

PROPIEDADES DE LOS ACIDOS NUCLEICOS Y TECNICAS DE DETECCION

1. RNA

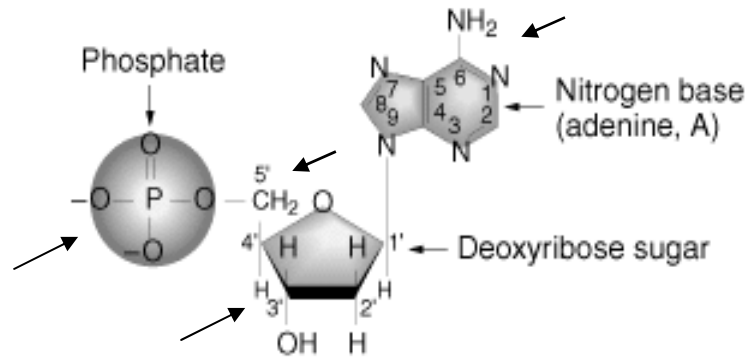
- *NORTHERN BLOT* CONVENCIONAL
- *NORTHERN BLOT* REVERSO (MICROARRAY)
- HIBRIDACION *IN SITU*

2. DNA

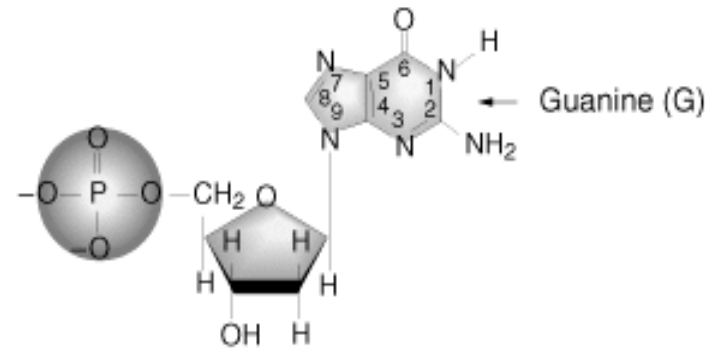
- *SOUTHERN BLOT*
- ANALISIS DE GENOTECAS

Estructura de los nucleótidos

Purine nucleotides

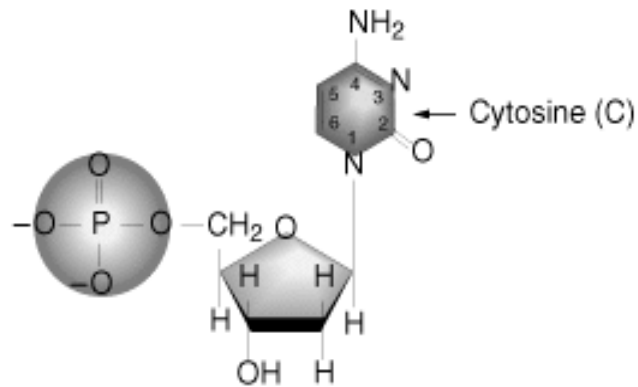


Deoxyadenosine 5'-phosphate (dAMP)

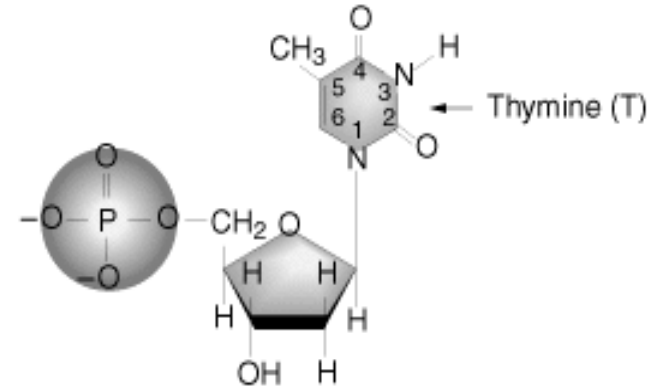


Deoxyguanosine 5'-phosphate (dGMP)

Pyrimidine nucleotides



Deoxycytidine 5'-phosphate (dCMP)



Deoxythymidine 5'-phosphate (dTMP)

Estructura del DNA

hydrogen bonded nucleotides
on opposite helices

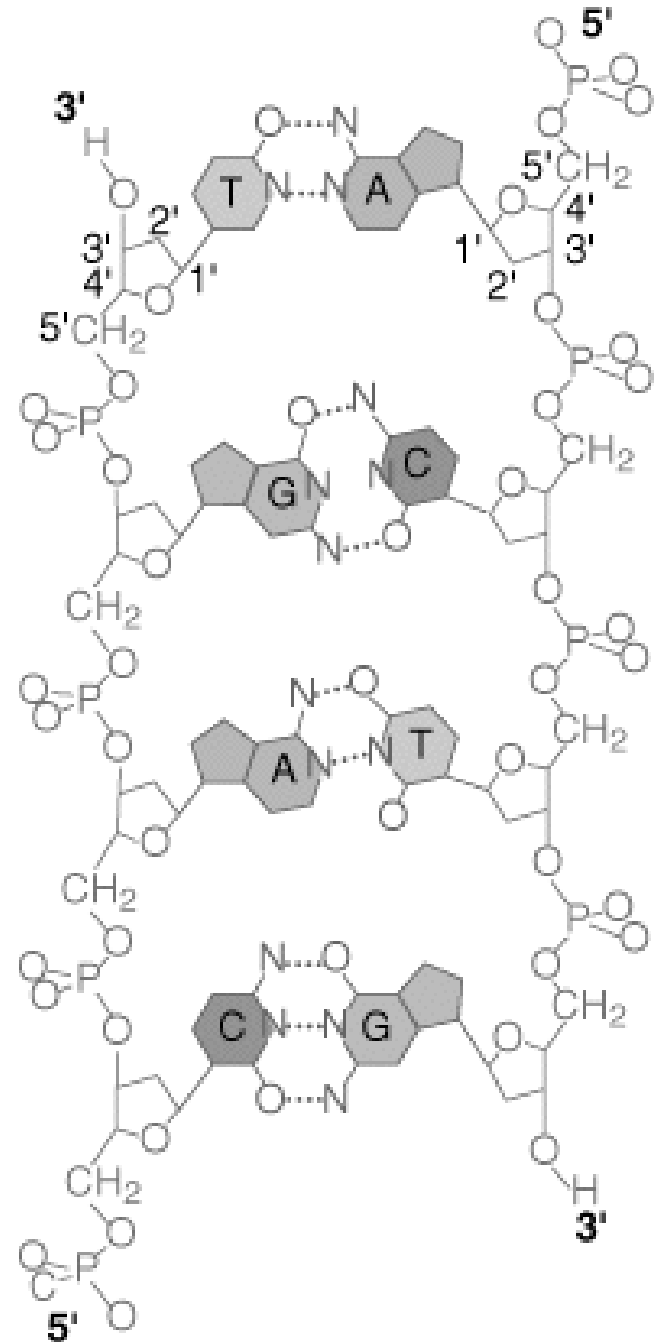
DNA helices are antiparallel

carbons on sugar define ends:
5' and 3'

pyrimidines bond with purines

T : A

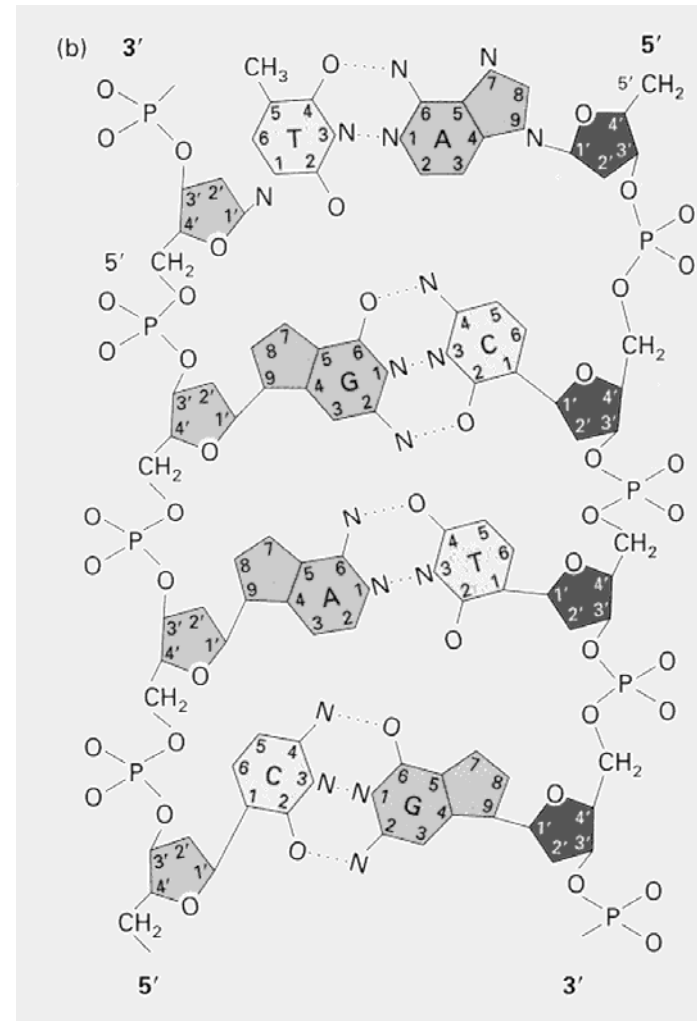
C : G



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.



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**

HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

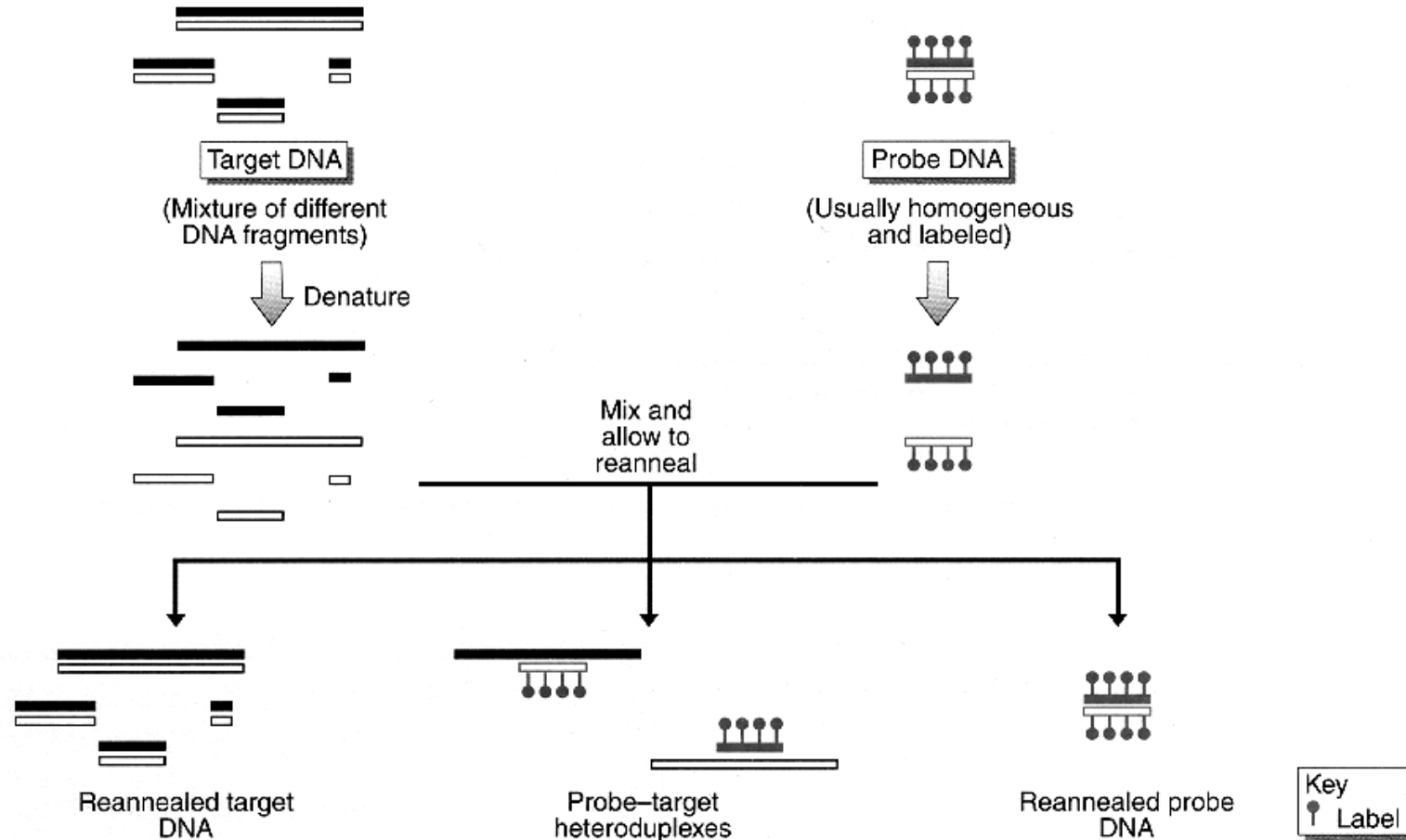


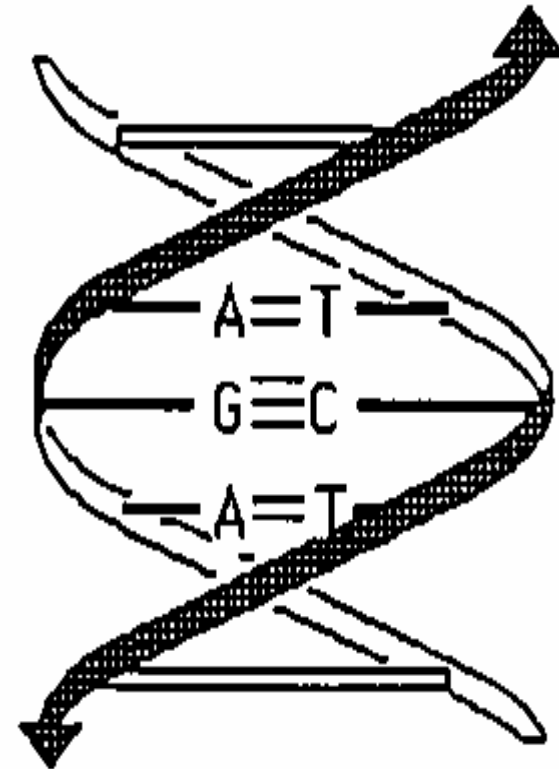
Figure 5.8: A nucleic acid hybridization assay requires the formation of heteroduplexes between labeled single-stranded nucleic acid probes and complementary sequences within a target nucleic acid.

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

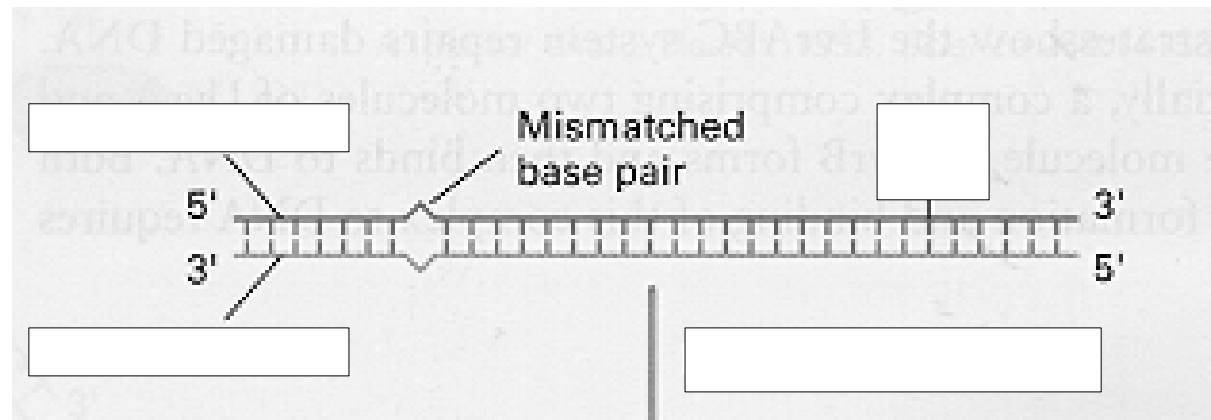
FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LA HIBRIDACION ENTRE ACIDOS NUCLEICOS

- 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

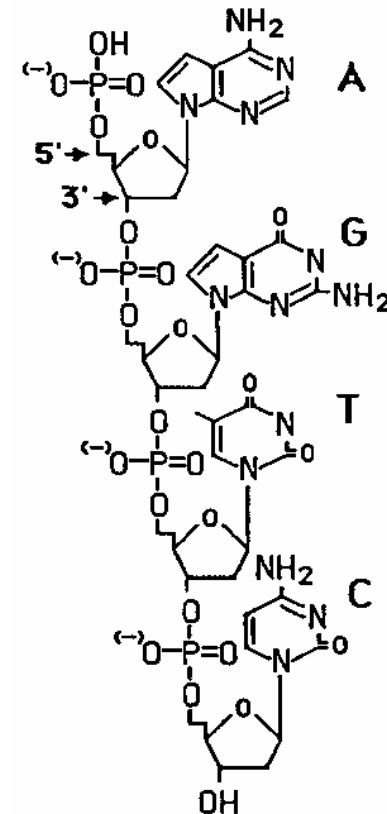


FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LA HIBRIDACION ENTRE ACIDOS NUCLEICOS

- 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 [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^{++})

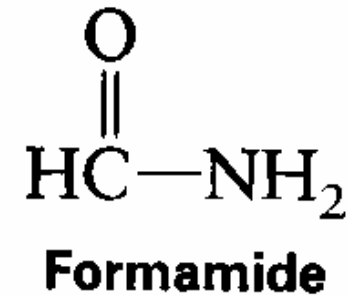


FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LA HIBRIDACION ENTRE ACIDOS NUCLEICOS

- 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

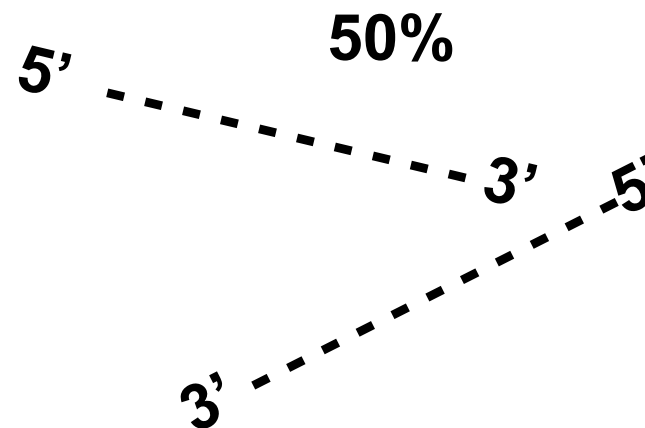
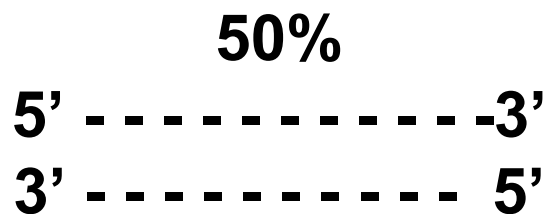


El efecto combinado de estos factores puede ser expresado en una ecuación para el calculo de la Tm

- ¿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

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

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+

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

CINÉTICA DE RE-ASOCIACIÓN

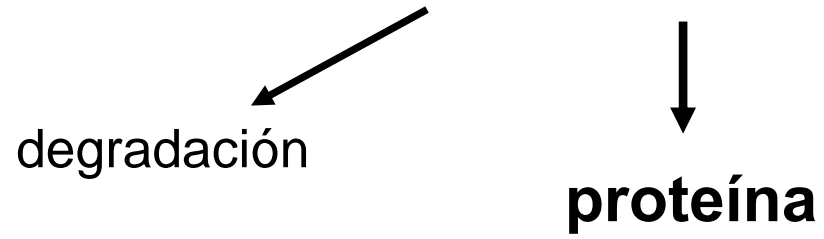
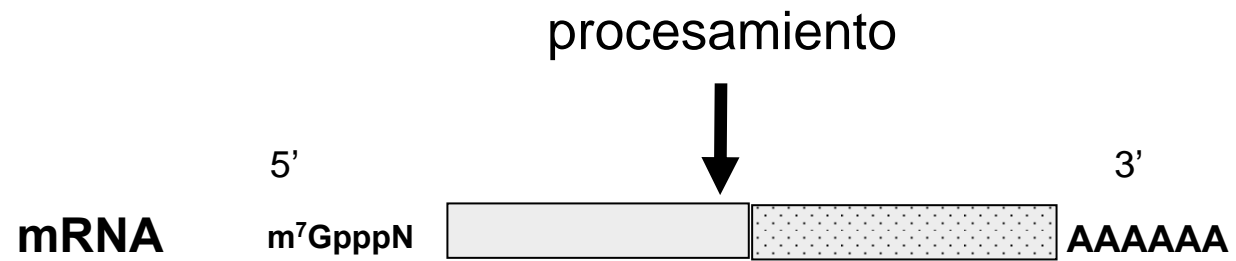
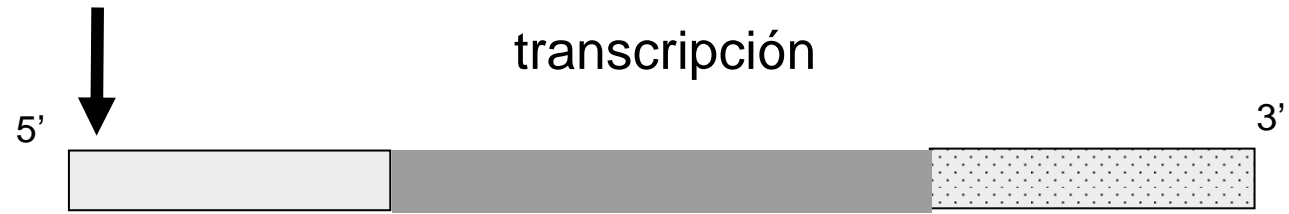
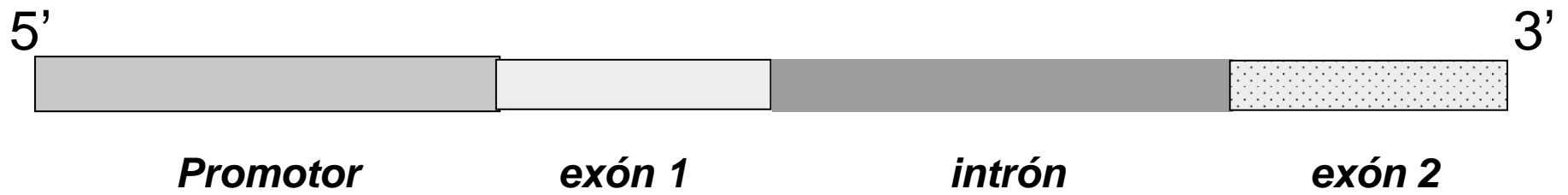
- Cuando el DNA de hebra doble es desnaturalado por calor la velocidad a la cual las hebras vuelven a formar la hebra doble depende de la concentración inicial de DNA.
- Si la concentración de DNA complementario es elevada, el tiempo necesario para la formación del híbrido es menor.
- La cinética de 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.

DETECCION DE ACIDOS NUCLEICOS

- NORTHERN BLOT

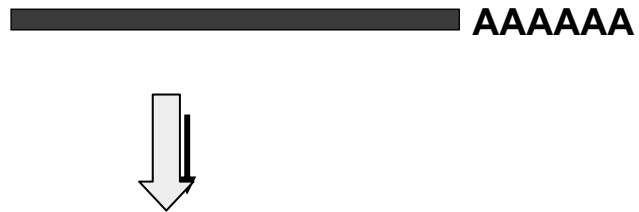
PERMITE DETECTAR LA PRESENCIA DE UN TRANSCRITO.

PROPORCIONA INFORMACION DE SU TAMAÑO, ABUNDANCIA Y POSIBLE PROCESAMIENTO.

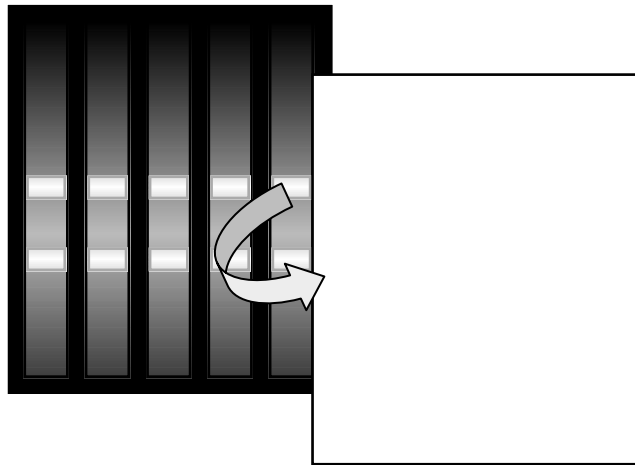


NORTHERN BLOT

1. Extracción del RNA

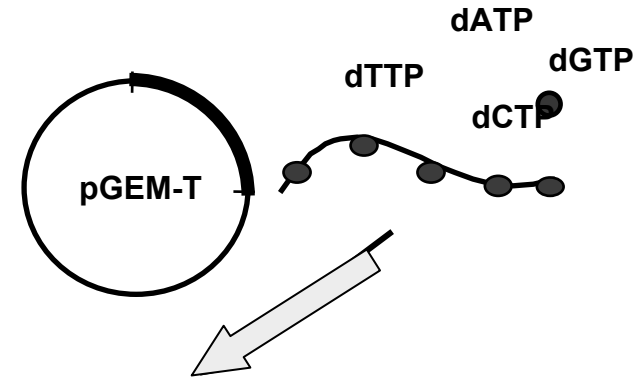


2. Electroforesis del RNA

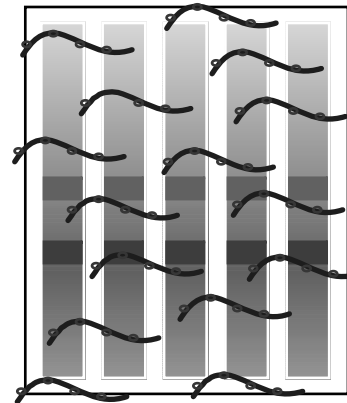


3. Transferencia a membrana

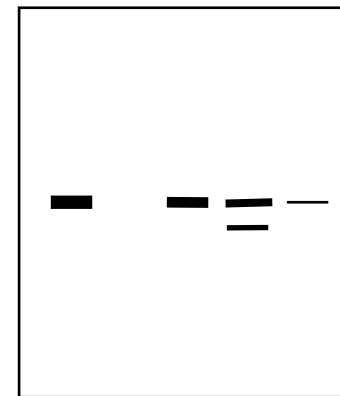
4. Generación de una sonda marcada



5. Hibridación

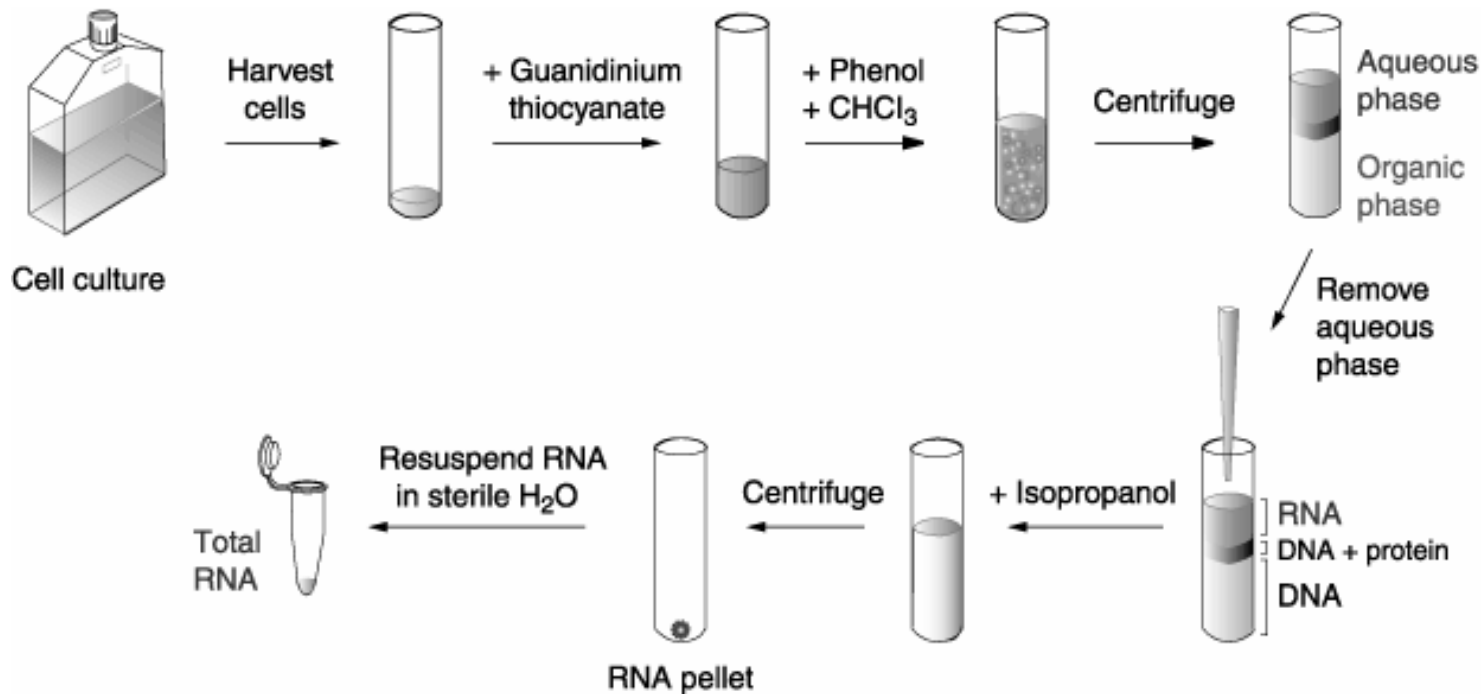


6. Visualización



Extracción del RNA y purificación de mRNA

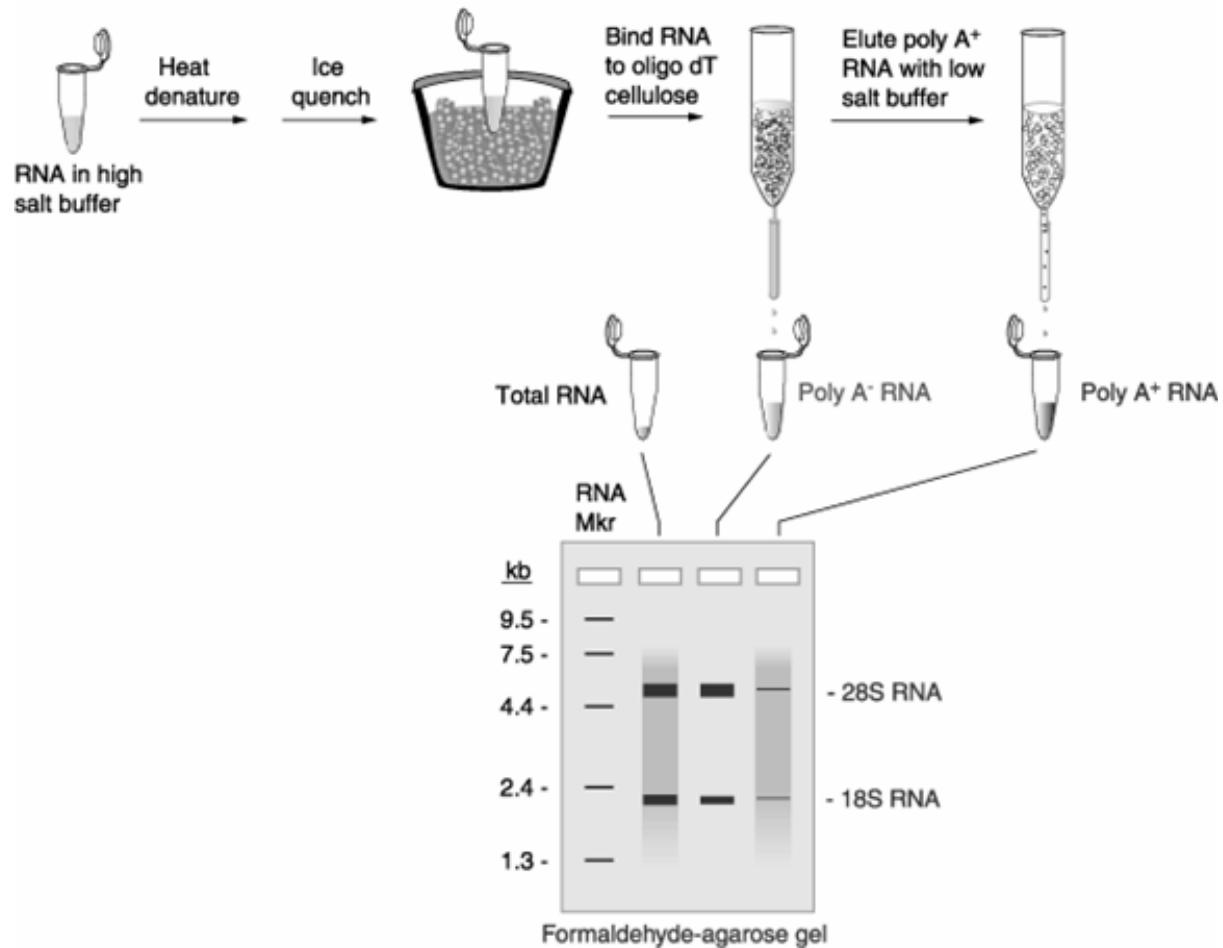
Extracción del RNA



Lisis con tiocianato de guanidina → inactivación de RNAsas.
Partición de DNA, RNA y proteínas en fenol ácido (pH 5-6).
Precipitación con isopropanol + LiCl₂.

Extracción del RNA y purificación de mRNA

Purificación de mRNA



Problemas con RNasas

Pancreatic RNase A



RNasas endoribonucleasa:

- resistentes a agentes quelantes de metales

- sobreviven ebullición y autoclave

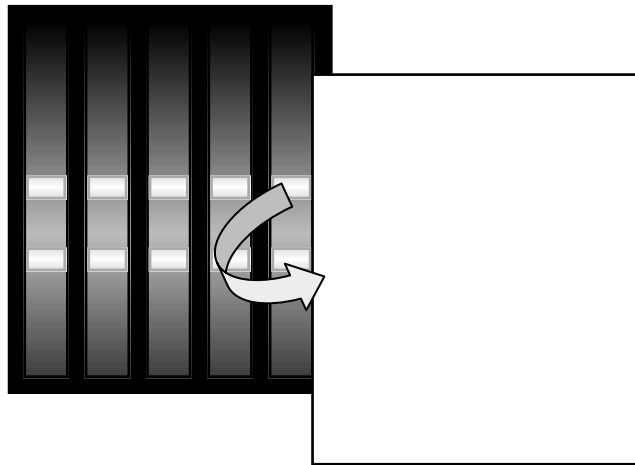
- dependen para su actividad de residuos de histidina presentes en su sitio activo, de manera que puede ser inactivadas con un agente alquilante de histidinas: dietilpirocarbonato (DEPC).

NORTHERN BLOT

1. Extracción del RNA

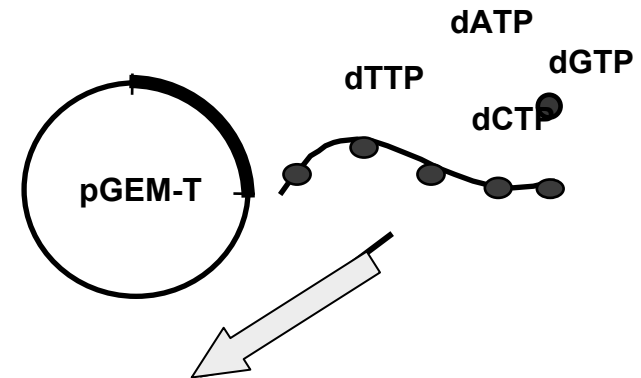


2. Electroforesis del RNA

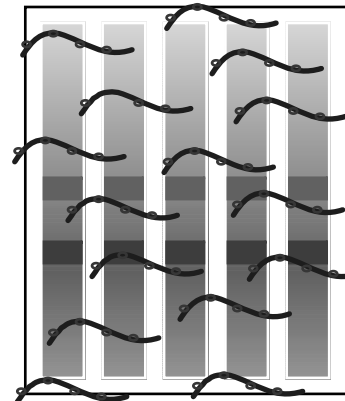


3. Transferencia a membrana

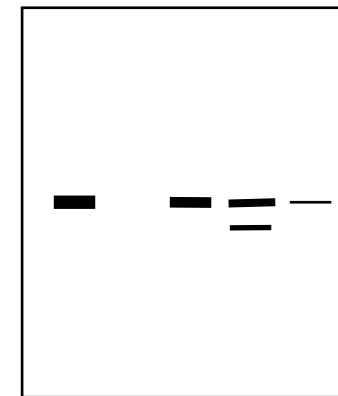
4. Generación de una sonda marcada



5. Hibridación



6. Visualización

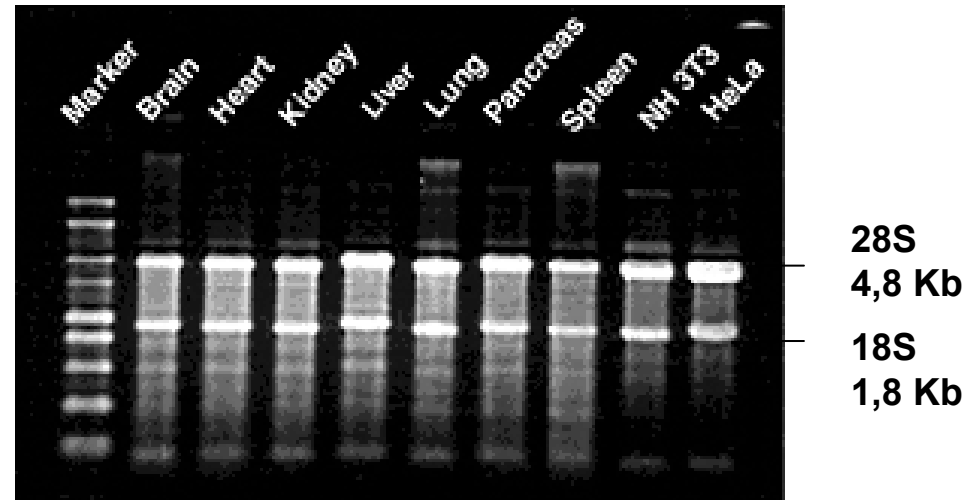
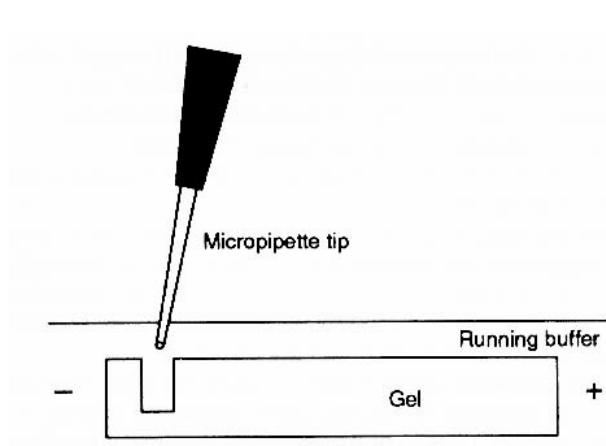


NORTHERN BLOT

2. ELECTROFORESIS DEL RNA

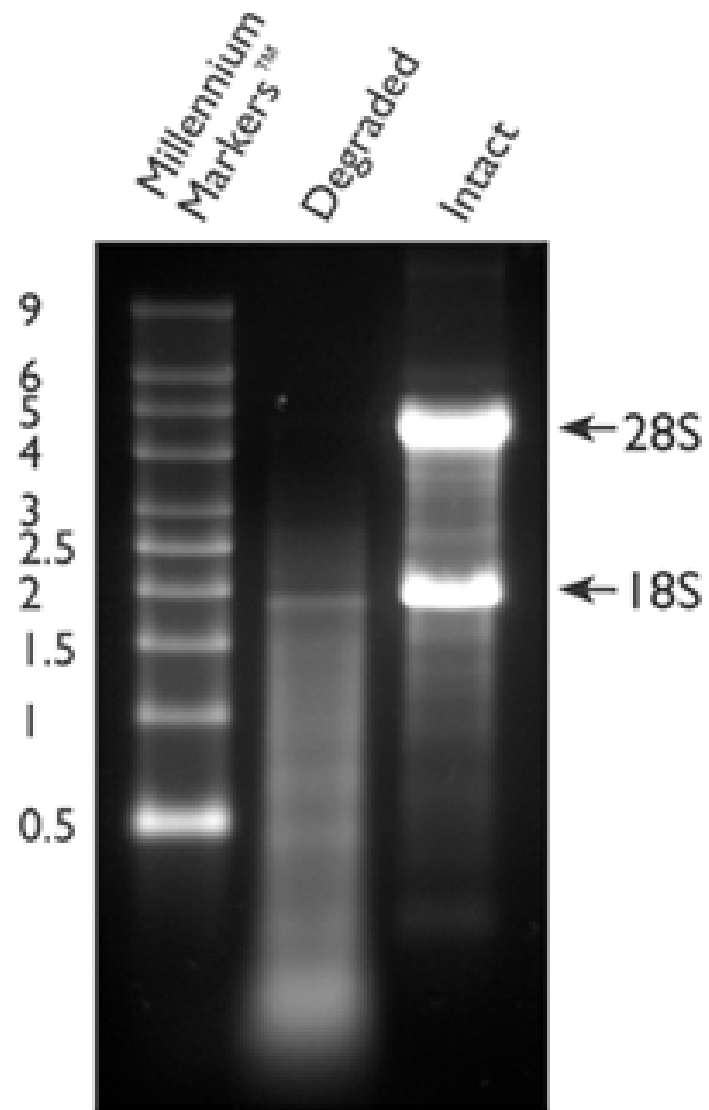
En geles de agarosa

En condiciones desnaturizantes (formaldehído/formamida)



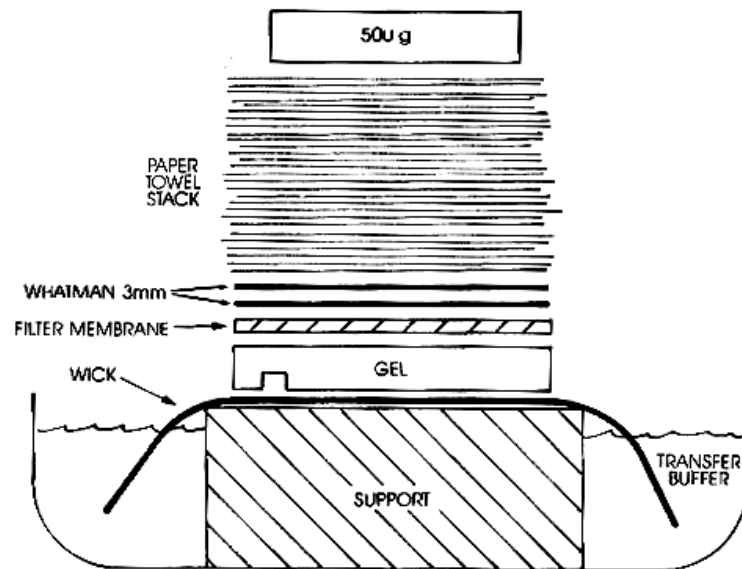
- El gel es teñido con bromuro de etidio y el RNA visualizado en un transiluminador UV

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



NORTHERN BLOT

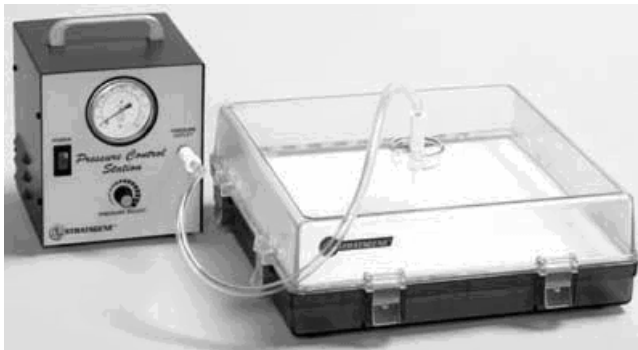
3. TRANSFERENCIA DEL RNA A UNA MEMBRANA



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

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 ($400-500 \mu\text{g}/\text{cc}^2$)
- 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

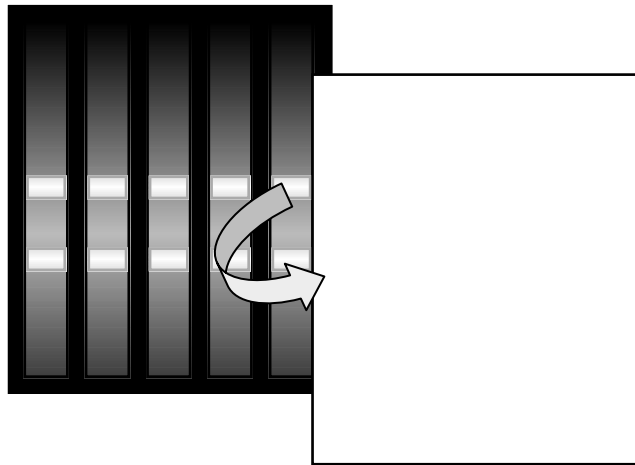
La exposición a la luz UV activa las bases T/U haciéndolas altamente reactivas con los grupos amino de la superficie de la membrana y formando enlaces covalentes. Aumenta la estabilidad y permanencia de los ácidos nucleicos en la membrana.

NORTHERN BLOT

1. Extracción del RNA

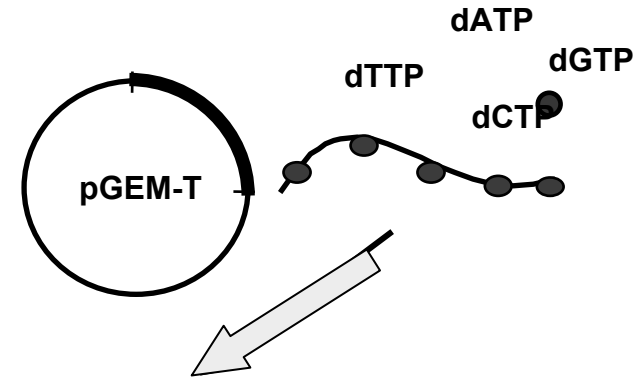


2. Electroforesis del RNA

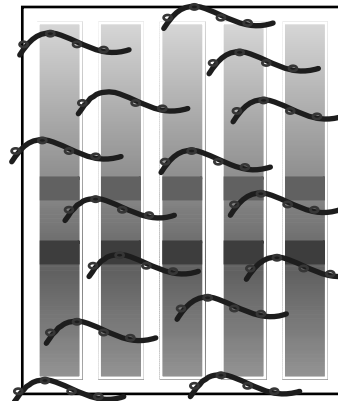


3. Transferencia a membrana

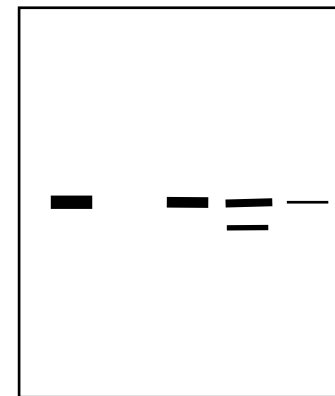
4. Generación de una sonda marcada



5. Hibridación



6. Visualización

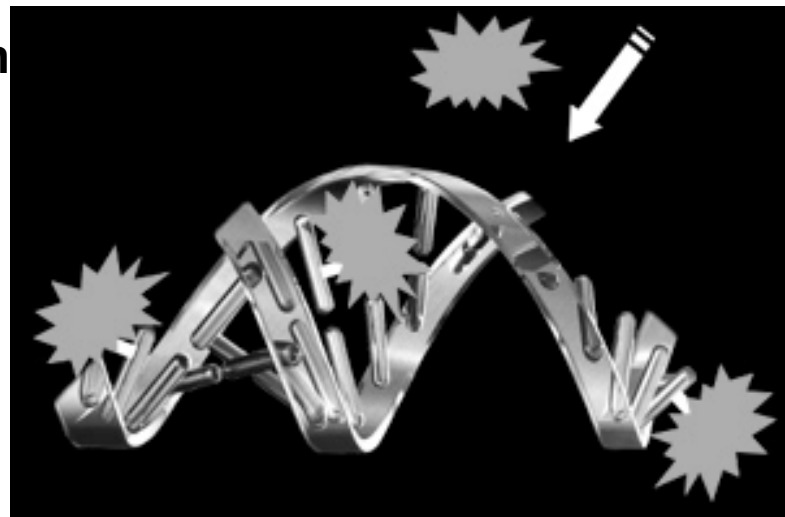


NORTHERN BLOT

4. GENERACION DE UNA Sonda MARCADA



Incorporación de un

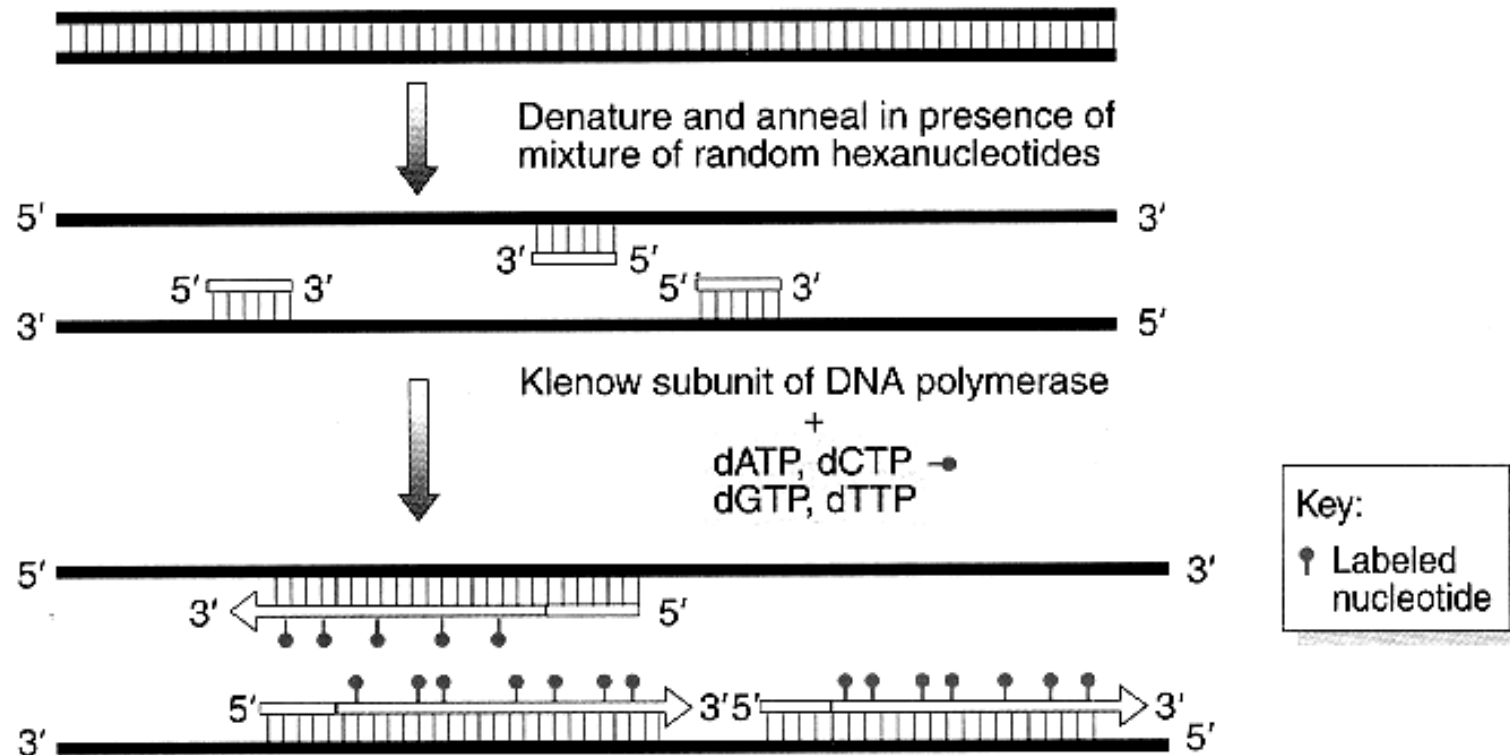


NORTHERN BLOT

4. GENERACION DE UNA SONDA MARCADA

Métodos de síntesis de una sonda marcada

- *Random priming*

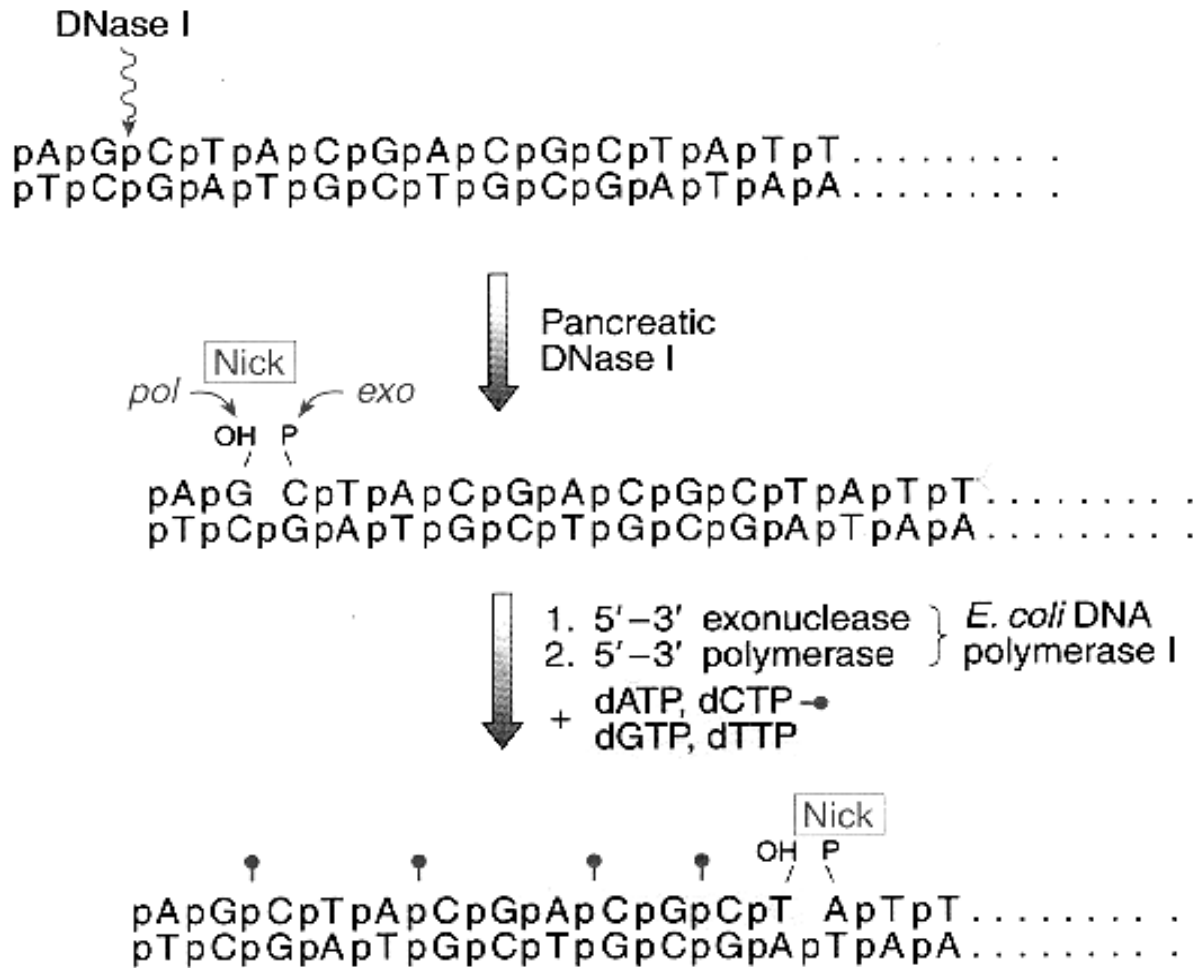


NORTHERN BLOT

4. GENERACION DE UNA SONDA MARCADA

Métodos de síntesis de una sonda marcada

- *Nick-translation*



DNase I rompe el
DNA
al azar

DNA polimerasa I
agrega
nucleótidos

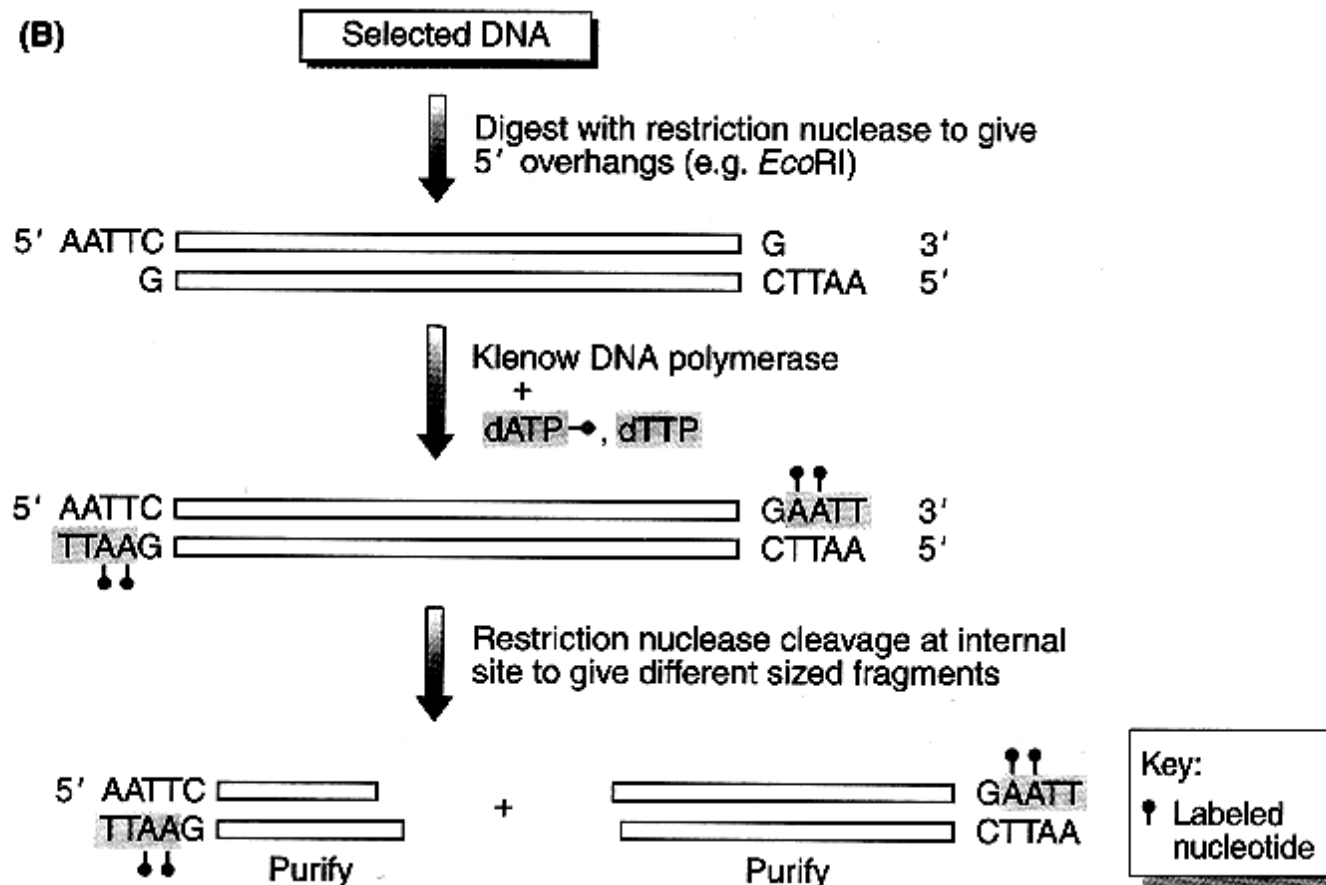
Key:
↑ Labeled
nucleotide

NORTHERN BLOT

4. GENERACION DE UNA SONDA MARCADA

Métodos de síntesis de una sonda marcada

- *End-labeling*



Síntesis de sonda de RNA

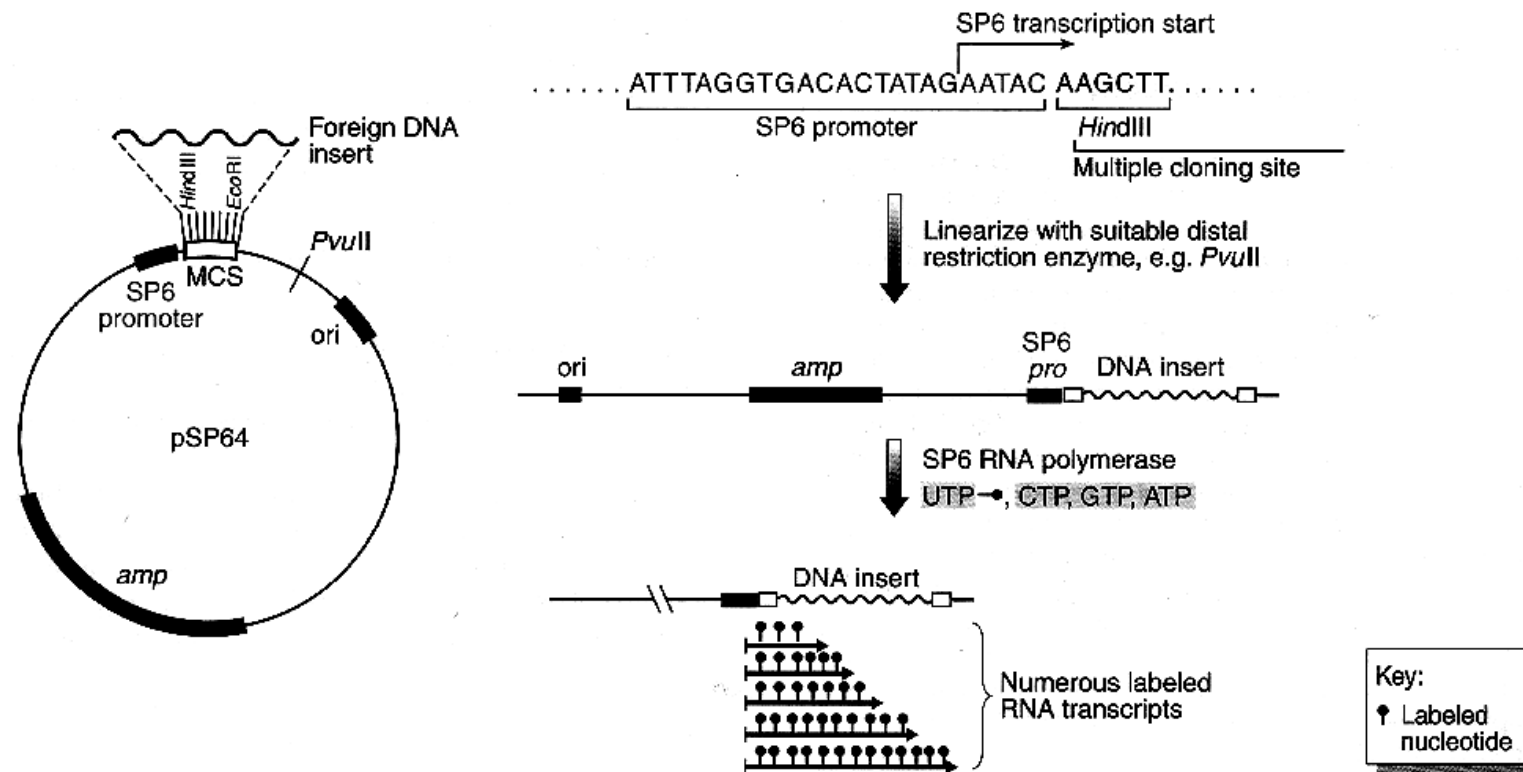


Figure 5.4: Riboprobes are generated by run-off transcription from cloned DNA inserts in specialized plasmid vectors.

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).

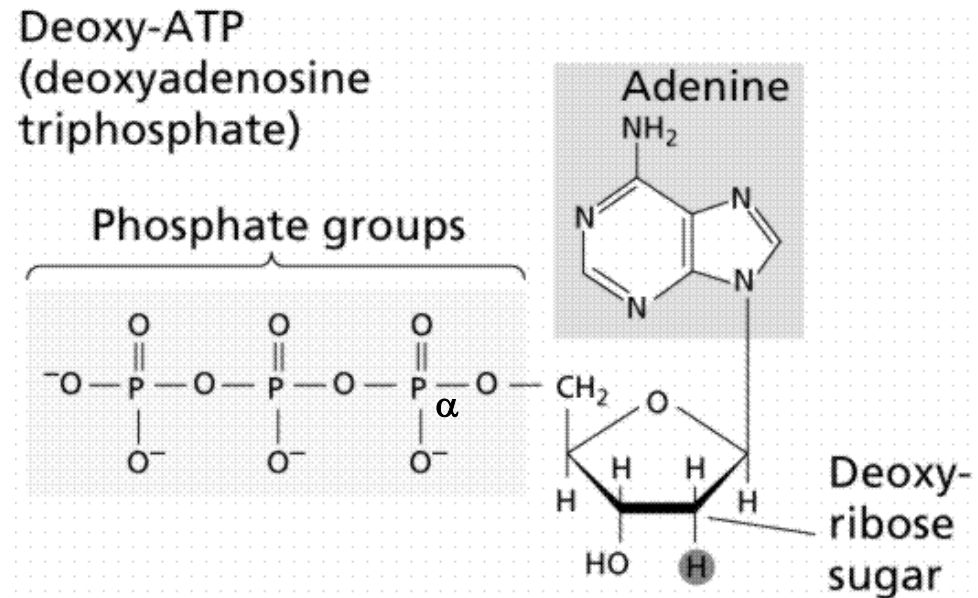
NORTHERN BLOT

4. GENERACION DE UNA SONDA MARCADA

TIPOS DE MARCA

1. Radioactiva:

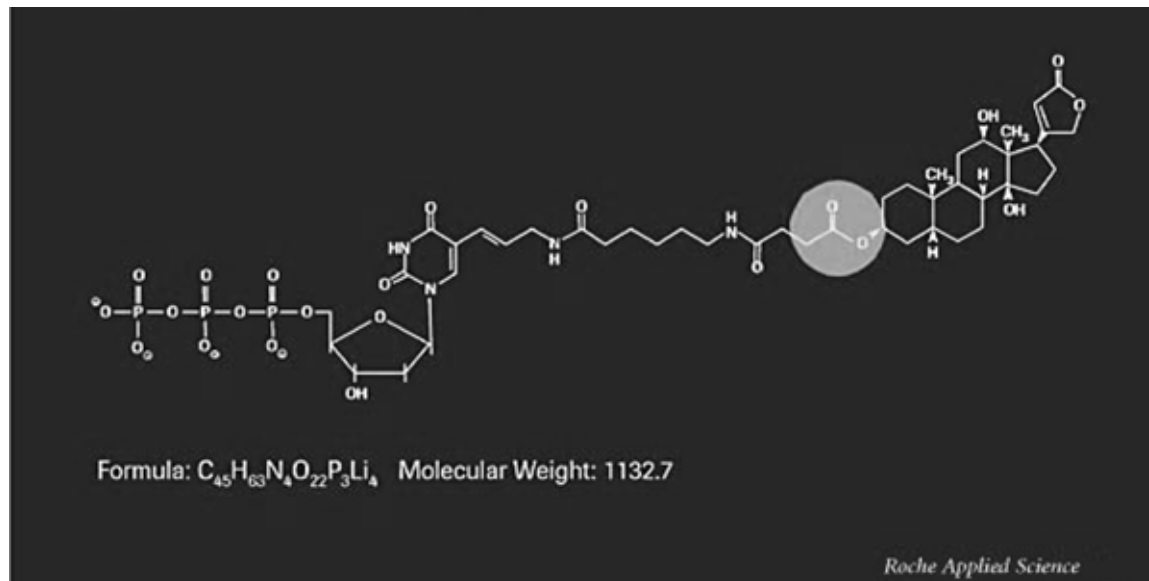
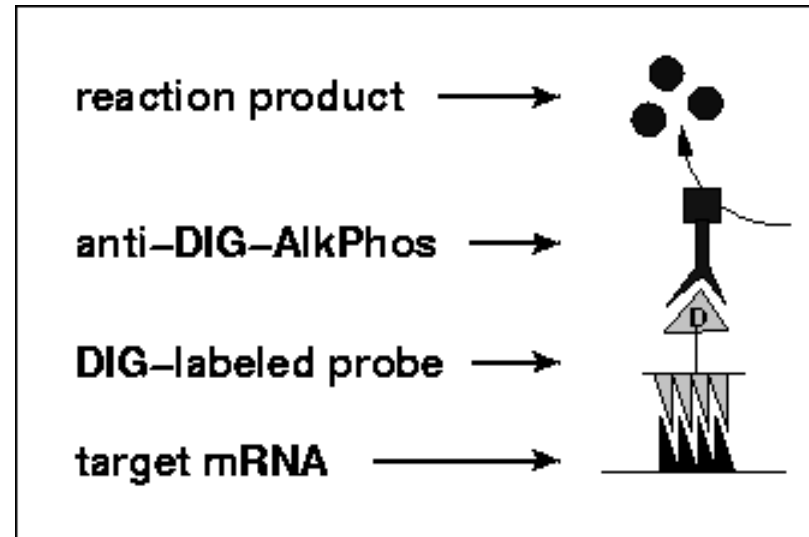
- dNTPs marcados en posición α con $^{32}\text{P}/^{33}\text{P}$
- muy sensible
- contaminante
- vida media del isótopo



NORTHERN BLOT

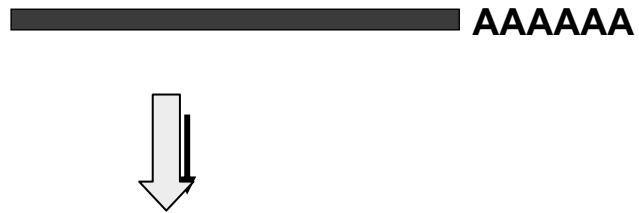
2. No radioactiva:

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

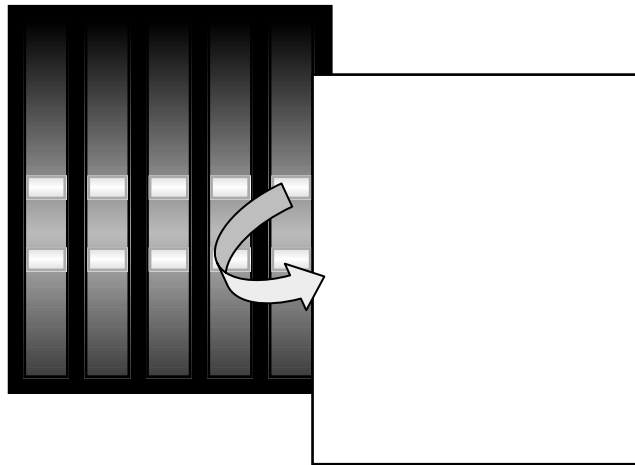


NORTHERN BLOT

1. Extracción del RNA

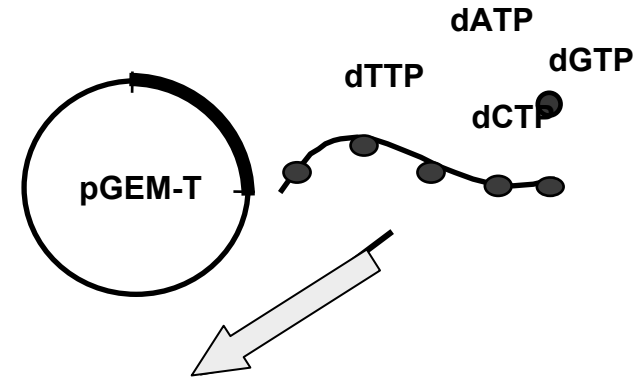


2. Electroforesis del RNA

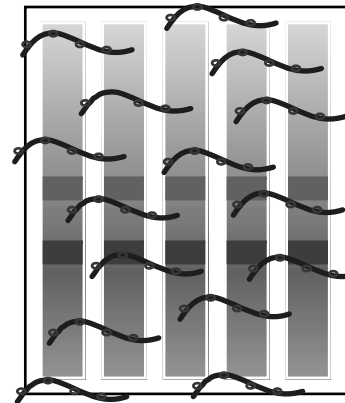


3. Transferencia a membrana

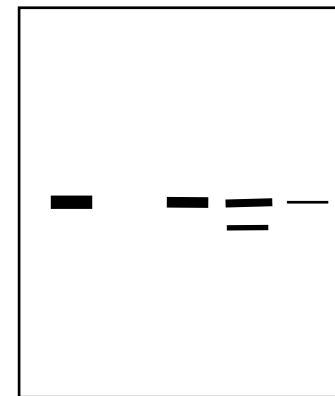
4. Generación de una sonda marcada



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

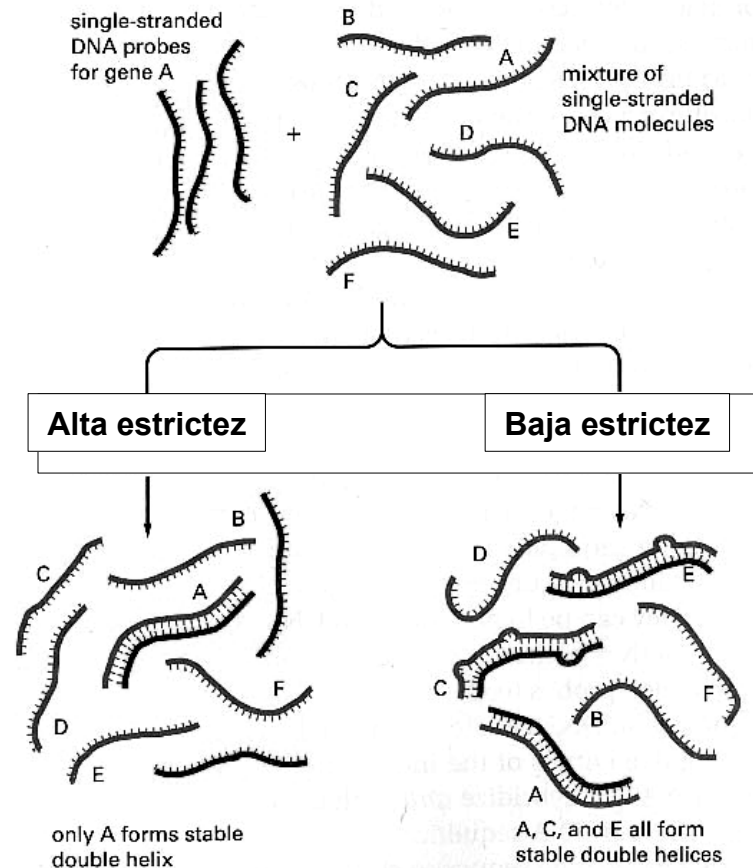
NORTHERN BLOT

ESTRICTEZ:

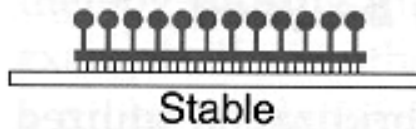
- Una medida de la probabilidad de separar dos hebras de ácidos nucleicos.
- Una medida de la habilidad de un ac. nucleico de hebra simple (sonda) de discriminar entre moléculas con las que comparte un alto o un bajo grado de complementariedad

–↑ estrictez → ↑ probabilidad de separar dos hebras

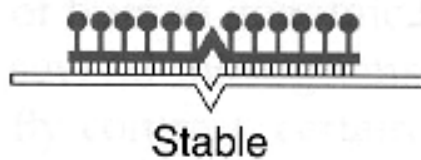
- Bajar la [sal]
- Aumentar la T°
- Incluir formamida



**Conventional
DNA probe**



Perfect
match



Single
mismatch
(e.g. allelic)



Stable
at reduced
hybridization
stringency

20% mismatch
(e.g. coding
sequences of
human and
mouse genes)

Las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos permiten la identificación de secuencias que pueden ser considerablemente diferentes a la sonda utilizada.

NORTHERN BLOT

C) Lavados

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

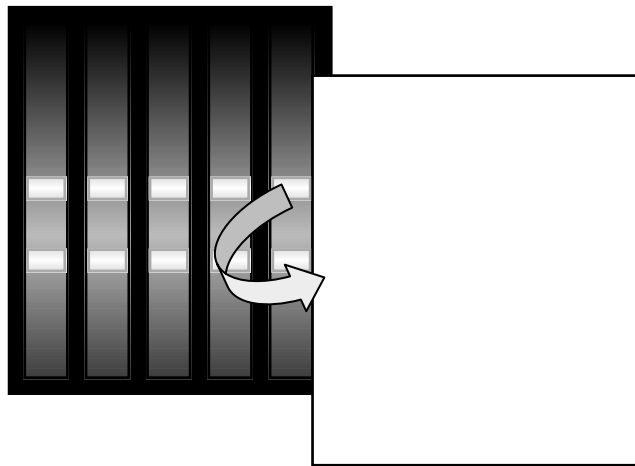
- ¿Cómo?
 - Incubando la membrana en una solución que carece de sonda marcada
 - Utilizando condiciones que minimizan la hibridación inespecífica.
 - Estrictez

NORTHERN BLOT

1. Extracción del RNA

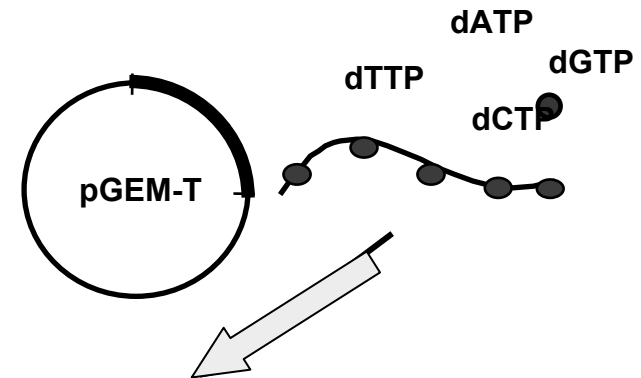


2. Electroforesis del RNA

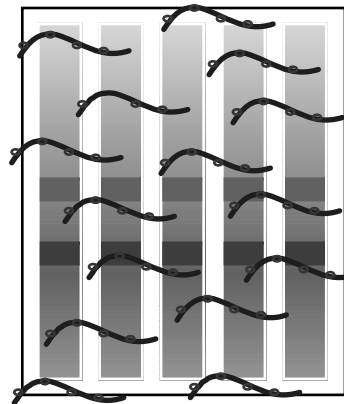


3. Transferencia a membrana

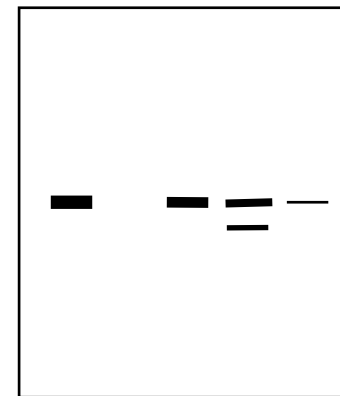
4. Generación de una sonda marcada



5. Hibridación



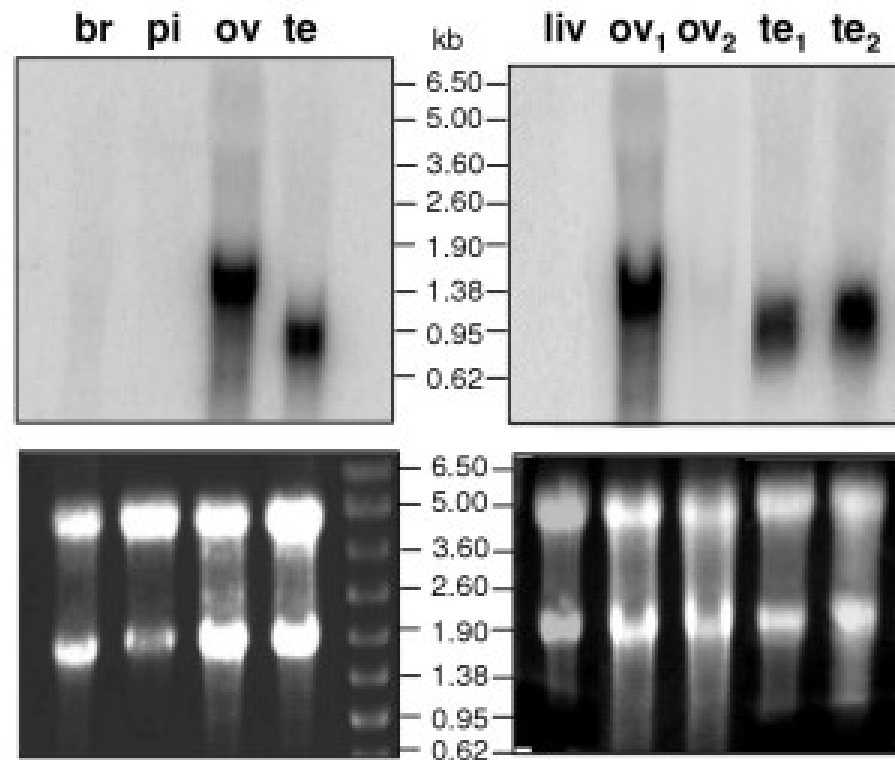
6. Visualización



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



DETECCION DE ACIDOS NUCLEICOS

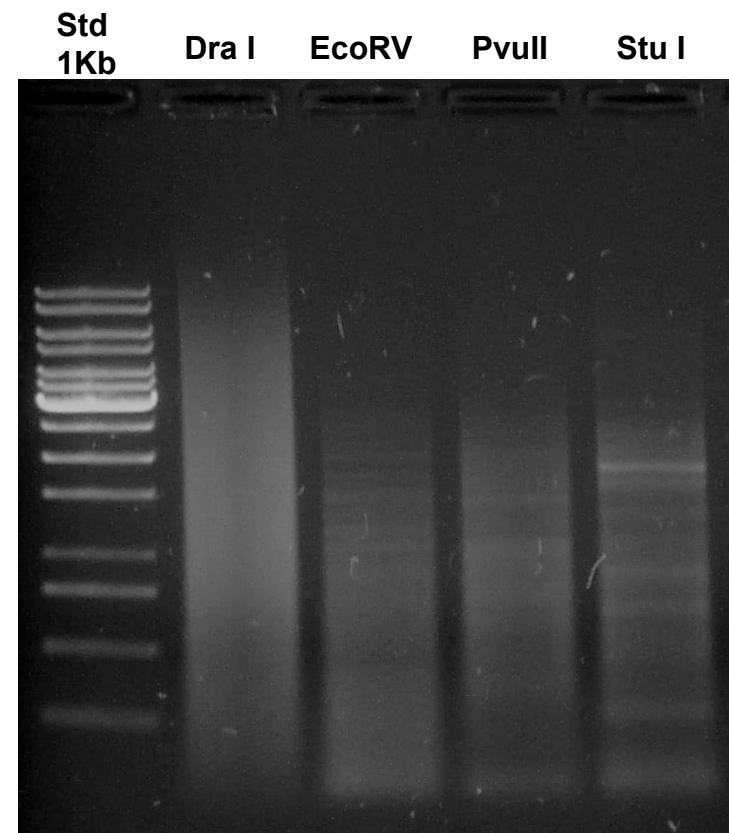
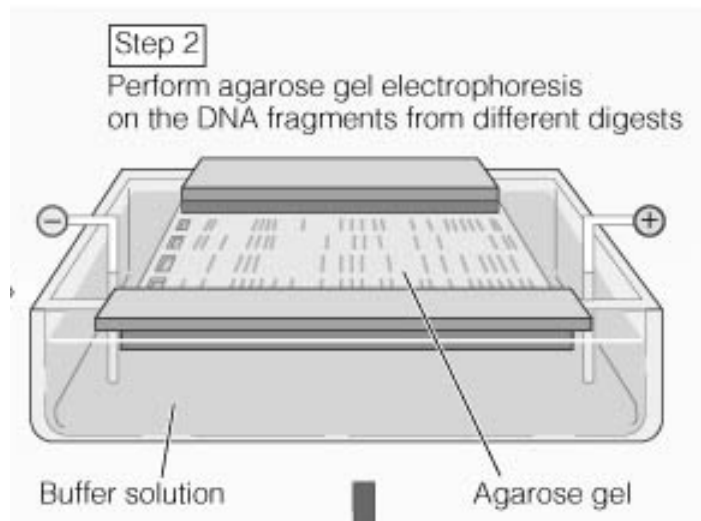
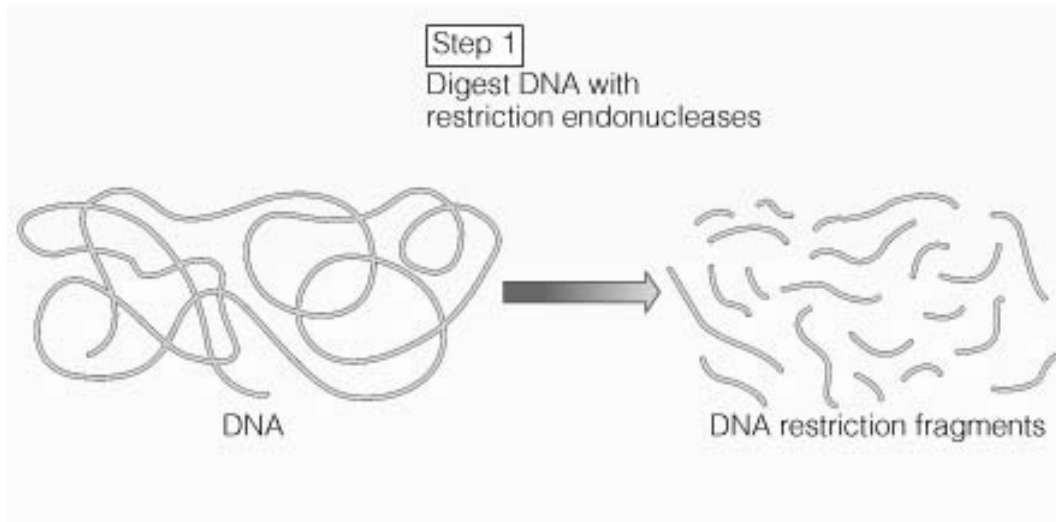
- SOUTHERN BLOT

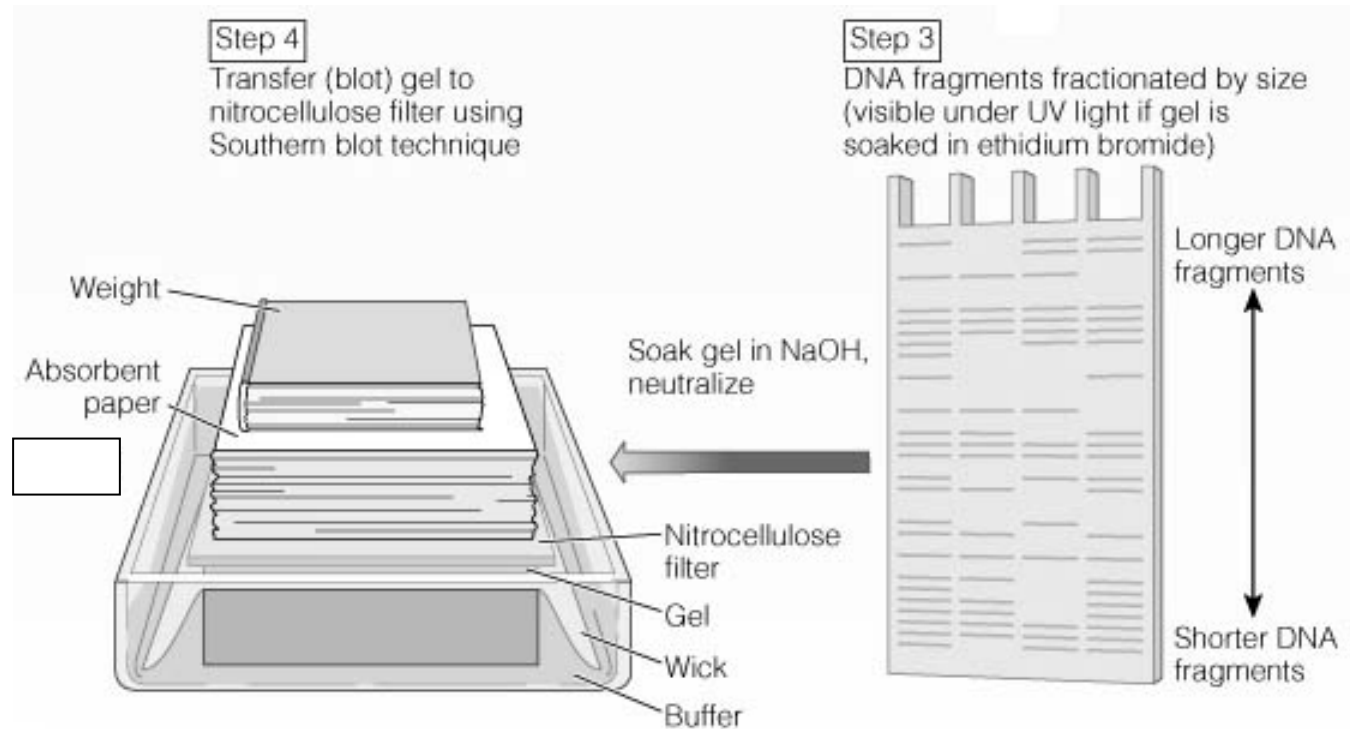
PERMITE DETECTAR LA PRESENCIA Y EL NUMERO DE COPIAS DE UN GEN EN UN GENOMA.

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





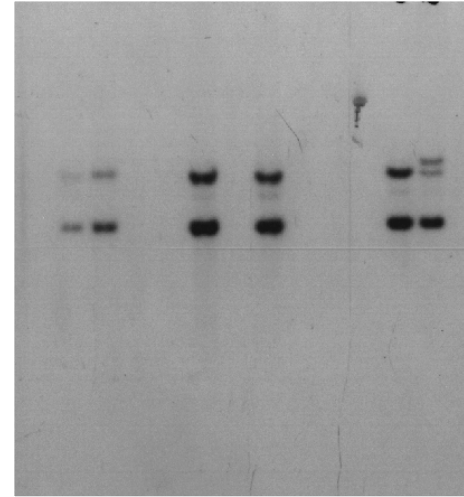
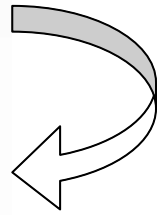
1. Los fragmentos de DNA en el gel son desnaturados en un buffer alcalino.
 - pH alcalino desnatura el DNA a la forma de hebra simple
2. El DNA es transferido a una membrana de nylon en buffer SSC (standard saline citrate)
 - Alta concentración de sal regula la estrictez (especificidad de unión de la 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

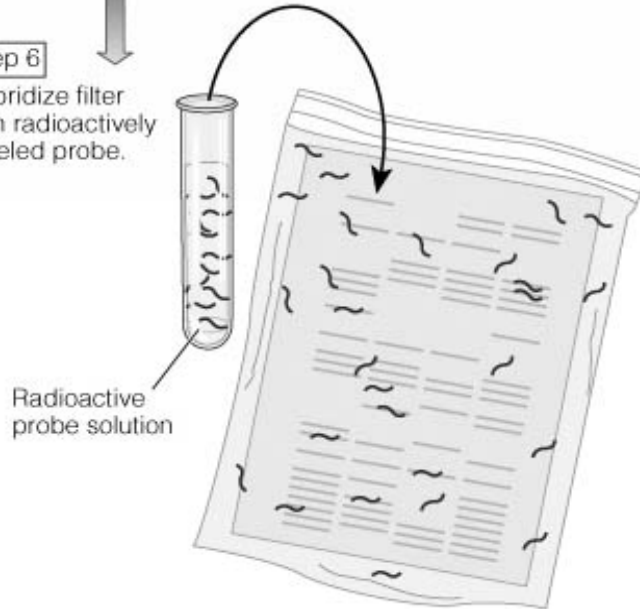


Uv



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

