

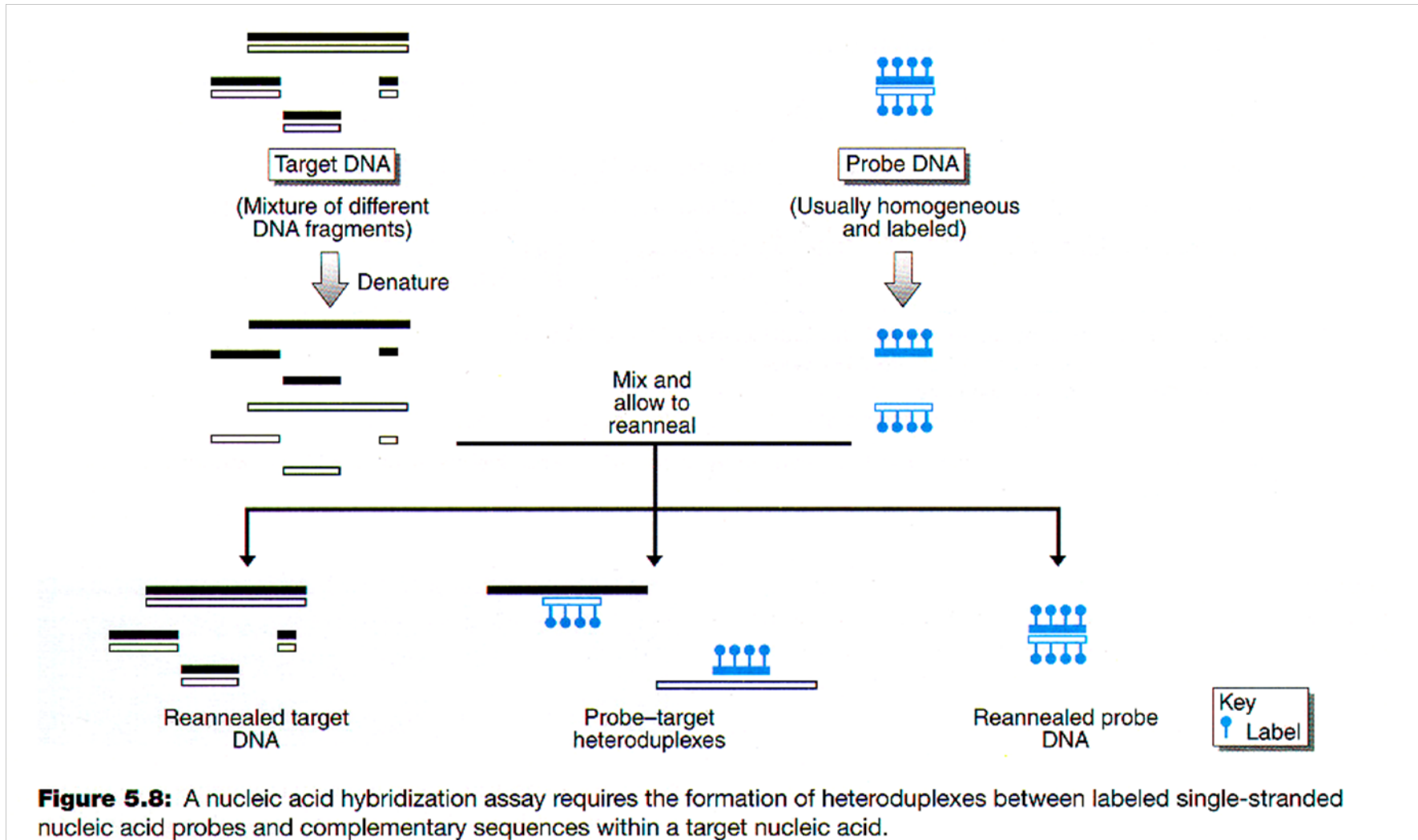
ENSAYOS DE HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

- ❖ 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



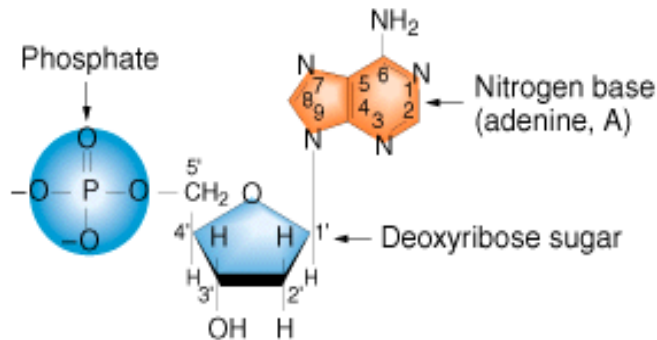
ENSAYOS DE HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

- 1. RNA
 - *NORTHERN BLOT* CONVENCIONAL
 - *NORTHERN BLOT* REVERSO
 - HIBRIDACION *IN SITU*

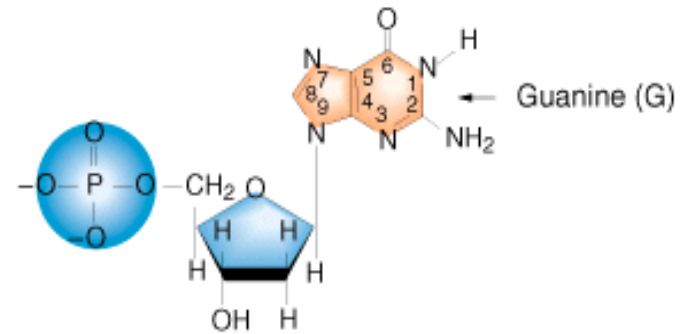
- 2. DNA
 - *SOUTHERN BLOT*
 - ANALISIS DE GENOTECAS

Estructura de los nucleótidos

Purine nucleotides

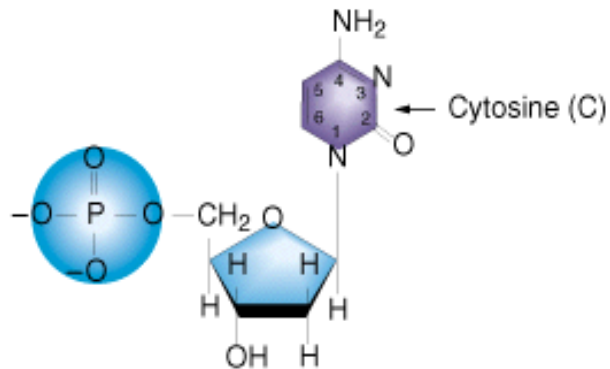


Deoxyadenosine 5'-phosphate (dAMP)

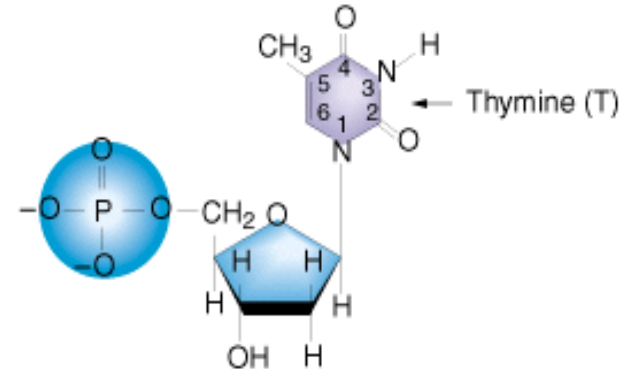


Deoxyguanosine 5'-phosphate (dGMP)

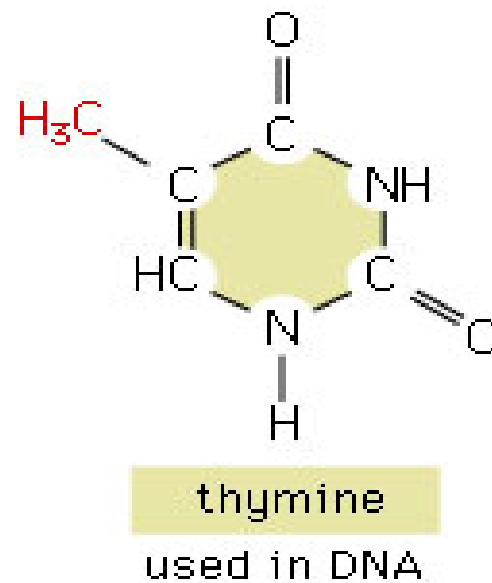
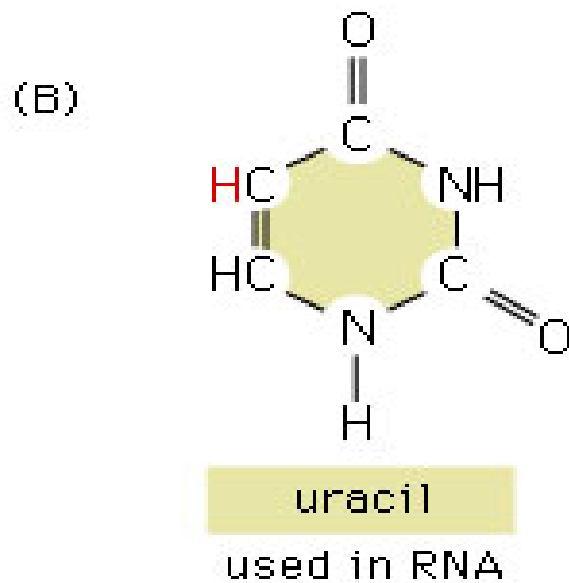
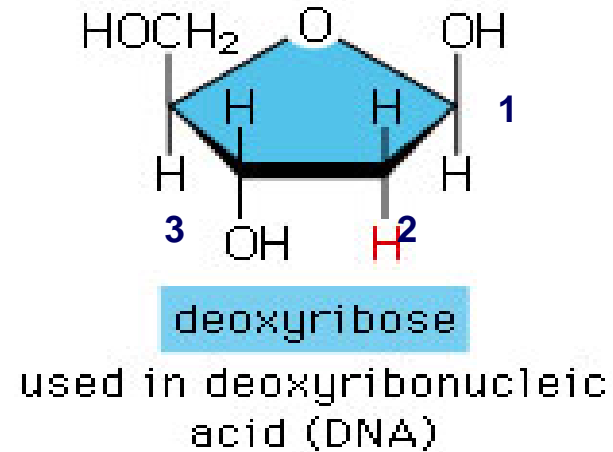
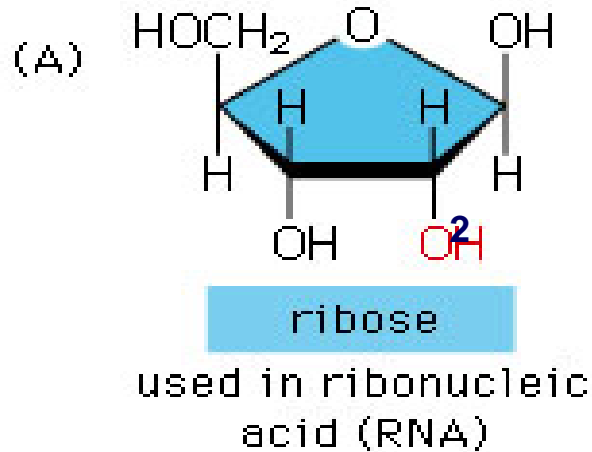
Pyrimidine nucleotides



Deoxycytidine 5'-phosphate (dCMP)



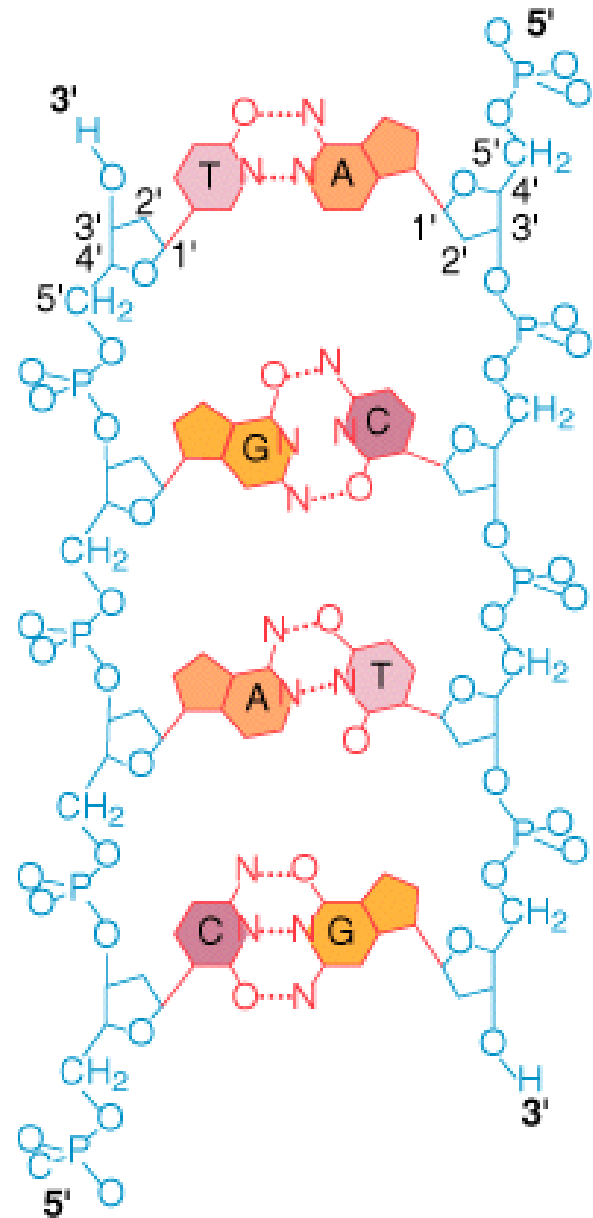
Deoxythymidine 5'-phosphate (dTMP)



©1998 GARLAND PUBLISHING

Estructura del DNA

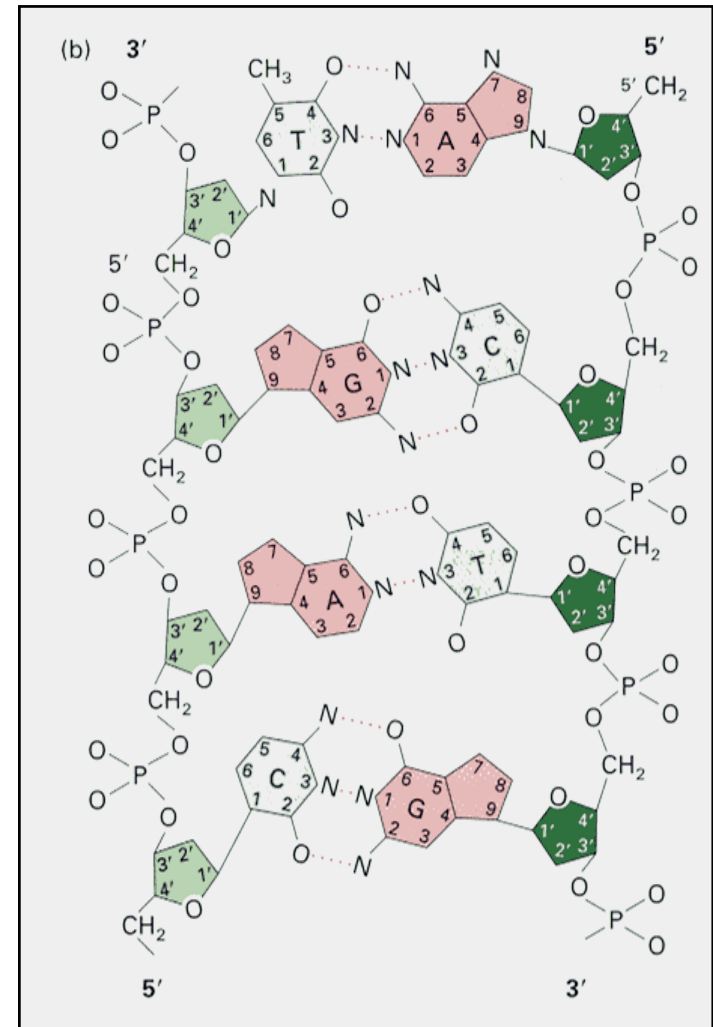
- Las moléculas de azúcar se unen a través de grupos fosfato formando enlaces fosfodiéster entre los átomos de carbono tercero (3') y quinto (5') de dos anillos adyacentes.
- Uniones asimétricas → cadenas antiparalelas con las bases nitrogenadas enfrentadas y unidas por puentes de hidrogeno.
- Apareamiento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



Estructura del DNA

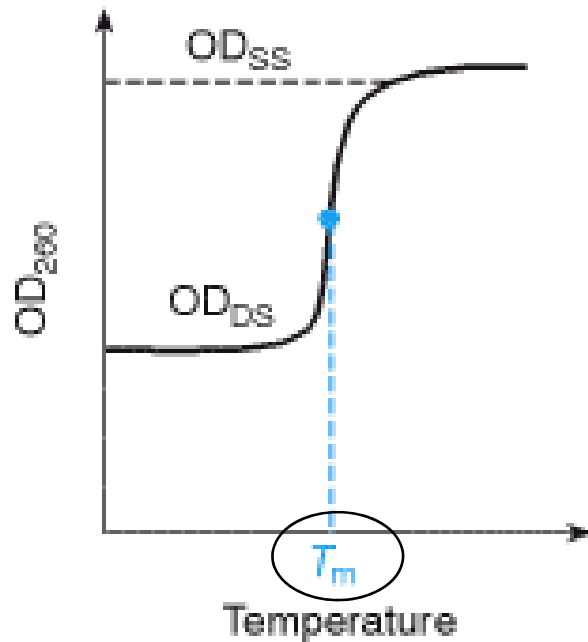
¿Cómo se mantienen unidas las dos hebras?

- 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 $\sim 90^\circ\text{C}$ 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

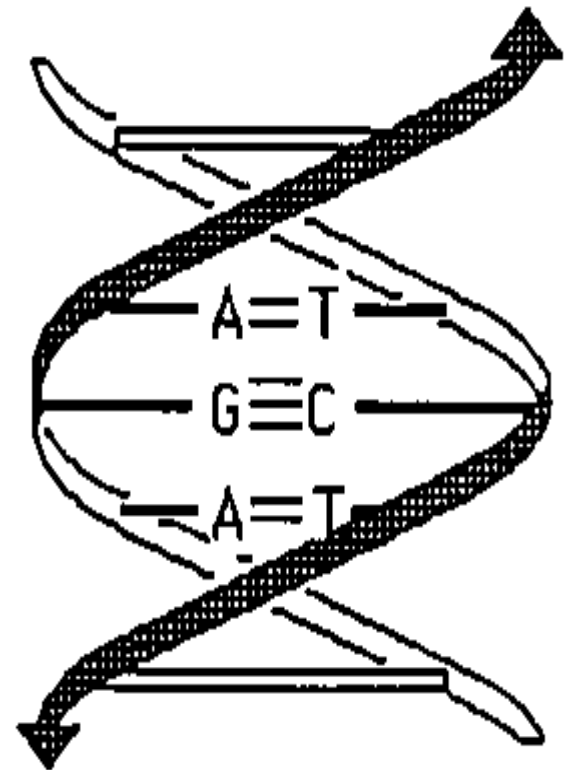
- La energía requerida para separar dos moléculas complementarias depende de varios factores:
 1. Largo de las hebras
 2. Composición de bases
 3. Composición química de la solución.
- Ensayos de hibridación → condiciones que promuevan la formación del heteroduplex, la temperatura de hibridación suele 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**

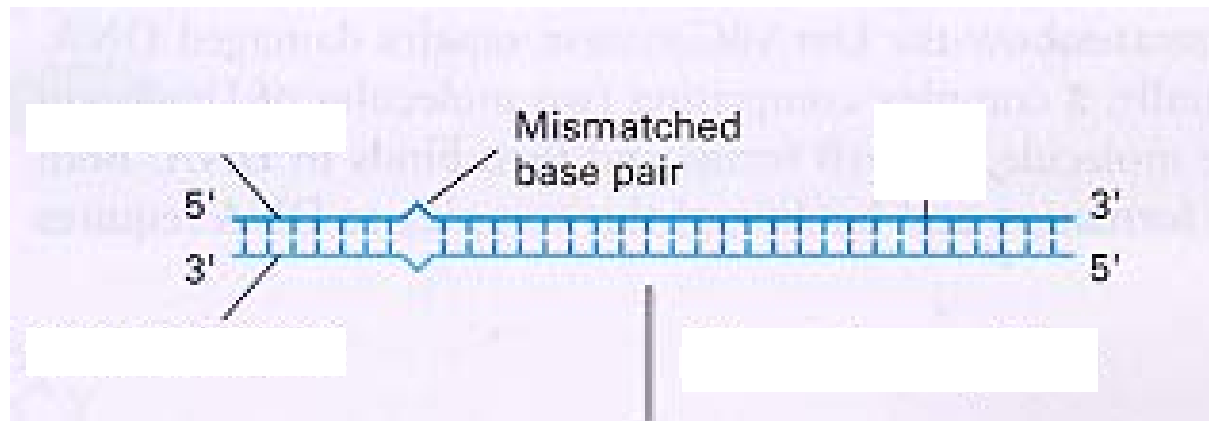
Factores que afectan la formación del heteroduplex

- 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

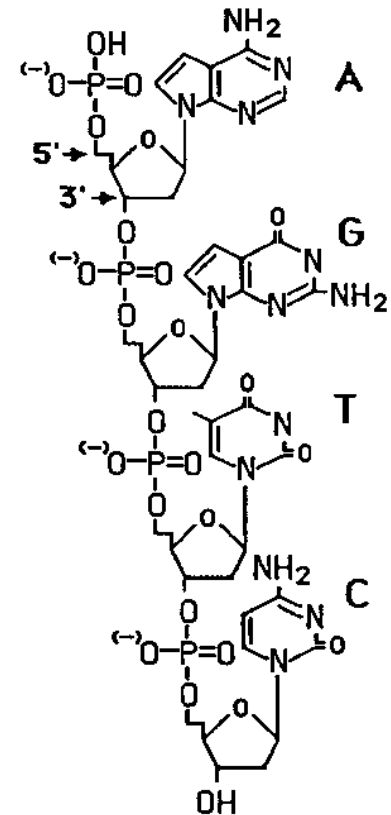


Factores que afectan la formación del heteroduplex

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

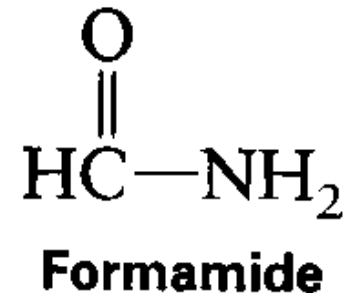
Factores que afectan la formación del heteroduplex

- 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 (Na^+) o divalentes (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° → 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

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

Para DNA:RNA

$$Tm = 79,8 \text{ °C} + 18,5\log[Na] + 58,4(\%G+C) + 11,8(\%G+C)^2 - 0,5(\%formamida) - (820/L)$$

Para oligonucleotidos en 1 M Na+

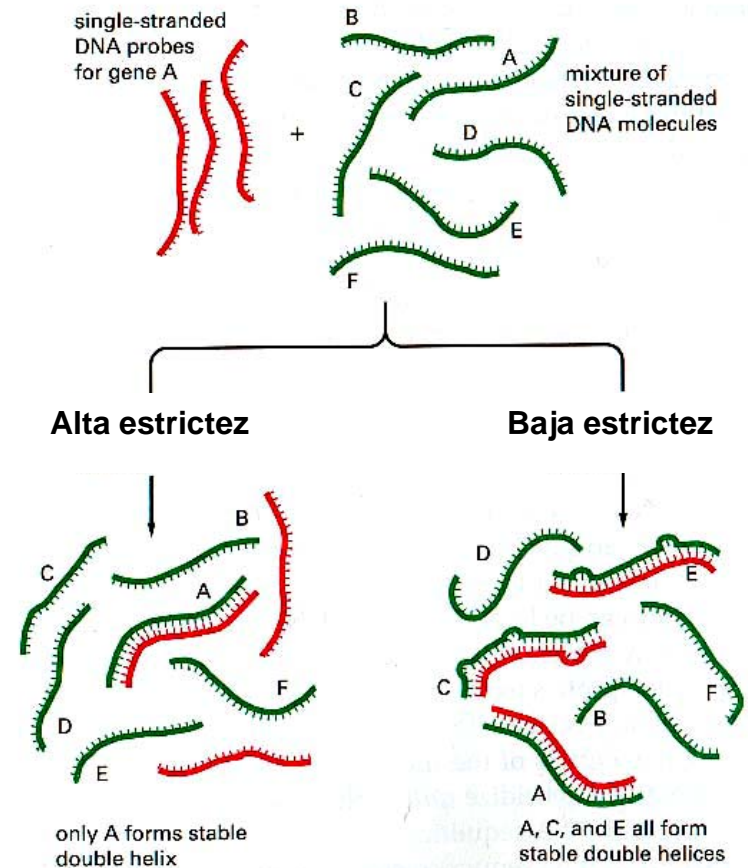
$$Tm (\text{°C}) = 4 (G+C) + 2 (A+T)$$

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

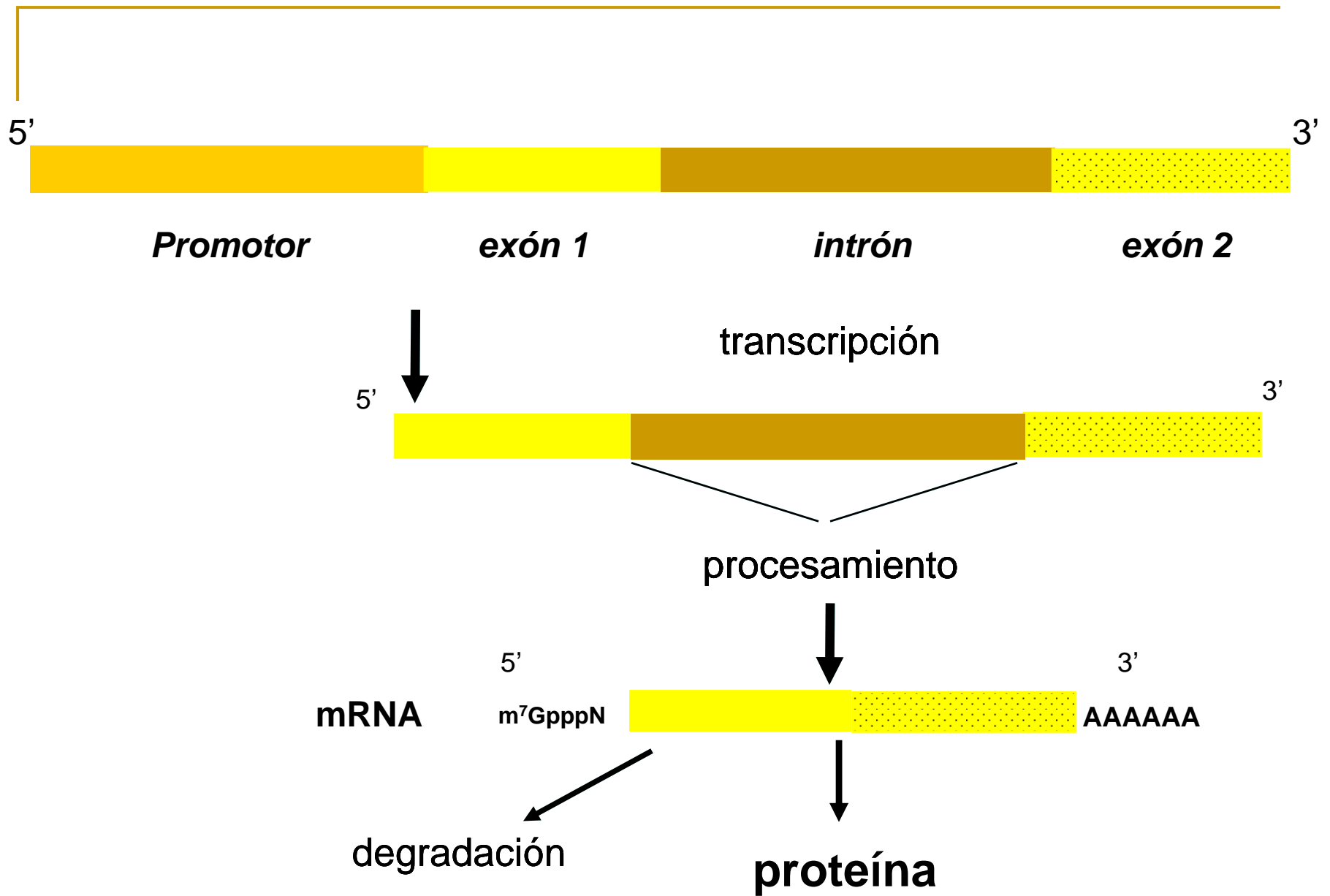
- Cuando el DNA de hebra doble es desnaturado por calor la velocidad a la cual se vuelve a formar la hebra doble depende de la concentración inicial de DNA.
- Si la concentración de DNA complementario es elevada, el tiempo necesario para la formación del híbrido es menor.
- La cinética de reasociación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

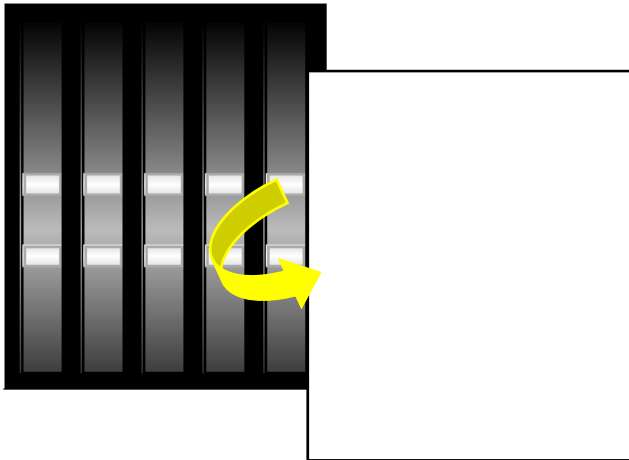


NORTHERN BLOT

1. Extracción del RNA



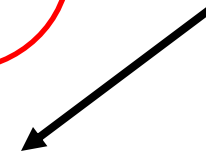
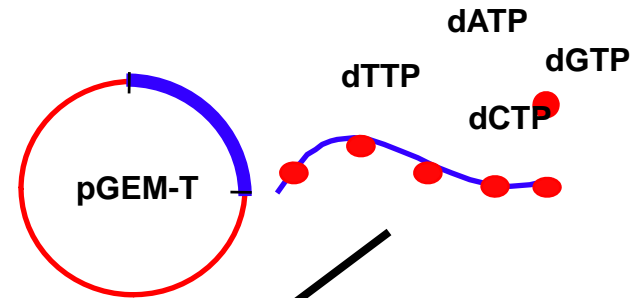
2. Electroforesis del RNA



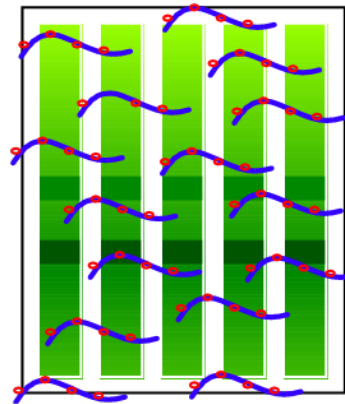
3. Transferencia a membrana



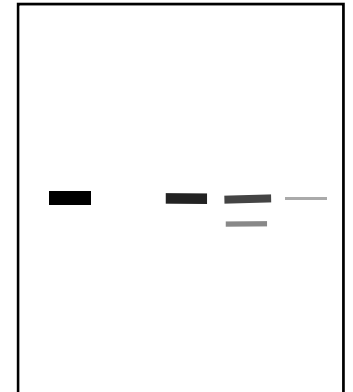
4. Generación de una sonda marcada



5. Hibridación

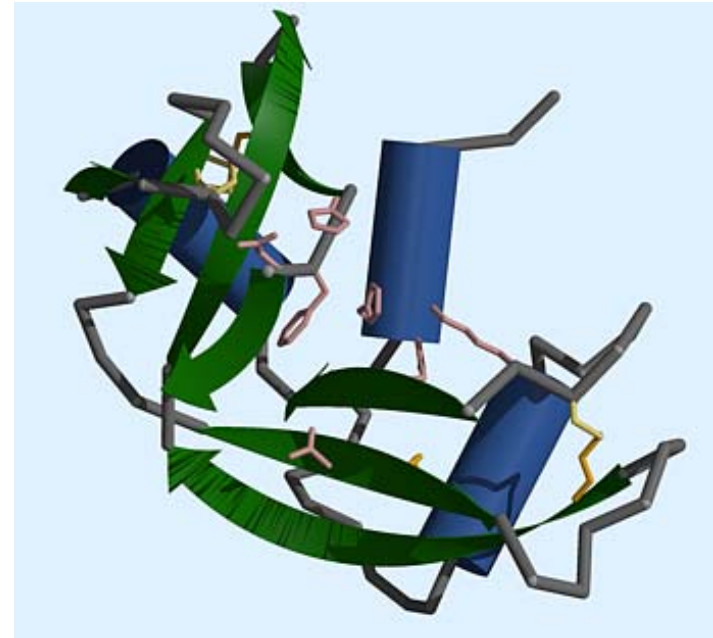


6. Visualización



Problemas con RNasas

Pancreatic RNase A



RNasas endoribonucleasa:

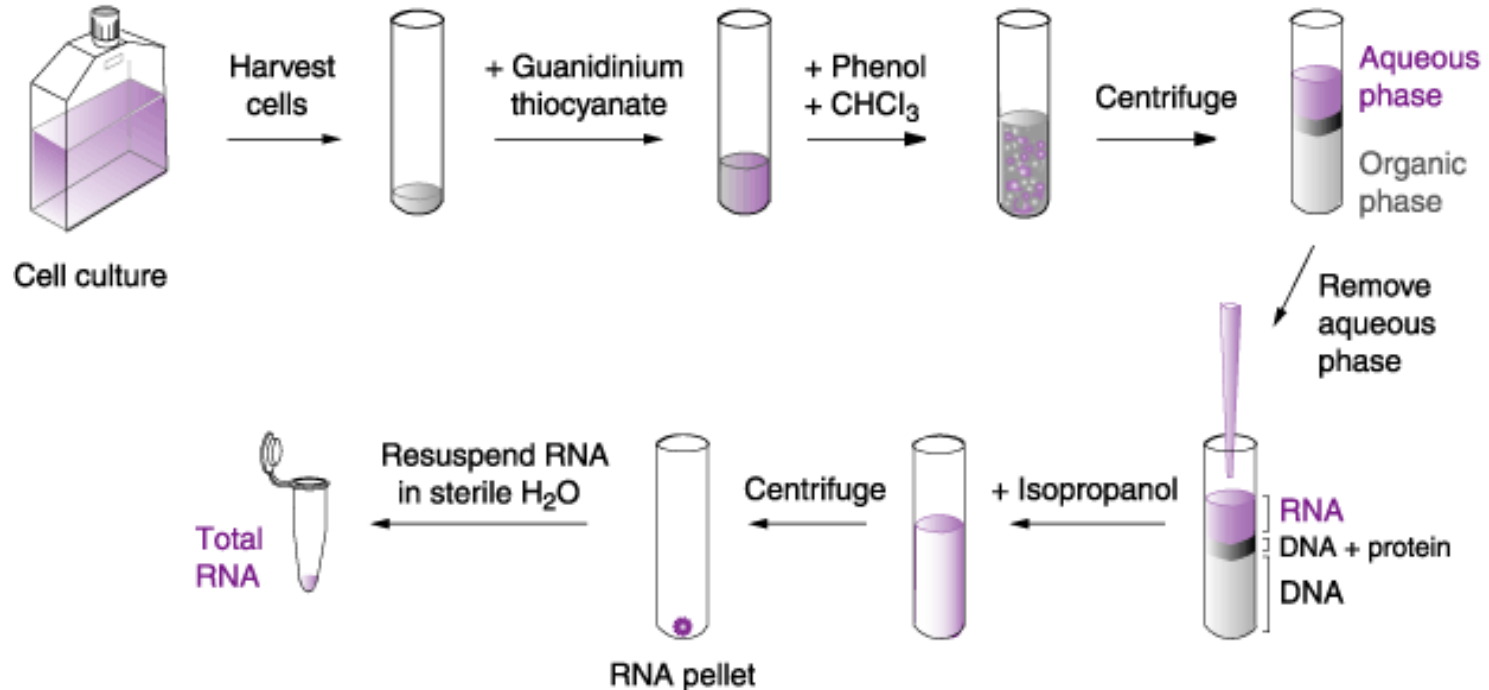
resistentes a agentes quelantes de metales

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

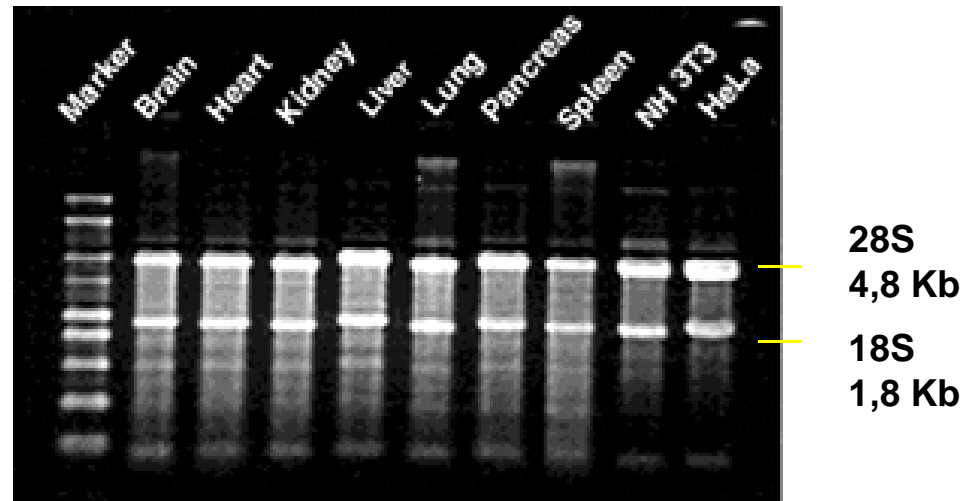
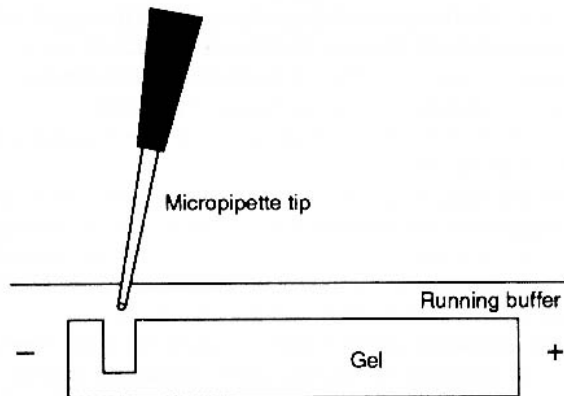
Extracción del RNA



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

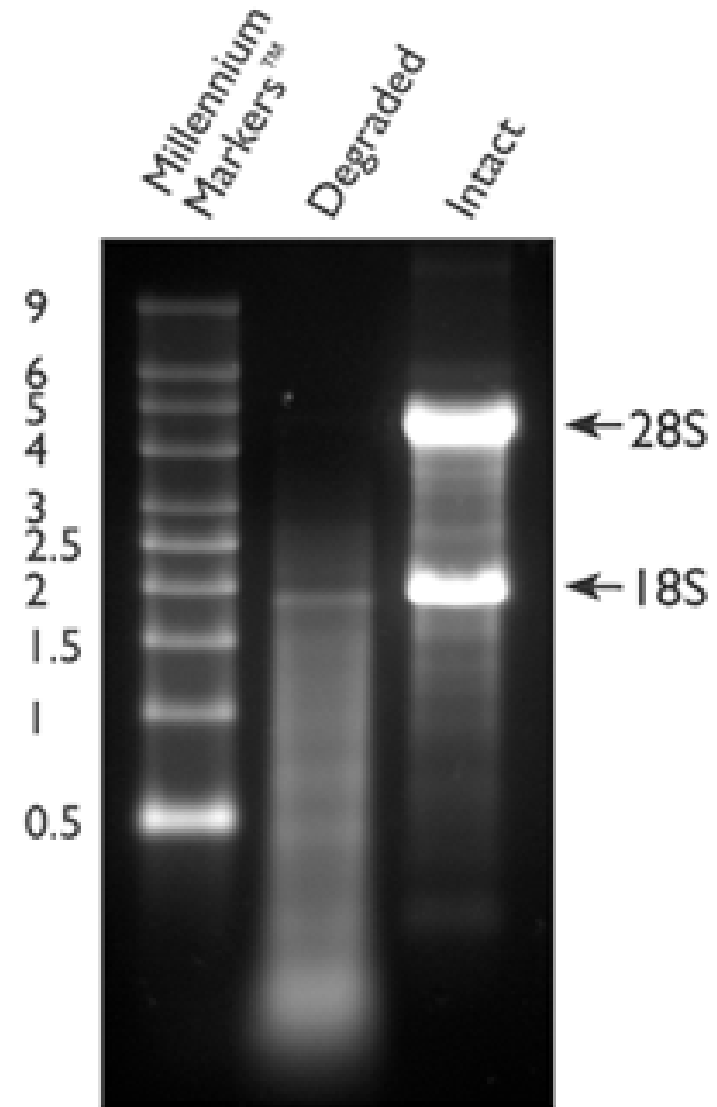
Electroforesis del RNA

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



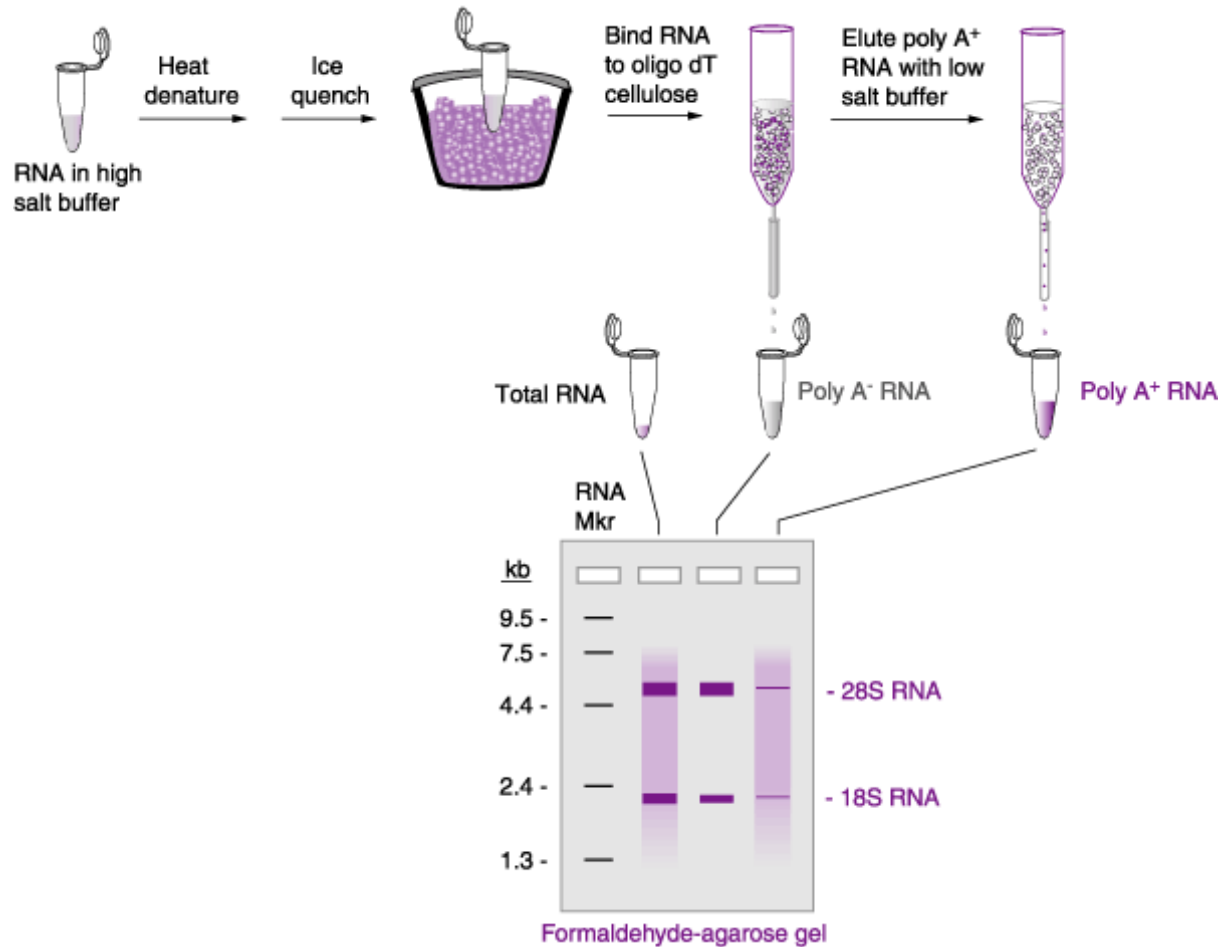
- El gel es teñido con bromuro de etidio y el RNA visualizado en un transiluminador UV.

- 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

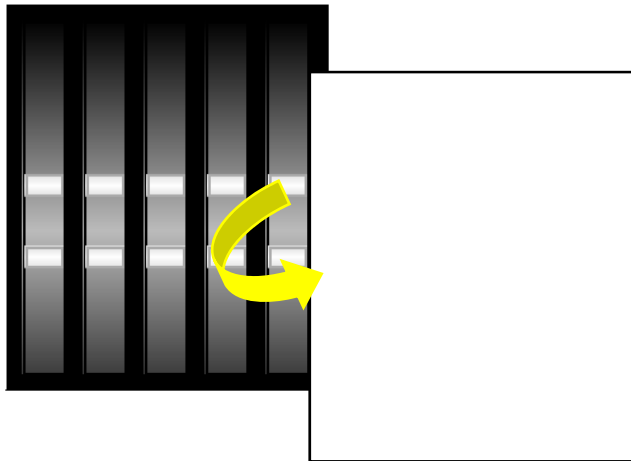


NORTHERN BLOT

1. Extracción del RNA

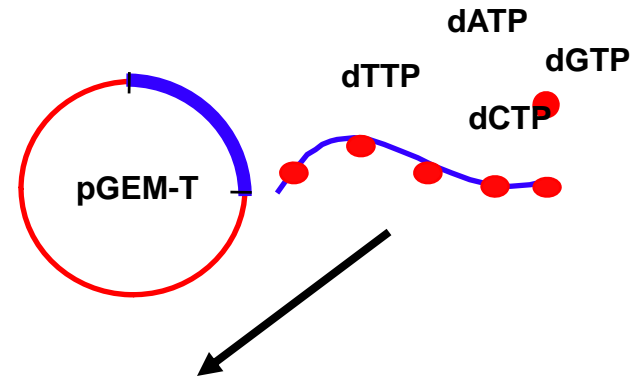


2. Electroforesis del RNA

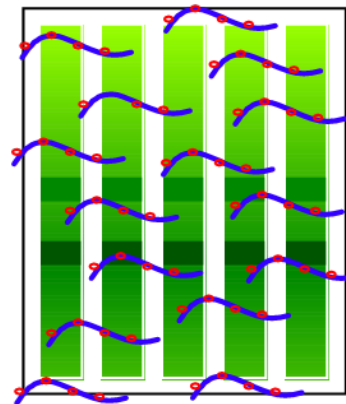


3. Transferencia a membrana

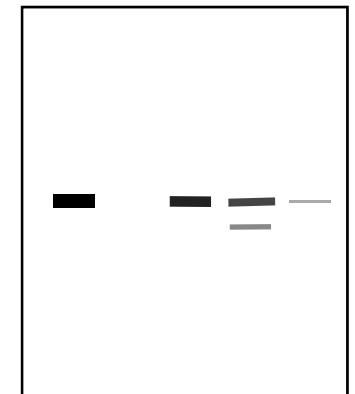
4. Generación de una sonda marcada



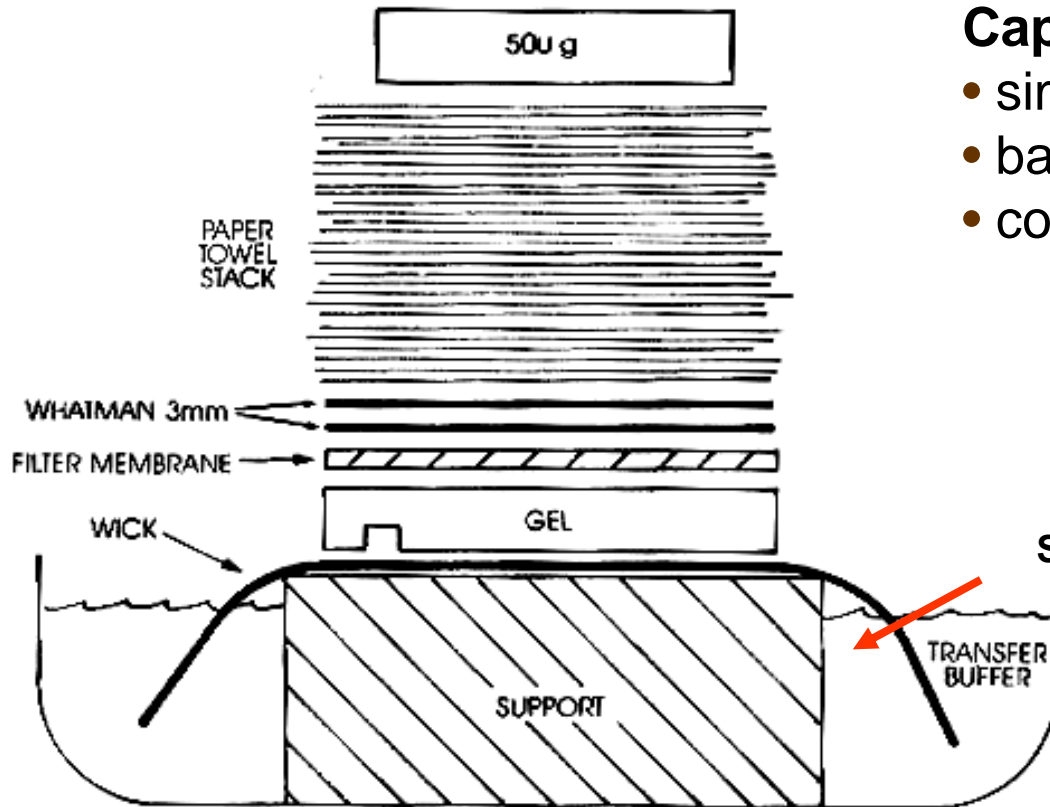
5. Hibridación



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

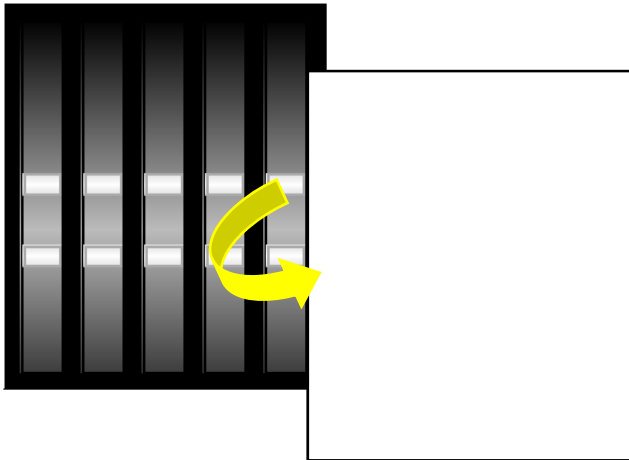
La exposición a la luz UV activa las bases T/U haciéndolas altamente reactivas con los grupos amino de la superficie de la membrana y formando enlaces covalentes. Aumenta la estabilidad y permanencia de los ácidos nucleicos en la membrana.

NORTHERN BLOT

1. Extracción del RNA



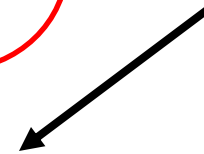
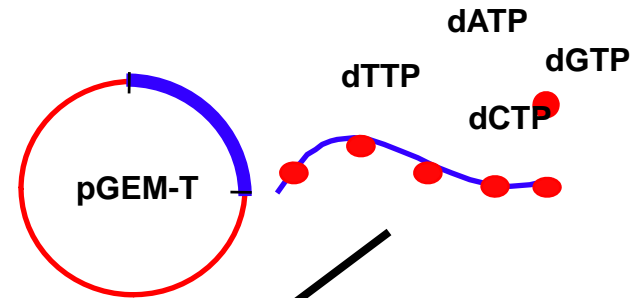
2. Electroforesis del RNA



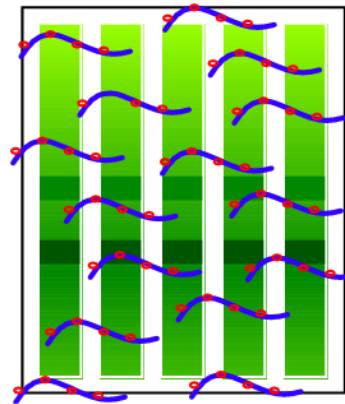
3. Transferencia a membrana



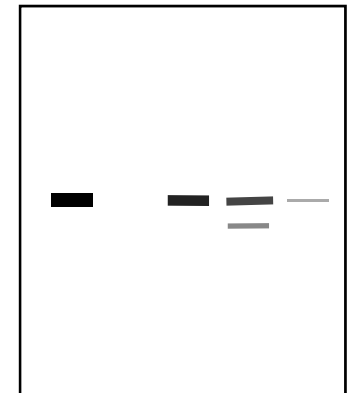
4. Generación de una sonda marcada



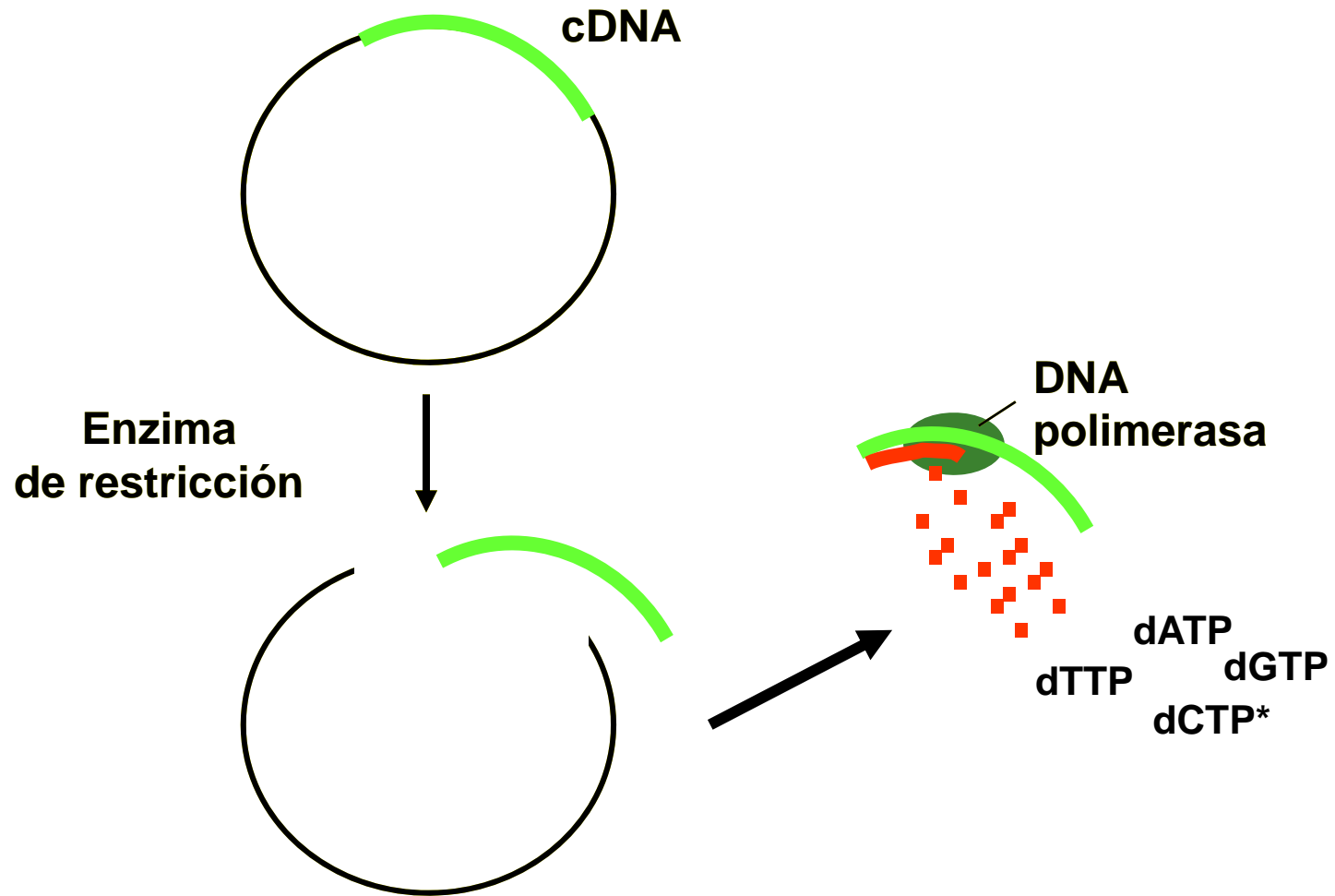
5. Hibridación



6. Visualización



Generación de la sonda marcada



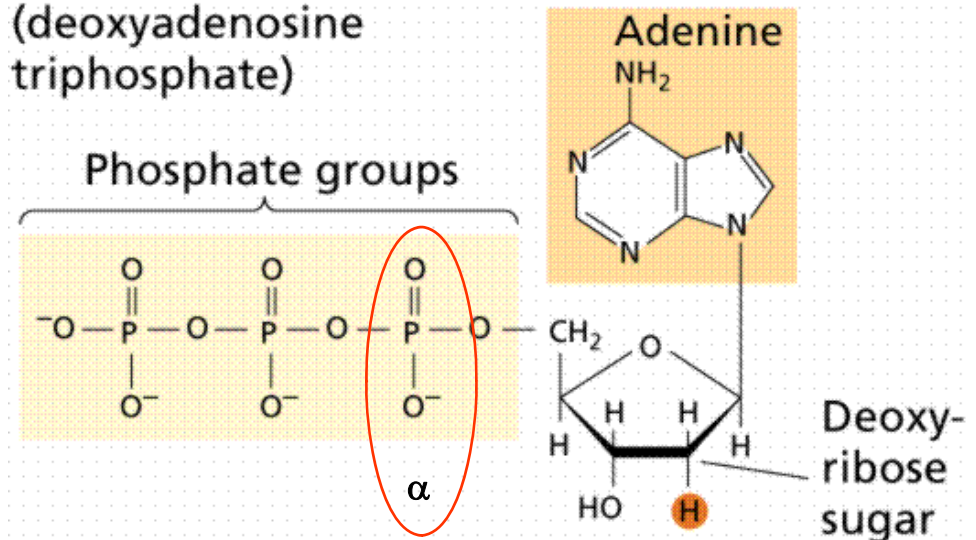
Generación de la sonda marcada

TIPOS DE MARCA

1. Radioactiva:

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

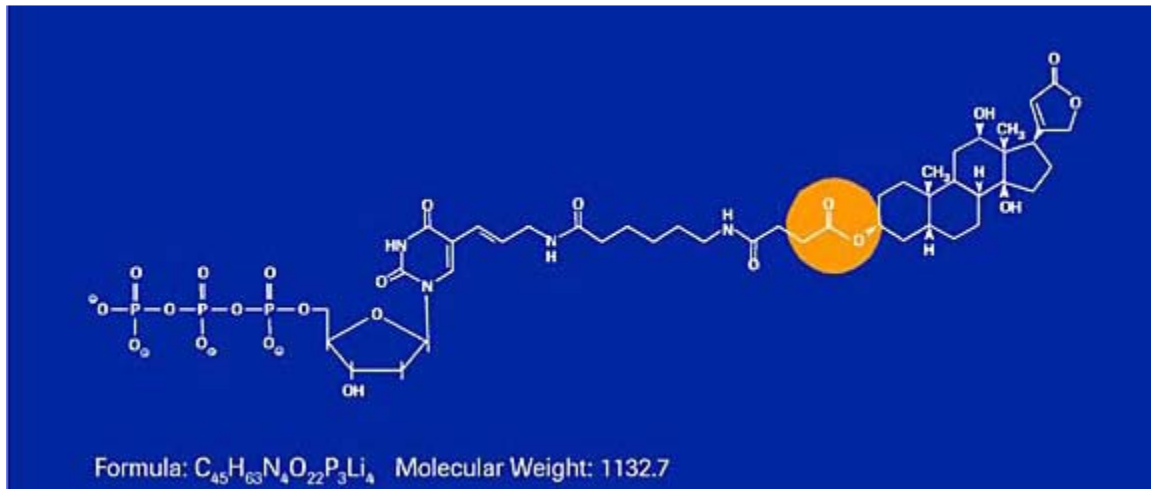
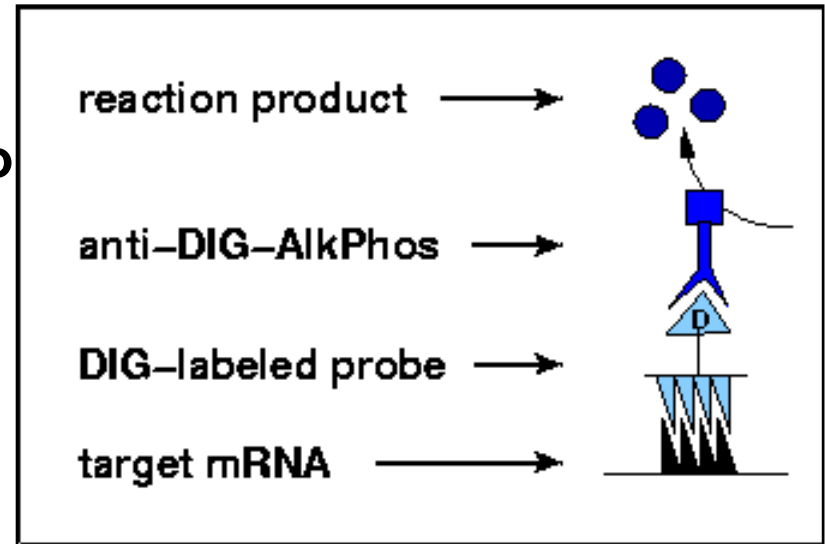
Deoxy-ATP
(deoxyadenosine
triphosphate)



Generación de la sonda marcada

2. No radioactiva:

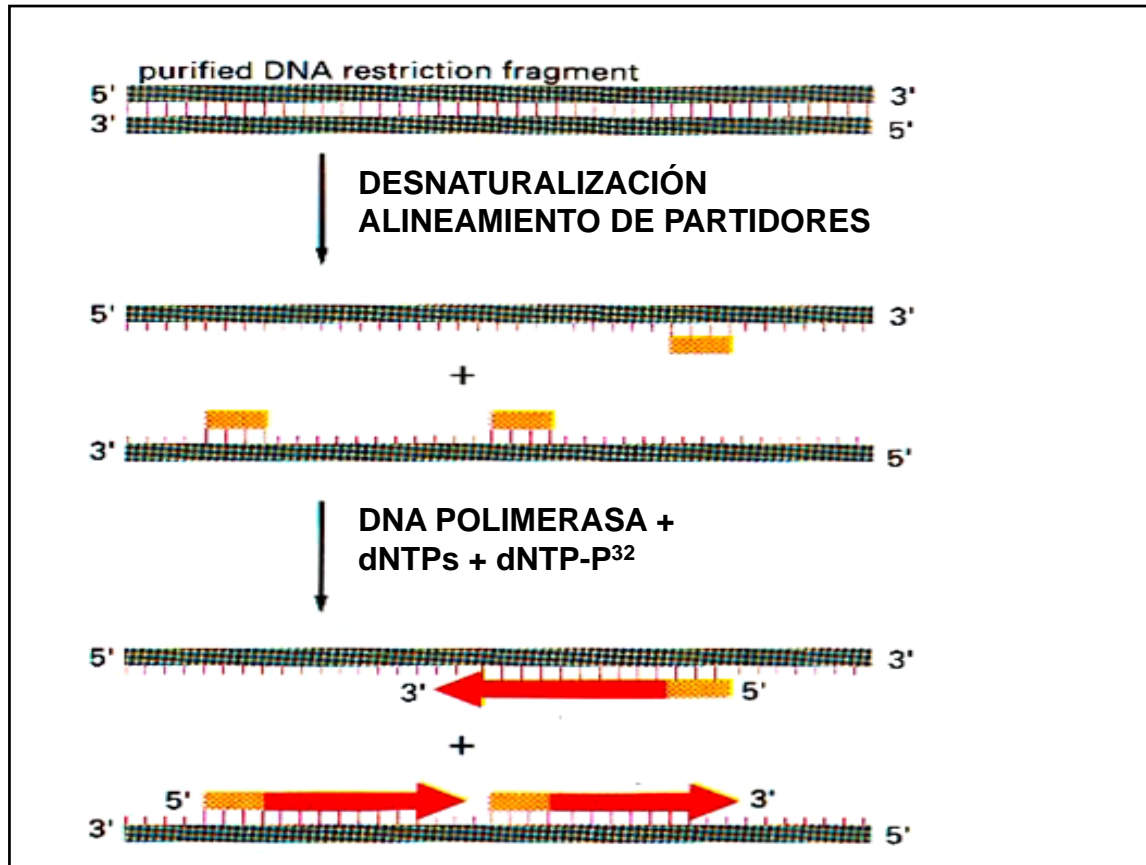
- dNTPs marcados con biotina o digoxigenina
- menor sensibilidad
- menor razón señal/ruido



Generación de la sonda marcada

Métodos de síntesis de una sonda marcada

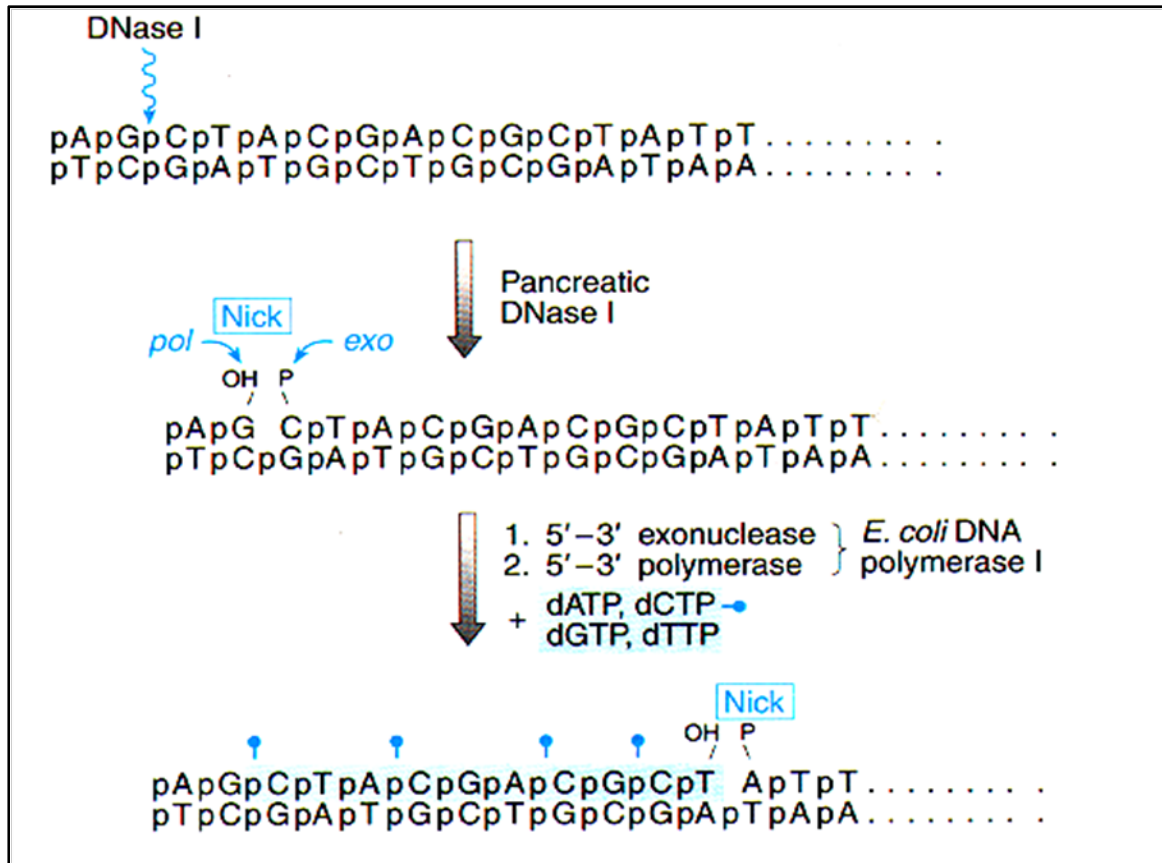
❖ *Random priming*



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

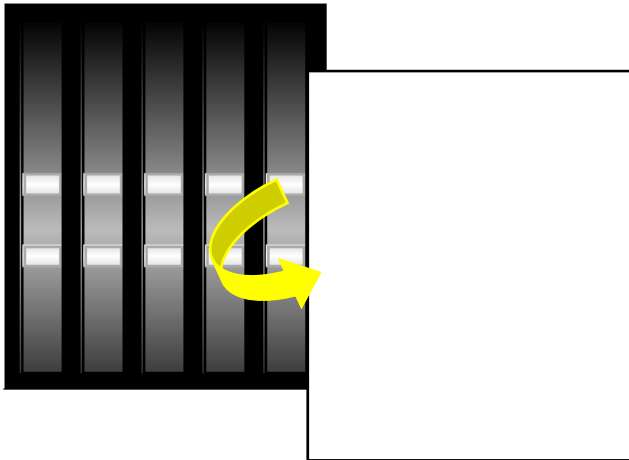
Key:
• Labeled nucleotide

NORTHERN BLOT

1. Extracción del RNA



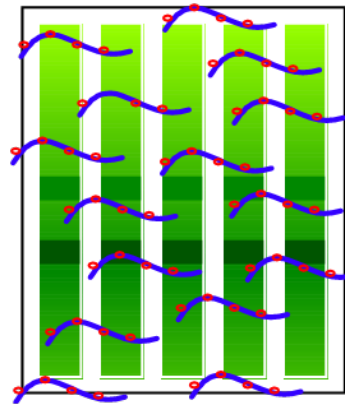
2. Electroforesis del RNA



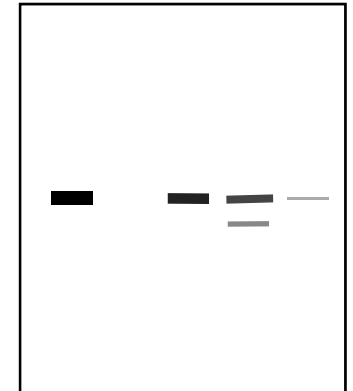
3. Transferencia a membrana



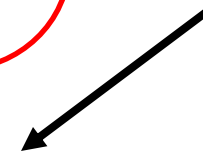
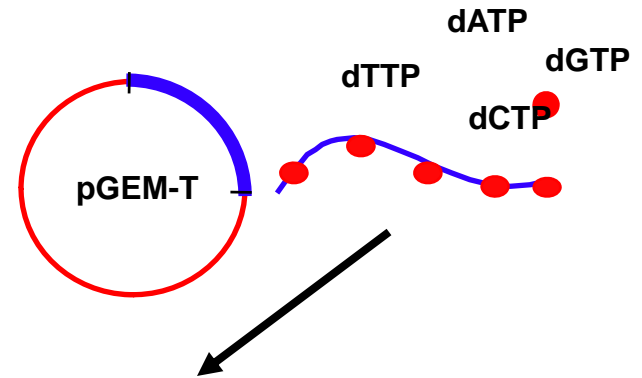
5. Hibridación



6. Visualización



4. Generación de una sonda marcada



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?

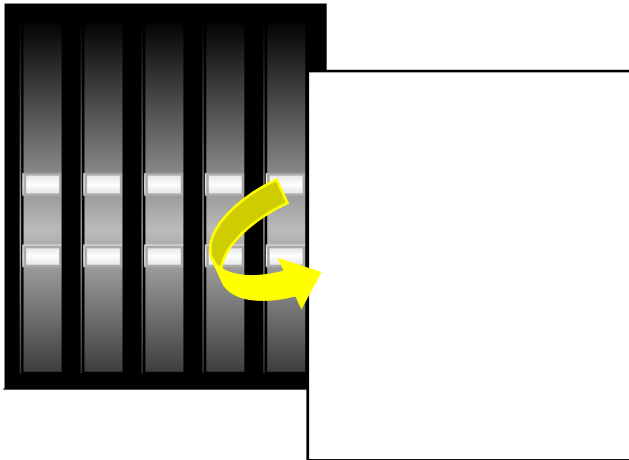
- Incubando la membrana en una solución que carece de sonda marcada
- Utilizando condiciones que minimizan la hibridación inespecífica.
 - Estrictez

NORTHERN BLOT

1. Extracción del RNA



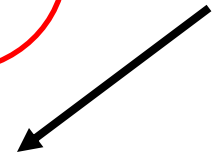
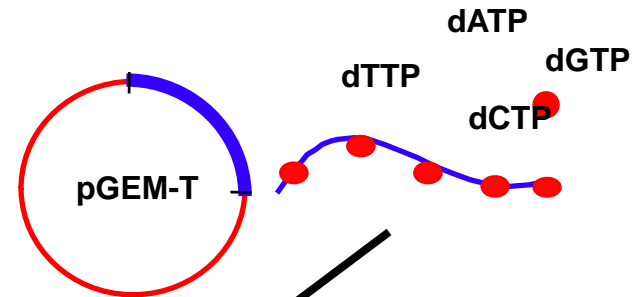
2. Electroforesis del RNA



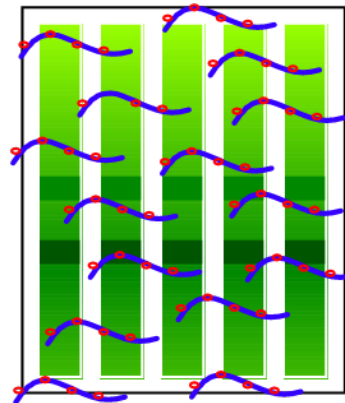
3. Transferencia a membrana



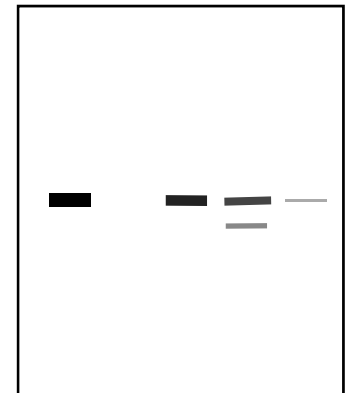
4. Generación de una sonda marcada



5. Hibridación

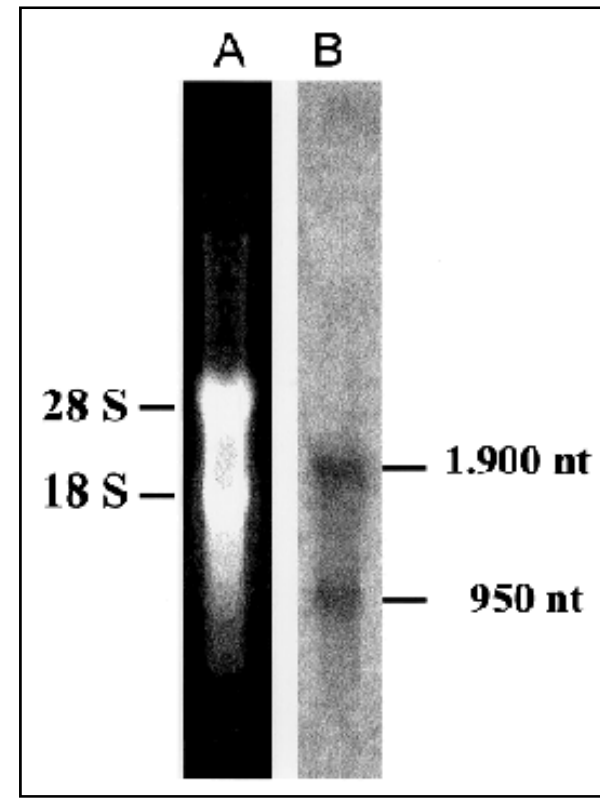
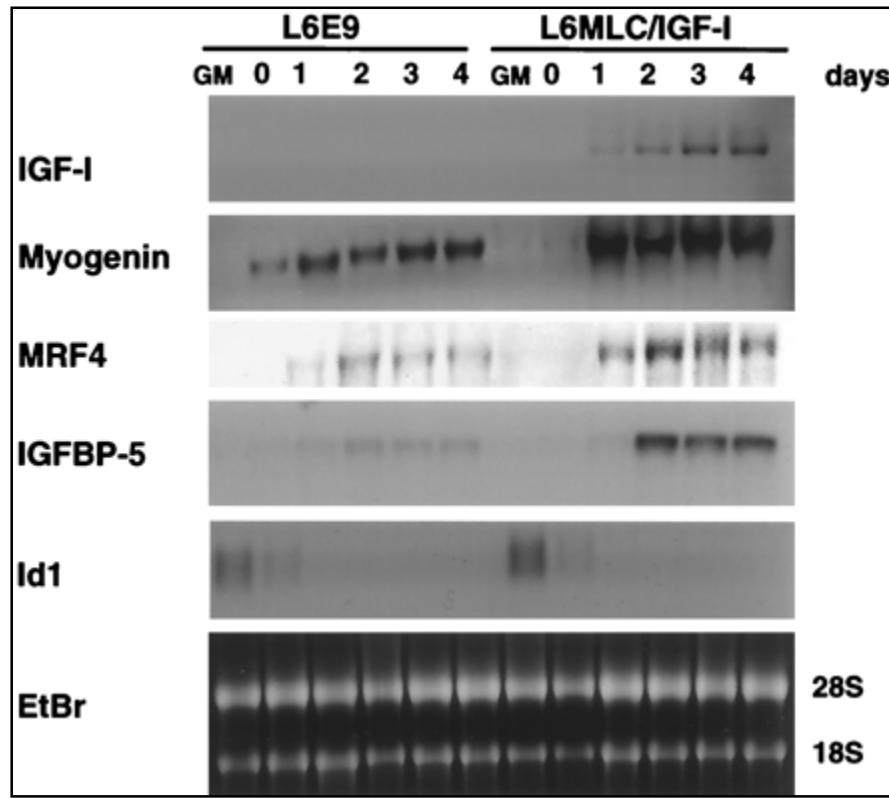


6. Visualización



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

