

## ADN/ARN MICROARRAYS

10 grupos de estudiantes

### NOTA IMPORTANTE:

**UTILIZAR ESTE KIT ANTES DE LOS 6 MESES POSTERIORES A SU RECEPCIÓN.**

### 1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de esta práctica es facilitar a los estudiantes la comprensión de los conceptos básicos de la técnica de Microarrays y su aplicación a la genómica funcional. La práctica consiste en una simulación diseñada para proporcionar a los estudiantes la oportunidad de analizar las diferencias en la expresión génica utilizando la metodología experimental del microarray de dos colores. En esta práctica, los estudiantes analizarán cuatro conjuntos de muestras simuladas de pacientes con cáncer 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
Muestras de pacientes en los microarrays QuickStrips™	Nevera
A Equilibration buffer	Nevera
B Control cDNA solution	Nevera
C Hybridation buffer	Nevera
Microtubos	
Tarjeta de microarrays	

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

**NOTA: ALMACENAR LOS COMPONENTES DEL KIT ADN/ARN MICROARRAYS EN EL REFRIGERADOR EN EL MOMENTO DE RECIBIRLO.**

## 2.1 Material requerido y no suministrado

Pipeta de volumen fijo (5  $\mu$ l) o micropipeta de volumen variable (5-50  $\mu$ l).

Puntas de pipeta.

U.V. onda larga fuente de luz (linterna o transiluminador). RECOMENDADO.

Estufa de incubación. RECOMENDADO.

Gafas de seguridad.

### 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 los 23 pares de cromosomas que se hallan 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 muy inferior a las estimaciones realizadas anteriores al Proyecto del Genoma Humano.

Los datos del Proyecto del Genoma Humano han 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 a la aparición de 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 regulación de la expresión génica precisa 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 nos permite analizar, únicamente, la expresión de unos pocos genes a la vez, por lo cual la investigación genómica requiere de mucho tiempo. La ventaja de la aparición de la tecnología de microarrays de ADN reside en que ha hecho posible la obtención, y posterior análisis de datos, 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, determinando si los genes se expresan o bien si su expresión está reprimida. Su pequeño tamaño y su capacidad para analizar la expresión de un gran número de genes simultáneamente ha hecho de los microarrays una herramienta importante para la investigación genómica en diversos campos tales como el descubrimiento de fármacos, la toxicología y el diagnóstico médico.

Cada chip se compone de unas pequeñas cadenas de una sola hebra de ADN, llamadas 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 cDNA:

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

## 3. La hibridación:

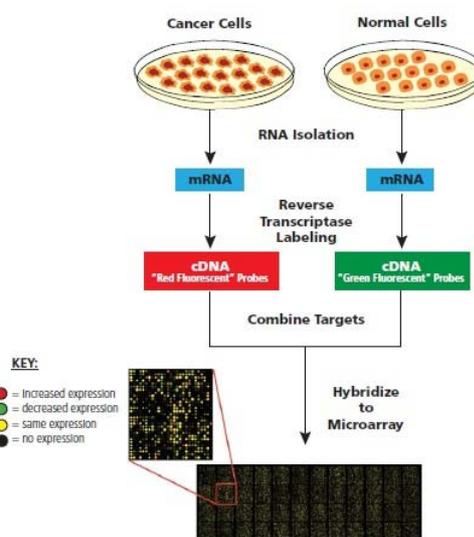
El cDNA marcado a partir de las muestras control y de las muestras experimentales se coloca en el chip microarray, donde se une (o se hibrida) con el punto que contiene el oligonucleótido formado por una secuencia complementaria. Estos resultados de hibridación dan lugar a una hélice estable de ADN de doble cadena. Después de la hibridación, el chip se lava varias veces para eliminar cualquier cDNA que no se haya unido a un oligonucleótido del chip.

## 4. Búsqueda y Análisis de Datos:

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

El color y la intensidad de fluorescencia obtenida en cada punto, permiten a los investigadores identificar diferencias genéticas clave, como las que existen entre las células normales y las células cancerosas de la piel. La biblioteca de cDNA control representa el nivel normal de expresión de los genes en las células de la piel. Si sólo se hibrida la biblioteca del DNA control en nuestro microarray, aparecerían diferentes puntos con diferentes intensidades de color verde. Las zonas verdes brillantes indican los oligonucleótidos que han capturado unos niveles elevados de cDNA (lo que sugiere un alto nivel de expresión), y las zonas que muestran una fluorescencia débil de color verde o de color negro, sugieren que hay una baja expresión de ARNm o bien que ese ARNm no se ha expresado. A la inversa, si en el mismo microarrays del chip se hibridó exclusivamente con la biblioteca de cDNA de cáncer de piel, se ven diferentes intensidades de color rojo. Cuando las dos bibliotecas se hibridan simultáneamente en el mismo microarrays del chip, se espera que aparezcan cuatro colores en el análisis, los colores negro (sin expresión), verde, rojo o amarillo, indicativos del nivel de expresión del gen.

El color amarillo presente en el microarray, aparece cuando el cDNA control y el cDNA correspondiente a las muestras experimentales se hibridan a los oligonucleótidos del array en cantidades equivalentes. Cuando aparece un punto verde nos indica la presencia de más de cDNA a partir de la muestra de control (sanos) que de la muestra experimental



**Figura 2:** Principios del análisis del microarrays de dos colores

(célula cancerígena). Por lo tanto, el punto de fluorescencia 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, el punto de fluorescencia 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. 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 obtenían. Algunos ejemplos de las bases de datos de microarrays son la Expresión Génica Omnibus (GEO) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), Array Express desarrollado 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 génica se utiliza actualmente en el desarrollo de fármacos, en estudios de respuesta a medicamentos, y en el desarrollo terapéutico. El estudio los datos de la expresión génica también es muy prometedor en el campo de la medicina personalizada: los tratamientos se adaptan específicamente al perfil genético de cada individuo, aumentando su eficacia. A medida de que 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 está orientado a que los estudiantes comprendan los conceptos básicos de la técnica del microarrays, así como su aplicación a la genómica funcional. La simulación del microarrays se ha diseñado para proporcionar a los estudiantes la oportunidad de analizar las diferencias en la expresión génica basándose en un microarray cuyos cDNA utilizados se han marcado con dos colores diferentes. En esta práctica, los estudiantes analizarán cuatro conjuntos de muestras simuladas de pacientes en los que se observan diferentes niveles de expresión génica. Al final de la práctica, los estudiantes habrán observado y analizado los niveles de expresión génica presentes en diferentes muestras experimentales, utilizando la técnica de microarrays.

En este experimento, se explorarán los microarrays de ADN. Se recogieron biopsias de cáncer de cuatro pacientes y se convirtieron en cDNA en presencia de una etiqueta fluorescente roja. Los estudiantes mezclarán el cDNA del paciente con el cDNA marcado en verde obtenido de las células normales, representando a las células control. Las muestras mezcladas se colocan en tarjetas de microarrays preparadas y se usa un tampón de hibridación para unir los cDNA de las muestras a los oligonucleótidos de los microarrays. Cada fila de la tarjeta de microarray contiene oligonucleótidos que corresponden a cuatro muestras de control (1-4), seguidas de cuatro genes de interés (5-8). Una vez secas las tarjetas, los microarrays se analizan bajo la luz UV para determinar la expresión de cada gen.

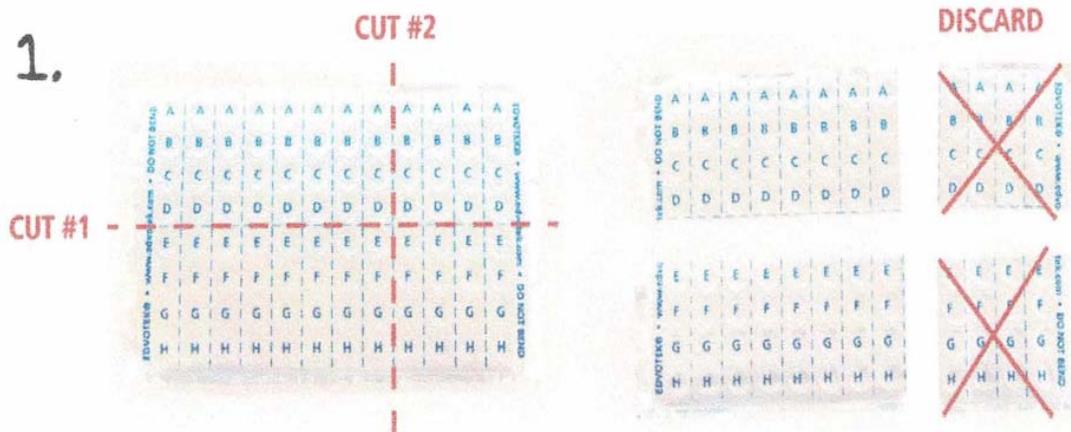
### 4.1 Precauciones

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

1. Llevar gafas y guantes de laboratorio durante la práctica.
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.

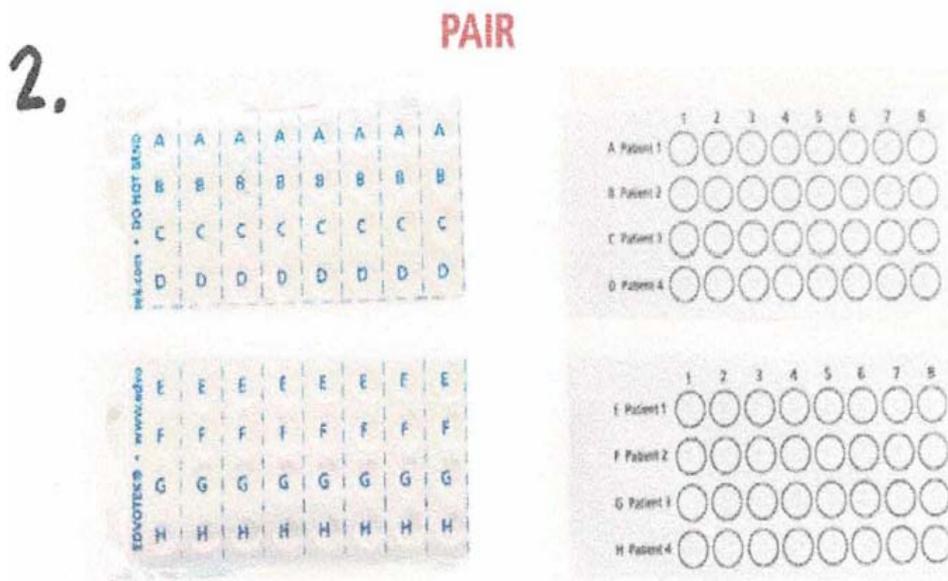
## 4.2 Preparaciones y consideraciones previas

### Preparación de las placas de microarrays QuickStrip™ y las tarjetas de papel de los microarrays



1. Utilizar unas tijeras para CORTAR las placas QuickStrip™ de microarrays de manera horizontal, entre las filas D y E. A continuación, CORTAR verticalmente entre las columnas 8 y 9 (tal y como muestra la figura 1).

**NOTA:** Las columnas 9-12 se descartan ya que **NO SE UTILIZAN** en estos experimentos, se han dejado vacías de forma intencionada.



2. EMPAREJAR cada placa QuickStrip™ de microarrays de 4 hileras con una tarjeta de microarrays de papel. Las placas que contienen las filas A-D deben emparejarse con una tarjeta para las filas A-D, mientras que las placas que contienen las filas E-H se emparejarán con una tarjeta para las filas E-H.

3. Cada grupo recibirá una de las placas QuickStrip™ de microarrays y una tarjeta de microarrays correspondiente. Las muestras son idénticas; las muestras para el paciente 1 están contenidas en las filas A y E, el paciente 2 en las filas B y F, etc.

4. Recordar a los estudiantes que deben golpear suavemente las placas QuickStrip™ de microarrays para asegurarse de que todas las muestras queden en el fondo de los pocillos.

#### **Preparación de tampones y muestras de cDNA de las muestras control:**

1. Dispensar 200 µl de ~~tampón~~ tampón de equilibrio (componente A) en 10 tubos de microcentrifuga. **Etiquetar los tubos como "EB"**.

2. Dispensar 200 µl de la solución de cDNA de las muestras control (componente B) en 10 tubos de microcentrifuga. **Etiquetar los tubos como "cDNA"**.

3. Dispensar 200 µl de ~~tampón~~ tampón de hibridación (Componente C) en 10 tubos de microcentrifuga. **Etiquetar los tubos como "HB"**.

#### **Material para los estudiantes**

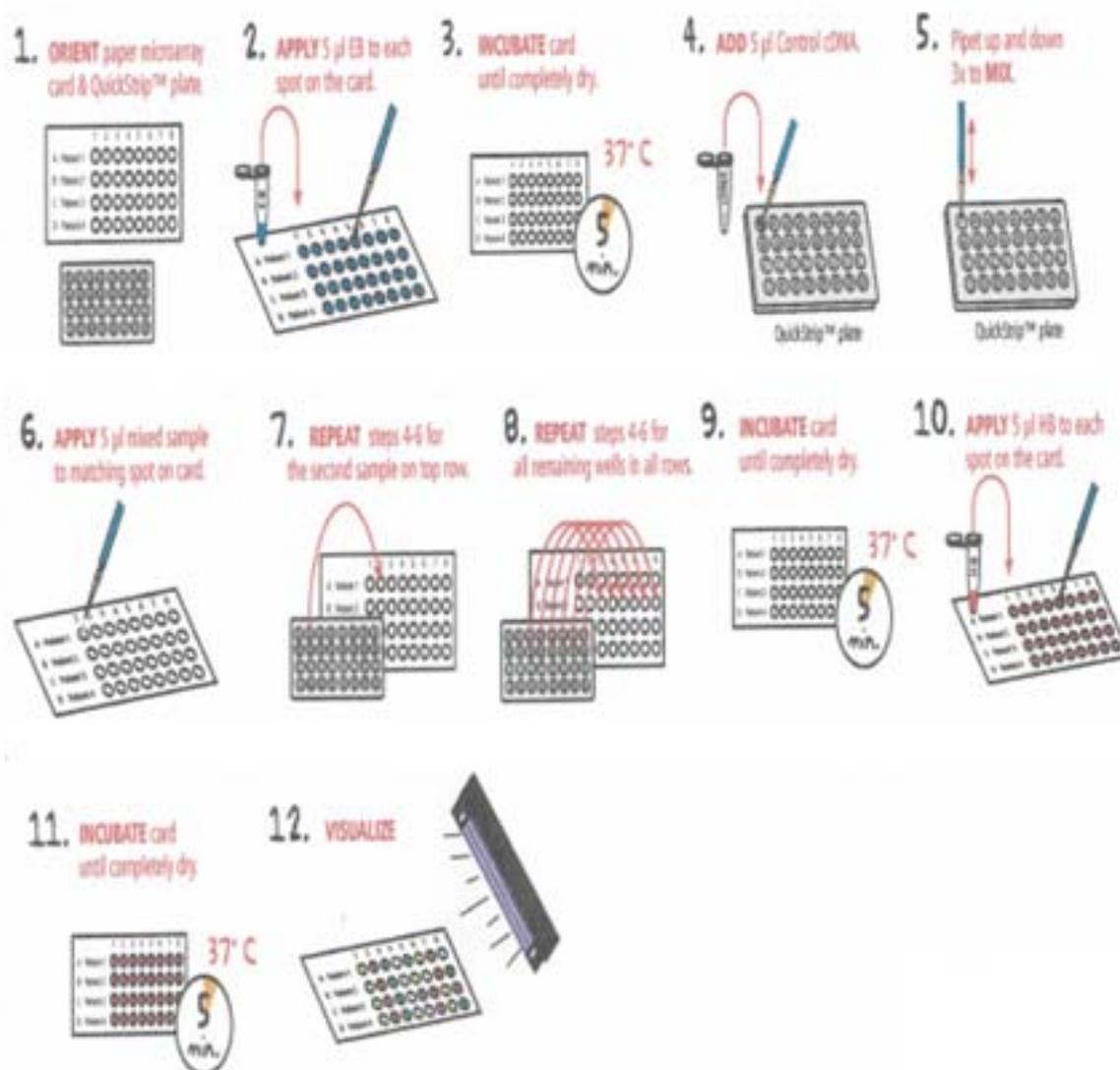
Para realizar el experimento de microarrays, cada grupo requerirá de una micropipeta de volumen ajustable o una pipeta de volumen fijo de 5 µl y puntas desechables. Para realizar el análisis de las tarjetas de microarrays, se requiere de una fuente de luz UV de onda larga (linterna) o de un transiluminador, que se puede compartir entre los grupos. El experimento puede pausarse después de cualquiera de los pasos de incubación y reanudarse en un momento posterior. Guarde las tarjetas de microarrays completamente secas a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

Si utiliza una estufa de incubación, ajuste la temperatura a 37 ° C.  
Alternativamente, las tarjetas de microarrays pueden secarse a temperatura ambiente.  
Las tarjetas de microarrays se deben secar completamente entre cada paso.

#### 4.3 Material que debe recibir cada grupo

- Placa QuickStrip™ que contiene muestras de pacientes (Filas A-D o Filas E-H).
- Tarjeta de microarrays de papel correspondiente.
- Tubo de microcentrifuga que contiene 200 µl de tampón de equilibrio.
- Tubo de microcentrifuga que contiene 200 µl de tampón de hibridación.
- Tubo de microcentrifuga que contiene 200 µl de cDNA de la muestra control.

## 5. PRÁCTICA



1. ORIENTAR la tarjeta microarrays de papel con la placa QuickStrip™ para que el paciente 1 (fila "A" o "E") se encuentre en la esquina superior izquierda de cada uno. ETIQUETE la tarjeta de microarrays con sus iniciales o número de grupo.

2. AÑADIR 5 µl de Equilibration Buffer (EB) a cada punto de la tarjeta de microarrays, con ayuda de la micropipeta.

3. INCUBAR la tarjeta de microarrays a 37 °C durante 5 minutos, o a temperatura ambiente durante 10 minutos. Dejar que las muestras se sequen por completo.

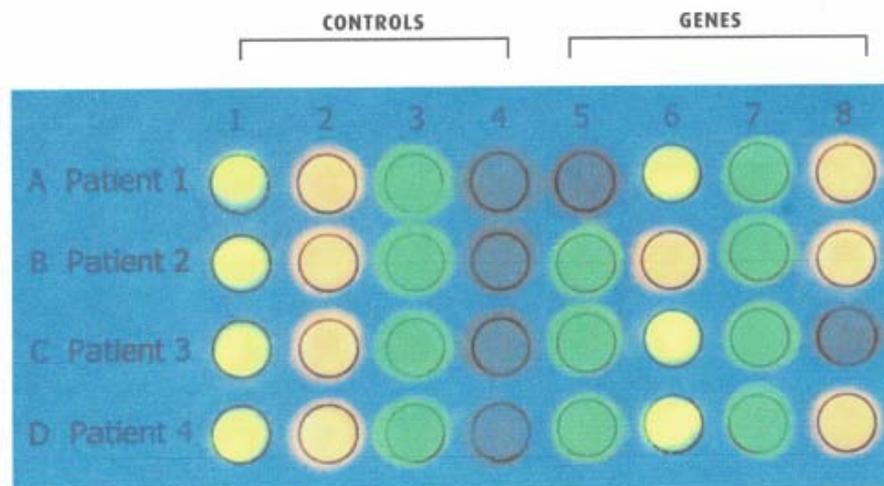
4. AÑADIR 5 µl de cDNA de la muestra control (cDNA) al pocillo superior izquierdo de la placa QuickStrip™ perforando el papel de aluminio. Utilizar una punta nueva de micropipeta.

5. Con la misma punta de micropipeta, pipetear hacia arriba y hacia abajo 3 veces para MEZCLAR y HOMOGENEIZAR la muestra antes de aplicarla.
6. Todavía usando la misma punta de micropipeta, AÑADIR 5  $\mu$ l de la muestra mezclada en el punto superior izquierdo de la tarjeta de microarrays.
7. Usando una punta nueva de micropipeta, REPITA los pasos 4-6 para la segunda muestra en la fila superior.
8. Continúe repitiendo los pasos 4-6 para cada pocillo adicional en la fila superior, luego proceder de la misma forma con las 3 filas restantes. Una vez que las 32 muestras se hayan mezclado con el cDNA de la muestra control y se hayan agregado a la tarjeta de microarrays de papel, seguir con el paso 9.
9. INCUBAR la tarjeta de microarrays en una estufa a 37 °C durante 5 minutos, o a temperatura ambiente durante 10 minutos. Dejar que las muestras se sequen por completo.
10. AÑADIR 5  $\mu$ l de tampón de hibridación (HB) en cada punto de la tarjeta de microarrays.
11. INCUBAR la tarjeta de microarrays en una estufa a 37 ° C durante 5 minutos, o a temperatura ambiente durante 10 minutos. Dejar que las muestras se sequen por completo.
12. VISUALIZAR el microarray utilizando una luz UV portátil de onda larga o un transiluminador de rango medio. Las tarjetas de microarrays pueden conservarse y analizarse durante una semana después, siempre que esté protegida de la luz.

## 6. RESULTADOS DEL EXPERIMENTO

Los resultados del microarrays indican cambios en la expresión génica entre las cuatro muestras de pacientes y el ADNc control. Las primeras cuatro columnas representan las muestras de control y deben verificarse primero para asegurarse de que el experimento funcionó como se esperaba. Una vez que se han verificado los controles, se pueden analizar los cuatro genes de interés en cada uno de los pacientes para determinar la regulación ascendente o descendente de los genes.

Los resultados de un experimento ejemplo se pueden ver a continuación:



	1	2	3	4	5	6	7	8
	Normal	Up	Down	Blank	Gene 1	Gene 2	Gene 3	Gene 4
Patient 1	N	↑	↓	-	-	N	↓	↑
Patient 2	N	↑	↓	-	↓	↑	↓	↑
Patient 3	N	↑	↓	-	↓	N	↓	-
Patient 4	N	↑	↓	-	↓	N	↓	↑

Las muestras de genes (columnas 5 a 8) que presentan fluorescencia de color amarillo indican una expresión génica (de los genes de estudio 1 a 4) similar a la del cDNA de la muestra control, mientras que la fluorescencia naranja-roja indica que el gen ha aumentado su expresión respecto del cDNA de la muestra control y la fluorescencia verde indica que la expresión del gen está disminuida en la muestra de los pacientes, respecto del cDNA de la muestra control (que indican normalidad). La ausencia de fluorescencia indica que no hay expresión génica. Por ejemplo, el paciente 1 tiene una expresión aumentada del gen 4, una expresión disminuida del gen 3, una expresión similar del gen 2 y ninguna expresión del gen 1.

## 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 de la técnica de los microarrays y por qué es importante para la biotecnología y la medicina.
3. ¿Cómo se hacen las bibliotecas de cDNA?
4. ¿Qué información ha sido posible obtener en los microarrays de ADN?
5. ¿Cómo identificamos y analizamos los puntos individuales en un chip de genes de microarrays?