

Ingeniería Genética II

Unidad IV

Microarreglos para análisis del DNA

***¿Cómo se puede estudiar la
variabilidad genómica sin
realizar secuenciación?***

Estudios de la variabilidad genómica

- Todos los **individuos** de una especie presentan **variabilidad genómica** endógena.
- Esa variabilidad (**SNPs, SNVs, Indels**) suele **no comprometer la dotación génica** del individuo según la correspondiente a su especie, aunque **sí** puede producir **multiplicidad de alelos** para cada *locus*.
- Según la **frecuencia poblacional** de cada alelo y su impacto fenotípico existirán **variantes típicas de grupos** (variantes, cepas, líneas, linajes, razas, etc.) y otras que marcarán a **individuos**.
- **Las primeras** pueden ser útiles para **aplicaciones de mejoramiento** vegetal o animal, para el **análisis epidemiológico** de entidades parásitas para el ser humano u organismos útiles para nosotros; mientras que **las segundas** pueden permitir **asociar** fenotipos no deseados (**enfermedades**) con **genotipos** particulares.

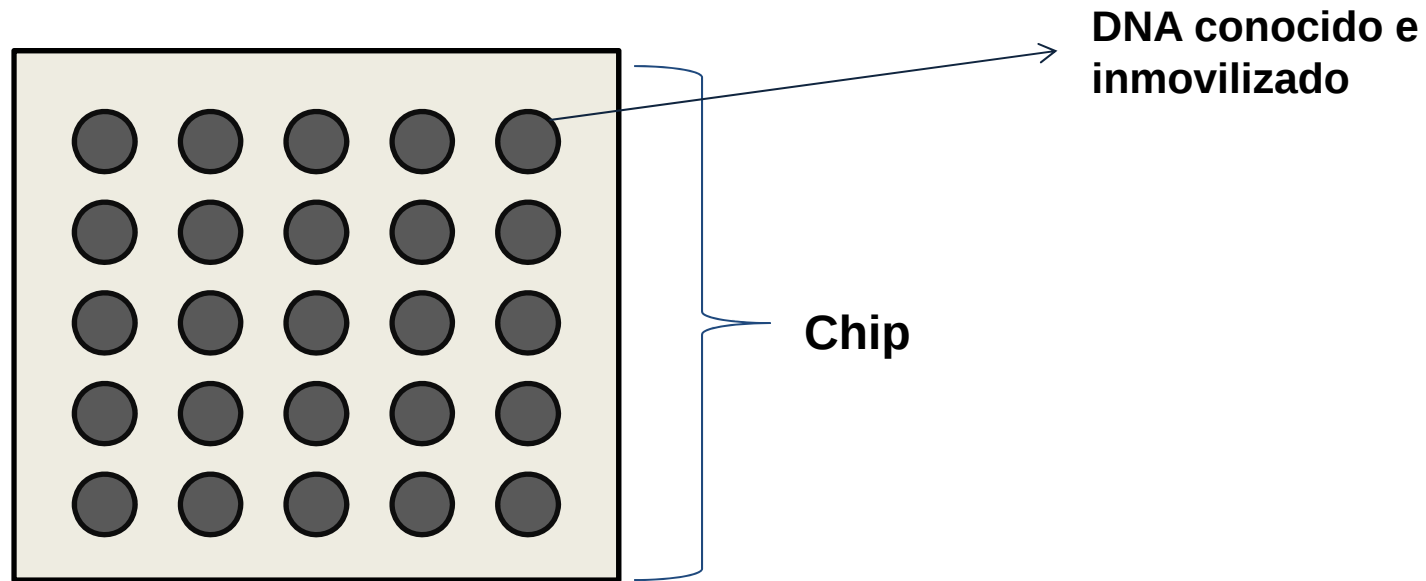
Estudios de la variabilidad genómica

- Hoy en día, el **estudio** de la **variabilidad genómica** a nivel poblacional para una especie puede encararse mediante **secuenciación NGS**.
- La disminución de costos y tiempos para re-secuenciar genomas transforma a dicha **aproximación** como la **ideal**.
- Sin embargo, **antes** del auge de las NGS la **genómica individual** era encarada mediante **otras tecnologías** que no involucraban la secuenciación.
- Dichas **aproximaciones siguen vigentes** y constituyen opciones tecnológicas útiles para la caracterización genotípica de individuos y poblaciones.

Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

- La principal **estrategia** para este **análisis global y simultáneo** (o paralelo) es la tecnología de los **microarreglos o *chips* de DNA**, metodología del tipo *high throughput* (alto rendimiento de procesamiento).
- Es una **técnica de hibridación** donde lo **conocido** está **inmovilizado** y lo **marcado** es lo que se quiere estudiar.



Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

Ejemplo de un *chip* de DNA



***¿Cómo son los
microarreglos?***

Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

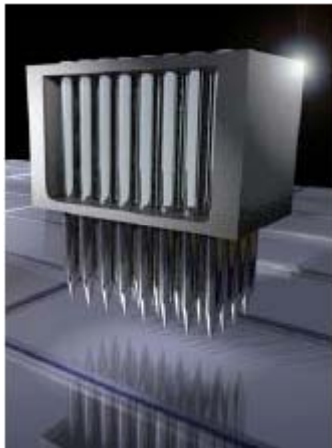
- Los ***chips*** son de **vidrio** o de **silicio**, generalmente de unos pocos centímetros (por ej. una medida posible es 2 cm x 2 cm).
- El número de posiciones de estudio variará en función del diseño del **DNA blanco inmovilizado**, que llamaremos **sondas** (si bien no poseerán marca detectable, son de secuencia conocida) **aunque son las dianas**.
- El **DNA inmovilizado** en ellos puede ser **depositado** en cada posición o **sintetizado allí** directamente.
- El ***chip* de DNA** es una **representación parcial** de la información contenida en un **genoma**.

***¿Cómo son los
microarreglos dónde las
dianas de DNA son
depositadas?***

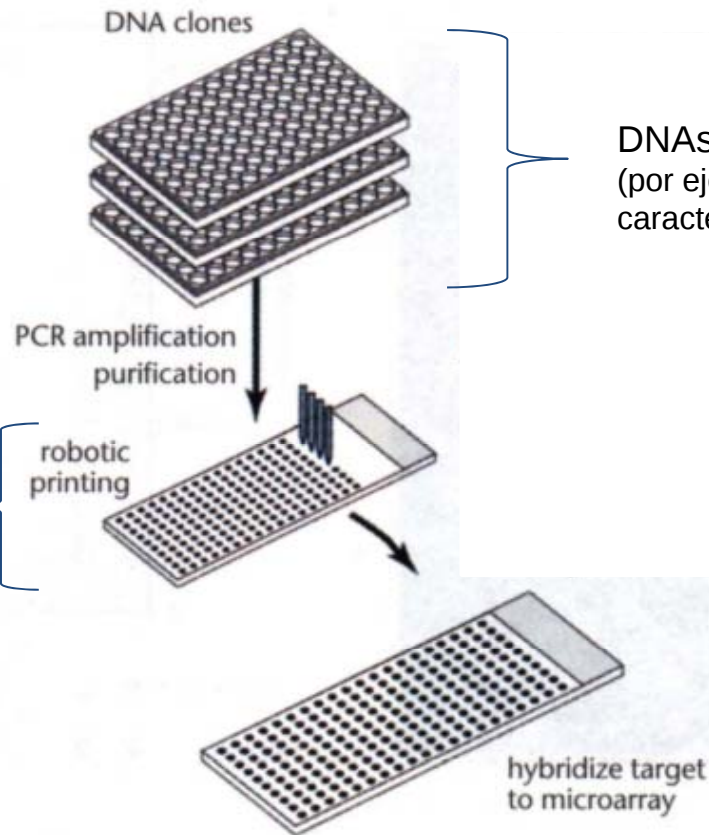
Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

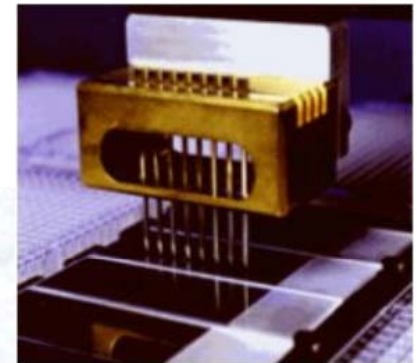
Chips conformados mediante **depósito directo** de sondas previamente sintetizadas (químicamente, enzimáticamente o biológicamente).



Depósito de las muestras



DNA de secuencia conocida
(por ejemplo clones de una biblioteca
caracterizada)



Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

Chips conformados mediante **depósito directo** de sondas previamente sintetizadas (químicamente, enzimáticamente o biológicamente).



- Poseen **miles de posiciones** (alrededor de 10.000).
- En general, las **dianas** son **DNAs clones** derivados de **bibliotecas** (0,5-1 kpb u oligonucleótidos de entre 20-100 b).
- Su **utilidad** es **mayor** en el **análisis de transcriptos** que en el estudio de polimorfismos de DNA.

***¿Cómo son los
microarreglos dónde las
dianas de DNA son
sintetizadas in situ?***

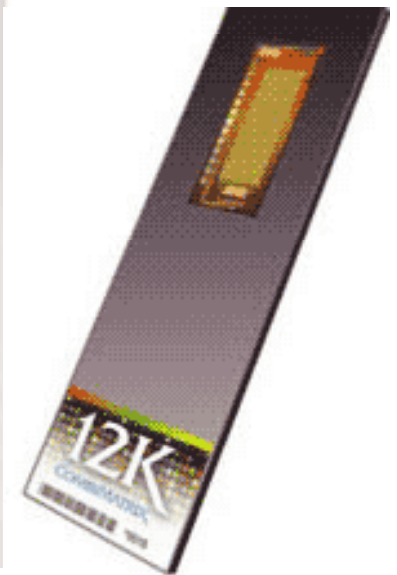
Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

Chips conformados mediante **síntesis directa** de sondas.



Tecnologías ***GeneChips*** de ***Affymetrix***,
NimbleGen, ***Agilent***, ***Combimatrix***



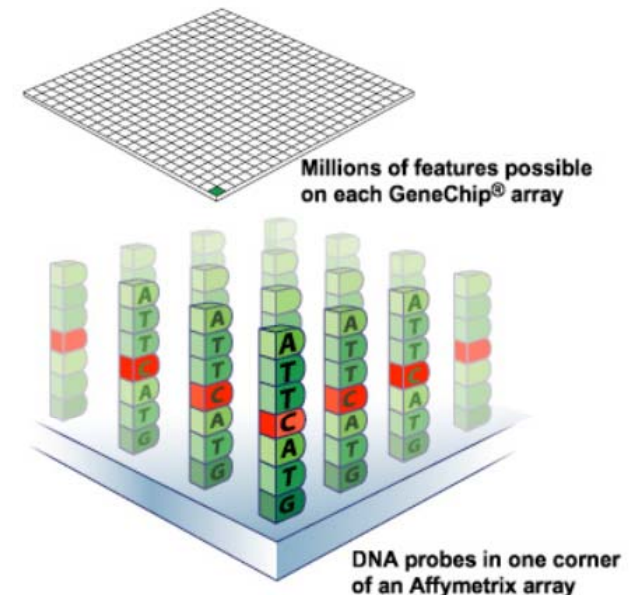
Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

Chips conformados mediante **síntesis directa** de sondas.



- Los ***chips*** son **cuadrados** (de 2 x 2 cm) y están divididos en alrededor de **400.000 celdas** (de 8 micrómetros de diámetro).
- Cada **celda** contendrá **millones de un tipo de oligonucleótido** o sonda (25 nt –Affymetrix-; 50 nt –NimbleGen-; 60 nt –Agilent-, 50 nt Combimatrix-).
- Estos arreglos se pueden usar para el **estudio de la variabilidad genómica**.



Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

Chips conformados mediante **síntesis directa** de sondas.

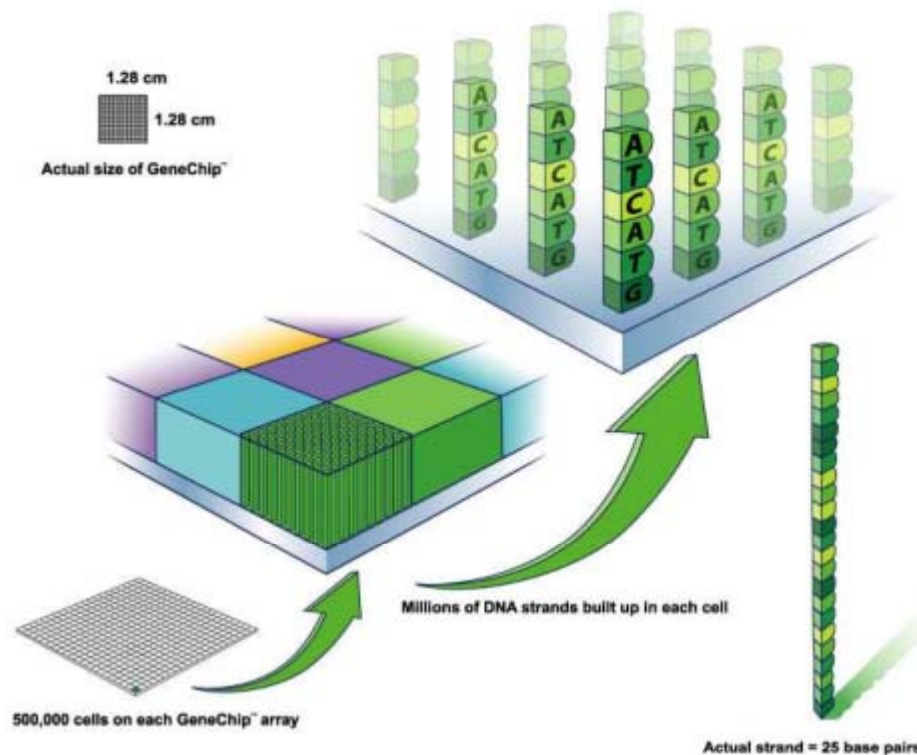


Image courtesy of Affymetrix.

Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

Chips conformados mediante **síntesis directa** de sondas.

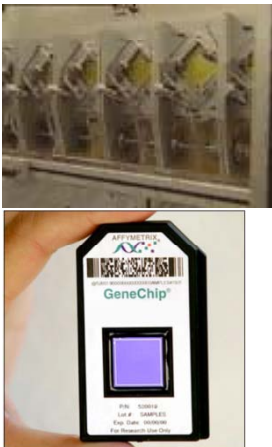
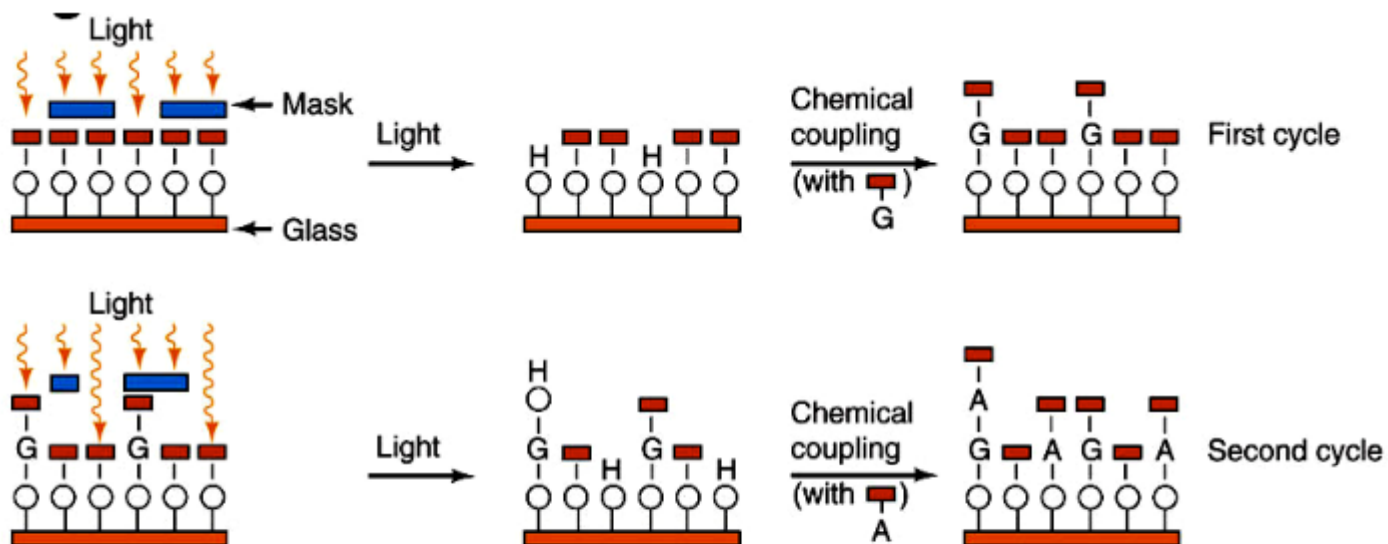
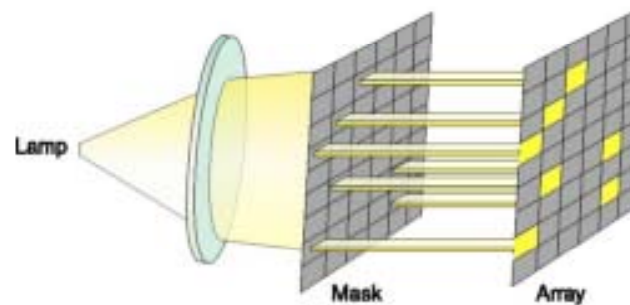


- Los ***GeneChips*** se utilizan para **estudiar** miles de **SNP's** para diferentes *loci*.
- En general, se utilizan **20-40 diferentes sondas** (40 celdas) para el estudio de **cada gen** (algunas de apareamiento perfecto y otras de apareamiento imperfecto).
- La **síntesis** de las sondas se realizan mediante diferentes tecnologías, como ***Fotolitografía*** (Affymetrix, NimbleGen), ***Inkjet*** (Agilent).o ***Electroquímica*** (Combimatrix).

Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

Fotolitografía

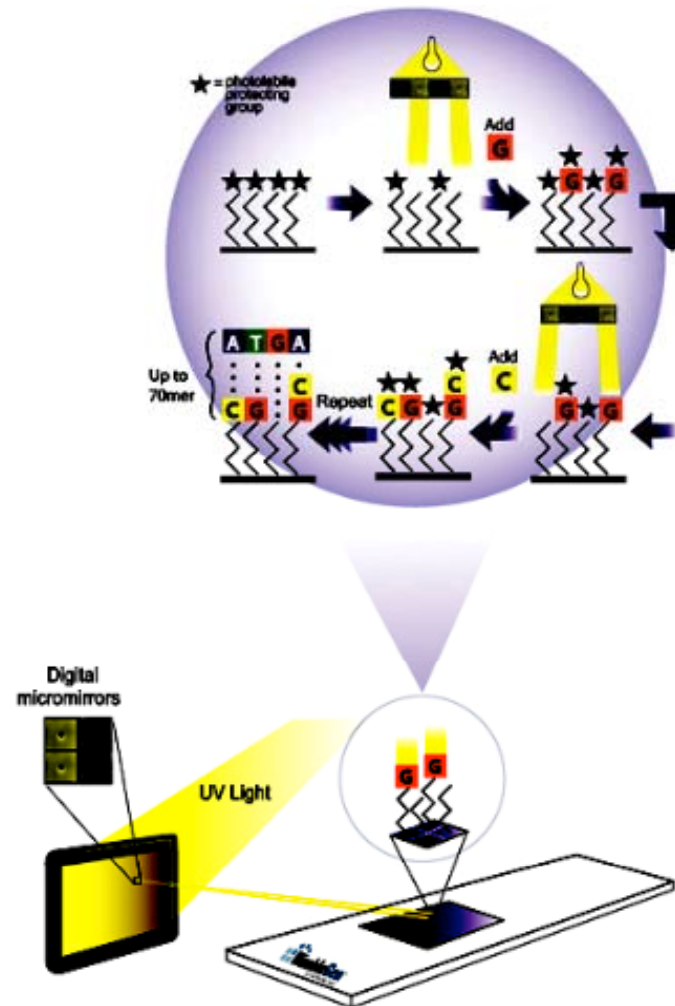


Affymetrix

Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

Fotolitografía

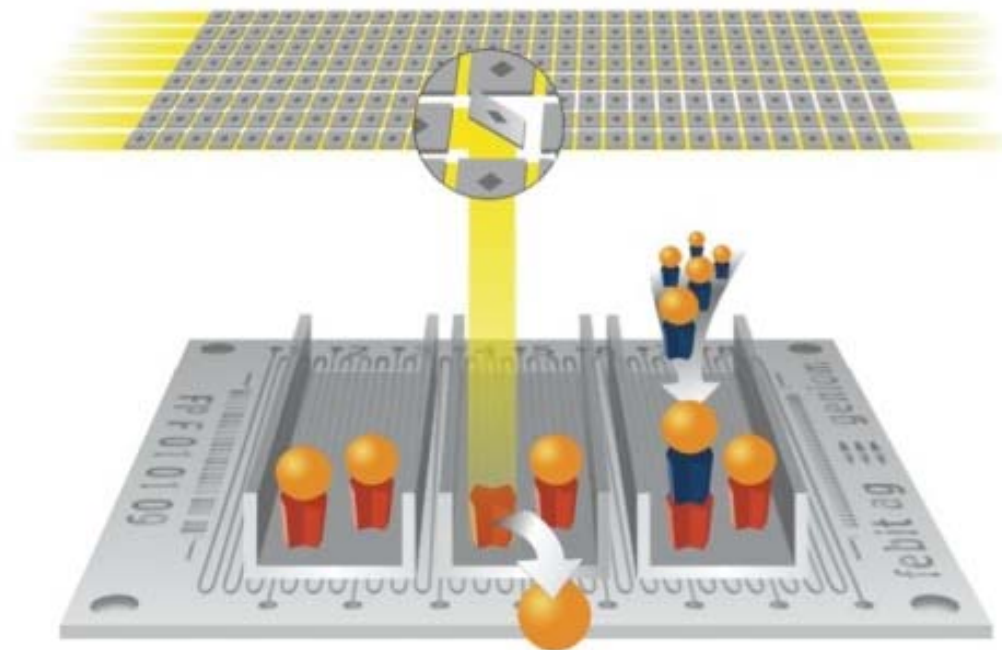


NimbleGen

Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

Fotolitografía

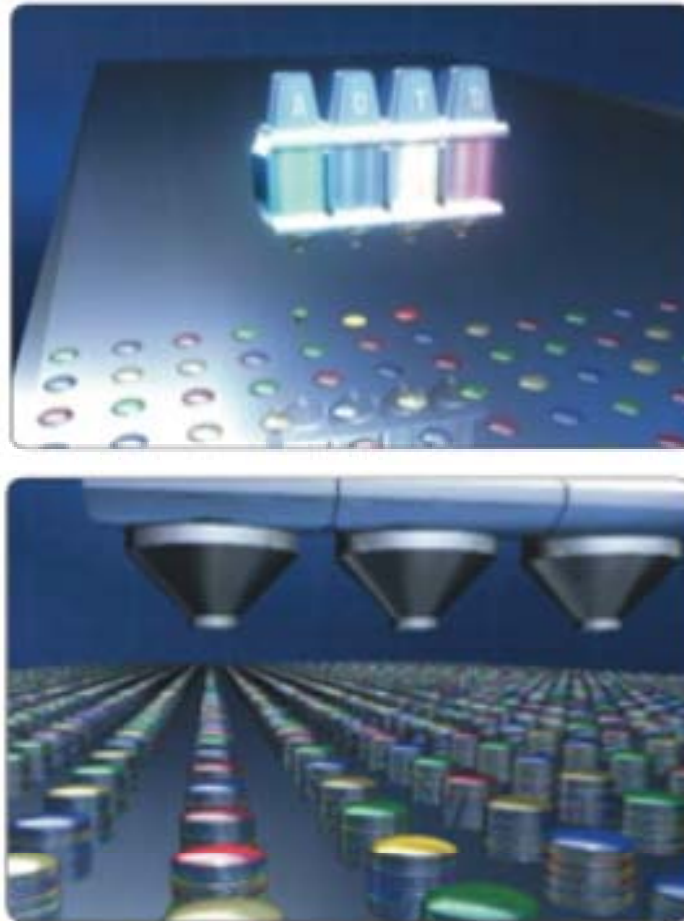


NimbleGen

Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

InkJet



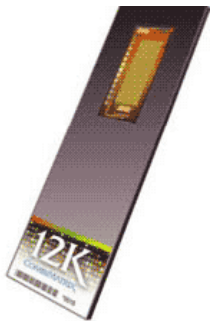
Agilent

Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

Electroquímica

- Está basado en tecnología de semi-conductores.
- Está dotado de microelectrodos en cada una de las posiciones.
- Estos microelectrodos están controlados por un *software*.
- La reacción química de síntesis de ssDNA es controlada por pulsos eléctricos.



Combimatrix

¿Cómo se realiza el análisis?

Estudios de la variabilidad genómica

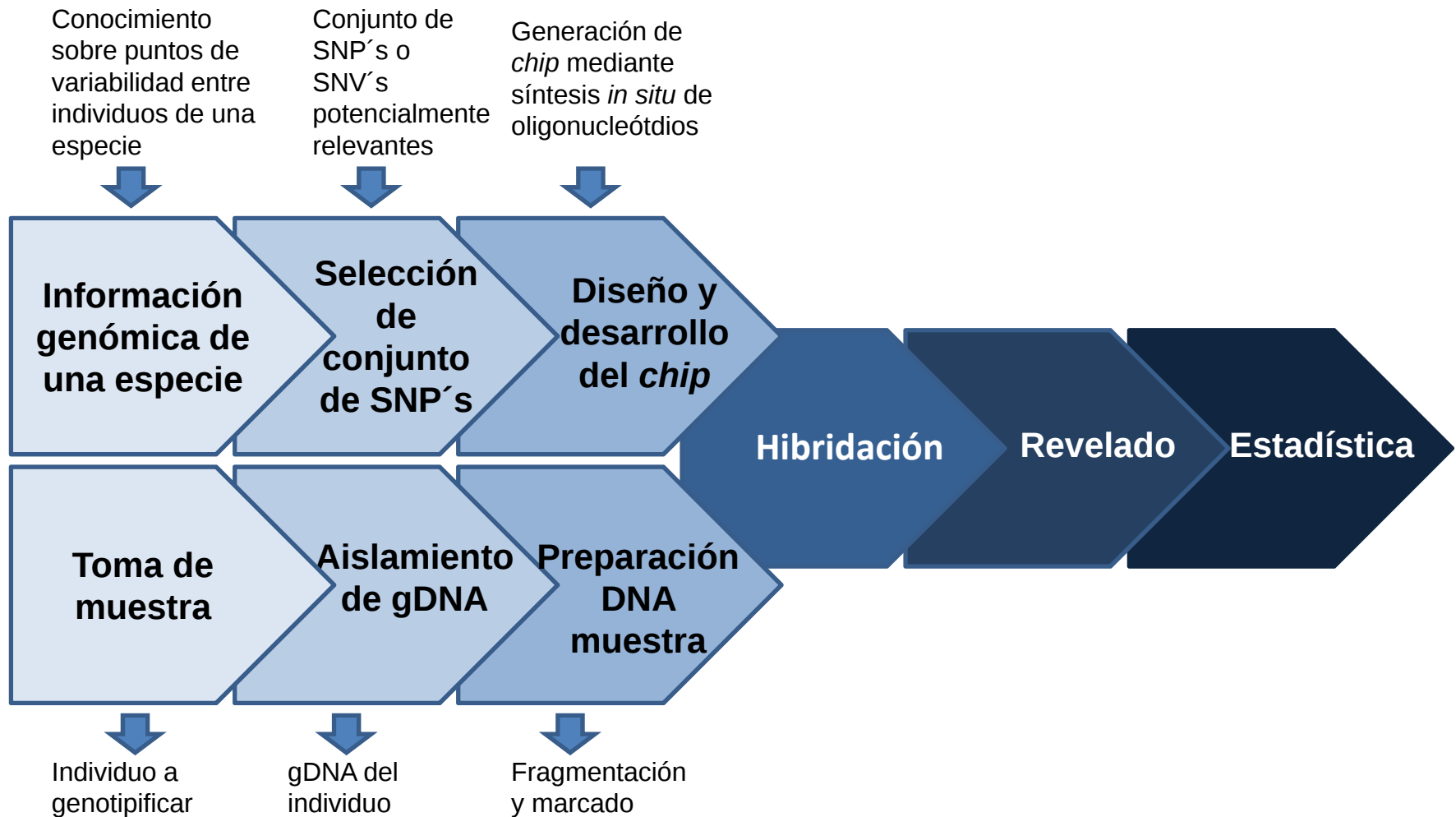
Microarreglos o *chips* de DNA

- El **principio básico** del uso de **microarreglos** para el estudio de SNP's y SNV's en poblaciones de individuos de una especie está **basado** en la **hibridación de ácidos nucleicos**.
- El **chip contiene** todas las variantes alélicas para las secuencias en estudio (se estudian entre 10.000 y 100.000 SNP's) constituyendo el **DNA diana**.
- La **muestra** será el **gDNA** de los **individuos**, adecuadamente fragmentado y marcado para su posterior detección (marcación fluorescente).
- Luego de enfrentar a la muestra con el DNA diana (el *chip*) y llevarse a cabo el **proceso de hibridación** y los lavados correspondientes, se procederá a **revelar** y registrar el resultado.
- El **análisis estadístico** posterior utilizando la información de las celdas positivas y negativas **sugerirá el genotipo del individuo investigado**.

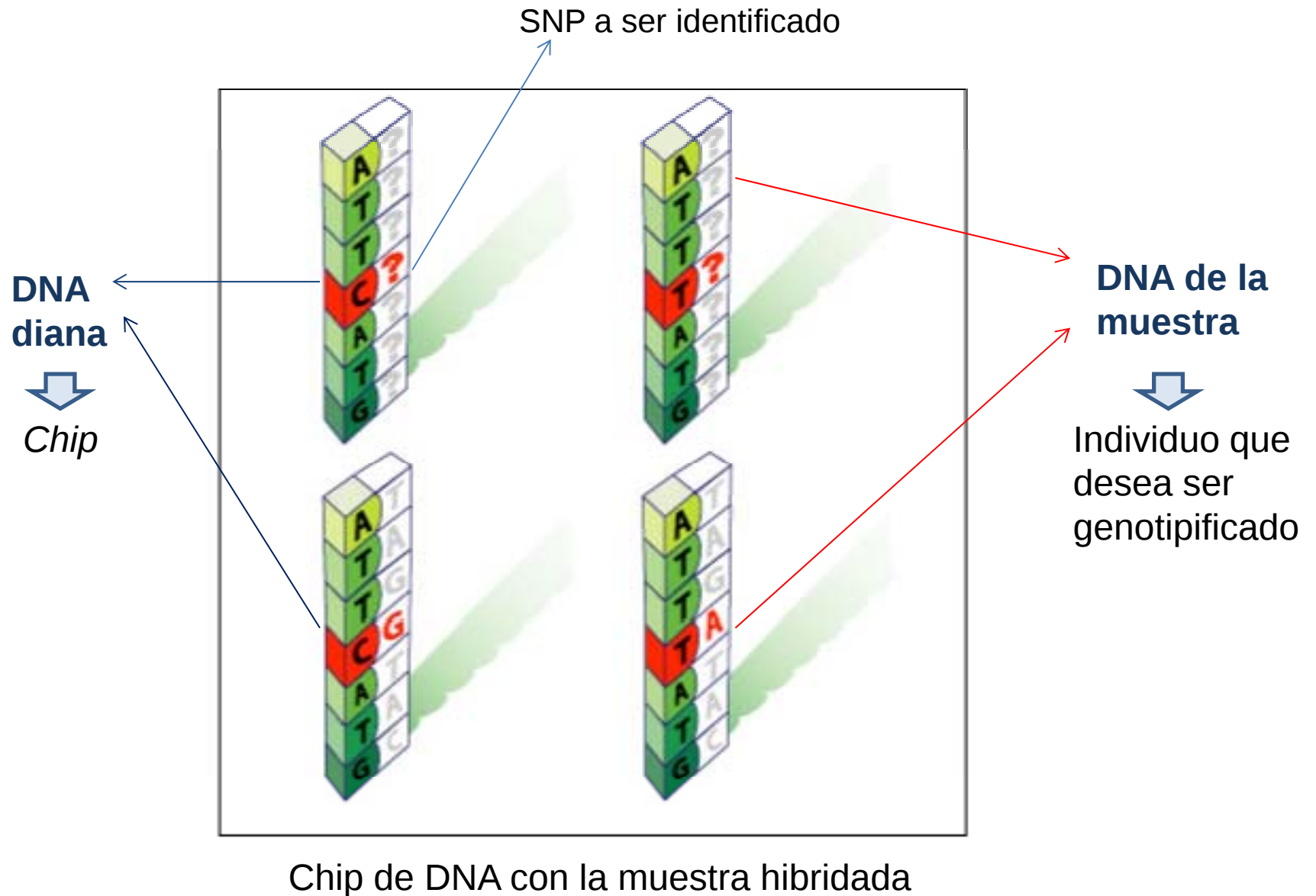
Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

El estudio de un genotipo para un individuo mediante microarreglos comprende el siguiente flujo de trabajo.



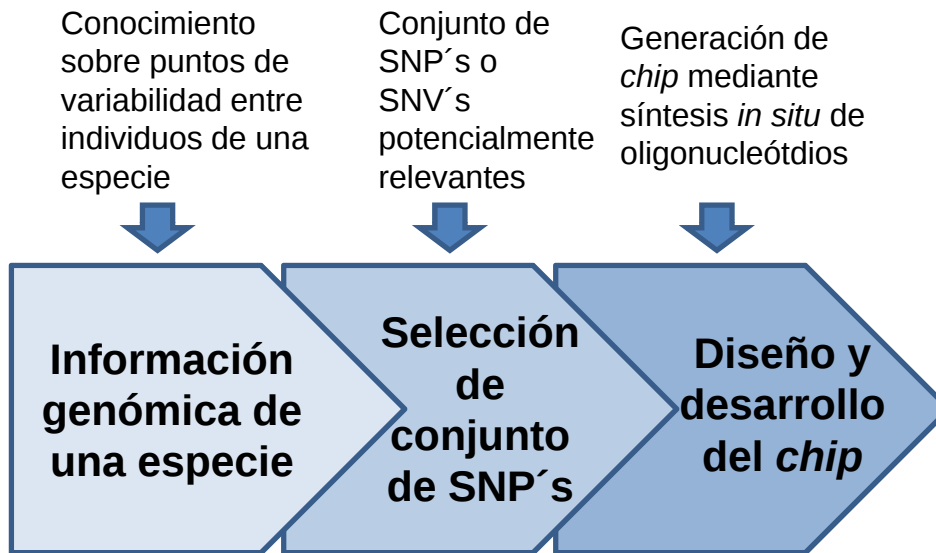
Estudios de la variabilidad genómica



Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

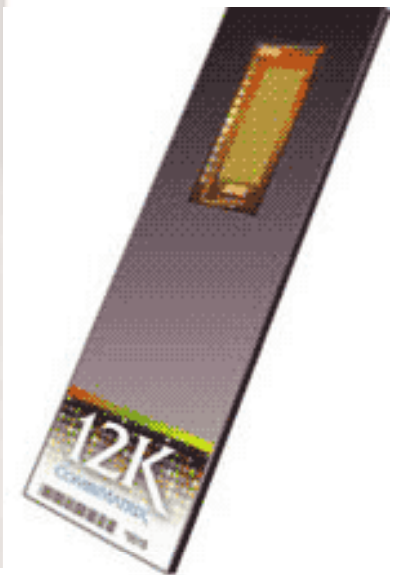
El estudio de un genotipo para un individuo mediante microarreglos comprende el siguiente flujo de trabajo.



Los ***chips*** de DNA contienen entre **10.000 y 100.000 SNP's o SNV's** para investigar en una muestra. La información para su diseño surge de muchos estudios poblacionales previos sobre variabilidad genómica.

Estudios de la variabilidad genómica

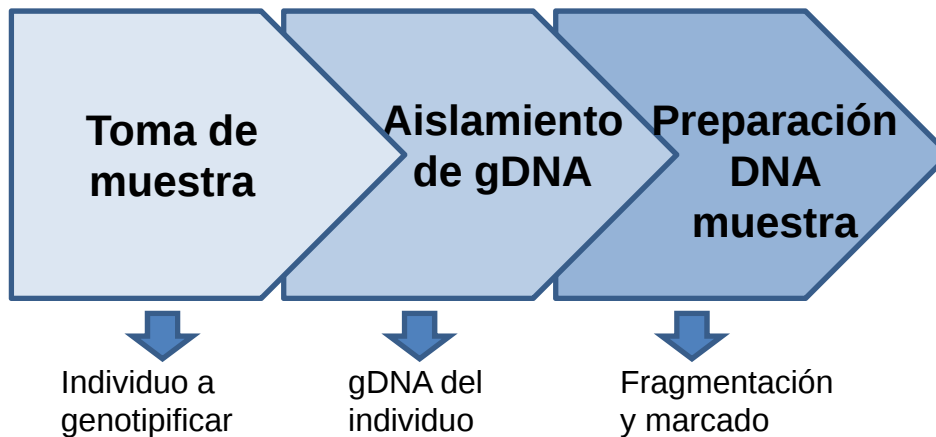
Microarreglos o *chips* de DNA



Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

El **estudio de un genotipo** para un individuo mediante microarreglos comprende el siguiente **flujo de trabajo**.



El **gDNA** de la muestra en estudio debe ser **fragmentado** y marcado para su posterior detección.

Estudios de la variabilidad genómica

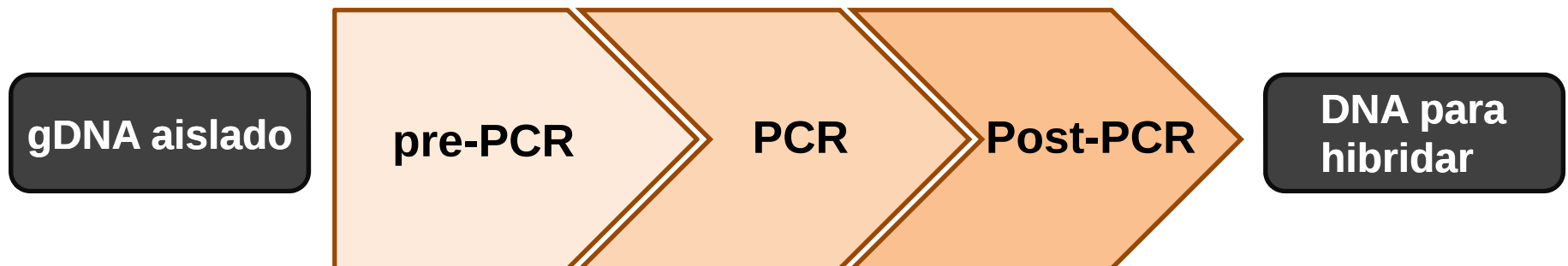
Microarreglos o *chips* de DNA

- Si el **organismo** es **unicelular**, la **muestra** derivará de un **cultivo** del mismo.
- Si el **organismo** es **multicelular**, la **muestra** puede derivar de **cualquier tejido** del individuo.
- En **humanos**, generalmente, la muestra deriva de una extracción de **sangre**.
- El **gDNA** es **aislado** de la biomasa seleccionada por **procedimientos estándar**.
- El **gDNA** debe estar **libre de inhibidores de PCR** (grupos hemo, exceso de sales, EDTA) y poseer **alto grado de integridad**.
- Se debe partir de alrededor de **500 ng** de **gDNA**. **Si no** se cuenta con dicha cantidad, puede llevarse a cabo una **WGA** (*Whole Genome Amplification*).

Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

El procesamiento del gDNA puede dividirse en las siguientes 3 etapas:



Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

El procesamiento del gDNA puede dividirse en las siguientes **3 etapas**:



gDNA aislado

pre-PCR

1

El **gDNA aislado** debe ser cuantificado y diluído hasta una concentración de **50 ng/μL**. Las diferentes muestras se disponen por duplicado en una placa de 96 *wells* (**250 ng por muestra**).

Estudios de la variabilidad genómica

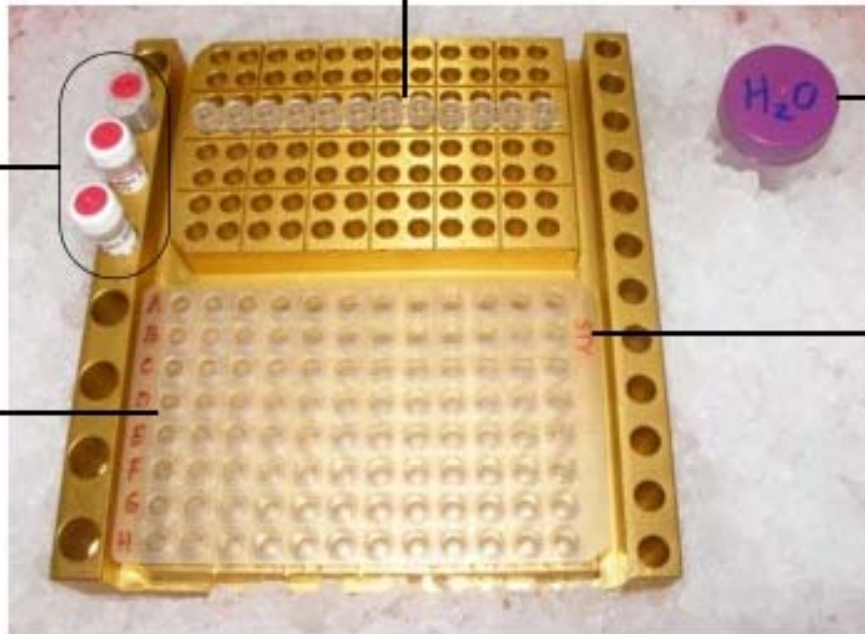
Microarreglos o *chips* de DNA

pre-PCR

1

10X Sty I Buffer
(NEBuffer 3), BSA
and Eppendorf
tube

Double cooling
chamber



Molecular biology-
grade water

Plate of genomic
DNA labeled Sty

Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

pre-PCR

2

La **mitad** de las muestras de **gDNA** es digerida con la enzima **StyI** (**C/CWWGG**).

La otra **mitad** de las muestras de **gDNA** es digerida con **NspI** (**RCTAG/Y**).

De este modo, cada gDNA es digerido con ambas enzimas independientemente.

R= A, G
W= A, T
Y= C, T



Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

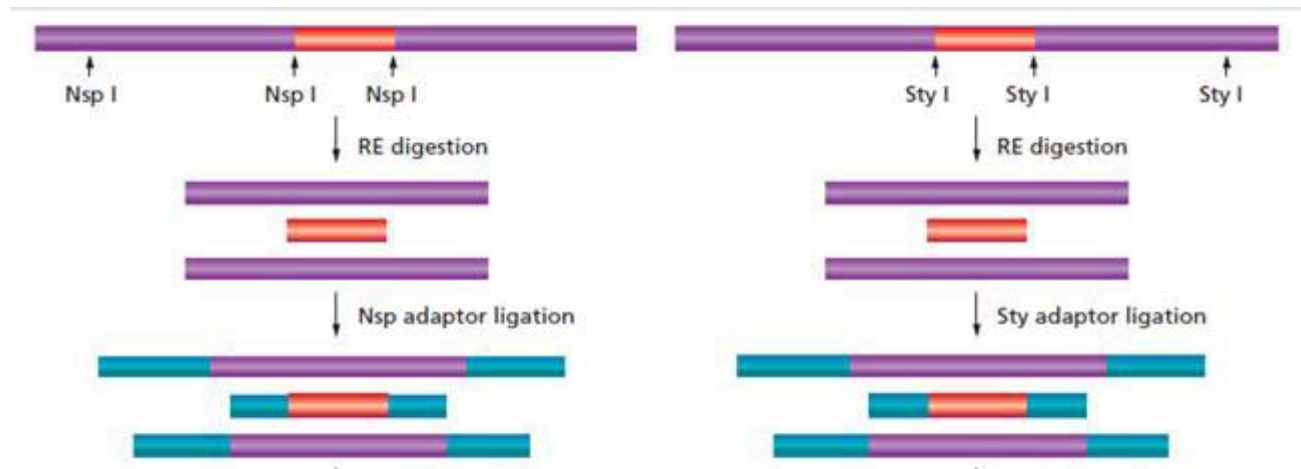
pre-PCR

3

Cada **muestra** digerida es **ligada** (con DNA ligasa) a **adaptadores específicos**.

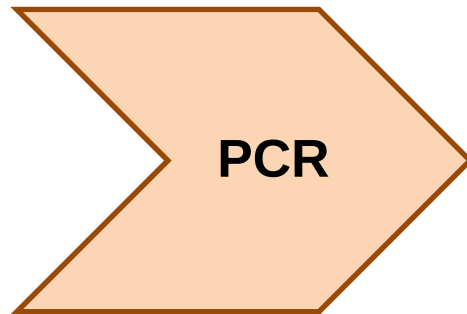
El gDNA tratado con *StyI* es ligada con **adaptadores *StyI***.

El gDNA tratado con *NspI* es ligada con **adaptadores *NspI***.



Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

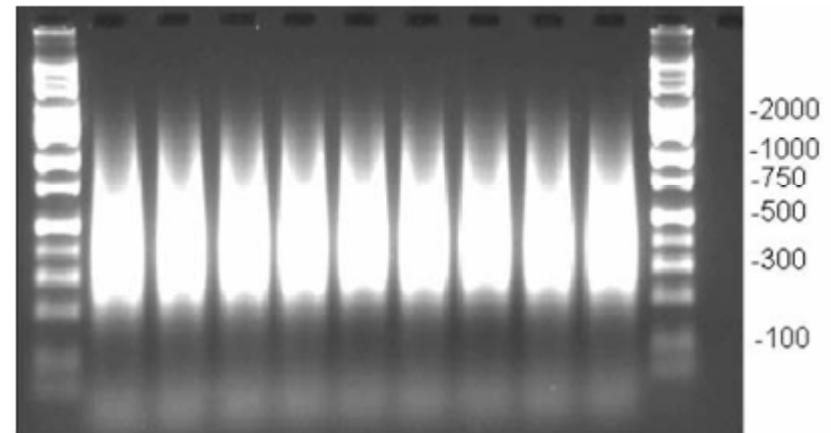


Luego, los **fragmentos genómicos** modificados con adaptadores son sometidos a **PCR** con *primer Styl* o *Nspl* según corresponda.

Se obtienen **fragmentos** entre **200 y 1.100 pb.**

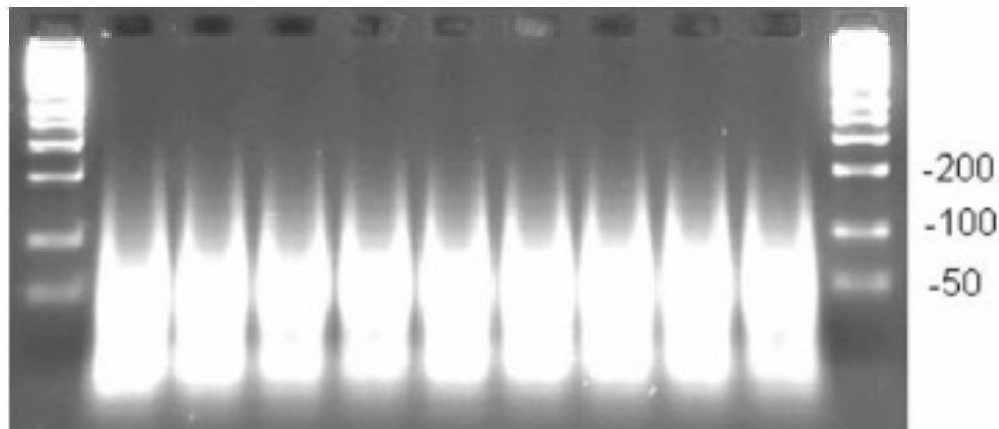
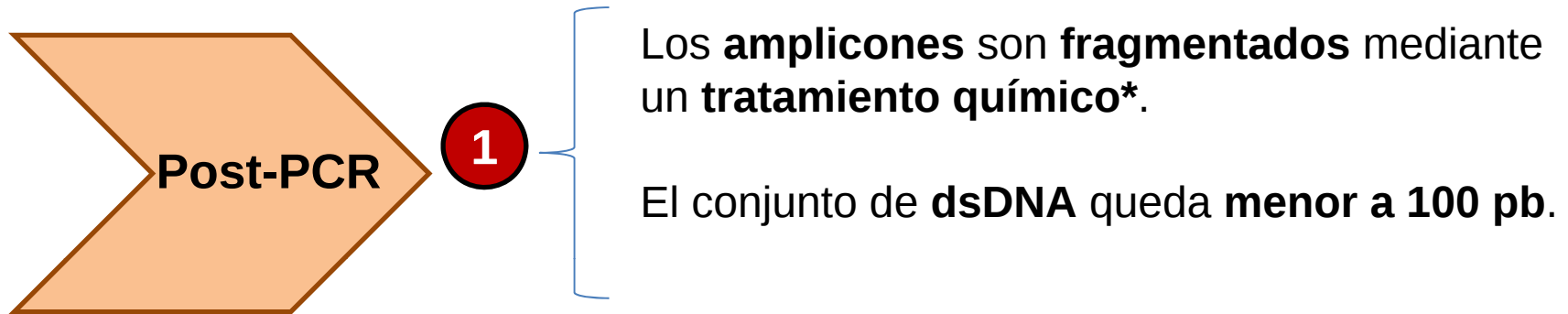
Se **juntan** los **amplicones** de cada **muestra** (2 PCRs por muestra)

GW6.0 PCR Program for GeneAmp® PCR System 9700		
Temperature	Time	Cycles
94°C	3 min	1X
94°C	30 sec	} 30X
60°C	45 sec	
68°C	15 sec	
68°C	7 min	1X
4°C	HOLD (Can be held overnight)	
Volume: 100 µL		



Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA



*El tratamiento involucra una reacción productora de radicales hidroxilo, con peróxido de hidrógeno, ácido ascórbico y complejos de hierro-EDTA.
Zhang et al, 2001. Reproducible and inexpensive probe preparation for oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Research*.

Estudios de la variabilidad genómica

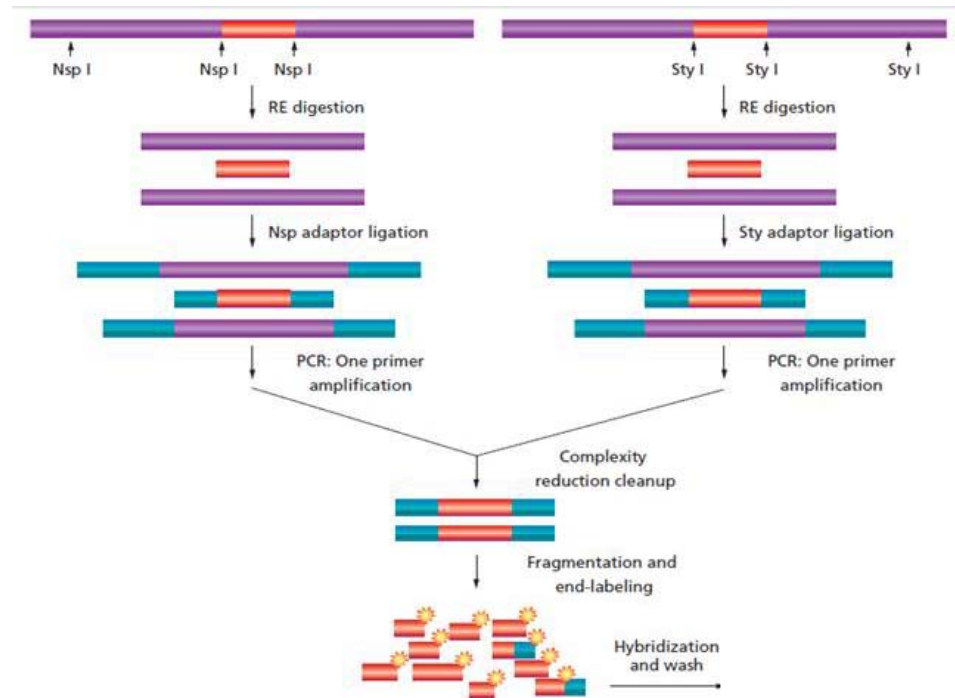
Microarreglos o *chips* de DNA

Post-PCR

2

Los **amplicones** fragmentados son **marcados**.

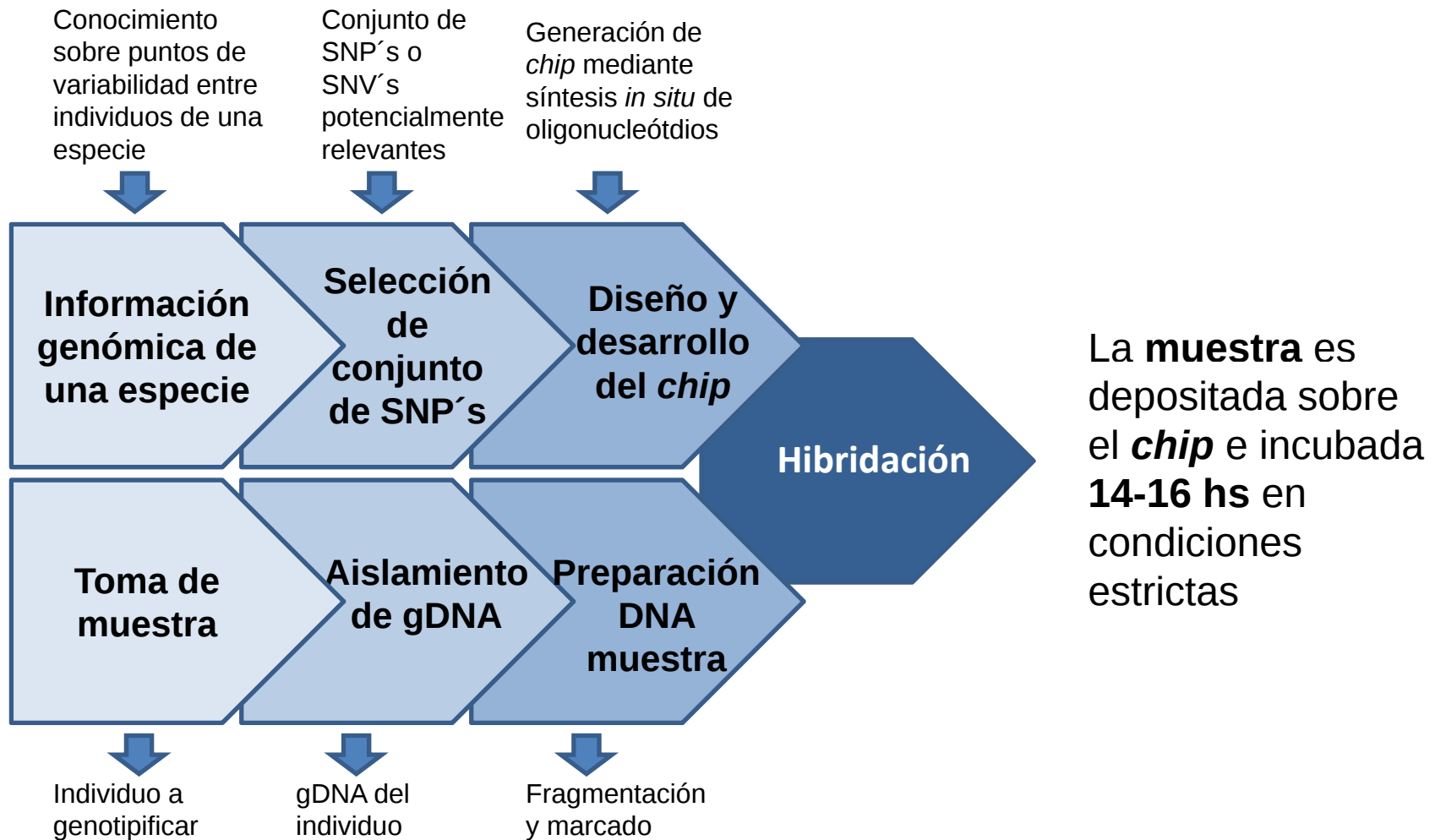
La **marcación** consiste en **tratar** a cada muestra con **TdT** (*transferasa terminal*) y un **ddNTP** marcado con **biotina**.



Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

El estudio de un genotipo para un individuo mediante microarreglos comprende el siguiente flujo de trabajo.



Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

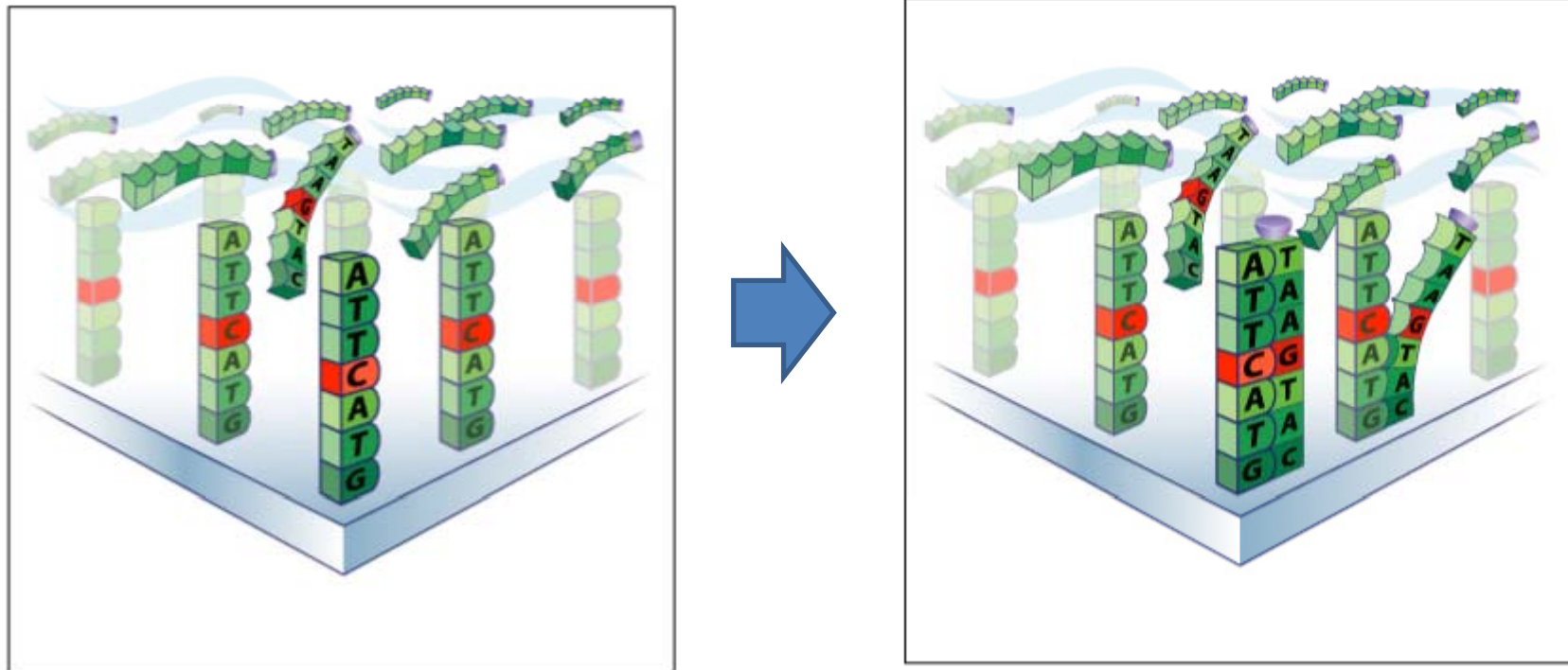


Siembra del *chip* con la muestra antes preparada, conteniendo la marca de biotina

Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

Las moléculas de la **muestra** se **enfrentan** al **DNA diana** y quedan retenidas donde aparean perfectamente.

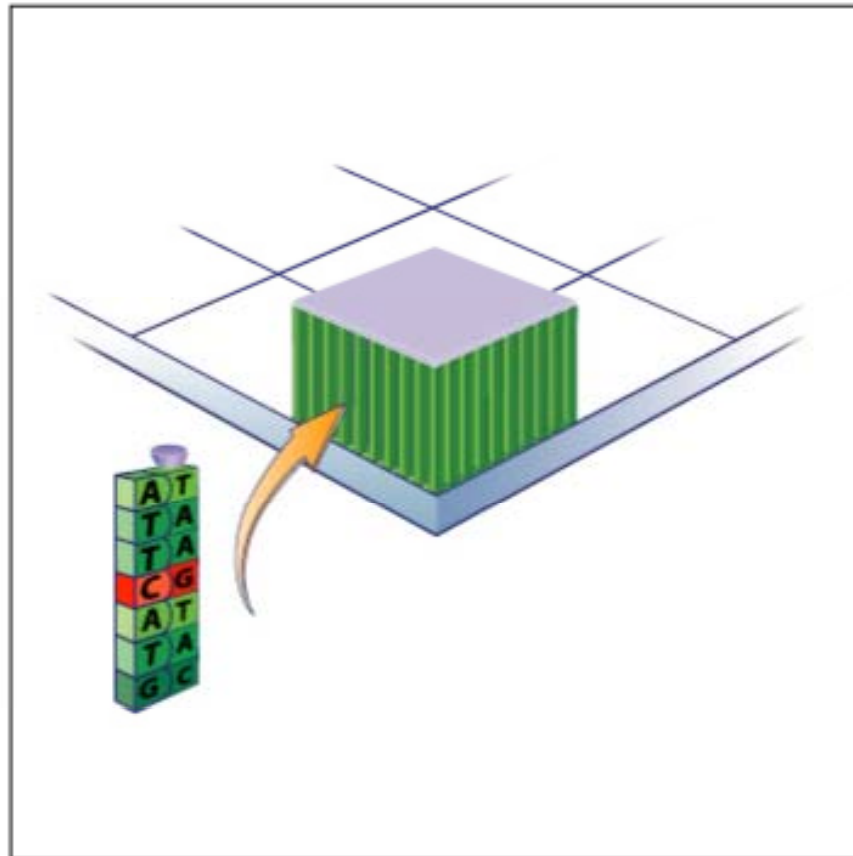


La hibridación es en condiciones estándar con presencia de DNA heterólogo como bloqueante.

Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

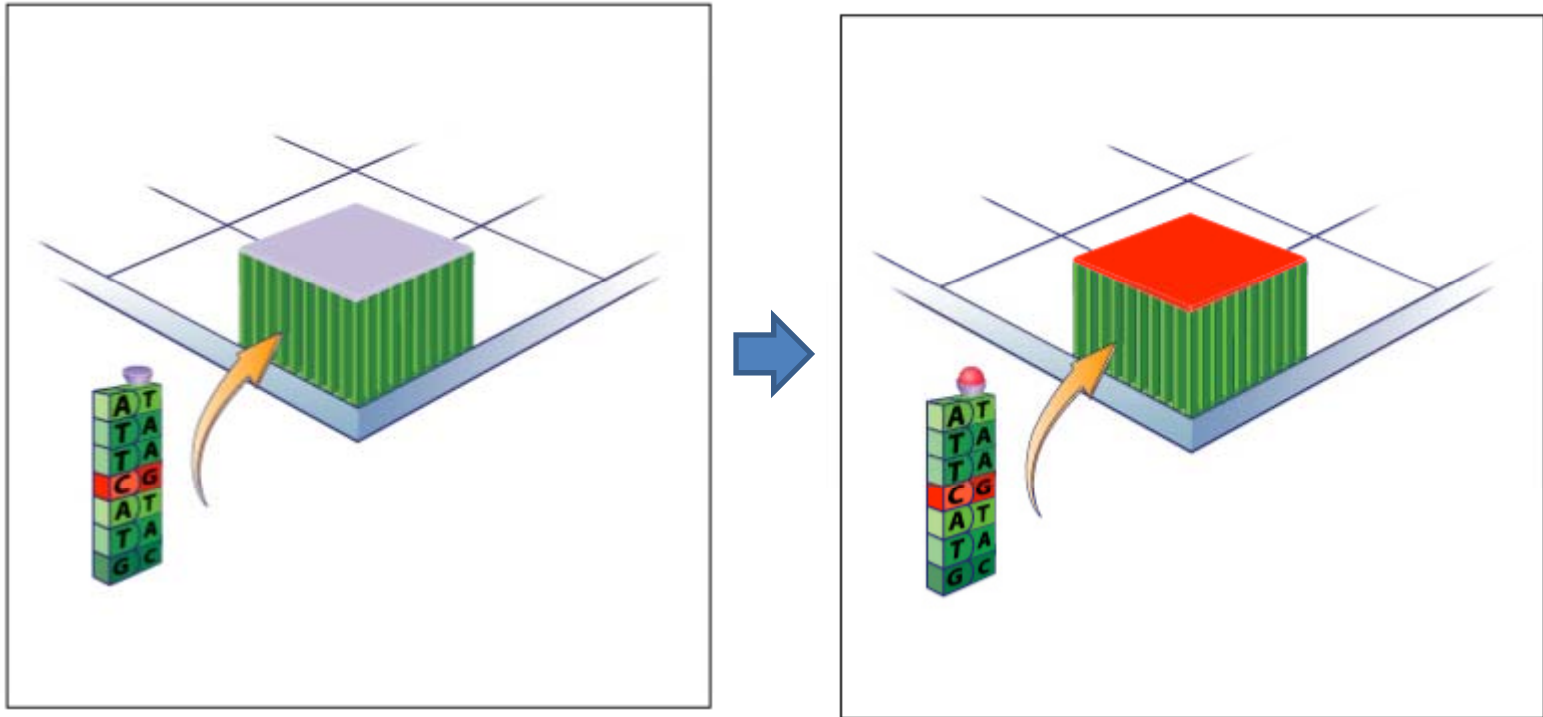
De esta manera, los oligonucleótidos de la celda quedan hibridados con los fragmentos de gDNA, quedando una **capa de biotina** sobre la **celda**.



Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

Después, se introduce estreptavidina marcada con el fluoróforo, de modo tal de transformar la hibridación en detectable con propiedades espectroscópicas.

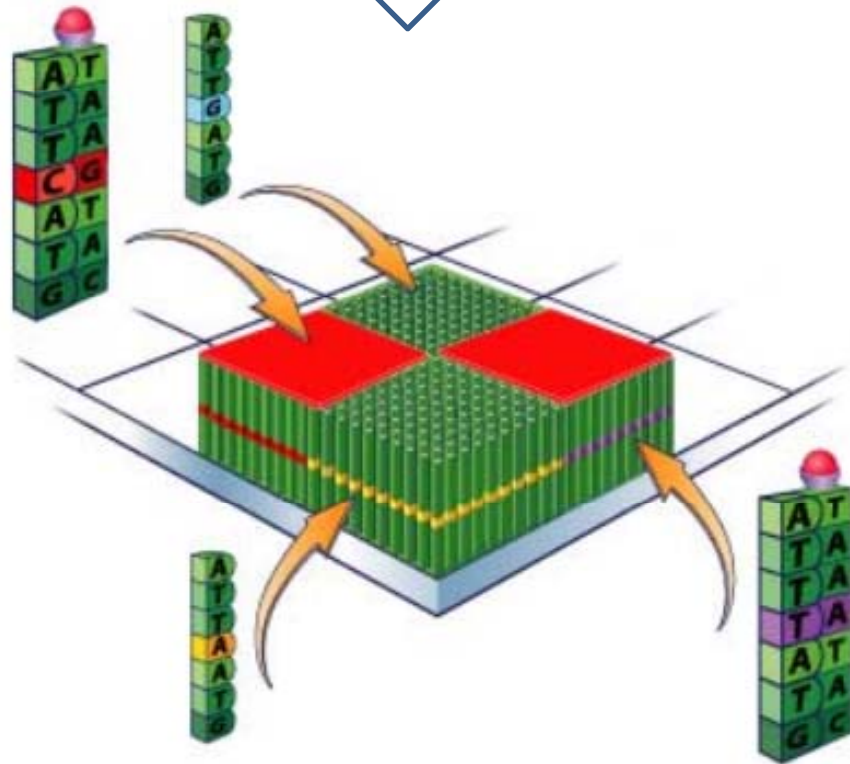


● Estreptavidina con fluoróforo

Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

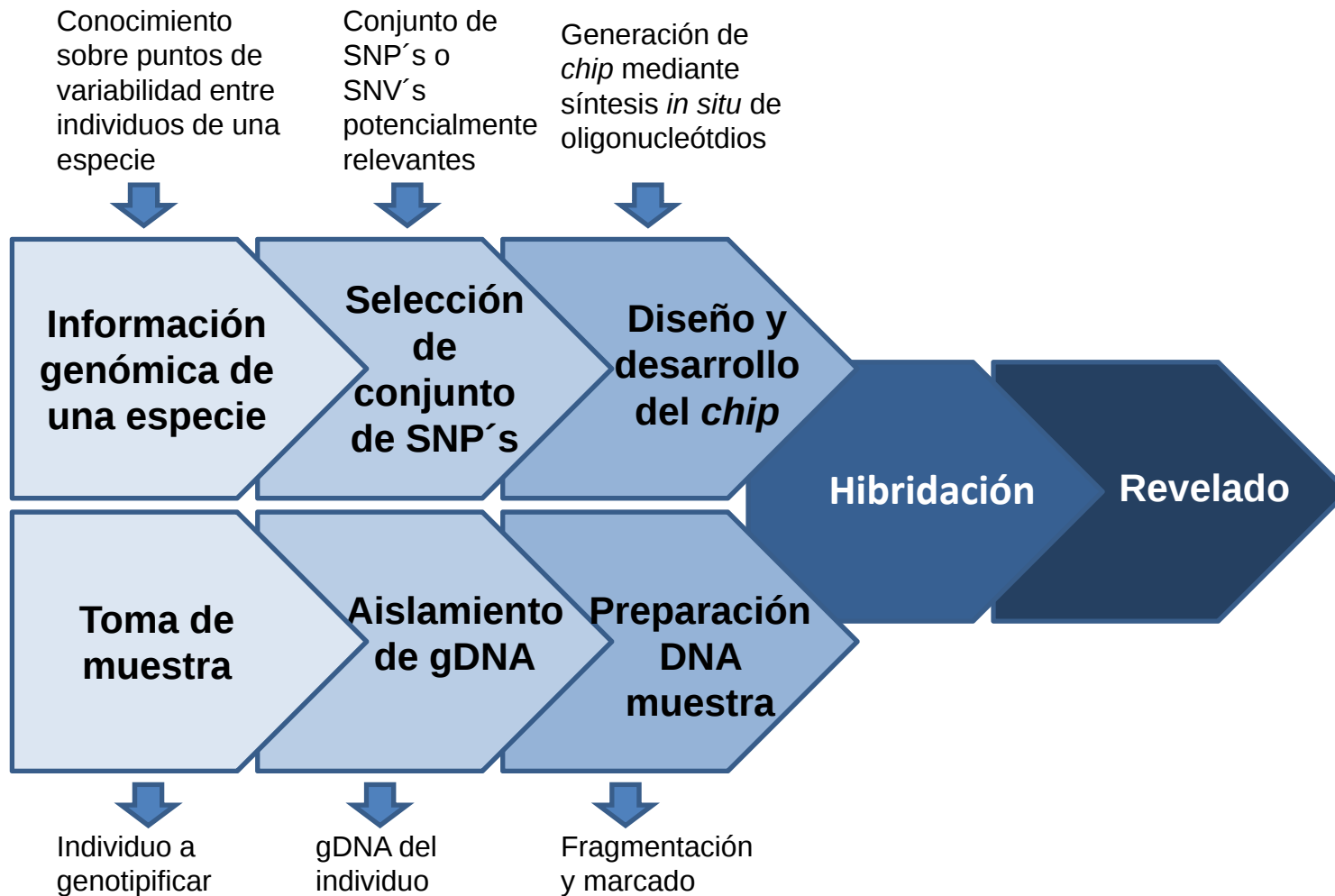
Ejemplo de celdas para detectar un mismo SNP



Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

El estudio de un genotipo para un individuo mediante microarreglos comprende el siguiente flujo de trabajo.



Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

- **Luego** de la **hibridación** se realizan **lavados** para eliminar los DNAs imperfectamente apareados (soluciones de concentración salina decreciente y presencia de detergentes).
- **Después**, se agrega **estreptavidina** marcada con un **fluoróforo** en presencia de BSA.
- La **estreptavidina** quedará **unida** a las **biotinas** presentes en las muestras de **gDNA**.
- **Finalmente**, se **excita** el microarreglo con **luz** apropiada y se **registra** la emisión de **fluorescencia** con un escáner.

Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

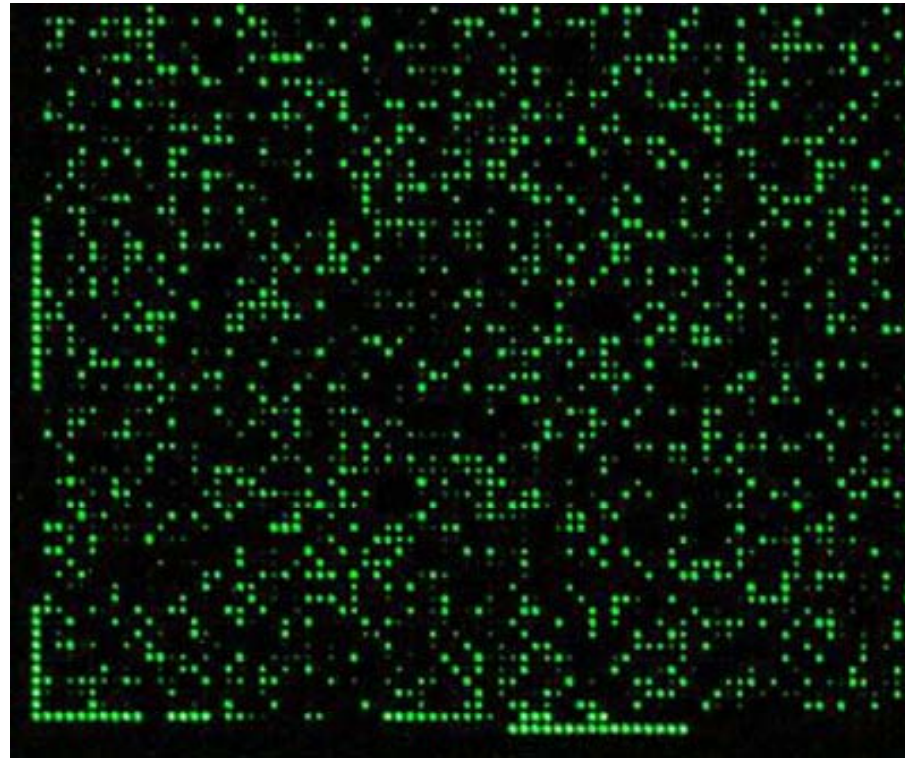


Escáner

Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

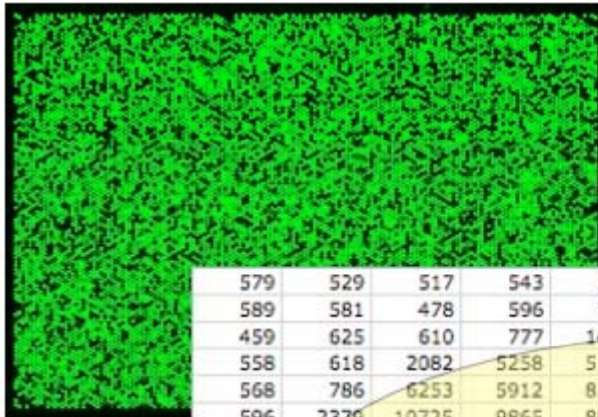
Resultado de un microarreglo revelado



Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

Resultado de un microarreglo revelado



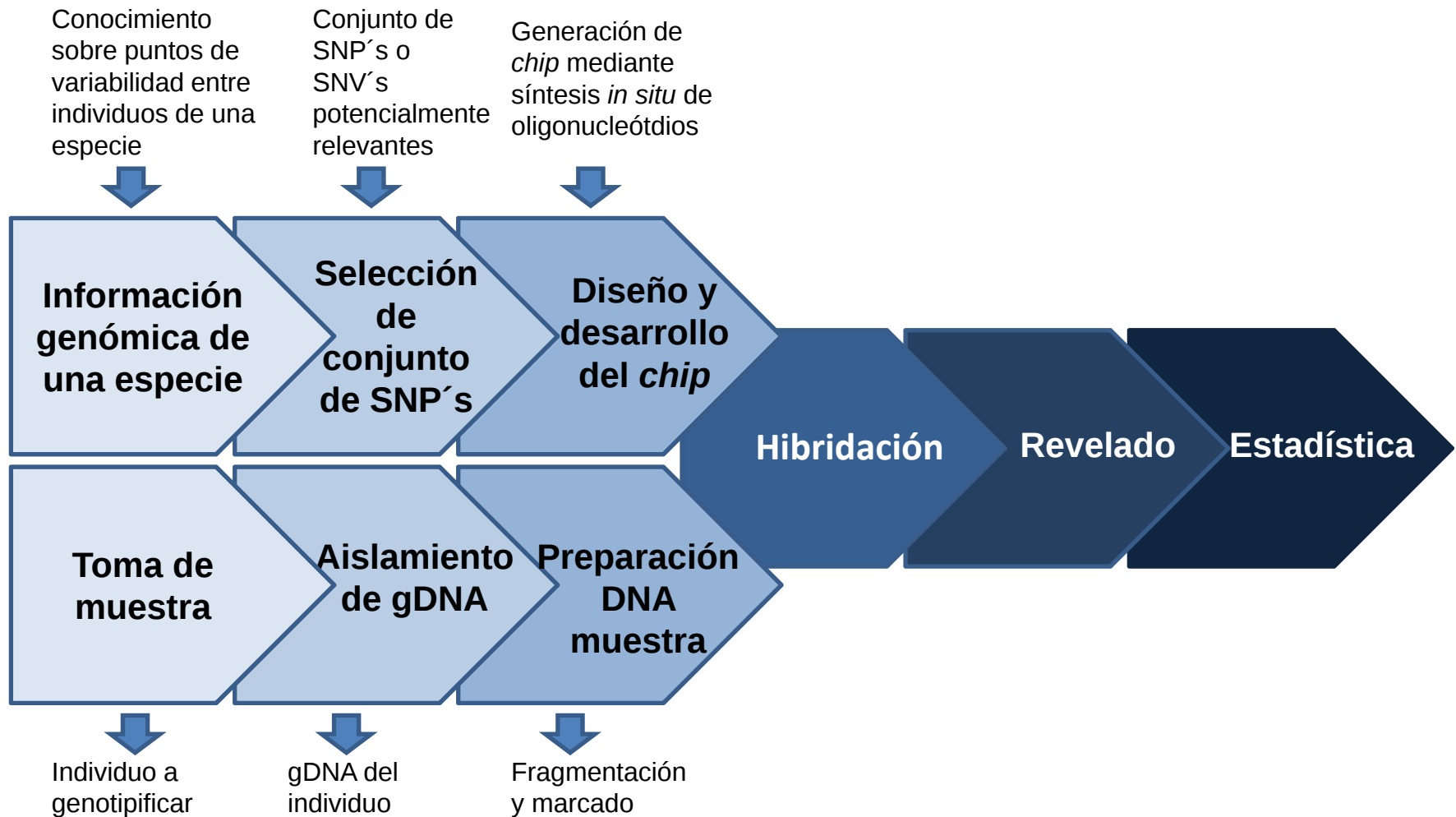
579	529	517	543	538	670	565	508	513	483	522	482
589	581	478	596	741	779	895	694	728	712	531	571
459	625	610	777	##	##	##	##	##	796	684	508
558	618	##	##	##	##	##	##	##	##	796	714
568	786	##	##	##	##	##	##	##	##	##	629
596	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	990
526	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##
606	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##
517	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##

579	529	517	543	538	670	565	508	513	483	522	482	##	##	##
589	581	478	596	741	779	895	694	728	712	531	571	##	##	##
459	625	610	777	1458	4606	6043	4738	1346	796	684	508	##	##	##
558	618	2082	5258	5122	2439	1279	2713	2191	1106	796	714	##	##	518
568	786	6253	5912	8342	7381	7351	5667	3475	2133	1257	629	##	475	486
596	2379	10725	9865	8082	6407	5261	7044	6364	3343	2331	990	125	478	531
526	3409	12231	10333	8060	7254	6730	6820	5707	6162	4015	1368	125	491	609
606	4842	13367	9052	8229	7423	6314	6587	6898	5949	6301	2127	146	444	475
517	4759	12274	9626	8668	8145	5930	5573	6151	6993	6205	3018			
582	3110	12256	8556	8467	7690	6220	5155	5943	6380	5833	4186			
811	1903	8213	7895	7863	6827	5461	6034	5156	5747	5875	3429			
663	611	3316	5849	7667	6278	6655	5988	5796	6484	3932	2305			
521	540	657	3647	4291	5799	6359	6045	4268	3149	2458	518			
533	463	528	571	1866	4402	3676	3033	3746	2077	475	486			
545	471	531	561	553	578	1117	784	484	525	478	531			
549	479	519	454	627	439	443	533	517	525	491	609			
549	559	555	580	554	419	557	565	549	546	444	475			

Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

El estudio de un genotipo para un individuo mediante microarreglos comprende el siguiente flujo de trabajo.



Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

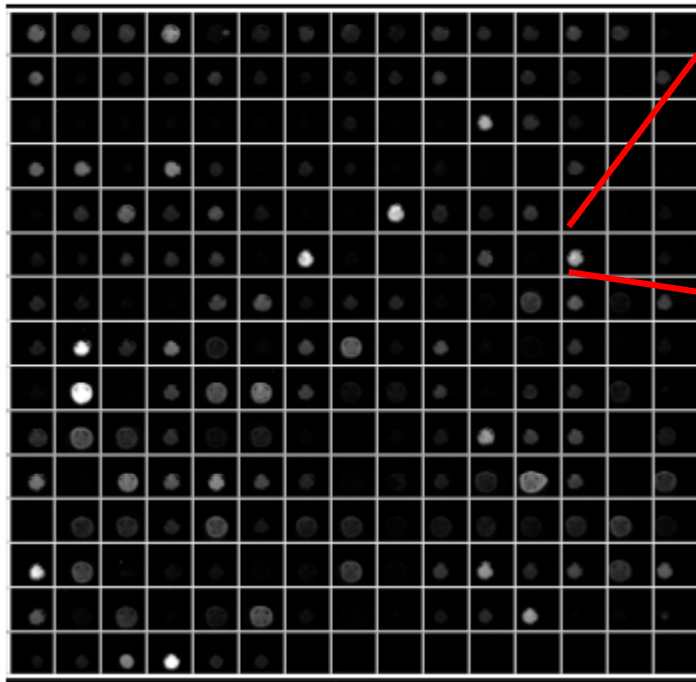
- **Luego** de **digitalizarse** la imagen del **microarreglo**, es necesario realizar un **análisis estadístico** para definir cuáles son los SNPs presentes en el gDNA en estudio.
- Esto involucra **comparar** las **señales** obtenidas en cada celda respecto de los **controles**, y de analizar en su **conjunto** todas las **sondas disponibles** para la determinación de **cada SNP** (las de apareamiento perfecto y las de apareamiento imperfecto, más las que cuestionan el tipo de alelo según variante del SNP).
- En función de todo lo anterior, se define el **genotipo** de la **muestra** analizada referenciando el rigor estadístico de la determinación.

Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

El microarreglo es analizado en cada uno de los *spots*.

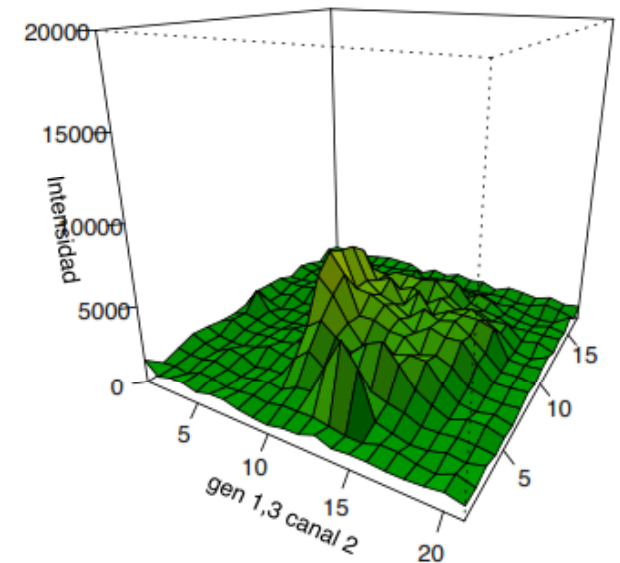
Selección de 1 *Spot*



Grilla del microarreglo



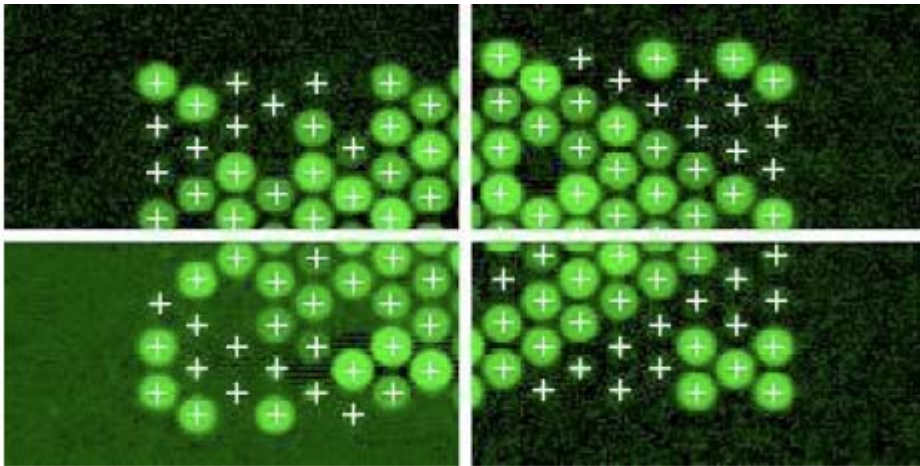
Análisis de la intensidad de señal



Estudios de la variabilidad genómica

Microarreglos o *chips* de DNA

El microarreglo es analizado en cada uno de los spots.



- En cada *spot* se localiza el centro, restándose toda la fluorescencia base en función del entorno.

- El resultado de todas las celdas existentes para determinar un SNP son comparadas y en función de ello y de un soporte estadístico se define cuál es el SNP presente en el gDNA.