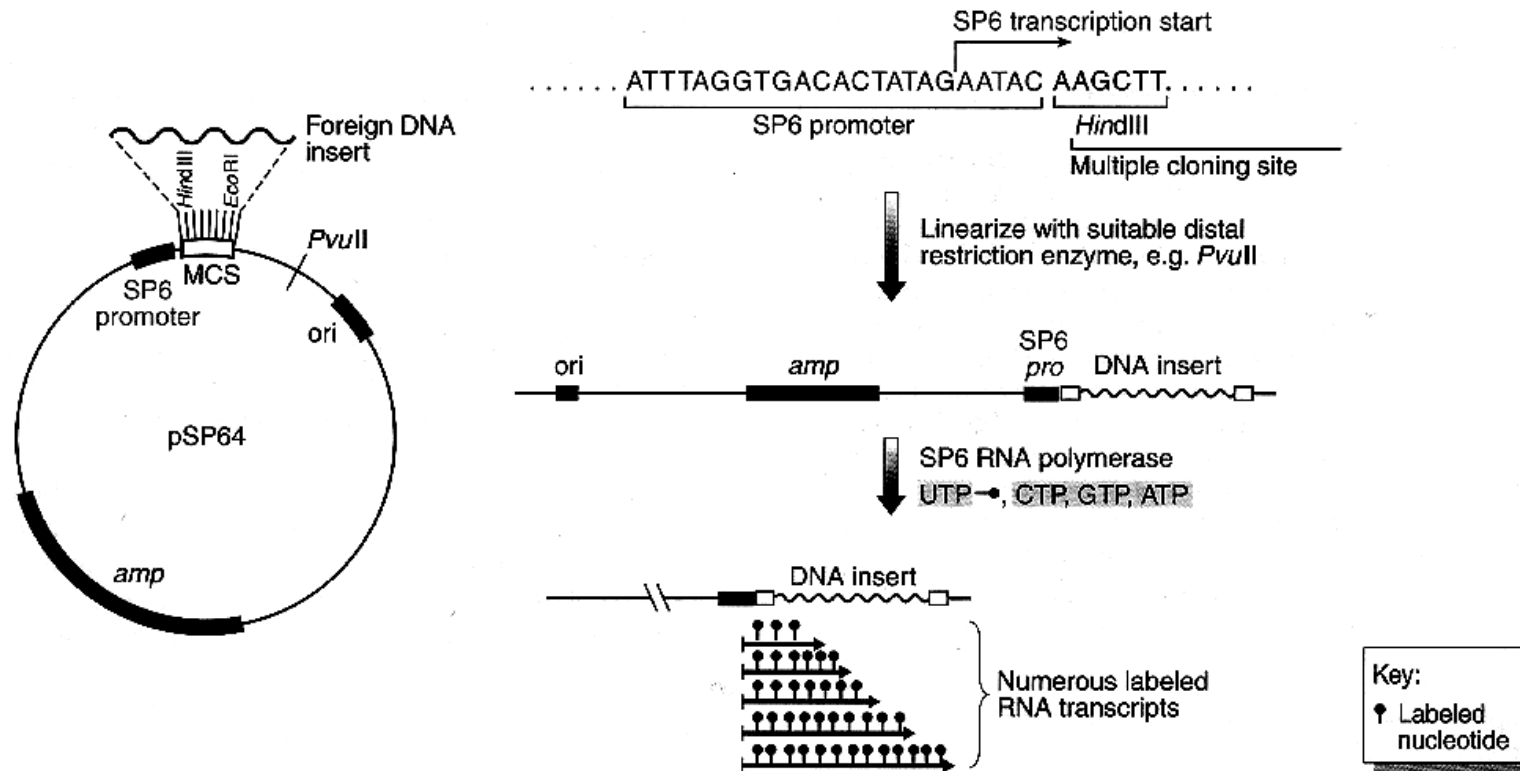


Figure 5.4: Riboprobes are generated by run-off transcription from cloned DNA inserts in specialized plasmid vectors.

The plasmid vector pSP64 contains a promoter sequence for phage SP6 RNA polymerase linked to the multiple cloning site (MCS) in addition to an origin of replication (*ori*) and ampicillin resistance gene (*amp*). After cloning a suitable DNA fragment in one of the 11 unique restriction sites of the MCS, the purified recombinant DNA is linearized by cutting with a restriction enzyme at a unique restriction site just distal to the insert DNA (*Pvu* II in this example). Thereafter labeled insert-specific RNA transcripts can be generated using SP6 RNA polymerase and a cocktail of NTPs, at least one of which is labeled (UTP in this case).

¿Cómo visualizar la sonda?

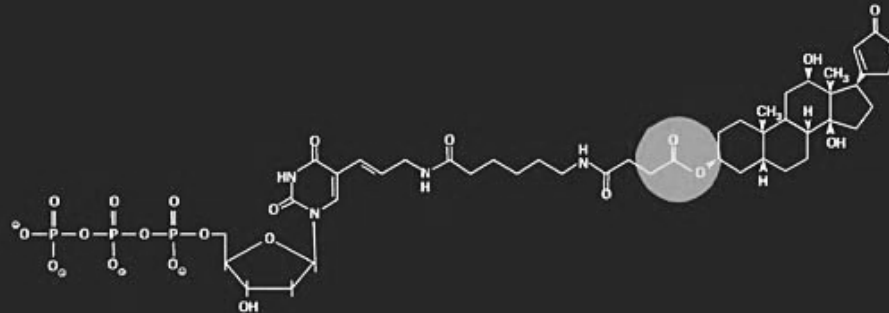


UTP-Fluoroforo



UTP-Digoxigenina

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

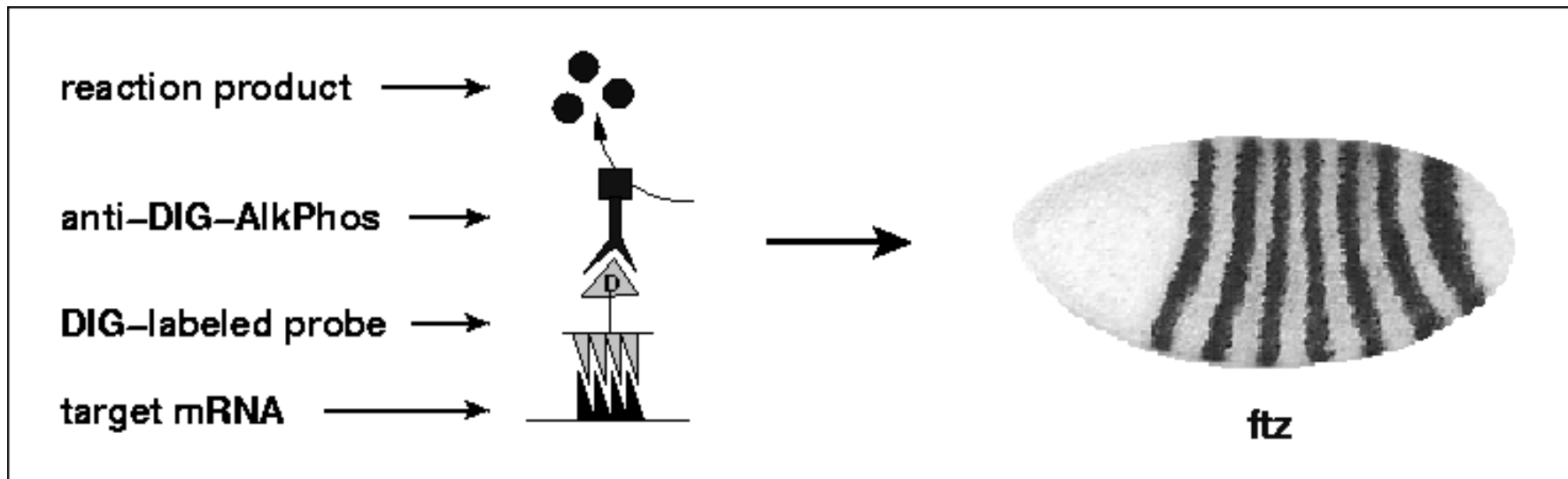


Formula: $C_{45}H_{63}N_4O_{22}P_3Li_4$ Molecular Weight: 1132.7

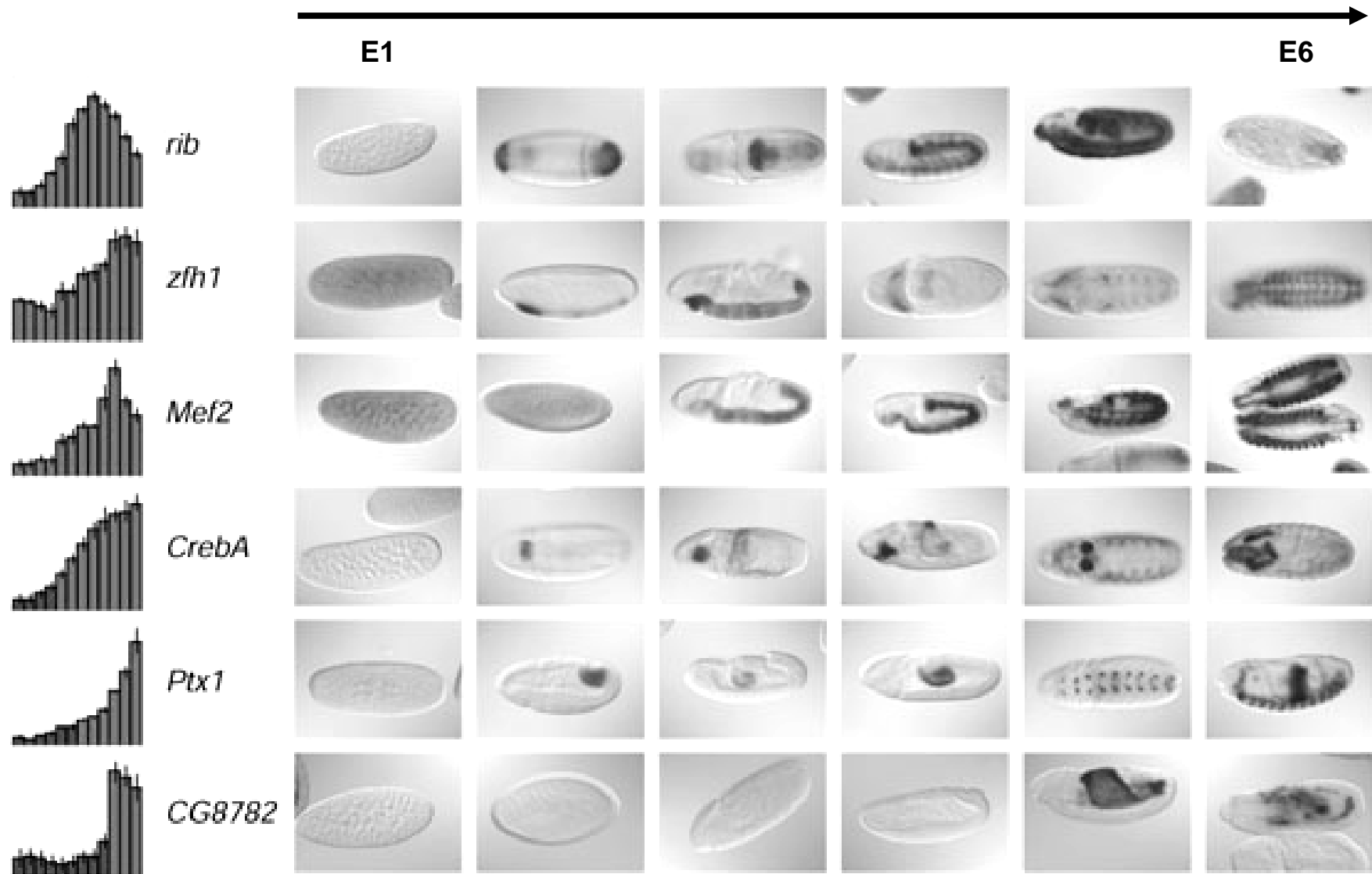
Roche Applied Science

DIG DIG DIG
ATCCGATGCATCCGA

UTP-Digoxigenina



Estados del desarrollo embrionario



Correlación entre imágenes y datos de microarrays

Fluctuaciones relativas de las señales de intensidad durante el desarrollo

