



**UNIVERSIDAD DE SONORA**

**POSGRADO EN BIOCIENCIAS**

**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR (2442)**

**UNIDAD 4. TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN**

**Elaboró: Dra. Kadiya del C. Calderón Alvarado**

# Hibridación con marcaje fluorescente

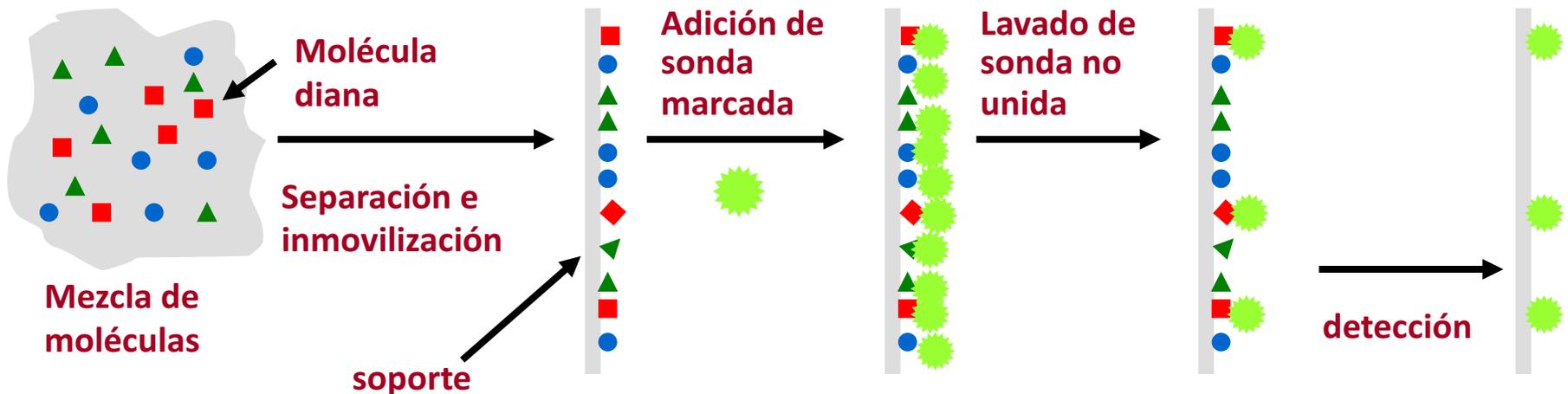
## Fundamento

Permite la **detección** de moléculas diana inmovilizadas sobre un soporte físico, mediante el empleo de una **sonda** específica.

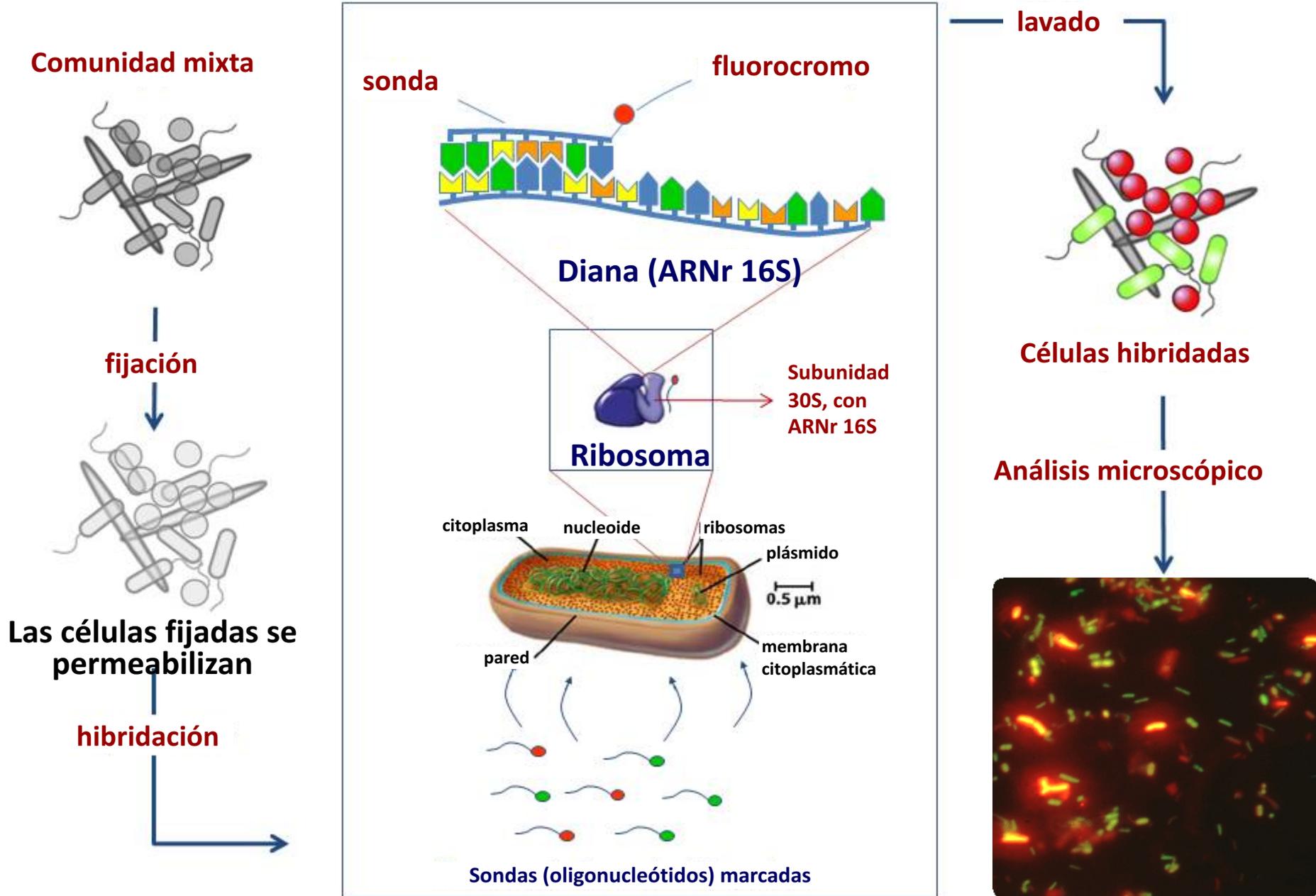
La sonda es una molécula de ADN **complementaria** (total o parcialmente) a la de la molécula diana (**ADN** ó **RNA**).

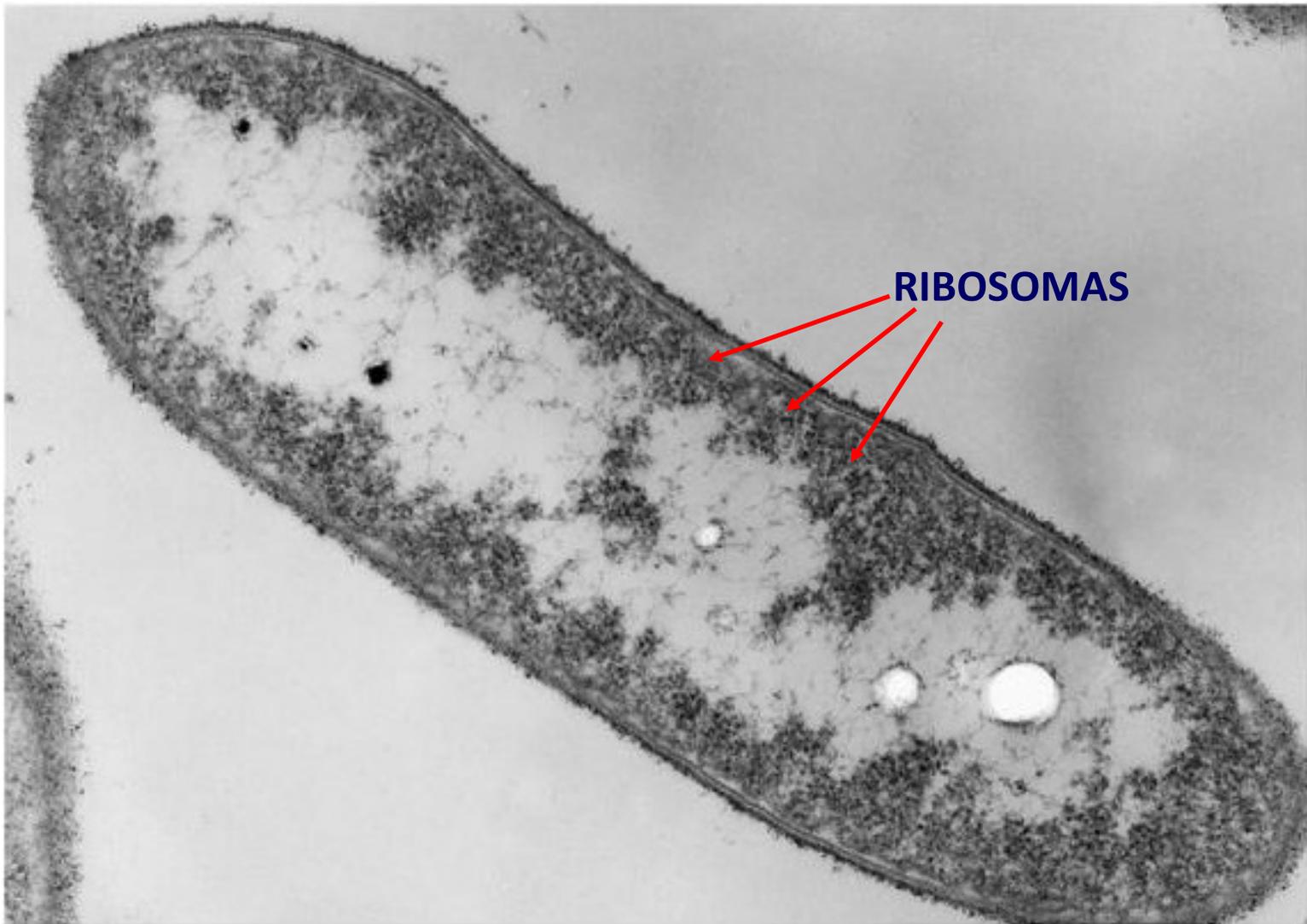
La complementariedad posibilita la formación de un **híbrido** entre la molécula diana y la sonda.

Si **la sonda es marcada** de modo visible (**fluorocromo**), tras la hibridación se produce la **detección** de la molécula diana, gracias a su unión con la sonda marcada.



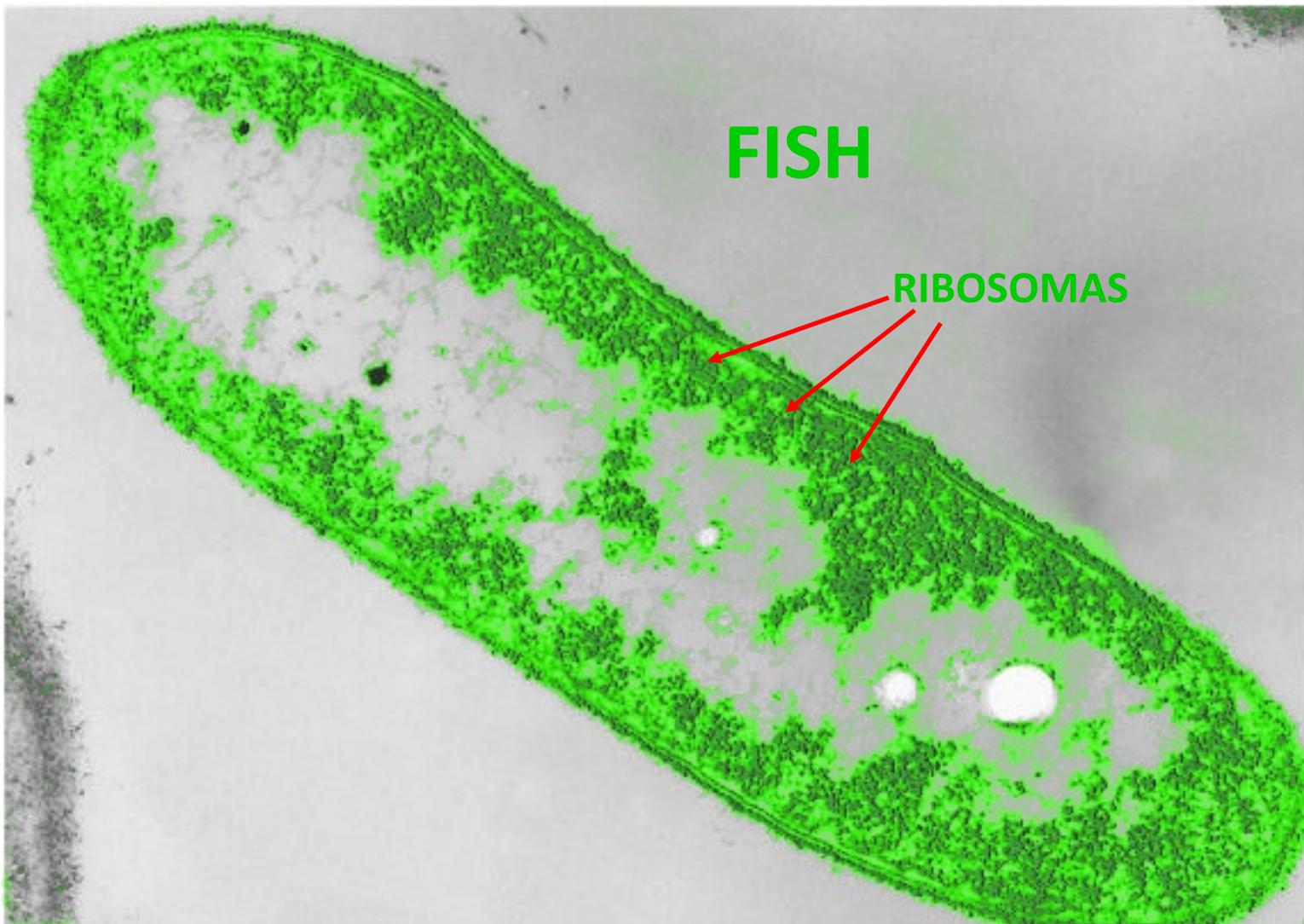
# Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)





**En células procariotas funcionales y activas, el citoplasma está repleto de ribosomas libres de unión a membranas y distribuidos al azar**

**Una célula bacteriana puede contener un promedio de 10.000 ribosomas (30% del peso de la célula)**

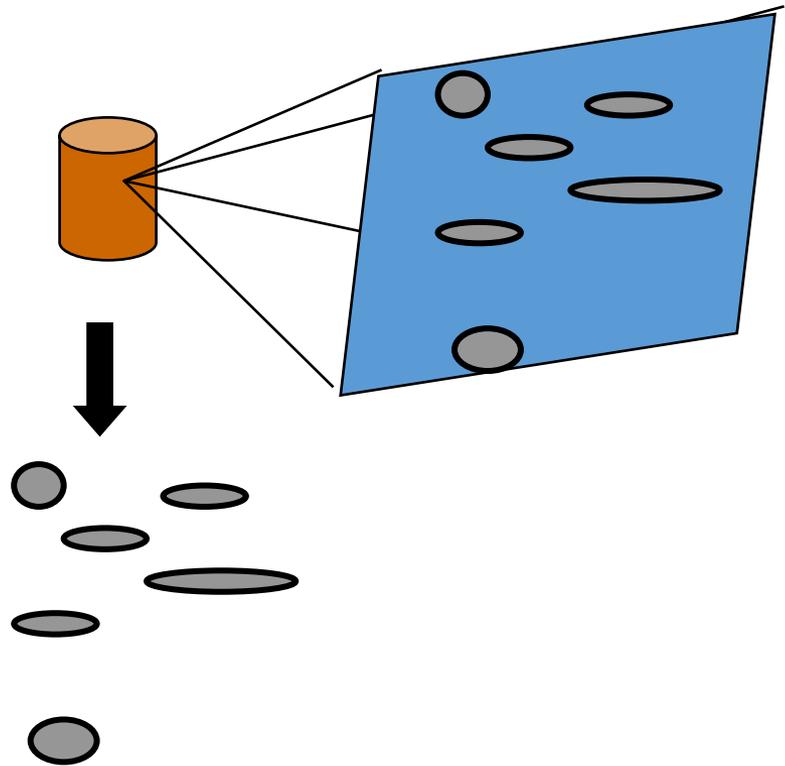


**En células procariotas funcionales y activas, el citoplasma está repleto de ribosomas libres de unión a membranas y distribuidos al azar**

**La técnica FISH “colorea” las células convirtiendo los ribosomas en puntos de emisión de luz**

# Diagrama de flujo

Muestra con secuencia diana



Fijación  
Inmovilización  
Deshidratación

# ¿Porqué es necesaria la fijación de las muestras?

- La degradación de ARNr se detiene
- La morfología de las células se preserva
- La membrana de las células o tejido a observar se permeabiliza.
  
- OJO: Para muestras frescas es necesario fijar rápidamente en el sitio!!!!
- Después de la fijación, las muestras se pueden preservar por periodos largos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Depende del material a fijar.....

Gram negative bacteria  $\Rightarrow$  4 % buffer formaldehído

Gram positive bacteria  $\Rightarrow$  Etanol

## Influencia en la preparación de las muestras

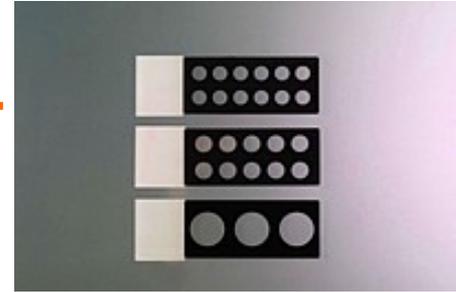
*Sulfurospirillum*  
Unoptimal preparation

10  $\mu$ m

*Sulfurospirillum*  
Optimal preparation

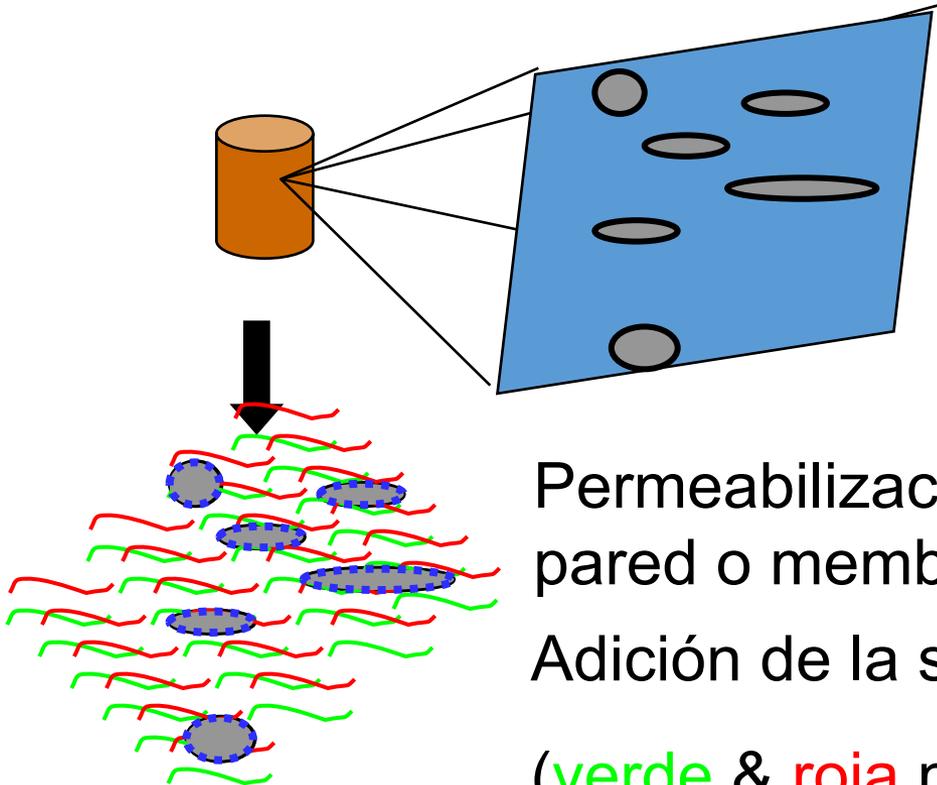
10  $\mu$ m

# Inmovilización y deshidratación



- En porta objetos especiales
- Un porta objetos adicional para cubrir la muestra puede o no ser necesario
  - poly-lysin coating
  - gelatine coating
- Se debe realizar una deshidratación paulatina con etanol (50 %, 80%, 96%)
- Permite largo tiempo de almacenamiento (-20°C)

Muestra



Permeabilizacion de la  
pared o membrana  
Adición de la sonda  
(verde & roja marcado)

## Ejemplo

Sondas-ADN: desoxioligonucleotidos marcados fuorescentemente fluorescent para organismos blanco

sonda NIT2

3' -TCCGCCACGCGATTGGGC-5'



*Nitrobacter hamburgensis* 5' -AGGCGGUGCGCUAACCCG-3'

*Nitrobacter winogradskyi* 5' -.....-3'

*Blastobacter denitrificans* 5' -.....A..-3'

*Bradyrhizobium japonicum* 5' -..A.....-3'

*Blastobacter natatorius* 5' - ....C.....-3'

3' -TCCGCCACGCGATTGGGC-5'

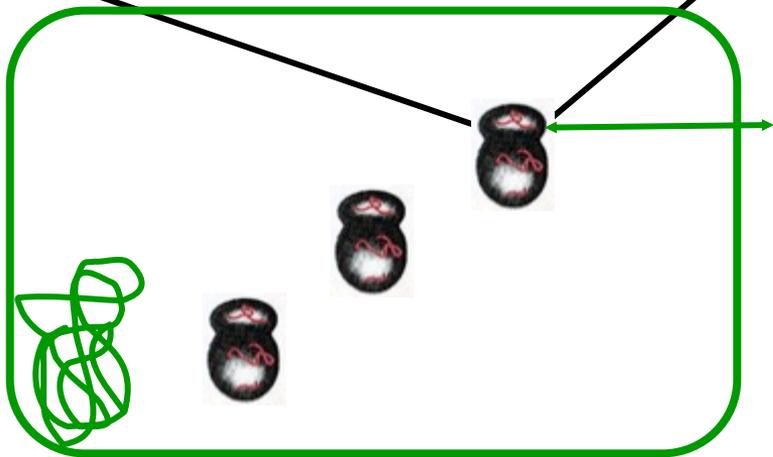


**MATCH**

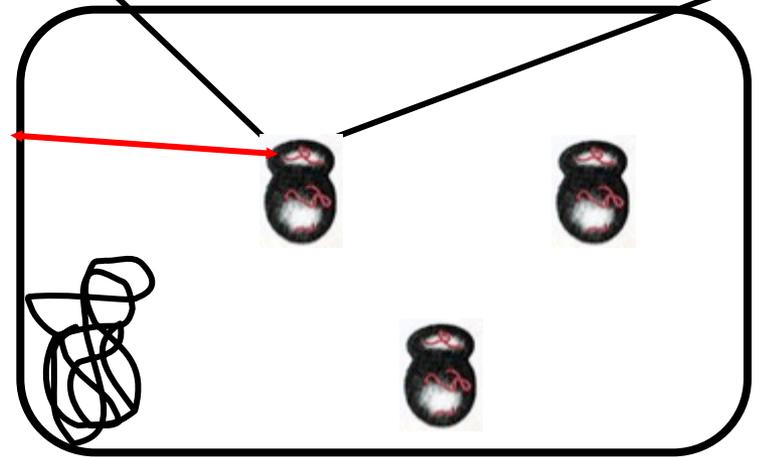
**NO MATCH**

-AGGCGGUGCGCUAACCCG-

---CGATCCCAUUUAAGCCGA---



16S rRNA



# Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

## Optimización de las condiciones de hibridación

- **Condiciones: determinan la especificidad de la hibridación**

- **Buffer de hibridación**
  - % NaCl
  - % Formamida
- **Temperatura de incubación de la hibridación**

- La concentración de NaCl y la T no permiten grandes variaciones
- Se suele hibridar a temperatura fija (46°C) y 0.9 mM de NaCl.
- La especificidad se logra **ajustando la concentración de formamida**

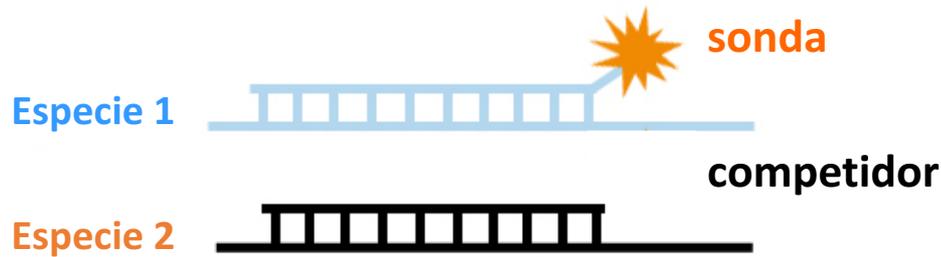
**1% aumento concentración de formamida = 0.5 °C aumento T° de hibridación**



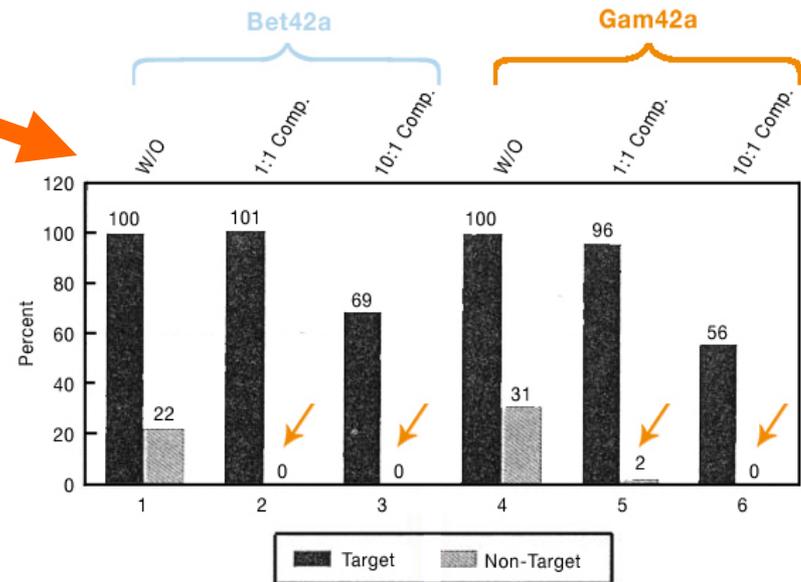


# Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

## El concepto del competidor



Bet42a	GCC TTC CCA CTT CGT TT
Comp	GCC TTC CCA CAT CGT TT
GAM42a	GCC TTC CCA CAT CGT TT
Comp	GCC TTC CCA CTT CGT TT



Manz et al., SAM 1992

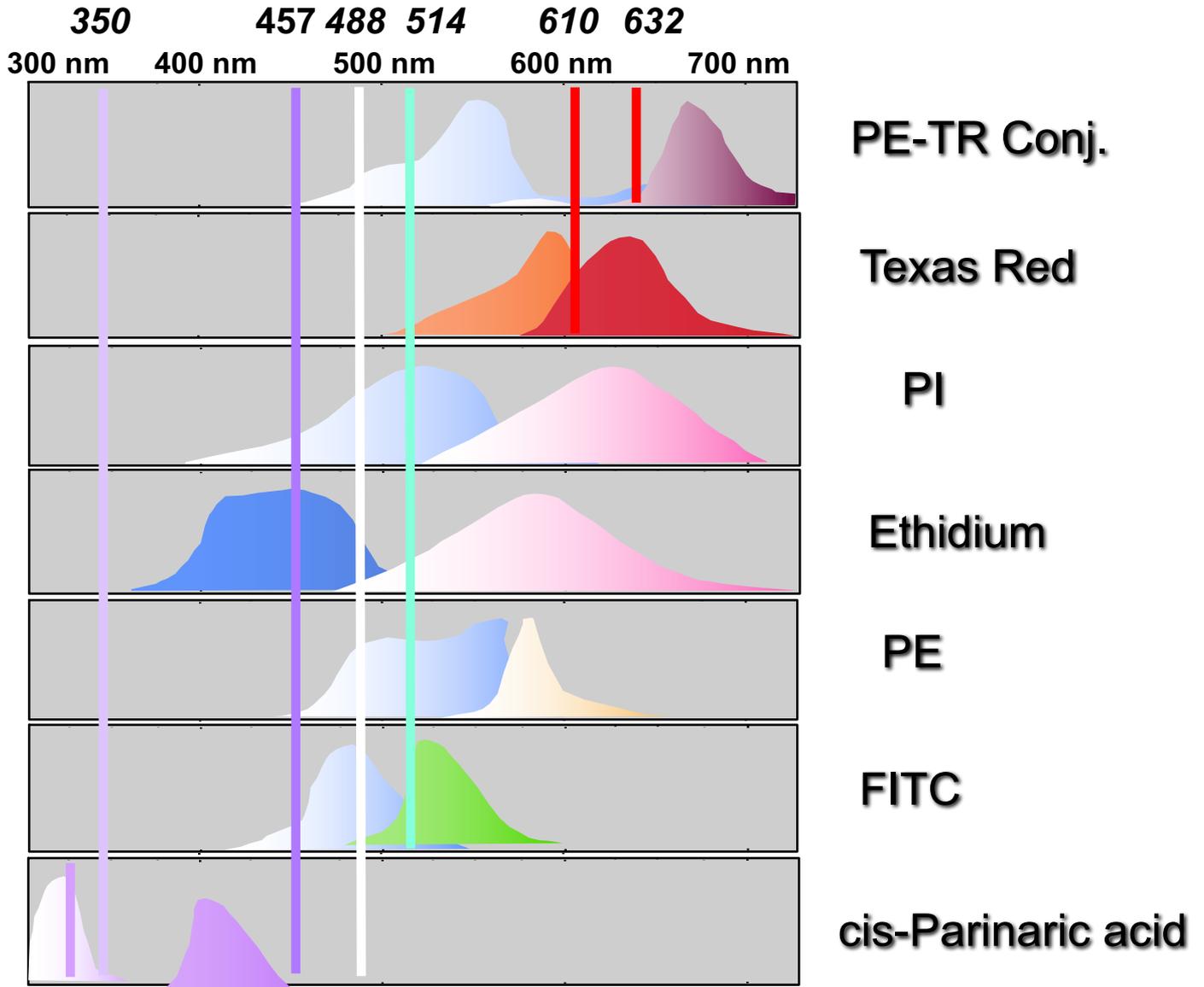
Poniendo el oligo competidor, este se une preferentemente a gamma y así la sonda de beta marcada con el fluorocromo ya no se les pega y eliminamos la unión inespecífica.

# Probe labelling

## 3' or 5' modification with a fluorescent dye

Dye	Colour	Absorption Max. (nm)	Emission Max. (nm)	Molar Extinction Coefficient (cm <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )
Dabcyl		453	None	32.000
Cy2	Green	489	506	150.000
 Fluorescein (FITC)	Green	494	525	73.000
FAM (Carboxyfluorescein)	Green	496	516	83.000
TET (Tetrachlorofluorescein)	Orange	521	536	73.000
HEX (Hexachlorofluorescein)	Pink	535	556	73.000
 Cy3	Orange	550	570	150.000
TAMRA (Carboxytetramethyl rhodamine)	Rose	565	580	89.000
Cy3.5	Scarlet	581	596	150.000
ROX (carboxy--x- rhodamine)	Red	575	602	82000
Texas Red	Red	596	615	85.000
Malachite Green	Green	630	None	76.000
 Cy5	Far Red	649	670	250.000
Cy5.5	Near-IR	675	694	250.000
Cy7	Near IR	743	767	250.000
FluorX	Green	494	520	68.000

**Common  
Laser  
Lines**



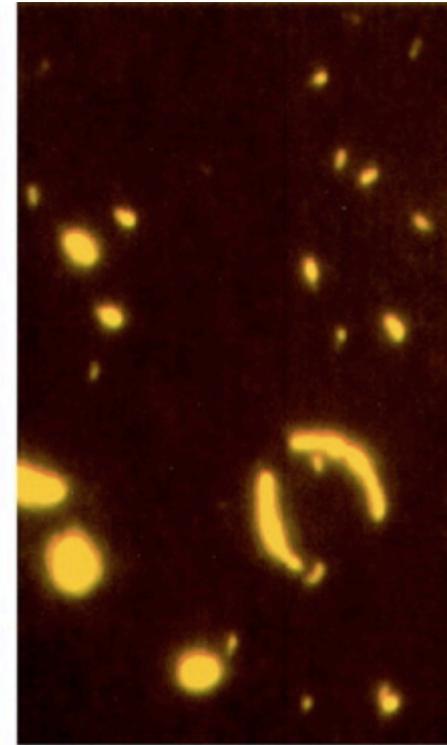
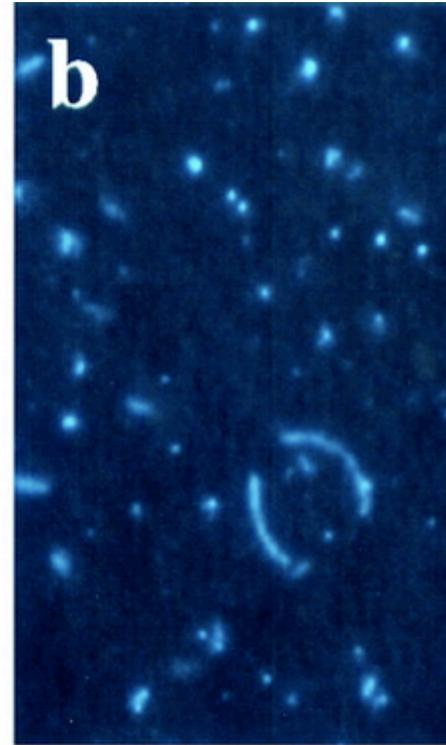
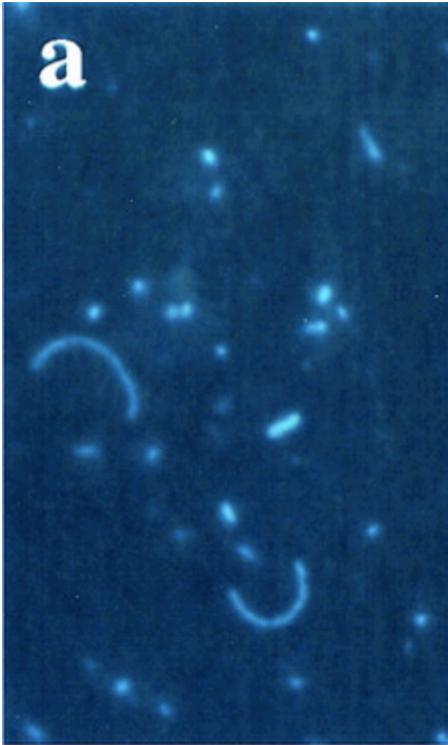
- **DAPI** ó (4',6-diamino-2-fenilindol) es un **marcador fluorescente** que se une fuertemente a regiones enriquecidas en Adenina y Timina en secuencias de ADN.

DAPI

FISH  
Probe EUB338

DAPI

CARD-FISH  
Probe EUB338



¿Dónde encuentro las sondas?

1. Literatura
2. Probase (<http://www.microbial-ecology.de/probase/>)
3. Se pueden diseñar (software especial)
  - PRIMROSE (<http://rdp.cme.msu.edu/>)
  - ARB ([www.arb-home.de/](http://www.arb-home.de/))

¿Dónde las ordeno?

Compañías especializadas (Eurogentec, Sigma, etc)

# Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

<http://www.microbial-ecology.net/probebase/>

University of Vienna  
Department of Microbial Ecology 

## probeBase

an online resource for  
rRNA-targeted oligonucleotide probes

**probeBase newsletter**  
Get a list of all new probes  
when probeBase has been updated!

probeBase comprises currently **2788 probes**, **175 primer**, **16 microarrays**, and **499 references**.

- ▶ **Search**  
Search probeBase for target organisms, probe names, primers, microarrays, target sites, probe accession numbers, references, etc.
- ▶ **Match**  
Match your 16S rRNA sequence(s) against probeBase and find all published probes targeting your sequence(s).
- ▶ **Lists**  
View lists of probes (according to probe categories), coverage of group-specific probes, microarrays, references, etc.
- ▶ **Submission**  
Submit new or missing probes to probeBase.
- ▶ **FAQ**  
Frequently Asked Questions
- ▶ **Links**  
Websites relevant to ribosomal RNA
- ▶ **Credits**  
Credits and acknowledgements

**Evaluation of primer pairs using probeBase and SILVA TestPrime**  
Direct submission of primer sequences from probeBase to the ▶ **SILVA TestPrime** tool facilitates evaluation of specificity and coverage of primer combinations. ▶ **Test with primer 27f**


**Diseño de las sondas**

**>2700 sondas registradas**

# Analisis de las muestras con....



Microscopio confocal, fluorescencia u epifluorescencia



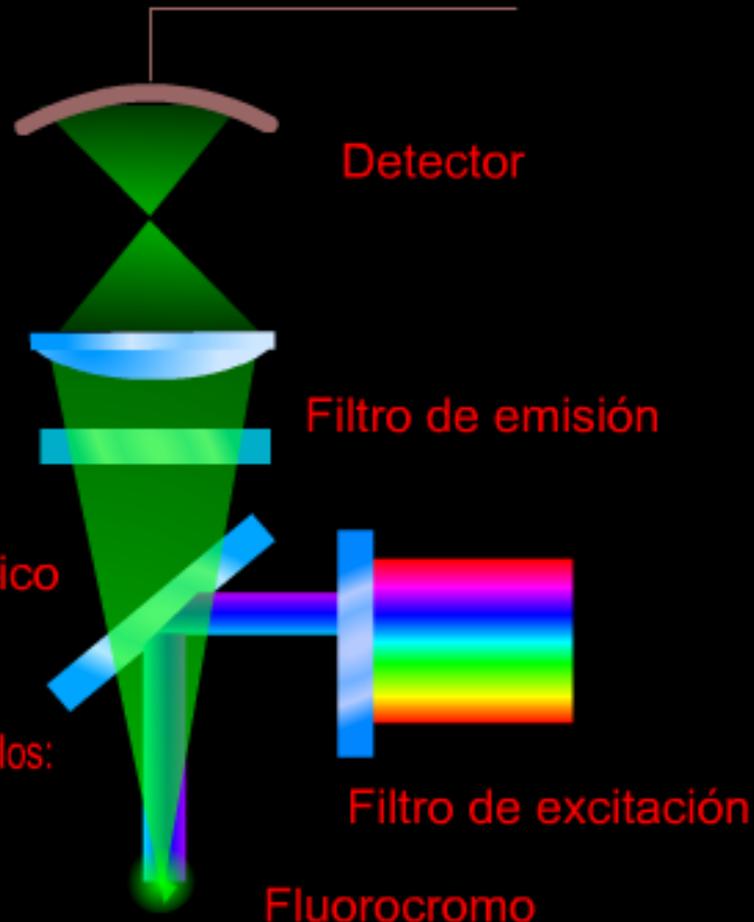
software

# El microscopio de fluorescencia

+ Energía  
- Longitud de onda ( $\lambda$ )



El detector, que suele ser del tipo CCD, transforma la luz que detecta en impulsos electricos que manda al ordenador para componer la imagen



Pulse sobre los elementos para verlos:

- Filtro de excitación ✓
- Dicroico ✓
- Filtro de emisión ✓
- Detector ✓

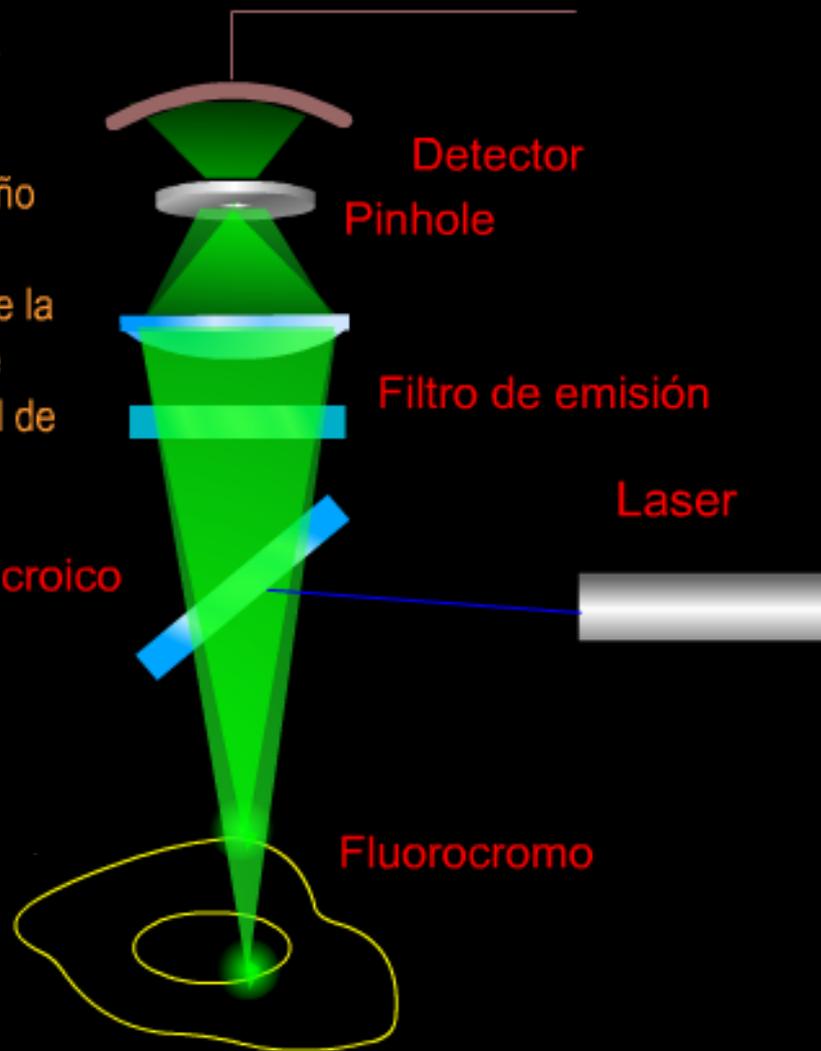
# ¿Cómo funciona un confocal?

+ Energía  
- Longitud de onda ( $\lambda$ )



A vertical color scale bar ranging from red at the bottom to purple at the top, with yellow and green in the middle. It is labeled with '+ Energía' at the top and '- Longitud de onda ( $\lambda$ )' on the left. A small '+' sign is at the bottom left of the bar.

El pinhole es un pequeño agujerito delante del detector que impide que la luz pase procedente de otros planos distintos al de interés.



Láser ✓

Pinhole ✓

# Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

## Cuantificación

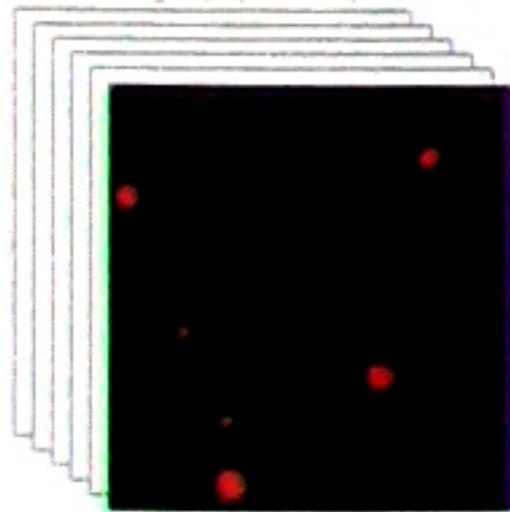
Es posible con CLSM + software (*daime*<sup>®</sup>)

Daims H, Lücker S, Wagner M. 2006. *daime*, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research. Environ. Microbiol. 8: 200-213.



## FISH con una sonda específica + EUBmix

Imagen de la señal de la sonda específica (población diana)

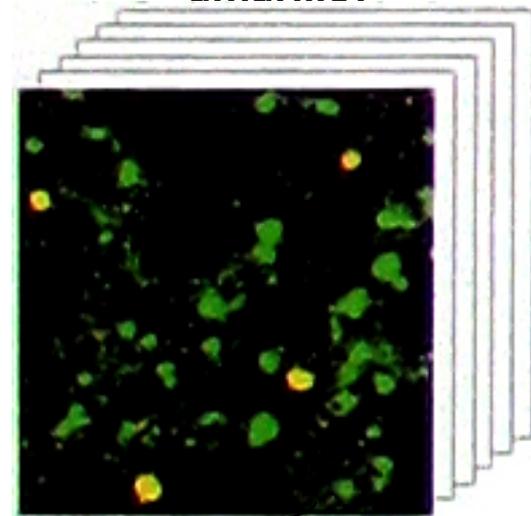


20-30 pares de imágenes



Tomadas en posiciones x-y-z al azar

Imagen de la señal de la sonda EUBmix (población diana en amarillo)

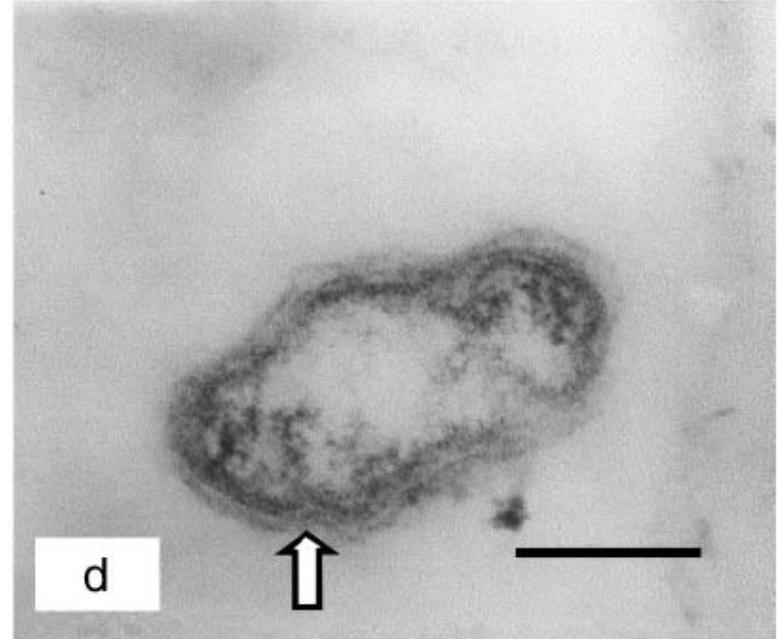
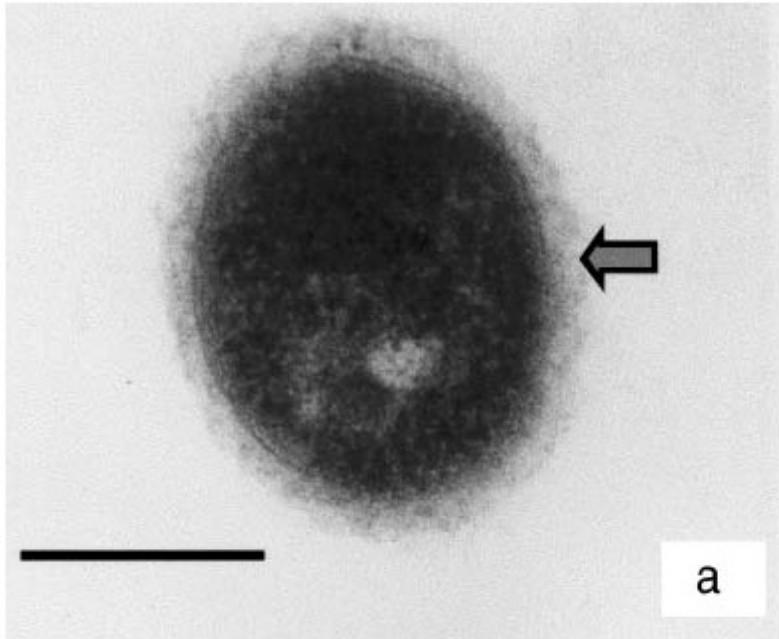


Área relativa de la población diana medida en cada par de imágenes

Media del área = fracción de biovolumen de la población diana

*Flavobacterium psychrophilum*

(Vatsos et al. 2003, Dis Aq Org 56:115)



Tras 3 días de cultivo

Tras 16 semanas de cultivo

Poblaciones **activas** de bacterias

→ Síntesis proteica → alto nivel de ARNr

→ Señales de FISH muy potentes

Células bajo déficit nutricional  
Células bajo estrés ambiental

→ Bajos niveles de ARNr

→ Señales de FISH débiles

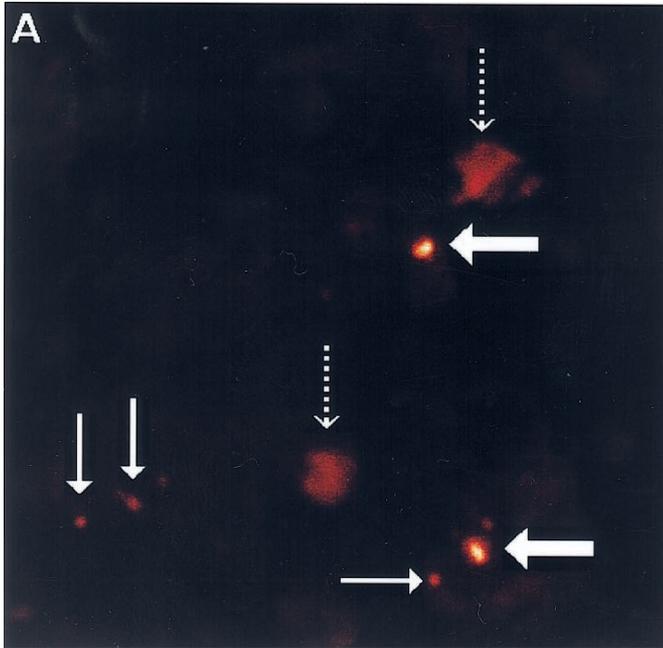
Células en fase de muerte

→ Sin niveles detectables de ARNr

→ Sin señales de FISH

## Bacterias del suelo

(Christensen et al. 1999, AEM 65:1763)



Sonda de FISH marcada (color rojo)



Bacterias activas



Bacterias inactivas



Artefactos

OJO: Intensidad NO siempre = actividad

Poblaciones **activas** de bacterias

→ Síntesis proteica → alto nivel de ARNr

→ Señales de FISH muy potentes

Células bajo déficit nutricional  
Células bajo estrés ambiental

→ Bajos niveles de ARNr

→ Señales de FISH débiles

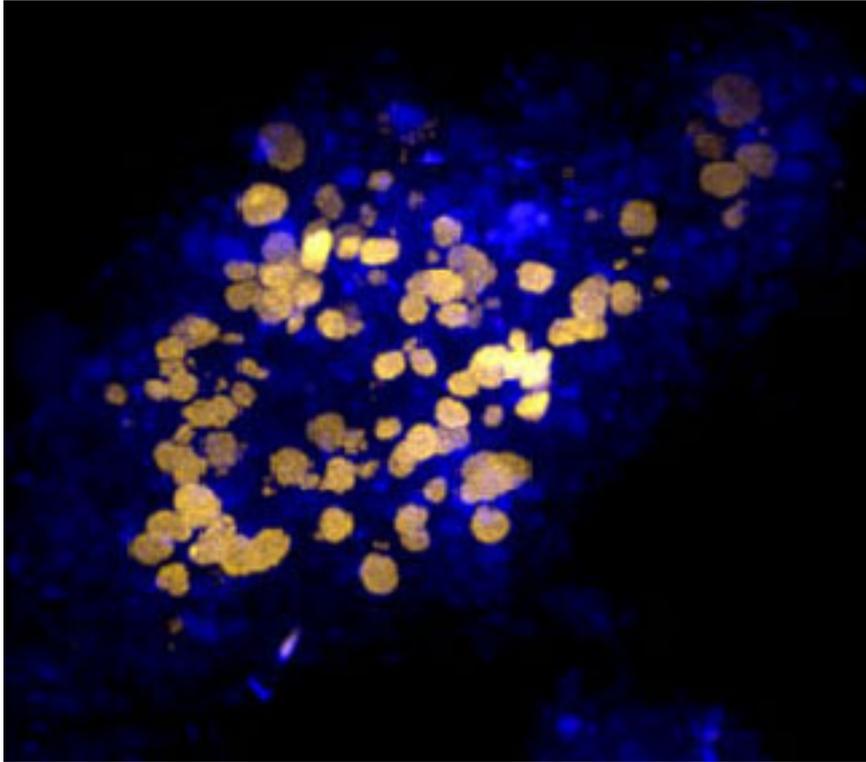
Células en fase de muerte

→ Sin niveles detectables de ARNr

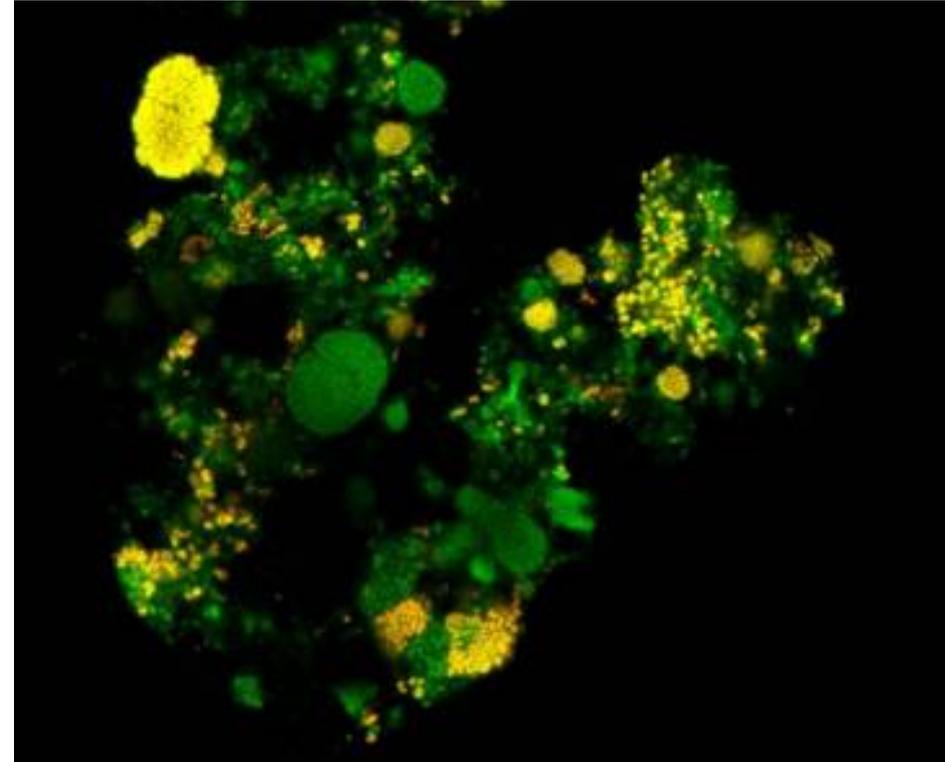
→ Sin señales de FISH

# Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

Examen: microscopía de epifluorescencia o láser confocal



*Nitrosococcus* sp. : amarillo (CY3)  
resto de bacterias: azul (DAPI)



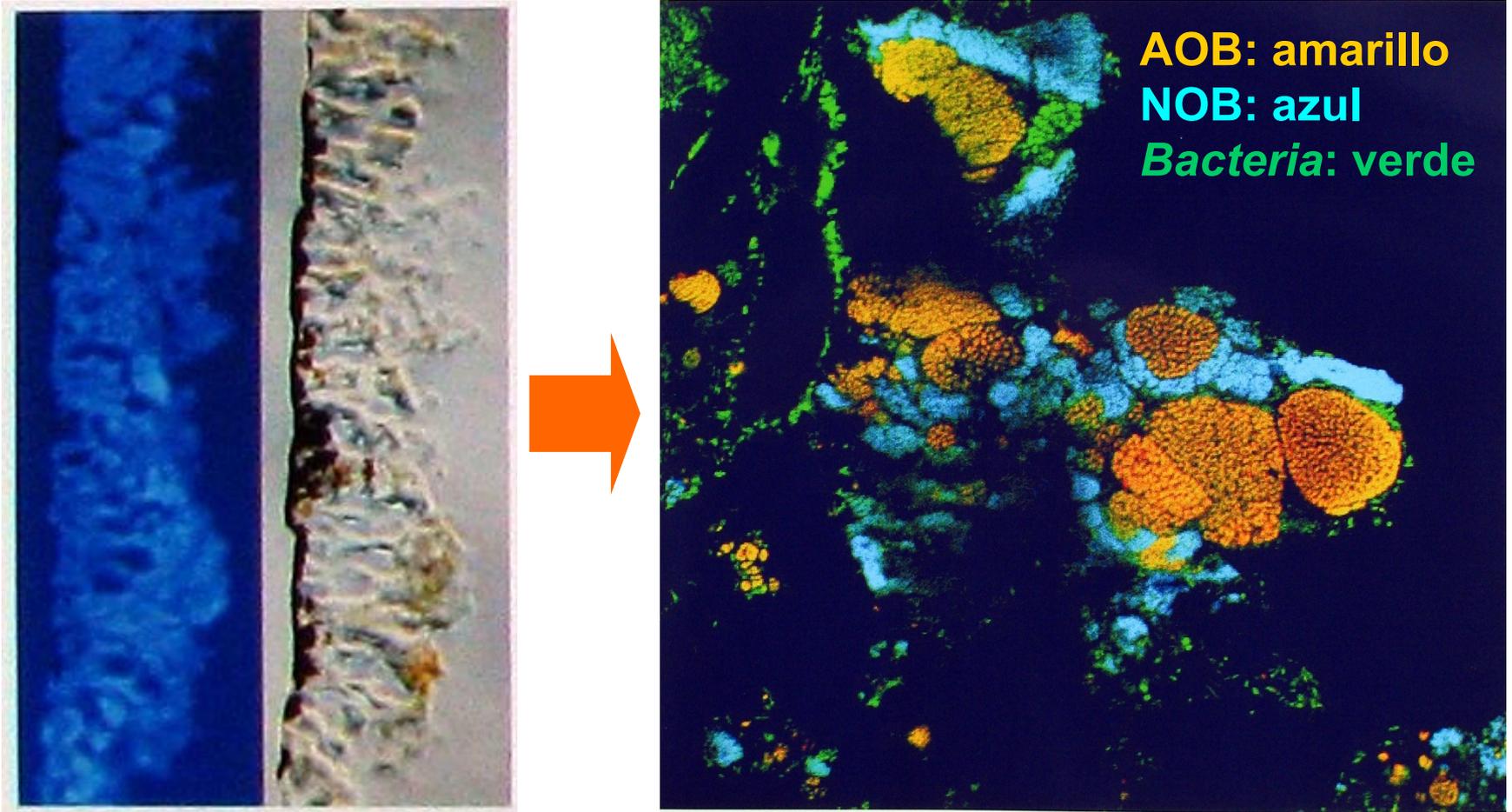
*Nitrosomonas* spp.: amarillo (CY3)  
resto de bacterias: verde (FLUOS)

La **cuantificación** es posible con CLSM y software ([daime<sup>®</sup>](#))

Almstrand et al., ASPD conference 2009

# Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

Diversidad de bacterias nitrificantes (oxidadoras de amonio y nitrito) en filtros sumergidos.



# Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

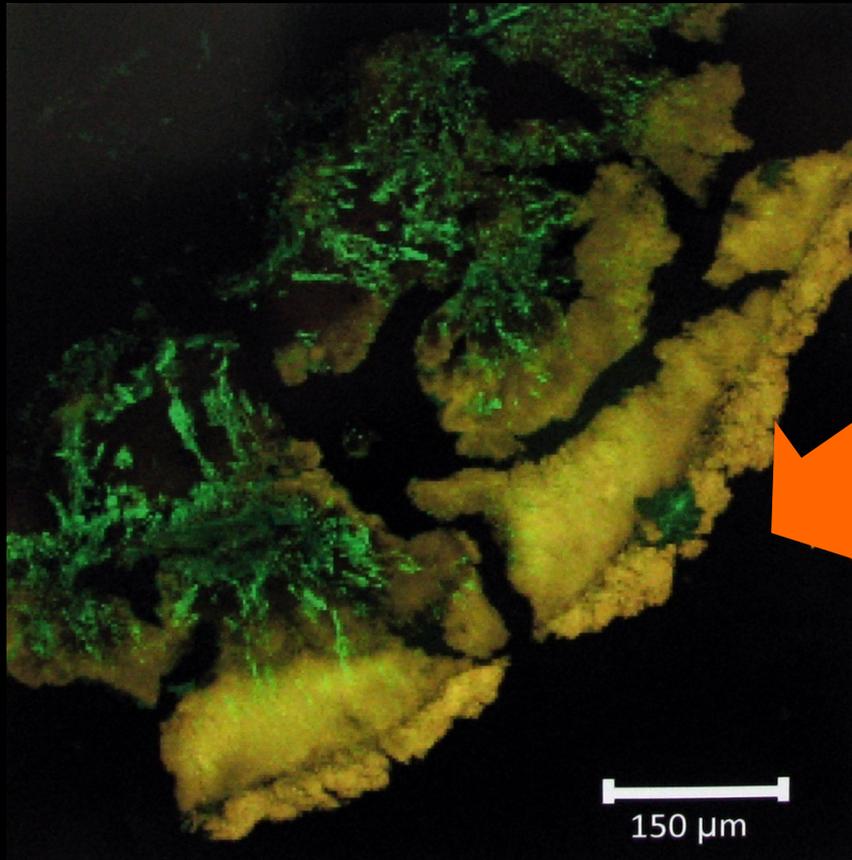
Diversidad de bacterias oxidadoras de amonio y anammox en un reactor granular.

*Figuroa et al., ASPD conference 2009*

85 días, superficie de los  
gránulos

NEU653: color amarillo

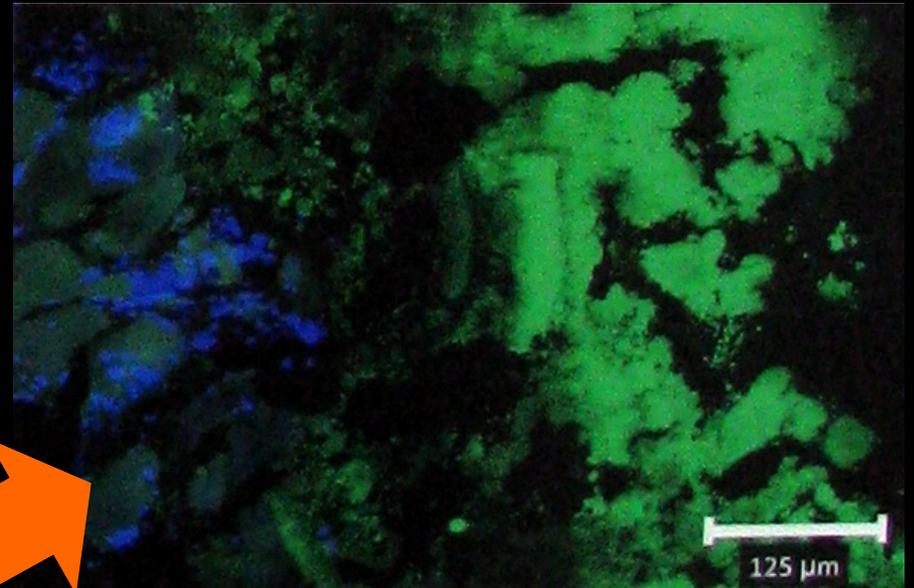
EUBmix: color verde



250 días, 400 μm profundidad  
dentro de los gránulos

NEU653: color verde

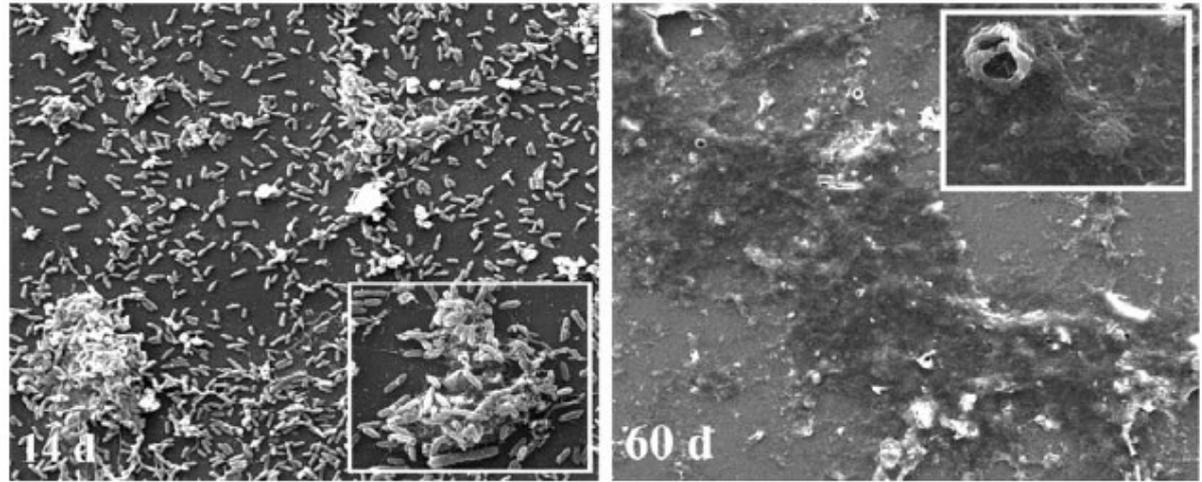
AMX820: color azul



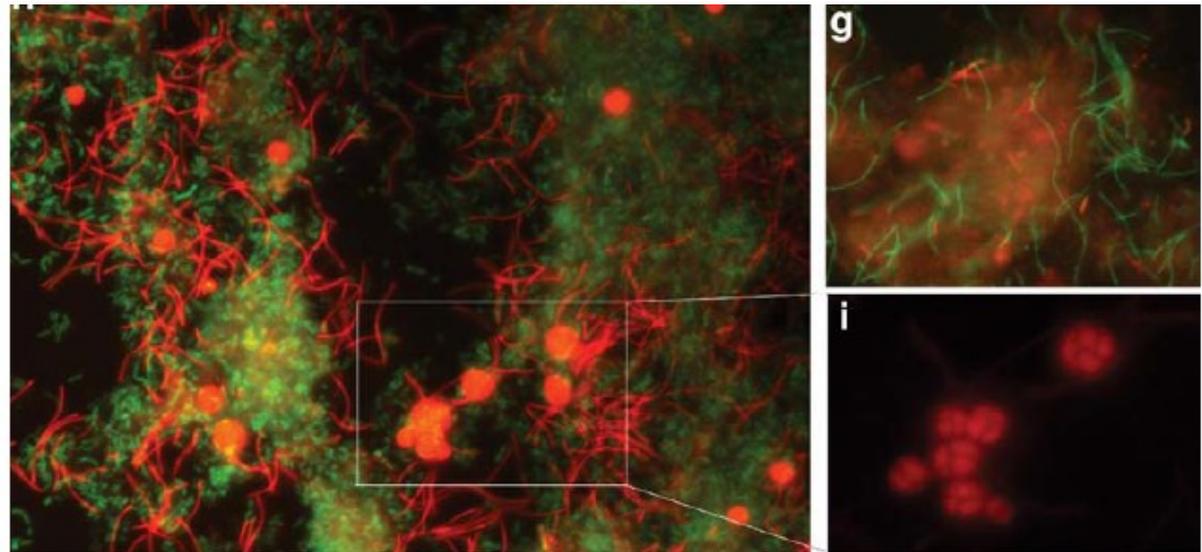
# Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

## Desarrollo de biopelículas en un tratamiento anaeróbico de agua residual urbana

SEM

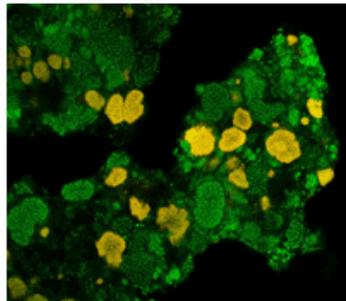
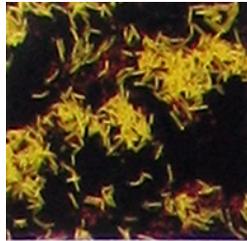
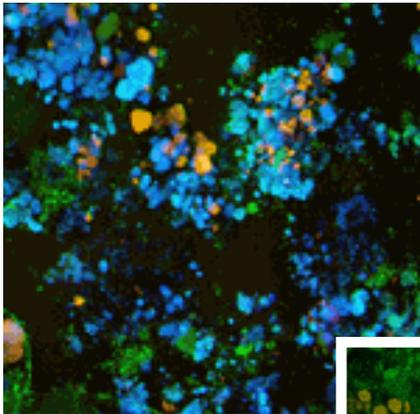
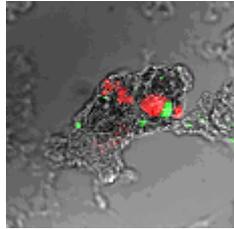


Sondas:  
Verde: eubacteria  
Rojo: arqueas



(Fernández et al., 2008, *Microbial Ecology* 56:121)

# Variantes de la técnica FISH aplicables en microbiología ambiental



**CARD-FISH**

**MICRO-CARD-FISH**

**Clone-FISH**

**Expression-FISH (ARNm-FISH)**

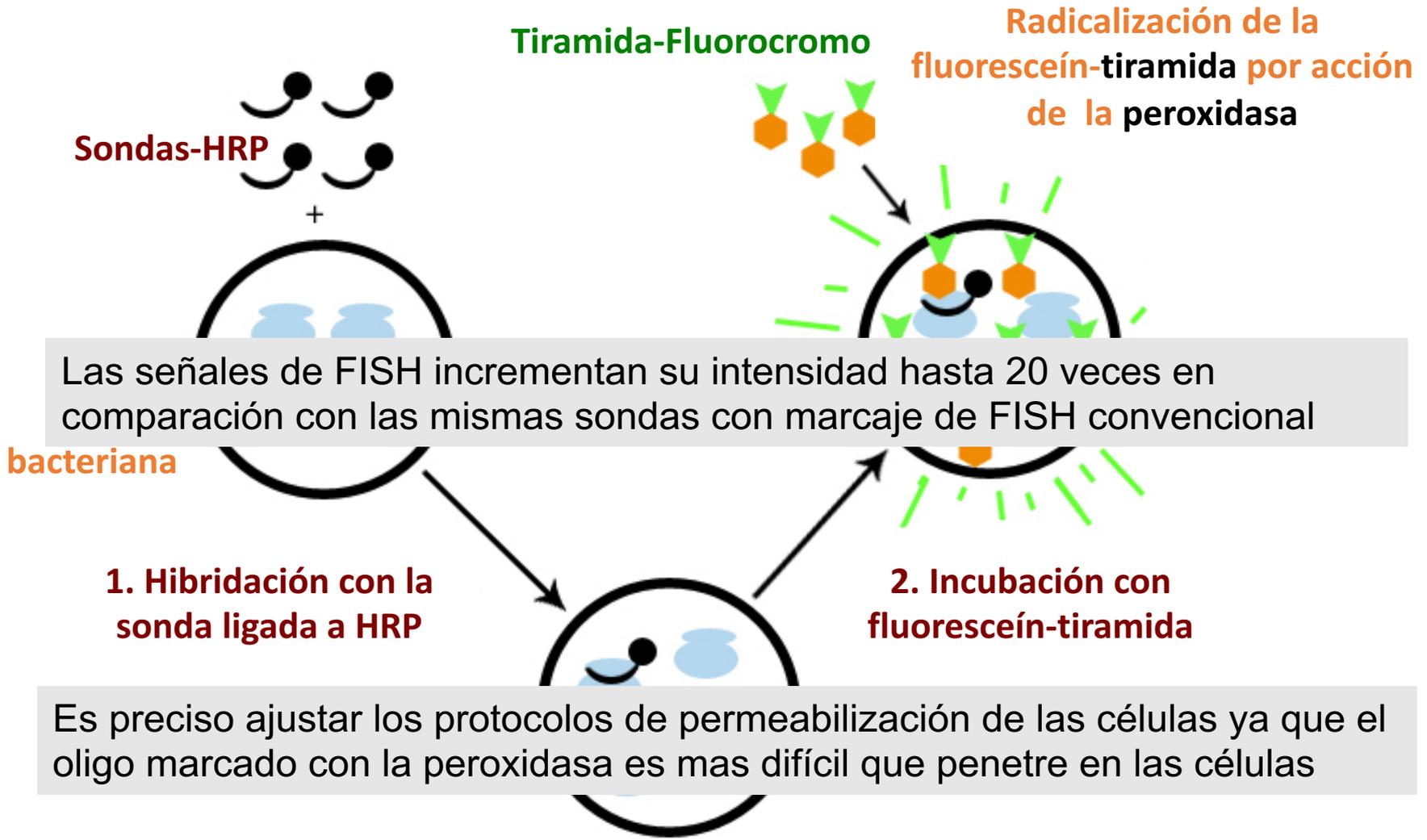
**FISH-MAR**

**Rainbow-FISH**

**Raman-FISH**

**Ring-FISH**

# Card-FISH



CARD: catalyzed reporter deposition

HRP= peroxidasa de rábano (horse radish)

## **CARD-FISH**

-técnica de marcaje alternativa.

-los oligos específicos van marcados con la peroxidasa de rábano (HRP) (unión covalente).

-Cuando usamos estos oligos, la tinción fluorescente es resultado de una segunda incubación con tiramida marcada con fluorocromos.

-Las moléculas de la peroxidasa específicamente unidas a los ribosomas catalizan la deposición de los compuestos reporter marcados en el interior de las células diana de la sonda, pues la tiramida es el sustrato de la peroxisada HRP.

-Las señales de FISH incrementan su intensidad hasta 20 veces en comparación con las mismas sondas con marcaje de FISH convencional.

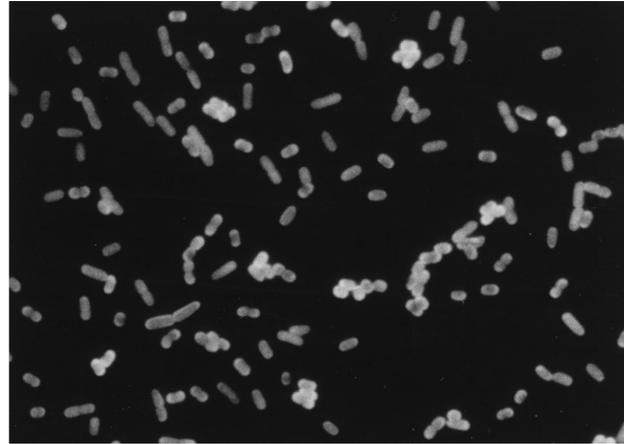
Sin embargo, es preciso ajustar los protocolos de permeabilización de las células ya que el oligo marcado con la peroxidasa es mas difícil que penetre en las células.

# Card-FISH

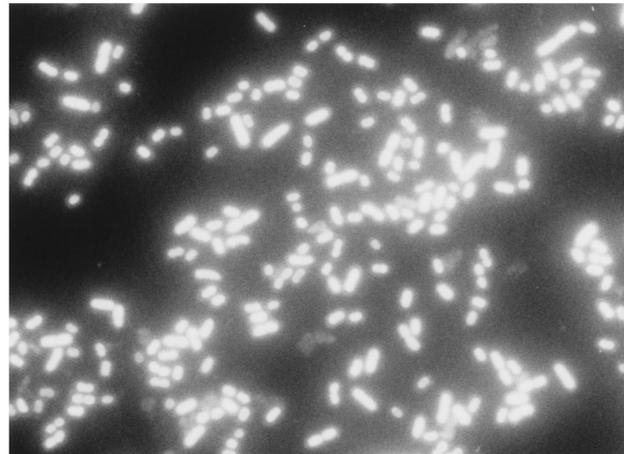
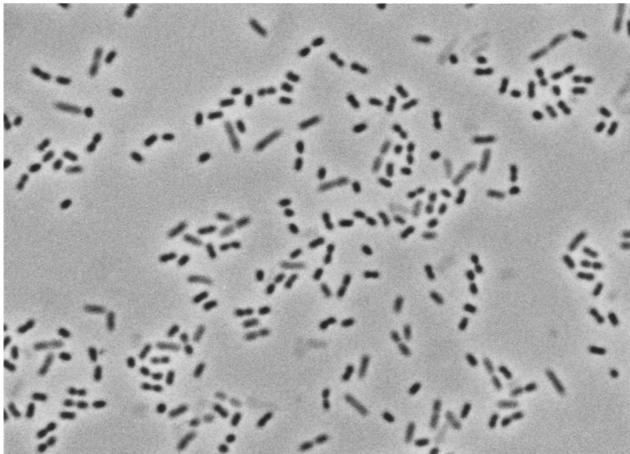
Microscopio de  
contraste de fases



Microscopio confocal



**FISH estándar**



**CARD-FISH**

**>20 x intensidad**

# FISH VERSUS CARD FISH

	FISH ESTÁNDAR	CADR-FISH
VELOCIDAD	>1 h	2 días
Pasos de lavado	>3	10
Pérdida de biomasa	poca	mucha
costo	50-200 euros	Más de 400 euros
Tiempo de almacenamiento	ilimitada	Aprox. 6 meses
Mezcla con sondas simultáneamente	>3	1
enzima	-	Peroxidasa

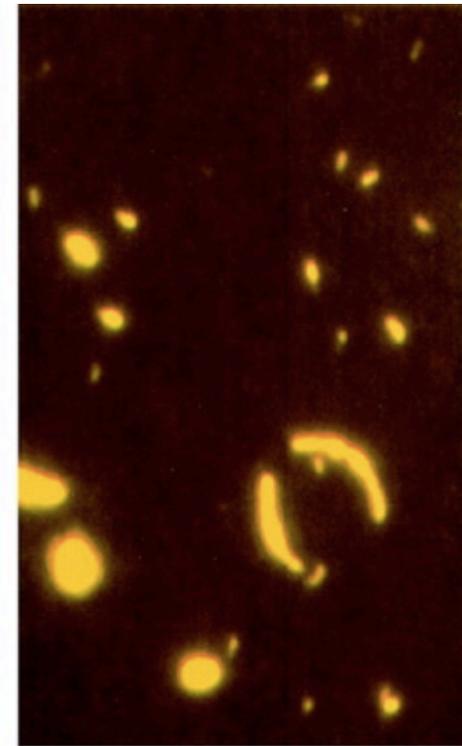
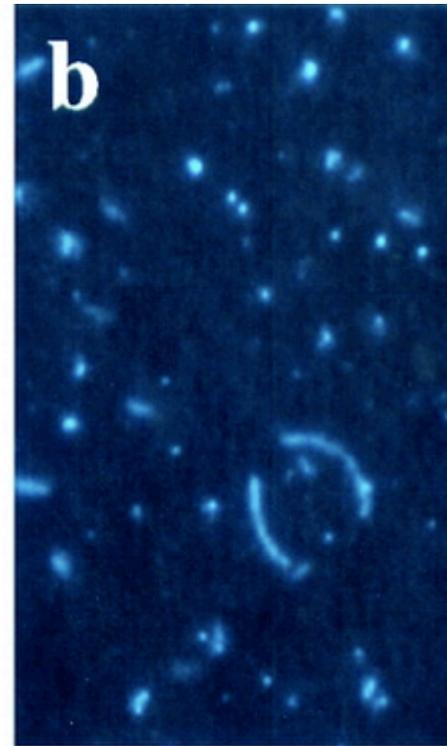
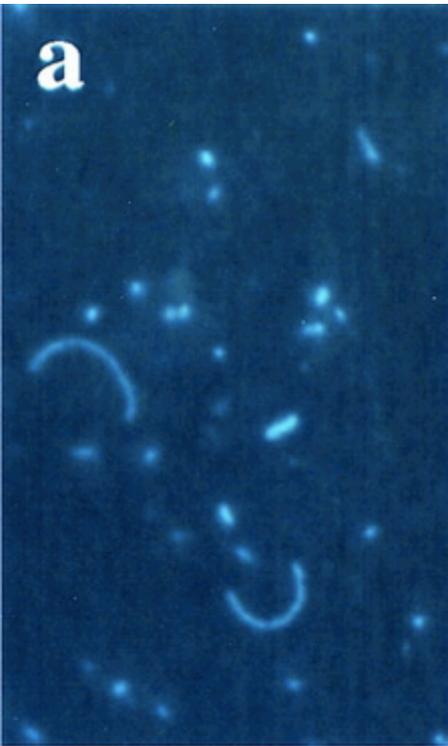
# Comparación entre FISH & CARD-FISH

DAPI

FISH  
Probe EUB338

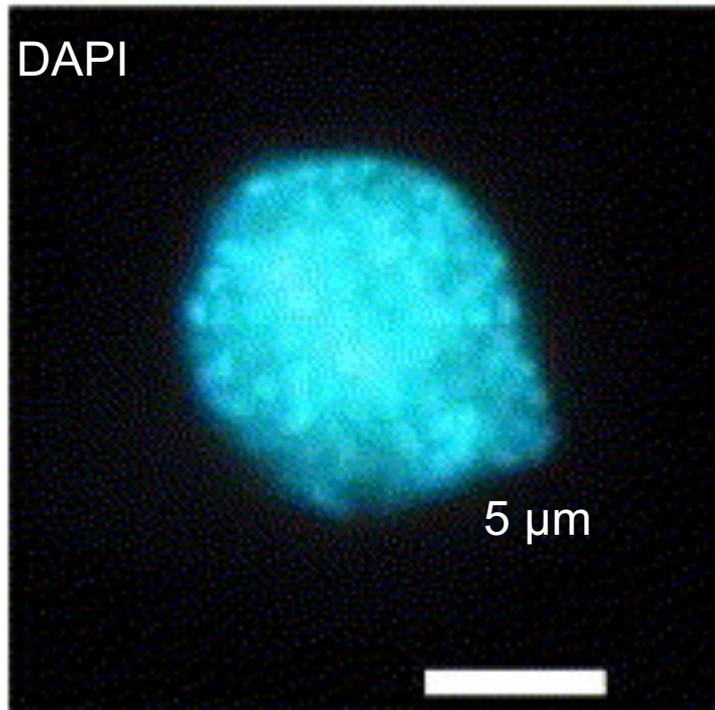
DAPI

CARD-FISH  
Probe EUB338

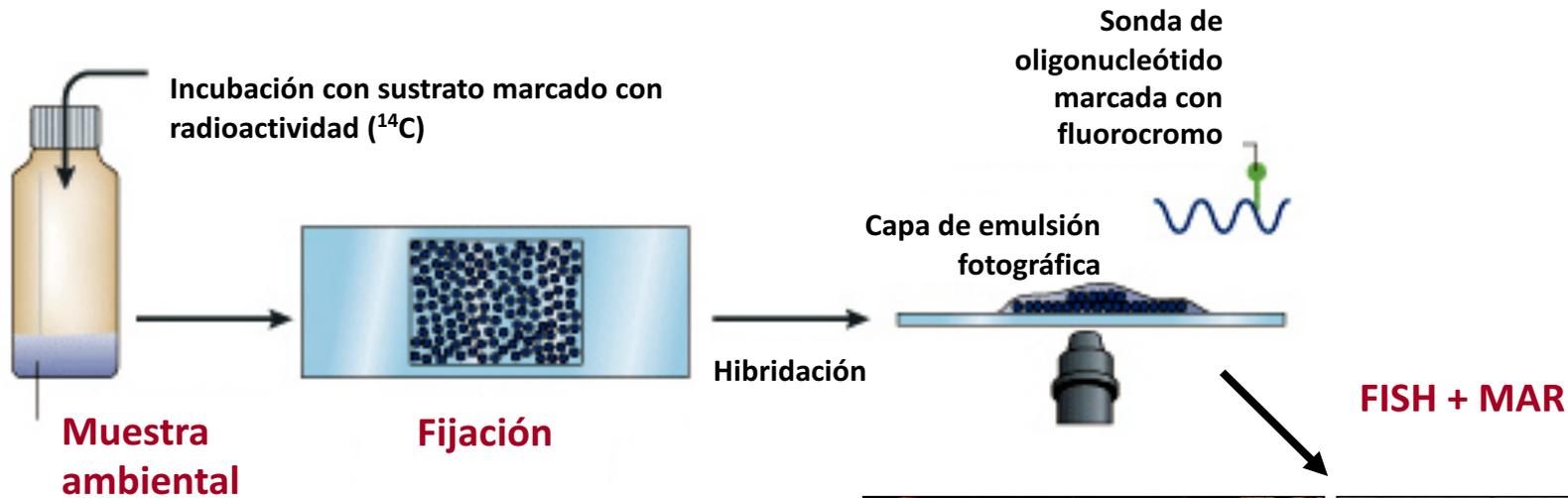


# Aplicación: bacteria y archaea de sedimentos marinos

- Oxidación anaerobia de metano
- Acopladas a sulfato reductoras
- “Simbiosis” entre Archaea y sulfato reductoras (SRB)



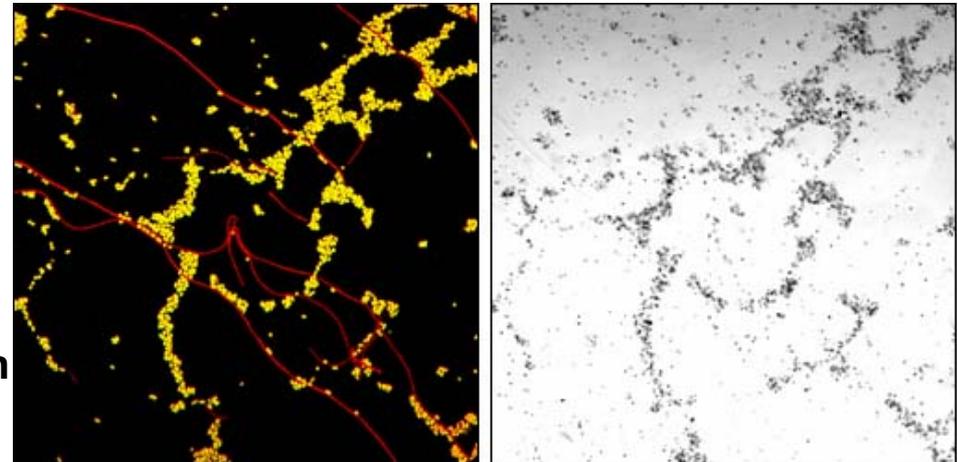
## FISH-MAR



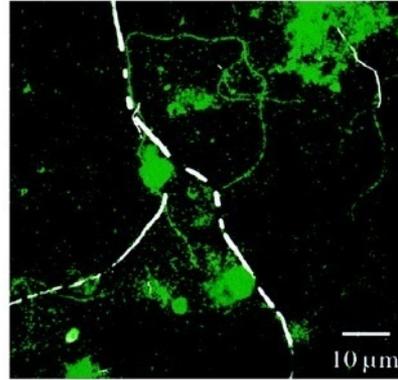
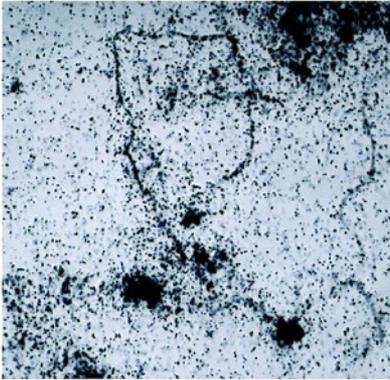
-Los portales se tratan con **emulsión autoradiográfica**, que se deposita sobre las células radioactivas.

-Las muestras se observan con CLSM.

-La **detección fluorescente** más la **detección radioactiva** permiten identificar la población que metaboliza el sustrato marcado.



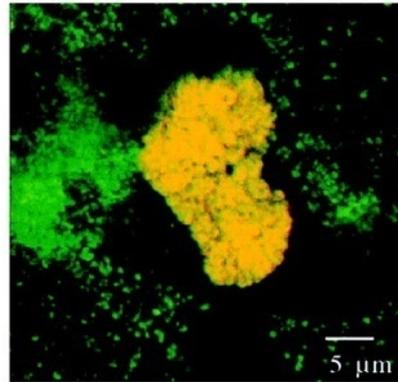
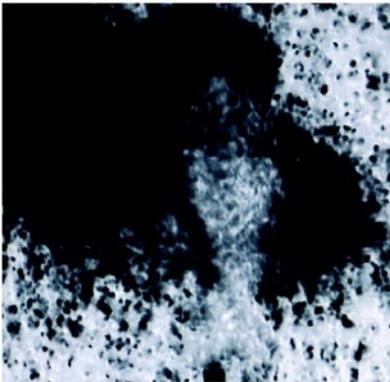
# FISH-MAR para el estudio de comunidades complejas en fangos activos para el tratamiento de aguas residuales



33p

Sondas:

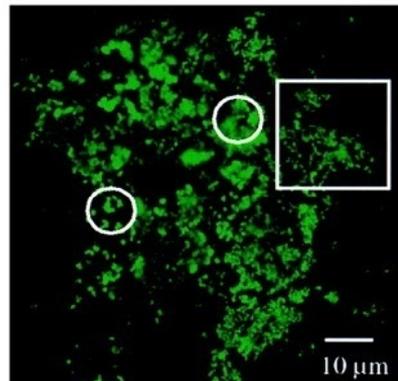
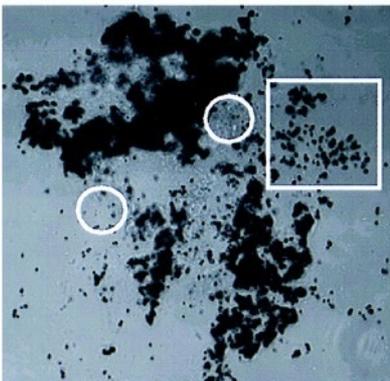
GAM42a (Cy3, blanco en la imagen),  
BET42a (Cy5, verde en la imagen)



<sup>14</sup>C Acetato

Sondas:

*Nitrosomonas europaea* NEU  
(Cy3 + Cy5 amarillo en la imagen),  
BET42a (Cy5, verde en la imagen)



<sup>14</sup>C Acetato

Sonda:

BET42a (FLUOS, verde en la imagen)

# Resumen:

- La combinación de diferentes sondas es posible.
- Ventaja, se detectan células ACTIVAS → rARN...mayor fluorescencia.
- Técnica muy usada para el rastreo de grupos específicos de células o bacterias en comunidades mixtas basados en su rARN.
- ¿Se puede medir el mARN?

Principio muy similar con la técnica de CARD-FISH

Sin embargo es bastante difícil porque:

$t_{1/2}$  mARN es muy inestable

Además de buscar el % óptimo para permeabilizar la célula

## Aplicaciones

### ***Cuantificación***

- Combinando sondas de grupos totales y sondas específicas (o DAPI)
- % concentración o número por superficie o área

### ***Identificación de patógenos***

- Rápida identificación de patógenos en muestras.
- 1 a 4 días más rápido comparado con un cultivo.

### ***Análisis funcional de muestras ambientales***

- FISH & microautoradiography (FISH-MAR)

# Hibridación Southern y Northern

- **Detección de secuencias conocidas de ADN (Southern blot) o ARN (Northern blot) mediante hibridación con sondas específicas marcadas.**

## **Aplicaciones:**

- **Localización de genes (ADN) o de la expresión de genes (mARN) en bacterias o células eucariotas.**
- **Aplicaciones de diagnóstico (pruebas de paternidad, medicina forense).**

## **Ventajas:**

- **Técnica muy sensible y específica.**
- **Más económica que PCR.**

## **Desventajas:**

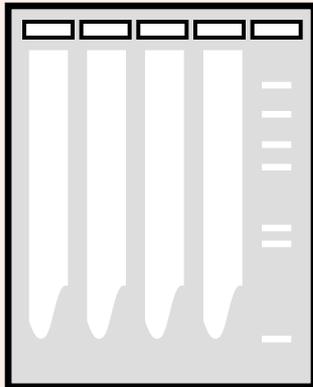
- **Técnica muy laboriosa.**
- **Está siendo desbancada por la PCR.**

# Hibridación ADN-ADN: Técnica Southern-blot

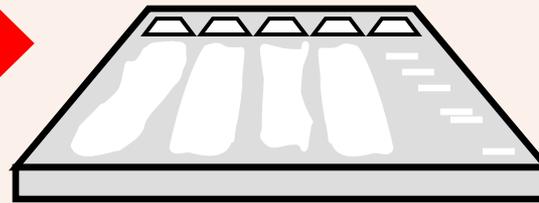
digestión del ADN  
con enzimas de restricción



1 2 3 4 M



Gel de agarosa  
ADNs genómicos cortados  
con enzima de restricción

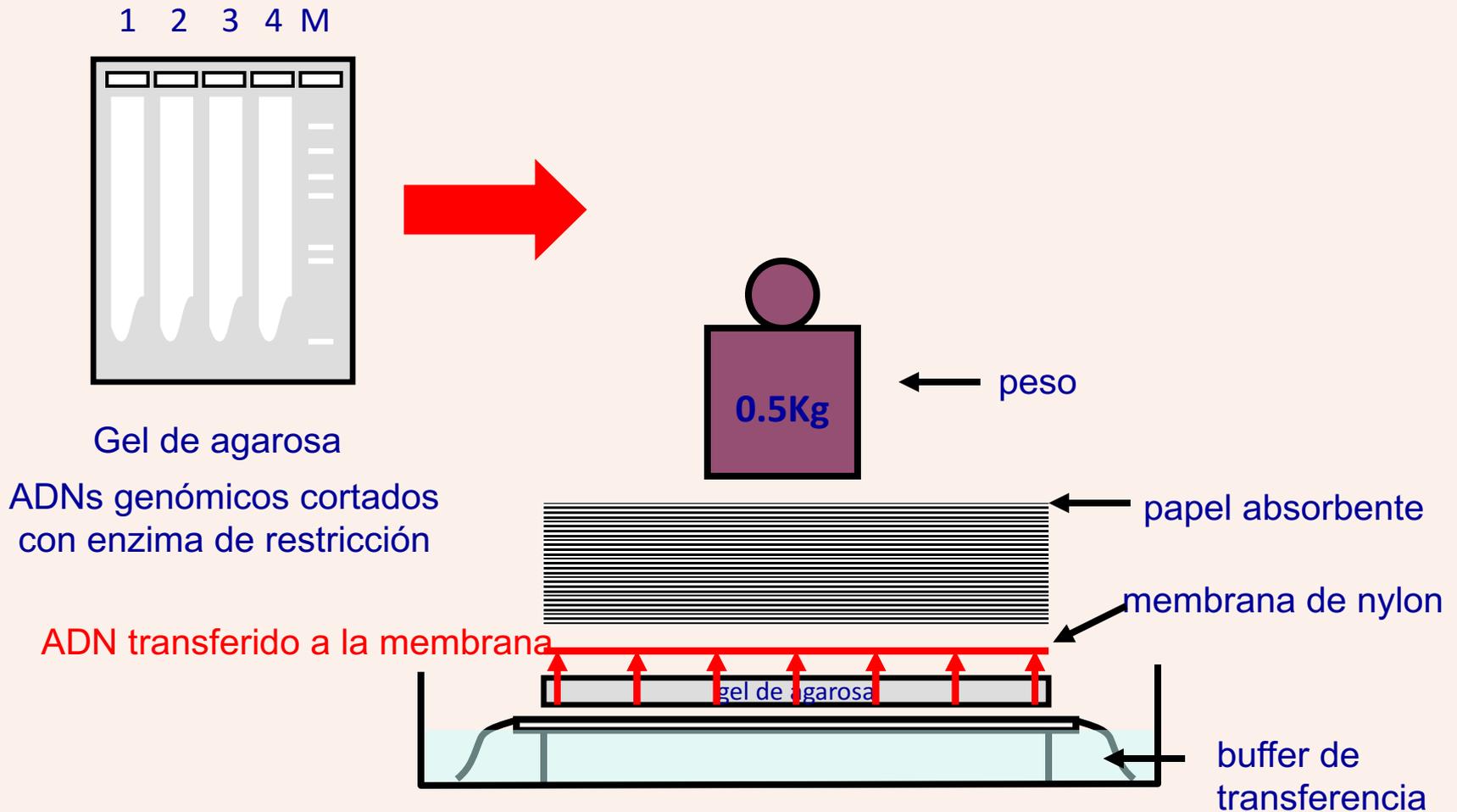


depurinación del ADN  
desnaturalización química

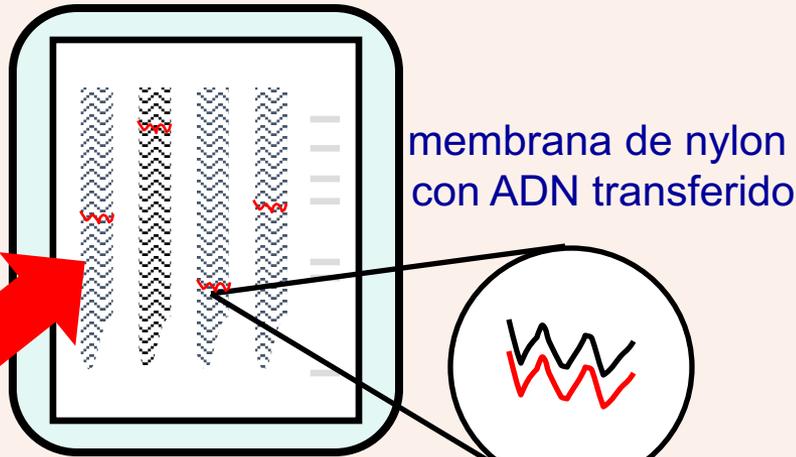


gel de agarosa

# Hibridación ADN-ADN: Técnica Southern-blot



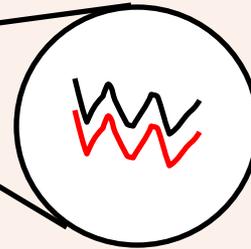
# Hibridación ADN-ADN: Técnica Southern-blot



membrana de nylon  
con ADN transferido

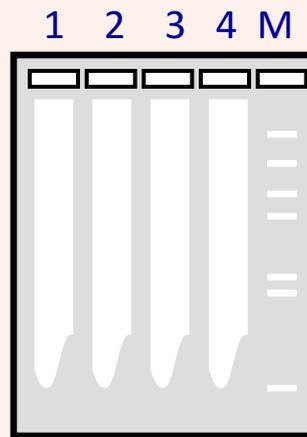
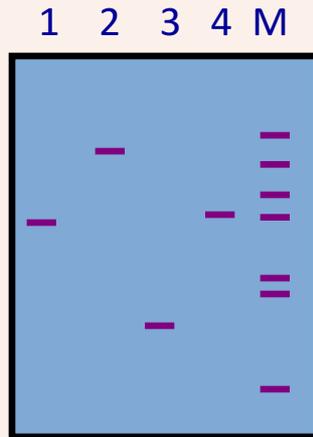


ADN sonda,  
marcado  
con digoxigenina



La sonda hibridará con las  
cadenas de ADN de  
secuencia complementaria

revelado con  
antiDIG más  
reactivo coloreado



Gel de agarosa original