



Universidad
de La Laguna

OPEN WARE COURSE



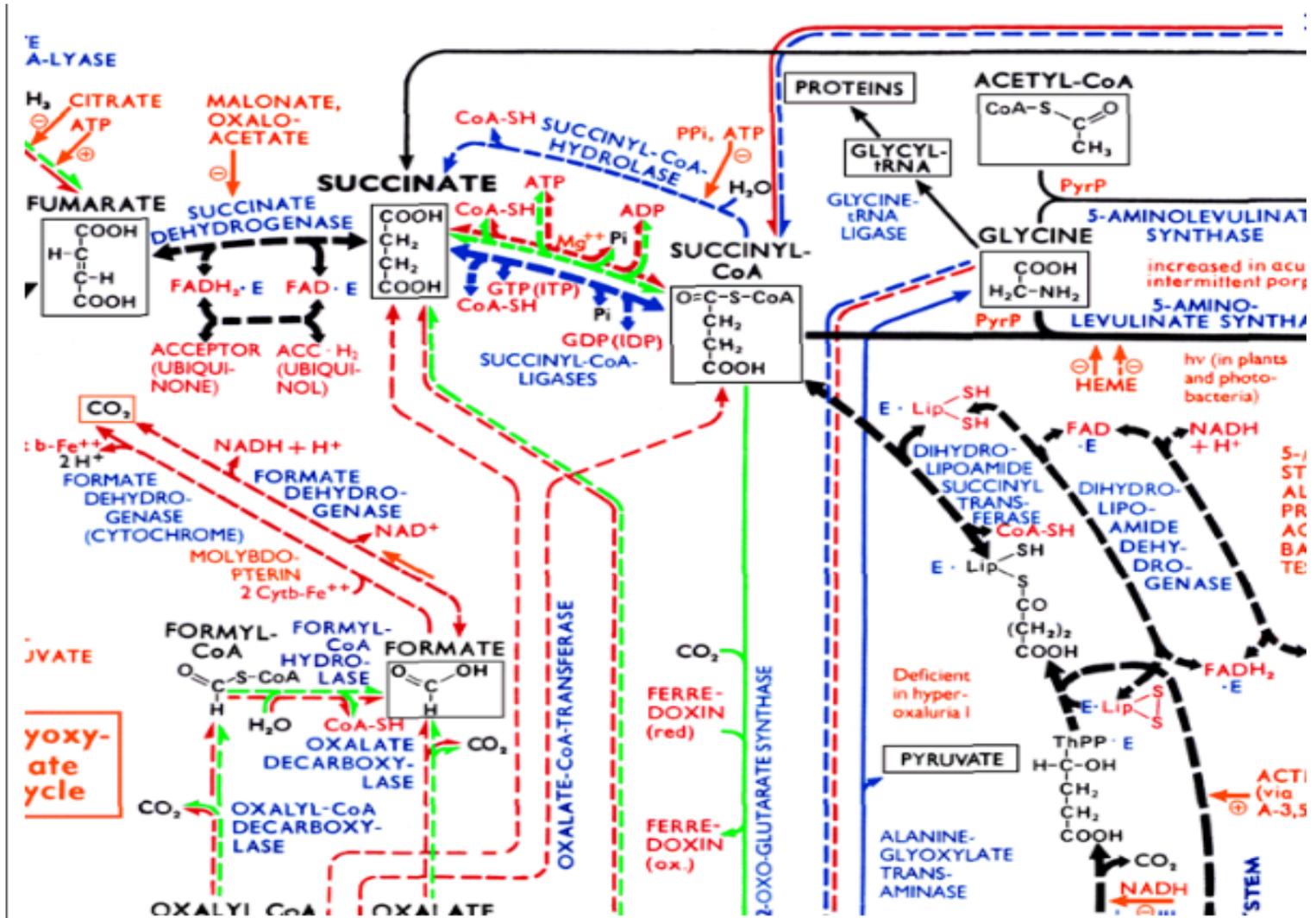
INSTITUTO UNIVERSITARIO
DE ENFERMEDADES TROPICALES
Y SALUD PÚBLICA DE CANARIAS
Universidad de La Laguna

Herramientas avanzadas de última generación

GENÓMICA APLICADA: mejora de la eficiencia del estudio de genes mediante el análisis masivo

María Antonieta Quispe Ricalde
Instituto Universitario de Enfermedades
Tropicales y Salud Pública de Canarias

Rutas metabólicas complejas: uso de equipos más potentes



QuantStudio™ 12K Flex



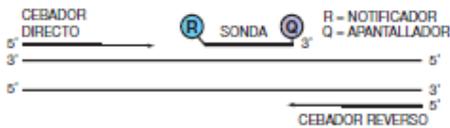
Equipo diseñado para el análisis masivo de genes.

PCR a tiempo real con sondas TaqMan

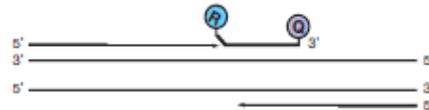
Dos principios:

- FRET Technology
- Actividad nucleasa 5' de la Taq polimerasa

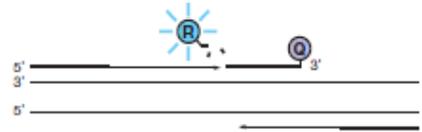
POLIMERIZACIÓN



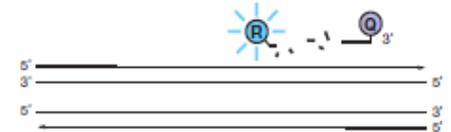
DESPLAZAMIENTO DE CADENA



PARTICIÓN



POLIMERIZACIÓN COMPLETADA



Paso 1: un notificador (R) y un apantallador (Q) se unen a los extremos 5' y 3' de una sonda TaqMan®.

Paso 2: cuando ambos marcajes están unidos a la sonda, se inhibe la emisión del fluorocromo notificador.

Paso 3: durante cada ciclo de extensión, la polimerasa Taq DNA separa el fluorocromo notificador de la sonda.

Paso 4: una vez separado del apantallador, el fluorocromo notificador emite su fluorescencia característica.

- Especificidad de los primers.
- Especificidad de la sonda

- Polimerización completa.
- Una nueva señal para una nueva copia de ADN

PCR a tiempo real con sondas TaqMan-MGB

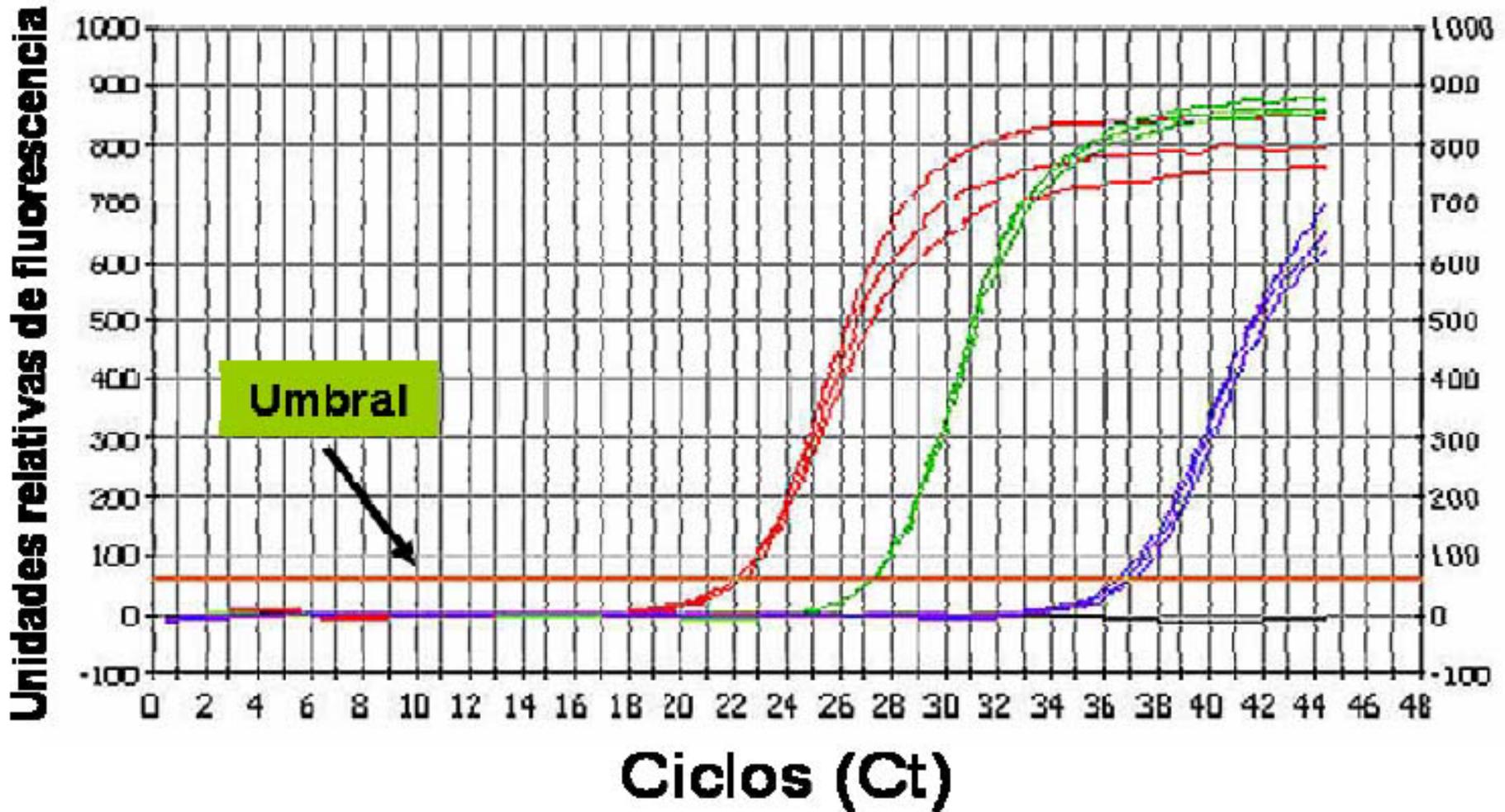
MGB (Minor groove binder)

- Estabiliza las 5-6 pb últimas en el extremo 3'.
- Permite la construcción de sondas más cortas y específicas y con una Tm apropiada.

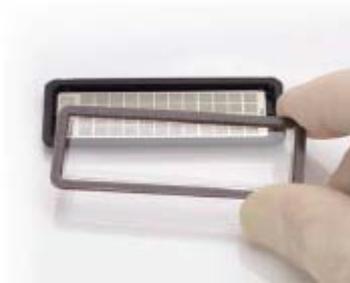
TaqMan® MGB Probes



PCR a tiempo real con sondas TaqMan: Resultados



Reacciones de PCR a tiempo real con sondas TaqMan en paneles del equipo QuantStudio 12KFlex:



Capacidad:

1 panel se llevan a cabo 3072 reacciones.

4 paneles: $3.072 \times 4 = 12288$ reacciones simultáneamente (más de 12.000 reacciones de PCR en una carrera).

¿En cuanto tiempo? : 2 horas.



SENCILLO Y AUTOMATIZADO

TECNOLOGÍA: Biología, Nanotecnología y Bioinformática

Plataforma para nanofluidos cubierto con componentes hidrofóbicos e hidrofílicos:
La reacción se realiza en **33 η L**.

Distribución:

1 Panel : 48 subarrays .
Cada subarray: 64 pocillos.

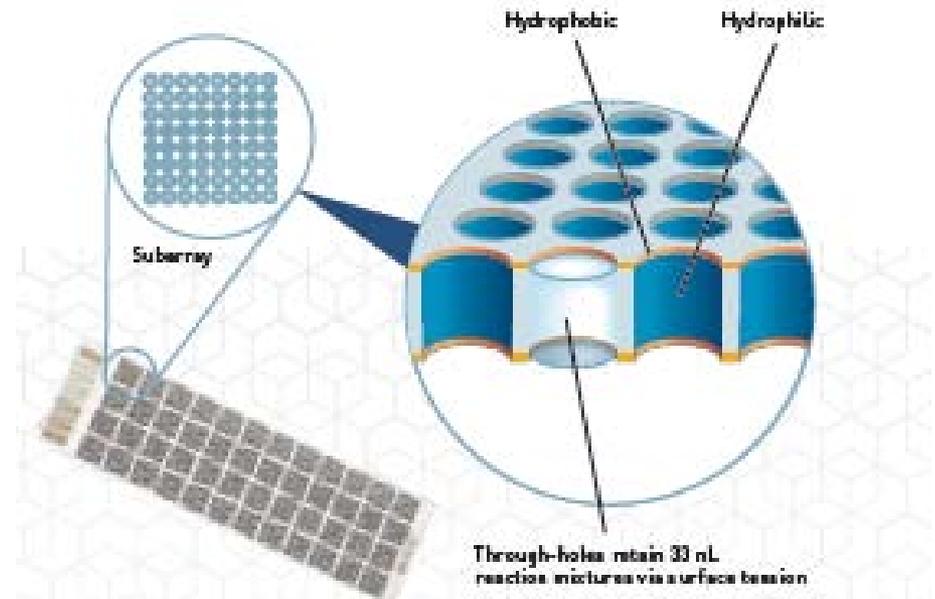
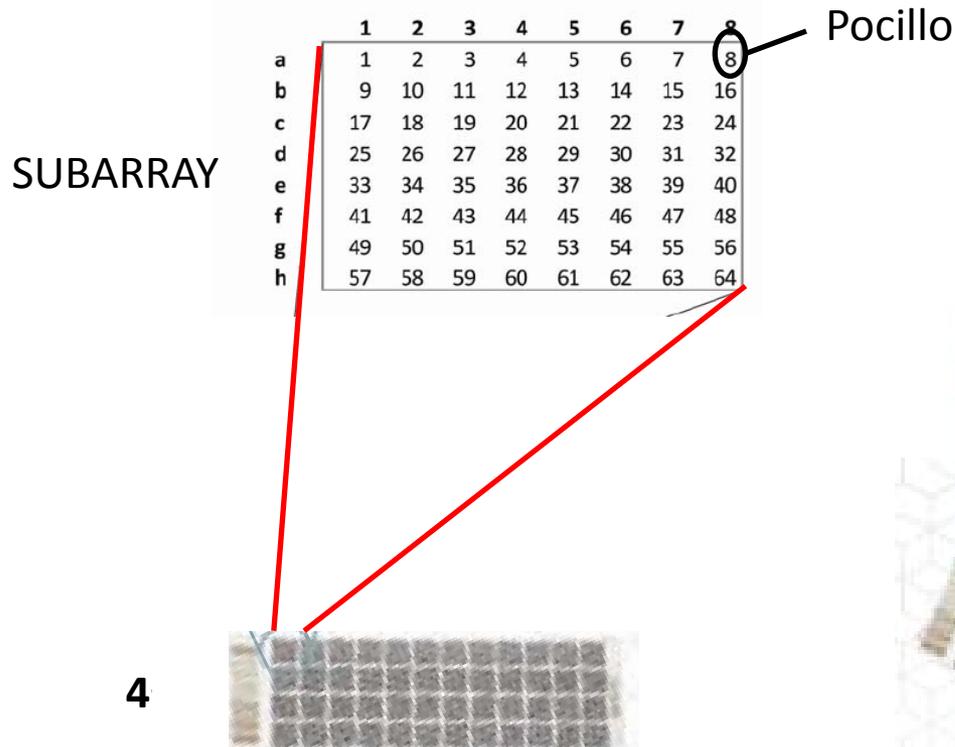


Figure 3. OpenArray® plate technology.

BIOINFORMÁTICA

- *QuantStudio 12K Flex software*: control del equipo.
- *Sample Tracker*: diseño de la distribución de muestras.
- *Accufill*: Equipo que dispensa las muestras en los 3072 pocillos de forma automática.

Análisis de datos:

- *Expression Suite Software v1.0*. **SOFTWARE LIBRE** para windows XP y 7.
- *TaqMan genotyper Software*: para genotipado. **SOFTWARE LIBRE** para windows XP y 7.
- *Digital suite Software v1.0* : Analiza los resultados de la PCR digital para la cuantificación absoluta con alta sensibilidad y precisión de detección.

Aplicaciones

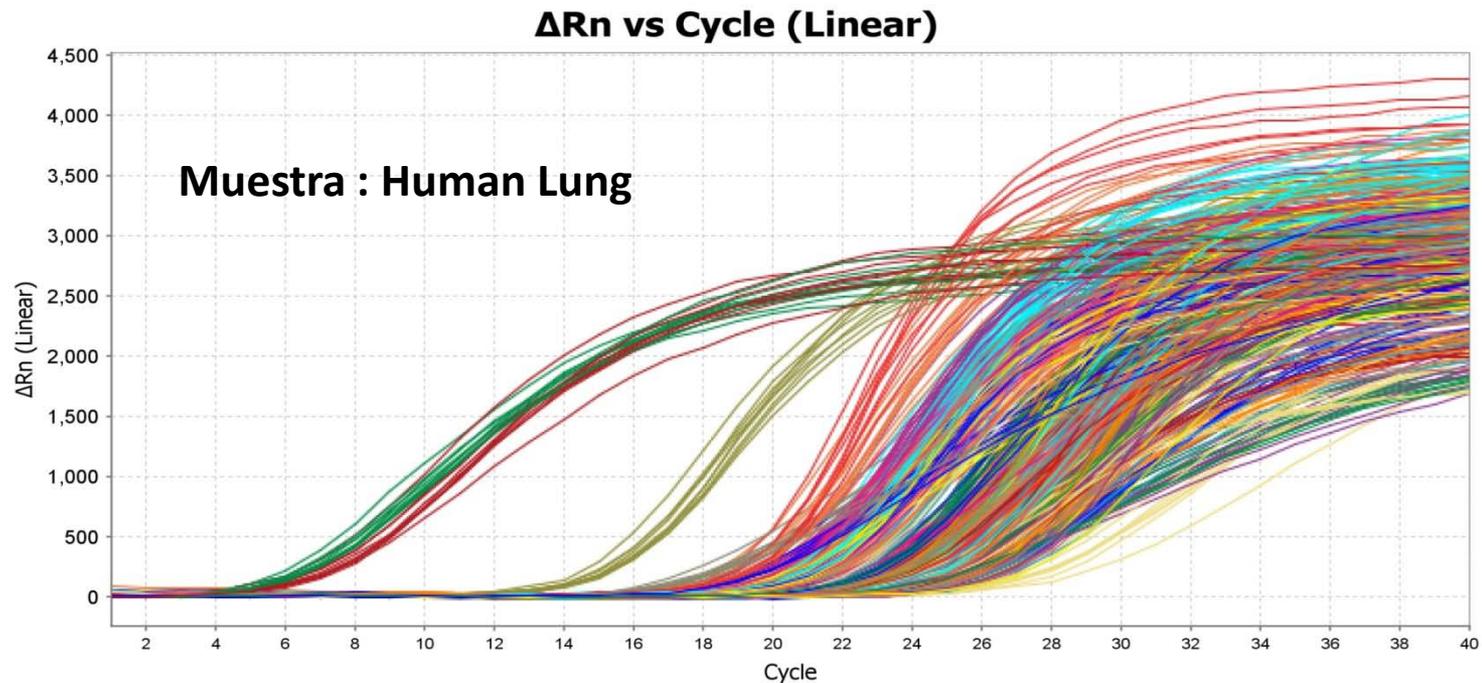
Paneles de expresión de genes de vías metabólicas.-

para investigadores que realizan estudios en enfermedades, están diseñadas para más comunes:

1. Cáncer
2. Inflamación en humanos
3. Inflamación en modelos animales: ratón.
4. Señales de transducción en humanos.
5. Investigación en células madre.
6. Aplicaciones farmacogenómicas.

Análisis de la expresión de genes endógenos

Gen endógeno: son genes que se mantienen de forma constante, no varían aún con los cambios externos que la célula pueda tener.



Legend

18S_Hs03003631_...	18S_Hs99999901_s1	ABL1;BCR_Hs0024...	ACTB_Hs9999990...	ALAS1_Hs001674...
ARF1_Hs00734523...	ATP5B_Hs009695...	B2M_Hs99999907...	CALM2_Hs008302...	CASC3_Hs002012...
CDKN1A_Hs00355...	CDKN1B_Hs00153...	CUL1_Hs01117001...	DIMT1L_Hs002055...	View All...

Análisis de la expresión de genes endógenos

Muestra Problema: HB-E1 (Análisis de 128 reacciones).

