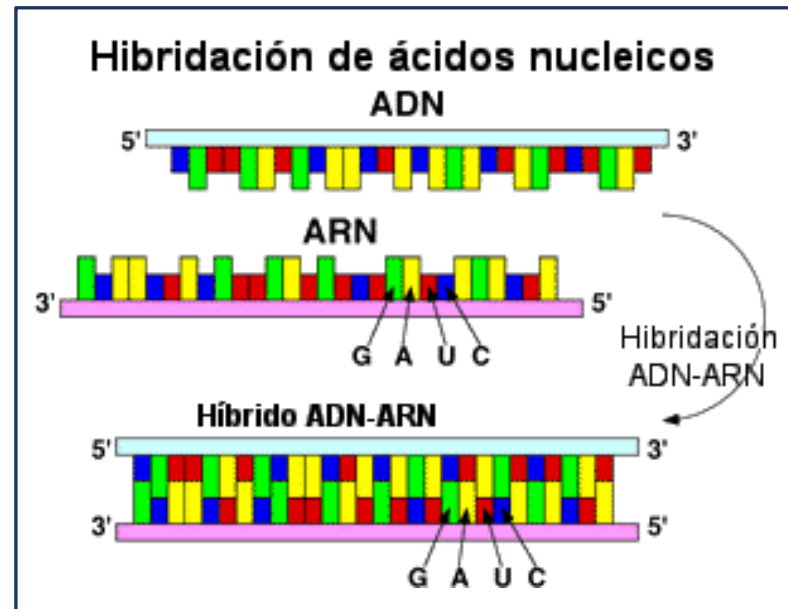
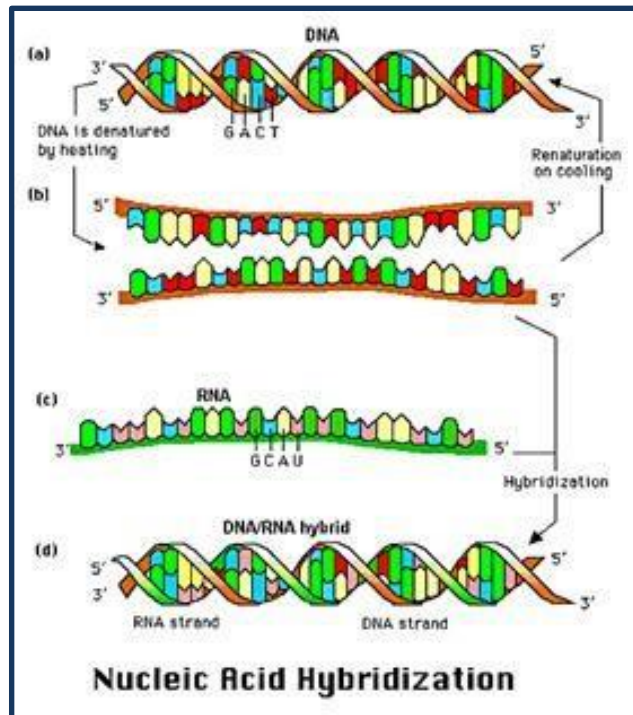
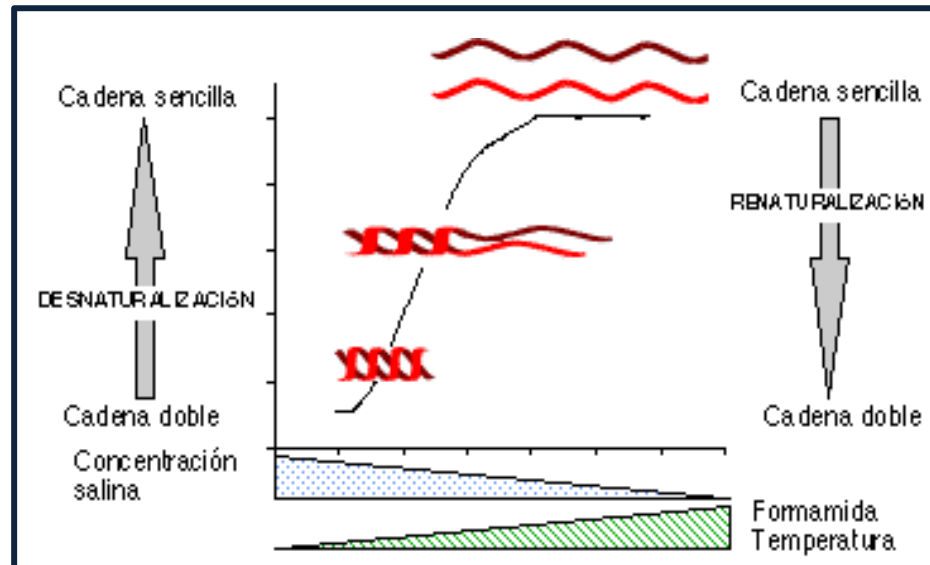




HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Consiste en la unión de dos moléculas monocatenarias de ácidos nucleicos, por la complementariedad de su secuencia de bases nitrogenadas, **originando una molécula híbrida bicatenaria**.



En biología molecular la hibridación **se utiliza para detectar secuencias concretas de ácidos nucleicos (ADN o ARN) mediante el empleo de fragmentos complementario**→ **SONDAS** que se marcan para poder ser visualizados.

Genéricamente, estas técnicas se conocen como **técnicas de hibridación**.

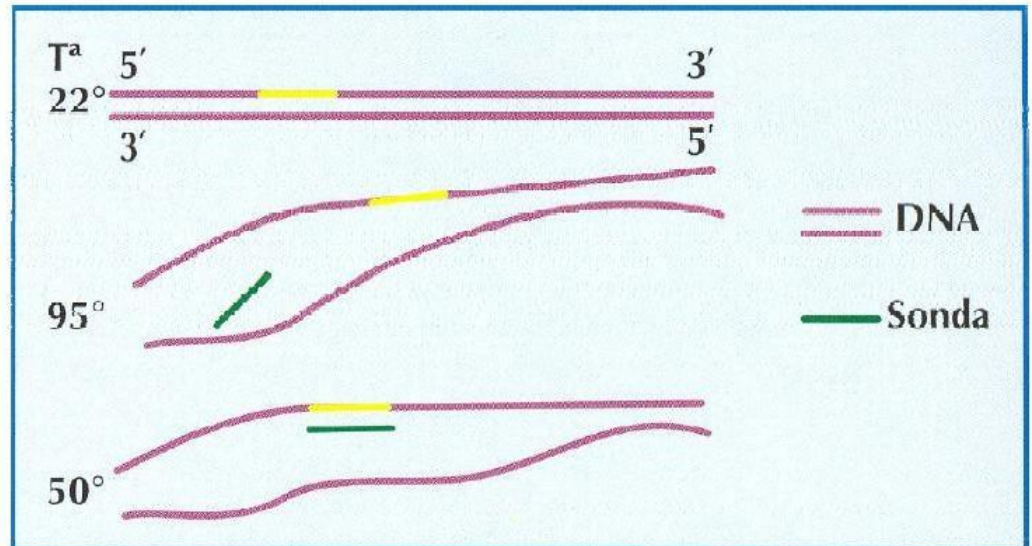
HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

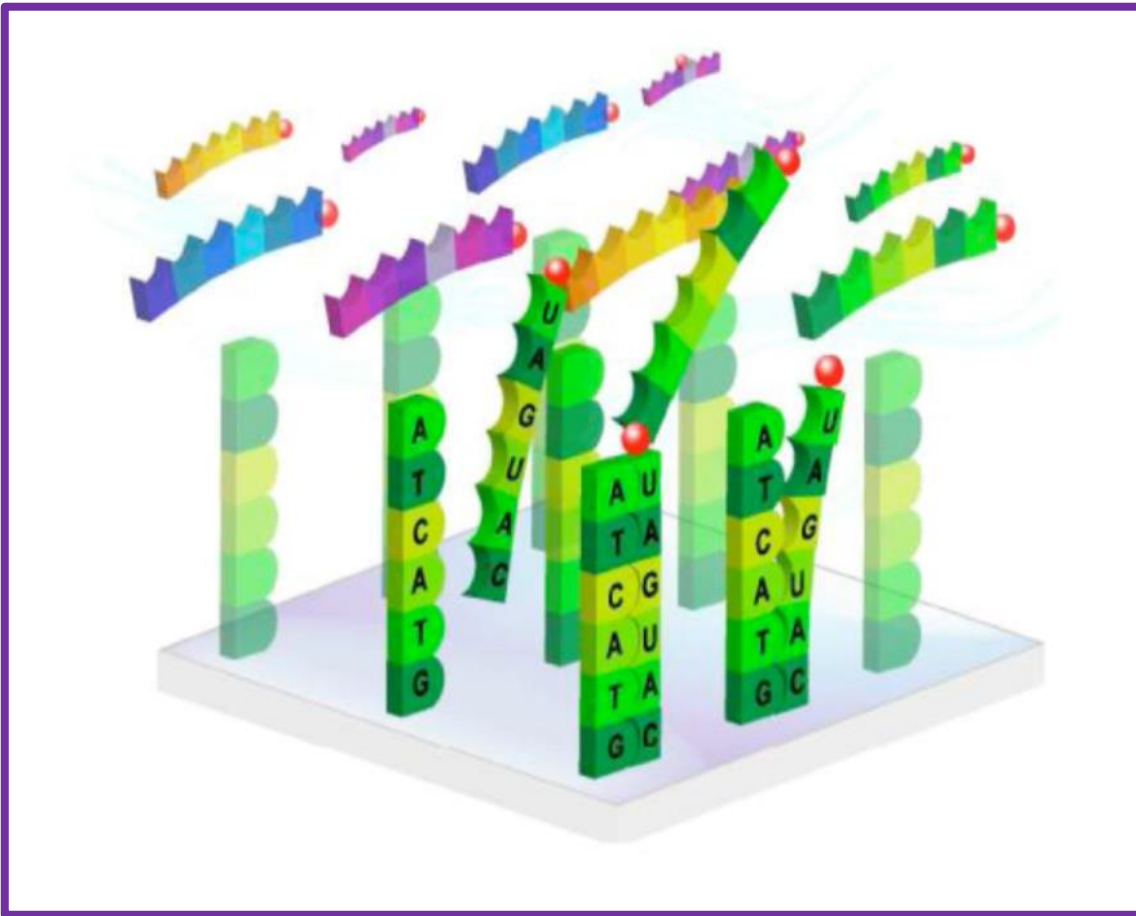
TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN: permiten detectar secuencias concretas de ácidos nucleicos → DIANAS (ADN o ARN) mediante el empleo de sondas marcadas.



- **SECUENCIA DIANA:** es la secuencia concreta de bases nitrogenadas que se pretende detectar en la muestra problema.
- **SONDA:** Cadena de nucleótidos cuya secuencia de bases nitrogenadas es complementaria a la secuencia diana.

Tras un proceso de hibridación adecuado se formará una estructura bicatenaria híbrida, constituida por la sonda y la secuencia diana, que podrá ser detectada gracias al marcaje que se habrá incorporado a la sonda.





BASES TEÓRICAS DE LA HIBRIDACIÓN

BASES TEÓRICAS DE LA HIBRIDACIÓN

El proceso de hibridación sonda/secuencia diana se basa en los fenómenos de **desnaturalización/renaturalización** de las moléculas bicatenarias del ADN.

DESNATURALIZACIÓN:

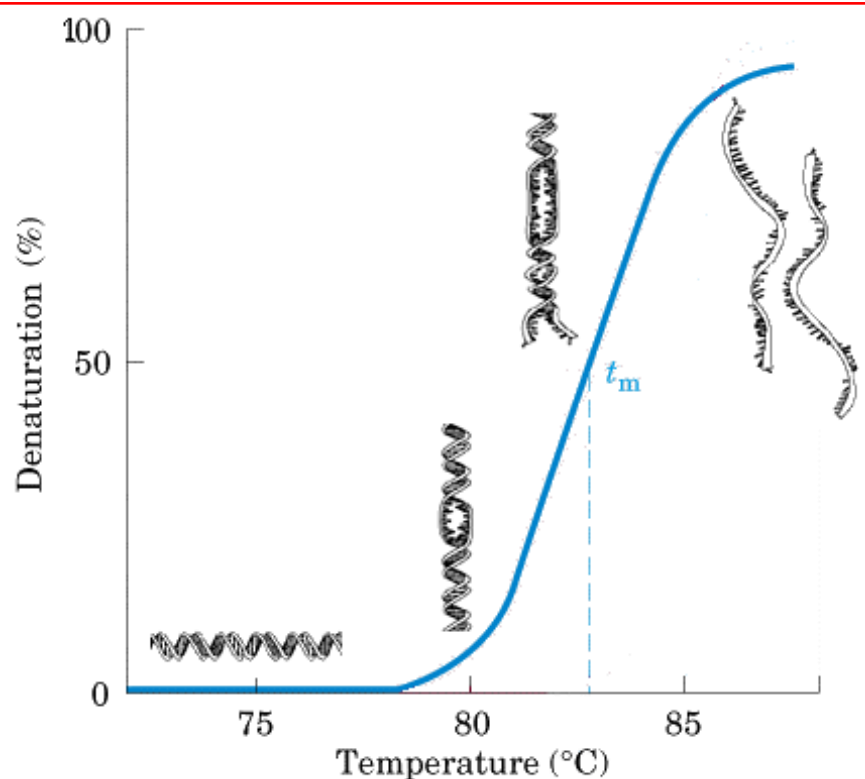
- Es una propiedad del ADN consistente en la **separación de las dos cadenas de una molécula bicatenaria por ruptura de los puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas complementarias.**
- La desnaturalización se consigue ***aumentando la temperatura*** o ***aumentando el pH*** (pH alcalino).
- Su comportamiento se representa en la **curva de fusión de ADN**.

RENATURALIZACIÓN:

- Es el proceso por el cual **las dos cadenas de una molécula de ADN complementario separadas mediante desnaturalización térmica vuelven a reasociarse**, al bajar lentamente la temperatura, hasta formar la doble hélice original.
- Este fenómeno se puede medir por la disminución de la absorbancia a 260 nm.

BASES TEÓRICAS DE LA HIBRIDACIÓN

CURVA DEL FUSIÓN DEL ADN



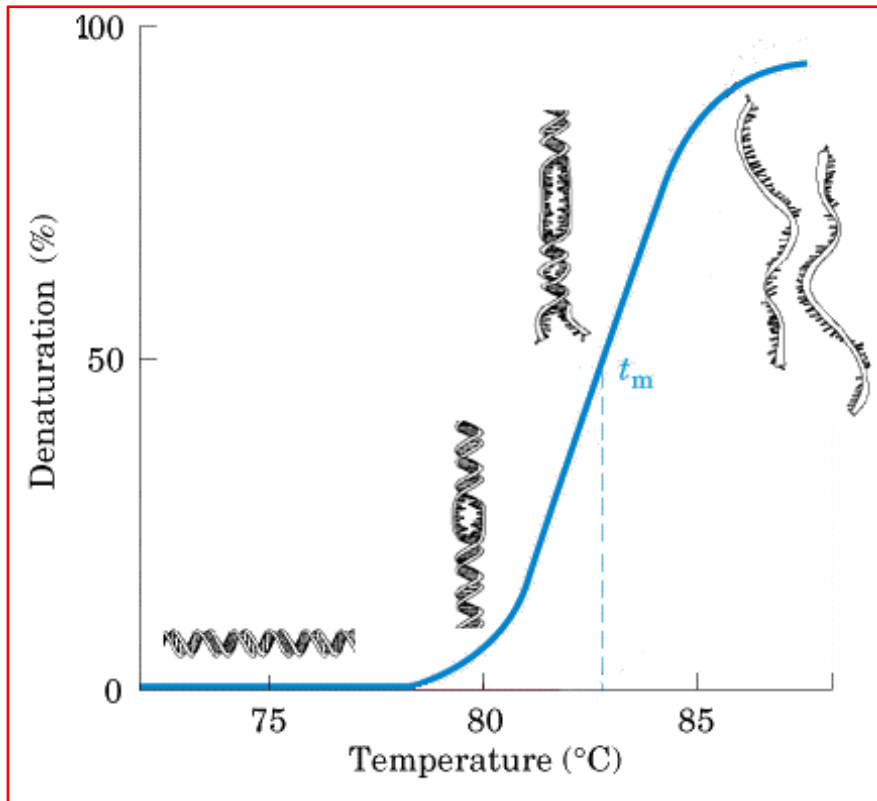
- Si se mide la absorbancia a 260 nm de una solución de una molécula bicatenaria de ADN en función de la temperatura, se obtiene una curva tipo sigmoide, llamada **curva de fusión**.
- En la curva de fusión se distinguen **tres zonas**

PRIMERA ZONA (ZONA A):

- Tramo recto, sin pendiente debido a que la absorbancia a 260 nm tiene un valor constante, aunque aumente la temperatura.
- La temperatura en esta zona no alcanza un valor suficiente para romper puentes de hidrógeno y, por tanto, el porcentaje de desnaturalización es 0%

BASES TEÓRICAS DE LA HIBRIDACIÓN

CURVA DEL FUSIÓN DEL ADN

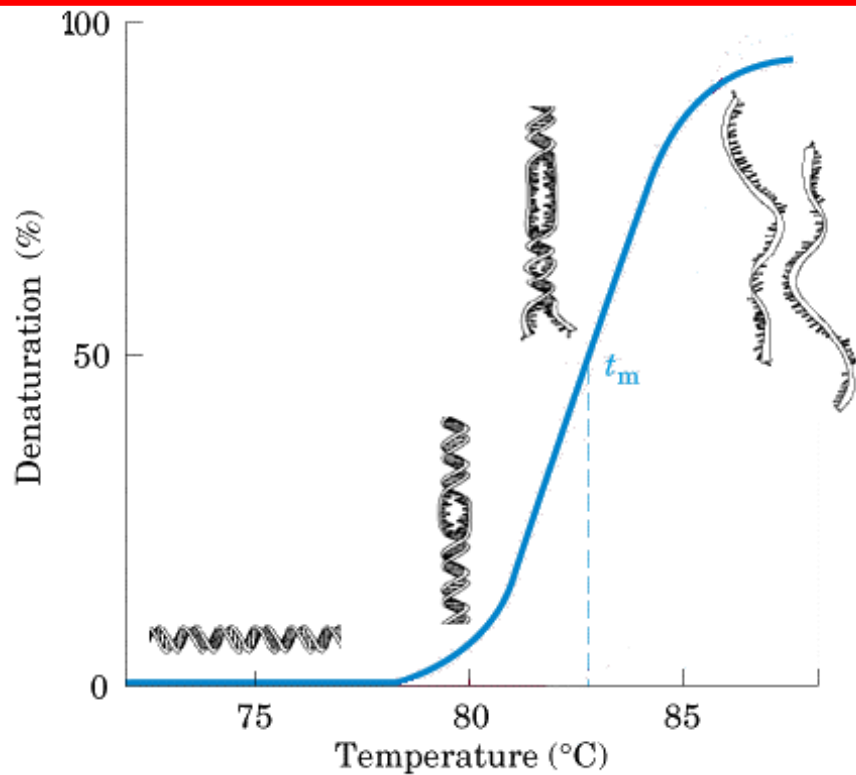


SEGUNDA ZONA (ZONA B):

- En este tramo se observa un **aumento de la absorbancia a medida que aumenta la temperatura**,
- Primero de manera **lenta** (curva cóncava),
- Después de forma **rápida** (recta con pendiente elevada)
- Finalmente de manera **lenta** (curva convexa) hasta obtener un valor de absorbancia máximo.
- **Al alcanzar este valor máximo de absorbancia la desnaturalización es del 100%.**

BASES TEÓRICAS DE LA HIBRIDACIÓN

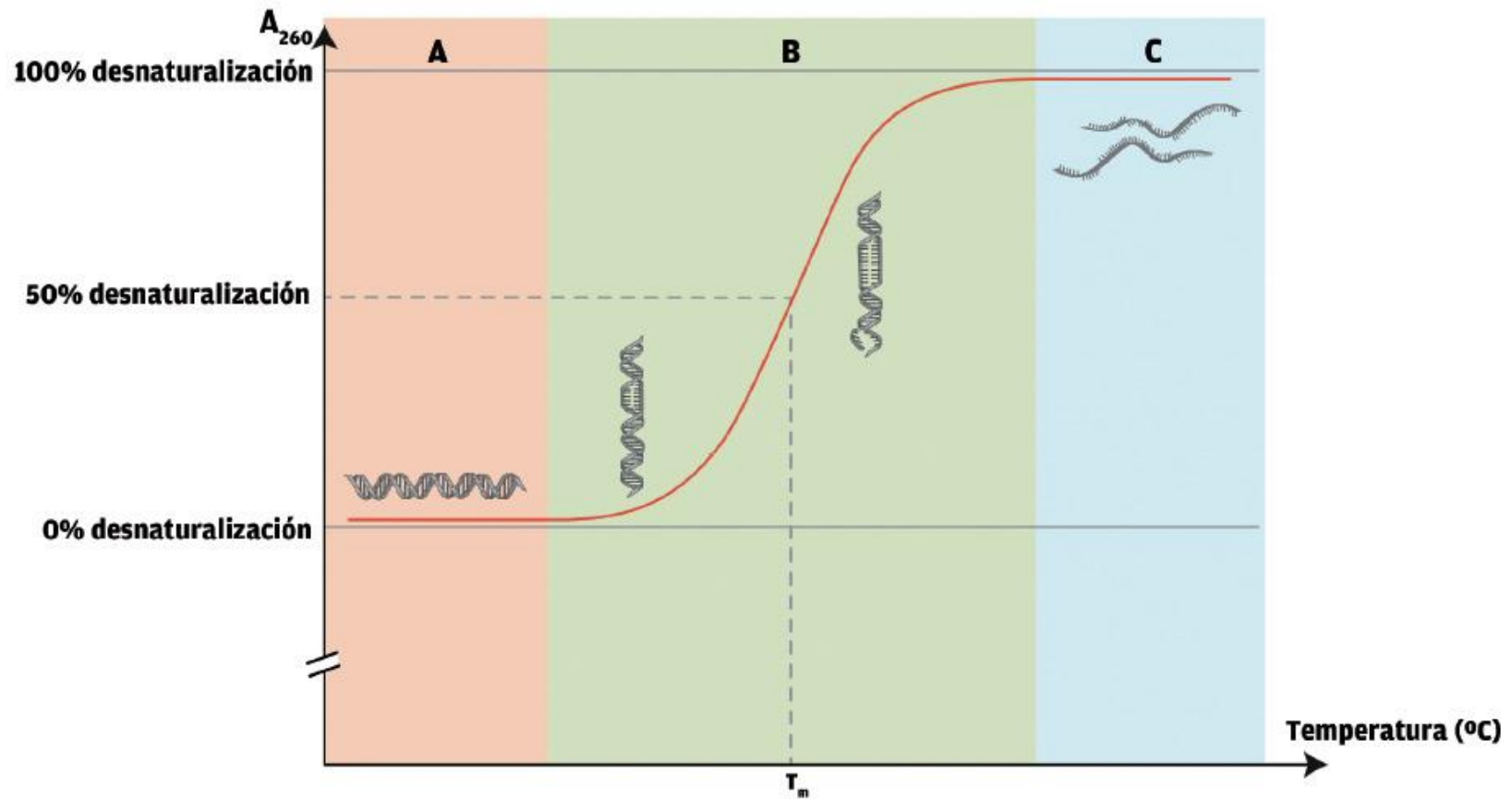
CURVA DEL FUSIÓN DEL ADN



TERCERA ZONA (ZONA C):

- La gráfica en esta zona corresponde a una recta de **pendiente prácticamente nula**, debido a que la absorbancia se mantiene en el valor máximo aunque la temperatura siga aumentando.
- **En esta fase, el ADN se mantiene desnaturalizado al 100%.**

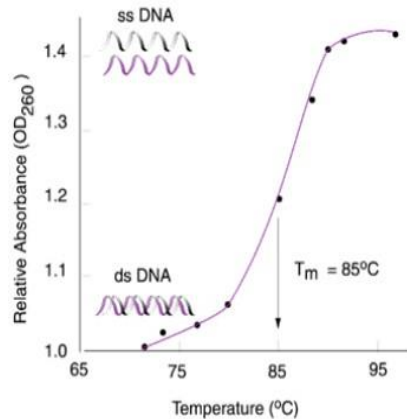
CURVA DEL FUSIÓN DEL ADN



BASES TEÓRICAS DE LA HIBRIDACIÓN

TEMPERATURA DE FUSIÓN DEL ADN T_m (Temperatura melting)

Temperatura de fusión: T_m

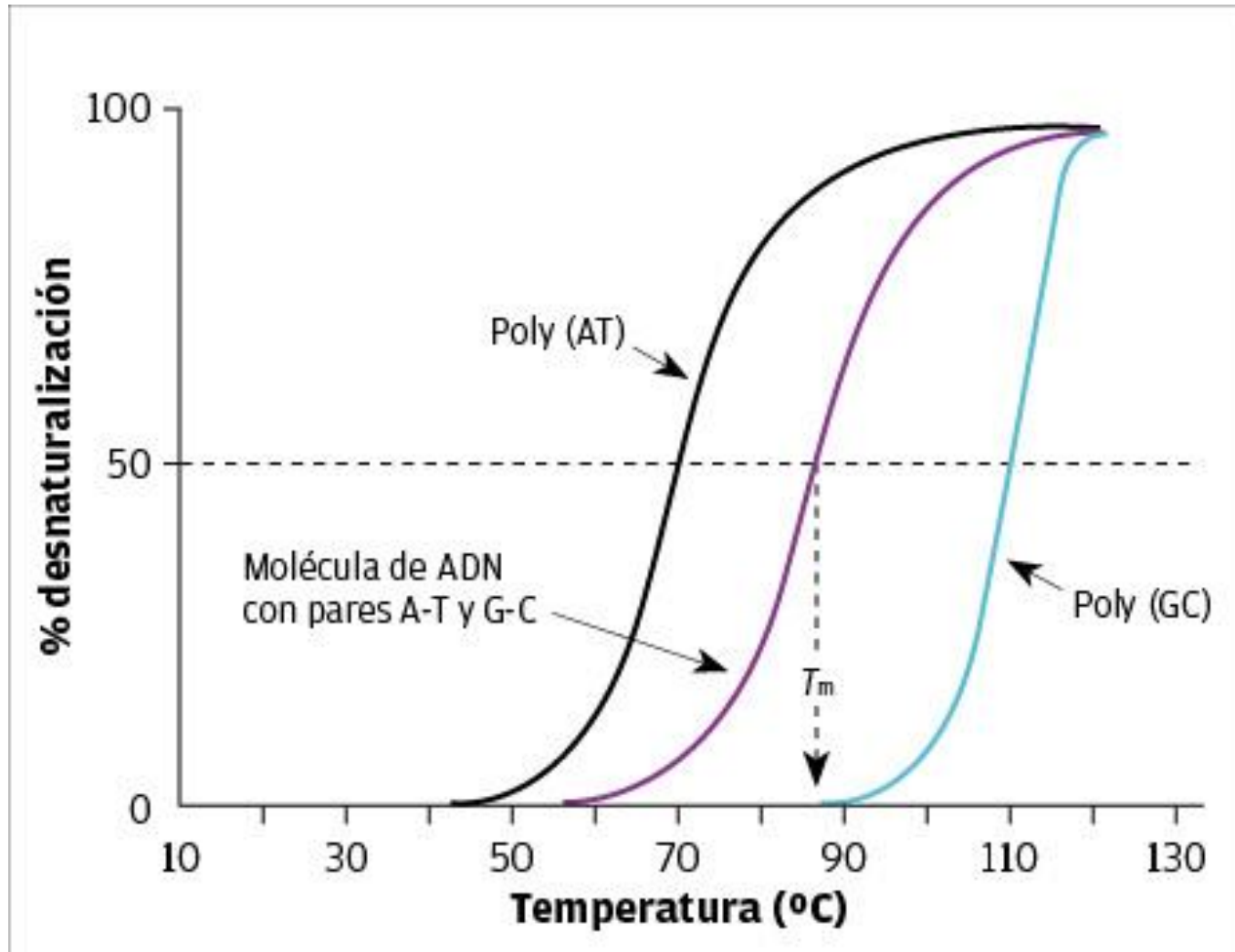


- Temperatura a la cual el 50% del DNA se encuentra en la forma desplegada.

Se puede definir la temperatura de fusión de una molécula bicatenaria de ADN como *la temperatura a la cual la desnaturalización es del 50%.*

- Para moléculas pequeñas, (< 500 pb), la T_m aumenta con la longitud.
- Para moléculas de más de 500 pb, el factor que más influye en la T_m es la proporción de **pares GC** (unidas por tres puentes de hidrógeno)
- En consecuencia, **cuanto mayor sea la proporción de pares GC en una molécula mayor será el número de puentes de H que hay que romper y por tanto será mayor la cantidad de energía que habrá que suministrar (en forma de calor $\rightarrow > t_m$) para separar las dos moléculas**

COMPARACIÓN DE LAS CURVAS DE FUSIÓN DE UNA MOLÉCULA DE ADN POLI-AT y UNA MOLÉCULA POLI-GC



BASES TEÓRICAS DE LA HIBRIDACIÓN

CINÉTICA DE RENATURALIZACIÓN

- En una solución que contiene ADN totalmente desnaturalizado, para que dos cadenas complementarias se asocien tiene que producirse un choque aleatorio entre ambas.
- Cuanto mayor sea el número de cadenas en la solución, es decir, **cuanto mayor es la concentración, mayor será la probabilidad de que dos cadenas complementarias se encuentren** y, por tanto, mayor será la velocidad de renaturalización.

1ª DIFERENCIA entre DESNATURALIZACIÓN/RENATURALIZACIÓN

- En la **desnaturalización** influye la composición de las bases y no influye la concentración.
- En la **renaturalización** influye la concentración y no la composición de la bases.

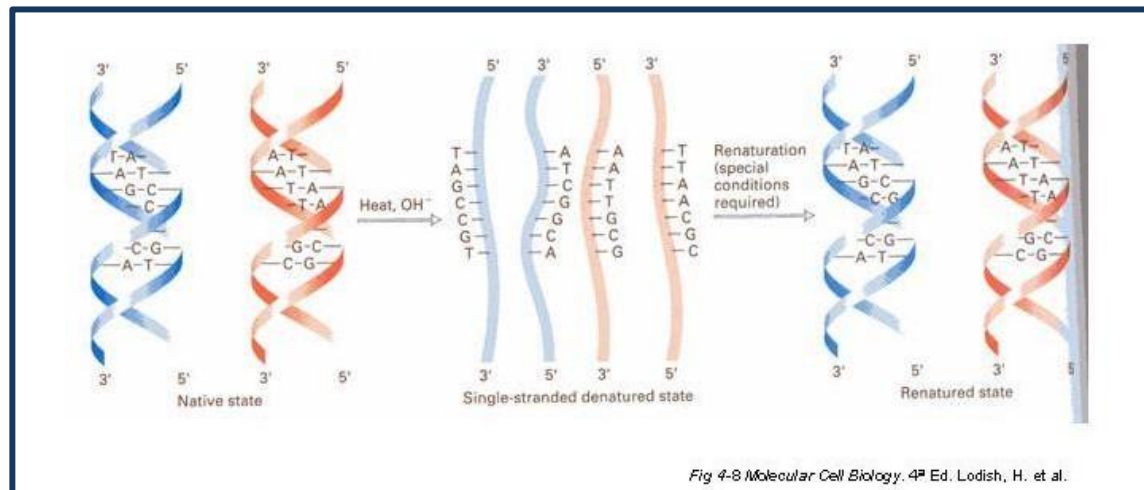
BASES TEÓRICAS DE LA HIBRIDACIÓN

CINÉTICA DE RENATURALIZACIÓN

Una vez que las dos cadenas complementarias de una molécula se encuentran, la re-asociación se produce en dos fases:

- **FASE DE NUCLEACIÓN**: es una *fase lenta* en la que **secuencias cortas de bases complementarias se aparean** por formación de puentes de hidrógeno.
- **FASE DE CIERRE EN CREMALLERA**: es una *fase rápida* en la que se produce el **cierre de las secuencias vecinas** originando la doble hélice.

La velocidad de la renaturalización viene marcada por la fase de nucleación

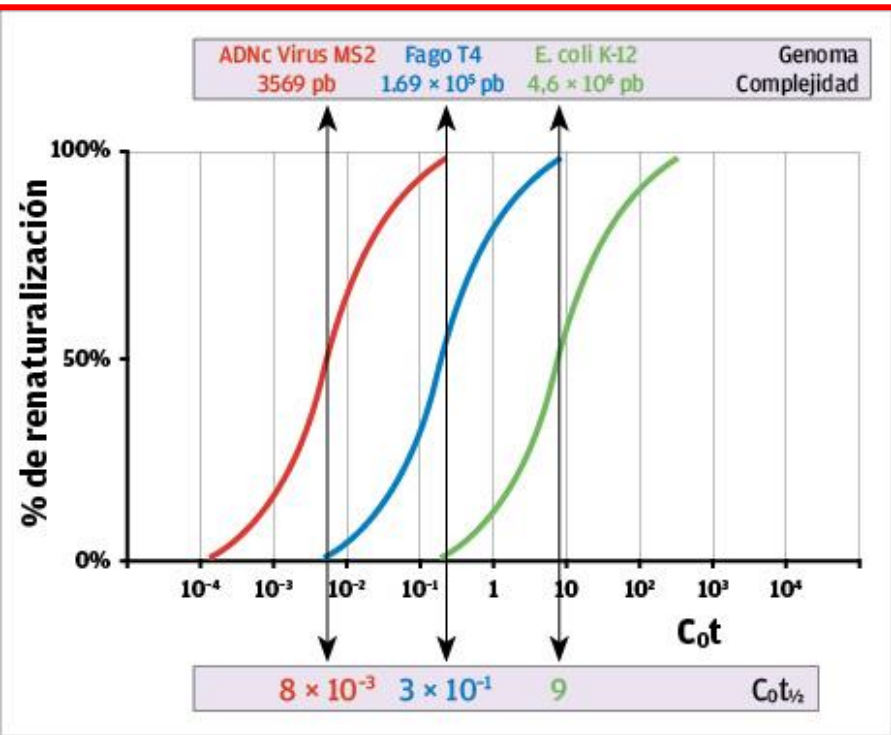


CURVAS DE RENATURALIZACIÓN

- Esta curva tendrá un comportamiento diferente en función de la complejidad del ADN
- Será diferente según sea el genoma de un organismo procariota o eucariota.

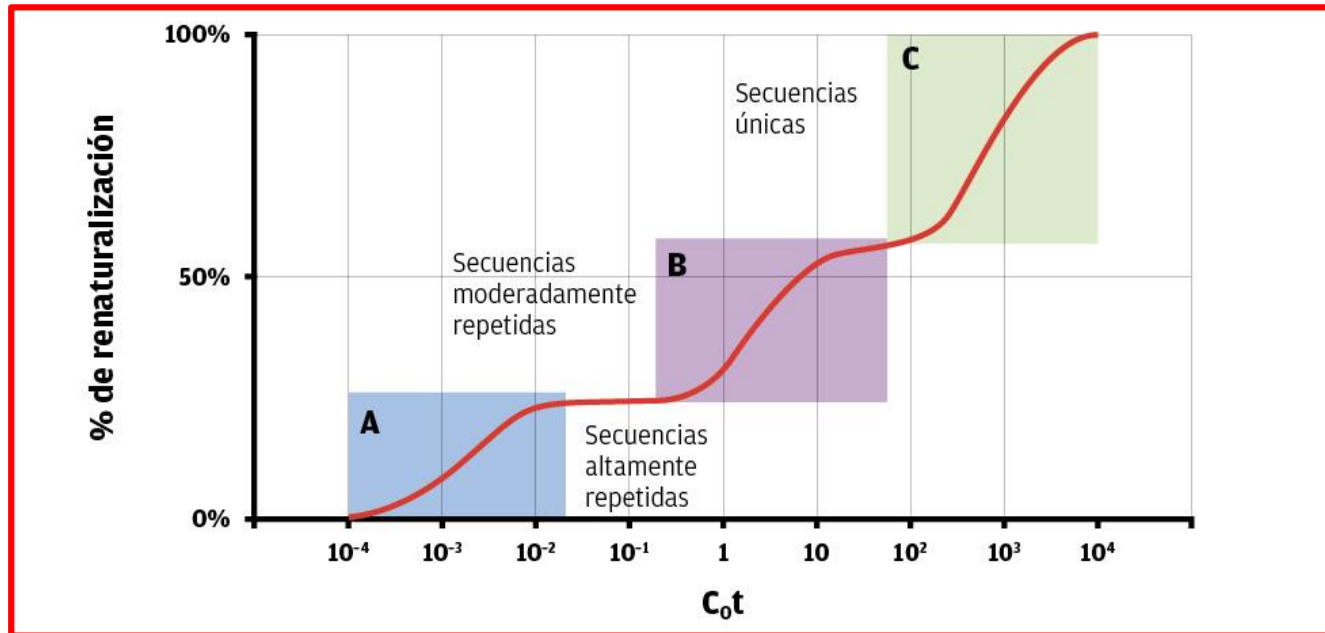
2ª DIFERENCIA entre DESNATURALIZACIÓN Y RENATURALIZACIÓN.

- En la desnaturalización, la longitud de la molécula no influye en la T_m para moléculas de más de 500 pb.
- Por el contrario, la velocidad de renaturalización es inversamente proporcional a la complejidad de la molécula.

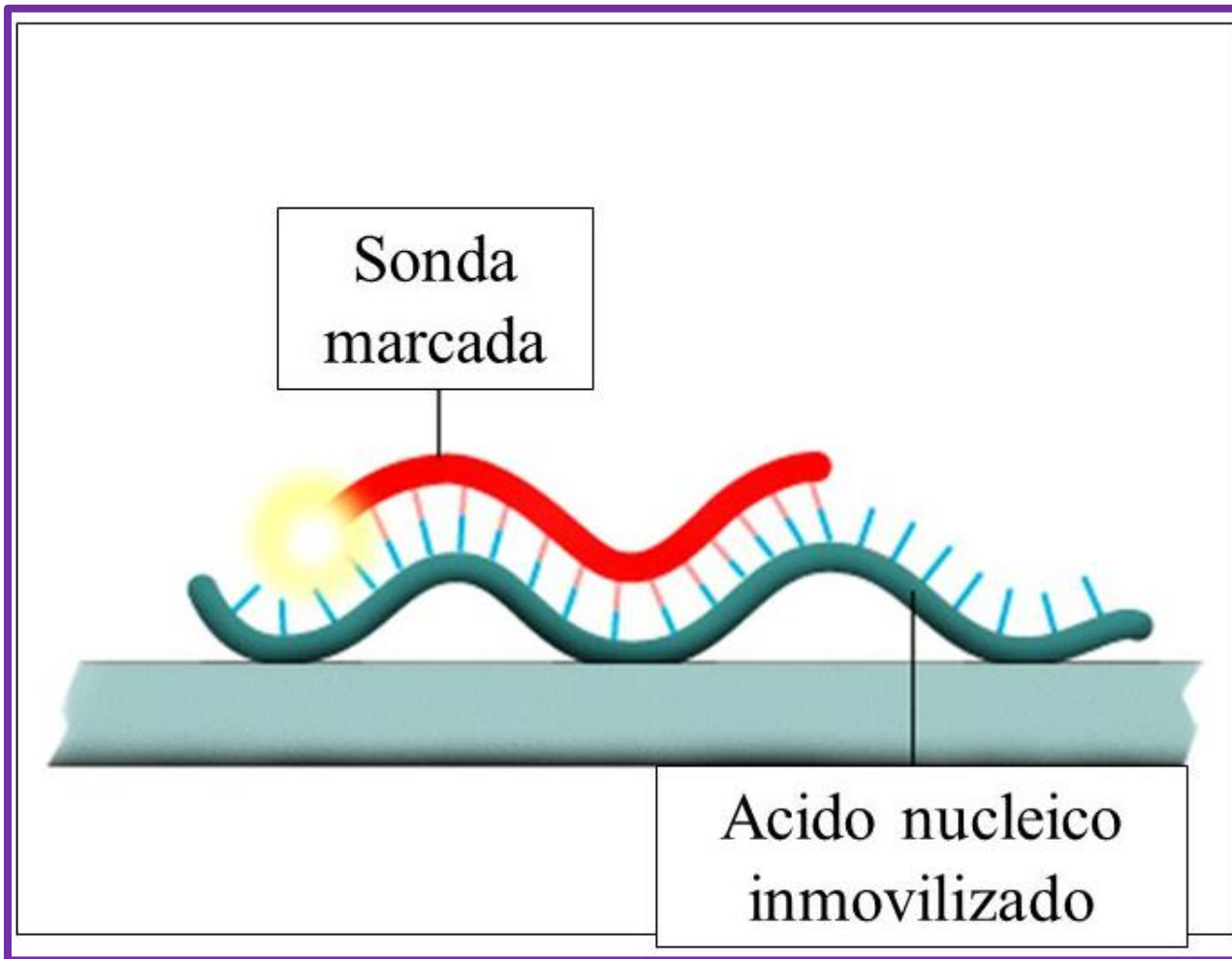


CURVAS DE RENATURALIZACIÓN

En los organismos eucariotas, la curva de renaturalización no es sigmoide, sino escalonada, con varios puntos de inflexión.



Curva de renaturalización de un organismo eucariota, con forma escalonada, en la que se pone de manifiesto la distinta velocidad de renaturalización de las secuencias altamente repetidas (A), las secuencias moderadamente repetidas (B) y las secuencias únicas (C).



HIBRIDACION

LA HIBRIDACIÓN

El híbrido sonda/secuencia diana tiene las mismas propiedades que una molécula bicatenaria de ADN en cuanto a desnaturalización y renaturalización.

- Las sondas usadas en las técnicas de hibridación suelen reconocer regiones de ADN o ARN de secuencia única.
- Se puede obtener una curva de fusión de cualquier híbrido, aumentando la temperatura y midiendo la absorbancia a 260 nm.
- Esta curva es también de tipo sigmoide y permite definir la correspondiente temperatura de fusión del híbrido.
- De esta forma se pueden comparar las T_m de diferentes híbridos.

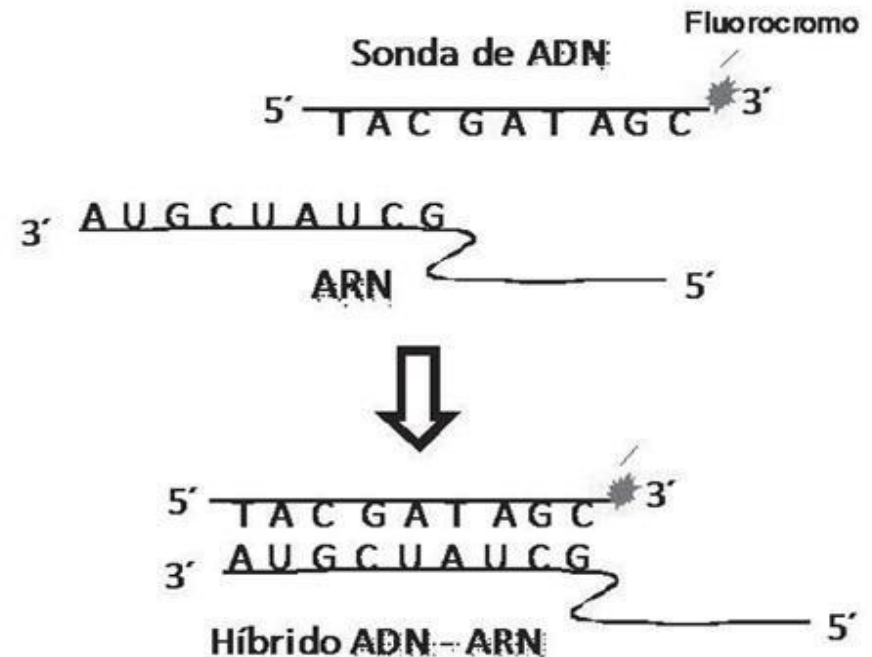


Figura 1. Principios de la hibridación. El apareamiento se puede presentar entre nucleótidos complementarios de moléculas de ADN-ADN o como lo muestra la figura entre cadenas ADN – ARN en la que A se aparea con U y G con C.

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA HIBRIDACIÓN

Todos aquellos factores que pueden modificar la **T_m** de un híbrido influyen en la hibridación:

- La presencia de agentes desnaturalizantes
- La fuerza iónica de la solución
- El porcentaje de bases no complementarias o *mismatch* (en inglés)

T_m: temperatura de fusión de una molécula bicatenaria de ADN (temperatura a la cual la desnaturalización es del 50%)

AGENTES DESNATURALIZANTES

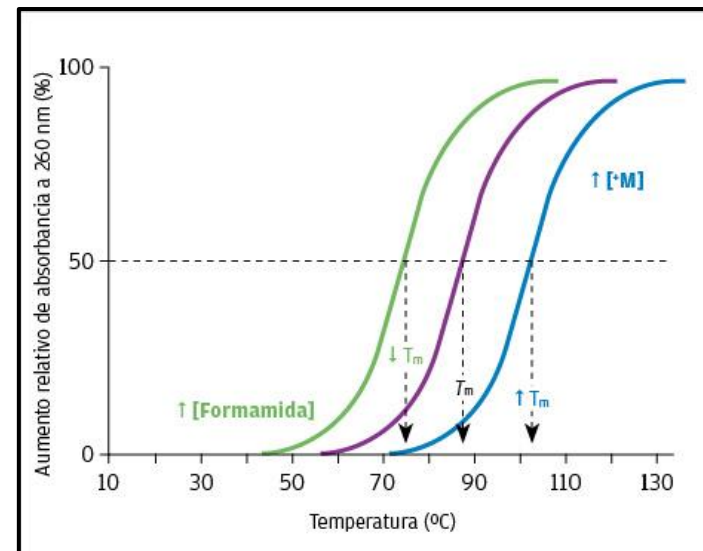
- Algunos agentes desnaturalizantes y solventes orgánicos, como el dimetilsulfóxido (DMSO) y la formamida, desestabilizan los puentes de hidrógeno entre las bases complementarias, facilitando su ruptura.
- Si se añaden estos compuestos al híbrido en solución, se requiere menos energía para desnaturalizarlo, por lo que la curva de fusión se desplaza hacia la izquierda y la **T_m disminuye**.

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA HIBRIDACIÓN

FUERZA IÓNICA DE LA SOLUCIÓN

- Los híbridos (igual que los ácidos nucleicos) **tienen una carga eléctrica neta negativa** por los fosfatos dispuestos en la periferia de la doble hélice.
- Los **cationes monovalentes** presentes en la disolución se disponen rodeando los híbridos y neutralizando su carga negativa. → Este fenómeno **estabiliza la doble hélice** (disminuye la repulsión electrostática entre las dos cadenas cargadas negativamente).
- **Cuanto mayor es la concentración de cationes monovalentes en la solución más energía en forma de calor hay que aportar al híbrido para desnaturalizarlo.**

Esto se refleja en la curva de fusión, que se desplaza hacia la derecha cuando se **aumenta la concentración de cationes monovalentes, aumentando la T_m .**



FACTORES QUE INFLUYEN EN LA HIBRIDACIÓN

PORCENTAJE DE BASES NO COMPLEMENTARIAS O MISMATCH

- Dependiendo de las condiciones en que se realice la hibridación, **una sonda puede unirse tanto a su secuencia diana como a secuencias parecidas** a la diana que tengan algunas bases distintas no complementarias.
- Es decir, se pueden formar **híbridos imperfectos** que mantienen un número reducido de bases desapareadas y, por tanto, contienen menor número de puentes de hidrógeno que los híbridos perfectos.
- El porcentaje de pares de bases no complementarias en el híbrido o mismatch es otro factor que influye en la T_m : **a mayor mismatch menor T_m** .



TIPOS Y CARACTERÍSTICAS DE LAS SONDAS

Las sondas son un elemento clave en la realización de técnicas de hibridación

CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las sondas pueden ser *bicatenarias* o *monocatenarias* y su tamaño puede oscilar entre el de *pequeños oligonucleótidos* y el de *grandes moléculas de miles de nucleótidos*.



ESPECIFICIDAD



Capacidad que tiene una sonda para discriminar la secuencia diana con la que se tiene que hibridar.
El tamaño mínimo de la secuencia de una sonda para que sea específica debe ser de 16 bases.



SENSIBILIDAD



Probabilidad de detectar cantidades mínimas del híbrido sonda-diana y está en relación con el número de moléculas marcadoras que admite la sonda.

TIPOS DE SONDAS



SONDAS DE ADN



- DE SÍNTESIS QUÍMICA
- DE ADN RECOMBINANTE
- DE PCR



SONDAS DE ARN



- DE SÍNTESIS QUÍMICA
- DE TRANSCRIPCIÓN



SONDAS QUÍMICAS SINTÉTICAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS



- SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS PEPTÍDICOS
- SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS BLOQUEADOS

Las sondas de ADN son las más utilizadas porque son fáciles de obtener en grandes cantidades y presentan una mayor versatilidad en cuanto a tamaño y métodos de marcaje.

SONDAS DE ADN

Las sondas de ADN son las más utilizadas. Sus cinéticas de desnaturalización y renaturalización son las más estudiadas y mejor comprendidas.

Según el proceso de obtención, las sondas de ADN pueden ser:

- De **PCR**
- De **síntesis química**
- De **ADN recombinante**

SONDAS PCR

La obtención de sondas de ADN mediante PCR **consiste en amplificar el fragmento que nos interesa como sonda mediante la reacción en cadena de la polimerasa.**

Este método implica conocer las secuencias que flanquean el fragmento que queremos utilizar.

CARACTERÍSTICAS SONDAS DE ADN OBTENIDAS POR PCR

- **Son bicatenarias**
- **Tienen un tamaño intermedio (cientos de bases)**

SONDAS DE ADN

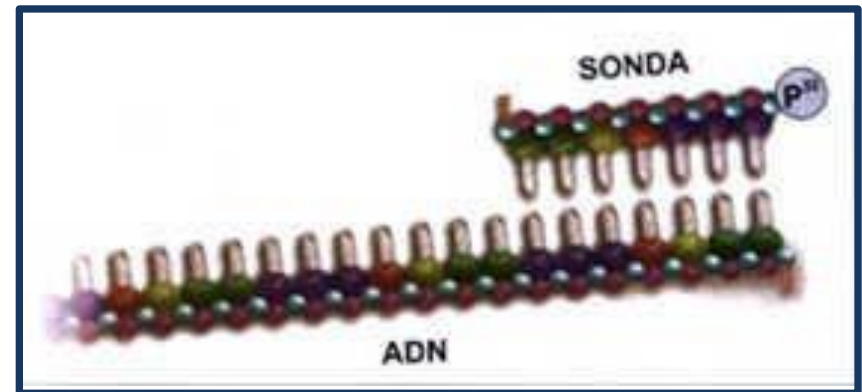
SONDAS DE SÍNTESIS QUÍMICA

Las sondas de ADN de síntesis química **se obtienen por condensación química secuencial de los desoxinucleótidos concretos que interesa incorporar para obtener una secuencia determinada.**

Actualmente este proceso está automatizado, anclando el primer nucleótido de la secuencia a una fase sólida y añadiendo nucleótido a nucleótido mediante ciclos de reacciones químicas.

CARACTERÍSTICAS SONDAS DE ADN OBTENIDAS POR SÍNTESIS QUÍMICA

- Son **monocatenarias**
- Tienen un **tamaño reducido**.
- Solo se pueden sintetizar oligonucleótidos relativamente pequeños (<200 nucleótidos) siendo **los más habituales inferiores a 40-50 nucleótidos**.



SONDAS DE ADN

SONDAS DE SÍNTESIS QUÍMICA

VENTAJAS	INCONVENIENTES
➤ Al ser monocatenarias, no requieren desnaturalización por calor durante el proceso de hibridación.	➤ Baja sensibilidad. El tamaño reducido limita el número de moléculas marcadoras que se pueden incorporar, lo que hace que su sensibilidad sea menor respecto a las otras sondas de ADN.
➤ Su tamaño reducido les permite una mejor penetración en el tejido, lo cual resulta ventajoso en las técnicas de hibridación in situ, sobre todo para detectar ARNm	➤ Tienen gran facilidad para hibridar inespecíficamente con secuencias parecidas a la secuencia diana, por lo que la hibridación tiene que hacerse en condiciones muy estrictas.

TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN IN SITU: Son las técnicas en las que **la hibridación de ácidos nucleicos se realiza directamente sobre extensiones citológicas o secciones de tejido** y el resultado obtenido se realiza microscópicamente en el contexto de detalles morfológicos.

SONDAS DE ADN

SONDAS DE ADN RECOMBINANTE

Las sondas de ADN recombinante **se obtienen por un proceso de clonación y amplificación por cultivo**, que se puede esquematizar de la siguiente manera:

- El fragmento de ADN que queremos emplear como sonda se inserta en un vector, normalmente un plásmido bacteriano.
- El plásmido recombinante se introduce en una bacteria y se cultiva en un medio apropiado.
- Posteriormente se extrae el plásmido amplificado y se emplea entero como sonda, o bien se separa el fragmento de interés con enzimas de restricción.

CARACTERÍSTICAS SONDAS DE ADN RECOMBINANTE

- Son **bicatenarias**. Esto hace que se requiera desnaturalización por calor como paso previo a la hibridación con las secuencias diana.
- Tienen un **gran tamaño** (cientos/miles de pares de bases). Esto hace que admitan gran número de moléculas marcadoras y, por tanto, tienen **mayor sensibilidad**.
- **No suelen hibridar inespecíficamente**, por lo que presentan **mayor especificidad**.

SONDAS DE ARN

- También denominadas **RIBOSONDAS**,
- Son menos utilizadas que las sondas de ADN.
- Son **siempre monocatenarias**, por lo que no requieren un paso previo de desnaturalización antes de la hibridación.

VENTAJA



Los **híbridos ADN/ARN** son ligeramente **más estables** que los híbridos ADN/ADN

INCONVENIENTE



Los **híbridos ADN/ARN** son **muy sensibles** a cualquier contaminación por las ARNasas que las degradan rápidamente.

Según el proceso de obtención, las sondas de ARN pueden ser:

- De síntesis química
- De transcripción.

SONDAS DE ARN

SONDAS DE ARN DE SÍNTESIS QUÍMICA

- Se obtiene por **condensación química secuencial de los ribonucleótidos** concretos que interesa incorporar para obtener una secuencia determinada.
- Presenta las mismas ventajas e inconvenientes que las sondas de síntesis química de ADN.

SONDAS DE ARN DE TRANSCRIPCIÓN

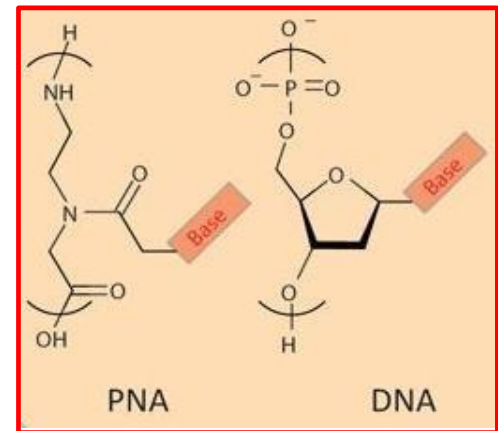
- El proceso de obtención consiste en **transcribir un vector que contiene el fragmento de interés** o un ADNc mediante una ARN polimerasa.
- Estas sondas suelen ser de tamaño intermedio (cientos de bases)

SONDAS QUÍMICAS SINTÉTICAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Normalmente las sondas utilizadas en las técnicas de hibridación son moléculas de ADN o ARN, pero en la actualidad se están empezando a comercializar como sondas modificaciones químicas sintéticas de los ácidos nucleicos.

SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS PEPTÍDICOS O PNA (PEPTIDE NUCLEIC ACID)

- Son oligómeros sintéticos en los que el esqueleto típico de azúcar-fosfato del ADN y ARN es sustituido por un esqueleto formado por unidades de aminoetil-glicina unidas entre sí por enlaces amida.
- Las sondas PNA hibridan con cadenas de ADN y ARN de secuencia complementaria mediante puentes de hidrógeno entre bases complementarias
- Se utilizan sobre todo en técnicas de hibridación in situ



CARACTERÍSTICAS ESPECIALES QUE LAS DIFERENCIAN DE LAS SONDAS DE ADN Y ARN

- No tienen carga eléctrica, al carecer de grupos fosfato
- No son degradadas por nucleasas ni por proteasas, lo que les confiere gran estabilidad.

SONDAS QUÍMICAS SINTÉTICAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS PEPTÍDICOS O PNA (*PEPTIDE NUCLEIC ACID*)

VENTAJAS

- **Hibridan más rápidamente** que sus contrapartidas de ADN o ARN.
- Los híbridos **PNA/ADN** o **PNA/ARN** son más estables que los híbridos **ADN/ADN** o **ADN/ARN** → debido a su falta de carga eléctrica, que hace que no exista el efecto de repulsión entre cadenas complementarias.
- **La fuerza iónica del medio influye muy poco en la estabilidad** de los híbridos formados con sondas PNA, también debido a su falta de carga.
- Gran capacidad para discriminar bases no complementarias en la secuencia diana, lo que las hace **muy específicas**.

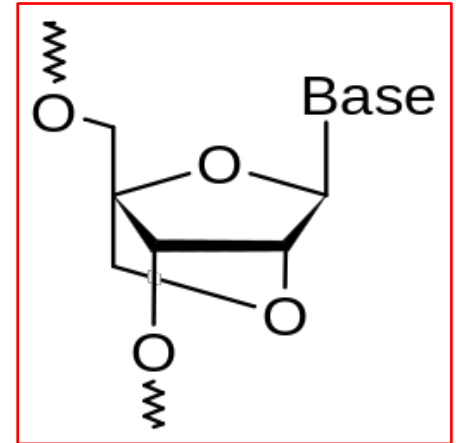
INCONVENIENTES

- Su **solubilidad es mucho menor** que las de ADN o ARN y **disminuye drásticamente con la longitud**.
- Por esa razón, el tamaño de estas sondas no suele sobrepasar las 30 bases.
- Solo se puede obtener por **síntesis química**.

SONDAS QUÍMICAS SINTÉTICAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS BLOQUEADOS O LNA (LOCKED NUCLEIC ACID)

Son oligómeros sintéticos de ribonucleótidos, en los que se modifican químicamente algunas de las ribosas del esqueleto azúcar-fosfato mediante la formación de un puente de oxígeno entre el carbono 2' y el carbono 4'.



CARACTERÍSTICAS SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS BLOQUEADOS

- Las sondas LNA presentan **mayor sensibilidad** y **especificidad** que su contrapartida de ARN sin modificar.
- Se obtienen por **síntesis química**.
- Son de **pequeño tamaño**.
- Se **usan** principalmente en **técnicas de hibridación in situ**.

EL MARCAJE DE LAS SONDAS

El **marcaje** es el procedimiento de marcar la sonda utilizada en las técnicas de hibridación con la finalidad de poder visualizar los resultados.

TIPOS DE MARCADORES:

El tipo de marcador utilizado condiciona el método de detección de la híbrido.

A) Marcadores que posibilitan la detección directa de la híbrido

- Isótopos radioactivos
- Fluorocromos

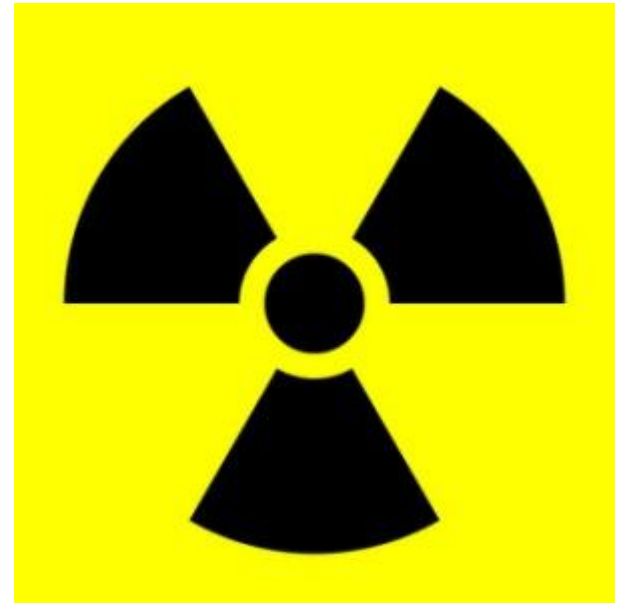
B) Marcadores que requieren métodos indirectos de revelado en varios pasos

- Haptenos (digoxigenina y biotina)

EL MARCAJE DE LAS SONDAS

ISÓTOPOS RADIOACTIVOS

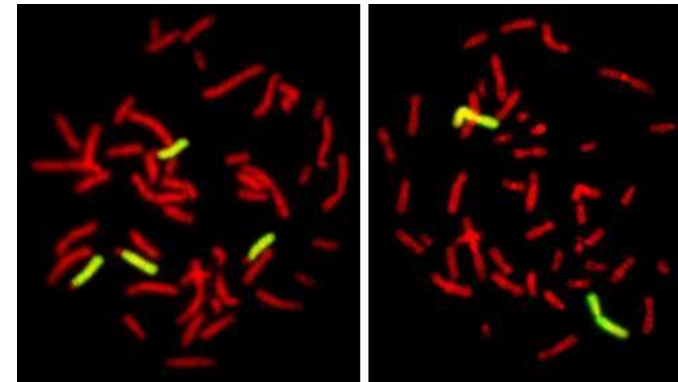
- Los isótopos radioactivos son *elementos químicos con capacidad de emitir radiaciones*. Los más utilizados son el *fósforo-32 (^{32}P)* y el *tritio (^3H)*.
- El marcaje en la sonda se produce *introduciendo nucleótidos radioactivos* que contienen alguno de estos isótopos.
- Con el marcaje radioactivo se consigue una gran sensibilidad, pero el uso de este tipo de sondas requiere instalaciones e infraestructuras adecuadas para el trabajo con material radioactivo, así como personal entrenado.
- *La detección de la híbrido se realiza revelando el marcaje radioactivo mediante autorradiografía* con una película de rayos X.



EL MARCAJE DE LAS SONDAS

FLUOROCROMOS

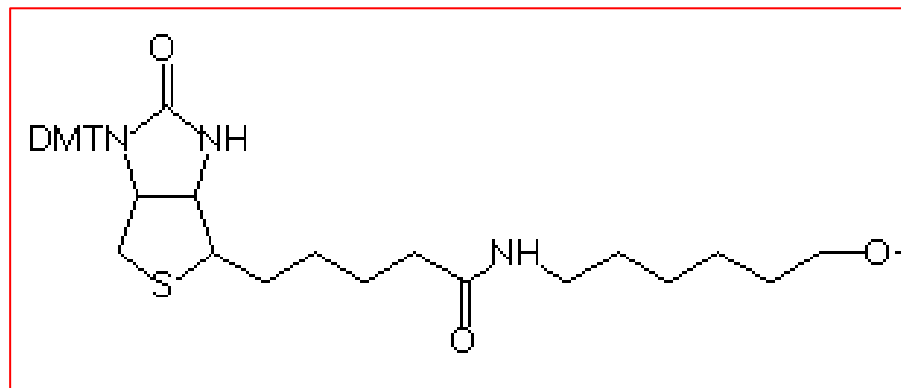
- Los fluorocromos son *compuestos químicos que emiten luz al ser excitados por la luz ultravioleta*.
- Tradicionalmente se han utilizado derivados de la fluoresceína y la rodamina, pero actualmente se han desarrollado multitud de marcadores fluorescentes que se acoplan bien a los nucleótidos y no alteran la especificidad de la sonda, como las cianinas, la familia Alexa-flúor...
- Las sondas marcadas con fluorocromos se utilizan principalmente en la **técnica FISH** (hibridación in situ fluorescente).
- El empleo de varias sondas marcadas con diferentes fluorocromos permite detectar simultáneamente varias secuencias diana. Esto es especialmente útil en estudios de citogenética.
- Para la detección del híbrido marcado se requiere un microscopio de fluorescencia.



EL MARCAJE DE LAS SONDAS

HAPTENOS

- Los haptenos son *moléculas de pequeño tamaño que, al igual que los fluorocromos, se pueden acoplar a los nucleótidos y no alteran la especificidad de la sonda.*
- Pero, a diferencia de ellos, ***no pueden ser detectados directamente***, por lo que la *detección del híbrido requiere métodos indirectos de revelado* basados en la afinidad química de moléculas o en métodos inmunológicos.
- Los haptenos más utilizados son la digoxigenina y la biotina.



EL MARCAJE DE LAS SONDAS

MÉTODOS DE MARCAJE

La mayoría de los métodos de marcaje utilizan reacciones enzimáticas y se basan en la incorporación a la sonda de nucleótidos marcados. Los más habituales son:

Desplazamiento de mella.

Cebado al azar o cebado aleatorio.

Marcaje terminal.

Marcaje por PCR.

Marcaje de sondas de ARN.

EL MARCAJE DE LAS SONDAS

MÉTODOS DE MARCAJE: **Desplazamiento de mella** (nick translation)

- Se utiliza para marcar:
 - **Sondas de ADN bicatenario de gran tamaño**, obtenidas por tecnología de ADN recombinante
 - **Genomas enteros**
- Se procede incubando una determinada cantidad de sonda con una mezcla de reacción que contiene:
 - **ADNasa I**
 - **ADN polimerasa I bacteriana**
 - **Una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato.**
 - De los cuatro tipos posibles de desoxirribonucleótidos, **uno de ellos está marcado, normalmente con un isótopo radiactivo o con un hapteno.**

EL MARCAJE DE LAS SONDAS

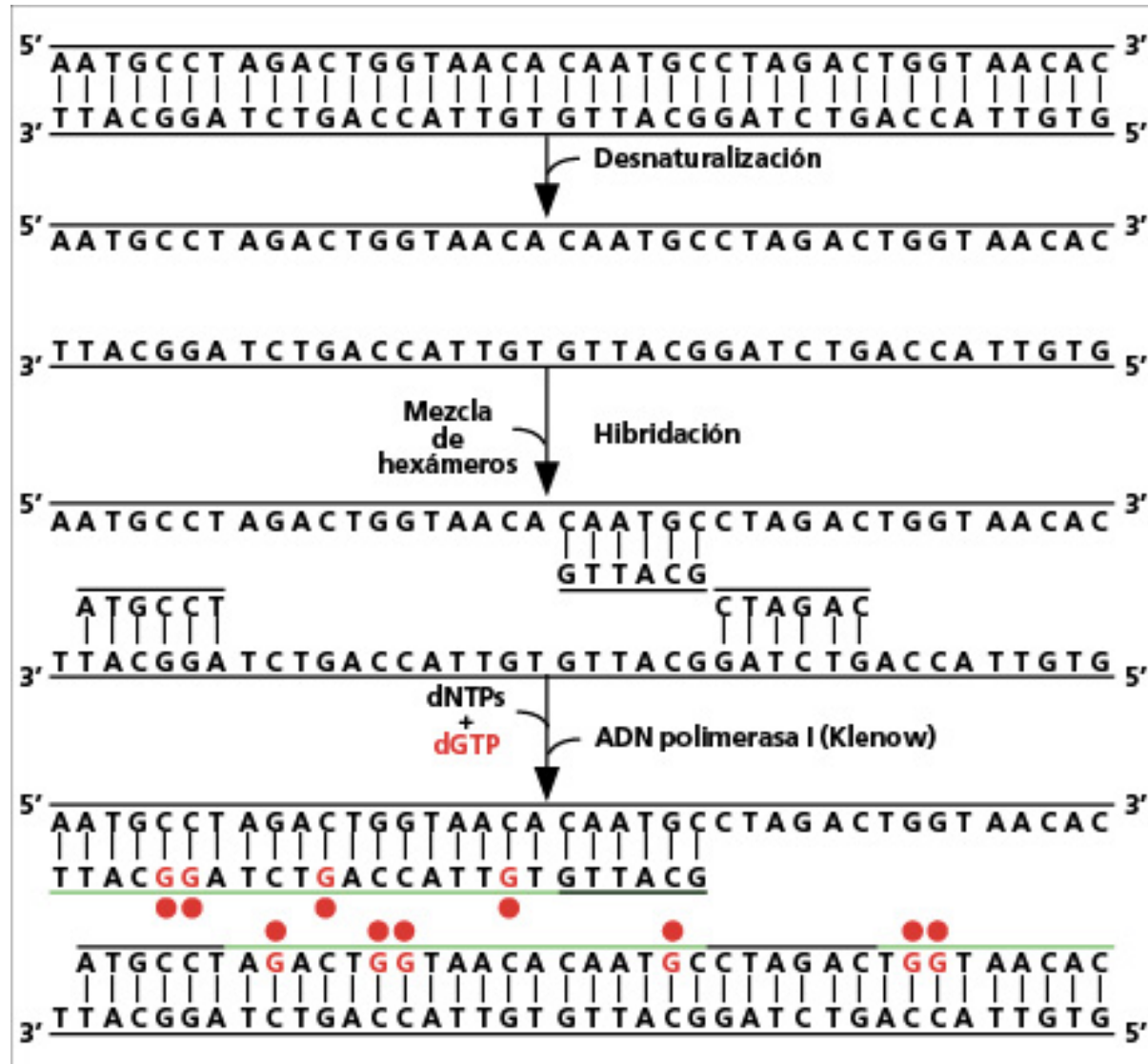
MÉTODOS DE MARCAJE: **Desplazamiento de mella** (nick translation)

Durante la incubación, normalmente a baja temperatura (15 °C), tienen lugar los siguientes procesos:

- La **ADNasa I** a bajas concentraciones y en presencia de cationes magnesio rompe enlaces fosfodiéster entre dos nucleótidos consecutivos al azar en ambas cadenas de la sonda → **produce mellas** (nick en inglés) en sitios al azar en ambas cadenas.
- La **ADN polimerasa I** intenta reparar las mellas.
- Para ello, gracias a su actividad exonucleasa 5'3', va eliminando nucleótidos, uno a uno, desde la mella hacia el extremo 3' de la cadena.
- Simultáneamente, gracias a su actividad polimerasa 5'3', va incorporando desoxirribonucleótidos en el extremo 3'-OH libre de la mella, sintetizando ADN complementario a la hebra intacta.

EL MARCAJE DE LAS SONDAS

MÉTODOS DE MARCAJE: **Desplazamiento de mella** (nick translation)



EL MARCAJE DE LAS SONDAS

MÉTODOS DE MARCAJE: **Marcaje terminal**

Se utiliza para marcar **sondas de ADN**

bicatenario o monocatenario

de pequeño y mediano tamaño

- Radiactivamente
- Con **fluorocromos**
- Con **haptenos**

En el marcaje terminal:

- Se emplea la enzima **desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT)**, una ADN polimerasa capaz de incorporar desoxinucleótidos al extremo 3'-OH libre de una molécula de ADN (bicatenaria o monocatenaria) sin necesidad de una cadena molde.
- Hay **dos posibilidades** de marcaje:
 - **Marcaje único en el extremo 3'.**
 - **Incorporación de una cola de nucleótidos marcados.**

EL MARCAJE DE LAS SONDAS

MÉTODOS DE MARCAJE: **Marcaje terminal**

DOS POSIBILIDADES DE MARCAJE:



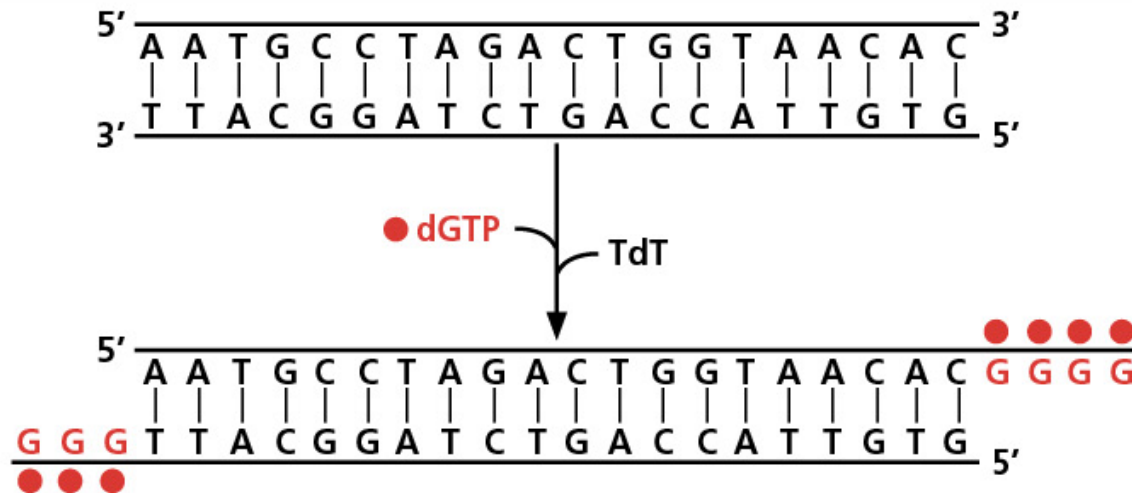
Incorporación de una cola de nucleótidos marcados.

- La sonda se marca añadiendo **una cola de nucleótidos marcados** de longitud variable.
- Por ejemplo en una mezcla de reacción que utilice una proporción de 1 didesoxinucleótido por cada 9 desoxinucleótidos (10%), al terminar la reacción de marcaje, estadísticamente se puede prever que la mayor parte de las sondas habrán incorporado colas de alrededor de 10 nucleótidos.

Marcaje único en el extremo 3'.

- Incorpora **un único nucleótido marcado** (normalmente con un fluorocromo) en el extremo 3' de la sonda.
- Se emplea en sondas pequeñas (oligonucleótidos),
- Se consigue añadiendo a la mezcla de reacción **un didesoxinucleótido** marcado, en lugar de un desoxinucleótido marcado.
- **Los didesoxinucleótidos no tienen un -OH libre en el carbono 3'** y, por lo tanto, cuando se incorporan a una cadena de ADN se detiene la síntesis, ya que no se pueden formar nuevos enlaces fosfodiéster.

MÉTODOS DE MARCAJE: Marcaje terminal



EL MARCAJE DE LAS SONDAS

MÉTODOS DE MARCAJE: **Marcaje por PCR**

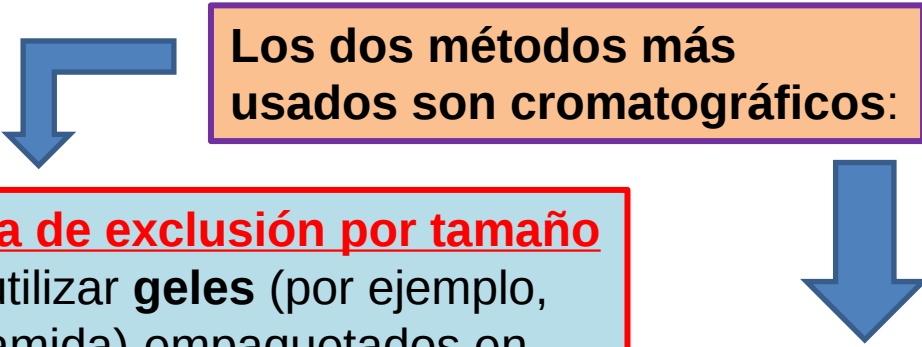
- El marcaje de sondas por PCR se realiza en el mismo proceso de obtención de las sondas por PCR,
- Utiliza desoxinucleótidos marcados radiactivamente o con haptenos en la mezcla de reacción.

MÉTODOS DE MARCAJE: **Marcaje de sondas de ARN**

- El marcaje se puede realizar en el mismo proceso de obtención de la sonda ARN mediante transcripción con una ARN polimerasa,
- Añadiendo ribonucleótidos marcados a la mezcla de reacción.

PURIFICACIÓN DE LA Sonda MARCADA

La **purificación de la sonda** consiste en la **eliminación de los nucleótidos libres marcados** para evitar ruido de fondo o interferencias en los resultados de las técnicas de hibridación.



Los dos métodos más usados son cromatográficos:

Cromatografía de exclusión por tamaño

- Se suelen utilizar **geles** (por ejemplo, de poliacrilamida) empaquetados en microcolumnas que se acoplan a tubos colectores tipo eppendorf.
- La mezcla de reacción se carga en la columna y se centrifuga
- Los nucleótidos libres quedan retenidos en el gel
- La sonda marcada purificada se recoge en el tubo colector.

Cromatografía de adsorción

- Se utilizan **matrices de lana de vidrio o sílice** empaquetadas en microcolumnas que se acoplan a tubos colectores tipo eppendorf, similares a las utilizadas en la purificación de ácidos nucleicos y basadas en los mismos principios,

FASES DE HIBRIDACIÓN

Todas las técnicas de hibridación se pueden dividir en cuatro fases genéricas:

PREHIBRIDACIÓN



Es la fase de preparación de la muestra y soporte.

HIBRIDACIÓN



En esta fase se produce la formación de la híbrido sonda/secuencia diana

LAVADO DE POSTHIBRIDACIÓN



- Es una fase crítica del proceso de hibridación.
- El objetivo es mantener los híbridos sonda/secuencia diana y eliminar los híbridos imperfectos con secuencias parecidas a la diana.
- De esta fase depende en gran medida la especificidad de la técnica.

DETECCIÓN DEL HÍBRIDO



Esta última fase consiste en detectar los híbridos específicos gracias al marcaje de la sonda.