

Ficha Técnica del “*LightCycler*”

**Selección de las Secuencias de las Sondas de
Hibridización para ser utilizadas en el “*LightCycler*”**

Por Olfert Landt y Andreas Nitsche, TIB MOLBIOL, Berlín
Traducción: Adriana A. Giri

1. Introducción

Objetivo de esta Ficha

La detección de determinados productos amplificados con sondas de hibridización permite el análisis en tiempo real de las secuencias amplificadas a partir de secuencias blanco o *target*. Por ejemplo, durante una reacción de amplificación, este método puede detectar secuencias específicas presentes en única copia en el DNA genómico o identificar mutaciones de una única base.

Esta Ficha Técnica provee una guía específica para seleccionar las secuencias que funcionarán como adecuadas sondas de hibridización (ver Sección 3). Además, creemos que la selección puede efectuarse con éxito si la función de la sonda es comprendida completamente (ver Sección 2).

Nota: La selección de secuencias que servirán como sondas de hibridización apropiadas para ser aplicadas al *LightCycler* no es tan difícil como la extensión de esta Ficha Técnica podría sugerir. En efecto, la mayoría de las secuencias seleccionadas funcionarán satisfactoriamente como sondas de hibridización, aún cuando las reglas específicas de selección no hayan sido seguidas.

Instrumentos para el Diseño de la Sonda

Como ayuda adicional en la selección de secuencias que se utilizarán como sondas de hibridización, mencionamos algunos de los *software* disponibles para facilitar el diseño de sondas (ver Sección 4).

En esta Ficha

Use esta Ficha Técnica para aprender más sobre los siguientes temas:

Tema	Ver Página
Función de las Sondas de Hibridización en el Análisis de Secuencias Específicas	3
Guía para el Diseño de Sondas de Hibridización	5
Elección de Secuencias Blanco Adecuadas para la Sonda	6
Características de las Sondas de Hibridización Adecuadas	7
Consideraciones Especiales para la Detección de Mutaciones	10
<i>Software</i> para el Diseño de Sondas de Hibridización	12

2. Función de las Sondas de Hibridización en el Análisis Específico de Secuencias

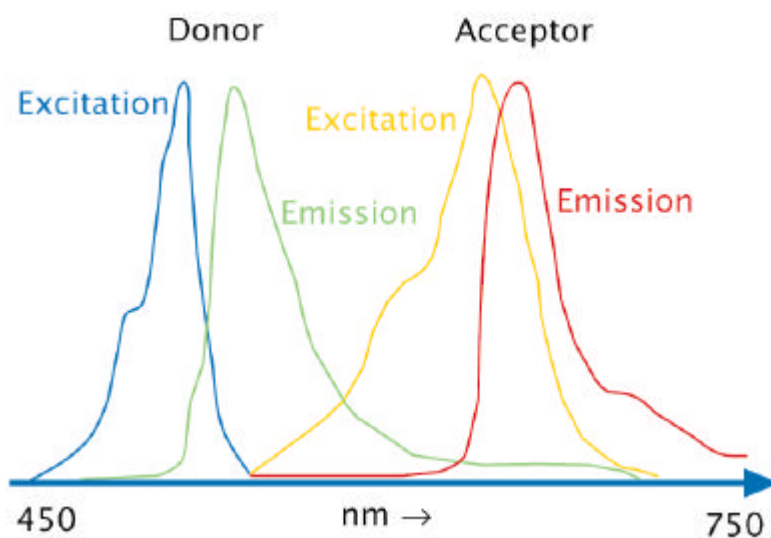
Generalidades El método “*LightCycler*” de hibridización con sondas utiliza dos sondas oligonucleotídicas que se hibridizan a secuencias adyacentes al DNA blanco, en una disposición “cabeza a cola”. Cada sonda está marcada con un colorante fluorescente o fluorocromo distinto. La interacción de los dos fluorocromos puede ocurrir solamente cuando ambos están unidos a la molécula blanco.

Cuando las dos sondas están hibridizadas a sus moléculas blanco, los fluorocromos se encuentran cercanos entre sí y pueden transferir energía de resonancia fluorescente (TERF) entre ellos.

Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente (TERF)

La transferencia de energía de resonancia fluorescente (TERF) es una transferencia de energía distancia-dependiente entre dos fluorocromos adyacentes sin la emisión de un fotón. Las condiciones principales para la TERF son:

- Las moléculas donadoras y receptoras deben estar en estrecha proximidad entre sí.
- El espectro de excitación del receptor debe solapar el espectro de emisión del donador (ver figura).
- Las orientaciones de los dipolos de transición del receptor y del donador deben ser aproximadamente paralelas.



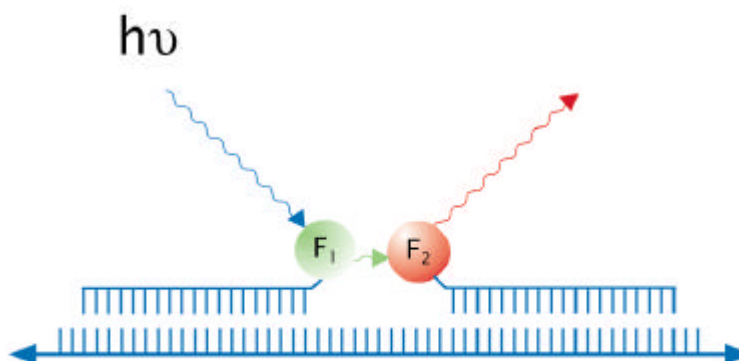
Continúa en la próxima página

2. Función de las Sondas de Hibridización en el Análisis Específico de Secuencias

Continuación

La TERF en las Sondas de Hibridización

El siguiente esquema ilustra cómo dos sondas oligonucleotídicas adyacentes producen una emisión fluorescente medible.



En la PCR, y durante la etapa de hibridización de los cebadores, dos oligonucleótidos distintos se hibridizan en disposición “cabeza a cola” a regiones adyacentes del DNA *target*. En la estructura híbrida los fluorocromos, que están unidos directamente a los oligonucleótidos, se encuentran muy cercanos entre sí. El fluorocromo del donador “F₁” (por ej. fluoresceína) es excitado por una fuente de luz externa, pasando un parte de su energía de excitación al fluorocromo adyacente del aceptor “F₂” (por ej. *LightCycler*-Rojo 640 o 705) (TERF) a través de interacciones dipolo-dipolo. El fluorocromo excitado F₂ emite una luz medible (a una longitud de onda distinta).

3. Guía para el Diseño de Sondas de Hibridización

Introducción El análisis mediante sondas de hibridización tendrá mayor probabilidad de éxito si la elección de la secuencia blanco de la sonda y el diseño de la sonda se harán siguiendo la guía provista en esta sección.

Guía para el Diseño de Todas las Sondas de Hibridización Los principios generales que se utilizan para el diseño de todas las sondas de hibridización (por ej. tanto para sondas que servirán en cuantificación como las que se usarán en análisis de mutaciones) están resumidos en la tabla siguiente. Cada fundamento luego será discutido con mayor detalle, en esta Ficha Técnica.

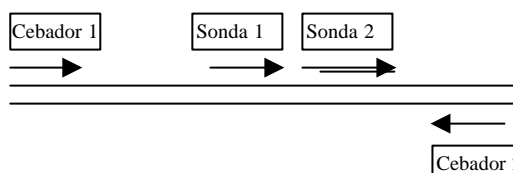
Cuando se consideran...	Usar estos principios	Para detalles, ver
Secuencias Blanco	Situada hacia el extremo 3' de la secuencia blanco. Es necesaria una región que presente una secuencia "balanceada" (por ej. que tenga una distribución semejante de las cuatro bases), que no sea auto-complementaria, monótona o repetitiva	Sección 3.1
Sondas	Separadas entre sí con una distancia de 1 a 5 bases; No deben contener: <ul style="list-style-type: none"> – Secuencias auto-complementarias, monótonas o repetitivas; – Grupos de G y C en ambos extremos; – Secuencias demasiado ricas en purinas. No deben hibridizarse a los cebadores usados en PCR Deben ser modificadas para no ser extendidas durante la PCR; Las T_m deben ser superiores de 5°–10°C respecto a las T_m de los cebadores; Sonda Donadora, extremo 3': marcada con Fluoresceína (FITC); Sonda Receptora, extremo 5: marcada con <i>LightCycler</i> - Rojo 640- o 705.	Sección 3.2

Consideraciones Especiales para el Análisis de Mutaciones Además de proveer las reglas fundamentales para el diseño de todas las sondas (ver temas anteriores), en la Sección 3.3 de esta guía se discute el análisis de mutaciones.

3.1. Elección de Secuencias Blanco Adecuadas para la Sonda

Introducción Use la guía de esta sección para elegir la secuencia blanco que será reconocida por las sondas.

Posición de la Secuencia Blanco de la Sonda La secuencia blanco de la sonda debe localizarse cerca del extremo 3' de la cadena blanco (por ej. lo mas lejos posible del sitio de unión del cebador 5', en la misma cadena). Recomendamos la elección de una secuencia blanco que sea lo mas cercana posible, sin llegar a solaparse, al sitio de unión del cebador en la cadena opuesta (ver dibujo). Esta posición da tiempo para realizar la medidas de fluorescencia antes que los cebadores sean completamente extendidos y que las sondas sean desplazadas por la Taq polimerasa.



Secuencias Blanco Adecuadas Las secuencias blanco deberán tener las siguientes características:

Características	Explicación
Es necesaria una región que presente una secuencia “balanceada” (ej. que tenga una distribución homogénea de las cuatro bases)	Una secuencia “balanceada” tiende a unirse a las sondas en manera estrecha pero no irreversible
No deben contener secuencias monótonas o repetitivas	Las secuencias monótonas o repetitivas tienden a formar híbridos que escapan a la detección.
No deben contener secuencias auto-complementarias	Las secuencias auto-complementarias pueden unirse por los extremos, formando lazos o <i>loops</i> , lo cual las hace menos accesible a la hibridización.

3.2. Características de las Sondas de Hibridización Adecuadas

Introducción Use la guía de esta sección como ayuda para el diseño de sondas de hibridización.

Guía General de Secuencias Cuando se diseñan las secuencias de las sondas, evitar las secuencias que puedan ocasionar problemas de hibridización:

Evitar las sondas con este tipo de secuencias...	Que pueden causar estos problemas
Secuencias monótonas o repetitivas	Formar híbridos que escapan a la detección.
Secuencias auto-complementarias	<ul style="list-style-type: none"> Pueden formar lazos o <i>loops</i>, lo cual reduce la disponibilidad de la sonda y, en consecuencia, su señal. Si las sondas hibridizan entre sí, generarán una señal constante que es independiente de la cantidad de producto amplificado en PCR.
Grupos de G y C en ambos extremos	La sonda puede unirse irreversiblemente a la secuencia blanco.
Secuencia demasiado rica en purinas (G y A)	Tiende a hibridizar débilmente.
Secuencias que puedan hibridizarse al extremo 3' de los cebadores de PCR.	Pueden formar dímeros cebador-sonda. ¹ Nota: Dado que las sondas están presentes en gran cantidad al inicio de la reacción, el riesgo de que se dé esta reacción colateral es muy elevado.

1 Para mayor información en cómo prevenir la formación de dímeros cebador-sonda (y dímeros de cebadores), ver *Roche Molecular Biochemicals Technical Note No. 1/99*.

Continúa en la próxima página

3.2. Características de las Sondas de Hibridización Adecuadas

Continuación

T_m de la Sonda Cuando se diseñan sondas de hibridización, consulte la guía resumida en la siguiente tabla para asegurarse que las secuencias de las sondas tengan T_m apropiadas.
Nota: Para información acerca de los *software* disponibles para el cálculo de las T_m, ver Sección 4.

Guía sobre la T _m s de la Sonda	Comentarios
Las T _m de las sondas deben ser superiores al menos de 5°–10°C respecto a las T _m de los cebadores.	<p>Dar tiempo adicional a la sonda para unirse a la secuencia blanco antes de ser desplazada por la Taq polimerasa.</p> <p>Explicación: Para que sea generada una señal, las dos sondas deben estar unidas simultáneamente al DNA blanco. Sin embargo, para poder unirse en manera satisfactoria a la secuencia blanco, las sondas de hibridización deberán competir con los cebadores de PCR para unirse al DNA blanco. En esta competencia, las sondas se encuentran en desventaja considerable, debido a las siguientes causas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Las sondas de hibridización están presentes a una concentración más baja respecto a los cebadores, y • Apenas el cebador de PCR se une, es inmediatamente extendido. Así, la secuencia blanco es rápidamente cubierta con los nuevos DNA sintetizados, aún a temperaturas inferiores a 72°C. <p>Nota: Para vencer esta desventaja, las T_m de las sondas de hibridización deben ser mayores a las T_m de los cebadores. Así, las sondas tendrán tiempo adicional para unirse a la secuencia blanco antes de ser desplazadas por la Taq polimerasa.</p>
Evitar el diseño de sondas extremadamente estables (T _m sonda 10°–20°C > T _m cebadores).	Las sondas extremadamente estables pueden interferir con la reacción de amplificación, y reducir la sensibilidad del ensayo.
Ajustar la T _m sonda según el tipo de aplicación en que será usada la sonda (cuantificación o análisis de mutaciones).	<ul style="list-style-type: none"> • Para cuantificación, las dos sondas deben poseer T_m aproximadamente iguales. • Para análisis de mutaciones, la T_m de la sonda sensora debe ser inferior a la T_m de la sonda de anclaje (para detalles, ver Sección 3.3).

Continúa en la próxima página

3.2. Características de las Sondas de Hibridización Adecuadas

Continuación

Elección de Fluorocromos

Los extremos adyacentes de las sondas de hibridización deberán ser marcados con fluorocromos. Use la tabla para elegir los fluorocromos para cada sonda en manera adecuada.

Para esta Sonda	Marcar este Extremo	Con este Fluorocromo
Sonda 1 (“donadora” o sonda 5’)	Extremo 3’	Fluoresceína (FITC, 3FL)
Sonda 2 (“receptora” o sonda 3’)	Extremo 5’	<ul style="list-style-type: none"> • <i>LightCycler</i>-Rojo 640, o • <i>LightCycler</i>-Rojo 705

Precauciones acerca el Marcado de Sondas:

Cuando se procede a marcar una sonda, observe las siguientes precauciones:

- No invertir el marcado de las sondas. Por ejemplo, no marcar la sonda 1 (la sonda de hibridización en 5’) con *LightCycler*-Rojo y la sonda 2 (la sonda de hibridización en 3’) con fluoresceína.
- Debido a las propiedades de la unidad óptica, solo los derivados FITC de la fluoresceína (que contienen puentes disulfuro) producen resultados confiables en el *LightCycler*.

Como Prevenir la Extensión de la Sonda

Debido a que las T_m de las sondas son mayores de las T_m de los cebadores de PCR, las sondas pueden funcionar como cebadores y producir síntesis *de novo* durante la amplificación. Para prevenir la extensión de las sondas durante la PCR, fosforilar el extremo 3’ de la sonda receptora (esta sonda será marcada con un colorante *LightCycler*-Rojo al extremo 5’, ver tema anterior).

Nota: El extremo 3’ de la sonda donadora será marcado con fluoresceína (ver tema anterior) y, de esa manera, no podrá ser extendida durante la PCR.

Espacio entre las Sonda de Hibridización

Cuando las sondas se hibridizan a la secuencia blanco, deben estar lo suficientemente cercanas entre sí como para permitir la transferencia de al menos un 50% de la energía de los fluorocromos. Deje un espacio –entre 1 y 5 bases– entre el extremo 3’ de la sonda 1 (sonda donadora) y el extremo 5’ de la sonda 2 (sonda receptora), en manera de dar espacio a los fluorocromos ubicados en el extremo de las sondas.

Recomendación: Durante los experimentos iniciales, elija secuencias blanco con un espacio de una sola base entre ellas.

3.3. Consideraciones Especiales para la Detección de Mutaciones

Introducción	<p>Cuando se utilizan sondas de hibridización para detectar mutaciones, cada sonda tiene funciones especializadas. Una sonda (sensora) cubre el sitio previsto de la mutación, mientras la otra sonda (de anclaje) produce la señal fluorescente. Use la guía de esta sección para obtener información adicional sobre el diseño de sondas que se utilizarán en la detección de mutaciones.</p>
<hr/>	
Secuencia de la Sonda Sensora	<p>La secuencia de la sonda sensora (que detecta la mutación) puede reconocer tanto una secuencia natural o <i>wild type</i> (1) como una secuencia mutante (2). En ambos casos, tienen diferentes usos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • En experimentos iniciales, use una sonda sensora que sea exactamente complementaria a la secuencia natural (sin mutaciones) para detectar las variantes mutantes de esa secuencia. <p><i>Nota:</i> En la mayoría de los casos, una única desigualdad entre el sitio blanco mutante y la sonda sensora causará un cambio de 5°–8°C en la curva de fusión del híbrido de la sonda de detección de la mutación (respecto a la curva de fusión del híbrido de la sonda de detección del <i>wild type</i>). Sin embargo, este cambio de temperatura depende de las secuencias que rodean la mutación. Por ejemplo, un cambio G → A en un ambiente rico de purinas, podría producir un cambio en la curva de apenas 2°C.</p> • Use una sonda sensora complementaria a la mutación para: <ul style="list-style-type: none"> – Confirmar la existencia de una mutación previamente identificada con una sonda del <i>wild type</i> (ver texto anterior), y – Descartar la presencia de otra variante de la secuencia en el sitio blanco. <p><i>Nota:</i> Algunas mutaciones prominentes pueden ser inicialmente identificadas con una sonda específica para una mutación. Sin embargo, no todas las secuencias blanco traen una segunda, menos prominente, que pueda ser identificada de esta manera.</p> <p><i>Precaución:</i> Cuando se diseña la sonda sensora para reconocer mutaciones, la base desigual puede localizarse tanto en el medio como hacia uno de los extremos de la sonda. No obstante, evitar que la base desigual quede adyacente a las 2 últimas bases de la sonda.</p>
<hr/>	
Puesta a Punto de las Sondas para Análisis de Mutaciones	<p>En algunos casos, la hibridización entre DNA mutante y sonda puede mejorarse mediante uno de los siguientes procedimientos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diseñando una sonda que reconozca la secuencia complementaria de la mutación. • Corriendo de pocas bases la secuencia blanco reconocida por la sonda, así la sonda se unirá con otra serie de bases en el entorno de la mutación • Introduciendo deliberadamente bases desiguales en la sonda para reducir una unión fuerte en las regiones adyacentes a la mutación.

3.3. Consideraciones Especiales para la Detección de Mutaciones

Continuación

T_m de las Sondas para Análisis de Mutaciones

Como ya se ha explicado en la Sección 3.2, la T_m de cualquier sonda de hibridización debe ser mayor a la T_m de los cebadores de PCR. Además, si las sondas serán utilizadas en análisis de mutaciones, la relación de las T_m de las dos sondas deberá ser la siguiente:

$$T_m \text{ de la sonda sensora} < T_m \text{ de la sonda de anclaje}$$

Explicación: De esta manera, se asegura que la sonda que cubre el sitio de la mutación (sonda sensora) mantendrá el control en la generación de la señal fluorescente. Además, compensa cualquier error en el cálculo de la T_m de las sondas.

Nota: Para asegurarse que la T_m de la sonda sensora sea inferior a la T_m de la sonda de anclaje:

- Hacer la sonda de anclaje mas larga que la sonda sensora, o
 - Diseñar la sonda de anclaje con un contenido mayor de G/C.
-

Alterar los Cebadores Para Prevenir la Formación de Dímeros “Cebador-Sonda”.

Para prevenir la formación de dímeros “cebador-sonda”, la secuencia de las sondas de hibridización nunca debe ser complementaria a la secuencia de los cebadores. Sin embargo, y en especial para las sondas que se usan en análisis de mutaciones, puede no ser posible alterar las secuencias elegidas para la sonda.

En esta situación, es preferible alterar la secuencia de los cebadores antes que la de las sondas. En muchos casos se puede prevenir la formación de dímeros cebador-sonda simplemente introduciendo o sacando la última base en la secuencia de los cebadores de PCR.

4. Software para el Diseño de Sondas de Hibridización

Introducción	Los <i>software</i> son herramientas de gran utilidad para el diseño de secuencias que serán usadas como sondas de hibridización. En esta sección se hace un breve resumen de alguno de ellos.
Software para la Selección de Secuencias de la Sonda	<ul style="list-style-type: none"> • Existen muchos programas disponibles para el diseño de cebadores de PCR (por ej., ver Sección 2.3.2, capítulo C en el “<i>LightCycler Manual del Operador</i>”). Alguno de ellos pueden ser útiles en el diseño de sondas de hibridización. • Si Ud. realiza el análisis de secuencias sin la ayuda de un sofisticado <i>software</i>, la función “buscar” de un procesador de texto tipo <i>Microsoft Word</i> le será útil a suficiencia. En este caso, busque las cuatro bases finales de la secuencia blanco (o de su secuencia complementaria) entre la secuencia del producto amplificado o de la sonda.
Software para el Cálculo de la T_m de la Sonda	<p>Para el cálculo de la T_m de cebadores y sondas, recomendamos el uso de programas que puedan calcular las T_m termodinámicamente, por ej, un programa que tenga en cuenta todas las bases vecinas y no solo el contenido GC. A continuación, sugerimos tres programas de este tipo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • OLIGO, de <i>Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO, USA</i> (http://oligo.net), o MedProbe, Oslo, Noruega (www.medprobe.com) • Programa (en lenguaje JAVA) disponible en la página web de TIB MOLBIOL, Berlin, Germany (www.TIB-MOLBIOL.de/oligo_ag.html) • Calculador <i>on-line</i> de T_m de oligonucleótidos (http://alces.med.umn.edu/rawtm.html) <p>Nota: se puede tener acceso al calculador de T_m en la página principal del <i>Virtual Genome Center</i> (http://alces.med.umn.edu/VGC.html).</p>
Precauciones acerca de los Valores de T_m Calculados	Los valores calculados con programas <i>software</i> son bastante precisos (error relativo: 1°–2°C). Sin embargo, como indica la tabla sucesiva, es necesario aplicar los datos obtenidos con cautela en el diseño de sistemas de sondas de hibridización.

Continúa en la próxima página

4. Software para el Diseño de Sondas de Hibridización

Continuación

Operación	Problemas potenciales	Solución propuesta
Comparación de los valores relativos de T_m de sondas y cebadores	Cada software asume diferentes parámetros de concentración de DNA y contenido de sales, por omisión (<i>default</i>).	Comparar solo las T_m calculadas con el mismo programa.
Puesta a punto de las temperaturas de hibridización de la PCR para sondas y cebadores	<ul style="list-style-type: none"> • Las T_m calculadas no corresponden a las temperaturas de hibridización de la PCR. • La hibridización de los cebadores de PCR generalmente ocurre a una mayor temperatura de la T_m calculada (porque los cebadores están presentes en exceso). 	Optimizar la reacción determinando la verdadera temperatura de hibridización experimentalmente, como sigue: <ul style="list-style-type: none"> • Para cebadores, usar un ciclador térmico con gradiente de temperaturas. • Para sondas de hibridización, usar el “<i>LightCycler</i>: Módulo para el Análisis de la Curva de Hibridización”.