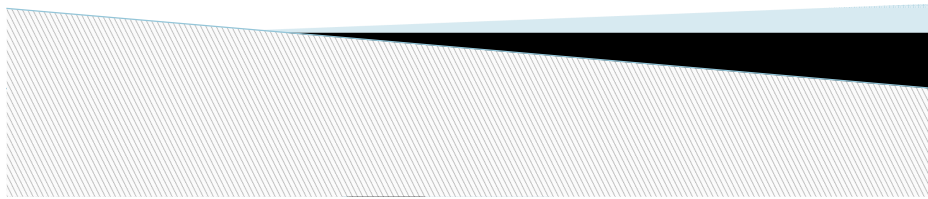


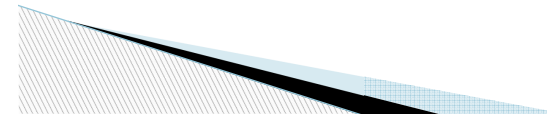
# HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

UNIDAD DIDÁCTICA 4  
BIOLOGÍA MOLECULAR

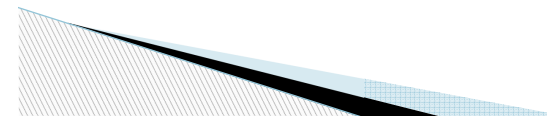
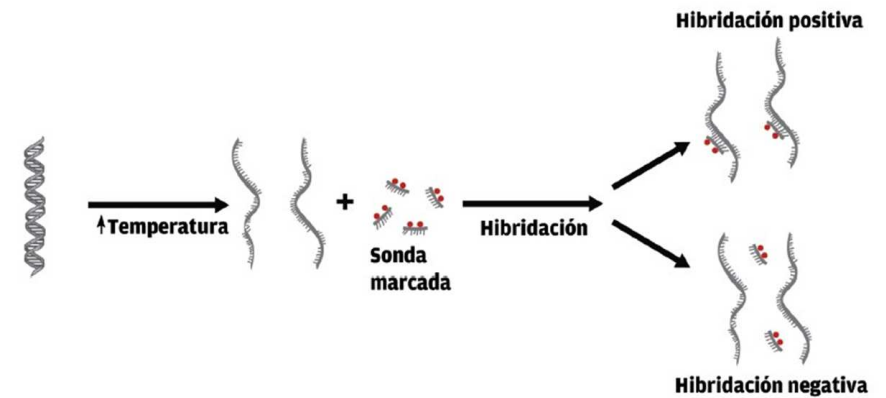
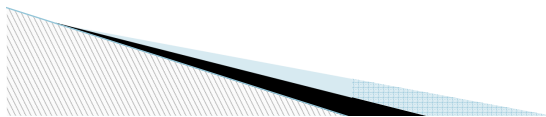


## ÍNDICE

- 4.1. El concepto de hibridación y su aplicación en Biología Molecular.
- 4.2 Bases teóricas de la hibridación:
  - 4.2.1. Desnaturalización.
  - 4.2.2. Renaturalización.
  - 4.2.3. Hibridación.
- 4.3. Tipos y características de las sondas:
  - 4.3.1. Características generales.
  - 4.3.2. Sondas de ADN.
  - 4.3.3. Sondas de ARN.
  - 4.3.4. Sondas químicas sintéticas de ácidos nucleicos.



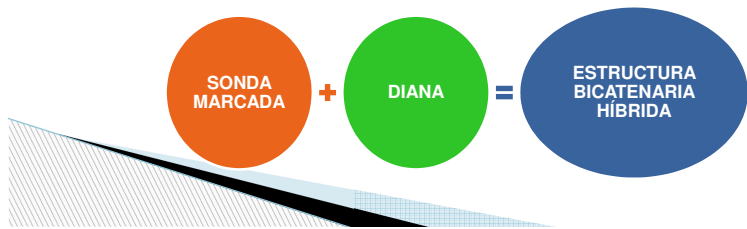
- 4.4. El marcaje de las sondas:
  - 4.4.1. Tipos de marcadores.
  - 4.4.2. Métodos de marcaje.
  - 4.4.3. Purificación de la sonda marcada.
- 4.5. Fases de la hibridación:
  - 4.5.1. Fase prehibridación.
  - 4.5.2. Fase de hibridación.
  - 4.5.3. Lavado de poshibridación.
  - 4.5.4. Fase de detección del híbrido.



## 4.1. Concepto hibridación y aplicación

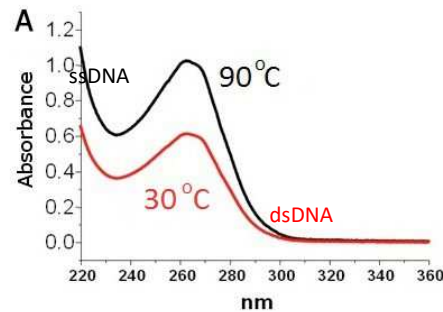
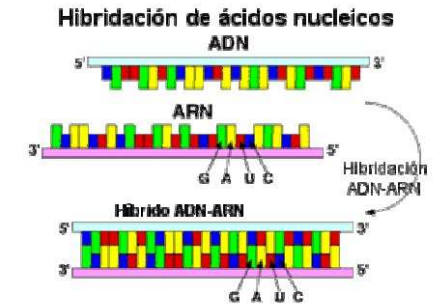
**Técnicas de hibridación:** permiten detectar secuencias concretas de ácidos nucleicos o *dianas* mediante el empleo de *sondas marcadas*.

- **Diana:** secuencia concreta de bases nitrogenadas que se pretende detectar en la muestra problema.
- **Sonda:** cadena de nucleótidos cuya secuencia de bases nitrogenadas es complementaria a la secuencia diana.

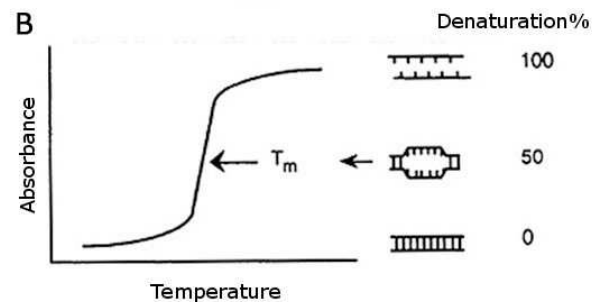


## HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

- DNA/DNA
- RNA/RNA
- DNA/RNA

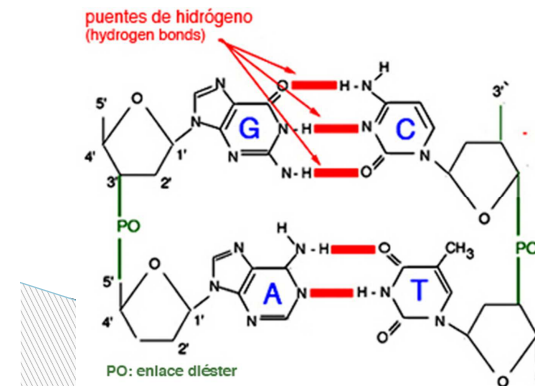


La Absorbancia del ADNds varía con la temperatura. La temperatura desnatura las moléculas del ADNds, que pasa a ser ADNss y a absorber más radiación.



## Temperatura de fusión (Tm)

- Temperatura a la cuál la desnaturalización de una molécula de ADN bicatenario es del 50%
- Temperatura donde el valor de absorbancia es la mitad entre el valor basal y el valor máximo.



**PUNTO DE FUSIÓN (Tm).** Cuanto mayor es el contenido de GC más alto es el punto.

# DESNATURALIZACIÓN

FACTORES QUE INFLUYEN  $T_m$

LONGITUD

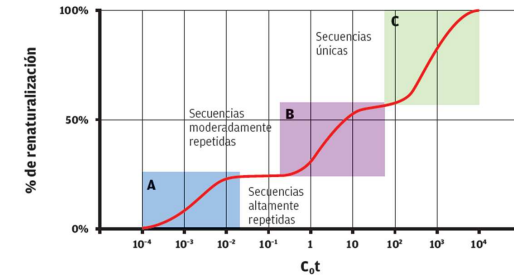
Moléculas ADNds menores 500 pb

PROPORCIÓN pares C-G

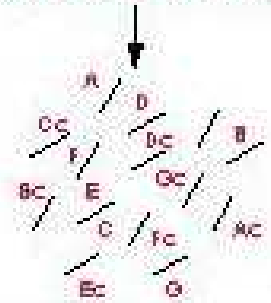
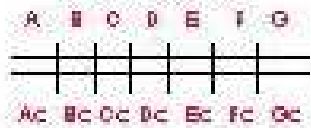
Moléculas ADNds mayores 500 pb

La parte correspondiente a cada componente:

- Tiene forma sigmoide
- Separado de las demás por mesetas o solaparse

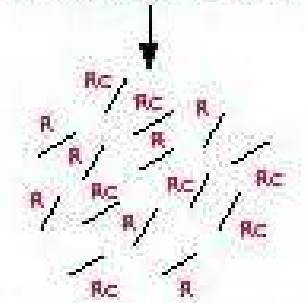
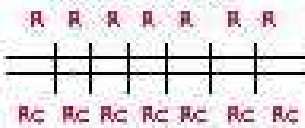


Ejemplo con 7 secuencias únicas diferentes



Cada secuencia única tarda más tiempo en encontrar a su complementaria. Velocidad de reanaturalización baja. Valor de  $C_0t$  alto.

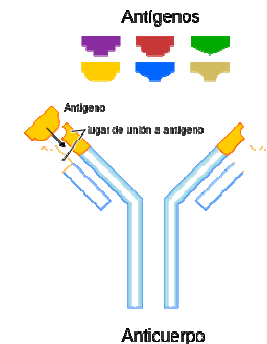
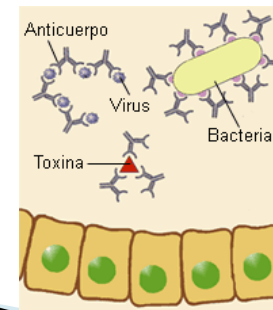
Ejemplo con una secuencia repetida 7 veces



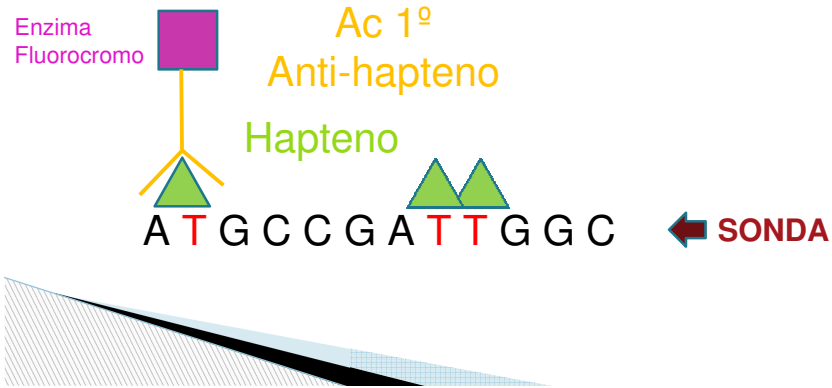
La secuencia repetida tarda poco tiempo en encontrar a su complementaria. Velocidad de reanaturalización alta. Valor de  $C_0t$  bajo.

## \* Definición hapteno

- Un **hapteno** es una sustancia química de pequeño peso molecular que no induce por sí misma la formación de anticuerpos pero al unirse a una **proteína transportadora** estimula una respuesta inmunitaria.



## HAPTENO-ANTIHAPTENO MÉTODO INDIRECTO

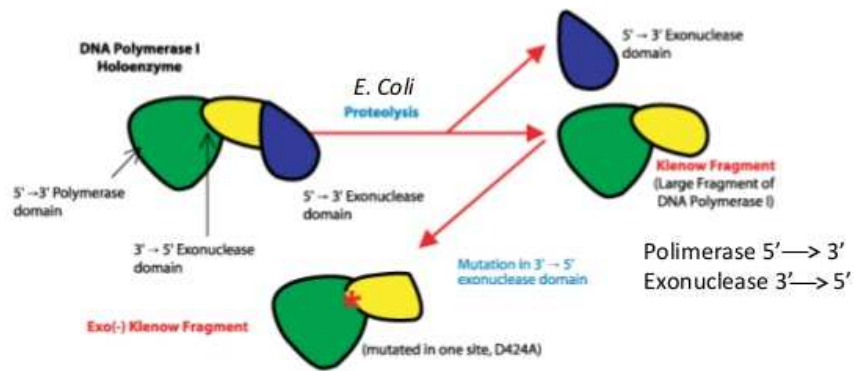


## a) Desplazamiento de mella (nick translation)

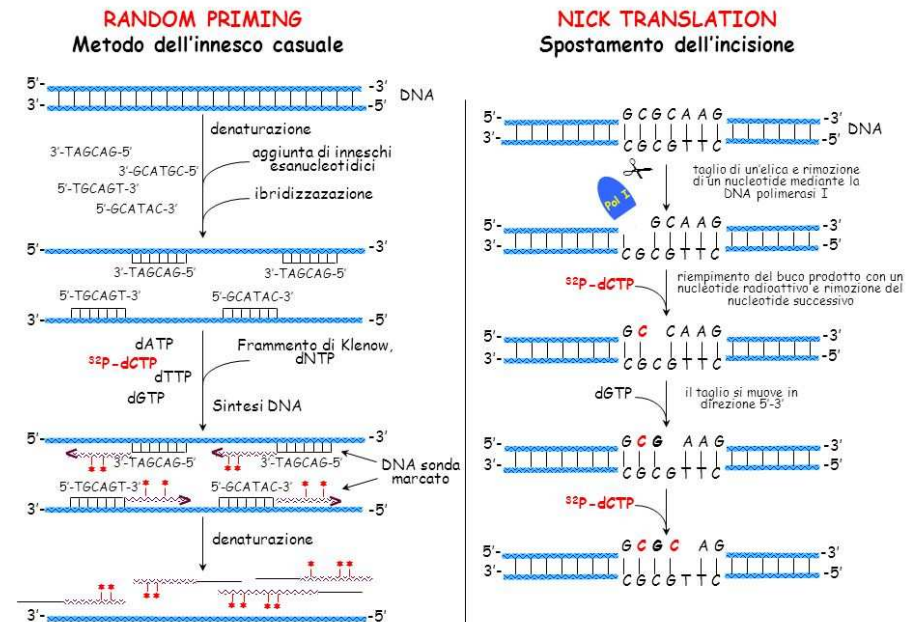
- Marcar sondas ADN bicatenario de gran tamaño obtenidas ADN recombinante- marcar genomas enteros. No necesita desnaturalización ADN.



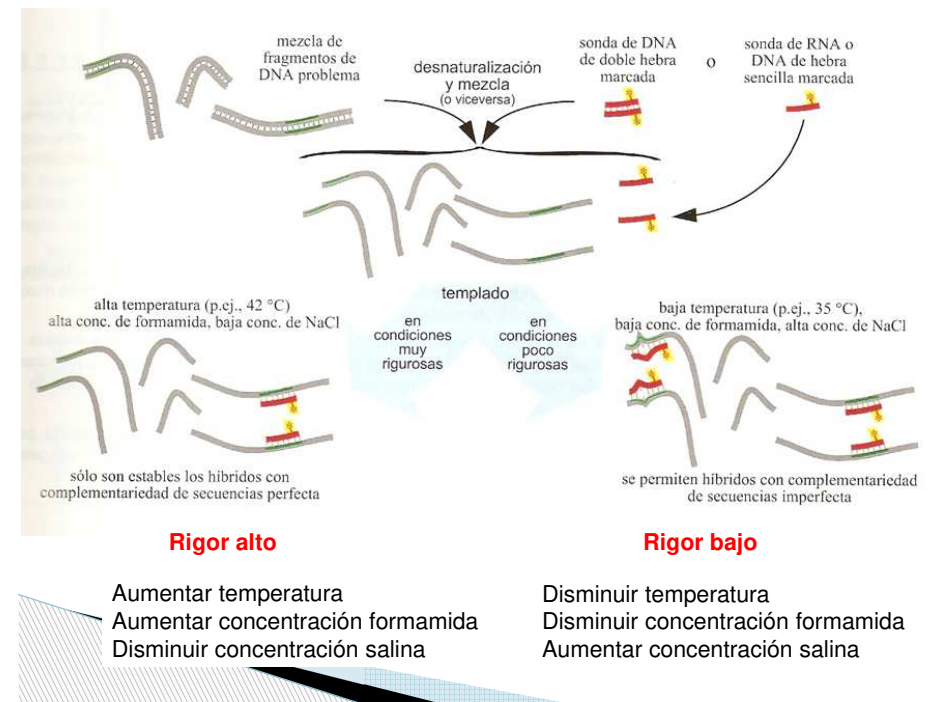
## Fragmento Klenow



## MARCATURA delle SONDE OLIGONUCLEOTIDICHE



<b>DESPLAZAMIENTO DE MELLA</b> <b>NICK-TRANSLATION</b>	<b>INICIACIÓN</b> <b>RANDOM PRIMING</b>
No se desnaturaliza	Se desnaturaliza
ADN polimerasa I funciona como exonucleasa y polimerasa 5-3	ADN polimerasa I sólo utilizamos el fragmento Klenow (solo funciona como polimerasa 5-3)
Necesitamos una segunda enzima para hacer la mella (ADNasa)	Sólo necesitamos una enzima, pero necesitamos los hexámeros (cebadores)
Ambas sirven para marcar sondas (moléculas grandes y genomas completos). Utilizan un desoxinucleótido marcado.	



**PARÁMETROS A CONTROLAR EN LA HIBRIDACIÓN Y EL LAVADO POST-HIBRIDACIÓN: temperatura, concentración salina (fuerza iónica) y concentración de formamida.**

HIBRIDACIÓN	LAVADO POST-HIBRIDACIÓN	
	BAJA RIGUROSIDAD	ALTA RIGUROSIDAD
ALTA CONCENTRACIÓN SALINA	ALTA CONCENTRACIÓN SALINA	BAJA CONCENTRACIÓN SALINA
BAJA CONCENTRACIÓN FORMAMIDA	BAJA CONCENTRACIÓN FORMAMIDA	ALTA CONCENTRACIÓN FORMAMIDA
	DISMINUIR LA TEMPERATURA	ELEVAR TEMPERATURA DEL LAVADO