

**Universidad de Puerto Rico  
Recinto de Río Piedras  
Facultad de Ciencias Naturales  
Departamento de Biología**

**Manual de Laboratorio: Biología Molecular Celular  
Experimentación con Microarrays  
BIOL 4036  
Dra. Michelle Borrero  
Segundo Semestre 2012-13**

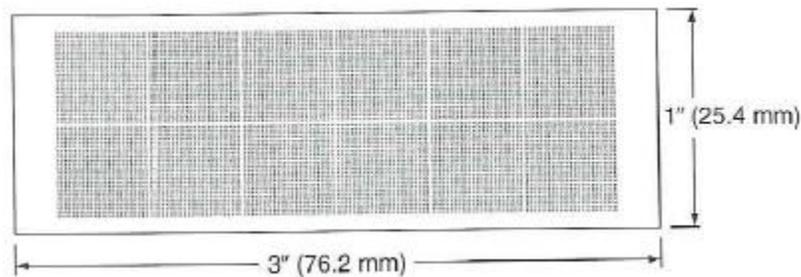
## **Índice:**

Introducción a Microarray.....	1
Cultivo Celular.....	4
Extracción RNA Total.....	10
Lecturas Espectrofotométricas utilizando NanoDrop®.....	16
Electroforesis de RNA Total.....	20
Síntesis y Marcaje de cDNA.....	25
Hibridación.....	29
▪ Pre-Hibridación.....	31
▪ Hibridación de 3DNA.....	33
Suplemento #1 Concentración de CDNA utilizando el filtro Millipore Microcon® YM-30...38	
Suplemento #2: Práctica del montaje de laminilla para hibridación.....	39
Suplemento #3: Pre Lavado .....	40
Suplemento #4: Hibridación del cDNA.....	41

## Introducción

A pesar de que todas las células somáticas contienen el mismo material genético, no todos los genes en ellas se expresan de la misma forma. La biología molecular, desde hace mucho, dispone de múltiples técnicas para analizar genes y sus productos (RNA y/o proteínas). Entre estas técnicas están: el “Northern Blot”, el “Southern Blot” y el “Western Blot”. No obstante, para entender cómo funcionan las células y cómo distintos procesos las impactan, es necesario entender la expresión y funcionamiento de múltiples genes (o de todos los genes de un organismo) simultáneamente.

Desde hace más de una década, el “DNA Microarray” ha permitido observar la expresión de miles de genes de distintos organismos de forma simultánea en el genoma. Esto ha revolucionado el entendimiento de enfermedades complejas como, por ejemplo, el cáncer. Los “microarrays” son soportes pequeños y sólidos donde las secuencias de genes se inmovilizan o se pegan a una ubicación fija. El soporte es usualmente una laminilla de cristal (Fig. 1). El funcionamiento de un “microarray” se da explotando la habilidad de una molécula de mRNA dada, que se liga específicamente o se hibridiza a la plantilla de DNA complementario que la origina. Todo este proceso se le conoce como “sondeo de hibridación”. La técnica utiliza la fluorescencia acoplada a ácidos nucleicos como “sondas móviles” para la identificación de secuencias que tienen la capacidad de hacer pares de bases entre sí.

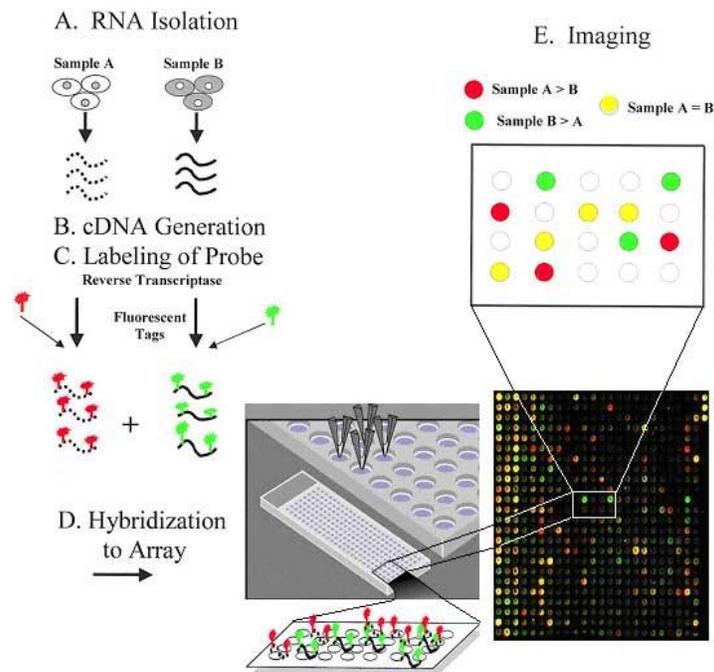


**Figura #1. Diagrama Esquemático de un DNA Microarray.** Este dibujo representa una laminilla normal de 1"x 3" que contiene un "array" de 7,500 pequeños puntos de DNA. (Cheung V.M, M. Morley, F. Aguilar, A. Massimi, R. Kucherlapeti, and G. Childs. Making and reading microarrays, *Native Genetics Supplement* Vol. 21 (1999) f. 2, p. 17

Por ejemplo, considera dos células: una célula tipo 1, saludable, y una célula tipo 2, enferma. Ambas contienen un juego idéntico de cuatro genes (A, B, C y D). Los científicos están interesados en determinar la expresión de estos cuatro genes en ambas células. Para hacerlo, se aísla el mRNA de cada una de las células para usarlo como templado y generar cDNA con una “etiqueta fluorescente”. Existen diferentes etiquetas que son utilizadas para que las muestras puedan ser diferenciadas en los pasos subsiguientes. Las dos muestras rotuladas se mezclan y se incuban con un “microarray” que ya tiene fijos los cuatro genes. Las moléculas rotuladas

comienzan a adherirse al “array” (de acuerdo a la composición de bases) que contiene el DNA de los genes de interés. Esto permite estudiar la expresión de estos genes en cada célula de donde se deriva la muestra. Cada punto en el “array” está asociado a un gen en particular y cada color en el mismo representa la expresión de genes saludables (control) o tejido enfermo (muestra). (Fig. #2 A-D)

Al visualizar los resultados del “array”, los puntos de **color verde** representan el cDNA control (genes que se expresan en tejido normal se hibridizan), el **color rojo** representa muestra experimental de cDNA (genes que se expresan en tejido enfermo se hibridizan), el **amarillo** representa la combinación de ambas (ambas muestras hibridizan) y el **negro** representa las áreas donde ninguna de las dos muestras hibridizaron. Después del proceso de hibridación, se pone el “microarray” en un lector que consiste de un laser, un microscopio especial y una cámara. Las etiquetas fluorescentes son excitadas por el láser, y el microscopio y la cámara trabajan juntos para crear una imagen digital del “array”. Los datos son obtenidos y almacenados en una computadora que utiliza un programa que calcula la proporción de fluorescencia (rojo a verde) en el “microarray”. Utilizando el escenario anterior, la computadora podría concluir: (1) ambos tipos de células expresaron el gen A al mismo nivel, (2) la célula 1 expreso más del gen B, (2) la célula 2 expreso más del gen C o (4) que ninguna de las dos expresaron el gen D.



**Figura # 2: Esquema del procedimiento de “Microarrays”:** Esta imagen puede ser encontrada en: [http://www.fastol.com/~renkwitz/microarray\\_chips.htm](http://www.fastol.com/~renkwitz/microarray_chips.htm)

Es importante destacar que esto es un ejemplo sencillo para demostrar puntos claves en el diseño experimental. Los “microarrays” han revolucionado el análisis de genes y su importancia en el estudio genómica es incalculable. Sin embargo, es importante notar que la experimentación con

los mismos tiene sus limitaciones, dependiendo del uso y aplicaciones que se haga de los datos obtenidos de éstos.

**Referencias:**

Genome Consortium for Active Teaching (GCAT). Department of Biology, Davidson College  
Disponible en Web: <http://www.bio.davidson.edu/projects/gcat/gcat.html>

Mathews, Holde. V, Ahern. (1999). Information Restructuring, *Biochemistry*. (pp. 976-978). San Francisco, CA: Addison Wesley Longman.

Microarrays: Chipping away at the Mysteries of Science and Medicine. A Science Primer [en línea]. National Center for Biotechnology Information [ref. de 13 de enero de 2012].  
Disponible en Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html>

Weaver, R. F. (2008). Genomics, Proteomics, and Bioinformatics, *Molecular Biology*. (pp. 27, 93). New York: McGraw-Hill.

# Cultivo Celular

## Introducción

Los linfocitos B son generados de células tallo en la médula ósea del sistema inmunológico. En general, los linfocitos tienen en su superficie celular proteínas llamadas inmunoglobulinas (Ig) que sirven como receptores de reconocimiento y que luego son secretadas como anticuerpos por una respuesta inmune. Estas proteínas son específicas para cada estructura química, lo que proporciona a cada organismo el potencial de secretar anticuerpos en contra de microorganismos infecciosos que pueda encontrar a lo largo de la vida. En presencia de un patógeno, los receptores de estas células o linfocitos B interactúan con las proteínas del patógeno iniciando una cascada de señales que cambian la expresión de genes en el núcleo de esta célula convirtiéndola en una célula madura. Esta actividad le confiere a la célula la capacidad de secretar anticuerpos específicos en contra del patógeno para su destrucción.

Para esta experiencia utilizaremos la línea de células de ratón Sp2/0-Ag14. Esta es una línea de mielomas de linfocitos B que se utiliza rutinariamente en la producción de hibridomas para la creación de anticuerpos monoclonales. Esta línea celular no secreta inmunoglobulinas y es sensible al medio HAT (hypoxantina-aminopterin-timidina) que inhibe la síntesis de nucleótidos por la ruta *de novo*.

## Materiales

- Suspensión de células Sp2/0-Ag14
- Medio de cultivo celular “*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*” (DMEM) con 10% Suero Fetal Bovino y antibióticos (gentamicina, penicilina, y estreptomycin), piruvato de sodio y L-Glutamina
- Alcohol 70%
- Solución Trypan Blue 0.4%
- Hemacitómetro
- Microscopio
- Frascos de cultivo de 25cm<sup>2</sup>
- Pipetas estériles plásticas
- Incubadora a 37° y 5% CO<sub>2</sub>

## Procedimiento

Las células Sp2/0-Ag14 crecen parcialmente adherentes al frasco. Su densidad óptima de crecimiento es de  $1.0 \times 10^6$  células/ml. A esta densidad, las células tienen que ser subcultivadas a una densidad de  $5.0 \times 10^4$  a  $5.0 \times 10^5$  células/ml.

Antes de comenzar cada parte del procedimiento, limpie la mesa del laboratorio con alcohol al 70%. Lávese bien las manos con jabón y luego con alcohol al 70%. Si utiliza guantes, con ellos puestos, lávese las manos con alcohol al 70%.

**NOTA: En todo momento se debe trabajar con técnicas asépticas y en un ambiente estéril cerca del mechero.**

1. Golpee rigurosamente el frasco de células en contra de la palma de la mano. Repita este paso 2 veces por cada lado del frasco. Verifique que las células estén completamente removidas del frasco.
2. Transfiera células a un tubo estéril de 15 ó 50 ml (dependiendo el volumen total del cultivo).
3. **Determine la densidad celular** (ver próxima sección)
4. Establezca la dilución correspondiente del cultivo utilizando el medio DMEM.
5. Incube a  $37^\circ\text{C}$  en 5%  $\text{CO}_2$  verificando cada 2 días el crecimiento hasta una densidad de  $1.0 \times 10^6$  utilizando un hemacitómetro.
6. Subcultive con medio fresco cuando su densidad alcance  $1.0 \times 10^6$  células/ml

### Determinación de densidad celular utilizando un hemacitómetro

Determinar el número de células en un cultivo es importante para estandarizar las condiciones de cultivo y experimentales. El hemacitómetro es un instrumento simple que se utiliza para obtener un número preciso de células en cultivo. Consiste de una laminilla con un área especializada compuesta de nueve cuadrantes de  $1\text{mm}^2$  cada uno. Estos cuadrantes, llamados cámaras de conteo, a su vez están divididos en cuadros. Los cuadrantes que se encuentran en las esquinas están divididos en 16 cuadrados y estos son los que se utilizan para contar las células. Sobre el instrumento se posa un cubreobjetos. La suspensión de células se coloca entre el área definida de la laminilla y el cubreobjetos moviéndose hacia las cámaras por capilaridad. (Figura 1.1)

#### A. Preparación del hemacitómetro

1. Limpie la superficie del hemacitómetro y el cubreobjetos con alcohol 70%. Es importante que ambos estén completamente limpios, secos y libres de partículas o huellas digitales.
2. Posicione el hemacitómetro en el microscopio.

3. Coloque el cubreobjetos como se muestra en la Figura 1.1 sobre los soportes.

#### B. Preparación de la suspensión de células para cargar el hemacitómetro

1. Invierta el tubo con la suspensión de células de 1 a 2 veces. Transfiera 100µl de la suspensión de células a un tubo de 1.5ml.

***NOTA: Este volumen no será devuelto al cultivo celular***

2. A un nuevo tubo de 1.5ml, transfiera 20µl de la suspensión de células. Añada la cantidad necesaria de la solución de “Trypan Blue” para obtener una dilución 1:1. Mezcle la muestra dando golpecitos con el dedo.
3. Adquiera 10µl de la muestra con Trypan Blue y cargue en el hemacitómetro por la hendidura triangular. La suspensión se mueve hacia la cámara de conteo por capilaridad.

#### C. Conteo de células

1. Examine sobre el microscopio. Cuento las células una por una en los cuatro cuadrantes disponibles de las cuatro esquinas. (ver Figura 1.1)

##### ***NOTAS:***

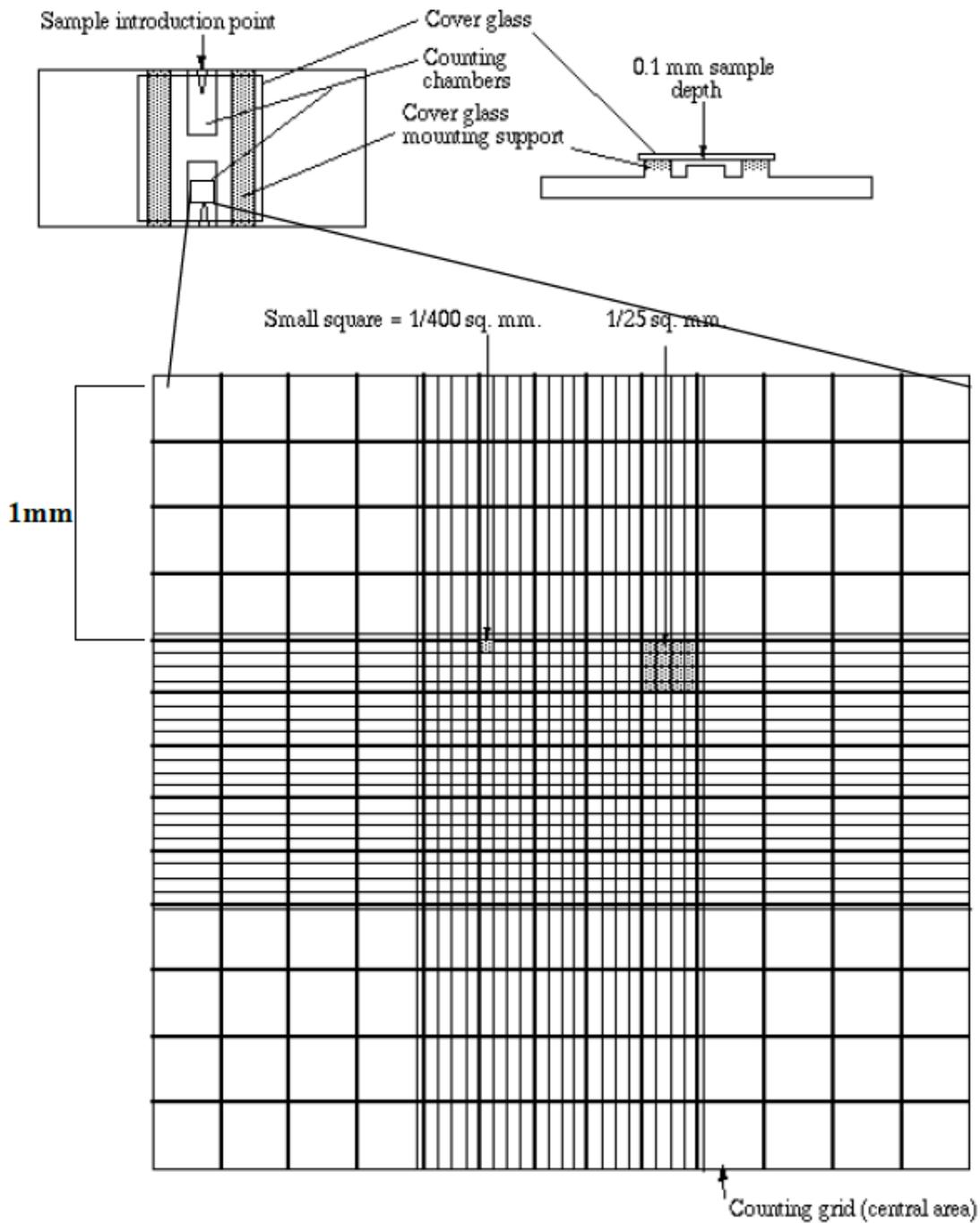
- *No cuente las células entre los cuadrantes ni en el medio del instrumento.*
  - *No considere las células que se posan sobre las líneas directamente.*
  - *No cuente las células teñidas de azul (estas células están muertas ya que adquirieron el tinte Trypan Blue del medio).*
2. El número total de células que se cuenten determinará la precisión. Para obtener un número lo más preciso posible, continúe contando células de cuadrante en cuadrante hasta que exceda 200 células. Utilice la siguiente fórmula para determinar la densidad de las células en la suspensión de células.

$$\frac{\text{Número total de células (contadas)} \times (\text{factor de dilución}) \times 10^4}{\text{Número de cuadrantes contados}} = \text{total de células/ml}$$

#### Subcultivo celular

1. Determine la cantidad de células en los mililitros totales de la suspensión
2. Determine:
  - ¿Cuántos mililitros totales (células + medio fresco) debes tener para obtener una densidad de  $5.0 \times 10^5$  células/ml?
  - ¿Cuántos mililitros de medio debes añadir?
3. Establece el subcultivo.

4. En un frasco de 25cm<sup>2</sup>, utilizando una pipeta estéril, añade la cantidad de medio fresco que determinó en el paso 2. Luego, añade los mililitros de la suspensión de células que determinó en el paso 2.
5. Incuba a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>. Verifica el cultivo cada 2 días.



**Figura 1.1** Laminilla del hemacitómetro (Improve Neubauer) y cubreobjetos. El cubreobjetos se ensambla a la laminilla y la suspensión de células es añadida a las cámaras de conteo usando una micropipeta. Los 4 cuadrantes de las esquinas son utilizados para el conteo de las células.

## Preguntas

1. ¿Cuál es el propósito de utilizar Trypan Blue?
2. Investigue los nutrientes que se encuentran en el medio de cultivo que se utilizó en este laboratorio. ¿Cuál es la función de estos suplementos?
3. ¿Por qué se añade suero bovino y antibióticos al medio de cultivo?
4. ¿A qué se debe el cambio en apariencia del medio luego de varios días de incubación?
5. ¿Cuál es el propósito de mantener una atmósfera de CO<sub>2</sub> en la incubadora para el cultivo de células eucarióticas?

## Referencias

ATCC Product Details. [En línea] Accesado: 24 de enero de 2013. Disponible en:  
<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-1581&Template=cellBiology>

Experimental biosciences. [En línea] Accesado: 13 de marzo de 2006. Disponible en:  
<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/cellcounting.html>

Harlow, E. and Lane, D. Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. New York, USA. 1988. pp. 245-281

Parham, P. (2005) The Immune System. Second Edition. Garland Science. New York, USA. 2005. pp 182-193

*\*Revisado enero 2013, MBS*

## Extracción de RNA total

### Introducción:

El RNA es una molécula biológicamente importante que consiste de una cadena de nucleótidos; cada uno compuesto de una base nitrogenada, una ribosa y un grupo fosfato. El RNA es muy parecido al DNA, pero difiere en algunos detalles estructurales muy importantes (Tabla #1). El RNA tiene cuatro estructuras principales, estas son: rRNA, tRNA, mRNA y snRNA.

	RNA	DNA
Composición	Una sola hebra	Doble hebra o doble hélice
Azúcar	Ribosa	Deoxiribosa
Bases Nitrogenadas	Uracil	Timina

**Tabla #1: Diferencias estructurales entre DNA y RNA**

Los distintos tipos de RNA difieren en su peso molecular, por esta razón se pueden separar por electroforesis de gel, centrifugación por gradiente de densidad, intercambio de aniones o cromatografía líquida. En el caso de mRNA, es heterogéneo en tamaño y secuencia, pero al tener un terminal 3' de poly-A es posible purificarlo a través de una cromatografía de afinidad utilizando un oligo(dt)-celulosa.

La extracción de RNA es un proceso delicado donde mantener un área de trabajo limpio y libre de ribonucleasas es un factor crítico. Estas enzimas degradan RNA y se encuentran prácticamente en todos lados, además son sumamente resistentes y difíciles de inactivar. *Ver apéndice sobre el manejo adecuado de muestras de RNA antes de proseguir.*

Este ejercicio de laboratorio se compone de tres partes: (1) Determinar la densidad celular, para aislar la cantidad de células necesarias para la experimentación, (2) extracción de RNA total y (3) análisis de la muestra de RNA.

### Densidad Celular:

***NOTA: Haga referencia al protocolo de Cultivo Celular***

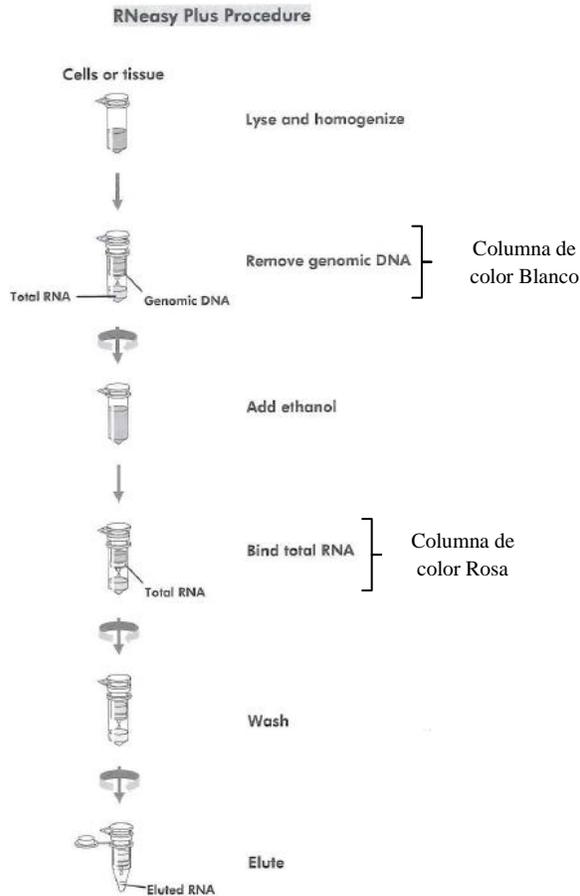
Esta primera parte del laboratorio consiste en calcular la densidad de las células utilizando un hemacitómetro. Para el experimento de hoy utilizaremos  $1 \times 10^7$  células/muestra de RNA. Es importante que la cantidad de células no sea mayor de ésta, ya que se sobrepasaría la cantidad de

enlace de la columna de RNA que se utilizara y se afecta la cantidad y calidad del RNA que se extraiga de las células.

### Extracción RNA

Para el procedimiento de extracción de RNA total es importante conocer que la molécula de RNA es extremadamente susceptible a degradación. Por lo tanto, este proceso deberá ser realizado de forma rápida y eficiente. La homogenización del material inicial y la disrupción del mismo es un requisito absoluto para todos los procedimientos de extracción de RNA total, puesto que la disrupción de las membranas plasmáticas de las células y organelos es necesaria para que todo el RNA contenido en la muestra sea librado y la homogenización es necesaria para reducir la viscosidad de los lisados producidos por la disrupción. La homogenización incompleta resulta en el enlace ineficiente del RNA a la columna que a su vez reduce el rendimiento de la misma.

El DNA es eliminado utilizando una de las columnas de purificación la cual está compuesta de silica. La solución restante contiene el RNA. Se añade etanol 70% el cual crea las condiciones óptimas para el enlace de RNA por la columna color rosa. Luego se lava repetidamente la solución con los buffers RPE y RWI. Estos buffers contienen sales de guanidina que ayudan a inactivar ribonucleasas, y finalmente se diluye el RNA en agua libre de ribonucleasas y se obtiene el RNA total.



Análisi: **Figura #1. Esquema del procedimiento de Extracción de RNA Total (QIAGEN® 2010)**

Luego de haber llevado a cabo la extracción de RNA se verificará la eficiencia de la extracción. La misma se llevara a cabo de dos maneras, primero utilizando un análisis espectrofotométrico y luego a través de una electroforesis.

### **Materiales:**

- Células (“pellet”) =  $1.0 \times 10^7$
- Tubos de 1.5 mL (procesados con DEPC)
- RNaseZap® (Ambion®)
- RNeasy® Mini Kit (QIAGEN®)
  - 600 µL solución RTL Plus + B-Mercaptoethanol
  - 350 µL etanol al 70%
  - 700 µL solución RW1
  - 1 mL solución RPE
  - 50 µL de agua libre de RNasas
  - Columna color rosa (“RNeasy Mini Spin Column”)
- Etanol 70%

- Centrifuga
- Microcentrifuga
- Jeringuilla de 1cc con aguja de 20 o 21 gauge
- Micropipetas adecuadas

**Procedimiento:**

**NOTAS:**

- *Utilizar, antes y durante del experimento, la solución de RNaseZap® para eliminar ribonucleasas en el área de trabajo, pipetas, guantes, etc.*
- *Recuerde que este procedimiento TIENE que llevarlo a cabo para sus células control y experimentales.*
- *Si decide congelar las células para luego llevar a cabo la extracción de RNA, es sumamente importante que recuerde que al congelar y descongelar las células la membrana celular se romperá. Al romperse la membrana celular el RNA que haya dentro de la membrana saldrá. De haber algún volumen en el tubo NO descarte, siga el protocolo de RNA desde la adición del buffer RLT PLUS.*

1. Determina la concentración de las células. → *Ver protocolo de cultivo celular.*
2. Aísla 2 muestras, cada una con  $1.0 \times 10^7$  de células (1 experimental y 1 control) y colócalas en tubos de 15 mL. (Recuerde que la cantidad de mL de células que necesites, dependerá de la concentración de tu cultivo).
3. Centrifuga por 10 min, a 1,200 rpm.
4. Verifica la formación de “pellet” de células y descarta el sobrenadante.
5. Suelta los pellets golpeando las paredes del tubo y re-suspéndelos en 1 mL del medio de cultivo.
6. Transfiere las muestras a tubos de 1.5 mL (total 2 tubos de 1.5 mL).
7. Centrifugue 5 minutos a velocidad máxima. Aspire el sobrenadante.
8. Resuspenda el pellet en 600  $\mu$ L de la solución RLT Plus con  $\beta$  mercaptoetanol.
9. Homogeniza la solución pasando a través de una jeringuilla de 5 a 6 veces.

***Nota: Del siguiente paso en adelante, toda centrifugación debe ser a una temperatura de 20 a 25°C.***

10. Transfiere el lisado a la columna color blanco (“gDNA Eliminator Spin Column”) que se coloca sobre el tubo de 2 mL. Centrifuga a velocidad máxima por 30 segundos.
11. Descarta la columna color blanco y MANTEN la solución que eluyó de la misma (el eluido contiene RNA).
12. Añade un volumen (aproximadamente 600  $\mu$ L de etanol al eluido del paso anterior y mezclar usando la micropipeta, evitando la formación de espuma. **No centrifugue.**
13. Transfiere hasta 700  $\mu$ L de la solución (incluyendo algún precipitado que se forme) a la columna color rosa (“RNeasy Spin Column”), que se coloca sobre un tubo de 2mL. Centrifugue a velocidad máxima por 15 segundos.  
*Descartar eluido*



14. Añade 700  $\mu$ L de la solución RW1 a la columna y centrifugue por 15 segundos a velocidad máxima. (Revisar tubo de 2 mL)  
*Descartar eluido*
15. Añade 500  $\mu$ L de la solución RPE a la columna y centrifugue por 15 segundos a velocidad máxima. (Revisar tubo de 2 mL)  
*Descartar eluido*
16. Añade 500  $\mu$ L de la solución RPE a la columna y centrifugue por 2 minutos a velocidad máxima.
17. Ponga la columna en un tubo nuevo de 1.5 mL. Es necesario cortar la tapa del tubo de 1.5 mL y guardarla para poder cerrar el tubo luego de la centrifugación.
18. Añade 50  $\mu$ L de agua libre de RNasas directamente a la membrana de la columna. Centrifugue por 1 minuto a velocidad máxima.

**Nota:**

- ***En este paso deseamos CONSERVAR EL ELUIDO ya que corresponde al RNA total de las células.***
  - a. Si desea obtener más de 30  $\mu$ g de RNA debe repetir este paso utilizando el mismo tubo de centrifuga para coleccionar el eluido (i.e., RNA)
- 19. Cierre el tubo y mantenga la muestra en hielo. Si no lo va a utilizar hasta una próxima ocasión, almacene en el congelador a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **Preguntas**

1. ¿Por qué es importante eliminar el DNA de la muestra?
2. ¿Qué pasaría si inviertes el orden en que utilizas las columnas durante este procedimiento?

## **Referencias:**

QIAGEN<sup>®</sup>. (September 2010). *RNeasy<sup>®</sup> Plus Mini Handbook* (Unknown Ed.). Sponsored by various countries.

*\*Revisado enero 2012*

## **Apéndice: Control de RNAsas**

Cuando se trata de técnicas moleculares como el PCR en tiempo real o el análisis de “arrays”, el obtener RNA de alta calidad es el paso más crítico. El cuerpo humano utiliza las RNAsas para defenderse en contra de microorganismos que invaden. Esto lo hacen a través de la secreción de estas mismas enzimas en fluidos como las lágrimas, la saliva, el moco y la transpiración o sudor. Los problemas de contaminación con RNAsas empeoran puesto que microorganismos y sus derivados (ej. enzimas de restricción, polimerasas, etc.) son utilizados con frecuencia en laboratorios.

Al trabajar con RNAsas debes tener las siguientes precauciones:

1. Utilice guantes en los experimentos para prevenir la contaminación con las RNAsas que se encuentran en la mayoría de las manos humanas.
2. Cambie sus guantes al tener contacto con piel (ej. cara), perillas, y superficies comunes.
3. Utilice un set de pipetas dedicado solo al trabajo con RNA.
4. Utilice puntas y tubos que estén garantizados como libre de RNAsas
5. Utilice químicos y reactivos libre de RNAsas.
6. Designar un área en el laboratorio que este apartado o protegido de escapes de aire y ventanas abiertas como “Zona libre de RNAsas”.

Estas precauciones te ayudaran a minimizar los problemas de contaminación con las RNAsas.

## Lecturas Espectrofotométricas utilizando NanoDrop®

### Introducción

La concentración de RNA en la muestra se puede determinar utilizando la correlación establecida por la Ley de Beer-Lambert. En el caso del RNA una unidad de Abs<sub>260</sub> corresponde a 44 µg/mL de RNA. Esta razón es solamente válida si la absorbancia se mide a pH neutral y si las lecturas de absorbancia se encuentran en un rango de 0.15 -1.0.

$$\text{Concentración de RNA} = (44 \mu\text{g/mL}) (\text{Abs}_{260}) (\text{factor de dilución})$$

$$\text{Cantidad total de RNA} = (\text{concentración de la muestra } \mu\text{g/mL}) \times (\text{mL totales de la muestra})$$

El análisis espectrofotométrico también permite obtener un estimado de la pureza de la muestra con respecto a la presencia de otros contaminantes que absorben luz ultravioleta UV como las proteínas. La misma se determina al determinar la razón entre la Abs<sub>260</sub> y la Abs<sub>280</sub>. Para una muestra de RNA puro esta razón es entre 1.9 a 2.1.

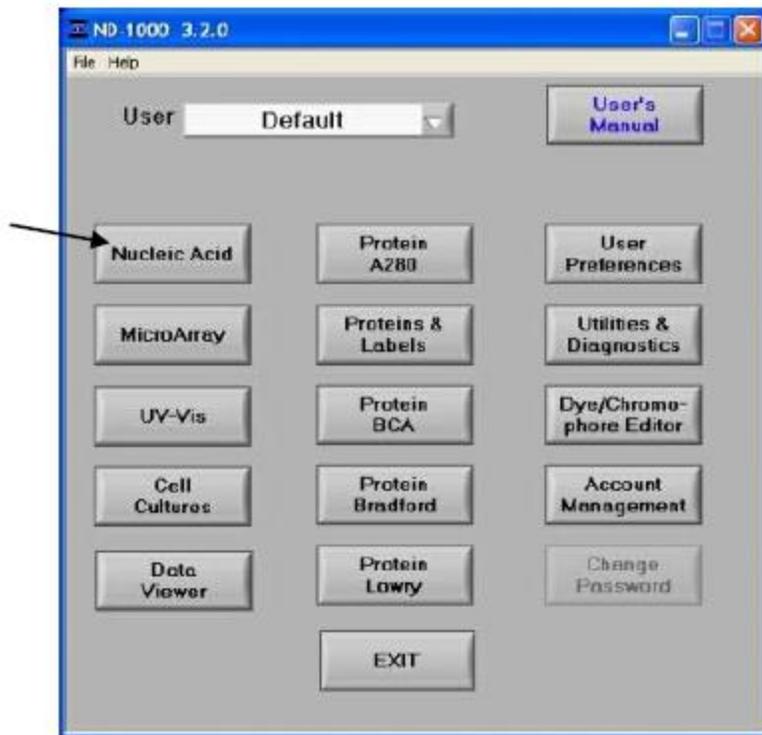
### Materiales

- Micropipeta de 0.5 – 10 µl a y respectivas puntas
- NanoDrop® (espectrofotómetro)
- Agua libre de RNasas
- Kim Wipe
- Muestras de RNA

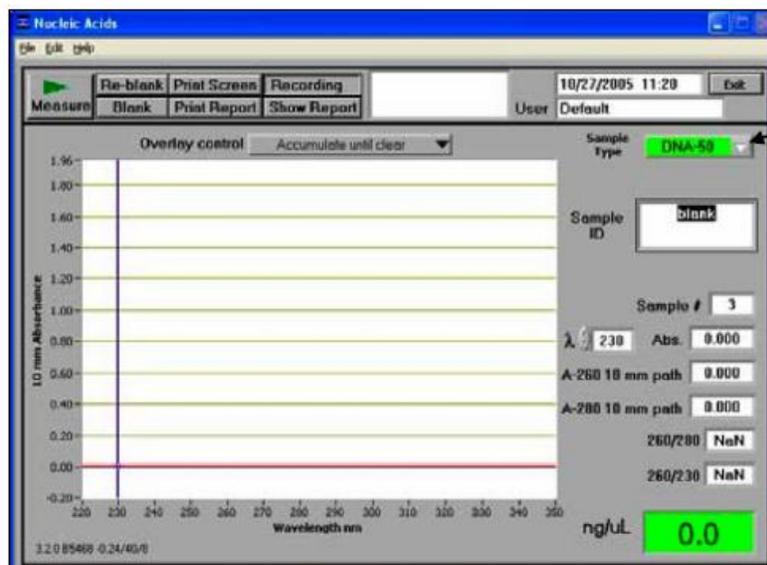
***Nota: Mantener la muestra de RNA en hielo y guardar tan pronto sea posible a temperatura de -20°C para evitar la degradación del mismo***

### Procedimiento

1. Utilizando un Kim Wipe, alce el brazo del NanoDrop y limpie el área de lectura. Deposite 1 µl de agua destilada en el área de lectura.
2. Vaya a la computadora y abra el programa. En las opciones que se presentan escoja la que corresponda a su muestra.



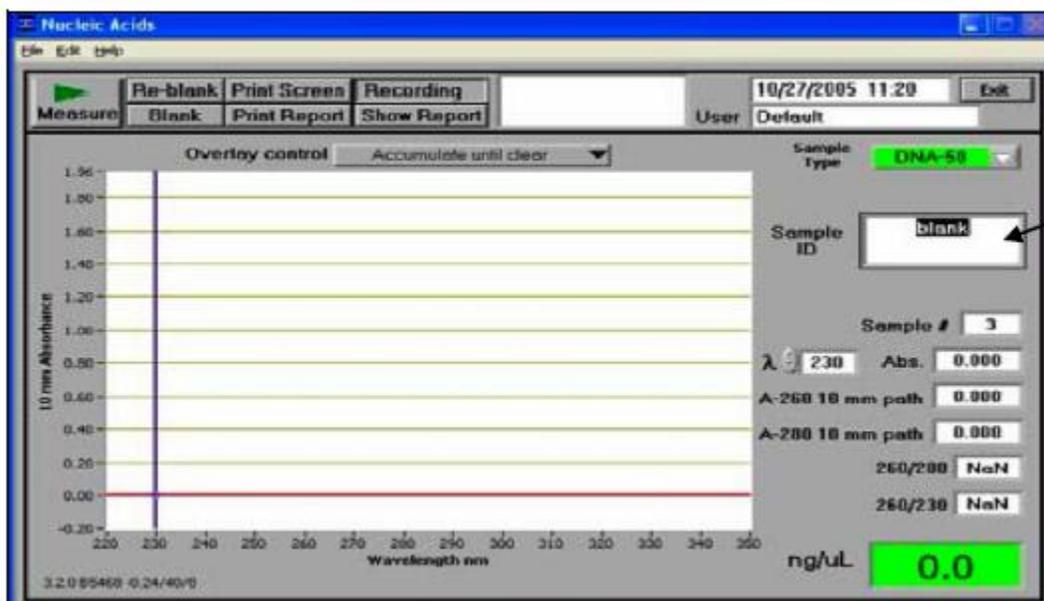
- Al abrir la ventanilla le aparecerán varias opciones. En la opción de “sample type” asegúrese que este programado para leer el tipo de muestra que seleccionó, sino oprimir la flecha y escoger la opción correcta.



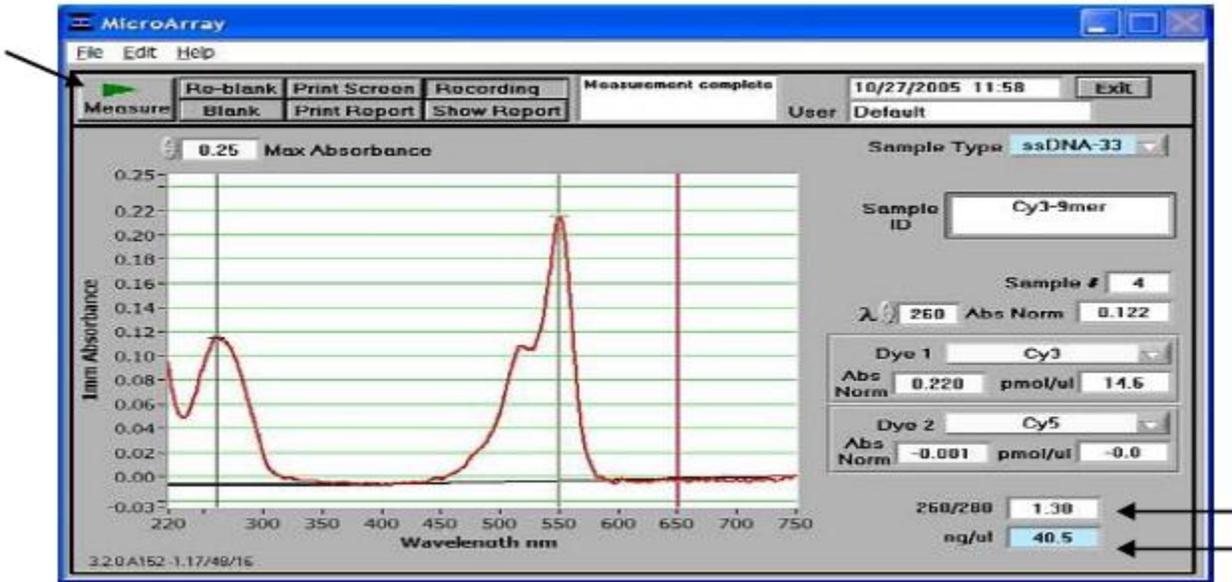
4. Oprima la opción de “BLANK”, para que el programa calibre la absorbancia con la solución blanco. Debe de aparecer una gráfica que tenga valor de 0 en el eje de y y sea una línea recta a través del eje de x.
5. Luego levante el brazo del NanoDrop y con un KimWipe limpie el agua destilada.
6. Añada 1 µl de la muestra y baje el brazo del NanoDrop con la muestra.
7. Verifique que el largo de onda este correcto según su muestra.



8. En la pantalla del programa debe de hallar el área de “Sample ID” y a su derecha una área en blanco para escribir. En esa área escriba la identificación de su muestra.



- También hallará una opción de medida. Al oprimir la opción se medirá la absorbancia de la muestra.



- Anote en su libreta la concentración de la muestra (ng/l) y la razón 260/280.

### Preguntas:

- De haber DNA en tu muestra, ¿Puede este afectar la concentración/cantidad total que se determina de RNA? Explica.
- ¿Qué puede causar que una muestra tenga una razón 260/280 menor de 1.9-2.1?

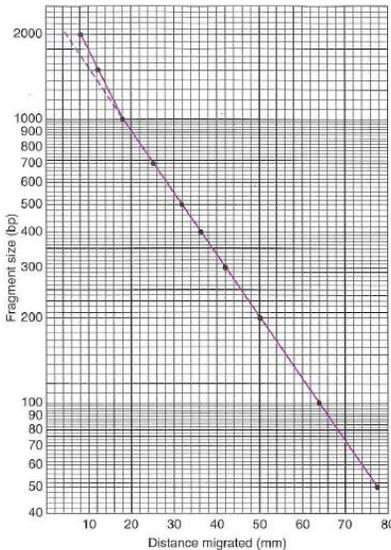
### Referencias:

- Daugherty, E. (2007). Spectrophotometers and Concentration Assays, *Biotechnology: Science for the New Millenium*. (pp. 189-194). Saint Paul, MN: Paradigm Publishing, Inc.
- NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers. (2007). *NanoDrop Technical Support Bulletin*. Wilmington, Delaware: NanoDrop Technologies, Inc.
- Switzer, R., & Garrit, L. (1999). Photometry, *Experimental Biochemistry: theory and exercises in fundamental methods*. (pp. 15-24). New York: W. H. Freeman and Company.

## Electroforesis de RNA total

### Introducción

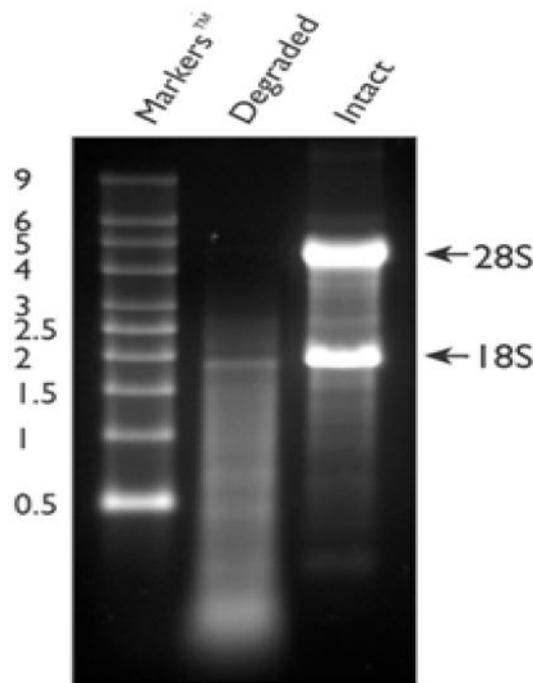
La **electroforesis** es una técnica que separa moléculas cargadas, según su movilidad, a través de un campo eléctrico. Las moléculas con cargas negativas (como los ácidos nucleicos) migran hacia el ánodo mientras que las moléculas con carga positiva migran al cátodo. Este proceso se puede realizar en distintas matrices. Las más comunes para trabajar la separación de ácidos nucleicos son la acrilamida y la agarosa. En éstas se genera una matriz porosa en el gel, y las moléculas migran por tamaño y forma (en el caso de los ácidos nucleicos, el factor “carga” no contribuye a la separación que ocurre a través de esta técnica ya que estas moléculas tienen la misma carga). El tamaño del poro en el gel depende de la concentración de acrilamida o agarosa utilizada; a mayor concentración, mayor la selectividad en el gel. El gel permite que las moléculas de menor tamaño sean las primeras en migrar, dejando las de mayor tamaño en la parte superior (Gráfica #1). Esta técnica, además de ser utilizada para separar las moléculas presentes en una muestra, se utiliza para determinar el peso molecular y estimar la cantidad relativa de moléculas. También, para determinar la pureza y la calidad de la integridad de las moléculas en la muestra



**Gráfica #1. Migración de los fragmentos de DNA según el tamaño de sus bases pares:** El eje vertical es logarítmico por que su movilidad electroforética (Radio de Migración) de los fragmentos de DNA es inversamente proporcional a el tamaño del logaritmo. (Weaver, Molecular Biology)

Al trabajar con RNA se puede utilizar electroforesis nativa o denaturante de acuerdo a la información que se pretende obtener. En la **electroforesis denaturante** las moléculas migran, exclusivamente, de acuerdo a su tamaño ya que se utiliza formaldehído para eliminar la conformación de las moléculas de RNA (el formaldehído rompe las estructuras secundarias del RNA). Por otra parte, la **electroforesis nativa** se utiliza cuando lo que se busca es mantener la conformación y la actividad de la molécula que se someterá a la electroforesis.

En el ejercicio de hoy utilizaremos la técnica de electroforesis nativa en agarosa para determinar la integridad y la calidad de la muestra de RNA total. La agarosa es un polisacárido natural, y es el material precursor en las aplicaciones de electroforesis. El análisis que realizaremos se logra evaluando la integridad y el grosor de las bandas correspondientes a los RNA ribosomales (rRNA) 28S y 18S (Figura 1). Una de las desventajas del gel nativo es que las bandas de RNA no estarán tan definidas en comparación con las bandas de RNA de un gel denaturante, y que una sola especie de RNA puede migrar, como varias bandas, representando múltiples estructuras. No obstante, para el propósito de determinar la calidad de la preparación de RNA, este tipo de gel es suficiente y provee la ventaja de que no hay que trabajar con sustancias toxicas como el formaldehído y la formalina.



**Figura #1: Electroforesis de RNA en gel de agarosa**

Imagen tomada de: [http://www.ambion.com/techlib/append/supp/rna\\_gel.html](http://www.ambion.com/techlib/append/supp/rna_gel.html)

### Visualización de los ácidos nucleicos

El RNA, al igual que el DNA, es incoloro, de manera que los fragmentos no se pueden ver en el gel durante la electroforesis. Para visualizar la migración de la muestra en el gel se añade una solución de carga, que contiene dos colorantes de azul, a la solución de ácido nucleico. Los colorantes no tiñen el DNA pero facilitan la carga de los geles y permite ver el avance de la electroforesis. Los colorantes, al igual que los ácidos nucleicos, migran hacia el polo positivo situado al final del gel.

Al finalizar el procedimiento la tinción de los ácidos nucleicos permite visualizar su localización en el gel. Para esto el gel es sumergido en una solución diluida de bromuro de etidio (EtBr). Este

se intercala entre los nucleótidos de las moléculas de ácidos nucleicos que se encuentran atrapadas en el gel de agarosa. El EtBr, al ser expuesto a luz ultravioleta (UV), indica la presencia de DNA con una fluorescencia anaranjada intensa. El grado de fluorescencia indicara, además de la presencia de DNA/RNA, la cantidad del mismo en la muestra. Para aumentar el contraste y visualizar con facilidad las bandas de DNA o RNA, el exceso de colorante se puede eliminar del gel destiñéndolo con agua. Cuando las bandas sean visibles, se utiliza un equipo fotográfico especial para la digitalización de la imagen.

## Procedimiento

**NOTA: Al trabajar con RNA es importante mantener las muestras y las superficies libres de ribonucleasas. Utilice guantes y RNA Zap® en todo momento. (Ver protocolo de RNA)**

1. Haga un gel de agarosa al 1% y una vez solidifique añada 1xTBE “running buffer” hasta cubrir el gel. **NOTA: Para más información sobre cómo hacer el gel, vea el Apéndice.**
2. Prepare las muestras de RNA (control y experimental)
  - a. Determine el volumen necesario para analizar de 1-2µg de la muestra de RNA.
  - b. En el tubo de 1.5mL prepara la muestra control de RNA de la siguiente manera:  
\_\_\_µL RNA (2µg)  
\_\_\_µL 10x Loading buffer  
\_\_\_µL dH<sub>2</sub>O libre de nucleasas  
  
Hasta llegar a un volumen de 10-20µL según indique el instructor.
  - c. Repita el paso (b) para la muestra de RNA experimental.
3. Remueva el peine del gel y añada los µL totales de las muestras en el pocillo correspondiente. Espere a que las muestras penetren de 2 a 3 mm en el gel.
4. Ponga la cubierta a la cámara de electroforesis, de forma que los ánodos y los cátodos estén en el lugar correspondiente.
5. Conecte los cables de la cámara de electroforesis al voltímetro. El voltímetro debe de estar alrededor de 5-6 V/cm. Deje correr por alrededor de dos horas o hasta que la muestra haya corrido 2/3 del gel.
6. Para visualizar los resultados, con mucho cuidado, saque el gel de la cámara y tíñalo con EtBr.

### Teñir con EtBr luego de la electroforesis

**NOTA: El EtBr es cancerígeno. Utilizar guantes al momento de trabajar con este químico. El área de uso debe estar cubierto por papel absorbente plástico.**

En el envase que contiene la solución acuosa de 0.5µg/mL de EtBr. Sumerge el gel e incuba de 10-20 minutos a temperatura ambiente. Para visualizar el gel, llévalo al transluminador UV. Si necesita aumentar el contraste, puede desteñir el gel en agua por 10-20 minutos a temperatura ambiente.

**NOTA: La luz UV debe ser utilizada con protección adecuada para los ojos.**

Todo puede ser desechado en el zafacón con excepción de las soluciones de EtBr y las geles que fueron sumergidas en él.

### **Preguntas**

1. ¿A qué se debe el “smear” de fragmento que se visualiza en la muestra de RNA?
2. ¿Cómo serían tus resultados si en vez de RNA total hubieses aislado solo mRNA?
3. ¿Por qué es importante que el RNA sea de alta calidad?
4. Si la muestra tuviese DNA genómico, ¿Se vería en el gel? ¿dónde migraría?

### **Referencias**

- Daugherty, E. (2007). DNA Isolation and Analysis, *Biotechnology Laboratory Manual*. (pp. 69-70). Saint Paul, MN: Paradigm Publishing, Inc.
- Farrell, S. O. (2008). Restriction Enzymes, *Instructor's Manual to accompany Experiments in Biochemistry: A Hands-on Approach*. (p. 121). Orlando, FL: Saunders College Publishing.
- Mathews, Holde, V., Ahern. (1999) The Matrix of Life: weak Interactions in Aqueous Environment, *BIOCHEMISTRY*. (pp. 52-55). San Francisco, CA: Addison Wesley Longman.
- Switzer, R. & Garrit, L. (1999) Electrophoresis, *Experimental Biochemistry: theory and exercises in fundamental methods*. (pp. 61-77). New York: W. H. Freeman and Company.
- Weaver, R. F. (2008). Molecular Tools for Studying Genes and Genes Activity, *Molecular Biology*. (pp. 84-88). New York: McGraw-Hill.

## **Apéndice: Preparación de gel de agarosa 1%**

### Gel

1. Para hacer un gel de agarosa al 1% tiene que preparar 50mL de solución de agarosa 1% en 1xTBE en un frasco Erlenmeyer de cristal de 125mL. No agite el envase ya que es difícil derretir agarosa que no está en la solución y está pegada a las paredes de vidrio de frasco. Marque el nivel del líquido en las afueras del frasco y ponga un Kimwipe en la apertura del frasco para evitar la evaporación excesiva.
2. Caliente el gel en el microondas (1.30 minutos). Agarre el frasco con guantes de protección ya que estará extremadamente caliente. La agarosa debe derretirse completamente sin dejar ningún grano en la solución. Verifique que el volumen de la solución no haya cambiado, si disminuye añada agua destilada (dH<sub>2</sub>O) hasta la marca.
3. Deje enfriar a temperatura ambiente hasta que se pueda tocar el frasco sin necesidad de los guantes de protección.
4. Mientras la solución se enfría, arme la cámara de electroforesis y coloque la bandeja, esta contendrá el gel de forma correcta y nivelada.
5. Vierta el gel de agarosa en la bandeja y luego introduzca el peine. Si se forman burbujas remuévalas con una micropipeta. Deje solidificar el gel por alrededor de 30 minutos a temperatura ambiente. La agarosa solidificada se torna de un color opaco.
6. Cuando solidifique la agarosa, añada 1xTBE “running buffer” hasta que el gel tenga una profundidad de 3-4mm. Con mucha delicadeza remueva el peine halando hacia arriba y en un solo movimiento.

## Síntesis y marcaje de cDNA

### Introducción

El DNA complementario o cDNA es una cadena de DNA que se sintetiza utilizando la molécula de RNA como templado. La técnica de sintetizar cDNA *in vitro* utiliza la enzima transcriptasa inversa, y el producto es una molécula de DNA que contiene las secuencias de DNA que codifican proteínas, ya que utiliza como templado el mRNA. La enzima transcriptasa inversa se encuentra en la naturaleza en retrovirus. En las células eucariotas también existen enzimas como las telomerasas, que utilizan un mecanismo similar (i.e., utilizan RNA como templado) para la síntesis de DNA.

Para la síntesis y marcaje de cDNA que realizaremos como parte del procedimiento de “microarrays” se utilizará el kit de la compañía Genisphere®: 3DNA Array 350 (Figura 1). El procedimiento de hoy conlleva la síntesis de cDNA utilizando la enzima transcriptasa inverso, una mezcla de deoxinucleótidos trifosfatados, y un iniciador de poly-timidina trifosfato. En los ejercicios subsiguientes, el cDNA se hibridizará a las moléculas de DNA que se encuentran en el “microarray” y el procedimiento termina al hibridizar el fluorocromo al cDNA utilizando una secuencia que se encuentra en el terminal 5’ del cDNA. La ausencia del fluorocromo durante el proceso de hibridación evita hibridaciones ineficientes al “microarray” y maximiza la señal que emite el fluorocromo porque evita que el mismo se desintegre.

El utilizar este kit para síntesis y marcaje de cDNA también tiene ventaja de que cada molécula de “3DNA” contiene un promedio de 375 moléculas florecentes por lo que provee amplificación de la señal que proviene del cDNA que esta enlazado y permite que la señal que se genera sea independiente de la composición de bases o longitud del cDNA.

### Materiales

- Alcohol 70%
- 3DNA Array 350 Kit (Genisphere®)
- Microtubos de 1.5 ml
- RNaseZap®
- Muestra de RNA
- Micropipeta 0.5 a 10 µl
- Puntas de micropipeta libres de RNasas

## Microarray Detection with 3DNA™ Reagents

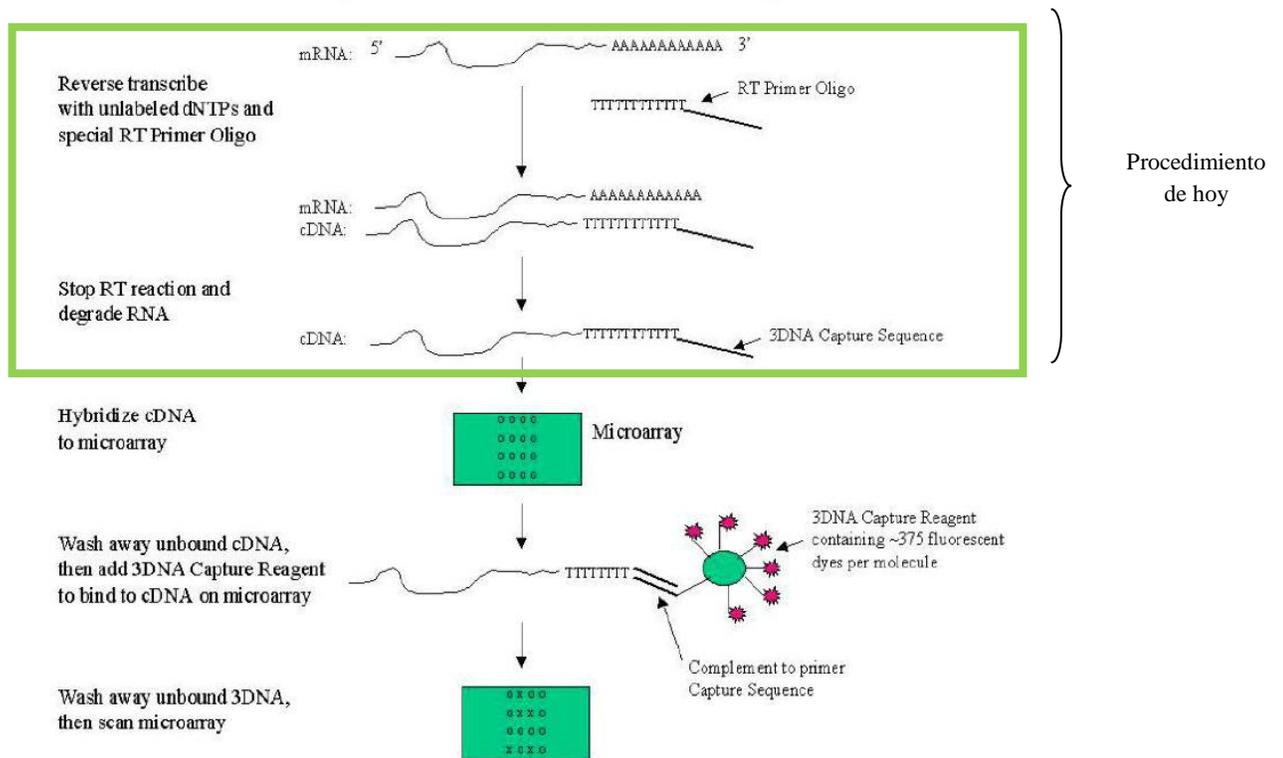


Figura #1: Esquema del procedimiento de síntesis y marcaje de cDNA utilizando el kit de Genisphere®

### Procedimiento

**Alerta:** Trabaje con todas las precauciones necesarias para mantener la estabilidad de su RNA. Mantenga sus muestras y soluciones en un contenedor de hielo todo el tiempo.

1. Prepare el “RNA-RT primer mix” para cada una de sus muestras.
  - 1 a 10 µl de RNA total (1-5 µg de RNA)
  - 1 µl de primer RT (Vial 2, ya sea Cy3 para la muestra control o Cy5 para la muestra experimental).
  - Añadir agua libre de nucleasas (Vial 10) hasta llegar al volumen final de 11 µl
2. Centrifugue la solución brevemente para colectar en el fondo.
3. Caliente la solución a 80°C por 10 minutos y transfiera inmediatamente a hielo de 2 a 3 minutos.
4. Prepare en un microtubo de 1.5 ml la solución de “reacción” para cada “RNA-RT primer mix” que preparó en el paso 1:
  - 4 µl 5X SuperScript II First Strand Buffer
  - 2 µl de agua libre de nucleasas (Vial 10)
  - 1 µl dNTP mix (Vial 3)

- 1  $\mu$ l Superase-In RNase inhibitor (Vial 4)
  - 1  $\mu$ l Superscript II enzyme, 200 units (transcriptasa inversa)
5. Centrifugue rápidamente, a máxima velocidad, los tubos que contienen las reacciones. El objetivo es colectar la solución en el fondo. Mantenga los tubos en hielo hasta ser utilizada.
  6. Añada 9  $\mu$ l de la solución de “reacción” (paso 4) a los 11  $\mu$ l del “RNA-RT primer mix”. UNO PARA CADA “COLOR”.
  7. Mezcle la solución (no utilice “vortex”) y centrifugue brevemente. Incube la solución 42°C por 2 horas.
  8. Añada 3.5  $\mu$ l de NaOH/50mM EDTA 0.5M, para detener la reacción.
  9. Incube a 65°C por 15 minutos. Este proceso desnatura los híbridos de DNA y RNA, y degrada el RNA restante.
  10. Añada 5  $\mu$ l de Tris-HCl 1M, a pH7.5, para neutralizar la reacción
  11. Para un ensayo de 2 canales (“Dual Channel Assay”):
    - Combine las soluciones de las reacciones que contienen Cy3 y Cy5, añadiendo la solución de Cy3 al tubo de Cy5
    - Enjuague el tubo de Cy3 con 73  $\mu$ l de 1X TE buffer
    - Añada el “enjuague” al tubo que contiene la mezcla de Cy3 y Cy5
  12. Si no va a utilizar el cDNA inmediatamente guarde en el congelador a -20°C a corto plazo o a -80°C a largo plazo.

### Preguntas

1. ¿Cuál es el propósito de añadir un iniciador poly dT? ¿Se podría utilizar otro? Explica.
2. ¿De qué color se verá el cDNA que será marcado con Cy3? ¿Y con Cy5?
3. ¿Por qué es necesaria la síntesis de cDNA como parte de este procedimiento? ¿Se podría utilizar RNA directamente? Explica.

### Referencias

Bain, V. (2004). cDNA synthesis and aminoallyl labeling (Cy3 & Cy5 Targets). *UNM SOM EXPERIMENTAL BIOTECHNOLOGY LABORATORY: MICROARRAYS*. SOP# M5. 1a

Agilent Direct-label cDNA Synthesis Kit Protocol. (2001). Palo Alto: CA: Agilent Headquarters Bio Research Solutions.

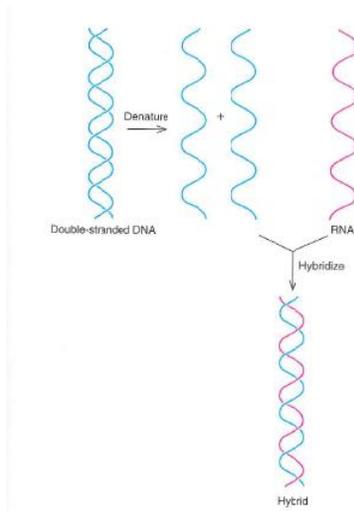
Van Leenen, D., & Bijma, T. (2002). Aminoallyl cDNA Synthesis and labeling, *Genomics Laboratory*. (pp. 1-4).

\*Revisado en enero 2012, MBS.

## Hibridación

### Introducción

La hibridación se puede identificar como la habilidad o capacidad de ácidos nucleicos, de una sola hebra, para formar una doble hélice con otra cadena sencilla de secuencias de bases complementarias. En otras palabras, la hibridación depende de la habilidad del DNA desnaturalizado para realinearse con las cadenas complementarias del blanco, bajo las condiciones apropiadas. . Bajo condiciones favorables que incluyen la temperatura, pH, y fuerza iónica de la solución estas moléculas se re-asociaran con ellas mismas o hibridizaran con otros polinucleótidos que contengan secuencias complementarias. (Fig. 1)



**Figura #1. Hibridación de DNA y RNA:** El DNA en la derecha es denaturado para separar las dos hebras (azul). Luego las dos hebras de DNA se mezclan con una hebra de RNA (rojo) que es complementaria a una de las hebras de DNA. Esta reacción de hibridación se lleva a cabo a temperaturas relativamente altas, que favorece la hibridación RNA:DNA sobre la formación DNA:DNA. El híbrido tiene una hebra de DNA (azul) y otra de RNA (roja).

La capacidad de los ácidos nucleicos de formar una doble cadena a través de la complementariedad de sus bases es la propiedad que es utilizada por múltiples técnicas para el estudio de los genes, incluyendo su estructura y expresión, por ejemplo, el “Northern Blot”, el “Southern Blot”, Microarrays, PCR, etc. Al realizar procedimientos en los que se inmoviliza las moléculas blanco de DNA es importante incluir un paso antes de la hibridación de la sonda, a esto se le conoce como el proceso de pre-hibridación, el cual consiste en la incubación de la muestra con una solución, conteniendo los mismos ingredientes que el buffer de hibridación con excepción de una sonda y/o con DNA no específico. El objetivo es bloquear todas las especies disponibles de manera que ocurran todas las posibles uniones no específicas antes de que la sonda sea introducida en el procedimiento.

Luego de la pre-hibridación, se procede a añadir la sonda bajo condiciones que favorezcan la formación específica de puentes de hidrogeno entre bases complementarias. Finalmente el exceso de sonda y/o la formación de moléculas híbridadas no-específicas se elimina a través de lavados con condiciones astringentes.

## **Referencias**

- Pulido Bravo, E. A. (2010). *Estandarización de la técnica de hibridación in situ para la detección de Streptococcus agalactiae en tejidos de tilapia roja (Oreochromis sp.) y sus uso potencial en estudios epidemiológicos y de patogénesis*. (Doctoral dissertation). Universidad Nacional de Colombia. (780119)
- Ramos Cerrillo, B. *Hibridación in situ*. (Doctoral dissertation). Instituto de Biotecnología UNAM.
- Switzer, R, & Garrit, L. (1999). Nucleic Acids, *Experimental Biochemistry: theory and exercises in fundamental methods*. (pp. 311-314). New York: W.H. Freeman and Company.
- Weaver, R. F. (2008). Molecular Tools for Studying Genes and Genes Activity, *Molecular Biology*. (p. 27y 93). New York: McGraw-Hill.

## Pre- Hibridación de “Microarrays”

### Materiales

- Hybridization Incubator (50°C)
- Baño Caliente (80°C)
- 2X Formamide-Based Hybridization Buffer (Vial 7) 3DNA
- 1µl mouse Cot-1 DNA (Invitrogen; Cat. No. 18440-016)
- Agua libre de nucleasa (Vial 10) 3DNA
- Dry Bath Incubator (70°C)
- Cubre objeto 24X60mm
- 40-45 mL de los siguientes Buffers:
  - 2x SSC, 0.2% SDS
  - 2x SSC
  - 0.2x SSC
- dH<sub>2</sub>O para enjuagar el microarray
- Botellas de aire comprimido
- Microarray
- Pinzas

### Procedimiento

1. Caliente el “microarray” en la incubadora de hibridización a 50°C por 10 minutos.
2. Caliente el 2X “Formamide-Based Hybridization Buffer” (vial 7) en la incubadora (“Dry bath incubator”) a 70°C por al menos 10 minutos o hasta que esté completamente resuspendido. Mezclar utilizando el vortex para resuspender de forma homogénea.
3. Prepare la solución de pre-hibridización:
  - 25µl de Vial 7
  - 1µl mouse Cot-1 DNA
  - 24µl de agua libre de nucleasa
  - = Volumen Total Final: 50µl
4. Caliente la solución de pre-hibridización en el baño de agua a 80°C por 10 minutos.
5. Aplique la solución de pre-hibridización al “microarray” y cubra con un cubreobjeto de 24x60mm.
6. Incube a 50°C en la incubadora de hibridización por 1 hora y media.
7. Luego lave el “microarray” de la siguiente forma:
  - 1 vez en el 2x SSC, 0.2% SDS por 15min a 60-65°C (solución se encuentra en el baño de agua).
  - 1 vez en el 2x SSC por 10 min a temperatura ambiente.

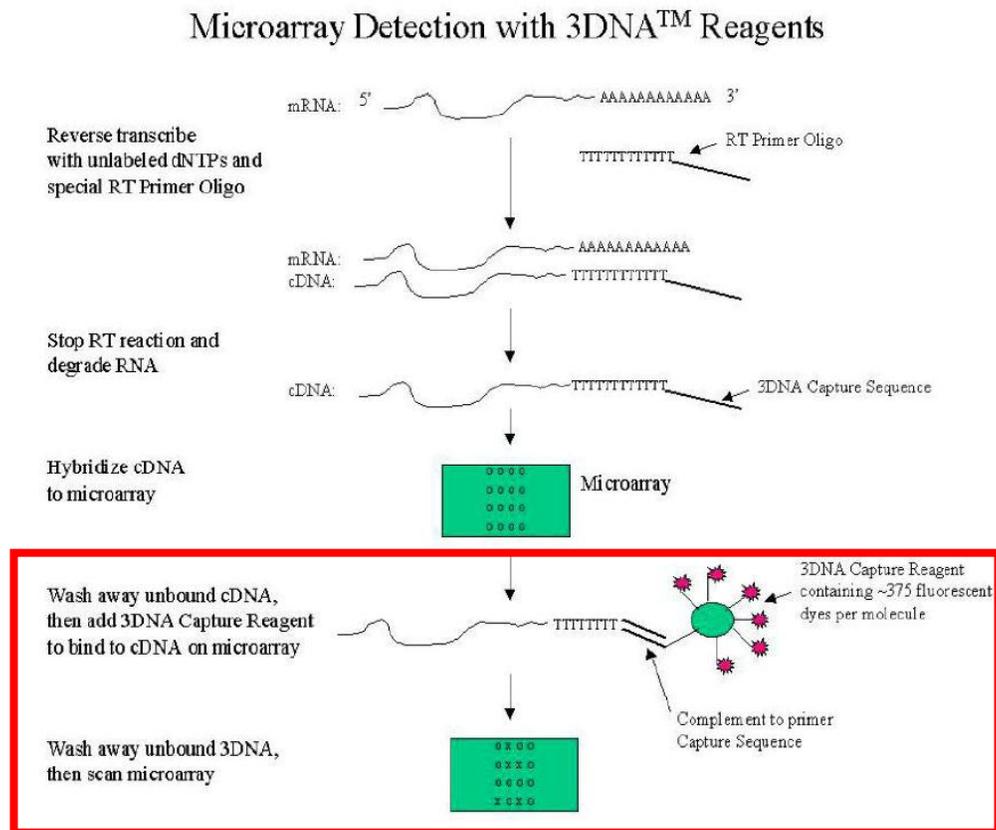
- 1 vez en el 0.2x SSC por 10min a temperatura ambiente.
  - Varias sumergidas en dH<sub>2</sub>O para sacar el exceso de sales y jabón.
8. **Inmediatamente**, seque la laminilla con aire comprimido. Recuerde que el ángulo que utilice para secar la laminilla, debe permitir que el agua corra por la misma sin dejar manchas. Si llega a mancharse la laminilla, vuelva a mojarla en dH<sub>2</sub>O y vuelva a secar utilizando el aire comprimido.

## Hibridación de 3DNA

### Introducción

En este paso se añadirá el fluorocromo a través de la molécula de 3DNA. Este es un proceso delicado, puesto que los fluorocromos tienden a perder su fluorescencia en presencia de luz, por esta razón los procesos se llevan a cabo en cuartos oscuros. La molécula de 3DNA se hibridará con el cDNA ya que la secuencia de captura está integrada en la molécula de cDNA. Esta secuencia de captura que se añade al cDNA en su síntesis, se enlaza con el dendrimero que tiene el fluorocromo.

Este sistema tiene dos ventajas, una de ellas siendo la incorporación tardía del tinte, para evitar degradación de fluorescencia. Además la adición del tinte con el sistema de 3DNA incita más probabilidad de que haya un enlace entre el fluorocromo y el cDNA.



**Figura #1: Esquema del procedimiento de síntesis y marcaje de cDNA utilizando el kit de Genisphere®**

## Materiales

- Microarray
- Cámara de hibridación (Micro-Array Hybrid Chamber)
- 3DNA Capture Reagent Cy5 (Vial 1)
- 3DNA Capture Reagent Cy3 (Vial 1)
- Agua libre de nucleasa (Vial 10)
- Hybridization buffer (Vial 6)
- Incubadora Seca (53°C, 60°C, 77°C)
- Incubadora de hibridación (60°C)
- Tubos de 1.5ml

## Procedimiento

*Nota: Los “Vials 1” son fotosensitivos debe llevar acabo procedimiento en cuarto oscuro o envolver con papel de aluminio los frascos que contengan sustancias fotosensitivas. Recuerde identificar TODOS los tubos.*

1. Prepare el 3DNA Hybridization mix de la siguiente forma:
  - 2.5µl 3DNA Capture Reagent (Vial 1/Cy3)
  - 2.5µl 3DNA Capture Reagent (Vial 1/Cy5)
  - 20µl Agua libre de nucleasa (Vial 10)
  - 25µl 2X Hybridization buffer (Vial 6)Volumen Total en µl: 50µl
2. Vortex y centrifugue el 3DNA Hybridization mix e incube a 77°C en la incubadora seca por 10min, luego mantenga a 60°C en la incubadora de hibridación.
3. Precaliente el microarray a 60°C en la incubadora de hibridación por 10 min en la incubadora.
4. Vortex y centrifugue el 3DNA Hybridization mix, en un cuarto **oscuro**, añada al microarray precalentado, utilizando la pipeta y punta correcta.

*Nota: Cualquier duda de cómo montar el cubreobjetos en el microarray, refiera al protocolo de Práctica de Montaje de laminilla para Hibridación*

5. Aplique el cubre objetos e incube en la cámara (Micro-Array Hybrid Chamber) por 2 horas. Añada 500µl de dH<sub>2</sub>O a la cámara en las áreas debidas.

## PostLavado Hibridación 3DNA

### Materiales

- Microarray
- Buffer's (2X SSC, 0.2%SDS, 2X SSC, 0.2X SSC)
- dH2O
- Aire comprimido
- Kim Wipes
- Baño de agua caliente 42°C

### Procedimiento

*Nota: Este procedimiento tiene que ser en OSCURIDAD, el microarray ya tiene integrado el fluorocromo y es sensible a luz. Si no se está llevando a cabo en un área oscura, forrar los tubos de 50ml en papel de aluminio.*

1. Precaliente el 2X SSC, 0.2%SDS a 42°C en un baño de agua caliente y sumerja el microarray por 20min.

*Nota: El cubreobjetos se desprenderá si no se desprende despegue el cubreobjetos con una aguja. Ponga un Kim Wipe en la mesa de trabajo y deje escurrir la laminilla SIN dejar que se SEQUE.*

2. Sumerja en 2X SSC a temperatura ambiente por 15min.

*Nota: Ponga un Kim Wipe en la mesa de trabajo y deje escurrir la laminilla SIN dejar que se SEQUE.*

3. Sumerja en 0.2X SSC a temperatura ambiente por 15min.

*Nota: Ponga un Kim Wipe en la mesa de trabajo y deje escurrir la laminilla SIN dejar que se SEQUE.*

4. Sumerja varias veces en dH2O para eliminar residuos.

5. Utilizando el aire comprimido, seque la laminilla en un cuarto **oscuro**.

*Nota: Recuerde que la laminilla debe estar a un ángulo cómodo para que las gotas de agua corran con facilidad y NO dejar residuos en la laminilla. Si llega a quedar algún residuo, no deje que se seque la laminilla, vuelva a mojarla (dH2O) y a secarla.*

## DyeSaver2

### Introducción

Con el tiempo los fluorocromos pierden su fluorescencia, por lo tanto se le añade una protección que evite el degrade del Cy3 y Cy5. El DyeSaver es un protector que evita que se desvanezcan las fluorocromos. El DyeSaver es altamente tóxico y debe de ser utilizado con la protección adecuada.

### Materiales

- Microarray
- DyeSaver2
- Pipetas y puntas debidas
- Microarray
- Kim Wipes
- Guantes
- Pinzas

### Procedimiento

***Nota: El DyeSaver es altamente volátil. Este procedimiento debe ser llevado a cabo en un "hood" y con el uso de guantes. Favor leer "product warnings y MSDS" antes de seguir con el experimento (ver anejo).***

1. Con mucho cuidado, llevar al "Hood" el microarray dentro de la cámara. Elimine el agua dentro de la cámara con un Kim Wipe.

***Nota: El microarray tiene los fluorocromos integrados, estos son sensitivos a la luz, todo procedimiento debe ser llevado a cabo en un cuarto oscuro.***

2. Ponga un Kim Wipe en el "Hood" cerca del Coplin Jar que contiene el DyeSaver.
3. Saque el microarray de la cámara y sumérgalo en el DyeSaver de 2 a 3 veces. Se debe formar una capa uniforme en el microarray. Puede utilizar pinzas para aguantar el microarray.
4. Si la capa no es uniforme vuelva a sumergir el microarray, luego deje caer el exceso en el Kim Wipe, finalmente guarde el microarray en la cámara y entregue al profesor o guarde en el desecador.

*Apéndice: Información sobre Dye Saver*

**PRODUCT WARNINGS**

**DANGER! HARMFUL OR FATAL IF SWALLOWED. EXTREMELY FLAMMABLE - VAPORS MAY CAUSE FLASH FIRES! VAPOR HARMFUL. IRRITATES EYES, SKIN AND RESPIRATORY TRACT.**

**CAUTIONS**

**CONTAINS KETONES AND TOLUENE.**

Contents are **EXTREMELY FLAMMABLE**. Keep away from heat, sparks, and open flame. Use only with adequate ventilation. Avoid contact with eyes and skin. Wash hands after using.

**FIRST AID:** In case of eye contact, flush thoroughly with large amounts of water for 15 minutes and get medical attention. For skin contact, wash thoroughly with soap and water. In case of respiratory difficulty, provide fresh air and call physician. If swallowed do not induce vomiting. Call Poison Control Center, hospital emergency room, or physician immediately.

**DELAYED EFFECTS FROM LONG TERM OVEREXPOSURE.** Contains solvents which can cause permanent brain and nervous system damage. Intentional misuse by deliberately concentrating and inhaling the contents can be harmful or fatal.

**WARNING:** This product contains chemicals known to the State of California to cause cancer and birth defects or other reproductive harm.

**DO NOT TAKE INTERNALLY. KEEP OUT OF THE REACH OF CHILDREN. FOR PROFESSIONAL USE ONLY. NOT FOR RESIDENTIAL USE.**

**DO NOT FREEZE. DO NOT STORE ABOVE 110F (45C).**

**Small, dried spills can be cleaned up with acetone. Please refer to the Material Safety Data Sheet**

**(MSDS) for further information.**

## **Suplemento #1: Concentración de cDNA utilizando el filtro Millipore Microcon® YM-30**

### **Materiales**

- Muestras de cDNA
- filtros de Millipore Microcon® YM-30 Centrifugal Filter Device
- Microcentrifuga
- Buffer 1X TE
- Tubos Eppendorf de 1.5ml
- Agua destilada
- Micropipetas de 100 µl y 10µl y sus respectivas puntas

### **Procedimiento**

1. Poner filtro de Microcon® en tubo de reserva de 1.5ml.
2. Lave el filtro añadiendo 100 µl de 1X TE buffer. No debe tocar el filtro con la punta de la pipeta.
3. Ponga la tapa al tubo y centrifugue a 12,000 rpm por 3 min.
4. Añada el cDNA al filtro sin que la punta de la micropipeta toque el filtro.
5. Asegure la tapa y centrifugue por 8- 10 min a 12,000 rpm.
6. Descarte el tubo de colección y añada 5 µl de 1X TE buffer al filtro, sin que la punta de la micropipeta toque el filtro. Asegúrese que el buffer humedezca todo el filtro.
7. Con mucho cuidado, vire el filtro y ponga boca abajo en un tubo de colección nuevo.
8. Centrifugue por 1min a 12,000 rpm.
9. Descarte el filtro, debe de obtener alrededor de 3 a 10 µl de cDNA en el fondo. Para verificar el volumen total debe utilizar la pipeta hasta identificar el mismo.
10. Luego de conocer el volumen de cDNA, añada agua libre de nucleasas hasta obtener un volumen total de 10 µl.

## Suplemento #2: Práctica del montaje de laminilla para hibridación

### Introducción

La práctica del montaje del cubreobjetos a la laminilla es esencial para las hibridaciones del microarray. Un montaje de laminilla exitoso implica que no haya burbujas de aire entre la laminilla y el cubreobjetos. Las burbujas de aire privan que las moléculas de cDNA se enlacen a las moléculas de ADN en el microarray.

### Materiales

- Laminilla
- Cubre objetos 24x60mm
- Agua
- Micropipeta y puntas indicadas
- Aguja de jeringuilla
- Botella de aire comprimido

### Procedimientos

1. Utilizando la micropipeta indicada, obtener un volumen de 50  $\mu$ l de agua y desplazar la misma por la laminilla de forma que haya la menor cantidad de formación de burbujas.
2. Con mucho cuidado incline la laminilla y esparza el agua.

***NOTA: NO DERRAMAR NADA***

3. Utilizando un cubre objetos 24x60mm, cubra el área de la laminilla humedecida.

***NOTA: Evite formación de burbujas***

4. Si hay burbujas presentes, utiliza la aguja para alzar el cubre objetos y eliminar la mayor cantidad de burbujas, no debe alzar el cubre objetos más de 3 veces ya que puede perjudicar las moléculas previamente enlazadas.
5. Practicas varias veces
6. Practicar el secado con aire comprimido.

Revisado marzo 2010

### Suplemento #3: Pre Lavado

Este protocolo es uno de los pasos que realizaremos para preparar el microarray para la hibridación del cDNA. El objetivo es preparar la laminilla para que el cDNA se pueda adherir a ella.

#### Materiales

- Laminilla de microarray
- 40-45 mL de los siguientes Buffers
  - 2X SSC/ 0.2% SDS
  - 0.2X SSC
- Agua destilada (dH<sub>2</sub>O)
- Aire a compresión
- Kim Wipes
- Baño de agua a 55°C
- Pinzas
- Cámara de Hibridación de Microarray

*Nota: El microarray debe estar a temperatura ambiente antes del primer baño con el buffer a temperatura 55°C. NO descarte los amortiguadores, los utilizara a través de varios experimentos.*

#### Procedimiento

1. Sumerja la laminilla en el buffer 2X SSC/ 0.2% SDS calentado a 55°C, por 20 min. Este buffer se encontrará en el baño de agua.

*Nota: Ponga un Kim Wipe en la mesa de trabajo y deje escurrir la laminilla SIN dejar que se SEQUE.*

2. Sumerja la laminilla en el buffer 0.2X SSC a temperatura ambiente por 5 min.

*Nota: Ponga un Kim Wipe en la mesa de trabajo y deje escurrir la laminilla SIN dejar que se SEQUE.*

3. Sumerja la laminilla en dH<sub>2</sub>O por 3 min a temperatura ambiente.
4. Descarte el cubreobjetos.
5. Utilizando el aire comprimido, seque la laminilla.

*Nota: Debe de posicionar la laminilla a un ángulo que las gotas de agua se deslicen con facilidad sin dejar residuo. Si la laminilla se seca y queda con residuos, volver a sumergir en el agua y volver a secar.*

6. Guarde el microarray en la cámara de hibridación y entregue a profesor.

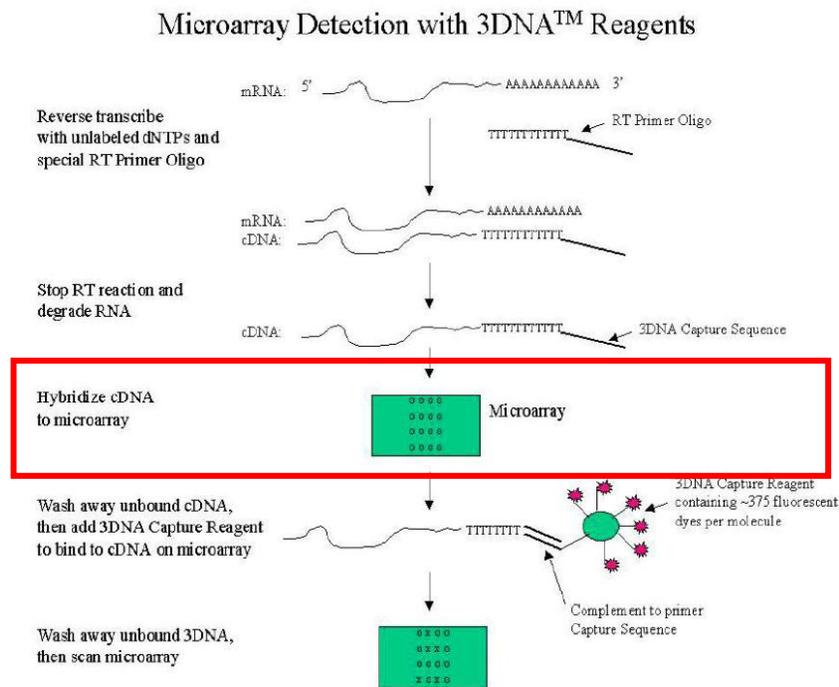
Rev. 28/marzo/2011, MBS

## Suplemento #4: Hibridación del cDNA - realizado por personal del laboratorio

### Materiales

- 2X Enhanced Hybridization buffer (Vial 12)
- cDNA (estudiantes)
- dT Blocker (Vial 9)
- Agua libre de nucleasa (Vial 10)
- Vortex
- Centrifuga
- Tubos de 1.5ml
- Incubadora de hibridación (60°C)
- Incubadora seca (68°C, 78°C)
- Cámara para almacenar microarray (dsecador)
- Microarray
- Cámara de hibridación

### Procedimiento



**Nota: Recuerde identificar TODOS los tubos.**

1. Precaliente el microarray a 60°C en la incubadora de hibridación y mantenga incubado hasta ser utilizado.
2. Prepare la solución de cDNA en un tubo de 1.5ml de la siguiente forma:

- 10 $\mu$ l cDNA
- 2 $\mu$ l dT Blocker (Vial 9)
- 17 $\mu$ l agua libre de nucleasa (Vial 10)
- 29 $\mu$ l 2X enhanced hybridization buffer (Vial 12)

Total de  $\mu$ l en solución: 58 $\mu$ l

3. Resuspenda la solución de cDNA, utilizando el vortex y centrifugue (quick spin).
4. Caliente la solución de cDNA a 78°C en la incubadora seca por 10 min y luego a 60°C en la incubadora de hibridización por 10 min.
5. Resuspenda la solución de cDNA, utilizando el vortex y centrifugue (quick spin).
6. Utilizando la pipeta y punta correcta, vierta la solución de cDNA en el microarray y cubra con el cubreobjetos.

***Nota: Cualquier duda de cómo montar el cubreobjetos en el microarray, refiera a panfleto de Práctica de Montaje de laminilla para Hibridación***

7. Ponga el microarray en una cámara (Micro-Array Hybrid Chamber) y añada 500 $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O en las áreas debidas de la cámara.

## Post Lavado de Hibridación

### Materiales

- Microarray
- Buffer's ( 2X SSC/0.2% SDS y 0.2X SSC)
- Agua destilada
- Aire a comprimido
- Kim Wipes
- Baño de agua a 42° C

### Procedimiento

1. Precaliente el buffer 2X SSC, 0.2% SDS a 42°C en el baño de agua y sumerja la laminilla por 15 min. Si el cubreobjetos no se despegar, utiliza una aguja para despegarla.

*Nota: Ponga un Kim Wipe en la mesa de trabajo y deje escurrir la laminilla SIN dejar que se SEQUE.*

2. Sumerja la laminilla por 12 min en el buffer 2X SSC a temperatura ambiente.

*Nota: Ponga un Kim Wipe en la mesa de trabajo y deje escurrir la laminilla SIN dejar que se SEQUE.*

3. Sumerja la laminilla por 12 min en el buffer 0.2X SSC a temperatura ambiente.

*Nota: Ponga un Kim Wipe en la mesa de trabajo y deje escurrir la laminilla SIN dejar que se SEQUE.*

4. Sumerja varias veces la laminilla en dH<sub>2</sub>O para eliminar residuos.

5. Inmediatamente seque la laminilla con aire comprimido.

*Nota: Recuerde que la laminilla debe estar a un ángulo cómodo para que las gotas de agua corran con facilidad y NO dejar manchas en la laminilla. Si llega a quedar alguna mancha, no deje que se seque la laminilla, vuelva a mojarla y a secarla.*

6. Guarde el microarray en la cámara de hibridación.