

MINISTERIO DE EDUCACIÓN, CIENCIA Y TECNOLOGIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO - QUÍMICAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS NATURALES

OLIMPIADA ARGENTINA DE BIOLOGÍA

APEB

ÁREA DE ACTUALIZACIÓN Y PERFECCIONAMIENTO EN LA ENSEÑANZA DE LA BIOLOGÍA

**CONTINUIDAD Y CAMBIO DE LAS ESPECIES I:
INTRODUCCIÓN A LA BIOTECNOLOGÍA**

Módulo III
Técnicas de Análisis molecular por hibridación

AUTORES

BIÓL. ELSA PINNA SENN
LIC. MARÍA ISABEL ORTIZ
PROF. GRACIELA DALMASSO

ASESOR PEDAGÓGICO - DIDÁCTICO

PROF. GRACIELA B. RAFFAINI

COORDINADOR

COMITÉ ORGANIZADOR EJECUTIVO

Estimado colega:

Esta es la tercera etapa del curso. Como siempre, le sugerimos que tome en cuenta las observaciones que pudieran haberle hecho los autores en los módulos anteriores a fin de favorecer su acercamiento a estos nuevos conceptos.

Remitimos el cuadernillo con los contenidos, actividades y material de estudio, y *otro con espacio para resolver esas actividades y la evaluación.*

En este módulo, las actividades propuestas le permitirán revisar conceptos analizados en los módulos anteriores y aplicarlos a nuevas situaciones problemáticas.

Como siempre puede dirigir sus consultas a los autores a través de e-mail o telefónicamente.

Continuemos la tarea...!!!

MINISTERIO DE EDUCACIÓN, CIENCIA Y TECNOLOGIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO - QUÍMICAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS NATURALES

OLIMPÍADA ARGENTINA DE BIOLOGÍA

APEB

ÁREA DE ACTUALIZACIÓN Y PERFECCIONAMIENTO EN LA ENSEÑANZA DE LA BIOLOGÍA

CONTINUIDAD Y CAMBIO DE LAS ESPECIES I:

INTRODUCCIÓN A LA BIOTECNOLOGÍA

Módulo III

Técnicas de Análisis molecular por hibridación

Módulo III: Técnicas de análisis molecular por hibridación

Introducción

La amplificación molecular en células analizada en el módulo 2 permite cortar, unir y multiplicar segmentos de DNA. Pero, nos preguntamos cómo localizar un fragmento de DNA determinado dentro de una genoteca. Para ello se utiliza una secuencia de DNA o RNA complementaria al DNA de interés, denominada “sonda”, que debe estar marcada de forma tal que pueda ser usada según la técnica de hibridación molecular estudiada en el módulo 1. Los primeros experimentos de hibridación molecular se hacían en solución, pero los tiempos de reasociación eran muy lentos. Para aumentar la velocidad de la reasociación, se decidió inmovilizar al DNA blanco en un soporte sólido, como por ejemplo una membrana de nitrocelulosa o de nylon (materiales a los que el DNA monocatenario se une con facilidad), agregar la sonda marcada y finalmente detectarla por autorradiografía o emisión de fluorescencia. Existen variantes de este método que permiten identificar un mRNA o una proteína específica.

El propósito de este módulo es proveer los conceptos básicos para analizar las distintas técnicas y herramientas utilizadas en el rastreo de las moléculas mencionadas y reconocer la importancia que conlleva en este campo de la ciencia.

Contenidos

- Tipos de sonda.
- Hibridación en colonia.
- Transferencia Southern o Southern blot.
- Transferencia Northern o Northern blot.
- Transferencia Western o Western blot.
- Rastreo (screening) molecular en una biblioteca de DNA.

Objetivos

- Diferenciar los distintos tipos de técnicas de rastreo.
- Reflexionar sobre el alcance de estas técnicas.

MÉTODOS Y APLICACIONES DE LA HIBRIDACIÓN MOLECULAR

La hibridación molecular es un método de identificación de moléculas de ácidos nucleicos que consiste en mezclar dos ácidos nucleicos cadena simple, uno marcado, que actúa como sonda, y otro que actúa como diana o blanco de hibridación. Analizaremos ahora las distintas técnicas, derivadas de ésta, que permiten localizar una secuencia clonada específica, caracterizar mRNAs o proteínas.

Actividad N°1

Se recomienda que, antes de realizar las actividades 1 y 2, lea el anexo 1 de este módulo, revise la síntesis elaborada en la actividad N°1 del módulo 1 y si Ud. considera necesario relea también las técnicas de análisis del DNA del anexo 1 del primer módulo, “Estructura y análisis del DNA y del RNA”.

El grado y especificidad de unión entre el DNA y la sonda depende de la homología de los pares de bases, de la longitud de las cadenas y de cuatro factores externos:

1. Temperatura.
2. pH.
3. Concentración salina.
4. Presencia de desnaturalizantes.

Las condiciones que determinan la especificidad de unión durante la hibridación entre dos ácidos nucleicos, corresponden a lo que se denomina RIGOR DE LA HIBRIDACIÓN.

- A) Explique de qué manera afectan cada uno de los factores externos mencionados arriba, el rigor de la hibridación.
- B) ¿Cuál de los cuatro factores es el más fácil de controlar y por qué?
- C) A modo de síntesis, complete el siguiente cuadro tachando lo que **no** corresponda.

	BAJA ESPECIFICIDAD DE LA SONDA	ALTA ESPECIFICIDAD DE LA SONDA
RIGOR DE HIBRIDACIÓN	Alto/ Bajo	Alto/ Bajo
TEMPERATURA	Alta/ Baja	Alta/ Baja
PH	Neutro/ extremo	Neutro/ extremo
CONCENTRACIÓN SALINA	Alta/ Baja/ cero	Alta/ Baja/cero
CONCENTRACIÓN DE DESNATURALIZANTE	Alta/ Baja/cero	Alta/ Baja/cero

Antes de continuar con las restantes actividades retome la lectura del anexo 1 del **segundo módulo**, “Tecnología del DNA recombinante”, centrando su atención en las técnicas de análisis molecular por hibridación.

Marcación de Sondas

Klug y Cummings (1999) definen como sonda: “una secuencia de nucleótidos marcados, complementarios a todo o parte de un gen o producto génico, que puede ser detectada por autorradiografía o microscopía de fluorescencia”. Las sondas pueden ser de cadena simple o doble; de DNA, de RNA, de cDNA o de oligonucleótidos sintéticos. Se pueden marcar fácilmente *in vitro* mediante la incorporación de nucleótidos que contengan un átomo o un grupo químico marcado en posición terminal o intercalar. Hay dos procedimientos básicos: uno utiliza isótopos radiactivos como por ejemplo: ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , ^3H . (ver figura 1.a.) y el otro la incorporación a un nucleótido de una molécula modificada, generalmente se utiliza **biotina o digoxigenina**, y el posterior acoplamiento a estas moléculas de **ligandos** unidos a **fluorocromos** (ver figura 1.b.)

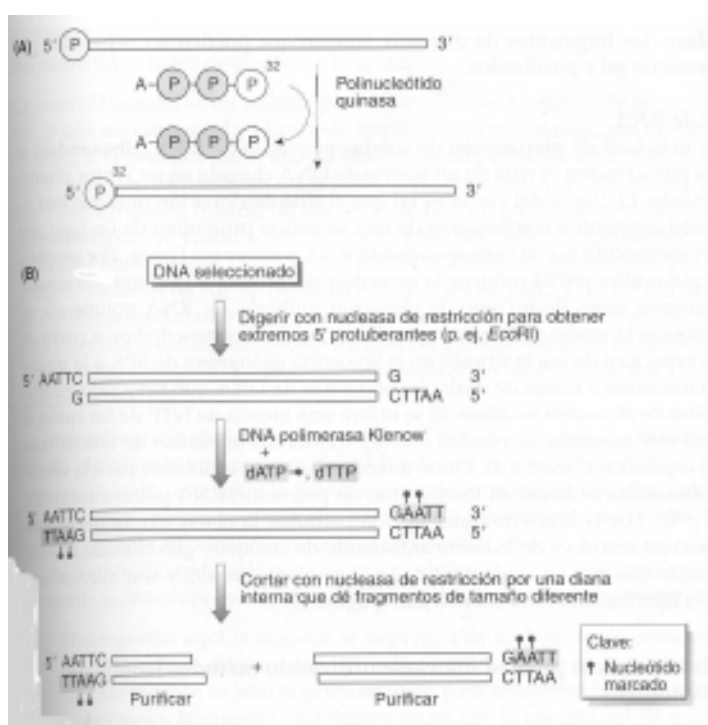


Fig. 1.a. Marcaje terminal o de extremos del DNA. (A) Marcaje terminal de oligonucleótidos empleando quinasas. El fosfato 5' terminal del oligonucleótido es sustituido por el fosfato de la posición gamma de un ATP radiomarcado con ^{32}P ATP. Se puede aplicar el mismo método para marcar los dos extremos 5' de un DNA bicatenario. (B) Rellenado de extremos utilizando el fragmento Klenow. Se corta el DNA de interés con una endonucleasa de restricción que deje los extremos 5' protuberantes. Los extremos 3' hidroxilo de la hebra que queda corta pueden ser reconocidos como cebadores para la acción polimerasa del fragmento Klenow, que añadirá nucleótidos tomando como molde la hebra protuberante. Si se quieren generar fragmentos marcados sólo en un extremo se puede cortar todo el segmento con una endonucleasa de restricción interna para generar fragmentos de tamaño diferente, que puedan ser separados por tamaño.

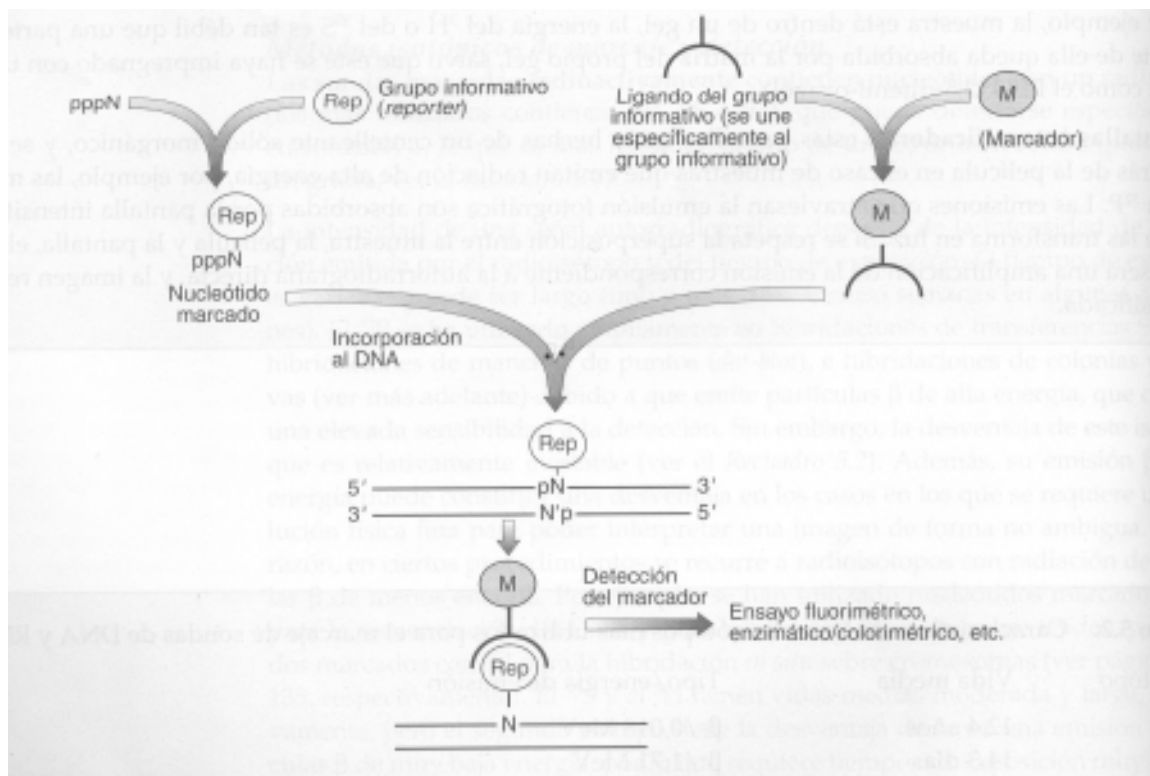


Fig 1.b. Principios generales del marcaje no isotópico. La proteína que reconoce el grupo informativo es a menudo un anticuerpo específico, como en el caso del sistema de la digoxigenina, o cualquier otro ligando que tenga una muy alta afinidad por el grupo específico, por ejemplo la estreptoavidina en el caso del marcador con biotina. El marcador puede ser detectado de varias maneras. Si es portador de un colorante fluorescente puede detectarse empleando métodos fluorimétricos. Alternativamente puede ser una enzima, por ejemplo la fosfatasa alcalina, que se puede acoplar a un ensayo en el que el producto de su actividad sea medible colorimétricamente.

Actividad N°2

Un método simple derivado de la técnica de hibridación molecular es la **Hibridación en colonia** (colony blotting) o **en calvas** (plaque blotting) según si el vector usado es un plásmido o un bacteriofago.

Analice el protocolo de hibridación en colonia mostrado en la figura 2 y responda:

- ¿Por qué una vez superpuesta la membrana de nylon o nitrocelulosa, se la invierte y deposita sobre una nueva placa con agar?
- ¿Por qué se deben lisar las células bacterianas?
- ¿Por qué se desnaturaliza el DNA?
- ¿Por qué es necesario realizar numerosos lavados de la sonda después de la hibridación?
- Una vez identificado el clon de interés, ¿qué se puede hacer con el mismo?

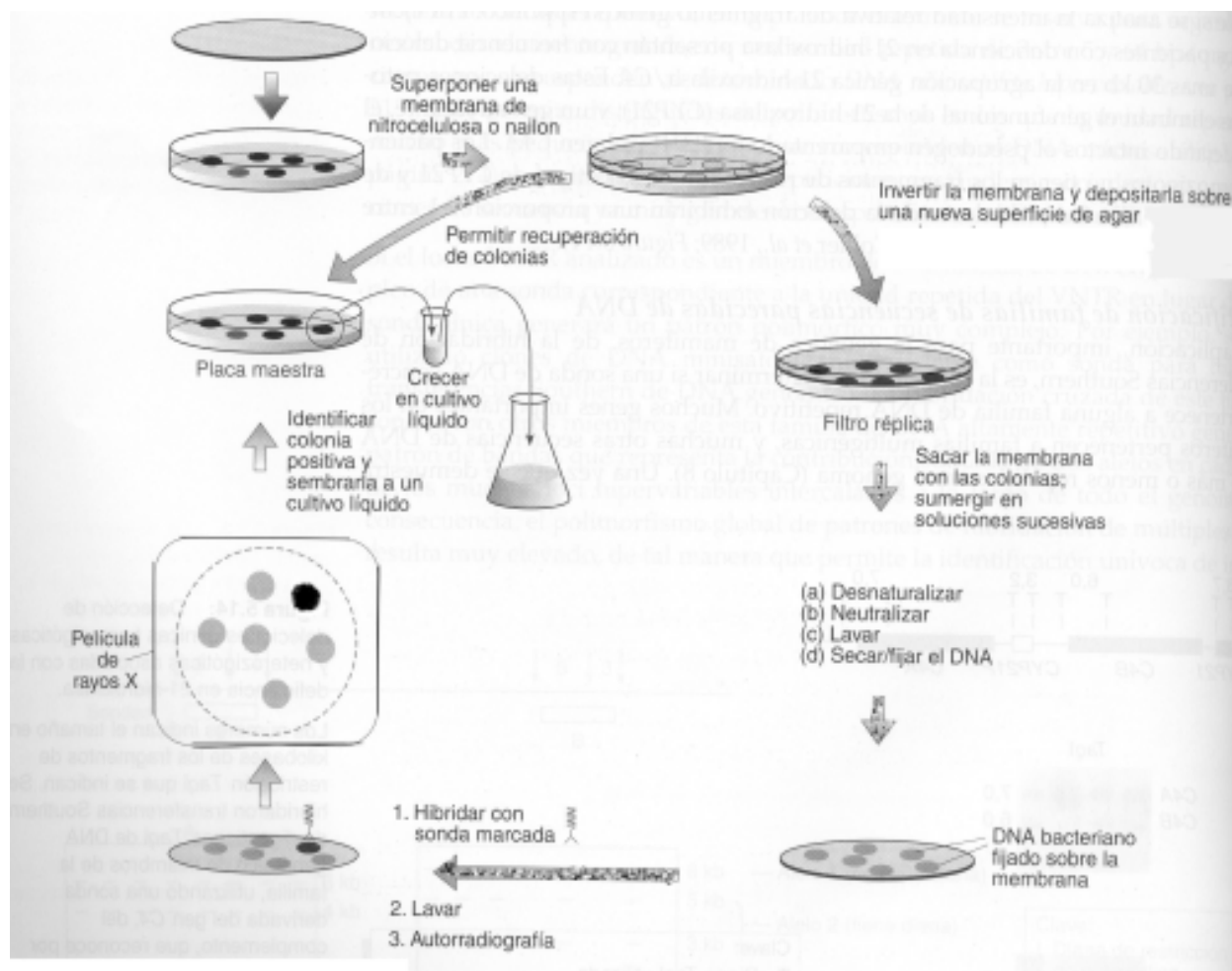


Fig. 2. La hibridación de colonias requiere replicar las colonias sobre membranas duraderas como paso previo a la hibridación de estas membranas con una sonda marcada de ácido nucleico. El método se aplica habitualmente para la identificación de colonias que contengan DNA recombinante, siempre y cuando se disponga de la sonda adecuada marcada.

Actividad Nº3

Otro método es la **Transferencia Southern o Southern blot** desarrollado por Edward M. Southern (Ref: *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517, 1975) para detectar determinados fragmentos de DNA separados por electroforesis en un gel de agarosa.

A) Analice la figura 3 y describa los principales pasos del protocolo.

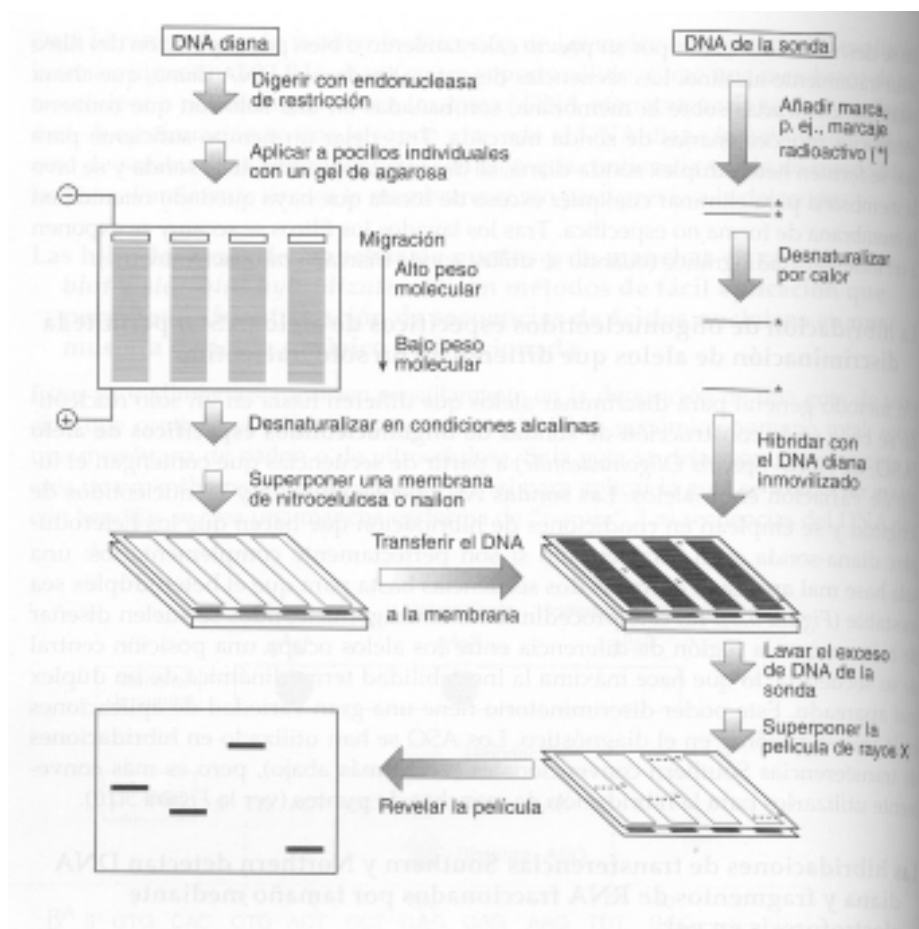


Fig. 3. La hibridación de transferencia de tipo Southern detecta fragmentos de DNA diana que han sido separados por tamaño utilizando electroforesis en gel.

B) Como se expresó arriba, esta técnica se basa en separar fragmentos de DNA por electroforesis:

B.1 ¿Hacia qué polo se dirigirá el DNA: al cátodo o al ánodo?

B.2 ¿En base a qué propiedad de la molécula de DNA se separan los distintos fragmentos?

B.3 ¿Es posible determinar el tamaño de los distintos fragmentos? Explique.

B.4 ¿Qué colorante se debe emplear para que los fragmentos de DNA sean visibles en el gel?

C) Compare la técnica de Southern con la técnica de Hibridación en colonia (actividad 2), y establezca las principales similitudes y diferencias.

D) Enumere las distintas aplicaciones de esta técnica.

Continuidad y cambio de las especies I: Introducción a la biotecnología

La figura representa un esquema de las autorradiografías obtenidas. Los lavados posthibridación se realizaron bajo dos condiciones de estrictez: a) menor estrictez y b) mayor estrictez.

Analice la figura y responda

- A) ¿Cuál / es de las diez crías es/son transgénica/s para el gen de la albúmina humana? ¿Por qué?
- B) ¿Qué representan las bandas que aparecen en (a), pero no en el (b)?
- C) ¿Qué resultado habría obtenido si el Southern hubiera sido realizado con DNA extraído a partir de células sanguíneas? Justifique.

Uno de los ratones transgénicos es sacrificado para aislar mRNAs de diferentes tejidos. Con las muestras de mRNAs se realizó la técnica de Northern, empleando como sonda el gen de la albúmina humana. El cuadro siguiente muestra los resultados obtenidos para distintos tejidos: (+) presencia (-) ausencia de mRNA del gen de la albúmina humana, bajo dos condiciones de estrictez.

RNAm de	Lavado con:	
	Menor estrictez	Mayor estrictez
HÍGADO	+	-
PÁNCREAS	-	-
MÚSCULO	-	-
LEUCOCITOS	-	-
CÉLULAS DE LA PARED ARTERIAL	+	+

- D) ¿A que gen corresponden los mRNAs que hibridan con las sondas cuando las condiciones de estrictez son bajas, y no hibridan cuando se aumenta la estrictez?
- E) ¿Por qué no ocurre lo mismo en el caso de los mRNA obtenidos a partir de células de la pared arterial?
- F) ¿En qué tejido se fabrica la pegatina?

Anexo 1

DESNATURALIZACIÓN DE DNA

Tal como figura en el anexo 1 del módulo I "Desnaturalizar" significa separar las dos cadenas de una molécula de ADN: se rompen los puentes de hidrógeno, la estructura dúplex se desenrolla y las cadenas se separan sin romperse los enlaces covalentes. La separación se puede realizar por calor o modificando la concentración salina.

HIBRIDACIÓN MOLECULAR

"La propiedad de renaturalización que tienen las cadenas sencillas complementarias de los ácidos nucleicos, es la base para una poderosa técnica analítica en genética molecular: la hibridación molecular" (Anexo 1 módulo 1).

"La hibridación molecular consiste en mezclar cadenas sencillas de dos ácidos nucleicos de origen diferente, uno marcado, que actúa de sonda y otro, un DNA o un RNA problema, que actúa de diana de la hibridación".

Un experimento clásico de hibridación consiste en:

1. Desnaturalizar tanto el DNA diana como la sonda (en caso de que sea DNA cadena doble) por separado.
2. Colocar juntos el DNA diana con la sonda en condiciones adecuadas para que ocurra la hibridación.
3. Lavado del exceso de sonda no hibridada.
4. Revelado de la sonda.

Estrictez de una reacción de hibridación

La estrictez especifica la fidelidad de la hibridación de una sonda. Una alta estrictez permitirá que la sonda hibride solamente con secuencias de DNA o RNA altamente complementarias. Si se reducen las condiciones de estrictez es posible detectar moléculas de DNA o RNA con mucha menor complementaridad, tal como secuencias conservadas evolutivamente en otros organismos.

La estrictez de una reacción de hibridación se puede modular controlando la temperatura, el pH, la concentración salina y la presencia de solventes orgánicos (desnaturalizantes).

Temperatura de hibridación y de lavados.

La hibridación depende de la capacidad de un DNA desnaturalizado de reasociar con cadenas complementarias. Los ácidos nucleicos cadena simple (sonda) formaran puentes de hidrógeno (con el DNA diana) a temperaturas de unos 20 a 25°C por debajo de la T_m (temperatura a la cual el 50% de las cadenas de DNA están desenrolladas, anexo 1 módulo 1) de la sonda. Modificando la temperatura de la reacción de hibridación es posible controlar la estrictez de la misma, a menor temperatura menor estrictez.

pH

Está estrechamente relacionado con la concentración salina o fuerza iónica. A un pH entre 5 y 9, la tasa de reasociación no se ve afectada. Para una mayor estrictez de hibridación, se debe emplear pH altos.

Concentración salina

Los cationes monovalentes (ej. iones de sodio) interactúan electrostáticamente con los ácidos nucleicos (en los grupos fosfato) de tal modo que la repulsión electrostática entre las dos cadenas del dúplex disminuye al aumentar la concentración salina. Es decir, a mayor concentración salina mayor estabilidad del híbrido. Cuando se utiliza una sonda de baja complementariedad con el DNA diana (apareamiento incorrecto) se debe emplear concentraciones salina altas para estabilizar el híbrido DNA-sonda. En el caso de que la sonda tenga alta homología con el DNA diana, se debe emplear baja fuerza iónica.

DESNATURALIZANTE

Los solventes orgánicos, como la formamida o la urea, reducen la estabilidad del DNA cadena doble, debido a que rompen químicamente los enlaces de hidrógeno. Estos compuestos son usados durante los experimentos de hibridación tanto en el paso (1) "desnaturalización del DNA diana", como en el paso (2) "hibridación de la sonda" para disminuir las temperaturas de trabajo, ya que si son muy altas pueden destruir al DNA. A mayor concentración de desnaturalizante , mayor estrictez.