

TÉCNICAS BASADAS EN HIBRIDACIÓN MOLECULAR

BIOLOGIA MOLECULAR



Dra. Ma. Laura Tondo

mtondo@fbioyf.unr.edu.ar



2026

DES NATURALIZACION Y RENATURALIZACION DEL DNA

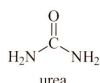
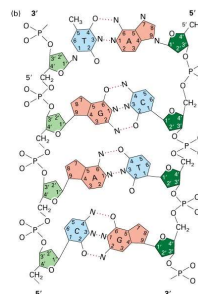
¿Cómo se mantienen unidas las dos hebras del DNA?

- Puentes de hidrógeno entre las bases.
- Interacciones hidrofóbicas entre bases adyacentes de una misma hebra.

Desnaturalización: pérdida de la conformación tridimensional (forma duplo-helicoidal) del DNA y separación de las hebras .

AGENTES DESNATURALIZANTES

- **Temperatura:** el aumento de la temperatura debilita las fuerzas que mantienen unidas las hebras del DNA, desestabilizando la estructura de la doble hélice.
- **Ácidos y bases:** el apareamiento de bases disminuye o se debilita por valores de pH alejados de la neutralidad, con la consiguiente desnaturalización del DNA.
- **Agentes químicos:** los grupos amino y carbonilo de ciertos compuestos químicos compiten en la formación de enlaces de hidrógeno con los grupos propios de las bases, facilitando así la ruptura de sus apareamientos y la consiguiente separación de las hebras.



Bajo condiciones controladas el proceso de desnaturalización del DNA puede ser **REVERSIBLE**

DESNATURALIZACIÓN Y RENATURALIZACIÓN POR EFECTO DE LA TEMPERATURA

El calentamiento **gradual** del DNA debilita las fuerzas estabilizadoras de la doble hélice, de forma que las dos hebras se desenrollan hasta su separación total. En este proceso de **desnaturalización** se pierden la estructura secundaria y superiores.

calentamiento

1 molécula de DNA de doble hebra

Si el enfriamiento se hace **lento** y sin llegar a bajas temperaturas (hasta 20-30 °C), hay posibilidad de que las secuencias complementarias se "encuentren" y se formen de nuevo los puentes de hidrógeno entre las hebras ("templado"). La mayor parte de las cadenas sencillas forman el mismo DNA doble original: se produce la **renaturalización** del DNA, es decir, la **desnaturalización** es **reversible**.

renaturalización

enfriamiento lento

enfriamiento brusco

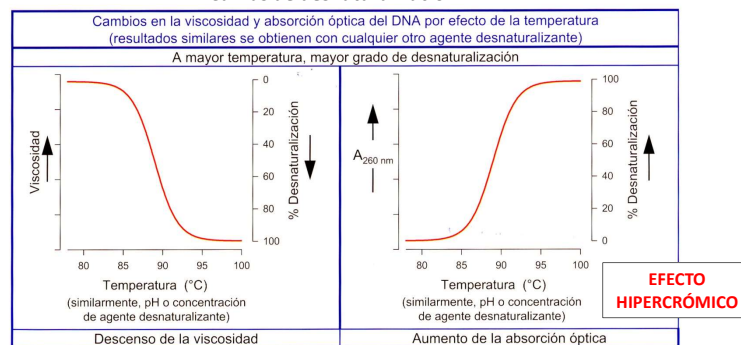
2 moléculas de DNA de hebra sencilla

Si después del aumento gradual de temperatura, se enfria **rápidamente** el sistema (mezcla de DNAs de hebra sencilla) las cadenas quedan disociadas: la **desnaturalización** es **irreversible** y se ha perdido la funcionalidad.

INFLUENCIA DE LA DESNATURALIZACIÓN SOBRE LAS PROPIEDADES DEL DNA

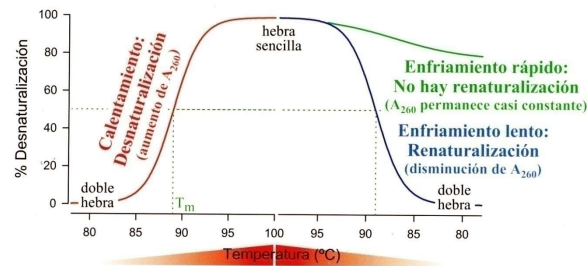
Cambios en las propiedades físicas del DNA durante el proceso de desnaturalización: aumento de la absorción óptica, cambio en la rotación óptica, aumento de la densidad de flotación y descenso de la viscosidad.

Curvas de desnaturalización



Temperatura de fusión o "melting" (T_m): es la temperatura central del intervalo de transición (50 % de desnaturalización). Es una *medida de la estabilidad estructural* de la molécula de DNA; su valor depende del pH y la fuerza iónica del medio, de la longitud de la molécula de DNA y de su composición en bases (contenido de pares de bases GC).

RENATURALIZACIÓN DEL DNA



La renaturalización depende sólo de la **complementariedad de secuencia** de las hebras.

Complementariedad: reconocimiento molecular específico de secuencia requerido para que dos moléculas de ácidos nucleicos se asocien.

HIBRIDACIÓN: formación de moléculas dúplex de DNA cuyas hebras tienen distinto origen (distinta especie o, en general, distinto ácido nucleico).

Debido al carácter artificial de su consecución, se considera también hibridación la formación de dúplex entre DNA y RNA, o entre un ácido nucleico y un oligonucleótido natural o sintético, siempre en función de la existencia de secuencias total o parcialmente complementarias.

La estabilidad del híbrido será tanto mayor cuanto más elevada sea la proporción de bases complementarias y mayor la longitud de las secuencias apareadas.

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Las reacciones de hibridación presentan dos características principales:

- ✓ son específicas – sólo se unen secuencias que son complementarias.
- ✓ ocurren en presencia de grandes cantidades de moléculas similares, pero no idénticas.

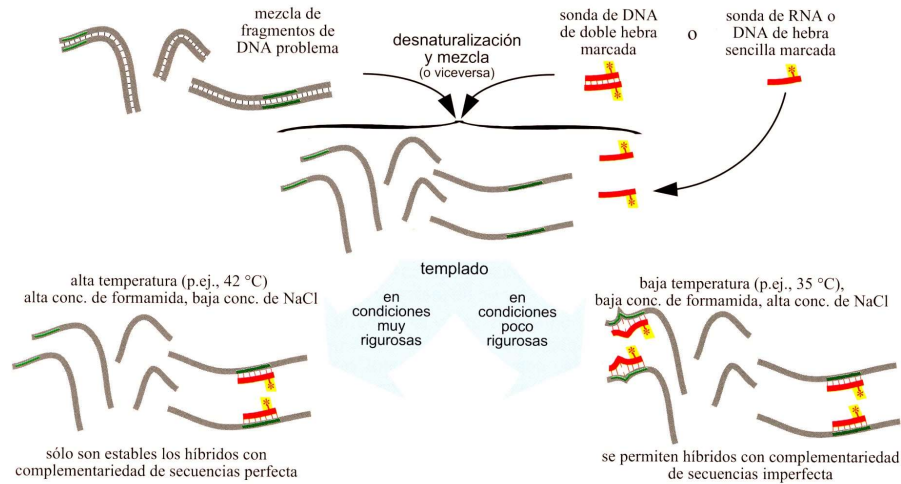
En una mezcla compleja de ác. nucleicos se aparean sólo aquellas secuencias que son complementarias, aun en presencia de una enorme cantidad de moléculas relacionadas, pero no-complementarias.

Las técnicas basadas en hibridación molecular permiten detectar y aislar moléculas de DNA o RNA específicas en una mezcla compleja que contiene numerosas moléculas similares.

Se requieren dos elementos básicos:

- La presencia de la **secuencia diana** o “blanco” en la muestra de ácidos nucleicos.
- Un fragmento corto de ácido nucleico, llamado **sonda**, de **secuencia conocida y complementaria** a la secuencia diana, **marcado** de alguna forma que permita su detección (radiactivo, fluorescente, etc.).

PRINCIPIO BÁSICO DEL ENSAYO DE HIBRIDACIÓN



Rigor (astringencia) de la hibridación: grado de especificidad en el apareamiento conseguido en los híbridos; medida de la capacidad de reconocimiento mutuo de dos secuencias.

Los ensayos de hibridación se pueden clasificar en tres grupos:

- Hibridación en fase líquida

(Hibridación de la sonda con una muestra de DNA o RNA en disolución)

- Hibridación en soporte sólido

("Dot-blot" y "Slot-blot", "Southern blot", "Northern blot")

- Hibridación *in situ*

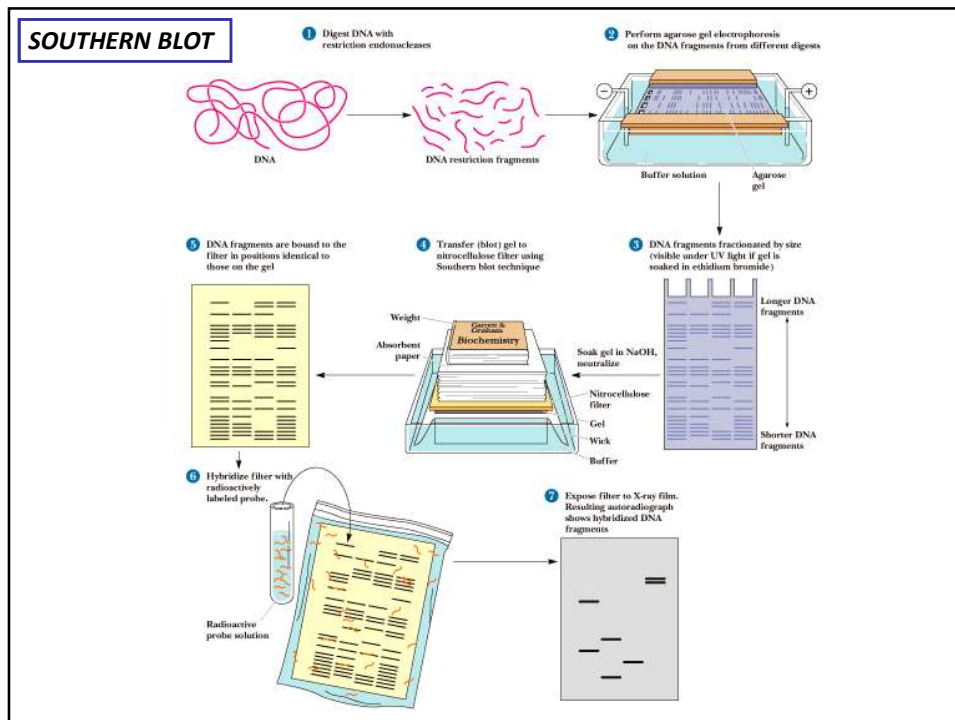
(La sonda se aplica sobre muestras en su ubicación natural, por ejemplo: cortes de tejido, células intactas, núcleos aislados, preparaciones de cromosomas, etc.)

SOUTHERN BLOT

1975 - E.M. Southern publicó un nuevo procedimiento para localizar secuencias de DNA sobre fragmentos de restricción separados por electroforesis en geles.

La característica fundamental de esta técnica es la transferencia de tales moléculas de DNA obtenidas por restricción desde el gel a una membrana. Esta transferencia ha sido llamada **Southern blotting**.

La técnica fue posteriormente aplicada a moléculas de RNA y fue llamada **Northern blot** (Thomas, 1980).



Pasos de la técnica de Southern blot

1- Digestión del DNA con enzimas de restricción.

La cantidad de DNA a ser digerido depende tanto de la complejidad del DNA como de la sonda a la cual será hibridizado:

- DNA plasmídico: 1 µg o menos
- DNA genómico total de mamífero: 8 a 10 µg

2- Electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida para separar los fragmentos de DNA de acuerdo a su tamaño.

3- Tratamiento ácido del gel con HCl 0,2 N (depurinización) ➡ OPCIONAL

La hidrólisis alcalina en los sitios depurinizados permite la transferencia uniforme de fragmentos de DNA de un amplio rango de tamaños.

4- Tratamiento del gel con solución desnaturizante (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M).

El tratamiento con álcali del gel desnaturiza los fragmentos de DNA antes de ser transferidos, asegurando que se encuentren en el estado de simple hebra y accesibles a la sonda.

5- Tratamiento con solución de neutralización (Tris 0,5 M, NaCl 3 M).

6- Transferencia de los fragmentos de DNA a membrana.

Membranas

Nitrocelulosa:

- baja capacidad de unión de ácidos nucleicos
- frágiles
- carga negativa

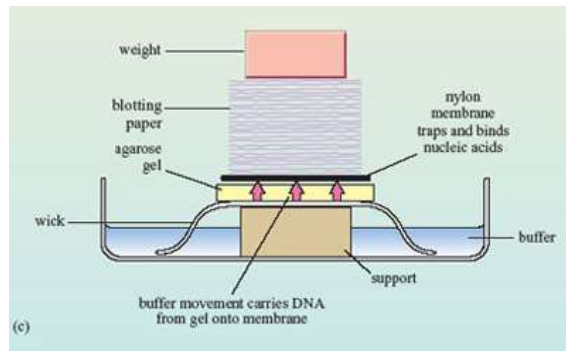
Nylon:

- mayor capacidad de unión de ácidos nucleicos
- mayor resistencia
- carga neutra o positiva
- mayor inespecificidad de fondo (*background*)

Transferencia

CAPILARIDAD

- Buffer 20X SSC: NaCl 3 M, citrato de sodio 300 mM, pH 7,0
- Papel de filtro Whatman 3MM
- La velocidad de transferencia de los fragmentos depende del tamaño de los mismos y de la concentración de agarosa del gel
- Puede llevar de 2 a 12 hs



ELECTROTRANSFERENCIA

Cuando la separación de los fragmentos de DNA se realiza en geles de poliacrilamida la transferencia por capilaridad no funciona y se debe usar corriente eléctrica para realizarla.

- Se usan membranas de nylon y se prepara un "sándwich" del tipo de *Western blot*.
- Condiciones de transferencia: buffer TBE 50 mM, 40 V, por un tiempo ≥ 2 hs y a 4-16 °C.

7- Tinción del gel con bromuro de etidio para evaluar la transferencia.

Lavado de la membrana con 2X SSC.

8- Fijación de los ácidos nucleicos a la membrana.

- **Nitrocelulosa:** la membrana se hornea durante 2 hs a 80 °C en un horno de vacío.
(Formación de uniones hidrofóbicas con la membrana)
- **Nylon:** entrecruzamiento por exposición a luz ultravioleta.
(Formación de enlaces covalentes entre residuos de T y grupos amino sobre la membrana)

9- Pre-hibridación (bloqueo de la membrana): 3hs a ON, a la T_m de la sonda.

Solución de prehibridación:

- | | |
|---|---|
| - Buffer 5X SSC | - DNA de espermatozoides de salmón 50 µg/ml |
| - 5X Denhardt (Ficoll, polivinilpirrolidona, BSA) | - formamida 50% |
| - KPO_4 25 mM, pH 7,4 | - SDS 1% (sólo membranas de nylon). |

10- Hibridación con la sonda marcada: 6 hs a ON, a la T_m de la sonda.

Solución de hibridación: Igual a la solución de prehibridación pero conteniendo además:

- sulfato de dextrán 10% (aumenta la velocidad y el grado de hibridación)
- sonda marcada (cantidad adecuada, ej. 1.000.000 cpm/ml)

Control de astringencia

La astringencia puede ser considerada como la especificidad con la cual una secuencia blanco en particular es detectada por la hibridación a una sonda.

La astringencia comúnmente se controla por la temperatura y la concentración de sales en los pasos de hibridación y lavado post-hibridación.

Mayor T° ➡ Mayor astringencia
Menor concentración de sales ➡ Mayor astringencia

La temperatura de melting (T_m) de un híbrido sonda-blanco puede ser calculada para proveer un punto de partida en la determinación de la astringencia correcta. Varios factores afectan la T_m , sus efectos pueden ser aproximados por la ecuación:

$$T_m = 81^\circ\text{C} + 16,6 (\log_{10}Ci) + 0,4 [\%(\text{G+C})] - 0,6 (\% \text{ formamida}) - 600/n - 1,5 (\% \text{ mismatch})$$

Donde, Ci es la concentración de sales (iones monovalentes) y n es la longitud del híbrido en pb.

11- Lavados de la membrana.

Comúnmente se realizan una serie de lavados de astringencia creciente.

- 2 lavados: 1x SSC, SDS 0,1%, T° ambiente (15 min cada uno).
- 2 lavados: 0,25x SSC, SDS 0,1%, T° de hibridación (15 min cada uno).

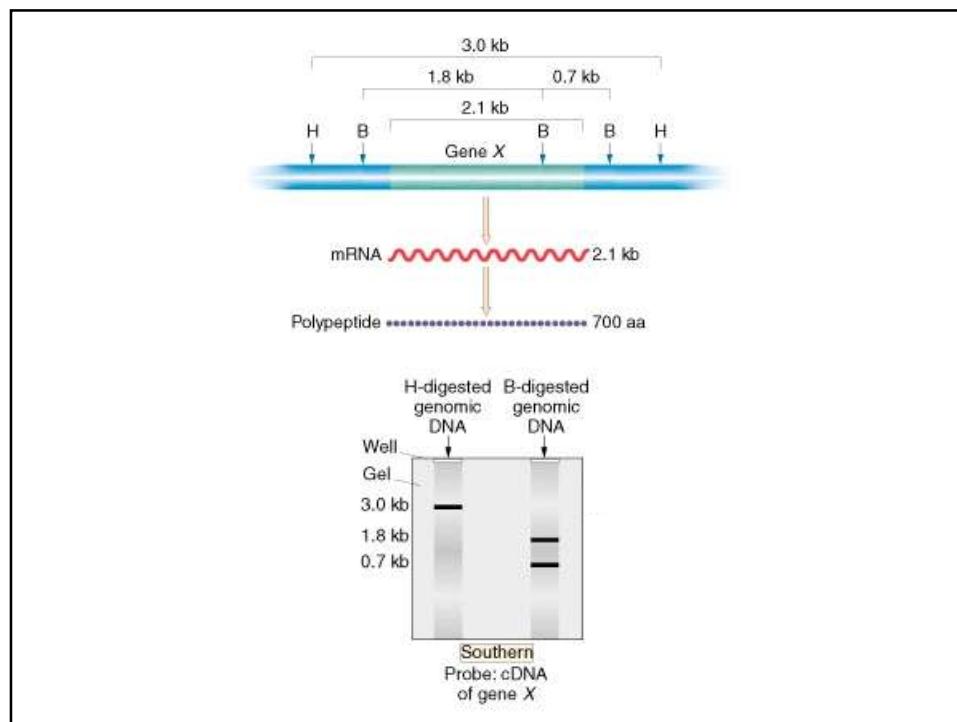
12- Revelado.

El método de revelado dependerá del tipo de marcación de la sonda utilizada.

- Sonda marcada con ^{32}P : autorradiografía.
- Sonda marcada con fluoróforo: fluorimetría.
- Sonda biotinilada: incubación con avidina (streptavidina) conjugada a enzima:
 - Fosfatasa alcalina* (AP): desarrollo de color con NBT/BCIP; quimioluminiscencia.
 - Peroxidasa de rabanito* (HRP): desarrollo de color en presencia de DAB/ H_2O_2 .
- Sonda conjugada a digoxigenina: revelado con anticuerpo conjugado a enzima (AP o HRP).

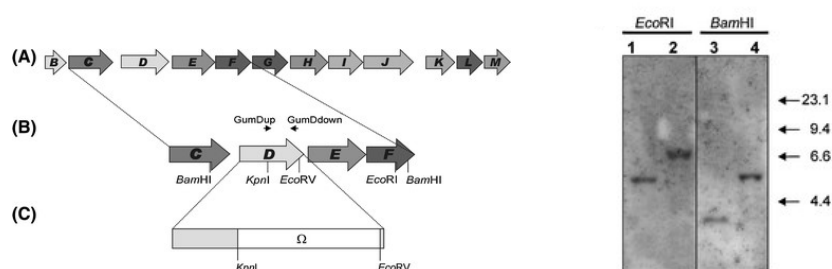
Ejemplos de aplicaciones de la técnica de Southern blot

- determinación del número de copias de un gen en el genoma.
- confirmación de mutaciones por inserción o delección.



- Confirmación de la mutación insercional de un gen mediante *Southern blot*

(Dunger *et al.*, 2007)



Calles 1 y 3: DNA de la cepa WT

Calles 2 y 4: DNA de la cepa mutante en el gen D

Fig. 1 a Genetic organization of *X. axonopodis* pv. *citri* gum operon. Gray filled arrows correspond to open reading frames (ORFs). b Genomic region containing *gumC*, *gumD*, *gumE*, and *gumF* genes; only relevant restriction sites are shown. Black arrows indicate the oligonucleotides used for the amplification of the gum754 bp fragment. c *ΔgumD* construction with the insertion of the Sp/Sm cassette. d Southern blot analysis. Genomic DNA from *X. axonopodis* pv. *citri* wild-type and *ΔgumD* were digested with restriction enzymes and subjected to

Southern hybridization using the gum754 bp fragment as a probe. Lanes 1 and 3 correspond to wild-type DNA and lanes 2 and 4 to mutant DNA digested with the indicated enzymes. Arrows show λ /HindIII molecular markers in kb. e and f Bacterial growth curves of *X. axonopodis* pv. *citri* wild-type (filled triangle) and *ΔgumD* (filled square) in XOL medium. Each data point is the mean of three experiments. For the sake of clarity when errors between replicates were very small error bars were omitted

NORTHERN BLOT

El ácido nucleico analizado es RNA.

Diferencias principales con la técnica de Southern blot:

- El RNA es separado por tamaño utilizando **geles** de agarosa **desnaturalizantes** para evitar la formación de estructuras secundarias por plegamiento.

→ Agregado de formaldehído o glioxal/DMSO tanto al gel como a las muestras de RNA

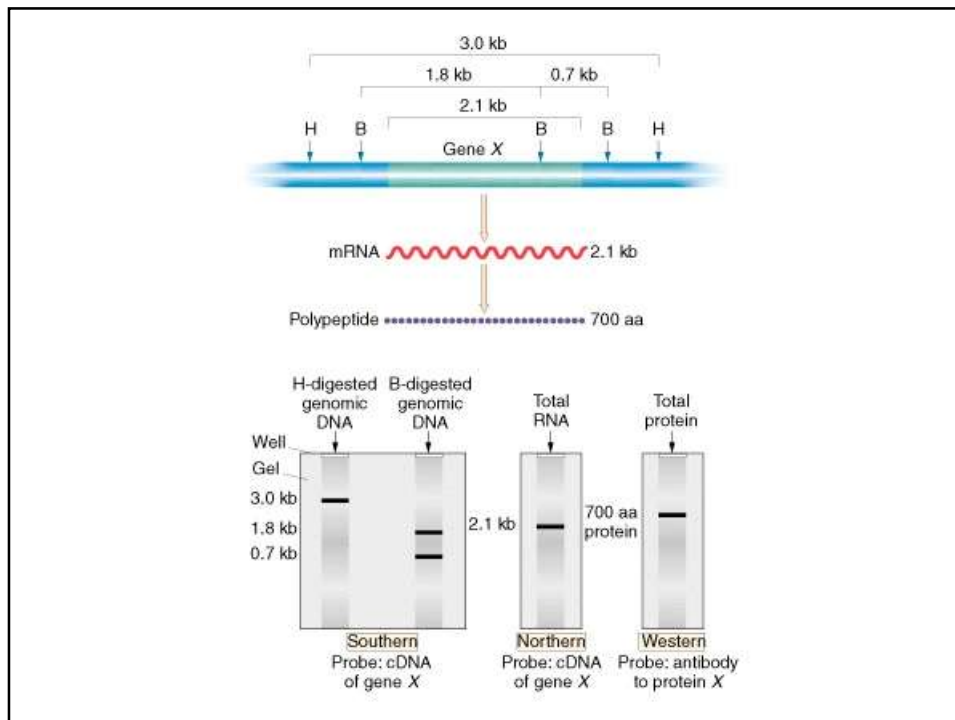
- Luego de la electroforesis el gel no necesita ser desnaturalizado por tratamiento con álcali, dado que las moléculas de RNA son simple hebra y ya se encuentran desplegadas.

- Los **materiales** a utilizar deben estar perfectamente **libres de** contaminación con **RNasas**.

Tratamiento del agua utilizada para todas las soluciones con DEPC.

- Corroboración de la **integridad de la muestra** en estudio: tinción de las muestras analizadas con bromuro de etidio o algún otro colorante para verificar que no hubo degradación durante la extracción del material.

<i>Southern blot</i>	<i>Northern blot</i>
1) Extracción de DNA de célula/tejido de interés	1) Extracción de RNA total o poli(A)⁺RNA
2) Corte con enzimas de restricción	
	2) Desnaturalización con formaldehído
3) Separación electroforética (usualmente geles de agarosa)	3) Separación electroforética (geles de agarosa desnaturalizantes)
3.1) Desnaturalización del DNA con álcali	
4) Transferencia a membrana de nitrocelulosa (usualmente por capilaridad)	4) Transferencia a membrana de nitrocelulosa (usualmente por capilaridad)
5) Bloqueo de la membrana con exceso de DNA	5) Bloqueo de la membrana con exceso de RNA
6) Hibridación con sonda marcada	6) Hibridación con sonda marcada
7) Lavado de la sonda no unida (control de astringencia)	7) Lavado de la sonda no unida (control de astringencia)
8) Revelado	8) Revelado



La técnica de hibridación Northern permite:

- Obtener información sobre el tamaño de RNAs y detalles de su procesamiento posterior.
- Estudiar el patrón de expresión de genes específicos. Permite determinar si un gen particular está siendo transcrito en un determinado tejido o bajo determinadas condiciones de crecimiento.
- Determinar la abundancia relativa de los transcritos. Mediante comparación de las intensidades de banda detectadas se pueden determinar las cantidades relativas de un transcrito en diferentes condiciones.

Controles fundamentales en la técnica de Northern blot:

- **Integridad del RNA:** se debe incluir un duplicado de las muestras en el gel para tinción con bromuro de etidio. La observación de bandas bien definidas correspondientes a los rRNA indica que el RNA utilizado no se encuentra degradado y es apto para el ensayo.
- **Control de la cantidad de muestra sembrada en cada calle:** si se desea realizar un análisis comparativo de la abundancia de transcrito es fundamental corroborar la igualdad en la cantidad de muestra colocada en cada pocillo del gel. Para ello se pueden comparar las intensidades de banda de los rRNA en el gel teñido con bromuro de etidio, o bien realizar en paralelo la hibridación con una sonda específica para un gen "housekeeping".

Ejemplo 1: Estudio de la expresión del gen *soxS* en *Salmonella enterica*.

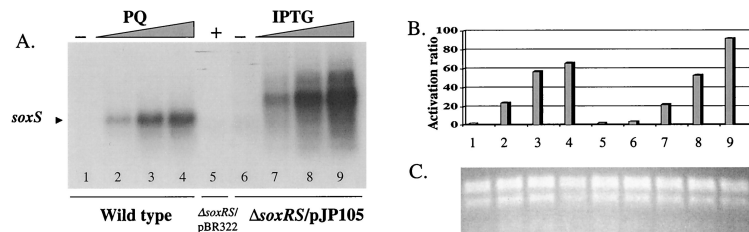


FIG. 1. Northern blotting analysis of *soxS* expression from strains ATCC 14028 and EM1/pJP105. (A) Northern blotting. A radioactively labeled 450-bp *EcoRI-HpaI* fragment of plasmid pBCKpn (Martins et al., unpublished data) containing the *S. enterica* serovar Typhimurium *soxS* coding region was hybridized with total RNA from strain ATCC 14028 (wild type) treated with increasing concentrations of PQ (0, 25, 100, or 250 μM; lanes 1 to 4, respectively) or strain EM1(*soxRS*)/pJP105 treated with increasing concentrations of IPTG (0, 0.125, 0.50, or 1.00 mM; lanes 5 to 9, respectively). The control strain, EM1/pBR322, was treated with 1.00 mM IPTG (lane 5). (B) Quantitation of the *soxS* radioactive signal. The radioactivity for the *soxS* band in each lane was quantitated by phosphorimaging. The values are the relative activations for the treatments, normalized to the signal in the absence of treatment in the wild-type samples and to the signal from lane 5 in panel A. The lane numbers correspond to those in panel A. (C) Total RNA loading. Shown is an ethidium bromide stain of a duplicate gel to that used for panel A.

Identification of SoxS-Regulated Genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Pomposiello and Demple (2000) J. Bacteriol. 182, 23-29.

Ejemplo 2: Estudio de la expresión de genes regulados por stress en plantas de *Arabidopsis*.

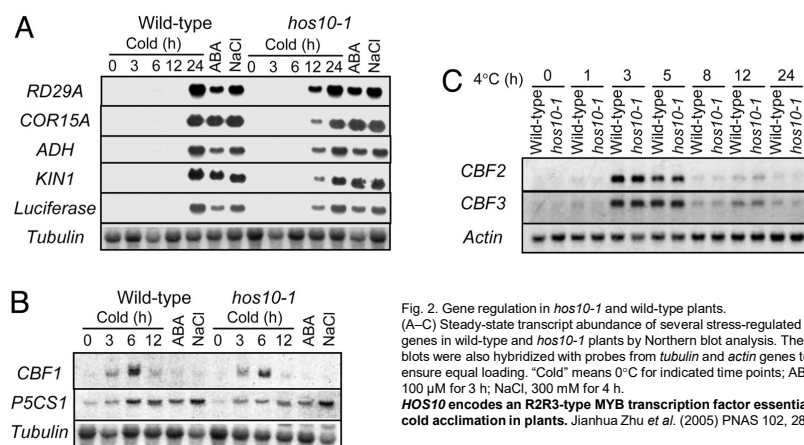
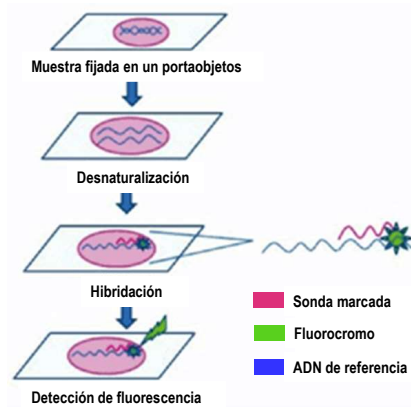


Fig. 2. Gene regulation in *hos10-1* and wild-type plants. (A–C) Steady-state transcript abundance of several stress-regulated genes in wild-type and *hos10-1* plants by Northern blot analysis. The blots were also hybridized with probes from *tubulin* and *actin* genes to ensure equal loading. "Cold" means 0°C for indicated time points; ABA, 100 μM for 3 h; NaCl, 300 mM for 4 h.

HOS10 encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plants. Jianhua Zhu et al. (2005) PNAS 102, 28.

HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Tipo especializado de hibridación en soporte sólido en la que la sonda se aplica sobre **muestras en su ubicación natural** (cortes de tejido, células intactas, núcleos aislados, generalmente preparados para microscopía)



1- Preparación del tejido: involucra la **fijación** del tejido (con soluciones de formaldehído o paraformaldehído en PBS) y su **permeabilización** para permitir la penetración de la sonda (tratamiento con detergentes como Tween-20, SDS o CHAPS, y enzimas proteolíticas como la proteinasa K).

2- Desnaturalización: calor, álcali o formamida.

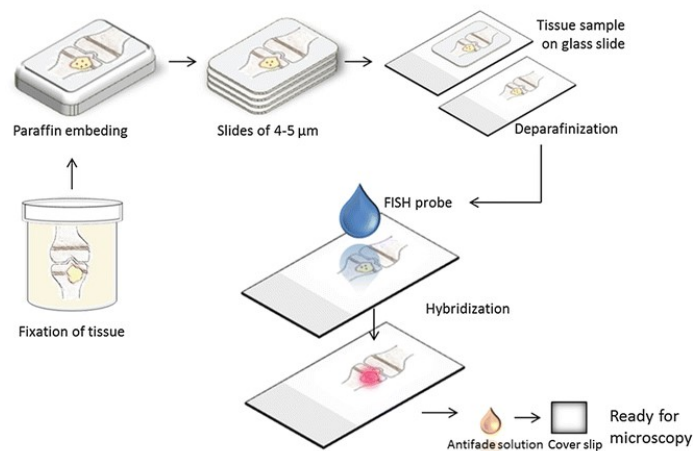
3- Hibridación con la sonda

4- Detección: autorradiografía y examen de la película fotográfica bajo el microscopio, o microscopía de fluorescencia si se emplearon sondas fluorescentes.

La sensibilidad y resolución aumentan con el empleo de **sondas marcadas con fluorescencia**. En este caso la técnica se denomina **hibridación *in situ* por fluorescencia** o **FISH** (*fluorescence in situ hybridization*).

Hibridación *in situ* tisular

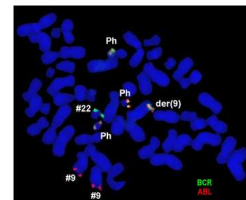
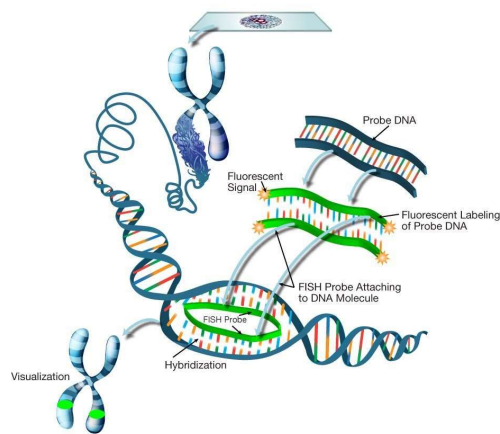
- Los tejidos pueden estar fijados con formalina, incluidos en parafina, congelados, etc.
- Se utiliza para detectar virus patógenos, diagnosticar células cancerosas como consecuencia de cambios genéticos o para estudiar cambios en la expresión génica, detectando secuencias en el ARN celular.



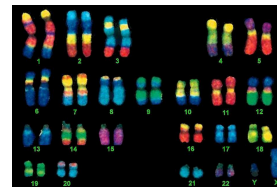
Hibridación in situ cromosómica

- Se realiza sobre preparaciones en porta de cromosomas metafásicos o prometafásicos, tratadas con fijadores para preservar las características morfológicas del cromosoma.

- Aplicaciones: diagnóstico de cromosomopatías, pintado de cromosomas (estudio de grandes reorganizaciones de los cromosomas que tienen lugar por ejemplo en procesos cancerosos).



Detección cromosomas Filadelfia

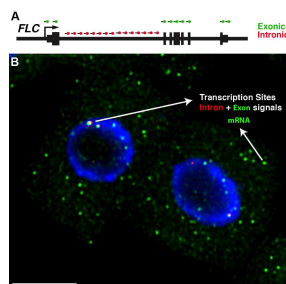
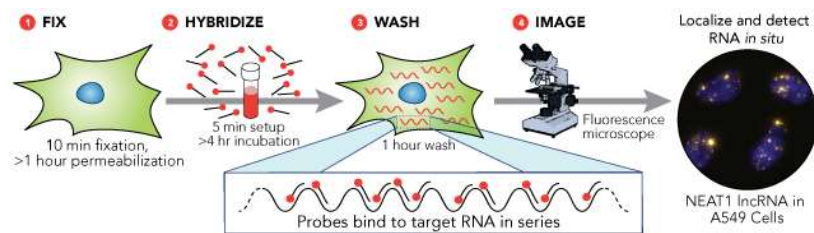


FISH chromosome painting

RNA FISH

- Se utilizan sondas de ADN e incluye los mismos pasos de: fijación, hibridación, lavado y detección.

- Permite la visualización de mRNA, ncRNA y miRNA en células y tejidos.



Ejemplo de aplicación

Detección de transcritos del gen FLC en células de raíces de *Arabidopsis thaliana*. Se utilizaron sondas para regiones intrónicas y exónicas marcadas con diferentes fluorocromos.

Duncan et al. (2017) *Bio-protocol* 7(8): e2240.

PREPARACIÓN Y MARCACIÓN DE SONDAS PARA HIBRIDACIÓN

TIPOS DE SONDAS

✓ Convencionales:

- de DNA, obtenidas por clonación, PCR o RT-PCR.
- de RNA o "ribosondas", obtenidas por transcripción de fragmentos clonados en vectores especiales, en presencia de una RNA polimerasa específica (ej. RNA polimerasa del fago SP6).

✓ Sintéticas: oligonucleótidos obtenidos por síntesis química.

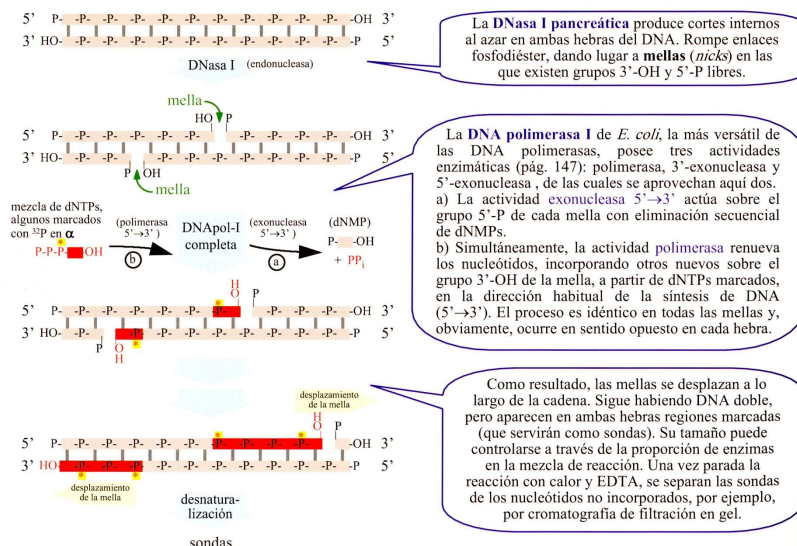
MARCACIÓN DE LAS SONDAS

- El **grupo marcador** puede ser de diversa naturaleza; los marcadores más utilizados son isótopos radiactivos, fluorocromos y enzimas.
- La marcación debe ser estable bajo diversas condiciones de temperatura, detergentes, etc., y no afectar a la reacción de hibridación.

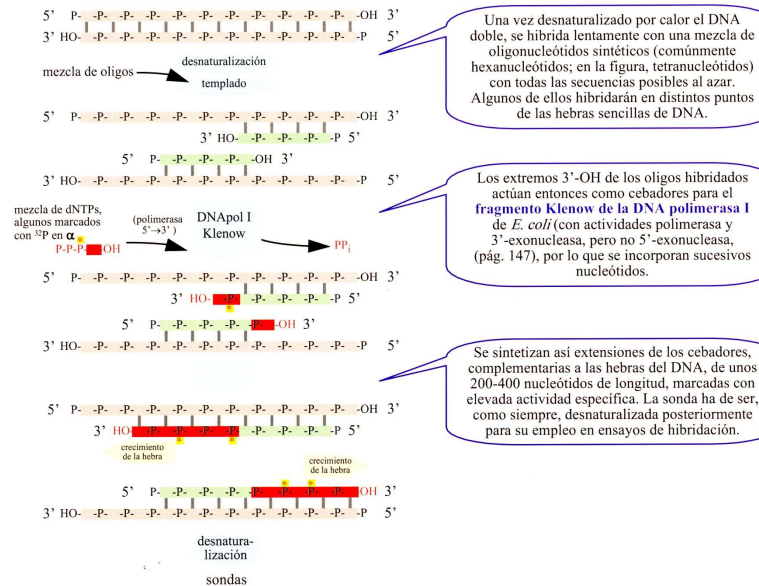
MÉTODOS DE INCORPORACIÓN DE LA MARCA

- Sondas obtenidas por PCR, ribosondas y sondas sintéticas: la sonda se puede marcar al mismo tiempo que se prepara, suministrando un dNTP (o NTP) marcado.
- Marcación posterior a la síntesis de la sonda: existen diversos métodos.

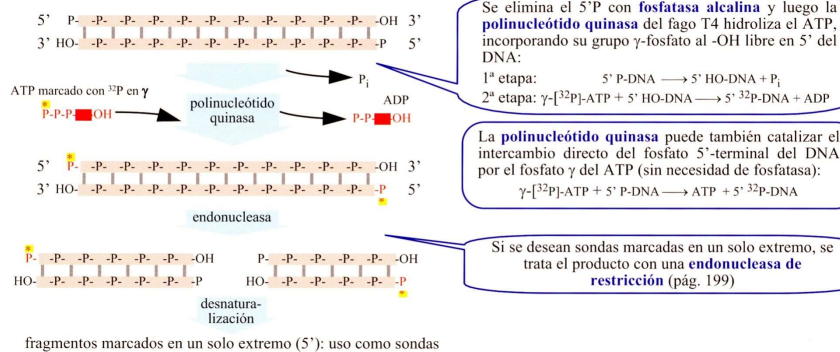
Método de traslado de la mella (*nick translation*)



Método de iniciación o cebado al azar (*random priming*)

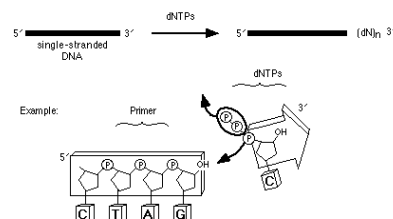


Marcación con polinucleótido quinasa

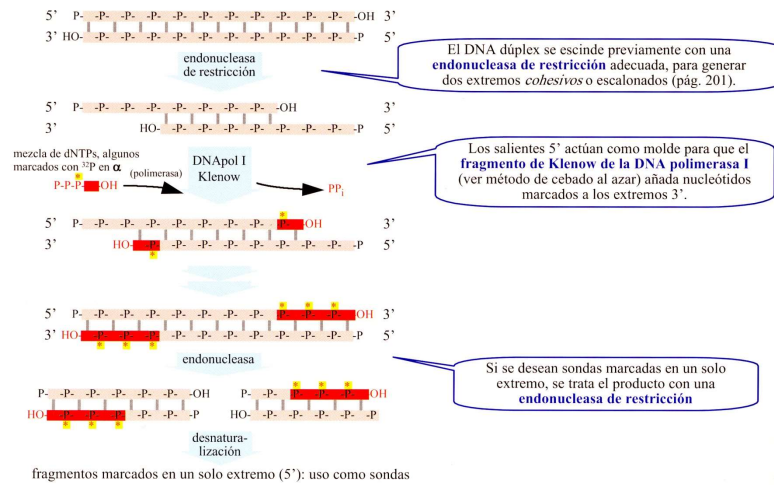


Marcación con terminal transferasa

- Adiciona nucleótidos al extremo 3'-OH del DNA.
- El DNA simple hebra es preferido como cebador; para DNA doble hebra la extensión es más eficiente con extremos 3' salientes.

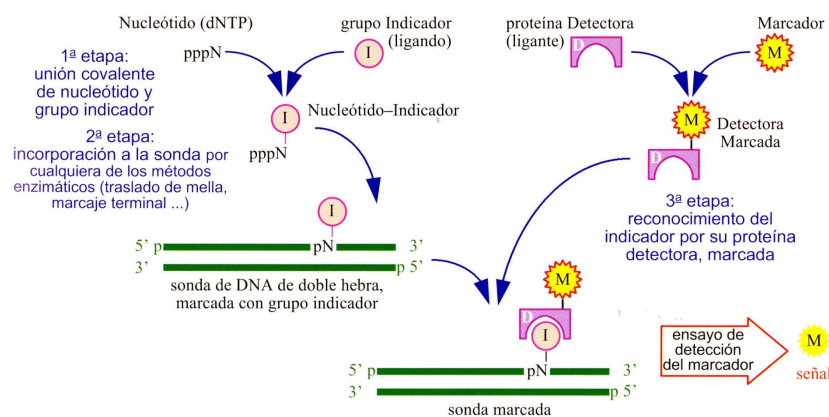


Marcación terminal por relleno



- Se utilizan enzimas de restricción que dejan extremos 5' salientes (*Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Hind*III)
- La elección del dNTP marcado depende de la endonucleasa de restricción utilizada. Por ejemplo, la marcación de extremos *Eco*RI (AATT) requiere dATP o dTTP marcado.

Marcación indirecta: se une a la sonda un grupo no detectable o **indicador**, el cual en una segunda etapa es reconocido por otra molécula, generalmente una proteína, que incorpora el marcador detectable.



Resumen de marcadores, indicadores y métodos para su detección

 Grupo <i>indicador</i> (ligando)	 Proteína <i>detectora</i> o ligante (*)	 Marcador	Detección del marcador	Sustrato de la reacción enzimática de detección
Biotina	Avidina, Estreptavidina, o variantes (**)	Isótopo radiactivo	Autorradiografía	
Digoxigenina	Anticuerpo anti-DIG	Fluorocromo	Fluorimetría	
		Peroxidasa (abreviada como PO, POD, HRPO, HRP)	Reacción Cromogénica:	ABTS TMB Derivados de α -naftol
			Reacción Fluorogénica:	Derivados de dioxetano o de luminol
		Fosfatasa Alcalina (AP)	Reacción Cromogénica:	NBT+BCIP NPP
			Reacción Fluorogénica:	AttoPhos™ HNPP+FastRedTR
		β -Galactosidasa (β -Gal)	Reacción Cromogénica:	X-gal CPRG
		Oro coloidal	Microscopia	

* La proteína ligante, con afinidad por el grupo indicador, va marcada para su detección, por alguno de los métodos indicados en la tabla de la derecha.

** Variantes de avidina obtenidas por ingeniería genética para modificar la afinidad, reducir la señal inespecífica, etc.

Abreviaturas:

ABTS = 2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato (6)]

TMB = 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

NBT = azul de nitroftalazina

BCIP = 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato

NPP = 4-nitrofenilfosfato

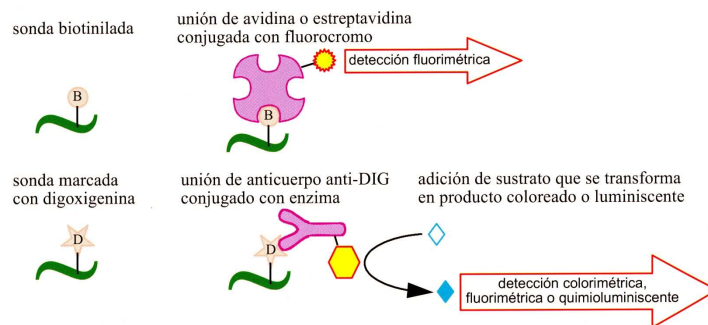
HNPP = 2-hidroxi-3-naftoico-2'-fenilamida fosfato

Fast Red TR = 4-cloro-2-metilbenceno-diazonio

X-gal = 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

CPRG = rojo de clorofenol- β -D-galactopiranosido

Ejemplos de marcación con grupos indicadores



Purificación de la sonda: separación de la sonda de los precursores marcados no incorporados.

- Cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-50; Biogel P-60).
- Precipitación de la sonda con etanol (menos eficiente).

! Para su aplicación en técnicas de hibridación molecular es necesario desnaturalizar la sonda por calentamiento para generar DNA simple hebra.

Bibliografía sugerida:

- José Luque y Ángel Herráez. Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud.
 - Tema 13: Hibridación de ácidos nucleicos: fundamento y métodos de ensayo.
 - Tema 14: Preparación y marcaje de sondas para hibridación.
- Schulze and Downward (2001) *Nature Cell Biology* 3:190-195.
- Moreno and Solé (2004) *Med. Clin. (Barc)* 122(Supl 1):73-79.
- Bilitewski (2009) *Methods Mol. Biol.* 509:1-14.