

## Tema 4: Hibridación de los ácidos nucleicos

### 1. Concepto de hibridación

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

La hibridación es un proceso de construcción artificial de ácidos nucleicos bicatenarios, en el que las dos cadenas complementarias que se unen proceden de moléculas diferentes y pueden ser dos cadenas de ADN, dos cadenas de ARN o una cadena de ADN otra de ARN. En biología molecular, el fenómeno de la hibridación se utiliza para detectar secuencias concretas de ácidos nucleicos (ADN o ARN) mediante el empleo de fragmentos complementarios o sondas que se marcan para poder ser visualizados. Genéricamente, estas tecnologías se conocen como técnicas de hibridación.

**Las técnicas de hibridación** permiten detectar secuencias concretas de ácidos nucleicos o dianas (ADN o ARN) mediante el empleo de sondas marcadas.

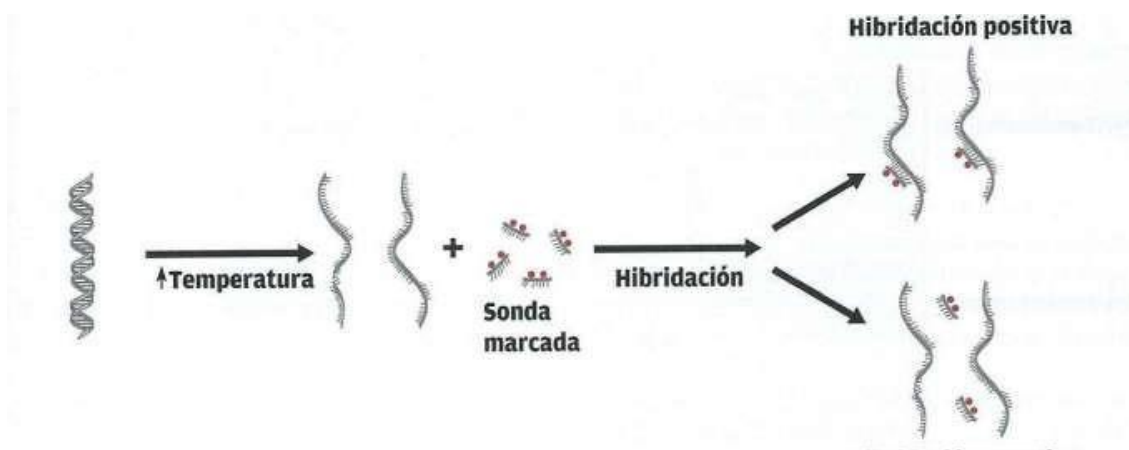
Para entender este concepto es necesario explicar las expresiones «secuencia diana» y «sonda».

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

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

Existen diferentes técnicas de hibridación que se diferencian por:

- El tipo de ácido nucleico que se pretende detectar.
- El tipo de sonda que se va a utilizar.
- El tipo de marcaje de la sonda.
- El medio o soporte (sólido, líquido o *in situ*) en el que se realiza la hibridación.



## 2. Bases teóricas de la hibridación

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

### 2.1. Desnaturalización

La desnaturalización es una propiedad del ADN consistente en la separación de las dos cadenas de una molécula bicatenaria por ruptura de los puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas complementarias.

La desnaturalización se consigue aumentando la temperatura o aumentando el pH (pH alcalino). Su comportamiento se representa en la curva de fusión del ADN.

#### Curva de fusión del ADN

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

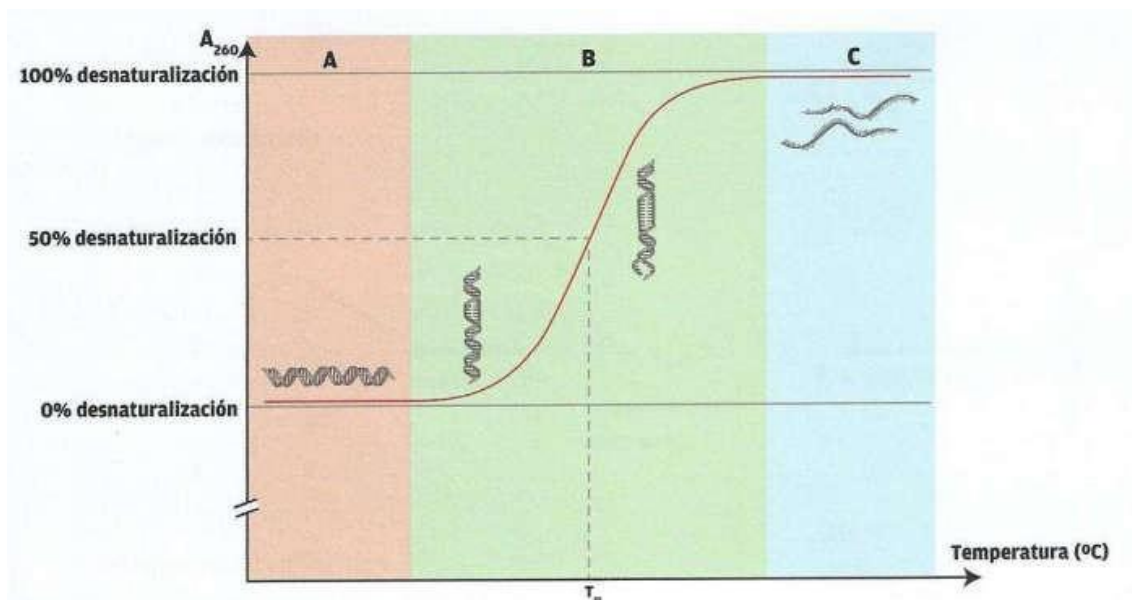
En la curva de fusión de una molécula bicatenaria de ADN se distinguen tres zonas:

- **Primera zona (zona A).** Es un tramo recto sin pendiente debido a que la absorbancia a 260 nm tiene un valor constante, aunque aumente la temperatura. Este valor corresponde al valor basal de absorbancia de la molécula bicatenaria y depende únicamente de la concentración de la molécula de ADN en solución. La temperatura en esta zona no alcanza un valor suficiente para romper puentes de hidrógeno y, por tanto, el porcentaje de desnaturalización es 0%, es decir, todo el ADN está en

## U.D. 4 Hibridación de los ácidos nucleicos

forma de doble hélice bicatenaria.

- **Segunda zona** (zona B). En este tramo se observa un aumento de la absorbancia a medida que aumenta la temperatura, primero de manera lenta (curva cóncava), después de forma rápida (recta con pendiente elevada) y finalmente de manera lenta nuevamente (curva convexa) hasta alcanzar un valor de absorbancia máximo. En este rango de temperaturas es donde se produce la desnaturalización progresiva de la molécula de ADN, de manera que al alcanzarse el valor máximo de absorbancia la desnaturalización es del 100%. El aumento de absorbancia a medida que la molécula se desnaturalizase conoce como efecto hipercrómico.
- **Tercera zona** (zona C). La gráfica en esta zona corresponde a una recta de pendiente prácticamente nula, debido a que la absorbancia se mantiene en el valor máximo aunque la temperatura siga aumentando. En esta fase, el ADN semantiene desnaturalizado al 100%.



### Temperatura de fusión

En la curva de fusión, la temperatura a la cual el valor de absorbancia es la mitad entre el valor basal y el valor máximo se conoce como temperatura de fusión,  $T_m$  (del inglés Temperature melting).

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

Para moléculas pequeñas, de menos de 500 pb, la  $T_m$  aumenta con la longitud. Pero para moléculas de más de 500 pb, el factor que más influye en la  $T_m$  es la proporción de pares G-C (bases unidas por tres puentes de hidrógeno).

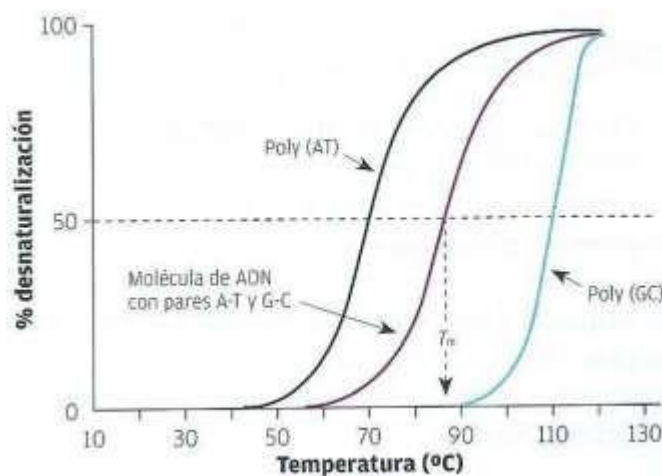
En consecuencia, cuanto mayor sea la proporción de pares G-C en una molécula, mayor será el número de puentes de hidrógeno que hay que romper para

## U.D. 4 Hibridación de los ácidos nucleicos

desnaturalizarla y, por lo tanto, mayor cantidad de energía habrá que suministrar (en forma de calor) para separar las dos cadenas. La  $T_m$  de las moléculas de gran tamaño está directamente relacionada con el contenido en pares GC: a mayor porcentaje de pares G-C, mayor  $T_m$

La  $T_m$  de cualquier molécula de ADN estará comprendida entre la  $T_m$  de una molécula poli-AT (0% de pares GC) y la  $T_m$  de una molécula poli-GC (100% de pares GC).

De forma análoga, la curva de fusión de cualquier molécula de ADN estará comprendida entre las curvas de fusión de una molécula poli-AT y una molécula poli- GC.



### 2.2. Renaturalización

La renaturalización es el proceso por el cual las dos cadenas de una molécula de ADN completamente separadas mediante desnaturalización térmica vuelven a reasociarse, al bajar lentamente la temperatura, hasta formar la doble hélice original.

Este fenómeno se puede medir por la disminución de la absorbancia a 260 nm.

#### Cinética de renaturalización

En una solución que contiene ADN totalmente desnaturalizado, para que dos cadenas complementarias se reasocien tiene que producirse un choque aleatorio entre ambas.

Cuanto mayor sea el número de cadenas en la solución, es decir, cuanto mayor sea la concentración, mayor será la probabilidad de que dos cadenas complementarias se encuentren y, por lo tanto, mayor será la velocidad de renaturalización.

## U.D. 4 Hibridación de los ácidos nucleicos

Esta es una primera diferencia entre desnaturalización y renaturalización en la desnaturalización influye la composición de las bases y no influye la concentración, mientras que en la renaturalización influye la concentración y no la composición de las bases. Una vez que las dos cadenas complementarias de una molécula se encuentran, la reasociación se produce en dos fases:

1. **Primera fase o fase de nucleación.** Es una fase lenta en la que secuencias cortas de bases complementarias se aparean por formación de puentes de hidrógeno.
2. **Segunda fase o fase de «cierre en cremallera».** Es una fase rápida en la que se produce el cierre de las secuencias vecinas originando la doble hélice.

La velocidad de la renaturalización viene marcada por la fase de nucleación y puede definirse con la siguiente fórmula:

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1+k \cdot C_0 t}$$

Donde:

$C$  es la concentración de ADN monocatenario en un tiempo  $t$  determinado.

$C_0$  es la concentración inicial a  $t=0$ .

$k$  es la constante de reasociación.

### Curvas de renaturalización

Representando la fracción de ADN renaturalizado (%) frente al logaritmo de  $C_0t$  se obtiene la curva de renaturalización o curva  $C_0t$ .

Esta curva tendrá un comportamiento diferente en función de la complejidad del ADN y por tanto en función de si el genoma es de un organismo procariota o eucariota.

### Curvas de renaturalización de genomas procariotas

Para grandes moléculas y genomas sin secuencias repetidas, como los de organismos procariotas, la curva de renaturalización es una curva sigmoide en la que también se puede definir un punto medio  $C_0t_{1/2}$ .

## U.D. 4 Hibridación de los ácidos nucleicos

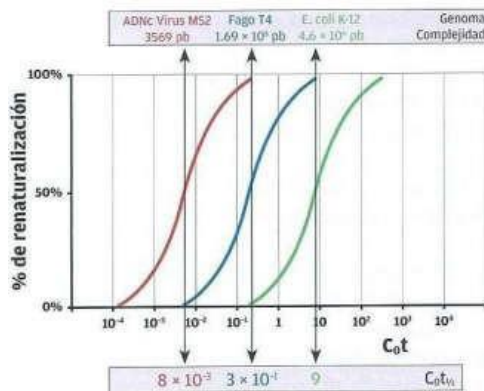
El valor  $C_{0t_{1/2}}$  se define como el valor de  $C_{0t}$  al cual la renaturalización es del 50%.

Este valor está directamente relacionado con la complejidad del ADN que renaturaliza.

### A mayor complejidad, mayor $C_{0t_{1/2}}$

La complejidad de un genoma de un organismo se define como la longitud en pares de nucleótidos de todas las secuencias diferentes presentes en el genoma y, por lo tanto, en el número de proteínas diferentes que se pueden sintetizar según la información que contienen.

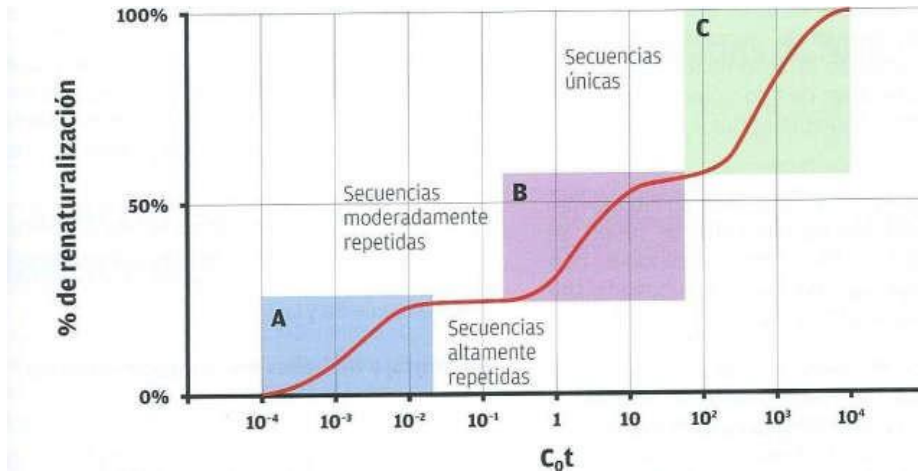
Esta característica constituye una segunda diferencia entre desnaturalización y renaturalización. En la desnaturalización, la longitud de la molécula no influye en la  $T_m$  para moléculas de gran tamaño. Por el contrario, la velocidad de renaturalizaciones inversamente proporcional a la complejidad de la molécula, de manera que a mayor complejidad del genoma (mayor longitud) menor velocidad de renaturalización.



### Curvas de renaturalización de genomas eucariotas

Para genomas con secuencias repetidas como los organismos eucariotas, la curva de renaturalización no es sigmoide sino escalonada con varios puntos de inflexión, ya que los genomas de eucariotas contienen tres tipos de secuencias.

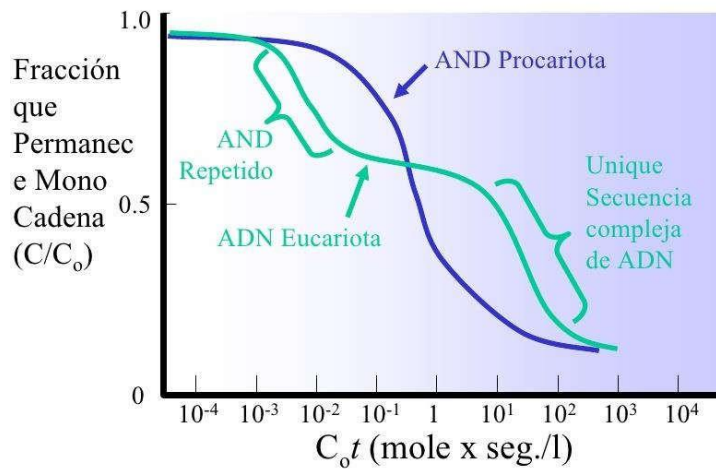
- Secuencias altamente repetidas: Se repiten un número muy elevado de veces a lo largo del genoma.
- Secuencias moderadamente repetidas: Se repiten varias veces.
- Secuencias únicas: Aparecen una sola vez



Para realizar las curvas de renaturalización de genomas eucariotas, el ADN se fragmenta. Esto implica que en el tubo donde se efectúa el experimento de renaturalización habrá un número reducido de fragmentos para cada secuencia única (tantos como genomas como hayamos fragmentado, ya que solo hay una en cada uno), decenas o cientos de fragmentos para cada secuencia repetida y miles de fragmentos para cada secuencia altamente repetida. Por eso, en la curva de renaturalización de genomas eucariotas, se observan 3 fases o componentes:

- **Componente rápido:** Corresponde a las secuencias altamente repetidas y que se asocia rápidamente porque su concentración en la solución es mucho mayor que la de las demás secuencias.
- **Componente intermedio:** Corresponde a las secuencias moderadamente repetidas y que se renaturalizan más lentamente que el anterior porque su concentración es menor.
- **Componente lento:** Corresponde a las secuencias únicas cuya concentración es muy baja y por lo tanto se renaturaliza lentamente. Estas curvas permiten estimar la complejidad global del genoma así como la proporción relativa y la complejidad media de cada tipo de secuencia (única y repetidas).

## Cinética de Reasociación



### 2.3 La hibridación

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

**Factores que influyen en la hibridación:** Todos aquellos factores que pueden modificar la T<sub>m</sub> de un híbrido influyen en la hibridación, estos factores son:

I.-Fuerza iónica: Es la concentración de sales de la solución. Cuanto mayor es la concentración de cationes (sobre todo la de cationes monovalentes, como el Na<sup>+</sup> o el K<sup>+</sup>) en la solución, mayor energía en forma de calor hay que aportar al híbrido para desnaturalizarlo, ya que disminuyen las fuerzas de repulsión entre las cadenas (neutralizan la carga negativa). Esto provoca que la curva de fusión se desplace hacia la derecha, aumentando la T<sub>m</sub>.

II.-Presencia de agentes desnaturalizantes: Algunos agentes como el DMSO (dimetilsulfóxido) y la formamida desestabilizan los puentes de hidrógeno facilitando su ruptura. Si se añaden estos compuestos al híbrido en solución, se requiere menos energía para desnaturalizarlo por lo que la curva de fusión se desplaza hacia la izquierda y la T<sub>m</sub> disminuye.

III.-Porcentaje de pares de bases no complementarias (*mismatch*): Se pueden formar híbridos imperfectos que mantienen un número reducido de bases desapareados y por tanto contienen menos puentes de hidrógeno que los híbridos perfectos. Por ello, el *mismatch* es otro factor que influye en la T<sub>m</sub>: a mayor *mismatch*, menor T<sub>m</sub> (será más fácil separarlos ya que tienen menos puentes de hidrógeno).

La influencia del *mismatch* en la T<sub>m</sub> del híbrido es tanto mayor cuanto menor es la longitud de la sonda, a menor longitud del fragmento con el *mismatch* menor T<sub>m</sub> (ya que habrá menos puentes de hidrógeno que mantienen unida la molécula). Así, para sondas de gran



## U.D. 4 Hibridación de los ácidos nucleicos

tamaño, la Tm del híbrido disminuye un grado por cada 1% de *mismatch* pero para sondas pequeñas una única base desapareada puede disminuir en varios grados la Tm del híbrido. Este fenómeno justifica el empleo de oligonucleótidos para detectar mutaciones puntuales por hibridación. Porque si la sonda no encaja perfectamente (hay *mismatch*) la temperatura variará considerablemente, evidenciando la mutación puntual.

### 3.- TIPOS Y CARACTERÍSTICAS DE LAS SONDAS.

Pueden ser bicatenarias/monocatenarias y su tamaño puede oscilar entre el de pequeños oligonucleótidos y el de grandes moléculas de miles de nucleótidos. La elección de unas u otras dependerá de la especificidad y sensibilidad que se quiera conseguir.

La **especificidad** es la capacidad que tiene una sonda para discriminar la secuencia diana con la que se tiene que hibridar. En general, se considera que el tamaño mínimo de la secuencia de una sonda para que sea específica debe ser de 16 bases. Las secuencias inferiores a 16 bases tienen una probabilidad muy elevada de encontrarse secuencias repetidas aleatoriamente a lo largo de un genoma, por lo que las sondas con ese tamaño hibridarían inespecíficamente con secuencias diana repetidas al azar por todo el genoma en estudio, imposibilitando así la detección específica de la región de interés.

La **sensibilidad** es la probabilidad de detectar cantidades mínimas del híbrido sonda-diana y está en relación con el número de moléculas marcadoras que admite la sonda.

Según su naturaleza, las sondas utilizadas en las técnicas de hibridación se pueden clasificar en:

**A.-Sondas de ADN:** Son las más utilizadas porque son fáciles de obtener en grandes cantidades y presentan una gran variedad en cuanto a tamaño y métodos de marcaje. A su vez, según el proceso de obtención, las sondas de ADN pueden ser:

- **De síntesis química:** Se obtienen cuando el primer nucleótido de la secuencia se une a una fase sólida (agar o polímeros) y posteriormente se añaden nucleótidos a nucleótido mediante ciclos de reacciones químicas. Actualmente este proceso está automatizado. Estas sondas se caracterizan por:

-Ser **monocatenarias**.

-Tener un **tamaño reducido**. Sólo se pueden sintetizar oligonucleótidos relativamente pequeños (<200nt) Los más habituales son los menores de 40- 50nt.

De estas características se desprenden ventajas/inconvenientes.

## U.D. 4 Hibridación de los ácidos nucleicos

### Ventajas:

**No requieren desnaturalización previa** por calor durante la hibridación (son monocatenarias). Su tamaño reducido les permite una **mejor penetración en el tejido**, lo cual resulta ventajoso en las técnicas de hibridación *in situ*, sobre todo para detectar ARNm.

### Inconvenientes:

**Baja sensibilidad:** El reducido tamaño limita el número de moléculas marcadoras que pueden incorporar, lo que hace que su sensibilidad sea menor respecto a las otras sondas de ADN.

También debido a su pequeño tamaño, tiene gran **facilidad para hibridar inespecíficamente** con secuencias parecidas a las secuencias diana.

- **Sondas ADN recombinante:** Se obtienen por un proceso de clonación y amplificación por cultivo que se puede esquematizar de la siguiente manera:

I.-El fragmento de ADN que queremos emplear como sonda se inserta en un vector (normalmente un plásmido bacteriano).

II.-El plásmido recombinante se introduce en una bacteria y se cultiva en un medio apropiado.

III.-Posteriormente se extrae el plásmido amplificado y se emplea entero como sonda, o bien se separa el fragmento de interés con enzimas de restricción.

Estas sondas se caracterizan por:

-Ser **bicatenarias**: Esto hace que se requiera una desnaturalización por calor como paso previo a la hibridación con las secuencias diana.

-Tener un **gran tamaño** (cientos/miles de pares de bases). Esto hace que admitan un gran número de moléculas marcadoras y, por tanto, tienen mayor sensibilidad.

-**No suelen hibridar inespecíficamente**, por lo que presentan una mayor especificidad.

- **Sondas PCR:** Consiste en amplificar el fragmento que nos interesa como sonda mediante la **Reacción en Cadena de la Polimerasa**. El método implica conocer las secuencias que flanquean el fragmento que queremos amplificar.

Se caracterizan por:

Ser bicatenarias.

-Tener un tamaño intermedio (cientos de bases).

## U.D. 4 Hibridación de los ácidos nucleicos

---

**B. Sondas de ARN:** Conocidas también como **ribosondas**, son menos utilizadas que las de ADN. Son siempre monocatenarias por lo que no requieren un paso previo de desnaturalización antes de la hibridación.

**Ventaja:** Los híbridos ARN/ARN son ligeramente más estables que los híbridos ADN/ADN o ARN/ADN.

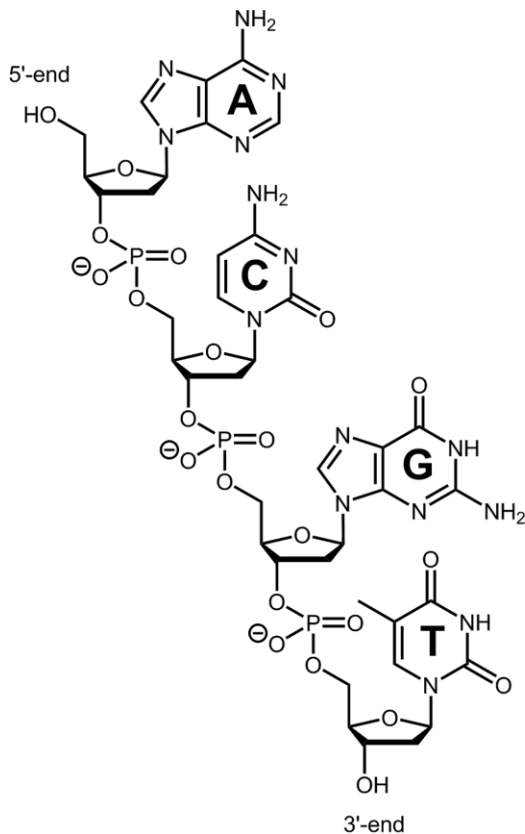
**Inconveniente:** Son muy sensibles a cualquier contaminación, como la omnipresencia de ARNasas que las degradan rápidamente.

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

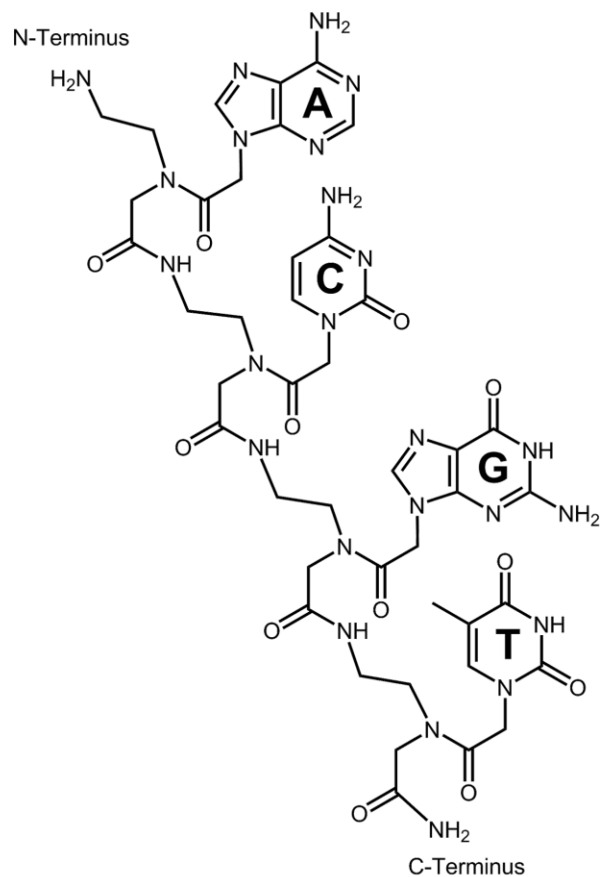
- **De síntesis química:** Se obtienen incorporando los ribonucleótidos de manera secuencial para obtener una secuencia determinada. Presenta las mismas ventajas e inconvenientes que las sondas de síntesis química de ADN.
- **De transcripción:** El proceso de obtención consiste en transcribir un vector que contiene el fragmento de interés o un ADNc (ADN complementario) mediante una ARNpolimerasa. Estas sondas suelen ser de tamaño intermedio (cientos de bases).

**C. Sondas químicas sintéticas:** Normalmente las sondas utilizadas en las técnicas de hibridación son moléculas de ADN o ARN, pero en la actualidad se están empezando a comercializar como sondas unas modificaciones químicas sintéticas de los ácidos nucleicos como son las sondas de ácidos nucleicos peptídicos, **PNA** (*Peptide Nucleic Acid*).

Los PNA son moléculas sintéticas en las que el esqueleto típico de azúcar- PO<sup>3-</sup> del ADN y ARN es sustituido por un esqueleto formado por unidades de **aminoetil- glicina (AEG)** en las que se les acopla una base nitrogenada.



**DNA**



**PNA**

Las sondas PNA hibridan con cadenas de ADN y ARN de secuencia complementarias mediante puentes de hidrógeno entre bases complementarias. Por su composición química **presentan dos características** que las diferencian de las sondas de ADN y ARN:

- **No tienen carga eléctrica** puesto que carecen de grupo PO<sup>3-</sup>.
- **No son degradadas** por nucleasas ni proteasas, lo que les confiere gran estabilidad.

**Ventajas** de las sondas PNA son:

- Hibridan más rápidamente que las sondas de ADN o ARN.
- Los híbridos resultantes PNA/ADN o PNA/ARN son más estables que los correspondientes híbridos ADN/ADN o ADN/ARN. Esto es debido a su falta de carga eléctrica, que hace que no exista el efecto de repulsión entre cadenas complementarias.
- Tienen gran capacidad para discriminar bases no complementarias en la secuencia diana, lo que las hace muy específicas.
- Su solubilidad es mucho menor que las sondas de ADN o ARN y disminuye drásticamente con la longitud, por esta razón el tamaño de estas sondas no suele sobrepasar las 30 bases

## U.D. 4 Hibridación de los ácidos nucleicos

(a mayor longitud, menor solubilidad).

### 4.- EL MARCAJE DE LAS SONDAS.

Las sondas empleadas en las técnicas de hibridación deben estar marcadas para detectar el híbrido formado con la secuencia diana. El marcaje es el procedimiento de señalar la sonda utilizada en las técnicas de hibridación con la finalidad de poder visualizar los resultados. Hay varias moléculas que se pueden usar como marcadores y el procedimiento para el marcaje de sondas dependerá del tipo de marcador que se utilice.

**4.1.- Tipos de marcadores:** Podemos clasificarlos según permitan o no detectar de manera directa el híbrido. Así tenemos:

#### a) Marcadores que posibilitan la detección directa del híbrido:

Isótopos radiactivos: Son elementos químicos con capacidad de emitir radiación. Los más usados son el  $^{32}\text{P}$  y el  $^3\text{H}$ . El marcaje en la sonda se produce introduciendo nucleótidos radiactivos que contienen alguno de estos isótopos. Con el marcaje radiactivo se consigue una gran sensibilidad, pero el uso de este tipo de sondas requiere instalaciones e infraestructuras adecuadas para el trabajo con material radiactivo, así como personal entrenado. Los isótopos radiactivos se utilizan principalmente en estas técnicas de hibridación: Southernblot, Northernblot y dotblot. La detección del híbrido se utiliza revelando el marcaje radiactivo mediante autorradiografía con una película de rayos X.

Fluorocromos: Son compuestos químicos que emiten luz al ser excitados por la luz ultravioleta (UV). Tradicionalmente se han utilizado derivados de la fluoresceína (verde) y la rodamina (rojizo) pero actualmente se han desarrollado multitud de marcadores que se acoplan bien a los nucleótidos y no alteran la especificidad de la sonda, como las cianinas (Cy3, Cy5, Cy7), la familia Alexa-fluor, etc. Cuando el quencher está unido al fluorocromo, este está inactivo, y cuando se separan se activa y emite la fluorescencia. Así, la sonda solo emitirá fluorescencia cuando se una a la secuencia diana.

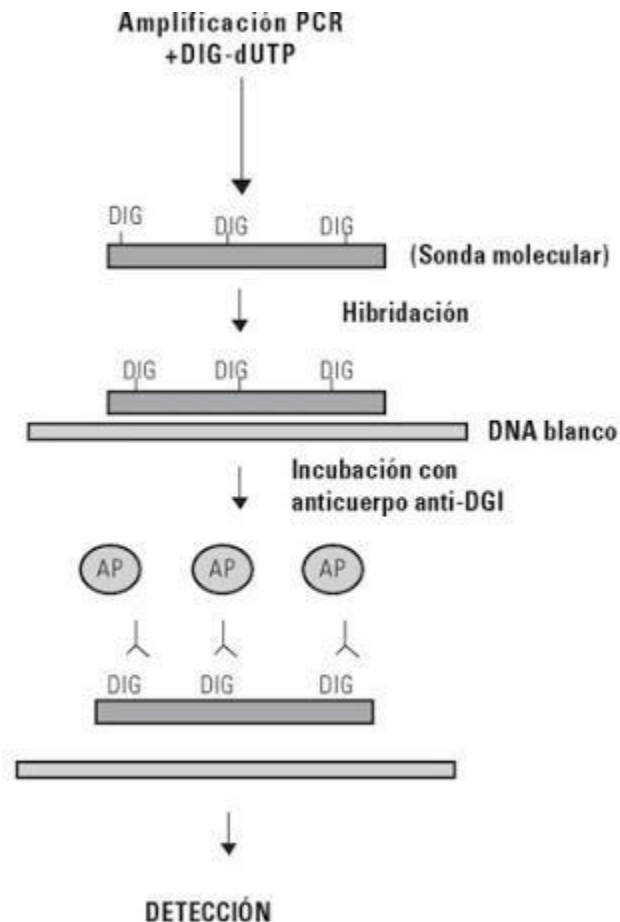
Las sondas marcadas con fluorocromos se utilizan principalmente en la técnica FISH (hibridación *in situ* fluorescente). El empleo de varias sondas marcadas con diferentes fluorocromos permite detectar simultáneamente varias secuencias diana. Esto es especialmente útil en estudios de citogenética. Para la detección del híbrido marcado se requiere un microscopio de fluorescencia.

#### b) Marcadores que requieren métodos indirectos de revelado en varios pasos:

Haptenos: Son moléculas de pequeño tamaño que al igual que los fluorocromos se pueden acoplar a los nucleótidos y no alteran la especificidad de la sonda. Pero a diferencia de ellos, no pueden ser detectados directamente. Una vez la sonda marcada con el hapteno se ha unido a la secuencia diana, tenemos que realizar un segundo paso para detectar los haptenos mediante afinidad química de moléculas o en métodos inmunológicos

## U.D. 4 Hibridación de los ácidos nucleicos

(anticuerpos). Los haptenos más utilizados son la digoxigenina y la biotina. Este tipo de sondas se pueden usar prácticamente en todas las técnicas de hibridación. Aunque tradicionalmente su sensibilidad ha sido menor que las de las sondas radiactivas, actualmente se pueden emplear métodos de amplificación de señal que aumentan mucho la sensibilidad.



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

**A. Desplazamiento de mella:** Se utiliza para marcar sondas de ADN bicatenario de gran tamaño, obtenidas normalmente por tecnología de ADN recombinante. Se produce incubando una determinada cantidad de sonda con una mezcla de reacción que contiene los siguientes elementos:

- ADNasa I.
- ADN pol I bacteriana.
- Una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP). De los cuatro posibles desoxirribonucleótidos trifosfato, uno de ellos estará marcado, normalmente, con un isótopo radiactivo o con un hapteno.

## U.D. 4 Hibridación de los ácidos nucleicos

La ADNasa I rompe los enlaces entre dos nucleótidos consecutivos al azar, es decir, produce mellas o huecos al azar en ambas cadenas. La ADN pol I gracias a su actividad exonucleasa elimina nucleótidos y gracias a su actividad polimerasa va incorporando nucleótidos nuevos que los coge del medio de reacción, donde uno de ellos estará marcado.

**B. Cebado al azar o cebado aleatorio:** Como el método anterior, se suelen utilizar para marcar sondas de ADN bicatenario de gran tamaño con isótopos radiactivos o haptenos. En este caso la sonda se incuba con los siguientes reactivos:

- Mezcla de todos los oligonucleótidos posibles de seis bases (hexámeros).
- Fragmento Klenow de la ADN pol I: Es un fragmento que conserva la actividad pol 5' a 3' pero carece de la actividad exonucleasa 5'a 3'.
- Mezcla de dNTPs, uno de ellos marcado.

El marcaje se puede hacer en varias fases:

I. Se desnaturaliza la sonda.

II. Unión al azar de los hexámeros a las cadenas de la sonda.

III. Los hexámeros unidos a la sonda actúan como cebadores para que la ADN pol I (fragmento Klenow) sintetice cadenas de ADN complementarias a la cadena molde, incorporando los dNTPs que hay en el medio de reacción, uno de los cuales está marcado.

**C. Marcaje terminal:** Se utiliza para marcar sondas de ADN bicatenario o monocatenario de pequeño y mediano tamaño, tanto radiactivamente como con fluorocromos o haptenos. En el marcaje terminal se emplea la enzima desoxirribonucleotidiltransferasa (TdT), una ADN pol capaz de incorporar desoxinucleótidos al extremo 3'-OH libre de una molécula de ADN bicatenario o monocatenario sin necesidad de una cadena molde. Esta enzima es capaz de incorporar todo tipo de nucleótidos marcados. Para realizar el marcaje, la sonda se incuba con la TdT y un dNTP marcado.

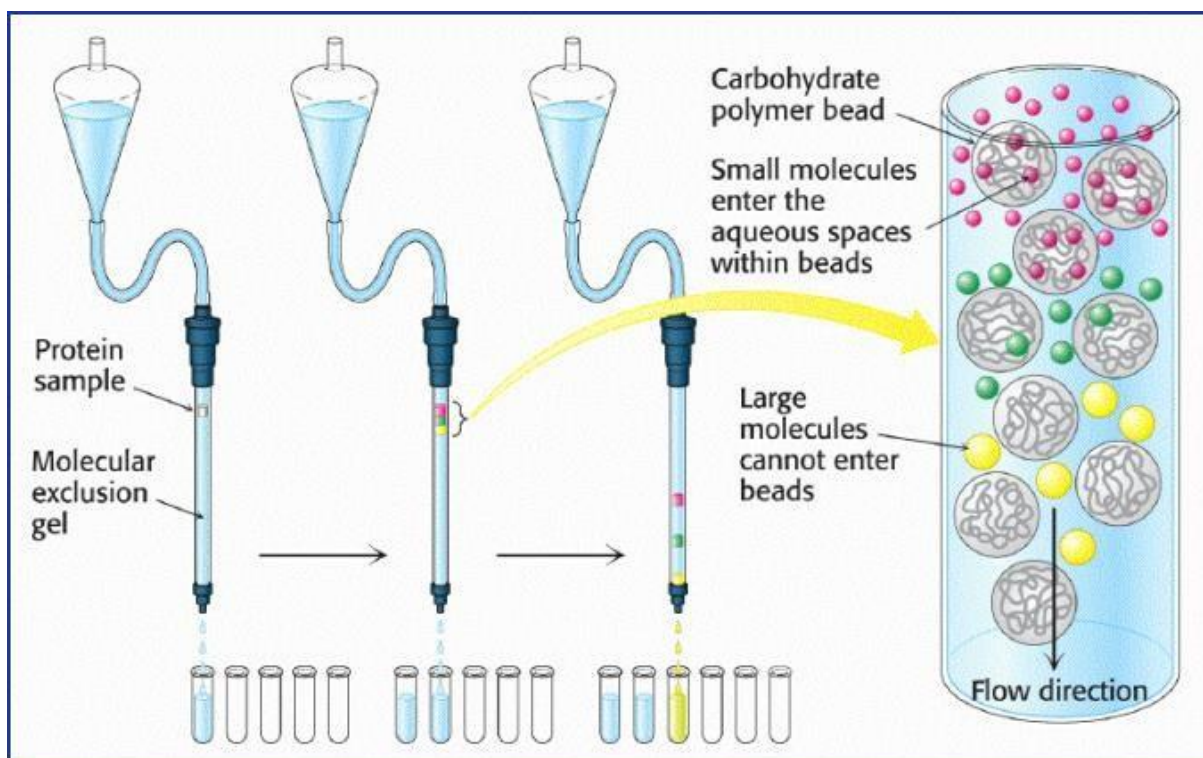
**D. Marcaje por PCR:** El marcaje de sondas por PCR se realiza en el mismo proceso de obtención de las sondas por PCR, utilizando dNTP marcados radiactivamente o con haptenos en la mezcla de reacción.

**E. Marcaje de sondas de ARN:** El marcaje se puede realizar en el mismo proceso de obtención de la sonda ARN mediante transcripción con una ARN pol, añadiendo ribonucleótidos marcados a la mezcla de reacción.

## U.D. 4 Hibridación de los ácidos nucleicos

**4.3.-Purificación de la sonda marcada:** La purificación de la sonda consiste en la eliminación de los nucleótidos libres marcados para evitar ruido de fondo o interferencias en los resultados de las técnicas de hibridación. Los dos métodos más usados para la purificación de las sondas son la cromatografía de exclusión por tamaño y la cromatografía de adsorción.

Cromatografía de exclusión por tamaño: Se suelen utilizar partículas de geles (normalmente de poli(acrilamida)) con un tamaño de poro determinado, que están empaquetadas en microcolumnas que se acoplan a tubos colectores tipo eppendorf. El tamaño de poro de estas partículas permite que las moléculas pequeñas entren en ellas pero las grandes no, por lo que cuando la mezcla de reacción se carga en la columna y se centrifuga, los nucleótidos libres quedan retenidos en el gel y la sonda marcada purificada se recogen en el tubo colector.



Cromatografía de adsorción: Se utilizan matrices de lana de vidrio o sílice empaquetado en microcolumnas que se acoplan a tubos colectores tipo eppendorf, similares a las utilizadas en la purificación de ácidos nucleicos y basadas en los mismos principios.

### 5.- FASES DE LA HIBRIDACIÓN.

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

**I.-Preparación de la muestra y soporte (prehibridación):** Según las técnicas, se pueden desarrollar en múltiples pasos que incluyen digestiones enzimáticas, electroforesis, transferencias, bloqueos de uniones específicas, etc.



## U.D. 4 Hibridación de los ácidos nucleicos

**II.-Fase de hibridación:** Se produce la formación del híbrido sonda-secuencia diana y es importante tener en cuenta que la hibridación se suele realizar a:

-Temperaturas prefijadas estándar, normalmente 37º-42º o 65ºC dependiendo de las técnicas.

-Incremento de la concentración de cationes. Para fijar esta concentración se utiliza un tampón salino de citrato de Na 0,3M y NaCl 3M a pH 7.

-El tiempo durante el que se incuba la sonda con la muestra para asegurarse una buena hibridación va a depender de la concentración de la sonda y según técnica puede oscilar entre los 30 min y las 24h.

**III.-Lavado post-hibridación:** Esta es una fase crítica del proceso de hibridación. El objetivo es mantener los híbridos sonda- secuencia diana y eliminar los híbridos imperfectos con secuencias parecidas a la diana.

**IV.-Fase de detección del híbrido:** Consiste en detectar los híbridos específicos gracias al marcaje de la sonda. Según cual sea el tipo de marcador utilizado (radiactivo, fluorocromo o hapteno) variará el método de detección:

Marcaje radiactivo: La detección se realiza mediante autorradiografía, colocando una placa de rayos X sobre el soporte para que la emisión radiactiva del marcador la impresione. Tras el revelado de la placa, la positividad de la hibridación se observa como marcas (puntos, manchas o bandas) oscuras.

Fluorocromos: Finalizada la técnica de preparación se llevan al microscopio de fluorescencia donde al ser excitadas con una longitud de onda adecuada, se produce la correspondiente emisión fluorescente del marcador que permite la visualización (rodamina y fluoresceína).

Haptenos: La detección se realiza por métodos inmunohistoquímicos con un anticuerpo anti-hapteno marcado con un fluorocromo (visualización con microscopía de fluorescencia) o una enzima, que cataliza una reacción en la que se produce un producto coloreado (visualización mediante microscopía óptica convencional).

### GLOSARIO

**Enzimas de restricción:** es aquella que puede reconocer una secuencia de nucleótidos en una molécula de ADN y cortar en ese punto, llamado sitio o diana de restricción.

**NT:** nucleótidos. Es el equivalente a pb cuando hablamos de cadenas simples. Es decir, una medida de longitud más.

**PB/BP (pares de bases):** hace referencia a la secuencia de bases nitrogenadas del ADN y ARN (adenina, timina, pirimidina, guanina y uracilo). Es una medida de la longitud de esas moléculas, un par de bases mide alrededor de 3,4 angstrom. A veces se habla de kpb (kilo), mpb (mega) o gpb (giga) que significan mil, millón y mil millones de pares de bases respectivamente.

**Oligonucleótido:** una secuencia de ácidos nucleicos pequeña, de cincuenta pares de bases o menos.