



UNIVERSIDAD DE SONORA



POSGRADO EN BIOCIENCIAS

MICROBIOLOGÍA MOLECULAR (2442)

UNIDAD 8: Citogenética Molecular

Elaboró: Dra. Kadiya del C. Calderón Alvarado

Contenido

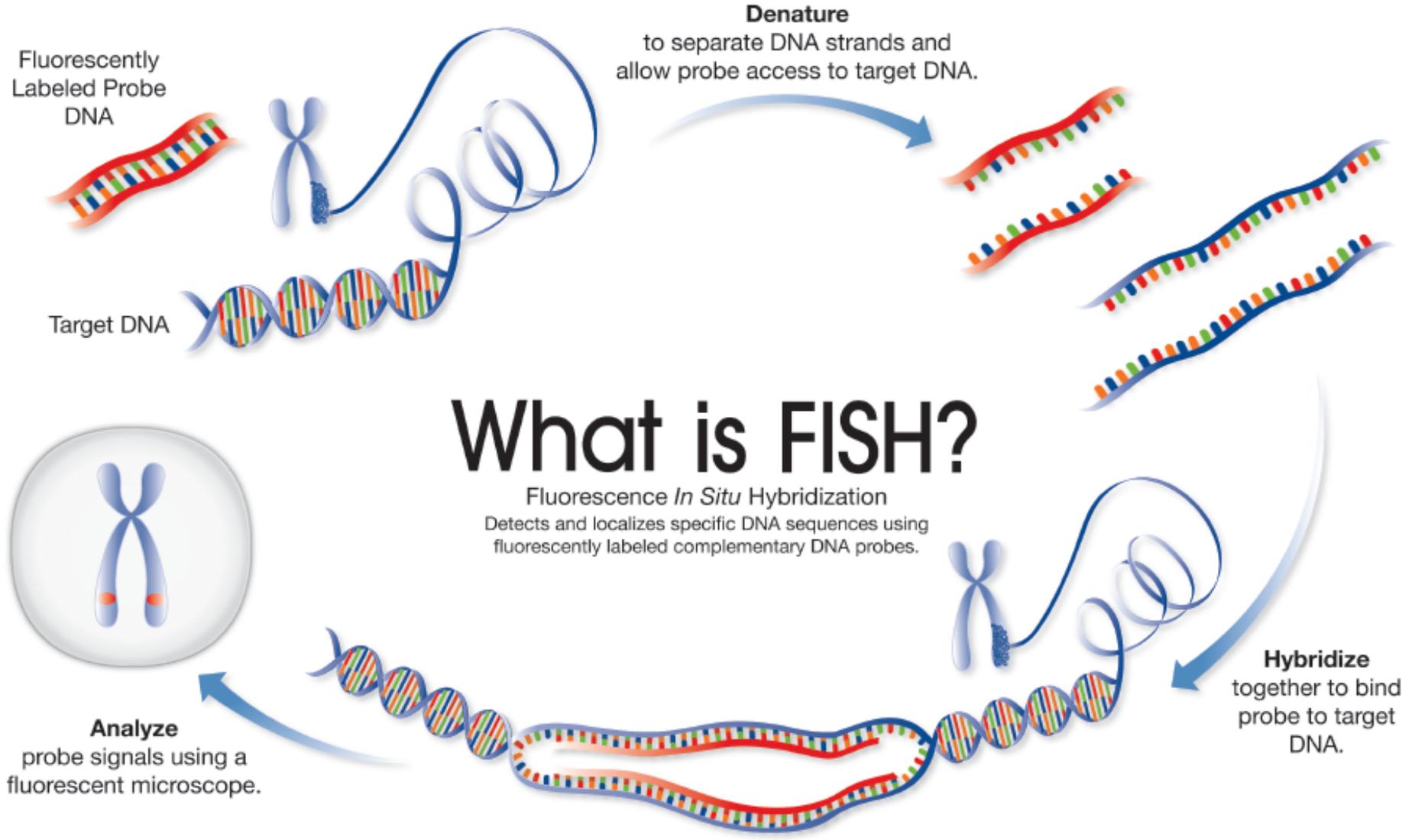
1. Hibridación in situ (FISH): aplicaciones e inconvenientes
2. Chips o microchips de ADN (Microarrays)
3. Hibridación genómica comparativa (CGH)
4. Hibridación genómica comparativa con arrays (aCGH)

Citogenética Molecular

- Consiste en la combinación de biología molecular y citogenética.
- Agrupa un conjunto de técnicas donde la el **ADN se marcadas con diferentes colorantes** que emiten **fluorescencia** para así poder **visualizar** mejor las regiones específicas del **genoma** que se quiera.



Tejidos, células, cromosomas y fibras de DNA



What is FISH?

Fluorescence *In Situ* Hybridization
Detects and localizes specific DNA sequences using fluorescently labeled complementary DNA probes.

Aplicaciones de la técnica de FISH

Muestras
clínicas

Ambientes
acuáticos

Plantas de
tratamiento
residual

Biorremediación

Simbiosis

Aún cuando FISH es una técnica **bastante específica** y sus resultados son **altamente confiables**, es necesario tener en cuenta algunos aspectos importantes:

Inconvenientes

Autofluorescencia	M.O, desechos inorgánicos, material que rodea célula
Especificidad de la sonda	Fabricadas en laboratorios especializados / control positivos y negativos
Dificultad de la sonda al sitio diana	Penetración insuficiente de la sonda por tipo de m.o (Ej. Gram -) / lisozima
Estructuras de orden superior	Formación de horquillas, proteína-ARNr impide la hibridación /
Bajo contenido de ARNr	Estado fisiológico
Pérdida de fluorescencia	Degradación paulatina por la intensidad de la luz / Marcadores fotoestables
Uso de sondas bacterianas universales	Falsos negativos/ EUB 338 eubacterias, NON 338, sondas coadyuvantes no marcadas

Chips y microchips (microarrays) de ADN

CHIP de ADN: conjunto **ordenado (array)** de hebras sencillas de ADN, unidas a una superficie, de manera que un grupo de genes de interés, o incluso el genoma completo de un organismo, o el metagenoma de un entorno, está representado:

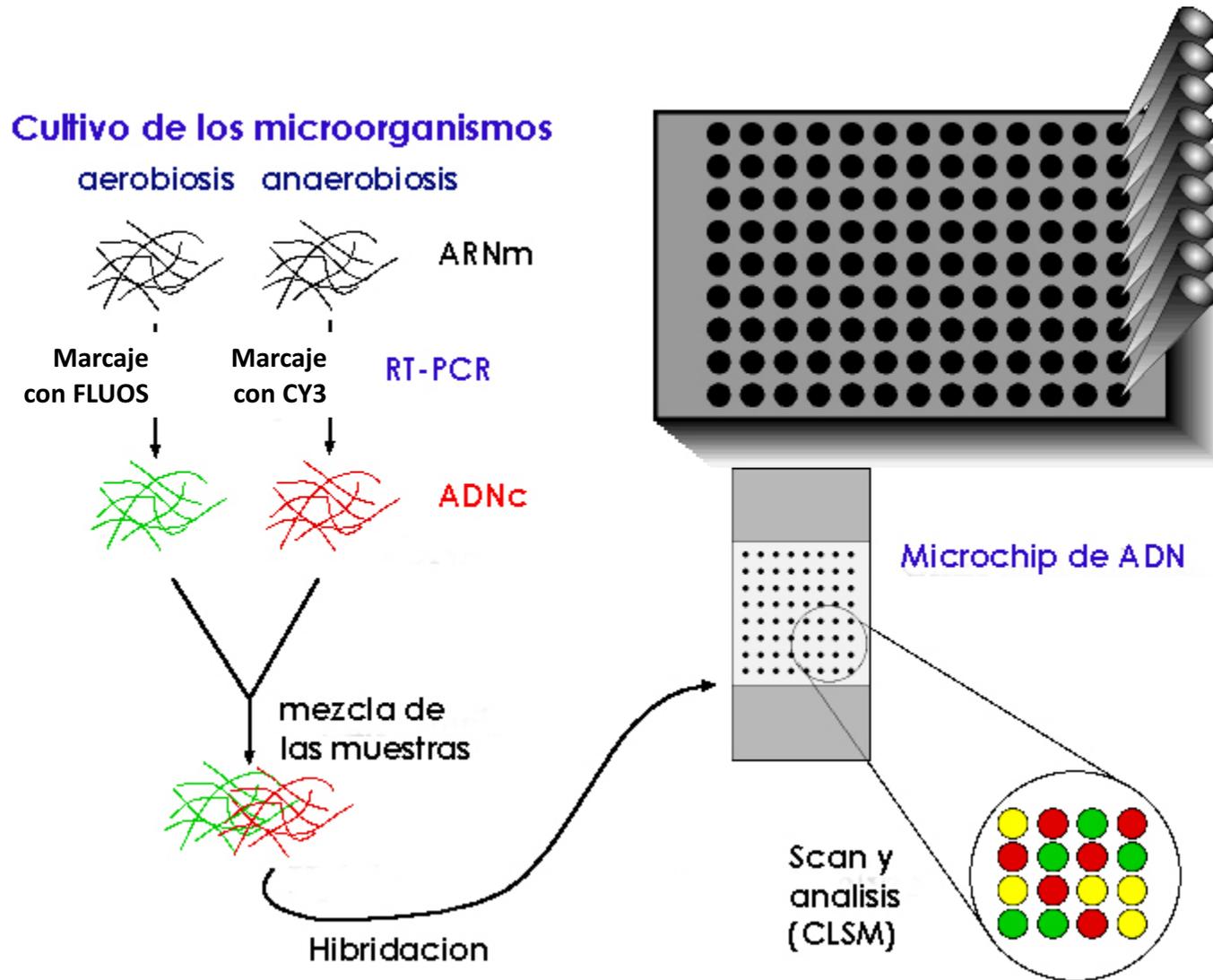


Miles de pequeños puntos
conteniendo secuencias de ADN
conocidas



- Técnica → emparejar cada hebra de ADN con su complementaria, si ésta se halla presente en una determinada muestra.
- Cuando dos hebras complementarias se encuentran, se unen entre ellas (hibridación).
- Si una de las hebras está marcada mediante un colorante fluorescente, es muy sencillo detectar aquellas hebras de ADN que han hibridado entre sí.
- Como cada hebra del chip es conocida, se puede identificar qué moléculas de ADN estaban presentes en la muestra.

Chips y microchips (microarrays) de ADN



Tipos de chips útiles en estudios de ecología y biorremediación:

- *Arrays* de oligonucleótidos filogenéticos: contienen secuencias signatura (=identificativas) del ARNr de **grupos específicos** de organismos.
- *Arrays* de genoma de comunidades: contienen secuencias signatura muy específicas de **genes de especies cultivadas**.
- *Arrays* de genes funcionales: contienen dominios conservados de **genes involucrados en rutas metabólicas específicas** de los ciclos de los elementos (C, N, S y metales)

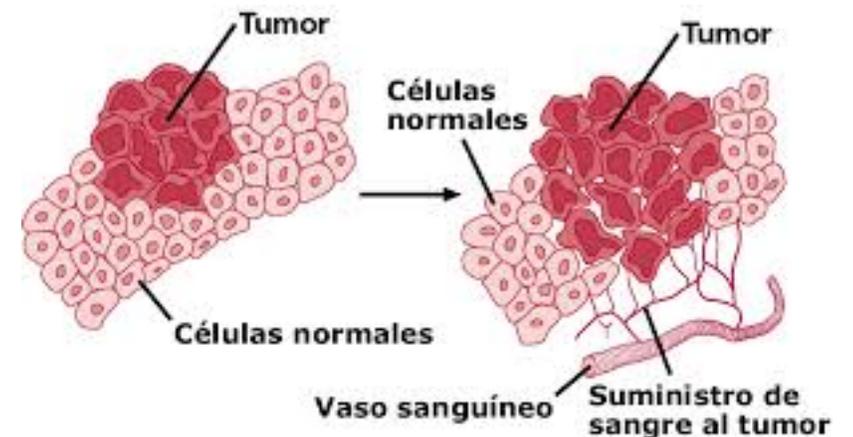
<https://www.youtube.com/watch?v=0ATUjAxNf6U>

Hibridación genómica comparativa (CGH)

Se desarrolló para el análisis del **genoma completo** del número de copias de la secuencia de ADN en un único experimento.

Recientemente, se ha utilizado para facilitar las **comparaciones de genomas de bacterias no secuenciadas** con el fin de buscar genes característicos o regiones cromosómicas relacionadas con fenotipos únicos.

1992 Kallioniemi et al., reportaron el primer análisis de CGH en la Universidad de California,

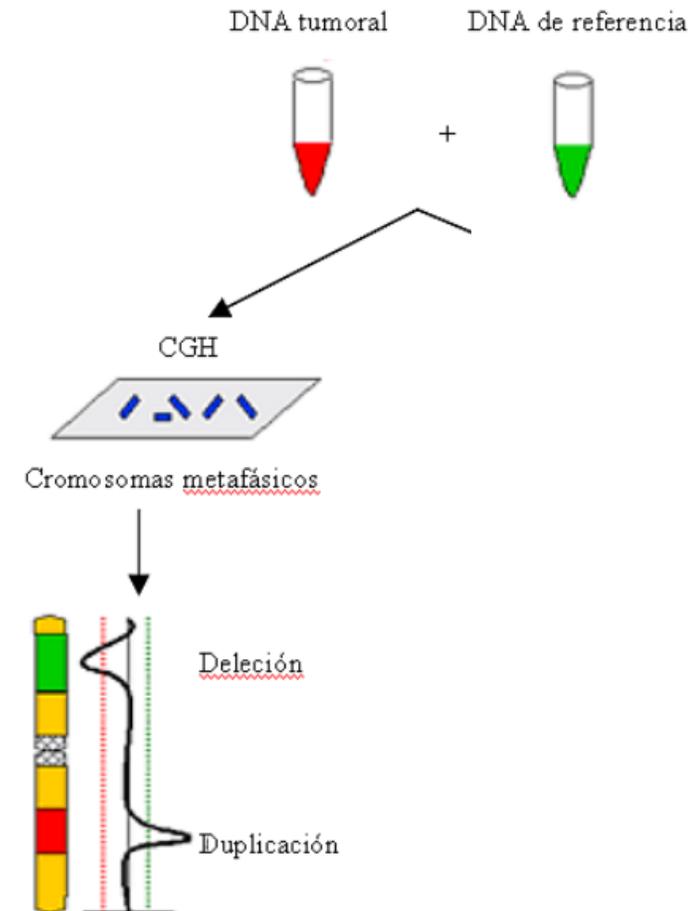


- ✓ Permite identificar y analizar alteraciones genéticas del tipo de **ganancia o pérdida** de material genético en una muestra de ADN en comparación con una muestra de referencia.
- ✓ Permite la exploración de los 46 cromosomas humanos en un solo **ensayo experimental**
- ✓ Permite la identificación de genes o regiones cromosómicas responsables de un fenotipo determinado.

Resolución de 5 – 10 mega bases

¿En qué se basa la técnica?

- ✓ Utiliza **dos colores para marcar la muestra a estudiar** junto a un ADN de referencia, que es hibridado con **cromosomas en metafase**.
- ✓ Las imágenes fluorescentes son capturadas por una cámara digital conectada al microscopio, con filtros ópticos para capturar la fluorescencia.
- ✓ El cambio **en el número de copias en el genoma relativo al normal** está basado en las diferencias en la intensidad de la fluorescencia a lo largo de los cromosomas.
- ✓ La relación de intensidad entre las dos señales fluorescentes proporciona una medida de la relación entre el número de copias de las dos muestras de ADN genómico.



Extracción del ADN de la muestra

1. Muestra está fresca o congelada (baja tasa de degradación)
2. Muestra está fijada con formalina o parafina (parcialmente degradada y entrecruzada)
3. Kits de extracción comerciales

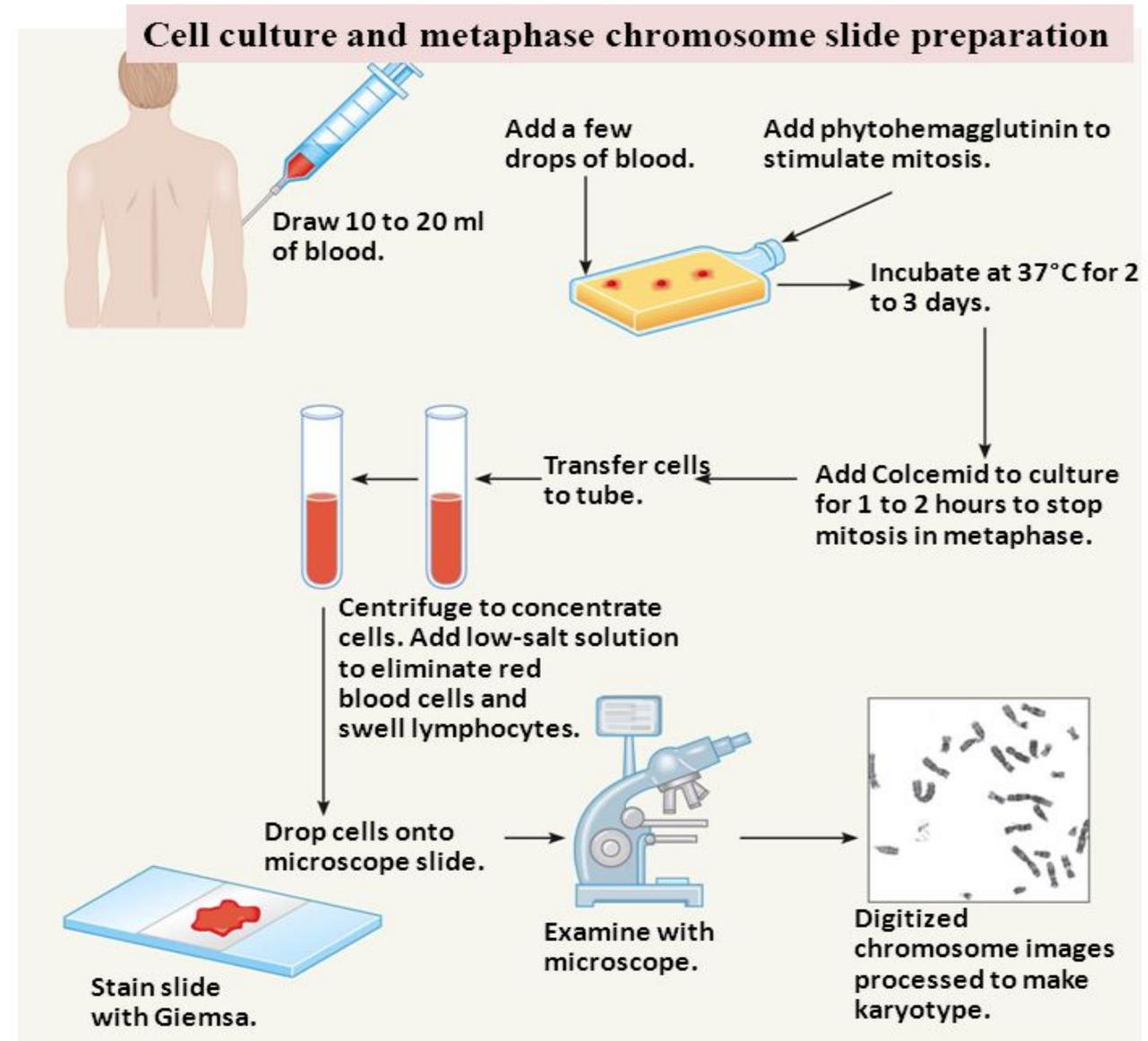
Contaminación o dilución de la muestra con células normales

1. El efecto en los resultados de CGH será que la relación de verde a rojo se desplaza hacia 1.0
2. Anomalías en los cromosomas no se detecten
3. Citometría de flujo (eliminar células inflamatorias)
4. Microdissección de una área del tumor

Consideraciones

Preparación de los portas con los cromosomas en metafase

1. Linfocitos de sangre periférica de mujeres sanas (XX)
2. Baja cantidad de citoplasma (florescencia fondo / desnaturalización)
3. Baja densidad celular pero con alto índice mitótico
4. Adecuar a un largo de 400-550 bandas
5. Colchicina → colcemid (***N*-methyl-*N*-deacetyl-colchicine**)



Oscuros, no brillantes, microscopio de contraste

Cantidad de ADN

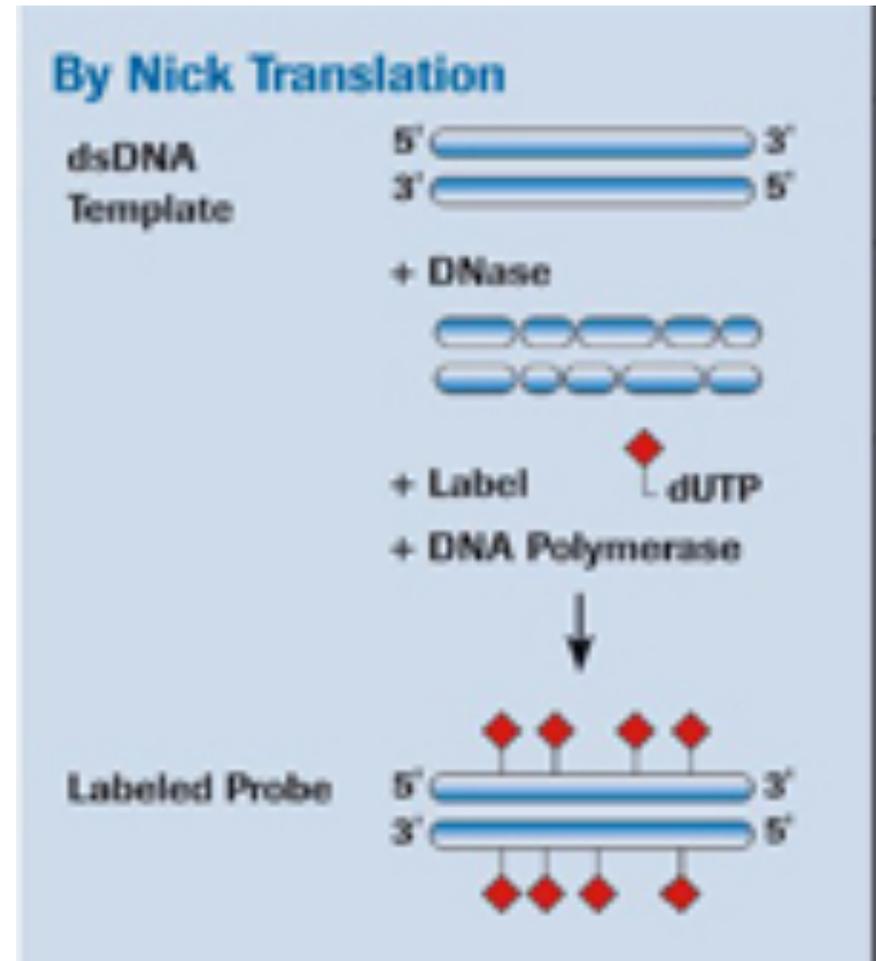
- 0.5-1 ug de ADN
- Se puede realizar amplificación del ADN de muestra y referencia

Marcaje del ADN (Nick traslation)

1. Marca y fragmenta el ADN (500-1500 pb)
2. Marcaje se checa mediante la detección de fluorescencia
3. Tamaño del ADN mediante electroforesis 1 % de agarosa

Bloqueo de secuencias repetitivas cortas y variables

1. Interfieren con el análisis
2. ADN no marcado Cot-1 para el bloqueo
3. Eliminar estas regiones (centrómeros y telómeros)



Array CGH:

Mismo principio que CGH pero.....

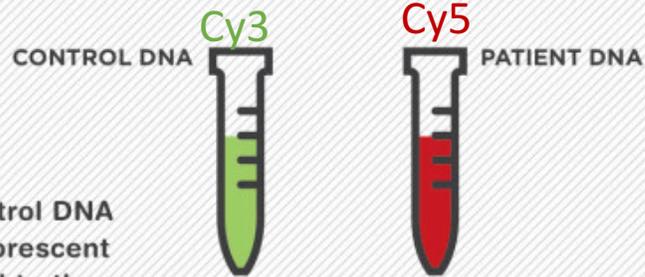
- Detectar variaciones de un menor número de **kilobases (kb)**
- No es necesario tener las muestras en metafase
- Presenta mayor resolución que la CGH en metafase (**150kb** o incluso genes frente a 5-20Mb).
- Se **utiliza un array** que esta compuesto por múltiples pocillos donde cada uno contiene fragmentos genómicos inmovilizados (procedentes normalmente de YACs o BACs).
- De esta manera se aumenta el número de copias diana

Array=arreglo

The Process of Array CGH

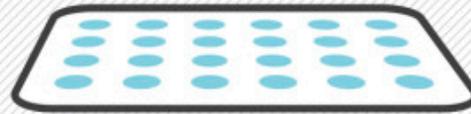
1

Patient and control DNA labeled with fluorescent dyes are applied to the microarray.



2

Patient and control DNA are hybridized to the microarray.



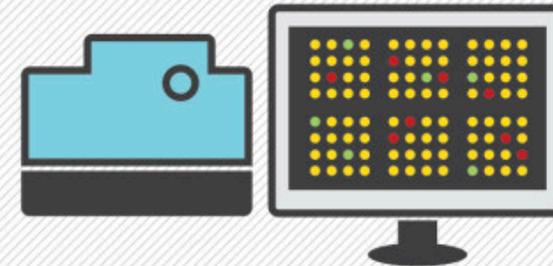
HYBRIDIZATION



DUPLICACIÓN DELECIÓN SIN CAMBIO

3

The fluorescent signals are measured by the microarray scanner.



4

The data is then analyzed by computer software which generates a plot.



DNA DOSAGE



¿Cuál es el resultado esperado?

Los DNAs competirán por hibridar en los mismos sitios por lo que:

1. Cromosomas en los que ambas muestras se encuentren en **proporción normal** → una **fluorescencia amarilla** (rojo+verde)
2. Si existe una **delección** → color rojo / ausencia del citocromo verde que es el que tiene la muestra.
3. Si existe una **duplicación**, → se observará una emisión verde.



La interpretación de los perfiles de relación se puede hacer usando umbrales fijos o estadísticos.

Ventajas y Desventajas

1. Permite estudiar variaciones de ADN y el número de copias a través de todo el genoma.
2. Permite realizar **el análisis citogenético realizando la extracción de ADN directamente de células sin cultivar, incluso desde tejidos en parafina o desde muestras congeladas.**
3. Es más rápida y presenta mayor resolución que el FISH y el cariotipo.
4. Es suficiente un microscopio de fluorescencia (para CGH en metafase)

1. Para que una pérdida o ganancia de material genético sea detectada por CGH convencional, ésta debe ser al menos de 5 - 10 Mb de longitud
2. No detecta mutaciones puntuales

Aplicaciones:

- Investigación contra el cáncer
- Diagnóstico de enfermedades raras
- Diagnóstico prenatal y preimplantatorio

Desventajas:

- No detecta mutaciones puntuales
- Para que una pérdida o ganancia de material genético sea detectada por CGH convencional, ésta debe ser al menos de 5 - 10 Mb de longitud

Artículos de discusión propuestos por los alumnos.....