
ENGINYERIA GENÈTICA



CIÈNCIES BIOMÈDIQUES UB - PRIMAVERA 2017

ALBERT TORELLÀ PEREZ

Índex

I	MANEIG D'ÀCIDS NUCLEICS	1
1	Preparació i anàlisi dels àcids nucleics	1
	Introducció — 1 • Purificació del DNA total procariota — 3 • Purificació del DNA plasmídic — 6 • Purificació del genoma de bacteriòfags — 8 • Aïllament de RNA — 9 • Electroforesi d'àcids nucleics — 10 • Quantificació de material genètic — 12	
2	Enzims per la manipulació dels àcids nucleics	14
	Fragmentació d'àcids nucleics — 14 • Enzims modificadors d'àcids nucleics — 19 • Unió de molècules de DNA. Lligases — 19 • Polimerases — 20	
3	Seminari. Aplicacions de la PCR	23
	Bases de la PCR — 23 • Aplicacions de la PCR i RT-PCR — 24	
II	CLONATGE	27
III	CARACTERITZACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS	28
IV	APLICACIONS DE L'ENGINYERIA GENÈTICA	29

I. MANEIG D'ÀCIDS NUCLEICS

1. Preparació i anàlisi dels àcids nucleics

1.1 Introducció

- Mitjans del segle XIX Mendel va establir les lleis de l'herència biològica.
- Principis del segle XX: Morgan i Sutton estableixen la teoria cromosòmica de l'herència i que els gens estan als cromosomes.
- 1944: Avery, MacLeod, MacCarty estableixen que el material genètic és ADN.
- El 1952-66 es va establir l'estructura del DNA, el codi genètic i elucidar els processos de transcripció i traducció.
- El 1972-73 es comencen a fer servir tècniques de DNA recombinant, produint-se així el naixement de l'enginyeria genètica.
- El 1985 es va introduir la tècnica de PCR.
- 1990: Seqüenciació de genomes

1.1.1 Clonatge

L'enginyeria genètica és un conjunt de mètodes que permeten el clonatge d'un fragment de DNA d'interès i introduir-lo a un altre organisme.

El clonatge de DNA consisteix en:

1. Construcció de la molècula de DNA recombinant: L'insert s'introdueix en un vector. El vector conté elements que permetin la replicació i expressió d'aquest DNA. El conjunt del vector i l'insert lligats constitueixen la molècula de DNA recombinant.
2. Introducció a la cèl·lula hoste
3. Multiplicació del DNA recombinant
4. Propagació del DNA recombinant
5. Obtenció dels clons

En el procés de clonatge:

1. El primer que cal tenir clar és el procés biològic que es vol estudiar.

-
2. Identificació del gen a estudiar. S'extreu i es purifica el DNA de l'organisme d'interès. En el cas dels eucariotes, molt sovint s'utilitza RNA i mitjançant la retrotranscripció obtenir la seqüència de cDNA.
 3. Fragmentar el DNA
 4. Elecció del vector: Si el volem propagar en procariotes o eucariotes, en funció de la mida de l'insert...
 5. S'ha d'obrir el vector per introduir l'insert.
 6. Fusió del DNA recombinant.
 7. Introducció en bacteris i producció de clons.
 8. Seleccionar el clon que conté el gen d'interès.

1.1.2 Llibreries

Les llibreries genòmiques es generen mitjançant la fragmentació del DNA de l'organisme de l'interès i es clonen en un vector d'interès i s'introdueix en un organisme senzill per generar clons de manera que cada clon contingui una molècula de DNA recombinant amb un insert diferent.

És necessari saber quants clons es necessiten per tenir representat un genoma. Depenrà de la mida del genoma d'interès i de la capacitat del vector (mida de l'insert que és capaç de lligar).

L'altre possibilitat és generar una llibreria de cDNA. Estan construïdes a partir de mRNA obtingut de les cèl·lules o teixits d'estudi, que s'han retrotranscrit a cDNA i lligat en un vector de clonatge. Cada clon presenta una còpia del mRNA obtingut.

1.1.3 Aplicacions

L'enginyeria genètica pretén produir una proteïna en concret per múltiples finalitats.

- Biofarmacèutic: Producció d'antibiòtics, proteïnes heteròlogues, generació de proteïnes amb noves funcions (més solubilitat, proteïnes quimera), generació de vacunes.
- Agrícola i ramader: modificació genètica de plantes, animals transgènics.
- Clínic: Diagnòstic, Teràpia gènica
- Forense

1.2 Purificació del DNA total procariota

El material genètic a purificar pot ser:

- DNA genòmic procariota
- DNA genòmic eucariota
- RNA, per generar llibreries de cDNA
- DNA plasmídic
- DNA de bacteriòfags

Els principals vectors són plàsmids i genoma de bacteriòfags.

1.2.1 Etapes en la preparació del DNA total procariota

Les etapes més generals són:

1. Creixement i concentració de les cèl·lules
2. Ruptura de les cèl·lules
3. Purificació del DNA
4. Concentració del DNA

1.2.1.1 Creixement i concentració del cultiu bacterià

Els bacteris creixen en un medi ric.

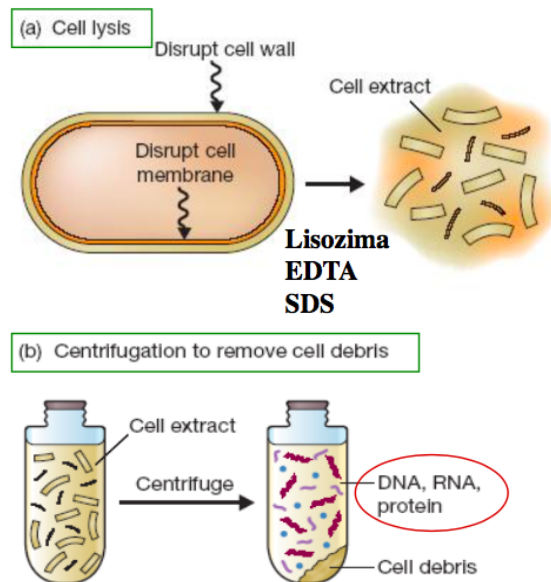
L'estimació del creixement es fa per la lectura de la densitat òptica a 600 nm. En la fase exponencial hi ha una relació directa entre DO i nombre de cèl·lules; sempre i quan siguin el mateix medi de cultiu, mateixa quantitat d'inòcul i temperatura de cultiu.

Després d'un temps, el cultiu es concentra mitjançant centrifugació a velocitats baixes per evitar trencaments cel·lulars.

1.2.1.2 Ruptura de les cèl·lules

Els mètodes físics (sonicació, pressió) tenen el problema que poden trencar el DNA. La millor opció és el tractament químic que trenquin la membrana i alliberin el contingut. Un dels components que s'utilitza és el lisozim que actua sobre la paret de mureïna. S'afegeix EDTA (tetraacetat d'etilendiamida) per quelar el Mg i desestabilitzar les membranes; a més inhibeix molts enzims bacterians (nucleases, polimerases). També s'addiciona SDS, un detergent per disgregar els lípids de la membrana.

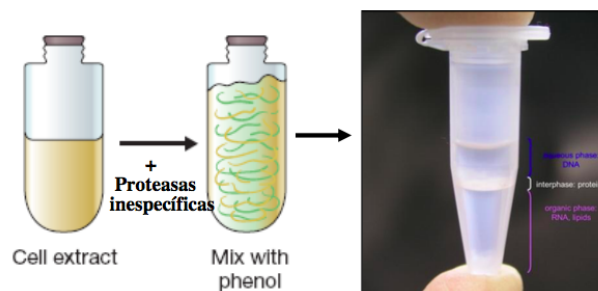
Es torna a centrifugar per eliminar els residus més grans. El pellet contindrà bacteris no lisats i complexos grans. El sobrenedant té DNA, RNA i proteïnes de baix pes molecular.



1.2.1.3 Purificació del DNA

Per eliminar el RNA, s'introdueix una RNasa. Després, s'eliminen les proteïnes mitjançant proteases inespecífiques com la proteïnasa K o la pronasa. El tractament amb fenol dissol les proteïnes hidrofòbiques; s'afegix 1 volum de fenol i es mescla per inversió i es centrifuga i sortiran dues fases:

- A la part superior hi ha la part polar amb el DNA.
- Interfase: Proteïnes
- A la part inferior hi ha el fenol.



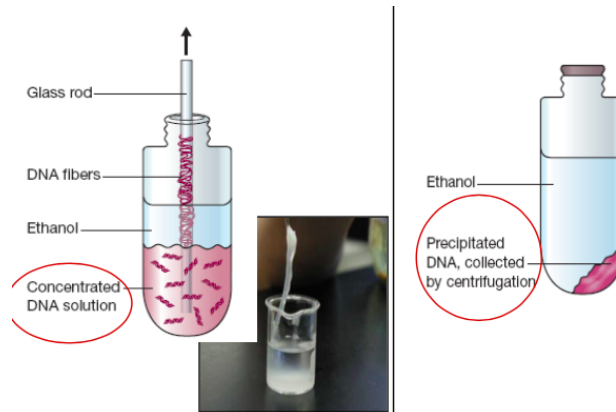
A la fase aquosa hi poden quedar traces de fenol, que inhibeix la majoria d'enzims. Llavors s'afegeix fenol amb cloroform equilibrat (25:24:1 fenol cloroform isoamilalcohol), s'agita per inversió, es centrifuga. El cloroform arrossega el fenol al fons del tub.

Es recull la fase aquosa i s'afegeix cloroform, s'agita per inversió i es centrifuga un altre cop. S'agafa la fase aquosa on hi ha el DNA pur.

1.2.1.4 Precipitació del DNA

Hi ha 2 mètodes:

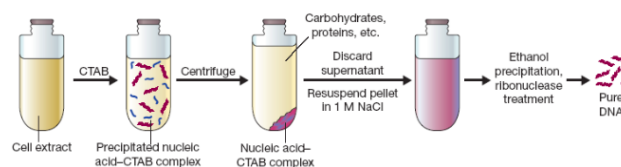
- Si hi ha molt volum; la precipitació es fa per sals+etanol. S'afegeix 2,5 volums d'etanol absolut fred a -20°C i s'introdueix una vareta de vidre i es remena tot rotant la vareta. Quan el DNA s'uneix a la vareta, s'introdueix en un tub amb buffer TE i es gira la vareta en sentit contrari.
- Si el volum és petit, s'afegeix 1/10 de NaAc i 2,5 volums d'etanol fred a -20°C *overnight*. Després es centrifuga, és possible que el pellet no sigui visible i es descarta el sobrenedant i es fa un rentat amb EtOH 70 %, amb una altra centrifugació. El pellet es seca a temperatura ambient i el pellet es resuspèn en TE/ aigua pura.



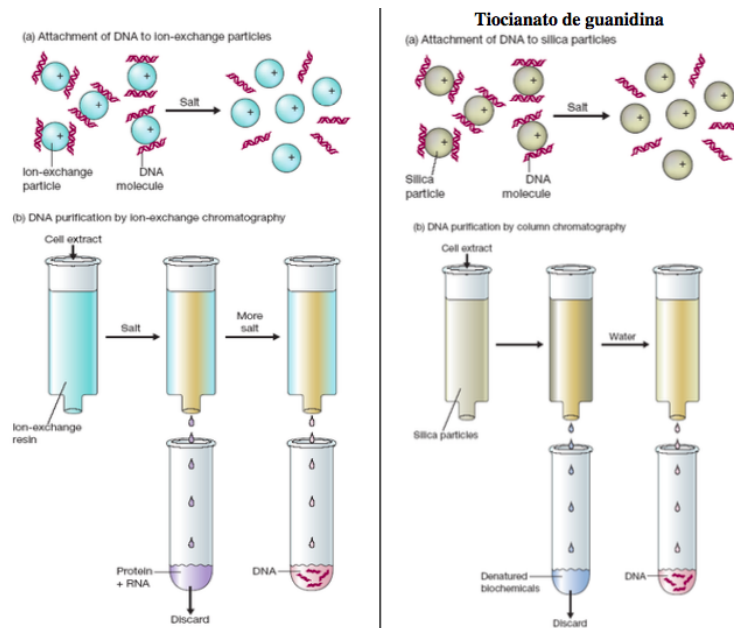
Algunes soques bacterianes presenten, p.e, una càpsula molt gruixuda o molt LPS i no és pràctic fer una extracció fenol:cloroform:isoamil alcohol.

Les cèl·lules vegetals presenten parets de cel·lulosa o xilosa, pel que s'utilitzen xilana-sa o cel·lulasa.

El **mètode CTAB** (bromur de cetil-trimetil-amoni) agafa l'extracte bacterià i aplica la RNasa. Després afegeix el CTAB, que forma complexos amb el DNA i és fàcil separar-los per centrifugació. Es descarta el sobrenedant i es recupera el pellet en un buffer amb NaCl. S'afegeixen 2 volums d'etanol i es centrifuga, el pellet es renta amb EtOH 70 %.



Molts kits comercials es basen en la **cromatografia d'intercanvi iònic**. Un cop s'han lissat les cèl·lules i s'obté l'extracte cel·lular es tracta amb RNasa. S'aplica aquesta suspensió en unes columnes de cromatografia amb resines de càrregues positives. El DNA s'associa a la resina i hi queda unit. Es fa un rentat de la resina per eliminar unions inespecífiques. Finalment es fa l'elució amb un tampó que desestabilitza la unió del DNA-resina.

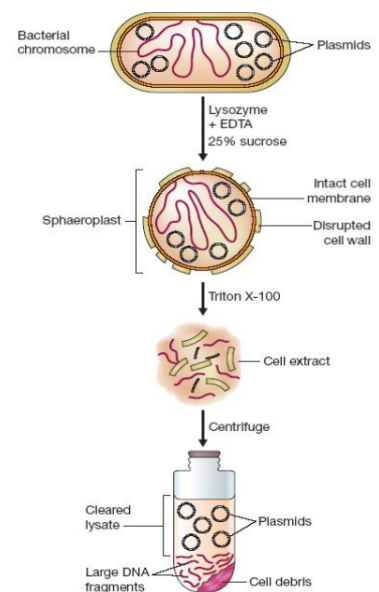


1.3 Purificació del DNA plasmídic

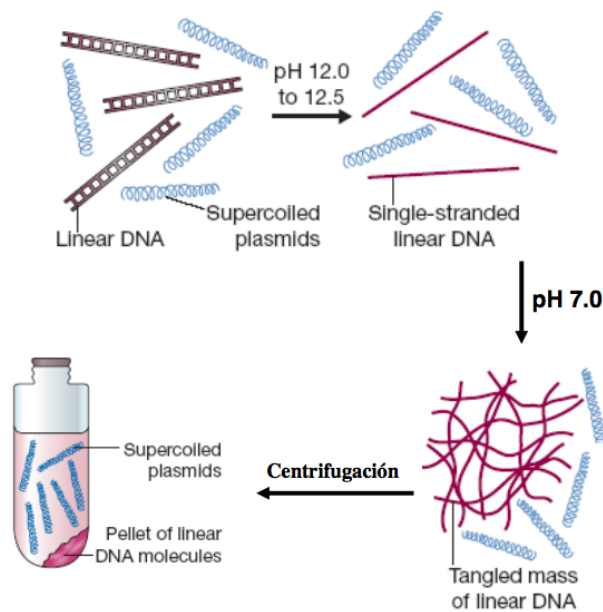
Els plàsmids són molècules de DNA circulars de doble cadena i de menor mida que un genoma. Té un origen de replicació propi. Els plàsmids codifiquen funcions no essencials pel bacteri però sí que proporcionen avantatges (resistència a antibiòtics).

La lisi busca conservar el DNA genòmic el més intacte possible. Es basa en lisozima, EDTA i un 25% de sucrosa per mantenir la osmolaritat i lisar només la membrana externa. Per lisar la membrana interna s'usen detergents no iònics com el Tritó X-100. L'extracte cel·lular contindrà els plàsmids intactes. Al pellet hi haurà restes cel·lulars i al sobrenedant serà un lisat clar on hi haurà plàsmids i fragments de cromosoma bacterià, RNA i proteïnes.

El DNA genòmic s'haurà trencat i estarà en forma lineal i els plàsmids estaran en conformació super enrotllada. La conformació super enrotllada presenta una unió diferent d'intercalants i la desnaturalització és diferent.



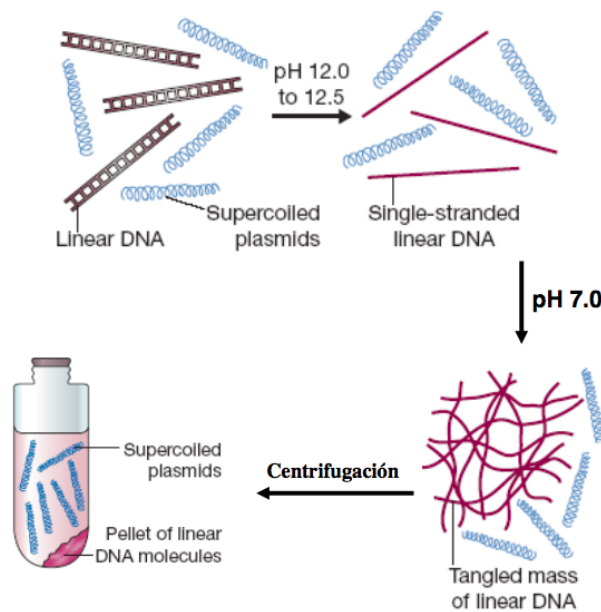
- **Desnaturalització alcalina:** És el mètode Birnboim. S'afegeix NaOH per desnaturalitzar dsDNA lineal (cromosoma bacterià). Seguidament, es provoca una renaturalització ràpida afegint NaAc, com que la complementarietat no és exacta la renaturalització provoca una estructura en forma de malla amb proteïnes adherides. Després de la centrifugació, al sobrenedant hi ha plàsmid, RNA i proteïnes. S'afegeix RNasa i es fa una extracció fenol-cloroform o per cromatografia d'intercanvi iònic.



- **Gradients de densitat:** Qualsevol molècula biològica té un punt de flotació específic. El gradient de densitat es pot generar afegint solucions successives de concentració decreixent en un tub però normalment es generen centrifugant una solució salina. Al fons del tub queda la solució més concentrada i a la part superior la solució està més diluïda; aquests gradients s'anomenen isopícnic. A la part inferior hi ha RNA, al mig hi ha DNA i a la part superior hi ha les proteïnes.

Per separar DNA genòmic i plasmídic s'afegeix EtBr (s'intercala al DNA). La idea és que el EtBr s'intercali menys al DNA plasmídic al ser circular i superenrotllat. Es prepara una solució de CsCl, amb EtBr i s'afegeix el lisat clar. Es separen dues bandes de DNA a la part central del tub. A sota queda el plàsmid i a sobre hi ha el DNA lineal.

El DNA plasmídic s'extreu amb una xeringa. El contingut es passa a un tub per treure el EtBr. S'afegeix isobutanol al tub i es centrifuga. A la part superior hi ha la fase orgànica amb el EtBr i a la part inferior hi ha la fase aquosa amb el DNA plasmídic. Posteriorment, la fase aquosa es passa per diàlisi per eliminar el CsCl. Per concentrar-lo, es fa una precipitació per etanol.



1.4 Purificació del genoma de bacteriòfags

S'ha de créixer un cultiu de bacteris per permetre la multiplicació del fag. Es necessiten volums grans de cultiu per obtenir prou DNA del fag.

10^{10} fags representen 500 ng de DNA.

En un fag amb cicle lític:

- Si la quantitat de bacteris inicials és molt baixa, la taxa d'infecció de les partícules fàgiques serà baixa.
- Si la quantitat de bacteris és molt alta, els fags no infectaran a la major part de la població i no hi haurà un lisat generalitzat del cultiu.

Si els fags són lisogènics, el genoma està integrat en el cromosoma bacterià. El fag λ salvatge presenta dificultats per entrar en cicle lític. En aquest cas, s'ha introduït una modificació al genoma del fag per poder induir lisi en funció de la temperatura.

S'ha de saber com induir la lisi en cada fag lisogènic.

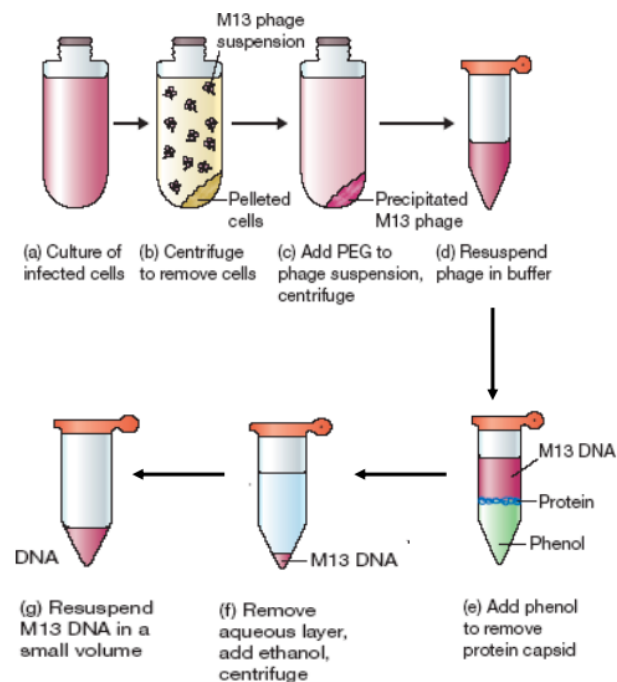
En primer lloc, s'han d'infectar els bacteris, induir el cicle lític i quan el cultiu esdevingui clar, es lisen amb cloroform. Es centrifuga el cultiu i al sobrenedant queden els fags i restes bacterianes. Per purificar les partícules fàgiques es pot fer per 2 procediments:

- **Gradients de CsCl:** El fag migrarà al seu punt de flotació. Amb una xeringa es punxa la banda amb fags, es desproteïnitza amb proteïnasa K, i es fa una extracció fenol-cloroform.
- **Precipitació amb polietilenglicol:** El PEG és un polímer que en presència de NaCl aglutina macromolècules. La suspensió de fag es tracta amb PEG i NaCl i s'incuba. Es centrifuga i al pellet quedaran els fags amb restes cel·lulars. Es re-suspèn el pellet i es fa una desproteïnitzaació i una extracció fenol-cloroform.

1.4.1 Purificació del genoma del fag M13

És un fag lisogènic però que allibera fags al medi sense lisar els bacteris. Quan al fag es troba dins el bacteri, queda en forma de plàsmid. Quan es generen les partícules fàgiques, el material genètic és dsDNA lineal. Per tant:

- Si es vol el DNA lineal: S'aïllen les partícules fàgiques.
- Si es vol el DNA com a plàsmid: S'aïllen els plàsmids de les cèl·lules bacterianes.



1.5 Aïllament de RNA

Es pot fer per:

- Gradients de CsCl: El RNA queda flotant a la part inferior del tub i es pot aïllar per mètodes ja coneguts.
- Tractament amb proteases/DNases i fenol

El RNA té algunes característiques que compliquen la seva manipulació:

- Inestabilitat
- Facilitat de degradació per la ubiquïtat de RNases. Els procediments incorporen inhibidors de RNases. El procediment es fa en fred i s'utilitza:
 - El dietilpirocarbonat (DEPC) en qualsevol solució que entri en contacte amb el RNA.
 - El tiocianat de guanidina desnatura les RNases.
 - El β -mercaptoetanol redueix les RNases.

El RNA s'ha de mantenir a temperatures baixes (ideal a -80°C).

Com que el mRNA eucariota presenta la poliadenilació a 3', es pot aïllar mitjançant una cromatografia d'afinitat. La resina de la columna conté una cel·lulosa unida a oligo-T, i així poder generar la llibreria de cDNA.

En el cas del mRNA procariota no es pot aïllar específicament. S'aïlla el RNA total.

1.6 Electroforesi d'àcids nucleics

Es basa en separar els àcids nucleics en un suport segons la seva mida. El suport genera uns porus pels quals passa el material genètic. La migració serà proporcional a la mida de l'àcid nucleic.

S'usen generalment 2 suports:

- **Poliacrilamida:** Genera porus molt petits. Gran resolució per fragments curts. Inferiors a 100 bp.
- **Agarosa:** Es poden preparar suports a diferents concentracions.

En concentracions petites, el gel separa bé els fragments curts però també els de més bp. Quan es va augmentant la concentració, augmenta la resolució dels fragments petits però no es distingeixen els més grans.



FIGURA 1: Marcador de DNA corregut en gels d'agarosa a diferents concentracions

Per fragments de RNA, es fa un gel d'agarosa amb un agent desnaturalitzant com el formaldehid.

1.6.1 Visualització de les bandes de DNA

1. Tinció amb agents intercalants com el EtBr o el SYBRsafe i s'irradia amb llum UV. L'agent intercalant es pot afegir al gel abans de solidificar o tenyir-lo després de córrer. La sensibilitat és de 25 ng.
2. Autoradiografia: Es detecten marques radioactives al material genètic. L'inconvenient és que s'ha de marcar el DNA/RNA. S'aplica un film fotogràfic per tal que impacti la radioactivitat i es revela la pel·lícula fotogràfica. Aquest sistema és més sensible. La sensibilitat és de 2 ng.

El marcador és el genoma del fag λ digerit amb HindIII. A l'esquerra el cromosoma bacterià no digerit és massa gran i no migra. A la dreta, es genera un smear quan s'analitza el cromosoma bacterià digerit amb una endonucleasa.

A baix, es visualitza un plàsmid no digerit i digerit. Al carril del plàsmid no digerit, hi ha diferents bandes que corresponen a les diferents conformacions espacials que pot adoptar el plàsmid.

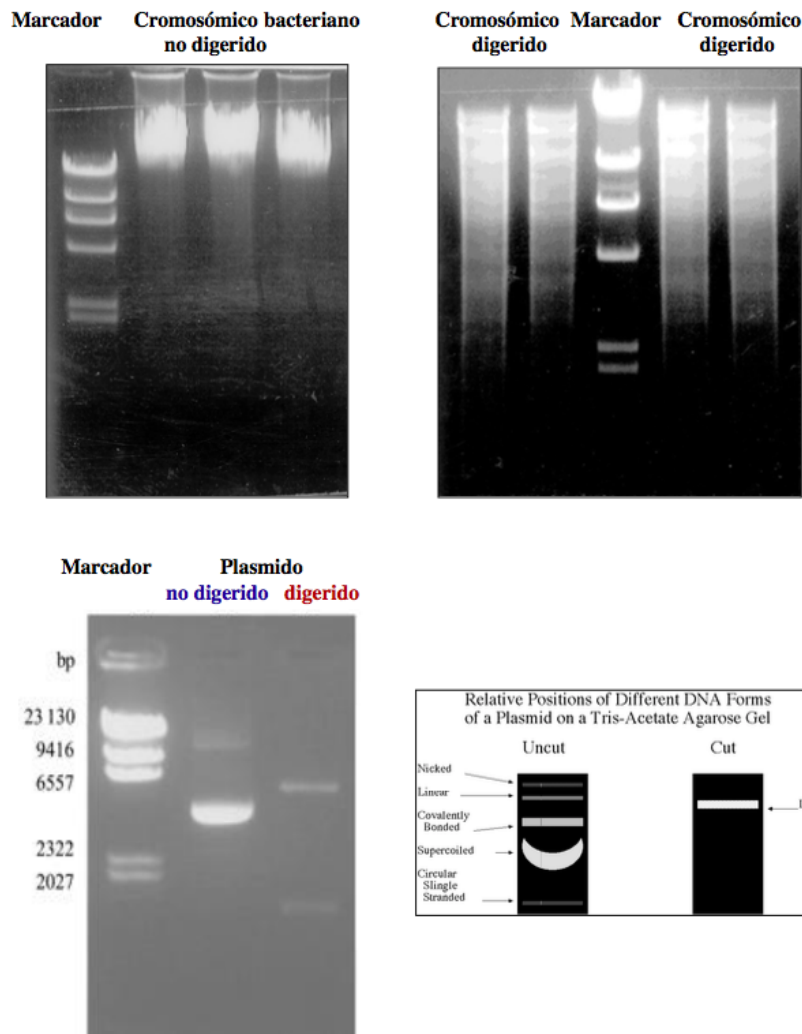


FIGURA 2: Visualització d'un cromosoma bacterià en un gel d'agarosa

1.6.2 Electroforesi de camp pulsant (PFGE)

Quan el material és molt gran (superior a 100 kb) no es pot aplicar a un gel d'agarosa normal. El que es fa és variar el sentit del corrent elèctric. Durant un temps va de positiu a negatiu, i després de negatiu a positiu i en diferents direccions; de manera que es genera una migració amb una trajectòria sinuosa i permet resoldre fragments de DNA de mida gran.

1.7 Quantificació de material genètic

Hi ha 2 mètodes:

1. **Mitjançant espectrofotometria.** El sistema de Nanodrop requereix 1 μL de mostra sense diluir i així la detecció és precisa i no es perd mostra. Es basen en determinar l'absorbància a 260 nm (espectre UV). Hi ha una relació entre DO i μg de DNA:

- 1 unitat d'absorbància a 260 nm = 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de dsDNA.

-
- 1 unitat de absorbància a 260 nm = 40 µg/ml de dsDNA.

També es mesura l'absorbància a 280 nm (per determinar si hi ha proteïnes) i a 230 nm.

La relació $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ ha d'estar entre 1.8-2. Si és inferior, vol dir que la mostra està contaminada amb proteïnes i s'ha de tornar a purificar.

2. **Comparació amb marcador de quantitats conegudes.** Comparant la mostra amb un marcador es pot conèixer la quantitat de cada fragment. Si el fragment té una mida i intensitat de fluorescència similar a alguna banda del marcador, podem assumir que la concentració de la mostra és igual a la concentració del fragment homòleg del marcador.

Es pot fer una altra estimació. Es mesura la longitud migrada per cada fragment en relació a una línia de referència i es construeix una gràfica distància-mida del DNA.

2. Enzims per la manipulació dels àcids nucleics

Hi ha 4 grups d'enzims, que són els més utilitzats:

- Nucleases tant de DNA com de RNA. Les més importants són les endonucleases de restricció.
- Enzims de modificació: Afegeixen o eliminen grups químics a les cadenes de DNA. Són la fosfatasa alcalina i la polinucleotidil quinasa.
- Lligasa: Unió de fragments de DNA.
- Polimerases: Síntesi de DNA o RNA a partir d'un motlle.

2.1 Fragmentació d'àcids nucleics

Els àcids nucleics són polinucleòtids; polímers resultants de la unió mitjançant un enllaç fosfodièster d'un nombre variable d'unitats monomèriques bàsiques, anomenades nucleòtids.

Es poden fragmentar els àcids nucleics per mètodes físics com l'aplicació de pressió o sonicació per ultrasons.

Es poden tractar els àcids nucleics amb solucions àcids, p.e amb l'inconvenient de trencar enllaços pentosa-base nitrogenada. Amb una solució alcalina, es desnaturalitza la molècula i es fragmenten les molècules de RNA.

Les nucleases es poden agrupar en 2 grups:

- **Exonucleases:** Tallen la molècula per l'extrem i alliberen nucleòtids d'1 en 1.
- **Endonucleases:** Talls en posicions internes dels àcids nucleics.

En funció del tipus d'àcid nucleic sobre el que actuen:

- **Desoxiribonucleases:** Tallen DNA.
- **Ribonucleases:** Tallen RNA.

2.1.1 Exonucleases

2.1.1.1 RNasa H

Actua en híbrids DNA-RNA tallant la molècula de RNA. Presenta activitat exonucleasa 5'→3' i 3'→5'. Permet eliminar el RNA dels híbrids RNA-DNA.

Aquest enzim és útil per preparar llibreries de cDNA, és a dir per eliminar el RNA restant.

2.1.1.2 Exonucleasa III

Presenta activitat exonucleasa a extrems 3'-OH, que han de ser roms (és a dir d'igual longitud). Actua sobre dsDNA. Necessita cations Mg^{2+} . Genera extrems protuberants en 5'. No pot actuar sobre extrems 3' protuberants ja que hi ha una zona de DNA lineal. Sí que pot actuar en extrems 5' protuberants.

2.1.1.3 Nucleasa BAL31

Té activitat 3'-OH exonucleasa i endonucleasa. Té com a substrat ssDNA i dsDNA. L'activitat endonucleasa predomina quan hi ha ssDNA. Requereix de Ca^{2+} . Genera fragments amb extrems roms i alguns amb extrems protuberants.

2.1.2 Endonucleases

2.1.2.1 RNasa A

Presenta activitat endonucleasa en extrems 3' de pirimidines (C, U, T). Té com a substrat ssRNA. S'usa per degradar RNA en l'extracció de DNA genòmic.

2.1.2.2 RNasa T1

Presenta activitat endonucleasa en extrems 3' de G, prenent com a substrat ssRNA.

2.1.2.3 Nucleasa S1

Té activitat endonucleasa però té una certa activitat exonucleasa. Té com a substrat ssDNA i RNA. Requereix Zn^{2+} i pH àcid (4,5). Pot actuar sobre dsDNA amb zones lineals (amb gaps).

Serveix per eliminar extrems protuberants i genera dsDNA amb extrems roms.

2.1.2.4 DNasa I

És una endonucleasa que té com a substrat ssDNA i dsDNA. Requereix Mg^{2+} si actua sobre ssDNA.

En una molècula de dsDNA amb Mg^{2+} genera extrems amb protuberància amb 5' o 3'. Si actua amb Mn^{2+} genera extrems roms.

Si s'utilitza amb Mg^{2+} genera extrems protuberants sobre els quals pot actuar una polimerasa.

2.1.3 Endonucleases de restricció

Tallen dsDNA i són específiques en una seqüència concreta. La utilitat és que si es tracta DNA genòmic i plasmídic amb un mateix enzim de restricció es generen extrems compatibles en ambdues molècules, els quals es poden lligar.

Es van descobrir en bacteris que eren resistents a la infecció per bacteriòfags. Van veure que hi havia enzims que degradaven DNA del fag però no del bacteri. Això era degut perquè el genoma bacterià estava metilat en determinades seqüències i això feia que aquest enzim no pogués tallar en aquestes zones.

Per tant, els bacteris que expressen un determinat enzim de restricció expressen també una metilasa que reconeix la mateixa zona que l'enzim de restricció que metila aquesta seqüència i protegeix el genoma bacterià de la degradació per aquest enzim de restricció.

Hi ha 3 tipus d'endonucleases de restricció:

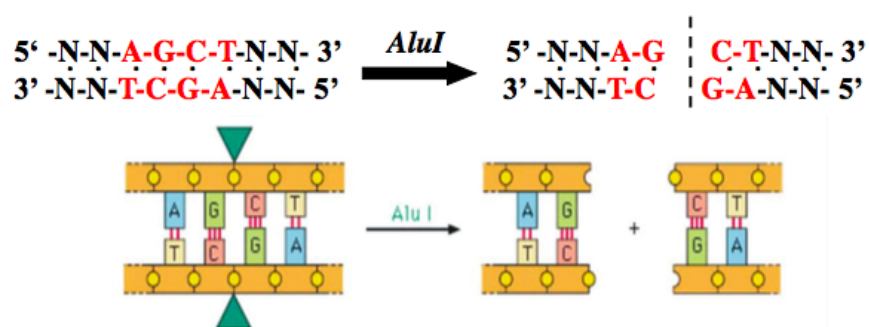
	Tipus I	Tipus II	Tipus III
Estructura/Funció	Únic, enzim multifuncional amb 3 subunitats diferents per unió, metilació i tall	Enzims separats per activitat endonucleasa i activitat de metilació	Enzim oligomèric amb activitat endonucleasa i metilasa que comparteixen una subunitat comú
Lloc de reconeixement	Asimètric	Palindròmic	Asimètric
Lloc de tall	Inespecífic	En el lloc de reconeixement	5-20 bp fora del lloc de reconeixement
Cofactor requerit	Mg ²⁺ , ATP, S-adenosilmetionina	Mg ²⁺	Mg ²⁺ , ATP, S-adenosilmetionina

TAULA 1: Tipus d'endonucleases de restricció

Com que les endonucleases de restricció de tipus II són independents a nivell estructural són independents de la metilasa. Reconeixen una seqüència específica o diana que pot ser de 4,6 o 8 nucleòtids.

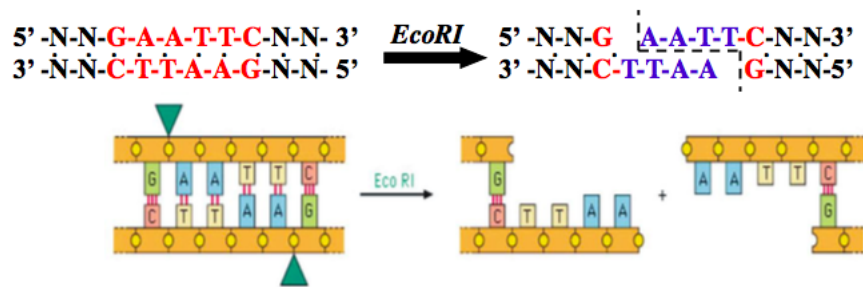
Els enzims de restricció poden generar 2 tipus d'extrems a les cadenes de DNA:

- **Extrems roms:** Genera talls simètrics, sense protuberàncies. Això s'anomena extrems roms, és a dir les dues cadenes complementàries tenen la mateixa longitud.

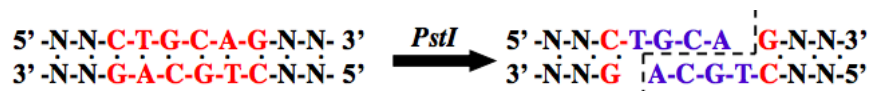


- **Extrems cohesius o protuberants:**

– Extrems 5' protuberants



– Extrems 3' protuberants



Diferents enzims de restricció que reconeguin dianes diferents poden generar els mateixos extrems protuberants, de manera que siguin extrems compatibles.

Quan l'enzim produeix extrems roms, sempre són compatibles.

Alguns enzims són **isoesquizòmers**. Els isoesquizòmers són enzims diferents que reconeixen una mateixa diana que la tallen de la mateixa manera o no.

L'**activitat star** suposa que modificant la concentració d'ions divalents, incrementa l'activitat i que tallin en més punts del que farien habitualment.

2.1.3.1 Freqüència de reconeixement

Es té en compte els monòmers que formen el DNA i la longitud de la seqüència de reconeixement. Per un enzim de restricció amb una seqüència de reconeixement de 6 nt, podem estimar que la freqüència de reconeixement és de $4^6 = 4096$, és a dir que hi ha una diana cada 4096 nucleòtids.

Si agafem el genoma del fag lambda i el digerim amb BamHI, SalI i BglII que tenen una seqüència de reconeixement de 6 nt, esperàriem 12 dianes per cada enzim. En realitat però obtenim 6 dianes per BglII, 5 dianes per BamHI i 2 dianes per SalI. Aquestes desviacions són deguts a la presència de zones riques en GC/AT, la metilació d'alguns nucleòtids.

Si es volen pocs talls en un DNA, s'escullen 6-cutters. Si es vol més fragmentació, s'escullen enzims 4-cutters.

2.1.3.2 Digestions de DNA

Es necessita el DNA, la presència de condicions adequades (presència de Mg^{2+} , la concentració de sals com NaCl, el pH o la temperatura). El pH ha de ser neutre i la temperatura de 37°C. Finalment, s'ha de posar la quantitat adequada d'enzim de restricció.

Els enzims es compten per unitats (U). Alguns enzims requereixen sèrum d'albúmina bovina.

En l'exemple:

2 ug lambda (16 uL)

2 uL tampó 10x 0,5 uL BglII (està a 4U/uL) 1,5 uL height20 uL finals

La reacció s'incuba a 37°C a 1,5h.

Un cop s'acaba la digestió, es posa en un gel d'agarosa. Si interessa una banda determinada, es talla i s'extreu i es purifica.

Si només interessa obrir el vector, s'inactiva l'enzim per calor o amb fenol. Si després s'ha de processar el vector amb un altre enzim, es purifica per aclarir les sals del buffer de reacció.

Si es vol digerir el DNA amb 2 enzims que tenen tampons no compatibles, es fan digestions successives.

2.1.3.3 Càlcul d'unitats d'enzims de restricció

Una unitat de l'enzim de restricció X es defineix com la quantitat d'enzim necessari per digerir 100 ng de DNA del fag lambda durant 1h a 37°C. El genoma d'aquest fag conté 5 dianes per l'enzim X distribuïdes al llarg de les 50 kb. Quantes unitats es necessiten per digerir en condicions òptimes i en 1h, 1 ug de DNA de 5kb que conté 10 dianes per aquest enzim?

Si el DNA és més petit, en 1 ug hi haurà més molècules. Per tant, si el DNA que volem digerir és de 5kb necessitem 10 vegades més molècules d'enzim que el del fag. Com que hi ha el doble de dianes, es necessita 2 vegades més enzim, i com que $1\text{ug}/100\text{ ng} = 10$. Es necessiten 200 U de l'enzim per fer aquesta digestió.

2.1.3.4 Mapes de restricció

Mostren la distribució de dianes al llarg d'un fragment de DNA. Es pot aplicar per ubicar gens en un genoma. S'observa en quin fragment hi ha activitat del gen X i observar si el gen està complet i codifica la funció.

Es pot aplicar pel genotipat de certs polimorfismes compresos en la diana d'un enzim. Amplificant el producte per PCR, es pot veure si l'amplímer es talla o no per l'enzim.

Molt sovint, els mapes es fan amb digestions dobles. S'ha de tenir en compte si la molècula és de DNA lineal o circular ja que l'endonucleasa en un DNA lineal genera 2 fragments i en un DNA circular genera 1 fragment lineal.

Problema 1

Un fragment de DNA de 10 kb és digerit per l'E2 i genera dos fragments de 1 i 9 kb. En ser digerit per l'E1 genera 2 fragments de 4 i 6 kb. En quina posició es troben les dianes corresponents a aquests enzims?

El DNA és lineal i cada enzim té 1 diana. Per establir la posició correcta s'ha de fer una doble digestió. Si la doble digestió dóna com a resultat una diana idèntica a una sola digestió, vol dir que el fragment no presenta la diana de l'altre enzim.

2.1.3.4.1 Problema 2

El DNA del fag lambda s'ha tallat amb diferents nucleases.

Tenir en compte que el DNA del fag lambda és lineal.

S'escull primer la endonucleasa que té un únic punt de tall.

A vegades, l'ordre dels fragments es pot determinar amb digestions parcials; és a dir que l'endonucleasa no talli en totes les seves dianes. La digestió es pot limitar amb menys unitats d'enzim o menys temps de reacció.

2.2 Enzims modificadors d'àcids nucleics

Són enzims que introdueixen o treuen grups químics als àcids nucleics.

- **Fosfatasa alcalina:** Treu el grup fosfat a 5' de DNA o RNA. Deixa les molècules amb un extrem 5'-OH i així els enllaços fosfodièster no es poden regenerar.
- **Polinucleotidil quinasa:** Afegeixen fosfats a extrem 5'-OH a RNA i DNA.

La **deoxinucleotidil transferasa terminal** afegeix dNTP sense copiar cap motlle a un extrem 3'-OH. Actua en ssDNA i dsDNA. No es pot controlar la longitud. És dependent de Mn o Mg.

2.3 Unió de molècules de DNA. Lligases

Permeten unir 2 fragments de DNA amb extrems compatibles (roms o protuberants) o reparar ruptures dels enllaços fosfodièster entre nucleòtids adjacents. Si falta algun nucleòtid la lligasa no pot actuar.

La unió de fragments amb extrems protuberants és més senzill per la presència de complementarietat de bases.

2.3.1 Mecanisme d'acció de la lligasa

1. Adenilació de la DNA lligasa: La reacció ha de contenir ATP.
2. Activació del 5'-fosfat.
3. Desplaçament del AMP i connexió de les cadenes.

Els productes resultants d'una lligació poden ser:

- El vector es pot tornar a tancar sobre si mateix, o amb altres vectors. El vector es multiplicarà i es perd eficiència en el clonatge.
- Unió de diversos inserts: Quan es transformin bacteris, els inserts es perdran perquè no tenen punt de replicació...
- Unió de diversos inserts al vector
- Unió de l'insert al vector

Per evitar la recircularització del vector, es pot tractar el vector amb fosfatasa alcalina i l'insert es tracta amb polinucleotidil quinasa i així la lligació és específica. S'introdueix l'insert dins el vector. Es restableix l'enllaç fosfodièster en 2 punts i els punts on no hi ha enllaç es reparen a la cèl·lula hoste.

- **Lligació de fragments amb extrems idèntics:** L'insert es pot col·locar en 2 direccions. Això és interessant per dirigir l'expressió en funció de cadena + o -. Pot ser que el vector es tanqui sobre si mateix quan es tracta amb la lligasa, que es pot evitar utilitzant una fosfatasa alcalina.
- **Lligació de fragments idèntics amb extrems diferents:** Per forçar que l'insert es col·loqui en una direcció determinada es fan servir enzims de restricció diferents per generar els extrems cohesius, de manera que el vector no es tancarà sobre si mateix. L'insert s'ha de generar de la mateixa manera.

Els extrems es poden alterar:

- **Transformació d'extrems cohesius en roms:** Amb la utilització de polimerases o de nucleases com la S1. Només es poden utilitzar polimerases quan hi ha un extrem protuberant 5' (que tingui un 3'-OH lliure).
- **Transformació d'extrems roms en cohesius:**
 - Connectors: oligos de dsDNA que tenen la diana que per l'enzim que interressi. Un cop es generi el fragment d'interès, es lliguen els connectors al fragment i es digereix la construcció amb l'enzim que ens interressi.
 - Adaptadors: Són fragments amb el un extrem rom i un altre protuberant. Es tracta el fragment i l'adaptador amb lligasa i es posa polinucleotid quinasa per generar un 5'-fosfat.
 - Generació d'homopolímers: S'afegeix un dNTP concret i la deoxinucleotid transferasa terminal i afegeix una cua de poliN. El vector ha de tenir cues complementàries a les del nostre fragment. Es posa una polimerasa per reparar els nicks i finalment amb lligasa per clonar el fragment.

2.4 Polimerases

Hi ha 2 grups de polimerases:

- DNA polimerases
 - DNA dependents
 - RNA dependents
- RNA polimerases
 - DNA dependents

– RNA dependents

Les polimerases són enzims que generen material genètic de nou a partir d'un motlle de RNA o DNA. La polimerasa necessita dNTP o NTP, que es col·loquen a l'extrem 3'-OH. De manera natural, el 3'-OH d'una cadena motlle no té extrems 3'-OH lliures. Per suplir això, es necessiten una parella de primers.

2.4.1 DNA polimerases

2.4.1.1 DNA polimerasa I

L'activitat primària és l'activitat polimerasa 5'→3' i requereix Mg²⁺ i dNTP. Una altra activitat primària és l'activitat exonucleasa 5'→3'. Actua sobre dsDNA amb primer o amb dsDNA amb gaps. Quan omple un gap, després actua com a exonucleasa i allibera la cadena de nucleòtids fins al final de 3'. La utilitat d'això és incloure nucleòtids marcats, p.e.

Com a activitat secundària és una exonucleasa 3'→5', pel que pot fer perillar la integritat dels primers. Aquesta activitat és *proofreading* i serveix per corregir errors.

Té activitat RNasaH, però és molt baixa.

S'han generat formes de la DNA polimerasa I sense activitat exonucleasa 5'→3' i amb activitat exonucleasa 3'→5' molt reduïda, i s'anomena Klenow. Amb aquest enzim modificat, es poden transformar extrems protuberants en roms. Un fragment de DNA amb 5'-protuberant, la cadena complementària fa de primer.

2.4.1.2 DNA polimerasa del bacteriòfag T4

Té activitat polimerasa 5'→3' i requereix Mg²⁺ i dNTP. Té activitat exonucleasa 3'→5' molt activa. Serveix per eliminar extrems 3' protuberants i transformar-los en roms.

2.4.1.3 DNA polimerasa del bacteriòfag T7

Té un temps d'inactivació molt alt, el que permet la síntesi de fragments llargs. Té activitat polimerasa 5'→3' i requereix Mg²⁺ i dNTP. Té activitat exonucleasa 3'→5' molt activa.

2.4.1.4 Secuenasa

Modificació de la DNA polimerasa del bacteriòfag T7; sense activitat exonucleasa 3'→5'. S'usa en reaccions de seqüenciació.

Aquestes polimerases tenen una temperatura òptima de 37°C.

2.4.1.5 DNA polimerases termoestables

Actuen a temperatures elevades (60°C), pel que s'evita la inactivació quan es desnatura l'tza el DNA. S'han aïllat de termòfils.

Tenen activitat polimerasa 5'→3' termoestable. No totes tenen activitat *proofreading*. La Taq tendeix a fer errors de síntesi ja que no té aquesta activitat.

PCR

S'ha de conèixer o bé la seqüència diana o les zones flanquejants per poder dissenyar els encebadors. Hi ha 3 etapes:

1. Desnaturalització del DNA a 95°C
2. Hibridació (*annealing*) dels primers a una temperatura d'hibridació correcta.
3. Extensió

Si això es fa n vegades, s'aconsegueixen fragments de la mateixa mida. Això permet la obtenció d'una gran quantitat d'un fragment de DNA d'interès.

2.4.1.6 Transcriptasa inversa

Té activitat polimerasa 5'→3' i requereix Mg²⁺ i dNTP. El substrat és RNA. Necessita un encebador. Algunes tenen activitat RNasaH.

La transcripció inversa de mRNA és una reacció per obtenir una lliberia de cDNA. Es mescla mRNA amb transcriptasa inversa i oligos de dT que actuaran com a primers. Això generarà una 1ra cadena de DNA. Amb una RNasaH s'elimina el RNA i una DNA polimerasa DNA dependent per sintetitzar la 2na cadena. La nucleasa S1 elimina els loops de DNA simple i així es pot lligar el cDNA a un vector.

2.4.2 RNA polimerases

Tenen activitat RNA polimerasa 5'→3' a partir de dsDNA amb promotors. Requereix Mg²⁺ i rNTP. Es genera mRNA.

Hi ha promotors usats en enginyeria genètica que reconeixen polimerases per millorar l'expressió. Si en un vector d'expressió, es clona un gen *downstream* d'un d'aquests promotors i es transfecta en un organisme que tingui polimerases que reconeguin aquests promotors i aconseguir una elevada expressió d'aquest gen. Els vectors poden acceptar gens en ambdues direccions o promotors que duguin gens en diferents direccions.

3. Seminari. Aplicacions de la PCR

3.1 Bases de la PCR

Hi ha 3 fites històriques de la biologia molecular:

1. Descobriments dels enzims de restricció
2. Desenvolupament de la PCR
3. CRISPR/Cas9

La PCR es basa en l'amplificació d'un fragment de DNA a partir d'uns primers perquè la polimerasa copiï la cadena motlle. Per a què els primers s'hibridin, fa falta que el DNA estigui desnaturalitzat.

La idea de la PCR és repetir diverses vegades el cicle. Així, el DNA s'amplifica de manera exponencial. El problema de la PCR era l'ús de polimerases termoestables que resisteixin les temperatures de desnaturalització.

Programa típic de PCR:

- 1 min 90°C desnaturalització
- 1 min 50-60°C hibridació
- 70°C extensió

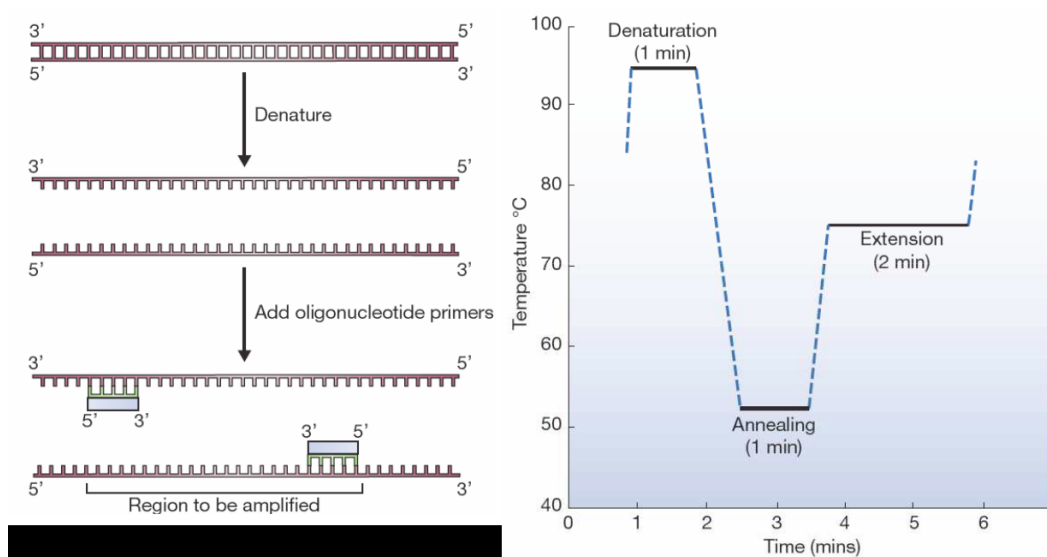


FIGURA 3: Esquema d'un cicle bàsic de PCR

3.1.1 Temperatura d'hibridació

La situació ideal és que els primers només hibridin en les dianes esperades. Pot passar que els primers no hibridin enlloc o que hibridin en llocs no esperats. Aquests fenòmens es controlen amb la temperatura d'hibridació.

La T_m es calcula com:

$$T_m = 4 \cdot (G/C) + 2 \cdot (A/T) \quad (1)$$

La temperatura d'hibridació es calcula com a 10°C per sota la T_m . Aquesta fórmula només s'utilitza per primers de PCR, no per sondes de Southern Blot, p.e. La longitud dels primers és d'uns 20 nt.

Les claus pel desenvolupament de la PCR han estat:

- Polimerases termoestables
- Termocicladors

Els pros i contres de la PCR són:

- Capacitat d'amplificació exponencial
- Contaminacions creuades freqüents
- Disseny a mida de seqüències de DNA
- Baixa fidelitat de la Taq DNA polimerasa (no té activitat *proofreading*)
- No amplifica RNA

Per compensar la baixa fidelitat de la Taq polimerasa, es poden fer servir polimerases d'alta fidelitat (que tenen activitat exonucleasa 3'→5').

Per amplificar el RNA es fa una reacció amb una retrotranscriptasa per obtenir un cDNA. La retrotranscriptasa és un enzim molt sensible i s'inhibeix molt fàcilment.

3.2 Aplicacions de la PCR i RT-PCR

3.2.1 Clonatge

La via clàssica del clonatge és l'ús d'enzims de restricció i lligases per introduir un gen en un vector. Moltes vegades, per aïllar el gen no es poden fer servir els enzims de restricció per obrir el vector.

Per solucionar això, es fa una PCR amb primers homòlegs al gen de 15nt i que incorporin les dianes de restricció que ens interessin. Per facilitar que la regió no homòloga hibridi, es baixa la temperatura d'hibridació al primer cicle. Després del primer cicle, es pot tornar a una temperatura d'hibridació restrictiva.

Pel clonatge s'usen polimerases termoestables d'alta fidelitat.

3.2.2 Mutagènesi dirigida

El procés, en primer lloc, requereix un primer que contingui la mutació. El primer ha d'hibridar amb la molècula simple (unicatenaria) de DNA que conté el gen d'interès. La DNA polimerasa allarga la cadena incorporant la mutació al DNA.

Aquesta tècnica no només fa possible crear mutacions puntuals en una molècula de DNA, sinó que també es poden produir deleccions i insercions. S'aconsegueix controlar el tipus de mutació que es pretén realitzar en el DNA modificant el primer. Per a les deleccions s'utilitzen primers que continguin la deleció però que tinguin la capacitat d'hibridació en la cadena de DNA en el lloc correcte; per contra, per a una inserció el primer haurà de portar el fragment extra de DNA a més d'hibridar correctament amb la cadena motlle.

Per realitzar mutagènesi dirigida, es pot utilitzar la PCR. Generalment, se solen utilitzar 4 primers: dos d'ells presenten la mutació; i els altres dos únicament s'utilitzen per amplificar la cadena. Ja que amb la PCR obtindrem una amplificació exponencial, el fragment mutat s'amplificarà de tal manera que superarà majoritàriament al nombre de cadenes normals sense la mutació. Després de la PCR, podem menysprear el nombre de cadenes de DNA normals en comparació amb les que han estat mutadas.

3.2.3 Diagnòstic

Per confirmar els productes de PCR i evitar falsos positius i falsos negatius:

- **Hibridació d'una sonda interna:** Southern Blot
- **nested PCR i semi-nested PCR:** Procés d'amplificació complementari a la PCR convencional. No és més que un segon procés d'amplificació partint del producte d'una PCR inicial. Incrementa la sensibilitat del procés global (detecció de fins a un genoma per reacció). Actua com a confirmació del resultat de la PCR inicial. Requereix el producte d'una PCR inicial i nous reactius. Els iniciadors són seqüències internes al fragment amplificat en la PCR inicial. Les condicions poden variar respecte a la PCR inicial. Una variant utilitza un iniciador nou i un utilitzat també en la primera PCR (PCR semianiuada).
- **Seqüenciació**

La RT-qPCR (RealTime PCR) permet quantificar el RNA/DNA. Es va desenvolupar per controlar l'eficàcia dels antivirals en pacients amb hepatitis C. Sistema per detectar a temps real els productes de PCR a mesura que es van acumulant. Així, quan més alt és el nombre inicial de còpies de l'àcid nucleic diana, abans es produeix un increment significatiu en la fluorescència observada.

El paràmetre CQ o CT (threshold cycle o cicle llindar) és el cicle en el qual la fluorescència emesa supera un nivell establert de fluorescència base.

La detecció del amplificat es fa per diversos mecanismes de fluorescència. Els sistemes més comunament utilitzats es basen en l'acumulació de fluorescència que pot relacionar-se amb la quantitat de producte de PCR generat.

Els mètodes poden ser:

- **No específics:** molècules de fluoròfor que s'uneixen a l'ADN, com el SYBR green I, i que emeten fluorescència quan s'intercalen a l'ADN de doble cadena exposat a una determinada longitud d'ona.

Associació d'aquests compostos amb dímers de iniciadors o amb altres productes d'amplificació no específics donant lloc a confusions en la interpretació dels resultats. Aquest problema pot solucionar-se afegint un període curt d'incubació a alta temperatura després de la fase d'elongació.

- **Específics:** com el basat en l'activitat 5'- exonucleasa de la Taq polimerasa (sondes TaqMan™).

Utilitza els components clàssics d'una reacció de PCR, i una sonda amb un fluoròfor a l'extrem 5' i un compost bloquejador de fluorescència en l'extrem 3' (quencher).

L'ús d'una sonda complementària a la seqüència buscada incrementa l'especificitat del procés.

Si la sonda aquesta intacta, la proximitat del compost bloquejador redueix la fluorescència emesa pel fluoròfor mitjançant un procés de transmissió d'energia de ressonància.

Quan la seqüència diana aquesta present, la sonda se li uneix en posició 3' respecte al lloc d'unió d'un dels iniciadors i és tallada per l'activitat 5' nucleasa de la Taq ADN polimerasa quan es dona l'extensió de l'iniciador. Aquest tall en la sonda separa el fluoròfor del compost bloquejador de manera que augmenta la senyal de fluorescència. A cada cicle es repeteix el procés, fet que augmenta la fluorescència de forma proporcional a la quantitat de amplicó produït.

Control de qualitat de PCR

Els controls positius i negatius apropiats són una part integral de qualsevol prova de laboratori. L'ús d'assajos de PCR (RT) ha augmentat ràpidament en els últims anys i els laboratoris s'han adaptat a l'aplicació d'aquestes tècniques d'organització ubicacions separades per a les diverses etapes en el procés de l'anàlisi.

En general, el major risc és per resultats falsos positius en els assajos de PCR, més comunament resulten de la contaminació amb productes d'ADN amplificats. Les mesures utilitzades per prevenir la contaminació i al seguiment acurat de la seva ocurrència mitjançant l'ús de múltiples controls negatius s'accentuen en la majoria dels papers. Així mateix, els resultats falsos negatius poden presentar un problema en una tècnica altament sensible com RT-PCR i això sembla ser reconegut en menor mesura.

- **Controls negatius:** Evita falsos positius.
- **Controls positius:** Control de l'extracció d'àcids nucleics i de la retrotranscriptasa-Taq Polimerasa.

II. CLONATGE

III. CARACTERITZACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

IV. APLICACIONES DE L'ENGINYERIA GENÈTICA
