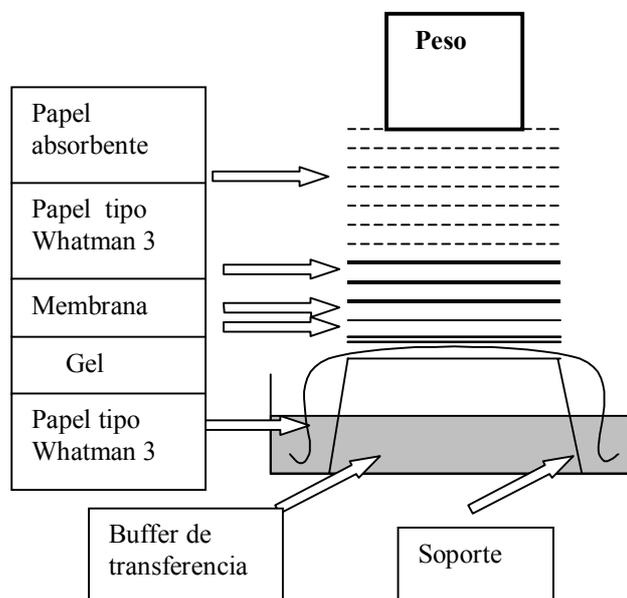


Módulo 3

Técnicas de Hibridación y Secuenciación de Ácidos Nucleicos

Día 1: Ensayo de Southern blot. Electroforesis y transferencia a membrana.

1. Discutir fundamentos teóricos de las técnicas de hibridización: marcado de sondas; condiciones de rigurosidad: temperatura; fuerza iónica; etc.
2. Realizar una electroforesis en agarosa al 2 % con Bromuro de Etidio y sembrar X μ g del ADN plasmídico recombinante seleccionado en el módulo previo digerido con enzimas adecuadas para la escisión del fragmento insertado. Sembrar asimismo el ADN sin digerir, un control negativo (vector sin inserto) y un marcador de peso molecular adecuado. Se correrán dos gels por duplicado. Correr 20-30 minutos a 120 V.
3. Después de la electroforesis fotografiar el gel incluyendo una regla de tal forma de poder determinar la distancia de migración de las bandas.
4. Introducir un corte en el gel que permita la posterior orientación.
5. Sumergir el gel por 30 minutos en solución de desnaturalización.
6. Enjuagar el gel rápidamente en agua destilada e incubar durante 30 minutos en solución de neutralización.
7. Mientras tanto montar dos dispositivos para la transferencia de la manera indicada en la figura. Para cada uno:
8. Cortar papel de filtro tipo Whatman 3 MM del tamaño del gel (por triplicado) y humedecer en buffer de transferencia.
9. Cortar papel de filtro tipo Whatman 3 MM del tamaño adecuado para permitir que el buffer de transferencia llegue al gel. Colocarlo sobre el soporte en la bandeja de transferencia permitiendo que los bordes queden sumergidos en el buffer de transferencia. **Cuidado el buffer de transferencia no debe alcanzar el nivel del soporte.**



10. Cuando el papel de filtro que se encuentra sobre el soporte está completamente húmedo, elimine las burbujas de aire ayudado por una varilla.
11. Cortar la membrana de transferencia de un tamaño 1 mm mayor que el gel en ambas dimensiones. **Use guantes.** Efectuar la misma marca que en el punto 4. Humedecer la membrana en el buffer de transferencia.
12. Sacar el gel de la solución de neutralización. Invertirlo y colocarlo sobre el papel húmedo sobre el soporte. **Asegúrese de que no quedan burbujas de aire.** Colocar Parafilm (o Rolopac) alrededor del gel.
13. Coloque la membrana húmeda sobre el gel. **Asegúrese de que no quedan burbujas de aire.**
14. Colocar los papeles Whatmann humedecidos, y una pila de papel absorbente del tamaño del gel. Sobre esta pila colocar una placa y sobre ésta un peso de 500g.
15. Dejar que la transferencia proceda por lo menos durante 8 horas. Al cabo de ese tiempo, remover el papel absorbente y los de filtro por encima de la membrana. Marcar con lápiz las posiciones de los pocillos. Usando pinzas sin dientes quitar la membrana y dejar sobre papel tipo Whatman 3 MM seco por algunos minutos. Fijar el ADN a la membrana por horneado a 80°C durante dos horas, o 120 grados 15 minutos (según las instrucciones del fabricante de la membrana). Este paso será llevado a cabo por los ayudantes de práctico, que "scannearán" las membranas boca abajo sobre el transiluminador, de modo de verificar la calidad de la transferencia. Las membranas con el ADN fijado se guardan a temperatura ambiente entre papeles Whatman.

Día 2: : Marcado no radiactivo de la sonda y técnicas de hibridación

La sonda a emplear será el fragmento de ADN conteniendo una porción del promotor del gen de pollo en cuestión. El vector se ha digerido con enzimas de restricción de modo de liberar inserto, y el inserto ha sido eluido de un gel de agarosa (de manera análoga a como se eluyó la banda de PCR para el clonado).

Para el marcado de la sonda se usarán guantes limpios, y se tendrá extremo cuidado de no contaminar los reactivos del kit.

16. Diluir 20 ul de solución de "crosslinker" con 80 ul de agua.
17. Diluir el ADN que se utilizará como sonda a una concentración de 10 ng/ul en agua ultrapura estéril.
18. Desnaturalizar 10 ul del ADN por calentamiento en baño de agua hirviendo por 5 minutos. Centrifugar unos segundos a máxima velocidad y colocar inmediatamente en baño de hielo por 5 minutos.
19. Trabajando en hielo, agregar 10 ul de buffer de reacción, 2 ul de reactivo de marcado y 10 ul de la solución de "crosslinker" preparada en el paso 16. Mezclar bien aunque suavemente luego de cada adición, y centrifugar unos segundos al final para colectar el contenido en el fondo del tubo.
20. Incubar a 37° C durante 30 minutos. Si se va a usar de inmediato, mantener en hielo hasta el momento de usar. En nuestro caso, agregar glicerol al 50% y guardar en freezer de -20 grados.

21. Fundamentos de prehibridización, hibridización, lavados, exposición y revelado en esta técnica (explicativo).
22. Prehibridizar una de las membranas por 30 minutos a 55 grados en botella de hibridización, con *AlkPhos Direct Hybridization buffer* (al que previamente se le agregaron NaCl y solución bloqueante) en una concentración de 0,125 ml por cm² de membrana (demostrativo).
23. Agregar sonda marcada **sin desnaturalizar previamente**, a una concentración de 10 ng/ml. Tener cuidado de no verter la sonda directamente sobre la membrana. Dejar la transferencia ocurrir durante 14 horas a 55 grados (demostrativo). Este paso no se llevará a cabo durante el práctico. Las ayudantes de práctico prehibridizarán e hibridizarán la segunda de las membranas transferidas por cada grupo con la sonda correspondiente la víspera del Día 3 ya que las membranas una vez hibridizadas no se pueden guardar, debiendo procederse a efectuar los lavados y revelado de inmediato.

Día 3: Lavados y detección quimioluminiscente

24. Lavar 2 X 10 minutos en solución de lavado 1 a 55 grados.
25. Lavar 2 X 5 minutos en solución de lavado 2 a temperatura ambiente. Los lavados se hacen en la botella de hibridización.
26. Eliminar el exceso de líquido y colocar, boca arriba, sobre una superficie limpia, no absorbente.. No dejar secar.
27. Colocar la membrana mojada dentro de una bolsita de detección (símil bolsita de autoclave abierta en tres de sus lados). Sellar.
28. Pipetear la solución de detección *CDP-Star* sobre la membrana (15-20 ul/ cm²). Cubrir con la otra hojita de la bolsa de modo de esparcir el líquido de manera homogénea, sin dejar burbujas. Incubar 5 minutos en la oscuridad. **Cuidado de no contaminar la solución de detección.**
29. Eliminar el exceso de líquido de la bolsita de detección, sellar la bolsita y exponer con un film por una hora, en un cassette de autorradiografía.
30. Durante el transcurso de esa hora, discutir sobre otros métodos de detección y marcado.
31. Revelar y fijar (5-10 minutos en solución de fijador). En función del resultado obtenido, se puede efectuar una segunda exposición.
32. Discusión de los resultados obtenidos en el ensayo de Southern blot.
33. Fundamentos teóricos de otras técnicas de hibridización (Northern y Western blot) y rastreo de bibliotecas.
34. Análisis de placas radiográficas correspondientes a técnicas de hibridización y rastreo.

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Solución de desnaturalización

NaCl 1,5 M
NaOH 0,5 N

Solución de neutralización

Tris.HCl pH 7,4 1,0M NaCl 1,5 M

SSC 20x

NaCl 3M
Citrato de sodio 0,3M
Ajustar pH a 7,0 con HCl

Buffer de hibridización

Agregar Na Cl al buffer hasta llegar a una concentración final de 0.5 M.
Adicionar reactivo bloqueante a una concentración final 4% w/v. Mezcle por una o 2 horas. Alicuotar y guardar entre -15 y -20°C.

Buffer de lavado primario

Urea 2M
SDS 0.1%
50mM fosfato de Na pH 7.0
MgCl₂ 1mM
Reactivo bloqueante 0.2%
Guardar hasta una semana a 2-8°C.

Buffer de lavado secundario 20X

Tris base 1M
NaCl 2M
Ajustar el pH a 10.

Buffer de lavado secundario (sol. de trabajo)

Diluir 1 en 20 y agregar MgCl₂ hasta una concentración final 2mM. Usar en el momento.

MATERIALES

- Estufa 80°C
- Punteros para pipetas automáticas
- Balanza
- Estufa de 37°C
- Incubador a 37°C con agitación
- Heladera
- Freezer de -20 grados (o congelador, para conservar las enzimas)
- Horno a microondas o plancha magnetica con calentador

- Barras magnéticas
- Matraces -Microcentrífuga
- Micropipetas automáticas (p20, p200 y p1000)
- Transiluminador
- Gradilla para microtubos de 1,5 ml
- Guantes
- Parafilm
- Tijera
- Rollo de cinta de papel para etiquetar tubos
- Marcador indeleble