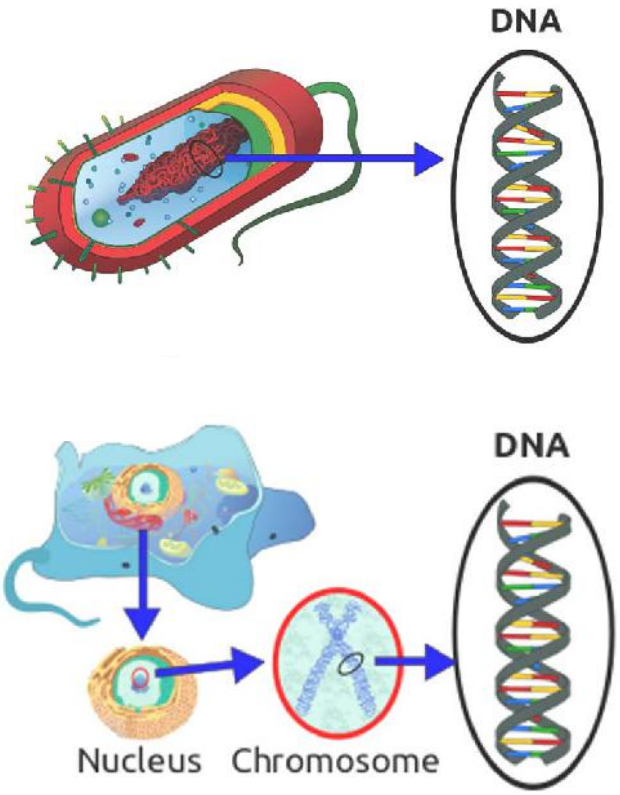
Manipulación de ácidos nucleicos

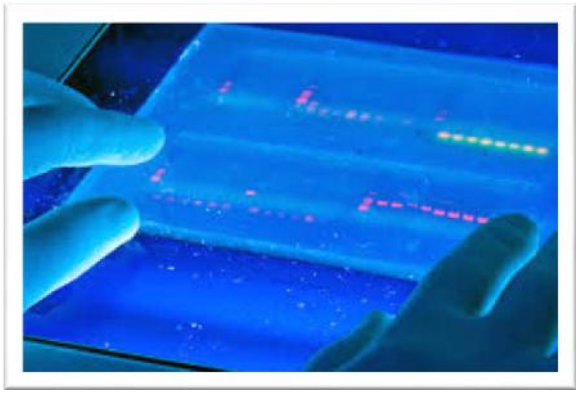
Técnicas en biología molecular

REFERENCIA:
Inma Quilis Bayarri
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat de València

¿Qué significa manipular ácidos nucleicos?

Cada día en los laboratorios de Biología Molecular de todo el mundo se realizan una serie de procesos básicos entre los que está sin duda la manipulación de ácidos nucleicos.





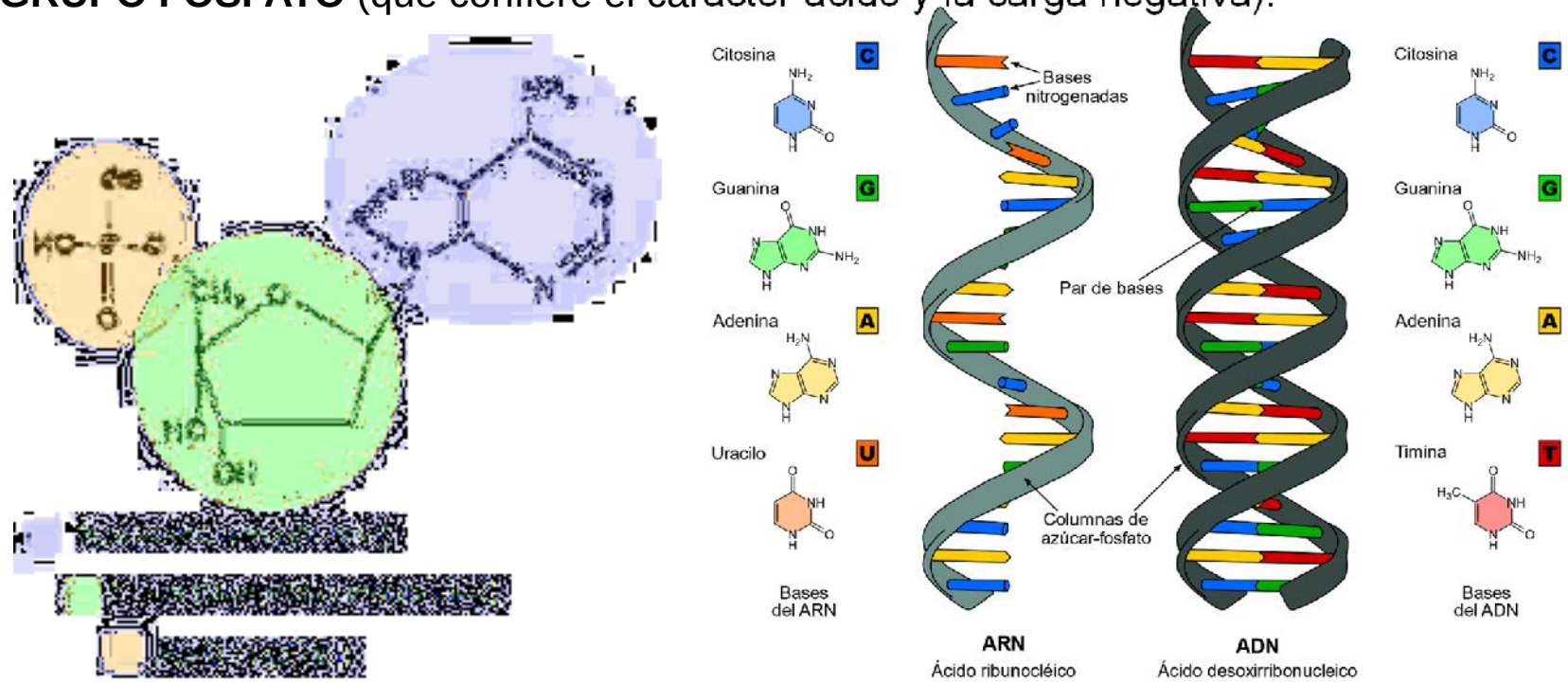
¿Qué es un ácido nucleico?

Existen dos tipos de ácido nucleico, el ribonucleico (**RNA**) y el desoxirribonucleico (**DNA**). Cada uno de ellos es una cadena polimérica de unidades monoméricas conectadas por enlaces covalentes (**enlace fosfodiéster**) que constan de:

AZÚCAR de 5 carbonos (ribosa en el RNA y 2´-desoxirribosa en el DNA)

BASE NITROGENADA (A,G,C y U en el RNA; A,G,C y T en el DNA)

GRUPO FOSFATO (que confiere el carácter ácido y la carga negativa).



Etapas básicas para la extracción y purificación de AN

Muestra

↓

Lisis celular

↓

Separación y purificación

↓

Precipitación

↓

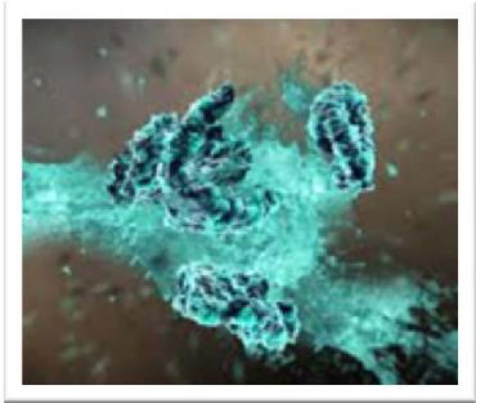
Calidad

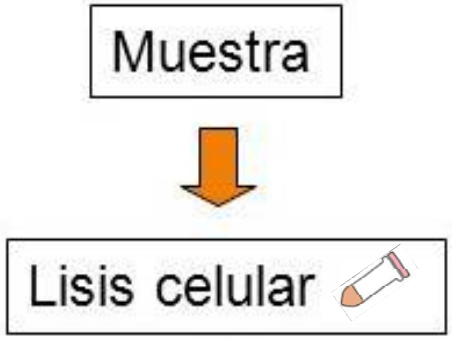
← Cualitativo: electroforesis

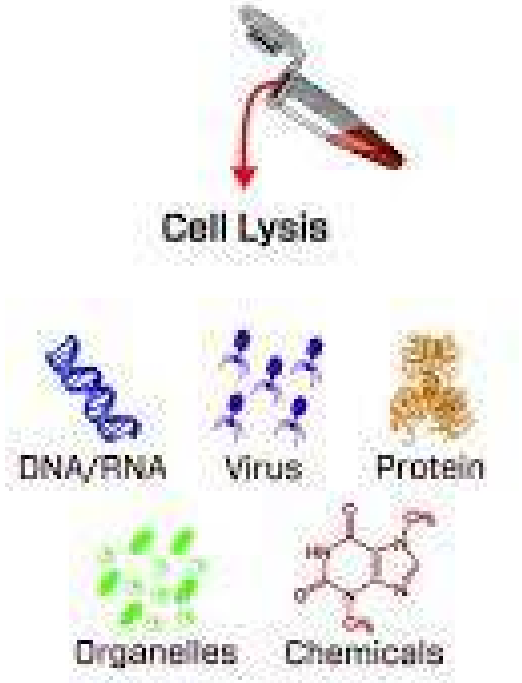
→ Cuantitativo: espectrofotometría UV

Lugar de trabajo y material estéril, Además de guantes

¿Cómo los extraemos de la célula?



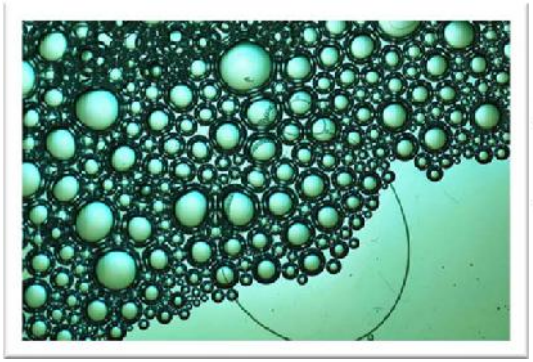




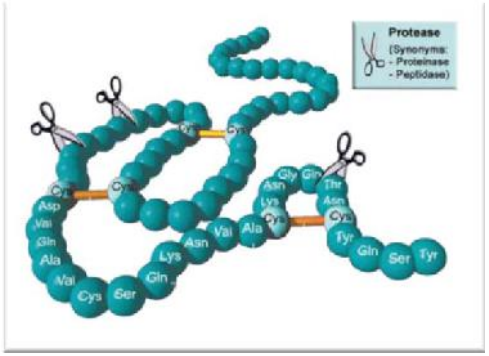
El primer paso consiste en acceder a nuestro material de interés y para ello, según el tipo de muestra hemos de conseguir **LISAR LAS CÉLULAS.**

Esto se consigue de forma sencilla en el caso de bacterias (lisis con SDS) o células animales (lisis directa al eliminar el medio de cultivo) pero puede ser algo más complicado en el caso de células vegetales o levaduras que presentan pared y precisan una rotura mecánica para eliminarla.

¿Cómo lo separamos del resto de los componentes celulares?



Separación y purificación



Los componentes celulares que no son de interés deben ser eliminados, esto se consigue añadiendo distintos reactivos:

Los **LÍPIDOS** de las membranas celular y nuclear con detergentes y surfactantes.

Las **PROTEÍNAS** añadiendo proteasas.

Si nuestro objetivo es el DNA se puede eliminar el **RNA** añadiendo RNasa.

La solución se trata entonces con sal a alta concentración para conseguir que todo el material no deseado agregue junto. Depués mediante centrifugación será separado del **DNA**.

¿Cómo lo separamos del resto de los componentes celulares?

Precipitación

La purificación del **DNA** de los detergentes, proteínas, sales y reactivos empleados durante la lisis celular se realiza por distintos procedimientos. Los más comunes son:

1. **Precipitación con Etanol frío o Isopropanol**. El DNA es insoluble en estos alcoholes por lo que precipitará y podrá ser separado por centrifugación.
   La precipitación se potencia añadiendo fuerza iónica (normalmene acetato sódico).
2. **Extracción con Fenol-Cloroformo**. El fenol desnaturaliza las proteínas de la muestra y tras centrifugar permanecen en la fase orgánica mientras el DNA se encuentra en la fase acuosa junto al cloroformo que eliminará los restos de fenol de la solución.
3. **Purificación en columna**. Se basa en el hecho de que los AN pueden unirse por adsorción a fases sólidas dependiendo del pH y la concentración salina del tampón.

¿Cómo lo separamos del resto de ácidos nucleicos?

Existen diferencias entre el DNA y el RNA que permiten su separación.

Los AN son muy sensibles a **NUCLEASAS** por eso durante su manipulación debemos extremar el cuidado para protegerlos de ellas. En el momento que se requiera trataremos la muestra con RNasa o con DNasa.

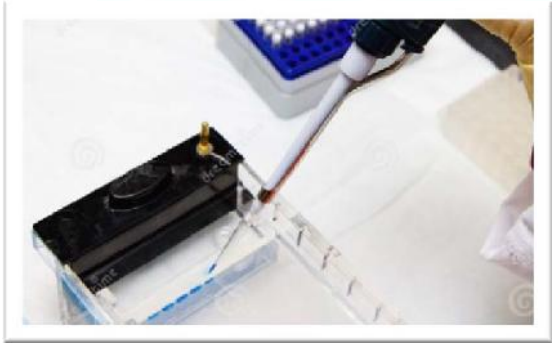
ETAPA	DNA	RNA
LISIS CELULAR	CTAB, SDS, Tris-HCl, EDTA, β-MERCAPTOETANOL	SARKOSYL, TRITÓN X, ISOCIANATO DE GUANIDINA, FENOL
PURIFICACIÓN	PROTEINASA STES. ORGÁNICOS SALES	CLOROFORMO
PRECIPITACIÓN	ALCOHOLES ALCOHOLES + SAL	ALCOHOLES
LAVADO	ETANOL 70%	ETANOL 70%
REHIDRATACIÓN	TE Ó H_2O	H_2O TRATADA CON DEPC
ALMACENAMIENTO	-20° C	-70° C

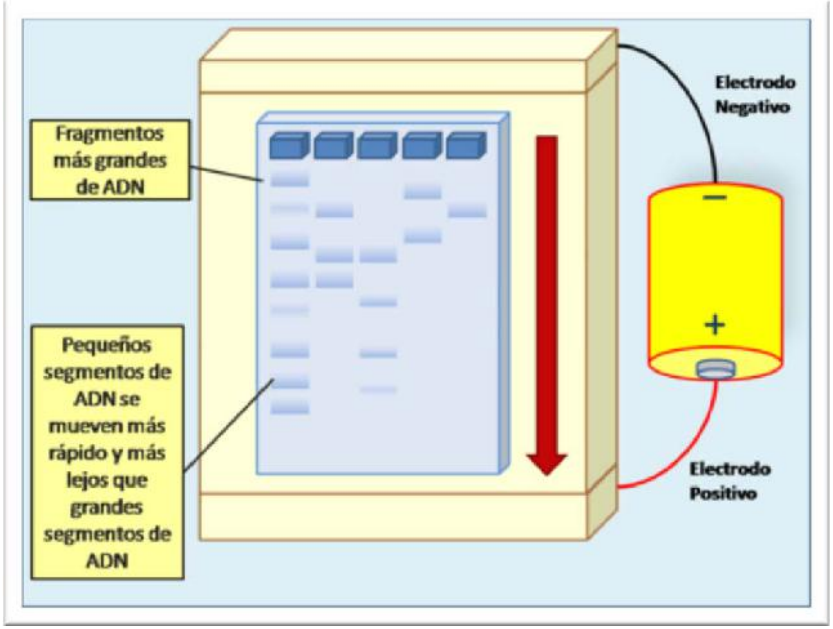
¿Cómo lo comprobamos?

Calidad

Cualitativo: electroforesis

Cuantitativo: espectrofotometría UV





Se basa en la fuerte absorción de luz a λ=260nm del DNA/RNA.

Existen espectofotómetros especializados para estas medidas.

¿Cómo lo identificamos y/o modificamos?

Una vez aislamos nuestro DNA/RNA puede tener distintos destinos según el problema u objetivo que se plantee. Muchas de estas técnicas y aplicaciones las veremos en las lecciones siguientes.

INGENIERÍA GENÉTICA

ESTUDIOS ÓMICOS

Tecnología del DNA Recombinante

Técnicas de Secuenciación

Enzimas de Restricción

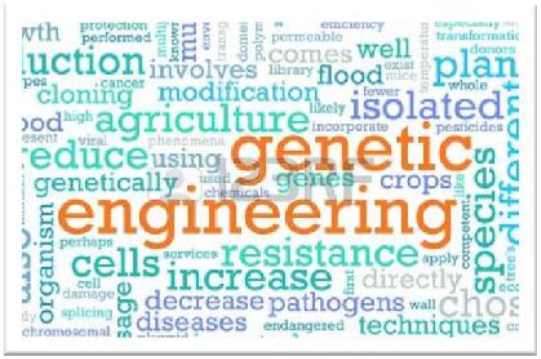
PCR

CRISPR

Sanger

Microarrays

NGS



Referencias bibliográficas y enlaces

Links:

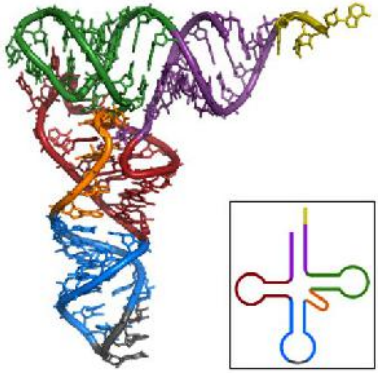
Para visualizar la EXTRACCIÓN DE DNA:
https://www.youtube.com/watch?v=JNl1kjw9ZDQ

Para visualizar la ELECTROFORESIS DE DNA:
https://www.youtube.com/watch?v=vq759wKCCUQ

Técnicas de secuenciación

La secuenciación del DNA

***Secuenciación**: Proceso mediante el cual se determina el orden preciso de las bases nitrogenadas de una cadena de DNA.*
La caracterización completa de un gen pasa por la determinación de su secuencia nucleotídica y el posterior análisis funcional de la misma.

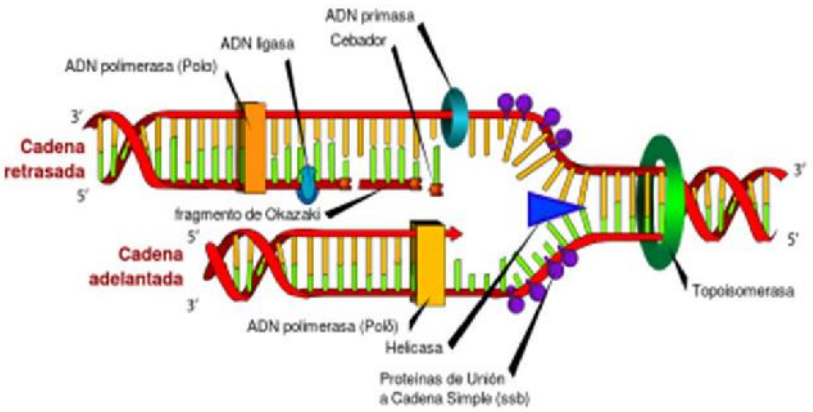


El primer ácido nucleico del que se obtuvo la secuencia completa de sus 80 nucleótidos fue el $tRNA^{Ala}$ de *S. cerevisiae*, en el año 1965.

La irrupción de la incipiente tecnología del DNA recombinante propició nuevas posibilidades para abordar el reto y fue el método desarrollado por Fred Sanger y su equipo, basado en la polimerización del DNA y conocido como

secuenciación mediante didesoxinucleótidos o método de Sanger

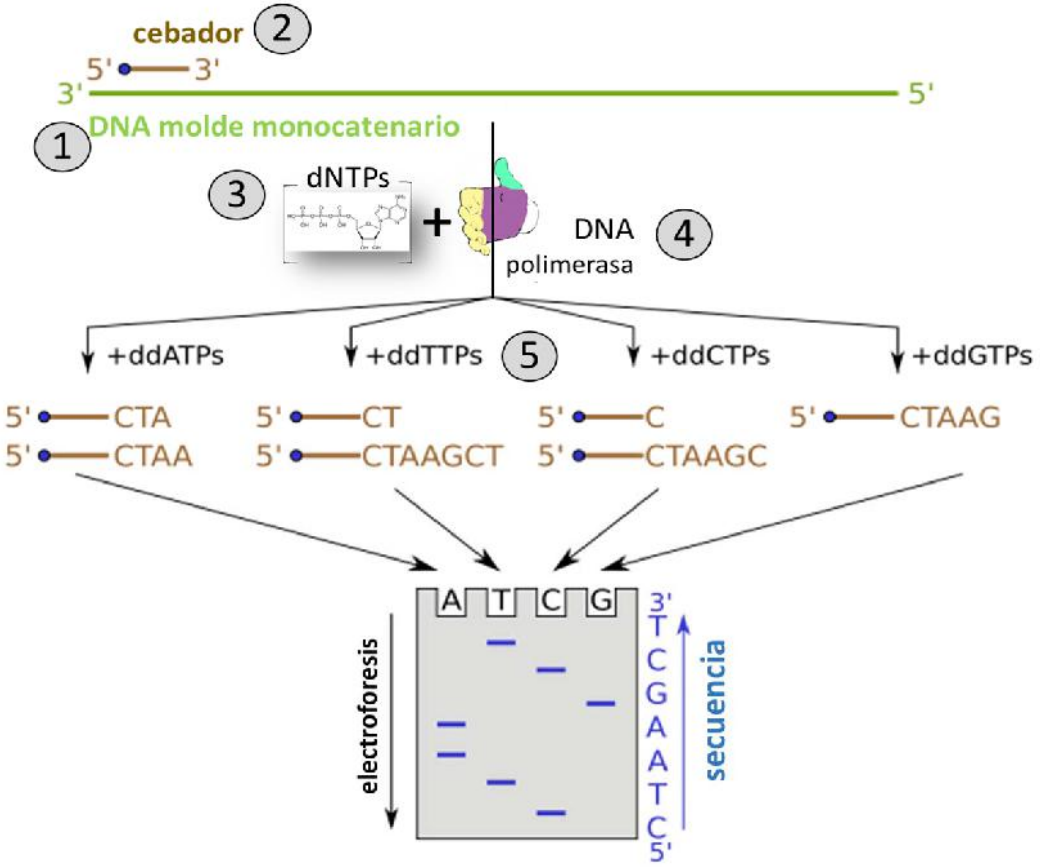
el que vino a convertirse durante muchos años en procedimiento estándar para secuenciar cualquier fragmento purificado de DNA.



El método enzimático de secuenciación de Sanger

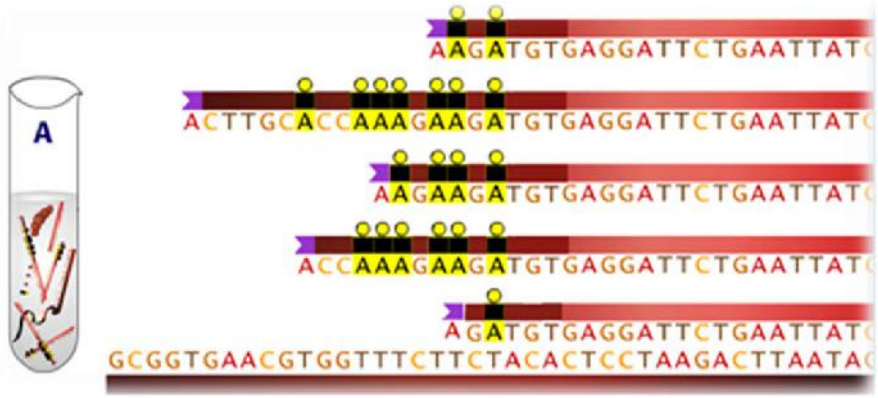
Se basa en la síntesis enzimática de la cadena complementaria a aquella que se quiere secuenciar.
Los elementos de la reacción enzimática de polimerización son:
(1) el DNA molde monocatenario a determinar clonado en un vector apropiado,
(2) un oligonucleótido que se empareje con éste y actúe de cebador,
(3) los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), uno de los cuales estará marcado y
(4) una DNA polimerasa.

Se preparan cuatro reacciones en paralelo y a cada una se le añade un 2',3'-didesoxinucleótido diferente (ddNTP) (5).

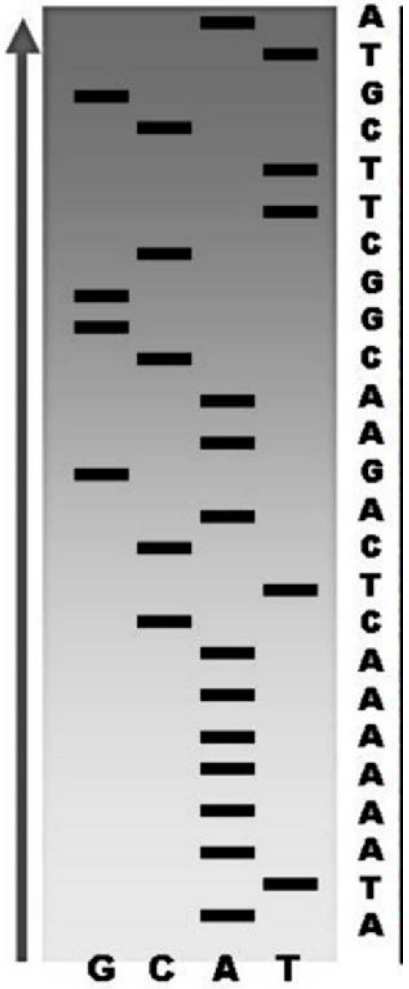


El método enzimático de secuenciación de Sanger

El resultado es la obtención, en cada reacción, de una mezcla de fragmentos de distintas longitudes, producto del bloqueo de la polimerización a nivel del último nucleótido incorporado, un ddNTP concreto que conocemos.



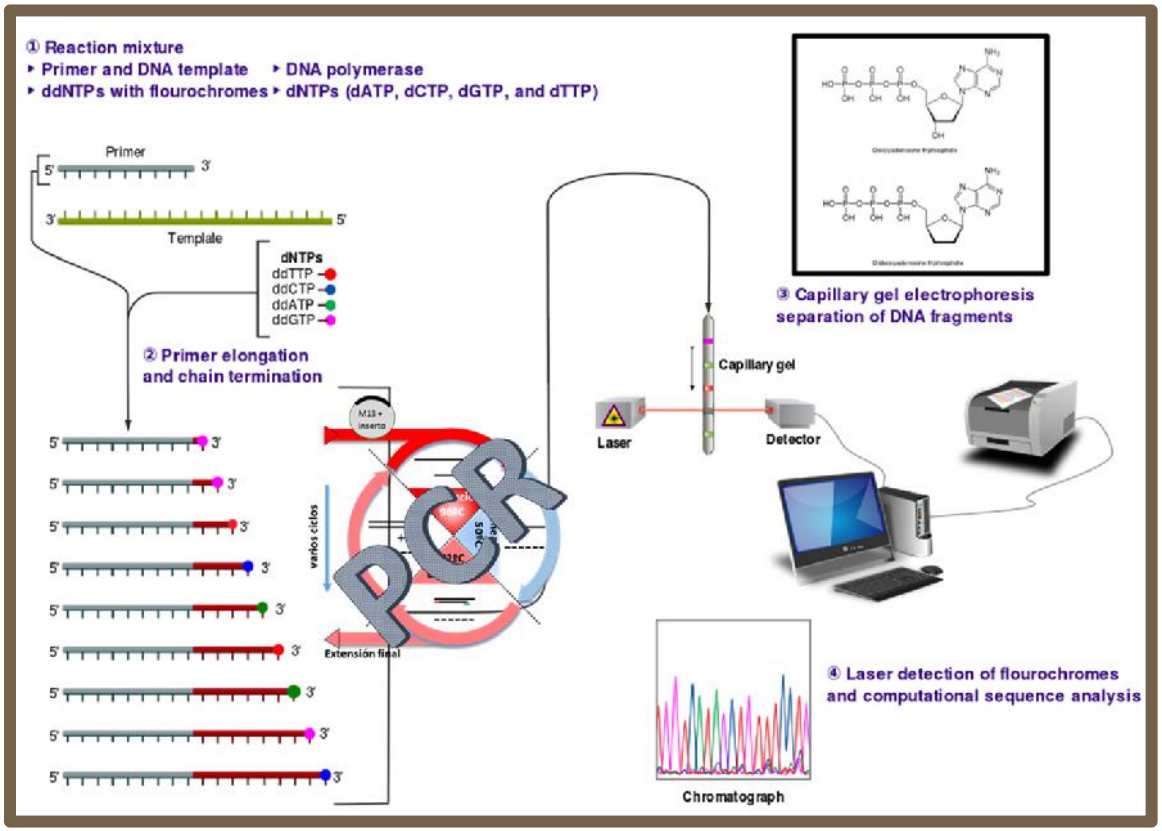
https://www.dnalc.org/resources/animations/sangerseq.html



La secuenciación automática

Mejoras del método enzimático:

1. Utilizando nuevas polimerasas, más eficientes y de mayor procesividad: **sequenasas**.
2. Combinando la reacción de secuenciación con **PCRs asimétricas.**
3. Introduciendo **fluorocromos diferenciales** acoplados a cada uno de los terminadores.
4. Diseñando **equipos que automatizan el proceso.**

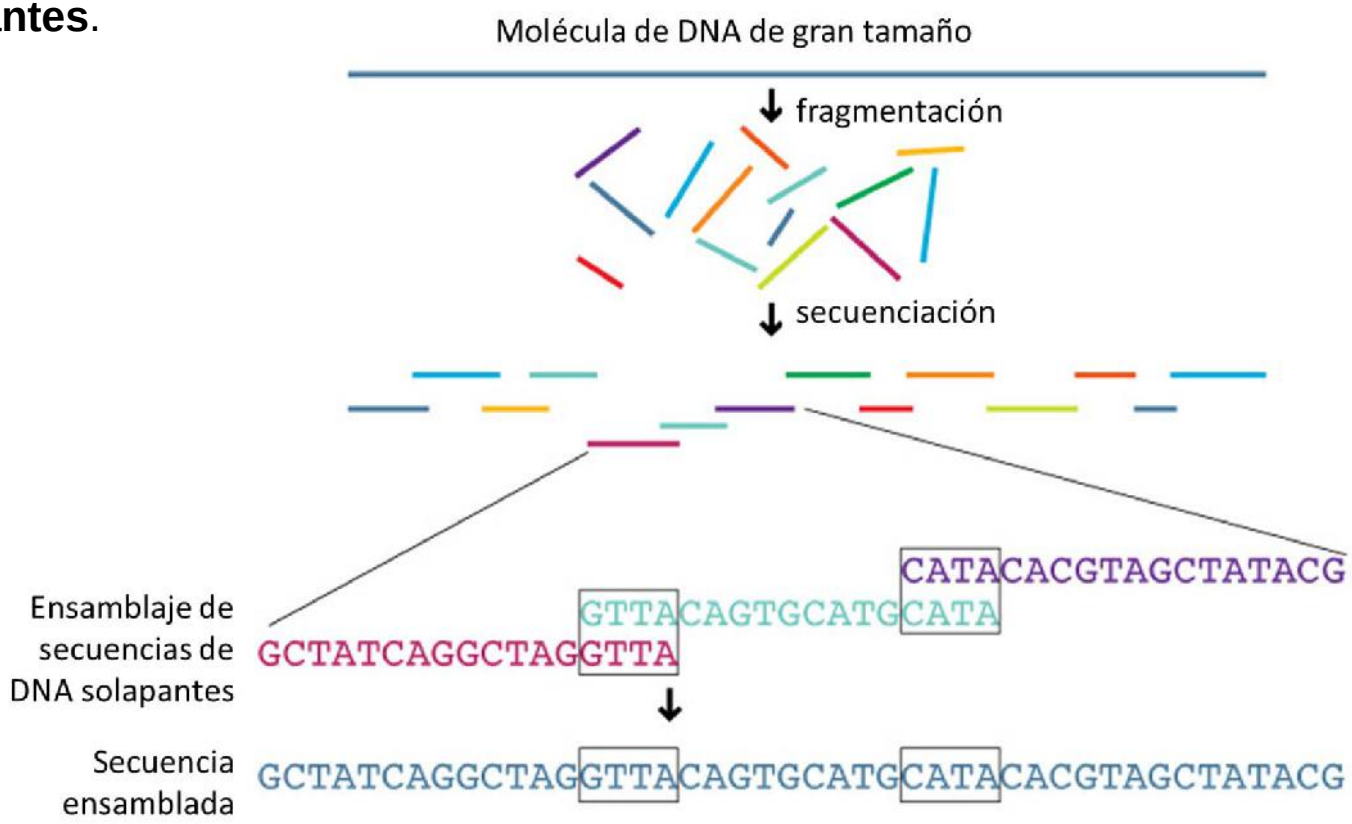


Secuenciación de fragmentos de gran tamaño o genomas

Las estrategias clásicas para el abordaje de este tipo de proyectos se basan esencialmente en dos tipos de aproximaciones o en híbridos de ambas:

1, “Shotgun clon por clon” o “Shotgun jerárquico”.

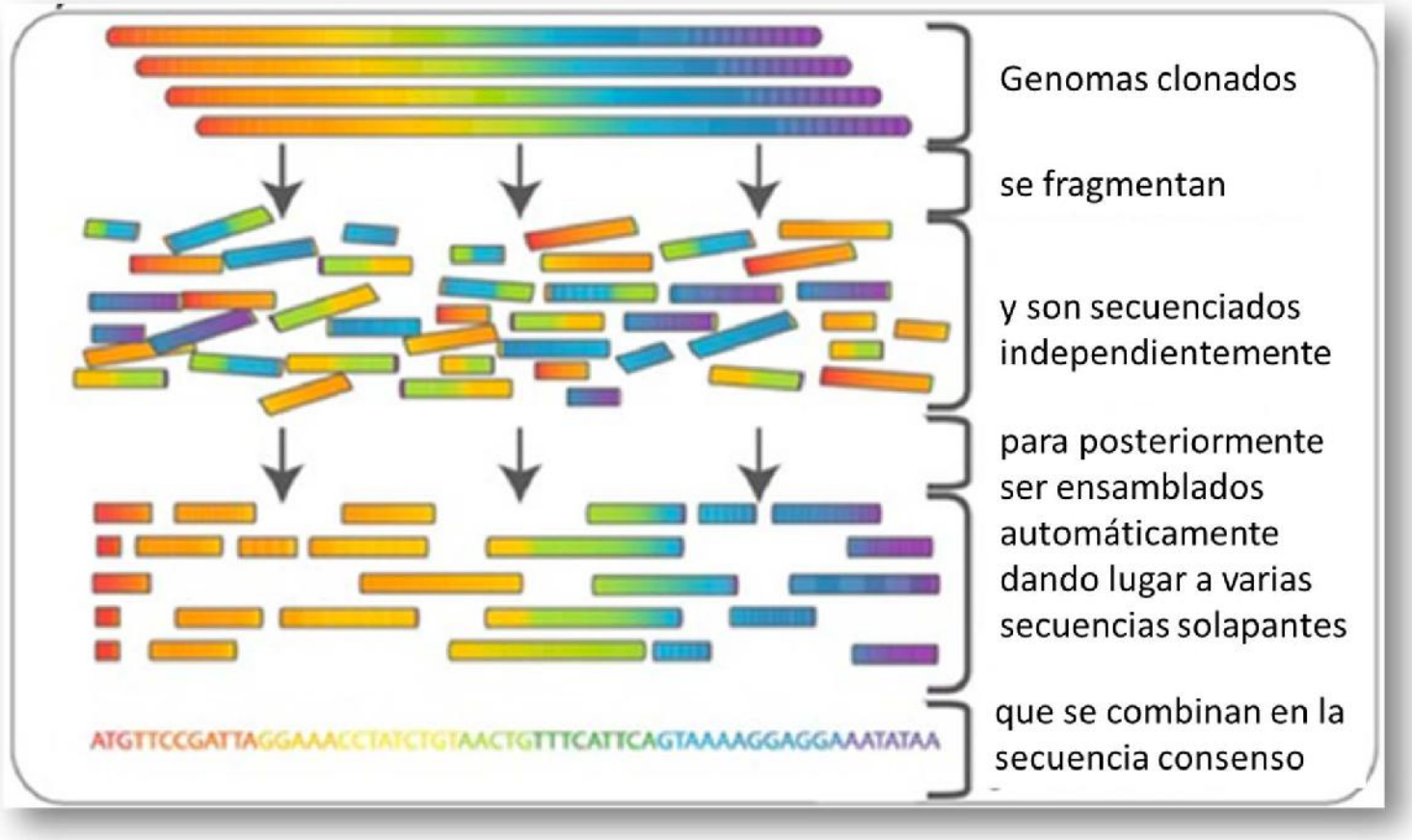
Esta estrategia, también denominada “basada en mapas”, implica una fase de pre-secuenciación en la que se identifican mediante marcadores moleculares y se ordenan un **conjunto de clones solapantes**.



Secuenciación de fragmentos de gran tamaño o genomas

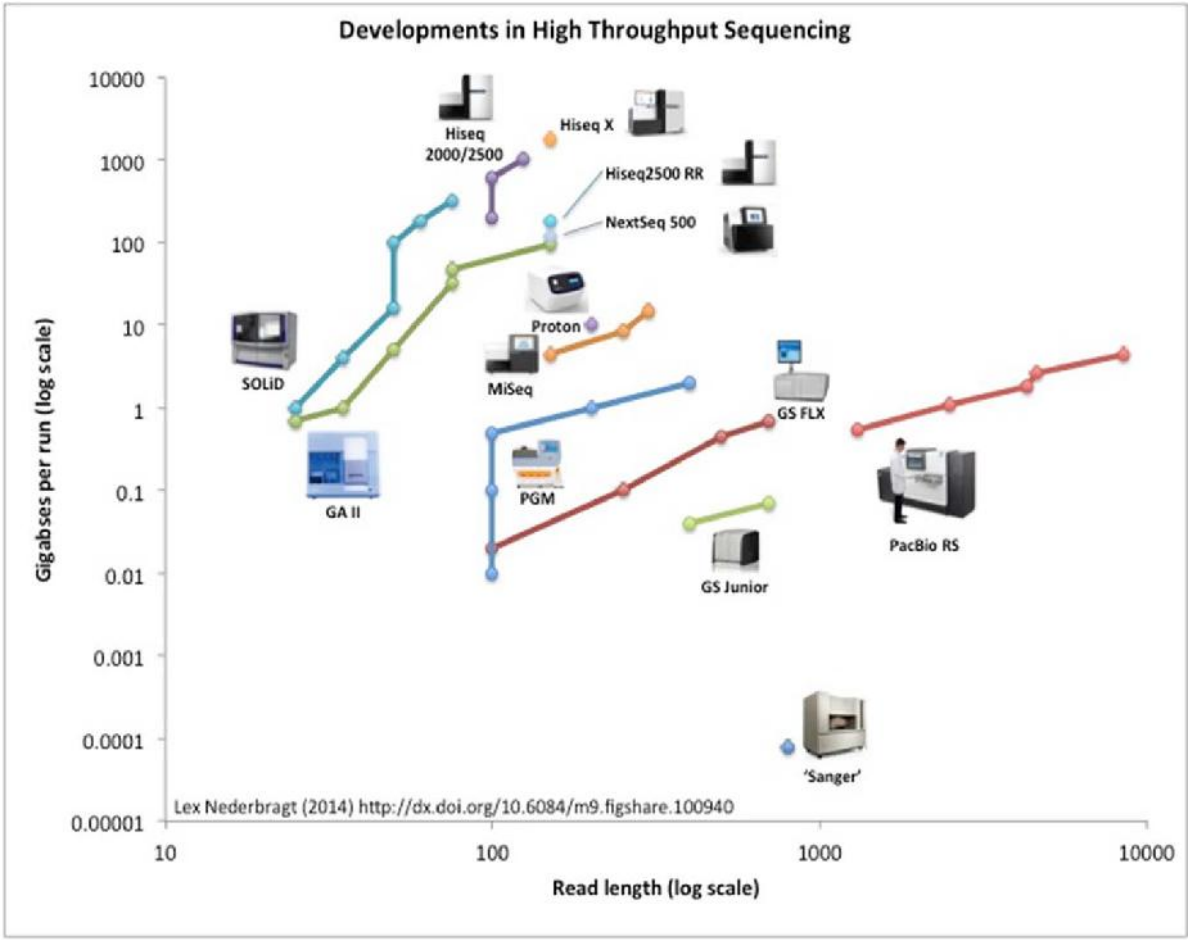
Las estrategias clásicas para el abordaje de este tipo de proyectos se basan esencialmente en dos tipos de aproximaciones o en híbridos de ambas:

2, “Shotgun aplicado al genoma completo”.
en este caso el genoma completo se fragmenta al azar, se clona y se secuencian los fragmentos.



Tecnologías de secuenciación masiva

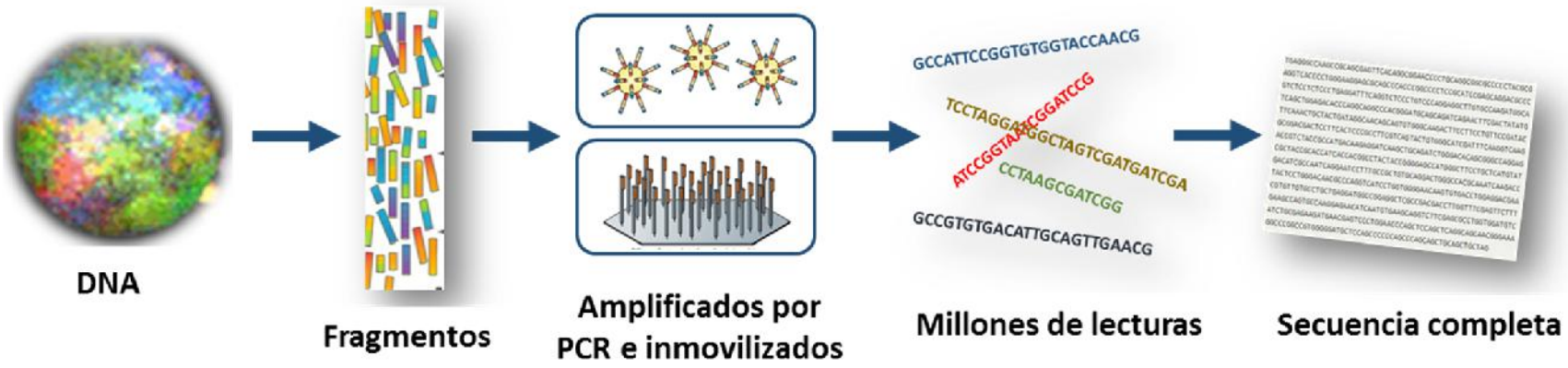
Desde 2005 se vienen desarrollando tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, conocidas como Next Generation Sequencing (NGS), o tecnologías de segunda generación, que permiten obtener millones de bases en un corto periodo de tiempo.



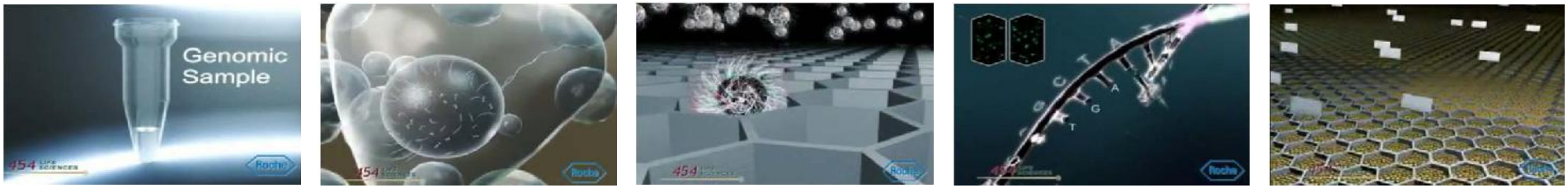
Tamaño de lectura completa, en gigabases, en función de la longitud de lecturas individuales para las diferentes plataformas de secuenciación. Escala logarítmica.

Tecnologías de secuenciación masiva: Pirosecuenciación

En todas ellas los miles de reacciones de secuenciación tienen lugar en una superficie muy reducida y los datos obtenidos a partir del análisis de imágenes requieren un tratamiento informático adecuado.



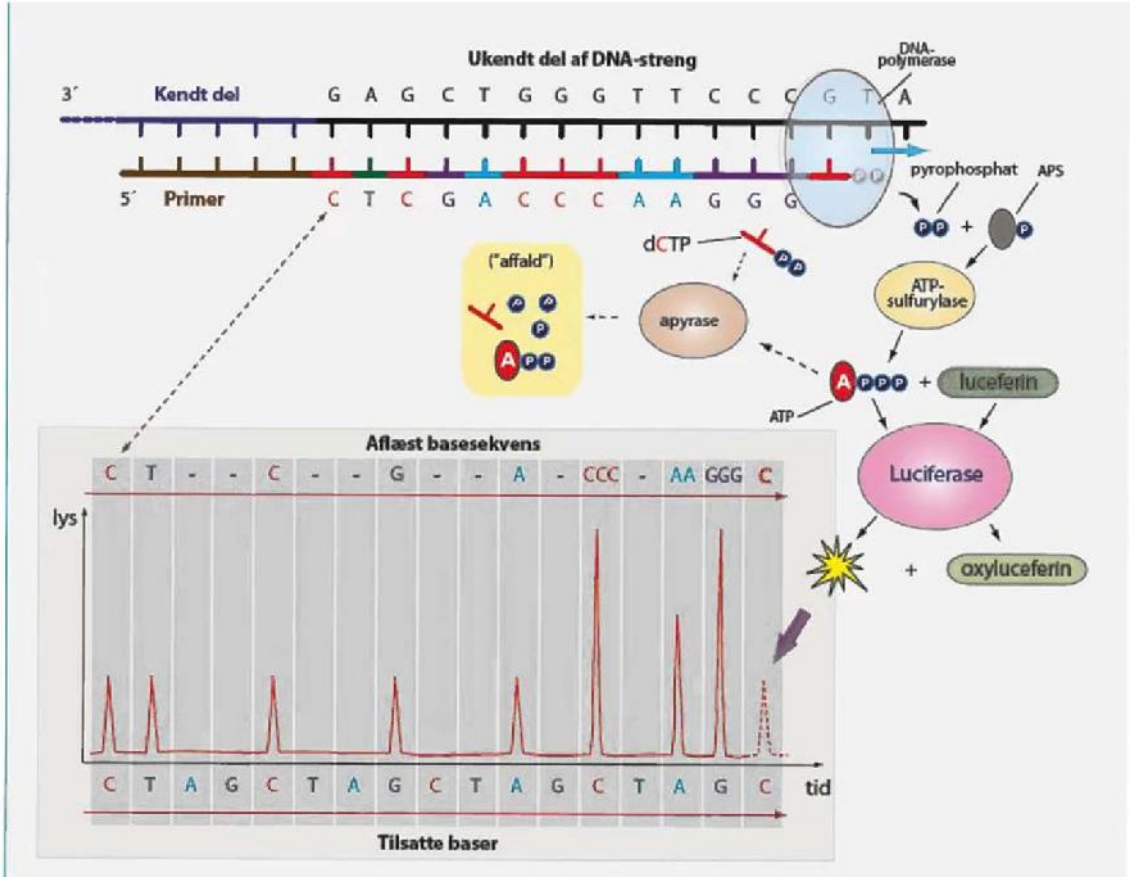
La empresa **Roche 454 Life Sciences** fue la primera en comercializar uno de estos sistemas. Su plataforma, **GS-FLX-454**, utiliza una serie de microesferas que portan distintos fragmentos del DNA a secuenciar, cada esfera un fragmento que es amplificado por PCR.



https://www.youtube.com/watch?v=bFNjxKHP8Jc&feature=fvw

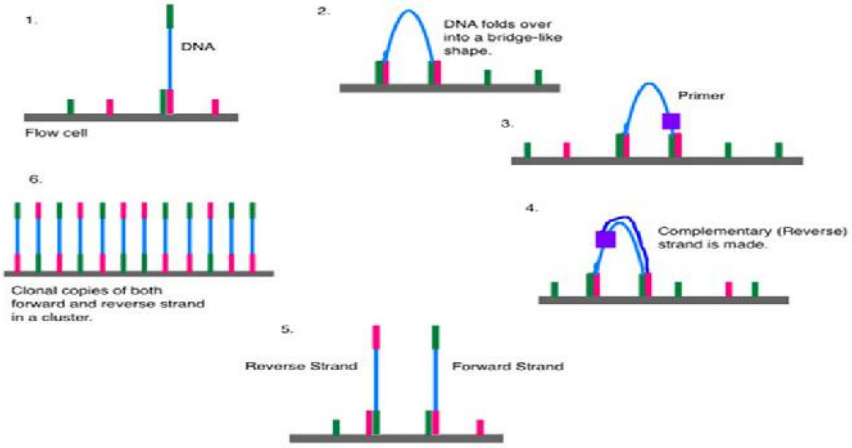
Tecnologías de secuenciación masiva: Pirosecuenciación

Esta reacción se lleva a cabo por síntesis con detección luminiscente o **pirosecuenciación**. Es una secuenciación en tiempo real, que va midiendo la liberación de pirofosfato (PPi) durante la síntesis del DNA. El orden en que cada desoxirribonucleótido se va incorporando se detecta a medida que la nueva cadena se va sintetizando, de manera que la secuencia se puede "leer" según ocurre la reacción.



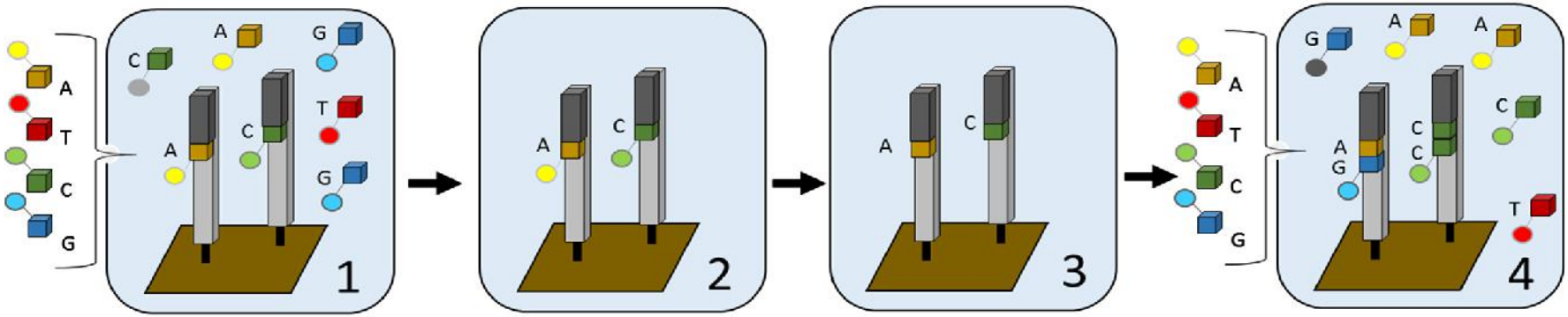
Tecnologías de secuenciación masiva: Terminadores reversibles

La empresa **Illumina**, ha desarrollado la plataforma **Solexa** que utiliza una estrategia diferente basada en el uso de **terminadores reversibles**.



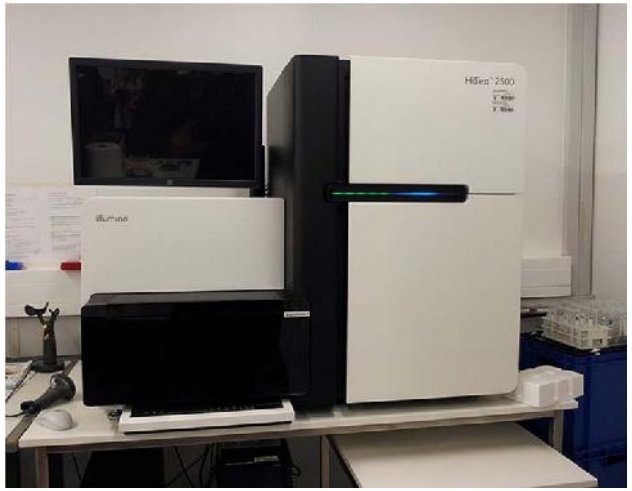
Pasos de la reacción de secuenciación:

(1) Unión de los cebadores y de los primeros nucleótidos marcados.
(2) Lavado y excitación de los marcadores fluorescentes anotando los puntos donde hay agrupaciones.
(3) Eliminación de terminadores y de marcadores fluorescentes.
(4) Nueva adición de nucleótidos.

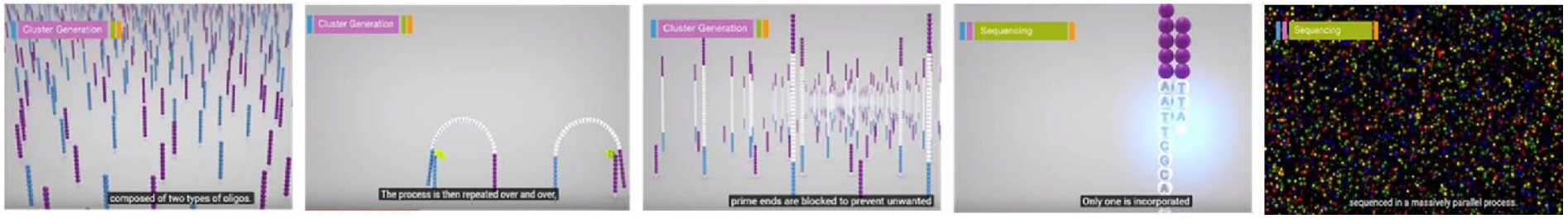


Tecnologías de secuenciación masiva: Terminadores reversibles

Así, se secuencian de manera simultánea cientos de miles de agrupamientos de secuencias de DNA cada uno de ellos correspondiente a una secuencia distinta, lo que permite obtener gran cantidad de secuencias en un corto periodo de tiempo.



Secuenciador Illumina HiSeq 2500

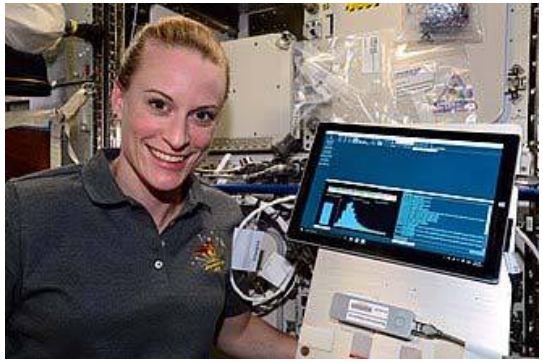


https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8

Tecnologías de secuenciación masiva: Nanoporos y detección electrónica

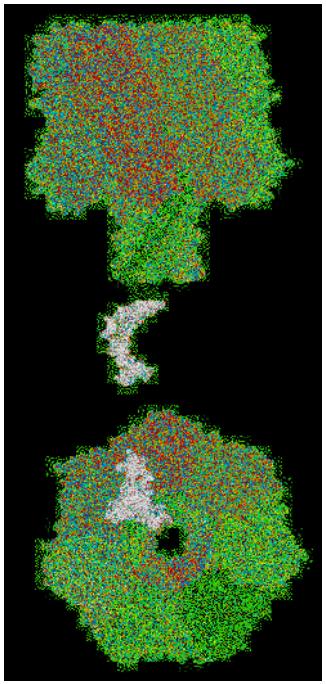
El objetivo de las metodologías de secuenciación conocidas como de **tercera generación** es la secuenciación de moléculas únicas en **tiempo real**, sin que se requiera la amplificación clonal de las moléculas individuales a secuenciar.

Oxford Nanopore Technologies ha desarrollado la plataforma **MinION** basada en la secuenciación de moléculas únicas mediante **detección electrónica a su paso por nanoporos**.



La astronauta estadounidense Kate Rubins con un secuenciador MinION en la ISS en agosto de 2016.

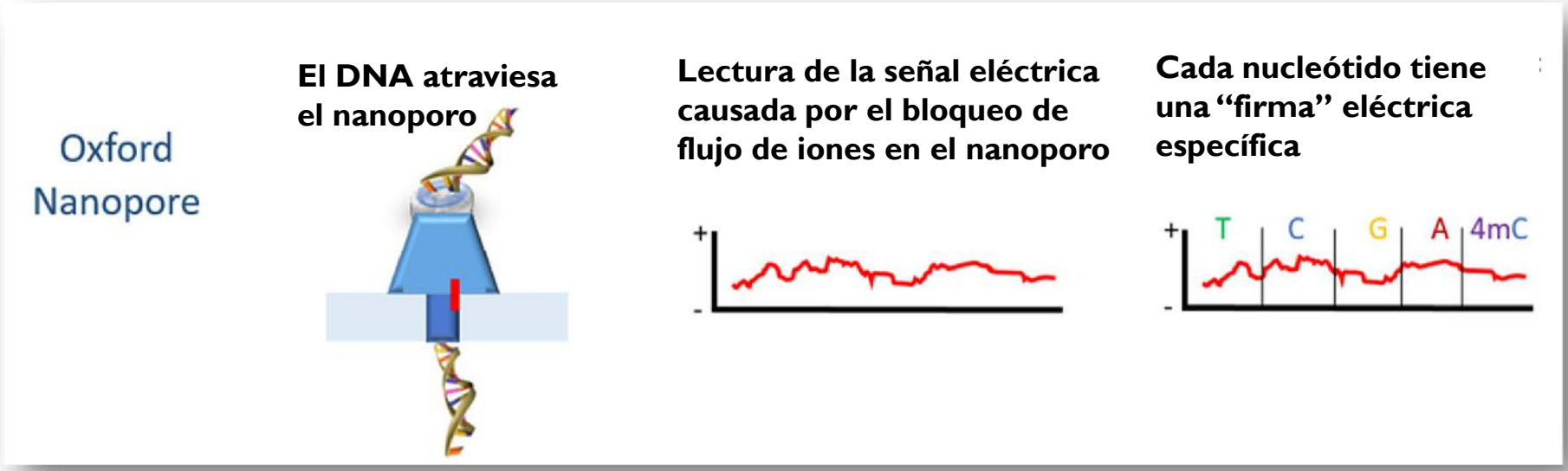
Los nanoporos son agujeros de tamaño nanométrico (entre 1 y 100 nm) que pueden ser creados de manera sintética por proteínas en forma de embudo o como huecos en materiales sintéticos.



Poro de alfa-hemolisina formado por siete subunidades (aparecen con colores distintos) junto a una pequeña molécula de ADN de 12 nucleótidos (color blanco). (Visión lateral y superior del poro).

Tecnologías de secuenciación masiva: Nanoporos y detección electrónica

Una enzima asociada a la proteína que forma el nanoporo guía al DNA hacia el mismo y el tamaño del poro le obliga a atravesarlo base a base variando la magnitud de la corriente de forma específica para cada base permitiendo así la lectura de la hebra.

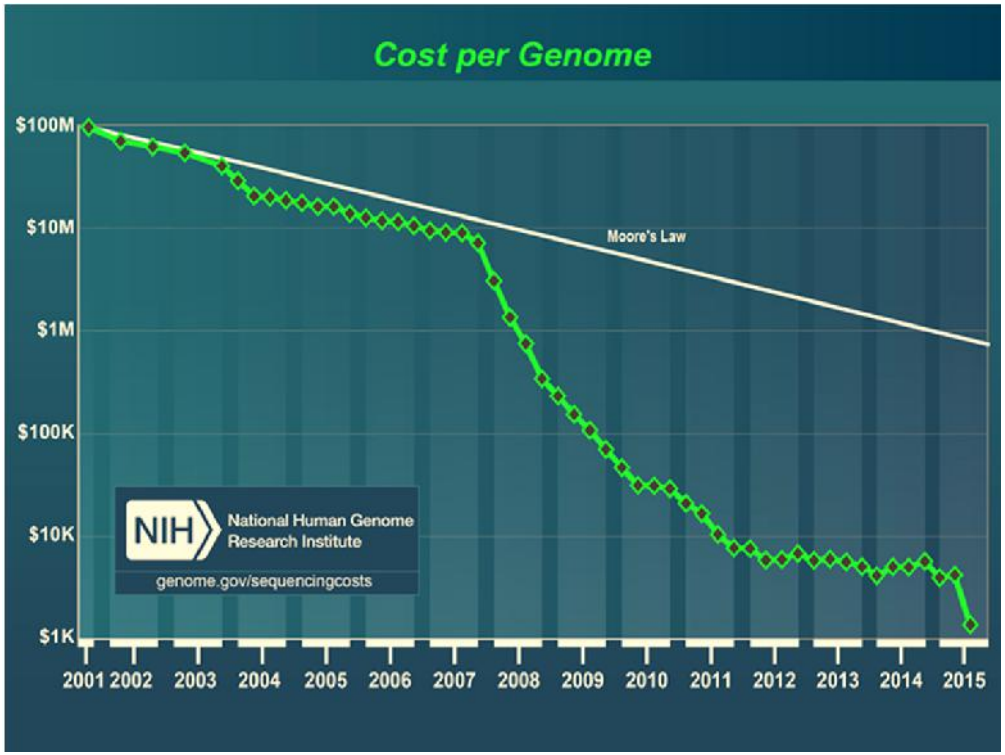


El precio de secuenciar un genoma completo

Determinar con precisión el coste de la secuenciación de un genoma dado (por ejemplo, un genoma humano) no es simple. Hay muchos parámetros a definir y matices a considerar.

El precio de generar una secuencia de genoma humano de alta calidad a mediados de 2015 era de poco más de 4,000 dólares mientras que a finales de 2015, la cifra había caído por debajo de los 1,500.

En paralelo, el precio para generar una secuencia de todo el exoma (conjunto de exones del genoma) se estimó algo inferior a 1,000 dólares.



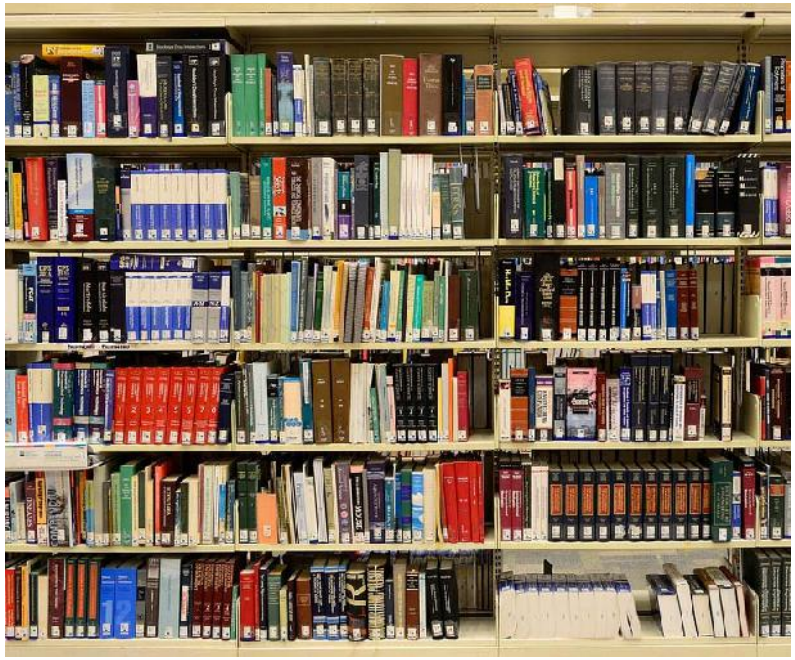
Genómica estructural

Conocer el genoma

GENOMA: Dotación completa de material genético de un organismo.

El genoma almacena toda la información biológica de un organismo.

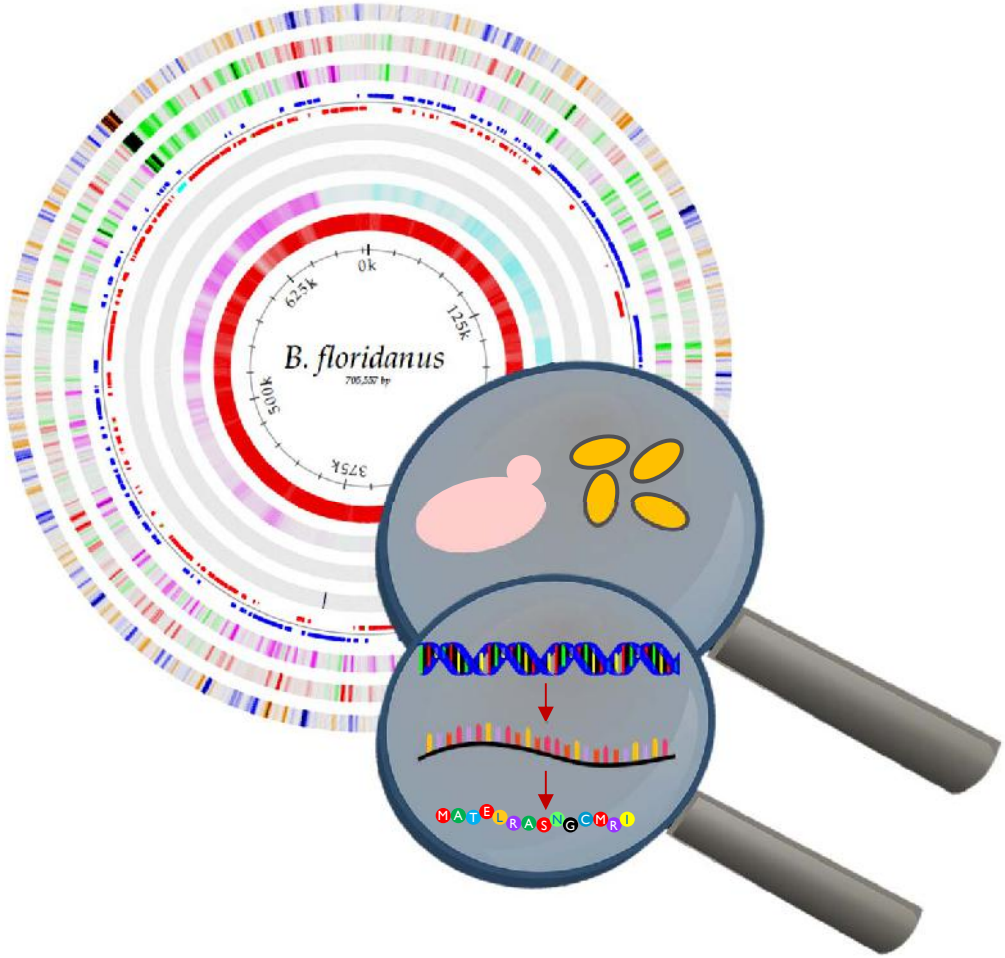
La utilización de esa información depende una compleja maquinaria bioquímica de expresión genómica.



Un genoma es mucho más que un conjunto de genes

Conocer el genoma

En cuanto conocemos la secuencia de un genoma, los genes que contiene pueden ser identificados y sus funciones pueden ser estudiadas con detalle



De la genética a la genómica

Durante el siglo XX se avanzó en el conocimiento de la naturaleza y contenido del material genético en cuatro fases:

1. **Bases celulares de la herencia:** los **cromosomas**
2. **Bases moleculares de la herencia:** la **doble hélice**
3. **Mecanismos biológicos que permiten la transcripción y traducción, y desarrollo de la Ingeniería Genética**
4. **Expansión de la Genómica:** análisis de la información contenida en **genomas completos**

15 de febrero de 2001: Genoma humano

3.000 millones de nucleótidos

De la genética a la genómica

GENÓMICA: Estudio molecular del **contenido**, **organización**, **función** y **evolución** de la información genética contenida en un genoma completo.

GENÓMICA ESTRUCTURAL: Secuenciación y análisis de la información contenida en el genoma.

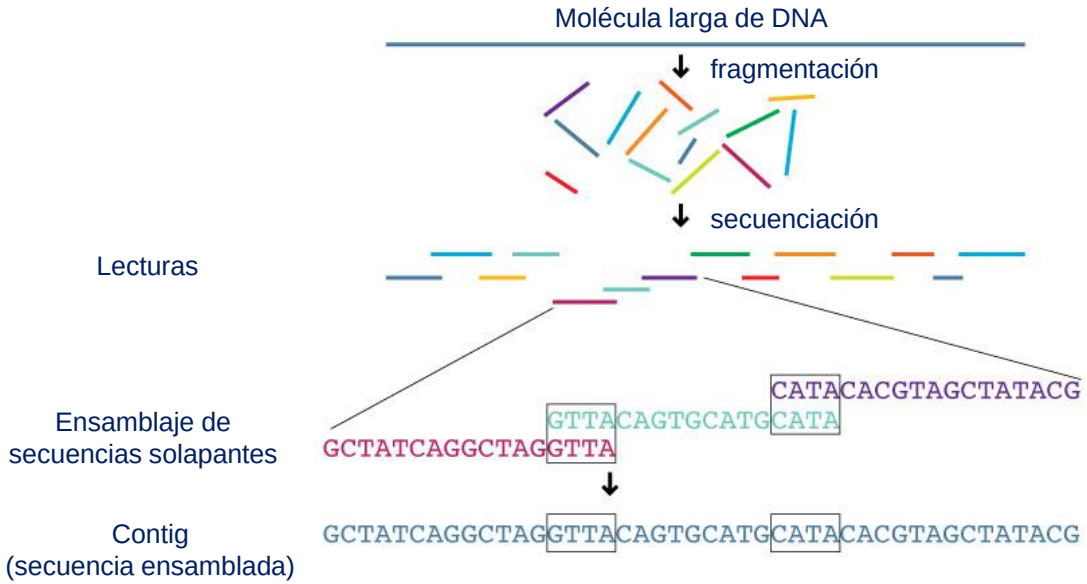
OBJETIVO: Cartografiar y determinar de forma completa y precisa la secuencia de DNA del genoma haploide representativo de una determinada especie, indicando la información que contiene.

Los estudios genómicos se caracterizan por ser **interdisciplinares**:

La enorme cantidad de datos generados requiere combinar tanto conocimientos relativos a diversas disciplinas biológicas (genética, bioquímica, biología celular, biología evolutiva…), como conocimientos estadísticos e informáticos.

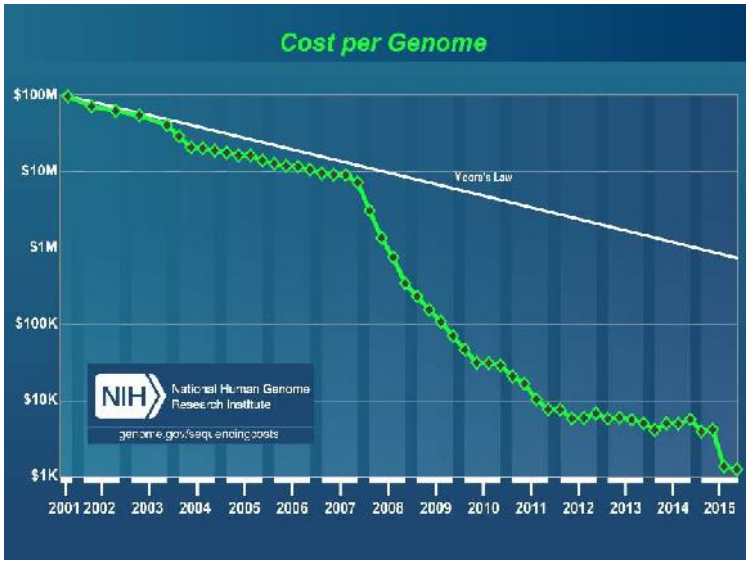
La lógica de la secuenciación genómica

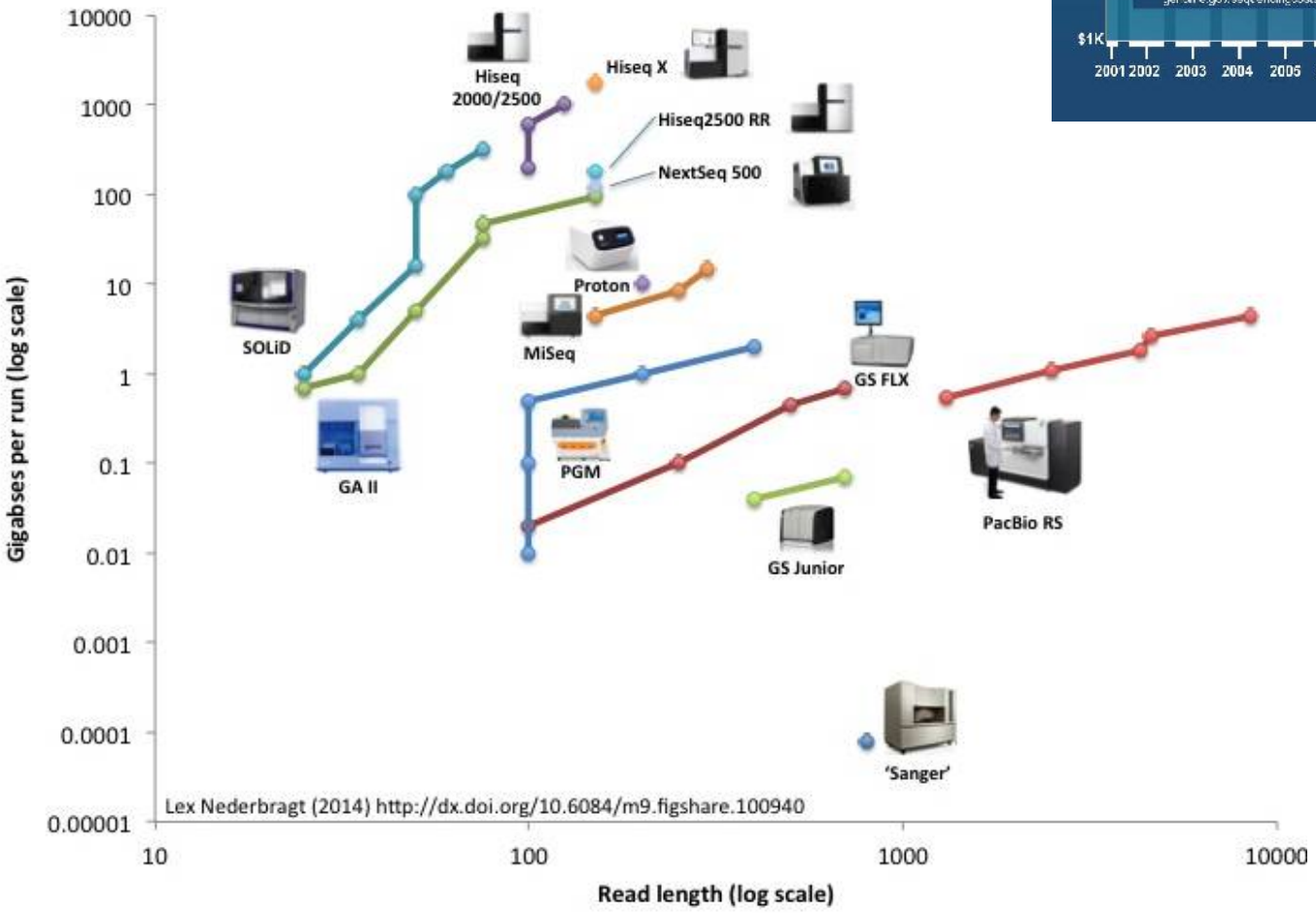
- El genoma se rompe en fragmentos pequeños cuya secuencia es determinada individualmente (**lecturas**). Es la fase de **secuenciación**.
- Las lecturas se analizan con programas informáticos que encuentran secuencias idénticas y permiten conectarlas en secuencias más largas o **contigs**. A este proceso se le denomina **ensamblaje**.
- El objetivo final es conseguir que cada cromosoma se encuentre unido en un solo contig.



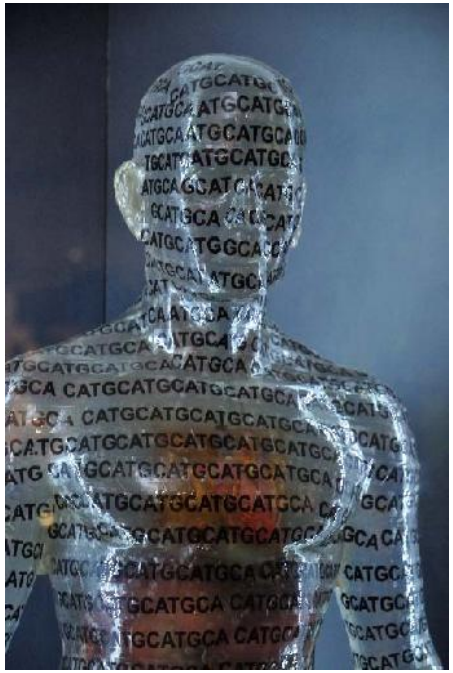
Secuenciación masiva

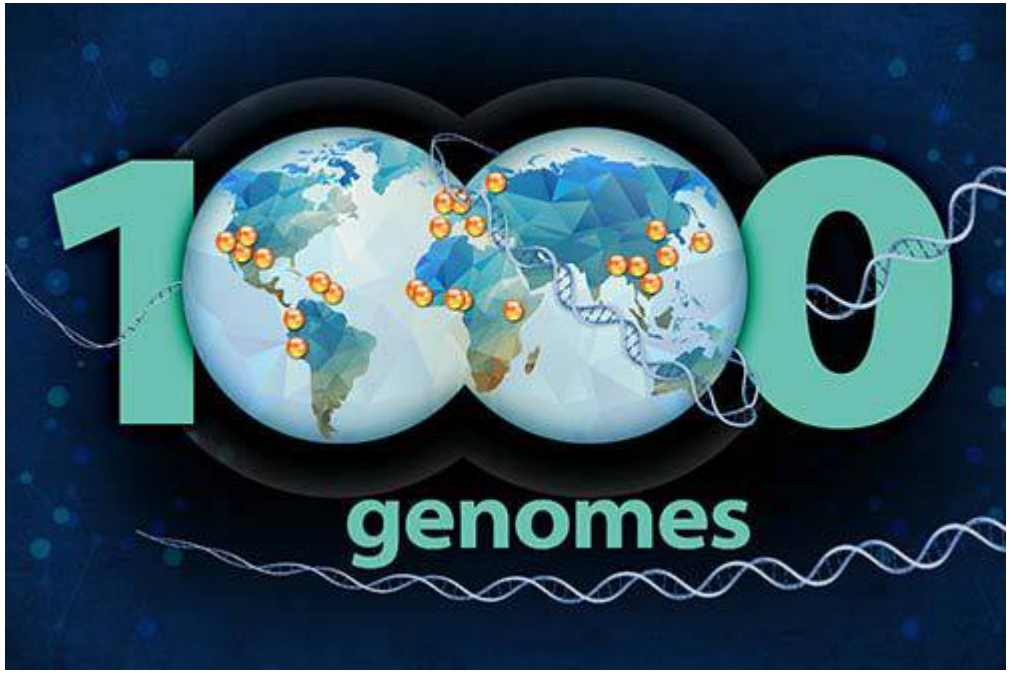
Las tecnologías de secuenciación masiva han abaratado enormemente el coste de secuenciar un genoma





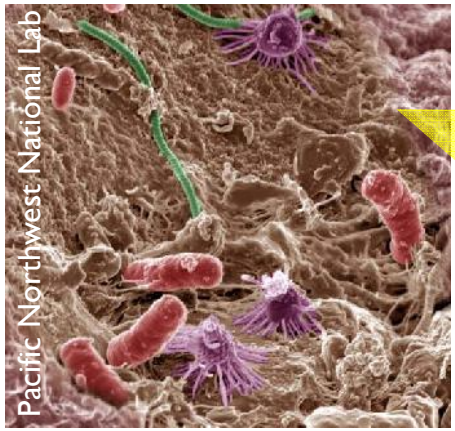
Los proyectos genoma

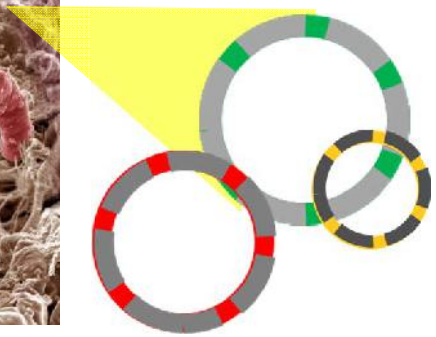


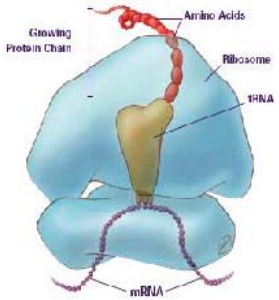


- Hemos pasado de secuenciar genomas modelo para una especie a secuenciar decenas o cientos de cepas de una determinada especie.
- Disponemos de miles de genomas de nuestra especie que permiten conocer la variabilidad existente en las distintas poblaciones humanas.

Análisis de microbiomas: estudio de la biodiversidad







- La gran mayoría de las especies microbianas que viven en el planeta no han podido ser cultivadas, lo que dificulta su estudio.
- Todos los seres vivos necesitan ribosomas para fabricar sus proteínas.
- Estudiando el rRNA 16S podemos conocer las bacterias presentes en comunidades complejas sin necesidad de aislarlas previamente.

Muestra ambiental

↓

Extracción DNA

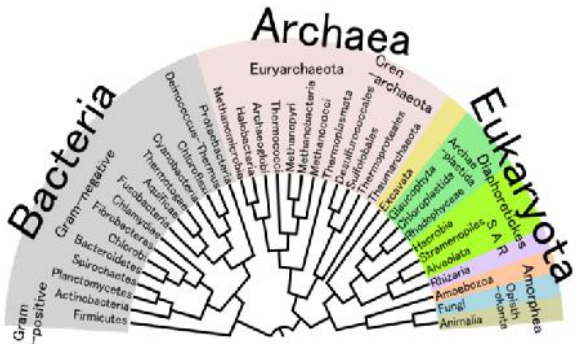
↓

Amplificación rRNA 16S

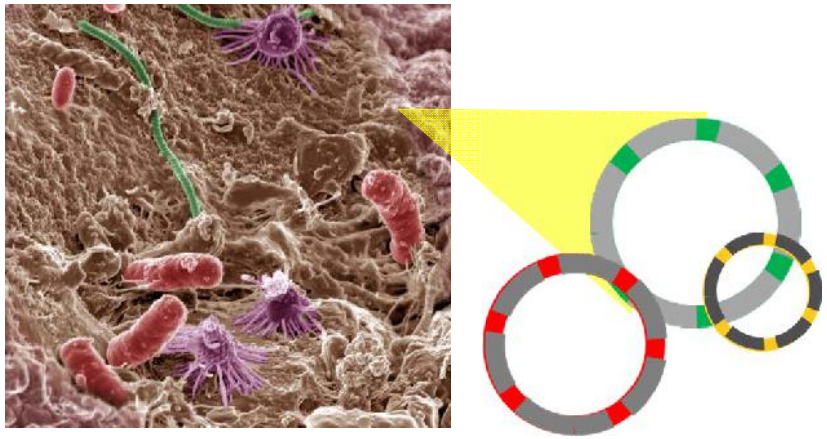
↓

Secuenciación

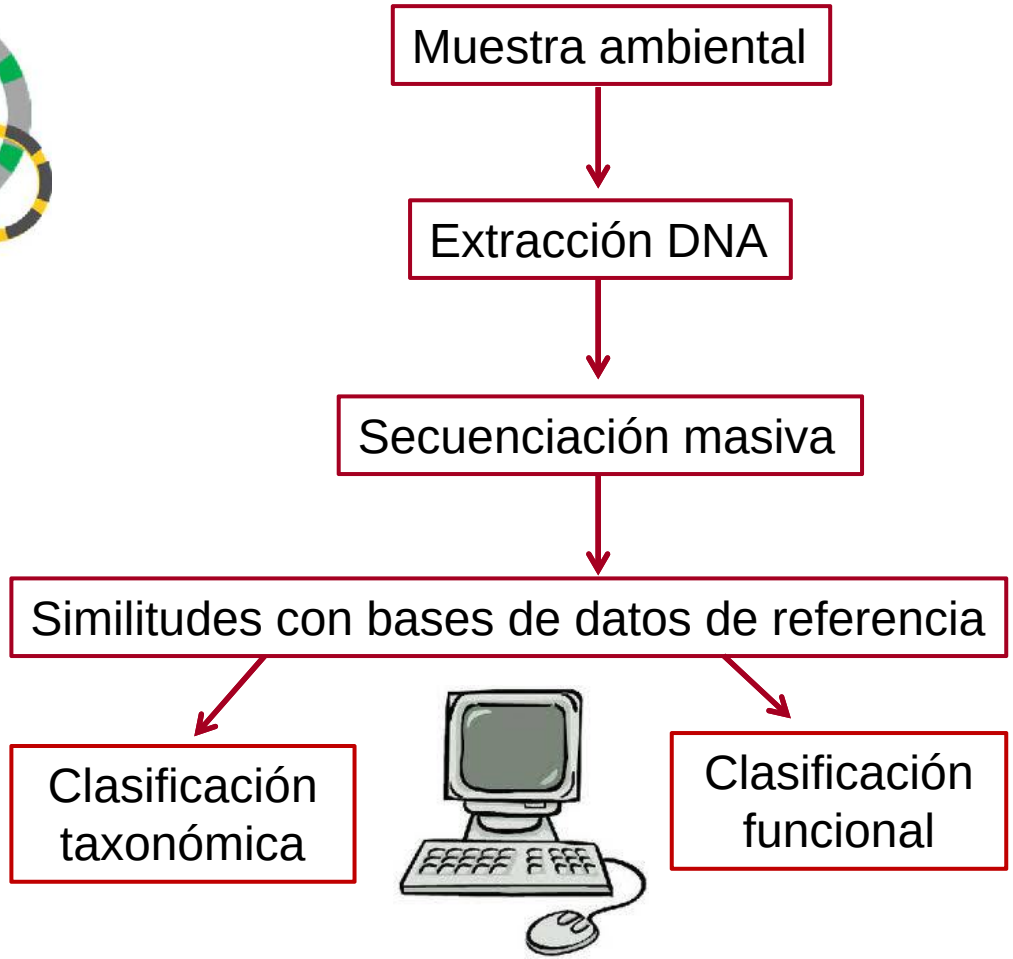
↓



Análisis de microbiomas: metagenómica



- La secuenciación masiva de todo el material genético de la muestra nos informa sobre las funciones que cada microorganismo realiza y las interacciones entre los miembros de la microbiota



Referencias bibliográficas y enlaces

- Videos Youtube:

  Whole Genome Sequencing and You
  https://www.youtube.com/watch?v=IXamRS85hXU

- Páginas web:

  Divulgación de las Ciencias Genómicas. UNAM.
  www.divulgacion.ccg.unam.mx

  1000 Genomes: A Deep Catalog of Human Genetic Variation.
  http://www.1000genomes.org/

- Otros enlaces:

  Understanding our microbial planet: the new science of metagenomics
  http://dels.nas.edu/Materials/Booklets/Metagenomics-Booklet

GENOMICA FUNCIONAL

¿Qué es la Genómica Funcional?

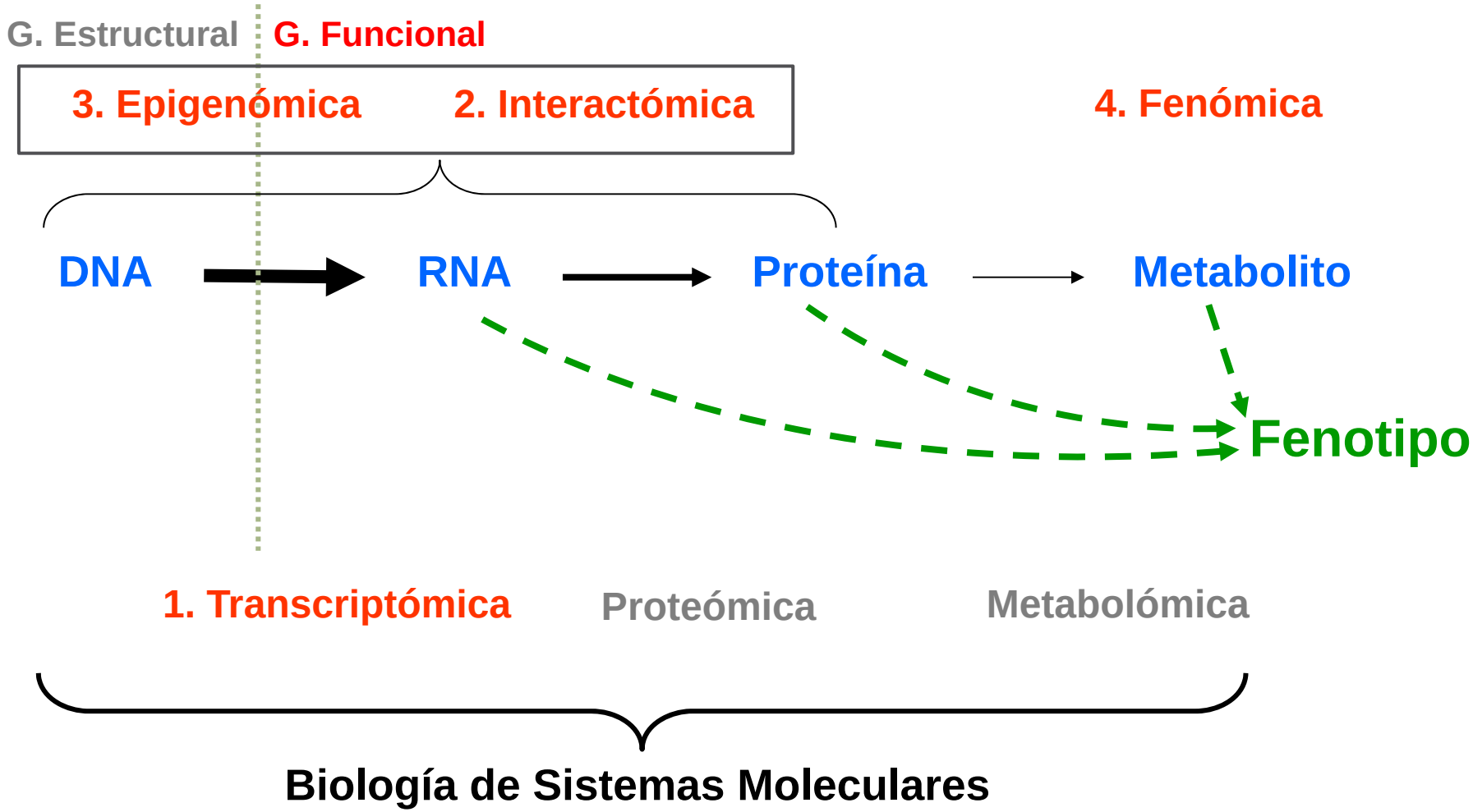
La GENÓMICA es la rama de la genética que comprende el estudio del contenido, organización, función y evolución de la información genética contenida en un genoma completo

La **GENÓMICA FUNCIONAL** analiza la función de las secuencias determinadas por la genómica estructural. Incluye el análisis del **transcriptoma** (conjunto completo de RNAs transcritos a partir de un genoma) y del **proteoma** (conjunto completo de proteínas codificadas por el genoma).

A diferencia de la genómica estructural (lección 2.3) y la proteómica, la genómica funcional se centra en los aspectos dinámicos de los genes, como su transcripción, la traducción, las interacciones DNA-proteína, RNA-proteína, proteína-proteína…

La **Proteómica** ha adquirido tanto relieve que se ha erigido en una disciplina independiente con un cuerpo de estudio muy voluminoso

Flujo de información genética



Estrategias *ómicas*

Se dice de ellas que son meras "***excursiones de pesca***" y que no tienen una hipótesis previa...("***guiadas por el experimento***")

- **Sin embargo están produciendo una enorme cantidad de datos, sobre los cuales se sustentan nuevas hipótesis y nuevos experimentos, tanto convencionales como *ómicos*.**
- **Además no sesgan los resultados hacia nuestros deseos ("*estrategias guiadas por la hipótesis*")**

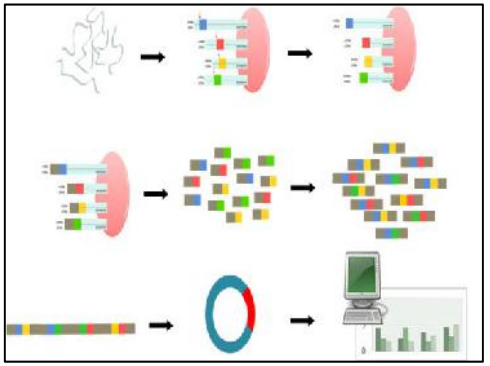
Deben diseñarse correctamente para que produzcan resultados útiles y estadísticamente contrastables. La interpretación de los resultados puede ser más difícil que en los experimentos convencionales

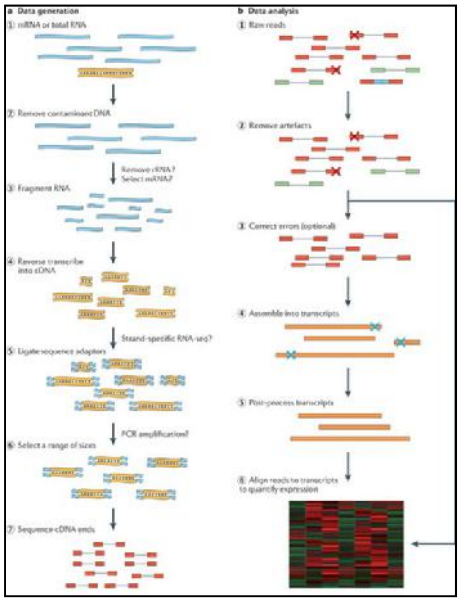
1. Transcriptómica. Métodos de análisis de las expresión génica global

La **transcriptómica** estudia y compara transcriptomas, es decir, los conjuntos de RNA mensajeros o transcriptos presentes en una célula, tejido u organismo

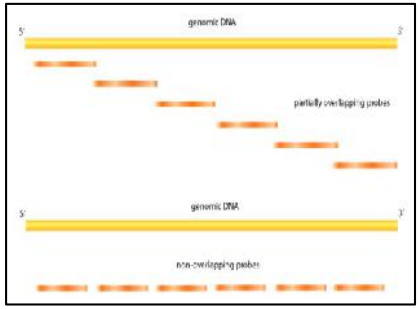
Métodos de análisis de la expresión génica múltiple (transcriptoma)

- Cuantificación:
  - SAGE
  - Chips de DNA (‘microarrays’)
  - RNAseq





- Mapeo:
  - Etiquetas 5’ CAGE y similares
  - Etiquetas 5’ y 3’ PET
  - Chips de embaldosado (‘*tiling arrays*’)



Aplicaciones de los estudios transcriptómicos

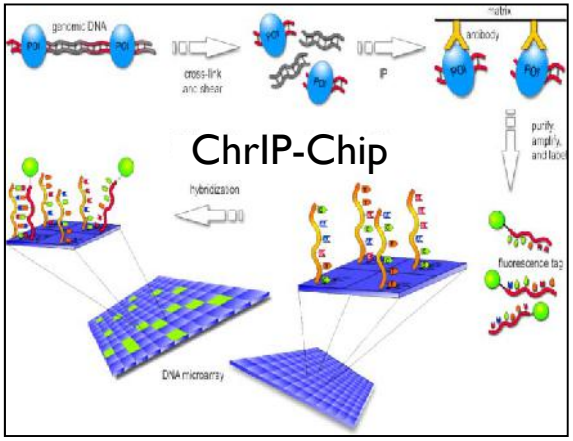
- Estudios de sensibilidad a drogas
- Comparación de fenotipos en función del patrón de expresión génica
- Establecer la estabilidad del mRNA a partir de datos de tasa de transcripción y cantidad de mensajero, mediante la técnica de **Genomic Run-On (GRO)**
- Medidas directas de la estabilidad del mRNA mediante el método de la **Parada Transcripcional**
- A partir del **Análisis de Polisomas** , podemos identificar el estado traduccional de todos los mRNAs de la célula y podemos estimar la Tasa de Traducción. La técnica del ***Ribosome Profiling*** nos permite además, establecer los sitios de unión de los ribosomas en un momento dado
- Mediante el uso de arrays diseñados específicamente, también podemos analizar simultáneamente el **Splicing alternativo** de cualquier organismo, o también la existencia de transcritos antisentido.

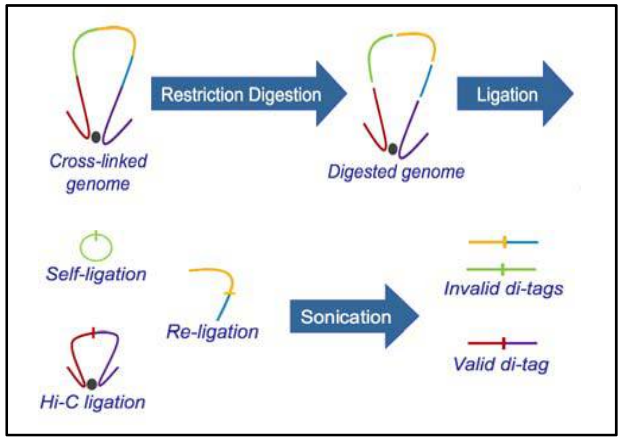
2. Interactómica. Métodos de análisis de las interacciones a nivel genómico

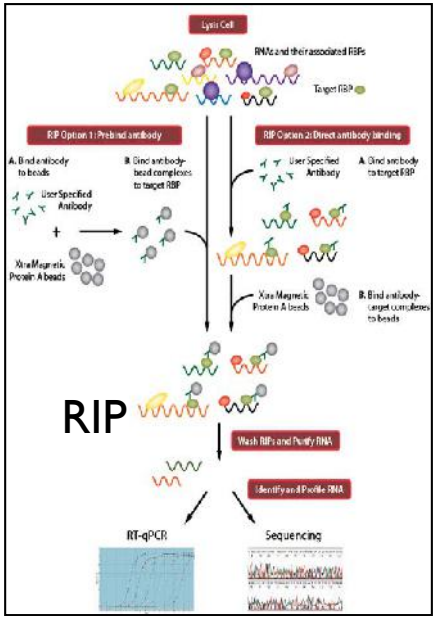
La **INTERACTÓMICA** estudia el conjunto de interacciones entre distintas biomoléculas en un entorno determinado. Estas interacciones tendrán en la mayoría de los casos, funciones reguladoras. Con las técnicas a nivel *ómico*, podemos analizar simultáneamente dichas interacciones a nivel de todo el genoma

Interacciones:

- Proteínas-DNA (e.g. Factores de transcripción): **ChrIP-Chip**, ChrIP-seq, ChrIP-exo, ChiA-PET, **Hi-C**
- Proteínas-RNA (e.g. Regulones de estabilidad): **RIP**, CLIP
- RNA-RNA (e.g. iRNAs): CLASH
- Proteína-Proteína (e.g. proteínas diméricas)







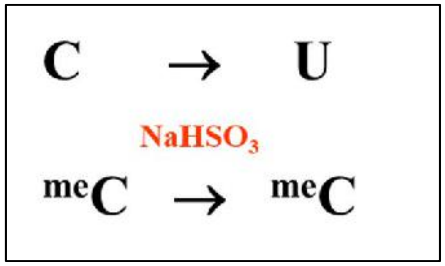
3. Epigenómica. Métodos de análisis del fenotipo global

Aunque la posición de los nucleosomas, de factores de transcripción (TF), la localización genómica de las modificaciones post-traduccionales y de las variantes de las histonas, constituyen una parte de la interactómica, también forman parte de la información genética transmisible que no es secuencia de DNA, es decir, epigenética a escala *ómica.*

La otra información epigenética principal es la modificación química tanto del DNA (metilación de citosinas, en las llamadas islas *CpG*) como de las histonas (acetilación, metilación, fosforilación,…), que sabemos interviene en la regulación de la expresión génica, activando o silenciando genes.

Detección de metilación de Citosinas en DNA genómico: **Epigenoma**

El método del tratamiento con bisulfito seguido de una ultrasecuenciación permite localizar las citosinas que estaban metiladas ya que después de la desaminación de las C con bisulfite, la secuenciación permite distinguir las que estaban metiladas que son leídas como C, de las que no lo estaban, que ahora son leídas como U

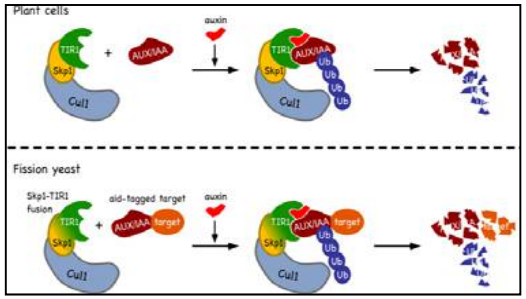


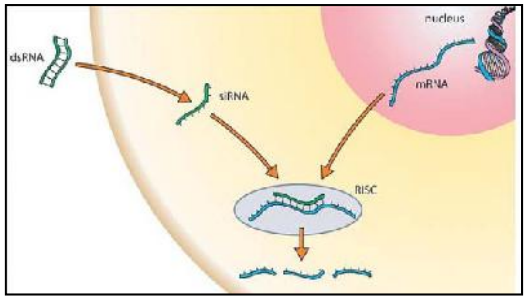
4. Fenómica. Métodos de análisis del fenotipo global

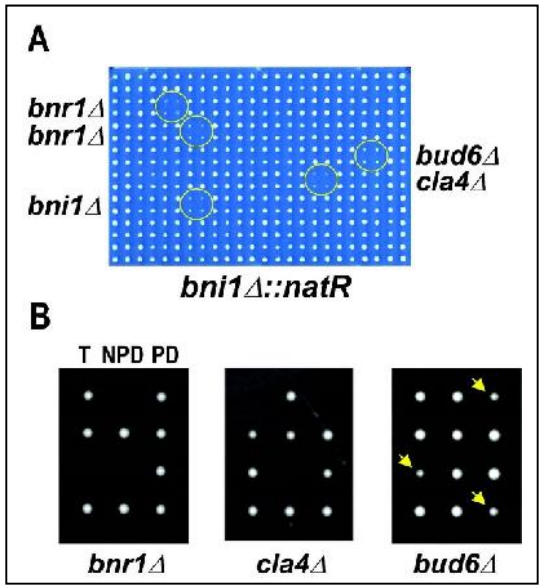
Un **fenoma** es el conjunto de todos los fenotipos expresados por una célula, tejido, órgano, organismo, o especie. La **FENÓMICA** sería el estudio de los fenomas, es decir, el estudio de la naturaleza de los fenotipos y la forma en que se determinan, en particular cuando se estudia en relación con el conjunto de todos los genes (genómica) o todas las proteínas (proteómica).

Para ver el fenotipo que causa un gen, según el abordaje que hace por ejemplo el análisis genético reverso, podemos provocar su mutación, eliminación o su inactivación y ver el fenotipo que origina. Lo podemos hacer:

- **Analizando una colección de mutantes de deleción**
- **Uso de promotores apagables**
- **Sistemas degrón**
- **iRNA**
- **Análisis sistemático de fenotipos sintéticos (SGA)**





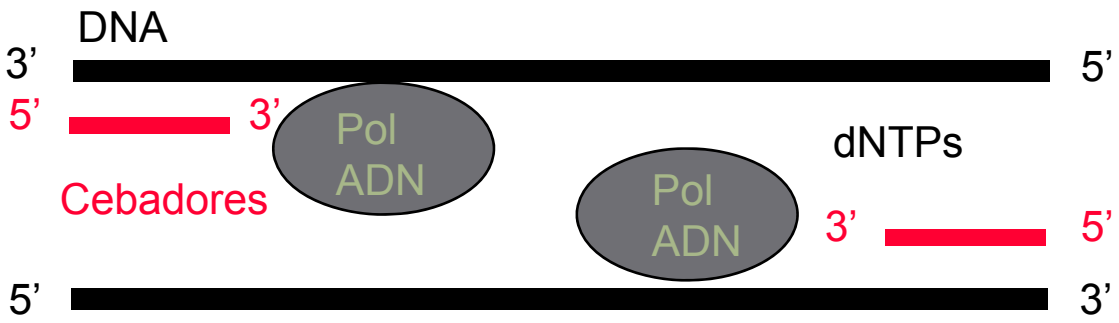


GENOMICA FUNCIONAL. Técnicas

- http://genome.cshlp.org/content/25/10/1427.full
- https://www.youtube.com/watch?v=uzINKcj-p78
- https://www.youtube.com/watch?v=4oFdS9EN9Pk
- https://www.youtube.com/watch?v=zwuUveGgmS0
- https://www.jove.com/video/3770/chromatin-interaction-analysis-with-paired-end-tag-sequencing-chia
- https://www.youtube.com/watch?v=Gn20IFt5XWQ
- https://www.youtube.com/watch?v=cK-OGB1_ELE
- https://www.youtube.com/watch?v=wQoTxveTavw

Fundamento de la PCR

Reacción enzimática de amplificación de ADN en la que interviene una polimerasa de ADN termoestable, dos cebadores de secuencia complementaria al ADN diana, que delimitan el tamaño del fragmento a copiar (amplicón), y desoxinucleótidos (dNTPs) como sustrato.

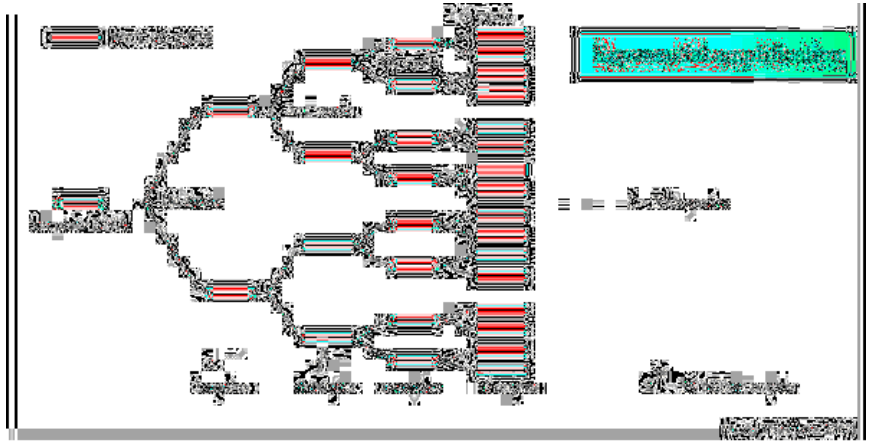


Pasos del proceso:

1.- Desnaturalización 95 ºC

2.- Hibridación 50-60 ºC

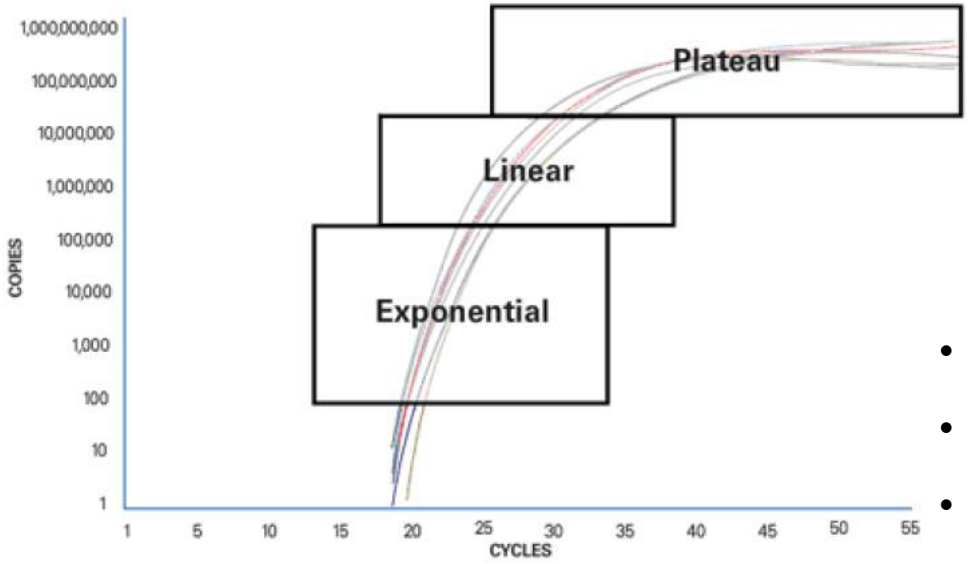
3.- Extensión 72 ºC



Fases de la reacción y detección del amplicón

Al inicio de la reacción el amplicón aumenta de modo exponencial, pasando por una fase lineal y finalmente alcanza la fase estacionaria o “plateau”.

En PCR convencional, la detección del producto de amplificación se realiza en la fase final, por electroforesis en gel de agarosa, mediante tinción del ADN.

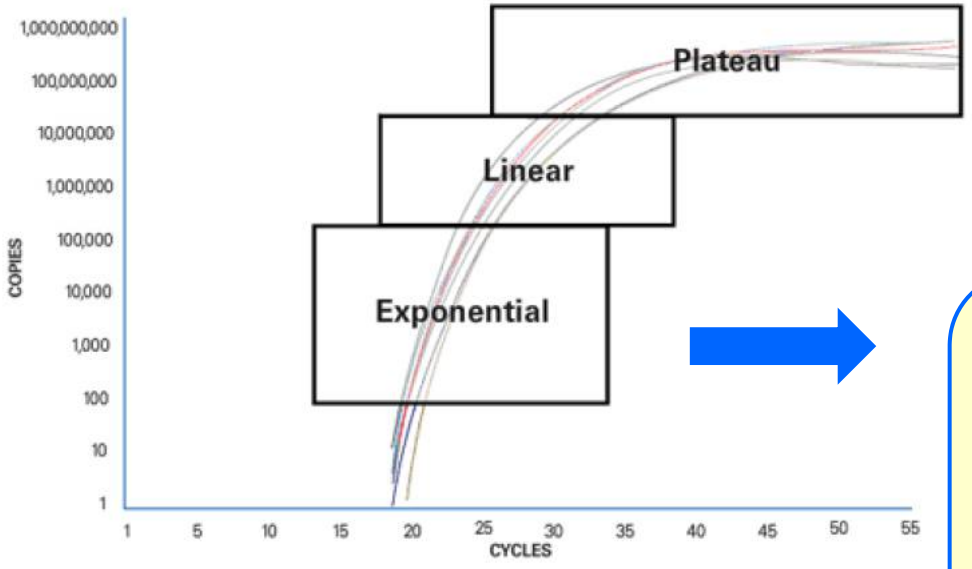


PCR convencional

- La detección es cualitativa
- Límite de detección 0,1 ng DNA
- Se confirma por tamaño, generalmente
- Se puede recuperar el fragmento del gel para secuenciación

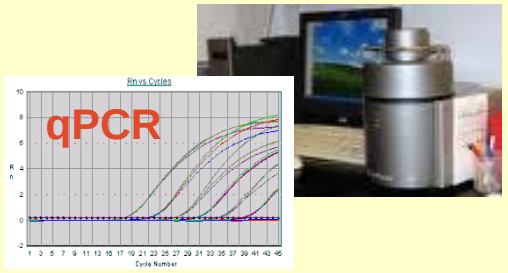
Fases de la reacción y detección del amplicón

En PCR a tiempo real, el amplicón generado es fluorescente y la detección se realiza mediante una cámara CCD que capta la señal en cuanto se hace perceptible, en la fase exponencial.



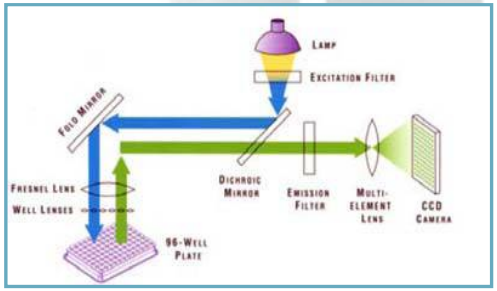
- La detección es en tiempo real
- Puede ser cuantitativa (qPCR), referida a curva patrón
- Límite de detección < 0,01 ng DNA

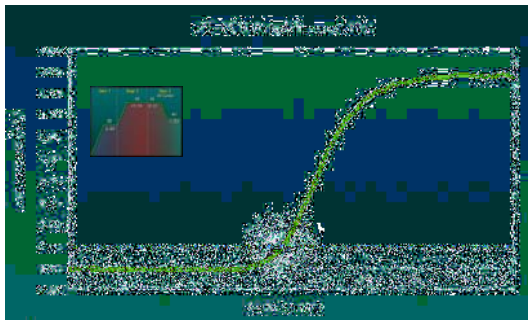
PCR a tiempo real



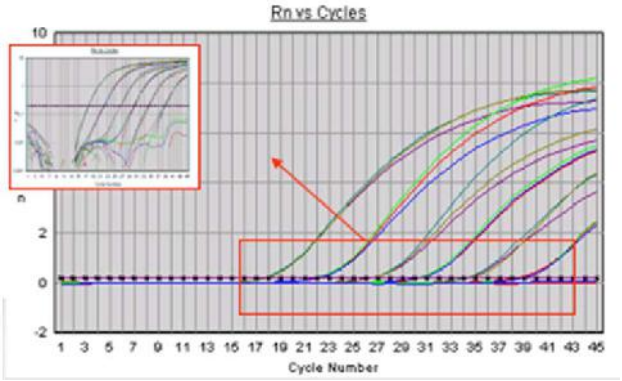
PCR a tiempo real

- Requiere de un sistema óptico integrado en el termociclador
- Marcado de los amplicones durante la amplificación
- Consiste en la monitorización de la fluorescencia emitida, a lo largo del proceso de PCR

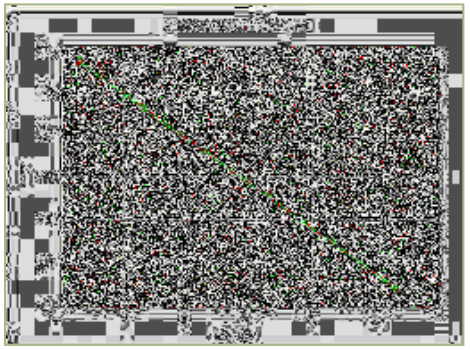




Ciclo umbral (C_T): parámetro de cuantificación que corresponde al inicio de la amplificación, y está directamente relacionado con la cantidad de ADN molde inicial

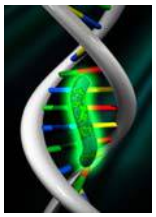


Cuantificación: mediante interpolación del valor de C_T en la curva estándar, construida con muestras de concentración conocida (CO)



Marcaje de amplicones en PCR a tiempo real

Sistemas **No específicos** para generar la señal fluorescente, sonda química que se une al DNA i.e. **SYBR® Green I**: fluoróforo que unido al DNA emite fluorescencia a 520 nm, cuando es excitado a λ 480 nm.



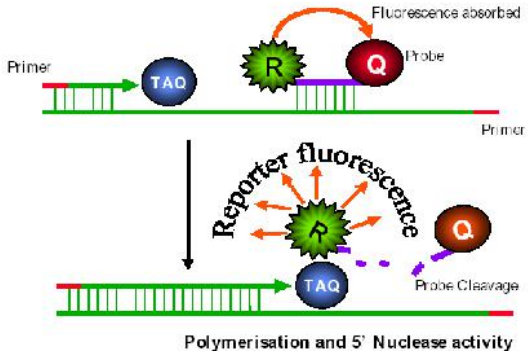
- La especificidad de la reacción depende de los cebadores
- La fluorescencia es reversible, al desnaturalizarse el ADN se libera el fluoróforo

Sistemas **específicos** para generar la señal fluorescente, sonda de ADN (oligonucleótido) marcado con fluorocromo i.e. **Sondas de hidrólisis** "5' nuclease assay" **TaqMan®**

- Sonda marcada con fluoróforo (reporter) y silenciador (quencher), no emite fluorescencia
- Si encuentra la diana en el amplicón, la Taq polimerasa con actividad 5'-3' exonucleasa degrada la sonda, el fluoróforo emite fluorescencia
- Los más frecuentes:

  Reporter FAM (6-carboxifluoresceína)

  Quencher TAMRA (3-carboxi-tetrametil-rodamina)



Ventajas de la PCR como técnica

- **Rapidez**, en pocas horas se dispone del resultado
- **Especificidad**, determinada por la complementariedad de secuencia de los cebadores y las condiciones de hibridación
- **Sensibilidad**, basta una única molécula de DNA molde para generar el amplicón

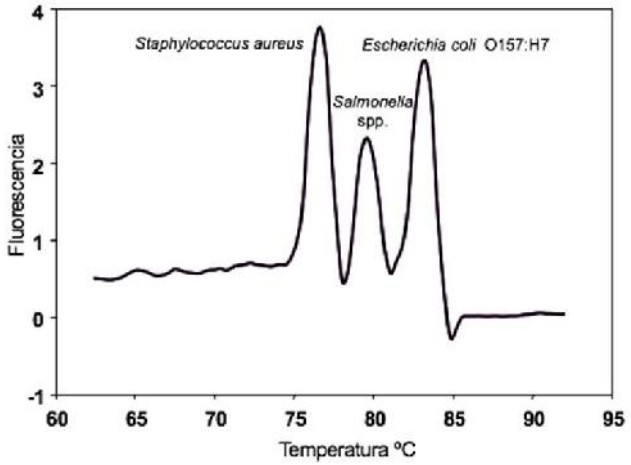
Aplicaciones

- Diagnóstico de enfermedades genéticas o infecciosas
- Detección de microorganismos patógenos en alimentos, aguas, muestras ambientales, etc.
- Detección de organismos manipulados genéticamente (OMG)
- Detección de alérgenos en alimentos (genes que codifican para la proteína alergénica o secuencias universales del organismo que la produce)
- Cuantificación mediante qPCR
- Identificación de microorganismos
- Genotipado (i.e. perfil toxinas *S. aureus*, *B. cereus*)

PCR múltiple

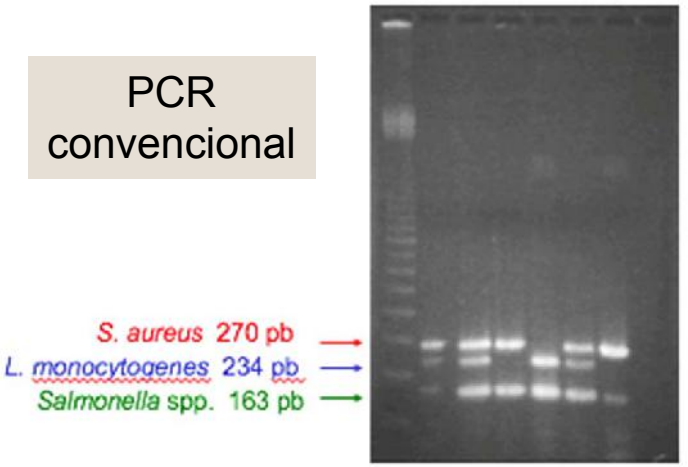
- Amplificación simultánea de dos o más amplicones
- Tamaños de amplicones deben ser distintos, pero en el mismo rango
- Se han de optimizar las concentraciones de cebadores, Mg^{2+}, dNTPs y DNA pol
- Establecer una T óptima promedio para las distintas parejas de cebadores
- Ahorra tiempo, trabajo y reduce el coste económico

qPCR múltiple en modo SYBR-Green



Co-detección de *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *Salmonella*

PCR convencional



Referencias bibliográficas y enlaces

Videos Youtube

PCR

https://youtu.be/Nl6eLez3CNI

https://youtu.be/iQsu3Kz9NYo

Electroforesis en gel de agarosa
https://youtu.be/NL1usCc0n38

qPCR, TaqMan
https://youtu.be/EaGH1eKfvC0

pPCR, SYBR green
https://youtu.be/CMHWR6l8IDY

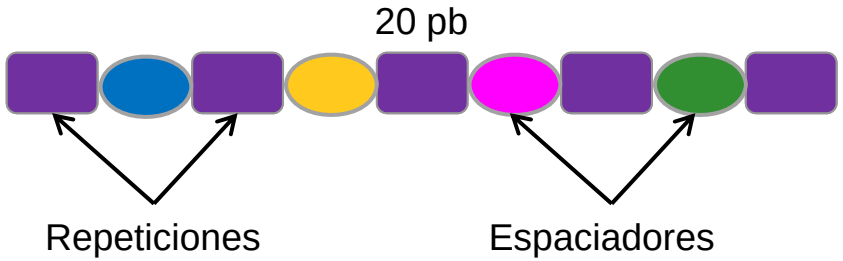
Lección 2.6. CRISPR

Biología molecular. Bases y aplicaciones
Módulo 2. Técnicas en biología molecular (I)

Sergi Maicas Prieto
Departamento de Microbiología y Ecología
Master en Biología Molecular, Celular y Genética
Universitat de València

¿Qué entendemos por CRISPR?

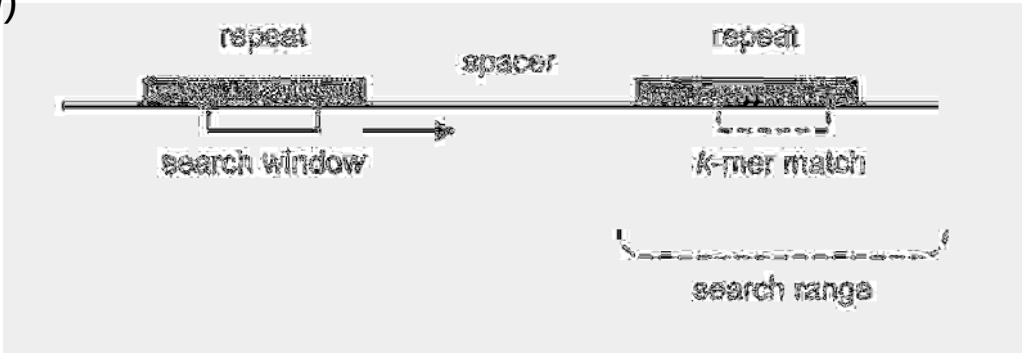
- Los CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) son repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas
- Consisten en fragmentos de DNA con repeticiones cortas de secuencias de bases, intercalados con pequeños fragmentos de "DNA espaciador" adquirido en exposiciones previas a un virus



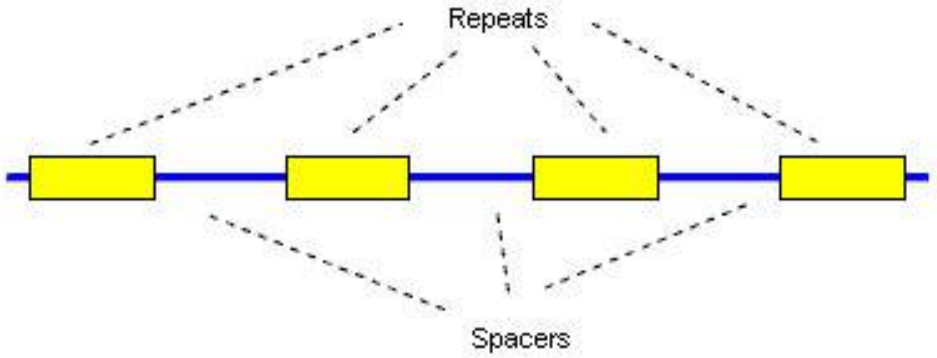
  - 40% de las bacterias
  - 90% de las arqueas
- Habitualmente asociados con los genes cas (nucleasas), como la Cas9

Identificación bioinformática de CRISPR en genomas y metagenomas

- Hay programas que permiten localizar repeticiones de los interespaciados en secuencias grandes de genoma y metagenoma
  - CRT (*CRISPR Recognition Tool*)



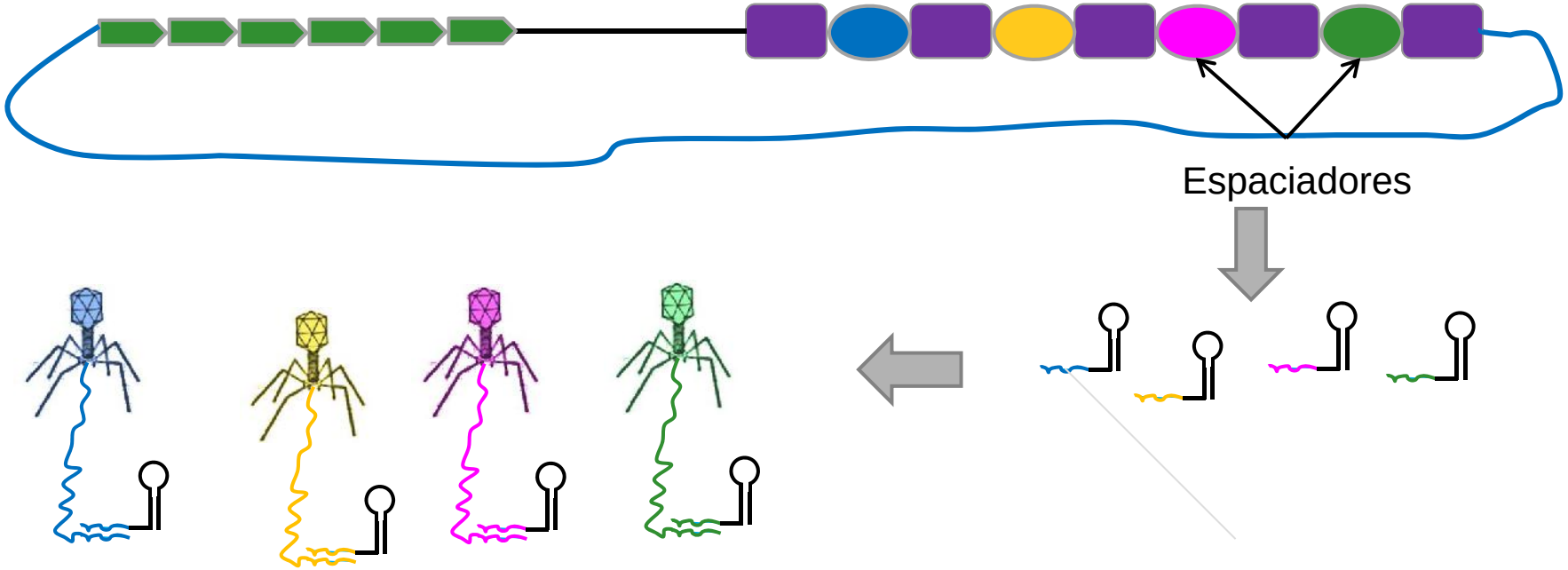
  - PILER-CR



  - CRISPRfinder

¿Qué utilidad tiene CRISPR en un procariota (bacteria o arquea)?

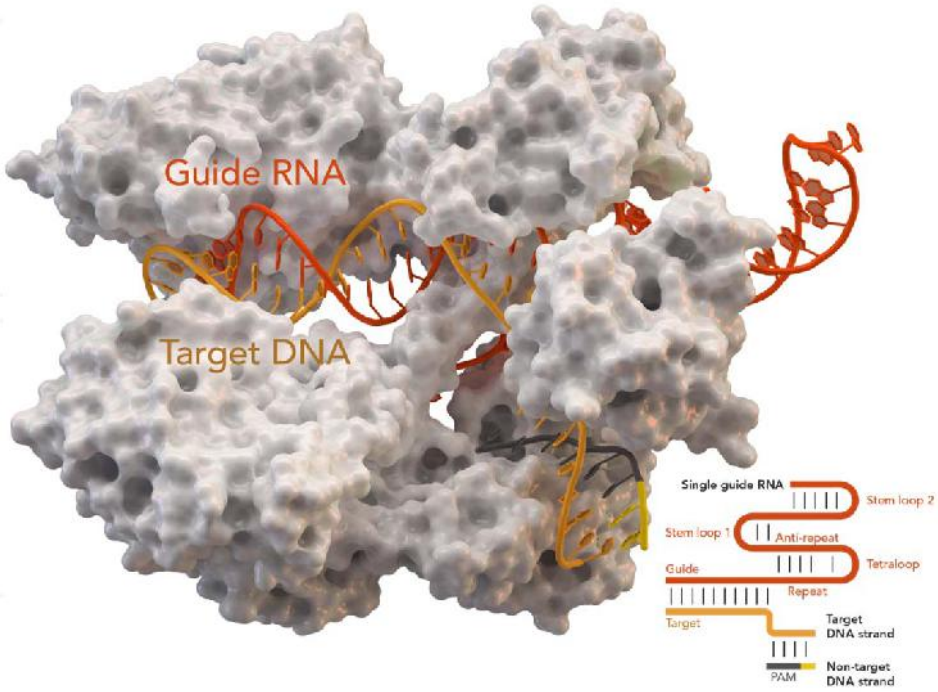
- El sistema CRISPR/Cas es un sistema inmune que confiere resistencia a agentes externos como plásmidos y fagos; es una forma de inmunidad adquirida
- Los espaciadores de los CRISPR reconocen secuencias específicas y guían a las nucleasas Cas para cortar y degradar esos fragmentos de DNA extraños, de manera similar al RNA de interferencia en eucariotas



La nucleasa Cas9

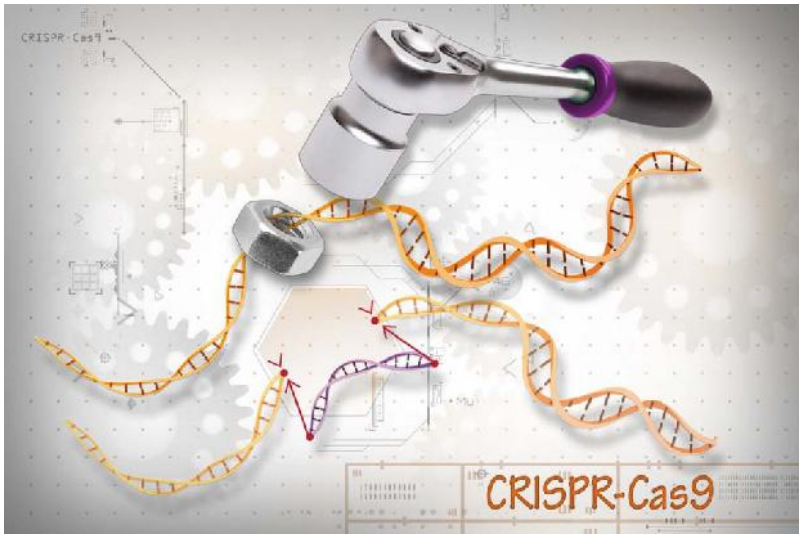
- una enzima endonucleasa de DNA de RNA guía asociada con un sistema CRISPR

- memoriza e interroga al DNA foráneo para comprobar si es complementario a los 20 pb de la región del espaciador del RNA guía



- Si el substrato de DNA es complementario al RNA guía, Cas9 se adhiere al DNA invasor, y lo corta
- Se conocen otras nucleasas, como Cpf1, con un mecanismo de actuación diferente

Edición genética



- CRISPR-Cas9 son unas “tijeras moleculares” tienen la capacidad de alterar, borrar o reorganizar el DNA de cualquier organismo vivo
- Es como hacer microcirugía de los genes para cambiar una secuencia de DNA con facilidad y precisión en puntos concretos de un cromosoma.
- Usar un único RNA en conjunción con la proteína “cortadora”, la enzima Cas9, que permite cortar cualquier secuencia de DNA que se desee
- Como se usa la misma proteína “cortadora” independientemente del gen diana, se pueden diseñar experimentos en los que cambian varios genes en un organismo al mismo tiempo usando Cas9 y múltiples RNA-guía

Hitos

1987
- Primer artículo sobre CRISPR (Ishino et al.)

2000
- CRISPR están presentes en los procariotas (Mojica et al.)

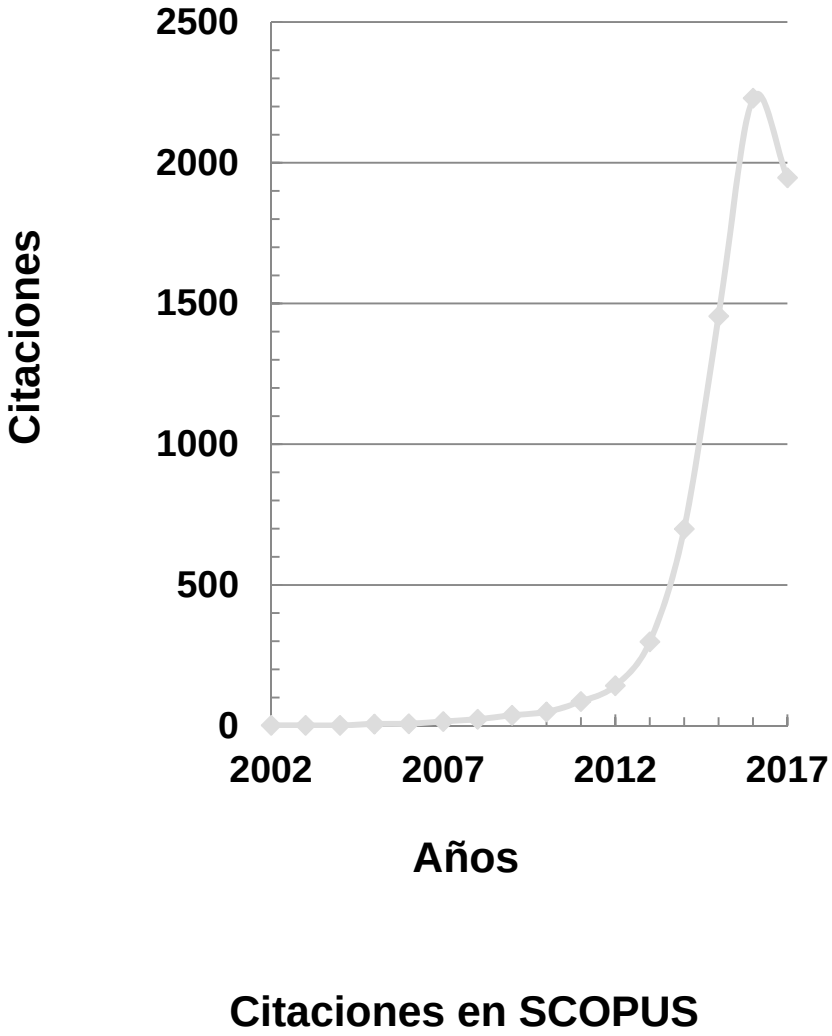
2005
- Identificación espaciadores de origen externo (mecanismo de inmunidad adaptativa)

2007
- Evidencia experimental de inmunidad adaptativa (Barrangou et al.)

2011
- CRISPR tipo II pueden expresarse de manera heteróloga (Sapranauskas et al.)

2013
- Ingeniería genética con Cas9 en células eucarióticas (Cong et al.)

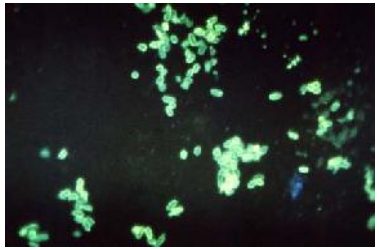
HOY



Citaciones en SCOPUS

Aplicaciones en numerosos organismos

- *S. pneumoniae, E. coli* (Jiang, Bikard *et al.,*2013*, Nat. Biotechnol.*)
- Células humanas (Le Cong *et al*., 2013, *Science*)
- Monos (Niu *et al*., 2014, *Cell*)
- Ranas (Blitz *et al.*, 2013, *Genetics*)
- Pez Cebra (Hwang *et al*., 2013, *Nature Biotechnol*.)
- Insectos (Wang *et al.*, 2013, *Cell. Res*.)
- Moscas (Gratz *et al.*, 2013, *Genetics*)
- Plantas (Li *et al.*, Shan *et al*., 2013, *Nature Biotechnol*.)
- Nematodos (Lo *et al*., 2013, *Genetics*)
- Levaduras (DiCarlo *et al*., 2013, *NAR*)
- Ganado (Tan *et al*., 2013, *PNAS*)



Aplicaciones

- Disrupción génica
- *Gene knock-out* (añadiendo un reporter)
- Introducción o corrección de SNP
- Etiquetado de genes
- Estudio de genes promotores (luciferasa)
- *Knockout* condicional
- Deleciones de cromosomas enteros
- Inserción de genes enteros
- CRISPR de interferencia (CRISPRi)
- CRISPR de activación (CRISPRa)

Aplicaciones (agricultura-alimentación)

- Inmunización artificial contra fagos por introducción de locus CRISPR en bacterias industrialmente importantes, incluyendo a esas utilizadas en la producción de comida y fermentaciones a gran escala
- Creación de una cepa de trigo resistente al oídio (hongo parásito de plantas, p.e. vid)
- Modificación de cultivos y animales de granja
- Ecosistemas (mosquitos transmisores de enfermedades)

Aplicaciones (biomedicina)

- Terapias génicas
- Tratamiento de enfermedades raras (mejorar la atrofia muscular en ratones afectados por distrofia de Duchene)
- Corregir mutaciones causantes de la fibrosis quística
- Acabar con el virus de la Hepatitis B, malaria, …
- Conferir resistencia al virus del HIV
- Modelización del cáncer (posibilidad de alterar varios genes en un mismo ensayo y de trabajar en modelos animales *in vivo*)
- Modificar células tumorales
- ¿Edición genómica de embriones?

Referencias bibliográficas y enlaces

Videos en youtube

- Sistemas CRISPR-Cas, una revolución biotecnológica con origen bacteriano" Francisco M. Mojica https://www.youtube.com/watch?v=GOK6FkfmHdQ&t=120s
- "Genome Engineering with CRISPR-Cas9" Jennifer Doudna https://www.youtube.com/watch?v=SuAxDVBt7kQ&t=18s

Otros enlaces:

- CRISPRCas9: Engineering a Revolution in Gene Editing http://www.sciencemag.org/sites/default/files/custom-publishing/documents/CRISPR-Cas9_booklet_HighRes.pdf

Lección 2.7. MICROARRAYS

Biología molecular. Bases y aplicaciones
Módulo 2. Técnicas en biología molecular (I)

José García Martínez
Departamento de Genética
Universitat de València

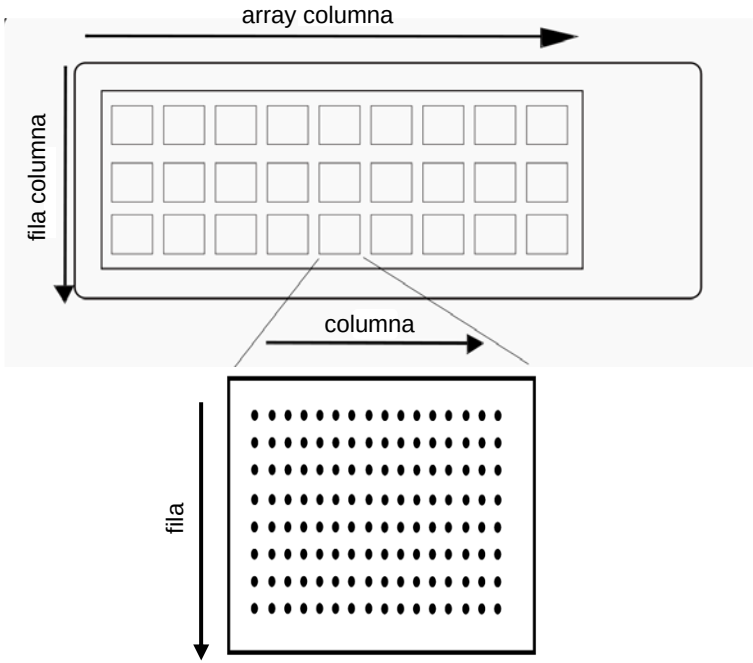
¿Qué es un microarray (o Chip de DNA)?

Una serie de sondas de DNA de longitud variable unidas a un soporte sólido en una disposición regular y prefijada, sobre las que podemos hibridar una muestra marcada

Sonda: DNA fijado al Chip

Muestra: DNA/RNA marcado

Diana: cada uno de los componentes de la muestra



Cada sonda es representativa de un gen o un transcrito (aunque un gen puede estar representado por más de una sonda)

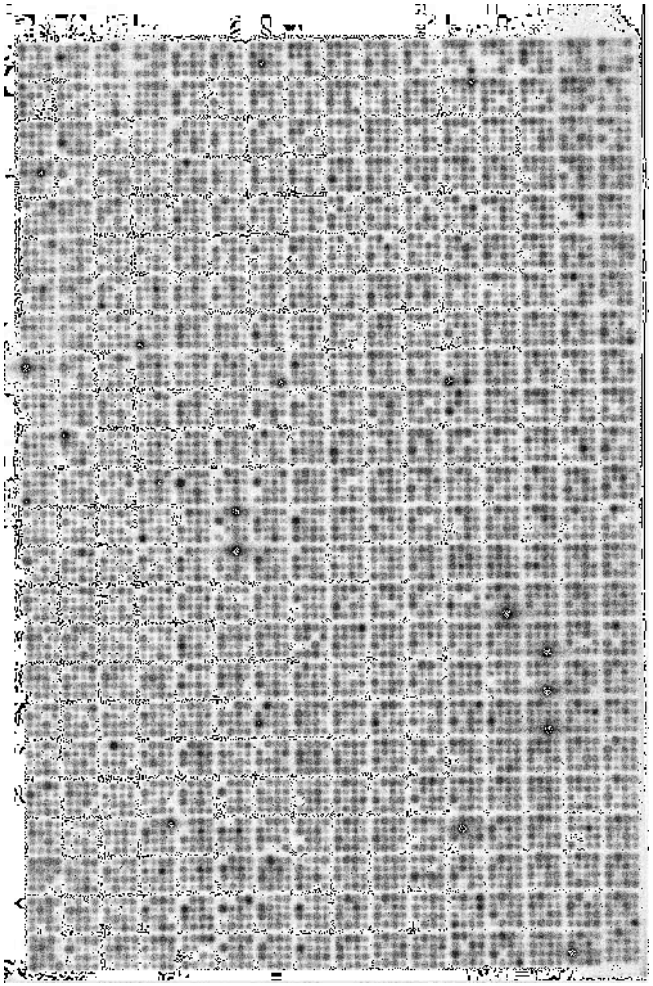
Tipos de sondas

- **DNA bicatenario:** normalmente fragmentos de PCR de longitud variable
- **Sondas de cDNA**
- **Oligonucleótidos:** sintetizados *in situ* (fotolitografía) o *in vitro* y luego unidos al soporte
  - Largos (10-100 nucleótidos)
  - Cortos (< 40 nucleótidos)

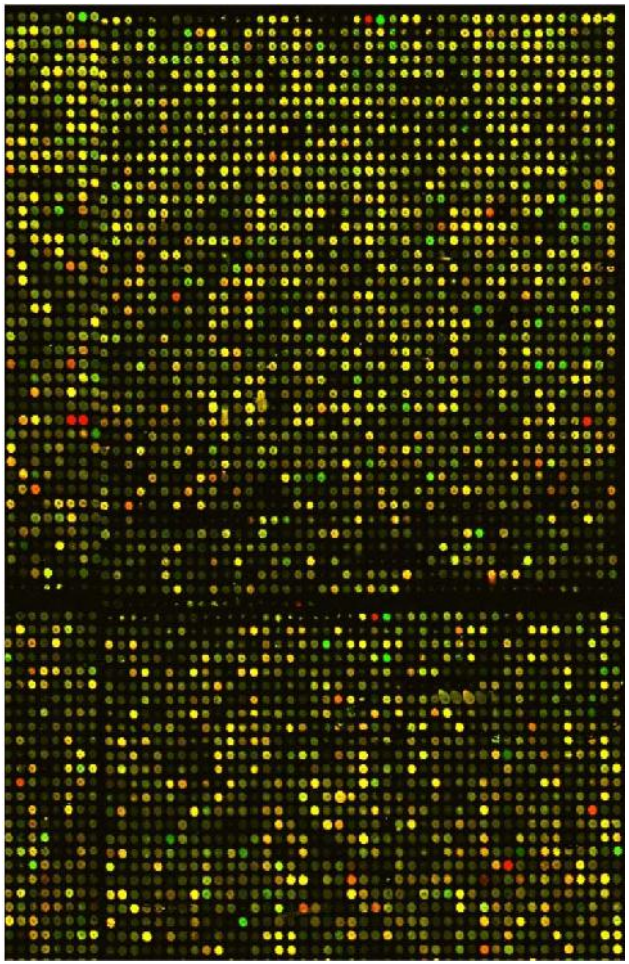
Soportes para unión de las sondas

- **Nylon** con carga + para *macroarrays*
- **Vidrio** con grupos reactivos (polilisina o grupos aldehído) para *microarrays*
- **Cartuchos** especiales para arrays de oligonucleótidos (sintetizados *in situ*)

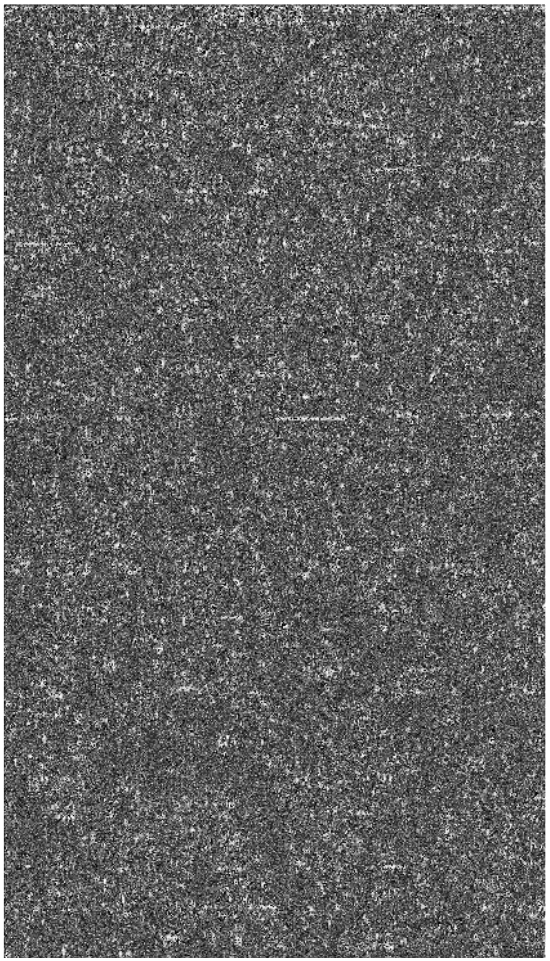
Imágenes de los diferentes arrays



Macroarrays de Nylon



Microarrays de vidrio



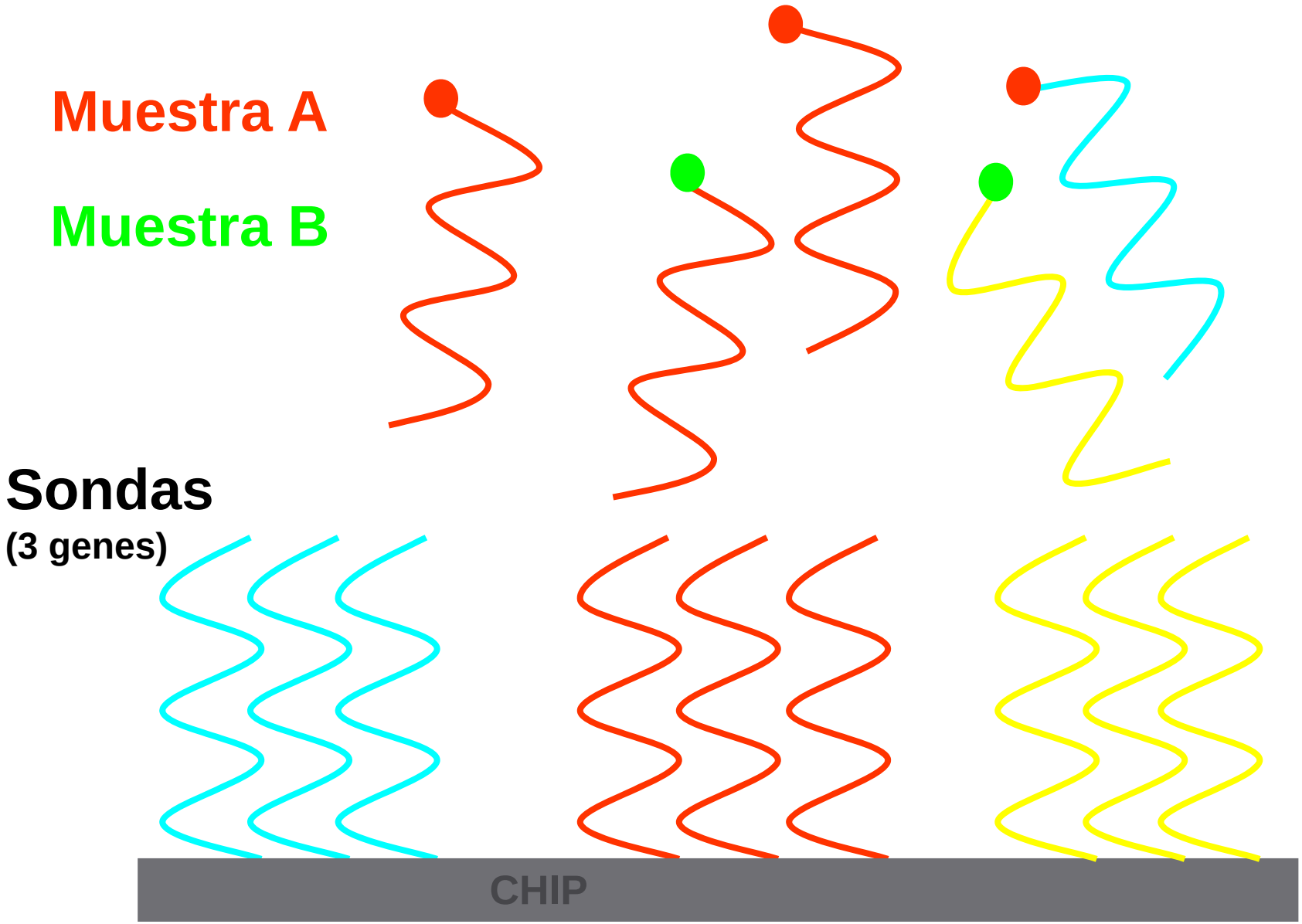
Oligo GeneChip® (*Affymetrix*)

Etapas en el trabajo con los Chips de DNA

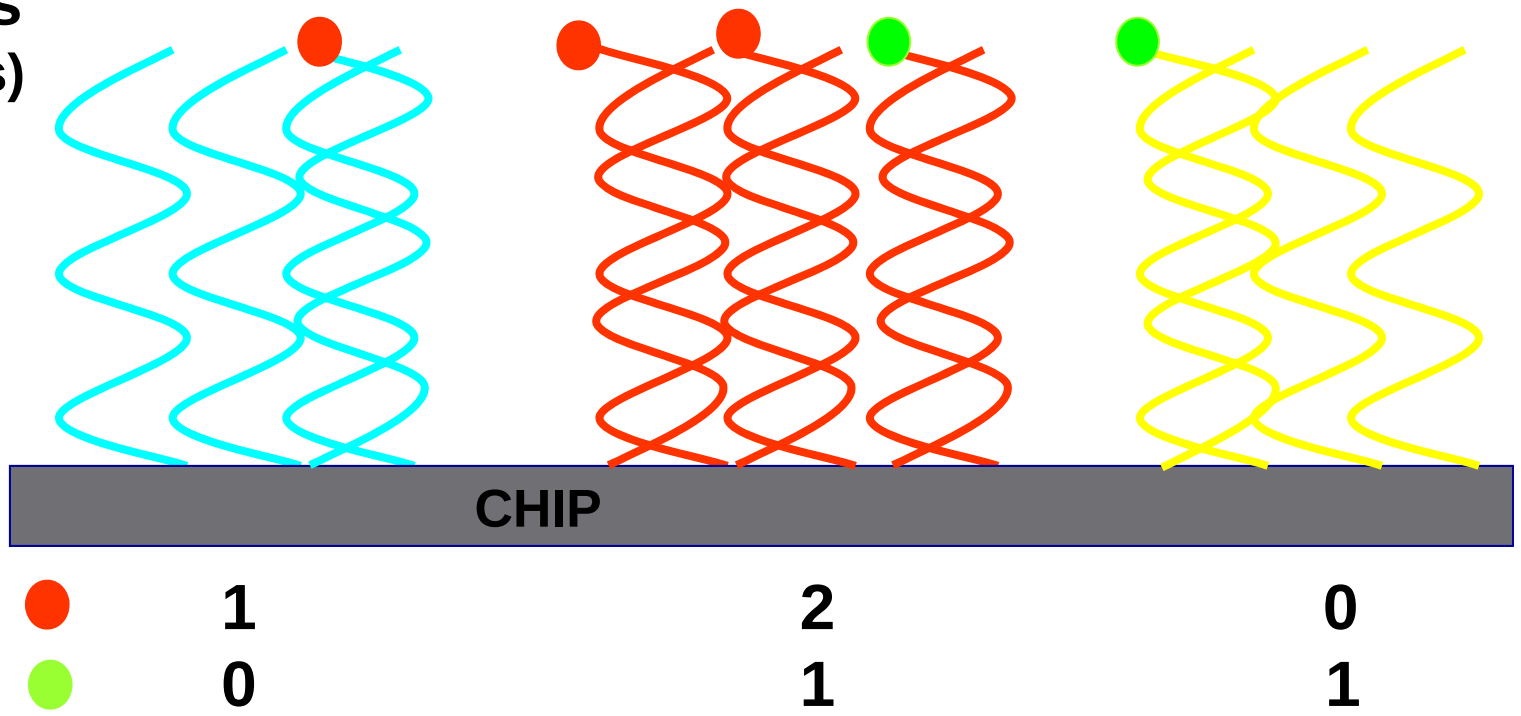
- **Fabricación del array** (o adquisición de un array comercial)
- **Uso del Chip:**
  - **Obtención y marcaje de la muestra**
  - **Hibridación y lavados**
  - **Lectura para la obtención de las imágenes de hibridación**
  - **Cuantificación de las imágenes**
  - **Normalización y análisis de los datos**

Objetivo final:

- ❑ Detectar cambios entre dos muestras diferentes
- ❑ Cambios a nivel de DNA o bien cambios a nivel de mRNA
- ❑ Las muestras que pretendemos analizar deben estar marcadas de manera diferencial (generalmente con fluoróforos diferentes, en el caso de los microarrays) o proceder de hibridaciones diferentes (en el caso de los macroarrays o chips de oligonucleótidos)


Muestra A
Muestra B
Sondas
(3 genes)
CHIP

Sondas
(3 genes)

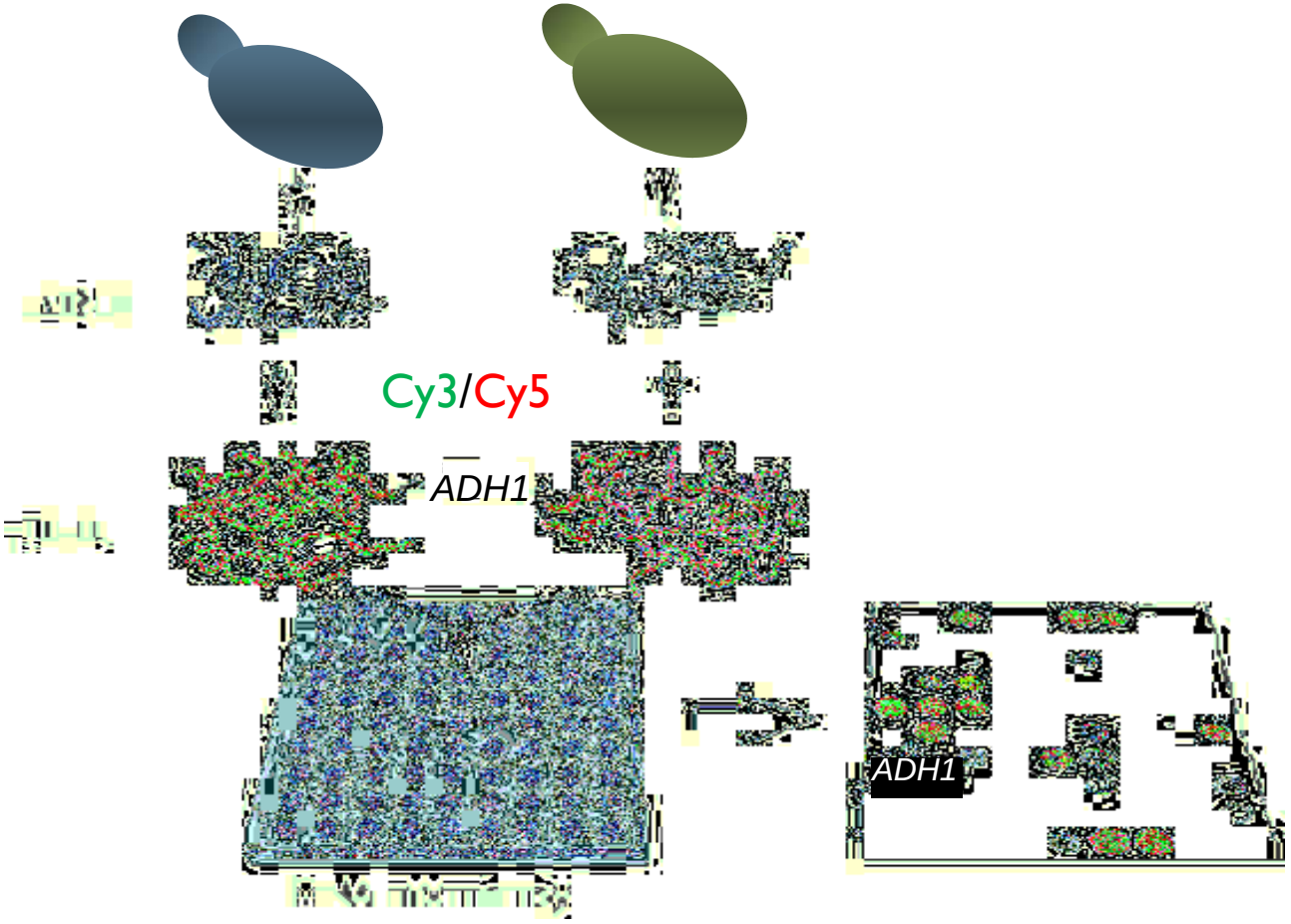


Usos de los microarrays de DNA

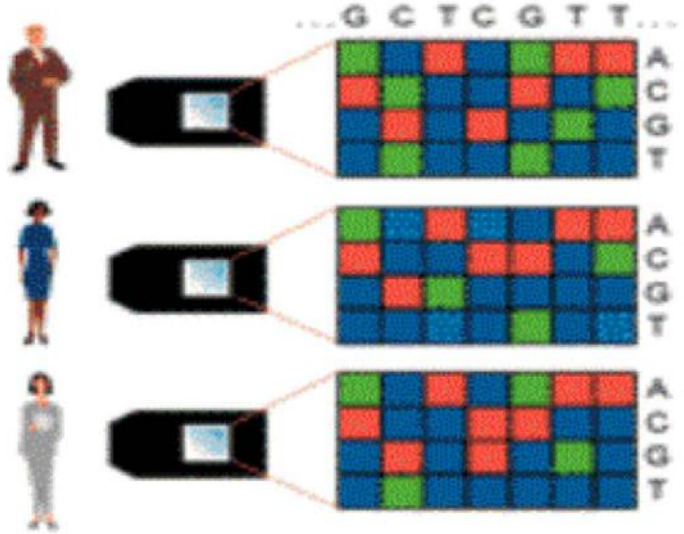
- **Expresión**: Cuantificar un conjunto de mRNAs o miRNAs de una muestra
- **ChIP** (Inmunoprecipitación de Cromatina): Identificar sitios de unión de proteínas a DNA
- **Análisis de SNPs**: Análisis de marcadores genéticos a gran escala
- **CGH** (Hibridación Genómica Comparada): Localización de reordenaciones cromosómicas
- **Secuenciación**: Identificación de la secuencia nucleotídica

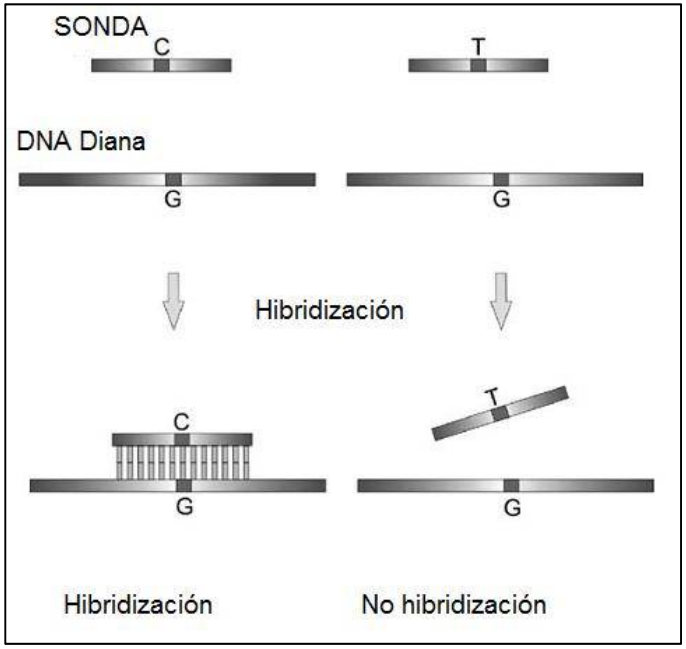
TRANSCRIPTÓMICA: Análisis de la expresión génica global

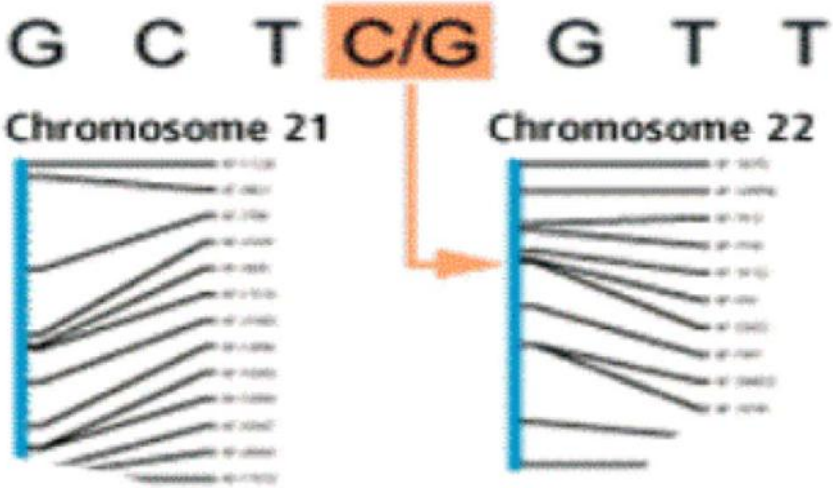
Si la muestra que usamos es mRNA podemos evaluar las diferencias de expresión génica (niveles de mRNA diferenciales) entre dos muestras diferentes (mutante/salvaje, diferentes dosis de un tratamiento, cambios tras un estrés,…)

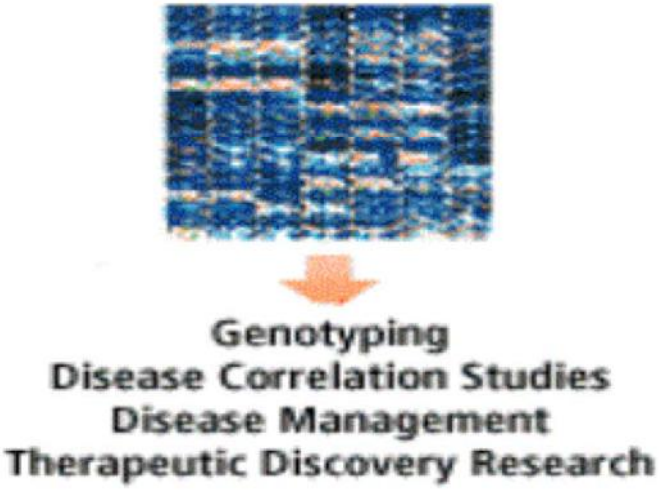


GENOMOTIPADO: Análisis de variaciones de secuencia (SNPs)



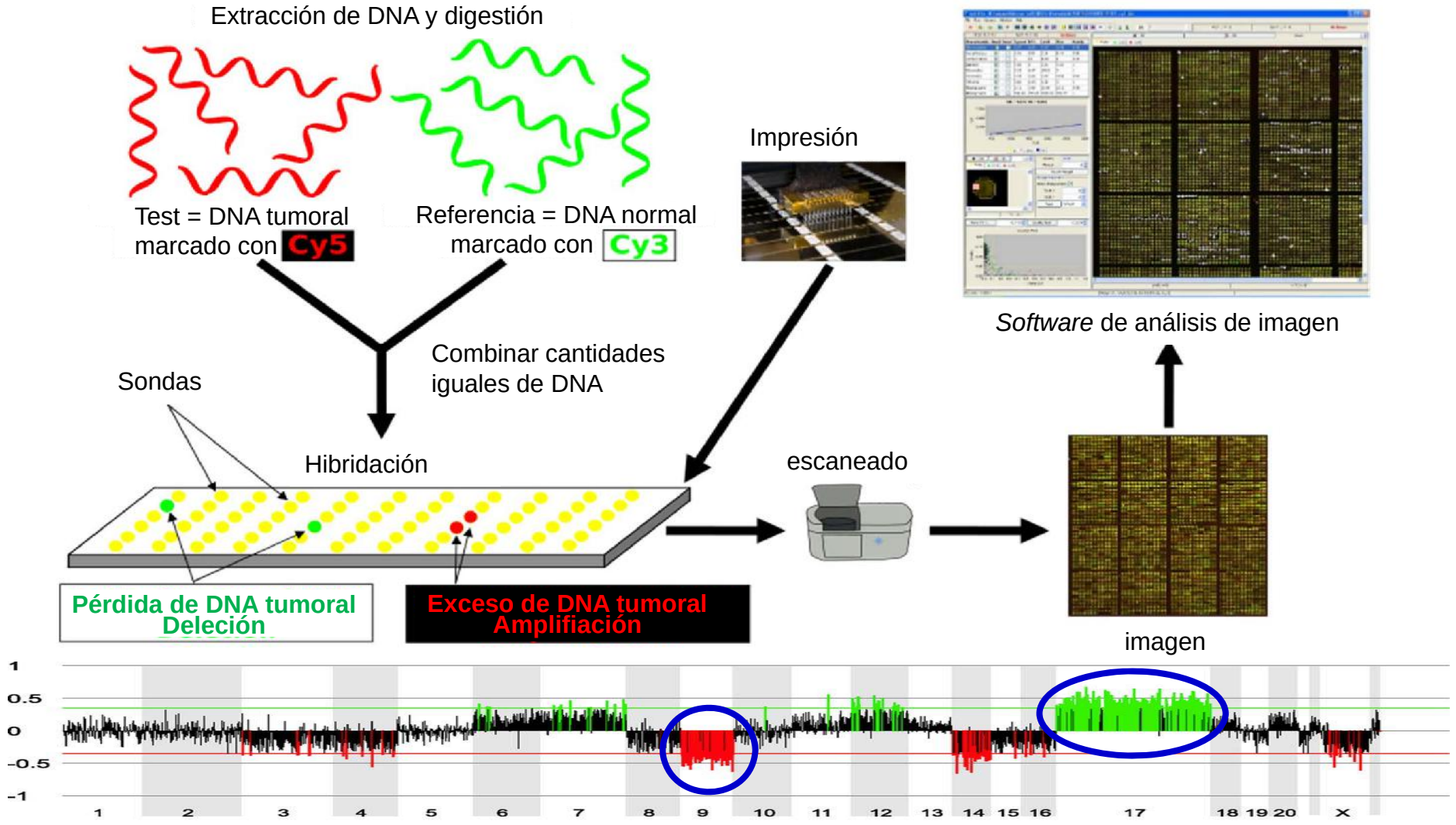






GENOMOTIPADO: Análisis total o parcial del genoma

Si la muestra que usamos es DNA genómico, nos permite ver diferencias entre genomas, e identificar deleciones y duplicaciones, y mapearlas incluso a nivel de gen



Referencias bibliográficas y enlaces

- https://www.youtube.com/watch?v=3ZXq_aDfSB8
- https://www.youtube.com/watch?v=pWk_zBpKt_w
- https://www.youtube.com/watch?v=VNsThMNjKhM
- https://www.youtube.com/watch?v=UgL1Pq2sk3M
- https://www.youtube.com/watch?v=ePFE7yg7LvM#t=25.062625
- https://www.youtube.com/watch?v=gfb8gYClc9Q
- https://www.youtube.com/watch?v=qC4RlnaA8fQ

Lección 2.8. Citometría de flujo

Biología molecular. Bases y aplicaciones
Módulo 3. Técnicas en biología molecular (I)

María Luisa Gil
Departamento de Microbiología y Ecología
Estructura de Recerca Interdisciplinar en Biotecnologia i Biomedicina (ERI BIOTECMED*)*
Universitat de València

Fundamentos de la citometría de flujo

1. Generalidades. Ventajas e inconvenientes de la citometría de flujo
2. Principales sistemas y componentes de un citómetro de flujo

3. Tipo de información multiparamétrica obtenida:
    - Directa: dispersión de la luz
    - Indirecta: emisión de fluorescencia

4. Análisis de los datos
    - Histogramas monoparametricos y biparametricos (dot-plots)
    - Selección de poblaciones: ventanas o regiones
    - Trabajando con multifluorescencia: solapamiento de espectros (compensación)

5. Separación celular por citometría de flujo

1. Generalidades

- La citometría de flujo es una tecnología que se utiliza con mucha frecuencia en Inmunología y en el análisis de células sanguíneas o Hematología. Sin embargo, tiene aplicaciones en otras muchas áreas como en Biología celular y molecular, Microbiología, Toxicología, Farmacología, Biología de plantas, Biología marina, etc.

- Se utiliza, tanto en investigación básica como en el diagnóstico clínico.

- Nos da información multiparamétrica de cada célula individual dentro de una población que puede ser heterogénea.

- La citometría de flujo detecta células individuales en suspensión, que son arrastradas por un flujo de líquido que las hace desfilar una por una y de esta forma son iluminadas por una fuente de luz.

- El citómetro recoge información de cada célula individual, basada en las propiedades de dispersión de la luz de las células que se están analizando y también incluye la emisión de fluorescencias si las células están marcadas con un fluorocromo.

1. Ventajas e inconvenientes

VENTAJAS

Análisis de un alto número de células en corto tiempo (5000-20000 eventos/segundo).

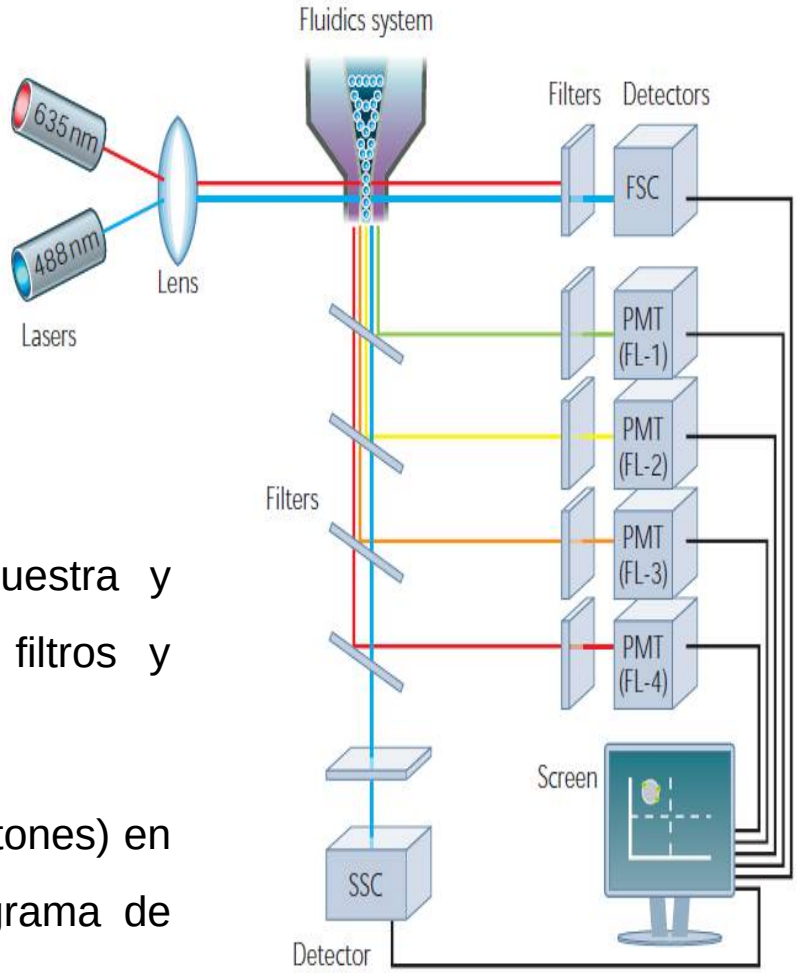
- Alta sensibilidad y objetividad. Nos da medidas cuantitativas: discriminación de células según la cantidad de marcador
- Podemos medir múltiples parámetro de cada célula individual. Es decir, podemos identificar una subpoblación minoritaria dentro de una población mayor heterogénea, sin necesidad de separación previa.
- Además, si disponemos de un citómetro separador, también podemos purificar subpoblaciones celulares.

INCONVENIENTES

- Poca información morfológica de la célula: incapacidad de visualizar las células que se analizan.
- Necesita células individuales en suspensión
- Los equipos son caros y se necesita cierto entrenamiento y formación para manejarlos

2. Principales sistemas y componentes

Un citometro de flujo es un sistema combinado de:



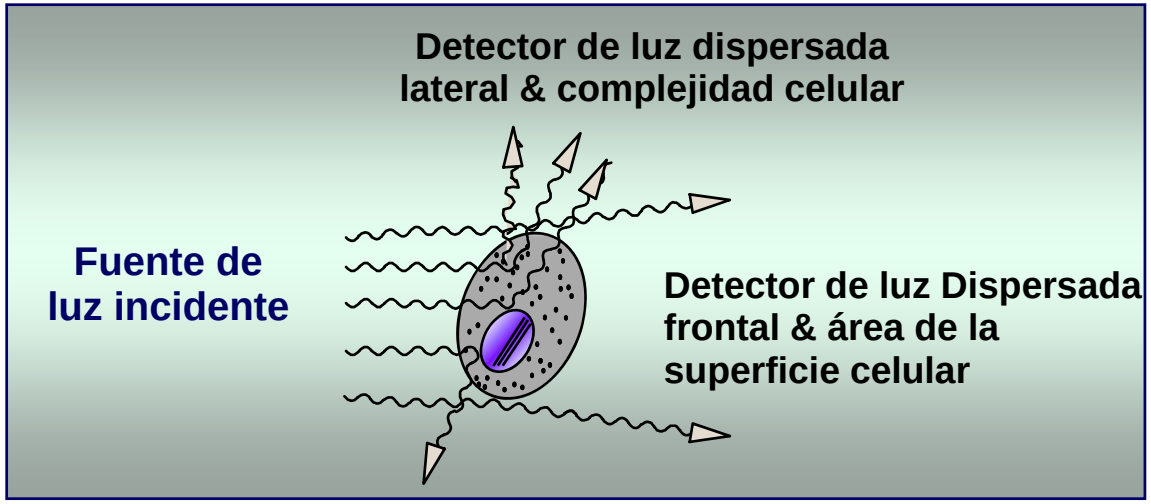
Sistema de flujo: Transportar la muestra hacia el haz de luz del láser y realizar la focalización hidrodinámica que es la causa del paso individualizado de ? En estas condiciones se produce la intercepción entre el haz focalizado del láser y la muestra, llamado punto de interrogación.

Sistema óptico: Iluminar las partículas de la muestra y obtener las señales de luz resultantes en los filtros y detectores (fotomultiplicadores) apropiados.

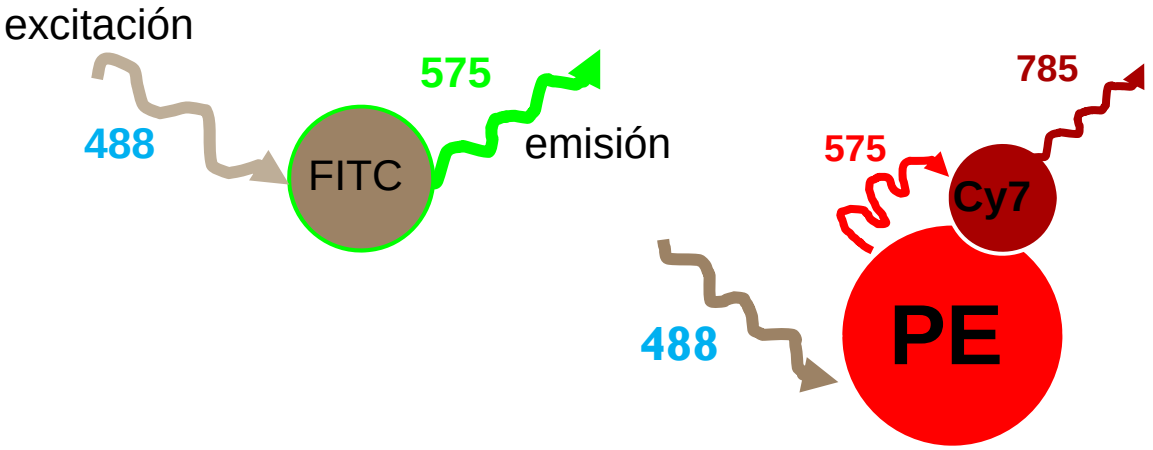
Sistema electrónico: Convertir las señales de luz (fotones) en señales electrónicas (pulso electrico) que un programa de cómputo puedan interpretar.

3. Tipo de información obtenida

Medidas directas que nos dan información sobre el tamaño (FS) y la complejidad interna o granularidad de la célula (SS)

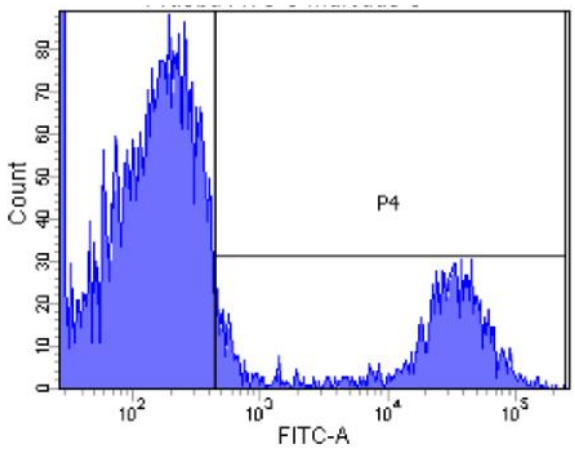


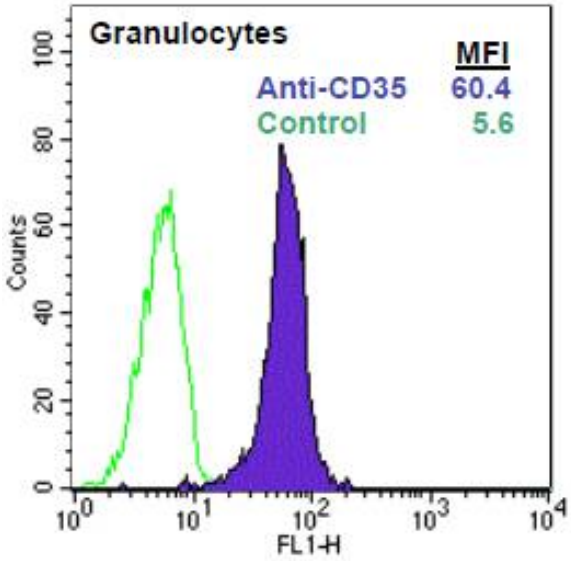
Medida de la fluorescencia emitida, si las células están marcadas con fluorocromos sencillos (ejemplo FITC) o en tándem (ejemplo PE Cy7)



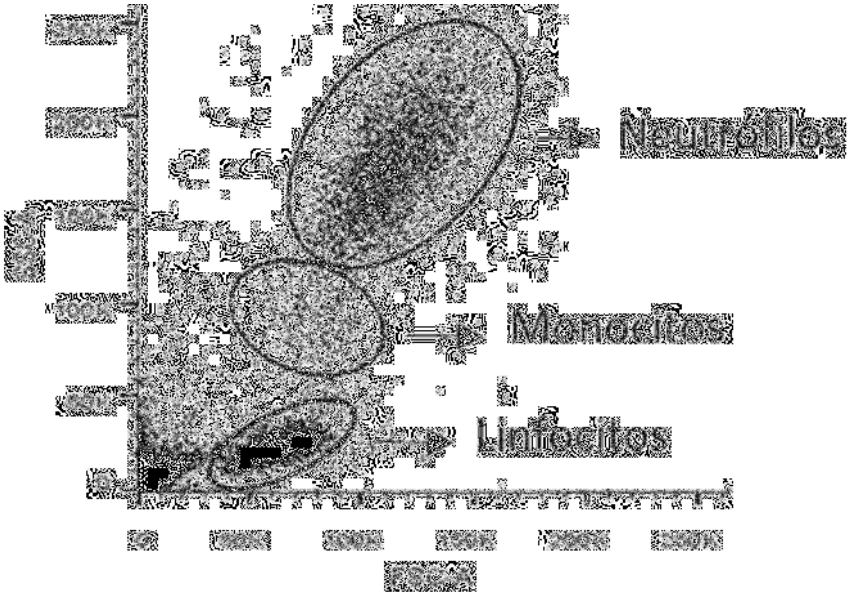
4. Análisis de los datos

Histogramas monoparamétricos (análisis de un parámetro)



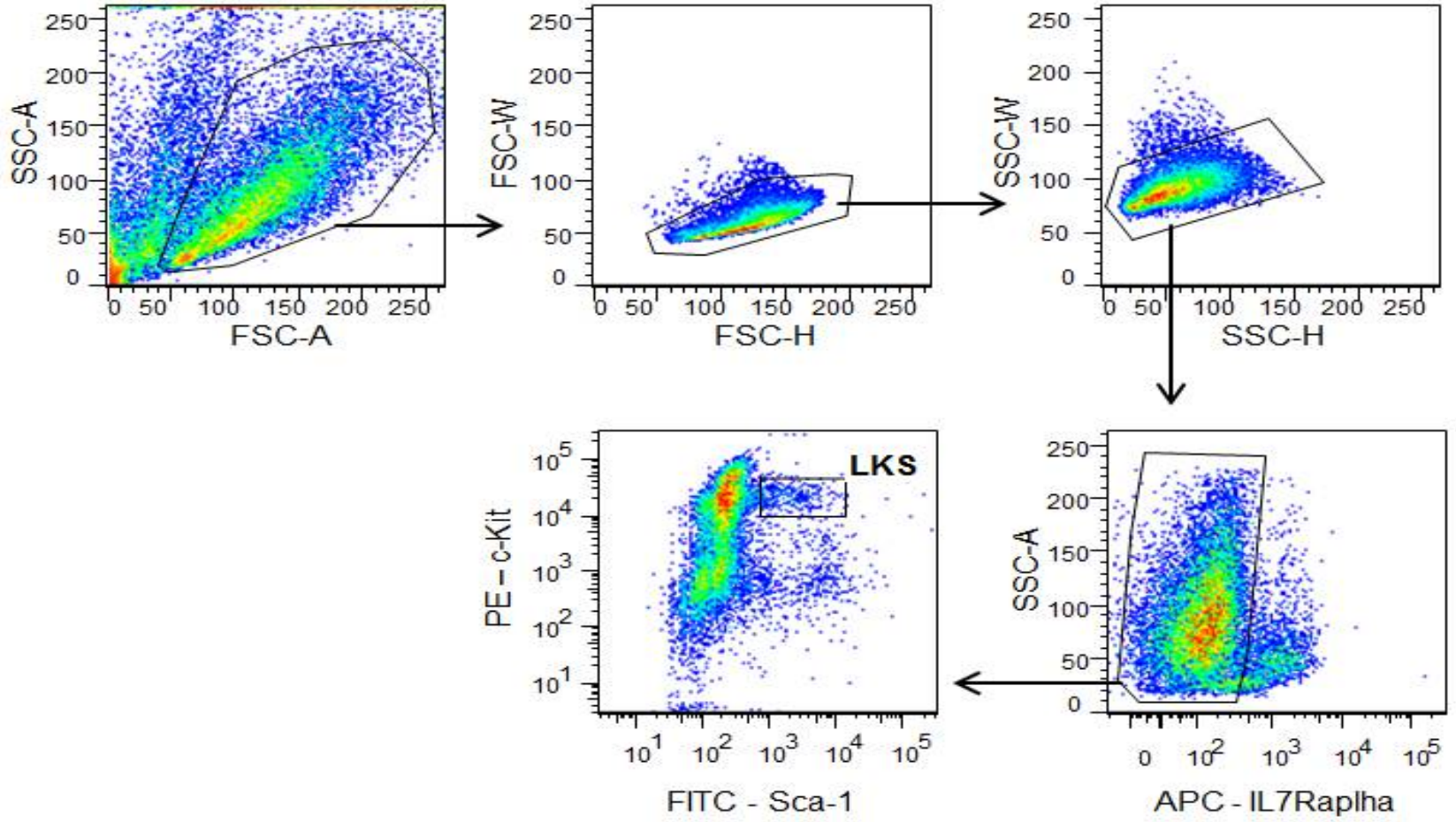


Histogramas biparamétricos (*dot-plots*) (análisis de dos parámetros)



4. Análisis de los datos

Selección de poblaciones: ventanas o regiones. Esto da una enorme potencia de análisis. Ejemplo de identificación de células madre hematopoyéticas de ratón (población muy minoritaria).



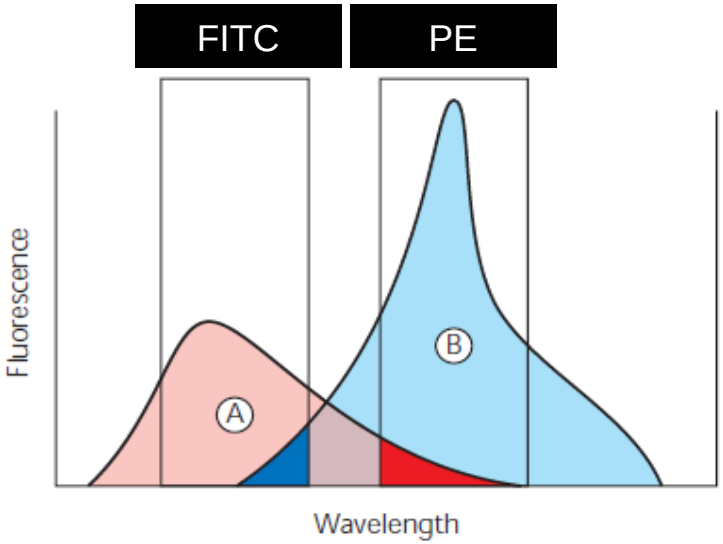
4. Análisis de datos

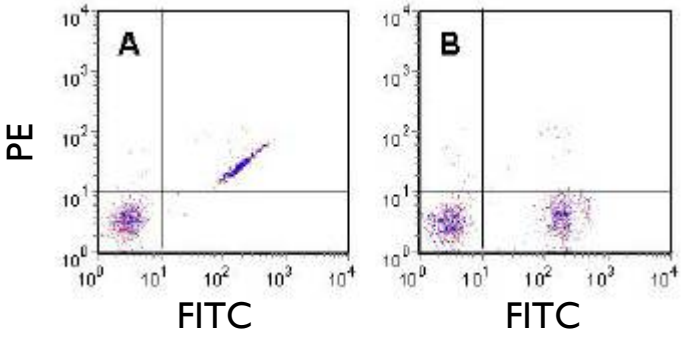
Al trabajar con multifluorescencia (mas de un fluorocromo simultáneamente), los espectros de emisión pueden solaparse.

Compensación→ Calcula y elimina la fluorescencia recogida en otros canales.

Los equipos actuales hacen las compensaciones automaticas.

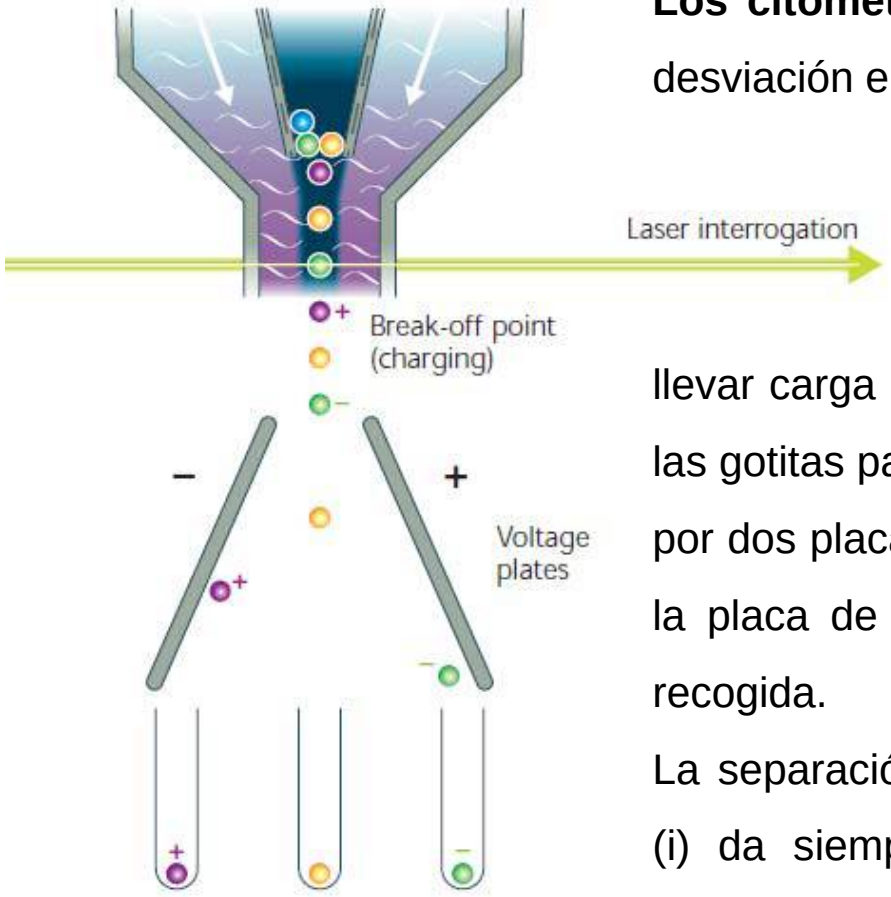
Los equipos más sofisticados pueden tener hasta 5 laser diferentes en la óptica de excitación, y cada uno de ellos con varios detectores asociados. Es decir, pueden detectar más de 20 fluorescencias de cada evento.





Control de compensación: marcas simples
A: antes de compensar.
B: después de compensar

5. Separación celular por citometría de flujo



Los citómetros separadores usan un principio basado en la desviación electrostática de gotitas cargadas eléctricamente.

Las gotitas individuales (que contienen el evento seleccionado) pueden cargarse individualmente, de forma que pueden llevar carga positiva, negativa o no llevar carga. A continuación las gotitas pasan a través de un campo eléctrico estático creado por dos placas cargadas. Las gotitas cargadas son atraídas por la placa de carga contraria, y son desviadas a los tubos de recogida.

La separación por citometría de flujo tienen grandes ventajas: (i) da siempre mucha pureza, (ii) se puede seleccionar la población a separar en base a múltiples parámetros (iii), se pueden separar hasta cuatro subpoblaciones celulares simultáneamente, con los equipos actuales.

Referencias bibliográficas y enlaces

http://www.youtube.com/watch?v=gEdZvuDrWo4&feature=related