

ADN/ARN MICROARRAYS

10 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de esta práctica es que los estudiantes comprendan los conceptos básicos de la técnica de Microarrays y como se aplica a la genómica funcional. Esta simulación se ha diseñado para proporcionar a los estudiantes la oportunidad de analizar las diferencias en la expresión génica utilizando un microarray de dos colores. En esta práctica, los estudiantes analizarán cuatro conjuntos de muestras simuladas de pacientes para determinar diferentes niveles de expresión génica. Al final de la práctica, los estudiantes habrán observado y analizado un experimento utilizando la técnica de Microarrays.

2. COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
Cuatro diferentes muestras de microarrays QuickStrips™	
Paciente 1	Nevera
Paciente 2	Nevera
Paciente 3	Nevera
Paciente 4	Nevera
Tarjeta de microarrays	Nevera

NOTA: ESTE EXPERIMENTO NO CONTIENE NINGUN MATERIAL PREPARADO A PARTIR DE FUENTES HUMANAS O DE VIRUS.

NOTA: ALMACENAR TODO EXPERIMENTO EN EL REFRIGERADOR DESPUÉS DE RECIBIRLO.

2.1 Material requerido y no suministrado

- Pipeta de volumen fijo (5 µl) o micropipeta de volumen variable.
- Puntas de pipeta.
- U.V. onda larga fuente de luz (linterna o transiluminador).

3. INTRODUCCIÓN

DESCUBRIENDO EL GENOMA HUMANO

El genoma de un organismo contiene la información genética necesaria para su crecimiento, desarrollo y supervivencia. En los seres humanos, esta información está contenida dentro de 23 pares de cromosomas en el interior del núcleo de una célula. A principios de 1990, los investigadores decidieron secuenciar el genoma humano completo (seis mil millones de pares de bases de ADN). Este compromiso internacional, llamado Proyecto Genoma Humano, puso en marcha el campo de la "genómica" (el estudio de la secuencia y estructura del genoma). Como resultado del Proyecto del Genoma Humano, se ha puesto a disposición del público una gran cantidad de información acerca de la secuencia de ADN.

Después que la secuencia completa consensuada del genoma humano fuera publicada en abril de 2003, los científicos empezaron a investigar la información oculta dentro de las secuencias de ADN. Utilizando la información de la secuencia, se puede asignar la localización cromosómica de genes específicos, y en la actualidad todavía están siendo identificados nuevos genes. Sin embargo, el análisis de secuencias ha determinado que sólo hay 21.000 genes que producen proteínas en el genoma humano, un número mucho más bajas que las estimaciones realizadas antes del Proyecto del Genoma Humano.

Los datos del Proyecto del Genoma Humano ha demostrado que las secuencias de ADN sólo se diferencian, aproximadamente, en un 0,2% entre diferentes individuos (aproximadamente solo cambia una de cada 500 bases). Variaciones específicas en el genoma de un individuo pueden ser utilizadas como marcadoras para predecir la predisposición para enfermedades particulares. Los científicos pueden analizar estas diferencias genéticas para explorar la diversidad humana y la evolución a nivel de la secuencia de ADN. Además de las secuencias de ADN que codifican para las proteínas, el genoma incluye secuencias de ADN que influyen en la producción de proteínas a través de otros mecanismos. Por ejemplo, secuencias conocidas como promotores controlan la transcripción de un ARNm específico. Otro código de secuencias de ADN para el ARN ribosomal, el ARN de transferencia, y microARN, que trabajan juntos para regular la traducción de proteínas. Por estas razones, es fundamental la comprensión de toda la secuencia del genoma humano, incluso aunque la mayoría del genoma no codifica ninguna proteína.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES MEDIANTE EL USO DE MICROARRAYS

Una precisa regulación de la expresión génica es esencial para un funcionamiento normal de las células y tejidos. Dependiendo de las características de su promotor, la expresión de un mRNA particular puede variar, desde la ausencia de expresión a la expresión de cientos de copias por célula. Las técnicas tradicionales tales como transferencia de Northern analizar la expresión de sólo unos pocos genes a la vez, por lo cual la investigación genómica lleva mucho tiempo. La aparición de la tecnología de microarrays de ADN ha hecho posible producir y analizar los datos de medición de los niveles de ARNm de miles de genes en un solo experimento.

Los Microarrays (o "chips de genes") han hecho posible identificar, clasificar y asignar funciones a muchos genes no caracterizados, simplemente mediante la determinación de cuando los genes se expresan o están reprimidos. Su pequeño tamaño y su

capacidad para analizar la expresión de un gran número de genes simultáneamente han hecho de los microarrays una herramienta importante para la investigación genómica en diversos campos tales como el descubrimiento de fármacos, la toxicología y diagnóstico médico.

Cada chip se compone de unas piezas cortas de una sola hebra de ADN llamados oligonucleótidos (oligos) que están fijadas a un portaobjetos de vidrio (Figura 1). El chip contiene una rejilla que comprende miles de oligos, cada uno con una secuencia conocida que corresponde a un gen particular a analizar. Debido a que un solo chip contiene miles de puntos, en cada experimento se puede analizar con precisión los niveles de expresión de miles de genes.



Figura 1: Un ejemplo de un chip de genes.

La tecnología de microarrays de dos colores permite la comparación de los perfiles de expresión de dos muestras diferentes (por ejemplo, células de la piel normal frente o células de cáncer de piel). Hay cuatro pasos básicos que intervienen en un microarray de dos colores (Figura 2):

1. Preparación de muestras

El ARNm total se extrae de las muestras control y experimentales.

2. Síntesis de ADNc

Se generan bibliotecas de ADN complementario (ADNc) a partir de las muestras de ARN usando transcriptasa inversa (RT), una enzima que utiliza ARN como molde para producir ADN. Las bibliotecas de ADNc son etiquetados con sondas fluorescentes. El ADNc aislado de la muestra control es marcado con una etiqueta fluorescente verde normalmente, mientras que cDNA aislado de la muestra experimental se marca con un fluorescente rojo.

3. La hibridación

El cDNA marcado a partir de muestras control y experimentales se coloca en el chip micromatriz, donde se une (o se hibrida) con el punto que contiene el oligo con una secuencia complementaria. Estos resultados de hibridación da lugar a una hélice de doble cadena de ADN estable. Después de la hibridación, el chip se lava varias veces para eliminar cualquier ADNc que no se ha unido a un oligo en el chip.

4. Búsqueda y Análisis de Datos

El chip se escanea con un láser que excita los marcadores fluorescentes. La información de la fluorescencia en cada punto se recoge y se procesa mediante un programa especializado que crea una imagen en color de la micromatriz. La imagen se analiza utilizando un programa que interpreta la fluorescencia de cada punto.

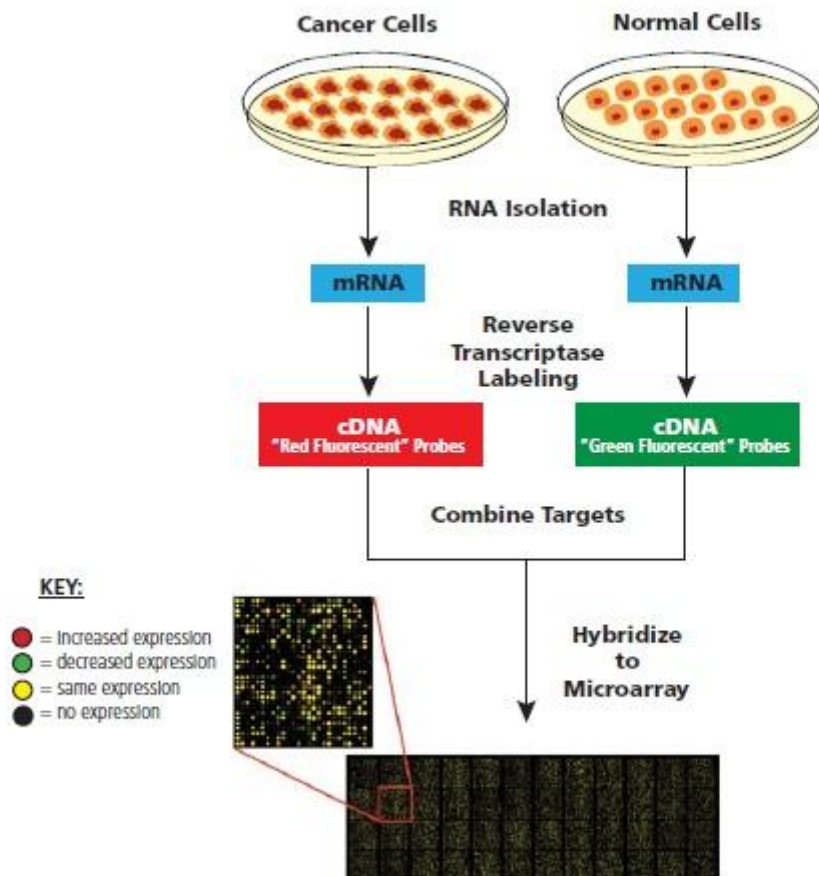


Figura 2: Principios del análisis de microarrays de dos colores

El color y la intensidad de fluorescencia en cada punto permiten a los investigadores identificar diferencias genéticas clave, como las que existen entre las células normales de la piel y las células de cáncer de piel. La biblioteca de cDNA control representa el nivel normal de expresión de genes en células de la piel. Si sólo se hibrida la biblioteca del control en nuestro microarrays, diferentes puntos aparecerían con diferentes intensidades de color verde. Manchas verdes brillantes indican los puntos que han capturado los niveles altos de ADNc (lo que sugiere un alto nivel de expresión), y manchas verdes débiles o negras sugieren que hay una baja (o no hay) expresión de ARNm. A la inversa, si el mismo chip se hibridó exclusivamente con la biblioteca de ADNc de cáncer de piel, se ven diferentes intensidades de color rojo. Cuando las dos bibliotecas se hibridan simultáneamente para el mismo chip, se espera que aparezcan cuatro colores en el análisis, los colores negro (sin expresión), verde, rojo o amarillo.

Aparecen manchas amarillas cuando el control y las muestras experimentales se hibridan en cantidades equivalentes. Cuando aparece un punto verde nos indica la presencia de más de ADNc a partir de la muestra de control (sanos) que de la muestra experimental (célula enferma). Por lo tanto, un punto verde revela que hay menos mRNA presente en la célula de cáncer de lo normal, y el gen se dice que tiene una "baja expresión". Por el contrario, una mancha roja significaría que el gen tiene una "elevada expresión" en la muestra del cáncer.

RETOS ACTUALES Y PROMESAS FUTURAS

En la era temprana de la genómica, los investigadores reconocieron la necesidad de sistemas de gestión de la información para organizar los datos generados por los microarrays. Además, los científicos necesitaban encontrar una forma de reconocer tendencias y correlaciones que de otra manera se perderían por la gran cantidad de datos que se obtenían. Como resultado, los científicos empezaron a emplear tecnologías informáticas para almacenar y procesar datos biológicos. Y como consecuencia de ello, apareció la bioinformática, un campo interdisciplinario que integra la informática, la biología y la tecnología de la información, que evolucionó para desarrollar extensas bases de datos con todos los datos biológicos que se obtenía. Algunos ejemplos de las bases de datos de microarrays son la Expresión Génica Omnibus (GEO) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), Array Express por el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), la Stanford Microarrays Database, y otros. Estas bases de datos permiten a los científicos de todo el mundo acceder y compartir grandes cantidades de datos durante sus estudios genómicos.

Los microarrays y sus análisis resultantes ya han contribuido significativamente a descubrimientos científicos. El análisis de la expresión se utiliza actualmente en el desarrollo de fármacos, estudios de respuesta a medicamentos, y el desarrollo terapéutico. El estudio los datos de la expresión génica también es muy prometedora para la medicina personalizada, en la que los tratamientos se adaptan específicamente al perfil genético de cada individuo para el tratamiento de una enfermedad en particular de manera más eficaz. Conforme los investigadores del genoma desarrollen formas más efectivas de analizar los datos generados en la expresión génica por los microarrays es probable que se acelere el ritmo de los descubrimientos.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

El objetivo de esta práctica es que los estudiantes comprendan los conceptos básicos de la técnica de Microarrays y como se aplica a la genómica funcional. Esta simulación se ha diseñado para proporcionar a los estudiantes la oportunidad de analizar las diferencias en la expresión génica utilizando un microarray de dos colores. En esta práctica, los estudiantes analizarán cuatro conjuntos de muestras simuladas de pacientes para determinar diferentes niveles de expresión génica. Al final de la práctica, los estudiantes habrán observado y analizado un experimento utilizando la técnica de Microarrays.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES PARA ESTUDIANTES

Para esta práctica, 16 muestras diferentes (cuatro por paciente) han sido pre-convertidos en ADNc en presencia de un marcador fluorescente incorporado durante la síntesis. Las bibliotecas de ADNc de pacientes se mezclan previamente con el ADNc marcados obtenidos a partir de células normales de control. Los estudiantes podrán observar las muestras de las tarjetas de microarrays en el orden establecido para cada paciente. Los puntos de muestreo de las tarjetas contienen fragmentos de ADNc sintetizados (por PCR) para cada uno de los ARNm de los pacientes. Las primeras cuatro muestras en cada microarray QuickStrips™ (A a D) son muestras de control, seguidas de cuatro muestras de pacientes (E a H). Las muestras de microarrays se marcan con una o varias líneas; por ejemplo, Paciente 1 (una línea), Paciente 2 (dos líneas), y así sucesivamente. Para obtener resultados correctos, es esencial la

precisión en el pipeteo y mantener las muestras de pacientes individuales en el orden correcto.

La técnica de microarrays detecta aumentos o descensos en la regulación de los genes basado en la expresión del ARNm de la célula. El ARNm de genes específicos del paciente se convierte en cDNA y están asociados a un marcador fluorescente de color rojo. Las dos muestras (ADNc de pacientes y de control) se mezclan y se hibridan a un chip de genes de microarray. Después de la hibridación, el chip de genes de microarrays es leen con un escáner de fluorescencia inducida por láser. La información obtenida desde el chip se almacena en un ordenador y se analiza usando un programa que específico que interpreta los datos del microarrays.

4.1 Precauciones

Aunque no se utiliza ningún material humano en esta práctica, se deben usar guantes y gafas de seguridad en todo momento como buenas prácticas de laboratorio.

1. Llevar gafas y guantes de laboratorio mientras se trabaja.
2. **NO PIPETEAR CON LA BOCA**, utilizar los dispositivos adecuados.
3. Extremar las precauciones cuando se trabajan con equipos que utilizan conjuntamente calor y mezcla de reactivos.
4. Lavarse las manos con jabón y agua después de haber trabajado en el laboratorio o utilizado reactivos o materiales biológicos.

4.2 Preparaciones y consideraciones previas

Las muestras de cDNA simuladas han sido alícuotas y empaquetadas en el microarrays QuickStrips™ (figura 3). La preparación inicial de la práctica sólo requiere la separación de los grupos de muestras en tiras.

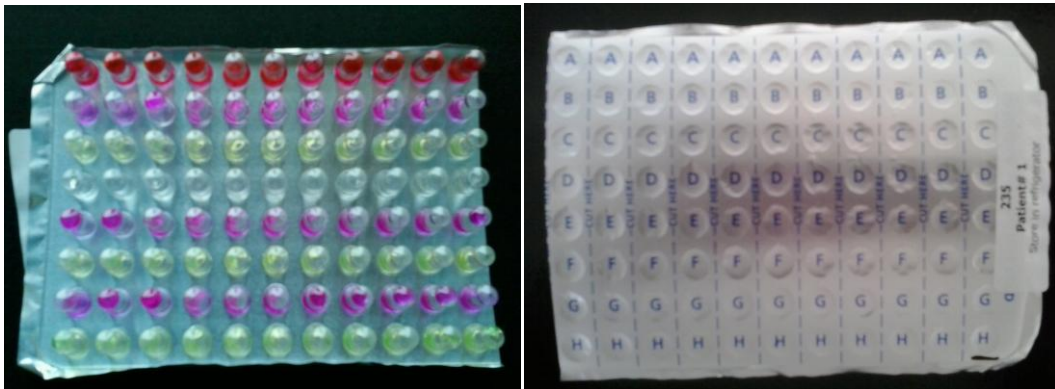


Figura 3: Placa de microarrays QuickStrip™

1. Use un rotulador para marcar (con un número o líneas) al final de cada Microarray QuickStrips™ como se muestra a continuación:

Paciente	Números o líneas
Paciente # 1	1 / I
Paciente # 2	2 / II
Paciente # 3	3 / III
Paciente # 4	4 / IIII

2. Separar cuidadosamente las microarrays QuickStrips™ individuales como se indica en el envase con unas tijeras.

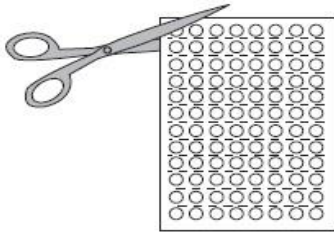


Figura 4: Cada placa de microarrays QuickStrip™ es para cada uno de los cuatro pacientes. Antes de cortar las placas, como se muestra, marcar en el extremo el número de líneas que le corresponda de acuerdo con el número que le toca (1, 2, 3 o 4).

NOTA: ¡Asegúrese de no perforar la lámina que cubre las muestras!

3. Cada estudiante recibirá un conjunto de cuatro microarrays QuickStrips™ marcadas con un número según al paciente que corresponda.



Figura 5: Microarrays QuickStrip™ de los cuatro pacientes.

4. Indicar a los estudiantes que golpeen suavemente sobre la mesa de laboratorio la microarrays QuickStrips™, para asegurar que todas las muestras están en el fondo del pocillo.

5. Se dará una tarjeta de microarrays para cada grupo. En la tarjeta, los puntos A-D representan muestras de control y los puntos E-H representan las muestras experimentales.

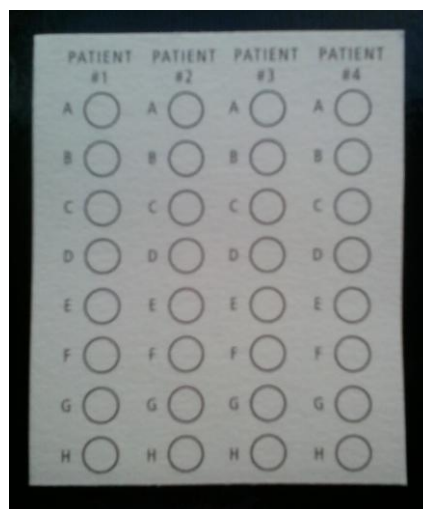


Figura 6: Tarjeta de microarrays.

4.3 Material que debe recibir cada grupo

- Cuatro tiras microarrays QuickStrips™ diferentes (marcadas con 1, 2, 3 y 4 líneas):
 - Una tira de muestra microarray con una línea: Paciente (#1).
 - Una tira de muestra microarray con dos líneas: Paciente (#2).
 - Una tira de muestra microarray con tres líneas: Paciente (#3).
 - Una tira de muestra microarray con cuatro líneas: Paciente (#4).
- Tarjeta de microarrays.
- Pipeta fija (de 5 µl) o variable.
- Puntas de pipeta.
- Fuente (linterna o transiluminador) de luz U.V. onda larga (luz negro), para ser compartida por todos los grupos de estudiantes.

5. PRÁCTICA

REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE MICROARRAYS

Use guantes y gafas de seguridad.

Para esta simulación de microarrays, no hay ningún paso de hibridación y lavado. Se utiliza una fuente de luz UV de onda larga para detectar la fluorescencia.

1. Obtener una tarjeta de microarrays.
2. Obtener cuatro microarray QuickStrips™ individuales con las muestras de ADN codificados para los pacientes 1, 2, 3 y 4, (como se muestra a continuación):

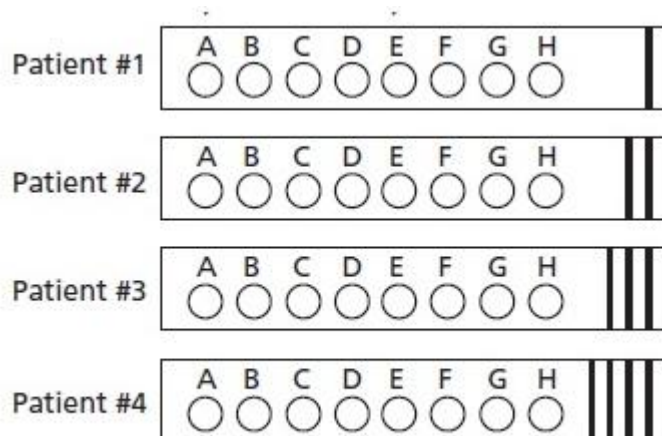


Figura 7: Ejemplo de microarrays QuickStrips™ de los estudiantes. Cada fila de muestras (tiras) constituye una muestra completa de cada paciente para ser utilizado por cada grupo de estudiantes.

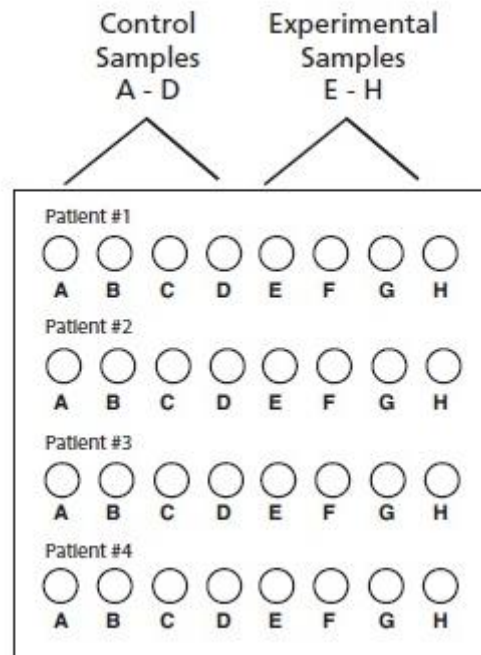
3. Perforar la lámina protectora que cubre los pocillos, pipetear 5 µl y aplicar cada muestra de ADNc en los lugares debidamente identificados para cada paciente en la tarjeta, como se muestra a continuación.

Figura 8
Muestras/puntos de Control A-D para los cuatro pacientes:

A = Normal.
 B = Sobre regulado.
 C = Poco regulado.
 D = En blanco.

Muestras/puntos experimentales E-H para los cuatro pacientes:

Puntos E-H en la tarjeta de microarrays representan los genes individuales.



NOTA: Para perforar la lamina protectora del microarrays QuickStrips™ puede utilizarse la misma punta de pipeta, siempre teniendo cuidado de no perder la muestra que hay en el interior del pocillo.

NOTA: Para trabajar bajo el criterio de unas buenas prácticas de laboratorio se debe utilizar una punta de pipeta para cada muestra/pocillo.

Si el consumo de puntas es demasiado elevado para el centro, puede reutilizarse una misma punta para cada paciente indicando a los alumnos que no es la forma correcta de trabajar en un laboratorio. En este caso, se deberá limpiar la punta con agua destilada entre cada muestra/pocillo y asegurándose que en la punta no queda agua que pueda diluir la muestra antes de aplicarla en la tarjeta.

4. Colocar la tarjeta en una incubadora a 37°C durante cinco minutos para permitir que las muestras se sequen.

5. Visualizar los resultados de la tarjeta utilizando una linterna o transiluminador UV de onda larga.

6. (Opcional) Registrar los resultados fotografiando la tarjeta de microarrays utilizando una cámara digital o Polaroid.

- Es recomendable ajustar la apertura de la cámara a f 5,6 durante 2 segundos.
- Si la fotografía es demasiado clara, cambiar la apertura a f 8 y exponer durante 2 segundos.
- Si es demasiado oscura, mantener la apertura en f 5.6 y reducir la velocidad de obturación a 1 segundo.

Los ajustes del equipo fotográfico pueden variar dependiendo del sistema de documentación fotográfica que se está utilizando.

6. RESULTADOS DEL EXPERIMENTO

RESULTADOS EXPERIMENTALES Y ANÁLISIS

Usando los símbolos apropiados en cada caso, anotar los resultados en la tarjeta de muestras de microarrays (ver clave abajo).

Ⓝ	Expresión normal (naranja).
⊖	Sin expresión (negro).
⤴	Expresión elevada (rojo).
⤵	Expresión baja (verde).

Figura 9: Clave de los resultados.

Los resultados obtenidos son los siguientes (figuras 10):

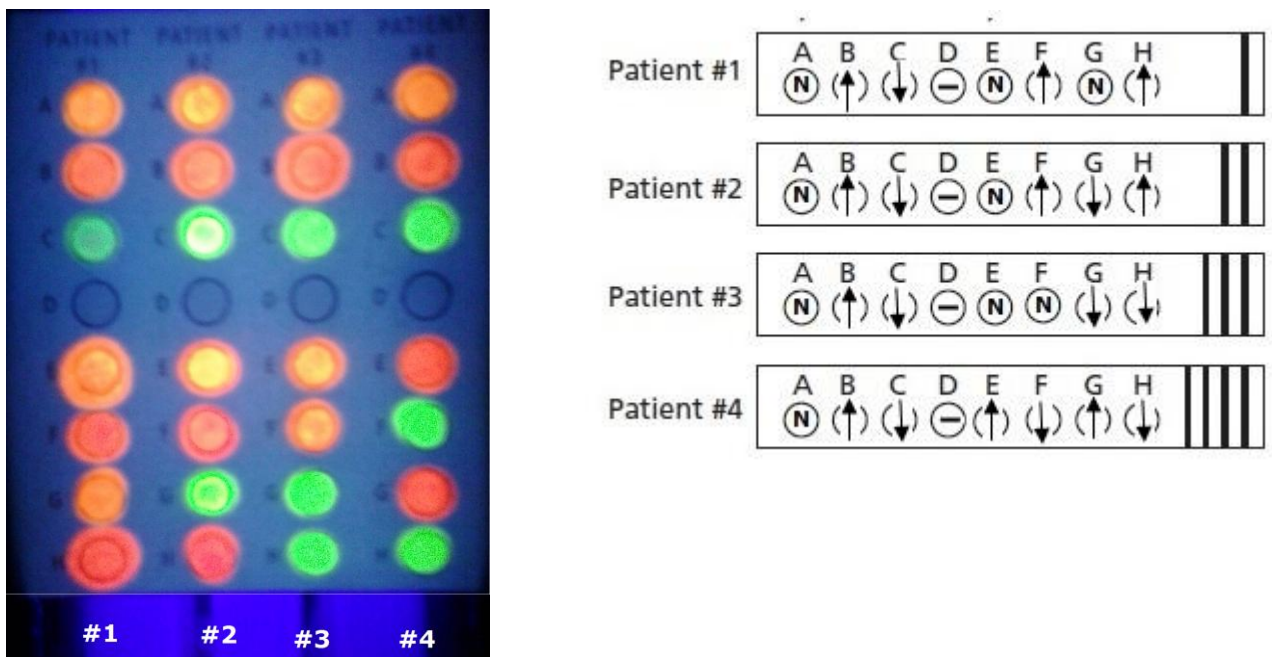


Figura 10: Resultados obtenidos.

7. PREGUNTAS SOBRE EL EXPERIMENTO

Responder a las siguientes preguntas de la práctica:

1. ¿Qué nueva información se encuentra a nuestra disposición como consecuencia del proyecto del genoma humano?
2. Explicar la tecnología básica detrás de microarrays y por qué es importante para la biotecnología y la medicina.
3. ¿Cómo se hacen las bibliotecas de ADNc?
4. ¿Qué información ha hecho posible los microarrays de ADN?
5. ¿Cómo identificamos y analizamos los puntos individuales en un chip de genes de microarrays?