
ENGINYERIA GENÈTICA



CIÈNCIES BIOMÈDIQUES UB - PRIMAVERA 2017

ALBERT TORELLÓ PÉREZ

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 — 7 • Purificació del genoma de bacteriòfags — 9 • Aïllament de RNA — 10 • Electroforesi d'àcids nucleics — 11 • Quantificació de material genètic — 13	
2	Enzims per la manipulació dels àcids nucleics	15
	Fragmentació d'àcids nucleics — 15 • Enzims modificadors d'àcids nucleics — 22 • Unió de molècules de DNA. Lligases — 22 • Polimerases — 23	
3	Estudi de la seqüència d'àcids nucleics. Marcatge	27
	Marcatge uniforme — 27 • Marcatge d'extrems — 28 • Sondes — 28	
II	CLONATGE	30
4	Clonatge. Cloning PCR	30
	PCR per clonar — 30 • Clonatge en vectors — 31	
5	Vectors de clonatge	33
	Requisits dels vectors de clonatge — 33 • Manipulació de plàsmids — 33 • Vectors d'expressió — 36 • Vectors derivats del fag λ — 37	
6	Genoteques	42
	Llibreries genòmiques — 42 • Llibreries de cDNA — 42 • Estratègies de selecció dels clons recombinants — 42	
III	CARACTERITZACIÓ DELS PRODUCTES D'EXPRESSIÓ	44
7	Caracterització de l'expressió gènica: RNA	45
	Southern Blot — 45 • Northern Blot — 46 • Reverse Transcriptase PCR — 47 • Hibridació <i>in situ</i> — 47 • Microxips — 48 • Estudi de promotors i zones reguladores — 48	
8	Caracterització de l'expressió gènica: proteïnes	51
	Extracció de proteïnes — 51 • Purificació de proteïnes — 52 • Electroforesi i isoelectroenfoque — 53 • Proteòmica — 54 • Western Blot — 54 • Dot Blot — 56 • ELISA — 56 • Immunodetecció <i>in situ</i> — 56 • Microxips — 58	
IV	APLICACIONS DE L'ENGINYERIA GENÈTICA	60

V	SEMINARIS	61
9	Seminari. Aplicacions de la PCR	61
	Bases de la PCR — 61 • Aplicacions de la PCR i RT-PCR — 62	
10	Seminari. Seqüenciació	66
	Mètodes de seqüenciació — 66 • Seqüenciació de genomes — 67 • Nous sistemes de seqüenciació — 68	
11	Vectors d'eucariotes	69
	Vectors de llevats — 69 • YAC — 69 • Vectors per plantes — 72 • Vectors per mamífers — 72	

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

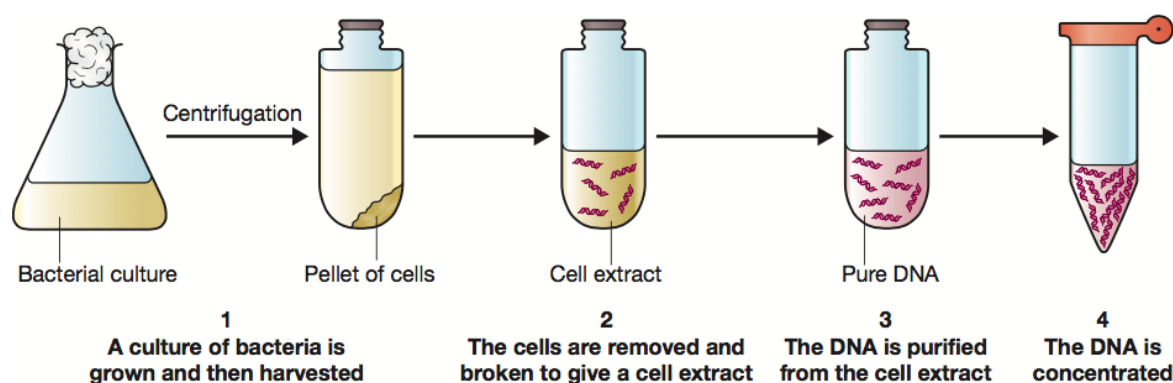


FIGURA 1: Passos bàsics per la preparació del DNA total d'un cultiu bacterià

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. 1 unitat de DO correspon aproximadament a $0.8 \cdot 10^9 \text{ cells/mL}$.

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

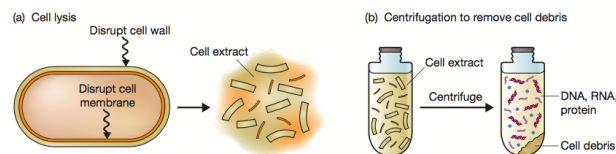
1.2.1.2 Ruptura de les cèl·lules

Els bacteris tenen una membrana plasmàtica envoltada per una paret cel·lular rígida. En algunes espècies, com *E. coli*, la paret cel·lular pot estar envoltada per una segona membrana. Aquestes barreres s'han de trencar per alliberar el DNA.

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.

La lisi química implica un agent disruptor de la paret cel·lular i un altre de la membrana plasmàtica. Els productes que s'utilitzen depenen de l'espècie bacteriana implicada, però amb *E. coli* s'utilitza lisozima i EDTA per trencar la paret cel·lular. La lisozima és un enzim present a la clara d'ou i en secrecions com les llàgrimes i la saliva, que digereix la paret de mureïna. L'EDTA és un quelant d'ions divalents (Mg^{2+}), que són imprescindibles per l'estructura de la paret i també inhibeix enzims cel·lulars que degraden DNA. Sota aquestes condicions, el debilitament de la paret cel·lular amb lisozima i EDTA és suficient per lisar els bacteris, però usualment s'afegeix un detergent fort com el SDS. Els detergents dissolen 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.



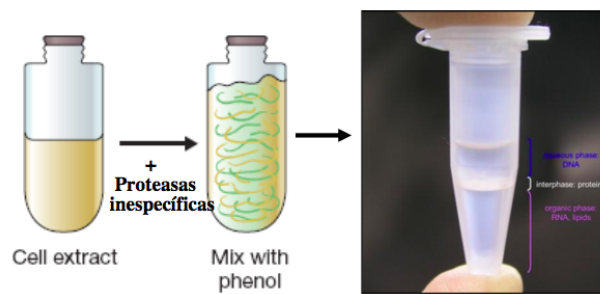
1.2.1.3 Purificació del DNA

El lisat bacterià conté quantitats significatives de proteïnes i RNA. Un mètode és tractar el lisat amb enzims que degradin els contaminants o usar una cromatografia d'intercanvi iònic per separar el lisat en els seus components i poder purificar el DNA.

1.2.1.3.1 Extracció orgànica i digestió enzimàtica

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.



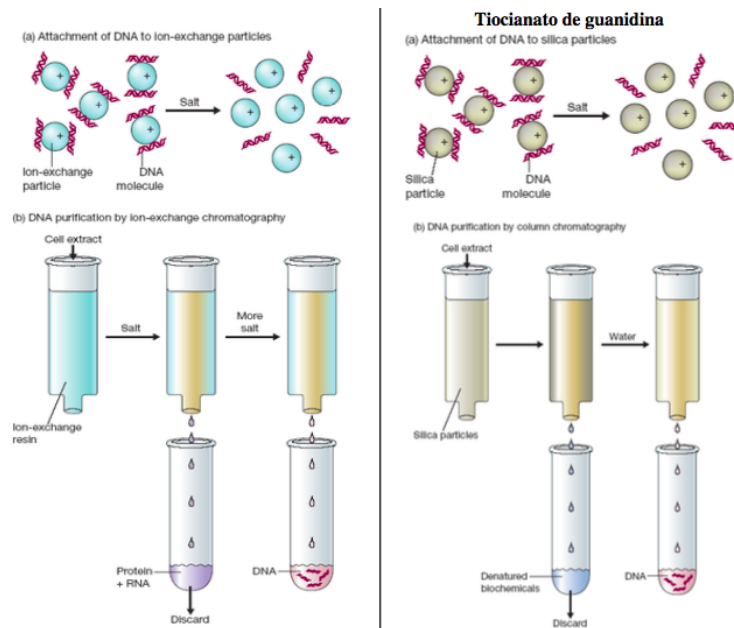
A la fase aquosa hi poden quedar traces de fenol, que inhibeix la majoria d'enzims. Llavors s'afegeix fenol amb cloroform equilibrat (25:24:1 fenol cloroform isoamilalcohol), s'agita per inversió, es centrifuga. El cloroform arrossega el fenol al fons del tub.

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.

1.2.1.3.2 Cromatografia d'intercanvi iònic

Aquest mètode separa les molècules en funció de la força en què s'uneixen a partícules carregades elèctricament presents en una matriu o resina. El DNA (carregat negativament) i s'uneix a la resina carregada. La unió electrostàtica es pot desfer per l'addició de sals.

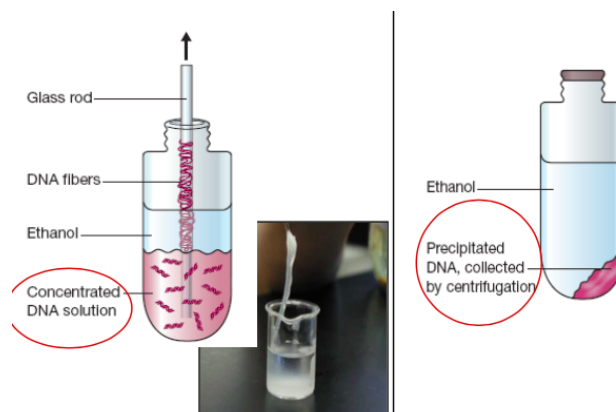
La forma més senzilla de dur a terme la cromatografia d'intercanvi iònic és col·locar la resina en una columna de vidre o de plàstic i després afegir l'extracte de cèl·lules a la part superior. L'extracte passa a través de la columna, i perquè aquest extracte conté molt poca sal totes les molècules carregades negativament s'uneixen a la resina i es retenen a la columna. Si una solució de sal d'augmentar gradualment la concentració és ara passar a través de la columna, els diferents tipus de molècula es eluir (és a dir, convertit en no unit) de manera seqüencial proteïna, RNA, i finalment el DNA. No obstant això, tal separació acurada en general no es necessita tan sols dues solucions de sal es fan servir, un la concentració és suficient per eluir la proteïna i el RNA, deixant només el DNA unit, seguit d'una segona d'una concentració més alta que s'elueix el DNA, ara lliure de les proteïnes i de RNA contaminants.



1.2.1.4 Concentració del DNA

Hi ha 2 mètodes basats en la precipitació per etanol:

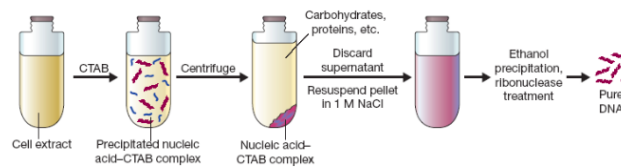
- Si hi ha molt volum; la precipitació es fa per sals+etanol. S'afegeix 2,5 volums d'etanol absolut fred a -20°C i s'introdueix una vareta de vidre i es remena tot rotant la vareta. Quan el DNA s'uneix a la vareta, s'introdueix en un tub amb buffer TE i es gira la vareta en sentit contrari.
- Si el volum 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 %.

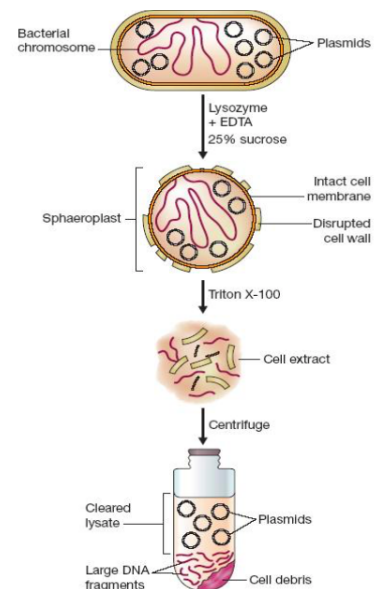


1.3 Purificació del DNA plasmídic

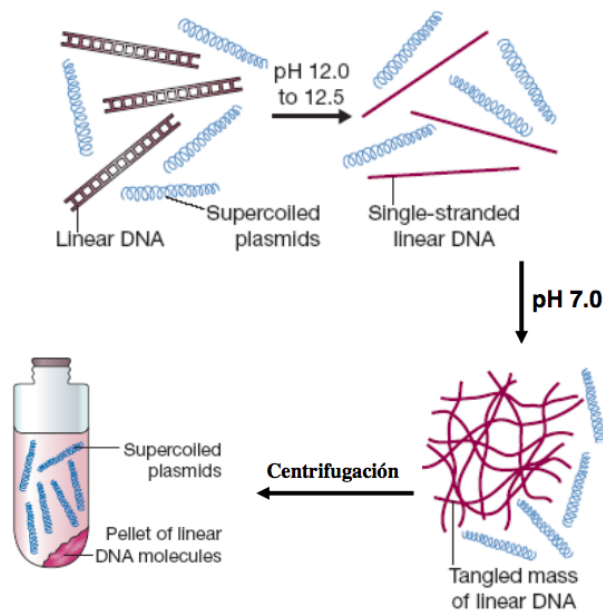
Els plàsmids són molècules de DNA circulars de doble cadena i de menor mida que un genoma. Té un origen de replicació propi. Els plàsmids codifiquen funcions no essencials pel bacteri però sí que proporcionen avantatges (resistència a antibiòtics).

La lisi busca conservar el DNA genòmic el més intacte possible. Es basa en lizozima, 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.



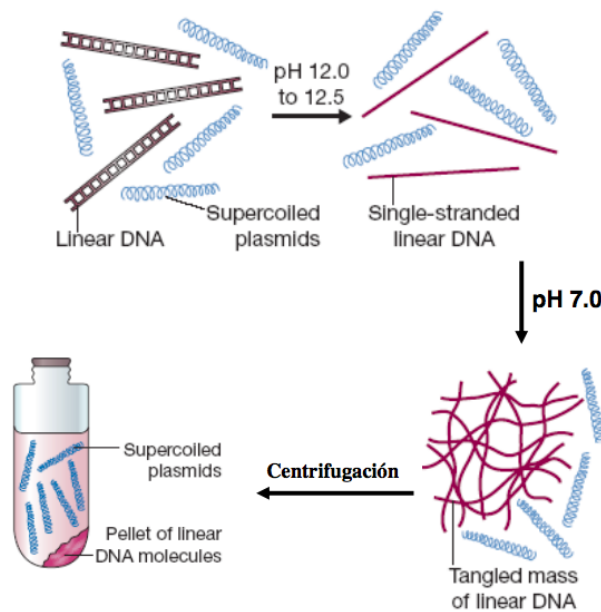
- **Desnaturalització alcalina:** És el mètode Birnboim. S'afegeix NaOH per desnaturalitzar dsDNA lineal (cromosoma bacterià). Seguidament, es provoca una renaturalització ràpida afegint NaAc, com que la complementarietat no és exacta la renaturalització provoca una estructura en forma de malla amb proteïnes 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.

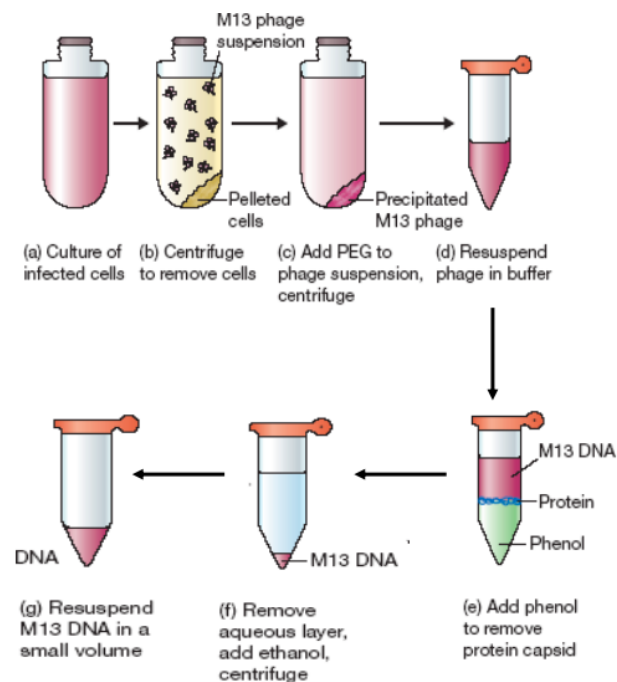
En primer lloc, s'han d'infectar els bacteris, induir el cicle lític i quan el cultiu esdevingui clar, es lisen amb cloroform. Es centrifuga el cultiu i al sobrenedant queden els fags i restes bacterianes. Per purificar les partícules fàgiques es pot fer per 2 procediments:

- **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 desproteïnitza 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 2: 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.

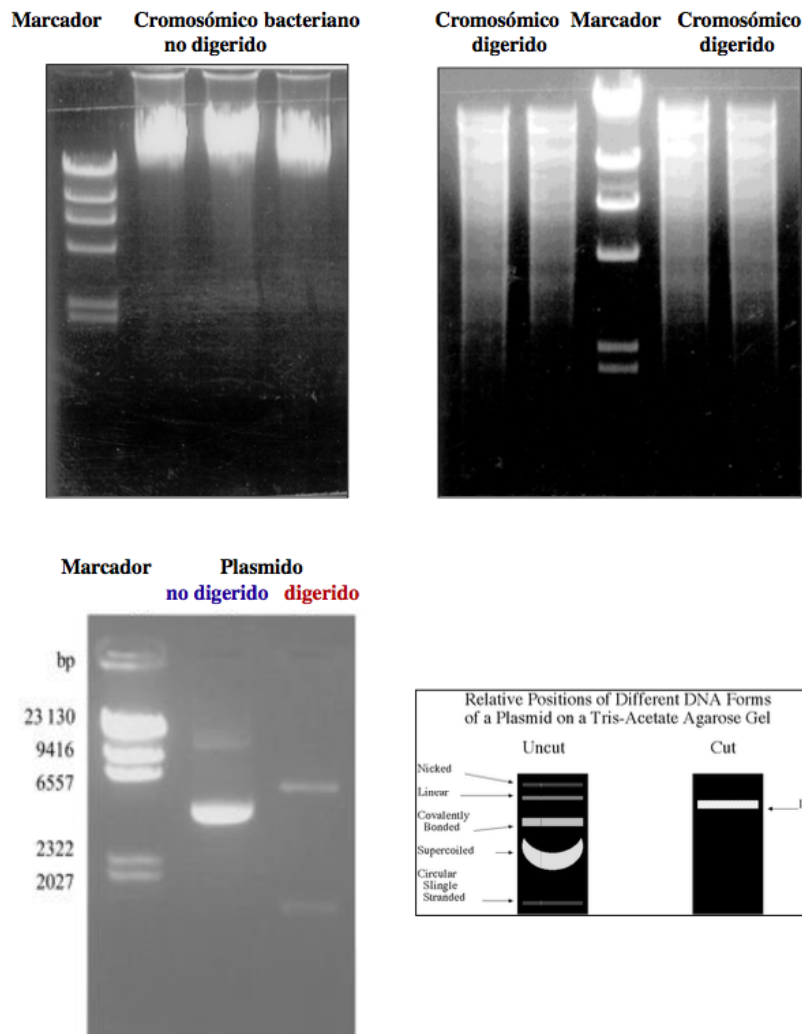


FIGURA 3: Visualització d'un cromosoma bacterià en un gel d'agarosa

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 μ L 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 μ g de DNA:

- 1 unitat d'absorbància a 260 nm = 50 μ g/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 desnatura 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:

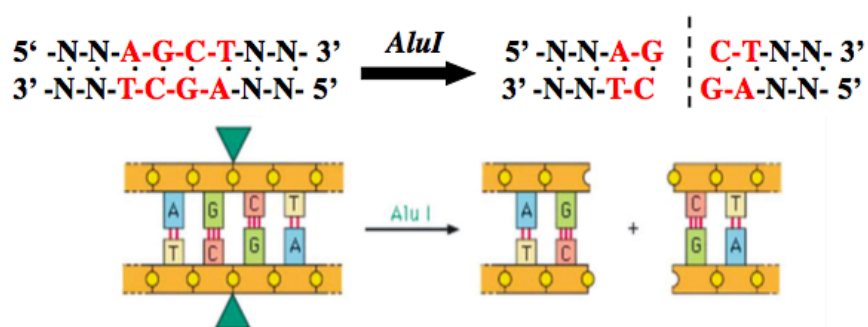
	Tipus I	Tipus II	Tipus III
Estructura/Funció	Únic, enzim multifuncional amb 3 subunitats diferents per unió, metilació i tall	Enzims separats per activitat endonucleasa i activitat de metilació	Enzim oligomèric amb activitat endonucleasa i metilasa que comparteixen una subunitat comú
Lloc de reconeixement	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.

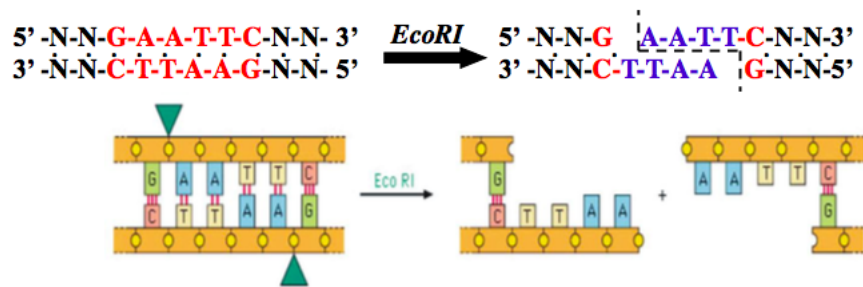
Els enzims de restricció poden generar 2 tipus d'extrems a les cadenes de DNA:

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

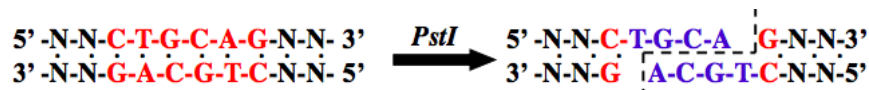


- **Extrems cohesius o protuberants:**

– 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 λ (16 uL)
2 uL tampó 10x
0,5 uL BglII (està a 4U/uL)
1,5 uL
<hr/>
20 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

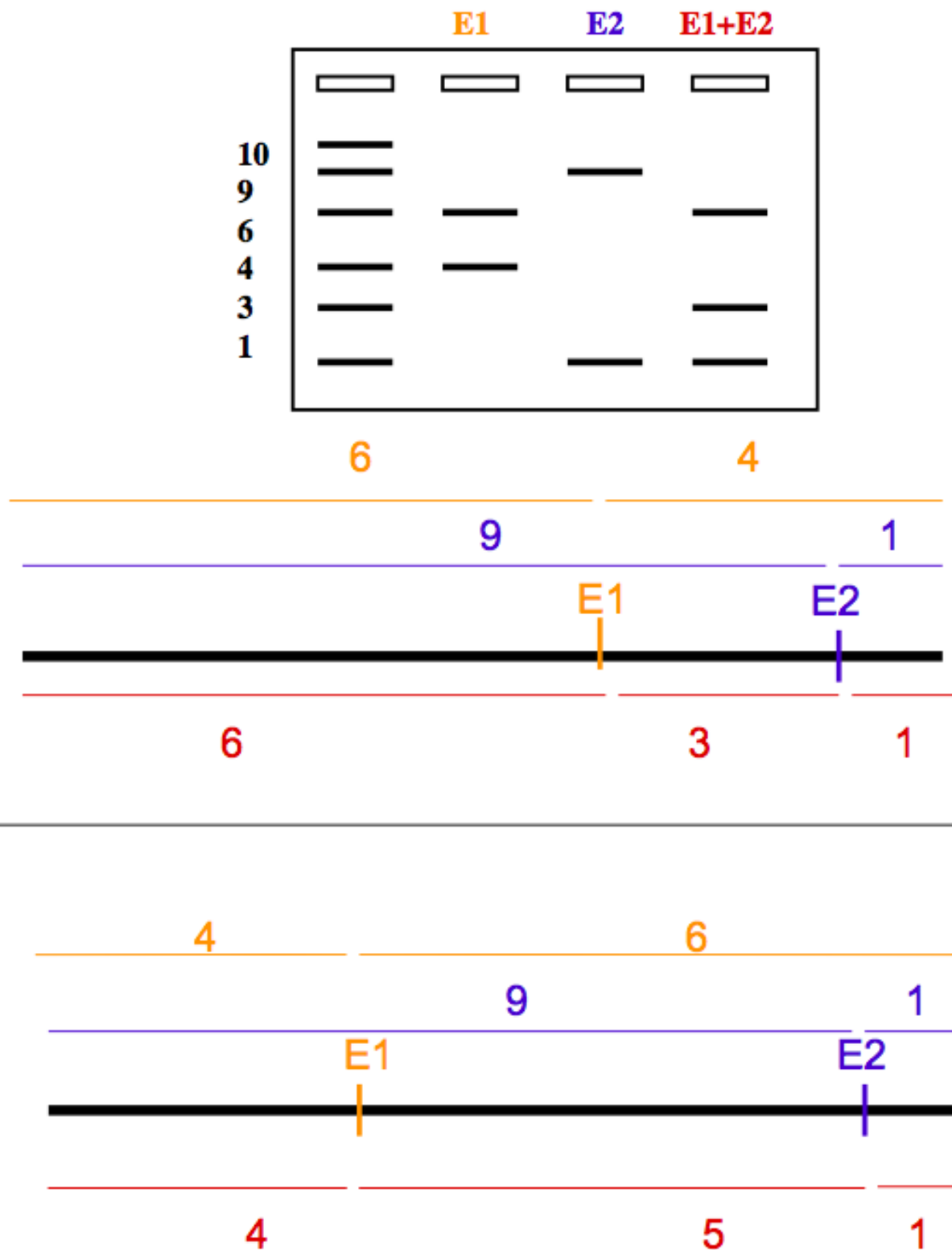
Mostren la distribució de dianes al llarg d'un fragment de DNA. Es pot aplicar per ubicar gens en un genoma. S'observa en quin fragment hi ha activitat del gen X i observar si el gen està complet i codifica la funció.

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.

Single and double digestions

Enzyme	Number of fragments	Sizes (kb)
XbaI	2	24.0, 24.5
XhoI	2	15.0, 33.5
KpnI	3	1.5, 17.0, 30.0
XbaI + XhoI	3	9.0, 15.0, 24.5
XbaI + KpnI	4	1.5, 6.0, 17.0, 24.0

Conclusions:

(1) As λ DNA is linear, the number of restriction sites for each enzyme is XbaI 1, XhoI 1, KpnI 2.

(2) The XbaI and XhoI sites can be mapped:



The only possibility is:

15.0, 9.0, 24.5

(3) All the KpnI sites fall in the 24.5 kb XbaI fragment, as the 24.0 kb fragment is intact after XbaI-KpnI double digestion. The order of the KpnI fragments can be determined only by partial digestion.

Partial digestion

Enzyme	Fragment sizes (kb)
KpnI – limiting conditions	1.5, 17.0, 18.5, 30.0, 31.5, 48.5

Conclusions:

(1) 48.5 kb fragment = uncut λ .

(2) 1.5, 17.0 and 30.0 kb fragments are products of complete digestion.

(3) 18.5 and 31.5 kb fragments are products of partial digestion.

The KpnI map must be:

30.0, 1.5, 17.0

Therefore the complete map is:

15.0, 9.0, 6.0, 1.5, 17.0

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 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.

TABLE 2.1: Thermostable DNA polymerases and their sources							
DNA polymerase	Natural/recombinant		Source				
Taq	Natural		<i>Thermus aquaticus</i>				
Amplitaq [®]	Recombinant		<i>T. aquaticus</i>				
Amplitaq [®] (Stoffel fragment)	Recombinant		<i>T. aquaticus</i>				
Hot Tub [™]	Natural		<i>Thermus flavus</i>				
Pyrostate [™]	Natural		<i>T. flavus</i>				
Vent [™]	Recombinant		<i>Thermococcus litoralis</i>				
DeepVent [™]	Recombinant		<i>Pyrococcus</i> GB-D				
Tth	Recombinant		<i>Thermus thermophilus</i>				
Pfu	Natural		<i>Pyrococcus furiosus</i>				
UITma [™]	Recombinant		<i>Thermotoga maritima</i>				

	Taq/ Amplitaq[®]	Stoffel fragment	Vent[™]	Deep- Vent[™]	Pfu	Tth	UITma[™]
Thermostability - half-life at 95°C (min)	40	80	400	1380	> 120	20	> 50 ^b
5'→3' exonuclease activity	Yes	No	No	No	No	Yes	No
3'→5' exonuclease activity	No	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes
Processivity	50–60	5–10	7	n.i.	n.i.	30–40	n.i.
Extension rate (nt/sec)	75	> 50	> 80	n.i.	60	> 33	n.i.
Reverse transcriptase activity	Weak	Weak	n.i.	n.i.	n.i.	Yes	n.i.
Resulting DNA ends	3' A	3' A	> 95% blunt	> 95% blunt	n.i.	3' A	Blunt
Strand displacement	n.i.	n.i.	Yes ^a	Yes ^a	n.i.	n.i.	n.i.
Molecular weight (kDa)	94	61	n.i.	n.i.	92	94	70

Both Vent and Pfu are also available in an exonuclease minus (exo⁻) form.
^a Strand displacement is temperature dependent.
^b Measured at 97.5°C.
n.i. No information.

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. Estudi de la seqüència d'àcids nucleics.

Marcatge

Hi ha 2 mètodes principals:

1. Marcatge uniforme: La marca és uniforme al llarg de la seqüència d'àcids nucleics.
2. Marcatge d'extrems

3.1 Marcatge uniforme

Es pot fer:

- **Radioactivitat:** amb ^{32}P . Els NTP tenen 3 grups fosfat (gamma, beta, alfa). Quan el NTP s'incorpora en una cadena d'àcids nucleics només queda l'alfa. Per tant, la marca s'ha de situa en alfa.
- **Sense radioactivitat:** La marca s'introdueix a un C de les bases nitrogenades. El més utilitzat és UTP. Una marca habitual és la biotina (amb afinitat per l'estrepto-vidina), la digoxigenina (detecció amb anticossos) i Alexa (fluorescent).

3.1.1 Introducció de marques

1. **Nick translation:** Marcar DNA de doble cadena. Es tracta el DNA amb DNasa I. S'usa una polimerasa que tingui activitat exonucleasa $5' \rightarrow 3'$, com la DNA polimerasa I en forma d'holoenzim (completa).
2. **Primer extension:** Es pot marcar tant DNA doble com simple. Es desnaturalitza el DNA (si és doble). S'utilitzen primers a l'atzar, que són seqüències aleatòries de 6-8 nt que s'uniran a diferents punts de la cadena de DNA.

Es pot fer per PCR de manera que s'obté gran quantitat de DNA marcat. El mix de dNTP té un d'ells marcat.

En la RT-PCR, es poden usar primers específics o no per retrotranscriure el RNA. Es degrada el RNA amb RNasa H. S'afegeix una DNA polimerasa i dNTP marcats i es fa una PCR normal.

Per fer una **sonda RNA**, s'usa un vector d'expressió on hi ha clonat el gen del qual volem el mRNA. Es clona el gen d'interès en un plàsmid amb promotors forts en la direcció que interressi. Es linearitza el plàsmid sense malmetre ni el gen ni el promotor. Després es fa una reacció amb una RNA polimerasa i rNTP marcats. Per purificar els productes d'expressió, es fa una reacció amb DNasa I i eliminar el DNA.

3.2 Marcatge d'extrems

3.2.1 Marcatge a l'extrem 3'

En funció de si hi ha:

- Si hi ha un **extrem protuberant en 5'**, s'amplifica amb el fragment Klenow i dNTP marcats.
- Si hi ha un **extrem rom o protuberant en 3'**, es fa servir una polimerasa amb activitat 3'->5', com la polimerasa T4.
 - Extrems roms: S'introdueix la polimerasa T4 i NTP que es trobin a l'extrem del fragment que es trobin marcats. La polimerasa actua com a exonucleasa fins que trobi un NTP que pugui col·locar.
 - Extrem 3' protuberant: La polimerasa T4 elimina l'extrem 3' protuberant fins que trobi un nucleòtid que pugui col·locar (que serà el marcat).

3.2.2 Marcatge a l'extrem 5'

S'ha d'usar ATP marcat a gamma. Es fa amb la polinucleotidil quinasa.

- Forward reaction: La fosfatasa alcalina treu el fosfat a 5', i la polinucleotidil quinasa restableix el fosfat, aquest ja marcat.
- Exchange reaction: La polinucleotidil quinasa genera ATP treient el fosfat de 5' i després es posa l'ATP ja marcat amb la polinucleotidil quinasa.

3.3 Sondes

Una sonda és un fragment de DNA o RNA que s'utilitza per detectar la presència de DNA o RNA de seqüència parcial o totalment complementària. Les complementarietats parcials generen híbrids molt inestables.

3.3.1 Dot Blot

En una llibreria amb X colònies, conté un gen d'interès que és similar al mateix gen d'un altre organisme. Es pot generar una sonda a partir del gen d'aquest 2n organisme per detectar quin clon de la llibreria és positiu per aquest gen.

1. La colònia es transmet a una membrana de niló (el niló té càrrega positiva i el DNA negatiu).
2. Es trenquen les colònies i es desnaturalitza el DNA.
3. Unió del DNA a la membrana per exposició a UV o a calor.

-
4. Bloqueig de la membrana per evitar unions inespecífiques.
 5. Desnaturalització de la sonda i aplicació a la membrana.
 6. Rentat de la membrana i revelat de la membrana.

3.3.2 Southern Blot

Es basa en la detecció de seqüències de DNA genòmic o plasmídic.

1. Fragmentació del DNA amb endonucleases + gel d'agarosa
2. Desnaturalització amb tractaments alcalins (NaOH)
3. Transferència a un filtre. El tampó difon pel gel d'agarosa fins al filtre, on arrosega el DNA i el fixa.
4. Bloqueig del filtre i fixa el DNA amb UV.
5. Hibridació de la sonda.

3.3.3 Detecció de sondes

- Sondes radioactives: Detecció per exposició a una pel·lícula de rajos X
- Sondes no radioactives:
 - Detecció directa
 - * Flurocroms: Visualització al microscopi de fluorescència.
 - * Peroxidasa: La sonda marcada amb peroxidasa s'hibrida amb un DNA mostra i es visualitza amb la incubació amb luminol, que en degradar-lo genera luminiscència i exposant-lo a una pel·lícula fotogràfica.
 - Detecció indirecta
 - * Sondes marcades amb digoxigenina: La sonda incorpora una marca de digoxigenina i es revela amb anticossos contra la digoxigenina. Els anticossos poden estar associats a un flurocrom o bé enzims (fosfatasa alcalina) o bé usar anticossos secundaris. La fosfatasa alcalina pot generar productes colorimètrics (BCIP) o quimioluminiscent (dioxetan).
 - * Sondes marcades amb biotina: Es revela amb estreptavidina-avidina marcats amb un flurocrom o un enzim. La senyal és més potent ja que la sonda pot tenir diverses marques de biotina. Aquests sistemes poden ser amplificables mitjançant l'ús d'anticossos anti-avidina amb biotina.

II. CLONATGE

4. Clonatge. Cloning PCR

La unió d'un insert en un vector genera una molècula de DNA recombinant. L'insert pot provenir de:

1. Genoma digerit amb endonucleases
2. Fragments de DNA digerits amb endonucleases
3. cDNA
4. Fragments amplificats per PCR o RT-PCR

4.1 PCR per clonar

En funció de la naturalesa del producte de PCR, es segueixen estratègies diferents:

1. **Extrems roms:** Si el producte de PCR té extrems roms, es pot clonar en un vector obert amb extrems roms o transformar els extrems roms de l'insert en cohesius per lligar-lo en un vector amb extrems cohesius.
2. **Nucleòtid adicional:** La TaqPOL genera un extrem protuberant en 3' amb un A. Llavors es pot clonar en un vector ja preparat amb una T protuberant. L'altra opció és transformar-los en extrems roms amb la nucleasa S1 o la polimerasa T4.
3. **Primers amb diana:**
 - Diana dins el primer: Es dissenyen primers flanquejants del gen que continuïn les dianes de restricció que interessin.
 - Diana en extensió del primer en 5': El gen no conté la diana de restricció adequada per clonar-lo en el vector, llavors s'introdueixen les dianes per PCR.

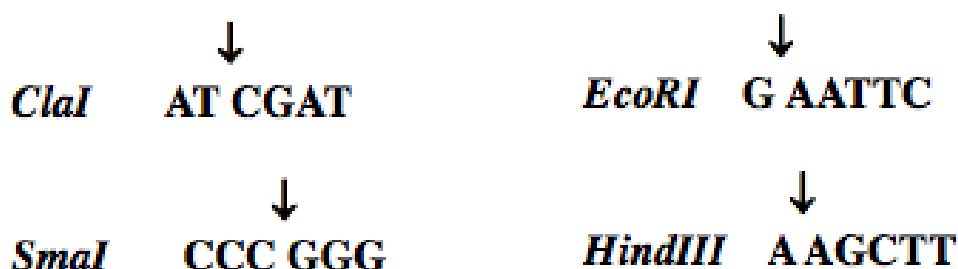
Problema

En la figura es mostra de forma esquemàtica un fragment de DNA del que coneixem la seqüència dels extrems.

5' CGATCCTAGAATAC.....TAACCCGGGAACAA 3'
3' GCTAGGATCTTATG.....ATTGGGCCCTTGT 5'

- a) Dissenya 2 primers per amplificar-la per PCR.

b) Volem amplificar el fragment per inserir-lo a continuació al *polilinker* d'un vector que conté únicament aquestes dianes de restricció:



Dissenya els primers corresponents sense usar ni connectors ni adaptadors.

A) 5' CGATCCTAGAATAC.....3'
5'TTGTTCCCGGGTTA.....3'

5' CGATCCTAGAATAC.....TAACCCGGGAACAA 3'
(.....VLLGGGGGGLLGLLS

5' CGATCCTAGAATAC.....3'
3' GCTAGGATCTTATG.....ATTGGGCCCTTIGTT 5'

B) 5' ATCGATCCTAGAATAC.....3'
5' TTGTT**CCCGGG**TTA.....3'

4.2 Clonatge en vectors

Quan es clona un gen en un vector, poden passar 3 coses:

- Vectors auto-lligats
- Molècula recombinant amb el gen que volem
- Molècules recombinants errònies

4.2.1 Selecció dels transformants

S'usen vectors que continguin gens de resistència a antibiòtics. Quan els bacteris es cultiven en un medi que conté antibiòtics només creixen els bacteris que han incorporat el vector.

4.2.2 Transformació

Hi ha bacteris que tenen transformació natural. El més habitual és induir la transformació mitjançant la generació de cèl·lules competents.

- Cèl·lules competents amb un tractament amb CaCl_2 en fred, el plàsmid s'uneix a la paret, s'incuba a 42°C durant 2 minuts.
- Electroporació: Una descàrrega elèctrica provoca forats a la paret, pel qual entra el plàsmid. Es posen els bacteris en un medi de recuperació.

En cèl·lules eucariotes també hi ha diferents mètodes:

- Transfecció: Es tornen les cèl·lules competents amb CaCl_2 i es precipita el DNA sobre la monocapa de cèl·lules animals. En cèl·lules vegetals, s'ha de degradar la paret de cel·lulosa i fer tornar les cèl·lules competents.
- Lipofecció: El material genètic es posa en contacte amb el material genètic de manera que es formi una vesícula tipus liposoma que contingui el DNA. Es poden en contacte els liposomes amb les cèl·lules a transfectar. El liposoma es fusiona amb la membrana plasmàtica i penetra el material genètic.
- Electroporació
- Microinjecció: S'injecta directament al nucli de la cèl·lula que interressi.
- Microprojectils: Projectils de tungstè recoberts del material genètic. Introducció amb pistoles gèniques.

5. Vectors de clonatge

5.1 Requisits dels vectors de clonatge

Han de tenir les següents característiques:

- Penetrar i mantenir-se a la cèl·lula hoste
- Replicar-se a la cèl·lula hoste: Ha de tenir un origen de replicació adequat per la cèl·lula hoste. El vector es pot integrar de forma episomal o mantenir-se independent com a forma plasmídica.
- Marcador genètic per la seva selecció: Els més utilitzats són els gens de resistència a antibiòtics. Després es suplementa el medi de creixement amb aquest antibiòtic per seleccionar els bacteris que han integrat el plàsmid.

La majoria de vectors són d'origen natural.

Hi ha els següents tipus de vectors:

- Plàsmids
- Genoma de bacteriòfags (incloent els còsmids)
- Vectors per llevats
- Vectors per eucariotes superiors

La capacitat de càrrega d'un plàsmid (mida de l'insert) és de 3-4 kb.

Una característica important són els **grups d'incompatibilitat** dels plàsmids, són plàsmids que tenen el mateix origen de replicació i que no poden coexistir en una cèl·lula hoste. Si es volen clonar 2 gens es pot fer en tàndem en 1 mateix plàsmid o en 2 plàsmids amb orígens de replicació diferents.

Hi poden haver diferents còpies del plàsmid en una mateixa cèl·lula: hi ha plàsmids *high copy* o *low copy*.

5.2 Manipulació de plàsmids

5.2.1 Plàsmid pBR322

Es va partir del ColE1 i es va extraure l'origen de replicació. Es va digerir i es va introduir un cassette de resistència a ampicil·lina de R1. Es va introduir un altre cassette de resistència a antibiòtics. La idea d'introduir 2 cassettes de resistència és diferenciar els clons recombinants si l'insert trunca 1 dels 2 cassettes.

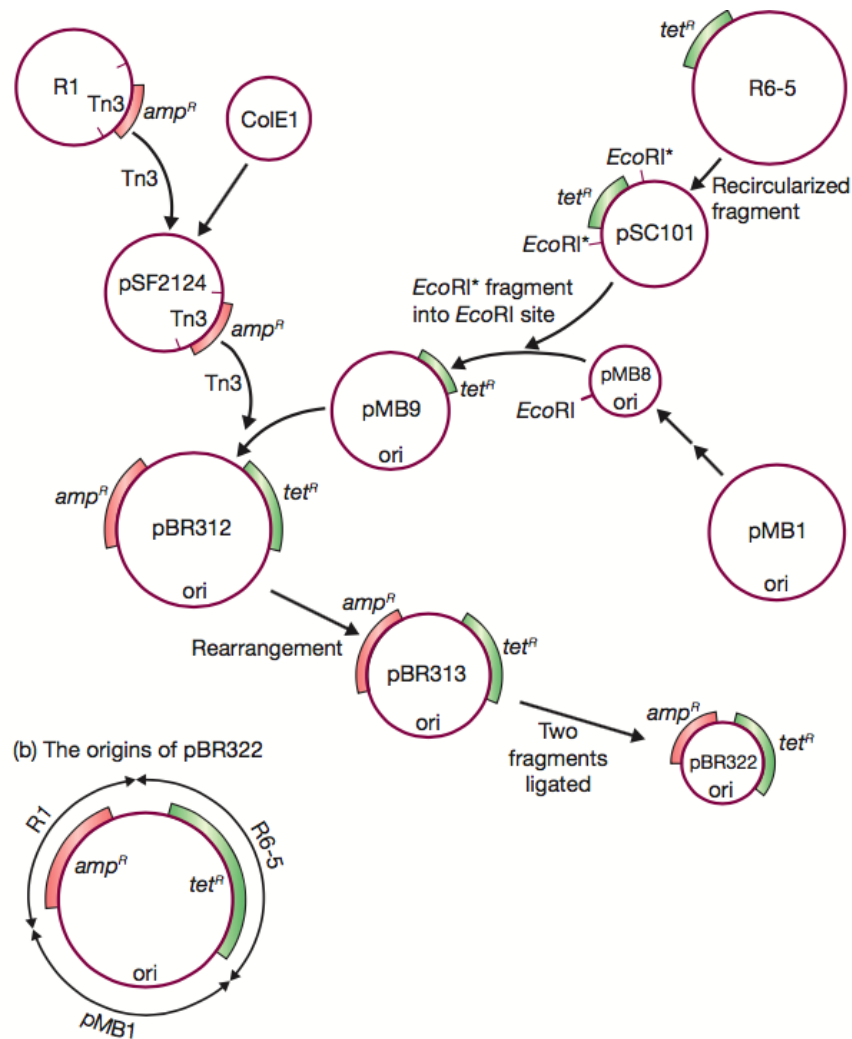


FIGURA 4: Obtenció original de pBR322

Es clona un gen dins el vector usant BamHI. Això provoca que es trenqui el cassette de resistència a tetraciclina.

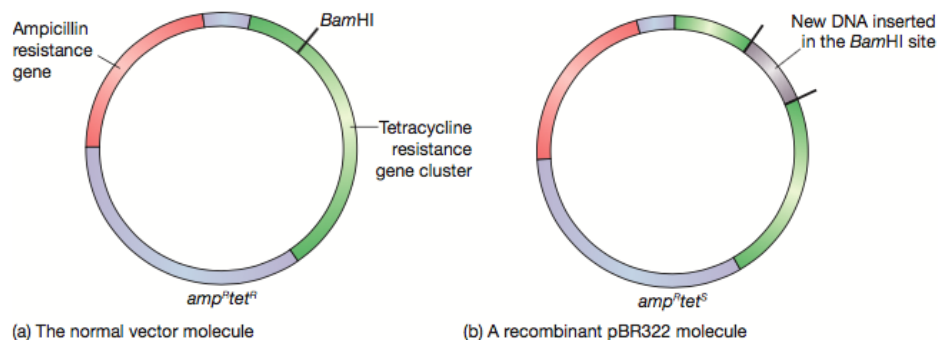


FIGURA 5: Clonatge d'un gen a pBR322

La selecció es fa en 2 passos: En 1 placa amb ampicilina i altra amb tetraciclina i es plaquegen les colònies en la mateixa posició. S'incuben i es mira quines colònies han crescut. Si la colònia ha crescut en les 2 plaques, es descarta ja que només hi ha el plàsmid nu. S'agafen les colònies que només en crescut en ampicil·lina.

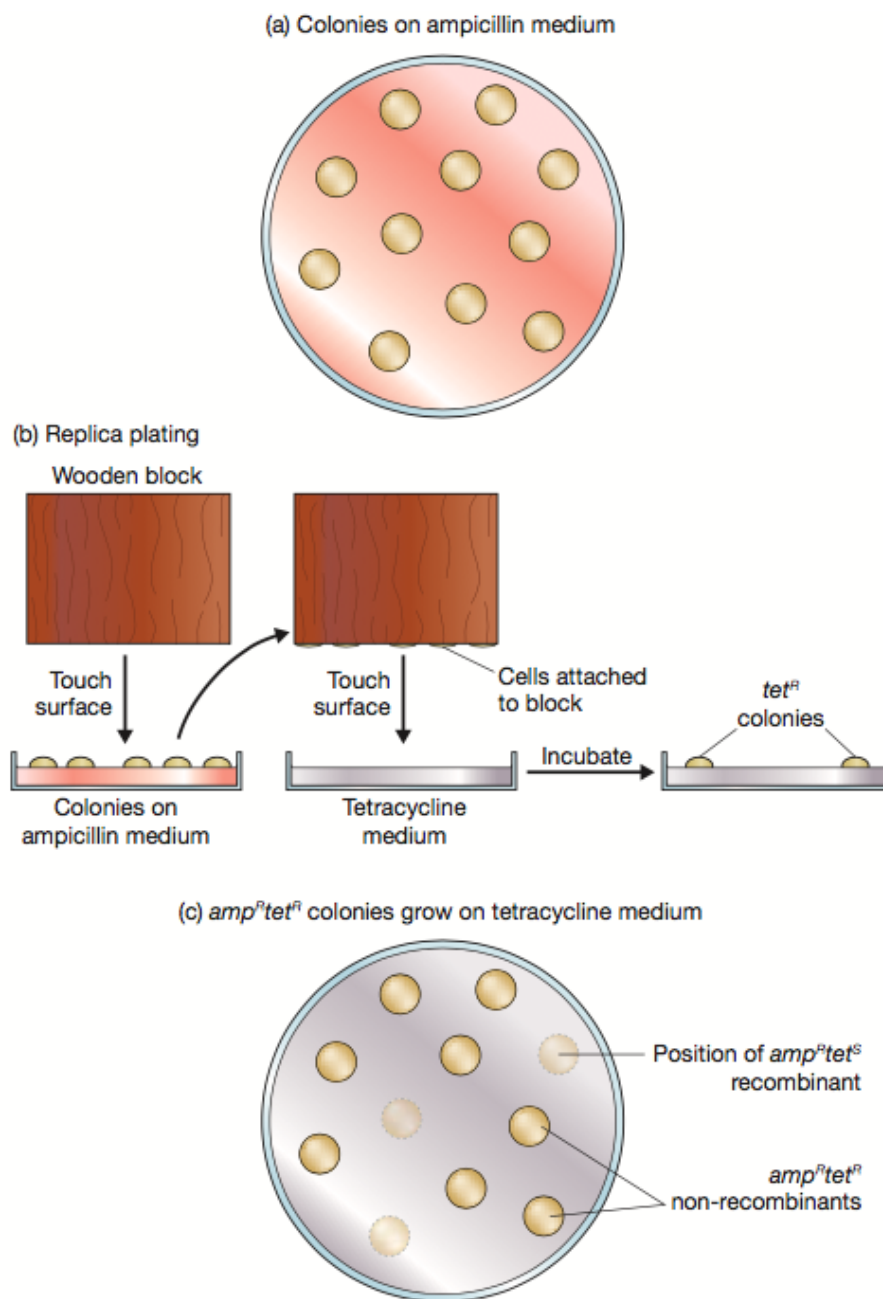


FIGURA 6: Selecció dels transformants per pBR322

5.2.2 Plàsmid pUC8

Encara que la inactivació insercional d'un gen de resistència a antibiòtics doni una bona manera d'identificar els recombinants, el mètode necessita 2 identificacions (pels transformants i els recombinants). El pUC8 porta un gen de resistència a ampicil·lina i el gen *lacZ'*, que codifica per una part de la β -galactosidasa. El clonatge amb pUC8 implica la inactivació insercional del gen *lacZ'*, i els recombinants s'identifiquen per la incapacitat de produir β -galactosidasa.

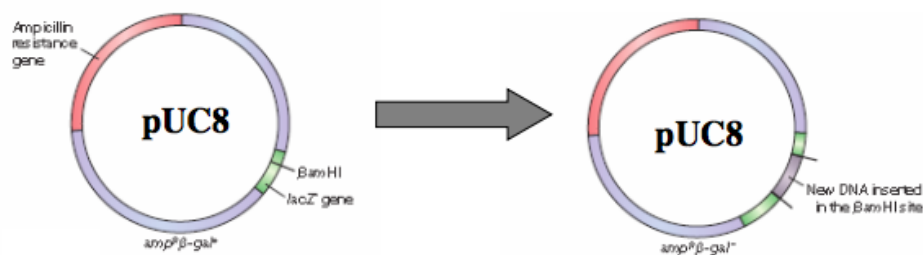


FIGURA 7: Clonatge amb pUC8

Algunes soques d'*E. coli* tenen un gen lacZ modificat, que falta la part codificada per lacZ' de la β -galactosidasa. Aquests mutants només poden sintetitzar l'enzim si duen el pUC8.

Les cèl·lules que tenen pUC8 són resistents a l'ampicil·lina i són capaces de sintetitzar la β -galactosidasa; els recombinants són resistents a ampicil·lina però incapaces de sintetitzar β -galactosidasa.

Això implica afegir a la placa d'agar X-Gal, que quan s'hidrolitza produeix una coloració blava. A més, s'afegeix IPTG (inductor de l'enzim) i ampicil·lina:

- Si la colònia és de color blau: la galactosidasa hidrolitza X-Gal i per tant no és recombinant (és a dir l'insert no s'ha lligat a la zona polilinker de lacZ').
- Si la colònia és de color blanc: la galactosidasa no és funcional i per tant l'insert s'ha lligat a la zona polilinker.

El pUC8 permet seleccionar transformants i recombinants en 1 sol pas.

pLac és un promotor induïble per IPTG. Així a la placa de cultiu s'ha de posar l'anti-biòtic (ampicil·lina), X-Gal i IPTG.

5.2.3 Fagèmids

Són plàsmids que tenen seqüències de fags. pEMBL8 té un gen de resistència a ampicil·lina, lacZ' i seqüències M13, que permetin induir còpies de DNA senzill i puguin ser empaquetades en un fag.

5.3 Vectors d'expressió

Els vectors d'expressió tenen un promotor fort, una caixa Shine-Dalgarno i la seqüència codificant. Molts vectors tenen seqüències terminadores.

Els promotors dels vectors d'expressió poden ser:

- Induïbles: A nivell basal no hi ha expressió. Quan s'introdueix un efector positiu, s'activa l'expressió del gen. Exemple de l'operó Lac induïble per IPTG.
- Repressibles: A nivell basal hi ha expressió. La introducció d'un efector provoca el silenciament de l'expressió. Exemple de l'operó Trp reprimible per triptòfan.

Quan s'expressen gens heterològament hi poden haver problemes amb la traducció (col·locació correcta dels aminoàcids en funció dels codons), plegament correcte... Per això es fan proteïnes de fusió. El que es fa és clonar l'insert enganxat a un gen bacterià sense alterar la pauta de lectura.

5.4 Vectors derivats del fag λ

El genoma del fag λ té una regió que no és essencial pel seu cicle vital. El genoma de λ pot circularitzar perquè té unes regions als extrems de cadena senzilla que són complementaris. Aquests extrems s'anomenen *cos*. El genoma de λ de forma episòmica es replica com a cercle rodant de forma concatenada. Un enzim de λ reconeix les seqüències *cos* i les talla. El fag λ reconeix els extrems *cos* i els empaqueta. Els fragments que es poden clonar en aquesta regió no essencial han de ser d'unes 3 kb.

Hi ha 2 problemes bàsics per clonar amb el fag λ :

1. Els inserts que accepta λ han de ser iguals o inferiors a 3 kb. Si la mida total del vector és superior a 52kb, no es pot empaquetar a l'estructura de λ i no es formen partícules infectives.
2. El genoma de λ té múltiples doanes de restricció, per tant no es poden usar endonucleases per obrir el vector i clonar un insert.

Hi ha 2 vectors derivats de λ :

- **Vectors d'inserció:** S'ha eliminat la zona no essencial i s'ha introduït una diana de restricció.

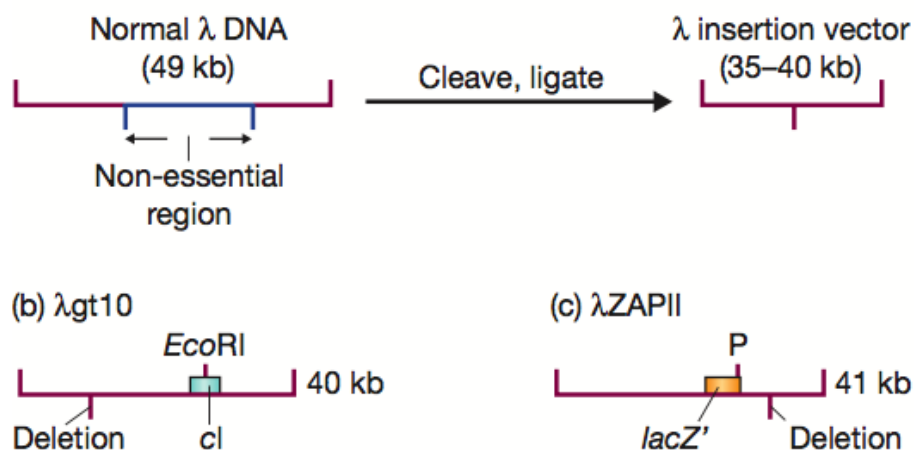


FIGURA 8: Construcció d'un vector d'inserció

- λ gt10 porta una diana EcoRI al gen *cl* (controla el cicle lisogènic). Els fags que tinguin un insert en *cl* tindran cicle lític i els que no seguiran un cicle lisogènic. Les calbes transparents suposen que λ segueix un cicle lític i per tant són recombinants; llavors es fa un raspall de les calbes i es recupera el fag recombinant. Si hi ha calbes tèrboles, vol dir que no hi ha fag recombinant.

- λ zapIII porta el gen *lacZ'* amb una diana a l'interior. S'introdueix en un bacteri que porti l'altre *lacZ* amb X-gal i IPTG. Si les colònies són clares vol dir que el fag és recombinant, si són blaves vol dir que el fag no és recombinant.

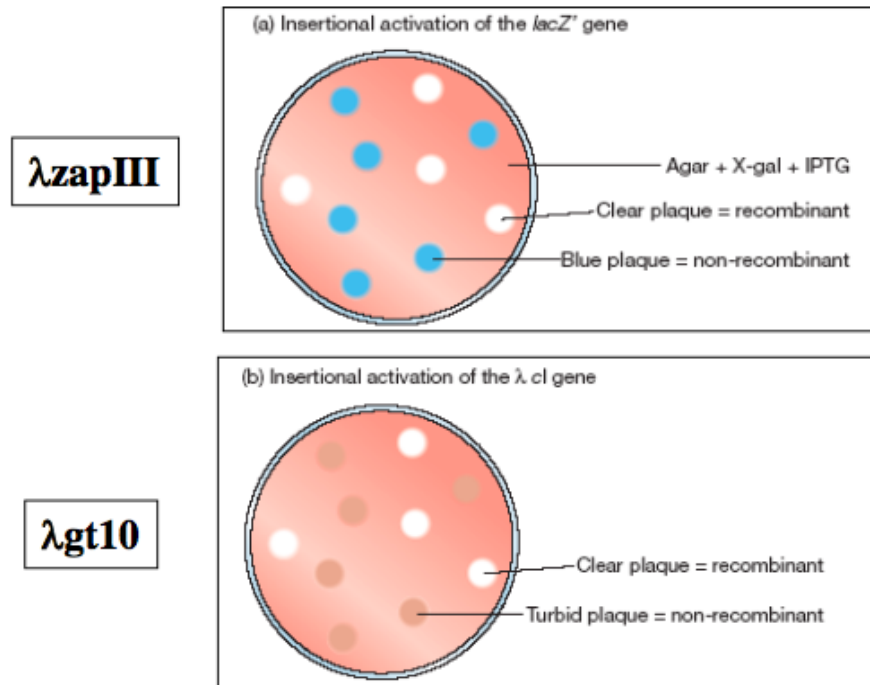


FIGURA 9: Selecció de transformants amb vectors d'inserció de λ

- **Vectors de substitució:** Té 2 dianes de restricció que es poden usar per clonar. Aquestes dianes flanquegen un segment de DNA que és substituït pel DNA a clonar. Sovint el fragment que es substitueix porta una diana de restricció addicional que es pot usar per tallar-la en fragments petits i evitar la pròpia reinserció. Poden carregar fragments de DNA més grans que els vectors d'inserció. Els vectors no recombinants són massa petits per empaquetar-los en partícules infectives de λ .

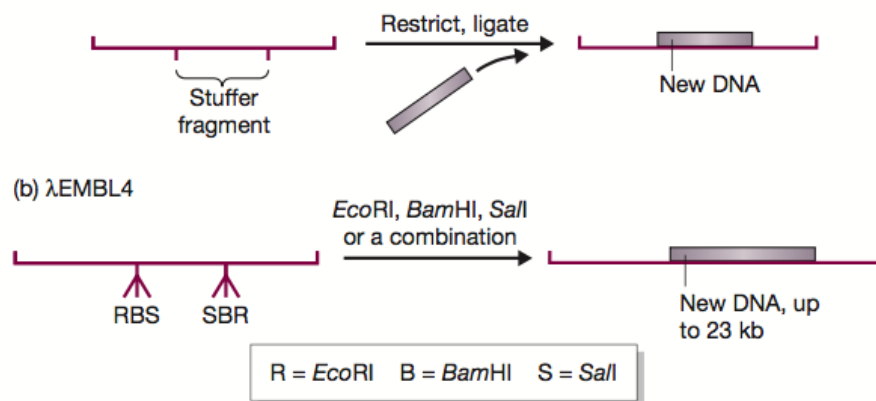


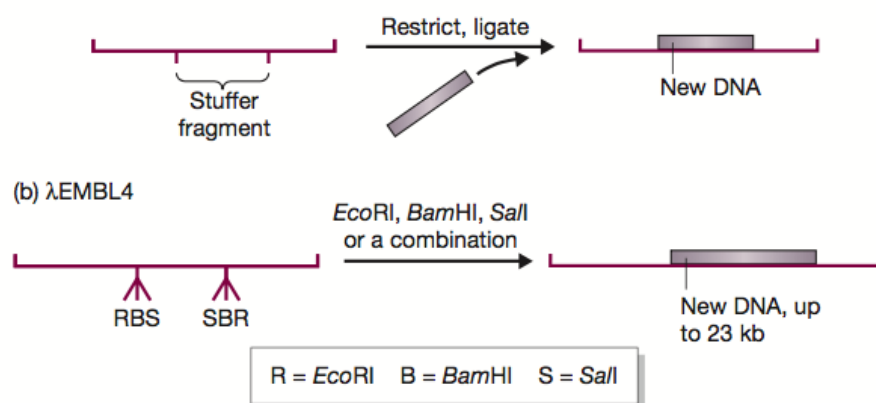
FIGURA 10: Clonatge amb vectors de substitució de λ

El vector λ EMBL4 pot carregar fins a 20 kb de DNA reemplaçant un fragment flanquejat per EcoRI, BamHI, SalI. Qualsevol d'aquests enzims es pot usar per eliminar el DNA reemplaçable. La selecció és:

- Mida
- Fenotip Spi: El fag λ normalment no pot infectar *E. coli* que ja tinguin un altre fag integrat. Llavors es diu que λ és Spi+. Hi ha cèl·lules mutants que porten P2 però es poden infectar per un altre fag, pel que els recombinants Spi- formen plaques i la resta no.

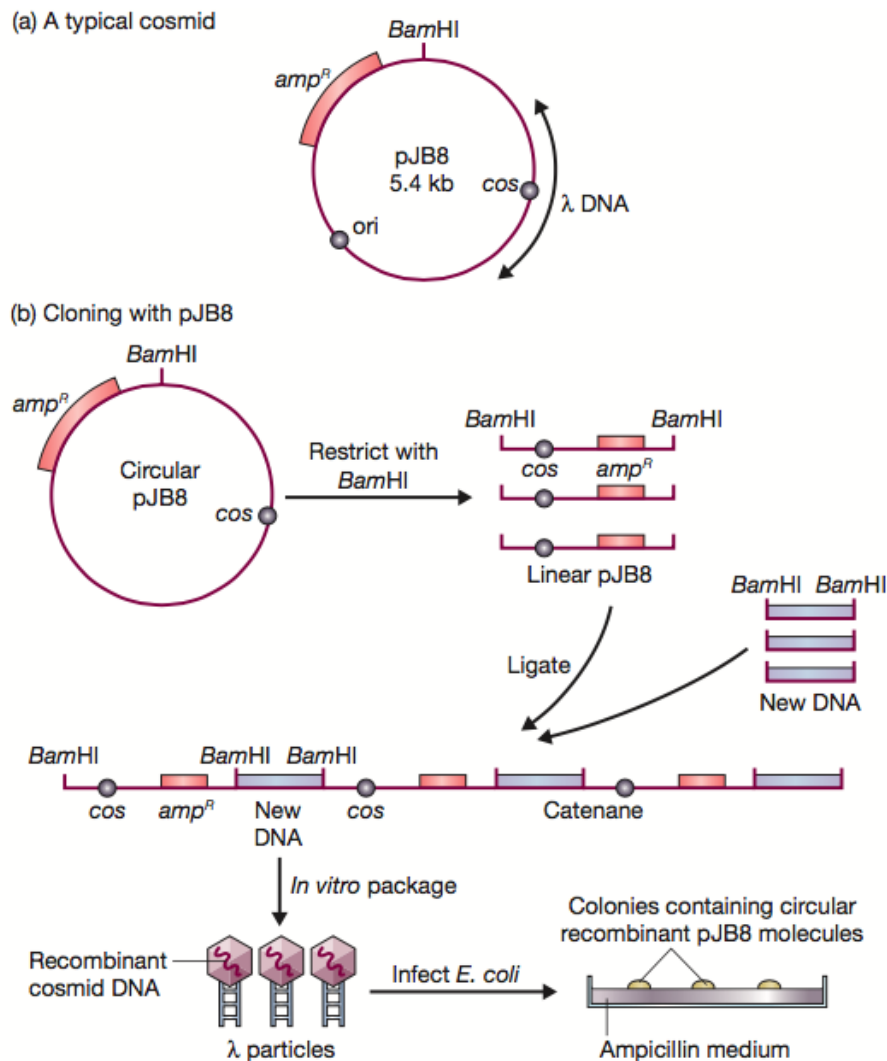
Un experiment de clonatge amb λ es pot fer com si fos un plàsmid normal. El DNA de λ es digereix, s'afegeix el nou DNA, es lliga la barreja, i les molècules resultants es transfecten a un cultiu d'*E. coli*. Aquest tipus d'experiment requereix que el vector estigui en forma circular.

A vegades, una simple transfecció no és particularment eficient. Es pot obtenir un gran nombre de recombinants amb algunes modificacions. El primer és usant el vector linealitzat. Quan el vector lineal es digereix, s'alliberen els braços dret i esquerre com a fragments separats. La molècula recombinant es pot obtenir barrejant el DNA a clonar amb els braços del vector. La lligació resulta en reorganitzacions moleculars, incloent la repetició de catenanes. Si l'insert és de mida correcta, els llocs cos que separen aquestes estructures estaran a la distància correcta per ser empaquetades *in vitro*. Després, es pot infectar un cultiu bacterià amb aquests fags.



5.4.1 Còsmids

Els còsmids són híbrids entre una molècula de fag i un plàsmid bacterià, i es basen en l'ús dels llocs cos. L'empaquetament en partícules fàgiques funciona amb qualsevol molècula de DNA amb llocs cos separats per 37-52 kb de DNA.



Un còsmid és un plàsmid amb un lloc cos. També necessita un marcador de selecció, com el gen de resistència a l'ampicil·lina, i un origen de replicació adequat. Els còsmids no produeixen calbes de lisi.

Providing the inserted DNA is the right size, in vitro packaging cleaves the cos sites and places the recombinant cosmids in mature phage particles. These lambda phage are then used to infect an *E. coli* culture, though of course plaques are not formed. Instead, infected cells are plated onto a selective medium and antibiotic-resistant colonies are grown. All colonies are recombinants, as non-recombinant linear cosmids are too small to be packaged into lambda heads.

Un experiment de clonatge amb còsmids, primer s'ha d'obrir el còsmid amb un únic lloc de restricció i lligar els fragments de DNA. Aquests fragments són produïts per una digestió parcial amb una endonucleasa, ja que la digestió total resulta en fragments que són massa petits per ser clonats a un còsmid. La lligació es fa per permetre la formació de les catenanes. Proporcionant l'insert de DNA de mida adequada, l'encapsidació *in vitro* s'escindeix als llocs cos i col·loca els còsmids recombinants en partícules de fag madures. Aquests fags λ s'utilitzen llavors per infectar un cultiu d'*E. coli*, encara que no es formin calbes de lisi. En lloc d'això, les cèl·lules infectades es col·loquen en plaques sobre un medi selectiu i les colònies resistents als antibiòtics creixen. Totes les colònies són recom-

binants, com còsmids lineals no recombinants són massa petits per a ser empaquetat en partícules λ .

6. Genoteques

6.1 Llibreries genòmiques

Les llibreries genòmiques estan construïdes mitjançant inserció de diferents fragments del genoma de l'organisme, obtinguts per digestió, en un vector de clonatge apropiat.

El nombre de clons representatius d'un genoma dependran de la mida del genoma i la mida dels fragments generats.

Es pot calcular com:

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - \frac{a}{b})} \quad (1)$$

On N és el número de clons, P és la probabilitat que qualsevol gen es trobi a la llibreria, a és la mida dels fragments inserits al vector i b és la mida total del genoma.

6.2 Llibreries de cDNA

S'aïlla el RNA total i es retrotranscriu a cDNA. Els fragments resultants es clonen en un vector apropiat. Les llibreries es poden enriquir per un determinat gen.

6.3 Estratègies de selecció dels clons recombinants

Hi ha sistemes de:

- **Detecció directa:** S'avalua si és recombinant i si conté el gen d'interès
 - Ús de medi selectiu: Si es vol clonar un gen de resistència a antibiòtic, es creixen els clons en un medi amb un antibiòtic determinat per la selecció dels recombinants i un segon antibiòtic per seleccionar els que contenen el gen que estem buscant.
 - Mutants auxotròfics: Bacteris mutants que no tinguin el gen que estem buscant. Si un bacteri és deficitari per un enzim biosintètic, no creixerà en un medi selectiu sense Trp. Si es transforma un bacteri Trp⁻ amb un vector que porta l'enzim, aquest clon creixerà en un medi selectiu per Trp.
- **Identificació del clon**
 - Detecció de la molècula recombinant per hibridació de sondes
 1. Transferència dels clons a filtres de nylon o nitrocel·lulosa
 2. Lisi dels clons: Tractament amb proteases i calor per desnaturalitzar el DNA
 3. Fixació del DNA amb UV
 4. Hibridació del DNA marcat amb sonda

-
5. Rentat per eliminar unions inespecífiques
 6. Revelat
- Detecció de la proteïna per immunodetecció
1. Transferència dels clons a una membrana
 2. Lisi de les colònies
 3. Incubació amb anticòs i amb anticòs secundari, si fos necessari.

III. CARACTERITZACIÓ DELS PRODUCTES D'EXPRESSIÓ

7. Caracterització de l'expressió gènica: RNA

Hi ha diferents tècniques per estudiar els transcrits:

- Northern blot
- Dot(slot)blot
- RT-PCR
- Hibridació in situ
- Microxips
- SAGE
- Gene reporter
- Promoter bashing
- Gel retardation (*Electrophoretic mobility shift assay*)

7.1 Southern Blot

Abans, però el **Southern Blot** es basa en:

- 1 Fragmentació del DNA amb endonucleases + gel d'agarosa
- 2 Desnaturalització amb tractaments alcalins (NaOH)
- 3 Transferència a un filtre. El tampó difon pel gel d'agarosa fins al filtre, on arrossega el DNA per capil·laritat i el fixa. El filtre pot ser de nitrocel·lulosa o de niló.
- 4 Bloqueig del filtre i fixa el DNA amb UV.
- 5 Prehibridació amb DNA inespecífic per cobrir regions sense DNA i evitar falsos positius.
- 6 Hibridació de la sonda (s'ha de conèixer la seqüència)
- 7 Detecció de la sonda: Amb un anticòs que reconeix la molècula marcadora, l'anticòs té unit un enzim.

7.1.1 Control de l'astringència

L'astringència fa referència al grau d'exigència a la complementarietat entre la diana i la sonda. Què succeirà si hi ha algun mismatch?? Aquest fet es pot modular experimentalment. Els paràmetres són:

- Temperatura: Com més elevada sigui la temperatura, més elevada serà l'astringència.
- Concentració de cations monovalents: Com més alta sigui la concentració, la hibridació serà menys astringent.
- Solvents orgànics (formamida): Com més solvents orgànics, més astringent serà la hibridació. Aquest paràmetre és estàndard (normalment el 50%).

Si volem ser poc exigents, s'ha de fer a temperatura baixa i alt contingut en Na^+ .

7.2 Northern Blot

El **Northern Blot** permet transferir RNA d'un gel d'agarosa a una membrana de nitrocel·lulosa o niló. El procediment és equivalent al Southern.

Alguns punts importants:

- L'extracció de RNA és molt delicada. Hi ha RNases a les mans, a les superfícies...
- Desnaturalització per evitar estructures secundàries que són típiques del tRNA però poden passar a mRNA.
- Gel i transferència desnaturalitzants
- Sonda: disseny i marcatge
- Condicions d'astringència
- Controls positius i negatius
- Mai es digereix amb enzims de restricció

El Northern es fa servir per determinar si s'expressa un gen en un moment o teixit concret, si hi ha un mRNA corresponent a una sonda, la presència relativa del transcrit en diferents teixits o moments o comprovar la mida real del mRNA.

Una gota que conté la molècula per ser detectada s'aplica directament sobre una membrana. Això és seguit per la detecció per sondes de nucleòtids (northern blot i southern blot).

La tècnica ofereix importants estalvis en temps. No obstant això, no ofereix informació sobre la mida de la biomolècula blanc. A més, si dues molècules de diferents mides són detectades, se seguirà veient com un sol punt. Per tant el dot blot només pot confirmar la presència o absència d'una biomolècula o biomolècules que poden ser detectats per les sondes de DNA.

7.3 Reverse Transcriptase PCR

És una tècnica semiquantitativa. Es comença amb RNA que es retrotranscriu a DNA fent un únic cicle d'amplificació amb primers oligo-dT. Es segueix amb una PCR convencional amb un primer que hibridi a l'altre extrem de cua de poli-A per obtenir un DNA de doble cadena. Es pot amplificar des d'1 pg de RNA.

Els resultats s'analitzen en un gel d'agarosa. Permet la determinació del nivell d'expressió d'un RNA particular.

Els punts importants són:

- L'extracció de RNA és molt delicada
- Disseny dels primers
- Condicions d'astringència
- Controls positius i negatius

La tècnica permet amplificar gens evitant els introns per seqüenciar, clonar en bacteris, etc.

7.4 Hibridació *in situ*

Consisteix en la detecció d'una seqüència específica de RNA sobre talls histològics o sobre un organisme sencer. L'objectiu és detectar el lloc d'expressió dels gens (ubicació dins de la cèl·lula, tipus cel·lulars, teixits, regió de l'organisme).

El procés és:

1. Fixació del material biològic per tal de mantenir l'estructura del teixit.
2. Permeabilització per permetre l'entrada de la sonda.
3. Disseny de la sonda i marcatge.
4. Pre-hibridació per emascarar els llocs inespecífics.
5. Hibridació de la sonda.
6. Rentats.
7. Detecció del senyal i reconeixement de les estructures. La detecció es fa amb anticossos units a fluorocroms o revelats enzimàtics. Els fluorocroms permeten detectar múltiples gens i fer estudis de co-expressió. El més sensible és l'ús dels enzims.

El control negatiu es fa un vector amb 2 promotors que vagin en sentits diferents del gen que es vol estudiat de manera que es generi una sonda *sense* i una altra *antisense*. La sonda *sense* no hibridarà amb res i serà el control negatiu.

7.5 Microxips

Permet l'anàlisi dels patrons d'expressió gènica de forma massiva. Permet detectar tots els gens que s'estan expressant en un determinat moment o teixit. Permet establir connexions entre teixits, cèl·lules.

Els microxips consisteixen en una hibridació amb moltes sondes de forma simultània. Les sondes són seqüències de gens coneguts. Les sondes estan fixades en una matriu sòlida (filtre de niló o portaobjectes) en un ordre conegut. El RNA de l'organisme o cèl·lules que es volen analitzar es transcriuen a cDNA, els quals es marquen amb fluorescència.

La comparació dels patrons d'expressió entre diferents mostres (p.ex. diferents tipus cel·lulars, o diferents moments o estats fisiològics) permet tenir una imatge de com els gens s'activen i desactiven al llarg del temps, en diferents teixits o òrgans d'un organisme, o com a resposta a determinats factors ambientals als que s'ha sotmès a l'organisme. Aquest tipus d'anàlisi experimental també permet comparar els patrons d'expressió entre cèl·lules normals i cèl·lules afectades per alguna malaltia (tumors, responent a una infecció,...) per tal de dissenyar noves estratègies terapèutiques.

Una alternativa als xips de DNA en les anàlisis massives és el SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*). El SAGE consisteix en extreure els RNAs d'una cèl·lula, passar-los a cDNA de doble cadena, tallar-los en fragments curts (d'uns 20 nucleòtids) i concatenar-los (enganxar-los uns a continuació dels altres en una única molècula de DNA) separats per una seqüència coneguda de 4 nucleòtids que correspon a la diana per a un enzim de restricció. La seqüenciació d'aquest concatèmers proporciona informació sobre els RNAs transcrits a la cèl·lula d'on prové la mostra.

7.6 Estudi de promotors i zones reguladores

L'expressió gènica és controlada per elements reguladors localitzats a les regions promotores dels gens.

Els promotors estan formats per un cert nombre de seqüències consens, situades a 5' del punt d'inici de la transcripció i organitzades formant els denominats nucli del promotor (*core promoter*) i promotor regulador.

El promotor core o basal està situat immediatament *upstream* del gen i és el lloc en què s'uneix l'aparell de transcripció basal. El promotor core típicament inclou una o més seqüències consens. Inclou l'iniciador (Inr) i, o bé la caixa TATA o bé l'element DCPE. Una de les més comunes és la caixa TATA, que té la seqüència consens TATAAA i es troba 25-30 bp *upstream* del lloc d'inici. Hi ha altres seqüències consens que s'han trobat als promotors *core*.

El promotor regulador es troba immediatament *upstream* del promotor core. Les proteïnes activadores de la transcripció s'uneixen a aquestes seqüències i entren en contacte directa o indirectament amb l'aparell de transcripció basal.

Diferents tècniques permeten identificar i estudiar aquests elements de control.

7.6.1 Promoter bashing

El *promoter bashing* és una estratègia identificació d'elements d'actuació en cis als promotors mitjançant la construcció d'una sèrie de promotors truncats generats deletant diverses regions, fusionats amb un gen reporter que permet avaluar l'expressió gènica.

Per estudiar la funció del promotor d'un gen determinat amb l'objectiu d'aconseguir entendre el mecanisme de regulació d'un gen, enlloc d'utilitzar el gen concret, s'utilitza un gen reporter sota el control del promotor d'interès.

El tipus de promotor més adequat depèn de què interessa a l'investigador: quantificar l'eficiència del promotor (i, per exemple, determinar efectes de mutacions o activitats de factors de transcripció que s'hi uneixen), o determinar el seu patró d'expressió teixit-específic.

De manera freqüent, se sol crear un vector de clonació que té el promotor eucariota unit a la regió codificant de la luciferasa, el gen que codifica la proteïna responsable de la bioluminescència en cuques de llum. En general, s'afegeix un senyal de terminació de transcripció per assegurar la correcta formació de mRNA. El vector híbrid s'introdueix a les cèl·lules objectiu, normalment en forma de plasmidi (el treball amb plasmidis permet una modificació més fàcil).

En introduir el plasmidi, no s'introdueix cap gen de la pròpia cèl·lula eucariota estudiada (ja que no expressa luciferina, que és el que codifica el plasmidi), però sí que s'introdueix el promotor d'un gen concret, que passa a estar sota una regulació depenent de la unió de diverses proteïnes presents en la cèl·lula. Com que el promotor es pot haver escindit per l'investigador abans de la transferència del plasmidi, es pot així estudiar quin fragment del mateix és el que possibilita la regulació, o també quines condicions cel·lulars l'estimulen, etc.

L'activitat transcripcional és directament proporcional a l'expressió del reporter, que alhora depèn de l'activitat del promotor.



FIGURA 11: Resultats d'un experiment de *promoter bashing*

7.6.2 Retard de la mobilitat electroforètica

És una tècnica basada en l'electroforesi en gel (d'agarosa el més comú):

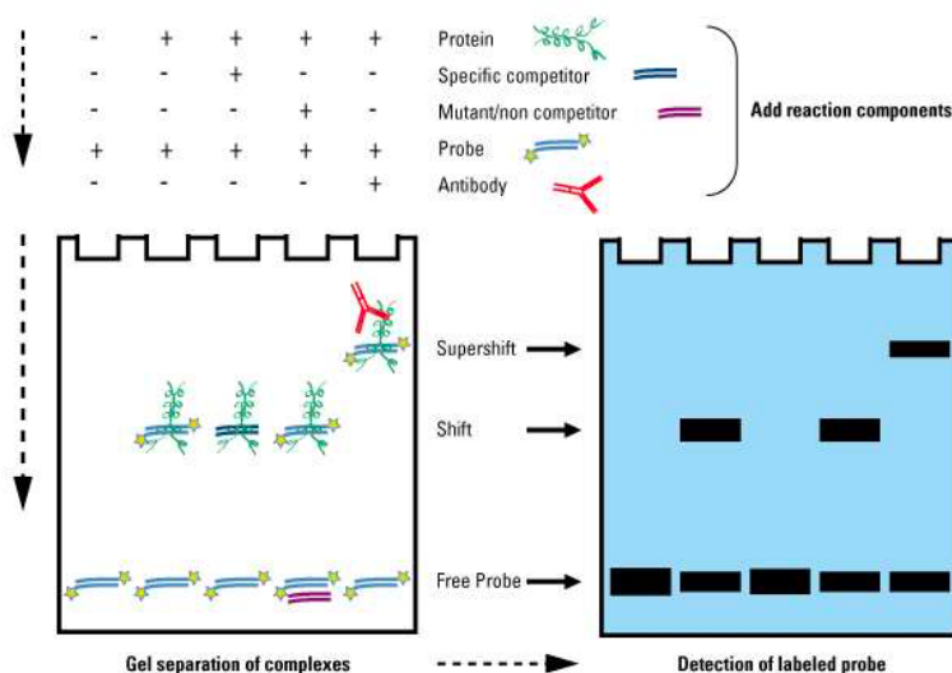
1. Es marca un fragment de DNA marcat radioactivament i de seqüència coneguda i es

fa córrer al gel d'agarosa, de tal manera que al revelat queda una banda indicadora del punt de referència on es troba el DNA sense unir a cap proteïna.

2. S'incuba aquest fragment de DNA marcat amb extractes proteics (solen ser extractes de proteïnes nuclears) i es fa córrer el DNA, observant que apareixen 2 bandes en revelar: una correspon al DNA sense unir a proteïnes, i apareix una altra que ha corregut menys i que es tracta del DNA que ha quedat unit a les proteïnes de l'extracte i que, en tenir el conjunt major PM, ha fet menys trajecte. No tot el DNA s'uneix a les proteïnes, ja que possiblement no hi ha prou proteïnes per unir a tota la quantitat de DNA afegit, i per això queda la banda inferior.

Aquest mètode permet fer estudis de competició per conèixer l'especificitat de les proteïnes d'unió al DNA:

- Competidors específics: es posen fragments de DNA NO marcats i de la mateixa seqüència que el DNA marcat inicial. El DNA no marcat es troba en concentracions molt elevades, molt més que el marcat (relació, p.ex. 1:1000). Com que és més abundant, s'uneix abans a la proteïna i desapareixerà la banda DNA marcat-proteïna quan es reveli l'electroforesi. Això permet justificar l'afinitat proteïna-seqüència de DNA estudiada (però no determinar si és d'unió específica o inespecífica).
- Competidors no específics: es posen a la preparació quantitats molt grans de DNA no marcat i de seqüència diferent a la del DNA marcat. Si les proteïnes tenen una unió específica, a l'electroforesi apareixen 2 bandes (DNA marcat i DNA marcat-proteïna). Si la unió és inespecífica, l'electroforesi mostra 1 sola banda (DNA marcat), ja que en haver-hi més quantitat de DNA no marcat, les proteïnes inespecífiques tenen més probabilitat d'acabar-hi unides que no pas al DNA marcat.



8. Caracterització de l'expressió gènica: proteïnes

8.1 Extracció de proteïnes

Les proteïnes es poden extreure d'un òrgan, teixit o cèl·lules amb diferents mètodes:

- Destrucció mecànica
 - Homogeneïtzació amb pistó de vidre
 - Homogeneïtzació amb molinet
- Tractament enzimàtic
- Xoc osmòtic
- Sonicació
- Congelació - Descongelació (nitrogen líquid)

8.1.1 Destrucció mecànica

Les mostres biològiques que es volen analitzar poden ser molt variades: des d'un fragment d'òrgan fins a cèl·lules en preparació. En tots els casos, per fer l'anàlisi electroforètic caldrà lisar i homogeneïtzar la mostra.

Per lisar les cèl·lules i desfer els teixits amb l'objectiu d'homogeneïtzar, solubilitzar i alliberar les proteïnes cel·lulars hi ha 3 aparells bàsics:

- Politró: aparell que consta d'un braç amb ganivet i que mitjançant moviments rotatoris esquinça el material (turmix). Sol servir per fragments més grans, teixits tous i durs.
- Potter: camisa i èmbol que presenta tefló a l'extrem, i que associat a un motor genera un moviment de vaivé amunt i avall mentre deixa 0,1-0,15 mm d'espai amb la camisa. L'èmbol també gira, i el material biològic tallat a trossos penetra en l'espai deixat entre èmbol i camisa, on es generen les turbulències i les friccions sobre els teixits que suposen el trencament de la membrana cel·lular. La camisa s'envolta de gel per controlar el despreniment de calor. Permet destruir teixits tous.
- Sonicador: utilitza ultrasons amb freqüència d'una 50 kHz, que destrueixen cèl·lules i orgànuls cel·lulars fàcilment.

Normalment, amb mostres de teixits es fa una primera homogeneïtzació amb Potter/ Politró i després es passa pel Sonicador per acabar d'homogeneïtzar. Amb mostres cel·lulars es pot passar directament pel Sonicador.

La homogeneïtzació es dona solubilitzant la mostra en un tampó d'homogeneïtzació on s'hi col·loquen detergents NO iònics (a diferència de l'SDS que sí que ho era, aquests no

busquen desnaturalitzar proteïnes) que permeten solubilitzar les proteïnes de membrana i obtenir així totes les proteïnes solubilitzades.

L'homogenat del teixit es pot filtrar amb una centrifugació i anar separant els diferents components cel·lulars. Amb polisacàrids complexos es crea un gradient continu de densitat en una ultra centrífuga. Aplicable segons el mètode (p ex, homogeneïtzació amb Potter i utilitzant detergents suaus, respectem la integritat dels orgànuls).

8.2 Purificació de proteïnes

La purificació es basa en anar eliminant els components d'un extracte biològic (tissular o cel·lular) per tal d'aïllar la proteïna d'interès.

Aprofitant les característiques fisicoquímiques de les proteïnes, es poden anar aïllant i purificant:

- Solubilitat
- Càrrega elèctrica i pH
- Afinitat bioquímica
- Pes
- Mida
- Propietats magnètiques

8.2.1 Solubilitat diferencial

8.2.2 Precipitació

El punt en què precipiten les proteïnes és el seu pI. Aquest procediment s'anomena precipitació isoelèctrica.

La solubilitat d'una proteïna en una concentració baixa d'ions augmenta a mesura que s'afegeix sal (*salting in*). Els ions addicionals oculten les càrregues de la proteïna i debiliten les forces d'atracció de la proteïna i això pot portar a l'agregació i a la precipitació. Si s'afegeix més sal (sulfats), la solubilitat de la proteïna disminueix novament (*salting out*). Es produeix una competència per l'aigua entre els ions i les càrregues de la proteïna.

8.2.3 Cromatografia

8.2.3.1 Cromatografia d'exclusió molecular

La fase estacionària està formada per partícules polimèriques de diferent porositat. La separació es basa en la diferent grandària de les partícules (massa molecular).

Les proteïnes més grans no poden passar pels porus de la matriu de filtració i són eluïdes amb major rapidesa que les de baix pes molecular que penetren pels porus de la matriu i recorren un camí molt més tortuós i més llarg.

8.2.3.2 Cromatografia de bescanvi iònic

La fase estacionària està composta per partícules de polímers amb càrrega elèctrica positiva (bescanvi aniònic) o càrrega elèctrica negativa (bescanvi catiònic).

Les proteïnes queden immobilitzades degut a la seva càrrega elèctrica. L'elució? es realitza augmentant progressivament la força iònica de la fase mòbil (eluent fins que s'assoleix el pI de la proteïna d'interès.

8.2.3.3 Cromatografia d'afinitat

La fase estacionària està composta per partícules de polímers unides covalentment al lligand (anticòs, glutatió, proteïna A, etc...). La proteïna problema queda immobilitzada per unió al lligand. L'elució de la proteïna a aïllar, augmentant la força iònica de la fase mòbil.

P.e si es volen purificar Ig, la fase mòbil es recobreix amb proteïna A. Les Ig s'uneixen inespecíficament a la proteïna A. Després dels rentats, es pot eluir.

8.3 Electroforesi i isoelectroenfoc

L'electroforesi en gels de poliacrilamida es pot donar en condicions natives, desnaturalitzants o reductores. Les condicions natives possibiliten que les proteïnes mantinguin l'estructura terciària i quaternària, mentre que les condicions desnaturalitzants suposen l'eliminació de qualsevol organització espacial (fins i tot estructura secundària) gràcies a un tractament amb calor i SDS que fa que totes les proteïnes quedin en forma lineal i corrin sobre el gel totalment estirades. L'SDS, però, només desorganitza les interaccions febles entre subunitats proteiques i dins una mateixa subunitat. Per a destruir els ponts disulfur s'utilitzen agents reductors com el β -mercaptoetanol o el DTT (ditiotreitòl). Així es poden destruir estructures quaternàries com la dels anticossos o enllaços covalents dins una mateixa cadena.

Els tractaments previs són:

- Ebullició de les proteïnes (100°C)
- β -mercaptoetanol o DTT per desfer els ponts disulfur per reducció.
- SDS, un detergent aniònic que confereix càrrega negativa a les proteïnes. S'addiciona a la solució de proteïnes i al gel.

Les diferències entre les tres condicions radiquen en els components dels gels i del tampó d'electroforesi, així com en el tractament de les mostres. El més freqüent és treballar en condicions desnaturalitzants i reductores alhora.

Les proteïnes integrals de membrana poden solubilitzar-se mitjançant detergents no iònics. Aquests detergents trenquen la bicapa lipídica (o desorganitzen el citosquelet) i formen complexos lípid-proteïna. Els detergents no iònics permeten recuperar proteïnes funcionals, i incorporar-les a noves vesícules. També són solubilitzats els fosfolípids de la membrana.

Un cop realitzada l'electroforesi i desplaçades les proteïnes sobre el gel, cal tenyir per poder observar les bandes. Abans, els gels es fixen amb metanol i àcid acètic. Existeixen 2 mètodes de tinció: tinció amb blau de Coomassie i tinció amb plata.

El blau de Coomassie arriba a resoldre pesos de fins a 100 ng de proteïna. En canvi, la plata resol fins a 1 ng de proteïna. Per tant, la tinció amb plata és molt més sensible i detecta concentracions molt més petites que no pas el blau de Coomassie.

8.3.1 Electroforesi bidimensional

S'agafen les proteïnes directament i es posen en un gel d'isoelectroenfoc. El gel d'isoelectroenfoc conté amfolines, molècules que en un camp elèctric s'ordenen segons el pI (2,5-11). Les proteïnes migren per aquest gel d'isoelectroenfoc fins que perden la càrrega. Llavors es bullen les proteïnes, SDS i mercaptoetanol i es fa un SDS-PAGE.

Permet conèixer el grau de fosforilació, glicosilació. Per identificar la proteïna, es retalla la taca.

8.4 Proteòmica

La proteïna es digereix parcialment amb tripsina i s'obtenen pèptids. Els pèptids es passen per un espectròmetre de masses. Es calcula la ratio massa/càrrega. Aquest perfil es compara amb una base de dades i així es pot conèixer la seqüència del pèptid, i després es pot saber a quina proteïna pertanyen.

8.5 Western Blot

L'electroforesi permet separar les proteïnes per pes molecular sobre una base inerta que és el PAGE. Apareixen les proteïnes majoritàries (les que superen els 100 ng en Coomassie o l'1 ng de resolució de la plata). Però per detectar si una proteïna és present en un determinat gel d'electroforesi que conté una mescla complexa de proteïnes s'utilitza el Western Blot.

La tècnica del Western Blot es basa en:

- 1 **Transferència Western:** transferència de les proteïnes del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocel·lulosa. La nitrocel·lulosa és una cel·lulosa tractada químicament que funciona com a suport inert fàcil de manipular i que capta proteïnes amb molta facilitat sense modificar-les químicament. És més resistent que l'acrila-mida, que e trencaria en els processos posteriors. La transferència Western es realitza més sovint mitjançant un corrent elèctric, per electrotransferència. El mètode es basa en un corrent elèctric i un tampó de transferència per portar les proteïnes des del gel cap a la membrana. Per això, s'apilen en l'ordre descrit i ben compactats els següents elements (del pol negatiu o càtode fins al pol positiu o ànode): esponja, diversos papers de filtre xopats amb el tampó de transferència, gel SDS-PAGE, membrana de nitrocel·lulosa, papers de filtre xopats i una altra esponja. Aquest muntatge (sandwich) es disposa en el sistema de transferència i s'aplica un corrent elèctric de magnitud adaptada als materials usats o al temps disponible. Les pro-

teïnes es desplacen cap al pol positiu, des del gel cap a la membrana, on queden atrapades.

L'electrotransferència és avui dia la tècnica més usada, tot i que també es pot fer per difusió simple i per transferència al buit, però no asseguren tant d'èxit. La tinció amb roig Ponceau s'enganxa a qualsevol proteïna. La membrana es submergeix en el roig de Ponceau i ens indica si la transferència ha estat correcta i no s'ha difós.

- 2 Etapa de bloqueig:** aplicació d'un agent bloquejant, és a dir, incubació de la membrana de nitrocel·lulosa amb una proteïna inert que garanteixi que els únics llocs on es poden associar els anticossos sonda siguin les proteïnes a detectar a les bandes d'electroforesi. Com que la nitrocel·lulosa té molta afinitat per les proteïnes, els llocs no ocupats per les bandes d'electroforesi podrien quedar totalment coberts dels anticossos de detecció de la proteïna objectiu. Per evitar-ho, es col·loca aquesta proteïna inert (sol ser la caseïna o albúmina al 5%) i tamponada que recobreix tots els espais que queden per omplir de la superfície de la membrana de nitrocel·lulosa.
- 3 Incubació amb els anticossos:** normalment es fa ús del mètode indirecte d'immunolocalització, on hi ha un Ac primari que reconeix l'antigen i un de secundari que és el que fa de senyal. Es fan 2 incubacions successives, l'una amb un anticòs primari (d'un animal, per exemple conill) i la segona amb un de secundari (d'un animal diferent, com cabra).
- 4 Quimioluminescència:** els anticossos secundaris solen estar marcats amb HRP (peroxidasa del rave). Tradicionalment s'utilitzava com a cromogen la diaminobenzidina (DAB), però el fet que sigui cancerígena va fer replantejar el mecanisme de detecció i avui dia s'usen bàsicament mètodes quimioluminescents.

La quimioluminescència s'aconsegueix gràcies al luminol, un compost que davant la HRP i el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) s'oxida i dóna lloc al 3-aminoflatat en un procés que emet llum. Aquesta llum emesa pot ser captada amb un film de radiografia (una pel·lícula fotogràfica col·locada sobre la membrana) i un cop processat el film (com un revelat fotogràfic) s'obtenen les bandes d'electroforesi on hi ha la proteïna d'interès.

El Western Blot es pot fer servir per:

- Variacions en l'expressió: el gruix i la intensitat de la banda són proporcionals a la quantitat de la proteïna (és a dir, a l'expressió).
- Variacions en el pes molecular: com que l'electroforesi separa per PM, es pot observar i determinar si una proteïna pateix alteracions en aquest pes, si hi ha isoformes proteiques de la mateixa proteïna en teixits diferents, si al llarg de la vida de la cèl·lula la proteïna canvia la seva estructura i altera el PM, etc.

8.6 Dot Blot

8.7 ELISA

Les proves immunoenzimàtiques es basen en l'existència de substàncies químiques (substrats) que per acció d'un enzim són transformades en una substància amb color que emet llum o fluorescència; la intensitat del color i de la radiació lumínica es pot quantificar mitjançant instruments de mesura. La prova discorre segons el procés següent: en la base d'un pouet de plàstic es fixen anticossos contra el antigen que volem detectar.

Quan la mostra s'introdueix en el pou es troba l'antigen buscat, els anticossos de la placa el fixen. A continuació, s'afegeix un anticòs dirigit contra l'antigen. S'afegeix el substrat incolor, transformat per l'enzim i fent que aparegui color. Quan la mostra no conté l'antigen buscat, l'anticòs marcat no queda en el pouet i no es produirà la coloració al afegir-ne el substrat.

És utilitzada per a la detecció de molècules biològiques molt diverses, basant-se en la especificitat del reconeixement antigen-anticòs i en la sensibilitat de les proves enzimàtiques. Els assajos immunoenzimàtics permeten obtenir informació quantitativa de la concentració d'un anticòs (Ab) o d'un antigen (Ag) en una mostra. Aquestes tècniques aprofiten la interacció de l'Ab amb l'Ag per a proveir la informació requerida.

De forma clàssica, el marcatge amb radioisòtops, de l'Ab o de l'Ag, ha estat la tècnica més utilitzada (radioimmunoassaig), per la elevada sensibilitat. Actualment la tecnologia ha hagut de substituir la utilització d'isòtops pel marcatge amb enzims (inclús per molècules fluorescents), en aquest tipus d'assajos, guanyant per un costat seguretat en la manipulació i per altre, estabilitat de la proteïna marcada (desaparició dels fenòmens de radiòlisis), sense perdre sensibilitat. En aquest context, es desenvolupa la tècnica de l'ELISA que permet simplificar els protocols perquè l'Ag o l'Ab (depèn de la variant), es troba adsorbit sobre una fase sòlida.

En l'ELISA directe es detecta la presència d'un antigen en la mostra per la fixació d'anticossos en els pouets contra l'antigen desitjat, s'afegeix la mostra problema i l'agent patògen s'unirà als anticossos si té l'antigen que aquests reconeixen. Una vegada units s'afegeix un segon anticòs contra l'antigen que posseeix un enzim unit. S'afegeix a més el substrat de l'enzim i la reacció es produeix, donant lloc a un canvi de color mesurat per espectrofotometria. És com una EIA.

8.8 Immunodetecció *in situ*

La immunolocalització consisteix en la tècnica que utilitza els anticossos per posar de manifest la distribució específica de les proteïnes.

Avui dia, es disposa de tècniques i d'eines per conèixer les concentracions dels components orgànics de mostres de teixit (Lowry, Bradford, etc.) i també la seva distribució dins el teixit.

Les tècniques de detecció *in situ* es basen en l'ús de molècules sonda, que es caracterit-

zen per poder posar de manifest una determinada molècula diana. Les molècules sonda poden ser, depenent de la seva naturalesa:

- **Lectines:** Proteïnes que reconeixen glúcids, en concret monosacàrids que ocupen posicions terminals en una seqüència de polisacàrids.
- **Àcids nucleics:** es pot treballar amb àcids nucleics complementaris a l'àcid nucleic que es vol localitzar. Per exemple, si es vol localitzar un tipus de mRNA determinat, es pot crear una seqüència de mRNA sonda que sigui complementària a un fragment d'aquest mRNA diana.
- **Molècules específiques:** es tracta de molècules que tenen una afinitat natural per una altra molècula determinada. Per exemple, la fal·loïdina uneix amb molta especificitat i força l'actina F. S'usa enlloc dels anticossos (Ac) per detectar-la, ja que és molt més barats d'obtenir (la sintetitza naturalment el fong *Amanita phalloides*).
- **Anticossos:** proteïnes generades pel SI que reconeixen amb molta especificitat proteïnes.

Les tècniques immunocito/histoquímiques es tracta del conjunt de tècniques que permeten determinar la distribució espacial d'un antigen i les seves característiques mitjançant l'ús d'anticossos com a sonda. Els Ag són normalment proteïnes, encara que també hi poden haver glúcids o lípids.

La unió Ag-Ac és impossible de visualitzar o detectar per si sola. Primer cal marcar els Ac amb fluorocroms (si es vol observar la distribució de la proteïna dins una cèl·lula, immunocitoquímica) o bé amb enzims (si es vol observar com es distribueix la proteïna dins un teixit, immunohistoquímica).

Els fluorocroms són molècules que absorbeixen la llum en una longitud d'ona determinada i emeten l'energia absorbida en forma de llum fluorescent a una longitud d'ona superior a la de la llum incident (per tant, la llum emesa és de menor energia).

Les estratègies de detecció dels anticossos es tracta de mecanismes que es busquen per incrementar el nombre de molècules marcades, ja que el color serà més intens. Es busca l'amplificació.

- **Mètode directe:** Es fonamenta en l'ús d'un sol anticòs, només hi ha una sola incubació amb un anticòs primari (aquell que reconeix l'antigen, tant en el mètode directe com en l'indirecte). Els avantatges del mètode directe són que és més ràpid i que té major especificitat (en el secundari es poden genera anticossos contra impureses filtrades en la injecció al segon animal).
- **Mètode indirecte:** Es fonamenta en un anticòs secundari marcat que reconeix l'anticòs primari sense marcar. Així, diversos Ac secundaris poden unir-se a un de sol de primari i la senyal serà més intensa. L'anticòs secundari s'obté aïllant les Fc de les IgG de l'animal que genera l'anticòs primari i injectant-les a un altre animal (solen ser animals grans, com porcs o cavalls) perquè generi anticossos contra les Fc

de les IgG del primer animal. Aquests anticossos contra Fc seran els anticossos secundaris marcats. Utilitzem anticossos secundaris biotinitzats en la regió Fc (s'ha unit biotina a la regió Fc), perquè resulta que existeix una proteïna: estreptavidina (*Streptomyces avidinii*) o la avidina (glicoproteïna tetramèrica de la clara d'ou) que té enorme afinitat per la biotina.

Es forma el complex avidina-biotina-peroxidasa (10 peroxidases) que ens permet augmentar el nombre de molècules marcadors gràcies a la avidina. El marcador és l'enzim peroxidasa (HRP). Afegim diaminobenzidina (DAB) que quan és oxidada precipita dona lloc a una taca de color marró.

Els avantatges del mètode indirecte són que és més sensible (hi ha un major nombre de molècules marcadors per antigen, com a mínim el doble) i més versàtil. És menys específic perquè pot existir la probabilitat que l'Ac secundari reconegui un epítot expressat per alguna proteïna del teixit i que no sigui la Fc de l'anticòs primari.

S'han de fer una sèrie de procediments perquè no es perdi la antigenicitat del teixit i els anticossos puguin, d'aquesta manera, reconèixer tots els antígens del teixit i fer la immunolocalització

- 1 Fixació, amb un agent fixador universal com el formaldehid al 4% per mantenir l'arquitectura cel·lular i tissular.
- 2 Permeabilització, amb un detergent per permetre que els anticossos penetrin a la membrana en cas que es vulguin immunolocalitzar proteïnes citoplasmàtiques.
- 3 Saturació: La fixació genera molts llocs inespecífics que s'emmaskaren usant una solució rica en proteïnes (caseïna, albúmina bovina, llet desnatada).
- 4 Incubació amb l'anticòs primari
- 5 Rentat
- 6 Incubació amb anticòs secundari
- 7 Detecció i visualització

8.9 Microxips

Utilitzen la mateixa tecnologia que les impressores d'injecció de tinta. Es disposen spots de 100 micres a l'array. El que està immobilitzat a l'array és l'esquer i no està marcat.

- **Microarrays de fase directa (FPPM):** les proteïnes o pèptids immobilitzats (esquer) i la seva posició són coneguts, permetent identificar, quantificar o valorar l'activitat d'altres molècules (presa) afins si són presents en les mostres solubilitzades. L'esquer poden ser anticossos. Hi ha mètodes de detecció directes que no necessiten marcatge basats en les propietats físiques de la interacció però són poc reproduïbles.

-
- **Microarrays de fase inversa (RPPM):** molècules ben caracteritzades i marcades (presa), presents en la fase soluble interaccionen amb proteïnes o pèptids immobilitzats (esquer) que són desconeguts (encara que sí ho és seva posició), permetent detectar-les i identificar-les. P.e, a partir d'una mostra s'extreuen les proteïnes i s'apliquen sobre el xip i s'aplica després un mAb contra la proteïna d'estudi.

IV. APLICACIONS DE L'ENGINYERIA GENÈTICA

V. SEMINARIS

9. Seminari. Aplicacions de la PCR

9.1 Bases de la PCR

Hi ha 3 fites històriques de la biologia molecular:

1. Descobriment 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

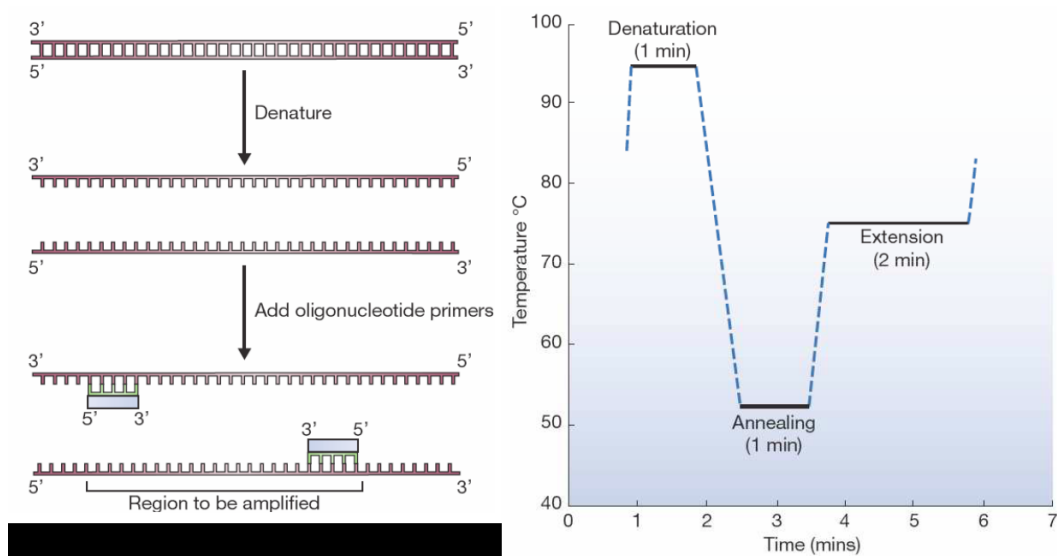


FIGURA 12: Esquema d'un cicle bàsic de PCR

9.1.1 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:

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

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.

9.2 Aplicacions de la PCR i RT-PCR

9.2.1 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 15 nt 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.

9.2.2 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 elonga 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 delecions i insercions. S'aconsegueix controlar el tipus de mutació que es pretén realitzar en el DNA modificant el primer. Per a les delecions s'utilitzen primers que continguin la delecio 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 mutades.

9.2.3 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 mes 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 TaqManTM).

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 a 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 així 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.

10. Seminari. Seqüenciació

La seqüenciació permet determinar la ordenació precisa dels nucleòtids en un fragment de DNA o en tot el genoma. Això permet detectar les pautes de lectura (n'hi ha 3 per sentit). Pot indicar regions promotores, seqüències reguladores...

10.1 Mètodes de seqüenciació

Es basa en què molècules de DNA de cadena simple que presenten diferències d'un únic nucleòtid poden separar-se mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida.

Hi ha 2 mètodes:

1. Maxam-Gilbert: Es basa en mètodes químics de degradació de DNA. El material genètic ha d'estar marcat, p.e amb radioactivitat.
2. Sanger: Es basa en un mètode biosintètic per la generació de fragments de DNA. Es necessita un DNA motlle, un primer i dNTP (dels quals un provocarà la parada de la síntesi).

10.1.1 Mètode de Maxam-Gilbert

Necessita el DNA marcat en una cadena només a 5', endonucleases i desnaturalitzarà el DNA. S'aplicaven tractaments que eliminaven selectivament diferents nucleòtids Els resultats es corrien en un PAGE.

Presenta molts inconvenients:

- El material genètic ha d'estar marcat.
- Requereix gran quantitat de DNA purificat.
- Requereix molts passos intermedis
- Lectures de fragments curts.
- És un mètode difícil d'automatitzar.
- Protecció parcial del DNA en ser degradat quan hi ha proteïnes unides a regions específiques, produint buits en la seqüència

10.1.2 Mètode de Sanger

Requereix menys DNA inicial i aquest no ha d'estar marcat. S'introdueixen el DNA motlle, primers, una polimerasa, dNTP i ddNTP. Els resultats es corren en PAGE i es revelen per autoradiografia. Tot i així, hi ha un punt en què els resultats ja no són fiables. La seqüenciació s'ha de fer amb múltiples primers. Cada ddNTP va a un tub diferent.

Molts vectors incorporen primers universals per seqüenciar.

Els requeriments generals d'aquest mètode són:

-
- Motlle de DNA
 - Primers, ja siguin universals o específics.
 - dNTP
 - ddNTP
 - Polimerasa (actualment s'usa la sequenasa)

Les avantatges són:

- Requereix poca purificació del material genètic
- No requereix tractament amb endonucleases
- No requereix un marcatge previ del DNA motlle
- Es pot automatitzar

Aquest mètode s'automatitza usant ddNTP marcats amb fluorocroms diferents. Un làser excita les bandes del PAGE i un detector transformarà les senyals en un ordinador on es veurà el cromatograma.

10.2 Seqüenciació de genomes

Hi ha 2 mètodes de seqüenciació genòmica:

1. Seqüenciació a l'atzar (*shotgun sequencing*): fragmentació del genoma en fragments molt petits, clonar-los en un vector i seqüenciar-les. Després s'ensemblen els fragments.
2. Seqüenciació jeràrquica (*clone contig sequencing*): Poca fragmentació, i així necessitar pocs clons per tenir representat el genoma.

10.2.1 Seqüenciació a l'atzar

Fragmentació a l'atzar i size select en un gel d'agarosa. Es va construir una llibreria amb els fragments clonats en vectors amb primers universals. A partir dels reads es generen contigs. El problema és la unió dels contigs. El que es fa és generar sondes pels extrems de cada contig per provar quins clons comparteixen aquesta zona.

Els principals problemes són:

- Lectures curtes (de 550 bp)
- Seqüències repetides, sobretot en eucariotes

10.2.2 Seqüenciació jeràrquica

S'usen vectors especials com els BAC per clonar fragments grans. Després es seqüencien els BAC i es determina el mapa de contigs.

Per determinar els clons contigs:

1. Es seqüencien els extrems dels clons
2. *Clone fingerprinting*: 2 clons contigs generaran un mateix fragment de restricció. Després s'usa un d'aquests fragments com a sonda en Southern Blot després d'haver-la marcat.
3. *Intersperced repeat element PCR* (IRE-PCR): Es fa una PCR usant primers específics pels extrems, de manera que amplifiquin la seqüència intermèdia.
4. *Sequence tagget site*

El procés de seqüenciació pot ser seqüencial, fragment a fragment del BAC. També es pot fer un *shotgun sequencing* del BAC.

10.3 Nous sistemes de seqüenciació

Els nous mètodes no requereixen clonar els fragments en vectors. Es fragmenta el DNA i es col·loquen uns adaptadors a ambdós extrems. L'amplificació del fragment i la detecció del nucleòtid és simultani.

- emulsion PCR
 - Piroseqüenciació
 - Seqüenciació per lligació
- bridge PCR (Illumina)

10.3.1 Piroseqüenciació

El DNA es fragmenta i es lliguen adaptadors, un dels quals té biotina unida. Es separen els fragments i es posen en tubs on hi ha uns beads en gotes d'aigua emulsionades en oli. Les beads tenen estreptovidina i els reactius per amplificar el fragment. Això es trasllada a una placa amb cel·les, que cada cel·la donarà la informació per un fragment. El primer s'uneix a l'adaptador no marcat amb biotina. S'afegeix APS, ATP, luciferina i polimerasa, luciferasa i sulfurilasa. La sulfurilasa agafarà APS i PPi per fer ATP. Llavors la luciferasa captarà aquest ATP i farà llum. Entre cicle i cicle s'afegeix apirasa per eliminar dNTP i ATP.

11. Vectors d'eucariotes

L'interès de clonar en organismes eucariotes té sentit per obtenir proteïnes amb les modificacions post-traduccionals correctes o bé per estudiar processos biològics en eucariotes.

Un altre problema és l'ús de codons. Com que el codi genètic està degenerat, i no té perquè ser compartit per tots els organismes ni la freqüència dels codons/anticodons és la mateixa.

11.1 Vectors de llevats

En *Saccharomyces cerevisiae*, hi ha soques que tenen un plàsmid de 6 kb. El sistema de selecció en eucariotes és l'auxotròfia (deficiència en biosíntesi d'un aminoàcid), i per això s'han aïllat soques de *Saccharomyces* auxotrofes per diferents aminoàcids. Els vector inclouen el gen que està mutat en aquestes soques, de manera que els transformants podran créixer en medi selectiu per aquest element en concret.

Shuttle vector: és un vector que pot actuar en 2 organismes diferents. El que es va fer va ser juntar 2 vectors (pRB322 i un plàsmid de llevats), de manera que repliquin en *E. coli* i *Saccharomyces*.

- YEPS: *Yeast Episomal plasmid*. Es pot integrar mitjançant recombinació homòloga.
- YIPS: *Yeast Integrative plasmid*. Sempre s'integren al genoma del llevat.
- YRPS: *Yeast Replicative plasmid*. Mai s'integren al genoma.

Un episoma és una seqüència que pot estar integrada al cromosoma bacterià o en forma de plàsmid.

11.2 YAC

Els YAC són *Yeast Artificial Chromosome*. Els fragments més grans de 40 kb són molt difícils de clonar. Els YAC permetien clonar fins a 600 kb. Són molt inestables i recombinen molt.

Els YACs són els vectors de clonatge més utilitzats, ja que són els que accepten més material genètic. Són vectors duals, ja que poden adquirir forma de plasmidi o de cromosoma eucariota típic, lineal.

En una primera etapa aquest cromosoma es troba en una conformació circular; encara no ha incorporat l'insert de DNA que volem clonar. Es transformen bacteris amb aquests YACs, que funcionen com a plasmidi bacterià, ja que tenen el Ori bacterià, i es replica dins aquests. Després s'introduiran a cèl·lules de llevat.

Els YACs tenen un marcador de resistència a l'ampicil·lina (Amp), el que ens permet identificar quines cèl·lules han incorporat aquest vector. Contenen també altres elements eucariotes, com ara telòmers de llevat (TEL), el centròmer (CEN4), l'origen de replicació de llevat (ARS1), i gens marcadors de cèl·lules eucariotes, com TRP1 i URA3.

Quan aquests plasmidis es digereixen, s'obtenen dues molècules, corresponents al braç llarg i al braç curt del cromosoma, els quals s'uneixen per formar el cromosoma eucariota comú mitjançant una lligasa. És en el moment en el que utilitzem aquesta lligasa quan incorporem el DNA digerit que volem mapar.

L'enzim que digereix el YAC és el mateix que realitza la digestió parcial del nostre DNA.

Els dos marcadors esmentats, TRP1 i URA3, es troben al braç llarg i al braç curt respectivament. TRP1 és necessari per a la síntesi de triptòfan, i URA3 és un enzim de la via biosintètica de l'uracil. Aquests dos marcadors ens són útils, ja que utilitzem cèl·lules que no poden sintetitzar triptòfan ni uracil per si soles per tal de comprovar que incorporin el YAC. El medi, doncs, tampoc tenen aquests compostos.

Per assegurar que l'insert del DNA que volem mapar ha anat bé, necessitem un tercer marcador, SUP4, que es troba en el lloc de digestió del plasmidi i, per tant, en el lloc de l'insert del DNA. Si el DNA problema s'incorpora correctament al YAC, el gen SUP4 queda partit, dividit; però si l'insert no s'ha incorporat correctament, el gen SUP4 romandrà intacte.

El gen SUP4 codifica per un tRNA especial que reconeix el codó de STOP però que incorpora un aminoàcid, fet que no és normal en els tRNA que reconeixen codons d'aturada. D'aquesta manera que obtindrem proteïnes més llargues del que és normal, ja que allà on hi hagi un codó STOP hi seguirà havent un aminoàcid i la transcripció continuarà.

Així doncs tenim que les cèl·lules de llevat són triples mutants: no sintetitzen triptòfan, no sintetitzen uracil i tampoc sintetitzen adenina. Al no sintetitzar adenina, el seu precursor de la ruta bioquímica s'acumula, i dona una tonalitat vermellosa a la cèl·lula.

El medi no incorporarà triptòfan ni uracil, però si es posa una quantitat d'adenina limitant, ja que sinó les cèl·lules no serien viables.

En afegir un cromosoma amb SUP4 funcional, la ruta de síntesi de l'adenina funcionarà correctament, ja que un dels enzims mutats de la via biosintètica d'aquest nucleòtid presenta un codó STOP, i al afegir el tRNA de SUP4 aquest codó STOP serà obviat (s'afegirà un aminoàcid igualment) i l'enzim serà funcional. Aleshores el precursor que dona la tonalitat vermellós a no s'acumularà i veurem la cèl·lula amb una tonalitat blanquinosa.

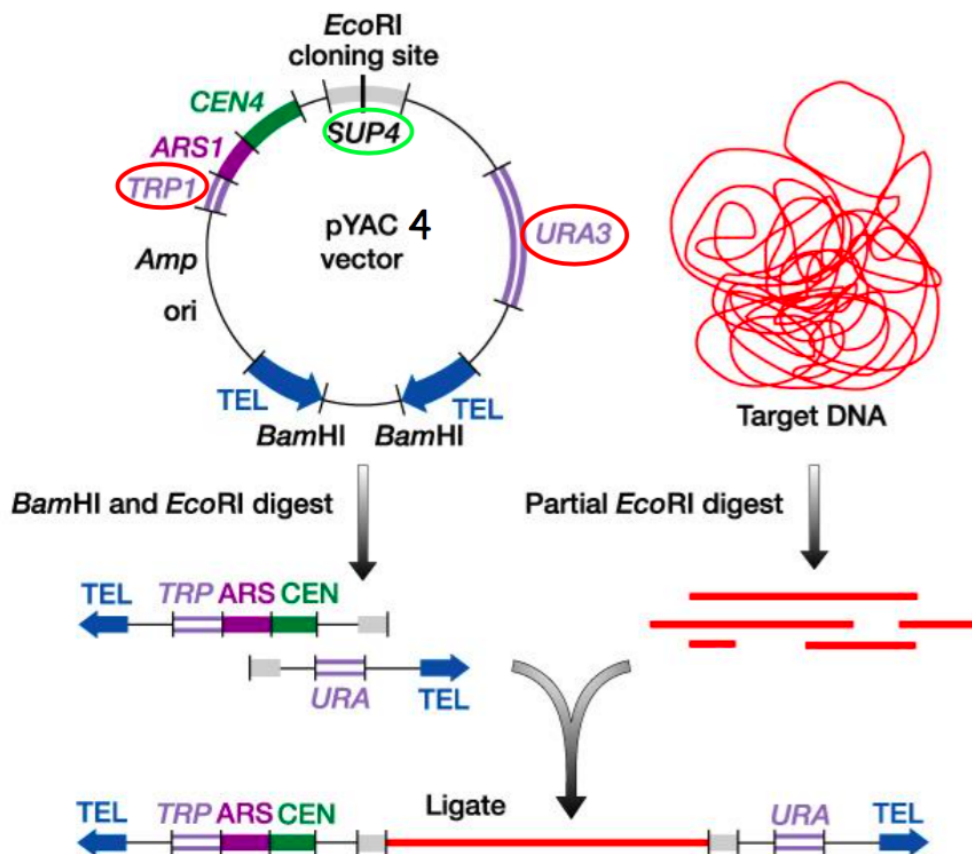
D'aquesta manera:

- Si no s'insereix correctament el nostre DNA d'interès al YAC, el gen SUP4 queda intacte, es sintetitza el tRNA corresponent i es duu a terme una correcta síntesi d'adenina, donant a la cèl·lula una tonalitat blanquinosa.
- Si s'insereix correctament el nostre DNA d'interès al YAC, el gen SUP4 queda fraccionat i no és funcional, pel què no existeix el tRNA corresponent i no es sintetitzarà adenina, fent que s'acumuli el seu precursor i donant a la cèl·lula una tonalitat vermella.

Això, però, ens suposa un problema, ja que el tRNA de SUP4 farà que qualsevol codó STOP normal no tingui el seu ús habitual; les cèl·lules seguiran sent viables però les proteïnes tindran una longitud major.

11.2.1 Estratègia de clonatge amb YACs

- **Soca AB1380:** contenen URA3, TRP1 i ade2.1. L'al·lel ade2.1 provoca un bloqueig en la síntesi de l'adenina, causant un cúmul de pigment vermell a la cèl·lula. És suprimible per SUP4.
- **pYAC:** contenen URA3, TRP1 i SUP4.
- **Soca AB1380 que conté el vector pYAC sense insert:** observem colònies blanques, ja que SUP4 suprimeix la mutació ade2.1.
- **Soca AB1380 que conté el vector pYAC amb insert:** observem colònies vermelles, ja que l'insert inactiva el supressor SUP4.



11.2.2 Inconvenients dels YACs

Els YACs són molècules inestables i poden esdevenir quimèrics degut a la gran mida dels inserts. Són grans fonts de reordenaments, com per exemple delecions de seqüències Alu reconegudes per homologia.

Normalment tenim tot el genoma en una barreja de lligació i es posa en contacte amb cèl·lules de llevat, incorporant cadascuna un sol insert. Es plaqueja de forma que cada

cèl·lula de la nostra solució estigui prou separada de la resta com per formar colònies d'un sol vector. Pot passar, però, que durant la lligació s'incorporin dos inserts en un sol vector, obtenint un vector quimera. Això ens causarà dificultats en el moment del reordenament del genoma.

Els YACs tenen un 15-20% de quimerisme.

Amb l'ús d'altres vectors, com BACs o PACs, perdem capacitat, però el quimerisme i la inestabilitat deixaran de ser un problema.

11.3 Vectors per plantes

Els vector de plantes i animals es basen en genomes vírics. Els vectors derivats del plàsmid Ti. *Agrobacterium tumefaciens* transfereix el plàsmid a la cèl·lula de la planta i després el plàsmid s'integra al genoma de la planta. S'indueix la proliferació cel·lular i s'activa la síntesi de compostos que són d'aliment per *A. tumefaciens*. El problema és que Ti és molt gran i és molt complicat clonar un fragment. El que s'ha fet és dividir el plàmid en 2: una part que conté les funcions del plàsmid i un altre que conté les regions per transferir el gen a la planta.

11.4 Vectors per mamífers