



Unidad Genómica

Nombre de la UNIDAD/Técnica: Genómica y Citometría de Flujo.

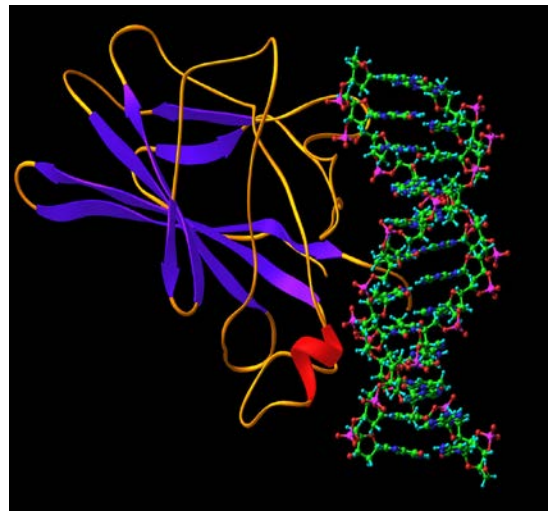
Responsable: José Antonio Mas Gutiérrez

Teléfono: 914 888 645 / 914 887 184

Email joseantonio.mas@urjc.es

Principios de la Técnica

La Genómica es el área de la Biología y conjunto de técnicas cuyo objeto es el estudio de los genomas y su funcionamiento siendo genoma el material genético contenido en cada una de las células de un organismo. La Genómica ha conocido un gran auge en los últimos años gracias al desarrollo de una serie de técnicas, fundamentalmente la secuenciación automática del ADN, la PCR en Tiempo Real y las tecnologías de microarrays.



La secuenciación automática del ADN asociada al desarrollo de programas bioinformáticos está permitiendo realizar la secuenciación de un gran número de genomas y decodificar en gran parte la información contenida en estos. La secuenciación automática se ha desarrollado a partir de modificaciones del método de secuenciación de Sanger y colaboradores de finales de los años 70. En el caso de la secuenciación automática el marcaje de los dideoxynucleótidos trifosfato o en su caso del oligonucleótido cebador se realiza con fluorocromos. Las reacciones que antes se realizaban en tubos separados se hacen en un mismo tubo en un termociclador resultando en una amplificación lineal de los productos de extensión.

Finalmente estos productos marcados con fluorescencia se separan por electroforesis capilar en un secuenciador automático que lleva incorporado un sistema de detección de fluorescencia y está conectado a un ordenador con programas informáticos específicos para determinar la secuencia de nucleótidos del ADN y analizar esta.

Técnicas genómicas que han resultado herramientas muy potentes en el estudio del funcionamiento de los genomas, fundamentalmente el estudio de la expresión génica son la PCR en Tiempo Real y las tecnologías de microarrays.

La PCR en Tiempo Real es una variante de la técnica de PCR desarrollada por Kary Mullis y colaboradores a finales de los años 80. En la PCR en Tiempo Real se trata de cuantificar el DNA molde de la PCR midiendo la

reacción en su fase de crecimiento exponencial. Para ello se emplean fluorocromos, fundamentalmente de dos tipos aunque hay más: Moléculas que se unen inespecíficamente al DNA de doble cadena y sólo emiten fluorescencia cuando están unido a este. La más utilizada es el SYBR Green. Sondas de hidrólisis. Son oligonucleótidos de pequeño tamaño que llevan unidos dos fluorocromos que presentan transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Cuando la DNA polimerasa de la PCR encuentra este oligonucleótido situado entre los dos oligonucleótidos cebadores lo hidroliza y al separarse los fluorocromos uno de estos emite fluorescencia.

La PCR en Tiempo Real se lleva a cabo en termocicladores especiales que tienen un sistema de excitación por luz y detección de fluorescencia. Están además conectados a un ordenador con programas informáticos que realizan el análisis de la señal de luz emitida en cada una de las reacciones.

La PCR en Tiempo Real se utiliza cuando se quiere estudiar la expresión de entre uno y varias decenas de genes. Para el análisis de la expresión génica a gran escala de entre centenares y miles de genes, en los últimos años se viene utilizando la técnica de los microarrays. Aunque esta técnica tiene otras varias aplicaciones la más utilizada ha sido el análisis de expresión génica a gran escala. En este caso, una muestra de ácidos nucleicos, usualmente cDNAs u oligonucleótidos que representan a la mayoría de los genes de un tipo celular se imprimen e inmovilizan mediante un sistema robótico en áreas discretas y muy pequeñas (algunas micras) de un soporte sólido. Esto es el microarray. Este se hibrida a continuación con una mezcla compleja de ácidos nucleicos procedentes de alguna fuente biológica marcados con fluorescencia en unas determinadas condiciones de salinidad y temperatura. Después de la hibridación el marcaje fluorescente se detecta y mide en un escáner de fluorescencia de alta resolución. El patrón de expresión génica de la muestra se obtiene analizando la señal emitida por cada uno de los puntos de luz del microarray que representa a un gen.

Campo de Aplicación

Las técnicas genómicas se aplican fundamentalmente al estudio del material genético de los seres vivos tanto a nivel de determinación de su secuencia y decodificación de esta como a nivel del funcionamiento de ese material genético.

Equipos Disponibles

Secuenciador por electroforesis capilar modelo ABI Prism 3100-Avant (Applied Biosystems).

Permite la secuenciación o análisis de 4 muestras en cada electroforesis y lectura simultánea de hasta 5 fluoróforos diferentes.



Aplicaciones:

-Secuenciación de ADN (plásmidos y productos de PCR).

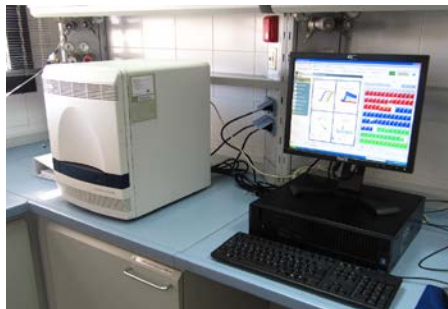
-Genotipado y detección de mutaciones mediante el análisis de fragmentos de ADN amplificados por PCR y marcados con fluorescencia. Permite la detección simultánea de hasta cinco fluorocromos diferentes.

Sistemas de PCR en Tiempo Real ABI 7500 Fast y ABI 7000 SDS

Se trata dos sistemas de PCR en Tiempo Real que detectan y cuantifican secuencias de ácidos nucleicos. La detección de los productos de PCR acumulados ciclo a ciclo es posible mediante la combinación de ciclos de temperatura programados, la detección de fluorescencia y la utilización de aplicaciones informáticas específicas. Las principales aplicaciones son análisis de expresión génica, detección de mutaciones, detección y cuantificación de microorganismos, o determinación del número de copias de un gen en un genoma.



ABI 7000 SDS



ABI 7500 FAST

Aplicaciones:

- Cuantificación de la expresión génica.
- Cuantificación absoluta de ADN (cuantificación de microorganismos en muestras biológicas, cuantificación de dosis génica).
- Genotipado (detección de polimorfismos de un nucleótido).

Sistemas de fotodocumentación Molecular Imager Chemidoc MP y Typhoon 9210

Sistemas para el análisis de geles y membranas de DNA, RNA y proteínas, placas multipocillo escogiendo entre:

- Fluorescencia de excitación verde directa.
- Fluorescencia de excitación roja directa.
- Quimioluminiscencia.

Permiten detectar hasta cuatro fluoróforos simultáneamente. Están equipados con software de análisis de imágenes y cuantificación de fluorescencia.



Typhoon 9210



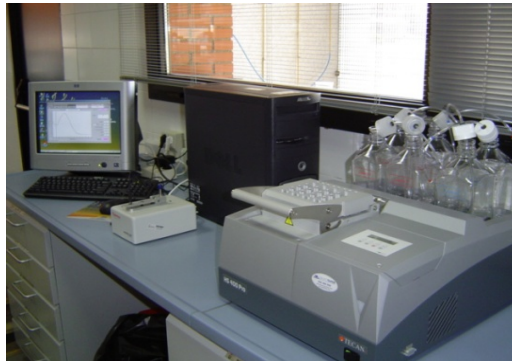
Molecular Imager Chemidoc MP

Aplicaciones:

-Detección y cuantificación de ácidos nucleicos y proteínas marcados con fluorescencia presentes en soportes sólidos o en disolución como membranas, geles o placas de distintos tipos. Aplicable por tanto en escaneado de microarrays, geles bidimensionales de proteínas así como otras técnicas como son Southern, Northern y Western blot.

Estación de hibridación de microarrays modelo HS400 Pro (Tecan).

Sistema automático de hibridación y lavado para microarrays de DNA y proteínas, sobre sobre soportes tipo portas de microscopía.



Aplicaciones:

-Hibridación y lavado de microarrays de DNA y proteínas.
-Hibridación “in situ” en cortes de tejidos sobre portas de microscopía.

Espectrofotómetro modelo Nanodrop 1000 (Thermo Scientific):

Espectrofotómetro que permite usar hasta 1 microlitro de muestra para su cuantificación.



Aplicaciones:

-Cuantificación precisa y determinación de calidad de muestras de ácidos nucleicos y proteínas utilizando volúmenes muy pequeños de estas muestras. Proporciona el espectro de absorción de la muestra.

Sistema de extracción de ácidos nucleicos modelo ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems).

Equipo que permite la extracción de ácidos nucleicos de hasta 96 muestras

simultáneamente.

Aplicaciones:

-Extracción de RNA total y DNA genómico a partir de todo tipo de tejidos y cultivos celulares en un tiempo de entre 30 y 45 minutos. El tejido ha de ser homogenizado previamente.

Citómetro de flujo Beckman Coulter Cytomics FC500 MPL

Es un sistema para la medición de propiedades biológicas y físicas de células y otras partículas que han sido marcadas con un pigmento fluorescente. Estas propiedades se miden cuando las células atraviesan en fila un haz de láser y dispersan la luz o emiten fluorescencia al ser excitado el pigmento. Ejemplos de aplicaciones son detección de proteínas en células en cultivo o de tejidos, análisis del ciclo celular, detección y cuantificación de microorganismos, estudios de viabilidad celular, detección de lípidos intracelulares, etc.



Otros equipos accesorios de la Unidad de Genómica):

- Termociclador modelo Mastercycler (Eppendorf).
- Termociclador C1000 Touch (BioRad). Este equipo tiene dos bloques programables de forma independiente, cada uno de 48 pocillos.
- Centrífuga refrigerada modelo 5415R (Eppendorf).
- Espectrofotómetro modelo Biophotometer (Eppendorf).
- Congelador de -86 °C NUAIRE de 4831.
- Termobloque modelo Accublock (labnet).
- Software específico para diseño de oligonucleótidos de PCR y sondas taqman.
- Software para cuantificación de bandas de geles y spots en Typhoon 9210.



Mastercycler

C1000 Touch